
现代有机仪器分析实验讲义

鞍山科技大学 化工学院实验中心

2004.6.16

编 委: (按章节顺序)

吴秀红 (第 1, 2 章)

于洪梅、曲敏 (第 3 章)

雷 芑 (第 4 章)

邹 萍 (第 5 章)

目 录

1. 气相色谱法	1
1.1 基本原理	1
1.2 气相色谱仪	1
1.3 Agilent 6890N GC 的使用方法	2
1.4 上分 122 GC 气相色谱仪的使用方法	6
1.5 上分 102 GC 气相色谱仪的使用方法	9
实验一 气相色谱柱的制备	10
实验二 醇系物的气相色谱分析	11
实验三 气相色谱法测定乙酸乙酯	12
2. 高效液相色谱法	13
2.1 基本原理	13
2.2 高效液相色谱	13
2.3 Agilent1100 HPLC 的使用方法	15
实验一 流动相流速对柱效的影响	17
实验二 高效液相色谱法测定茈萘和菲	18
实验三 反相高效液相色谱法测定水中的氟离子	19
3. 红外光谱法 (CAI 实验教学软件)	
4. 紫外-可见分光光度法 (CAI 实验教学软件)	
5. 离子阱质谱分析法	21
5.1 基本原理	21
5.2 仪器组成	22
5.3 质谱仪器的基本指标	23
5.4 实验步骤	25
5.5 实验讨论	26
6. 核磁共振波谱法	28
6.1 基本原理	28
6.2 Bruker advance 500MHz 核磁共振波谱仪	31
6.3 Bruker advance 500MHz 核磁共振波谱仪的使用方法	33
实验 测定未知样品的 ¹ H NMR	40
附图	41
图一 醇系物的测定	41
图二 乙酸乙酯和环己烷的测定	42
图三 高效液相色谱法测定茈萘和菲	43
图四 反相高效液相色谱法测定水中氟离子	44
图五 未知物的离子阱质谱图	45
图六 未知物的核磁共振谱图	47

1、 气相色谱法

1.1 基本原理

组分性质不同,在固定相上的溶解或吸附能力不同,即它们的分配系数大小不同。分配系数大的组分在固定相上的溶解或吸附能力强,停留时间也长,移动速度慢,因而后流出柱子。可见只要选择合适的固定相,使被分离组分的分配系数有足够差别,再加上对色谱柱和其他操作条件的合理选择,就可得到令人满意得分离。

1.2 气相色谱仪

普通填充柱气相色谱仪和毛细管柱气相色谱仪流程如图 14-1 所示,两者十分相似,后者比前者多一个分馏装置,柱后加一个尾吹气路。尾吹气路又称辅助气路。

1.2.1 载气及进样系统

载气由高压气瓶供给,经压力调节器减压和稳压,以稳定流量进入气化室、色谱柱、检测器后放空。常用载气有氢气、氮气。前者主要用热导检测器时使用;后者主要用氢火焰离子化检测器时使用。

进样就是用注射器(或其他进样装置)将样品迅速而定量的注入气化室气化,再被载器 带入柱内分离。要想获得良好分离,进样速度应极快,样品应在气化室内瞬间气化。常用注射器规格为:气体用 0.5~10 ml 医用注射器;液体用 0.5~50 μ L 微量注射器。

毛细管柱由于其内径细,固定液膜厚度薄,因此样品容量很小。对液体样品,一般进样量为 10^{-3} ~ 10^{-2} μ L,气样 10^{-7} ml,所以需要分流进样技术,及在气化器出口载气分两路,绝大部分放空,极小部分进入柱子,这两部分的比例大小叫做分流比。

1.2.2 色谱柱

色谱柱是色谱仪的心脏。柱由柱管固定相组成。常用柱管材料为不锈钢\玻璃或石英玻璃。将选定的固定液涂布在载体上,然后装入色谱柱,这种柱子称为填充柱。常用填充柱内径一般为几毫米,长度从 0.5 米至几米不等。常用载体有红色载体,如 6201 系列;有白色载体,如上式 101\102 系列。前者适用于分析弱的物质,后者适用于分析极性强的物质。毛细管填充柱极较少使用。市售毛细管柱都用石英玻璃拉制而成,并在其外面包制聚酰胺\硅橡胶等高分子材料以增加其柔性和强度。常用商品毛细管柱的内径有 0.53mm\0.32mm 和 0.25mm 等几种规格,长度为 10~30m。它的固定液直接涂布或通过化学键键合在预先经过处理的管壁上。

要使样品中各组分得到良好分离,主要依赖于固定液的选择。实际上工作中遇到的样品往往比较复杂,多变,因此选择固定液无严格规律可循,一般凭经验规则,或根据文献资料选择。在充分了解样品性质的基础上,尽量使固定液与样品组分之间有某些相似性,使两者之间作用力增大,从而有较大的分配系数的差别,

以实现良好分离。

几种常用的代表性固定液列与下面(按极性增加的顺序): 甲基硅橡胶(SE-30), 最高使用温度 350°C; 50%苯基甲基聚氧烷(OV-17), 最高使用温度 375°C; 三氟丙基甲基聚硅氧烷(OV-210), 最高使用温度 250°C; 聚乙二醇(PEG-20M), 最高使用温度 200°C; 丁二酸二乙二醇聚酯(DEGS), 最高使用温度 200°C。最高使用温度指固定液在此温度以上, 它的蒸汽压急剧上升而造成基线不稳。

1.2.3 检测器

检测器的作用是将载气中组分的含量的变化转变成可测的电信号, 然后输入记录器记录下来。最常用的检测器有两种: 热导检测器和氢火焰离子化检测器。热导检测器是基于不同组分有与载气不相同的热导系数, 因而传导热的本领大小不同。即使同一组分, 浓度不同, 传导热的程度也不相同, 因此, 检测器输出信号的大小是组分浓度的函数。热导检测器通用性好, 但灵敏度有限。常规填充柱气相色谱仪所使用的热导检测器由于死体积大而不能通用于毛细管色谱仪。毛细管色谱仪所使用的热导检测器要求死体积小。惠普公司生产的单丝微型热导检测器的池体积只有 3.5UL, 可作为毛细管柱的检测器。

氢火焰离子化检测器是最长用的检测器。除了对无机气体及少数在火焰中不分解的化合物没有信号或信号极小, 几乎对所有有机物都产生响应。当载气携带被柱分离后的组分进入氢火焰中燃烧, 生成正负离子。这些离子在电场中形成电流(约 10^{-10} ~ 10^{-8} A 大小), 并流经高电阻, 产生电压降, 再输入放大器放大后记录下来。从填充柱操作转换到毛细管柱操作, 氢火焰离子化检测器的喷嘴应更换成更细的喷嘴, 以减小死体积。惠普公司的气相色谱仪中, 直径为 0.28mm 的喷嘴可与毛细管柱配用。

1.2.4 记录器

记录器就是记录直流电压信号的电子电位差计。

色谱分析中常用的电子电位差计一般满量程为 5mV 或 10mV。根据走纸速度需要, 记录器的纸速可以改变。纸速太慢, 画出的色谱峰很窄, 在测量峰的宽度时, 误差增大; 纸速过快, 矮小的峰形很难看, 且造成纸张浪费。在毛细管色谱中, 由于出峰快, 峰形窄, 因而需要使用快速响应的记录仪。以色谱数据处理机或色谱工作站作为记录器, 由于其具有响应快速, 色谱数据存储灵活及再处理功能强等特点, 越来越为色谱工作者普遍采用。

1.3 Agilent 6890 N GC 的使用方法

1.3.1 仪器设置

进样口: 填充柱进样口(PPIP); 毛细柱进样口(S/SL)

检测器: FID、ECD

色谱柱: HP-5, 30m, $320\mu \times 0.25\mu\text{m}$

进样体积: $1\mu\text{l}$

1.3.2 气体准备

FID: 高纯氢 (99.999%), 干燥空气。

μECD : N_2 (99.999%)

载气：高纯氮（99.999%）

1.3.3 基本操作步骤：

（一）、开机：

- 1、打开电源（按相应的检测器所需载体）。
- 2、打开计算机，进入 Windows NT（或 Windows 2000）画面。
- 3、打开 6890N GC 电源开关。（6890N 的 IP 地址一通过其键盘提前输入 6890N 通讯）
- 4、待仪器自检完毕，双击 Instrument 1 Online 图标，化学工作站自动与 6890N 通讯，此时待 6890N 显示屏上显示“Loading---”。进入的工作站界面如下图：
- 5、从“View”菜单中选择“Method and run control”画面，单击“Show top toolbar”，“Show status toolbar”，“Instrument diagram”，“Sampling Diagram”，使其命令前有“√”标志，来调用所需的界面。

（二）、数据采集方法编辑

- 1、从“Method”菜单中选择“Edit Entire Method”项，如下图所示，选中除“Data Analysis”外的三项，单击 OK，进入下一画面。
- 2、在“Method Comments”中输入方法的信息（如方法的用途等），单击 OK 进入下一画面。
- 3、如果未使用自动进样器，则在“Select Injection Source/Location”画面中选择 Manual，并选择所用的进样口的物理位置（Front 或 Back），单击 OK，进入下一画面。
- 4、如使用自动进样器，则选择 GC Injector；若为气体阀进样，则选择 6890 GC Valve 同时选中阀的位号。
- 5、柱参数设定：
 - A、点击“Columns”图标，则该图标对应的参数显示出来。在“Change”钮，点击“increment”钮，点击 ok，从柱子库中选择您的柱子，则该柱子的最大耐高温及液膜厚度显示在窗口下方，点击 ok，点击“install as column 1”或“install as column 2”。（填充柱不定义）。
 - B、Mode—选择合适的模式，恒压或恒流；Inlet—柱连接进样口的物理位置；Detector—柱连接检测器的物理位置；Outlet Psi—选择 Ambient（连 MSD 则为真空）；
 - C、选择合适的柱头压、流速、线速度（三者只输一个即可）。点击“Apply”钮。
- 6、分流不分流进样口参数设定：

单击“Inlets”图标，进入进样口设定画面。单击“Apply”上方的下拉式箭头，选中进样口的位置选项（Front 或 Back）；

 - A、单击“Gas”下方的下拉式箭头，选择合适的载气类型（如 N₂）；
 - B、击“Mode”下方的下拉式箭头，选择合适的进样方式（如不分流方式 Splitless，分流方式 Split），在“Set point”下方的空白内输入进样口的温度，进样口的压力（如 200℃，15psi），然后点击 On 下方的

所有方框；

- C、“Split Vent”右边的空白框内输入吹扫流量（如 0.75min 后 60ml/min）；如图所示，点击“Apply”钮。（选择分流方式，则要输入分流比）。

7、柱温箱温度参数设定：

点击“Oven”图标，进入柱温箱参数设定。

在“Set point”右边的空白框内输入初始温度（如 40℃），点击“On”左边的方框；Ramp---升温阶次；℃/min—升温速率；Hold min—在 Next °C 保持的时间；也可输入柱子的最大耐高温、平衡时间（如 325℃，3min）；

下图为一程序升温的例子，点击“Apply”钮。

40℃（2min）----10℃/min----90℃（0min）----15℃/min----170℃（2min）。

8、FID 检测器参数设定：

单击“Detector”图标，进行检测器参数设定。

单击“Apply”上方的下拉式箭头，选中进样口的位置选项（Front 或 Back），在“Set point”下方的空白框内输入：H2——33ml/min；air—400 ml/min；检测器温度（如 300℃）；辅助器（如 25 ml/min），并选择辅助器体的类型（如 N2），并选中该参数，如图所示。

Lit offset—点火下限值（2.0PA 为缺省值），若显示信号小于输入值，仪器将自动点火，两次点不着，仪器将发生报警信息，并关闭 FID 气体。

编辑完，点击“Apply”钮。

9、ECD 检测器的参数设定：

单击“Detector”图标，进行检测器参数设定。

单击“Apply”上方的下拉式箭头，选中进样口的位置选项（Front 或 Back），

在“Set point”下方的空白框内输入：检测器温度（如 300℃）；辅助器为 40 ml/min（或辅助器及柱流量的和为恒定值（如 40 ml/min）当程序升温时，柱流量变化，仪器会相应调整辅助器的流量，使到达检测器的总流量不变），并选择辅助气体的类型（如 N2），选中该参数。

选中 Electrometer，点击“Adjust”钮，输入检测器的输出值（如 40HZ），点击 Start 钮，则仪器调整输出为 40HZ

10、信号参数设定：

A、点击“signals”图标，进入信号参数设定画面。

在 signal 1 或 signal 2 处选择 Det,在“Source”处选 front detector（如果 front detector 是所用检测器），

