**复习提纲**

**一、色谱（Chromatography）**

色谱法是一种重要的分离分析方法，它是根据组分在两相中作用能力不同而达到分离目的的。（1）**按流动相分：**气相色谱（GC）、液相色谱（LC）、超临界流体色谱（SFC）；（2）**按机理分：**吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、排阻色谱等等；（3）**按固定相在支持体中的形状分：**柱色谱、平板色谱（纸色谱 薄层色谱）；（4）**按按分离效率分：**经典液相色谱和**高效液相色谱（HPLC）。**

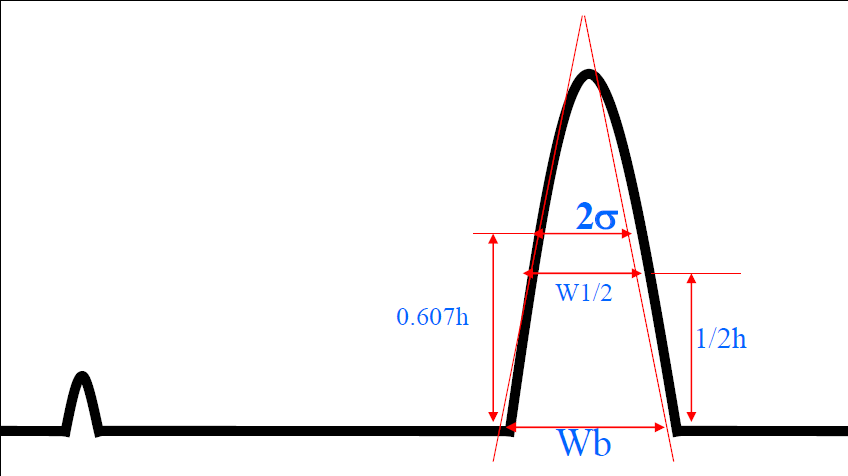
1、理解基本概念与术语：

**研究核心：**选择最合适的色谱体系和条件，在最短的时间内达到最佳的分离效果。

（1）色谱流出曲线 （chromatogram）：指样品注入色谱柱后，信号随时间变化的曲线。

（2）基线：无组分通过色谱柱时，检测器的噪声随时间变化的曲线。

（3）峰宽：峰底宽Wb，峰半宽W1/2，标准偏差σ



（4）保留值

保留时间tR：进样到出现色谱峰的时间。

保留体积VR：进样到出现色谱峰时消耗的流动相体积。

死时间t0：流动相流过色谱柱的时间。

死体积V0：色谱柱的空隙体积。

校正保留时间：t’R=tR+ t0

校正保留体积：V’R=VR- V0

校正：死时间/体积反应柱和仪器系统的几何特性，与被测组分性质无关，故通过校正来更好地反应被测组分的保留特性。

VR=tR×F（F——流动相流动线速度）

（4）相对保留值

某一组分1的校对保留值和标准物2的校对保留值之比，称为组分1对2的相对保留值。相对保留值仅随柱温及固定相变化

（5）分配系数与分配比（容量因子）

分配系数K：一定T、p，两相达平衡后，组分在固定相和流动相浓度的比值。

分配比k：一定T、p，两相达平衡后，组分在固定相和流动相质量的比值。

K与k的关系：

k与保留值的关系：

（6）分离效能的指标

①选择性（相对保留值）

相对保留值越大，选择性越好（？）

②峰宽度

③分离度

分离度考虑了保留时间和峰宽度，是一个综合指标。

R<1.0，两峰明显重叠；

R=1.0，两峰达97.7%分离；

R≥1.5，两峰完全分开。

2．色谱两大理论—塔板理论和速率理论。塔板理论描述色谱流出曲线的方程，并通过这一方程各参数来研究影响分离的因素，**要会计算**。速率理论（van Deemter方程）是描述提高柱效的途径，理解范第姆特方程中各参数的含义？

