



化药 中药 抗生素
生化药物 生物制品 药用辅料

色谱及痕量元素分析

药物分析应用专辑

禹重科技® ÜZONGLAB
成分分析仪器|表面测试仪器|样品前处理仪器

ThermoFisher
SCIENTIFIC

目 录

第一章 离子色谱篇.....	5
1.1 离子色谱原理.....	5
1.2 ICS系列离子色谱仪的技术特点.....	5
1.2.1 色谱柱技术.....	5
1.2.2 抑制器技术.....	5
1.2.3 在线电解淋洗液发生器技术.....	6
1.2.4 毛细管离子色谱.....	7
1.2.5 测定糖类物质的HPAEC-PAD技术.....	7
1.2.6 测定氨基酸的HPAEC-IPAD技术.....	8
1.3 离子色谱在化学药物分析中的应用.....	8
1.3.1 药物对离子和药物赋形剂.....	8
1.3.2 阿伦膦酸钠有关物质.....	9
1.3.3 膦甲酸钠注射液中膦甲酸钠含量及有关物质.....	9
1.3.4 氯膦酸二钠含量及其有关物质.....	10
1.3.5 利塞膦酸钠含量及其有关物质.....	11
1.3.6 帕米膦酸二钠注射液中帕米膦酸的含量.....	12
1.3.7 托吡酯中硫酸根和氨基磺酸.....	12
1.3.8 1,4-丁烷二磺酸腺苷蛋氨酸中的1,4-丁烷二磺酸.....	13
1.3.9 在线基体去除直接进样分析厄贝沙坦中的叠氮根离子.....	13
1.3.10 氯化乌拉胆碱中乌拉胆碱的含量.....	14
1.3.11 卡巴胆碱注射液中卡巴胆碱的含量及杂质.....	15
1.3.12 合成药物中吗啉和乙基吗啉.....	15
1.3.13 盐酸二甲双胍中二甲双胍的含量及其有关物质二甲胺.....	16
1.3.14 盐酸帕洛诺司琼的有关物质.....	18
1.3.15 果糖二磷酸有关物质.....	18
1.3.16 米格列醇的含量及其有关物质.....	19
1.4 离子色谱在抗生素分析中的应用.....	19
1.4.1 庆大霉素.....	20
1.4.2 阿米卡星.....	21
1.4.3 小诺霉素.....	22
1.4.4 替加环素中的叔丁胺和N-叔丁基甘氨酸.....	23
1.4.5 硫酸依替米星中亚硫酸根及其有关物质.....	24
1.4.6 奈替米星.....	25
1.4.7 头孢吡肟中N-甲基吡咯烷.....	25
1.5 离子色谱在生化药物及生物制品分析中的应用.....	26
1.5.1 肝素钠中的多硫酸软骨素和硫酸皮肤素.....	26

1.5.2 肝素钠中半乳糖胺	27
1.5.3 依诺肝素、那曲肝素中的硫酸根	28
1.5.4 那曲肝素钙中的亚硝酸根	28
1.5.5 阿卡波糖的含量	29
1.5.6 磺达肝癸钠的含量及其有关物质	29
1.5.7 多肽中乙酸根和三氟乙酸根	30
1.5.8 疫苗多糖的单糖组成	30
1.5.9 脱氧核苷酸钠注射液粉剂和注射液中C、A、T、G	31
1.5.10 右旋糖酐羟丙甲纤维素滴眼液（泪然）中聚季铵盐-1	32
1.5.11 羟乙基淀粉中乙二醇	33
1.6 离子色谱在中药分析中的应用	33
1.6.1 中药中的阴离子和有机酸	33
1.6.2 中药中的阳离子	34
1.6.3 阿胶中的六价铬	34
1.6.4 三七总皂苷冻干粉针剂中的游离糖类	35
1.6.5 槐耳多糖系列降解产物单糖组成	35
1.6.6 蛇毒冻干粉中的氨基酸	36
1.7 离子色谱在药用辅料分析中的应用	37
1.7.1 乳酸中乙醇酸的测定	37
1.7.2 医用几丁糖中氯乙酸的测定	38

第二章 液相色谱篇.....39

2.1 液相色谱原理与组成	39
2.2 Ultimate 3000系列高效液相色谱仪的技术特点	40
2.2.1 泵	40
2.2.2 自动进样器	40
2.2.3 柱温箱	40
2.2.4 检测器	40
2.2.5 色谱柱	40
2.3 液相色谱在化药分析中的应用	41
2.3.1 奥美拉唑肠溶胶囊含量	41
2.3.2 醋酸地塞米松片含量测定	41
2.3.3 对乙酰氨基酚滴剂含量及有关物质	42
2.3.4 格列吡嗪含量	43
2.3.5 利血平含量及有关物质	44
2.3.6 滴眼剂中尿囊素含量	45
2.3.7 维生素AD滴剂中微量VD3.....	45
2.3.8 头孢地尼中有关物质	46
2.4 液相色谱在抗生素分析中的应用	48
2.4.1 卡那霉素含量	48
2.4.2 庆大霉素C组分	49
2.5 液相色谱在生化药物中的分析应用	50

2.5.1 神经生长因子在不同色谱分离模式下结果的比较	50
2.5.2 蛋白溶液中人血白蛋白和EPO(重组人促红细胞生成素)的含量	52
2.5.3 单克隆抗体 (MAbs) 的各种影响因素比较	53
2.5.4 人血免疫球蛋白	54
2.5.5 四甘肽	55
2.6 液相色谱在中药及中成药成分及指纹分析中的应用	56
2.6.1 跌打丸含量	56
2.6.2 复方丹参片	56
2.6.3 麦味地黄丸含量	57
2.6.4 双黄连口服液含量	57
2.6.5 银杏制剂中银杏内酯	58
2.6.6 枸杞药材中甜菜碱含量	59
2.6.7 黄芪及复方中黄芪甲苷的含量	60
2.6.8 桅子指纹图谱	62
2.7 液相色谱在药用辅料中的分析应用	63
2.7.1 生物缓冲液中的盐酸胍与氯离子	63
2.7.2 蛋白药物中的聚山梨醇酯20	64
第三章 元素分析篇	65
3.1 原子吸收光谱仪 (AAS)	65
3.1.1 原子吸收光谱的基本原理	65
3.1.2 Thermo iCE 3000系列原子吸收光谱仪的技术特点	65
3.2 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES)	66
3.2.1 电感耦合等离子体发射光谱的基本原理	66
3.2.2 Thermo iCAP 7000系列电感耦合等离子体原子发射光谱仪的技术特点	66
3.3 电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS)	66
3.3.1 电感耦合等离子体质谱的基本原理	66
3.3.2 Thermo iCAP Q系列ICP-MS的技术特点	67
3.4 Thermo提供完整的元素分析解决方案	68
3.5 元素分析在化学药物分析中的应用	68
3.5.1 ICP-MS测定肝素钠样品多种重金属和贵金属含量	68
3.5.2 ICP-MS测定化学药物样品中多种重金属和贵金属含量	69
3.6 元素分析在中药分析中的应用	72
3.6.1 ICP-OES测定丹参与赤芍中重金属和多种微量元素含量	72
3.6.2 ICP-MS测定丹参与赤芍中重金属和多种微量元素含量	73
3.7 元素分析在药用辅料分析中的应用	75
3.7.1 石墨炉原子吸收法测量明胶空心胶囊中铬元素含量	75
第四章 气相色谱篇	77
4.1 气相色谱、气质联用原理	77

4.1.1 气相色谱基本原理	77
4.1.2 气相色谱的组成	77
4.1.3 气相色谱检测器	77
4.1.4 质谱仪的基本结构和功能	78
4.2 气相色谱, 气质联用技术的特点	78
4.2.1 TRACE 1300系列GC特点	78
4.2.2 ISQ单四级杆质谱特点	79
4.2.3 气相色谱自动进样器特点	80
4.3 气相色谱、气质联用在化药分析中的应用	81
4.3.1 HS-GC (顶空-气相色谱) 分析药物中的溶剂残留	81
4.3.2 GC/FID用于药物含量分析	84
4.3.3 GC/MS用于药物杂质分析	85
4.4 气相色谱、气质联用在中药分析中的应用	86
4.4.1 GC/ECD用于中药农残有机氯分析	86
4.4.2 GC/MS用于中药农残分析	87
4.4.3 HS-GC/MS (顶空-气质联用法) 检测中药中的挥发油	91
第五章 加速溶剂萃取篇	93
5.1 加速溶剂萃取原理	93
5.2 加速溶剂萃取仪的技术特点	94
5.2.1 大容量, 高灵活性以及高效率	94
5.2.2 以分钟计算的萃取时间	94
5.2.3 极大地节省溶剂	95
5.2.4 选择性提取	95
5.2.5 标准方法	96
5.3 加速溶剂提取在中药分析中的应用	96
5.3.1 人参中的人参皂苷	96
5.3.2 圣约翰草中金丝桃素以及金印草根中黄连素	98
5.3.3 中药中的挥发油	99
5.3.4 顺序萃取法萃取陈皮中的橙皮苷	100
5.3.5 在线净化分析检测黄连上清丸中的小檗碱	101
5.3.6 ASE-Gilson ASPEC全自动样品处理系统联用提取圣约翰草中的双蒽醌	102
5.3.7 中药中的农药残留	104
5.4 加速溶剂提取在化药分析中的应用	106
5.4.1 药片中的活性物质菲洛地平及其降解产物	106
5.4.2 药片中低含量的降解产物	106
5.4.3 膏药中的硝化甘油	107
5.5 加速溶剂提取在抗生素分析中的应用	108
5.5.1 发酵菌丝中的青霉素和头孢菌素C	108

第一章 离子色谱篇

1.1 离子色谱原理

离子色谱作为高效液相色谱的一种特殊类型，以分离含带电物质（离子）为主要目的，因此被称为离子色谱。离子色谱系统的构成和HPLC相同，由流动相传送部分、进样系统、分离系统、检测器及数据处理系统组成。其主要的分离原理为离子交换，即基于被分离对象与固定相上离子交换功能团的电荷吸附能力差异而被分离，而极性吸附能力的差异则作为次要的因素。其它分离机理还有离子排斥等。离子色谱所用流动相则为可离子化的酸或碱，因此泵及管路系统必须是耐高压且耐酸碱腐蚀的PEEK材料。离子具有导电能力，能检测导电能力变化的电导检测器则作为主要的检测手段，紫外、电化学等作为辅助手段。而为了降低电导检测的背景，提高灵敏度，离子色谱还含有差别于其他色谱系统的抑制器模块。

1.2 ICS系列离子色谱仪的技术特点

赛默飞离子色谱一直保持世界及国内的领先地位，正是基于其优良的品质和尖端的技术特点。

1.2.1 色谱柱技术

赛默飞公司开发的系列氢氧化物淋洗液分析柱，代表了离子色谱阴离子分析最新发展方向。具有背景低，噪音小，灵敏度高的特点，可用于梯度淋洗和二维离子色谱等。公司自主研发和生产的高效大容量色谱柱，可以满足各种条件下相关组分的分离分析要求。这些色谱柱具有柱效高，柱容量大等特点，可明显改善弱保留组分的分离，同时对于高基体浓度的样品中痕量组分的分离具有突出优势。它们可100%兼容反相有机溶剂，可适应pH范围0~14的样品，这大大拓宽离子色谱应用范围。此外还可提供专用分析柱进行糖、氨基酸、抗生素、核酸及蛋白质、肽的分析。

1.2.2 抑制器技术

在离子色谱流动系统中，待分析物以及淋洗液中的可离解物质均以离子状态存在，而电导检测器检测的就是淋洗液中所有离子的总电导率。为准确检测待测离子，需要使用抑制器将淋洗液中的反离子除去（以阴离子分析为例，系统中的阳离子就是以达到降低基线背景和噪音，提高检测组分响应值的效果）。正是由于抑制器的发明才使得使用离子色谱作为一种分析手段成为可能。

1975年由原戴安公司率先研制并生产出了抑制器，由此开创了现代离子色谱时代。时至今日公司已开发出了10代具有专利技术的抑制器，并一直引领着离子色谱抑制器技术的发展，代表着世界抑制器技术的最高水平。早期抑制柱与现在连续自动再生电解微膜抑制器技术的性能对比表格见表1-1。

公司可提供多种阴/阳离子膜抑制器，自动电解连续再生微膜抑制器抑制容量高，无需使用蠕动泵再生。另外具有平衡快，抗污染，重复性好，零维护和操作简单等特点。

表1-1 柱形抑制器与微膜抑制器的主要性能对比

	柱型抑制器	连续自动再生电解微膜抑制器
抑制机理	离子交换机理捕获反离子	利用电解水和离子选择透过膜原理
化学再生	需要额外的泵和手工配制再生液	不需要泵或再生液，自动电解连续再生

弱酸性阴离子回收率及稳定性	弱酸（如亚硝酸根）回收率较低，回收率稳定性较差	无论强酸性还是弱酸性阴离子均稳定保持着很高的回收率
阴离子抑制功能	仅限于碳酸盐体系，针对氢氧根体系的兼容性不佳。	可兼容碳酸盐体系、氢氧化物体系、硼酸盐体系等所有常见阴离子淋洗液
阳离子抑制功能	成功应用实例不多	适用于硫酸，甲烷磺酸等体系
抑制器容量及梯度兼容能力	需定期再生或更换。在进行梯度淋洗时，基线漂移比较明显	可实现连续自动再生功能；可以兼容梯度淋洗，改善基线漂移
抑制器死体积	较大，会造成色谱峰展宽。峰型较差	较小，柱后死体积小，峰型更加尖锐
检测结果重现性	抑制柱轮流使用，无法确保连续工作状态下保留时间和峰面积的重现性	无论标准溶液还是样品，均采用同一抑制器，重现性结果非常稳定
硫酸盐残留	需要使用硫酸进行在线或离线再生，因此抑制柱上会残留并释放约50 μg/L的硫酸盐，不适于痕量样品的分析	无需使用硫酸作为再生液，因此无硫酸残留问题

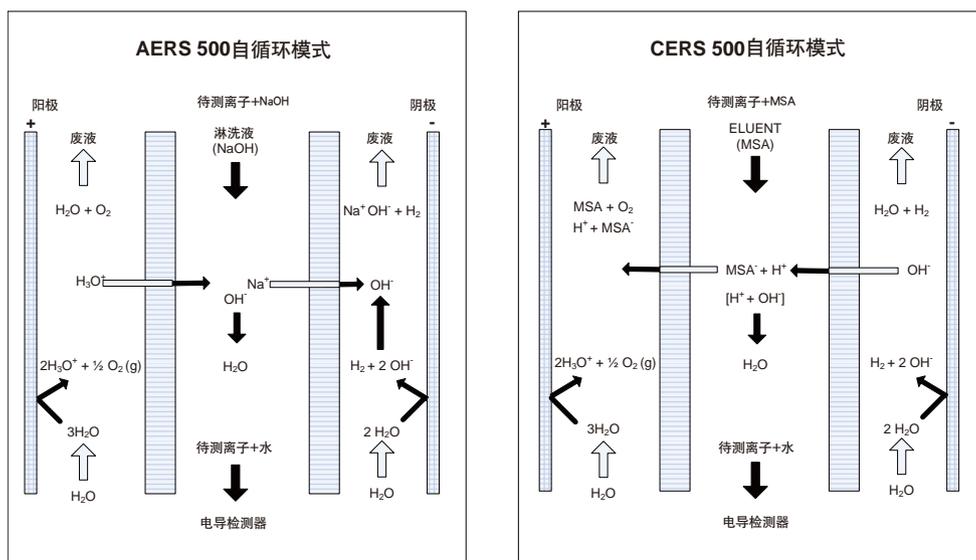
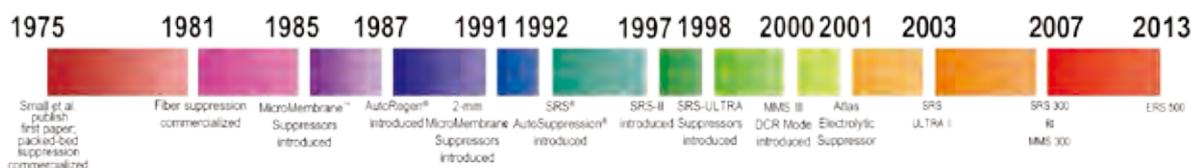


图1-1 自动电解连续再生微膜抑制器工作原理图

1.2.3 在线电解淋洗液发生器技术

在线电解淋洗液发生器采用简单的电解和膜交换原理，即可产生所需梯度的高纯淋洗液，堪称经典理论的崭新应用。

对于复杂样品的分析，浓度线性梯度可以在洗脱强保留物质的同时分离弱保留物质。线性梯度淋洗可得到比等度分离响应更高、峰宽更窄、更对称的色谱峰。

相比传统方法，使用在线电解淋洗液发生器不再需要购买价格昂贵的梯度泵，不需要手工配制淋洗液。免化

学试剂 (RFIC) 系统基于等度泵条件, 组成包括在线电解淋洗液发生器, 电解连续再生捕获装置和自动电解连续再生微膜抑制器。实验中仅使用高纯水, 而不需要人工配制任何化学试剂! RFIC为专利技术, 多次荣获国际大奖 (2002年匹兹堡银奖、2003年匹兹堡金奖、2005年匹兹堡银奖)。图1-2为RFIC的工作原理。目前可提供用于阴离子分离的KOH、NaOH、LiOH或Na₂CO₃以及阳离子分离的MSA淋洗液发生罐。

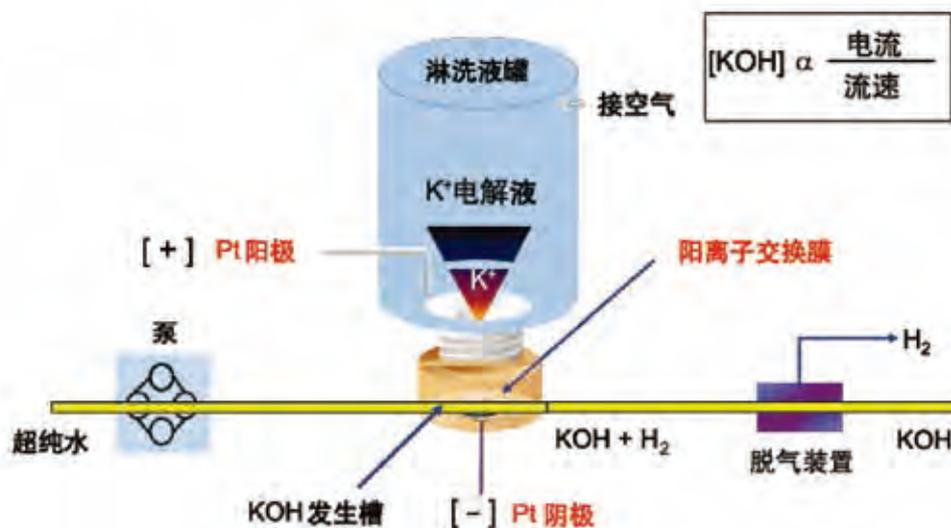


图1-2 RFIC的工作原理

1.2.4 毛细管离子色谱

毛细管型离子色谱为原戴安公司于2010年推向市场的全新离子色谱技术。其采用毛细管级别的泵, 流路中的所有设备都经过重新设计, 包括淋洗液发生系统、淋洗液纯化系统、抑制器系统和检测器系统, 具有极少的死体积。配合全新的毛细管色谱柱 (柱直径为0.4 mm), 只需要常规柱1/100的淋洗液 (即10 μL/min)、近1/100的进样量 (0.4 μL), 就能达到与原来常规分析柱相同的分离分析效果。其具有以下特点:

超低的流速, 一年耗水量仅为5.26L;

进样体积小 (0.4 μL), 非常适合于比较贵重、难以得到或有毒有害的样品进样;

可连续运行, 样品通量高, 稳定性好, 使用方便。

1.2.5 测定糖类物质的HPAEC-PAD技术

采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法 (High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD) 测定糖类, 是糖类分析技术的一次飞跃。常见糖类物质在水中的pKa一般在12~14之间, 而常见糖醛酸和糖胺的pKa也都小于7。当所处碱性溶液的pH值≥12时, 大多数糖类化合物均能部分或全部以阴离子的形式存在, 因而可以采用阴离子交换色谱柱, 以强碱性溶液为淋洗液进行分离。目前, 赛默飞提供的CarboPac系列阴离子交换糖分析柱有7种 (MA1, PA1, PA10, PA20, PA100, PA200, SA10), 提供广范围且高效的糖分离技术。糖类物质在强碱性条件和适当的施加电位下在金电极表面发生氧化还原反应, 通过测定过程所产生的电流变化而实现对其准确测定。Rocklin等于1998年提出了新的四电位波形, 大大提高了电极的使用寿命和长期稳定性, 使得糖检测技术向前又迈进一大步。

脉冲安培检测糖类方法相比于传统检测方法具有明显的优势: 灵敏度高, 0.1~1 pmol检测下限; 选择性高, 仅仅可以检测多羟基化合物; 直接检测, 无需衍生, 兼容梯度淋洗; 准确的分析, 好的重现性。

1.2.6 测定氨基酸的HPAEC-IPAD技术

高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培法 (High Performance Anion Exchange Chromatography-Integrated Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-IPAD) 是一种直接测定氨基酸的方法。因氨基酸具有两性离子结构, 在碱性介质中, 以羧基阴离子状态存在, 这是氨基酸使用离子交换分析法的基础。在pH12~13溶液中, 在金工作电极和参比电极之间施加一个较高的电位, 氨基酸的氨基在金电极表面被氧化。与脉冲安培相似, 积分脉冲安培法中加到工作电极上的也是一种自动重复的电位对时间的脉冲电位波形, 其不同之处是采样时的电位不是恒定的, 而是在高一低值之间扫描。Clarke等人经过对检测氨基酸的施加电位波形的优化克服了基线漂移, 改进了线性、信噪比和长时间的重复性, 而不损伤金工作电极。

离子色谱法分析氨基酸, 无需衍生, 可直接分离检测氨基酸。此外检测灵敏度高, 对氨基酸的检出限达到 pmol~fmol级。

1.3 离子色谱在化学药物分析中的应用

1.3.1 药物对离子和药物赋形剂

药品的质量监督在关注健康的现代社会越来越重要。对于含有带电基团的药物分析, 例如广泛使用的磺胺类药物, 或者含有带电配位基团或辅料的药物例如氢溴酸右美沙芬、盐酸头孢吡肟等, 使用的反相色谱方法, 通常需要衍生化或在流动相中添加离子对试剂, 提供检测发色团和增加反相色谱行为的保留, 操作繁琐。离子色谱是广泛用于测定带电粒子(离子)的分析方法, 为这类药物提供了可靠的手段。

辅料等对离子大多是阴离子, 常见有盐酸, 硫酸, 硝酸, 磷酸, 乙酸, 甲烷磺酸, 氢溴酸, 丙酸, 马来酸, 柠檬酸。含有这些对离子的药物均可以采用离子色谱法直接测定阴离子, 同时也可对药物进行间接定量。

色谱柱: IonPac AS11, 13 μ m, 250 \times 4 mm,

P/N: 044076;

IonPac AG11, 13 μ m, 50 \times 4 mm,

P/N: 044078;

柱温: 30 $^{\circ}$ C;

淋洗液条件见表1-2;

流速: 2.0 mL/min;

进样量: 25 μ L;

检测方式: 抑制型电导检测, 阴离子电解再生抑制器, 自循环模式, 抑制电流 190 mA;

常见阴离子及有机酸分离情况见图1-3。

表1-2 梯度淋洗液条件

时间/min	KOH mmol/L
0	0.5
2.5	0.5
6	5
18	38.3

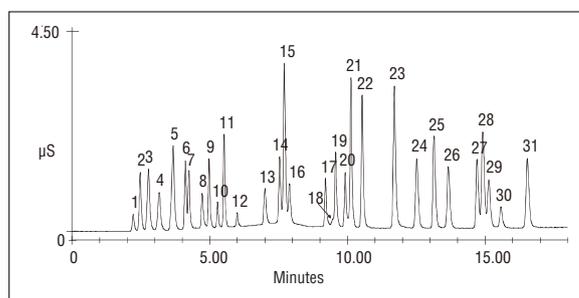


图1-3 常见阴离子和有机酸的分离

色谱峰: 1.奎尼酸; 2.氟; 3.乙酸; 4.丙酸; 5.甲酸; 6.甲基磺酸; 7.丙酮酸; 8.戊酸; 9.一氯乙酸; 10.溴酸; 11.氯; 12.亚硝酸; 13.三氟乙酸; 14.溴; 15.硝酸; 16.氯酸; 17.亚硒酸; 18.碳酸; 19.丙二酸; 20.顺丁烯二酸; 21.硫酸; 22.草酸; 23.钨酸; 24.邻苯二甲酸; 25.磷酸; 26.铬酸; 27.柠檬酸(枸橼酸); 28.丙三羧酸; 29.异柠檬酸; 30.顺乌头酸; 31.反乌头酸

1.3.2 阿伦磷酸钠有关物质

阿伦磷酸钠是氨基二磷酸盐，能抑制破骨细胞活性，并通过成骨细胞间接起抑制骨吸收作用，为骨代谢调节剂。临床上主要用于妇女骨质疏松症的治疗。

美国药典（USP）采用高效液相离子排斥色谱法检测阿伦磷酸及其有关物质，需要衍生化增加发色团进行紫外检测，操作繁琐且该方法不能用于氟、氯、亚硝酸等无机杂质的检测。中国药典尚无检测方法收录，国内也未见报道。本方法使用离子色谱法对其无机阴离子有关物质进行测定。

仪器：离子色谱仪带电导检测器；

色谱柱：IonPac AS11，13 μ m，250 \times 4mm，

P/N：044076；

IonPac AG11，13 μ m，50 \times 4mm，

P/N：044078；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液条件见表1-3；

流速：1.0mL/min；

进样量：25 μ L；

检测方式：抑制型电导检测，阴离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流75mA；

谱图见图1-4。

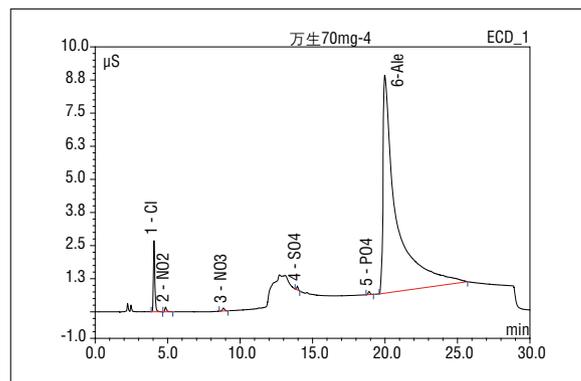


图1-4 阿伦磷酸中有关物质色谱图（阴离子）

表1-3 梯度淋洗液条件

时间/min	KOH mmol/L
0	3
6	3
23	30
26	30
30	3

1.3.3 膦甲酸钠注射液中膦甲酸钠含量及有关物质

膦甲酸钠（Foscarnet Sodium）是一种焦磷酸盐类物质，属非核苷类抗病毒药物，能对抗多种RNA和DNA病毒，包括疱疹病毒、巨细胞病毒和免疫缺陷病毒，目前临床上用于治疗艾滋病（AIDS）患者的巨细胞病毒性视网膜炎和单纯疱疹病毒性皮肤黏膜感染，对耐阿昔洛韦的免疫功能损害患者有效。

美国药典（USP34）规定膦甲酸钠采用电位滴定法测定，有关物质磷酸盐和亚磷酸盐采用液相色谱法测定。国家药品标准WS1-（X-178）-2004Z规定膦甲酸钠采用光度法测定，膦甲酸钠收录于中国药典2010版增补本新增品种，其含量测定采用非水滴定法，有关物质则采用液相色谱法，色谱柱使用离子交换柱。另有文献报道采用高效液相色谱法测定膦甲酸钠。本法采用离子色谱法可以同时测定注射液中膦甲酸钠及其有关物质磷酸盐和亚磷酸盐。

仪器：离子色谱仪带电导检测器；

色谱柱：IonPac AS18，7.5 μ m，250 \times 4mm，

P/N：060549；

IonPac AG18，13 μ m，50 \times 4mm，

P/N：060551；

柱温：30℃；
淋洗液条件见表1-4；
流速：1.0mL/min；
进样量：25μL；
检测方式：抑制型电导检测，阴离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流100mA；
谱图见图1-5。

表1-4 梯度淋洗液条件

时间/min	KOH mmol/L
0	22
9	22
12	35
25	35
25.1	22
32	22

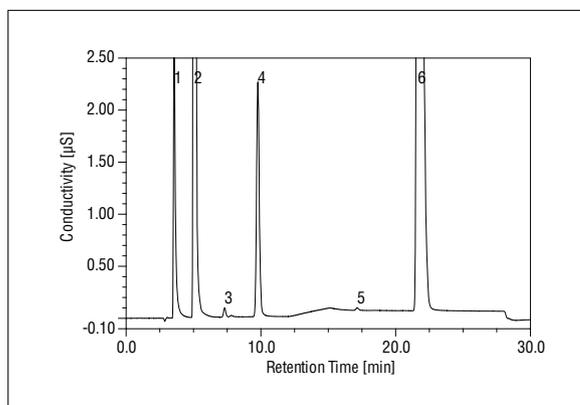


图1-5 磷甲酸钠注射液含量测试及有关物质色谱图
色谱峰：1 未知峰；2 氯离子；3 亚磷酸根；4 硫酸根；5 磷酸根；6 磷甲酸钠

1.3.4 氯磷酸二钠含量及其有关物质

氯磷酸二钠（Clodronate Disodium）又名氯屈磷酸二钠，化学名二氯亚甲基二磷酸二钠，为第二代双磷酸类药物，用于治疗骨质疏松症，变形性关节炎，恶性肿瘤骨转移引起的高钙血症和骨痛症等，其作用效果比第一代双磷酸类药物依替磷酸钠强十倍。

氯屈磷酸二钠溶于水生成带负电荷离子，无明显的紫外吸收。由于其水溶性和带电性，用反相HPLC和GC检测，都必须进行柱前衍生。而络合滴定的选择性有限。而根据其带电性，使用离子交换色谱分离则有很大的优势，因氯磷酸二钠本身就带负电荷，可以用电导检测器检测，检测限为0.04 μg/mL。氯磷酸二钠的含量测试和有关物质分析方法在2010版药典修订为使用离子色谱法检测。主成分及有关物质分离参见谱图1-6和1-7。

(1) 含量测定分析条件：

仪器：离子色谱仪带电导检测器
色谱柱：IonPac AS11-HC，9.0μm，250×4mm，
P/N：052960；
IonPac AG11-HC，9.0μm，50×4mm，
P/N：052962；

柱温：30℃；
淋洗液：45mmol/L KOH，等度淋洗；
流速：1.2mL/min；
进样量：25μL；

检测方式：抑制型电导检测，阴离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流134mA；

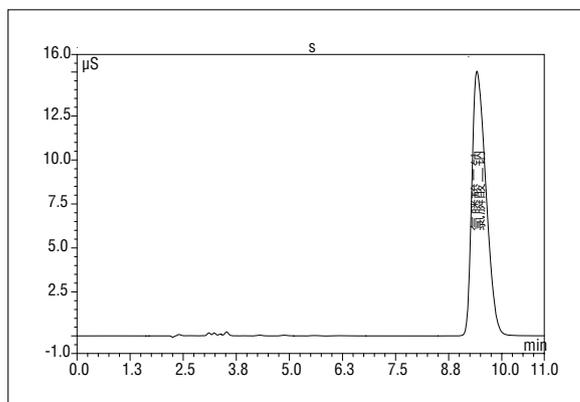


图1-6 氯磷酸二钠含量测定色谱图

(2) 有关物质分析条件:

仪器: 离子色谱仪带电导检测器;
 色谱柱: IonPac AS11-HC, 9.0 μ m, 250 \times 4mm,
 P/N: 052960;
 IonPac AG11-HC, 9.0 μ m, 50 \times 4mm,
 P/N: 052962;
 柱温: 30 $^{\circ}$ C;
 淋洗液条件: 带CR-ATC的EGC产生KOH, 淋洗液条件见表1-5;
 流速: 1.2mL/min;
 进样量: 25 μ L;
 检测方式: 抑制型电导检测, 阴离子电解再生抑制器, 自循环模式, 抑制电流149mA;

表1-5 梯度淋洗液条件

时间/min	KOH mmol/L
0	20
20	50
24	50
25	20
30	20

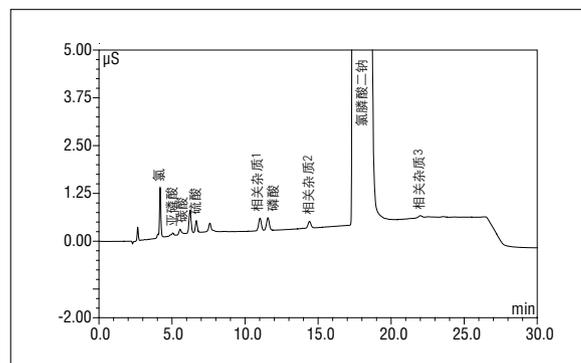


图1-7 氯磷酸和其有关物质分离色谱图

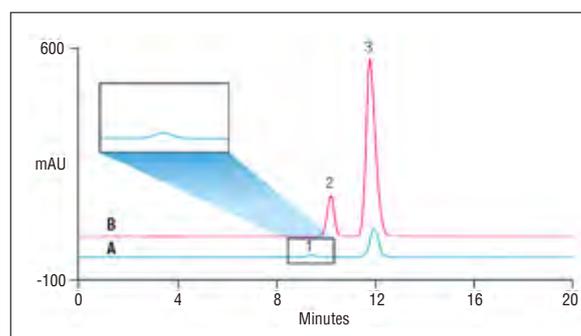
1.3.5 利塞磷酸钠含量及其有关物质

利塞磷酸钠 (Risedronate sodium), 为第三代双膦酸类药物, 用于治疗变形性骨炎和骨质疏松症, 主要作用为抑制破骨细胞形成, 附着于骨表面影响破骨细胞活性, 促进破骨细胞凋亡。其具有强大的抗骨吸收作用, 效果是一代双膦酸类药物的5000倍。

利塞磷酸钠因其结构中存在两个极性的磷酸基团, 在水中以离子形式存在, 在反相高效液相色谱柱上难以保留, 需使用离子对试剂。此外利塞磷酸的结构具有金属离子螯合作用, 在反相液相色谱中峰形较差, 不得不添加如EDTA等螯合试剂, 抑制利塞磷酸与金属的螯合。因此, 利塞磷酸分离采用离子色谱法更为合适。美国药典国家处方集 (USP-NF) 采用离子色谱法对利塞磷酸钠进行含量和部分有关物质测定, 中国药典2010版尚无收录。

仪器: 离子色谱仪带电导检测器;
 色谱柱: IonPac AS7, 10 μ m, 250 \times 4mm,
 P/N: 035393;
 IonPac AG7, 10 μ m, 50 \times 4mm,
 P/N: 035394;
 柱温: 25 $^{\circ}$ C;
 淋洗液: 4.8mmol/L EDTA, 氢氧化钠调pH 9.5 \pm 0.1,
 等度淋洗;

流速: 0.8mL/min;
 进样量: 20 μ L;
 检测方式: 紫外检测, 263nm;
 谱图见图1-8。

图1-8 利塞磷酸钠及其有关物质色谱图
 色谱峰: 1. 有关物质C; 2. 有关物质A; 3. 利塞磷酸

1.3.6 帕米磷酸二钠注射液中帕米磷酸的含量

帕米磷酸二钠 (Pamidronate Disodium) 是一种双磷酸类骨吸收抑制剂, 临床上广泛应用于治疗骨质疏松症、肿瘤并发的高钙血症和变形性骨炎。帕米磷酸二钠注射液为帕米磷酸二钠加适量甘露醇制成的灭菌水溶液。

目前测定帕米磷酸二钠及其制剂的方法主要有高效液相色谱荧光检测法、高效液相色谱蒸发光散射法和高效液相色谱示差折光检测法, 由于荧光检测需要柱前衍生, 步骤繁琐; 蒸发光检测需要用到离子对试剂, 对实验条件要求较高, 重现性较差; 示差折光检测的灵敏度较低。帕米磷酸含有一个氨基和两个磷酸基团, 为两性离子, 通过调节pH值抑制其中一方向电离, 可以通过离子色谱进行分离。而中性情况下其带负电荷较多, 可以通过离子色谱法电导检测器进行检测。中国药典2010版第二部收载检测方法为离子色谱法。

仪器: 离子色谱仪带电导检测器;

色谱柱: IonPac AS22, 6.5 μ m, 250 \times 2 mm,

P/N: 064137;

IonPac AG22, 6.5 μ m, 50 \times 2 mm,

P/N: 064135;

柱温: 30 $^{\circ}$ C;

淋洗液: 3 mmol/L草酸, 等度淋洗;

流速: 1.2 mL/min;

进样量: 25 μ L;

检测方式: 非抑制型电导检测;

谱图见1-9。

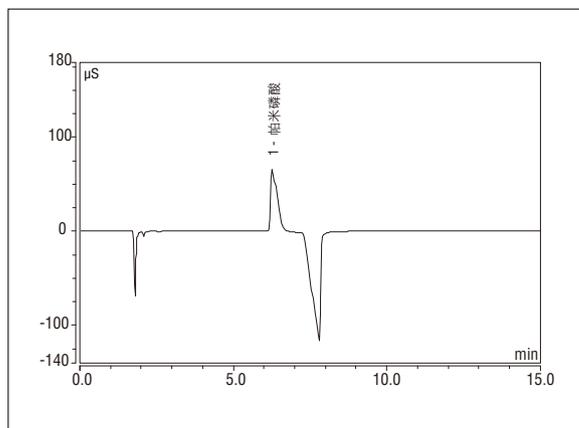


图1-9 帕米磷酸二钠含量测定色谱图

1.3.7 托吡酯中硫酸根和氨基磺酸

托吡酯是一种由氨基磺酸酯取代单糖的新型抗癫痫药物 (第二代)。常温下稳定, 在高温或高湿环境下则会降解生成一些杂质, 氨基磺酸盐和硫酸盐等。而通过对无机产物氨基磺酸盐和硫酸盐的检测则可有效监测托吡酯的降解情况。

美国药典 (USP) 采用离子色谱法抑制型电导检测托吡酯中的氨基磺酸盐和硫酸盐, 但在原USP色谱条件下需要手动配制氢氧化钠淋洗液, 存在一些如基线漂移, 保留时间的重现性不好等问题。中国药典尚无检测方法收载。本方法符合USP<621>色谱条件调整, 使得淋洗液可以通过淋洗液发生器自动生成, 避免手动配制带来的问题。

仪器: 离子色谱仪带电导检测器

色谱柱: IonPac AS11-HC, 9 μ m, 250 \times 4 mm,

P/N: 052960;

IonPac AG11-HC, 9 μ m, 50 \times 4 mm,

P/N: 052962;

柱温: 30 $^{\circ}$ C;

淋洗液条件: 带CR-ATC的EGC产生KOH, 淋洗液条件见表1-6;

流速: 1.5 mL/min;

进样量: 25 μ L;

表1-6 梯度淋洗液条件

时间/min	KOH mmol/L
0	2.5
7	2.5
15	60
20	60
20.1	2.5
25	2.5

检测方式：抑制型电导检测，阴离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流223 mA；
谱图见1-10。

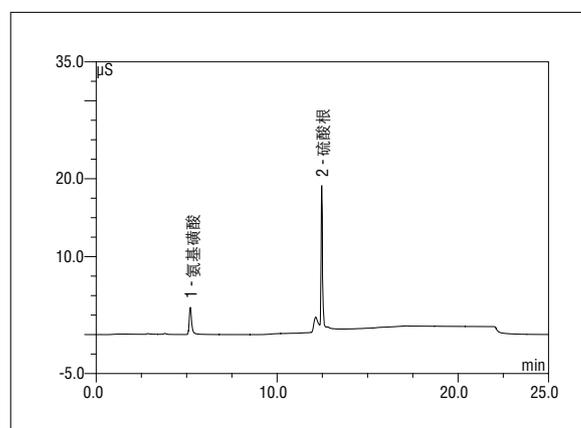


图1-10 托吡酯中氨基磺酸盐和硫酸盐色谱图

1.3.8 1,4-丁烷二磺酸腺苷蛋氨酸中的1,4-丁烷二磺酸

1,4-丁烷二磺酸腺苷蛋氨酸用于治疗肝硬化前和肝硬化所致肝内胆汁淤积。腺苷蛋氨酸是人体组织和体液中普遍存在的一种生理活性分子，作为甲基供体（转甲基作用）和生理性巯基化合物的前体参与体内重要的生化反应。在肝内，通过使质膜磷脂甲基化而调节肝脏细胞膜的流动性，且可通过转硫基反应促进解毒过程中硫化产物的合成，防止肝内胆汁淤积和造成胰腺炎。

1,4-丁烷二磺酸是腺苷蛋氨酸盐反离子，对腺苷蛋氨酸起稳定作用，目前美国药典（USP）和中国药典对丁烷二磺酸腺苷蛋氨酸均无收载。有文献报道采用碳酸盐淋洗液体系阴离子色谱法测试1,4-丁烷二磺酸，但碳酸根淋洗液相对背景电导较高，本方法则使用氢氧根体系离子色谱抑制型电导检测法测试1,4-丁烷二磺酸。

仪器：离子色谱仪带电导检测器

色谱柱：IonPac AS11-HC，9 μm，250 × 4 mm，

P/N: 052960；

IonPac AG11-HC，9 μm，50 × 4 mm，

P/N: 052962；

柱温：30 ℃；

淋洗液：30 mmol/L NaOH，等度淋洗；

流速：1.0 mL/min；

进样量：25 μL；

检测方式：抑制型电导检测，阴离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流75 mA；

谱图见1-11。

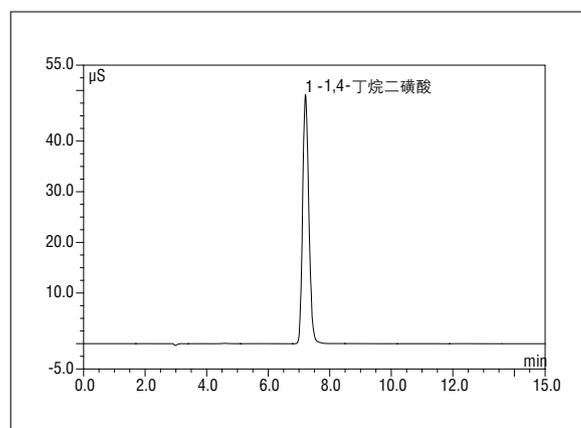


图1-11 样品中1,4-丁烷二磺酸色谱图

1.3.9 在线基体去除直接进样分析厄贝沙坦中的叠氮根离子

厄贝沙坦用于治疗原发性高血压。其在生产过程中使用了2-丁基-3-[(2'-氰基联苯-4-基)甲基]-1,3-二氮杂螺[4,4]壬-1-烯-4-酮与叠氮化钠。叠氮化物和氰化物相似，对细胞色素氧化酶和其它酶有抑制作用，并能使体内氧合血红蛋白形成受阻，可引起中毒死亡。在酸性条件下可释放叠氮酸气体，吸入中毒后出现眩晕、虚弱无力、视觉模糊、呼吸困难、昏厥感、血压降低、心动过缓等。因此建立快速、灵敏、准确、可靠的药物中叠氮根分析方法十分必要。

美国药典（USP）采用离子色谱法抑制型电导检测厄贝沙坦中的叠氮根，而中国药典则尚无叠氮根检查规定。已见报道叠氮根分析方法有：容量法，分光光谱法，气相色谱法，高效液相色谱法和离子色谱法等。通常情况下容量分析法和分光光谱分析法干扰严重，不适合药物分析，特别是痕量叠氮根。GC法和HPLC法则要求对样品进行特定的预处理，而采用碳酸钠进行洗脱的IC法，必须要对样品作蒸馏预处理，影响测试的灵敏度，同时增加分析的时间和费用。使用氢氧根离子色谱分析灵敏度比用碳酸钠洗脱系统有明显的提高。此外，本方法使用了阀切换技术在富集待测的叠氮化物的同时去除不溶于水的厄贝沙坦，样品溶解在有机溶剂中即可直接进样，操作简单。

仪器：离子色谱仪带电导检测器

色谱柱：IonPac AS18, 7.5 μ m, 250 \times 4mm,

P/N: 060549;

IonPac AG18, 13 μ m, 50 \times 4mm,

P/N: 060551;

富集柱：IonPac AG11-HC, 9 μ m, 50 \times 4mm,

P/N: 052962;

