



中华人民共和国国家标准

GB/T 19267.11—2008
代替 GB/T 19267.11—2003

刑事技术微量物证的理化检验 第 11 部分：高效液相色谱法

Physical and chemical examination of trace evidence in forensic sciences—
Part 11: High performance liquid chromatography

2008-08-14 发布

2009-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

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/X 射线能谱法；
- 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 的第 11 部分。

本部分代替 GB/T 19267.11—2003《刑事技术微量物证的理化检验 第 11 部分：高效液相色谱法》。

本部分与 GB/T 19267.11—2003 相比主要变化有：

- 对部分术语和定义进行了修改(见本部分和 GB/T 19267.11—2003 的第 3 章)；
- 对仪器组成、技术参数进行了修改和补充(见本部分和 GB/T 19267.11—2003 的第 5 章)；
- 对检材处理方法进行了修改(见本部分和 GB/T 19267.11—2003 的 6.1)。

本部分由中华人民共和国公安部提出。

本部分由全国刑事技术标准化技术委员会理化检验标准化分技术委员会(SAC/TC 179/SC 4)归口。

本部分起草单位：云南省公安厅物证鉴定中心。

本部分主要起草人：李虹。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 19267.11—2003。

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

GB/T 19267 的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 液相色谱法术语 柱色谱法和平面色谱法

GB/T 13966 分析仪器术语

GB/T 14666 分析化学术语

3 术语和定义

GB/T 9008、GB/T 13966 和 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)

采用高效色谱柱、高灵敏度检测器以及高压输液泵的液相色谱法,称高压液相色谱法或高速液相色谱法。与经典的液相色谱法相比,具有很高的柱效和分离能力,对难挥发、热不稳定、分子量大的高分子化合物及离子型化合物的分析极为有利。

3.2

超高效液相色谱法 ultra performance liquid chromatography(UPLC)

基于色谱理论范德米特(Van Deemeter)方程的理论基础,选用 $1.7\ \mu\text{m}$ 小颗粒分离的理论,降低相应的理论塔板高度,使分离度比高效液相色谱法色谱柱使用的填料 $5\ \mu\text{m}$ 颗粒分离度提高 70%,柱效提高 3 倍,因而具有更强的分离能力,更快的分析速度和更高的灵敏度,可高灵敏度、快速分离复杂组分如天然产物或中草药及痕量的目标化合物。超高效液相色谱技术是今后高效液相色谱技术发展的趋势。

3.3

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或对流动相流出体积的曲线图。

3.4

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。

3.5

峰高 peak height

峰的顶点到基线的距离。

3.6

峰面积 peak area

峰与峰基之间包围的面积。

3.7

分离度 resolution

两个相邻色谱峰的分离程度。数值上等于两个组分保留值之差与其平均峰宽值之比,用 R 表示,按下列公式计算:

$$R = 2 \times (t_{R_2} - t_{R_1}) / (W_1 + W_2)$$

式中:

t_R ——保留时间;

W ——峰宽。

3.8

响应值 response

组分通过检测器所产生的信号。

3.9

灵敏度 sensitivity

物质响应值随通过检测器的物质的量的变化率,用 S 表示,按下列公式计算:

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

式中:

ΔQ ——物质量的变化;

ΔR ——响应信号的变化。

3.10

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。

3.11

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,按下列公式计算:

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

式中:

P_i ——柱入口压力,单位为兆帕(MPa);

P_o ——柱出口压力,单位为兆帕(MPa)。

3.12

反相液相色谱法 reversed-phase liquid chromatography

固定相极性比流动相极性弱的液相色谱法。

3.13

正相液相色谱法 normal-phase liquid chromatography

固定相极性比流动相极性强的液相色谱法。

3.14

梯度洗脱 gradient elution

间断或连续地变更流动相组成。

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。它包括多种分离模式,如液-液分配色

谱、液-固吸附色谱、离子交换色谱、亲和色谱、凝胶或尺寸排阻色谱、电泳等。与经典液相柱色谱相比，它具有高效、快速和灵敏的特点，可以分离不可挥发而具有一定溶解性的物质或热不稳定的物质。

5 仪器

5.1 高效液相色谱仪

5.1.1 仪器组成

高效液相色谱仪由五部分组成：输液系统、进样系统、分离系统、检测系统以及数据处理系统。

5.1.2 色谱柱

色谱柱是高效液相色谱仪的分离系统，按不同的分离原理，色谱柱可分为下列几种：

- a) 液-液色谱法固定相：它的固定相为“化学键合固定相”，即把固定液（十八烷基、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：有两种，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：分软质凝胶、半硬质凝胶和硬质凝胶三大类。软质凝胶，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。

5.1.3 检测器

5.1.3.1 紫外检测器(UVD)

目前应用最广泛的检测器，检测灵敏度高，线性范围宽，对流速和温度不敏感，线性范围 10^4 ，最小检测浓度达 10^{-10} g/mL。

5.1.3.2 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~800 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。

