

前 言

GB/T 19267《刑事技术微量物证的理化检验》分为 12 个部分：

- 第 1 部分：红外吸收光谱法；
- 第 2 部分：紫外-可见吸收光谱法；
- 第 3 部分：分子荧光光谱法；
- 第 4 部分：原子发射光谱法；
- 第 5 部分：原子吸收光谱法；
- 第 6 部分：扫描电子显微镜法；
- 第 7 部分：气相色谱-质谱法；
- 第 8 部分：显微分光光度法；
- 第 9 部分：薄层色谱法；
- 第 10 部分：气相色谱法；
- 第 11 部分：高效液相色谱法；
- 第 12 部分：热分析法。

本部分为 GB/T 19267 第 11 部分。

本部分由全国刑事技术标准化技术委员会(CSBTS/TC179)提出并归口。

本部分的起草单位：广州市公安局刑事科学技术研究所。

本部分起草人：卢培标。

刑事技术微量物证的理化检验

第 11 部分：高效液相色谱法

1 范围

本部分规定了高效液相色谱的检验方法。

本部分适用于刑事技术领域中微量物证的理化检验,其他领域亦可参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 19267 的本部分的引用而成为本部分的条款。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部分,然而,鼓励根据本部分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部分。

GB/T 9008—1988 液相色谱法术语

GB/T 13966—1992 分析仪器术语

GB/T 14666—1993 分析化学术语

3 术语和定义

GB/T 9008、GB/T 13966、GB/T 14666 中确立的以及下列术语和定义适用于本部分。

3.1

高效液相色谱法 high performance liquid chromatography(HPLC)

具有高分离效能的柱液相色谱法。

3.2

色谱图 chromatogram

色谱柱流出物通过检测器时所产生的响应信号对时间的曲线图或流动相流出体积的曲线图,或者通过适当方法观察到的纸色谱或薄层色谱斑点、谱带的分布图。

3.3

色谱峰 chromatographic peak

色谱柱流出组分通过检测器系统时所产生的响应信号的微分曲线。

3.4

峰高 peak height

从峰的最大值到峰底之间距离。

3.5

峰面积 peak area

指峰顶至峰底之间的面积。

3.6

分离度 resolution

两个相邻色谱峰的分离程度,以两个组分保留值之差与其平均峰宽值之比 R 表示。

$$R = 2 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

式中:

t_R ——保留时间;

W ——峰宽。

3.7

响应值 response

组分通过检测器所产生的信号。

3.8

灵敏度 sensitivity

通过检测器的物质质量变化 ΔQ 时, 响应信号 ΔR 的变化率, 用 S 表示。

$$S = \Delta R / \Delta Q$$

3.9

半高峰宽 peak width at half height

通过峰高的中点作平行于峰底的直线, 此直线与峰两侧相交两点之间的距离。常用符号 $W_{h/2}$ 表示。

3.10

压力梯度校正因子 pressure gradient correction factor

用以校正色谱柱中由于流动相的可压缩性所产生的压力梯度的因子, 用 j 表示。

$$j = 3/2 \times [(P_i/P_o)^2 - 1] / [(P_i/P_o)^3 - 1]$$

式中:

P_i ——柱入口压力, MPa;

P_o ——柱出口压力, MPa。

3.11

反相液相色谱法 reversed-phase liquid chromatography

固定相的极性较流动相的极性弱的液相色谱法。

3.12

正相液相色谱法 normal-phase liquid chromatography

固定相的极性较流动相的极性强的液相色谱法。

3.13

峰面积近似求法 approximation of peak area

指使用手工的方法近似测量色谱峰的面积。

对称峰: $A = h \times W_{h/2}$

不对称峰: $A = h \times (W_{0.15} + W_{0.85}) / 2$

式中:

h ——峰高;

$W_{h/2}$ ——半峰宽;

$W_{0.15}$ ——为峰高 0.15 处的峰宽;