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液条件：带CR-ATC的EGC产生KOH，淋洗液条件见表1-7；

流速：1.0mL/min；

进样量：200 μ L；

检测方式：抑制型电导检测，阴离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流100mA；

谱图见1-12。

表1-7

时间/min	KOH mmol/L
0	7
20	7
25	45
30	7

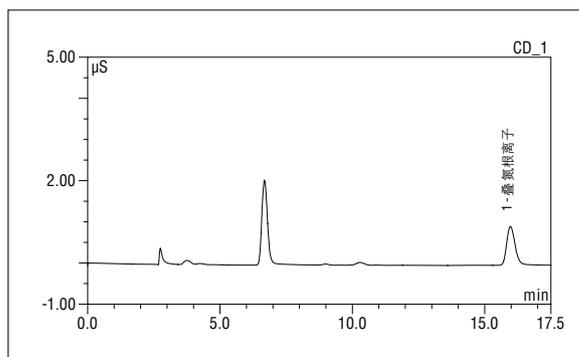


图1-12 厄贝沙坦中叠氮根色谱图

1.3.10 氯化乌拉胆碱中乌拉胆碱的含量

氯化乌拉胆碱，又称氯贝胆碱，是由带正电的氨甲酰胆碱与带负电的氯离子形成的盐，其为季铵盐类的拟副交感神经药，主要用于治疗手术后腹胀、尿潴留以及其他原因所致的胃肠道或膀胱功能异常。

乌拉胆碱国内尚无分析方法报道。美国药典（USP）方法24 NF 19（第230页）建议，乌拉胆碱的分析使用离子色谱法代替重量分析法。现行美国药典（USP）35采用离子色谱法对乌拉胆碱进行含量测定和有关物质检测，但淋洗液中需添加乙腈作为改良剂，且因为手动配制而易引入人为操作误差。本方法做出两项改进，一方面淋洗液无需添加有机试剂，甲基磺酸（MSA）淋洗液由淋洗液发生器电解在线产生，自动化程度高，重现性好，且方便。另一方面，USP采用的50 μ L进样体积检测1000mg/L的样品，会造成柱负担过重，可降为25 μ L进样。使用阴离子分离柱，抑制型电导检测，可以实现常规阳离子、乌拉胆碱以及其分解产物2-HPTA（2-羟基丙基三甲基胺）的同时分离测定。

仪器：离子色谱仪带电导检测器

色谱柱：IonPac CS14, 8.0 μ m, 250 \times 4mm, P/N: 044123;

IonPac CG14, 8.0 μ m, 50 \times 4mm, P/N: 044124;

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液：20mmol/L MSA，等度淋洗；

流速：1.0mL/min；

进样量：25 μ L；
 检测方式：抑制型电导检测，阳离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流67 mA；
 谱图见1-13。

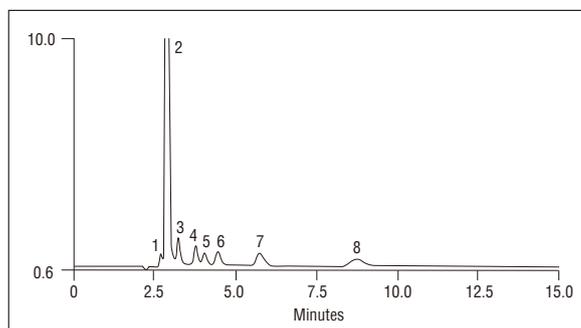


图1-13 乌拉胆碱及其降解产物2-HPTA和常见阳离子分离色谱图

色谱峰：1.锂；2.钠；3.铵；4.钾；5.镁；6.钙；
 7. 2-羟基丙基三甲基胺；8. 乌拉胆碱

1.3.11 卡巴胆碱注射液中卡巴胆碱的含量及杂质

卡巴胆碱为M、N胆碱受体激动药，是人工合成的拟胆碱药，具有双重缩瞳作用：可直接作用瞳孔括约肌上的胆碱受体，产生缩瞳效果；同时有抗胆碱酯酶作用，能维持长时间的缩瞳效果。

卡巴胆碱注射液为中国药典收载品种，目前使用的含量测定方法为紫外分光光度法，该方法需对卡巴胆碱衍生后才能测定，操作繁琐，易引入误差。本实验使用离子色谱法对卡巴胆碱进行测定，灵敏度高，重现性好，且该色谱条件可同时分离测定卡巴胆碱注射液中的杂质胆碱和乙酰胆碱。

仪器：离子色谱仪带电导检测器；

色谱柱：IonPac CS17，7.0 μ m，250 \times 4mm，

P/N：060557；

IonPac CG17，7.0 μ m，50 \times 4mm，

P/N：060560；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液：5 mmol/L MSA，等度淋洗；

流速：1.0 mL/min；

进样量：10 μ L；

检测方式：抑制型电导检测，阳离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流67 mA；

分离色谱图见1-14。

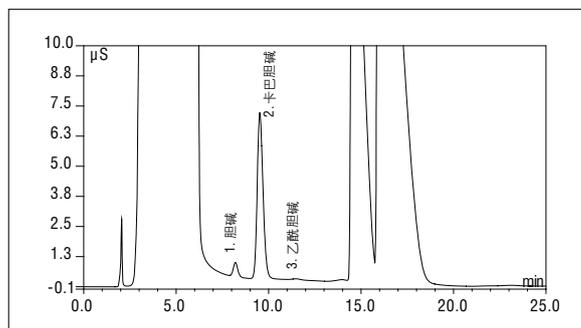


图1-14 卡巴胆碱及其制剂中杂质胆碱和乙酰胆碱的分离色谱图

1.3.12 合成药物中吗啉和乙基吗啉

吗啉又称吗啡林，常温下是一种无色油状液体，是一种重要的医药中间体，可用于生产吗啉胍、病毒灵、布洛芬、咳必定、萘普生、二氯苯胺、苯乙酸钠等多种重要药物。乙基吗啉是吗啉的衍生物，也用于医药合成中间体。

由于吗啉及其衍生物呈一定极性和碱性，使用反相高效液相色谱法存在不易保留，出峰时间过早等问题，而使用气相色谱法则存在前处理和色谱柱寿命等问题。吗啉和乙基吗啉在酸性溶液中生成带正电荷的离子，水溶性强，适合离子色谱法分离。因其结构无明显的紫外吸收，而其具有带电性而可使用电导检测器检测。

仪器：离子色谱仪带电导检测器；
 色谱柱：IonPac CS17, 7.0 μ m, 250 \times 4mm,
 P/N: 060557;
 IonPac CG17, 7.0 μ m, 50 \times 4mm,
 P/N: 060560;
 柱温：40 $^{\circ}$ C；
 淋洗液条件见表1-8；
 流速：1.2 mL/min；
 进样量：25 μ L；
 检测方式：抑制型电导检测，阳离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流67 mA；

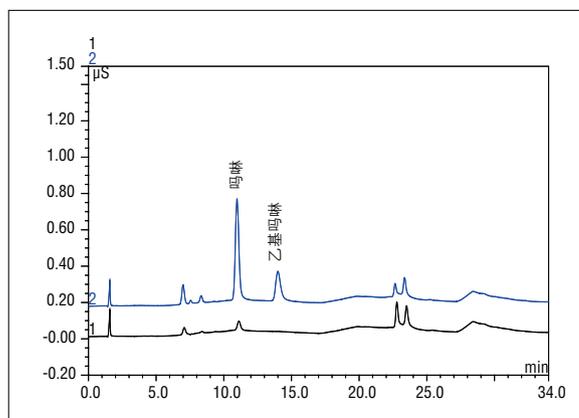


图1-15 吗啉和乙基吗啉的分离色谱图
 1. 吗啉样品；2. 吗啉样品加标。

表1-8

时间 /min	A DI water /%	B 100 mmol/L MSA /%
0	97	3
3.5	97	3
12	95	5
15	95	5
20	91	9
25	91	9
30	60	40
34	60	40
35	0	100
37	0	100
38	97	3
45	97	3

1.3.13 盐酸二甲双胍中二甲双胍的含量及其有关物质二甲胺

盐酸二甲双胍 (Metformin hydrochloride) 是广泛应用治疗2型糖尿病的口服药物，尤其是肥胖和伴高胰岛素血症者。二甲双胍抑制肝糖元异生，减少葡萄糖的来源，增强组织对葡萄糖的摄取和利用，增强胰岛素敏感性，抑制胰高血糖素的释放。它对胰岛功能正常或已丧失的糖尿病人均有降血糖作用，但不降低正常人的血糖。

二甲双胍的合成是通过二甲胺和双氰胺反应，二甲胺在弱酸性条件下可以转化为致癌的二甲基亚硝胺，因此需要检测二甲胺的残留。美国药典 (USP) 和中国药典2010版均采用非水滴定法作为原料含量测定方法，液相色谱法作为有关物质检测方法。多篇文献报道可使用离子对试剂的高效液相色谱法。二甲双胍为多氨基碱性化合物，极性较强，在酸性溶液中生成带正电荷的离子，也适合用离子色谱法分析。

(1) 二甲双胍测定条件

仪器：离子色谱仪带紫外检测器

色谱柱: IonPac CS17, 7 μ m, 250 \times 4mm,
P/N: 060557;
IonPac CG17, 7 μ m, 50 \times 4mm,
P/N: 060560;

柱温: 30 $^{\circ}$ C;

淋洗液: 7mmol/L 甲基磺酸, 等度淋洗;

流速: 1.0mL/min;

进样量: 25 μ L;

检测方式: 紫外检测;

谱图见1-16。

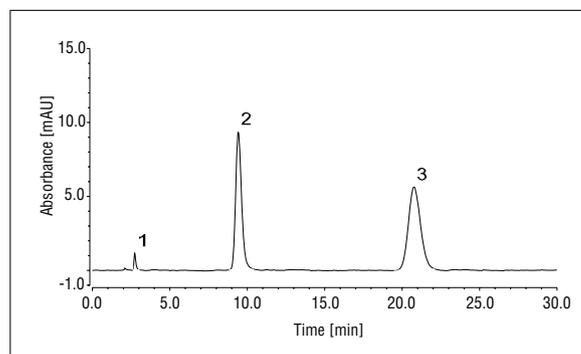


图1-16 盐酸二甲双胍对照品及有关物质色谱图

1. 双氰胺; 2. 三聚氰胺; 3. 盐酸二甲双胍

(2) 二甲胺测定条件

色谱柱: IonPac CS19, 8 μ m, 250 \times 4mm,
P/N: 076026;
IonPac CG19, 8 μ m, 50 \times 4mm,
P/N: 076027;

柱温: 40 $^{\circ}$ C;

淋洗液条件参见表1-9;

流速: 1.0mL/min;

进样量: 20 μ L;

检测方式: 抑制型电导检测, 阳离子电解再生抑制器, 自循环模式, 抑制电流120mA;

二甲双胍中二甲胺的分离谱图见图1-17。

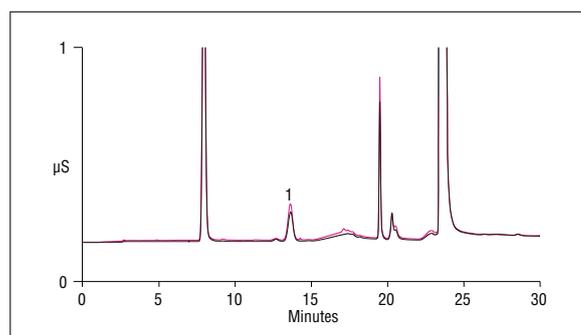


图1-17 药物二甲双胍中的二甲胺色谱图

表1-9

时间/min	MSA mmol/L
-7	2
12	2
16	12
18	12
20	40
30	40

1.3.14 盐酸帕洛诺司琼的有关物质

帕洛诺司琼，是人工合成一种抑制恶心呕吐药，属于新型高选择性、高亲和性5-HT₃受体拮抗剂。临床上用于治疗由中、重度致吐性化疗药物引起的急性、延迟性恶心和呕吐。(S)-(-)-3-氨基奎宁环胺双盐酸盐（KN）是其合成中间体。

美国药典和中国药典尚无检测方法收载，对帕洛诺司琼的质量控制有文献报道采用高效液相色谱法测试，但无法检测(S)-(-)-3-氨基奎宁环胺双盐酸盐中间体。(S)-(-)-3-氨基奎宁环胺双盐酸盐为极性阳离子，易溶于水，可使用离子色谱法测定。

仪器：离子色谱仪带电导检测器

色谱柱：IonPac CS17，7.0μm，250×4mm，

P/N：060557；

IonPac CG17，7.0μm，50×4mm，

P/N：060560；

柱温：30℃；

淋洗液：20mmol/L MSA，等度淋洗；

流速：1.0mL/min；

进样量：25μL；

检测方式：抑制型电导检测，阳离子电解再生抑制器，自循环模式，抑制电流59mA；

谱图见1-18。

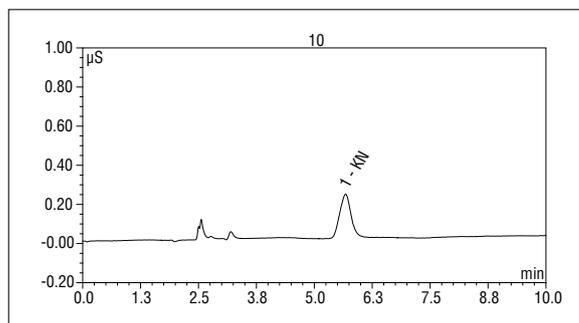


图1-18 帕洛诺司琼中起始原料
(S)-(-)-3-氨基奎宁环胺双盐酸盐色谱图

1.3.15 果糖二磷酸有关物质

果糖二磷酸，又称1，6-二磷酸果糖，是存在于人体内的细胞代谢物，能调节葡萄糖代谢中多种酶的活性，改善细胞缺氧、缺血的状态，有利于受损肝细胞的恢复。据报道，外源性的果糖二磷酸，能够通过激活磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的活性，使细胞内三磷酸腺苷和磷酸肌酸的浓度增加，促进钾离子内流，有益于缺血、缺氧状态下细胞的能量代谢和葡萄糖的利用，从而减轻缺血心肌的损伤。临床上常用于心肌缺血、心绞痛、脑梗塞的辅助治疗，常见胶囊和注射液两种剂型。

果糖二磷酸有关物质主要有果糖、磷酸果糖、6-磷酸葡萄糖，这几种化合物极性较大，没有紫外吸收，用常规液相方法无法检测。药品原标准使用薄层法检测的有关物质，不易重复。在离子色谱上糖和磷酸化糖有较好分离，且在安培检测器上的响应很高，可达到μg/L级别，因此可用离子色谱分离安培检测。该方法重复性和灵敏度都明显好于薄层色谱法。

仪器：离子色谱仪带安培检测器

色谱柱：Carbopac PA20，6.5μm，150×3mm，

P/N：060142；

柱温：30℃；

淋洗液条件见表1-10；

流速：0.4mL/min；

表1-10

时间 min	A DI water %	B 250mmol/L NaOH %	C 1000mmol/L NaOAc %
0	97	3	0
14	97	3	0
20	85	15	0
35	70	15	15
40	25	15	60
45.1	20	80	0
47.1	20	80	0
47.2	97	3	0
55	97	3	0

进样量：20 μ L；
 检测方式：脉冲安培检测（PAD），Au电极，AgCl参
 比模式，糖四电位波形；
 谱图见1-19。

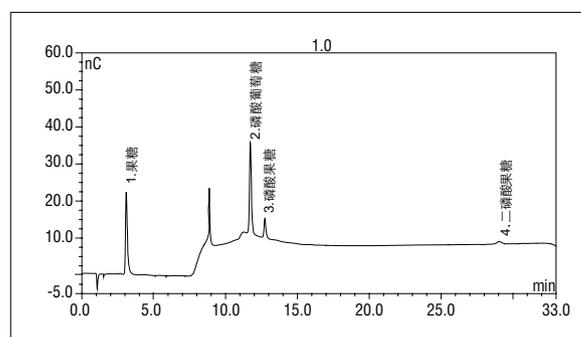


图1-19 果糖二磷酸及有关物质分离色谱图

1.3.16 米格列醇的含量及其有关物质

米格列醇是德国拜耳制药公司上世纪80年代初研究开发的一种新型降糖药，属于 α -葡萄糖苷酶抑制剂。米格列醇的结构与葡萄糖相似，能够可逆地竞争性抑制假单糖 α -葡萄糖苷酶，对 α -糖苷酶如蔗糖酶、葡萄糖淀粉酶、麦芽糖酶、异麦芽糖酶、海藻糖酶、乳糖酶都有抑制作用。由于作用机制为可逆竞争性抑制，因而该化合物并不完全抑制葡萄糖的吸收，而是延缓了葡萄糖的吸收过程，使消化道各区域对葡萄糖的吸收更平均，从而平缓了餐后碳水化合物消化吸收所产生的尖锐血糖峰值。

米格列醇一般是以葡萄糖为原料，经胺化后，再经微生物氧化和氢化后生产N-取代的脱氧野尻霉素，最后氧化生成米格列醇，该过程中会引入较多杂质。米格列醇极性较大，本身无紫外吸收，且其副产物结构中均含有羟基结构，符合电化学检测的要求，因此开发了离子色谱分离脉冲安培检测的方法。

仪器：离子色谱仪带安培检测器；

色谱柱：Carbopac MA1 Analytical, 7.5 μ m, 250 \times 4mm,

P/N: 044066；

Carbopac MA1 Guard, 7.5 μ m, 50 \times 4mm,

P/N: 044067；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液条件：60% 1 mol/L NaOH-40% DI water，等度

淋洗；流速：0.4 mL/min；

进样量：50 μ L；

检测方式：脉冲安培检测（PAD），Au电极，AgCl参

比模式，糖四电位波形；

谱图见1-20。

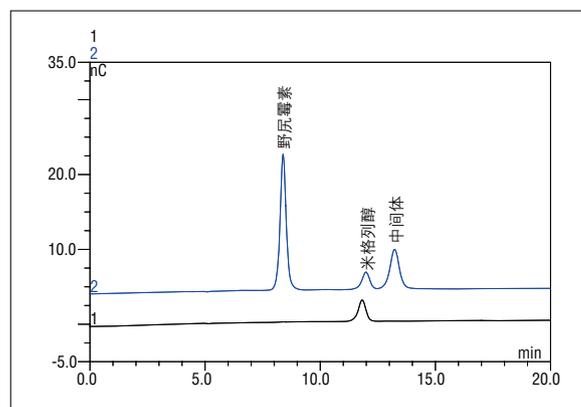


图1-20 米格列醇和其有关物质分离色谱图

1. 米格列醇样品；2. 米格列醇样品加杂质标准

1.4 离子色谱在抗生素分析中的应用

氨基糖苷类抗生素是临床常用的一类抗生素，其结构都是由多元环己醇和氨基糖两部分缩合而成。氨基糖苷类抗生素的水溶性较大，代谢时主要以原形由肾脏排泄，具有不同程度的肾毒性和耳毒性。但这类抗生素抗菌谱广，对革兰氏阴性菌和葡萄球菌、结核杆菌等都有良好的抗菌活性，在临床上应用比较广泛。目前临床常用的氨基糖苷类抗生素主要有庆大霉素、阿米卡星、奈替米星和小诺霉素、依替米星、妥布霉素、巴龙霉素和西索米星等。其中小诺霉素和依替米星是国内自主研发的，在国内有较大的市场；由国内生产的妥布霉素、阿米卡星在欧美市场占有较大的份额。

氨基糖苷类抗生素结构中既有氨基糖又有环己醇，极性较大，在常规反相C18上基本没有保留。同时其结构中不具有特征的紫外吸收基团，无法用紫外检测器进行测定。2010版中国药典（ChP）中收载的氨基糖苷类抗生素共有十三种，含量测定多采用微生物法，有关物质分析有采用离子对分离-蒸发光检测器检测（LC-ELSD）的方法，也有采用液相分离柱后衍生紫外检测的方法。这些方法存在检测灵敏度低，操作繁琐等问题。为克服上述问题，美国药典（USP）对有些品种采用离子色谱分离安培器检测（IC-PAD）的方法进行测定含量，欧洲药典（EP）对氨基糖苷类抗生素的测定多选择C18柱加离子对试剂分离柱后加碱安培检测（LC-PAD）的方法。这些方法（见表1-12，1-13）不但满足了氨基糖苷类抗生素含量测定的要求，扩大了杂质的检出种类，也大大提高了检测灵敏度。

表1-11 EP收载的用LC-PAD 或IC-PAD 检测的品种和项目

	检测项目1		检测项目2		检测项目3	
	检测项目	方法	检测项目	方法	检测项目	方法
硫酸阿米卡星	/	/	有关物质	LC: C18-PAD	/	/
阿米卡星	/	/	有关物质	LC: C18-PAD	/	/
硫酸庆大霉素	/	/	组分	LC: C18-PAD	有关物质	LC:C 18-PAD
妥布霉素	/	/	有关物质	LC: C18-PAD	含量测定	LC: C18-PAD
硫酸新霉素	鉴别	LC: C18-PAD	有关物质	LC: C18-PAD	/	/
硫酸奈替米星	鉴别	LC: C18-PAD	有关物质	LC: C18-PAD	/	/
盐酸大观霉素五水合物			有关物质	LC: C18-PAD	含量测定	LC: C18-PAD
新霉素B	鉴别	LC: C18-PAD	有关物质	LC: C18-PAD	/	/

表1-12 USP收载的用LC-PAD 或IC-PAD检测的品种和项目

	检测项目1		检测项目2		检测项目3	
	检测项目	方法	检测项目	方法	检测项目	方法
阿米卡星	/	/	鉴别B	IC: MA1-PAD	含量测定	IC: MA1-PAD
硫酸阿米卡星	/	/	鉴别B	IC: MA1-PAD	含量测定	IC: MA1-PAD
硫酸阿米卡星注射液	/	/	鉴别B	IC: MA1-PAD	含量测定	IC: MA1-PAD
硫酸卡那霉素	鉴别C	IC: MA1-PAD	/	/	含量测定	IC: MA1-PAD
卡那霉素注射液	鉴别B	IC: MA1-PAD	/	/	/	/
硫酸链霉素	含量测定	IC: PA1-PAD	/	/	/	/
注射用链霉素	含量测定	IC: PA1-PAD	/	/	/	/
链霉素注射液	含量测定	IC: PA1-PAD	/	/	/	/

1.4.1 庆大霉素

庆大霉素主要用于治疗细菌感染，尤其是革兰氏阴性菌引起的感染，是为数不多的热稳定性的抗生素。庆大霉素是小单胞菌产生的抗生素混合物，组分主要有C_{1a}、C₂、C_{2b}、C_{2a}和C₁。目前在USP和CP中庆大霉素的含量测定均为微生物效价法。CP中有关物质测定为LC-ELSD法；EP中有关物质和组分测定均采用LC-PAD法，要求更为严格。妥布霉素有关物质的测定方法与庆大霉素组分类似，同样也采用反相离子对分离柱后加碱安培检测方法。

仪器：离子色谱仪带安培检测器

色谱柱：Acclaim Polar Advantage II, 5 μ m, 250 \times 4.6 mm,
P/N: 063199;

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液：900 mL去离子水+7 mL三氟乙酸+250 μ L五氟丙酸+4 mL NaOH (50%, w/w)，用NaOH调节pH=2.6，加入15 mL乙腈，用去离子水定容到1000 mL，等度淋洗；

流速：1.0 mL/min；

柱后加碱衍生：50% NaOH按照1:25稀释，等度淋洗，
流速：0.3 mL/min；

流速：1.0 mL/min；

进样量：25 μ L；

检测方式：脉冲安培检测 (PAD)，Au电极，AgCl参比模式，糖四电位波形；

色谱图谱图见1-21。

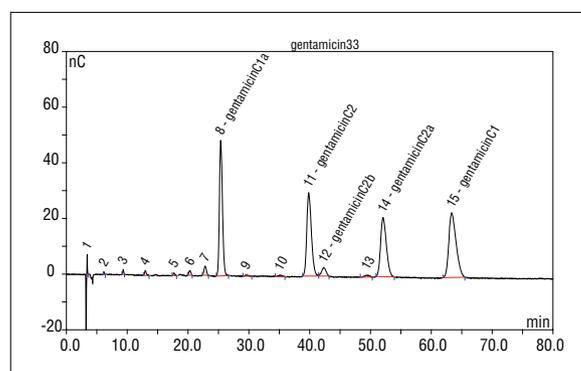


图1-21 庆大霉素样品的测定

1.4.2 阿米卡星

阿米卡星常用于治疗严重的多药物耐药的革兰氏阴性菌医院获得性感染，如绿脓杆菌、不动杆菌和肠杆菌等。目前在中国药典中，阿米卡星有关物质和含量测定采用柱前衍生LC-UV法。USP中阿米卡星的鉴别和含量测定均为IC-PAD法；而EP中有关物质分析采用LC-PAD法，含量测定采用LC-UV法。

(1) USP方法 (IC-PAD)

色谱柱：CarboPac MA1分析柱，7.5 μ m，

250 \times 4 mm，P/N: 044066；

CarboPac MA1保护柱，7.5 μ m，50 \times 4 mm，

P/N: 044067；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

流动相：99 mmol/L KOH；

流速：0.45 mL/min；

进样体积：20 μ L；

检测器：脉冲安培检测 (PAD)，AAA Au电极，pH参比模式，氨基酸六电位波形；

谱图见1-22。

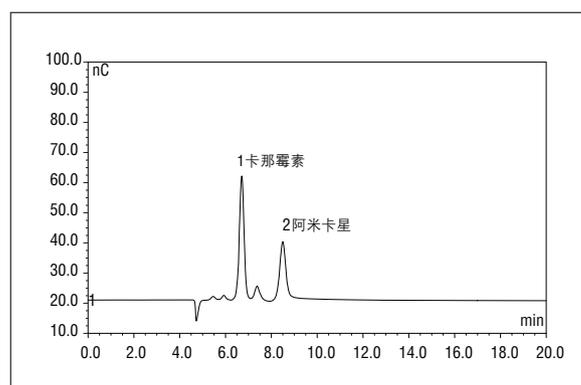


图1-22 阿米卡星样品的测定

(2) LC-PAD法的数据

仪器：离子色谱仪带安培检测器；

色谱柱：Acclaim Polar Advantage II, 5 μ m,
250 \times 4.6mm, P/N: 063199;

柱温：40 $^{\circ}$ C；

流动相：A:1.8g/L庚烷磺酸钠, 20g/L无水硫酸钠,
1.4%四氢呋喃, 5% 0.2mol/L磷酸二氢钾缓
冲液 (pH 3.0)；B: 1.8g/L庚烷磺酸钠,
28g/L无水硫酸钠, 1.4%四氢呋喃, 5%
0.2mol/L磷酸二氢钾缓冲液 (pH 3.0)，梯
度见表1-13；

流速：1.0mL/min；

柱后加碱：50%氢氧化钠溶液1 \rightarrow 25 (V/V)，流速：
0.3mL/min；

检测方式：脉冲安培检测 (PAD)，Au电极，AgCl参
比模式，糖四电位波形；

谱图见1-23。

表1-13

time (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
3	100	0
50	30	70
65	0	100
65.1	100	0
75	100	0

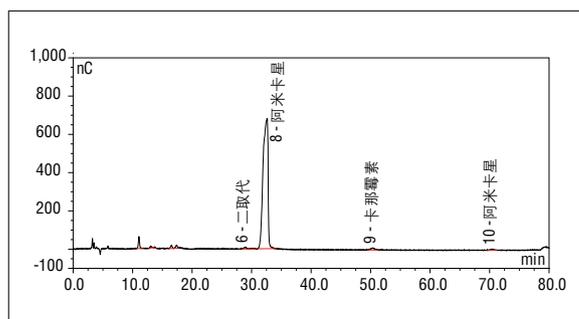


图1-23 阿米卡星供试品溶液的谱图

1.4.3 小诺霉素

硫酸小诺霉素是中国自主研发的抗生素新药，被中国药典2010版收载，中国药典所用分析方法为LC-ELSD。蒸发光散射检测在流动相的选择上必须是易挥发的缓冲液，同时灵敏度也较低，其峰面积对数与浓度对数成线性关系也使得操作和计算相对复杂。LC-PAD可提高杂质的检出能力，分离度和定量准确度。

仪器：离子色谱仪带安培检测器

色谱柱：Acclaim Polar Advantage II, 5 μ m,
250 \times 4.6mm, P/N: 063199;

柱温：40 $^{\circ}$ C；

流动相：800mmol/LNaAc (HAc调pH至5.0) +
1mmol/L辛烷磺酸钠+1%乙腈；

流速：0.7mL/min；

柱后加碱：0.5mol/L NaOH, 流速：0.5mL/min；

检测方式：脉冲安培检测 (PAD)，Au电极，AgCl参
比模式，糖四电位波形；

谱图见1-24。

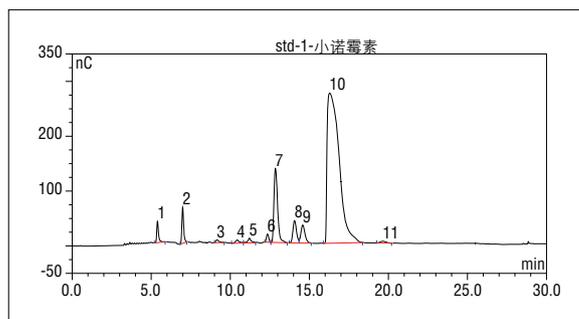


图1-24 小诺霉素标样测定谱图

1.4.4 替加环素中的叔丁胺和N-叔丁基甘氨酸

替加环素 (Tigecycline) 结构与四环素类药物相似, 是一种新型广谱抗菌素, 是首个被批准用于临床的静脉内给药的甘氨酸环素类抗生素。对有抗药性的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有活性, FDA于2005年6月批准上市。叔丁胺 (SDA) 盐酸盐是替加环素的一种原料, 本身具有较高的毒性, 需要开发测定有关物质的方法; 而N-叔丁基甘氨酸盐则是替加环素的重要中间体, 也需要测定N-叔丁基甘氨酸在替加环素中的残留情况。

N-叔丁基甘氨酸同时有氨基和羧酸基团, 是两性化合物; 而叔丁胺的极性较大, 这两种化合物在常规C18柱上均无法保留。淋洗液中加入离子对试剂可延长叔丁胺保留时间, 但其本身无特征紫外吸收波长, 采用末端吸收干扰较大, 无法满足有关物质分析的要求。在酸性条件下, 叔丁胺与酸成盐后带正电荷, 可以采用阳离子分析柱分离后通过电导检测器检测。分析N-叔丁基甘氨酸可采用柱前衍生法使其在色谱柱上有保留, 在紫外检测器中有响应, 但操作繁琐, 且可能受替加环素基体影响较大。采用阴离子交换安培检测方法测定N-叔丁基甘氨酸不需要衍生, 且安培检测的灵敏度高, 满足低含量有关物质分析的要求。

(1) 叔丁胺测定条件:

仪器: 离子色谱仪带电导检测器;

色谱柱: IonPac CS17分析柱, 7 μ m, 250 \times 4 mm,

P/N: 060557;

IonPac CG17保护柱, 7 μ m, 50 \times 4 mm,

P/N: 060560;

柱温: 30 $^{\circ}$ C;

流动相: 梯度淋洗见表1-14;

流速: 1.0 mL/min;

进样体积: 25 μ L;

检测器: 电导 (电导池温度35 $^{\circ}$ C), 阳离子电解再生抑制器, 自循环模式;

谱图见1-25。

表1-14

时间min	甲基磺酸浓度mmol
0	0.5
12	1.1
16	1.3
25	10
30	10
30.1	0.5
35	0.5

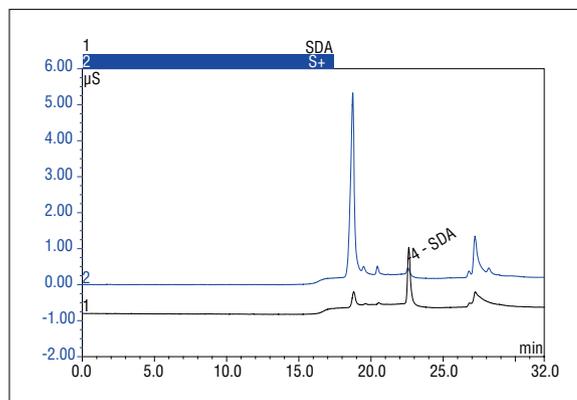


图1-25 样品和标样中的叔丁胺

(2) N-叔丁基甘氨酸测定条件:

仪器: 离子色谱仪带安培检测器

色谱柱: AminoPac PA10分析柱, 8.5 μ m,

250 \times 2 mm, P/N: 055406;

AminoPac PA10保护柱, 8.5 μ m, 50 \times 2 mm,

P/N: 055407;

柱温: 30 $^{\circ}$ C;

流动相: 梯度淋洗;

条件参见表1-15, A: DI water; B: 250mmol/L NaOH;

C: 1000mmol/L NaOAc;

表1-15

时间min	A%	B%	C%
0	65	30	5
8	65	30	5
9	37.5	30	32.5
13	37.5	30	32.5
14	65	30	5
20	65	30	5

流速：1.0 mL/min；
进样体积：25 μ L；
检测方式：脉冲安培检测（PAD），AAA Au电极，
pH参比模式，氨基酸六电位波形；
谱图见1-26。

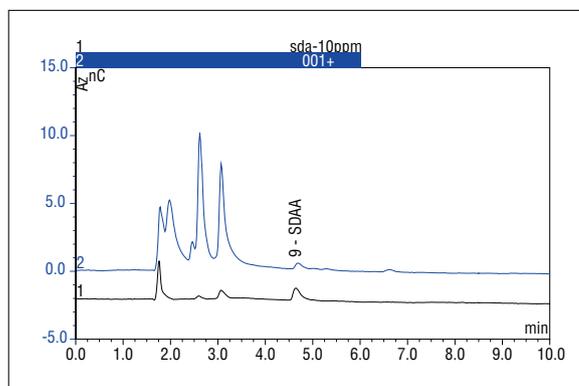


图1-26 样品中N-叔丁基甘氨酸的加标测定

1.4.5 硫酸依替米星中亚硫酸根及其有关物质

依替米星是一种新的半合成广谱抗生素，对大部分革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌有较强的抗菌作用。中国药典的方法是LC-ELSD检测。采用LC-PAD方法，不仅有关物质的检出增多，且灵敏度大大提高。采用阴离子色谱柱分离电导检测，可将依替米星中的硫酸根和亚硫酸根完全分开，准确测定其中亚硫酸盐的含量，更全面的控制药品的质量。

(1) 亚硫酸根测定条件

仪器：离子色谱仪带电导检测器；
色谱柱：IonPac AS15分析柱，9 μ m，250 \times 4 mm，
P/N：053940；
IonPac AG15分析柱，9 μ m，50 \times 4 mm，
P/N：053942；
柱温：30 $^{\circ}$ C；
流动相：20 mmol/L KOH等度淋洗；
流速：1.0 mL/min；
进样体积：10 μ L；
检测器：抑制型电导（电导池温度35 $^{\circ}$ C），阴离子电
解再生抑制器，自循环模式；
谱图见1-27。

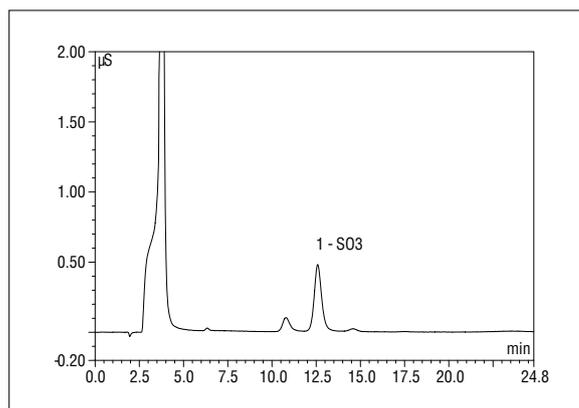


图 1-27 样品中亚硫酸根的测定

(2) 有关物质检查测定条件

仪器：离子色谱仪带安培检测器；
色谱柱：Acclaim Polar Advantage，5 μ m，
150 \times 4.6 mm，P/N：061320；
柱温：40 $^{\circ}$ C；
流动相：800 mmol/L NaAc（HAc调pH至5.0）+1 mmol/L
辛酸磺酸钠+1%乙腈；
流速：0.7 mL/min；

柱后加碱：0.5 mol/L NaOH，流速：0.5 mL/min；
 检测方式：脉冲安培检测（PAD），Au电极，AgCl参
 比模式，糖四电位波形；
 谱图见1-28。

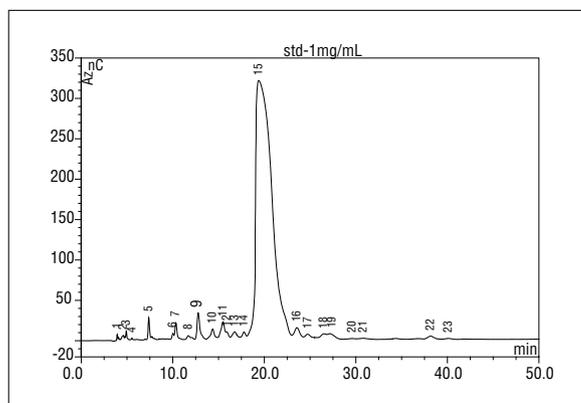


图1-28 依替米星有关物质检测

1.4.6 奈替米星

奈替米星是一种稳定的氨基糖苷类抗生素，各国药典均有收载。中国药典所收载的有关物质分析方法为LC-ELSD法，淋洗液中含有大量的三氟乙酸对色谱柱的要求较高，而ELSD检测器在定量方面计算相对复杂。USP所用定量和鉴别方法均为柱前衍生C18柱分离UV检测。EP中鉴别和有关物质分析采用LC-PAD，进一步提高杂质的检出能力、分离度和定量准确度。

仪器：离子色谱仪带安培检测器

色谱柱：Acclaim Polar Advantage II，5 μm，
 250 × 4.6 mm，P/N：063199

柱温：40℃

流动相：800 mmol/L NaAc（HAc调pH至5.0）+1 mmol/L
 辛烷磺酸钠+1%乙腈

流速：0.7 mL/min

柱后加碱：0.5 mol/L NaOH，流速：0.5 mL/min（流速
 需重新确定）

检测方式：脉冲安培检测（PAD），Au电极，AgCl参
 比模式，糖四电位波形；

谱图见1-29。

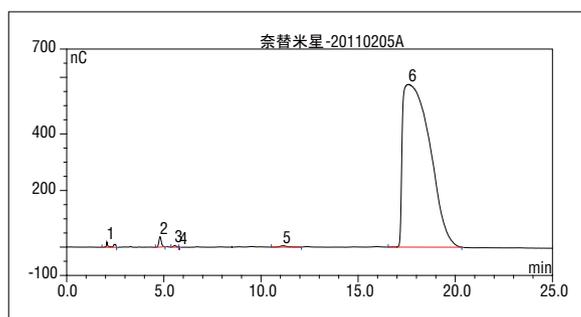


图1-29 奈替米星样品中有关物质的测定

1.4.7 头孢吡肟中N-甲基吡咯烷

头孢吡肟是第四代头孢菌素，具有低毒和广泛的抗菌效果，但是热不稳定，在环境温度高于25℃时，快会速分解并且在4℃时也会缓慢降解。其主要降解产物N-甲基吡咯烷（NMP），NMP会使头孢吡肟的效力降低并且有潜在毒性，因此检测NMP对于评价该药品纯度和潜在毒性很重要。

美国药典（USP）和中国药典2010版采用阳离子交换色谱分离电导检测法进行NMP的限度检测，但是现行方法分析时间需要3-4h，因此美国药典（USP）建议改进法定检测条件以缩短分析时间到60min。中国药典本方法采用非抑制型电导检测，该检测方法允许在淋洗液中添加有机试剂，缩短洗脱时间。

仪器：离子色谱仪带电导检测器

色谱柱：IonPac SCS1，4.5 μm，250 × 4 mm，
 P/N：079809；

IonPac SCG1, 4.5 μ m, 250 \times 4 mm,
P/N: 079933;
柱温: 30 $^{\circ}$ C;
淋洗液: 10mmol/L硝酸-5%乙腈, 等度淋洗;
流速: 1.0mL/min;
进样量: 10 μ L;
检测方式: 非抑制型电导检测;
谱图见1-30。

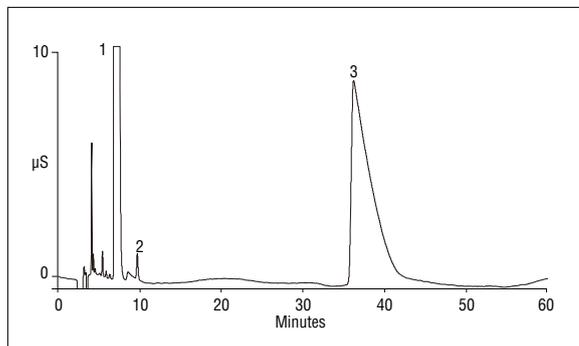


图1-30 头孢吡肟及其降解产物N-甲基吡咯烷(NMP) 色谱图

1. 精氨酸; 2. NMP; 3. 头孢吡肟

1.5 离子色谱在生化药物及生物制品分析中的应用

生化药物是从生物体分离、纯化, 或经化学修饰、生物技术制备或重组获得的可用于预防、治疗和诊断疾病的一类药物。生化药物源自生命体, 和人体具有更好的生物兼容性, 且疗效确切, 具有明确的靶向性, 与传统的化学药物相比毒性较低, 在临床上的应用越来越广泛。具不完全统计生化药物所占的市场份额越来越大。

生化药物从结构上讲主要包括糖类、氨基酸类、肽类、蛋白质类、酶和辅酶类、核酸类等。这些化合物有的水溶性较大, 有的是两性化合物, 且极性大, 在C18反相柱上保留较弱, 使用常规液相色谱来分析往往效果不佳。离子色谱来分析生化药物不但能够检测常见的硫酸根等阴离子, 还能够采用安培检测器测定糖和氨基酸, 在强碱性条件下, 糖和氨基酸以离子交换模式在色谱柱中分离后, 进入安培检测器直接获得电信号, 无需衍生等繁琐操作, 且灵敏度可达到示差检测器近百倍。

1.5.1 肝素钠中的多硫酸软骨素和硫酸皮肤素

肝素是高度硫酸化的糖胺聚糖, 含10~30个二糖单位不等。自从1937年肝素在临床上用作抗凝剂以来, 肝素一直是一种主要的抗凝药物。肝素钠中含有杂质主要有硫酸皮肤素、多硫酸软骨素等。目前, 中国药典、美国药典和欧洲药典均对杂质的限量做出了规定。离子色谱配合紫外检测器可分别测定肝素钠中的多硫酸软骨素、硫酸皮肤素含量。

仪器: 离子色谱仪带紫外检测器
色谱柱: IonPac AS11, 13.0 μ m, 250 \times 2 mm,
P/N: 044077;
IonPac AG11, 13.0 μ m, 50 \times 2 mm,
P/N: 044079;
柱温: 30 $^{\circ}$ C;
梯度淋洗: A: 0.04% NaH₂PO₄, pH 3.0;
B: 0.04% NaH₂PO₄/14% NaClO₄, pH 3.0;
淋洗液条件见表1-16:

表1-16

时间/min	A%	B%
0	80	20
60	20	80
61	80	20
75	80	20

流速：0.22 mL/min；
进样量：10 μ L；
检测方式：紫外检测202 nm；
分离色谱图谱见1-31。

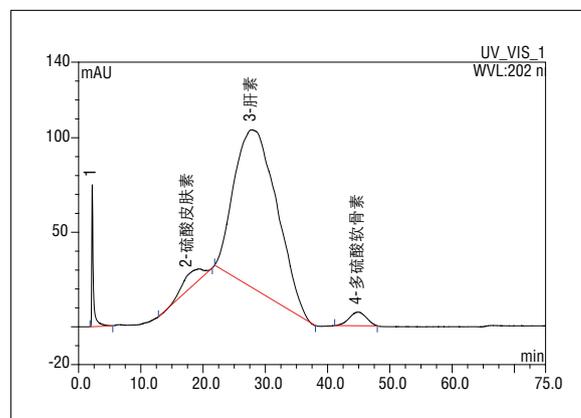


图1-31 肝素钠系统适应性谱图

1.5.2 肝素钠中半乳糖胺

自2010年美国出现严重的肝素钠临床不良反应后，肝素钠中导致过敏的原因一直都是分析工作研究的重点，有研究认为肝素钠的不良反应与其中含有氨基半乳糖杂质有关。因此国外药典，尤其是美国药典，需要将肝素钠水解，然后用离子色谱配合安培检测器测定肝素钠样品水解后的氨基半乳糖和氨基葡萄糖的含量比，严格控制肝素钠的质量标准。

