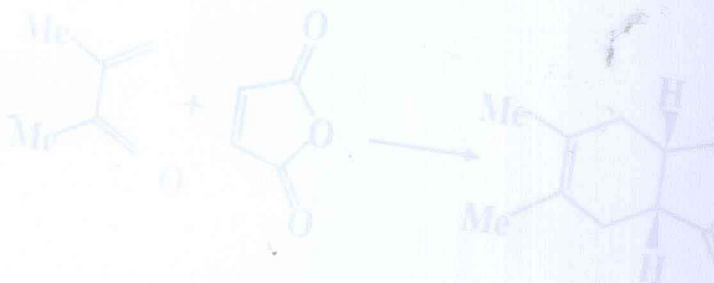


药学实验室用书



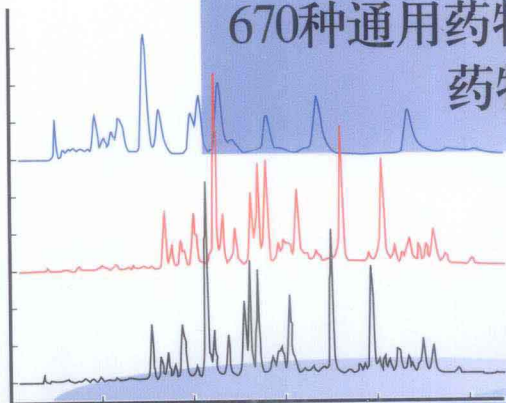
药物分析 技术与方法

季一兵 陈建秋 李书兰 陈德英 编著

分析方法+实例

670种通用药物，2000余种**分析技术与方法**条目

药物分析实验室实用性工具参考书



中国医药科技出版社

药 学 实 验 室 用 书

YAOWU FENXI
JISHU YU FANGFA

药物分析 技术与方法

季一兵 陈建秋 李书兰 陈德英 编著

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是以 670 种通用药物分析技术与方法为主线的应用性工具书, 全书参考 3000 余篇国内外最新文献报道, 共收编包括国家基本药物、医院常用药物及国内外新近研发上市的新药品种的共 2000 余种分析方法。每种方法实例均以实验条件、样品处理、结果与评价和参考文献等项目条目化排布, 加之书后附录的中英文药名检索, 使内容非常明确, 便于读者查阅。本书理论阐述简明扼要, 收录药物及分析方法众多, 实用性和新颖性兼备, 可作为工具性参考书供药物分析工作者及相关领域的科研人员借鉴使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

药物分析技术与方法/季一兵等编著. —北京: 中国医药科技出版社, 2012. 1

药学实验室用书

ISBN 978 - 7 - 5067 - 4409 - 6

I. ①药… II. ①季… III. ①药物分析 IV. ①R917

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 202098 号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100082

电话 发行: 010 - 62227427 邮购: 010 - 62236938

网址 www.cmstp.com

规格 787 × 1092mm¹/₁₆

印张 44³/₄

字数 929 千字

版次 2012 年 1 月第 1 版

印次 2012 年 1 月第 1 次印刷

印刷 河北省南宫市印刷有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978 - 7 - 5067 - 4409 - 6

定价 98.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换



前言

药物分析学是一门研究和发展药品全面质量控制方法的学科，是药学科学领域中的一个重要组成部分。现代药学、分析化学技术以及计算机科学等的日新月异给药物分析学科的发展提供了良好的契机。药物分析方法应该更加灵敏、专属、准确、快速和智能化，使其能够深入到工艺流程、反应历程、生物体内代谢过程和综合评价等各领域的动态分析研究中。

随着药物分析应用范围的不断拓展，越来越多的科学工作者投身于药物分析技术和方法的研究中，然而药物品种不断推陈出新，体系越来越复杂，给药物分析及相关领域的工作者提出了不小的挑战。目前国内关于药物分析理论、技术及实验方法的相关专著虽然很多，却未见一本全面收集和介绍国家基本药物、常用药物及国内外新近研发上市的新药品种的分析方法的工具性书籍供实验室药物分析研究人员和操作人员方便的参考，这便成为本书编著的出发点。

本书内容共分十二章，第一章对药物分析的发展概况和趋势进行简要介绍，第二章则从实验技术和方法的选择、设计和优化、样品预处理及方法的验证和评价等方面对药物分析方法的建立进行全方位的阐述，期望即便是初涉该领域的工作者也能很快掌握方法的建立过程。第三章至第十二章则按照药物治疗用途分类，参考 3000 余篇国内外最新文献报道，共收编了 670 多种药物的 2000 余种分析方法，每种方法实例均以实验条件、样品处理、结果与评价和参考文献等项目条目化排布，使读者能够根据试验样品中待测药物组分的含量、介质等具体情况以及实验室条件灵活选择实验方法，书后附录的中英文药名检索，使内容非常明确，便于查阅。

本书由季一兵和陈建秋、李书兰、陈德英等同仁通力合作，查阅大量国内外文献，精心编著而成。计算机数据库辅助搜索文献只是第一步，更多复杂的工作是在对每篇文献的阅读，对方法进行筛选和多篇文献的互相印证，力图收集适用于国内实验室条件的切实可行的实验技术和方法。此外，在本书的编写过程中，陈建秋对写作格式提出了很好的建议；刘美霞、徐艳、郑燕、高婷和王玺等同学在整理文献和索引中做了很多工作，在此表示衷心的感谢，同时也感谢中国医药科技出版社在本书出版过程中给予的帮助和支持。