（1）塔板理论

**目的：**从理论上得出描述色谱流出曲线的方程，并通过这一方程各参数来研究影响分离的因素。

**两大假设：**①色谱柱存在多级塔板；②组分通过时在每级塔板处，两相间达到一次平衡。

**流出曲线方程的简略推导：**

设有分配比，经过一次转移后，0级塔板上组分的分量为，1级塔板上组分分量为，经多次转移，组分在各级塔板的量将符合二项分布，即

任一级塔板r对应的分量为，

以此作图即得流出曲线。

N特别大时，将呈正态分布，

，

由Wb，W1/2与σ的关系，得理论塔板数n的计算方法，

塔板高度H为，

有效塔板数neff为，

n与neff的关系为，

小结：影响色谱柱效率的是理论塔板数n，n越大，色谱峰越窄，分离效率越好。色谱分离不限于液-固相，也可是气-液相。

（2）速率理论

**塔板理论的缺陷：**半经验性理论，忽略了纵向扩散的影响，假设不可能完全实现，无法给出影响塔板高度的因素等。

**Van Deemter方程：**

①A-涡流扩散项：固定相填充不均匀引起的峰展宽，与颗粒直径正相关。

λ：填充的不规则因子 dp：固定相颗粒粒径

②B/u-纵向分子扩散项：由浓度差引起，分子延纵向扩散形成的展宽。由于组分在液相中扩散系数很低，因此液相色谱中可忽略B。

r：弯曲因子，Dm：组分在流动相的扩散系数

③Cu-传质阻力项：组分在流动相和固定相之间传质的阻力。

第一、二项分别为固定相和流动相传质阻力。

对Van Deemter方程求导可得，

（3）分离条件的选择

联立上述公式可得，

例：有一根1m长的柱子，分离组份1和2，色谱图数据为：tM=5s，t1=45s，t2=49s，W1=W2=5s。若欲得到R=1.2的分离度，有效塔板数应为多少？色谱柱要加长到多长？

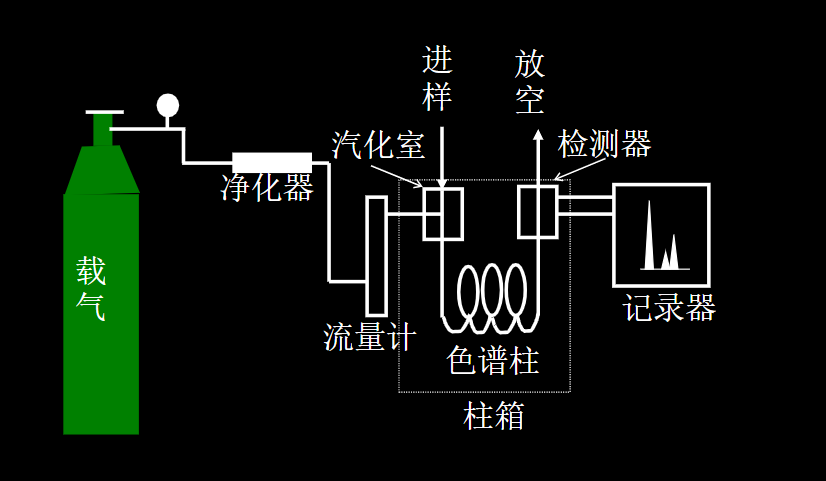
解：首先计算相对保留值r2,1

计算1m长柱子中理论塔板数n，

R=1.2时对应的塔板数，

3、掌握气相色谱仪的结构组成，气相色谱常用的检测器及其特点（什么物质用什么类型的检测器）？什么是担体？气相色谱分离物质，用极性或者非极性固定液，物质流出的先后？

（1）气象色谱仪的组成



①载气系统：要求纯净（净化器）、稳定（稳压阀或双路气）。常用H2、N2、He。

②进样系统：进样装置和汽化室。汽化室要求：体积小、热容大、对样品无催化作用。对高分子样品采用裂解装置（管式炉、热丝、居里点裂解器等）

③分离系统：由色谱柱和固定相组成。

色谱柱包括填充柱和毛细管柱。毛细管柱较细长。

固定相有固体固定相和液体固定相。固体固定相是固体吸附剂。液体固定相由担体和固定液组成。**担体**是一种多孔的、化学惰性的固体颗粒，可以提供较大表面积的惰性表面以承担固定液。