色谱柱：AminoTrap, 10 μ m, 50 \times 3 mm,

P/N: 060146;

CarboPac PA20分析柱, 6.5 μ m,

150 \times 3 mm, P/N: 060142;

淋洗液：NaOH梯度淋洗，梯度见表1-17；

流速：0.5 mL/min；

检测方式：脉冲安培检测（PAD），Au电极，AgCl参比模式，糖四电位波形；

进样体积：10 μ L；

样品前处理：称取12 mg肝素钠置于10 mL玻璃管中，加5 mL 5 mol/L盐酸溶解，密闭。100度加热样品溶液6小时，冷却至室温，转移溶液于500 mL容量瓶，用水稀释至刻度，过0.22 μ m滤膜后进样。

具体样品分离谱图见1-32。

表1-17

时间/min	NaOH浓度 (mmol/L) %
0	14
10	14
10.1	200
15	200
15.1	14
20	14

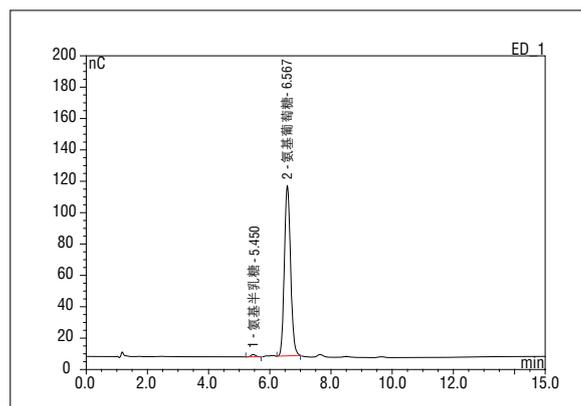


图1-32 肝素钠样品中半乳糖胺的测定

1.5.3 依诺肝素、那曲肝素中的硫酸根

低分子肝素 (low-molecular-weight heparin, LMWH) 是近年发展起来的新一代肝素类抗血栓药物, 其抗血栓作用优于肝素, 而抗凝血作用低于肝素, 且具有皮下注射吸收良好、生物利用度高、体内半衰期长、出血倾向小等优点, 目前已广泛应用于临床。低分子肝素常以硫酸盐形式存在, 因此需要控制其中游离硫酸盐的含量。

中国药典中附录VIII B中硫酸盐检查法采用的是酸性条件下硫酸钡比色法, 这个方法的最低定量限一般仅可达到10mg/L, 容易受到样品颜色的干扰, 且不溶性药物容易包覆硫酸钡, 而造成测定不准确。

采用离子色谱法测定依诺肝素和那曲肝素中的硫酸根, 操作简单, 而且定量准确。大分子的肝素在分析硫酸根的条件下不被洗脱, 不会造成对硫酸根测定的干扰, 在样品分析完成后, 使用高浓度的高氯酸钠容易可将肝素完全洗脱, 保持色谱柱的稳定性。

仪器: 离子色谱仪带电导检测器;

色谱柱: IonPac AS11分析柱, 13 μ m, 250 \times 4mm, P/N: 044077;

IonPac AG11保护柱, 13 μ m, 50 \times 4mm, P/N: 044079;

柱温: 30 $^{\circ}$ C;

淋洗液: 3mmol/L Na₂CO₃;

流速: 0.5 mL/min;

进样体积: 10 μ L;

检测方式: 抑制型电导 (电导池温度35 $^{\circ}$ C), 阴离子
电解再生抑制器, 自循环模式;

谱图见1-33。

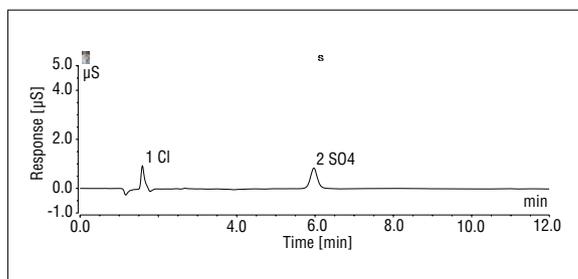


图1-33 依诺肝素中硫酸根和氯离子的测定

1.5.4 那曲肝素钙中的亚硝酸根

那曲肝素钙 (Nadroparin calcium) 是低分子肝素的一种, 由亚硝酸降解肝素得到, 均分子量为3600-5000, 峰位分子量4300。那曲肝素钙的生产过程中使用了亚硝酸, 而亚硝酸根是一种毒性物质, 在人体特定的环境条件下, 可以合成一种很强的化学致癌物——N-亚硝基化合物, 能够诱发几乎所有内脏器官的肿瘤。因此, 检测那曲肝素钙中残留的亚硝酸根含量, 对保证患者用药安全具有重要意义。

安培检测器是一种高灵敏度的选择性检测器, 在给定电位下, 亚硝酸根可在安培检测器中显示灵敏的检测信号, 在25 μ L进样条件下, 其检测限可达到0.1 μ g/L, 符合欧洲药典对那曲肝素钙中亚硝酸根检测的要求。同时在安培检测器中F⁻、Cl⁻、Br⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻均无响应, 不干扰亚硝酸根检测。

本文建立了离子色谱法分离安培检测器检测那曲肝素钙中亚硝酸根含量的方法, 灵敏度高, 线性、回收率、重现性好。

仪器: 离子色谱仪带安培检测器;

色谱柱: CarboPac PA1保护柱, 50 \times 4mm,

P/N: 043096;

柱温30 $^{\circ}$ C;

淋洗液: 13.61g/L NaAc, 磷酸调pH值至4.3;

流速: 1.0 mL/min;

检测方式: 直流安培检测 (DC, 电压1.0V), 玻碳电
极, AgCl参比模式;

进样体积: 25 μ L;

谱图见1-34。

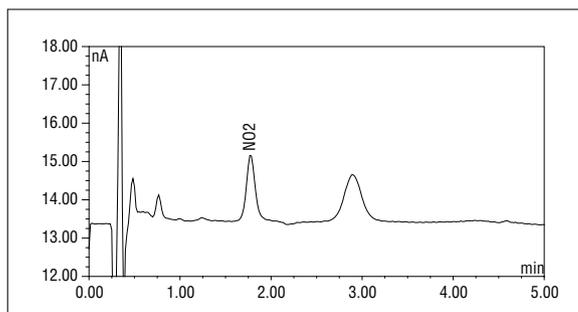


图1-34 那曲肝素钙样品中亚硝酸根的测定

1.5.5 阿卡波糖的含量

阿卡波糖是德国拜耳制药公司上世纪80年代初研究开发的一种新型降糖药，是一种新型葡萄糖苷酶抑制剂，可有效控制餐后血糖的升高，且副作用较小，在临床上的应用非常广泛。

阿卡波糖极性较大，本身无紫外吸收，且其副产物结构中均含有羟基结构而无法用常规C18柱分离和紫外检测器检测。相关厂家制定的原药品标准方法是采用氨基柱分离，紫外检测器检测的方法；也有文献报道采用示差检测器检测法。上述两种方法的存在诸多缺陷，如氨基柱稳定性差，紫外检测波长接近末端，干扰；示差检测器灵敏度较低，无法满足杂质检测的要求。阿卡波糖的结构类似糖醇，且其副产物结构中也含有羟基结构，在给定电压下，这种多羟基结构能在电极上发生氧化还原反应，从而产生与浓度相关电信号，符合电化学检测的条件。

仪器：离子色谱带安培检测器；

色谱柱：CarboPac PA20保护柱，6.5 μ m，30 \times 3 mm，

P/N: 060144；

CarboPac PA20分析柱，6.5 μ m，

150 \times 3 mm，P/N: 060142；

淋洗液：45 mmol/L NaOH/30 mmol/L NaOAc等度淋洗；

流速：0.4 mL/min；

检测方式：脉冲安培检测（PAD），Au电极，AgCl参比模式，糖四电位波形；

进样体积：10 μ L；

谱图见1-35。

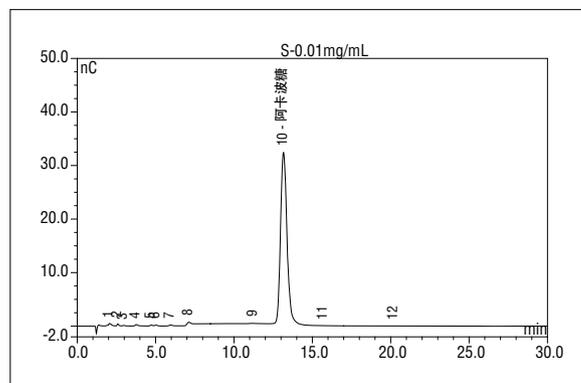


图1-35 阿卡波糖样品分离色谱图

1.5.6 磺达肝癸钠的含量及其有关物质

磺达肝癸钠（Arixtra）是一种新型的高选择性Xa因子抑制剂，是纯化学合成的戊聚糖钠的甲基衍生物，分子量为1728道尔顿。它的作用主要通过抗凝血酶（ATⅢ）对Xa的特殊抑制而发挥凝血疗效。Arixtra在临床上常用作手术后的抗凝，以及深度静脉血栓病症，防止血液凝固，抑制血栓形成。

Arixtra含5个糖单元，每个糖单元上都结合了硫酸盐基团，具有很强的极性，在常规反相C18柱上几乎没有保留。而糖单元上结合的硫酸根使Arixtra在离子交换色谱柱上有很强的保留，使用低浓度盐溶液几乎无法将Arixtra从离子交换色谱上洗脱下来。Arixtra本身的结构特点使得其定量分析和有关物质检测成为一个难题。本文介绍了离子色谱法分离、紫外检测器检测磺达肝癸钠含量及其有关物质的方法，且灵敏度高，线性、重现性好。

仪器：离子色谱仪带紫外检测器

色谱柱：CarboPac PA1分析柱，10 μ m，250 \times 4 mm，

P/N: 035391；

CarboPac PA1保护柱，10 μ m，50 \times 4 mm，

P/N: 043096；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液：梯度淋洗见表1-18；

表1-18 梯度淋洗条件

时间 /min	A H ₂ O(含10 μ L DMSO)%	B 2 mol/L NaCl%
0	50	50
5	50	50
25	10	90
30	10	90
35	50	50
50	50	50

流速：1.0 mL/min；
进样体积：100 μ L；
检测方式：紫外检测210 nm；
谱图见1-36。

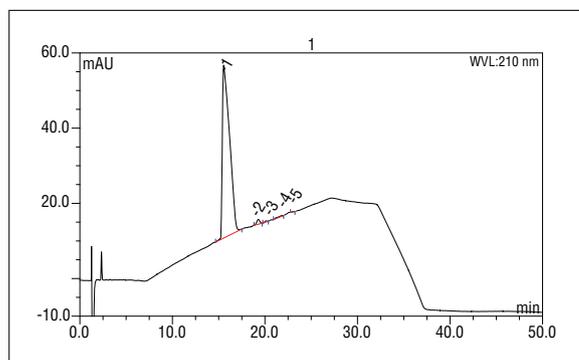


图1-36 磺达肝癸钠样品中杂质的检测

1.5.7 多肽中乙酸根和三氟乙酸根

在蛋白多肽纯化过程通常使用乙酸和三氟乙酸作为沉淀剂，有时作为纯化过程或者合成过程中的洗脱液。从而导致乙酸和三氟乙酸在最终成品中残余，而这种残余可能对人体造成伤害，因此必须进行检测。另外一种常用的蛋白沉淀剂硫酸铵也需要检测。使用离子色谱检测多肽中的乙酸和三氟乙酸，前处理简便，可同时检测三种离子，且灵敏度高，常见的几种阴离子不干扰其测定，能够满足多肽药品中杂质离子的检测需求。

仪器：离子色谱带电导检测器

色谱柱：IonPac AS23分析柱，6 μ m，250 \times 4 mm，

P/N：064149；

IonPac AG23保护柱，11 μ m，50 \times 4 mm，

P/N：064147；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液：4.5 mmol/L Na_2CO_3 /0.8 mmol/L NaHCO_3 ；

流速：1.2 mL/min，等度淋洗；

进样体积：25 μ L；

检测方式：抑制型电导（电导池温度35 $^{\circ}$ C），阴离子
电解再生抑制器，自循环电抑制；

谱图见1-37。

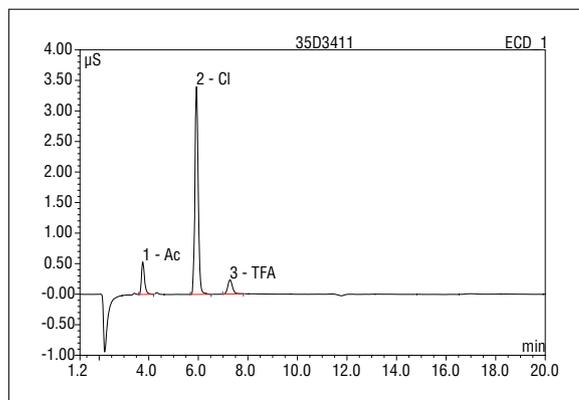


图1-37 样品中三氟乙酸根和乙酸根的测定

1.5.8 疫苗多糖的单糖组成

疫苗是将病原微生物及其代谢产物经过人工减毒、灭活或利用基因工程等方法制成的用于预防传染病的制剂。从结构上讲，疫苗多数为糖蛋白，疫苗种类不同，疫苗多糖的单糖组成也有差异。研究疫苗中的单糖组分对于控制疫苗的质量具有重要意义。

离子色谱-脉冲安培法对于糖类物质的分离和检测相比于传统方法具有极大的优势，方法的分离度更好，而灵敏度也更高。多糖样品经过水解稀释后测定其中的单糖组成，可为疫苗研究和质量控制提供依据和参考。

仪器：离子色谱带安培检测器

色谱柱：CarboPac PA10保护柱，6.5 μ m，50 \times 4 mm，P/N：046115；

CarboPac PA10分析柱，6.5 μ m，250 \times 4 mm，P/N：046110；

淋洗液：NaOH/NaOAc梯度淋洗；

流动相条件参见表1-19，A：DI water；

B：250mmol/L NaOH；

C：1000mmol/L NaOAc；

检测方式：脉冲安培检测（PAD），Au电极，AgCl参比模式，糖四电位波形；

进样体积：25 μ L；

谱图1-38为Hib流感多糖-A群流脑多糖-C流脑多糖复合疫苗样品经酸水解后的分离谱图，图中包含了疫苗游离多糖和总多糖的分离情况。

表1-19

时间min	A%	B%	C%
-5	94	6	0
8	94	6	0
10	40	40	20
25	40	40	20
25.1	20	80	0
30	20	80	0
30.1	94	6	0

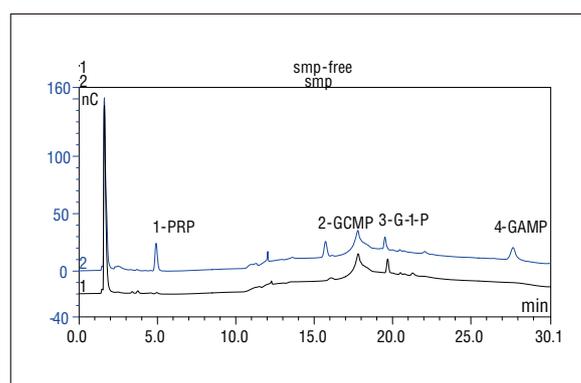


图1-38 疫苗多糖样品中单糖的测定
(样品和游离糖对比)

1.5.9 脱氧核苷酸钠注射液粉剂和注射液中C、A、T、G

脱氧核苷酸钠有促进细胞成长，增强细胞活力的功能，以及改变机体代谢的作用，在临床上常用于治疗慢性乙肝。由于分子结构中含有磷酸基团，因此在常规C18上的保留很弱。现有药典方法推荐使用WhatmenTM Partisil-5 SAX色谱柱分离，分离效果非常差，且柱寿命相对较短。采用DNAPac PA100高效阴离子交换核酸分离柱，在梯度淋洗条件下可实现C、A、T、G四种脱氧核苷酸与常见4种主要杂质的良好分离，分离度可达到1.5以上，峰形对称度在0.83-1.15之间，而理论塔板数均能高于5000。且灵敏度较高，10 μ L进样时即可达到0.1 mg/L以下的检出限（LOQ）。此外样品中共存的单核苷酸和聚核苷酸都能得到较好的分离和洗脱。

仪器：离子色谱仪带紫外检测器；

色谱柱：DNAPac PA100，13.5 μ m，250 \times 4 mm，

P/N：043010；

DNAPac PA100G，13.5 μ m，50 \times 4 mm，

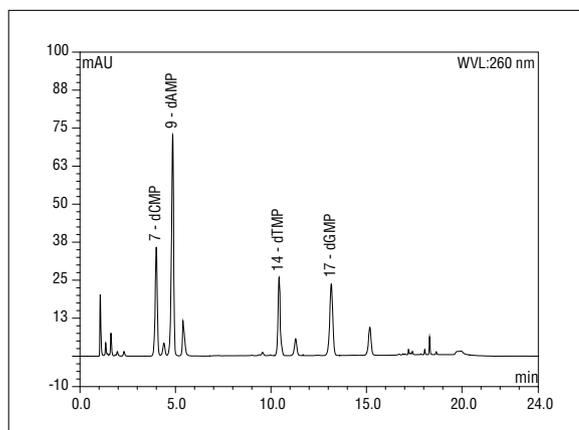
P/N：043018；

柱温：20 $^{\circ}$ C；

表1-20

时间/min	A H ₂ O%	B 17 mmol/L Na ₃ PO ₄ 50 mmol/L NaOH %	C 270mmol/L NaClO ₄	D 100mmol/L NaClO ₄
0	96	4	0	0
5	96	4	0	0
5.01	86	14	0	0
14	72	14	0	14
18	16	14	0	70
18.01	6	14	80	0
18.5	6	14	80	0
18.51	96	4	0	0

检测方式：紫外检测260nm；
进样体积：10 μ L；
淋洗液：梯度淋洗条件见表1-20；
谱图见1-39。



谱图1-39 注射液中四种脱氧核苷酸的测定

1.5.10 右旋糖酐羟丙甲纤维素滴眼液（泪然）中聚季铵盐-1

聚季铵盐-1 (polyquaternium-1) 是一类强阳离子高分子聚合物，低毒、无刺激性，具有杀菌消毒性能，属于非氧化性杀菌生物剂。目前，作为防腐剂广泛用于隐形眼镜护理液和滴眼液中。

对于眼用制剂中的防腐剂目前尚无明确限量要求，一般为万分之一到万分之二，国家药监局对眼用制剂中防腐剂含量要求为标示量的80%-120%。防腐剂的添加量较低，检测时宜采用灵敏度高检测限低的检测方法。美国药典（USP）和中国药典对防腐剂的检测均采用生物效力法测定，但生物效力检测精密度差，重复性低。聚季铵盐-1在酸性溶液中生成带正电荷的离子，可以采用离子色谱法分析。

仪器：离子色谱仪带电导检测器；

色谱柱：PLRP-S 1000A，8 μ m，250 \times 4.6mm；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液条件见表1-21；

流速：1.0mL/min；

进样量：250 μ L；

检测方式：抑制型电导检测，阳离子化学再生抑制器，外接TBAOH抑制模式；

谱图见1-40。

表1-21

时间/min	A	B
	15mmol/L MSA: ACN (50: 50) /%	15 mmol/L MSA- 0.1mmol/L OSA /%
0	16	84
3	16	84
4	80	20
11	80	20
17	16	84
25	16	84

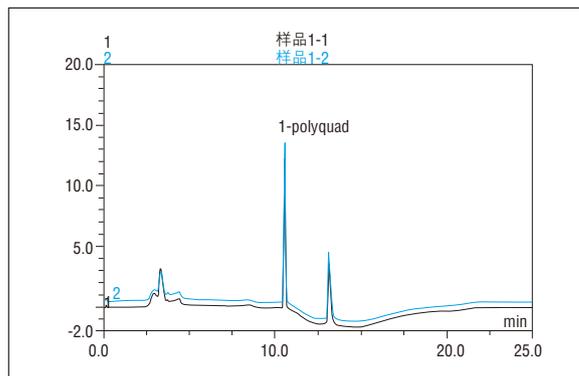


图1-40 药物泪然中聚季铵盐色谱图

1.5.11 羟乙基淀粉中乙二醇

羟乙基淀粉 (Hydroxyethyl starch, HES) 注射液是欧洲目前最常用的血浆代用品, 为治疗和预防低血容量和休克的首选药物。原料羟乙基淀粉中含有淀粉羟乙基化反应过程中产生的中间产物乙二醇。由于羟乙基淀粉注射液作为静脉滴注给药, 用量大且疗程长, 而乙二醇及其代谢物具有肾毒性, 因此严格控制本品中乙二醇的残留量甚为必要。

乙二醇本身无特征紫外吸收, 在羟乙基淀粉中的含量很低, 采用常规方法无法满足检测的要求。强碱性条件下乙二醇结构中的羟基可在安培检测器上有灵敏的响应, 满足限量检测的要求。

仪器: 离子色谱仪带安培检测器

色谱柱: RESTEK ultra AQ C18 5 μ m, 250 \times 4.6mm, Cat: 9178575-700;

柱温: 30 $^{\circ}$ C;

淋洗液: 去离子水;

流速: 1.0mL/min;

柱后加碱衍生: 1.5mol/L NaOH溶液, 流速: 0.2mL/min;

进样量: 20 μ L;

检测方式: 脉冲安培检测 (PAD), Au电极, AgCl参比模式, 糖四电位波形;

谱图见1-41。

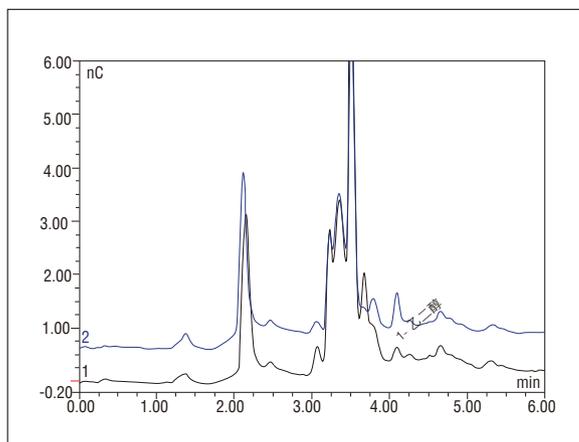


图1-41 羟乙基淀粉样品中乙二醇及加标样品分离谱图

1.6 离子色谱在中药分析中的应用

中药中的无机组分对人类健康的作用已引起世人的广泛关注, 而且研究表明中药的疗效与无机元素的种类及含量有十分密切的关系。此外, 中药中的有机酸和多糖也是重要的药效成分。利用离子色谱法分析阴阳离子, 有机酸, 多糖等具有快速、简便、灵敏、选择性好的特点, 并能同时测定多种组分, 在临床及药物分析中已得到较多应用。

1.6.1 中药中的阴离子和有机酸

有机酸广泛存在于植物的叶、花、茎、果、种子、根等各部分, 除游离态外, 大多数都是与钾、钠、钙等阳离子或生物碱结合成盐而存在。越来越多的研究证明, 中药中的有机酸类成分具有广泛的生物活性。由于中药材化学成分复杂, 其药效往往是多种活性成分共同作用的结果, 现代中医理论认为中药的药效不仅同药材的有机成分有关, 也与无机离子有关。

目前阴离子常规的检测方法多为化学法, 方法灵敏度低, 重现性较差, 而关于有机酸测定的文献, 大多采用高效液相色谱法, 流动相配置方法复杂, 且灵敏度较低。而离子色谱法采用KOH梯度淋洗, 方法简便, 且具有较高的灵敏度。

仪器: 离子色谱仪带电导检测器

色谱柱: IonPac AS11-HC, 9.0 μ m, 250 \times 4mm, P/N: 052960;

IonPac AG11-HC, 13.0 μ m, 50 \times 4mm, P/N: 052962;

柱温: 30 $^{\circ}$ C

淋洗液：0-12min, 1mmol/L, 12-35 min, 1-20mmol/L,
35.1-45 min, 50mmol/L, 45.1-50min, 1mmol/L
流速：1.0mL/min
进样量：25 μ L
检测方式：抑制型电导检测，阴离子电解再生抑制
器，自循环模式，抑制电流120mA。
谱图见图1-42。

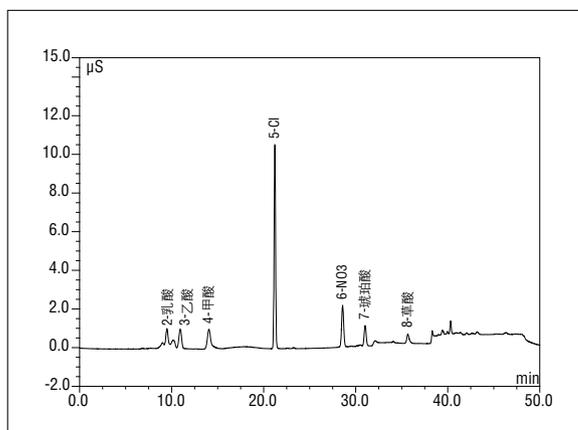


图1-42 中药样品中有机酸和阴离子色谱图

1.6.2 中药中的阳离子

光度法、原子吸收法测定阳离子单次只能测定单一组分，且仪器使用复杂、操作繁琐，而离子色谱法可同时测定样品中的多种成分，分析时间短，灵敏度高。

仪器：离子色谱仪带电导检测器

色谱柱：IonPac CS12A, 8.5 μ m, 250 \times 4 mm,

P/N: 046073;

IonPac CG12A, 8.5 μ m, 50 \times 4 mm,

P/N: 046074;

淋洗液：20mmol/L甲基磺酸

流速：1.0mL/min

进样量：25 μ L

流速：1.0mL/min

进样量：25 μ L

检测方式：抑制型电导检测，阳离子电解再生抑制
器，自循环模式，抑制电流59mA；

谱图见图1-43。

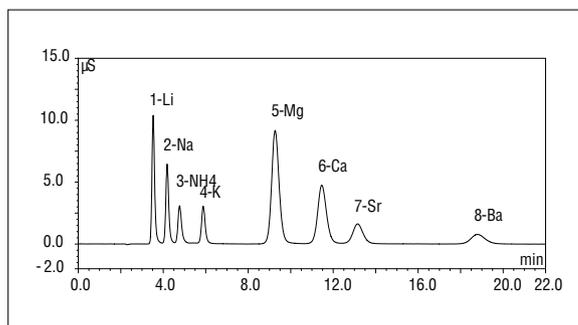


图1-43 中药样品中阳离子色谱图

1.6.3 阿胶中的六价铬

2010版《中国药典》规定，阿胶检测的几大指标为含氮量、水分、总灰分、挥发性碱性物质、微生物、重金属、砷盐等，但重金属指标中不含六价铬含量，行业监管存在空白。

六价铬为极毒物，在体内具有致癌作用，还会引起诸多的其他健康问题。目前六价铬的检测方法主要有离子色谱法（EPA 7199）和比色法（EPA 7196A）等。本方法采用离子色谱法灵敏度高，检测限浓度达 μ g/L级。

仪器：ICS-2100配十通阀；LPG3400低压四元泵；VWD3400紫外检测器；375 μ L编结反应管；4.5米绿色PEEK管；ICS-900（柱后衍生液泵）

色谱柱：IonPac AS19, 7.5 μ m, 250 \times 4 mm, P/N: 062885;

IonPac AG19, 11 μ m, 50 \times 4 mm, P/N: 062887;

IonPac NG1, 10 μ m, 35 \times 4 mm, P/N: 039567;

IonPac ATC-HC, 750 μ m, 75 \times 9 mm, P/N: 064755;

淋洗液：25 mmol/L KOH；
 流速：1.0 mL/min；
 进样量：25 μ L；
 衍生液：2 mmol/L DPC、10% 甲醇（V:V）、2.5% 硫酸（V:V）；
 衍生液流速：0.50 mL/min；
 在线前处理液：25 mmol/L KOH 和乙腈交替淋洗；
 在线前处理液流速：0.55 mL/min；
 检测波长：545 nm；
 谱图见图1-44。

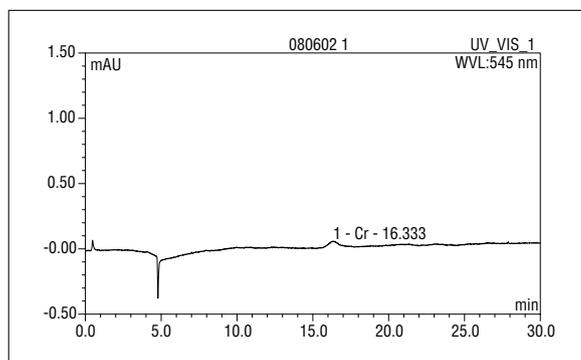


图1-44 阿胶样品中六价铬离子色谱图

1.6.4 三七总皂苷冻干粉针剂中的游离糖类

三七主要成分为三七总皂甙和糖类，多年来其研究主要集中在皂甙。近年来游离糖越来越引起人们的兴趣，对它的作用研究也逐渐深入。

现在大多采用分光光度法测定中药总糖的含量，需要有机试剂蒽醌，硝基水杨酸等，方法繁琐，且不具备选择性。气相色谱法和毛细管电泳法测定糖类必须经过衍生后方可检测。常规的液相色谱法虽然无需衍生但灵敏度较低，仅适合于常量样品的分析。采用离子色谱法检测三七中的游离糖类方法简便，且灵敏度高。

仪器：离子色谱仪带脉冲安培检测器

色谱柱：CarboPac PA20，6.0 μ m，150 \times 3 mm，

P/N: 060142；

CarboPac PA20，6.0 μ m，30 \times 3 mm，

P/N: 060144；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液：0-25 min，10 mmol/L NaOH；25.1-35 min，
200 mmol/L NaOH；35.1-40 min，10 mmol/L
NaOH；

流速：0.45 mL/min；

进样量：10 μ L；

检测器：脉冲安培检测（PAD），Au 电极，AgCl 参比
模式，糖四电位波形；

谱图见图1-45。

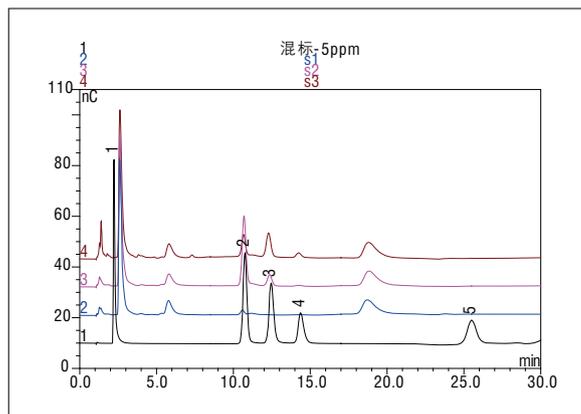


图1-45 三七总皂苷样品色谱图

(1. 甘露醇 2. 葡萄糖 3. 甘露糖 4. 果糖 5. 乳糖)

1.6.5 槐耳多糖系列降解产物单糖组成

中药多糖是非细胞毒物质，它在医药领域中的重要性近年来引起人们极大的重视。槐耳多糖是由槐栓菌经固体发酵培养得到的菌丝体中抽提、分离、纯化得到的化合物，药理研究表明槐耳多糖具有明显抗癌及免疫增强作用。对于多糖的研究，往往会通过适当的前处理水解步骤将多糖降解为单糖再进行分析。本方法采用离子色谱搭配安培检测器，选用CarboPac PA20分析柱，在KOH溶液度淋洗等条件下，不同单糖类均可获得良好的分离，方法无需衍生操作简便，且灵敏度可达 μ g/L 级。

仪器：离子色谱仪带脉冲安培检测器

色谱柱：CarboPac PA20, 6.0 μ m, 150 \times 3 mm,

P/N: 060142;

CarboPac PA20, 6.0 μ m, 30 \times 3 mm,

P/N: 060144;

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液：1 mmol/L KOH；

流速：0.45 mL/min；

进样量：10 μ L；

检测器：脉冲安培检测（PAD），Au电极，AgCl参比模式，糖四电位波形；

谱图见图1-46。

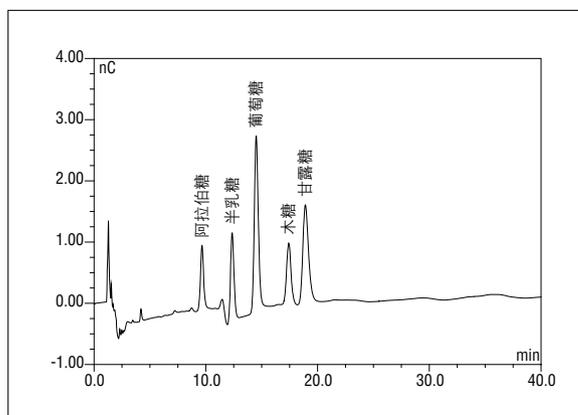


图1-46 槐耳多糖降解产物色谱图

1.6.6 蛇毒冻干粉中的氨基酸

蛇毒是极珍贵的药物原料，又是难得的生化试剂和科学实验材料。蛇毒成分复杂，除神经毒素、心脏毒素、凝血毒素、出血毒素及酶类等主要成分外，还含有一些小分子肽、氨基酸、碳水化合物、脂类、核苷、生物胺类及金属离子。其中氨基酸是蛇毒中的重要组成活性成分。

目前关于蛇毒中氨基酸的测定报道较少，报道的方法中大多采用柱前衍生高效液相色谱法测定其中氨基酸含量，衍生步骤复杂且重现性差。本方法采用离子色谱法，以氢氧化钠和醋酸钠作为淋洗液，直接进样，无需衍生，操作方法简单，且具有较高灵敏度。

仪器：离子色谱仪带安培检测器

色谱柱：AminoPac PA10, 8.5 μ m, 250 \times 2 mm,

P/N: 055406;

AminoPac PA10, 8.5 μ m, 50 \times 2 mm,

P/N: 055407;

淋洗液：梯度淋洗，条件见表1-22；

流速：0.25 mL/min；

进样量：25 μ L；

检测器：脉冲安培检测（IPAD）；AAA Au电极，pH参比模式，氨基酸电位波形；

谱图见图1-47。

表1-22

时间 /min	A DI water /%	B 250 mmol/L NaOH /%	C 1 mol/L NaOAc /%	Curve
0.0	76	24	0	
2.0	76	24	0	
8.0	54	36	0	8
11.0	54	36	0	
18.0	40	20	40	
21.0	44	16	40	
23.0	14	16	70	8
40.0	14	16	70	
40.1	20	80	0	5
42.1	20	80	0	
44.3	76	24	0	5
65.0	76	24	0	

峰：1. 精氨酸 (Arg)； 2. 赖氨酸 (Lys)；
 3. 丙氨酸 (Ala)； 4. 苏氨酸 (Thr)；
 5. 甘氨酸 (Gly)； 6. 缬氨酸 (Val)；
 7. 丝氨酸 (Ser)； 8. 脯氨酸 (Pro)；
 9. 异亮氨酸 (Ile)； 10. 亮氨酸 (Leu)；
 11. 蛋氨酸 (Met)； 12. 组氨酸 (His)；
 13. 苯丙氨酸 (Phe)； 14. 谷氨酸 (Glu)；
 15. 天冬氨酸 (Asp)； 16. 胱氨酸 (Cys)；
 17. 酪氨酸 (Tyr)

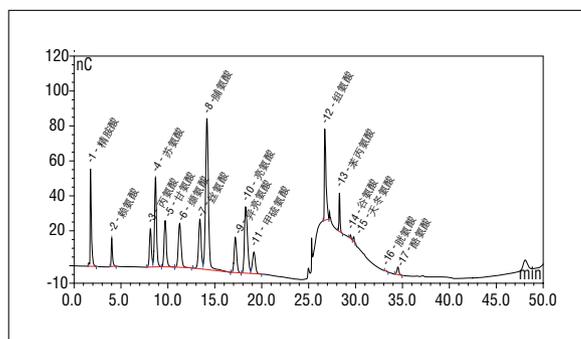


图1-47 蛇毒冻干粉样品中17种氨基酸色谱图

1.7 离子色谱在药用辅料分析中的应用

原料药在制备成成品的过程中，离不开常见的药用辅料。药用辅料质量的优劣直接影响到药品质量的高低，因此严格控制辅料质量就显得尤其重要。辅料中的杂质有一部分极性大，水溶性强，无法用液相等其他方法准确测定，特别是一些有害杂质，含量很低但毒性很大，离子色谱分析此类物质具有高效分离、灵敏检测和专属性强等特点，为辅料质量控制提供了有效的解决方案。

1.7.1 乳酸中乙醇酸的测定

乳酸是常用辅料，与药物成盐后存在于药品中。乙醇酸是在乳酸生产过程中产生的副产物，由于其结构与乳酸类似，分离存在难度。使用ICE-AS6柱排斥法可分离乳酸和乙醇酸，但ICE-AS6的柱效和容量都不高，不适用于乙醇酸与乳酸的比例达到1:10000的情况。采用AS15色谱柱，可将乙醇酸和乳酸分开，且乳酸在后不干扰乙醇酸的定量。

仪器：离子色谱带电导检测器

色谱柱：IonPac AS15，9 μ m，250 \times 4mm分析柱，

P/N：053940；

IonPac AG15，9 μ m，50 \times 4mm保护柱，

P/N：053942；

柱温：40 $^{\circ}$ C；

淋洗液：5 mmol/L KOH；

流速：1.2 mL/min；

进样体积：25 μ L；

检测方式：抑制型电导检测，阴离子电解再生抑制器，自循环模式；

谱图见1-48。

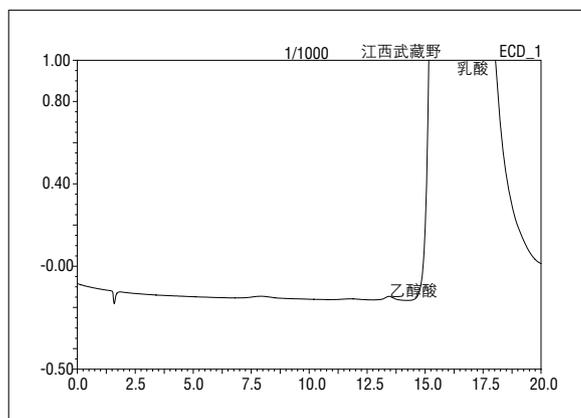


图1-48 乳酸样品中乙醇酸的测定

1.7.2 医用几丁糖中氯乙酸的测定

医用几丁糖是由蟹壳提纯的高分子化合物几丁质，经脱N-乙酰基再深加工后制成的一种聚氨基葡萄糖，是一种生物相容性好、可降解性的医用高分子材料。医用几丁糖具有选择性促进上皮细胞、内皮细胞生长而抑制成纤维细胞生长的生物特性，可促进组织生理性修复，抑制疤痕形成，减少组织粘连。在普通外科、妇产科等腹、盆腔手术中广泛用来预防术后肠粘连和盆腔粘连。

医用几丁糖在加工过程中需要用到氯乙酸，而氯乙酸对人体细胞具有较大的刺激性，因此在最终产品中需要监测其含量。几丁糖在使用过程中多用生理平衡液配制而成，其中氯离子的含量较高。采用离子色谱电导检测器可同时将氯乙酸和高浓度的氯离子分开，并对氯乙酸准确定量。

仪器：离子色谱带电导检测器

色谱柱：IonPac AS23, 6 μ m, 250 \times 4mm分析柱，

P/N: 064149;

IonPac AG23, 11 μ m, 50 \times 4mm保护柱，

P/N: 064147;

柱温：30 $^{\circ}$ C；

淋洗液：Na₂CO₃/NaHCO₃ 4.5 mmol/L /0.8 mmol/L；

流速：1.2 mL/min；

进样体积：25 μ L；

检测方式：抑制型电导，阴离子电解再生抑制器，自循环电抑制模式；

谱图见1-49。

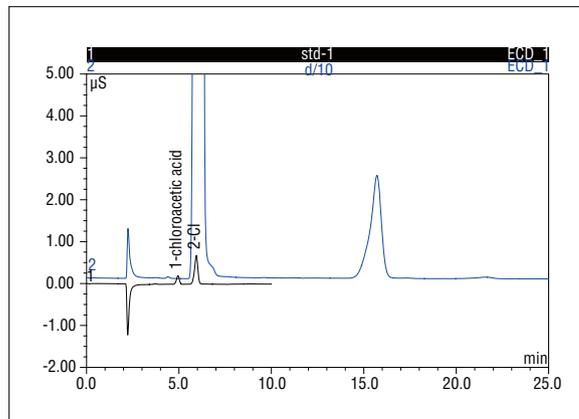


图1-49 几丁糖样品中氯乙酸的测定

第二章 液相色谱篇

2.1 液相色谱原理与组成

高效液相色谱法又叫做高压或高速液相色谱、高分离度液相色谱或近代柱色谱，以液体为流动相，采用高压输液系统，是色谱法的一个重要分支。它是用高压输液泵将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱，经进样阀注入待测样品，由流动相带入柱内，在柱内各成分被分离后，依次进入检测器进行检测，从而实现对待测成分的分析。高效液相色谱系统的组成包括泵、进样器、柱温箱、色谱柱和检测器等。如图2-1所示。

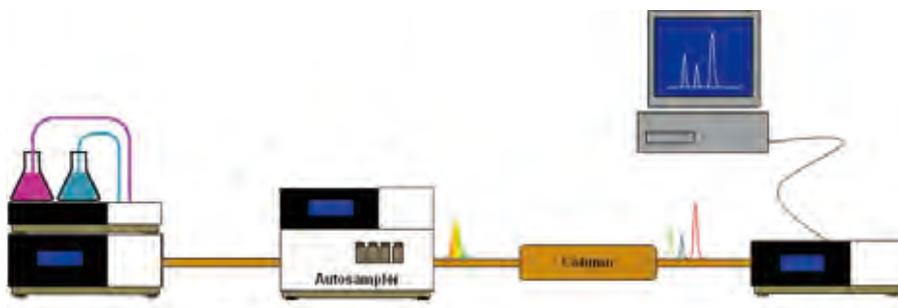


图2-1 高效液相色谱系统

高效液相色谱法（HPLC）是在20世纪60年代末，以经典液相色谱为基础，引入了气相色谱的理论，在技术上采用了高效固定相、高压输液系统和高灵敏度的在线检测器，从而发展起来的一种新型分离分析技术。随着科学和技术的不断改进与发展，目前已成为应用极为重要、广泛的分离分析手段。它摆脱了气相色谱的局限，几乎可以分析任何物质，具有分离效率高、分析速度快、应用范围广和操作自动化等特点。

经典液相色谱自从发明以来，逐渐应用于各个工业分析领域，随着后期的快速发展，产生了高效液相色谱，直至近年来又生产出了超高效液相色谱，它主要有以下几个特点：1) 采用高压泵作为液体输送系统，流动相均为液体，流经色谱柱时，受到的阻力较大，为了能迅速通过色谱柱，必须对载液加高压，近年来的超高效液相色谱系统，泵的压力能耐受1000 Bar以上。2) 高通量分析：分析速度快、载液流速快，现代液相色谱，相对以前经典液相色谱法速度快得多，通常分析一个样品在15~30分钟，一般小于1小时。超高效液相色谱，甚至在5分钟内即可完成。3) 高效分析：分离能力越来越强，色谱柱的粒径越来越小，现在能生产出亚2微米硅胶填料，使色谱柱的理论塔板数增加了数十倍，分离效能提高，峰容量大大增加。同时，有了不同的键合相与填料技术，可通过选择固定相和流动相以达到最佳分离效果，比经典色谱的分离效能高出许多倍。4) 高灵敏度：紫外检测器可达0.01ng；荧光检测器能达到pg级；没有紫外吸收的化合物，如采用Thermo的电雾式检测器，能达到ng检出限。5) 应用范围广：百分之七十以上的有机化合物可用高效液相色谱分析，特别是高沸点、大分子、强极性、热稳定性差化合物的分离分析，显示出优势。在当今高速发展的工业领域，如制药行业，液相色谱的应用越来越广泛，同时，随着制药行业的发展，对液相色谱的要求也逐渐提高，要求更高分析通量，更短分析时间，节省分析成本，达到分析目的。

液相色谱在制药行业的应用，主要表现在药物的分离、纯化、分析与制备方向，主要应用有：1) 检测药物的含量：通过高效液相色谱的专一性、高灵敏度、快速简便等特点，定量测定化学合成药物的主要活性成分及杂质的含量，也可以定量分析中药及天然药物中主要成分的含量等。2) 药效的检测：液相色谱在药物代谢分析，药物动力学研究及新药效能研究等发挥功能，来帮助确定药物的功效。

