



中华人民共和国国家标准

GB/T 16631—2008
代替 GB/T 16631—1996

高效液相色谱法通则

General rules for high performance liquid chromatography

2008-06-18 发布

2009-02-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 高效液相色谱法概述	3
5 水、试剂和溶剂	5
6 取样及预处理的操作	5
7 仪器配置	6
8 洗脱剂	8
9 色谱柱和柱填料	10
10 仪器安装的环境要求和安全	11
11 测量和试料的制备	12
12 分析步骤	13
13 定性分析	14
14 定量分析	14
15 分子量分布的测量	18
16 制备型液相色谱法	19
17 数据质量的保证	19
18 专项标准中涉及的项目	21
附录 A (资料性附录) 本标准章条编号与 JIS K 0124—2002 章条编号对照	23

前 言

本标准修改采用日本工业标准 JIS K 0124—2002《高效液相色谱法通则》(英文版)。

本标准根据 JIS K 0124—2002 重新起草。在附录 A 中列出了本标准章条编号与 JIS K 0124—2002 章条编号的对照一览表。

考虑到我国国情,本标准与 JIS K 0124—2002 的主要差异如下:

- 引用了我国国家标准 GB/T 9008—2007(本标准第 2 章);
- 删除了 GB/T 9008—2007 中已有的术语和定义(本标准第 3 章);
- 对试剂和溶剂规格分别进行了规定(本标准的 5.2 和 5.3)。

本标准代替 GB/T 16631—1996《柱液相色谱分析法通则》。

本标准与 GB/T 16631—1996 相比主要变化如下:

- 删除了 1996 年版标准的资料性附录附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F、附录 K、附录 M、附录 N、附录 P;
- 增加了第 3 章“术语和定义”、第 5 章“水、试剂和溶剂”、第 6 章“取样及预处理的操作”、第 16 章“制备型液相色谱”、第 17 章“数据质量的保证”和第 18 章“专项标准中涉及的项目”;
- 修改了标准名称(见 1996 年版和本版标准的封面);
- 修改了标准范围(见 1996 年版和本版标准的第 1 章);
- 修改了高效液相色谱法概述(1996 年版第 3 章;本版第 4 章);
- 修改了有关仪器配置的规定(1996 年版第 4 章;本版第 7 章);
- 修改了有关洗脱剂的规定(1996 年版第 5 章;本版第 8 章);
- 修改了有关色谱柱和柱填料的规定(1996 年版第 6 章、第 9 章;本版第 9 章);
- 修改了仪器安装的环境要求和安全要求(1996 年版附录 G、附录 H;本版第 10 章);
- 修改了有关测量/制备前的准备工作的规定(1996 年版第 7 章;本版第 11 章);
- 修改了有关操作过程的规定(1996 年版第 8 章、第 10 章、附录 J;本版第 12 章);
- 修改了有关定性分析的规定(1996 年版第 11 章;本版第 13 章);
- 修改了有关定量分析的规定(1996 年版第 12 章、附录 L;本版第 14 章);
- 修改了有关分子量分布的测量的规定(1996 年版第 13 章;本版第 15 章)。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中国石油和化学工业协会提出。

本标准由全国化学标准化技术委员会(SAC/TC 63)归口。

本标准由中国石油化工股份有限公司北京燕山分公司、中化化工标准化研究所负责起草。

本标准主要起草人:黄铃、徐泽峰、杨建海、魏静。

本标准于 1996 年 12 月首次发布。

高效液相色谱法通则

1 范围

本标准规定了使用高效液相色谱法进行的定性定量分析和提纯精制的通用规则。

本标准适用于使用高效液相色谱法对无机、有机化合物的定性定量分析及提纯精制,以及对高分子化合物的分子量的测定的一般要求。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 9008 液相色谱法术语 柱色谱法和平面色谱法

3 术语和定义

GB/T 9008 确立的以及下列术语和定义适用于本标准。

3.1

高效液相色谱仪 high performance liquid chromatograph
进行高效液相色谱分析的仪器。

3.2

分析物 analyte
样品或样品溶液中存在的待分析的目标组分。

3.3

样品溶液 sample solution
样品溶解在其中的溶液或提取用于分析的溶液。

3.4

试样溶液 test sample solution
用于测试的样品溶液本身或预处理过的样品溶液

3.5

泵 pump
驱动流动相(洗脱剂)的设备。

3.6

自动进样器 automatic sample injector, auto sampler
自动将试样溶液接连地注射进到液相色谱仪的柱子中的设备。

3.7

柱箱 column compartment
色谱柱置于其中的容器。

3.8

色谱柱管 chromatographic tube
柱填料被填充在其中的圆形柱管,其两端装配有过滤器等部件。

3.9

对称因子 symmetry factor

表征色谱峰的对称程度的因子。由下列方程得到：

$$S = W_{0.05h} / 2f$$

式中, S ——对称因子；

$W_{0.05h}$ ——从峰基线测得的 1/20 峰高处的峰宽度；

f ——从峰顶点向记录纸的水平轴划垂直线, 与 $W_{0.05h}$ 峰宽线相交, 峰的前侧的距离定义为 f ；

$W_{0.05h}$ 和 f 单位相同。

3.10

柱前衍生化 precolumn derivatization, precolumn labeling

样品组分在进到色谱柱之前, 与衍生试剂反应进行衍生化的过程。

3.11

柱后衍生化 postcolumn derivatization, postcolumn labeling

样品组分在色谱柱分离之后, 加衍生试剂到洗出液中进行衍生化的过程。

3.12

标准溶液 reference solution

其特征值如浓度或分子量是已知的并确定足以用作液相色谱分析的标样的溶液。

3.13

分离模式 separation mode

主要由液相色谱分离机理进行分类的操作模式。

3.14

稀释标准溶液 diluted reference solution

被稀释成一定浓度的标准溶液。

3.15

混合标准溶液 mixed reference solution

通过混合一种以上标准溶液或稀释标准溶液制备的含规定浓度样品组分的溶液。

3.16

内标物 internal standard

内标法中用作标样的物质。

3.17

分子量分布 molecular weight distribution

与分子量有多分散性的化合物有关。表示了各种分子作为分子量函数的量。

3.18

分级 fractionation

通过色谱柱分离和洗脱取得分析物的操作。

3.19

流分 fraction

通过分级操作分离得到的溶液。

3.20

方法确认 method validation

证明使用高效液相色谱的分析方法适合分析目的的各种测试。

4 高效液相色谱法概述

4.1 液相色谱法(LC)是一种具有下述特征的物理和化学分离分析方法。它使用液体作为流动相,每种分析物在色谱柱的固定相和流动相间的相互作用存在差别,这种差别被利用来分离混合物。流动相被加压传送以取得短时间内的分离的高效液相色谱分析方法被称为高效液相色谱法(HPLC)。用于高效液相色谱法的设备被称为高效液相色谱仪。

4.2 LC可应用于测定非挥发性或者热不稳定性化合物,这些化合物难于用气相色谱法测定。因为LC的扩散速度比气相色谱法慢,所以其分离能力比气相色谱法差。虽然LC的分离能力没有气相色谱法高,但是它具有优良的定量能力和容易得到分离的化合物的流分的特点。LC不仅可应用于一般有机化合物,而且也可应用于离子化合物、天然产物、聚合物以及其他广泛领域。

4.3 通过综合分析高效液相色谱法所使用的固定相和流动相,可以认识其各种分离机理。表1列出了高效液相色谱法的分类及其分离机理的特点、典型柱填料及其用途。

表1 HPLC:分类和分离机理特点、典型柱填料及其用途

分离机理	特 点	典型柱填料	用 途
分配色谱(包括反相分配色谱、正相分配色谱以及反相离子对色谱)	- 分离是基于固定相和流动相间分配平衡。 - 各种柱填料和各种流动相的结合应用广泛	化学键合型硅胶(ODS, NH等)、多孔聚合物等	- 范围从低分子量到高分子量物质的分离。 - 同系物的分离
吸附色谱	- 分离是基于溶质在无机氧化物固定相上的吸附平衡。 - 非极性有机溶剂用作流动相	硅胶、氧化铝、二氧化钛、碳等	极性化合物和异构体的分离
尺寸排阻色谱(分子筛分色谱、凝胶过滤色谱、凝胶渗透色谱)	- 分离是基于聚合物填料窄孔的分子筛分。 - 操作条件温和。 - 亲水聚合物填料和合成的聚合物填料有不同应用	葡聚糖凝胶,琼脂糖凝胶,聚苯乙烯凝胶,聚甲基丙烯酸酯凝胶等	- 蛋白、酶等的分离纯化及脱盐(亲水聚合物填料)。 - 合成聚合物的分子量分级(合成聚合物填料)
离子交换色谱(包括离子排斥色谱和离子色谱)	- 分离是基于离子交换剂和离子溶质间的静电相互作用。 - 应用广泛	离子交换树脂	离子型物质的分离分析,脱盐,盐交换
亲合色谱	- 分离是基于衍生自生物组织的分子识别能力。 - 选择性极高	酶、肽、糖等组合	生理活性物质的浓缩、分离和精制