B、选择 Save data，并选择 All—表示存储所有的数据。

C、点击“data rate”下方的下拉式箭头，选择数据采集速率（如 20HZ），点击“Apply”钮。

D、在“run time checklist”中选中“data acquisition”，单击 ok。

E、单击“method”菜单，选中“save method as”，输入一方法名，如“test”，单击 ok。

F、从“Run control”菜单中选择“sample info”选项，如上图所示，输入操作者名称（如 zzz），在“Data file”中选择“Manual”或“Prefix”。

区别：Manual---每次做样之前必须做出新名字，否则仪器会将上次的数据覆盖掉。Prefix—在 Prefix 框中输入前缀，在 Counter 框中输入计

数器的起始位。

G、单击 OK, 等仪器 Ready, 基线平稳, 从 Method 菜单中选择 “Run method”, 进样。

(三)、数据分析方法编辑:

- 1、从 “View” 菜单中, 单击 “data analysis” 进入数据分析画面。
- 2、从 “file” 菜单中选择 “load signal” 选项, 选中您的文件名, 单击 ok。
- 3、做谱图优化: 从 “graphics” 菜单中选择 “signal options” 选项, 如下图所示, 从 “ranges 中选择 Auto scale 及合适的显示时间, 单击 ok 或选择 Use Range 调整。反复进行, 直到图的比例合适为止。
- 4、积分:
 - (1)、从 “integration “中选择” Auto integrate”如积分结果不理想, 在从菜单中选择 “integratin events” 选项, 选择合适的 slope sensitivity, peak width, area reject , height reject。
 - (2)、从 “integration” 菜单中选择 “integrate” 选项, 则数据被积分。
 - (3)、如积分结果不理想则重复上两步动作, 直到满意为止。
 - (4)、单击左边 “√” 图标, 将积分参数存入方法。
- 5、打印报告:
 - (1)、从 “report” 菜单中选择 “specify report” 选项, 进入如下画面。
 - (2)、单击 “quantitative results” 框中 calculate 右侧的黑三角, 选中 percent (面积百分比), 其他选项不变。
 - (3)、单击 ok。
 - (4) 从 “report” 菜单中选择 “print report”, 则报告结果将打印到屏幕上, 如想输出到打印机上, 则单击 report 底部的 “print “钮。

(四)、关机:

实验结束后, 退出化学工作站, 退出 Windows 所有的应用程序, 用 Shut down 关闭 PC, 关闭打印机电源, 在主机键盘上关闭 FID/NPD/FPD 气体 (H₂, Air), 同时关闭 FID/NPD/FPD/ECD/ μ ECD/TCD 检测器, 降温各热源 (Oven temp, Intel temp, Det temp), 待各处温度将下来后, (低于 50°C), 关 GC 电源, 最后关载气。

(五)、注意事项:

- 1、柱老化时, 勿将柱端接到检测器上, 防止污染检测器;
- 2、柱老化时, 请在室温下通载气 10min 后, 再老化, 以防损坏柱子。
- 3、其它注意事项见说明书。

1.4. 上分 122 气相色谱仪的使用方法

1.4.1 仪器设置

进样口：填充柱进样口；毛细柱进样口
 检测器：FID、ECD
 色谱柱：SE-30，3mm，320 μ * 0.25 μ m
 进样体积：1 μ l

1.4.2 气体准备

FID：高纯氢（99.999%），干燥空气。

ECD：N₂（99.999%）

载气：高纯氮（99.999%）

1.4.3 FID 基本操作步骤

1. 打开气源（按相应的检测器所需气体）

2. 合上主机电源开关

约经 1~2 分钟微机进行自检及初始化，在正常情況下会显示：

INI	TIAL
-----	------

此符号表示请设置温控参数。或显示：

OVEN	XX
------	----

—此符号表示可正常操作

3. 温度及程升参数的设置

微机温控在初始化时设置柱箱初始温度为 100℃，进样器 A，进样器 B，初始温度为 200℃，离子室温度为 200℃，热导池温度为 30℃。柱箱最高限制温度为 400℃。柱箱的升温极限取决于色谱柱规定的最高使用温度，因此柱箱、进样器、检测器要按规定条件重新设定最高温度。

A. 柱箱、进样器、检测器最高温度的设置

如设置进样器，检测器最高温度 300℃，请按下操作：

[换挡] [功能] [5] [键入] [换挡] [退出] 显示

DMAX	300
------	-----

表示检测器和进样器最高限制温度 300℃

设置柱箱最高温 250℃，请按下操作：

[换挡] [功能] [7] [键入] [2] [5] [0] [键入] [换挡] [退出]

要检查柱箱设置的最高温度，请按下操作：

[换挡] [功能] [7] [键入] [换挡] [退出] 显示

CMAX	250
------	-----

表示柱箱最高限制温度 250℃

当柱箱温度超过设置的最高温度线时，显示窗显示：

O V E R C O L

同时微机自动切断加热器电源，并且峰鸣器连续发声。当柱箱温度下降后或重新设定柱箱最高温度比当时温度高时，可按[清除]键解除峰鸣器报警声。

B. 设置进样器、检测器的工作温度

- 1、设置进样器 A 温度为 250℃

操作

[换挡] [进样器 A] [2][5][0] [键入]

- 2、置进样器 B 温度为 220℃

操作

[进样器 B] [2][2][0] [键入]

- 3、置热导池温度为 150℃

操作

[换挡] [离子室] [1][8][0] [键入]

要检查进样器、检测器的设置可如下操作

检查进样器 A

请顺序按键

[换挡] [进样器 A] [键入] 显示

INJA	200
------	-----

C. 设置进样器、检测器、柱箱的工作温度

- (1) 设置进样器 A 温度为 250℃, 操作

[换挡] [进样器 A] [2][5][0] [键入]

- (2) 设置进样器 B 为 220℃, 操作

[进样器 B] [2][2][0] [键入]

- (3) 设置柱箱温度为 150℃, 操作

[柱箱] [初始温度] [1][5][0] [键入]

- (4) 设置热导池温度为 150℃, 操作

[热导池] [1][5][0] [键入]

- (5) 设置离子室温度为 180℃, 操作

[换挡] [离子室] [1][8][0] [键入]

要检查进样器、检测器的设置可如下操作

A. 检查进样器 A

请顺序按键 [换挡] [进样器 A] [键入] 显示

INJA	200
------	-----

B. 检查进样器 B

请顺序按键 [进样器 B] [键入] 显示

INJA	220
------	-----

C. 检查柱箱

请顺序按键 [柱箱] [初始温度] [键入] 显示

OVEN	150
------	-----

D. 检查热导池

请顺序按键 [热导池] [键入] 显示

TCCDT	150
-------	-----

E. 检查离子室

请顺序按键 [换挡] [离子室] [键入] 显示

IONT	180
------	-----

F. 设置终止温度 I 160℃ II 180℃ III 200℃, 操作

[终止温度] [1][6][0] [键入] [1][8][0] [键入] [2][0][0] [键入]

G. 设置终止时间 I 5分 II 15分 III 22分操作

H.

[终止时间] [5] [键入] [1][5] [键入] [2][2] [键入]

上述设置完成了三阶程序升温参数后置入, 若要设置四、五阶程序升温参数, 在三阶段升参数设置完继续输入即可。

1.4.4. 毛细管柱分析操作

操作步骤如下所示:

- (1) FID 检测器、FID 放大器、记录仪及数据处理机之间的连接和相关操作同填充柱的 FID 操作
- (2) 打开毛细管气路面板上“开关阀”, 调节“压力调节”稳压阀旋钮(逆时针大, 顺时针小), 调至所需的位置。此时“载气压力”表应有柱前压指示。(若不使用填充柱, 关闭填充柱气路上的二个载气稳流阀, 即调至刻度指示约“1”的位置, 这时填充柱二载气压力表 A、B 应无压力指示)。
- (3) 给进样器 B 一个初始温度(高于柱温 30℃), 再设定 FID 检测器温度(离子化室)至工作温度(设定值应大于柱温)。
- (4) 设定毛细管分流进样器(进样器 A)温度到所需要值。
- (5) 若使用玻璃毛细管柱, 则应先把柱温升高, 让玻璃毛细管柱在酒精灯上烧直时, 固定液分解的组分全部赶出色谱柱。
- (6) 再设定柱温到所需要值。
- (7) 等 FID 检测器温度(离子化室温度)超出 100℃时, 打开氢气和空气针形阀旋钮, 调节到所需流量值。
- (8) 打开“尾吹调节”稳流阀, 调节旋钮把尾吹流量调至适当值(一般调到“4~6”圈, 这是尾吹流量在 16.4~47.85ml/min)。
- (9) 调节“隔膜清扫”针形阀旋钮, 使其流量在 2~8 ml/min。隔膜清扫流速测定在主机后上方“分流清扫”出口处, 见图 5-6 所示。在测清扫流量时, 必须把毛细管“分流调节”针形阀关闭。
- (10) 调节“分流调节”针形阀(顺时针调节指示数值大, 此时分流流速变大, 分流比也大)。测分流流速的方法, 也在“分流清扫”出口处, 同时应把“隔膜清扫”针形阀关闭。测定隔膜清扫流速和分流流速的方法, 是在“分流清扫”出口处接上皂沫流量计。
- (11) 测定线速度: 通过柱子的线速度是进一个不被固定相保留的组分(典型样品 CH₄)。用记时器测定从进样开始到出峰的时间(保留时间), 如用数据处理机或 FJ-2000 型色谱工作站, 则保留时间可自动求出, 线速度由下面公式求出:

$$\text{平均线速度 } \bar{\mu} \text{ (cm/sec)} = [\text{柱长 } L \text{ (m)} * 100] / t \text{ (sec)}$$

1.5 上分 102GC 基本操作

1.5.1 氢火焰检测器(FID) 同 GC122 区别于 GC102 于恒温下操作。

1.5.2 热导检测器(TCD) 高纯氢 (99.999%)、N₂ (99.999%)。

1、打开气源 (按相应的检测器所需气体)

2、在接通电源前, 仪器的总开关、微电流放大器及热导池电源的电源开关均应处于“关”状态。选择柱室、气化室、离子室的恒温控制温度。

3、接通电源, 启动仪器的总开关, 这是恒温室风扇开始运转 (总开关内藏指示灯亮), 同时温度控制器中的温度指示窗开始指示被选择的加热区域的实际温度值。至温度显示值不再上升, 与设置温度值相符 (或接近时), 该加热区域即处于恒温状态。

4、启动微电流放大器或热导池电源的开关

5、当使用热导检测器时, 应调节热导池桥流至适当值。一般当载气为氢气时, 最大电流不超过 240 mA; 当载气为氮气时, 最大电流不超过 140 mA。

若无载气通过热导池池体时, 决不能开启热导池电源的开关, 不然有可能烧断桥路钨丝。刚开机时当检测器温度在升温过程中, 桥电流会有变化, 是属正常现象, 至检测温度恒定后再调正电流值至所需值, 即可固定旋钮位置。若操作条件不变重复开机, 检测器温度未恒定时, 桥电流将暂时大于原设定值, 是属正常现象, 不必调动“电流调节”旋钮, 至温度恒定后, 电流值会逐渐降至原设定值。

实验一 气液色谱柱的制备

一、目的要求

- 1、掌握静态法固定液涂布技术。
- 2、掌握柱填装及老化技术。

二、原理

一根良好的色谱柱不仅与选择合适的固定液与载体有重要关系, 而且与固定液涂布在载体表面是否均匀, 以及固定相填装是否均匀紧密密切相关。本实验采用静态法涂布。涂布时要求做到载体不破碎, 液膜均匀。涂布完毕后, 进行柱的填装。填装好的柱子不能马上使用, 需要老化处理。所谓老化, 即将色谱柱置于高于所要求的柱温下进行实验, 以除去残余溶剂和其他杂质, 并使固定液均匀、牢固地分布在载体表面。

三、仪器与试剂

仪器 上分 102GC, TCD 检测器, 台天平; 真空泵。

试剂 101 白色载体 (60~80 目); 二氯甲烷; 邻苯二甲酸二壬酯 (色谱固定液)。

四、实验步骤

1、色谱柱的清洗

将不锈钢柱用 5%~10% 的热 NaOH 溶液清洗数次，以除去内壁污物，再用水冲洗干净，烘干备用。

2、固定液涂布

固定液的配比：邻苯二甲酸二壬酯（DNP）/101 载体=5/100。

将市售载体（60~80 目）过筛，除去过细颗粒。称取 8g 载体，置于 50ml 量筒内，记下体积。称取 0.4g DNP 于小烧杯中。用量筒量取略少于载体体积的二氯甲烷，并分数次将 DNP 全部转移至 400ml 烧杯中，将载体倒入，迅速摇匀，使二氯甲烷淹没全部载体。于室温下，置于通风橱内，让二氯甲烷挥发，并适当轻轻拍打烧杯，帮助载体翻转。直至无二氯甲烷气味止。

