

0502 薄层色谱法

薄层色谱法系将供试品溶液点~~样~~于薄层板上，在展开容器内用展开剂展开，使供试品中所含成分分离，所得色谱图与适宜的标准物质按同法~~测定~~所得的色谱图~~比较~~对比，亦可用薄层色谱扫描仪进行扫描，用于鉴别、检查或含量测定。

1. 仪器与材料

(1) 薄层板 按支持物的材质分为玻璃板、塑料板或铝板等；按固定相种类分为硅胶薄层板、键合硅胶~~薄层板~~、微晶纤维素薄层板、聚酰胺薄层板、氧化铝薄层板等。固定相中可加入黏合剂、荧光剂。硅胶薄层板常用的有硅胶 G、硅胶 GF₂₅₄、硅胶 H、硅胶 HF₂₅₄，G~~和~~和 H 分别表示含或不含石膏黏合剂~~，~~，F₂₅₄ 为在紫外光 254nm 波长下显绿色背景的荧光剂。按固定相粒径大小分为普通薄层板（10~40 μ m）和高效薄层板（~~52~~~10 μ m）。

在保证色谱质量的前提下，可对薄层板进行特别处理和化学改性以适应分离的要求，可用实验室自制的薄层板。固定相颗粒大小一般要求粒径为 10~40 μ m~~，~~，玻板应光滑、平整，洗净后不附水珠。

(2) 点样器 一般采用微升毛细管或手动、半自动、全自动点样器材。

(3) 展开容器 上行展开一般可用适合薄层板大小的专用平底或双槽展开缸，展开时~~需~~须能密闭。水平展开用专用的水平展开槽。

(4) 显色装置 喷雾显色应使用玻璃喷雾瓶或专用喷雾器，要求用压缩气体使显色剂呈均匀细雾状喷出；浸渍显色可用专用玻璃器~~皿~~械或用适宜的~~玻璃缸~~展开缸代替；蒸汽熏蒸显色可用双槽展开缸或适宜大小的干燥器代替。

(5) 检视装置 为装有可见光、254nm 及 365nm 紫外光源及相应的~~滤光片~~滤光片的暗箱，可附加摄像设备供拍摄图像用。暗箱内光源应有足够的光照度。

(6) 薄层色谱扫描仪 系指用一定波长的光对薄层板上有吸收的斑点，或经激发后能发射出荧光的斑点，进行扫描，将扫描得到的谱图和积分数据用于物质定性或定量~~分析~~分析的分析仪器。

2. 操作方法

(1) 薄层板制备

市售薄层板 临用前一般应在 110℃活化 30 分钟。聚酰胺薄膜不需活化。铝基片薄层板、~~塑料薄层板~~塑料薄层板可根据需要剪裁，但须注意剪裁后的薄层板底边的固定相层不得有破损。如在存放期间被空气中杂质污染，使用前可用三氯甲烷、甲醇或二者的混合溶剂在展开缸中上行展开预洗，晾干，110℃活化~~后~~，置干燥器中备用。

自制薄层板 除另有规定外，将 1 份固定相和 3 份水（或加有黏合剂的水溶液，如 0.2%~0.5%羟甲基纤维素钠水溶液，或~~为~~规定浓度的改性剂溶液）在研钵中按同一方向研磨混合，去除表面的气泡后，倒入涂布器中，在玻~~璃~~板上平稳地移动涂布器进行涂布（厚度为 0.2~0.3mm），取下涂好的~~薄层的玻板~~薄层的玻板，置水平台上于室温下晾干后，在 110℃烘 30

分钟，随即置于有干燥剂的干燥箱中备用。使用前检查其均匀度，在反射光及透射光下检视，表面应均匀、平整、光滑，并且无麻点、无气泡、无破损及污染。

(2) 点样 除另有规定外，在洁净干燥的环境中，用专用毛细管或配合相应的半自动、自动点样器械点样于薄层板上。一般为圆点状或窄细的条带状，点样基线距底边 10~15mm，高效薄层板一般基线距底边 8~10mm。圆点状样点直径一般不大于 4mm，高效板一般不大于 2mm。接触点样时注意勿损伤薄层表面。条带状样点宽度一般为 5~10mm，高效薄层板条带宽度一般为 4~8mm，可用专用半自动或自动点样器械喷雾法点样。点间距离可视斑点扩散情况以相邻斑点互不干扰为宜，一般不小于 8mm，高效薄层板供试品间隔不小于 5mm。

