



项目五

高效液相色谱法 及其在食品分析中的应用

【知识目标】

- 1.理解柱色谱法分离机理；
- 2.认知高效液相色谱仪的基本结构和各部件的作用；
- 3.熟悉高效液相色谱法的实验技术,包括样品预处理、分离模式选择、流动相选择等；
- 4.熟悉高效液相色谱法的定性和定量测定方法；
- 5.了解高效液相色谱法在食品分析中的原理及实验技术。

【技能目标】

- 1.能正确使用高效液相色谱仪以及相关设备；
- 2.熟悉高效液相色谱仪的日常维护与保养；
- 3.能根据待测样品和实验室现有条件进行最佳实验条件的选择,如样品预处理、分离模式选择、流动相选择、定性和定量测定方法等；
- 4.能正确进行数据记录和处理；
- 5.能利用高效液相色谱法对食品项目进行定性和定量测定。

知识基础

液相色谱法与气相色谱法的基本概念与理论是一致的,如各种溶剂的分离原理、溶质在固定相上的保留规律、溶质在色谱柱中的峰形扩散过程等。但液相色谱的流动相为液体,其扩散系数、黏度、密度等与气体均有很大的差别,因此将对色谱分析过程产生影响。

按分离机理可以将液相色谱分为五类:液-固吸附色谱、液-液分配色谱、键合相色谱、离子色谱、凝胶色谱,这里主要介绍前三种。

一、液-固吸附色谱

液-固吸附色谱是以固体吸附剂作为固定相,吸附剂通常是多孔的固体颗粒物质,如氧化铝、硅胶、活性炭、碳酸钙、氧化镁等,在它们的表面存在吸附中心,根据物质在固定相上的吸附作用不同进行分离。当流动相通过固定相(吸附剂)时,吸附剂表面的活性中心就要吸附流动相分子。当试样分子被流动相带入色谱柱内,只要它们在固定相上有一定程度的保留就要取代数目相当的已被吸附的流动相溶剂分子,于是,在固定相表面发生竞争吸附,与吸附剂结构和性质相似的组分易被吸附,呈现高保留值;反之,与吸附剂结构和性质差异较大的组分不易被吸附,呈现了低保留值。

液-固吸附色谱固定相目前应用最广泛的是极性固定相硅胶,又分为全多孔型和表面多孔型硅胶微粒固定相。其中,表面多孔型硅胶微粒固定相吸附剂出峰快、柱效能高,适用于极性范围较宽的混合样品的分析,缺点是样品容量小;而全多孔型硅胶微粒固定相由于其表面积大、柱效能高而成为液固吸附色谱中使用最广泛的固定相。

液-固吸附色谱是以表面吸附性为依据的,所以它常用于分离极性不同的化合物,也能分离那些具有相同极性基团,但数量不同的样品。此外,液-固吸附色谱还适用于分离异构体,这主要是因为异构体有不同的空间排列方式,吸附剂对它们的吸附能力有所不同,从而得到了分离。

二、液-液分配色谱

液-液分配色谱中,一个液相作为流动相,另一个液相(固定液)则分散在很细的惰性载体(也叫担体)或硅胶上作为固定相,固定液与流动相互不相溶,它们之间有一个界面,固定液对于被分离组分是一种很好的溶剂。当被分析的样品随流动相进入色谱柱后,各组分按照它们各自的分配系数,很快地在两相间达到分配平衡,导致各组分迁移速度不同,从而实现分离。

依据固定相和流动相的相对极性的不同,液-液分配色谱可分为:液-液正相分配色谱(固定相的极性大于流动相的极性)和液-液反相分配色谱(固定相的极性小于流动相的极性)。液-液正相分配色谱固定液是极性的,流动相是非极性的(流动相以己烷、庚烷为主体,可加入少于20%的极性改性剂,如乙腈、乙醇等),可用来分离极性较强的水溶性样品,非极

性组分先洗脱出来,极性组分后洗脱出来。在液-液反相分配色谱中,固定液是非极性的或弱极性的,流动相极性较强(流动相以水为主体,可加入一定量的改性剂,如甲醇、乙腈等),可用来分离脂溶性样品,极性组分先洗脱出来,非极性组分后洗脱出来。

液-液分配色谱既能分离极性化合物,又能分离非极性化合物,如烷烃、烯烃、芳烃、稠环、染料、甾体化合物等。

三、键合相色谱

采用化学键合相的高效液相色谱法称为键合相色谱法。键合固定相非常稳定,在使用中不易流失,且键合到载体表面的官能团可以是各种极性的,因此,它适用于各种样品的分离分析。目前,键合相色谱法已逐渐取代液液分配色谱法,获得了日益广泛的应用,在高效液相色谱法中占有极其重要的地位。

根据键合固定相与流动相相对极性的强弱,键合相色谱分为正相键合相色谱和反相键合相色谱。在正相键合相色谱中,使用的是极性键合固定相(以极性有机基团,如氨基、氰基等键合在硅胶表面制成),键合固定相的极性大于流动相的极性,适用于分离脂溶性或水溶性的极性与强极性化合物。在反相键合相色谱中,使用的是极性较小的键合固定相(以极性较小的有机基团,如苯基、烷基等键合在硅胶表面制成),键合固定相的极性小于流动相的极性,适用于分离非极性、极性或离子型化合物。在键合相色谱中使用的流动相类似于液-固吸附色谱、液-液分配色谱中的流动相。

反相键合相色谱在食品分析中的应用主要包括三个方面:第一,食品本身营养成分的分析,如维生素、脂肪酸、香料、有机酸、矿物质等;第二,食品添加剂的分析,如甜味剂、防腐剂、人工合成色素、抗氧化剂等;第三,在食品加工、储运、保存过程中由周围环境引起的污染物的分析,如农药残留、霉菌毒素、病原微生物等。

思考与练习

一、填空题

- 1.柱色谱法按分离机理可以将高效液相色谱法(HPLC)分为____、____、____、____、____五类。
- 2.根据键合固定相与流动相相对极性的强弱,键合相色谱法分为____和____。
- 3.在反相键合相色谱法中,键合固定相的极性____流动相的极性。

二、选择题

- 1.液-固吸附色谱是以固体吸附剂作为固定相,吸附剂常用固体颗粒物质有()

A.氧化铝	B.硅胶
C.活性炭	D.二氧化硅

2. 液-液正相分配色谱法可用来分离极性较强的水溶性样品, 先洗脱出来的是()。
- A. 非极性组分 B. 极性组分 C. 流动相 D. 固定相
3. 在高效液相色谱法中, 某组分的保留值大小实际反映了()的分子间作用力大小。
- A. 组分与流动相 B. 组分与固定相
C. 组分与流动相和固定相 D. 组分与组分

三、简答题

1. 简述高效液相色谱法与气相色谱法的异同点。
2. 某天然化合物的相对分子质量大于 400, 用什么方法分析比较合适?
3. 液-固吸附色谱中常用的固定相是什么?
4. 按固定相与流动相相对极性的不同, 液-液分配色谱法可分为哪两类?
5. 何谓键合固定相?
6. 试说明键合固定相的类型及应用范围。

学习情景一 高效液相色谱仪的认知与操作



高效液相色谱仪
的认知与操作

一、高效液相色谱仪的基本结构

高效液相色谱仪由输液系统、进样系统、分离系统、检测系统和数据处理系统组成。其结构如图 5-1 所示。

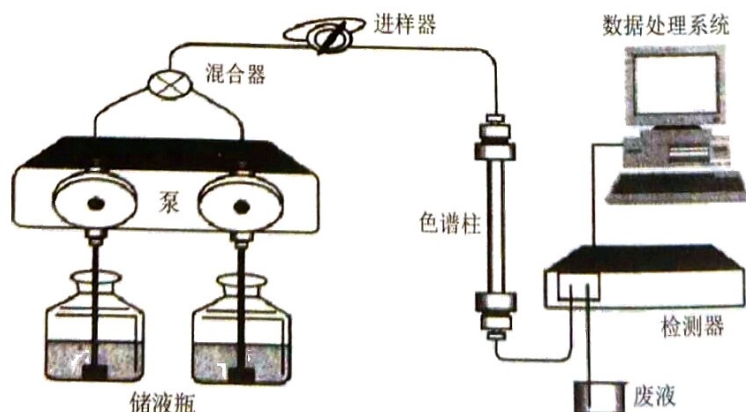


图 5-1 高效液相色谱仪的基本结构

(一) 输液系统

输液系统的作用是向色谱柱提供压力高且流速稳定的流动相。输液系统包括储液瓶、泵、溶剂混合和梯度控制装置(混合器)等。

1. 储液瓶

储液瓶用来储存液体流动相,大多由化学稳定性好的玻璃、聚四氟乙烯等材料制成,容积一般为 0.5~2 L。储液瓶要求能承受一定压力、耐腐蚀、易于脱气操作。

分析过程使用的液体流动相常为有机溶剂、缓冲溶液、水等,在放入储液瓶之前需经过过滤和脱气处理。使用 0.5 μm 以下微孔膜过滤,除去溶剂中的机械杂质,以防输液管道或进样阀产生阻塞。所有溶剂在使用前必须脱气,因为色谱柱是在高压下工作的,而检测器是在常压下工作的,若流动相中所含有的空气不除去,则流动相通过柱子时其中的气泡受到压力而压缩,流出柱子后到检测器时因压力降低而将气泡释放出来,影响色谱柱分离效果、检测器的基线稳定及保留时间和峰面积的重现性。脱气方法有加热法、吹氮置换法、抽真空法和超声波法,脱气效果依次降低。脱气后的流动相液体应密封保存以防止外部气体重新溶入。近年来许多商品仪器配置在线脱气机,其原理就是真空脱气。

2. 泵

泵是高效液相色谱仪的关键部件,其作用是将流动相以稳定的流速或压力输送到色谱分离系统,使样品在色谱柱中完成分离。目前,仪器常配备恒流往复泵,对其要求是:压力稳定、流速恒定、流量可调、泵体材料耐腐蚀、死体积小,具有较高的输出压力。泵工作示意图如图 5-2 所示。

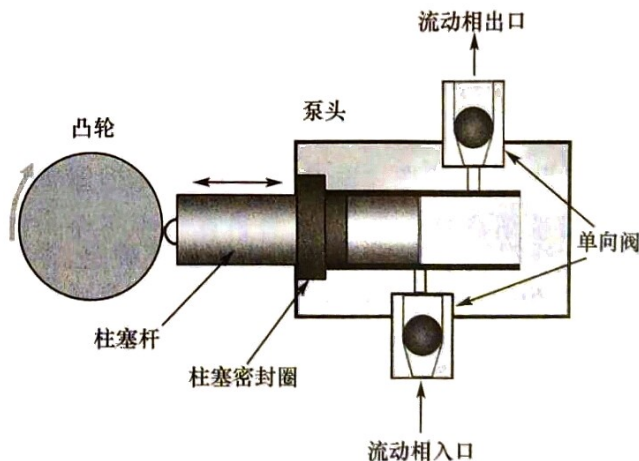


图 5-2 泵工作示意图

3. 溶剂混合和梯度控制装置(混合器)

溶剂混合和梯度控制装置用来控制流动相的组成,分为等梯度洗脱和梯度洗脱两种方式。等梯度洗脱是在整个分离过程中,流动相的组成不变,这种方式柱效能相对较低,分析时间长。梯度洗脱是指在分离过程中改变流动相的组成(溶液极性、离子强度、pH 等)。在梯度洗脱时,按操作者给定的程序将两种或两种以上的溶剂在泵前或泵后混合,混合的比例随时间按一定的变化率(梯度)自动连续地变化。流动相的组成及其洗脱强度按一定程序随时间变化,使得复杂样品在尽量短的时间内所有待测的组分均有较好的分离度,谱峰间距较均匀,避免色谱峰前挤后松甚至强保留组分出不来的现象。

