

全国轻化工类高等学校
工业分析专业系列教材

色谱分析法

实验与习题

齐齐哈尔轻工学院 杭州大学 浙江工学院 华东冶金学院

重庆大学出版社

全国轻化工类高等学校
工业分析专业系列教材

色谱分析法实验与习题

主 编 史景江

副主编 杨国樑 苏立强

重庆大学出版社

内 容 提 要

本书是全国轻化工类高等学校工业分析专业系列教材中《色谱分析法》的配套教材。实验部分包括常用色谱备件使用方法；进样技术（填充柱与毛细管柱）实验；样品化学衍生化实验；色谱概论演示实验；色谱基本理论实验；填充柱、毛细管柱、裂解、程序升温气相色谱法实验；检测器性能测试；气相色谱分析方法实验；HPLC实验技术及HPLC分析方法实验等；习题部分与实验紧密结合分章列出相关思考题与习题并附有答案。

本书供轻化工类高等学校工业分析专业及其他高等学校相关专业作为试用教材，也可供石油、化工、食品、环保、卫生、医药、生化、纺织专业等作为教学参考书，同时可供各类从事色谱工作的有关科技人员实验人员参考。

色 谱 分 析 法 实 验 与 习 题

主 编 史 景 江
副 主 编 杨 国 豪 苏 立 强
责 任 编 辑 李 长 惠 饶 邦 华

重庆大学出版社出版发行
新华书店经销
重庆印制一厂印刷

开本：850×1168 1/32 印张：5.125 字数：138 千

1993年6月第1版 1993年6月第1次印刷

印数：1—6000

标准书号：ISBN 7-5624-0573-5 定价：3.50元
TQ·11

[川]新登字020号

编写说明

齐齐哈尔轻工学院发起并组织全国11所轻化工类高等学校共同编写的“全国轻化工类高等学校工业分析专业系列教材”，自1990年3月陆续出版以来，已使用2年，受到了全国轻化工类高等学校、专业相关的高等学校、科研单位及企事业相关专业的科技工作者的欢迎。为全面培养人才，为使读者获得本专业较全面的技能，能在社会实践中发挥独立分析问题和解决问题的能力，现出版相应于主系列教材的配套系列教材——《色谱分析法实验与习题》、《波谱分析法实验与习题》、《光谱分析法实验与习题》、《电化学分析法实验与习题》及《分析仪器实验与维护》。该系列教材属建国以来本专业创编教材，已列入轻工业部高等学校“八五”教材规划。

齐齐哈尔轻工学院、北京化工学院、郑州轻工业学院、北京轻工业学院、大连轻工学院、沈阳化工学院、杭州大学、浙江工学院、上海工程技术大学纺织学院、华东冶金学院、成都大学参加该系列教材编写工作的同志，于1991年5月在齐齐哈尔轻工学院召开了第一次全体会议，讨论了该系列教材编写大纲、编写内容、编写计划以及编写分工；并经民主协商确定了编委会及各门教材主编、副主编；重庆大学出版社编辑在会上讲述了有关出版教材的要求。

该系列教材编委会组成如下：

主任委员 史景江

副主任委员 于世林 张绍衡 郭德济

委员 张达英 刘頔荣 李寅蔚 杨国樑

刘汉成 朱艳云 王儒富 蒋孔颐

高义泰 李国童 刘瑞华

会议经过充分讨论，确立该系列教材要贯彻与主系列配套精神，

以主教材内容为纲、以补充新内容为方向，突出新实验题目、新技术及新方法；每册字数限在15~20万范围内，实验课题覆盖面要宽，突出代表性，必选及任选题目由各院校根据本校实际情况酌定。

此后，1992年1月在北京化工学院又召开了主编会议，对全系列教材初稿进行了认真的审查和讨论，提出了修改意见，明确了统一编写格式和出版要求，并返还作者重修。于1992年1月完成了清稿，经主编统稿审定稿，是年下半年陆续送交出版社出版。

