

# 高效液相色谱技术在药品检验中的应用研究

路文涛 杨雪莹

陕西省药品和疫苗检查中心 陕西 西安 710065

**【摘要】** 高效液相色谱技术是一种先进的药用产品分析技术,具有高效、快速等优点。目前,我国的高效液相色谱技术在分离效果和解析速率等方面均获得了突破性发展,并保持着经典液相色谱的高度流动性和普遍适应性等优势,因此在生物工程、食品、制药等行业中得到广泛应用。本文对高效液相色谱技术进行简单概述,并分析该技术的原理和特点,以及高效液相色谱仪各系统的组成和特点,着重探究高效液相色谱技术在药物检验中的实际运用及未来进展。

**【关键词】** 高效液相色谱法;药品检验;应用研究

**【中图分类号】** R917

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 2096-1685(2022)12-0103-03

## 1 高效液相色谱技术的概述

高效液相色谱技术,简称为 HPLC,是一种新式的分离和解析技术;其是在经典液相色谱法的基础上发展而来的一种成熟的液相色谱方法,并在色谱理论的基础上进行改进。该技术的工作方式:用给定极性的简单水溶液及各种配比的均匀水溶液作为流动相,利用泵将流动相导入填料柱,待加入的试样在流动相导入柱中完成分散后,将各部分依次导入检测器,再利用记录机、数据分析设备完成数据处理,得出最后的测量结果<sup>[1]</sup>。

和常规的液相色谱法比较,高效液相色谱法通过小颗粒的高效固定相和均质填充技术可达到良好的分离效果。另外,由于采用了高压流动泵可有效提高分离率,因此仅需数分钟便可完成整个分离过程,较常规的液相色谱法快。高效液相色谱技术不但能快速解析结果,同时还能合理调节色谱条件,使高效液相色谱仪能自始至终保证良好的核心机能,并能有效提高监测精度。高效液相色谱法具有众多优势,如高压、快捷、有效、高灵敏度等,因此被广泛用于制药业和其他行业。

## 2 高效液相色谱技术的原理及特点

### 2.1 高效液相色谱技术的原理

高效液相色谱技术通过高压输液控制系统来输出用作流动相的液相。高效液相色谱法是最重要的色谱分析法高新技术之一,使用大型高压输液泵将不同配比的组分或不同种类的流动相液和单一溶剂的混合液泵进有固定方向进样阀的实验柱中,并注入试验样品<sup>[2]</sup>。流动相首先被导入色谱柱,其主要成分被充分分析和分离后,再被导入相应的检测器以监测和分析化学样品。从技术上来说,高效液相色谱法和典型液相色谱法并无显著差异,但是由于使用了先进的压力输液泵、高灵敏度的检测装置及更高效率的微粒固定相,从而使高效液相色谱技术更具活力。现代高效液相色谱法使用了小柱径和小的液相色谱分析法填充物,其分离速率快于经典的液相色谱法。

### 2.2 高效液相色谱技术的特点

高效液相色谱技术具备以下几个主要特性:高压、高速度性、高有效性、高灵敏度及适应能力强且适应范围大等<sup>[3]</sup>。由于高效液相色谱法技术具备高压的特性,因此其可使用同一种液相为流动相(又称载液);但液相在流过色谱柱时会造成较大的阻碍,因此需要施以高压让载液快速穿过色谱柱。高效液相色谱法的重要优势在于其速度较快,柱中流动相的体积流量比经典液相色谱法高,达到 1~10mL/min;另外,高效液相色谱法需满足的解析时限也短于经典液相色谱法,通常少于 1h,因此,分离技术效益更优。高效液相色谱法的重要特征在于高灵敏度,因此高灵敏度检测器也将被广泛应用在高效液相色谱法中,以进一步提高对分析方法的敏感性,如荧光检测器的高灵敏度范围能达 10~11g。

高效液相色谱技术有适合范围大面积的优点,尽管气相色谱法有分散效果好、敏感度高、解析速度快、操作简单等优势,但是受到技术上的局限,难以运用气相色谱法来分析沸点太高或热稳定能力过低的化合物。而高效液相色谱法只需把试样转变为溶剂,而不需要挥发,因此不受试样挥发性的影响。高沸点、热稳定能力差、相对分子量较高(超过 400)的有机物(这些物质几乎占有有机物总数的 75%~80%),原则上都可广泛应用于高效液相色谱法分离与分析。而基于统计数据,约 20%的已知物质都能用气相色谱法进行分析,大约 70%~80%的物质能用高效液相色谱法进行分析<sup>[4]</sup>。

