

# 测定农药和其它有毒物质用的高效液相色谱仪 (OIML 国际建议 NO.112) 摘要

赵 敏

(国家标准物质研究中心 北京 100013)

## 1 适用范围

1.1 本建议规定了在进行污染监控和食品质量评价时,用来测定农药和其它有毒物质的高效液相色谱仪(HPLC)的性能测试及检定的要求,取样技术和测量方法不在本建议内。

1.2 本建议介绍了 HPLC 系统的主要部件,包括泵、进样装置、色谱柱、检测器、温度控制 and 数据处理系统等的计量和技术要求,检测器是指紫外/可见分光光度检测器,荧光检测器和电化学检测器。

1.3 HPLC 系统可以测量氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类、有机磷酸酯类、多环芳香烃、酚类、异氰酸酯类、黄曲霉毒素类、氰苯氧酸除草剂类、三嗪类除草剂和胺类等化合物。但有的化合物需转化成衍生物后才能进行测量。

## 2 有关术语

### 2.1 进样装置

将试样引进色谱柱的设备。

### 2.2 色谱柱

盛装固定相且流动相在其中流过的管子。

### 2.3 流动相

流过色谱柱并从柱中洗脱出试样组分的液体(溶剂),它可以是单一组分也可以是多种组分的混合物。

### 2.4 固定相

附着于色谱柱内固体载体上的、有活性的、不流动的物质或固体载体本身,通过一种或几种可能的方式相结合,延迟试样组分通过色谱柱。

### 2.5 载体

与色谱柱内固定相联接的物质(一起构成填充物),流动相在其中流过。该物质通常是惰性的,用粒径  $d_p$  ( $\mu\text{m}$ ) 来表述其特征。

### 2.6 洗脱

用流动相将试样组分从固定相上洗下来的过程。

### 2.7 检测器

对从色谱柱上洗脱下来的试样组分的出现产生响应的装置。

### 2.8 噪声

检测器信号变化的量度,可分为三部分:

短期噪声包括所有可观察到的、频率为  $10^{-2}$  Hz 到  $10^{-1}$  Hz (每分钟一周或一周以上)的检测器信号的随机变化,测量的是峰-峰值。

长期噪声包括所有可观察到的、频率在 0.1 Hz 到 1.0 Hz 之间检测器信号的随机变化。

漂移是至少在半小时内测量到的基线信号的平均斜率。

### 2.9 仪器检测下限

使检测器产生的信号等于短期噪声信号 3 倍的试样组分的量。

### 2.10 检测器的线性范围

被测试样组分浓度或质量流速范围,在此范围内检测器的灵敏度变化不超过 5%,其值为线性上限与检测下限之比。

### 2.11 检测器动态范围

试样组分浓度或质量流速范围,在此范围内试样量的改变能使检测器的输出信号产生可测量的变化。其值为检测上限与检测下限的比值。

### 2.12 检测器灵敏度

流动相中单位浓度试样组分产生的输出信号,表示为:

$$S = \frac{A \times F}{M}$$

式中

S: 灵敏度

A: 试样组分的积分面积

F: 流速

M: 注入的试样组分的质量

(注:库仑型的电化学检测器不能使用此式)

### 2.13 色谱图

检测器输出信号对时间的记录图,图上有被测试样组分的特征峰。

### 2.14 测量的保留时间

从试样注入到被测组分出现最大输出峰所经过的时间。

### 2.15 重复性

在相同测量条件下和在相对短的时间间隔内,连续测量同一被测量,所得结果之间的一致性程度。相同测量条件是指测量方法、操作人员、测量仪器、测量地点和环境条件均相同。

## 3 仪器说明

3.1 HPLC 系统框图 (见图 1)。溶剂槽中的流动相经过滤后由泵输送到进样装置、色谱柱和检测器,进样装置将试样注入色谱柱,试样通过色谱柱被分离成单个组分。洗出液经对试样组分有响应的检测器检测,检测器输出信号可即时显示和/或存储在数据处理系统中。为阻挡破坏柱效的物质,需要一根保护柱。为进行试样组分的衍生反应,需配备一个柱后反应器。

