

談製藥工業中高效液相層析法之應用

何 智

壹、前 言

近年來，藥物化學分析領域所用技術，產生了重大的變化，是有目共睹的事實。越來越多具備高度自動化採樣處理、控制及資料處理等系統而極其精巧的分析儀器，在藥物發展及品管的分析實驗室中，扮演著與日俱增的重要角色。這趨勢的主要目標是，希望於較短的時間內，用較少的努力，獲得更多可靠的結果。這將導致藥物能更快地發展，最終產品有更好的品質，以及對病人保證更高的安全。

本文係基於新技術，加於新藥物產品上的新法規需求，及探討與開發新藥物所賴現代化的方式等，回顧高效液相層析法（HPLC）在製藥工業及分析趨勢中之角色地位。

貳、製藥工業中之HPLC之 工具價值

於藥物發現之過程中，為分離新的天然產物，HPLC兼具分析及半製備兩種功能。這些得自於植物，黴菌及動物的天然產物，是導致新藥物的化學修正之重要的起始物質（“引導化合物”）。於生物技術領域中，HPLC多方應用於蛋白質的及胜肽之分離，特性記述及製備等。這些化合物具熱及化學不穩定性，所以

，HPLC技術既理想又合適。由於擁有極性及檢體製備容易等優點，於大部份的實例中，逆相（reversed-phase, RP）式HPLC比正常相（normal-phase）式HPLC較被垂青。

當正在發展藥物時，HPLC被應用於新藥物的特性記述上，特別是純化定量及含量測定等。至於自動化HPLC則被使用於不同劑型的分析，過程驗證及程序控制中。在新藥物傳輸系統擔任藥物賦型劑的原料而言，HPLC是重要性日增的一種分析技術，而且，它將補充，或者甚至是替代很多簡單的藥典方法。對藥物的定量，代謝產物（metabolites）的特性記述，及藥品動力學（pharmacokinetic）的研究，HPLC為分析生物材料的一種重要方法。現代化的檢體製備法，前層析管衍化法，層析管扭轉及機器人系統的使用等，均能簡化複雜的含量測定步驟及能改善再現性（reproducibility）及準確性。

在最終產品及原料的生產及品管中，HPLC被用為品質保證的工具。然而，HPLC豈只是一種分析技術而已，它同時也以製備或生產級，被用在藥物最後的純化上。對多重結晶，以HPLC進行純化工作，是一種可選擇的方案，因為大量的藥物損失，會被HPLC純化步驟給降到最低程度。

在這些應用中，吾人發現HPLC確實是一種簡單與可靠的方法。而全部的分析成本，堪與其他的分析方法，如氣相（GC），超臨界流體（SFC），或薄層層析法（TLC），或光譜法一爭長短。

參、製藥工業面臨的挑戰

製藥工業正面臨著HPLC扮演重要角色的挑戰。吾人希望現代的生物技術將會為滿足醫藥上的需要而生產新的藥物。新的生物技術產品也是藥理學的重要工具。現代的合成藥物不再以消旋物（racemates）行銷，有可能以光活性化合物上市，所以，光學純度必須被檢視。由於經濟的壓力及有限的註冊專利保護，為了縮短一藥物的發現及它的介紹進入市場所需時間，需要快速發展新的藥物。優良製造標準（GMP）及優良實驗室規範（GLP）均需要方法的小心驗證及方法發展的詳實流程記載，系統適用性（suitability）測試，以及分析的結果等。這一切挑戰將造成HPLC更經常的應用。

肆、HPLC 的優點

在製藥工業中，大部份的檢體為水溶液，無論有否檢體製備步驟，均可用RP-HPLC予以有效率地分析。HPLC所具有的選擇性，幫助了光活性化合物的解析。如：純度定量或者藥理學。HPLC很快速，而且，包含使用機器人的取樣自動化，有益於生產量之增加，來日應被增加地使用於程序控制中。

伍、HPLC 之弱點

當使用現代化的3- μm HPLC層析管，由於有死體積及速度等問題存在，致使大部份現成的HPLC儀器遭逢嚴重的限制。很多梯度儀器的耽擱體積及混合體積，比一支3公分 \times 2mm之3- μm 層析管的體積大10-100倍。這是為什麼

