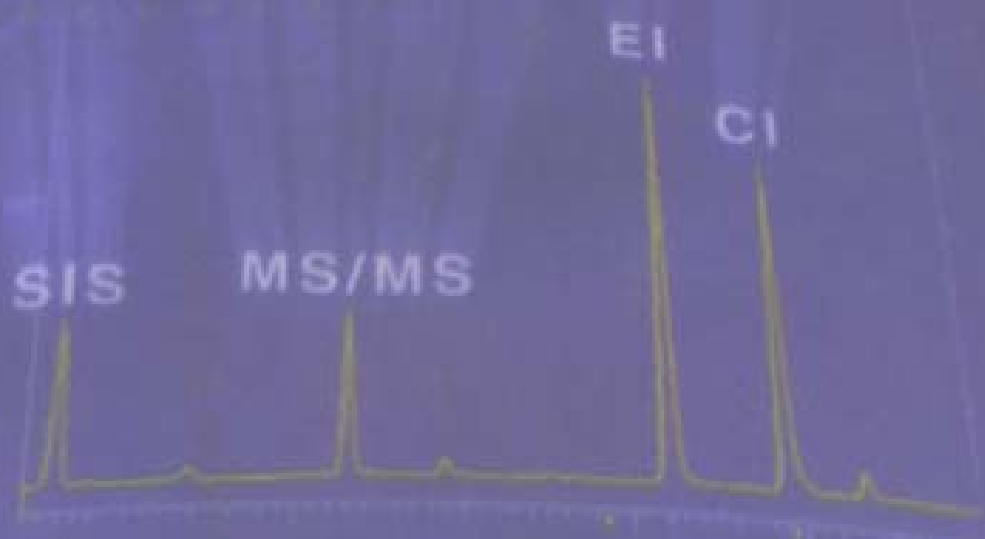


现代仪器分析 原理与技术

主编 王世平 王静 仇厚援



哈尔滨工程大学出版社

0657
W38

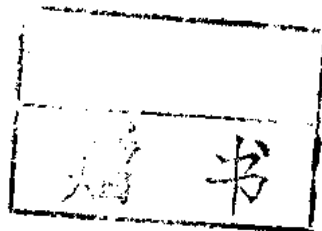
426488

现代仪器分析原理与技术

主 编 王世平 王 静 仇厚援
副主编 吴莉宇 王伊强 滕 冰 庞亚民
主 审 周国江



00426488



哈尔滨工程大学出版社

0647/28-1
内 容 简 介

仪器分析是现代农业及生物学等领域中最实用的一门科学，本书从光谱学、色谱学、电磁波谱学及电化学等几个方面系统地阐述了分析仪器的原理与技术，并结合近代分析仪器的动态发展介绍毛细管电泳、质谱、核磁共振波谱等新的分析技术。

本书内容新颖，实用面较广，可作为高等院校生物类、化学类、农业类、医学类等相关专业的研究生或本科生的教材和参考书，也可作为从事分析测试工作人员的参考书。

现代仪器分析原理与技术
XIANDAI YIQI FENGXI YUANLI YU JISHU

王世平 王静 仇厚媛 主编

责任编辑 罗东明

哈尔滨工程大学出版社出版发行

哈尔滨市南通街145号 哈工程大学11号楼

发行部电话(0451)2519328 邮编: 150001

新华书店经销

东北农业大学印刷厂印刷

开本 787mm×1 092mm 1/16 印张 21.125 字数 420 千字

1999年1月第1版 1999年1月第1次印刷

印数: 1~1000册

ISBN 7-81007-930-1

TH·39 定价: 22.00元

前 言

现代仪器分析是一门发展迅速、应用广泛的实用分析技术。这类技术具有快速、灵敏、准确的特点，并以化学和物理学为基础，在结构化学、光化学、化学动力学、生物学和医学等研究工作中起着重要的作用；在食品分析、饲料分析、环境分析、农产品分析、药物分析等学科领域都有很强的实用价值。

根据近年来仪器分析的理论与技术的发展动态，本教材主要编写了光谱分析法、色谱分析法、电磁波谱分析法、电化学分析法等几方面的内容。涉及内容具体有紫外-可见光光谱、红外光谱、原子吸收光谱、发射光谱、荧光光谱、气相色谱、液相色谱、薄层色谱、毛细管电泳、质谱、核磁共振波谱、极谱分析、电位分析等。

本教材力求对相关专业的较宽适用面，采用的框图、表格、公式简明扼要，理论内容深入浅出，应用技术实用性强。各章根据需要融合很多新的技术，如二极管阵列检测技术、分段平面阵列电荷耦合检测技术、中阶梯光栅分光技术、毛细管电泳色谱分析技术等。

为了便于对各种分析方法作总结归纳，本教材在绪论基础上分四篇内容，并以不同分析方法为单元独立成章，每章一般都分为概述、基本原理、仪器组成、分析技术和应用范例等部分，并备有思考题，有利于学生自学。

本教材由东北农业大学、华南热带农业大学、浙江大学、华南农业大学、大连水产学院、北京石油化工学院、黑龙江矿业学院等多家单位参加编写。全书篇章分为十六章内容。各章编写人员为绪论：王世平；第一篇第一章：王世平；第二章：王世平、王伊强、孙郁柱、王继红；第三章：王伊强、王世平；第四章：王世平、王伊强、刘桂秋；第五章：王世平、周玉岩、王旭梅；第六章：滕冰；第二篇第七章：王静；第八章：王静、杨军；第九章：王静、王晴、滕冰；第十章：滕冰、刘志强；第十一章：王世平、戴文达；第三篇第十二章：王静；第十三章：庞亚民、王静；第四篇第十四章：仇厚授；第十五章：吴莉宇、贺利民；第十六章：彭黎旭、仇厚授、庞亚民、孙郁柱等。审阅本教材有周国江、王伊强等同志，哈尔滨师范大学徐国林教授、华南农业大学王继英教授、哈尔滨理工大学张学明副教授对各章节都提出了很多中肯意见，在此对他们表示衷心的感谢。

限于编者的水平与经验，书中不足和错误在所难免，恳望读者不吝指正。

作 者

1999年1月于哈尔滨东北农业大学

目 录

绪论	(1)
第一节 分析化学与仪器分析	(1)
第二节 分析仪器的分类	(2)
第三节 分析仪器的的重要组成部分	(3)
第四节 分析仪器的主要性能指标	(7)
思考题	(11)
第一篇 光谱法	(12)
第一章 光谱法导论	(12)
第一节 概述	(12)
第二节 光与物质的作用	(12)
第三节 基本光学单元	(17)
第四节 光吸收定律	(26)
思考题	(33)
第二章 紫外-可见光光谱法	(34)
第一节 紫外-可见光光谱法的特点	(34)
第二节 紫外-可见光吸收光谱	(35)
第三节 紫外-可见光分光光度计	(46)
第四节 紫外-可见光分光光度法的应用	(55)
思考题	(61)
第三章 红外吸收光谱法	(62)
第一节 红外光谱发展历史及现状	(62)
第二节 红外吸收光谱	(63)
第三节 付里叶变换红外光谱	(65)
第四节 红外分光光度计	(72)
第五节 红外光谱样品制备技术	(75)
第六节 定性分析	(80)
第七节 定量分析	(83)
第八节 计算机图谱检索	(84)
第九节 红外-色谱联机技术	(85)
思考题	(88)
第四章 原子吸收光谱法	(89)
第一节 概述	(89)
第二节 原子吸收光谱法的基本原理	(89)
第三节 原子吸收分光光度计	(91)

第四节	原子吸收分光光度法的定量方法	(98)
第五节	原子吸收分光光度法的干扰及消除方法	(99)
第六节	原子荧光分光光度法简介	(100)
第七节	原子吸收分光光度法样品制备方法简介	(101)
思考题	(102)
第五章	发射光谱法	(103)
第一节	概述	(103)
第二节	发射光谱的激发光源	(104)
第三节	等离子发射光谱仪	(108)
第四节	等离子发射光谱主要工作参数及定量分析法	(111)
第五节	ICP 发射光谱的干扰问题	(112)
第六节	ICP 发射光谱技术和其它分析技术的比较	(113)
第七节	发射光谱法的应用	(114)
思考题	(116)
第六章	荧光光谱法	(117)
第一节	概述	(117)
第二节	荧光光谱法的基本原理	(117)
第三节	荧光分光光度计	(127)
第四节	荧光分析的定性定量方法	(131)
第五节	荧光分析的干扰因素	(132)
第六节	荧光分析法的应用	(136)
思考题	(137)
第二篇	色谱法	(138)
第七章	色谱法导论	(138)
第一节	概述	(138)
第二节	色谱图及重要参数	(141)
第三节	色谱法基本理论	(144)
思考题	(151)
第八章	气相色谱法	(152)
第一节	概述	(152)
第二节	气相色谱仪的基本组成	(152)
第三节	气相色谱的固定相	(155)
第四节	气相色谱检测器	(161)
第五节	气相色谱定性分析	(167)
第六节	气相色谱的定量分析	(169)
第七节	气相色谱的其他分析技术	(174)
第八节	毛细管柱色谱	(175)
第九节	气相色谱法的技术应用	(179)

思考题	(181)
第九章 高效液相色谱法	(182)
第一节 概述	(182)
第二节 高效液相色谱的类型及其分离原理	(183)
第三节 高效液相色谱仪	(187)
第四节 高效液相色谱固定相	(191)
第五节 高效液相色谱流动相	(195)
第六节 色谱系统的选择及应用	(200)
第七节 高效液相色谱与氨基酸分析	(205)
思考题	(211)
第十章 薄层色谱法	(212)
第一节 概述	(212)
第二节 薄层色谱法的基本原理	(212)
第三节 薄层色谱法的基本技术	(213)
第四节 薄层色谱的定性定量方法	(223)
第五节 薄层扫描仪	(228)
第六节 薄层色谱法的应用	(232)
思考题	(233)
第十一章 毛细管电泳	(234)
第一节 概述	(234)
第二节 毛细管电泳基本原理	(235)
第三节 毛细管电泳的检测器	(236)
第四节 毛细管电泳有关技术术语	(237)
第五节 毛细管电泳技术的分类	(238)
第六节 毛细管电泳在生物技术中的应用	(245)
思考题	(246)
第三篇 电磁波谱法	(247)
第十二章 质谱法	(247)
第一节 概述	(247)
第二节 质谱法原理	(247)
第三节 质谱仪	(250)
第四节 质谱分析	(253)
第五节 定性定量分析	(256)
思考题	(256)
第十三章 核磁共振波谱法	(258)
第一节 基本原理	(258)
第二节 核磁共振波谱仪	(259)
第三节 核磁共振波谱的特征性和化学结构	(261)

第四节	^{13}C 核磁共振	(265)
思考题	(270)
第四篇	电化学法	(271)
第十四章	电化学法导论	(271)
第一节	概述	(271)
第二节	电化学分析基础	(271)
第三节	电极的类型	(277)
思考题	(282)
第十五章	离子选择性电极法	(283)
第一节	概述	(283)
第二节	离子选择性电极的膜电位	(284)
第三节	离子选择性电极的类型	(284)
第四节	离子选择性电极的基本特征	(291)
第五节	离子选择性电极的定量方法	(293)
第六节	离子选择性电极分析法的应用	(297)
思考题	(299)
第十六章	极谱分析法	(300)
第一节	概述	(300)
第二节	仪器基本装置和方法简介	(300)
第三节	极谱定量分析原理	(302)
第四节	极谱定性分析原理	(310)
第五节	其他极谱分析及方法	(314)
第六节	极谱分析法的应用	(325)
思考题	(327)

绪 论

第一节 分析化学与仪器分析

在以往的工农业生产各领域中，分析化学（Analytical Chemistry）中的容量分析法和重量分析法是一种最常用的分析检验手段。随着生产与现代科学技术的发展，分析化学进入以系统论、信息论、控制论及与计算机技术相结合进行分析检测的新阶段，使得人们对分析化学的本质有了新的认识和发现。与其它化学学科相比，分析化学不是直接研究和提供某种有机化合物或无机化合物，而是研究所涉及物质的化学组成和结构，因此说分析化学是研究物质的分离、鉴定与测定原理和方法的一门学科。

根据分析化学的定义范畴、方法及任务，它在一些领域主要研究的发展方向是：

1. 在无机元素的分析技术方面：人们主要是根据经典化学分析理论，利用物质的化学组成和化学性质，通过物理变化及化学反应达到分离鉴定的目的，但检出灵敏度有限。为了提高方法灵敏度和选择性，人们根据火花光源原理，发展了火焰光度计、原子吸收分光光度计、原子荧光光度计、等离子发射光谱仪、X衍射仪等；利用中子、光子活化分析原理，发展了中子活化仪、同位素示踪仪、同位素闪烁仪等，仪器分析技术的发展，也带动了同位素技术的发展。

2. 在化合物分析技术方面：常量范围内主要以重量法、容量法为主要分析手段，但特异性有限，操作方法繁杂。随着比色技术的发展，人们最初利用比色计可进行痕量范围阴离子测定，并已发展到利用可见光分光光度计、极谱仪、离子色谱仪分析内容更多的阴离子化合物，使分析技术更加快速、灵敏、准确和实用。

3. 在痕量有机化学分析技术方面：随着生物技术、食品分析、药物检验等领域的发展，根据分析理论在样品处理技术方面，仅靠萃取、浓缩、沉淀等分离方法还不够，将上述分离技术与薄层色谱仪、气相色谱仪、液相色谱仪及相关仪器相结合，拓宽了这一领域的实用范围。

4. 在微观和表面分析技术方面：随着显微技术的发展，人们不仅要了解物质表面现象，还要对物质内部的组成有更深刻地认识，它是通过某种特定信息手段，如图片、图像、三维成像等反映出来，并对某种化学结构组成进行定性、定量分析。目前通过电子显微镜、电子探针、电子能谱、共聚焦激光显微镜等分析技术使这一领域的研究上升到一个新的阶段。

综上所述，现代科学技术的发展，对分析化学提出了一系列新要求，而当今以信息论、控制论与计算机自动化技术相结合的技术发展日趋成熟，人们对分析化学这一学科本质内容又有了新的认识，使分析化学理论与分析技术的联系更加紧密。

仪器分析（Instrumental Analysis）作为一门特殊学科脱颖而出，它在经典的分析化学基础上，利用仪器的分析手段，探索新的分析理论，研究新的分析技术，因此说：利用特殊仪器装置定性、定量分析检测物质的组成、结构及某些物理特性是分析化学最

有利的工具。仪器分析是研究有关物质分析的理论与技术的一门科学。它与化学分析同属分析化学范畴。

实际上，仪器分析是在化学的基础上吸收了物理学、光学、电子学等内容，根据电、热、声、光、磁的性质来进行分析，并依靠特定仪器装置来完成。由于计算机技术的引入，使仪器分析的快速、灵敏、准确等特点更加明显，多种技术的结合与联用使仪器分析应用面更加广泛。

第二节 分析仪器的分类

现代分析仪器的种类十分庞杂，应用原理都不近相同，为了方便区分现有仪器类别，根据仪器的工作原理以及应用范围，可将分析仪器分为以下几类：

1. 电化学分析仪器：根据氧化还原电极电位鉴别样品的阴、阳离子的形态含量和活度。如电位滴定仪、pH计、极谱仪等。

2. 热学式分析仪器：根据热力学平衡原理，测定物质热交换量。如热分析仪等。

3. 磁学式分析仪器：利用原子核在磁场作用下产生共振吸收定性、定量鉴定物质的结构组成。如核磁共振波谱仪。

4. 光学式分析仪器：利用物质对光吸收的选择性和发射光的特殊性分析物质的结构及组成。如紫外-可见分光光度计、荧光光度计、火焰光度计及原子吸收分光光度计等。

5. 射线式分析仪器：根据X射线穿透性的原理，测定物质的结构及组成，如X射线分析仪。

6. 色谱类分析仪器：利用各物质组分在流动相和固定相之间交换、分配、吸附等作用的差异，达到分离鉴定的目的。如薄层色谱仪、气相色谱仪、液相色谱仪等。

7. 电子光学和离子光学式分析仪器：在特定的物理环境中通过对被电离物质荷质比的分析，来鉴定物质的结构组成。如电子探针仪、质谱仪。

8. 物性测定仪器：根据物理特性及方法，检测物质的组成和性质。如温度测定仪、水分测定仪、粘度计、比重仪等。

9. 其它专用型和多用型仪器：利用化学测定方法，通过仪器完成各阶段的测定步骤。如蛋白质含量测定仪、脂肪含量测定仪、流动注射仪。

在明确分析目的前提下，正确选用某一种分析仪器，必须要掌握分析仪器原理及分析技术的应用。通常各种仪器主要是根据所涉及物质的理化性质，利用对特异光、电信号等响应，通过数据或图谱等形式表达出来。表0-1为不同分析方法信号传递方式及分类。

从分析仪器功能来看，一是为了分析确定物质中的结构与组成；二是利用相关技术对物质中各组成实行分离（如色谱技术）。有的兼有两种功能，对一些复杂的物质分析常需要多种技术相结合，如色谱-质谱联机、色谱-红外联机、毛细管电泳-质谱联机。

表 0-1 分析方法中信号表达及分类

种类	信号表达方式	分析方法种类
化学分析	质量 容量	重量分析法 (离心、沉淀分离) 容量分析法
仪器分析	电位 电导 电流 电量 热焓	电位法 (电位滴定) 电导法 溶出伏安法, 极谱法 库仑法 热焓法, 热导法
	光电子辐射吸收	吸收光谱法(紫外、可见、红外等), 核磁共振波谱法
	辐射发射	发射光谱法(X 射线、紫外、可见、荧光、磷光) 放射性化学法
	辐射散射	浊度法, 拉曼光谱法
	辐射衍射	X 射线衍射法, 电子衍射法
	辐射旋转	偏振法, 旋光色散法
	电场中的荷质比	质谱法
	电场中电荷迁移率	电泳分离法
两相中的分配比	色谱法(气相、液相、薄层)	

本书仅对生物技术、食品分析、环境分析等领域中常用的一些仪器进行介绍, 即光谱分析仪、色谱分析仪与电化学分析仪三大类。我们学习仪器分析时应该把对基本原理的理解与仪器的实际运用两者并重。忽视对仪器的具体使用方法的学习, 显然无法进行实际分析的操作应用, 但如果忽视对仪器基本原理的掌握, 与仪器的应用技术脱离, 则只能得到支离破碎的呆板知识, 也不利于掌握同原理的新型仪器。

仪器分析包括样品前处理与仪器测定两个部分, 这些测定方法就是现代仪器分析方法。

第三节 分析仪器的的重要组成部分

各类分析仪器的作用原理各不相同, 但都是由一些相同的基本部分组成的, 分析流程具有一定规律, 其技术要求也是大致相同的。对一些具体的分析仪器来说, 不一定完全是由这些基本部分组成的, 可能有一些特殊部分, 但通过本节介绍, 可以帮助我们在应用某种分析方法之前, 形成一个完整的分析流程的概念, 了解掌握常见仪器的组成结构和通性。

1. 分析流程

当进行某项分析工作时, 首先要明确分析目的, 确立分析技术手段, 制定出相应分析流程。一个完整的分析方法应从取样开始, 包括样品存储方式、样品的前处理、分析测定、分析结果检验、数据处理统计, 以及结果的表达解释等, 如图 0-1。分析的精度决定于分析全过程, 而仪器分析是保证整个分析过程获取分析数据的一个重要步骤。

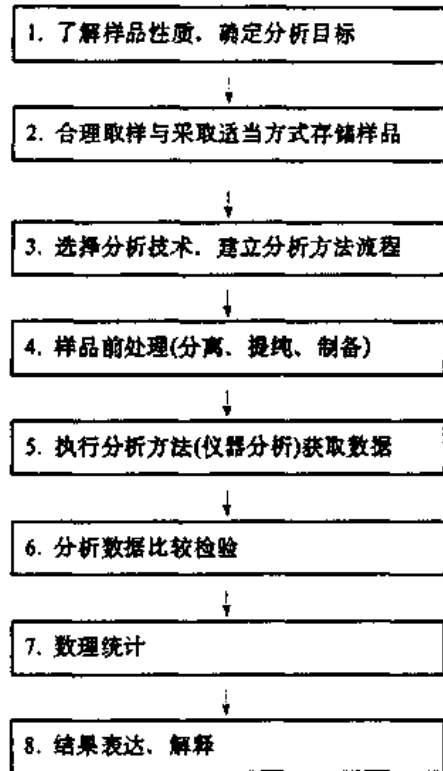


图 0-1 分析流程图

2. 分析仪器基本组成

(1) 取样装置

取样装置的作用是把待分析的样品引入仪器。对于某些仪器来说，取样装置恰恰就是进样器，进样器有手动和自动二种，通常为针筒注射进样器。对于工艺流程用的分析仪器，取样装置就要复杂得多。流程中的样品主要呈气体或液体状态，对于气体样品，取样时必须考虑系统是正压还是负压。

取样装置及抽吸装置的结构是多种多样的，但其结构一般并不复杂，大多采用多孔陶瓷之类的物质，以便对分析的样品进行一次过滤，以减少进入系统的机械杂质，避免堵塞或沾污管道及检测器等。

对于取样系统的要求，首先要能经受工艺过程中的恶劣条件，如高温、高压、腐蚀等，同时要保证不能与样品中的任何成分发生化学反应，以防样品成分改变。因此，必须根据样品的性质及工艺条件来选择制造取样装置的材料。

(2) 预处理系统

仪器分析的任务不应限于静态分析，还应包括工艺流程中的分析检验。预处理系统主要是针对工艺流程分析仪器而讲的，它的任务是将从现实过程中取出的样品加以处理，以满足检测系统对样品状态的要求，有时还需进一步除去机械杂质及水蒸气，除去样品中对待测组分有干扰的组分，以保证仪器测量的精度。

预处理系统一般包括冷却器或恒温器，过滤器或净化器，以及保证仪器选择性的某些辅助装置。

(3) 分离装置

“分离”在这里是广义的，在各种能同时分析多种组分的分析仪器里，都有分离装置。它既包括对样品本身各组分的分离，也包括能量的分离，如光学式分析仪器中的分光系统（或称单色器、色散器等），色谱仪中的色谱柱。

对于分离系统的要求，主要是分辨率。对于多组分分析仪器来说，其分辨率的高低主要取决于分离系统，它往往决定该仪器的主要性能。

在分析仪器中安装分离系统，以实现多组分的快速测量，已越来越引起人们的关注。

(4) 检测器及检测系统

检测器是分析仪器的核心部分，根据试样中待分析组分的含量，检测器发出相应的信号，这种信号多数是以电参数输出的。

仪器的主要技术性能，特别是单组分分析仪器，其技术性能主要取决于检测器。例如气相色谱仪虽为多组分分析仪器，但它的主要性能取决于色谱柱和检测器。因此，应充分重视对检测器性能的了解、使用和维护。

(5) 测量系统及信号处理系统

从检测器输出的信号是各式各样的，常见的有电阻的变化、电容的变化、电流的变化、电压的变化、频率的变化、温度的变化和压力的变化等，其中以电参数的变化尤为普遍。测出这些参数的变化，就能间接地确定组分含量的变化，我们就把测量这些变化的线路或装置统称为测量系统。

在分析仪器中，由于上述参数的变化往往是很小的，如电阻变化可以低到 $10^{-5} \Omega$ ，电流的变化可以低到 10^{-10} A ，甚至更低。因此，需将这些变化很小的参数加以适当放大后，再进行测量和显示。此外，由检测器输出的信号经常是非线性的，这样有时就要有加以线性化的信号处理装置。

为了提高显示精度，便于观察和与电子计算机联用，测量系统愈来愈多地采用数字显示。因此，系统中就必须有模数转换装置，以便把测量系统输出的模拟信号转换成数字信号。

在实际使用时，可根据不同情况采用不同信号处理装置。信号处理系统是信号从检测器发出到显示出来这一过程中的中间环节，对它们的要求主要是不失真地将信号输送给显示装置。

(6) 显示装置

把分析结果显示出来的装置称为显示装置。其显示方式通常有两种：模拟显示和数字显示。

模拟显示在过去用得很普遍，它是在刻度盘上由指针模拟信号的变化，连续地指示出测量结果，或同时由记录笔记录信号的变化曲线。模拟显示装置大多采用电流表、电压表或带自动记录的电子电位差计等，其缺点是显示精度不很高，读数误差较大，而且也不太美观。

数字显示是目前正在大力发展中的一种显示方法，它是把信号经过处理后，直接用数字显示其含量数值。

此外，还有一类叫图像显示，其所用的显示元件是感光胶片、显像管等，它们主要用于多组分分析仪器。对于要求快速扫描、快速反应以及集中显示的场合，用显像管（阴极射线管）显示有很大的优越性。

对于显示装置的要求，主要是能精确显示出检测器发出的信号。此外还有一个响应时间的问题，即能及时地显示分析数据。

(7) 补偿装置

补偿装置对于某些分析仪器是必不可少的，否则会降低仪器的精度和可靠程度。补偿装置的作用是消除或降低客观条件或样品的状态对测量结果的影响，其中主要是样品的温度与压力、环境的温度与压力的波动对测量的影响。这类装置大多是在测量系统或信号处理系统中引入一个与上述条件波动成比例的负反馈来实现的。

许多仪器无法直接引入补偿装置，在这种情况下，为了保证仪器的测量精度，不得不使仪器的结构复杂化。很多仪器往往由于补偿不好，而成为仪器精度不高的主要原因。

(8) 保证操作条件的辅助装置

有些仪器如果不能按上述的办法进行补偿时，为了保证测量精度，必须采取相应的措施，附加某些辅助装置，如流体稳压阀、稳流阀、恒温器、稳压电源、电磁隔绝装置等，使操作条件适应测定的需要。当然，用某种特定的仪器进行测量时，这些因素不一定都存在，需根据具体条件确定选用何种辅助装置。

现代分析仪器发展趋势是：

①普及计算机及微型计算机的应用，不断提高自动化程度；②广泛采用新技术，实现多技术联用；③在仪器结构设计方面，主要趋势是采用标准组件式结构，如“积木式”结构的气相色谱仪，即将仪器解体为若干个标准部件，再按各种组合方式组合成不同用途或不同功能的仪器。在电子部件方面的插件可以是一个放大器、一个程序控制器、一个与计算机连接的接口、一个微型计算机或者一个仪器刻度标准装置等等，只要把这类插件插入相应的位置，就可完成所有电路连接。

采用标准组件式结构的好处主要是：便于实现零部件系列化；用户可用不同的标准化组件和插件组合成自己所需要的仪器，并为以后扩大使用范围留有充分余地；仪器的测试、维修、寻找故障等都比较方便。

分析仪器的基本组成可用仪器结构框图表示，如图 0-2。

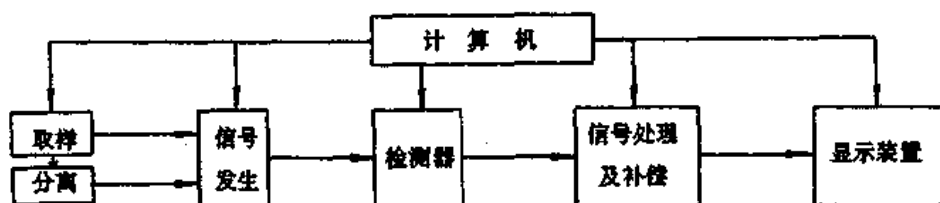


图 0-2 分析仪器结构框图

例如一台酸度计工作流程为：样品液通过电解液中的氢离子活度作为信号源，由玻璃电极和参比电极部分作为检测器，仪器工作时的信号表达及转换方式是电压、电流信

号，电信号经信号处理器进行放大，结果表达方式为 pH 值，结果显示可通过表头、记录仪、打印机、数字显示器等方式。

第四节 分析仪器的主要性能指标

分析仪器的主要性能指标包括灵敏度、精度、重复性、噪音、最小检测量、线性范围、选择性、分辨率以及响应时间，除响应时间是动态性能指标外，其余的都是静态性能指标。

在分析仪器中，通常把组分含量的变化转换为其它量（如电量、光学量、温度、压力等）的变化，用转换的物理量来表示，当然其直观性比用含量来表示要差一些，但是对反应仪器的性能却比较确切一些。

1. 灵敏度

灵敏度是指输出量（可能是电量或其他物理量）与输入量之比。由于分析仪器的应用原理不同，灵敏度的表示方式也有所不同。

2. 准确度，精密度，精确度

准确度：实验值和真值之间相符的程度。

精密度：精密度又称精度，各实验值彼此之间相符的程度。

重复性：由一个分析者，在一个给定的实验室中，用一套给定的仪器，在短时期内，对某物理量进行反复定量测量所得的结果，我国习惯把重复性称之为室内精密度。

再现性：由不同实验室的不同分析者和仪器，共同对一个物理量进行定量测量的结果，我国习惯称之为室间精密度。

精确度：应包含准确度和精密度两方面内容，它们分别对两类不同性质的系统误差和随机误差进行描述，故只有当系统误差和随机误差都小时才能说精确度高。也就是说，精确度描述了对同一测量值作多次重复测量时，所有测量值对其真值的接近程度和各测量值之间的接近程度。

准确度、精密度和精确度三者的含义，可用图 0-3 所示打靶的情况来比喻。图中 (a) 表示精密度很高，即随机误差小，但是不正，所有击中点均同样偏离靶心较远，也就是说有一较大的系统误差，准确度低；(b) 表示精密度不如 (a)，击中点较分散，但准确度较 (a) 高，即系统误差较 (a) 要小；(c) 表示精密度和准确度都高，随机误差和系统误差均较小，即精确度高。

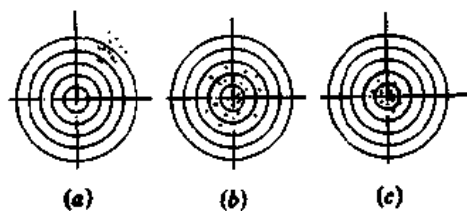


图 0-3 几种误差表现形式

由此可见准确度高，是建立在精密度基础上的。但精密度高并不说明其准确度也高。只有准确度在一定精度下多次测量的平均值与真值相符的程度越理想，精确度也就越好。

3. 误差

误差：测量值和真值的差，通常可用绝对误差和相对误差来表示。

$$\text{绝对误差} = \text{测量值} - \text{真值}$$

$$\text{相对误差} = \frac{\text{测量值} - \text{真值}}{\text{真值}} \times 100\%$$

因为测量值可能大于或小于真值，所以无论是绝对误差，还是相对误差都有正、负之分。

偏差：个别测量值和平均值的差。

误差按其性质的不同可分为两类，即系统误差和偶然误差。

系统误差也称偏倚，它总是存在于一系列同样的或相似的测量中，因此它是不能用任何取平均值的办法消除的。系统误差可由分析方法误差、仪器自身误差、试剂误差、操作者误差等因素产生。

偶然误差又称不可测误差，或称随机误差，是由于无法控制的因素所造成的，它的值或大或小，所以单个地看，随机误差是没有规律的，要想消除这样的误差，只有对一个量进行极多次测量，然后将结果进行统计，找出最可能的值，使随机误差在一定限度内不再影响测量的准确度。

为了消除系统误差，提高分析结果准确度，将误差减少到最小，在实际工作中，要按规程正确使用仪器并对仪器进行校正；按规程正确进行分析检验工作；进行空白实验；进行对照实验。

4. 噪声，信噪比

噪声是指仪器在没有加入被测物质时，即输入为零时，仪器输出信号的波动或变化。

通常用仪器输出信号与仪器噪声的比值作为相对灵敏度指标来衡量仪器的性能好坏叫信噪比。

噪声的表现形式有：短周期的波动，即指示值以零点为中心作无规则的抖动，如图 0-4 中的记录曲线 1，即通常认为的噪音；长期噪音，也称为“起伏”，其特征是指针沿某一中心作大的往返波动，但中心不变，如图 0-4 中的记录曲线 2；零点漂移，即指针作单方向的慢慢移动，如图 0-4 中的记录曲线 3。

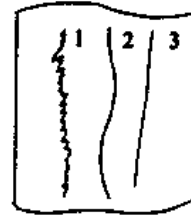


图 0-4 噪声的几种形式

影响噪声的因素是多方面的，有外来干扰，仪器本身元件材料和仪器的灵敏度大小。在外界干扰条件相同时，提高仪器的灵敏度，往往噪音也会成比例增加。因此在调试仪器时，要兼顾这两方面影响因素。

噪音的大小，一般都用相应的物理量或指示记录仪器的指示参数表示。例如，指示记录仪如果是毫伏输入，则噪音以毫伏数表示。

上述三种噪音形式，在仪器的实际工作中，都应力求避免或使其降到最小。

5. 最小检测量

最小检测量或称之为检测极限，它是指仪器能确切反应的最小物质含量。故从其本身的物理意义来看，用“最小检测量”比较直观、明确，而用“检测极限”比较含混，因为“极限”还有上极限和下极限之分，这里明确是下极限。所以，用“检测极限”不易表达清楚。

最小检测量这个指标在食品分析中显得很重要。例如在分析食品中有害物质的含量时，由于某种有害物质的含量往往是很低的，有时可达 $10^{-9} \sim 10^{-12} \text{g}$ ，这就要求所用的分析仪器能测出其含量，即其最小检测量要足够小，否则仪器就等于没有用。随着科学技术的发展，这类要求愈来愈多，也愈来愈高。

(1) 最小检测量的确定

确定一台仪器的最小检测量，一般是以噪声水平为依据，可用下式表示最小检测量：

$$D = nN / S$$

式中 D 为最小检测量， N 为噪声水平， S 为仪器的灵敏度， n 为安全系数。

噪声水平 N 用记录仪的测量值表示，如记录仪表是一个毫伏计，则 N 的单位是毫伏。灵敏度 $S = dy / dC$ ，其中 dy 一般也是以毫伏表示。为了保险起见，将实际测得的噪声水平放大若干倍， n 一般取 1~5 之间。如在气相色谱仪中，取 $n = 2$ 。

(2) 噪声水平的衡量

当实测记录曲线如图 0-5 所示，即是一条抖动但中心位置不变的线时，可取这些记录线两侧最高峰作平行线，则此平行线间的宽度即为仪器的实测噪音水平。但当某一含量输入后，它引起仪器的输出信号小于噪音，即是记录线上其中一个很小的峰，其大小在记录曲线两平行线之间。这种情况很难分辨它究竟是噪音还是真正的输出信号，这样小的含量所输出的信号被噪音所淹没，是分辨不清的。故规定只有输入的含量所引起仪器的输出信号大于或至少等于噪音水平，才能算为该仪器的最小检测量。

(3) D 与 S 的关系

从公式 $D = nN / S$ 可以看出，灵敏度 S 愈大，在噪音水平相同时，其最小检测量 D 愈小。此性质反映在图 0-6 中。图中 A 和 B 分别为两台仪器的反应曲线， A 代表的灵敏度比 B 代表的灵敏度高。虚线表示两台仪器的噪音水平相同，则 D_A 和 D_B 分别为 A 、 B 的最小检测量，而且 $D_A < D_B$ 。

在调试仪器时要适当处理好灵敏度 S 、噪音水平 N 与最小检测量三者的关系。提高仪器的灵敏度，对降低最小检测量是有利的。但是必须注意，提高灵敏度只有在噪音水平并不增大的情况下才是有效的。然而，往往是在提高灵敏度的同时，噪音水平也成比例地加大。在这种情况下，对降低最小检测量是毫无益处的。所以，降低最小检测量，必须在提高灵敏度的同时抑制噪音。

在此应该指出，当比较仪器的性能时，应取同样的样品进行实测，因不同物质在同一台仪器上其灵敏度不一定相同。故不同的物质在某台仪器上的最小检测量也就不一样。另外灵敏度还常与操作条件有关。

6. 线性范围

线性范围是指输入与输出成比例的输入含量的范围，其表示方法如图 0-7，线性范围就是反应曲线呈直线的那一段所对应的物质含量范围，如图 0-8 中的 C_B-C_A ，超出 A 、 B 两点，反应曲线开始弯曲，就不属于线性范围了。



图 0-5 求取最小检测量的噪音图

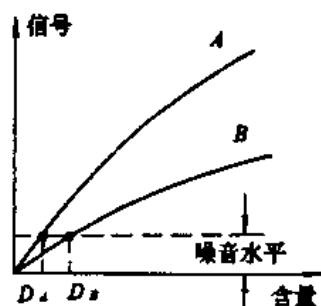


图 0-6 灵敏度对最小检测量的影响

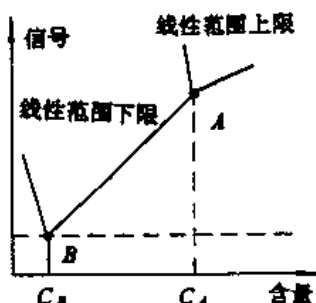


图 0-7 线性范围表示图

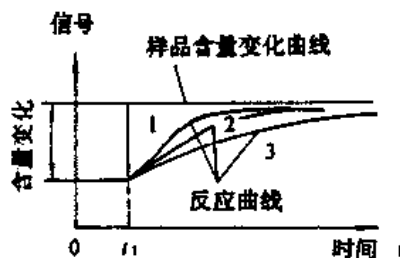


图 0-8 响应时间与样品含量变化关系

7. 响应时间

响应时间是指在样品含量发生变化以后输出信号随着发生变化的快慢程度。在图 0-8 中，横坐标代表时间 t ，纵坐标代表信号。在 t_1 时刻，样品的浓度突然发生变化，仪器的指示就按反应曲线变化。图中曲线 1 表示反应最快，即响应时间最短，其次是曲线 2，反应最慢的是曲线 3。响应时间可根据分析的具体需要选定。

8. 选择性和分辨率

选择性和分辨率是分析仪器特有的一项性能指标，它们都表示一种仪器区分特性相近组分的能力，也就是说，几种组分在某一方面的性能比较相近，而仪器所应用的原理又正是这种特性，选择性和分辨率是指这台仪器是否能将这组分区分开来，并可进行定性、定量分析。

上述八项性能指标是分析仪器的主要性能指标。在实际分析中，这些性能指标对正确选用仪器是非常重要的。但这些性能指标有些在名词上或具体提法上还不很统一，因此，在具体应用时，要注意对这些性能指标的实质理解，并弄清它们间的相互关系以及具体数据求算的根据。

综合地说，选用分析仪器时，最关心的分析仪器性能主要是如下几方面：

- (1) 灵敏度和最小检测量；
- (2) 准确性、精度和重复性；

- (3) 选择性;
- (4) 线性范围.

思 考 题

1. 分析仪器的基本组成有哪些?
2. 仪器分析主要有哪些误差因素?
3. 怎样理解最小检测量概念?
4. 怎样理解化学分析法与仪器分析法?

第一篇 光谱法

第一章 光谱法导论

第一节 概述

光谱学(Optical Spectroscopy)内容十分广泛,它包括光的发射、传播和接收等规律;光与其它物质的相互作用如光的吸收、发射、散射、折射、衍射、干涉等;光的机械作用和光的热、电、化学、生理效应;光的本质问题及光在实际工作中的应用。

光谱分析主要依据物质本身微观粒子(分子、原子或离子)的性质及相互之间作用表现的特征性,并通过一定的手段研究分析其变化规律,以某种光谱形式表征出来。通常凡是待测物质受到某种能量作用后产生光信号,或待测物质受到光作用后产生某种分析信号的分析方法称为光学分析法。

光谱的形成过程一般要经过如下步骤:

(1) 产生作用能量:为了得到被测物的有关信息,需要产生能量作用于待测物质,作用能量的形式可以是光和热,如荧光光谱的作用能量是激发光。

(2) 获取分析光信号:被测物质与作用能量相互作用产生的分析光谱。

(3) 检测分析光谱:通过特殊载体将光谱信号转换成电信号。

(4) 形成光谱信息:将转换的电信号,再进行相应转换变成图谱或数据。

(5) 取证分析光谱:根据最终获取光谱图的特征,确定待分析物质的结构和组成。

第二节 光与物质的作用

光在本质上是一种电磁波。在电磁波谱中,由于产生的方法以及它们与物质的相互作用各不相同,习惯上把它分割成若干个波段。波长最长的是无线电波,一般无线电波是借助电磁振荡电路通过天线发射的。无线电波按照波长不同,又可分为长波、中波、短波和超短波(又称微波)等,长波的波长在3km以上,中波大约为200m,短波为几十米,超短波的波长小到0.1mm。其次是红外线、可见光与紫外线三部分,它们总的叫作热辐射,是由炽热的物体、气体放电以及其它光源由分子和原子的外层电子运动所发射的电磁波。这一部分电磁波除了人眼能够看得见的可见光之外,其它都是看不见的。可见光在波谱中所占区域很小,波长400~760nm,红外线和紫外线所占的区域则大得多。紫外线的波长是5~400nm,红外线的波长0.75~500 μ m。红外线的热效应特别显著,而紫外线的化学效应最强。紫外线以外是伦琴射线,它是由运动电荷突然被阻挡时(例如电子射到金属靶时)所产生的电磁波,它的能量大,穿透物质的本领很强。现在知道的最短波长的 γ 射线,它是原子核内部状态变化时所产生的电磁波,波长在

0.01nm 以下，它的能量更大，穿透本领也更强。但是伦琴射线与 γ 射线的波动性随波长的减小，愈来愈不显著，相反地，它们的粒子性却愈来愈显著。

图 1-1 是不同波长电磁波谱的划分，它们仅仅表示各波长区域的大致范围和相互位置，不可能划分出各区间的严格界限，实际上各区间都是逐步过渡的，而不是截然分开的。

不同波长的电磁波的区别，在无线电波段常用频率来区分它们；在紫外线波段，则喜欢用波长来区分，而不用频率。

波长的常用单位有：埃 (\AA)、纳米 (nm)、微米 (μm) 等，在紫外线波段用得最多的是纳米 (nm)，它们之间的换算关系是：

$$10^{-1}\text{nm} = 10^{-4}\mu\text{m} = 10^{-8}\text{cm} = 10^{-10}\text{m}$$

$$1\text{nm} = 10\text{\AA}$$

一、光的波、粒二相性

光具有波动性，按波动理论，光的干涉、衍射、色散都是光的波动性质的反映。由于光波是频率很高的电磁波，因此它是表征振动的电场强度与磁场强度随时间在空间的分布特征，或运动状态按周期性变化的分布。如图 1-2 所示。

光波的电矢量和磁矢量是在相互垂直并与光的传播方向垂直的平面内振动的。电矢量和磁矢量的振动周期就是光波的振动周期，当然它们的传播速度也就是光波的传播速度，而传播方向则是按右手螺旋从电矢量经 $\pi/2$ 转向磁矢量时拇指所指方向。例如在图 1-2 中电场在纸面上做正弦振动，而磁场在垂直于纸面的方向做正弦振动，则光的传播方向如图箭头所指示的方向。

用 $E(x,t)$ 代表某一单色光强度，则某波动方程的表征形式为：

$$E(x,t) = A\cos 2\pi(\nu t - \delta x + \theta) \quad (1-1)$$

式中， $E(x,t)$ 为时间 t 与光源距离为 x 处的电场强度； A 为振幅； θ 为初相位；频率 ν 为时间参数，即单位时间内电场振动的次数，它与周期 T 互为倒数，可表示为

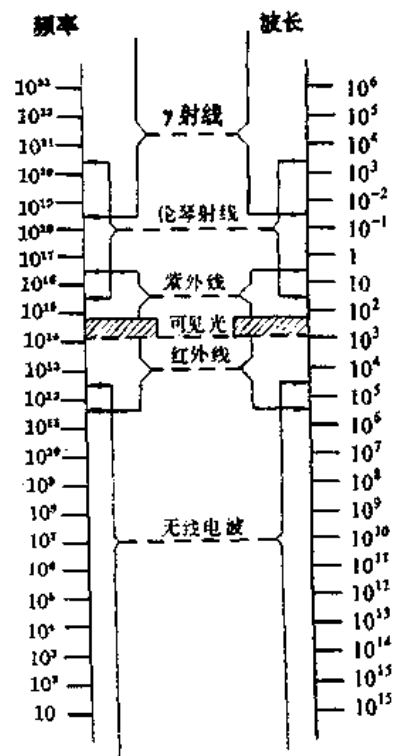


图 1-1 电磁波谱

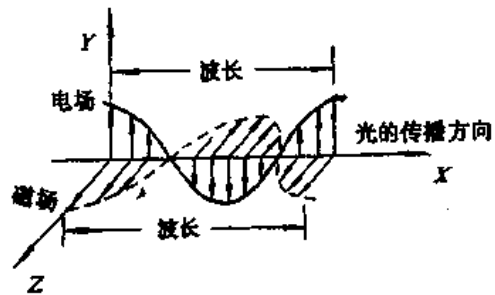


图 1-2 光的波动性示意图

$\nu = 1/T$; 波数 δ 为空间参数, 即指在空间每单位距离中含有波长的数目, 它与波长互为倒数, 可表示为 $\delta = 1/\lambda$.

电场的振动和磁场的振动都是能量的一种形式, 所以光在空间中传播时都携带有能量, 光的能量大小完全由电场振荡和磁场振荡的强弱所决定。

光具有粒子性 (量子性), 光是由一束特殊的微粒子——即光子流组成的, 光量子的能量与电磁波的频率成正比, 其表征形式为:

$$\Delta E = h\nu = hc/\lambda \quad (1-2)$$

式中, E 为光子能量; h 为普朗克常数; ν 为频率; c 为光速; λ 为波长。

当光量子的频率加倍时, 则它的能量也加倍, 这是粒子性所具有的, 像紫外线的光电效应只能用光的量子性来解释, 所以光具有两相性, 它既有电磁波的性质, 又有粒子的性质——光子。

二、光与物质的相互作用

光是由分子或原子向外辐射的, 原子是由原子核和核外高速运动的电子所组成的, 原子核带正电, 电子带负电, 原子核所带的正电与电子所带的负电, 在数量上是相等的, 因此整个原子呈中性, 电子在原子中的分布可以分为很多层, 最靠近原子核的电子与原子核之间的结合力很强, 所以它不易被激发和电离, 但最外层的电子与原子核之间的结合力最弱, 不需要大的能量就会使它们激发和电离, 这些最外层的电子在化学反应中参与反应, 因此在化学上就把最外层的电子称为“价电子”, 在光学中, 最外层的电子是参与辐射发光和吸收光子过程的主要因素, 因此在光学中就把最外层的电子称为“光学电子”, 光学电子与价电子指的是相同的电子, 电子在原子核外高速运动, 不是可以在任意轨道上运动的, 而是有严格的法则来限制它们, 也就是说电子在原子核外运动只允许在特定的轨道上, 由于每一轨道都相应于一定的能量, 因此电子的能量也不能是任意的数值, 只允许某些特定的数值, 所以电子具有的能量也不是连续的。

电子在原子核外高速运动, 不是可以在任意轨道上运动的, 而是有严格的法则来限制它们, 也就是说电子在原子核外运动只允许在特定的轨道上, 由于每一轨道都相应于一定的能量, 因此电子的能量也不能是任意的数值, 只允许某些特定的数值, 所以电子具有的能量也不是连续的。

图 1-3 是分子或原子的能级跃迁示意图, 每条横线就代表一个电子能级, 也就是分子或原子都有它的特征能级, 分子或原子具有的最低

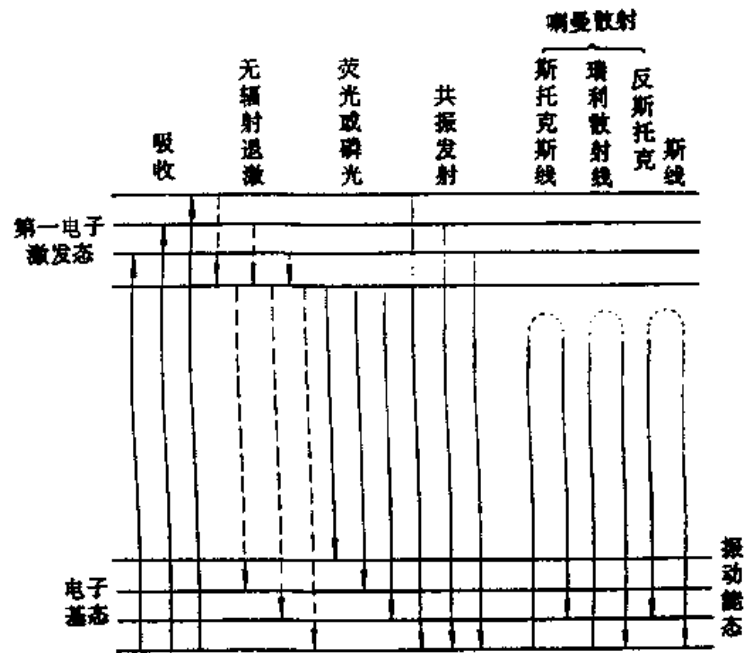


图 1-3 分子的吸收、发射、喇曼散射
实线表示辐射跃迁; 虚线表示无辐射跃迁

线就代表一个电子能级, 也就是分子或原子都有它的特征能级, 分子或原子具有的最低

能量称为基态，基态也就是正常分子或原子所具有的状态，基态以上的各能级叫做激发态。当一束光照射到物质上时，物质将吸收一部分能量的光子，除吸收外还有发射及散射，其过程具有量子化特征。

(1) 光的吸收 当分子与原子吸收光子能量后，从低能态激发到高能态，激发态的寿命很短，约为 10^{-8} s，在退激时可发生激发分子或原子 X^* 与其它分子原子相碰撞，消耗一部分能量跃迁回基态，其能量转化为热能，可表示为：



由于分子与原子具有一定的能级，因此对不同波长的人射光其吸收程度是不相同的，这就是吸收光谱。

由于分子、原子中电子轨道能级的量子化，光子能量是量子化的，因此物质对光具有选择性吸收，也就是说物质对光的吸收因光的波长或频率不同而有所不同，对有些波长的光能够吸收，而对另一些波长的光不能吸收，当白光照射到不透明物质的表面上时，由于对光的选择吸收，使反射光和散射光组成和人射光不同，因而显出颜色。对于透明物质或溶液，由于选择吸收，使透过光的组成和原来人射光不同，因而也呈现颜色。物质除吸收可见光外，还可选择吸收不可见光，如紫外光和红外光等。

物质中分子或原子被光照射，光子与其碰撞，只有当光子的能量与某两个能级差相等时，光子的能量才能被物质分子或原子所吸收，使分子原子的内能得到跃迁，即

$$\Delta E_{\text{内}} = E_{\text{转}} + E_{\text{振}} + E_{\text{电}} = E_{\text{激发}} - E_{\text{基态}} = h\nu \quad (1-5)$$

电子能级的跃迁需要较大能量，一般在紫外及可见光区发生。振动能级与转动能级的跃迁，需吸收较低能量，一般发生在红外区。

(2) 光的发射 分子或原子的发光是因为从高激发态跃迁到较低能级时，它所释放出来的能量，以光的形式向外辐射；辐射出来的光子，其能量完全由两个能级之间的能量差所决定，因此辐射光波长也完全由能级差决定，能级差愈大，则光的波长愈短，能级差愈小，则光的波长愈长。

当激发分子 X^* 发射光子 $h\nu$ 直接回到基态：



发射光的波长等于激发时所吸收的人射光的波长，这种发射称为共振发射。共振发射仅在孤立原子体系中才能发生，对分子来说其发生的可能性很小。

激发态分子因与其它原子分子相碰撞，一部分能量转化为热能损失后，下降到第一电子激发态的最低振动能级，然后再从此振动能级跃迁到基态的其它振动能级并发射光子，发射光的波长比入射光的波长要长些，这种发射称为荧光发射



式中， $\nu' < \nu$ 。

处于第一电子激发态的最低振动能级状态的分子不直接跃迁回到基态而是转入亚稳

的三重态。分子在此三重态的寿命较长些 ($10^{-4} \sim 10s$)，从此三重态跃迁回到基态的振动能级并发射光子，这种发射称为磷光发射。

上述三种类型的发射光在各方向均有。

(3) 喇曼散射 入射光与分子相互碰撞后可发生弹性散射和非弹性散射。弹性散射时，光子与分子无能量交换，仅光子的方向改变，其能量没有改变称此种散射为瑞利散射。非弹性散射不仅光子的方向改变，而且光子与分子有能量交换，当光子将部分能量传递给分子时，光子能量减少，称此种散射光线为斯托克斯线。当分子由高能态跃到低能态则光子能量增加，这就是反斯托克斯线。由于在常温时分子处在低能态的数目多，故斯托克斯线比反斯托克斯线强得多。瑞利散射占散射的 99%。

当分子由某一电子能级跃迁到另一电子能级时，同时伴随产生振动转动能级变化，因此吸收光谱应为线状光谱。在分子为气态时，分子之间相互作用较弱，可以观察到这种线光谱。但是在溶液中，分子之间相互作用较强，振动转动能级变得很密，因此吸收光谱形成带状光谱。

三、光谱及光谱分类

光谱的直观意义是按波长顺序排列的光辐射。对于可见光光源可用单色器色散后，用肉眼观察，也可用照像的方法拍摄光源经单色器色散后在聚焦平面上各不同波长下光强度的底片。以坐标图形式表示光谱，横坐标为按大小顺序排列的波长（或频率、波数），纵坐标为各单色光的强度或相对强度。这种以坐标图表示的光谱称为光谱曲线。

光谱可按不同形式分类。按光谱产生的方式可分为发射光谱、吸收光谱、散射光谱等。按光谱区域可分为紫外光谱、可见光谱、红外光谱等。按光谱的来源可分为原子光谱、分子光谱，而分子光谱又可分为转动光谱、振动光谱、电子光谱、荧光发射光谱等。按光谱形状可分为连续光谱、线光谱、带光谱。

1. 发射光谱

(1) 连续光谱 由白炽固体或液体所发射的光谱，例如白炽灯中炽热的钨丝，熔化的铁水。在一定波长范围内，不同波长的光连续不断，没有锐线和分立的谱带。当物质处于固态或液态，即处于凝聚态，由于原子间的相互作用，使能级变得很复杂，谱线变宽以致于连续。

高温高压下的气体，如氢灯、高压汞弧灯可产生一定波长范围的连续光谱。

(2) 线光谱（明线光谱） 处于稀薄气态的原子被激发后发射明线光谱，例如在火焰中金属盐受热发出的光谱（焰色反应），以及空心阴极灯发出的光谱都是线光谱。由于处在稀薄气态，原子间相互作用力小，此时各元素原子的固有能级发出特征线光谱，成彼此分立的锐谱线。火焰发射、原子吸收、等离子发射等光谱分析法都是利用线光谱来进行定性、定量分析的。

(3) 带光谱 由数个一定宽度光带和暗区相间组成，带光谱实际是谱线密集的线光谱。例如煤气灯中心部分，CO 被激发而发出带光谱，在乙炔-氧化亚氮火焰中有 CN 的带光谱，带光谱是由一些化合物分子在激发温度较低时而发出的，它是能级相差很小的转动能级叠加到振动能级及分子轨道能级中而产生，是分子光谱。

2. 吸收光谱

吸收光谱也有连续、带状和线吸收光谱之分。例如用分光镜观察太阳光谱，在连续光谱的背景上出现许多暗的吸收线，这是因为太阳的大气层中有 60 余种元素的蒸气，它们跃迁时吸收太阳光谱中相应波长的光辐射。吸收光谱中最重要的谱线是带光谱。分子吸收光谱都是带光谱，例如紫外-可见光吸收光谱、红外吸收光谱等。

(1) 转动光谱 分子转动能级之间能量差很小，间隔约在 0.05eV 以下，吸收低能量光子，转动吸收光谱在远红外区，波数小于 400cm^{-1} ，光谱由彼此分开的独立谱线组成。

(2) 振动光谱 分子中振动能级间能量差约为 $0.05\sim 1\text{eV}$ ，较转动能级间能量差约大 100 倍。振动能级的跃迁常有转动能级伴随发生，同一振动能级跃迁可从基态的不同转动能级开始跃迁到激发态的不同转动能级，许多能量相近的不同谱线密集成吸收带，出现于中红外区，波数在 4000cm^{-1} 到 400cm^{-1} 之间，通常称为振动-转动光谱，或红外光谱。

(3) 电子吸收光谱 分子中电子能级间的能量差约为 $1\sim 20\text{eV}$ ，是振动能级能量差的 $10\sim 100$ 倍。电子能级跃迁时常同时发生振动和转动能级的跃迁。电子激发时可以从许多可能的振动和转动能级开始，跃迁到高级电子能级中许多可能的振动能级上去，而振动和转动能级的数目又是很多的，因此从一个电子能级跃迁到激发态电子能级时，由许多密集的谱线形成吸收带。分子中电子能级的跃迁吸收光子的能量在紫外及可见光区。

第三节 基本光学单元

一、单色器

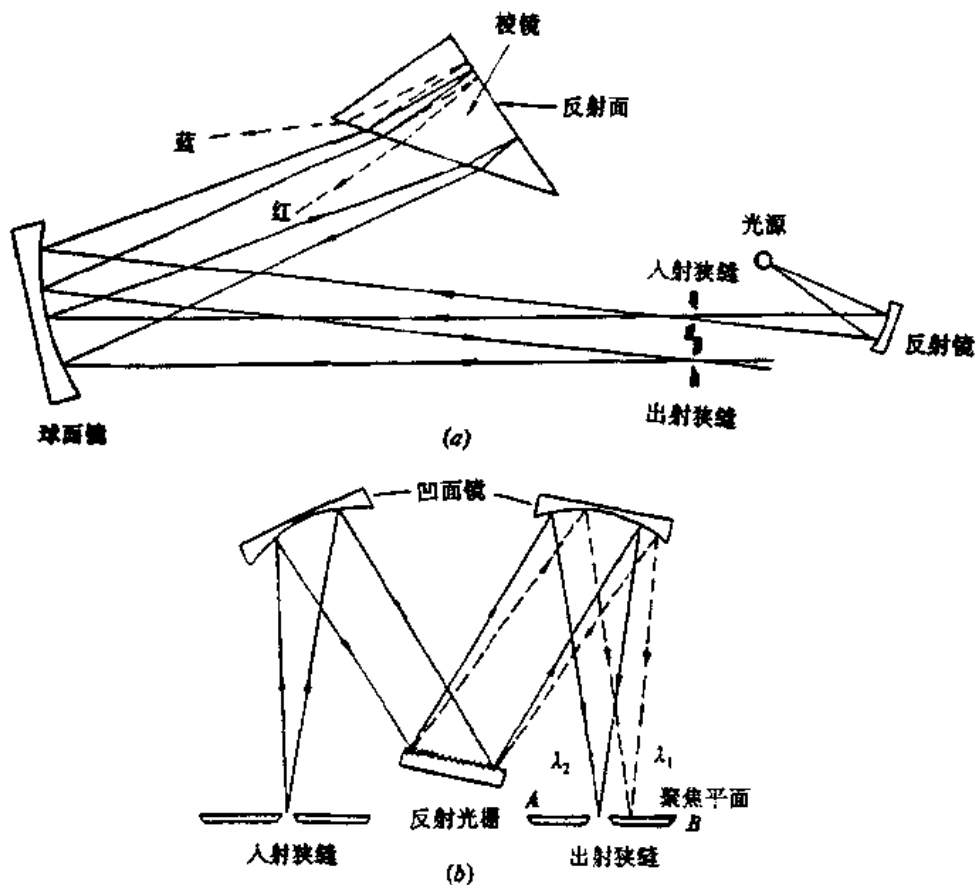
通常光源发出的光多为连续光谱的复合光，它包括一个或几个光谱区域内各种波长的光波。在光谱仪器中应用的是单色光，要想获取单色光就必需使用单色器，因此单色器是光谱仪器的核心部分。一般单色器装在内外涂黑的密闭盒子中，主要由入射狭缝、准光镜、棱镜或光栅、滤光片、聚光镜、出射狭缝组成。如图 1-4 所示。

1. 狭缝

由两块金属制成刀刃，如图 1-5。经过精密加工，二刀刃互相平行，并在同一平面内。狭缝中间的间隙称为狭缝的机械宽度，可以是固定的，也可通过测微机械装置自动或手动调节。机械宽度可在 $0.05\sim 2.0\text{mm}$ 之间，视使用的波段、仪器种类及档次而不同。狭缝愈窄，透过光的纯度愈高，灵敏度愈高，但狭缝太窄，透过光强度弱，检测困难，需根据测定需要选择合适的宽度。

入射狭缝的作用是自光源选出一束光，使其接近于平行光束，并阻止光源以外的其它光进入光路。

出射狭缝位于单色器聚焦平面上，色散后的各单色光经过聚光镜分别在聚焦平面的不同位置聚焦成像后，当转动色散元件时，使各单色光分别逐个通过出射狭缝。一般人射狭缝与出射狭缝同时调节，处于同样宽度。



(a) 棱镜为色散元件，准光及聚光用同一球面凹镜 (b) 光栅为色散元件。

图 1-4 单色器示意图

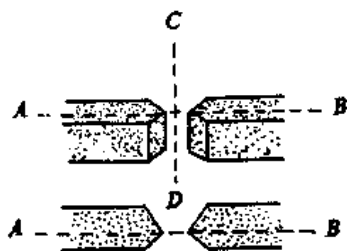


图 1-5 狭缝示意图

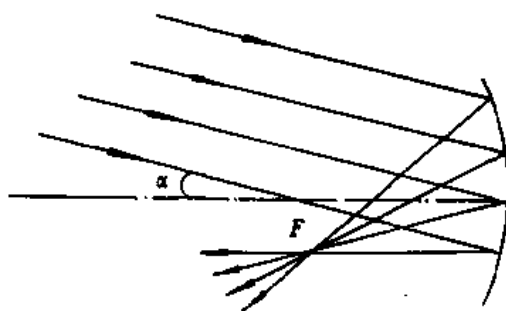


图 1-6 凹面镜的聚光和准光作用

2. 准光镜与聚光镜

从点光源发出的光为球面波，经过入射狭缝选取一束光，接近于平行光，再经过准光镜变为平行光。所谓平行光是波面互相平行，对于每种单色光波面上各点相位相同。只有平行光束到达色散元件时才有相同的入射角。聚光镜的作用是使色散后不同波长的各平行光束会聚于聚光镜的焦平面上的不同位置分别成像，准光与聚光可由凹面反射镜

来完成，见图 1-6。如果把入射狭缝放在凹面反射镜主轴一侧的焦平面，则入射光经过凹面镜反射后在主轴的另一侧成为平行光束射出，这就是准光作用。如果在主轴一侧平行光以 α 角入射，平行光经凹面镜反射后将会聚于主轴另一侧焦平面上的 F 点而成像，这就是聚光作用。

3. 滤光片

它是一种简单的、带通较宽的分光器，它的作用就是把不必要的光滤掉，让需要的光带透过去。滤光片即构成了分光器的全部，因此这种分光器的结构很简单，它是光谱仪器中经常使用的一种分光器。滤光片按其透光性质又可为：

(1) 中性滤光片 这种滤光片在一个比较宽的波长范围内，光的透光率是恒定的，即透过率与波长无关。如图 1-7 就是这种滤光片，它在可见光区 (400~800nm) 的透光率几乎是水平线。

(2) 截止滤光片 这种滤光片可使波段的一侧几乎是完全不透明的，而波段的另一侧则几乎是透明的。如图 1-8。

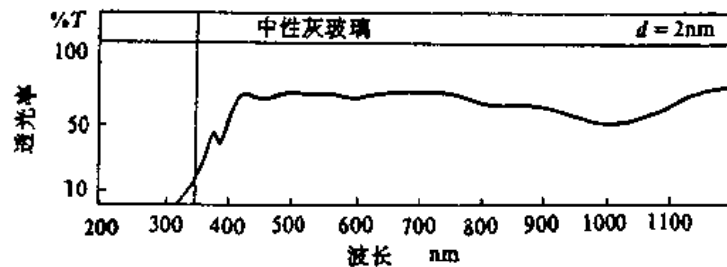


图 1-7 中性滤光片透光特性

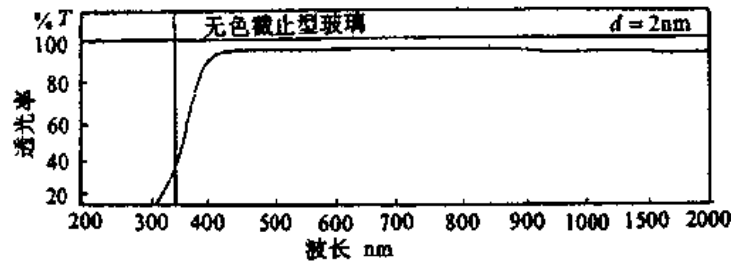


图 1-8 截止滤光片透光特性

(3) 带通滤光片 它在某一个波长范围内透过率较高，当波长低于或高于这个范围时，则光透不过去。实际上这种滤光片是由两个截止滤光片组成的，如图 1-9。

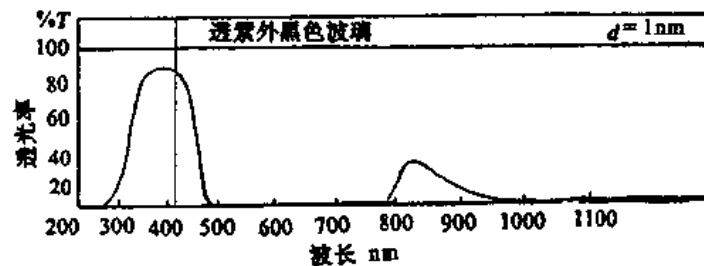


图 1-9 带通滤光片透光特性

(4) 干涉滤光片 它的通带宽度更窄，可以窄到几个毫微米。干涉滤光片的另一特

点是，透过率比较高，一般可达 85% 以上，而在紫外部分的透过率最高可达 60% 左右。

4. 棱镜

不同介质之间光的折射率 n 随温度及光的波长而改变，一般都指 20℃ 的折射率，这时 $n = f(\lambda)$ 。波长越短折射率越大，使不同波长的光得以分开。入射时折射一次，经镀铝反射面反射后，进入空气时又折射一次。

在可见光区使用玻璃棱镜最好，因玻璃的折射率随光的波长变化较大。

普通玻璃棱镜透过紫外光能力很弱，不适用于紫外光分光，常用光学石英玻璃棱镜代替。光学石英玻璃内含杂质很少，透光能力强（尤其在 230~180nm 的远紫外区）。如图 1-10 所示，当多种波长的人射光的人射角均为 α 时，且其中 $\lambda_1 < \lambda_2 < \lambda_3$ ，这些波长的光通过棱镜后的偏向角有 $\delta_3 < \delta_2 < \delta_1$ 的关系，波长越短的光（如 λ_1 ）则通过棱镜后的偏向角 δ_1

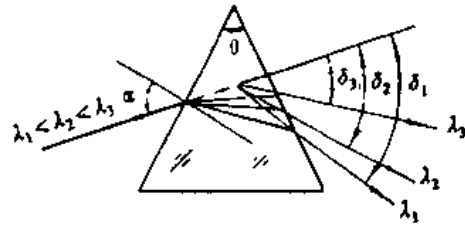


图 1-10 棱镜的色散

就越大（即折射率大），由此可见棱镜的色散不是线性的，而是随光的波长的改变而改变的，这是它的缺点。石英棱镜分光的波长范围很窄，对短波应用极限只能达到 185nm，但用在大气中的光谱分析仪器，波长到 185nm 也就足够用了。真空紫外波段的棱镜材料可用氟化锂 LiF 制成，氟化锂的短波使用极限可达 120nm，波长再短就只能用光栅了。

一般可见光光度计用玻璃棱镜，紫外-可见光分光光度计或发射光谱仪使用石英棱镜，而红外光谱仪使用氯化钠或溴化钾晶体材料做棱镜，因为玻璃和石英对红外光的透过率低。

5. 光栅

光栅是利用光的衍射及干涉原理制成的色散元件，随着光栅刻划技术的发展，光栅已被广泛应用。近些年来，由于全息照相技术的发展，光栅的刻划技术有了重大改进。用全息照相方式制成的光栅在质量上、成本上都优于用机械方式制成的光栅。

仪器中常用的平面反射光栅是把金属、玻璃或塑料的表面磨光，用金钢石针头刻画许多互相平行的刻线，然后镀上金属膜。光栅的面积约为 $25 \times 25 \text{mm}^2$ 到 $100 \times 100 \text{mm}^2$ 。紫外及可见光一般用 1 200 条/mm 的光栅，红外光则用每毫米数百条刻线的光栅。平行刻线的间隔称为光栅常数 d ，应与入射光的波长数量级相等，如光栅刻线为 2 000 条/mm，则 $d = \frac{1}{2\,000} = 5 \times 10^{-4} \text{mm} = 500 \text{nm}$ 。光栅的色散作用是通过光的干涉加强和干涉减弱来实现的，如图 1-11 所示。

复合光经准光后成为平行光束，相同波长的单色光在垂直于前进方向的波面上相位相等。考虑二束复合光 1 和 2，以入射角 i 照射到光栅平面。每个宽斜面看作是一个反射光的点光源。当 1 到达光栅时，A、C 二点是同相位点，2 要多走 BC 段距离才到达光栅表面，这时 1' 在反射后已多走 AD 一段距离，反射后当 1'、2' 二条光线达到距聚

光栅等距离点 BD 时, 二光线的光程差为 $BC - AD$.
 $\lambda BC / AB = \sin i$, $AB = d$,
 $BC = d \sin i$, $AD / AB = \sin \theta$,
 $AD = d \sin \theta$, 对于复合光 $1'$ 、 $2'$ 中波长为 λ 的光, 如果恰好符合下述条件则得到干涉加强:

$$BC - AD = n\lambda, \quad (n = 1, 2, 3 \dots n) \quad (1-8)$$

n 为正整数, 即光程差为某波

长的整数倍时, 该波长的单色光得到干涉加强. 这时的衍射角为 θ , 在该衍射角方向, 其它波长的光都被干涉减弱. 在其它衍射角方向, 将有其它波长的光符合 $BC - AD = n\lambda$ 的条件, 分别得到干涉加强. 转动光栅改变入射角, 又可得到几条单色光.

$$n\lambda = BC - AD = d(\sin i - \sin \theta) \quad (1-9)$$

如果 i 与 θ 角在光栅法线的两侧, θ 角为负, 上式变为:

$$n\lambda = d(\sin i + \sin \theta) \quad (1-10)$$

在一定入射角 i , 不同的衍射角 θ 方向, 得到不同的单色光, 转动光栅, 相同衍射角中的各相同波长的光分别聚焦成像.

光栅可同时形成多级光谱, 式 (1-10) 在相同入射角及衍射角条件下, 出现几个不同波长的光重叠, 如图 1-12. 在某 θ 方向得到 $n=1$ 的一级光谱为 800nm , 则 $n=2$ 的二级光谱为 400nm , $n=3$ 的三级光谱 267nm 也在同一方向重叠出现. 一般光谱仪都有合适的滤光片可方便地消除光谱级的重叠现象.

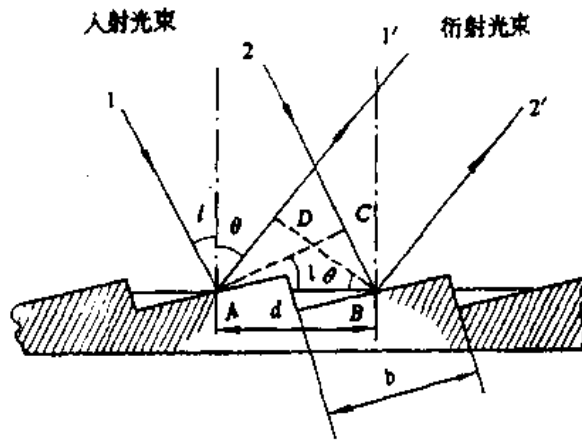


图 1-11 平面反射光栅的衍射

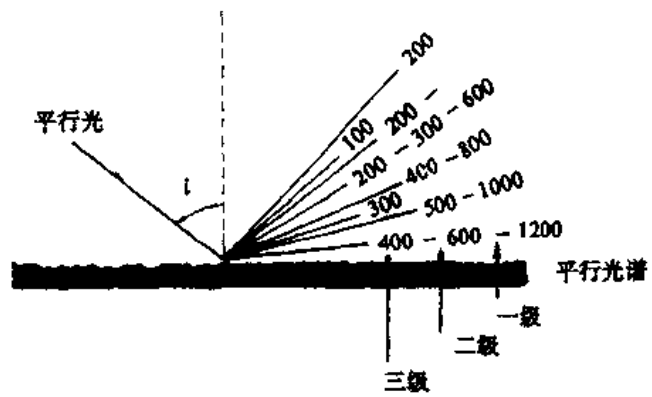


图 1-12 光栅色散的多级光谱

光栅的线色散是常数, 因此谱线排列均匀, 这个特点在使用上是很方便的. 通常棱镜只在短波段其色散力才与光栅可以相比较, 而在大部分波长范围特别是长波, 光栅比棱镜的色散能力大得多. 三种类型的单色器件的性能如图 1-13 所示.

