

现代分析测试技术应用丛书

药物分析

■ 盛龙生 何丽一 徐连连 沈文斌 编著

化学工业出版社



现代分析测试技术应用丛书

药 物 分 析

盛龙生 何丽一 徐连连 沈文斌 编著

化 学 工 业 出 版 社

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

药物分析/盛龙生等编著. —北京:化学工业出版社,
2002.12

(现代分析测试技术应用丛书)

ISBN 7-5025-4190-X

I. 药… II. 盛… III. 药物分析 IV. TQ460.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 086578 号

现代分析测试技术应用丛书

药 物 分 析

盛龙生 何丽一 徐连连 沈文斌 编著

责任编辑:李晓文 田 桦

责任校对:蒋 宇

封面设计:蒋艳君

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话:(010)64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 46 $\frac{3}{4}$ 字数 1163 千字

2003 年 2 月第 1 版 2003 年 2 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4190-X/TQ·1646

定 价:98.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责退换

前 言

药物分析是药品质量保证体系的关键，在药品的研究、开发、生产、流通和临床等各个环节中均离不开药物分析。目前，医药工业面临着激烈的国际竞争，基因工程药物的迅速发展，中药的现代化和国际化进程，对药物分析提出了更高的要求，现代分析技术在药物分析中的应用日益广泛。在药品鉴定和新药研制过程中，经常涉及色谱和光谱方法学及解析等问题，《现代分析测试技术应用丛书——药物分析》就是为药品生产、检验和研究机构中从事药物分析及药品结构确证的技术人员编写的。主要介绍气相色谱法、平面色谱法、高效液相色谱法、电泳法、分光光度法、核磁共振光谱和质谱法，并讨论了分析方法的验证，希望对实际工作有所帮助，本书也可用作高等医药院校的教学参考资料。

本书的内容力求实用、先进，理论从简。着重介绍现代分析测试技术在化学合成药物、中药、生物技术药物及药物代谢等领域中的应用。每种方法均讨论了其基本理论、知识、方法和技术并选择了典型应用实例，以期实现理论与实践的结合，提高读者分析问题和解决问题的能力。因此，建议读者除了学习方法学以外，也应仔细阅读应用实例中的有关内容，尤其是方法的建立、验证及讨论部分。在某些应用实例中，还涉及了方法的改进及新的技术。

平面色谱法由中国医学科学院药物研究所何丽一编写，电泳法和毛细管电泳法由江苏省药品检验所徐连连编写，核磁共振光谱由中国药科大学沈文斌编写，色谱法导论、气相色谱法、高效液相色谱法、分光光度法、质谱法和分析方法验证由中国药科大学盛龙生编写，在编写过程中，王颖和丁岗博士给予了很大帮助。本书的出版得到了化学工业出版社和中国药科大学的大力支持。

由于编者水平所限，书中错误和不足之处在所难免，恳请读者批评、指正。

编 者
2002年9月

内 容 提 要

本书主要介绍了气相色谱法、平面色谱法、高效液相色谱法、电泳法、分光光度法、核磁共振光谱和质谱法等现代分析测试技术，着重介绍了现代分析测试技术在化学合成药物、中药、生物技术药物、药物代谢等领域中的应用，并结合典型应用实例，讨论了分析方法的建立和验证。本书注重内容的实用性和先进性，针对每种分析方法，详细讲解了基本原理、仪器与试剂、分析条件、技术参数、分析步骤、数据处理、结果讨论等。