具3 μm 及更小微粒之有效率HPLC層析管尚未造成突破的主要原因。於例行的應用中，HPLC儀器的可靠性，是另一項的弱點。取樣及幫浦到失敗的平均時間（MTF）應被增加。處理複雜的分離時，選擇性是一項重要的因素，然而，HPLC層析管的安定性與再現性都尚未至理想的境界。最後，迄至目前，仍然沒有如GC火燄游離偵測器般靈敏度高的普遍型偵測器。比較於其他的分離技術，HPLC缺乏毛細管GC，毛細管區帶電泳（CZE）及毛細管SFC等的分離效率。

陸、HPLC 之新趨勢

HPLC將大受其他分離技術，特別是CZE及毛細管SFC的影響。這些新技術已推動HPLC的儀器發展，因此，可望micro-HPLC系統將很快地變得重要，這將有助於具小微粒及較短層析管，效率更高LC克服目前的限制，以及開拓新的領域。

圖1顯示在這方面的新發展。圖2所示者為

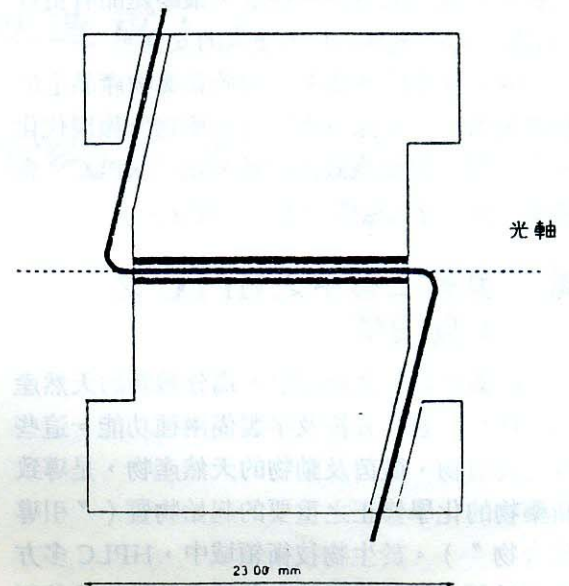


圖1 毛細流動槽之縱向剖面圖

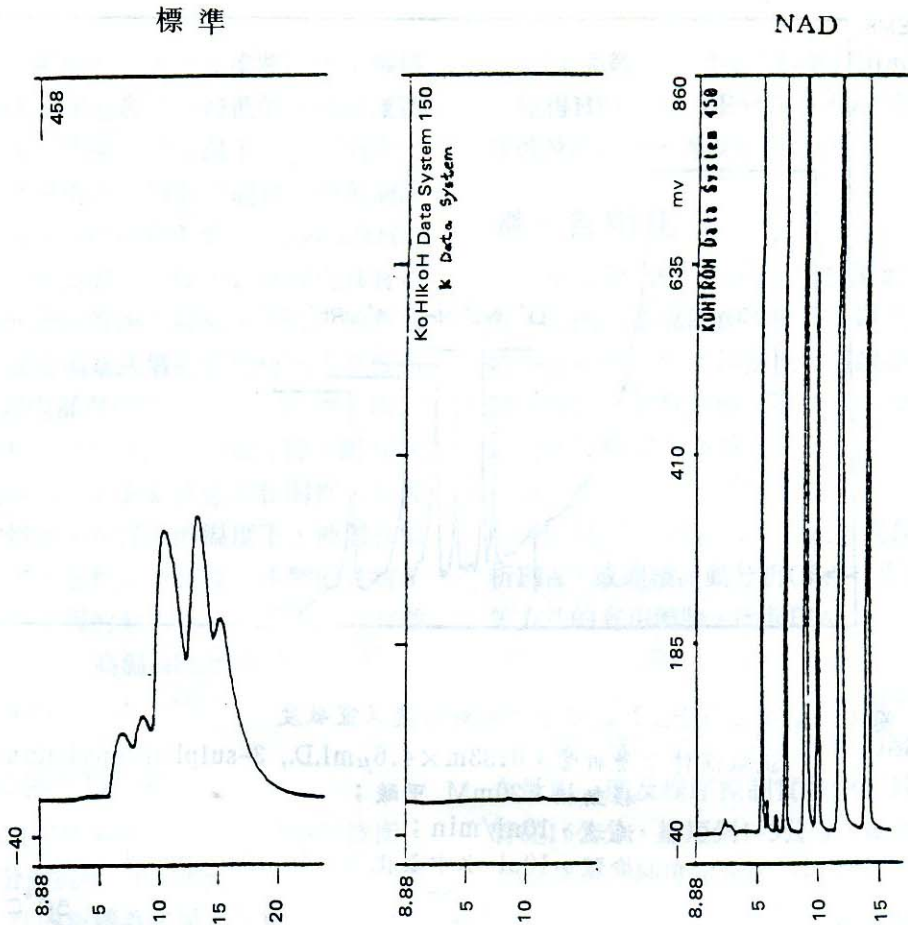


圖 2 不同流動槽之解析度及靈敏度

試驗條件：層析管，FuC-150，15cm×320 μ m I.D.；
 移動相，氦甲烷—水(7:3, V/V)；
 流速，3 μ l/min；