光栅分光的优点是:

(1) 光栅的色散波长范围很宽, 从几十埃到几百微米的范围均能色散, 而且色散是线性的, 即对不同波长色散率都是一样的. 而棱镜的色散则不是线性的 (棱镜波长越短

色散越大)。

(2) 光栅分光的灵敏度高, 因为光栅对光的吸收要比棱镜吸收的少, 所以光栅分光比棱镜分光的灵敏度高。

(3) 光栅比石英棱镜便宜。

由于光栅比棱镜具有更多的优点, 所以目前各种光谱仪器多采用光栅分光。

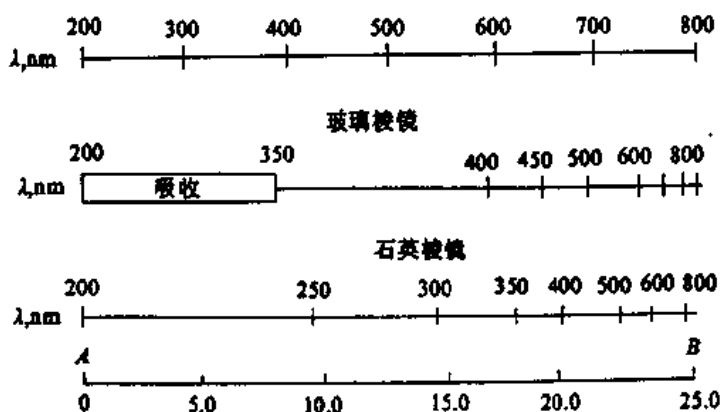


图 1-13 三种单色器的色散特性

图中 A 和 B 二点相当于图 1-4(b) 中的 AB。

二、检测器

检测器是将光信号转换为电信号。由于光信号微弱, 需对转换后的电信号加以放大便于测量。

在光谱分析仪器当中, 从重要性来讲除了关键的单色器外, 检测器也是一个非常重要的部件。检测器按工作性质可分为光电效应检测器、热电效应检测器、光化学效应检测器、生物效应检测器, 在光谱仪器中最常应用的是光电效应检测器。

具有一定能量的光子照射到某些物质的表面时, 则物质会发生各种电性质的改变, 如物质发射电子、电导率发生变化和产生电位差等现象, 这些现象均称为光电效应。概括起来光电效应可分为三种, 即外光电效应、内光电效应和光生伏特效应。

1. 外光电效应检测器

当一定波长的光照射到金属的表面时, 使金属中的自由电子被激发后逸出金属表面产生光电子发射, 这就叫外光电效应。

由外光电效应制成的光电转换器件有两种, 即光电管和光电倍增管。它们都能将微弱的光信号转换成电信号, 这一功能是由接收光子而放出电子的光电阴极完成的。

(1) 光电管

光电管由一个阴极和一个阳极构成, 它们都装在抽成真空或抽成真空后充入少量惰性气体的外壳中, 阴极镀上适当的光电发射材料。光通过石英窗照射到阴极表面时, 光

能激发出自由电子，在两极间加电压后，电子定向向阳极运动，形成光电流。光电管的构造如图 1-14。

对于一定的光辐射强度，光电流随外加电压的升高而增加，但升高到一定电压后，光电流就不再增加，该电压称为饱和电压，约为 90V，这时所有被激发的自由电子都被阳极收集，效率达到 100%，在饱和电压以后，光辐射强度与光电流成线性关系。由于阴极表面

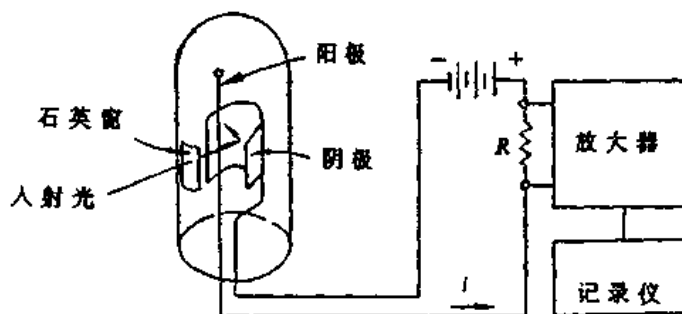


图 1-14 光电管示意图

面所涂光敏金属化合物不同，对各波长光辐射的响应灵敏度不同，所以有红敏光电管和蓝(紫)敏光电管之分。红敏光电管的阴极所镀的光敏物质为氧化铯，适用波长范围为 625~1 000nm；蓝敏光电管的光敏物质为铯铷合金，适用于检测 200~625nm 的光。

光电管的光电流很小，约为 10^{-11} A，需经电子放大器放大后，才能为仪表指示，或记录器记录。

光电管或光电倍增管的阴极未受光照射时，也可测出很弱的光电流，称为暗电流，是由阴极表面光敏物质受热产生热电子发射而产生的电流。对于光电管一般规定在 90V 电压下，暗电流不得超过 10^{-6} A (经放大后)，在实际仪器中都设有补偿电路，以消除暗电流。

光电管的线性较好，也就是说在很宽的光强范围和一定波长范围内其光电流的大小与入射光强度成正比。一个好的光电管还应考虑它的稳定性、暗电流大小、响应快慢(当入射光强度变化时，光电流跟随其变化的快慢)、温度系数等因素。使用光电管时应注意不要使其“疲劳”，当光电管的光电流超过一定限度时其灵敏度就要降低甚至不能使用，因此不要用过强的光照射阴极，特别不要在过强光照下连续工作。

(2) 光电倍增管

要得到高纯度的单色光，狭缝与带宽需很窄，光强度就要减弱，需使用光电倍增管，以得到较强的光电流。图 1-15 为光电倍增管的示意图。

光电倍增管是在光电管里增加了电子流的放大装置而构成的探测元件。金属表面受快电子轰击后放射出电子来，这种现象称为“二次电子发射”。金属表面发射的二次电子的数目比轰击它的电子数目大很多倍，这就产生了放大作用。光电倍增管的结构形状有很多种，但其原理都一样，如图 1-15 所示的结构。入射光照射到半透明的阴极上，阴极放射出电子来，电子经聚焦电极作用后聚在第一打拿极 D_1 上， D_1 产生二次电子发射，具有放大作用。由于各电极上加有电压 100V 左右(总的外加电压约 1 000V)，电子在此电压下得到加速，轰击第二打拿极，电子的数目再一次被二次电子发射所倍增，后面的各打拿极将相继产生倍增放大作用，直到电子被收集到阳极(亦称收集极)，因为经过多次放大倍增，收集极的电流被增大很多倍。许多光电倍增管的电子放大系数

达 10^8 。所以在使用时应严密遮光，以免损坏光电倍增管。由于光电倍增管的增益随外加电压（即加在各打拿极上的电压）的增高迅速增大，因此对供电电压的稳定度要求高，通常应优于 0.1%。光电倍增管的线性较好，是性能良好的探测元件，在分光光度计中常采用它。

光电管或光电倍增管做为极微弱的光信号接受器时，暗电流是非常有害的。它限制了弱光测量的极限值，可造成工作的不稳定性，因此希望管子的暗电流值愈小愈好。当管子的增益愈高，则暗电流就愈大，因此在使用时常采用下列措施减少管子的暗电流：①用暗电流补偿技术，在测量弱光时信号电流与暗电流可以相比拟，这时在阳极回路里与输出表头并联一反向直流电压，用以抵消暗电流。②致冷技术，用干冰、液氮和半导体致冷器使管子冷却，这样由热电子发射造成的暗电流可基本上消除（低于 -40°C 时）。③磁散焦技术，在管子的阴极区外面加一磁场使阴极

暗电流散焦，从而使暗电流的电子偏离正常轨道，不使它进入倍增系统，因而降低了管子的暗电流。图 1-16 是光电倍增管工作时的基本电路。使用时电源电压的选择要合适，即电源电压要尽量偏低。光电流不能很大，若光太强时会造成阴极疲劳，产生误差。同时要注意环境的屏蔽（射线屏蔽、电磁屏蔽等）。管子适于在黑暗中保存，管座要保持清洁和干燥，以防止漏电，增大暗电流之值。

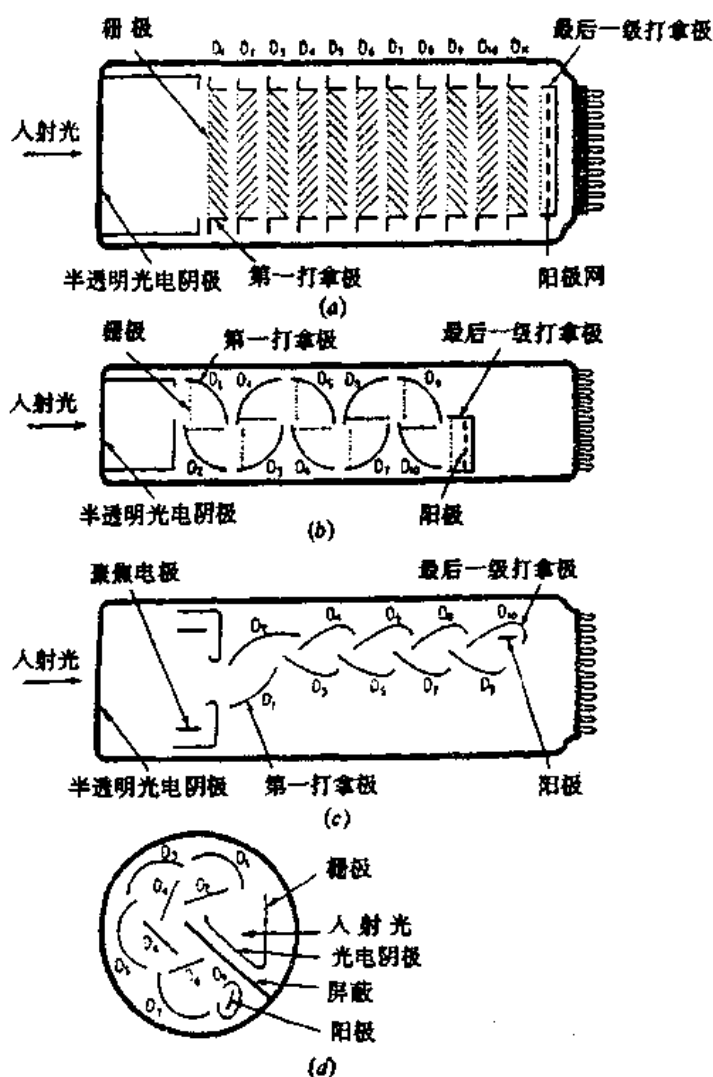


图 1-15 光电倍增管的结构

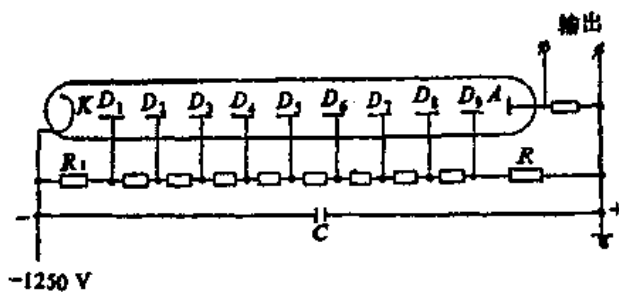


图 1-16 光电倍增管的基本工作电路

2. 内光电效应检测器

一定波长的光照射到半导体（或绝缘体）的表面上时，使被束缚的电子受到激发，电子从原子的内层跃迁到外层，甚至成为自由电子，结果使受光照射的半导体或绝缘体的电导率增加，这种作用称为内光电效应。光导管就是利用内光电效应制成的半导体器件。由于这类器件的电阻受光照而变化，所以它又称为光敏电阻。在光导管受到光照射后，电阻率减小，导致电路中电流的增加。光照越强，电路中的电流值也就越大。

如用于可见光-近红外光的硫化镉和硒化镉光导管；用于近红外光的硫化铅光导管；用于远红外光的硒化铅、碲化铅、铋化铟光导管。

3. 光生伏特效应检测器

一定波长的光照射到某些半导体材料表面时，可能在半导体材料的受光面和背光面之间产生电位差。这时如在半导体的两面之间串入检流计就会产生电流。这种光电效应称为“光生伏特效应”，这样的半导体元件称为光电池。光电池可以把太阳能转换成电能，在光学仪器上可以用光电池做为光检测元件使用。光照愈强，短路电流就越大，以此把光信号转换为电信号，用以检测光辐射的大小。如硒光电池和硅光电池就是利用这一原理进行工作的。硒光电池是一种结构较简单价格便宜的探测元件，在底电极上涂一层半导体硒，作为一个电极，另一电极为一金属环，硒表面是一半透明金膜。当光照射到硒表面时，硒中电子跑向金膜，使其带负电，而硒层失去电子，变成正极，因此可产生光电流。光越强，光电流越大。当入射光不太强时光强与产生的光电流为线性关系。光电池对不同波长的光有不同的响应。硒光电池的光谱响应近似人的眼睛的光谱响应，但易疲劳，它可制成各种式样及尺寸，常用于光电比色计中。

三、光源

光源应能发出在使用范围内连续光谱的许多波长的光波，另外要有足够强的光强度。在可见光区使用钨灯或碘钨灯，在紫外光区使用氢灯或重氢灯，不同的仪器在使用时可手动选择或自动换灯。

钨灯为钨丝灯泡，电压为 6V 或 12V，需使用稳压电源，保持光的强度稳定，适用于 320~2500nm 的波长范围。钨灯在使用过程中，由于钨逐渐蒸发，钨附着在灯泡内表面上，影响光的透射性，输出功率逐渐降低，性能下降，寿命减少。为了改变这一不利因素，近年来许多仪器多选用碘钨灯，该灯在充足的惰性气体中加少量碘蒸汽，在高温下使碘与钨化合及分解，抑制钨的快速蒸发，同时也防止钨附着在灯泡壁上，保持钨灯长期稳定发光的性能，延长灯泡使用寿命。碘钨灯也称卤灯。

氢灯和重氢（氘）灯是发光二极管，发出 160~375nm 的连续紫外光。电源由电子管稳压器供给，氢灯装于带有石英窗口的玻璃管中，紫外光由石英窗口发出，玻璃管内装有阳极及网状阴极，阳极电压为 60~90V，阳极电流为 300mA，管内充以氢气或重氢，接通电源后，阴极作为灯丝，受热发射热电子，被阳极吸引而产生电弧，氢气受电子冲击而被激发产生光辐射，从石英窗发出连续的紫外光和弱的可见光。在可见光区能见到它的明线光谱，其中 379.79nm、486.1nm 及 656.3nm 可供单光束分光光度计校正波长使用。如充以重氢，可增加光强度，并延长使用寿命，如用重氢灯，使用的校正波长变为 656.1nm 及 486.0nm。

紫外光源的稳定输出是很重要的，它直接影响到测量结果的精度和重复性。氘灯紫外输出能量非常稳定，是光谱仪器上的一个理想紫外光源。

其它气体放电光源如汞灯、氙灯等也都是采用小瓦数的球形点光源，这是为了在光学系统上处理方便。当然同样也要求它们光输出要稳定，寿命要长。荧光分光光度计多用球形氙灯（如日本岛津 RF-荧光分光光度计就是用球形氙灯），而原子吸收光谱仪则多用原子光谱灯，要求它辐射的原子光谱线半宽度要窄，以利于提高仪器的灵敏度。

红外光谱多用碘钨灯（近红外）、能斯特灯（中红外）、汞灯（远红外）。

四、吸收池

是一种能装待测样品的容器。可放液体、气体样品，在可见光区使用时称为比色皿。对于 350nm 以下的紫外光使用水晶或熔融石英吸收池，这种材料也可用在可见光区到 3 μ m 的红外光区。玻璃吸收池可用于 350nm 以上到 2 μ m 的光谱区，形状以方形居多，也有圆柱状。对着光路的两面（也称窗口）是固定的，前后也有区别，其方向用文字、箭头、标点等表示，使用时方向要经常保持一致。常用的液体吸收池有各种不同厚度，其光径为 0.1~10cm，以 1.0cm 光径的吸收池使用较多，其容积为 1.5~3.0mL，还有微量和半微量吸收池，其光径亦为 1.0cm，但容量可小至 0.25mL，可根据溶液的浓度、样品的多少加以选择，光径要准确，其误差应为公称长度的 0.5% 以内。

有时为了测量方便或自动控制，需采用流动液槽，液槽内容积有多种规格，最小可达几微升。

玻璃和石英对光辐射也不是完全透明的，1cm 石英吸收池在 220~270nm 时，以空气为对照，其百分透光度为 70，即石英对紫外光也有一定吸收，同时每个吸收池多少也不一样，在定量测定工作中所使用的一组吸收池一定要互相匹配，事先须经过选择，选择的方法即以各吸收池盛同一种溶液，于所用波长下测定其透光度，相互间的误差应在透光度 0.2%~0.5% 之间。

吸收池在光路中的两面必须保持清洁，不得有手印、污垢以及前次测定的残留物质。可用洗涤剂或热硝酸浸泡清洗。

第四节 光吸收定律

一、光吸收定律

溶液对光吸收的定量关系如图 1-17 所示。用一个石英吸收池，光径为 b ，即光通过吸收池所经过的距离。经过准光的单色光通过吸收池的 A 部分（ A 的截面积为 $X \times Y$ ）。首先在吸收池中装入空白溶液，空白溶液中只含溶剂及吸光物质以外的其它成分。除不含吸光物质外，在组成与含量方面尽量与样品溶液相同。测量透过空白溶液光的强度，以 I_0 表示。当吸收池中换上含吸光物质的样品溶液时，以 I_0 做为样品溶液的人射光强度，再测得通过样品溶液的透射光强度 I 。空白溶液的作用是为了消除吸收池表面和溶液对光的散射、反射及背景吸收（主要吸光物质以外，其它成分对光的吸收）所造成的影响， I_0 就是已扣除这些影响，经过校正的真实的样品溶液入射光强度。

取无穷小液层 db ，经过 db 后，光强度减弱为 dI ，对光的吸收是由于光子与吸光物质分子碰撞而发生的能量传递过程，碰撞的几率决定于 $db \times X \times Y$ 体积中吸光物质分子数目 N 和每秒钟通过截面积 $X \times Y$ 的光子数目 I 。 N 增加一倍，碰撞几率增加一倍，吸收的光能 dI 与 N 及 I 成正比： $N = 6.02 \times 10^{20} cdb \times X \times Y$ ，式中 6.02×10^{20} 为阿佛加德罗常数，这里用的是毫摩尔， c 为吸光物质溶液的浓度。因为 X 、 Y 为常数，所以有：

$$N = k'cdb \quad (1-11)$$

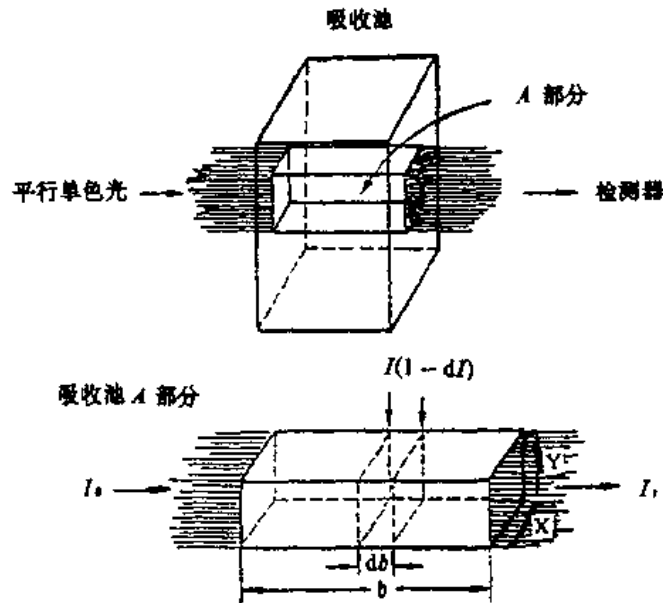


图 1-17 溶液对光吸收的定量关系

式中， $k' = (6.02 \times 10^{20})(X \times Y)$ ，又因为 $dI \propto NI$ ，所以

$$dI = -KIcdb \quad (1-12)$$

K 为比例常数，负号表示当液层厚度增加时，光强度反而减弱。 I 是变量，是 b 的函数，液层中不同位置 I 不同，因光不断被吸收而减弱。分离变量得到：

$$\frac{dI}{I} = -Kcdb \quad (1-13)$$

对于吸收池中的 A 部分，当液层厚度由 0 变到 b 时，光强度由 I_0 变为 I_1 。将无穷小量 dI 求和，即将式 (1-13) 积分，得到在全部液层厚度 b 中由于样品溶液的吸收光强度减少的程度。

$$\int_{I_0}^{I_1} \frac{dI}{I} = -K \int_0^b cdb$$

$$\ln \frac{I_1}{I_0} = -Kbc \quad (1-14)$$

将自然对数变为以 10 为底的常用对数

$$2.303 \lg \frac{I_0}{I_t} = -Kbc \quad (1-15)$$

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = \frac{K}{2.303} bc \quad (1-16)$$

令 $A = \lg \frac{I_0}{I_t}$, A 称为吸光度; $\varepsilon = \frac{K}{2.303}$, 称为摩尔吸光系数

$$A = \lg \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon bc \quad (1-17)$$

式 (1-17) 即为吸收定律, 它的意义是: 溶液的吸光度与溶液中的吸光物质的浓度及液层厚度的乘积成正比。也称为朗格-比耳定律, 简称比耳定律。

二、吸收定律中名词的意义及单位

1. 吸光度“ A ”也称消光值“ E ”或光密度“ D ”, 如果单色光通过溶液后完全不被吸收, $I_t = I_0$, $A = 0$; 溶液愈浓或液层愈厚, 光被吸收愈多, I_t 比 I_0 愈小, A 愈大; 当 $I_t \rightarrow 0$, $A \rightarrow \infty$, 所以 A 的取值范围为 $(0 \sim \infty)$, 所谓无穷大, 就是光子能完全被吸收。 A 表示吸光物质溶液对单色光的吸收能力。

2. 摩尔吸光系数“ ε ”及吸光系数“ a ”。在推导吸收定律时, 浓度用 mol/L 或 mmol/mL, 这样得到的比例常数“ ε ”称为摩尔吸光系数。如果浓度用 g/L 升或 mg/mL, 则比例常数用“ a ”表示, 称为吸光系数, 吸收定律可写成 $A = \lg \frac{I_0}{I_t} = abc$ 。

有些地方在表示吸收强度时, 常以摩尔吸光系数和百分吸收系数表示。即当光径为 1cm, 溶液浓度为每升溶液中含 1mol 溶质时, 所得的吸收值, 可表示为 $\varepsilon_{\max} = A / c(\text{mol}) \cdot 1(\text{cm})$ 。

百分吸收系数指当溶液浓度为 1% (W/V), 即 100mL 溶液中含有 1g 溶质, 通过的光路径为 1cm 时的吸光值, 以 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 表示, 即 $E_{1\%}^{1\text{cm}} = A / c(\%) \cdot 1(\text{cm})$ 。

摩尔吸收系数与百分吸收系数换算关系为:

$$\varepsilon_{\max} = E_{1\%}^{1\text{cm}} \times \frac{\text{物质分子量}}{10} \quad (1-18)$$

以上二系数是物质定性的依据, 也是物质定量的标准, 不同物质的 λ_{\max} 可能相同, 但是它们的 ε_{\max} 或 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 值不一定相同。在紫外光谱中 ε_{\max} , 吸收强度与电子跃迁几率有关, 所以 ε_{\max} 值大说明电子跃迁几率大。

例如, 核黄素分子量为 376.4, 用 0.02M 醋酸溶液配成浓度每 1mL 含 0.01mg (0.001%) 的溶液时, 用 1cm 比色皿在 445nm 的波长测得吸光度为 0.324, 其百分吸收系数:

$$E_{1\%}^{1\text{cm}} = \frac{0.324}{0.001 \times 1} = 324$$

摩尔吸收系数:

$$\varepsilon = 324 \times \frac{376.4}{10} = 12\ 200$$

3. 透光度“ T ”，定义 $\frac{I_t}{I_0} = T$ ，称为透光度，意义是透射光占入射光的百分数。常用百分透光度， $\%T = T \times 100$ 。例如 I_0 为 100， I_t 为 33，则 $T = 0.33$ ， $\%T = 33$ 。 T 与 A 的关系：

$$A = \lg \frac{I_0}{I_t} = -\lg \frac{I_t}{I_0} = -\lg T \quad (1-19)$$

$$-\lg T = \varepsilon bc \quad (1-20)$$

因为： $\%T = T \times 100 = \frac{I_t}{I_0} \times 100$ ； $\frac{I_t}{I_0} = \frac{\%T}{100}$

所以： $A = -\lg \frac{\%T}{100} = -\lg \%T + \lg 100 = 2 - \lg \%T \quad (1-21)$

4. 常见术语和符号(包括经常在其他书刊看到的符号)

采用符号①	意义	名称 透光度 (Transmittance)	符号 T	同义词② 名称 透射 (Transmission)
T	$\frac{P}{P_0}$ 或 $\frac{I}{I_0}$			
A	$\lg \frac{P_0}{P}$ 或 $\lg \frac{I_0}{I}$	吸光度 (Absorbance)	$O.D., D$ 或 E	光密度 (Optical density)
a	A / bc ③	吸光系数 (Absorptivity)	k	消光系数 (Extinction Coefficient) 吸收指数 (Absorbancy index)
ε	A / bc ④(或 $= Ma$)	摩尔吸光系数 (Molar absorptivity)	a_m	摩尔消光系数 (Molar extinction Coefficient) 摩尔吸收指数 (Molar absorbancy index)
$a_{1\%}^{1cm}$		比吸光系数 (Specific absorption coefficient)	$E_{1\%}^{1cm}$	百分吸收系数 (Percentage absorption Coefficient)
b		液池厚度 (Cell thickness)	l 或 d	比消光系数 (Specific extinction coefficient) 样品光径 (Sample path length)

① 根据 Anal. Chem., 45, 2449(1973)建议的；

② 经常在书刊杂志上可看到的；

③ C 可用 g/L 表示或其它特定浓度单位表示；

④ C 表示摩尔浓度； M 为分子量或式量。

三、比耳定律曲线；吸收光谱曲线

因为吸光度与溶液浓度成正比，以 A 为纵坐标， c 为横坐标作图，得到一通过坐标

原点的直线，称为比耳定律曲线。也可用%*T*与*c*作图，成对数关系，见图1-18。

以波长为横坐标（也可用频率或波数），以在各波长下所测吸光度或百分透光度为纵坐标绘图，得到的光谱曲线称为吸收光谱曲线，该曲线通常用波峰和波谷的曲线来表征，见图1-19。

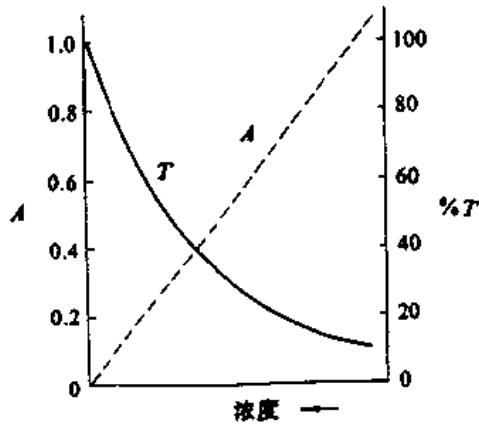


图 1-18 比耳定律曲线的两种表示方法

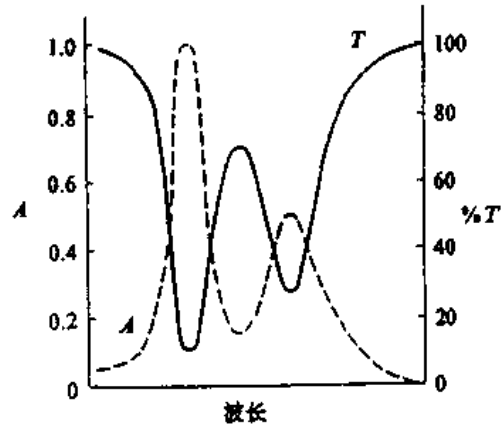


图 1-19 吸收光谱曲线及其两种表示方法

分光光度计所测量的是相对透光度，但仪器的指示部分都有*A*与%*T*两种标度，这是因为*A*与*C*成正比关系，使用方便。两种标度的对照见图1-20。

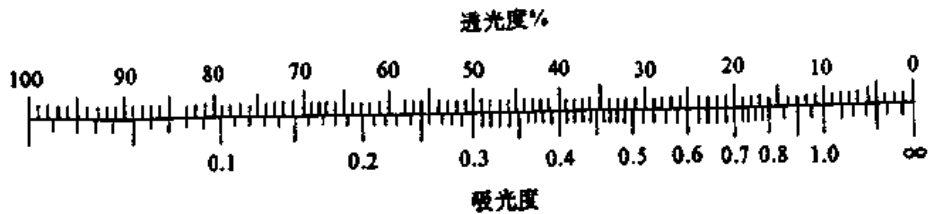


图 1-20 吸光度与百分透光度两种标度数值对照表

吸收峰都有一定宽度，一般规定以峰的顶点所对应的波长来表示峰的位置。对于%*T*- λ 或%*T*- ν 的吸收光谱曲线，则取峰谷所对应的波长或波数来表示，都称为最大吸收波长。因溶剂对峰的形状和位置有影响，必要时可注明溶剂。峰的高低或强度则用 $\lambda_{\text{最大}}$ 处的摩尔吸光系数表示，记作 $\epsilon_{\text{最大}}$ 。

用半峰宽表示吸收峰的宽度及特征。半峰宽为峰高一半处的宽度，以波长单位nm表示，或以波数表示。

四、比耳定律的偏离

比耳定律只在理想条件下才成立，实际条件下常发生对比耳定律的偏离，在应用比耳定律时要注意它的局限性。吸光度与液层厚度的线性关系并未发现偏离现象，偏离主要发生在吸光度与溶液浓度之间的比例关系，偏离的原因可归纳为下列几种：

1. 定律本身的限制

比耳定律是一个有限制的定律，它适用的浓度范围为 $10^{-2} \sim 10^{-7} \text{M}$ 之间。当 $c > 10^{-2} \text{M}$ ，即高浓度时，吸光物质的分子或离子的电荷分布互相影响，从而改变了对

光的吸收能力，由于相互影响的程度同浓度有关，因而使吸光度与浓度之间的线性关系发生偏离。当 $c < 10^{-7} \text{M}$ ，即吸光物质的浓度太低时，检测器不能分辨强度相差微小的两束光，测量误差太大。

在低浓度的吸光物质溶液中，如含有高浓度的其它电解质，吸光分子附近的离子通过静电的相互作用，改变了吸光物质的摩尔吸光系数，与浓溶液相似同样，造成对比耳定律的偏离，这一影响随着溶液的稀释而减小。

2. 仪器误差

主要有下列两种：

(1) 入射光非单色性的影响 由于单色器只能分出具有一定带宽的单色光，而不是绝对的某一波长的单色光，在不同波长下吸光物质的吸光系数或摩尔吸光系数不同，因而造成对比耳定律的偏离。

在制定某化合物的定量分析方法时，先测定吸收光谱曲线，选好 $\lambda_{\text{最大}}$ ，以最大吸收波长为入射光。在 $\lambda_{\text{最大}}$ 处 ϵ 最大，测定的灵敏度和准确度都高，另外这部分峰平坦、对称，在带宽 $d\lambda$ 之间，不同波长下的 ϵ 基本为常数，单色光不纯产生的影响可忽略不计。如选 λ_{B} ， ϵ 小，测量灵敏度和准确度偏低，另外在带宽 $d\lambda_{\text{B}}$ 中 ϵ 不为常数，变化较大，造成对比耳定律的负向偏离。见图 1-21。

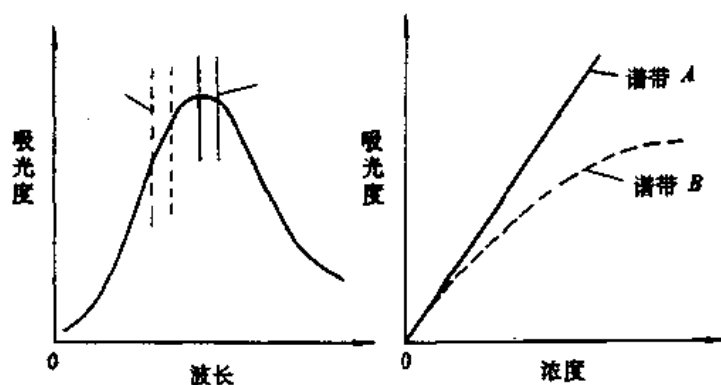


图 1-21 吸收波长的选择及单色光不纯对比耳定律的影响

(2) 杂散光的影响 没有经过正常色散途径，与单色器所指示波长相差甚远的异常光辐射称为杂散光。它的来源是镜面、旋转扇形镜、棱镜或光栅表面、吸收池等，由于有灰尘、刻痕、污迹或光学系统的缺陷等出现散射光，单色器内壁和大气灰尘的散射光所造成。一般单色器都或多或少存在杂散光，它是光学分析仪器的重要性能指标之一。以在某波长时杂散光占该波长单色光强度的百分比来表示。测定方法是用某一波长下能完全吸收该波长单色光的浓溶液或滤光片测量其透光度，这时的透光度代表杂散光的强度，再测该波长下空白溶液的透光度，二透光度的比值乘以 100%，即为杂散光的百分含量（需注明波长）。常用 220nm 下的杂散光表示仪器的性能，在 220nm 可用 10g/L 的 NaI 水溶液测量杂散光，NaI 溶液可完全吸收 220nm 的光波。透过杂散光还可用 0.05% 铬酸钾相对于水在 400nm 透光度来表征。 I_s 表示杂散光的强度，则 $\frac{I_s}{I_0} \times$

100% = 杂散光的百分含量, 图 1-22 表示不同杂散光含量造成对比耳定律的偏离情况 (造成负偏离)。

对于吸光物质浓度大的溶液, 即吸光度大、透光度小时, 对比耳定律偏离显著, 误差变得严重。例如某溶液在 λ_0 时的吸光度为 2.0, 透光度为 1%, 如果在 λ_0 中混有 0.1% 杂散光, 则入射光 λ_0 的 1% 及全部杂散光透过溶液, 即总透光度为 1.1%, 吸光度不再是 2.0, 而是 1.959, 这样 0.1% 的杂散光造成分析误差 2%。

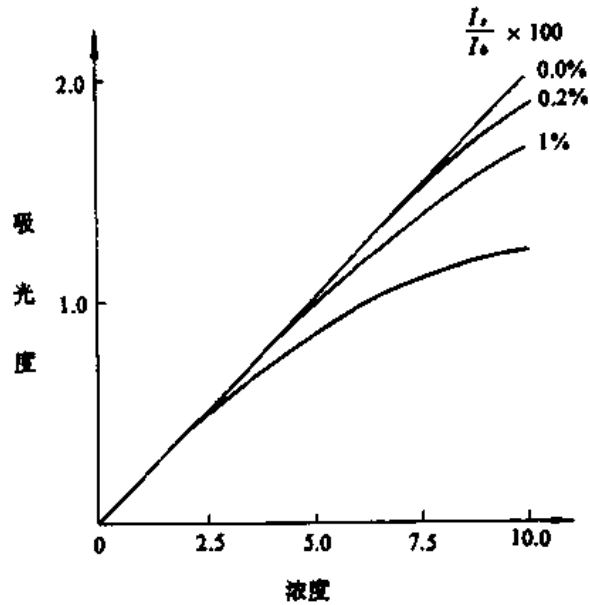


图 1-22 不同杂散光含量对比耳定律偏离的影响

重铬酸根在水溶液中存在如下的平衡:



重铬酸钾水溶液用水稀释时, 颜色由橙红变为黄色, 两者的吸光系数也不相同, 因此当铬的总浓度相同时, 各溶液的吸光度决定于重铬酸根和铬酸根浓度之比, 然而这一比值随溶液稀释而显著改变, 造成吸光度与铬的总浓度 (分析浓度) 之间线性关系的偏离, 实际分析铬时, 可以在溶液中加入 KOH (使浓度为 0.05M 左右), 这样 Cr (VI) 全部转化为 CrO_4^{2-} 形式; 或加入 H_2SO_4 , 使 Cr (VI) 全部转化为 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 形式, 这样吸光度与铬的总浓度之间便能符合比耳定律。

五、光度测量的误差

分光光度法在吸光度高及吸光度低时测定误差都较大, 吸光度太低时, I_0 与 I_t 几乎相等, 仪器检测不够灵敏, 误差大, 吸光度太高时, I_t 太小, 测量也难于准确。

假设仪器 %T 的读数或记录误差为 1%, 对于某一仪器为常数, 用 $dT = 0.01$ 表示, 样品成分含量的相对误差用 $\frac{dc}{c}$ 表示, 由 $A = \epsilon bc$ 和 $A = -\lg T$, 有:

$$c = -\frac{\lg T}{\epsilon b}, \text{ 对其微分得 } dc = -\frac{1}{\epsilon b} \times \frac{\lg e}{T} dT, \text{ 由前式得 } \frac{dc}{c} = \frac{\lg e dT}{T \lg T}$$

$$\text{因为 } \lg e = 0.4343, \text{ } dT = 1\%, \text{ 所以 } \frac{dc}{c} = \frac{0.4343 \times 1\%}{T \lg T} = \frac{0.4343}{T \lg T} \%$$

含量相对误差是 T 的函数, 可求出不同 T 时的相对误差, 图 1-23 为在 523nm, 光径为 1cm, $\epsilon = 2400$ 所测高锰酸钾在不同透光度时浓度的相对误差, 从图中可看出,

当透光度约为 0.4 时，相对误差为最小。

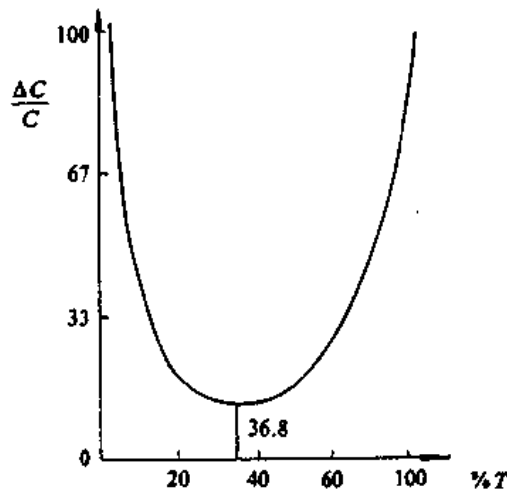


图 1-23 光度测量的相对误差与透光度的关系曲线

准确的求最小含量相对误差所对应的透光度是对 (1-21) 式求极值，即令其一阶导数等于零，解出 T 。

$$\frac{d}{dT} \left[\frac{\lg e dT}{T \lg T} \right] = 0 = \lg T + \lg e$$

$$\lg T = -\lg e = -0.434$$

$$T = 0.368 \text{ 或 } \%T = 36.8$$

通过计算，同样得到在 $T = 0.368$ (或 $A = 0.434$) 处含量的相对误差 $\frac{dc}{c}$ 有一极小值，对于光度测量误差为 1% 的仪器，最小含量相对误差为 2.73%，精密仪器光度测量误差在 0.2% ~ 0.5% 左右，则相对误差可减小至 $\frac{1}{2}$ 到 $\frac{1}{5}$ 。从图 1-23 看出，一般应使透光度读数落在 $\%T = 15 (A = 0.8)$ 到 $\%T = 65 (A = 0.2)$ 之间为合适，这时与相对误差的极小值相差不多。在此透光度范围内， $dT = 1\%$ 时， $\frac{dc}{c} \approx 3\%$ ； $dT = 0.5\% \sim 0.2\%$ ， $\frac{dc}{c} \approx 1\% \sim 2\%$ 。通过调整溶液浓度，或改变吸收池光径，以及选择合适波长等方法，使透光度读数落在 15% ~ 65% 之间，对应的吸光度为 0.85 ~ 0.25 之间。根据这一原理，为了减少光度测量误差，样品溶液浓度的吸光度值最好控制在上述数值范围内。

思考题

1. 为什么物质对光会产生选择性吸收?
2. 造成对比耳定律的偏离的因素有哪些?
3. 简述棱镜分光和光栅分光的基本原理和主要特点。
4. 参比溶液的作用如何? 如何适当选择参比溶液?
5. 比色测定时如何选择适当的波长和浓度范围?

第二章 紫外-可见光光谱法

紫外-可见光光谱法(Ultraviolet-Visible Spectroscopy)是仪器分析方法的一种。虽然它的灵敏度不如原子吸收光谱法及荧光光谱法等方法高,但由于它具有较高的精密度、仪器简单、方法快速可靠、适用范围较广等优点,因此,它已成为仪器分析中广泛采用的方法之一。

近年来,人们对提高分光光度法的灵敏度作了深入的研究。例如,寻求高灵敏度试剂,利用动力学反应,应用共沉淀、萃取、色谱、离子交换等分离方法进行预浓缩、富集,并对仪器进行改进等,这些都使灵敏度大为提高,尤其是应用离子缔合络合物,常可使摩尔吸收系数提高到 10^5 以上;寻求高选择试剂,用掩蔽剂消除干扰,可使分光光度法选择性进一步提高;采用双波长分光光度法,可以在某些干扰因素存在下,不经分离而对某一组分进行测定;采用双闪耀光栅技术,提高了仪器分辨率及测量精度,方法更加简便可靠。由于紫外-可见光分光光度法具有上述优点,所以它在高纯物质测试、环境监测、生物化学、农业化学、食品分析等领域处于重要地位。

紫外-可见光光谱法是基于物质对光辐射的选择性吸收,或者说它是建立在分子中电子跃迁时吸收光辐射能量的特征基础上的分析方法。通常分子中电子跃迁吸收光子的能量比分子振动所需能量高,吸收光谱出现在紫外-可见光区,由于吸收池和光学元件以及空气组分(氧气等)吸收小于190nm波长的光,因此常规紫外测定分析都集中在近紫外区190~400nm范围,可见光区一般在400~800nm范围。

第一节 紫外-可见光光谱分析法的特点

一、与比色法的异同点

当紫外光、可见光射入到某物质后,会引起物质内部分子、电子的运动状态发生变化,光将消耗一部分能量,然后透射出来,经过单色器可得到一组光谱,即吸收光谱。比色法及分光光度法的基本原理都是相同的,它们都是根据物质产生吸收光谱的原理,并以比耳定律为基础建立的分析方法。其不同点是辐射样品的人射光不同,比色法的人射光是一段光谱带,它是用滤光片获取的,波长分辨性能差,吸光度测量误差大,线性范围小,在定量分析方面只有用标准曲线法,才能弥补这一不足之处。分光光度法的人射光是接近于某一单色光,其谱带宽度最多不超过3~5nm,最窄的可在0.1nm以下,它是用棱镜和光栅分离出不同波长的人射光,由于其波长分辨率高,测量精度高,其仪器结构比比色计要复杂,精密得多,因此根据这种分光原理设计的仪器称为分光光度计。

从分析对象来看,比色法只适用于可见光范围,测定的对象必须是具有生色团结构的有色物质。而分光光度法适用于可见光到紫外光整个波长范围,甚至可以扩展到近红外光范围,它不仅可测定有色物质,对具有共轭双键等结构的无色物质也能精确测定。

二、分光光度法的应用特点

由于分光光度法的人射光是以棱镜或光栅为单色器，同时在狭缝的控制配合下可得一条谱带很窄的单色光，因此其测定的灵敏度，选择性和准确度均比比色法高。紫外-可见光分光光度法可测定微量物质，测定灵敏度可达 $10^{-4} \sim 10^{-7} \text{g/mL}$ ，光度计定量测定的精密度可达 0.5%，甚至可以更低。由于分光光度法使用的是纯度较高的单色光，因此利用此方法测定含有两种或两种以上样品组分时，不必预先进行样品分离处理，只需选用样品组分特征波长的单色光就可进行测定分析。分光光度法不仅可采用线性回归方式进行定量，而且可直接通过百分消光系数与摩尔消光系数换算公式进行定量，因而在定量方式上较比色法更具有实效性。

第二节 紫外-可见光吸收光谱

一、吸收光谱的形成

原子或分子中的电子，总是处在某一种运动状态之中，每一种状态都具有一定的能量，属于一定的能级。这些电子由于各种原因（例如受到光、热、电等的激发，或者放出光或热）而从一个能级转移到另一个能级，称为跃迁。当这些电子吸收了外来辐射的能量，就从一个能量较低的能级跃迁到另一个能量较高的能级。因此，每一跃迁都对应着吸收一定的能量（即一定波长）的辐射。如果有一连续的辐射光照射于单原子元素的蒸气，就可以得到一系列吸收光谱，即原子从基态跃迁到其较高能级的谱线。这种原子光谱是不连续的线状光谱。由于谱线的频率或波长与跃迁前后两个能级的能量差之间的关系服从普朗克 (Planck) 条件，即

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (2-1)$$

两个能级之间的能量差一般为 $1 \sim 10 \text{ eV}$ ，因此各条谱线的频率或波长差别较大，呈线状分开。

分子吸收光谱形成的机理与原子光谱形成的机理是相似的，是由于能级之间的跃迁所引起的。但是由于分子内部运动所牵涉到的能级变化比较复杂，分子吸收光谱也就比较复杂。一个分子的总能量 E 可以写成内在能量 E_0 、平动能 $E_{\text{平}}$ 、振动能 $E_{\text{振}}$ 、转动能 $E_{\text{转}}$ 以及电子运动能量 $E_{\text{电子}}$ 之总和，即

$$E = E_0 + E_{\text{平}} + E_{\text{振}} + E_{\text{转}} + E_{\text{电子}} \quad (2-2)$$

E_0 是分子固有的内能，不随运动改变； $E_{\text{平}}$ 是连续变化的，未量子化，因而它们的改变不会产生光谱。所以，一个分子吸收了外来辐射之后，它的能量变化 ΔE 为其振动能变化 $\Delta E_{\text{振}}$ 、转动能变化 $\Delta E_{\text{转}}$ 以及电子运动能量变化 $\Delta E_{\text{电子}}$ 之总和，即

$$\Delta E = \Delta E_{\text{振}} + \Delta E_{\text{转}} + \Delta E_{\text{电子}} \quad (2-3)$$

在式 (2-3) 右边的三项中， $\Delta E_{\text{电子}}$ 最大，一般在 $1 \sim 10 \text{ eV}$ 之间。现假设 $\Delta E_{\text{电子}}$ 为

5 eV, 则根据式 (2-1) 得到相应的波长应该是

$$\lambda = \frac{hc}{\Delta E_{\text{电子}}} = \frac{6.62 \times 10^{-27}(\text{erg} \cdot \text{s}) \times 3 \times 10^{10}(\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})}{5 \times 1.6 \times 10^{-12}(\text{erg})} \\ = 2.5 \times 10^{-3} \text{cm} = 250 \text{nm}$$

因此由于分子内部电子能级的变化而产生的光谱位于紫外光区或可见光区内。

分子的振动能级间隔 $\Delta E_{\text{振}}$ 大约比 $\Delta E_{\text{电子}}$ 小十倍, 一般在 0.05~1eV 之间。当发生电子能级之间的跃迁时, 不可避免地也要发生振动能级之间的跃迁, 因而得到的不只是一条波长为 250nm 的谱线, 而是得到一系列的谱线。

分子的转动能级间隔 $\Delta E_{\text{转}}$ 大约比 $\Delta E_{\text{振}}$ 小十倍或百倍, 一般小于 0.05 eV, 也可以小到 10^{-4} eV 以下。现假设 $\Delta E_{\text{转}}$ 为 0.005 eV, 则为 5 eV 的电子能级间隔的 0.1%。当发生电子能级之间的跃迁和振动能级之间的跃迁时, 也不可避免地要发生转动能级之间的跃迁, 因而所得到的谱线彼此间的波长间隔只有 $250 \times 0.1\% = 0.25$ (nm), 由于彼此间波长间隔太小, 因此它们连在一起, 呈现带状, 称为带状光谱。分子的能级示意图见图 2-1。图 2-1 中的 A 和 B 是两个电子能级; 在同一电子能级中还因振动能量不同而分

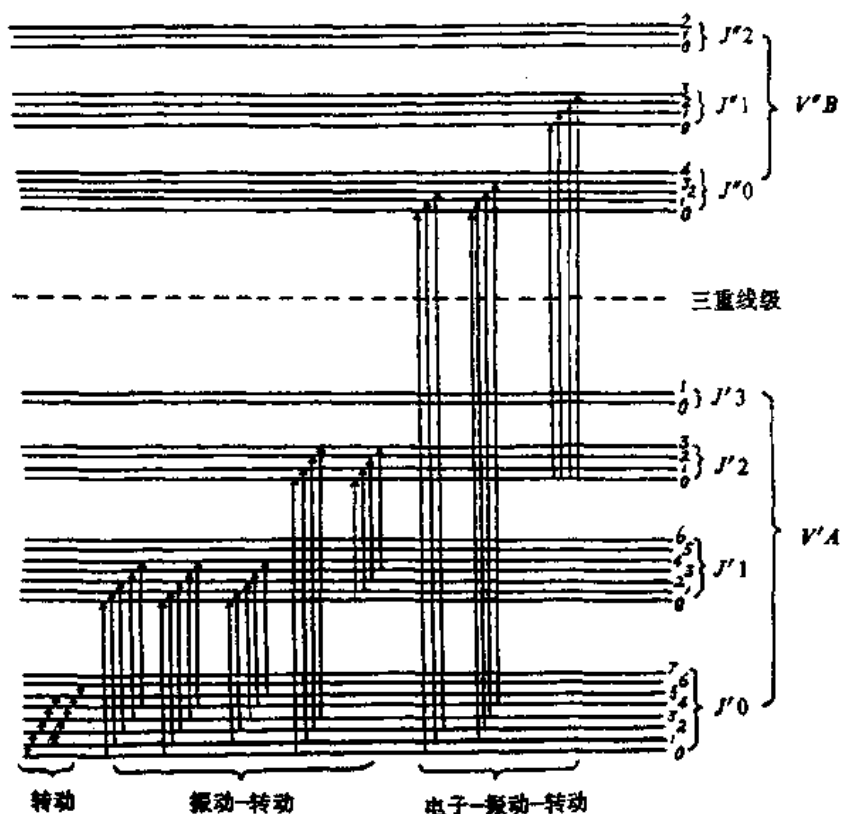


图 2-1 分子能级示意图

为若干 $V=0, 1, 2, 3 \dots$ 等振动能级; 在同一电子能级和同一振动能级中, 还因转动能量不同而分为若干 $J=0, 1, 2, 3 \dots$ 等转动能级。

由上述可知，一些物质会呈现的颜色的特征，这是由于它们对可见光中某些特定波长的光线选择吸收的缘故。根据前面的叙述我们可以知道，物质只能选择性地吸收那些能量相当于该分子振动能变化、转动能变化以及电子运动能变化之总和的辐射。各种物质分子的能级是千差万别的，它们内部各种能级之间的间隔也各有不同。可以说各种物质对光的选择吸收这一性质，反映了分子内部结构的差异。换句话说，各种物质的内部结构决定了它们对不同光线的选择吸收。

既然物质对光的吸收具有选择性，我们可以缓慢地改变通过某一吸收物质的人射光的波长，并记录该物质在每一波长处的吸光度，然后以波长为横坐标，以吸光度为纵坐标作图，这样得到该物质的吸收光谱或吸收曲线。从某物质的吸收光谱中可以看出它在不同的光谱区域内吸收能力的分布情况。显然，某物质吸收光谱的形状是与它的内部结构紧密相关的。因此，研究各种物质的吸收光谱，可以为研究它们的内部结构提供重要的信息。

二、紫外-可见光吸收光谱类型

紫外与可见光吸收光谱主要可以划分为以下六种类型：

(1) $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收谱带；(2) $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收谱带；(3) $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁引起的吸收谱带；(4) $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁引起的吸收谱带；(5) 电荷转移引起的吸收谱带；(6) 配位体场跃迁产生的吸收谱带。

1. 发色团

许多有色物质的颜色是由于在这些物质的分子内存在着一个或多个像 $C=C$ 、 $C=O$ 、 $N=N$ 这些含有 π 电子的基团，因此人们把这些会使物质具有颜色的基团称为发色团。如表 2-1 为 n 种常见发色团吸收及跃迁类型。

表 2-1 发色团的吸收峰及电子跃迁

发色团	化合物类型	举例	溶剂	吸收峰		电子跃迁
				$\lambda_{\text{最大}}(\text{nm})$	$\epsilon_{\text{最大}}$	
烯烃	$RCH=CHR$	乙烯	蒸汽	$\begin{cases} 165 \\ 193 \end{cases}$	$\begin{cases} 15\ 000 \\ 10\ 000 \end{cases}$	$\pi \rightarrow \pi^*$
炔烃	$RC \equiv CR$	2-辛炔	庚烷	$\begin{cases} 195 \\ 223 \end{cases}$	$\begin{cases} 2\ 100 \\ 160 \end{cases}$	$\pi \rightarrow \pi^*$
羰基(酮)	$\begin{array}{c} R \\ \diagdown \\ C=O \\ \diagup \\ R \end{array}$	丙酮	己烷	$\begin{cases} 188 \\ 279 \end{cases}$	$\begin{cases} 900 \\ 15 \end{cases}$	$\begin{cases} \pi \rightarrow \pi^* \\ n \rightarrow \pi^* \end{cases}$
羰基(醛)	$\begin{array}{c} O \\ \parallel \\ RC \\ \diagdown \\ H \end{array}$	乙醛	$\begin{cases} \text{蒸汽} \\ \text{己烷} \end{cases}$	$\begin{cases} 180 \\ 290 \end{cases}$	$\begin{cases} 10\ 000 \\ 17 \end{cases}$	$\begin{cases} \pi \rightarrow \pi^* \\ n \rightarrow \pi^* \end{cases}$
羧基	$\begin{array}{c} O \\ \parallel \\ R-C \\ \diagdown \\ OH \end{array}$	乙酸	95%乙醇	208	32	$n \rightarrow \pi^*$
酰胺	$\begin{array}{c} O \\ \parallel \\ R-C \\ \diagdown \\ NH_2 \end{array}$	乙酰胺	水	220	63	$n \rightarrow \pi^*$
硝基	$R-NO_2$	硝基甲烷	异辛烷	280	22	$n \rightarrow \pi^*$
亚硝基	$R-N=O$	亚硝基丁烷	乙醚	$\begin{cases} 300 \\ 665 \end{cases}$	$\begin{cases} 100 \\ 20 \end{cases}$	$\begin{cases} - \\ n \rightarrow \pi^* \end{cases}$

如果一个化合物的分子含有数个发色团，但它们彼此并不紧靠着，也就是说不发生共轭作用，那么该化合物的吸收光谱将包含有这些个别发色团原有的吸收带，这些吸收带的位置及强度相互影响不大。如果两个发色团彼此相邻，形成了一个共轭基团，那么原来各自发色团的吸收带就消失了，而产生了新的吸收带。新吸收带的位置一般比原来的吸收带处在较长的波长处，而吸收带的强度也显著增大。这是由于共轭的 π 电子在整个共轭体系内流动，属于共轭基链上全部原子所有，而不是专属于某两个原子所有，所以它们受到的束缚力小得多，只要受到能量较低的辐射即可被激发，因而使得吸收光谱的波长较长，吸收朝可见光区移动，也使吸光系数变大，颜色加深。

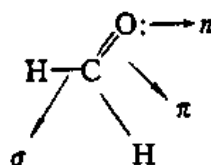
2. 助色团

有些基团本身虽然不会使物质具有颜色，但它们却会增大某一发色团的发色能力，这样的基团称为助色团。助色团通常是一些含有未共享 n 电子对的氧原子、氮原子或卤素原子的基团，即非共价键基团，如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{Br}$ 等。它们本身在大于 200nm 范围没有吸收，当它们与发色团相连接时，形成非键电子与 π 电子的共轭，使电子活动范围增大，吸收向长波方向位移，吸收强度增加，有时把这种现象也称助色效应。

3. 有机化合物分子中的几种电子及其可能的跃迁形式

有机化合物的紫外与可见光吸收光谱是与它们的电子跃迁有关的，即决定于分子的结构（分子中电子的结合情况）。一般来说，有机化合物分子中含有某种基团，在它的吸收光谱中就会呈现某种标志性的特征吸收带。

一个有机化合物分子对紫外光或可见光的特征吸收，可以用吸收最大处的波长（或称吸收峰的波长）来表示，记为 $\lambda_{\text{最大}}$ 。 $\lambda_{\text{最大}}$ 决定于分子的激发态与基态之间的能量差。从化学键的性质来看，与吸收光谱有关的电子主要有三种：（1）形成单键的 σ 电子；（2）形成复键的 π 电子；（3）未共享的电子，或称非键 n 电子。对于位于周期表的第二、三周期的元素来说， n 电子是 p 电子。这三种类型的价电子可以用甲醛来说明：



根据分子轨道理论，分子中这三种电子的能级高低次序是：

$$(\sigma) < (\pi) < (n) < (\pi^*) < (\sigma^*)$$

σ 、 π 表示成键分子轨道； n 表示非键分子轨道； σ^* 、 π^* 表示反键分子轨道。 σ 轨道和 σ^* 轨道是由原来属于原子的 s 电子和 p_x 电子所构成的； π 轨道和 π^* 轨道是由原来属于原子的 p_y 和 p_z 电子所构成的； n 轨道是由原子中未参与成键的 p 电子所构成的。图 2-2 表示上述几种分子轨道能量的相对大小。在大多数有机化合物分子中，电子总是充填在 n 轨道以下的各个分子轨道中。当受到外来辐射的激发时，处在较低能级的电子就跃迁到较高的能级。由于各个分子轨道之间的能量差不同，因此要实现各种不同的跃迁所需要吸收的外来辐射的能量也是各不相同的。饱和烃无例外地都含有 σ 电子。

电子从 σ 轨道跃迁到 σ^* 轨道称为 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁。实现 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁所需要吸收的能量最大，因而所吸收的辐射的波长最短，处在小于 200nm 的远紫外区(或称真空紫外区)。例如乙烷的吸收峰大约在 150nm。由于氧和水的吸收带也在远紫外区，目前一般的紫外分光光度计还难以在远紫外区工作，因此一般不讨论由于 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁引起的吸收谱带。电子从 σ 轨道跃迁到 π^* 轨道，或者从 π 轨道跃迁到 σ^* 轨道，分别称为 $\sigma \rightarrow \pi^*$

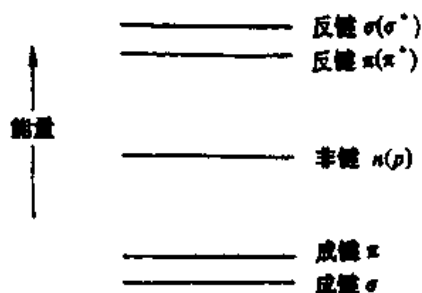


图 2-2 简单有机化合物发色团的分子轨道图

跃迁和 $\pi \rightarrow \sigma^*$ 跃迁。实现这两种跃迁所需要吸收的能量比实现 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁的小，但相应的波长还是小于 200nm，仍属远紫外区，因此也很少讨论。电子从 π 轨道跃迁到 σ^* 轨道称为 $\pi \rightarrow \sigma^*$ 跃迁。具有未共享电子对的一些取代基可能发生 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁。例如含有像 S、N、Br 或 I 等杂原子的饱和有机化合物，以及含有 O 和 Cl 原子的化合物，都会发生这种类型的跃迁。实现 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁需要吸收的能量更小一些，吸收峰的波长一般在 200nm 附近。电子从 π 轨道跃迁到 π^* 轨道，称为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。实现 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所需要吸收的能量也比较小，一般吸收峰的波长也在 200nm 附近。不饱和的有机化合物，例如含有 $>C=C<$ 或者 $-C \equiv C-$ 等发色团的有机化合物，都会发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。最后一种情况就是电子从非键的 n 轨道跃迁到 π^* 轨道，称为 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁。实现这种跃迁所需要吸收的能量最小，因此其吸收峰的波长一般都处在近紫外光区，甚至在可见光区。综合以上六种情况，图 2-3 定性表示了各种不同类型的电子跃迁所需要吸收的能量大小以及相应的吸收峰的大致波长。

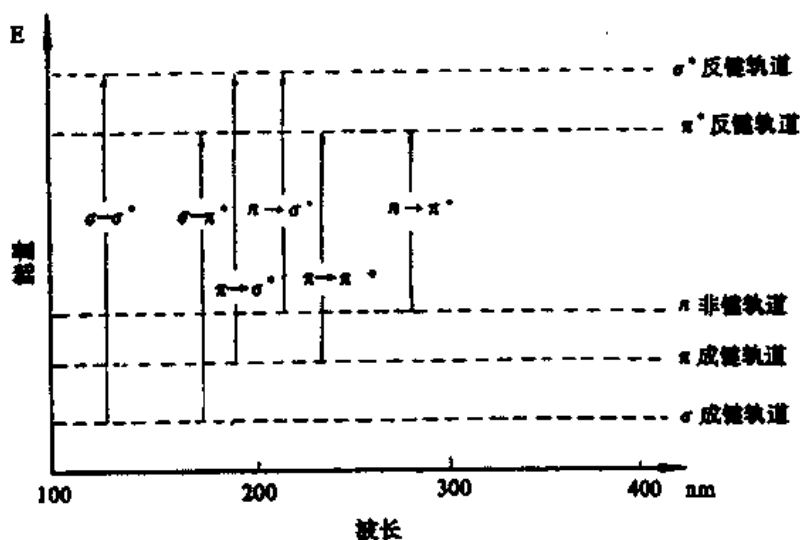


图 2-3 各种电子跃迁相应的吸收峰和能量示意图

除了上面所述的由于电子在有机化合物的不同分子轨道之间跃迁会产生六种紫外与可见光吸收谱带之外，还有两种情况会引起紫外与可见光吸收谱带，即电荷转移引起的吸收谱带和配位场吸收谱带。这两种情况也甚为多见，十分重要。

电荷转移吸收谱带指的是许多无机物（例如碱金属卤化物）和某些由两类有机化合物混合而得的分子络合物，它们在外来辐射激发下会强烈地吸收紫外光或可见光，从而获得紫外或可见光吸收光谱。在这一吸收过程中，实际上是发生了一个电子从体系的一部分（称为电子给予体）转移到体系的另一部分（称为电子受体）的过程，因此这样获得的吸收光谱称为电荷转移吸收谱带。例如，在乙醇介质中，将醌与氢醌混合，就可以获得美丽的醌氢醌暗绿色结晶，它的吸收峰在可见光区内。

配位场吸收谱带指的是过渡金属水合离子或过渡金属离子与显色剂（通常是有机化合物）所形成的络合物在外来辐射作用下，由于吸收了适当波长的可见光（有时是紫外光），从而获得相应的吸收光谱。根据晶体场理论，过渡金属离子（又称中心离子）具有简并的（即能量相等的） d 轨道，而 H_2O 、 NH_3 之类的偶极分子或 Cl^- 、 CN^- 这样的阴离子（又称配位体）按一定的几何形状排列（即配位）在过渡金属离子的周围时，将使得这些原来简并的 d 轨道分裂为能量不同的能级。如果 d 轨道是未充满的，则受外来辐射能的作用会引起电子在这些不同的能级之间跃迁。由于它们的基态与激发态之间的能量差别不大，因此只要波长较长、能量较小的可见光就可以实现这一跃迁，即它们的吸收峰多在可见光区内。例如 $Ti(H_2O)_6^{3+}$ 水合离子的吸收峰在 490nm 处。

可见，发生在紫外和可见光区内的、由于电子的跃迁或转移而引起的吸收光谱有八种。我们已经说过， $\sigma \rightarrow \pi^*$ 跃迁、 $\pi \rightarrow \sigma^*$ 跃迁以及 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁引起的吸收光谱都发生在小于 200nm 的远紫外区，由于仪器方面检测的困难，这三种吸收光谱研究得较少。较常见的是 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁、 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁、 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁引起的三种吸收光谱，以及电荷转移吸收光谱和配位场吸收光谱。图 2-4 比较形象地表示出这五种常见的吸收光谱（同时也标出 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁引起的吸收光谱）在光谱区中的位置和大致强度。下边的横坐标是波长（单位是 nm），上边的横坐标是波数（单位是 cm^{-1} ）；纵坐标是吸光强度，用摩尔吸光系数的对数（以 10 为底）表示。

由图 2-4 可见， $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收谱带的吸光强度最大，电荷转移吸收光谱的次之，而配位场吸收谱带最小。

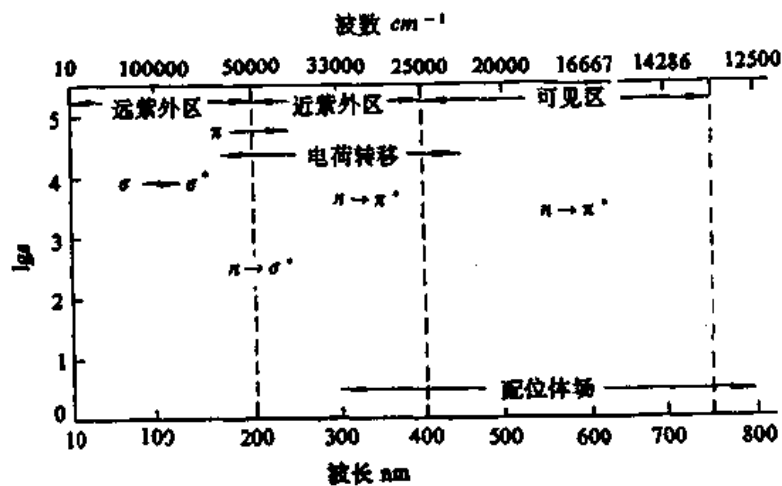


图 2-4 几种常见的紫外与可见光吸收光谱

4. 红移与蓝移

某些有机化合物经取代反应引入含有未共享电子对的基团（如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SR}$ 等）之后，吸收峰的波长向长波方向移动，这种效应称为红移效应，这些会使某化合物的 $\lambda_{\text{最大}}$ 向长波方向移动的基团称为向红移基团。

与红移效应相反，有时在某些发色团（如 $>\text{C}=\text{O}$ ）的碳原子一端引入一些取代基之后，吸收峰的波长会向短波方向移动，这种效应称为蓝移效应，这些会使某化合物的

$\lambda_{\text{最大}}$ 向短波方向移动的基团（如 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{CH}_3 \end{array}$ 等）称为向蓝移

基团。

除了引入某些取代基会引起吸收光谱的红移或蓝移之外，改用极性不同的溶剂也会引起吸收光谱的红移或蓝移，这种作用称为溶剂效应。

三、紫外-可见光吸收光谱的特征表示

根据电子及分子轨道的种类可将吸收光谱按下述形式划分，在分析光谱时，由峰位推测化合物的结构。

1. 当发色团与助色团形成 $p \rightarrow \pi$ 共轭基团时，如 $>\text{C}=\text{O}$ 、 $-\text{NO}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{N}=\text{N}-$ 、 $-\text{C}=\text{S}$ 等，发生 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁可产生吸收峰，而这类吸收带的特点是所需能量小，吸收带一般位于 $\lambda = 300\text{nm}$ 左右，但是跃迁几率小，一般 $\epsilon < 100$ ，如表2-2。

表 2-2 含有羰基、氮氧键类化合物的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收特性

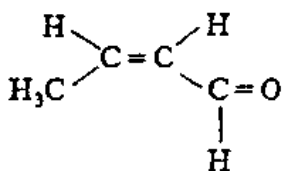
化合物	$\lambda_{\text{最大}}$	$\epsilon_{\text{最大}}$	溶剂
丙酮	279	13	异辛烷
甲乙酮	279	16	异辛烷
二异丁酮	288	24	异辛烷
环戊酮	299	20	己烷
环己酮	285	14	己烷
乙醛	290	17	异辛烷
丙醛	292	21	异辛烷
异丁醛	290	16	己烷
硝基甲烷	275	15	庚烷
硝酸辛酯	270	15	戊烷
乙醛	293	11.8	己烷
乙酸	204	41	乙醇
乙酸乙酯	207	69	石油醚
乙酰胺	220(肩)		水
乙酰氯	235	53	己烷
乙酰肟	225	47	异辛烷
丙酮	279	15	己烷

2. 当化合物含有共轭体系时, 发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁, 这一吸收带的特点是随着共轭体系增大, 吸收带向长波方向移动, 吸收强度增大, 一般 $\epsilon > 10^4$. 如表 2-3.

