

# HPLC内标标准曲线法测定炔诺酮的含量



# Contents

- 1 实验目的
- 2 仪器原理
- 3 常用术语
- 4 仪器操作
- 5 实验内容

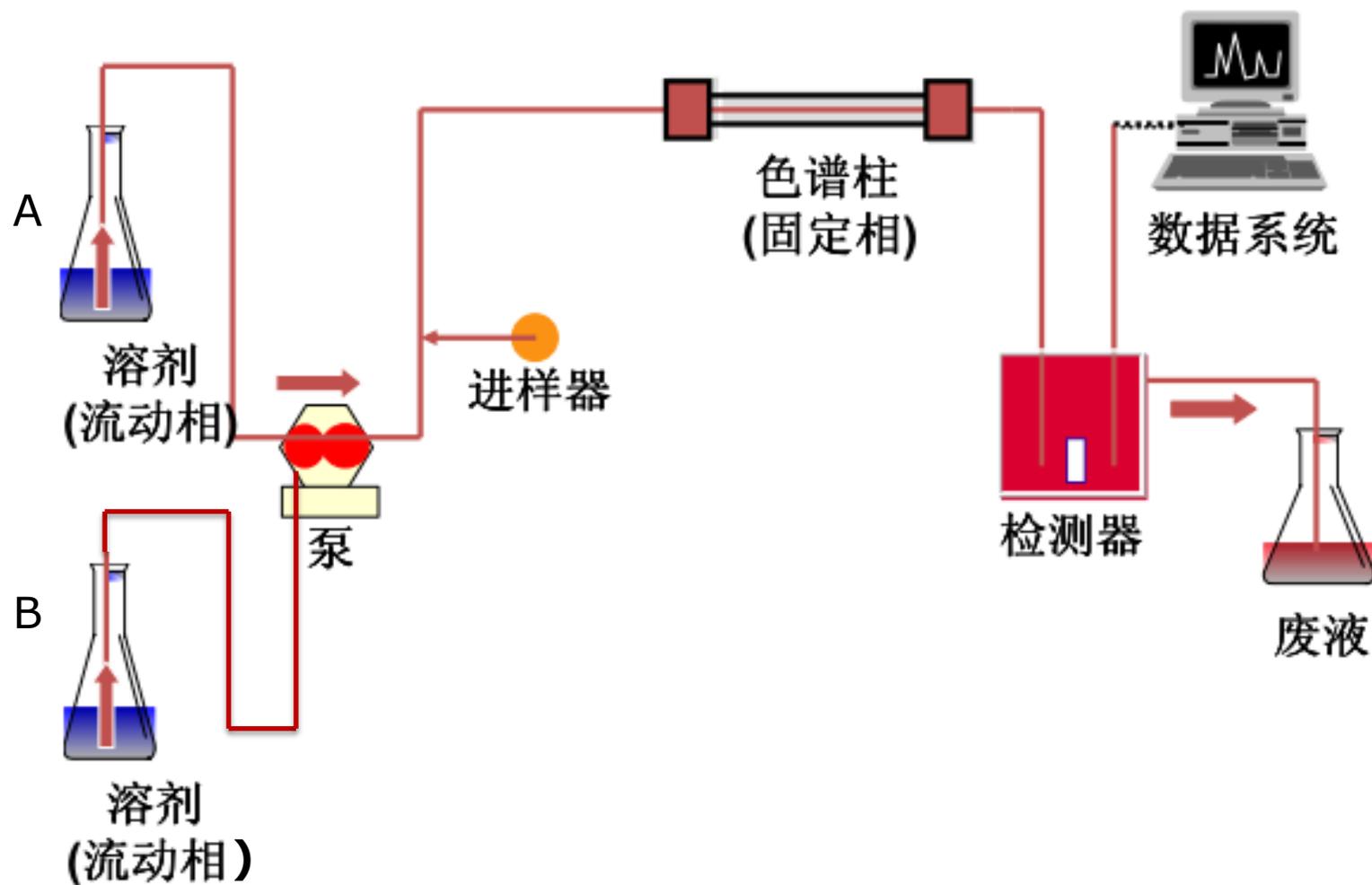
# 实验目的

- 掌握高效液相色谱法的原理
- 掌握内标标准曲线法的定量原理
- 了解HPLC仪器的一般使用方法

# HPLC仪器原理

- **HPLC, High Performance Liquid Chromatography**, 高效液相色谱法。
- 高效液相色谱是色谱法的一个重要分支，以液体为流动相，采用高压输液系统，将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱，在柱内各成分被分离后，依次进入检测器进行检测，从而实现对试样的分析。
- 广泛应用于医药、化学、食品、农业、环境等多个领域，对氨基酸、蛋白质、糖、农药、化药、抗生素、胆固醇、有机金属、无机物等成分进行定性和定量等。

