

高等医药院校教材

# 仪器分析实验指导

黄丽英 主编



厦门大学出版社  
XIAMEN UNIVERSITY PRESS

国家一级出版社  
全国百佳图书出版单位

# 仪器分析实验指导

主 编 黄丽英

副主编 陈敬华

厦门大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

仪器分析实验指导/黄丽英主编. —厦门:厦门大学出版社, 2014. 1

ISBN 978-7-5615-4889-9

I. ①仪… II. ①黄… III. ①仪器分析-实验-高等学校-教学参考资料

IV. ①O657-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 004513 号

厦门大学出版社出版发行

(地址:厦门市软件园二期望海路 39 号 邮编:361008)

<http://www.xmupress.com>

[xmup@xmupress.com](mailto:xmup@xmupress.com)

南平市武夷美彩印中心印刷

2014 年 1 月第 1 版 2014 年 1 月第 1 次印刷

开本:720×970 1/16 印张:7.75

字数:130 千字 印数:1~3 000 册

定价:19.00 元

本书如有印装质量问题请直接寄承印厂调换

## 前 言

分析化学分为化学分析和仪器分析,现代分析主要以仪器分析为主,它是一门实践性很强的学科。实验课在教学中占有十分重要的地位,在本课程教学中,许多院校安排的实验课教学时数与理论课相当,甚至更多。迄今为止,适用于高等院校药学、医学检验、临床医学(七年制)及预防医学专业的仪器分析实验教材极少,各校大多自编实验讲义供教学使用。因此编写一部适合于医学院校(不同于综合性大学的仪器分析实验教材)上述各专业的仪器分析实验教材是非常必要和迫切的。

本书根据药学、药剂、临床药学、检验、预防医学、基础医学和临床医学(七年制)各专业仪器实验教学基本要求,考虑当前学生的基础及专业设置、仪器设备等情况,在多年仪器分析实验改革和研究取得的成果基础上,借鉴国内外高校在分析化学实验改革方面的经验,吸收现代仪器分析最新研究成果,精心编写而成。

编写过程,坚持紧紧围绕上述各专业教育和人才培养目标要求,突出各专业的特色,以新的教学大纲为基础,强调培养目标和用人要求相结合,特别强调注重学生的创新意识和实践能力培养,注重教材整体优化,提高教材的适应性和可读性,更好地满足教学的需要。为了便于学生学习和教师授课,编写形式上有所创新,采用了“模块化编写”。另外,由于实验室不可能购置多套同类仪器设备,一般多采用轮转的方式做仪器分析实验,实验进度与讲课通常不能同步进行。在这种情况下,对实验前的预习就提出更高的要求。本书在每章的开头,扼要介绍某类仪器分析的基本原理和特点,并且在每个实验之前,再进一步阐明该实验的要点,以便于读者自学。全书共分为 10 章,由仪器及基础实验、综合设计实验、外文实验四个部分组成,共包含 39 个实验。每个实验包括实验目的、实验原理、仪器与试剂、实验内容、实验数据记录及处理、思考题等内容。

