

## 附件 1: 0512 高效液相色谱法草案第二次公示稿

### 0512 高效液相色谱法

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。注入的供试品溶液,由流动相带入色谱柱内,供试品溶液中各组分在柱内被分离,并进入检测器而被检测,由积分仪或数据处理系统记录和处理色谱信号。

#### 1. 对仪器的一般要求和色谱条件

高效液相色谱仪由高压输液泵、进样器、色谱柱、检测器、积分仪或数据处理系统组成。色谱柱内径一般为 2.1~4.6mm,填充剂粒径约为 2~10 $\mu$ m。超高效液相色谱仪是耐超高压、小进样量、低死体积、高灵敏度检测的高效液相色谱仪。

##### (1) 色谱柱

反相色谱柱:以键合非极性基团的载体为填充剂填充而成的色谱柱。常见的载体有硅胶、聚合物复合硅胶和聚合物等;常用的填充剂有十八烷基硅烷键合硅胶、辛基硅烷键合硅胶和苯基硅烷键合硅胶等。

正相色谱柱:用硅胶填充剂,或键合极性基团的硅胶填充而成的色谱柱。常见的填充剂有硅胶、氨基键合硅胶和氰基键合硅胶等。氨基键合硅胶和氰基键合硅胶也可用作反相色谱。

离子交换色谱柱:用离子交换填充剂填充而成的色谱柱。有阳离子交换色谱柱和阴离子交换色谱柱。

手性分离色谱柱:用手性填充剂填充而成的色谱柱。

色谱柱的内径与长度,填充剂的形状、粒径与粒径分布、孔径、表面积、键合基团的表面覆盖度、载体表面基团残留量,填充的致密与均匀程度等均影响色谱柱的性能,应根据被分离物质的性质来选择合适的色谱柱。

温度会影响分离效果,品种正文中未指明色谱柱温度时系指室温,应注意室温变化的影响。为改善分离效果可适当调整色谱柱的温度。

残余硅羟基未封闭的硅胶色谱柱,流动相 pH 值一般应在 2~8 之间。烷基硅烷带有立体侧链保护、或残余硅羟基已封闭的硅胶、聚合物复合硅胶或聚合物与第一次公示稿比较,修改处加橙色标记

色谱柱可耐受更广泛 pH 值范围的流动相，可用于 pH 值小于 2 或大于 8 的流动相。

(2) **检测器** 最常用的检测器为紫外-可见分光检测器，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、电雾式检测器、示差折光检测器、电化学检测器和质谱检测器等。

紫外-可见分光检测器、荧光检测器、电化学检测器为选择性检测器，其响应值不仅与被测物质的质量有关，还与其结构有关；蒸发光散射检测器、电雾式检测器和示差折光检测器为通用检测器，对所有物质均有响应；结构相似的物质在蒸发光散射检测器和电雾式检测器的响应值几乎仅与被测物质的量有关。

紫外-可见分光检测器、荧光检测器、电化学检测器和示差折光检测器的响应值与被测物质的质量在一定范围内呈线性关系；蒸发光散射检测器的响应值与被测物质的量通常呈指数关系，一般需经对数转换；电雾式检测器的响应值与被测物质的量通常也呈指数非线性关系，一般需经对数转换或用二次函数计算，但在较小质量范围内可基本呈线性。

不同的检测器，对流动相的要求不同。紫外-可见分光检测器所用流动相应符合紫外-可见分光光度法（通则 0401）项下对溶剂的要求；采用低波长检测时，还应考虑有机溶剂的截止使用波长。蒸发光散射检测器、电雾式检测器和质谱检测器不得使用含非挥发性成分的流动相。

(3) **流动相** 反相色谱系统的流动相常用甲醇-水系统或乙腈-水系统，用紫外末端波长检测时，宜选用乙腈-水系统。流动相中如需使用缓冲溶液，应尽可能使用低浓度缓冲盐。用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱时，流动相中有机溶剂一般应不低于 5%，否则易导致柱效下降和色谱系统不稳定。

正相色谱系统的流动相常用两种或两种以上的有机溶剂，如二氯甲烷和正己烷等。

流动相注入液相色谱仪的方式（又称洗脱方式）可分为两种：一种是等度洗脱，另一种是梯度洗脱；用梯度洗脱分离时，梯度洗脱程序，通常以表格的形式在品种项下规定，其中包括运行时间和流动相在不同时间的成分比例，通常以表格的形式在品种项下规定。

