

液相色谱分析法模块之
任务4 外标法定量

教学任务

- 讲解样品处理方法
- 叶酸片中主成分的含量测定
- 应用外标法进行定量分析
- 讲解分析中的污染和仪器的维护

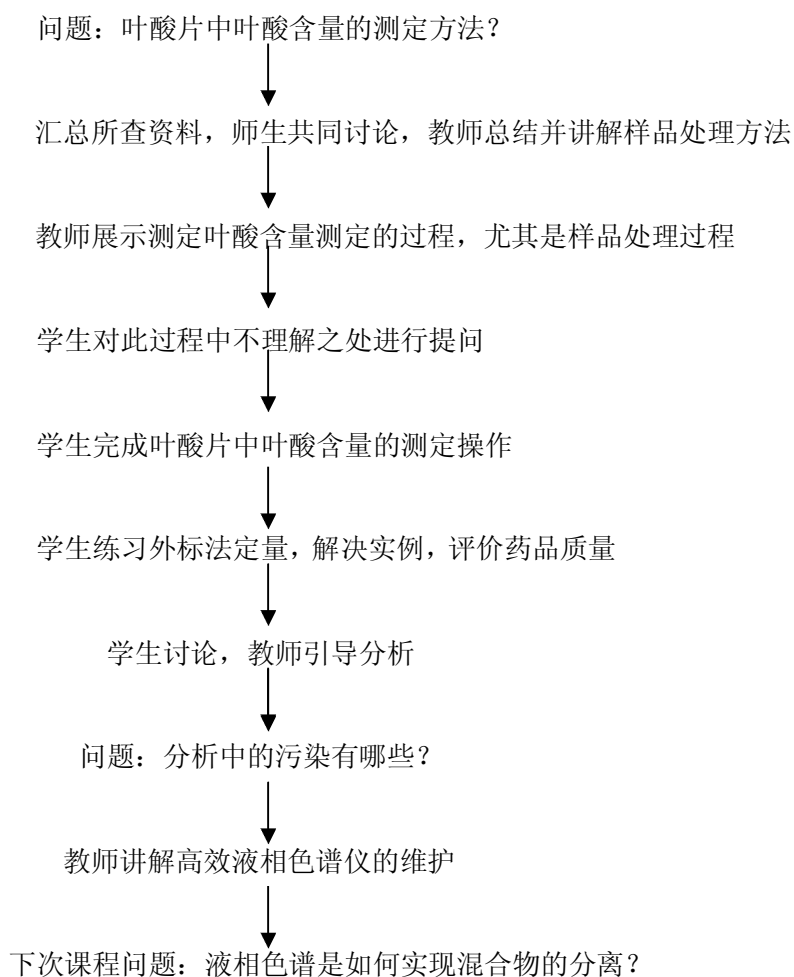
教学方法

- 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6学时。

教学设计



课程引入

- 问题：叶酸是作为人体必须的营养成份之一，如何测定叶酸片中叶酸的含量？
(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，如化学分析法、液相色谱法(内标法、外标法)等。)
- 最后教师引出本次课程的教学内容：“采用外标法测定叶酸的含量”
- 药物作为一个复杂的混合物，如何对混合物进行前处理？

样品处理

(教师可引导学生回忆在以前实训中样品的预处理方法)

样品前处理是指样品的制备和对样品中待测组分进行提取、净化、浓缩的过程。前处理的目的是消除基质干扰，保护仪器，提高方法的准确度、精密度、选择性和灵敏度。样品处理是分析检测的关键环节时间，约占分析检测时间的60%。

□ 提取

提取就是用物理的或化学的手段破坏待测组分与样品成分间的结合力，将待测组分从样品中释放出来并转移到易于分析的溶液状态，提取过程可以除去99%以上的样品基质。经典的方法有均质提取法、振荡提取法、索氏提取法等。

□ 净化

提取过程中，许多与待测组分溶解性相似的杂质将被一起转移出来，这些杂质会干扰对待测组分的测定，因此需要将待测组分与杂质分离，这个分离过程称为净化。比较传统的净化手段有液液萃取和固相萃取等，目前比较先进、实用的处理技术凝胶渗透色谱、基质固相分散技术、分子印记技术等也得到了比较广泛的应用。

