

0512 高效液相色谱法

高效液相色谱法系采用高压输液泵将规定的流动相泵入装有填充剂的色谱柱,对供试品进行分离测定的色谱方法。注入的供试品,由流动相带入色谱柱内,各组分在柱内被分离,并进入检测器检测,由积分仪或数据处理系统记录和处理色谱信号。

1. 对仪器的一般要求和色谱条件

高效液相色谱仪由高压输液泵、进样器、色谱柱、检测器、积分仪或数据处理系统组成。色谱柱内径一般为 3.9~4.6mm,填充剂粒径为 3~10 μm 。超高效液相色谱仪是适应小粒径(约 2 μm)填充剂的耐超高压、小进样量、低死体积、高灵敏度检测的高效液相色谱仪。

(1) 色谱柱

反相色谱柱:以键合非极性基团的载体为填充剂填充而成的色谱柱。常见的载体有硅胶、聚合物复合硅胶和聚合物等;常用的填充剂有十八烷基硅烷键合硅胶、辛基硅烷键合硅胶和苯基硅烷键合硅胶等。

正相色谱柱:用硅胶填充剂,或键合极性基团的硅胶填充而成的色谱柱。常见的填充剂有硅胶、氨基键合硅胶和氰基键合硅胶等。氨基键合硅胶和氰基键合硅胶也可用作反相色谱。

离子交换色谱柱:用离子交换填充剂填充而成的色谱柱。有阳离子交换色谱柱和阴离子交换色谱柱。

手性分离色谱柱:用手性填充剂填充而成的色谱柱。

色谱柱的内径与长度,填充剂的形状、粒径与粒径分布、孔径、表面积、键合基团的表面覆盖度、载体表面基团残留量,填充的致密与均匀程度等均影响色谱柱的性能,应根据被分离物质的性质来选择合适的色谱柱。

温度会影响分离效果,品种正文中未指明色谱柱温度时系指室温,应注意室温变化的影响。为改善分离效果可适当提高色谱柱的温度,但不宜超过 60 $^{\circ}\text{C}$ 。

残余硅羟基未封闭的硅胶色谱柱,流动相 pH 值一般应在 2~8 之间。烷基硅烷带有立体侧链保护、或残余硅羟基已封闭的硅胶、聚合物复合硅胶或聚合物色谱柱可耐受更广泛 pH 值的流动相,适合于 pH 值小于 2 或大于 8 的流动相。

(2) **检测器** 最常用的检测器为紫外-可见分光检测器，包括二极管阵列检测器，其他常见的检测器有荧光检测器、蒸发光散射检测器、**电喷雾检测器**、示差折光检测器、电化学检测器和质谱检测器等。

紫外-可见分光检测器、荧光检测器、电化学检测器为选择性检测器，其响应值不仅与被测物质的量有关，还与其结构有关；蒸发光散射检测器、**电喷雾检测器**和示差折光检测器为通用检测器，对所有物质均有响应，结构相似的物质在蒸发光散射检测器的响应值几乎仅与被测物质的量有关。

紫外-可见分光检测器、荧光检测器、电化学检测器和示差折光检测器的响应值与被测物质的量在一定范围内呈线性关系；~~；~~**但蒸发光散射检测器的响应值与被测物质的量通常呈指数关系，一般需经对数转换**；~~；~~**电喷雾检测器的响应值与被测物质的量通常也呈指数关系，一般需经对数转换或用二次函数计算，但在小质量范围内可基本呈线性。**

不同的检测器，对流动相的要求不同。紫外-可见分光检测器所用流动相应符合紫外-可见分光光度法(通则 0401)项下对溶剂的要求；采用低波长检测时，还应考虑有机溶剂的截止使用波长，并选用色谱级有机溶剂。蒸发光散射检测器、**电喷雾检测器**和质谱检测器不得使用含不挥发性**盐成分**的流动相。

(3) **流动相** 反相色谱系统的流动相常用甲醇-水系统和乙腈-水系统，用紫外末端波长检测时，宜选用乙腈-水系统。流动相中应尽可能不用缓冲盐，如需用时，应尽可能使用低浓度缓冲盐。用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱时，流动相中有机溶剂一般应不低于 5%，否则易导致柱效下降、色谱系统不稳定。

正相色谱系统的流动相常用两种或两种以上的有机溶剂，如二氯甲烷和正己烷等。

流动相注入液相色谱仪的方式(又称洗脱方式)可分为两种：一种是等度洗脱，另一种是梯度洗脱；用梯度洗脱分离时，通常以表格的形式在品种项下规定，其中包括运行时间和流动相在不同时间的成分比例。