2.2 Ultimate 3000系列高效液相色谱仪的技术特点

Ultimate 3000系列高效液相色谱仪由泵、自动进样器、柱温箱和检测器四大部分组成，每一部件都有自己独特的特点。

2.2.1 泵

Ultimate 3000系列有等度泵、二元梯度泵、四元梯度泵、双三元梯度泵和快速泵。

其中Ultimate 3000系列的双三元梯度泵是一种非常特殊的应用泵，其采用独特的双泵设计可以为许多应用提供有效手段。双三元梯度泵的每个泵都可以是一个独立的系统，在变色龙软件的控制下分别可以同时控制三种不同的流动相进行复杂样品的分析，每个泵可以单独进行样品分析，也可以为一些特殊应用，如二维色谱和柱后衍生等同时在一个分析中使用。

Ultimate 3000系列的快速泵是Ultimate 3000系列的泵的一个升级，对于前面介绍的二元梯度泵、四元梯度泵以及双三元梯度泵，Ultimate 3000系列下都有相应的快速泵，可以将系统提升到超高效液相水平。

2.2.2 自动进样器

Ultimate 3000系列的自动进样器因为其创新、合理的设计，可以精确地为nL至mL级的样品进行进样。样品盘具有定时震动功能，可以保证长时间放置在样品盘里的样品溶液更加均匀。样品盘的360度转动功能可以有效地降低进样针的活动空间，使进样位置更加精确，独特的专利设计阀和温控系统，为客户进行大量样品测试和对温度变化敏感的特殊样品测试提供了有力的保障。

2.2.3 柱温箱

Ultimate 3000系列的柱温箱不仅有常规温控系列，还有特殊的具有阀切换功能的温控系列，为Ultimate 3000系列的双三元液相色谱的一些特殊的应用提供了有力的支持，而且可以通过阀的不同配置，可以在不需要人为更换色谱柱的条件下实现不同色谱柱的样品分析。

2.2.4 检测器

液相色谱检测器可以分为通用型检测器和选择性检测器。通用型检测器是指可连续测量色谱柱流出物（包括流动相和样品组分）的全部特性变化；而选择型检测器是用以测量被分离样品组分某种特性的变化，这类检测器对样品中组分的某种物理或化学性质敏感，而这一性质是流动相所不具备的，或至少在操作条件下不显示。如紫外/可见光吸收检测器和荧光检测器等属于选择型检测器；示差折光检测器、电雾式检测器和蒸发光散射检测器等属于通用型检测器。

赛默飞独特的电雾式检测器是一种新型的，高灵敏度，重现性较好的检测器，它基于雾化检测器的原理，通过测定带电溶质的信号电流来得到目标物强度信息，不依赖于化合物的分子结构，具有更好的通用性，能检测大部分非挥发性和半挥发性的有机物。电雾式检测器在2004年10月一经推出，就相继获得了仪器行业的最高荣誉，2005年PITTCO“撰稿人”银奖和素有“发明领域的诺贝尔奖”的2005年R&D100奖。

2.2.5 色谱柱

色谱柱是HPLC分离的核心，而对分离起决定作用的是色谱柱的填料颗粒和键合固定相，基于硅胶良好的物理性质，以硅胶为基质的填料是目前液相色谱柱中应用最广泛的。Thermo公司生产的色谱柱填料有硅胶和聚合物

两种, 根据硅胶不同的特性有Hypersil Gold、Hypurity、Synchronis、Accucore、Biobasic、Acclaim等系列, 聚合物基质柱有Propac、Mabpac、DNAPac、HyperREZ等系列, 主要键合相有C18、C8、C4、NH₂、CN、AQ、苯基、硅胶正相柱等, 其他还有C30、C1、PFP、BDS、HILIC、PA2、离子交换柱等, 也有一些针对某种特殊应用所开发的键合相填料, 如Acclaim surfactant分析柱对表面活性剂有特殊的选择效应, Acclaim WAX、Acclaim WCX及Acclaim Trinity等色谱柱同时具有反相-离子交换功能对离子特性的化合物具有很好的选择性。其他填料有石墨化碳等, 如Hypercarb色谱柱, 具有特殊保留机制, 用于极性化合物和立体异构体分析。

2.3 液相色谱在化药分析中的应用

2.3.1 奥美拉唑肠溶胶囊含量

奥美拉唑是质子泵抑制剂, 是目前四种常用抗溃疡药(碱胶体、H₂受体阻滞剂、质子泵抑制剂、前列腺素抑制剂)中效果最好, 且副作用发生率最低的药, 本实验按照2010版中国药典该品种含量测定项对该品种进行分析, 测定结果完全满足2010版药典的测定要求, 测定结果见图2-2和表2-1。

表2-1 待测组分测定结果

供试品中组分名称	保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
奥美拉唑 Omeprazole	13.422	11.651	13589	/	1.00

色谱柱: Acclaim 120 C8, 5 μ m, 4.6 \times 150mm,

P/N: 059140;

流动相: 0.01 mol/L磷酸氢二钠溶液(用磷酸调节pH值至7.6)-乙腈(75:25);

流速: 1 mL/min;

柱温: 40 $^{\circ}$ C;

进样量: 20 μ L;

检测方式: 紫外检测器, 波长302 nm。

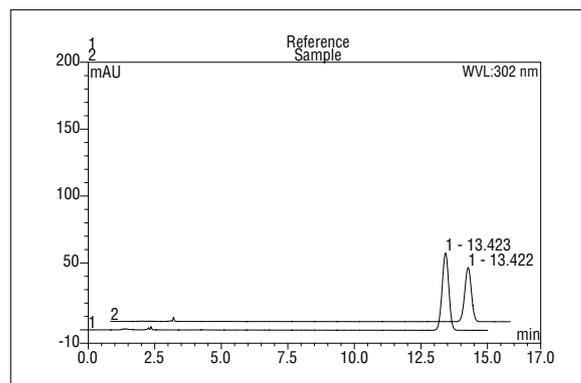


图2-2 对照品和样品测定谱图 (1.对照品 2.样品)

2.3.2 醋酸地塞米松片含量测定

醋酸地塞米松片是肾上腺皮质激素类药, 其抗炎、抗过敏、抗休克作用比泼尼松更显著, 而对水钠潴留和促进排钾作用很轻, 对垂体-肾上腺抑制作用较强。本实验按照2010版中国药典该品种含量测定项对该品种进行分析, 测定结果完全满足2010版药典的测定要求, 测定结果见图2-3和表2-2。

表2-2 待测组分测定结果

供试品中组分名称	保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
醋酸地塞米松 Dexamethasone Acetate	22.587	37.701	18068	/	1.02

色谱柱: Acclaim 120 C18, 5 μ m, 4.6 \times 250mm,
P/N: 059149
流动相: 乙腈-水 (40:60)
流速: 1 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C;
进样量: 20 μ L;
检测方式: 紫外检测器, 波长240nm。

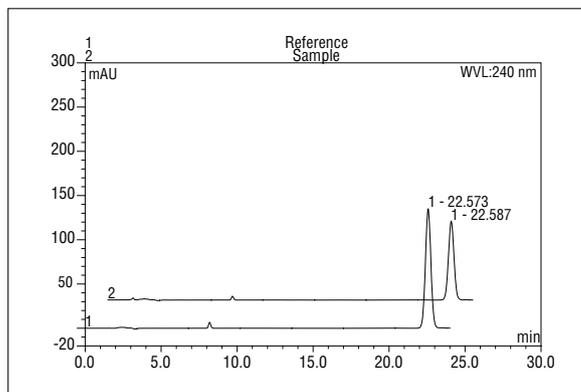


图2-3 对照品和样品测定谱图 (1. 对照品 2. 样品)

2.3.3 对乙酰氨基酚滴剂含量及有关物质

对乙酰氨基酚滴剂用于儿童普通感冒或流行性感冒引起的发热, 也可用于缓解轻至中度疼痛如头痛、关节痛、偏头痛、牙痛、肌肉痛、神经痛。本实验按照2010版中国药典该品种含量测定和有关物质测定项对该品种进行分析, 测定结果完全满足2010版药典的测定要求, 测定结果见图2-4、2-5和表2-3、2-4。

表2-3 待测组分测定结果

供试品中组分名称		保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
对乙酰氨基酚	Paracetamol	10.247	31.461	18993	20.01	1.00
茶碱 (内标)	Theophylline	18.363	30.340	20259	/	1.03

表2-4 有关物质测定结果

供试品中组分名称		保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
对乙酰氨基酚	Paracetamol	10.173	925.369	11864	/	1.24
对氨基酚	P-aminophenol	4.660	0.007	15955	21.21	1.00

(1) 含量测定

色谱柱: Acclaim 120 C18, 5 μ m, 4.6 \times 250mm,
P/N: 059149;
流动相: 0.05 mol/L醋酸铵溶液-甲醇 (85:15)
流速: 1.0 mL/min;
柱温: 30 $^{\circ}$ C;
进样量: 10 μ L;
检测方式: 紫外检测器, 波长257nm

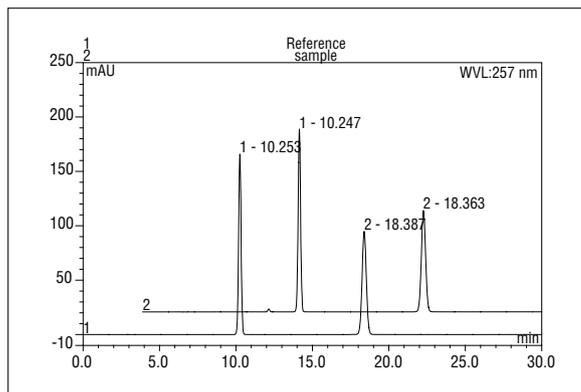


图2-4 对照品和样品测定谱图 (1. 对照品 2. 样品)

(2) 有关物质

色谱柱: Acclaim 120 C18, 5 μ m, 4.6 \times 250mm,

P/N: 059149

流动相: 0.05mol/L醋酸铵溶液-甲醇 (85:15)

流速: 1.0mL/min;

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样量: 10 μ L;

检测方式: 紫外检测器, 波长257nm

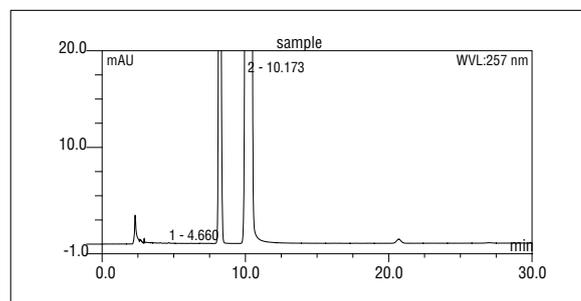


图2-5 样品测定谱图

2.3.4 格列吡嗪含量

本品主要用于单用饮食控制治疗未能达到良好效果的轻、中度非胰岛素依赖型病人；虽用胰岛素治疗，但每日需要在30~40单位以下者；对无症状病人，在饮食控制基础上仍有显著高血糖；对胰岛素有抗药者可加用本品。本实验按照2010版中国药典该品种含量测定项对该品种进行分析，测定结果完全满足2010版药典的测定要求，测定结果见图2-6和表2-5。

表2-5 待测组分测定结果

供试品中组分名称	保留时间 min	峰面积 mAU*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
格列吡嗪 Glipizide	10.150	25.143	8164	/	1.06

色谱柱: Acclaim 120 C18, 5 μ m, 4.6 \times 150mm,

P/N: 059148

流动相: 0.1mol/L磷酸二氢钠溶液 (用2.0mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至6.00 \pm 0.05) - 甲醇 (55:45)

流速: 1.50mL/min;

柱温: 40 $^{\circ}$ C

进样量: 20 μ L;

检测方式: 紫外检测器, 波长225nm。

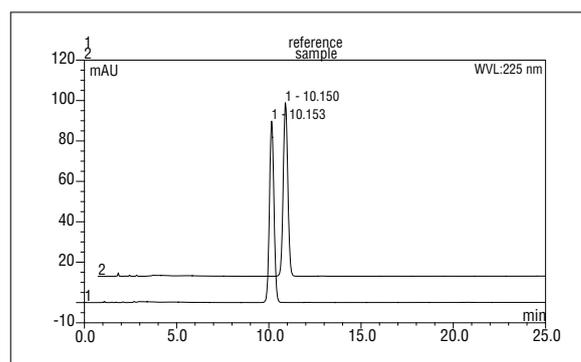


图2-6 对照品和样品测定谱图 (1.对照品 2.样品)

2.3.5 利血平含量及有关物质

利血平为吲哚型生物碱，存在于萝芙木属多种植物中。广泛用于轻度和中度高血压的治疗；作为降血压及安定药，其降压作用虽起效慢，但作用持久。本实验按照2010版中国药典该品种含量测定和有关物质测定项对该品种进行分析，测定结果完全满足2010版药典的测定要求，测定结果见图2-7、2-8和表2-6、2-7。

表2-6 待测组分测定结果

供试品中组分名称		保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
利血平	Reserpine	28.800	7.047	16503	/	0.98

表2-7 待测组分测定结果

供试品中组分名称		保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
利血平	Reserpine	28.747	190.404	12591	5.27	0.92
杂质1	Impurity 1	7.373	0.358	5355	16.55	0.98
杂质2	Impurity 2	15.847	0.104	10338	15.70	0.96
杂质3	Impurity 3	34.720	0.540	12402	2.43	0.95
杂质4	Impurity 4	37.790	1.689	13837	/	0.94

(1) 含量测定

色谱柱：Acclaim 120 C18，5 μ m，4.6 \times 250mm，

P/N：059149

流动相：乙腈-1%乙酸铵溶液（46:54）

流速：1.50mL/min；

柱温：35 $^{\circ}$ C

进样量：10 μ L；

检测方式：紫外检测器，波长268nm。

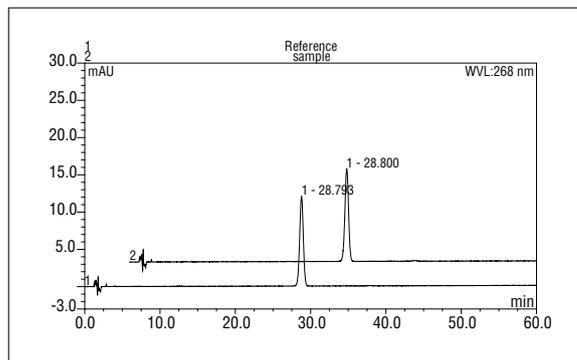


图2-7 对照品和样品测定谱图（1.对照品 2.样品）

(2) 有关物质

色谱柱：Acclaim 120 C18，5 μ m，4.6 \times 250mm，

P/N：059149

流动相：乙腈-1%乙酸铵溶液（46:54）

流速：1.50mL/min；

柱温：35 $^{\circ}$ C

进样量：10 μ L；

检测方式：紫外检测器，波长268nm。

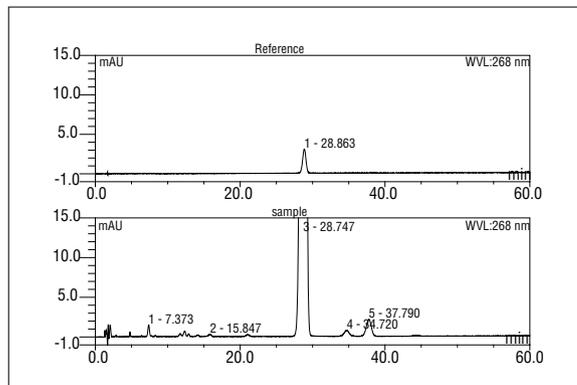


图2-8 对照品和样品测定谱图
（上图为对照品，下图为样品）

2.3.6 滴眼剂中尿囊素含量

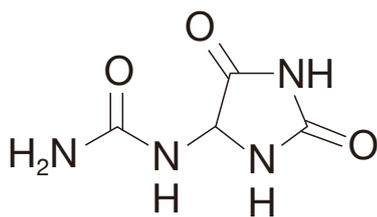


图2-9 尿囊素结构式

尿囊素是一种无毒、无味、无刺激性、无过敏性的白色晶体，其结构见图2-9。能溶于热水、热醇和稀氢氧化钠溶液，微溶于常温的水和醇，其饱和溶液（浓度为0.6%）呈微酸性，pH为5.5。在pH值为4-9的水溶液中稳定。在非水溶剂和干燥空气中亦稳定；在强碱性溶液中煮沸及日光曝晒下可分解。尿囊素应用比较广泛，在医药方面：尿囊素具有促进细胞生长，加快伤口愈合，软化角质蛋白等生理功能，对骨髓炎、糖尿病、肝硬化、痤疮均有较好疗效。在化妆品方面也广泛用于雀斑霜、粉刺液、香波、香皂、牙膏、刮脸洗剂、护发剂、收敛剂、抗汗除臭洗剂等的添加剂。

目前文献报道分析尿囊素的方法有HPLC-UV方法，其多采用磷酸缓冲盐-甲醇/乙腈为流动相，用C18反相分析，检测则以低波长。方法的不足之处在于，尿囊素极性很强，反相分离峰形很差；尿囊素紫外吸收弱，且低波长检测样品容易受到干扰。本方法采用亲水液相色谱-CAD检测器分析使尿囊素克服了上述弱点，对于分析尿囊素样品是一种稳定、简单和高效的方法。测定结果见图2-10。

色谱柱：ZIC-pHILIC，5 μ m，150 \times 4.6mm，
P/N：1.50461.0001；
柱温：35 $^{\circ}$ C；
进样量：1 μ L
检测方式：电雾式检测器（CAD）CoronaUltra；雾化
温度：25 $^{\circ}$ C；气体（N₂）压力：35.0psi；
采集频率：5Hz；
流动相：乙腈-5%乙酸铵（80:20），pH3.53；
流速：0.8mL/min

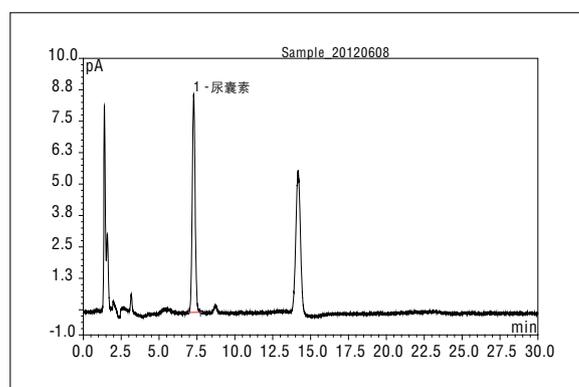


图2-10 样品测定谱图

对于亲水液相色谱，流动相的缓冲盐、pH值和温度等对分离起主要作用，在建立方法时应主要考虑，本试验分析过程中采用5mM乙酸铵-乙腈流动相均能获得较好峰型。当分析样品时，则尿囊素受到大峰干扰，于是通过调节乙酸铵的pH来改善分离，结果当pH值至3.53时，获得良好分离；其它流速等，一般不改善分离度，但比常规反相色谱更易加快分析速度。另外使用CAD检测器避免了低波长处杂质的干扰。

2.3.7 维生素AD滴剂中微量VD3

2010版《中国药典》中关于维生素D的测定方法非常复杂，要求测定前维生素D和维生素D3的含量，常用第二法测定，方法中样品需要皂化、液液萃取、浓缩、反相制备色谱净化、再浓缩等一系列处理后才能进样，整个过程耗时很长且无法保证方法重现性。双三元液相色谱系统具有在线固相萃取功能，可以利用阀切换只将目标化合物从固相萃取柱转移至分析柱进行分析，起到很好的净化效果。系统配置图参见图2-11。

色谱柱：分析柱Cnwsil Silica，5 μ m，4.6 \times 250mm，
P/N：LAEQ-1825004605；
SPE柱Acclaim HILIC-10，3 μ m，
3 \times 150mm，P/N：074258；
柱温：30 $^{\circ}$ C；
富集泵：流动相A：正己烷；流动相B：异丙醇；富集
泵流动相条件及阀切换时间参考表2-8；

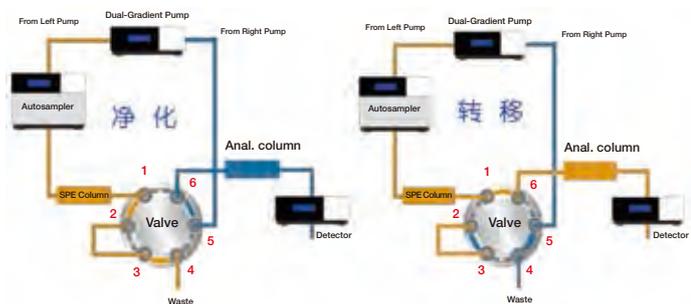


图2-11 仪器连接图

分析泵：流动相A：正己烷；流动相B：正戊醇；

分析泵流速：1.0 mL/min；

分析泵等度：A:B=991:9（离线混合）；

检测方式：紫外检测器，波长254 nm；

进样量：20 μ L；

样品前处理方法：精密称取维生素AD胶囊中油状成分1.0 g于100 mL锥形瓶中，加乙醇30 mL、维生素C 0.2 g与50%氢氧化钾溶液3 mL，置水浴上加热回流30 min，冷却后，自冷凝管顶端加水10 mL冲洗冷凝管内壁，将皂化液移至分液漏斗中，皂化瓶用水100 mL分数次洗涤，洗液并入分液漏斗中，用正己烷振荡萃取3次，合并正己烷液，用水洗涤数次，直至水层遇酚酞不再显红色，静置，分取正己烷萃取液，水浴中减压蒸干，以正己烷溶解并定容至10 mL量瓶中，作为供试品溶液，摇匀，待用。未用完溶液放入4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

样品测定谱图见图2-12。

样品经过皂化处理后，去除了大量干扰成分。前维生素D达到了基线分离，UV扫描图比较均匀，方法专属性较好。通过前处理与双三元液相色谱相结合，很好地解决了复杂基质的干扰，对待测组分达到了很好的测定。

表2-8 富集泵流动相条件及阀切换时间

时间 (min)	富集泵 (B%)	富集泵流速 (mL/min)	阀切换时间	阀
0	1	0.6	0	1-2
10	5	0.6	5.6	6-1
16	5	0.6	6.0	1-2
16.1	1	0.3	6.7	6-1
35	1	0.3	7.25	1-2
35.1	1	0.6	-	-
45	1	0.6	-	-

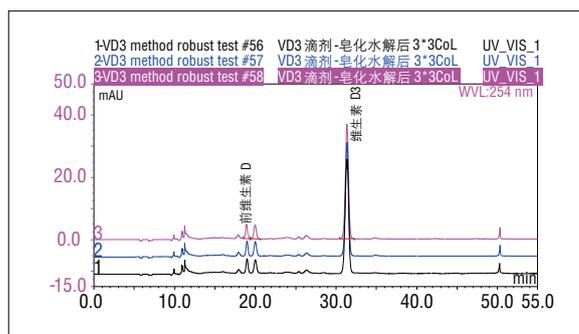


图2-12 样品测定色谱图

2.3.8 头孢地尼中有关物质

药品杂质是反映药品质量的重要指标，人用药品注册技术要求国际协调会议（International Conference of Harmonization ICH）要求：表观含量>0.1%的杂质应进行定性分析；常规的杂质定性分析方法通常采用分离制备杂质纯品，再进行波谱学方法解析。

近年来，越来越多的利用液质联用技术分析有关物质的含量及定性。但目前药典中很多的有关物质分析的方法，均采用非挥发性缓冲盐，甚至添加了离子对试剂作为流动相，因此不能直接进入质谱分析，给杂质定性带来了很大的挑战，导致应用出现局限性。本方法介绍了采用柱切换二维液相色谱分离-质谱定性的方法，来解决此类问题，对一维上洗脱下来的杂质等目标化合物经过阀切换至二维色谱柱，在二维色谱柱上进行除盐后，再进质谱进行定性分析，通过质谱裂解规律，寻找杂质可能产生的来源以及形成的机理，取得了较好的效果。本实验仪器连接图见图2-14。

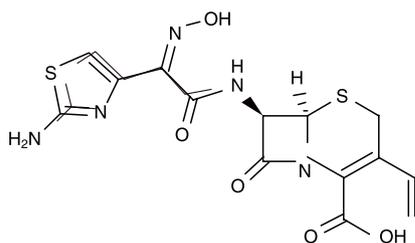


图2-13 头孢地尼化学结构式

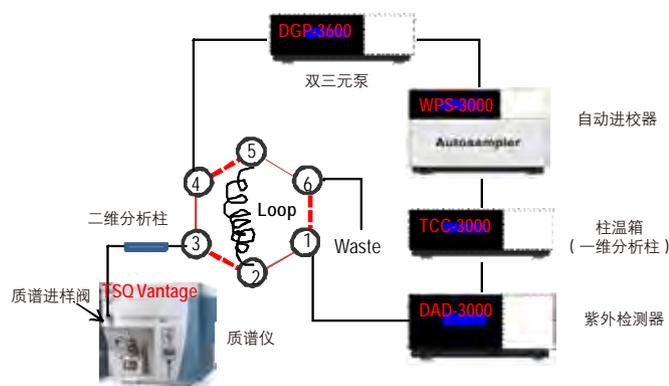


图2-14 仪器连接图

头孢地尼，属第3代头孢，其结构见图2-13。胶囊剂：50 mg/粒，100 mg/粒，由日本藤泽药品工业公司原研，1991年首次在日本上市，商品名Cefzon，1997年12月被美国上市，1999年在韩国上市，2001年国产头孢地尼获准在中国上市。该品用于对头孢地尼敏感的葡萄球菌属、链球菌属、肺炎球菌、消化链球菌、丙酸杆菌、淋病奈瑟氏菌、卡他莫拉菌、大肠埃希菌、克雷伯菌属、奇异变形杆菌、普鲁威登斯菌属、流感嗜血杆菌等菌株所引起的感染。

一维分析柱：Acclaim 120 C18，5 μ m，4.6 \times 150mm，
P/N：059148；

二维色谱柱：Acclaim PAII，3 μ m，3.0 \times 50mm，
P/N：068973

MS工作参数：

- 1) Full Scan，ESI源，正离子模式，M/Z：100-600；
负离子模式：100-600；Scan time 0.4S。
- 2) 子离子扫描（母离子根据full scan扫描得到）：正负离子同时扫描，Full scan M/Z=100-600，Scan time 0.2s，FWHM 0.70，CE 10V，Energy Ramp：40eV
- 3) 调谐参数：电压：2200V；雾化温度：350 $^{\circ}$ C；鞘气压力：35psi；辅助气压力：10psi；毛细管温度：300 $^{\circ}$ C。

一维分析流动相（右泵），梯度程序见表2-9：

流动相A：0.25%四甲基氢氧化铵溶液（用磷酸调节pH=5.5）1000 mL，加入0.1mol/L乙二胺四醋酸二钠溶液0.4 mL；流动相B：0.25%四甲基氢氧化铵溶液（用磷酸调节pH=5.5）-乙腈-甲醇=500-300-200，加入0.1mol/L乙二胺四醋酸二钠溶液0.4 mL。

二维分析流动相（左泵），梯度程序见表2-10：A：0.005 mol/L醋酸铵，pH用乙酸调节至5.5；B：乙腈。阀切换时间见表2-11，测定谱图见图2-15、2-16。

柱温：40 $^{\circ}$ C；进样体积：20.0 μ L；检测波长：254nm。

表2-9 一维流动相梯度

时间min	流速mL/min	A%	B%
0	1.0	95	5
2	1.0	95	5
22	1.0	75	25
32	1.0	50	50
37	1.0	50	50
38	1.0	95	5
48	1.0	95	5

表2-10 二维流动相梯度

时间min	流速mL/min	A%	B%
0	0.3	100	0
6	0.3	100	0
20	0.3	85	15
30	0.3	80	20
40	0.3	60	40
48	0.3	60	40

表2-11 阀切换时间

化合物编号	峰保留时间/min	六通阀切换时间/min	质谱进样阀切换质谱时间/min
6	16.6	16.5-16.7	20.7
7	18.7	18.6-18.8	22.8
9	24.0	23.9-24.1	28.2
10	26.8	26.7-26.9	30.9
12	29.7	29.6-29.8	32.8
15	36.9	36.8-37.0	41.0

根据破坏样品紫外谱图，发现热破坏杂质峰更多，因此，选用热破坏样品进行杂质分析。从图可以看出，9号峰为主峰头孢地尼，其他峰为杂质峰，分别对6、7、9、10、12、15号峰等进行了阀切换，把每个峰先切到定量环里，然后再启动左泵洗脱除盐后，进质谱分析。图2-16为质谱上进样阀除盐切换时间试验图谱。

从图2-16可以看出，上图为负离子模式，M-H为291.1，是EDTA盐；正离子模式下，M+H 74.1为四甲基氢氧化铵盐，因此，要把流动相中的盐去除干净，需要找到合适的质谱上的进样阀的切换时间，把这两个峰进行切除，流入废液。在本试验中，质谱进样阀的切入时间约为4.0min（以六通阀切换进样后开始计算）。

通过该方法，对每一个杂质进行单独切换后，通过定量环转移至二维色谱柱上，再采用与质谱兼容的流动相，把二维色谱柱上保留的盐份去除掉，然后把目标化合物洗脱下来，进质谱分析，该方法取得了较好的结果，解决了相关难题，最终分析结果见下表。

表2-12 最终分析结果

化合物编号	可能的母离子 M/Z	子离子扫描碎片 M/Z	有无文献报道
6	M+H 414.1	129.5、149.8、204.6	有
7	M+H 384.1		有
9	M+H 396.1		有，主成分
10	M+H 414.1	369.9、244.8、183.1	有
12	M+H 396.0		有
15	M+H 369.7		无

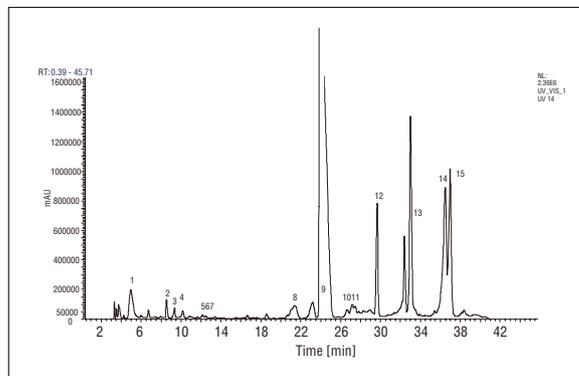


图2-15 样品紫外谱图（热破坏）

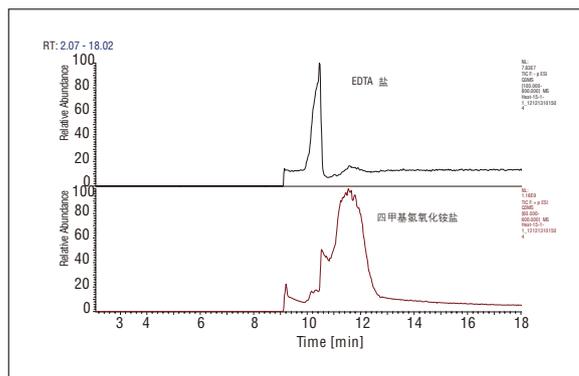


图2-16 质谱上流动相中的TIC图
(上图为负离子模式，下图为正离子模式)

2.4 液相色谱在抗生素分析中的应用

2.4.1 卡那霉素含量

氨基糖苷类抗生素（Aminoglycosides）是由氨基糖与氨基环醇通过氧桥连接而成的苷类抗生素，它是抗生素中很重要的一类，研究表明：此类药物可影响细菌蛋白质合成的全过程，妨碍初始复合物的合成，诱导细菌合成错误蛋白以及阻抑已合成蛋白的释放，从而导致细菌死亡。由于氨基糖苷类抗生素无紫外吸收，在普通C18色谱柱上保留较弱，所以对于此类抗生素的分析一直是个难点，本文使用UPLC结合CAD检测器分析卡那霉素，方法灵敏度和准确性高，稳定性好。

色谱柱：Waters BEH C18，1.7 μ m，2.1 \times 100mm， P/N：186002352；

流动相：100mM TFA/H₂O-MeOH（97:3）

检测方式：Corona Ultra电雾式检测器，雾化器温度：25 $^{\circ}$ C；气体（N₂）压力：35.0psi；数据采集频率：10Hz
流速：0.2mL/min；

柱温：30℃；

进样量：3μL；

测定图谱见图2-17、2-18；

样品测定结果见表2-13。

按照供试品溶液制备项下制得以下3种卡那霉素注射液供试品溶液，注入液相色谱仪进行测定，计算含量结果如下表：

表2-13 样品测定结果

	峰面积	样品浓度 mg/mL	实际含量 mg/mL
注射液1-1	810046	0.388	129.392
注射液1-2	821022	0.395	131.702
注射液2-1	733337	0.340	113.244
注射液2-2	730754	0.338	112.700
注射液3-1	751408	0.351	117.048
注射液3-2	780709	0.370	123.216

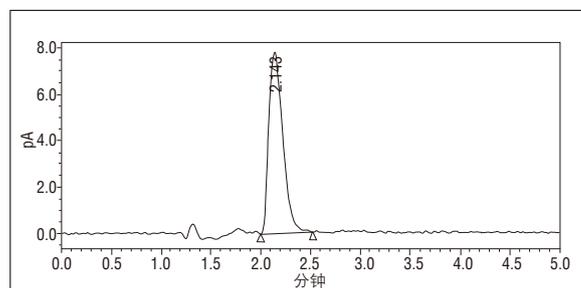


图2-17 对照品溶液测定谱图

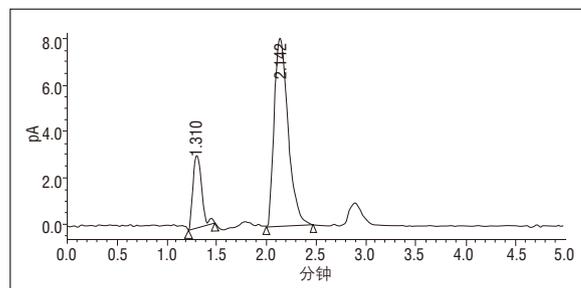


图2-18 供试品溶液测定谱图

本实验采用UPLC-CAD对卡那霉素含量进行测定，实验精密度、重复性、稳定性都较好，方法准确度良好，灵敏度高。供试品溶液中卡那霉素与卡那霉素B分离度大于2.0，该方法完全可以用于其有关物质卡那霉素B的测定。CAD动态范围较宽，本方法不进行对数转换直接计算标准曲线方程 $y=52782x+19538$ ，R值0.998（0.3μg-3μg）。

电雾式检测器操作简单，设置参数少，稳定性较好，受环境影响小。该检测器在测定氨基糖苷类物质上具有较高推广应用的價值。

2.4.2 庆大霉素C组分

庆大霉素是一种常见氨基糖苷类抗生素，主要用于治疗细菌感染，尤其是革兰氏阴性菌引起的感染。庆大霉素能与细菌核糖体30s亚基结合，阻断细菌蛋白质合成。庆大霉素是为数不多的热稳定性的抗生素，在人用药和兽药领域均大范围应用。庆大霉素的主要成分包括四个组分，统称庆大霉素C组分，2010版中国药典使用ELSD测定，本文使用CAD检测器分析庆大霉素C组分，分离度较高，稳定性和重现性较ELSD有较大提高。测定谱图见图2-19、2-20，分析结果见表2-14、2-15。

色谱柱：Acclaim 120 C18，5μm，4.6×150mm，

P/N：059149

流动相：100mmol/L TFA/H₂O- MeOH（92:8）

检测方式：Corona Ultra电雾式检测器，雾化器温度：

25℃；气体（N₂）压力：35.0psi；数据采集

频率：5Hz

流速：0.6mL/min；

柱温：30℃；

进样量：10μL

该样品C组分合格，符合C1 25%-50%，C1a 15%-40%，(c2+c2a) % 20%-50%药典规定。

本实验采用HPLC-CAD检测器对庆大霉素C组分进行测定，实验精密度、重复性、线性都较好。与蒸发光散射测定方法比较，不取对数线性相关系数就可以达0.999，从而计算结果不用进行对数转换，较ELSD检测大大简化了含量计算过程。对照品和供试品溶液色谱图中C2和C2a之间的峰为小诺霉素峰，它们三个之间的分离度大于2.0，由于该化合物为庆大霉素C组分中的次要成分所以未对其进行分析。

CAD检测器操作简单，设置参数少，稳定性较好，受环境影响因素少。该检测器在测定氨基糖苷类物质上具有较高推广应用的价值。

表2-14 CAD测定C组分线性关系

标准曲线 (线性范围1 μ g-20 μ g, 未取Log对数)	
C1a	$y=0.455x+0.535$ R=0.999
C2	$y=0.549x+0.754$ R=0.998
C2a	$y=0.413x+0.299$ R=0.999
C1	$y=0.641x+0.440$ R=0.999

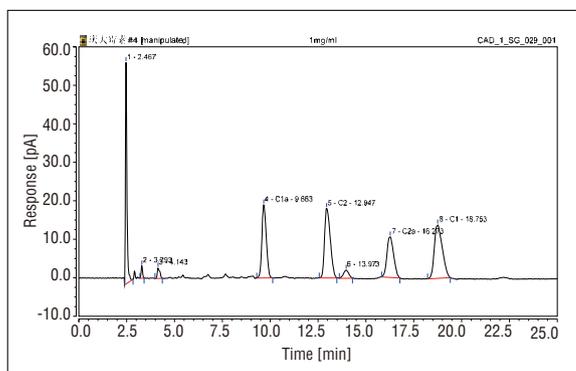


图2-19 C组分对照品测定谱图

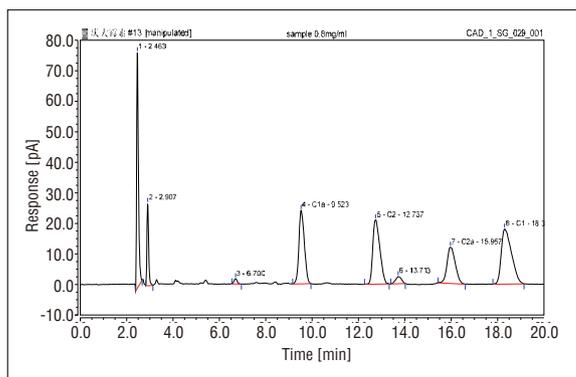


图2-20 样品测定谱图

表2-15 样品测定结果

样品	C1a%	C2%	C2a%	C1%	(C2+C2a) %
1	25.63807	24.40509	23.85764	26.12537	48.26273
2	25.65109	24.53197	23.86917	26.16714	48.40114

2.5 液相色谱在生化药物中的分析应用

2.5.1 神经生长因子在不同色谱分离模式下结果的比较

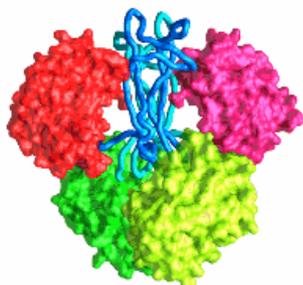


图2-21 经典的NGF空间结构

神经生长因子 (NGF) 是1951年由诺贝尔生理学和医学奖获得者R. Levi-Montalcini和S. Cohen在小鼠肉瘤细胞内发现的。NGF是一种蛋白质，含三种亚基 α 、 β 、 γ ，以 $\alpha_2\beta\gamma_2$ 五个亚基组成，分子量为1300000，通常称为7S NGF。只有 β 亚基具有促进神经生长的作用，用不同方法提取可以得到一种2.5S的NGF，大致相当于 β 亚基部。由两个118个氨基酸组成的单链通过非共价键结合而成的二聚体，分子量为26600左右，等电点是9.3，不同种间NGF的结构具有高度的同源性，生物效应也无明显的种间特异性。

图2-21为经典的NGF空间分子结构，红色： α 亚基（功能尚不清楚），绿色： γ 亚基（具有蛋白酶活性），蓝色： β 亚基（具有生物活性的NGF）。目前有较多的文献采用反相高效液相色谱的方法进行快速简便的NGF含量的测定，但是作为生物活性物质，NGF在有机相（乙腈或者甲醇）的条件下会发生不可逆的生物活性变性，因此本文

考虑采用离子交换液相色谱方法对NGF进行离子交换模式下的分离,在缓冲液条件下保持了NGF的生物活性,使分析的过程更接近生物体液环境,同时考察了不同的pH条件对NGF分离的影响。各种不同分离方法色谱条件见表2-16、2-17,各分离模式下柱温均为30℃,进样量10μL,检测波长280nm。分析图谱见图2-22到2-24。

(1) 反相色谱条件:

色谱柱: Acclaim300 C18, 3μm, 3×150mm,

P/N: 063684

流动相: A: 0.1% TFA超纯水;

B: 0.1% TFA乙腈;

流速: 0.50mL/min

梯度洗脱见表2-16:

表2-16反相色谱流动相梯度

时间/min	A%	B%
0	90	10
3	90	10
18	45	55
18.1	20	80
25	20	80
25.1	90	10
35	90	10

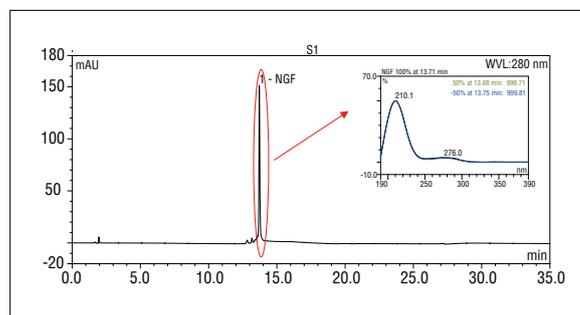


图2-22 反相色谱条件分离图谱

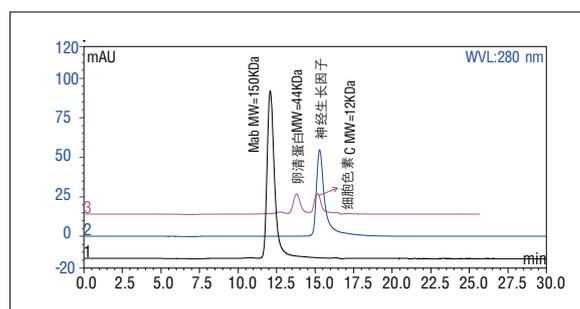


图2-23 体积排阻色谱分离图谱

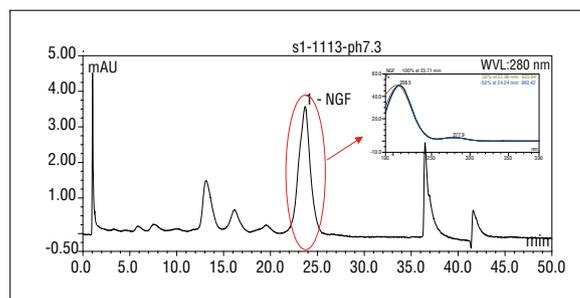


图2-24 离子交换色谱法分离图谱

(2) 体积排阻色谱条件:

色谱柱: Mab Pac SEC-1, 5μm, 4.0×300mm,

P/N: 074696

流动相: 50mmol/L磷酸钠缓冲液pH=6.8和

0.3mol/L的NaCl的混合溶液

流速: 0.20mL/min

(3) 离子交换色谱条件:

色谱柱: MAb Pac SCX-10, 10μm, 4.0×250mm,

P/N: 074625

流动相: A: Tris缓冲液pH=7.2,

B: Tris缓冲液加0.5mol/L的NaCl, pH=7.2;

流速: 1.0mL/min

梯度洗脱条件见表2-17:

表2-17 离子交换色谱流动相梯度

时间/min	A%	B%
0	60	40
5	60	40
25	50	50
25.1	20	80
30	20	80
30.1	60	40
40	60	40

本实验分别采用反相、体积排阻和离子交换的色谱方法分离了NGF（神经生长因子）。

反相色谱条件测定选择了适于测定蛋白成分的孔径为300Å的色谱柱；体积排阻色谱采用MabPac SEC-1柱同时进样的还有牛血清白蛋白（BSA）、卵清蛋白和细胞色素C，由图2-23可知，客户提供NGF样品的色谱峰与细胞色素C（MW=12KDa）的保留时间比较接近，因此其分子量可能为13-14KDa，是由118个氨基酸构成的单链，而没有形成二聚体。在体积排阻的色谱图上可以看到除了主峰，基本没有小杂峰，所以可以认为NGF样品中没有小片段的杂蛋白的影响。