3、柱的填装

在柱一端塞入少许玻璃棉，用数层纱布包住，与真空泵相连。另一端接漏斗。启动真空泵，边抽气边从漏斗上慢慢加入以涂布好的载体，并轻轻敲打柱壁，直至载体不再下沉为止。在另一端也塞上玻璃棉。

4、老化

将柱接入色谱仪（注意将真空泵的柱端与检测器相连，但在老化时，只需接与气化器相连接得一端），并检漏。检漏方法是：通入载气后，柱出口堵死，转子流量计应下降至零。否则，应在各接头处用肥皂水检查。检查毕，擦干肥皂水，调节柱温至 95℃，老化数小时，直至基线平直为止。至此，柱以可供分析使用。

五、注意事项

- 1、涂布固定液时，切忌用玻璃棒搅拌载体。
- 2、填充时不得敲打过猛。
- 3、当需使用二氯甲烷时，应在通风橱内操作。
- 4、

六、思考题

- 1、载体颗粒受外力作用破碎，对分离有何危害？
- 2、固定液涂布不均，对分离有何危害？
- 3、老化时，为什么要将接真空泵的柱端与检测器相连？不老化有何危害？

实验二 醇系物的气相色谱分析

一、目的要求

- 1、掌握气相色谱分析的基本操作和醇系物的分析方法；
- 2、学习用归一法计算各组分的含量。
- 3、熟悉 TCD 操作与使用。

二、基本原理

甲醇、乙醇、正丙醇和正丁醇及可能含有的水分称为醇系物，可以采用气相色谱法进行分析。

以 GDX—103 作固定相，用热导池检测器，在一定条件下可实现各组分的分离。采用归一化法定量。

三、仪器和试剂

102GC 气相色谱仪，氢气（或氮气）钢瓶，微量注射器。
由甲醇、乙醇、正丙醇和正丁醇组成的混合样，GDX—103。

四、实验步骤

1、色谱柱的制备

将选定的固定相装入内径 4mm、长 2m 的不锈钢色谱柱，并于 200℃ 下老化数小时。

3、操作条件

热导池检测器：桥电流 200mA（氢气为载气）、130mA（氮气作载气）；衰减 1：1；检测室温度 135℃，柱温：105℃，气化室温度：120℃。载气流速：50~100ml/min。进样量：将模拟样品（由甲醇：乙醇：水按 1：2：2 混合而成）0.5μL（氢气作载气）、2~3μL（氮气做载气）进样。

4、操作步骤

将仪器调整到待测状态后，以微量注射器进样。

五、数据处理

测试结束后取下色谱图，按下列计算式，用归一化法求个组分的含量：

$$C_i\% = \frac{f_i A_i}{\sum f_i A_i}$$

当以热导池为检测器，氢作载气，各组分的质量校正因子值列于表 1—1。

表 1—1 各组分的质量校正因子

组分	f_i
水	0.55
甲醇	0.58
乙醇	0.64

六、思考题

- 1、为什么本实验可以用归一法定量？
- 2、比较氢气和氮气作载气的桥电流及两种载气的优缺点。

实验三 气相色谱法测定乙酸乙酯和环己烷

一、目的要求

了解气相色谱分析仪的基本流程，不给过多的具体步骤，由学生自己根据学过的知识去摸索实验最佳条件，然后完成色谱分析全过程。

二、仪器与试剂

仪器 102 气相色谱仪，不锈钢填充柱，氢火焰检测器，微量注射器
试剂 乙酸乙酯、环己烷（均为分析纯）

三、实验步骤

- 1、色谱柱的制备：应用实验一制备的色谱柱完成分析。
- 2、将色谱柱接入色谱仪，完成分析前的一切工作。
- 3、操作条件选择：可自己初步拟定分离条件，在分离后加以改进。

建议条件如下：

 检柱温：50℃，

 测室温度 120℃，

 气化室温度：110℃。

氢气和空气流量分别为 35 和 350ml/min。

四、结果处理 在 N-2000 色谱工作站上完成。

五、结果讨论

有很多因素影响柱效，如柱温、载气流量、固定液含量、载气性质、进样速度、进样量等，对自己拟定的分析方法和结果进行讨论。

2、高效液相色谱法

2.1 基本原理

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）和其相色谱发展起来，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、高效等特点。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）

高效液相色谱法克服了气相色谱法要求样品挥发性大、热稳定性好的局限，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。流动相可选择范围广泛，而 GC 则只有有限的几种气体可供选择。HPLC 按分离原理可分为吸附色谱、键合相色谱、离子交换色谱和凝胶排阻色谱。

吸附色谱法是当组分分子流经固定相（吸附剂，如硅胶或氧化铝）时，不同组分分子、流动相分子就要对吸附剂表面的活性中心展开竞争。这种竞争能力的大小，决定了保留值大小，即被活性中心吸附得越牢得分子，保留值越大。

键合相色谱类似与气相色谱中的固定液的液体，通过化学反应键合到硅胶表面，从而形成固定相。采用化学键合相的色谱法称为键合相色谱。若采用极性键合相、非极性键合相，则称为正相色谱；采用非极性键合相，极性流动相，则称为反相色谱。保留值的大小取决于组分分子与键合固定液分子间作用力的大小。

离子交换色谱法是流动相中的被分离离子，与作为固定相的离子交换剂上的平衡离子进行可逆交换时，它们对交换剂的基体离子亲和力大小的不同而达到分离的。组分离子对交换剂基体离子亲和力越大，保留时间就越长。

凝胶排阻色谱法的固定相是一类孔径大小有一定范围的多孔材料。被分离的分子大小不同，它们扩散渗入多孔材料的容易程度不同，小分子最易扩散进入细孔中，保留时间最长；大分子完全排斥在孔外，随流动相很快流出，保留时间最短。

在以上四种分离方式中，反相键合相色谱应用最广，因为它采用醇-水或晴-水系作流动相。纯水易得廉价，它的紫外吸收极小。在纯水中添加各种物质可改变流动相的选择性。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（ $C_{18}H_{37}$ —）键合到硅胶表面。这种键合相又称 ODS (Octadecylsilyl) 键合相，如国外的 Partisil5-ODS、Zorbax-ODS、ShimpackCLC-ODS，国产的 YWG- C_{18} 等。

2.2 高效液相色谱仪

高效液相色谱仪的流程示意图见图 2-1

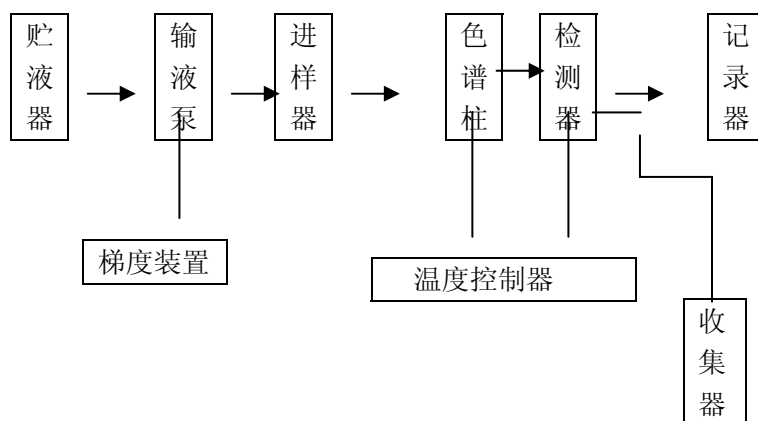


图 2-1 高效液相色谱仪示意图

2.2.1 流动相

贮液器用来存放流动相，流动相从高压的色谱柱内流出时，会释放其中溶解的气体，这些气体进入检测器后会使得噪音剧增，甚至由于产生巨大的吸收或吸收读数波动很大使信号不能检测，因此，流动相在使用之前必须经过脱气处理。贮液器应带有脱气装置，通常，有的仪器本身附有反压脱气装置，将他与配套检测器使用，就可避免吸收池内产生气泡。

为延长色谱柱的寿命，流动相在使用前用微孔滤膜（ $0.45\mu\text{m}$ ）进行过滤，除去颗粒物。低沸点和高黏度的溶剂不合适作为流动相。含有 KCL、NaCL 等卤素离子的溶液，PH 小于 4 或大于 8 的溶液，由于会腐蚀不锈钢管道或使硅胶的性能受到破坏，也不宜做流动相。

2.2.2 输液系统

输液系统通常有输液泵、单相阀、流量控制器、混合器、脉动缓冲器、压力传感器等部件组成。输液泵分为单柱塞往复泵和双柱塞往复泵，用来输送流动相。由于高效液相色谱固定相颗粒极细，色谱柱阻力很大，因此泵的输液压力最高可达 40Mpa，准确性达 $\pm 2\%$ 。

为了改进分离效果，往往采用多元溶剂，而且在分离过程中按一定程序连续改变流动相组成，因次泵系统还需具备梯度淋洗装置。

2.2.3 进样器

在高压液相色谱仪中，采用六通高压微量进样阀进样。它能在不停流的情况下将样品进样分析。进样阀上可装不同容积的定量管， $5\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ 等。

2.2.4 色谱柱

高效液相色谱仪的色谱柱通常都采用不锈钢，内填颗粒直径为 $3\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 等规格的固定相，柱长一般不超过 30cm。分析柱内径通常为 $0.4\sim 0.6\text{cm}$ ，

制备柱可达 2.5cm。虽然液相色谱的分离操作可在室温下操作，但多数都配置恒温柱厢。为保护分析柱，通常可在分析柱前再装一根短的前置柱。前置柱内填料与分析柱完全一样。

2.2.5 检测器

HPLC 常用检测器有紫外吸收检测器、荧光检测器、示差折光检测器和电导检测器。紫外检测器灵敏度较高，通用性较好。荧光检测器是选择性强的检测器，仅适合对有荧光物质的检测，其灵敏度比紫外检测器高出 2-3 个数量级。示差折光率检测器是一类通用检测器，只要组分折光率与流动相折光率不同就能监测，但两者之差有限，因此灵敏度较低，对温度变化较为敏感，不能用于梯度淋洗；电导检测器是离子色谱中应用较多的检测器。

2.2.6 馏分收集器和记录器

馏分分布收集器用来收集纯组分。当进行制备色谱操作时，可以设置一个程序使之将欲分离的组分自动逐个分离，以备后用。记录器可采用记录仪或色谱工作站。

2.3 Agilent 1100 HPLC 的使用方法

Agilent 1100 HPLC 基本设置包括 四元输液泵、柱温箱、紫外可见光检测器等独立单元。记录系统为 HP Chemical Station（色谱工作站）。

Agilent 1100 HPLC 操作界面（online）见图 2-2。

图 2-2 Agilent “online”操作主界面

2.3.1 开机前准备工作

1、 开机前准备工作包括选择、纯化和过滤流动相；检查贮液瓶中是否具有足够的流动相，吸液砂芯过滤器是否已可靠地插入贮液瓶底部；废液瓶是否已倒空，所有排液管道是否已妥善插在废液瓶中。

2、 开启 Agilent 1100 HPLC 真空脱气、四元泵、柱温箱、紫外检测器各模

板电源,再开启 HP Chemical Station 主机电源,进入 HP Chemical Station “on line”主界面。

3、打开 Purge 阀,单击 pump 图标,单击 set up 选项,进入 pump 编辑画面,设 flow: 5ml/min,单击 OK。单击 pump 图标,单击 pump control 选项,选中 ON,单击 OK,则系统开始 purge,直到所有要用通道无气泡为止。单击 pump 图标,单击 setup 选项,进入 pump 编辑画面,设 flow: 1.0ml/min,关闭 purge valve。

4、单击泵下面的瓶图标,输入 Actual Volume 和 Total Volume;也可输入阻止分析和关系的体积。单击 OK。

2.3.2 数据采集方法编辑

1、从 method 菜单中选择 edit entire method 项,选中除 data analysis 外的三项,单击 OK,进入下一画面。

2、在 method comments 中加入方法的信息(如:方法的用途等),单击 OK 进入下一画面。

3、在 flow 处输入流量 1ml/min,在 Solvent B 处输入 70.0, (A=100-B),也可 insert 一行 timetable,编辑梯度淋洗。Pressure Limits Max 处输入柱子的最大耐高压,以保护柱子,单击 OK 进入下一画面。

4、在 Temperature 下面的方框内输入所需温度,并选中它,点击 more>>键,选中 same as left 使柱温的温度左右一致,单击 OK 进入下一画面。

5、在 Wavelength 下方的空白处输入所需的检测波长,如 254nm,在 peakwidth(response time)下方点击下拉式三角框,选择合适的响应时间,如 >0.1min(2s)。