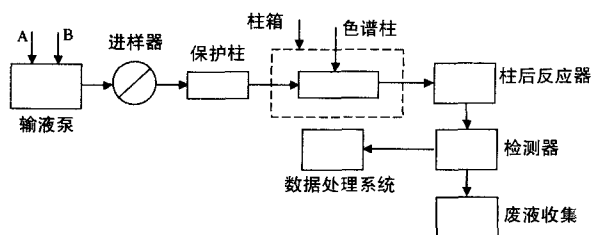


图 1 HPLC 系统方框图

### 3.2 主要部件

3.2.1 流动相 流动相有纯溶剂和混合溶剂两种,根据分析方法和检测器选用。在反相高效液相色谱分析中,最常用的流动相是甲醇或乙腈与水的混合物。

3.2.2 泵 常用的泵有柱塞泵和往复泵。柱塞泵是由一机械控制的活塞以恒定速率在一定体积的工作室内运行来输送流动相的。往复泵由一个或多个泵头组成,泵头上有带往复活塞或隔板的小体积工作室,单向阀与活塞(或隔板)同步驱动,交替充满和排空每个工作室,以此来输送流动相。

3.2.3 进样装置 常用的进样装置是一个阀和一个环管,注射器中的试样在常压下注入阀腔或环管,然后借助转动或滑动将试样转到有压力的、流动着的流动相中。

3.2.4 保护柱 保护柱安装在进样装置和色谱柱之间,以防止试样中的颗粒状物质或强吸性附物质降低柱效。

3.2.5 色谱柱 色谱柱的使用取决于分析方法,应选择使被测试样组分分离最好的柱子。十八烷基

甲基硅烷柱(OVS C<sub>18</sub>)是反相 HPLC 系统最常用的色谱柱。

3.2.6 反应器 柱前或柱后反应器用于检测被测试样组分之前制备其衍生物。

3.2.7 检测器 如果被测试样组分的吸光度与其浓度有关,可用紫外/可见分光光度检测器检测从柱上洗脱下来试样的吸光值。低压汞灯光源的单波长(固定波长)检测器是常用的检测器。荧光检测器是用来测量被测试样组分吸收光后被激发而发射的荧光与其浓度关系的。电化学检测器用来测量能够在电极上发生电化学氧化或还原反应的试样组分含量。

3.2.8 数据处理系统 数据处理系统提供记录和显示以时间函数表示的 HPLC 系统检测器的输出信号方式。为此可使用电位法条状纸记录仪、积分仪和/或计算机系统。

## 4 计量要求

### 4.1 泵

4.1.1 泵应能在 0MPa 至 40MPa 压力范围内工作。

4.1.2 泵流量应能从 0.1mL/min 到 5.0mL/min。用水检测时,当流量为 1mL/min 时,整个系统压力至少在 14MPa,收集 10min 流动相,泵流速重复性应在 3% 以内。

4.1.3 在 14MPa 压力和 1mL/min 流量的条件下,用水进行检测,10min 内泵压力脉冲应小于  $\pm 2\%$  (峰对峰)。

### 4.2 进样装置

进样装置应能输送指定体积的试样。对于 1.0 $\mu$ L 至 1000 $\mu$ L 范围内的进样体积,重复性为  $\pm 1\%$  或  $\pm 0.05\mu$ L,以较大者计。进样装置应满足高达 34MPa 的压力要求。

### 4.3 柱温

对有温度控制设备的仪器,柱温应以 1 $^{\circ}$ C 的增幅进行调节,并可控制在  $\pm 0.1^{\circ}$ C 之内。

### 4.4 检测器

4.4.1 按下面条款所述条件进行检测时,检测器的检测限和线性范围应能达到其最低性能要求。规定的检测限应是有  $\pm 10\%$  误差的最大允许值;尽管生产厂家可能规定了特定限制下的动态范围,但线性范围仍是仪器定量的工作范围。仪器工作的温度和湿度范围分别是 10~35 $^{\circ}$ C 和 60%  $\pm$  20%。

4.4.2 常规检测条件如下 根据制造厂商的推荐,选择一根已填装好的柱子;选择厂商推荐使用的等

浓洗脱流动相和柱温；选择合适类型和大小的注射器，注射检测化合物；检测器温度控制在仪器的工作温度范围，或通常在 10℃ 至 23℃ 间的某一指定温度的 ±1℃ 以内。