(3) 展开 将点好供试品的薄层板放入展开缸中，浸入展开剂的深度为距原点 5mm 为宜，密闭。除另有规定外，一般上行展开 8~15cm，高效薄层板上行展开 5~8cm。溶剂前沿达到规定的展距，取出薄层板，标记溶剂前沿，晾干，待检测。

展开前如需要溶剂蒸汽预平衡，可在展开缸中加入适量的展开剂，密闭，一般保持 15~30 分钟。溶剂蒸汽预平衡后，应迅速放入载有供试品的薄层板，立即密闭，展开。如需使展开缸达到溶剂蒸汽饱和的状态，则须在展开缸的内壁贴与展开缸高、宽同样大小的滤纸，一端浸入展开剂中，密闭一定时间，使溶剂蒸汽达到饱和再依法展开。

必要时，可进行二次展开或双向展开，进行第二次展开前，应使薄层板残留的展开剂完全挥干。

(4) 显色与检视 有颜色的物质可在可见光下直接检视，无色物质可用喷雾法、或浸渍法或熏蒸法以适宜的显色剂显色，或加热显色，在可见光下检视。有荧光的物质或显色后可激发产生荧光的物质可在紫外光灯（365nm 或 254nm）下观察荧光斑点。对于在紫外光下有吸收的成分或用其他方法无法检视的物质，可用带有荧光剂的薄层板（如硅胶 GF₂₅₄ 薄层板），在紫外光灯（254nm）下观察荧光板面上形成的荧光物质淬灭形成的斑点暗斑。

(5) 记录 薄层色谱图像一般可采用摄像设备拍摄，以光学照片或电子图像的形式保存。也可用薄层色谱扫描仪扫描或其他适宜的方式记录相应的色谱图。

3. 系统适用性试验 按各品种项下要求对实验条件进行系统适用性试验，即用供试品和标准物质对实验条件进行试验和调整，应符合规定的要求。

(1) 比移值 (R_f) 系指从基线至展开斑点中心的距离与从基线至展开剂前沿的距离的比值。

$$R_f = \frac{\text{基线至展开斑点中心的距离}}{\text{基线至展开剂前沿的距离}}$$

除另有规定外，杂质检查时，各杂质斑点的比移值 R_f 以在 0.2~0.8 之间为宜。

(2) 检出限 系指限量检查或杂质检查时，供试品溶液中被测物质能被检出的最低浓度或质量。一般采用已知浓度的供试品溶液或对照标准溶液，与稀释若干倍的自身对照标准溶液在规定的色谱条件下，在同一薄层板上点样、展开、检视，后者显清晰可辨斑点的浓度或质量作为检出限。

(3) 分离度(或称分离效能) 鉴别时, 供试品与标准物质色谱中的斑点均应清晰分离。~~当在薄层色谱扫描法用于限量检查和含量测定时, 要求定量待测峰与相邻峰之间有较~~良好的分离度, ~~两峰分离度~~ (R_s) ~~可用下列的计算公式为计算:~~

$$\del{R_s = 2(d_2 - d_1) / (W_1 + W_2)}$$

$$R_s = \frac{1.18a(R_{f2} - R_{f1})}{(W_{h/2,1} + W_{h/2,2})} \quad \text{或} \quad R_s = \frac{2(d_2 - d_1)}{(W_1 + W_2)}$$

式中, R_{f2} , R_{f1} 分别为两峰的比移值, $R_{f2} > R_{f1}$;

d_2 , d_1 分别为相邻两峰与原点的距离, $d_2 > d_1$;

$W_{h/2,1}$, $W_{h/2,2}$ 分别为相邻两峰的半高峰宽;

W_1 , W_2 分别为相邻两峰的峰宽;

a 为展开剂迁移(展开)距离。

除另有规定外, 分离度应大于 1.0。

当有异议时, 分离度 (R_s) 应以半高峰宽 ($W_{h/2}$) 的计算结果为准。

~~d_2 为相邻两峰中后一峰与原点的距离,~~

~~d_1 为相邻两峰中前一峰与原点的距离,~~

~~除另有规定外, 分离度应大于 1.0。~~

在用于化学药品杂质检查的方法选择时, 可将杂质对照品用供试品自身稀释的对照溶液溶解制成混合对照溶液, 也可将杂质对照品用待测组分的对照品溶液溶解制成混合对照标准溶液, 还可采用将供试品以适当的方法降解方法获得的溶液作为对照溶液, 上述溶液点样展开后的色谱图中, 应显示清晰分离的斑点。

(4) 相对标准偏差 薄层色谱扫描法用于含量测定时, 同一供试品溶液在同一薄层板上平行点样的待测成分的峰面积测量值的相对标准偏差应不大于 5.0%; 需显色后测定的或者异板的相对标准偏差应不大于 10.0%。

