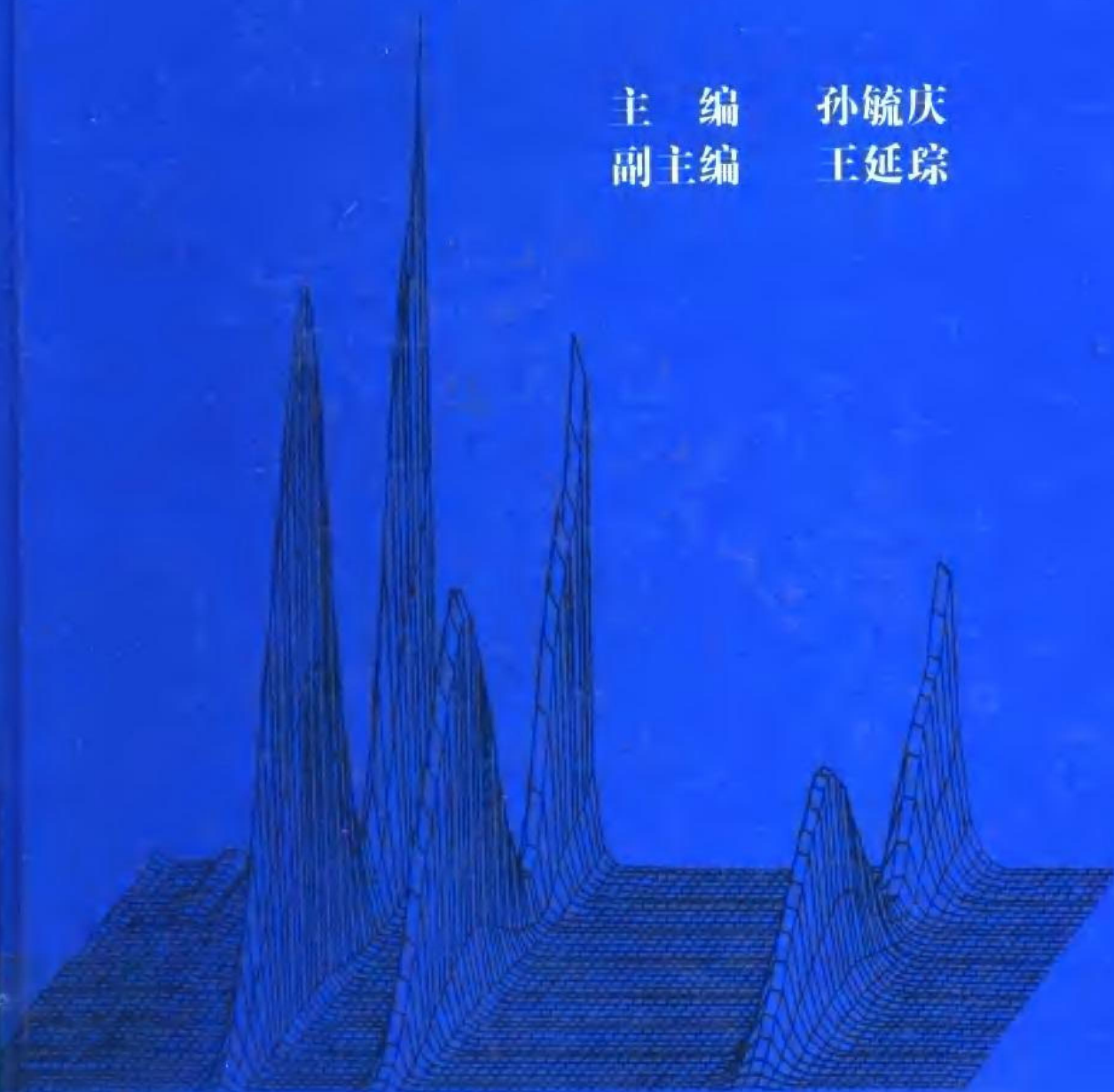


现代色谱法

及其在医药中的应用

主 编 孙毓庆
副主编 王延琮



人民卫生出版社

现代色谱法 及其在医药中的应用

主 编 孙 毓 庆

副主编 王 延 琮

编写人员:

孙毓庆(沈阳药科大学教授,博导)

王延琮(沈阳药科大学教授)

林乐明(中国科学院大连化学物理
研究所研究员)