# HPLC仪器原理



# 常用术语

## 硬件部分

- 流动相
- 泵（单泵，双泵，四元泵）
- 柱子
- 进样器（手动进样器，自动进样器）
- 检测器（UV，DAD，荧光检测器）

# 常用术语

## 软件部分

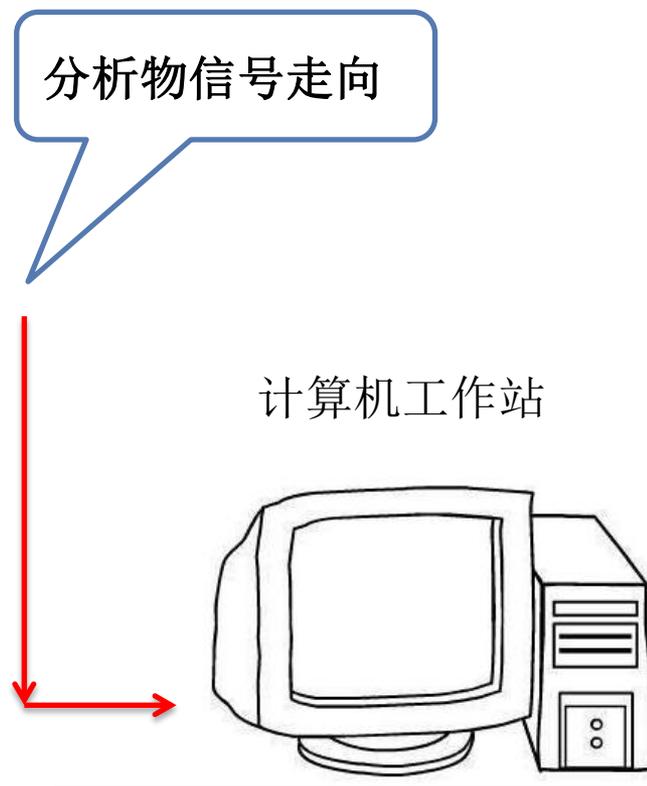
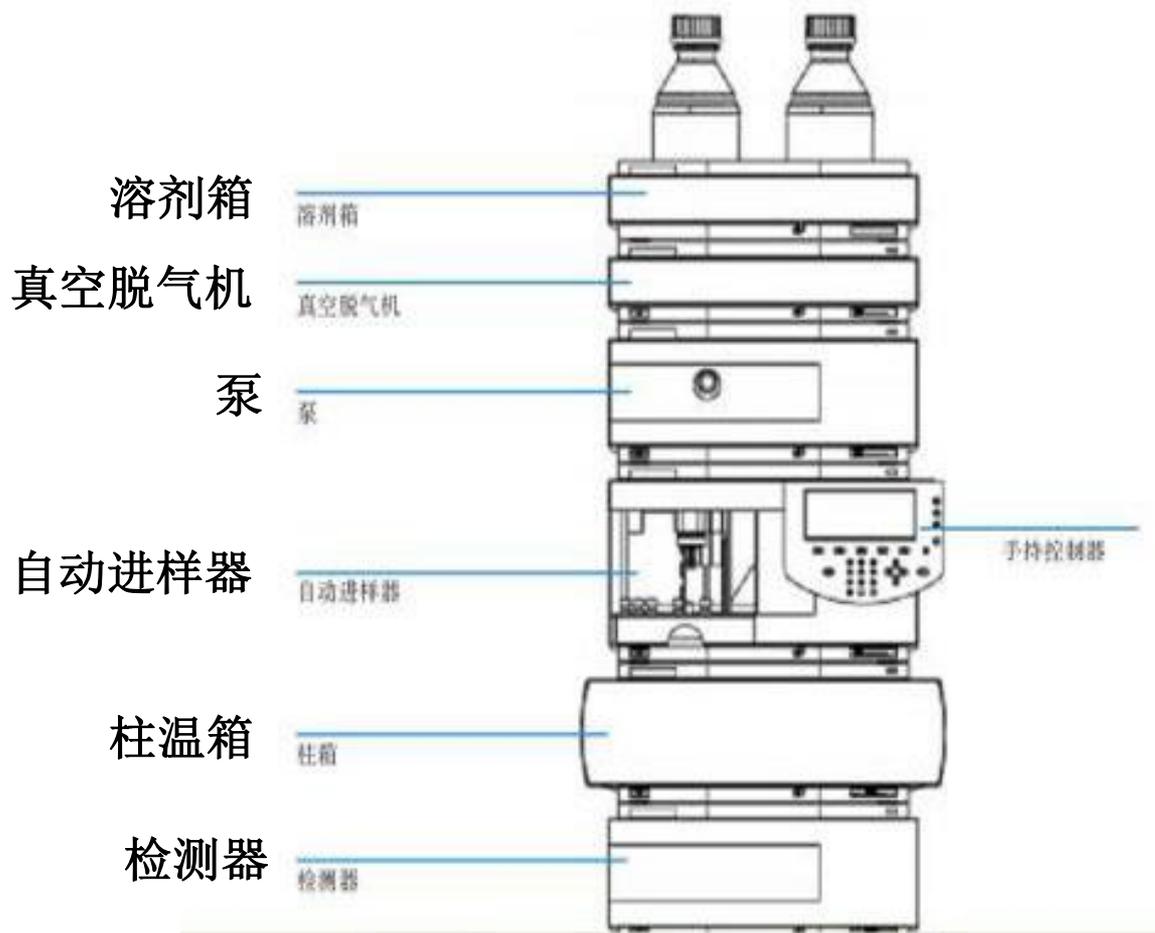
- 工作站（online, offline）
- 方法（Method） 涵盖所有检测参数的设定，进样量、流速、柱温、流动相比例、检测时间、检测器等
- 序列（Sequence） 涵盖进样的信息，样品位置、样品名、进样次数、文件保存路径等-自动进样
- 报告（Report） 将上述信息生成一个文件

# 常用术语

## 操作部分

- ▶ 脱气（排除系统中的气泡）
- ▶ 平衡（活化柱子）
- ▶ 按方法开始实验
- ▶ 冲洗柱子（防止柱子堵塞）
- ▶ **Standby/Off**（实验结束后停止）

