

附录 V D 高效液相色谱法

带格式的：字体：四号

高效液相色谱法系采用高压输液泵将规定的流动相泵入装有填充剂的色谱柱，对供试品进行分离测定的色谱方法。注入的供试品，由流动相带入柱内，各组分在柱内被分离，并依次进入检测器，由积分仪或数据处理系统记录和处理色谱信号。

1. 对仪器的一般要求 所用的仪器为高效液相色谱仪。仪器应定期检定并符合有关规定。

(1) 色谱柱 最常用的色谱柱填充剂为化学键合硅胶。反相色谱系统使用非极性填充剂，以十八烷基硅烷键合硅胶最为常用，辛基硅烷键合硅胶和其他类型的硅烷键合硅胶（如氰基键合硅烷和氨基键合硅烷等）也有使用。正相色谱系统使用极性填充剂，常用的填充剂有硅胶等。离子交换色谱系统使用离子交换填充剂；分子排阻色谱系统使用凝胶或高分子多孔微球等填充剂；对映异构体的分离通常使用手性填充剂。

填充剂的性能（如载体的形状、粒径、孔径、表面积、键合基团的表面覆盖度、含碳量和键合类型等）以及色谱柱的填充，直接影响供试品的保留行为和分离效果。孔径在 15nm（1nm=10Å）以下的填料适合于分析分子量小于 2000 的化合物，分子量大于 2000 的化合物则应选择孔径在 30nm 以上的填料。

除另有规定外，分析柱的填充剂粒径一般在 3μm~10μm 之间。粒径更小（约 2μm）的填充剂常用于填充微径柱（内径约 2mm），使用微径柱时，输液泵的性能、进样体积、检测池体积和系统的死体积等必须与之匹配；如有必要，色谱条件也需作适当的调整。当对其测定结果产生争议时，应以品种正文规定的色谱条件的测定结果为准。

带格式的：字体：非加粗，无下划线

带格式的：缩进：首行缩进：2 字符

以硅胶为载体的普通键合固定相的使用温度通常不超过 35℃，为改善分离效果可适当提高色谱柱的使用温度，但不能超过 60℃。

批注 [F1]: 此处分段

流动相的 pH 值应控制在 2~8 之间。当 pH 值大于 8 时，可使载体硅胶溶解；当 pH 值小于 2 时，与硅胶相连的化学键合相易水解脱落。当色谱系统中需使用 pH 值大于 8 的流动相时，应选用耐碱的填充剂，如采用高纯硅胶为载体并具有高表面覆盖度的键合硅胶填充剂、包覆聚合物填充剂、有机-无机杂化填充剂或

批注 [F2]: 此处分段

非硅胶填充剂等；当需使用 pH 值小于 2 的流动相时，应选用耐酸的填充剂，如具有大体积侧链能产生空间位阻保护作用的二异丙基或二异丁基取代十八烷基硅烷键合硅胶填充剂，或有机-无机杂化填充剂等。

(2) 检测器 最常用的检测器为紫外检测器，包括二极管阵列检测器，其他常见的检测器有荧光检测器、蒸发光散射检测器、示差折光检测器、电化学检测器和质谱检测器等。

紫外、荧光、电化学检测器为选择性检测器，其响应值不仅与待测溶液的浓度有关，还与化合物的结构有关；蒸发光散射检测器和示差折光检测器为通用型检测器，对所有的化合物均有响应；蒸发光散射检测器对结构类似的化合物，其响应值几乎仅与待测物的质量有关；二极管阵列检测器可以同时记录待测物的吸收光谱，故可用于待测物的光谱鉴定和色谱峰的纯度检查。

紫外、荧光、电化学和示差折光检测器的响应值与待测溶液的浓度在一定范围内呈线性关系，但蒸发光散射检测器响应值与待测溶液的浓度通常呈指数关系，故进行计算时，一般需经对数转换。

不同的检测器，对流动相的要求不同。如采用紫外检测器，所用流动相应符合紫外-可见分光光度法（附录 IV A）项下对溶剂的要求；采用低波长检测时，还应考虑有机相中有机溶剂的截止使用波长，并选用色谱级有机溶剂。蒸发光散射检测器和质谱检测器通常不允许使用含不挥发性盐组分的流动相。

(3) 流动相 反相色谱系统的流动相首选甲醇-水系统（采用紫外末端波长检测时，首选乙腈-水系统），如经试用不适合时，再选用其他溶剂系统。应尽可能少用含有缓冲液的流动相，必须使用时，应尽可能选用含较低浓度缓冲液的流动相。由于 C₁₈ 链在水相环境中不易保持伸展状态，故对于十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的反相色谱系统，流动相中有机溶剂的比例通常应不低于 5%，否则 C₁₈ 链的随机卷曲将导致组分保留值变化，造成色谱系统不稳定。

各品种项下规定的条件除固定相种类、流动相组分、检测器类型不得改变外，其余如色谱柱内径、长度、载体粒度、流动相流速、混合流动相各组分比例、柱温、进样量、检测器的灵敏度等，均可适当改变，以适应供试品并达到系统适用性试验的要求。其中，调整流动相组分比例时，以组分比例较低者（小于或等于 50%）相对改变量不超过±30%且绝对改变量不超过±10%为限，如 30%相对改

