

附件：0514 分子排阻色谱法草案公示稿（第一次）

0514 分子排阻色谱法

分子排阻色谱法是根据待测组分的分子大小进行分离的一种液相色谱技术。分子排阻色谱法的分离原理为凝胶色谱柱的分子筛机制。色谱柱多以亲水硅胶、凝胶或经过修饰的凝胶如葡聚糖凝胶（Sephadex）和琼脂糖凝胶（Sephарose）等为填充剂，这些填充剂表面分布着不同孔径尺寸的孔，~~药物~~
~~分子供试品溶液~~进入色谱柱后，它们中的不同组分按其分子大小进入或不进入相应的孔内，大于所有孔径的分子不能进入填充剂颗粒的任何孔内部，在色谱过程中不被保留，最早被随流动相洗脱至柱外，表现为保留时间较短；小于所有孔径的分子能自由进入填充剂表面颗粒的所有孔径内，在色谱柱中滞留时间较长，表现为保留时间较长；其余分子则按分子大小进入不同的孔径内，分子越小，进入孔的数量越多，滞留时间越长；反之，分子越大，滞留时间越短，从而使分子按其大小依次被依次洗脱。

1.对仪器的一般要求

分子排阻色谱法所需的仪器由输液泵、进样器、柱温箱（色谱柱）、检测器和数据处理系统等组成。~~进样器和检测器同高效液相色谱法（通则 0512），~~
~~液相色谱~~输液泵一般分常压、中压和高压泵。~~进样器和柱温箱同高效液相色谱法（通则 0512）。常用检测器有紫外-可见分光检测器、示差折光检测器、蒸发光散射检测器与静态光散射检测器等。在药物分析中，尤其是分子量或分子量分布测定中，通常采用高效分子排阻色谱法（HPSEC）。应选用填充~~
~~填与供试品分子大小相适应的填充剂的色谱柱填充剂。流动相可分为水相和有机相，使用的流动相水相通常为水溶液或、缓冲溶液或水与少量有机溶剂的互混溶液，溶液的 pH 值不宜超出填充剂的耐受力，一般 pH 值在 2~8 范围。流动相中可加入适量的有机溶剂，但不宜过浓，一般不应超过 30%，有机相通常为四氢呋喃和 N,N-二甲基甲酰胺等。流速不宜过快，一般为 0.5~1.0ml/min。~~

2.系统适用性试验

红色字体为删除内容，蓝色字体为增订内容

分子排阻色谱法的系统适用性试验中色谱柱的理论板数（ n ）、分离度、重复性、拖尾因子的测定方法，在一般情况下，同高效液相色谱法（通则 0512）项下方法，但在高分子杂质检查时，某些药物分子的单体与其二聚体不能达到基线分离时，其分离度的计算公式为可以用峰谷比 $\frac{p}{v}$ 来表示分离程度：

$$R = \frac{\text{二聚体的峰高}}{\text{单体与二聚体的谷高}}$$

$$\frac{p}{v} = \frac{\text{二聚体的峰高}}{\text{单体与二聚体之间的谷高}}$$

除另有规定外，分离度峰谷比应大于 2.0。

3.测定法

（1）分子量测定法 一般适用于蛋白质和多肽的分子量测定。按各品种项下规定的方法，选用与供试品分子大小相适宜的色谱柱和适宜分子量范围的标准物质。除另有规定外，标准物质与供试品均需使用二巯苏糖醇（DTT）和十二烷基硫酸钠（SDS）处理，以打开分子内和分子间的二硫键，并使分子的构型与构象趋于一致，经处理的蛋白质和多肽分子通常以线性形式分离，以标准物质分子量（ M_w ）的对数值对相应的保留时间（ t_R ）制得标准曲线的线性回归方程 $\lg M_w = a + bt_R$ ，供试品以保留时间由标准曲线回归方程计算其分子量或亚基的分子量。

（2）生物大分子聚合物分子量与分子量分布的凝胶渗透色谱（GPC）测定法 生物大分子聚合物如多糖、多聚核苷酸和胶原蛋白等具有分子大小不均一的特点，故生物大分子聚合物分子量与分子量分布是控制该类产品的关键指标。在测定生物大分子聚合物分子量与分子量分布时，选用与供试品分子结构与性质相同或相似的标准物质十分重要。