 室溫，
 壓力，4.6MPa(46 bar)；
 檢體，PAHs；
 注射體積，60 nl；
 偵測，UV(254nm), 0.1a.u.f.s., t=2.0S；
 紀錄紙速度，0.25cm/min.

一種新穎的micro-HPLC UV偵測器，其所用的毛細管式流動槽，有約20mm的光路徑長度，能顯著改善訊號對雜訊 (signal-to-noise) 比，如今，被使用於CZE，與CZE相連之螢光及UV偵測器，也被使用於開管式HPLC系統。圖3顯示一個於開管式LC系統，用離子選擇電極

(ion-selective electrode)，在幾秒內分離離子的電化學偵測之實例。

期望提高溫度將於HPLC扮演一個重要性日益增加的角色。填塞式一層析管層析法之溫度在室溫以上時，能戲劇性地改善成效，這已有聞多年，如圖4所示。從H對u作圖所得曲線

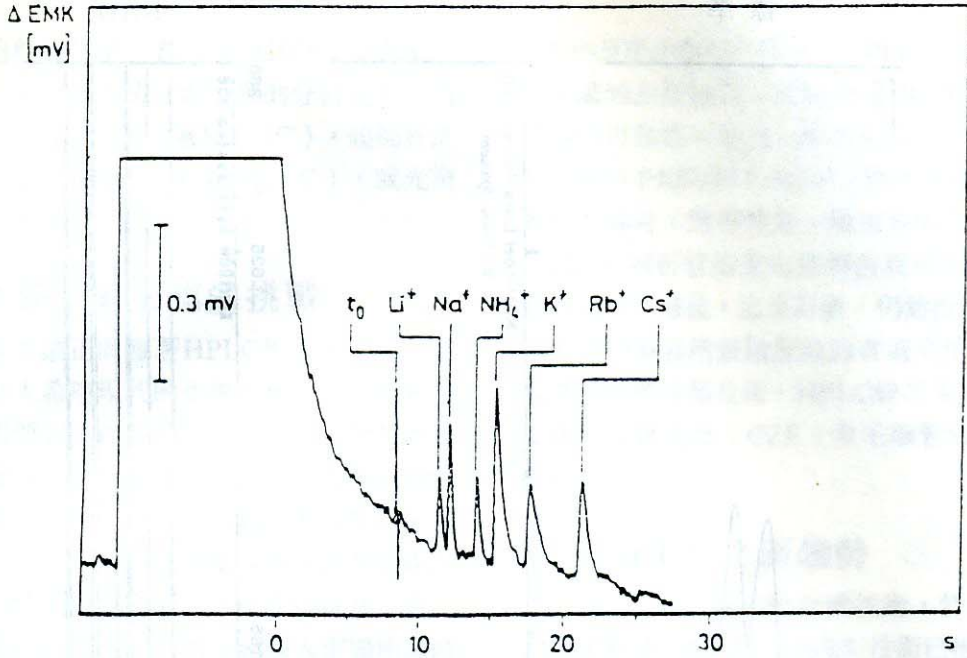


圖 3 開管式 HPLC 之離子分離解析度及靈敏度

試驗條件：層析管，0.33m×4.6 μ m I.D., 3-sulphopropylsilane；
 移動相，20mM 甲酸；
 流速，10nl/min；
 檢體，10pl 水中氯化物，40-2000 μ mol/l