由于本书所收集的技术和方法均来自于文献报道，我们并未对每种方法进行实验验证，因此仅供药物分析工作者和相关领域研究人员参考，书中如有疏漏和不足，恳请读者批评指正。

目录

第一章 绪论	(1)
第二章 药物分析技术和方法的建立	(4)
第一节 实验技术和方法的选择	(4)
第二节 样品的预处理	(16)
第三节 实验方法的设计和优化	(22)
第四节 分析方法的验证和评价	(27)
第三章 抗微生物和抗寄生虫类药物分析方法	(31)
第一节 抗生素药	(31)
第二节 合成抗菌药	(119)
第三节 抗真菌药	(152)
第四节 抗病毒药	(159)
第五节 抗分枝杆菌药	(171)
第六节 抗蠕虫药	(179)
第七节 抗原虫药	(183)
第四章 心血管系统药分析方法	(191)
第一节 治疗慢性心力衰竭药 (强心药)	(191)
第二节 抗心律失常药	(198)
第三节 降血压药	(215)
第四节 抗心绞痛药	(273)
第五节 钙通道阻滞药	(280)
第六节 抗休克血管活性药	(295)
第七节 血脂调节药	(305)
第八节 周围血管扩张药	(318)
第九节 其他心血管系统药	(323)
第五章 肿瘤用药分析方法	(334)
第一节 影响核酸生物合成的药物	(335)
第二节 干扰转录过程和阻止 RNA 合成的药物	(341)
第三节 直接影响 DNA 结构和功能的药物	(344)
第四节 抑制蛋白质合成与功能的药物	(355)
第五节 调节体内激素平衡的药物	(358)

第六节	抗肿瘤辅助药	(360)
第六章	消化系统药物分析方法	(365)
第一节	抗酸药	(365)
第二节	胃酸分泌抑制药	(368)
第三节	胃粘膜保护药	(384)
第四节	促胃肠动力药	(394)
第五节	胃肠解痉药	(398)
第六节	止吐药和催吐药	(411)
第七节	泻药和止泻药	(414)
第八节	肝病辅助药	(420)
第九节	利胆药	(449)
第十节	减肥药和其他消化系统药	(456)
第七章	呼吸系统药分析方法	(466)
第一节	平喘药	(466)
第二节	镇咳药	(482)
第三节	祛痰药	(488)
第八章	神经系统药物分析方法	(496)
第一节	中枢神经兴奋药	(496)
第二节	抗震颤麻痹药	(504)
第三节	抗癫痫药及抗惊厥药	(508)
第九章	治疗精神障碍药分析方法	(517)
第一节	抗精神病药	(517)
第二节	抗抑郁药	(532)
第三节	抗躁狂症药	(544)
第四节	镇静催眠、抗焦虑药	(545)
第十章	免疫系统药分析方法	(556)
第一节	抗变态反应药	(556)
第二节	免疫调节药	(567)
第十一章	内分泌系统药分析方法	(577)
第一节	肾上腺皮质激素	(577)
第二节	垂体激素相关药	(588)
第三节	抗糖尿病药	(590)
第四节	甲状腺用药	(608)
第五节	抗痛风药	(615)
第十二章	镇痛药分析方法	(621)
第一节	解热镇痛抗炎药类	(621)
第二节	麻醉性镇痛药	(666)

第三节 抗偏头痛药	(675)
第四节 其他镇痛药	(678)
附录 药名索引	(686)
中文名称拼音索引	(686)
英文索引	(696)

第一章

绪 论

药品是用于防病、治病、诊断疾病、改善体质、增强抵抗力的一种特殊商品。药品的安全性和有效性直接关系到用药者的健康和生命安全。而药物分析的目的正是为新药研发过程中提供有力的现代分析手段；为药品的生产过程中的质量控制、优化工艺、科学合理的贮藏条件和管理条件提供有效依据；为药物的不良事件的及时发现、确认、处理及危害性评价提供快速准确的分析手段等，因此药物分析学是一门研究和发 展药品全面质量控制的方法学科，是药学科学领域中的一个重要组成部分。研究的主要内容包括药物及其制剂的检验、药物稳定性研究、药物代谢分析、药物临床监测分析、毒物分析、兴奋剂检测、成瘾药物检查、假劣药品的识别、环境中药物残留分析等。

