

液相色谱旁路校正定量法研究

林力行 林克丹¹ 张彬²(南京药物研究所, 210009; ¹南京市药品检验所, 210015)**关键词** 旁路校正法; 快速定量液相色谱法; 旁路等效管

色谱过程包括柱上分离、管内流动和池内检测, 分离过程是首要的, 但是对于一个对照(标准参考)品来说, 分离是不必要的, 对照品可通过旁路管直接进入检测器而不必经柱分离, 这种方法我们定名为旁路校正法。该法的测定结果与绝对校正(外标)法一致, 相对偏差小于2%, 本法省时省试剂并延长柱寿命, 可代替绝对校正法和内标法。

本法和紫外分光吸收系数法^[1]、流出峰法^[2]以及一种新仪器设计^[3]组成一种新的液相色谱法——快速定量液相色谱法, 它加快了液相色谱的定量过程, 可不作标准曲线或用改进的方法做标准曲线。

1 原理

液相色谱定量法通常是相对定量法, 它必须用对照品进行比较, 由于单色光不纯等原因, 浓度-峰面积直线不通过原点, 要用一系列浓度梯度溶液制备标准曲线。制备标准曲线的对照品可在相同的流速下通过旁路管而不必通过柱, 直接进入检测器。

色谱曲线是正态分布曲线, 进样峰为矩形, 对照品峰直接进入检测器仍然是矩形峰, 用根据正态分布曲线设计的峰参数来记录, 计算矩形峰时, 曲线的不同会引入很大误差, 为此, 把旁路管设计成等效流路管, 它由系列毛细管组成, 内径粗细不同的毛细管交替相连, 当矩形(对照品)峰流经毛细管时, 内径的突然扩大和缩小造成湍流, 连续的湍流影响, 使峰高降低,

峰宽增宽, 逐渐使矩形峰展宽并变成近似正态分布曲线, 这组毛细管的死体积很小(约1~2 ml), 这一过程费时很少。

2 方法和结果

2.1 仪器

WATERS 510泵, 岛津 SPD-2AM 紫外检测器, C-R3A 数据处理机, 7125进样阀, ODS 柱(WATERS)。

仪器装置见图1。

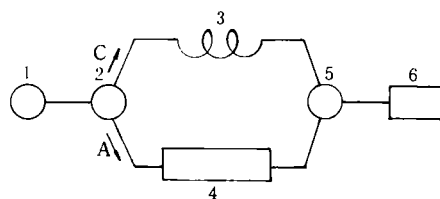


Fig 1. Scheme of the device

1. Injection valve 2. 3-ports valve 3. Capillary (Bypass equivalent tube) 4. Column 5. 3-ports valve 6. Detector
C. Flow line of Bypass calibration A. Flow line of sampling analysis

等效流路管组成:

(1) 长10 m, 内径0.5 mm 的聚四氟乙烯管。

(2) 长380 mm, 内径1.5 mm 的聚四氟乙烯管和6根外径1.5 mm, 内径0.216 mm, 长20 mm 的不锈钢管, 细管插入粗管中, 每隔20 mm 插入一根。

(3) 长20 mm, 外径1.5 mm, 内径0.5 mm 不锈钢管21根和内径1.5 mm 的聚四氟乙烯管20

根,间隔相连。

2.2 实验与计算

2.2.1 样品稀释倍数与等效流路管

稀释倍数是指色谱峰洗脱体积与进样体积之比。在以苯为检测样品、乙醇为流动相、紫外检测波长为254 nm,流量为1 ml/min,进样20 μ l时,不同的等效流路管稀释样品的倍数不同(见表1)。

Tab 1. The attenuation factor (eluting volume/injecting volume) with different equivalent flow tubes

No.	Peak area, μ v·s	Peak height, μ v	Peak width,s	Eluting volume, μ l	Attenuation factor
1	1778889	69619	61.16	1019.37	51
2	1774302	29937	141.87	2364.45	118
3	1826572	24837	176.03	293.90	147

2.2.2 旁路校正法与绝对校正法的比较

以苯为检测试剂:取苯(AR)经重蒸后,加甲醇制成3个不同浓度溶液分别用旁路校正法和绝对校正法制备标准曲线,实验结果见表2。对同一未知样品测定结果比较见表3。

Tab 2. The linear correlation from two methods

Conc. μ l/ml	Area, μ v·s	
	Bypass calibration (CV%,n)	Absolute calibration (CV%,n)
0.001	374617(0.1, 3)	338235(0.5, 3)
0.003	1133937(0.07, 3)	1093608(0.5, 3)
0.005	1903743(0.1, 3)	1836915(0.2, 3)
$A_1 = -9412 + 3822815C_1$ $A_2 = -34422 + 3746698C_2$		

Tab 3. Comparison of the results determined with two methods

Batch	Peak area, μ v·s	Contents, μ l/ml		Relative deviation, %
		Bypass calibration	Absolute calibration	
880919	1500390	0.003949	0.004096	1.8
881108	1513234	0.003983	0.004131	1.8

以 α -细辛醚为检测试剂:制备 α -细辛醚标准品并配制成3个不同浓度的 α -细辛醚溶液,流动相甲醇-水(100:40),检测波长258 nm,流量1.0 ml/min。其他色谱条件同前,分别用旁路校正法和绝对校正法制备标准曲线并进行比较,结果见表4。