4.4 HPLC的基本配置如图1所示。HPLC由下列部件组成:流动相提供单元(液体泵)、进样器、色谱柱和柱箱、检测器、数据处理机和记录仪。流动相的流速由泵设定,一定体积的流动相被传送到进样器,再到色谱柱。泵输送流动相的流速范围通常在0.01 mL/min~10 mL/min。常用往复柱塞泵(见图2)。当使用梯度洗脱法时,使用1~4个单元泵或者一个梯度器。

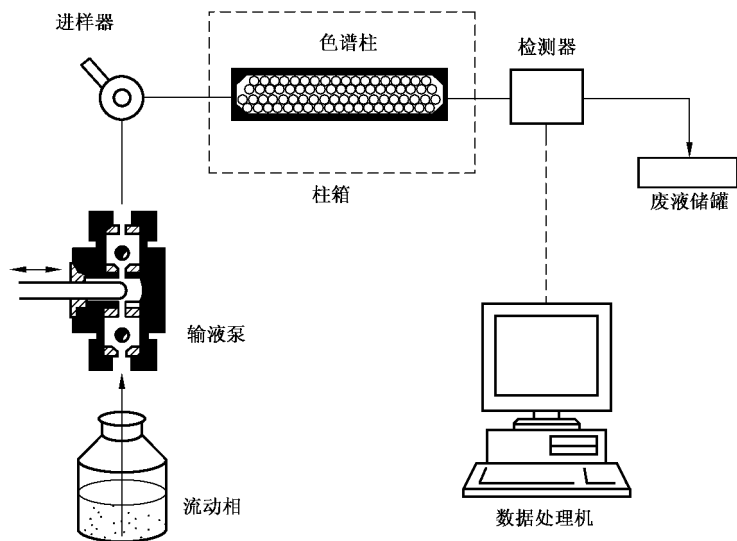


图 1 HPLC 的基本配置(示意图)

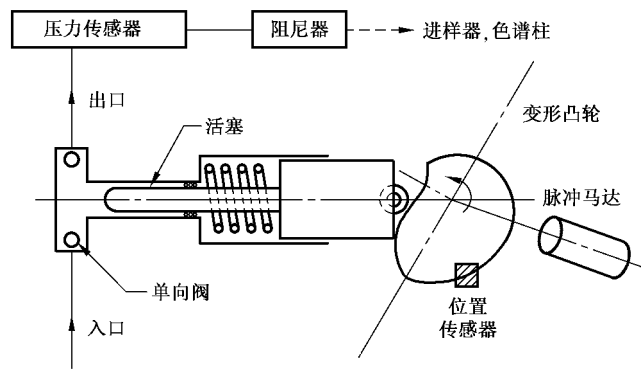


图 2 往复式柱塞泵的基本配置(示意图)

- 4.5 通常用微量注射器量取一定体积的样品溶液,注入进样阀,扳动按钮将样品溶液注入色谱柱。有时使用自动进样器按序列自动进多个样品。
- 4.6 HPLC 使用的柱填料具有相对均匀的颗粒尺寸,粒径一般在 $1\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$ 之间,填料被装填在内径 $1\ \text{mm}\sim 12\ \text{mm}$ 的不锈钢或塑料的色谱柱管中,柱长一般几十厘米或者更短。填料的粒径和柱子的尺寸根据其用途而有所不同。
- 4.7 分析物被色谱柱分离,然后基于其物理、光学、电、化学及其他特性被检测器检测。HPLC 的典型检测器是紫外可见光检测器。通常这种检测器的流通池体积在 $4\ \mu\text{L}\sim 20\ \mu\text{L}$ 之间,它测量被分离后的分析物在一定波长下的吸光度(吸收强度)。其他检测器包括示差折光指数检测器、荧光检测器、电化学检测器、电导检测器、质谱仪等。HPLC 使用的典型检测器的特点列于表 2。当需要选择性检测或 g/L 量级以下的高灵敏度检测时,依赖于分析物特征使用不同的检测器。

表 2 HPLC 使用的典型检测器及其特点

检测器	最小检测灵敏度/g	选择性	温度的影响	流速的影响	梯度洗脱
吸光度检测器(UV/VIS 检测器)	10^{-10}	有(吸光物质)	小	无	可用
荧光检测器(FLD)	10^{-12}	有(荧光物质)	有	无	可用
示差折光检测器(RID)	10^{-7}	无	有	无	不可用
电化学检测器(ECD)	10^{-12}	有(氧化还原物质)	有	有	可用
电导检测器(CD)	10^{-10}	有(离子)	有	有	不宜
质谱(MS)	10^{-12}	无	有	有	可用

- 4.8 如果分析物不能直接检测或者高灵敏检测不可能实现,则可使用柱前衍生化或柱后衍生化。前者

是分析物在进到色谱柱之前进行的衍生化,而后者是分析物被色谱柱分离之后衍生试剂同洗脱液进行混合进行的衍生化。

4.9 检测器得到每个分析物的响应并转化成电信号,然后送到数据处理机。记录检测器得到的信号对时间作图得到如图3所示的色谱图。数据处理机基于得到的色谱图进行各种参数运算,对分析物进行定性定量分析。当使用保留值对分析物进行定性时,用其保留值(保留时间等)同相同条件下的标准样品的保留值进行比较。当使用质谱或二极管阵列检测器对分析物进行定性时,用分析物的谱图同标样的谱图进行比较。当进行定量分析时,从色谱图得到峰面积值或峰高值,将其代入由含分析物的标准溶液制得的标准曲线进行定量测定。

4.10 另一方面,也有可能通过收集与色谱图上色谱峰相对应的流出液对分离的分析物进行等分收集,进行提纯,即制备型液相色谱法。

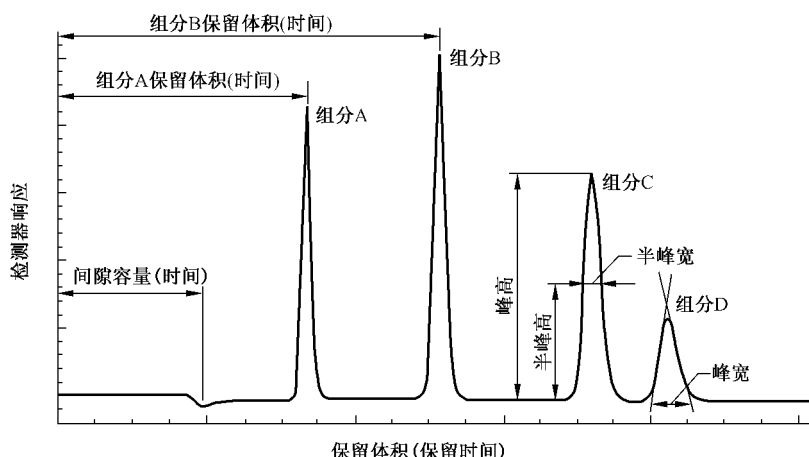


图3 色谱图和每个参数的名称

5 水、试剂和溶剂

5.1 水

本标准使用的水应是通过蒸馏或离子交换等方法精制的水,或者通过反渗透、蒸馏、离子交换等方法结合精制的水。水质不应干扰分析。

5.2 试剂

试剂应是分析纯试剂或质量更好的试剂。试剂不应干扰分析。

5.3 溶剂

溶剂应是 HPLC 级的产品或质量相当或更好的产品。它们不应干扰所使用的检测器的性能。

6 取样及预处理的操作

高效液相色谱分析要求按样品的分析目的选择合适的取样方法。根据样品形式和分析目的,样品可直接进高效液相色谱仪,或者对分析物进行萃取、衍生、浓缩等预处理。

6.1 取样

取样应根据分析目的、样品性质及测试项目使用最佳方法进行,考虑具有样品代表性及能区分每个样品特征的差异。如果有专项标准,则按该标准进行取样操作。为了防止由于老化之类的外部因素引起的变化,预处理和进样的过程应尽可能快地进行。如果样品需要贮存,要预先确认样品不会因为贮存和转移运输发生变化。如果在初步试验和实际测定时样品量和分析物浓度存在较大差别,则设定的条件将无效。如果怀疑样品发生了变化,则要采取相应对策¹⁾。用于取样和样品贮存的容器和器具不应含

