

仪器分析实验指导

(供药学专升本使用)

温州医学院药学院

药物分析教研室

2011.6

目录

一、电子天平的使用-----	1
二、用氯离子选择性电极测定氯离子浓度-----	4
三、可见分光光度法测定水样中微量铁的含量-----	7
四、紫外分光光度法测定维生素B ₁₂ 注射液的含量-----	12
五、原子吸收分光光度法测定锌含量-----	15
六、红外光谱分析-----	17
七、毛细管气相色谱法(示教)-----	24
八、高效液相色谱仪的使用(示教)-----	26

实验一 电子天平的使用

一、目的与要求

- 1、了解电子天平的基本结构。
- 2、掌握电子天平的使用方法 & 规则。
- 3、掌握差减法称量固体样品。

二、方法提要

分析天平是定量分析中最重要而又最常见的仪器之一。了解分析天平的结构，正确地进行称量是做好定量分析实验的基本保证。常见的分析天平有阻尼天平、半机械加码电光天平、全机械加码电光天平、电子天平等。一般可准确称量到 0.0001~0.0004g。

人们把用电磁力平衡原理称量物体的天平称为电子天平，其特点是称量准确可靠、显示快速清晰，具有全自动故障诊断系统、简便的内置砝码自动校准装置、动态温度补偿以及超载保护装置等，还具有计数称量、动态称量、百分比称量、净重求和以及单位换算等多种应用程序。下面介绍实验中常用的电子天平（以 METTLER TOLEDO 梅特勒-托利多型号为例）。

1、天平的结构

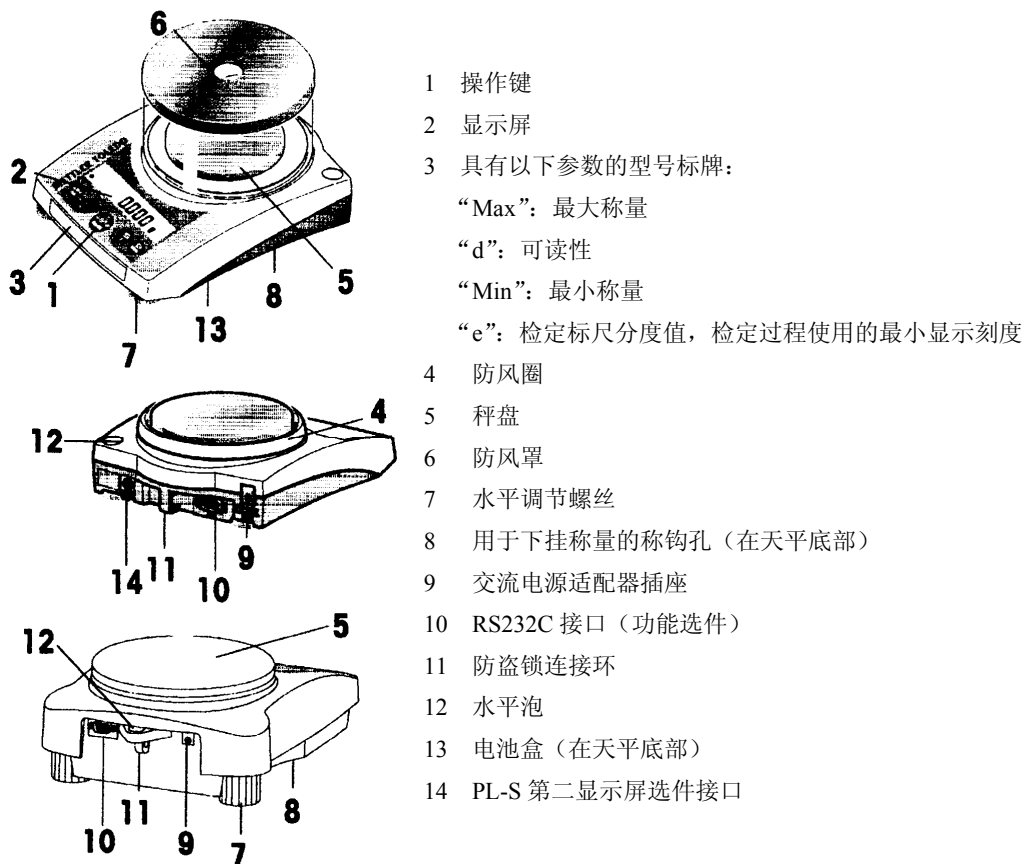
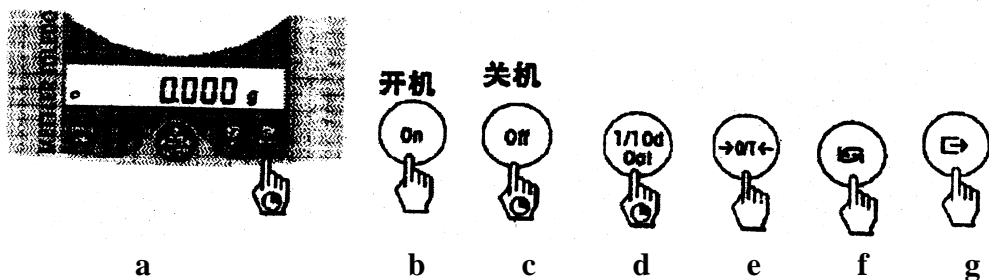


图 1-1 METTLER TOLEDO（梅特勒-托利多）型电子天平

2、操作键功能介绍



- a 操作面板 d 短时间按键：可读性（1、10d）减少；长时间按键：校正（cal）
e 清零/去皮 f 转换、改变设置 g 通过接口传输称量数据到激活的打印机

3、称量方法

- (1) 直接称量法：此法适用于称量器皿及在空气中性质稳定，不吸湿，无腐蚀性的试样，如金属、矿石等。
- (2) 定量称量法：又称为固定质量称量法。此法适用于称量在空气中稳定，不易吸水，且指定了称量质量的试样。

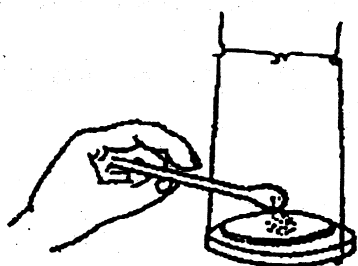


图 1-2 定量称量法

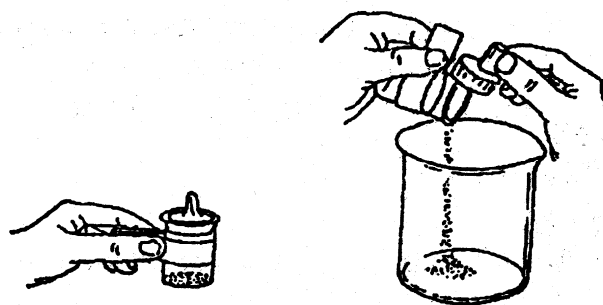


图 1-3 差减称量法

- (3) 差减称量法：又称为减量称量法。此法用于称量易吸水、易氧化，或易与 CO_2 起反应的物质。称出试样的量只须在要求的范围之内，并且是由两次称量之差来计算的。

三、仪器及试剂

电子天平，干燥器，称量瓶，称量纸，药匙，小烧杯。

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ，无水 Na_2CO_3 。

四、实验步骤

1、称量前的准备工作：检查天平的清洁与水平情况后，让秤盘空载并点击“ON”键，天平进行自检（显示屏上的所有字段短时点亮），当天平回零时（小数点后的位数可按“1/10d”键调节），自检完成，点击“cal”键用校正码进行校正，校正完成天平就可以称量了。

2、定量称量练习：用定量称量法准确称量 0.0300g $K_2Cr_2O_7$ 。

(1) 将称量纸放在秤盘上，等待，直到稳定状态探测符“。”消失。点击“O/T”键，除去皮重，此时显示“0.0000”。

(2) 用药匙取少量 $K_2Cr_2O_7$ ，将样品慢慢加入称量纸中，直到显示屏显示“0.0300”，则所称的 $K_2Cr_2O_7$ 样品为 0.0300g。

3、差减法称量练习：用差减称量法准确称量 0.20~0.25g Na_2CO_3 (要求准确到 0.0001g)。

(1) 从干燥器中取出盛有无水 Na_2CO_3 的称量瓶（应用洁净纸条夹取），精确称量，记下质量为 W_1 g。

(2) 自天平中取出称量瓶，将试样慢慢倾入烧杯中（操作方法如图 1-3 所示）。

(3) 再次称出称量瓶与剩余试样的质量，设为 W_2 g， W_2 应在 $(W_1-0.25)$ g~ $(W_1-0.20)$ g之间。在倾样时，很难一次倾准，因此第一次倾出少一些，根据此质量估计不足的量（为倾出量的几倍），继续倾出。 W_1-W_2 即为第一份试样的质量。

(4) 再倾第二份试样于第二只烧杯中，再次称出称量瓶与剩余试样的质量，设为 W_3 g，则 W_2-W_3 即为第二份试样的质量。

4、称后检查：按使用注意事项⑧进行检查，在天平使用登记簿上填写天平使用情况并签名。请老师检查验收。

五、注意事项

①称量前检查天平是否水平，天平是否清洁，必要时用软毛刷清扫。

②取放物品时，应轻拿、轻放。用手拿取被称物时，要垫上纸条或戴上细纱手套，不可直接用手接触被称物，以免影响它的质量。

③试剂和试样不得直接放在盘上，必须盛在干净的容器中。对于吸湿性物质或具有腐蚀性的物品，必须放在称量瓶或其它适当的密闭容器中称量，以免腐蚀和损坏天平。

④天平箱内应放置吸湿干燥剂（如硅胶）。

⑤不得把热的或冷的物体放进天平称量，应预先将称量物品放在天平附近的干燥器内，待其温度恒定后再称量。

⑥发现天平不正常或对使用方法不了解，必须请老师指导，不要自行处理。

⑦称量的数据应立即写在记录本上，不能记在纸片上或其它地方。

⑧称量完毕，及时将天平复原，关好天平门，关机，并在天平使用登记本上登记。

六、思考题

1、称量的方法有哪几种？什么情况下用定量称量法？什么情况下用差减称量法？

2、在称量过程中，为什么必须关好天平的左右两侧边门？

3、差减称量法称取试样的过程中，能否采用药匙加取试样？

实验二 氯离子选择性电极测定氯离子浓度

一、实验目的

- 1、了解氯离子选择性电极的构造。
- 2、熟悉氯离子选择性电极的选择性。
- 3、掌握用氯离子选择性电极测定氯离子浓度的原理和方法。

二、原理

氯离子选择性电极是属于压片膜电极，其敏感膜由 AgCl 和 Ag_2S 的粉末混合物压制而成。用塑料管作为电极管，并以全固态工艺制成。其结构如图 2-1 所示。将氯离子选择性电极浸入含 Cl^- 的溶液中，可产生相应的膜电势。