□ 浓缩

在残留分析中，经过提取和净化后的待测组分的存在状态经常不能满足检测仪器的要求，无法直接测定，如浓度低于检测器的测定范围、待测物的溶剂与仪器要求不符合等。此时必须对组分进行浓缩，浓缩是指通过减少样品中溶剂的量而使组分浓度升高，溶剂挥发是常规的浓缩方法，常见减压蒸馏和气流吹蒸两种方式。

□ 衍生化

所谓衍生化，就是将用通常检测方法不能直接检测或检测灵敏度比较低的物质与某种试剂(即衍生化试剂)反应，使之生成易于检测的化合物。按衍生化的方法可以分为柱前衍生化和柱后衍生化。按生成衍生物的类型又可分为紫外-可见光衍生化、荧光衍生化、拉曼衍生化和电化学衍生化。衍生化技术不仅使高效液相色谱分析体系复杂化，而且需要消耗时间，增加分析成本，有的衍生化反应还需要控制严格的反应条件。因此，只有在找不到方便而灵敏的检测方法，或为了提高分离和检测的选择性时才考虑用衍生化技术。

测定过程演示

(本过程教师可通过“教师现场演示”的方式进行教学,尤其是含盐流动相的配制和样品的预处理过程,包括称量,目的是让学生掌握整个样品预处理过程)

- 配制流动相:磷酸二氢钠缓冲液(取磷酸二氢钠6.80g,加水880mL,振摇使溶解,用氢氧化钠溶液调节 $\text{pH}=6.30\pm 0.05$)—甲醇(80:20)为流动相。用 $0.45\mu\text{m}$ 有机相滤膜减压过滤,脱气。
- 色谱分离条件:C18色谱柱($5\mu\text{m},4.6\text{mm i.d.}\times 250\text{mm}$);波长:254nm;流速: $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。
- 叶酸标准品:精密称取0.01g叶酸对照品,置50mL容量瓶中,加30mL0.5%的氨水溶解,再用纯水定容至刻度。
- 叶酸试样(5mg/片):取叶酸片40片,精确称量,研磨至均匀,精确称取二片重量的叶酸粉末于50mL的容量瓶中,加入30mL0.5%氨水,在热水浴中振摇20分钟,冷却后用纯水定容至刻度,摇匀,过滤。
- 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倍的叶酸标样,在上述分析条件下进样。在相同的条件下,对叶酸样品进行测定,记录标样与样品的色谱峰面积和保留时间。
- 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样品的预处理等,最后教师可在学生讨论的基础上作一个总结;)

- 叶酸的定性问题:一般可采用标准物质进行保留时间的对照来定性。
- 在样品的预处理和溶液配制中,称量的操作与我们平时的操作略有不同,这是药物称量的特点。
- 叶酸含量的定量问题:本项目的测定采用“外标法”进行定量。
- 其它注意事项:本项目的测定需使用电炉,操作时要注意用电安全;同时配制氨水溶液应在通风柜中进行。

学生完成叶酸含量测定

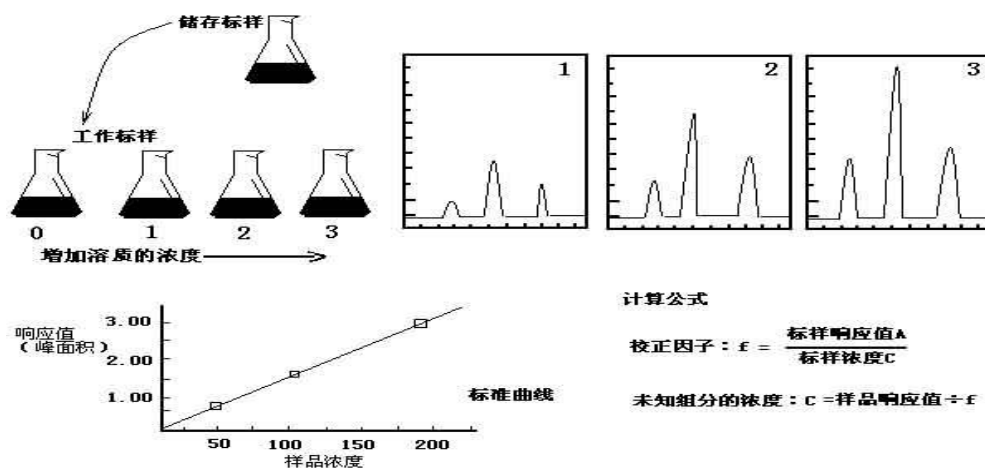
(教师应根据实验室的具体情况合理安排学生完成各项实验操作。如根据仪器实际台套数,分成几组学生,部分学生配制流动相,部分学生配制试样、部分学生操作仪器等)