1) 例如,生物样品分析物可能被酶和微生物分解,或者被代谢产物和增殖污染。在这样的情况下,应采取诸如添加防腐剂、低温贮存、调节 pH 值、过滤、热处理、干燥等对策。防腐剂可能影响分析物和色谱图,应引起注意。

有任何吸附样品或溶解于样品的物质。贮存容器应贴上必要的警示标签。如果为了保证数据的可靠性需要进行重复测定,则相同样品必须同时在两处或两处以上的取样点抽取。

6.2 预处理

样品在进高效液相色谱仪之前,应针对分析目的、样品性质和测试项目使用最合适的方法进行预处理。预处理一般可改善特性、精密度、灵敏度等,消除测量的干扰物质,保护色谱柱和仪器免于损坏,简化测定操作过程,以及使分析物保持稳定。

预处理包括下列过程:称重、蛋白质脱除、萃取(液液萃取、固相萃取、溶剂蒸馏、超滤分离、超临界流体萃取等)、净化(液液萃取、固相萃取等)、脱水、脱盐、浓缩、定容、衍生、标准物加入、溶剂调整(衍生化、溶解在适于进样的溶剂中)等等。如果有专项标准,则按该标准进行预处理。如果加入内标物,在色谱图上内标物应与样品基质很好地分离。其保留时间应与目标组分的保留时间差别不大。如果使用质谱,与内标物的分离不一定是必需的。样品应溶解在少量其淋洗能力等于或小于流动相的溶剂中。溶剂可能影响稳定性和目标组分的分离,因此应谨慎选择。必要时,使用 $0.2\ \mu\text{m}\sim 0.5\ \mu\text{m}$ 的过滤膜对样品进行过滤以除去不溶物。预处理有可能引起来自试剂、容器、环境等的污染,引起杂质的混入以及分析物的损失,应引起注意。

7 仪器配置

7.1 流动相供应单元

输送流动相(洗脱剂)到色谱柱的供应单元,主要由下列部件组成:

7.1.1 洗脱剂储液器

洗脱剂储液器应使用不影响流动相(洗脱剂)化学组成的材料制成。洗脱剂储液器应防止在使用过程中环境因素对流动相的污染,如蒸发变质等。

7.1.2 脱气器

脱气器被用来连续脱除溶解在流动相(洗脱剂)中的空气,以免由于仪器内温度压力变化引起的气泡问题,从而保证稳定的流速和信号背景。

7.1.3 供液泵

以精确流速将流动相(洗脱剂)输送到色谱柱的泵必须满足下列要求:

- a) 流速范围宽;
- b) 流速精度高;
- c) 流量脉动低;
- d) 在较宽的压力范围内具有稳定的输液能力;
- e) 与液体接触的材料具有优异的化学惰性;
- f) 易于更换流动相。

7.1.4 梯度洗脱单元

梯度洗脱单元由控制器和混合器组成,控制器可以连续改变混合流动相(洗脱剂)的组成而混合器将获得均匀的混合溶液。混合比的设定范围要宽,浓度要精确。

7.2 进样器

进样器的材料和构造应确保所进的样品没有吸附保留,进样重复性好。如果用自动进样器自动进行许多试样的进样,那么它应具有以下基本功能:重复性、定量进样准确性、保留小、极小的样品量等等。如果有预期的用途需要,则应加上冷却功能,以便增加制备好的样品数量和降低样品组分的分解和蒸发。

具有样品预处理功能或柱前衍生化功能的自动进样器也可能用到。

7.3 分离单元

7.3.1 色谱柱

根据分析目的,使用本标准第9章叙述的色谱柱。从进样器到色谱柱入口的流路和从色谱柱出口

到检测器的流路应使用死体积尽可能小的管路,以免样品谱带扩散。

可使用保护柱来防止分析柱性能损坏。

7.3.2 色谱柱箱

使用色谱柱箱可提高分离分析的稳定性从而确保分析精度。色谱柱箱应具有温度控制功能。控制温度可优化色谱柱性能、增强分离选择性以及防止柱温受环境温度变化的影响。

7.4 检测器

洗脱剂从色谱柱进入检测器的微流池,检测器按照不同原理以流动相作为背景检测分析物的浓度或体积。常用检测器的特点见表2。

7.4.1 吸光度检测器

吸光度检测器检测样品组分在紫外可见光区的吸光度。按分析物的吸收特性确定吸收波长。常用的吸光度检测器类型是分光光束通过流动池中的样品组分,到二极管阵列检测器,产生光谱,测量各波长下的吸光度变化。通过使用各波长下的色谱图和每个组分的保留时间可以获得定性分析结果和峰组分纯度的确认。

7.4.2 示差折光指数检测器

样品组分的流出引起流动相折光指数改变,这种改变被检测器以折光指数之差进行检测。

7.4.3 荧光检测器

荧光检测器检测样品中某个组分受到激发光激发在特定波长下的荧光强度。为了设定最佳波长和定性确认峰组分,有些荧光检测器具有进行激发、激发产生的荧光波长扫描以及荧光光谱采集等功能。

7.4.4 电化学检测器

电化学检测器检测样品组分在加有特定电压的工作电极上进行氧化还原反应产生的电流。

7.4.5 电导检测器

电导检测器检测流动相溶液和样品组分之间电导的差别。

7.4.6 质谱检测器

质谱检测器将从色谱柱流出的样品组分进行离子化,然后按照质荷比检测这些离子。

7.4.7 其他类型检测器

其他类型检测器包括下列检测器:

- a) 红外光谱检测器(IR);
- b) 旋光度检测器(OR),圆二色检测器(CD);
- c) 火焰离子化检测器(FID);
- d) 放射检测器(RI);
- e) 介电检测器;
- f) 化学发光检测器(包括生物发光)(CLD);
- g) 原子吸收分光光度检测器(AA);
- h) 电感耦合等离子体发射光谱检测器(ICP-AES);
- i) 高频等离子体质谱检测器;
- j) 热检测器;
- k) 光散射检测器;
- l) 黏度检测器;
- m) 离子电极检测器;
- n) 超声波检测器;
- o) 核磁共振仪检测器。

7.5 数据处理机

数据处理机显示色谱图和计算得到的定量结果。计算可通过制备校准曲线,用浓度对保留时间、峰

高、峰面积等作图。有些数据处理机具有光谱分析功能。

7.6 附件

根据分析目的,如果必要,应提供下列附件:

- a) 计算机(用于工作站,用于数据处理和仪器控制);
- b) 路径切换阀(柱切换、循环、反冲等);
- c) 流分收集器;
- d) 柱后反应器。

8 洗脱剂

8.1 洗脱剂的选择

应按分离模式或检测模式选择洗脱剂,以满足要求。

8.1.1 要求

洗脱剂应满足下列要求:

- a) 能合适地分离分析物;
- b) 不会化学的或物理的破坏柱填料;
- c) 能溶解样品而没有破坏;
- d) 适合检测器;
- e) 脱除固体物质²⁾;
- f) 脱气³⁾。

8.1.2 按分离模式选择(见表3)

表3 按分离模式选择洗脱剂

分离模式		洗 脱 剂	备 注
吸附色谱		己烷、戊烷、二氯甲烷、乙醚、异丙醇、甲醇,以及其他具有不同极性的有机溶剂,可混合使用	洗脱剂极性越高,洗脱能力越强。分离选择性随洗脱剂的极性改变。除此之外,还随氢键、可受性和偶极作用而改变
分配色谱	正相色谱	己烷、戊烷、二氯甲烷、乙醚、异丙醇、甲醇,以及其他具有不同极性的有机溶剂,可混合使用	洗脱剂极性越高,洗脱能力越强。分离选择性由分析物在洗脱剂和固定相中的溶解性决定。除此之外,还随氢键、可受性和偶极作用而改变
	反相色谱	甲醇、乙腈、THF ^{a)} 和其他有机溶剂同水或缓冲溶液混合使用	洗脱剂极性越低,洗脱能力越强。分离选择性由分析物在洗脱剂和固定相中的溶解性决定。除此之外,还随氢键、可受性和偶极作用而改变。如果分析物是离子型化合物,洗脱剂的 pH 值将严重影响保留/分离。在离子型化合物电离的 pH 值下,保留很弱,而在非电离的 pH 值下,保留变强
	反相离子对色谱	能同要分析的离子形成离子对的缓冲溶液被制备,加入疏水试剂作为对离子。这样的缓冲溶液同甲醇、乙腈、THF ^{a)} 和其他有机溶剂混合使用	有机溶剂的混合比越大,洗脱能力越强。作为离子对色谱的洗脱剂,调整离子对试剂浓度和 pH 值很重要