本书由黄丽英(第九章、第十章)、陈敬华(第一章、第二章、第三章)、雷云

(第四章、第八章)和彭花萍(第五章、第六章、第七章)通力协作编写而成。在编写过程中得到福建医科大学药物分析系全体同仁全力支持,对此表示诚挚的谢意。

由于编者水平有限,书中难免存在错误和不妥之处,恳请专家和读者不吝批评指正。

**编 者**

2013 年 12 月

## 目 录

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 第一章 紫外—可见分光光度法                                 | 1  |
| 1.1 概述                                         | 1  |
| 1.2 实验部分                                       | 2  |
| 实验一 邻菲罗啉分光光度法测定铁(可见分光光度法)                      | 2  |
| 实验二 亚硝酸盐含量的测定(可见分光光度法)                         | 7  |
| 实验三 胶束增溶分光光度法测定水中微量镉(可见分光光度法)                  | 10 |
| 实验四 废水中酚的测定(4-氨基安替比林法)                         | 13 |
| 实验五 维生素 B <sub>12</sub> 注射液的定性鉴别及含量测定(紫外分光光度法) | 16 |
| 实验六 萃取法分离—紫外分光光度法测定复方乙酰水杨酸<br>药片中各组分的含量        | 19 |
| 第二章 分子荧光分析法                                    | 24 |
| 2.1 概述                                         | 24 |
| 2.2 实验部分                                       | 24 |
| 实验七 维生素 B <sub>2</sub> (核黄素)的测定(荧光光度法)         | 24 |
| 实验八 荧光分光光度法测定秦皮乙素含量                            | 29 |
| 实验九 荧光分光光度法测定牛血清白蛋白含量                          | 31 |
| 实验十 奎宁的荧光特性和含量测定                               | 33 |
| 第三章 原子吸收分光光度分析                                 | 36 |
| 3.1 概述                                         | 36 |
| 3.2 实验部分                                       | 37 |
| 实验十一 原子吸收分光光度法测定自来水中钙、镁的含量                     | 37 |
| 实验十二 人体血清中铜、锌含量的测定                             | 41 |
| 实验十三 黄酒中铜、镉含量的测定(原子吸收分光光度法)                    | 43 |

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| 实验十四 石墨炉原子吸收光谱法测定血清中的痕量铬 .....           | 47        |
| <b>第四章 电感耦合等离子体原子发射光谱法 .....</b>         | <b>50</b> |
| 4.1 概述 .....                             | 50        |
| 4.2 实验部分 .....                           | 51        |
| 实验十五 电感耦合等离子体发射光谱法测定水中镉离子含量 .....        | 51        |
| 实验十六 电感耦合等离子体发射光谱法测定人发中微量 Cu、Fe、Zn ..... | 55        |
| <b>第五章 化学发光分析法 .....</b>                 | <b>58</b> |
| 5.1 概述 .....                             | 58        |
| 5.2 实验部分 .....                           | 59        |
| 实验十七 化学发光法测定食品中的绿原酸 .....                | 59        |
| 实验十八 化学发光法测定污水中的苯酚 .....                 | 61        |
| <b>第六章 电位法和永停滴定法 .....</b>               | <b>65</b> |
| 6.1 概述 .....                             | 65        |
| 6.2 实验部分 .....                           | 66        |
| 实验十九 饮用水中氟含量的测定(离子选择性电位法) .....          | 66        |
| 实验二十 氯化钠与碘化钠混合物的电位连续滴定(电位滴定法) ...        | 70        |
| 实验二十一 亚硝酸钠标准溶液的配制与标定(永停滴定法) .....        | 74        |
| 实验二十二 盐酸普鲁卡因注射液的重氮化滴定 .....              | 76        |
| <b>第七章 薄层色谱法 .....</b>                   | <b>79</b> |
| 7.1 概述 .....                             | 79        |
| 7.2 实验部分 .....                           | 80        |
| 实验二十三 薄层色谱法定性分析氨基酸 .....                 | 80        |
| 实验二十四 薄层色谱扫描法测定苯甲酸和山梨酸含量 .....           | 82        |
| <b>第八章 气相色谱法 .....</b>                   | <b>85</b> |
| 8.1 概述 .....                             | 85        |
| 8.2 实验部分 .....                           | 85        |

|               |                                                                                                               |            |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 实验二十五         | 苯、甲苯、二甲苯同系物的气相色谱法测定 .....                                                                                     | 85         |
| 实验二十六         | 气相色谱内标法测定白酒中乙酸乙酯含量 .....                                                                                      | 87         |
| 实验二十七         | 气相色谱法测定蔬菜中有机磷农药残留量 .....                                                                                      | 90         |
| 实验二十八         | 气相色谱—质谱联用测定尿样中类固醇兴奋剂 .....                                                                                    | 92         |
| <b>第九章</b>    | <b>高效液相色谱法 .....</b>                                                                                          | <b>95</b>  |
| 9.1           | 概述 .....                                                                                                      | 95         |
| 9.2           | 实验部分 .....                                                                                                    | 96         |
| 实验二十九         | 高效液相色谱法分析食品中的糖精钠 .....                                                                                        | 96         |
| 实验三十          | 高效液相色谱法测定食品中的维生素 C .....                                                                                      | 99         |
| 实验三十一         | 内标对比法测定对乙酰氨基酚 .....                                                                                           | 101        |
| 实验三十二         | 外标法测定阿莫西林 .....                                                                                               | 103        |
| 实验三十三         | 高效液相色谱法测甲硝唑片剂中甲硝唑的含量 .....                                                                                    | 105        |
| 实验三十四         | 液相色谱—质谱联用法测定水中五氯酚 .....                                                                                       | 108        |
| <b>第十章</b>    | <b>设计实验 .....</b>                                                                                             | <b>113</b> |
| 10.1          | 概述 .....                                                                                                      | 113        |
| 10.2          | 实验部分 .....                                                                                                    | 114        |
| 实验三十五         | 盐酸奥布卡因的定量分析 .....                                                                                             | 114        |
| 实验三十六         | 酒中甲醇含量的测定 .....                                                                                               | 115        |
| 实验三十七         | 头发中微量元素的测定 .....                                                                                              | 115        |
| 实验三十八         | 血清中氯离子含量的测定 .....                                                                                             | 115        |
| Experiment 39 | Determination of quinine and sodium benzoate<br>in tonic water by uv absorbance spectroscopy<br>or HPLC ..... | 115        |