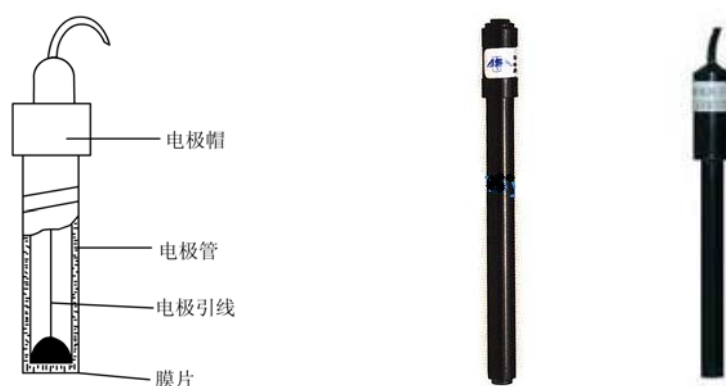


图 2-1 氯离子选择性电极结构示意图

以氯离子选择性电极作指示电极，为正极；饱和甘汞电极作参比电极，为负极。插入溶液中组成工作电池，如图 2-2。

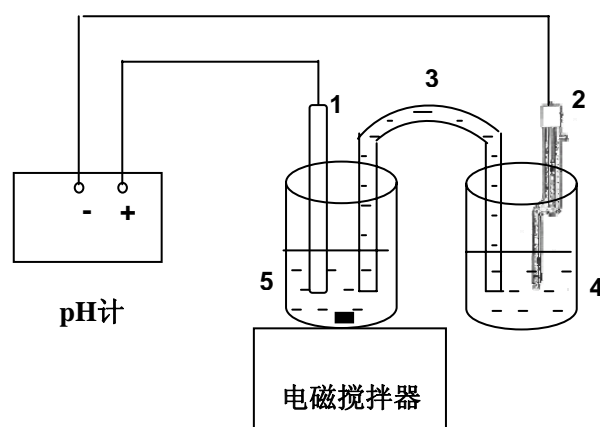


图2-2 测定氯离子浓度装置示意图

- 1.氯离子选择性电极 2.饱和甘汞电极
3. KNO_3 盐桥 4.饱和 KNO_3 5.待测溶液

电池电动势:

$$\begin{aligned} E &= \varphi_{\text{膜}} - \varphi_{\text{甘}} \\ &= \left(K - \frac{2.303RT}{nF} \lg[Cl] \right) - \varphi_{\text{甘}} \\ &= \left(K + \frac{2.303RT}{F} pCl \right) - \varphi_{\text{甘}} \\ &= K' + \frac{2.303RT}{F} pCl \end{aligned}$$

电池电动势 E 与氯离子浓度的负对数呈线性关系。

利用标准曲线法,在一定条件下,分别测出一系列不同浓度的氯离子标准溶液的电池电动势 E,以标准溶液的浓度的负对数为横坐标,相应的电池电动势为纵坐标,在坐标纸上描点作图,就可制得标准曲线。若在同样条件下测未知溶液的电池电动势,即可由标准曲线得知被测溶液的氯离子浓度的负对数,从而求得被测溶液中氯离子的浓度。

离子选择性电极对特定的离子有电位响应,因而用来测定该离子。但离子选择性电极并不是专一性电极,除对特定离子有响应外,对于某些其他离子也会有响应,只是响应程度不同或响应较小。

一般情况下,阳离子不干扰阴离子选择性电极,阴离子不干扰阳离子选择性电极。但如与膜表面上的离子反应生成一种新的、不容性的化合物时,无论阴离子或阳离子都会出现干扰。

Ag^+ , Hg_2^{2+} , Hg^{2+} 等阳离子对氯离子的测定有干扰,可用EDTA掩蔽以消除干扰。

Br^- , I^- , S^{2-} , CN^- 等阴离子对氯离子的测定也有干扰, S^{2-} 离子可以加 PbCO_3 除掉。在 Cl^- 离子浓度为 10^{-4}mol/L 时, Br^- 离子浓度达到 $2 \times 10^{-4}\text{mol/L}$, I^- 离子浓度达到 $1 \times 10^{-4}\text{mol/L}$,出现干扰。

三、仪器与试剂

pH计,磁力搅拌器,搅拌子,氯离子选择性电极,饱和甘汞电极, KNO_3 盐桥,容量瓶:100ml 1个,50 ml 4个,25ml移液管1支,10ml吸量管2支,5 ml吸量管2支,1ml吸量管2支,100微升微量注射器2支,50ml烧杯6个。

0.1000mol/LNaCl标准溶液,0.1mol/LNaBr溶液,1mol/L Na_2SO_4 溶液, KNO_3 饱和溶液,待测未知液。

四、实验步骤

1、标准曲线的制作:

(1) 氯离子系列标准溶液的配制:用0.1000mol/LNaCl标准溶液依次稀释成 5.00×10^{-2} , 1.00×10^{-2} , 1.00×10^{-3} , 1.00×10^{-4} , 1.00×10^{-5} mol/LNaCl的系列标准溶液。

(2) 氯离子系列标准溶液电动势的测定:用氯离子选择性电极为正极,带 KNO_3 盐桥的饱

和甘汞电极为负极，将标准溶液系列由稀到浓逐个转入待测小烧杯中组成电池，在搅拌下，测定电池电动势。以 pCl 为横坐标，相应的电池电动势 E 为纵坐标，绘制标准曲线。

2、试样中氯离子的测定：

由待测未知溶液与上述电极组成电池，在搅拌下，测定电池电动势。从标准曲线上求得未知试样中氯离子浓度的负对数，从而求得被测溶液中氯离子的浓度。

3、氯离子选择性电极的选择性试验：

Cl^- 离子浓度为 $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的溶液 10ml，与电极组成电池，测量电池电动势。加入 $1 \text{ mol/L Na}_2\text{SO}_4$ 溶液 0.01ml、0.1ml、1ml（溶液中 Na_2SO_4 分别为 10^{-3} ， 10^{-2} ， 10^{-1} mol/L ），观察并记录加入后电动势的变化情况。

另取一份 Cl^- 离子浓度为 $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的溶液 10ml，重复上面的实验，但将加入的溶液改为 0.1 mol/L NaBr 溶液，加入量为 0.01ml、0.02ml，0.05ml，0.1ml、1ml（溶液中 NaBr 浓度分别为 10^{-4} ， 2×10^{-4} ， 5×10^{-4} ， 10^{-3} ， 10^{-2} mol/L ），观察并记录加入后电动势的变化情况。

根据实验数据，说明 SO_4^{2-} 、 Br^- 两种离子存在对氯离子选择性电极测定氯离子浓度的干扰情况。

五、注意事项

1、氯离子选择性电极在使用前应在 $10^{-3} \text{ mol/L NaCl}$ 溶液中浸泡活化 1h，再用去离子水反复清洗至空白电势值为 250mV 左右，才可以使用，这样可缩短电极响应时间并改善线性关系；电极响应膜切勿用手指或尖硬的东西碰划，以免沾上油污或损坏，影响测定；使用后立即用去离子水反复冲洗，以延长电极使用寿命。

2、仪器装置应按图-1 联接。由于饱和氯化钾甘汞电极中有 Cl^- 存在，电极内的 Cl^- 可通过陶瓷芯多孔物质向溶液中扩散，影响 Cl^- 的测定，故饱和甘汞电极不能直接插入待测溶液中，而须用 KNO_3 盐桥加以连接。使用时务必注意盐桥的两端不能混淆插入溶液。

3、测定电动势一律在搅拌下进行，测定时搅拌速度应保持恒定。

4、测定次序应按由稀到浓进行，以免带入较大误差。每测一次溶液后，应用滤纸靠拢氯电极吸干外表溶液。

5、 $10^{-5} \text{ mol/L NaCl}$ 溶液测定时往往其电动势 E 值偏离直线，故在处理数据时可以除去此点。

六、思考题

1、实验中为什么要使用 KNO_3 盐桥，而不是将饱和甘汞电极直接插入待测溶液中？

2、为什么测定标准曲线溶液时，须按由稀到浓的次序进行测定？

3、用氯离子选择性电极测定氯离子浓度时，随着氯离子选择性电极在待测溶液浸泡时间的增长，其电动势 E 会不会改变？如何改变？

实验三 可见分光光度法测定水样中微量铁的含量

一、实验目的：

- 1、掌握 722 型分光光度计构造及使用方法。
- 2、掌握标准曲线的绘制，并通过标准曲线测出水样中 Fe^{3+} 的含量。

二、实验原理：

在可见光区的吸光光度测定中，若被测组份本身有色，则可直接测定。若被测组份本身无色或色很浅，则可利用显色剂与其反应（即显色反应），使生成有色化合物，进行吸光度的测定。

大多数显色反应是络合反应。对显色反应的要求是：

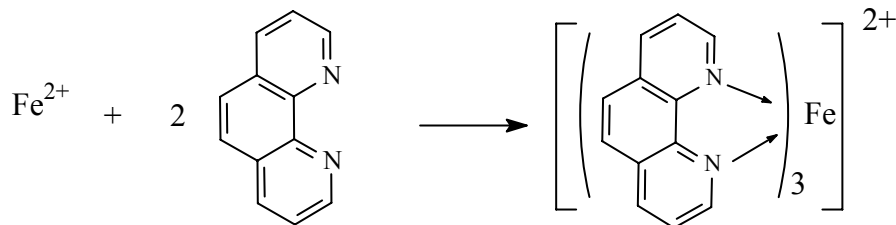
- 1、灵敏度足够高，一般选择产物的摩尔吸光系数大的显色反应，以适合于微量组份的测定；
- 2、选择性好，干扰少或容易消除；
- 3、生成的有色化合物组成恒定，化学性质稳定，与显色剂有较大的颜色差别。

在建立一个新的吸光光度方法时，为了获得较高的灵敏度和准确度，应从显色反应和测量条件两个方面，考虑下列因素：

- 1、研究被测离子、显色剂和有色化合物的吸收光谱，选择合适的测量波长；
- 2、溶液 PH 值对吸光度的影响；
- 3、显色剂用量、显色时间、颜色的稳定性及温度对吸光度的影响；
- 4、被测离子符合比尔定律的浓度范围；
- 5、干扰离子的影响及其排除的方法；
- 6、参比溶液的选择。