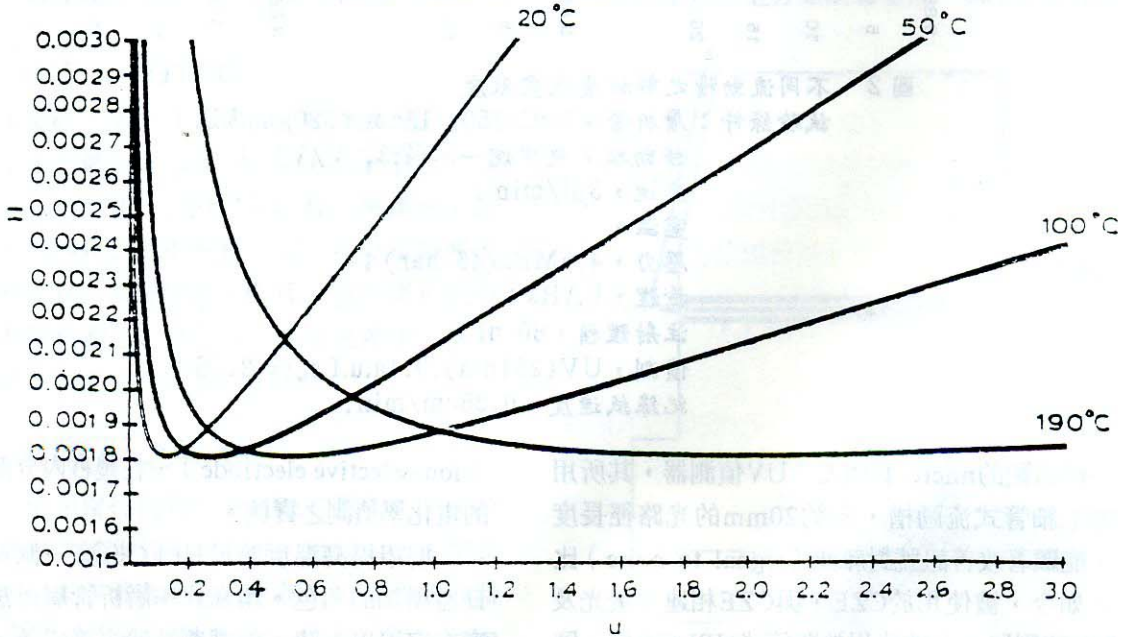


圖 4 20, 50, 100 及 190°C 下，填塞式 HPLC 之層析管，H(cm)對 u(cm/s) 作圖模擬之曲線填塞式層析管之顆粒，5 μ m.

，可見在較高溫度下，流重速率將由極小轉移到較高，同時斜率也會為一較低值。較高流速下之效率損失，明顯小於室溫下之效率損失。對於大分子之層析法，擴散可能是一種限制因素，於是，這就顯得特別重要。如Antia及Horvathls指出，提高溫度，對黏度也具有益的效果，將使層析管壓力降低。此外，提高溫度不只是有益於填塞式層析管層析法，在較高溫度下，使用內部直徑甚至是20-100 μm (圖5a) 開放式層析管的HPLC，亦屬可行。圖5b顯示，在較高溫度下，對 k' 具強的相關性，是種更為有利的情形。在提高的溫度下，液體移動相之物理性質，很類似於超臨界流體的性質；同時，對分離過程的動力學亦具有相似的有益效果。但問題是，高溫HPLC及SFC之間，是否有任何明顯的差別？