2) 为了脱除固体物质,洗脱剂通常应通过孔径 0.5 μm 或更小的膜进行过滤。如果使用粒径为 3 μm 或更小的柱填料,使用的过滤膜的孔径应是粒径的 1/10。

3) 如果高效液相色谱仪具有脱气装置,则不必预先脱气。

表 3 (续)

分离模式		洗 脱 剂	备 注
离子交换色谱		缓冲溶液被使用,其缓冲能力使得分析物的电荷差别在一定的 pH 值下最大。通常初始洗脱剂的浓度是 20 mmol/L ~ 50 mmol/L	初始洗脱剂是分析物在该 pH 值下电离的缓冲溶液,分析物被保留。然后,氯化钠和其他碱以梯度或线性增加添加浓度的方式加入到缓冲溶液中。另外,缓冲溶液的 pH 值将改变,以便使分析物朝非电离方向转化。反之,洗脱剂也可能是在该 pH 值下分析物不电离的缓冲溶液,并且分析物可通过只是移动被分离。如果树脂型离子交换剂被使用,除了离子交换外还可能存在疏水作用、氢键、尺寸排除等。因此,加入有机溶剂可调整分离
离子排阻色谱		在羧酸或其他弱酸的情况下,使用水或 1 mmol/L~10 mmol/L 的酸的水溶液(pH 值为 2~3)。在弱碱性化合物情况下,主要用水	一般地,如果分析物被电离,洗脱就快,如果不电离,洗脱就慢。通常,洗脱剂的 pH 值应选择以使分析物间的电离速度的差最大
亲和色谱		使用的缓冲溶液的 pH 值和离子强度适于分析物和配体相互作用。蛋白质等的亲和色谱常使用三氯乙酸缓冲溶液、磷酸缓冲溶液、醋酸缓冲溶液等	在其中分析物有可能同配体偶合的洗脱剂应同色谱柱保持平衡。样品进到色谱柱,然后离子强度和 pH 值将改变。这是一种非特定洗脱。另外,游离的过量配体或其相似物质溶液应被使用,这是一种特定洗脱
尺寸排阻色谱	非水尺寸排阻色谱	使用对分析物和柱填料都很亲和且不易受吸附、分配等这些不属于排阻色谱分离模式影响的溶剂。在此,聚苯乙烯凝胶被用作柱填料,则常用 THF ^a ,因为其具有相近的溶解作用参数。如果分析物是极性的,可能使用 DMF ^c 和其他极性溶剂	如果尺寸排阻色谱需要在 100 °C 或更高温度下进行,则可能使用 TCB ^b 。当溶剂在室温下是固体时,分析后应将柱上保留的溶剂用其他溶质置换。溶剂置换时,流速不能超过色谱柱的工作压力。不必要的溶剂置换将缩短色谱柱的使用寿命
	耐水尺寸排阻色谱	洗脱剂中加入碱以便阻止柱填料和分析物间的静电作用并增加离子强度。在蛋白质和其他样品的情况下,pH 值影响稳定性和空间构型,可能使用其他合适的缓冲溶液	如果分析物同柱填料存在疏水作用的可能性,在色谱柱可接受的范围内,可在洗脱剂中加入甲醇或其他极性有机溶剂
^a THF 四氢呋喃; ^b TCB 三氯苯; ^c DMF 二甲基甲酰胺。			

8.1.3 按检测器选择(见表 4)

表 4 按检测器选择洗脱剂

检 测 器	洗脱剂的选择
吸光检测器	通常选择的洗脱剂在检测波长下是透光的或只有微不足道的吸收。使用没有紫外吸收的高纯溶剂、水和试剂制备洗脱剂。一般情况下,溶剂在短波长有强的吸收,一些缓冲溶液在紫外区有强吸收,应给予注意。在梯度洗脱的情况下,洗脱剂组成的变化可引起吸收强度的变化,引起基线波动。在检测波长下,使用的所有溶剂必须是足够透光的

表 4（续）

检 测 器	洗脱剂的选择
荧光检测器	洗脱剂应在激发光波长和荧光波长下都不吸收。使用没有荧光杂质的高纯溶剂、水和试剂制备洗脱剂
示差折光指数检测器	洗脱剂的折光指数应与分析物的折光指数有差别。应充分搅拌洗脱剂使浓度差最小
电化学检测器	使用电化学惰性的高纯溶剂、水和试剂制备洗脱剂
化学发光检测器	洗脱剂在检测波长下应没有吸收。使用没有发光杂质的高纯溶剂、水和试剂制备洗脱剂
质谱	洗脱剂应该是挥发性的。使用没有杂质的高纯溶剂、水和试剂制备洗脱剂

8.2 洗脱剂的制备

8.2.1 混合洗脱剂的制备

最适合分离的洗脱剂通常用两种或更多种溶剂充分混合制备。除了尺寸排阻色谱,很少使用单一溶剂。关于混合洗脱剂的制备,应注意以下几点:

- a) 使用能够完全混合的溶剂;
- b) 充分搅拌以获得均匀组成;
- c) 混合洗脱剂的组成可用室温下混合前的体积比表示。混合洗脱剂的体积不一定等于各溶剂体积的总和。由此,各溶剂的体积应分别测量;
- d) 如果混合时溶液温度改变,应冷却至室温;
- e) 当有机溶剂和缓冲溶液或离子对试剂混合时,如果产生沉淀的可能性很高,应使用孔径 0.5 μm 或更小的过滤膜进行过滤除去沉淀;
- f) 依赖于贮存条件,有些洗脱剂可能容易发生组成变化、化学变化、吸水等。

8.2.2 洗脱剂脱水和溶剂的水饱和

如果样品组分遇水不稳定,或者像硅胶或其他一些对水很亲和的物质被用作固定相,应注意洗脱剂中的水分,并且用前应进行脱水。

在吸附色谱法中,水分严重影响分离选择性,可使用用特定的水分饱和的溶剂制备洗脱剂。

8.2.2.1 洗脱剂的脱水

脱水应使用合适的干燥剂。醇类和乙腈可以用 3A 和 4A 分子筛脱水。

8.2.2.2 溶剂的水饱和

将有机溶剂同稍稍多于饱和水量的水混合,在高于使用温度 5 $^{\circ}\text{C}$ ~ 10 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下充分搅拌,然后在使用温度下搅拌。静置分层后,取有机相层即制得 100% 水饱和的溶剂。将其按一定比例同完全脱水的溶剂混合,即可制得一定饱和度的水饱和溶剂。

8.2.3 洗脱剂的 pH 值调节方法

在反相分配色谱中,可加入少量的酸或碱来调节洗脱剂的 pH 值,洗脱剂的 pH 值也可能由于空气中的二氧化碳的溶解作用受影响。如果 pH 值严重影响分离,必须使用缓冲溶液,缓冲溶液在所用的 pH 值范围内具有足够的缓冲能力。如果用有机溶剂同缓冲溶液混合制备洗脱剂,混合比将影响氢离子浓度。但是,混合前缓冲溶液的 pH 值通常应就是洗脱剂的 pH 值。

9 色谱柱和柱填料

9.1 色谱柱

9.1.1 色谱柱的标记

色谱柱多种多样。色谱柱的标记除了柱填料的名称外,还要指明色谱柱管的材料、长度和内径。

9.1.2 色谱柱管的材料

用作色谱柱管的材料应有足够的强度、有光滑的内表面、对洗脱剂和分析物惰性。例如有不锈钢、聚醚醚酮(PEEK)、玻璃、衬玻璃不锈钢、石英管等。

9.1.3 色谱柱的分类

依赖于分析样品的类型、进样量和特点以及分析条件,色谱柱有不同的尺寸。按内径可以将色谱柱分类如下:

- a) 半制备柱:内径 12 mm~50 mm(不含 50 mm);
- b) 通用柱:内径 3 mm~12 mm(不含 12 mm);
- c) 半微柱:内径 1 mm~3 mm(不含 3 mm);
- d) 微柱:内径 1 mm 以下。

9.2 柱填料

柱填料通常是相对均匀的颗粒,粒径范围 $1\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$,或者是具有同等效果的棒状连续体。填料在工作条件下具有物理化学稳定性。

柱填料材料有硅胶类的无机物、聚苯乙烯凝胶类的聚合物,以及用上述材料作母体在其表面上化学键合有机分子的物质。

9.3 分离方式和色谱柱填料

按照色谱柱填料和洗脱剂的组合,HPLC有多种分离方式。按分析物的化学、物理特性,合理地选择分离方式。

9.4 柱性能评价

色谱柱条件可用峰型、理论板数、对称因子等参数评价。色谱柱性能以柱寿命、分离能力、选择性、最大样品负荷等参数评价。

当评价色谱柱性能时,应在一定条件下进行,这些条件不受环境和仪器影响,保证获得重复性。

10 仪器安装的环境要求和安全

10.1 环境要求

安装高效液相色谱仪的房间一般应满足下列条件:

- a) 温湿度应在仪器规定的范围内且不会突然改变;
- b) 没有震动和阳光直射;
- c) 清洁无尘、无腐蚀性气体,有良好的通风;
- d) 没有强磁场和电场;
- e) 电源电压、容量和频率符合仪器规定,电压波动在 $\pm 10\%$ 以内,没有频率波动;
- f) 提供接地电阻小于 $100\ \Omega$ 的接地点。

10.2 安全

为安全目的,应注意下列事项:

- a) 分析使用的样品和化学试剂在处理时应注意其爆炸性、易燃性、毒性或危害性。废液应该按照环保规定,在进行安全和无害化处理后弃置。危险物质和有毒和有害物质应该按照相关法规进行处理⁴⁾;
- b) 将仪器接地;
- c) 当使用压力容器内气体时,要遵从相关规定。如果其容器置于仪器附近,则容器应该固定到基座、墙壁、实验台上等等,以免翻倒;
- d) 在操作仪器前,要彻底检查管路、接头等处是否漏液和漏气;

4) 当处理有毒有害化学试剂时,应穿戴防护服(护目镜、橡胶手套和防毒面具等)。

- e) 直接接触仪器内部有可能引起电击。在检查和维修⁵⁾时,应先切断电源;
- f) 有些检测器使用光源灯,工作时发射紫外线,因此在维护和更换灯时应戴护目镜。光源灯工作时发热,不得触摸;
- g) 仪器有可能产生电磁干扰,或者受其他仪器的电磁干扰,应给予注意;
- h) 如果直接用手接触生物样品(血清、血浆、组织、尿样等),有可能引起感染。须小心处理这些样品。要注意防止样品直接接触皮肤。

11 测量和试料的制备

11.1 样品的制备

样品进行制备可改善分析物的定性定量精度,稳定分析物不发生变化,保护色谱柱和仪器。样品制备包括:样品溶液的稀释/浓缩、样品溶液中干扰物的脱除、样品溶液中加入标准溶液、分析物的衍生化等。

样品制备既要改善分析精度,也要提高制备过程的效率。可使用自动进样器、使用高压切换阀的柱切换等方法来自动进行样品制备。

如果样品制备的条件有专项标准规定,则按该标准进行。

11.1.1 样品溶液的稀释或浓缩

为了使分析物保持在合适的浓度范围内,应对样品溶液预先进行稀释或浓缩(溶剂萃取、固相萃取等)。在试样溶液制备好后,应尽快进样分析。试样溶液应溶于流动相。

11.1.2 样品溶液中干扰组分的脱除

如果样品中含有固体组分、对色谱柱有不利影响的组分或者干扰定性定量分析的组分,应使用过滤膜法(用孔径 $0.5\ \mu\text{m}$ 或更小的膜)、功能膜(超滤膜)法、固相萃取、溶剂萃取等方法制备试样溶液,脱除先前的干扰物质。

11.1.3 样品溶液中加入标准溶液

当使用内标法时,样品溶液中要加入内标物;当使用标准标准加入法时,样品溶液中要加入标准溶液或稀释标准溶液。因此,试样溶液需要进行制备⁶⁾。试样溶液制备时可使用混合的稀释标准溶液。

11.1.4 柱前衍生化

如果不能直接检测分析物,或者需要高灵敏性或高选择性检测,或者需要优化分离,可在试样进色谱柱前使试样中的目标成分衍生化。柱前衍生化有两种情形:一种是加入试样溶液中分析物的衍生剂,另一种是加入进行氧化、还原、分解等反应的试剂。

柱前衍生化可通过自动进样器具备的功能自动进行,这样的功能包括:加入试剂、混合反应液体、控制反应时间、注射反应液体等⁷⁾。

11.2 分析检测器的选择

HPLC 检测器检测从色谱柱流出的流动相中的分析物,完成定性定量分析。检测器各种各样,应根据实际试样选择合适的检测器。一些检测器的类型见 7.4。

11.3 柱后衍生化

分析物通过色谱柱分离后,衍生试剂、pH 值调节溶液等与流出物混合,将其加热、光照或通过像非固定酶色谱柱之类的一个反应器,使其经过衍生反应之后再检测。当由于下述原因而使选择性的、高灵敏的检测成为不可能时才应用柱后衍生,这些原因包括:分析物结构完整不能检测、检测灵敏度低、残余

5) 如果仪器使用锂电池,不当处理可能引起爆炸。

6) 加入标准溶液不应在试样溶液中产生沉淀或化学反应,例如形成络合物,这些事应先进行确认。

7) 依赖于反应参数,如试剂的数量、加入的量、混合作用的次数、反应温度、反应时间等。适宜的柱前衍生试剂是有限的。

物干扰大。

11.4 等度洗脱

使用单一组成洗脱剂将分析物从色谱柱中洗脱,通常采用单元泵,其特点是具有良好的保留时间重复性。

11.5 梯度洗脱

梯度洗脱就是洗脱剂组成按时间程序改变,将分析物从色谱柱中洗脱。与等度洗脱相比,梯度洗脱减少了洗脱时间,而且峰型更尖锐。洗脱剂组成可以呈线性、梯度或指数变化。通常有两种梯度洗脱方式:一种是低压梯度洗脱,使用一个单元泵作为输送液体的设备,另一种是高压梯度洗脱,需要多个单元泵。

11.6 馏分制备

制备色谱的准备工作应满足如下条件:

- a) 用于制备色谱的样品溶液的准备:
 - 1) 进样溶剂应能溶解样品且不改变分析物的性质。样品应溶解在溶解力等于或弱于洗脱剂的溶剂中;
 - 2) 样品溶液中颗粒物和不容物质应事先通过膜过滤等方法除去;
 - 3) 样品应先利用溶剂萃取等方法进行粗分。
- b) 洗脱剂的准备:
 - 1) 洗脱剂对填充物应是惰性的且不影响样品的活性;
 - 2) 洗脱剂应适合于样品的等分回收;
 - 3) 洗脱剂中的颗粒物或灰尘应事先通过膜过滤等方法除去。
- c) 制备色谱装置:
 - 1) 与液体接触部件的材料,如液体泵、管线和色谱柱管应不被样品或洗脱剂腐蚀,且不应污染样品和洗脱剂;
 - 2) 设备应足以耐受操作压力;
 - 3) 相应于所用色谱柱的尺寸和流速,死体积应足够小;
 - 4) 检测器的灵敏度应根据进样量进行优化。
- d) 色谱柱的准备:
 - 1) 填料在操作条件下应当具有物理化学稳定性,由于不可逆吸附和氧化造成目标成分损毁应很小;
 - 2) 应使用分析柱以小规模研究制备色谱条件,色谱柱应在优化条件下使用;
 - 3) 等分制备色谱柱的性能应在预先确定的条件下得到确证。

12 分析步骤

12.1 分析条件的设定

以下项目应按专项标准规定的条件进行设定建立:

- a) 流动相的种类和流速(当使用梯度洗脱方法时,流动相的起始组成、组成变化比、最终组成等的各种程序);
- b) 色谱柱的种类;
- c) 色谱柱的温度;
- d) 检测器的灵敏度;
- e) 数据处理部分的条件(数据处理机、记录仪)。

12.2 基线稳定性的确认

当在 12.1 所规定的条件下运行时,应确认基线的波动对测定没有影响。

12.3 进样

使用微量注射器准确量取一定体积的样品,注入进样阀,扳动阀钮快速进样。当使用自动进样器时,设定合适的条件。

12.4 分析步骤

如使用记录仪,在进样的同时,在记录仪的记录纸上标记进样点。调整衰减,使得按组分的量将色谱峰绘制得尽量大,但不超出记录纸。如使用数据处理机,要设定采样时间和其他采样参数。

12.5 色谱图的记录

典型色谱图的编排,一般应当记录如下项目:

- a) 检测日期和检测名称;
- b) 高效液相色谱仪生产商及型号;
- c) 样品名称;
- d) 试样的制备方法以及进样量(μL 或 mL);
- e) 柱填料的种类或色谱柱的类型;
- f) 色谱柱管的材质、内径(mm)和长度(mm);
- g) 柱温($^{\circ}\text{C}$);
- h) 流动相(洗脱剂)的种类;
- i) 流动相(洗脱剂)的流速(mL/min)及柱前压力(Pa);
- j) 梯度洗脱方法的分析条件;
- k) 检测器类型和操作条件;
- l) 使用化学反应时,反应液体和反应试剂的种类和流速(mL/min)、流动相和反应液体的混合比和反应条件;
- m) 数据处理机类型和记录条件;
- n) 其他必须的项目。

