**卫生化学**

**第一章：绪论**

**卫生化学（名）：**是应用分析化学的基本理论和实验技术研究预防医学领域中与健康相关化学物质的质、量及其变化规律的学科。

**卫生化学的任务和内容：**卫生化学的任务主要是从事预防医学中所需要的化学检验方法的研究。

**卫生化学的内容包括：**  
1.误差、分析数据处理，分析质量控制、计量认证简介。  
2.仪器分析：是以测量物质的某些物理或物理化学性质的参数来确定其化学组成、含量或结构的分析方法。包括光学分析法、电化学分析法及色谱分析法等。  
3.预防医学领域中各类样品的采集原则和样品前处理。  
4.与讲课内容相适应的实验内容。

**仪器分析的特点（与化学分析比较）：**

1.灵敏度高，检出限量可降低。

2.选择性好。

3.操作简便，分析速度快，容易实现自动化。

4.相对误差较大。

5.需要价格比较昂贵的专用仪器。

**仪器分析与化学分析关系（填）：**

1.仪器分析与化学分析的区别不是绝对的，仪器分析是在化学分析基础上的发展。不少仪器分析方法的原理，涉及到有关化学分析的基本理论。

2.不少仪器分析方法，还必须与试样处理、分离及掩蔽等化学分析手段相结合，才能完成分析的全过程。

3.仪器分析有时还需要采用化学富集的方法提高灵敏度。

区别化学/仪器分析的重要方法：浓度

**仪器分析方法：**

1.光学分析法。

2.电化学分析法。

3.色谱法。

**分析方法分类：**

1.化学分析和仪器分析。

2.常量、半微量和微量分析。

3.常组分、微量组分和痕量组分分析。

4.无机分析和有机分析。

5.常规分析和仲裁分析。

**分析的一般过程：**

1.样品采集；

2.样品处理；

3.分析方法的建立；

4.分析结果的计算与数据处理。

**分析结果的表示方法：**

1.固体样品：固体样品的结果表示方法是质量分数，即重量百分比。

2.液体样品：液体样品的分析结果要用物质的量浓度表示，有时也用质量浓度表示。

3.气体样品：空气中有害物质一般常以质量浓度（mg/m3）和体积分数（ml/m3）表示。

**第二章分析数据的处理和分析工作的质量保证**

**误差的分类，产生原因，消除方法**

随机误差 ：是指在分析过程中，由某些确定因素引起的误差。

（1）方法误差：完善分析方法。

（2）仪器与试剂误差：校准仪器可校正仪器误差，提纯试剂或使用纯度的更高的试剂可以校正试剂误差

（3）主观误差：

2.随机误差：指一些偶然出现的误差。多次重复测量可以减小随机误差

**准确度和精密度的关系**

准确度可反应分析方法或测量系统中的系统误差和随机误差的大小，精密度可反映分析方法或测量系统中随机误差的大小。高精密度是保证测量结果高准确度的先决条件，然而仅仅有高精密度仍不足以保证测量结果的高准确度，只有在分析过程中严格控制和消除分析方法或系统中的系统误差才有可能获得高准确度的测量结果。

**有效数字的定义和运算规则**

有效数字：指在测量中能实际测量的有实际意义的数字。

运算规则：四舍六入五留双

**第三章：紫外-可见分光光度法**

**紫外-可见分光光度法：**是根据溶液中物质的分子或离子对紫外和可见光谱区辐射能（200-800nm）的吸收来研究物质的组成含量和结构的方法。

它广泛用于无机和有机物的定性和定量测定，是卫生分析中常用的分析方法。

**电磁辐射：**是一种以巨大速度（在真空中为2.9979×1010cm/s）通过空间传播的能量，最小单位是光子。它具有波粒二象性，既具有粒子的性质，也具有波动的性质。

**分子的总能量由以下几部分组成：**

E总=E电子+E振动+E转动

E电子是分子中电子相对于原子核运动所具有的能量；  
E振动是分子内原子在平衡位置附近振动所具有的能量；  
E转动是分子绕着重心转动所具有的能量。

当分子吸收一个具有一定能量的光子时，分子就由较低的能级跃迁到较高的能级，如从E0→E1。被吸收光子的能量必须与分子跃迁前后的能级差恰好相等，光子才能被吸收。  
即分子吸收具有量子化的性质。

E入射光=E激发态+E基态=hv

**朗伯—比尔定律：**当一束平行单色光通过一个一定厚度的含有吸光物质的物体时，一些光子被吸收，光的强度会降低。

-lgI/I0=abC

透光率T：即透射光强度 I与入射光强度 I0 的比值。

若以透光率的负对数为吸光度A**，即A=-lgT， 则A=abc，**即在一定条件下吸光度与吸收层厚度和吸光物质的浓度成正比。

**朗伯—比尔定律成立的前提是：**（1）入射光是单色光；（2）吸收发生在均匀的介质中；（3）吸收过程中，吸收物质互相不发生作用。

吸收定律中的a称为吸光系数，即单位吸收层厚度、单位浓度的吸光度。其在给定条件下(单色光波长、溶剂、温度等)，吸光系数是物质的特征常数。

在吸光度与浓度之间的直线关系中，吸光系数是斜率，是定量的依据，其值越大，灵敏度越高。

**摩尔吸光系数ε(molar absorptivity)：**其意义是溶液中吸光物质浓度为1mol/L，吸收层厚度为1cm时的吸光度。

**分光光度计主要部件和类型：**

1.光源：（1）紫外光源：主要采用氢灯或氘灯。光谱范围为150-400nm。

（2）可见光源：通常使用钨灯。波长大于350nm

2.单色器：（1）棱镜，（2）光栅；

3.吸收池；

4.检测器（或传感器）：（1）单道光子检测器（2）多道光子检测器

5.读出装置或显示系统。

**分光光度计的类型：**

1.单光束分光光度计；

2.双光束分光光度计；

3.双波长分光光度计。

**分光光度法的定性和定量：**

1.定性方法：根据被测物及标准物的

（1）吸收曲线的形状是否相似；

（2）λmax、λmin及λsh是否相同；

（3）ε是否相同进行定性分析。

2.定量方法：

（1）标准曲线法：A=abc

（2）直接比较法：CX=(CS\*AX )/AS

（3）双波长分光光度法；

（4）催化动力学分光光度法。

**分光光度法的误差来源及其消除：**

1.偏离吸收定律所引起的误差；① 改进仪器性能，增加抗光谱干扰能力。②采用掩蔽剂，加入一种能与干扰离子选择性形成较稳定的无色络合物(或与分析物具有不同的吸收光谱)的试剂。

2.光度误差；① 当待测物含量高时，少取样品或稀释试液；含量低时，多取样品或预先用适当方法富集。

② 选择适当厚度的吸收池，以调节A读数。

3.仪器误差；① 测定前仪器先预热，使光源尽量稳定。②选择配套的比色皿。③ 比色皿应清洗干净。

4.与显色反应有关的误差；①加入掩蔽剂使干扰离子形成稳定的无色络合物。

②改变干扰离子的价态以消除干扰。

③控制溶液pH值。

④选用适当的测定波长以消除干扰。

⑤如果应用上述方法尚不能消除干扰离子的影响，那么只有将干扰离子预先分离除去。通常分离方法有沉淀分离法、离子交换法、溶剂萃取分离、蒸馏和挥发分离法等。

5.参比溶液。①溶剂空白：如果试剂、显色剂和共存离子均为无色、或对测定无干扰，则可以用蒸馏水或纯溶剂作参比溶液。

②试剂空白：如果共存离子对测定无干扰，而试剂和显色剂带色，则可按操作步骤取适当体积的试剂和显色剂相混合，并稀释至相对的体积，作为参比溶液。

③样品空白：如果只有样品本身有色，显色剂无色，可用不加显色剂的样品溶液作参比溶液。

④平行操作空白：为抵消在操作过程中，由于试剂、器皿、水和空气等引入干扰杂质对被测组分的影响，则可取蒸馏水或去离子水代替试样，按照与样品分析相同的条件与样品平行操作，测定时用它作参比溶液，称为“平行操作空白”。