柒、介紹新的技術

CZE及SFC是兩種近年來出現的新技術，將與HPLC分庭抗禮，但同時也將激發對HPLC技術具重要性的新儀器之發展。應用到藥物分析領域之SFC, CZE及HPLC等技術之比較，已被敘述過。據吾人之經驗，對藥物傳輸系統言，毛細管式SFC系統適用於高分子賦形劑之研究，由於屬於天然物，此等材料多係複雜的混合物，如使用SFC技術分析之，可不經衍化步驟或複雜的檢體製備工作。

CZE不僅會對勝肽、蛋白質及其餘高分子化合物產生重大的衝擊，對小分子也不例外如圖6所示。然而，開管式CZE還是有些限制。甚至是效率巨大的CZE，對異構物的分離，或者，一般而言，對分子量及結構類似的化合物，仍有困難存在。與凝膠體或者乳滴物 (micelles) 的二次作用，能改善分離的選擇性，卻不會降低其解析度。CZE已發展成電動力式層析系統，或者是電端滲透 (electroendosmotically)

驅動LC系統 (試與壓力驅動HPLC系統比較)，使得HPLC及CZE分別具有的優點——高選擇性及高效率，得以相互合併。

捌、自動化

在自動化中，HPLC所扮演的角色，為節省了時間，造成儀器的善用，以及獲得更好的結果，這些已經在其他地方討論過。自動的檢體注射器，智慧型檢體處理器，及為製備檢體而使用的機器人系統，是HPLC系統機械化的部分，大大地改善了成本效率 (每座儀器) 及結果的品質。快速的LC系統將成為流動注射分析FIA，或連續流動分析CFA，及直接UV定量等方法的有效備胎。比起FIA，CFA及UV等方法，用很短層析管 (1-3公分) 的快速LC系統，其優點在於較少的干擾，可預期的人力因素，很簡單的驗證方法。在高產率的溶離率測定，含量均一度及程序控制實驗中，只要能把層析管從15公分，縮短到1-3公分，就會有更多用於含量測定及純度定量的HPLC的精巧方法，蛻化成為既簡單又快速的HPLC系統。

玖：專家系統與方法發展

除了檢體製備，檢體注射及資料評估之自動化外，HPLC領域中，專家系統正日漸扮演一定分量的角色。這些專家系統，不僅有效地幫助解決問題，同時，用於訓練，也是很有用處，來日，將可發展成以知識為本的架構 (即知識庫專家系統)。一些專家系統，在商業上已經是現成可用，例如，PiTechnology的HPLC Doctor；LC Resources的DryLab simulation軟體等。專家系統的主要應用，在於方法發展。很多策略曾經被討論於文獻中，最重要的是提供了關於分離的重要參數之資訊，指明了一個方法的潛在問題及其恆定性。方法發展的良好文書處理，將可使方法從一實驗室移轉