此外，对方法的精密度和准确度，也需进行试验。

铁的显色试剂很多，例如硫氰酸铵、巯基乙酸、磺基水杨酸钠等。邻二氮菲是测定微量铁的一种较好的试剂，它与二价铁离子反应，生成稳定的橙红色络合物（ $\lg K_{\text{稳}}=21.3$ ），最大吸收波长 $\lambda_{\text{max}}=510\text{nm}$ 。



此反应很灵敏，摩尔吸光系数 ϵ 为 1.1×10^4 。在 PH2~9 之间，颜色深度与酸度无关，颜色很稳定，在有还原剂存在的条件下，颜色深度可以保持几个月不变。本方法的选择性很高，相当于铁含量 40 倍 Sn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 SiO_3^{2-} ；20 倍的 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 VO_3^- 、 PO_4^{3-} ；5 倍 Co^{2+} 等均不干扰测定，所以此法应用很广。

分光光度法中，当入射光波长一定，溶液的温度一定，液层厚度一定时，根据 Beer 定律可得： $A=Kc$

即在一定条件下，吸光度与溶液的浓度成正比。在标准曲线中， A 与 c 成线性关系。

在一定波长单色光照射下，采用相同厚度的比色皿，分别测出一系列不同浓度标准溶液的吸光度。以标准溶液的浓度为横坐标，相应的吸光度为纵坐标，在坐标线上描点作图，就可制得标准曲线。若在同样条件下测未知溶液的吸光度，即可由标准曲线求得被测溶液的浓度。

三、仪器与试剂：

1、仪器

- (1) 722 型分光光度计一台（附 1cm 比色皿 4 只）
- (2) 容量瓶 50ml 9 只
- (3) 吸量管 1ml 2 支 2ml 1 支 5ml 2 支

2、试剂

- (1) 标准铁溶液（100 $\mu\text{g/ml}$ ）：准确称取 0.8634g $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，置于烧杯中，加入 20ml 1:1 HCl 和少量水，溶解后，转移至 1 升容量瓶中，以水稀释至刻度，摇匀。
- (2) 盐酸羟氨（10%水溶液）——临用时配制
- (3) 邻二氮菲溶液（0.15%）——临用时配制
- (4) 醋酸钠溶液（1mol/L）
- (5) HCl 溶液（6mol/L）
- (6) 水样

四、实验步骤：

1、标准曲线的制作：在 6 只 50 毫升容量瓶中，用吸量管分别加入 0.00 毫升、0.20 毫升、0.40 毫升、0.60 毫升、0.80 毫升、1.00 毫升标准溶液（含铁 100 微克/毫升），再分别加入 1.00 毫升 10% 盐酸羟氨溶液，2.00 毫升 0.15% 邻二氮菲溶液和 5.00 毫升 1mol/L 醋酸钠溶液，以水稀释至刻度，摇匀。在 510nm 波长下，用 1 厘米比色皿，以试剂空白为参比溶液，测定各溶液的吸光度，以吸光度为纵坐标，铁含量（微克/50 毫升）为横标，绘制标准曲线。

2、未知试样溶液的测定：取三个 50ml 容量瓶，分别加入 5.00ml 未知试样溶液，按上步骤 1 的方法配制溶液并测量吸光度，从标准曲线上求得未知试样的浓度。

五、思考题

- 1、分光光度计主要由哪些部件构成？使用时要注意哪些？
- 2、用邻二氮菲法测定铁时，为什么在测定前需加入还原剂盐酸羟氨？
- 3、根据制备标准曲线测得的数据判断本次实验所得浓度与吸光度间的线性好不好？分析其原因。

附：722S 型分光光度计

(一) 722S 型分光光度计的构造与光学原理：

722S 分光光度计是一种简洁易用的分光光度法通用仪器，能在从 340~1000nm 波长范围内执行透过率，吸光度和浓度直读测定。其光学系统结构如图 3-1

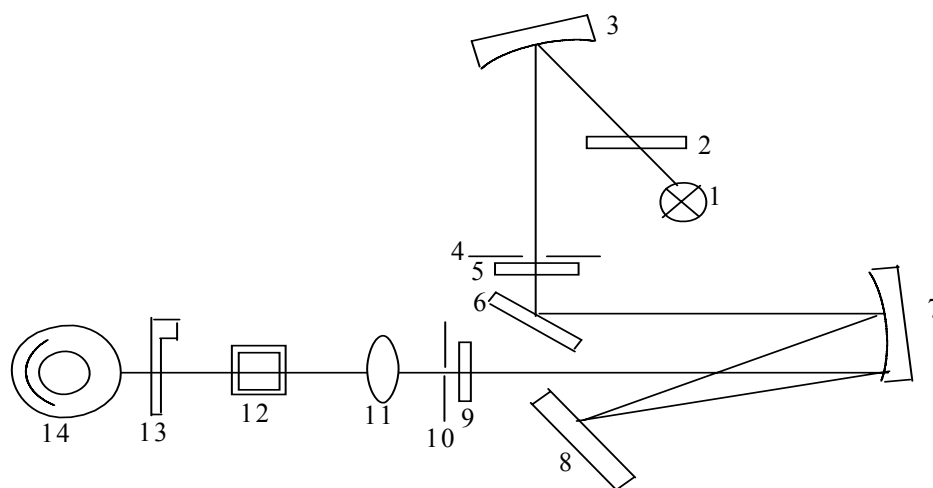


图 3-1 722 型分光光度计的光学系统图

- 1、W 灯 2、滤色片 3、聚光镜 4、进狭缝 5、保护玻璃 6、反射镜 7、准直镜
8、光栅 9、保护玻璃 10、出狭缝 11、聚光镜 12、样品室 13、光门 14、光电管

光源钨卤素灯发出的连续辐射光线，经滤光片和球面反射镜至单色器的入射狭缝聚集成像，光束通过入射狭缝经平面反射镜至准直镜，产生平行光射至光栅，在光栅上色散后又经准直镜聚焦在出射狭缝上成一连续光谱，光出射狭缝射出一定波长的单色光，通过比色皿被有色溶液部分吸收后，透过光照射至光电管上，由于放大器和对数放大器的作用，其光能量的变化情况通过数字显示器反映，可直接读出吸光度 A 或透光率 T 或被测溶液的浓度。

722S 分光光度计外型结构如图 3-2 所示

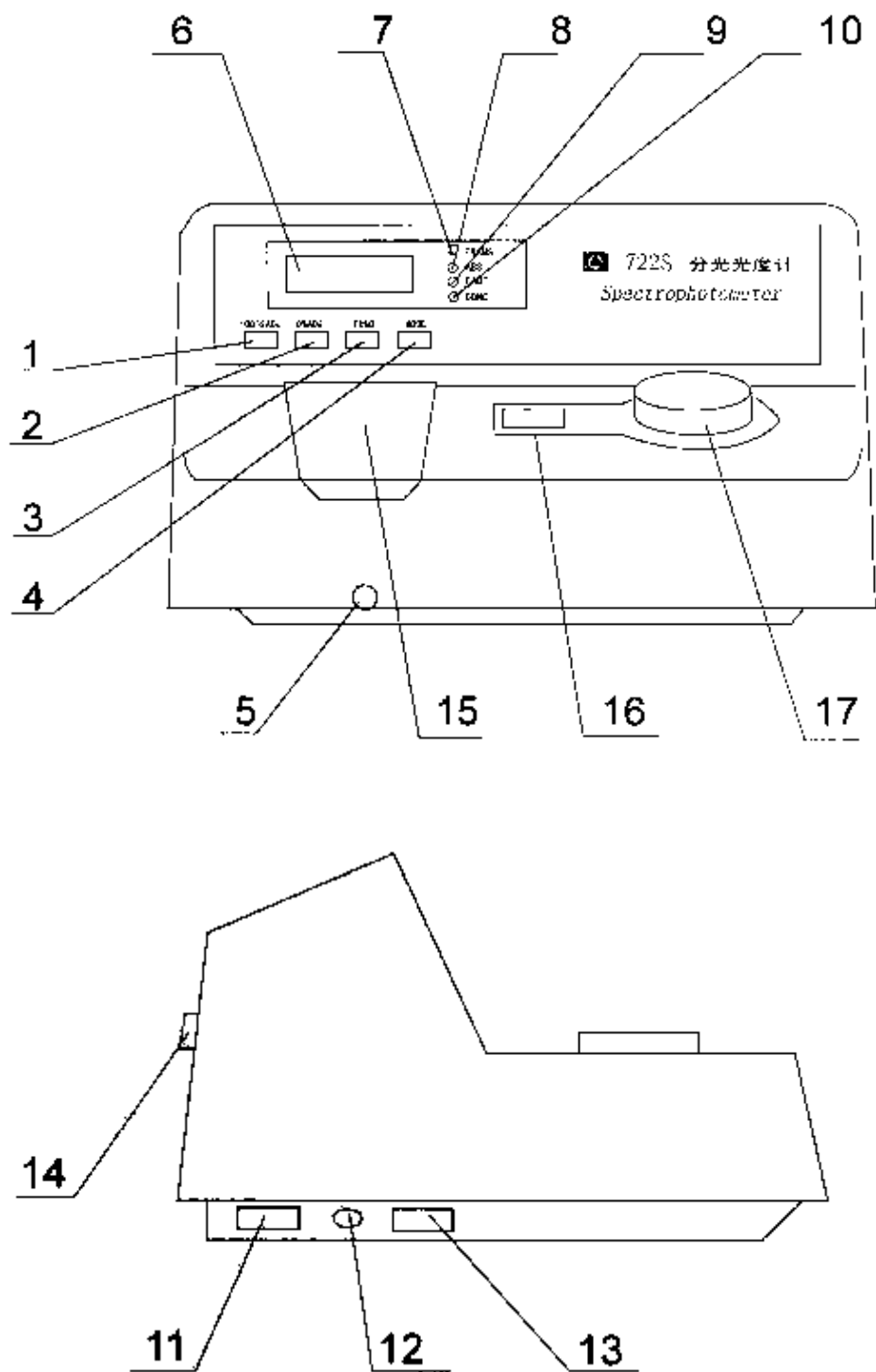


图 3-2 722S 分光光度计外

1、 \downarrow /100%T 键 2、 \downarrow /0%T 键 3、Function 键 4、MODE 键 5、试样槽架拉杆 6、显示窗 4 位 LED 数字 7、TRANS 指示灯 8、ABS 指示灯 9、FACT 指示灯 10、CONC 指示灯 11 电源插座 12 熔丝座 13、总开关 14、RS232C 串行接口插座 15、样品室 16、波长指示窗 17、波长调节钮。