一、现代药学对药物分析技术与方法的要求

各学科间的相互渗透促进了现代药学科学事业迅猛发展，同时也对药物分析学科不断提出新的问题和要求。在化学、生物学及材料学等学科不断进步的推动下，药剂学的剂型研究从一般的片剂、胶囊剂或注射剂到口服缓、控释制剂和靶向制剂的研究，目前已进入载体给药系统（drug delivery system, DDS），包括各种生物学载体给药系统、无机载体给药系统、磁性微粒载体给药系统及微针经皮给药系统等研究开发全面展开阶段。对于这些制剂的质量控制，包括质量标准的研究和制订、生物利用度以及药代动力学的研究，必须采用灵敏度高、专属性好的分析方法；随着我国改革开放的深入，知识产权的保护措施和激烈的市场竞争越来越制约着专利品种的仿制，创新药研究与开发成为我国药学事业发展的一个重要方向，新药研制开发中所研究的药动学、生物利用度、药物体内分布及其在体内的代谢转化，乃至代谢物的分离鉴定，都离不开现代药物分析手段的辅助；从 20 世纪 80 年代第一个生物技术药物——人胰岛素上市后，现代生物技术所研制的生化药物和基因工程药物迅速拓展，生物药物分子结构复杂，同时具有多方面的生物活性和功能，在检测方法上，大都采用适合于肽、蛋白质、多糖等大分子化合物的现代色谱、光谱综合性分析方法；中药现代化体现了在新的历史条件下中药研究的“与时俱进”，围绕着中药的有效性、安全性和可控性，中药质量控制是关键。从中药的活性成分的提取、化学结构的确定到中药新型制剂的研制工艺过程和产品的质量控制，必须运用多种现代分离分析技术和计算机技术；药物安全预警，即药物警戒（pharmacovigilance）是指有关药物不良作用的检出、评估、掌握、防范以及其他与药物问题相关的科学与活动。药物预警旨在保障药物作用安全有效，而

药物分析技术是其中不可缺少的分析判断手段，现代分析技术的应用有助于早期发现、预防药物不良事件的发生，将危害降至最低。

因此，现代药学的飞速发展给药物分析学科和药物分析工作者提出了迫切任务，要求药物分析技术能够深入到工艺流程、反应历程、生物体内代谢过程和综合评价等各领域的动态分析研究中。所采用的分析方法应该更加灵敏、专属、准确和快速，并朝着自动化、最优化和智能化方向发展。

二、药物分析技术与方法的发展概况

用现代化的分析方法科学、有效和全面的控制药物的质量，了解药物在复杂体系中的作用规律过程，一直是药物分析界努力探索的重要方向，其研究的焦点和难点主要集中在：①复杂体系，即药物往往不是以纯净的形式存在，而是处于复杂的混合体系中。从各种药物制剂、天然药物、生化药物到体液中、环境中等的药物分析，无不伴随着复杂介质的干扰。②所要求研究药物成分的量不断降低，从常量到微量，再到痕量，甚至要达到分子水平的检测。解决“复杂介质中的微量（痕量）药物成分分析”需要当前最先进的分析技术和方法。

（一）分离分析技术的发展

在近几年的药物分析技术不断发展过程中，高效液相色谱（HPLC）当之无愧的成为应用最为广泛的实验技术。其中反相色谱技术是在解决原料药含量测定、稳定性研究等问题时最为常见的分离模式，通常采用内径为 $5\mu\text{m}$ 的硅胶键合相，150mm 或 250mm 标准长度的色谱柱及紫外检测技术。光电二极管阵列（DAD）检测方法因其能提供在线光谱信息，从而实现峰纯度检查等而逐渐普及并开始成为常规检测手段。当然，色谱工作者们也从未间断对 HPLC 固定相及检测技术进行研究和改进，从而适应复杂介质中微量药物分析的要求。虽然 C18，C8 及 CN 基柱仍为现阶段药物分析色谱固定相的主流，但各种新型固定相如整体柱（monolithic columns），分子印迹聚合物，小粒径硅胶型固定相及非硅胶型固定相等不断涌现。低于 $3\mu\text{m}$ 粒径的固定相和高压输送色谱系统促成了新型 HPLC 分离模式——超高效液相色谱系统（UPLC）的诞生和发展，并已经开始在药物分析领域发挥作用。HPLC 分析灵敏度的提高很大程度上取决于使用的检测器，因此检测技术是药物色谱分析研究的一个热点。目前，除了常规的紫外检测器外，质谱（MS）检测器因其灵敏度高及通用性好已有逐渐普及的趋势，化学发光检测器（CLD）因其结构简单，灵敏度高、专属性好；蒸发光散射检测器（ELSD）因其通用性强等特点均已在药物分析中广泛应用。

毛细管电迁移（CEM）技术近年来仍然是药物分析应用和研究的重要分析技术，其主要在测定药物光学纯度及复杂药物（如复方药物、天然产物及生物药物）分离分析等领域发挥其优势。毛细管电泳（CE）及电动力学色谱（EKC）技术的发展主要是针对分离介质展开，各类非水介质因其在黏度、介电常数及选择多样性等区别于水溶液体系的特点而用于某些水不溶性药物、难分离药物等的分离分析中。手性分离介质的探索是 CE 研究中一个持续的热点，除各类环糊精体系被广泛应用外，其他手性分离介质，如各类手性冠醚、多糖类、万古霉素类及离子液体等手性添加剂也引起普遍关注，但对这些新型添加剂，手性分离机理还缺乏深入的研究。毛细管电色谱（CEC）手

性分离技术的讨论则集中在各类特殊的手性固定相的开发,包括纤维素键合硅胶、 β -环糊精手性固定相、 α_1 酸性糖蛋白和黏蛋白固定相等。这类手性固定相的优点在于广泛使用于各种分离介质,另外也展现出不同于其他手性分离介质的特性,从而拓展了手性药物的分离领域。