参加本系列教材编写者，都是具有丰富教学经验的专业教师，他们绝大多数为教授、副教授。但是，由于任务较重，合作院校较多，错误和不足在所难免，恳请读者提出批评、指正。

※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※

本书第一章由齐齐哈尔轻工学院王清滨编写；第二章、第三章由齐齐哈尔轻工学院史景江编写；第四章、第八章由华东冶金学院成金玉编写；第五章、第七章由杭州大学杨国祯编写；第六章由齐齐哈尔轻工学院郑永杰编写；第九章由齐齐哈尔轻工学院苏立强编写；第十章、第十一章由浙江工学院刘汉成、王丽丽编写。

目 录

实 验 部 分

第一章 气相色谱实验技术	1
常用色谱备件使用方法	1
实验一 填充柱气相色谱进样技术练习	3
实验二 毛细管气相色谱进样技术比较	4
实验三 样品化学衍生物的制取——硝酸根衍生化为硝基苯	5
实验四 样品化学衍生物的制备——脂肪酸甲酯衍生物的制备	6
第二章 色谱法概论(演示)	8
实验一 C_5-C_{14} 脂肪醇混合物的填充气相色谱分离	8
实验二 毛细管气相色谱法直接进样分离白酒中微量香味化合物	11
实验三 RP-HPLC 等梯度洗脱分离水溶性维生素(Vitamin) B_6 、 B_1 及 B_{12}	13
第三章 色谱基本理论	18
实验一 有关色谱参数的测试及计算	18
实验二 组分色谱流出曲线极大点浓度的测量	23
实验三 Van Deemter 方程图解曲线绘制及其主要变形因素(D_g 、 K' 等)的影响	26
实验四 色谱柱温度对分离度的影响	29
第四章 填充柱气相色谱法	33
实验一 气-液填充色谱柱的制备及评价	33
实验二 煤气中氧、氮、一氧化碳、甲烷的分离测定	37
实验三 烷基苯中痕量水的测定	39
实验四 食品中山梨酸、苯甲酸的测定	42
实验五 水中苯系物的测定	45
实验六 巴比妥酸类催眠药物的测定	48

实验七 新型氧化铝填充毛细管柱分离测定丙烯中 C_1-C_4 烃	56
第五章 毛细管柱气相色谱法	53
实验一 毛细管柱安装及基本性能评价指标的测定与计算	53
实验二 轻石脑油的分析	55
实验三 毛细管气相色谱法测定风油精中樟脑、薄荷脑和水杨酸甲酯的含量	57
实验四 毛细管气相色谱法测定食品、饮料中的氨基酸	59
实验五 毛细管气相色谱法测定环境试样中的有机污染物	62
第六章 裂解气相色谱法	65
实验一 羟乙基淀粉的裂解气相色谱分析	65
实验二 二元共聚物裂解气相色谱的分析及鉴定	66
实验三 裂解气相色谱法研究石蜡	68
实验四 丙烯酸酯类高分子品呈色剂的裂解气相色谱分析	69
第七章 程序升温气相色谱法	72
实验一 轻油中单体烃的程序升温气相色谱分析	72
实验二 PTGC法分离白酒中醇、酯、醛多元混合物	73
第八章 气相色谱检测器	77
实验一 热导检测器 (TCD) 基本性能指标的测定	77
实验二 氢火焰离子化检测器 (FID) 基本性能指标的测量	79
实验三 TCD和 FID 线性范的测量	82
实验四 蔬菜水果中农药残留量的测定	84
第九章 气相色谱分析方法实验	88
实验一 保留值定性	88
实验二 保留指数定性	89
实验三 白酒中醇、酯类成分定性分析-GC/MS 法	90
实验四 柱上选择性除去法定性	93
实验五 峰面积及校正因子的测量	94
实验六 内标法定量分析 (聚苯乙烯中苯乙烯、乙苯的分析)	96
实验七 煤油成分的分析——归一化法	98

