

国外药典(美、英、日)

# 收载的色谱分析

第一部分 高效液相色谱法

广西药检所编印

1985

## 编译说明

我们在逐步开展色谱分析仪器化工作中积累了一些学习国外药典的摘译资料，并请广州市药检所张景钊、谢培山等同志协助校对，这些资料在“中南协作区药品检验所色谱技术交流会”上印发交流后，受到有关测试人员的欢迎。考虑到《中华人民共和国药典》1985年版即将出版，新版药典已增添了高效液相色谱法测试新技术，我们特将美国药典 19、20 版，英国药典 1980 版，日本药局方第十改正版（1981）所收载的高效液相色谱法译文资料重加校核、复印，以供药品科研、生产、质检等有关部门人员参照阅读。

限于我们的业务水平和理解能力，错误、不当之处在所难免，热诚希望多加指正。

广西药检所仪器室

1985. 4.

# 国外药典(美、英、日)收载的色谱分析

## 第一部分 高效液相色谱法

### 美国药典 (USP XIX, USP XX)

一. 美国药典 19 版附录 —— 高效液相色谱法	1
二. 美国药典 19 版收载的 HPLC 测定品种	5
三. 美国药典 20 版附录 —— 加压液相色谱法	11
四. 美国药典 20 版高效液相色谱用填料	15
五. 美国药典 20 版收载的 HPLC 测定品种	17
六. 美国药典 20 版前言 —— 系统适用性试验	38
七. 美国药典附录色谱法中与高效液相色谱法有关部分	39
1. 柱色谱法	39
2. 气相色谱法	42

### 英国药典 (BP 1980)

八. 英国药典 1980 版附录 —— 高效液相色谱法	52
九. 英国药典 1980 版收载的 HPLC 测定品种	53

### 日本药局方第十改正版

十. 日本药局方第十改正版解说书 (1981) —— 液相色谱法	59
十一. 日本药局方第十改正版收载的 HPLC 测定品种	68

# 一. 高效液相色谱法

USP XIX p. 638

## High-Performance Liquid Chromatography

液相色谱法由于柱技术, 高压泵送系统和检测器的进展, 已改革成为高速、高效的分离方法。柱技术是以使用小孔径柱(2-5mm内径)和小颗粒(3-50 $\mu$ m)填料, 让流动相和固定相之间得到快速平衡为基础的。小颗粒柱技术, 要求高压泵送系统能够在高达5000磅/每平方英寸(psi)高压时输送流动相, 以获得每分钟约1ml的流速。由于用这种柱填料, 通常需用微少的样品(一般少于20 $\mu$ g), 需要灵敏的检测器。具有这种柱技术条件的液相色谱法就可以作物样的高速分离, 在许多方面它可与气相色谱相媲美, 此外它具有对非挥发性或对热不稳定的物质能色谱分离而不会分解或不需制备挥发性衍生物的优点。高效液相色谱法, 对属于这种类型的许多药物的分离和分析, 已证明为高度有效的方法。

高效能的柱填料以及在有效地使用了有流动溶剂参与的灵敏检测器的出现, 是促进液相色谱发展的主要原因。填料中所用的固定相载体, 通常是直径30-50 $\mu$ m微粒, 具有固体核心和透的多孔的外壳。有些壳材料可事先活化而产生吸附性能, 而另一些是载体涂上了一层固定相薄膜, 供作分配或离子交换分离。固定相可以是液体或聚合物, 可以涂渍或化学键合到载体表面上成一层薄膜, 这样减少了传质阻力, 使流动相和固定相之间很快得到平衡。液体固定相必须在流动相溶剂中极不相混溶, 一般来说流动相溶剂需事先用固定相液体饱和, 以防止固定相从柱上剥落。涂在载体上的聚合物固定相是较耐用的。已经化学键合到载体上的固定相可在多种溶剂和升温时场合下应用。