李发美(沈阳药科大学教授,博士)

班允东(沈阳药科大学副教授,博士)

邸 欣(沈阳药科大学讲师,博士)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

现代色谱法及其在医药中的应用 / 孙毓庆主编. — 北京:
人民卫生出版社, 1998
ISBN 7-117-03036-4

I. 现… II. 孙… III. 色谱法-应用-医药学 IV. R313

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 18590 号

现代色谱法及其在医药中的应用

孙毓庆 主 编

人民卫生出版社出版发行

(100078北京市丰台区方庄芳群园 3区 3号楼)

三河市宏达印刷厂印刷

新华书店经销

787×1092 16开本 34.25印张 785千字

1998年 11月第 1版 1998年 11月第 1版第 1次印刷

印数: 00 001—3 570

ISBN 7-117-03036-4/R·3037 定价: 47.50元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

序

色谱作为分离分析科学,已有近一个世纪的发展过程。进入廿世纪以来科学技术有了飞速发展,色谱学已发展成为一个独立的学科,并形成了气相色谱、液相色谱、薄层色谱、离子色谱,超临界流体色谱、亲合色谱、疏水色谱、毛细管电泳和电色谱等许多分支,各种色谱仪器与质谱、红外、核磁等技术联用仪器已成为令世人瞩目的高新技术产品。色谱过程动力学、热力学及色谱条件优化等基础理论的发展以及色谱专家系统的深入研究促进了色谱智能化进程。色谱在石油化工、精细化工、医药卫生、生化、临床、环保以及军工等领域获得了越来越广泛的应用,成为当代科技发展不可缺少的手段。色谱在适应当代科技发展需要的过程中,不断地利用科技发展的新成果推进自己的新理论、新方法和新技术的研究。面对 21 世纪的生命科学、基因工程、生物工程、能源和环境等学科的需要,色谱学将会有有一个更大的发展。

医药领域是色谱应用的重要领域之一。孙毓庆教授及其合作者们多年来一直活跃在这一领域中,在推动色谱发展及其在医药领域中应用方面做出了杰出的贡献。《现代色谱法及其在医药中的应用》一书就是他们几十年来从事色谱研究及教学工作成果的结晶。其内容丰富、新颖、实用。书中不仅介绍了色谱基础理论,而且还介绍了色谱新方法,新技术以及色谱专家系统、毛细管电泳等当前色谱研究的热点。本书的出版又为色谱的百花园中增添了一支灿烂的花朵。

张 玉 奎

中国科学院大连化学物理研究所

1998 年 5 月于大连

前 言

本书共十章,可归纳为三部分:色谱法的基础内容(基础理论、基本色谱方法)、色谱法的新方法与新技术及样品预处理。色谱的基础理论包括:各种色谱基本概念、塔片理论和速率理论等。基本色谱法包含:气相色谱法、高效液相色谱法及薄层色谱法三部分内容。本书中介绍当前最热门的毛细管电泳法、应用广泛的色谱联用技术、液相色谱法的关键技术——溶剂系统的优化方法及色谱法智能化技术——色谱专家系统作为色谱法的新方法与新技术。样品预处理方法包括:各种萃取方法及衍生化技术。本书内容力求新颖、实用,并兼顾广度与深度,文字叙述力求简炼,并附有附录和大量参考文献,以求既可作为研究生色谱学的教材,又可作为色谱工作者的参考书之用。

本书由王延琮、林乐明、李发美、班允东、邸欣及孙毓庆等六名同志通力合作,精心编写而成。编写分工如下:孙毓庆,第一、二、四章;王延琮,第三章、第二章部分及附录;林乐明,第五、八章;李发美,第十章及第四章部分;班允东,第六、七章;邸欣,第九章及第四章部分。

本书得益于沈阳药科大学分析化学教研室与中科院大连化学物理研究所有关同志,几十年从事色谱科研与教学工作的经验及文献资料的积累。本书基础内容部分(第一至第五章)是在1987年孙毓庆编写的沈阳药科大学研究生教材《色谱分析法》及1990年孙毓庆、王延琮、林乐明等编著的《薄层扫描法及其在药物分析中的应用》的基础上,修改并增加新内容编写而成。第六章液相色谱溶剂系统的最优化方法的主要内容取自于班允东副教授的博士论文;第七章毛细管电泳,系该同志博士后研究课题所应用的试验技术,并综合大量文献资料而成。第八章色谱联用技术与第十章样品预处理方法,分别由林乐明研究员与李发美教授结合各自的研究工作及参考大量文献资料编写而成。第九章色谱专家系统的部分内容取之于邸欣博士的博士论文。