其他分离分析技术,如气相色谱(GC)仍主要应用于挥发性药物及药物中残留有机溶剂的分离分析中;薄层色谱(TLC)和高效薄层色谱(HPTLC)则集中于药物纯度及稳定性研究中;超临界流体色谱(SFC)的研究尤其是用于分离天然药物、极性药物和手性药物的报道有增加的趋势。由于中等大小的极性分子似乎易受 CO_2 和 N_2O 的良好超临界作用而形成溶剂化物,如与离子化检测器相联,可显示极大的应用前景。

(二) 药物分析技术和方法的多样化

除上述色谱分析技术以外,各类光谱分析技术在药物分析领域中的地位也日益显现。在药物研制及质量控制过程中,紫外光谱法、荧光光谱法、核磁共振光谱法和X-射线衍射分析法等仍被广泛的应用。包括红外(IR)、近红外(NIR)、远红外(FIR)、太赫兹(T-RAY)和拉曼(RAMAN)光谱分析等技术的振动光谱法因其无损分析、仪器逐渐小型化及样品前处理简单等优势而被用于处理很多药物分析问题,如药物的鉴别、含量测定;对药物活性成分理化性质研究及其在生产过程中性质变化进行监控;对药物内部结构和分子间相互作用的研究;对药物制剂的缓释性质进行测定等。已有大量文献介绍NIR光谱分析技术在药物分析上的应用。如,原料药和制剂的鉴别和分类、含水量的测定、抗生素制剂生产全过程的控制分析、粉末混合均匀性在线检测以及固体制剂无损分析等。随着NIR光谱仪技术的不断提高和化学计量学的发展,NIR光谱分析技术必将在现代药物分析领域中获得越来越广泛的应用。除了在分光光度计上直接测定数据外,分光光度计与其他设备如流动注射分析(FIA)的联用方法可用于各类药物的测定。

联用技术(hyphenated techniques)已成为药物分析技术中一个主要的发展方向,两种分析技术联用,取长补短,互相补充,解决复杂成分样品的分析问题。特别是高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)正逐渐成为常规分析手段,另外还有毛细管电泳-质谱联用(CE-MS)、高效液相色谱-核磁共振光谱联用(HPLC-NMR)、高分辨气相色谱-质谱联用(HRGC-MS)等技术在药物及其代谢产物研究、天然产物化学成分分析及生物大分子分析等方面发挥着重要作用。

电化学分析技术在药物分析中的应用也不应被忽视。除了常规的直接和间接电化学分析方法的普遍应用外,近期研究较多的为纳米材料修饰电极及其在电化学分析中的应用,通过对纳米金属氧化物、纳米金属离子、碳纳米管及碳纳米管复合物对电极进行修饰可提高电极的选择性和测定灵敏度,已用于研究多种抗生素类药物的电化学生物行为并对其进行快速测定。

此外,微流控芯片(microfluidic chip)技术、差热分析(DSC)、热重分析(TGA)、电感耦合等离子质谱分析(ICPMS)、扫描电镜/能谱联合分析(SEM-EDX)、共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)分析技术均被应用于各药物分析领域中。

第二章

药物分析技术和方法的建立

药品质量是这种特殊商品安全性和有效性的基础，为确保药品的“安全有效”，药物分析必须为药物研发及生产流通中的各种质量问题提供合理可行的分析技术和方法。首先，应综合考虑分析的目的及待测药物的来源、结构、性质等特点，参照各国药典及文献方法并兼顾实验条件，选择合适的分析技术和方法，然后进行实验条件的筛选和优化，并进行严格的方法学验证，最终建立起稳定可靠并切实可行的分析方法。

第一节 实验技术和方法的选择

药物分析学科的发展依赖于分析技术的进步。近年来，用于药物分析的新技术与新方法层出不穷，仪器更灵敏、自动化、多功能；技术更先进；方法更快速、实用、简便。但是，药品种类繁多，测定要求各不相同，一个完整无缺的，适用于任何药品，任何剂型，任何要求的测定方法是不存在的。因此我们必须根据药物的结构、性质、测定要求和现有的设备与技术条件；根据准确、专属、灵敏、快速、简便等要求来选用适宜的测定方法。

一、常用药物分析方法的分类

在药物分析中，常用的分析方法可分为化学分析法和仪器分析法。

1. 化学分析法 以物质的化学反应为基础的分析方法，包括重量分析法和滴定分析法。

重量分析法是化学分析法中最经典的方法，适用于常量组分的测定，其准确度高（相对误差0.1%~0.2%），不需要与标准试样或基准物质进行比较，但其操作繁琐、耗时。目前药典上仍采用重量法测定某些药物的含量及进行一些分析项目（如干燥失重测定法、炽灼残渣检查法、灰分测定法等）。滴定分析法适用于常量组分分析，也可用于微量组分分析。其具有操作简便、快速、准确的特点。此外，非水滴定法具有一切滴定分析所具有的优点，可用于半微量组分，取样量小，常可直接滴定药物中的生理活性基团，原料药含量测定首选滴定分析法。

