

药物制剂流程

与质量监督检验鉴别检查分析测定

实用手册

◎ 主编 廖小明



$$B_0 = \frac{d_p^2}{1012} \quad (5-5-24)$$

式中 d_p 为固定颗粒直径。对于毛细管柱，其比渗透率表示为：

$$B_0 = \frac{d^2}{32} = \frac{r^2}{8} \quad (5-5-25)$$

d 与 r 分别为毛细管的内径和内半径。

B_0 为色谱柱的特性参数，与所用固定液无关。用填充柱， B_0 正比于固定相颗粒直径。对毛细管柱， B_0 正比柱内径的平方。

B_0 与色谱柱压力降 (ΔP) 的关系为：

$$\Delta P = \frac{\eta}{B_0} Lu \quad (5-5-26)$$

式中 η 为载气在柱温下的粘度； L 为柱长； u 为载气平均线速度。式 (5-5-26) 说明，填充柱的压力降随固定相颗粒直径的降低和柱长的增加而增加，毛细管柱的压力降随柱内径的减小和柱长增加而增加。当柱长、载气平均线速度同时，填充柱的进口压要比毛细管柱大 100~400 倍，因此填充柱不能太长。当毛细管柱与填充柱具有相同压力降时，毛细管柱长可为填充柱的 30~50 倍。尽管毛细管柱用得很长，但因其 k 值比填充柱小，而且可采用很高的载气线速度，因而分析所用时间仍比填充柱短。

3. 毛细管柱的性能指标

(1) 柱数。

表征柱效有多种方法，其中最常用的理论塔片数 (n) 表示为

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

但理论塔片数还不能直接反映毛细管柱分离性能。例如，在一根很长的毛细管柱上，某组分流出色谱柱的时间 t_R 很长，但死时间 t_0 也会很大，结果计算出的理论塔片数的值相当大，但分离能力却很低，因此毛细管柱的理论塔片数多是一种表面现象，原因是它的有效塔片数并不多。对某组分的有效塔片数 n_{eff} 定义为：

$$n_{\text{eff}} = 5.54 \left(\frac{t_R - t_0}{W_{1/2}} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t'_R}{W_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t'_R}{W} \right)^2 \quad (5-5-27)$$

某组分流出色谱柱时间 t_R 愈靠近死时间 t_0 (空气或甲烷峰的时间)，其有效塔片数越少，分离效能越低。因此有效塔片数与理论塔片数不同，它直接反映色谱柱对物质分离能力的高低。一根结构和操作不良的毛细管柱，其理论

塔片数与有效塔片数相差甚大,究其原因常常是由于柱管内径太粗、固定液膜太薄且太均匀、载气流速过高、进样量过大或柱温太高等因素的影响,致使有效塔片数下降。虽然理论塔片数多的色谱柱有效塔片数不一定很多,但说明这根色谱柱有潜力可挖,只要将操作条件加以改善,就可使它成为一根有效塔片数多的色谱柱;而理论塔片数不多的柱子,有效塔片数也不可能多。这就是理论塔片数至今经常用以评价柱效的原因。图 5-5-31 表示同一长度的柱子具有相同的有效塔片数、不同理论塔片数所得的色谱图。

从图可以看出,分离的清晰程度是相同的,理论塔片数越高的柱流出的色谱峰就越窄,出柱时间较短。因此说,理论塔片数实际上是表征柱内峰宽变化的指标。

根据理论塔片数 n 与有效塔片数 n_{eff} 之间的关系式

$$n_{\text{eff}} = n \left(\frac{k}{1+k} \right)^2$$

对于 $k=1$ 的组分, n_{eff} 只是 n 的 25%; 而对于强保留组分, 如 $k=10$ 的线组分, n_{eff} 与 n 趋于相同, 此时 n_{eff} 与 n 都是合适的柱效指标。一般是在 $k>2$ 的条件下进行柱效的测定, 并以塔片数/米表示。

柱效也可用理论塔片高 H 或有效塔片高度 H_{eff} 来表征。

(2) 涂渍效率。

涂渍效率 (coating efficiency; CE) 是指最佳条件下理论塔片高度即最小板高 H_{min} 与实测塔片高度 H 之比, 以百分数表示。

$$CE = \frac{H_{\text{min}}}{H} \times 100\% \quad (5-5-28)$$

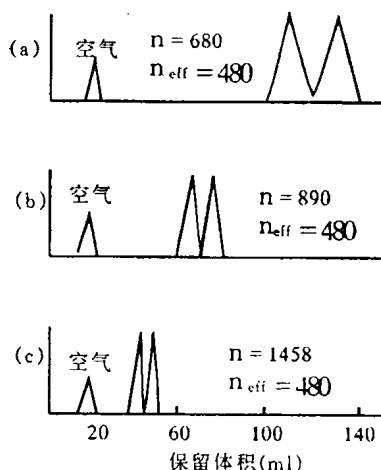


图 5-5-31 有效塔片数相同而理论塔片数不同的毛细管柱的分离情况

一支色谱柱作涂渍效率高,表明柱子的理论利用率高,即达到“理想化的程度”高。用它来评价柱效的优点是与柱长无关,而且包括了组分的容量因子和柱径等参数,可用作柱子之间质量的比较。WCOT 柱的 CE 一般在 20% ~ 60%, SCOT 柱地 30% ~ 80%。

