

液相色谱分析法模块之
任务3 归一化法定量

教学任务

- 测定分析纯甲苯试剂的纯度
- 应用归一化法进行定量分析
- 讲授高效液相色谱方法建立的一般模式

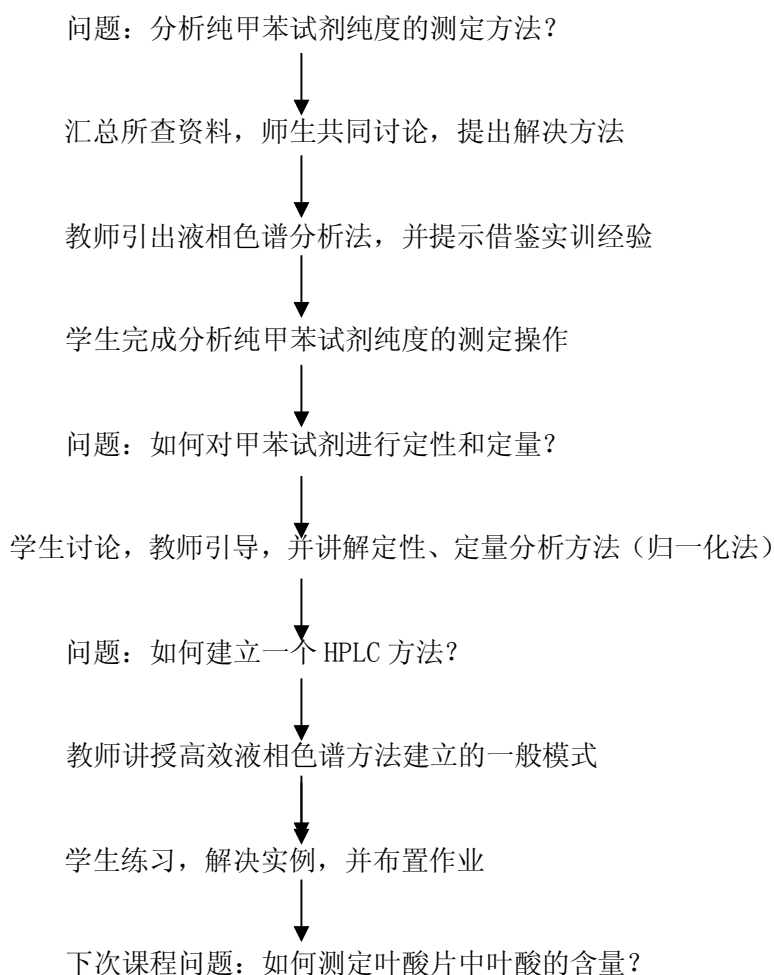
教学方法

- 引探与讲练结合

教学学时

- 每20人一个学习组，4人一台液相色谱仪，分组循环操作，整个任务需4学时。

教学设计



课程引入

- 问题：作为化工中间体的分析纯甲苯试剂，按物料入库要求，需要抽样检查，如何测定甲苯

的纯度？

(上次课结束后即布置并安排学生在课后查阅资料)

- 学生根据所查资料提出解决方案并进行现场讨论以决定各解决方案的优劣。
(教师可事先准备几种办法以备用, 如灼烧残渣法, 沸程测定法, 气相色谱法等。)
- 最后教师引出本次课程的教学内容: “采用液相色谱法测定分析纯甲苯的纯度”

测定过程演示

(本过程教师可以“图片”的形式展示测定过程, 也可以“教学录像”演示测定过程, 也可以“教师现场演示”的方式进行教学, 目的是让学生掌握整个测定过程)

- 配制流动相: 甲醇/水(85/15)的流动相1000mL, 并进行过滤和脱气处理。
- 色谱分离条件: C18色谱柱(5 μ m, 4.6mm i.d. \times 150mm); 波长: 254nm; 流速: 1.0mL \cdot min⁻¹。
- 打开检测器、高压泵电源开关, 按上述分离条件设置参数; 打开排放阀, “purge” 1-2分钟, 关闭“purge”, 使仪器在设定的条件下平衡。
- 打开工作站, 设置分析方法。
- 等基线平衡后, 用微量注射器量取定量环体积的3-5倍的甲苯试样(10 μ L分析纯甲苯试样, 用甲醇稀释至50mL), 在上述分析条件下进样。
- 记录下样品名对应的文件名, 同时打印出经优化的色谱图和分析结果。

学生对测定过程提问、相互讨论与教师的阶段总结

(本过程教师积极“引导”学生对该测定过程不理解之处提问, 可事先设计部分问题如①定性问题②定量问题③常见参数的设置等, 最后教师可在学生讨论的基础上作一个总结;)

- 甲苯的定性问题: 一般可采用标准物质进行保留时间的对照来定性。
- 参数的设置: 回忆在仪器操作任务中, 做过的苯的定性实验, 是否可以借鉴其色谱分离条件。
- 甲苯纯度的定量问题: 本项目的测定采用“归一化法”进行定量。
- 其它注意事项: 本项目的测定使用有毒有害的甲醇作为流动相, 操作时要注意不要溅至眼睛。
(教师可用一些安全上的实例给学生讲述此问题, 以引起同学们的注意, 同时辅以学生“安全问题”讨论来提高学生的学习主动性与增强教学效果。)