## 3 高效液相色谱仪各系统的组成及特点

### 3.1 进样系统

进样通常用隔膜式注射采样器或高压注射室进行,注射量恒定,这对于提高所分析的样品的可重复性具有积极作用。

### 3.2 输液系统

该系统主要由一个高压泵、一个流动相存贮器及一个梯度仪构成。高压泵的整体压力在  $1.47\sim 4.4\times 10^7\text{Pa}$  之间,流量可

作者简介:路文涛(1981—),男,陕西武功人,汉族,本科,主管药师,陕西省药品和疫苗检查中心。

杨雪莹(1996—),女,陕西渭南人,汉族,硕士研究生,陕西省药品和疫苗检查中心。

调且均衡。当高压速度流动相经过色谱柱中时,虽然降低了样本在色谱柱中的传递效果,但可促进其在色谱柱中的移动,增加物理清晰度、样本均匀收集率,同时能保持试样的生物活性。流动相储存器和梯度计可通过固定相或试样的化学特性改善流动相,包含通过改变极性、分子硬度、洗脱液 pH 值及转移至竞争性抑制物或改性剂上,可以更高效地隔离化合物。

### 3.3 分离系统

整个体系主要由一条色谱柱、一条连接管和一条恒温器所构成。色谱柱一般为 10~50cm 高(如果需要两根,其之间可加一根连接管),内径为 2~5mm,由优质不锈钢、厚壁玻璃管或钛合金等制成<sup>[5]</sup>。柱子应配备固定相(由基质和固定溶液组成),颗粒直径为 5~10 $\mu\text{m}$ 。固定相的基质通常由耐机械的环氧树脂或有机硅凝胶所构成,其通常是惰性、多孔、有较高比表面积的物质,且其外表可被机械地浸渍(如在气相色谱固定相制备中),或与不同基因的高分子物质(如磷酸基、季胺基、羟甲基、苯基、氨基或不同长度的烷基碳链等)或配体连接。

因此,这种类型的固定化对结构不同的物质具有良好的选择性;例如,通过将豌豆凝集素(PSA)耦合到多孔硅石表面,可以从成纤维细胞中分离糖蛋白。此外,固定相基质的小颗粒尺寸使其非常容易实现均匀和密集的柱层,从而减少涡流扩散的影响。基质的较小尺寸和浅微孔导致了样品质量能在短距离内传递至微孔区域,这对于降低带宽和增加清晰度具有积极意义。基于柱效理论,基质粒径越小,塔板的理论数量  $N$  越高,这也进一步支持了基质粒径越小物理分辨率就更高的理由。另外,高效液相色谱恒温器也可调节从室内温度,通过增加物质传递量和缩短分析时限,能大大提高色谱分析的有效性。

### 3.4 检测系统

高效液相色谱仪通常使用紫外检测器、示差折射率检测器和荧光检测器三种检测器。紫外检测器:主要应用于测定带有紫外线(或可见光)吸收特性的样品;其特点是应用范围广泛(如蛋白质、核酸、氨基酸、核苷酸、肽、激素等),灵敏度高,其线性适用范围较广,对环境温度和速率改变均不灵敏,还可以测定从低梯度溶剂中洗脱的试样数量。示差折射率检测仪:凡是试样成分的折射率和流动相的折射率差异较大时,可以用示差折射率检测仪筛查。目前,这个测试系列已被广泛用作大多数葡萄糖类有机结合体的测定。该体系使用操作简便,但是由于敏感度较低,而且流动相的变化会引起折射率的变化,因此既不适合痕量分析,也不适合测试阶梯散射的样品。荧光检测仪:如果一种物质具有荧光性,在一定条件下,其发出的荧光强度与该物质的浓度成正比。因此,这种检测仪只适用于测定荧光有机物质(如多环芳烃、氨基酸、胺、维生素和某些蛋白质),对于痕量分析和测试梯度洗脱的样品也较为敏感<sup>[6]</sup>。

