

高效液相色谱法基本知识

(见第7章)

① HPLC 法分类与定义

正相高效液相色谱法 (NP-HPLC) —— 固定相极性大于流动相极性。常用色谱柱有硅胶柱、氰基柱、氨基柱；流动相为烷烃加适量极性溶剂，如正己烷-异丙醇、正己烷-乙醇等。主要用于分离溶于有机溶剂的极性至中等极性的分子型化合物，如维生素 A、维生素 D、维生素 K₁ 的含量测定。

反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) —— 流动相极性大于固定相极性。常用色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶 (ODS) 柱；流动相主要成分为甲醇-水或乙腈-水 (添加适量酸或缓冲盐)，用于大多数非极性、弱极性药物的分离分析。

② 系统适用性试验内容与要求

理论板数 (n) = $16(t_R/W)^2$ 或 $n = 5.54(t_R/W_{h/2})^2$ ，计算 n 时应指明测定物质。当测定结果有异议时，应以峰宽 (W) 计算结果为准。

$$\text{分离度 } (R) = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2} \text{ 或 } R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{1.70(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$
，一般要求待测组分与相邻共存物之间的 R 应大于 1.5。当测定结果有异议时，应以峰宽 (W) 计算结果为准。

重复性：用于评价连续进样中，色谱系统响应值的重复性能。取同一溶液连续进样 5 次，其峰面积的相对标准偏差 (RSD) 应不大于 2.0%。

$$\text{拖尾因子 } (T) = \frac{W_{0.05h}}{2d_1}$$
，峰高法定量时 T 应在 0.95~1.05 之间。

③ 测定方法

内标法：按规定，取被测物对照品和内标物质一定量，混合，配制成校正因子测定用的对照溶液，注入高效液相色谱仪，记录色谱峰面积。根据对照溶液色谱图中对照品和内标物质的峰面积或峰高，以及对照品和内标物的浓度，按下式计算校正因子 (f)：

$$f = \frac{A_{\text{内}} / C_{\text{内}}}{A_{\text{对}} / C_{\text{对}}}$$

另取被测物适量，加一定量内标溶液，混合，制成供试品溶液，注入高效液相色谱仪，记录色谱峰面积。根据供试品溶液色谱图中待测成分和内标物质的峰面积或峰高，按下式计算供试品溶液中待测成分的浓度 ($C_{\text{样}}$)：

$$C_{\text{样}} = f \times \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{内}} / C_{\text{内}}}$$

外标法：按规定，精密称取对照品和供试品，分别配制成溶液，注入高效液相色谱仪，记录各自色谱图，测量对照品溶液和供试品溶液中待测成分的峰面积 (或峰高)，按下式计算供试品溶液中待测成分的浓度 ($C_{\text{样}}$)：

$$C_{\text{样}} = C_{\text{对}} \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{对}}}$$