④控温系统：控制恒温或程序升温。K是热力学常数，温度越高，K值越小，保留时间越短。因此可通过柱温调节分离程度。

⑤检测器：将分离后各组分的量转变为电信号并记录。要求灵敏度高、线性范围宽、响应速度快、结构简单、通用性强。

（2）气相色谱常用检测器

①热导检测器

原理：基于各物质热导系数的不同

特点：结构简单，对无机物和有机物都有响应，灵敏度不高

检测物质：对所有物质都有响应

②氢火焰离子化检测器

原理：有机物在火焰中电离形成离子流，根据离子流的出现和大小进行分析。

特点：1、灵敏度高（10-12g/s），线性范围宽

2、适于有机物的检测

3、不能检测惰性气体、空气、H2O、CO、CO2、NO、SO2、H2S等。

检测物质：有机物

③电子俘获检测器

原理：载气在β-射线源下电离形成稳定的基流，卤素、S、P、O等电负性原子捕获电子形成负离子并与载气正离子结合，使基流信号下降，据此检测组分。

特点：

1、对卤素、S、P、O有很强的响应

2、灵敏度高，可用于痕量农药残留的分析

3、线性范围较窄

检测物质：含卤素、S、P、O等电负性较强原子的物质

④火焰光度检测器

原理：S、P在燃烧中被激发，从而发生特征的光信号（S-394nm，P-526nm）

检测物质：含硫、磷的化合物

（3）气象色谱的分离

**极性原则**

非极性组分分离：用非极性固定液，出峰顺序由蒸汽压决定，沸点高的保留时间长。

中等极性组分分离：用中等极性固定相，沸点与分子间力同时起作用。

强极性组分分离：用强极性固定相，分子间力起作用，按极性大小出峰，极性小的新出峰。

极性和非极性分离：用极性固定相，非极性先出峰。

能形成氢键的试样：选择极性或氢键型固定液，不易形成氢键的后出峰。

**如何判断极性：**

选取两种分析对象A，B，以β、β’-氧二丙氰、角沙烷，待测固定液为固定液制成色谱柱，求三种固定液中的：

则该固定液的相对极性Px为

4. 了解高效液相色谱法的特点，熟悉高效液相色谱仪的主要部件及分析流程，理解液相色谱流动相的选择？

**高效液相色谱：**

气相色谱只适合分析较易挥发、且化学性质稳定的有机化合物，而HPLC则适合于分析那些用气相色谱难以分析的物质，如挥发性差、极性强、具有生物活性、热稳定性差的物质。

**特点：**

1、色谱柱可反复使用，流动相可选择范围宽，流出组分容易收集；

2、分离效率高，灵敏度高；

3、操作自动化，应用范围广。

**主要部件：**

1、输液系统：