(二)、仪器使用方法:

- 1、接通电源，开电源开关 ON，预热 30 分钟。
- 2、调节波长调节旋钮选择所需波长。
- 3、按 MODE 键选择所需标尺：TRANS，ABS，FACT，CONC。并由指示灯分别指示。
若测定透光度 T，则 TRANS 指示灯亮。
- 4、打开试样盖（关闭光门），按“0%”键，即自动调整零位。
- 5、将装有溶液的比色皿放置比色架中，盖上样品室，将参比溶液比色皿置于光路，按下“100%T”键，自动调整“100%T”。
- 6、重复步骤 4，5（调整“0%T”“100%T”）。
- 7、轻轻拉动试样槽架拉杆，将被测溶液置于光路中，显示窗上直接显示相应的数据 T。
- 8、若测定吸光度 A，只要将上述步骤“3”的标尺置 ABS，其余步骤同上。
- 9、若测定浓度 C：
 - (1) 可①按上述步骤测出标准样品吸光度。
 - ②置标尺为浓度直读 CONC。
 - ③按↑或↓键，使读数达已知含量值或含量值的 10n 倍。
 - ④置入未知样品溶液。
 - ⑤读出显示值即含量值（或含量值的 10n 倍）。
 - (2) 也可直接使用浓度因子功能，若将步骤“9（1）”中执行至第三步后置标尺至 Factor 在显示窗中出现的数字即这一标准样品的浓度因子，记录这一因子数，则在下次开机，测试时不必重测已知标准样品，只需重输入这一因子即可直读浓度，具体步骤如下：
 - ①开机，预热、置波长、置背景溶液，调“0%”调“100%”。
 - ②置标尺为 FACT。
 - ③按↑或↓使显示值为输入因子数。
 - ④置标尺为 CONC。
 - ⑤置入未知样品溶液。
 - ⑥读出显示值即浓度值。
- 10、测完后，切断电源，开关应拨在 OFF 位置，将比色皿取出洗净，并将比色皿座架及暗箱用软纸擦净。

本仪器随机设有 RS-232C 串行通讯口，可配合串行打印机或 PC 使用。

(三) 仪器使用注意事项:

- 1、仪器安放在稳固工作台上，避免震动，并避免阳光直射，避免灰尘及腐蚀性气体。
- 2、仪器表面宜用温水擦拭，请勿使用酒精，丙酮等溶剂清洁，不使用时请加防尘罩。
- 3、比色皿每次使用后应用石油醚清洗，并用镜头纸轻拭干净，存于比色皿盒中备用。

实验四 紫外分光光度法测定维生素B₁₂注射液的含量

一、目的

- 1、理解紫外—可见分光光度法定性分析、定量分析的原理。
- 2、掌握紫外—可见分光光度法测定维生素B₁₂含量的原理。
- 3、掌握紫外—可见分光光度计的结构、原理与操作。

二、原理

分子中的电子发生跃迁需要的能量约在 1~20eV 之间，其对应的吸收光的波长范围大部分处于紫外和可见光区域，通常将分子在这一区域的吸收光谱称为电子光谱或紫外—可见吸收光谱。物质的吸收光谱本质上就是物质中的分子和原子吸收了入射光中的某些特定波长的光能量，相应地发生了分子振动能级跃迁和电子能级跃迁的结果。由于各种物质具有各自不同的分子、原子和不同的分子空间结构，其吸收光能量的情况也就不会相同，因此，每种物质就有其特有的、固定的吸收光谱曲线，可根据吸收光谱上的某些特征波长处的吸光度的高低判别或测定该物质的含量，这就是分光光度定性和定量分析的基础。分光光度分析就是根据物质的吸收光谱研究物质的成分、结构和物质间相互作用的有效手段。

紫外可见分光光度法的定量分析基础是朗伯—比尔（Lambert-Beer）定律，即物质在一定浓度的吸光度与它的吸收介质的厚度呈正比。在紫外可见光的范围内，对于一个特定的波长，吸收的程度正比于试样中该成分的浓度，因此测量光谱可以进行定性分析，而且根据吸收与已知浓度的标样的比较，还能进行定量分析。

1. 紫外-可见分光光度计的基本结构

紫外-可见分光光度计由光源、单色器、吸收池、检测器以及数据处理及记录系统组成。

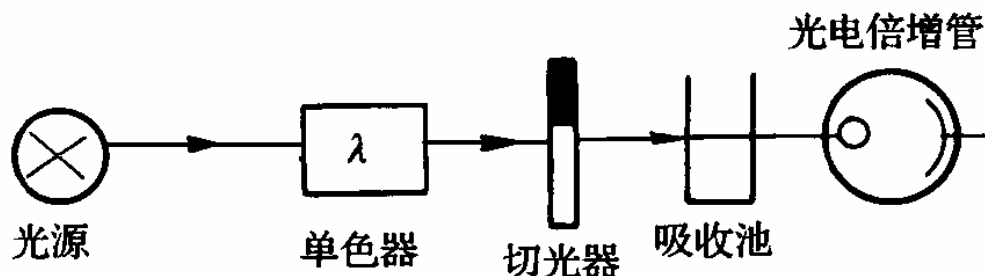


图 1 紫外—可见分光光度计基本结构图

2. 透光率和吸光度

如图 2 所示：入射光强度 I_0 ，吸收光强度 I_a ，透过光强度 I_t ，反射光强度为 I_r

$$I_0 = I_a + I_t + I_r$$

被测溶液和参比的吸收池同样材料和厚度，反射光强度影响相互抵消，上式简化为

$$I_0 = I_a + I_t$$

透光率愈大，溶液对光的吸收愈少；

$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

反之，透光率愈小，溶液对光的吸收愈多

$$A = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I_t}$$

透光率的负对数称为吸光度，用符号 A 表示。A 愈大，溶液对光的吸收愈多。

3. 朗伯—比尔定律

朗伯—比尔定律是光吸收的基本定律，它可表述为：当一束单色光穿过透明介质时，光强度的降低同入射光的强度、吸收介质的厚度、溶液的浓度成正比。用数学表达为：

$$A = \lg I_0/I = k c l$$

当 l 以 cm ， c 以 g/L 为单位时， k 称为吸光系数，用 a 表示，即： $A = a c l$ ；

当 l 以 cm ， c 以 mol/L 为单位时， k 称为摩尔吸光系数，用 ϵ 表示，它比 a 更为常用， ϵ 的单位为 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ，即： $A = \epsilon c l$

维生素 B_{12} 吸收光谱上有三个吸收峰：分别为 $(278 \pm 1) \text{ nm}$ 、 $(361 \pm 1) \text{ nm}$ 、 $(550 \pm 1) \text{ nm}$ ，三个吸收峰均可以根据吸收曲线扫描得到。选择其中最大的吸收峰，根据朗伯-比尔定律，以标准曲线法测定维生素 B_{12} 的含量。

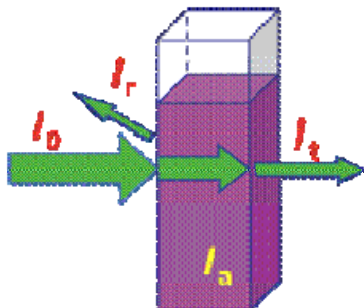


图2 样品对入射光的反射及透射作用



图3 TU—1901紫外—可见分光光度计

三、仪器与试剂

TU—1901 紫外—可见分光光度计，石英吸收池，维生素 B_{12} 注射液、维生素 B_{12} 标样

四、实验步骤

1、标准溶液和待测标准溶液的配制


将维生素B₁₂标样配制成标准溶液，其浓度分别为 6ug/ml、12ug/ml、18ug/ml、24ug/ml、30ug/ml。根据维生素B₁₂注射液的标示含量配制成一定浓度的待测溶液。

2、吸收曲线的绘制

(1) 开机

① 打开计算机，Windows 完全启动后，打开主机电源。

(2) 仪器初始化

① 在计算机窗口上双击图标，仪器进行自检(自检时不得把吸收池上方的盖子打开)，大约需要四分钟。进入工作界面，预热半小时。

(3) 任意选择一个标准溶液浓度，进行光谱扫描。

① 参数设置：光谱扫描窗口下，选择菜单栏上的参数设置，在测量中设置所需参数：


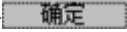
波长范围(起始波长大，结束波长小)；



测光方式(一般为 Abs 或 T%)；

扫描速度(一般为中速)；

采样间隔(一般为 1nm 或 0.5nm)；

记录范围(一般为 0-1)。

② 基线校正：两个吸收池中放入空白溶液，单击基线进行校正，校完后单击，取出外池空白溶液。

③ 扫描：外池放入任一浓度标准溶液，单击开始进行扫描，得到吸收光谱曲线，单击峰值检出，得到几个吸收峰的位置，其中最大吸收峰用作下面的测量。

3、利用标准曲线测量待测样品含量




① 参数设置：定量测量窗口下，选择菜单栏上的参数设置，在测量中设置所需参数：

测量模式(一般为单波长)；

输入测量波长；

选择曲线方程(一般为 $C=K_0A+K_1\cdots$)；

选择浓度单位。

- ② 校零：两个吸收池中都放入空白溶液，单击  校零进行校零，校完后取出外池空白溶液。
- ③ 测量标准样品：输入标准样品的编号和浓度。放入第一个浓度的标准样品，将鼠标移到第一个标准样品测量表格，单击  开始。以此类推，将所有标准样品测完。检查标准曲线相关系数 R^2 值情况，一般应为 $R^2 \geq 0.999$ 以上标准曲线方可使用。
- ④ 未知样品测定：放入未知样品，将鼠标移动到未知样品测量表格，单击  开始，即可测出样品吸光值，根据已得到的线性方程和相关系数计算出待测样品的含量。

3、整理关机

测量完成后，退出紫外软件操作系统，依次关掉主机电源，计算机，盖上防尘罩；将比色皿中的溶液倒尽，然后用蒸馏水或有机溶剂冲洗比色皿至干净，倒立晾干。做好使用登记，得到管理老师认可方可离开。