表 2-3 几种共轭多烯化合物的吸收特性

化合物	共轭双键数	$\lambda_{\text{最大}}(\text{nm})$	$\epsilon_{\text{最大}}$	颜色
乙烯	1	195	~5 000	无
丁二烯	2	217	21 000	无
己三烯	3	258	35 000	无
二甲基辛四烯	4	296	52 000	淡黄
癸五烯	5	335	118 000	淡黄
二氢 β 胡萝卜素	8	415	210 000	橙黄
番茄红素	11	470	185 000	红
去氢番茄红素	5	504	150 000	紫

α, β -不饱和的醛类和酮类化合物都含有与羰基共轭的不饱和碳-碳键, 这类化合物分子会同时存在由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收光谱. 一个典型的例子是巴豆醛:



在巴豆醛中, 两个发色团 (具有 π 电子的 $>C=C<$ 和具有 n 电子的 $>C=O$) 形成了共轭体系. 原来一个孤立的 $>C=C<$ 发色团在 166nm 附近呈现一个 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的吸收峰; 而原来一个孤立的 $>C=O$ 发色团在 170nm 附近呈现一个强的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的吸收峰, 并在 280nm 附近呈现一个弱的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的吸收峰. 当这两个发色团共轭地存在于巴豆醛分子中时, 原来 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的 $\lambda_{\text{最大}}$ 都向长波方向移动, 这可以用图 2-5 所示的能级图加以说明. 在所形成的巴豆醛分子轨道中有四个 π 轨道和一个氧的 p 轨道. 由于 π_3^* 轨道与 p 轨道之间的能量差比原来 $>C=O$ 中 π^* 轨道与 p 轨道之间的能量差小, 原来 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的 $\lambda_{\text{最大}}$ 从 280nm 移动到 320nm; 而 π_3^* 轨道与 π_2 轨道之间的能量差也比原来 $>C=C<$ 中 π^*

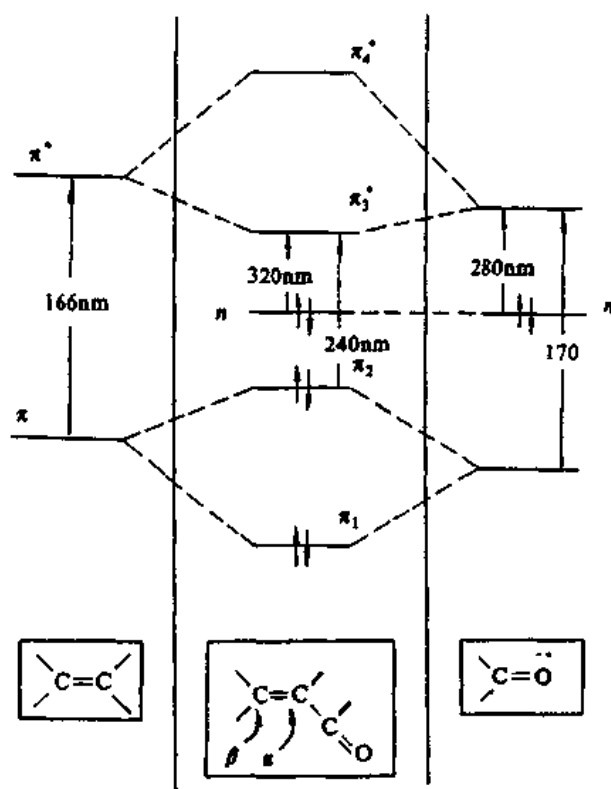


图 2-5 巴豆醛的能级图及其电子跃迁

形成的巴豆醛分子轨道中有四个 π 轨道和一个氧的 p 轨道. 由于 π_3^* 轨道与 p 轨道之间的能量差比原来 $>C=O$ 中 π^* 轨道与 p 轨道之间的能量差小, 原来 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的 $\lambda_{\text{最大}}$ 从 280nm 移动到 320nm; 而 π_3^* 轨道与 π_2 轨道之间的能量差也比原来 $>C=C<$ 中 π^*

轨道与 π 轨道之间的能量差小，因而原来 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的 $\lambda_{\text{最大}}$ 从 166nm 移动到 240nm。同时，这两种跃迁引起的吸收带的强度都有所加强。

3. 芳香族化合物包括芳杂环族的特征吸收是苯环自身 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的，这个谱带在 230~270nm 之间出现精细结构如图 2-6。通常在 254nm 处有一弱吸收， ϵ 约为 200；在 203nm 有一个比较强的吸收， ϵ 约为 7 000；在 184nm 处有一个强吸收， ϵ 约为 50 000。

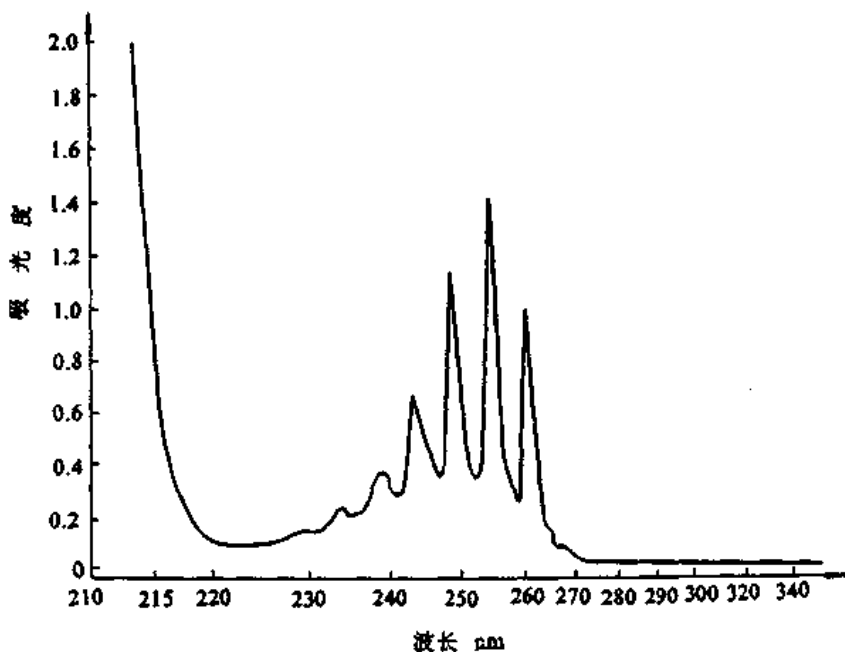


图 2-6 苯的精细结构

当苯环被取代后，这些小峰即行消失，如助色团 -OH、-Cl 等取代时，吸收带红移，一般体现在 210nm 左右，当取代基团与苯环共轭时，吸收峰向更长波段移动，如表 2-4 为苯单取代吸收特性。

由于稠环芳香烃具有两个或两个以上共轭的苯环，引起 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所需要的能量较小，因而在更长的波长处呈现吸收。共轭的苯环数目越多，共轭体系就越大，波长值也越大。

四、物质与光吸收的关系

1. 电荷转移与配位场

当外来辐射照到某些无机化合物或有机化合物时，会产生电荷转移吸收谱带。

水合的 Fe^{2+} 离子在外来辐射作用下可以将一个电子转移给 H_2O 分子，从而可以获得紫外吸收光谱，过程为：

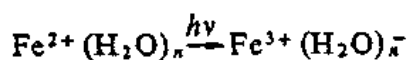
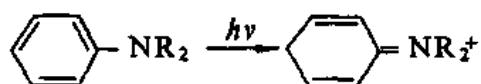


表 2-4 某些单取代苯的吸收特性

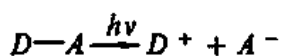
取代基	203.5nm 谱带	$\epsilon_{\text{最大}}$	254nm 谱带	$\epsilon_{\text{最大}}$	溶 剂
-NH ₂	203	7 500	254	169	2% 甲醇
-H	203.5	7 400	254	204	2% 甲醇
-CH ₃	206.5	7 000	261	225	2% 甲醇
-I	207	7 000	257	700	2% 甲醇
-Cl	209.5	7 400	263.5	190	2% 甲醇
-Br	210	7 900	261	192	2% 甲醇
-OH	210.5	6 200	270	1 450	2% 甲醇
-OCH ₃	217	6 400	269	1 480	2% 甲醇
-SO ₂ NH ₂	217.5	9 700	264.5	740	2% 甲醇
-CN	224	13 000	271	1 000	2% 甲醇
-COO ⁻	224	8 700	268	560	2% 甲醇
-COOH	230	11 600	273	970	2% 甲醇
-NH ₂	230	8 600	280	1 430	2% 甲醇
-O ⁻	235	9 400	287	2 600	2% 甲醇
-C CH	236	15 500	278	650	庚烷
-NHCOCH ₃	238	10 500	—	—	水
-CH=CH ₂	244	12 000	282	450	乙醇
-COCH ₃	240	13 000	278	1 100	乙醇
-Ph	246	20 000	—	—	庚烷
-CHO	244	15 000	280	1 500	乙醇
-NO ₂	252	10 000	280	1 000	己烷
	268.5	7 800	—	—	2% 甲醇
-N=N-Ph(反式)	319	19 500	—	—	氯仿

如果用 CNS⁻ 离子检出 Fe³⁺ 离子时溶液呈血红色，这一过程发生的是电子从 CNS⁻ 离子转移到 Fe³⁺ 离子上而得到一个 CNS 基。

如某些有机物分子在光辐射作用下发生分子内电荷转移，由下式可见：



即电子是从 -NR₂ 取代基转移到苯环上。由此可用通式表示电荷转移过程：



D 为电子给予体，A 为电子接受体。

而当过渡金属离子与显色剂（配位体）形成络合物时，即存在电荷转移吸收，又存在配位体吸收。电荷转移吸收谱带常发生在紫外区，有时也延伸到可见区。过渡金属离子拥有 d 电子，在受到配位体影响，使 d 轨道发生变化，产生跃迁。由于实现 d 电子跃迁所需要的能量比较小，因而配位场吸收谱带常发生在可见光区。过渡金属水合离子或过渡金属离子与一些配位体形成的络合物往往会呈现某种特征颜色，它们的颜色一般都与配位场吸收谱带有关。

过渡金属离子都具有一个未填满的 d 电子壳层，d 电子壳层中电子的总数因过渡金

属离子种类而异。各种过渡金属水合离子所呈现的颜色与其 d 电子壳层中 d 电子的总数有密切的关系。表 2-5 列出一些过渡金属水合离子的颜色与其 d 电子壳层构型的关系，表中也列出了 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Sc^{3+} 等非过渡金属离子。从表 2-5 中清楚可见， d 电子壳层中没有 d 电子或者含有 10 个 d 电子的金属离子，或者说 d 电子壳层中不成对 d 电子数目等于零的金属离子，都是无色的，例如 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Sc^{3+} 、 Cu^+ 、 Zn^{2+} 和 Ga^{3+} 等离子。具有半满的 d 壳层的过渡金属离子，或者说 d 电子壳层中不成对 d 电子数目等于 5 的过渡金属离子，它们的颜色都很淡，例如 Mn^{2+} 离子和 Fe^{3+} 离子，而含有 1 至 4 和 6 至 9 个 d 电子的过渡金属离子则都呈现特征的颜色。

表 2-5 某些过渡金属水合离子的颜色

d 电子总数	不成对电子数目	金属水合离子	颜色
0	0	K^+ 、 Ca^{2+} 、 Sc^{3+}	无色
1	1	Ti^{3+}	紫红色
2	2	V^{3+}	绿色
3	3	Cr^{3+}	紫色
4	4	Cr^{2+}	蓝色
5	5	Mn^{2+}	淡红色
		Fe^{3+}	淡紫色
6	4	Fe^{2+}	绿色
7	3	Co^{2+}	桃红色
8	2	Ni^{2+}	绿色
9	1	Cu^{2+}	蓝色
10	0	Cu^+ 、 Zn^{2+} 、 Ga^{3+}	无色

2. 物质颜色与光吸收的关系

化合物呈现的颜色与光有着密切的关系。不同波长的可见光可使人眼感觉出不同颜色。日光或白炽灯光都是混合光，它们是由波长 400~800nm 的电磁波按适当强度比例混合而成的。由于人视觉的分辨能力有限，人们看到某种颜色光是介于某一波长范围的光。如表 2-6 列出不同颜色光的近似范围。

表 2-6 不同颜色光的波长

日光	红外光	无色	> 800nm
	可见光	红光 橙光 黄光 黄绿光 绿光 青光 蓝光 紫光	800~650nm 650~600nm 600~580nm 580~550nm 550~500nm 500~450nm 450~420nm 420~400nm
	紫外光		< 400nm

当将某两种颜色的光按适当强度比例混合时,可以形成白光。这两种颜色光就称为互补色。如图 2-7 所示。图中处于直线关系的两色光为互补色。如绿色光和紫色光就是互补色,黄色光和蓝色光是互补色,以此类推。溶液所以呈现不同的颜色是由于该溶液对光具有选择性吸收的缘故。

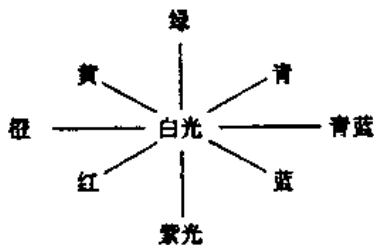


图 2-7 光色互补示意图

当一束白光(混合光)通过某溶液时,如果该溶液对可见光区各种波长的光都没有吸收,即入射光全部通过溶液,则该溶液呈无色透明状。当该溶液对可见光区各种波长的光全部吸收时,则该溶液呈黑色。如某溶液对可见光区某种波长的光选择性的吸收,则该溶液即呈现出被吸收波长光的互补色光的颜色。例如当一束白光通过 KMnO_4 溶液时,该溶液选择性的吸收了绿色波长的光,而将其它颜色光两两互补成白光而通过去,只剩下紫色光,未被互补,所以 KMnO_4 溶液呈现紫色。

第三节 紫外-可见光分光光度计

一、紫外-可见光分光光度计的组成

分光光度计一般由五个主要部分组成,即光源、单色器、样品室、检测器、显示系统。如图 2-8 所示。

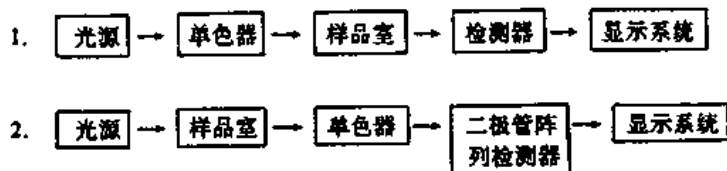


图 2-8 分光光度计主要组成部分

分光光度计的主要部件已在第一章第 2 节中叙述,在这里主要介绍一下近两年新推出的二极管阵列检测器(简称 DAD)。

二极管阵列检测器的结构如图 2-9 所示。光从氙灯发出后,通过一个消色透镜系统照射在流动池上,经过一狭缝,此狭缝的宽度同光谱带宽有关。然后,光束在全息光栅的表面色散,分光后到达光电二极管阵列上,它是由一组光电二极管组成。检测器通过其光电二极管阵列的电子线路,在几毫秒左右测出一定波长范围的光谱信息。与普通的光谱检测器相比,它的样品与全息光栅的相对位置正好相反,因此,这种光路结构常

被称为“倒置光学”系统。

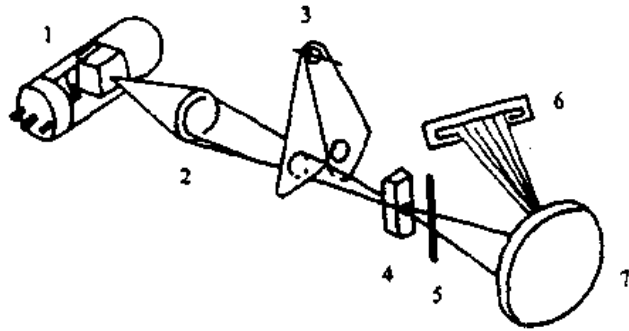


图 2-9 二极管阵列检测器光路图

1. 氙灯 2. 透镜 3. 快门 4. 流动池 5. 狭缝 6. 二极管阵列 7. 光栅

二极管阵列检测器与普通紫外分光检测器相比较，在光路系统安排上有着重要的区别，DAD 是令光束先通过样品流动池，然后由分光技术使所有波长的光在二极管阵列接收器上同时被检测。二极管阵列接收器上的光讯号用电子学的方法快速扫描提取出来，扫描速度非常快，远远超出色谱出峰的速度。因此，可用来观察气相色谱或液相色谱柱流出物的每个瞬间的动态光谱吸收图。

DAD 的特点是：

1. 全波长测定

利用二极管阵列检测器，可以选择整个波长范围即 190~800nm，仅需一次样品测定，在这段波长范围内有吸收的所有组分都被实时采集检测出来。对于开发、优化分析方法轻而易举，在纯度测定时由于参考的波长多而使可靠性提高。同时测定的数据可以用三维谱图的形式表示，与色谱联用得到以时间-波长-吸收值为坐标的三维色谱光谱图，如图 2-10。这一点对于复杂样品的分析尤为重要。

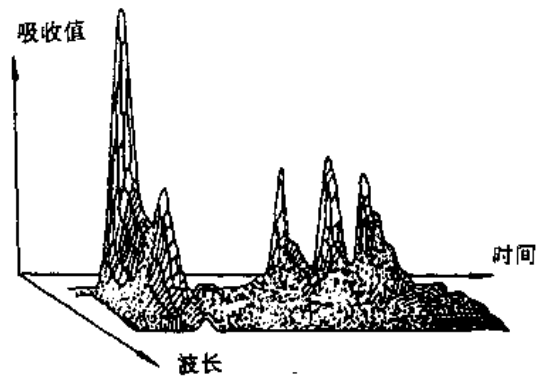


图 2-10 三维色谱光谱图

2. 高的光谱分辨率

能区分只有微小差别的光谱，可提供更准确的光谱图，并在更高置信度水平上得到化合物鉴定及峰纯度定量分析结果。

3. 灵敏度高

二极管阵列检测器可以在多个波长下监测样品，当选择分析组分的最大波长时这一

点尤为重要。选择不同波长是为了在最高灵敏度条件下检测出微量组分，得到最佳的光谱图，根据提供的三维信息图谱，使结果更加准确可靠。

4. 基线噪声、漂移小

基线噪声、漂移小，基线噪声应在 $1.5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-5}$ 范围内；漂移应在 $1.5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-3}$ 范围内。

二、紫外-可见光分光光度计的分类及特点

1. 单光束分光光度计

单光束分光光度计的结构示意，如图 2-11。

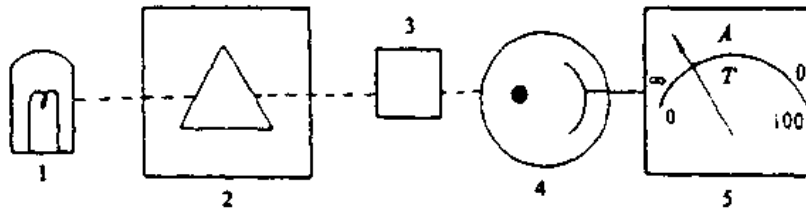


图 2-11 单光束分光光度计示意图

1. 光源；2. 单色器；3. 样品室；4. 检测器；5. 显示系统

一束经过单色器的光，轮流通过参比溶液和样品溶液，进行光强度（吸收）的测量。由于采用一路光束，光路系统简单，光源来的能量损失小，机械振动小，因此噪音小，信噪比高。

因为仪器的自校装置，从而使仪器稳定性得到了提高，如果有很好的光源系统，重现性比双光束还要好，同时便于计算机控制快速扫描。

2. 双光束分光光度计

双光束分光光度计，如图 2-12 所示。

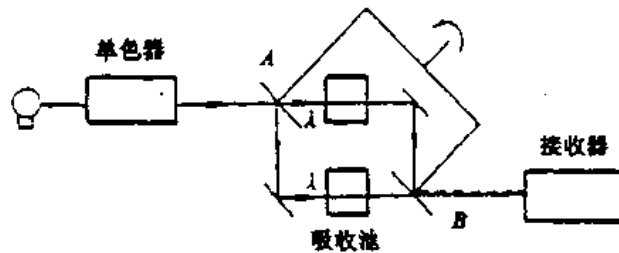


图 2-12 双光束分光光度计示意图

A、B 为旋转镜

由光源发出的光通过单色器分光，经旋转镜 A 将光分为两束，一束通过参比池，

另一束通过样品池，一次测量可得到样品溶液的吸光值，两束光同时分别通过两个池子，可消除光源强度变化引起的误差，图 2-12 为旋转镜示意图。

3. 双波长分光光度计

同一光源发出的光被分为两束，分别经过两个单色器，同时测到两个不同波长的单色光，交替照在同一溶液里，经检测器得到的信号是两波长吸光度之差，可测定混浊样品等，如图 2-14。

当试液中含有两种组分且光谱互相重叠时，用双波长法是其最大的优势，而用单光束分光光度计从事这方面工作时，往往必须预先对试样进行萃取分离或加掩蔽剂等方式才能进行测定。

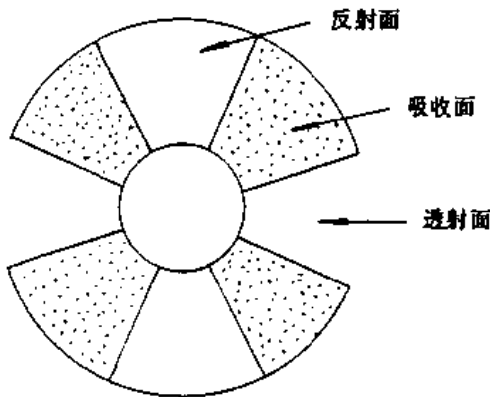


图 2-13 旋转镜

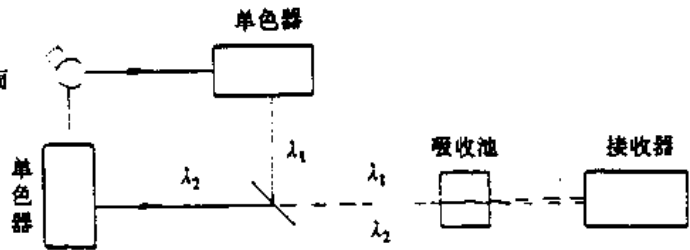


图 2-14 双波长分光光度计示意图

根据比耳定律，样品溶液在两个波长 λ_1 和 λ_2 的吸光度的差值与溶液中待测物质的浓度成比例。双波长分光光度法以待测组分吸收光谱的任意波长为零点，测定它与任意其它波长间的吸光度差值。

双波长分光光度法具有下列优点：

(1) 因为仅用一个样品池进行测量，不需要用参比吸收池，故可消除参比池与样品池的不同而引起的误差。

(2) 对混浊样品进行测定时，可消除不同混浊度所引起的背景吸收，即基线的变化几乎完全被消除。

(3) 适当选择波长，简化混合组分同时测定过程。

三、实验操作中影响准确度的因素及校正方法

使用分光光度计，应按仪器的说明书进行操作，并应定期对仪器进行检定，使仪器的准确度和精密度符合要求，表 2-7 为紫外-可见光分光光度计主要性能指标。

1. 光源的调节

对仪器的光源要作很好调节，因为在测定时，我们所需要的单色光愈纯愈好，也就是狭缝能开得愈小愈好。若希望狭缝能开得较小，则必须充分发挥光源的强度，因此要仔细地调整，使单色器获得最大光强度。

表 2-7 紫外-可见分光光度计主要性能指标

性能指标 \ 仪器类型	简易型适于一般定量	一般扫描型	精密扫描型
波长范围	200~00nm	190~00nm	190~00nm
波长准确性	2nm	±0.5nm	< ±0.3nm
波长再现性	±0.3nm	±0.2nm	< ±0.1nm
带宽	7nm	任选 0.5、1、2nm	任选 0.1、0.2、0.5、1、2nm
光度准确度	±0.5%T (在 30%T)	±0.005A (在 1A)	±0.001 5A (在 1A)
光度再现性	±0.003A (在 1A)	±0.002A (在 1A)	±0.000 1A (在 1A)
杂散光	0.1% (在 340nm) 0.15% (在 220nm)	<0.000 5% (340nm)	<0.000 5% (220nm) <0.000 1% (340nm)
基线漂移	0.002A / 5h	0.002A / h	0.000 1A / h
光度范围	0~3A	-3~4.5A	-3~6.0A

2. 波长准确度的检查

色散系统分出的实际波长是否与刻度值相符合，主要取决于分光系统制造时的精密度，气温的变化及仪器机械部件的磨损均可引起误差，因此要经常校对。一般讲来，有机化合物在紫外区的吸收峰大都比较平，波长若有误差，尚不致严重影响测定的吸收度，但如果采用解多元方程式方法测定几个混合物时，或采用校正杂质吸收度时，须在非吸收峰位置测定读数，波长略有不同即引起很大的误差，如图 2-15。

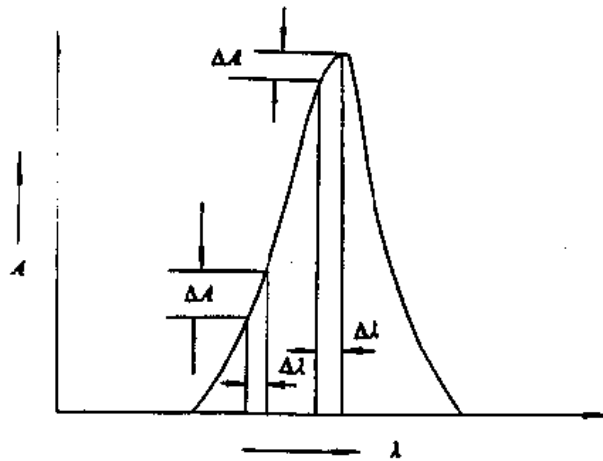


图 2-15 在非最大吸收峰位置测定读数
由于波长偏移而引起误差

可以看出在最大吸收波长测定时，波长略差一点，对吸收度影响较小，但在吸收图谱上升或下降较陡位置测定时波长略差一点，将使吸收度有很大误差，故仪器波长不但是要经常校正，还要在仪器验收和使用一段时间以后将全部波长校正一下，以了解全部波长的可靠程度。

波长校正方法一般可利用氢灯谱线 379.79, 486.13, 656.28nm; 汞灯谱线 623.44, 546.07, 435.84, 334.15, 275.28, 237.83nm 自行校正。如无汞灯，可用苯在无水乙醇中在紫外区有特征吸收，峰位为 229.2, 233.9, 238.9, 243.3, 248.5, 254.5, 260.6。

268.4nm。对于具有扫描功能光谱仪一般用钛滤光片进行校正。校正波长如图 2-16。

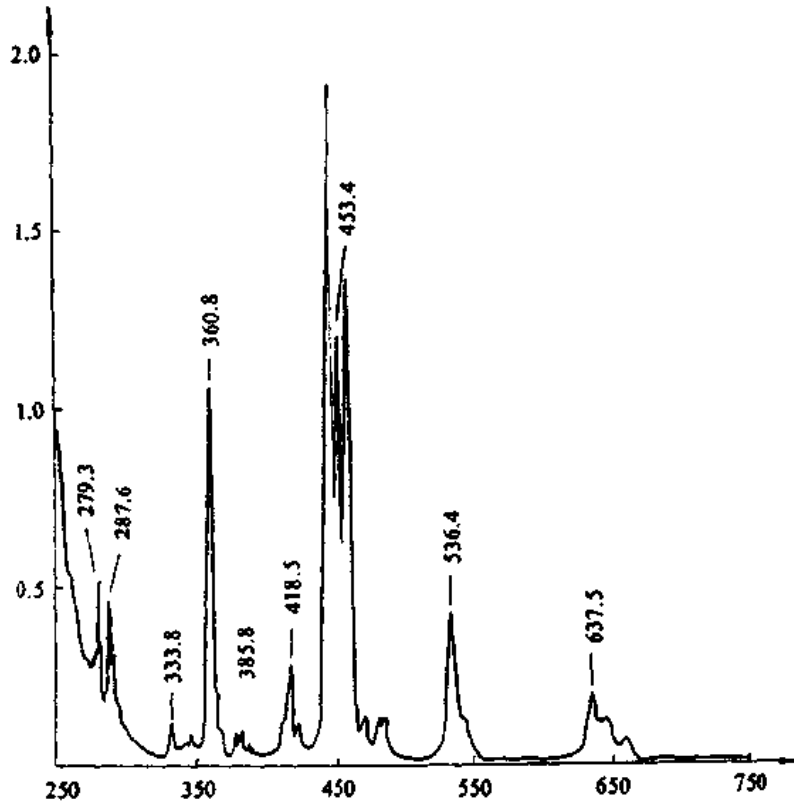


图 2-16 钛滤光片光谱图

3. 吸光度精度检查

国内外通常采用重铬酸钾溶液检验仪器的吸光度精度，具体方法如下：

精密称取在 105℃ 干燥至恒重的重铬酸钾基准试剂 0.200 0g，置 500mL 容量瓶中，用 0.02M 硫酸溶解，并稀释至 500mL，取 10mL 再稀释至 100mL。

测定：选好配对的一厘米石英吸收池，以 0.02M 硫酸为空白，在波长 235，275，313，350nm 测定，并计算其吸收系数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ，见表 2-8。

表 2-8 重铬酸钾硫酸溶液的吸收系数

波长 (nm)	吸收系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	允许误差 (nm)
235	124.3	122.0~125.5
275	144.8	143.0~146.3
313	49.0	48.5~49.5
350	107.3	105.5~108.5

4. 吸收池校正

吸收池厚度直接影响吸收度的数值，因此吸收池的厚度必须很精确，其实际厚度与

标示厚度必须符合，否则会影响测定结果，有的分光光度计的吸收池经过精确的测量，每个吸收池上均注明其实际光路长度，例如 9.98mm，10.01mm 等，但有些吸收池没有注明，一般在出厂时已作检查，但新使用时仍需要校正。

在测定溶液的吸光度时，由于吸收池中的反射、吸收及散射的影响而减弱光线的强度，因此测定溶液吸收及空白吸收时，其折射、吸收和散射影响必须相等，才可以消除测定中的误差，吸收池在波长较短的紫外光区的透光率会有变化，因此在每次测定时，都要作吸收池误差的校对，其方法如下：

(1) 小心检查吸收池有没有裂缝和气泡，将每个吸收池用铅笔作出记号区别，洗净后分别加入相同溶剂测定，在大部分的波长范围内，所测出的透光率应相等或相差很小，如一个透光率是 100%，而另一个也应是 100% 或 99%~101% 以内。

(2) 每个吸收池均装入测定时用的溶剂，以一只吸收池作空白，在所用的波长测其他吸收池的吸收度，取吸收度最小的一只作空白，测定并记下其他吸收池的吸收度，倾去其他吸收池的溶剂，以被测溶液冲洗，装入被测溶液，置仪器中测吸收度，然后减去相应的测定溶剂时的吸收度，即为被测溶液的吸收度。在测定时，要用擦镜头纸抹干擦净。

5. 溶剂的选择

分光光度法测定时，溶剂的影响是很大的。用不同的溶剂测得的吸收光谱是不同的，在选择溶剂时，要注意在测定范围内，溶剂没有吸收或吸收很小，溶剂能将溶质充分溶解，要留意溶剂对吸收光谱的影响。

芳香族溶剂，不适宜于紫外线 300nm 以下测定，脂肪醛及酮类在 280nm 附近具有吸收，在近紫外区完全透明的有水、烃类、碳氢化合物、脂肪醇类（乙醇及甲醇）、乙醚、稀氢氧化钠、氢氧化铵、盐酸溶液等，氯代烃如氯仿及四氯化碳也适用。

6. 参比溶液的选择

利用参比溶液可以调节仪器零点，消除由于吸收池壁和溶剂对入射光反射与吸收所引起误差，有时可以消除某些共存组分干扰。例如：在测定某组分时，可能从所用容器、试剂及环境中带人一定量的被测组分；显色剂的色泽、空白溶液的色泽，以及方法中无法分离掩蔽的其他组分的色泽等等，都会影响吸光度的测定。此时可应用相应的空白溶液来消除其影响。因此正确选择合适的空白溶液，对提高方法的准确度，起着重要的作用。

空白溶液的选择，应按不同情况进行处理。例如试样中其他组分本身，或与显色剂作用所生成的化合物及所用试剂等，在测定波长下，没有光吸收或虽有吸收，但所引起的测定误差在允许误差范围内，此时可用蒸馏水或所用的溶剂作为空白溶液。

如果显色剂有颜色，并在测定波长下对光有吸收，则应用显色剂溶液作为空白溶液。显然，空白溶液中所加入显色剂及其他试剂的量，应与试样测定时一致。

如果试样中其他组分本身的颜色对测定有干扰，而所用显色剂没有颜色，则可用不加显色剂的试样溶液作为空白溶液。

四、分光光度计简介

目前用户拥有的产品国内以上海分析仪器厂、北京分析仪器厂的分光光度计为主。

国外以日本岛津、日本日立、美国贝克曼、美国泊金-埃尔默、英国派-尤尼肯等数家公司的分光光度计为主。

图 2-17 为贝克曼公司 DU600 系列光路图。

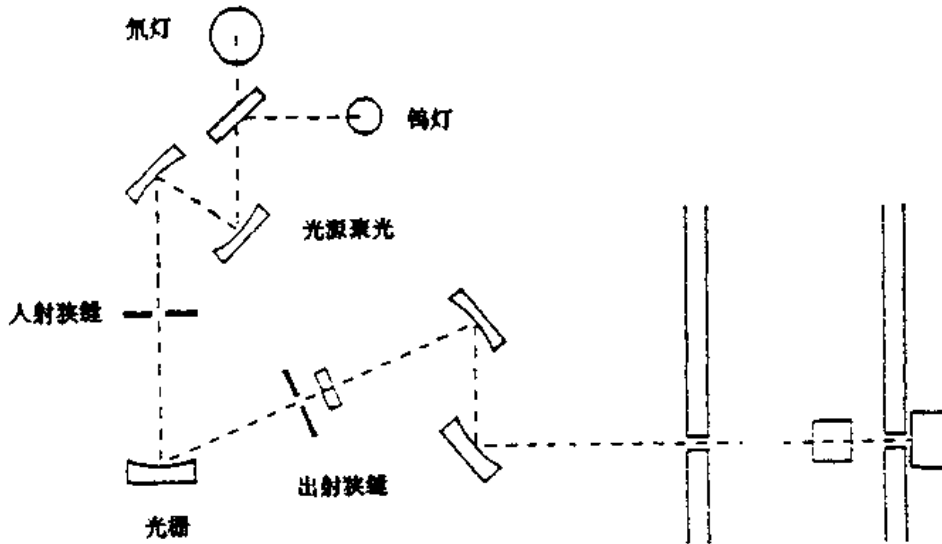


图 2-17 DU600 系列光路图

DU600 系列是内置微机控制的常规型分光光度计，波长范围在 190~1100nm，高速扫描可达 2400nm/min，每秒钟收集多至 20 个数据，是一种多用途的经济型仪器。

图 2-18 为二极管阵列分光光度计。

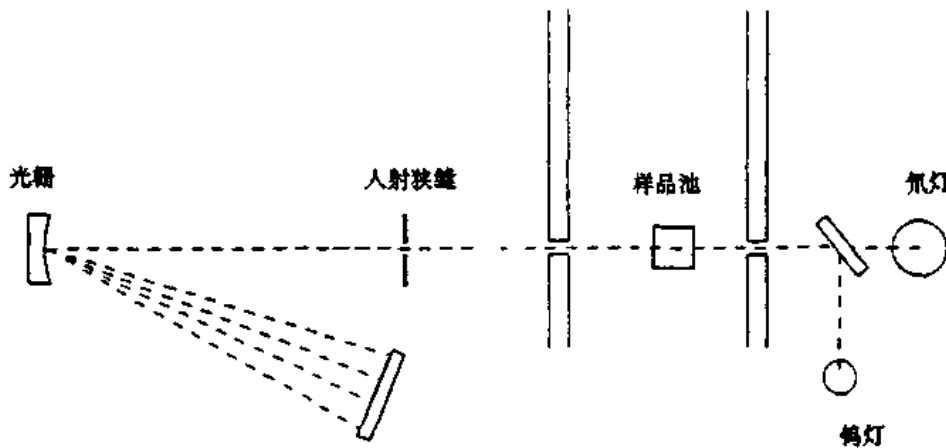


图 2-18 二极管阵列分光光度计

仪器是由微机控制，光电二极管为 1024 个，波长范围在 190~800nm，超高速的全波长扫描只需 0.1s，提供快速的光谱分析，特别适用于酶动力学研究和新方法的开

展。

图 2-19 为双光束二极管阵列检测器系列光路示意图。

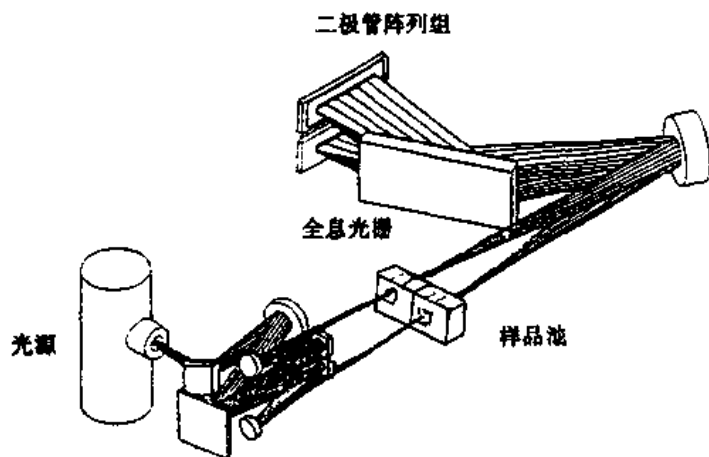


图 2-19 双光束二极管阵列检测器

由于近代电子计算机技术的应用，扩大了仪器的功能和灵活性，使之更适应实际工作中的各种需要。当今最新型号的仪器常具有如下功能：

1. 为了显示图谱的精细结构，提高测量的准确性，波长横坐标及吸光度（透光度）纵坐标的标度都可以放大。在 190~1100nm 波长范围内任意选择所需要的扫描波段，并以吸收或透射两种方式扫描，进行光谱图分析，包括光谱图定位峰、谷点、读数跟踪、光谱图重叠相比。

2. 采用固定波长测定时，同一样品，可同时测定 2~12 个波长的吸收或透射方式的读数，并可同时乘以相应的计算因子。

3. 具有谱图相减、1~4 阶导数及对数计算功能。导数光谱法便于显示光谱的细微变化，特别是在弱吸收峰被强吸收峰所掩盖时，弱吸收峰可用导数光谱显示清楚并被测量。如图 2-20。

4. 可进行净吸光值计算，在定性及定量分析中使用二波长或三波长运算（净 A_2 及净 A_3 运算）。如图 2-21。

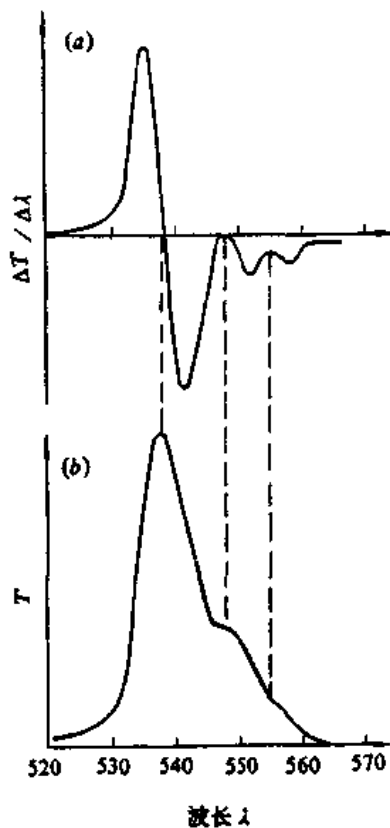


图 2-20 导数光谱与吸收光谱的比较
(a)为导数光谱；(b)为吸收光谱(以透过光作图)

双波长运算中, 净 $A_2 = A_2 - A_1$, 含量计算 = $(A_2 - A_1) \times$ 系数, 在图 2-21 (b) 中净 $A_3 = (A_3 - A_1) - MN$. 根据相似三角形对应边成比例, 得到 $MN = (A_2 - A_1) \cdot \frac{\lambda_1 - \lambda_3}{\lambda_1 - \lambda_2}$, 故净 $A_3 = (A_3 - A_1) - (A_2 - A_1) \cdot \frac{\lambda_1 - \lambda_3}{\lambda_1 - \lambda_2}$, 如要求含量, 再乘以系数. 二波长及三波长法对于扣除背景及干扰成分的影响, 以及消除由于样品混浊而引起的光散射和溶液中的气泡所造成的基线漂移都是有效的.

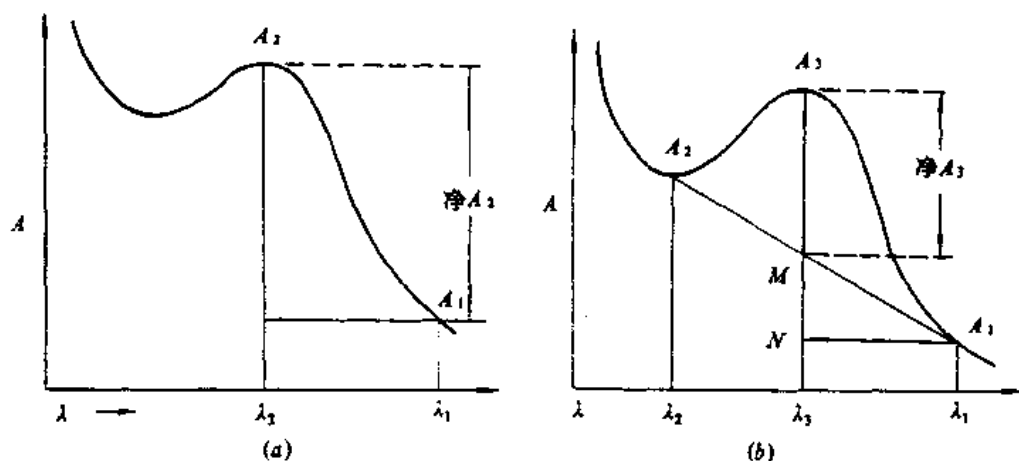


图 2-21 二波长及三波长运算方法

5. 具有随时间变化的光谱扫描, 自动地实时跟踪样品在不同反应时间的吸光值或透光值, 为酶动力学研究提供实用可靠的手段.

第四节 紫外-可见光分光光度法的应用

一、定性分析

紫外和可见光谱的特征吸收带是主要的定性依据, 但在定性分析上的应用是有限的, 因为其吸收带很宽, 缺乏精细结构的特征, 在定性方面不如红外吸收光谱, 如果只有一两个发色团相同, 其它部分的结构略有不同, 对紫外和可见光谱影响变化不大, 往往具有十分接近的吸收光谱, 所以在鉴定化合物时要注意, 即使是光谱相同, 未必是同一种化合物, 要采用其它分析方法配合进一步鉴定.

二、定量分析

定量分析的依据是比耳定律, 在液层厚度一定时, 溶液的浓度与吸光度要成正比关系.

1. 标准曲线法

配制 5~10 个不同浓度的标准溶液, 在该溶液最大特征吸收波长下, 逐一测定吸光度或透光度, 以吸光度为纵坐标, 溶液浓度为横坐标, 绘制工作曲线, 待测样品以同样方法测得吸光度, 并从工作曲线上求得相应浓度.

2. 直接比较法

先配制一种已知浓度的标准溶液 $c_{\text{标}}$ ，测其吸光度为 $A_{\text{标}}$ ，再在相同条件下测得样品溶液的吸光度为 $A_{\text{样}}$ ，根据下列公式求得样品浓度。

$$c_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}} \times c_{\text{标}}}{A_{\text{标}}} \quad (2-4)$$

此法可不做标准曲线，但要求溶液中的待测物质能严格符合光的吸收定律，而且样品溶液和标准溶液的吸光度值较为接近。这种方法的测定误差比标准曲线法要大一些。

3. 标准增量法

采用标准曲线法使未知样与标准样保持一致，在实际中并不是总能做到的，采用增量法可以弥补这一缺点，方法是将未知样分成体积相同若干份，除其中一份不加已知量被测组分外，其余都加，在合适条件下测定。如未知样不含被测组分，吸光值 A 应为零，曲线过原点。但实际没过原点，有截距 A_1 ，校正后，曲线延长至 OO' 浓度为 c_2 ，如图 2-22。

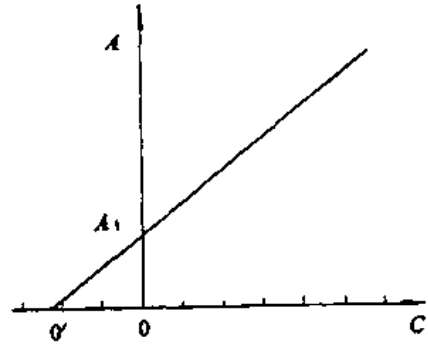


图 2-22 标准增量法图示

此法还可以检查实验过程的系统误差。设样品中被测组分真实含量为 c_x ，实验值为 c_1 ，在样品中增加已知量 b 时，测得实验值为 c_2 ，实验过程系统误差为 K ，则：

$$c_1 = Kc_x \quad c_2 = K(c_x + b) \quad K = (c_2 - c_1) / b \quad (2-5)$$

必要条件是当被测组分含量变化时 K 不随其改变。

4. 多组分分析法

当样品溶液中含有二种以上组分时，由于组分之间吸收峰相互干扰情况不同，计算方式也有所不同。

(1) 吸收光谱不重叠

如图 2-23 在 λ_1 处 B 无吸收，在 λ_2 处 A 无吸收，所以可分别在 λ_1 及 λ_2 处测定组分 A 和 B 的浓度，直接应用比耳定律计算。

(2) 吸收光谱相互重叠

如果二组分各自的吸收光谱互相重叠，则混合物的吸收光谱为二组分各自吸收光谱的加和，如图 2-24。首先要从已知浓度的各单独组分吸收光谱中获得 $\epsilon_{\lambda_1}^A$ 、 $\epsilon_{\lambda_1}^B$ 、 $\epsilon_{\lambda_2}^A$ 、 $\epsilon_{\lambda_2}^B$ 。

$$\text{在 } \lambda_1 \text{ 有: } A_{\lambda_1}^A = \epsilon_{\lambda_1}^A bc_a \quad A_{\lambda_1}^B = \epsilon_{\lambda_1}^B bc_b$$

$$A_{\lambda_1} = A_{\lambda_1}^A + A_{\lambda_1}^B = \epsilon_{\lambda_1}^A bc_a + \epsilon_{\lambda_1}^B bc_b \quad (2-6)$$

$$\text{在 } \lambda_2 \text{ 有: } A_{\lambda_2}^A = \epsilon_{\lambda_2}^A bc_a \quad A_{\lambda_2}^B = \epsilon_{\lambda_2}^B bc_b$$

$$A_{\lambda_2} = A_{\lambda_2}^A + A_{\lambda_2}^B = \epsilon_{\lambda_2}^A bc_a + \epsilon_{\lambda_2}^B bc_b \quad (2-7)$$

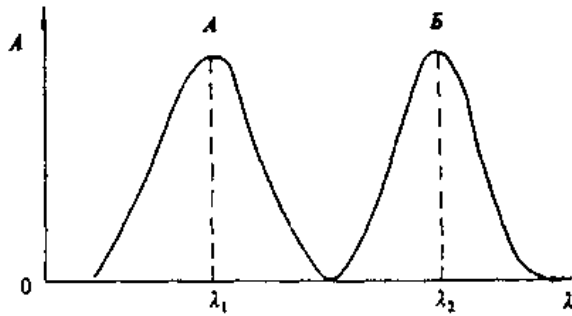


图 2-23 吸收光谱不重叠

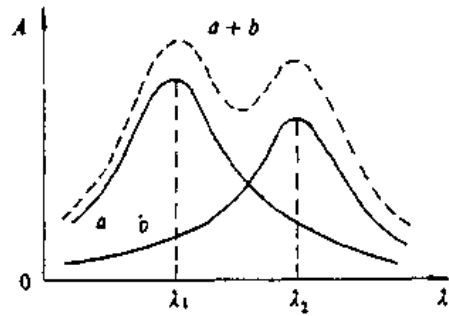


图 2-24 二组分吸收光谱

其中 A_{λ_1} 、 A_{λ_2} 为混合溶液 $a+b$ 在 λ_1 、 λ_2 处吸光值；

$A_{\lambda_1}^a$ 、 $A_{\lambda_2}^a$ 是混合溶液中组分 a 在 λ_1 、 λ_2 处吸光值；

$A_{\lambda_1}^b$ 、 $A_{\lambda_2}^b$ 是混合溶液中组分 b 在 λ_1 、 λ_2 处吸光值。

解由式(2-6)和(2-7)组成的方程组可求得 c_a 、 c_b 。采用此法可求得两种以上组分的含量。

三、分光光度法的技术应用

1. 叶绿素的测定

将 1g 鲜重叶片放在干净研钵内，加 40mL 80% 丙酮，把组织研成匀浆，研磨大约 3min，小心地把绿色液体转移到一个垫有滤纸的漏斗内，当过滤提取液时（抽滤），用另外 30mL 80% 丙酮重复研磨所剩物成匀浆，3~4min 之后，如前一样将第二次提取液过滤到含第一次提取液的烧瓶里。

最后用 80% 丙酮将滤液定容至 100mL。叶绿素有叶绿素 a 和叶绿素 b ，它们分别有特征吸收光谱。在丙酮提取液中，叶绿素 a 在波长 663nm，叶绿素 b 在波长 645nm 有吸收峰。叶绿素提取液的消光度在两种波长下分别为 A_1 及 A_2 ，它们可写为：

$$\begin{aligned} A_1 &= \epsilon_{a1}dc_a + \epsilon_{b1}dc_b \\ A_2 &= \epsilon_{a2}dc_a + \epsilon_{b2}dc_b \end{aligned} \quad (2-8)$$

式中 c_a 、 c_b 分别为叶绿素 a 及叶绿素 b 的浓度，为了便于区别用 d 代表光径。当 $d=10\text{mm}$ ， c 取 mg/mL 为单位时，其 ϵ 值已由实验测定，分别为：

$$\begin{aligned} \epsilon_{a1} &= 82.09 & \epsilon_{b1} &= 9.24 \\ \epsilon_{a2} &= 16.75 & \epsilon_{b2} &= 45.6 \end{aligned}$$

可得到每克叶片中所含叶绿素的毫克数：

$$\text{叶绿素 } a \text{ 含量 (mg/g)} = (12.7A_1 - 2.69A_2) \times \frac{V}{1000 \times W} \quad (2-9)$$

$$\text{叶绿素 } b \text{ 含量 (mg/g)} = [22.9A_2 - 4.68A_1] \times \frac{V}{1000 \times W} \quad (2-10)$$

$$\text{总叶绿素含量 (mg/g)} = [20.2A_2 + 8.02A_1] \times \frac{V}{1000 \times W} \quad (2-11)$$

式中 W 为叶片的鲜重，单位为克。 V 是 80% 丙酮-叶绿素提取液的最终体积，单位为毫升。测量时以 80% 丙酮为空白对照，比色池的光径为 10mm。另外，叶绿素 a 、 b 的等吸收点在 652nm，故可在 652nm 测定。

$$\text{总叶绿素含量} = \frac{A_{652} \times 1000}{34.5} \times \frac{V}{1000 \times W} \text{ (mg/g)} \quad (2-12)$$

2. 蛋白质测定

蛋白质的分析是生物化学和其它生物学科、食品检验、临床诊断等领域最常涉及到的分析检测手段。由于蛋白质种类很多，分子组成、结构、分子量差别很大，功能各异，因此分析蛋白质含量的方法很多，各有其特点。分光光度法是目前最常用的一种方法。

(1) 双缩脲法

利用双缩脲反应，肽、蛋白质与二价铜离子在碱性溶液中形成紫色络合物，最大吸收波长在 540nm，可测定含有 10~1200 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白质样品，标准曲线的线性关系和重复性好。

双缩脲试剂：硫酸铜 1.5g，酒石酸钾钠 6g，碘化钾 1g，溶于适量水中，搅拌状态下加入 300mL 10% 氢氧化钠溶液，用水稀释至 1000mL，在塑料瓶中贮存。

蛋白标准液：准确称取经恒重的标准蛋白质，用水配成 100mg/mL 的溶液。

标准曲线绘制及样品测定：在试管中分别加入 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6mL 标准蛋白液，用水补足到 0.6mL，另取一份 0.6mL 样品，上述溶液中分别加入 2.4mL 双缩脲试剂，混均后室温放置 15min，540nm 处测定。

(2) 考马斯亮蓝 G_{250} 染色法

考马斯亮蓝 G_{250} ，在酸性溶液中为棕红色，它和蛋白质通过疏水作用结合后产生颜色反应呈蓝色。在 595nm 处有最大光吸收，在一定的范围内，蛋白质含量与 595nm 的吸收值成正比。测定蛋白质浓度范围为 1~140 $\mu\text{g/mL}$ ，几乎无测定干扰，灵敏度较高。配制显色剂：将 100mg 考马斯亮蓝 G_{250} 溶解于 50mL 95% 的乙醇中，加入 100mL 85% 的磷酸，加水稀释至 1000mL。

配制标准蛋白溶液：在试管中分别加入含 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μg 的标准蛋白质，加水至 60 μL ，加 3mL 染色液，另取样品液也加 3mL 染色液，混匀后室温放置 15min，595nm 处测定。

3. 核酸测定

由于核酸和蛋白质通常（结合在一起）以核蛋白的形式存在，所以在提纯核酸的过程中，要测定其中蛋白质杂质的含量。通过两个波长（260nm/280nm）的吸收读数比

率和空白的校正，即可估算核酸的纯度。DNA 比值为 1.8，RNA 比值为 2.0。对核酸来说，260nm / 280nm 的比值越小，说明蛋白杂质越多，两个波长吸收比率小于所规定的最小值，则核酸纯度不符合要求。核酸测定方式有几种可供选择，即四种指定的参数法：

- (1) 测定 260nm / 280nm 及 280nm / 260nm 的比率。
- (2) 测定 260nm / 280nm 及 280nm / 260nm 的比率，背景校正波长 320nm。
- (3) 测定 230nm / 280nm 及 260nm / 230nm 的比率，背景校正波长 320nm。
- (4) 测定 260nm / 280nm 及 280nm / 260nm 的比率，用 Warburg 和 Christian 系数计算蛋白质和核酸浓度。

常涉及到用于测定核酸样品的波长有 4 个。

① 230nm，肽键的吸收波长，用此波长检测蛋白质的含量比 280nm 处更灵敏，但常用缓冲液（如 Tris 等）对测定有干扰。

② 280nm，蛋白质中芳香族氨基酸的吸收波长，由于干扰少，被经常使用。

③ 260nm，大多数单核苷酸的最大吸收波长均在 260nm 附近，用来检测核酸的含量。

④ 320nm，用于本底校正，核酸和蛋白质在此波长下无吸收，一些干扰因素（如散射光）可产生吸收，为使用方便起见，将上述 4 种波长按不同组合编成四个固定的指定参数方法。

核酸中的嘌呤、嘧啶、蛋白质中的酪氨酸、色氨酸都有共轭双键，分别在波长 260nm、280nm 处有紫外吸收，由于各种核酸、蛋白的差异很大，为了更准确的测定核酸和蛋白质的浓度，用经典浓度公式，即 Warburg 和 Christian 浓度公式测定核酸和蛋白质浓度。

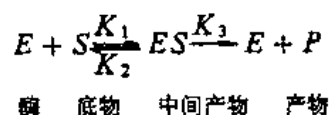
$$\text{蛋白质}(\mu\text{g} / \text{mL}) = 1552 \times A_{280} - 757.3 \times A_{260} \quad (2-13)$$

$$\text{核酸}(\mu\text{g} / \text{mL}) = 62.9 \times A_{260} - 36 \times A_{280} \quad (2-14)$$

4. 酶动力学研究

分光光度法是酶动力学研究最有效的工具。

通过酶促反应动力学的研究，有助于了解酶与底物的结合机制和作用方式，酶的底物浓度与酶促反应速度的关系符合米氏理论。



在进行酶机理研究中，常涉及到 K_m 、 V_{max} 、 K_{cat} 、 K_i 的概念：

1. K_m 为米氏常数，是酶在反应达到平衡态时的常数，是酶学研究中的一个极重要的数据。单位：摩尔 / 升 (mol / L)。

2. V_{max} 为最大反应速度，当底物浓度 S 很高时，所有的酶 E 都会被底物饱和，转变为中间产物 ES ，酶促反应达到最大反应速度（微摩尔浓度变化 / 分钟）。

3. K_{cat} 为酶促反应常数，表示每摩尔酶在单位时间内将底物转变为产物的底物摩尔数， K_{cat} 值多在 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ s 之间。

4. K_i 为抑制剂常数。测定 K_m , V_{max} 的意义在于在酶促反应中知道所要求的反应速度，(应达到 V_{max} 的百分数)，求出应加入底物的合理浓度，反过来，根据已知的底物浓度，求出该条件下的反应速度。Michaelis-Menten 的酶动力学公式，称为米氏方程。

$$V = \frac{V_{max} S}{K_m + S} \quad (2-15)$$

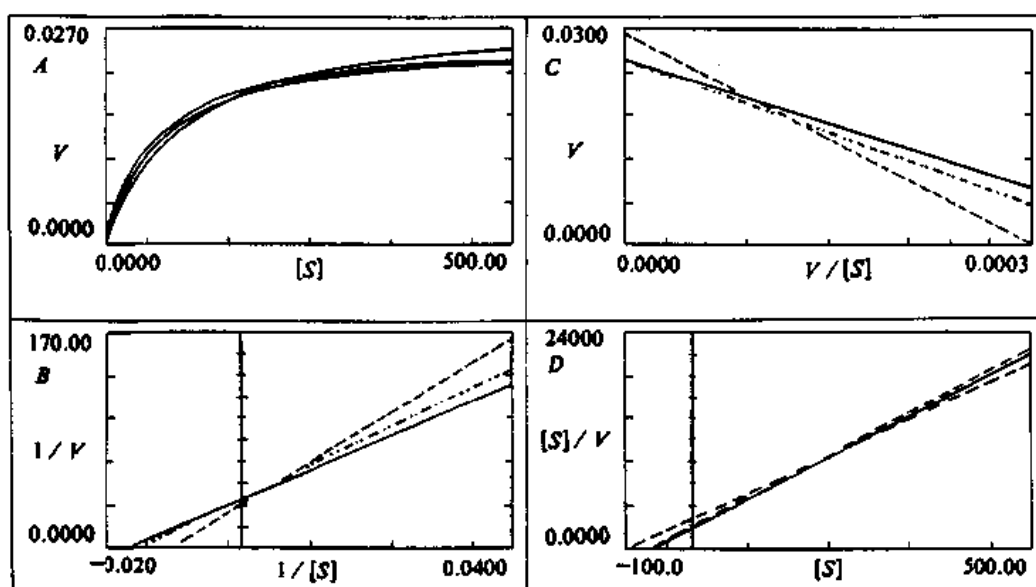


图 2-25 酶动力学图谱

为了得到准确的 K_m 值，将米氏方程变成 $y = ax + b$ 的直线方程，可得到多种形式的方程图解法推出 K_m 值。如图 2-25 中：

图 A 为以 V 对 S 作图在 $V_{max}/2$ 时的底物浓度 S ，为 K_m 。

图 B 为米氏方程双倒数作图法，以 $1/V$ 对 $1/S$ 作图，横轴截距 $1/S = -1/K_m$ 。

图 C 为米氏方程单倒数作图法，以 V 对 V/S 作图，纵轴截距除以横轴截距，即得 K_m 。

图 D 为以 S/V 作为 S 的函数作图。

思考题

1. 为什么 $n-\pi^*$ 跃迁所需能量比 $\pi-\pi^*$ 跃迁略低, 而它的吸收系数却比 $\pi-\pi^*$ 跃迁小得多?
2. 比色法与分光光度法的区别是什么? 各有何特点?
3. 如何理解助色团、发色团、红移、蓝移, 并举例说明。
4. 如何理解“双光束”与“双波长”的工作原理, 各有何特点?
5. 二极管阵列原理与普通光栅分光的原理区别在哪里?

第三章 红外吸收光谱法

红外吸收光谱 (Infrared Absorption Spectroscopy) 应用非常广泛, 尤其在化学领域, 利用红外光谱鉴别物质中含有的化合物基团, 推断未知物的结构, 特别是对有机化学理论及结构分析论证是一种极好的手段。随着科学技术的发展, 红外光谱已经进入了付里叶变换光谱阶段。这种技术具有快速、灵敏、准确等特点。

第一节 红外光谱发展历史及现状

一、红外光的发现

红外光又称红外辐射, 也常把其称为红外线。不管用何种名称, 红外这个定语是不能改动的。

太阳光谱看上去是白色的, 但让一束太阳光通过一个玻璃三棱镜, 然后投射到一白色幕布上, 出现在幕布上不再是白光, 而是由红、橙、黄、绿、青、蓝、紫色组成的彩色光带。这个分光实验说明, 白色的太阳光原来是由多种彩色光混合而成的。利用三棱镜可以把它分解成多种颜色组成的光带, 在物理学上通常称其为太阳光谱。

看到太阳光谱后, 自然会产生这样一种问题, 在光谱的两端, 红光和紫光外面是否还有其它物质存在, 各种颜色的光, 除了色彩不同外, 是否有其它不同的特性, 人受到太阳光的照射会感到热, 这种热效应的各种光是否都一样。根据这一问题, 1800年维廉姆·赫斯克尔将一热偶计放在太阳光谱的红端以外的区域, 被加热的程度比放在可见光谱区要厉害得多。这说明太阳光谱的红光之外还有一种物质存在, 当时就称为不可见光。由于它位于太阳光谱的红光区外面, 很自然地取名为红外光。

二、付里叶变换

早在17世纪人们就发现了光束重叠时会出现交替的明暗条纹这个事实, 这就是光的干涉。19世纪末, 迈克尔逊设计了一种仪器, 可以得到很好的干涉谱图, 这种仪器后来得名为迈克尔逊干涉仪。1892年瑞利通过付里叶变换的数学运算, 将干涉图与通过干涉仪的辐射光谱联系起来。然而, 完整的干涉谱图的测量超越了当时的技术发展水平。把干涉谱图经过数学处理——付里叶变换计算成光谱的第一人是英国天文物理学家费尔杰特, 他在1949年完成的这项工作, 标志着干涉光度法作为一个站得住脚的通用光谱技术的开始。付里叶变换光谱在化学上的应用首先是在远红外区域, 这主要是因为远红外区对干涉仪动镜移动的机械公差要求不像在中红外区那样苛刻, 技术上容易实现。干涉光度法在远红外区的成功应用促进了该法在中红外区的研究工作。中红外区付里叶变换光谱技术的重大突破发生在1966年, 这就是库里-塔基快速付里叶变换算法首次用于干涉光度法, 以前几小时才能完成的计算, 用了这个快速算法只要几分钟甚

至几秒钟就够了。自 1968 年以来，不断造出许多适于化学家使用的仪器，这些仪器是把干涉仪与小型计算机联接起来，仅在开始测量一个干涉谱图的几秒甚至一秒钟之内就可得到光谱。

早期商品红外分光计多是棱镜型的，它仍是借助光的折射效应实现对复色的红外线分光的，分辨率较低。由于棱镜材料多具吸湿性，因此要求其使用环境的相对湿度比较低，由于折射率还要受到温度的影响，因此其使用环境的温度波动也不能大。棱镜型的仪器被视为第一代红外分光光度计。后来由于光栅的刻制和复制技术的进步，迅速生产出大量光栅型红外分光计，它是靠光的衍射效应实现对复色光的红外线分光的，分辨率较高，此类仪器对其使用环境条件要求不高，价格也比较便宜，被视为第二代红外分光光度计。

但是色散型红外分光光度计仍有两个固有的缺陷无法解决。其一是由于扫描速度太慢，限制了应用面的扩大，很难使它与色谱仪联用分析复杂组分；其二由于必须使用狭缝，进入单色器、检测器的光能受到限制，信噪比较小，灵敏度比较低，诸如测定镜面漫反射光谱、常温样品红外发射光谱、低能量远红外光谱技术应用受到限制。

随着计算方法和计算技术的进步，近些年来迅速生产出各种型号的红外付里叶变换分光光度计 (Fourier Transform Infrared Spectrometer, 缩写 FTIR)，它没有分光元件，是干涉调频分光计，可认为是第三代红外分光光度计。

付里叶红外技术的应用推动了相关技术的发展。红外显微技术、镜面漫反射技术、红外-色谱联机技术、红外-质谱联机技术日趋成熟，已成为分析技术领域中的一种重要研究检测手段。

第二节 红外吸收光谱

一、红外光谱的形成

当一束具有连续波长的红外光照射一物体时，该物质内部的分子就要吸收一部分光能，使分子内部的能级发生变化，主要体现为振动能级和转动能级的变化，这种变化会引起偶极矩变化，如果透过的光用单色器色散就会得到红外光谱。

红外光谱区可分为三个区域，即近红外区、中红外区、远红外区。由于从各区获取的光谱信息不同，如表 3-1，涉及对象也有所不同。

表 3-1 红外光谱区分类

名称	波长 μ	波数 cm^{-1}
近红外 泛音区	0.78~2.5	12 800~4 500
中红外 基本振动区	2.5 ~25	4 500~400
远红外 转动区	25~1 000	400~10

近红外区主要研究如 O-H、N-H 及 C-H 键的倍频和组合频的吸收。中红外区主

要由分子振动能级跃迁引起的，绝大部分有机化合物和大部分无机化合物的化学键振动基频均出现在这一区域内，对于化合物的结构和组成分析是非常重要的区域，大部分的分析研究对象主要涉及此区，几十年来，对于物质在这一区的光谱结构分析研究已非常详细，并卓有成效，本章也主要讨论这一内容。远红外区主要利用分子的转动能级研究金属有机化合物的纯转动吸收及晶体的晶格振动吸收特征。

习惯上红外区的波长用微米 (μm) 表示，但在中红外区常用波数 (cm^{-1}) 表示。

二、分子振动光谱

物质中的分子均处于一定能态并不停地运动，分子的运动可分为平动、转动、振动和分子内电子的运动，每种运动状态都处于一定能级，这一相关内容的讨论参见第一章第二节。

根据光与物质的相互作用关系，初能态和终能态之间能量差愈大，则吸收光的频率愈高，波长愈短；反之，则吸收光的频率愈低，波长愈长。能级示意图见图 3-1。

从图中可见，分子的转动能级十分接近，而振动能级之间相距较远，在光谱的红外区纯属分子振动的变化是无法观察的，因为转动跃迁叠加在它们之上，因此，典型的振动吸收光谱是由复杂谱带而不是由单个谱线组成的。但是在实际中红外光谱并不是如图 3-1 所设想的由分散的单个谱线所组成，而表现为包括一定波长幅度的宽谱带，这是因为毗邻的分子使分子能级畸变以及仪器难以分辨波长接近的吸收线所致。

分子振动能级的变化主要表现在分子的原子间位置的变化，如果分子在振动过程中不伴随偶极矩变化，则无振动光谱。

引起分子偶极变化的振动，一般可分为两大类，即伸展振动和变形振动，伸展振动指两个原子是沿着键的方向往复的运动，这种运动主要是改变键长，而不发生键轴或键角的变化，伸展振动又可分为对称伸展振动和不对称伸展振动，变形振动指原子垂直于价键方向的振动，在运动时引起键角的变化，变形振动又可分为对称、不对称、面内、面外等形式，并根据它的形象分为剪式、摇摆、卷曲振动。

各种振动类型的示意图及其名称、符号如图 3-2 所示。

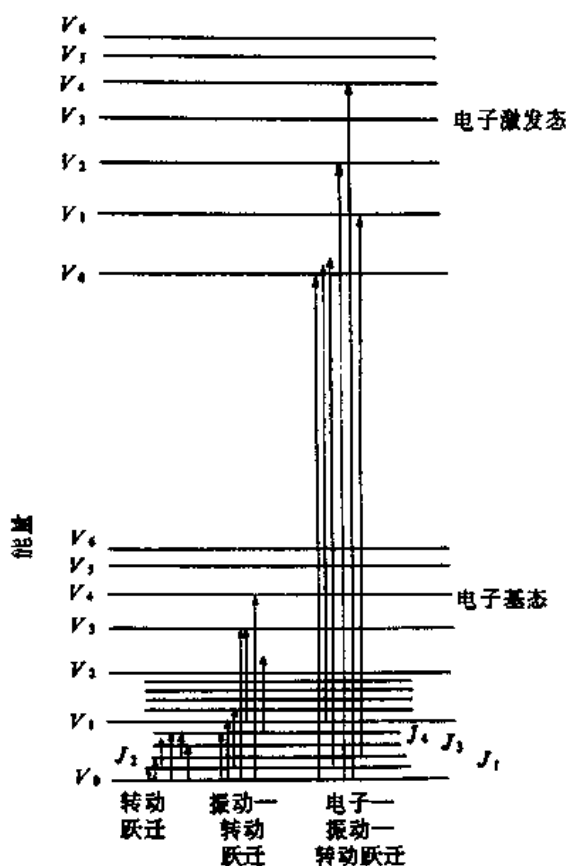


图 3-1 能级示意图

V_1-V_0 表示振动的能级 J_1-J_0 表示转动的能级

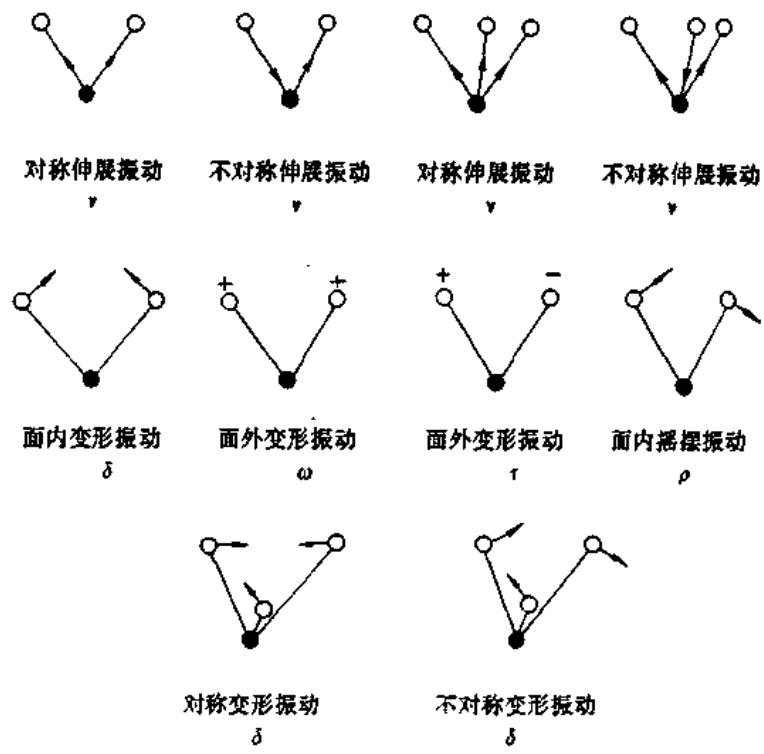


图 3-2 各种振动类型示意图
(+表示由纸面向外, -表示由纸面向内)

第三节 付里叶变换红外光谱

一、迈克尔逊干涉仪

迈克尔逊干涉仪由光源、分束器、固定镜、可动镜和检测器等部件组成, 图 3-3

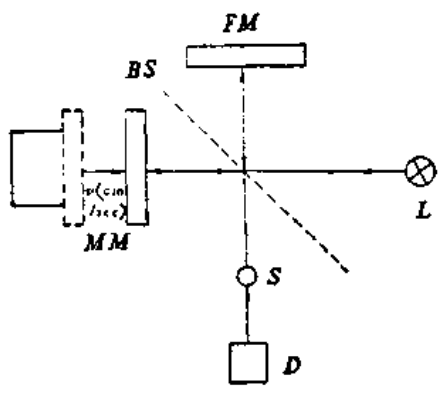


图 3-3 迈克尔逊干涉仪原理示意图

L. 光源 BS. 分束器 FM. 固定镜
MM. 可动镜 S. 样品 D. 检测器 v. 镜移速度

和图 3-4 都是迈克尔逊干涉仪的原理示意图。光源发出的未经调制的光射向分束器 BS, 分束器呈 45° 角放置, 原则上, 它应使 50% 入射光透过, 50% 入射光反射, 因此它是由一种特殊的半透膜材料制成的。当入射光进入干涉仪后, 光束经分束器分裂成一半透射光和一半反射光, 透射光通过分束器后到达动镜 MM 被反射, 沿原路回射到半透膜上并被反射到达检测器 D; 反射光照射到定镜 FM 上被原路反射透过分束器而到达检测器 D, 两束光在这里重叠发生干涉, 在检测器上得到的是相干光。如果进入半透膜的波长为一单色光, 某时刻动镜和

定镜与半透膜等距离，故到达检测器的两束光相位相同，发生相长干涉，亮度最大。当动镜移动 $\lambda/4$ 时，则这束光的光程变化 $\lambda/2$ ，在检测器得到两束光相位相差 180° ，发生相消干涉，亮度最小。凡动镜移动 $\lambda/4$ 的奇数倍时，两束光的相位就会相差 $\pm\lambda/2$ 、 $\pm 3\lambda/2$ 、 $\pm 5\lambda/2 \dots$ ，发生的都是相消干涉。动镜移动 $\lambda/4$ 偶数倍时，两束光的相位差为波长 λ 的整数倍时都发生相长干涉。动镜以某一速度作匀速移动，检测器接收的干涉信号强度就会以某一频率作周期性变化，这样，通过干涉仪就可把高频率振动的红外光（频率 = 光速 / 波长 $\approx 10^{14}$ Hz）调制成音频信号（ $10^2 \sim 10^3$ Hz）。

二、付里叶变换在光谱法中的运用

1. 干涉图的获取

如果一束红外光射向衍射光栅后，如图 3-5 在反射镜 M_1 的焦面上可以观察到几个衍射级。

如果光栅常数 g 和入射角 φ_1 是已知的，入射光的波长根据相长干涉条件可由第 n

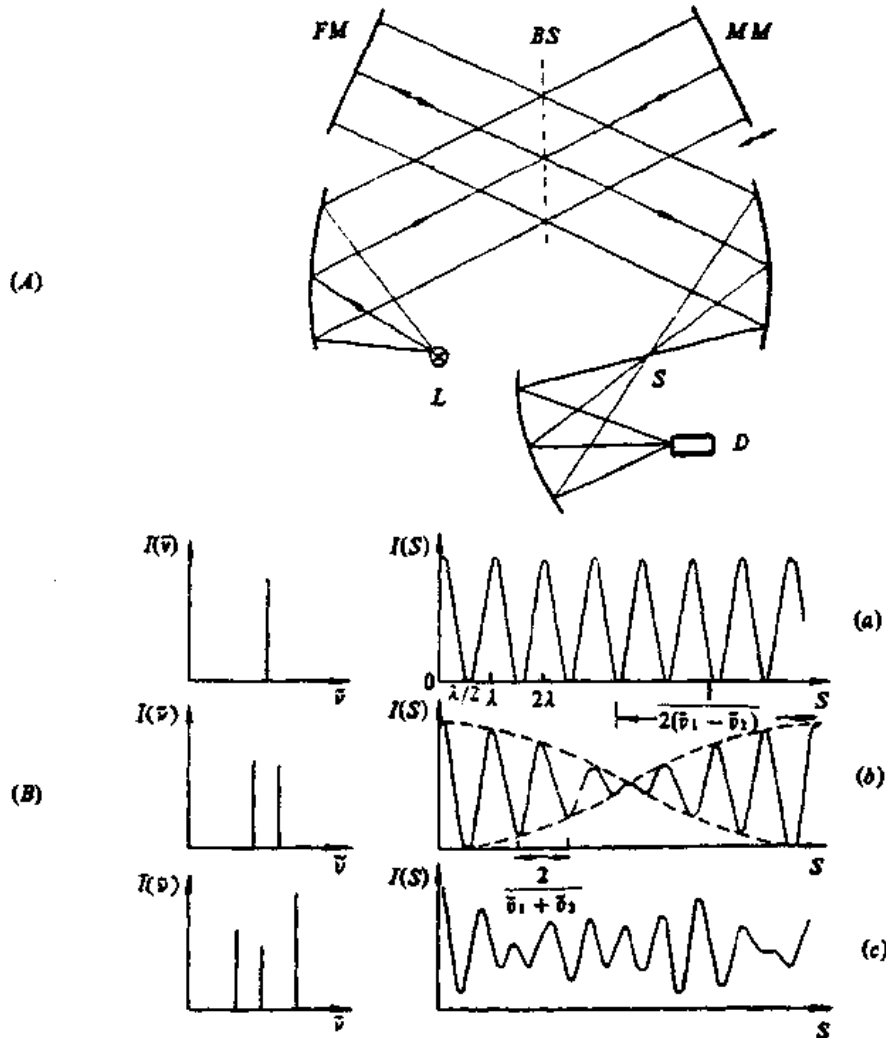


图 3-4 (A) 迈克尔逊干涉仪

(B) 一条、二条和三条窄线的光谱图和干涉图

级的衍射角 φ_n 求出:

$$n\lambda_0 = g(\sin\varphi_n - \sin\varphi_i) \quad n = 0, \pm 1, \pm 2 \dots \quad (3-1)$$

如果光源发射出来的光包含两条或两条以上的窄线, 那末将会得到衍射图样的两个或两个以上的穿插组. 由这些穿插衍射图样可求出这些窄线的波长或频率.

我们也可以用迈克尔逊干涉仪来测定波长, 见图 3-4(B). 分束器将光分成两束, 分别射向定镜和动镜. 待它们达到检测器时已经发生了干涉, 这个干涉取决于动镜的位置, 即取决于两束光的光程差. 这里也首先考虑波长为 λ_0 的单一窄线, 如果光程差 S 是波长的整数倍时, 就会发生相长干涉:

$$S = n\lambda_0 \quad n = 0, \pm 1, \pm 2 \dots \quad (3-2)$$

达到检测器上的干涉光的强度 I 将作为光程差的函数 $I(S)$ 被记录下来, 见图 3-4(B) 右方. 曲线 $I(S)$ 有极大值 ($S = n\lambda_0$) 及极小值 [$S = (n + \frac{1}{2})\lambda_0$].

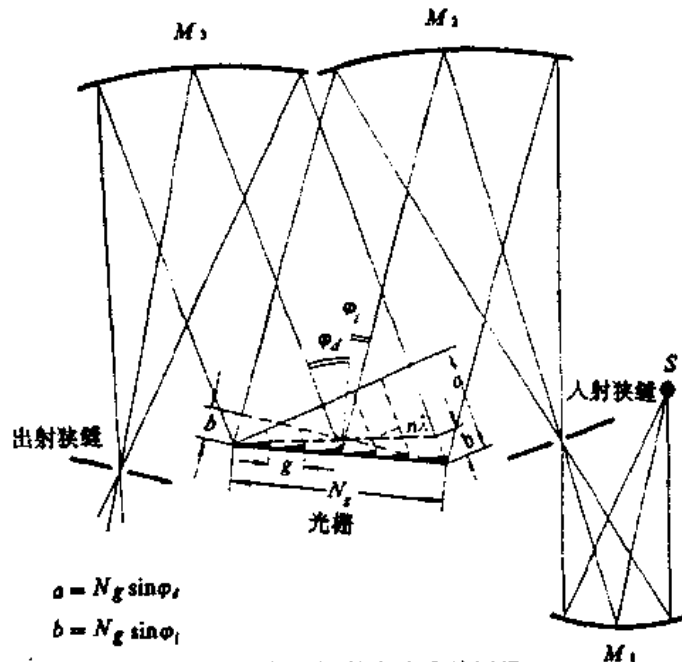


图 3-5 衍射光栅基本公式的图示

S . 光源 M_1, M_2, M_3 . 反射镜 φ_i . 入射角 φ_n . 衍射角

现在来研究一下干涉谱 $I(S)$ 的数学形式. 光是电磁波, 它具有电磁波的一切属性, 其运动规律服从麦克斯威 (Maxwell) 方程. 光可用电场强度矢量 E 和磁场强度矢量 H 来表征. E 与 H 是以相同的位相在垂直于光的传播方向且在彼此垂直的方向上振动. 能够引起发光、光电效应、光化学作用和其它许多物理作用的是电场. 又由于 E 与 H 有着确定的关系, 因此只要研究表征光的电场的运动和变化就可以了. 我们用平面波来描写迈克尔逊干涉仪的两束光.