本书可供在药品生产、检验和研究机构中从事药品分析和药品结构确证的技术人员使用，也可作为高等院校医药专业师生的教学参考资料。

目 录

第一章 色谱法导论	1
一、概述.....	1
二、基本术语.....	1
(一) 保留时间和调整保留时间	1
(二) 保留因子	2
(三) 分离因子和相对保留	2
(四) 谱带展宽和柱效	2
(五) 谱带展宽的 Van Deemter 方程	3
(六) 谱带展宽的柱外效应	5
(七) 分离度	6
(八) 峰不对称性	7
三、色谱定量分析.....	7
(一) 校正因子	8
(二) 校正因子的测定方法	8
参考文献.....	8
第二章 气相色谱法	10
第一节 概述	10
一、气相色谱法的特点	10
二、分离度和保留指数	11
第二节 色谱柱	13
一、填充柱	13
(一) 固定液.....	13
(二) 担体.....	19
(三) 色谱柱的制备.....	21
(四) 多孔聚合物微球.....	22
二、空心柱	23
(一) 柱管.....	23
(二) 柱类型.....	24
(三) 固定相与稳定性.....	24
(四) 色谱柱的选择.....	25
第三节 进样系统	26
一、填充柱进样口	26
二、毛细管柱进样口	27
(一) 分流进样.....	27
(二) 不分流进样.....	29

(三) 柱头进样	33
三、顶空进样	34
(一) 基本原理	34
(二) 手动进样 HS-GC	36
(三) 自动进样 (压力平衡系统)	37
第四节 检测器	38
一、火焰离子化检测器	38
(一) 工作原理	38
(二) 影响 FID 灵敏度的因素	39
二、电子捕获检测器	40
三、检测器与 FSOT 柱的连接	40
第五节 样品的预处理及衍生物制备	41
一、样品的预处理	41
二、衍生物制备	41
(一) 三甲基硅烷化试剂	42
(二) 甲酯化试剂	42
(三) 卤素试剂	42
第六节 应用实例	43
一、有机溶剂残留量测定	43
(一) 盐酸莫索尼定中有机溶剂残留量的测定	43
(二) 顶空气相色谱法对盐酸曲马多中二氧六环残留量的限量检测	45
(三) 微量顶空 GC 技术用于测定水不溶药物中的有机溶剂残留	46
二、挥发油等成分分析	48
(一) 高良姜及其近缘植物挥发油成分的气相色谱指纹图谱研究	48
(二) 气相色谱法测定紫苏叶中紫苏醛的含量	51
(三) 紫苏子中 α -亚麻酸的气相色谱法测定	53
(四) 穿龙薯蓣总皂苷中薯蓣皂苷元含量的毛细管色谱法研究	54
(五) 川芎干燥根茎挥发油化学成分及其稳定性的研究	55
(六) 挥发油固相萃取预分离	58
三、GC 在生物样品中的应用	59
(一) 气相色谱电子捕获法测定人体血浆中尼索地平的浓度	59
(二) 人尿中克罗帕米的 GC/MSD 检测方法研究	61
(三) 气-质联用法测定血浆中阿司匹林和水杨酸浓度及人体药代动力学研究	63
(四) 气相色谱/电子捕获法测定人血浆中的关附甲素	66
(五) 气相色谱/电子捕获法测定人血浆中的 paroxetine	67
(六) 电子捕获及火焰离子化气相色谱法测定尿中扁桃酸对映体	68
(七) 液相微萃取/毛细管气相色谱法测定生物介质中的苯二氮革类药物	72
四、GC 用于氨基酸分析 (冬瓜果肉中游离氨基酸的 GC/MS 分析)	77
参考文献	80
第三章 平面色谱法	81

第一节 概述	81
一、薄层色谱法的特点	81
二、平面色谱法的主要技术参数	82
(一) 保留值	82
(二) 分配系数与容量因子	83
(三) 理论塔板数与塔板高度	84
(四) 分离度及分离数	84
第二节 滤纸及吸附剂	85
一、滤纸及吸附剂的选择	85
(一) 滤纸	85
(二) 吸附剂	86
二、薄层的制备	91
(一) 载板 (支持物)	91
(二) 黏合剂及添加剂	91
(三) 涂层方法	92
(四) 薄层板的活化与活度标定	93
(五) 滤纸及薄层板的预处理	93
(六) 吸附剂及预制板包装上的符号及含意	94
第三节 点样	94
一、点样方式和设备	94
(一) 点状点样	94
(二) 带状点样	95
(三) 自动点样	95
(四) 其他点样方式	95
二、样品溶液及点样顺序	95
第四节 展开	96
一、展开方式	96
(一) 一维展开——单向展开	97
(二) 二维展开——双向展开	98
(三) 强迫流动展开	98
二、展开设备	98
(一) 上行展开室	99
(二) 下行展开室	99
(三) 水平展开室	99
(四) 全自动展开室	100
(五) 加压展开室	102
(六) 旋转薄层色谱仪	103
三、展开剂	103
(一) 吸附薄层色谱法	104
(二) 聚酰胺薄层色谱法	108