$W_{0.85}$ ——为峰高 0.85 处的峰宽。

3.14

梯度洗脱 gradient elution

间断地或连续地变更流动相的化学组分, 从而改变液相色谱分离效果的洗脱方法。

4 原理

高效液相色谱法是以高压下液体为流动相的液相柱色谱法。它的色谱分离原理取决于所用的色谱

柱的性质,如液-液分配、液-固吸附、离子交换、离子对等。与经典液相色谱相比,它具有流速快、分离效率高和检测灵敏度高的特点。

5 仪器

5.1 仪器名称

高效液相色谱仪。

5.2 仪器组成

5.2.1 高效液相色谱仪一般由五部分组成:输液系统、进样系统、分离系统、检测系统以及数据系统。

5.2.2 色谱柱

- a) 液-液色谱法固定相:它的固定相为“化学键合固定相”,即把固定相(ODS、苯基、醚基、胺基、氰基等)通过化学键合的方法接在担体(多为硅胶)上;
- b) 液-固吸附色谱法固定相:采用的吸附剂有硅胶、氧化铝、分子筛和聚酰胺等;
- c) 离子交换色谱法固定相:有二种,即薄膜型离子交换树脂(薄壳玻璃珠为担体)和离子交换键合固定相(用化学反应将交换基团结合在惰性担体表面);
- d) 排阻色谱法凝胶色谱固定相:分软质、半硬质凝胶和硬质凝胶三大类。软质,如葡萄糖凝胶,琼脂糖凝胶等适合水作为流动相;半硬质凝胶,如苯乙烯-二乙烯基苯交联共聚凝胶,适用于非水溶剂作流动相;硬质凝胶,如多孔硅胶多孔玻璃珠等,不易受水或非水溶剂流动相溶剂系统的压力、流速、pH值及离子强度的影响,适用于高流速的操作;
- e) 离子对色谱:能解离的溶质及其对离子(即平衡离子)均能分别溶于水相中,但当二者结合成离子对后,只溶于有机相中。常用的离子有:烷基铵离子,如四丁基铵离子用于分离酸类;烷基磺酸基类,如庚烷磺酸钠用于分离儿茶酚胺类和表面活性剂,十二烷基磺酸用于分离有机胺类化合物。在正相和反相柱上均能实现。

5.2.3 检测器

5.2.3.1 紫外检测器(UV)

基于被分析试样对特定波长紫外光的选择性吸收。这是最常用的检测器,线性范围 10^1 ,最小检测浓度达 10^{-10} g/mL。线性范围宽,对流速和温度变化不敏感。

5.2.3.2 二极管阵列检测器(DAD)

采用光电二极管阵列检测元件,可在190 nm~950 nm之间快速扫描获三维色谱-光谱图。DAD灵敏度极高,对复杂试样的组分可同时进行多波长检测,并给出最佳定量结果。

5.2.3.3 荧光检测器(FD)

线性范围 10^3 ,最小检测浓度达 10^{-12} g/mL。凡有发出荧光的化合物,或经衍生后可产生荧光的化合物均可进行检测。

5.2.3.4 示差折光检测器(RI)

示差折光检测器又称折光指数检测器,线性范围 10^4 ,最小检测浓度达 10^{-7} g/mL。

5.2.3.5 其他检测器

除上述检测器外,还有移动丝氢火焰检测器(线性范围为 10^5 ,最小检出浓度为 10^{-7} g/mL)、电子捕获检测器(线性范围 10^2 ,最小检出浓度为 10^{-10} g/mL)、以及红外吸收检测器、极谱检测器和放射性检测器等。

5.3 主要技术要求

5.3.1 色谱柱系粒径为 $3\ \mu\text{m}$ 、 $5\ \mu\text{m}$ 和 $10\ \mu\text{m}$,最佳为 $3\ \mu\text{m}$ 填料(多孔物如硅胶、氧化铝、高分子的多孔小球、或者是表面多孔的物质如固体硅珠上化学键合一个薄薄的多孔层充填而成)。

5.3.2 输送流动相的泵最高耐压为7 000 psi(480大气压),通常仪器压力上限操作在5 000 psi(350个大气压)。要求以恒流量泵输送液体,使保留时间保持不变。

5.3.3 液相色谱用的光学和电化学的检测器(检测器检测极限一般在 10^{-8} 物质的量 $\sim 10^{-9}$ 甚至 10^{-11} 物质的量)应该对压力波动不敏感。

5.3.4 根据被测样品的量配用相应的环管进样器,批量样品的分析,则要求自动进样器。

5.3.5 包括联接管路在内从进样阀到检测器应尽量减小柱外死体积,避免样品带的扩散而导致分离度的降低。

5.3.6 整个色谱仪器系统必需耐腐蚀、无表面吸附,常用为不锈钢材料。除了常用的不锈钢材料外,也有采用全塑料材料系统的,如聚四氟烯材料。

6 检材处理和样品制备

6.1 检材处理

必须根据被测样品的理化性质进行必要的处理,净化后溶解于适量的溶剂中才能进行 HPLC 检测。使用 HPLC 检测常见的微量物证,主要有:爆炸残留物中炸药,纤维上的染料分析,化妆品分析,粘合剂中防腐剂分析以及书写材料的分析等等。