在本书编写过程中,张国华讲师为本书的打字、编排及绘图工作,付出了大量的艰辛劳动。沈阳药科大学分析化学教研室的黄跃生副教授、王东援副教授、周密工程师、孙国祥讲师及天津医科大学王安副教授等都给予了一些支持。Waters公司为本书提供资料并给予大力支持。北京华润生物电子有限公司也提供一些新资料,中科院大连化学物理研究所副所长张玉奎研究员为本书作序,岛津公司高工胡永礼提供资料,人民卫生出版社张月如编审,对于本书的出版也给予了许多帮助,在此一并致谢。

由于水平所限,书中可能还有不少错误,恳请读者指正,以利于修改。

孙毓庆

1997.5.1.于沈阳

目 录

第一章 绪论	1
第一节 色谱法的分类.....	1
(一)按流动相与固定相的分子聚集状态分类.....	1
(二)按操作形式(固定相的形态)分类.....	2
(三)按色谱过程的分离机制分类.....	2
(四)其它分类方法.....	3
第二节 色谱法的发展简史与进展.....	4
一、色谱法发展简史	4
二、色谱法的进展概况	6
(一)色谱专家系统.....	7
(二)色谱-光谱联用法	7
(三)色谱-色谱联用法(二维色谱法)	7
(四)毛细管电色谱法.....	8
(五)其它方面.....	8
第三节 色谱文献.....	9
一、色谱专业期刊	9
二、色谱手册	9
三、主要色谱参考书.....	10
参考文献	12
第二章 基础理论	13
第一节 色谱参数(基本概念)	13
一、色谱流出曲线与色谱峰.....	13
二、定性参数.....	15
(一)保留时间	15
(二)保留体积	15

(三)比移值(R_f)	16
(四)保留指数(I)	17
三、柱效参数	19
(一)区域宽度	19
(二)理论塔片数与理论塔片高度	20
四、分离参数	21
(一)分离度	21
(二)有效峰数	23
(三)分离值	23
(四)分离数	25
五、相平衡参数	26
(一)分配系数	26
(二)容量因子(k)	27
第二节 塔片理论	28
一、差速迁移	29
二、塔片理论的基本假设	30
三、二项式分布	30
四、色谱流出曲线方程的连续函数形式	34
五、正态分布方程式	36
六、理论塔片数及理论塔片高度的计算	39
第三节 速率理论	40
一、气相色谱速率理论方程式	41
(一)影响板高因素的讨论	42
(二)Van Deemeter 方程式在气相色谱中的表现形式	44
二、液相色谱速率理论	45
(一)Giddings 液相色谱速率方程式	45
(二)Giddings 耦合式简介	48
(三)折合板高方程式	48
(四)柱外效应	49
参考文献	49

第三章 气相色谱法

第一节 概述	51
第二节 气相色谱填充柱	53
一、气-液填充柱	53
(一)固定液	53
(二)载体	63
(三)气-液填充柱的制备	65

二、气-固填充柱	67
第三节 检测器	68
一、检测器的分类与性能指标	69
(一)分类	69
(二)性能指标	69
二、常用检测器	71
(一)热导检测器	71
(二)氢焰离子化检测器	73
(三)电子捕获检测器	75
(四)火焰光度检测器	76
第四节 分离条件的选择	78
一、影响分离度的因素	78
二、实验条件的选择	80
第五节 定性分析方法	83
一、利用保留值定性	83
二、利用选择性检测器定性	87
三、利用化学反应定性	88
四、利用两谱联用定性	88
第六节 定量分析方法	89
一、峰面积的测量	89
二、定量校正因子	90
三、定量分析方法	94
(一)归一化法	94
(二)内标法	95
(三)内标对比法	96
第七节 毛细管柱气相色谱法	97
一、毛细管色谱柱的分类	97
二、固定液的涂渍	98
三、毛细管柱速率理论	99
四、影响分离度的因素	101
五、毛细管柱与填充柱的比较	102
六、毛细管柱的性能指标	104
七、毛细管柱色谱系统	106
第八节 程序升温与程序流量气相色谱法	107
一、程序升温气相色谱法	107
二、程序流量气相色谱法	111
第九节 裂解气相色谱法	116
一、裂解色谱的基本原理	117
二、裂解器	118