# 常用术语

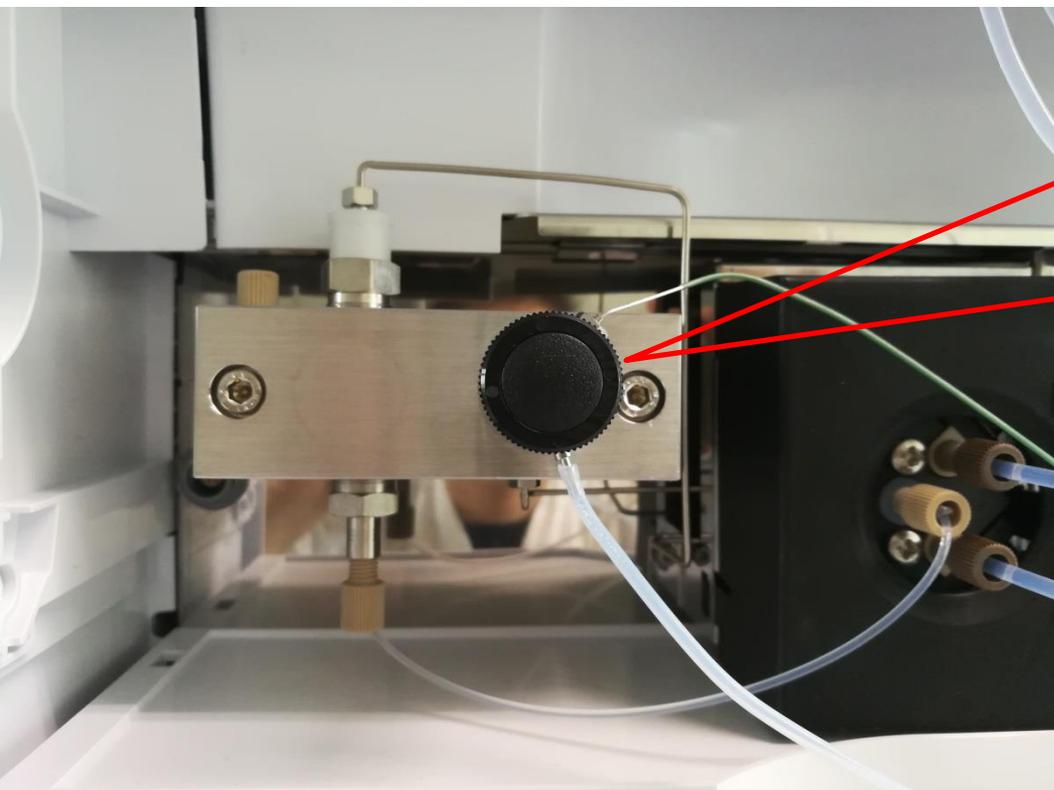


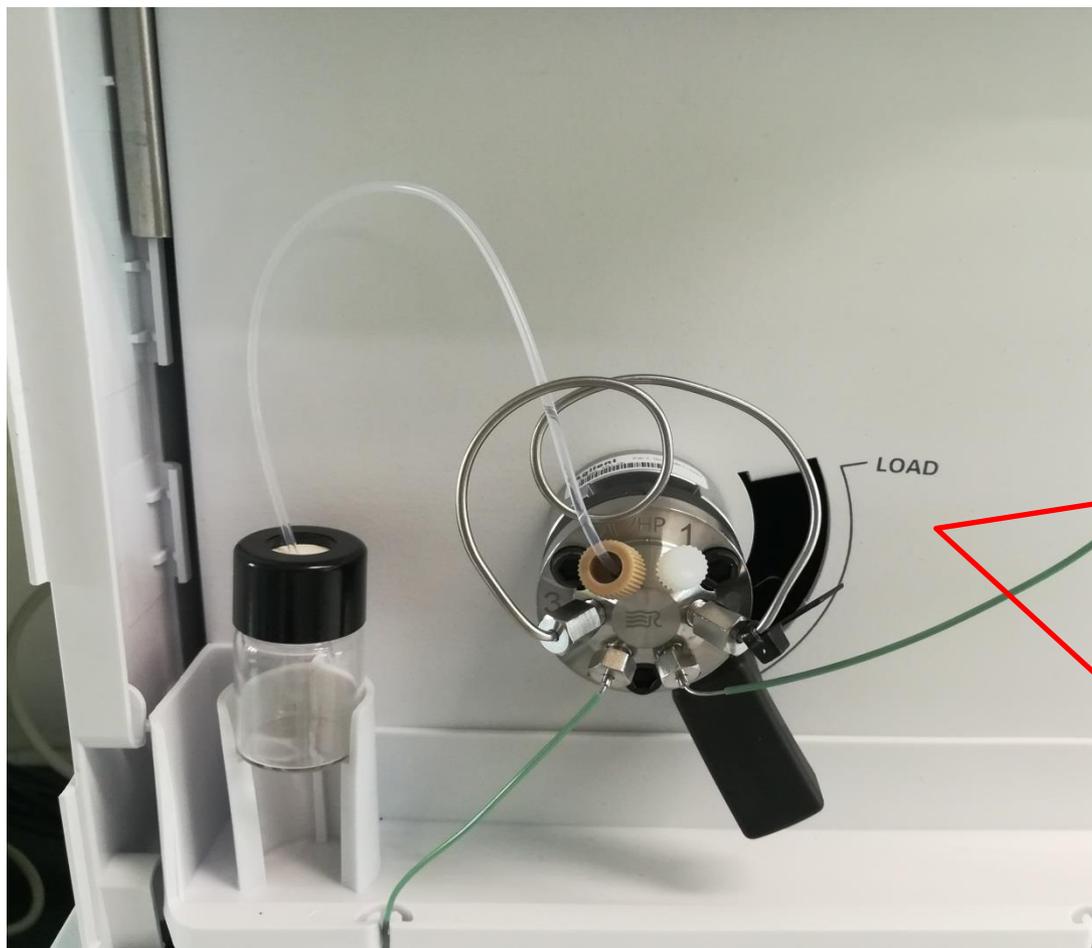
# 仪器操作



## 冲洗阀 (purge)

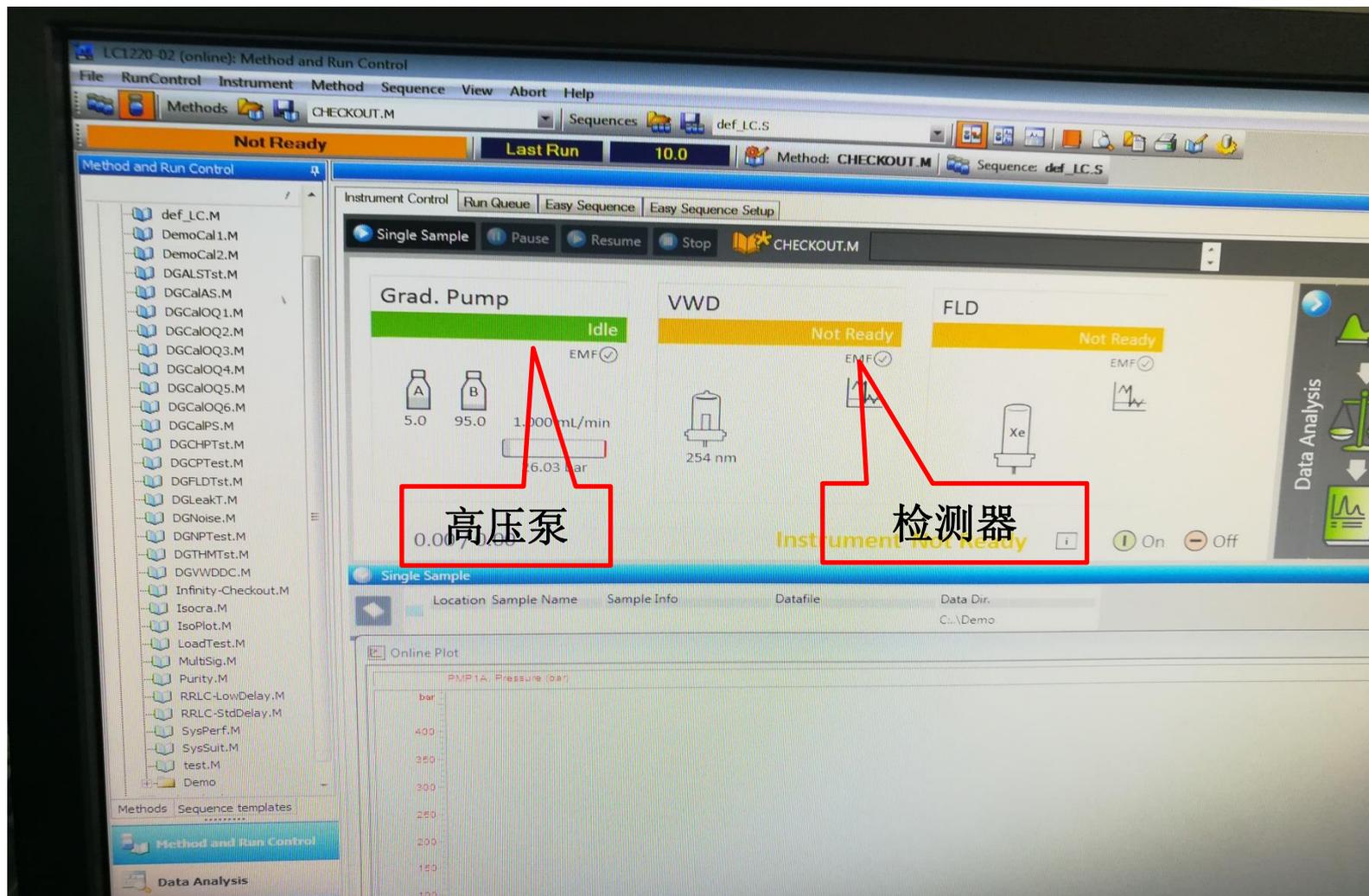
- 顺紧逆松。
- 拧紧，流动相走柱子，拧松走废液，
- 用于排除流路中的气泡

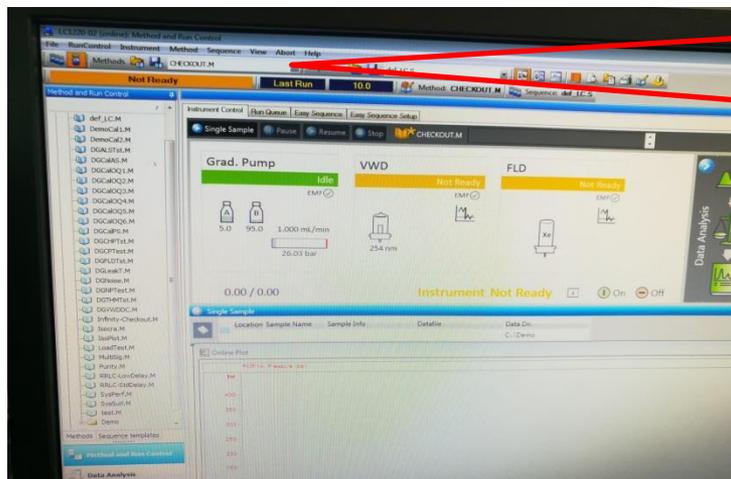




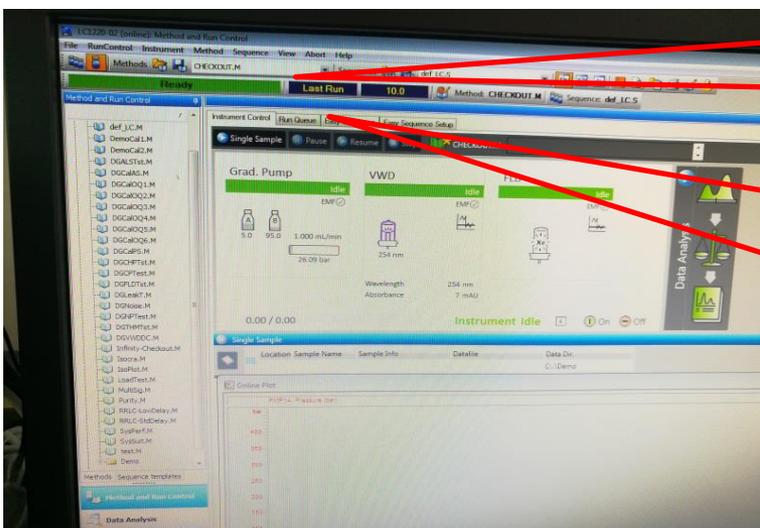
## 手动进样器

- 进样针置于注射位置，进样时扳至**load**位置，进样后扳于**inject**位置**5**秒后，再取下进样针