(3) 分离数。

毛细管柱的分离性能,虽可用分离度 R 表示,但习惯上多用分离数 TZ 。它是指碳原子数 Z 与 $Z+1$ 的两个相邻标准同系物峰之间,可插入分离度达到 $R=1.177$ 时的组分峰的数目。分离数是在程序升温条件下测得柱效参数,它与固定液的特性、柱长、柱温以及载气流速有关,与色谱柱有效塔片数有下列关系:

$$TZ = 0.425 \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \right] \sqrt{n_{eff}} - 1 \quad (5-5-29)$$

式中 α 为分配系数比。由于分离数随被测组分的容量因子而改变,因此必须规定被测组分。通常用 $k=3$ 的组分的分离数来比较柱效。

(4) 柱惰性。

色谱柱的惰性反映柱子的去活性程度,通常以色谱峰拖尾的程度来衡量。色谱柱惰性的好坏直接影响柱效、柱内液膜稳定性以及组分的有效分离与检测。特别是对一些极性强的组分,由于受柱内活性点的吸附或催化反应影响,使峰严重拖尾或减小甚至消失不见流出,因此色谱柱的惰性是衡量柱性能好坏的又一重要指标。色谱柱惰性主要取决于柱管的材料和处理方法。它可从标准试样中色谱峰的拖尾程度、相对峰高或某些极性组分的保留时间来判断。

(5) 热稳定性。

在毛细管柱上进行分离分析,大多数是在较高的柱温下或采用程序升温来实现的,因此柱的热稳定性必须良好。要求高温条件下固定液保持稳定,流失和分解最小且柱效不下降。一般用程序升温基线漂移大小或 GC-MS 中的总离子流基线漂移等来评价柱的稳定性。

根据连续使用过程中给定溶质 k 和柱效变化,也能说明柱的稳定性。如 SiO_2 涂层 $47\text{m} \times 0.4\text{mm}$ 的 OV-17 玻璃和石英毛细管柱,在 $100 \sim 260^\circ\text{C}$ 程序升温使用 7 ~ 10 个月以上,柱效无明显变化,说明柱的稳定性较好。

6. 极性和吸附性

分离由不同极性和沸点的溶质组成的“试验混合物”,可评价色谱柱的极性和吸附性等。试验混合物包含有极性和沸点顺序相反的组分,如乙醇 (bp 78.5)、甲乙酮 (bp 79.6)、苯 (bp 80.1)、环己烷 (bp 80.7)。在非极性柱上,组分按沸点顺序出柱,低沸点的组分先出柱;而在极性柱上,按极性顺序出柱,极性弱的先出柱;在弱极性柱上环己烷先于苯出柱。根据组分出

柱顺序就可判别色谱柱的极性。

色谱峰是否拖尾可反映色谱柱是否有残余吸附活性。如果乙醇、甲乙酮等极性物质色谱峰拖尾,说明色谱柱存在残余吸附活性;而环己烷峰拖尾则反映色谱系统死体积太大或固定液液膜太厚。

二、检测器

检测器(detector)是将流出色谱柱的载气中被分离组分的浓度(或量)的变化转换为电信号(电压或电流)变化的装置。色谱柱与检测器构成分离-分析仪器——气相色谱仪的两个主要部分,前者“司分离”,后者“司分析”。

气相色谱仪的检测器已有三十余种之多,常用检测器可分为浓度型检测器和质量型检测器两大类。下面介绍三种最基本的检测器,热导检测器、氢焰离子化检测器和电子捕获检测器。

(一) 热导检测器

热导检测器(thermal conductivity detector; TCD)是利用被检测组分与载气的热导率^①的差别来检测组分的浓度变化。具有构造简单、测定范围广、稳定性好、线性范围宽、样品不被破坏等优点。TCD是一种通用型检测器。但灵敏度低。

1. 检测原理

在一块不锈钢块上钻上孔道,装入热敏元件(热丝),就构成热导池。热敏元件用钨丝或铼钨丝等制成,它们的电阻随温度的升高而增大,并且具有较大的温度系数,故称为“热敏”元件。钨丝的电阻温度系数为 6.5×10^{-3} 欧/(欧·度)。将两个材质、电阻相同的热敏元件,装入一个双腔的池体中,构成双臂热导池(图5-5-32a)。一臂联接在色谱柱之前,只通载气,称为参考臂;另一臂联接在色谱柱之后,称为测量臂。两臂的电阻分别为 R_1 与 R_2 。将 R_1 、 R_2 与两个阻值相等的固定电阻 R_3 、 R_4 组成桥式电路(图5-5-32b)。

当载气以恒定的速度通入热导池,并以恒定的电压给热导池通电时,热丝温度升高。所产生的热量主要经载气由热传导方式传给温度低于热丝的池体;其余部分由载气的“强制”对流所带走;热辐射散失的热量很小,可忽略不计。当热量的产生与散失建立热动平衡后,热丝的温度恒定。若测量臂

^① 热导率(导热系数)是衡量物质导热性能的指标,用“ λ ”表示。当物质的横截面积为 1m^2 ,厚 1m ,两侧温差为 1 开尔文(K)时,每秒传导过此物质的热量称为热导率。按国际单位制规定:热导率的单位为瓦/(米·开)。

无样气通过, 即只通载气时, 两个热丝的温度相等, $R_1 = R_2$ 。根据惠斯敦电桥原理, 当 $R_1/R_2 = R_3/R_4$ 时, A、B 两点间的电位差 $V_{AB} = 0$ 。因此, 此时检流计 G 中无电流通过 ($I_G = 0$), 检流计指针停在零点。