4. 色谱条件调整

品种正文项下规定的色谱条件可作如下调整:

展开剂的组成比例: 占比小的组分, 可在相对值 $\pm 30\%$ 或绝对值 $\pm 2\%$ 范围, 取较大者进行调整; 其他组分的调整不得过绝对值 $\pm 10\%$ 。占比小的组分是指小于或等于

($100/n$) % 组分, n 是展开剂中各组分个数。当展开剂由 3 个组分组成, 如某组分占比为 10%, 为占比小的组分, 其相对值 $\pm 30\%$ 的范围是 7%~13%, 绝对值 $\pm 2\%$ 的范围是 8%~12%, 可在较大的相对值范围调整。

除另有规定外, 展开剂中水相组分的 pH 值可在 ± 0.2 pH 单位范围内调整。

展开剂缓冲组分中盐的浓度可在原规定值 $\pm 10\%$ 范围内调整。

点样体积: 如使用 2~10 μm 的细颗粒薄层板, 标准物质溶液可在规定点样体积的 10%~20% 范围调整, 供试品溶液根据检测要求可作相应调整, 以与标准物质的点样量相适应。使用其它粒度薄层板, 可根据检测需求适当调整点样体积。

应评价色谱条件调整对分离和检测的影响, 必要时对调整后的方法进行确认。若调整超出上述或品种项下规定的范围, 将被认为是对方法的修改, 需要进行充分的方法学验证。

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。

4.5. 测定法

(1) 鉴别 按各品种项下规定的方法，制备供试品溶液和对照标准溶液，在同一块薄层板上点样、展开与检视，供试品色谱图中所显主斑点的位置~~与~~和颜色（或荧光）应与标准物质色谱图的斑点一致。必要时化学药品可采用供试品溶液与标准溶液混合点样、展开，与标准物质相应斑点应为单一、紧密斑点。

(2) 限量检查与杂质检查 按各品种项下规定的方法，制备供试品溶液和对照标准溶液，并按规定的色谱条件点样、展开和检视。供试品溶液色谱图中待检查的斑点与相应的标准物质斑点比较，颜色（或荧光）不得更深；或照薄层色谱扫描法操作，测定峰面积值，供试品色谱图中相应斑点的峰面积值不得大于标准物质的峰面积值。含量限度检查应按规定测定限量。

化学药品杂质检查可采用杂质对照法、供试品溶液的自身稀释对照法~~或~~或两法并用。供试品溶液除主斑点外的其他斑点与相应的杂质对照标准溶液或系列浓度杂质对照标准溶液的相应主斑点比较，不得更深~~；~~或与供试品溶液自身稀释对照溶液或系列浓度自身稀释对照溶液的相应主斑点比较，不得更深。通常应规定杂质的斑点数和单一杂质质量，当采用系列自身稀释对照溶液时，也可规定估计的杂质总量。

(3) 含量测定 照薄层色谱扫描法，按各品种项下规定的方法，制备供试品溶液和对照标准溶液，并按规定的色谱条件点样、展开、扫描测定。或将待测色谱斑点刮下经洗脱后，再用适宜的方法测定。

5.6. 薄层色谱扫描法 系指用一定波长的光照射在薄层板上，对薄层色谱中可吸收紫外光或可见光的斑点，或经激发后能发射出荧光的斑点进行扫描，将扫描得到的图谱及积分数据用于鉴别、检查或含量测定。可根据不同薄层色谱扫描仪的结构特点，按照规定方式扫描测定，一般选择反射方式，采用吸收法或荧光法。除另有规定外，含量测定应使用市售薄层板。

扫描方法可采用单波长扫描或双波长扫描。如采用双波长扫描，应选用待测斑点无吸收或最小吸收的波长为参比波长，供试品色谱图中待测斑点的比移值（ R_f 值）、光谱扫描得到的吸收光谱图或测得的光谱最大吸收和最小吸收应与对照标准溶液相符，以保证测定结果的准确性。薄层色谱扫描~~法~~定量测定应保证供试品斑点的量在线性范围内，必要时可适当调整供试品溶液的~~点样量~~，供试品与标准物质同板点样、展开、扫描、测定和计算。

薄层色谱扫描~~法~~用于含量测定时，通常采用线性回归二点法计算，如线性范围很窄时，可用多点法校正多项式回归计算。供试品溶液和对照标准溶液应交叉点于同一薄层板上，供试品~~溶液~~点样不得少于2个，~~对照标准物质溶液~~每一浓度不得少于2个。扫描时，应沿展开方向扫描，不可横向扫描。