- 不用时处于**inject**位置





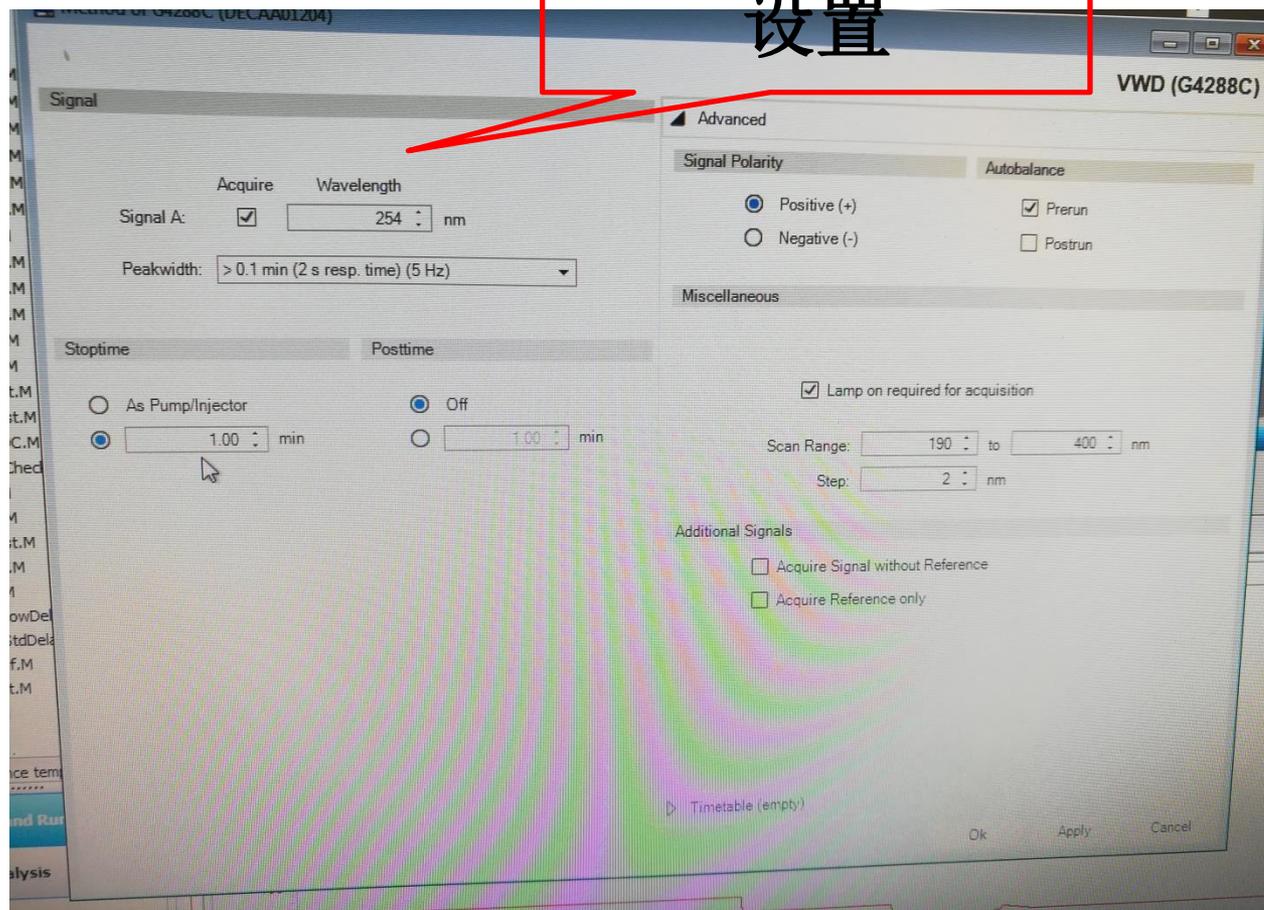
仪器状态  
橙色-未就绪，可能  
有模块没有打开

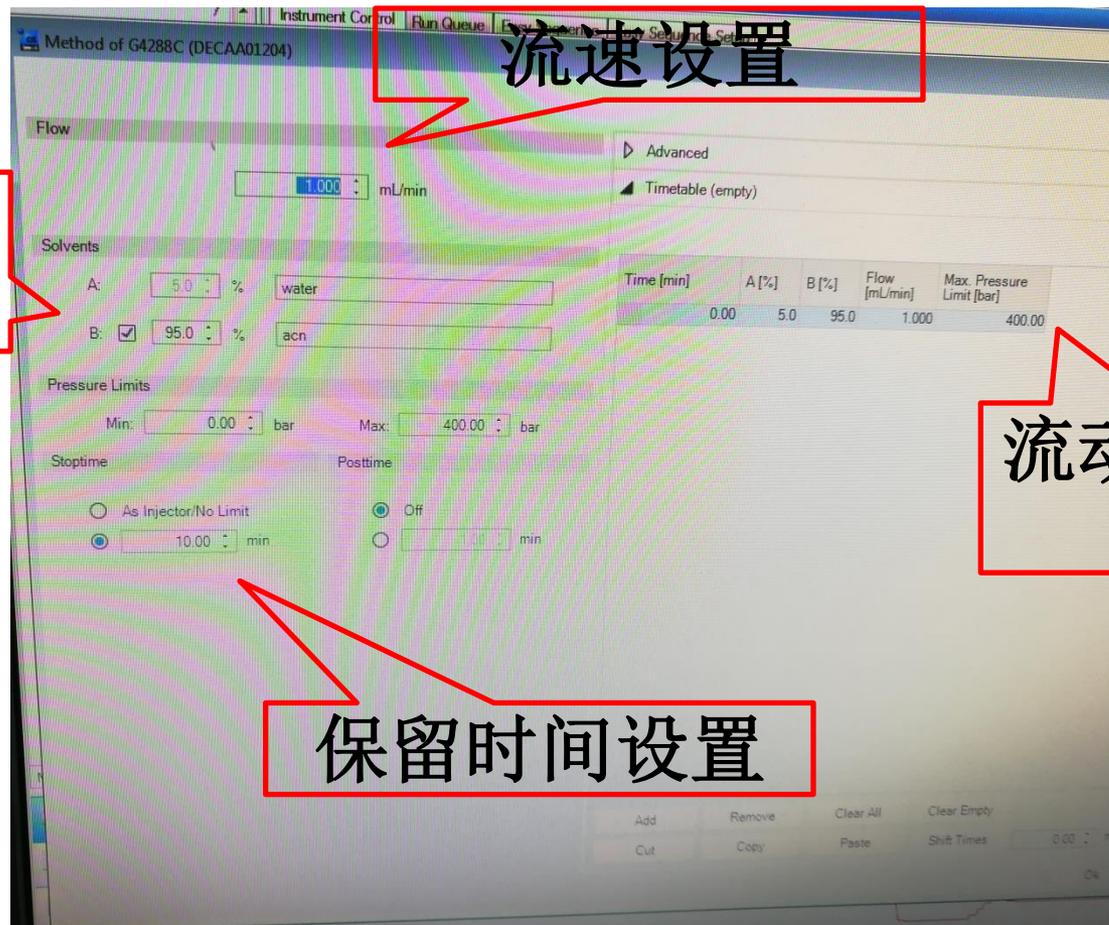


绿色-可以进样

红色-报警，停止使用  
蓝色-正在运行，请  
勿改动

# 紫外检测波长 设置





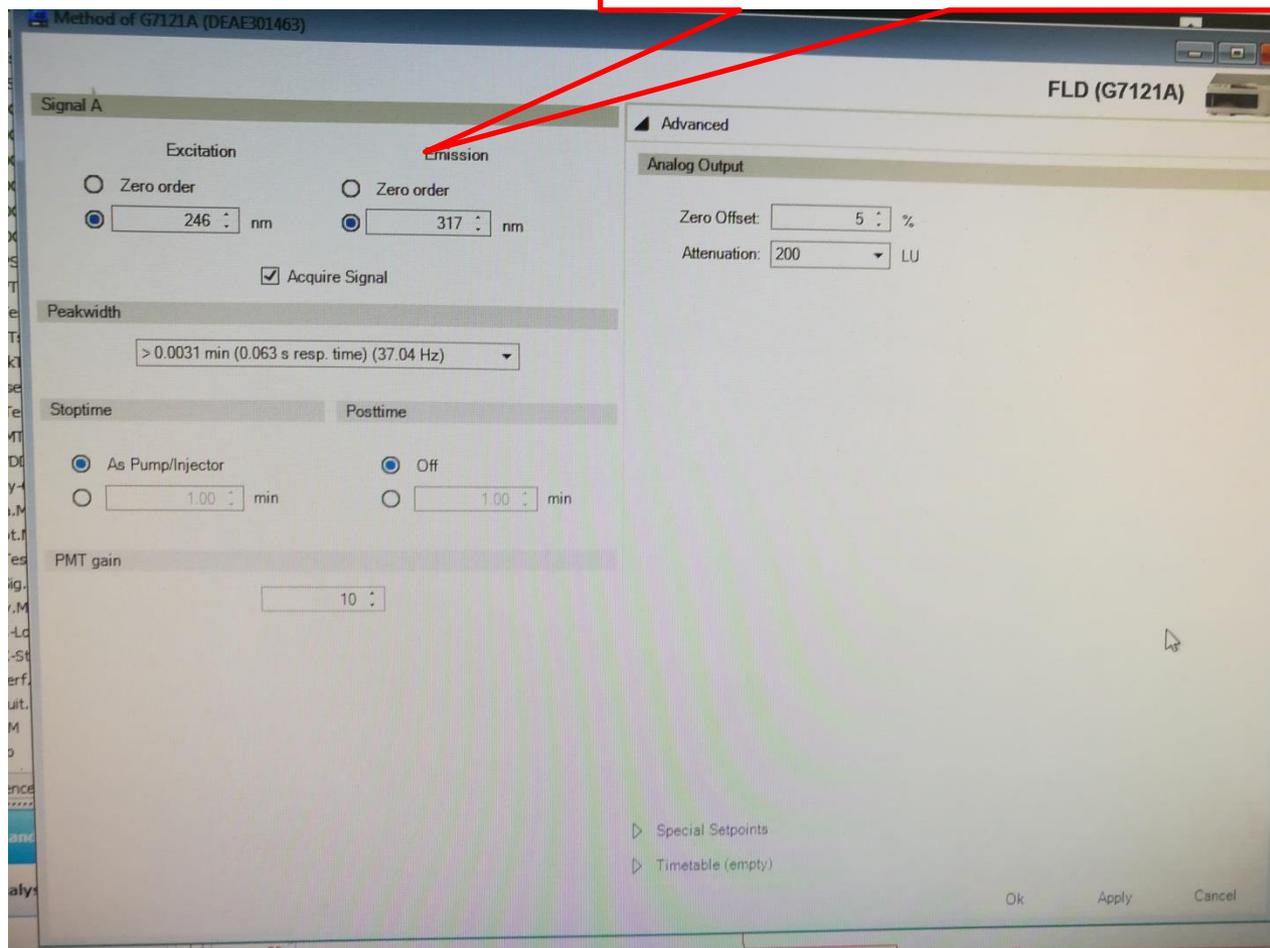
流动相  
比例设置

流速设置

流动相梯度  
设置

保留时间设置

# 荧光检测波长设置



Sample Name: new std

样品名

样品位置

```

=====