5.1.3.3 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。

5.1.3.4 示差折光检测器(RID)

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。

5.1.3.5 蒸发光散射检测器(ELSD)

一种质量型检测器，用来检测不挥发性化合物，尤其对一些无紫外吸收或紫外末端吸收的化合物更具优越性。

5.1.3.6 电导检测器(ECD)

离子色谱中使用最广泛的检测器。采用两对电极测量水溶液中离子型溶质的电导，由电导的变化测定淋洗液中溶质浓度，灵敏度可达 10^{-8} g/mL，线性动态范围为 10^3 。

5.1.3.7 其他检测器

除上述检测器外，还有电子捕获检测器（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。

5.2 主要技术要求

5.2.1 色谱柱系粒径为 3 μm 、5 μm 和 10 μm ，最佳为 3 μm 填料(多孔物如硅胶、氧化铝、高分子的多孔小球或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)。

5.2.2 输送流动相的泵最高输出压力应达 40 MPa~50 MPa。要求以恒流量泵输送液体，使保留时间保持不变。

5.2.3 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，应尽可能使用自动进样器。

5.2.4 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。

5.2.5 整个色谱仪器系统必须耐腐蚀、无表面吸附，常用不锈钢材料。另外，也有采用全塑料系统的，如聚四氟乙烯材料。

6 检材处理和样品制备

6.1 检材处理

在进行 HPLC 分析前，必须对被测样品进行处理。样品预处理是 HPLC 分析的重要部分，经样品预处理可相对除净损害色谱柱的物质，对试样进行预富集，消除与待测组分峰重叠的干扰组分，将待测组分转变为适于检测的形式，提高检测灵敏度和选择性。

使用 HPLC 分析的常见微量物证主要有：爆炸残留物中的炸药，纤维上的染料，化妆品，粘合剂中的防腐剂以及书写材料等。

检材应根据被测组分的理化性质和其基体情况进行必要的处理，当其基体并不太复杂，可直接浸泡提取、浓缩即可进行 HPLC 分析。如果基体比较复杂则根据杂质的性质采取液-液萃取、固相萃取、样品衍生化等预处理方法进行 HPLC 分析。

6.2 样品制备

经过提取、净化和浓缩后的样品首先经 0.20 μm 或 0.45 μm 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 mm~8 mm。细管柱分析柱内径为 1 mm~2 mm。1 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 μm 、5 μm 、7 μm 、10 μm 等规格，常用的为 5 μm 或 10 μm 。

在分离方法确定之后，根据具体化合物的类型选用适当的色谱柱。对于微量物证的检材，可采用反相或正相液-液分配色谱法，选择 C_8 、 C_{18} 烷基-硅胶键合固定相或者氨基、氰基-硅胶键合固定相色谱柱。

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,如正庚烷、环己烷、正己烷等,用乙醇、三氯甲烷、异丙醇、四氢呋喃作调节剂。

反相色谱系统:选择水作洗脱剂,常用甲醇、乙腈作调节剂。

溶剂的极性由强到弱顺序为:水、甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、异丙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、二氯甲烷、三氯甲烷、二氯乙烷、苯、乙醚、正庚烷、环己烷、正己烷。

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、四氢呋喃、正己烷等作流动相。

7.3.3 流动相的选择要求

用流动相的溶剂纯度要高,不能引起柱效损失,不能与被分离的组分起反应,以避免保留时间变化。选择流动相应考虑溶剂的强度、极性、黏度、沸点、溶解度和 pH 值等因素。

7.4 仪器性能检查

7.4.1 初步检查

按照仪器的操作手册对仪器的性能进行详细检查。

7.4.2 输出压力

最高输出压力应达 40 MPa ~50 MPa。

7.4.3 流量精度

在 0.1 mL/min~10 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

利用上一次实验的结果,计算分析柱的理论板数至少在 2 000 以上。

7.5 实验过程

7.5.1 流动相脱气

用作流动相的水和溶剂分别通过 0.45 μm 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。通常有两种,一为搅拌下真空抽气 10 min,一为超声浴中 15 min~20 min。

7.5.2 冲柱

检测前,都用本次实验的流动相以 1.0 mL/min 的流速,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 进样

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,定量分析进样量范围为 0.5 μL ~100 μL 。非制备性的进样量一般为 1 μL ~10 μL ,可根据样品浓度选择合适的进样量。

7.6 定性分析

在特定的色谱条件下(流动相组成、色谱柱、柱温等不变),被测化合物与标样的保留值一致,可以初步认为被测化合物与标样相同。若流动相组成经多次改变后,被测化合物的保留值均与标准样的保留值相一致,就能够进一步证明被测化合物与标准样为同一化合物。

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响应值不同,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:

$$f'_i = f_i/f_s = (W_i \times A_s)/(W_s \times A_i)$$

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响应值(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,并配制成一一定浓度的贮液。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。建立被测组分和等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,内含等量内标物的试样,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定量测定后,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。