被定镜反射的一束光波的电场为:

$$E_1 = E_0 e^{i(\omega t - \varphi_1 r)} \quad (3-3a)$$

被动镜反射的一束光波的电场为:

$$E_2 = E_0 e^{i(\omega t - q \cdot r_2)} \quad (3-3b)$$

式中, ω 为圆频率; t 为时间; q 为波矢; r 为离开光源的距离。

假定这两束光的强度相等:

$$I_0 = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} E_0^2 \quad (3-4)$$

这里强度的含义是单位面积上功率通量对时间的平均值, 即单位时间、单位面积上通过的辐射能量。将麦克斯威方程解的一些关系 ($I = \bar{S} = \overline{|E \times H|}$; $\sqrt{\epsilon} E = \sqrt{\mu} H$, $|E \times H| = |E| \cdot |H| \sin E \hat{H} = |E||H|$; 取 V/m 和 A/m 为 E 和 H 的单位, 则 $\sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} = 2.65 \times 10^{-3} A/V$) 代入 I 的表达式就得到 (3-4) 式。

由 (3-3a) 和 (3-3b) 可知两束光叠加得到的总强度为:

$$\begin{aligned} I &= \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} |E_1 + E_2|^2 \\ &= \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} [E_0^2 + E_0^2 e^{-i q \cdot (r_1 - r_2)} + E_0^2 e^{i q \cdot (r_1 - r_2)} + E_0^2] \end{aligned} \quad (3-5)$$

将 (3-4) 式及 $q = \frac{2\pi}{\lambda_0} = 2\pi\tilde{\nu}_0$ 关系代入 (3-5) 式, 并取光程差 $S = \frac{1}{q} q \cdot (r_1 - r_2)$, 由三角函数关系式 $\cos x = \frac{1}{2}(e^{ix} + e^{-ix})$ 得:

$$I(S) = 2I_0[1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}_0 S)] \quad (3-6)$$

这是对一条单色光的干涉谱图的解析结果。

必须指出, $I(S)$ 与检测器上信号是不完全相同的, 而是仅与它成比例, 为了讨论上的方便, 比例系数暂不予考虑。显然, 由 (3-6) 式可得, 当 $S = n\lambda_0$ 时, I 有极大值, $I_{\max} = 4I_0$; 当 $S = \left(n + \frac{1}{2}\right)\lambda_0$ 时, I 有极小值, $I_{\min} = 0$, 正说明干涉的明暗条纹, (3-6) 式的解析结果和实验结果是一致的。

现在来考虑频率分别为 $\tilde{\nu}_1$ 和 $\tilde{\nu}_2$ 的两条窄线, 得到的干涉图 [图 3-4 (b)] 是两条线的两个干涉图的叠加。此时

$$I(S) = 2I_1[1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}_1 S)] + 2I_2[1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}_2 S)] \quad (3-7)$$

若 $I_1 = I_2 = I$, 则用三角和差化积运算整理后得:

$$I(S) = 4I \left[1 + \cos\left(2\pi\frac{\tilde{\nu}_1 - \tilde{\nu}_2}{2} S\right) \cdot \cos\left(2\pi\frac{\tilde{\nu}_1 + \tilde{\nu}_2}{2} S\right) \right] \quad (3-8)$$

式中第一个 \cos 因子表示拍频 $\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{2}(\tilde{\nu}_1 - \tilde{\nu}_2)$ 下的振动，第二个因子表示在平均频率 $\tilde{\nu} = \frac{1}{2}(\tilde{\nu}_1 + \tilde{\nu}_2)$ 下的振动。两个频率的和可从极大值之间的光程差 ΔS 求出，两个频率的差可以从拍频图样的极大值和极小值之间的光程差求出。有了 $(\tilde{\nu}_1 + \tilde{\nu}_2)$ 和 $(\tilde{\nu}_1 - \tilde{\nu}_2)$ ，就有了足够的条件求出 $\tilde{\nu}_1$ 和 $\tilde{\nu}_2$ 了。

然而这种直接解析干涉谱图的方法，对于多于两条线的情况就不能用了。对于强度不同的三条线，干涉谱图也是单个线干涉谱图的叠加如图 3-4。

$$I(S) = 2 \sum_{n=1}^3 I_n [1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}_n S)] \quad (3-9)$$

还没有一个简单的方法，能从这个干涉谱图求出三条线的频率和强度，即得到光谱 $I(\tilde{\nu})$ 。

我们面临的问题正是怎样由 $I(S)$ 得到 $I(\tilde{\nu})$ ，甚至对于最简单的三条窄线的情况，都没有简单的解。

2. 付里叶变换

将干涉谱 $I(S)$ 变成光谱 $I(\tilde{\nu})$ ，是经过对 $I(S)$ 进行下述处理实现的。为了便于说明这种处理的原理，让我们再回到单色光的情况，由 (3-6) 式从干涉谱图减去平均值 $2I_0$ ，得到振荡的部分：

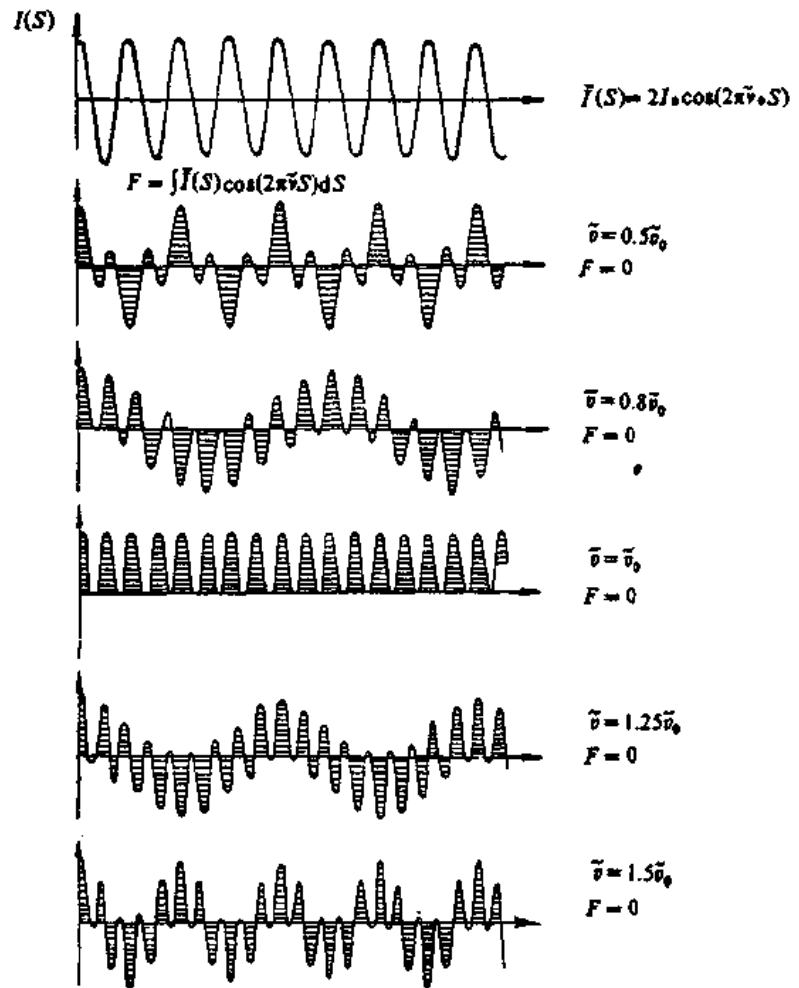


图 3-6 (3-11)式之图示

$$\bar{I}(S) = I(S) - 2I_0 = 2I_0 \cos(2\pi\tilde{\nu}_0 S) \quad (3-10)$$

然后再乘以 $\cos(2\pi\tilde{\nu}S)$ ，其中 $\tilde{\nu}$ 的取值范围是 $0 \leq \tilde{\nu} \leq \infty$ ，这样就得到一些经选择的 $\tilde{\nu}$ 值的 $\bar{I}(S)\cos(2\pi\tilde{\nu}S)$ 对 S 的曲线，除了 $\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_0$ 的情况外，这些曲线下面积之和均等于零（见图 3-6）。这样的面积可以表示为一项积分，利用三角函数形

式 $\int_{-a}^a \cos(mx)\cos(nx)dx = \int_x^{m+n} \frac{m+n}{m-n}$, 它是频率的函数:

$$I(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} \bar{I}(S)\cos(2\pi\tilde{\nu}S)dS = 2I_0 \int_0^{\infty} \cos(2\pi\tilde{\nu}_0 S)\cos(2\pi\tilde{\nu}S)dS$$

$$\rightarrow \begin{cases} = 0, \text{当 } \tilde{\nu} \neq \tilde{\nu}_0 \\ \neq 0, \text{当 } \tilde{\nu} = \tilde{\nu}_0 \end{cases} \quad (3-11)$$

由此就可看出, $I(\nu)$ 是 $\bar{I}(S)$ 的付里叶余弦变换, 并可证明它代表强度的光谱分布。经 (3-11) 式这样的数学处理, 只有 $\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_0$ 时积分才不等于零。也就是说, 这是在一条单线时求出 (3-2) 式中 λ_0 (或 $\tilde{\nu}_0$) 的一种手段。在三条窄线的情况下, $I(\tilde{\nu})$ 只能由这种数学方法求出。这时干涉谱图的振荡部分是:

$$\bar{I}(S) = 2 \sum_{n=1}^3 I_n \cos(2\pi\tilde{\nu}_n S) \quad (3-12)$$

根据(3-11)式,

$$I(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} \bar{I}(S)\cos(2\pi\tilde{\nu}S)dS = \int_{-\infty}^{\infty} \left[2 \sum_{n=1}^3 I_n \cos(2\pi\tilde{\nu}_n S) \right] \cos(2\pi\tilde{\nu}S)dS$$

$$\rightarrow \begin{cases} \neq 0 \sim I_1, \text{当 } \tilde{\nu} = \tilde{\nu}_1 \\ \neq 0 \sim I_2, \text{当 } \tilde{\nu} = \tilde{\nu}_2 \\ \neq 0 \sim I_3, \text{当 } \tilde{\nu} = \tilde{\nu}_3 \\ = 0, \text{当 } \tilde{\nu} \text{取所有其它值} \end{cases} \quad (3-13)$$

这表明, 只有当 $\tilde{\nu}$ 等于 $\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2, \tilde{\nu}_3$ 三者之一时, $I(\tilde{\nu})$ 才不等于零, 并且积分值是正比于该线强度的。因此, $\bar{I}(S)$ 的付里叶变换 $I(\tilde{\nu})$ 就是光源所发射的光的光谱。

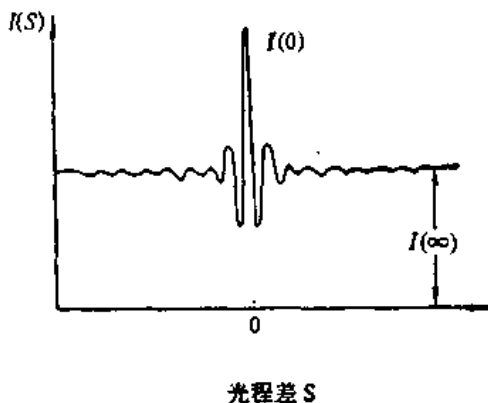


图 3-7 连续光谱的干涉谱图

如果 $I(\tilde{\nu})$ 不是几条分立的窄线, 那末, 用 $I(S)$ 计算成 $I(\tilde{\nu})$ 的手段就只能是付里叶变换了, 这里 $I(S)$ 是双光束迈克尔逊干涉仪所测得的干涉谱。这就是付里叶变换光谱的基本原理。如前所述, 完成付里叶变换对 $I(S)$ 有一定数学要求, 在物理上和实验上合理的干涉谱图 $I(S)$ 均能满足这些要求。

现在来探讨一个连续光谱的干涉谱图。每一强度为 $I(\tilde{\nu})$ 的宽度无限小的光谱单元 $d\tilde{\nu}$ 都能提供和一条窄线一样的干涉图, 因此总的干涉图是所有这些光谱单元干涉谱图的叠加[由(3-6)式和(3-12)式]:

$$I(S) = 2 \int_0^{\infty} I(\bar{\nu}) [1 + \cos(2\pi\bar{\nu}S)] d\bar{\nu} \quad (3-14)$$

得到如图 3-7 所示的干涉谱图，它有如下性质：

- (1) 如果干涉仪两束光光学特性相同，则 $I(S)$ 对于 $S=0$ 是对称的。
- (2) 在一定的光程差 S_c 之外，($S > S_c$)，干涉谱图是不变的， $I(S) = I(\infty)$ ，此时干涉谱图与光程差就没有关系了。

(3) 在 $S=0$ 处，产生主中心峰，即所有波长的光均在这里发生相长干涉。

如同(3-11)式一样，实际应用时，付里叶变换也只需振荡的那一部分：

$$\bar{I}(S) = I(S) - \frac{1}{2} I(0) = I(S) - I(\infty) = 2 \int_0^{\infty} I(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu}S) d\bar{\nu} \quad (3-15)$$

如果实验上能得到所有 S 值的 $I(S)$ ，则付里叶变换的结果是

$$\bar{I}(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} \bar{I}(S) \cos(2\pi\bar{\nu}S) dS = 2 \int_0^{\infty} \bar{I}(S) \cos(2\pi\bar{\nu}S) dS \quad (3-16)$$

综上所述的结果，可把付里叶变换归结为下述一般步骤：当干涉仪动镜作匀速位移时，等间隔采样，记录 $I(S)$ 值；测定光程差 $S=0$ 时的 $I(0)$ ；将 $\left[I(S) - \frac{1}{2} I(0) \right]$ 代入 (3-16) 式中的 $\bar{I}(S)$ ，对选定的一个频率（波长）积分；对每一频率（波长）完成 (3-16) 式的积分，得到 $I(\bar{\nu})$ 曲线，即为光谱。

三、付里叶变换光谱的特点

由于单色器采用的是迈克尔逊干涉仪，获取的是干涉图谱信号，因此与棱镜、光栅作为单色器的色散型光谱仪相比较，具有很多优点：

1. 光谱测量速度快

在色散型仪器中，由于检测器不能响应入射光的频率，只能响应它的强度，因此需要把入射的复合光用单色器分解成若干个 M 小的分辨单元来测定。但是对于干涉仪来说，入射光可以被调制成交变信号，检测器既可接收强度信号，又可接收频率信号，这样入射光的所有波长的光信号可同时落在检测器上。同一个时间内，在色散型仪器中只检测一个 M 分辨单元信号，而在干涉仪中可完成一项完整的光谱测量。所以在相同信噪比的条件下，付里叶变换光谱测量时间仅是色散型光谱的 M 分之一。也就是说在同一时间内付里叶变换光谱仪的信噪比要比色散型光谱仪的信噪比大。这一特点也称多路传输优点或称费尔杰特优点。

信噪比的改善与检测器的特性有关，一般要求检测器的噪声不随水平信号增加而增高。红外检测器符合这一要求，而光电管和光电倍增管不具有这一特性，这似乎是付里叶变换方法用于紫外及可见区的一项难题。

2. 光通量大

常规的红外分光光度计由于受到狭缝的限制，到达检测器上的辐射能量非常有限，光能的利用率极低。对于付里叶变换光谱仪来说，没有狭缝的限制，到达检测器的辐射

能量较大，在同样分辨率的情况下，其辐射能量要比色散型仪器大得多，从而使检测器接收到的信号和信噪比要大的多，因此具有较高的灵敏度。它不仅能做弱能量远红外光谱测定，也可以测定样品的反射光谱等。这一特点也称杰基诺特优点。

3. 波数准确度高

干涉仪器有一个运动部分，即动镜部分，它是在无阻力的特殊支承体系上滑动，其运动速度被高度稳定的氦-氖激光器所监测，因此波数的准确性和重复性都比常规分光光度计要高。这个特点也称为康纳斯优点。

4. 杂散光低

由于动镜以某一固定速度移动，可以将高频入射光调制成音频信号，同频率调制其它外来光源可能性很小，因此可把外来杂散光当作直流信号处理，在整个光谱范围内杂散光低于 0.05%。

5. 可降低样品发射效应

因为仪器中干涉仪位于光源和样品之间，一方面光束分裂器遮挡了来自光源的辐射，对热敏感的样品可保持原状，另一方面干涉仪也相当于一个位于样品前的辐射斩波器，样品本身发出的光不会被调制成音频信号，它与杂散光一样不会被检测器检测。

6. 可测光谱范围宽

在 $5\ 000\sim 400\text{cm}^{-1}$ 区域内，不需更换任何光学元件，就可一次性完成全过程测定，若简单更换光源、光束分裂器和检测器，通常可使测量范围延伸到 $2\ 500\sim 10\text{cm}^{-1}$ 范围。

7. 适用微小试样研究

由于付里叶变换红外光谱引入激光光源作参比准直光源，这样整个光源光束截面积甚小，约 1mm 左右，因此可以不用借助显微镜和聚光器等特殊装置，即可研究单晶、单纤维一类物质，对于微量及痕量分析这一点甚为重要。同时这一特点为推进红外显微技术的发展及与其它相关技术联用提供更加便利的条件。

第四节 红外分光光度计

红外分光光度计根据结构也可采用单光束和双光束两种。根据原理可分为色散型红外光谱仪、付里叶变换红外光谱仪、喇曼激光红外光谱仪。近几年市场上主要以付里叶变换红外光谱仪为主。如图 3-8 为美国尼高力公司 5DXB 系列付里叶红外光谱仪光路图。

分光光度计主要组件有：

一、光源

红外光源按照区域可选用不同光源：

1. 近红外区 $10\ 000\sim 5\ 000\text{cm}^{-1}$ 可选用碘钨灯。
2. 中红外区 $5\ 000\sim 400\text{cm}^{-1}$ ，可选用能斯特灯、硅碳棒、炽热镍铬丝圈。

能斯特灯是一个直径为 1~2mm，长约 20mm 的稀土氧化物做成的圆柱体细棒。棒两端封接有铂导线以便让电流通过。由于具有较大的电阻负温度系数，因此工作时必

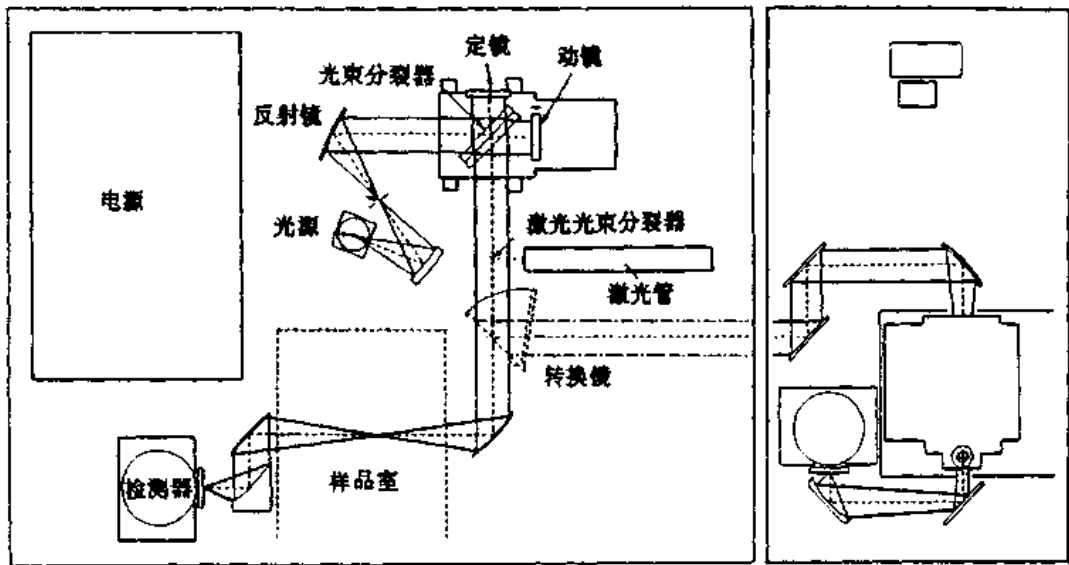


图 3-8 尼高力 5DXB 付里叶红外光谱光路图

须预热，温度达 700°C 以上变成导体，然后才能有足够的电流通过而燃亮并保持其所需的温度。因为电阻随温度升高而减小，因此光源必须有限流装置，否则灯将很快烧毁。灯的寿命一般为 2 000h。发光强度较高，高于同温度下的硅碳棒，其机械强度较差，易断裂，使用时要防震。

硅碳棒长约 5cm，直径为 0.5cm，由硅碳砂加压锻烧制成。电加热，有正电阻系数，电接点需水冷防止打弧。它具有发光面积大、坚固、寿命长、工作前勿需预热等特点。

炽热镍铬丝圈不需预热，低压即可点亮，工作寿命 1 000h。

3. 远红外区小于 400cm^{-1} 采用高压汞灯。高压汞灯是一种等离子体辐射源，它所产生的辐射主要来自电子和中性原子的碰撞。在长波区它的发射强度与同温度的黑体辐射基本相同，在短波区远小于同温度黑体辐射。因此它特别适用于 300cm^{-1} 以下远红外区。由于其工作温度较高，需配备水冷装置。

二、透光材料

由于玻璃等透明物质对红外光有吸收，因此红外分光光度计所用的透光材料包括棱镜、透镜、样品池、密封用窗片等要有较好的红外透光性能，很多金属盐类具有较好的红外透光性能，但这些盐类物质水溶性较好，易吸潮，因此红外透光材料在使用过程中需要恒温、干燥的环境条件。部分常见红外光学材料特性见表 3-2。

三、光束分裂器

光束分裂器是一张半透膜，理想的分束器应使入射光一半透过，一半反射。但任一物质都不可能对所有波长的红外光具有相同的透射和反射能力，因此在不同的金属盐类等衬板材料上涂敷另一种金属化合物膜。在中红外区采用锆膜；近红外区用三氧化二铁

或硅膜；远红外区用苯二甲酸乙二醇酯一类涤纶膜。

表 3-2 红外光学材料性能

材 料	适宜范围(cm^{-1})	理化性质
石 英 SiO_2	10 300~2 800	耐水、硬
氯化钠 NaCl	5 000~625	溶于水、硬、易加工
溴化钾 KBr	4 000~400	溶于水、比氯化钠软、易加工
氟化钙 CaF_2	4 200~1 000	耐水、溶于铵盐、硬
碘化铯 CsI_2	10 000~200	易溶于水、软
溴碘化铯 KRS-5	5 000~250	耐水、有毒、溶于碱、不溶于酸
聚乙烯 高密	625~10	耐水

四、检测器

红外光谱检测器要求具有既能响应入射光的强度，又能响应入射光的频率，因此它多采用响应快、探测率高、噪音低的热释电型和光电型检测器。

1. 硫酸三甘肽 (TGS) 检测器

此检测器是由无色、无溴化合物材料制成，化学式为 $(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ 。它是一种利用热释电方式检测信号，即当它吸收辐射后温度升高，偶极矩也随之发生变化。但 TGS 材料表面产生的电荷分布是比较稳定的，它不能对内偶极矩的突然变化迅速发生响应，这样一些杂散电荷和极化引起的表面电荷不能相互抵消，产生一个明显的外电场。利用上述特性可探测光辐射能量。常温下 TGS 易潮解，通常是密封在一小舱中使用。

2. 汞镉 (MCT) 检测器

汞镉检测器是用半导体碲化镉和化合物碲化汞混合制成，这种检测器可以利用入射光的光能与检测材料中的电子能态作用产生载流子的特性或利用由于有不均匀的半导体受光照时，在某一位置产生电位差输出信号的特性，对光波的响应速度极快，因此它的灵敏度很高，比 TGS 要大 10 倍。该检测器在液氮下工作。

五、参比干涉仪

在付里叶变换光谱仪中为了提高仪器的测量准确性，通常要引入两个参比干涉仪。

1. He-Ne 激光参比干涉仪

如何让迈克尔逊干涉仪的动镜等间隔位移采样，使计算机准确地进行干涉图数字化变换处理，需引入一个 He-Ne 激光器作参比干涉仪。通常这个参比干涉仪与主干涉仪共用一个动镜，并用一个硅光电二极管作检测器。由于激光波长是固定的单色光，波长为 632.8nm，它经干涉仪调制后将得到一条呈余弦曲线的干涉图，如图 3-9，当对样品进行扫描时，可用这个余弦干涉图来监测，在参比干涉图通过零点时，经过一个触发器对样品干涉图进行采样。

此参比干涉仪可用来监视动镜的速度和决定动镜在扫描过程中的运动距离。扫描时，动镜应该非常平稳，速度均一，否则光谱噪声增加，图谱变形。

2. 白光参比干涉仪

在进行多次扫描采集数据时，He-Ne 激光参比干涉仪不能使每个干涉图的第一个数据点都在动镜同一位置处收集。因此在主干涉仪中必须设第二个参比干涉仪即白光干涉仪。它也与主干涉仪共用一个动镜，可用钨灯光源，也可采用自然光，单独用锗光电二极管作检测器。由于白光是复合光，它的干涉图特征是有一个最高峰，如图 3-9。当该峰出现时，可开始进行数据采集，这样可保证每次扫描获得的干涉图都在同一起始点进行累加。

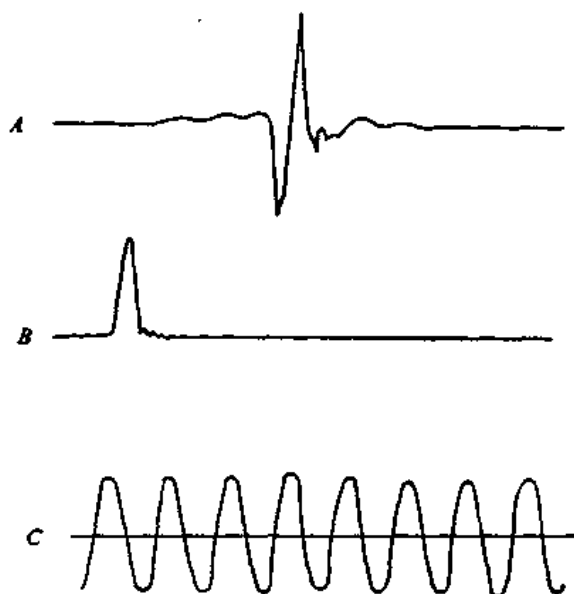


图 3-9 FTIR 三个干涉图

A. 样品干涉图 B. 白光干涉图 C. 激光干涉图

所以在付里叶变换红外光谱仪中，一般是两个干涉仪，同时获取三个干涉图：样品干涉图、激光（单色光）干涉图、白光干涉图见图 3-9。

第五节 红外光谱样品制备技术

要想得到一张很好的红外光谱图，样品制备是很重要的。进行红外测定的样品一般要求：

1. 样品纯度越高越好，至少其组分不应超过 2~3 个。多组分样品必须预先用物理或化学法如蒸馏、重结晶、萃取、渗析、层析、离心等方式分离纯化，有条件可采用仪器法分离制备或直接采用联机技术获取，否则复杂组分的光谱互相重叠，图谱难于解析。

2. 对样品的理化性质、来源、结构类型必须有初步了解，以便采取适当的制备方法。

3. 样品必须预先除去游离水，避免水对样品图的影响和对吸收池窗片的腐蚀。

一、气态样品制备技术

分子气态密度较小，分子间距离较远，相互作用较弱。因而气态、液态和固态的红外光谱有明显不同，它常常只有几个吸收峰，每个吸收峰由几个尖峰组成。分子在气态

时所需气体体积相应地比液体大，故需要特殊的样品吸收池，即长光程气体吸收池。它是用玻璃管或有机玻璃作主体，池身装有两个活塞以便灌注气体，吸收池两端装有红外透光窗片。其结构如图 3-10。

在进行气体测定时，下列几点必须加以注意：

1. 水蒸汽在中红外区有着大量的吸收峰，因此样品在注入气体吸收池前需保证干燥，以免干扰样品谱图，并可使窗片不受水汽腐蚀。

2. 样品测定后应用干燥的气流连续洗涤气槽，以免影响下次测定结果。

3. 由于振动转动吸收峰的强度不仅和气体样品的分压有关，而且和它的总压有关，所以在定量分析时，一定要保证总压相等，必要时可补充灌注在红外区无吸收的惰性气体如氮气、氩气等使总压相等。如果气体样品的总压低时，用简单的水银压力计即可精确记录气体的总压。

二、液态样品制备技术

化合物本身为液体或一些固体需要以溶液形态进行测定的均可用这个方法，对于一些吸收峰很强的液体，如果用调节厚度方法仍不能得到满意的图谱，往往需要将溶液稀释后，再用此法进行测定。

液体或溶液样品的红外光谱测定常在液槽中进行。液槽的结构大同小异，都是由槽架、窗片、铅（或聚四氟乙烯）垫片以及橡胶垫组成的。将中间夹有垫片的两片红外透光窗片放在金属框架上用螺丝固定，在一块窗片上钻有小孔与垫片之间相通，以便灌注样品，垫片用来限制光程长短和样品的体积，垫片的厚度有 0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0mm。常用的液槽有：可拆式液槽、固定式液槽和可调厚度液槽。如图 3-11 为固定式液槽结构示意图。

使用液体槽应注意所用的溶剂必须预先脱水，以防窗片受腐蚀，脱水可用无水硫酸钠，分子筛或在溶剂中加入过量的 KBr，并在红外分光光度计上检查后，再放在干燥器中保存备用。

所用溶液法测定必须选择适当的溶剂，一般说来作为红外测定用溶剂的要求是能透过红外光；对溶质应有较大的溶解度；与溶质不发生强的溶剂效应，且不发生反应；对窗片不腐蚀；毒性小。原则上分子简单，极性小的物质均可作为红外样品溶剂，常用溶剂有二氯乙烷、三氯甲烷、四氯乙烯、二硫化碳、四氯化碳、环己烷等。

液体池窗片在使用一段时间后，表面因吸水潮解透明度下降，透光性能下降，这时应对窗片进行抛光处理。

抛光窗片时，先在砧面上撒上一些抛光粉（可用粒度为微米级的 Fe_2O_3 粉），滴上数滴甲醇，使成浆状，然后将欲抛光的窗片置于毛玻璃上作圆周运动研磨，当甲醇将要干时，迅速地将窗片沿着砧面移出，并在鹿皮上摩擦即可得一透明的窗片。照此法再抛

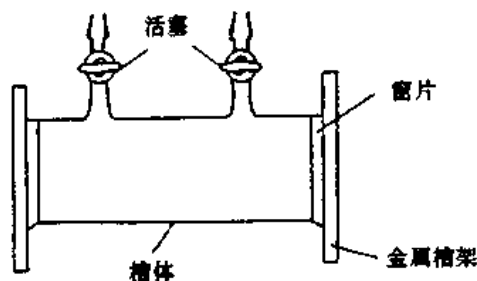


图 3-10 气体吸收池结构示意图

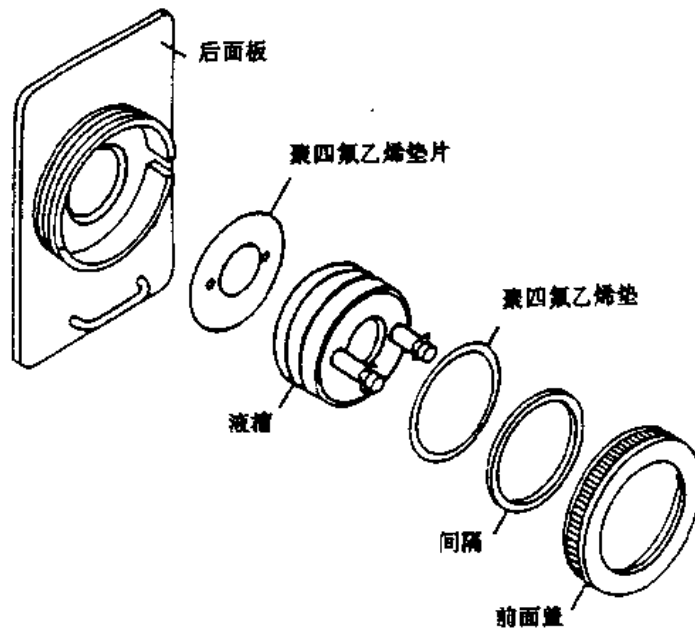


图 3-11 固定式液槽构造示意图

光窗片的另一面。

三、固态样品制备技术

1. 研糊法

研糊法的制样过程是将 2~3mg 干燥样品在玛瑙研钵中研磨数分钟后，滴加少量糊剂到研钵中继续研磨直到样品的混合物呈浆糊状，然后将糊状物均匀地涂在可拆液槽的一块窗片上，再盖上另一窗片即可进行测定。

用研糊法测定一般要求颗粒要小至 $2\mu\text{m}$ ，因为这样可消除或削弱由于氧化及取向效应引起吸收峰位置的移动。制样时可先将样品溶于挥发性溶剂中研磨到需要的粒度，待溶剂挥发后，再加糊剂研磨。对于具有韧性的物质，则可置于干冰或液氮中冷冻使其变脆后，再研磨成粉末。但用此法粉碎样品时，大气中的水汽将会冷凝下来，所以在加糊剂前，样品必须预先烘干。

如果样品在研磨过程中发生分解，则不宜使用研糊法制样。研糊法由于厚度难以掌握，所以不适宜样品的定量分析。

2. 压片法

这个方法是把固体分散在碱金属卤化物中压成透明薄片，然后直接进行测定，用这个方法可减少粒子的散射影响。

压片法的优点是：无介质的干扰，故测定一次可得完整图谱；制备样品方法简单、方便；压片便于保存或回收；散射光影响小。

在压片法中常用的碱金属卤化物有 KBr, NaCl, KCl, KI, AgCl 等, 也有人用聚四氟乙烯或聚乙烯 (在远红外区), 这些固体介质在加压后易形成透明的薄片, 在中红外区均无吸收, 而且具有高的化学稳定性。

供压片用的 KBr 的纯度级别需达到光谱纯, 分析纯的 KBr 经过 1~2 次重结晶后再用, 废旧的窗片或裁制窗片剩下的边角料经粉碎后也可以用, KBr 粉末应预先在玛瑙研钵中研磨, 通过 200 目筛孔 (约 $2\mu\text{m}$), 然后在 $120\sim 150^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干约一天, 或在 200°C 高温炉中烘数小时, 并用瓶装, 贮藏于干燥器中备用。由于 KBr 粉末极易吸湿, 每次制样前需在红外灯下烘一段时间后再用, 如果空气湿度大于 70%, 则制样最好在干燥箱中进行。

样品 1~2mg 与 100~200mg 的 KBr 粉末直接混匀研磨, 对于难研磨的样品可预先溶解在溶剂中, 然后与 KBr 粉末混磨, 直到溶剂挥发干为止, 但后一方法必须将溶剂清除干净, 否则将给解释图谱带来困难。

压片用的模具是由模砧、模膛、底模、底座及柱塞组成, 压片模具的构造如图 3-12 所示。

压片前先将模砧、底模装在底座上, 然后将样品 KBr 粉末用平头不锈钢铲转移到模膛中的底模上, 用小毛刷小心将粉末铺平, 中心部分略高些, 然后将顶模轻轻放入, 慢慢捻动后再放上柱塞, 将压模放在油压机上用真空泵抽真空 1~2min, 抽去混在样品中的空气以提高压片的透过率, 然后逐渐加压 10T (总压) 保持 5min, 缓慢降压后取下压模, 将底模取出放在另一底座上, 再用柱塞在油压机上将底模顶出, 用镊子或用带橡胶的手套将压片取出, 同时用同样方法制备一纯 KBr 片, 作为参比用于补偿光路中水蒸汽和 CO_2 的干扰。

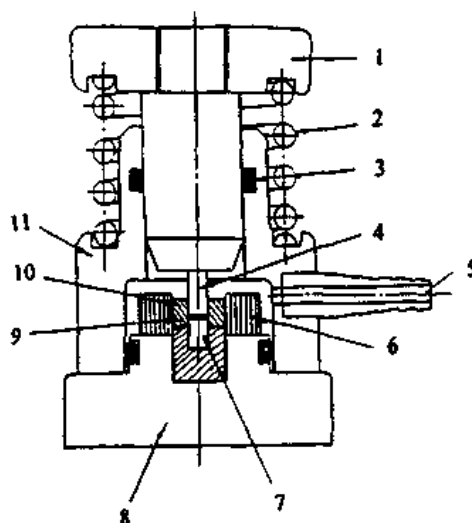


图 3-12 压片的模具构造示意图

1. 压杆 2. 弹簧 3. 橡皮垫圈 4. 顶模 5. 抽气口
6. 片框 7. 底模 8. 底座 9. 样品 10. 微压片框 11. 顶盖

采用 KBr 压片法应注意以下几点: (1) 碱金属卤化物易吸湿, 在 3400cm^{-1} 和 1640cm^{-1} 区常有干扰, 故在解释 O-H, N-H 基团时应小心区别, 如果用聚四氟乙烯作为介质, 因它极易干燥而且可压成很薄薄片, 则可以避免水分的干扰, (2) 碱金属卤化物会与有些样品发生离子交换, 产生相应的杂质吸收峰, (3) 有些样品在压片过程中发生物理或化学变化, 使图谱出现差异, (4) 固体样品由于晶形不同, 其红外光谱也不相同。

因此对一些无机化合物、糖、固态有机酸、固态酚、胺、亚胺、胺盐、酰胺等化合

物用 KBr 压片法制备样品不一定合适。

3. 薄膜法

该法操作简便，也是常用的固体制样方法，一般制备薄膜的方法有：(1) 对于熔点低的物质可直接放在 KBr 窗片上，然后涂制或压制成膜，用此法溶样时可用红外灯加热熔融或用电吹风（热）来加热，但需注意加热温度不宜过高，以免样品发生升华、分解或导致窗片破裂。(2) 有些固体样品可选择适当挥发性溶剂溶解后将溶液滴加于窗片上，挥去溶剂则形成薄膜，注意务必溶剂除尽，否则对测定有影响。(3) 粘性较大的一些物质或土壤悬浮胶体等可将它们涂在表面平滑的金属板、玻璃板或塑料板上，待其自然干燥，成膜，可用平头铲或刮刀片将膜揭下直接测定，用此种方法制膜厚度难以控制，且形成的膜常常是中间薄边缘厚，有时揭膜难成整体。(4) 生物材料、塑料等也可用微切片技术制成膜片。

薄膜法常用于生化样品的红外测定，如蛋白质、多肽和多糖的结构分析。一些物质如蛋白质和粘多糖的水溶液常常放在 AgCl 窗片上，KRS-5 片也可用。

四、多重衰减全反射 (ATR) 技术

近年来由于引用了反射光谱技术使得一些吸收特别强的物质或不透明的物质，如粉末、糊状、不透明的表层涂层物、橡胶及生物组织切片，纤维等也都可以用红外光谱进行定性、定量分析。

多重衰减全反射如图 3-13 所示，当红外光照射到晶体片上时，如果晶体和样品的界面入射角大于临界角（折射率的函数），则此束光线将完全从界面上反射，如果与晶体表面接触的样品对此光线有选择吸收时，使得反射光强度被衰减，当用分光光度计测定这些衰减的吸收并以波长为函数作图时，便可得到物质的吸收光谱。

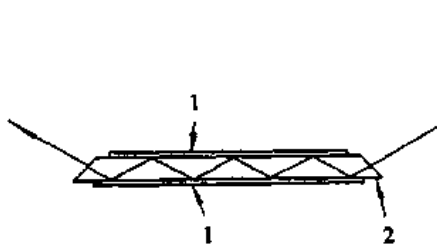


图 3-13 多重衰减全反射晶体

1. 样品薄片 2. 全反射晶体(KRS-5, Ge, AgCl 等)

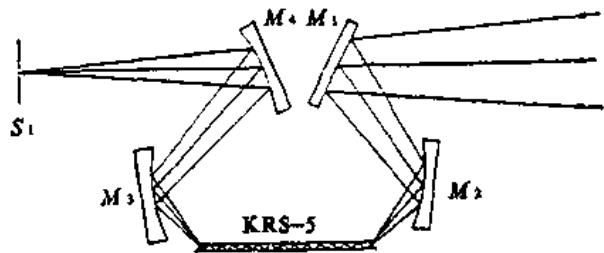


图 3-14 多重衰减全反射装置

M_1 平面镜 M_2, M_3, M_4 球面镜 S_1 入口狭缝

一次反射能量的变化相当小，因此所产生的吸收谱带很弱，但是如果增加了反射的次数，则增加了光的吸收，使反射的吸收谱带增强，这与透射吸收池增加光程的原理是相似的，因此多重衰减全反射可以用来测定一些吸收很弱的样品。多重衰减全反射装置如图 3-14。

第六节 定性分析

各种化合物结构不同，分子振动时在红外区各有其独特的吸收光谱，分子振动光谱的吸收峰位置和强度取决于各基团的振动频率和相邻基团的影响，红外光谱具有如同指纹一样的特征性，因此它不仅可以区分由不同原子和化学键所组成的物质，而且还可以识别各种同分异构体如链异构、位异构、顺反异构、固体多晶异构等，依据这些特性可进行定性分析。

一、官能团的红外特征性

各种官能团的红外吸收谱带均在一定波数范围内出现，因而具有一定的特征性，也就被称为特征吸收谱带，最大吸收峰所在位置称为特征频率，根据这些可以确定某官能团的存在与否。

1. 在 $4000 \sim 1300\text{cm}^{-1}$ ($2.5 \sim 7.7\mu$) 区域内有氢原子单键 X-H (X 为 O、N、C、S 等) 的伸缩振动，各种双键、叁键的伸展振动，在这个区域中羰基峰很少与其它峰重叠，谱带强度很强，是最易识别的吸收峰。

2. $1300 \sim 400\text{cm}^{-1}$ ($7.7 \sim 25\mu$) 被称为指纹区，这个区的能量比特征区低，各种单键的伸缩振动及多数基团的弯曲振动均出现在这一区域。由于各种单键的强度大致相同，且在分子中常以 C-C-C-C... 的方式连结在一起，这样引起单键之间相互作用和对分子结构细微变化的高度敏感性，且弯曲振动的能级差别小，因此，这一区域谱带一般比较密集，故称为指纹区。

3. 已知分子量可求化学式并求不饱和度，由不饱和度可推出化合物可能结构范围。

$$\text{不饱和度} = 1 + n_4 + \frac{1}{2}(n_3 - n_1) \quad (3-17)$$

n_1 、 n_3 、 n_4 分别为分子中一价、三价、四价原子的数目。

规定 C=C、C=O、饱和环状结构的不饱和度为 1，C≡C、C≡N 的不饱和度为 2，苯环的不饱和度为 4。

例：分子式 $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ 在红外光谱有羰基吸收峰且有双键，

$$\text{不饱和度} = 1 + 6 + \frac{1}{2}(0 - 6) = 4, \text{ 结构为 } \text{O} = \text{C}_6\text{H}_4 = \text{O}$$

4. 从官能团判断化合物类别、结构。

如： $3750 \sim 3000\text{cm}^{-1}$ 有 O-H、N-H 伸缩振动。

$3300 \sim 2900\text{cm}^{-1}$ 有 -C≡C-H、C=C、Ar-H(C-H) 伸缩振动。

$3000 \sim 2700\text{cm}^{-1}$ 有 CH_3 -、 $-\text{CH}_2$ -、C-H、 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \text{H} \end{array}$ 伸缩振动。

$2400 \sim 2100\text{cm}^{-1}$ 有 C≡C、C≡N 伸缩振动。

1 900~1 650 cm^{-1} 有 C=O 酸、醛、酮、酰胺、酯、酸酐伸缩振动。

1 675~1 500 cm^{-1} 有 C=C 脂肪族和芳香族、C=N 伸缩振动。

1 475~1 300 cm^{-1} 有 C-H 弯曲振动。

1 000~650 cm^{-1} 有 C=C-H, Ar-H 弯曲振动面外。

为了便于记忆, 可将整个红外区划分四个区:

(1) 4 000~2 500 cm^{-1} X-H 伸缩振动区。

(2) 2 500~2 000 cm^{-1} 叁键和累积双键区。

(3) 2 000~1 500 cm^{-1} 双键伸缩振动区。

(4) 1 500~670 cm^{-1} C-H、O-H 变角振动、C-O、C-N、C-X 的伸缩振动。

第一区中:

O-H 伸缩振动是判断有无醇、酚和有机酸类以及 H_2O 的主要依据。

C-H 伸缩振动以 3 000 cm^{-1} 为分界线来区别饱和与不饱和碳氢化合物。

N-H 伸缩振动, 伯、仲酰胺和伯仲胺类化合物在此处均有吸收。

第二区中:

该区红外谱带较少, $\text{C}\equiv\text{C}$ 、 $\text{C}\equiv\text{N}$ 伸缩振动和 $\text{C}=\text{C}$ 、 $\text{C}=\text{C}=\text{O}$ 等反对称伸缩振动在此区有明显的特征峰。

第三区中:

该区主要包括 C=O、C=C、C=N、 $-\text{NO}_2$ 等的伸缩振动, 苯环的骨架振动, 芳香族化合物在此区有明显的特征峰。

C=O 的伸缩振动使所有羰基化合物 (酮、醛、羧酸、酯、酰卤、酸酐...) 在 1 600~1 900 cm^{-1} 区域有非常强的吸收峰, 因此 C=O 的伸缩振动吸收带是判断有无羰基化合物存在的重要依据。另外 C=O 伸缩振动吸收峰的位置与邻近基团有密切关系, 对结构分析很有价值。C=C 伸

缩振动一般在 1 600~1 660 cm^{-1} 区域产生强度较弱的吸收峰, 只有当双键两端的 C 原子上所邻接的基团差别较大时, 双键的伸缩振动强度增大, 如正己烯 $\text{H}_2\text{C}=\text{HC}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 中 C=C 峰很强。

单核芳烃的 C=C 伸缩振动在 1 500~1 450 cm^{-1} 和 1 600~1 590 cm^{-1} 这两个峰是鉴别有无苯核存在的标志之一。通常 1 600 cm^{-1} 峰较弱, 1 500 cm^{-1} 峰

较强。苯的衍生物在 2 000~1 667 cm^{-1} 出现 C-H 面外弯曲振动, 强度很弱的吸收峰, 而其吸收峰数目和形状与芳核取代类型有关。利用这个区域吸收峰和 900~600 cm^{-1} 内苯环的 C-H 面外弯曲振动吸收峰共同确定苯环的取代类型是很方便的。如图 3-15。

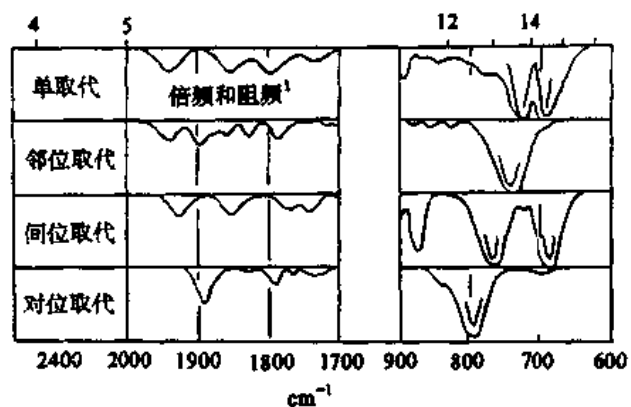


图 3-15 苯的不同取代基的特征谱图

第四区中:

这个区振动形式很多,光谱较复杂,除少数较强特征峰外,一般难以解析。这里给出几个主要吸收峰: CH_3 、 CH_2 、饱和 C-H 弯曲振动($1370\sim 1380\text{cm}^{-1}$ 对称变形), 在 722cm^{-1} 处随着相连 CH_2 个数减少, 吸收向高波数位移, 由此可观察分子链长短。

烯烃的弯曲振动, 在 $1000\sim 800\text{cm}^{-1}$ 对结构分析很有价值, 尤其对合成橡胶 1,4 顺反结构确定。

在 $900\sim 650\text{cm}^{-1}$ 可就芳烃的 C-H 弯曲振动确定苯环的取代类型, 甚至可以对苯环的邻、间和对位异构体的混合物进行定量分析。

二、光谱解析程序

红外光谱定性分析方法, 主要是靠积累经验, 通常是先特征区, 后指纹区; 先强峰, 后弱峰; 先否定后肯定。

在特征频率区 $4000\sim 1300\text{cm}^{-1}$ 时:

1. 先确定 C-H 振动是否存在及类型, C-H 振动在 $3000\sim 2800\text{cm}^{-1}$ 区间内, 此区有吸收峰, 则分子为有机化合物的可能性大。

如吸收频率大于 3000cm^{-1} , 则说明分子中有不饱和碳原子存在, 或样品是高卤代烷或环烷。如吸收频率小于 3000cm^{-1} , 说明分子中碳原子是饱和的, 如两者均有, 则说明分子中即有饱和碳原子也有不饱和碳原子。在 1460cm^{-1} 处有吸收峰, 表明分子中有 CH_3 或 CH_2 。 1380cm^{-1} 有吸收峰, 则表明有 C- CH_3 , 并根据峰形可判断分子的分支情况, 例: 乙基、丙基、异丙基、丁基。

在 725cm^{-1} 有中强度吸收峰, 可推测分子中有直链存在, 且 CH_2 的数目大于 4 个以上。

2. 确定化合物可能存在的类型

查出 $3200\sim 1300\text{cm}^{-1}$ 区最强的吸收峰, 然后再找出中强峰分析。 1740cm^{-1} 有强吸收峰, 证明羰基存在。 $1600\sim 1500\text{cm}^{-1}$ 有中等强度吸收峰, 有芳烃存在。

若 $1650\sim 1610\text{cm}^{-1}$ 有中等强度的吸收峰, 有烯烃。若 C=C 键位于分子对称中心, 在该区无吸收峰。在 2210cm^{-1} 有弱吸收峰或在 2190cm^{-1} 、 2115cm^{-1} 有中强吸收峰出现时, 分子为炔烃类。如 C \equiv C 位于结构对称中心, 此区无吸收。

如谱图只有 CH_2 无 C- CH_3 的特征吸收, 可能为脂环族化合物。只有 CH_2 、 CH_3 而无芳烃、烯烃、炔烃吸收, 为脂肪族饱和烃。如在谱图只有少数几个宽峰, 无 C-H 吸收, 多数为无机化合物。

在指纹区 $1300\sim 650\text{cm}^{-1}$ 时:

从最强峰到中强峰顺序分析, 并根据特征区查出的基团, 用指纹区的吸收情况进一步讨论该基团的存在与否, 及与其它基团结合的方式。

在解释图谱时注意:

(1) 图谱中的吸收峰往往不可能全部解释, 尤其是指纹区, 由于某些峰是分子整体吸收, 有些是某峰的倍频或组频, 而某些是几个基团振动吸收的叠加, 所以在解析时应注意其它基团的吸收干扰。

(2) 采取先否定的办法。

(3) 在 3350cm^{-1} , 1640cm^{-1} 处的吸收峰可能为样品中水的吸收。大气中的 CO_2 在 2350cm^{-1} , 667cm^{-1} 有吸收。

(4) 聚合物通常只有几个宽的弱吸收峰。

例題，推断分子式 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$ (无色液体) 化合物结构。图谱见图 3-16。

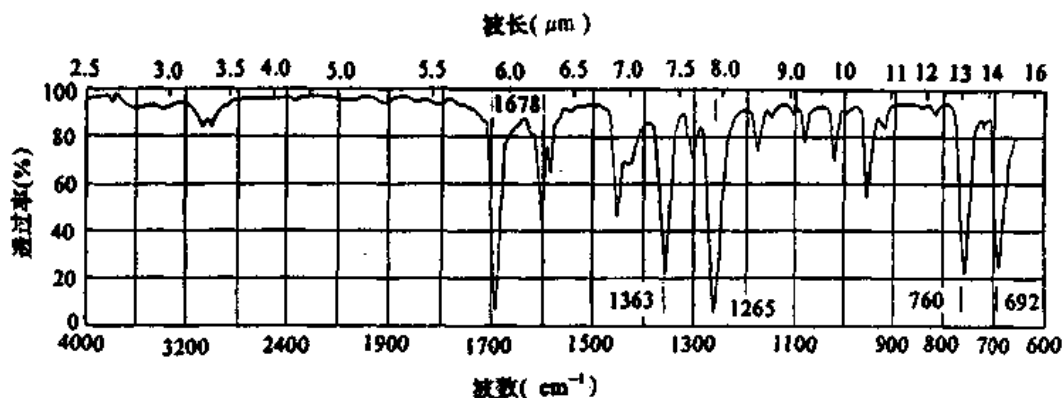
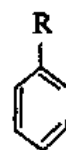


图 3-16 红外光谱

$$\text{不饱和度} = 1 + 8 + \frac{1}{2}(0 - 8) = 5$$

归属: $3100 \sim 3000\text{cm}^{-1}$ C-H 不饱和
 1600cm^{-1} } C=C 芳香
 1580cm^{-1} }
 1480cm^{-1} }
 760cm^{-1} } C-H 芳香单取代
 690cm^{-1} }

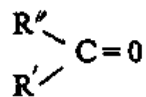
结构 不饱和度



4

C_6H_5

1695cm^{-1} C=O 酮



1

CO

$3000 \sim 2900\text{cm}^{-1}$ C-H 饱和 }
 1360cm^{-1} CHCH₃ }

-CH₃

0

CH₃

C=O 共轭强度增加

根据对图谱的解析有苯环和单取代苯吸收、因 C=O 与苯环共轭，所以结构可能为：苯乙酮。

第七节 定量分析

红外光谱法的定量分析的主要依据也是比耳定律，在此基础上大多是借助测定吸收峰处的吸光值来进行，峰高法中基线法是最常用的一种，目前红外计算机图谱检索及定量分析也多采用此种方法。基线法如图 3-17A。

画一条与吸收峰拐点 (为该峰透过率最大处) 相切的 KL 线作为基线，如果通过分

析波数 ν_0 的垂线和该基线相交于 M 点, 则用基线法测得峰顶 N 处的吸光度为

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad (3-18)$$

式中 I_0 和 I 分别是 M 和 N 处的透过率。由此可知, 所谓基线法, 实际上就是用基线来表示该分析峰不存在时的背景吸收线, 并用它来代替记录纸上的 100% (透过) 坐标。在作基线时应该根据具体情况十分谨慎地进行, 一般说来, 基线可有以下几种画法:

(1) 如果分析峰不受其它峰干扰, 则可作如图 3-18 中的 1 线为基线, 即作一直线和峰的两拐点相切。

(2) 如果分析峰受到近旁峰的干扰, 则可作单点水平切线为基线, 如图 3-17 中的 2 线。

(3) 如果干扰峰和分析峰紧靠在一起, 但是它们的影响实际上是恒定的, 也就是说, 当浓度变化时, 干扰峰的峰肩位置变化不是太厉害, 则可以采用图 3-17 中的 4 线作基线。

(4) 基线也可以不是直线, 例如根据吸收峰应该是对称的这个原理, 其外推曲线很可能就是附近分析峰的合适基线, 如图 3-17 中的 3 线。

当然取图 3-17 中的 5 线和 6 线作基线也是可以的, 只要所取的切点位置不会因浓度不同而有较大的变化即可, 但是为保证分析的准确度, 基线最好能保持水平, 并具有低的吸光度。

第八节 计算机图谱检索

近年来, 由于计算机技术发展很快, 人们可以把大量的化合物的红外吸收信息谱存入计算机中, 形成规模宏大的信息库, 并通过计算机快速进行数据处理, 自动识别。计算机图谱检索方式已成为分析仪器的定性、定量分析在各领域应用非常便捷的工具。

通常红外图谱检索系统首先是对红外光谱进行编码, 然后再进行检索和输出。一个检索系统可以完成两种基本功能, 对于一给定的输入信息, 如分子式或化合物结构式, 给出光谱形式的答案; 对于给定的输入谱图寻找相同或相似谱图输出, 前者类似查阅谱图档案, 后者相当于谱图解析。

红外光谱是由连续平滑的曲线组成的, 为了把谱图内不同频率、强度、半峰宽的频带存入计算机内, 要用大量的点来代表这条曲线, 每一点用数字表示, 一般采用合理的编码方式。常用的是:

1. 二进制码有峰 / 无峰表达方式, 每 $0.1\mu\text{m}$ 间隔用一位二进制码表示, 在这范围内有峰取 1, 无峰取 0。

2. 用数学表达式表示红外图谱, 如高斯函数或其它相似的函数, 这样可以使描述整个图谱的数字量大大减少。

3. 考虑谱带强度与形状的编码, 因为红外光谱是带状光谱, 在解析光谱时要求有

强度与峰形的概念，所以用有峰/无峰的红外光谱编码就显得不够完善。

红外光谱谱库的谱图数目和数据量是很大的，为了节省检索时间，且能尽快地挑选出候选谱图，还要不使应选人的谱图落选，需注意以下问题：

(1) 由于仪器的误差，制样方法及编码误差等种种原因，两个完全相同化合物的光谱编码不一定完全相同，因而检索程序要给予光谱编码一定的误差范围。

(2) 这种方法不仅能检索出谱图库内与未知物光谱完全相同的光谱，同时还能检出与未知物相近似的谱图供参考。因为谱库中很可能不存在未知物这个化合物，因此对其给出的结果要有个半定量的近似程度说明，并按其相似程度进行排队。

(3) 输入数据和输出形式要采用人们易于理解和接受的形式且输入数据易于核对，减少差错。

检索过程的第一步是输入未知物的光谱数据，然后与谱图库查对，例如用有峰/无峰编码方式，在无谱峰区比较只要这个范围内有峰，就可快速淘汰，未淘汰的谱图再与未知谱在一定的误差范围内详细比较，将误差较大的谱图淘汰掉，对于相似程度较近谱图按经验公式计算相似程度，用得分的方式表示，按其得分高低的顺序排队，最后得出最高得分谱图的编号及名称。

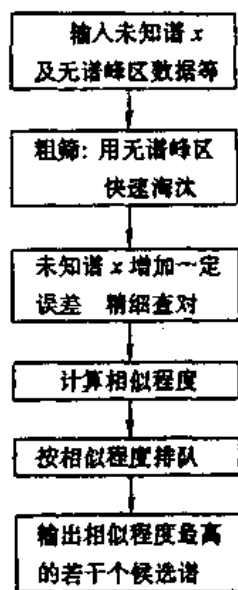


图 3-18 红外光谱检索流程图

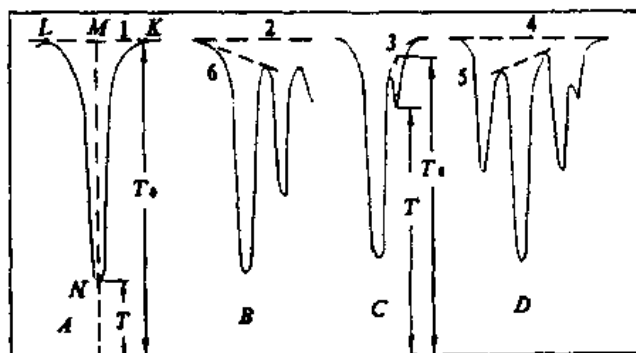


图 3-17 基线画法举例

第九节 红外-色谱联机技术

一、气相色谱-付里叶变换红外光谱联用技术

气相色谱仪具有高的分离效能，但对馏出物的鉴别能力差，而红外光谱仪能提供丰富的分子结构方面的信息，却不具备分离能力，人们利用上述原理曾设计以转动（或振动）反射镜式光栅的机械方法，以使红外光谱仪的扫描速度能跟上色谱仪的出峰时间，但均不理想，直到快速扫描付里叶变换红外光谱仪出现后才比较满意地解决了色谱/红

外联用问题。

目前，付里叶变换红外光谱 (FTIR) 和气相色谱 (GC) 联用有两种类型，一种是和填充柱色谱联用，另一种是和毛细管柱色谱联用。

1. 与填充柱色谱联用

付里叶变换红外色谱仪是通过“接口”来实现和气相色谱仪联用的，其结构如图 3-19。与填充柱色谱相联的接口关键组件是光管，它是一根内壁镀金的硼硅玻璃管，它的容积主要由色谱峰体积来决定，如果其容积大于色谱峰体积，则色谱的前后馏出物必将在光管中重新混合，使色谱柱原分离效率难以保持，但若光管容积过小，色谱馏分仅有一部分进入光管，又会使光谱的检测下限上升，有人曾论证光管的最佳容积应等于或略小于色谱峰半峰宽体积的平均值，以便能在保持色谱分离效率的情况下获得高的检测灵敏度。

通常光管的两端用 KBr 窗封闭，色谱馏分的出入口紧挨着窗片以减少死体积，工作时一方面色谱馏出物经输送管线（内经约 1mm）导入光管中，另一方面来自主机的人射干涉光束经椭球镜聚焦后射向光管窗口，它在管中作多次反射，再经椭球镜、平面镜反射至检测器，由于出射光很弱，故配以高灵敏度的 MCT 检测器，为避免色谱馏分冷凝，光管和输送管路皆缠绕电热丝保温。

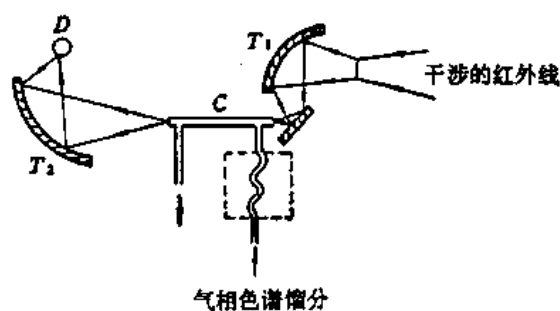


图 3-19 单光路光管示意图

T_1 和 T_2 椭球面镜 C. 光管 D. 检测器

2. 与毛细管色谱联用

毛细管色谱具有分离效率高、分析速度快。目前具有最高分离效率的毛细管色谱柱，当推小口径薄涂层的涂壁开管柱，如内经为 0.1mm，固定液涂层为 0.1 μ m 的熔融石英柱，但使用这种柱子样品进样量少，致使只有少数几个主要组分的色谱峰能得到光谱检定，

如果超量进样，则又将使色谱柱的分离效率降低。因此现在都用大口径厚涂层柱，内经为 0.3~0.5mm，固定相涂层厚为 0.5~1.5 μ m 的柱可在分离效率降低不太大的情况下，使进样量满足 FTIR 仪的灵敏度，并且采用较低的程序升温速率 (2 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C/min) 以使分离效率得到改善。

在联用中，光管的温度一般比最高柱温高 20 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C，但光管镀金内壁对红外光的反射率与温度呈反比关系，温度越高，整个光学的通过率愈低，因此毛细管色谱与 FTIR 联用时，选择适当的光管温度更显重要。

由于毛细管色谱出峰快，因此干涉仪的动镜也应选择较高的移动速度，以便能获得窄色谱峰的光谱。

鉴于采用了快转的动镜速度，因此在和毛细管色谱联用时，一般采用“分段收集法”来获得干涉图。就是说向色谱仪注入样品后，软件程序即令干涉仪每若干次扫描累加成一组，在收集后一组干涉图时，计算机即快速地将前一组干涉图转换成光谱，并存储在

磁盘中。因此色谱峰出完时，也就同时得到了它们的光谱。这种实时运算不但缩短了操作时间，而且也大大节省了磁盘的存贮空间。

二、高效液相色谱-付里叶变换红外光谱联用技术

高效液相色谱和付里叶变换红外联用与气相色谱和付里叶变换红外联用一样都要用到接口，只不过是光管改为流动池，但是两者的差别还是很大的。气相色谱的载气没有红外吸收，而液相色谱的洗脱剂却有红外吸收。由于液谱这种不利因素，对馏出物的红外光谱有严重干扰，这给联用技术带来了很大麻烦。

在液相色谱中，最常用的检测器是紫外光检测器和示差折光检测器，而前者要求被检测组分具有合适的发色团，而后者则需要在严格的恒温下操作，使洗脱剂的成分和流速不能有变化，保证折光率不发生变化。目前 LC/FTIR 联用通过两种途径来实现，一是流通型液槽法，另一是洗脱剂除去法。

1. 流通型液槽法

这种方法接口较简单，是最广泛采用的一种方法。当液相色谱柱馏出的样品组分和洗脱剂一起流经流动液槽时，FTIR 仪每累加若干个干涉图后获一光谱（以纯洗脱剂作参比），并对指定的各红外特征吸收区的吸收值作连续测定。

为了保持足够高的透过率，以便在中红外区大多数波长下能观察到溶质的吸收带，就要使流动池的光程短一些，一般以 $100\mu\text{m}$ 为宜。流动池池体直径通常不应超过 4mm ，这样任一时刻在流动池内保持的洗脱剂都不会超过 $2\mu\text{L}$ 。由普通填充柱馏出的任何一个色谱峰其保留体积均不会小于 $250\mu\text{L}$ ，因此高压液相色谱和付里叶变换红外联用在溶剂透过率高的光谱区里检测极限会比气相色谱与付里叶变换红外光谱联用大两个数量级。

由于从高效液相色谱出现的组分溶液浓度都很低，因此只要以纯洗脱剂作参比，在所得的比例光谱中，洗脱剂的吸收大多可扣除掉，光谱对洗脱剂流速改变并不敏感，但在作梯度洗脱时，洗脱剂的变动将影响光谱质量，而洗脱剂在光谱中吸收总是有干扰的，因此又发展了第二种方法即在光谱测定前除去洗脱剂。

2. 洗脱剂除去法

这种方法是采用漫反射技术。它是由样品自动制备系统和漫反射系统组成。样品自动制备系统是一个由微处理机控制带有 32 个样品杯的转盘，样品杯里装有粒度很细的 KBr 或 KCl 粉末，在位置 1 样品杯接收液相色谱馏出液，在位置 2 除去溶剂，在位置 3 进行漫反射光谱测定。如图 3-20。

当不出色谱峰时，纯的洗脱剂由通过电磁阀与真空泵相连的移液毛细管吸走，当色谱出峰时，色谱仪检测器输出信号超过了设定值，微处理机即令电磁阀关闭，对色谱馏出液进行浓缩，并控制浓缩管的加热温度，调节雾化气流的流速，使约 90% 的洗脱剂挥发掉，浓缩了的馏出液滴入样品杯。当一个色谱峰出完时，紫外检测器输出电压信号就低于设定值，电磁阀即行打开，不含样品的洗脱剂又被吸走，而带有样品的样品杯前移等待吹扫，更前边的已吹扫过的样品杯则被测定其漫反射光谱，如此循环至色谱峰出完。据称这种技术的灵敏度已达到 10ng 的水平。

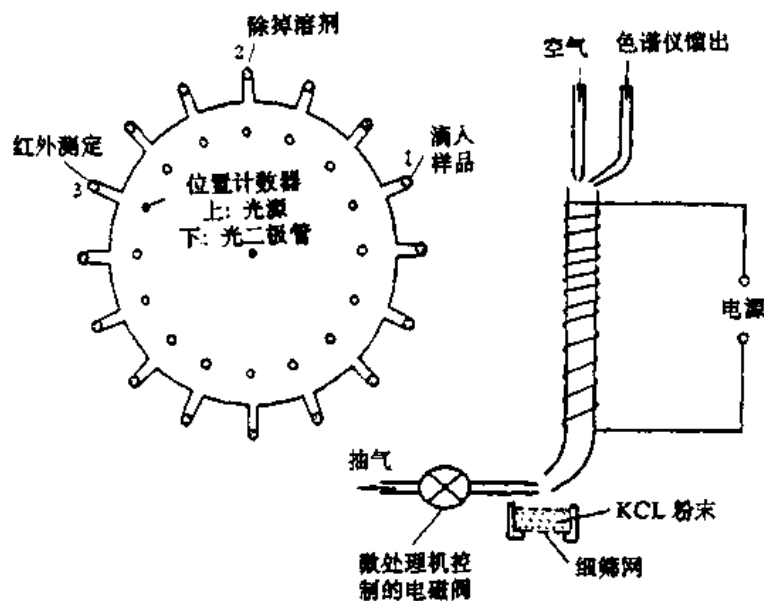


图 3-20 漫反射测定的样品自动制备系统示意图

采用漫反射技术比采用流动池在灵敏度上提高了 2~3 个数量级，然而这个技术的最大缺点是被分离的每一组分必须在色谱检测器上有响应，否则无法收集。若使用的是一个波长为 254nm 的紫外检测器，那么非芳烃化合物大概就要漏掉，因此在测定时对样品要有一些限制：

- (1) 样品沸点不能低于洗脱剂，且性能稳定。
- (2) 样品必须要能被检测器检测。
- (3) 由于水具有大的表面张力和潜热，难以除去，因此洗脱剂中最好没有水。

思考题

1. 何谓第一、二、三代红外光谱仪？各有何特点？
2. 简述付里叶红外光谱的工作原理及特点。
3. 常用红外光源和检测器有几种？各有何特点？
4. 在进行红外样品测试时要注意哪些问题？
5. 红外光谱解析有何特点？

第四章 原子吸收光谱法

第一节 概 述

原子吸收光谱法 (Atomic Absorption Spectroscopy) 与分子吸收光谱法比较, 既有类似之处, 又有许多特点。原子吸收光谱法是基于待测物质的蒸气态的基态原子吸收特定波长辐射 (或称共振辐射吸收) 而建立起来的, 其基本过程是: 光源发射出特征辐射供待测元素的自由原子吸收后, 再测定其特征辐射减弱的程度, 以此求出样品中待测元素的含量。原子吸收光谱法是 50 年代后才逐渐发展起来的一种分析技术, 特别是近些年来, 得到了迅速的发展。

原子吸收光谱法具有许多特点:

1. 特征性强, 因待测元素要按自身的特征吸收光源中的特征谱线, 几乎每一种待测元素都有着与其它元素不可能相混淆的特征吸收谱线, 光谱干扰小, 因此具有良好的选择性。

2. 分析速度快, 因采用的方法不同, 测定时间长则几分钟, 短则仅需几十秒钟。

3. 分析灵敏度高, 准确度好, 由于被测样品和所用方法的不同, 元素的最小检出量可达 $10^{-8} \sim 10^{-14} \text{g}$ 。

4. 背景影响比较小, 原子吸收光谱分析测定的不是相对于背景的信号强度。

但在多元素空心阴极灯尚未普遍推广应用之前, 测定不同元素都需一个特定的空心阴极灯, 这对同时要测定试液中多种元素是不便的。

另外, 在远紫外区共振线小于 200nm 的一些元素如 C、N、P、S 等不能利用原子吸收法测定。

由于原子吸收光谱分析法的灵敏度高、准确度好、分析速度快、仪器操作简便、易于普及, 现已广泛应用于各个相关领域。

第二节 原子吸收光谱法的基本原理

一、原子吸收光谱基本原理

在通常的情况下, 原子处于基态, 当特征辐射通过原子蒸气时, 基态原子就从入射辐射中吸收能量由基态跃迁到激发态, 通常是第一激发态, 发生共振吸收, 产生原子吸收光谱。原子能级的能量变化是量子化的, 原子吸收光谱的波长 λ 由产生该原子吸收谱线的能级之间的能量差 ΔE 决定,

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} \quad (4-1)$$

处于基态待测原子蒸气对光辐射的共振吸收程度取决于吸收光程内基态原子的浓度

N_0 ,

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = RN_0L \quad (4-2)$$

式中, I_0 为入射光强度; I 为透射光强度; L 为光程长度; R 为原子蒸气对频率为 ν 的光吸收系数。由于原子对光吸收具有选择性, 因而对不同频率的光吸收程度不同, 如将吸收强度对频率作图, 可得图 4-1 的曲线。从图中可见, 原子从基态跃迁至激发态的共振吸收线并不是绝对单色几何线, 而是具有一定宽度, 通常用谱线峰值一半处 $\Delta\nu$ (半宽度) 来表征吸收线的宽度, 一般在 $0.01 \sim 0.001\text{nm}$ 。

原子吸收线的特点是由吸收线的波长、形状、强度来表征的。吸收线波长决定原子跃迁的能级差, 吸收线形状由其半峰宽来表征, 吸收线的强度由能级间跃迁几率决定。

二、原子吸收谱线的测量

由于原子吸收谱线的半峰宽很小, 要测量这样一条很小宽度吸收值, 就需要分辨率极高的单色仪, 这样的工艺制做是很难达到的, 同时这种测量在实际应用上也是难以实现的。为了解决这个难题, 采用锐线光源能发射出谱线半宽度很窄的发射线, 此光源就是元素的空心阴极灯。它发射的谱线和原子吸收谱线的中心频率一致, 都处在 ν_0 处, 如图 4-2。

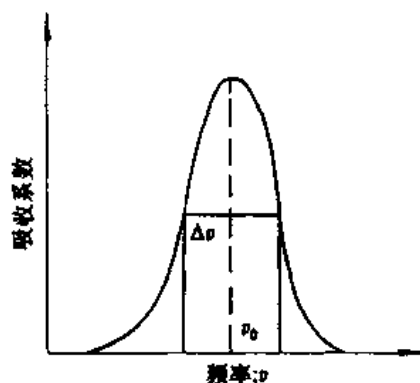


图 4-1 原子吸收线的轮廓图

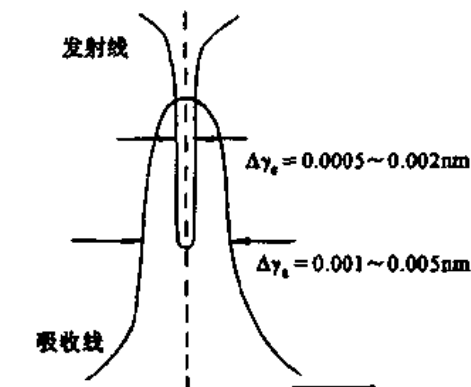


图 4-2 吸收线与空心阴极灯发射线

锐线光源发射线的半宽度 $\Delta\nu_e$ 要比吸收线半宽度 $\Delta\nu_a$ 小得多。这种单色性更好的锐线光可以充分的被原子蒸气吸收, 此时入射光强度 (阴影重合部分) 及透射光强度 (阴影以外) 相差较大, 检测它们差别就不那么困难了。这就是原子吸收光谱法中需要用锐线光源的道理。

三、原子吸收与原子浓度关系

在通常的火焰和石墨炉原子化温度条件下, 处于激发态的原子数与基态原子的浓度相比, 可以忽略不计, 实际上可将基态原子的浓度看作总原子数, 这样蒸气中总原子数 N 与试样中被测元素的含量 C 成正比。

$$N = \beta C \quad (4-3)$$

式中 β 表示与实验条件和被测元素化合物性质有关的系数。由(4-2)和(4-3)式可得:

$$A = KCL \quad (4-4)$$

式中 $K = R\beta$ 。此式就是原子吸收分光光度法定量分析的基本关系式。

第三节 原子吸收分光光度计

一、基本结构与工作原理

原子吸收分光光度计的主要组成部分与紫外-可见分光光度计基本类似，但其功能设置及组成结构有所不同，如图 4-3。

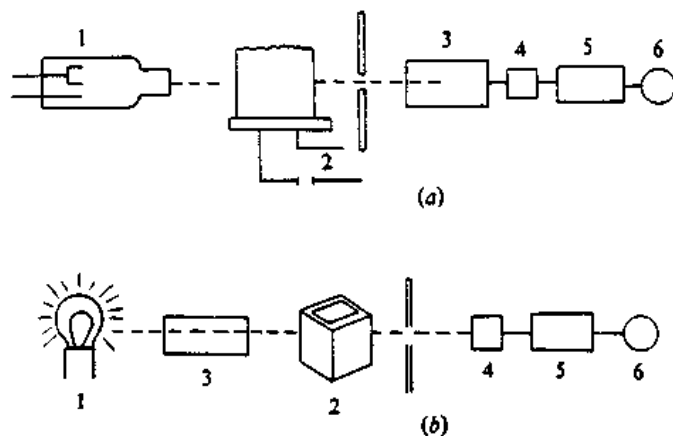


图 4-3 原子吸收分光光度计和紫外-可见分光光度计比较

(a) 原子吸收分光光度计: 1. 光源 2. 原子化系统 3. 单色器 4. 光电倍增管 5. 放大器 6. 读数器

(b) 紫外-可见分光光度计: 1. 光源 2. 单色器 3. 比色皿 4. 光电管 5. 放大器 6. 读数器

原子吸收分光光度计按光束形式可分为单光束型仪器与双光束型仪器，其基本结构如图 4-4 所示。

对于单光束型仪器，来自光源的特征辐射通过原子化器内原子蒸气时，一部分辐射被基态原子所吸收，透过原子蒸气的一部分辐射经过分光系统，将所需要的辐射送入检测器，检测器将接收的光信号转换为电信号，再经过电子线路处理，最后用屏幕将信号显示出来，或用记录仪记录下来。

对于双光束型仪器，先用分束器或旋转反射镜将来自光源的特征辐射分为两束，其中之一为试样光束，通过原子化器，由于基态原子的吸收使光的强度减弱，另一光束为参比光束，不通过原子化器，强度不减弱，再用半透明反射镜将两光束的强度合成为一束光，通过分光系统后进入检测器，经过电子线路处理，最后在显示器或记录仪上指示

两光束之比。

二、主要部件

1. 光源

光源的基本功能是发射被测元素的特征辐射。对光源的基本要求是，发射的特征辐射的半宽度要明显地小于原子吸收光谱线的半宽度，辐射的强度足够大，稳定性好，背景低，具有良好的信噪比，且使用寿命长。原子吸收分光光度计中最常用的光源是空心阴极灯和无极放电灯。

(1) 空心阴极灯 空心阴极灯由一个用被测元素纯金属或其合金制成的圆形空心阴极与一个用高熔点金属钨或钛、锆、钽制造的阳极组成。阴极与阳极封闭在充有约 200Pa 压力的超纯单原子氩或氖气体的玻璃套管内，如图 4-5 所示。

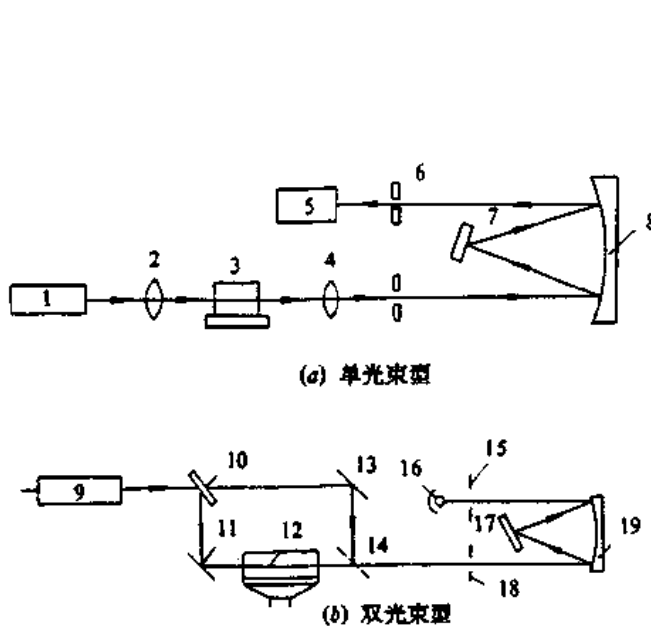


图 4-4 原子吸收分光光度计的基本结构

- 1,9. 空心阴极灯 2,4. 透镜 3,12. 原子化器
5,16. 检测器 6. 狭缝 7,17. 光栅
8,11,13,19. 反射镜 10. 旋转反射镜
14. 半反射镜 15. 出射狭缝 18. 入射狭缝

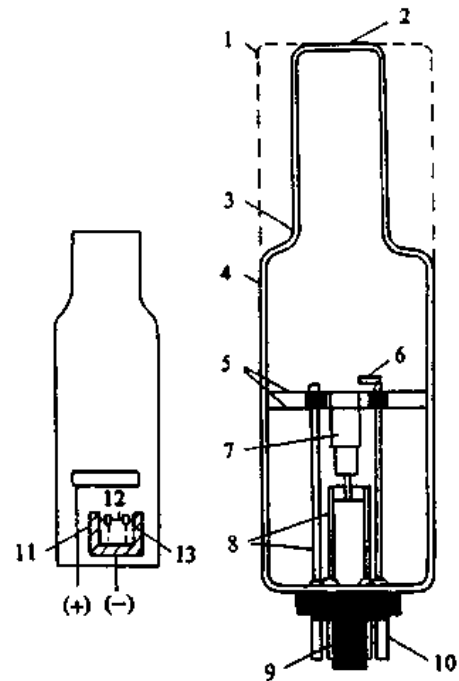


图 4-5 封闭型空心阴极灯结构示意图

1. 紫外玻璃窗口 2. 石英窗口 3. 密封
4. 玻璃套 5. 云母屏蔽 6. 阳极 7. 阴极
8. 支架 9. 管座 10. 连接管脚
11,13. 阴极位降区 12. 负辉光区

空心阴极灯是一种特殊的气体放电管，在管内产生辉光放电。普通的辉光放电是一种高电压低电流放电，而在空心阴极灯内产生的辉光放电是一种特殊的辉光放电，放电电压只有 300~500V，但电流密度大，放电主要集中在阴极空腔内，形成强度很大的负辉光区。放电产生的电子在飞向阳极的过程中，受到电场加速，与惰性气体的原子碰撞并使惰性气体电离。产生的正离子从电场获得动能，当其撞击在金属阴极表面时，可将被测元素的原子从阴极表面溅射出来并积聚在空心阴极内。积聚在空心阴极内的原子受