Acq. Operator   : ly                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 1
Injection Date  : 5/23/2014 11:24:54 AM           Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\2014-05-23 11-24-38\20140513.M
Last changed   : 5/23/2014 11:24:37 AM by ly
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\DEF.LC.M
Last changed   : 5/23/2014 3:18:11 PM by ly
                (modified after loading)
=====

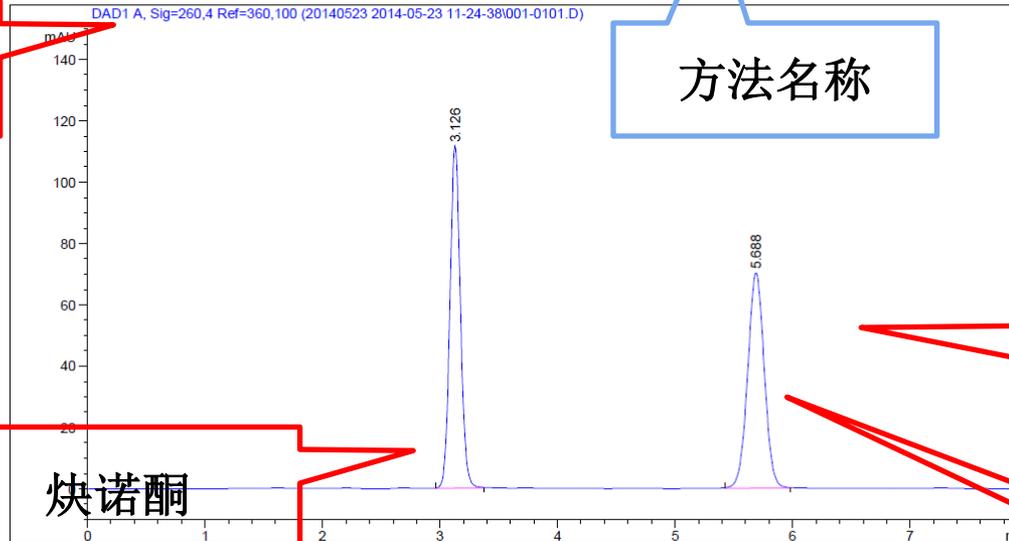
```

文件名称

进样量

检测波长

方法名称



色谱图

炔诺酮

黄体酮

Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=260,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.126	BB	0.0960	689.19470	111.64135	49.8950
2	5.688	BB	0.1529	692.09418	70.26131	50.1050