6、在 timetable 中可以 insert 一行,可以输入随时间切换的波长,如 1min,波长=300nm,单击 OK 进入下一画面。

7、从 run control 菜单中选择 sample info 选项,输入操作者名称,在 data file 中选择 manual 或 prefix。区别: manual—每次做样之前必须给出新名字,否则仪器会将上次的数据覆盖掉。Prefix—在 prefix 框中输入前缀,在 counter 框中输入计数器的起始位。

8、基线调节:待基线稳定后,按“Balance”键,使基线回至零点附近,准备进样。

9、进样:将六通阀旋转至“LOAD”位置,用平头注射器进样后,转回至“INJECT”位置,工作站上即出现竖直红线,计时开始,同时界面变成蓝色。

2.3.3 数据分析方法编辑:

1、从 view 菜单中,单击 data analysis 进入数据分析画面。从 file 菜单中选择 load signal 选项,选中你的数据文件名,单击 OK。做谱图优化,从 graphics 菜单中选择 signal options 选项,再从 ranges 中选择 Auto scale 及合适的显示时间,单击 OK,或选择 Use Range 调整,直到图的比例合适为止。

2、积分:从 integration 中选择 Auto integrate,如积分结果不理想,再从菜单中选择 integration events 选项,选择合适的 slope sensitivity, peak width, area reject, height reject。从 integration 菜单中选择 integrate

选项, 则数据被积分。单击左边 \checkmark 图标, 将积分参数存入方法。

3、打印报告: 从 report 菜单中选择 specify report 选项, 单击 quantitative result 框中 calculate 右侧的黑三角, 选中 percent (面积百分比), 其他选项不变, 单击 OK。从 report 菜单中选择 print report, 则报告结果将打印到屏幕上, 若想输出到打印机上, 则单击 report 底部的 print 按钮。

2.3.4 关机程序:

先以 100%水冲洗色谱柱 20 分钟, 再换成 100%甲醇冲洗 10 分钟, 关闭 offline 工作站; 置 pump control 为 off, 柱图标为 off; 关闭 online 工作站, 从 file 菜单中选择 exit, 回至 start 界面, 按 shutdown 等待关机。

使用液相色谱仪的注意事项:

- 1、输液泵应避免长时间在高压下工作 ($>30\text{Mpa}$)。如果发现输液泵工作压力过高, 可能由以下原因造成: 色谱柱、管道、过滤器和柱子前接头等堵塞或输液流量太大, 应立即停泵, 查清原因后开泵。
- 2、实验开始前和实验开始结束后用甲醇冲洗管道和色谱柱若干时间, 可以避免许多意想不到的麻烦, 当用 PH 缓冲液作流动相时, 实验结束后, 先用石英亚沸蒸馏水冲洗半小时, 再用纯甲醇冲洗 15min。

实验一 流动相流速对柱效的影响

一、 目的要求

通过 H-u 曲线的绘制, 进一步理解在高效液相色谱中 H-u 曲线的特点。

二、 原理

组分在液体中的扩散系数只有在气体中的 10^{-4} - 10^{-5} , 所以在 Van Deemter 方程中的分子扩散项对理论塔板高度的贡献很小, 而影响塔板高度的主要因素则是涡流扩散项和传质阻力项。只要采用了直径为数微米颗粒均匀的高效固定相, 且填充致密、均匀, 一定能获得高柱效。

三、 仪器与试剂

仪器 Agilent 1100 HPLC 高效液相色谱仪; 紫外-可见吸收检测器, 色谱柱 ODS 20cm \times 4.6cm; 微量注射器。

试剂 甲醇 (色谱纯), 乐百氏纯净水, 茚 (分析纯)。流动相: 甲醇/水=85/15, $\lambda=228\text{nm}$

四、 实验步骤

- 1、将色谱柱接入色谱仪, 按开机顺序说明启动色谱工作站, 通过色谱工作站控制色谱分离与分析过程, 待基线平直后即可进样分析。
- 2、 调节流动相流速为 0.3ml/min, 注入茚标准溶液 (1.5mg/ml) 2 μL ,

记下保留时间，然后注入纯甲醇（非滞留组分） $5\mu\text{L}$ ，记下保留时间。

- 3、分别改变流动相流速为 0.6、1.0、1.5、2.0 ml/min。每改变速度后，重复步骤 2。
- 4、实验结束后，按操作说明书关好仪器。

五、结果处理

绘 H-u 出图，并与气相色谱实验三的 H-u 图加以比较、讨论。

六、注意事项

- 1、用微量注射器吸液时，要防止气泡吸入。首先将擦干净并用样品吸洗过的注射器插入样品液面下，反复提拉数次，驱除气泡，然后缓慢提升针芯到刻度。（或针尖垂直向上，轻弹针外壁）
- 2、使用定量环进样时，注射器注入的体积为定量环体积的 3-6 倍。
- 3、本实验柱温为室温。

七、思考题

- 1、能实现高效的关键是什么？
- 2、理想的高效液相色谱法 H-u 曲线的形状如何？为什么？

实验二 高效液相色谱法测定萘和菲

一、目的和要求

- 1、理解液相色谱的原理与应用
- 2、掌握用保留值定性及用标准曲线法进行定量的方法

二、原理

采用反相液相色谱柱进行分离，以紫外检测器进行检测，以萘（菲）标准系列溶液的色谱峰面积对其浓度做工作曲线，再根据样品中的萘（菲）的峰面积，由工作曲线算出其浓度。

三、仪器与试剂

仪器 Agilent 1100 HPLC (美国 Agilent 公司)，HP 工作站，ODS 柱， $5\mu\text{L}$ 定量环。

试剂

- 1、甲醇（色谱纯），二次蒸馏水
- 2、萘标准储备溶液
- 3、菲标准储备溶液

四、实验步骤

- 1、使 Agilent 1100 HPLC 色谱仪正常工作，色谱条件为：
柱温： 25°C
流动相：甲醇：水=80：20

流动相流量：1.0ml/min

检测波长：228nm

- 2、 茚标准系列溶液配制：
- 3、 菲标准系列溶液配制：
- 4、 绘制工作曲线：
- 5、 样品测定。

五、 结果处理

可在“on line”和“off line”HP 工作站内处理数据，在”结果预览“中直接得出结果。

六、 关机

实验结束后，按要求处理好色谱柱（对于反相柱，用 100%甲醇以 1ml/min 冲洗 10 分钟），关好仪器。

七、 思考题

- 1、 用标准曲线法定量的优缺点是什么？
- 2、 为什么改变流动相配比可以改变分离状况？

实验三 反相高效液相色谱仪测定水中的F⁻三（选做）

一、 目的与要求

- 1、 反相离子对的原理与应用
- 2、 了解液相色谱多用途分析途径

二、 原理

氟化物的测定通常采用电化学方法¹和专门离子色谱仪，将高效液相色谱（HPLC）用于测定无机离子，虽然只有 10 多年的时间，但已显示出了巨大优越性。本文采用IC柱，等梯度洗脱，脱温 40℃直接进样，间接紫外检测，无需除去阳离子的样品前处理操作，流动相可被循环利用，既节省试剂又减少对环境的污染。采用反相柱分离保留时间长，可提高柱效和选择性，改善固定相和流动相的配比能够提供更多的优化参数，这也是该方法比离子交换法明显优越处。

三、 仪器和试剂

仪器：Agilent1100LC 高效液相色谱仪，PHS-3C 精密酸度计，IC 柱(ODP-50)，SB2200 型超声震荡器。

试剂：氟离子标准溶液 1000mg/L：称取干燥器中干燥过的NaF(分析纯)2.210 溶于少量水中，倾入 1000ml容量瓶中，定容；混合阴离子标准溶液（F⁻的质

量浓度 1000mg / L Check out,随Agilent仪器带); 流动相添加剂 (仪器带); 乙腈 (分析纯); 实验用水为二次蒸馏水。

四、实验步骤

1、仪器条件: 柱箱温度 40℃, 流动相体积流量 1mL/min 波长 266nm, 进样量 25μL 极性置于“正”。色谱图见附图 2-2。

2、流动相的配制: 量取 810mL 二次蒸馏水置于预先洗净的 1000mL 试剂瓶内。瓶内放有磁子, 超声震荡 15min; 向试剂瓶内加入 50mL 添加剂, 超声震荡 15min; 向试剂瓶内加入 140mL 乙腈, 超声震荡 15min; 向试剂瓶内加入 2.1mL 的 1mol/LNaOH 溶液, 搅拌, 同时用预先校准的酸度计测定试剂瓶中溶液的 pH 值 (6-7); 然后逐滴加入 0.1mol/LNaOH 溶液, 调节试剂瓶中溶液的 pH 值为 8.6±0.1, 备用。

3、水样处理: 澄清水样直接经 0.45μm 水膜过滤后即可测定。

4、标准曲线绘制

配置一系列标准溶液, 在色谱工作站上完成曲线回归, 回归方程为

5、计算

$$C_F = \rho D$$

式中: ρ 为从标准曲线上查得的式样中 F 的质量浓度, mg/L; D 为稀释倍数。

五、结果处理

可在“on line”和“off line”HP 工作站内处理数据, 在”结果预览“中直接得出结果。

六、关机

实验结束后, 按要求处理好色谱柱 (对于反相柱, 用 100%甲醇以 1ml/min 冲洗 10 分钟), 关好仪器。

七、思考题

- 1、反相液相色谱法与常规液相色谱法有什么不同?
- 2、除氟离子外, 反相液相色谱法还可以测定哪些离子?

5 离子阱质谱分析法

5.1 基本原理

质谱分析是先将物质离子化，按离子的质荷比分离，然后测量各种离子谱峰的强度而实现分析目的的一种分析方法。质量是物质的固有特征之一，不同的物质有不同的质量谱——质谱，利用这一性质，可以进行定性分析；谱峰强度也与它代表的化合物含量有关，利用这一点，可以进行定量分析。

离子阱近几年来开始作为一种简易质谱计而崭露头角，目前一般将它与色谱仪联用，作为色谱的检测器。它的离子源与质量分析器同处一室，由色谱仪流出的组分直接送入兼作离子源和分析器的“阱”内。阱由一对终端帽和一对环形电极构成。离子阱的质量分离原理类似于四极滤质器，在终端帽与环形电极之间加一电压 $U + \bar{V} \cos \omega t$ ， U 为直流分量， \bar{V} 为射频分量的幅值， ω 为角频率。由这个电压在阱内产生一个电场。场内任一处 (z , r) 的电位为

$$\Phi = (U + \bar{V} \cos \omega t) \frac{r^2 - 2z^2}{2r_0^2} \quad (5-1)$$

离子在场内运动方程为

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} - \frac{2e(U - V \cos \omega t)}{r_0^2} \cdot z = 0 \quad (5-2)$$

$$m \frac{d^2 r}{dt^2} + \frac{2e(U - V \cos \omega t)}{r_0^2} \cdot r = 0 \quad (5-3)$$

$$\text{令 } a = -4eU / m z_0^2 \omega^2$$

$$q = -2e\bar{V} / m z_0^2 \omega^2$$

$$T = \omega t / 2$$

$$\text{则 } \frac{d^2 z}{d^2 T} + (a + 2q \cos 2T) z = 0 \quad (5-4)$$

$$\frac{d^2 r}{d^2 T} - (a + 2q \cos 2T) r = 0 \quad (5-5)$$

式(1-4)、(1-5)即为马绍方程。只有当 a 和 q 取一定范围的值时, 方程才有稳定解。所有落在稳定区内的离子就一直被约束在阱内。

与四极滤质器不同的是, 离子阱收集检测的是稳定区以外的离子。当改变 a 、 q 值时, 不同质量的离子依次被解除约束, 穿过终端帽上的孔进入电子倍增器, 经放大处理后, 输出质谱信号。

在实际工作时, 将终端帽接地, 在环形电极上加射频电压, 这样直流分量 $U=0$, a 也等于零, 离子的稳定区仅由 q 值决定。扫描可通过改变 q 值(频率)达到。

5.2 仪器组成

一台质谱仪的分析系统一般由四个部分组成, 如图 1 所示。进样系统按电离方式的需要, 将样品无分馏地送入离子源的适当部位。离子源是用来使样品分子或原子电离生成离子的装置, 除了使样品电离外, 离子源还必须使生成的离子会聚成有一定能量和几何形状离子束后引出。质量分析器是利用电磁场(包括磁场、磁场与电场组合、高频电场、高频脉冲电场等)的作用将来自离子源的离子束中不同质荷比的离子按空间位置、时间先后或运动轨道稳定与否等形式分离的装置。检测器是用来接收、检测和记录被分离后的离子信号的装置。样品由进样装置导入离子源, 在离子源中被电离成正离子或负离子, 离子按质荷比大小由质量分析器分离后, 被检测系统接收并记录而获的质谱图。