### 3.5 数据处理系统

该系统允许收集、储存、显示、打印和处理测试数据,以便正确进行试样分离、制备或鉴定。

## 4 高效液相色谱技术在药品检验中的应用

### 4.1 高效液相色谱技术在药物浓度和有效成分测定上的应用

高效液相色谱技术具备高分辨率、高速度、高再现性及智能化等优点,特别对于药物含量的测定,如果合格样品用这种方法进行检测,可有效防止造假和其他非法活动。中国药典中使用高效液相色谱技术的条目逐年增加,美国药典中的条目目前已超过 2000 条;表明,高性能液相色谱技术在药物检测中的应用越来越广泛,其积极作用也逐渐显现。

在药物上市之前,政府应对其活性物质浓度实施严密监控,只有当活性物质浓度超过规定标准后,方可上市使用。高效液相色谱技术是一个精确、灵敏的方法,可用于检测医药产品的主要成分,从而减少了添加剂对检测结果的直接影响。例如,如果使用高效液相色谱技术测定了凤尾茶的黄酮提取率含量,就能精确检测黄酮提取含量,由于测试方式简便、结果稳定,在凤尾茶出口过程中也能使用这个技术进行检验,对中药出口起到重要的促进作用。根据研究结果,HPLC 可以用来测定不同成熟度和不同地区的黄芪的活性物质含量,从而确定黄芪在不同生长阶段的比较效果,以及哪些植物的质量更好。因此,使用高效液相色谱技术可以更准确、更容易地进行药物检测。

### 4.2 高效液相色谱技术在药品鉴别上的应用

由于 HPLC 组分的结构和特性对保留时间有较大影响,而保留时间是药物鉴定和表征中重要的参数之一,因此 HPLC 方法可以根据此特性鉴定药物。例如,中药防风有很多品种,在临床应用中差异较大,如果不及时区分,容易造成临床问题。因此,为了实现药用产品的准确给药,可以用高效液相色谱技术进行薄层色谱鉴定。

### 4.3 高效液相色谱技术在有关物质检查中的应用

现在,药品质量标准要求对药品生产过程中可能产生的物质检查标准越来越严格,包括如降解产物、聚合物等各方面,但考虑到实际生产情况,可以授权使用一定量的无害或毒性较低的相关物质。在药品试验中需要控制某些药品中相关物质的含量,这就排除了主要成分以外的成分对药品安全的影响。因此,有必要使用高效液相色谱法对物质进行检测和监测,这已成为鉴定物质的主要方法之一。药物中的化学杂质通常可分为三种,即有机合成杂质、无机化学杂质和残余溶液。在《中国药典》中,主要采用高效液相色谱法测定有关物质的条目数量逐年增加,说明其应用广泛。

### 4.4 高效液相色谱技术在中药成分检验的应用

中药是一个复杂、多成分的系统,具有多变性、总体平衡调节等特性。由于中医是一种复杂的多成分医学,各成分之间需相互作用才能完成治疗过程。因此,利用高效液相色谱技术,可高效、快速地分离中药成分,从而有效地进行检测、鉴定和确定中药含量。

#### 4.5 高效液相色谱技术在抗生素类药物检验中的应用

高效液相色谱技术在抗生素药物的检测中也发挥着越来越重要的作用,利用该技术可实现更好的成分分离。在医药学上使用抗生素会产生一定副作用,大部分原因是由于药品原料中存在的中间产品、降解产物和聚合物等物质,会对患者产生副作用。高效液相色谱方法是鉴定抗生素中能导致患者反应的化学物质的有效办法,能有效抑制抗生素中杂质的产生。测定非抗生素类药物中的抗生素浓度可避免抗生素的滥用。现在我国对抗生素的应用已经有了具体的法律规范,为防止对人体和动物产生抗生素耐药,许多消炎药的抗生素含量都经过严格测试,以确保符合规定标准。高效液相色谱法也可用于检测动物食品中的抗生素残留,以防止人们通过食用肉、蛋和牛奶摄入抗生素而产生抗生素抗性。

#### 4.6 高效液相色谱技术在违法添加违禁药物检查上的应用

在这个阶段,高效液相色谱技术在药物监管中发挥着重要作用。我国有严格的中医药质量标准,而上述规范和标准都是由国家医药质量监督管理部门统一颁布的。因此,除去药物中的活性物质外,药物中的某些物质也需要加以更严密的检测,以确定是否存在有害物质或禁用物质。