(4) **色谱参数调整** 品种正文项下规定的色谱条件（参数），除填充剂种类、

流动相组分、检测器类型不得改变外，其余如色谱柱内径与长度、填充剂粒径、流动相流速、流动相组分比例、柱温、进样量、检测器灵敏度等，均可适当调整。

若需使用小粒径（约 2 $\mu\text{m}$ ）填充剂和小内径（约 2.1mm）色谱柱或表面多孔填充剂以提高分离度或缩短分析时间，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，必要时，色谱条件（参数）可适当调整。

色谱参数允许调整范围见表。

表色谱参数允许调整的范围

参数变量	参数调整	
	等度洗脱	梯度洗脱
固定相	不得改变填充剂的理化性质，如填充剂材质、表面修饰及键合相均需保持一致；从全多孔填料到表面多孔填料的改变，在满足上述条件的前提下是被允许的	
填充剂粒径( $d_p$ )、柱长( $L$ )	改变色谱柱填充剂粒径和柱长后， $L/d_p$ 值(或 $N$ 值)应在原有数值的 -25%~+50% 范围内。	
流速	如果改变色谱柱内径及填充剂粒径，可按下式计算流速， $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)]$ ，在此基础上根据实际使用时系统压力和保留时间调整	
	最大可在 $\pm 50\%$ 的范围内调整	除按上述公式调整外，不得扩大调整范围
进样体积	调整以满足系统适用性要求，如果色谱柱尺寸有改变，按下式计算进样体积， $V_{inj2} = V_{inj1} \times (L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)$ ，并根据灵敏度的需求进行调整	
梯度洗脱程序(等度洗脱不适用)	$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) \times [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$ ，保持不同规格色谱柱的洗脱体积倍数相同，从而保证梯度变化相同，并需要考虑不同仪器系统体积的差异	
流动相比例	最小比例的流动相组分可在相对值 $\pm 30\%$ 或者绝对值 $\pm 2\%$ 的范围内进行调整(两者之间选择最大值)；最小比例流动相组分的比例需小于 $(100/n)\%$ ， $n$ 为流动相中组分的个数	可适当调整流动相组分比例，以保证系统适用性符合要求，并且最终流动相洗脱强度不得弱于原梯度的洗脱强度
流动相缓冲液盐浓度	可在 $\pm 10\%$ 范围内调整	
柱温	除另有规定外，可在 $\pm 10^\circ\text{C}$ 范围	除另有规定外，可在 $\pm 5^\circ\text{C}$ 范围内调

与第一次公示稿比较，修改处加橙色标记

	内调整	整
pH值	除另有规定外，流动相中水相pH值可在±0.2pH范围内进行调整	
检测波长	不允许改变	

表 允许调整的色谱参数及范围

参数变量	参数调整
固定相	不得改变固定相的理化性质，如填充剂材质、表面修饰及键合相均需保持一致。
填料粒径(dp)，柱长(L)	改变色谱柱填充剂粒径和柱长后， $L/dp$ 值应保持不变或在原规定值的-25%~+50%范围内。
从全多孔填料到表面多孔填料	在满足等度或梯度洗脱要求（如为等度洗脱，当理论板数（ $N$ ）在原色谱柱的-25%~+50%范围内；如为梯度洗脱，当所有色谱峰 $(t_R/W_{h/2})^2$ 值在原色谱柱的-25%~+50%范围内）时可以调整，且可使用 $L$ 和 $dp$ 的其他组合。前提是应满足系统适用性要求，且已知成分的选择性和出峰顺序不变。
柱内径(dc)	在填料粒径和/或柱长没有变化的情况下，可以调整柱内径。为避免柱内径减小可能引起的柱外谱带展宽，应减小仪器连接死体积、进样量或检测池的体积，适当增加采集速率。
流速	等度洗脱时，在柱尺寸未改变时，允许流速调整±50%。当柱内径和粒径改变时，按下式计算并调整流速： $F_2=F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$ 。由于柱尺寸的变化作上述调整后，允许流速额外变化±50%。 梯度洗脱时，当柱内径和粒径改变时，按下式计算并调整流速： $F_2=F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$ 。
进样体积	$V_{inj2}=V_{inj1} \times (L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)$ 。即便色谱柱尺寸没有调整，也可调整进样体积以满足系统适用性的要求，上述体积调整公式可能不适用于表面多孔（SPP）柱替代全多孔（TPP）柱。
等度洗脱流动相比例	占比小的流动相组分比例可在相对值±30%进行调整，但任何组分比例的变化不能超过绝对值±10%。占比小的流动相组分是指小于或等于 $(100/n)\%$ 比例的组分， $n$ 为流动相中含有的组分数。
梯度洗脱程序和流动相比例	流动相的比例和梯度洗脱程序调整是可以接受的，条件是：(1) 满足系统适用性要求；(2) 出峰顺序不变，分离度和灵敏度满足要求；(3) 流动相的组成和梯度洗脱程序应使第一个峰被充分保留，最后一个峰被完全洗脱。各梯度段梯度时间的调整详见后文。