五、注意事项

- (1) 空白溶液与供试品溶液必须澄清，不得有浑浊。如有浑浊，应预先过滤，并弃去初滤液。
- (2) 测定时，除另有规定外，应以配制供试品溶液的同瓶溶剂为空白对照，采用 1cm 的石英吸收池。
- (3) 一般供试品溶液的吸收度读数，以在 0.3~0.7 之间的误差较小。
- (4) 吸收池应选择配对，否则会引入测定误差。在规定波长下两个吸收池的透光率相差小于 0.5% 的吸收池作配对，在必要的情况时，须在最终测量扣除吸收池间的误差修正值。
- (5) 由于吸收池和溶剂本身可能有空白吸收，因此测定供试品前要先用配制供试品溶液的同瓶溶剂进行空白校零。
- (6) 在测定时或改测其它检品时，应用待测溶液冲洗吸收池 3~4 次，用干净绸布或擦镜纸擦净吸收池的透光面至不留斑痕（切忌把透光面磨损）。
- (7) 取吸收池时，应拿毛玻璃两面，切忌用手拿捏透光面，以免粘上油污。使用完后及时用测定溶剂冲净，再用纯化水冲净，用干净绸布或擦镜纸擦干，晾干后，放入吸收池

盒中，防尘保存。

六、思考题

1. 朗伯-比尔定律表达式是怎样的？透光率与吸光度如何换算？
2. 分光光度计的主要部件及其作用是怎样的？
3. 如何提高测定灵敏度和准确度？

实验五 原子吸收分光光度法测定锌含量

一、目的与要求

- 1、掌握原子吸收分光光度计的基本原理。
- 2、了解原子吸收分光光度计的基本结构、性能和操作方法。
- 3、熟悉用标准曲线法测定锌含量的原理及方法。

二、方法提要

原子吸收分光光度法是基于从光源辐射的待测元素特征光波通过样品蒸气时，被蒸气中待测元素的基态原子所吸收，测定辐射光强度减弱的程度，以求出样本待测元素含量的一种方法，原子吸收遵循一般分光光度法的吸收定律。

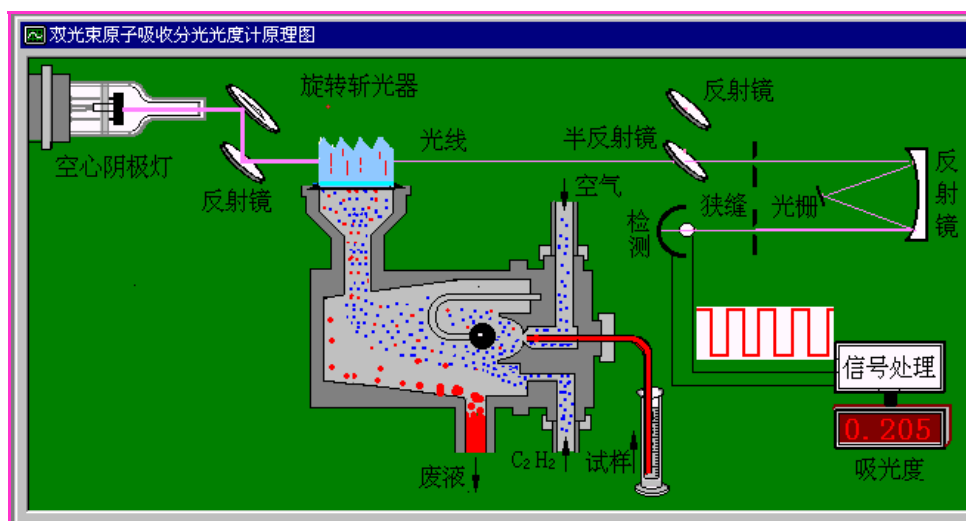


图 5-1 双光束原子吸收分光光度计原理图

三、仪器与试剂

- 1、仪器：AA 240 duo 原子火焰分光光度法（AAS, 美国 varian 公司），空气压缩机，乙炔钢瓶，锌空心阴极灯，烧杯，容量瓶，移液管。
- 2、试剂：标准锌储备液(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

四、操作步骤

- 1、**标准溶液的配制**：精密移取标准锌储备液 1.00mL 置于 50mL 的容量瓶中，用两次去离子水稀释至刻度。（此溶液的锌浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）再分别精取此溶液 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 和 5.00 mL 于 5 个 25 mL 的容量瓶中并以两次去离子水稀释至刻

度。

2、 仪器工作条件：

锌空心阴极灯工作电流	4mA
狭缝宽度	0.2nm
波长	213.9nm
乙炔气流量	0.06mL/min

3、 **测定：**将仪器调节到最佳工作条件后，以两次去离子水调零。由稀至浓测定各标准溶液的吸光度。

相同条件下测定样品溶液及样品空白的吸光度：

$$\text{样品溶液的吸光度} = \text{测定值} - \text{空白值}$$

根据标准溶液的吸光度作出工作曲线，在工作曲线上查出试样中锌的浓度，计算出锌的含量。

五、 注意事项

1、 原子吸收分光光度法是一种极灵敏的分析方法，所使用的试剂其纯度应符合要求，玻璃仪器应严格洗涤并用重蒸馏的去离子水充分冲洗，保证洁净。

2、 气体导管、雾化器和燃烧器均应保持清洁。气体导管的所有接头应保证无漏且气体压力恒定。

六、 思考题

- 1、 原子吸收分光光度法主要的测试条件有哪些？简述其对测定结果的影响。
- 2、 原子吸收分光光度计与紫外-可见分光光度计中的单色器作用有何不同？
- 3、 原子吸收分光光度法定量方法有哪一种？各适用于何种情况？
- 4、 原子吸收分光光度计测定不同元素时，对光源有什么要求？
- 5、 试样原子化的方法有哪一种？

实验六 红外光谱法

一、目的与要求

- 1、了解 Thermo Nicolet NEXUS 670 FT-IR 红外光谱仪的结构及工作原理
- 2、掌握常用的红外样品制备方法
- 3、掌握红外光谱的测定方法

二、基本原理与红外光谱仪简介

(一) 基本原理

红外光谱法是以一定波长的红外光照射物质时，若该红外光的频率，能满足物质分子中某些基团振动能级的跃迁能量条件，则该分子就吸收这一波长红外光的辐射能量，引起偶极矩变化，而由基态振动能级跃迁到较高能级的激发态振动能级。检测物质分子对不同波长红外光的吸收强度，就可以得到该物质的红外吸收光谱。

绝大多数有机化合物的基团振动频率分布在中红外区（波长在 $2.5\sim 25\mu\text{m}$ ），用波数（波长的倒数）来表示为 $4000\sim 400\text{cm}^{-1}$ ，这也是常见的红外谱图扫描范围。由于每种化合物均有红外吸收，尤其是有机化合物的红外光谱能提供丰富的结构信息，因此红外光谱是有机化合物结构解析的重要手段之一。

红外光谱仪按其发展，大体经历了三个阶段，第一代仪器是用棱镜作为单色器，第二代仪器是用光栅作为单色器，此两者均为色散型红外光谱仪，与紫外-可见分光光度计的组成基本相同，由光源、样品室、单色器以及检测器等部分组成。随着计算机技术的发展，20 世纪 70 年代开始出现第三代仪器——光干涉型红外光谱仪，即傅立叶变换红外光谱仪（FT-IR, Fourier transform infrared spectrometer）。由于测定快速灵敏，具有多种智能处理能力，目前几乎所有的红外光谱仪都是傅立叶变换型的。以下对傅立叶变换红外光谱仪结构和原理作简要介绍。

(二) 傅立叶变换红外光谱仪

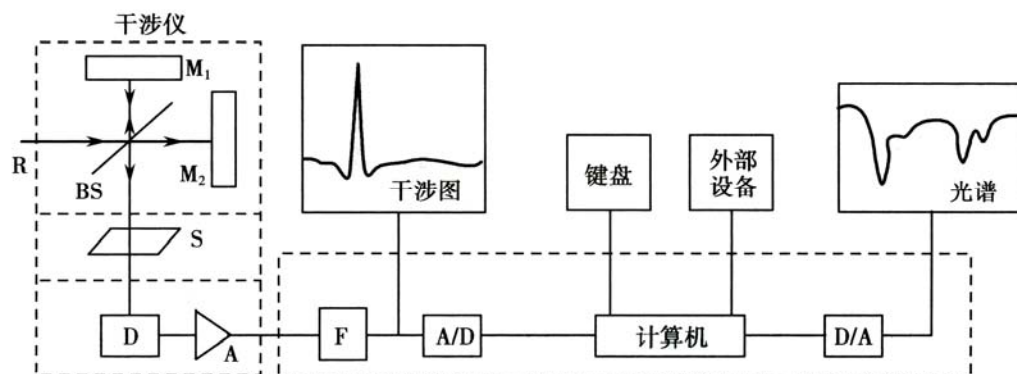


图 6-1 傅立叶变换红外光谱仪构成示意图

R: 红外光源; M_1 : 定镜; M_2 : 动镜; BS: 光束分离器; S: 样品
D: 检测器; A: 放大器; F: 滤光器; A/D: 模-数转换器; D/A: 数-模转换器

傅立叶变换红外光谱仪主要是由光源、迈克逊干涉仪（Michelson interferometer）、检测器和计算机组成，见图 6-1。其光学系统的核心部件是迈克逊干涉仪，如图 6-2 所示。

迈克逊干涉仪主要由定镜（ M_1 ）、动镜（ M_2 ）、光束分离器（BS）和检测器（D）组成， M_2 沿图示方向移动，故称动镜。在 M_1 和 M_2 间放置呈 45° 角的半透膜光束分离器BS，BS 可使 50%的入射光透过，其余 50%反射。当由光源R发射出的光进入干涉仪后，被分裂为透射光 I 与反射光 II。I、II 两束光分别被动镜和定镜反射，两束光会合时，由于动镜的位置不同及所致的光程差异，产生干涉光束（包括各种波长的干涉信号）从干涉仪中输出。干涉光束进入样品区，光束中与样品特征相关波长的干涉光被选择性地吸收，最终在检测器上产生包含了样品红外吸收波长和强度特征的干涉信号。

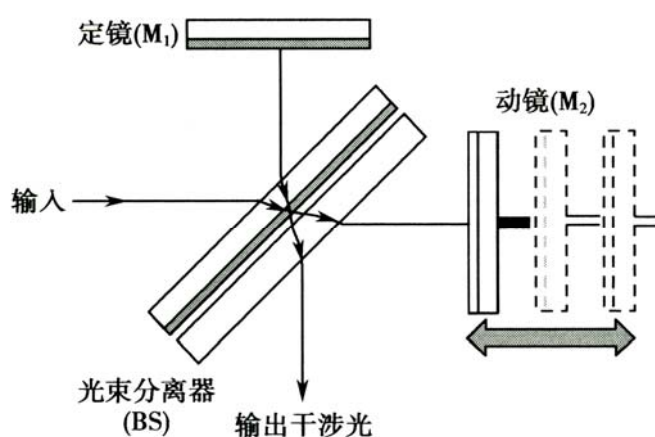


图 6-2 迈克逊干涉仪构成示意图

测得的随时间变化的数字化的干涉信号（时域函数）经快速 Fourier 变换，即成为随着波长（波数）改变的吸收光谱（频域函数）。同时测定无样品的空白介质的背景吸收后，计算即得以强度（ $T\%$ 或 A ）表示的样品的红外光谱（图 6-3）。