高效液相色谱技术在如今的打假工作中起到关键作用。使用高效液相色谱法可有效检测药品中运用常规液相色谱法无法检测和定量的副产品。高效液相色谱法能测出药物中违禁成分的存在和浓度,较好地解决了药物中复杂成分的问题,有效、快捷地完成药物测定工作。高效液相色谱技术在监测和有效检测非法添加违禁药品方面发挥了积极作用。因此,研究人员构建了高效率液相色谱—电喷雾质谱检测仪—双波段紫外检测器联用检验工艺技术;利用该检验工艺技术能检验在某些保健食品产品中,是否加入了他达拉非等制剂,如抗疲劳保健类产品;利用这些方法能有效消除以中药等基本物质所构成的膳食补充剂中对某些健康相关化合物的影响。

#### 5 高效液相色谱技术在药品检验中的进展

随着科技的迅速发展,更先进的检测工具在高效液相色谱技术中的成熟运用,也促使了该项技术的运用更加深入,而高效液相色谱技术也在未来将有更多的发展空间<sup>[7]</sup>。尤其是通过引进前沿的分子生物学技术和现代分子药理学,并结合应用质谱技术,以及结合应用色谱柱切换技术和组合使用化学梯度洗脱技术,将在新药发现中起到更关键的作用。

目前在使用高效液相色谱法开展监测时,往往会遭到外部要求的负面影响。但是,随着科学技术的进展,高效液相色谱法的抗干扰能力将会增强,液相色谱法与质谱法一起成为了海外地区检测中低浓度生物制药成分及代谢物的主要方式。在对某些中药成分的检测中,液相色谱法与质谱法的组合才能够

给出正确的检验结论。由于高效液相色谱法在多个方面都是兼容的,因此与核磁共振组合应用的进展空间更大。

同时,高效液相色谱法也在不断发展,在临床实践中得到了更广泛的应用,成为药物检测的重要工具和科学依据。由于中成药在中国的临床医疗中具有重要地位,应用也较为广泛,但大多数中药都含有天然成分,而且成分比较复杂,处于临床试验阶段。高效液相色谱法敏感度和准确度均较高,因此可以考虑在一些天然药物的检测中发挥更重要的作用。

此外,高效液相色谱技术也已经引入了一些成熟的检验设备,扩大了该技术的应用范围。与传统质谱分析法技术、色谱分析法柱切换技术、梯度洗脱技术,及其他国际领先的化学检测器技术相结合,同时与现代生物学研究和现代药理学研究密切结合,高效液相色谱技术在未来的药品检验中定会发挥重要作用。目前,鉴于国际上对药品相关知识产权和专利的进一步保护,一些经济和政治因素使得药品检测变得更加重要;而在中药方面,HPLC技术正逐渐发挥越来越重要的作用。在技术时代的背景下,该项技术将继续朝着信息化、智能化和自动化方向发展。

#### 6 结语

由于我国社会经济与科技的日趋发达,民众日常生活品质的日渐改善,中国在医疗卫生和医疗药品领域取得了长足进步,因此,做好药品检验领域的工作具有重要意义。高效液相色谱法在现代药品的检验中扮演着不可缺少的角色,尤其是在药品成分检测和药物的识别鉴定方面。因此,为了更好地服务于药物检测,应提升高效液相色谱技术和网络技术的融合,积极学习其他发达国家的相关检验水平,并与全球标准相适应。

#### 参考文献

- [1] 骆海春,陈高健,朱飞如,等.高效液相色谱技术在药品检验中的应用研究[J].中国药物经济学,2022,17(2):125-128.
- [2] 刘福军,刘启军.高效液相色谱技术在食品药品检测中的运用[J].食品安全导刊,2021(21):159,161.
- [3] 米雪.高效液相色谱在食品药品检测中的应用[J].甘肃畜牧兽医,2021,51(2):17-19.
- [4] 牟晓博,鲁金凤,任玉新.浅析高效液相色谱技术在药品检验中的应用[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(46):292.
- [5] 闫锦凤.高效液相色谱技术在药品检验中的应用[J].科技风,2019(10):207.
- [6] 苑晓艳,何伯海.高效液相色谱技术在药品检验中的应用[J].化工管理,2015(31):189.
- [7] 白亚琴.高效液相色谱技术在药品检验中的应用及进展研究[J].生物技术世界,2015(3):1.