到电子、惰性气体原子以及离子的非弹性碰撞而被激发，发出特征辐射。

(2) 无极放电灯 无极放电灯是在一个封闭的长约几厘米、直径为 5~10mm 的石英管内，充有几百帕压力的氩气并装有几毫克的被测元素的纯金属或其卤化物。石英放电管在射频或微波高频电场中，借助于高频火花放电，激发功率可达 200W。随着放电过程的进行，管内温度升高，金属或卤化物蒸发、解离，与被激发的气体原子碰撞发射被测元素的原子特征辐射。用射频激发的无极放电灯稳定性高、自吸小。用微波激发的无极放电灯输出强度大、寿命长。它也可发射出谱线半宽度很窄的锐线光谱。

目前生产的无极放电灯仅限于本身或其化合物具有较高蒸气压的元素，如 K、Cs、Cd、Sn、Pb、As、Bi、Hg、Se、Te 等。通常无极放电灯比同元素的空心阴极灯的稳定性好、寿命长、辐射强度高。

2. 原子化器

原子化器是原子吸收分光光度计的关键部件之一，其功能是提供一定能量，使被测元素的单质或化合物，转变为原子蒸气，实现原子化，并使游离出来的基态原子进入光源的辐射光程。对原子化器的基本要求是：有尽可能高的原子化效率、稳定性高、重现性好、干扰少。原子化器分有预混合火焰原子化器、石墨炉原子化器、氢化物发生原子化器、冷原子发生原子化器。

(1) 预混合火焰原子化器 对火焰原子化器的基本要求是：试样利用效率高，有足够高的火焰温度，稳定性好，低的背景发射与噪声，使用安全。预混合火焰原子化器由雾化器、混合室与燃烧器三部分组成。典型的预混合火焰原子化器如图 4-6 所示。

雾化器是火焰原子化器的核心部件，其功能是产生气溶胶。对它的要求是喷雾稳定，产生的气溶胶粒径微细均匀，雾化效率高。仪器一般配置的是气动雾化器，气动雾化器采用同心圆设计，由一吸样管与一只喷嘴组成，前者用铂或铂铱合金制作，后者用不锈钢或聚四氟乙烯制造。雾化效率约为 10%。为克服试液粘度对进样的影响，有时采用蠕动泵或注射泵强制进样。雾化球的作用是进一步细化气溶胶，提高雾化效率。

混合室的功能是将由雾化器来的粒径较大的气溶胶凝结为大液珠，沿泄液管排走，并将部分去溶的气溶胶与燃气、助燃气预先混合均匀后输往燃烧器，以减少火焰的扰动。

燃烧器的功能是将进入火焰的气溶胶原子化，产生被测元素的基态原子。用大块不锈钢、钛或其它耐高温抗腐蚀的材料制造，多为单缝燃烧器，缝宽通常为 0.5mm，对含盐量高的试液，可采用较宽的燃烧缝或使用三缝燃烧器。必须保持供气速度大于燃烧速度，以防止回火，常用的火焰为空气-乙炔火焰、氧化亚氮-乙炔火焰。用前一种火焰的燃烧器缝长为 10cm，用后一种火焰的燃烧器缝长为 5cm，空气-乙炔与氧化亚氮-乙炔火焰的温度分别可达到 2500K 与 2950K。

预混合火焰原子化器只适用于低燃烧速度的火焰，不能用于纯氧作助燃气的高燃烧速度的火焰。

用火焰法实现原子化的优点是操作简便，提供的原子化条件比较稳定，适用范围广。缺点是易生成难解离氧化物的一些元素如 Al、Si、V、Th、B 等，原子化效率不高，而且在原子化过程中伴随着一系列化学反应的发生，使过程复杂化。火焰温度明显

地影响着原子化过程。一般说来，火焰温度高是有利的，但并不是在任何情况下都是如此。火焰温度提高后，碱金属、碱土金属等低电离电位元素的电离度增加；火焰发射加强，背景增大；多普勒效应增加，吸收线变宽；气体膨胀因数增加，大气中基态原子浓度减小，所有这些效应都要导致测定灵敏度的降低。因此，对于特定的测定对象，应选择一个最适宜的温度，常用气体火焰温度特性见表 4-1。

各种混合气体要按一定的比例使用，如空气-乙炔的燃助比大时，火焰温度较高，火焰燃烧高度低，燃烧充分，原子化区域窄，适用一些易分解、易挥发的碱土金属的测定。当燃助比小时，火焰燃烧高度较高，温度较低，由于燃烧不完全，噪声较大，适用稀土等三十多种元素测定，不适宜对易形成难解离氧化物元素的测定。

表 4-1 各种火焰温度及燃烧速度

气体混合物	温度℃	燃烧速度 cm/s	气体混合物	温度℃	燃烧速度 cm/s
空气-丙烷	1 925	82	氧气-氢气	2 700	900
空气-氢气	2 045	320	氧气-乙炔	3 060	1 130
空气-乙炔	2 300	160	氧化亚氮-乙炔	2 955	180

乙炔-氧化亚氮是原子吸收光谱分析中最常用的一种火焰，由于温度较高，可以造成强还原性气氛，使许多难解离的元素的氧化物原子化，并减弱在乙炔-空气火焰或其它火焰中可能存在的化学干扰现象。为了不影响分析方法的灵敏度要注意火焰气体的燃助比，同时大部分火焰气体易燃易爆，在操作中应严格遵守操作规程。

(2) 无火焰石墨炉原子化器 火焰原子化器有它的局限性。首先，火焰法的雾化效率不高，被雾化的试样溶液大约只有 5%~15% 进入火焰参与原子化，这些试液被火焰气体成百上万倍稀释，且金属原子易受助燃气及火焰周围空气的氧化作用生成稳定难溶氧化物，因而，火焰中的自由原子浓度很低，这就限制了灵敏度的进一步提高。其次，火焰温度不稳定，火焰法不能直接测定固体试样等。为了克服上述不足之处，发展了无火焰石墨炉原子化器。如图 4-7。

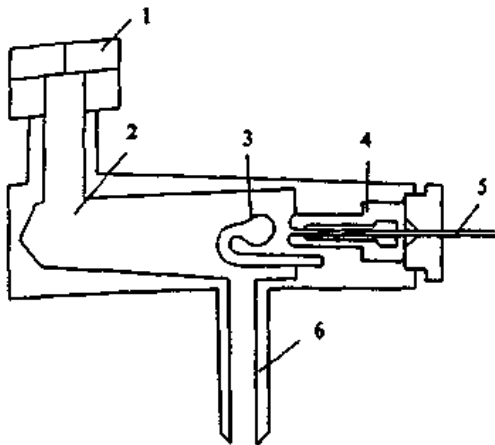


图 4-6 预混合型火焰原子化器
1. 燃烧器 2. 混合室 3. 雾化球 4. 雾化器
5. 吸液毛细管 6. 溢流管

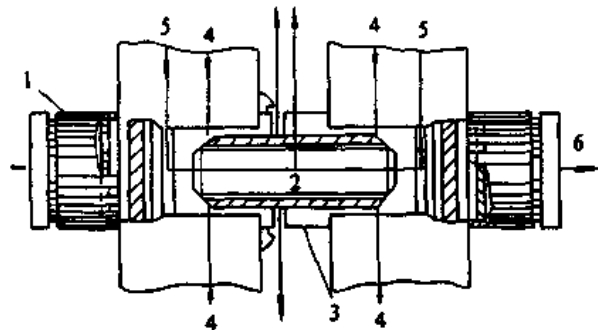


图 4-7 石墨管式原子化器
1. 窗组件 2. 石墨管 3. 石墨接触器 4. 外气路
5. 内气路 6. 光束

石墨炉原子化器是一种电阻加热器，石墨管作为吸收池与电阻发热体，夹在两电极之间，通电后石墨炉开始升温，最高温度可达3000℃。电极用冷却水箱冷却，内外气路通保护气——氩气，避免炽热的石墨成分与大气中的氧接触，防止石墨管被烧蚀，同时保护已原子化了的原子不再被氧化，并将热处理过程中蒸发出来的共存组分携带出光路。现在多用热解镀层石墨管，石墨管表面沉积一层致密坚硬的、抗渗透与耐氧化的热解石墨层，可以改善其使用性能并延长使用寿命。

石墨炉电热原子化器通常设计有慢速斜坡升温与快速升温两种升温方式。在实际工作中，采用何种升温方式取决于试样的性质。快速升温实现快速原子化，可以降低原子化温度，得到的原子密度大，测定的灵敏度明显地提高，最理想的是以“无限”快的速度升温到恰高于试样的原子化温度，但有时为了除去大量盐或油类物质，或者为了碳化与灰化生物或其它有机物，保证共存组分全部除去与分解，需采用斜坡升温方式。石墨管的温度用光敏二极管监控。

石墨炉进行工作时要对试样进行干燥→灰化→原子化→净化处理几个环节。干燥是为了蒸发试样中的溶剂及水分。灰化是减少或消除试样在原子化过程中可能带来的干扰，灰化温度一般在300℃~1500℃，比干燥温度高一些，但不应使吸光值降低。原子化是使样品完全原子化，根据元素性质设定原子化时间，温度一般在1500℃~3000℃。净化是为了消除样品中难溶元素在石墨管中的残留，减少“记忆”效应，其温度要比原子化温度高200℃~400℃，时间比较短。

与火焰原子化相比，石墨炉原子化的特点是：①试样原子化是在充有惰性气体保护的气室于强还原性石墨介质内进行的，有利于难熔氧化物的解离。②用样量少，固体样为几毫克，液体样为几微升，试样可全部蒸发，原子化有效停留时间长，有利于测量，几乎全部样品参与光吸收，绝对灵敏度高。③由于试样全部蒸发，排除了火焰中常常产生的被测组分与火焰组分的相互作用，减少了化学干扰等因素。

(3) 氢化物发生原子化器 氢化物发生原子化器形式多样，主要由氢化物发生器、吸收池及其它的部件组成。被测试样先在氢化物发生器中与强还原剂发生还原反应，生成被测元素的低沸点共价型氢化物 RH_{3-m} ，其中 m 为被测元素的高价态。最常用的强还原剂是 $NaBH_4$ 、 KBH_4 以及 $SnCl_2$ 。产生的氢化物用惰性气体载入吸收池。氢化物不稳定，在不是很高的温度下易分解为自由原子。氢化物发生法用来测定在样品中含量很低的 Ge, Sn, Pb, As, Sb, Bi, Se 与 Te 等元素，这些元素分析线通常在真空紫外区，这时背景吸收很强，直接分析检出能力差。

(4) 冷原子发生原子化器 冷原子发生原子化器用于汞的测定，它实际上就是一个汞发生器，通常用石英管制作，加热温度由室温到数百度之间。石英管接入光路中。测定时，先将试样转化为易于气化的汞化物形态，再将其导入石英管进行测定。低温原子化法测定汞有加热气化法与还原气化法，再将汞蒸气导入气体流动吸收池测定。后一种方法是将试样中的汞转化为二价汞离子 Hg^{2+} ，再用 $SnCl_2$ 将 Hg^{2+} 还原为汞，产生的汞蒸气导入流动吸收池进行测定。

3. 光学系统

光学系统由入射狭缝、准光镜、色散元件、成像物镜与出射狭缝组成，分光系统的

核心部件是色散元件，常用的色散元件是光栅，光栅刻线 1 000~3 000 条/mm，焦距 0.25~0.5m，光谱范围 190~900nm，其主要功能是将被测元素的共振线分出来，同时阻止其它的谱线进入检测器，原子吸收光谱较简单，只需使用中等分辨能力的光栅即可，分光系统的设计要求光路要短，以增大光通量。

4. 信号检测与数据处理系统

应用最多的检测器是光电倍增管，研究型仪器有使用二极管阵列检测器与其它固体检测器的。

输出的直流信号经过进一步放大，最后用检流计指示出来，或用记录仪记录，或在 CRT 上显示。现代化的仪器还设有自动调零、自动曲线校直、背景校正、数据统计处理及数据库等多种多样的功能，整个仪器的操作由计算机控制与管理。

三、背景校正系统

表 4-2 分析线与校正背景用的非吸收线

分析线	非吸收线	分析线	非吸收线	分析线	非吸收线	分析线	非吸收线
Ag328.07	Sn326.23	Cs852.11	Ne854.47	Mg285.21	Mg280.26	Se196.09	Se199.51
Ag328.07	Ag312.30	Cu324.75	Cu324.32	Mn279.48	Cu282.44	Se196.09	Se203.99
Al309.27	Al306.61	Cu324.75	Cu323.12	Mn279.48	Pb280.20	Si251.61	Cu252.67
Al309.27	Mg313.16	Dy421.17	Fe421.65	Mo313.26	Mo312.20	Si251.61	Cu249.22
As193.76	As191.29	Dy421.17	Ag421.10	Mo313.26	Mo311.22	Sn224.61	Dd226.50
Au242.80	Sn242.17	Er400.80	Er394.44	Na589.59	Mo588.83	Sn224.61	Cu224.70
Au267.60	Pt265.95	Eu459.40	C460.10	Na589.59	Ne585.25	Sn286.33	Sn284.00
B249.68	Cu244.16	Fe248.33	Cu249.22	Ni232.00	Ni232.14	Sr460.73	Ni460.50
Ba553.55	Mo553.31	Ga287.42	Sn284.00	Ni232.00	Ni231.60	Sr460.73	Ne453.78
Ba553.55	Ne556.28	Ga287.42	Cd283.69	P213.55	Zn213.86	Te214.28	Zn213.86
Bi234.86	Sn235.48	Hg253.65	Cu249.22	Pb217.00	Pb220.35	Te214.28	Sb217.58
Bi223.06	Cd226.50	Hg253.65	Al266.92	Pb283.31	Pb282.32	Ti364.27	Ni361.94
Bi223.06	Bi227.66	I183.04	I184.45	Pb283.31	Cd283.69	Ti364.27	Ne352.05
Bi306.77	Al306.61	In325.61	Al306.61	Pd247.64	Pd247.70	Ti365.35	Ni361.94
Br148.85	Ni149.47	In325.61	In305.12	Pd247.64	Pd247.75	Tl276.79	Tl227.50
Ca422.67	Fe421.94	K766.49	K769.90	Pt265.95	Pt246.69	U358.49	Fe358.12
Ca422.67	Fe423.59	K766.49	Pb763.22	Rb780.03	Ba778.05	V318.54	V319.98
Cd228.80	Cd226.50	La550.13	Mo550.55	Rh343.49	Rh350.73	V318.54	Cu324.75
Co240.71	Co241.16	La550.13	Co548.33	Rh343.49	Ne352.05	W255.14	W255.48
Co240.71	Sn242.17	Li670.78	Ne671.70	Ru349.89	Ne352.05	Zn213.86	Zn212.27
Cr357.87	Ne352.05	Mg285.21	Cd283.69	Sb217.58	Sb217.91	Zn213.86	Zn210.22
Cr357.87	Fe358.12	Mg285.21	Sn284.00	Sb231.15	Sb231.40		

1. 非吸收线法校正背景 主要是根据所采用空心阴极灯发出的标准谱线与实际分析元素吸收的谱线进行对比, 非吸收线法对仪器没有特殊的要求, 各种型号的仪器都可采用此法来校正背景。该法的缺点是, 由于背景随波长而改变, 吸收线与非吸收线(背景校正线)处的背景不一定相同, 因此不能对背景进行精确的校正, 且需进行两次测量。常用来校正背景的非吸收线, 见表 4-2。

2. 连续光源校正背景 连续光源校正背景法原理是: 先用锐线光源测得分析线与背景吸收的总吸光度, 再用连续光源(在紫外区用氘灯, 在可见区用碘钨灯)在同一波长测量吸收值, 由于这时是宽带测量, 分析线很窄, 不到通带宽度的 1%, 分析线的吸收只占总吸收很少的部分, 可以忽略不计, 因此, 可将连续光源测得的吸光度值看作是纯背景吸收, 两次测得的吸光度值相减, 即可得到校正背景后的分析线的吸光度值。

连续光源测得的背景是通带宽度范围内的平均背景, 它与分析线处的背景不一定相同, 因此背景不能得到精确的校正。锐线光源与连续光源的放电性质不同, 能量分布有差异, 光斑因大小不同难于严格重合, 也影响背景精确的校正。连续光源的能量较弱, 只能校正低背景吸收, 不能校正精细结构与光谱干扰引起的背景。

3. 喇曼效应校正背景 喇曼效应校正背景是基于光的偏振特性, 因此它扣除背景、去干扰能力很强, 其灵敏度和特异性都高于一般原子吸收分光光度法。目前在商品仪器中应用吸收线调制法, 调制方式有恒定磁场与可变磁场调制两种方式。

恒定磁场调制方式是在原子化器上垂直于光束方向施加一恒定磁场, 在磁场的作用下, 分析线分裂为 π 与 σ_{\pm} 组分, 前者与分析线的波长相同, 平行于磁场方向, 后者偏离分析线的波长, 垂直于磁场方向。光源发射线经过起偏器后变为偏振光, 随着起偏器的旋转, 平行与重直于磁场方向的偏振光交替地通过原子化器, 当平行于磁场方向的偏振光通过原子化器时, π 与 σ_{\pm} 组分都产生吸收, 测得原子吸收与背景吸收的总吸光度; 当垂直于磁场方向的偏振光通过原子化器时, 由于偏振方向不同, 不为 π 组分吸收, 测得分析线波长处的背景吸收的吸光度。两次测得的吸光度值相减, 便得到校正了背景吸收后的分析线的吸光值。

可变磁场调制方式是在原子化器垂直于光束方向施加一电磁铁, 它仅在原子化阶段被激磁。偏振器是固定的, 其作用是去掉平行于磁场方向的 π 组分, 只让垂直于磁场方向的 σ_{\pm} 组分通过原子化器。在零磁场时, 测得原子吸收与背景吸收的总吸光度, 激磁时, 只测得背景吸收的吸光度, 两次测得的吸光度值相减, 便得到校正背景吸收后分析线的吸光度值。

喇曼效应校正背景可以校正吸光度高达 1.5~2.0 的背景, 能校正精细结构与光谱干扰引起的背景吸收。缺点是, 由于 π 组分吸收曲线的弯曲程度大于 σ_{\pm} 组分吸收曲线的弯曲程度, 故在高浓度测定时, 工作曲线出现返转, 产生双值曲线。光路中存在偏振器, 光能量有损失, 影响测定灵敏度。为了克服这一缺点, Perkin-Elmer 公司突破传统的横向喇曼效应加偏振器校正背景的设计, 开发了采用纵向交流喇曼效应校正背景与横向加热的新型原子吸收分光光度计, 纵向磁场方向与光速平行, 不存在 π 组分, 无需偏振器, 增大了光通量, 当有磁场时, 只测得背景吸收。纵向与横向喇曼效应校正背景的原理, 如图 4-8 所示。

4. 自吸收效应校正背景 自吸收效应校正背景法是基于高电流脉冲供电时空心阴极灯发射线的自吸收效应。当以低电流脉冲供电时，空心阴极灯发射锐线光谱，测得原子吸收与背景吸收的总吸光度。当以短时间高电流脉冲供电时，发射线产生自吸收效应，在极端的情况下发射线产生自蚀，这时只测得背景吸收的吸光度，两次测得的吸光度值相减，便得到校正了背景吸收后的分析线的吸光度值。这种校正背景方法可以校正精细结构与光谱干扰引起的背景吸收，没有光能量损失与工作曲线逆转的问题。对于在高电流脉冲供电时发射线自吸收效应不够大的难解离氧化物，测定灵敏度有损失。

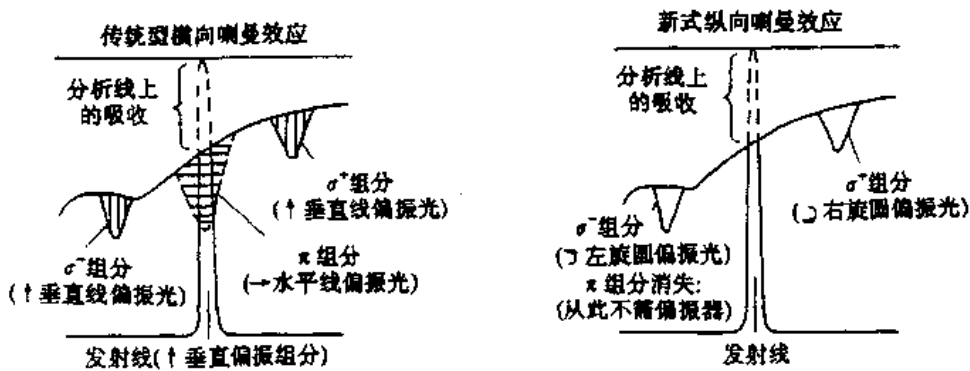


图 4-8 纵向与横向塞曼效应校正背景的原理示意图

第四节 原子吸收分光光度法的定量方法

一、标准曲线法

标准曲线法是原子吸收定量分析中最常用的一种方法，具体内容可参见第二章第四节。在实际工作中得到的标准曲线往往有弯曲的现象，其原因有：非吸收光的影响，共振变宽对吸收强度的影响；电离效应的影响。因此在应用中要注意：所配制的标准溶液的浓度，应在吸光度与浓度成直线关系的范围内；标准溶液与试样溶液都应用相同的试剂处理；所有测定值都应扣除空白值；在整个分析过程中操作条件应保持不变；由于雾化效率和火焰状态经常变动，标准曲线的斜率也随之变动，因此，每次测定前应用标准溶液对吸光度进行检查和校正。

二、标准加入法

当试样自身的组成对空白值影响较大，无法扣除，在测定纯物质中极微量的杂质元素时，往往采用标准加入法（也称标准增量法），方法内容可参见第二章第四节。

使用标准加入法时，应注意以下几点：待测元素的浓度与其对应的吸光度应呈线性关系；为了得到较为精确的外推结果，最少应采用四个点来作外推；本法只能消除化学干扰、物理干扰和电离干扰等，但不能消除背景干扰，如有背景干扰，必须扣除背景，否则将得到偏高结果；对于斜率太小的曲线，此法容易引起较大的误差。

三、内标法

内标法是原子吸收分析中常用的一种方法，它是在标准样品和未知样品中分别加入内标元素，测定分析线和内标线的强度比，并以吸光度之比值对被测元素含量绘制校正曲线。内标元素应与被测元素在原子化过程中具有相似的特性。内标法的优点是可以消除在原子化过程中由于实验条件例如气体流、火焰状况、石墨炉温度等变化而引起的误差，提高了测定精度。

第五节 原子吸收分光光度法的干扰及消除方法

在原子吸收分光光度法中，干扰效应大致可以分为电离干扰、物理干扰、光谱干扰和化学干扰等。

一、电离干扰

电离干扰是由于原子的电离而引起的干扰效应，其结果使火焰中待测元素基态原子数减小，测定结果偏低。电离的多少可用电离度来表示，所谓电离度是电离的金属正离子浓度与该金属的总浓度之比。电离度的大小，与电离平衡常数、温度、原子在火焰中浓度有关。电离平衡常数越大，温度越高，电离度就越大，电离度随火焰中被测元素浓度增大而减小，加入易电离元素，增加火焰中的自由电子浓度，可以有效地抑制和消除电离干扰效应。常用的消电离剂是碱金属元素。

二、物理干扰

物理干扰是指试样在转移、蒸发和原子化过程中由于试样任何物理特性的变化而引起的吸光度下降的效应。在火焰原子化法中，试液的粘度改变影响取样速度；表面张力影响形成的雾珠大小；溶剂的蒸气压影响蒸发速度和凝聚损失；雾化气体压力、取样管的直径和长度影响取样量的多少等等。在石墨炉原子化法中，进样量大小、保护气的流速等影响基态原子在吸收区的平均停留时间。所有这些因素最终都要改变吸光度。

物理干扰是非选择性干扰，对试样中各元素的影响基本上是相似的。

配制与被测试样相似组成的标准试样，是消除物理干扰最常用的方法。采用内标法来消除物理干扰也是行之有效的。

三、光谱干扰

光谱干扰主要与仪器分辨率和光源有关，有时也受共存元素的影响。

1. 光谱线重叠干扰 原子吸收分析中谱线重叠的几率是较小的，但个别仍有可能产生谱线重叠干扰。如用 228.802nm 吸收线测定 Cd，有 As 共存时，As 的 228.810nm 吸收线可产生干扰。这种影响只有很少几种元素出现。

2. 与光源有关的光谱干扰

这类干扰是由吸收线与相邻谱线不能完全分开所造成的光谱干扰。产生原因可能有：复杂元素本身发射出单色器不能完全分开的谱线；空心阴极灯的阴极材料中杂质发射干扰谱线；空心阴极灯内所充气体产生的谱线可能造成的干扰等，如遇上述情况，可更换光源，减小狭缝宽度和灯电流，或采用其它分析线。

3. 与原子化器有关的背景吸收产生谱线干扰

在原子吸收分光光度法中，分子吸收和散射的后果是相同的，产生表现的虚假吸收，使测定结果偏高。校正这种虚假的背景吸收的方法，常用的是氘灯校正法。这种校正方法是以如下的基本假定为依据的，在使用连续光源（如氘灯）时，被测元素的线吸收相对于总入射光强度是可以忽略不计的，这一假定是合理的。从这一基本假定出发，引出了如下的校正方法，先用锐线光源（如空心阴极灯）测定分析线的线吸收和分子吸收的总吸光度 A_T ，再用氘灯光源在同一波长位置测定相应于分析线位置的分子吸收产生的吸光度 A_m （这时线吸收可以忽略不计），两次测定之差 $A_T - A_m$ 即为欲测定的分析线的真实吸光度。近年来发展了一种利用喇曼效应校正背景的新技术，和氘灯校正背景法利用谱线波长和强度特性来校正背景不同，喇曼效应校正背景法是利用光谱线的偏振特性，它的突出优点是能将较高的背景予以很好地扣除。

四、化学干扰

化学干扰是指在溶液中或气相中由于被测元素与其它组分之间的化学作用而引起的干扰效应，它主要影响被测元素的化合物离解和原子化。化学干扰是原子吸收分光光度法中的主要干扰来源。化学干扰是选择性干扰。

被测元素与共存元素之间形成热力学更稳定的化合物，这是产生化学干扰的重要原因之一。大家熟知的磷酸根对测定钙的干扰就是由于这一原因，被测元素在火焰中形成稳定的氧化物、碳化物或氮化物也是引起化学干扰的重要原因。例如 Al、Si 等在空气-乙炔火焰中由于形成稳定的氧化物，原子化效率不高，测定灵敏度很低。又如 B、U 甚至在还原性的氧化亚氮-乙炔火焰中测定其灵敏度都很低，就是由于它们生成了难解离的碳化物和氮化物。在石墨炉原子化器中，W、B、La、Zr、Mo 等容易生成碳化物，使测定灵敏度降低。

化学干扰的原因是各种各样的，是一种选择性干扰，因此，具体采用什么方法来消除干扰也要视情况而定。常用的简便而有效的方法是加入释放剂和保护剂。释放剂与干扰组分形成更稳定或更难挥发的化合物，从而使被测元素从干扰组分形成的化合物中释放出来。例如磷酸根干扰钙的测定，当加入镧或锶之后，镧或锶同磷酸根结合而将钙释放出来。保护剂的作用是它与被测元素形成稳定的化合物，阻止了被测元素和干扰元素之间的结合，而保护剂与被测元素形成的化合物在原子化条件下又易于分解和原子化。例如加入 EDTA，它与被测元素钙、镁形成螯合物，从而抑制了磷酸根对镁、钙的干扰。

提高火焰温度可以抑制或避免某些化学干扰，例如在高温氧化亚氮-乙炔火焰中，磷比钙量大 200 倍，也不干扰钙的测定，而在空气-乙炔火焰中，干扰则是很显著的。

第六节 原子荧光分光光度法简介

原子荧光分光光度法是将样品溶液通过火焰原子化器或无火焰原子化器原子化产生的基态原子，用光源照射激发，当受激原子返回低能态时，发出原子荧光，通过检测装置测定原子荧光强度，以便测定样品中待测元素的含量。

同分子荧光一样，各种元素由于原子结构的不同，原子所发射的荧光波长各不相同

同。所发射的荧光强度与单位体积的原子化器中该种元素的基态原子数目成正比，如将激发光的强度和原子化条件保持恒定，则可由荧光的强度测出试样溶液中该元素的含量，从而进行原子荧光定量分析。

原子荧光分析所使用的仪器和原子吸收分析所使用的基本上一样，但光源、原子化器和分光系统不是排在一条直线上，而是排成直角形，如图 4-9 所示。

为了提高测定的灵敏度，应采用高强度辐射光源，如高强度空心阴极灯或无极放电灯等。原子荧光分析可用火焰，也可用无火焰原子化，但火焰有很大的消光作用。

原子荧光分析具有干扰少，灵敏度高的优点，对于一些元素，如 Zn、Cd、Ca、Mg 等，原子荧光分析具有很高的灵敏度，并具有更宽线性范围。

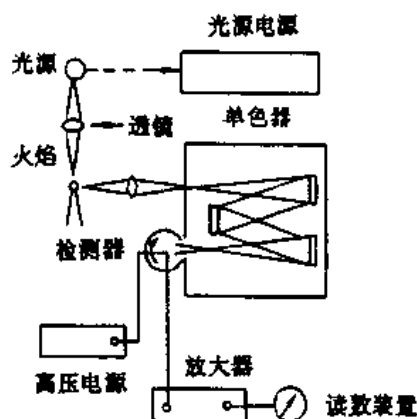


图 4-9 原子荧光分光光度计示意图

第七节 原子吸收分光光度法样品制备方法简介

原子吸收分光光度法主要用于土壤、动植物组织等试样的微量元素分析，因此适用范围非常广泛。在应用原子吸收分析方法时，必须对样品进行预处理，处理方式有：

1. 干灰化法

干灰化法是将植物、粮食等样品在 450℃ ~ 550℃ 高温下灼烧灰化，使碳水化合物分解挥发，留下无机盐、金属、非金属氧化物等。灰化残渣用硝酸或盐酸溶液提取，制备成待测液。用此待测液进行原子吸收光谱法测定时其干扰因素少，便于测定，缺点是某些元素由于脱水可能不易提取完全。

2. 湿灰化法

湿灰化法即三酸（硝酸-硫酸-高氯酸）混合消化法。当硝酸分解时放出新生态氧，具有强氧化性，植物、粮食及其它生物物质所含有有机质被氧化，有机质中的氢被氧化成水，碳氧化成二氧化碳等。硫酸在有机质存在时，同样分解为水、二氧化硫和氧 ($2\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{SO}_2 + \text{O}_2$)。硫酸的存在能加速氧化过程，这不仅是由于增加新生态氧，而且是由于使溶液的沸点增高（浓硫酸沸点 338℃）的缘故，因此，也防止了在硝酸完全分解后局部温度过高，而导致高氯酸盐和有机物作用产生爆炸危险。高氯酸在加热时生成无水高氯酸，与有机质作用后分解成水、氯、氧，新生态氯和氧具有强的氧化力，样品经过湿灰化法制备成的待测液能比较完全地提取各元素，但其干扰因素较多（可以采取适当措施加以消除）。

3. 其它方法

粉碎的植物干样用 6mol/L HCl 煮沸 15min 即可定量地浸出 Ca、Mg、K、Na、Mn、Cu、Zn、Fe、Cr，而无需彻底分解有机物。

样品在密闭容器的氧气中燃烧后用一定的吸收液溶解。在测定 Se、Hg 等样品时可

采用此法，它可减少易挥发组分的损失。

用原子吸收光度法测定植物叶片中微量营养元素 Cu、Zn、Fe、Mn，其试样处理可用 4mol/L HCl 微煮沸 40min，叶片中的 Cu、Zn、Fe、Mn、Ca、Mg、K、Na 均可完全定量地浸出，而不必用繁琐的三酸法消煮或干法灰化，因而方法简便、快速。

思考题

1. 如何理解共振线？在原子吸收光谱中为什么常选择共振线作为分析线。
2. 原子吸收分光光度计由哪几部分组成？它与普通分光光度计在结构上的异同点是什么？
3. 空心阴极灯的工作原理和特点。
4. 原子吸收分光光度计中为什么要采用锐线光源？
5. 比较火焰原子化与无火焰原子化的优缺点。
6. 原子吸收分光光度计工作时的干扰因素是什么？如何抑制？

第五章 发射光谱法

第一节 概 述

发射光谱法 (Emission Spectroscopy) 在农业、环保、生物、医学等领域中进行无机元素组成分析, 尤其是在痕量元素的分析方面, 曾经是重要分析手段之一。60 年代至 70 年代, 原子吸收光谱技术发展起来以后, 由于当时发射光谱技术在多元素分析的灵敏度与精确度方面比原子吸收光谱技术要差, 其应用面似乎受到一定限制, 但发射光谱法具有同时进行多元素分析的特点始终是该技术的一个明显优势。

近十年来, 随着计算机技术的发展应用, 发射光谱技术也有很多新突破, 多元素分析的灵敏度和精密度都有了大幅度的提高, 分析技术日趋完善, 某些元素的最小检出量可达 10^{-11}g , 使这一技术实用性更强, 应用面更宽。

在应用发射光谱尤其是电感耦合等离子 (Inductively Coupled Plasma, 简写 ICP) 光谱技术时, 首先显示的是其同时进行多元素分析的能力, 其次是其具有良好的动态范围, 即校准曲线在几个数量级的范围内都成线性关系, 这是一个非常有价值的特性。

ICP 光谱分析主要是一种溶液分析技术, 即使对固体样品也具有同样优势, 样品经溶解后, 可避免许多干扰, 因此在检测灵敏度, 测量精密度, 分析速度等方面都有其引人注目的特点。

1. 同时分析

在分析单个元素的相同时间内, ICP 光谱能够同时分析十几种甚至更多种元素, 这种能力显然是该方法最突出优点之一。

2. 顺序分析

ICP 光谱由于具备扫描功能, 因而可按顺序或其它方式提供很多分析线, 利用计算机控制单色仪扫描对每个元素考察不同谱线的特性, 针对不同的基体试样, 选择最佳谱线, 避免光谱重叠产生的干扰。

3. 宽动态范围

某些分析仪器和原子吸收光谱中仪器输出信号和被测元素浓度之间的线性范围小, 因此动态范围窄。但在 ICP 光谱分析中, 从光电倍增管输出的毫伏信号与元素的浓度在几个数量级的范围内都成正比, 信息处理方式简便, 动态范围宽, 溶液中元素浓度一般从 $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 (甚至超过) $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围的校正曲线都呈直线。

4. 基体干扰少

在 ICP 光源中, 样品气溶胶通过炬管中心通道受热蒸发、分解和激发。由于温度可达 $5000\sim 7000\text{K}$, 在发射谱中的化学干扰和电离干扰均较低。

5. 低的最小检测量

在原子吸收光谱中, 一般用基态原子线作分析线, 其背景噪声与信号噪声水平不相上下。而 ICP 光谱是一种发射分析法, 它是用激发态的谱线作分析线, 在高温条件下

获得原子化和激发效率，信号强度大，其信号噪声水平大于背景噪声水平，因此对很多元素有较好的最小检测量，其最小检测量的平均值比原子吸收法要好 5~10 倍（除碱土金属），对于一些耐高温氧化物中的元素，最小检测量要增加几个数量级。一些元素的最小检测量如表 5-1。

表 5-1 ICP 光谱仪的最小检测量

检出限 ng/mL	元 素
0.01~0.1	Mg Ca Ba Sr
0.1 ~10	Ag B Be Cl Co Cr Ca Cu Fe Ni Li Zn
10 ~100	As In Mo P Pb Se Sb Na
100~1 000	K Be Te

6. 精密度和准确度好

由于样品溶液在测试过程中以气溶胶形式均匀激发，消除组分影响，采用的高温惰性等离子体，消除了被分析物质在体系中可能产生的化学反应，使被分析元素充分原子化，减少或消除化学干扰。环形的电屏蔽装置，构成了光源的电稳定性。上述特点促使分析结果的离散程度大大减小，精密度和准确度提高，其它光谱技术很难与其相比。当被测元素浓度大于或等于最小检测量 100 倍时，测量结果的标准偏差可 < 1%。

第二节 发射光谱的激发光源

发射光谱分析法是根据被分析物质在高温下，分解形成原子所发射的特征光谱的波长及其强度，并对多种元素进行定性定量分析。

发射光谱有连续光谱、带光谱和线光谱如图 5-1，但发射光谱主要应用的是线状光谱。



图 5-1 A. 连续光谱 B. 带光谱 C. 线光谱

根据光与物质的相互作用原理（参见第一章第二节）发射光谱和原子的结构有着密切的关系，各种元素的电子层结构不同，能级有差异，因此不同元素的线状光谱具有极强的特征性。

当一个要鉴定的试样被激发时，所发射的光谱中有某一元素的特征谱线出现，即可认定试样中有该元素存在。已被精确测定的各元素的谱线可以做为光谱定性分析的依据。该元素特征谱线的发射强度说明试样中原子含量的多少，是光谱定量分析的依据。

在光谱分析中，所有的试样都要通过一定的手段使组成试样的分子被蒸发分解为自由原子或离子并进一步得到激发，使其发射出特征光谱来。这一目的必须通过一定的激

发光源来完成。

常用的光源有火焰、直流电弧、交流电弧、火花。近年发展起来的还有各种等离子体光源。

在分析中，要求光源具有灵敏度高，背景低，稳定性与再现性强，干扰少，操作简便等特点。这些要求很难同时满足。

一、火焰光源

火焰光源是发射光谱分析中采用最早的激发手段。这种光谱分析称为火焰光度分析。由于火焰的温度低于电弧和火花，更低于等离子体，因此较多地用于钾、钠的测定。

火焰燃烧器的结构有两种类型：预混燃烧器中燃料气体、助燃气体和随助燃气体流动而雾化的试样溶液预先混合，然后进入燃烧器中燃烧。形成的火焰称预混火焰，如图 5-2a。

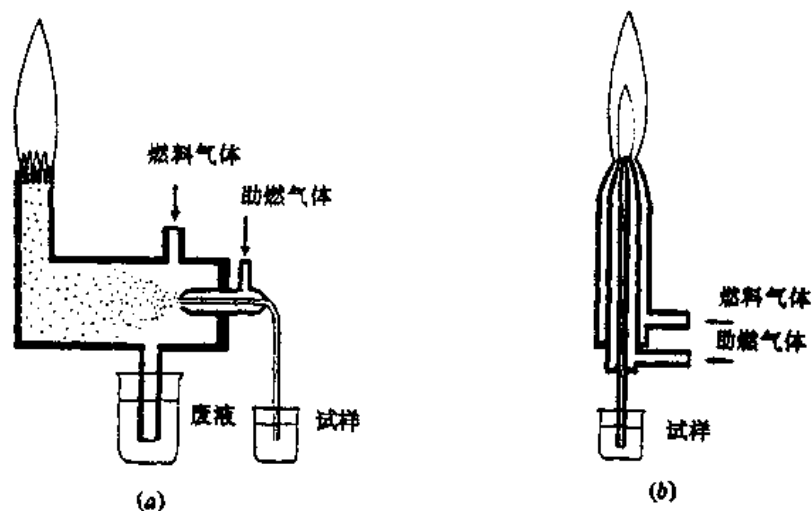


图 5-2 预混型燃烧器和全消耗型燃烧器

另一种为全消耗型燃烧器，燃料与助燃气体的混合，试样的雾化均在燃烧器口进行。形成的火焰称扩散火焰（图 5-2b），前一种燃烧器试样雾化后在混合时大部分回流排掉，只有少部分进入火焰得到激发，但稳定性好，目前多采用这种燃烧器。后一种虽然样品全部进入火焰，但激发效率并不一定高，且稳定性差，故使用较少。

燃料气体最常用的是乙炔、煤气或丙烷气，助燃气体是空气。有时为了分析更多的元素或提高分析灵敏度，使用一氧化二氮（笑气）作为助燃气体与乙炔燃烧，火焰温度可达 2800℃（表 5-2）。

表 5-2 火焰温度

空气-丙烷	1800℃
空气-乙炔	2400℃
一氧化二氮-乙炔	2800℃

多数原子吸收分光光度计都有提供火焰发射光源的功能，因此也可作为火焰光度计使用。

二、电弧电源

如果在相隔数毫米的两个碳电极间加

上 200~300V 直流或交流电时，在电极间可形成电弧，温度可达几千度。如果在电极间载有试液，在一定温度下试液中原子、离子、电子之间相互碰撞受到激发而发射出光谱。

通常直流电弧可激发 60~70 种元素，灵敏度高，可进行一些痕量元素的分析，由于电极温度极高，稳定性较差，从而影响分析精确度，此种方式常用于定性分析。

交流电弧具有同直流电弧相似的优点，灵敏度稍低，稳定性却高得多，尤其是低压电弧，由于电源方便，线路比较简单是定量分析中经常使用的光源。其缺点是光源的稳定性和难激发的非金属元素分析的灵敏度不及火焰光源。

三、电感耦合等离子体光源

自然界中物质通常有三种聚集状态即气、液、固态，但对于某些物质（单质）在高温状态下会存在另一种聚集态——等离子态。处于高温的某种气体，由于分子的热运动，分子间激烈碰撞，电子脱离原子核成为自由电子，形成了由大量自由电子和正离子组成的电离气体，其特点是气体中正负电荷所带电量相等，整体呈电中性，这种呈电离状态的气体称为等离子体。

等离子体光源是近年来发展比较快的一种光源技术，它主要有直流等离子体，微波等离子体，电容耦合等离子体与电感耦合等离子体（ICP）光源。这里主要介绍发展较快的 ICP 光源。

ICP 光源的焰炬装置见图 5-3。焰炬由三个同心石英管组成，在内、中、外三层分别通入不同流速的氩气。在外层管管口绕有数匝铜感应线圈，当有高频电流（一般为 27MHz，数百至数千瓦功率）通过时，在线圈的周围产生高频电磁场。当在炬口用点火器（碳棒点火时，由于被电离气体在电磁场涡流中的高速运动，在炬口形成温度高达 6 000~10 000K 的等离子体。被喷成雾状的试样溶液随氩载气一同进入石英内管，并穿透等离子体核心区，在此过程中被分解为原子或离子并受到激发。

光源的能量通常用无线电频率高频发生器（RF）提供，振荡频率为 27.12MHz，功率约 1.8kW，当高频发生器产生的高频电流通过感应线圈时，就有高频交变电磁场产生，在石英炬管的轴向磁场最强，当石英炬管内通过氩气时，轴向的高频变化磁场使炬管内氩气中的带电粒子排列成一个闭合环路（电磁感应，变

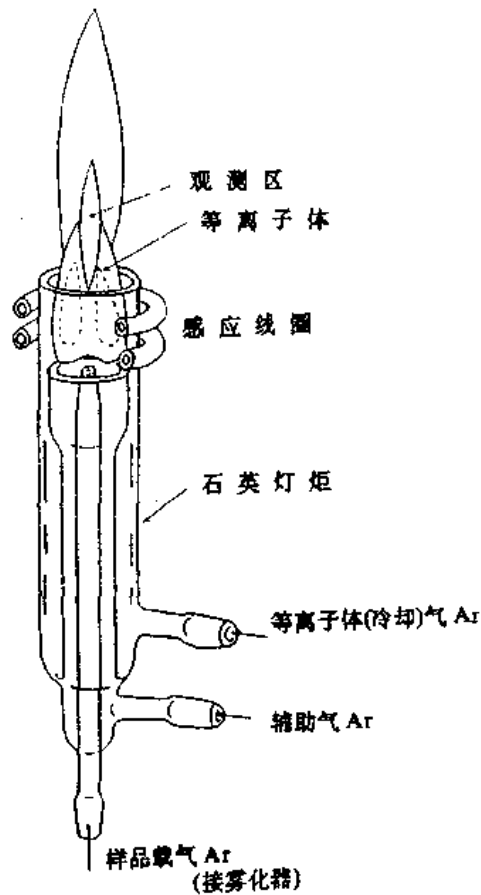


图 5-3 电感耦合等离子体焰炬

化磁场在导体中感应出电流)。因为高频磁场的方向和强度都随时间变化,所以在闭合环路中流动着的带电粒子(离子和电子)在周期变化磁场的每半周都要受到高频磁场的加速和减速,带电粒子高速运动受到阻力便产生热量,高温和碰撞使炬管内的气体继续电离,产生持续的等离子体炬。

高频发生器输送高频电流,通过电磁感应,把能量提供给氩等离子体。在等离子体中,当电子和正离子因碰撞而结合时,又释放出光和热,产生约 10 000K 的高温。

为使氩气能在高频磁场中产生等离子体,氩气中事先要播种自由电子及离子。这是由炬管上方的碳棒在氩气中放电产生的,称为点火。点火后,播种的电子和离子在高频磁场中经多次振荡,碰撞,提供热能和动能,进一步引发氩气电离,产生持续的等离子体。

由于在感应线圈环形结构内温度较高,可达 10 000K 以上,发射出的辐射光强度很高,不能用作发射光谱谱线光源。在感应线圈上 10~30mm 处光的强度减弱,等离子体变得透明,光谱的观测常在这一范围内进行,称为正常分析区。观测谱可通过观测高度进行调整。

ICP 分析的进样方式是,先将样品制成溶液,将溶液由蠕动泵通过毛细管 B 输送到喷雾器中,见图 5-4。高速载气由喷嘴 A 射出,由于射流的动能,和射流形成的负压,把液体样品从毛细管 B 喷出,并破碎成雾滴。在雾化器和炬管中间有一雾化室 C,起缓冲稳定作用,并对雾滴进行筛分,小雾滴以气溶胶 D 的形式被载气通过样品注入管 E 带入炬焰 F 中。载气流速的大小会影响雾化效率,并决定样品气溶胶在等离子体内停留时间,还对观测高度,中心通道的温度等产生影响。

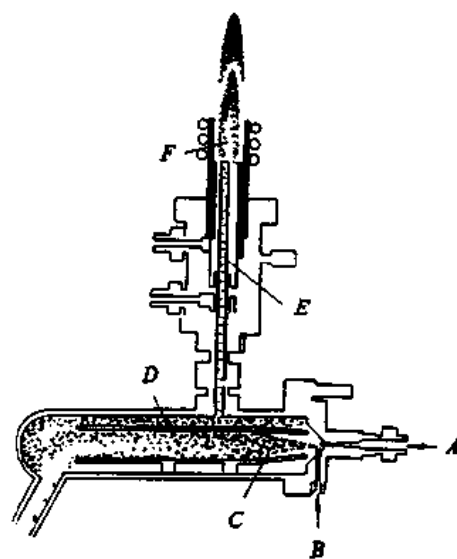


图 5-4 ICP 进样系统

- A. 载气喷嘴 B. 样品喷嘴 C. 雾化室
D. 气溶胶 E. 样品注入管 F. 炬焰

样品在 ICP 炬焰中的原子化及激发过程如下:

溶液 $\xrightarrow{\text{雾化}}$ 气溶胶 $\xrightarrow{\text{去溶剂}}$ 液态分子 $\xrightarrow{\text{汽化}}$ 气态分子 $\xrightarrow{\text{原子化}}$ 气态原子 $\xrightarrow{\text{激发}}$ 激发态原子、发射原子线 $\xrightarrow{\text{电离}}$ 离子 $\xrightarrow{\text{激发}}$ 激发态离子、发射离子线

通常 ICP 炬管光源都采用垂直安装 RL 式,径向观测等离子体,适用于各类样品分析,动态线性工作范围宽,但存在一些光谱干扰等因素,某些元素的痕量分析受到限制。国外新近推出了水平安置炬管 XL 式,轴向观测等离子体的技术如图 5-5,进一步改善了痕量元素的检出灵敏度。水平安置炬管,采用压缩空气切去等离子体尾焰,以减少分子谱干扰和保护外光路元件。这种端视式等离子体能获得比侧视式 RL 好 5~10 倍

的最小检测量，特别适合于检测更低含量的痕量元素，尤其适合于高纯金属、高纯材料、化工、水质、环保等领域的样品分析（最小检测量比较见表 5-3）。

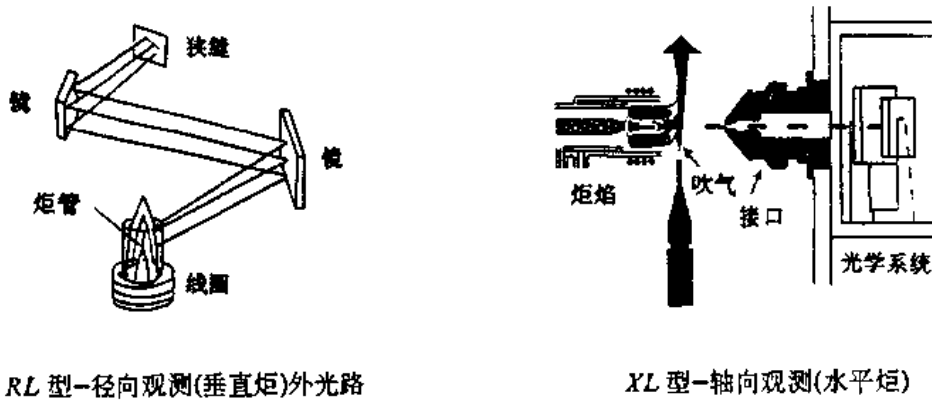


图 5-5

表 5-3 RL 与 XL 最小检测量(PPb)比较

元素	As	B	Ba	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Pb	Zn
RL	8.5	0.8	0.09	0.02	0.24	1.0	0.4	0.7	13	0.06	0.2	3.0	3.2	0.1
XL	0.9	0.5	0.01	0.02	0.09	0.2	0.2	0.3	2.0	0.01	0.03	0.5	0.8	0.07

第三节 等离子发射光谱仪

根据发射光谱原理仪器基本组成，框图如图 5-6 所示。

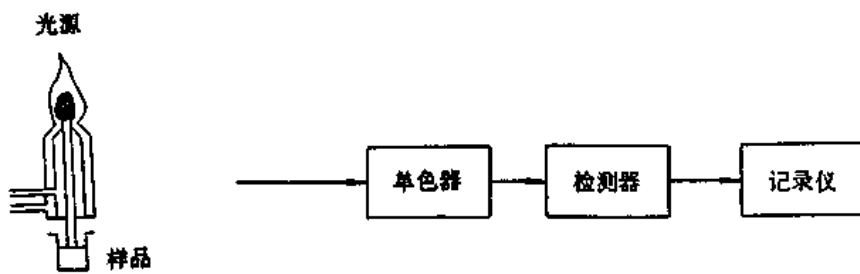


图 5-6 发射光谱分析仪器的基本组成

按照发射光谱仪基本组成，单通道顺序扫描等离子光谱仪光路系统如图 5-7 所示，等离子炬前面的反射镜用以调节观测高度，光栅转动的角度由计算机控制步进电机精密驱动的，操作人员利用计算机按所设波长指示步进电机转动光栅角度，将元素发射的某一单色波长的光照射到光电倍增管进行检测。通常在进行多元素同时分析时，光栅

从低波长向高波长转动，依次使各元素分析波长的单色光到达检测器。

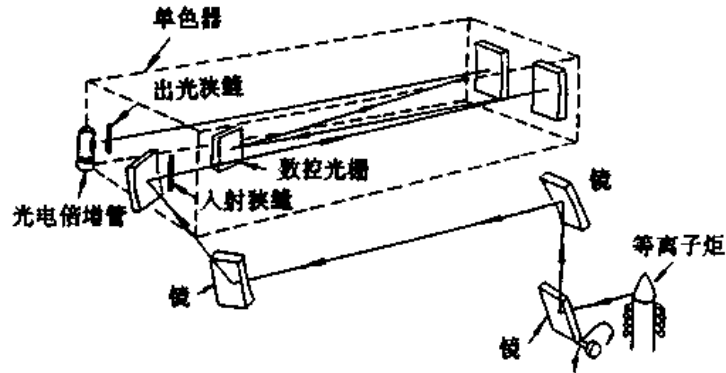


图 5-7 单通道顺序扫描式等离子发射光谱仪光学系统

全谱直读等离子发射光谱仪在 165~782nm 范围内分 235 个区段，全谱分段直读，并采用分段式平面阵列电荷耦合检测器（SCD），加快和提高了分析速度与测量精度。如图 5-8 所示，ICP 光通过两个曲面反光镜聚焦于入射狭缝，由微机控制前置反光镜调节选择 ICP 最佳观察高度及位置。入射光经抛物面准直镜反射成平行光，照射到中阶梯光栅上衍射分光，再经（Schmidt）光栅交叉衍射生成二维色散平面谱图，配合 SCD 平面检测器检测，而仪器从（Schmidt）光栅中央孔洞分出一部分光经棱镜进行交叉色散，再配另一个 SCD 检测器以同时测量可见光光谱（404~782nm）。

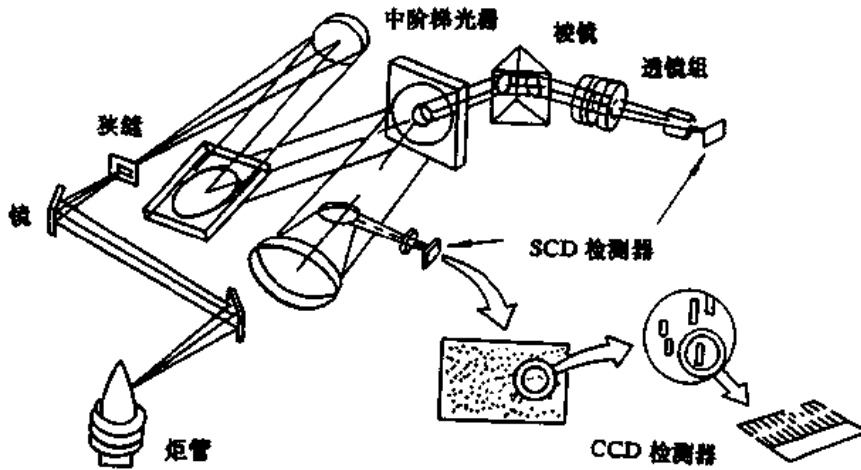


图 5-8 OPTIMA 3000 系列等离子体发射光谱仪光路

采用宽狭缝和大面积中阶梯光栅，以获得大的光通量和强聚光能力，仪器设有紫外光与可见光二路成像系统，使用两个检测器以增加检测器有效面积，从而提高了谱线分辨率和测量速度，使用消色差、消像差的成像系统，使谱线极为清晰，光学杂散光极低，确保极好的信噪比。

1. 中阶梯光栅

中阶梯光栅技术主要特点是可以达到很高的线色散率和理论分辨率，且均可在各相应光谱级的闪耀波长位置工作。因其所用的光谱级较高，可采用 28~120 级，但不同光谱级的光谱线相互重叠十分严重，因而不能象普通光栅用滤光片的方法分离光谱级。为了克服这一弱点一般采用交叉色散技术，即用棱镜或普通光栅构成第二色散元件，与中阶梯光栅交叉配置，把经中阶梯光栅衍射分光后所得到的包含不同光谱级的光谱沿垂直方向拉开，在焦面上获得二维光谱如图 5-9 所示。这种技术可以有效排除光谱干扰，同时又能提高谱线的分辨率及分析精度。

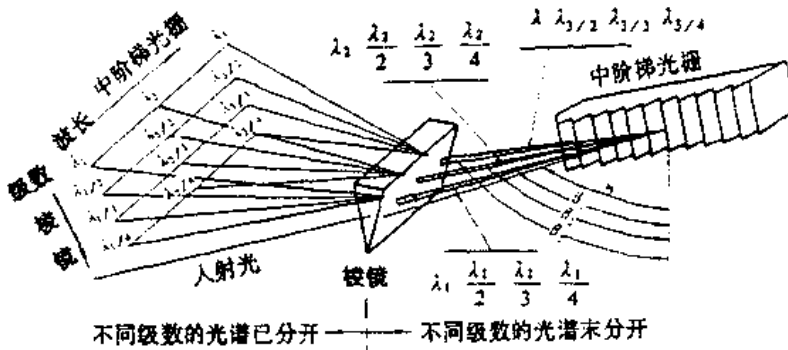


图 5-9 中阶梯光栅——棱镜交叉色散原理示意图

2. SCD 检测器

等离子光谱的各种元素发射谱线有数千条，对于传统的光电倍增管技术，要想选择数千条分析谱线并且同步测定信号与背景似乎不太可能，采用 SCD 检测器可以有效解决上述问题，如图 5-10。

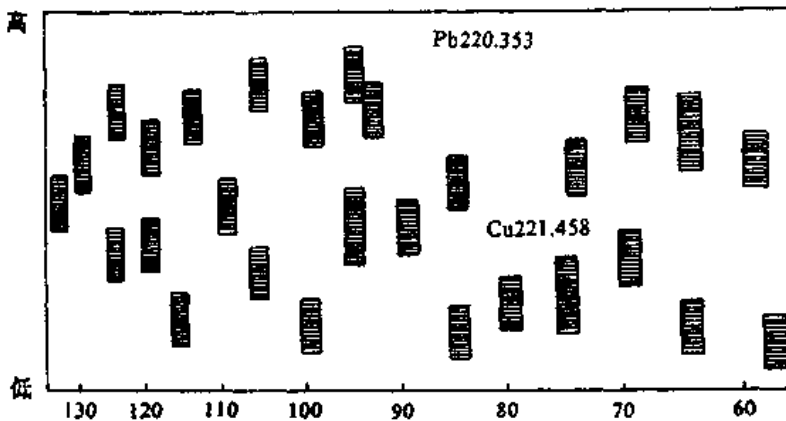


图 5-10 SCD 检测器子阵列分布示意

SCD 检测器是光电效应检测器 (CCD) 的进一步发展，是以半导体硅片为基材的集成电路式的光电检测器。当受光照射时，由光电效应在芯片上产生电荷，而在硅片表

面上施加一定的电势，使它产生贮存电荷的分立势阱，这些势阱构成检测器微元，成千上万个微元构成一个平面检测阵列。它与二维色散的分光系统相匹配，使要检测的几十，甚至几百条谱线都在同一时刻检测它们的谱线强度和背景强度，实现了全谱直读的检测技术。SCD把 $13 \times 19\text{mm}$ 的CCD划分成235个子阵列，每个子阵列包含20~80个微元以检测一条相应的谱线或一区段的谱图，其四周设有屏蔽地线，以使每个子阵列的电荷即使是超饱和时也不能溢出到相邻的子阵列中，确保高、低、痕量元素检测的准确性。而每个子阵列都编上地址码，由微机控制，按用户的选取直接输出所需测定的谱线的谱图数据，克服了CCD读出数据时必须全部顺序读出的缺点，使读出和打印数据极为灵活、快速。同时，每个子阵列还包括一套照相快门和信号处理放大系统，能自动按信号的强弱选定积分时间(1~65 000ms)，避免接收信号饱和溢出而干扰已设定元素的检测灵敏度。

第四节 等离子发射光谱主要工作参数及定量分析法

一、主要工作参数

1. 反向(RF)输出功率

在等离子炬中，增大RF功率，使等离子体温度增高，元素的发射强度增加，但同时等离子体中电子、离子密度增加，它们复合产生的连续背景加深。如温度为7 000K、8 000K、10 000K时，背景强度为1:10:1 000，因此增大功率，会使背景信号增强，检测灵敏度下降，为了有效获取谱线信息通常RF控制在1.1~1.6kW左右，参数见表5-4。

表 5-4 ICP 操作参数

名 称	水 溶 液	有机溶液
等离子气流量	12~15L/min	17~19L/min
辅助气流量	0.6~1.0L/min	1.2~1.8L/min
载气流量	1.0~1.2L/min	0.7~0.9L/min
RF	1.1~1.25kW	1.4~1.6kW
观测高度	15mm	15mm

2. 观测高度

由于等离子炬焰的温度沿高度方向不同，不同元素都有其合适的激发温度，尽管选取分析波长和谱线性质(原子线或离子线)与激发温度有关，但火焰的不同观测高度信噪比差别较大，大多数元素15mm是最佳观测高度，低于190nm波长时，背景强度较低，观测高度可选10~12mm。

3. 等离子气流量

要想维持炬管中等离子体稳定，并可达到冷却保护炬管作用，通常气体流量控制在10~20 L/min，流量过高，造成不必要的浪费。

4. 载气流量

载气流量由小增大时，样品气溶胶增多，发射强度也相应增加，但同时又使等离子体温度下降，光谱强度减弱。由于每种元素在特定波长下都有一最佳流速，载气波动会对分析结果造成很大影响，分析时要控制其稳定性，通常控制在 $0.8 \sim 1.2 \text{ L/min}$ 。

二、定量分析方法

发射光谱的定量分析方法是根据试样中被测元素发射的谱线强度与浓度之间函数关系，以比耳定律为主要参考依据。数据信息通过计算机进行采集、处理，数据处理可采用内标法、外标法、最小二乘法等定量方法，将结果按用户要求输出。

第五节 ICP 发射光谱的干扰问题

干扰问题是评价一种分析方法的重要指标之一。它决定了所选取分析方法的分析速度和分析质量。ICP 光源的干扰是比较少的，但仍存在一定干扰因素，如基体干扰和光谱干扰。

一、基体干扰

基体干扰是由于试样中的物理特性不同而引起的干扰，所以又称物性干扰。在 ICP 仪器中，主要用气动雾化器使试液雾化为气溶胶。气动雾化器的雾化率及气溶胶质点的大小与试液的物理性质，诸如试液粘度、表面张力及密度等直接相关。另外样品与标准溶液基体组成的差异，例如酸度，碱、酸种类，总离子含量的不同，同样会引起溶液吸进率及气溶胶输送量的变化，造成测量结果偏高或偏低。其干扰程度取决于样品输送量所受影响的大小。为了消除这类干扰，采用蠕动泵输送样品，对于维持稳定的样品输送量是行之有效的。还可以采用基体匹配法。在配制溶液时保持标准样品及空白溶液的酸度一致，在标准与空白溶液中加入样品中含有的一些非测定成分，使三者总离子浓度及化学组成尽量保持一致。一般来说将固体溶解物含量控制在 0.5% 以下时，基体干扰将大为减弱。在实际运用中注意以下几方面来消除干扰因素：

1. 酸溶液的背景值及其中元素的谱线强度均低于水溶液；

2. 随着酸的浓度增加，谱线强度显著降低；

3. 各种无机酸的影响按以下顺序递增：
 $\text{HCl} \rightarrow \text{HNO}_3 \rightarrow \text{HClO}_4 \rightarrow \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$ ；

4. 谱线强度的变化与提升率的变化成比例。

二、光谱干扰

在 ICP 光源中光谱干扰要严重一些。光谱干扰有以下几种类型：

1. 简单背景漂移（图 5-11(a)），在分析线两侧背景强度一样；

2. 斜坡背景漂移（图 5-11(b)），在分析线两侧背景强度不一致；

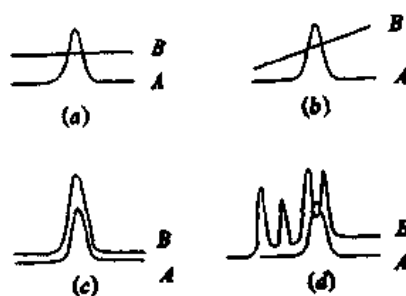


图 5-11 光谱干扰

(a) 简单背景漂移 (b) 斜坡背景漂移
 (c) 直接谱线重叠 (d) 复杂谱线重叠

3. 直接谱线重叠〔图 5-11(c)〕, 干扰线和分析线完全重合;

4. 复杂谱线重叠〔图 5-11(d)〕, 分析线和两条或两条以上的干扰线重叠。

谱线重叠干扰在工作中经常会碰到, 消除方式一般采用消除光谱背景, 对试样进行化学分离及另选无干扰谱线。

第六节 ICP 发射光谱技术和其它分析技术的比较

目前, 现代化分析手段愈来愈多, 摆在分析工作者面前的现代化分析仪器琳琅满目, 而仪器的设计者都声称它们具有高灵敏度、高精密度, 可以分析各种类型的样品。因此, 要选择哪一种仪器及使用哪一种分析技术最合理有效, 就成为分析工作者必须正面回答的问题, 尤其是当两种技术的分析对象相近时, 这种选择和评价更为困难, 也更为必要。

原子吸收光谱仪和原子发射光谱仪在结构上有些主要部件是十分相似的, 两种分析技术在分析对象、应用范围及技术性能等方面也有许多相似之处, 因而导致一种错误的想法, 在同一实验室中, 只要配置两种仪器中的一种就可以了, 但实际情况是, 尽管 ICP 光谱技术和原子吸收光谱技术有相同之处, 但也有很多不同之处, 随着两种技术的发展和改进, 各自的技术更趋成熟和完善, 特点也更加突出。

原子吸收法测定金属元素, 有良好的检测限, 但实际情况告诉我们, 除了某些易挥发及易原子化的元素以外, 对于许多元素并不具有很高的灵敏度, 高熔点的金属和难挥发的元素的检测限都较差, 甚至根本无法直接测定, 例如钍就是其中的一个元素。检测限最好的元素是镁、钙、锌等, 铈、锆、钽、硼、磷的检测限很差, 而 ICP 光源则与此不同, 由于温度高, 可以使最难离解的化合物分解并原子化, 因而对各元素都有较好的灵敏度, 例如当用 ICP 光源测定铀时, 积分 10s 可获得 $0.04\mu\text{g}/\text{mL}$ 的检测限, 这一数值就优于原子吸收法 1 000 倍, 对于硼和磷来说, ICP 光源也优越得多, 表 5-5 介绍了两种技术的性能。

数据表明, ICP 光谱法的检测限略优于火焰原子吸收法, 而不如石墨炉原子吸收法, 但硼、钨、铀、锆等元素例外。

在分析精密度方面, 火焰原子吸收法可达到 0.3%~0.5%, 石墨炉原子吸收法的精密度较差, 在 2%~10% 之间, ICP 光谱法的精密度和积分时间及测量方式有关, 静态测量时最好可达到 0.3% 的精密度, 动态测量时可达 0.5% 的精密度, 而在积分时间为 1s 时只能达到 1% 的精密度, ICP 光谱法的精密度可以满足大多数分析要求, 但还略逊于火焰原子吸收法, 而远高于石墨炉原子吸收法。

近几年 ICP 光谱中分光技术, 检测技术等都有重大改进, 分析精密度也得到了提高。

由于原子吸收光谱火焰温度较低, 因此化学干扰, 电离干扰比较严重, 如磷对钙有吸收抑制作用, 而 ICP 光谱火焰温度较高, 这类干扰因素很小。

在 ICP 光源中, 光谱干扰是一个比较严重的问题, 因 ICP 光源中发射谱线数目很多, 如仅一铁元素就有约 4 000 条谱线, 因而辨认谱线和消除干扰就成为建立分析方法

表 5-5 检测限的比较($\mu\text{g}/\text{mL}$)

元 素	ICP / 5 000	火焰原子吸收法	石墨炉原子吸收法
B	0.000 5	0.008	0.000 15
Ba	0.003	0.7	0.015
Cd	0.003	0.002	0.000 003
Mn	0.000 6	0.002	0.000 01
P	0.02	50	0.03
Ti	0.002	0.04	0.000 5
W	0.02	1	-
U	0.04	30	-
V	0.002	0.04	0.000 1
Zr	0.004	0.35	-

的一项重要任务。

在原子吸收法中，谱线干扰的机会很少，仅发现屈指可数的几个光谱干扰实例。因此建立方法时，消除干扰几乎可以不费时间。

为了消除光谱干扰，采用高色散的分光系统并利用电视终端，可以清晰地监视和发现谱线干扰而加以避免。顺序型等离子体光谱仪，可以方便的避开干扰谱线或另选无干扰的谱线。由于电子计算机的发展，可以采用大容量计算机，通过大量实验，求出干扰谱线的“干扰等效谱线的干扰等效浓度”值，而从测定数据中扣除之。

ICP 光谱法工作曲线的线性范围，要比原子吸收法宽得多，一般不难达到五个数量级。而原子吸收法一般只有两个数量级。例如，原子吸收法测定锰时，在 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下为直线；ICP 光谱法则高达 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 仍为直线。

由于 ICP 光谱法的工作曲线线性范围很宽，因而分析时可避免多次稀释样品的麻烦。

第七节 发射光谱法的应用

一、水质分析

水中痕量元素的分析是一项难度较大的工作，稍不注意就会出现质量问题，因为水样不稳定，以及因为分析元素含量极低时，玷污问题就显得十分突出，所以必须非常注意制样和分析的所有步骤中的操作细节。

1. 采样

水样采集时要考虑到自然环境和人为污染等空间和时间等潜在影响因素。采样时应尽可能避免沉积物的干扰，并注意采样装置及其它附属设施可能带来的玷污。

2. 过滤

天然水总是含有一些微细的悬浮物，它们所携带的待测元素可能比真溶液中的还要

多。尽管在某些情况下能够分析全部水样，但这种水样由于悬浮物的沉降而不稳定，需要做某种处理以溶解待测元素。在一般情况下都要过滤水样，常常在现场用 $0.45\mu\text{m}$ 孔径的塑料滤膜过滤，通过这种滤膜的物质被认为是“溶解”的。如有必要，在经过适当的溶解处理后可另行分析滤渣。

3. 保存

水样最好保存在硼硅玻璃瓶、高密度聚乙烯或聚丙烯瓶中，因为塑料器皿避免了与玻璃发生碱金属离子、尤其是硼的交换，所以在大多数 ICP 光谱分析中最好用塑料器皿。瓶子在使用前必须用稀硝酸仔细清洗干净，并且仔细检查其适用性。

4. 保持稳定

在采样和分析过程中通常要用 1% 无机酸酸化水样以保持稳定，这将减少容器表面对痕量金属离子的化学吸附并防止阳离子水解和沉淀，同时也强烈地抑制由于生物作用而引起的变化，这对诸如汞和砷这些容易进入生物圈的元素是十分重要的。在 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存样品以及在某些情况下深冻能进一步减少不稳定成分的损失或变化。

5. 预富集

预富集是使待测元素转入比原水样体积小小的试液中，扩大了分析方法对低含量样品分析的应用面，预富集方法可分为两种：一种是非选择性富集法，即对样品中所有的溶解物质都等同富集，如利用蒸发减少样品的体积就是主要的非选择性富集法，萃取、共沉淀及离子交换也都属于这种方法；二是选择性富集法，即仅对某些待测元素进行富集，而将其余组分弃去。在 ICP 光谱技术中，这种方法非常有用，因为它常常能富集样品中低含量的重金属元素。

例如痕量元素镉、钴、铜、铁、锰、镍、铅和锌在缓冲溶液中与二乙基二硫代氨基甲酸钠反应，用三氯甲烷萃取。500mL 原始水样中待测元素最终进入 5mL 水溶液中，富集倍数为 100 倍。

二、污泥分析

污泥中主要由有机质和硅质成分组成，并含有众多钨成分，为了使基体中的各种常量及痕量元素释放溶解在溶液中，必须采用适当方式充分氧化试样中有机物。

溶解污泥等物质的混合酸有多种，最常用的有：①王水；②硝酸；③硝酸-高氯酸；④硝酸-硫酸。在某些方法中，溶解法优于干法灰化。在对比研究中，人们可以通过测定这种方法释放出钨的表观浓度来估计该方法的有效性。这些方法显然不能溶出硅质物质中所含的全部重金属元素，但这在环境意义上并不重要，因为这样强的混合酸都不能溶出的元素，它在生物圈中就不能看作是有毒元素。

例如：将 0.5g 的干燥样品与混合酸一起加热，直至有机物被硝酸完全氧化，溶液变得澄清无色。然后将残液稀释至 25mL 进行分析。通常用硝酸溶解为最佳方法，它能提供镉、铬、铜、镍、铅和锌的可靠结果。该法也能直接应用于 ICP 光谱测定，同时还能包括另外一些元素的分析。

三、生物样品分析

在本方法中用硝酸处理植物或动物组织样品，先是冷处理，然后加热处理，当反应要结束时加入高氯酸完成氧化，同时将混合酸逐渐蒸发至干，将残渣溶于盐酸待分析。

除了含有大量油或脂肪的样品外，此方法适用于大多数种类的植物和动物组织，但挥发性元素（硼、硫、硒、汞）可能损失，土壤玷污带来的铈和钪不能完全溶解。生物样品处理方法为：

称样（在 105℃ 干燥并磨碎的样品 2.00g），放入干净、干燥、编号的锥形瓶中，加入 10~40mL 硝酸，盖上表面皿，在通风橱内放置过夜，将锥形瓶放在电热板上慢慢加热，直到起泡现象停止，溶液接近澄清，在加热过程结束时硝酸应保持微沸状态（但是没有大量损失）。让锥形瓶冷却，检查溶液表面是否有漂浮的油珠。加入 3mL 高氯酸，将锥形瓶置于电热板上，不加表面皿，非常缓慢地加热直到刚好蒸干，切勿过度加热。让锥形瓶冷却，加入 2~3mL 水、2.0mL 6mol/L HCl，低温加热溶解残渣，将冷却后的溶液移入带刻度试管或带刻度烧瓶中，用水稀释定容。

思考题

1. 简述明线光谱、带光谱和连续光谱的特征。
2. 何谓等离子体。
3. 简述电感耦合等离子体炬的工作原理。
4. 发射光谱与吸收光谱各有何特点？
5. 干灰化与湿灰化法各有何特点？

第六章 荧光光谱法

第一节 概 述

当用某一波长的光（如紫外光）照射某一物质时，这种物质能在极短的时间内发射出较照射波长稍长的光（如可见光），这种光称为荧光。如果这种物质在较长的时间内，发出比荧光波长更长的光，即可称为磷光。1852年斯托克斯阐明了荧光发射的机制，认为荧光是由于物质吸收了光能而重新发出的不同波长的光线，而不是由于光的漫反射作用引起的，并从一种能发荧光的矿物——萤石（Fluospa）而定名荧光。20世纪以来，对荧光现象进行了广泛而深入的研究，研究比较多的是物质吸收紫外光后，发出波长较长的紫外荧光，以及吸收波长较短的可见光后，发出波长较长的可见荧光。除此以外，物质吸收了波长较短的X光后，发出波长稍长的X光荧光，以及有些物质吸收了红外光后，发出红外荧光等等。一般所称的荧光分析是指对紫外荧光或可见荧光的分析。本章主要介绍与分子荧光相关的内容。

第二节 荧光光谱法的基本原理

一、荧光的产生

当光照射某物质以后可以有两种情况发生：一种是能量几乎不被吸收，另一种是能量被全部或部分吸收。在后一种情况下，光能被转移给分子，根据量子理论，分子从光波中吸收的能量是量子化的，每个分子具有一系列严格分立的能级，处于基态的分子吸收了特征频率的能量以后，可以从低能级跃迁到高能级，被吸收的光量子的能量正好等于两个能级之差。如图6-1。

图6-1表示一个分子的各种能级。基态用G表示，第一电子单线激发态用 S^* 表示，第二电子单线激发态用 S^{**} 表示，第一电子三线激发态用 T^* 表示。基态和激发态都有几个不同的振动能级，图中用 $V=0, 1, 2, 3$ 表示。

当光量子打到分子上时，大约在 10^{-15} s内被吸收，同时电子就跃迁到比较高的单线电子激发态 S^* 或 S^{**} 等。这种辐射的吸收是高度专一的，一定的结构只吸收一定的能量辐射，并且吸收的光量子的能量必定正好等于两个能级之差，这种从基态到单线态的跃迁相应于分子的紫外—可见吸收光谱。跃迁以后，能量较高的激发态分子，通过内部能量的传递把部分能量转移给周围分子（如溶剂分子），自己回到电子激发态的最低振动能级。处于电子激发态的最低振动能级的分子平均寿命大约为 10^{-8} s左右。这时它不通过内转换的方式来消耗能量回到基态，而通过发射出相应的光量子来释放能量，回到基态的各个不同振动能级，这时就产生了荧光。因为在发射荧光以前有一部分能量已被消耗，所以发射的荧光能量要比吸收的能量小，也就是荧光的特征波长比吸收的特征波