与第一次公示稿比较，修改处加橙色标记

柱温	等度洗脱：除另有规定外，在原规定温度的±10℃范围内调整。 梯度洗脱：除另有规定外，在原规定温度的±5℃范围内调整。
流动相缓冲液盐浓度	在原规定值±10%范围内调整。
pH 值	除另有规定外，流动相中水相 pH 值在原规定值±0.2pH 范围内进行调整。
检测波长	不允许改变。

注： $F_1$ 为调整前原规定流速； $F_2$ 为调整后流速； $dc_1$ 为调整前原规定色谱柱的内径； $dc_2$ 为调整后色谱柱的内径； $dp_1$ 为调整前原规定色谱柱的粒径； $dp_2$ 为调整后色谱柱的粒径； $V_{inj1}$ 为调整前原规定进样体积； $V_{inj2}$ 为调整后进样体积； $L_1$ 为调整前原规定色谱柱柱长； $L_2$ 为调整后色谱柱柱长； $t_R$ 为峰保留时间； $W_{h/2}$ 为峰半高峰宽。

可通过相关软件计算表中流速、进样体积和梯度洗脱程序的调整范围，并根据色谱峰分离情况进行微调。

调整后，系统适用性应符合要求，且色谱峰出峰顺序不变。通常，较小的填充剂粒径需增加线速度，较大的填充剂粒径需降低线速度，在按上表调整流速时，要注意仪器的压力限值。若减小进样体积，应保证检测限和峰面积的重复性；若增加进样体积，应使分离度和线性关系仍满足要求。

对于梯度洗脱，柱尺寸（柱长和柱内径）改变导致柱体积改变，会影响控制选择性的梯度洗脱体积。可通过调整梯度洗脱体积使其与柱体积成比例。由于梯度洗脱体积是梯度时间（ $t_G$ ）和流速 $F$ 的乘积，因此需要对每个梯度段的梯度时间进行调整，以保持梯度洗脱体积与柱体积的比值恒定（表示为 $L \times dc^2$ ）。由原来的梯度时间（ $t_{G1}$ ）、流速、柱长和柱内径，按下式计算新的梯度时间（ $t_{G2}$ ）。

$$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1/F_2) \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$$

梯度洗脱条件的调整可分步进行：（1）根据 $L/dp$ 调整柱长和粒径；（2）根据粒径大小和柱内径的变化调整流速；（3）根据柱长、柱内径和流速的变化，调整每个梯度段的梯度时间。

~~若减小进样体积，应保证检测限和峰面积的重复性；若增加进样体积，应使分离度和线性关系仍满足要求。应评价色谱参数调整对分离和检测的影响，必要时对调整色谱参数后的方法进行确认。若调整超出表中规定的范围或品种项下规定的范围，被认为是对方法的修改，需要进行充分的方法学验证。~~  
与第一次公示稿比较，修改处加橙色标记

调整梯度洗脱色谱参数时应比调整等度洗脱色谱参数时更加谨慎，因为此调整可能会使某些峰位置变化，造成峰识别错误，或者与其他峰重叠。如梯度微调后仍不能满足系统适用性要求，通常应考虑滞留体积的缘故或更换色谱柱。

滞留体积（*dwelt volume*，用*D*或*V<sub>D</sub>*表示），也称为梯度延迟体积，是指从流动相混合点至柱入口之间的体积。梯度洗脱时，所采用设备的配置可显著地影响方法所述的分离度、保留时间和相对保留时间。如果发生这种情况，可归因于过大的滞留体积。因此，应考虑方法开发时的系统与实际使用系统之间滞留体积的差异，在开始梯度程序前增加一个等度平衡阶段，通过调整等度阶段时间来调整梯度时间点，以与所使用的分析设备相适应。如在品种项下给出了方法开发时所用的滞留体积，则原梯度表中所述的时间点（*t*，min）可用按下式计算的调整后时间点（*t<sub>c</sub>*，min）代替：