**显色条件：**

1、显色剂浓度；

2、溶液的pH值；

3、显色时间；

4、显色温度；

5、共存离子的影响；

**常见的参比溶液及其用途：**

1.溶剂空白：如果试剂、显色剂和共存离子均为无色、或对测定无干扰，则可以用蒸馏水或纯溶剂作参比溶液。

2.试剂空白：如果共存离子对测定无干扰，而试剂和显色剂带色，则可按操作步骤取适当体积的试剂和显色剂相混合，并稀释至相对的体积，作为参比溶液。

3.样品空白：如果只有样品本身有色，显色剂无色，可用不加显色剂的样品溶液作参比溶液。

4.平行操作空白：为抵消在操作过程中，由于试剂、器皿、水和空气等引入干扰杂质对被测组分的影响，则可取蒸馏水或去离子水代替试样，按照与样品分析相同的条件与样品平行操作，测定时用它作参比溶液，称为“平行操作空白”。

**提高分析灵敏度和准确度的方法：**

1.萃取分光光度法：是提高吸光度法灵敏度最常用的方法。

2.示差分光光度法：

（1）高吸光度示差法：用一种比样品溶液浓度（C）稍低的参比溶液（C1）代替空白（相当于C1=0）来调节仪器的满标度。

（2）低吸光度示差法：用一种比样品溶液浓度稍高的参比溶液（C2）代替调节暗电流（相当于C2=∝）来调节仪器的零点。

**分离技术在分析化学中的作用：**

提高方法的专一性；提高方法的灵敏度。

具体的说有以下几方面作用：

（1）与干扰物质分离；

（2）预浓集痕量组分；

（3）将被测组分转移至合适介质中；

（4）离析出纯组分；

（5）实现间接分析的重要步骤。

**样品的分解和溶解方法有：**

溶解法（水溶法、酸溶法、碱溶法等），分解法（干法灰化、湿法灰化、微波溶解等）。

**分离方法有：分离技术在分析化学中的两在作用是：提高方法的专一性；提高方法的灵敏度。**

色谱法，溶剂萃取法，固相萃取及超临界流体萃取，吸附与解吸，沉淀与共沉淀，蒸馏、挥发及区域熔融，电泳，膜分离，泡沫浮选，超离心等。

**十六、消除干扰方法：**

1.掩蔽剂使干扰离子形成稳定的无色络合物。

2.改变干扰离子的价态以消除干扰。

3.溶液pH值。

4.适当的测定波长以消除干扰。

5.应用上述方法尚不能消除干扰离子的影响，那么只有将干扰离子预先分离除去。通常分离方法有沉淀分离法、离子交换法、溶剂萃取分离、蒸馏和挥发分离法等。

**第三章：分子荧光分析法**

**光致发光（名）：**吸收辐射能后处于电子激发态的分子以发射辐射的方式释放能量回到基态，这一现象称为发光。 最常见的两种发光现象是分子荧光和分子磷光。

**分子荧光的发生原理：**某些物质分子吸收了一定波长的光能之后，基态电子跃迁到激发态，很快以无辐射跃迁的形式下降到第一电子激发态的最低振动能级。再由第一电子激发态的最低振动能级下降到基态的各个振动能级，同时发射出比原来所吸收的频率较低波长较长的光能，这种光称为荧光。

**使分子从基态跃迁到激发态的辐射称为激发光。**

**分子的去激发过程：**分子被激发到较高的能级后不稳定，将以不同途径释放多余的能量回到基态，这个过程即为分子的去激发过程。

**去激发过程包括下面几个可能的途径：**

（1）振动弛豫；（2）内部转换；（3）荧光发射；（4）系间跨跃；（5）磷光发射；（6）能量外部转移。

**激发光谱与荧光光谱：**

1.激发光谱：荧光强度为纵坐标，激发光波长为横坐标所得的光谱曲线为激发光谱。

2.荧光光谱：荧光强度为纵坐标，荧光波长为横坐标所得的光谱曲线为荧光光谱。

3.荧光光谱的特征：（1）荧光波长比激发光波长长；（2）荧光光谱的形状与激发光波长无关；（3）荧光光谱与激发光谱的形状呈镜像对称。

**荧光与分子结构的关系（荧光强度与溶液浓度的关系）：**

能够发射荧光的物质都应同时具备两个条件：一是物质分子必须有强的紫外-可见吸收；二是物质具有较高的荧光效率。

**荧光物质对光辐射的吸收，服从于朗伯—比尔定律，即：**

I / I0 = 10 –abc荧光物质吸收的光强度 = I0 －I = I0 (1 － 10 -abc)

**2.荧光效率：**激发态分子中发射荧光的量子数占吸收激发光的量子总数的比例，数值在0-1之间。

ϕ = 发射荧光的光量子数 / 吸收光的光量子数或ϕ=发射荧光的分子数/吸收光的分子数

**3.F = K’ϕ I0 (1 － 10 -abc)**；当***abc<0.05*，I0一定**时***F = K C，***此式仅适用于**低浓度**的情况，此时荧光强度与溶液浓度关系曲线为**一直线**。

**内滤效应和荧光猝灭效应：**当浓度增大至一定限度时，荧光强度与溶液浓度关系曲线将弯向浓度轴。

**内滤效应：**是指样品浓度过大时，使荧光在未射出样品池之前就被溶液中未被激发的荧光物质所吸收（自吸收）而引起的荧光强度随浓度下降的现象。

**荧光猝灭效应：**即荧光分子与溶剂或其他溶质分子之间相互作用，使荧光强度减弱的现象。能引起荧光强度降低的物质称为荧光猝灭剂。荧光猝灭包括动态猝灭和静态猝灭。

**影响荧光测定的因素：**

1.分子结构：只有那些具有共轭双键的分子有利于发射荧光。而饱和的或只有孤立双键的化合物，不呈现显著的荧光。

2.溶剂因素：同一种荧光物质在不同溶剂中，其荧光光谱的位置和强度都有差别。

3.浓度：在F与C的关系中提出，仅适用于低浓度的情况，另外浓度增大，由于内滤效应和荧光猝灭效应等引起曲线弯曲。  
4.酸度：带有酸性或碱性环状取代基的芳香化合物的荧光一般都与pH值有关，有些化合物在离子状态时不显荧光，因此，在利用荧光强度作测定时，溶液的pH值的严格控制是非常重要的，需通过实验来确定。  
5.温度：因此在测定过程中尽可能保持温度恒定并选择低温条件进行荧光检测。

6.荧光的熄灭：即荧光的猝灭效应和内滤效应。  
7.共存物质产生荧光：杂质产生荧光干扰测定。  
8.散射光的干扰：配制溶液的溶剂、容器以及能形成胶粒的溶质在激发光照射下，常发射散射光，如果荧光光谱与此种散射光重叠或部分重叠，就要影响荧光的测量，因而在测定时应设法避免。  
散射光有两种，一是瑞利散射光，二是拉曼散射光

**荧光法测量仪的主要部件**

激发光源：测量荧光强度所用的激发光源一般要比测量吸光度中所用的光源强度强

滤光片或单色器：：激发单色器，发射单色器

样品池：通常用石英制成，因为荧光有紫外区的，普通玻璃会吸收。样品池为四面透光的方形石英池

检测器：用光电管或光电倍增管作检测器。新一代荧光光谱仪中使用了电荷偶合元件检测器，可一次获得荧光二维光谱

**十一、荧光分析法的定性和定量：**

1.定性：荧光分析法定性时，一定要有标准品作对照。荧光物质的最大激发波长和所发射的最强荧光波长是鉴定物质的根据，也是定量测定时的最灵敏的条件。

2.定量：

（1）荧光强度与荧光物质浓度关系： F=KIϕ

（2）定量分析方法：

①标准曲线法：在测定标准曲线时，常采用系列中某一标准溶液作为基础，将空白溶液的荧光强度读数调至0%，将该标准溶液的荧光强度读数调至100%或50%，然后测定系列中其他各个标准溶液的荧光强度。

②直接比较法：FS-FO=KCS，FX-FO=KCX得CX=CS(FX-FO/FS-FO)