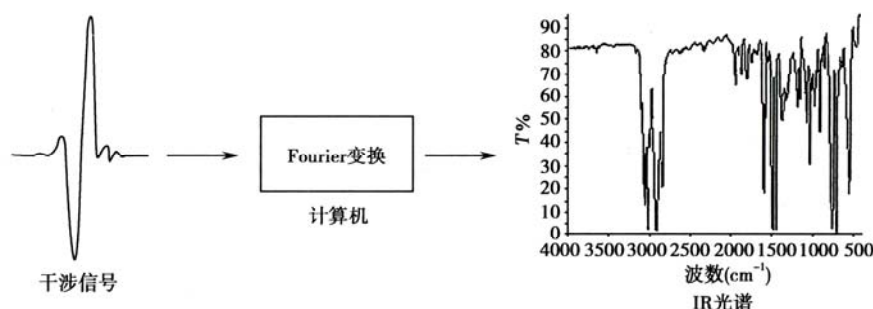


图 6-3 FT-IR 光谱仪信号转换示意图

（三）Thermo Nicolet NEXUS 670 FT-IR 红外光谱仪简介

NEXUS 670 型红外光谱仪是美国热电尼高力仪器公司（Thermo Nicolet Corporation）出品，是典型的傅立叶变换红外光谱仪，其外形如图 6-4。



图 6-4 Thermo Nicolet NEXUS 670 FT-IR 红外光谱仪外形图

NEXUS 670 型红外光谱仪内部结构图见图 6-5，其中激光器的主要作用是帮助光学系统不断调整，以保证光路的绝对准直。

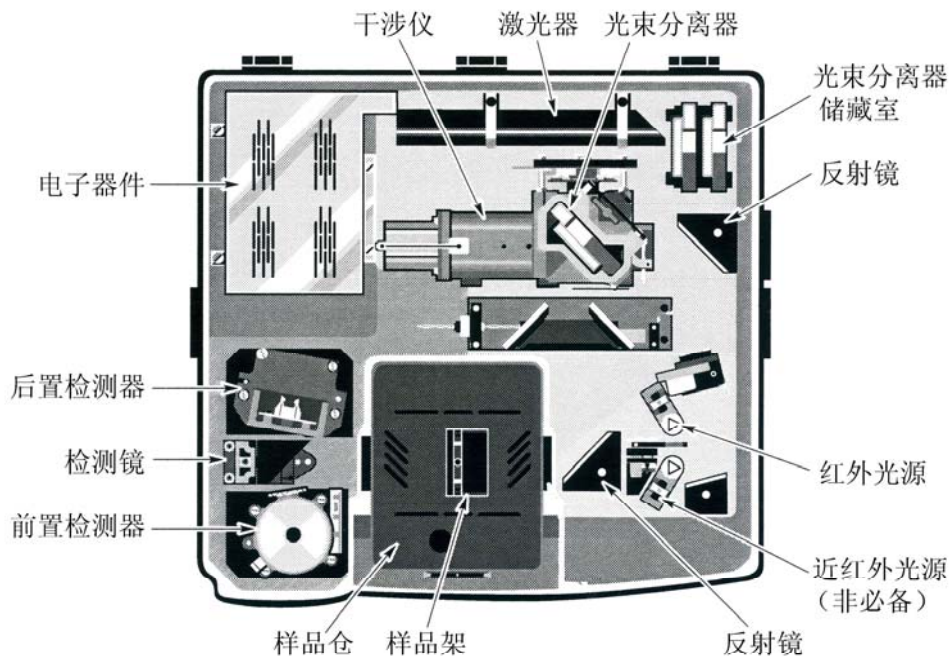


图 6-5 Thermo Nicolet NEXUS 670 FT-IR 红外光谱仪内部结构图

三、仪器及试剂

Thermo Nicolet NEXUS 670 傅立叶变换红外光谱仪

OMNIC 红外光谱采集处理系统 YP-2 压片机 聚乙烯薄膜

聚苯乙烯薄膜

溴化钾，光谱纯

四、操作步骤

(一)、样品制备方法

1、气体试样

气体试样一般都灌注入玻璃气槽内进行测定。它的两端粘合有透红外光的盐窗，盐窗的材质一般是 NaCl 或 KBr。进样时，先将气槽抽真空，然后导入待测气体至一定压力，即可进行测定。

2、液体试样

①液膜法：

液体样品常用液膜法。该法适用于不易挥发(沸点高于 80℃)的液体或粘稠溶液。使用两块 KBr 或 NaCl 盐片，如图 6-6 所示。将液体滴 1-2 滴到盐片上，用另一块盐片将其夹住，用螺丝固定后放入样品室测量。若测定碳氢类吸收较低的化合物时，可在中间放入夹片(spacer, 约 0.05-0.1mm 厚)，增加膜厚。测定时需注意不要让气泡混入，螺丝不应拧得过紧以免窗板破裂。使用以后要立即拆除，用脱脂棉沾氯仿、丙酮擦净。

②溶液法：

溶液法适用于挥发性液体样品的测定。使用固定液池，将样品溶于适当溶剂中配成一定浓度的溶液(一般以 10%w/w 左右为宜)，用注射器注入液池中进行测定。如图 6-7 所示。所用溶剂应不损伤盐片，不与样品起反应；溶剂的光谱在较大范围内无红外吸收，或者溶剂的吸收不与样品吸收重合。常用溶剂为 CS₂、CCl₄、CHCl₃ 等。

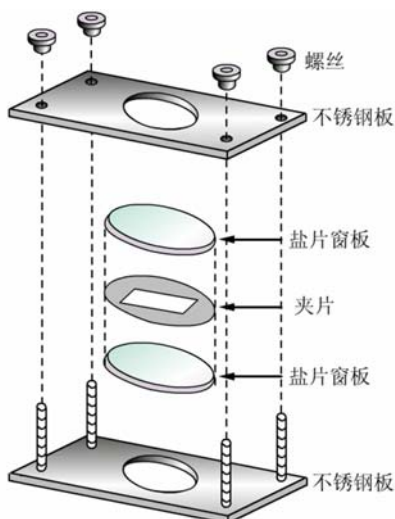


图 6-6 液膜法测定用的组合窗板

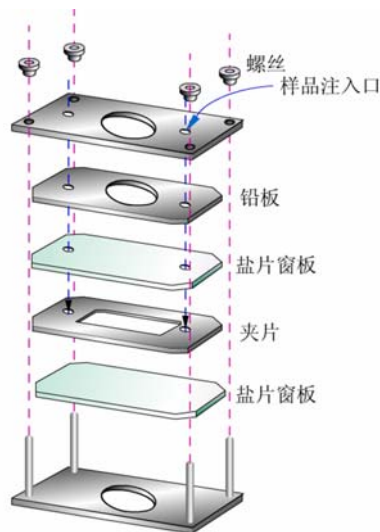


图 6-7 溶液法测定用的固定液池

③水溶液的简易测定法：

由于盐片窗口怕水，因此一般水溶液不能测定红外光谱。利用聚乙烯薄膜是水溶液红外光谱测定的一种简易方法。如图 6-8 所示，在金属管上铺一层聚乙烯薄膜，其上压入一橡胶圈。滴下水溶液后，再盖一层聚乙烯薄膜，用另一橡胶圈固定后测定。需注意的是，聚乙烯、水及重水都有红外吸收。

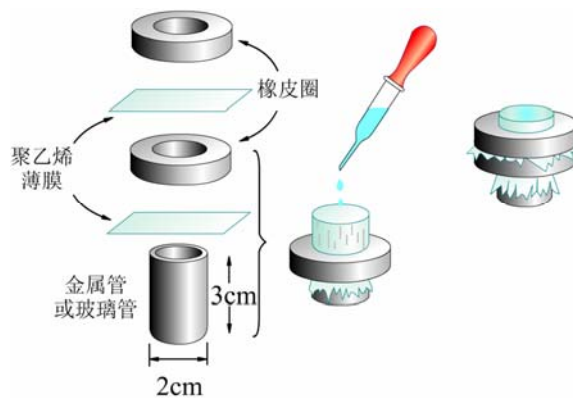


图 6-8 水溶液的简易测定法

3、固体试样

①压片法：

固体样品常用压片法，它也是固体样品红外测定的标准方法。将固体样品 0.5-1.0mg 与 150mg 左右的 KBr 于玛瑙研钵中研磨成均匀、细小的颗粒，用压片机压成薄片。薄片应透明均匀。压片模具及压片机因生产厂家不同而异。图 6-9 是一种压片模具的示意图。

②糊状法：

固体样品还可用糊状法(或重烃油法，Nujol法)。将固体样品(5-10mg)放入玛瑙研钵中充分研细，滴加少量液状石蜡或重烃油等适宜的液体，调成均匀糊状，涂在盐片上用组合窗板组装后测定。但需注意，液体石蜡适用于 $1300\sim 400\text{ cm}^{-1}$ ；全氟代烃适用于 $4000\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ ，两者配合可完成整个波段的测定。

③薄膜法：

适用于高分子化合物的测定。将样品溶于挥发性溶剂后倒在洁净的玻璃板上，在减压干燥器中使溶剂挥发后形成薄膜，固定后进行测定。常见盐片的红外透明范围为：KBr(400 cm^{-1})，NaCl(650 cm^{-1})，CsI(150 cm^{-1})等。