2. 仪器分析法 采用比较复杂或特殊的仪器设备，通过测量能表征物质的某些物理或化学性质来确定其组成、含量和结构的分析方法。仪器分析法分为光学分析法、电化学分析、色谱分析和热分析等。

二、常用分析方法介绍

在实际分析工作中，基于仪器和设备条件的考虑，我们通常采用价格合理、应用广泛的设备。现针对应用最普及的紫外-可见分光光度法、高效液相色谱法、气相色谱法以及毛细管电泳法作详细介绍。

(一) 紫外-可见分光光度法

紫外-可见分光光度法 (ultraviolet-visible spectrophotometry, UV) 是利用物质的分子对波长为 200~800nm 范围内的光的吸收作用，对物质进行定性、定量及结构分析的一种分析方法，所依据的光谱是分子吸收入射光中特定波长的光而产生的吸收光谱。其操作简单、准确度高、重现性好，被广泛应用于医药、化工、冶金、环境保护、地质等诸多领域。

1. 基础理论 各种化合物的紫外-可见吸收光谱的特征就是分子中电子在各种能级间跃迁的内在规律的体现。有机化合物的紫外吸收光谱，取决于分子中外层电子的性质。我们都知道有机化合物的电子跃迁有 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 、 $n \rightarrow \sigma^*$ 、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \pi^*$ 四种，最有用的吸收光谱是基于 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁而产生的，这两类跃迁所需要的辐射能量大多处于波长大于 200nm 的区域，它们要求分子中含有不饱和键。此外，溶剂的极性也会使吸收光谱的位置发生改变。极性较大的溶剂，一般会使 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁谱带向长波方向移动，称为红移；而使 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁谱带向短波方向移动，称为蓝移。而无机化合物的紫外-可见吸收光谱主要由电荷转移和配位体场跃迁产生。

朗伯-比耳定律是紫外-可见分光光度法定量分析的基础：

$$A = -\lg T = ECl \quad (2-1)$$

式中 A 为吸收度； T 为透光率； E 为吸收系数，定量分析中一般采用比吸光系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)，其物理意义为当溶液浓度为 1% (g/ml)，液层厚度为 1cm 时的吸收度数值； C 为 100ml 溶液中所含被测物质的重量 (按干燥品或无水物计算，g)； l 为液层厚度，cm。

2. 紫外-可见分光光度计 紫外-可见分光光度计按光学系统可分为单光束和双光束分光光度计、单波长和双波长分光光度计。其由 5 个部件组成：①辐射光源。要求能发射足够强的连续光谱，稳定性好，辐射能量随波长无明显变化。最常用有钨灯和氘灯，钨灯用于可见光区，而氘灯用于紫外光区。②单色器。它是分光光度计的“心脏”部分，主要由狭缝、色散元件和透镜系统组成，其中色散元件是关键部件，常用的有棱镜和光栅，现在商品仪器几乎都用光栅作为色散元件。③吸收池。通常有玻璃吸收池和石英吸收池两种，前者用于可见光区测定，后者用于紫外光区测定。④检测器及数据处理系统。常用的检测器有光电管、光电倍增管。

3. 检测条件的选择 物质的吸收光谱与测定条件 (温度、溶剂、pH 等) 及仪器参数密切相关。检测条件不同，吸收光谱的形状、吸收峰的位置、吸收强度等都可能发生变化。

(1) 溶剂 紫外-可见光谱法的测定一般在溶液中进行，对于固体样品要转化为溶液，无机样品要选用合适的酸溶解或碱熔融，而有机样品需用有机溶剂溶解。所选用的溶剂要有良好的溶解能力，尽量选用低极性，并在测定波长范围内无明显吸收，

可使被测样品有良好的吸收峰形，挥发性小，不易燃，无毒性，价格便宜等溶剂系统。

(2) 波长 一般选择待测组分吸收光谱中最大吸收波长作为测定波长，这样可获得最高的灵敏度，且吸光度随波长的变化量小，可得到较好的精密度。

(3) 狭缝宽度 狭缝与测定灵敏度和工作曲线的线性范围直接相关，狭缝太宽会影响入射光单色性，这种光学干扰直接导致工作曲线线性范围变窄；狭缝太窄，入射光强度较弱，不利于测定。一般在具有合适线性范围的前提下，采用最大狭缝宽度。

(4) 吸光度范围 吸光度在 0.2 ~ 0.8 之间时测定误差最小，因此，应将待测组分的浓度控制在吸光度为 0.2 ~ 0.8 之间。

(二) 高效液相色谱法

高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 是用高压输液泵将流动相泵入装有固定相的色谱柱，经进样阀注入供试品，由流动相带入柱内，分离后，各组分依次进入检测器，色谱信号由记录仪记录。其具有分离性能好、分析速度快、灵敏度高、流动相选择范围宽、流出组分易收集、色谱柱可反复使用和应用范围广等特点。HPLC 分析不受样品挥发性和热稳定性的限制，只要求样品能够制成溶液即可，因此，高效液相色谱特别适用于沸点高、热稳定性差、极性強、分子量大的高分子化合物以及离子型化合物的分析，如氨基酸、蛋白质、核酸、生物碱、甙体、抗生素等。HPLC 在药物分析中常用于药物的鉴别、检查和含量测定。