三、裂解色谱的操作条件	119
四、应用实例	119
第十节 顶空分析法	122
一、概述	122
二、基本原理	122
三、顶空分析装置	123
四、应用实例	124
第十一节 气相色谱法应用实例	125
一、在药学中的应用	125
二、在医学中的应用	135
参考文献	138

第四章 高效液相色谱法

第一节 概述	140
第二节 各类高效液相色谱法及其分离机制	141
一、基本原理与四种基本类型液相色谱的保留值	142
(一)基本原理	142
(二)各类液相色谱的保留值	143
二、液-固吸附色谱法	143
三、液-液分配色谱法	145
四、键合相色谱法	146
(一)反相键合相色谱法	146
(二)正相键合相色谱法	147
(三)离子对色谱法	148
(四)离子抑制色谱法	150
五、离子交换色谱法	152
(一)离子交换树脂	152
(二)离子交换平衡	154
(三)离子色谱法	155
(四)离子排斥色谱法	158
六、空间排斥色谱法	159
(一)分离机制	159
(二)高分子化合物的分子量测定	161
七、亲合色谱法	162
(一)亲合色谱的概念	163
(二)亲合色谱的分离机制	163
八、胶束色谱法	164
(一)胶束色谱中常用表面活性剂	165

(二)分离机制·····	165
九、手性色谱法·····	166
(一)手性药物的色谱法与拆分意义·····	166
(二)Pirkle 型手性固定相的分离机制·····	167
(三)环糊精色谱法·····	168
第三节 高效液相色谱固定相·····	170
一、液-固色谱固定相·····	170
(一)硅胶·····	170
(二)高分子多孔微球·····	171
二、化学键合相·····	172
(一)非极性键合相·····	172
(二)中等极性键合相·····	173
(三)极性键合相·····	174
三、离子交换树脂·····	174
四、凝胶·····	174
五、亲合色谱固定相·····	175
(一)载体的选择·····	175
(二)配基的选择·····	176
(三)固定相的制备·····	177
六、手性固定相(CSP)·····	178
第四节 流动相·····	180
一、一般要求·····	180
二、液-液分配色谱的流动相·····	181
三、液-固吸附色谱的流动相·····	183
四、反相离子对色谱的流动相·····	185
五、离子交换色谱的流动相·····	186
六、凝胶色谱的流动相·····	187
七、梯度洗脱·····	188
第五节 仪器·····	189
一、输液泵·····	190
二、色谱柱与进样器·····	193
(一)进样器·····	194
(二)色谱柱与柱效评价·····	194
(三)色谱柱切换装置·····	196
三、检测器·····	196
(一)紫外检测器·····	196
(二)荧光检测器·····	203
(三)蒸发光散射检测器·····	205
(四)化学发光检测器·····	208

(五)安培检测器.....	209
(六)其它检测器.....	210
四、仪器性能检查	210
第六节 定性、定量分析方法	212
一、定性分析方法	212
二、定量分析方法	213
(一)外标法.....	213
(二)内标法.....	213
(三)内加法.....	216
第七节 应用实例.....	216
一、在药学中的应用	216
二、在医学中的应用	228
参考文献.....	232

第五章 薄层色谱法..... 234

第一节 概述.....	234
第二节 薄层色谱系统简介.....	238
一、薄层板	238
(一)薄层材料及其参数.....	238
(二)薄层板的涂铺.....	243
二、点样	249
(一)点样的一般要求.....	249
(二)点样装置.....	249
三、展开	252
(一)展开方式.....	252
(二)展开装置.....	254
四、检测	259
(一)薄层色谱斑点显示装置.....	259
(二)斑点的定位方法.....	260
(三)薄层色谱实验的记录.....	262
第三节 薄层色谱参数.....	263
一、流动相动力学参数	263
二、保留参数	264
三、薄层板分离效能参数	265
四、容量因子与比移值之间的关系	267
五、分离评价参数	268
(一)分离度(R)	268
(二)分离数(S_N)	268