（1）高压输液泵：以稳定的流速或压力将流动相输送到色谱系统。

（2）在线脱气装置：也使用超声、真空等脱气方式。脱气的目的是去除气泡，保证流动相流速稳定，减小噪音。

（3）梯度洗脱装置：通过两个输液泵流速的变化，改变流动相洗脱能力，作用与气象色谱的程序升温类似。

2、进样系统

通常采用六通阀。

3、色谱柱

核心部件。要求柱效高、柱容量大、性能稳定。

4、检测器

连续监测流出物的组成和含量变化的装置。

（1）紫外-可见检测器

（2）荧光检测器：灵敏度高，选择性好，适用于药物、生化样品的分析。

（3）蒸发光散射检测器：适用于无紫外吸收、无电活性、不发荧光的样品的检测。

（4）电化学检测器

**分析流程：**

**流动相的选择：**

1、对样品有一定溶解度；

2、适用于选用的检测器，如用紫外检测时，不能选择对紫外光有吸收的溶剂；

3、化学惰性好，液液色谱中不能与固定相互溶，硅胶吸附剂不能用碱性溶剂，氧化铝吸附剂不能用酸性溶剂。

4、黏度低。黏度太大会降低样品的扩散系数，导致传质减慢，柱效降低，同时柱压也会升高。

5、高纯度。宜采用色谱纯试剂，否则会导致噪音增加，干扰定性、定量。

6、安全低毒，环境友好。

5. 熟悉吸附色谱法、分配色谱法、离子交换色谱法和体积排除色谱法的应用特点，选择分离类型的原则，了解色谱技术在生物分析中的应用。

**各种色谱法：**

（1）吸附色谱

原理：各组分在固定相表面的吸附作用不同。

固定相：活性硅胶、氧化铝、活性炭、聚乙烯、聚酰胺等固体吸附剂，所以吸附色谱也称液固吸附色谱。活性硅胶最常用

流动相：弱极性有机溶剂或非极性溶剂与极性溶剂的混合物，如正构烷烃（己烷、戊烷、庚烷等）、二氯甲烷/甲醇、乙酸乙酯/乙腈等

应用特点：用于结构异构体分离和族分离。如农药异构体分离、石油中烷、烯、芳烃的分离。缺点是易产生不对称峰和拖尾现象。

（2）分配色谱

原理：样品分子在流动相、固定相间溶解度不同（分配作用）。液-液分配色谱和键合固定相分配色谱。

固定相：

非极性键合固定相：键合在载体表面的功能分子是烷基、苯基等非极性有机分子。如最常用的ODS柱或C18柱就是最典型的代表，其极性很小。

键合在载体表面的功能分子是具有二醇基、醚基、氰基、氨基等极性基团的有机分子

流动相：

正相HPLC（normalphaseHPLC）：是由极性固定相和非极性（或弱极性）流动相所组成的HPLC体系。其代表性的固定相是改性硅胶、氰基柱等，代表性的流动相是正己烷。吸附色谱也属正相HPLC。