批注 [F3]: 将“分离对象”改为“供试品”。

删除的内容: 分离对象

变量的数值超过 10%时, 则改变量以±10%为限。对于必须使用特定牌号的填充剂方能满足分离要求的品种, 可在该品种项下注明。

2. 系统适用性试验

色谱系统的适用性试验通常包括理论板数、分离度、重复性和拖尾因子等四个指标。其中, 分离度和重复性是系统适用性试验中更重要的参数。

按各品种项下要求对色谱系统进行适用性试验, 即用规定的对照品溶液或系统适用性试验溶液对色谱系统进行试验, 必要时, 可对色谱系统进行适当调整, 应符合要求。

删除的内容: 。

(1) 色谱柱的理论板数 (n) 用于评价色谱柱的效能。由于不同物质在同一色谱柱上的色谱行为不同, 采用理论板数作为衡量柱效能的指标时, 应指明测定物质, 一般为待测组分或内标物质的理论板数。

在规定的色谱条件下, 注入供试品溶液或各品种项下规定的内标物质溶液, 记录色谱图, 量出供试品主成分峰或内标物质峰的保留时间 t_R (以分钟或长度计, 下同, 但应取相同单位) 和峰宽 (W) 或半高峰宽 ($W_{h/2}$), 按 $n=16(t_R/W)^2$ 或 $n=5.54 (t_R/W_{h/2})^2$ 计算色谱柱的理论板数。

带格式的: 缩进: 首行缩进: 0 字符

(2) 分离度 (R) 用于评价待测组分与相邻共存物或难分离物质之间的分离程度, 是衡量色谱系统效能的关键指标。可以通过测定待测物质与已知杂质的分离度, 也可以通过测定待测组分与某一添加的指标性成分 (内标物质或其它难分离物质) 的分离度, 或将供试品或对照品用适当的方法降解, 通过测定待测组分与某一降解产物的分离度, 对色谱系统进行评价与控制。

批注 [F4]: 删除 “可选择下列方法考察分离度”

删除的内容: 可选择下列方法考察分离度,

批注 [F5]: 增加对照品降解

无论是定性鉴别还是定量分析, 均要求待测峰与其他峰、内标峰或特定的杂质对照峰之间有良好的分离度。除另有规定外, 待测组分与相邻共存物之间的分离度应大于 1.5。分离度的计算公式为:

$$R=2 (t_{R2}-t_{R1}) / (W_1+W_2) \text{ 或 } R=2 (t_{R2}-t_{R1}) / 1.70(W_{1,h/2}+W_{2,h/2})$$

式中 t_{R2} 为相邻两峰中后一峰的保留时间;

t_{R1} 为相邻两峰中前一峰的保留时间;

W_1 、 W_2 及 $W_{1,h/2}$ 、 $W_{2,h/2}$ 分别为此相邻两峰的峰宽及半高峰宽 (如图)。

当对测定结果有异议时, 色谱柱的理论板数 (n) 和分离度 (R) 均以峰宽 (W) 的计算结果为准。

批注 [F6]: 建议删去, 仍用原稿, 采用峰宽计算即可。

批注 [F7]: 建议删去仍用原稿, 采用峰宽即可。

批注 [F8]: 如增加半高峰宽, 图中亦应相应增加。

批注 [F9]: 原稿中仅采用峰宽计算, 此处增加半高峰宽且还有结果异议问题, 建议仍用原稿内容, 删去半高峰宽的描述。

(3) 重复性 用于评价连续进样后，色谱系统响应值的重复性能。采用外标法时，通常取各品种项下的对照品溶液，连续进样 5 次，除另有规定外，其峰面积测量值的相对标准偏差应不大于 2.0%；采用内标法时，通常配制相当于 80%、100%和 120%的对照品溶液，加入规定量的内标溶液，配成 3 种不同浓度的溶液，分别至少进样 2 次，计算平均校正因子。其相对标准偏差应不大于 2.0%。

(4) 拖尾因子 (T) 用于评价色谱峰的对称性。为保证分离效果和测量精度，应检查待测峰的拖尾因子是否符合各品种项下的规定。拖尾因子计算公式为：

$$T=W_{0.05h}/2d_1$$

式中 $W_{0.05h}$ 为 5% 峰高处的峰宽；

d_1 为 5% 峰高出峰顶点至峰前沿之间的距离（如图）。

除另有规定外，峰高法定量时 T 应在 0.95~1.05 之间。

峰面积法测定时，若拖尾严重，将影响峰面积的准确测量。必要时，可根据情况对拖尾因子作出规定。

3. 测定法

(1) 内标法

按各品种项下的规定，精密称（量）取对照品和内标物质，分别配成溶液，精密量取各适量，混合配成校正因子测定用的对照溶液。取一定量注入仪器，记录色谱图。测量对照品和内标物质的峰面积或峰高，按下式计算校正因子：