实验八	混合酚样品中邻甲酚的测定——叠加法	99
第十章	高效液相色谱法实验技术	101
实验一	HPLC柱填充技术和柱性能考察	101
实验二	HPLC几个基本实验技术	105
实验三	二元梯度洗脱与恒定洗脱对比	108
实验四	HPLC制备纯组分技术	110
第十一章	HPLC分析方法实验	113
实验一	反相离子对色谱分离水溶性维生素	113
实验二	反相离子对色谱中 t_M 的测定	114
实验三	HPLC分离血清中的皮质醇和皮质酮	116
实验四	HPLC分离测定血清中多种抗癫痫药物	117

习 题 部 分

第一章	气相色谱实验技术	121
	思考题	121
第二章	色谱法概论	122
	思考题	122
第三章	色谱基本理论	123
	例题	123
	思考题与习题	127
第四章	填充柱气相色谱法	135
	思考题	135
第五章	毛细管柱气相色谱法	137
	思考题与习题	137
第六章	裂解气相色谱法	138
	思考题与习题	138
第七章	程序升温气相色谱法	139
	思考题与习题	139
第八章	气相色谱检测器	140

	例题.....	140
	思考题与习题.....	141
第九章	气相色谱分析方法.....	144
	例题.....	144
	思考题与习题.....	145
第十章	液相色谱法概论.....	148
	例题.....	148
	思考题与习题.....	150
	参考文献.....	153

实 验 部 分

第一章 气相色谱实验技术

常用色谱备件使用方法

一、载气钢瓶的使用规程

在气相色谱分析中，载气一般由高压气瓶（即钢瓶）供给。钢瓶内所贮气体在外壳上都有明显标记，如氮气，瓶外漆黑色，用黄色标写“氮”；氢气漆深绿色，红色标写“氢”；空气漆黑色，白色标写“空气”。钢瓶在使用时应注意下列事项：

1. 钢瓶必须分类保管，直立要固定，远离热源，避免暴晒及强烈震动，室内存放瓶量不得超过2瓶。
2. 氧气瓶及专用工具严禁与油类接触。
3. 钢瓶上选用的氧气表要专用，安装时螺扣要上紧。
4. 操作时严禁敲打，发现漏气须立即修好。
5. 用后气瓶的剩余残压不应少于980kPa。
6. 氢气减压表系反螺纹，安装拆卸时应予注意，防止损坏螺纹。

二、减压阀的使用及注意事项

在气相色谱分析中，钢瓶供气的初始压力在9.8—14.7MPa之间，使用时须加减压阀控制输出压力。在使用减压阀时应注意：

1. 减压阀应与钢瓶配套使用，不同气体钢瓶所用的减压阀是不同的，不能乱用。氧气减压阀严禁接触油脂，以免发生火警事故。氢气减压阀接头为反向螺纹，安装时需小心。使用前应将钢瓶接口和减压阀接头上灰尘物清除后才能安装，使用时需缓慢调节手轮，使用后

必须旋松调节手轮和关闭钢瓶阀门。

2. 连接口可加铅或石棉纸垫圈，以保证密封。

3. 输出气体时，先把减压阀关闭(逆时针旋转松开调节螺杆)，适当地开启钢瓶阀门(按阀门上箭头标示方向)。要注意不要站立在减压阀正面及钢瓶出气口前，并应慢慢开启。此时，高压压力表显示钢瓶内气体压力，然后顺时针顶紧调节螺杆，使低压压力表指示在需输出的压力。

4. 关闭气源时，先关闭减压阀，后关闭钢瓶阀门，再开启减压阀，排出减压阀内气体，最后松开调节螺杆。

三、微量注射器的使用及注意事项

气相色谱分析中常用注射器手动进样。气体试样一般使用0.25, 1, 2, 5ml等规格的医用注射器，液体试样则使用1, 5, 10, 50, 100 μ l等规格的微量注射器。使用时应注意：