按各品种项下规定的方法，除另有规定外，同样采用分子量标准物质和适宜的 GPC 软件，以标准物质重均分子量（ M_w ）的对数值对相应的保留时间（ t_R ）制得标准曲线的线性回归方程 $\lg M_w = a + bt_R$ ，供试品采用适宜的 GPC 软件处理结果，并按下列公式计算出供试品的分子量与分子量分布。

$$M_n = \sum RI_i / \sum (RI_i / M_i)$$

$$M_w = \sum (RI_i M_i) / \sum RI_i$$

$$D=M_w/M_n$$

式中 M_n 为数均分子量;

M_w 为重均分子量;

D 为分布系数;

RI_i 为供试品在保留时间 i 时的峰高;

M_i 为供试品在保留时间 i 时的分子量。

(3) 分子排阻色谱-静态光散射 (SEC-SLS) 测定法

利用分子排阻色谱法, 将供试品中分子从大到小依次分离, 进入与其它检测器如示差检测器联用的静态光散射检测器, 激光器激发的光源照射含有经分离待测成分的溶液, 其散射光强度[表示为瑞利比 $R(\theta)$]与待测成分的分子量、浓度相关。

瑞利比公式如下所示:

$$\frac{K^* \times c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w \times P(\theta)} + 2A_2 \times c$$

式中, $R(\theta)$ 为瑞利比, 代表净散射光信号 (溶质散射信号值)。

k^* 为光对比参数, 等于 $4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 / (\lambda_0^4 N_A)$, $k^* = k \times (dn/dc)^2$, k 是一个常数, 等于 $\frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A}$; n_0 为溶剂折射率, N_A 为阿伏伽德罗常数, λ_0 为入射波长, dn/dc 为折射率增量, 描述折射率随分析物浓度的变化, 可以通过测定已知溶剂中各种浓度样品的折射率来获得, 以折射率 n 与浓度 c 做线性回归, 拟合的曲线斜率即为 dn/dc 。

c 为供试品溶液浓度, mg/ml。

$P(\theta)$ 为形状因子, 等于 $1 + (16\pi^2/3\lambda^2)(r_g^2)\sin^2(\theta/2)$ 。当角度 θ 较小时, 由于 $\sin^2(\theta/2)$ 趋近于 0, 因此 $P(\theta) \approx 1$; λ 为相对散射波长, 等于 λ_0/n 。

A_2 为第二维里系数; 描述非理想溶液中分子之间的相互作用。在理想的系统/溶液中, $A_2=0$ (即分子间没有相互作用), 并且散射光的强度将随浓度线性增加。在稀溶液中分子间的相互作用变得更少, 当浓度 (c) 趋近于 0 时, 可以合理地假设 $A_2=0$ 。

M_w 为分析物/溶质的重均摩尔质量 (分子量)。

r_g 为均方根半径, 相当于球形粒子半径, 表示分子大小。

静态光散射器可分为小（又称低）角度激光散射检测器和多角度激光散射检测器。在几种典型实验情况下，瑞利比计算公式转换为下表中的计算方程。1）小角度在稀溶液测量散射，提供样品分子量的信息；2）小角度测量系列浓度散射，提供分子量和溶液非理想性信息；3）多角度在稀溶液测量散射，提供分子量和分子大小信息；4）多角度测量系列浓度散射，提供分子量、分子大小和溶液非理想性信息。一般来说，为同时获得 M_W 、 A_2 和 r_g 的值，需要在至少三个不同角度上测量，通常角度越多，测量的结果越准确。

几种典型实验的计算方程表

	稀溶液	系列浓度
小角度光散射（LALS）	$\frac{K^* \times c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_W}$ 输出：仅 M_W	$\frac{K^* \times c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_W} + 2A_2c$ 输出： M_W 和 A_2
多角度光散射（MALS）	$\frac{K^* \times c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_W} \left(1 + \frac{q^2 r_g^2}{3} \right)$ 输出： M_W 和 r_g^2	$\frac{K^* \times c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_W} \left(1 + \frac{q^2 r_g^2}{3} \right) + 2A_2c$ 输出： M_W 、 r_g^2 和 A_2