在 HPLC 中，根据固定相的性质，其分离模式可分为液-固吸附、化学键合相、离子交换、离子对、分子排阻、手性亲和色谱等。在药物分析中，大多采用化学键合相色谱法。色谱系统由极性固定相和非极性流动相组成，称为正相色谱法 (normal phase chromatography, NPC)。反之，如采用非极性固定相和极性流动相，为反相色谱法 (reversed phase chromatography, RPC)。

1. 分离度和实验条件 混合物中，两成分的色谱分离度受实验条件的影响，对于给定的分离，如何改变条件，提高分离度是我们最关心的问题，分离度与实验条件的关系体现在下式中

$$R = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (2-2)$$

这个公式将许多实验变量概括为柱效、柱选择性和色谱保留三个方面，便于指导实验条件的改变，达到预期的分离。

(1) 溶剂强度的影响 由式 (2-2)，分离度 R 随容量因子 k 的增加而增加，当 k 达到 10 以上，继续增加 k，不显著影响 R，而分析时间增加了，最佳的 k 在 2 ~ 10 之间。成分的保留可通过改变流动相的溶剂强度加以控制。强溶剂降低保留，而弱溶剂增加保留。表 2-1 概括了主要不同类型 HPLC 方法改变溶剂强度的方法。

表 2-1 改变溶剂强度控制样品保留

HPLC 分离模式	改变溶剂强度的通则
反相	水 (A) 和有机相 (B) 混合溶剂, 如乙腈-水增加 B%, 降低色谱保留 k
正相	非极性溶剂 (A) 和极性溶剂 (B) 的混合物, 如正己烷-异丙醇, 增加 B%, 降低色谱保留 k
离子对	同反相 HPLC
离子交换	缓冲溶液加盐, 如 5mmol/L 乙酸钠加 50mmol/L 氯化钠, 增加离子强度 (NaCl 浓度), 降低色谱保留 k

(2) 选择性的影响 许多样品经适当调节溶剂强度 (B%) 至适当的保留, 就能得到适当的分离。但是, 其他一些样品, 即使所有谱带在 $0 < k < 20$ 间, 仍然得不到完全的分离。所以下一步要改变条件使谱带间的距离或选择性 (α) 发生改变。改变 α 是通过改变流动相、柱填料和温度实现的, 通常改变流动相组成。

a. 改变流动相 流动相的选择取决于 HPLC 方法类型 (见表 2-1), 对于反相色谱法, 这也是药物分析中最常用的 HPLC 方法, 见表 2-2 概括了通过改变流动相来改变选择性的方法。

表 2-2 RPC 中改变流动相以改变选择性 α

改变项	第 1 次	第 2 次
改变 B%	40% 乙腈	45% 乙腈
改变有机溶剂 (a)	40% 乙腈	50% 甲醇
混合有机溶剂 (a)	40% 乙腈	20% 乙腈加 25% 甲醇
改变 pH 值 (b)	pH 2.5	pH 3.5
改变离子对试剂浓度 (b)	无试剂	25mmol/L 辛酸磺酸盐
改变缓冲剂或浓度 (b)	25mmol/L 枸橼酸盐	50mmol/L 乙酸盐
改变添加剂 (b)	无添加剂	10mmol/L 三乙胺
加络合剂 (c)	无添加剂	10mmol/L 硝酸银

注: (a) 指所有中性或含离子及可离子化成分样品; (b) 指含离子及可离子化的样品; (c) 指可与络合剂相互作用的特殊样品。

在实验中, 改变选择性 α 的步骤一般按表 2-2 自上而下变化为好。改变流动相的第一项就是改变溶剂强度, 在优化色谱保留的同时, 也可能同时优化了选择性。无论在正相还是反相色谱法中, 改变溶剂的类型是改变选择性的有效方法, 通常是改变强溶剂成分 B。溶剂的选择性取决于其偶极矩、酸性和碱性, 如酸性溶剂甲酸、乙酸和氟代醇类, 碱性溶剂胺类, 偶极性溶剂乙腈、三氯甲烷和二氯甲烷等。改变溶剂类型常导致峰间距离的明显变化, 但是有可能使原来重叠的谱带分离了, 但又使原来分离的谱带重叠了。此时, 混合这两种不同类型的溶剂, 常可得到预期的结果。对含离子或可离子化成分样品, 流动相可通过改变 pH 值、离子对试剂或胺添加剂、缓冲盐或其浓度等进一步改变选择性。在某些情况下也可加络合剂至流动相以增加选择性。

b. 改变固定相 色谱柱填料的性质对选择性有很大的影响。通常, 是在改变了流动相后仍然不能达到预期分离时, 才考虑改变色谱柱, 而且改变色谱柱通常是与改变

流动相结合起来的。在 HPLC 中,以硅胶为基质的反相键合填料应用最为广泛(如 C_{18} 柱),这种填料的主要优点是柱效高,缺点是对流动相的 pH 值范围及组成有一定限制(通常为 pH 2~8)。