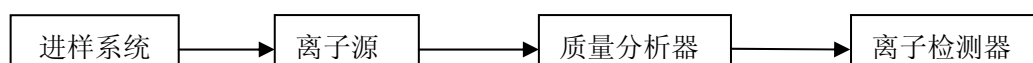


图 1. 质谱仪分析系统的基本组成

一台完整的质谱仪器, 除了分析系统之外还有电学系统和真空系统。电学系统为质谱仪器的每一个部件提供电源和控制电路。真空系统提供和维持质谱仪器正常工作所需要的高真空, 通常在 $10^{-3} \sim 10^{-9}$ Pa。另外, 现代质谱仪器均配有计算机数据处理系统。随着计算机技术的飞速发展, 计算机也愈来愈多地承担起仪器控制的任务, 质谱仪器的控制和操作的自动化程度大大提高。

5.2.1 离子源

离子源是质谱仪器最主要的组成部件之一。其作用是使被分析的物质电离成为离子, 并将离子会聚成有一定能量和一定几何形状的离子束。由于被分析物质的多样性和分析要求的差异, 物质电离的方法和原理也各不相同。在质谱分析

中，常用的电离方法有电子轰击、离子轰击、原子轰击、真空放电、表面放电、场致电离、化学电离和光致电离等。各种电离方法是通过对应的各种离子源来实现的，不同离子源的工作原理、组成结构各不相同。作为质谱仪器的一个重要部分，离子源的性能直接影响质谱仪器的主要技术指标。因此，不论何种离子源都必须满足以下一些要求：1、产生的离子流稳定性高，强度能满足测量精度；2、离子束的能量和方向分散小；3、记忆效应小；4、质量歧视效应小；5、工作压强范围宽；6、样品和离子的利用率高。

5.2.2 质量分析器

质量分析器是质谱仪器的主体部分。一个理想的质量分析器应具备分辨率高、质量范围宽、分析速度快、灵敏度高及无质量歧视效应等特点。但是能满足上面所有要求的质量分析器是不存在的，不同类型的质量分析器具有各自的优缺点。

5.2.3 离子检测系统

在质谱仪器中，离子源内生成的离子经过质量分析器的分离后，由离子检测系统按离子质荷比大小接收和检测。作为质谱仪器的检测器，一般要求其具有稳定性好（包括对时间的稳定性和对工作环境的稳定性），响应速度快，增益高，检测的离子流范围宽，在检测的质量范围内无质量歧视效应等特点。但不同类型、不同用途的质谱仪器对检测器性能的要求不尽相同，因此应该根据具体要求选择适当的检测器。

5.2.4 进样系统

通常的质谱仪器都是在高真空条件下工作的，而被分析的样品则处于常压环境下。将样品无分馏、快速、安全和方便地送入质谱仪器的离子源是进样系统的主要任务。商品仪器中配备的进样系统有直接进样系统、间接进样系统和参考样品进样系统。随着色谱与质谱联用技术的发展，气相色谱和高效液相色谱这些以成分分离见长的分析仪器，在联用技术中可以看作是质谱仪器的一种特殊进样系统，它们先将混合物样品作了预分离后，再将它们导入质谱仪。当然，从另一角度看，质谱仪也可看作是色谱仪器的具有结构分析能力的特殊检测器。

5.3 质谱仪器的基本指标

一般用几个基本指标来衡量一台仪器的性能。质谱仪的三个重要的指标是：质量范围、分辨本领和灵敏度。有的指标，如扫描速度等，对某些应用具有特殊的意义。仪器的性能还应该从仪器所具有的功能多少来衡量。如质谱仪的进样方法、电离方式、质量分析器的功能，计算机功能等都是衡量仪器性能的指标。

5.3.1 质量范围

质量范围（Mass Range）就是一台质谱仪能够测量的离子质量下限（Lower Limit）与上限（Upper Limit）之间的一个范围。离子质量的单位即原子质量单位

(atomic Mass Unit, 简称 amu)。实际上质量范围的下限却从 0 开始, 所以一台仪器的质量范围就是这台仪器所能测量的最大的 m/z 值。这是一个非常重要的参数, 因为它决定了可测量的样品的分子量。特别是在质谱应用进入到生物大分子分析的时代, 质量范围已成为质谱学工作者最感兴趣的焦点。在大部分商品仪器的质量上限不超过 4000 的情况下, 人们已将目标设在几万以上, 而且取得了不少突破。

5.3.2 分辨率

分辨率是仪器对不同质量离子分离和对相同质量离子聚集两种能力的综合表征。如果两个离子峰其质量数分别为 m_1 和 m_2 , 两峰的质量数之差为两峰的质量数之差为 $\Delta m = m_2 - m_1$, 当仪器把这两个峰刚好分开时, 就定义为仪器的分辨率:

$$R = (m_1 \text{ 或 } m_2) / \Delta m \quad (3-1)$$

所谓“刚好分开”, 是指前一峰的峰尾和后一个峰的起点相连, 且连结点刚好落在基线上, 或者说两峰的中心距 Δx 等于两峰的平均宽度

$$\bar{W} = (W_1 + W_2) / 2 \quad (3-2)$$

5.3.2 灵敏度

灵敏度(Sensitivity)参数标志了仪器对样品在量的方面的检测能力。它是一台仪器的电离效率、离子传输率及检测器效率的综合反应。根据不同的测试条件, 灵敏度可用不同的方法来描述。但总的来说, 各种方法分属于绝对灵敏度和相对灵敏度两个概念。前者指分析样品时在记录器上得到可检测的质谱信号所需要的样品量(克); 后者指可探测到的微量杂质的最小相对浓度。

有机质谱常用某种标准样品的最小检测量来衡量灵敏度参数。如用硬脂酸甲酯作标样, 检测其分子离子峰信号, 同时给出信噪比值。当测试条件相同时, 所用的样品量越小, 表明仪器的灵敏度越高, 这种方法就是绝对灵敏度法。

不少仪器采用相对灵敏度法。相对灵敏度可衡量仪器检测含于其他物质中的极微量样品的能力。若相对灵敏度为通常用 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示(1ppm), 相对灵敏度与进样量有关, 增加进样量能增加样品的绝对量, 使仪器较容易检测出样品的信号。但无限制地增加进样量会使样品信号被无用的本底或噪声所淹没。

5.4 试验步骤

- 1、用鼠标双击桌面上的 **LCMSD. BAT** 图标, 打开液质联机工作界面, 如图 2 所示。

用鼠标左键单击双元泵的开关, 出现“**Turn on all pump**”画面, 选择“**yes**”; 用鼠标左键单击柱温箱的开关, 出现“**Turn on the thermostat**”画面, 选择

“yes”；
 用鼠标左键单击 DAD 检测器的开关，选择“control”；
 在“lamps”一栏，将 UV 及 Vis 选项中选择“on”，并选择“OK”；这时，
 与高效液相色谱有关的所有组件已经全部打开。

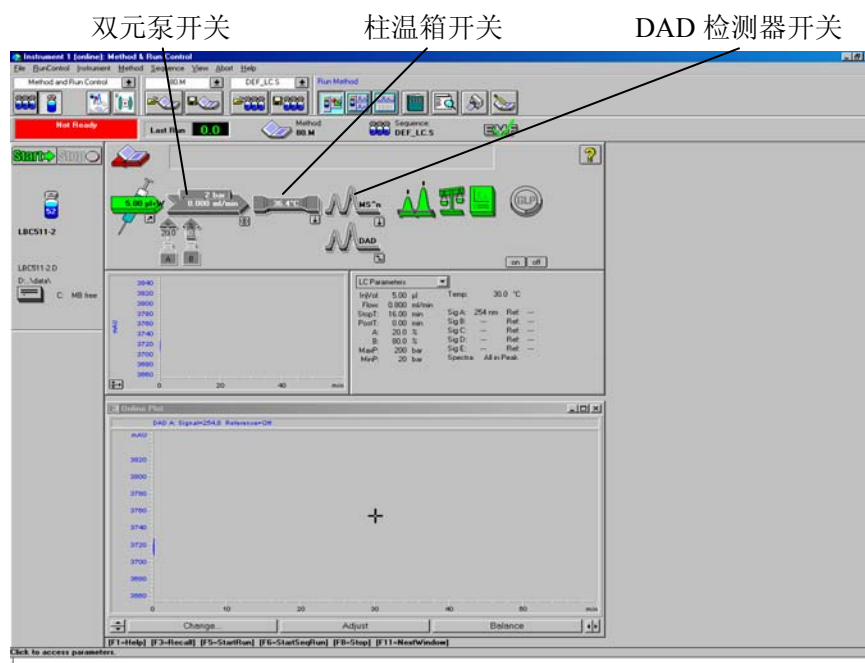


图 2 液质联机工作界面

- 面任务栏中选择“MSD-TRAP”工作界面。按要求设置好参数后，点击“Standby”图标，待所设定的参数达到所设定的数值之后，点击“Operate”图标，这时，质谱已经准备就绪。
- 图 2 的液质联机界面上，选择“File”，然后选择“Load Method”，选择一个液质联机的方法；将样品信息输入后，点击图 2 中的“Run”图标，就可以采集数据，进行分析了。
- 桌面任务栏中选择“Data Analysis”工作界面，从“File”菜单项中选择“Open”，从相应的文件夹中打开所要分析的数据文件，可见其质量数为 379.1，因为是正离子模式，故其分子量为 378，其谱图如图 3 所示。

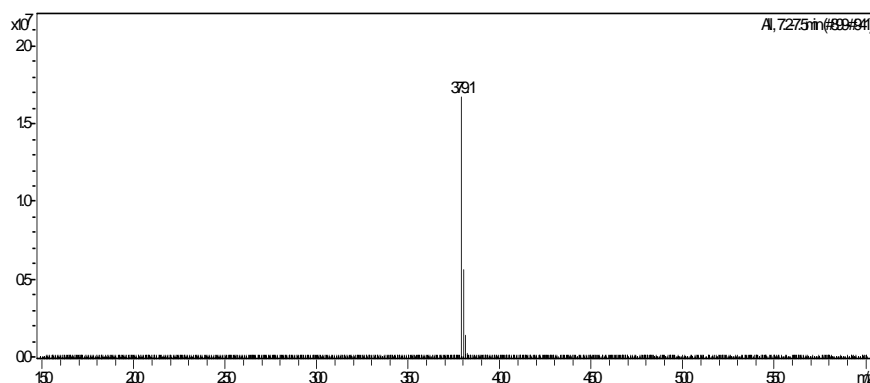


图3 ESI-LC/MS 质谱图

5.5 实验讨论

大气压电离液相色谱 / 质谱 (ESI-LC/MS, APCI-LC/MS) 是近十几年来得到快速发展的一种软电离方式液相色谱/质谱联用技术。电喷雾 (ESI) 和大气压化学电离 (APCI) 接口是这一技术发展的核心。虽然目前的 ESI 和 APCI 接口已可与磁质谱乃至飞行时间质谱相联接, 但最为成熟的仍是与四极质谱仪的联机。

作为软电离接口, ESI 接口不具备很好强的使化合物开裂的能力。离子源内离子传输区的碰撞诱导解离 (collision-induced degradation, CID) 电压设置作为得到碎片的手段, 仅对某些不稳定结构有效, 对某些结构稳定的化合物, 如大部分的甙体化合物, 不能产生显著量的碎片, 这显然对化合物结构信息的获得有一定的制约, 与 ESI 相比, APCI 接口则在此方面有一定的优势。

APCI接口采用了电晕(corona)放电技术作为化学电离的手段, 以电晕针产生的电子轰击空气中主要组份 N_2 , O_2 , H_2O , 得到初级离子 (primary ion) M_2^* , O_2^* , H_2O^* , 现由这些初级离子与被分析物分子进行电子或质子交换产生出被分析物的分子离子。这样一种电离过程可使某些化合物碎片有显著增加。

有关 ESI 和 APCI 质谱的开裂规律, 目前尚无更多工作被报道。一般而言, 同一化合物的 CID 质谱与 EI(electron impact)质谱有一定的区别, 可能是由于前者的开裂环境 (尤其是 APCI) 比 EI 源更为复杂些, 诸如脱水、分子离子复合物出现的可能性会更大。

1、ESI/APCI 的适用对象

ESI: 适用于中等极性、热不稳定化合物;

APCI: 适用于中等极性化合物分子中不含酸、碱基团的化合物, 如碳氢化合物、醇类、酯类等。

2、离子化方式

ESI: 溶液中及在气相中的质子交换, 其中含酸, 碱基团的化合物其离

子化可以在溶液内预先完成。APCI: 包含溶液中的质子交换, 气相中的质子交换及电子交换。

3、离子的预形成在离子化机制的讨论中作为离子成因的一部分。由此出发, 在实际工作中经常在有机酸或碱的样品中加入挥发性碱和酸(如甲酸, 乙酸, 三乙胺等)使其预先形成离子。