1. 注射器是易碎器械，使用时应多加小心，不用时要洗净放入盒内，不要随便玩弄，来回空抽，特别是在将干未干情况下来回拉动，否则会严重磨损，损坏其气密性，降低准确度。

2. 注射器在使用前后都须用丙酮等溶剂清洗，当试样中高沸点物质玷污注射器时，一般可用下列溶液依次清洗，5% 氢氧化钠，水溶液，蒸馏水，丙酮，氯仿，最后用泵抽干，不宜使用强碱性溶液洗涤。

3. 对于10—100 μ l的注射器，如遇针尖堵塞，宜用直径为0.1mm的细钢丝耐心穿通，不能用火烧的方法，防止针尖退火而失去穿刺能力。

4. 若不慎将注射器芯子全部拉出，则应根据其结构小心装配。

5. 硅橡胶密封垫圈在几十次进样后，容易漏气，需及时更换。

6. 用注射器取液体试样，应先用少量试样洗涤几次或将针头插入试样反复抽排几次，再慢慢抽入试样，并稍多于需要量。如内有气泡则将针头朝上，使气泡上升排出，再将过量的试样排出，用无棉的

纤维纸（如擦镜纸）吸去针尖外所沾试样。注意切勿使针头内的试样流失。

7. 取气体试样也应先洗涤注射器，取样时应将注射器插入有一定压力的试样气体容器中使注射器芯子慢慢自动顶出，直至所需体积以保证取样正确。

8. 取好样后应立即进样，进样时，注射器应与进样口垂直，针尖刺穿硅橡胶垫圈，插到底后迅速注入试样，完成后立即拔出注射器，整个动作应进行得稳当、连贯、迅速。针尖在进样器中的位置、插入速度、停留时间和拔出速度等都会影响进样的重复性，操作时应注意。

9. 医用注射器进气体试样时，应防止注射器芯子位移，可用拿注射器的右手食指卡在芯子与外管的交界处，以固定它们的相对位置，从而保证进样量的准确。

实验一 填充柱气相色谱进样技术练习

一、实验目的

1. 熟悉填充柱色谱仪进样系统结构。
2. 掌握微量注射器的使用方法。
3. 练习进样技术。

二、仪器与试剂

1. 仪器 103型气相色谱仪，上海分析仪器厂。
2. 试剂 甲乙酮、环己烷、苯，均为色谱纯或优级纯。

三、实验步骤

1. 色谱条件 柱：2m× ϕ 3mm 不锈钢柱；载体：硅烷化白色载体（60—80目）；固定液：DNP；配比：20:100；柱温 $T_c=90^\circ\text{C}$ ；检测温度 $T_d=90^\circ\text{C}$ ；气化温度 $T_b=130^\circ\text{C}$ ；氢火焰检测器。

2. 操作：

(1) 调整仪器，使其正常运行；

(2) 用 $1\mu\text{l}$ 注射器分别取 $0.1\mu\text{l}$ 三种纯物质, 多次进样, 观察同一物质相同进样量情况下色谱峰重现性;

(3) 将三种物质按一定比例混合, 制成混合样, 用 $10\mu\text{l}$ 注射器进样 $1\mu\text{l}$, 多次进样观察每次进样时色谱峰重现情况。

四、问题讨论

1. 为什么有时同一样品同一进样量时色谱峰形(如峰高)不同?

2. 为什么有时进样后不出峰?