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F}$$

式中 *D* 为实际使用的分析设备的滞留体积（ml）；

*D<sub>0</sub>* 为方法开发时分析设备的滞留体积（ml）；

*F* 为流速（ml/min）。

如验证证明分析方法应用时不需等度平衡，则可省略这一等度阶段。

应评价色谱参数调整对分离和检测效果的影响，必要时对调整色谱参数后的方法进行确认。多个参数的调整将对系统性能产生累积影响，需要作适当的风险评估。

对于组分或基质特别复杂的体系，如中药分析方法，进行其色谱参数调整时应特别谨慎。

若调整超出表中规定的范围或品种项下规定的范围，被认为是对方法的修改，需要进行充分的方法学验证。

当对调整色谱条件后的测定结果产生异议时，应以品种项下规定的色谱条件的测定结果为准。

在品种项下一般不宜指定或推荐色谱柱的品牌，但可规定色谱柱的填充剂（固定相）种类（如键合相，是否改性、封端等）、粒径、孔径，色谱柱的柱长和/或柱内径；当耐用性试验证明必须使用特定品牌号的色谱柱方能满足分离要

求时，可在该品种正文项下注明。

**(5) 溶液制备** 为减少溶剂峰和色谱峰的畸变，制备供试品溶液和参比物质溶液可用流动相（或梯度起始比例流动相组成）作为溶剂；为提高供试品中待测成分与参比物质的保留时间和峰面积响应的一致性，制备供试品溶液和参比物质溶液的溶剂组成尽可能保持一致。如供试品和/或参比物质在流动相中的溶解性不够，可先用流动相组成中具溶解能力的某一溶剂或其它适宜溶剂制备供试品溶液或/和参比物质溶液贮备液，再将贮备液用流动相（或梯度起始比例流动相组成）稀释到测试的浓度。

在测试序列中，应取制备溶液的溶剂和/或稀释剂进样以确认其是否对待测物质峰有干扰。

对于含量测定，单点对照法定量用供试品溶液与对照品溶液浓度应相同或相近，确保在分析方法线性范围内，并有足够的精密度。

对于限度检测，如有关物质检测，除另有规定外，供试品溶液浓度应保证能准确检测限度最低 0.1% 的杂质，对照溶液或对照品溶液浓度应与所关注的限度浓度相当。

## 2. 系统适用性试验

色谱系统的适用性试验参数通常包括但不限于理论板数、分离度或和峰谷比、灵敏度、拖尾因子和重复性等五个参数。

按各品种正文项下要求，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在规定的色谱系统进行试验，必要时，可对色谱系统进行适当调整，以符合要求。

**(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色谱柱效能的指标时，应指明测定物质，一般为待测物质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，量出供试品主成分色谱峰或内标物质色谱峰的保留时间  $t_R$  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。 $t_R$ 、 $W$ 、 $W_{h/2}$  可用时间或长度计（下同），但应取相同计量单位。

**(2) 分离度 ( $R_s$ )** 用于评价待测物质与被分离物质之间的分离程度，是衡

与第一次公示稿比较，修改处加橙色标记

量色谱系统分离效能的关键指标。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物质与某一指标性成分（内标物质或其他难分离物质）的分离度，或将供试品或对照品用适当的方法降解，通过测定待测物质与某一降解产物的分离度，对色谱系统分离效能进行评价与调整。

无论是定性鉴别分析还是定量测定，均要求待测物质色谱峰与内标物质色谱峰或特定的杂质对照色谱峰及其他杂质色谱峰之间有良好的分离度。除另有规定外，待测物质色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度应不小于 1.5。分离度的计算公式为：

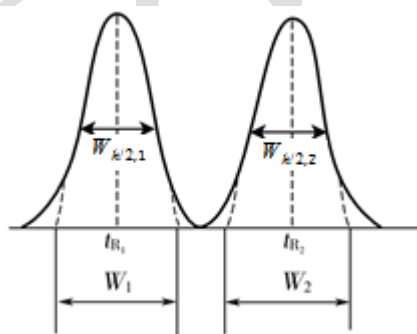
$$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2} \quad \text{或} \quad R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{1.70(W_{h/2,1} + W_{h/2,2})}$$

$$R = \frac{1.18(t_{R_2} - t_{R_1})}{(W_{h/2,1} + W_{h/2,2})} \quad \text{或} \quad R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$$