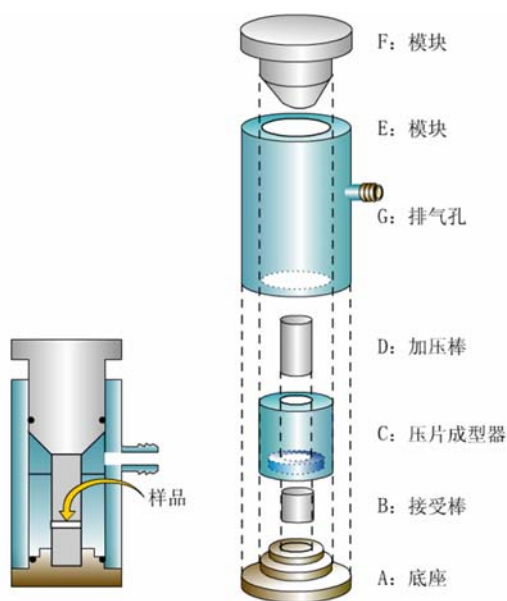


图 6-9 压片模具

(二)、Thermo Nicolet NEXUS 670 FT-IR 红外光谱仪的操作

1、开启电源开关，预热。

2、点击电脑桌面上的【OMINIC】快捷键，进入 OMNIC 红外光谱采集处理系统(图 6-10)。

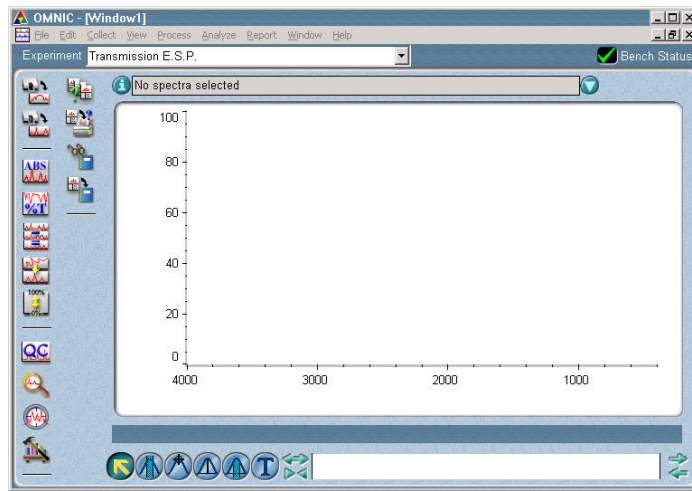


图 6-10 红外光谱采集处理系统界面

3、设定条件

(1) 点击主菜单上的 Collect (采集)，从下拉菜单中选择 Experiment Setup (实验设置) (见图 6-11)，通常样品透射测定参数设置为：

No. of scans (扫描次数): 12

Resolution (分辨率): 4

Final format (谱图形式): %Transmittance (百分透光率)

Correction (校正): 选 None 或其他要求。

File Handling (文件处理): 选 Save automatically (自动保存)，或不选。

Background Handling (背景处理): Collect background before every sample (采集样品前先采集背景谱图) 或其他方式。

(2) 其他设定可采用默认选项或按照具体要求选择。

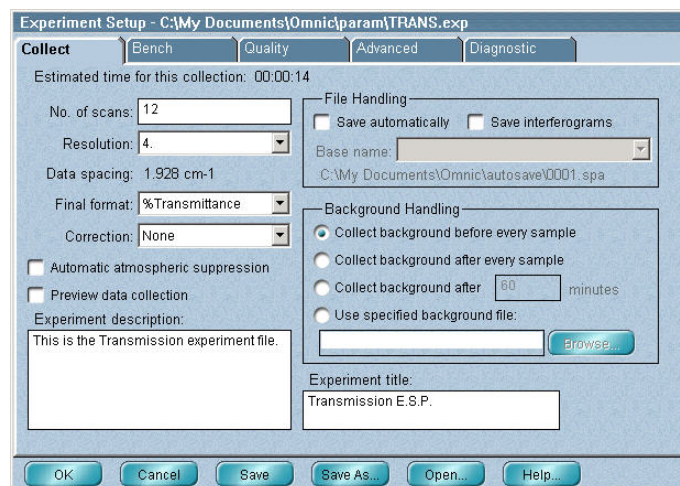


图 6-11 实验参数设置界面

4、数据采集

(1) 点击 Collect 栏下拉菜单中选择 Collect Sample (样品采集), 将弹出提示窗口: “Enter the spectrum title” (输入光谱名称), 输入合适的谱图名称后点击 “OK”。

(2) 确认后, 将出现提示 “Please prepare to collect the background spectrum” (准备采集背景谱图), 此时样品仓中应是没有样品 (即空气为空白) 或是空白的溴化钾晶片 (压片法), 按 “OK” 确认后即采集背景的谱图。

(3) 背景谱图采集完毕后, 自动提示 “Please prepare to collect the sample spectrum” (准备采集样品谱图), 将已经制备好的待测样品放入样品仓中, 点击 “OK”, 系统将进行采集并同时扣除背景, 得到样品的红外光谱图。

5、数据处理

6、保存谱图、打印红外光谱分析报告。

7、退出光谱采集处理系统, 关闭电脑, 清理桌面。

五、注意事项

1、注意保持实验室温度 16-27℃, 相对湿度小于 65%。

2、保护仪器 (尤其是光源和稳压电源) 散热良好。

3、爱护氯化钠、溴化钾单晶片, 不要用手直接接触盐片表面, 不要对着盐片呼吸, 避免与吸潮液体或溶液接触。

4、样品应不含水。水在红外光谱图 3450cm^{-1} 和 1640cm^{-1} 处出现吸收峰, 对羟基峰有干扰。

5、压片法制得的晶片, 必须无裂痕, 局部无发白现象, 如同玻璃般完全透明, 否则应重新制作。晶片局部发白, 表示压制的晶片厚薄不均匀; 晶片模糊, 表示晶片吸潮。

六、思考题

1、在红外样品制备时, 对固体试样的制片有何要求?

2、今欲测定一种仅溶于水的试样, 可以用哪些方法来制备试样?

3、测定红外谱图时, 试样容器的材质常采用氯化钠和溴化钾。它们适合的波长范围各为多少?

4、红外光谱实验室为什么对温度和相对湿度要维持一定的指标?

实验七 毛细管气相色谱法（示教）

一、目的与要求

- 1、了解毛细管气相色谱仪的结构及基本操作。
- 2、了解程序升温色谱技术及与恒温色谱法的区别。
- 3、了解 GC 化学工作站的使用。

二、方法提要

1、程序升温色谱法即柱温按预定的加热速度，随时间呈线性或非线性的增加，则混合物中各组分将在其较佳柱温下流出色谱柱。程序升温能改善复杂成分样品的分离效果，缩短分析周期，改善峰形，提高检测灵敏度。因此该法对宽沸程多组分混合物的分离尤显示出优越性。

2、毛细管柱的气路系统特点，在于进柱前有一载气分流气路，以控制进柱样品量和提供大量溶剂并预放空，避免柱子过载。另外，由于毛细管柱径细，体积小，只能采用低流速（0.5~2.0 ml / min），故在柱后与检测器之间附一尾吹气路（补充气路），以减小柱出口至检测器之间的过渡管线及接头区的死空间，防止分离后组分造成的堆积和重新混合等不良影响。并使单位时间内到达质量型检测器（FID）的样品质量增多，从而提高检测灵敏度。

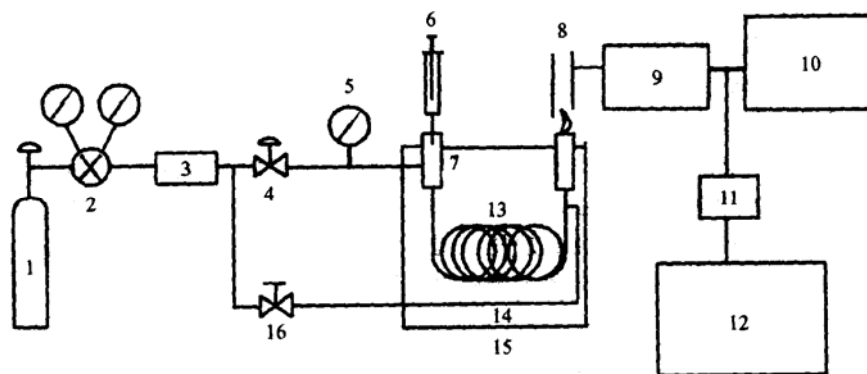


图 7-1 气相色谱仪流程示意图

- 1、载气钢瓶 2、减压阀 3、净化器 4、稳压阀 5、压力表 6、注射器 7、气化室 8、检测器
9、静电计 10、记录仪 11、数模转换 12、数据处理系统 13、色谱柱 14、补充气（尾吹气）
15、柱恒温器 16、针形阀

三、仪器及试剂

安捷伦 Agilent 6890N 型气相色谱仪，HP-5 毛细管柱，微量注射器。

丙酮

四、实验步骤

1、开机：

- ① 先开载气 (N₂) 10min。
- ② 开主机电源：自检、开机成功。
- ③ 连机：online 在线连接 GC 化学工作站。

2、Load method bingtong：设置参数

进样口：分流模式，分流比 50 : 1；温度 250℃

分离柱：恒压，流量 1.0

柱温：程序升温——50℃恒 1 分钟，再升至 150℃ (30℃/ min)，150℃再恒 1 分钟。

检测器FID：H₂ (ml / min) 40

空气 (ml / min) 450

温度 (℃) 250

3、进样：当 READY 绿灯亮起，并且基线稳定即可进样；用微量进样器进样 0.2 μl 丙酮，得色谱图。

4、数据处理 (GC 工作站)：面积归一法。

5、关机：

- ① 退出 GC 化学工作站 (选方法 shut down)
- ② 各温度 oven<50℃、back inlet<100℃、back det<100℃ 全 off 后，再关主机电源。
- ③ 关载气。

五、注意事项

1、在程序升温分析中应使用高纯载气，以防止微量有机杂质和微量氧引起基线漂移或因氧化而改变固定液的保留特性。

2、通常在样品中最易挥发组分的沸点附近确定程序升温的起始温度，由样品中高沸点组分的保留温度和固定液的最高使用温度来确定终止温度，注意终止温度不可超过固定液的最高使用温度。

3、毛细管 GC 仪采用尾吹气法，故最好用质量型检测器，如 FID 等。对于普通浓度型检测器，如 TCD 等，若加入尾吹气，会冲淡样品浓度，从而降低检测灵敏度，因此在填充柱中使用的普通浓度型检测器不可直接用在毛细管色谱中。

4、离开实验室前应检查各气源是否关好。

六、思考题

- 1、与填充柱色谱法相比，毛细管气相色谱法有何特点？
- 2、程序升温气相色谱法适用于哪些类型样品的分析？
- 3、气相色谱仪由哪五大系统组成？

实验八 高效液相色谱仪的使用（示教）

一、实验目的

1. 了解 HPLC 仪器基本结构, 掌握实验仪器的一般使用方法;
2. 加深对色谱分离原理的理解, 掌握主要实验条件的选择;
3. 掌握保留时间初步定性和外标法的定量方法

二、实验原理

以液体为流动相的色谱法称液相色谱法, 由经典液相色谱(柱层析、纸层析、薄层层析)和气相色谱发展起来, 采用高压液体作流动相并采用了新型固定相和连续自动检测系统, 从而大大提高了理论塔板数, 具有快速、高效、高选择性等特点, 特别适用于大分子量的高分子化合物及离子型化合物的分离与分析。因此人们称这种新型的液相色谱为高速、高压或高性能液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography), 简称 HPLC。