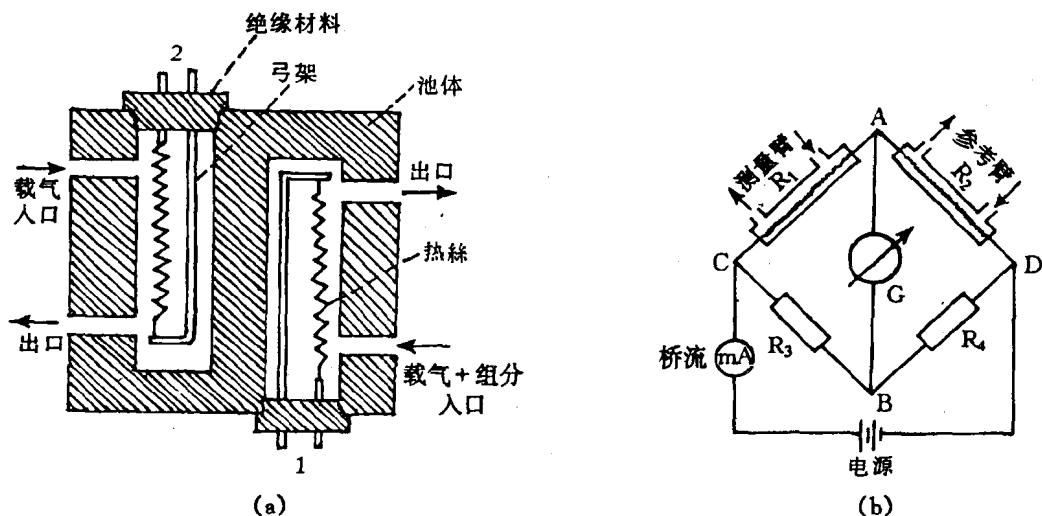


图 5-5-32 双臂热导池的构造 (a) 和检测原理 (b) 示意图

1—测量臂

当样品由进样器注入色谱柱, 分离后, 某组分被载气带入测量臂时, 若组分与载气的热导率不等, 则测量臂的热动平衡被破坏, 热丝的温度将改变。若组分的热导率小于载气的热导率, 则热传导散热减少, 热丝的温度升高, 电阻 R_1 增大。 $R_1 > R_2$; $R_1/R_2 \neq R_3/R_4$; $V_{AB} \neq 0$; $I_G \neq 0$, 检流计指针偏转。当组分完全通过测量臂后, 指针又恢复至零点。若用记录器 (电子毫伏计) 代替检流计, 则可记录 $mV-t$ 曲线, 即色谱流出曲线。

由于 V_{AB} 的大小决定于组分与载气的热导率之差, 以及组分在载气中的浓度, 因此在载气与组分一定时, 峰高 (V_{AB}) 与组分在载气中的浓度成正比。

早期生产的气相色谱仪多用双臂热导池, 灵敏度较低。目前都采用四臂热导池。将电桥上两个固定电阻 (R_3 、 R_4) 也换成热敏元件则构成四臂热导池, 其灵敏度在同样条件下是双臂热导池的二倍。

2. 载气的选择

在热导池体温度与载气流速等实验条件恒定时, 检测器的灵敏度决定于载气与组分热导率之差, 两者相差越大, 电阻 R_1 改变越大, 检测器越灵敏。若 $\lambda_{\text{组分}} = \lambda_{\text{载气}}$, 则不产生信号。现将几种物质的热导率列于表 5-5-16。

由表 5-5-16 可看出, 若用氮气为载气, 样品为空气, 因为 $\lambda_{N_2} = \lambda_{\text{空气}}$, 则样品不出峰。氮气的热导率比较小, 与多数有机物的热导率 [一般小于 3

$\times 10^{-2} \text{W}/(\text{m} \cdot \text{K})]$ 相差较小, 因此用氮气为载气时, 灵敏度低, 且有时出倒峰。例如, 一个混合物中含有甲烷及丙烷, 若用氮气为载气, 当甲烷进入检测器时, 因 $\lambda_{\text{甲烷}} > \lambda_{\text{N}_2}$, 散热多, 热丝温度降低, 电阻减小; 当丙烷进入检测器后, 因 $\lambda_{\text{甲烷}} < \lambda_{\text{N}_2}$, 散热少, 热丝温度升高, 电阻增大。因此, 后者若为正峰, 则前者为倒峰。若选用氢气为载气, 可获得较高的检测灵敏度, 而且不出倒峰, 但不安全。氮气较理想, 但价格较贵。

表 5-5-16 几种气体与有机液体蒸气在 373K (100℃) 的热导率 [$\text{W}/(\text{m} \cdot \text{K})$]

化合物	$\lambda \times 10^2$	化合物	$\lambda \times 10^2$
氢气	22.36	乙烯	3.10
氮气	17.42	丙烷	2.64
空气	3.14	苯	1.84
氦气	3.14	乙醇	2.22
甲烷	4.56	丙酮	1.76

注: 手册上热导率的单位为卡/(厘米·秒·度)。表中数据是根据 $1 \text{卡}/(\text{厘米} \cdot \text{秒} \cdot \text{度}) = 418.68 \text{瓦}/(\text{米} \cdot \text{开})$ 换算而来。