品种正文项下规定的条件，除填充剂种类、流动相组分、检测器类型不得改变外，其余如色谱柱内径与长度、填充剂粒径、流动相流速、流动相组分比例、柱温、进样量、检测器灵敏度等，均可适当**改变调整**。~~，以达到系统适用性试验的要求。调整流动相组分比例时，当小比例组分的百分比例 X 小于等于 33%时，~~

允许改变范围为 $0.7X \sim 1.3X$ ；当 X 大于33%时，允许改变范围为 $X-10\% \sim X+10\%$ 。

若需使用小粒径（约 $2\mu\text{m}$ ）填充剂以提高分离度或缩短分析时间，输液泵的性能、进样体积、检测池体积和系统的死体积等必须与之匹配，如有必要时，色谱条件（参数）可适当调整。

调整后，系统适用性应符合要求，且色谱峰出峰顺序不变。若减小进样体积，应保证检测限和峰面积的重复性；若增加进样体积，应使分离度和线性关系仍满足要求。

对于梯度洗脱，调整其色谱参数应比调整等度洗脱色谱参数时更加谨慎，因此调整可能会使某些峰位置变化，造成峰识别错误，或者与其他峰合并。

色谱参数允许调整范围见表 1。

表 1 色谱柱、填料粒径和相应参数允许调整的范围

参数变量	参数调整
固定相	不得改变固定相的理化性质，如填料材质，表面修饰及键合相均需保持一致；从全多孔填料到表面多孔填料的改变，在满足上述条件的前提下是被允许的
填料粒径(dp), 柱长(L)	改变色谱柱粒径和柱长后， L/dp 值(或 N 值)应在原有数值的 $-25\% \sim +50\%$ 范围内
流速	$F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)]$ ，在此基础上可以根据实际使用时系统压力和保留时间，允许流速在 $\pm 50\%$ 的范围内进行调整
进样体积	$V_{inj2} = V_{inj1} \times (L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)$ ，并根据灵敏度的需求进行调整。 即便没有对色谱柱尺寸进行调整，进样体积也可调整以满足系统适用性的要求
梯度洗脱程序 (等度洗脱不适用)	$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) \times [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$ ，保持不同规格色谱柱的洗脱体积倍数相同，从而保证梯度变化相同，并需要考虑不同仪器系统体积的差异
等度洗脱流动相比例 (梯度洗脱不适用)	最小比例的流动相组分可在相对值 $\pm 30\%$ 或者绝对值 $\pm 2\%$ 的范围内进行调整（两者之间选择最大值）；最小比例流动相组分的比例需小于 $(100/n)\%$ ， n 为流动相中组分的个数

流动相缓冲液盐浓度	可在±10%范围内调整
柱温	当温度有规定时，可在±10℃范围内调整
pH 值	除另有规定外，流动相中水相 pH 值可在±0.2pH 范围内进行调整
检测波长	不允许改变

F_1 : 原方法中的流速

F_2 : 调整后方法中的流速

dc_1 : 原方法中色谱柱的内径

dc_2 : 调整后方法中色谱柱的内径

dp_1 : 原方法中色谱柱的粒径

dp_2 : 调整后方法中色谱柱的粒径

V_{inj1} : 原方法中进样体积

V_{inj2} : 调整后方法中进样体积

L_1 : 原方法中色谱柱柱长

L_2 : 调整后方法中色谱柱柱长

t_{G1} : 原方法的梯度段洗脱时间

t_{G2} : 调整后的梯度段洗脱时间

可通过相关软件计算表 1 中流速、进样体积和梯度洗脱程序的调整范围，并根据色谱峰分离情况进行微调。

若调整超出表 1 中规定的范围，调整的方法应进行相应的方法学验证。

无论调整后的方法验证与否，当对其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。

在品种项下一般不宜指定或推荐色谱柱的品牌，但可规定色谱柱的填料（固定相）种类（如键合相，是否改性、封端等）、粒径、孔径，色谱柱的柱长或柱内径；当耐用性试验证明必须使用特定牌号的色谱柱方能满足分离要求时，可在该品种正文项下注明。

2. 系统适用性试验

色谱系统的适用性试验通常包括理论板数、分离度、灵敏度、拖尾因子和重复性等五个参数。

按各品种正文项下要求对色谱系统进行适用性试验,即用规定的对照品溶液或系统适用性试验溶液在规定的色谱系统进行试验,必要时,可对色谱系统进行适当调整,以符合要求。

(1) 色谱柱的理论板数 (n) 用于评价色谱柱的分离柱效能。由于不同物质在同一色谱柱上的色谱行为不同,采用理论板数作为衡量色谱柱效能的指标时,应指明测定物质,一般为待测物质或内标物质的理论板数。