学生完成分析纯甲苯试剂纯度测定的实验操作

(教师应根据实验室的具体情况合理安排学生完成各项实验操作。如根据仪器实际台套数, 分成几组学生, 部分学生配制流动相, 部分学生配制试样、部分学生操作仪器等)

- 要求每位学生独立完成进样, 独立处理数据, 合理安排时间。
- 如果峰高超出检测器检测范围, 可以将甲苯溶液进行稀释。
- 废液的处理必须有专门的容器。

甲苯的定性和定量

问题：如何对甲苯定性、并对纯度进行定量？

□ 定性方法（联系气相色谱的定性）

1、利用已知标准样品定性

利用标准样品对未知化合物定性是最常用的液相色谱定性方法，该方法的原理与气相色谱法中相同。

2、利用检测器的选择性定性

双检测器定性体系可以用来对被测化合物进行定性分析，同一种检测器对不同种类的化合物的响应值是不同的，而不同的检测器对同一种化合物的响应也是不同的。所以当某一被测化合物同时被两种或两种以上检测器检测时，两检测器或几个检测器对被测化合物检测灵敏度比值是与被测化合物的性质密切相关的。

3、利用紫外检测器全波长扫描功能定性

紫外检测器是液相色谱中使用最广泛的一种检测器。全波长扫描紫外检测器检测化合物的紫外光谱图。再通过对照标准谱图的方法来识别化合物。

此外，利用二极管阵列检测器得到的包括有色谱信号、时间、波长的三维色谱光谱图，其定性结果与传统方法相比具有更大的优势。

□ 归一化法定量

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中的归一化法类似。

计算公式为 $w_i = A_i / \sum A_i$

实例：本次实验数据的计算处理。

HPLC 方法的建立

（教师可引导学生对甲苯纯度测定方法予以分析）

一、理论型

□ 了解样品的基本情况

所谓样品的基本情况，主要包括样品所含化合物的数目、种类（官能团）、分子量、 pK_a 值、UV光谱图以及样品基体的性质（溶剂、填充物等）、化合物在有关样品中的浓度范围、样品的溶解度等。

□ 明确分离目的

①主要目的是分析还是回收样品组分？

②是否已知样品所有成分的化学特性，或是否需做定性分析？

③是否有必要解析出样品中的所有成分（比如对映体、非对映体、同系物、痕量杂质）？

④如需做定量分析，精密度需多高？

⑤本法将适用几种样品分析还是许多种样品分析？

⑥将使用最终方法的常规实验室中已有哪些 HPLC 设备和技术？

□ 了解样品的性质和需要的预处理

考察样品的来源形式，可以发现，除非样品是适于直接进样的溶液，否则，高效液相色谱分离前均需进行某种形式的预处理。

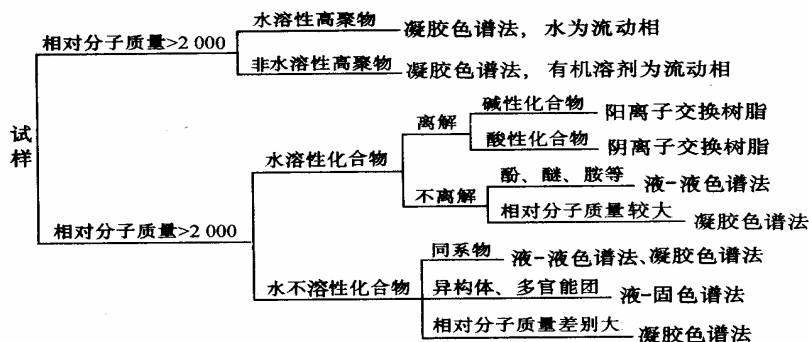
□ 检测器的选择

不同的分离目的对检测的要求不同，如测单一组分，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。另外，如目的是定性分析或是制备色谱，则最好有通用型检测器，以便能检测到混合物中的各种成分。

应尽量使用紫外检测器（UV），因为目前一般的 HPLC 都配有这类检测器，它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手段。

□ 分离模式的选择

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，确定高效液相色谱的分离模式。



在高效液相色谱法作为分离方法中，有 80% 的物质的分离依靠反相色谱来完成。在反相色谱中，水是常用的流动相弱组分，C₁₈ 是常用的填充载体，重要的是选择流动相的强组分，常用的强组分有甲醇、乙腈与四氢呋喃。

二、经验型

经验型的液相色谱法是我们常用的方法建立手段，我们可以借鉴前辈、同行和国外学者的成果，把他们所用的方法经过消化吸收，转化为我们所用。这不但可节省人力、物力和财力，而且可以较快的完成任务。

下次课程问题：

- 叶酸是人体必须的一种物质，它能促进胎儿脑神经的发育，也能防止人体贫血，你能设计一可行的分析方案，检测某药厂的叶酸片中的叶酸的含量吗？（提示：1、可查阅文献资料；2、可参照国标。）