**第五章：原子吸收分光光度法**

**一、原子吸收分光光度法：**是基于从光源辐射出具有待测元素特征谱线的光，通过试样蒸气时被蒸气中待测元素基态原子所吸收，由辐射谱线被减弱的程度来测定试样中待测元素含量的方法。

**二、原子吸收分光光度法的主要优点：**灵敏度高、选择性好、准确度较高、抗干扰能力强、分析速度快及应用范围广等。

PPT：① 谱线简单；② 具有较高的精密度和准确度；③ 多数元素的检出能力很好；④分析速度快，操作简单及受操作人员熟练程度的影响小。

**三、与紫外可见分光光度法比较的特点：**

①AAS与紫外可见分光光度法一样，定量分析的依据均为朗伯—比尔定律。  
② 原子吸收法所要测量的是气态原子的吸收，得到的光谱是原子吸收光谱；而紫外可见分光光度法测量的是溶液中分子的吸收，得到的光谱是分子吸收光谱。  
③ 谱线尖锐，气态原子吸收是线吸收，即“窄带”吸收；溶液中分子的吸收产生的电子光谱是宽带光谱，带宽可达几个nm以上。  
④ 原子吸收法的光源是锐线光源；紫外可见分光光度法使用的光源是连续光源。  
⑤ 原子吸收分光光度法的原子化器放在单色器前。

**四、原子吸收光谱和原子发射光谱：**

核外电子分层排布，每层具有确定的能量，称为原子能级。

核外电子的排布具有最低能级时，原子处于基态，最稳定。

当原子受外界能量激发时，最外层电子吸收一定的能量而跃迁到较高的能级上，原子处于激发态，得到原子吸收光谱。

这种激发到较高能级的电子是不稳定的，在极短时间内又回到原能级，同时辐射出原吸收的能量，得到原子发射光谱。

**五、共振线：**电子从基态跃迁到第一激发态（能量最低的激发态），要吸收一定频率的光，由此产生的吸收谱线为共振线。共振线为元素的特征谱线。

在原子吸收法中，就是利用处于基态的待测原子蒸气对从光源辐射的共振线的吸收来进行分析的。

**六、谱线轮廓与锐线光源：**

若将一束频率为ν，强度为I0的平行光通过厚度为10cm的原子蒸气时，一部分光被吸收，而透射光的强度Iν仍服从朗伯－比尔定律：

IV=I0\*E-KVL

其中*Kv*与*N0*成正比。

**锐线光源**是指发射线半宽度很窄的光源

**七、**共振吸收线不是一条严格的几何线，而且具有一定的宽度，具有一定的形状。主要是由原子的性质以及外界因素引起的。

使谱线变宽主要有三个原因：

1.自然变宽：无外界影响时谱线具有的宽度。

2.热变宽或多普勒变宽：原子在空间作相对热运动所引起的变宽。

3.碰撞变宽或洛伦兹：原子与其他外来粒子相互碰撞引起的谱线变宽。

**八、原子吸收强度与原子浓度的关系：**







而Kv与原子总数N成正比。

在实际工作中，若从吸光度来测定待测元素吸收辐射的原子总数，则不必求吸收系数，经推导得：A=K’NL（K’为常数项）

即吸光度与待测元素吸收辐射的原子总数成正比，而原子总数N ∝基态原子数No ；则吸光度A∝基态原子数No。

浓度与待测元素吸收辐射的原子总数是成正比的，C∝原子总数N

A=KC

总结：试样中待测元素的浓度C∝原子蒸气中原子总数=原子蒸气中基态原子数+激发态原子数，而激发态原子数可忽略不计=原子蒸气中基态原子数∝A——可测。

**九、原子吸收分光光度计的基本结构：**

1.光源：（1）空心阴极灯，（2）无极放电灯，（3）高聚焦短弧氙灯；

3.分光系统；

4.检测系统；

5.显示系统。

**十、原子化法：原子化器**的作用是把样品中的分析物蒸发并转变成气态基态原子,样品中的分析物蒸发并转变成气态基态原子的转变效率称为原子化效率，火焰和石墨炉原子化法应用较为广泛。

**（1）火焰原子化器：**

**雾化器：**作用是将试样溶液分散为很小的雾滴、**雾化室：**作用是使微细的雾滴与燃气均匀混合

**燃烧器：**预混合型燃烧器的主要优点是产生的原子蒸气多，火焰稳定，背景较小而且较安全，目前应用较多。

**火焰的作用：**提供一定的能量，促使试样雾粒蒸发、干燥并经过热离解或还原作用，产生大量基态原子

**（2）石墨炉原子化器：**利用大电流（常高达数百安培）通过高阻值的石墨管时所产生的高温，使置于其中的少量溶液或固体样品蒸发和原子化。程序一般包括**干燥、灰化、原子化及除残**（高温净化）四步。

干燥：主要是除去溶剂。

灰化（分解）：主要是使分析物盐类分解并赶走阴离子，破坏有机物及除去易挥发的基体或其他干扰元素。

原子化：是使以各种形式（盐类或氧化物等）存在的分析物挥发并离解为中性基态原子。

除残：其作用是除去石墨管中的残留分析物

**优点：**①试样几乎可以完全原子化；②对于易形成耐熔氧化物的元素如Al、Si等，由于没有大量氧存在，并由石墨提供了大量的碳，所以可以得到较好的原子化效率；③试样用量少，测定含量很低。

**缺点：**①共存化合物的干扰要比火焰法大，重现性差，其相对标准偏差达5～10%；②有时记忆效应较严重（特别是石墨管经多次使用后，其管壁可能变成多孔海绵状，以致样品渗入孔内而使记忆效应加剧）；③由杂散光引起的背景干扰比较严重，一般都要校正背景。

（3）氢化物发生原子化器；氢化物发生原子化法是近年来发展起来的一种低温原子化法。该法用来测定As、Se、Sn、Ge及Hg等元素。这种元素在强还原剂NaBH4或KBH4作用下生成熔点、沸点低的共价分子型氢化物。如：  
AsCl3+4KBH4+HCl+8H2O——→AsH3+4KCl+4HBO2+13H2↑  
生成的氢化物在不很高的温度下就分解出自由原子，达到瞬间原子化。

（4）化学发生吸收管原子化器

**十一、定量分析方法：**

1、标准曲线法：由于每次开机工作状态不一样，因此每次测定样品前必须先做标准曲线。  
2、直接比较法  
3、标准加入法：当待测样品的基体影响较大，又没有纯净的基体空白，或测定纯物质中极微量的元素时，采用标准加入法。

**十二、干扰及其消除方法：**

（一）电离干扰：  
 由于某些易电离的元素在火焰中电离的结果，使参与原子吸收的基态原子数减少，而使吸光度下降。  
 加入“消电离剂”消除电离干扰。  
（二）物理干扰：  
 由试液和标准溶液物理性质的差别所产生的干扰称为物理干扰。  
 配制与待测液具有相似组成的标准溶液，是消除干扰的常用而有效的方法。

（三）化学干扰：  
 化学干扰是指被测元素与共存的其它元素发生化学反应，生成一种稳定的化合物而影响原子化效率。  
① 使用高温火焰或提高石墨炉原子化温度，可以减轻这种干扰。  
② 在标准溶液和待测液中加入某种试剂，也可控制干扰。  
 A、释放剂，如LaCl3等。  
B、保护络合剂，如EDTA等。  
③ 化学分离的方法从样品中除去干扰元素，或者是仅把待测元素分离出来。常用的方法有萃取、离子交换和沉淀法等。

（四）光谱干扰：  
 光谱干扰主要来自仪器和光源，主要由于分析的谱线与相邻谱线不能分开造成的。  
（五）背景干扰：  
 ① 火焰或石墨炉中固体或液体微粒及石墨管壁对线光源的散射而使透射强度减弱，称为光散射背景干扰。  
 ② 火焰气体及在原子化过程中生成的气体分子、氧化物、盐类和氢氧化物等对辐射吸收而引起的分子吸收干扰。  
 常用的校正方法是氘灯背景校正法及塞曼效应背景校正法。