由非极性固定相和极性流动相所组成的液相色谱体系，与正相HPLC体系正好相反。其代表性的固定相是十八烷基键合硅胶(ODS柱），代表性的流动相是甲醇和乙腈。

应用特点：考虑流动相极性、选择性（按接受质子能力、给出质子能力和偶极作用能力分）。

（3）离子交换色谱

原理：使用表面有离子交换基团的离子交换剂作为固定相。通过不同离子与交换基的作用力大小不同来进行分离。常用的有磺酸基、羧酸基、季铵盐等。

应用特点：适于分离带电的物质，流动相常用含盐的缓冲液，有时也加入有机溶剂以增加某些组分的溶解度。

（4）体积排斥色谱/凝胶色谱/分子筛色谱

原理：多孔物质做固定相，样品分子受孔径大小影而分离。

应用特点：不需要通过改变流动相组成的方法来控制分离度，故流动相仅需考虑对样品的溶解性、低粘度和与柱填料匹配的要求。

**选择分离类型的原则：**根据各方法的特点来选择，如分离结构异构体和族分离时用吸附色谱，组分在两相中溶解性明显不同时用分配色谱，分离带电组分用离子交换色谱，分离大小差异很大的分子（如生物大分子等）时使用体积排斥色谱。

**色谱在生物分析中的应用：**

1、用于分离提纯，如毛细管电泳分离和富集维甲酸异构体。

2、用于研究未知反应的生成物，如通过峰的多少来判断生成物数量等。

3、用于生物分子的鉴定、分析，可通过色谱分析氨基酸、DNA、兴奋剂等分子。

4、用于疾病诊断。如用气相色谱检测肿瘤早期病人呼吸气中特有的挥发性有机物（VOCs）或原有的VOC含量改变。

5、对单个细胞上的特定蛋白进行检测。如毛细管电泳法检测单个细胞上Pgp的含量。

6. 了解细管电动色谱、毛细管电泳。

**毛细管电泳：**

以内径20-200μm的毛细管为分离通道，高压直流电场为驱动力，依据样品各组分淌度**或和**分配系数的差异实现分离的技术。

原理：物质离子在电场中差速迁移。迁移速度为

γ-离子的表观液态动力学半径，η-介质的粘度。

淌度μ：单位场强下的平均电泳速度。

电渗流：固液间形成双电层，液体两端施加电压时就会形成电渗流。电渗流为平流，展宽很小。速度一般为离子迁移速度的5~7倍。

Lef-毛细管有效长度，teo-电渗流标记物（中性物质迁移时间）。

电渗流的方向：取决于毛细管内表面电荷性质，内表面带负电，则溶液带正电，电渗流流向阴极，内表面带正电则相反。可通过毛细管改性和加电渗流反转剂（阳离子表面活性剂等）使电渗流方向改变。

影响电渗流的因素：

（1）电场强度：电渗流速度与电场强度成正比。

（2）毛细管材料表面电荷特性的影响。

（3）pH值的影响。溶液pH影响毛细管表面的电离。适应毛细管中，pH=7时电渗流最大，pH<3，表面完全被氢离子中和，电渗流为0.

（4）缓冲液离子浓度：离子浓度越高，双电层厚度越小，电渗下降。此外也可影响溶液粘度和工作电流。

（5）温度：温度变化来自焦耳热。温度越高，粘度越低，电渗流增大。

（6）添加剂：高浓度中性盐使离子强度增大，溶液粘度增大，电渗流减小。不同电荷的表面活性剂可改变电渗流大小和方向。

分离效果的评价：

（1）迁移时间（保留时间）

V-外加电压，L-毛细管总长度。

（2）分离效率（塔板数）

毛细管电泳中仅存在纵向扩散，扩散系数小的物质分离效率高，这也是分离生物大分子的依据。

（3）分离度

影响分离度的主要因素：工作电压，毛细管有效长度与总长之比，有效淌度差。

影响分离效率的因素：

（1）纵向扩散：大分子的扩散系数小，这是大分子试样分离的依据。

（2）进样：进样长度太大时，引起的峰展宽大于纵向扩散，导致分离效率下降。实际进样长度应小于等于毛细管总长的1%~2%。

（3）焦耳热和温度梯度：散热梯度中形成温度梯度（中心温度高）将破坏塞流，导致区带展宽。可通过减小毛细管内径和控制散热的方法缓解。

（4）溶质与管壁间相互作用：蛋白、多肽等带电多，且含有较多疏水基，吸附问题比较严重。可用两性离子代替强电解质，浓度约为溶质的100-1000倍时，抑制吸附且不增加溶液电导，对电渗流影响不大。