(三) 分配薄层和纸色谱法	108
(四) 离子交换薄层色谱法	109
(五) 凝胶薄层色谱法	109
(六) 胶束薄层色谱法	110
(七) 包合薄层色谱法	111
(八) 手性薄层色谱	111
四、影响展开的因素	111
(一) 相对湿度的影响	111
(二) 溶剂蒸气的影响	112
(三) 温度的影响	115
(四) 展开方式的影响	115
(五) 展距的影响	115
(六) 展开室的放置	116
第五节 定位与定性	116
一、定位	116
(一) 光学检出法	116
(二) 蒸气显色法	116
(三) 物理显色法	116
(四) 试剂显色法	116
(五) 生物自显影	119
(六) 放射自显影	119
二、定性	119
(一) 斑点的 R_f 值	119
(二) 斑点的显色特性	119
(三) 斑点的光谱扫描	120
(四) 薄层色谱与其他分析技术的联用	120
第六节 含量测定	121
一、半定量	121
(一) 目测比较法	121
(二) 限量检查法	122
二、定量	122
(一) 间接定量 (洗脱测定法)	122
(二) 直接定量 (薄层扫描法)	122
三、影响薄层扫描定量的因素	132
(一) 吸附剂性能及薄层质量	132
(二) 点样	133
(三) 展开	133
(四) 显色	133
(五) 薄层扫描定量	134
第七节 平面色谱法在药物分析中的应用	134

一、中草药和中成药的鉴别及成分分析	134
(一) 中药材的品种鉴别	135
(二) 中成药的鉴别	139
(三) 中药的薄层指纹图谱(图像)鉴别	148
(四) 中草药成分分析	155
(五) 中成药的含量测定及质量标准研究	165
二、平面色谱在合成药物分析中的应用	173
(一) 药物的定性鉴别	174
(二) 纯度检查	180
(三) 合成药制剂的含量测定	183
(四) 稳定性考察	190
(五) 体内药物的测定及药物代谢研究	195
参考文献	204
第四章 高效液相色谱法	207
第一节 分离度和实验条件	207
一、溶剂强度的影响	208
二、选择性的影响	209
(一) 改变流动相	209
(二) 改变固定相	211
(三) 改变温度	211
三、柱理论板数的影响	211
(一) 柱条件和分离	212
(二) 柱理论板数和流动相流速	212
(三) 柱外效应	212
四、进样量的影响	213
(一) 体积过载, 进样体积对分离的影响	213
(二) 质量过载, 样品质量对分离的影响	213
(三) 痕量分析	214
第二节 色谱柱	214
一、柱填料	214
(一) 硅胶填料	215
(二) 多孔聚合物	216
(三) 其他无机填料	216
二、键合固定相	217
(一) 键合硅胶	217
(二) 极性取代基硅烷键合相	217
(三) 反相键合相的保留	218
(四) 键合相柱的稳定性	218
(五) 键合相填料的新进展	220
第三节 色谱峰的检测	222