第四节 流动相与展开体系·····	269
一、展开机制简介·····	269
二、溶质、溶剂和溶剂强度参数·····	273
(一)溶质的性质·····	273
(二)溶剂的性质·····	273
(三)溶剂强度参数·····	274
(四)溶剂的选择性·····	276
(五)展开体系·····	280
第五节 薄层色谱的光学扫描·····	285
一、原理·····	285
二、光学系统·····	288
(一)单光束单波长系统·····	288
(二)单光束双波长系统·····	289
(三)双光束单波长系统·····	289
三、扫描方式·····	290
(一)直线式扫描·····	290
(二)锯齿式扫描·····	290
四、测量方式·····	290
(一)吸光度测量·····	290
(二)荧光测量·····	290
(三)荧光淬灭测量·····	291
五、扫描仪·····	292
六、扫描定量中的标准校正·····	292
(一)定量工作曲线的线性化·····	292
(二)定量校正的回归方法·····	294
七、扫描定量中的误差·····	295
第六节 定性方法·····	295
一、利用保留值定性·····	296
二、通过板上化学反应定性·····	296
三、通过板上光谱图定性·····	297
四、薄层色谱与其它技术联用定性·····	298
(一)间接联用·····	298
(二)直接联用·····	299
第七节 定量分析方法·····	300
一、定量方法·····	300
(一)间接定量法·····	300
(二)直接定量法·····	301
二、定量校正方法·····	302
(一)归一化法·····	302

(二)内标法.....	302
(三)外标法.....	303
第八节 定量薄层色谱方法的认证.....	304
一、认证实验的设计	304
二、主要认证参数	304
第九节 薄层色谱法应用简述.....	306
一、医学与生化分析	307
二、药物与生药分析	307
三、食品分析	308
四、环境污染分析	308
五、薄层色谱在化学领域中的应用	309
参考文献.....	309

第六章 液相色谱溶剂系统的最优化方法导论..... 313

第一节 概述.....	313
第二节 优化参数与优化指标.....	314
一、优化参数	314
二、优化指标	315
第三节 高效液相色谱的最优化方法.....	319
一、三角形法	319
(一)四面体法.....	319
(二)其它方法.....	321
二、图解法	322
(一)窗口图形法.....	322
(二)重叠分辨率图法.....	325
三、直接法	328
(一)单纯形法.....	328
(二)其它方法.....	332
第四节 薄层色谱的最优化方法.....	335
一、直接法	335
(一)均匀设计法.....	335
(二)单纯形法.....	340
(三)外部惩罚函数法.....	346
(四)其它方法.....	347
二、梯度法	347
(一)牛顿法.....	347
(二)共轭梯度法.....	349
三、三角形法	351

(一) Glajch 三角形法	351
(二) 其它方法	353
四、图解法	353
参考文献	353

第七章 毛细管电泳法

第一节 概述	357
一、毛细管电泳法的发展史	357
二、毛细管电泳法的基本装置	358
三、毛细管电泳法的基本概念	360
四、毛细管电泳法的应用范围	362
第二节 毛细管电泳法的基本原理	363
一、自由区带毛细管电泳法(CZE)的基本原理	363
(一) 毛细管区带电泳的重复性	363
(二) 影响 CZE 迁移行为的因素	364
二、凝胶毛细管电泳法(CGE)的基本原理	365
(一) 凝胶介质	365
(二) 凝胶电泳	367
(三) 毛细管凝胶电泳	367
三、等电聚焦毛细管电泳法(CIEF)的基本原理	369
(一) 原理	369
(二) 等电聚焦在毛细管内进行的特殊性	369
(三) 毛细管等电聚焦的运行过程	371
(四) 毛细管等电聚焦中蛋白质的沉淀	372
(五) 技术上的几点改进	372
四、胶束电动毛细管色谱法(MEKC)的基本原理	373
(一) 原理	374
(二) 一些基本关系	375
(三) 准固定相	375
(四) 流动相	377
(五) MEKC 方法设计的一般途径	377
第三节 毛细管电泳法的柱系统	379
一、毛细管的规格与材料	379
二、管壁静态改性	380
(一) 偶联剂	381
(二) 方法举例: 格氏反应	381
(三) 柱改性前后的性能比较	382
(四) 管壁改性和化学选择性	382