常用的检材预处理是使用适当的溶剂将样品提取出来。如果基体并不是很复杂,则提取的样品溶液经过适当的浓缩即可进行 HPLC 分析。但是在一个复杂的基体中则需要合适的样品制备,尤其是去除干扰比较大的那些物质,以便顺利地进行 HPLC 的分析。如去除分子量大于 2 000 的水溶性化合物,可以使用凝胶色谱柱或透析膜;离子型的化合物可以用离子交换树脂进行样品制备;常规的薄层色谱法可以起到预分离的效果;固相萃取法对微量样品的制备比柱色谱和薄层色谱的效果更为突出。

6.2 样品制备

经过提取、净化和浓缩后的样品首先经 $0.20\ \mu\text{m}$ 或 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤,然后在氮气流下吹干,再用本次实验的流动相溶解,获得透明澄清的样品溶液,否则还需再次过滤。

7 试验方法

7.1 分离方法的选择

7.1.1 根据试样的分子量、极性、溶解度、化学结构等选择合适的方法。

7.1.2 分子量在 200~2 000 之间,可用液-液分配色谱法或液-固吸附色谱法。

7.1.3 分子量大于 2 000,可用排阻色谱法。

7.1.4 溶于水并能离解的化合物(如有机酸、有机碱等),采用离子交换色谱或离子对色谱法。

7.1.5 溶于有机溶剂的强极性化合物,用正相液-液分配色谱法。

7.1.6 溶于有机溶剂的中等极性化合物,用反相液-液分配色谱法或液-固吸附色谱法。

7.2 色谱柱的选择

常规使用的分析柱管内径在 $4\ \text{mm}\sim 8\ \text{mm}$ 。细管柱分析柱内径为 $1\ \text{mm}\sim 2\ \text{mm}$ 。 $1\ \text{mm}$ 以下的内径则用于毛细管分析柱。管的内径决定了色谱分离的流速和样品的载量。

色谱柱固定相的粒度通常有 $3\ \mu\text{m}$ 、 $5\ \mu\text{m}$ 、 $7\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ 等规格,常用的为 $5\ \mu\text{m}$ 或 $10\ \mu\text{m}$ 。

在分离方法确定之后,根据具体化合物的类型按手册或样本选用具体的柱。对于微量物证的检材,大部分选择 C_8 、 C_{18} 烷基-硅胶键合固定相柱,或者氨基、氰基-硅胶键合固定相柱,用于反相或正相液-液分配色谱法。

7.3 流动相的选择

7.3.1 流动相的组成

7.3.1.1 洗脱剂

能使试样溶解,并达到各组分分离的溶剂。

7.3.1.2 调节剂

调节保留时间的长短,改善试样组分的分离状态。常用的调节剂有醇、酮、酸、酯、醚和胺类等。

7.3.2 流动相的性质

7.3.2.1 强度

液固吸附色谱法中溶剂的强度是分离条件的首选参数。

7.3.2.2 极性

液-液分配色谱法中溶剂的极性是分离条件的首选参数。

正相色谱系统:选择非极性的溶剂作洗脱剂,如正己烷、正庚烷、环己烷等,用乙醇、异丙醇、四氢呋喃、三氯甲烷作调节剂;

反相色谱系统:选择水作洗脱剂,常用甲醇、乙腈作调节剂。

溶剂的极性顺序为水、乙腈、甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、四氢呋喃、乙酸乙酯、乙醚、二氯甲烷、三氯甲烷、二氯乙烷、苯、正己烷、正庚烷。

7.3.2.3 pH值

离子对色谱法中一般采用缓冲液作流动相,因为pH值直接影响流动相中离子的形成及离子对与固定相作用的程度,故要严格控制。

7.3.2.4 溶解性能

排阻色谱法中首先要考虑流动相对试样的溶解性能,为此,有时不得不选用黏度较大的溶剂,如乙醇、正己烷、四氢呋喃等作流动相。

7.3.3 流动相的选择要求

选用流动相的溶剂应避免引起柱效损失;避免保留时间变化;不能与被分离的组分起反应,应考虑溶剂的纯度,至少使用分析级以上的。必要时使用液相色谱级的,如甲醇、乙腈。选择流动相应考虑溶剂的强度、极性、黏度、沸点、溶解度和pH值。这些因素对色谱性能均有不同程度的影响,但是对不同的色谱模式而言,有起主导作用的因素。