3-10 $\mu$ m直径的柱填料颗粒几乎完全是多孔的, 它们比30-50

$\mu\text{m}$  粒度的填料，提供更加有效的分离，也可使这些微粒制成具有吸附作用或者把它们涂上固定相。为得到高效能的色谱柱，必须用匀浆法填充填料，与  $30-50\ \mu\text{m}$  颗粒比较， $30-50\ \mu\text{m}$  的可用于装法填充。

高效液相色谱法最常用是离子交换、分配和吸附三种方式。离子交换色谱主要用于分离分子量小于  $1500$  的水溶性离子的或可电离的物质，离子交换色谱的固定相，通常是具有不同活性的基团的有机合成树脂。阳离子交换树脂含有负电荷活性部位，用以分离碱性物质如胺类；而阴离子交换树脂具有正电荷活性部位，它可以吸引如那些带有磷酸盐、硫酸盐或羧酸盐基团的物质。这些水溶性离子或可电离的化合物被树脂吸引，其吸引力的差异供色谱分离。流动相的  $\text{pH}$ 、温度、离子型式、离子浓度和影响溶质吸引力的有机改性剂以及它们的可变因素，均可调节，以获得要求的分离度。

在分配色谱中，使用极性相反的流动相和固定相。如果流动相是极性的，固定相是非极性的，那么，分子量小于  $1000$  的非极性碳氢可溶性化合物，诸如脂溶性维生素和萜醌类，由于对固定相的亲合力不同而能被分离。用较低极性溶剂来调节极性流动相溶剂，引起柱上化合物亲和力的减低和保留时间的缩短。如果流动相是非极性而固定相是极性的，那么，可以色谱分离极性的物质如醇、胺类。此外，非极性流动相可用更为极性的溶剂来调节，以缩短保留时间和改变其分离。

大量的非离子化合物，选用适当的固定相和流动相，可用吸附色谱分离。（分配和吸附技术的进一步细节见前面章节）

## 仪器：

液相色谱仪基本上由泵送系统，样品进样装置，色谱柱，检测器，放大器和记录器组成。高压泵送系统通过高压管路和接头，从溶剂储

液罐输送流动相溶剂到柱子。可使用两种进样方法称为注射器进样和阀进样。压力小于 1500 psi 时，注射器进样是常用进样法。流动相压力超过 1500 psi 时，由于出现进样重现性的困难，设计高压时操作的进样阀被广泛使用。

通常用于分析分离的柱子具有小的内径 (2 - 4 mm) 而较大直径的柱子用于制备工作。色谱柱可以加数从作出更有效的分离，然而由于固定相的降解或者流动相的沸点，通常 100°C 是上限。

差示型检测器用于检测样品溶液与流动相相差异的某些物理性质。通常用的检测器是紫外分光计和差示折光计。紫外分光计是最灵敏和稳定的检测器，但只限于有紫外吸收的物质。强紫外吸收剂的可检限度约为 1 ng (毫微克)。差示折光计检测纯溶剂和测试物质溶液折光率的差异。这样使它成为更加普遍有用，而灵敏度较小的检测器，具有较低的可检限度约为 1 μg (微克)。差示折光计对溶剂组成、流量和温度也十分灵敏，因此要求有参比柱和流动相的流量，以提供满意的基线。检测器接到合适的自动记录装置，常见的长条纸电位记录仪，信号是对时间绘图。

流动相组成明显地影响色谱的性能，因此应该小心控制。流动相组成对容量因子 ( $k$  或在固定相中消耗时间的量对在载体中消耗时间的量之比，见气相色谱项下) 的影响比温度大得多。

分配和吸附色谱，流动相可用另一种溶剂改性，而在离子交换色谱中，pH 和离子强度二者，如同溶剂改性一样，能使容量因子起变化。在色谱运行过程中，改变溶剂组成的技术，称之为梯度洗脱或溶剂程序。这种色谱方法有时用来分离容量因子差异很大组分的复杂样品。用梯度洗脱色谱法，柱填料在作为流动相的溶剂中必须是耐用的。对溶剂组成变化敏感的检测器，如差示折光计，用梯度洗脱技术是较