采用离子交换色谱方法分离NGF时，色谱柱和流动相的pH选择对样品的影响较大，而且之前鲜有采用离子交换的方法分离NGF的报道。根据NGF（二聚体）的pI约为9.3，因此考虑采用MabPac SCX-10阳离子交换的色谱柱对其进行分析，改变了不同的梯度条件，但在流动相pH为5.6和6.5的条件，NGF在色谱柱基本没有保留，很快就出峰，说明在此pH条件下，NGF蛋白整体可能呈电中性或者带负电荷，导致其在阳离子色谱柱上没有保留。后将流动相pH分别调节到7.1、7.2和7.3，比较了不同的结果。将pH调节为7.3时，改变不同的梯度条件，NGF还是为一个峰，而前面的小杂峰能够较好分离。因此流动相的pH对NGF分离的影响比较大，能够将NGF样品中具有电荷差异的样品进行分离。

2.5.2 蛋白溶液中人血白蛋白和EPO(重组人促红细胞生成素)的含量

人血清白蛋白（人血浆白蛋白）存在于人体血浆中，占血清蛋白质的55-63%，是血清中少数不含糖的蛋白质之一，分子量67.5kD，由585个氨基酸残基组成的单链多肽，分子中含17个二硫键，等电点为4.9。具有增加血容量和维持血浆胶体渗透压、运输和解毒以及营养共给的功能。

EPO（重组人促红细胞生成素）由肾皮质肾小管周围间质细胞和肝脏分泌的一种激素样物质，能够促进红细胞生成。其为酸性糖蛋白，疏水性极强，含有165个氨基酸，相对分子质量约为34 kD（30-39kD），其中糖链约占39%，两个链内二硫键，等电点为3.75-4.15。医疗用途：增加红血球的数目，用于贫血、组织断离等治疗；体育用途（兴奋剂）：增加训练耐力和训练负荷，属于国际奥委会规定的违禁药物。

本文采用离子交换液相色谱方法和空间排阻色谱法对人血白蛋白和EPO分离。各种不同分离方法色谱条件见表2-18，各分离模式下柱温均为30℃，进样量10μL，检测波长280nm。分析图谱见图2-25到2-26。

(1) 体积排阻色谱条件：

色谱柱：Mab Pac SEC-1, 5μm, 4.0×300mm,

P/N: 074696

流动相：1.5 mmol/L KH₂PO₄-3.2 mmol/L

Na₂HPO₄-400 mmol/L NaCl, pH=7.3混合溶液

流速：0.20 mL/min

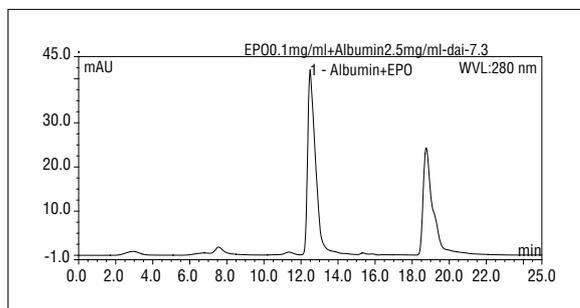


图2-25 体积排阻色谱分析样品图谱

(2) 离子交换色谱条件：

色谱柱：Mab Pac WAX-10, 10μm, 4.0×250mm,

P/N: 054999

流动相：A: 10 mmol/L Tris缓冲液pH=8.2；

B: 10 mmol/L Tris缓冲液, 1.0 mol/L的NaCl,
pH=8.2；

流速：1.0 mL/min

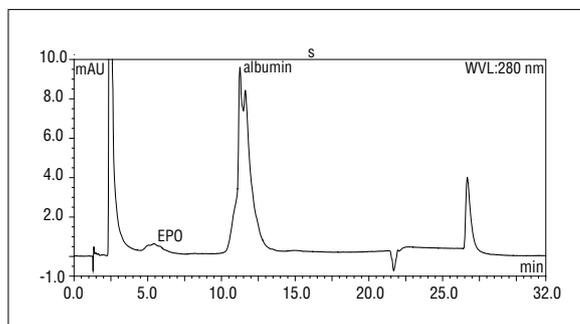


图2-26 离子交换色谱法分离图谱

梯度条件见表2-18;

采用离子色谱法测定样品, 保留时间和峰面积的重现性非常好, 含量接近标示量。同时人血白蛋白和EPO分别在0.1-10 mg/mL和0.05-1.62 mg/mL范围内, 线性关系较好, 见附录结果。因此采用阴离子交换色谱柱ProPac WAX-10在最优的色谱条件下能够对人血白蛋白和EPO进行很好分离分析。

参照药典的方法, 采用Mab Pac SEC-1色谱柱对EPO、人白和样品溶液进行分析, 结果表明样品溶液中, 低浓度的EPO峰和高浓度的人白色谱峰重叠在一起, 无法进行很好分离, 主要原因可能实验室色谱柱的体积排阻限比较宽(10-1000kD), 建议采用体积排阻限符合药典的色谱柱, 结果可能会比较好。

表2-18 离子交换色谱流动相梯度

时间/min	A%	B%
0	95	5
20	50	50
20.1	10	90
25	10	90
25.1	90	10
32	90	10

2.5.3 单克隆抗体 (MAbs) 的各种影响因素比较

在生物技术领域, 离子交换色谱被广泛应用于电荷差异蛋白的分离, 包括单克隆抗体 (MAbs), 其原理基于流动相梯度变化的离子强度对蛋白大分子的作用力的差异, 而到达分离蛋白电荷异构体的目的。MAbs作为生化药物已经在治疗很多疾病的过程中发挥至关重要的作用, 尤其是在癌症的治疗方法, 已经商品化的MAbs药物包括罗氏公司的帕妥珠单抗、诺华公司的依维莫司等等。

MAbs药物的每个生产环节中, 必须采用适合的方法进行产品的纯化和质量控制, 测定其效价、聚集体和电荷亚型变体。电荷亚型变体是在生产过程中产生的, 这些副产物会产生与主产品不同的药效, 有时会引起严重的副作用。因此本文采用离子交换色谱的方法对MAbs进行分离分析, 同时考察了不同色谱条件对分离的影响。各分离模式下柱温均为25℃, 检测波长214nm和280nm, 流速为1.0mL/min。

(1) 离子交换色谱条件:

色谱柱1: ProPac WCX-10, 10 μ m, 4 \times 250mm,
P/N: 054993;
色谱柱2: MAbPac SCX-10, 10 μ m, 4 \times 250mm,
P/N: 074625;
流动相: A: 20mmol/L MES, 用NaOH调节pH=5.5;
B: 20mmol/L MES, 0.25 mol/L NaCl, 用
NaOH调节pH=5.5;
进样量: 10 μ L
梯度条件见表2-19:

表2-19 离子交换色谱流动相梯度

Time/min	A%	B%
0.0	70	30
50	70	30
50.1	40	60
55	40	60
55.1	70	30
65	70	30

(2) 疏水作用力色谱条件:

色谱柱: ProPac HIC-10, 10 μ m, 4 \times 250mm,
P/N: 074197;
流动相: A: 0.02 mol/L 醋酸钠, 调节pH= 7.0,
2 mol/L (NH₄)₂SO₄;
B: 0.02 mol/L 醋酸钠, 调节pH=7.0
梯度条件见表2-20:

表2-20 疏水作用力色谱流动相梯度

Time/min	A%	B%
0.0	100	0
25	0	100
45	0	100
45.1	100	0
65	100	0

分别采用离子交换色谱（图2-27）和疏水作用力色谱（图2-28）分析MAbs样品，在IEC分离模式下，MAbs出现六个显著的色谱峰，它们之间存在电荷差异，依据电荷的差异在流动相盐梯度的条件下进行分离，这些色谱峰为单抗的电荷变体，说明客户提供的样品变体含量较高；而在HIC分离模式下（图2-28），出现一个色谱峰，主要原因是MAbs和固定相、流动相之间以疏水作用力大小进行分离，而MAbs电荷的差异对其没有影响，因此针对不同的分离目的，采用合适的分离模式是比较重要的。

比较了MAbs在MabPac SCX-10和ProPac WCX-10两根色谱柱上的分离结果，色谱柱规格一致（4×250 mm），粒径均为10μm，虽然样品浓度有差异，整体色谱图比较接近，因此在分离MAbs样品时，MabPac SCX-10也是一款较合适的色谱柱。

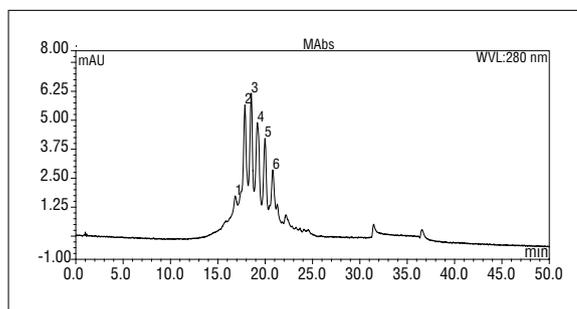


图2-27 采用离子交换色谱（IEC）模式分离色谱图

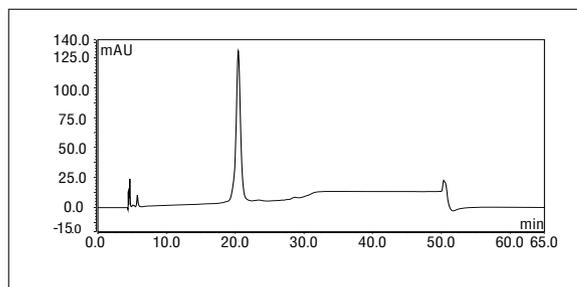


图2-28 采用疏水作用力色谱（HIC）模式分离色谱图

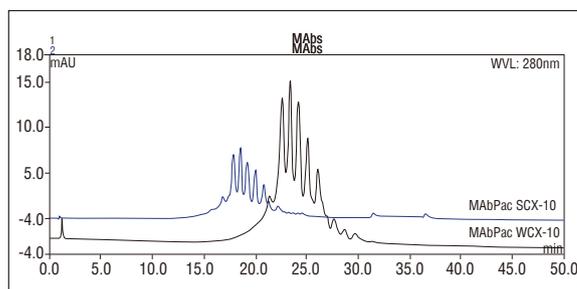


图2-29 色谱柱MabPac SCX-10和ProPac WCX-10分离结果比较

2.5.4 人血免疫球蛋白

人免疫球蛋白、人狂犬病免疫球蛋白1a和人狂犬病免疫球蛋白1b是由人的血浆制备的血液制品，用于预防麻疹、传染性肝炎和狂犬病等相关疾病，若与抗生素合并使用，可增强对某些严重细菌和病毒感染的疗效。

色谱柱：MabPac SEC-1, 5μm, 4×300mm, 300Å,

P/N: 074696

流动相：50mmol/L磷酸缓冲盐-300mmol/LNaCl,

pH=6.8混合溶液，等度洗脱；流速0.2mL/min；

检测方式：紫外检测器，波长280nm；

柱温：25℃；

进样体积：20μL；

测定谱图见图2-30到2-33。

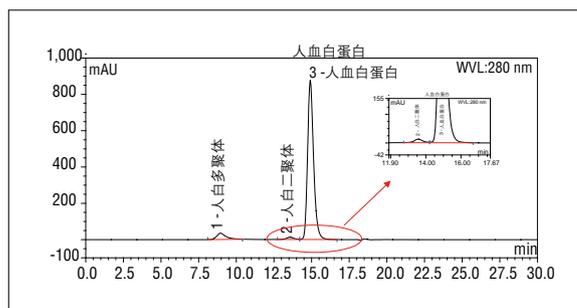


图2-30 人血白蛋白分析谱图

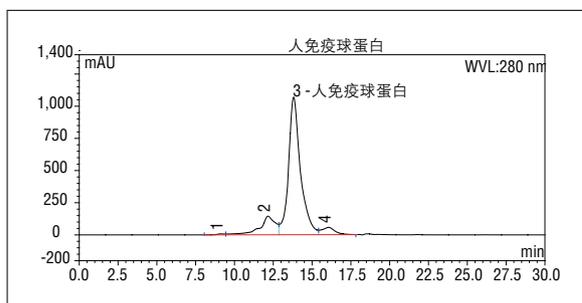


图2-31 人免疫球蛋白分析谱图

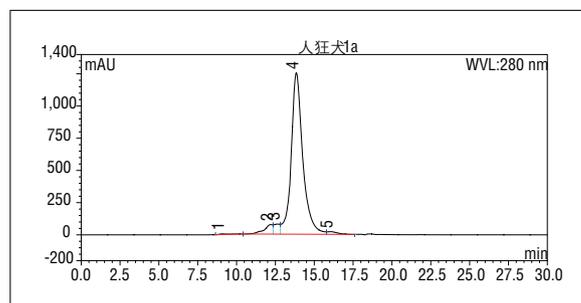


图2-32 人狂犬病免疫球蛋白1a分析谱图

本实验采用MAbPac SEC-1体积排阻的色谱柱进行分析，人血白蛋白的拖尾因子和分离度均达到药典要求，按照面积归一化法计算，人血白蛋白的多聚体、二聚体及单体的含量与客户提供的实际含量一致。

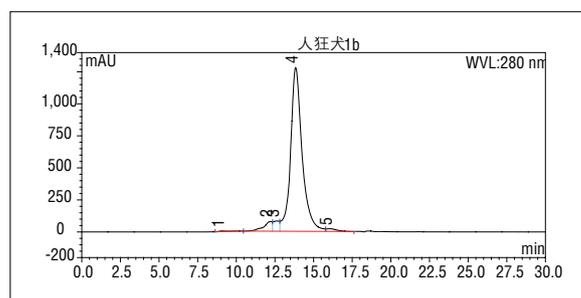


图2-33 人狂犬病免疫球蛋白1b分析谱图

2.5.5 四甘肽

四甘肽是从天然食品中提取的蛋白质，再经过定向酶切及特定小肽分离技术获得的小分子多肽物质。四甘肽的氨基酸组成中，支链氨基酸（亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸）含量很高。具有降血压、醒酒、护肝和增强免疫及增强运动能力等作用。本实验采用Acclaim 120 C18色谱柱，使用磷酸盐缓冲液对四甘肽进行分析，分离度高，结果可靠。分析谱图见图2-34。

色谱柱：Acclaim 120 C18，5 μ m，4.6 \times 250mm，

P/N: 059149

流速：1.0mL/min；

柱温：35 $^{\circ}$ C

进样量：10 μ L；

检测方式：紫外检测器，波长215nm。

流动相：A：磷酸盐（11 mmol/L H₃PO₄ + 800 mmol/L H₂O 用三乙胺调pH 2.5）；

B：H₃PO₄调节超纯水的pH到2.5；

C：乙腈；

梯度条件见表2-21：

表2-21 流动相梯度条件

时间/min	B%	C%
0	70	30
5	70	30
35	30	70
40.1	70	30
50	70	30

样品在乙腈中的溶解度比较低，实验开始时采用DMF和乙腈的混合物溶液溶解样品，溶解度相对较大，进样分析Fmoc四甘肽的含量大于98%（采用面积百分比），后改用直接磷酸调节pH到2.5，梯度分离Fmoc四甘肽，保留时间延长，且柱效更高，对Fmoc四甘肽的分离较好。

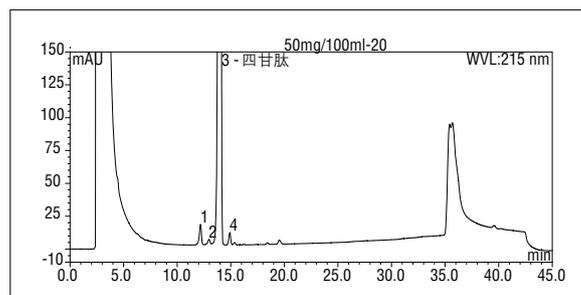


图2-34 样品含量分析谱图

2.6 液相色谱在中药及中成药成分及指纹分析中的应用

2.6.1 跌打丸含量

跌打丸是骨伤科一种常用的中成药。它具有活血化瘀、消肿止痛的功效，一般多用于治疗跌打损伤、闪腰岔气、伤筋动骨、瘀血作痛等症。本实验按照2010版中国药典该品种含量测定项对该品种进行分析，测定结果完全满足2010版药典的测定要求，见图2-35和表2-22。

表2-22 待测组分测定结果

供试品中组分名称	保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
血竭素高氯酸盐 Drachodin Perochlorate	9.660	4.936	11426	/	1.05

色谱柱：Acclaim 120 C18，5 μ m，4.6 \times 250mm，

P/N：059149；

流动相：乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钠溶液（49:51）

流速：1.00 mL/min；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

进样量：10 μ L；

检测方式：紫外检测器，波长440nm；

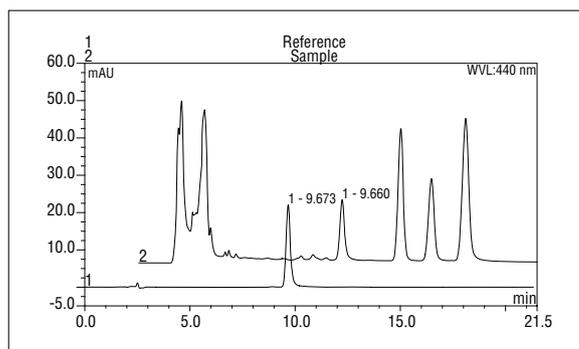


图2-35 对照品和样品测定谱图（1. 对照品 2. 样品）

2.6.2 复方丹参片

复方丹参片在我国应用广泛，多家药厂均有该品种。功能活血化瘀，理气止痛，用于气滞血瘀所致的胸痹，症见胸闷、心前区刺痛；冠心病心绞痛见上述证候者。本实验按照2010版中国药典该品种含量测定项对该品种进行分析，测定结果完全满足2010版药典的测定要求，见图2-36和表2-23。

表2-23 待测组分测定结果

供试品中组分名称	保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
丹参酮II A Tanshinone II A	37.107	35.345	11826	/	0.97

色谱柱：Acclaim 120 C18，5 μ m，4.6 \times 250mm，

P/N：059149；

流动相：甲醇-水（73:27）

流速：1.00 mL/min；

柱温：25 $^{\circ}$ C；

进样量：10 μ L；

检测方式：紫外检测器，波长270nm。

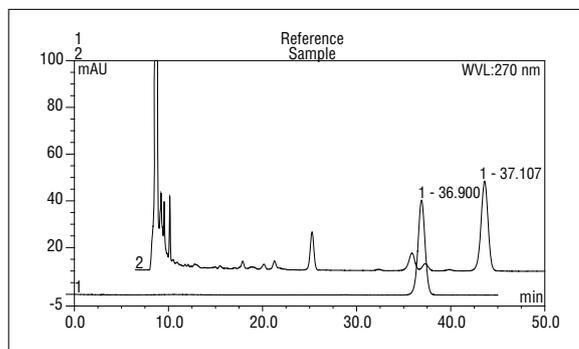


图2-36 对照品和样品测定谱图（1. 对照品 2. 样品）

2.6.3 麦味地黄丸含量

麦味地黄丸为传统名方六味地黄丸加减方，又名八仙长寿丸，成份：熟地黄、山茱萸（制）、山药、牡丹皮、茯苓、泽泻、麦冬、五味子。辅料为淀粉、蜂蜜。此药较六味地黄丸增加养阴生津之功，是治疗肺肾阴虚、咳嗽虚喘的有效成药。本实验按照2010版中国药典该品种含量测定项对该品种进行分析，测定结果完全满足2010版药典的测定要求，见图2-37和表2-24。

表2-24 待测组分测定结果

供试品中组分名称		保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
丹皮酚	Paenol	10.793	72.421	14833	/	0.94

色谱柱：Acclaim 120 C18，5 μ m，4.6 \times 250 mm，

P/N：059149；

流动相：甲醇-水（70:30）

流速：1.00 mL/min；

柱温：25 $^{\circ}$ C；

进样量：10 μ L；

检测方式：紫外检测器，波长274 nm。

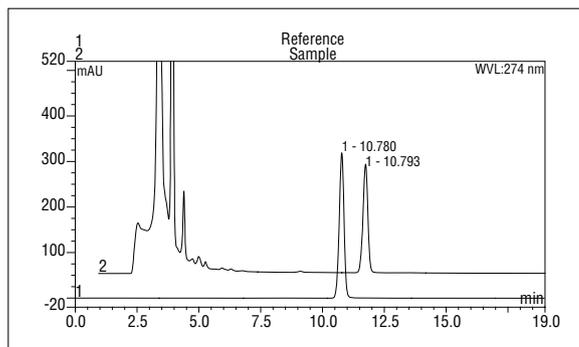


图2-37 对照品和样品测定谱图（1. 对照品 2. 样品）

2.6.4 双黄连口服液含量

双黄连口服液由金银花、黄芩及连翘经提取精制而成，具有辛凉解表、清热解毒功效，对于上呼吸道感染、扁桃体炎、咽炎、病毒性肺炎等细菌和病毒感染性疾病有一定疗效。其中绿原酸、黄芩苷、连翘苷、汉黄芩素是其主要活性成分。本实验按照2010版中国药典该品种含量测定项下条件对该品种进行分析，测定结果完全满足2010版药典的测定要求，见图2-38、2-39和表2-25、2-26。

表2-25 待测组分测定结果

供试品中组分名称		保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
黄芩苷	Balcalin	17.173	44.723	8455	/	1.09

(1) 黄芩苷

色谱柱：Acclaim 120 C18，5 μ m，4.6 \times 250 mm，

P/N：059149；

流动相：甲醇-水-冰醋酸（50:50:1）

流速：1.00 mL/min；

柱温：25 $^{\circ}$ C

进样量：10 μ L；

检测方式：紫外检测器，波长274 nm。

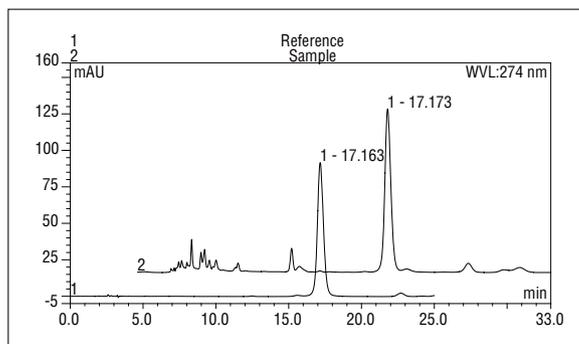


图2-38 对照品和样品测定谱图（1. 对照品 2. 样品）

表2-26 待测组分测定结果

供试品中组分名称	保留时间 min	峰面积 mAu*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
连翘苷 Forsythin	15.873	13.906	15413	/	0.93

(2) 连翘苷

色谱柱: Acclaim 120 C18, 5 μ m, 4.6 \times 250mm,

P/N: 059149;

流动相: 乙腈-水 (25:75)

流速: 1.00 mL/min;

柱温: 25 $^{\circ}$ C

进样量: 10 μ L;

检测方式: 紫外检测器, 波长278nm

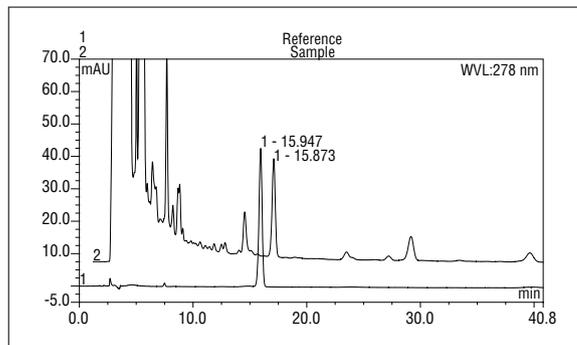


图2-39 对照品和样品测定谱图 (1. 对照品 2. 样品)

2.6.5 银杏制剂中银杏内酯

银杏内酯化合物属于萜类化合物, 由倍半萜内酯和二萜内酯组成, 是银杏叶中一类重要的活性成分。银杏内酯对血小板活化因子 (PAF) 受体有强大的特异性抑制作用, PAF是血小板和多种炎症组织分泌产生的一种内源性磷脂, 是迄今发现的最有效的血小板聚集诱导剂, 它与许多疾病的产生、发展密切相关。而银杏内酯目前认为是最有临床应用前景的天然PAF受体拮抗剂, 其拮抗作用活性与化学结构密切相关。

对于银杏内酯的分析, 因其紫外吸收弱, 多采用HPLC-ELSD方法。中国药典2010版分析银杏内酯采用正丙醇-四氢呋喃-水, 反相色谱分析, 所使用溶剂为非常规溶剂, 且正丙醇的沸点接近100 $^{\circ}$ C, 在检测器上挥发性不好, 容易导致噪音增加, 导致方法重复性差。另外, 由于ELSD灵敏度较低, 使用的对照品量较大。而电雾式检测器 (CAD) 是一种通用型检测器, 具有宽的动态范围和低至ng级的检测灵敏度, 它的检测不依赖于分析物光学性质, 也不依赖于分析物在气相中离子化的能力, 能够检测所有非挥发性的物质, 同时适用于各种分离模式, 如等度、梯度, HILIC, 离子交换, SFC和SEC等。

本方法采用HPLC-CAD方法, 采用常规反相色谱溶剂, 并且使用灵敏度更高的CAD检测器, 改善了药典方法的上述缺点。

分析柱: Acclaim 120 C18, 5 μ m, 150 \times 4.6mm,

P/N: 059148;

柱温: 35 $^{\circ}$ C;

检测方式: 电雾式检测器 (CAD) Corona Ultra, 雾化温度 35 $^{\circ}$ C, 采集频率10Hz;

进样量: 1 μ L;

流动相条件: 甲醇-水, 梯度洗脱, 流动相条件见表 2-27;

标准品测定谱图见图2-40。

表2-27 梯度洗脱表

时间 (min)	Methanol (%)	Water (%)	流速 (mL/min)
0	27	73	0.8
10	30	70	0.8
15	35	65	0.8
22	35	65	0.8

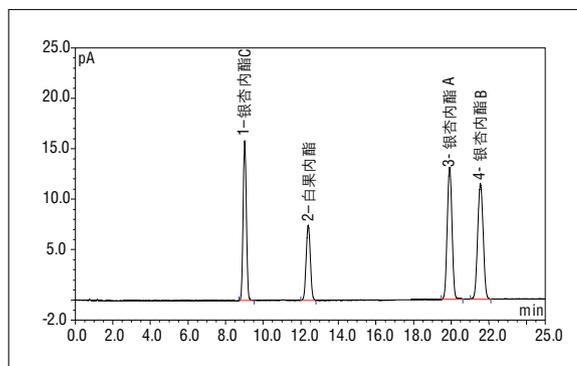


图2-40 银杏内酯标准品色谱图

表2-28 CAD与ELSD检测银杏内酯灵敏度比较

检测器	峰名	信噪比 (S/N)	检测器	峰名	信噪比 (S/N)
CAD	银杏内酯C	864.1	ELSD	银杏内酯C	111.2
	白果内酯	448.0		白果内酯	191.7
	银杏内酯A	767.5		银杏内酯A	166.9
	银杏内酯B	694.8		银杏内酯B	96.1

在灵敏度方面,相同浓度标准进样相同体积,在CAD检测器和ELSD检测器上比较各峰的灵敏度(表2-28)。结果显示,CAD检测的灵敏度最低也比ELSD高2倍以上。因此,对于银杏内酯检测,CAD检测器可以获得比ELSD更好的灵敏度。

银杏叶片制剂分析结果见图2-41。

本实验充分表明电雾式检测器具有宽的动态响应范围和较高的灵敏度,较ELSD具有更好的稳定性,是测定无紫外吸收物质的最佳选择。

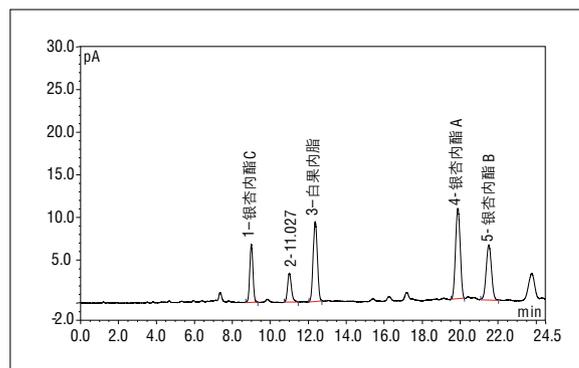


图2-41 银杏内酯标准品色谱图

2.6.6 枸杞药材中甜菜碱含量

甜菜碱 (Betaine) 常规状态下为易吸潮的鳞状或棱状结晶,热至310℃左右分解,味甜,结构式参见图2-42。用于抗肿瘤,降血压,抗消化性溃疡及胃肠功能障碍,治疗肝脏疾病。

甜菜碱的分析多采用液相色谱法,现有文献报道有HPLC-UV,用紫外检测,由于甜菜碱紫外吸收弱,所以干扰多;HPLC-ELSD方法,由于ELSD检出限较高,所以对于低含量检测则不能进行。从色谱柱来讲,甜菜碱分离多以SCX以离子交换机理分离或者C18以离子对形式分离,需要复杂缓冲盐及离子对,不利于方法的稳定性。因此,中国药典2010版对于枸杞子中的甜菜碱检测仍旧采用薄层扫描色谱法,但操作积极复杂。本方法采用亲水液相色谱-电雾式检测器进行测定,完全解决了上述测定甜菜碱方法的弊端,可作为甜菜碱的标准测定方法。分析谱图见图2-43、2-44。

色谱柱: ZIC-pHILIC, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm,
P/N: 1.50461.0001;
检测方式: 电雾式检测器;雾化温度, 35℃; 气体
(N₂) 压力, 35.0psi; 采集频率, 5Hz;
流动相: 乙腈-5%乙酸铵, pH 4.00;
流速: 0.5 mL/min;
柱温: 50℃;
进样量: 1 μ L。

流动相pH值显著影响甜菜碱盐酸盐中氯离子的峰型,当流动相pH在6.3或者4.5时,氯离子峰型较差,且与甜菜碱峰靠近。当流动相pH4.0时,氯离子峰型改善,并且与甜菜碱峰分离度加大。

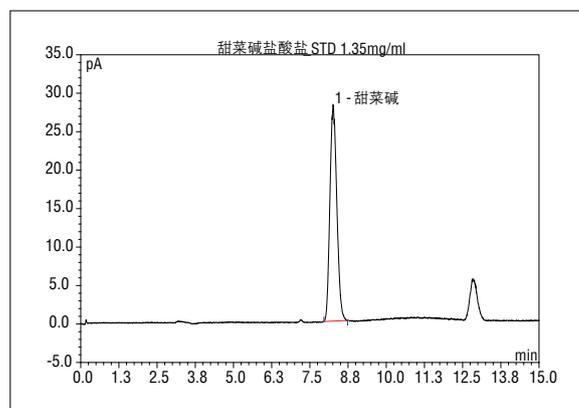


图2-43 标准品色谱图

表2-29 样品测定结果

样品名称	测定浓度mg/mL	称样量g	含量%
品牌1 121203批	0.2124	1.0215	1.04
品牌2 121203批	0.2086	1.0286	1.01
品牌3 121130批	0.2392	1.0245	1.17

本方法采用亲水液相色谱，使用U3000-CAD联用测定枸杞中甜菜碱含量，大大简化了药典对于枸杞子药材中甜菜碱测定的操作。并且容易获得精密、准确的结果。

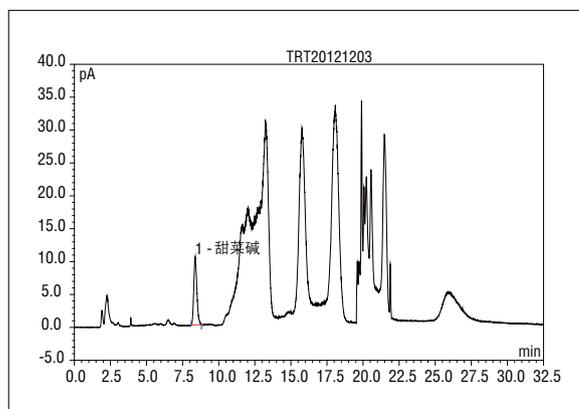


图2-44 样品色谱图

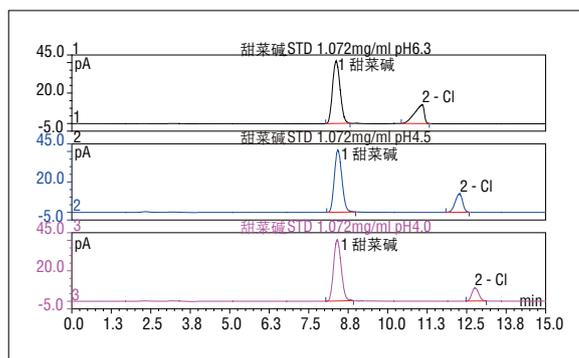


图2-45 不同流动相对于分离及Cl峰型的影响
(上: pH4.0; 中: pH4.5; 下: pH6.35)

2.6.7 黄芪及复方中黄芪甲苷的含量

黄芪是常见的补益类中药，也是中药方剂及其制剂中使用频率较高的药材。其中黄芪甲苷是主要活性成分，药品标准中常将其作为质量评价指标成分。但黄芪甲苷的测定有两个难点，一是黄芪甲苷是末端吸收的物质，采用UV末端波长或ELSD检测，灵敏度较差；二是黄芪甲苷在黄芪中含量较低，基质成分复杂。2010版药典一部中，黄芪药材的前处理工艺采用正丁醇萃取，经过D101大孔吸附树脂离线纯化后，用HPLC-ELSD检测，前处理步骤较多，黄芪甲苷回收率不高。

本文利用双三元高效液相系统（Dual Gradient Liquid Chromatography, DGLC），采用在线净化方法结合电雾式检测器检测，对样品进行净化后再自动切换到分析柱上进行分析，系统连接方式见图2-46。该方法可实现样品自动化处理，回收率高，在线SPE柱可重复利用等优点。

纯化柱：Acclaim PALL, 5 μ m, 4.6 \times 50 mm, P/N: 063189;

分析柱：Acclaim 120 C18, 5 μ m, 4.6mm \times 150mm, P/N: 059148;

柱温：35 $^{\circ}$ C；

流速：1.0mL/min；

检测方式：电雾式检测器（CAD）Corona Ultra；雾化器温度，30 $^{\circ}$ C；气体（N₂）压力，35.0psi；

数据采集频率：5Hz。

流动相组成及流速见表2-30，梯度程序见表2-31，测定结果见图2-47到图2-52。

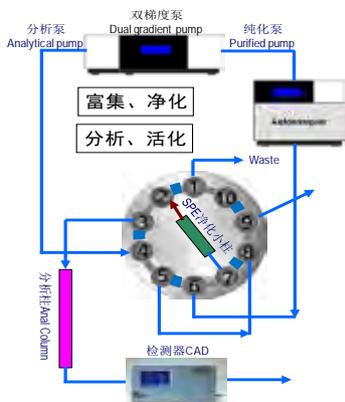


图2-46-1 阀1-2位相通时连接图

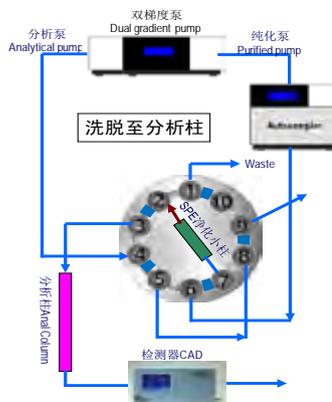


图2-46-2 阀1-10位相通时连接图

图2-46 仪器连接图

表2-30 流动相组成

	纯化泵 (right pump)	分析泵 (left pump)
流动相A	Water	
流动相B	MeOH	ACN

表2-31 纯化泵梯度洗脱条件

时间 (min)	(A%)	(B%)	时间 (min)	阀
0	100	5	0	1-2
3	100	25	24	10-1
30	5	25	24.9	1-2
40	5	75		
40.1	100	95		
50	100	5		

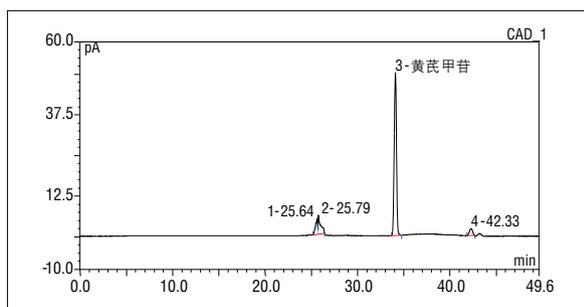


图2-47 黄芪甲苷对照品色谱图

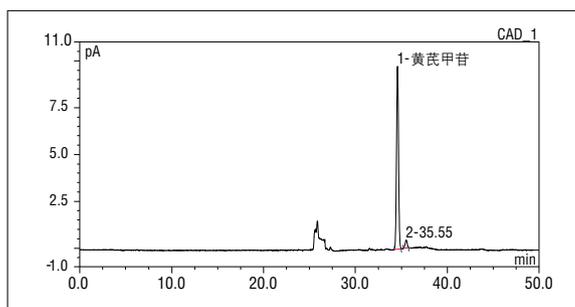


图2-48 黄芪饮片（蜜炙）色谱图

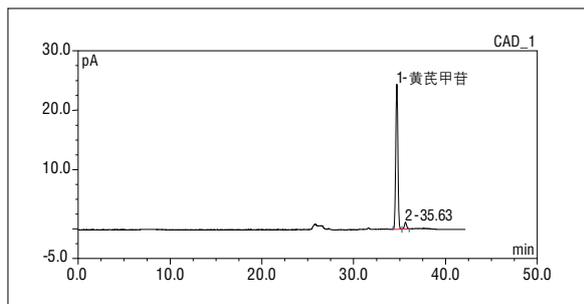


图2-49 黄芪饮片（生品）色谱图

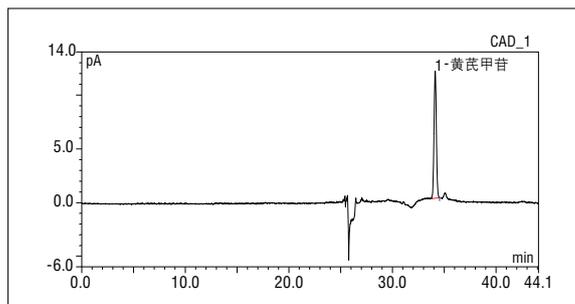


图2-50 归脾丸色谱图（进样体积100μL）

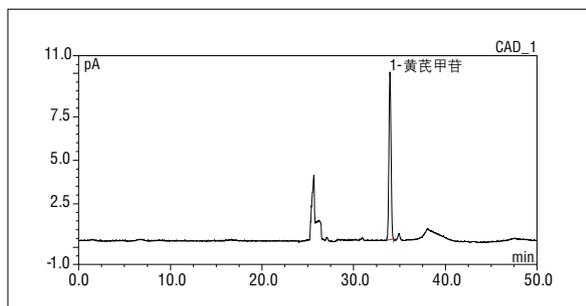


图2-51 补肾固齿丸色谱图 (进样体积50 μ L)

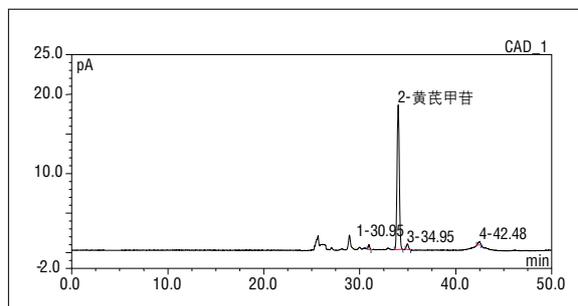


图2-52 颈复康颗粒色谱图 (进样体积50 μ L)

本文使用双三元液相结合电雾式检测器对黄芪药材和不同复方中的黄芪甲苷进行了检测，方法具有很好的通用性，可以用于多种含有黄芪甲苷的品种的分析。

2.6.8 梔子指纹图谱

梔子 (*Gardenia jasminoides* Ellis) 是茜草科梔子属梔子的干燥成熟果实，具有泻火除烦，清热利湿，凉血散淤的功能。临床上用于保肝利胆，抗炎镇痛，降压调脂，抗菌消炎，抑制中枢，促进胰腺分泌的治疗，是我国中医临床常用大宗药材品种之一，主产于江西、湖南等地。梔子的化学成分复杂，其中含有多种环烯醚萜类化合物，包括梔子苷、羟异梔子苷、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷酸、京尼平等，其中，梔子苷是梔子的主要有效成分。由于受地理因素和生长环境的影响，不同产区的栽培和野生梔子的化学组成不尽相同。

中药指纹图谱能全面反映中药所含内在化学成分的种类与数量，进而分析中药的质量。现阶段，中药的有效成分绝大多数没有明确，采用中药指纹图谱的方式将会有效地表征中药特征。因此，本文采用Thermo Ultimate 3000高效液相色谱仪对梔子提取物进行梯度洗脱分析，建立了梔子药材的指纹图谱液相色谱分析条件，并进行了重现性和稳定性等实验，可用于梔子等中药材的质量控制和相关进一步的分析研究。

分析柱：Acclaim 120 C18，5 μ m，4.6 \times 150mm，P/N：059149；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

检测方式：紫外检测器，波长238nm；

进样量：20 μ L；

流动相条件见表2-32，对照品及样品测定谱图见图2-53、2-54。

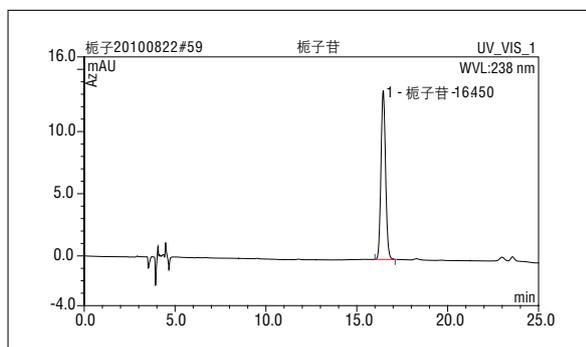


图2-53 对照品色谱图

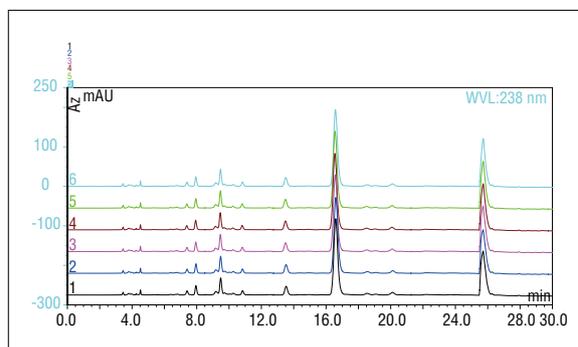


图2-54 供试品连续进样6次色谱图

根据以上优化的色谱条件进行分析, 对照品桅子苷保留时间为16.450 min, 峰面积3.9694 mAU*min, 对称因子1.05, 有效理论塔板数20435。通过精密度实验与稳定性试验等, 及与对照品进行相关分析比较, 证明该条件方法可用于桅子的指纹图谱分析。

表2-32 流动相条件及梯度

Time (min)	Flow (mL/min)	A% ACN	B%0.05% 三氟乙酸
-1.0	0.8	3	97
0	0.8	3	97
6.0	0.8	9	91
12.0	0.8	9	81
21.0	0.8	16	84
21.1	0.8	60	40
25.0	0.8	75	25
28.0	0.8	75	25
28.1	0.8	3	97
35.0	0.8	3	97

2.7 液相色谱在药用辅料中的分析应用

2.7.1 生物缓冲液中的盐酸胍与氯离子

盐酸胍, 白色结晶性粉末, 易溶于水和乙醇, 水溶液呈中性, 主要用于医药、农药、染料及其它有机合成物的中间体。

盐酸胍属于紫外末端吸收和易电离化合物, 在反相液相色谱上保留很弱难于检测, 通常采用离子交换色谱电导检测器法或离子对液相色谱紫外检测器法进行分析, 离子色谱电导检测器法能分别测定胍和氯离子, 且对胍和氯离子的检测灵敏度较高, 但不能用同一根色谱柱同时分离胍和对离子-氯离子; 离子对试剂液相色谱紫外检测器法, 分离度较好, 但胍类处于紫外末端吸收, 极易受到离子对试剂造成的背景升高的影响, 使得检出限较高, 达不到分析的要求。本文采用了Trinity P1色谱柱, 一种新型的三位一体混合基质色谱柱, 能对有机化合物-胍和其对离子-氯离子进行同时分离, 同时采用一种新型的通用型检测器-电雾式检测器 (CAD) 同时对阴、阳离子和有机物进行同步检测。结果表明, 采用Trinity P1色谱柱和CAD检测器能对胍和氯离子进行了分离检测, 取得了较理想的结果, 同时, 该方法简单易行, 相对离子对液相色谱紫外检测器法和分光光度法等都有明显的优势。