五、注意事项

1. 取好样后应立即进样, 进样时整个动作应稳当、连贯、迅速。

2. 硅橡胶密封垫圈在几十次进样后, 容易漏气, 需及时更换。

实验二 毛细管气相色谱进样技术比较

一、实验目的

1. 熟悉毛细管色谱常用的进样技术。
2. 比较常用的三种进样方式的优缺点。

二、仪器与试剂

1. 仪器 Varian-6000气相色谱仪; 配分流/不分流进样器, Varian-北京分析仪器厂; 另备有冷柱头进样器 OCT-3, 澳大利亚SGE公司。

2. 试剂 甲苯、萘、芘、蒽、菲, 均为色谱纯或优级纯。

三、实验条件

1. 实验条件 柱: SE-54SCOT ($\phi 0.3\text{mm} \times 19\text{m}$); 载气: 高纯氮, 线速度 $10-20\text{cm/s}$; 氢气: 线速度 $40-100\text{cm/s}$; 程序升温: $70-100^\circ\text{C} \xrightarrow{5-6^\circ\text{C}/\text{min}} 290^\circ\text{C}$; 氢火焰检测器, 进样量 $2\mu\text{l}$ 。

2. 实验样品 以甲苯为溶剂, 用分析天平精确称量萘、芘、蒽、菲, 使其浓度为 $1-100\mu\text{g/ml}$, 配成混合试样。

3. 操作:

取实验样品, 分别以分流、不分流及冷柱头三种方式进样, 以萘、芴的相对保留时间为基准, 考察三种进样方式的定性精度。

(1) 取混合样, 以分流进样方式进样 4 次, 每次都求出萘、芴的相对保留时间, 然后计算 4 次进样的相对标准偏差。

(2) 取混合样, 以不分流进样方式重复以上操作。

(3) 取混合样, 以冷柱头进样方式重复以上操作。

(4) 比较三种进样方式的相对标准偏差。

四、问题讨论

1. 毛细管色谱为什么要采用分流进样?

2. 分流不分流进样的原理是什么?

3. 冷柱头进样的原理是什么?

实验三 样品化学衍生生物的制取

——硝酸根衍生化为硝基苯

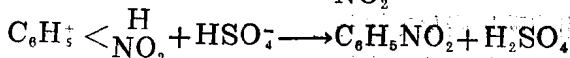
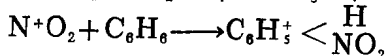
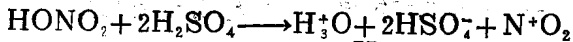
一、实验目的

1. 了解无机离子转化为有机衍生物的途径。

2. 熟悉衍生化反应的操作。

二、基本原理

利用硝酸根在硫酸存在下与苯反应生成硝基苯, 从而把硝酸根转化为可进行气相色谱分析的确基苯。基本反应式为:



以硝基苯气相色谱行为计算其对应的硝酸根。

三、仪器与试剂

1. 仪器 104型气相色谱仪(电子捕获检测器), 上海分析仪器厂。

2. 试剂 苯：优级纯；硝酸钾：分析纯；硫酸：优级纯；硝基苯：色谱纯或优级纯。

四、实验步骤

1. 硝酸根标准溶液的配制 称取0.7218g 烘干后的硝酸钾，用重蒸去离子水稀至1L，取10ml此溶液再用去离子水稀至1L，即得硝酸根标准溶液。

2. 衍生化操作 取标准溶液1ml于10ml带塞试管中，加入2ml浓硫酸，再加入1ml苯，摇动5min，静止分层后，苯层清液即为硝基苯溶液。

3. 色谱定性

(1) 色谱条件 $\phi 3\text{mm} \times 1.6\text{m}$ 玻璃柱，硅烷化 ChromSorbw 载体 (60—80目)，涂2%OV—17；高纯氮载气，流速60ml/min， $T_c=150^\circ\text{C}$ ； $T_i=200^\circ\text{C}$ ； $T_o=200^\circ\text{C}$ 。

(2) 操作 取制备液5 μl 进样，记录硝基苯保留时间；取1mg/l硝基苯标准溶液5 μl ，进样，记录保留时间，比较两次进样所得峰保留时间，从而确定硝基苯的生成。