4、流速匹配

一般而言, 流动相流速增加则检出灵敏度降低。实际工作中, 4.6mm 内径的液相柱不大适用于液质联用分析。尤其是 ES 和 APCI 分析, 采用 2mm 内径的液相柱可方便地获得适用于分离和检出的流速匹配。

5、辅助气的流速和温度

辅助气的气流量的确定主要由流动相的流速和性质决定, 流动相流速大则辅助气流速要相应地加大。如采用用水或水为主的流动相也要适当的增加辅助气流。

辅助气温度的设置要优先考虑被分析化合物的热稳定性, 某些热不稳定化合物的分解临界温度范围是委小的, 此时要做细致的温度优化。

6、溶剂的选择

(1) 诸如甲醇、水以及醋酸、甲酸的铵盐缓冲液为最常用的溶剂, 原因是它具有:

- a. 显著的质子递自递作用, 有利于离子在溶液中的预形成;
- b. 适中的介电常数, 避免喷口放电(放电会导致喷口毛细管损坏);
- c. 挥发性强, 易脱去;
- d. 乙腈在 APCI 分析中更为常用, 因它有较好的电子交换作用。

(2) 某些难挥发盐的缓冲液在 ESI 和 APCI 分析中是禁用的, 如磷酸盐缓冲液, 但也有人实在中验中采用, 且有较好的信号出现。使用时要避免过高浓度以防出现放电。三氟乙酸是蛋白或肽类在进行液相分离时最常用的离子对试剂(0.01%~0.1%TFA 水溶液)。

由上以上讨论可知, ESI 和 APCI 分析中要加以细心选择优化的, 同时也有较大选择余地的是流动相的组成。

7 单级质谱的噪声

以 ESI 和 APCI 为接口的离子阱质谱, 其噪声是最难以解决的问题, 在低质量范围内测定时更是如此。噪声的来源可能为:

- (a)溶剂中的杂质;
- (b)辅助气和喷雾气中的杂质;
- (c)高分子聚合物中含有的增塑剂及其他杂质;

(d)复杂的生物学基质。

其中，溶剂杂质形成的噪声似乎是最难以解决的问题，因为目前生产商尚不能提供出适合 ESI 和 APCI 使用的溶剂。市售的色谱纯溶剂仅是对光学检测器而言，这种试剂中可能含有某些能在 ESI/APCI 上产生很强信号的杂质。

6 核磁共振波谱法

NMR是研究原子核对射频辐射(Radio-frequency Radiation)的吸收, 它是对各种有机和无机物的成分、结构进行定性分析的最强有力的工具之一, 有时亦可进行定量分析。(测定有机化合物的结构, ^1H NMR—氢原子的位置、环境以及官能团和C骨架上的H原子相对数目)

在强磁场中, 原子核发生能级分裂(能级极小: 在 1.41T 磁场中, 磁能级差约为 25210-3J), 当吸收外来电磁辐射(10-9-10-10nm,4-900MHz)时, 将发生核能级的跃迁----产生所谓 NMR 现象。

射频辐射—原子核(强磁场下, 能级分裂)-----吸收—能级跃迁—NMR

与 UV-vis 和红外光谱法类似, NMR 也属于吸收光谱, 只是研究的对象是处于强磁场中的原子核对射频辐射的吸收。

6.1. 核磁共振基本原理

6.1.1 原子核能级的分裂及描述

(1) 原子核之量子力学模型

带电原子核自旋 \longrightarrow 磁场磁矩 \longrightarrow μ (沿自旋轴方向)

磁矩 μ 的大小与磁场方向的角动量 P 有关:

$$\mu = \gamma p$$

其中 γ 为磁旋比, 每种核有其固定值。而且,

$$p = m \frac{h}{2\pi} \text{ (其中 } m = I, I-1, \dots, 1 \text{)}$$

其中 h 为 Planck 常数 (6.624210^{-27} erg.sec); m 为磁量子数, 其大小由自旋量子数 I 决定, m 共有 $2I+1$ 个取值, 或者说, 角动量 P 有 $2I+1$ 个状态! 或者说有 $2I+1$ 个核磁矩。

对氢核来说, $I=1/2$, 其 m 值只能有个取向: $+1/2$ 和 $-1/2$ 。也即表示 H 核在磁场中, 自旋轴只有两种取向, 两个能级的能量差为:

$$\Delta E = 2\mu B_0 = \frac{\gamma h}{2\pi} B_0$$

又因为, $\Delta E = h\nu_0$

$$\text{所以, } \frac{\gamma h}{2\pi} B_0 = h\nu_0 \quad \text{即, } \nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

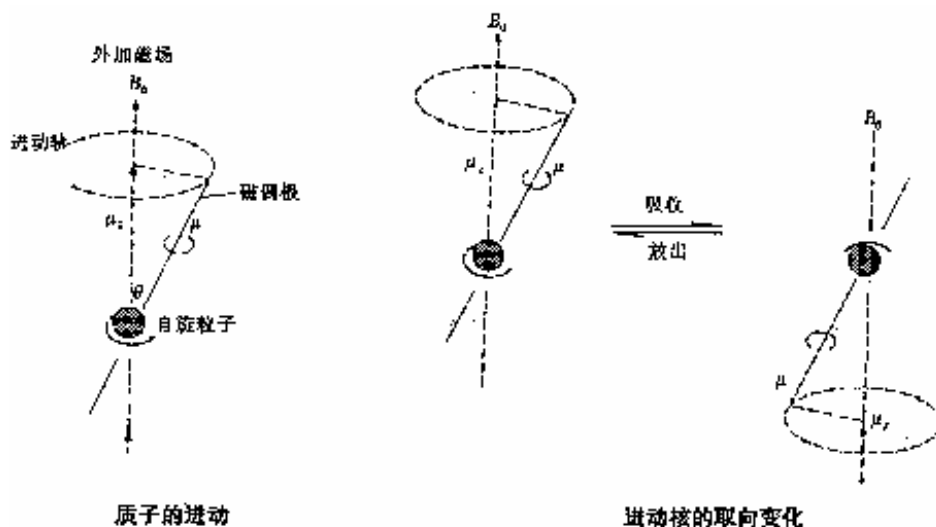
也就是说, 当外来射频辐射的频率满足上式时就会引起能级跃迁并产生吸收。

(2) 原子核之经典力学模型

当带正电荷的、且具有自旋量子数的核会产生磁场, 该自旋磁场与外加磁场相互作用, 将会产生回旋, 称为进动(Precession), 如下图。进动频率与自旋核角速度及外加磁场的关系可用 Larmor 方程表示:

$$\omega_0 = 2\pi\nu_0 = \gamma B_0 \quad \text{或} \quad \nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

此式与量子力学模型导出的式子完全相同。 ν_0 称为进动频率。在磁场中的进动核有两个相反方向的取向, 可通过吸收或发射能量而发生翻转, 见下右图。



总之, 无论何种模型看, 核在磁场中都将发生分裂, 可以吸收一定频率的辐射而发生能级跃迁。

(3) 几点说明

a 并非所有的核都有自旋, 或者说, 并非所有的核会在外加磁场中发生能级分裂!

当核的质子数Z和中子数N均为偶数时, $I=0$ 或 $P=0$, 该原子核将没有自旋现象发生。

如 ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S 等核没有自旋。

b 当Z和N均为奇数时, I=整数, P10, 该类核有自旋, 但NMR复杂, 通常不用于NMR分析。如 ^2H , ^{14}N 等

c 当Z和N互为奇偶时, I=半整数, P10, 可以用于NMR分析, 如 ^1H , ^{13}C 。

6.1.2 能级分布与弛豫过程

(1) 核能级分布

在一定温度且无外加射频辐射条件下, 原子核处在高、低能级的数目达到热力学平衡, 原子核在两种能级上的分布应满足 Boltzmann 分布:

$$\frac{N_i}{N_j} = e^{-\Delta E/kT} = e^{-h\nu/kT}$$

通过计算, 在常温下, ^1H 处于 B_0 为 2.3488T的磁场中, 位于高、低能级上的 ^1H 核数目之比为 0.999984。

可见, 处于低能级的核数目仅比高能级的核数目多出百万分之十六! 当低能级的核吸收了射频辐射后, 被激发至高能态, 同时给出共振吸收信号。但随实验进行, 只占微弱多数的低能级核越来越少, 最后高、低能级上的核数目相等-----饱和-----从低到高与从高到低能级的跃迁的数目相同---体系净吸收为0-----共振信号消失!

幸运的是, 上述“饱和”情况并未发生!

(2) 弛豫

处于高能态的核通过非辐射途径释放能量而及时返回到低能态的过程称为弛豫。由于弛豫现象的发生, 使得处于低能态的核数目总是维持多数, 从而保证共振信号不会中止。弛豫越易发生, 消除“磁饱和”能力越强。

据 Heisenberg 测不准原理, 激发能量 ΔE 与体系处于激发态的平均时间(寿命)成反比, 与谱线变宽 $\Delta\nu$ 成正比, 即:

$$\Delta E = h\Delta\nu = \frac{1}{\Delta\tau}$$

可见, 弛豫决定处于高能级核寿命。而弛豫时间长, 核磁共振信号窄; 反之, 谱线宽。

弛豫可分为纵向弛豫和横向弛豫。

1) 横向弛豫 τ_1 : 又称自旋-晶格弛豫。处于高能级的核将其能及时转移给周围分子骨架(晶格)中的其它核, 从而使自己返回到低能态的现象。

- a. 固体样品---分子运动困难--- τ_1 最大---谱线变宽小---弛豫最少发生;
- b. 晶体或高粘度液体---分子运动较易--- τ_1 下降---谱线仍变宽---部分弛豫;
- c. 气体或受热固体---分子运动容易--- τ_1 较小---谱线变宽大---弛豫明显。

综述: 样品流动性降低(从气态到固态), τ_1 增加, 横向弛豫越少发生, 谱线窄。

2) 纵向弛豫 τ_2 : 又称自旋-自旋弛豫。当两个相邻的核处于不同能级, 但进动频率相同时, 高能级核与低能级核通过自旋状态的交换而实现能量转移所发生的弛豫现象。

- a. 固体样品---结合紧密---自旋核间能量交换容易--- τ_2 最小--- 谱线变宽最大(宽谱)---纵向弛豫容易。
- b. 受热固体或液体---结合不很紧密---自旋核间能量交换较易--- τ_2 上升---谱线变宽较小---纵向弛豫较易;
- c. 气体---自旋核间能量交换不易--- τ_2 最大---谱线变宽最小---纵向弛豫最难发生。

综述: 样品流动性降低(从气态到固态), τ_2 下降, 越多纵向弛豫发生---谱线宽。

3) 在相同状态样品中, 两种弛豫发生的作用刚好相反, 只是在液态样品中, 二者的弛豫时间 τ_1 和 τ_2 大致相当, 在 0.5-50s之间。两种弛豫过程中, 时间短者控制弛豫过程。

溶剂选择原则: 稀溶液; 不能与溶质有强烈相互作用。

6.2 核磁共振波谱仪

仪器组成: 如图。

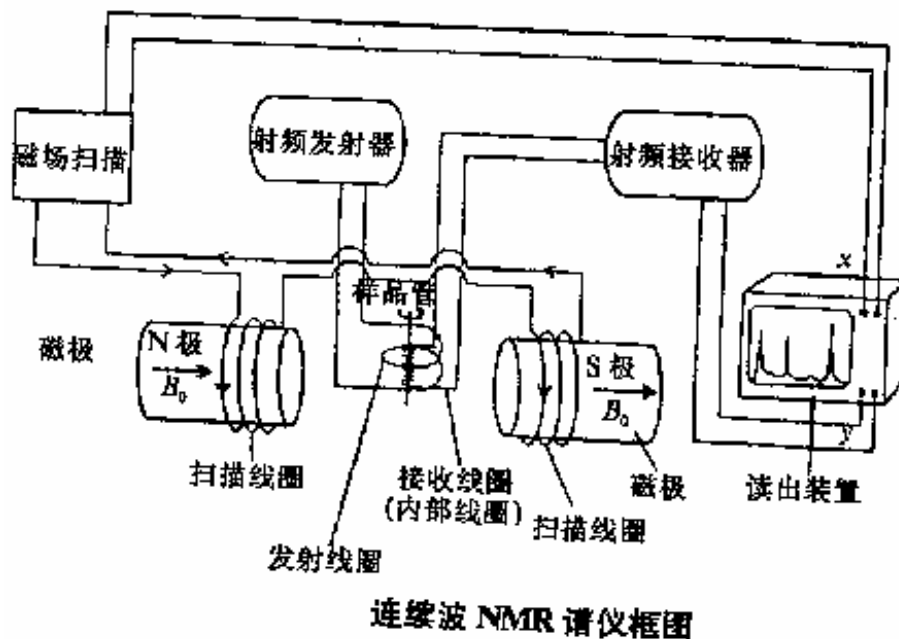


图 6-1

6.2.1 磁体

(1) **磁铁**: 产生一个恒定的、均匀的磁场。磁场强度增加, 灵敏度增加。

a. **永久磁铁**: 提供 0.7046T(30MHz)或 1.4092T(60MHz)的场强。特点是稳定, 耗电少, 不需冷却, 但对室温的变化敏感, 因此必须将其置于恒温槽内, 再置于金属箱内进行磁屏蔽。恒温槽不能断电, 否则要将温度升到规定指标要 2~3 天!。

b. **电磁铁**: 提供 2.3T 的场强, 由软磁铁外绕上激磁线圈做成, 通电产生磁场。它对外界温度不敏感, 达到稳定状态快, 但耗电量大, 须要水冷, 日常维护难。

c. **超导磁铁**: 提供 5.8T 的场强, 最高可达 12T, 由金属(如 Nb、Ta 合金)丝在低温下(液氦、液氮)的超导特性而形成的。在极低温下, 导线电阻挖为零, 通电闭合后, 电流可循环不止, 产生强磁场。特点是场强大、稳定性好, 但仪器价格昂贵, 日常维护费用极高。