#### 4.4.3 紫外/可见分光光度检测器

· 类型：浓度、样品池长度依赖型，有选择性，应用广泛。

· 检测化合物：葱。

· 波长：254nm ± 5nm，（对固定波长），252nm ± 2nm，（对 200nm ~ 600nm 可变波长）。

· 检测条件：

对选定内径（I. D.）的色谱柱，额定流速如下：

I. D./mm	流速/ml · min <sup>-1</sup>
4.6	1.0
3.9	0.7
2.0	0.2

注：对于其它内径的柱子，使用流速 = (I. D.)<sup>2</sup>/21.2 mL · min<sup>-1</sup>。

对选定长度的柱子，被测化合物的保留时间应是：

柱长/cm	保留时间范围/min
30	10.6 ~ 14.0
25	8.8 ~ 11.7
20	7.0 ~ 9.3
15	5.3 ~ 7.0
10	3.5 ~ 4.7
7.5	2.7 ~ 3.5
6	2.1 ~ 2.8

· 输出半高峰宽 ≤ 2 × [5 × t<sub>r</sub><sup>2</sup>/L × d<sub>p</sub>]<sup>1/2</sup> × 0.01 min（信噪比大于 100），式中：

t<sub>r</sub>：保留时间

d<sub>p</sub>：柱填料的粒径，μm

L：柱长，cm

· 检测限：注入 3ng 葱（±2%）

· 线性范围：10<sup>4</sup>

#### 4.4.4 荧光检测器

· 类型：浓度依赖型，有选择性，单位池体积化合物依赖型

· 检测化合物：葱

· 波长：最大激发波长 250nm ± 5nm，最大发射波长 400nm ± 5nm

· 检测条件：与紫外/可见光检测器的条件一致

· 输出半高峰宽：与 4.4.3 相同

· 检测限：注入 1ng 葱（±10%）

· 线性范围：10<sup>3</sup>

#### 4.4.5 电化学检测器

· 类型：浓度依赖型，有选择性

· 检测化合物：氢醌（氧化作用），醌（还原作用）

· 检测条件：

用 15% 甲醇/水溶液中 0.1mol 醋酸缓冲液（pH = 4.9 ± 0.1）做流动相。

工作电极用玻璃炭或多孔石墨电极，用于氧化作用时，工作电极对 Ag/AgCl 参比电极的电极电位是 +0.7V 或对 Pd 电极是 +0.5V；用于还原作用时，工作电极对 Ag/AgCl 参比电极的电极电位是 -0.2V 或对 Pd 参比电极是 -0.4V。

对选定内径（I. D.）的色谱柱，额定流速如下：

I. D./mm	流速/mL · min <sup>-1</sup>
4.6	2.0
3.9	1.4
2.0	0.4

对选定长度的柱子，保留时间范围如下：

柱长/cm	保留时间范围/min
30	6.6 ~ 8.7
25	5.5 ~ 7.2
20	4.4 ~ 5.8
15	3.3 ~ 4.4
10	2.2 ~ 2.9
7.5	1.6 ~ 2.2
6	1.3 ~ 1.7

· 输出半高峰宽：信噪比大于 100 时应 < 4 [5 × t<sub>r</sub><sup>2</sup>/L × d<sub>p</sub>]<sup>1/2</sup> × 0.01 min

· 检测限：注入 50pg 氢醌（±10%）

· 线性范围：10<sup>3</sup> ~ 10<sup>4</sup>

## 5 技术要求

5.1 流动相应是高效液相色谱级试剂，对于某些测量可能需要进一步纯化。使用的水应是高纯水，特别要没有有机物。使用前流动相应使用仪器厂商推荐的多孔过滤器过滤。必要时脱气，防止在 HPLC 系统中形成气泡。

5.2 在 HPLC 系统内，泵和柱之间应配备压力监视器和限压开关。

5.3 泵应设定成以恒定流速输送单一流动相通过柱子进行等浓洗脱。对梯度洗脱，是在单泵系统的

入口处控制流动相组分混合,或者是在进样器前由两个或多个泵系统输送流动相进行混合产生溶剂梯度。

5.4 泵前可安装  $2\mu\text{m}$  和  $10\mu\text{m}$  的附加过滤器。在泵和进样装置后应使用一个保护柱或过滤器以除去颗粒状物质。