困难的。

## 步骤：

高效液相色谱法中所用的化合物鉴定、校准技术和数据归纳的步骤与气相色谱法基本相同（见气相色谱项下步骤）。对于精密的定量工作，必须具备线性动态范围大的检测器，而且被测组分必须能与任何干扰的杂质分辨开来。线性动态范围的定义是：检测器信号响应与样品浓度成线性比例时，样品最小可检量与最大检测量的范围。在定量工作中，最大适应范围应为3个数量级。在此范围内，记录纸上的峰面积与样品量是成比例的。

峰高与峰面积两者与样品浓度有关。峰高易于测量，但由于温度和溶剂组成变化引起保留时间的变化，使峰高受到很大影响。因此认为峰面积是对定量较为准确的参数，为了校准检测器的响应，必须显示出峰面积与已知浓度对照标准的关系。

外标校准法的缺点是准确度和精密度取决于进样的重现性。因为高压时注射器进样的重现性有相当大的变化，而使用内标方法可得最好的定量结果。已知浓度的内标，各加到未知样品液和已知浓度的对照标准溶液中，其峰面积之比，用以计算未知样品的浓度。

（丁济译，余绍良、张景钊校）

## 二 USP 19 版收載的 HPLC 測定品種

### 1. 枸橼酸氯米芬胺 (克羅米芬)

USP XIX p. 97

#### Clomiphene Citrate

檢查： 反式異構體 (Trans-isomer)

流動溶劑 (流動相)： 二氯甲烷：四氫呋喃 (95:5)。 此液

200 ml 通過含有 8g 矽膠 (60—200 目) 和 2.4 ml 水的  
柱子使水化。混和 60 ml 水飽和的溶劑及 40 ml 乾燥的溶劑。

標準製備液： 精密稱取約 25 mg USP 氯米芬胺對照標準品入 60 ml 分液器中，使溶于 25 ml 稀鹽酸 (1 → 100) 中，加 5 ml 氫氧化鈉試液，用 3 × 15 ml 氯仿分次提取。提取液用無水硫酸鈉乾燥，在減壓下蒸去氯仿，溶解殘渣于 10.0 ml 二氯甲烷中。

樣品製備液： 精密稱取約 25 mg 氯米芬胺于 60 ml 分液器中，並溶于 25 ml 稀鹽酸 (1 → 100) 中，按標準製備液“加 5 ml 氫氧化鈉試液”起製備。

操作步驟： 進相同體積約 1  $\mu$ l 的標準製備液和樣品製備液入高壓液體色譜儀，用 2 m × 2 mm (內徑) 填充薄殼氧化鋁載體的填充柱。色譜儀裝有 254 nm 外能檢測吸收的紫外檢測器以及合適的記錄器。將操作參數加以調整，使達到每小時 15 ml 的流量和不少於 1.2 的分辨率 (保留時間對平均峰寬差異的比例)。測量標準製備液和樣品製備液中順式 - (cis-) 和反式 - (trans-) 異構體各自的峰面積 (順式異構體先于反式異構體洗脫)。



按下式  $100 A_T / (A_C + A_T)$  计算标准液和样品液中各自的反式异构体的面积百分率  $\% A_S$  和  $\% A_U$ 。

按下式  $\% W_S (\% A_U / \% A_S)$  计算样品液中反式异构体的百分率。此外：

$\% W_S$  为 USP 氟羟甲睾酮对照标准品中反式异构体的标示重量百分率；

$\% A_S$  为标准制备液中分出的反式异构体峰面积百分率；

$\% A_U$  为样品制备液中分出的反式异构体峰面积百分率；

$A_T$  为反式异构体峰面积；

$A_C$  为顺式异构体峰面积。

检出反式异构体应在 30.0% — 50.0% 之间。

## 2. 氟羟甲睾酮

USP XIX p. 206

### Fluoxymesterone

含量测定：

内标溶液：溶解炔诺酮 (norethindrone) 于乙醇中，使溶液每 ml 约含 200  $\mu\text{g}$ 。

流动相：甲醇：水 (1: 4) 去气溶液，使氟羟甲睾酮的保留时间在 4-7 分钟之间，内标峰保留时间在 8-14 分钟之间。

标准制备液：精密称取 105°C 事先干燥 3 小时的 USP 氟羟甲睾酮对照标准品，溶于内标溶液，使溶液每 ml 具有约 250  $\mu\text{g}$  已