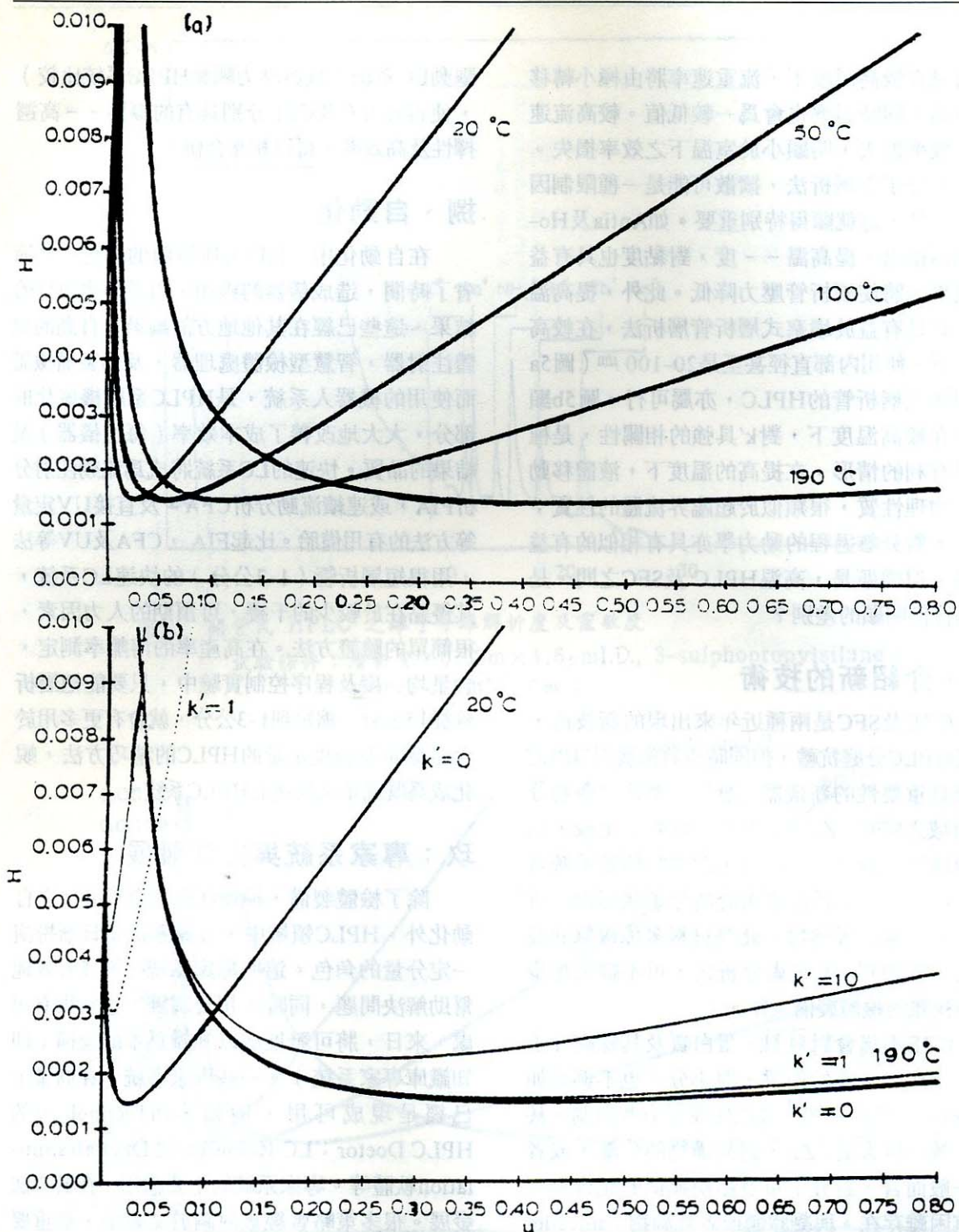


圖5 20,50,100 及 190 °C 下開管式 HPLC 之層析管 H (cm) 對 u (cm/s) 作圖
 模擬之曲線如圖所示 $k' = 0$;
 (b) 20 及 190 °C 對 k' 之影響。毛細層析管之內部直徑, $50 \mu\text{m}$ 。

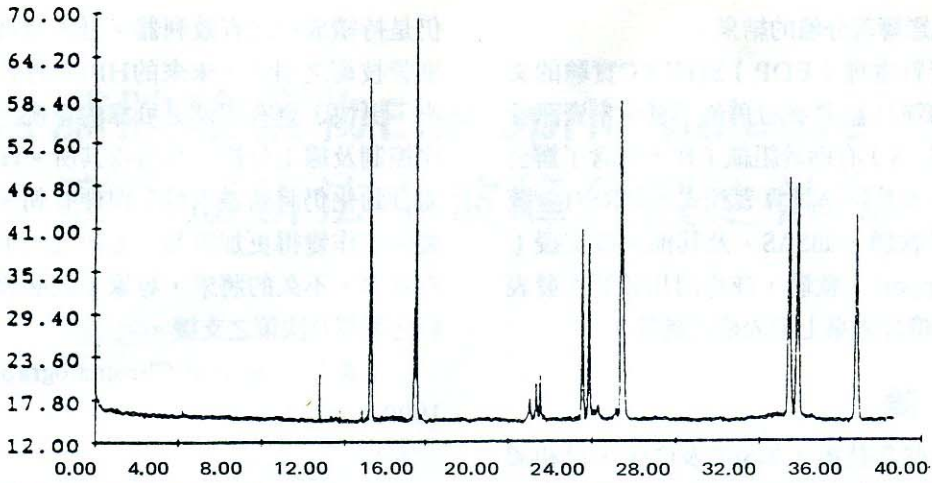


圖 6 CZE 分離 terbinafin 及其副產物
 試驗條件：毛細層析管，87cm×50 μ m I.D.；
 緩衝液，30mM Na₂HPO₄-40% 氬甲烷；
 電壓，25. kV；
 線上偵測器，(200nm)，0.006 a.n.f.s,
 相對解析度之地圖基於10~70%之梯度