5.5 色谱柱应是管状填充柱,用金属、玻璃或塑料制成,能承受泵产生的压力。

5.6 HPLC 系统的所有管道连接应安排得合理,以减少柱前和柱后的体积(死体积)。

5.7 如果需要满足 4.4.2 的要求,应有控制检测器温度的手段。

5.8 数据处理系统应具有准确记录和显示 HPLC 系统检测器输出信号对时间函数关系的功能。

5.9 标志应贴在 HPLC 系统所有主要部件的显著位置上,包括:

- 制造厂商名称
- 仪器型号、系列号和生产日期
- 要求的电压、频率和电流

## 6 操作指导

6.1 在正常工作条件下, HPLC 系统使用高电压和高压力下可燃及有潜在毒性的液体。应在仪器明显部位放置警示标识,提示使用者注意。仪器的安装与操作,特别是通风和样品与溶剂废物处理,应严格遵循各国有害废物处理与安全的规定。

6.2 仪器制造厂商应提供 HPLC 系统或主要配件的安装、操作和日常维护的说明书,也可以根据要求提供服务和分析方法手册。

6.3 仪器安装前,应考虑所有的实验室环境因素。制造厂商应提供 HPLC 系统操作说明,包括功率消耗,高、低额定电压和频率,以及环境温度与湿度范围。

## 7 计量控制

### 7.1 型式批准

7.1.1 型式批准试验是通过一些检验,证实一台或一批仪器样机的型式或类型是否符合本建议的要求。

7.1.2 制造厂商须向负责此项工作的国家机构提供所要求数量的仪器和操作手册,此外还须提供制造厂的检测、校准数据和其它有助于确认仪器性能是否符合本建议要求的相关信息。

7.1.3 检查仪器操作手册是否完整,说明是否清楚。

7.1.4 负责此项工作的国家机构,应在检查操作手册的同时检查仪器,以确认满足如下要求:

- 压力监视器和压限开关(5.2)
- 泵和管路系统(5.3和5.6)
- 检测器的温度控制(5.7)
- 数据处理系统(5.8)
- 标志(5.9)

7.1.5 负责此项工作的国家机构应进行一系列的测试,或采用厂商的测试数据,以证实满足以下应用性能要求:

- 泵(4.1.2和4.1.3)
- 进样装置(4.2)
- 温度控制(4.3)
- 检测限(4.4)
- 检测器的线性范围和灵敏度(4.4)

7.1.6 型式评价检测结果和获得的信息,需按各国规定格式的要求编制成报告。应向制造厂商提供有关任何检测失败的详细说明。

### 7.2 首次检定和后续检定

7.2.1 传统的首次检定和后续检定的法定计量控制,对现用的仪器可能不适用。但是,负责此项工作的国家机构应考虑采纳 7.3 规定的控制程序,作为保持 HPLC 系统计量完整性的手段。

7.2.2 针对特定分析方法制订的控制程序,可包括评价使用 HPLC 系统实验室的方法。合适的评价程序应包括以下几个方面:用户实验室的认可,用户实验室自我认证及通过用户实验室间的比对测量进行的能力验证。

### 7.3 用户检测和记录

7.3.1 HPLC 系统的首次检测应根据制造厂商的说明进行。检测结果要符合厂商给出的技术规格。

7.3.2 为确保仪器用于某种分析方法时处于最优操作状态,应进行日常检测。每日按质量控制图,使用标准物质检验仪器的工作范围。日常检查 HPLC 系统操作准备的程序见附录 E。

7.3.3 HPLC 整体系统的综合检测应经常进行(例如每个工作周期进行一次),使用适合于某类样品化合物和分析方法的标准物质。该检测应重点鉴定仪器的检测限、灵敏度和测量范围。HPLC 整体系统的性能检测见附录 C。

7.3.4 负责此项工作的国家机构颁布的检测程序,应规定适用于污染物测定用的 HPLC 系统性能测试、校准程序和日常检测方法。合适的话,也应规定检测的时间间隔。

7.3.5 对每个 HPLC 系统, 应保存包括下面按时间顺序记载的书面信息记录:

- 首次和综合性能检测结果
- 日常测试结果, 应记录保留时间、峰面积或峰高和峰宽
- 每次分析使用的标准(参考)样品、流动相、注射器、色谱柱(包括粒径)、洗脱步骤、检测器和数据处理系统的识别说明
- 故障说明和采取的维修措施
- 维护和/或修理部分

## 8 参考文献(略)

附录 A、B 和 D (略)