知浓度的溶液。

样品制备液：精密称取约 25 mg 氟羟甲睾酮，溶解于内标溶液中，使溶液每 ml 具有约 250  $\mu$ g 已知浓度的溶液。

仪器：使用合适的普通型高压液相色谱仪，装有在约 254 nm 处检测紫外光吸收的检测器，装有合适的记录仪并能提供直到约 1000 磅/每平方吋 (psi) 的柱压。采用不锈钢柱，约 100 cm 长，2.1 mm 内径，用十八烷基硅烷键合表面多孔球形玻璃微珠载体作固定相。作适用性试验，色谱分离不同体积的标准制备液，间距在 1  $\mu$ l 和 6  $\mu$ l 之间以决定适宜的进样体积和其他操作参数。在适用的色谱图中，氟羟甲睾酮和内标峰之间的分辨率  $R$  应不小于 2.0，单一样品重复 6 次进样，变异系数不超过 2.0%。

操作步骤：色谱分离等体积的样品制备液和标准制备液。按式 0.1 C ( $R_u/R_s$ ) 计算氟羟甲睾酮中  $C_{20}H_{29}FO_3$  的 mg 数。

此处：C 是浓度，每 ml 标准制备液中 USP 氟羟甲睾酮

对照标准品的  $\mu$ g 数；

$R_u$  是样品制备液中氟羟甲睾酮<sup>峰</sup>和内标峰的积分面积之比；

$R_s$  是标准制备液中氟羟甲睾酮<sup>峰</sup>和内标峰的积分面积之比。

### 3. 氟羟甲睾酮片

USP XIX p. 207

#### Fluoxymesterone Tablets

含量测定：

内标溶液、流动相、标准制备液和仪器：按氟羟甲睾酮含量测定

项下准备。

样品制备液：取不少于10片氟羟甲睾酮片，称重，研细。精密称取相当于5 mg 氟羟甲睾酮片粉，转移入合用的离心管中，加20.0 ml 内标液，激烈振摇15分钟，离心，使用澄清的提取液。

操作步骤：按氟羟甲睾酮含量测定项下操作步骤进行。按式  
 $0.02 C (R_u/R_s)$  计算片剂中  $C_{20}H_{29}FO_3$  的量 (mg)。

#### 4 丙酮缩去炎松乳膏 USP XIX p. 514

##### Triamcinolone Acetonide Cream

含量测定：

流动相：异丙醇-氯仿液 (1→10)，调整到丙酮缩去炎松的保留时间在3—6分钟内。

标准制备液：精密称取 USP 丙酮缩去炎松对照标准品，溶于流动相中，使成每 ml 已知浓度为约 0.2 mg 的溶液。

样品制备液：精密称取丙酮缩去炎松乳膏，约相当于 1 mg 丙酮缩去炎松，转移入分液漏斗中。加入 40 ml 氯仿，9 ml 水和 1 ml 稀硫酸 (1→35)。激烈振摇 2—3 分钟，让两相分离，氯仿层流经铺有 20—40 g 无水硫酸钠的过滤漏斗，滤入玻璃层析柱 (约 1.3 cm × 45 cm，配有活塞和玻璃棉塞)，柱内填有 8 g 活性硅酸镁 (60—100 目)。让氯仿层流过此柱。用 3 × 40 ml 氯仿重复抽出，弃去洗脱液。另用 40 ml 水：甲醇：丙酮 (1:5:94 v/v) 混合液从柱上洗脱丙酮缩去炎松，把洗脱液收集于合适的接受容器中，将洗脱液于 50°C 以下蒸发，用氮气流干燥。残渣用少量氯仿转移入 5 ml 容量瓶中，加入足量异丙醇使达到