**十三、分析线的选择：**

1.分析线：一般选择最灵敏的共振吸收线。干扰大时，可选择次吸收线。

2.狭缝宽度：灵敏度足够的情况下，狭缝宽度尽量小。  
3.灯电流的选择：灯电流过大，放电不稳，而且灯寿命会缩短；灯电流过低，放电也不稳，光强度下降。一般灯电流不大于允许的最大工作电流值的一半。

**十四、灵敏度和检出限：**

1.灵敏度：① 能产生1%吸收的被测元素的浓度和含量分别定义为特征浓度和特征含量，而将灵敏度定义为校正曲线*A=K·C*的斜率 *S=dA/dC*

② 灵敏度与一系列因素有关，首先取决于待测元素的性质，其次，还和测定仪器的性能以及实验条件有关。

2.检出限：检出限是指待测元素能产生三倍于标准偏差的读数时的浓度，此标准差是对空白溶液进行十次以上连续测定，由所得的吸光度来求标准偏差。

**第五章：电位分析法**

**电化学分析法的分类：**

1.电位法——以测量电池电动势或电极电位来测定物质的活度的方法。

理论基础是Nernst公式：

2.电导法——以溶液电导L（1/R）为测量参数的方法。  
3.库仑法——测量通过电解池的电量。   
4.伏安法——以测量电解过程中所得电流—电压曲线来确定溶液中被测成分浓度的方法。用固体电极或表面静止的电极，如铂电极、悬汞电极或汞膜电极，称为伏安法。

使用的极化电极是滴汞电极的伏安法称为极谱法。

理论基础是电解法和电位法的结合。

**电位分析法基础：**

**（一）电化学电池：**是一种能实现化学能与电能相互转换的装置。

一支电极与它所接触的电解质溶液构成一个半电池。

二个半电池组成一个电化学电池。

二个半电池的电解质溶液不能相互混溶，又必须相互导电，所以需要用半透性隔膜或盐桥将它们隔开。

分类：（1）原电池——自发地将本身的化学能变成电能。

（2）电解池——实现电化学反应所需要的能量是外电源供给的。

**（二）原电池：**

**1.原电池的结构：**丹尼尔电池是个典型的原电池。  
**2.电池反应及表示方法：**

若把锌棒插入ZuSO4溶液中，铜棒插入CuSO4溶液中，二者用盐桥隔开，使氧化还原反应分开进行，这样就构成了铜锌电池，即丹尼尔电池。

用导线将二个电极接通，在电极上将发生各自的反应：

锌电极上发生氧化反应：  
Zn====Zn2+＋2e铜电极上发生还原反应：  
Cu2+＋2e ==== Cu总的电池反应方程式：  
Zn＋Cu2+=====Zn2+＋Cu电化学反应实质上为氧化还原反应，也是将化学反应转变为一个能够产生电流的电池的首要条件。其次才是适当的装置，使反应通过电极完成。

输出电子的极发生了氧化反应，接受电子的极发生了还原反应。

**电化学规定：（阴阳极，正负极的确定）**不论是原电池还是电解池，凡是电极反应是氧化反应的，称此电极为阳极；电极上发生的是还原反应的，称此电极为阴极。

即 锌电极——阳极 铜电极——阴极  
锌电极——→阳极→负极→左侧→氧化反应  
铜电极——→阴极→正极→右侧→还原反应

**液接电位和盐桥：**

1.液体接界电位*φj：*

在两种含有不同溶质的溶液界面上，或者两种溶质相同而浓度不同的溶液界面上，存在微小的电位差，称为液接电位。

*φj*的大小一般不超过0.03*V*。

产生的原因是由于离子迁移速率的不同而引起的。

2.盐桥：

一般是用饱和的*KCl*(C=4.2mol/L)溶液装在倒置的U型管内构成盐桥，放在两个溶液之间，以代替原来的两个溶液直接接触。

用*KCl*是因为K+和Cl-的迁移速率相近。

**电池电动势：**是相互接触相的相间电位的总和。

E电池=φ+-φ-=φ阴-φ阳=φ右-φ左

因为有液接电位，所以

E=*φ+-φ-+φj*

其中*φ+、φ-*为右半电池和左半电池的电位，称为电极电位，因此电池电动势的大小取决于电极电位。

**电极电位产生原因：**

1.定义：电极和电解质之间的电位差。

2.产生原因：

（1）由于带电质点在两相间的转移。此质点可以是离子或电子。

（2）某些阳离子或阴离子在相界面附近的某一相内选择性吸附。

（3）不带电的偶极质点（如有机极性分子和水偶分子）在界面附近的定向吸附。

**能斯特方程：**

电极电位的大小不仅与组成电极的物质本身有关，还与其活度（浓度）以及温度等因素有关，能斯特方程表示电极电位与组成电极的物质及其活度、温度之间的关系。

对于任意给定的一个作为正极的电极，其电极反应可以写成通式：

*氧化态（Ox）*＋*ne——→还原态（Red）*

那么电极电位的能斯特公式的通式为：



*φ*0 ——表征某一特定反应的常数，只与电对的性质有关。也即参与反应的所有物质的活度等于1时的电极电位，称为电极的标准电位。  
R——气体常数=8.814伏特·库仑·开-1·摩尔-1T——绝对温度=273＋t℃  
F——法拉第常数=96493库仑  
n——由半反应式所确定的参与反应的电子数  
aOx——表示氧化态一方的活度乘积  
aRed——表示还原态一方的活度乘积  
（1）在稀溶液中a≈C；

（2）标准和样品在γ一致时，

如设在常温（25℃）下，则改写为：

这就是最常用的电极的电极电位和电极表面溶液活度之间的能斯特公式。

**标准氢电极：**

IUPAC（International Union of Pure and Applied Chemistry）规定用标准氢电极（SHE）作为标准电极。

（1）规定：在任何温度下，标准氢电极的相对平衡电位都为零。

（2）工作条件：A、氢离子活度为1mol/L

B、气体压力为1个大气压（1atm），即1.01325×105Pa

C、作为气体电极的铂片上镀有铂黑，半电池反应为：

*2H+*＋*2e——→H2*  
 *φ SHE=φ0=0.0000V*

对于任意给定的电极，它与标准氢电极构成的电池，若已消除液接电位，表达式为E电池=*φ给定-ΦSHE=φ给定*

标准氢电极‖给定电极

因此该原电池的电动势： ；

如使给定电极的电解质溶液中离子活度为1mol/L，则测得：

因此*φ*0为一常数，可查表得。

**直接电位法：**

1.定义：是在通过电池的电流为零的条件下测定电池的电动势，从而利用电极电位与浓度的关系来测定物质浓度的一种电化学方法。

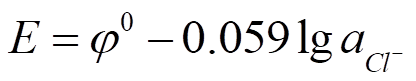
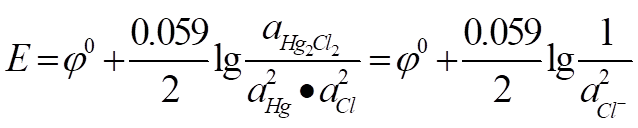
2.分类：电位分析法分为直接电位法和电位滴定法。

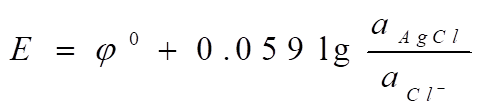
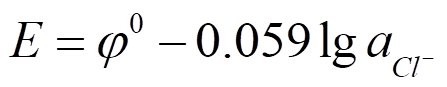
3.一支指示电极（用于测定过程中溶液本体浓度不发生变化的体系的电极）与另一支合适的参比电极（提供标准电位的辅助电极）构成电位分析法的测量电池。

**4.工作原理**：一支离子选择电极与一支参比电极共同组成一个测量电池，测得的电池电动势与离子选择电极的膜电位有关，此电位值与溶液中特定离子的活度对数值有线性关系，从而求出该离子的浓度，这就是直接电位法的工作原理。

**参比电极**

电化学分析中最常用的参比电极是甘汞电极及银—氯化银电极，特别是饱和甘汞电极及饱和银—氯化银电极。  
（一）甘汞电极  
 它属于金属及该金属的难溶性盐和一种与此盐具有相同阴离子的可溶性盐溶液组成的电极。  
　　甘汞电极中金属是Hg，难溶性盐为Hg2Cl2（甘汞），可溶性盐是KCl。  
甘汞电极的半电池式为：  
Hg, Hg2Cl2∣ KCl