式中  $t_{R_2}$  为相邻两色谱峰中后一峰的保留时间；

$t_{R_1}$  为相邻两色谱峰中前一峰的保留时间；

$W_1$ 、 $W_2$  及  $W_{h/2,1}$ 、 $W_{h/2,2}$  分别为此相邻两色谱峰的峰宽及半高峰宽，见下图。



当对测定结果有异议时，色谱柱的理论板数（ $n$ ）和分离度（ $R_s$ ）均应以峰宽（ $W$ ）半高峰宽（ $W_{h/2}$ ）的计算结果为准。

**(3) 峰谷比** 若待测物质峰与相邻峰之间未达到基线分离，如在有关物质检测时，峰谷比（ $p/v$ ）可作为系统适用性试验参数。下图表示部分分离两个色谱峰的示意图，峰谷比值计算公式为：

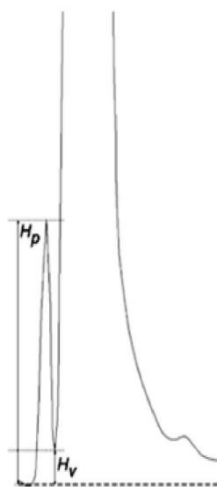
$$p / v = \frac{H_p}{H_v}$$

与第一次公示稿比较，修改处加橙色标记



式中  $H_p$  为小峰平行外推基线的高度；

$H_v$  为小峰和大峰间曲线最低点平行外推基线的高度。



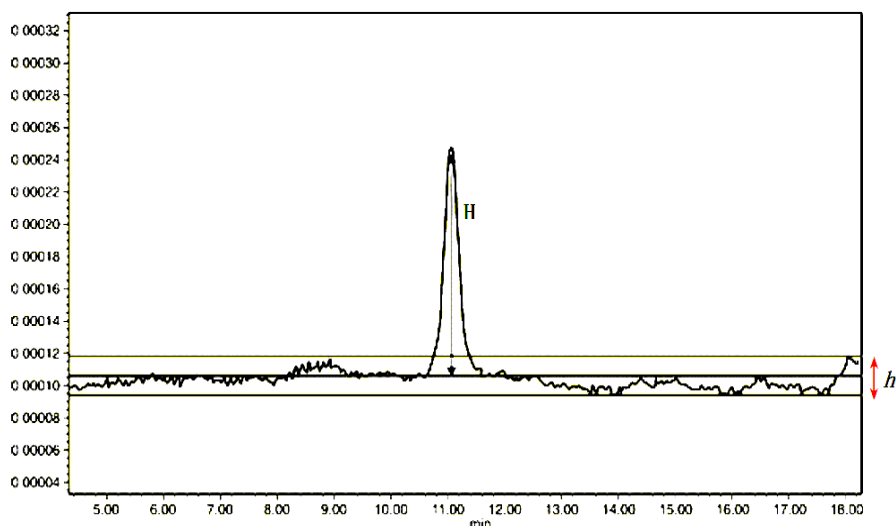
峰谷比值计算示意图

~~(3)(4)灵敏度用于评价色谱系统检测微量物质的能力,通常以信噪比(S/N)来表示。建立方法时,可通过测定一系列不同浓度的供试品或对照品溶液来测定信噪比。定量测定时,信噪比应不小于10;定性测定时,信噪比应不小于3。系统适用性试验中可以设置灵敏度实验溶液来评价色谱系统的检测能力。~~

信噪比(S/N)用于定义系统的灵敏度,按下式计算:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

在使用规定的参比溶液获得的色谱图中, $H$ 为从目标峰最大值到基线信号的峰高,基线外延距离至少为目标峰半高峰宽的5倍; $h$ 为使用空白溶液在距离目标峰至少5倍宽范围内观察到的最大和最小噪声的幅度,见下图。如可能,应平均分布在目标峰的两侧。



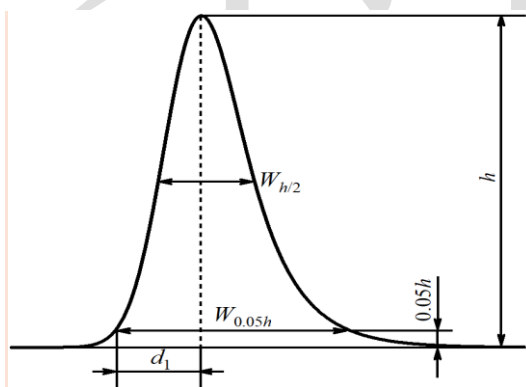
通常，定量限的信噪比应不小于 10，检测限的信噪比应不小于 3。系统适用性试验中可以设置灵敏度试验溶液来评价色谱系统检测低含量成分的能力。