流动相的标示组成，並加氣仿到刻度。

操作步骤：用微量注射器或样品阀进相等量（ $4\mu\text{L}$ 和 $20\mu\text{L}$ 之间）标准液和样品液入高压液相色谱仪，在室温下操作，调节进样量和其他操作参数，使所得标准液峰约为0.6满刻度。仪器配有 $2\text{mm}$ （内径） $\times 60-100\text{cm}$  填有球形硅胶吸附剂的填充柱，並装有紫外检测器能在 $254\text{nm}$  检测吸收以及合适的记录器。在适用的色谱内，单一样品5次重复进样的变异系数不得过3%。在同一保留时间处，测量样品制备液和标准制备液的峰高。按式  $5C(H_u/H_s)$  计乳膏中  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{FO}_6$  的量（mg）。

此处： $C$  为标准制备液中 USP 丙酮缩去炎松的浓度（ $\text{mg/mL}$ ）；

$H_u$  为样品制备液中所得的峰高；

$H_s$  为标准制备液中所得的峰高。

## 5. 丙酮缩去炎松己酸酯 USP XIX p. 517 Triamcinolone Hexacetonide

含量测定：

流动相：异丙醇-二氯甲烷液（约5% V/V），在室温色谱操作时，丙酮缩去炎松己酸酯的保留时间约为2.5-3.0分钟。

标准制备液：精密称定真空 $60^\circ\text{C}$ 干燥4小时的USP丙酮缩去炎松己酸酯对照标准品约10mg，入100ml容量瓶，加50ml流动相，振摇，必要时，用机械振荡器直到溶液溶解完全，用流动相稀释到刻度，混匀。

样品制备液：精密称取约10mg丙酮缩去炎松己酸酯，按标准制

备液项下制备溶液，但样品干燥省略。

操作步骤：用适宜的微量注射器或样品阀分别进等体积的样品制备液和标准制备液（ $4\ \mu\text{l}$ 和 $20\ \mu\text{l}$ 之间）入高压液相色谱仪。调整样品量和其他操作参数，使所得标准制备液峰约为0.5满刻度。仪器配有 $2\ \text{mm}$ （内径） $\times 60-100\ \text{cm}$  填有球形硅珠吸附剂的填充柱，并装有能在 $254\ \text{nm}$ 检测吸收的紫外检测器以及合适的记录器。在同一保留时间处，测量样品制备液和标准制备液的峰高，按式  $100C(H_u/H_s)$  <sup>计标</sup> 丙酮缩去炎松己酸酯中  $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{FO}_7$  的量（ $\text{mg}$ ）。

此处： $C$ 为标准制备液中 USP 丙酮缩去炎松对照标准品的浓度（ $\text{mg}/\text{ml}$ ）；

$H_u$  为样品制备液中所得峰高；

$H_s$  为标准制备液中所得的峰高。

## 6 灭菌丙酮缩去炎松己酸酯混悬液 USP XIX p. 517 Sterile Triamcinolone Hexacetonide Suspension

含量测定：

流动相和标准制备液：按 517 页丙酮缩去炎松己酸酯项下制备。

样品制备液：精密量取灭菌丙酮缩去炎松己酸酯混悬液，约相当于  $20\ \text{mg}$  丙酮缩去炎松己酸酯，转移入分液器中，加  $20\ \text{mL}$  水。用  $4 \times 35\ \text{mL}$  氯仿提取，每份氯仿通过用氯仿湿润的无水硫酸钠滤入  $200\ \text{mL}$  容量瓶中。加氯仿到刻度，摇匀。在  $50^\circ\text{C}$  下蒸发  $10.0\ \text{mL}$  此氯仿液，用氮气流干燥。此残渣溶于  $10.0\ \text{mL}$  流动相中。