在规定的色谱条件下,注入供试品溶液或各品种项下规定的内标物质溶液,记录色谱图,量出供试品主成分色谱峰或内标物质色谱峰的保留时间 t_R 和峰宽(W)或半高峰宽($W_{h/2}$),按 $n = 16(t_R/W)^2$ 或 $n = 5.54(t_R/W_{h/2})^2$ 计算色谱柱的理论板数。 t_R 、 W 、 $W_{h/2}$ 可用时间或长度计(下同),但应取相同单位。

(2) 分离度 (R) 用于评价待测物质与被分离物质之间的分离程度,是衡量色谱系统分离效能的关键指标。可以通过测定待测物质与已知杂质的分离度,也可以通过测定待测物质与某一指标性成分(内标物质或其他难分离物质)的分离度,或将供试品或对照品用适当的方法降解,通过测定待测物质与某一降解产物的分离度,对色谱系统分离效能进行评价与调整。

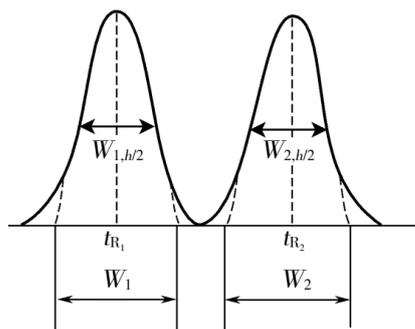
无论是定性鉴别还是定量测定,均要求待测物质色谱峰与内标物质色谱峰或特定的杂质对照色谱峰及其他色谱峰之间有良好的分离度。除另有规定外,待测物质色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度应大于 1.5。分离度的计算公式为:

$$R = \frac{2 \times (t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2} \quad \text{或} \quad R = \frac{2 \times (t_{R_2} - t_{R_1})}{1.70 \times (W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$

式中 t_{R_2} 为相邻两色谱峰中后一峰的保留时间;

t_{R_1} 为相邻两色谱峰中前一峰的保留时间;

W_1 、 W_2 及 $W_{1,h/2}$ 、 $W_{2,h/2}$ 分别为此相邻两色谱峰的峰宽及半高峰宽(如图)。



当对测定结果有异议时，色谱柱的理论板数(n)和分离度(R)均以峰宽(W)的计算结果为准。

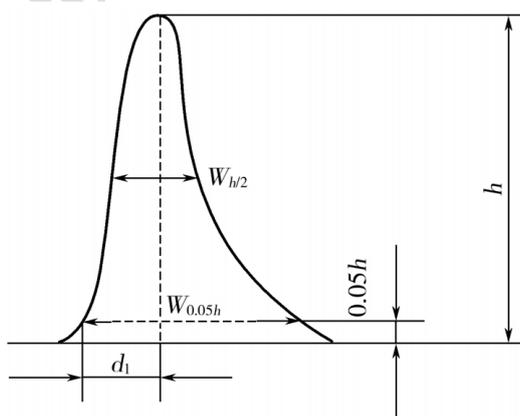
(3) **灵敏度** 用于评价色谱系统检测微量物质的能力，通常以信噪比(S/N)来表示。通过测定一系列不同浓度的供试品或对照品溶液来测定信噪比。定量测定时，信噪比应不小于 10；定性测定时，信噪比应不小于 3。系统适用性试验中可以设置灵敏度实验溶液来评价色谱系统的检测能力。

(4) **拖尾因子 (T)** 用于评价色谱峰的对称性。拖尾因子计算公式为：

$$T = \frac{W_{0.05h}}{2d_1}$$

式中 $W_{0.05h}$ 为 5% 峰高处的峰宽；

d_1 为峰顶在 5% 峰高处横坐标平行线的投影点至峰前沿与此平行线交点的距离（如图）。



以峰高作定量参数时，除另有规定外， T 值应在 0.95~1.05 之间。

以峰面积作定量参数时，一般的峰拖尾或前伸不会影响峰面积积分，但严重拖尾会影响基线和色谱峰起止的判断和峰面积积分的准确性，此时应在品种正文项下对拖尾因子作出规定。

(5) **重复性** 用于评价色谱系统连续进样时响应值的重复性能。采用外标

法时，通常取各品种项下的对照品溶液，连续进样 5 次，除另有规定外，其峰面积测量值的相对标准偏差应不大于 2.0%；采用内标法时，通常配制相当于 80%、100%和 120%的对照品溶液，加入规定量的内标溶液，配成 3 种不同浓度的溶液，分别至少进样 2 次，计算平均校正因子，其相对标准偏差应不大于 2.0%。当待测成分是微量或痕量，进样量少或其色谱峰响应值较小时，对相对标准偏差的要求可适当放宽。