（5）其他因素：电分散作用、层流现象等。

毛细管电泳仪：

（1）高压电源：0-30kV，稳定、连续可调的直流电源。可恒压、恒流、恒功率输出，电源极性易转换。

（2）毛细管：需电绝缘、紫外/可见透明、富有弹性，内径一般在10-150μm。目前有玻璃、熔融石英和聚四氟乙烯等材质，在外围一般包一层聚合物薄膜。

（3）进样方法：分为流体力学进样，电动进样（适合粘度大的试样，易导致进样不均或离子丢失）和扩散进样

（4）缓冲液池：要求化学惰性，机械稳定性好。

（5）柱恒温系统：要求稳定、快速。

（6）检测器：有紫外-可见、荧光和激光诱导荧光三种，灵敏度依次提高，后两种样品需衍生。

毛细管电泳仪的特点：

（1）仪器简单，易自动化

（2）分析速度快，分离效率高：理论塔板数达105~107/m。

（3）操作方便、消耗少：纳升级进样量，水介质中进行

（4）应用范围极广

**二、质谱**

1．掌握质谱仪的基本构造和原理（重点掌握各种质量分析器和电离源的原理和特点），MALDI-TOF-MS是什么？主要用于什么物质分析？

2．熟悉质谱中的常见的离子类型：什么是分子离子峰、同位素离子峰、亚稳离子峰、碎片离子峰等。什么是麦氏重排？

3．了解质谱定性定量分析。

4．熟悉简单的质谱解析及其应用。

**三、紫外-可见吸收光谱**

1. 理解紫外-可见吸收光谱产生的机理。

2.什么是生色团、助色团、红移和紫移、增色和减色效应?

3．了解影响紫外-可见光谱的因素。

4．熟悉紫外-可见分光光度计的基本结构及各部分的功能，了解双光束分光光度计的结构与工作原理。

6．掌握紫外-可见的定量基础？吸收定律 A= ε b c，要会计算？

**四、分子发光分析**

1．理解荧光、磷光和化学发光产生的原理？

2、什么是荧光量子产率？和物质结构的关系？荧光的定量分析的基础（公式）？什么是荧光猝灭？

3、熟悉荧光分光光度计的基本组成及各部分功能？如两个单色器的作用？

4、和紫外-可见吸收光谱相比较，荧光为什么灵敏度较高？

**五、红外吸收光谱法和激光拉曼光谱**

1．理解红外光谱的产生条件和原理？

2．了解色散型红外光谱仪器基本结构，了解傅立叶红外光谱仪（光学系统的主体是迈克尔逊（Michelson）干涉仪）。

3．熟悉红外光谱的官能团吸收特征和一般图谱解析方法(先计算不饱和度）

4．理解拉曼散射的理论基础，什么是拉曼位移？

Rayleigh散射——弹性碰撞（方向改变而未发生能量交换）

Raman散射——非弹性碰撞（方向改变并发生能量交换）

5．红外和拉曼光谱的异同点？

6. 了解表面增强拉曼散射效应Surface-enhance Raman Scattering（SERS）？

**六、****核磁共振波谱**

1、核磁共振产生的基本条件？

2、什么是屏蔽效应？什么是化学位移？常用的基准物质是什么？熟悉常见化合物的质子位移（例如苯环上的氢、醛基氢、羧酸氢等）。

3、什么自旋-自旋耦合和裂分？掌握自旋-自旋耦合和裂分的规律，什么是耦合常数？

4、熟悉一级谱图的解析。

5、了解核磁共振波谱仪的基本组成及各部分功能，了解样品的制备。

6、简要了解碳-13谱，和氢谱相比，有什么特点？

**七、电化学分析**

1、什么是电池？什么是原电池和电解池？

2、掌握电位分析法测定pH值的方法。了解电位分析法的电极—指示电极（玻璃电极即pH电极、离子选择性电极、生物电极（酶电极和免疫电极等））和参比电极（饱和甘汞电解和银/氯化银电极）。测量的是电池的电动势（电极电位），根据能斯特方程，把待测物的浓度和电位联系起来。化学电池是原电池。

3、理解电解和库仑分析法。化学电池是电解池？什么是分解电压？

4、了解极谱、伏安分析法？什么是极限扩散电流？什么是半波电位？

**八、原子光谱**

**1、**原子发射光谱定性分析：不同元素的原子能级结构不同，因此能级跃迁所产生的谱线具有不同的波长特征。根据谱线特征可以进行发射光谱定性分析。什么是共振线？什么是自吸收？原子发射光谱定量分析：罗马金-赛伯公式

2、原子发射光谱仪的光源作用？有哪些类型？

3、原子吸收光谱定量分析？原子吸收光谱仪的结构组成？光源——空心阴极灯。