梯度洗脱分为高压梯度和低压梯度两种方式,如图 5-3 所示。

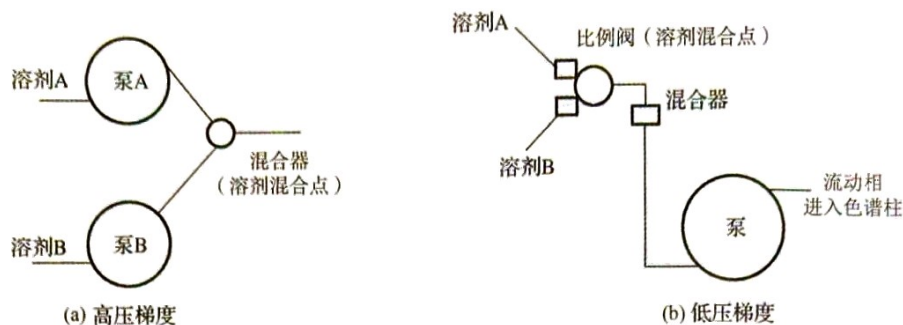


图 5-3 高压梯度和低压梯度

高压梯度，是用两台高压输液泵将两种溶剂输入混合器，进行混合后再送入色谱柱。其主要优点是：两台高压输液泵的流量皆可独立控制，可获得任何形式的梯度程序，精度高，易于实现控制的自动化；高压混合不易产生气泡，对洗脱液的脱气要求较低。但因需两台高压输液泵，故成本较高。

低压梯度，是在常压下将两种溶剂输送至混合器中混合，然后用高压输液泵将流动相输入色谱柱中。其主要优点是：仅需使用一台高压输液泵，成本低廉，使用方便；另外，因混合在泵加压前完成，可避免高压混合中洗脱液的体积变化而引起流量不稳定等问题。但低压混合易产生气泡，故对脱气要求较高。若没有配置在线脱气机，在梯度洗脱时，应尽量避免将几乎 100% 的某一种溶剂（例如纯甲醇或纯甲醇中加 0.1% 甲酸）与几乎 100% 的另一种溶剂（例如纯水或纯水中加 0.1% 甲酸）直接上机混合，因为这样混合的热效应较大，上机前尽管已经分别脱气，但难以脱气完全，故易产生气泡，造成压力和基线不稳，此问题在低压混合时需特别注意。

(二) 进样系统

进样系统的作用是将待分析样品准确送入色谱柱的装置，要求密封性好、死体积小、重复性好，进样引起色谱分离系统的压力和流量波动要很小。常用的有手动进样器和自动进样器两种。

1. 手动进样器

目前手动进样器只有六通阀进样器，进样体积由定量环确定，常规的高效液相色谱仪通常使用 10 μL 和 20 μL 体积的定量环。进样时先将样品注入定量环，然后将阀门转动 60° 到进样位置，高压输液泵输送的流动相带着样品送入色谱柱。如图 5-4 所示。

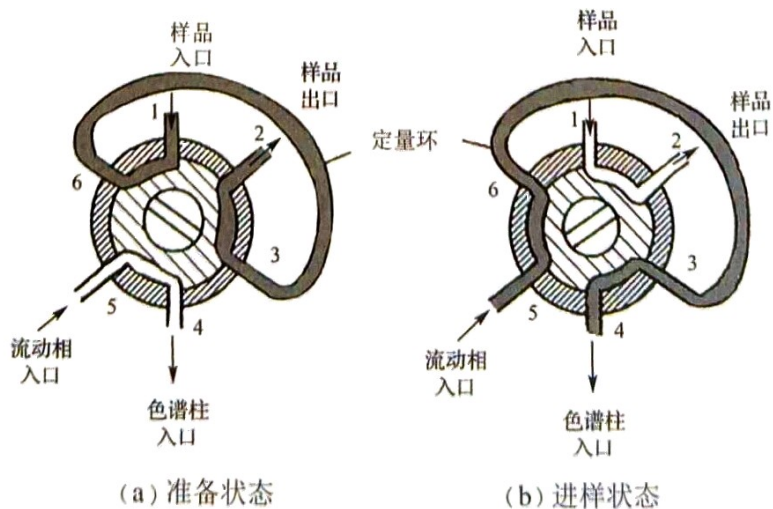


图 5-4 六通阀进样器工作原理

2. 自动进样器

自动进样器是由计算机自动控制定量阀,按预先编制的注射样品操作程序进行工作的。取样、进样、复位、样品管路清洗和样品盘的转动,全部按预定程序自动进行,一次可进行几十个或上百个样品的分析。自动进样器进样重复性高,适合于大量样品的分析,节省人力,可实现自动化操作,但此装置一次性投资较高。如图 5-5 所示。

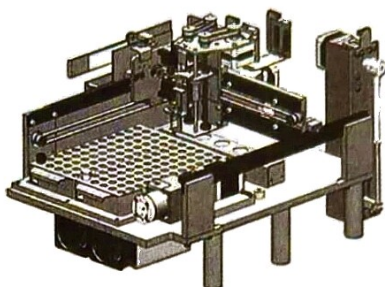


图 5-5 自动进样器

(三) 分离系统

分离系统是 HPLC 实现高效、快速分离的核心,由连接管、色谱柱、保护柱(选配)、色谱柱恒温装置(选配)等组成,其中色谱柱是色谱仪的心脏。柱效能高、选择性好、分析速度快、性能稳定是对色谱柱的一般要求。

1. 色谱柱

色谱柱是内部抛光的不锈钢柱,一般长 5~25 cm,内径 2~5 mm。色谱柱内部填充各种微粒(粒径 3~10 μm)填料,又称固定相,是色谱柱的主体。从化学组成上看,固定相主要有硅胶、氧化铝、键合型硅胶等。

键合型硅胶是利用硅胶表面的羟基与带有活性基团的有机化合物通过化学反应制得。依据键合到硅胶表面的官能团不同,化学键合相主要有正相、反相和离子交换三种类型。正相键合相是指键合的有机分子中含有极性基团,常见的有醚基($-\text{ROR}'$)、氰基($-\text{CN}$)、氨基($-\text{NH}_2$)和二醇基($-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$)。反相键合相键合的有机分子中含有的是烷基($-\text{R}$)或苯基(C_6H_5-),烷基 R 的链长是 $\text{C}_2\sim\text{C}_{18}$,随着 R 碳链的增长,固定相的极性逐渐降低,疏水性逐渐增强。其中最常用的是 C_{18} ,即十八烷基键合硅胶,又称 ODS。离子交换键合相分为两类:一类是阳离子交换固定相,含磺酸基($-\text{SO}_3\text{H}$)或羧基($-\text{COOH}$);另一类是阴离子交换固定相,含季氨基($-\text{R}_4\text{N}^+$)或氨基($-\text{R}_2\text{N}$)。硅胶基质的化学键合相是目前应用最广的固定相,约占整个 HPLC 所用固定相的 3/4。

2. 保护柱

保护柱,又称预柱,是在色谱柱的前端装有与分析柱相同固定相的短柱(5~30 mm 长),可以经常而且方便地更换,因此,起到保护分析柱和延长分析柱寿命的作用。虽然采用保护柱往往会使色谱柱损失一定的柱效能,但是,换一根色谱柱不仅浪费(柱失效往往只在柱端部分),而且费事,而保护柱对色谱系统的影响基本上可以忽略不计,所以,即使损失一点柱效能也是可取的。

3. 色谱柱恒温装置

提高柱温有利于降低溶剂黏度、提高样品溶解度和改变分离度,也是保留值重复稳定的

必要条件,特别是对需要高精度测定保留体积的样品分析尤为重要。常用的色谱柱恒温装置有水浴式、电加热式和恒温箱式三种。实际恒温过程中要求最高温度不超过 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$,否则流动相汽化会使分析工作无法进行。

(四)检测系统

检测系统即检测器,是用于连续监测被色谱系统分离后的柱流出物的组成和含量变化的装置。其作用是将柱流出物的组成和含量变化转化为可供检测的信号,完成定性和定量分析。HPLC 检测器可分为两类:通用型检测器和选择型检测器。

通用型检测器可连续测量色谱柱流出物(包括流动相和样品组分)的全部特性变化,通常采用差分测量法。这类检测器包括示差折光检测器、电导检测器和蒸发激光散射检测器等。通用型检测器适用范围广,但由于对流动相有响应,因此易受温度变化、流动相流速和组分变化的影响,噪声和漂移都较大,灵敏度较低,一般不能用于梯度洗脱(蒸发激光散射检测器除外)。

选择型检测器用于测量被分离样品组分某种特性的变化,这类检测器对样品中组分的某种物理或化学性质敏感,而这一性质是流动相所不具备的,或至少在操作条件下不显示。这类检测器包括紫外检测器、荧光检测器、安培检测器等。选择型检测器灵敏度高,受操作条件变化和外界环境影响小,并且可用于梯度洗脱操作。

1.紫外-可见光检测器(UV-Vis)

紫外-可见光检测器,简称紫外检测器,是高效液相色谱法广泛使用的检测器,它的作用原理是被分析试样组分对特定波长紫外或可见光的选择性吸收,组分浓度与吸光度的关系遵守朗伯-比尔定律。

紫外-可见光检测器具有很高的灵敏度,最小检测浓度可达 10^{-9} g/mL ,这种检测器对温度和流速不敏感,可用于梯度洗脱,缺点是不适用于对紫外光或可见光完全不吸收的试样,溶剂的选用受到限制(紫外光不能透过的溶剂如苯等不能用)。应用此检测器,还能获得分离组分的紫外吸收光谱。即当试样组分通过流通池时,短时中断液流进行快速扫描(停流扫描),以得到紫外吸收光谱,为定性分析提供信息,据此选择最佳检测波长。

2.光电二极管阵列检测器(DAD)

光电二极管阵列检测器是紫外检测器的一个重要进展,其光路如图 5-6 所示。在此检测器中先使光源发出的紫外或可见光通过液相色谱流通池,在此被流动相中的组分进行特征吸收,然后通过入射狭缝进行分光,使含有吸收信息的全部波长的光聚焦在阵列上同时被检测,并用电子学方法及计算机技术对二极管阵列进行快速扫描并采集数据。由于扫描速度非常快,每帧图像仅需 10^{-2} s ,远远超过色谱流出峰的速度,因此无须停流扫描而观察色谱柱流出物的各个瞬间的动态光谱吸收图。经计算机处理后可得到三维色谱-光谱图,如图 5-7 所示。因此,可利用色谱保留值规律及光谱特征吸收曲线综合进行定性分析。

3.荧光检测器(FD)

荧光检测器是一种灵敏度和选择性良好的检测器。许多物质,特别是具有对称共轭结构的有机芳环分子受紫外光激发后,能辐射出比紫外光波长长的荧光,例如多环芳烃、维生

素 B 类、黄曲霉素、卟啉类化合物等,许多生化物质包括某些代谢产物、药物、氨基酸、胺类、甾族化合物都可用荧光检测器检测,其中某些不发射荧光的物质亦可通过化学衍生转变成能发出荧光的物质,而得到检测。

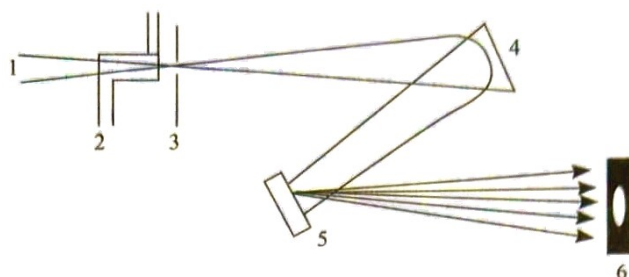


图 5-6 光电二极管阵列检测器光路

1—光源;2—流通池;3—入射狭缝;4—反射镜;5—光栅;6—二极管阵列

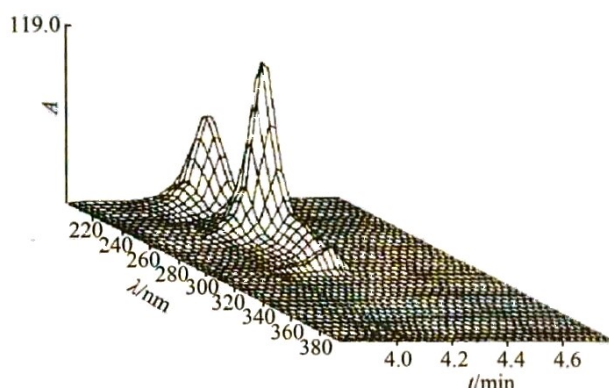


图 5-7 DAD 测定的三维色谱-光谱图

荧光检测器的灵敏度比紫外检测器要高百倍,当要对痕量组分进行选择性的检测时,它是一种强有力的检测工具,但它的线性范围较窄,不宜作为一般的检测器来使用。荧光检测器也可用于梯度洗脱。测定中不能使用可熄灭、抑制或吸收荧光的溶剂做流动相。对不能直接产生荧光的物质,要使用色谱柱后衍生技术,操作比较复杂。