3. 测定法

3.1 定性分析

常用的定性方法主要有但不限于以下：

(1) 利用保留时间定性

保留时间 (retention time) t_R 被定义为被分离组分从进样到柱后出现该组分最大响应值时的时间，也即从进样到出现某组分色谱峰的顶点时为止所经历的时间，常以分 (min) 为时间单位，用于反映被分离的组分在性质上的差异。通常以在相同的色谱条件下待测成分的保留时间与对照品的保留时间是否一致作为待测成分定性的依据。

在相同的色谱条件下，待测成分的保留时间与对照品的保留时间应无统计学意义上的显著性差异；两个保留时间不同的色谱峰归属于不同化合物，但两个保留时间一致的色谱峰有时未必可归属为同一化合物，在作未知物鉴别时应特别注意。

若改变流动相组成或更换色谱柱的种类，待测成分的保留时间仍与对照品的保留时间一致，可进一步证实待测成分与对照品为同一化合物。

当待测成分 (保留时间 $t_{R,1}$) 无对照品时，可以样品中的另一成分或在样品中加入另一成分作为参比物 (保留时间 $t_{R,2}$)，采用相对保留时间 (RRT) 作为定性 (或定位)、校正因子计算含量的方法。在品种项下，除另有规定外，相对保留时间以未扣除死时间的非调整保留时间按下式计算。

$$RRT = \frac{t_{R,1}}{t_{R,2}}$$

若需以扣除死时间的调整保留时间计算，应在相应的品种项下予以注明。

(2) 利用光谱相似度定性

化合物的全波长扫描紫外光谱图提供一些有价值的定性信息。待测成分的光谱与对照品的光谱的相似度可用于辅助定性分析。用二极管阵列检测器可得到更多的信息，包括色谱信号、时间、波长的三维色谱光谱图，其定性结果以及用于峰纯度分析，与紫外检测器相比具有更大的优势。

同样应注意，两个光谱不同的色谱峰表征了不同化合物，但两个光谱相似的色谱峰未必可归属为同一化合物。

(3) 利用质谱检测器定性

利用质谱检测器提供的色谱峰分子质量和结构的信息进行定性分析，可获得比仅利用保留时间或增加光谱相似性进行定性分析更多的、更可靠信息，不仅可用于已知物的定性分析，还可提供未知化合物的结构信息。

3.2 定量分析

(1) 内标法 按品种正文项下的规定，精密称（量）取对照品和内标物质，分别配成溶液，各精密量取适量，混合配成校正因子测定用的对照溶液。取一定量进样，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：

$$\text{校正因子}(f) = \frac{A_S/c_S}{A_R/c_R}$$

式中 A_S 为内标物质的峰面积或峰高；

A_R 为对照品的峰面积或峰高；

c_S 为内标物质的浓度；

c_R 为对照品的浓度。

再取各品种项下含有内标物质的供试品溶液，进样，记录色谱图，测量供试品中待测成分和内标物质的峰面积或峰高，按下式计算含量：

$$\text{含量}(c_X) = f \times \frac{A_X}{A'_S/c'_S}$$

式中 A_X 为供试品的峰面积或峰高；

c_X 为供试品的浓度；

A'_S 为内标物质的峰面积或峰高；

c'_S 为内标物质的浓度；

f 为内标法校正因子。

采用内标法，可避免因样品前处理及进样体积误差对测定结果的影响。

(2) 外标法 按各品种项下的规定，精密称（量）取对照品和供试品，配制成溶液，分别精密取一定量，进样，记录色谱图，测量对照品溶液和供试品溶液中待测物质的峰面积（或峰高），按下式计算含量：

$$\text{含量}(c_X) = c_R \times \frac{A_X}{A_R}$$

式中各符号意义同上。

由于微量注射器不易精确控制进样量，当采用外标法测定时，以手动进样器定量环或自动进样器进样为宜。

(3) 加校正因子的主成分自身对照法 测定杂质含量时，可采用加校正因子的主成分自身对照法。在建立方法时，按各品种项下的规定，精密称（量）取待测物对照品和参比物质对照品各适量，配制待测杂质校正因子的溶液，进样，记录色谱图，按下式计算待测杂质的校正因子。

$$\text{校正因子} = \frac{c_A/A_A}{c_B/A_B}$$

式中 c_A 为待测物的浓度；

A_A 为待测物的峰面积或峰高；

c_B 为参比物质的浓度；

A_B 为参比物质的峰面积或峰高。

也可精密称（量）取主成分对照品和杂质对照品各适量，分别配制成不同浓度的溶液，进样，记录色谱图，绘制主成分浓度和杂质浓度对其峰面积的回归曲线，以主成分回归直线斜率与杂质回归直线斜率的比计算校正因子。