13 定性分析

在相同条件下分析标样和样品,得到色谱图,将稀释标准溶液或混合稀释标准溶液的保留数据⁸⁾⁹⁾与样品中未知组分的保留数据进行比较,可进行定性分析。在这种情况下,为了确认未知组分峰的单一性,可以改变分离条件进行测定,例如改变流动相和固定相;也可使用如下定性技术包括离线操作来进行验证:

- a) 使用不同原理的多个检测器;
- b) 使用二极管阵列检测器;
- c) 使用质谱、红外光谱、发射光谱分析、核磁共振波谱及其他方法;
- d) 使用化学反应或酶反应或类似方法。

14 定量分析

14.1 测定

为了进行测定,需计算色谱峰面积^{10),11)},通过标准曲线法、内标法或标准加入法¹²⁾进行测定。

- 8) 保留数据是下述术语的通称:保留时间、保留体积、调整保留体积、特征保留体积、相对保留值、保留系数等等。
- 9) 同样条件下重复试验的保留数据的分散性,其相对标准偏差应小于等于 3%。
- 10) 可用峰高代替峰面积。
- 11) 峰面积的计算需根据峰型划合适的基线。
- 12) 当可获得合适的内标物时,采用内标方法。在这种情况下,可以修正进样误差或预处理误差。标准加入法可修正样品基质的影响,这是其优点。

14.2 峰高的测量

峰高就是用峰顶点的信号值减相同保留时间处基线的信号值,或者从峰顶点朝记录纸的横坐标作图与基线垂直相交,从顶点到交点的距离。

14.3 峰面积测量

峰面积(A)是从峰开始到峰结束,峰的信号值和基线的信号值之差的积分;或者峰高(h)和半峰宽($W_{0.5h}$)的乘积。但是后者不能用于明显前伸或拖尾的峰。

当使用数据处理机时,峰面积采用处理机上给出的数值。要按色谱峰型合理设定数据处理机的条件。

14.3.1 半峰宽法

按图 4 所示方法进行半峰宽法测量峰面积。

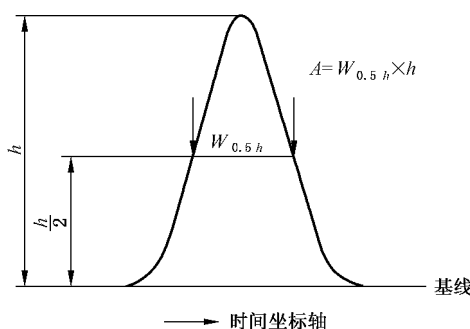


图 4 半峰宽法测量峰面积

14.3.2 重叠峰面积的分割方法

14.3.2.1 垂直法

如图 5 所示,当两个峰的面积相近时,从峰谷朝基线垂直划线将基线上的峰分割成两部分,从而得到各自的面积。

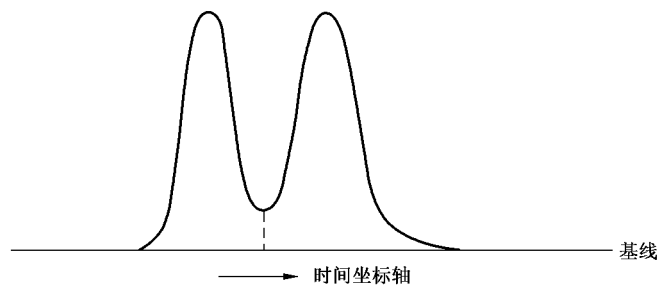


图 5 垂直法峰面积分割

14.3.2.2 峰谷-峰谷法

如图 6 所示,本法应用于与背景重叠的峰。连接相邻峰谷部分,可得到包含的面积。

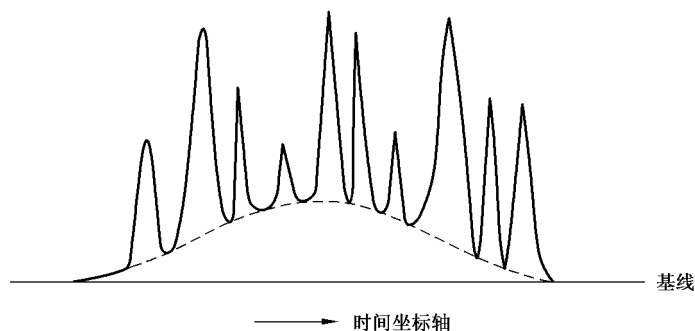


图 6 峰谷-峰谷法峰面积分割

14.3.2.3 切线法

如图 7 所示,小峰重叠在大峰的峰尾上,在这种情况下,从峰谷到大峰峰脚划切线,切线以上部分作为小峰的面积。通过指数函数曲线法进行峰分割可以代替切线法。

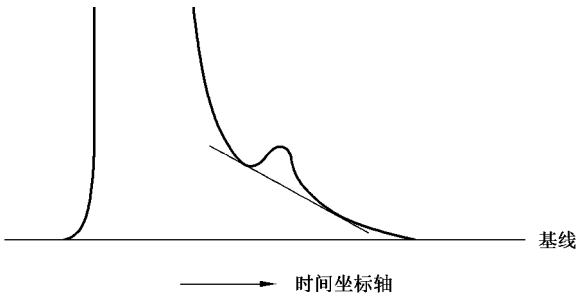


图 7 切线法峰面积分割

14.4 标准曲线法

制备 3 到 4 个梯度浓度的分析物的标准溶液,每个稀释的标准溶液,取一定体积进样,记录色谱图,计算每个峰的面积。横坐标上取所进的稀释的标准溶液中分析物的量,纵坐标上取其峰面积,绘制如图 8 所示的校准曲线。

所绘制的校准曲线范围应尽可能涵盖测量点。

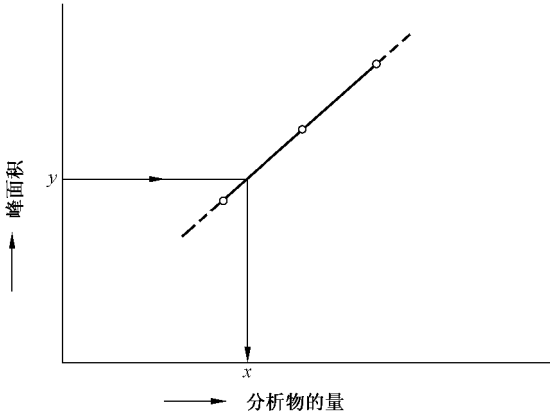


图 8 标准曲线法的标准曲线

在相同条件下进试样溶液,记录色谱图,使用标准曲线可从峰面积(y)得到分析物的量(x),并计算样品中分析物的浓度。使用本方法时,整个测量过程应在一定条件下严格进行。本方法的另一个名称是外标法。

14.5 内标法

制备含一定浓度内标物¹³⁾的分析物的稀释标准溶液 3 到 4 个,分析物浓度呈梯度变化¹⁴⁾。每个稀释标准溶液取一定量进色谱分析,记录色谱图,并测量峰面积。然后,取所注射的分析物的量(M_x)与内标物的量(M_s)之比(M_x/M_s)作为横坐标,分析物的峰面积(A_x)与内标物的峰面积(A_s)之比(A_x/A_s)作为纵坐标,绘制标准曲线,如图 9 所示。

所绘制的标准曲线范围应尽可能涵盖测量点。

- 13) 选择内标物时,要求其化学性质与分析物类似、色谱峰尽可能与分析物色谱峰相近且性能稳定,与样品中其他组分能完全分离。
- 14) 如果先前确认过校准曲线是经过原点的一条直线,则可选择一定浓度的分析物,进样分析,测量它的 A_x/A_s 并用这点绘制标准曲线。

接下来,加入内标物¹⁵⁾制备试样溶液,试样浓度要与稀释标准溶液浓度相近,在稀释标准溶液相同条件下进样分析,记录色谱图。在色谱图上,计算分析物的峰面积(A'_x)同内标物的峰面积(A'_s)之比(A'_x/A'_s),使用标准曲线,得到分析物的量同内标物的量之比,从所取的内标物的量计算得到分析物的量。然后,计算样品中分析物的浓度。