4. 示差折光检测器 (DRI)

示差折光检测器,又称折光指数检测器,是通过连续监测参比池与测量池中溶液的折射率之差来测定试样浓度的检测器。溶液的光折射率是溶剂(流动相)和溶质(试样)各自的折射率乘其浓度之和,因此溶有试样的流动相和纯流动相折射率之差,表示试样在流动相中的浓度。几乎每种物质都有各自的折射率,因此都可用示差折光检测器来检测,示差折光检测器是一种通用型的浓度检测器。

示差折光检测器对温度变化很敏感,使用时温度变化要求保持在 $\pm 0.001\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内。此检测器对流动相流量变化也敏感,要求流动相组成完全恒定,稍有变化都会对测定产生明显影响,因此不宜做梯度洗脱。此外,示差折光检测器灵敏度较低,不宜用于痕量分析。

5. 电化学检测器 (ECD)

常用电化学检测器包括电导检测器和安培检测器。电导检测器主要用于离子色谱法,检测原理是基于组分在某些介质中电离后电导值的变化来测定其含量。检测池内有一对平行的铂电极,构成电桥的一个测量臂。当电离组分通过时,其电导值和流动相电导值之差被记录,得出色谱图。电导检测器对温度和流速敏感,不能用于梯度洗脱。安培检测器用于测

定能氧化还原的物质,灵敏度很高。其检测原理是组分通过电极表面时,当两电极间施加大于该组分的氧化(或还原)电位的恒定电压时,组分被电解而产生电流,服从法拉第定律,记录得色谱图,检测池相当于一个微型电解池。

6. 蒸发激光散射检测器(ELSD)

蒸发激光散射检测器是近年新出现的高灵敏度、通用型检测器。其工作原理是:首先将柱洗脱液雾化形成气溶胶,然后在加热的漂移管中将溶剂蒸发,余下的不挥发性溶质颗粒在光散射检测池中得到检测。ELSD 的响应不依赖于样品的光学特性,任何挥发性低于流动相的样品均能被检测,不受其官能团的影响。ELSD 最大的优越性在于能检测不含发色团的化合物,包括氨基酸、脂肪酸、糖类、表面活性剂等,尤其对于一些较难分析的样品,如磷脂、皂苷、生物碱、甾族化合物等无紫外吸收或紫外末端吸收的化合物,更具有其他 HPLC 检测器无法比拟的优越性。

蒸发激光散射检测器与 DRI 和 UV-Vis 比较,它消除了溶剂的干扰和因温度变化而引起的基线漂移,即使用梯度洗脱也不会产生基线漂移。它还具有死体积小、灵敏度高等优点。所以,ELSD 和气相色谱分析中的氢火焰检测器(FID)一样,其应用范围越来越宽。

常用检测器性能指标(光电二极管阵列检测器性能较特殊,此处未列出)见表 5-1。

表 5-1 常用检测器性能指标

	检测器				
	紫外	示差折光	荧光	电化学	蒸发激光散射
测量参数	吸光度/AU	折光指数/RIU	荧光强度/AU	电导率/ $(\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1})$	质量/ng
池体积/ μL	1~10	3~10	3~20	1~3	—
类型	选择型	通用型	选择型	选择型	通用型
线性范围	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10
最小检出浓度/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻¹¹	10 ⁻³	—
最小检出量	约 1 ng	约 1 μg	约 1 pg	约 1 mg	0.1~10 ng
噪声(测量参数)	10 ⁻⁴	10 ⁻⁷	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³
能否用于梯度洗脱	可以	不可以	可以	不可以	可以
对流量敏感性	不敏感	敏感	不敏感	敏感	不敏感
对温度敏感性	低	10 ⁻⁴ °C	低	2%/°C	不敏感

(五)数据处理系统

现在广泛使用色谱数据处理机和色谱工作站来记录和处理。计算机的广泛应用使得高效液相色谱操作更加快速、简便、准确、精密和自动化,现在已可在互联网上远程处理数据。计算机的用途包括三个方面:①采集、处理和分析数据;②控制仪器;③色谱系统优化和专家系统。

二、高效液相色谱仪的基本操作

高效液相色谱仪的品牌型号繁多,但实际操作步骤却几乎一致。

(一)准备

- 1.准备所需的流动相,选用合适的微孔滤膜,抽滤,然后超声脱气 10~20 min。
- 2.根据待检样品的需要更换合适的色谱柱(注意方向)和定量环,或使用自动进样器。
- 3.配制样品和标准溶液。
- 4.检查仪器各部件的电源线、数据线和输液管道是否连接正常。

(二)操作流程

- 1.开机:接通电源,待泵和检测器自检结束后,打开色谱工作站。
- 2.排气:打开排液阀,排出管路中气泡,直至气泡排尽,关闭排液阀。
- 3.参数设定:通过软件设置泵流量、各流动相比例、运行时间、检测波长等参数,设置完成后下载此方法至仪器。
- 4.平衡系统:待达到设定参数值时,查看基线是否平稳,基线平稳则可进行进样测试。
- 5.进样:点击单次运行,设置好数据文件信息和保存路径后,使用注射器将样品由手动进样口注入仪器,开始检测。
- 6.数据处理:样品检测结束后,通过工作站的再解析分析数据。
- 7.关机:所有样品检测完,冲洗柱一段时间;结束后停泵,关闭软件,切断仪器电源。

三、高效液相色谱仪的日常维护与保养

高效液相色谱仪是精密仪器,为保证分析结果的准确性,保证仪器正常运行,应掌握必要的仪器维护和保养常识。

(一)储液瓶及溶剂处理

- 1.溶剂在使用前应应用微孔滤膜过滤后才可使用,以保持储液瓶的清洁。
- 2.在泵的进口和出口与进样阀之间,应设置过滤器,过滤器使用 3~6 个月后或出现阻塞现象时要及时更换新的,以保证仪器正常运行和溶剂的质量。
- 3.应使用专用储液瓶并定期用酸、水和溶剂清洗(最后一次清洗应选用 HPLC 级的水或有机溶剂)。
- 4.溶剂变质或被污染以及藻类的生长会堵塞溶剂过滤头,从而影响泵的运行。清洗溶剂过滤头的具体方法是:取下过滤头→用硝酸溶液(1+4)超声清洗 15 min→用蒸馏水超声清洗 10 min→用洗耳球吹出过滤头中的液体→用蒸馏水超声清洗 10 min→用洗耳球吹净过滤头中的水分,清洗后按原位装上。

(二)泵

- 1.每次使用之前应放空,排除气泡,并使新流动相从放空阀流出 20 mL 左右。
- 2.更换流动相时一定要注意流动相之间的互溶性问题,如更换非互溶性流动相则应在更换前使用能与新、旧流动相均互溶的中介溶剂清洗泵。
- 3.如用缓冲溶液做流动相或一段时间不使用泵,工作结束后应在泵中用超纯水或去离子水洗去系统中的盐,然后用纯甲醇或乙腈冲洗。
- 4.不要使用存放多日的蒸馏水及磷酸盐缓冲溶液;如果应用许可,可在溶剂中加入 $0.0001 \sim 0.001 \text{ mol/L}$ 的叠氮化钠。
- 5.仪器使用一段时间后,应用扳手卸下在线过滤器的压帽,取出其中的密封环和不锈钢烧结过滤片一同清洗,具体方法同过滤头的清洗,清洗后按原位装上。
- 6.使用缓冲液时,由于脱水或蒸发,盐会在柱塞杆后部形成晶体,泵运行时这些晶体会损坏密封圈和柱塞杆,所以应该经常清洗柱塞杆后部的密封圈。
- 7.泵长时间不使用,必须用去离子水清洗泵头及单向阀,以防阀球被阀座“锚住”,泵头吸不进流动相。
- 8.柱塞和柱塞密封圈长期使用会发生磨损,应定期更换密封圈,同时检查柱塞杆表面有无损耗。
- 9.实验室应常备密封圈、各式接头、保险丝等易耗部件和拆装工具。

(三)进样器

- 1.对六通阀进样器,保持清洁可延长阀的使用寿命。
- 2.进样前应使样品混合均匀,以保证结果的精确度。
- 3.样品瓶应清洗干净,无可溶解的污染物。
- 4.自动进样器的针头应有钝化斜面,侧面开孔;针头一旦弯曲应立即换上新针头,不能弄直了继续使用;吸液时针头应没入样品溶液中,但不能碰到样品瓶底。
- 5.为了防止缓冲盐和其他残留物留在进样系统中,每次工作结束后应冲洗整个系统。

(四)色谱柱

- 1.色谱柱的管外以箭头显著地标示了柱的使用方向,安装和更换色谱柱时一定要使流动相按箭头所指方向流动。
- 2.在进样阀后加流路过滤器($0.45 \mu\text{m}$ 不锈钢烧结片),挡住来源于样品和进样阀垫圈的微粒。
- 3.在流路过滤器和分析柱之间加上“保护柱”,收集阻塞柱进口的、来自样品的、会降低柱效能的化学“垃圾”。
- 4.流动相流速不可一次改变过大,应避免色谱柱受突然变化的高压冲击,使柱床受到冲击,引起紊乱,产生空隙。
- 5.色谱柱应在要求的 pH 范围和柱温范围内使用。不要把柱放在有气流的地方或直接放到阳光下,气流和阳光都会使柱产生温度梯度,造成基线漂移。如果怀疑基线漂移是由温

度梯度引起的,可以设法使柱恒温。

6.样品进样量不应过载。进样前应将样品进行必要的净化,以免其中的杂质对色谱柱造成损伤。

7.应使用不损坏色谱柱的流动相。在使用缓冲溶液时,盐的浓度不应过高,并且在工作结束后要及时用纯水冲洗柱,不可过夜。

8.每次工作结束后,应用强溶剂(乙腈或甲醇)冲洗色谱柱。柱不用或储藏时,应将其封闭储存在惰性溶剂中,见表 5-2。

表 5-2 色谱柱固定相的封存和禁用溶剂

固定相	硅胶、氧化铝、正相键合相色谱柱	反相色谱柱	离子交换柱
封存溶剂	2,2,4-三甲基戊烷	甲醇	水
禁用溶剂	二氯代烷烃,酸、碱性溶剂	—	—

9.柱应定期进行清洗,以防止有太多的杂质在柱上堆积。

10.色谱柱使用一段时间后,柱效能会下降,此时可对柱进行再生处理。

(五)检测器

检测器每次使用时应及时排出流通池中的气泡。分析前,在柱平衡将完成时(通常大于 30 min),再打开检测器;分析完成后,马上关闭检测器,以延长检测器的使用寿命。

思考与练习

一、填空题

- 1.高效液相色谱仪由_____、_____、_____和_____组成。
- 2.高压输液系统一般包括_____、_____和_____等。
- 3.梯度洗脱装置依据溶液混合的方式可分为_____和_____。
- 4.高效液相色谱仪中常用的进样器有_____和_____。
- 5.流动相常用的脱气方法有_____、_____、_____。
- 6.示差折光检测器又称_____检测器,是一种_____检测器,它是通过连续监测_____和_____中溶液的折射率之差来测定试样浓度的检测器。
- 7.蒸发激光散射检测器与 DRI 和 UV-Vis 比较,它消除了_____和因_____而引起的基线漂移,即使用_____也不会产生基线漂移。

二、选择题

- 1.液相色谱法中,溶剂在使用前应做哪些处理? ()
A.过滤 B.加热 C.脱气 D.通气
- 2.在液相色谱法中,梯度洗脱的优点有哪些? ()
A.提高分离度 B.缩短分离时间 C.降低最小检测量 D.提高分离精度