保留时间

峰面积

```

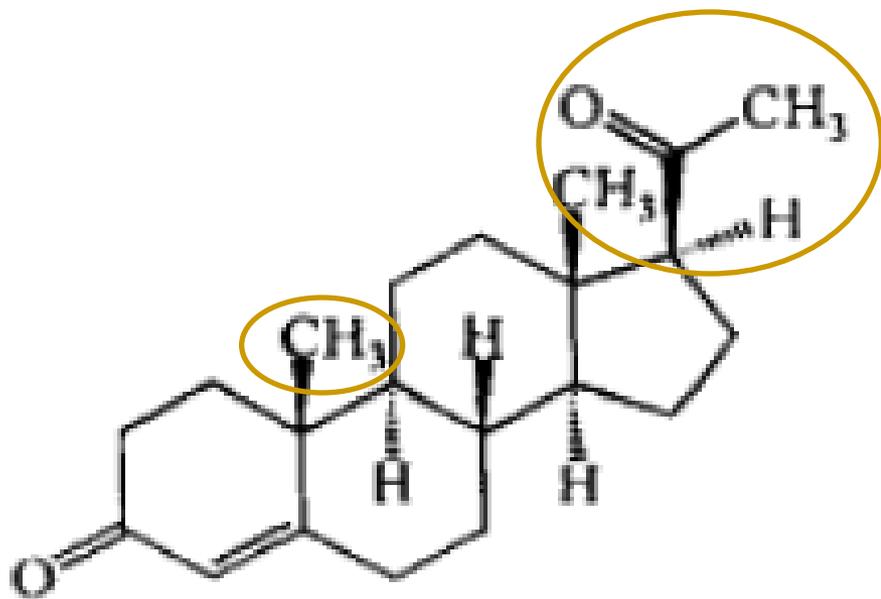
Totals :                               1381.28888  181.90266

```

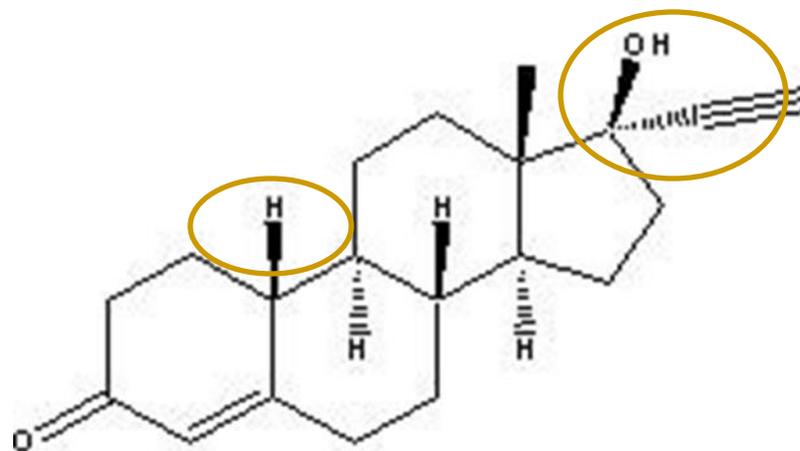
# 内标物质的选择

- **1.**内标物应是该试样中不存在的纯物质；
- **2.**它必须完全溶于试样中，并与试样中各组分的色谱峰能完全分离；
- **3.**加入内标物的量应接近于被测组分；
- **4.**色谱峰的位置应与被测组分的色谱峰的位置相近，或在几个被测组分色谱峰中间。

# 内标与物质的结构



黄体酮



炔诺酮

# 实验内容

## 定量原理 内标标准曲线法

- 在系列标准溶液和样品溶液中均加入同等浓度的内标物质。
- 测定分析物和内标物的HPLC信号，得到 $A_{\text{分析物}}$ 和 $A_{\text{内标物}}$ 。
- 以标准溶液 $C_{\text{标}}$ 作为横坐标，以 $A_{\text{标}}/A_{\text{内标物}}$ 的比值为纵坐标作图，得标准曲线。浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
- 测定样品的 $A_{\text{样}}/A_{\text{内标物}}$ ，带入标曲，算出对应的 $C_{\text{样}}$ 。

## 实验操作1-用内标法测定对乙酰氨基酚

用移液器按下表进行溶液配置，用**流动相**定容至刻度。

组号	快诺酮 ~263.9 $\mu\text{g}$ /mL	内标（黄体酮） ~268.4 $\mu\text{g}$ /mL	定容体积 (流动相定容)
出峰时间	3.1 min	5.7 min	
1	100 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	10mL
2	200 $\mu\text{L}$		
3	300 $\mu\text{L}$		
4	400 $\mu\text{L}$		
5	500 $\mu\text{L}$		
S	300 $\mu\text{L}$		