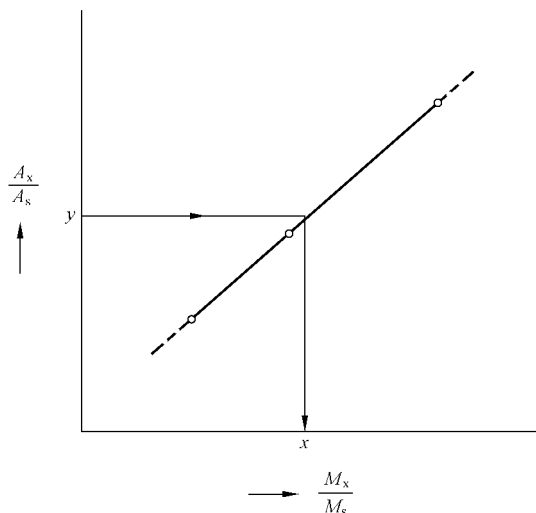


图9 内标法的校准曲线

14.6 标准加入法

取四份或四份以上一定体积的样品溶液,各自加入分析物标准溶液,获得梯度浓度。其中一份不加入分析物标准溶液。直接使用这些溶液或者将其稀释到一定体积制备试样溶液。取一定体积的试样溶液进样分析,记录色谱图,测量分析物的峰面积。计算添加的分析物的浓度,绘制关系曲线,横坐标¹⁶⁾是添加的分析物增量,纵坐标是峰面积。从不含标准溶液的样品溶液得到分析物的峰面积(图10中的 y),对应找出关系曲线与横坐标的截距(图10中的 x)¹⁷⁾,可得分析物的浓度。

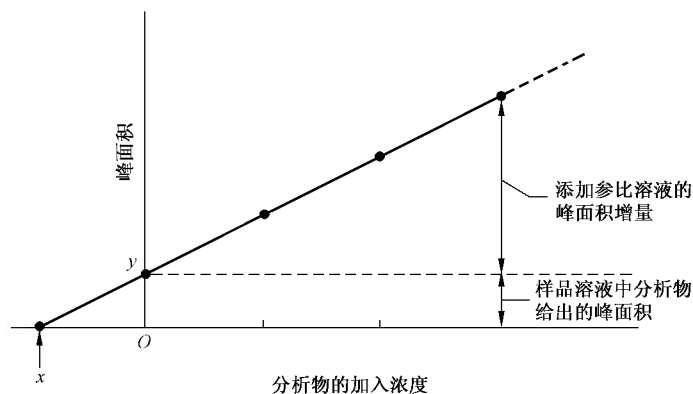


图10 加标法关系曲线

14.7 测定值的表述

报告组分名称和测定值。测定值用 g/L、mg/L、μg/L、mol/L 或类似单位来表述。

- 15) 将内标物加入到样品溶液中应不会引起有可能造成分析物和内标物浓度变化的像沉淀这样的化学反应。
- 16) 因为分析物浓度的增量与加入的标准溶液的数量(或者一定体积的加入数、加入的体积或者横坐标上能取的加入数)成正比。
- 17) 本方法只可应用于关系曲线为线性时。

15 分子量分布的测量

分子量分布的测量按如下方法进行:样品与分子量标准样品¹⁸⁾测量条件一致,然后测量保留体积或保留时间和尺寸排阻色谱的重量分数¹⁹⁾。在这种情况下,当测量的分子量是以相对分子量表达时,要进标准样品,使用的色谱柱应能给出尽可能对称的峰型并具有足够理论塔板数。

15.1 使用校准曲线测量平均分子量的方法

校准制备与测量在相同操作条件下进行,测量所得色谱图上每个分子量数据的保留体积或保留时间切分成至少 20 个部分。然后从每一切分点的高度关系计算得到平均分子量。

15.1.1 校准曲线的制备

将已知分子量的单分散标准样品进色谱测量,将保留体积或保留时间对分子量作关系曲线²⁰⁾(校准曲线)。

15.1.2 保留体积转化为分子量

使用事先制作的校准曲线进行转化,得到的分子量是已经转化为标准物分子量(如聚苯乙烯)的相对分子量。

15.1.3 数均分子量、重均分子量、 z -均分子量和分散度 d 值的计算

色谱图的横坐标(保留体积)将被切分成至少 50 份,从切分点纵向划平行线,和色谱图的基线相交,得到从切分点到交点的长度(高度)。根据每一切分点的分子量(M_i)和它的高度(H_i)按式(1)计算:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i} = \frac{\sum H_i}{\sum \left(\frac{H_i}{M_i} \right)} \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i} = \frac{\sum H_i M_i}{\sum H_i}$$

$$\overline{M}_z = \frac{\sum M_i^3 N_i}{\sum M_i^2 N_i}$$

$$d = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$$

其中, $\overline{M}_z$: z -均分子量

18) 标准样品应优选具有窄分子量分布的物质,列举如下:

$$\begin{array}{ll} M_p < 2 \times 10^3 & \overline{M}_w / \overline{M}_n < 1.20 \\ 2 \times 10^3 < M_p < 10^6 & \overline{M}_w / \overline{M}_n < 1.10 \\ 10^6 < M_p & \overline{M}_w / \overline{M}_n < 1.20 \end{array}$$

其中, $\overline{M}_n$: 数均分子量

$\overline{M}_w$: 重均分子量

M_p : 峰值分子量,如果标准样品没有给出如产品样本中的准确值,可以使用如下近似方程式进行计算:

$$M_p = (\overline{M}_n \times \overline{M}_w)^{1/2}$$

19) 当能够获得重量分数时,峰高可以用分子量修正,摩尔吸收或折光指数浓度的变化依赖于分子量。如果样品的化学结构相同只有聚合度不同,影响可忽略不计,峰高本身可作为替代。

20) 校准曲线应当用标准样品的 $\log M_{pi}$ 和洗脱体积 T_i ,按如下线性或三次方程计算得到:

$$\begin{array}{l} \log M = A_0 + A_1 T \\ \log M = A_0 + A_1 T + A_2 T^2 + A_3 T^3 \end{array}$$

M_i : 每点的分子量

N_i : 每点的分子数

H_i : 每点的色谱图高度

d : 分散度

15.1.4 分子量分布曲线的绘制

取横坐标上的分子量和纵坐标上的重量分数作关系曲线(分子量微分曲线和分子量积分曲线)。

15.2 根据图谱测量分子量分布

样品的分子量分布可以通过图谱比较进行估算,如:在相同条件下用相同物质测得的色谱峰;在合适分隔的分子量之间的面积;分子量分布面积,其中纵坐标用每一点的高度(H_i)分数作为刻度, H_i 通过在 15.1.1 和 15.1.2 中描述的操作得到;等等。

16 制备型液相色谱法

16.1 等分制备方法(痕量成分的等分制备)如下:

- a) 根据所需要的等分制备量,选择设备及色谱柱。特别是关于分析物中痕量成分的等分制备,推荐选择有较小死体积的设备、色谱柱、管线等,使用无吸附的柱子和等分容器;
- b) 制备色谱的设备管线用合适的溶剂洗涤,用洗脱剂置换;
- c) 连接色谱柱,输送液体,确保基线稳定。如需要,应分析色谱柱的流出液以确认对分析物等分制备没有问题;
- d) 使用样品注射器注射样品至色谱柱;
- e) 如果需要,分析物应当进行粗分。

16.2 等分制备的流分的分析

应使用适合于分析物的方法进行等分制备的流分的纯度分析及定量分析。

17 数据质量的保证

为了保证数据质量,应验证新开发的分析方法(包括分析条件的改变)²¹⁾,即使是法定方法(如专项标准)也应当由使用的实验室验证。实验室开发的方法(内部方法)在应用前也应验证。在应用分析方法时应保留验证记录。

17.1 数据质量的控制

数据质量用测量值的“不确定度”表示,本标准使用包含因子 $k=2$ 的扩展不确定度 U 。

数据质量应通过制备质量控制样品(QC 样品)²²⁾和定期分析 QC 样品进行监控。

日常分析时,20 个样品应包含一个 QC 样品和一个空白样品,应进行平行分析来控制数据的质量。

17.2 获得最小检测限的方法

当要获得最小检测限时,需要建立方法并报告方法,该方法的误差概率可以通过统计技术进行解释。

为获得最小检测限,通常需要分别测定空白样和合适的加料试样至少 20 次。为了计算最小检测

21) 当开始实际分析时,应选择和优化色谱柱和洗脱剂,即分析方法应得到开发或改进。在这种情况下需要确认开发的方法适合于分析目的。验证分析的项目包括精密性、准确性(回收率)、线性、最小检测限、最小测定限、范围、稳定性测试等

22) 使用内部标准材料(实验室已测定标准材料的值)或者购买的标准材料或者有证的标准材料作为 QC 样品。如果分析样品是均匀的和稳定的,可使用以大体积保留的样品。