3. 色谱柱的存放应注意哪些方面? ()
- A. 存放前充分冲洗
B. 选用合适的存放溶剂
C. 接好堵头, 避免固定相干涸
D. 注意存放环境
4. 下列检测器在获得色谱流出曲线时, 同时获得被分离组分三维色谱-光谱图的是()。
- A. 光电二极管阵列检测器
B. 示差折光检测器
C. 荧光检测器
D. 紫外检测器
5. 下列哪种检测器不能使用梯度洗脱()。
- A. 光电二极管阵列检测器
B. 示差折光检测器
C. 荧光检测器
D. 紫外检测器
6. 在高效液相色谱法中, 通用型检测器是()。
- A. 光电二极管阵列检测器
B. 示差折光检测器
C. 荧光检测器
D. 紫外检测器
7. 在高效液相色谱法中, 提高柱效能的途径有()。
- A. 提高柱温
B. 降低板高
C. 降低流动相流速
D. 减小填料粒径

三、简答题

1. 简述六通阀进样器的工作原理。
2. 流动相在使用前为什么要进行过滤和脱气?
3. 简述高效液相色谱法对检测器的要求。
4. 简述高效液相色谱仪的日常维护。

学习情景二 高效液相色谱法的实验技术

一、典型实例——小麦粉中过氧化苯甲酰的测定 (DB 22/T 384—2004)

1. 原理

甲醇提取的过氧化苯甲酰, 用碘化钾作为还原剂将其还原为苯甲酸, 用高效液相色谱法进行分离, 在 230 nm 下检测。

2. 试剂和材料

所用试剂除特别注明外,均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682—2008 规定的一级水要求。

(1) 甲醇:色谱纯。

(2) 碘化钾溶液:50%水溶液(质量浓度)。

(3) 苯甲酸:纯度 $\geq 99.9\%$,国家标准物质。

(4) 乙酸铵缓冲溶液(0.02 mol/L):称取乙酸铵 1.54 g 用水溶解并稀释至 1 L,混匀后用 0.45 μm 的滤膜过滤后备用。

(5) 苯甲酸标准储备液(1 mg/mL):称取 0.1 g(精确至 0.000 1 g)苯甲酸,用甲醇稀释至 100 mL。

3. 仪器设备

(1) 高效液相色谱仪:配有紫外检测器, C_{18} 反相色谱柱。

(2) 天平:感量为 0.000 1 g。

(3) 旋涡混合器。

(4) 溶剂过滤器。

4. 分析步骤

(1) 样品制备

称取样品 5 g(准确至 0.1 mg)于 50 mL 具塞比色管中,加 10.0 mL 甲醇,在旋涡混合器上混匀 1 min,静置 5 min,加 50%碘化钾水溶液 5.0 mL,在旋涡混合器上混匀 1 min,放置 10 min。加水至 50.0 mL,混匀、静置,吸取上清液通过 0.22 μm 滤膜,滤液置于样品瓶中备用。

(2) 标准曲线的制备

准确移取苯甲酸标准储备液 0 mL、0.625 mL、1.25 mL、2.50 mL、5.00 mL、10.00 mL、12.50 mL、25.00 mL 分别置于 8 个 25 mL 容量瓶中,分别加甲醇至 25.00 mL,配成浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 、200.0 $\mu\text{g/mL}$ 、400.0 $\mu\text{g/mL}$ 、500.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 000.0 $\mu\text{g/mL}$ 的苯甲酸标准系列溶液。

分别称取 8 份 5 g(精确至 0.1 mg)不含苯甲酸和过氧化苯甲酰的小麦粉于 8 支 50 mL 具塞比色管中,分别准确加入苯甲酸标准系列溶液 10.00 mL,其余操作同 4(1)中“在旋涡混合器上混匀 1 min”及以下叙述。标准溶液的最终浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、40.0 $\mu\text{g/mL}$ 、80.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 、200.0 $\mu\text{g/mL}$ 。依次取不同浓度的苯甲酸标准溶液 10.00 μL ,注入高效液相色谱仪,以苯甲酸峰面积为纵坐标,以苯甲酸浓度为横坐标,绘制标准曲线。标准物质液相色谱图和含有标准物质的小麦粉样品液相色谱图如图 5-8、图 5-9 所示。

(3) 测定

① 色谱条件

色谱柱:250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm , C_{18} 反相柱(为了延长柱寿命,建议加 C_{18} 保护柱);检测波长:230 nm。

流动相:甲醇水(含 0.02 mol/L 乙酸铵)为 10:90(体积分数);流速:1.0 mL/min。

进样量:10.0 μ L。

②样品测定

取 10.0 μ L 试液注入高效液相色谱仪,根据苯甲酸的峰面积从工作曲线上查出对应的苯甲酸浓度,并计算样品中过氧化苯甲酰的含量。

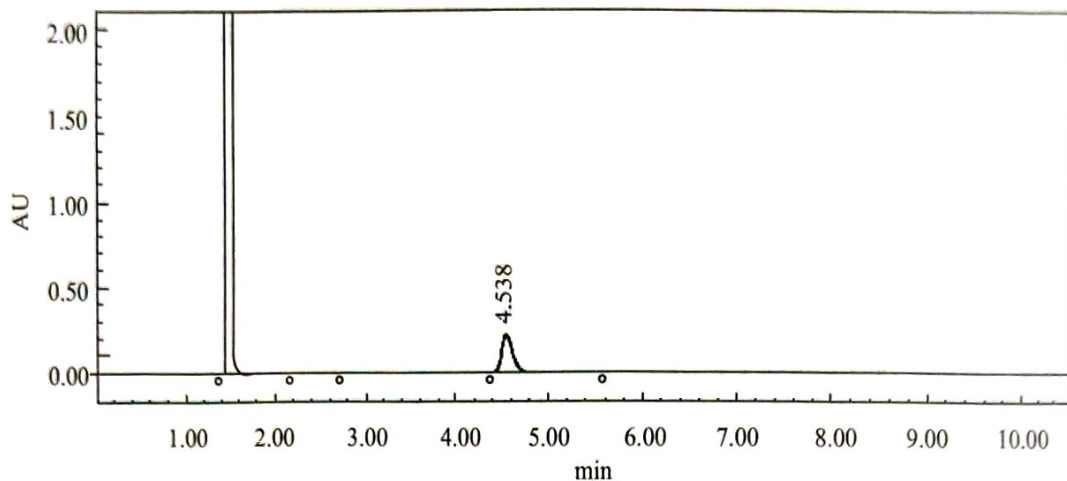


图 5-8 苯甲酸标准溶液液相色谱图

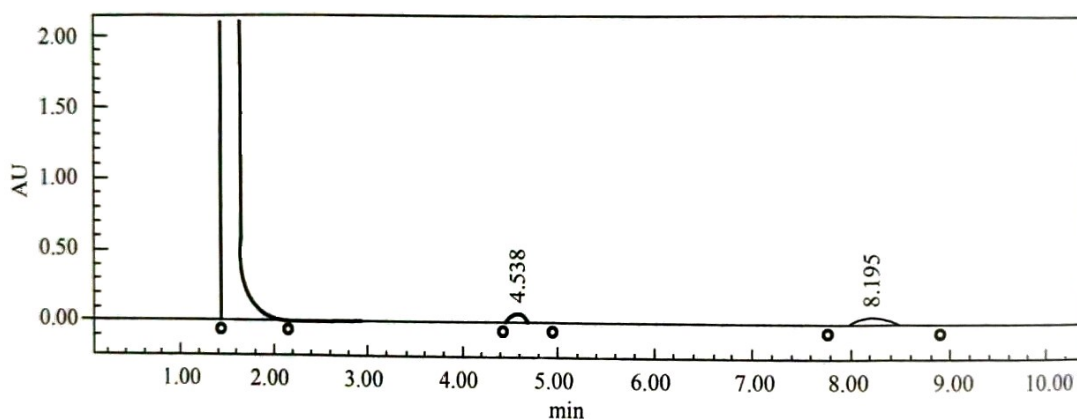


图 5-9 小麦粉样品液相色谱图

5. 计算方法

按式(5-1)计算样品中过氧化苯甲酰含量

$$D = \frac{cV \times 1\,000}{m \times 1\,000 \times 1\,000} \times 0.992 \quad (5-1)$$

式中: D ——样品中过氧化苯甲酰含量, g/kg;

c ——由工作曲线上查出的试样测定液中相当于苯甲酸的浓度, μ g/mL;

V ——试样提取液的体积, mL;

m ——样品质量, g;

0.992——由苯甲酸换算成过氧化苯甲酰的换算系数: $242.2/(2 \times 122.1)$ 。

结果保留两位有效数字。

二、样品预处理

由于食品分析的样品基质一般比较复杂,故在上机分析前必须进行一系列的预处理过程,以达到下述目的:

- ①定量提取出欲测定的目标组分;
- ②除去微粒;
- ③减少干扰杂质,改善分离效果;
- ④浓缩微量的组分;
- ⑤提高检测的灵敏度及选择性;
- ⑥有利于色谱柱及仪器的保护。

在样品预处理时,还应注意以下几点:

- ①处理后用于进样的样品应是一种均相溶液,它的溶剂强度要比流动相的起始强度低;
- ②要尽可能避免待测组分的损失,一般预处理过程的回收率不应低于 90%;
- ③在清除原有干扰的过程中,不要带进新的干扰物质;
- ④所用溶剂尽量做到无毒无害或低毒低害、价廉易得,衍生化试剂纯度要高,用量要适当,反应条件需严格掌握。具体的样品预处理方法应根据食品样品的种类、来源背景和待测项目要求,并参考相关文献资料而定。

三、检测器的选择

不同的测试目的应选择不同的检测器。如果检测单一组分,理想的检测器应仅对所测成分响应,而其他任何成分均不出峰;如果检测目的是定性分析或是制备色谱,则最好用通用型检测器,以便能检测到混合物中的各种成分;如果检测目的是定量分析,检测器灵敏度越高、最低检出量越小越好;如果检测目的是制备分离,则检测器的灵敏度没必要很高。

目前,一般的高效液相色谱仪都配有紫外检测器,使用方便且受外界影响小。如被测化合物没有足够的 UV 生色团,则应考虑使用其他检测器,如示差折光检测器、荧光检测器、电化学检测器等。如果实在找不到合适的检测器,也可以考虑将样品衍生化为有 UV 吸收或有荧光的产物,用紫外检测器或荧光检测器。

四、分离条件的选择

分离条件的选择包括分离模式和柱系统的选择,是高效液相色谱方法建立的关键步骤。一般可在充分考虑样品的溶解度、分子量、分子结构和极性差异的基础上,确定适当的分离模式和柱系统,如图 5-10~图 5-12 所示。

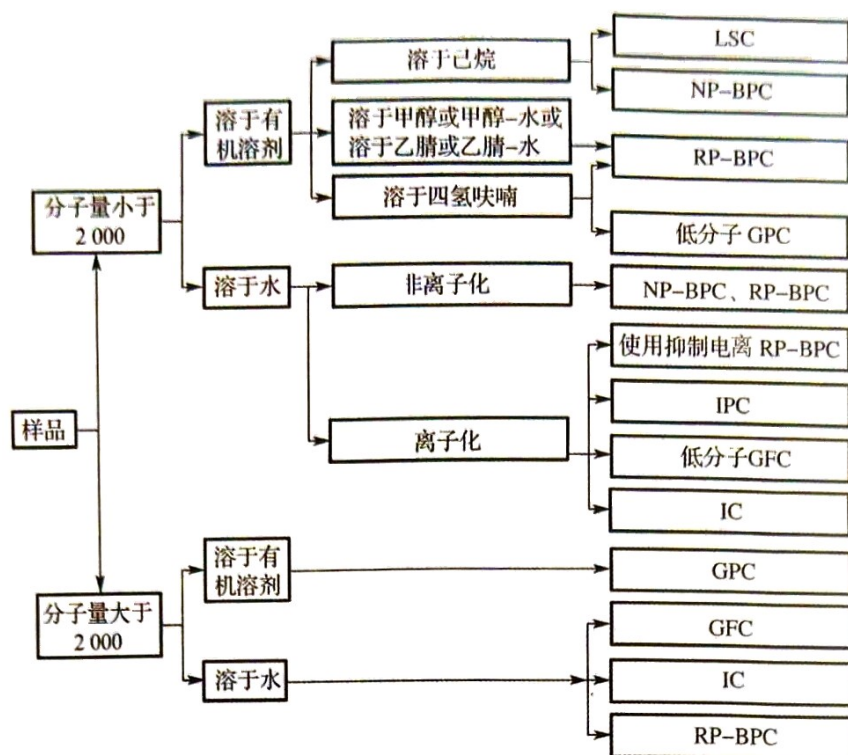


图 5-10 选择高效液相色谱分离模式指导图

LSC—液-固色谱法；NP-BPC—正相键合相色谱法；RP-BPC—反相键合相色谱法；
GPC—凝胶渗透色谱法；GFC—凝胶过滤色谱法；IPC—离子对色谱法；IC—离子色谱法