电极反应可以分成两步看，这两步是同时进行的。  
2Hg====2Hg+＋2e  
 2Hg+＋2Cl-====Hg2Cl2  
实际为 Hg2Cl2＋2e=====2Hg＋2Cl-  
25℃时电极电位为  
  
  
 所以甘汞电极的电极电位取决于aCl-，KCl的浓度不同时，甘汞电极的电极电位也不同。

（二）银—氯化银电极  
 　结构，中间为一根银丝，经电解处理使其表面氯化，覆盖一层棕色AgCl镀层，溶液为KCl溶液，浓度分别为三种0.1mol/L、1mol/L和饱和KCl溶液。  
25℃时电极电位为  
  
  
所以与甘汞电极一样，其电极电位取决于KCl溶液的

**离子选择性电极**

（1）pH玻璃电极

pH玻璃电极核心部分是敏感玻璃的球泡，0.1㎜厚，内参比液为0.1mol/LHCl溶液，内参比电极为Ag—AgCl电极。  
（1）pH敏感玻璃薄膜的组成：  
一般有三种氧化物：Na2O、CaO、SiO2，它们的摩尔数之比约为22：6：72。其中SiO2是玻璃的形成剂。

（2）pH玻璃电极的电极电位  
 为了使玻璃薄膜能起pH电极的作用，其表面必须水化，不水化的玻璃薄膜不起pH电极的作用。  
H+＋Na+Gl-——→Na+＋H+Gl-（硅酸）  
　　水化层厚度为10-5—10-4㎜。这是电极起作用的主要部分。  
玻璃电极在：（1）水化层—溶液界面之间靠H+的转移来输送电流；（2）水化层内部的电流由碱金属离子和H+携带（浓差扩散）；（3）干玻璃层内的电流以离子形式传导，涉及碱金属离子从某一点位到另一点位的运动，即电荷是由Na+交换的形式进行传递，从而使电路导通。这样在玻璃膜的两个界面上就产生了电位差，即*φ*M

**十二、离子选择电极的一般性能**

（1）能斯特响应；（2）线性范围和检测下限:校准曲线的直线部分所对应的活度范围称为线性范围,检测下限为离子选择电极可测定的待测离子的最低浓度；（3）选择性:选择系数Ki,j来表示。Ki,j表示一个外来离子j对于电极用于测定的主要离子i的反应性的干扰程度；（4）电极斜率；（5）响应时间；（6）温度效应；（7）膜内阻；（8）稳定性。

**十三、影响响应时间的因素：**

（1）敏感膜的组成及性质；

（2）被测溶液的浓度；

（3）被测离子到达电极表面的速度；

（4）共存离子的影响；

（5）温度的影响；

（6）电极敏感膜表面的光洁度和厚度的影响；

（7）测量顺序（浓→稀或相反）。

**十四、直接电位法的定量方法：**

**（一）重要的实验条件**：

1.离子强度的影响：各个试液之间要保持离子强度一致，使标准曲线的标液与试液的离子强度一致。最常用的方法是加入惰性盐，称为离子强度调节剂，加入离子强度调节剂浓度大，这样标液及试液的离子强度几乎由该调节剂决定。

2.溶液的pH值的影响：可以加pH缓冲剂调节适当的pH。

3.消除Fe3+、Al3+等离子的干扰，加入掩蔽剂。

将pH缓冲剂、惰性盐、掩蔽剂混合在一起，此混合溶液称为总离子**4.强度调节缓冲剂。它的主要作用有：（1）维持样品和标准溶液恒定的离子强度；（2）保持试液在离子选择电极适合的pH范围内，避免H+或OH-的干扰；（3）使被测离子释放成为可检测的游离离子。**

**对于TISAB的基本要求是不能含有对离子选择电极产生响应的离子，同时其浓度要远远超过试液的离子强度，通常情况下大于0.5mol/L。**

**（二）定量方法：**

1.标准曲线法：标准曲线法适用于大量样品的例行分析，而且要求被测体系应比较简单。  
2.标准加入法：标准加入法分两步进行测定，先测体积为Vx，浓度为Cx的样品溶液的电位值E1，然后在样品溶液中加入体积为Vs，浓度为Cs的标准溶液，并测量其电位值E2，根据Nernst公式。





注意几点：

（1）对于阳离子电极，△E=E2-E1，对于阴离子电极，△E=E1-E2，大小相等，符号相反。

（2）通常要求，VX约=100VS ，CS约=100CX，从而使标准加入后的电位变化达20-30mv。

（3）s为实际斜率，s一方面可从标准曲线上查得，另一方面也可把测定E2后的试液用空白试液稀释一倍，再测定电位值E3，则：



**第六章 经典液相色谱法**

**一、色谱法：**（名）利用各组分物理化学性质的不同，在流动相流经固定相时，由于各组分在两相间的吸附、分配或其它亲和力的差异而产生不同速度的移动，最终达到分离的目的。

掌握：

**二、色谱法的特点：**

1.高分离效能、高灵敏度、高选择性；

2.分析速度快；

3.应用范围广。

**三、色谱法的分类：**

按流动相和固定相的物理状态分类：

按流动相的物理状态分类：

1.用气体作为流动相的色谱法称为气相色谱法；

2.用液体作为流动相的色谱法称为液相色谱法；

3.用超临界流体作为流动相的色谱法称为超临界流体色谱法。

再结合固定相的物理状态，有以下的类型：

1.气相色谱:

（1）气固色谱（GSC）：固体吸附剂

（2）气液色谱（GLC）：液体（涂布在担体或毛细管壁）

2.液相色谱:

（1）液固色谱（LSC）：固体吸附剂

（2）液液色谱（LLC）：液体（涂布或化学键合在担体上）

（二）按分离机理分类:

1、吸附色谱法：利用组分在吸附剂上吸附能力强弱不同而进行分离的方法。

2、分配色谱法：利用组分在固定液中溶解度不同而达到分离的方法。

3、离子交换色谱法：利用组分在离子交换剂上的亲和力大小不同而达到分离的方法。

4. 排阻色谱法：利用大小不同分子在多孔固定相中的选择渗透而达到分离的方法，又称为凝胶色谱法。

5. 亲和色谱法、生物色谱法：利用不同组分与固定相的高专属性亲和力进行分离的技术。

（三）按操作形式分类:

1、柱色谱法：将固定相置于柱管内构成色谱柱，色谱过程在色谱柱内进行的方法。

按照管柱的粗细和固定相的填充方式又分为:

(1)毛细管柱色谱法;

(2)填充柱色谱法。

2、平面色谱法：色谱过程在固定相构成的平面状层内进行的色谱法。

按平面色谱材料不同可分为:

（1）将固定相涂铺在玻璃板、铝箔板或塑料板等上的薄层色谱法；

（2）将含水滤纸作固定相的纸色谱法。

**色谱分离过程：**

色谱法的基本步骤

第一步：根据试样分析目的选择固定相，按操作形式的要求制备成色谱床（装填成色谱柱，或涂铺到薄层板上等）。

第二步：进样（或点样）。将处理好的样品以一定方式加到固定相的一端。

第三步：洗脱或展开。将流动相以一定速率载运样品连续通过固定相，使样品各组分在两相相对运动中彼此分离。

第四步：收集从色谱床上分离的各组分，进行检测（定性、定量分析）。

**色谱法的基本参数：**

1．分配系数K：在一定的温度和压力下，某个组分在固定相（s）与流动相（m）中达到分配平衡时的浓度之比，称为该组分的分配系数，即，K = Cs/Cm。

K值的大小与组分、固定相及流动相的性质和温度有关，与两相的体积无关。

不同组分在两相之间具有不同的分配系数K ，使得不同组分在柱中产生差速迁移而得到分离。

2.分配比*k：*又称为容量因子，在一定的温度和压力下，某个组分在两相分配达到平衡时，分配在固定相和流动相中的摩尔数或质量之比，即：

*k* = ns/nm 或 *k* =ms/mm =CsVs/CmVm= K Vs/Vm

式中ns、nm分别为组分在固定相和流动相中的摩尔数，Vs、Vm分别为固定相和流动相的体积，ms、mm分别为组分在固定相和流动相中的质量。

*k*值越大，说明组分达到分配平衡时在固定相中的量越多，它是衡量色谱柱对被分离组分保留能力的重要参数。

*k*值的大小由组分与两相的热力学性质决定，随温度、压力与两相体积的变化而变化。

3. 保留值：

（1）试样中被分离的各组分在色谱柱中保留程度的参数，是各组分在柱内差速迁移的反映。

（2）通常用组分流出色谱柱所需的时间，或用将组分带出色谱柱所需流动相的体积表示，分别称为保留时间或保留体积。

保留值反映了被分离组分在性质上的差异。

在一定的实验条件下，不同物质均有确定不变的保留值，因此保留值是色谱定性分析的基本参数。

**吸附柱色谱法：**

1.方法：固定相为吸附剂的色谱法称为吸附色谱法。吸附色谱法是各种色谱法中最早建立的色谱法。大部分GSC和LSC都属于吸附色谱法。

吸附色谱的实质就是利用被分离组分对固体表面活性吸附中心吸附能力的差别而实现分离。

吸附剂通常是多孔性固体颗粒物质，在其表面存在分散的吸附中心（吸附点位）。吸附是指溶质在吸附剂表面上集中浓缩的现象。

流动相分子与样品分子争夺吸附剂表面活性中心。

在吸附柱色谱法中，固定相是固体吸附剂，吸附剂对不同的组分表现出程度不同的吸附能力。待分离的组分随流动相通过吸附剂时，由于吸附剂对不同组分有不同的吸附力，使得不同组分随流动相迁移运载的速率不同，产生差速迁移，最后使得不同组分按先后次序流出色谱柱，实现分离。

2.基本原理：

Ka的大小取决于组分分子和吸附剂之间以及组分分子和流动相之间作用力的强弱。

不同组分Ka数值不同， Ka值大表示组分在吸附剂上保留强，难以洗脱；Ka值小表示组分在吸附剂上保留弱，易于洗脱。

试样中各组分由于ka值不同，在柱色谱过程中得以分离。

**七、分配柱色谱法：**

1.方法：固定相为涂布于载体上的一层固定液和载体组成。

固定液可选用不同极性的溶剂

载体可以用硅胶、多孔硅藻土等惰性物质

流动相是与固定液不相混溶的某种溶剂。

因固定相和流动相均为液体，故又称为液-液分配色谱法。

2.原理：利用被分离组分在互不相溶的两种液体中的溶解度差异，造成组分在两相中达到分配平衡时具有不同的分配系数（K=Cs/Cm）来实现分离。

这种分配平衡可在色谱柱中反复多次进行，各组分因分配系数K不同而产生差速迁移，从而得到分离。

**正相分配色谱和反相分配色谱：**

正相分配色谱：

1.常用的固定液有水、不同pH值的水溶液，以及甲醇、乙醇、甲酰胺等极性溶剂。

2.常用的流动相有苯、甲苯、环己烷、乙酸乙酯等。

3.以极性较强的溶剂涂在载体上作为固定相；

4.以极性较弱的溶剂作流动相的分配色谱，亦称常规分配色谱；

5.适用于极性化合物的分离；

6.其流出顺序是极性小的先流出，极性大的后流出。

反相分配色谱：

1.常用的固定液有辛烷、氯仿、硅油和石蜡等；

2.常用的流动相有水、不同pH值的水溶液，以及甲醇、乙醇、甲酰胺、乙二醇等极性溶剂。

3.以极性较弱的溶剂涂在载体上作为固定相；

4.以极性较强的溶剂作流动相的分配色谱；

5.适用于非极性及弱极性化合物的分离；

6.其流出顺序与正相分配色谱正好相反，即：极性大的先流出，极性小的后流出。

**薄层色谱法：**

1.TLC是将固定相（如吸附剂）均匀地铺在具有光洁表面的玻璃、塑料或金属薄膜表面上形成薄层，在此薄层上进行色谱分离的方法。

2.方法：

（1）制板：将吸附剂（固定相）均匀涂铺在表面光洁的玻璃、塑料或铝铂上制成薄层板。

（3）点样：把待分析样品滴加在薄层板一端的起始线上。

再把薄层板放入密闭容器（称层析缸或展开槽）中，以适当的溶剂（也称展开剂）进行展开。

（3）展开过程中，在薄层板上吸附剂的毛细管作用下，溶剂载带着试样缓缓移动，各组分在两相之间不断地发生吸附、解吸的重复过程。

（4）由于不同组分的吸附系数、移动速率不同，展开一定时间后，各组分互相分离，在薄层板的不同位置上形成不同的斑点。

**第八章气相色谱法GC**

**一、气相色谱法**

**1.定义：**以气体作为流动相的色谱法称为气相色谱法 (GC)

**2.特点：**高分离效能、高选择性、高灵敏度、样品用量少、分析速度快、应用范围广

**3.局限性：**对于挥发性差和热稳定性不好的物质难以分析；定性能力较弱，不能直接给出定性结果，一般要求有已知纯物质作对照，以确定相应的物质。

**4.分类：**

①按固定相状态分类：气-固色谱法，气-液色谱法  
②按色谱原理分类：分配色谱，吸附色谱  
③按色谱柱分类：填充柱色谱法，毛细管柱色谱法

**5.气相色谱仪组成：**

载气系统：气源、气体净化、气体流速控制等

进样系统：进样器、气化室、温控装置

分离系统：色谱柱、柱温箱、温控装置

检测系统：检测器、温控装置

记录系统：放大器、记录仪、数据处理装置

6.**固定相的选择：**

（1）固体固定相：常用固体吸附剂做固定相，主要用于分析永久性气体和气态烃类物质

（2）液体固定相：由固定液和载体组成

①**担体（载体）：**比表面积大，孔径分布均匀；化学惰性，表面无吸附性或吸附性很弱，与被分离组份不起反应；

具有较高的热稳定性和机械强度，不易破碎；颗粒大小均匀、适度。一般常用60~80目、80~100目。

**②**GC用的担体分为硅藻土型和非硅藻土型。

硅藻土型担体是天然硅藻土经煅烧而成的。可分为红色担体和白色担体。

非硅藻土型有氟担体、玻璃微球担体、高分子多孔微球等。

**7.应用**

①在卫生检验中的应用：

空气、水中污染物如[挥发性有机物](https://baike.baidu.com/item/%E6%8C%A5%E5%8F%91%E6%80%A7%E6%9C%89%E6%9C%BA%E7%89%A9)、多环芳烃，苯、甲苯、苯并（a）比等；农作物中残留有机氯、有机磷农药等；食品添加剂苯甲酸等；体液和组织等生物材料的分析如[氨基酸](https://baike.baidu.com/item/%E6%B0%A8%E5%9F%BA%E9%85%B8)、脂肪酸、维生素等 。

②在医学检验中的应用：

体液和组织等生物材料的分析：如脂肪酸、甘油三酯、维生素、糖类等。

在药物分析中的应用：抗癫痫药、中成药中挥发性成分、[生物碱](https://baike.baidu.com/item/%E7%94%9F%E7%89%A9%E7%A2%B1)类药品的测定等。

**二、检测器**

**1.作用：**将色谱分离后的各组分的量转变成可测量的电信号，然后记录下来

**2.要求：**灵敏度高、线性范围宽、响应速度快、结构简单、通用性强

**3.**根据检测原理的不同，可分为**浓度型检测器和质量型检测器两类。**

①浓度型检测器：产生的电信号大小与进入检测器的载气中组分的浓度成正比。如热导检测器、电子捕获检测器。1mL载气中携带1mg组分通过检测器时，产生的电压

②质量型检测器：产生的电信号大小与单位时间内通过检测器的物质量成正比，如火焰离子化检测器、火焰光度检测器、氮磷检测器。每秒有1g组分被载气携带通过检测器时，所产生的电压或电流值