# 第一章 紫外—可见分光光度法

## 1.1 概述

当以一定波长的单色光照射吸光物质溶液时,由于吸光物质分子吸收一部分光能,使透射光的强度减弱,记录照射前、后光强度随波长的变化情况,即可得到该物质的吸收光谱。因为各种物质分子的组成和结构上的差异,它们的吸收光谱也不相同。可见光分光光度法就是利用物质分子对光的选择性吸收进行定量测定的分析方法。

朗伯—比耳定律是光吸收的基本定律,也是分光光度法的定量依据,朗伯—比耳定律的数学表达式为

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon bc$$

式中,  $A$ —吸光度;

$I_0$ —为入射光强度;

$I$ —透射光的强度;

$\epsilon$ —摩尔吸光系数,  $\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;

$b$ —物质吸收层的厚度,  $\text{cm}$ ;

$c$ —物质的浓度,  $\text{mol/L}$ 。

根据朗伯—比耳定律,许多物质的浓度都可通过测量吸光度的方法进行测定。特别是有些物质的摩尔吸光系数  $\epsilon$  比较大,因此分光光度法测定的灵敏度比较高,适合于微量分析。与其他仪器分析方法所需设备相比,分光光度计结构简单,价格较低廉,操作也简便,它是目前各分析实验室中使用最为普遍的一种分析仪器,所以分光光度法是广泛运用的一种分析方法。

## 1.2 实验部分

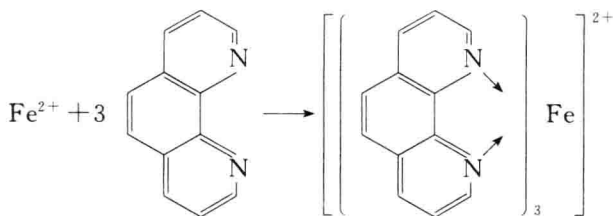
### 实验一 邻菲罗啉分光光度法测定铁 (可见分光光度法)

### 一、实验目的

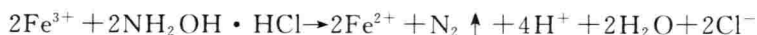
1. 熟悉分光光度法测定铁的原理和方法。
2. 通过测定铁的条件实验,掌握分光光度法测定铁的条件及方案的拟定方法。
3. 掌握标准曲线法的定量分析原理。
4. 掌握分光光度计的使用方法。

## 二、实验原理

邻菲罗啉是测定微量铁的一种较好显色剂,在 pH 2~9 的溶液中能与  $\text{Fe}^{2+}$  离子生成稳定的红色配合物,显色反应如下:



所生成的红色配合物的最大吸收峰在 510 nm 波长处, 其  $\lg K_{\text{稳}} = 21.3$ , 摩尔吸光系数  $\epsilon_{510} = 1.1 \times 10^4$ , 反应灵敏, 且在一定浓度范围内 (含铁 0.5 ~ 8 mg/L), 浓度与吸光度之间的关系符合 Beer 定律, 适用于微量测定。当铁为三价时, 可用盐酸羟胺还原, 反应式如下:



显色反应的适宜 pH 值范围很宽(2~9),酸度过高( $\text{pH} < 2$ )反应进行较慢;若酸度过低, $\text{Fe}^{2+}$ 离子将水解。

邻菲罗啉与  $\text{Fe}^{2+}$  离子反应的选择性很高,相当于含铁量 5 倍的  $\text{Co}^{2+}$

$\text{Cu}^{2+}$  离子, 20 倍量的  $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{V}^{5+}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  离子, 甚至 40 倍量的  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ 、 $\text{Sn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  离子等均不干扰测定。