三、管壁动态改性	383
第四节 毛细管电泳法的进样技术	383
一、电动进样	384
二、气动进样	385
三、进样的注意事项	386
第五节 毛细管电泳法的检测器	387
一、紫外检测器	388
二、荧光检测器	390
三、电化学检测器	391
(一)电导检测器(ECD)	391
(二)电势检测器(EPD)	392
(三)安培检测器(AED)	392
四、质谱检测器	396
五、拉曼光谱检测器	397
六、间接检测	397
第六节 毛细管电泳法的应用实例	398
一、毛细管电泳法在药学中的应用	398
(一)手性药物的分离	398
(二)其它药物的分离(图例)	402
二、毛细管电泳法在医学中的应用	409
参考文献	411

第八章 色谱联用技术

第一节 二维色谱法	417
一、二维薄层色谱法	417
二、多维气相色谱法	418
(一)手动样品馏分转移	418
(二)阀切换	419
(三)无阀气控切换	419
(四)在线冷阱	420
(五)并联多柱系统	420
三、多维液相色谱法	422
(一)样品净化和富集	422
(二)谱带切割与再循环	423
(三)反向冲洗	424
(四)多功能柱切换	424
四、液相和气相色谱联用	425
五、液相和薄层色谱联用	426

第二节 色谱与光谱等方法联用	426
一、气相色谱/质谱联用	427
(一)质谱单元	427
(二)接口技术	430
(三)色谱单元	432
(四)联机分析所提供的信息	433
二、气相色谱/付氏变换红外光谱联用	435
(一)色谱单元	435
(二)付氏变换红外光谱单元	436
(三)接口技术	436
(四)联机分析所提供的信息	438
三、用光电二极管阵列装置作为高效液相色谱的检测器	439
四、液相色谱/质谱联用	441
(一)接口技术简介	441
(二)大气压下化学电离离子源用于液相色谱/质谱联用系统	443
(三)接口技术性能比较	447
五、液相色谱/付氏变换红外光谱联用	448
(一)流通池接口	448
(二)去溶剂接口	448
六、薄层色谱/付氏变换红外光谱联用	449
七、薄层色谱/质谱联用	450
八、毛细管区带电泳/质谱联用	450
九、超临界流体色谱/质谱联用	450
十、超临界流体色谱/付氏变换红外光谱联用	452
十一、液相色谱/核磁共振波谱联用	454
十二、多机联用	454
参考文献	456

第九章 色谱专家系统简介 458

第一节 概述	458
第二节 气相色谱专家系统	460
一、判断样品可用 GC 法的依据及其软件	461
二、最佳气相色谱柱系统选择的依据及其软件	463
三、柱系统推荐专家系统的应用	466
第三节 高效液相色谱专家系统	468
一、高效液相色谱最佳柱系统推荐及其软件	468
二、高效液相色谱智能优化及其软件	471
三、反相液相色谱定性及其软件	474

第四节 薄层色谱专家系统.....	479
一、薄层色谱分析方法的选择原则	479
二、ETP 系统的功能和应用	481
(一)方法咨询.....	481
(二)信息查询.....	483
参考文献.....	485

第十章 样品预处理方法.....

第一节 概述	48
第二节 物理的分离与浓缩技术.....	487
一、过滤与超滤	487
二、沉淀分离法	488
三、吸附和吸收	489
四、蒸馏	490
五、溶剂的挥发	490
第三节 溶剂萃取.....	491
一、从固体基质中萃取待分析组分	491
二、液-液萃取	491
第四节 固相萃取.....	492
一、固相萃取剂的种类	493
二、键合硅胶固相萃取剂的作用机制	493
三、固相萃取的一般装置和操作	494
四、萃取方法的建立	495
五、自动化	496
第五节 超临界流体萃取.....	497
一、超临界流体的性质	497
二、超临界流体萃取	497
三、在线联用技术	499
四、应用	499
第六节 化学衍生化技术.....	499
一、化学衍生化在色谱分析中的作用和要求	499
二、柱前衍生化和柱后衍生化技术	500
(一)柱前衍生化技术.....	500
(二)HPLC 中的柱后衍生化技术	500
(三)GC 中的柱后衍生化技术	502
第七节 用于高效液相色谱的衍生化试剂.....	503
一、可见-紫外衍生化试剂	503
(一)胺类和氨基酸的可见-紫外衍生化试剂	503