※ 磁场漂移应在 10^{-9} - 10^{-10} 之间----可通过场频锁定方式克服。

6.2.2 探头

由样品管、扫描线圈和接收线圈组成。样品管要在磁场中以几十Hz的速率旋转, 使磁场的不均匀平均化。扫描线圈与接收线圈垂直放置, 以防相互干扰。在CW-NMR中, 扫描线圈提供 10^{-5} T的磁场变化来进行磁场扫描。

6.2.3 主机

一般的包含射频发射、接受，信号放大，样品温度控制，样品升降，锁场、匀场等一系列装置。

6.2.4 工作站

主要通过人机对话进行各种参数的设置，数据的保存及处理。

6.3 BRUKER AVANCE500 核磁共振波谱仪的使用方法

BRUKER AVANCE500 核磁共振波谱仪包括超导超屏蔽磁体、前置放大器、主机、探头、工作站，以及 BCU-05 变温单元、空气压缩机等。



图 6-2 磁体、前置放大器、BCU-05 变温单元



图 6-3 主机、UPS、工作站

BRUKER AVANCE500 核磁共振波谱仪采用 winnmr 3.1 系列软件，其操作主界面如图：

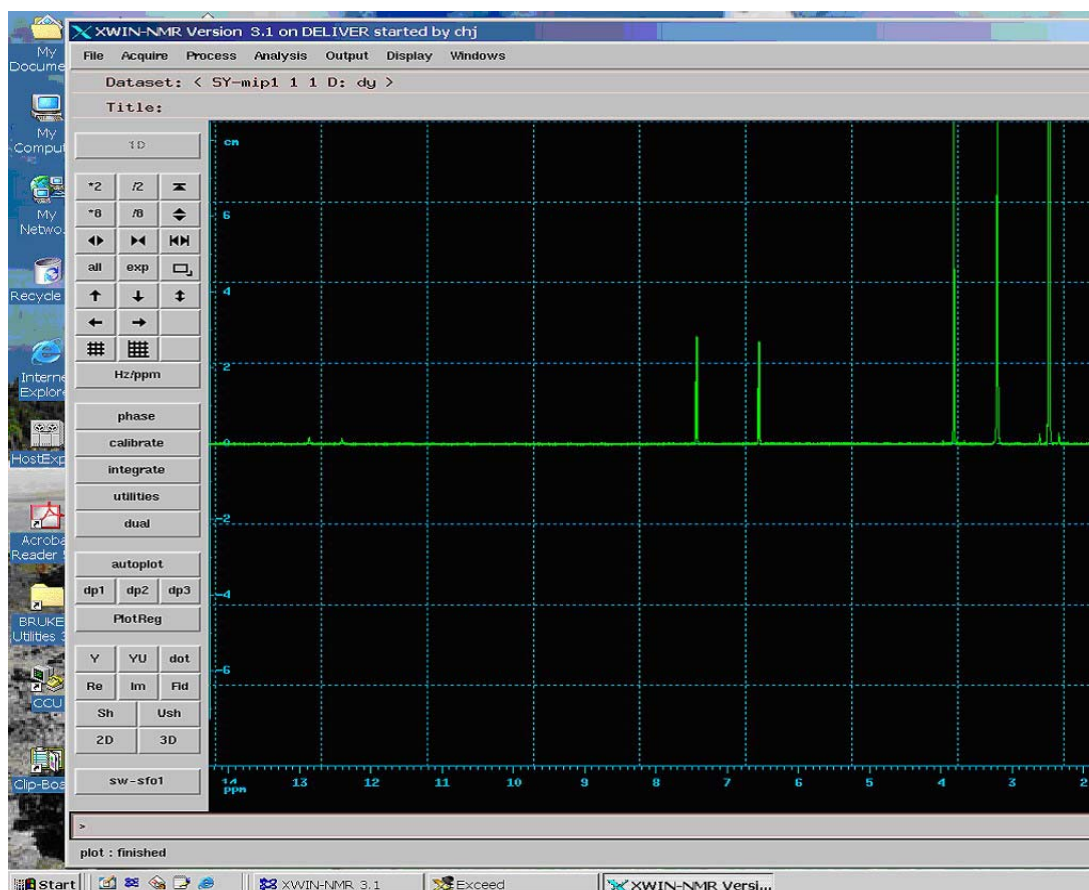


图 6-4 NMR 主界面显示图

6.3.1 测试前的准备

(1) 样品的配制

- 使用干净和干燥的样品管以免污染样品
- 使用高质量的样品管以免匀场困难
- 如果样品溶液有悬浊物最好过滤样品溶液
- 为了好匀场，尽可能保持相同样品溶液在相同体积或相同的高度（Φ 5mm:0.6ml or 4 cm)
- 使用量高器来确定样品的放置高度（注意样品管在转子中不能太松和太紧，以免在实验过程中下滑或实验后拔不出来）
- 样品管在放入磁体前一定要擦拭干净
- 应保证转子特别是反射面的干净

点击 BSMS 键盘的 lift on/off 弹出或放入样品。

(2) 探头调谐

探头的核心是部分是发射和接收线圈。要检测 NMR 信号，谐振回路的阻抗必须与发射机和接收机的阻抗匹配，这要靠调谐来实现。“Tune”使谐振频率等于观察核的共振频率；“Match”改变线路的阻抗，使线路的阻抗与发射机的阻抗匹配。正确的调谐才能得到最佳的灵敏度，正确的匹配使 90° 脉宽最小，减少偏共振效应，同时减少对探头的损害。

键入 atma，谱仪将根据所做实验自动调谐。

(3) 锁场和匀场

键入 lock 并在弹出的对话框里选择所用溶剂，点击 lock 按钮进行锁场。

匀场(shimming):

1. 手动匀场：更换样品后，如果样品溶液的体积或高度差别不大，一般只需要调节Z和Z²，有时可能还需要调节X,Y和Z³
2. 自动梯度匀场 (gradshim)：如果仪器配有梯度探头，可用梯度进行匀场。

6.3.2 Bruker 核磁共振实验的采样参数

Xwinnmr 程序中所有的采样参数都可以在打入 eda 命令后得到的窗口中加以选择和设置, 而窗口中出现的参数种类和顺序是可以通过编辑文件而改变的。该文件为: /u/exp/stan/nmr/form/acqu.e (在对该文件编辑以前, 必须先做该原始文件的备份)。在《Xwinnmr Software Manual》的“*The Acquire Menu*”一章中对这些采样参数的意义有较详细的描述。

eda 窗口中的参数大致可以分成以下三类:

(1) 与谱仪有关的参数

这类参数主要和仪器型号 (Avance或AMX/ARX) 和配置 (是否有DQD等) 有关。绝大多数的参数在仪器安装过程中, 执行expinstall命令时, 就会根据仪器的状况而设置。通常不需要再改变。其中参数AQ_mod一般设置为qsim, 当仪器配有DQD时应该为DQD, 但DQD对采样谱宽 (SW) 有一定要求, 谱宽太大 (如 ^{13}C 谱), 则还是应设置成qsim。

(2) 与样品和谱图有关的参数

这类参数的设置应视样品的情况而定, 主要有以下几个参数:

1. 采样谱宽 SW
通常用 ppm 表示, 也可用 Hz 表示 (SWH)
2. 采样数据点 TD
该数据值决定了 FID 的数据点
确定了上述两个参数, 同时也确定了其它一些采样参数的数值, 如 FIDRES. FW. AQ 和 DW 等。实际上它们之间是相互关联的, 一个参数的改变会引起其它一个或几个参数的改变。
 - a) 采样次数 NS
该参数的设置既要考虑样品的浓度, 也要考虑脉冲程序中相循环的要求。
 - b) 空采次数 DS
视脉冲程序的要求而定, 通常设置为 16 次。
 - c) 接受增益 RG
设置的数值使得第一次采样的 FID 占屏幕高度的三分之一左右即可。
 - d) 自旋核 NUC1, 基础共振频率 BF1, 绝对照射频率 SFO1、频率偏置 O1
当 NUC1 设置成要测定的核时, Xwinnmr 程序就会设置一个该核的基础共振频率 BF1, 它与另外二个参数的关系为 $\text{SFO1}=\text{BF1}+\text{O1}$, 其中 O1 为通常设置的发射中心。

(3) 与脉冲程序有关的采样参数

脉冲程序通常是由一组脉冲和一些不同的时间延迟组合而成的, 因此这类参数主要是用来设置这些脉冲和时间延迟的。每一个脉冲

需要脉冲宽度（作用时间）和发射功率二个参数才能确定。这类参数主要有以下几种：

1. PULPROG 设置成实验所需的脉冲程序的名字
2. D0-D31 描述不同的时间延迟。Xwinnmr 程序允许在一个脉冲序列中最多有 32 个互不相同的时间延迟。其中 D1 是专门用来设置驰豫延迟的；而 D0 和 D10 是固定用来设置 2D 和 3D 谱间接采样的时间变量的。
3. P0-P31 用来设置脉冲程序中各个脉冲的宽度（作用时间）
4. PL0-PL31 用来设置脉冲程序中各个脉冲所对应的发射功率
5. CPDPRG1-CPDPRG8 用来选择和设置组合脉冲（CPD）的方式（程序名字）

除此之外，这类参数还包括一些确定梯度场脉冲（或形状脉冲）的形状和作用时间的参数和一些不同的列表（list），后者用来设置实验中所需的变量。

6.3.3 XWINNMR 数据处理

核磁共振数据处理的各种参数都可以在打入 `edp` 命令后出现的对话框中进行设置和选择，而该对话框中参数种类的多少是可以根据需要进行编辑的。编辑的文件为：`/u/exp/stan/nmr/form/proc.e`。（注意：编辑前必须做好原始文件的备份）

由于所有的参数都必须通过其相关命令的执行而起作用，因此在《Xwinnmr Software Manual》（以下简称 Manual）中，对各个参数意义的描述是与对其相关命令的描述连在一起的，即：在叙述一个命令的同时，将与其相关的各种参数的意义加以说明。

Xwinnmr 的数据处理主要分成以下几个部分：

(1) 窗函数处理

Xwinnmr 程序在 `edp` 的对话框中提供了指数函数（EM）、高斯函数（GM）、正弦函数（SINE）、正弦平方函数（QSINE）等各种窗函数。它们的执行都需要预先设置与其相关的参数，如：EM 的 LB、GM 的 LB 和 GB、SINE 和 QSINE 的 SSB 等。这些参数的意义在《Manual》的“The Process Menu for 1D Data”一章中有详细的介绍。程序还能使操作者直接观察窗函数中各个参数的变化对 FID 和谱图的作用效果。具体操作如下：

1. 在数据窗口的上端菜单中点击 *process* 然后在其下拉的菜单中再选择 *Manual window adjust*，此时数据窗口将变成上下二部分，上面为窗函数曲线和经该窗函数处理后的 FID 信号；下面为该 FID 经 FT 变换后的谱图。

2. 在新出现的窗口的左端命令菜单里选择需要的窗函数。然后用鼠标选择和改变与该窗口函数相关的参数数值，就可以同时看到窗函数的曲线、FID 形状以及谱图上峰形随之变化的过程。在《Manual》的“1D Data Processing Tutorial”一章对此有详细的介绍。