- 要求每位学生独立完成进样,独立处理数据,合理安排时间。

- 色谱柱的个体差异很大，即使是同一厂家的同种型号的色谱柱，性能也会有差异。因此，色谱条件（主要是指流动相的配比）应根据所用色谱柱的实际情况作适当的调整。
- 合理安排实验时间，团队合作精神非常重要。

外标法定量

- 外标法处理实验数据



外标法的特点：操作、计算简单，是一种常用的定量方法。它无需各组分都被检出、洗脱。但需要标样，标样及未知样品的测定条件要一致，进样体积要准确。

实例：本次实验数据的处理

- 根据外标法处理本项目的数据，并评价该药品的含量是否合格？（教师引导学生查阅中国药典和相关的质量标准）

分析中的污染及液相色谱仪的维护

- 一般检测的环境、容器、试剂都是影响测定结果的因素。

➤ 容器

实验室常用的器皿有玻璃类、瓷类、石英类、塑料类等，在进行分析时，应按照待测样品的要求来选则器皿，不管使用哪种器皿，容器的洗条清洁都是很重要的，也是取得好的检测结果的基本保证。

➤ 试剂

在液相色谱分析中，所选用的试剂必须是色谱纯、优级纯或分析纯，如果用含量有杂质的试剂，则会出现杂峰而影响测定结果。

➤ 环境污染

仪器室的有害气体、气溶液、灰尘等等都能造成污染，影响检测结果，这种污染很难校正。因此，仪器室与其他实验室应隔离，保持清洁，仪器室内应安装空调，注意防潮、防腐、防震、空气相对湿度应小于 70%为宜

□ 高效液相色谱仪的维护

➤ 贮液器

- ①配制后的流动相在使用前都应用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤后才可使用，以保持贮液器的清洁；
- ②用普通溶剂瓶作流动相贮液器时应不定期废弃瓶子（如每月一次），买来的专用贮液器也应定期用酸、水和溶剂清洗（最后一次清洗应选用 HPLC 级的水或有机溶剂）。

➤ 高压输液泵

- ①用高质量试剂和 HPLC 级溶剂；
- ②过滤流动相和溶剂，溶剂使用前必须先经过脱气；
- ③每天开始使用时放空排气，工作结束后从泵中洗去缓冲液；
- ④不让水或腐蚀性溶剂滞留泵中；

➤ 进样器

- ①对六通进样阀而言，保持清洁和良好的装置可延长阀的使用寿命；
- ②进样前应使样品混合均匀，以保证结果的精确度；
- ③样品瓶应清洗干净，无可溶解的污染物；
- ④自动进样器的针头应有钝化斜面，侧面开孔；针头一旦弯曲应该换上新针头，不能弄直了继续使用；吸液时针头应没入样品溶液中，但不能碰到样品瓶底；
- ⑤为了防止缓冲盐和其它残留物留在进样系统中，每次工作结束后应冲洗整个系统。

➤ 色谱柱

- ①在进样阀后加流路过滤器（ $0.5\ \mu\text{m}$ 烧结不锈钢片），挡住来源于样品和进样阀垫圈的微粒；
- ②在流路过滤器和分析柱之间加上“保护柱”，收集阻塞柱进口的来自样品的降低柱效能的化学“垃圾”。
- ③色谱柱应避免突然变化的高压冲击；
- ④色谱柱应在要求的 pH 值范围和柱温范围下使用，应使用不损坏柱的流动相；
- ⑤进样前应将样品进行必要的净化，以免进样后对色谱柱造成损伤；
- ⑥每次工作结束后，如果流动相是水和有机溶剂系列，则用流动相冲洗 30 分钟左右；如果流动相中含有盐溶液，则先用水-甲醇（90：10），然后再用纯甲醇冲洗 20 分钟并保存。

➤ 检测器

流动相应过滤并脱气，不但能保证流动池的清洁，还能保证基线的稳定。

下次课程问题：

- 液相色谱是如何实现混合物的分离？（查阅资料，建议参考气相色谱理论）