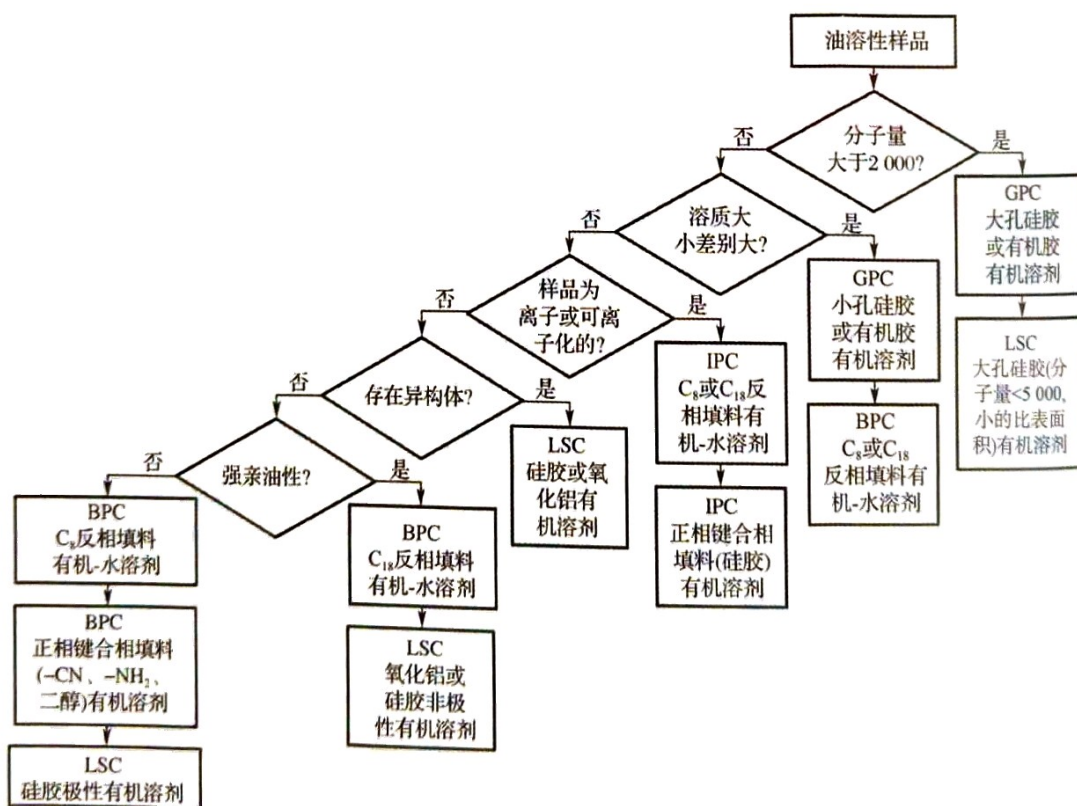


图 5-11 油性样品柱系统选择图

LSC—液-固色谱法；BPC—键合相色谱法；IPC—离子对色谱法；GPC—凝胶渗透色谱法

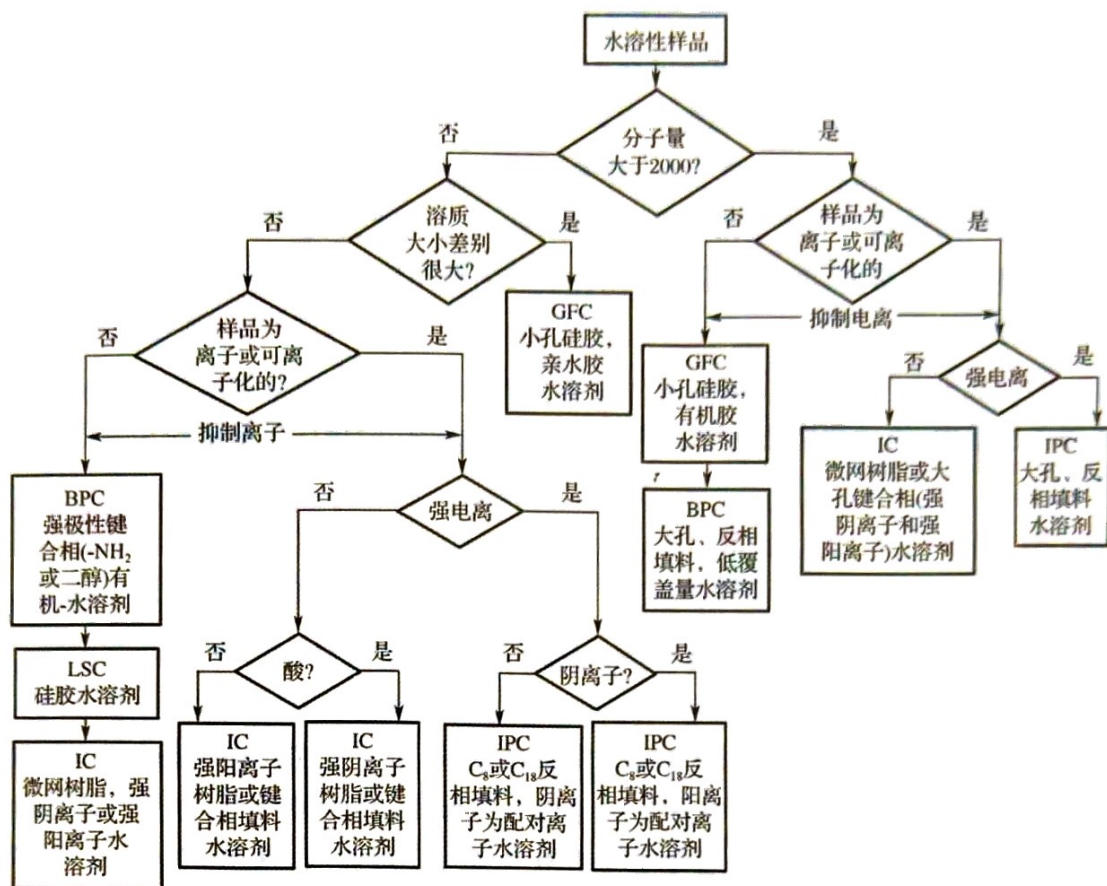


图 5-12 水溶性样品柱系统选择图

LSC—液-固色谱法; BPC—键合相色谱法; IC—离子色谱法;

IPC—离子对色谱法; GFC—凝胶过滤色谱法

五、流动相的选择

(一) 流动相的基本要求

1. 黏度较小

一般适合做高效液相色谱流动相的溶剂黏度应小于 $2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 。黏度大,一方面会使液相传质慢,柱效能低;另一方面会导致柱压降增加,流动相黏度增加一倍,柱压降也相应增加一倍,过高的柱压降会引起仪器漏液,泵负载过大而易出故障。

2. 对样品有一定的溶解能力

所用流动相对样品有一定的溶解度,否则吸附-解吸或液液分配等过程都无法进行,试样只能沉积在柱头上,达不到分离的目的。

3. 与检测器相匹配

紫外检测器是高效液相色谱法中使用广泛的一类检测器。因此,流动相应当在所使用波长下没有吸收或吸收很小。又如用示差折光检测器时,应当选择折射率与样品差别较大的溶剂作为流动相,以提高灵敏度。

4.与色谱系统的适应性

流动相的选择应考虑色谱柱的稳定性和输液部件及整个色谱系统的维护要求,应避免使用会引起柱效能降低或柱性能改变的流动相。

5.有足够的纯度

色谱柱在使用过程中有大量溶剂通过,溶剂杂质过多就会使柱填料被污染或降低检测器对被检测组分的灵敏度,因此应尽量使用色谱级的专用溶剂,至少应当选择合格的分析纯试剂(且要重蒸)。

6.有利于样品的回收

在制备色谱中,流动相应选用沸点较低易蒸发除去溶剂,且尽量不使用含非挥发性盐的缓冲液。

7.避免使用具有显著毒性的溶剂

应尽量避免使用具有显著毒性的溶剂,以保证操作人员的安全。

(二)流动相的 pH

采用反相色谱法分离弱酸($3 \leq \text{pH} \leq 7$)或弱碱($7 \leq \text{pH} \leq 8$)样品时,通过调节流动相的 pH,以抑制样品组分的解离,增加组分在固定相上的保留,并改善峰形,这种技术称为反相离子抑制技术。分析弱酸样品时,通常在流动相中加入少量弱酸,常用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液和 1% 醋酸溶液;分析弱碱样品时,通常在流动相中加入少量弱碱,常用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液和 30 mmol/L 三乙胺溶液。

(三)流动相成分选择

在化学键合相色谱法中,溶剂的洗脱能力与它的极性直接相关。在正相色谱中,溶剂的强度随极性的增强而增加,通常采用烷烃加适量极性改性剂。反相色谱的流动相通常以水做基础溶剂,再加入一定量的能与水互溶的极性改性剂,如甲醇、乙腈等。极性改性剂的性质及其所占比例对溶质的保留值和分离选择性有显著影响。一般情况下,甲醇-水系统能满足多数样品的分离要求,且黏度小、价格低,是反相色谱最常用的流动相。

(四)流动相的过滤

所有溶剂在使用前都必须经 0.45 μm 滤膜过滤,以除去杂质,即使是色谱纯试剂也不例外。用滤膜过滤时,特别要注意分清有机相滤膜和水相滤膜。有机相滤膜一般用于过滤有机溶剂,过滤水溶液时流速低或滤不动。水相滤膜只能用于过滤水溶液,严禁用于有机溶剂,否则滤膜会被溶解。溶有滤膜的溶剂不得用于 HPLC。对于混合流动相,可在混合前分别过滤,如需混合后过滤,首选有机相滤膜。

(五)流动相的脱气

所用流动相必须先脱气,否则容易产生气泡,影响泵的工作。气泡还会影响柱的分

离效率,影响检测器的灵敏度、基线稳定性,甚至导致无法检测。此外,溶解在流动相中的氧还可能与样品、流动相甚至固定相发生反应。溶解气体还会引起溶剂 pH 的变化,容易使结果产生误差。溶解氧能与某些溶剂(如甲醇、四氢呋喃)形成有紫外吸收的络合物,此络合物会提高背景吸收,并导致检测器灵敏度的轻微降低,但更重要的是,会在梯度淋洗时造成基线漂移。

(六)流动相的制备

用高纯度的试剂配制流动相。水应为新鲜制备的高纯水,凡规定 pH 的流动相均应使用精密 pH 计进行调节。应配制足量的流动相备用。

(七)流动相的储存

流动相一般储存于玻璃、聚四氟乙烯或不锈钢容器内,不能储存在塑料容器中。因许多有机溶剂如甲醇、乙酸等可浸出塑料表面的增塑剂,导致溶剂受污染,这种被污染的溶剂如用于 HPLC 系统,可能造成柱效能降低。储存容器一定要盖严,防止溶剂挥发引起组成变化,也防止氧和二氧化碳溶入流动相。磷酸盐、乙酸盐缓冲液很容易长霉,应尽量新鲜配制使用。