一、UV 检测器	222
二、其他检测器	226
(一) 折光检测器和蒸发光散射检测器	226
(二) 荧光检测器	227
(三) 电化学检测器	227
(四) 质谱检测器	227
第四节 建立分析方法的步骤和样品制备	228
一、建立分析方法的步骤	228
二、样品制备	229
(一) 溶剂萃取	229
(二) 固相萃取	229
(三) 其他方法	230
三、HPLC 方法的选择与建立	230
第五节 反相色谱法	231
一、中性化合物反相色谱法	231
(一) 溶剂强度	233
(二) 溶剂的选择性	234
二、酸、碱性及离子化合物反相色谱法	235
(一) 酸碱平衡与保留	235
(二) 化合物的 pK_a	236
(三) 缓冲溶液的选择	236
(四) 酸碱性样品 RPC 的优化	237
三、离子对色谱法	240
(一) 保留机制	240
(二) 流动相 pH 值	240
(三) 离子对试剂浓度	240
(四) 离子对试剂类型	241
(五) 起始条件	241
(六) 保留范围及选择性的控制	242
第六节 正相色谱法	245
一、NPC 的保留	246
(一) 样品和溶剂的定位	246
(二) 溶剂强度	246
(三) 流动相选择性	248
(四) 柱类型的影响	248
(五) 温度影响	248
(六) 用水溶液流动相分离亲水样品	248
二、NPC 的优化	249
(一) 起始实验	249
(二) 调整保留范围	249

(三) 优化选择性	250
(四) 其他问题	250
第七节 其他分离模式	250
一、离子交换色谱法	250
(一) 保留的基础	250
(二) 方法的建立	251
(三) 硅胶柱	252
二、分子排阻色谱法	252
(一) SEC 保留的基础	253
(二) 方法的建立	254
三、手性 HPLC	255
(一) 手性衍生化	256
(二) 手性流动相添加剂	256
(三) 手性固定相	256
(四) 手性识别原理	256
(五) 以蛋白为基础的 HPLC 手性固定相	258
(六) 其他手性固定相	260
第八节 梯度洗脱	267
一、概述	267
二、梯度洗脱原理	268
(一) 梯度陡度的影响	269
(二) 梯度范围的影响	270
(三) 梯度形状的影响	272
三、梯度分离方法的建立	273
四、梯度分离的实验条件	275
(一) 设备差异	275
(二) 分离的重现性	276
(三) 基线问题	277
第九节 应用实例	277
一、药品的含量测定及有关物质、降解产物检查	277
(一) RP-HPLC 法测定盐酸吡格列酮含量及有关物质的方法学研究	277
(二) RP-HPLC 法测定贝诺酯及其有关物质	280
(三) 高效液相色谱法测定雷登泰口服液中愈创木酚甘油醚、盐酸伪麻黄碱、 氢溴酸右美沙芬的含量	283
(四) 高效液相色谱法测定土霉素及其盐酸盐的含量及有关物质	285
(五) 头孢曲松钠含量测定与有关物质检查	287
(六) 高效液相色谱法检查 <i>N</i> -(反式-4-异丙环己基甲酰基)- <i>D</i> -苯丙氨酸中 的顺式异构体杂质	289
(七) 安美汀中高分子杂质的分离分析与质量控制	291
(八) 柱前衍生化 HPLC 法同时测定注射用头孢拉定中的 3 种成分	294