使用静态光散射检测器测定分子量时，为校正当前系统，小角度光散射检测器使用已经校正的分子量对照品来获取“绝对”散射强度和瑞丽散射关系系数；多角度光散射检测器使用纯溶剂-甲苯来获取该系数。水相系统常使用牛血清白蛋白或葡聚糖，有机相系统常使用窄分布聚苯乙烯或其它经过光散射方法标定的分子量对照品确认系统的准确性，以测得分子量与对照品标示分子量比较的偏差值 S 考察系统准确性，S 通常应不大于 5%。

操作步骤

按各品种项下规定的方法，除另有规定外，取供试品以适宜的溶剂配制供试品溶液，用与供试品分子大小范围相适宜的色谱柱分离后，用品种项下规定的静态光散射检测器检测，根据所采集到的光散射信号和由示差折光检测器提供的对应折射率增量(dn/dc)，按上表中的计算方程，或通过齐姆(Zimm)作图法或直接使用光散射专用软件计算分子量和分子量分布。

(34) 高分子杂质测定法 高分子杂质系指供试品中含有分子量大于药物分子的杂质，通常是药物在生产或贮存过程中产生的高分子聚合物或生产过程中未除尽的可能产生过敏反应的高分子物质。

按各品种项下规定的色谱条件进行分离。

定量方法

①主成分自身对照法 同高效液相色谱法（通则 0512）项下规定。一般用于高分子杂质含量较低的品种。

②面积归一化法 同高效液相色谱法（通则 0512）项下规定。

③限量法 除另有规定外，规定不得检出保留时间小于标准物质保留时间的组分，一般用于混合物中高分子物质的控制。

④自身对照外标法 一般用于 Sephadex G-10 凝胶色谱系统中 β -内酰胺抗生素中高分子杂质的检查。在该分离系统中，除部分寡聚物外， β -内酰胺抗生素中高分子杂质在色谱过程中均不保留，即所有的高分子杂质表现为单一的色谱峰，以供试品自身为对照品，按外标法计算供试品中高分子杂质的相对百分含量。

【附注】Sephadex G-10 的处理方法

色谱柱的填装 装柱前先将约 15g 葡聚糖凝胶 Sephadex G-10 用水浸泡 48 小时，使之充分溶胀，搅拌除去空气泡，徐徐倾入玻璃或其他适宜材质的柱，一次性装填完毕，以免分层，然后用水将附着玻璃管壁的 Sephadex G-10 洗下，使色谱柱面平整，新填装的色谱柱要先用水连续冲洗 4~6 小时，以排出柱中的气泡。

供试品的加入 进样可以采用自动进样阀，也可以直接将供试品加在床的表面（此时，先将床表面的流动相吸干或渗干，立即将供试品溶液沿着色谱管壁转圈缓缓加入，注意勿使填充剂翻起，待之随着重力的作用渗入固定相后，再沿着色谱管壁转圈缓缓加入 3~5ml 流动相，以洗下残留在色谱管壁的供试品溶液）。

起草单位：广州市药品检验所

联系电话：020-26283409

0514 分子排阻色谱法修订说明

一、制修订的目的意义

根据近年来国内外药典分子量与分子量分布测定方法发展情况，在对企业与仪器公司调研基础上，结合当前主流分子排阻色谱应用技术与实验数据提出本修订草案，使其更加科学、合理，与国际通用技术要求接轨。

二、主要修订内容

- 对概述中的部分描述进行修订。
- 在“1. 对仪器的一般要求”项下，补充分子排阻色谱法所需仪器组成的表述，增加常用检测器表述。
- 在“2. 系统适用性试验”部分以峰谷比 $\frac{p}{v}$ 替换原有分离度的表述。
- “测定法”项下“生物大分子聚合物分子量与分子量分布的测定法”修订为“凝胶渗透色谱（GPC）测定法”。
- “测定法”项下增加“（3）分子排阻色谱-静态光散射（SEC-SLS）测定法”内容。