(八)使用卤代有机溶剂应特别注意的问题

卤代有机溶剂可能含有微量的酸性杂质,能与 HPLC 系统中的不锈钢发生反应。卤代有机溶剂与水的混合物比较容易分解,不能存放太久。卤代有机溶剂(如 CCl_4 、 CHCl_3 等)与各种醚类(如乙醚、二异丙醚、四氢呋喃等)混合后,可能会反应生成一些对不锈钢有较大腐蚀性的产物,这种混合流动相应尽量不采用,或新鲜配制。此外,卤代有机溶剂(如 CH_2Cl_2)与一些反应性有机溶剂(如乙腈)混合静置时,还会产生结晶。总之,卤代有机溶剂最好新鲜配制使用。如果是和干燥的饱和烷烃混合,则不会产生类似问题。

(九)流动相的选择步骤

第一步,由强到弱。一般先用 90% 的乙腈(或甲醇)/水(或缓冲溶液)进行实验,这样可以很快地得到分离结果,然后根据出峰情况调整有机溶剂(乙腈或甲醇)的比例。

第二步,“三倍”规则。每减少 10% 的有机溶剂(甲醇或乙腈)的量,保留因子约增加三倍,此为“三倍”规则。调整的过程中,注意观察各个峰的分离情况。

第三步,粗调转微调。当分离达到一定程度,应将有机溶剂 10% 的改变量调整为 5%,并据此规则逐渐降低调整率,直至各组分的分离情况不再改变。

六、定性和定量方法

(一)定性方法

高效液相色谱法的定性与气相色谱法类似,即确定各色谱峰所代表的化合物。但由于液相色谱法中影响溶质迁移的因素较多,即便在相同的色谱条件下,同一组分在不同的色谱柱上的保留值也可能差别很大,因此定性难度更大,常用的定性方法有如下几种:

1.用已知标准样品定性

如果在相同的色谱条件下被测化合物与标准样品的保留值一致,就可以初步认为被测化合物与标准样品相同。若流动相组成经多次改变后,被测化合物的保留值仍与标准样品的保留值一致,就能进一步证实被测化合物与标准样品为同一化合物。

2.检测器的相对响应

可以将两种检测器(例如可变波长紫外吸收检测器与荧光检测器或可变波长紫外吸收检测器与示差折光检测器)串联或分别使用,同一种化合物在两个检测器上的响应比,在相同的条件下应当是相同的。对于紫外检测器,还可比较被测样品与标准样品的目标峰在两个不同检测波长条件下的响应,以确认它们是否为同一化合物。若它们在两个不同波长下的响应比相同,即可确认它们为同一物质。

3.利用紫外检测器全波长扫描功能定性

紫外检测器是高效液相色谱法中使用广泛的一种检测器。全波长扫描紫外检测器可以根据被检测化合物的紫外光谱图得到一些有价值的定性信息。

传统的方法是:在色谱图上某组分的色谱峰出现极大值,即最高浓度时,通过停泵等手段,使组分在检测池中滞留,然后对检测池中的组分进行全波长扫描,得到该组分的紫外-可见吸收光谱图;再取可能的标准样品按同样方法处理。对比两者光谱图即能鉴别该组分与标准样品是否相同。对于某些有特殊紫外-可见吸收光谱图的化合物,也可以通过对照标准光谱图的方法来识别化合物。

(二)定量方法

高效液相色谱定量方法与气相色谱定量方法类似,其峰面积的测量、积分处理方法、定量校正因子的定义和计算方法均和气相色谱相同。

1.外标法

外标法是用待测组分的纯物质配制标准系列浓度的溶液和待测试样同时做色谱分析来比较而定量的一种方法,可分为标准曲线法和直接比较法。具体方法可参阅本教材项目四中学习情景二。

2.内标法

内标法是比较精确的一种定量方法。它是将已知量的参比物(内标物)加到已知量的试样中,那么试样中参比物的浓度为已知;在进行色谱测定之后,待测组分峰面积和参比物峰面积之比应等于待测组分的质量与参比物质量之比,求出待测组分的质量,进而求出待测组分的含量。具体方法可参阅本教材项目四中学习情景二。

3. 归一化法

归一化法要求所有组分都能分离并有响应,其基本方法与气相色谱法中的归一化法类似。由于高效液相色谱法所用检测器一般为选择性检测器,对很多组分没有响应,因此高效液相色谱法较少使用归一化法进行定量分析。

思考与练习

一、填空题

1. 高效液相色谱法的流动相在使用前必须经过过滤,有机溶液用_____滤膜过滤,水溶液用_____滤膜过滤。
2. 分离条件的选择包括_____的选择和_____的选择两方面,是高效液相色谱法建立的关键步骤。
3. 反相色谱的流动相通常以_____作为基础溶剂。
4. 流动相的 pH 应使用_____进行测定。
5. 根据检测目的选择检测器,如果是定性分析或是制备色谱,则最好用_____型检测器;如果是_____分析,检测器灵敏度越高、最低检出量越小越好;如果检测目的是_____,则检测器的灵敏度没必要很高。

二、选择题

1. 高效液相色谱法配制流动相所用的水可选择下列哪些水? ()
 A. 新鲜制备的高纯水
 B. 纯水机或超级纯水机制得的水
 C. 蒸馏水
 D. 重蒸馏水
2. 流动相可储存于下列哪些容器中? ()
 A. 玻璃容器
 B. 塑料容器
 C. 聚四氟乙烯容器
 D. 不锈钢容器
3. 常用有机溶剂有①色谱纯②优级纯③分析纯,纯度从高到低的顺序正确的是()。
 A. ①>②>③
 B. ①<②<③
 C. ①>③>②
 D. 三者纯度相同

三、简答题

1. 简述样品预处理的目的是。
2. 高效液相色谱法对流动相的要求有哪些?
3. 简述高效液相色谱法流动相的选择和配制的步骤。
4. 简述真空脱气装置的工作原理。
5. 在哪种情况下适合于采用梯度洗脱技术?
6. 分离下列物质,宜用何种高效液相色谱方法?(1)乙醇和正丙醇;(2)己酸和戊酸。
7. 核苷经液相色谱柱分离,用紫外检测器测得各色谱峰,经鉴定为下列组分,见表 5-3:

表 5-3

核苷组分

组分	死时间	尿苷	肌苷	鸟苷	腺苷	胞苷
保留时间/min	4.0	30	43	57	71	96

如果在另一色谱柱中填充相同固定相,但柱的尺寸不同,测得死时间为 5.0 min,尿苷为 53 min,某组分洗脱时间为 100 min,试说明这个组分是什么物质?

学习情景三 高效液相色谱法在食品分析中的应用

一、食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定

1. 原理

不同样品经提取后,将提取液过滤,经反相高效液相色谱分离测定,根据保留时间定性,外标峰面积定量。

2. 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

(1) 甲醇:色谱纯。

(2) 乙酸铵溶液:称取 1.54 g 乙酸铵,加水溶解并稀释至 1 000 mL,经微孔滤膜过滤。

(3) 亚铁氰化钾溶液:称取 106 g 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$,加水至 1 000 mL。

(4) 乙酸锌溶液:称取 220 g 乙酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ 溶于少量水中,加入 30 mL 冰乙酸,加水稀释至 1 000 mL。

(5) 氨水(1+1):氨水与水等体积混合。

(6) 正己烷。

(7) pH 4.4 乙酸盐缓冲溶液。

① 乙酸钠溶液:称取 6.80 g 乙酸钠 $(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O})$,用水溶解后定容至 1 000 mL。

② 乙酸溶液:取 4.3 mL 冰乙酸,用水稀释至 1 000 mL。

将上述两种溶液按体积比 37:63 混合,即得 pH 4.4 乙酸盐缓冲溶液。

(8) pH 7.2 磷酸盐缓冲溶液。

① 称取 23.88 g 磷酸氢二钠 $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$,用水溶解后定容至 1 000 mL。

② 称取 9.07 g 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) ,用水溶解后定容至 1 000 mL。

将上述两种磷酸盐溶液按体积比 7:3 混合,即得 pH 7.2 磷酸盐缓冲溶液。

(9) 标准溶液的配制。

① 苯甲酸标准储备液:准确称取 0.236 0 g 苯甲酸钠,加水溶解并定容至 200 mL。此溶液每毫升含苯甲酸 1.00 mg。

② 山梨酸标准储备液:准确称取 0.268 0 g 山梨酸钾,加水溶解并定容至 200 mL。此溶液每毫升含山梨酸 1.00 mg。

③ 糖精钠标准储备液:准确称取 0.170 2 g 糖精钠($C_6H_4CONaSO_2$)(120 °C 烘干 4 h),加水溶解并定容至 200 mL。此溶液中糖精钠的含量为 1.00 mg/mL。

④ 混合标准使用液:分别准确吸取不同体积苯甲酸、山梨酸和糖精钠标准储备液,将其稀释成苯甲酸、山梨酸和糖精钠含量分别为 0.000 mg/mL、0.020 mg/mL、0.040 mg/mL、0.080 mg/mL、0.160 mg/mL、0.320 mg/mL 的混合标准使用液。

(10) 微孔滤膜:0.45 μ m,水相。

3. 主要仪器与设备

(1) 高效液相色谱仪:配有紫外检测器。

(2) 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

(3) 超声波水浴振荡器。

(4) 食品粉碎机。

(5) 旋涡混合器。

(6) pH 计。

(7) 天平:感量为 0.01 g。

(8) 分析天平:感量为 0.1 mg。

4. 分析步骤

(1) 样品处理

① 液体样品

a. 碳酸饮料、果酒、葡萄酒等液体样品:称取 10 g 样品(精确至 0.001 g)(如含有乙醇需水浴加热除去乙醇后再用水定容至原体积)于 25 mL 容量瓶中,用氨水(1+1)调节 pH 至近中性,用水定容至刻度线,混匀,经微孔滤膜过滤,滤液待上机分析。

b. 乳饮料、植物蛋白饮料等含蛋白质较多的样品:称取 10 g 样品(精确至 0.001 g)于 25 mL 容量瓶中,加入 2 mL 亚铁氰化钾溶液,摇匀,再加入 2 mL 乙酸锌溶液摇匀,以沉淀蛋白质,加水定容至刻度线,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经微孔滤膜过滤,滤液待上机分析。

② 半固体样品

a. 含有胶基的果冻样品:称取 0.5~1 g 样品(精确至 0.001 g),加水适量,转移至 25 mL 容量瓶中,再加水至约 20 mL,置于 60~70 °C 水浴中加热片刻,加塞,剧烈振摇使其分散均匀后,加氨水(1+1)调节 pH 至近中性,加塞,剧烈振摇,使样品在水中分散均匀,置于 60~70 °C 水浴锅中加热 30 min,取出后趁热超声 5 min,冷却后用水定容至刻度线,用微孔滤膜过滤,滤液待上机分析。

b. 油脂、奶油类样品:称取 2~3 g 样品(精确至 0.001 g)于 50 mL 具塞离心管中,加入 10 mL 正己烷,用旋涡混合器使其充分溶解,4 000 r/min 离心 3 min,吸出正己烷提取液转移至 250 mL 分液漏斗中,再向 50 mL 具塞离心管中加入 10 mL 正己烷重复上述步骤,合

并正己烷提取液于 250 mL 分液漏斗中。于分液漏斗中加入 20 mL pH 4.4 乙酸盐缓冲溶液,加塞后剧烈振摇分液漏斗约 30 s,静置分层后,将水层转移至 50 mL 容量瓶中,再加入 20 mL pH 4.4 乙酸盐缓冲溶液,重复上述步骤,合并水层并用乙酸盐缓冲溶液定容至刻度线,经微孔滤膜过滤,滤液待上机分析。