色谱柱: Acclaim Trinity P1, 3 μ m, 3.0 \times 100mm,

P/N: 071387;

流动相A: 乙腈, 流动相B: 0.020mol/L醋酸铵溶液, pH5.0 (醋酸调节), A: B=30: 70, 等度洗脱; 流速0.5 mL/min; 分析时间15 min;

检测方式: Corona Ultra电雾式检测器, 氮气 (雾化气) 压力, 35 psi; 雾化室温度, 25 $^{\circ}$ C; 采样频率, 5 Hz;

柱温: 30 $^{\circ}$ C;

进样体积: 1.0 μ L;

测定谱图见图2-55。

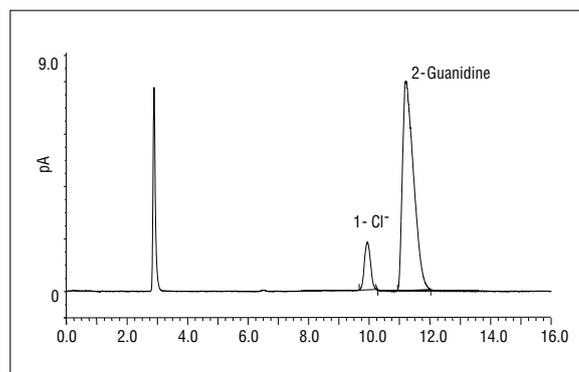


图2-55 样品色谱图
1. Cl⁻; 2. Guanidine

该方法采用Trinity P1柱结合CAD检测器同时分析测定了生物缓冲液中胍和氯离子，操作简单、易于掌握，该方法也可用于测定代谢过程或合成的医药中间体与其对离子。但该方法对离子的检测，相对离子色谱电导检测器而言，灵敏度稍差，若要进一步提高灵敏度，可以采用Trinity P1柱在HILIC模式下进行分析，检测限能降低4-5倍左右。

2.7.2 蛋白药物中的聚山梨醇酯20

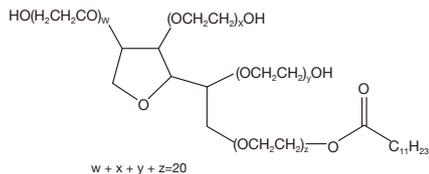


图2-56 聚山梨醇酯20分子结构式

聚山梨醇酯20 (Polysorbate 20)，商品名为吐温20 (Tween 20)，分子结构式见图2-56，是聚山梨醇酯类中的一种，属于非离子型表面活性剂，具有乳化、扩散、增溶、稳定等作用。在生物制药行业中，聚山梨醇酯常用作蛋白乳化剂，可减少蛋白质之间原有的相互作用，且不破坏蛋白的结构。

聚山梨醇酯20含有较多的亲水性基团，没有强生色官能团，采用常用的反相液相色谱-紫外检测器较难进行准确的定性与定量测定。混合液相色谱分离模式蒸发光散射检测器法，是一种较为理想的方法，但由于该检测器灵敏度低，重现性差；液质联用法，分析聚山梨醇酯，由于其成分较复杂，因此定量较麻烦，且仪器使用成本较高；本文尝试采用一款较新的高灵敏度、通用型检测器-电雾式检测器 (CAD) 进行了分析，CAD是一款通用型的质量检测器。因此，利用这款检测器，检测蛋白药物中的聚山梨醇酯20的含量的方法具有一定的可行性和借鉴意义。

色谱柱：Oasis MAX，30 μ m，2.1 \times 20 mm，

P/N: 186002052；

流动相A：2%甲酸的异丙醇溶液，流动相B：2%甲酸水溶液，梯度洗脱，流速1 mL/min，洗脱程序见表2-33。

检测方式：(1) Corona Ultra电雾式检测器，氮气（雾化气）压力，35 psi，雾化室温度，30 $^{\circ}$ C；采样频率，5 Hz。

(2) 二极管阵列检测器，波长为280 nm。

柱温：30 $^{\circ}$ C；

进样体积：30 μ L；

测定结果见图2-57。

表2-33 梯度洗脱表

时间/min	A%	B%
0	10	90
1.0	20	80
3.4	20	80
3.5	100	0
4.5	100	0
4.6	10	90
7.0	10	90

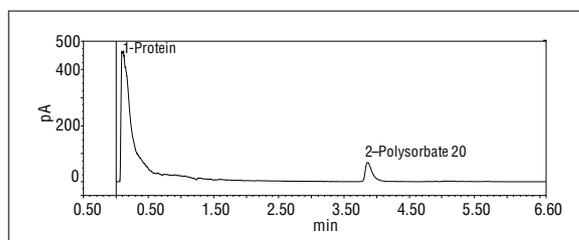


图2-57 样品色谱图

(1号峰主要为蛋白，2号峰为聚山梨醇酯20)

本实验建立了蛋白类药物，如某人源化单克隆抗体中聚山梨醇酯20的含量测定方法。经过精密度、重复性、线性等方法学考察，表明本方法准确度高，精密度、重现性较好，在9.4-188 μ g \cdot mL $^{-1}$ 范围内，线性相关较好 ($r=0.9994$)，定量限达1.1 μ g \cdot mL $^{-1}$ ，可作为药物及制剂中聚山梨醇酯20的含量测定方法。CAD作为质量型检测器，当需要检测更低浓度样品，可以通过适当增大进样体积，或进行柱后有机相补偿，提高化合物的响应，降低定量检出限。同时，由于该检测器响应因子一致，可以通过聚山梨醇酯20的浓度同步对蛋白类药物进行初步半定量分析。总体而言，该方法设计巧妙，原理新颖，操作使用方便，取得了较理想的结果，因此具有较好的推广与借鉴意义。

第三章 元素分析篇

3.1 原子吸收光谱仪 (AAS)

3.1.1 原子吸收光谱的基本原理

原子吸收光谱分析基本原理是将光源辐射出的待测元素的特征光谱通过样品的蒸汽中待测元素的基态原子所吸收，由发射光谱被减弱的程度，进而求得样品中待测元素的含量。

原子吸收光谱仪由光源、原子化器、光学系统、检测系统和数据工作站组成。光源提供待测元素的特征辐射光谱；原子化器将样品中的待测元素转化为自由原子；光学系统将待测元素的共振线分出；检测系统将光信号转换成电信号进而读出吸光度；数据工作站通过应用软件对光谱仪各系统进行控制并处理数据结果。

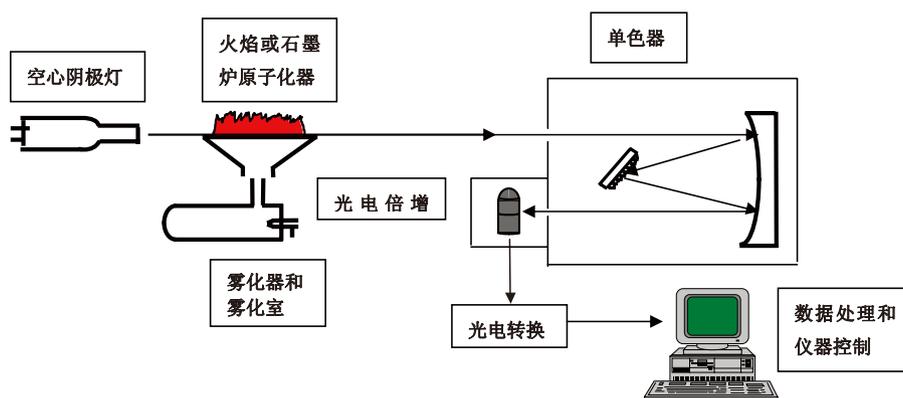


图 3-1 原子吸收光谱仪结构示意图

3.1.2 Thermo iCE 3000系列原子吸收光谱仪的技术特点



图3-2 iCE3500原子吸收光谱仪实物图

iCE3000 系列AA是Thermo Fisher最新研发的原子吸收光谱仪。获IBO设计金奖的原吸产品，赋予iCE3000具有高自动化，灵敏度高，后期使用成本低的优点。

iCE3000系列均采用专利的Stockdale双光束系统，在稳定基线漂移下同时获得最大能量。iCE 3500是当今最为完美的火焰和石墨炉双原子化器系统，无需手动或者机械切换，瞬间完成从火焰到石墨炉分析的切换。石墨炉具有塞曼、氘灯和联合方式多种背景校正技术，满足了高灵敏度、宽动态线性范围和全波长范围以及结构化背景校正的要求。GFTV石墨炉可视系统可以清晰地观察到石墨管中包括进样、干燥和灰化的情况，并可方便调整自动进样器进样位置，是最佳的石墨炉分析辅助工具。ELC长寿命石墨管可以保证在2800度使用2000次，降低了石墨炉分析的使用成本。全软件控制的VP100氢化物发生器，新型汽液分离装置，高灵敏而且稳定性好。独特的Wizards向导软件指导使用者轻松完成包括仪器调整、参数最佳化、测试和报告

等各种任务。SOLAAR Security能够保护您的数据，用于符合满足特定要求或是GLP操作规范。软件包提供包括电子签名、事件记录、审计示踪以及操作控制等所以工具，使您的分析可满足FDA 21 CFR Part11规定的所有要求。完整的AA Validator校验包为火焰、石墨炉系统提供了日志、SOP标准操作规程和检查表，满足仪器性能校验及3Q验证的要求。

3.2 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES)

3.2.1 电感耦合等离子体发射光谱的基本原理

样品首先被雾化器吹散成粒径为1-10 μm 之间的的气溶胶，经氩气由中心管注入等离子体中，雾滴在进入ICP之前，经雾化室除去大雾滴使到达ICP的气溶胶微滴快速地去溶、蒸发、原子化和离子化，从而发射出各元素的特征发射谱线，经光学系统分光后，根据发射谱线的强度与溶液中的已知元素浓度进行标准曲线校正，从测得的未知样品元素强度从而得到浓度值。

电感耦合等离子体原子发射光谱 (ICP-AES) 技术的先驱是Greenfield和Fasel，他们在1964年分别发表了各自的研究成果。七十年代后该技术取得了真正的进展，1974年美国的Thermo Jarrell-Ash公司研制出了第一台商用电感耦合等离子体原子发射光谱仪。

3.2.2 Thermo iCAP 7000系列电感耦合等离子体原子发射光谱仪的技术特点



图3-3 iCAP7400电感耦合等离子体发射光谱仪实物图

iCAP 7000系列是Thermo Fisher 最新开发的ICP光谱仪，从2013年全球发布，以其优异的性能、独特的设计、人性化易使用和多用途高效率等特点吸引了很多客户的眼球。iCAP 7000具有双向和垂直两种观测方式，可以适用于要求低检出限和耐复杂基体各种应用的需求。

RACID86检测器具有60%以上的紫外量子化效率，提高了Al 167、P 174和B182谱线的灵敏度，15秒积分时间可以获得亚ppb级的检出限，尤其是紫外谱线的检出限在同类仪器中处于领先地位。新型固态RF发生器采用变频快速匹配，适合于有机样品直接进样。独特的CFD等离子体炬室设计，耐高温的SiN锥口，可有效去除水平炬的尾焰，并保持良好紫外灵敏度。精密机内恒温 and 先进波长校准技术确保长期稳定性，无需重复曲线校准。高分辨率，200nm处光学分辨率为0.007nm，P213.618、Cu213.598nm谱线可完全分开。高效快速分析，可在1分钟内完成多达60个元素的测定。270 $^{\circ}\text{C}$ 人体工学设计大进样室，前置大蠕动泵，中心管和炬管使用卡式安装拆卸，快速简便。EMT炬管适合于包括30%盐水等高基体样品分析，延长使用寿命，方便更换清洗。等离子体冷却气流量低，光室采用多点分布驱气方式，远紫外区可快速达到真空，节省氩气消耗。FullFrame全谱摄谱研究模式可以拍摄“指纹”谱图，进行材料杂质元素识别，全谱图比对和基体谱图差减，方便元素定性和半定量测定。Qtegra软件提供对仪器所有功能全自动控制；数据库兼容性好，并符合FDA 21CFR Part 11 规范。

3.3 电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS)

3.3.1 电感耦合等离子体质谱的基本原理

样品溶液通过蠕动泵导入到气动雾化器中。雾化器将溶液带入到高速氩气流的尖端，从而形成很细的气溶胶。雾化后的样品根据液滴大小在喷雾室中被分散。大的液滴被阻挡，而小的液滴随着气流进入到等离子体中。连续供给的射频场形成了由氩原子、离子和电子组成的高能量的氩等离子体。等离子体最热的部位能达到6000-8000 K。在等离子体中，气溶胶液滴被蒸发、原子化和离子化。离子是通过一个金属锥（采样锥）的采样孔在大气压下进入到约为2mbar的扩散区域，随后通过第二个金属锥（截取锥）的孔径进入到中间室。

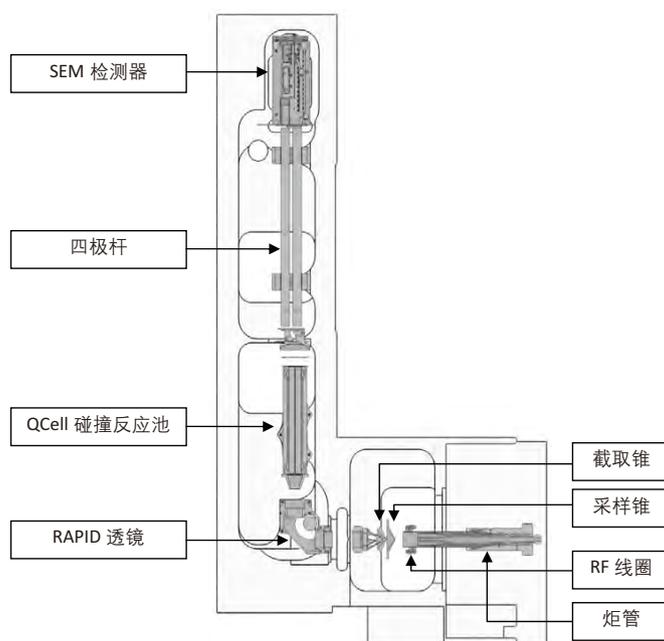


图3-4 ICP-MS结构示意图

静电离子透镜系统通过一个差式的小孔将离子束聚焦到约为 10^{-7} mbar的分析器室。这些离子在四极杆上按照质荷比大小以微秒级的时间尺度被过滤。被选择的质量数在一个离散的打拿极电子倍增器上被检测。倍增器有两种同步操作模式：脉冲计数和模拟。这两种模式相结合能无缝检测横跨8-9个数量级的信号。“交叉校准”检测器用于将模拟计数转换成等量的脉冲计数。检测器的输出信号与气溶胶中元素的浓度成比例关系，因此如果将仪器响应值与已知浓度的标样做校准曲线就能计算未知样品的浓度。

3.3.2 Thermo iCAP Q系列ICP-MS的技术特点

较低的检出限要求，在药物分析中几个重点的重金属元素限值较低。iCAP Q ICPMS具有极低的背景等效浓度（BEC），因此对于上述的低含量元素可以获得理想的检出限，因此可以完成最苛刻的痕量分析。

高低含量元素同时分析，药物中的往往同时关注高含量元素如K Na, Ca, Mg, Ba, Sr等元素，在多数样品含量均在 $\mu\text{g/mL}$ （ppm）的水平，最高可以高达 $100\mu\text{g/mL}$ 以上。高含量元素分析并不是ICP-MS分析的优势，ICP-MS最大的特点还是低检出限以及痕量分析能力。但是考虑到国标要求测定的无机元素高达31种，因此快速，简便的多元素同时分析对ICP-MS用户是非常重要的。iCAP Q ICP-MS配置的高性能检测器具有高达9个数量级的线性范围，可以从 $<1\text{cps}$ 到 10^{10}cps 之间做出线性响应。即便如此，对于高含量的碱金属与碱土金属分析，我们还需要对仪器稍作调整，使检测器工作在适中的强度下，从而延长检测器寿命，降低使用成本。iCAP Q ICP-MS标准配置的Xt接口具有非常理想的灵敏度响应特点，即灵敏度随着质量数增加而增高，因此对于高含量的轻质量元素，可以提高更高的检测上限，无需任何高级技术，

皆可在Xt接口上分析高达 200ppm 的Na溶液，而同时并不影响低含量的重金属元素的准确测定。

采用高分辨率技术（High Resolution），可以进一步衰减高含量元素灵敏度，软件中只需点击设置即可使用。采用CCT技术不仅可以去除干扰，同时也可以有效降低轻质量元素灵敏度，因此也可以作为药物中高含量元素分



图3-5 iCAP Q 电感耦合等离子体质谱仪实物图

析的模式选择。另外，将HPLC、IC等色谱与ICP-MS连用进行元素的多种元素形态分析已经成为一种趋势，被越来越被的更多的用户和实验所认可。

3.4 Thermo提供完整的元素分析解决方案

面对严格的法规要求，赛默飞世尔提供全面的痕量元素分析产品，从而保证快速、准确的完成大批量样品的多元素分析工作，具体比较可参见表3-1。

表3-1 Thermo元素分析产品检测能力对比

元素分析仪器	分析性能	样品分析速度	线性范围	操作/维护复杂程度
iCE3000系列 火焰原子化	多数元素获得mg/L、 mg/kg级检出限	单个元素分析， 重复3次测量10秒完成	1-2个数量级 线性范围	操作简单，维护成本较低
iCE3000系列 石墨炉原子化	多数元素获得μg/L、 μg/kg级检出限	单个元素分析， 90秒完成	1-2个数量级 线性范围	操作比较复杂，耗材成本较高
iCAP6000系列 ICP-OES	多数元素获得μg/L、 μg/kg级检出限	多元素同时分析， 30秒完成	5-6个数量级 线性范围	操作简单，维护成本较低
iCAP Q ICP-MS	多数元素获得ng/L、 ng/kg级检出限	多元素同时分析， 平均3min/样品	高达9个数量级 线性范围	操作调整复杂，对用户要求 较高，需要一定的定期维护

3.5 元素分析在化学药物分析中的应用

3.5.1 ICP-MS测定肝素钠样品多种重金属和贵金属含量

肝素钠，对凝血过程的许多环节都有影响，可延长凝血时间和凝血酶原时间，不论在体内或体外，都有迅速的抗凝血作用；2008年3月19日，为加强对肝素产品生产和质量的监督管理，国家药监局发布了《关于进一步加强肝素钠药品生产质量监督管理的通知》（国食药监电[2008]10号），要求各食品药品监督管理局加强对辖区内肝素钠原料药、制剂生产企业生产质量监督检查工作。2009年，美国FDA 为确保肝素产品质量和防止潜在污染，由美国药典委员会对肝素产品采用了新的质量控制方法，修订后的美国药典标准已于2009年10月1日起公布生效；欧洲药典也于2010年8月1日更新了肝素钠的质量标准。

试验样品采用微波密闭消解方式，在2% HNO₃介质中以10ng/mL的Sc、Y、In、Bi溶液作为内标控制元素，内标控制稳定性数据见图3-6。通过优化调整仪器Q-Cell KED（低质量数剔除）技术参数，具体仪器测定参数参见表3-2，有效地去除了干扰物的产生和影响，实现对27种元素的准确测量，样品测定结果见表3-4。

表3-2 仪器测定参数

仪器参数	设定值	仪器参数	设定值
Analyzer Pressure Readback (mbar) 真空度	7E ⁻⁰⁷	Plasma Power (W) 激发功率	1550
Spray Chamber Temperature (°C) 雾室温度	2.70	Peristaltic Pump Speed (rpm) 蠕动泵速	40.00
Cool Flow (L/min) 冷却气流量	14.00	Auxilliary Flow (L/min) 辅助气流量	0.80
Sampling Depth (mm) 采样深度	5.00	Nebulizer Flow (L/min) 雾化气流量	1.16
Torch Horizontal Position 炬管水平位置	0.81	Torch Vertical Position 炬管垂直位置	-0.68
Q Cell gas (L/min) 碰撞气	4.2	KED 低质量数剔除	3

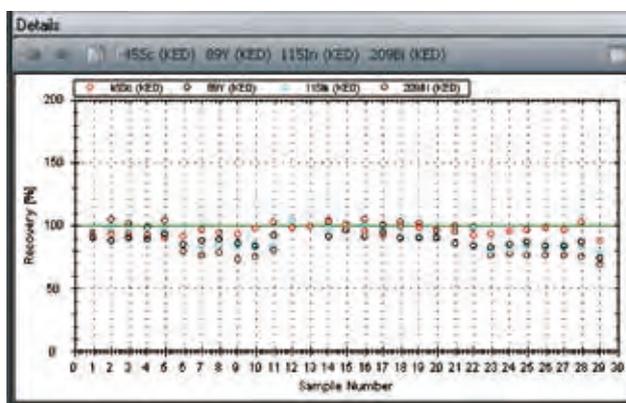


图3-6 内标控制稳定性数据

表3-4 样品分析结果 (mg/Kg)

元素	²⁴ Mg	²⁷ Al	⁴⁴ Ca	⁴⁸ Ti	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁵ Mn	⁵⁷ Fe	⁵⁹ Co
平行样品1	0.393	4.05	37	1.45	1.89	0.072	<0.01	0.623	<0.01
平行样品2	0.372	3.91	38.6	1.45	1.62	0.128	<0.01	0.91	<0.01
加标5ng/mL	5.03	--	--	5.14	4.77	4.84	4.17	5.96	4.45
回收率%	100.6	--	--	102.8	95.4	96.8	83.4	119.2	89
元素	⁶⁰ Ni	⁶³ Cu	⁶⁶ Zn	⁷⁵ As	⁷⁸ Se	⁸⁸ Sr	⁹⁸ Mo	⁹⁹ Ru	¹⁰³ Rh
平行样品1	0.022	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	19.7	0.01	<0.001	<0.001
平行样品2	0.019	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	19.3	0.011	<0.001	<0.001
加标5ng/mL	4.26	4.26	4.4	4.38	4.25	--	5.11	5.14	4.76
回收率%	85.2	85.2	88	87.6	85	--	102.2	102.8	95.2
元素	¹⁰⁷ Ag	¹⁰⁸ Pd	¹¹¹ Cd	¹¹⁶ Sn	¹²¹ Sb	¹³⁷ Ba	¹⁹³ Ir	¹⁹⁵ Pt	²⁰⁸ Pb
平行样品1	0.008	0.002	<0.01	0.012	0.011	5.36	<0.001	<0.001	<0.01
平行样品2	0.008	0.002	<0.01	0.014	0.013	5.37	<0.001	<0.001	<0.01
加标5ng/mL	4.78	4.65	4.58	5.25	5.22	--	5.97	5.57	5.49
回收率%	95.6	93	91.6	105	104.4	--	119.4	111.4	109.8

3.5.2 ICP-MS测定化学药物样品中多种重金属和贵金属含量

监测和控制药物制剂中的金属杂质是制药行业的重点，因为药物生产和制药过程往往涉及直接添加金属（作为催化剂）或通过受污染的试剂、生产过程中药物成分接触金属表面等原因无意引入金属。历史上，曾通过肉眼比色法检测金属硫化物（美国药典231方法（USP 231））等主观测试作为定性分析方法，但这些方法现已确认是不准确的，而且不能全面检测出所有相关金属成分。2008年8月，美国国家科学院医学研究所（IOM）举办了一次研讨会，与会者提出了制定上述测量的改进方法并统一分析方法的计划。随后，修订版的杂质限值（USP 232）和新的分析步骤（USP 233）敲定，其中介绍了使用ICP-OES和ICP-MS测定医药产品中金属杂质的方法。

表3-5 USP232元素限量指标 (μg)

元素	V	Cr	Mn	Ni	Cu	As	Mo	Hg
每日剂量限值 (PDE*)	250	250	2500	250	2500	15.0	250	15.0
每次剂量限值 (J)	62.5	62.5	625	62.5	625	3.75	62.5	3.75
元素	Pb	Pd	Cd	Pt	Os	Ir	Rh	Ru
每日剂量限值 (PDE)	10.0	100	5.00	100	<100 (总量不超过)			
每次剂量限值 (J)	2.50	25.0	1.25	25.0				

PDE*, Permitted Daily Exposure based on a 50 kg person;

J, 每次剂量限值, 每日以4次计算。

分析共使用三种制药样品, 分别为: 可溶性阿司匹林产品 (片剂)、感冒和流感药剂 (粉剂)、儿童咳嗽糖浆 (液体); 每种样品 (5.00 ± 0.05 g) 溶入500 mL含有1% (v/v) HNO₃、0.5% (v/v) HCl和200 μg/L Au的稀释剂, 之后再以同样的稀释剂稀释10倍, 以备分析。用同一稀释剂配置校准溶液, 使用外部校准方法测量样品与之对照。校准溶液含有“USP 232元素杂质-限值”中列出的全部16种元素, 分别用10、5和5 μg/L的Ga、In和Tl作为内标物, 通过三通管直接在线加入进行标准化。

Thermo Scientific iCAP Qc ICP-MS所用的进样系统包括标准的Peltier冷却石英气旋雾化室、PFA 同心雾化器和可拆卸石英矩管 (2.5 mm内径, 石英进样器)。同时也使用了标准的镍制样品锥和Skimmer锥。该仪器在使用动能区分 (KED) 的单一碰撞池模式下运行, 采用纯氦气作为碰撞气体。采用Elemental Scientific公司 (Omaha, NE, USA) 生产的SC4 DX自动进样器采集所有样品进行分析, 具体仪器测定参数参见表3-7, 样品测量结果见表3-7, 内标控制稳定性见图3-7, 以及样品基体条件1J加标精密度数据见表3-9。

表3-6 仪器测定参数

参数	设定值
功率	1550 W
雾化气	0.89 L/min
辅助气	0.8 L/min
冷却气	14 L/min
碰撞池气体	He, 7 mL/in
进样和冲洗时间	45 s
峰值点数	1
重复次数	3
采集时间	3.5 min

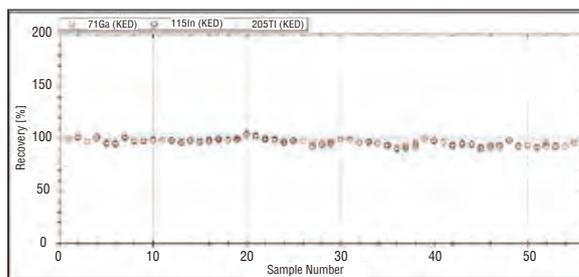


图3-7 内标控制稳定性数据

表3-7 样品测量结果 (μg/5g)

样品	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁵ Mn	⁶⁰ Ni	⁶³ Cu	⁷⁵ As	⁹⁸ Mo	¹⁰² Ru
可溶性阿司匹林1#	N.D.	0.04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
可溶性阿司匹林2#	N.D.	0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
可溶性阿司匹林3#	N.D.	0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
感冒和流感药剂1#	0.012	0.03	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.
感冒和流感药剂2#	0.012	0.03	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	N.D.	N.D.

感冒和流感药剂3#	0.015	0.02	N.D.	N.D.	0.01	N.D.	N.D.	N.D.
止咳糖浆1#	N.D.	N.D.	1.00	N.D.	0.05	N.D.	N.D.	N.D.
止咳糖浆2#	N.D.	N.D.	0.97	N.D.	0.05	N.D.	N.D.	N.D.
止咳糖浆3#	N.D.	N.D.	1.01	N.D.	0.06	N.D.	N.D.	N.D.
样 品	¹⁰³ Rh	¹⁰⁶ Pd	¹¹¹ Cd	¹⁸⁹ Os	¹⁹³ Ir	¹⁹⁵ Pt	²⁰² Hg	²⁰⁸ Pb
可溶性阿司匹林1#	N.D.							
可溶性阿司匹林2#	N.D.							
可溶性阿司匹林3#	N.D.							
感冒和流感药剂1#	N.D.							
感冒和流感药剂2#	N.D.							
感冒和流感药剂3#	N.D.							
止咳糖浆1#	N.D.	0.019						
止咳糖浆2#	N.D.	0.017						
止咳糖浆3#	N.D.	0.018						

表3-9 感冒和流感制剂基体条件1J加标精密度 (μg)

样品	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁵ Mn	⁶⁰ Ni	⁶³ Cu	⁷⁵ As	⁹⁸ Mo	¹⁰² Ru
感冒和流感药剂1#	65.2	63.6	642	62.6	627	4.03	63.9	6.11
感冒和流感药剂2#	64.8	63.3	636	61.5	613	4.04	64.1	6.28
感冒和流感药剂3#	65.8	64.1	651	62.3	620	4.10	66.7	6.31
感冒和流感药剂4#	66.3	64.8	649	62	627	4.09	66.2	6.46
感冒和流感药剂5#	66.4	65.1	656	63.1	634	4.07	65.0	6.39
感冒和流感药剂6#	66.6	64.7	655	62.2	623	4.01	63.5	6.21
平均值	65.9	64.3	648	62.3	624	4.1	64.9	6.29
标准偏差	0.72	0.72	7.78	0.54	7.16	0.04	1.31	0.13
RSD, %	1.09	1.12	1.20	0.87	1.15	0.88	2.01	1.99
样品	¹⁰³ Rh	¹⁰⁶ Pd	¹¹¹ Cd	¹⁸⁹ Os	¹⁹³ Ir	¹⁹⁵ Pt	²⁰² Hg	²⁰⁸ Pb
感冒和流感药剂1#	6.07	23.9	1.24	6.40	6.41	25.60	3.66	2.49
感冒和流感药剂2#	6.13	24.2	1.27	6.17	6.39	25.30	3.68	2.43
感冒和流感药剂3#	6.30	25.1	1.18	6.19	6.45	25.50	3.75	2.46
感冒和流感药剂4#	6.35	25.5	1.27	6.21	6.48	26.20	3.77	2.43
感冒和流感药剂5#	6.24	24.6	1.22	6.10	6.33	25.20	3.71	2.37
感冒和流感药剂6#	6.04	24.2	1.22	6.27	6.54	26.00	3.78	2.48
平均值	6.19	24.6	1.23	6.22	6.43	25.6	3.73	2.44
标准偏差	0.13	0.61	0.03	0.10	0.07	0.39	0.05	0.04
RSD, %	2.05	2.49	2.79	1.65	1.14	1.53	1.32	1.79

3.6 元素分析在中药分析中的应用

3.6.1 ICP-OES测定丹参与赤芍中重金属和多种微量元素含量

《中国药典2010版》其中一部（中药）就收载2136种，中药材植物除了在生长过程中受到地域性重金属本底的影响，近年来还受到污水、污泥、肥料、采矿以及工业废弃物的肆意排放等影响，使用一些地区中药材中重金属污染日益严重。重金属的过量摄入将对人体的新陈代谢及正常的生理作用具有明显的伤害并导致各种疾病的发生，近年来许多国家和地区均对中药材中重金属含量具有严格法规性的限量标准，如中国药典2010版、美国药典USP232等，这都将着力解决制约中药药品质量与安全的突出问题，大大提高中药药品标准质量控制水平。

中药材样品采用硝酸溶解后，并在硝酸介质中，按照优化后的仪器参数条件及筛选后的分析谱线，对于重金属As、Hg采用在线混合-气液分离-氢化物发生法测量，而对于Pb、Cd以及其它多种微量元素则采用常规标准曲线法进行测量，具体仪器参数见表3-10。

表3-10 仪器参数

仪器条件	设置条件	部件号
进样泵管	聚氯乙烯，橙/白，ID=0.64	8423 120 51511
排液泵管	聚氯乙烯，白/白，ID=1.02	8423 120 51551
还原剂管	聚氯乙烯，白/蓝	
雾化器 ^①	石英，同心雾化器	8423 120 51431
雾化器 ^②	石英，V-G雾化器	8423 120 51321
载气流量	0.6 LPM ^① ， 0.4LPM ^②	
雾化室	石英，高效旋流雾化室	8423 120 51411
炬管中心管	石英，2.0mm中心管	8423 120 51971
观测方式	水平	8423 120 51741
RF功率	1200 W	
积分时间	LOW-15 秒，High-5秒	

实验通过标准配置和氢化物发生法进样系统对相同溶液进行了比较测试，当As元素采用了氢化物发生法其灵敏度提高约12倍，Hg元素采用氢化物发生法后其灵敏度提高约26倍，具体数据见表3-11。

表3-11 标准进系统与氢化物发生法进样系统灵敏度对比表

测量方法	元素	净强度	原始强度	背景强度	信背比	净强度比（灵敏度提高）
标准进样系统	As	131.3	443.8	312.5	1.42	11.7
氢化物发生法		1531.2	1882.8	351.6	5.35	
标准进样系统	Hg	157.7	450.0	292.3	1.54	26.0
氢化物发生法		4106.3	4420.1	313.8	14.1	

分别通过在线混合-气液分离-氢化物发生法和标准配置进样系统两种方法对空白溶液（10% HNO₃）进行连续11次的测量，以11次空白溶液的3倍标准偏差做为该条件下的检出限（μg/mL），其中方法法定量限采用3倍检出限乘以稀释因子30（0.5g+0.5g→30g）得到，见表3-12。

表3-12 重金属元素的检出限与方法定量限

元素	波长 (nm)	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	方法定量限 ($\mu\text{g/g}$)	元素	波长 (nm)	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	方法定量限 ($\mu\text{g/g}$)
As*	189.042	0.0003479	0.0313	Hg*	184.950	0.0000501	0.0045
Pb	220.353	0.0009863	0.0888	Cd	214.438	0.0000784	0.0071

选取丹参GBW (E) 090066和赤芍GBW (E) 090067两种中药材中重金属及微量元素成分分析标准物质进行测量,其标准物质推荐值、实际测量值、分析精密度信息见表3-13和表3-14。

表3-13 丹参GBW (E) 090066标准物质测量结果及精密度 (n=3)

元素	波长 (nm)	推荐值 ($\mu\text{g/g}$)	测量值 ($\mu\text{g/g}$)	精密度 (RSD,%)	元素	波长 (nm)	推荐值 ($\mu\text{g/g}$)	测量值 ($\mu\text{g/g}$)	精密度 (RSD,%)
As*	189.042	0.40 \pm 0.06	0.34	2.599	Hg*	184.950	0.012 \pm 0.001	0.010	13.53
Pb	220.353	0.93 \pm 0.04	0.89	2.119	Cd	214.438	0.047 \pm 0.004	0.043	2.317
Cu	324.754	11.6 \pm 1.1	11.83	0.993	Ni	231.604	15.1 \pm 2.1	15.34	1.028
Mn	257.610	31.7 \pm 2.5	30.95	0.853	Fe	259.940	1131 \pm 16	1138	1.065
Ca	181.450	2941 \pm 62	2890	0.706	Ba	233.527	50.5 \pm 1.8	52.05	0.44
Cr	267.716	---	27.03	1.265	V	292.402	---	3.213	1.22

表3-14 赤芍GBW (E) 090067标准物质测量结果及精密度 (n=3)

元素	波长 (nm)	推荐值 ($\mu\text{g/g}$)	测量值 ($\mu\text{g/g}$)	精密度 (RSD,%)	元素	波长 (nm)	推荐值 ($\mu\text{g/g}$)	测量值 ($\mu\text{g/g}$)	精密度 (RSD,%)
As*	189.042	0.108 \pm 0.009	0.107	1.543	Hg*	184.950	0.011 \pm 0.001	0.011	8.669
Pb	220.353	0.37 \pm 0.03	0.362	1.675	Cd	214.438	0.102 \pm 0.007	0.106	0.334
Cu	324.754	4.6 \pm 0.4	5.026	0.587	Ni	231.604	2.9 \pm 0.5	2.667	2.204
Mn	257.610	13.4 \pm 1.2	14.02	1.001	Fe	259.940	205 \pm 9	208	1.141
Ca	181.450	21890 \pm 910	22614	0.663	Ba	233.527	50.5 \pm 3.4	51.63	0.567
Cr	267.716	---	2.184	1.376	V	292.402	---	0.51	0.363

注:本节中所带As*、Hg*均为氢化物发生法测量结果;

3.6.2 ICP-MS测定丹参与赤芍中重金属和多种微量元素含量

重金属的过量摄入将对人体的新陈代谢及正常的生理作用具有明显的伤害并导致各种疾病的发生,许多国家和地区均对中药材中重金属含量具有严格法规性的限量标准,如中国药典2010版、美国药典USP232等,这都将着力解决制约中药材质量与安全的突出问题,大大提高质量控制水平。

中药材国家标准物质丹参GBW (E) 090066和赤芍GBW (E) 090067,采用密闭罐电热板消解技术,简化了实验步骤,适合大批量样品分析,采用iCAP Q ICPMS分析不样品中V、Cr、Cd、Mo、Ni、Cu、As和Pb,方法简便快捷,仅用内标即可校正样品基质变化对待测元素的影响,检出限低,满足中国药典2010版、美国药典USP232对上述元素的质控要求,具体仪器参数见表3-15。

表3-15 仪器测定参数

仪器参数	设定值	仪器参数	设定值
真空度 (mbar)	7E ⁻⁰⁷	激发功率 (W)	1550
雾室温度 (°C)	2.70	蠕动泵速 (rpm)	40.00
冷却气流量 (L/min)	14.00	辅助气流量 (L/min)	0.80
采样深度 (mm)	5.00	雾化气流量 (L/min)	1.16
炬管水平位置	-1.43	炬管垂直位置	-0.90

根据检出限的定义，平行7次测定试剂空白溶液和样品空白溶液，采用3倍标准偏差得到对应浓度，按样品稀释倍数200倍（0.1g 样品至20g）计算，得到原始样品中测定元素的仪器检出限和方法检出限，见表3-16。

表3-16仪器和方法检出限

元素	IDL ^a	MDL ^b	LOQ ^c	药典2010限量	LOQ ^a (5g sample)	USP232 PDE ^e (Oral Daily Dose)
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	µg	µg/day
Ni	0.001	0.005	0.016	---	0.08	500
Cr	0.002	0.007	0.023	---	0.12	---
Cd	0.001	0.003	0.011	0.3	0.06	25
Pb	0.001	0.003	0.011	5.0	0.06	5
V	0.002	0.004	0.013	---	0.07	100
Cu	0.002	0.004	0.012	20	0.06	1000
As	0.001	0.003	0.008	2.0	0.04	1.5 (无机砷)
Mn	0.002	0.006	0.019	---	0.09	---

- a. 仪器检出限 (IDL)，稀释倍数200；
- b. 方法检出限 (MDL)，稀释倍数200；
- c. 定量下限 (LOQ)，10/3 × MDL，稀释倍数200；
- d. LOQ (Relative to the original 5g sample)，稀释倍数200；
- e. PDE, Permitted daily exposure based on a 50kg person。

对国家标准物质丹参GBW (E) 090066和赤芍GBW (E) 090067，按照上述实验方法进行前处理，并采用ICPMS进行分析测定，并依次加入不同浓度元素标准溶液，得到加标回收率，结果均在80%~120%，测定结果见表3-17和表3-18。

表3-17 国家标准物质丹参GBW (E) 090066 分析结果

丹参 GBW (E) 090066	参考值 µg/g	测定值 µg/g	加标量 µg/g	测定值 µg/g	回收率 %
Ni	15.1 ± 2.1	13.7	10	24.3	106
Cr	---	22.3	10	33.4	111
Cd	0.047 ± 0.004	0.05	10	11.1	111
Pb	0.93 ± 0.04	0.91	10	12.1	112

V	---	3.55	10	14.1	105
Cu	11.6±1.1	11.3	10	22.3	110
As	0.40±0.06	0.44	10	11.3	109
Mn	31.7±2.5	32.6	10	42.9	103

表3-18 国家标准物质赤芍GBW (E) 090067 分析结果

丹参GBW (E) 090066	参考值 μg/g	测定值 μg/g	加标量 μg/g	测定值 μg/g	回收率 %
Ni	2.9±0.5	2.55	10	12.6	101
Cr	---	1.92	10	12.1	102
Cd	0.102±0.007	0.104	10	10.5	104
Pb	0.37±0.03	0.38	10	9.93	96
V	---	0.46	10	10.1	96
Cu	4.6±0.4	4.87	10	15.8	109
As	0.108±0.009	0.114	10	9.47	94
Mn	13.4±1.2	13.9	10	24.3	104

3.7 元素分析在药用辅料分析中的应用

3.7.1 石墨炉原子吸收法测量明胶空心胶囊中铬元素含量

2012年4月15日, 央视《每周质量报告》曝光“毒胶囊”事件, 现行药典中关于药用明胶和空心胶囊中重金属铬的限量标准为最高不得超过2 mg/kg。受铬元素自身特性所决定, 测量条件将需要较高的原子化和除残温度, 因此对石墨炉原子化系统的升温上限、升温速率、石墨管的耐受性提出了更为严格的要求。

实验中样品前理、测量参数、标准曲线制备等均依照2010版《中国药典》要求, 随机选取三种颜色的胶囊样品, 采用iCE3500系列石墨炉原子吸收光谱仪并结合ELC长寿命石墨管进行了胶囊中铬的分析, 分析参数及石墨炉条件信息见表3-19。

表3-19 仪器参数及石墨炉条件

项目	参数
分析元素:	Cr
测量方式:	石墨炉
背景校正:	横向塞曼
石墨管类型:	ELC
测量波长:	357.9 nm
光谱通带:	0.5 nm
干燥温度:	100
灰化温度:	1200
原子化温度:	2500
除残温度:	2700

其中石墨炉参数详解：

干燥温度：100℃，斜坡升温8秒保持时间30秒，升温速率：10℃/秒，通气0.2L/min；

灰化温度：1200℃，斜坡升温7.3秒保持20秒，升温速率：150℃/秒，通气0.2L/min；

原子化温度：2500℃，原子化时间4秒，升温速率：直接升温，通气0.1L/min；

除残温度：2700℃，除残时间3秒，通气0.2L/min。

在石墨炉分析中，原子化阶段通常情况下采取为停气方式，以相对延长原子蒸汽在石墨管中的停留时间和提高原子蒸汽浓度，进而提高分析灵敏度；但对于高浓度样品分析而言，则需要降低灵敏和有较宽的线性范围以减少稀释环节所带来的误差，通过改善原子化阶段气体流量的方式达到线性范围的扩展。实验样品测量结果、加标回收率见表3-20。

表3-20 样品测量结果及回收率

编 号	溶液浓度 (ng/mL)	加标浓度 (ng/mL)	回收率%	样品结果 (mg/kg)
A颜色胶囊	5.324			
A颜色胶囊加标	10.45	5.0	103	0.53
B颜色胶囊	22.61			
B颜色胶囊加标	50.50	25.0	112	2.26
C颜色胶囊	10.41			
C颜色胶囊加标	34.10	25.0	95	1.04

第四章 气相色谱篇

4.1 气相色谱、气质联用原理

4.1.1 气相色谱基本原理

气相色谱法 (gas chromatography 简称GC) 是色谱法的一种。气相色谱法由于所用的固定相不同, 可以分为两种, 用固体吸附剂作固定相的叫气固色谱, 用涂有固定液的担体作固定相的叫气液色谱。

GC主要是利用物质的沸点、极性及吸附性质的差异来实现混合物的分离, 其过程如图4-1所示。

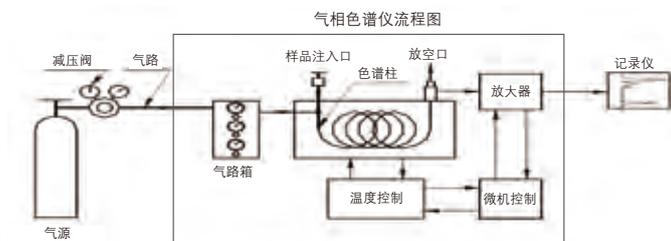


图4-1 气相色谱分析流程图

待分析样品在汽化室汽化后被惰性气体 (即载气, 也称流动相) 带入色谱柱, 柱内含有液体或固体固定相, 由于样品中各组分的沸点、极性或吸附性能不同, 每种组分都倾向于在流动相和固定相之间形成分配或吸附平衡。但由于载气是流动的, 这种平衡实际上很难建立起来。也正是由于载气的流动, 使样品组分在运动中进行反复多次的分配或吸附/解吸附, 结果是在载气中分配浓度大的组分先流出色谱柱, 而在固定相中分配浓度大的组分后流出。当组分流出色谱柱后, 立即进入检测器。检测器能够将流入的样品组分转变为电信号, 而电信号的大小与被测组分的量或浓度成正比, 将这些信号放大并记录下来, 就形成了气相色谱图。

4.1.2 气相色谱的组成

气相色谱仪由以下五大系统组成: 气路系统、进样系统、分离系统、温控系统、检测记录系统。组分能否分开, 关键在于色谱柱; 分离后组分能否鉴定出来则在于检测器, 所以分离系统和检测系统是仪器的核心。