(二) 氢焰离子化检测器

氢焰离子化检测器 (hydrogen flame ionization detector; FID) 利用有机物在氢焰的作用下, 化学电离而形成离子流, 借测定离子流强度进行检测。FID 具有灵敏度高、响应快、线性范围宽等优点, 是目前最常用的检测器之一。但这种检测器是专属型检测器, 一般只能测定含碳有机物, 而且检测时样品被破坏。

有机化合物进入氮火焰, 在燃烧过程中直接或间接产生离子。检测器 (图 5-5-33) 的收集极 (阳极) 与极化环 (阴极) 间具有电位差, 使离子在收集极与极化环间作定向流动形成离子流。离子流强度与进入检测器中组分的量及分子中的含碳量有关, 因此在组分一定时, 测定电流 (离子流) 强度可以对组分进行定量。

在没有有机物通过检测器时, 氢气燃烧, 在电场作用下, 也能产生极微弱的离子流。一般只有 $10^{-12} \sim 10^{-11} \text{A}$, 此电流称为检测器的本底。在有微量有机物引入检测器后, 电流急剧增加, 可达到 10^{-7}A , 电流大小与有机物引入的量成正比。在两极间接上一高电阻 ($10^8 \sim 10^{11} \Omega$), 并使高电阻的两端 (A、B 两点) 与微电流放大器的输入端并联。当电流产生微小的变化时, 则

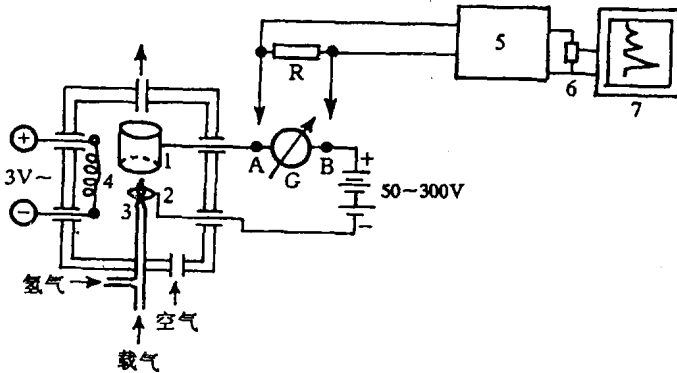


图 5-5-33 氢焰检测器检测原理示意图

1—收集极；2—极化环；3—氢火焰；4—点火线圈

5. 微电流放大器；6—衰减器；7—记录器

在高电阻上产生很大的电压变化，再经放大器放大，然后由记录器（电子电位差计）记录电压随时间的变化，而得色谱流出曲线。

有机化合物在氢火焰中的离子化机制有几种说法，其中化学电离理论能较好地解释烃类的离子化机制，有一定参考价值。该理论认为有机物在氢火焰中先形成自由基，而后与氧产生正离子，由这些离子形成的离子流产生电信号。

（三）电子捕获检测器

电子捕获检测器（electron capture detector, ECD）利用电负性物质捕获电子的能力，通过测定电子流进行检测。ECD 具有灵敏度高、选择性好的特点。它是一种专属型检测器，是目前分析痕量电负性有机化合物最有效的检测器，对含卤素、硫、氧、羰基、氰基等的化合物有很高的响应。可检测出 CCl_4 为 10^{-14} g/ml 。但对无电负性的物质如烷烃等几乎无响应。其线性范围窄，分析重现性较差。

电子捕获检测器有放射性和非放射性两种类型。图 5-5-34 是放射性 ECD 的结构示意图。检测器内有一个圆筒状放射源，放射源贴在阴极壁上，内腔中央的不锈钢棒作正极，在两极间施加直流或脉冲电压。

β 放射源不断放射出 β 粒子，即初级电子。当载气（Ar 或 N_2 ）分子进入内腔时，不断受到 β 粒子轰击而离子化，形成了次级电子和正离子。在电场的作用下，初级和次级电子一齐向阳极运动，并为阳极所收集，产生约 $10^{-9} \sim 10^{-8} \text{ A}$ 的基始电流（基流），在记录器上产生一条平直的基线。当电负性组分进入检测器时，立即捕获这些自由电子，结果使基流下降，产生信号。在

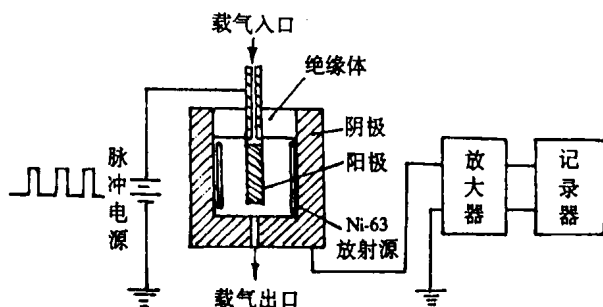


图 5-5-34 电子捕获检测器结构示意图

一定浓度范围内，响应信号强度与组分浓度 C 之间的关系为：

$$I_e = I_0 e^{-KAC} \quad (5-5-30)$$

式中 I_e 为信号电流， I_0 为基流， K 为检测器常数， A 为组分的电子吸收系数，它与组分的性质有关。

(四) 检测器的性能指标

对检测器性能的要求主要有四方面：①灵敏度高；②稳定性好，噪声低；③线性范围宽；④死体积小，响应快。

1. 噪声和漂移

无样品通过检测器时，由仪器本身和工作条件等的偶然因素引起的基线起伏称为噪声 (noise; N)。噪声的大小用噪声带 (峰-峰值) 的宽度来衡量 (图 5-5-35)。例如，不进样时，记录某检测器的基线带宽为 0.02mV ，即噪声为 0.02mV 。

