

# 高效液相色谱在化学药物分析中的应用

陈 英 崔洪英 曹 娟

江苏恒瑞医药股份有限公司 江苏连云港 222000

**摘要:** **目的:** 探讨实际应用高效液相色谱在化学药物分析中的应用价值。**方法:** 由生产厂家提供的阿奇霉素、克拉霉素、罗红霉素三种抗生素作为调查分析对象。分别采用HPLC检测以及薄层色谱TLC检测, 对比分析两种检测方法检测结果。**结果:** 检测结果显示, 当色谱柱为 $30^\circ$ 和 $90^\circ$ 时, HPLC检测药物完全分离时间明显较TLC检测短, 差距显著( $P<0.05$ ); **结论:** 高效液相色谱HPLC检测对药物的分离时间、回收率均得到显著提升。

**关键词:** 高效液相色谱; 化学药物; 应用价值

## Application of High Performance Liquid Chromatography in Chemical Drug Analysis

Ying Chen, Hongying Cui, Juan Cao

Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd, Lianyungang, Jiangsu, 222000

**Abstract:** **Objective:** To explore the practical application value of high performance liquid chromatography in chemical drug analysis. **Methods:** Azithromycin, clarithromycin and roxithromycin provided by the manufacturer were investigated and analyzed. HPLC detection and TLC detection were used to compare the results of the two detection methods. **Results:** The results showed that when the chromatographic column was  $30^\circ$  and  $90^\circ$ , the complete separation time of HPLC was significantly shorter than that of TLC ( $P<0.05$ ); **Conclusion:** The separation time and recovery rate of drugs by HPLC were significantly improved.

**Keywords:** High performance liquid chromatography; Chemical drugs; Application value

### 引言:

薄层色谱TLC为早前药物分析较为常见的方法, 就研究初期分析化学药物的药理起着重要的影响和作用, 但经过长时间实验发现存在分离难问题, 使得最终检测结果出现问题。而HPLC为药物分析的先进方法, 本次调查主要针对阿奇霉素、克拉霉素、罗红霉素三种抗生素作为调查分析对象。现将报告阐述如下。

### 一、资料与方法

#### 1.1 一般资料

分析样品选取阿奇霉素(国药准字H20000197, 东北制药集团沈阳第一制药有限公司, 规格(0.59/片)、克拉霉素(国药准字H20033513, 江西汇仁药业有限公司, 规格0.259/片)、罗红霉素(国药准字B20067998, 长春长庆药业集团有限公司, 规格(0.39/粒), 同时将检验结果根据检验方法分为TLC组和HPLC组, 对于两组化学药物的一般资料发现无明显差距( $P<0.05$ )。

#### 1.2 方法

对于化学药物分析, 通常需要进行复杂的分离后样品进行多个分析仪分析。其中, 薄层色谱是目前应用最为广泛而简单的分析方法, 主要包括液相色谱法(HPLC)、微孔多孔液相色谱法(HPLC与液相色谱、毛细管柱、高效液相溶剂、超声波等)及流动相色谱。其中HPLC是最早提出并开始应用于研究化合物分离分析方法。该法以流动相分析为主, 分离剂可以是石油基化合物。具体可分为两种形式, 即溶剂相色谱法(如HPLC法)和液相色谱法(如毛细管柱、溶剂柱等)。HPLC(高效液相色谱法)是基于流动相分离原理和多孔微孔液相色谱原理, 以及液相、溶剂/柱模型进行分离分析设计而成的一种高效液相色谱法<sup>[1]</sup>。此方法利用高效液相色谱分离多种物质(溶液)并测定其含量的新方法。因此, 该法又称高效液相色谱法。目前薄层色谱法还广泛应用于其他一些化学分析方法, 包括溶剂法、同位素分

析法、原子吸收光谱法、红外光谱法等等<sup>[2]</sup>。

不同的样品分析方法会使用到不同的仪器。通常情况下,如果使用同种类型的仪器,样品分离就会比较困难。使用不同种类仪器,将会带来样品的分离结果存在一定差异。因此,为了保证分离结果的准确性,应当选用相同种类、性能良好、适用性强的仪器进行分析。比如常规药物分析某一化合物的特征峰,而薄层色谱柱能达到非常高的分离效率。并且由于药物分析需要进行许多复杂信号的分析,因此需要采用与常规色谱类似的仪器进行分析,才能确保分析结果更加准确。另外一般情况下,很多仪器并不具备自动上样功能,对于药物分析而言还需要采用手动上样功能。自动上样功能可以根据不同产品提供了不同型号的薄层色谱柱上上样功能。如果药品在实验室中需要进行大量检测,那么只有采用薄层色谱柱上上样功能才能得到满意效果。此外,根据薄层色谱柱上上样功能来选择不同种类、性能良好的薄层色谱柱是仪器选型过程中比较重要的一环<sup>[3]</sup>。在使用某一种薄层色谱柱对不同样品进行分析时,应注意这一点,具体实验内容如下:

**TLC组:**将参加实验的三种药物研磨成粉,每份样本取适量溶解到50ml量杯中,摇匀2min并静置5min,分别经过淋洗、上样、复淋洗、洗脱以及分离程序提取化学药物成分,并采用高效硅胶色柱检测,分别记录色谱。

**HPLC组:**前期处理方法与TLC相同,联合滤过并采用紫外线扫描,波长保持在200~400nm,将扫描后标本注入液相色谱仪,记录检测结果。

### 1.3 观察指标

分别观察两组检测结果在不同温度下色谱柱的化学药物分析时间,以及两组药物的纯度、分离率以及回收率。

### 1.4 统计学方法

本实验使用SPSS 19.0统计软件进行统计分析,计数资料以率(%)表示,采用t检验。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )为测量数据,并使用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 二、结果

2.1 对比两组检测样本30° 色谱柱图结果,详见表1。

表1 对比两组检测样本30° 色谱柱图结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	阿奇霉素	克拉霉素	罗红霉素
TLC	3	15.53 ± 0.59	15.39 ± 0.81	14.39 ± 0.89
HPLC	3	2.14 ± 0.41	2.09 ± 0.39	2.09 ± 0.31
T	-	38.105	30.029	23.274
P	-	0.002	0.001	0.001

2.2 对比两组检测样本90° 色谱柱图结果,详见表2。

表2 对比两组检测样本90° 色谱柱图结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	阿奇霉素	克拉霉素	罗红霉素
TLC	3	1.28 ± 0.27	1.39 ± 0.41	1.29 ± 0.37
HPLC	3	14.01 ± 0.39	14.02 ± 0.69	14.11 ± 0.79
T	-	52.196	28.274	28.964
P	-	0.001	0.001	0.001

## 三、讨论

分析是从化学性质、结构、功能和应用价值等方面对样品进行定性和定量分析的一种方法。分析具有高灵敏度、特异性强、重复性好、分析过程的精确度及分析结果的可重复性等特点。在分析化学药的分子组成和结构时,可利用常规的流式或离子体流动相,也可利用流动相的离子化作用作为流动相过程;此外对化合物或溶剂也可以用流式进样器作为流动相,再用离子化作用产生分子链转移,从而实现分离。在进行药物成分分析时,可利用高效液相色谱TLC与PLC法等分析方法进行高效液相色谱TLC与PLC法分析。高效液相色谱TLC和PLC方法具有高灵敏度和高重复性等特点;而在对化合物进行分析时,可利用色谱柱、溶剂、温度和流动相流速等技术因素有效控制分析过程;同时还可以利用测定信号与分析结果之间的关联性对化合物或溶剂在流动相中存在关系产生直观的认识<sup>[4-6]</sup>。

流速分析法在实际应用中可以将不同种类的化学药进行分离,将分离的化合物在固定相上以一定的流速缓慢流动,在流动相上进行分离,当液体中的杂质流过时,液体中被分离出来的杂质从固定相上移走而形成一定浓度的沉淀,形成沉淀后可测定流速值<sup>[7]</sup>。流速分析法是通过测定流速来确定某些固体药液中杂质流速变化关系,从而在一定范围内测定出各种固体药液中杂质或其它固定相成分浓度,从而为质量控制和生产工艺优化提供依据。流速分析法应用广泛,而且比较经济。而高纯药物分子具有高比表面吸附力和高比表面积等特点,对其进行分析可以更加方便快捷地进行定性和定量处理,所以很多高纯药物的成分都可以通过流速分析法准确进行定性检测与定量分析。比如阿奇霉素在使用TLC法进行定量检测时需要保证其浓度范围在2-3 $\mu$ g/ml;克拉霉素在使用TLC法进行定量检测时需要保证其浓度范围在0.5-2 $\mu$ g/ml;罗红霉素在使用TLC法进行定量检测时需要保证其浓度范围在0.2-0.5 $\mu$ g/ml等<sup>[8]</sup>。这样不仅可以提高效率 and 准确度,而且可以更加方便快捷地分析样品中不同物质的成分含量并进行定性和定量检测,从而可以减少操作人员工作量和样品分析时间。

高效液相色谱(TLC)是一种利用离子化方式将分子进行分离的药物分析方法,它具有易于操作、分离效

果好、分析速度快、灵敏度高等特点。传统色谱分析仅有极少量基线的峰,无法进行有效的数据处理,因此在众多药物分析方法中,液相色谱更是一种被广泛采用的传统方法<sup>[9]</sup>。高效液相色谱法是利用固定相,根据流动相的特点以及化学药物中离子分布情况选择流动相来分离和保存目标物质的一种科学方法。在传统药物分析中一般采用气相色谱仪(GC)或质谱(GC)进行测定;而高效液相色谱仪则可采用高效磁液(TLC)和微波离子化技术进行测定。近年来,由于液相色谱具有诸多优点,在新药开发中得到了越来越多应用<sup>[10]</sup>。例如:近年来用于抗生素检测和药品原料分析的相关设备和仪器已经基本实现国产化。