**3.常用检测器特点：**

**（1）氢火焰离子化检测器**：①典型的质量型检测器

②对有机化合物具有很高的灵敏度（10-12g/s）

③无机气体、水、四氯化碳等含氢少或不含氢的物质灵敏度低或不响应

④氢焰检测器结构简单、稳定性好、灵敏度高、线性范围宽（107）、响应迅速等特点

是目前应用最广泛的色谱检测器之一

**含碳有机物**

**（2）电子捕获检测器：**

电子捕获检测器：只对含有卤素、硫、磷、氮、氧等电负性强的元素的物质有响应，对饱和烃类几乎无响应。化合物所含元素的电负性越强，灵敏度越高，能测出样品中含量仅10-14g/ml的六六六农药残留，是一种专属性的高灵敏度检测器。**用于电负性有机化合物。**

在卫生分析中常用于农药残留、环境污染物、食品添加剂等分析

**（3）火焰光度检测器：**FPD适用于大气、水和食品中含磷或硫的痕量污染物的分析，其检出限可达10-11~10-12g/s，卫生分析中常用于有机磷、有机硫农药残留量的测定。**含硫磷有机物**

**（4）氮磷检测器：**对含氮化合物的测定，NPD要比FID灵敏大约50倍；对含磷化合物的测定，NPD要比FID灵敏大约500倍。**含氮磷有机物**

**毛细管柱气相色谱仪结构**

1.毛细管柱色谱仪和填充柱色谱仪结构十分相似，其主要差别在于毛细管柱色谱仪的柱前多一个分流/不分流进样器，柱后多一个尾吹气路。

2.毛细管柱的柱容量小，能负荷的样品量少，液体样品的进样量通常为10-3~10-2微升，为保证进样准确可靠，通常使用分流进样器作分流进样。

3.分流比：进入色谱柱内的样品占进样量的比例。

4.尾吹装置：减少柱后死体积，改善柱效；使检测器处于最佳气体流速，提高灵敏度。

**四、色谱流出曲线：**样品经色谱柱分离后，检测器输出的电信号随时间变化的曲线，称为色谱流出曲线

**1.用时间表示的保留值**

保留时间(*t*R)：组分从进样到柱后出现浓度极大值所需的时间

死时间(*t*M)：不与固定相作用的组分（如空气）的保留时间

调整保留时间(*t*R ‛)：扣除死时间的保留时间 ，*t*R‛=*t*R-*t*M

**用体积表示的保留值**

死体积VM(dead volume)

VM = tM ×F0

F0为色谱柱出口处的流动相流量，单位：m L/min

保留体积VR(retention volume)

VR = tR×F0

调整保留体积V’R(adjusted retention volume)

V’R =VR － VM

**相对保留值r21：在相同操作条件下，两组分的调整保留值之比，称为相对保留值**

①根据色谱峰的个数，可以判断样品中所含组分的最少个数；

②根据色谱峰的保留值，可以进行定性分析；

③根据色谱峰的面积或峰高，可以进行定量分析；

④色谱峰的保留值及其区域宽度，是评价色谱柱分离效能的依据；

⑤色谱峰两峰间的距离，是评价固定相（或流动相）选择是否合适的依据。

**分配系数和分配比：**

**①分配系数**：是指在一定温度下，达到分配平衡时某一物质在两种互不相溶的溶剂中的活度（常近似为浓度）之比。为一常数。分配系数可用于表示该物质对两种溶剂的亲和性的差异。

**②分配比：**分配比是指在溶剂萃取过程中，当萃取体系达到平衡后，被萃物在有机相的总浓度和在水相的总浓度之比。

**五、塔板理论：**

**（1）**塔板理论把色谱柱比作蒸馏塔，把色谱柱看作是由许许多多的小段组成，每一小段相当于蒸馏塔中的一个塔板，在每一个色谱柱的“塔板”内，一部分为涂在担体上的液相，另一部分为载气所占据的空间。组分进入色谱柱后，在一个塔板内进行两相间的分配，分配达到平衡后被载气带到下一个塔板，经过多个塔板，多次分配平衡，各组分被彼此分离。塔板数越多，组分在柱内两相间达到分

配平衡的次数也越多，柱效越高，分离越好。

**（2）**色谱柱内每达成一次分配平衡所需的柱长称为理论塔板高度(height equivalent of a theoretical plate)，简称板高H

对于一根长L的色谱柱，溶质平衡的次数应为：

n = L / H

n称为理论塔板数(number of theoretical plate) 。

色谱柱的柱效随理论塔板数n的增加而增加，随板高H的增大而减小。塔板数 n 越大，被测组分在柱内被分配的次数越多，所以柱效能越高，所得色谱峰越窄。

**速率理论：**

1956年van Deemter提出了速率理论方程式（范氏方程），其简化式为：

H *=* A *+* B*/*u *+* C*·*u

H：理论塔板高度，u：载气的线速度(cm/s)

u=L/t0

减小A、B、C三项可提高柱效；存在着最佳流速；

**七、柱的总分离效能指标**

难分离物质对的分离度大小受色谱过程中两种因素的综合影响：

①保留值之差─色谱过程的热力学因素，反映了选择性的好坏，与分配比*k、*相对保留值r21 有关；

②区域宽度─色谱过程的动力学因素，反映了柱效能的高低，与理论塔板数n有关。

**程序升温法的优点**

在较低的初始温度，沸点较低的组分（即最早流出的峰）可以得到良好的分离。

随柱温增加，较高沸点的组分也能较快地流出，并和低沸点组分一样也能得到分离良好的尖峰。

**柱效能指标：**在tR一定时，若峰越窄，理论塔板数越大，则理论塔板高度越小，柱的分离效率越高，因此，一般把理论塔板数称为柱效指标

**定性定量分析方法**

**定性分析：**

**（1）用已知的纯物质对照定性**

比较法——利用保留值定性  
在相同的条件下(往往在同一色谱柱和同一实验中)，分别测定纯物质和被测未知组分的保留值，加以比较，若被测组分与纯物质的保留值相同，则可初步认为它们是同一物质。

峰增高法——利用加入已知物增加峰高法定性，当样品比较复杂，相邻的组分保留值接近，或操作条件不易控制稳定时，可以在得到未知试样的色谱图后，将某种已知纯物质直接加入试样中，在相同条件下再次进行分析，并对比前后两色谱图。如果某一被测组分的峰高增加，则表示样品中可能含有加入的这种已知物。

双柱（多柱）定性：在一根色谱柱上用保留值鉴定组分有时不一定可靠，因为不同物质有可能在同一色谱柱上具有相同的保留值。  
要想使定性结果更加可靠，可采用双柱或多柱法进行定性，即采用两根或多根极性不同的色谱柱进行分离，观察未知物和标准物的保留值是否始终重合。

**(2) 利用文献保留值数据定性：**当没有纯物质样品时，有时就只好利用文献上发表的保留值定性，即通过将测得的样品物质保留值与文献所载的物质保留值对照，进行定性。其中最重要的文献保留值是相对保留值ris和保留指数。

**(3) 与其它仪器分析方法结合定性：**当对未知样品中所含组分全然不了解时，可用与质谱、红外光谱等仪器联用的方法进行定性。气相色谱是将混合物分离为纯组分的重要手段，而红外、核磁共振、质谱等方法适用于鉴定未知物的结构，但需要被鉴定的未知物为纯组分。因此，将这两种方法联用，将是解决复杂未知物定性问题的最有效工具

**2.定量方法**

**（1）外标法**标准曲线法，取待测物质的纯物质配成一系列不同浓度的标准样，分别取一定体积进行分析，测得响应信号（峰面积或峰高），绘制其对浓度的关系曲线，即标准曲线。分析试样时，在同样操作条件下，进入相同体积的试样，测得试样的响应信号，由上述标准曲线即可查得待测组分的浓度。

**（2）内标法**

外标法常因进样量不准或操作条件不易控制稳定一致而引起误差，为克服这一缺点，可采用内标法。内标法是将一定量的纯物质作为内标物，加入到准确称量的试样中，根据内标物及试样的质量以及色谱图上的峰面积计算待测组分的含量。