(九) 发酵液中红霉素及有关物质的测定	295
(十) 梯度正相色谱法用于高通量药物筛选	297
二、手性药物分离	298
(一) 柱前衍生化 RPC 分离布洛芬等羧酸类药物对映体	298
(二) β -环糊精手性流动相添加剂 RPC 分离氯噻酮 (chlorthalidone) 对映体	300
(三) 蛋白手性 HPLC 柱的保留特性	302
(四) 西沙比利手性 HPLC 药物动力学研究	305
三、氨基酸、多肽、蛋白质和多糖的分析	308
(一) AccQ-Tag 法测定复方氨基酸注射液中氨基酸的含量	308
(二) 重组人胰岛素类似物的 HPLC 分析	310
(三) 重组人生长激素胰蛋白酶肽图谱的微径 LC/MS 研究	314
(四) 首批重组人组织纤溶酶原激活剂国家标准品的研制	319
(五) 高效液相色谱法测定尿多酸肽注射液中小分子肽的分子量	321
(六) 高效凝胶渗透色谱法在右旋糖酐铁质控中的应用	322
(七) 高效凝胶渗透色谱法测定莫海林分子量及其分布	325
四、体液中药物浓度测定及药物代谢动力学研究	327
(一) 人血浆和尿中替莫唑胺 (temozolomide) 的测定	327
(二) 体液中果聚糖的快速测定	329
(三) 克林沙星在大鼠体内的药代动力学和生物利用度	331
(四) 手性和非手性联用色谱法研究尼卡地平对映异构体兔体内过程的差异性	333
五、中药成分和中药指纹图谱测定	337
(一) 伊犁贝母中西贝素和西贝素苷的高效液相色谱-蒸发光散射检测法	337
(二) 反相高效液相色谱法测定长春花组织培养物中吲哚生物碱含量	339
(三) 穿龙薯蓣中薯蓣皂苷元的高效液相色谱法测定	342
(四) 三七注射液指纹图谱的 LC/MS 测定	343
(五) 西青果与诃子的 HPLC 指纹图谱鉴别研究	346
参考文献	350
第五章 电泳法和毛细管电泳法	353
第一节 电泳法	353
一、基本原理	354
二、影响颗粒泳动速度的因素	355
(一) 测试样品	355
(二) 电场强度	355
(三) 缓冲液	355
(四) 溶液的温度和黏度	356
(五) 电内渗	356
(六) 分子筛效应	356
三、纸电泳	356
(一) 仪器装置	357
(二) 操作法	357

(三) 应用实例	358
四、乙酸纤维薄膜电泳	360
(一) 仪器装置	361
(二) 操作法	361
(三) 应用实例——人血白蛋白(或丙种球蛋白)纯度检查	362
五、琼脂糖凝胶电泳	363
(一) 仪器装置	364
(二) 操作法	364
(三) 应用实例	365
六、聚丙烯酰胺凝胶电泳	369
(一) 聚丙烯酰胺凝胶电泳的分类	369
(二) 不连续电泳的浓缩效应	369
(三) 聚丙烯酰胺凝胶的聚合	371
(四) 仪器装置	374
(五) 操作法	375
(六) 相对迁移率及纯度测定	380
(七) 应用实例	381
七、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	382
(一) 原理	382
(二) 缓冲系统的选择	383
(三) 凝胶浓度的选择	384
(四) 样品的制备	384
(五) 标准蛋白的选择	385
(六) 制胶、加样、电泳、染色和脱色	385
(七) 分子量测定	385
(八) 注意事项	385
(九) 应用实例	386
第二节 毛细管电泳法	388
一、基本原理	388
(一) 电渗流	389
(二) 淌度与迁移时间	390
(三) 分离效能与分离度	391
二、毛细管电泳的分离模式	394
(一) 毛细管区带电泳	394
(二) 胶束电动毛细管色谱	402
(三) 毛细管凝胶电泳	406
(四) 毛细管等电聚焦电泳	408
(五) 毛细管等速电泳	410
(六) 其他分离模式	411
三、毛细管电泳仪的基本组成部件	413

(一) 毛细管柱	413
(二) 直流高压电源	414
(三) 毛细管恒温装置	414
(四) 电极和溶液控制系统	414
(五) 检测器	416
四、毛细管电泳的实验操作	420
五、应用实例	425
(一) 多肽和蛋白质类药物	425
(二) 中药及中药复方制剂	429
(三) 化学药物及其复方制剂	432
(四) 抗生素类药物	439
参考文献	440
第六章 分光光度法	443
第一节 概述	443
一、分光光度法原理	443
二、光吸收的定律	444
第二节 紫外-可见光分光光度法	445
一、有机化合物的 UV-Vis 光谱	445
(一) 电子跃迁类型	445
(二) 发色团与助色团	445
(三) 吸收带类型	446
二、有机化合物的发色团	446
(一) 单个发色团及其相互作用	446
(二) 烯和多烯	447
(三) 苯和芳烃	448
(四) 羰基化合物	450
三、应用实例	451
(一) 药品的鉴别	452
(二) 药品的杂质检查	453
(三) 药品的含量测定	454
第三节 红外分光光度法	461
一、概述	461
二、基本原理	461
三、实验技术	463
(一) 固体和液体样品	463
(二) 气体样品	465
(三) 气相色谱-红外光谱联用技术	465
(四) 固体样品的漫反射 IR 光谱	468
四、振动类型和红外光谱	468
五、特征吸收	470