校正因子可直接载入各品种项下，用于校正杂质的实测峰面积，需作校正计算的杂质，通常以主成分为参比，采用相对保留时间定位，其数值一并载入各品种项下。

测定杂质含量时，按各品种项下规定的杂质限度，将供试品溶液稀释成与杂质限度相当的溶液，作为对照溶液，进样，记录色谱图，必要时，调节纵坐标范围（以噪声水平可接受为限）使对照溶液的主成分色谱峰的峰高约达满量程的

10%~25%。除另有规定外，通常含量低于 0.5%的杂质，峰面积测量值的相对标准偏差（RSD）应小于 10%；含量在 0.5%~2%的杂质，峰面积测量值的 RSD 应小于 5%；含量大于 2%的杂质，峰面积测量值的 RSD 应小于 2%。然后，取供试品溶液和对照溶液适量，分别进样。除另有规定外，供试品溶液的记录时间，应为主成分色谱峰保留时间的 2 倍，测量供试品溶液色谱图上各杂质的峰面积，分别乘以相应的校正因子后与对照溶液主成分的峰面积比较，计算各杂质含量。

（4）不加校正因子的主成分自身对照法 测定杂质含量时，若无法获得待测杂质的校正因子，或校正因子可以忽略，也可采用不加校正因子的主成分自身对照法。同上述（3）法配制对照溶液、进样、调节纵坐标范围和计算峰面积的相对标准偏差后，取供试品溶液和对照品溶液适量，分别进样。除另有规定外，供试品溶液的记录时间应为主成分色谱峰保留时间的 2 倍，测量供试品溶液色谱图上各杂质的峰面积并与对照溶液主成分的峰面积比较，依法计算杂质含量。

（5）面积归一化法 按各品种项下的规定，配制供试品溶液，取一定量进样，记录色谱图。测量各峰的面积和色谱图上除溶剂峰以外的总色谱峰面积，计算各峰面积占总峰面积的百分率。用于杂质检查时，由于仪器响应的线性限制，峰面积归一化法一般不宜用于微量杂质的检查。

如适用，也可使用其他方法如标准曲线法等，并在品种正文项下注明。

4. 多维液相色谱

多维色谱又称为色谱/色谱联用技术，是采用匹配的接口将不同分离性能或特点的色谱连接起来，第一级色谱中未分离或需要分离富集的组分由接口转移到第二级色谱中，第二级色谱仍需进一步分离或分离富集的组分，也可以继续通过接口转移到第三级色谱中。理论上，可以通过接口将任意级色谱串联或并联起来，直至将混合物样品中所有的难分离、需富集的组分都分离或富集之。但实际上，一般只要选用两个合适的色谱联用就可以满足对绝大多数难分离混合物样品的分离或富集要求。因此，一般的色谱/色谱联用都是二级，即二维色谱。

在二维色谱的术语中，1D和2D分别指一维和二维；而¹D和²D则分别代表第一维和第二维。

二维液相色谱可以分为差异显著的两种主要类型。若两种色谱的联用仅是通过接口将前一级色谱中某一（些）组分传递到后一级色谱中继续分离，这是中心

切割式二维色谱 (**heart-cutting mode two-dimensional chromatography**)，一般用 LC-LC (也有用 LC+LC) 表示。但当两种色谱联用，接口将前一级色谱中的全部组分连续地传递到后一级色谱中进行分离，这种二维色谱称为全二维色谱 (**comprehensive two-dimensional chromatography**)，一般用 LC×LC 表示。LC×LC 是将¹D 色谱柱的流出物连续转移至²D 色谱柱。相比之下，LC-LC 则是将¹D 流出物选择性地 (部分地) 转移至²D 色谱柱。此外，这两种类型下还有若干子类，包括选择性二维色谱 (sLC×LC) 和多中心切割 2D-LC (mLC-LC)。

LC-LC 或 LC×LC 两种二维色谱可以是相同的分离模式和类型，也可以是不同的分离模式和类型。接口技术是实现二维色谱分离的关键之一，原则上，只要有匹配的接口，任何模式和类型的色谱都可以联用。

和一维色谱一样，二维色谱也可以和质谱、红外和核磁共振等联用。