基线随时间朝某一方向的缓慢变化称为漂移 (drift; d)。通常用一小时内基线水平的变化来衡量。

2. 灵敏度

灵敏度 (sensitivity) 又称响应值或应答值。是用来评价检测器质量或比较不同类型检测器时的重要指标。

(1) 浓度型检测器的灵敏度 (S_c)。

1ml 载气中携带 1mg 的某组分通过检测器所产生的 mV 数。 S_c 的单位为 $\text{mV} \cdot \text{ml}/\text{mg}$ 。计算公式：

$$S_c = AC_1 C_2 C_3 / W \quad (5-5-31)$$

A 为色谱峰面积 (cm^2)， C_1 为记录器的灵敏度 (mV/cm)， C_2 为记录纸速的倒数 (min/cm)， C_3 为柱出口载气流速 (ml/min)， W 为进样量 (某组分纯品， mg)。

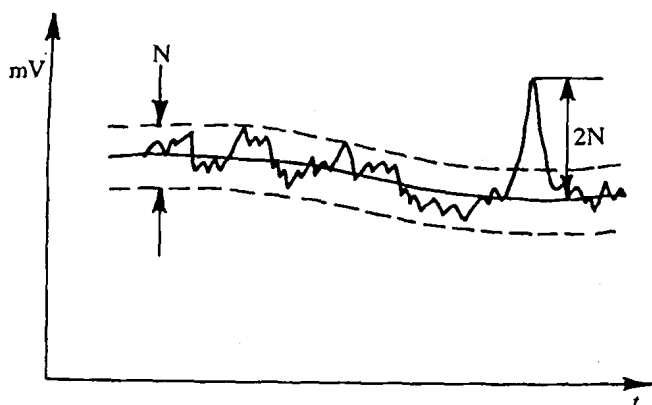


图 5-5-35 检测器的噪声和检测限

(2) 质量型检测器的灵敏度 (S_m)。

每秒有 1g 某组分通过检测器时所产生的 mV 数或 A (安倍) 数。 S_m 的单位为 $\text{mV} \cdot \text{s/g}$ 或 $\text{A} \cdot \text{s/g}$ 。计算公式:

$$S_m = AC_1 C_2 \cdot 60/W \quad (5-5-32)$$

A、 C_1 与 C_2 的含义同前, W 的单位常用克表示。

3. 检测限

检测限 (detectability; D) 或称敏感度 (M)。灵敏度不能全面地表明一个检测器的优劣, 因为它没有反映检测器的噪声水平。信号可以被放大器任意放大, 使灵敏度增高, 但噪声也同时放大, 弱信号仍然难以辨认。因此评价检测器不能只看灵敏度, 还要考虑噪声的大小。检测限从这两方面来说明检测器性能。

某组分的峰高恰为噪声的二倍时, 单位时间内载气引入检测器中该组分的质量或单位体积载气中所含该组分的量称为检测限。由于低于此限组分峰将被噪声所淹没, 而检测不出来 (图 5-5-35)。

$$\text{质量型检测器:} \quad D_m = 2N/S_m \quad (5-5-33)$$

$$\text{浓度型检测器:} \quad D_c = 2N/S_c \quad (5-5-34)$$

D_c 与 D_m 的单位分别为 g/s 及 g/ml (或 mg/ml)。检测限越小, 检测器的性能越好。

三、定性与定量分析法

药典规定应先进行系统适用性试验, 证明该系统的理论数、分离度和相对标准偏差均符合规定后, 再进行定性、定量分析。

(一) 定性分析

气相色谱定性分析的任务是确定色谱图上每个峰代表什么物质,定性分析的根据是每个峰的保留值。一定色谱条件下,每一种物质都有一个确定的保留值,即保留值是特征的。通常有已知对照品时,可在相同色谱条件下绘制色谱图,如果样品峰和对照品峰的保留值相同则可能为同一物质。为了确证是同一物质,尚需作进一步的确证试验。采用对照品进行对比时,定性分析任务比较容易完成。药品检验中常用来已知药品的真伪鉴别或已知杂质的限量检查。中国药典(1995)一部中有10个品种(少林风湿跌打膏、贝羚胶丸、伤湿止痛膏、安宫牛黄丸、安阳精制膏、苏合香丸、脑立清丸、紫雪、麝香和麝香保心丸)用本法鉴别。中国药典(1995)二部中维生素E胶丸和维生素E粉两个品种用本法鉴别。

(二) 定量分析

气相色谱法定量分析的依据是供试品组分含量与峰面积成正比。正常峰的峰面积为峰高与半峰宽及1.065三项的乘积,即 $A_i = 1.065 \times h \times W_{h/2}$ 。积分仪或数据处理机常以微伏·秒($\mu V \cdot s$)为单位报告峰面积的大小。中国药典(1995)一部中桉油、斑蝥和麝香三个品种用气相色谱法测定含量。中国药典(1995)用于气相色谱分析的定量测定方法有4种:

1. 外标法测定供试品中某杂质或主成分的含量

按各种药品测定方法的规定,精密称取对照品和供试品,配制成溶液,分别精密量取一定量,注入仪器,记录色谱图,量取对照品和供试品中待测成分的峰面积(或峰高),计算含量:

$$m_i = m_r \times \frac{A_i}{A_r}$$

式中 m_i ——待测成分的量;
 A_i ——待测成分的峰面积;
 m_r ——对照品的量;
 A_r ——对照品的峰面积

采用外标法时应注意加样的精确度。例如,药典检查苯甲醇中苯甲醛的限量时,就采用了外标法。又如检查氯贝丁酯及其胶囊中对氯酚的限量,检查硫糖铝中 α -甲基吡啶的限量和检查聚乙二醇400中乙二醇和二甘醇的限量时,均采用了外标法。

2. 内标法加校正因子测定供试品中某杂质或主成分含量

按各种药品测定方法的规定,精密称取对照品和内标物质,分别配成溶液,精密量取各溶液,配成测定校正因子所用的对照溶液,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 f :

$$f = \frac{A_s/m_s}{A_r/m_r}$$

式中 A_s ——内标物质的峰面积或峰高;

A_r ——对照品的峰面积或峰高;

m_s ——内标物质的量;

m_r ——对照品的量

再取含内标物质的供试品溶液,注入仪器,记录色谱图,测量供试品(或其杂质)峰和内标物质峰的峰面积或峰高,按下式计算含量:

$$m_i = f \times \frac{A_i}{A_s/m_s}$$

式中 f ——校正因子;

A_i ——供试品(或其杂质)峰面积或峰高;

A_s ——内标物质的峰面积或峰高;

m_i ——供试品(或其杂质)的量;

m_s ——加入内标物质的量。

当配制测定校正因子用的对照溶液和含有内标物质的供试品溶液是同一份内标物质溶液时,则配制内标物质溶液时,不必精密称取内标物质。

内标物质应是供试品不含有的成分,应能与待测成分峰或其杂质峰完全分离,内标物在溶液中稳定,其杂质对待测成分也应完全分离,并应与待测成分峰靠近一些。内标法是一种相对测量法,待测成分与内标物质同时进样,在同样条件下记录色谱图。进样量的准确程度和操作条件略有变化,均不影响测定结果,是一种准确的定量方法。药典中常应用内标法测定供试品含量或检查杂质限量。例如测定维生素 E 含量时,取正三十二烷为内标物配成 1.0mg/ml 内标溶液。另取维生素 E 对照品用上述内标溶液为溶剂配对含维生素 E 2.0mg/ml 的溶液。取此溶液 1~3 μ l 注入气相色谱仪,记录色谱图,计算校正因子。另取供试品约 20mg,精密称定,也用上述内标溶液为溶剂准确配成 10ml 溶液为供试品溶液。取 1~3 μ l 注入气相色谱仪,记录色谱图,计算供试品中维生素 E 的含量。

3. 不加校正因子面积归一化法测定各杂质及杂质的总量限度

按各药品检查项下的规定配制供试品溶液。取一定量注入气相色谱仪,记录相当于主成分峰保留时间数倍的色谱图。计算各杂质峰面积及其总和,计算各杂质及其总和所占的百分比,用本法测定结果时,溶剂峰不计算在总面积中。

$$\text{被测组分, \%} = \frac{\sum A_i}{\sum A} \times 100\%$$

式中 $\sum A_i$ ——被测组分峰面积之和;

$\sum A$ ——全部峰面积之和

例如药典中用此法检查三唑仑中的有关物质, 规定除溶剂峰外所有杂质峰峰面积的总和不得超过主峰面积的 1.5%。又如检查盐酸哌唑嗪中异戊醇残留量, 不得超过 0.1% g/g。再如检查氯贝丁酯及其胶囊中挥发性杂质的限量。

4. 不加校正因子, 内标法测定供试品中杂质的总量限度

取供试品, 按各品种项下规定的方法配制不含内标物质的供试品溶液, 注入仪器, 记录色谱图 I; 再配制含有内标物质的供试品溶液, 在同样条件下注样, 记录色谱图 II。记录的时间除另有规定外, 应为该品种项下规定的内标峰保留时间的数倍, 色谱图上的内标峰高应为记录仪满标度的 30% 以上, 否则应调整注样量或检测器灵敏度。在图 5-5-36 中去掉 1 号峰 (内标峰) 所剩余的色谱图即可代表色谱图 I。图 5-5-36 可代表色谱图 II, 1 号峰 (内标峰) 的峰高约为纵坐标满标度的 30%, 1 号峰的保留时间近 5min, 而整个色谱图的记录时间为 15min, 相当于内标峰保留时间的 3 倍。

如果色谱图 I 中没有与色谱图 II 上内标峰保留时间相同的杂质峰, 则色谱图 II 中各杂质峰面积之和应小于内标物质峰面积 (溶剂峰不计在内)。即图 5-5-36 中, 处于 1 号峰前后的两个杂质峰面积之和应小于 1 号峰面积。如果色谱图 I 中有与色谱图 II 上内标物质峰保留时间相同的杂质峰, 应将色谱图 II 上的内标物质峰面积减去色谱图 I 中此杂质峰面积, 即为内标物质峰的校正面积; 色谱图 II 中各杂质峰总面积加色谱图 I 中此杂质峰面积, 即为各杂质峰的校正总面积, 各杂质峰的校正总面积应小于内标物质峰的校正面积。