(2) 充零、线性预测和 FT 变换

图谱处理中,如果参数 $SI > TD/2$ 时,在 FID 后面就会多出 $2*SI-TD$ 个数值为零的数据点,称之为充零,目的是为了提提高谱图的数字分辨率。

作线性预测处理时,处理参数中的 ME-mod 要设置成 Lpfr 或 Lpfc (程序会根据采集的 FID 情况自动地选择), NCOEF (表示线性预测计算中所用的系数) 通常设置为 100-200 之间。另有二个参数, TDeff 和 LPBIN, 与线性预测有关, 如果它们的设置都为零时, 表示所有采样点 (TD) 都用来做线性预测的计算, 而通过预测得到的数据点则为 $2*SI-TD$ 。(当 $SI=TD/2$, 则表示原来的 FID 数据点 TD 已经足够了, 不需要充零或线性预测了)。当 $0 < TDeff < TD$ 时, 表示不是用全部的采样数据点 (TD), 而只是其中的 TDeff 个数据点用来做线性预测的计算。当 $TD < LPBIN < 2SI$ 时, 表示原始的 FID 后面多出的数据点, 并不都是由线性预测的到的, 其中, LPBIN 以后的数据点 ($2*SI - LPBIN$) 则是由充零得的。有关线性预测的详细内容在《Manual》的“*The Process Menu for 1D Data*”一章中有详细的介绍。

充零、线性预测和窗函数都是对 FID 信号进行的一些数学处理, 即是在做富利叶变换 (FT) 之前完成的。这些处理是把 FID 文件读到内存中进行运算, 然后存在另外的文件中。因此原始的 FID 文件是保存不变的, 是存在目录 / du / data / USER / nmr / Name / EXPNO / 下面的, (其中 du, USER, Name, EXPNO 是根据计算机系统的设定和操作者的选择而定的)。而处理后的数据是存在目录 / du / data / USER / nmr / Name / EXPNO / pdata / PROCNO / 下面的。充零和线性预测的运算是和 FT 变换的命令连在一起的, 当执行 FT 变换的命令时, 程序根据上述参数的设置, 先完成充零和线性预测, 然后再作 FT 变换。

通常 FT 变换的到的是全谱, 即采样时定的谱宽 SW。Xwinnmr 程序也提供了一种局部的 FT 变换 (strip transform) 的功能, 即得到不是全谱, 而是感兴趣的一部份图谱。这个范围的设置是与两个处理参数, STRT 和 STSI, 有关, 这二个参数的单位是数据点而不是 ppm 和 Hz, STRT 的数值表示感兴趣的范围是从该数据点开始的, STSI 的数值表示该范围一共由多少数据点组成。例如: 全谱是由 32k 个数据点组成 ($SI = 32k$)。当 $STRT=0$. $STSI=16k$ 则得到的是前面一半谱; 而 $STRT=16k$.. $STSI=16k$. 则是后面一半谱, $STRT=8k$. $STSI=16k$.则是中间的一半谱。

(3) 相位校正

Xwinnmr 程序对 FT 变换后得到的图谱进行相位校正时有手动和自动二种, 通常使用手动的相位校正, 自动的相位校正则有以下三个命令:

- pk: 程序根据 edp 中的参数 PHC0 和 PHC1 的数值对全谱进行相位校正
- apk: 程序根据谱图上各个峰的情况, 先自动计算出合适的 PHC0 和 PHC1 的数值, 然后进行全谱的校正, 并把这两个数值保存在相应的参数里。
- apks: 和 apk 命令具有相同的功能, 但计算 PHC0 和 PHC1 的方法不同。

(4) 基线校正

基线校正分为自动和手动两种。

自动基线校正是计算出一条与谱图基线相匹配的多项式曲线来完成的。多项式的程度是由参数 **ABSG** 的设置决定的, (最大值为 6, 通常设置为 5)。有三个命令可以做自动基线校正: **abs** 和 **absd** 两个命令都是对全谱的基线进行校正, 差别是它们的计算方法不同, 而 **absf** 命令则是对局部的谱图进行基线校正。这个范围是由 **ABSF1** 和 **ABSF2** 两个参数确定。表示从多少 ppm 起到多少 ppm 止 (**ABSF1** > **ABSF2**)。

手动基线校正的过程是选择某种函数, 如多项式, 正弦函数或指数函数等, 人为地改变该函数中的各项系数, 使得该函数曲线与图谱的基线重叠, 当图谱的基线减去该函数的曲线时, 基线就变得平整了。具体的操作如下:

从菜单选择 **Process** → **Special processing** → **Baseling** → **correction basl**, 此时数据窗口会随之改变, 然后在左边菜单里选择所需要的函数, 用鼠标轮流改变与该函数相关的系数 (**A. B. C. D. E** 中的几个或全部), 使得随之改变的函数曲线与图谱的基线重叠, 再按 **diff**, 使基线平整, 然后再按 **return**, 选择 **Save & return** 即可。

Xwinnmr 程序还提供了一种称之为曲线规 (**cubic spline**) 方法作手动基线校正, 这种方法首先要在全谱上定几个基线点, 然后在各基线点之间用不同的函数来模拟出与基线重叠的曲线。具体操作过程在《Manual》的“1D Data processing tutorial”一章中有详细的介绍。

(5) 谱图定标

Xwinnmr 程序可以直接在谱上定标。这需要在谱图上找到一个相关峰, 其化学位移值是已知的 (如溶剂峰), 或者采用定标试剂 (如 **TMS**), 点击命令菜单上的 **calibrate**, 用出现的十字光标的中心对准该相关峰, (可以把包含相关峰的部份放大) 按鼠标中键, 在程序显示化学位移值的框内输入该相关峰正确的化学位移值即可。

(6) ¹H积分

Xwinnmr 程序提供积分功能。在主界面上点击 **integrate**, 点击鼠标左键, 这时鼠标变为向下箭头, 移到被积分峰的左侧点击中间键, 再移到被积分峰右侧点击中间键, 完成一次积分。积分完毕返回时点击保存即可。

6.3.4 谱图打印

已经处理好的谱图可在 **Xwinnmr** 主窗口点击 **DP1** 定义谱图范围, 并可键入 **view** 预览谱图, 结果满意键入 **plot** 输出到打印机。

Xwinnmr 还提供 **XWIN-PLOT** 程序进行谱图处理及输出, **XWIN-PLOT** 采用所见即所得方式, 其谱图处理功能更加强大。

思考题:

1. 在 NMR 测量时, 要消除顺磁杂质, 为什么?

2. 在 NMR 测量时, 要求将样品高速旋转, 为什么?

实验 测定未知样品的¹H NMR

一. 目的要求

1. 了解核磁共振波谱法测定化合物的结构。
2. 学习 AVANCE 500 核磁共振波谱仪的使用方法。
3. 学习核磁共振谱图的解析方法。

二. 原理

见 6.1 节

三. 仪器与试剂

仪器: AVANCE 500 核磁共振波谱仪; NMR 样品管 (5mm) 1 支。

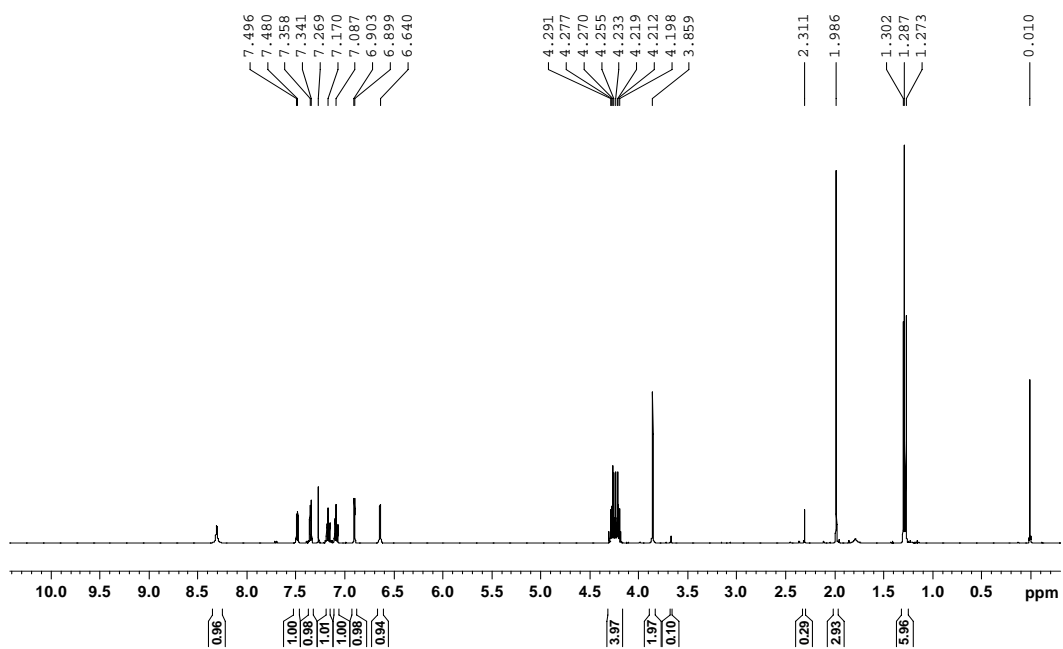
试剂: 未知样品 5mg; 氘代试剂 1ml。

四. 实验步骤

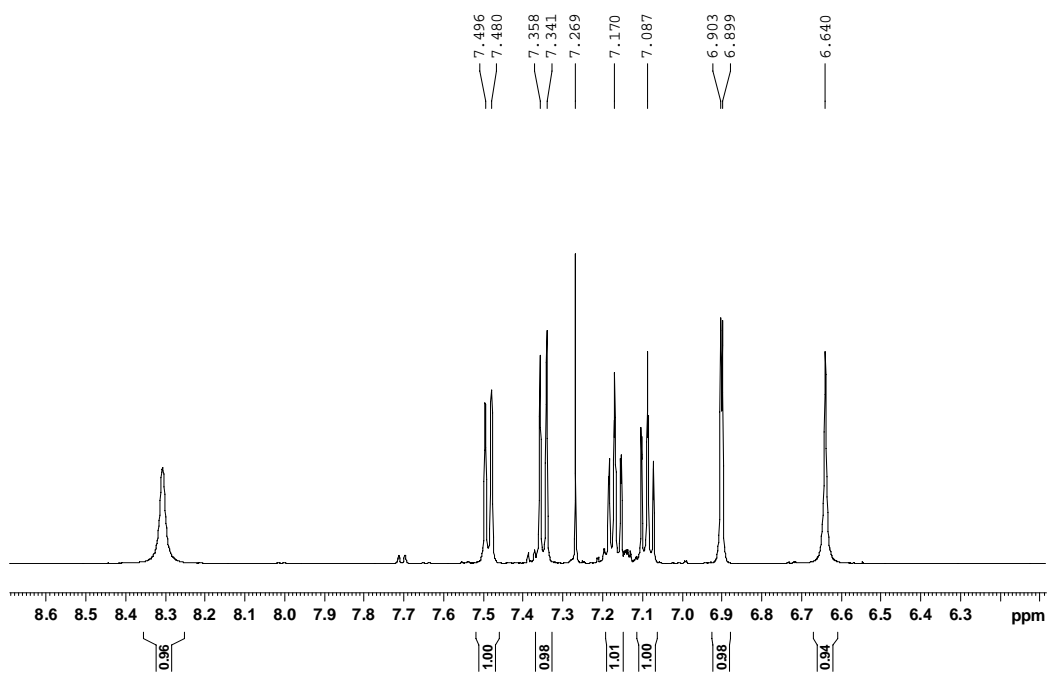
1. 配制样品溶液: 见 6.3.1。
2. 放入样品。
3. 建立数据目录: 读出一套标准数据, 键入 **edc**, 输入文件名, 实验号, 处理号。
4. 键入 **atma** 调谐。
5. 键入 **lock** 锁场, 调节 **BSMS** 键盘进行匀场。
6. 设定采样参数并键入 **zg** 采样。

五. 结果处理

1. 键入 **ft** 进行傅立叶变换。
2. 调整相位。
3. 调整基线。
4. 谱图定标。
5. 积分。
6. 打印谱图。

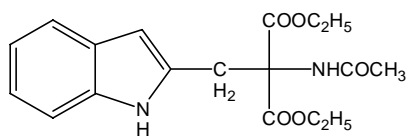


全图



局部放大

7. 根据所作谱图分析样品结构。



六. 注意事项

1. 匀场好坏对谱图质量影响很大，一定要做好匀场。
2. 需要升温、降温处理的样品，在升、降温过程中注意调节加热电压及气体流速。

七. 思考题

1. 化学位移是否随外加磁场而改变？为什么？
2. 波谱图的峰高是否能作为质子比的可靠量度？积分高度和结构有何关系？