③ 固体样品

a. 肉制品、饼干、糕点:称取粉碎均匀样品 2~3 g(精确至 0.001 g)于小烧杯中,用 20 mL 亚水分数次清洗小烧杯将样品移入 25 mL 容量瓶中,超声振荡提取 5 min,取出后加 2 mL 铁氰化钾溶液,摇匀,再加入 2 mL 乙酸锌溶液,摇匀,用水定容至刻度线,移入离心管中,4 000 r/min 离心 5 min,吸出上清液,用微孔滤膜过滤,滤液待上机分析。

b. 油脂含量高的火锅底料、调料等样品:称取样品 2~3 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 具塞离心管中,加入 10 mL 磷酸盐缓冲溶液,用旋涡混合器充分混合,4 000 r/min 离心 5 min,小心吸出水层转移到 25 mL 容量瓶中,再加入 10 mL 磷酸盐缓冲溶液于具塞离心管中,重复上述步骤,合并两次水层,用磷酸盐缓冲溶液定容至刻度线,混匀,用微孔滤膜过滤,滤液待上机分析。

c. 凝胶糖果、胶基糖果:按半固体样品含有胶基的果冻样品处理。

(2) 色谱条件

① 色谱柱: C_{18} 柱, 250 mm×4.6 mm×5 μ m, 或性能相当者。

② 流动相: 甲醇+乙酸铵溶液(5+95)。

③ 流速: 1 mL/min。

④ 检测波长: 230 nm。

⑤ 进样量: 10 μ L。

(3) 测定

取处理液和混合标准使用液各 10 μ L 注入高效液相色谱仪进行分离,以其标准溶液峰的保留时间为依据定性,以其峰面积求出样液中被测物质含量,供计算。苯甲酸、山梨酸和糖精钠同时测定的高效液相色谱图如图 5-13 所示。

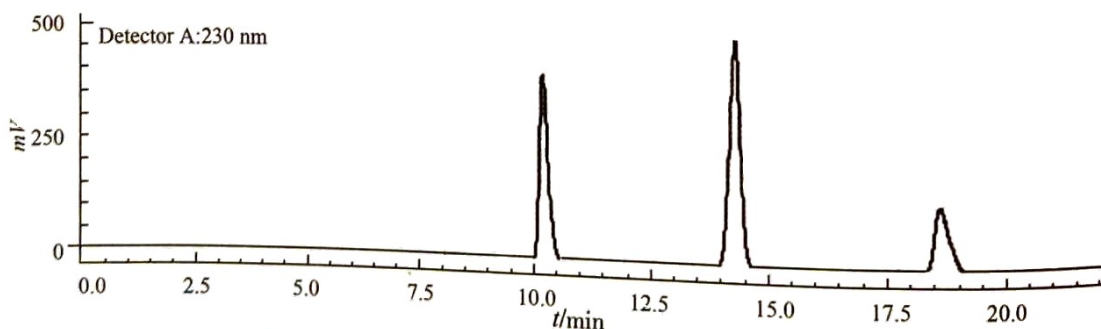


图 5-13 苯甲酸、山梨酸和糖精钠高效液相色谱图

5. 结果计算

样品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的含量按式(5-2)计算

$$X = \frac{cV \times 1\,000}{m \times 1\,000} \quad (5-2)$$

式中: X ——样品中待测组分含量, g/kg;

c ——由标准曲线得出的样液中待测物的浓度,mg/mL;

V ——样品定容体积,mL;

m ——样品质量,g。

计算结果保留两位有效数字。

6.精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

二、动物性食品中对乙酰氨基酚残留量的测定

1.原理

试料中残留的对乙酰氨基酚,用乙酸乙酯提取、HLB柱净化、甲醇洗脱、氮气吹干、流动相溶解、高效液相色谱测定、外标法定量。

2.试剂和材料

以下所用试剂,除特别说明均为分析纯;水为符合GB/T 6682—2008规定的一级水。

(1)对乙酰氨基酚标准品:含量 $\geq 99\%$ 。

(2)甲醇:色谱纯。

(3)乙酸乙酯。

(4)正己烷。

(5)HLB固相萃取柱:60 mg/3 mL,或相当者。

(6)5%甲醇水溶液:取甲醇5 mL,用水溶解并稀释至100 mL。

(7)0.05 mol/L 乙酸铵溶液:称取乙酸铵3.15 g,用水溶解并稀释至1 000 mL,滤膜过滤。

(8)1 mg/mL 对乙酰氨基酚标准储备液:精密称取对乙酰氨基酚10 mg,置于10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度线,配制成浓度为1 mg/mL的对乙酰氨基酚标准储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期3个月。

(9)10 $\mu\text{g/mL}$ 对乙酰氨基酚标准工作液:精密量取1 mg/mL对乙酰氨基酚标准储备液1.0 mL于100 mL容量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度线,配制成浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的对乙酰氨基酚标准工作液(现配现用)。

3.主要仪器和设备

(1)高效液相色谱仪:配紫外检测器。

(2)分析天平:感量为0.1 mg。

(3)天平:感量为0.01 g。

(4)冷冻高速离心机。

(5)匀浆机。

(6)旋涡混合器。

(7)循环水真空泵。

(8)具塞离心管:50 mL。



动物性食品中
兽药残留量的
检测

(9)滤膜:0.45 μm 。

4.试料的制备与保存

(1)试料的制备

取新鲜或冷冻的空白或供试组织,去除筋膜,绞碎,并使均质。

——取均质后的供试样品,作为供试试样。

——取均质后的空白样品,作为空白试样。

——取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

(2)试料的保存

-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

5.测定步骤

(1)提取

称取试料(5 ± 0.05)g,置于具塞离心管中,加 20 mL 乙酸乙酯旋涡混合 2 min,6 000 r/min 离心 15 min,取上清液,置于另一具塞离心管中,残渣中加入 10 mL 乙酸乙酯,重复提取一次,合并两次上清液,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸发至干,用甲醇 3 mL 溶解残余物,加 5 mL 正己烷,混匀,静置分层,丢弃正己烷层液,取下层液,置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中用氮气吹干,用 6 mL 水溶解残余物,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,备用。

(2)净化

HLB 柱依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化,取备用液过柱,控制流速小于 2 mL/min。用 3 mL 水和 3 mL 5% 甲醇淋洗,4 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,置于 40~45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中用氮气吹干,用流动相 1.0 mL 溶解残余物,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,供高效液相色谱仪测定。

(3)标准曲线的制备

精密量取 10 $\mu\text{g/mL}$ 对乙酰氨基酚标准工作液适量,用流动相稀释,配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 600 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,供高效液相色谱仪测定。以测得的峰面积为纵坐标,以对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

(4)测定

①色谱条件

a.色谱柱: C_{18} 柱,250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm ,或性能相当者。

b.流动相:甲醇+0.05 mol/L 乙酸铵溶液(20+80,V/V)。

c.流速:1.0 mL/min。

d.紫外检测波长:250 nm。

e.进样量:50 μL 。

f.柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

②测定法

取试样溶液和相应的标准溶液,做单点或多点校准,按外标法以峰面积计算。标准溶液及试样溶液中对乙酰氨基酚响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下,标准溶液、空白试样溶液、空白添加试样溶液的高效液相色谱图分别如图 5-14~图 5-16 所示。

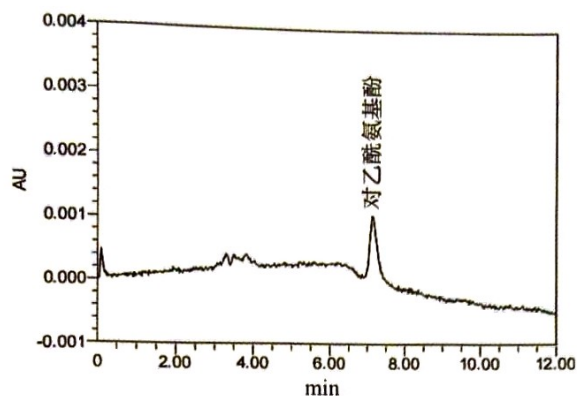


图 5-14 对乙酰氨基酚标准溶液高效液相色谱图(10 μg/L)

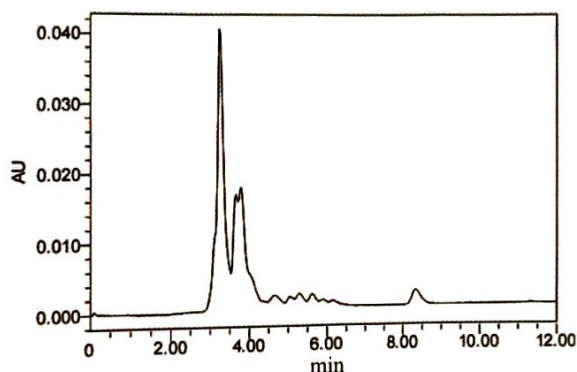


图 5-15 猪肌肉组织空白试样溶液高效液相色谱图(10 μg/L)

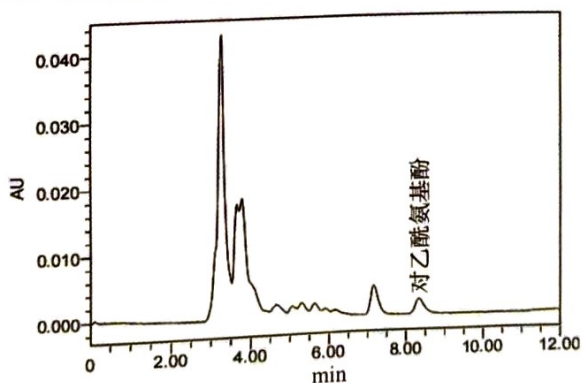


图 5-16 猪肌肉组织空白添加试样溶液高效液相色谱图(10 μg/kg)

(5)空白实验

除不加试样外,采用完全相同的步骤进行平行操作。

5.结果计算

试样中对乙酰氨基酚药物的残留量(μg/kg)按下式计算

$$X = \frac{A c_s V}{A_s m} \quad (5-3)$$

式中: X ——供试试样中对乙酰氨基酚药物残留量, μg/kg;

A ——试样溶液中对乙酰氨基酚的峰面积;

A_s ——标准工作液中对乙酰氨基酚的峰面积;

c_s ——标准工作液中对乙酰氨基酚的浓度, μg/L;

V ——溶解残余物所用流动相体积, mL;

m ——供试试样质量, g。

注:计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

7. 检测方法的灵敏度、准确度、精密度

(1) 灵敏度

本方法的检出限为 $3 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $10 \mu\text{g/kg}$ 。

(2) 准确度

本方法在 $10 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $70\% \sim 110\%$ 。

(3) 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

知识拓展

一、液相色谱的速率方程

高效液相色谱法的基本概念及理论基础,如保留值、分配系数、分配比、分离度、塔板理论、速率理论等与气相色谱法基本一致,其不同之处由流动相采用液体和气体的性质差异所引起。液体是不可压缩的,其扩散系数只有气体的十万分之一至万分之一,黏度为气体的 100 倍,而密度为气体的 1 000 倍。这些差别对液相色谱的扩散和传质过程影响很大, Giddings 等在范氏方程基础上提出了液相色谱速率方程,如下

$$H = H_e + H_d + H_s + H_m + H_{sm} = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (5-4)$$

式中: H ——塔板高度;

A ——涡流扩散项(H_e);

B/u ——分子扩散项(H_d);

Cu ——传质阻力项,包括固定相传质阻力项(H_s)、移动流动相传质阻力项(H_m)和滞留流动相传质阻力项(H_{sm})。

二、影响速率方程的因素

(一) 涡流扩散项

其含义与气相色谱法的涡流扩散项相同。减小 H_e 可提高液相色谱柱的柱效能,可采用减小粒度和提高柱内填料装填均匀性的方式实现。目前多采用 $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 的球形固定相,柱效能可达 10^4 塔板/m。涡流扩散引起的色谱峰形扩展,如图 5-17 所示。

(二) 分子扩散项

试样中组分在流动相带动下流经色谱柱时,由组分分子本身运动引起的纵向扩散导致色谱峰形扩展,又称纵向扩散,如图 5-18 所示。液相色谱中流动相为液体,黏度比载气大得多,柱温多采用室温,比气相色谱的柱温低得多,因此组分在液体中的扩散系数比在气体中的扩散系数要小 4~5 个数量级。当流动相的线速度大于 1 cm/s 时,分子扩散项对色谱峰形扩展的影响可以忽略,而气相色谱中此项却很重要。