中国药典 (1995) 中用本法检查氟烷中的挥发性杂质, 见图 5-5-36; 检查华法林钠中的异丙醇限量; 检查秋水仙碱中的溶剂残留总量; 检查盐酸芬氟拉明中的 N-乙基- α -甲基-4-三氟甲基苯乙胺; 检查酞丁安中二氧六环的限量 (14.0% ~ 20.0%)。

四、裂解气相色谱法

气相色谱法仅限于分析易挥发的物质, 对于大分子、难挥发的物质必须预先制备成易挥发的衍生物才能分析, 而对高聚物及非常复杂的生化物质 (如生物大分子、细菌、细胞等) 的分析就难以胜任。1959 年 Martin 和 Folmer 等首次将裂解器和气相色谱仪联用, 开辟了用气相色谱法分析研究高分子、

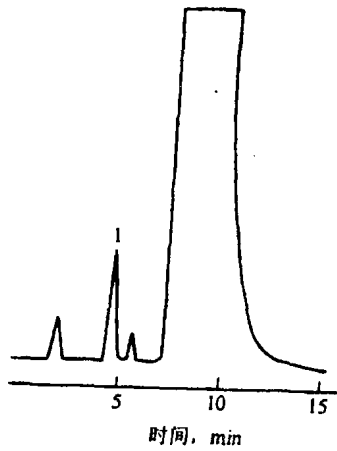


图 5-5-36 氟烷气相色谱图

1—内标峰

生物大分子的新途径。这种新的色谱法称为裂解气相色谱法 (pyrolysis gas chromatography; PGC) 简称裂解色谱法。它是在严格控制的操作条件下, 使少量天然或合成的高分子化合物, 进行高温热裂解, 生成的低分子热裂解产物在气相色谱仪内进行分离分析。由于裂解碎片的组成、相对含量与被测物质的结构密切相关, 因此每种物质的裂解色谱图具有各自的特征, 称为“指纹”热解色谱图, 用其作为“指纹”鉴定高分子化合物。根据热裂解色谱图反映出的物质结构、组成的特征碎片, 可对混合物中各组分进行定性、定量分析。由于裂解气相色谱具有灵敏度高、分析速度快、造价低, 特别是与质谱、付里叶变换红外光谱仪联用, 可以对裂解产物进行鉴定, 为高分子化合物的组成、结构、裂解研究提供了丰富的资料。

用裂解色谱法分析中草药见于 1981 年日本学者的报道, 在医学诊断方面也有很多应用。

(一) 裂解色谱的基本原理

1. 裂解色谱的特点

(1) 色谱柱具有高分离效能, 对于结构相似或同类高分子之间的微小差异, 都能在裂解图上灵敏地反映出来, 找到相应的特征。由于干扰组分彼此分离, 结果易于解释, 数据处理简单, 分析速度快。

(2) 各种类型、状态的样品, 不需要分离直接进样分析。可以分析固化树脂、涂料等不溶、不溶材料。

(3) 由裂解碎片色谱图, 不仅可以了解材料的组成, 还可以获得许多结构方面的信息。

(4) 仪器设备简单、价廉，易于推广。

2. 裂解机理

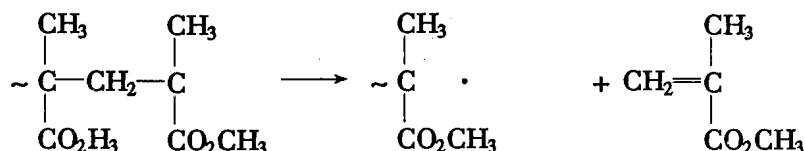
裂解色谱系将高聚物裂解成挥发性的小分子，然后用气相色谱法进行分离鉴定，从而可了解高聚物裂解机理，用来估计样品可能发生的反应及其产物，以便选择条件，解释实验结果，这些对裂解色谱都是十分必要的。

裂解色谱主要是通过加热或光照的方法，对物质进行裂解。裂解温度一般在 400 ~ 900℃ 间。在一定条件下，虽然高聚物分子结构不同，但裂解时都是遵循着某些反应规律进行的。因此所得裂解产物就具有特征性和统计性，这就是裂解色谱法分析高聚物的基础。

烯烃高聚物裂解大致有三种方式：

(1) 解聚（或称毁聚）。

此种裂解主要产物为单位。凡是具有 α -取代基单体聚合的高聚物，大都趋向这种裂解。如聚甲基丙烯酸甲酯等，裂解时单体产量大于 90%。

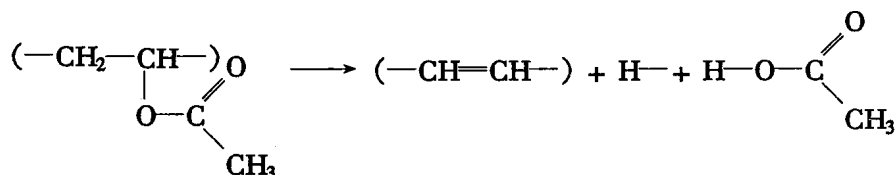


(2) 无规断链

一般不含季碳原子的烯基聚合物按此方式裂解。其裂解产物按碳数分布较宽，单体产量较低。

(3) 非断链。

当聚合物容易进行消除反应时，出现非断链裂解。如聚酯酸乙烯：



由于所产生的挥发性产物与该聚合物或共聚物的单位浓度有关，这类反应在定量研究中特别有用。

以上裂解机理表明，高聚物总是按某种方式裂解，产生一定的小分子。裂解产物不仅反映原来高聚物的结构特征，也和原高聚物在量上保持对应关系。

(二) 裂解器

裂解色谱发展中存在的主要问题，是同一样品在不同实验室间所得结果的重现性较差。这种裂解的不一致主要来源于装置和操作技术的彼此巨大差别。为了使每一种裂解色谱体系能适应分析的要求，就要严格控制和测定裂