五、问题讨论

1. 本衍生反应速度与哪些因素有关？
2. 硝化反应应注意哪些问题？

实验四 样品化学衍生物的制备 ——脂肪酸甲酯衍生物的制备

一、实验目的

1. 了解脂肪酸甲酯化方法的原理。
2. 掌握脂肪酸甲酯化的方法与操作。

二、基本原理

对于 C_1-C_6 的一元脂肪酸，采用以四甲基氢氧化铵中和各酸，使之生成对应的羧酸盐，羧酸盐在二甲基乙酰胺非质子极性溶剂中，

于室温下与碘甲烷通过 S_N2 亲核取代反应生成各酸对应的甲酯。

三、仪器与试剂

1. 仪器 SC—6气相色谱仪，四川分析仪器厂。
2. 试剂 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸及其甲酯、四甲基氢氧化铵、碘甲烷、二甲基乙酰胺，均为色谱纯或分析纯。

四、实验步骤

1. 衍生化操作：

(1) 在分析天平上准确称量各标准酸，以30%丙酮水溶液定容，使各酸浓度为1mg/ml；

(2) 取上述溶液1ml置于直径50mm的蒸发皿中，加数毫升30%丙酮水溶液稀释后，立即以0.1M四甲基氢氧化铵溶液中和至pH呈8.5—9.0。蒸发皿于沸水浴上蒸干，冷却至室温以约2ml二甲基乙酰胺分次溶解剩余盐类，合并溶液于一干燥洁净的具塞试管中，加入1.5倍上述中和时所消耗四甲基氢氧化铵摩尔数的碘甲烷，紧塞、摇匀，室温下静置约30min，上层清液为色谱分析试样。

2. 色谱定性：

(1) 色谱条件 2m× ϕ 3mm不锈钢柱，80—100目6201红色载体，15%邻苯二甲酸二壬酯与5%吐温—80混合固定液。

Tc=100℃；进样温度：150℃；Ti=120℃；

载气：N₂，35ml/min；H₂，40ml/min；空气，500ml/min。

(2) 操作 取衍生化后样品进样，记录各组分峰的保留时间。然后取各标准脂肪酸甲酯样品，配成1mg/ml浓度标准样，进样后记录各标准酯保留时间。然后与衍生化样品对照，进行定性。

五、问题讨论

1. 为了使酯化反应更彻底，四甲基氢氧化铵用量以使pH高于8.5为宜。稍过量的四甲基氢氧化铵会在以后的蒸发过程中分解成甲醇和三甲胺被除去，对酯生成反应无影响。

2. 酯化反应时间应在30min以上。

第二章 色谱法概论 (演示)

实验一 C₅—C₁₄脂肪醇混合物的 填充气相色谱分离

一、目的要求

1. 通过本演示实验使学生了解填充气相色谱法的分离原理。
2. 加深色谱法定义及基本概念的理解。
3. 通过具有一定极性的较难分离的脂肪醇混合样品之分离, 使学生对填充柱效有一定认识, 加深对色谱热力学过程和动力学过程的宏观理解。
4. 通过对分子量较大、沸程较宽、挥发性较差的多元混合组分分离, 使学生对填充柱的选择性和分离度有所理解。

二、基本原理

本实验基本原理在于性质不同的C₅—C₁₄脂肪醇同系物, 与同一强极性FFAP固定液分子间发生亲和性的相互作用力, 从而固定相对组分分子产生了保留作用。由于各组分分子极性不同, 分子大小不同, 则固定相对它们的保留值不同。在流动相(气体)不断地冲洗下, 各组分在柱中的移动速率产生了差别, 使它们彼此拉开了距离, 最终以不同时间流出色谱柱, 进而达到多元混合组分分离。本实验较理想的色谱图, 见图2-1-1。

三、仪器与试剂

1. 仪器 气相色谱仪 (SP-501N, 103型GC仪或其他类型)一套; 氢火焰离子化检测器 (FID); 色谱数据处理机或记录仪一台; 氢气发生器或氢气钢瓶一件; 氮气钢瓶一个; 空气泵一台 (2XZ-02型); 电子交流稳压器 (2kVA以上) 一台; 2000mm×φ4mm不锈钢色谱柱或玻璃柱两根; 5μl或10μl微量注射器一支。