长要长，见图 6-1。

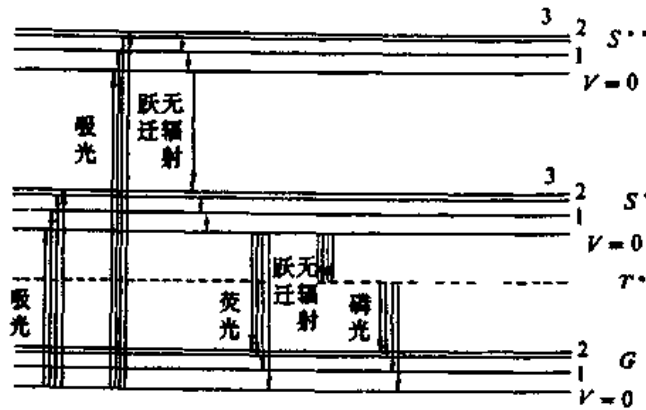


图 6-1 吸收光谱和荧光光谱能级跃迁示意图

磷光现象涉及到单线态到三线态的系间跃迁，即电子自旋方向发生了变化。从基态到三线态的跃迁是一种禁戒跃迁，但从单线态到三线态的转换是可能的。因为第一电子三线激发态的最低振动能级的能量比第一电子单线激发态的最低振动能级的能量低，所以如果处在第一电子单线激发态最低振动能级的分子不直接降落至基态，而是通过无辐射跃迁（系间跨越）降至一个中间的亚稳能级—三线态后，再放出光量子回到基态各振动能级时，就发出磷光。磷光的寿命可为 10^{-4} s 到数秒，所以，除去激发光源后，荧光立即熄灭，但磷光还可能持续一段时间。因为由三线态降落到基态所放出的能量较由第一单线激发态的最低振动能级降落至基态所放出的能量要小，所以磷光的波长要比荧光的波长稍为长些。

由荧光产生的机制及图 6-1 可以看出：

1. 激发光谱的形状和吸收光谱的形状极为相似见图 6-2，这是因为物质分子吸收能量的过程就是其激发过程。当然在激发光谱未进行校正时，与吸收光谱可能有差别。

2. 发射光谱的形状和激发光的波长无关（个别化合物例外），这是因为荧光的产生是由第一电子单线激发态的最低振动能级开始的，与荧光物质分子原来被激发到哪一个能级无关。所以，利用这一特性可检查化合物的纯度。

3. 荧光光谱的形状和吸收光谱极为相似，且呈镜像对称关系，见图 6-3。吸收光谱中第一吸收带的形成，是由于该物质的分子由基态被激发至第一电子激发态中各个不同振动能级所致，所以其形状决定于第一电子激发态中振动能级的分布情况；荧光光谱的形成，是由于激发分子从第一电子激发态中最低振动能级降落至基态中各个不同振动能级所致，所以其形状决定于基态中振动能级的分布情况。由于基态中能级的分布和第一电子激发态能级的分布情况类似，当由基态中最低振动能级跃迁到第一电子激发态各个振动能级而显示的吸收峰时，第一电子激发态振动能级越高，则两个能级的能量差就越大，吸收峰的波长越短。与此相反，由第一电子激发态的最低振动能级，降落至基态的各个振动能级而显示的荧光峰中，基态的振动能级越高，则两个能级的能量差就越小，荧光峰的波长越长。所以前后两者不但形状相似，且呈镜像对称关系，但这种镜像对称

关系是表现为频率或波数对称而不是波长对称。

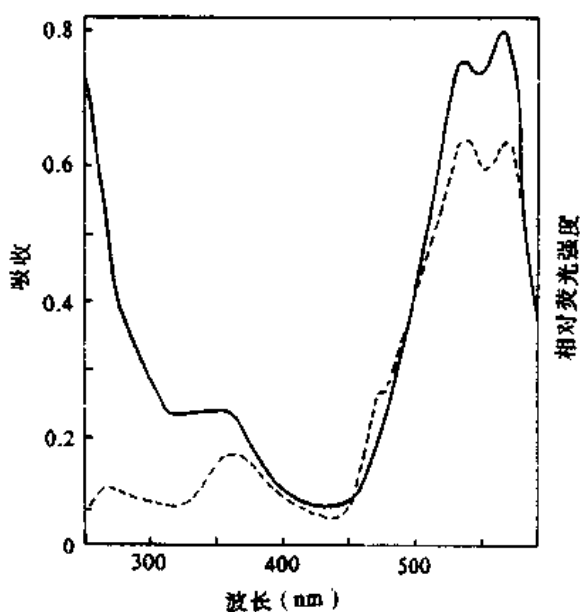


图 6-2 PBBR-铝螯合物(在 95%乙醇中)的吸收光谱(实线)和激发光谱(虚线)

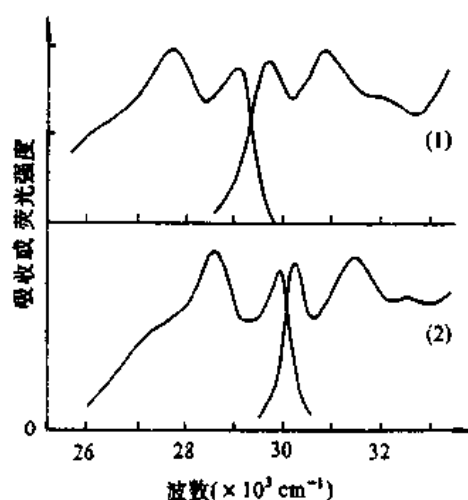


图 6-3 吡啶在正丁醇(1)和正己烷(2)中的吸收光谱和荧光光谱

此外，经常可以看到大多数荧光物质的荧光光谱只有一个荧光带，不像吸收光谱具有几个吸收带，这是产生吸收光时，分子可由基态跃迁至几个不同的电子激发态，因而吸收光谱中常可呈现几个吸收带，而发射荧光时，仅由第一电子激发态的最低振动能级降落至基态，所以荧光光谱通常只呈现一个荧光带。

二、荧光和分子结构的关系

荧光和分子结构的关系是个比较重要的问题，因为弄清它们的关系，可以预示分子能否发荧光、在什么条件下发荧光以及发出的荧光将具有什么特性，它可给荧光分析应用提供重要的信息。但是由于迄今为止，对激发态分子的性质还了解不深，所以对它们的关系还不是十分清楚。

产生荧光的首要条件是物质分子必须具有生色团，其次该物质必须具有一定的荧光效率和适宜的环境。我们把分子中能发射荧光的基团，称为荧光团。虽然可以说荧光团一定是生色团，但生色团未必一定是荧光团。如果它的荧光效率等于零，就不能发射出荧光。这是由于处于电子激发态的分子，可以由许多方式（如热、碰撞等）把激发能释放出来，而发射荧光只是其中的一种方式。

此外，一种物质吸收光的能力及荧光效率又与物质所处的环境紧密相关。由于环境条件常常影响分子对能量的吸收和消耗，所以，环境（如溶剂、pH 值、温度等）常常是影响物质荧光效率高低，甚至能否产生荧光的重要因素。

判断化合物能否产生荧光，一般可以从以下几个方面来分析：

1. 碳原子骨架

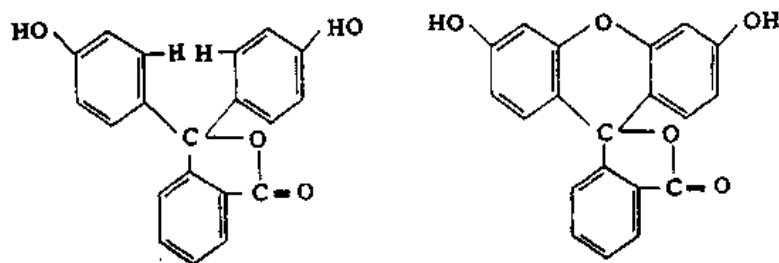
荧光通常发生于具有共轭双键体系的分子中，这种体系中的 π 电子共轭度越大，

则非定域 π 电子越易被激发，荧光也就越易产生，而且荧光光谱将向长波移动。所以绝大多数能产生荧光的物质含有芳香环或杂环。

π 电子共轭度的结构改变，有利于提高荧光效率或使荧光波长向长波方向移动。例如对-苯基化、间-苯基化以及乙烯化作用都将增加苯的荧光强度，并使荧光光谱红向移动。

2. 分子的几何排布

具有强烈荧光的有机分子，多数具有刚性的平面结构。如果一个有机分子具有共轭双键的非刚性链，而使其分子处于非平面构型，那么这样的有机分子大多不会发射荧光。如荧光素具有平面构型，所以是一个强荧光物质，但与其有相似结构的酚酞，由于没有氧桥，不易保持平面型，所以是非荧光物质。



酚 酞

荧光素

如果一种有机分子本来不发荧光，但与金属离子形成络合物时，使分子变为平面构型，就能产生荧光。

3. 取代基的类型和位置

在芳香化合物的芳香环上，进行不同基团的取代，对该化合物的荧光强度和荧光光谱都将产生很大的影响。取代基可以分为三类：

(1) 使荧光加强的如：-OH、-OR、-NH₂、-NHR、-NR₂、-CN、-OCH₃、-OC₂H₅。

(2) 使荧光减弱的如：-CO₂H、-COOH、-C=O、-NO₂、-NO、-SH、-F、-Cl、-Br、-I。

(3) 影响不明显的如：R、SO₃H、NH₃⁺。

所以，苯胺和苯酚的荧光较苯强五十倍，而硝基苯、苯甲酸和溴苯则是非荧光物质。卤化作用对芳香化合物的荧光效率有很大的影响。一卤化苯的荧光效率随着卤素的电负性的增大而增大。

当然，分子所处的环境，如溶剂、温度、pH 值等会影响分子的结构及立体构像，也会影响分子的荧光。如硫酸奎宁溶解在 0.2M 硫酸中，能发强荧光。但当溶解在 0.1M 盐酸中时，就无荧光。又如苯胺在 pH 值为 7~12 的溶液中，会发蓝色荧光。但在 pH < 2 和在 pH > 13 的溶液中，都不发射荧光。这说明发生荧光的是苯胺分子，而

苯胺离子却是不发生荧光的，这个例子表明未离解的分子和它的离子的荧光性质是不相同的，也就是说，pH 值对溶液的荧光强度影响是很大的。

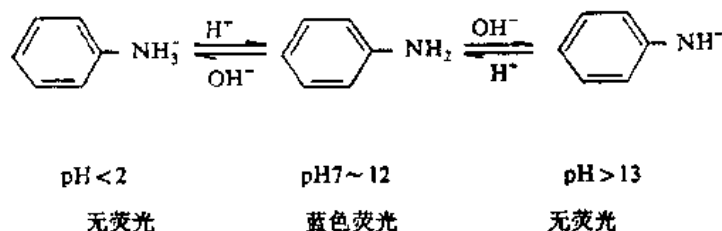


表 6-1 列举了一些化合物的化学结构与荧光的关系。

除此以外，立体异构现象对于荧光强度也有显著的影响，顺式和反式同分异构体具有不同的荧光强度。如 1, 2-二苯乙烯的反式异构体有强荧光，但顺式异构体则不产生荧光。

掌握荧光与化学结构的关系，可以帮助我们如何将非荧光物质转化为荧光物质，或将荧光强度不大，选择性不高的荧光物质转化为荧光强度大并选择性高的物质，以提高分析的效果。例如，不发生荧光的甾族化合物，在经浓硫酸处理之后，可被转化为荧光物质。这是由于从不发生荧光的环状醇类结构，改变为能发生荧光的酚类结构的缘故。又如肾上腺素和去甲肾上腺素都能发荧光，但如有其它酚类结构的生物物质同时存在时，相比之下，它们的荧光强度不大，选择性不高，不适于分析之用，如将它们氧化，并进行内部缩合反应，或使它们和乙二胺发生缩合，把它们转化为发出明亮荧光的三环杂环化合物，则荧光强度将大为增加。所以，深入了解荧光特性和化学结构的关系，对荧光分析是有很大帮助的。

三、荧光分析的特点

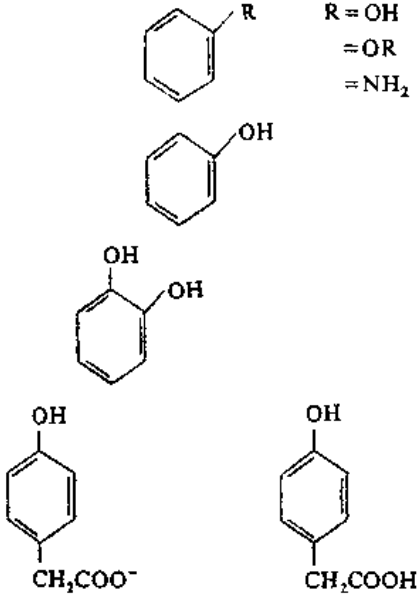
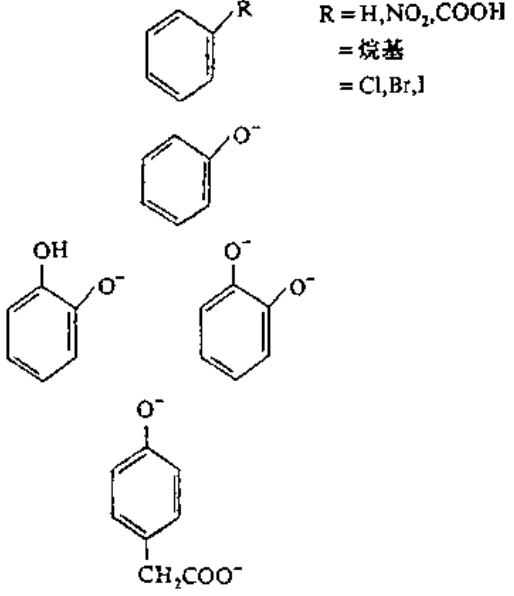
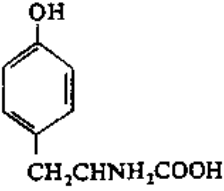
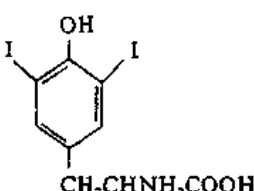
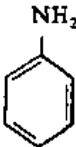
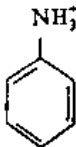
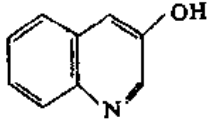
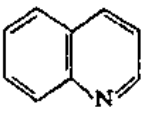
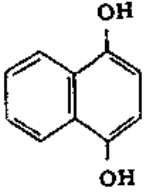
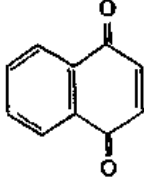
1. 灵敏度高

荧光分析的最大特点之一是灵敏度高，与常用的分光光度法比较，荧光是在入射光的直角方向检测，即在黑背景下检测荧光的发射；而分光光度法是在入射光的直线方向检测，即在亮背景下检测暗线，所以一般来说，荧光分析的灵敏度要比常规的分光光度法高 2~3 个数量级。不管是有机分子还是无机元素，都可以用荧光分析法来进行微量的测定，如污水中重金属离子，用间接荧光分析方法可检测到 $5 \times 10^{-8} \text{g}$ 铅， $1 \times 10^{-8} \text{g}$ 汞。激素的测定如皮质甾酮能测到 $1 \times 10^{-10} \text{g}$ 。DNA 的测定如采用溴化乙锭作荧光探针，最低检测量可达 10^{-9}g 。

2. 选择性强

荧光光谱包括激发光谱和发射光谱。激发光谱是指不同激发波长的辐射引起物质发射某一波长荧光的相对效率，而发射光谱是指某一激发光引起物质发射不同波长荧光的相对强度。前者是将发射波长固定，扫描激发波长；后者是将激发波长固定，扫描发射波长。因此，与分光光度法比较，荧光法在鉴定物质时，选择性更强。由于分光光度法只能得到待测物质的特征吸收光谱；而荧光法则既能依据特征发射，又可按照特征吸

表 6-1 分子结构和荧光的关系(在室温时测量)

发生荧光的结构	不发生荧光的结构
 <p>R = OH = OR = NH₂</p>	 <p>R = H, NO₂, COOH = 烷基 = Cl, Br, I</p>
	
	
	
	
$\begin{array}{cccccccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ & & & & & & & \\ \text{H}_2\text{C} & =\text{C} & -\text{C} & =\text{C} & -\text{C} & =\text{C} & -\text{C} & =\text{CH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{cc} \text{H} & \text{H} \\ & \\ \text{H}_2\text{C} & =\text{C} & -\text{C} & =\text{CH}_2 \end{array}$

收光谱来鉴定物质。因此，假如某几种物质的发射光谱相似，就可以从激发光谱的差异把它们区分开来，如果它们的吸收光谱相同，则可用发射光谱将其区别。如酪氨酸和色氨酸，它们的吸收峰虽然相近，但在紫外光照射下，酪氨酸的发射峰在 303nm，色氨酸的发射峰则在 348nm。

3. 试样量少且方法简便

由于荧光分析法灵敏度高，因而为少量试样的测定提供了可能性，特别是在使用微量池微升时，用量可以大大减少。荧光检测器作为高效液相色谱的重要检测器，使高效液相色谱的分析灵敏度、选择性大大提高，并可获得稳定的基线。

4. 能提供更多的信息

荧光分析法能提供包括激发光谱、发射光谱、荧光强度、荧光寿命、总荧光量、荧光效率、荧光偏振等许多物理参数，可获取结构和样品浓度的更多信息，这些是分光光度法所不能相比拟的。

四、荧光参数

1. 激发光谱

任何发荧光的分子都具有两个特征光谱——激发光谱和发射光谱。它们是用荧光分析法进行定量和定性分析的基本参数和依据。

激发光谱是引起荧光的激发辐射在不同波长的相对效率。把荧光样品放入光路中，选择合适的发射波长和狭缝宽度，使之固定不变，然后用激发单色器扫描，即可获得激发光谱。激发光谱的形状与测量时选择的发射波长无关，但其相对强度与所选择的发射波长有关。发射波长固定在峰位时，所得的激发光强度最大。

在通常的情况下，激发光谱的形状与吸收光谱的形状相同，但必须是真实的激发光谱。表观激发光谱因包含光源、单色器等光谱特性的影响，常与吸收光谱有一定的差别。

在荧光测定中，通常用激发光谱中最长的峰值波长激发样品。因为这样可以避免较短的波长由于有较高的辐射能量而使样品产生光分解。

2. 发射光谱

与激发光谱密切相关的是荧光发射光谱。它是由于分子吸收辐射后再发射的结果。把荧光样品放入光路中后，选择合适的激发波长和狭缝，使之固定不变，然后扫描发射波长，即可得到发射光谱。

一般来说，发射光谱的形状与激发波长的选择无关（个别化合物例外）。但当激发波长选在远离激发峰的地方，发射强度就小。除此以外，发射波长总是比激发波长要长，且发射光谱与吸收光谱呈镜像对称关系。

利用这种镜像关系的理论，可以区别吸收带是属于第一单线电子激发态的振动带，还是属于更高的电子激发态的振动带。同时还能辨别散射或不纯物质的存在。例如图 6-4 是葱和奎宁的吸收光谱和发射光谱，镜像对称关系非常明显。在葱的光谱中，有四个主要吸收峰，它们是从基态跃迁到第一单线电子激发态的不同振动能级；同样还可以看到与这四个吸收峰呈镜像对称的四个荧光峰，这是相应于从第一单线电子激发态到基态的不同振动能级。图中奎宁有两个吸收峰，一个在 250nm，相应于从基态到第二电

子激发态的跃迁。另一个在350nm，相应于从基态到第一电子激发态的跃迁，但发射峰只有一个，相应于从第一电子激发态到基态的跃迁。

3. 斯托克斯位移

激发峰位和发射峰位的波长之间的差是一个表示分子发光特性的物理常数，这个常数被称为斯托克斯位移(Stokes shift)，表示分子在回到基态以前，在激发态期间能量的消耗。

4. 荧光强度与总荧光量

(1) 荧光强度

这是最常用的荧光参数之一，目前一般的商品仪器都采用荧光强度来表示荧光的相对强弱，所用的单位常为任意单位，表示的强度只是相对强度。

在仪器上测定一个物质的相对强度与很多因素有关，可以用公式(6-1)来表示：

$$F = K\phi I_0 \epsilon bc \quad (6-1)$$

式中， F 为荧光强度； K 为仪器常数； ϕ 为量子产率； I_0 为激发光强度。

从式中首先可以看出，荧光强度是与仪器条件有关的，同一物质用不同的仪器，或即使用相同的仪器，用不同的测定条件，得到的值常常是不同的，因此用工作曲线法做定量分析时，测标准样品和待测样品一定要采用相同的测定条件。从公式中还可以看出，荧光强度与物质本身的量子产率及激发光强度成正比，量子产率是发射量子数与吸收量子数之比，它本身就表示物质发射荧光的本领，所以量子产率大，发射的荧光就强。而激发光源的强度直接关系到激发能量的大小，与荧光强度直接有关。从荧光强度与激发光源的输出成正比这一点出发，在荧光仪器中采用的光源越强，则检测灵敏度越高。但由于激发光源强度太大，会带来很多缺点，所以实际应用中不使用强光源。除上述以外，荧光强度还与摩尔吸收系数 ϵ ，样品光径 b 及浓度 c 这三个因素有关。如果随着浓度的增加，由于增加分子碰撞、内滤光效应等，常常使荧光强度不增加，反而减少，即产生所谓的浓度淬灭现象。

(2) 总荧光量

不用某一波长的荧光强度来表示某物质发射的荧光强弱，而用该物质的发射光谱总面积来表示荧光的量，称为“总荧光量”。

一般在滤片荧光计中(第二单色器用滤片)测得的读数，即为样品的总荧光量。而使用荧光分光光度计(第二单色器为光栅)时，则可把发射波长放在零或用积分光谱面积来得到总荧光量。采用总荧光量来测定某物质含量，可以提高检测灵敏度。

5. 峰位和谱带宽度

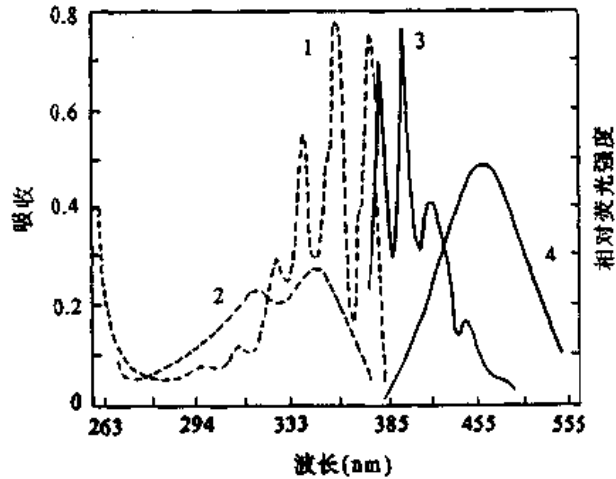


图 6-4 蕙和奎宁的吸收光谱和荧光光谱

1. 蕙的吸收光谱 2. 奎宁的吸收光谱
3. 蕙的荧光光谱 4. 奎宁的荧光光谱

(1) 峰位

峰位即指激发峰的波长和发射峰的波长。常用符号 $\lambda_{\text{最大}}$ 表示。真实光谱的峰位可以进行定性比较，但表观光谱的峰位，则只能在相同仪器及相同条件下才能加以比较。

(2) 谱带宽度

谱带宽度通常用“半宽”来表示，即峰的强度值的一半时，其横坐标上的波长宽度。当然表示谱带宽度的方法还有多种，如光谱的有效面积除以峰高等等。

5. 荧光效率

荧光效率亦可称量子产率，是物质荧光特性的重要参数。它表示物质发射荧光的本领，是荧光测定的基本参数之一，尤其在大分子构像的研究中占有特殊重要的地位。

荧光效率通常用 ϕ 表示，其定义为：发射量子数与吸收量子数之比。如公式(6-2)所示。根据这个定义，任何物质的量子产率不可能大于1。

$$\phi = \frac{\text{发射量子数}}{\text{吸收量子数}} \quad (6-2)$$

在溶液很稀时，荧光强度与荧光效率的关系，由(6-1)式可导出：

$$\frac{\phi_1}{\phi_2} = \frac{F_1 A_2}{F_2 A_1} \quad (6-3)$$

上式中 A 表示物质的吸光度。如果把一种已知荧光效率的物质作为测定标准，再分别用荧光分光光度计和紫外分光光度计测定标准及试样的真实发射光谱的面积及在激发波长的吸收，就可以用上述公式算出试样的荧光效率。但要考虑以下几个问题：

(1) 选择合适的荧光标准

在过去的很多工作中，大多采用硫酸奎宁作标准，这是因为硫酸奎宁的荧光效率比较高，化合物比较稳定，且吸收光谱和发射光谱分得比较开。奎宁是一种比较异常的荧光化合物，它的发射光谱随激发波长而变化，荧光效率亦随激发波长而异。因此把它用作标准时，必须对这一性质加以考虑。

选择标准的原则是：标准和试样最好有相近的性质和相近的激发光谱，激发和发射光谱不重叠，溶液稳定。如测定蛋白质的荧光效率时，可用色氨酸作标准。

(2) 准确地测出真实发射光谱的面积

得到标准和试样的真实光谱后，可用称重、数格或用求积仪积分等办法得到发射光谱的面积（即发射的总荧光量）。如果采用前一种方法，要注意记录纸的均匀性。如采用后一种方法，要多次平均，以保证其准确性，当然用数字积分仪较为理想。现在用计算机可直接得到发射光谱面积和荧光效率。

(3) 浓度的影响

一般来说，在稀溶液中样品浓度对荧光效率没有影响。但是，如果浓度比较大，就必须考虑自吸收的影响以及形成二聚体等情况。因为二聚体的吸收光谱不同于原来的化合物，所以荧光效率当然就要发生变化。

由于用来测定荧光效率的溶液吸收很小，所以最好使用带有量程扩展的紫外分光光

度计来读数，以保证读数的准确性。

(4) 激发波长的影响

许多化合物的荧光效率与激发波长的选择无关，所以激发波长可选择在既接近样品的激发峰，又接近标准的激发峰的波长上。但是有些化合物其吸收光谱与真实激发光谱不重叠，化合物的发射光谱随激发波长而变化（不是由于化合物不纯而引起的变化），荧光效率当然也就随着激发波长而变化。

对于这类化合物必须注意在测定时所用的激发波长，特别在选作标准时，如果标准和试样需要用不同的激发波长，则应使用公式（6-4）计算荧光效率。

$$\frac{\phi_1}{\phi_2} = \frac{F_1 I_{02} A_2}{F_2 I_{01} A_1} \quad (6-4)$$

(5) 温度的影响

由于温度对荧光是一个明显的影响因素，又由于温度对溶液的吸收和荧光发射强度的影响程度有差别，因而必然对荧光效率有影响，如维生素 B₆ 的荧光效率与温度的关系如图 6-5 所示。

(6) 溶剂的选择

溶剂本身在测定的范围内应没有吸收，纯度要高。如果溶剂有荧光，则在发射光谱总面积中，必须扣除溶剂荧光的面积。如果空白值太高，则不宜采用，否则即使扣除，也会引入较大的误差。

除上述一些问题以外，还要防止测定溶液的光分解、荧光污染、淬灭、散射等影响。因为这些因素都会影响荧光量子产率测定的准确性。

(7) 荧光寿命

在分子生物学的研究中，荧光寿命是一个重要的参数，因为它在分子之间相互作用的动力学方面，能给出许多重要的信息。

当去掉激发光以后，分子的荧光强度降到激发时最大荧光强度的 $1/e$ 所需要的时间，称为荧光寿命。

① 浓度影响

可以看到一些荧光染料的荧光寿命，随着浓度的增加而延长。实验证明，这种现象不是由于二聚体的形成或激发物的存在，而是由于自吸收的结果。因为这种现象常常在吸收光谱和荧光光谱重叠的情况下发生。重叠区的荧光在发射后，再一次被吸收，经历

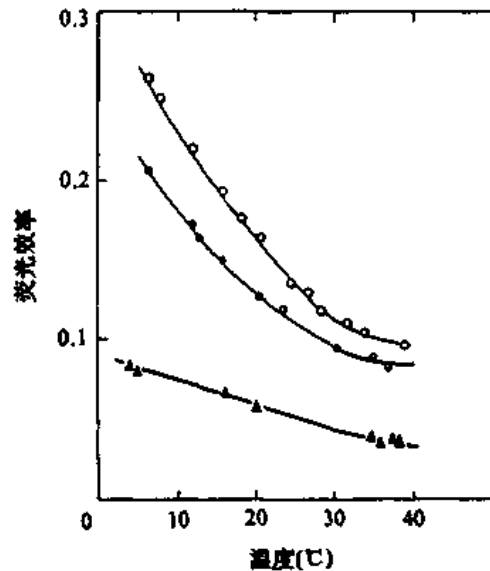


图 6-5 维生素 B₆ 化合物的荧光效率与温度的关系

▲ 吡哆醛 ● 吡哆胺 ○ 吡哆胺磷酸盐

了二次激发或多次激发。

表 6-2 荧光素和叶绿素 *a* 的荧光寿命和浓度的关系

化 合 物	溶 剂	浓 度	$\tau(10^{-6}s)$
叶绿素 <i>a</i>	95%	$\sim 2 \times 10^{-7}M$	5.5
		$\sim 4 \times 10^{-7}M$	6.5
荧光素	0.01M 氢氧化钾	$10^{-6}M$	3.8
		$10^{-4}M$	5.1
荧光素	0.01M 氢氧化钠	$1\mu g/mL$	4.2
		$10\mu g/mL$	4.7

② 淬灭影响

碰撞淬灭使荧光寿命缩短和荧光效率减少，它使测量误差增大。要注意有的缓冲液可淬灭被研究分子的荧光。如中性的 0.1M 磷酸缓冲液能淬灭酪氨酸的荧光，使酪氨酸的荧光寿命从 $3.4 \times 10^{-6}s$ 缩短为 $2.6 \times 10^{-6}s$ 。

第三节 荧光分光光度计

常用的荧光分光光度计基本组成是由激发光源、激发单色器、样品室、发射单色器及检测器、记录系统等构成。

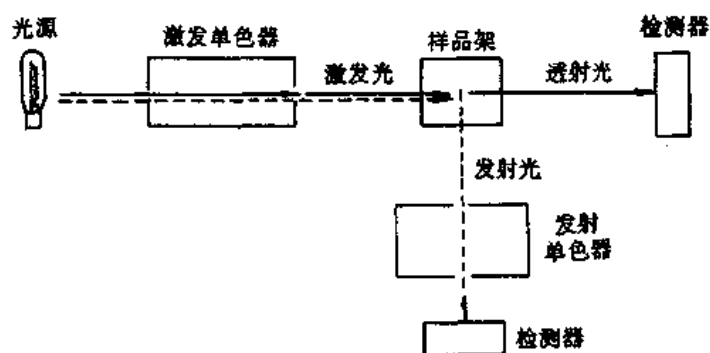


图 6-6 紫外分光光度计和荧光分光光度计结构图

——紫外分光光度计光路 - - - - 荧光分光光度计光路

一、荧光仪器的基本构成

1. 激发光源

在紫外-可见光区常用的荧光激发光源有钨灯、碘钨灯、氢灯、氘灯、汞灯、氙灯等。使用激发光源应考虑它的稳定性和强度。光源的稳定性直接影响测量的重复性和精确度，但这可以通过使用电源的稳压、稳流技术来解决。虽然从理论上说，发射荧光的强度取决于激发光源的强度，可是在实际中常常避免用强光源，这主要是因为强光源导致散射光和热量的增多，散射光增多干扰荧光的测定，热可以减低荧光，强光源照射容

易使样品发生光分解。钨灯和碘钨灯在紫外区只输出很小能量，低于 350nm 几乎没有能量输出。很多荧光化合物需要 250~400nm 波长激发，故这两种灯很少用。氢灯和氘灯是分光光度计常用紫外光源，能在紫外区提供连续光谱，但是氢灯在 300nm 以下能量输出相当低。氘灯比氢灯能量高三倍，并且可以使用至 500nm 范围内。汞灯的发射强度较大，且稳定，但汞灯给出的不是连续光谱。适当改进的汞灯可以提供除自身谱线以外的宽带光谱。汞蒸气发射的波长及其相对强度见图 6-7。目前荧光分光光度计大多采用 150W 和 500W 的高压氘灯作光源。因为氘灯能在紫外和可见光区给出比较好的连续光谱，但是它的紫外区的强度没有汞灯大（约为汞灯的 1/2），无臭氧氘灯在 250nm 以下强度很弱。氘灯需要性能较高的电源。

2. 单色器

目前大多数荧光分光光度计都采用衍射光栅作为色散元件。荧光分光光度计有两个单色器，激发单色器和发射单色器，前者用于从复合光源中选出所需的单一波长的激发光，后者用于从发射荧光中选出特征发射波长。狭缝是单色器重要的组成部份，它关系到分辨率的优劣。一般来说，狭缝越小，单色性越好，但光强度也随着减小，测定灵敏度大大下降。所以狭缝只能小到一定的程度，要有足够大的信号能被检测到。为了既提高分辨率，又有高的测定灵敏度，最好的办法是选择灵敏的光电倍增管。

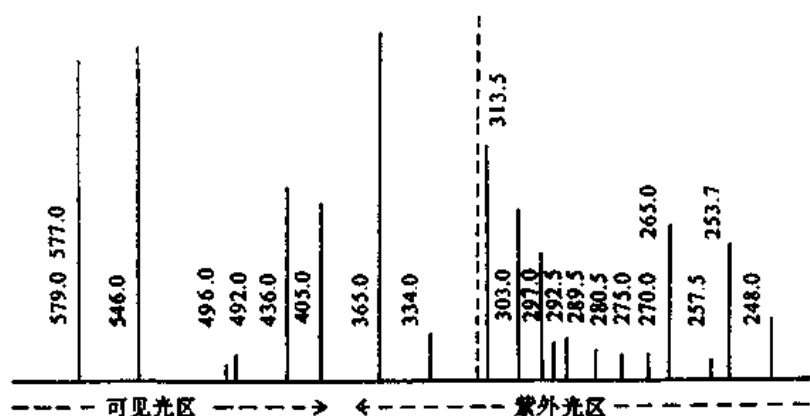


图 6-7 汞蒸气的发射光谱

3. 样品池

荧光分光光度计所有的样品池与分光光度计类似，但相邻面或四面都透光。有玻璃池和石英池，一般不用大容量的样品池，多使用微量池。

4. 检测器

荧光分光光度计均采用光电倍增管作检测器。

二、荧光分光光度计的性能和结构

较高级的荧光分光光度计应具备下述特点，高灵敏度、高分辨率、低杂散光。能自动校正光谱，测定荧光、磷光、化学发光及生物发光等。能适用于液体、气体、混浊体和固体样品的测定。具有计算机控制系统。

现以日立 850 型荧光分光光度计为例介绍荧光分光光度计的结构、原理和工作过程，参见图 6-8。由氙灯光源发出的光经激发单色器后进入样品池，样品被激发后发出的荧光经发射滤光片和发射单色器进入荧光检测器，荧光检测器测得的荧光强度的模拟电信号经模数转换器转换成数字量后，经总线送入中央处理机，经中央处理机处理的数字信号又经数模转换器转换成模拟信号输给记录仪绘出谱图。

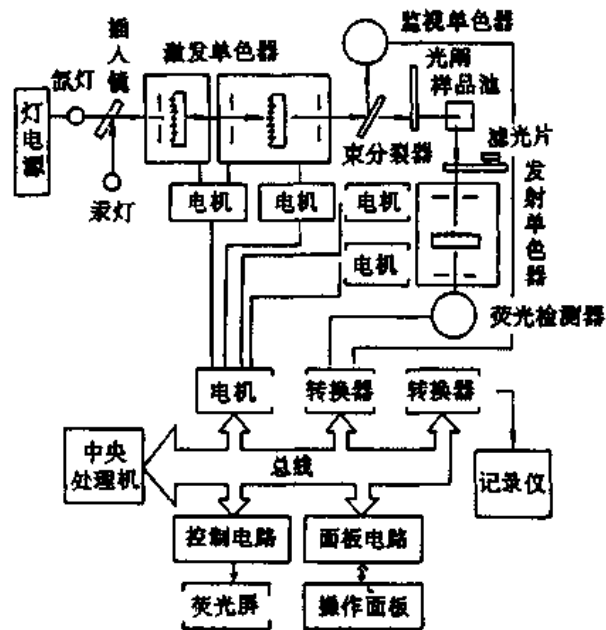


图 6-8 日立 850 荧光分光光度计的结构框图

三、仪器校正

1. 灵敏度的校正，荧光分光光度计的灵敏度可用被测出的最低信号表示，或用某一标准荧光物质的稀溶液放在一定激发波长照射下发射出的最低信噪比时的荧光的最低浓度表示。荧光分光光度计的灵敏度与三个方面有关：第一是与仪器的光源强度、单色器性能及放大器系统和光电倍增管的灵敏度有关；第二是和所选用的波长和狭缝宽度有关；第三和被测定的空白溶剂的散射、散热、激发光、杂质荧光等有关。由于影响荧光分光光度计灵敏度的因素众多，同一型号的仪器，甚至同一台仪器在不同时间操作，所测量得到结果也不尽相同。因而每次测定时，在选定波长及狭缝宽度的条件下，先用一种稳定的荧光物质，配成浓度一致的标准溶液进行校正（或称标定），使每次测得的荧光强度调节到相同数值（50%或 100%），如果被测物质所产生的荧光很稳定，自身就可以做为标准液。从紫外区到可见光区内常用的标准荧光物质有酚（溶于甲醇）、吲哚（溶于乙醇）、奎宁（溶于 0.05M 硫酸）及荧光素（溶于水及乙醇）等，最常用的是硫酸奎宁，它产生的荧光十分稳定，用 0.001g 标准奎宁，溶于 0.05M 硫酸（ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ），将此溶液进行不同比例稀释后用于仪器校正。

2. 波长校正

新安装的仪器和使用时间较长的仪器，或者更换了光学部件需要进行波长检查的仪器，要核对波长读数与真实值是否一致。目前大部份仪器都是利用汞灯的已知标准谱线，汞灯有 13 条波长准确不变的谱线，可利用其中 435.83nm 和 546.00nm 两条谱线检查两个单色器的波长精度。

3. 激发光谱和发射光谱的校正

用荧光分光光度计所测得的激发光谱或荧光光谱往往是表观的，不是真实的，物质的激发光谱可能是它的吸收光谱。其因素较多，一方面原因是光源的强度随波长而变，同时每个检测器对不同波长光的敏感度不同，即检测器的敏感度与波长不成线性。另一

个原因是用单光束荧光分光光度计测定激发光谱或发射光谱时，因不使用参比溶液作相对校正，所以影响较大，尤其是当峰位的波长处于检测器灵敏度曲线的斜坡时，误差最显著。激发光谱的校正就是为了扣除激发光谱和激发单色器的光谱特性的影响。

(1) 激发光谱的校正

激发光谱的校正方法很多，应用较多的是荧光溶液校正法，用浓的罗丹明 B 的荧光发射值来校正激发光谱。由于罗丹明 B 的量子输出与入射光强度成正比，且有较宽的吸收带，这说明罗丹明 B 的荧光强度只随激发光强度变化，而不随激发光波长而变化，也即罗丹明 B 的发射光谱的形状与激发光谱形状相同。在实际校正时，先对罗丹明 B 溶液进行激发光谱扫描，将获取的发射光谱存入计算机，然后自动从样品的表现观激发光谱中扣除之，即得到样品的真实光谱。

(2) 发射光谱的校正

发射光谱的校正就是为了扣除发射单色器和光电倍增管的光谱特性的影响，可以用专用的散射器插在样品架上，激发光经散射器散射到发射单色器上，然后对其同时扫描，检测器检出包括激发光谱在内的发射光谱，（后者反映了发射单色器和光电倍增管的光谱特性），再从中扣除激发光谱即可得到发射光谱，这些运算工作均由计算机来完成。从上述过程可以看出，在进行发射光谱校正之前必须先进行激发波长的校正。

4. 最佳测定条件的选择

荧光分光光度与其它光谱法相比，可选择的测定条件比较多，可优化各种分析条件，使之彼此得到很好的配合，获得满意的激发光谱和发射光谱。

(1) 波长扫描范围

对已知光谱特性的样品，不需进行广泛扫描，可对一个未知光谱特性的样品，扫描激发光谱和发射光谱。扫描发射光谱时，要考虑散射光的问题，在短波方面多扫一段，以观察瑞利散射和拉曼散射的影响。

(2) 两个单色器的入射与出射狭缝宽度

狭缝宽度通常有两种表示方法：一是用狭缝的实际宽度表示，单位为毫米。另一是用单色光的谱带宽度表示，单位是纳米。由于单色器的设计不同，使用相同的狭缝宽度时，其谱带宽未必相同。与紫外分光光度计的道理一样，为了得到具有高分辨的最大光通量，单色器的入射和出射狭缝宽度，通常应该相等，激发和发射单色器的狭缝大小的选择要根据样品要求而定。定性时狭缝窄一些好，但定量时，狭缝过于小，光强大大减弱，会影响测定的灵敏度和准确性。

3. 样品池大小及位置

样品池的形状和大小，可以选择，精确测定时应该用正方池。微量池的显著优点是样品用量少，其另一个优点是可以克服内滤光效应。缺点是狭缝宽度较大时，池壁的散射和反射会进入发射单色器，而使空白荧光增加，如果不用微量池，又要克服内滤光效应，可以如图 6-9 所表示的那样，将正规池放在偏离中心的位置来检测。

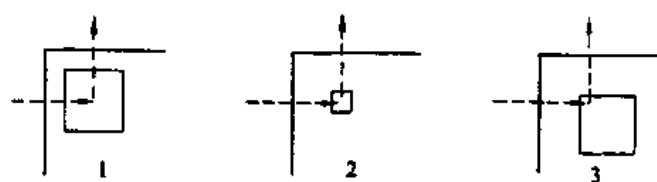


图 6-9 样品池的检测位置

1. 标准池(10mm)中心检测 2. 微量池中心检测 3. 标准池偏离中心检测

第四节 荧光分析的定性定量方法

一、定性方法

由于荧光光谱的形状和峰的位置对荧光物质具有特征性，因此可利用其特征激发波长和特征发射波长为定性依据，荧光法定性常采用直接比较法即将未知样品与已知标准物质在相同条件下测定其激发光谱和发射光谱，并加以比较鉴定。

二、定量方法

目前荧光分析大多用于定量，其测定方法与紫外光谱法基本相同，一般多采用工作曲线法，在测定多组分混合物时也采用联立方程法、双波长法或导数法等，当测定浓度较高的荧光物质时，也可采用差示光谱法。

1. 荧光强度与溶液浓度的关系

荧光是由物质在吸收光能之后发射的，因此，溶液的荧光强度和该溶液的吸光程度以及溶液中荧光物质的荧光效率有关，溶液被入射光 I_0 激发之后，可以在溶液的各个方向观察到荧光强度 F 。但由于激发光源能量的一部分被透过，因此，在透射光的方向观察荧光是不适宜的，一般是在与激发光源垂直的方向观测。

溶液的荧光强度 F 与吸收的光能成正比，因此荧光强度与溶液浓度及荧光效率符合 (6-4) 关系式：

$$F = A I_0 [1 - (1 - 2.3\epsilon bc)] = 2.3 A I_0 \epsilon bc = \phi I_0 \epsilon bc \quad (6-4)$$

从上式可以看出，对于某一荧光物质的稀溶液，在一定频率和一定强度的人射光照射下，如果光被吸收的百分率不太大，且溶液的浓度很小，溶液的厚度不变时，则它所发生的荧光强度和该溶液的浓度成正比。

从上式还可以看出，荧光分析和分光光度分析在灵敏度上有显著差别，因为在荧光分析中，荧光强度和入射光强度及溶液浓度呈线性关系；而在分光光度分析中，

$$\lg \frac{I_0}{I_0 - I_t} = \lg \frac{I_0}{I_t} = \epsilon bc \quad (6-5)$$

对于很稀的溶液， I_t 值（溶液的吸光度）很小， $\lg \frac{I_0}{I_0 - I_t}$ 接近于零，其浓度就不能从

中反映出来，所以测定灵敏度受到一定限制，而荧光分析不会受到这种因素的限制，只要提高检测器灵敏度，就能将极少量吸收光所产生的荧光反映出来，所以荧光分析的灵敏度较高，可测到 10^{-12}g 。

2. 比例法

如果标准曲线通过零点，就可选择其线性范围，用比例法进行测定。取已知量的纯净荧光物质，配制一标准溶液，使其浓度在线性范围之内，测定荧光强度 E_0 。然后在同样条件下测定试样溶液的荧光强度 F_x ，由标准溶液的浓度 C_s 和两个溶液的荧光强度比，求得试样中荧光物质的浓度 C_x 。在空白溶液的荧光强度调不到 0% 时，必须从 F_s 及 F_x 值中扣除空白溶液的荧光强度 F_0 ，然后进行计算。

$$\frac{F_s - F_0}{F_x - F_0} = \frac{C_s}{C_x}, \quad C_x = C_s \frac{F_x - F_0}{F_s - F_0} \quad (6-6)$$

第五节 荧光分析的干扰因素

荧光分析法有较高的灵敏度，但干扰因素较多，影响分析的重现性，在实验中应特别引起注意。

一、溶剂和化学试剂

对于溶剂，主要考虑两个问题：一是溶剂的选择要适宜，二是溶剂应达到足够的纯度。如果溶剂在一定波段范围有光吸收，就不宜在此波段使用。如苯、丙酮、酚等在紫外光的一些波段有吸收，就不宜在紫外光区使用，如果把它们用作荧光物质的溶剂，即使用量很少，例如从分离过程中残留下来的部分溶剂，也足以干扰荧光实验。

同一种荧光物质在不同溶剂中，其荧光光谱（包括激发和发射光谱）的形状和强度，都可能会有显著的不同。如硫酸奎宁在硫酸中有荧光，而在盐酸中无荧光。

对溶剂的另一个要求是纯度，因为溶剂中的杂质会干扰待测样品的荧光，或使其增强，或使其减弱，甚至改变光谱的形状。如溶剂中含有卤族元素、硝化物或重金属等，就会降低样品的荧光强度。在乙醚中即使有非常微量的过氧化物，也会由于电荷转移而减弱氮杂环的荧光。脂肪醇能淬灭氮杂环的荧光，而且它常常存在于某些溶剂中。相反，乙醇中由于极微量葱的存在，常使乙醇有荧光，所以实验前必须将乙醇加氢氧化钾蒸馏。经离子交换处理的蒸馏水，用 320nm 激发，有时在 410nm 显示荧光读数，所以制备的蒸馏水应该使用双蒸馏器蒸馏或采用超纯水。溶剂一定要严格处理，对溶剂中存在着减少荧光强度的因素更要注意，因为这

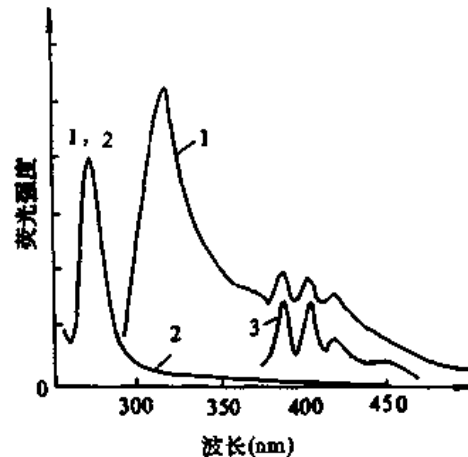


图 6-10 激发波长为 250nm 时微量葱对乙醇荧光的影响

1. 未处理乙醇
2. 蒸馏后的乙醇
3. 蒸馏后的乙醇加葱(0.0003 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

种因素常常不易被人们觉察。配制校正仪器用的标准样品，所用溶剂更应谨慎。

二、荧光污染

荧光污染的来源有：

1. 涂活塞用的润滑油

润滑油有很强的荧光，是荧光污染的来源，应避免使用。在必要的萃取过程中，最好不使用分液漏斗，而用试剂瓶和吸量管来完成。如果必须使用分液漏斗，则活塞上不要涂油。

2. 去污剂

在荧光实验中，污染的又一个原因常常是去污剂。因为目前实验室中用于洗涤器皿的合成去污剂，都能产生很强的荧光。所以常常发现用这些去污剂洗过的器皿，会显示出微弱的荧光。在用洗液洗器皿时，必须漂洗干净，否则即使留下很小量，也能在紫外光范围吸收足够的光而干扰实验。

用于荧光实验的玻璃器皿，用一般方法洗净后，可先在稀硝酸中煮沸，然后漂洗。再在蒸馏水中煮沸、清洗。至少是最后一步操作所用的玻璃器皿，必须用这种方法清洗后使用。

3. 微生物污染

在一些长期放置的缓冲液和贮液中，由于微生物的滋生，也会产生荧光污染以及光散射。

4. 滤纸

滤纸也是污染的来源，因为它含芳环化合物的残渣。而芳环化合物，特别是酚类，常常具有荧光，所以应避免使用。倘若必须使用，则应选择适宜的滤纸，并用相应的溶剂事先漂洗，或在最后测定荧光时给以校正。

三、稀溶液分析中的干扰

一般认为物质在稀溶液（约 $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下）中，不像在浓溶液中那样稳定，故常常用较浓的溶液作为母液保存。例如作标准用的硫酸奎宁，一般都配成 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 母液，贮存备用。稀溶液不稳定的原因，主要是由于它容易变质。当然在浓溶液中，类似的变质行为可能也在进行，但是不明显。而在稀溶液中常常成为不可忽视的问题。

1. 表面吸附

表面吸附常常不被人们注意，但在稀溶液测定中却有影响。特别是使用有机溶剂时，这种吸附更为严重。溶质常常被吸附在瓶子、吸管、试管、吸收池壁上。有人做过这样的实验， $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的奎宁苯溶液放在大面积的玻璃表面皿上，结果奎宁完全被吸附。对于芳香族化合物来说，这种吸附更为严重。并且所用的溶剂极性越小，吸附就越大。在非极性溶剂中加一点极性溶剂如无水乙醇，经常可以减少这种吸附损失。

为了克服表面吸附，应尽可能减少接触表面的机会，或将器皿事先在强酸或强碱中加热处理。

2. 氧化

氧化是容易在很稀的溶液中发生的另一种损失。微量氧化剂，包括氧的存在，会减弱化合物的荧光。并且这种损失在极稀的溶液中变得很明显。如肾上腺素（在 0.1M 盐

酸中) 浓度为 100~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时比较稳定, 可在冰箱中保存一年以上, 但溶液低于 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 就很不稳定, 必须新鲜配制。特别是用乙醚作溶剂时, 乙醚中微量的过氧化物能明显地降低荧光强度。用硫酸亚铁来漂洗乙醚, 能除去这种干扰。

3. 光分解

在比较稀的溶液中, 光分解会变成一个严重的问题。所以对光不稳定的化合物, 必须尽量避免光照。如果使用强光源, 在荧光测量期间, 光敏感物质的光分解是很明显的。此时能观察到荧光读数越来越低, 甚至荧光峰也产生位移。为了克服光分解现象, 在制样过程中, 应使样品尽量避免一般光照, 可在暗室操作, 或将样品用黑纸包好, 在测定时要注意关光闸。尽可能缩短测定时间。

当测定对光不稳定的材料时, 最好使用弱光源, 或者用一个宽大的、不聚焦的光束来激发样品。

四、温度对荧光的影响

温度对溶液荧光的影响是很明显的。一般来说, 溶液的荧光强度随温度的升高而减弱。其主要原因是由于分子内的能量转移作用, 将激发能转为基态的振动能, 或通过碰撞将能量转移给其它分子。而另一原因, 则可能是激发分子与溶剂分子之间发生某些可逆的光化学反应。溶液中如有淬灭剂存在, 温度对荧光强度影响将会变得更复杂起来。

在荧光测定期间, 发生温度变化的最大原因, 是由于激发光源产生的热量。因此, 在检测一些温度系数大的样品时, 必须使用恒温池架, 保证样品温度的恒定。

五、溶液 pH 值的影响

大多数芳香化合物带有酸或碱的功能团, 因此它们对 pH 值的变化是很敏感的。无机螯合物的荧光亦同样对 pH 值很敏感。例如苯酚是个弱酸, 它在酸性溶液中以分子形式存在, 呈现荧光。但在碱性溶液中, 则以阴离子形式存在, 不显示荧光。镁和 8-羟基喹啉-5-磺酸钠在 pH 值为 8 以上形成荧光螯合物, 但 pH 值下降到 5.7 以下, 螯合物即离解, 荧光也因此而消失。利用类似的性质, 一些物质如 β -萘酚、荧光素、吖啶橙等可以作为不同 pH 值范围的指示剂。

表 6-4 荧光指示剂

指 示 剂	颜色变化	pH 值范围	指 示 剂	颜色变化	pH 值范围
4-甲基-7-羟基香豆素	绿-浅蓝	0.0~2.0	吖啶	绿-蓝	4.5~6.0
七叶灵(Esculin)	无色-蓝	1.5~2.0	奎宁	蓝-紫	5.9~6.1
水杨酸	无色-蓝	2.5~4.0	2-萘酚	浅蓝-蓝	7.0~8.5
四磺荧光素	无色-蓝	3.0~4.0	果色素	浅绿-绿	7.0~8.5
邻-苯二胺	绿-无色	3.1~4.4	得豆素	浅绿-绿	8.0~9.5
对-苯二胺	无色-橙黄	3.1~4.4	吖啶橙	浅黄绿-黄	8.0~10.0
5-氨基水杨酸	无色-绿	3.1~4.4	四溴荧光素 BN	无色-黄	10.5~14.0
荧光素	浅绿-绿	4.0~5.0	β -萘磺酸	蓝-紫	12.0~14.0
2',7'-二氧荧光素	浅绿-绿	4.0~6.0			

利用一些物质在不同 pH 值溶液中荧光强度的改变, 不但可以判别各种滴定的终

点, 而且对研究物质在不同 pH 值时构像变化等信息也是很有效的。

溶液的 pH 值对于荧光强度的影响, 必须和不可逆的化学变化区别开来。有些荧光物质在酸性或碱性介质中, 因水解而使荧光强度改变, 有的荧光物质在酸性或碱性介质中, 发生环的破裂或链的断开, 也会引起荧光强度的改变。

六、溶液粘度的影响

化合物的荧光强度受溶剂粘度的影响, 一般来说, 是随着介质粘度的升高而增强。这是由于介质粘度增加, 减少了分子碰撞及能量损失的结果。

七、荧光淬灭

荧光淬灭是指由于荧光物质分子与溶剂分子或与其它溶质分子的相互作用所引起的荧光强度降低的现象。这些会引起荧光淬灭的物质, 称为淬灭剂。具体地说, 荧光淬灭的原因是溶液中淬灭剂分子和荧光物质分子之间发生相互作用, 致使荧光物质的荧光效率降低或激发态寿命缩短, 从而导致荧光强度的降低。

已经知道, 卤族离子、重金属离子、氧、有机或无机的硝化物等都能淬灭荧光。有时甚至是极微量的淬灭剂也能导致明显的荧光减弱。但是淬灭并不是任意的, 是有其特异性的, 是由物质之间发生特殊的化学作用所引起的, 能引起淬灭最常见的物质是大气氧, 因此必须用通氮赶氧的办法克服这种淬灭。虽然荧光淬灭在荧光分析中是个不利因素, 但是我们有时可以利用淬灭剂对荧光物质淬灭并进行定量分析。实验显示, 利用氧分子对硼酸根的二苯乙醇酮络合物对荧光的淬灭效应, 可以作微量氧的测定。由于淬灭作用是特异性的, 所以灵敏度更高, 选择性更强。

八、光散射

光散射常常影响实验操作中的灵敏度。在荧光测定中, 可能遇到的光散射主要有:

1. 容器表面的散射

在荧光测定时, 有时来自容器表面的散射光会进入检测器而干扰测定。特别是长期使用后表面光洁度下降, 池散射比较大, 其散射光的波长与激发光波长相同。一般正方形或矩形池散射光的干扰比圆形池小。减小狭缝或缩小检测器的窗口, 也可以减小来自池壁的散射光的影响。

2. 丁铎尔 (Tyndall) 散射

样品池中如有胶体颗粒或气泡存在时, 与其相遇的入射光会改变方向进入检测器, 这种现象称为丁铎尔散射。散射光的波长和激发光波长相同。当样品溶液除去胶粒和气泡后, 丁铎尔散射即可消除。

3. 瑞利 (Rayleigh) 散射

溶剂分子吸收了频率较低的光线后, 不足以使分子中的电子跃迁到激发态, 而只是上升到基态中较高的振动能级, 并在极短的时间内 ($10^{-15} \sim 10^{-12}$ s) 返回到原来能级, 而释放出和激发光相同波长的光线, 称为瑞利散射。因为它几乎没有能量损耗, 所以瑞利散射光的波长和激发光波长相同, 并能在所有的波长发生。散射光的强度与波长的四次方成反比, 即波长越短, 瑞利散射越大。

以上几种散射光的波长都与激发光波长相同, 一般离荧光峰较远, 比较容易辨认。如采用荧光分光光度计, 只要选用合适的波长, 不致引入误差。

4. 喇曼 (Raman) 散射

喇曼散射是由于分子吸收了频率较低的光能而跃迁到基态中较高的能级之后，返回到稍高于原来的能级时产生的，因而发出的喇曼光波长较激发光的波长稍长（红伴线），或者它返回到稍低于原来的能级，因而释放的喇曼光波长比激发光波长稍短（蓝伴线），以上这两种情况的散射光都叫做喇曼散射。红伴线和蓝伴线在瑞利线两边，但红伴线比蓝伴线强得多。喇曼带就好像是瑞利散射的“卫星”，对于一定的分子，喇曼主带与激发光之间有一定的频率差。一般来说，喇曼散射要比瑞利散射弱，当测定溶液浓度低，要求仪器灵敏度高时，喇曼峰常常成为测定中的突出矛盾，因为它比瑞利峰更靠近待测荧光峰，有时甚至混入其中不易分辨，特别是使用滤片荧光计时，喇曼散射常常成为荧光空白的一部分，使得荧光本底过高，而降低了测定的灵敏度和准确度。此时一定要选择合适的滤片，以除去喇曼光造成的本底。使用荧光分光光度计时，减小狭缝或采用截止滤片等可以除去喇曼散射的影响。

由于散射光（包括喇曼散射在内）在偏振方向上与荧光有区别，所以有的仪器就是使用偏振器和光学滤片，在不提高散射的情况下，提高了仪器测定的灵敏度。另外，对大部分溶液来说，利用其喇曼散射随激发波长的变化而变化，而荧光发射则与激发波长的选择无关，也可以区分喇曼散射和荧光发射。

上面列举了荧光测定可能遇到的各种影响因素。在实际工作中，情况常常是很复杂的。对于不同样品来说，各种因素的影响程度也不一样，所以一定要分清主次，并采取合理措施来排除其影响，才能得到满意的测定结果。

第六节 荧光分析法的应用

荧光分析法的应用很广泛，其中用直接荧光法测定较少，大多数是采用间接荧光法。至少有 60 多种无机元素可以用荧光法测定；在有机化合物的分析中，脂肪族的醇、醛、酸，芳香族的酚、醛、酸、稠环和杂环可以用荧光法分析；很多的糖类，氨基酸及蛋白质类，酶和辅酶核酸类化合物可用荧光法分析；绝大多数的维生素都能用荧光法分析；许多抗菌素和其它药物，甾族激素，以及农药都可以用荧光法分析。

一、硒含量的荧光分析法测定

Se (IV) 与 2,3 二氨基萘 DAN 作用生成 4,5 苯并苯硒脑，在紫外光照射下产生黄色荧光，可用环己烷从水相中萃取后测定，激发波长 366nm，发射波长 520~560nm，荧光强度与硒含量成比例。

把含硒量为 0.05~0.5 μ g 的样品放在三角瓶中，加消化液 A（钼酸钠 10g 溶于 150mL 水中）3mL，消化液 B（硝酸-去硒硫酸-高氯酸为 3:1:0.5）15mL，于电炉（砂浴）逐渐加热约 10min 后，有白烟出现，继续加热溶液至淡黄色微带绿色为终点，加入 2mL 0.2mol/L EDTA，用氨水和盐酸调 pH 为 1.5~2.0，再加 10% 盐酸羟胺 2mL，放置 5min，于暗处加 DAN 试剂 4mL，混匀于沸水浴加热 5min 后冷却，加入环己烷 6mL，萃取 4min，分出环己烷相并离心后取清液为样品，同时取试剂空白和硒标准液 0.1 μ g 按前述消化、衍生处理后，分别于荧光分光光度计上测定荧光强度。

二、谷物中的色氨酸的荧光法测定

在常见的 20 多种氨基酸中，色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸具有天然荧光，其中色氨酸天然荧光最强，不需衍生，可直接测定。色氨酸虽有足够的荧光强度，但在蛋白质中结合时，常常发生色氨酸荧光淬灭效应，在 8mol/L 尿素存在下，以木瓜蛋白酶水解样品中的蛋白质，可消除这种淬灭效应。

称取粉碎脱脂的谷物样品 100mg，加入 5mL 木瓜蛋白酶试液（50mg 木瓜蛋白酶悬浮于新配制的含有 120g 尿素，0.16g 巯基乙酸钠，0.19g EDTA 以及 9g 四硼酸钠和水组成的 250mL 溶液中），调节 pH 值为 7.6，在 37℃ 下振荡水解 24h。离心后取上清液即可进行荧光测定，并以上述不含木瓜蛋白酶的溶液做空白测定，激发波长 288nm，发射波长 348nm。酪氨酸在 pH=11 时的的荧光比色氨酸小 100 倍，而在 pH=7 时的荧光强度与色氨酸相同，可是它们的激发和发射波长不同，可作为定性分析。

三、蔬菜或水果中抗坏血酸含量的测定

将样品提取液中抗坏血酸用活性炭或 2,6-二氯酚靛酚等氧化剂氧化成脱氢抗坏血酸，在常温下与邻苯二胺反应生成能发出紫蓝色荧光的噻恶啉衍生物。用 350nm 激发波长、430nm 发射波长测定，与标准抗坏血酸溶液在相同条件下产生的荧光强度对照，即得抗坏血酸总量。需测定还原性抗坏血酸时，试样提取液不经氧化，直接与邻苯二胺反应后测定，即得原液中脱氢抗坏血酸量，再从抗坏血酸总量中减去脱氢抗坏血酸量即得还原型抗坏血酸量。测定步骤如下：

1. 提取 准确称取 20g 有代表性的样品，加 10% 偏磷酸溶液 20mL 浸泡，再加 20g 左右石英砂充分研磨提取，再加 10% 偏磷酸 160mL，3 000r/min 离心 10min，取上清液测定。

2. 测定 待测定样试管和空白样试管内各加待测溶液 1mL。标准样和标准空白样试管各加浓度为 50 μ g/ml 的抗坏血酸标准液 1mL。四支试管内各加 0.2% 2,6-二氯酚靛酚 1mL，3% 硫脲(50%乙醇)0.1mL，充分混合，还原过剩的二氯酚靛酚。然后在测定样试管中加入 50% 醋酸钠水溶液 1mL，空白样试管中加入含 3% 硼酸的 50% 醋酸钠水溶液 1mL 充分混合，放置 15min 以上。在四支试管中分别加入 0.02% 邻苯二胺水溶液 5mL，充分混合，室温下避光放置 35min，激发波长 350nm，发射波长 430nm 测定。

思考题

1. 荧光光谱法与紫外-可见光光谱法的主要区别是什么？
2. 什么是激发光谱和发射光谱？如何测量？
3. 荧光分光光度计为什么要进行光谱校正？
4. 荧光分析实验中应注意哪些干扰因素？
5. 解释下列概念：荧光强度、荧光寿命、荧光淬灭、喇曼散射、瑞利散射。

第二篇 色谱法

第七章 色谱法导论

第一节 概述

一、发展概况

色谱法是在本世纪初由俄国植物学家 Michael Tswett 创立的，1906 年他发表一篇文章，报导了将碳酸钙粉末紧密地填充在一根玻璃管中，再将植物叶片中各种色素的石油醚萃取液加至碳酸钙柱顶部，并不断用石油醚冲洗，由于碳酸钙粉末对各种色素吸附能力的差别，各种色素以不同的速度由上向下移动，在柱中绿叶的各种色素彼此彻底分离，形成不同颜色的谱带，可以把柱中的谱带，分段切取，或继续以石油醚冲洗，各种色素从柱中按次序先后流出，然后分别收集，进行提纯或鉴定。

柱中分离得到的色带称为色谱和色层，后来就把这种分析方法叫做色谱法，英语的 chromatography 是由希腊字 chroma 和 graphcin 演变而来的，分别相当英语的 color 和 to write，意思是“谱写颜色”，虽然后来色谱法的发展不限于分离有色物质，更多的是用于无色物质的分离和鉴定，但现在仍沿用色谱这个名称，有人主张将色谱名称改为层析，但未得到普遍的承认。

按现代色谱学术语把 Tswett 实验中静止不动的碳酸钙称为固定相，装有固定相的管子称为色谱柱，冲洗过程称为洗脱，洗脱用的相对流动的溶剂称为流动相。

原始的色谱过程，可用图 7-1 表示，1941 年 Martin 和 Synge 把含有一定量水分的硅胶作为固定相填充到柱中，然后让各种氨基酸混合溶液流过柱子，再用氯仿洗脱，结果使各个氨基酸相互分离开来，这个方法虽在操作形式上与 Tswett 的方法相似，但在分离的原理上则完全不同，它不是借助各组分被固定相吸附能力的强弱进行分离，是由混合物中各组分在硅胶中的水和有机溶剂两相间的溶解度不同，或者说在两相间分配的多少不同、浓度比例不同，达到分离目的。因为组分只有进入流动相才能在柱中移动，移动过程中在流动相中溶解度大的组分，经过多次两相间的分配平衡，先从色谱柱中流出，与流动相中溶解度小的组分分离，这样建立了色谱学的液-液分配理论，这种色谱称为分配色谱。1944 年 Martin 和 Synge 用滤纸代替硅胶，不用色谱柱，固定相是滤纸中含有水分的纤维素，流动相仍用有机溶剂，成功地分离了各种氨基酸，从而创立了简便的纸分配色谱法，简称纸色谱法，这种技术在 50 年代逐渐被薄层色谱所取代。

1952 年 Jamls 和 Martin 提出用气体作流动相，色谱柱中填充的固定相是由多孔颗粒状的情性物质所支持的液体薄层所组成，多孔情性物质称为载体或担体，液体薄层（在柱的使用温度下为液体）称为固定液，即这种固定相是由担体和固定液组

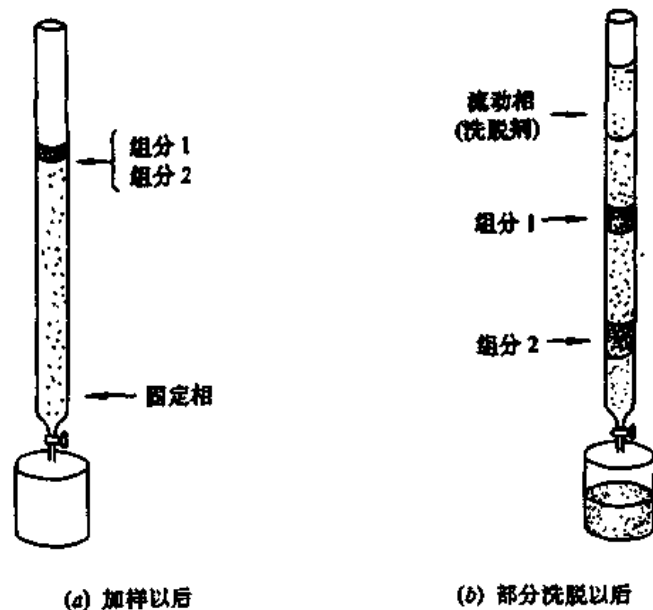


图 7-1 在简单色谱柱中分离二组分的混合物

成。把这种色谱技术称为气相色谱。不久就有了商品气相色谱仪问世并很快发展成为应用广泛，极为重要的分析方法之一。20世纪60年代高效液相色谱又得到迅速发展。从而大大扩展了色谱分析的应用范围。目前，色谱法已成为许多领域不可缺少的分析手段。

二、色谱法的分类

色谱分析可以从不同角度进行分类：

1. 按固定相及流动相的物理状态分类

表 7-1 按物性分类表

流动相	总称	固定相	色谱名称
气体	气相色谱	固体	气-固色谱
		液体	气-液色谱
液体	液相色谱	固体	液-固色谱
		液体	液-液色谱

2. 按固定相形状分类

(1) 柱色谱 固定相装在柱管中。它又可分为填充柱色谱和空心毛细管柱色谱。

(2) 纸色谱 利用滤纸作固定相，当流动相流过时，样品组分在纸上展开进行分离。

(3) 薄层色谱 固定相被涂在平板上形成薄层。

3. 按分离过程的物理化学原理分类

(1) 分配色谱 对于液-液色谱, 固定相与流动相均为液态物质, 利用组分在固定相与流动相两种液相中溶解度的不同 (因而分配系数不同) 而进行分离的色谱。

(2) 吸附色谱 用固体吸附剂作固定相的 (气相或液相) 色谱, 它是利用组分在吸附剂上吸附力的不同, 因吸附平衡常数不同而将组分分离的色谱。

(3) 离子交换色谱 液相色谱中利用离子交换原理而进行分离的色谱。

(4) 凝胶色谱(排阻色谱) 液相色谱中利用分子大小、形状不同进行分离的色谱。

(5) 电色谱 利用带电物质在电场作用下移动速度不同进行分离的色谱。电泳就是一种最重要的电色谱。

三、色谱方法的共同特点

1. 凡是用色谱分离法, 其色谱系统的核心都具有组分分离功能 (如色谱柱), 分离系统有流动相和固定相。色谱分析时, 固定相是相对不移动的, 而流动相冲洗样品时在色谱系统内对固定相作相对的运动。

2. 色谱分离的基本过程是样品中的组分随着流动相的洗脱, 在色谱的分离系统内形成组分浓度分布谱带, 从而达到分离的目的。组分谱带在色谱系统内的宏观运动有两种基本形式: 迁移和扩散, 它们主要决定于组分的热力学性质与色谱系统的结构、色谱条件以及有关的动力学因素。

3. 色谱分离的必要条件是不同的组分在色谱系统中能够分离, 使组分迁移速度有差异, 即热力学性质有差异。它反应在组分对流动相和固定相有不同的作用力。这种作用力可以是吸附力 (吸附色谱), 溶解能力 (分配色谱), 离子交换能力 (离子交换色谱), 渗透能力 (凝胶色谱)。在分配色谱中, 用于描述某一组分对流动相和固定相的作用力的参数是分配系数 k 。某一组分的分配系数 k 是指该组分在固定相和流动相中分配达到平衡时 (此时系统的热力学参数自由能最低), 组分在固定相和流动相中的浓度 C_s 、 C_m 之比, 因此也称为浓度分配比:

$$k = \frac{C_s}{C_m} \quad (7-1)$$

分配色谱法就是在色谱柱内, 当样品随流动相在色谱系统流动时, 利用组分在两相中进行、连续、多次的分配, 由于样品混合物中各组分在两相中具有不同的分配系数, 形成了差速迁移, 从而达到分离。其它类型的色谱分析也可类似地定义分配系数。

4. 色谱系统中, 某两种组分若分配系数不同, 就有可能分离, 但分离是否能实现,

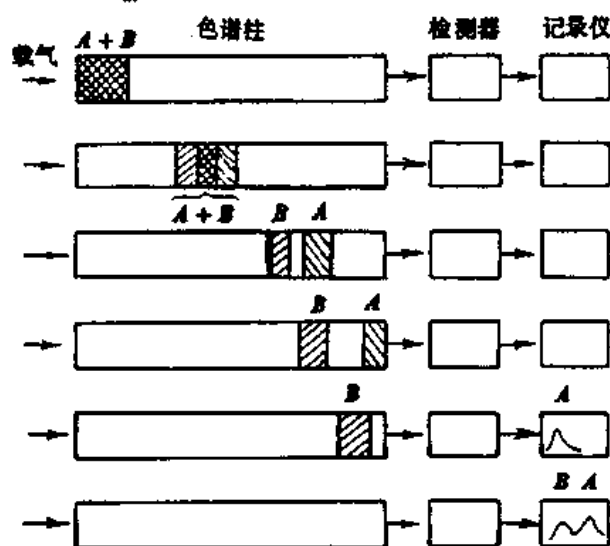


图 7-2 二元混合物在色谱柱内分离示意图

中的 EF ，亦称色谱峰拐点峰宽，即峰高 0.607 处峰的宽度，它反应了组分在色谱系统中扩散的程度。此外，还有两种表示峰宽的量即底峰宽 W_b 为过色谱峰拐点作切线与底边交点间的距离，如图中的 IJ (4σ)，半峰宽 $W_{1/2}$ ，如图中的 GH (2.35σ)。

色谱峰形的对称性可用不对称因子 S_a 表示

$$S_a = CD / 2CB \quad (7-2)$$

$S_a = 1$ 时，为符合正态分布的对称峰， $S_a < 1$ 为前伸峰； $S_a > 1$ 为拖尾峰。

二、组分在色谱系统中的保留值

组分在色谱系统中的保留值，是描述某一种组分在色谱系统中迁移特征的一个量，决定于组分的特征，也与色谱系统有关。保留值可用时间或体积表示。

保留时间 t_R 、保留体积 V_R ：某组分的保留时间或保留体积分别是指色谱过程从组分进样开始，至流出色谱系统、浓度达到极大值所需的时间或所耗用流动相的体积，保留时间不但决定于组分特征，还与流动相的流速（流量 F_C ）有关，保留时间乘以流量 F_C ，就得到保留体积。

$$V_R = t_R \cdot F_C \quad (7-3)$$

死时间 t_m ——指流动相流过色谱系统所需的时间，因此也称为流动相保留时间。

死体积 V_m ——指流动相流过色谱系统所需的体积，等于分离系统中除固定相以外（流动相所占）的空间。

调整保留时间 t'_R ——指扣除死时间的组分保留时间，表达式为 $t'_R = t_R - t_m$ 。

调整保留体积 V'_R ——指扣除死体积的组分保留体积，表达式为 $V'_R = V_R - V_m$ 。

三、分离度

分离度 R 是指某两个相邻组分通过色谱系统后被分离的程度。组分分离的程度与组分的迁移和自身的扩散有关。见图 7-4。图中：

(a) 两个组分迁移速度的差别小，各组分自身的扩散又大，两组分不能分离。

(b) 两个组分迁移速度的差别大，各组分自身的扩散虽然大，两组分仍能分离。

(c) 两个组分迁移速度的差别虽小，但各组分自身扩散小，两组分也能分离。

(d) 两个组分迁移速度的差别大，各组分自身扩散也小，两组分分离极好。

某相邻的两组分间的分离度 R 等于两组分保留值之差除以它们的平均底峰宽 (W 的单位与 t_R 相同)。即：

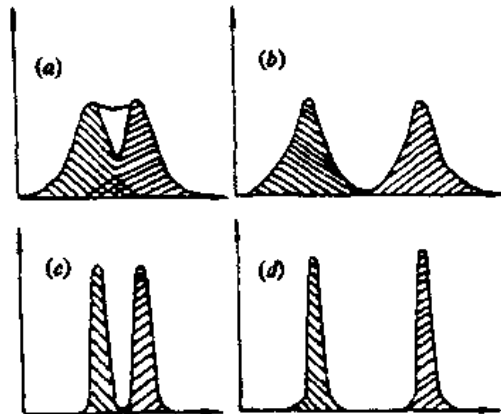


图 7-4 组分迁移速度差及各组分自身的扩散与组分分离的关系

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} = \frac{\Delta t_R}{W_{1,2}} \quad (7-4)$$