**(4) (5) 拖尾因子 (T)** 用于评价色谱峰的对称性。拖尾因子计算公式为：

$$T = \frac{W_{0.05h}}{2d_1}$$

式中  $W_{0.05h}$  为 5% 峰高处的峰宽；

$d_1$  为峰顶在 5% 峰高处横坐标平行线的投影点至峰前沿与此平行线交点的距离，见下图。



除另有规定外，在检查和含量测定项下，以峰面积作定量参数时， $T$  值应在 0.8~1.8 之间；以峰高作定量参数时，~~除另有规定外~~， $T$  值应在 0.95~1.05 之间。

以峰面积作定量参数时，一般的峰拖尾或前伸不会影响峰面积积分，但严重拖尾会影响基线和色谱峰起止的判断和峰面积积分的准确性，此时应在品种正文项下对拖尾因子作出予以规定。

**(5) (6) 重复性** 用于评价色谱系统连续进样时响应值的重复性能。除另有规定外，通常取各品种项下的对照品溶液或其它溶液，连续重复进样 5 次，其峰与第一次公示稿比较，修改处加橙色标记

面积响应测量值（或内标比值或其校正因子）的相对标准偏差应不大于 2.0%，如品种项下规定相对标准偏差大于 2.0%，则以重复进样 6 次的计算。视进样溶液的浓度和/或体积、色谱峰响应和分析方法所能达到的精度水平等，以满足检测所需的精密度要求为前提，对相对标准偏差的要求可适当放宽或收紧，~~放宽或收紧的范围以满足品种项下检测需要的精密度要求为准~~并在品种项下予以规定。

(7) **其他参数** 保留时间和相对保留时间常用于评价系统适用性，如在品种项下列出但未明确为系统适用性要求，它们仅作为一种参考。实验得到的相对保留时间与品种项下规定值间的差异应为多少，没有适用的可接受标准。

对于复杂体系，如适用，可在品种项下附对照图谱，通过供试品图谱与对照图谱的比对来评价系统适用性。

上述系统适用性试验及其可接受标准，根据方法验证特别是耐用性试验结果在品种项下描述。如上述的与品种项下描述的系统适用性试验及其可接受标准不同，则以品种项下描述为准。

除品种项下描述的任何其他系统适用性试验及其标准外，不论品种项下描述与否，用于检查或定量分析时，重复性试验应满足本通则或品种项下的要求。在整个分析过程中，色谱系统应满足系统适用性要求，否则实验结果不被接受。

### 3. 测定法

#### 3.1 定性分析

常用的定性分析方法主要有但不限于以下：

##### (1) 利用保留时间定性

保留时间（retention time,  $t_R$ ）定义为被分离组分从进样到柱后出现该组分最大响应值时的时间，也即从进样到出现某组分色谱峰的顶点时为止所经历的时间，常以分钟（min）为时间单位，用于反映被分离的组分在性质上的差异。通常以在相同的色谱条件下待测成分的保留时间与对照品的保留时间是否一致作为待测成分定性鉴别的依据。

在相同的色谱条件下，待测成分的保留时间与对照品的保留时间应无显著性差异；两个保留时间不同的色谱峰归属于不同化合物，但两个保留时间一致的色谱峰有时未必可归属为同一化合物，在作未知物鉴别定性分析时应特别注意。

若改变流动相组成或更换色谱柱的种类，待测成分的保留时间仍与对照品的保留时间一致，可进一步证实待测成分与对照品为同一化合物。

当待测成分（保留时间 $t_{R,1}$ ）无对照品时，可以样品中的另一成分或在样品中加入另一成分作为参比物（保留时间 $t_{R,2}$ ），采用相对保留时间（ $RRT$ ）作为定性（或定位）的方法。在品种项下，除另有规定外，相对保留时间通常是指待测成分保留时间相对于主成分保留时间的比值，以未扣除死时间的非调整保留时间按下式计算。

$$RRT = \frac{t_{R,1}}{t_{R,2}}$$

若需以扣除死时间的调整保留时间计算，应在相应的品种项下予以注明。

## （2）利用光谱相似度定性

化合物的全波长扫描所得的紫外-可见光区吸收光谱图提供一些有价值的定性信息。待测成分的光谱与对照品的光谱的相似程度可用于辅助定性分析。二极管阵列检测器开启一定波长范围的扫描功能时，可以获得更多的信息，包括色谱信号、时间、波长的三维色谱光谱图，既可用于辅助定性分析鉴别，还可用于峰纯度分析。