(一) 与氢连接的单键的吸收带	474
(二) 叁键和累积双键的吸收带	477
(三) 双键 C=O、C=N、C=C、N=N、N=O 的吸收带	478
(四) 芳香化合物典型吸收带	482
(五) 指纹区吸收带	483
六、定量分析	484
(一) IR 定量分析的测定条件	484
(二) 吸收度 A 的测定	485
(三) IR 定量方法	485
(四) 吸收度比法	486
(五) 内标法	486
七、应用实例	487
(一) 结构确证	487
(二) 多晶的 IR 光谱	489
(三) 含量测定	490
参考文献	491
第七章 核磁共振光谱	492
第一节 核磁共振基本原理	492
一、核自旋	492
二、核磁共振	493
(一) 核的磁化——在外磁场 H_0 中核的进动与取向	493
(二) 核磁共振现象	494
三、弛豫	495
(一) 原子核磁能级上的粒子分布	495
(二) 弛豫过程	495
四、化学位移	496
(一) 核外电子的抗磁屏蔽 ($\sigma_{抗}$)	497
(二) 核外电子的顺磁屏蔽 ($\sigma_{顺}$)	497
(三) 远程屏蔽 ($\sigma_{远}$)	498
(四) 化学位移及其表示方法	498
五、自旋-自旋偶合	499
六、核磁共振信号强度	499
第二节 实验技术	500
一、脉冲傅里叶变换核磁共振仪	500
二、射频脉冲	502
三、自由感应衰减信号	503
四、傅里叶变换及其在 NMR 谱中的应用	504
五、样品及溶剂	505
第三节 质子核磁共振谱	506
一、化学位移	506

(一) 影响化学位移的因素	506
(二) 化学位移与分子结构	514
二、自旋-自旋偶合 (偶合常数)	525
(一) 邻碳偶合	525
(二) 同碳偶合	529
(三) 远程偶合	531
(四) 芳烃及杂环质子间的偶合	531
(五) 质子与其他磁核的偶合	533
三、氢谱的解析	533
(一) 自旋偶合系统的命名方式	535
(二) 一级分析	539
(三) 氢谱解析应注意的问题	542
(四) 氢谱解析的一般步骤	548
(五) 氢谱解析实例	549
第四节 核磁共振碳谱	553
一、化学位移	553
(一) 影响 ^{13}C 化学位移 (δ_{C}) 的因素	553
(二) 各类有机物中 ^{13}C 的化学位移	556
二、偶合常数	593
三、双共振技术	598
(一) 质子宽带去偶	598
(二) 偏共振去偶	599
(三) 选择性质子去偶	600
(四) 门控去偶	601
(五) 反转门去偶法	601
四、多脉冲实验	602
(一) 不灵敏核的极化转移增益法	604
(二) 无畸变极化转移增益法	607
第五节 二维核磁共振光谱	610
一、二维核磁共振的基础知识	610
(一) 2D-NMR 的基本概念	610
(二) 2D-NMR 谱的优点	610
(三) 2D-NMR 实验的时间分段	610
(四) 2D-NMR 的信号记录方式	611
(五) 2D-NMR 共振峰的命名	611
二、二维核磁共振的基本类型	611
(一) 无混合期的 2D 谱——2D 分解谱	611
(二) 有混合期 (M 段) 的二维谱——2D 相关谱	611
三、其他实用 2D-NMR 谱	618
(一) 全相关谱	618