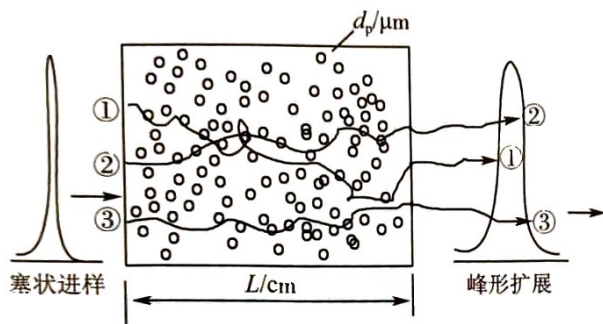


图 5-17 涡流扩散引起的色谱峰形扩展

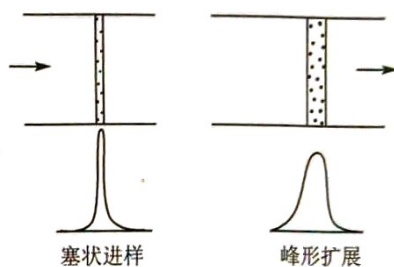


图 5-18 分子扩散引起的峰形扩展

(三) 固定相传质阻力项

溶质分子从液体流动相转移进入固定相和从固定相移出重新进入液体流动相的过程,会引起色谱峰形的明显扩展,如图 5-19 所示。对由固定相的传质过程引起的峰形扩展,可从改善传质和加快组分分子在固定相上的解吸过程加以解决。对液液分配色谱,可使用薄的固定相层。如采用化学键合相,“固定液”只是在载体表面的一层单分子层时,此项就可忽略。对吸附、排阻和离子交换色谱法,可使用小的颗粒填料来改进。

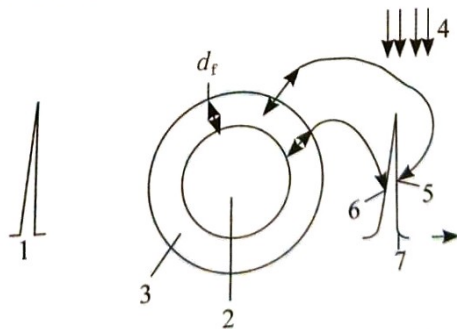


图 5-19 固定相传质阻力引起的峰形扩展

1—进样后起始峰形；2—载体；3—固定液（液膜厚度为 d_f ）；4—液体流动相；5—溶解在固定液表面溶质分子到达峰的前沿；6—溶解在固定液内部溶质分子到达峰的后尾；7—样品移出色谱柱时的峰形

(四) 移动流动相传质阻力项

当流动相流过色谱柱内的填充颗粒形成流路时,靠近填充颗粒的流动相流动得慢一些,而流路中部的流动相流动最快,即柱内流动相的流速并不是均匀的;靠近填充颗粒的组分分子流速慢,引起峰形扩展,如图 5-20 所示,这是由于处于边缘的

分子与固定相的作用大于处于流路中心的分子与固定相的作用而引起的。

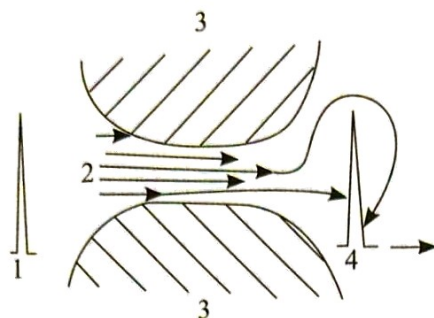


图 5-20 移动流动相传质阻力引起的峰形扩展

1—进样后的起始峰形；2—移动流动相在固定相颗粒间构成的流路；
3—固定相基体；4—样品移出色谱柱时的峰形

(五) 滞留流动相传质阻力项

由于固定相填料的多孔性,微粒的小孔内所含的流动相处于停滞不动的状态。流动相中的组分分子要与固定相进行质量交换,必须先由流动相扩散到滞留区。有些分子在滞留区内扩散较短距离又回到流动相,而向小孔深处扩散的分子则在滞留区停留时间较长,由此引起的峰形扩展,如图 5-21 所示。

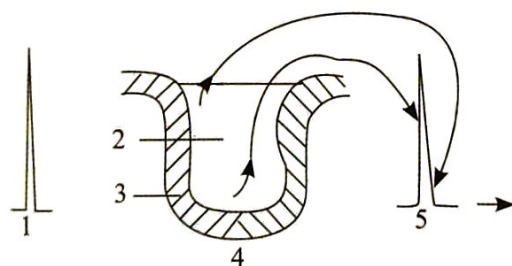


图 5-21 滞留流动相传质阻力引起的峰形扩展

1—进样后的起始峰形；2—滞留流动相；3—固定液膜；4—固定相基体；5—样品移出色谱柱时的峰形

可以看出,要提高液相色谱分离的效率,必须得到小的 H 值,可从液相色谱柱、流动相及流速等综合考虑。一般来说,柱填料颗粒较小、填充均匀和流动相流速较低时, H 值较小;流动相黏度较低和柱温较高时, H 值较小;样品分子较小时, H 值较小。采用薄壳型填料,可消除滞留流动相传质阻力的影响,从而降低 H 。减小粒度是提高柱效能的最有效途径。采用湿法匀浆装柱技术后,目前使用的高效液相色谱柱粒径均小于 $10\ \mu\text{m}$,得到了高柱效能。多孔微粒填料的 H 值低且分离效率高,样品负荷量比薄壳型填料要大,成为目前广泛应用的高柱效能填料。采用低黏度的流动相及增加柱温可以增大组分在液体中的扩散系数。但用有机溶剂做流动相时,增加柱温会产生气泡,故一般均在室温下进行实验。虽然甲醇对人体有害,但是因其黏度是乙醇的 $1/2$,故常用溶剂仍选甲醇,还可达到降低柱压的作用。降低流速可降低传质阻力项的影响,但增加了分析时间。应根据液相色谱速率方程,对各影响因素予以综合考虑。

国标中高效液相色谱法测定的食品项目

序号	测定项目	检测国标	检测器
1	畜禽肉中己烯雌酚的测定	GB/T 5009.108—2003	紫外检测器或 二极管阵列检测器
2	畜禽肉中土霉素、四环素、金霉素残留量的测定(高效液相色谱法)	GB/T 5009.116—2003	紫外检测器或 二极管阵列检测器
3	己内酰胺	GB 31604.19—2016	紫外检测器
4	大豆及谷物中氟磺胺草醚残留	GB/T 5009.130—2003	紫外检测器或 二极管阵列检测器
5	植物性食品中灭幼脲残留量的测定	GB/T 5009.135—2003	紫外检测器或 二极管阵列检测器
6	饮料中咖啡因的测定	GB/T 5009.139—2014	紫外检测器或 二极管阵列检测器
7	饮料中乙酰磺胺酸钾的测定	GB/T 5009.140—2003	紫外检测器或 二极管阵列检测器
8	植物性食品中除虫脲残留的测定	GB/T 5009.147—2003	紫外检测器或 二极管阵列检测器
9	植物性食品中游离棉酚的测定	GB/T 5009.148—2014	紫外检测器或 二极管阵列检测器
10	食品中栀子黄的测定	GB/T 5009.149—2016	荧光检测器
11	食品中有机酸的测定	GB/T 5009.157—2016	紫外检测器或 二极管阵列检测器
12	蔬菜中维生素 K ₁ 的测定	GB/T 5009.158—2016	紫外检测器或 二极管阵列检测器
13	水果中单甲醚残留的测定	GB/T 5009.160—2003	紫外检测器
14	动物性食品中氨基甲酸酯类农药多组分残留高效液相色谱测定	GB/T 5009.163—2003	紫外检测器
15	食品中牛磺酸的测定	GB/T 5009.169—2016	紫外检测器
16	保健食品中褪黑素含量的测定	GB/T 5009.170—2003	紫外检测器
17	梨果类、柑橘类水果中噻螨酮残留量的测定	GB/T 5009.173—2003	紫外检测器
18	保健食品中脱氢表雄甾酮(DHEA)的测定	GB/T 5009.193—2003	紫外检测器
19	保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定	GB/T 5009.194—2003	紫外检测器
20	保健食品中吡啶甲酸铬含量的测定	GB/T 5009.195—2003	紫外检测器

(续表)

序号	测定项目	检测国标	检测器
21	保健食品中盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的测定	GB/T 5009.197—2003	紫外检测器
22	贝类记忆丧失性贝类毒素软骨藻酸的测定	GB/T 5009.198—2016	紫外检测器或 二极管阵列检测器
23	粮、油、菜中的甲萘威残留量的测定	GB/T 5009.21—2003	紫外检测器
24	食品中维生素 A 和维生素 E 的测定	GB/T 5009.82—2003	紫外检测器或二极管 阵列检测器或荧光检测器
25	蜂蜜中苯酚残留量的测定方法	GB/T 18932.13—2003	荧光检测器
26	食品中黄曲霉毒素的测定	GB/T 18979—2003	荧光检测器或质谱检测器
27	食品中苏丹红染料的检测方法	GB/T 19681—2005	紫外检测器或 二极管阵列检测器
28	水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定	GB/T 20361—2006	荧光检测器
29	淀粉衍生物葡萄糖浆、果糖浆和氢化葡萄糖浆成分的测定	GB/T 20379—2006	示差折光检测器
30	鸡组织中己烯雌酚残留的测定	GB/T 20443—2006	电化学检测器
31	动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法	GB/T 21317—2007	质谱检测器
32	食品中叔丁基对苯二酚的测定	GB/T 21927—2008	荧光检测器
33	食品中胆固醇的测定	GB/T 22220—2008	紫外检测器
34	食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定	GB 5009.8—2016	示差折光检测器或蒸发 激光散射检测器
35	食品中苯并(a)芘的测定	GB 5009.27—2016	荧光检测器
36	食品中脱氢乙酸的测定	GB/T 23377—2009	紫外检测器或 二极管阵列检测器
37	水果、蔬菜中多菌灵残留的测定	GB/T 23380—2009	紫外检测器或 二极管阵列检测器
38	食品中丙酸钠、丙酸钙的测定	GB 5009.120—2016	紫外检测器或 二极管阵列检测器

(续表)

序号	测定项目	检测国标	检测器
39	胡椒碱含量的测定	GB/T 17528—2009	紫外检测器
40	食品接触材料及制品 11-氨基十一酸迁移量的测定	GB 31604.13—2016	荧光检测器
41	食品接触材料高分子材料食品模拟物中 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷(双酚 A)的测定	GB/T 23296.16—2009	荧光检测器
42	食品接触材料及制品 1,3-苯二甲胺迁移量的测定	GB 31604.11—2016	荧光检测器
43	食品中禁用物质的检测(碱性橙染料)	GB/T 23496—2009	紫外检测器
44	保健食品中大豆异黄酮的测定方法	GB/T 23788—2009	紫外检测器
45	食品中赭曲霉毒素 A 的测定	GB 5009.96—2016	荧光检测器
46	粮油检验花生中白藜芦醇的测定	GB/T 24903—2010	紫外检测器
47	粮油检验粮食中麦角甾醇的测定	GB/T 25221—2010	紫外检测器
48	粮油检验大豆异黄酮含量测定	GB/T 26625—2011	紫外检测器
49	动植物油脂生育酚及生育三烯酚含量测定	GB/T 26635—2011	紫外检测器或荧光检测器
50	牛奶中左旋咪唑残留量的测定	GB 29681—2013	紫外检测器
51	水产品中青霉素类药物残留的测定	GB 29682—2013	紫外检测器
52	动物性食品中对乙酰氨基酚残留量的测定	GB 29683—2013	紫外检测器
53	水产品中阿苯达唑及其代谢物多残留的测定	GB 29687—2013	荧光检测器
54	牛奶中甲砒霉素残留量的测定	GB 29689—2013	紫外检测器
55	鸡可食性组织中尼卡巴嗪残留量的测定	GB 29691—2013	紫外检测器
56	牛奶中喹诺酮类药物多残留的测定	GB 29692—2013	紫外检测器
57	动物性食品中常山酮残留量的测定	GB 29693—2013	紫外检测器
58	动物性食品中 13 种磺胺类药物多残留的测定	GB 29694—2013	紫外检测器

(续表)

序号	测定项目	检测国标	检测器
59	水产品中阿维菌素和伊维菌素多残留的测定	GB 29695—2013	紫外检测器
60	鸡可食性组织中地克珠利残留量的测定	GB 29701—2013	紫外检测器
61	水产品中甲氧苄啶残留量的测定	GB 29702—2013	紫外检测器
62	动物性食品中氮哌酮及代谢物多残留的测定	GB 29709—2013	紫外检测器