$$\text{校正因子}(f) = (A_S/c_S)/(A_R/c_R)$$

式中 A_S 为内标物质的峰面积或峰高；

A_R 为对照品的峰面积或峰高；

c_S 为内标物质的浓度；

c_R 为对照品的浓度。

再取各品种项下含有内标物质的供试品溶液，注入仪器，记录色谱图，测量供试品中待测成分（或其杂质）和内标物质的峰面积或峰高，按下式计算含量：

$$\text{含量}(c_X) = f \cdot A_X/(A'_S/c'_S)$$

式中 A_X 为供试品（或其杂质）峰面积或峰高；

c_X 为供试品（或其杂质）的浓度；

删除的内容：加校正因子测定供试品的主成分含量

A'_s 为内标物质的峰面积或峰高；

c'_s 为内标物质的浓度；

f 为校正因子。

20090506 凌所长删除

(2) 外标法

按各品种项下的规定，精密称（量）取对照品和供试品，配制成溶液，分别精密取一定量，注入仪器，记录色谱图，测量对照品溶液和供试品溶液中待测成分的峰面积（或峰高），按下式计算含量：

$$\text{含量}(c_X) = c_R(A_X/A_R)$$

式中各符号意义同上。

由于微量注射器不易精确控制进样量，当采用外标法测定供试品中成分或杂质含量时，以定量环或自动进样器进样为好。

(3) 加校正因子的主成分自身对照法

测定杂质含量时，可采用加校正因子的主成分自身对照法。在建立方法时，按各品种项下的规定，精密称（量）取杂质对照品和待测成分对照品各适量，配制测定杂质校正因子的溶液，进样，记录色谱图，按上述（1）法计算杂质的校正因子。此校正因子可直接载入各品种项下，用于校正杂质的实测峰面积。这些需作校正计算的杂质，通常以主成分为参照，采用相对保留时间定位，其数值一并载入各品种项下。

测定杂质含量时，按各品种项下规定的杂质限度，将供试品溶液稀释成与杂质限度相当的溶液作为对照溶液，进样，调节检测灵敏度（以噪音水平可接受为限）或进样量（以柱子不过载为限），使对照溶液的主成分色谱峰的峰高约达满量程的 10%~25%或其峰面积能准确积分（通常含量低于 0.5%的杂质，峰面积的相对标准偏差（RSD）应小于 10%；含量在 0.5%~2%的杂质，峰面积的 RSD 应小于 5%；含量大于 2%的杂质，峰面积的 RSD 应小于 2%）。然后，取供试品溶液和对照品溶液适量，分别进样，供试品溶液的记录时间，除另有规定外，应为主成分色谱峰保留时间的 2 倍，测量供试品溶液色谱图上各杂质的峰面积，分别乘以相应的校正因子后与对照溶液主成分的峰面积比较，依法计算各杂质含量。

批注 [F10]: 原稿内容，建议保留。

删除的内容: 当配制校正因子
测定用的对照溶液和含有内标物质的供试品溶液，使用等量同一浓度的内标物质溶液时， $c_s=c'_s$ ，则配制内标物质溶液不必精密称（量）取。

带格式的: 突出显示

删除的内容: 测定供试品中某个杂质或主成分含量

删除的内容: 某

删除的内容: 或主成分

删除的内容: 测定杂质含量

(4) 不加校正因子的主成分自身对照法

测定杂质含量时，若没有杂质对照品，也可采用不加校正因子的主成分自身对照法。同上述（3）法配制对照溶液并调节检测灵敏度后，取供试品溶液和对照溶液适量，分别进样，前者的记录时间，除另有规定外，应为主成分色谱峰保留时间的 2 倍，测量供试品溶液色谱图上各杂质的峰面积并与对照溶液主成分的峰面积比较，计算杂质含量。

若供试品所含的部分杂质未与溶剂峰完全分离，则按规定先记录供试品溶液的色谱图 I，再记录等体积纯溶剂的色谱图 II。色谱图 I 上杂质峰的总面积（包括溶剂峰），减去色谱图 II 上的溶剂峰面积，即为总杂质峰的校正面积。然后依法计算。

(5) 面积归一化法

按各品种项下的规定，配制供试品溶液，取一定量注入仪器，记录色谱图。测量各峰的面积和色谱图上除溶剂峰以外的总色谱峰面积，计算各峰面积占总峰面积的百分率。

用于杂质检查时，由于峰面积归一化法测定误差大，因此，本法通常只能用于粗略考察供试品中的杂质含量。除另有规定外，一般不宜用于微量杂质的检查。

删除的内容: 测定杂质含量

删除的内容: 当

删除的内容: 时

删除的内容: (5)面积归一化法测定杂质含量

由于峰面积归一化法测定误差大，因此，本法通常只能用于粗略考察供试品中的杂质含量。除另有规定外，一般不宜用于微量杂质的检查。方法是测量各杂质峰的面积和色谱图上除溶剂峰以外的总色谱峰面积，计算各峰面积及其之和占总峰面积的百分率。

批注 [F11]: 此处同上述几种方法，增加样品配制、进样等描述。

删除的内容: 本法是

删除的内容: 及其之和