HPLC 系统一般由**输液泵、进样器、色谱柱、检测器、数据记录及处理系统**等组成, 如图 8-1 所示, 其中输液泵、色谱柱、检测器是关键部件。

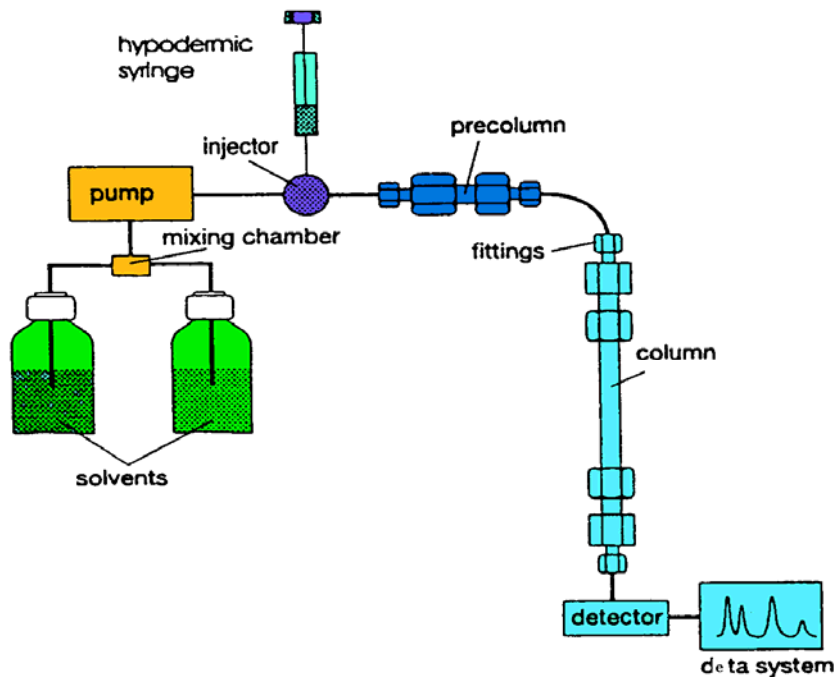


图 8-1 HPLC 仪结构

1) 输液泵是 HPLC 系统中最重要部件之一, 有的仪器还有梯度洗脱装置、在线脱气机。输液泵性能的好坏直接影响整个仪器的性能和分析结果的可靠性, 为了延长泵的使用寿命和维持其输液的稳定性, 操作过程中应防止任何固体微粒和气泡进入泵体, 流动相需要先过滤和脱气, 可采用 Millipore 滤膜 (0.2 μm 或 0.45 μm) 等滤器和脱气装置, 而且输液泵的滤器应经常清洗或更换。输液泵的工作压力决不要超过规定的最高压力, 否则会使

高压密封环变形，产生漏液。

2) 进样器大都使用六通进样阀或自动进样器。一般 HPLC 分析常用六通进样阀，其关键部件由圆形密封垫（转子）和固定底座（定子）组成。六通阀的进样方法如图 8-2，有部分装液法和完全装液法两种：①用部分装液法进样时，进样量应不大于定量环体积的 50%（最多 75%），并要求每次进样体积准确、相同。此法进样的准确度和重复性决定于注射器取样的熟练程度，而且易产生由进样引起的峰展宽。②用完全装液法进样时，进样量应不小于定量环体积的 3~5 倍（最少 3 倍），这样才能完全置换定量环内的流动相，消除管壁效应，确保进样的准确度和重复性。

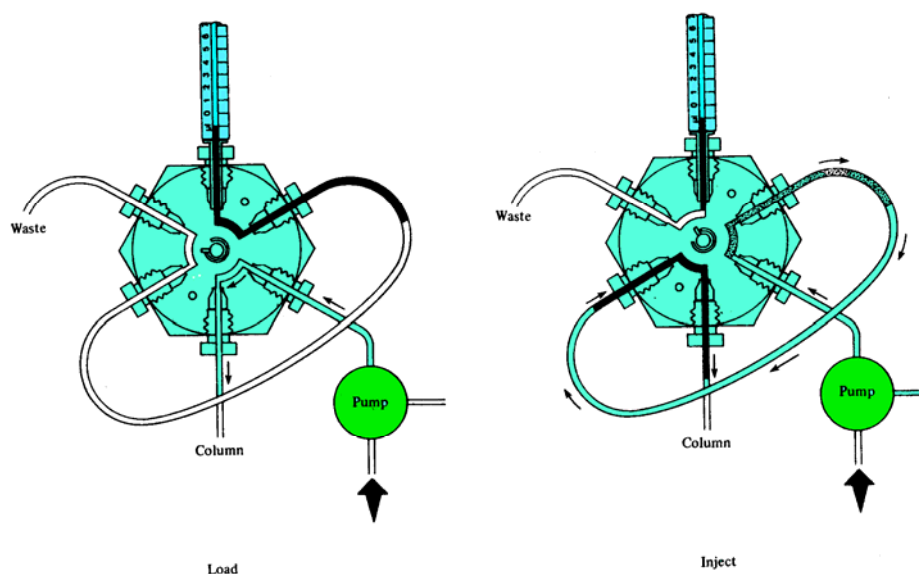


图 8-2 六通阀进样原理

3) 色谱柱是色谱系统的关键，决定组分分离的好坏，所以对色谱柱的要求是柱效高、选择性好，分析速度快等。对于一般的分析只需 5000 塔板数的柱效；对于较难分离物质对则可采用高达 2 万的柱子，因此一般 10~30cm 左右的柱长就能满足复杂混合物分析的需要。使用最广泛的反相键合相是十八烷基键合相，即让十八烷基 (C₁₈H₃₇—) 键合到硅胶表面，又称 ODS(Octadecylsilyl)或 C18。

4) 检测器的作用是把洗脱液中组分的量转变为电信号。紫外检测器是 HPLC 中应用最广泛的检测器，灵敏度高，噪音低，线性范围宽。UV 检测器分为固定波长检测器、可变波长检测器和光电二极管阵列检测器(DAD)。使用过程中，要注意流动池内不能有气泡，避免被污染，否则产生噪音或基线漂移及出现许多线状“峰”，一般灯源开启稳定 20 至 30 分钟后，才可进样分析。

5) 数据记录处理系统也称色谱工作站，通过工作站可进行全系统的自动化控制，其用途包括三个方面：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。

高效液相分配色谱法有反相或正相色谱法两种分离模式。反相高效液相色谱法

(RP-HPLC)应用最为广泛,据统计,它占整个 HPLC 应用的 80%左右。它是采用非极性固定相(如 C18 等)、极性溶剂(如甲醇等)作为流动相的一种分离模式,极性较强或亲水的样品分子和反相柱中的固定相上的相互作用较弱,分配较少,因此随着流动相比较快流出。本实验采用 RP-HPLC 分离模式,以紫外检测器进行检测,待测样品中不同组分分子与固定相作用力的大小不同而产生分离,结果以色谱峰的形式进行记录。

三、仪器与试剂

仪器: Agilent HP 1100 高效液相色谱仪;紫外检测器;定量环体积 20 μ l; 50 μ l 微量注射器;超声波清洗器。

色谱柱: C18 或 C8

试剂: 1. 甲醇(HPLC 纯);超纯水。

2. 苯标准溶液;混合样品

四、色谱条件

流动相: 甲醇:水=80:20;固定相: Agilent C8 (150 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m)不锈钢柱;

流速: 1.0mL/min ;室温;检测波长: 254nm

五、实验步骤

1. 开启仪器: 打开计算机,并运行 Bootp Server 程序;打开 1100 LC 各模块电源;待各模块自检完成后,双击 Instrument Online 图标,化学工作站自动与 1100LC 通讯,进入的工作站画面。

2. 排气泡: 流动相过滤、脱气后使用,打开废液阀(purge 阀),开启泵(pump on),设定流速 5mL/min 冲洗,直到输液管中无气泡为止,一般需 2-5min,降低流速关上 purge 阀。

3. 条件设定: 通过泵设定流动相组成、分析时间及流速;开启检测器灯源,设定检测波长;编辑方法 method 并保存,从“Run control”菜单中选择“Sample info”选项,设定样品名称。

4. 进样分析: 预热半小时左右,等仪器 Ready,基线平稳,准备进样;先使六通阀处于装样(load)位置,用微量注射器将样品注入定量环,快速转动手柄至进样(injection)位置,此时仪器会输出一个脉冲,标记开始采集数据。本实验先对苯、甲苯的标准溶液逐一进样分析,确定各自的保留时间,然后对试样溶液进行测定,确证组分,计算结果。

5. 数据处理:

(1) 试样溶液中组分的定性

根据标准样品溶液的保留时间,对试样溶液中的组分进行对比定性确认。

(2) 试样溶液中组分含量的计算

根据色谱峰面积(或峰高)测定样品中某一组分的准确含量。常用色谱的定量方法有内标法、外标法和面积归一法等。本实验采用外标法定量,以浓度表示的各组分含量 X (μ g/mL),按该式计算:

式中:

$$X = \frac{C_1 \times A_2}{A_1}$$

C1 — 标样溶液中,相应组分的浓度(μ g/mL);

A1 — 标样溶液中，相应组分峰面积；

A2 — 试样溶液中，相应组分峰面积。

6. 实验结束后，按要求关好仪器（与开机顺序相反）。

五、注意事项

1. 实验中要求用超纯水，有机溶剂为色谱纯试剂，使用前都必须经微孔滤膜滤过，以除去微粒杂质。流动相必须脱气，否则有气泡进入系统，会影响泵、检测器、柱子，甚至使无法检测。

2. 色谱柱上有箭头标注方向，一般不能反冲，分析复杂样品时需对其进行预处理或在进样器和色谱柱之间连接一保护柱。

3. 用微量注射器吸液时，要防止气泡吸入。转动六通阀阀芯时不能太慢，更不能停留在中间位置，否则流动相受阻，使泵内压力剧增将损坏柱头。

4. 实验结束后，要注意冲洗，例如 ODS 柱宜用甲醇冲洗至基线平衡。当采用盐缓冲溶液作流动相时，使用完后应用无盐流动相（水）冲洗。

六、思考题

1. HPLC 实验中手动进样的原理是什么？进样量有何要求？
2. 微粒杂质和气泡对 HPLC 仪器有何影响？
3. 色谱定性定量分析的依据是什么？主要有哪几种定量方法？
4. 从仪器构造、分离原理和应用范围三方面比较 HPLC 和 GC 的异同点。