R 值越大, 表示两个峰分开的程度越大, $R = 1$ 时, 组分中有 98% 被分离; $R \geq 1.5$ 时, 两峰基本上被分离, 只有 0.3% 重叠在一起, 因此, 可用 $R = 1.5$ 作为相邻两峰已完全分开的标志。

四、容量因子和相比

容量因子 k' , 亦称质量分配比, 是指组分在色谱系统的固定相和流动相之间达到分配平衡时, 在两相中组分的质量比 (或摩尔数之比)。

$$k' = \frac{N_s}{N_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = k \frac{V_s}{V_m} \quad (7-5)$$

式中, N_s 为固定相中组分的质量; N_m 为流动相中组分的质量; C_s 为组分在固定相中浓度; C_m 为组分在流动相中浓度; V_s 为色谱柱中固定相的体积; V_m 为色谱柱中流动相的体积。

相比 β 是指色谱柱中流动相和固定相体积的比值, β 值与 k 、 k' 有如下关系:

$$\beta = \frac{V_m}{V_s} = \frac{k}{k'} \quad (7-6)$$

组分在色谱系统中的保留值决定于组分的热力学性质。色谱分离时, 每个组分的保留时间 t_R 可分为两个部分: 一部分是平均停留在固定相中的时间, 用 t_s 表示; 另一部分是平均停留在流动相中的时间, 这个时间等于死时间 (流动相保留时间) t_m 。

$$t_R = t_s + t_m \quad (7-7)$$

又可证明 $t_s / t_m = N_s / N_m = k'$ 由此可得:

$$t_R = t_m + t_s = t_m(1 + t_s / t_m) = t_m(1 + k') \quad (7-8)$$

$$t'_R = t_m k' \quad (7-9)$$

同样, 保留体积 V_R 与调整保留体积 V'_R 也可表示如下:

$$V_R = V_m(1 + k') = V_m + V_s k \quad (7-10)$$

$$V'_R = V_m k' = V_s k \quad (7-11)$$

五、相对保留值

为了描述某两种组分通过色谱柱后被分离的原因, 必须引入关于两种组分热力学性质差别的参数。相对保留值 α 亦称分离因子或选择性因子, 是指样品中某组分调整保留值与相邻的另一组分的调整保留值的比值为:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{V'_{R2}}{V'_{R1}} = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad (7-12)$$

也等于两组分质量分配比 k' 或浓度分配比 k 的比值: $\alpha = k'_2 / k'_1 = k_2 / k_1$

t'_{R2} 、 t'_{R1} 通常是同一样品分离过程中相邻的两个组分的调整保留时间, 习惯上设

定 $t'_{R2} > t'_{R1}$, 故 $\alpha \geq 1$. 若 $\alpha = 1$, 则该两组分热力学性质相同, 因而不能分离; 只有 $\alpha > 1$ 时这两种组分才有可能分离。

第三节 色谱法基本理论

根据大量的色谱实践, 人们归纳出如下的三个色谱基本理论问题: ①影响色谱分离的动力学因素又称色谱动力学问题, 主要是选择高效能的色谱柱; ②影响色谱分离的热力学因素也称色谱热力学问题, 主要是使用高选择性的色谱柱; ③分离条件的最优化。

为了系统地了解色谱理论, 我们把色谱分离过程分成以下四种典型情况: 线性, 理想色谱分离; 线性, 非理想色谱分离; 非线性, 理想色谱分离; 非线性, 非理想色谱分离。

所谓“线性”是指分离过程中, 溶质在两相中的分配关系是线性关系, 其分配系数不随浓度变化而变化; “非线性”则是指分配系数随浓度的变化而变化。“理想”是指溶质在柱内运行是理想的过程, 即假设它没有扩散现象产生, 否则, 就属于“非理想”的过程。

色谱理论是根据这四种典型的色谱分离过程提出模型, 进行数学坐标处理, 得出相对应的数学结果。这些理论中常用的是“塔板”理论 (接近线性, 理想色谱分离过程), “速率”理论 (接近线性, 非理想色谱分离过程)。

一、塔板理论

塔板理论认为色谱柱中发生的过程与精馏塔类似, 把色谱柱比拟为精馏塔, 从而借用了处理分馏过程的塔板理论和方法, 成功地处理了色谱过程, 实际上色谱柱中并不存在塔板, 但这种理论沿用至今, 仍有一定的价值。

1. 基本假设

塔板理论设想色谱柱由许许多多小段组成, 每一小段称为一块理论塔板, 每块塔板的高度称为理论塔板高度 H , 一根色谱柱所包含的理论塔板的块数称为理论塔板数 N , 因此柱子塔板数为: $N = L/H$, 其中 L 为柱长。样品组分进入色谱柱后就依次在每块塔板中的流动相和固定相两相间按照分配系数 k 进行分配, 并在瞬间达到分配平衡, 经许许多多塔板反复多次的分配平衡后, 最终使分配系数不同的各组分得以分离。塔板理论把连续的色谱过程看作是在许多块塔板中分配平衡的多次重复。塔板理论从理论上证明了保留值与分配系数间的关系是分配系数大的组分保留值也大。

2. 塔板理论方程式

可以证明, 当塔板数 N 很大时, 流出液的浓度 C 随淋洗体积 V 的变化可用如下方程来描述:

$$C(V) = \frac{M}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-1/2\left(\frac{V_R - V}{\sigma}\right)^2} \quad (7-13)$$

式中, M 为进样量; V_R 为保留体积; σ 为标准差, $\sigma = V_R/\sqrt{N}$ 。设进样量为常数, 则可以把 M 看成 1, 于是:

$$C(V) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-1/2\left(\frac{V_R - V}{\sigma}\right)^2} \quad (7-14)$$

把 $C = f(V)$ 坐标改成 $C = f(t)$, t 为溶质流出时间, 则上式可写成:

$$C(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-1/2\left(\frac{t_R - t}{\sigma}\right)^2} \quad (7-15)$$

很显然, $C = f(V)$ 及 $C = f(t)$ 与已知的高斯函数:

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad (7-16)$$

相同, 因此, 色谱流出曲线方程式就是高斯分布函数。这一推导与实验事实相符, 典型的色谱峰形图正是呈高斯分布。当流出曲线方程式中, $V = V_R$ 时,

$$C_{\max} = \frac{M}{\sqrt{2\pi}\sigma} = \frac{\sqrt{NM}M}{\sqrt{2\pi}V_R} \quad (7-17)$$

也可以写成:
$$C_{\max} = \frac{\sqrt{NM}M}{\sqrt{2\pi}t_R} \quad (7-18)$$

因此, 组分的最大浓度 (峰高) 正比于进样量 M 和塔板数 N , 而与保留体积 V_R 或保留时间 $t[R]$ 成反比。这说明 ① 色谱定量分析时, 对于一定的色谱柱和保留体积 (即相同的色谱条件) 可以用峰高或峰面积作为定量的依据; ② 当保留体积和进样量一定时色谱柱的理论板数越高则峰高越高 (峰宽越小); ③ 对一定的色谱柱随着组分出峰的时间推迟, 保留体积增加, 峰变矮, 即先出的峰高而窄, 后出的峰低而宽。

3. 柱效率及其计算

色谱柱的理论塔板数越大, 表示样品在柱中分配平衡次数越多, 样品与固定相间的相互作用也越显著, 也就是柱的分离效率越高, 所以常用理论塔板数来衡量柱效。

当 $C_{\max}/C = 2$, 即用来表示半峰宽的位置时, 理论塔板数公式推导为:

$$\frac{C_{\max}}{C} = \frac{\frac{\sqrt{n}M}{\sqrt{2\pi}t_R}}{\frac{\sqrt{n}M}{\sqrt{2\pi}t_R} e^{-\frac{N}{2}\left(1 - \frac{t}{t_R}\right)^2}} \quad (7-19)$$

则 $e^{-\frac{N}{2}\left(1 - \frac{t}{t_R}\right)^2} = 2$, 两边取自然对数, 整理得:

$$N \left[\frac{(t_R - t)^2}{t_R^2} \right] = 2 \ln 2 \quad (7-20)$$

当 $C_{\max}/C = 2$ 时, $t_R - t = \frac{1}{2} W_{1/2}$, 所以上式变成:

$$N = 8 \ln 2 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (7-21)$$

也可以写成:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (7-22)$$

t_R 包括了死时间, 组分消耗在色谱系统的死时间与分配平衡无关, 它不参加柱内的分配。因此, 为了更好地反映色谱柱实际效能, 提出了有效塔板数 N_{eff} 和有效塔板高度 H_{eff} 的概念。

$$N_{eff} = 5.54 \left(\frac{t_R - t_m}{W_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R - t_m}{W} \right)^2 \quad (7-23)$$

$$H_{eff} = L / N_{eff} \quad (7-24)$$

当柱长一定时, 板高越小, 则塔板数越大, 表示柱效越高; 相反, 板高越大, 则塔板数越小, 柱效越低。图 7-5 为 $N=5$ 时组分的流出曲线

但图 7-5 流出曲线不对称, 与正态分布不同。这是由于柱子总塔板数太少的缘故。当 N 大于 50 时, 就可以得到对称的曲线。而一般色谱法中, N 值是很大的, 如气相色谱一般为 $10^3 \sim 10^6$ 。若柱内的塔板数增加则峰形变窄并趋于对称。图 7-6 为由三种不同柱效的色谱柱得到的色谱示意图。

4. 塔板理论的讨论

塔板理论对色谱分析时组分在色谱柱内分布 (或色谱峰) 的数学模型即随着洗脱时间的增加, 组分在柱内逐步形成向后迁移的浓度正态分布的谱带; 正态分布的标准差决定于谱带在色谱柱中所在位置 L 、所对应的柱效 ($N = L / H$) 与淋洗时间。

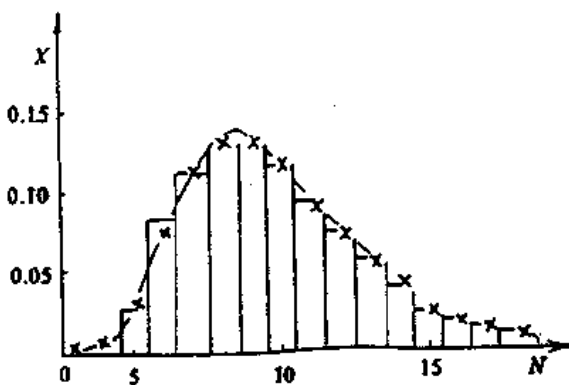


图 7-5 $N=5$ 时组分流出色谱柱示意图

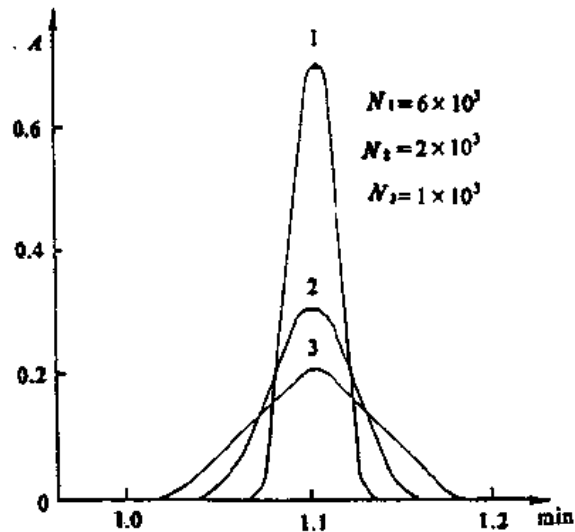


图 7-6 理论塔板数与谱带展宽的关系

理论塔板数是反映柱效能的指标, 理论塔板数 N 的物理意义在于说明柱中组分所达到平衡次数的多少。色谱分离时, 组分 1、2 在色谱系统中分离的基本条件是它们的

热力学性质容量因子 k' 不同，这仅是分离的可能性，但这种可能性在色谱系统中的实现及实现的程度取决于组分在分配系统中达到分配平衡的次数。对于柱效高的色谱柱，组分在柱内流过较短的距离 H 就能够达到分配的平衡，组分在柱内分配平衡次数越多，组分间热力学性质的差异表现得就越充分，组分与固定相的相互作用力也更显著，分离效果好；反之，对于柱效低的色谱柱，组分经过这样的色谱柱时达到平衡分配的次数少，组分间热力学性质的差异不能充分表达，分离效果不好。

塔板理论还能很好地解释色谱图。如流出曲线的形状、浓度最大值的位置、数值和流出时间、色谱峰的区域宽度和保留值的关系。因此，塔板理论有一定的实用价值。

但是，把色谱柱作为精馏柱或精馏塔来看待，这个概念并不完全符合色谱柱内的情况。它依据的分配平衡只是一种理想极限状态。组分在柱内的流动并不是跳跃式的或脉冲式的，而是连续的。在一个塔板高度内，不能达到瞬时平衡，质量传递需要一定的时间，达不到完全的平衡。因此，塔板理论不能解释同一色谱柱对不同组分的理论塔板数和理论塔板高度可能不同；也不能解释同一组分不同操作条件下，理论塔板数和理论塔板高度的不同；不能找出影响塔板高度的内在因素；也不能为操作与应用色谱方法提供改善柱效的途径与方法。因为塔板理论只考虑组分的热力学性质，而没有考虑组分分子在柱内动力学因素，这就是塔板理论的局限性。总之，塔板理论主要是描述与解释宏观的色谱过程，不能用于研究色谱分离的微观机理。后来又发展了一些理论以修正或补充其不足，其中比较满意的是速率理论。

二、速率理论

塔板理论提出了用理论塔板数或理论塔板高度评价柱效的方法。速率理论则从动力学出发，进一步指出了影响板高的诸因素。

速率理论方程又称范氏方程，它概括了板高增加（柱效降低）的三大因素：涡流扩散、分子扩散与传质阻力。

$$H = A + \frac{B}{U} + Cu \quad (7-25)$$

式中，第一项称涡流扩散项，第二项称分子扩散项，第三项称传质阻力项， U 为流动相平均线速度，在实际应用中也可采用流动相体积流速来进行有关计算。

要提高柱效，减小板高，就要使方程式中各项减小，速率理论提出了提高柱效的三个途径。

1. 涡流扩散项 A

色谱柱是由填充物与柱管所组成的。填充物本身的几何形状往往是无定形的，填充物的颗粒大小是不均匀的，同时，填充物在柱内填充的紧密，均匀程度也是不一致的，同一组分的分子通过色谱柱时有三种情况：颗粒之间的孔隙小时，组分的一部分分子受到的阻碍大，移动距离小，速度慢；颗粒之间的孔隙大时，组分的一部分分子受到的阻碍小，移动距离较长，速度快；还有一部分分子受到颗粒的阻力介乎二者之间，移动距离也在二者之间，因此，组分分子在流动相中形成了不规则的“涡流”，由于这种涡流扩散现象，使这三部分分子到达柱末端的时间不同，而引起峰形变宽。涡流扩散项与其相

关因素的关系式为:

$$A = 2\lambda d_p \quad (7-26)$$

其中, λ 为度量色谱柱填充不均匀的因子; d_p 为固定相颗粒的平均直径。可见色谱柱填充得越均匀, 所用固定相颗粒直径越小时, A 越小, H 也就越小, 柱效越高。

2. 分子扩散项 B/U

当样品进入色谱柱后, 由于存在着浓度梯度, 组分分子由浓度高的区域向浓度低的区域扩散, 其扩散方向与流动相运动方向一致。

分子扩散项与其相关因素的关系式为:

$$\frac{B}{U} = \frac{2rD_m}{U} \quad (7-27)$$

其中 r 为度量色谱柱中通道弯曲的因子, D_m 为组分分子在流动相中的扩散系数, U 为流动相线速度。由于分子在液体中的扩散系数比在气体中小得多 (仅为气相色谱的 $10^{-4} \sim 10^{-3}$ 倍), 所以在液相色谱中, 分子扩散项对色谱峰展宽的影响可以忽略。在气相色谱中, 增加载气密度可使 D_m 减小, 增加载气密度的办法是增加载气压力或分子量, 而 r 值随载体颗粒直径的增加而增加, 所以减小分子扩散项的办法是使用粒度小而且均匀的固定相, 使用高分子量的载气和较高的载气流速。

3. 传质阻力项 C/U

样品各组分流经色谱柱时, 组分分子一方面在流动相的带动下向柱后移动; 另一方面又按浓度分配比在两相间不断分配扩散, 进行质量传递, 称为传质, 这种传质是动态的过程。实际上质量传递达到分配平衡需要一定的时间, 分离柱内不断向前运动的组分在两相中达不到完全平衡状态, 因此对传质产生一种阻力, 称为传质阻力。有的组分分子较早地由固定相进入流动相, 产生峰形的前沿, 而有的组分分子较晚进入流动相, 形成峰形拖尾展宽, 因而形成组分谱带的展宽。

传质阻力项包括: 固定相传质阻力项, 流动相传质阻力项, 停滞流动相传质阻力项。

(1) 固定相传质阻力项 $C_s U$

组分分子从流动相进入到固定液内进行质量交换的传质过程取决于固定液的液膜厚度以及组分分子在固定液内的扩散系数:

$$C_s U = \frac{W d_f^2}{D_s} \quad (7-28)$$

式中, W 为系数, 与容量因子 k' 有关; d_f 为固定液的液膜厚度, D_s 为组分在固定液内的扩散系数, D_s 随固定液粘度的减小而增大, 所以减小该项目的办法是使用低粘度的固定液, 固定液的涂层应薄而且均匀, 同时使用较低的流动相流速并使组分有较高的分配系数。

(2) 流动相传质阻力项 $C_m U$

处于同一流路的分子，它们的流速各不相同。靠近色谱柱边壁分子流动的速度比流路中央分子的速度慢，从而引起峰形展宽。

$$C_m U = \frac{\psi d_p^2}{D_m} U \quad (7-29)$$

式中， ψ 为系数，与容量因子 k' 有关，其它符号同前。

(3) 停滞的流动相传质阻力项 $C_m U$

用多孔固定相时，颗粒内的孔穴充满了静态的流动相。组分分子必须穿过这段停滞的流动相，扩散到固定相表面与固定相进行质量交换，因此，体积大、微孔小的固定相，传质速率慢，峰形扩展严重。

$$C_m U = \frac{\delta d_p^2}{D_m} U \quad (7-30)$$

式中， δ 为系数，与容量因子 k' 有关。

减小 (2)、(3) 项的办法是选用粘度小的流动相，选用孔径大、微孔浅、粒度小且均匀的固定相。在高效液相色谱中，流速对板高的影响不如气相色谱那样明显，因此，允许使用较高的线速度，而在气相色谱中要使用较低的流速。

综合上述各塔板高度分量，可得到色谱的塔板高度 H 与流量 U 关系的表达式：

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2rD_m}{U} + \left(\omega \frac{d_p^2}{D_s} + \psi \frac{d_p^2}{D_m} + \delta \frac{d_p^2}{D_m} \right) U \quad (7-31)$$

由此可见，决定板高的除了流量外主要是：固定相与流动相的物理特性 (D_m , D_s , d_p , d_p), 化学特性 (ω , ψ , δ) 以及色谱柱填充的状况 (λ , r)。

4. 理论塔板高度与流动相流速的关系曲线

按速率理论方程式，作 $H-U$ 关系曲线，见图 7-7。色谱柱的板高与流量的关系由三项构成：涡流扩散项 A 的影响为一常数，不随 U 而改变；传质阻力项 CU 为一定斜率的直线；分子扩散项 B/U 为双曲线。

在低流速时，板高及峰变宽主要是由分子扩散项 B/U 所决定；在高流速时传质过程中偏离分配平衡的影响增加，这时 CU 项是影响峰宽和板高的主要因素。如图 7-7 中曲线所示，在气相色谱中，当载气流速由低到高增加时，开始 H 降低，柱分离效率增高；超过某一流速后，再增加流速， H 反而升高，柱效降低。在三项影响因素综合作用下，可以得到一个最佳流速 $U_{最佳}$ 和 $H_{最小}$ ，这时柱的分离效率最高。

例题，根据范氏方程，推导以 A 、 B 、 C 表示的载气最佳线速度和最小板高的表达式。

解：对方程 $H = A + B/U + CU$ 求导数

$$\frac{dH}{dU} = -\frac{B}{U^2} + C$$

当 H 为最小值时，一阶导数为零，

$$-\frac{B}{U^2} + C = 0$$

$$U_{\text{最佳}} = \sqrt{B/C}$$

$$H_{\text{最小}} = A + B/U_{\text{最佳}} + CU_{\text{最佳}} = A + 2\sqrt{BC}$$

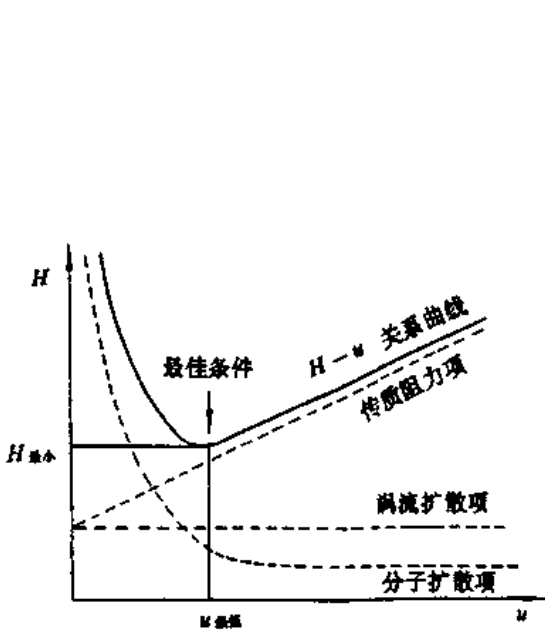


图 7-7 色谱的板高与流动相流量曲线

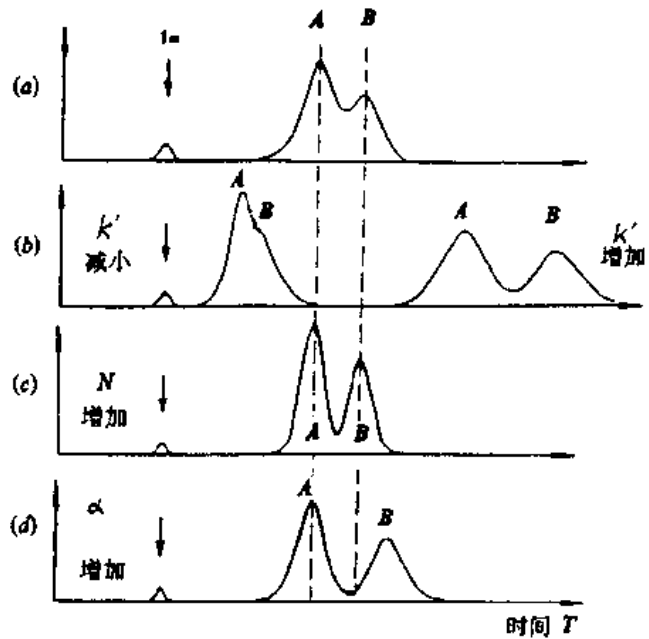


图 7-8 改变 k' 、 N 和 α 值对分离度的影响

范氏方程式中三个常数的求法如下：

对于某一色谱柱，在组分，载气，柱温等一定时，

- (1) 用三个相差较大的，不同流速 U ，取得三个色谱图。
- (2) 在三个色谱图中选择某个峰，分别求出对应三种 U 的色谱柱板高 H 。
- (3) 由已知 U 和 H 建立三个范氏方程，解联立方程求出 A 、 B 、 C 。

对于某一色谱柱，根据 A 、 B 、 C 三项数值，可看出何者影响柱效最大，以便采取相应的改进措施。当已知三常数时，在不同的 U 下计算 H ，可绘制板高流量曲线，得到某一色谱柱的 $U_{\text{最佳}}$ 和 $H_{\text{最小}}$ 。求出的流速可能很慢，使保留时间太长，操作不便。实际工作中可使用 $U_{\text{最佳}}$ 的二倍流速，仍可在较短的时间内，得到较好的分离。

5. 分离度与柱效和选择性的关系

根据分离度定义公式：

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (7-32)$$

设色谱中 1、2 两相邻组分的峰宽相等，则可推导出如下关系：

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right) \quad (7-33)$$

此方程被称为基本分离方程。由方程看出，决定物质分离的三个基本要素为相对保留值 α ，容量因子 k' 和理论塔板数 N 。式中前一项为理论塔板数，是柱效指标，提高柱效的途径即速率理论。后一项称溶剂效率，反映固定相对不同组分的保留作用的选择性，而 $\alpha = t'_{R2} / t'_{R1} = k'_2 / k'_1$ ，其值越大，表明固定相对两组分的保留作用的差别越大，即选择性越强。所以分离度是柱效和选择性的综合反映，是色谱柱的总分离效能指标。提高分离度则可从提高柱效和选择性两方面入手，改变 R' ， N 值， k' 、 N 、 α 对分离度的影响见图 7-8。(a) 图的两峰分离不良，改善的途径有两个：一是提高柱效，其作用是使峰形变窄，可提高分离度，如 (c) 图所示；二是提高固定相的选择性（改换固定相的种类和配比）使两峰之间的距离加大（使固定相对后一峰的保留作用增强），其效果如 (d) 图所示。其中 (b) 图是改变容量因子 k' 的效果， k' 的改变主要是通过变更流动相的配比，改变温度等，但需注意，改变温度同样会改变柱效。实际色谱分离时， k' 应控制在 3~7 之间。

思 考 题

1. 色谱法有哪些类型？其分离基本原理是什么？
2. 速率理论方程式对色谱分析有何指导意义？
3. 为什么可用分离度 R 作为色谱柱的总分离效能指标？
4. 一根具有 8100 块理论塔板的色谱柱，异辛烷和正辛烷的保留时间各为 800s、815s。问：(1) 二组分通过该柱子时，所得到的分离度是多少？(2) 假如二组分保留时间不变，当使分离度达到 1.01 时，所需的塔板数是多少？

第八章 气相色谱法

第一节 概述

气相色谱法 (Gas Chromatography) 是用气体作为流动相的色谱法。作为流动相的气体称为载气。用活性吸附剂作固定相的称气-固吸附色谱。用液体作固定相的称为气液-分配色谱。气相色谱法除具有色谱法的一般优点外, 与其它色谱法比较具有以下几个特点:

1. 高选择性, 表现在它能分离理化性质极为相似的组分, 如二甲苯的三个异构体, 同位素等。
2. 高效能, 一般色谱柱达几千个塔板数, 毛细管柱可达 100 万个塔板数。
3. 低检测限, 可检测 $10^{-7} \sim 10^{-13} \text{g}$ 的物质。
4. 分析速度快, 一般分析只需几分钟到几十分钟。
5. 应用范围广, 凡是在 $-196^{\circ}\text{C} \sim +450^{\circ}\text{C}$ 的范围内, 只要稍有一定蒸气压力的组分均可进行分析, 对于不易挥发, 易分解的物质可经过化学转化, 生成易挥发的稳定的衍生物后, 亦可进行气相色谱分析。

气相色谱也有一定的缺陷。在没有纯样品时对未知物的准确定性和定量较困难。往往需要与红外、质谱等仪器联用。沸点高的、易分解、腐蚀性和反应性较强的物质, 气相色谱分析也较为困难。有人统计过, 约有 20% 左右的有机物能用气相色谱测定。因此, 气相色谱的应用有一定的局限性。

第二节 气相色谱仪的基本组成

目前, 气相色谱仪的型号很多, 且性能不一, 但其基本结构是相同的, 主要由六个部分组成: 气路系统、进样系统、色谱柱、检测器、温度控制系统、记录及数据处理系统。其简单流程图如下:

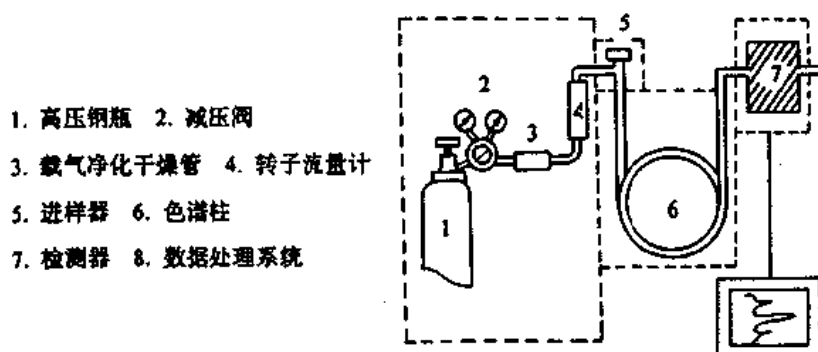


图 8-1 气相色谱仪流程

气相色谱仪的工作过程可简述如下：钢瓶中的高压载气经减压并调节至所需流量后，进入进样口，再流经色谱柱及检测器，然后排放。分析样品时，样品经进样口注入后，立即在气化器中高温气化，并随载气进入色谱柱，在柱中被分离后，依时间先后从色谱柱流出进入检测器，检测器根据各组分的浓度或质量的多少，转换成不同强度的电信号，经放大器放大输给记录仪，得到色谱流出曲线，即色谱图。

一、气路系统

气相色谱仪的气路系统由载气、辅助气体及其所流经的部件组成。

1. 载气

气相色谱所用载气应该不和样品及流动相发生化学反应。常用载气有氮气、氢气、氦气等，其中氦气最为理想，但因其价格高，故很少使用。氢气也常有较好的灵敏度，但氢气易燃易爆，因此使用最多的是氮气。氮气要求纯度为99.99%以上，调节流速不超过100mL/min，常用20~50mL/min。

2. 辅助气体

气路中除载气外，根据选用检测器的不同，有时需要通入辅助气体。辅助气体包括：空气、氧气、氢气。实验室中气体可由高压钢瓶供给，空气也可由空气压缩机提供，氢气由氢气发生器提供。

3. 稳压、稳流和流量调节装置

为了定性、定量的需要，气相色谱要求载气有稳定的压力和流速，流速的波动不应超过0.2%，因此，气相色谱仪上都装有各种调节阀，它们具有稳压稳流作用，并有精密的流量调节作用。

二、进样系统

进样就是把气体、液体样品快速定量地加到色谱柱内，进行色谱分离。进样量的准确性和重复性以及样品的结构等对定性和定量有很大的影响。

进样系统包括进样器和气化室。气化室的作用是使注入的样品在瞬间气化，通常要求其热容量大，死体积小，以免因冷样品的注入而引起温度变化。气化室温度是色谱分析的重要参数之一。

常用的进样器有微量注射器和进样阀。对于液体样品可用0.5~100 μ L不同规格的微量注射器进样，将注射器的针头插入气化室的自封硅橡胶隔垫中快速注射。

气体样品可用普通医用注射器进样，或用六通阀进样。进样方式有手动进样和自动进样器进样两种。

三、色谱柱

色谱柱是色谱仪的“心脏”，混合物各组分能否分离开，主要取决于色谱柱的效能。色谱柱由柱管和填充其中的固定相组成。色谱柱主要分为填充柱和毛细管柱两大类。

1. 填充柱

在柱内装有颗粒状固定相的色谱柱称为填充柱。色谱柱内径约为2~4mm，长度在1~10m之间，通常为2~4m。可由不锈钢、玻璃、聚四氟乙烯制成，对于有反应性或腐蚀性的样品，可选用玻璃柱。

柱越长、越细，分离效率越高，但柱子太长，分离时间也长，总之要选择既能将各

组分分开，而分离时间又不太长的色谱柱为宜。填充色谱柱有 U 形、W 型和螺旋型三种。

2. 毛细管柱

又称开口管柱，空心细管柱，用来分析复杂混合物，这种柱内径为 0.1~0.5mm，长 1~100m 以上，用玻璃管或石英管在高温下拉制成毛细管，呈螺旋形，固定液直接涂渍或键合在管壁上。

3. 填充色谱柱的制备

一根装填优良的色谱柱，对色谱的分离起决定性的作用。制备过程大致分以下几个阶段。

(1) 载体的处理 将选择好的载体进行预处理，酸洗或硅烷化，以消除表面活性中心，减少吸附作用，避免严重吸附和拖尾现象。

(2) 固定液的涂渍 固定液涂渍方法有多种，无论采用何种方法涂渍，一般都应遵守下面几条规则：保证固定液涂布均匀；避免载体颗粒破碎；避免使用高沸点溶剂。

(3) 色谱柱的填充 取预先处理好的色谱柱，将柱的一端塞入少量玻璃棉并与真空系统连接，另一端接上漏斗，开动真空泵，将固定相从漏斗中灌进柱子，同时用适当工具轻轻由下至上敲打柱子各部位，使柱内填料装填紧密而均匀，又不损坏填料颗粒。填满后，塞上少量玻璃棉，把装入柱内的固定相称重，记下重量，并在色谱柱上标示装填方向，以便把接在抽气管上的一端接到检测器上，因为这一头比另一头要紧密些。如果接反了，操作过程中柱内填料将发生位移，容易出现空缺。

(4) 色谱柱的老化 老化的目的在于：除去柱中的杂质和短链的高聚物，这些较易挥发的物质若残留在柱中，以后会慢慢流出，形成噪音和基线漂移。另外可促使固定液均匀牢固地分布于载体上。老化都是在比使用温度高 5℃~20℃ 的条件下进行。老化最好是逐步进行，先在较低的载气流速下，柱温由室温升至使用温度，升温过程最好持续几个小时完成。不能突然在 200℃~300℃ 的条件下加热，老化过程需连续进行 4~8h 以上，直至记录仪基线平直为止。

四、检测器

检测器是气相色谱仪的“眼睛”。它是检测色谱柱流出组分及含量变化的器件。目前检测器的种类很多，但常用的只有几种。关于常用检测器的结构及检测原理将在后面章节介绍。

五、温度控制系统

温度是气相色谱分析的重要操作条件之一，它直接影响样品的气化、柱的分离效率和检测器的灵敏度等。因此，气相色谱仪都配有精密的温度控制装置，以提供一个合适的、高稳定的温度环境。

色谱柱恒温室控温范围在 15℃~350℃，有的仪器最高可达 450℃，要求其保温性能好，温度分布均匀，内装电风扇，强制空气对流循环，同一截面不同点温度差不超过 ±0.5℃，温度能自动控制，控制点精度不超过 ±0.1℃。

柱恒温室工作温度的选择需注意如下几点：

(1) 不能超过固定液允许的使用温度，否则会造成固定液的严重流失，干扰测定。

并使柱效降低。

(2) 要有足够高的温度使样品组分在柱中保持气态。

(3) 在样品允许的前提下，选择较低的柱温，这样组分在固定液中溶解度大，分离效果好，但温度低时保留时间延长，通常温度降低 30℃，保留时间延长一倍，所以要兼顾二者，选择一个合适的温度，既保证分离，又缩短时间。

气化室温度为 50℃~400℃或更高，根据样品的气化温度可选择比色谱柱恒温室温度高 10℃~50℃，甚至 50℃~100℃，以保证样品在气化室中瞬间气化，很快被载气带入色谱柱。

检测器恒温室温度一般选择与柱温相同，或略高于柱温。对氢火焰离子化检测器、火焰光度检测器等，其温度不得低于 100℃，防止水蒸汽影响。

六、记录及数据处理系统

由检测器产生的电信号，通过记录仪记录，以便得到一张永久的色谱图。新型的色谱仪都配有微处理机处理分析数据，打印或显示分析结果，简单快速，提高了定量精度及工作效率，实现了色谱分析数据处理的自动化。

第三节 气相色谱的固定相

固定相是色谱柱的核心部分，样品组分的分离在很大程度上决定于固定相的选择。气相色谱固定相主要分为固体固定相、液体固定相和聚合物固定相三类。

一、固体固定相

也称固体吸附剂，主要用于分析永久气体及一些低沸点物质，如气态烃。因为永久气体在一般固定液里溶解度很小，还没有一种满意的固定液能分离它们，而在吸附剂上其吸附能力差别较大，可以得到满意的分离。

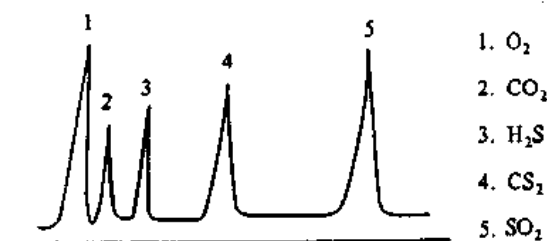


图 8-2 活性吸附剂分离气体色谱图

二、液体固定相

液体固定相由担体和固定液组成

1. 担体

担体也称载体，它的作用是用来支撑一层均匀的固定液薄膜，同时使载气顺利通过，它应具有下列特性：表面有微孔结构，微孔的结构要均匀，具有很大的比表面积

(1~20m²/g); 具有一定的惰性, 与样品组分不起化学反应, 物理吸附作用应该很小; 具有一定的粒度和规则的形状, 最好是球形, 有一定的机械强度, 在装填过程中不易破碎; 热稳定性好。

硅藻土型担体是常用的担体, 天然硅藻土是由无定形二氧化硅及少量金属氧化物组成的, 经高温煅烧, 粉碎过筛而成, 因处理方法不同分为红色担体和白色担体。

表 8-1 气-固色谱常用的几种吸附剂及其性能

吸附剂	化学组成	最高使用温度	性质	分析对象	使用前活化处理方法
活性炭	C	<200℃	非极性	惰性气体 (-196℃), N ₂ , CO ₂ , CH ₄ 等永久性气体 N ₂ O 等	粉碎过筛, 用苯浸泡几次, 以除去其中的硫磺、焦油等杂质, 然后在 380℃ 下通入过热水蒸气, 吹至乳白色物质消失为止。装在磨口瓶内保存待用, 装柱前, 在 160℃ 烘烤 2h 即可使用。
硅胶	SiO ₂ · xH ₂ O	<400℃	氢键型	一般气体, C ₁ ~C ₄ 烷烃, N ₂ O, SO ₂ , H ₂ S, CO, CF ₂ Cl ₂ , 等气体(常温下)	粉碎过筛后, 用 6M 盐酸浸泡 1~2h, 然后用蒸馏水洗到没有氯离子为止。在 180℃ 的烘箱中烘 6~8h, 装好待用, 装柱后于使用前在 200℃ 下通载气活化 2h。
氧化铝	Al ₂ O ₃	<400℃	极性	氢同位素及异构体 (-196℃), C ₁ ~C ₄ 烷烃	粉碎过筛后, 根据分析对象的性质净化, 并在较高的温度下活化处理。一般在 600℃ 的马福炉内烘 4h 活化。
分子筛 A 型	Na ₂ O, CaO, Al ₂ O ₃ , 3SiO ₂	<400℃	强极性	惰性气体 H ₂ , O ₂ , N ₂ , CH ₄ , CO 等, 一般永久性气体及 NO, N ₂ O 等	粉碎过筛后, 用前在 550℃~600℃ 的马福炉内烘 2h, 或在 350℃ 下真空活化 2h。
GDX -01 -02 -03 -04	高分子多孔微球	<200℃	极性有所变化	气相和液相中水的分析, CO, CO ₂ , CH ₄ , 低级醇及 H ₂ S, SO ₂ , NH ₃ , NO ₂ 等	170℃~180℃ 下烘去微量水分后, 在 H ₂ 或 N ₂ 气流中处理 10~20h。

红色担体——天然硅藻土中的铁, 煅烧后生成氧化铁, 呈现浅红色。孔穴多, 孔径小, 比表面大, 可负担较多固定液, 缺点是表面存在活性吸附中心, 分析极性物质时易产生拖尾峰。通常非极性固定液使用红色担体, 用于分析非极性组分。国产 6201 担体及美国 Chromosorb P 属于此类。

白色担体——天然硅藻土在煅烧前加入少量碳酸钠等助溶剂, 使氧化铁在煅烧后生成铁硅酸钠, 变为白色。由于助溶剂的存在, 生成的硅酸钠玻璃体破坏了硅藻土中大部

分细孔结构，黏结为较大的颗粒，表面孔径粗，比表面积小，也是由于碱性助溶剂的影响，担体中碱金属氧化物含量较高，pH 值偏碱性。白色担体表面有一定惰性，表面吸附作用和催化作用少，极性固定液使用白色担体，用于分析强极性物质。国产 101 担体及美国 Chromosorb W 属于此类。

表 8-2 红色、白色担体物理性质比较表

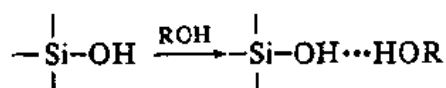
物理性质	红色担体	白色担体
pH 值	6~7	8~9
实际密度(g/mL)	2.26	2.20
填充密度(g/mL)	0.47	0.24
孔隙直径(μm)	0.4~1	8~9
比表面积(m ² /g)	3.5~4.0	1~1.3
固定液负荷(%)	30~40	20~30

硅藻土型担体在使用前应进行预处理：

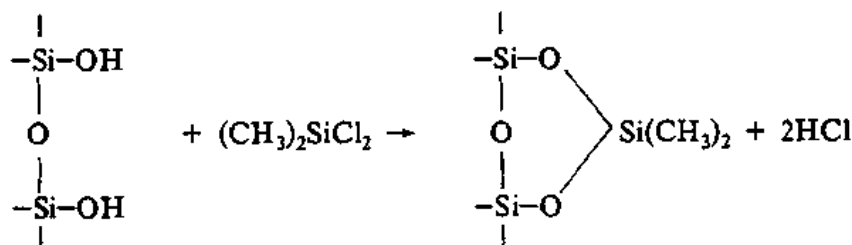
(1) 酸洗 用 6M 盐酸在加热情况下处理约半小时，然后冲洗至中性，目的是除去担体中的金属氧化物。

(2) 碱洗 用 5% 氢氧化钾-甲醇溶液回流，再冲洗至中性，目的是除去酸性氧化物，如 Al₂O₃ 等。

(3) 硅烷化处理 硅藻土型担体表面有硅醇基结构，-OH 是酸性基团，并有弱极性，容易与极性组分，特别是具有碱性基团的组分发生作用，当与能形成氢键的极性分子接触时，羟基可与极性分子形成氢键，产生吸附。



硅烷化是消除担体表面活性的有效方法，常用的硅烷化试剂有二甲基二氯硅烷 (DMCS)，三甲基氯硅烷 (TMCS) 和六甲基二氯硅烷 (HMDS)。



这样将极性 OH 换成 DMC 的二甲基硅醚基团，而把活性表面换成惰性表面，消除了氢键作用力。

上述预处理方法可根据具体情况使用其中的一种，也可同时用几种方法，经过预处理的担体，可以直接使用。

2. 固定液

固定液主要是一些高沸点有机物，对固定液的要求为：在使用温度下是液体，应具有不挥发性，其蒸汽压应小于 0.1mmHg；具有良好的热稳定性；对待分离的各组分应具有合适的分配系数 $K > 1$ 。对两个沸点或性质相近的组分，有尽可能高的分离能力，即分配系数存在一定差别；固定液与样品组分不产生化学反应。

组分能否分离取决于各组分在液相中的保留时间，而保留时间和组分在气、液两相间的分配系数有关，分配系数的大小是由组分和固定液分子之间的作用力所决定。分子间力与化学键力不同，它是分子间较弱的一种吸引力。这种作用力包括：静电力、诱导力、色散力和氢键作用力。若组分分子与固定液分子间的上述作用力越大，则样品组分在柱中的保留时间越长。若样品中不同组分分子与固定液分子间的作用力差别越大，则样品中各组分的分离越好，上述作用力的大小，常用“极性”表示。

对固定液的选择，可先考虑下列几点注意事项：

(1) 现有的固定液约有 1 000 多种，但性质差别较大，适用于分离不同种类化合物的常用固定液只有 20 余种，因此主要是在这 20 余种固定液中进行选择。

(2) 不要简单认为固定液的极性与组分结构无关，产生极性的因素很多，例如偶极矩、诱导作用、可极化性、酸性及碱性基团等，因此要具体考虑组分与固定液之间各种可能的反应与作用力。

(3) 选择固定液主要靠经验与实践，事先要充分查阅文献资料，了解前人在分析某组分或类似化合物时所选用固定液及操作条件。

固定液的选择主要是根据相似相溶原理，即固定液与样品的化学结构相似。极性相似，则二者之间的分子间力较强，溶解度较大。首先要了解各种固定液的相对极性。这里介绍一种常用的固定液相对极性 P 的测定方法：首先规定极性的 β, β' -氧二丙腈 $(\text{CNCH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ 的极性 $P = 100$ ，非极性的角鲨烷的极性 $P = 0$ 。选两种常见物质，正丁烷及丁二烯，作为标准物，然后在角鲨烷、氧二丙腈及被测固定液柱上，分别测定其相对保留时间，并取对数： $q = \lg (t'_{R}(\text{丁二烯}) / t'_{R}(\text{正丁烷}))$ ，则被测固定液的相对极性 P_x ，可用下式算出：

$$P_x = 100 - \frac{100(q_1 - q_x)}{q_1 - q_2} \quad (8-1)$$

式中， q_1 为丁二烯和正丁烷在 β, β' -氧二丙腈柱上测得的相对保留时间对数为 0.773；

q_2 为丁二烯和正丁烷在角鲨烷柱上测得的相对保留时间对数为 0.080；

q_x 为丁二烯和正丁烷在被测固定液上相对保留时间对数。

然后，以 20 为一级，把相对极性 0~100 分为五级，分别用“+1”、“+2”、“+3”、“+4”、“+5”表示，如 SE-30 相对极性为 13，则极性为“+1”级，而相对极性为 0 的用“-1”表示。

为便于依据相似相溶原理，根据待测组分的化学结构、极性选择相似结构和极性的

固定液，可将常见的有机物按其形成氢键能力和极性大小分类，见表 8-4。

表 8-3 固定液的相对极性和级别

固定液名称	相对极性	级别
β, β' -氧二丙腈	100	+5
<i>N</i> -(甲基乙酰基)- β -氨基丙腈	87	+5
丙二醇碳酸酯	83	+5
二甲基甲酰胺	80	+4
聚乙二醇 600	78	+4
二乙基甲酰胺	62	+4
环氧丙基吗啉	57	+3
1,2-丁二醇亚硫酸酯	54	+3
<i>N</i> - β -羟基丙基吗啉	50	+3
二丁基甲酰胺	43	+3
羟乙基月桂醇	36	+2
邻苯二甲酸二壬酯	25	+2
SE-30	13	+1
阿皮松	7	+1
角鲨烷	0	-1

表 8-4 化合物的极性分类

1 最强极性	2 强极性	3 中等极性	4 弱极性	5 非极性
水、氨基醇、羧酸类、多元酚、二元酸	醇、脂肪酸、酚、伯仲胺、脲、含 α -H 硝基化合物、含 α -H 的腈、 NH_3 、HF、HCN、胍	醚、酮、醛、酯、叔胺、不含 α -H 的硝基化合物、不含 α -H 的腈	CHCl_3 、 CH_2Cl_2 、 CH_3CHCl_2 、 CH_2Cl 、 CH_2Cl 、芳烃、烯烃	饱和烃、 CS_2 、硫醇、硫化物、 CCl_4

表 8-4 中第一类化合物是能形成氢键网络的，第二类为含有电负性很大的原子 (O、N、F)，又有活泼氢原子的化合物。第三类含有电负性原子，但无活泼氢原子。第四类含有活泼氢原子，但无氢键提供者的电负性原子 (O、N、F)，第五类为不能形成氢键的化合物。

非极性物质一般选用非极性固定液 ($P=0$ ，-1 或 +1 类)，分子间主要是色散力起作用，各组分按沸点顺序先后流出。

分离极性物质，选用极性固定液，分子间起作用的是色散力和诱导力，样品中各组分主要按极性顺序分离，极性小的先流出色谱柱，对于强极性物质，选用强极性固定液 ($P=+4$ ，+5)，分子间主要是静电力起作用。

分离非极性和极性混合物时，如选用非极性固定液，极性组分先出峰，如选用极性固定液，则非极性组分先出峰。

对于能形成氢键的样品，如醇、酚、胺等，一般选择极性或氢键型的固定液，例如多元醇固定液，这时样品中各组分是根据和固定液分子间形成氢键能力大小先后流出，不易形成氢键的先流出，最易形成氢键的后流出。对于复杂的难分离的物质，可以用二种或二种以上的混合固定液。五种最常用固定液列于表 8-5。

表 8-5 五种常用固定液

序号	名称	商品名	极性	最高使用温度	溶剂	参考用途
1	甲基硅橡胶 (甲基硅酮)	SE-30	+1	300℃	氯仿	高沸点弱极性物质
2	苯基(50%)甲基 聚硅氧烷	OV-17	+2	300℃	氯仿丙酮	高沸点有机物
3	三氟丙基(50%) 甲基聚硅氧烷	QF-1	+3	250℃	同上	含卤素、甾族 化合物及某些炔烃 醇、酮的分离
4	聚乙二醇-20M	PEG-20M	氢键型	> 200℃	同上	含氮、氧化合 物，烷烃的正构、 异构
5	聚二乙二醇丁 二酸酯	DEGS	+4	220℃	同上	脂肪酸酯及其 他含氧化合物

这五种常用固定液的热稳定性好，使用温度范围宽，极性范围广，可作为实验室的常备柱，作常规分析及选择固定液用。选择固定液时可先在这五种色谱柱进行初步分离，观察样品组分在色谱图上的分离情况，然后再根据极性选择合适的固定液。

三、聚合物固定相

又称高分子多孔微球。它是近年来发展起来的一种新型合成有机固定相，本身是担体，又是固定液，既可直接用于分离，也可作为担体，在表面涂固定液后再用于分离。一般认为物质在其表面既存在吸附作用，又存在溶解作用。在低温时可能以吸附为主，近似于气固色谱，在较高的柱温下，可能以溶解为主，接近于气相分配色谱。聚合物固定相主要是由苯乙烯或丙烯腈等单体及交链剂，如二乙烯苯等共聚而成，在制备极性固定相时可在共聚物中引入极性官能团。

聚合物固定相具有以下优点：具有较大的比表面积，表面孔径均匀；对非极性及极性物质无有害的吸附活性，拖尾现象小，极性组分也能出对称峰；由于不存在液膜，无流失现象。热稳定性好；机械强度和耐腐蚀性较好，系均匀球状，在填充色谱时均匀性、重现性好，有助于减少涡流扩散。

商品中有以乙基苯乙烯与对-二乙烯苯为主体的 Porapak 系列，和以苯乙烯与二乙烯苯为主体的 Chromosorb 系列，都有不同比表面和不同极性的系列产品。

第四节 气相色谱检测器

气相色谱检测器是把色谱柱后流出物质的信号转换为电信号的一种装置。根据检测原理不同，检测器分为两种：

浓度型检测器——响应讯号和载气中组分的瞬间浓度成正比。常用的浓度型检测器有热导检测器 (TCD) 和电子捕获检测器 (ECD)。

质量型检测器——响应讯号和单位时间内进入检测器组分的质量成正比。常用的质量型检测器有火焰离子化检测器 (FID)、火焰光度检测器 (FPD) 和火焰热离子检测器 (FTD)。

一、常见检测器

1. 热导检测器

热导检测器 (TCD) 是一种应用最广泛的通用型检测器，可分析许多有机物和某些无机物，不破坏样品，可收集馏分或与其他仪器如质谱、红外光谱仪等联用，另外具有结构简单，性能可靠等优点。

热导检测器由热导池及惠斯登电桥组成。热导池体由不锈钢制成，在检测器恒温室中自动控制恒定的工作温度。热导池由参比池和测量池两部分组成，两池中的热敏元件分别构成惠斯登电桥的两臂，并且其电阻相等，参比池中只有载气通过，而测量池中则有载气和组分通过。热敏元件可由高电阻率和电阻温度系数大的铼钨丝、铂丝或球形热敏电阻构成。

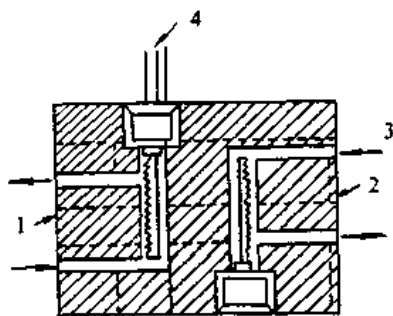


图 8-3 热导池体

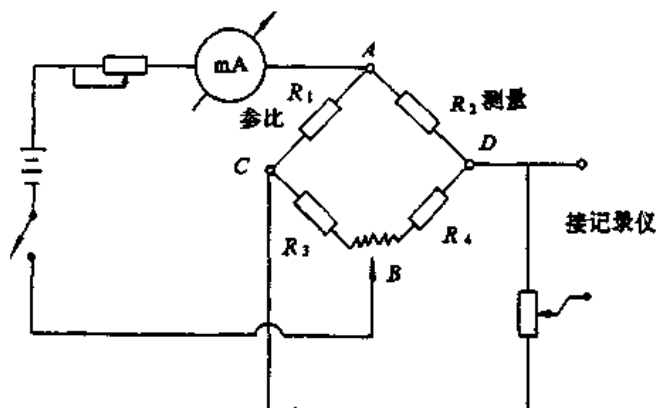


图 8-4 热导池桥路示意图

热导检测器的工作原理主要是根据不同的物质具有不同的导热系数。气体的导热系数 λ 是在温度为 0°C 或 100°C 温度梯度为 $1^\circ\text{C}/\text{cm}$ 时，通过一平方厘米截面每秒传导的热量 (卡)，其单位为卡/厘米·度·秒，使用时用 $\lambda \cdot 10^5$ 表示。

通常分子量小的气体热导系数高，分子量相近或相同时，则受分子结构因素的影响。

表 8-6 某些气体和蒸汽的导热系数

气体名称	$\lambda \cdot 10^3$		分子量
	0℃	100℃	
氢	41.6	53.4	2
甲烷	7.2	10.9	16
氟	5.8	7.5	28
己烷	3.0	5.0	86
苯	2.2	4.4	78
氯仿	1.6	2.6	119.4

图 8-4 为热导池的桥路示意图。调节可变电阻 W 可改变通过电桥的电流，称为桥流，桥流由毫安表指示，桥流是记录热导检测器信号的一个重要参数。通一定桥流后使热敏元件加热到一定温度，这时 $R_1 = R_2$ 。通载气后，载气流经参比池和测量池，因载气的导热系数大，传导的热量多，热敏元件温度迅速下降，电阻减小，载气流速是恒定的，在参比和测量两池中，热敏元件温度下降和电阻变化的程度相同，即 $\Delta R_1 = \Delta R_2$ 。调节电桥的滑动接点 B ，使电桥处于平衡状态，电桥的输出端 CD 与记录仪的微分放大器相连，当电桥处于平衡状态时，记录笔不动，并停留在记录纸上响应信号的起点处。这就是池平衡的调节，当记录纸移动时，这时记录笔记录的是色谱图的基线。电桥平衡时，输出端 CD 二端电位相等，这时：

$$\frac{R_1 + \Delta R_1}{R_3} = \frac{R_2 + \Delta R_2}{R_4} \quad (8-2)$$

当经过色谱柱分离后的组分先后进入测量池时，由于被测组分与载气的二元混合物的导热系数与纯载气不同，使测量池中热敏元件散热情况发生变化，而与参比池热敏元件的电阻值之间产生差异， $\Delta R_1 \neq \Delta R_2$ ， $(R_1 + \Delta R_1)/R_3 \neq (R_2 + \Delta R_2)/R_4$ ，电桥失去平衡，在 CD 两端产生电位差，就有信号输出。某一组分在载气中流出浓度越大，使导热系数及 ΔR_2 变化越大，电桥的输出信号相应增加，记录笔也按比例移动。记录笔记录的是测量池组分浓度的瞬间变化值。为了根据进样量及样品中组分含量的多少调节合适的色谱峰高度，防止组分含量太高，使电桥输出电位差太大，超过了记录器的记录范围，热导检测器有衰减调节机构，它把电桥输出的电位加到一系列串联的电阻二端，按分压器原理，根据需要分取电桥输出电压的全部、或 $1/2$ 、 $1/4$ 、 $1/10$...等，分取的电压作为记录仪的输入信号。桥流增加，热敏元件温度提高，池壁的温差加大，气体容易将热量传出去。但桥流也不宜过大，过大将使热敏元件处于灼热状态，引起基线不稳，甚至会将铂钨丝烧坏。一般氮作载气时桥流在 $100 \sim 150\text{mA}$ 之间，氢作载气时桥流在 $150 \sim 200\text{mA}$ 之间为宜。

载气和组分的热导系数相差越大，检测器灵敏度越高，因为一般物质的热导系数都比较小，因此选择热导系数大的气体 (H_2 、 N_2) 作载气为佳。

2. 火焰离子化检测器

火焰离子化检测器 (FID) 又称氢火焰电离检测器，也是广泛应用的检测器，具有如下突出的优点：能检测大多数有机化合物，并具有很高的灵敏度；对于载气中的杂质，如水、 CO_2 等没有响应；气体流速、压力、温度的变化对检测器没有显著影响；检测器对 H_2 、 N_2 、 H_2O 等载气都不敏感，因此当没有样品时，无响应信号，可得到稳定的基线；调节机构简单。

火焰离子化检测器的构造主要是一个不锈钢制成的离子室，其中包括燃烧气 (氢气)、助燃气 (空气)、载气及样品入口、火焰喷嘴及一对电极。

从色谱柱流出的载气、样品组分与氢气混合，从不锈钢或白金制成的喷嘴喷出，助燃气 (空气或氧气) 从侧面引入，通过自动电点火机构点火燃烧，约 $2100^\circ C$ 的高温火焰提供能量，使被测有机物组分发生离子化反应，电离成正离子及电子，火焰上方为一筒状收集电极 (负极)，下方为一圆环状发射极 (正极)，两极间施加约 $250V$ 的恒定电压，形成静电场，在电场作用下，电离产生的正离子被收集极收集，电子被发射极收集，形成电流，该电流通过一测量电阻 R ，在 R 两端产生电压降，由于火焰电阻很高 (约为 $10^{12}\Omega$)，同时在氢火焰中电离发生的几率很低，大约每 10^5 个碳原子中只有一个碳原子被电离，所以产生的电流很微弱 (约为 $10^{-10}A$)，需要复杂的放大系统，产生微电流的大小与进入离子室的被测组分数成正比，所以氢火焰检测器为质量型检测器，主要用于分析含碳有机物。

正确选择气体流速得到最好的灵敏度和稳定性，一般采用载气流速为 $30mL/min$ ，氢气流速为 $30mL/min$ ，空气流速为 $300mL/min$ ，即三者之比为 $1:1:10$ ，生成正离子时需要氧，选择最佳氢气流速，燃烧时提供足够的能量，生成更多离子，而不过多消耗由外部扩散进来的用于氧化作用的氧。

火焰离子化检测器对在火焰中不电离的化合物，例如： CO 、 CO_2 、 SO_2 、 N_2 、 NH_3 、 H_2S 、 H_2O 、 CS_2 等不能检测，对空气和水没有响应，它适合于分析大气污染物和含水样品，例如酒精、饮料等，对 CS_2 没有响应，使 CS_2 在用火焰离子化检测器时可作为溶剂，而不会出现溶剂峰。

3. 电子捕获检测器

电子捕获检测器 (ECD) 是次于热导、火焰离子化检测器而居第三位的离子化检测器，可与火焰离子化检测器使用同一放大器，结构如下图 8-6。

在离子室中装有圆筒状 β -射线放射源，为负极，一个不锈钢棒为正极，以聚四氟乙烯为绝缘体，使用同位素作为 β -射线的放射源，常用的有氚源—— 3H 吸附于钛膜或钷中，和镍源—— ^{63}Ni 电镀在不锈钢筒上。 ^{63}Ni 源的主要优点是使用温度可达 $350^\circ C$ ，而氚源最高使用温度为 $220^\circ C$ 。

电子捕获检测器是一种选择性检测器，它只对具有电负性的物质，即含有卤素、硫、磷、氮的有机化合物有响应信号，电负性越强，检测灵敏度越高，因此对含氯的有机化合物，有机氯农药残留等的分析特别有价值，但对不具有电负性原子的化合物，例

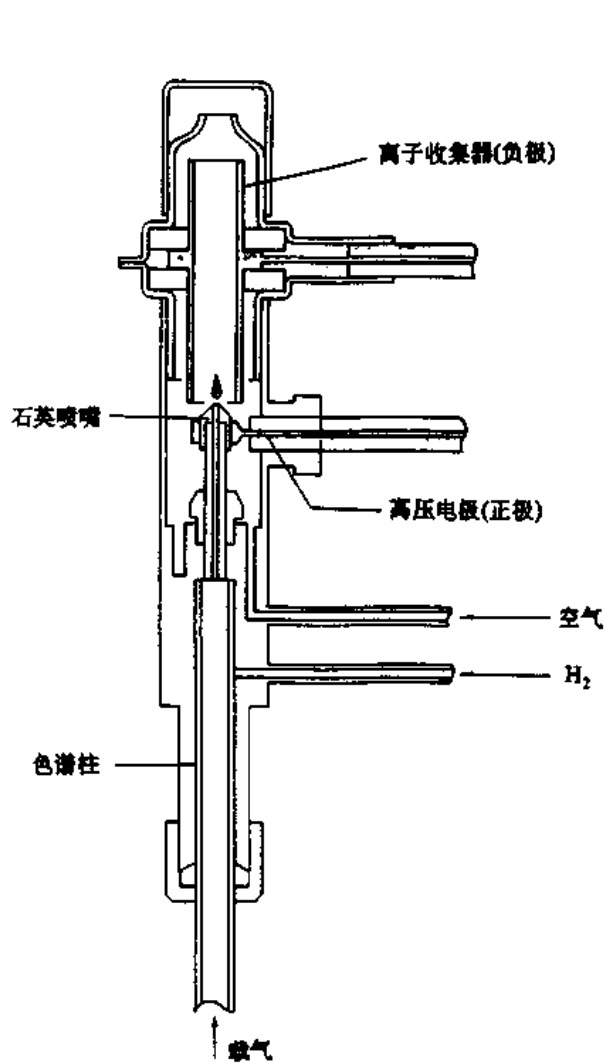


图 8-5 氢火焰离子化检测器

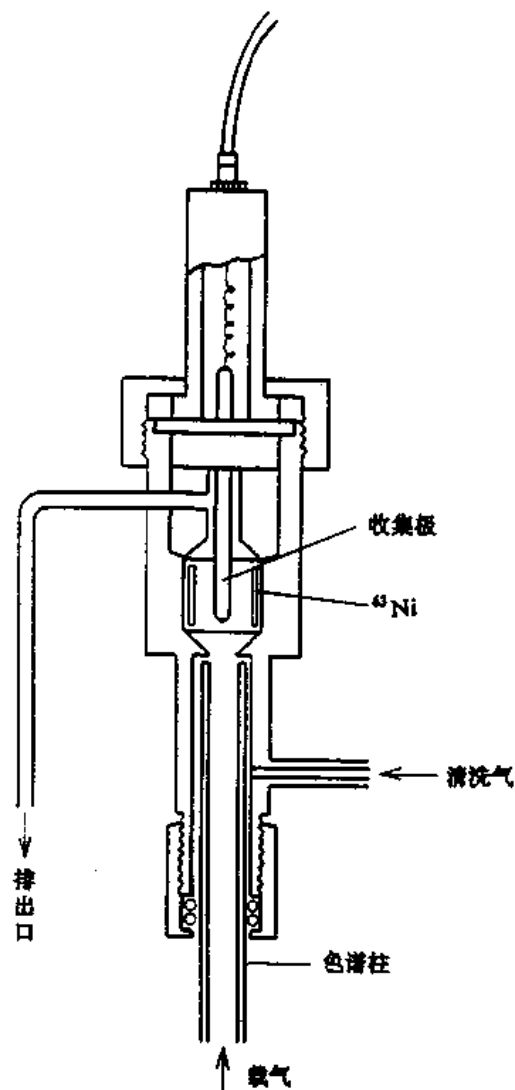


图 8-6 电子捕获检测器

如烃类化合物等，由于不能捕获电子，就无响应信号。

放射源发射的 β -射线，将载气 N_2 或 Ar 电离产生正离子和快速低能量的电子，这些电子在两极间外加电场作用下向正极运动，形成恒定的电流，称为基流，当电负性组分进入检测器后，就捕获这些低能电子，变成带负电荷的分子离子，这些分子离子比原来基流中的电子运动速度慢得多（因为重量大），从而使基流降低，产生负信号，即形成倒峰，被测组分浓度越大，倒峰越大，电子捕获检测器所测量的是信号的损失，分子离子与带正电荷的载气离子相遇各自变成中性分子被载气带走。

通常用氮气作为电子捕获检测器的载气，由于氮气中常含有微量氧和水等电负性杂质，严重降低检测器的基流，因此需使用纯度在 99.99% 以上的高纯氮，或将氮气通过加热至约 $480^\circ C$ 的紫铜屑除氧，使氮气中氧含量降低至 1ppm 以下。

4. 火焰光度检测器

火焰光度检测器 (FPD) 是一种高灵敏度、高选择性检测器，它只对含磷、含硫

化合物有响应信号，所以也叫硫、磷检测器，可用于 SO_2 、 H_2S 、石油精馏物含硫量及有机磷、有机硫农药痕量残留物的分析。

火焰光度检测器是在富氢火焰中测量硫、磷化合物分解产物的分子发射光谱，所谓富氢火焰是氢与空气中的氧 $>3:1$ 。

含硫化合物被载气带进富氢火焰，首先氧化燃烧生成磷的氧化物，然后被火焰中的氢还原生成 HPO 裂片，被火焰高温激发，发出一系列特征波长的光谱，其发光最强的波长为 526nm ，用 526nm 的干涉滤光片，测量其发光强度而检测磷。

含硫化合物被载气 (N_2) 带入富氢火焰中燃烧，首先氧化成 SO_2 ，然后被氢还原

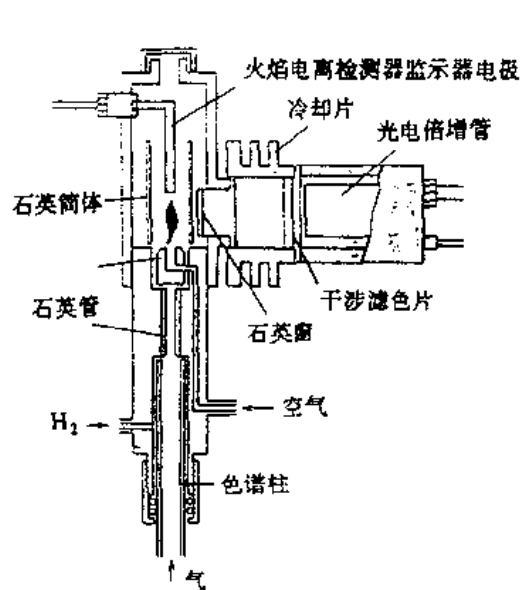


图 8-7 火焰光度检测器

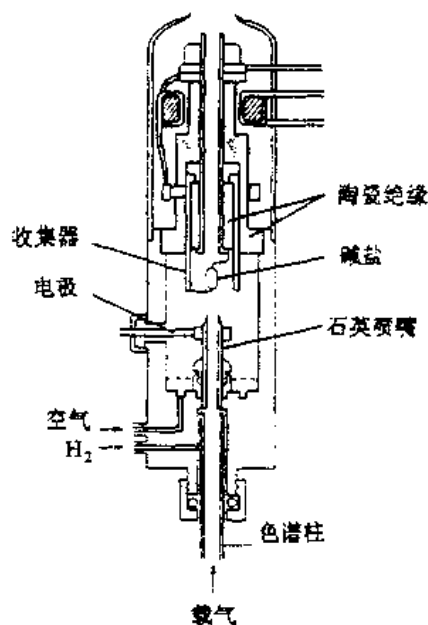


图 8-8 火焰热离子检测器

成硫原子，两个硫原子约在 390°C 生成激发态的硫分子，硫分子回到基态时，就发射 $350\sim 430\text{nm}$ 的特征分子光谱，其最大波长为 394nm ，用相应的干涉滤光片，测量其发光强度而检测硫。

火焰光度检测器主要由火焰喷嘴，滤光片，光电倍增管等组成。光电倍增管应对准火焰上部，测硫时用 394nm 滤光片，测磷时换上 526nm 滤光片。

5. 火焰热离子检测器

火焰热离子检测器 (FTD) 是一种对含氮和含磷有机化合物有高灵敏度响应的检测器，因此也称为氮磷检测器。

火焰热离子检测器构造与火焰离子化检测器基本相同，只是在火焰喷嘴上加一个碱盐环，碱盐可用硅酸钠或溴化铯。在缺氧条件下操作，空气流速约为火焰离子化检测器的三分之一。

二、检测器的性能指标及表示方法

衡量检测器的性能指标有：(1) 灵敏度；(2) 噪声和检测极限；(3) 最小检出量；

(4) 线性范围。

以响应信号 R 对样品中某组分的量 (浓度或质量) 作图, 得到检测器的响应曲线。

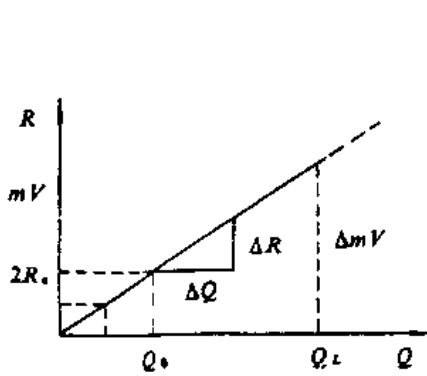


图 8-9 检测器的响应曲线

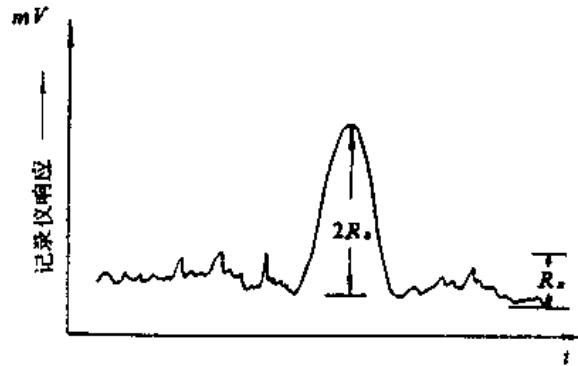


图 8-10 噪声及检测极限示意图

上图中, R_n 为噪声水平; 信号等于 $2R_n$ 时, 可从噪声背景中辨认出来, 即检测极限 $Q_0 = 2R_n$; Q_L 为线性响应的极限, 允许检测某组分的最大量。

1. 灵敏度为单位浓度 (或质量) 的组分通过检测器时所产生响应信号的大小, 灵敏度用 S 表示:

$$S = \Delta R / \Delta Q \quad (8-3)$$

浓度型检测器信号大小和浓度成正比。灵敏度用 S_c 表示, 对液体样品浓度单位 mg/mL ,

$$S_c = \frac{\text{mV}}{\text{mg/mL}} = \text{mV} \cdot \text{mL} / \text{mg} \quad (8-4)$$

S_c 的意义是单位体积 (毫升) 载气中有单位重量 (毫克) 的某组分所产生的信号毫伏数。

质量型检测器信号大小和单位时间内进入检测器的某组分的质量成正比, 灵敏度以 S_m 表示,

$$S_m = \frac{\text{mV}}{\text{g/s}} = \text{mV} \cdot \text{s} / \text{g} \quad \text{或} \quad S_m = \frac{A}{\text{g/s}} = A \cdot \text{s} / \text{g} \quad (8-5)$$

S_m 的意义是进入检测器的组分为每秒一克时产生的信号毫伏数, 或安培数。

实际测定某检测器的灵敏度或某组分在特定检测器中的灵敏度时, 在一定操作条件下, 如色谱柱、温度、电流、电压等, 将一定量纯样品注入色谱仪, 用容易得到的仪器及色谱参数, 按下式计算。

对浓度型检测器:

$$S_c = \frac{h \cdot W_{1/2} \cdot u_1 \cdot u_3}{u_2 \cdot m} \quad (\text{mV} \cdot \text{mL} / \text{mg}) \quad (8-6)$$

对质量型检测器:

$$S_m = \frac{60 \cdot h \cdot W_{1/2} \cdot u_1}{u_2 \cdot m} \quad (\text{mV} \cdot \text{s} / \text{g}) \quad (8-7)$$

式中, h 为峰高(cm); $W_{1/2}$ 为半峰宽(cm); u_1 为记录仪灵敏度(mV/cm); u_2 为记录仪纸速(cm/min); u_3 为载气流速(ml/min); m 为样品量(mg 或 g)

2. 敏感度(检测极限)为检测器的信号输出能通过放大器放大到很高数值, 因此检测器的灵敏度能够任意增大, 但是检测器和电子线路里的电噪声也同时被放大, 所以噪声水平限制了组分能被检出的浓度或质量流速。噪声 R_n 是指未进样时, 由于仪器本身的原因造成的基线起伏信号, 常以其振幅的毫伏数表示。组分的峰高 mV 恰为噪声两倍时, 单位时间引入检测器中该组分的质量(质量型检测器)或该组分的浓度(浓度型检测器)称为敏感度。

$$D = 2R_n / S \quad (8-8)$$

根据灵敏度所用单位不同, 敏感度也分 D_c 、 D_m

$$D_c = 2R_n / S_c \quad (\text{mg} / \text{mL}) \quad (8-9)$$

$$D_m = 2R_n / S_m \quad (\text{g} / \text{s}) \quad (8-10)$$

3. 最小检出量 m_0

产生的色谱峰高恰等于二倍噪声时所需的样品量为最小检出量。

$$\text{对浓度型检测器} \quad m_0 = \frac{W_{1/2} \cdot u_3 \cdot D_c}{u_2} \quad (8-11)$$

$$\text{对质量型检测器} \quad m_0 = \frac{60 W_{1/2} \cdot D_m}{u_2} \quad (8-12)$$

4. 检测器的线性范围

色谱分析定量的依据是检测器的响应与样品浓度之间的线性关系, 但这种线性关系仅在一定进样量范围内存在。检测器的线性范围定义为检测器保持线性时允许的最大样品浓度与最小样品浓度之比, 即 Q_L / Q_0 。故分析时应首先检查检测器对所测组分的线性范围, 以免在线性范围以外定量而得出错误结果。

第五节 气相色谱定性分析

一、用已知纯物质对照定性

这是气相色谱分析中最常用的定性方法, 通常都是在严格控制操作条件不变的情况下, 比较已知纯物质与未知组分的保留值来定性。

1. 用保留时间或保留体积定性

此法定性的依据是在相同操作条件下，任何一种物质都有一定的保留值。作为定性的指标，保留值可以是保留时间，也可以是保留体积。为了消除某些操作条件变化带来

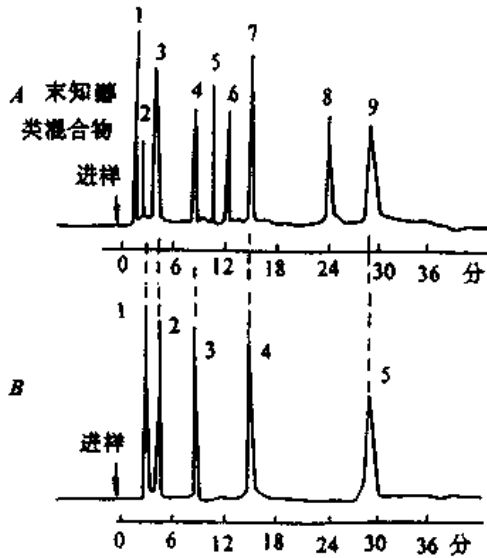


图 8-11 用已知物对照定性

1. 甲醇 2. 乙醇 3. 正丙醇 4. 正丁醇 5. 正戊醇

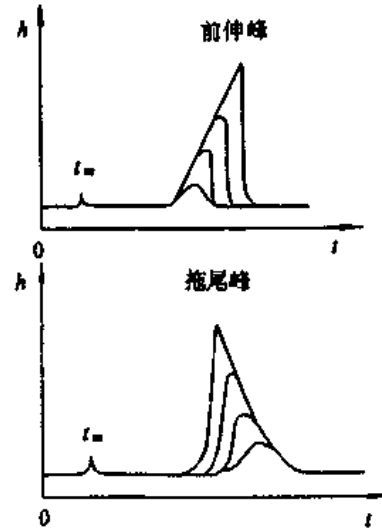


图 8-12 噪声及检测极限示意图

的影响，可使用相对保留值 α ，它只是柱温、固定液性质的函数，它完全由组分的热力学性质决定，而与其他操作条件无关。图 8-11 所示为利用保留时间定性。对某些峰形不对称的组分，其保留值随进样量不同而变化如图 8-12 所示，准确的保留值应外推到进样量趋于零时的数值，实际上就是进样量很小时的数值。在一般定性分析中，应尽量使已知纯物质的色谱峰高和未知组分的峰高相接近，再比较其保留值。用保留时间定性，时间允许误差小于 2%。

