

附錄 IV(B) 色譜法 — 高效液相色譜法

高效液相色譜法是由固體固定相及液體流動相組成的分離技術。供試品經進樣閥注入，由流動相帶入柱內，各成份被固定相分離，依次通過檢測器，記錄色譜圖。

- (1) **供試品的製備** — 測定前，將藥材樣品粉碎，通過二號篩。供粉碎的樣品量應為測定量的五倍以上。
- (2) **儀器的一般要求** — 按各藥材品種項下的規定，選擇液相色譜的固定相和流動相。十八烷基鍵合硅膠為其中一種最常用的填充劑。離子交換填充劑，用於離子交換色譜法。多孔硅膠或高分子微球填充劑，用於分子排阻色譜法。色譜柱溫度常為室溫，常用檢測器為紫外吸收檢測器。

各藥材品種項下規定的固定相種類及流動相組分、檢測器類型，均不應改變。必要時，其餘條件可適當改變，以符合系統適用性試驗的要求。

- (3) **系統適用性試驗** — 是指按各藥材品種項下有系統適用性的規定，對儀器進行適用性試驗，用規定的化學對照品對儀器進行調整，以適應該藥材項下規定的參數要求，如色譜柱的理論塔板數 (n)、重複性、分離度 (R) 和拖尾因子 (T)。

- (a) **理論塔板數 (n)** — 理論塔板數用於衡量色譜柱的效能。其值應不低於各藥材品種項下的規定。按下列公式計算理論塔板數：

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

式中 t_R = 對照品溶液指標成份峰或供試品溶液待測峰的保留時間；
 $W_{h/2}$ = 對照品溶液指標成份峰或供試品溶液待測峰二分之一峰高處的峰寬。

- (b) **重複性** — 重複性是指取對照品溶液，至少重複進樣5次，計算峰面積及保留時間的相對標準偏差，應符合各藥材品種項下規定。
- (c) **分離度 (R)** — 為保證定量分析準確，除另有規定外，待測峰與鄰近峰的分離度 (圖1) 應大於1.5。按下列公式計算分離度：

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

式中 t_{R1} 及 t_{R2} = 各為相鄰二峰 (峰1及峰2) 的保留時間；
 W_1 及 W_2 = 各為相鄰二峰 (峰1及峰2) 的峰寬。

- (d) **拖尾因子 (T)** — 測量時，尤其當採用峰高法，須檢查待測峰的拖尾因子 (圖2)。該數值亦應符合各藥材品種項下的規定。按下列公式計算拖尾因子：

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

式中 $W_{0.05h}$ = 0.05 峰高處的峰寬；
 d_1 = 峰頂垂直綫至 0.05 峰高處前沿之間的距離。

- (4) **定量操作程序** — 參照儀器說明書的操作說明，裝配高效液相色譜儀器。按規定的高效液相色譜條件，注入適量系列濃度的對照品溶液，繪製標準曲綫，進行分析。在相同色譜條件下，與對照品溶液的保留時間比較，鑒定供試品溶液色譜中的待測成份。或者，在供試品溶液中加入適量對照品，進行分析，以確證供試品溶液中的待測峰。

用化學對照品的峰面積與標準溶液中相應濃度 (mg/L) 作圖，繪製 5 點標準曲綫，得斜率、截距、回歸方程及相關系數。按下列公式計算供試品溶液中待測成份的濃度：

二極管陣列檢測器

$$\text{待測成份濃度} = \frac{A - I}{m}$$

式中 A = 供試品溶液中待測成份峰面積；
 I = 5 點標準曲綫的截距；
 m = 5 點標準曲綫的斜率。

蒸發光散射檢測器

$$\text{待測成份濃度} = e^{[\ln(A)-I]/m}$$

式中

A = 供試品溶液中待測成份峰面積；

I = 5 點標準曲綫的截距；

m = 5 點標準曲綫的斜率。

按下列公式計算樣品中待測成份的百分含量：

$$\text{待測成份百分含量 (\%)} = \frac{C \times V \times D}{10000 W}$$

式中

C = 供試品溶液中待測成份的濃度 (mg/L)；

D = 溶液稀釋因子；

V = 供試品溶液最後製成體積 (mL)；

W = 用以製備供試品溶液的樣品量 (g)。

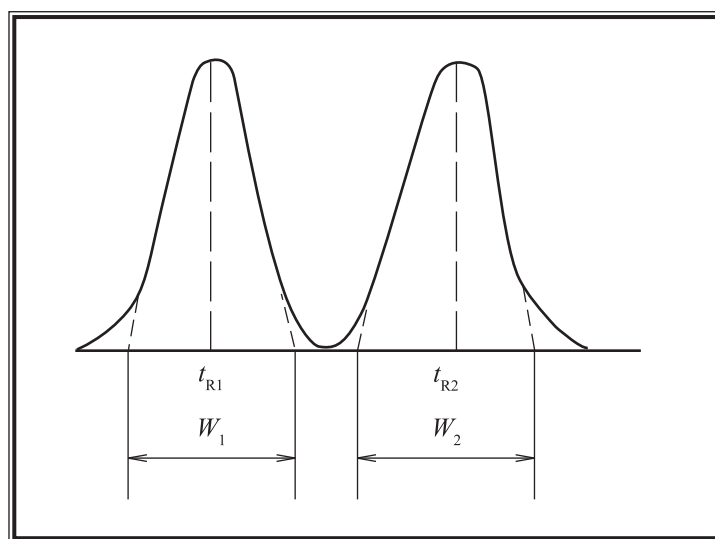


圖1 計算分離度 (R) 參數示意圖

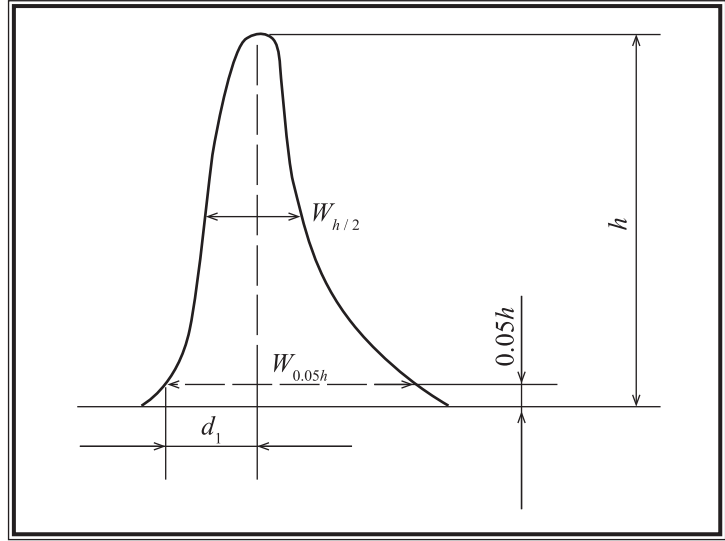


圖2 計算拖尾因子 (T) 參數示意圖