### 三、仪器与试剂

仪器 分光光度计; 移液管 10、25 mL; 量筒 5、500 mL; 容量瓶 50、250 mL; 吸量管 1、5、10 mL; pH S-3B 型酸度计。

试剂  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (A. R), 铁标准溶液 ( $c_{\text{Fe}^{3+}} = 10 \mu\text{g/mL}$ ); 10% 盐酸羟胺水溶液 (临用新配); 0.1% 和 0.02% ( $\approx 0.001 \text{ mol/L}$ ) 邻菲罗啉水溶液 (临用新配); 1 mol/L NaAc 缓冲溶液; 0.1 mol/L HCl 的溶液; 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液; 广泛 pH 试纸和不同范围的精密 pH 试纸。

### 四、实验步骤

#### 1. 铁标准溶液配制

(1) 铁标准溶液 ( $c_{\text{Fe}^{3+}} = 10 \mu\text{g/mL}$ )

准确称取 0.2159 克  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  于小烧杯中, 加入  $c(\text{HCl}) = 0.1 \text{ mol/L}$  溶解后移入 250 mL 容量瓶中并以此盐酸稀释至刻度, 摇匀, 所得溶液  $c_{\text{Fe}^{3+}} = 100 \mu\text{g/mL}$ 。然后吸取上述溶液 25.00 mL 置于 250 mL 容量瓶中, 加入  $c(\text{HCl}) = 0.1 \text{ mol/L}$  溶液稀释至刻度, 摇匀。此时溶液  $c_{\text{Fe}^{3+}} = 10 \mu\text{g/mL}$ 。

(2) 铁标准溶液 ( $C_{\text{Fe}^{3+}} = 0.001 \text{ mol/L}$ )

准确称取 0.4822 克  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  于小烧杯中, 加入  $c(\text{HCl}) = 0.1 \text{ mol/L}$  溶液溶解后移入 1 L 容量瓶中并以此盐酸稀释至刻度, 摇匀。此溶液  $c_{\text{Fe}^{3+}} = 0.001 \text{ mol/L}$ 。

#### 2. 条件实验

(1) 吸收曲线的绘制

用吸量管分别准确吸取  $10 \mu\text{g/mL}$  铁标准溶液 0.00、2.00 mL 于 50 mL 容量瓶中, 依次各加入 1 mL 10% 盐酸羟胺溶液、5.00 mL NaAc 溶液和 5 mL 0.1% 邻菲罗啉溶液, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀。放置 10 分钟, 以不加铁的试剂空白溶液为参比溶液, 用不同波长, 从 440~500 nm、520~570 nm 每隔 10 nm 测定一次吸光度, 500~520 nm 每隔 2 nm 测定一次吸光度。然后以波长为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制吸收曲线, 吸收曲线上选择最大吸收波长  $\lambda_{\text{max}}$  作为测定波长。

### (2) 邻菲罗啉铁配合物的稳定性

按照上述方法配制,加入邻菲罗啉显色剂,记下容量瓶稀释至刻度后的时刻( $t=0$ ),立即在最大吸收波长(510 nm)处,以相应的试剂溶液为参比溶液测定吸光度。然后依次测定放置 15、30、60 和 90 分钟时的溶液的吸光度。以时间( $t$ )为横坐标,吸光度( $A$ )为纵坐标,绘制  $A-t$  曲线。从曲线上观察此配合物稳定情况。

### (3) 显色剂浓度的影响

用吸量管分别准确地加入 5.00 mL 10  $\mu\text{g/mL}$  铁标准溶液于 7 只 50 mL 容量瓶中,并分别依次加入 1 mL 10% 盐酸羟胺溶液、5 mL NaAc 溶液和分别为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 和 6.0 mL 的 0.1% 邻菲罗啉溶液,用蒸馏水分别稀释至刻度,摇匀。放置 10 分钟,以蒸馏水为参比溶液,在波长 510 nm 处测定上述各溶液的吸光度。然后以邻菲罗啉显色剂的毫升数为横坐标,相应的吸光度为纵坐标,绘制  $A-V$  曲线。根据曲线确定显色剂的适宜用量。