限,应得到净测量值(扣除空白值后)的标准偏差 σ ,并乘以 3.29,结果值被转化为浓度(定量)。如果减少重复测量次数,如减少至 5 次,最小检测限应当通过估算全域标准偏差来计算,即 n 次重复测量的标准偏差的数值应乘以 t 值($n=5$ 时为 4.26)。作为最小检测限,需要报告“在 95%置信度下能给出区别于空白的信号的分析物浓度(量)”。

最小检测限可以是信号 S 与噪声 N 的比值。即当 S/N 值为 2 或 3 时²³⁾²⁴⁾,它可能是目标物的质量或浓度。当本方法描述最小检测限时,也需要提及 S/N 值和记录仪响应时间或数据处理机的参数(积分时间等),这可按图 11 所示的进行。使用含单个分析物的低浓度样品,用高灵敏度记录并绘制色谱图,以便有可能充分测量噪音水平(图 11 中的细线)。如下进行计算:

信号:用一条线连接检测器输出数据的平均值,得到没有噪声的色谱图(图 11 中的粗线)。峰高,即从基线到峰顶点的距离被取作信号 S 。

$$S=h$$

噪声:围绕半峰宽的 20 倍基线最大与最小输出信号之差的幅度的一半作为噪声 N 。

$$N=\frac{h_N}{2}$$

当最小测定限要报告时,最小测定限的定义应被规定并且最小测定限的值按定义报告。

测量重复次数与放大因子对应关系见表 5。

表 5 测量重复次数 n 与放大因子 t

测量重复次数 n	放大因子 t
3	5.84
4	4.71
5	4.26
6	4.03
7	3.89
8	3.79
9	3.72
10	3.67
11	3.62
12	3.59
13	3.56
14	3.54
15	3.52
∞	3.29

有几个方法规定最小测定限。其一,采用最小检测限的 3 到 5 倍的数值;其二,采用 $S/N=10$ 时分析物的量或浓度;另外,也有可能采用在下面情况下分析物的量达到的数值,即当分析物的量降低时,其精密性也下降,直到变异系数大于 10%。

23) 假设 $S/N=2$ 被规定为最小检测限,理论上,误差概率是 0.1%。可以说它就是给出的信号能区别于空白的分析物的浓度(量)。

24) 为什么 $S/N=2$ 或 3 被规定为最小检测限? 原因如下。确实,理论上当 $S/N=2$ 时误差概率是 0.1%,可是从经验来说,考虑漂移、波动、污染等因素的影响,规定 $S/N=2$ 或 3 作为最小检测限是合理的。

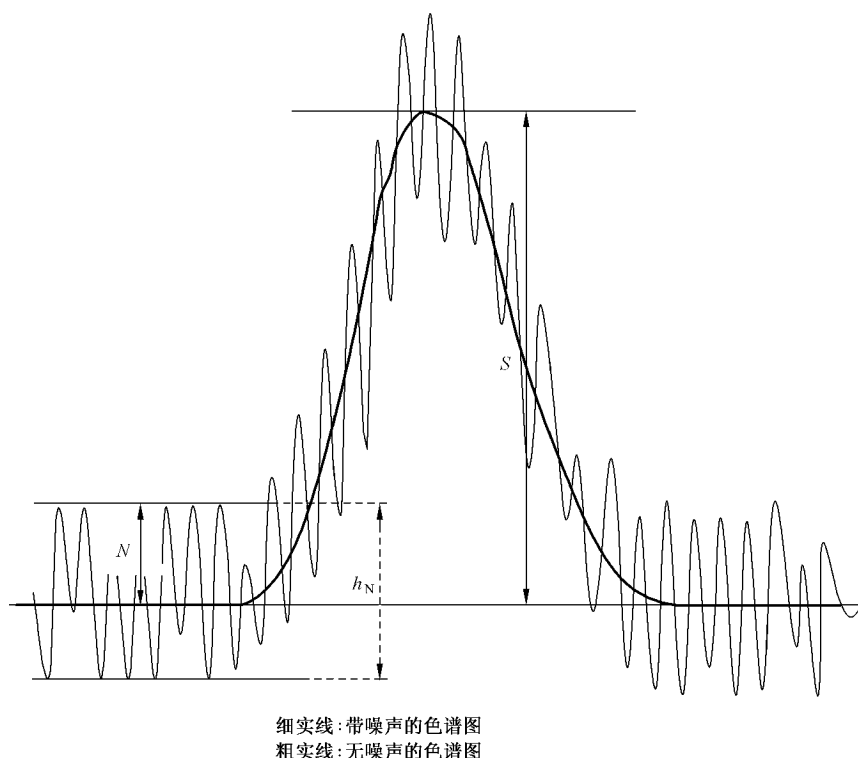


图 11 分析物浓度接近最小检测限时高灵敏度下示意色谱图

17.3 空白试验溶液

使用空白样品获得色谱图。当使用与分析物平行处理得到的空白测量样品溶液时,这样的样品未加入分析物,可以区分样品基质的影响和整个分析操作的影响。当纯溶剂作为空白测量时,有可能将溶剂空白与设备的影响,如进样时的污染、交叉污染等分离开并且获得溶剂空白。

17.4 设备性能的定期检查

按分析仪器制造商提供的操作手册进行,以规定频率检查仪器的每个组件。保留检查记录。

18 专项标准中涉及的项目

当 HPLC 被用来分析时,至少应规定下列项目。

另外,必需通过分析方法验证,系统验证测试等方法对数据质量控制进行规定。

18.1 分析的组分及其浓度范围

18.2 样品的采取、预处理及贮存方法

18.3 分析条件如下:

- 色谱柱填料的种类和颗粒大小;
- 色谱柱管的材料、内径、长度;
- 色谱柱的温度(如果需要);
- 流动相的种类、流速、组成和淋洗条件;
- 进样方法、进样量、稀释比;
- 当采用柱后衍生化技术时,反应液的组成、流速及反应条件;
- 检测器的种类及需要的灵敏度²⁵⁾;

25) 当一定组分的量被进样分析时,检测器灵敏度由色谱图的信噪比(S/N)或信空比(S/B)规定。测试方法也应清楚叙述。

h) 数据处理部分(数据处理机,记录仪);

i) 测量时间范围(数据输入时间)。

18.4 组分确认方法

应给出典型色谱图。在色谱图上,应附有分析条件、峰组分名称、保留时间、检测器的信号输出量程等。

18.5 定量分析:

a) 峰面积或峰高的测量方法;

b) 定量方法类型和重复分析次数;

c) 定量分析使用的材料[分析物纯物质、内标物(种类、纯度),或者当其是分析物的纯物质的混合物时,其组成、浓度范围及制备方法]。

18.6 分析结果的表述和浓度单位

附 录 A
(资料性附录)

本标准章条编号与 JIS K 0124—2002 章条编号对照

表 A.1 给出了本标准章条编号与 JIS K 0124—2002 章条编号对照一览表。

表 A.1 给出了本标准章条编号与 JIS K 0124—2002 章条编号对照

本标准章条编号	对应的 JIS 标准章条编号
3.1~3.20	3 中 b、c、d、e、j、l、n、q、t、u、 v、y、z、ab、ac、ad、ae、ag、ah、aj
5.1	5 中 a
5.2	5 中 b 的一部分
5.3	5 中 b 的一部分
7.1.1~7.1.4	7.1 中 a~d
7.3.1~7.3.2	7.3 中 a~b
7.4.1~7.4.7	7.4 中 a~g
8.1.1~8.1.3	8.1 中 a~c
8.2.1	8.2 中 a
8.2.2	8.2 中 b
8.2.2.1~8.2.2.2	8.2 中 b 的 1)、2)
9.1.1~9.1.3	9.1 中 a~c
11.1.1~11.1.4	11.1 中 a~d
11.6.1~11.6.4	11.6 中 a~d
14.3.1	14.3 中的 Remarks 1
14.3.2	14.3 中的 Remarks 2
14.3.2.1~14.3.2.3	14.3 中的 Remarks 2 的 a~c
15.1.1~15.1.4	15.1 中 a~d
16.1~16.2	16 中 a~b
18.1~18.6	18 中 a~f
附录 A	—

注：表中的章条以外的本标准其他章条编号与 JIS K 0124—2002 其他章条编号均相同且内容相对应。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
高效液相色谱法通则
GB/T 16631—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.75 字数 49 千字
2008年10月第一版 2008年10月第一次印刷

*

书号: 155066·1-33481

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 16631-2008

中国标准出版社授权北京万方数据股份有限公司在中国境内(不含港澳台地区)推广使用