**第九章高效液相色法HPLC**

**一、高效液相色法与经典液相色谱比较**

**1.高效：**HPLC使用了细颗粒、高效率的固定相和均匀填充技术，从而使HPLC具备了新型高效的色谱分离柱，柱效可高达每米105理论塔板。5~10μm，经典液相色谱法为150~220μm

**2.高速：**由于HPLC采用了细颗粒的固定相，使传统的依靠重力输液的方法彻底不可行，HPLC法中采用了高压泵输送流动相，使分离速度大大提高。通常的工作压力-几十~4百大气压

**3.高灵敏度：**HPLC采用了高灵敏的检测器，将检测器接在柱后直接检测洗脱的各组分，根据组分的特性可采用紫外、荧光、电化学等不同检测器，最小检测量可达10-9~10-11g。

**4.高自动化：**HPLC仪器采用了先进的计算机技术，使HPLC整个系统的运行、操作都受计算机控制(色谱工作站)。仪器可自动控制色谱条件、自动进样、自动处理数据、绘图和打印结果，成为全自动的仪器**。**

**简：**（1）应用了颗粒极细、规则均匀的固定相

（2）采用高压输液泵输送流动相

（3）在线检测器：紫外、荧光、质谱

**二、高效液相色法与气相色谱法相比较**

**优点**

**１．应用范围广：**

GC的分析对象：足够挥发性、热稳定性

HPLC的分析对象：高沸点相对分子质量大热稳定性差的有机化合物

**2.选择性好，分离能力强：**

在分离能力方面，HPLC对于性质和结构相似的物质分离的可能性比GC更大，这是由于：

（1） HPLC可利用被分离组分极性的差别，或大小的差别，或离子交换能力的差别，或生物分子间亲和力的差别进行分离。

（2） HPLC可用多种溶剂作流动相，所以可通过改变流动相组成来改善分离效果(而GC的流动相为载气，不可随意改变其组成来改善分离)。

**３.对温度控制要求低**

GC要求系统在稳定的高温下运行，而HPLC可以在室温下进行操作**．**

**４.易于制备**

HPLC的馏分容易收集，所以HPLC除了用于分离分析外，还可用于分离制备。

**缺点**

1.缺乏通用型的高灵敏度检测器(目前常用的灵敏度较高的紫外、荧光检测器都是选择性检测器)；

2.仪器比较复杂、昂贵；柱和流动相的消耗成本高；

3.溶剂对环境和操作人员有影响。

4.所以，对于既能用GC也能用HPLC测定的物质，一般还是用GC法更适当些

**简：**（1）不受试样的挥发性和热稳定性的影响

（2）流动相的选择范围宽

（3）室温条件下分离

**三、高效液相色谱法分类**

HPLC根据分离机理和采用固定相的不同，可分成不同类型，主要有如下常见的类型：

1．吸附色谱法

2．化学键合相色谱法(分配色谱法)

3．离子交换色谱、离子色谱、反相离子对色谱

4．排阻色谱(凝胶色谱法)

**四、高效液相色谱法应用**

卫生、食品、环境等领域：

食品添加剂检测无机阴阳离子、有机酸、氨基酸、糖、维生素、脂肪酸、香料、甜味剂、防腐剂、人工色素、病原微生物、霉菌毒素、多核芳烃。食品安全、环境中污染物分析

**五、高效液相色谱仪组成**

**1、高压输液系统：等强度洗脱，梯度洗脱**

①.贮液装置②.高压输液泵 ③.过滤器④脱气装置⑤压力脉动阻滞器⑥梯度洗脱装置

**2.进样器（Injector）：六通进样阀；自动进样器**

进样器是将样品送入色谱柱的装置。

要求：进样装置的密封性好，死体积小，重复性好，进样时对色谱系统的压力、流量影响小。

进样方式有两种：进样阀进样和自动进样装置进样。

**3.分离系统：色谱柱**

HPLC的分离系统包括色谱柱的柱管和固定相、流动相。

填装好某种固定相的色谱柱是可以直接购买得到的。

对色谱柱的制作加工有很高的要求：要求具有耐高压、耐腐蚀、抗氧化、密封不漏液和柱内死体积小等基本性能。

对填装的固定相的性能和填充技术也有高的要求，要求具备柱效高、柱容量大、分析速度快、柱寿命长的特点

**4.检测系统：**检测器的作用是将柱流出物(流出液)中各样品组分的含量转变为可供检测的电信号

紫外-可见检测器②荧光检测器③示差折光率检测器④蒸发光散射检测器⑤质谱检测器

**六、高效液相色谱法固定相**

**1.吸附色谱固定相：**目前广泛使用的是全多孔微粒型色谱材料，通常是硅胶，粒度一般为3~10μm，即这种固定相由全多孔微粒硅胶的均一色谱材料组成。

**液液分配色谱固定相——化学键合固定相**

用化学反应的方法将固定液的官能团键合在载体的表面上而形成的填料。

**优点：**

（1）柱效高，分离选择性好，适用于分离几乎所有类型的化合物（可以通过改变键合的有机官能团的类型来改变分离的选择性）

（2）化学稳定性和热稳定性高（耐溶剂冲洗）

（3）均一性好，不易流失，稳定性好，重现性好，寿命长

（4）载样量大

**第十章质谱法**

**一、质谱法：**是将化合物形成分子离子、碎片离子，按其质荷比（*m/z*）的不同进行分离、测定，来进行物质成分和结构分析的方法，由质量分析器将离子按其质荷比（m/z）的差异分离，并由检测器测定，得到质谱图（mass spectrum），从而根据质谱图进行物质成分和结构分析的方法。

**二、质谱仪的组成：**

**1.进样系统**

**2.离子源：**将进样系统引入的气态样品分子转化成离子

①真空离子源

EI-电子电离源（Electron Ionization）

CI-化学电离源（Chemical Ionization）

②大气压源

ESI-电喷雾源（Electrospray ionization ）

APCI-大气压化学电离源（Atmospheric-pressure chemical ionization ）

MALDI-基质辅助激光解吸附（ Matrix-assisted laser desorption ionization ）

**3.质量分析器**

**4.检测器**

**5.真空系统用：**①作加速离子的几千伏高压会引起放电；

②大量氧会烧坏离子源灯丝

干扰离子源正常调节；

引起其它分子离子反应，使质谱图复杂化；

⑤离子与分子碰撞导致质谱峰变宽

目的：避免离子碰撞，减少本底干扰

碰撞偏离期望运动轨迹

碰撞可能导致副反应

**三、质量分析器原理：将离子源中形成的离子按质荷比的差异进行分离**

**1.磁质量分析器：分为单聚焦质量分析器和双聚焦质量分析器**

**2.飞行时间分析器：**离子在漂移管中飞行的时间与离子质量的平方根成正比。对于能量相同的离子，离子的质量越大，达到接收器所用的时间越长，质量越小，所用时间越短，根据这一原理，可以把不同质量的离子分开。适当增加漂移管的长度可以增加分辨率。所有离子一同起跑，质量小的跑的快，时间分辨

**3.四级杆质量分析器：**

**四、联用仪接口作用：**

**1.分子分离器连接 (主要用于填充柱)：**扩散型——扩散速率与物质分子量的平方成反比，与其分压成正比。当色谱流出物经过分离器时，小分子的载气易从微孔中扩散出去，被真空泵抽除，而被测物分子量大，不易扩散则得到浓缩。

**2.直接连接法(主要用于毛细管柱)：**在色谱柱和离子源之间用长约50cm，内径0.5mm的不锈钢毛细管连接，色谱流出物经过毛细管全部进入离子源，这种接口技术样品利用率高。

**3.开口分流连接：**该接口是放空一部分色谱流出物，让另一部分进入质谱仪，通过不断流入清洗氦气，将多余流出物带走。此法样品利用率低。

**五、联用技术**

1.电感耦合等离子体-质谱联用技术

2.气相色谱-质谱联用技术

3.液相色谱-质谱连用技术