4.1.3 气相色谱检测器

(1) 氢火焰离子化检测器 (FID)

它是气相色谱应用最广泛的气相色谱检测器, 是典型的破坏型、质量型检测器。氢火焰检测器结构简单、性能优异、稳定可靠、操作方便, 对几乎所有的有机化合物都有相应, 而且灵敏度高 (可检测到ppm), 线性范围宽 (10^6 - 10^7)。其主要缺点是需要三种气源 (氮气、氢气和空气) 及其流路控制系统, 尤其是对防爆有严格要求。

(2) 热导检测器 (TCD)

它是气相色谱法最常用的一种通用的非破坏性浓度型检测器, 一直是实际工作中应用最多的气相色谱检测器之一。TCD特别适用于气体混合物的分析, 对于那些氢火焰离子化检测器不能直接检测的无机气体的分析, TCD

更是显示出独到之处。

(3) 电子捕获检测器 (ECD)

电子捕获检测器也是一种离子化检测器，它是一个有选择性的高灵敏度的检测器，它只对具有电负性的物质，如含卤素、硫、磷、氮的物质有信号，物质的电负性越强，也就是电子吸收系数越大，检测器的灵敏度越高，而对电中性（无电负性）的物质，如烷烃等则无信号。

(4) 火焰光度检测器 (FPD)

火焰光度检测器是气相色谱仪用的一种对含磷、含硫化合物有高选择性、高灵敏度的检测器。最小检测量可达 10^{-11} 克，同时，这种检测器对有机磷、有机硫的响应值与碳氢化合物的响应值之比可达 10^4 ，因此可排除大量溶剂峰及烃类的干扰，非常有利于痕量磷、硫的分析，是检测有机磷农药和含硫污染物的主要工具。

(5) 氮磷检测器 (NPD)

氮磷检测器也叫热离子检测器 (TID)。它的特点是对含N、P的化合物具有选择性：对P的响应是对N的响应的10倍，是对C原子的 10^4 倍。此外它的灵敏度高，与FID对P、N的检测灵敏度相比，NPD分别是FID的500倍（对P）和50倍（对N）。

4.1.4 质谱仪的基本结构和功能

质谱系统一般由真空系统、进样系统、离子源、质量分析器、检测器和计算机控制与数据处理系统（工作站）等部分组成。

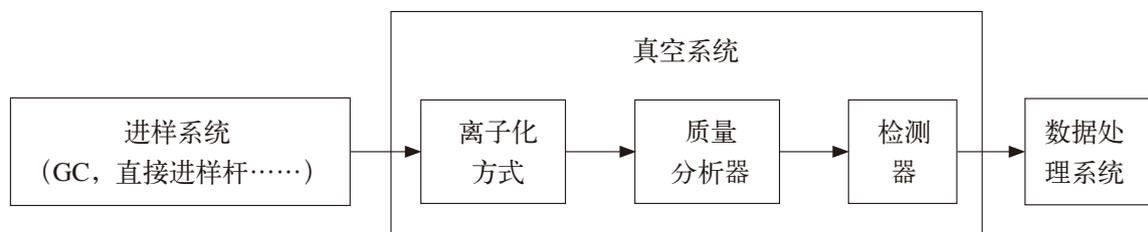


图4-2 气质联用组成示意图

质谱仪的离子源、质量分析器和检测器必须在高真空状态下工作，以减少本底的干扰，避免发生不必要的分子-离子反应。质谱仪的高真空系统一般由机械泵和扩散泵或涡轮分子泵串联组成。

离子源的作用是将被分析的样品分子电离成带电的离子，并使这些离子在离子光学系统的作用下，汇聚成有一定几何形状和一定能量的离子束，然后进入质量分析器被分离。其性能直接影响质谱仪的灵敏度和分辨率。

质量分析器是质谱仪的核心，它将离子源产生的离子按质荷比 (m/z) 的不同，在空间位置、时间的先后或轨道的稳定与否进行分离，以得到按质荷比大小顺序排列的质谱图。以四极质量分析器（四极杆滤质器）为质量分析器的质谱仪称为四极杆质谱。它具有重量轻、体积小、造价低的特点，是目前台式气相色谱-质谱联用仪中最常用的质量分析器。

检测器的作用是将来自质量分析器的离子束进行放大并进行检测，电子倍增检测器是色谱-质谱联用仪中最常用的检测器。

计算机控制与数据处理系统（工作站）的功能是快速准确地采集和处理数据；监控质谱及色谱各单元的工作状态；对化合物进行自动的定性定量分析；按用户要求自动生成分析报告。

4.2 气相色谱，气质联用技术的特点

4.2.1 TRACE 1300系列GC特点



图4-3 TRACE 1300 (左) 和TRACE 1310 (右) 实物图

Thermo Scientific TRACE 1300 Series GC 是世界上第一台也是唯一一台可以让用户方便拆卸、快速更换进样口和检测器的模块化的气相色谱 (图4-3)。它将传统的气路控制单元、加热单元等集中到了一个模块中, 如图4-4所示。通过这种模块化的设计, 它提高了流量的控制精度, 以及检测器的灵敏度和重现性。此外, 它还使得传统实验室用户可以方便地维护进样口和检测器, 例如: 方便用户快速地拆卸、更换进样口和检测器模块 (图4-5), 降低了工作量, 提高了工作效率。

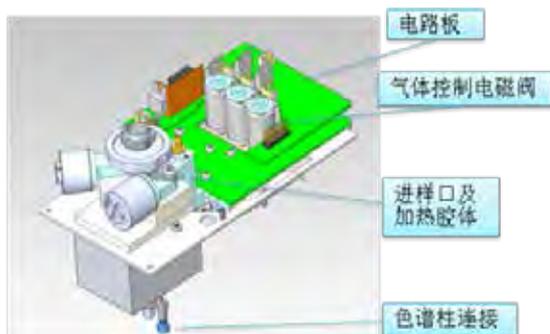


图4-4 模块化的进样口示意图



图4-5 快速更换进样口示意图

4.2.2 ISQ单四级杆质谱特点

赛默飞于2010年正式推出了Thermo Scientific ISQ™单四级杆GC/MS, 其拥有不停真空更换整个离子源的独特功能。配备了最新ExtractaBrite™离子源的ISQ能够为GCMS的常规分析保证最长的运行时间, 提高了工作效率, 简化客户的日常操作。目前, ISQ系列GC-MS系统包括ISQ QD单四级杆GC-MS和ISQ LT单四级杆GC-MS, 该系统基于成熟的技术, 提供可满足您实验室当前及未来需求的解决方案。



图4-6 ISQ QD单四级杆GC-MS (左) 和ISQ LT单四级杆GC-MS (右)

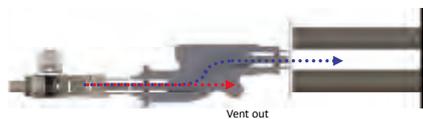


图4-7 独特的“S”型预四级杆

(1) 其独特的”S”型预四级杆设计，最大程度上避免了污染。经过连续7天全天候的高通量样品测试证明ISQ GC/MS是一个非常稳定且耐用的系统。

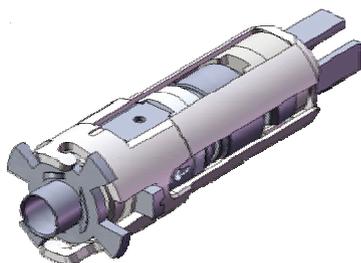


图4-8 新型的ExtractaBrite可拆卸离子源

(2) 新型的ExtractaBrite可拆卸离子源降低了源维护的频率和时间，可以在单位时间测试更多的样品，从而提升了工作效率。

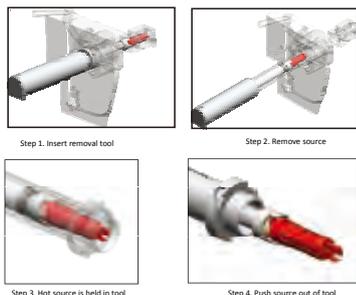


图4-9 不停真空快速更换离子源

(3) ISQ更为突出的特点是在质谱不停真空的情况下，更换整个离子源。当系统需要维护时，可以省去常规系统所需的一切耗时且费力的过程包括停真空、冷却、清洗、重装及重启机器。

(4) 新型的ISQ单四级杆GC/MS将扫描质量范围扩展到1.2-1100 amu，为化合物分析提供更大的平台。

(5) ISQ是适用于当今快速气相色谱方法的理想系统。新的电子元件可以使ISQ从采集数据到读写数据总速率在全扫描125 amu范围下，达到60 amu/s，在实际应用中可真正实现高速数据采集功能。FS/SIM交替扫描方式为用户提供一次进样同时定性定量的解决方案，在一次分析运行中完成化合物确证和筛选。

(6) ISQ GC/MS标配了最新版本的Thermo Scientific TraceFinder软件包，负责GC/MS数据采集、分析和报告。TraceFinder易于使用，通过采集、分析和出报告一体式的工作流程来提高工作效率。

4.2.3 气相色谱自动进样器特点

要获得最佳重现性和准确率，必须进行精确进样。Thermo Scientific AI/AS1310自动进样器、TriPlus 300顶空自动进样器以及TriPlus RSH自动样品处理平台能够为各类样品分析提供理想的解决方案。

(1) AI/AS1310自动进样器

AI1310的基本配置一次可容纳8个样品瓶，而AS1310可容纳155个样品瓶。出色的精度和免工具校准使该进样器成为常规液体样品进样的理想选择（图4-10）。



图4-10 AI1310（左）和AS1310（右）实物图



图4-11 TriPlus 300顶空自动进样器

(2) TriPlus 300顶空自动进样器

TriPlus 300 顶空自动进样器提供了定量环式自动进样器能够配备的最大样品容量。这款自动进样器装有120位样品盘，加热炉中有最多的18个样品位可以将样品同时孵化，达到最高的样品交叠容量，可以允许很长的无人照管序列运行，而将样品通量最大化（图4-11）。



图4-12 TriPlus RSH实物图

(3) TriPlus RSH自动样品处理平台

TriPlus RSH是一个三合一自动样品处理平台，它具有在同一个序列当中，液体模式、顶空模式和固相微萃取模式自动切换功能。而且可以在样品预处理时稀释不同浓度的样品、添加内标物、配制校正曲线和加入衍生化试剂等用途。因此，常规实验室配备了Triplus RSH后，必然会节约样品预处理时间，增加结果的精确性并且减少错误的概率，从而提高整个实验室的效率（图4-12）。

4.3 气相色谱、气质联用在化药分析中的应用

4.3.1 HS-GC（顶空-气相色谱）分析药物中的溶剂残留

药物中的残留溶剂系指在原料药或辅料的生产过程以及制剂制备过程中使用但在工艺过程中未能完全去除的有机溶剂。药品还可能被来自包装、运输、仓储过程中接触的有机溶剂污染。药品生产商有责任确保终产品中任何一种溶剂的残留量对人体无害。

因残留溶剂会影响产品的安全性，故必须对其进行监测。《中国药典（2010版）》参考了国际协调大会（ICH）颁布的残留溶剂研究指导原则，对四类有机溶剂进行了限量要求（表4-1）。

本法采用顶空-毛细柱气相色谱法，测定药物中多种挥发性溶剂残留。

表4-1 药物中常见残留溶剂及其限度

溶剂名称	PDE*值 (mg/天)	限度 (%)	溶剂名称	PDE值 (mg/天)	限度 (%)
第一类溶剂（应该避免使用）			第三类溶剂（GMP或其他质量要求限制使用）		
苯	0.0	0.0002	醋酸	50.0	0.5
四氯化碳	0.0	0.0004	丙酮	50.0	0.5
1,2-二氯乙烷	0.1	0.0005	甲氧基苯	50.0	0.5
1,1-二氯乙烯	0.1	0.0008	正丁醇	50.0	0.5
1,1,1-三氯乙烷	15.0	0.15	仲丁醇	50.0	0.5

第二类溶剂 (应该限制使用)			醋酸丁酯	50.0	0.5
乙腈	4.1	0.041	叔丁基甲基醚	50.0	0.5
氯苯	3.6	0.036	异丙基苯	50.0	0.5
氯仿	0.6	0.006	二甲亚砷	50.0	0.5
环己烷	38.8	0.388	乙醇	50.0	0.5
1,2-二氯乙烯	18.7	0.187	醋酸乙酯	50.0	0.5
二氯甲烷	6.0	0.06	乙醚	50.0	0.5
1,2-二甲氧基乙烷	1.0	0.01	甲酸乙酯	50.0	0.5
N,N-二甲基乙酰胺	10.9	0.109	甲酸	50.0	0.5
N,N-二甲基甲酰胺	8.8	0.088	正庚烷	50.0	0.5
1,4-二氧六环	3.8	0.038	醋酸异丁酯	50.0	0.5
2-乙氧基乙醇	1.6	0.016	醋酸异丙酯	50.0	0.5
乙二醇	6.2	0.0062	醋酸甲酯	50.0	0.5
甲酰胺	2.2	0.022	3-甲基-1-丁醇	50.0	0.5
正己烷	2.9	0.029	丁酮	50.0	0.5
甲醇	30.0	0.3	甲基异丁基酮	50.0	0.5
2-甲氧基乙醇	0.5	0.005	异丁醇	50.0	0.5
甲基丁基酮	0.5	0.005	正戊烷	50.0	0.5
甲基环己烷	11.8	0.118	正戊醇	50.0	0.5
N-甲基吡咯烷酮	5.3	0.484	正丙醇	50.0	0.5
硝基甲烷	0.5	0.005	异丙醇	50.0	0.5
吡啶	2.0	0.02	醋酸丙酯	50.0	0.5
四氢噻吩	1.6	0.016	第四类溶剂 (尚无足够毒理学资料)		
四氢化萘	1.0	0.01	1,1-二乙氧基丙烷		
四氢呋喃	7.2	0.072	1,1-二甲氧基甲烷		
甲苯	8.9	0.089	2,2-二甲氧基丙烷		
1,1,2-三氯乙烯	0.8	0.008	异辛烷		
二甲苯	21.7	0.217	异辛烷		
			异丙醚		
			甲基异丙基酮		
			甲基四氢呋喃		
			石油醚		
			三氯醋酸		
			三氟醋酸		

*PDE: 允许日暴露量

检测方法

气相色谱型号: Thermo Scientific TRACE 1310 GC; 进样口: Split/Splitless; 检测器: FID; 自动进样器: TriPlus RSH; 色谱工作站: Thermo Scientific Dionex Chromeleon 7.1。

TriPlus RSH顶空模式参数:

进样量: 1 mL
 孵化炉温度: 80 °C;
 孵化时间: 20分钟
 进样针温度: 120 °C

TRACE 1310仪器参数

色谱柱: TR-V1, 30m × 0.32mm ID × 1.8μm, P/N: 260V339P
 柱箱温度: 40°C (保持20分钟), 10°C/min, 至240°C (保持20min)
 进样口: SSL, 140°C, 分流比 5:1
 检测器: FID, 240°C
 载气: 氦气; 恒流模式: 2.1 mL/min (35 cm/sec)

分析结果

本方法对表4-2中28个组分进行分析, 分析浓度见表4-2。各化合物分离度良好 (见图4-13、图4-14、图4-15)。

表4-2 目标组分分析浓度

一类溶剂	分析浓度 (mg/kg)	允许每天的接触量 (mg/kg)
1,1-二氯乙烯	4	8
1,1,1-三氯乙烷	5	1500
四氯化碳	2	4
苯	1	2
1,2-二氯乙烷	2.5	5
二类溶剂A类组分	分析浓度 (mg/kg)	允许每天的接触量 (mg/kg)
甲醇	150	3000
乙腈	20.5	410
二氯甲烷	30	600
反-1,2-二氯乙烷	47	1870
顺-1,2-二氯乙烷	47	1870
四氢呋喃	34.5	720
环己烷	194	3880
甲基环己烷	59	1180
1,4-二恶烷	19	380
甲苯	44.5	890
氯苯	18	360
乙苯	18.4	2170
邻二甲苯	9.8	
间二甲苯	65.1	
对二甲苯	15.2	

二类溶剂B类组分	分析浓度 (mg/kg)	允许每天的接触量 (mg/kg)
正己烷	14.5	290
硝基甲烷	2.5	50
氯仿	3	60
1,2-二甲氧基乙烷	5	100
1,1,2-三氯乙烯	4	80
吡啶	10	200
2-己酮	2.5	50
四氢化萘	5	100

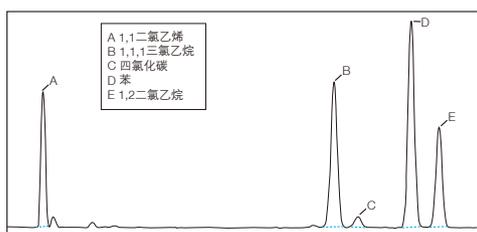


图4-13 一类溶剂色谱图

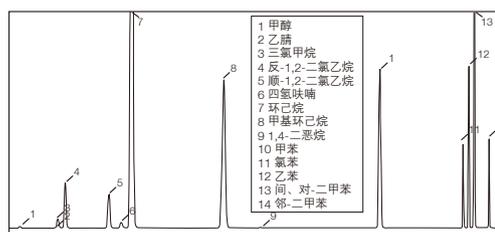


图4-14 二类溶剂A (Class 2 A) 色谱图

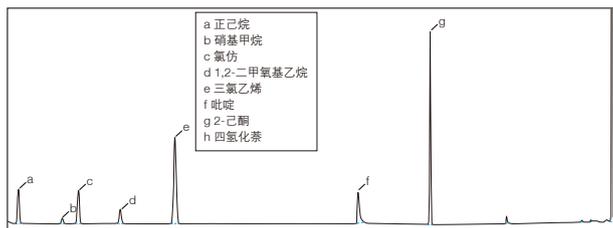


图4-15 二类溶剂B (Class 2 B) 色谱图

4.3.2 GC/FID用于药物含量分析

气相色谱法在药物分析领域中应用面广泛，能够对很多易挥发半挥发化合物进行分析。《中国药典（2010）》中就有很多药材采用气相色谱法进行含量测定，如丁香、八角茴香，藿香、冰片、松节油等中有效成分含量的测定。本文以GC/FID法测定鱼金注射液中有效成分为例进行说明。

样品前处理

量取本品25 mL，置于分液漏斗中，加入乙酸乙酯5 mL，氯化钠5 g，震荡3 min左右，分液，提取乙酸乙酯层。再向水层加入乙酸乙酯5 mL，震荡3 min左右。静置分液后，提取乙酸乙酯层。将两次取得的乙酸乙酯层合并，置于10 mL容量瓶中，用乙酸乙酯稀释至刻度，摇匀。

色谱条件

- 色谱柱：TR-FFAP，60 m × 0.25 mm × 0.25 μm，P/N：260N154P；
- 柱温：70℃（5 min）-5℃/min-140℃（2 min）-30℃/min-230℃（5 min）；
- 不分流进样，分流时间为1 min；
- 进样口温度：230℃；

载气：氮气（99.999%），恒流模式，1.5 mL/min。

FID检测器温度：280℃；氢气流量：35 mL/min，空气流量：350 mL/min；尾吹气氮气：30 mL/min。进样量：1 μL。

分析结果：

采用GC法成功的分析了鱼金注射液中的三种有效成分芳樟醇、龙脑酯和甲基正壬酮。三种化合物分离度良好，且分析实际样品时无杂质峰干扰（图4-16，图4-17）。

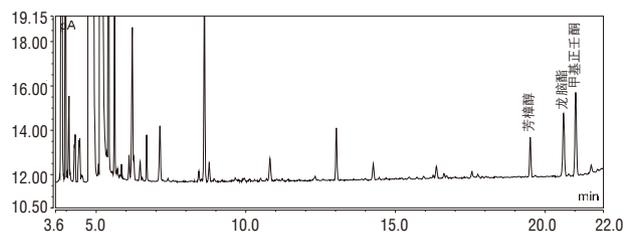


图4-16 标准溶液色谱图

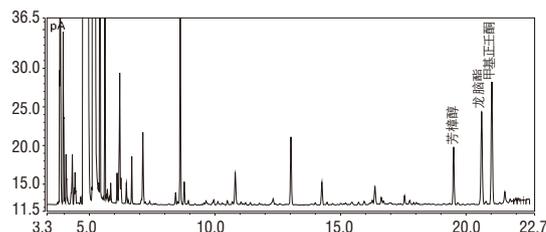


图4-17 样品色谱图

4.3.3 GC/MS用于药物杂质分析

药物在生产加工、包装运输等过程中易引入少量杂质。由于工艺改进及产品质控等需要对杂质进行定性定量分析，但往往由于含量低且化合物未知，需要一种灵敏度高且能够对未知化合物进行定性分析的分析手段。GC/MS能够满足这种需求，既能够采用NIST谱库对未知化合物进行定性分析、结构鉴定，又能够对药物中痕量杂质进行定量分析。本方法以GC-MS检测口服液中的苯甲酰芽子碱为例进行说明。

样品前处理：

口服液样品采用固相萃取的方法进行萃取浓缩，SPE小柱为Trace-B，具体操作步骤见图4-18。萃取完后采用六氟异丙醇（HFIP）和五氟丙酸酐（PFPA）进行衍生化，氮气吹干后，乙酸乙酯复溶，GC/MS分析。

GC/MS分析条件

色谱条件：

色谱柱：TR-5MS, 15 m × 0.25 mm × 0.25 μm,

P/N: 260F130P;

柱温：110℃（1 min），30℃/min到240℃

（0.1 min），120℃/min到300℃（0.2 min）。

进样口温度：220℃；不分流进样，分流时间为1 min；进样量：2 μL。

载气：氮气（99.999%），载气模式：1.5 mL/min

（5 min），以7 mL/min升至5 mL/min

（0.6 min）。

质谱条件：

Full scan模式：离子源温度：200℃，扫描范围：50-650 amu。

SIM模式：离子源温度：225℃；选择离子为：318.10, 321.10, 438.90, 442.10。

PCI SIM模式：离子源温度：200℃，选择离子为：

318.10, 321.10, 440.10, 443.20。

EXTRACTION
Condition Columns
• 2 mL Methanol
• 1 mL DI Water
Specimen Application
• Apply prepared specimens to columns – draw through under low vacuum (~0.5 mL/min)
Wash Columns
• 1 mL DI Water
• 1 mL 0.1M HCl
• Dry columns under high vacuum for 2 minutes
Elute
• 2 mL 80/18/2 methylene chloride/isopropanol/ammonium hydroxide
CONCENTRATE
• Evaporate extracts to dryness under N ₂ at 40°C
DERIVATIZATION
• 25 μL HFIP and 50 μL PFPA at 90°C for 10 minutes
• Cool 2 minutes
CONCENTRATE
• Evaporate excess HFIP/PFPA under N ₂ at 50°C
• Reconstitute with 50 μL ethyl acetate

图4-18 口服液样品前处理过程

分析结果

本实验中比较了两种不同离子源的灵敏度。实验结果表明采用PCI分析苯甲酰芽子碱得到的灵敏度更高（见图4-19），且无杂质干扰。

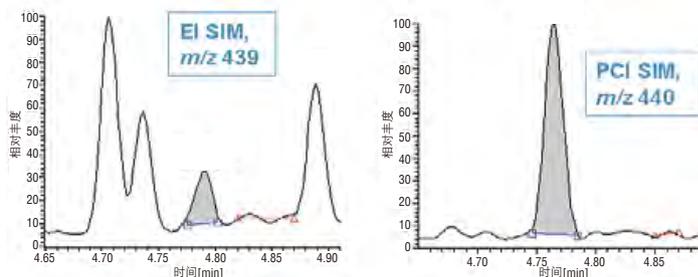


图4-19 EI源和CI源信噪比比较

本方法采用PCI-GC/MS法检测口服液中的苯甲酰芽子碱，方法检出限为0.5 ng/mL。线性范围为0.75-10 ng/mL，RSD小于6.0% (n=10)（图4-20）。

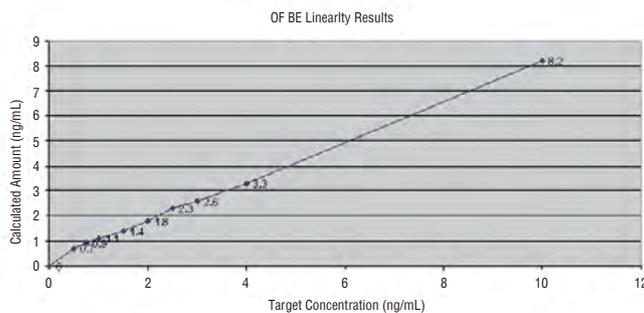


图4-20 苯甲酰芽子碱线性

4.4 气相色谱、气质联用在中药分析中的应用

4.4.1 GC/ECD用于中药农残有机氯分析

《中国药典（2010版）》中提供了有机氯的分析检测方法。采用的前处理方法为浸泡加超声波提取的方法，但该方法消耗溶剂量大、时间长、效率低、不能全自动进行，并且对实验员身体有损伤、污染环境。本实验建立了加速溶剂萃取中药材中有机氯的气相色谱分析方法。该方法操作简单快速、重复性好、回收率高。

色谱条件

色谱柱：TG-5MS, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, P/N: 26098-1420;

柱温：80℃ (1 min)，20℃/min到180℃ (0 min)，5℃/min到300℃ (0 min)，最后20℃/min至320℃ (5 min)；

进样口温度：250℃；不分流进样，分流时间为1min；载气：氮气 (99.999%)，恒流模式，1 mL/min。

ECD检测器温度：300℃；尾吹气：15 mL/min。进样量：1 μL。

分析结果

采用空白基质配制17种农药组份的混合标准溶液，各组分离情况良好（图4-21）。实验结果表明17种组分在20-400 μg/L线性关系良好，线性相关系数均大于0.99。同时以三倍信噪比计算各组份检出限，均在1.0-2.0 μg/L之间（见表4-3）。

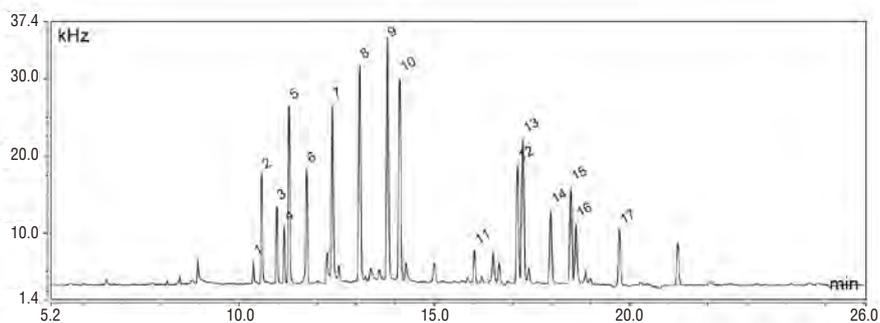


图4-21 100 μg/L基质标准溶液色谱图

表4-3 保留时间、线性及检出限数据

序号	化合物	保留时间/min	线性范围 μg/L	线性方程	R ² /%	检出限 μg/L
1	α-六六六	10.367	20.0-400	Y=0.3217+0.0093*X	0.9992	1.0
2	六氯苯	10.580	20.0-400	Y=0.4149+0.0115*X	0.9976	1.0
3	β-六六六	10.970	20.0-400	Y=0.1162+0.0052*X	0.9962	2.0
4	五氯硝基苯	11.160	20.0-400	Y=0.2536+0.0089*X	0.9992	1.0
5	γ-六六六	11.292	20.0-400	Y=0.9737+0.0167*X	0.9987	1.0
6	δ-六六六	11.720	20.0-400	Y=0.3188+0.0083*X	0.9991	1.0
7	五氯苯氨	12.388	20.0-400	Y=0.5588+0.0147*X	0.9991	1.0
8	七氯	13.088	20.0-400	Y=0.2830+0.0111*X	0.9961	2.0
9	五氯硫代苯甲醚	13.802	20.0-400	Y=0.8991+0.0206*X	0.9994	1.0
10	艾氏剂	14.113	20.0-400	Y=0.3088+0.0094*X	0.9985	1.0
11	氯丹	16.017	20.0-400	Y=0.0126+0.0082*X	0.9959	2.0
12	p,p'-DDE	17.127	20.0-400	Y=0.1924+0.0090*X	0.9981	2.0
13	狄氏剂	17.267	20.0-400	Y=0.2087+0.0099*X	0.9991	2.0
14	异狄氏剂	17.973	20.0-400	Y=0.1353+0.0108*X	0.9986	2.0
15	p,p'-DDD	18.490	20.0-400	Y=0.1172+0.0090*X	0.9991	2.0
16	o,p'-DDT	18.618	20.0-400	Y=0.0273+0.0091*X	0.9997	2.0
17	p,p'-DDT	19.723	20.0-400	Y=0.0960+0.0036*X	0.9996	2.0

4.4.2 GC/MS用于中药农残分析

《中国药典（2010版）》中提供了有机氯、有机磷和拟除虫菊酯三类农药残留的检测方法。但药典中提供的方法前处理繁琐，三类农药残留分别采用了不同的前处理方式，不同的检测方法，且该方法非常耗时。本文建立了加速溶剂萃取-固相萃取-气质联用法对中药中49种有机氯、有机磷及拟除虫菊酯农药残留同时检测，结果表明该方法灵敏度好，回收率高，线性范围好。

气质条件

色谱条件：

色谱柱：TG-5MS, 30m × 0.25 mm × 0.25 μm, P/N: 26098-1420;

柱温：80℃（1min），20℃/min到180℃（0min），5℃/min到300℃（0min），最后20℃/min至320℃（5min）；
 进样口温度：250℃；不分流进样，分流时间为1min；载气：氦气（99.999%），恒流模式，1mL/min。进样
 量：1μL。

质谱条件：EI离子源，离子源温度：250℃；传输线温度：280℃；选择离子扫描（SIM）模式（见表4-4）；

表4-4 49种农药残留保留时间及特征离子

序号	化合物	保留时间/min	定量离子	定性离子
1	甲胺磷	5.22	94	95、142
2	敌敌畏	5.34	109	185、220
3	乙酰甲胺磷	6.63	136	42、94
4	氧乐果	8.18	156	79、110
5	久效磷	8.98	127	67、97
6	甲拌磷	9.23	260	121、231
7	α-六六六	9.40	183	219、254
8	六氯苯	9.49	284	282、286
9	乐果	9.62	87	93、125
10	β-六六六	9.95	183	219、254
11	五氯硝基苯	9.97	237	142、214
12	γ-六六六	10.17	183	219、254
13	二嗪磷	10.28	304	137、179
14	地虫硫磷	10.32	246	137、174
15	δ-六六六	10.83	183	219、254
16	五氯苯氨	11.26	265	230、263
17	磷胺	11.29	127	72、264
18	甲基毒死蜱	11.56	286	125、288
19	甲基对硫磷	11.74	263	233、246
20	七氯	12.02	272	237、337
21	甲基嘧啶磷	12.32	290	276、305
22	杀螟硫磷	12.42	277	109、125
23	五氯硫代苯甲醚	12.60	296	294、298
24	马拉硫磷	12.66	173	143、158
25	毒死蜱	12.87	97	197、199
26	倍硫磷	13.00	278	109、125
27	艾氏剂	13.04	263	265、293
28	对硫磷	13.12	291	186、235
29	水胺硫磷	13.24	136	230、289
30	毒虫威	14.18	323	267、269
31	喹硫磷	14.40	146	156、157
32	杀扑磷	14.83	145	157、302

33	氯丹	14.93	375	373、377
34	p,p'-DDE	16.06	318	246、316
35	狄氏剂	16.23	263	277、380
36	异狄氏剂	16.89	263	317、345
37	乙硫磷	17.43	231	199、384
38	p,p'-DDD	17.46	235	165、237
39	o,p'-DDT	17.52	235	165、237
40	三唑磷	17.94	161	172、257
41	三硫磷	18.34	157	199、342
42	p,p'-DDT	18.72	235	165、237
43	溴螨酯	20.45	341	183、185
44	伏杀磷	21.53	182	154、367
45	谷硫磷	21.67	160	77、132
46	氯菊酯	23.80、24.06	183	163、165
47	氰氟菊酯	25.49、25.71、25.80、25.88	181	152、180
48	氰戊菊酯	27.20、27.61	125	167、225
49	溴氰菊酯	28.66	181	77、253

分析结果

采用空白基质配制49种农药组份的混合标准溶液(色谱图见4-22)采用上述方法分别进样分析,考察各组分在10.0-400 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内的线性。实验结果表明49种组分在10-400 $\mu\text{g/L}$ 线性关系良好,线性相关系数均大于0.99(见表4-5)。对100 $\mu\text{g/L}$ 加标水平平行测定3次,RSD值在0.7-8.1%,符合稳定性要求。同时以三倍信噪比计算各组分检出限,各组分检出限在0.3-2.0 $\mu\text{g/L}$ 之间(见表4-5)。

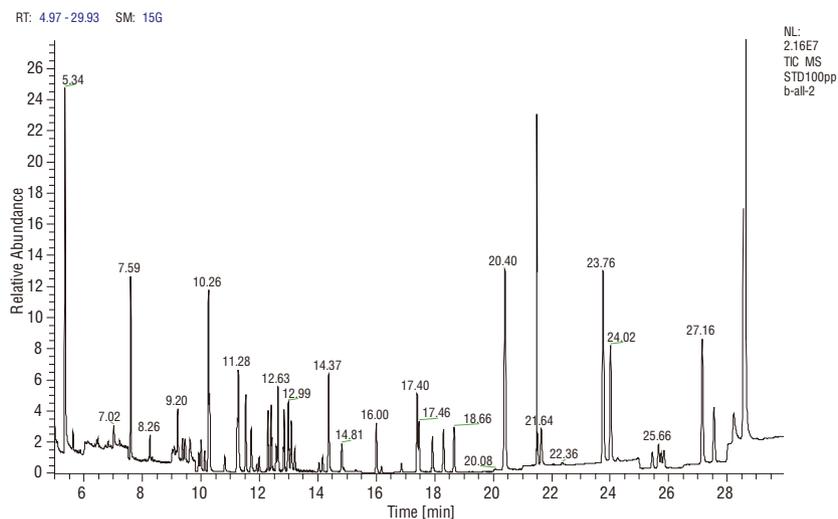


图4-22 100 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液总离子流图

表4-5 线性、检出限及RSD数据 (n=3)

序号	化合物	线性方程	R ² /%	检出限	RSD/%
1	甲胺磷	Y=376153+17113.8*X	0.9921	2.0	8.1
2	敌敌畏	Y=716186+109320*X	0.9999	0.5	4.7
3	乙酰甲胺磷	Y=547204+1243.3*X	0.9963	2.0	7.3
4	氧乐果	Y=169222+8328.9*X	0.9941	2.0	7.7
5	久效磷	Y=-360522+58880*X	0.9984	1.0	3.4
6	甲拌磷	Y=-2208.4+3300.3*X	0.9981	0.5	3.8
7	α-六六六	Y=133017+9790.6*X	0.9969	0.5	1.4
8	六氯苯	Y=61814.7+8093*X	0.9987	0.5	3.8
9	乐果	Y=301896+23818.1*X	0.9995	1.0	4.6
10	β-六六六	Y=138639+7335.1*X	0.9992	0.5	3.2
11	五氯硝基苯	Y=24671+6507.7*X	0.9999	0.5	4.2
12	γ-六六六	Y=328059+7505.9*X	0.9997	0.5	1.2
13	二嗪磷	Y=-13819+6439.3*X	0.9981	0.5	1.6
14	地虫硫磷	Y=-18474.3+8979.5*X	0.9989	0.5	3.9
15	δ-六六六	Y=28157.4+10430.4*X	0.9987	0.5	4.3
16	五氯苯氨	Y=89290+22265.5*X	0.9989	0.5	4.1
17	磷胺	Y=-1788.9+70988*X	0.9987	0.5	4.9
18	甲基毒死蜱	Y=59559.2+21934.2*X	0.9998	0.3	5.9
19	甲基对硫磷	Y=-62323.1+10419.3*X	0.9973	0.5	5.6
20	七氯	Y=259769+4857.5*X	0.9962	0.5	4.6
21	甲基嘧啶磷	Y=4385.8+14085.4*X	0.9993	0.3	5.1
22	杀螟硫磷	Y=-98389+8814.1*X	0.9980	0.5	5.6
23	五氯硫代苯甲醚	Y=45928.9+10303.6*X	0.9997	0.3	3.1
24	马拉硫磷	Y=-75504+32231.9*X	0.9978	0.5	4.2
25	毒死蜱	Y=203007+28449.8*X	0.9997	0.5	4.1
26	倍硫磷	Y=52879.9+20094.2*X	0.9999	0.5	2.6
27	艾氏剂	Y=28786.6+4718.6*X	0.9995	0.5	0.7
28	对硫磷	Y=-51463.7+5987*X	0.9947	1.0	4.5
29	水胺硫磷	Y=126536+30966.8X	0.9993	0.5	4.0
30	毒虫威	Y=7613.7+2354.6*X	0.9998	0.5	1.4
31	啶硫磷	Y=14129+32405.9*X	0.9998	0.5	4.2
32	杀扑磷	Y=105674+31673*X	0.9998	0.5	4.5
33	氯丹	Y=1850.4+826.7*X	0.9999	0.5	4.7

34	p,p'-DDE	$Y=66327+4867.2*X$	0.9966	1.0	5.2
35	狄氏剂	$Y=30072.5+1342.86*X$	0.9986	0.3	3.3
36	异狄氏剂	$Y=21152.4+3239.2*X$	0.9989	1.0	2.5
37	乙硫磷	$Y=-87039.5+14761.6*X$	0.9961	0.5	3.8
38	p,p'-DDD	$Y=195811+21020.9*X$	0.9979	0.5	4.9
39	o,p'-DDT	$Y=88330.7+14780.7*X$	0.9980	0.5	5.1
40	三唑磷	$Y=-34429+32702.7*X$	0.9993	0.5	2.1
41	三硫磷	$Y=92757+19142.6*X$	0.9988	0.5	5.3
42	p,p'-DDT	$Y=45129.6+13476.4*X$	0.9990	0.5	5.6
43	溴螨酯	$Y=112151+16617.3*X$	0.9998	0.5	2.8
44	伏杀磷	$Y=136841+16745.4*X$	0.9986	0.5	5.4
45	谷硫磷	$Y=248784+11934.7*X$	0.9924	0.5	0.4
46	氯菊酯	$Y=566051+59719*X$	0.9971	0.3	2.7
47	氯氰菊酯	$Y=434255+17461.5*X$	0.9933	1.0	6.3
48	氰戊菊酯	$Y=415176+23617.4*X$	0.9951	0.5	2.7
49	溴氰菊酯	$Y=13796.2+263999*X$	0.9999	0.3	1.9

4.4.3 HS-GC/MS (顶空-气质联用法) 检测中药中的挥发油

中药挥发油 (Volatile oils) 又称精油 (Essential oils), 是中草药中一类具有芳香气味的、在常温下能挥发的油状液体的总称。中药挥发油是一个非常复杂的体系, 如何利用现代分析方法, 确定并分离中药提取物中挥发油成分, 并获取其定性信息, 是现阶段中药挥发油研究的关键。

采用HS-GC/MS鉴定薄荷及白术两味中药不同炮制方法下的挥发油成分。同时本方法还能应用于中药指纹图谱的建立。

GC/MS条件

顶空条件: 平衡温度和时间: 100℃ (20 min); 进样体积: 1 mL; 进样深度: 标准; 进样针温度: 100℃

色谱条件: 色谱柱: TR-5, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, P/N: 260E142P;

程序升温: 60℃ (保持1 min), 3℃/min升至160℃, 再以5℃/min升至250℃ (保持5 min)。SSL进样口, 不分流进样, 进样口温度为250℃; 载气为He (99.999%), 载气流速1 mL/min。

质谱条件: EI源, 灯丝延迟3 min, 电离电压: 70 eV; 传输线温度250℃, 离子源温度: 200℃, 扫描范围40-450 amu, 灯丝电流50 μA。

分析结果

本实验经顶空进样, 对薄荷及白术的挥发性成分进行GC-MS分析, 得到薄荷中的化学组分总离子流图 (图4-23)、白术中的化学组分总离子流图 (图4-24), 以峰面积归一化法计算挥发油各组分相对含量。采用计算机内存的NIST标准谱库的检索, 同时参照相关文献进行确认, 结合人工谱图解析、查对有关质谱资料、对比基峰相对丰度等几个方面进行直观比较, 从而确定薄荷和白术中的挥发性化学成分。确定出薄荷中的42个组分, 白术中的49个组分, 每种组分的匹配度均达75%以上。

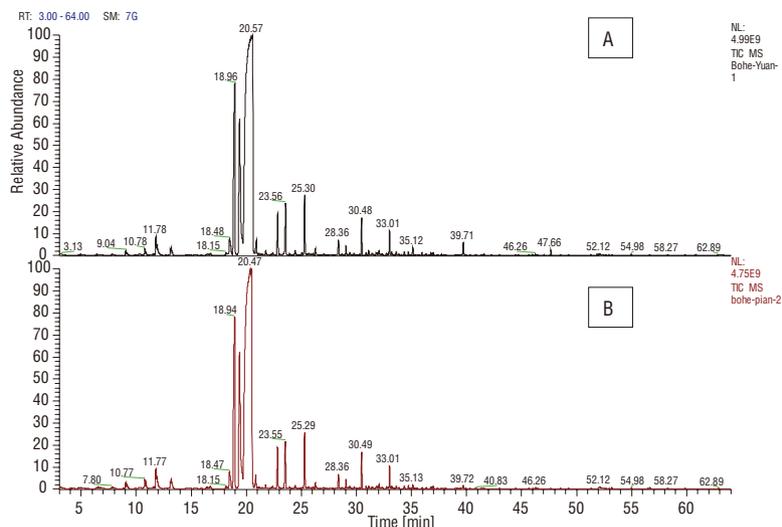


图4-23 薄荷原粉 (A). 薄荷片粉 (B). 总离子流图

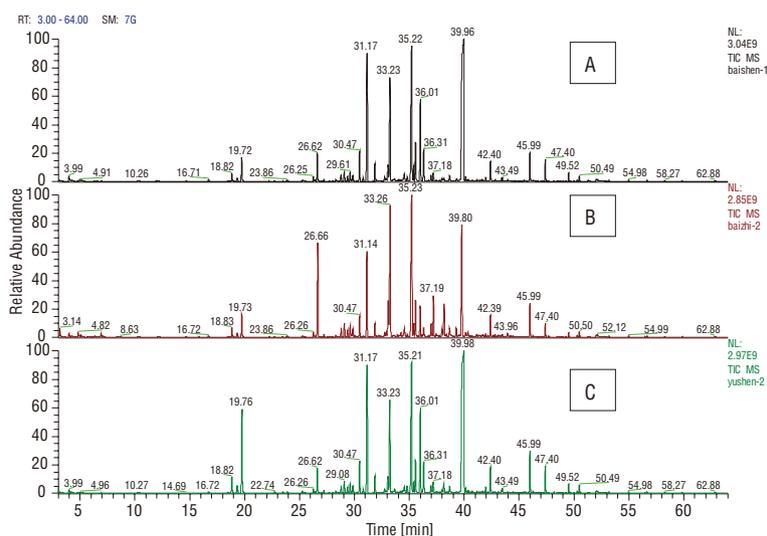


图4-24 白术生品 (A). 白术制品 (B). 於术生品 (C). 总离子流图

第五章 加速溶剂萃取篇

5.1 加速溶剂萃取原理

在整个分析测试的过程中，样品前处理具有举足轻重的作用，而应用于样品前处理技术的新技术发展往往要滞后于其它方面的技术的发展。如传统的萃取技术：索氏提取、超声提取、浸泡提取、震荡提取等，这些传统的萃取技术有很多缺点：耗费较长的萃取时间（数小时），使用大量的溶剂（每个样品要使用数百毫升），需要繁琐的人力操作，且人对样品的干预性很大。除了进行样品前处理所引起的高额成本之外，研究表明样品处理过程同时也是分析环节的主要误差来源。科学家们持续不懈地努力，试图寻找和开发出更快，更好，更高效，成本更低的前处理方法。而加速溶剂萃取技术（ASE）从根本上解决了长期以来传统方法（如索氏提取和超声提取等）所不能解决的难题。

加速溶剂萃取技术（ASE）是一项自动萃取技术，它通过提高提取温度和压力以达到在短时间内完成萃取的目的。已开发的ASE方法广泛应用于环境、医药、食品、聚合物以及消费品工业。ASE被美国EPA方法3545A和6860，以及美国材料测试学会的ASTM D7210所采用。国家标准《GB/T 19649-2005》、《GB/T 19649-2006》、《GB/T 22996-2008》、《GB/T 23376-2009》等均采用ASE为前处理设备。