高效液相色谱(TLC)的进样量一般在50-150 ml之间,色谱柱中一般含有30-50 ml的流动相;流动相中水含量一般为30-50 ml或其他杂质不能很好地溶解到流动相中;这就导致了流线型结构在进样量很大时造成流动相液流变严重且很难通过分离柱和样品之间的相互干扰来实现分离结果一致性。流动相液质流动过程中所产生的大部分热量都需要通过热交换或加热产生热交换进行带走。因此通过对液体进样量控制在20 ml左右或50 ml左右便可得到比较理想的分离效果。流动相本身即有热传导功能;流速过大或过小都会使液体快速蒸发,使样品温度升高。由于流动相中存在流动不良和热导作用造成样品与流动相有很大差异。因此当需要检测时需通过改变流动相液质流速来实现自动调节。

分析仪器设备的选择与维护对于每一种化学药品,尤其是化学合成制剂以及天然产物等有不同程度的研究和生产情况,使用不同设备其作用、操作、特点及优势也各不相同。对于药物分析而言,应根据分析对象的特点及所使用仪器的性能,选择适合的分析方法和检测设备。因为每种药物物质都有其各自的特性,在不同的分析条件下均可能表现出不同的特点。因此选择分析仪器时应尽可能选择一种科学、经济、合理、方便操作而又保证质量稳定良好的分析仪器,如流速为0.2 mL/min-0.7 mL/min以上为宜。由于高效液相色谱(含离子色谱)采用一定比例的流动相与固定相流动相溶液在不同流动中发生流动相交换导致分离现象,所以选择流动相需具备一定比例及流动相中能进行流速调节、温度调节等流动相交换过程或与流动相交换相同时进行流动相交换过程或以适当降低固定相流速来调节流动相交换过程。流速一般在0.1-0.2 mL/min之间。这样可以实现不同浓度样品间液相中不同溶剂(如有机溶剂、酚类、甲苯等)流动相交换过程<sup>[11-12]</sup>。当流速小于上述要求时,可考虑使用

固定相流速调节机,因为每个流速仪只能完成一种或多种流动相交换过程,而且会出现一定程度的峰形不佳问题。当流速小于0.25 mL/min时建议选用固定相泵、毛细管柱或毛细管电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)来提高检测精度和灵敏度。

综上所述:采用HPLC检测以及薄层色谱TLC检测对阿奇霉素、克拉霉素、罗红霉素三种抗生素检测后。透过检测结果可知当色谱柱为30°和90°时,HPLC检测药物完全分离时间明显较TLC检测短,差距显著(P<0.05);因此,高效液相色谱HPLC检测对药物的分离时间、回收率均得到显著提升。

#### 参考文献:

- [1]许惠,汪贞,古文,等.超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术非靶向筛查涪陵地区有机污染物[D].2020.
- [2]赵娜,梁嘉诚,时丽艳,等.QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定有机肥料中10种氟喹诺酮类药物残留[D].2019.
- [3]项昭保,伍晓玲,汪程远,等.色谱及其联用技术在保健食品非法添加药物检测中的应用研究进展[D].2019.
- [4]程军,刘颜.高效液相色谱-电化学检测法在药物分析中的应用[D].2017.
- [5]厉芬,陈褚建,王新财,等.高效液相色谱在化学药物分析中的实际应用.医药前沿,2018,8(12):114
- [6]王海艳.降压类中成药及保健食品中21种非法添加化学药物的快速检测研究.中国保健营养,2020,30(17):11
- [7]区敏霞.高效液相色谱同时测定水产品中7种磺胺类药物残留的方法改进.食品安全导刊,2017(21):133-135
- [8]廖庆禄.高效液相色谱法测定大豆异黄酮含量的研究.医药产业资讯,2005,2(7):106-107
- [9]吴学兵,朱峰,王君锋,等.混匀不充分致糖化血红蛋白色谱图基线斜升2例报道.检验医学与临床,2021,18(2):287-288
- [10]莫浩勋.强腐蚀性化学药物引起牙齿过敏症1例.临床口腔医学杂志,2002,18(z1):75-75
- [11]顿珠次仁,陈正红,米玛,等.关于藏药矮紫堇有效成分及色谱图的研究.西部中医药,2020,33(4):55-58
- [12]陈晓婷,李云飞,张炳峰,等.BIO-RAD Variant II TURBO糖化血红蛋白仪色谱图分析及处理.国际检验医学杂志,2013,34(18):2455-2456