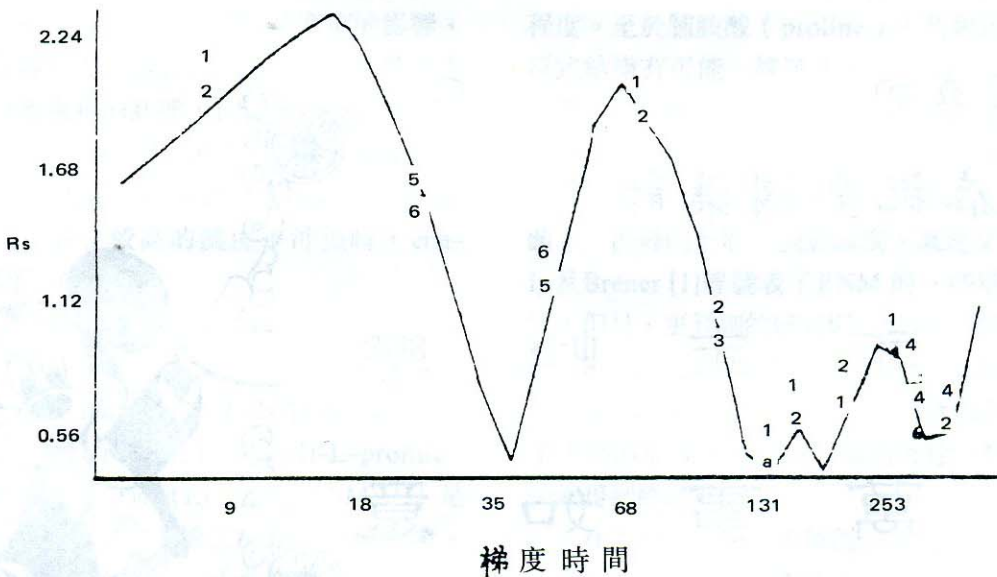


圖 7 Drylab 最小解析度之模擬

到另外的實驗室，變得更為容易。圖7顯示 DryLab有關梯度實驗最佳化的一個例子，該圖可供判斷最小解析度。這與層析法響應函數的

多維表達，並非只供絕對或區域極小值之調查；同時也指出了一些變因，如pH值，離子強度，或逆相系統中有機修正物含量等之改變，是

如何靈敏地影響著分離的結果。

電子資料處理 (EDP) 對HPLC實驗的文書工作, 扮演日益重要的角色。實驗室資訊管理系統 (LIMS) 有助於組織工作, 包含了辦公室自動化系統及科學試算表程式, 如RS/1, 統計評估套裝軟體, 如SAS, 及其他決策支援 (decision-support) 軟體, 或專門用於製作發表用圖片及幻燈片之桌上型表格系統等。

拾、結 論

縱然一些新技術, 如SFC及CZE, 已相繼問世, 但HPLC在製藥工業之品管實驗室中,

仍是持續成長之有效利器。吾人認為, 由於毛細管技術之引進, 未來的HPLC將發展成為更小, 更快, 更有效及更可靠的系統, 應用於程序控制及線上分析, 必恰得其所。HPLC系統的自動化仍將精益求精, 俾便有朝一日, 檢體製備工作變得更加容易, 方法發展工作變得更有效率。不久的將來, 專家系統必會助益於資料之闡釋及決策之支援。

(譯自Journal of Chromatography, 507 (1990) 141-149.)

· 本文轉載自藥物食品檢訊月刊129期



恭祝全國藥師

新 年 快 樂

萬 事 如 意