系统的、重现的选择性最好是通过改变柱键合相功能团的途径达到,如 C_{18} 改变为苯基柱、氰基柱或氨基柱。氰基柱适合于分析极性化合物,尤其是在硅胶柱上峰形不对称的化合物的分析。氨基柱可用于极性化合物的正相、弱阴离子交换和反相色谱分离,这取决于样品的性质和流动相的组成。

c. 改变温度 增加柱温 1°C ,通常降低保留(k) 1%~2%,同时,还会改变 α 。在实验中,色谱柱、进样器和检测器都是恒温的,恒温可以在方法建立过程中优化温度,在方法建立之后的日常工作中使保留时间、分辨率及检测信号保持稳定,尤其是对含离子或可离子化成分样品,对于含酸、碱官能团的药物,恒温常常可达到较好的结果。此外,适当提高柱温可以降低溶剂黏度、降低柱压、提高柱效,甚至改变选择性,因为随着温度升高,水的黏度、介电常数会减小,可以提高流动相的洗脱效果,而且在高温下,色谱峰的拖尾现象将有所改善,峰形也会变得更加对称。

(3) 色谱柱理论塔板数的影响 如果通过调整 k 和 α 后,分离度仍然不能满足需要,按式(2-2),可通过增加理论塔板数 n 使所有谱带的分辨率提高。在高效液相色谱中,①流动相为液体,其黏度 η 远小于气体,组分在液相中的扩散系数 D_m 比气相色谱中小 10^5 ;②为节省分析时间,流动相流速 u 为最佳流速 u_{opt} 的 3~5 倍,因此速率方程中影响塔板高度 H 的只有两项,即:

$$H = A + Cu \quad (2-3)$$

故高效液相色谱中要获得较高分离效率,主要考虑公式 2-3 中的涡流扩散项 A 和传质阻抗项 Cu 。增加理论塔板数与下述因素有关:较小的柱填料粒度和仔细填装的柱(柱质量);较低的流速;较低的流动相黏度和较高的柱温;较小的样品分子;最小的柱外效应。

(4) 进样量的影响 对于常规柱(4~5mm i. d., 150~250mm),进样量 $< 25\mu\text{l}$ 或 $10\mu\text{g}$ 。随着柱长和柱内径的减少,进样体积及质量应随柱体积的变小而相应降低。在硅胶柱或以硅胶柱为基质的反相填料上分离碱性化合物(药物中常含碱性氮原子)应尽量降低样品量($< 1\text{g}$),以免谱带过分展宽和拖尾(硅醇基的作用)。

2. 色谱峰的检测 HPLC 采用在线检测技术,最常用的检测器是紫外检测器(UV),一般采用可变波长(分光光度)或二极管阵列检测器(DAD)。

HPLC 分析结果的好坏,除了分离条件之外,取决于检测波长的选择。检测波长的选择取决于样品中各组分在流动相中的吸收光谱。最好采用 DAD,在一次进样后,DAD 可同时采集不同波长下的色谱图,随后可以显示任一波长下的色谱图。DAD 可提供每一色谱峰的 UV 光谱,因而利于最佳检测波长的选择,用于最终建立的 HPLC 方法。此外,检查色谱峰各个位置的光谱,可以评价色谱峰纯度,如果色谱峰为单一成分,则色谱峰各点的光谱应重叠。但是,当主成分与杂质具有相同或相似的吸收光谱时,确定色谱峰纯度应与其他分析技术相结合。使用 DAD 还能进行“峰追踪”,在药物代谢中,为了追踪色谱图中何处为代谢产物,可以用原药物的最大吸收波长显示色谱图,因为代谢物的母核应与原药物相同,因而其吸收光谱相似。

还有其他的检测器, 如示差折光检测器 (refraction index, RI) 和蒸发光散射检测器 (ELSD), 为通用型检测器, 它们几乎对所有样品成分有响应, 且对不同化合物的响应差别较小。因此, 这些检测器用于: 样品缺乏 UV 响应; 流动相在检测波长处有强烈吸收; 用色谱峰面积归一化法分析未知成分的含量。此外, 还有荧光、电化学和质谱检测器等等, 基于操作条件、成本、简便等因素的考虑, 其应用受到了限制。

3. HPLC 方法的选择 HPLC 方法的选择可参照表 2-3, 表中说明了常用 HPLC 方法及其应用范围。大多情况下可选用 RPC。虽然许多有机化合物在 RPC 流动相中溶解度有限, 但实际上不成为问题, 因为通常进样量很小 (μg 或 ng 量)。

表 2-3 HPLC 方法和应用范围

方法	应用范围
反相 HPLC 流动相: 水-有机溶剂 色谱柱: C_{18} , C_8 , 苯基, 氰基	首选为能溶于水-有机混合液的中性或弱酸、弱碱化合物
离子对 HPLC 流动相: 水-有机溶剂, 缓冲溶液和离子对试剂 色谱柱: C_{18} , C_8	酸碱性较强的或离子化合物
正相 HPLC 流动相: 有机溶剂混合液 色谱柱: 氰基, 氨基, 二醇基, 硅胶	首选为不溶于水-有机混合液的化合物; 异构体 (立体、位置) 分离以硅胶为好
离子交换色谱法 流动相: 水相, 缓冲液控制 pH 值 色谱柱: 阴离子或阳离子交换	分离无机离子混合物首选离子色谱法; 分离蛋白质、核酸及有关化合物的良好选择
分子 (尺寸) 排阻色谱法 流动相: 水相 (凝胶过滤); 或有机相 (凝胶渗透) 色谱柱: 凝胶过滤用二醇基, 凝胶渗透用聚苯乙烯或硅胶; 孔径大小支配分子范围	分离大分子, 如蛋白质和合成聚合物的首选, 还可用作测量分子量及分布
疏水-相互作用色谱法 流动相: 盐溶液 色谱柱: 类似于反相填料, 但疏水性小得多	用于分离蛋白质
手性色谱法 流动相: 水-有机溶剂 色谱柱: 手性柱	光学异构体 (对映体) 分离