### (4) 溶液酸度对配合物的影响

用吸量管分别准确地加入 10.00 mL 10  $\mu\text{g/mL}$  铁标准溶液于 8 只 50 mL 容量瓶中,并各加入 1.0 mL 10% 盐酸羟胺溶液和 5 mL 0.1% 邻菲罗啉溶液,然后按表 1-1 分别加入  $c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$  或  $c(\text{NaOH})=0.1 \text{ mol/L}$  溶液,再分别用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。放置 10 分钟,用 1 cm 比色皿,并以蒸馏水作参比,在波长 510 nm 处测定各溶液的吸光度。最后以 pH 值为横坐标,相应的吸光度为纵坐标,绘制  $A-\text{pH}$  曲线。根据曲线确定进行测定的适宜 pH 范围。

表 1-1 分别加入  $c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$  或  $c(\text{NaOH})=0.1 \text{ mol/L}$  溶液的体积

| 编号                         | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8    |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| $V(\text{HCl})/\text{mL}$  | 2.0 | 1.0 | 0.5 |     |     |     |     |      |
| $V(\text{NaOH})/\text{mL}$ |     |     | 0.0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 5.0 | 10.0 |

根据上面条件实验的结果,拟出邻菲罗啉分光光度法测定铁的分析最优条件并讨论之。

| $\lambda_{\text{max}}$ | 显色剂用量/mL | pH | $t/\text{min}$ | $T/^{\circ}\text{C}$ |
|------------------------|----------|----|----------------|----------------------|
|                        |          |    |                |                      |

## 3. 铁含量的测定

## (1) 标准曲线的绘制

用吸量管分别准确地吸取 10  $\mu\text{g/mL}$  铁标准溶液 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 和 7.00 mL 于 8 只 50 mL 容量瓶中,依次各加入 1 mL 10% 盐酸羟胺溶液、5 mL NaAc 溶液和 5 mL 0.1% 邻菲罗啉溶液,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。放置 10 分钟,以不加铁的试剂空白溶液为参比溶液,在分光光度计上,选定波长 510 nm 处分别测定各溶液的吸光度。以铁含量为横坐标,相应的吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

## (2) 水样中微量铁的测定

以井水、河水或自来水为样品,准确吸取澄清水样 5.0 mL(或适量)置于 50 mL 容量瓶中,按上述制备标准曲线的方法配制溶液并测定其吸光度。最后根据水样的吸光度,在标准曲线上查出水样中铁的含量。

## 4. 配合物组成的测定——摩尔比法

取 9 只 50 mL 容量瓶中,各加入 1 mL  $c(\text{Fe}^{3+})=0.001 \text{ mol/L}$  标准溶液,并分别依次加入 1 mL 10% 盐酸羟胺溶液、5 mL NaAc 缓冲溶液和各为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0 mL 0.02% 邻菲罗啉溶液,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。放置 10 分钟,然后在波长 510 nm 处,以蒸馏水为参比溶液测定各溶液的吸光度。以吸光度对  $c_R/c_{\text{Fe}}$  作图,根据曲线上前后两部分延长线的交点位置确定  $\text{Fe}^{2+}$  离子与邻菲罗啉反应的配位比。

## 五、数据处理

## 1. 将分析结果填入下表

## (1) 吸收曲线

|                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 波长 $\lambda/\text{nm}$ | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 502 | 504 | 506 | 508 | 510 | 512 | 514 |
| 吸光 $A$                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 波长 $\lambda/\text{nm}$ | 516 | 518 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 |     |     |     |     |     |
| 吸光 $A$                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

## (2) 邻菲罗啉配合物的稳定性

|                     |   |    |    |    |    |
|---------------------|---|----|----|----|----|
| 放置时间 $t/\text{min}$ | 0 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| 吸光度 $A$             |   |    |    |    |    |

(3) 显色剂浓度的影响

| 编号      | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 显色剂量/mL | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 4.0 | 5.0 | 6.0 |
| 吸光度 A   |     |     |     |     |     |     |     |

(4) 溶液酸度对配合物的影响

| 编号    | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH 值  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 吸光度 A |   |   |   |   |   |   |   |   |

(5) 标准曲线与铁含量的测定

| 铁标准溶液体积/mL         | 0.0 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 4.0 | 5.0 | 6.0 | 7.0 | 水样(5.0 mL) |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| 总铁量/ $\mu\text{g}$ |     |     |     |     |     |     |     |     |            |
| 吸光度 A              |     |     |     |     |     |     |     |     |            |