解色谱的所有参数，才能获得有意义的和重现的裂解色谱图。样品是在裂解器中裂解的。其结构与性能直接关系到裂解的结果。

各种裂解器在设计上虽然差异很大，但均需满足一些共同的要求：死体积小，热容量高、升温速率快、与样品接触的材料无催化作用，样品计量和进行操作方便等。

裂解中一个重要参数是样品达到裂解温度所需要的时间。样品的升温时间对裂解产物影响很大。一般升温快，生成低分子量的物质多些，这是因为没有充分时间使小分子重新组合成较大分子所致。在裂解器设计中，与高聚物样品接触的部件材料多用金和铂制造，以防在高温裂解时产生催化作用，使裂解产物起了变化，从而难以了解其规律。在高温下，裂解器材料很易老化，导致升温时间及最终裂解温度的改变。

为了获得有意义的能重现的结果，要注意加入裂解器样品的数量。样品量过大，不仅影响样品的温度均匀，也影响达到需要温度的时间，并使最终温度不能确定。

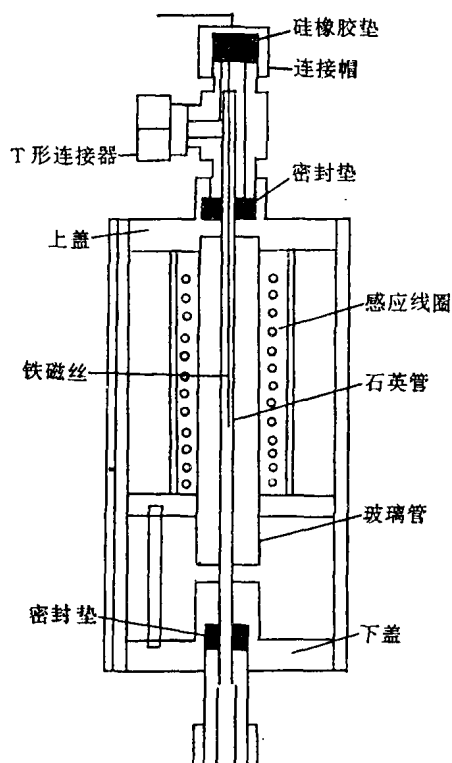


图 5-5-37 居里点裂解头结构示意图

常用的裂解器有以下几种：

1. 蒸气裂解器

它是一个管式反应器,液体样品从加热器注入,蒸气在反应器中裂解。裂解温度能在很大范围内连续变动。这种裂解装置样品量不能超过 $1\mu\text{l}$,否则难以得到重现的结果。

2. 管式炉裂解器

由石英管制成,电炉加热,裂解温度为 $300\sim 1000^{\circ}\text{C}$,恒温精密度高。样品置于铂金小舟内,通过样品杆将样品舟送入裂解炉。这种装置结构简单,能定量进样,操作方便。主要缺点是死体积大,易产生二次反应。

3. 热丝裂解器

裂解是在一根热丝上进行,热丝用稳定电压加到恒定温度。样品涂在丝上或放在绕成盘状的丝上,将热丝置于石英或玻璃管中,然后通电(约 10A)一定时间(约 5 秒),使样品瞬间裂解,裂解产物被载气带入色谱柱中分离。这种裂解器结构比较简单,加热时间短,二次反应少。缺点是升温速率较慢,不便定量进样,一般只用于定性鉴定。

4. 居里点裂解器

它是一种高频感应加热裂解器,其结构见图 5-5-37。如果将一根铁磁铁丝装在一个线圈内,并给线圈通入高频电流,则在铁磁丝内产生感应电流,使铁磁丝加热,加热速率很快,在较短时间铁磁丝的温度就达到居里点温度(居里点是一种由铁磁到顺磁的磁转变温度),在热动平衡状态下,铁磁丝稳定在居里点附近几度内。

这种裂解器升温时间短,平衡温度可精确控制和严格重现,使裂解图的重现性大大提高,是一种较理想的裂解器。目前上海分析仪器厂生产的 103 气相色谱仪带有居里点裂解器。定性、质量重现性良好。

5. 激光裂解器

这是一种比较新的裂解装置。激光裂解温度很高,升温速率极快,裂解色谱图简单,重现性好,但因使用激光发生器,造价较高。这种裂解器特别适用于合成材料的研究。

(三) 裂解色谱的操作条件

热裂解反应基本上分为两类:一类是热降解,另一类为热裂解。

热降解反应温度比较低。降解产物与原化合物分子量差别不大,大多数情况下没有 C-C 键的断裂。如高级醇脱水,生成相应烯;微生物、蛋白质降解生成脂肪胺、脂肪酸等。

热裂解是高分子有机化合物在 $500\sim 1100^{\circ}\text{C}$ 发生共价键破裂生成自由基,一般是 C-C 键断裂。自由基再进一步裂解、重排,重新组合成稳定的低分子。裂解过程是随机的,在相同条件下裂解反应能够重复。