同样应注意，两个光谱不同的色谱峰表征了不同化合物，但两个光谱相似的色谱峰未必可归属为同一化合物。

## （3）利用质谱检测器提供的质谱信息定性

利用质谱检测器提供的与色谱峰对应化合物的分子质量和结构的信息进行定性分析鉴别，可获得相比与仅利用保留时间或增加保留时间结合光谱相似性进行定性分析鉴别，可获得更多的、更可靠的信息，不仅可用于已知物的定性分析鉴别，还可提供未知化合物的结构信息（通则 0431）。

## 3.2 定量分析

### （1）内标法

按品种正文项下的规定，精密称（量）取对照品和内标物质，分别配成溶液，各精密量取各适量，混合配成校正因子测定用的对照溶液；精密量取适量，取一定量进样，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：

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

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。

再精密量取各品种项下含有内标物质的供试品溶液适量，进样，记录色谱图，测量供试品中待测成分和内标物质的峰面积或峰高，按下式计算含量：

$$\text{含量}(c_X) = f \times \frac{A_X}{A_S/c_S}$$

式中 $A_X$ 为供试品的峰面积或峰高；

$c_X$ 为供试品的浓度；

$A_S$ 为内标物质的峰面积或峰高；

$c_S$ 为内标物质的浓度；

$f$ 为内标法校正因子。

采用内标法，可避免因样品前处理及进样体积误差对测定结果的影响。

## (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，分别精密量取一定各适量，进样，记录色谱图，测量对照品溶液和供试品溶液中待测物质的峰面积（或峰高），按下式计算含量：

$$\text{含量}(c_X) = c_R \times \frac{A_X}{A_R}$$

式中各符号意义同上。

~~当采用外标法测定时，以手动进样器定量环或自动进样器进样为宜。~~

## (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。这里定义的校正因子是指单位质量参比物质（包括内标）的色谱响应与单位质量待测物的色谱响应的比值，即用参比物质的色谱响应校正待测物质的色谱响应。需作校正计算的杂质，通常以主成分为参比，也可以供试品中存在的已知杂质或加入的另一成分为参比。

在建立方法时，按各品种项下的规定，精密称（量）取待测物对照品和参比物质对照品各适量，配制待测杂质校正因子的溶液，进样，记录色谱图，按下式计算待测杂质的校正因子。

$$\text{校正因子} = \frac{e_A/A_A}{e_B/A_B}$$

$$\text{校正因子} = \frac{c_A/A_A}{c_B/A_B} = \frac{A_B/c_B}{A_A/c_A}$$

式中， $c_A$ 为待测物的浓度；

$A_A$ 为待测物的色谱响应（峰面积或峰高）；

$c_B$ 为参比物质的浓度；

$A_B$ 为参比物质的色谱响应（峰面积或峰高）。

也可精密称（量）取主成分参比物质对照品和杂质对照品各适量，分别配制成不同浓度的溶液，分别精密量取各适量，进样，记录色谱图，绘制主成分参比物质浓度和杂质浓度对其峰面积的回归曲线，以主成分参比物质回归直线斜率与杂质回归直线斜率的比计算校正因子。

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，~~需作校正计算的杂质，通常以主成分为参比~~，采用相对于参比物质的保留时间定位，其数值一并载入各品种项下。

以主成分作为参比物质测定杂质含量时，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（或取主成分对照品配制成与杂质限度相当的溶液，作为对照品溶液），精密量取适量，进样，记录色谱图。~~必要时，调节纵坐标范围（以噪声水平可接受为限）使对照溶液的主成分色谱峰的峰高约达满量程的10%~25%。~~除另有规定外，通常含量低于0.5%的杂质，峰面积测量值的相对标准偏差（RSD）应小于10%；含量在0.5%~2%的杂质，峰面积测量值的RSD应小于5%；含量大于2%的杂质，峰面积测量值的RSD应小于2%。~~然后，再精密量取供试品溶液和对照溶液适量，分别进样。~~除另有规定外，供试品溶液的色谱图记录时间，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（或对照品）溶液主成分的峰面积比较，计算各杂质含量。

取供试品溶液稀释作为对照溶液并加校正因子的方法通常被称为加校正因子的主成分自身对照法。

加校正因子的对照法不仅可用于杂质测定,也用于多组分中某些组分的含量测定。

#### (4) 不加校正因子的主成分自身对照法

测定杂质含量时,若无法获得待测杂质的校正因子,或校正因子对赋值准确性的影响可以忽略,也可采用不加校正因子的主成分自身对照法。同上述(3)法选择参比物质,配制对照(或对照品)溶液、进样、~~调节纵坐标范围~~和计算峰面积的相对标准偏差后,再精密量取供试品溶液和对照品溶液适量,分别进样。除另有规定外,供试品溶液的色谱图记录时间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(或对照品)溶液主成分的峰面积比较,依法计算杂质含量。