## 2. 绘图与计算

(1) 吸收曲线  $A-\lambda$ ; (2)  $A-t$  曲线; (3)  $A-V_R$  曲线, (4)  $A-\text{pH}$  曲线; (5) 标准曲线; (6)  $A$ -摩尔比曲线。

(2) 根据水样的吸光度, 计算水样中铁的含量

从标准曲线上查得水样中总铁微克数, 并以每 mL 水样中含铁微克数表示:

$$\text{水样的含铁量}(\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{总铁量}(\mu\text{g})}{V(\text{水样毫升数})}$$

## 六、注意事项

1. 盐酸羟胺水溶液不稳定, 临用新配。
2. 加入试剂的顺序不得更改。

## 七、思考题

1.  $\text{Fe}^{3+}$  离子标准溶液在显色前加盐酸羟胺的目的是什么? 如测定一般铁盐的总铁量, 是否需要加盐酸羟胺?

2. 在本实验的各项测定中,某种试剂加入量的容积要比较准确,而某种试剂则可不必,为什么?

3. 溶液的酸度对邻菲罗啉铁的吸光度影响如何?为什么?

4. 试拟出以邻菲罗啉分光光度法分别测定试样中微量  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  离子含量的分析方案。

## 实验二 亚硝酸盐含量的测定(可见分光光度法)

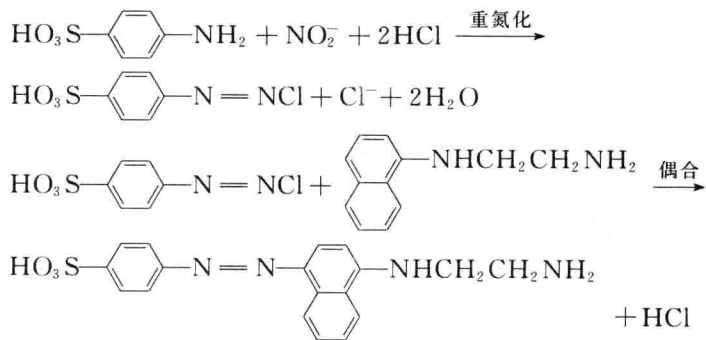
### 一、实验目的

1. 掌握分光光度法测定亚硝酸盐的原理。
2. 掌握分光光度计的使用方法。

### 二、实验原理

利用亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-$ )在酸性条件下与对氨基苯磺酸反应生成重氮盐,然后与 N-萘基乙二胺偶合生成红色偶氮化合物,其  $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$ 。

生成物红色的深度与亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-$ )含量成正比,通过与标准溶液比较即可测定  $\text{NO}_2^-$  的含量。



### 三、仪器与试剂

仪器 分光光度计;移液管 25 mL;量筒 5、500 mL;容量瓶 50、100、250 mL;吸量管 1、2、5 mL。

试剂  $\text{NaNO}_2$  (A. R.);0.3% N-萘基乙二胺溶液;0.5%对氨基苯磺酸溶液。

## 四、实验步骤

### 1. 试剂配制

(1)亚硝酸钠标准溶液的配制:将  $\text{NaNO}_2$  (A. R) 于硫酸干燥器中放置 24 小时后,准确称取 0.1500 克(相当于 0.1000 克  $\text{NO}_2^-$ )于小烧杯中,加蒸馏水溶解后转移到 250 mL 容量瓶中并稀释至刻度,摇匀,即得 400  $\mu\text{g/mL}$  的  $\text{NO}_2^-$  标准储备液。操作液:吸量管准确吸取 2.50 mL 上述储备液于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。此溶液  $C_{\text{NO}_2^-} = 10.00 \mu\text{g/mL}$ 。

(2)0.3% N-萘基乙二胺溶液:称取 0.3 克 N-萘基乙二胺,用 1% HCl 溶解并稀释至 100 mL,储于棕色瓶中,在冰箱内保存。

(3)1.0% 对氨基苯磺酸溶液:称取 1.0 克对氨基苯磺酸,用 20% HCl 溶解并稀释至 100 mL,储于棕色瓶中,在冰箱中保存。

### 2. 标准曲线的绘制

分别准确地吸取标准溶液(10.00  $\mu\text{g/mL}$ ) 0.0、0.30、0.60、0.90、1.20、1.50 mL 于 6 只 50 mL 容量瓶中,加入蒸馏水 30 mL,分别加入 1.0% 对氨基苯磺酸溶液 2 mL,摇匀;放置 3 分钟,再加入 5 mL 0.3% N-萘基乙二胺溶液并加水稀释至刻度,摇匀。放置 15 分钟,用 1.0 cm 比色皿,以试剂空白溶液为参比溶液,在波长 540 nm 处测定上述各溶液的吸光度,绘制标准曲线。