那为什么我们采取在高温高压条件下进行萃取呢？首先，高温下，溶剂对样品的溶解能力增强。例如，如果把溶剂温度从50℃提高到150℃，葱类的溶解性增加了近13倍。温度的升高同时也提高了样品的扩散速度。这就意味着目标萃取物从基质边界层移向表面的速度变快，而目标物萃取都是在基质表面被溶剂萃取。高温同时也能降低溶剂的粘度，这意味着溶剂渗透入基质内空隙更加容易。此外，升高的温度更易于打破溶剂-基体相互作用（偶极吸引力、范德华力、氢键等），从而将目标物从基质中萃取出来。综合考虑来说，温度的升高加快了萃取速度，减小了溶剂用量。然而，单单依靠升高温度还不足以达到对所有有机溶剂都能显著提高其萃取效果的作用，因为很大一部分有机溶剂的沸点都相对较低。这也是索氏提取及自动索氏提取技术的局限性所在，最高的萃取温度即为溶剂的沸点温度。如果在萃取的过程中给溶剂施以足够高的压力，那么则可以使用高于溶剂沸点的温度进行萃取。这就意味着，即使采用沸点很低的溶剂，高温溶剂萃取的优越性依然能得到充分的体现。另外在高压条件下工作，也可以加快整体萃取速度，高压下液体泵入填充体内更加容易。加压溶剂会被强制压入溶剂基质的空腔中，更充分地接触其中的目标萃取物。基于此，高温和高压的结合使得萃取更加快速和完全（图5-1）。

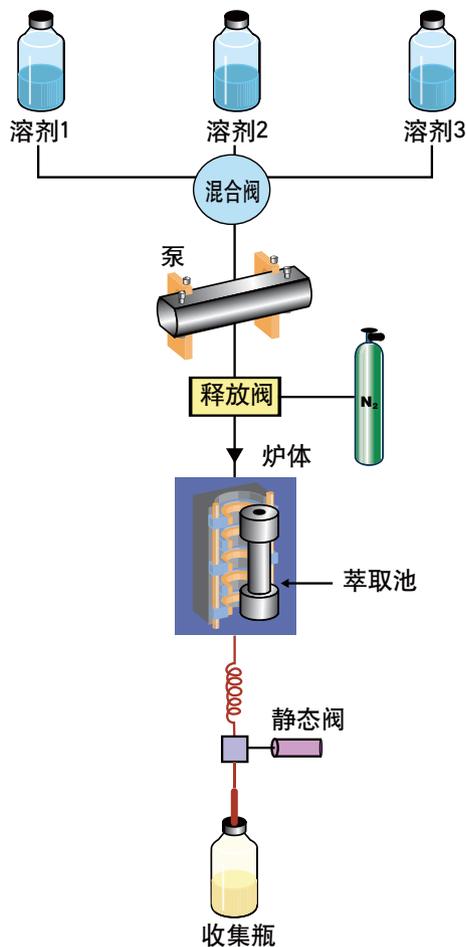


图5-1 ASE原理示意图

5.2 加速溶剂萃取仪的技术特点

5.2.1 大容量，高灵活性以及高效率

ASE 150以及ASE 350萃取仪（参见图5-2）给需要自动萃取固体和半固体样品的实验室带来很多好处，均可处理1-100g样品。ASE 150和350都配置快速泵（70mL/min），可提高工作效率（表5-1）。此外，ASE 350完全集成了ASE 200和ASE 300的功能，与溶剂控制器集成在一起，减小了工作台的体积。



图5-2 ASE 150和ASE 350产品照片

表5-1 ASE 150和ASE 350产品特点比较表

产品特点	优点	ASE 150	ASE 350
可用250mL或60mL收集瓶	增加灵活性	✓	✓
Dionium™ — 化学惰性萃取池（选项）	可直接提取经强酸或强碱前处理过的样品，扩大使用范围	✓	✓
新的快速泵（70mL/min）	萃取速度更快	✓	✓
可选用各种体积的萃取池（1, 5, 10, 22, 34, 66和100mL）	提高灵活性以满足许多应用样品的要求	✓	✓
大的前面板以及新的控制键	操作更方便	×	✓
集成的溶剂控制器	仪器占用体积更小	×	✓
USB接口以支持Firmware更新和电脑连接	可下载样品信息	×	✓

5.2.2 以分钟计算的萃取时间

传统的萃取技术经常以小时计算萃取时间，一次萃取甚至超过48小时，而ASE技术通常所用时间仅为12-20分钟（表5-2）。

表5-2 ASE与各萃取技术特点比较

萃取技术	样品大小（克）	溶剂体积（毫升）	溶剂/样品	平均提取时间
索氏提取	1 ~ 100	300 ~ 500	16 ~ 30	4 ~ 48 小时
超声提取	30	300 ~ 400	10 ~ 13	0.5 ~ 1 小时
微波提取	5	30	6	0.5 ~ 1 小时
自动索氏	10	50	5	1 ~ 4 小时
ASE	1 ~ 100	15 ~ 45	1.5	12 ~ 20 分钟

5.2.3 极大地节省溶剂

与现有其它技术相比，ASE可省50-90%的溶剂消耗（表5-2）。

5.2.4 选择性提取

(1) 选择性萃取

ASE350拥有三位的溶剂控制器，可以根据样品的极性选择不同极性的溶剂萃取目标化合物，有利于萃取条件的摸索。



图5-3 不同极性溶剂对同一种烟草样品进行选择性萃取的结果
(从左至右：水、甲醇、丙酮、二氯甲烷、正己烷)

(2) 分步提取

对基质复杂样品进行萃取时，杂质干扰往往是分析工作者最头痛的问题，例如在对动物组织进行萃取时，脂肪就是常见的干扰物，而溶剂的极性往往会影响到干扰物的保留。实验证明增加萃取的温度或增加萃取溶剂的极性都会降低脂肪保留剂保留脂肪的能力。对含脂肪样品中的极性物质萃取时可以选择两步法萃取：第一步用非极性溶剂将脂肪萃取后弃去，第二步用极性溶剂对极性物质进行萃取。ASE 350能够自动实现分步提取的功能，能够达到除去干扰杂质的目的。

(3) 在线净化

在萃取池中事先加入相应的吸附剂等净化材料（如固相萃取颗粒、GPC凝胶颗粒、C18、铝粉等），将样品放置到吸附剂上方进行萃取，萃取的同时完成净化。在线净化示意图见图5-4。

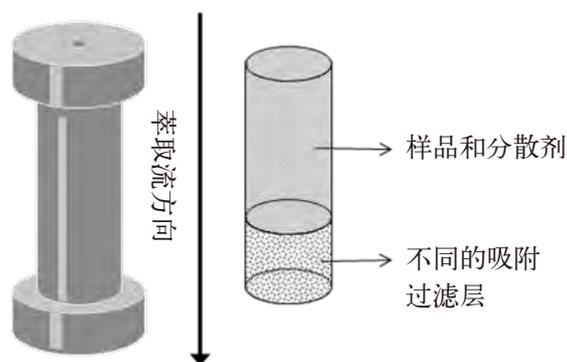


图5-4 在线净化示意图

5.2.5 标准方法

目前ASE已被多项国际国内标准采用，且这些标准方法还在不断的增加中。

表5-3 采用ASE的部分官方标准方法

标准号	标准名称
GB/T 19649-2005	粮谷中405种农药多残留测定方法气相色谱-质谱和液相色谱—串联质谱法
GB/T 19649-2006	粮谷中475种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法
GB/T 22996-2008	人参中多种人参皂甙含量的测定液相色谱-紫外检测法
GB/T 23376-2009	茶叶中农药多残留测定气相色谱-质谱法
SL 391-2007	有机分析样品前处理方法
ASTM D7210	萃取聚烯烃塑料添加剂的标准实施规程
ASTM D7567	使用快速溶剂萃取检测交联乙烯塑料中凝胶含量的试验方法
E PA 方法3545A	OCP, OPP, BNA, TPH, PCDD, 除草剂和半挥发性物质
E PA 方法6860	离子色谱/电喷射离子化/质谱检测水、泥土和固体废弃物中的高氯酸盐
E PA 方法8290A	高分辨气相色谱和高分辨质谱检测PCDDs和PCDFs
L00.00-34	食品中农残检测（德国）
SN/T 2593.1-2010	电子电气产品中多环芳烃的测定第1部分

5.3 加速溶剂提取在中药分析中的应用

5.3.1 人参中的人参皂苷

人参为我国珍贵的中药材，在我国药用历史悠长。人参具有大补元气、强心固脱、安神生津之功效。其化学成分主要含有皂苷、糖类、蛋白质等，其中人参皂苷是主要活性成分，已确定结构的已有30余种。目前《中国药典（2010版）》中对人参中人参皂苷的提取方法为先采用索氏提取人参中的精油成分，然后经过浸泡过夜后采用水饱和的正丁醇进行超声提取。药典方法前处理步骤繁琐，耗时长，且溶剂消耗较大。国标《GB/T 22996-2008人参中多种人参皂苷含量测定 液相色谱-紫外检测法》中则直接采用ASE提取，然后采用液相色谱分析。该方法简单快速，能够准确测出人参中人参皂苷的含量。

仪器

ASE 350
Ultimate 3000 HPLC

ASE萃取

人参样品经切片后，采用粉碎机将人参样品粉碎，过30-50筛。精确称取1.00 g人参样品，和硅藻土混合后，倒入事先垫有纤维素膜的萃取池（SST，10 mL）中，按下列ASE条件萃取（表5-4）。萃取液水浴蒸干，取5 mL甲醇复溶，过0.45 μm滤膜，待HPLC分析（条件参照国标《GB/T 22996-2008人参中多种人参皂苷含量测定 液相色谱-紫外检测法》）。

表5-4 ASE萃取条件

条件	参数
萃取溶剂	甲醇
萃取温度	140℃
静态时间 (min)	5
静态循环次数	2
吹扫体积	50%
吹扫时间	100s
总溶液消耗 (mL)	20
总时间 (min)	20

分析结果

本实验采用添加不同水平的人参皂苷进行加标回收实验, 结果见图5-5和表5-5。

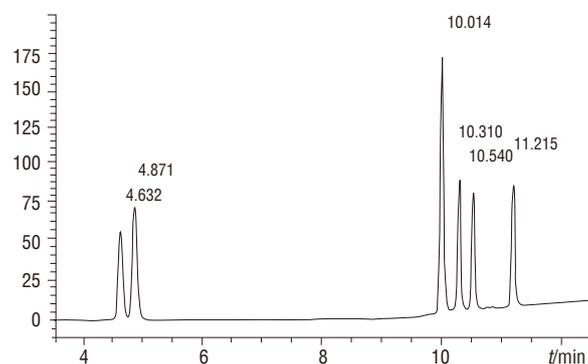


图5-5 人参皂苷标准物质色谱图

(Re: 4.632; Rg1:4.871; Rf: 10.014; Rb1:10.310; Rc: 10.540; Rb2: 11.215)

表5-5 人参皂苷添加浓度及其平均回收率数据

人参皂苷	添加浓度/(mg/kg)	平均回收率/%
Re	50	91.98
	100	87.19
	150	91.37
	200	94.78
Rg1	50	94.22
	100	86.69
	150	91.28
	200	97.12
Rf	25	90.69
	50	91.09
	75	102.79
	100	98.52
Rb1	50	85.69
	100	92.26
	150	93.95
	200	99.95
Rc	50	90.73
	100	87.09
	150	94.19
	200	99.61
Rb2	50	89.95
	100	87.24
	150	96.90
	200	100.43

5.3.2 圣约翰草中金丝桃素以及金印草根中黄连素

本应用文献介绍了使用ASE萃取已商品化的营养补充剂，贯叶连翘（圣约翰草）中的金丝桃素以及白毛茛中（金印草根）的黄连素。贯叶连翘提取物已用来治疗各种肾病，抑郁等。贯叶连翘的药用成分主要是金丝桃素以及相关的二萜酮（总的金丝桃素）。白毛茛主要是可增强免疫系统，有相当高浓度的生物碱黄连素（最活性成分），白毛茛碱和氢化小檗碱。以下介绍采用ASE萃取金丝桃素，黄连素和其它天然产物样品。

仪器：

ASE 200 加速溶剂萃取仪，带有11 mL萃取池

DX500 HPLC系统

萃取条件

萃取溶剂：乙腈

温度：100 °C

系统压力：10 MPa（1500psi）

加热时间：5 min

静态时间：5 min

冲洗体积：60%

吹扫时间：100 秒

静态循环次数：1次

总萃取时间：14 min/样品

溶剂总量：12-15 mL/样品

样品制备

样品从当地保健食品店购得。样品呈囊状，打开后研磨并充分混匀。取1~3 g放入11 mL萃取池中，萃取池的出口放置一片纤维素滤膜。

结果与讨论

(1) 金丝桃素

ASE萃取商品化的圣约翰草产品。萃取步骤如上述所示，采用工业标准方法测定金丝桃素的含量。现有萃取此产品的方法为索氏萃取和超声萃取，这两种方法均耗时且需要大量的溶剂。ASE萃取只需消耗15 mL的溶剂，在14分钟内即可萃取完全。分析结果如表5-6所示。此产品中测定的金丝桃素含量（以总二萜酮计）的RSD为0.44%，四次分析的偏差为4.1%。这个值与标签要求的最低0.3%金丝桃素测定的RSD保持一致。

(2) 黄连素

ASE所有的萃取程序均参照以上方法描述的萃取条件。此样品中分析结果如表5-7所示。黄连素的平均含量为1.44%，4次分析的RSD值为2.8%。标样以及萃取样品分析的色谱图如图5-6所示。

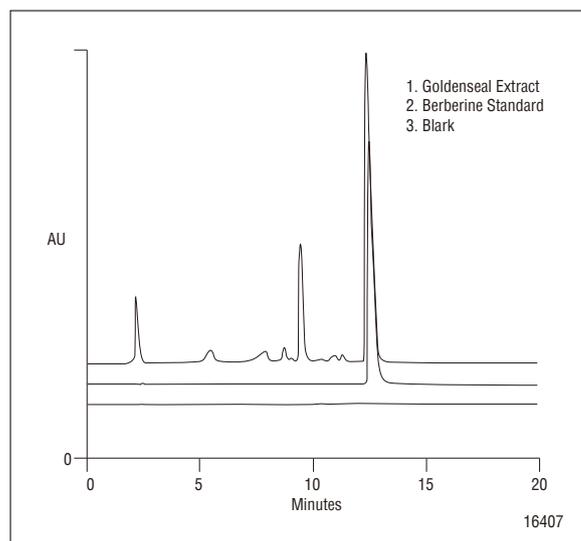


图5-6. 黄连素标样和白毛茛萃取液的色谱比较图

在上述的两个方法中，乙腈与甲醇均是合适的萃取溶剂，而且乙腈和甲醇亦与萃取后样品处理步骤和HPLC分析兼容。

表5-6 ASE 萃取圣约翰草的结果

萃取	金丝桃素含量
1	0.43%
2	0.45%
3	0.46%
4	0.42%
平均值	0.44%
偏差	0.018
相对标准偏差	4.1%

表5-7 ASE 萃取白毛茛的结果

萃取	黄连素含量
1	1.43%
2	1.43%
3	1.41%
4	1.50%
平均值	1.44%
偏差	0.44
相对标准偏差	2.8%

5.3.3 中药中的挥发油

中药挥发油 (Volatile oils) 又称精油 (Essential oils)，是中草药中一类具有芳香气味的、在常温下能挥发的油状液体的总称。中药挥发油是一个非常复杂的体系，如何利用现代分析方法，确定并分离中药提取物中挥发油成分，并获取其定性信息，是现阶段中药挥发油研究的关键。

本文参考文献《加速溶剂萃取技术在中药有效成分分析中的应用 (陈军辉等)》，以ASE提取木香中挥发油为例进行说明。

ASE条件

样品从当地中药材店购得。将样品粉碎，过筛。取3 g 样品，与石英砂混合均匀后放入34 mL萃取池中（萃取池的底部放置一片纤维素滤膜），按下述ASE条件萃取（表5-8）。

分析条件

GC/MS分析：HP-5MS色谱柱(30m×0.25mm×0.25μm)，载气为氦气，流速1mL/min；进样口温度为250℃，传输线温度为300℃。电子能量70eV，离子源温度230℃。升温程序为：初始温度80℃，以4℃/min的速率升到250℃。进样量1μL，不分流进样，扫描方式为Scan方式。

结果

同时比较了4种提取方法所得挥发油的提取效率（结果见表5-9），可以看出加速溶剂萃取法的提取效率略高于超声法而低于索氏提取法，但索氏提取却需要较长的提取时间（约6h）；水蒸气蒸馏法耗时、提取效率低。ASE萃取时间短，萃取效率高，因此加速溶剂萃取法是中药材木香挥发油萃取的有效方法。

表5-8 ASE萃取条件

条件	参数
溶剂	二氯甲烷
温度	90℃
加热时间	5 min
静态萃取时间	10 min
循环次数	1
吹扫体积	60%
吹扫时间	60 s

表5-9 挥发油不同提取方法提取率的比较

方法	萃取时间	溶剂消耗/mL	萃取率/%
超声提取	40 min	50	7.27
ASE	10 min	54	7.54
索氏提取	6 h	50	9.76
水蒸气蒸馏	5 h	-	1.31

5.3.4 顺序萃取法萃取陈皮中的橙皮苷

中药陈皮中的橙皮苷具有抗氧化性，防止自由基的形成，能够作为功能性因子加入到食品中。参照《中国药典（2010版）》，对橙皮苷的提取需先采用石油醚索氏提取陈皮中的挥发油类成分，然后再进行橙皮苷的提取，该前处理方法需要消耗大量的时间和溶剂。加速溶剂萃取仪（ASE）很好地解决了上述问题，具有简单、快速、溶剂消耗小、萃取效率高及环境污染小等优点。采用ASE提取，建立序列（sequence）的方式，分别用石油醚和甲醇顺序提取，能够在半个小时左右的时间内处理好样品，大大的节省了前处理时间及溶剂消耗。

ASE条件

仪器：ASE 350

前处理方法：陈皮样品粉碎至30目左右，过30目筛。取粉碎后样品2g，精密称定，加入石英砂适量，混合均匀，转至底层垫有纤维素膜的萃取池（10mL）中，加速溶剂萃取（表5-10），弃去石油醚提取液，甲醇提取液过0.45μm滤膜，HPLC分析（分析条件见《中国药典（2010版）》）。

结果与讨论

ASE和药典方法比较

《中国药典（2010版）》方法：取陈皮样品2g，精密称定，置索氏提取器中，加石油醚80 mL，加热回流3 h，弃去石油醚，药渣挥干，加甲醇80 mL，再加热回流至提取液无色（约3-4h），放冷，滤过，滤液置100 mL容量瓶中，定容，摇匀，即得。

当采用1次萃取循环作为循环次数时，ASE对陈皮中的橙皮苷的平均萃取率为5.1%，RSD为3.8%（n=3）。同时采用2010版药典规定方法对同一样品进行萃取，索氏提取的平均提取率为5.2%，RSD为7.4%（n=3）。实验结果表明：ASE对陈皮中的橙皮苷的萃取率和药典推荐方法-索氏提取萃取率相当，但ASE更加省时，省溶剂，平行性更好（表5-11）。

ASE采用2次萃取循环作为萃取循环次数时，ASE对陈皮中的橙皮苷的平均萃取率为6.3%，RSD为3.1%（n=3），较传统的索氏提取提高了约20%，且稳定性更好。同时ASE具有速度快、溶剂消耗少等优点（表5-12）。

表5-10 ASE萃取条件

ASE条件	Step1	Step2
溶剂	石油醚	甲醇
温度	120℃	120℃
加热时间	6 min	6 min
静态萃取时间	3 min	5 min
循环次数	2	1-2
吹扫体积	60%	60%
吹扫时间	200s	90s
总体积	40 mL	
总时间	30 min	

表5-11 ASE和索氏提取比较（ASE采用1次萃取循环）

萃取方法	样品量	溶剂量	耗时	萃取率	RSD
ASE	2g	55 mL	35 min	5.1%	3.8%
SE	2g	200 mL	7 h	5.2%	7.4%

表5-12 ASE和索氏提取比较（ASE采用2次萃取循环）

萃取方法	样品量	溶剂量	耗时	萃取率	RSD
ASE	2g	55 mL	35 min	6.3%	3.1%
SE	2g	200 mL	7 h	5.2%	7.4%

5.3.5 在线净化分析检测黄连上清丸中的小檗碱

在分析基质复杂的样品时，萃取过程中干扰物质容易同目标化合物一起萃取出来，这些共萃取物干扰分析。通常需采用额外的净化步骤来对萃取液进行处理，如柱层析法、固相萃取法（SPE）、凝胶色谱法（GPC）等，以减少共萃取物的干扰。复方中药黄连上清丸基体组成复杂，主要组成药物17种，《中国药典（2010版）》对黄连上清丸中的小檗碱提取采用水浴，超声提取，浓缩提取液后过层析柱去除杂质，该方法操作复杂，耗时耗力。本方法采用In-cell cleanup ASE提取技术对复方中药黄连上清丸进行提取净化，取得了满意的效果。

ASE条件

仪器：ASE 350,

前处理方法：取黄连上清丸水丸1 g，精密称定，加入硅藻土（DE）适量，研磨，混合均匀。在萃取池（22 mL）中垫入纤维素膜，加入5 g碱性氧化铝，填平；将混合均匀的样品加入萃取池中，加速溶剂萃取条件参见表5-13，萃取液定容，滤过，待HPLC分析。

HPLC条件

仪器：Ultimate 3000 HPLC

分析柱：Acclaim 120 C18, 5 μm, 4.6 × 250 mm ,
P/N: 059149;

流动相：乙腈-33 mmol/L磷酸二氢钾溶液（35:65）

柱温：30℃

检测波长：270 nm

进样量：10 μL

表5-13 ASE萃取条件

ASE条件	参数
溶剂	甲醇
温度	140℃
加热时间	7 min
静态萃取时间	5 min
循环次数	2
吹扫体积	60%
吹扫时间	90 s
总体积	40 mL
总时间	20 min

结果与讨论

In-cell cleanup净化过程

参考2010版药典，采用碱性氧化铝作为在线净化吸附剂。取1 g黄连上清丸样品，分别于萃取池底部添加不同量的碱性氧化铝，考察碱性氧化铝的量对净化效果的影响。实验结果表明：当不添加碱性氧化铝萃取时，HPLC分析小檗碱时，小檗碱色谱峰被杂质峰覆盖，干扰严重（见图5-7、图5-8）。当碱性氧化铝添加量达到5 g时，样品中小檗碱色谱峰未见干扰，采用DAD检测器进行紫外光谱图扫描，±50%和100%处三张光谱图重叠良好，光谱纯度因子PPI大于999.0，小檗碱色谱峰没有杂质干扰。比较未净化样品和净化样品色谱图，净化样品杂质峰明显减少（见图5-9，红线圈出部分）。

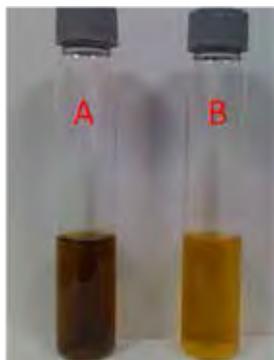


图5-7 萃取液颜色比较
(A: 未添加碱性氧化铝; B: 添加5 g碱性氧化铝)



图5-8 碱性氧化铝颜色变化
(A: 萃取前; B: 萃取后)

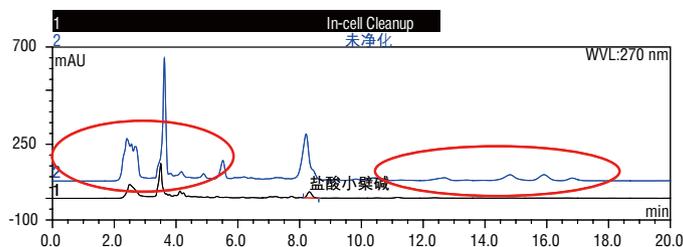


图5-9 未净化样品和净化样品色谱图比较
(1. 添加5g碱性氧化铝净化样品；2. 未添加碱性氧化铝净化样品)

ASE和药典方法比较

分别采用ASE在线净化技术和《中国药典（2010版）》方法对同一样品进行萃取，经HPLC分析得出结果（表5-14）。采用ASE在线净化萃取技术提取的样品中小檗碱含量为0.497 mg/g，标准偏差为2.6%（n=3）；采用《中国药典（2010版）》方法提取的样品中小檗碱含量为0.474 mg/g，标准偏差为3.5%（n=3）。采用在线净化-ASE萃取法和《中国药典（2010版）》方法对小檗碱的萃取率接近，但在线净化-ASE萃取法省去了药典方法中过层析柱，浓缩等步骤，大大简化了实验过程，实现了萃取净化一步到位的目的。

表5-14 ASE和索氏提取比较（n=3）

萃取方法	样品量	溶剂量	耗时	样品含量 (mg/g)	RSD/%
ASE	1g	40 mL	20 min	0.497	2.6
USE	1g	100 mL	4 h	0.474	3.5

结果讨论

采用In-cell cleanup ASE提取中药复方黄连上清丸中的小檗碱，和《中国药典（2010版）》推荐方法对小檗碱的萃取率接近，能够去除干扰小檗碱测定的杂质，能够达到萃取净化一步到位，同时具有操作简单、快速、高效等特点。

5.3.6 ASE-Gilson ASPEC全自动样品处理系统联用提取圣约翰草中的双萜醌

对一些复杂基质的样品进行前处理，往往需要在样品萃取完成后进一步净化，以减少杂质的干扰。现在市场上较多的自动净化设备，例如ASPEC就是Gilson公司生产的液体处理系统，其可编程来完成样品的净化及液体样品的萃取。ASE的自动萃取系统和ASPEC的自动液体样品处理系统联用是样品处理技术的一大进步，同步实现了固体样品的萃取和净化步骤，大大简化了样品前处理的步骤。

本应用文献中介绍了采用ASE-ASPEC自动化萃取及处理装置提取圣约翰草（金丝桃属植物）中的双萜醌。并将采用联用系统得到的结果与传统的超声提取后手动SPE净化的结果进行了比较。

仪器

- ASE 200 加速溶剂萃取仪
- Gilson ASPEC XL 液体处理系统 (P/N: 2910815)
- ASE- ASPEC 连接接口 (P/N: 2707915)

超声萃取条件

- 萃取溶剂：乙醇/水（1:1, v/v）
- 时间：1 h
- 溶剂体积：20 mL

离心时间：10 min
 总萃取时间：70 min
 总溶剂消耗量：20 mL

ASE条件

萃取溶剂:乙醇/水 (1:1, v/v)
 温度：100℃
 压力：1500 psi
 加热时间：5 min
 静态时间：5 min
 冲洗体积：60%
 吹扫时间：100秒
 循环次数：1次
 总萃取时间：14 min
 总溶剂消耗量：12-15 mL

SPE 条件（手动和自动）

固相萃取柱：氧化铝-N，6 mL，填充2 g填料
 柱预处理：3 mL异丙醇
 萃取液：6 mL
 洗提液：乙醇/水 (1:1, v/v)，3 mL

样品准备

样品购自当地的保健品店。植物样品从几个胶囊中取出并充分混合。在装有纤维素滤膜的11 mL ASE萃取池中称取1 g样品。

手动净化萃取液

经超声、离心后，将萃取液从装植物材料的试管取出。固相萃取前，萃取液定容至20 mL。采用ASE方法的萃取液，可以通过调整方法参数中的冲洗体积，使得最终的体积为20 mL。手动固相萃取时，采用真空泵抽取样品。ASPEC则利用气压使溶剂流过萃取柱。上述无论是手动还是自动萃取程序，溶液的体积均是一样的。

分析

过固相萃取柱除去共萃取的杂质后，用分光光度计在590 nm处测定样品中的双葱醌含量。以超声萃取后手动固相萃取的结果为基准（此方法是INA的标准方法）。

ASPEC和ASE通过Gilson 联用装置 (P/N2707915) 紧密连接起来（如图5-10所示）。前者用计算机通过735 采样软件（Gilson）控制，后者通过仪器的前面板操作。ASPEC中导入萃取方法，通过等待命令控制。ASPEC在清洗SPE固相萃取柱后，等待ASE完成萃取。ASE萃取完成时，收集瓶就位并将完成信号发送给ASPEC。然后ASPEC从收集瓶吸取6 mL 萃取液到SPE固相萃取柱，并发信号给ASE开始萃取新样品的同时ASPEC继续程序处理样品。当ASE和ASPEC完成整个样品和清洗程序后，双葱醌采用分光光度法分析。ASE萃取填充干净的沙子，萃取液作为分光光度法的空白。



图5-10 ASE-ASPEC连接系统

结果与讨论

表5-15总结了此次研究的结果。第一行是传统的超声萃取，手动SPE净化后采用分光光度法测定双葱醒的数据。第二行是ASE萃取，手动SPE净化后所测得的结果。第三行是ASE与Gilson ASPEC联用所得的结果。如结果所示，ASE萃取所得的结果优于传统的超声方法。萃取过程全自动可改善萃取结果的精密度。

表5-15 萃取后手动SPE净化与ASE-ASPEC 联用的全自动样品处理的结果比较

	回收率 (%) (以超声萃取为基准)	RSD (%)
超声-手动SPE	100	4.2 (n=4)
ASE-手动SPE	138.0	4.1 (n=4)
ASE-ASPEC	135.1	1.8 (n=8)

5.3.7 中药中的农药残留

《中国药典（2010版）》中提供了有机氯、有机磷和拟除虫菊酯三类农药残留的检测方法。但药典中提供的方法前处理繁琐，三类农药残留分别采用了不同的前处理方式，不同的检测方法，且该方法非常耗时。本方法采用ASE提取中药中49种有机氯、有机磷及拟除虫菊酯类农药残留，分析结果良好。

样品：甘草、金银花、人参、黄芪等

仪器：

ASE 350
10mL不锈钢萃取池
GC或GC/MS

表5-16 ASE萃取条件

条件	参数
溶剂	丙酮：正己烷=1:1
温度	80 °C
加热时间	5 min
静态萃取时间	5 min
循环次数	2
吹扫体积	60%
吹扫时间	60 s
总萃取时间	20 min
总萃取液体积	20 mL

样品制备

中药材样品采用粉碎机粉碎，过30目筛。精确称取样品2g，加入硅藻土适量，混合均匀，转至底层垫有纤维素膜的萃取池（10 mL）中，按表5-16加速溶剂萃取条件萃取。萃取完成后萃取液氮吹浓缩至近干，加3 mL乙腈/乙酸乙酯（3/1）复溶。采用Carb/NH₂ SPE小柱净化后，GC/MS分析。

分析结果

本实验对有机氯、有机磷及拟除虫菊酯三类农药共49种农药残留进行分析，实验结果表明ASE具有良好的加标回收率及RSD（表5-17）。

表5-17 49种农药加标回收率及RSD数据（n=3）

序号	化合物	加标50 µg/L 回收率/%	加标100 µg/L 回收率/%	加标200 µg/L 回收率/%	RSD/%
1	甲胺磷	43.9	52.4	53.6	8.1
2	敌敌畏	110.5	108.3	101.1	4.7
3	乙酰甲胺磷	63.7	61.5	69.1	7.3
4	氧乐果	50.6	59.8	65.7	7.7
5	久效磷	108.6	118.3	99.8	3.4
6	甲拌磷	94.0	98.9	89.3	3.8
7	α-六六六	74.5	78.8	80.1	1.4

8	六氯苯	83.2	85.7	86.4	3.8
9	乐果	115.3	104.5	97.5	4.6
10	β -六六六	103.0	99.4	83.1	3.2
11	五氯硝基苯	107.2	103.4	93.9	4.2
12	γ -六六六	70.7	77.8	80.5	1.2
13	二嗪磷	99.2	101.7	91.3	1.6
14	地虫硫磷	94.6	98.2	82.9	3.9
15	δ -六六六	104.3	82.6	91.4	4.3
16	五氯苯氨	98.2	103.1	91.1	4.1
17	磷胺	116.8	111.1	90.4	4.9
18	甲基毒死蜱	100.1	104.0	92.9	5.9
19	甲基对硫磷	101.8	108.9	103.4	5.6
20	七氯	87.0	82.3	85.1	4.6
21	甲基嘧啶磷	102.0	103.6	93.1	5.1
22	杀螟硫磷	71.2	91.6	95.2	5.6
23	五氯硫代苯甲醚	83.0	92.4	85.5	3.1
24	马拉硫磷	106.1	107.6	97.2	4.2
25	毒死蜱	86.4	113.0	84.5	4.1
26	倍硫磷	104.5	101.7	92.2	2.6
27	艾氏剂	94.1	96.7	84.2	0.7
28	对硫磷	98.1	103.1	105.5	4.5
29	水胺硫磷	118.2	112.8	106.5	4.0
30	毒虫威	110.0	118.0	105.2	1.4
31	喹硫磷	101.1	101.2	93.2	4.2
32	杀扑磷	79.6	86.0	82.1	4.5
33	氯丹	99.2	97.2	90.5	4.7
34	p,p'-DDE	76.6	73.0	76.7	5.2
35	狄氏剂	76.1	80.3	82.7	3.3
36	异狄氏剂	101.0	103.2	93.8	2.5
37	乙硫磷	108.4	111.6	101.7	3.8
38	p,p'-DDD	73.2	78.3	81.7	4.9
39	o,p'-DDT	78.1	72.3	80.3	5.1
40	三唑磷	114.0	104.2	82.1	2.1
41	三硫磷	88.8	108.0	92.3	5.3
42	p,p'-DDT	71.2	74.1	79.6	5.6
43	溴螨酯	73.8	77.1	80.5	2.8
44	伏杀磷	108.0	108.6	102.8	5.4
45	谷硫磷	116.4	109.3	103.1	0.4

46	氯菊酯	97.0	107.7	107.3	2.7
47	氯氰菊酯	79.5	82.0	87.4	6.3
48	氰戊菊酯	102.7	89.4	95.1	2.7
49	溴氰菊酯	83.1	79.5	85.7	1.9

5.4 加速溶剂提取在化药分析中的应用

5.4.1 药片中的活性物质非洛地平及其降解产物

药片中活性物质提取是药物分析中最常见的操作之一，通常需要将药片研碎，而后采用液固萃取，或者采用超声波来加速萃取过程。然而，这些操作繁琐，耗时耗力，面对大量样品时，需要采用自动化程度更高的前处理方法。本文以提取药片中的非洛地平为例进行说明。

仪器

ASE 200 加速溶剂萃取仪

ASE萃取条件

溶剂：乙腈：甲醇=2:1

萃取温度：50℃

加热时间：5 min

静态时间：5 min

循环次数：1次

冲洗体积：60%

吹扫时间：90秒

实验结果

本实验中比较了不同萃取温度、样品颗粒大小等因素对非洛地平及其降解产物HI52/37的萃取率的影响。实验结果表明，最佳萃取温度为50℃，样品颗粒<1 mm时能得到最佳萃取效果（图5-11）。

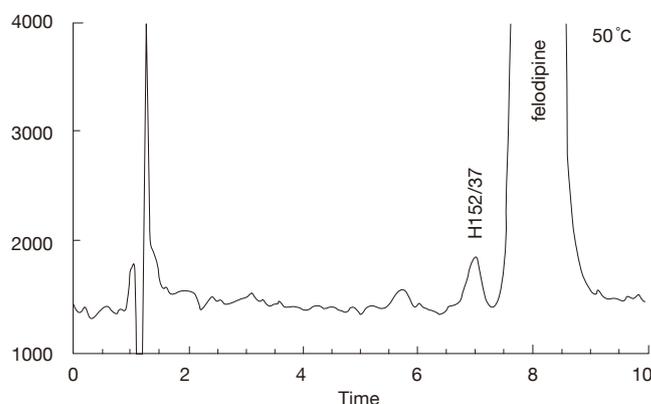


图5-11 样品测试色谱图

5.4.2 药片中低含量的降解产物

新药研发阶段中杂质和降解产物的定性定量分析是一项至关重要的工作，其中最大的挑战为低含量化合物的分析。这样往往需要采用多次提取来达到检出的目的，这样既消耗时间也消耗大量的有机溶剂。

仪器

ASE 200加速溶剂萃取仪
Alliance 2690 HPLC (Waters)

ASE萃取条件

溶剂：2:8=乙腈:0.1%磷酸
萃取温度：70℃
样品量：10片
加热时间：5 min
静态时间：3 min
循环次数：3次
冲洗体积：60 %
吹扫时间：90秒

样品处理

将药片放入表面皿中，置于恒温恒湿试验箱中70℃，相对湿度70%保持6周，让待测药片降解。降解后样品保存于5℃冰箱中直至分析。分析时将药片研碎，和适量硅藻土混匀，倒入萃取池中。

实验结果

采用ASE萃取，LC分析不同降解条件下药片的降解产物，实验结果见（图5-12）。

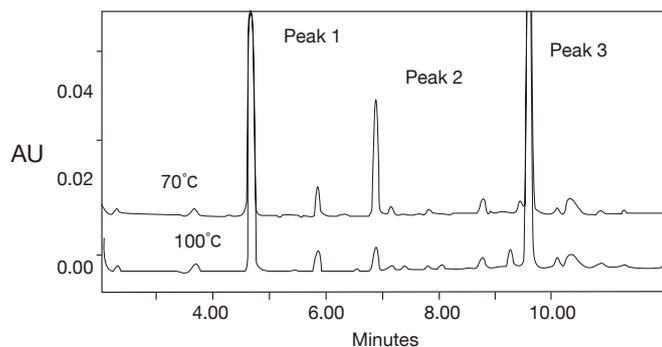


图5-12 不同降解条件下降解产物含量比较

5.4.3 膏药中的硝化甘油

质控与保存期限研究均需要分析药物的成分。分析药物成分最耗时的往往在于样品前处理。对于膏药成分的分析更是如此，因为膏药基体比其它药物复杂得多。现有技术从膏药中萃取硝化甘油需要大量的有机溶剂以分离最终合成产物中的活性成分。

本方法介绍使用ASE从成型的膏药中萃取硝化甘油。实验结果表明ASE萃取所得的结果与标准的超声萃取方法相同。

仪器

ASE 200 加速溶剂萃取仪
DX500 HPLC (带有AD20紫外检测器)

ASE萃取条件

溶剂：乙醇

池温：室温
 压力：1500psi
 样品量：1片，10或20 cm²
 加热时间：5 min
 静态时间：3 min
 冲洗体积：100 %
 循环次数：3次
 吹扫时间：90秒

结果

表5-18总结了ASE萃取10 cm²膏药的回收率数据。ASE萃取20 cm²膏药的回收率数据如表5-19所示。由于药物分析方法认证要求，同时给出了峰面积和峰高的数据。

如表5-18和表5-19数据所示，ASE萃取所得的回收率与精确的结果与现有液相萃取方法相同。然而ASE可显著减少溶剂消耗量，而且更省时（如表5-20所示）。

表5-18 ASE 萃取每片10cm²的膏药中硝化甘油的回收率
(平行测定10次)

	峰面积	峰高
平均含量 (mg/片)	31.4	31
%RSD	1.4	1.4
与现有方法回收率的比值	99.1	97
现有方法的%RSD	1.5	1.5

表5-19 ASE 萃取每片20cm²的膏药中硝化甘油的回收率
(平行测定10次)

	峰面积	峰高
平均含量 (mg/片)	62.0	62.9
%RSD	3.9	3.9
与现有方法回收率的比值	96.0	96.7
现有方法的%RSD	1.1	1.0

表5-20 萃取方法比较

	现有方法	ASE
溶剂	乙醇	乙醇
溶剂消耗量	10cm ² 为175 mL 20cm ² 为175 mL	10cm ² 为50 mL 20cm ² 为100 mL
萃取后处理	过滤、稀释	97.0
分析	HPLC	HPLC
总的样品处理时间	2h/样品	30min/样品

5.5 加速溶剂提取在抗生素分析中的应用

5.5.1 发酵菌丝中的青霉素和头孢菌素C

随着人们环保意识的提高，如何处理处置制药行业产生的废菌渣，实现废菌渣的无害化、资源化成为亟待解决的难题。对青霉素、头孢菌素菌渣中含有大量的菌体蛋白，丰富的维生素、生长因子及培养基残留物等营养物质，可用于肥料及饲料生产。但需要对青霉素及头孢菌素含量进行检测以便生产利用。

仪器

ASE 350 加速溶剂萃取仪

UltiMate3000 HPLC

ASE萃取条件

溶剂：水

池温：室温

静态时间：5 min

循环次数：2次

冲洗体积：60 %

吹扫时间：120秒

萃取池：10mL SST

总萃取时间：15 min

总萃取体积：15 mL

实验结果

采用本方法对青霉素菌丝及头孢菌素菌丝中的青霉素及头孢菌素C进行提取，实验结果见图5-13，5-14和表5-21。

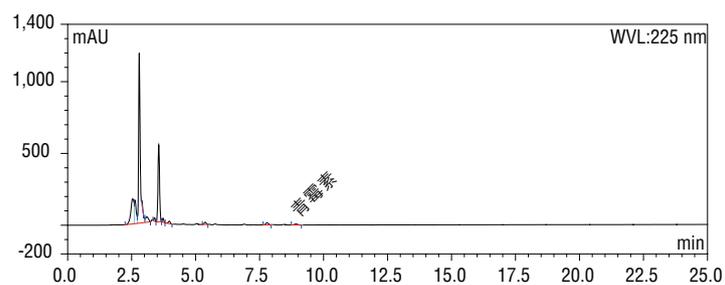


图5-13 青霉素菌丝样品色谱图

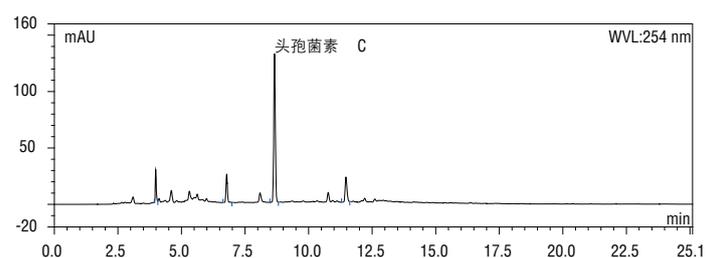


图5-14 头孢菌素C菌丝样品色谱图

表5-21 菌丝中青霉素和头孢菌素C的含量及RSD (n=3)

样品	萃取次数	萃取率/μg/g	平均萃取率/μg/g	RSD/%
青霉素样品	1	174.0	182.4	4.3
	2	189.8		
	3	183.4		
头孢菌素样品	1	2346.8	2298.1	2.2
	2	2302.8		
	3	2244.7		

更安全

ThermoFisher
SCIENTIFIC

更清洁

更健康

赛默飞致力于帮助您使世界变得

关于赛默飞世尔科技

赛默飞世尔科技（纽约证交所代码：TMO）是科学服务领域的世界领导者。公司年销售额170亿美元，在50个国家拥有员工约50,000人。我们的使命是帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。我们的产品和服务帮助客户加速生命科学领域的研究、解决在分析领域所遇到的复杂问题与挑战，促进医疗诊断发展、提高实验室生产力。借助于Thermo Scientific、Life Technologies、Fisher Scientific和 Unity™ Lab Services四个首要品牌，我们将创新技术、便捷采购方案和实验室运营管理的整体解决方案相结合，为客户、股东和员工创造价值。

赛默飞世尔科技中国

赛默飞世尔科技进入中国已超过30年，在中国的总部设于上海，并在北京、广州、香港、台湾、成都、沈阳、西安、南京、武汉等地设立了分公司，员工人数超过3800名。为了满足中国市场的需求，现有8家工厂分别在上海、北京和苏州运营。我们在全中国共设立了7个应用开发中心，将世界级的前沿技术和产品带给国内客户，并提供应用开发与培训等多项服务；位于上海的中国创新中心结合国内市场需求和国外先进技术，研发适合中国的技术和产品；我们拥有遍布全国的维修服务网点和特别成立的中国技术培训团队，在全国有超过2000名工程师提供售后服务。我们致力于帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。

禹重科技® UZONGLAB

成分分析仪器 | 表面测试仪器 | 样品前处理仪器

上海市闵行区春申路2525号芭洛商务大楼

电话：021-8039 4499 传真：021-5433 0867

上海|北京|沈阳|太原|长沙|广州|成都|青岛|香港

全国销售和售后服务电话：400-808-4598

邮编：201104, China

邮箱：shanghai@uzong.cn

更多信息请访问：www.uzong.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC



了解我们



微信公众号