操作步骤：按丙酮缩去炎松己酸酯项下操作步骤进行。按式

$200C(H_u/H_s)$  计算混悬液中  $C_{30}H_{41}FO_7$  的量 (mg)。

比处：C 为标准制备液中 USP 丙酮缩去炎松己酸酯对照  
标准品的浓度 (mg/ml)；

$H_u$  为样品制备液中所得峰高；

$H_s$  为标准制备液中所得峰高。

(丁济译，余绍良校)

### 三. 加压液相色谱法 USP XX p.942

#### Pressurized Liquid Chromatography

液相色谱法由于柱技术、高压泵送系统和检测器的进展，已改革成为高速、高效的分离方法。这种方法有时称为 HPLC，用高性能液相色谱(法)或高压液相色谱(法)来表示。柱技术是以使用小孔径柱 (2—5 mm 内径) 和小颗粒 (3—50  $\mu m$ ) 填料，在流动相和固相之间得到快速平衡为基础的。小颗粒柱技术，要求高压泵送系统能够在高压时 (高达 300 大气压) 输送流动相，以获得每分钟数 ml 的流速。由于用这种柱填料，通常需用微少的样品 (一般少于 20  $\mu g$ )，需要灵敏的检测器，具有这种柱技术条件的液相色谱法就可以作物料的高速分离。在许多方面，它可与气相色谱相媲美；此外它具有对非挥发性或对热不稳定物质能色谱分离而不会分解或不需制备挥发性衍生物的优点。

高效能的柱填料以及在有效地使用了有流动溶剂参与的灵敏检测器的出现，是促进液相色谱发展的主要原因。填料中的一类固相载体

体，具有固体核心和薄的多孔外壳，由直径 $30-50\mu\text{m}$ 微粒组成。有些壳载体材料，可事先活化而产生吸附性能，而另一些是载体涂上了一层固定相薄膜，供作分配或离子交换分离。固定相可以是液体或者是聚合物，可以涂渍或化学键合到载体表面上，成一层薄膜，这样减少了传质阻力，使流动相和固定相之间很快得到平衡。液体固定相必须在流动相溶剂中极不相混溶；一般来说流动相溶剂，需事先用固定相液体饱和，以防止固定相从柱上剥落。涂在载体上的聚合物固定相是较耐用的。已经化学键合到载体上的固定相在多种溶剂和升温的场合下应用，更加方便。

另外， $3-10\mu\text{m}$ 较小直径填料几乎完全是多孔的，它们比 $30-50\mu\text{m}$ 粒度的填料，提供更加有效的分离。也可使这些微粒制成具有吸附作用或者把它们涂上固定相。为得到高效能色谱柱，必须用匀浆法填充填料，与 $30-50\mu\text{m}$ 颗粒比较， $30-50\mu\text{m}$ 可用于装法填充。

高效液相色谱法最常用是离子交换、分配和吸附三种方式。离子交换色谱主要用于分离分子量小于1500的水溶性离子的或可电离的物质，离子交换色谱的固定相，通常是具有不同活性的基团的有机合成树脂。阳离子交换树脂含有负电荷活性部位，用以分离碱性物质如胺类；而阴离子交换树脂具有正电荷活性部位，它可以吸引如那些带有磷酸盐、磺酸盐或羧酸盐基团的物质。这些水溶性离子或可电离的化合物被树脂吸引，其亲和力<sup>的</sup>差异引起色谱分离。流动相的pH，温度，离子型式，离子浓度和影响溶质吸引力的有机改性剂以及它们的可变因素，均可调节，以获得要求的分离度。

在分配色谱中，使用不同极性的流动相和固定相。如果流动相是极性的，固定相是非极性的，在反相系统时，那么分子量小于1000的非极性碳氢可溶性化合物，诸如脂溶性维生素和萜醌类，由于对固定相的亲和力不同而能被分离。用较低极性溶剂来调节极性流动相溶剂，引起柱上化合物亲和力<sup>的</sup>减低和保留时间的缩短。如果流动相是非极性而固定相是极性的，那么可以色谱分离极性的物质如醇、胺类。此外，