### 附录 C HPLC 系统的性能检验(强制性)

C.1 本性能检验适用于 HPLC 整体系统的综合性能检验。检验结果应与本建议第 4 条的要求一致, 因此, 也适用所用检测器的性能检验。

C.2 本性能检验适用于反相 HPLC 系统和紫外/可见分光光度(UV-VIS)检测器或荧光检测器, 对于全面测试, 建议用甲醇/水溶液中的葱作为测试化合物。

C.3 制备浓度为 1.5mg 葱/mL 甲醇的储备液, 分别用于检验 UV-VIS 检测器和荧光检测器。如果检验电化学检测器, 检测化合物氢醌或醌的浓缩和稀释因子应和 UV-VIS 检测器要求的一致。

C.4 通过系列稀释储备液, 配制 60% 甲醇和 40% 水溶液中的另外三种标准溶液, 对 UV-VIS 检测器, 其稀释因子分别为 0.1, 0.05 和 0.01; 对荧光检测器, 稀释因子分别为 0.01, 0.0066 和 0.0033, 或用最小浓度不大于所用检测器检测限 100 倍的稀释因子。

C.5 根据柱直径, 按 4.4.3 中的要求设置合适的泵流速; 调整流动相组分和/或柱温使之满足指定柱长要求的保留时间。保持 4.3 和 4.4.2 中要求的温度, 测量半高峰宽, 如果半高峰宽不能满足 4.4.3 或 4.4.4 的要求, 在继续测试前应更换柱子。

C.6 依次注入 C.4 中配制的每种稀释标准溶液 20 $\mu$ L, 测量各标准溶液的吸光度和噪声至少 4 次。

C.7 记录保留时间、峰面积、峰高、噪声水平和半高峰宽。用峰高除以噪声水平来计算信噪比, 计算峰面积和保留时间的相对标准偏差。

C.8 每种稀释试样保留时间的相对标准偏差应小于 3%, 相应输出信号峰面积或峰高的相对标准偏差应

小于 5%。测得半高峰宽的最大值应满足 4.4.3 或 4.4.4 中规定的要求。

C.9 以 C.7 获得的峰面积或峰高的平均值对以纳克为单位注入的检测化合物量作图。计算曲线斜率, 数据拟合应符合最小二乘法线性曲线的规则。在图上画一条三倍于 C.7 所得噪声水平的线, 检测限就是这两条线的交点数值, 须满足 4.4 的要求。三个浓度的每个样品需测量四次, 其数据的最小二乘法拟合结果的线性相关系数( $r^2$ )应达 0.98 或更好。

C.10 检测限是由注入 20 $\mu$ L 的稀释储备液直接测量的。对 UV-VIS 检测器, 储备液稀释因子是  $10^{-4}$ , 对荧光检测器是  $0.33 \times 10^{-4}$ 。

C.11 重复注入 20 $\mu$ L 葱储备液四次, 四次测量结果平均值与检测限的比是线性范围, 它应与 4.4 的要求符合在  $\pm 5\%$  以内。

C.12 仪器的灵敏度是 C.9 所得曲线的斜率, 或按照 2.12 中的公式计算。

### 附录 E 检查 HPLC 系统操作的准备程序

E.1 本检查程序提供了分析前对 HPLC 系统进行调试和检查的方法。

E.2 目的是对整体 HPLC 系统进行日常检查。

#### E.3 准备步骤

E.3.1 接通 HPLC 系统主机、泵、检测器、柱温箱、记录仪或积分仪等所有电源。

E.3.2 将脱过气的合适流动相溶剂装入溶剂储存槽中。

E.3.3 在以 1mL/min 的流速泵送流动相通过柱子前, 应清洗所有连接管路并排气。

#### E.4 检查步骤

E.4.1 用量筒收集流出的流动相, 测量流速的稳定性, 在 10min 内至少连续收集三次。

E.4.2 在色谱柱适应了流动相后, 检查系统压力和溶剂输送系统的压力波动, 对于 10MPa 的输送压力, 压力波动应小于  $\pm 0.2$ MPa。

E.4.3 检查所有连接处有无溶剂渗漏。

E.4.4 通过观察数字显示或记录仪和/或积分仪的响应, 检查检测器的稳定性。

E.4.5 确认所有温度控制部件的温度已达到仪器额定设置。

#### E.5 结论

如果 E.4 的所有条件都合格, 则认为 HPLC 系统准备就绪, 可以进行测量。