### 3. 水样中含量的测定

用移液管准确地吸取 25.00 mL 水样于 50 mL 容量瓶中,同上加显色剂并用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,放置 15 分钟后测定其吸光度。根据水样的吸光度在标准曲线上查得相应的浓度,并以  $\mu\text{g/mL}$  表示水样中的  $\text{NO}_2^-$  含量。

## 五、数据处理

### 1. 标准曲线与水样中 $\text{NO}_2^-$ 含量的测定

|                                        |     |     |     |     |     |     |           |
|----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|
| $\text{NO}_2^-$ 标准体积/mL                | 0.0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 水样(25 mL) |
| $\text{NO}_2^-$ 质量/ $\mu\text{g}$      |     |     |     |     |     |     |           |
| $C_{\text{NO}_2^-} / (\mu\text{g/mL})$ |     |     |     |     |     |     |           |
| 吸光度 A                                  |     |     |     |     |     |     |           |

## 2. 绘图与计算

(1)标准曲线的绘制:以标准曲线中  $\text{NO}_2^-$  的含量( $\mu\text{g}$  或  $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标,相应的吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

(2)水样中  $\text{NO}_2^-$  的含量的计算:根据水样的吸光度标准曲线上查得其相应的  $\text{NO}_2^-$  含量,并以每 mL 水样中含  $\text{NO}_2^-$  的质量表示:

$$\text{水样中NO}_2^- \text{ 含量}(\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{NO}_2^- \text{ 的总量}(\mu\text{g})}{V_{\text{水样}}} = \frac{50}{25} \times c_{\text{NO}_2^-}$$

## 六、注意事项

1. 样品中的亚硝酸盐含量务需当天及时测定,样品必须低温保存。
2. 样品中亚硝酸盐含量过低时,必须做到最大量[例如测定如下样品中  $\text{NO}_2^-$  含量时其最大取样量分别为:水样 40 mL;胃液(滤液)10 mL;蔬菜、粮食(滤液)40 mL],如最大取样量仍测定不出时,则为未检出。
3. 本方法可用于测定胃液、唾液、水、粮食和蔬菜中的  $\text{NO}_2^-$  含量。其样品处理如下:

(1)水:取水样 10~40 mL,若水浑浊应过滤,然后再用水冲洗,含量太高时,应稀释再取。

(2)胃液:取空腹胃液约 10 mL,离心(3000 转/分)5 分钟,(不够时,取 2.0~2.5 mL)于 25 mL 具塞比色管中,加 5 mL  $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$  缓冲溶液、1.5 mL 30%  $\text{ZnSO}_4$  溶液、1.5 mL 15%  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  溶液,剧烈振摇 30 秒左右,静置 5~10 分钟,经小漏斗滤入 25 mL 比色管中(定性滤纸不含硝酸盐、亚硝酸盐)。用少量去离子水洗比色管三次,每次洗液倾入漏斗,待流干后用水沿漏斗壁淋洗,流干后取去漏斗,加水稀释至刻度,摇匀后取 10 mL 测定其  $\text{NO}_2^-$  含量。

(3)蔬菜:称取鲜菜 50 克切碎,加 100 mL  $\text{HAc-NaAc}$  缓冲溶液在组织打碎机中打碎。称取 30 g 匀浆加入 20 mL  $\text{HAc-NaAc}$  缓冲溶液、5 mL 10%  $\text{Zn}(\text{Ac})_2$  溶液,振摇 30 秒(若泡沫多可加 1~2 滴戊醇),放置 30 分钟后过滤于 100 mL 容量瓶中,用去离子水少量多次冲洗,最后稀释至刻度,摇匀,取 10~40 mL 测定其  $\text{NO}_2^-$  含量。

(4)唾液:取空腹自然流出的唾液约 5 mL,离心(3000 转/分)5 分钟,取上清液 1~2 mL 于 100 mL 容量瓶中,用去离子水稀释至刻度,混匀后取 10~40 mL 测定其  $\text{NO}_2^-$  含量。