非极性流动相可用更为极性的溶剂来调节，以缩短保留时间和改变其分离。

大量的非离子化合物，选用适当的固定相和流动相，可用吸附色谱分离。（分配和吸附技术的进一步细节，见前面章节）

### 仪器：

液相色谱仪基本上由泵送系统、分析物进样装置、色谱柱、检测器、放大器和记录仪组成。高压泵送系统通过高压管路和接头，从溶剂储液罐输送流动相溶剂到柱子。分析物引到柱上有两种方法，为流动液流进样法和截流进样法。这些技术可以使用注射器或进样阀。注射器进样技术，在柱顶端压力小于70大气压（约1000 psi，即每平方英寸1000磅）时，可使用隔膜。更高压力时，要使用进样阀引入试样。有些阀系统与已经装柱，载有试样的环相连接，再由阀系统传送到流动相液流中。另一些阀系统，用注射器将分析物引入空腔内，然后由阀系统将载满腔中的试样转接到高压的液流中。截流技术是停止柱流，至进样器压力降到零后，打开进样口，用注射器注入分析物，然后关上进样口，重新开泵。高压迅速恢复，且操作过程中几乎没有区带扩展。在较高压力时，截流技术比用隔膜进样有更好的重现性，并避免了许多溶剂损坏隔膜的问题。

通常用于分析分离的柱子具有小的内径（2-4 mm）；较大直径的柱子用于制备级。色谱柱可以加热以作出更有效的分离，但是超过60°C就很少使用，因为在升高温度时，由于固定相的降解或流动相的挥发引起了潜在性的困难。

检测器一般使用包括紫外分光光度计、差示折光计和荧光计。低压汞灯紫外分光光度计是最普通和稳定的检测器，但它只限于检测在254 nm波长处有吸收辐射的物质。它对强烈吸收紫外光的化合物的灵敏限度约为1 ng（毫微克）。在254 nm处明显地不吸收光的化合物，通常可以转换成在此波长处有吸收的适当衍生物，从而增加了单波长检测器的应用范围。引入能够在另外的波长处操作的检测器，



加宽了紫外检测的范围。

差示折光计检测纯溶剂和在此溶剂被色谱分离物质的溶液折光率之间的差异。然而，它比较普遍地适用，差示折光检测器具有约 $1\mu\text{g}$ （微克）量的较低检测限度，是灵敏度较低的检测器。它对溶剂组成、流量和温度方面小的变化会产生响应，因此，要使用参比柱和要求一定的流动相流量，使得到满意的基线。

荧光计，对于固有荧光的化合物，或者通过化合物化学变化，或者在特定的官能团中用荧光试剂接合的化合物，是一个灵敏的检测器。

衍生物色谱分离以前，与某些试剂进行衍生化。另一种方法是把试剂导入洗脱液液流，与分析物就地起反应，然后衍生物暴露到检测器。

装在体积很小的薄膜池中的碳-糊（Carbon-paste）电极的电化学检测器，可方便地用于测定很小量（ $1\text{ng}$ ）而易于氧化的化合物，特别是酚类和儿茶酚类。

通常，从色谱仪检测器发出的信号，在供给适合的自动记录装置之前是经放大的，常见的长条纸电位记录仪，信号是对时间绘图。信号也可以接到电子数字积分仪上，自动测量色谱峰面积。

流动相的组成明显地影响色谱的性能，因此应该小心控制。流动相组成对容量因子（ $k'$ 或在固定相中消耗时间的量对在流动相中消耗时间的量之比，见GC项下）的影响比温度大得多。

分配和吸附色谱，流动相可用另一种溶剂改性，而在离子交换色谱中， $\text{pH}$ 和离子强度二者，如同溶剂改性一样，能使容量因子起变化。在色谱运行过程中，连续改变溶剂组成的技术，称之为梯度洗脱或溶剂程序。这种色谱方法有时用来分离具有容量因子差异很大的组分的复杂样品。对溶剂组成变化敏感的检测器，如差示折光计，用梯度洗脱技术是更困难的。

## 步骤：

加液相色谱法中使用的化合物鉴定，校准技术以及数据归纳的