Tab 4. Comparison of the standard curves by two methods

Conc. μ g/ μ l	Peak area, μ v·s	
	Bypass calibration (CV%,n)	Absolute calibration (CV%,n)
10.2	182563(0.4, 3)	177684(0.7, 3)
20.4	468981(0.5, 3)	453110(1.0, 3)
40.8	913414(0.5, 3)	898440(0.3, 3)
$A_1 = -39653 + 23584C_1$ $A_2 = -44981 + 23307C_2$		

3 讨论

3.1 本法与常规的绝对校正法结果基本一致,相对偏差小于2%,可代替绝对校正法,具有省时、经济、延长柱寿命的优点。

3.2 等效流路管的稀释倍数应和样品测定时的稀释倍数大致相近,以减少误差,当对照品纯度不够时,本法引入的误差和绝对校正法是相同的,但符号相反。

3.3 本法较紫外吸收系数法和流出峰法简单,不需精确测定流通池参数和流量,由于对照品经旁路流入检测器时间较短,能快速及时校正仪器,本法有可能代替内标法。本法将色谱仪分为柱与非柱两部分,这给排除色谱仪的故障带来方便。

3.4 本法可代替洗脱法^[4]以研究柱的吸留,并可监控样品中待测组分是否流完,当柱有吸留时,本法应用校正系数校正。

3.5 实验观察表明,不经柱分离的旁路峰仍有拖尾现象,我们认为,色谱峰拖尾除了柱的因素之外,至少还有两个重要因素,即类多普勒效应和时差效应,这将另文报道。

参考文献

- 林力行. 一种新的液相色谱定量法—紫外分光吸收系数法. 南京药学院学报, 1986; 17(1): 20
- 林力行, 林克丹. 液相色谱流出峰定量法研究. 中国药科大学学报, 1990; 21(2): 84
- 中国专利(实用新型). 第38792号
- 陈洪, 达世禄, 吴采樱. O-Tolldined 在反相色谱柱上的吸附性能. 色谱, 1989; 7(1): 10

Study on Bypass Calibration Quantitation for HPLC

Lin Lixing, Lin Kedan¹, Zhang Bin

Nanjing Institute of Materia Medica, 210009; ¹Nanjing Municipal Institute for Drug Control, 210015

A novel quantitative method for HPLC-bypass calibration method has been established. Since the standards for preparation of standard curve are pure, it may be flowed into the detector directly from bypass equivalent tube under same flow rate without being separated by the column. This method is more saving both in time and reagent. It could prolong the lifetime of column and its results coincide with those of absolute calibration method. The relative deviation is less than 2%.

Key words. Bypass Calibration Method; Rapid quantitation HPLC; Bypass equivalent tube

《中国药典(1990年版二部)注释》简介

药典是记载药品标准的法典。国家药典由国家卫生部门主持编纂、颁布和实施。我国现代药典的编纂已有60余年历史。1930年出版的《中华药典》为我国现代药典的肇始,1949年中华人民共和国诞生后,自1950年开始编纂《中华人民共和国药典》(简称中国药典),迄今已先后出版了1953、1963、1977、1985和1990年版共5个版次。

药品标准是药品现代生产和质量管理的重要组成部分;它是药品的生产、供应、使用和监督管理等部门共同遵循的法定技术依据;同时也是医药生产、科技发展和临床用药水平的综合反映。因此,制订药品标准必须坚持质量第一的观点,充分体现安全有效,技术先进和经济合理的原则。

药品质量的内涵概括起来有三个方面:真伪、纯度和品质;三者的统一即使用中的有效性和安全性。药品标准的内容根据品种和剂型的不同,一般应包括以下诸项:品名(法定名、汉语拼音名和拉丁名);有机药物的结构式、分子式和分子量;来源或有机药物的化学名;含量或效价规定;处方与制法;性状;鉴别;检查;含量测定或效价测定;类别;剂量;注意;规格;贮藏;制剂。上述内容就其性质区分,一为标准规定,二为检测方法。由于药典体例、文字规范化要求十分严格,故对每项规定的原由和依据,对选用的检测方法的原理及其准确度和精密度等内容,在各论中均不可能赘述。因此使用者在操作实践中常有困惑不解之感,为此特组织编写了《中华人民共和国药典(1990年版二部)注释》一书,目的是辅导药典实施和帮助读者加深对药典内容的理解。该书采用注与释结合的方法编写。在内容上除理论性解说外,还尽可能写进了在药典实践中积累的一些比较成熟的经验以及国内外有关文献的提示。

对药典各论的注释系以1990年版收载的项目规定为基础,顺序编写。以每种原料药为一个编写单元;制剂注释随原料药,避免内容上的重复。附录的注释按附录目次顺序编写,一项附录为一个编写单元。为节约篇幅,药典各论和附录的注释均不转录药典原文。全部注释的列项顺序与药典相同,但无注释内容的项目则付缺如。

对药品各论的注释主要增加了各药的概述和制法概要两部分内容。概述部分扼要介绍按临床疗效划分的药物类别,主要的药理作用、临床适应症、体内吸收代谢和不良反应等内容以及各该药物的历史与药典收载情况等等。制法概要主要介绍药物的来源与制法,侧重介绍药物合成或制取的路线流程,尽可能以反应式表示。对具体生产环节的控制因素,如:反应温度,时间,加入试剂的量等条件则不详列。一般均按文献记载简述,但力求结合国内生产实际。其它注释的内容则主要是解释各项具体规定的原由及所采用的检测方法的原理和操作中需要注意之点,如在列述某药的紫外吸收时,同时附示该药紫外吸收图谱;对采用红外光谱法进行药物鉴别的品种,均在鉴别项下列出

(下转243页)