取供试品溶液稀释作为对照溶液但不加校正因子的方法通常被称为不加校正因子的主成分自身对照法。

#### (5) 面积归一化法

按各品种项下的规定,配制供试品溶液,取一定量进样,记录色谱图。测量各色谱峰的面积和色谱图上除溶剂峰、试剂峰、样品基质带入峰以外的总色谱峰面积,计算各色谱峰面积占总峰面积的百分率。~~用于杂质检查时,由于仪器响应的线性限制,峰面积归一化法一般不宜用于微量杂质的检查。~~

~~如适用,也可使用其他方法如标准曲线法等,并在品种正文项下注明。~~

#### (6) 校准曲线法

对于复杂药物体系中的成分和/或待测分量在较大范围变化的含量测定,可采用标准曲线法。标准曲线法可分为外标法和内标法。

① 外标校准曲线法:精密称取对照品(或工作对照品)适量,或精密量取对照品储备液适量,配制成不同浓度的系列溶液,精密量取系列溶液各适量,进样,记录色谱图,测量峰响应,用峰响应(或经转换)对浓度绘制标准曲线,通过最小二乘法计算出回归曲线方程。在相同的色谱条件下,再精密量取供试品溶液适量,进样,记录色谱图,测量供试品溶液中待测成分的峰响应,由待测成分的峰响应(或经转换)和回归曲线方程确定供试品溶液中待测分量的量。

② 内标校准曲线法：精密称取对照品（或工作对照品）适量，或精密量取对照品储备液适量，与精密量取的内标溶液混合，配成含等量内标物的不同浓度待测成分的系列溶液，精密量取系列溶液各适量，进样，记录色谱图，测量待测成分和内标物的峰响应比值，用峰响应比值（或经转换）对待测成分浓度绘制标准曲线，通过最小二乘法计算出回归曲线方程。在相同的色谱条件下，再精密量取加有与对照品系列溶液相同量内标物的供试品溶液，进样，记录色谱图，测量供试品溶液中待测成分和内标物的色谱峰响应比值，由待测成分的峰响应比值（或经转换）和回归曲线方程确定供试品溶液中待测成分的量。

如适用，也可使用其他方法如标准加入法、内插法等，并在品种正文项下注明。

#### 4. 多维液相色谱

多维色谱又称为色谱/色谱联用技术，是采用匹配的接口将不同分离性能或特点的色谱连接起来，第一级色谱中未分离并或需要分离富集的组分由接口转移到第二级色谱中，第二级色谱仍需进一步分离或分离富集的组分，也可以继续通过接口转移到第三级色谱中。理论上，可以通过接口将任意级色谱串联或并联起来，直至将混合物样品中所有难分离、需富集的组分都得到分离或富集之。但实际上，一般只要选用两全级合适的色谱联用就可以满足对绝大多数难分离混合物样品的分离或富集要求。因此，一般的色谱/色谱联用都是二级，即二维色谱。

在二维色谱的术语中，1D和2D分别指一维和二维；而<sup>1</sup>D和<sup>2</sup>D则分别代表第一维和第二维。

二维液相色谱可以分为差异显著的两种主要类型：中心切割式二维色谱（heart-cutting mode two-dimensional chromatography）和全二维色谱（comprehensive two-dimensional chromatography）。中心切割式二维色谱是通过接口将前一级色谱中某一（些）组分传递到后一级色谱中继续分离，一般用LC-LC（也可用LC+LC）表示；全二维色谱是通过接口将前一级色谱中的全部组分连续地传递到后一级色谱中进行分离，一般用LC×LC表示。此外，这两种类型下还有若干子类，包括多中心切割2D-LC（mLC-LC）和选择性全二维色谱（sLC×LC）和~~多中心切割2D-LC（mLC-LC）~~。



LC-LC 或 LC×LC 两种二维色谱可以是相同的分离模式和类型，也可以是不同的分离模式和类型。接口技术是实现二维色谱分离的关键之一，原则上，只要有匹配的接口，任何模式和类型的色谱都可以联用。

与一维色谱一样，二维色谱也可以和与质谱、红外和核磁共振等联用。

# 公示稿

---

起草单位：江苏省食品药品监督检验研究院

复核单位：中国药科大学、浙江大学、北京市药品检验研究院

主要起草人及联系方式：王玉、曹玲、李睿，13851847568@163.com