4. 梯度洗脱 梯度洗脱是指由几种不同极性的溶剂组成流动相, 通过改变流动相中各溶剂组成的比例来改变流动相的极性, 使每个流出的组分都有合适的容量因子 k , 并使样品中的所有组分可在最短时间内实现最佳分离。常用一个强度弱的溶剂 A 和一个强的溶剂 B, B 溶剂的强度应能够在梯度过程中使所有欲测谱带都能被洗脱, 并使各谱带的 k 值在 2~10 之间。

在 HPLC 分析中, 梯度洗脱对改善色谱峰形, 增加峰容量有重要作用。梯度洗脱可提高分离度, 缩短分离时间, 降低最小检测量, 对组成复杂的混合物, 特别是包含组分的容量因子分布范围宽 ($0.5 < k < 20$), 保留值相差较大的混合物, 使用梯度洗脱是最适宜的。

影响梯度洗脱的因素有梯度洗脱时间、强溶剂组分 B 浓度变化范围、柱温、梯度

洗脱程序曲线形状、流动相流速及柱死体积等，具体介绍如下：

(1) 梯度洗脱时间对分离的影响 梯度洗脱时间表达的是流动相中强洗脱溶剂组分 B 在单位时间内的浓度变化速率 ($\%/min$)。随梯度洗脱时间的延长，各组分平均容量因子增大，组分间分离度增加，总分析时间延长，梯度陡度逐渐减小。因此，要在满足一定分离度的前提下，尽量缩短梯度洗脱时间。

(2) 强溶剂组分 B 浓度变化范围的影响 强溶剂组分 B 浓度变化范围是指流动相中强溶剂组分 B 分别在起始相和终止相中的浓度，调节这个范围对得到最佳的梯度分离起重要作用。一般第一个谱峰的保留时间最好为死时间的 2 倍，而梯度结束时把最后一个峰洗脱出来，使色谱图的开始和结束并无浪费的保留时间。

(3) 梯度形状的影响 梯度形状主要有线形、凹形、凸形和折线形，如图 2-1 所示。大多数梯度分离用线性梯度，其易于优化，但有时非线性梯度可改善分离。如若在一个梯度洗脱中，聚集在谱图中间的组分过于密集，不能实现理想的分离，此时可将梯度形状改为折线形，即在中间部分加入适当时间的等度洗脱以获得中间组分的理想分离。

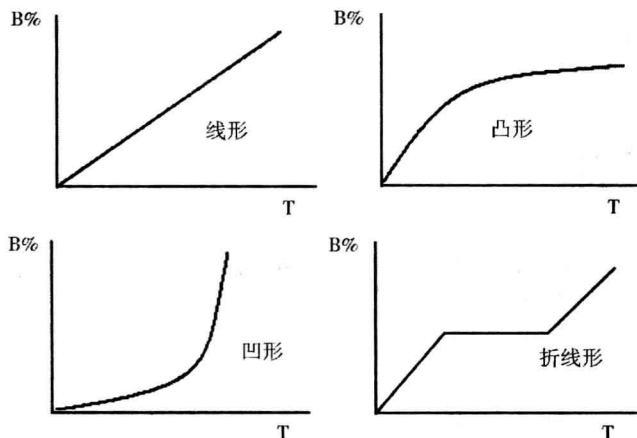


图 2-1 梯度形状

梯度洗脱为液相色谱分析注入了新的活力，已成为 HPLC 分析中的重要分离技术，但是，梯度洗脱中会常发生基线漂移和非样品峰，因此，在建立梯度方法时，应先做梯度洗脱空白试验，尤其是在 UV 短波长检测条件下，基线漂移是很普遍的，要求使用高纯度的溶剂和添加剂。

5. 进展 随着分离要求的提高，寻找更有效、适用范围更广的固定相成为 HPLC 的研究重点。除了 C_{18} 、 C_8 、苯基等键合相外，又相继出现了封端处理的或者极性嵌入型色谱柱，但是他们的分离效果还是有很大的限制。因此，药物分析工作者趋向于寻找新颖的键合相功能团。自从 Glennon 等研究发展了环芳烃四酯固定相后，环芳烃固定相被广泛的研究。MaciejBarc 等成功制备了 CalixBzF10 键合硅胶固定相，将氟原子引入环芳烃固定相，其可以分析氟化物以及不含氟的化合物，对于结构相似的化合物有很高的响应，还显示出很高的分离能力。对于酸、碱以及中性分子都能达到有效分离。