## 实验操作1-用内标法测定对乙酰氨基酚

- 样品配好后均用0.22um微孔滤膜过滤。



少量样品（本次实验采用）

- 用移液器吸取100 $\mu$ l溶液样品，手动进样分析，以A1-A5，B1-B5.....命名文件。

# 色谱条件

仪器：Agilent 1220

色谱柱：Eclipse XDB-C18柱（150×4.6mm，5μm）

流动相：甲醇:水（V/V）=80:20

流速：1mL/min

进样量：20μL，手动进样

紫外检测波长：250nm

工作站：Agilent ChemStation

# 仪器设定

## 操作部分

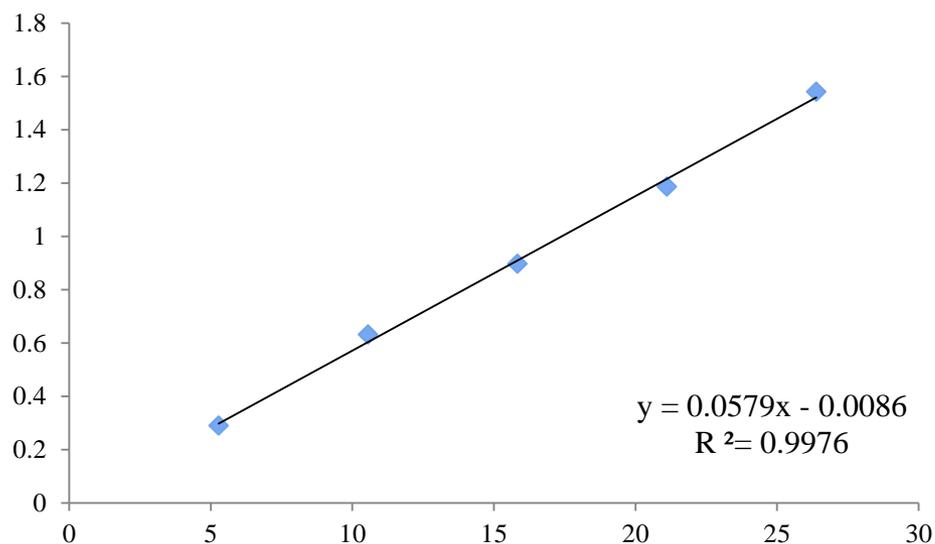
- ▶ 平衡（活化柱子）
- ▶ 按方法设定开始实验（具体见11、26页）
- ▶ 冲洗柱子-
  - 甲醇：水（10：90）冲洗30分钟
  - 甲醇：水（95：5）冲洗30分钟以上

# 实验内容

## 结果计算

- 计算 $A_{\text{样}}/A_{\text{内标物}}$
- 带入标曲计算浓度

$A_{\text{标}}/A_{\text{内标物}}$



2018年Agilent 1220数据

浓度 (μg/mL)

# 实验报告

## 一、实验目的

## 二、实验原理

有关高效液相色谱的原理。炔诺酮和黄体酮的结构。

## 三、仪器构件

写出高效液相色谱仪的主要模块及其作用。

## 四、实验操作

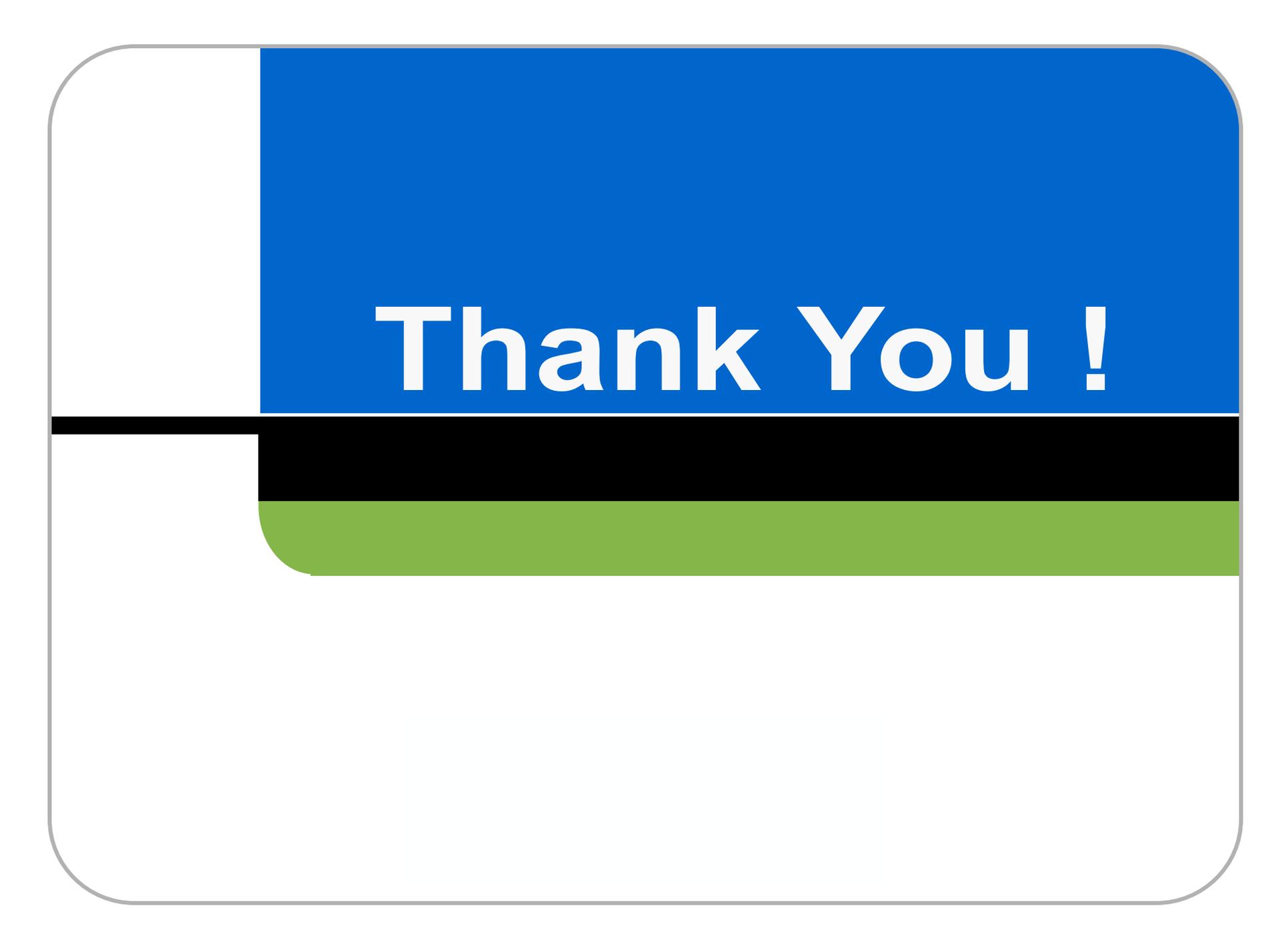
- 1、色谱条件；
- 2、本组样品处理方法；

## 五、结果与计算

- 1、分别列出标准品和内标物、样品和内标物的保留时间和峰面积；
- 2、用内标标准曲线法计算出回归曲线和样品浓度；  
炔诺酮样品的理论浓度为  $\sim 263.9\mu\text{g} / \text{mL}$
- 3、实验报告后附上自己组的一张色谱图，4-5人/组。

## 六、根据实验结果，填写思考题

改变影响因素			结果		
流动相	流速	检测波长	峰形	保留时间	峰面积
----	0.6mL/min	----			
----	----	238nm			
甲醇:水 (V/V) 60:40在10分钟内变 为90: 10	----	----			
甲醇:水 (V/V) =60:40	----	----			



**Thank You !**