7.4 仪器性能检查

7.4.1 初步检查

在对样品进行检验前,按照仪器的操作手册对仪器的性能进行详细的检查,使仪器处于良好的性能下进行操作。

7.4.2 输出压力

最高输出压力在 $35 \text{ MPa/cm}^2 \sim 50 \text{ MPa/cm}^2$ 。

7.4.3 流量精度

在 $0.1 \text{ mL/min} \sim 10 \text{ mL/min}$ 的范围内精度 $\pm 1\%$ 。

7.4.4 基线噪声和漂移

低噪声的基线是呈绒毛状的平稳直线。漂移的大小是以一小时内连续测定信号的变化作为量度。

7.4.5 柱的性能

利用上一次试验的结果,计算理论板数至少在 2 000 以上。

7.5 试验过程

7.5.1 流动相脱气

流动相的水和溶剂分别通过 $0.45 \mu\text{m}$ 用于水相和有机相的滤膜,然后混合。除仪器本身附有脱气装置外,都需进行脱气。通常有二种,一为搅拌下真空抽气 10 min,一为超声波脱气。后者在超声浴中 15 min \sim 20 min。

7.5.2 冲柱

检测前,都用本次试验的流动相以 1 mL/min 的流量,等度或梯度模式冲柱 15 min 以上,直到获得稳定的、低漂移的基线。

7.5.3 注射

通常用手动六通阀的环管进样(如罗达因阀, Rheodyne)。环管的体积是固定的,有 $0.5 \mu\text{L} \sim$

100 μL 适于定量分析。非制备性的进样量一般为 1 μL ~10 μL ,取决于样品浓度。

7.6 定性分析

在相同的条件下(温度、流速、柱负荷等),化合物的保留体积或保留时间是相同的,其标准偏差为 2%。因此,可以用已知标准品进行对照。在不很复杂的体系中,若被测样品的组分与标准品的保留值相同,则可能为同一物质。

7.7 定量分析

7.7.1 归一化法

7.7.1.1 校正因子测定

基于等量的不同物质在同一检测器上的相应值不同,故需要引入校正因子。

准确称取一定量的被测组分纯品和标准物,混合均匀后溶于合适的溶剂或者分析所用的流动相中。分别测得相应的峰面积,按下述公式计算各被测组分的校正因子:

$$f'_i = \frac{f_i}{f_s} = \frac{W_i \times A_s}{W_s \times A_i}$$

式中:

f'_i ——组分 i 的相对校正因子;

f_i ——组分 i 的绝对校正因子;

f_s ——标准物 s 的绝对校正因子;

W_i ——组分 i 的量;

A_i ——组分 i 的峰面积;

W_s ——标准物 s 的量;

A_s ——标准物 s 的峰面积。

7.7.1.2 归一化的含量计算

在相同的分析条件下,试样中全部组分都显示出色谱峰时,测量的全部峰面积经相应的校正因子修正并归一化,按下式获得每个组分的百分含量:

$$C_i(\%) = A_i f_i / (A_1 f_1 + A_2 f_2 + A_3 f_3 + \dots + A_n f_n) \times 100\%$$

式中:

C_i —— i 组分的百分含量;

A_i —— i 组分在试样实测时获得的峰面积。

7.7.2 外标法

使用与待测组分同质的纯品配制成具有梯度浓度的标准溶液,建立标准溶液与其相应的相应值(峰面积)的校准曲线。在相同的分析条件下,准确注射相同体积的试样并测出峰面积,然后从校准曲线上求得量。

7.7.3 内标法

选择一个合适的纯品作为内标物,它的性质与被测组分相近但与被分析体系中所有组分完全分离。准确称取一定量的被测组分纯品与内标物,分别溶于合适的溶剂或者分析所用的流动相中,并配制一定浓度的贮液。将被测组分的贮液配制成具有梯度浓度的标准溶液,并使每种标准溶液含有等量的内标物。建立被测组分和恒量内标物的面积比与被测组分浓度的校准曲线。在相同的分析条件下注射相同体积,内含恒量内标物的试样,测出二者的面积比,然后从校准曲线上求得量。

8 结果表述

检材谱图与比对样品谱图或标准谱图进行定性比较或含量测定后,给出检材与何种比对样品成分相同或不相同,以及含量范围的结论。此外,还应注明检测条件。