2. 利用峰高增加法定性

将已知纯物质加入到未知混合样品中去，若待测组分峰比不加已知纯物质时的峰高增加了，而半峰宽并不相应增加，则表示该混合物中含有已知物的成分。

3. 利用双柱或多柱定性

严格地讲，仅在一根色谱柱上用以上方法是不可靠的，因有时两种或几种物质在某色谱柱上具有相同的保留值。此时，用已知物对照定性一般要在两根或多根性质不同的色谱柱上进行。两色谱柱的固定液要有足够的差别，如一根是非极性固定液，一根是极性固定液，这时不同组分的保留值是不一样的，从而保证定性结果可靠。

二、与其它分析仪器结合定性

气相色谱能有效地分离复杂的混合物，但不能有效地对未知物定性。有些分析仪器如质谱、红外等虽是鉴定未知结构的有效工具，但对复杂的混合物则无法分离、分析。把两者结合起来，实现联机既能将复杂的混合物分离又可同时鉴定结构，是目前仪器分析的发展方向。

1. 气相色谱与质谱联用（简称气质联用）

质谱法的鉴别能力很强，响应速度快、灵敏度高、适于作单一组分的定性分析。色谱与质谱联用实际是将质谱仪作为色谱仪的一个检测器，将经色谱分离的组分一一送入质谱仪定性。气质联用的关键是两仪器间的接口问题，质谱仪是在内部抽成真空的条件下工作，因此必须把色谱仪流出组分与大量载气分开后才能进入质谱仪，所以接口是起上述作用的分子分离器。气质联用目前已成为很成熟的技术，其应用面很广，是分析复杂混合物的最有效的工具之一。

2. 气相色谱与红外光谱的联用

红外光谱仪也是有很强定性能力的仪器。色谱与红外的联用起初受到后者灵敏度低、扫描速度慢的限制，发展较慢。近年来随着高灵敏度和高扫描速度的付里叶红外光谱仪的出现，色谱与红外的联用得到迅速发展。

第六节 气相色谱的定量分析

气相色谱定量分析的依据是：样品组分含量 W_i 与响应信号峰面积 A_i 或峰高 h_i 成正比。

$$W_i = f_i A_i, \quad W_i = f_i h_i \quad (8-13)$$

式中， W_i 为组分 i 的含量，可用重量 (g)、体积 (mL)、摩尔等单位； f_i 为比例常数，称为校正因子，它的意义是与单位峰面积相当的组分 i 的含量。

因为同样量的不同物质在同一检测器上所得信号（峰面积或峰高）大小不同，因此在定量时不能简单的用峰面积或峰高进行比较，需要引入校正因子，同样量的不同物质在同一检测器上校正因子不同，使检测器产生的信号（峰面积或峰高）能真实反映物质的含量。因此进行定量分析首先要测量峰面积、峰高和求出校正因子。

一、峰面积的测量

1. 常见的各种峰形

(1) 完全分离的峰又分为对称与不对称峰。峰形的对称性用不对称因子 S_a 表示：

$$S_a = \frac{ac}{2ab} \quad (8-14)$$

$S_a = 1$ 时为对称峰， $S_a > 1$ 为拖尾峰， $S_a < 1$ 时为前伸峰。

(2) 重叠峰。

(3) 在主峰拖尾尾部上的峰，这种峰是由于主峰太大峰太宽，拖尾严重，主峰还没有出完，杂质峰便开始流出。

2. 峰面积的测量

根据不同的峰形采用不同的测量峰面积的方法。对于完全分离的对称峰可采用峰高乘半峰宽法。

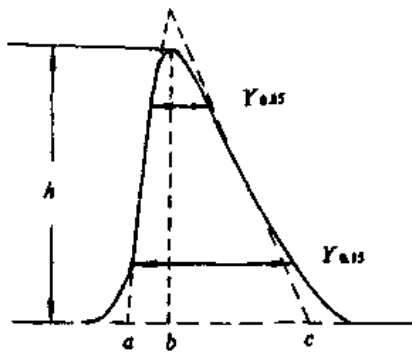


图 8-13 不对称色谱峰

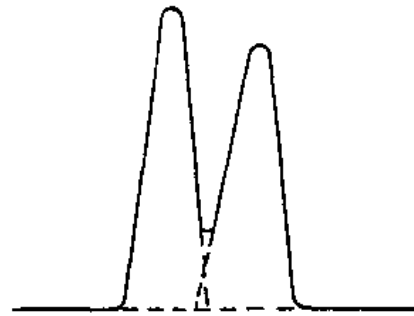


图 8-14 过半峰高的重叠峰

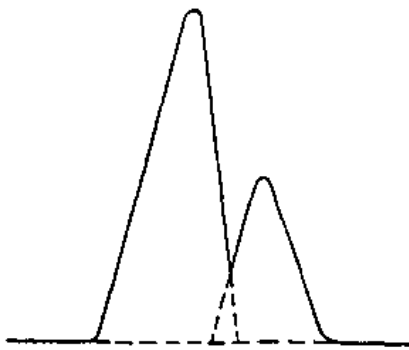


图 8-15 不过半峰高的重叠峰

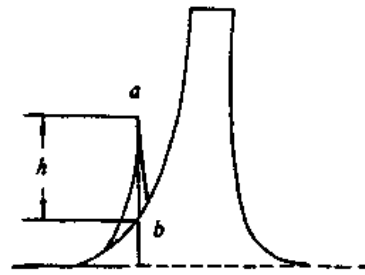


图 8-16 在主峰拖尾尾部上的峰

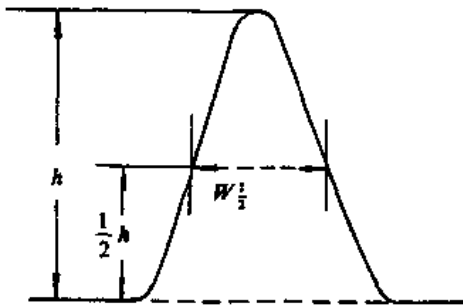


图 8-17 峰高乘半峰宽计算峰面积

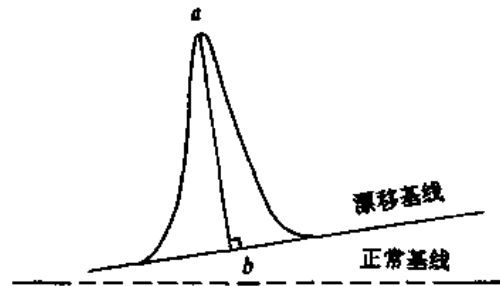


图 8-18 基线漂移时峰面积的测量

$$A = hW_{1/2} \quad (8-15)$$

对于不对称色谱峰一般可用峰高乘平均峰宽法计算其峰面积。见图 8-13。

取 0.15 处和 0.85 处所对应的峰宽 $Y_{0.15}$ 和 $Y_{0.85}$ 之平均值乘峰高 h 来近似计算其峰面积。

$$A = \frac{h}{2} (Y_{0.15} + Y_{0.85}) \quad (8-16)$$

(1) 未完全分离的重叠峰面积的测量

在色谱分析中，一般要求相邻两色谱峰的分度度 R 大于 0.5，对于 R 大于 0.5 者，通常可直接用峰高乘半峰宽计算其近似面积。

如果 R 小于 0.5 时，则可按图 8-14 所示的方法，作出其对称峰边后，再按峰高乘半峰宽方法，近似计算其峰面积。

(2) 在主峰拖尾尾部上的峰面积测量

从峰顶 A 作轨迹线的垂线，如图 8-16 交于 B ，以 AB 为小峰峰高 h ，然后根据其对称性程度选用上述方法计算其近似面积。

(3) 基线漂移时峰面积的测量

从峰顶作漂移基线之垂线得其峰高，然后根据其峰形的对称性选用前述方法。

现代仪器多采用自动积分仪或数据处理机，对峰面积的测量则更为准确、快速。

对于尖锐而高的峰，其半峰宽很窄，峰宽难于准确测量，常采用峰高定量，不但计算简单而且精确度较高。

二、定量校正因子

由式 (8-13) 可知 $f_i = W_i / A_i$ ，这样测得的校正因子称为绝对校正因子，由于 f_i 受操作条件影响较大，难于测准，在实际工作中也可使用相对校正因子 f_{is} ， f_{is} 为组分 i 和标准物质 S 的绝对校正因子之比：

$$f_{is} = \frac{f_i}{f_s} \quad (8-17)$$

不同检测器所用标准物质不相同，热导检测器使用苯为标准物质，火焰离子化检测器用正庚烷为标准物质。

由于样品可用重量、体积、摩尔浓度为计量单位，因而有不同的相对校正因子（以下简称校正因子）。

(1) 重量校正因子

这是最常用的校正因子，以 f_w 表示。

$$f_w = \frac{f_i(W)}{f_s(W)} = \frac{A_s W_i}{A_i W_s} \quad (8-18)$$

(2) 摩尔校正因子

计量单位以重量被相应的分子量除所得摩尔数表示。

$$f_m = \frac{f_i(M)}{f_s(M)} = \frac{A_s W_i M_s}{A_i W_s M_i} = f_w \frac{M_s}{M_i} \quad (8-19)$$

M_i 和 M_s 分别为被测组分和标准物质的分子量。

(3) 体积校正因子

如果以体积单位计量，即注射一定体积的气体样品，可以从摩尔校正因子求得体积校正因子，因为一摩尔任何气体在标准状态下都是 22.4L，可证明体积校正因子就等于

摩尔校正因子,

$$f_i = \frac{f_i(V)}{f_s(V)} = \frac{\frac{W_i}{M_i A_i} \times 22.4}{\frac{W_s}{M_s A_s} \times 22.4} = \frac{W_i A_s M_s}{A_i M_i W_s} = f_m \quad (8-20)$$

如以峰高为定量依据, 按同样方法求出相对校正因子 f_w 、 f_m 、 f_s 。

相对校正因子的测量方法:

准确称量被测组分和标准物质, 选择合适的重量使两者的峰面积不要相差太大, 要尽量使用色谱纯试剂或纯度大于 99% 的纯样品, 然后在实验条件下进样分析, 注意进样量应在检测器的线性范围之内, 测量各峰面积, 然后按上述公式计算校正因子, 如果几次测量数值接近, 可取其平均值。

表 8-7 校正因子测量举例(苯为标准, 热导检测器)

组分	分子量	重量	峰面积	f_w	$f_m(f_s)$	S_w	$S_m(S_s)$
苯	78	8.501	165.5	1.00	100	1.00	1.00
甲苯	92	3.242	61.8	1.02	0.86	0.98	1.16
乙苯	106	4.785	88.6	1.05	0.78	0.95	1.29

三、相对响应值

绝对响应值定义为

$$A_i = S_i W_i \text{ 或 } S_i = \frac{A_i}{W_i} \quad (8-21)$$

它的意义是组分 i 的单位含量所对应的峰面积, 其数值大小直观反映组分的信号大小, 与校正因子的关系为 $S_i = 1/f_i$, 即互为倒数。

也可求得不同计量单位的相对响应值:

$$\text{重量相对响应值: } S_w = 1/f_w \quad (8-22)$$

$$\text{摩尔相对响应值: } S_m = 1/f_m \quad (8-23)$$

四、定量方法

在色谱定量分析中, 较常用的定量方法有下列三种:

1. 归一化法

当样品中组分都能流出色谱柱, 在所用检测器上都有信号, 即都能出峰, 可用此法进行定量计算, 所谓归一化就是把所有出峰组分的含量之和按 100% 计, 假定样品中有 n 个组分, 每个组分的量为 W_1, W_2, \dots, W_n , 各组分含量的总和 W 为 100%, 其中组分 i 的百分含量可按下列式计算:

$$W_i\% = \frac{W_i}{W} = \frac{W_i}{W_1 + W_2 + W_3 + \dots + W_n} \times 100\%$$

$$= \frac{A_i f_i}{A_1 f_1 + A_2 f_2 + A_3 f_3 + \dots + A_n f_n} \times 100\% \quad (8-24)$$

如果各组分的 f_i 值近似相同，如同系物中沸点相接近的各组分，则上式可简化为：

$$W_i\% = \frac{A_i}{A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n} \times 100\% \quad (8-25)$$

如果色谱峰形对称、窄长、操作条件稳定，可用峰高代替峰面积进行归一化法定量：

$$W_i\% = \frac{h_i f_i^0}{h_1 f_1^0 + h_2 f_2^0 + h_3 f_3^0 + \dots + h_n f_n^0} \times 100\% \quad (8-26)$$

归一化法的优点是简便、准确、操作条件对结果影响较少，但某些不需要定量的组分也要测出其校正因子和峰面积。

2. 内标法

首先选择一个化合物作内标物，它的色谱峰与被测组分峰应能完全分离，且靠近被测组分。分析时准确称取 W 克待测样品，加入一定量的 W_i 克内标物，混合后进样，分别测出内标物和待测组分的峰面积 A_i 和 A_s ，则有如下关系：

$$\frac{W_i}{W_s} = \frac{A_i \cdot f_i}{A_s \cdot f_s} \quad \text{即} \quad W_i = \frac{A_i \cdot f_i}{A_s \cdot f_s} \cdot W_s$$

则 $W_i\% = \frac{W_i}{W} \times 100\% = \frac{A_i \cdot f_i \cdot W_s}{A_s \cdot f_s \cdot W} \times 100\% \quad (8-27)$

此式即为内标法的计算公式。式中 f_i 、 f_s 分别为被测组分和内标物的重量校正因子。

内标法的优点是定量准确，测定条件不受操作条件、进样量以及不同操作者进样技术的影响，缺点是选择合适的内标物有一定困难，每次需准确加入内标物，并增加了色谱分离条件的难度。

3. 外标法 又称标准样校正法或标准曲线法。

(1) 标准曲线法 用待测组分的纯样品配制浓度递增的标准溶液，定量进样，测量峰面积或峰高，以峰面积或峰高对标准溶液浓度作关系曲线即标准曲线。分析样品时，按相同操作条件定量进样，由所得的峰面积或峰高从标准曲线上查出该组分的浓度。

(2) 单点校正法 如果样品的浓度变化不大，可用此法定量。先用标准样品测出校正因子 f_s ，分析时，以同一操作条件分析，按下式直接计算组分的含量： $W_i = A_i \cdot f_i$

外标法的优点是操作简单、计算方便、应用广泛。缺点是定量结果受进样量的准确性、操作熟练程度和仪器稳定性的影响较大，标准曲线需经常核对修正。

第七节 气相色谱的其他分析技术

一、顶空气相色谱法

顶空气相色谱法 (Headspace Gas Chromatography, 简称 HSGC) 是一种测定液体或固体中挥发性组分的间接方法, 它有静态和动态两种方式。

静态顶空分析是分析在密闭系统中的蒸汽相, 这一蒸汽相要与被分析的固体或液体样品达到热力平衡, 样品是处于平衡气相的一部分。一般只需要将被分析的样品置于密闭的容器中使液相或固相与气相达到平衡, 然后用气密性注射器吸取蒸气样品注入色谱柱中。

动态顶空分析则不存在平衡状态, 所以叫吹洗, 捕集分析或气体鼓泡 (清洗技术), 要求的设备条件要比静态复杂。它用一种惰性气体在规定时间内恒速鼓泡经过液相或固相样品, 蒸汽收集留在吸附阱中, 待加热时脱吸附进入气相色谱中, 所以顶空分析仪备有解热吸附器、热解器、顶空采样器、自动热解采样器等。这种分析方法可以免去样品冗长的预处理步骤, 大大节省人力和时间, 同时可避免水、高沸点物质或非挥发性物质带入色谱柱, 而引起柱的超载或对色谱系统的污染。对分析聚合物中可挥发性组分有特殊的优点。

二、程序升温气相色谱法

对于含组分较少且沸点范围不宽的样品, 采用恒定的柱温进行分离, 效果较好。对于含组分较多且沸点范围较宽的样品, 如仍采用恒定的柱温, 则会出现两种情况, 一种是采用较低的柱温, 使高沸点组分保留时间较长, 这样不但使峰形很宽和矮平, 而且也会拖长分析时间; 另一种是采用较高的柱温, 使低沸点组分流速过快, 色谱峰尖而重叠, 影响相互间的分离。因此对这类样品应采用程序升温气相色谱法 (Programmed Temperature Gas Chromatography), 即在分离过程中柱温按预定的程序随时间呈线性或非线性增加。这样就可既增加低沸点组分的分离, 又改善了高沸点组分的峰形和缩短分析时间。

程序升温的方式有:

线性升温, 即柱温随时间成比例的增加, 适用于沸点均匀分布的样品。

非线性升温。适用于沸点范围很宽且沸点分布不均匀的样品。

到底选用那一种升温方式, 要视具体条件和样品性质而定。

三、裂解气相色谱法

所谓裂解气相色谱 (Pyrolysis Gas Chromatography), 就是将聚合物在裂解器中加热至几百度或更高的温度, 聚合物的大分子则因受热而裂解为若干易挥发的小分子物质 (碎片), 然后将此裂解产物进行气相色谱分析。由于一定性质的聚合物在一定的温度下, 裂解产物组成有一定规律, 由于碎片组成和相对含量与被测物质的结构、组成有一定的对应关系, 因此各种物质的裂解色谱图具有各自的特征性, 称为指纹裂解谱图, 可作为定性的依据, 同时也可利用裂解谱图中能反映物质结构、组成的特征碎片来定性和定量地分析混合物中的各组分。

目前裂解色谱已在高聚物、医学和生物化学方面得到了广泛的应用，如用于高聚物的定性鉴别，共聚物的定量分析，聚合物和共聚物微观结构的研究，聚合物热稳定性、热降解机理和动力学研究，以及色谱峰指纹鉴定等。

聚合物的裂解是在裂解器中进行的，在裂解色谱中对裂解器的要求是要能得到可重复的结果。与此有关的重要参数是：①将样品加热到预定的裂解温度所需的时间，样品的温度上升时间严重影响到裂解所得的产物，②与样品接触的部件所用材料，在裂解温度下，有的物质（如铁和石英）对裂解可起催化作用，使裂解产物的分布改变；而有的物质（如金和铂）则不起催化作用，它们是制造裂解器常用的材料，③裂解产物的体积应尽可能小，使裂解产物马上进入载气流中，并保持在均匀的温度之下。

常用的裂解器有：蒸汽相裂解器；管式裂解器；热丝裂解器；带状裂解器；居里点裂解器；激光裂解器。

第八节 毛细管柱色谱

用于气相色谱分析的毛细管柱（Capillary Column），在理论上是由 Golay 在 1957 年提出的，这是一种在毛细管内壁涂上固定液、内径 0.2~0.5mm，长 30~300m、效能极高的色谱柱，理论塔板数可达 10^6 。在色谱分离方法中，气相色谱法不比其它的分析方法差，如果使用毛细管柱，则可得到更高的分离度。所以，对毛细管柱分析法的研究，主要集中在生产优质的毛细管柱上。

一、毛细管柱

1. 弹性石英柱

与填充柱不同的是，毛细管柱是在柱的内壁上直接涂渍或键合上固定液，对柱子的材质构成有一定的要求。金属毛细管柱适用于碳氢化合物等吸附性小的组分的分离。玻璃毛细管柱，经过各种各样的处理，可以分析原来金属毛细管柱不能分析的极性强的物质，但玻璃毛细管柱有两个缺点：（1）需要对内壁进行处理，未经处理的玻璃毛细管柱基本不能用。（2）容易破碎。

弹性石英毛细管柱的出现（以下称为 FQ 柱）完全克服了上述两个缺点，图 8-19 是 FQ 柱的构造。最外层是耐热树脂，最内层是高纯度石英（99.9999%）。由于有高纯度石英层，起到了惰性的目的，最外层树脂的柔软性使柱子具有不易折断的性能。所以，只需要在石英管状物上覆盖上树脂，即可用于气相色谱分析。与玻璃毛细管柱相比，

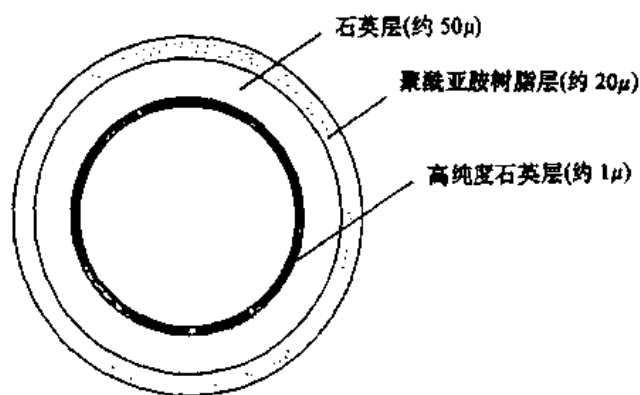


图 8-19 石英毛细管柱断面

石英毛细管柱具有的特点是：(1) 内壁是惰性物质，因此不需特别处理。(2) 具有柔软性，不易破碎，可与进样口、检测器方便地连接。

2. 键合液相

提高毛细管柱的使用寿命，是将固定液通过键合反应键合在管内壁，形成高分子化、耐热性增强、抗溶剂溶解的物质，从而大大提高了毛细管柱的使用寿命。

二、毛细管柱与填充柱的比较

毛细管与填充柱相比，其显著差别是柱容量小，柱效能高，柱渗透率大。

1. 毛细管柱的容量 毛细管柱的容量很小，其固定液含量只有几十毫克，比填充柱要少几十倍至几百倍。因此进样量要极其微小。要把这样微量的样品重复地、定量地引入毛细管柱中进行定量分析，毛细管柱的操作技术比填充柱要困难得多，对仪器结构、性能的要求也严格得多。

2. 毛细管柱的效能 普通填充柱柱效较低，一般只有几千块理论塔板数，而毛细管柱柱效较高，一般比填充柱高 10~100 倍，最高可达 10^6 块理论塔板数。所以用填充柱难以实现的分离，可用毛细管柱解决。例如用填充柱只能分离 $\alpha = 1.10$ 的物质时，而用毛细管柱 $\alpha = 1.03$ 也可以分离。所以对于复杂的多组份混合物和难分离的样品都可采用毛细管柱分析。

3. 毛细管柱的渗透率 毛细管柱是空心的，比填充柱对气流的阻力要小得多。一般用比渗透率 B_0 来表示色谱柱对气流的阻力，对于填充柱其比渗透率近似公式为：

$$B_0 = d_p^2 / 1012 \quad (8-28)$$

d_p 为载体有效颗粒直径，当颗粒较细时， $d_p = 0.004 \sim 0.007 \text{cm}$ (200~400 目)，当颗粒较粗时 $d_p = 0.04 \sim 0.08 \text{cm}$ (20~40 目)，对于毛细管柱：

$$B_0 = d^2 / 32 = r^2 / 8 \quad (8-29)$$

d 、 r 分别为毛细管的内径和半径， $d = 0.2 \sim 0.5 \text{mm}$ ，由上面两式可以看出，毛细管柱的渗透率比填充柱高得多，而 B_0 与柱子的压力降 (ΔP) 有如下的关系式：

$$\Delta P = \frac{\eta}{B_0} Lu \quad (8-30)$$

η 为载气在柱温下的粘度 (单位， $\text{g/cm} \cdot \text{s}$)。式 (8-30) 指出，填充柱的压力降随颗粒直径的降低和柱长的增加而迅速增加；同时毛细管柱内径和柱长是压力降的控制因素。当柱长、平均线速度保持一样时，则填充柱的进口压要比毛细管柱大 100~400 倍，故填充柱不能太长。当压力降一样时，毛细管柱柱长可比填充柱长 30~50 倍，而保留时间正比于柱长，即柱子越长，分析时间越长。但对于毛细管柱，可采用线速度较高的载气，缩短保留时间，进行快速分析。

三、毛细管柱的色谱系统

毛细管柱和填充柱的色谱系统，基本上是一样的，就是说用一般的气相色谱仪也能做毛细管色谱分析。不过由于毛细管柱内径很细，柱容量很小，峰很窄，出峰很快。因

此对色谱仪本身如进样系统、检测器、记录系统等有些特殊的要求。

1. 进样系统

由于毛细管柱内径很细，样品容量很小，液膜只有 $0.2\sim 1\mu\text{m}$ ，相应的固定液只有几十毫克，因此进样量必须极小，一般液体样品 $10^{-2}\sim 10^{-3}\mu\text{L}$ ，气体样品 10^{-7}mL ，要把这样极微量样品，瞬间引进毛细管柱，常采用分流法进样和不分流式进样。

(1) 分流法进样装置

在气化室出口分两路，试样的绝大部分放空，极小部分进柱子，这两部分之比叫分流比。分流法又分为动态法和静态法两种，静态法不常使用。

动态分流法是最早开始使用的，如今也是最多被使用的分流方法。不同仪器上的分流器有各种形式，见图 8-20。A、C 两种分流器线性不好，B、D 两种分流器线性和重复性较好，但对宽沸程样品仍有失真现象。通常在分流器的放空处接一个阻力，这个阻力可以是一段毛细管、一个细直径的针头，或一个针形阀，通过改变阻力大小来调节分流比。

图 8-21 为分流法毛细管柱系统的示意图，其中尾吹气体为空气、氮气或氦气，以防止由于毛细管柱与检测器的连接部分的死区而引起的峰扩张。

(2) 不分流式进样装置

这种方法由瑞士哥乐布 (Dr.Grob) 发明，所以一般称为“Grob 法”。其构造与分流法的构造非常相似，实际上，只要更换注入部分，很多部分都可以与分流法通用。图 8-22 是不分流式毛细管系统的示意图。

在进行样品分析时，首先关闭电磁阀 SV_1 ，此时气化室内的载气流量相当小，仅为 $0.5\sim 2\text{mL}/\text{min}$ ，注入试样后要等 $1\sim 2\text{min}$ ，气化的试样完全输送到柱管后再打开电

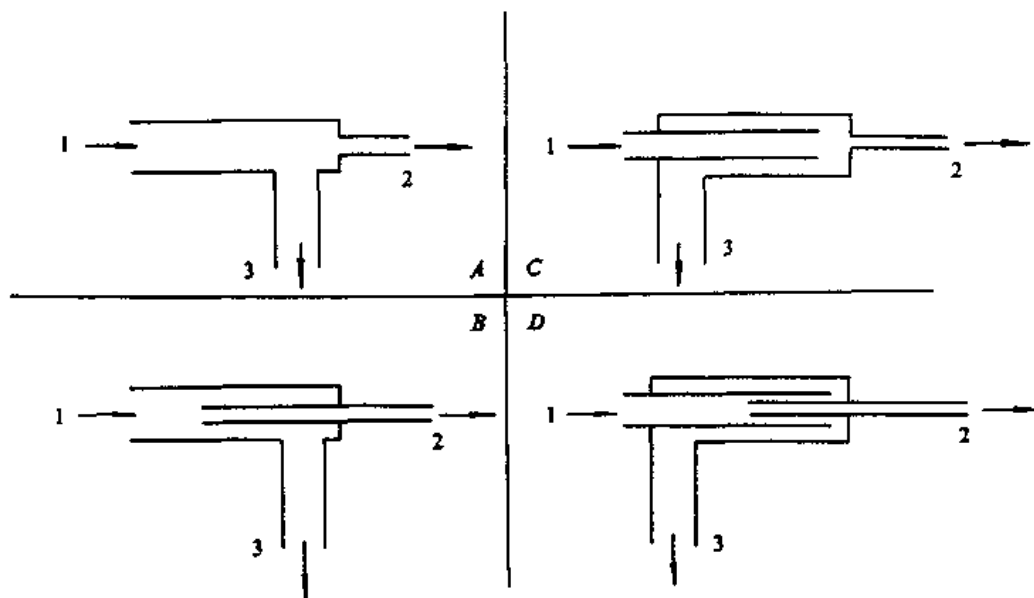


图 8-20 四种毛细管分流器

1. 注射头 2. 进毛细管柱 3. 放空

A. T形旁通管 B. 同心管 C. 反流 T形旁通管 D. 改进同心管

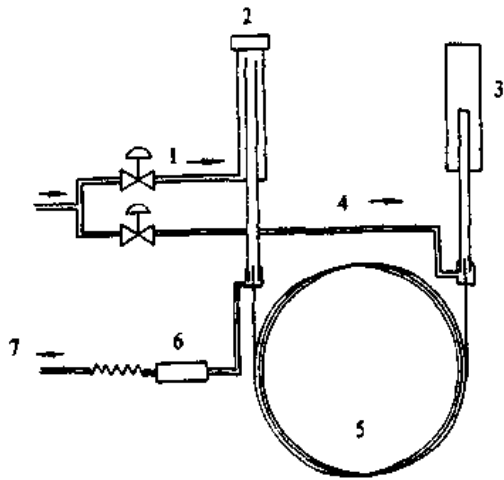


图 8-21 分流/不分流式毛细管柱系统的示意图

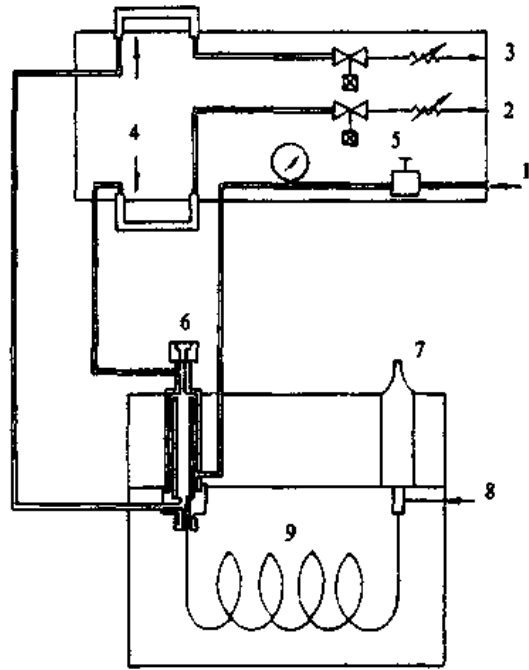


图 8-22 不分流式毛细管系统示意图

磁阀，这时大量的载气冲洗气化室，除掉扩散的溶剂蒸气，便能防止峰拖尾现象。另外，在打开电磁阀的状态下进行分析时，被气化的试样大部分通过电磁阀排出去，因此，可以用于分流方式。

这种 Grob 式不分流法的长处是，利用溶剂效应，不用冷媒就可以得到低沸点物质的锐利峰形。将柱室温度保持在比溶剂的沸点低 $20^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 左右，由气化室出来，进

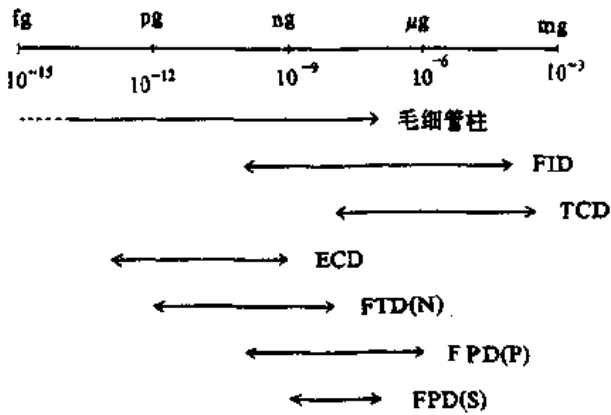


图 8-23 各种检测器的动态范围

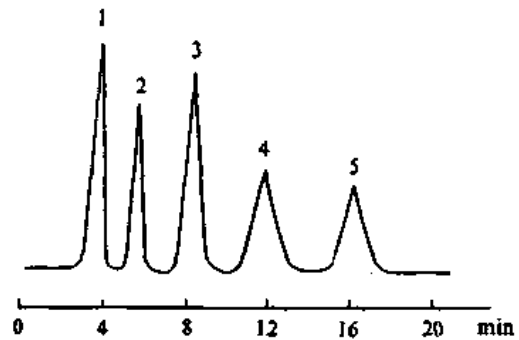


图 8-24 混合气体色谱图

1. 氢 2. 氧 3. 氮 4. 甲烷 5. 一氧化碳

入柱里的溶剂遇凝固，从而在柱内径壁形成一层溶剂液状膜，这层膜成为一种固定相液相，同时又保持着比溶剂本身沸点高的溶质，这种现象就称为溶剂效应。

2. 检测器

一般来说, 内径为 0.2~0.3mm 的毛细管柱可分离试样量为 0.1pg~100ng (10^{-13} ~ 10^{-7} g), 各种检测器的线性范围如图 8-23 所示, 从这个图可以明显看出 TCD 不可用于毛细管柱, FID, ECD, FTD, FPD 可以用于毛细管柱。

3. 记录系统

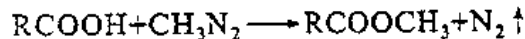
毛细管色谱峰非常窄, 其宽度只有几秒或少于 1s, 要求记录系统快速, 如果记录仪笔速太慢, 色谱峰将追踪不上, 峰面积将减少, 特别对于宽沸程混合物中的轻组分, 定量分析结果会偏低, 这时最好使用电子积分仪, 记录仪只能在定性时使用。

第九节 气相色谱法的技术应用

一、样品的前处理

气相色谱只能分析气态物质和具有挥发性的有机物, 一般说来, 气体和沸点及极性较低的液体, 可以直接进样分析, 但对于某些物质, 由于它们的极性很强, 挥发性、热稳定性很低, 不适于直接进样分析, 因而也无法进行定性、定量, 对于这类物质, 可用化学处理, 将其转化为相应的挥发性衍生物, 再进行色谱分析, 化学处理方法很多, 这里只介绍常用、简单易行的二种:

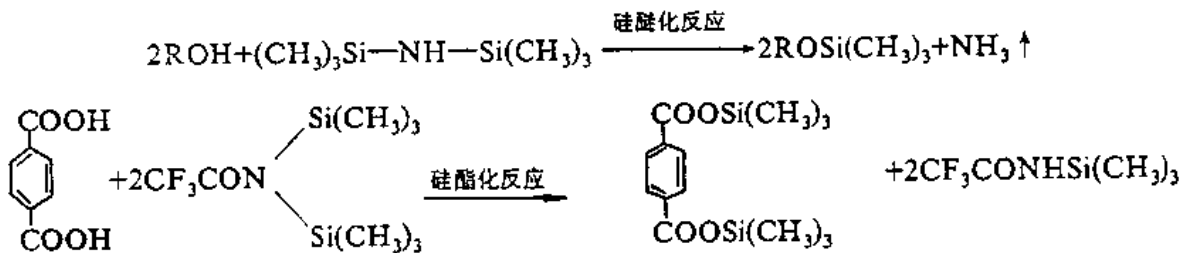
1. 酸类化合物的重氮甲烷甲酯化法:



产物是相应酸的甲酯和氮气, 不引入杂质, 转化率也很高。

2. 用硅烷化试剂进行硅酯化及硅醚化反应

硅烷化试剂主要有: 六甲基二硅氮烷 (HMDS), 三甲基-氯硅烷 (TMCS), 双-(三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺 (BSTFA), 在羟基及羧基化合物中引入三甲硅烷基 $(\text{CH}_3)_3\text{Si}-$, 使化合物的沸点和极性比原来组分大大降低, 更便于色谱分析, 例如:



二、气相色谱分析实例

1. 氧、氮、氢、甲烷和一氧化碳的分析

色谱条件

色谱柱: 5A 分子筛 (40~60 目) 玻璃柱, $5\text{m} \times \phi 4\text{mm}$ 。

柱温: 68°C , 气化室温度: 80°C , 检测器温度: 100°C , 载气, Ar: $16\text{mL}/\text{min}$ 。

检测器: 热导检测器

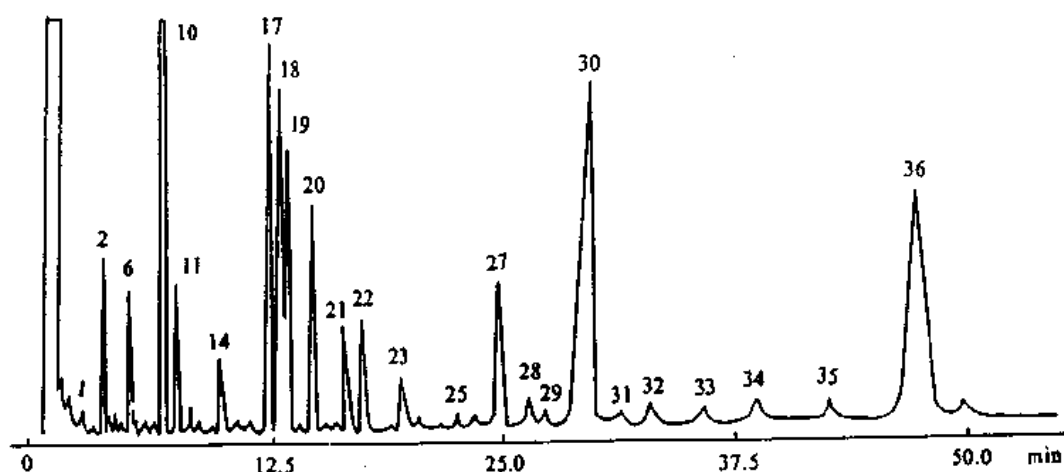


图 8-25 扇贝脂肪中脂肪酸甲酯色谱图

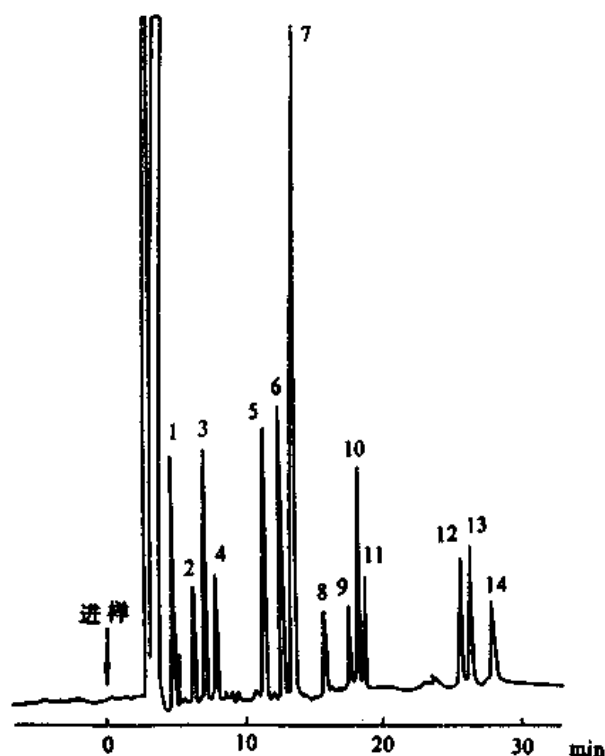
1. C_{11:0} 2. C_{12:0} 3. C_{12:1} 4. C_{13:0} 5. C_{13:1} 6. C_{14:0} 7. C_{14:1} 8. C_{15:0} 9. C_{15:1} 10. C_{16:0}
 11. C_{16:1} 12. C_{16:2} 13. C_{17:0} 14. C_{17:1} 15. C_{17:2} 16. C_{17:3} 17. C_{18:0} 18. C_{18:1} 19. C_{18:2}
 20. C_{18:3} 21. C_{19:0} 22. C_{18:3} 23. C_{20:0} 24. C_{20:1} 25. C_{20:2} 26. C_{21:0} 27. C_{20:4} 28. C_{21:1}
 29. C_{20:4} 30. C_{20:5} 31. C_{22:0} 32. C_{22:1} 33. C_{22:3} 34. C_{22:4} 35. C_{22:5} 36. C_{22:6}

* 为支链脂肪酸

2. 扇贝脂肪中脂肪酸的分析

色谱条件

色谱柱: PEG-20M 玻璃毛细管柱, 40m × φ0.35mm.



1. 六氯苯
2. α-六六六(α-666)
3. 艾氏剂
4. γ-六六六(γ-666)
5. 滴滴伊(o,p-DDE)
6. α-硫丹
7. 滴滴伊(p,p-DDE)
8. 狄氏剂
9. 滴滴涕(o,p-DDT)
10. 异狄氏剂
11. 滴滴滴(o,p-DDD)
12. 滴滴涕(p,p-DDT)
13. 滴滴滴(p,p-DDD)
14. β-硫丹

图 8-26 标准农药混合物色谱图

柱温: 165℃以 5℃/min 升至 175℃, 恒温 6min 后再以 10℃/min 升至 192℃。

进样口温度: 280℃, 检测器温度: 280℃, 载气 N_2 : 1.5mL/min, 尾吹 40mL/min, 检测器: 氢火焰离子化检测器。

3. 超痕量标准农药混合物的分析

色谱条件

色谱柱: OV-225 石英毛细管柱, 26.5m × ϕ 0.4mm。

柱温: 217℃, 进样口温度: 270℃

检测器温度: 300℃, 载气, $Ar/CH_3(95:5): 25mL/min$, 检测器: 电子捕获检测器 (^{63}Ni)

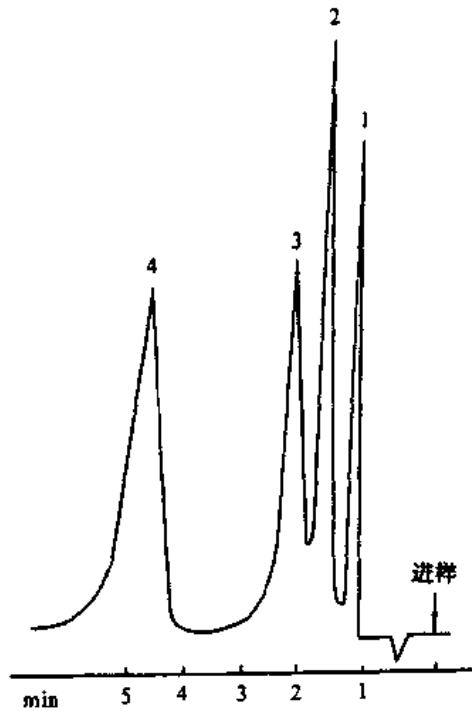


图 8-27 $10^{-9}g$ 级硫化物的自动监测色谱图

1. 硫化氢 2. 二氧化硫 3. 甲硫醇 4. 二硫化碳

4. 大气中 $10^{-9}g$ 级硫化物的自动监测 色谱条件

色谱柱: 5% 聚间苯醚 (五环) / 聚四氟乙烯微球 (40~60 目), 聚四氟乙烯柱, 4m × ϕ 3mm, 柱温: 40℃, 载气: 空气, 52mL/min, 检测器: 火焰光度检测器。

思考题

1. 气相色谱法有哪些特点?
2. 试述气相色谱的流程。
3. 对担体和固定液的要求各是什么?
4. 常用的气相色谱检测器有哪几种? 简述其原理, 各适合分析哪类化合物?
5. 色谱常用的定量方法有哪几种?

6. 毛细管柱色谱与填充柱色谱比较有哪些不同?

7. 用氢火焰离子化检测器测定 0.05% 的苯溶液, 进样 $1\mu L$, 峰高 10cm, 半峰宽 0.5cm, 已知记录仪纸速 1cm/min, 灵敏度 0.2mV/cm, 噪音为 0.02mV, 计算氢火焰离子化检测器的灵敏度和检测限。

8. 某样品重 0.1g, 加入 0.1g 内标物, 欲测组分 A 的面积校正因子为 0.80, 内标物的面积校正因子为 1.00, 组分 A 的峰面积为 $60mm^2$, 内标物峰面积为 $100mm^2$, 求组分 A 的百分含量。

第九章 高效液相色谱法

第一节 概述

高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, 简称 HPLC) 是 60 年代末 70 年代初迅速发展起来的分离分析技术, 它是在经典液相色谱的基础上, 引入气相色谱的理论, 在技术上采用了高压泵、高效固定相和高灵敏度检测器, 实现了分析速度快、分离效率高和操作自动化, 这种柱色谱技术被称做高效液相色谱法。

高效液相色谱法与经典液相色谱法比较具有如下优点:

1. 在分析速度上, 高效液相色谱比经典的液相色谱要快数百倍。这是因为经典液相色谱是在常压下靠重力加料, 洗脱速度很慢, 通常分离一个组分需要几个小时, 甚至几天, 而高效液相色谱采用高压泵输液, 流动相流速一般可达 $1\sim 10\text{mL}/\text{min}$, 个别可高达 $100\text{mL}/\text{min}$ 以上, 分析时间大大缩短。

2. 在分离效率上, 高效液相色谱法比经典液相色谱法要高得多, 经典液相色谱法, 通常采用粒度较粗 ($> 100\mu\text{m}$) 固定相做填料, 柱效率较低, 而高效液相色谱法采用均匀的微颗粒 ($3\sim 50\mu\text{m}$) 做固定相, 理论塔板数最高可达 10 万/米。

3. 在样品检测上, 高效液相色谱仪使用了新型的检测器, 检测灵敏度大大提高, 自动化程度也日趋完备。

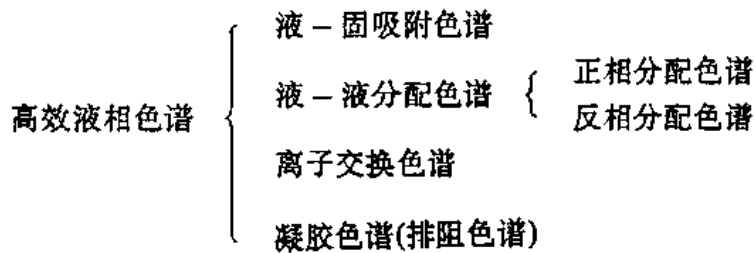
另外, 经典的液相色谱柱一般只用一次, 用后, 其中的固定相即弃去, 既费人力, 又费物力, 而高效液相色谱则使用密闭的, 可重复使用的色谱柱, 进样采用注射器和进样阀, 准确而快速, 操作方便, 因此高效液相色谱无论是定性还是定量方面, 都比经典的液相色谱有较高的准确性和精密度。

那么高效液相色谱法和气相色谱法比较又有哪些不同呢?

虽然气相色谱具有很好的分离能力, 分析速度快, 灵敏度更高, 操作方便, 但气相色谱法要将被分析的物质转化为气态以后才能加以分析, 对于在使用温度下不挥发性物质、遇热分解的物质、离子型的物质、分子量超过 300 以上的高分子物质等难以分离测定, 因此使用受到限制。高效液相色谱法不受样品的高沸点、热稳定性的限制, 从低分子到高分子都在适用范围之内 (约占有机物的 $80\%\sim 85\%$), 作为分离分析手段, 气相色谱和液相色谱是相互补充的。就色谱分离过程而言, 它们的差别主要在于气相色谱的流动相是气体, 而液相色谱的流动相是液体, 由于气体和液体物理性质的差别决定了液相色谱要实现快速、高效的目的, 必须采用均匀的微颗粒做固定相, 同时必须采用高进口柱压 ($> 10\text{M Pa}/\text{cm}^2$) 以加速色谱分离过程, 这正是由经典液相色谱发展到高效液相色谱所采取的重要手段。不过就目前来看, 检测器的种类和灵敏度尚未达到气相色谱法的水平。

第二节 高效液相色谱的类型及其分离原理

高效液相色谱与气相色谱一样其分离系统也由两相——固定相和流动相组成。高效液相色谱的固定相可以是吸附剂、化学键合固定相（或在惰性担体表面涂上一层液膜）、离子交换树脂或多孔性凝胶。流动相是各种溶剂。高效液相色谱法按组分在两相间分离机理分类，主要可分为：



一、液-固吸附色谱法

液-固吸附色谱法是以液体为流动相，以固体吸附剂如硅胶、各种微球硅珠、氧化镁、氧化铝、活性炭、聚酰胺等作为固定相。

液-固吸附色谱分离物质的依据是混合物组分在色谱柱上吸附能力大小不同。分离过程是吸附与解吸的平衡过程，也是溶剂分子 Y （流动相）与样品中溶质分子 X （组分）在吸附剂表面竞争的结果。

这种竞争吸附，同时表现在不同溶质分子的不同官能团对吸附剂表面吸附-解吸作用的强弱上。



式中，下标 m 为流动相， a 为吸附剂表面， X_m 和 X_a 分别表示在流动相中的溶质分子和吸附在吸附剂表面的溶质分子， Y_m 和 Y_a 分别表示在流动相中的溶剂分子和吸附在吸附剂表面的溶剂分子， n 是被吸附的溶剂分子数。吸附达到平衡时，可用下式表示：

$$K = \frac{[X_a][Y_m]^n}{[X_m][Y_a]^n} \quad (9-2)$$

K 为吸附平衡常数，简称吸附常数。显然，吸附系数大的组分，吸附剂对它的吸附力强，保留值大，流出色谱柱慢。吸附色谱的分离方式见图 9-1。

液-固吸附色谱主要用来分析极性官能团且极性不太强的化合物，其特点是具有特殊的选择性。对同系物的选择性很小，而对不同族化合物具有好的选择分离能力。另外，液-固吸附色谱对异构体也有很好的选择性，用于分离几何异构体和同分异构体比其它方法更优越。

液-固吸附色谱的主要缺点是重复性差。对流动相的含水量必须严格控制，使水分处于平衡状态，保证分离精度。

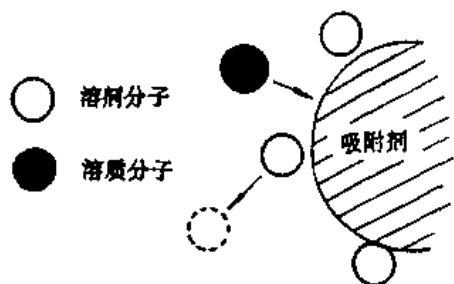


图 9-1 吸附色谱

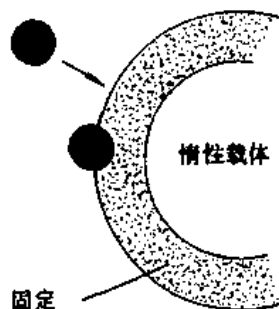


图 9-2 分配色谱

二、液-液分配色谱法

流动相为液体，固定相是将固定液涂渍或键合在惰性载体表面上，流动相与固定相之间应互不相溶。分配色谱法是基于样品中各组分在固定相和流动相之间的分配系数 K 的差异而进行分离的，即：

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (9-3)$$

C_s 、 C_m 分别表示组分在固定相和流动相中分配平衡时的浓度，其分离机理见示意图 9-2。根据固定相和流动相极性的差异，液-液分配色谱可分为四种类型。

1. 正相分配色谱法

固定相的极性大于流动相的极性，叫做正相分配色谱。这种色谱常用于分离极性较强的化合物，如酚类、胺类、羟基化合物、氨基酸等。分离顺序是极性较弱的组分保留值小，先流出色谱柱。

2. 反相分配色谱法

固定相的极性小于流动相的极性，叫做反相分配色谱，它是目前高效液相色谱法中应用得最多和最有效的方法。这种色谱常用于分离非极性化合物，分离顺序是极性较强的组分保留值小，先流出色谱柱。正相分配色谱法和反相分配色谱法的比较见表 9-1。

表 9-1 正相分配色谱法与反相分配色谱法比较

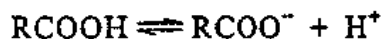
相分类	固定相	流动相
正相	极性	非极性
反相	非极性	极性

3. 离子抑制色谱法

在反相分配色谱法的基础上，通过调节流动相的 pH 值和增加流动相中离子的浓度，抑制试样的解离，增加其存在于未解离状态的几率，受到解离抑制的试样在弱极性

固定相里依据反相色谱的原理进行分离。

例如，当把一个弱的有机酸 RCOOH 注入到反相色谱柱上，用水做流动相，有机酸有如下的离解过程：



若调节流动相的 pH 值在弱碱性范围内，则有利于有机酸的离解，从而增加了酸在流动相中的溶解度， K 变小；若调节流动相的 pH 值在弱酸性范围，则“抑制”了酸的离解，而未离解的中性有机酸分子则与弱极性固定相有更大的疏水缔合作用， K 增大，有利于该有机酸与其它组分的分离。这就是离子抑制色谱的原理。对于有机碱则有相反的变化。

离子抑制色谱法适用于弱电解质的分离；弱电解质及中性物质的同时分离；也可用于两性电解质的部分分离，不适用于强酸强碱性物质的分离。

4. 离子对色谱法

是液-液分配色谱法的一种特殊形式。离子对色谱的机理可以用离子对形成来解释。在色谱体系中，固定相为非极性，流动相为其中加入一种电荷与样品组分子相反的离子 B^+ 的溶液，由于静电引力，带正电的离子 B^+ 与带负电的样品组分子 A^- 生成离子对：

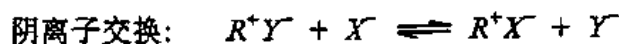


$A^-_{\text{水相}}$ 表示组分子 A^- 在水相中， $B^+_{\text{水相}}$ 表示组分子 B^+ 在水相中， $A^-B^+_{\text{有机相}}$ 表示离子对 A^-B^+ 在有机相(固定相)中。由于离子对具有疏水性，因而易与非极性有机相(固定相)亲合。组分子的性质不同，与所加相反离子形成离子对的能力大小不同，离子对疏水性不同，导致各组分子在固定相中保留时间不同，从而达到分离的目的，这就是离子对色谱的基本原理。

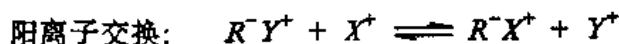
以上所说的固定相为非极性，流动相为极性，称为反相离子对色谱法，反之，固定相为极性，流动相为非极性，称为正相离子对色谱法。能用离子对色谱法分离的样品种类很多，它适用于分析离子型或可离解的化合物，如碱类、酸类离子以及有可离解的多官能团化合物的分离。

三、离子交换色谱法

流动相为缓冲液，固定相是离子交换剂。其机理是离子交换树脂上的离子基团与流动相中具有相同电荷的组分子进行可逆交换，由于离子交换剂对样品中各组分子离子的交换系数不同而使混合物达到分离。根据离子的性质可分为阳离子交换色谱和阴离子交换色谱见图 9-3。



$$K = \frac{[R^+X^-][Y^-]}{[R^+Y^-][X^-]} \quad (9-4)$$



然而，值得注意的是，在某些情况下的分离也同时伴随着离子交换作用和分配作用。

凝胶色谱法适用于分离分子量大于 2 000 的高分子化合物，如蛋白质、酶、核酸等，也适用于分离分子量小于 2 000 但分子大小差别较大的混合物。凝胶色谱在生物样品与高分子化学分析中有重要的应用价值。

第三节 高效液相色谱仪

图 9-5 是带有高压梯度系统的液相色谱流程图。这种系统可以进行等比洗脱或梯度洗脱。液相色谱仪工作时，贮液槽中的流动相被高压泵吸入后输出，流经色谱柱、检测器、进入废液槽，当进行样品分析时，样品从进样口注入，流动相带动样品进入色谱柱进行分离，经分离的组分依次进入检测器，由记录仪记录下来，得到色谱图及有关数据。高效液相色谱仪的基本组成

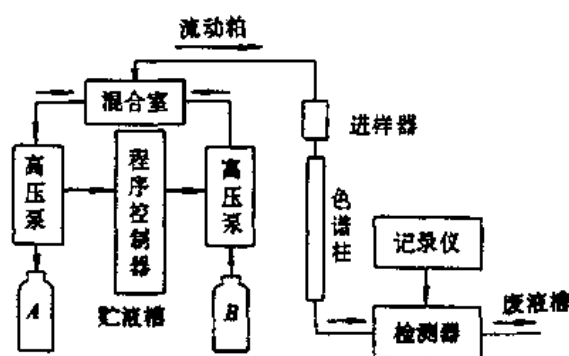


图 9-5 高效液相色谱仪流程

成可分为输液系统、进样系统、色谱分离系统、检测系统、数据处理及记录系统。现简略分述如下：

一、输液系统

1. 贮液槽和输液管道

贮液槽是用来存贮足够数量、符合分析要求流动相的容器。贮液槽的常用材料为玻璃或不锈钢等。容器一般为 0.5~2L 为宜。流动相需预先经过脱气才能使用，否则，由于柱后压力下降使溶解于流动相中的空气自动脱出在检测器内形成气泡，引起基线漂移或不规则噪声。脱气的方法有抽真空、加热沸腾 15min 和超声波脱气法。将溶剂瓶置超声波水浴中同时抽真空的脱气方法效果最好，1~2min 即可达到单独用超声波或抽真空 20min 的效果。不锈钢的输液管道是连接高效液相色谱仪各主要系统，构成流路系统，管道均采用很小的内径，以防止组分的扩散和减少溶剂的死体积。从贮液槽到高压泵入口的输液管道前端装有过滤器，以滤除流动相中的微粒。

2. 高压泵

高压泵是高效液相色谱仪最重要的部件之一。它的作用是将流动相在高压下连续送入色谱柱，使样品在色谱柱内完成分离过程。高效液相色谱仪的高压泵应具有输出压力高、流量稳定、流量可调范围宽、泵内死体积小、具有梯度洗脱及耐酸耐碱腐蚀、溶剂更换迅速等性能。高效液相色谱仪上最广泛采用的是往复式恒流泵，见图 9-6。

这种泵由电机带动凸轮 A 驱动柱塞 B，在泵腔内往复运动，经一对球型单向阀 a、b 控制，每个冲程推动少量流动相进入色谱柱，在反冲程时，柱塞的运动通过球型单向

阀将流动相自贮液槽吸入泵腔，可通过柱塞往复频率控制流量。

3. 梯度洗脱装置

梯度洗脱亦称溶剂程序，是指在分离过程中，随时间函数程序改变流动相组成。梯度洗脱装置有两种，低压梯度装置和高压梯度装置。高压梯度装置又可分为两种工作方式：一种是以两台或多台高压泵将不同的溶剂吸入混合室，在高压下混合，然后进入色谱柱。它的优点是只要通过电子控制系统分别程序控制两台或多台输液泵的流量，就可以获得多种形式的淋洗浓度曲线。其缺点是如需混合多种溶剂，则需要多台高压泵；另一种是以一台高压泵通过多路电磁阀控制同时吸入几种溶剂（各路吸入的流量可以控制），经混合后送到色谱柱，这样只要一台高压泵。

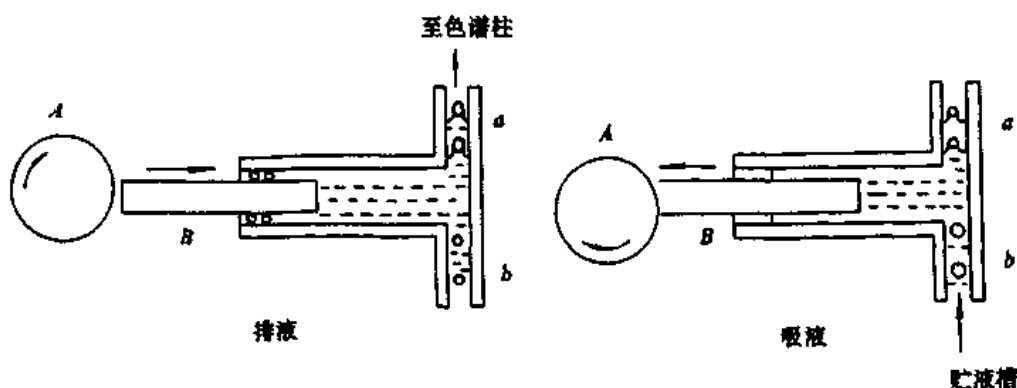


图 9-6 往复式柱塞泵工作原理示意图

二、进样系统

进样系统包括进样口、注射器、六通阀和定量管等，它的作用是把样品有效地送入色谱柱。进样系统是柱外效应的重要来源之一，为了减少对板高的影响，避免由柱外效应而引起峰展宽，对进样口要求死体积小，能够使样品各组分几乎同时进入色谱柱。

目前，多采用耐高压、重复性好、操作方便的带定量管的六通阀进样系统见图 9-7。进样阀手柄有两个旋转位置，一个位置（进样位置）是用虚线表示的流路连通，泵输送流动相进入色谱柱，由注射器注入的样品溶液保留在定量管中；另一个位置（分析位置）是直线的流路接通，泵输送流动相通过定量管将样品带入色谱柱。进样方式有手动进样和自动进样。

三、色谱分离系统

色谱分离系统包括色谱柱和恒温装置。分离系统性能的好坏是色谱分析的关键。采用最佳的色谱分离系统，充分发挥系统的分离效能是色谱工作中重要的一环。

1. 色谱柱及其填充

色谱柱由柱管和固定相构成。高效液相色谱的柱管多用不锈钢制成，除要求耐高压外，还要求管内壁有很高的光洁度。常用柱管内径为 2~6mm，长度为 15~50cm。

高效液相色谱柱的装填比气相色谱柱要求严格得多，目前常用的是匀浆填充法，适

用于颗粒直径小于 $20\mu\text{m}$ 的填料。匀浆法常用二氧六环和四氯化碳不同密度的混合液作为匀浆剂，将填料调成匀浆，经超声波处理使其高度分散。将匀浆液置于匀浆罐中，用高压泵以 $400\text{MPa}/\text{cm}^2$ 以上的压力将顶替液打入匀浆罐，以把匀浆液顶入色谱柱中，装成均匀、紧密的色谱柱。

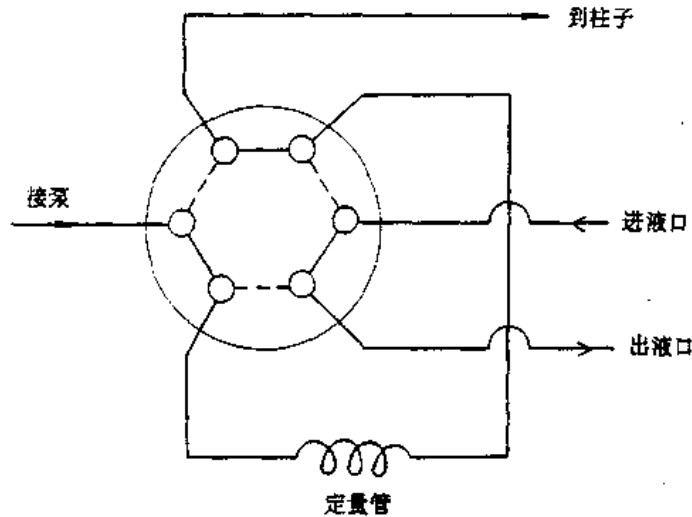


图 9-7 六通阀进样示意图

充填后的色谱柱需进行柱效测定，以鉴定色谱柱的性能，如键合相常用苯、萘、菲的混合物为样品，用甲醇：水（83：17）为流动相，测定其理论塔板数和分离度。

2. 柱恒温器

柱温是液相色谱的重要操作参数。高精度的温度控制对保证色谱柱性能，进行高精度、高重现性的分析是必不可少的。一般来说，在较高的柱温下操作，具有三个好处：

①能增加样品在流动相中的溶解度，从而缩短分析时间。通常柱温每升高 6°C ，组分保留时间减少约 30%。②能改善传质过程，减少传质阻力，增加柱效。③能降低流动相粘度，因而在相同的流量下，柱压力降低。液相色谱常用柱温范围为室温至 65°C 。

四、检测器

高效液相色谱的检测器分为两类即通用型检测器和选择型检测器。通用型检测器是以差示测量法来显示出样品和流动相之间某种物理性质上的差异为基础的，但由于它易受外界条件的影响，通常不能用梯度淋洗。这些检测器包括示差折光检测器，电导率检测器等。选择型检测器是以测量样品的特有性质为基础，而对温度和流速等外界条件不敏感，灵敏度高，可适用于梯度淋洗。它们包括紫外可见光检测器，荧光检测器，放射性检测器，极谱检测器，库仑检测器等。

理想的高效液相色谱检测器，应该具备以下几个特点：①灵敏度高；②对各类组分化合物都有响应，或有特殊的选择性；③线性范围宽；④死体积小；⑤不破坏样品；⑥性能稳定，对温度和流速的变化不敏感；⑦能连续工作，可靠方便。到目前为止，还没有这样理想的检测器，不过，现有的检测器种类多，性能广，可以互相补充。

1. 紫外-可见光检测器

紫外-可见光检测器是高效液相色谱中应用得最广的检测器，它对许多样品具有高的灵敏度，最小检测量可达 10^{-9} g，线性范围宽（约为 10^4 ）。

紫外-可见光检测器的工作原理和分光光度计相同，都以朗伯-比耳定律为基础，即当样品池的长度一定时，吸光度与样品浓度成正比。结构也和分光光度计相似，由光源、单色器、吸收池和光电转换元件光电管或光电倍增管组成。所不同的是，它的比色池改为流动比色池，体积比较小（容量仅几微升）。

紫外-可见光检测器适用于测定在 190~800nm 波长范围内有吸收的组分。

2. 荧光检测器

荧光检测器（FD）属选择性检测器，用于测定能发出荧光的物质。

当某些组分受波长较短的光照射时，能吸收该波长的光线而处于激发状态，随之辐射出比激发光波较长的光线，这种光线一般是可见的，称为荧光。如果入射的激发光强一定，溶液的厚度不变，在被测组分浓度较低时，组分受激发而发生的荧光强度 F 与被测组分的浓度成正比。许多化合物包括药物、氨基酸、胺类、维生素和甾族化合物都能用荧光检测器检测。许多自身不能被激发而产生荧光的化合物经过荧光衍生化处理后也可进行荧光检测。一些荧光较弱的化合物经荧光增强处理后也能进行荧光检测。

如果选用的溶剂对激发光和荧光是绝对透明的，溶剂对检测无干扰，则可以很方便地使用梯度洗脱技术。用荧光检测器检测强荧光化合物如硫酸喹啉，其最低检测浓度可达 10^{-9} g/mL。荧光检测器的流程如图 9-8 所示。由氙灯发出的 190~800nm 的光线透过半透半反射镜后，经激发单色器，得到一定波长的单色光，然后由透镜聚焦在流动池上。当柱后流出物中有能被激发产生荧光的组分流入检测池内时，则吸收激发光发出荧光。此荧光通过发射单色器，得到荧光光谱中发射强度和特异性均理想的发射单色光，照射到光电倍增管，转变为光电流并放大后送至记录仪记录。为了提高灵敏度并消除来自流动相发射出的基底荧光，目前多使用设有参比池和测量池的双光束光测量系统。

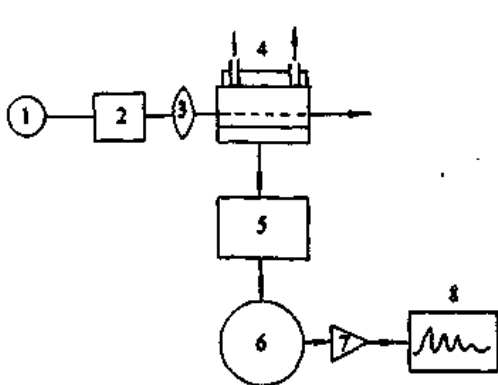


图 9-8 荧光检测器

1. 光源
2. 激发单色器
3. 流动池
4. 发射单色器
5. 光电倍增管
6. 放大器
7. 记录器

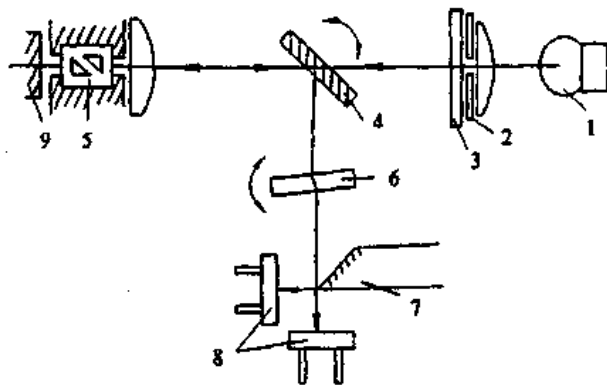


图 9-9 偏转式示差折光检测器

1. 流动池
2. 透镜
3. 狭缝
4. 光源
5. 调零镜
6. 分光镜
7. 光电管

3. 示差折光检测器

示差折光检测器 (RI) 属通用型检测器, 是利用纯流动相与含有被测组分的流动相之间折射率的差别进行检测的, 凡具有与流动相折射率不同的组分, 均可使用这种检测器。

示差折光检测器按其工作原理可以分成偏转式和反射式两种类型。偏转式检测器的基本原理如图 9-9 所示。光源发出的光先变成一束光, 再经透镜变成平行光, 并交替照射到样品池和参比池, 由反射镜反射至光电管。调整光学调零, 使光电信号输出为零, 当样品池有样品组分流过时, 样品组分的折射率发生变化, 光束经折射后不再照射在光电管中央, 光电管产生与光束的偏移成正比的输出信号, 经放大器放大送至记录仪。

示差检测器的优点是应用面广, 它的主要缺点是对温度和流速变化敏感, 灵敏度低, 不宜作痕量分析和梯度洗脱。

4. 二极管阵列检测器

二极管阵列检测器 (DAD) 是近几年发展起来的一种新型检测器, 其本质仍为紫外-可见光检测器, 不同的是进入流动池的不再是单色光, 得到的信号可以是在所有波长上的三维色谱光谱信号 (二极管阵列检测器原理可参见第二章第三节)。

当然这种检测技术的应用价值决不是在于演示三维的谱图, 而是表明了它可提取丰富的信息, 用以判别色谱分离的状况及强化定量和定性分析。其局限性是造价高, 一次性投资大。

高效液相色谱仪的数据处理及记录系统与气相色谱仪相同, 在此不再叙述。

第四节 高效液相色谱固定相

高效液相色谱固定相大致可分成三种类型:

1. 薄壳型或表面多孔型固定相

这种填料是一种具有实心硬核 (一般是玻璃) 的多孔层微球, 玻璃核的外面包了一层很薄的 (约 $1\sim 2\mu\text{m}$) 有空隙结构的多孔材料 (如硅胶、氧化铝、聚酰胺), 微球直径约为 $30\mu\text{m}$ 。薄壳型固定相的柱效比经典液相色谱固定相高 $50\sim 500$ 倍, 但缺点是面积小, 样品容量大大减少, 不宜用于大量化合物的分离及制备。图 9-10 是 Du Pont 公司的商品填料 Zipax 的结构示意图。

2. 全多孔型固定相

目前, 直径 $5\sim 10\mu\text{m}$, 大小均匀的全孔硅胶已被广泛用于高效液相色谱。由于颗粒直径很小, 全孔型固定相的理论塔板数可达 $5\sim 10$ 万/米, 是薄壳型填料的 $30\sim 50$ 倍。

这种填料不仅能涂渍固定液, 而且多孔硅胶表面也可以化学键合上具有不同作用基团的固定液。图 9-11 是商品名称为 Zorbax 的结构示意图。

图 9-12 是 Zorbax ODS 的表面示意图。固定相上键合的十八烷基, 是通过 Si-O-Si 共价键牢固地键合在硅胶载体上。

3. 多孔聚合物固定相

不同类型合成树脂填料已被用于高效液相色谱，其中应用最为广泛的是聚苯乙烯和二乙烯基苯交联而成的聚苯乙烯凝胶。这种填料不仅能直接用于分配色谱，而且可以通过引入离子交换基团用于离子交换色谱。但应注意因流动相引起的溶胀与收缩现象。

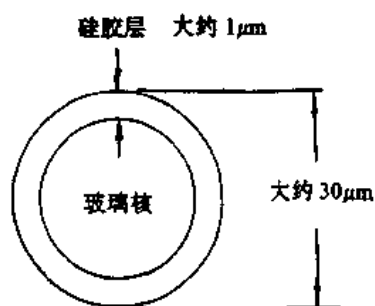


图 9-10 Zipax

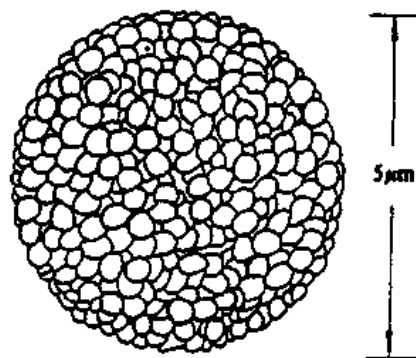


图 9-11 Zorbax

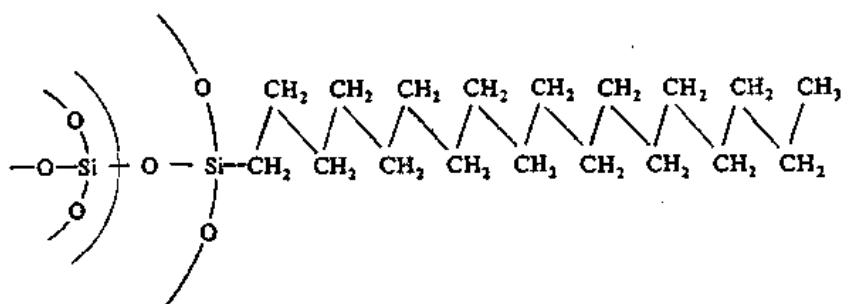


图 9-12 Zorbax ODS 固定相

一、液-固吸附色谱固定相

液-固吸附色谱固定相是一些吸附活性强弱不同的吸附剂，大部分为硅胶基质，氧化铝也较常用，此外也有用氧化镁、分子筛、聚丙烯酰胺、活性炭等。从结构上，可分为薄壳型和全多孔型两种。按极性强弱可分为极性吸附剂（如硅胶、氧化铝、氧化镁等）和非极性吸附剂（如活性炭）。在选用硅胶和氧化铝做固定相时，应注意以下几点：(1) 酸性化合物易吸附在氧化铝上；(2) 中度碱性的化合物易吸附在硅胶上；(3) 不饱和化合物（烯烃、芳香烃）易吸附在氧化铝上；(4) 卤素化合物易吸附在氧化铝上；(5) 对酸敏感而易分解的化合物应在氧化铝上作色谱分离；(6) 对碱敏感而易分解的化合物应在硅胶上作色谱分离。

二、液-液分配色谱固定相

液-液分配色谱固定相是在载体上涂渍一层固定液。根据固定液与载体结合方式可

分为涂渍固定相和化学键合固定相。

1. 涂渍固定相

液-液色谱采用的固定相有类似于气相色谱的涂渍固定相，只是粒度小于气相色谱固定相。常用的载体主要是全多孔型硅珠、薄壳型硅珠，气相色谱使用的其它担体亦有应用，但不常用。常用的固定液只是极性不同而又为数不多的几种，如 β, β' -氧二丙腈、聚乙二醇、角鲨烷等，这类涂渍固定相最大缺点是固定液容易流失，稳定性和重复性不易保证，目前已很少使用。

2. 化学键合固定相

化学键合固定相兼有吸附和分配色谱两种机理。化学键合固定相的优点是：

(1) 由于表面键合了有机物基团，消除了表面的吸附活性点，使表面更均一。(2) 可以通过改变键合有机分子的各种不同基团来改变选择性；(3) 柱效高；(4) 固定液不流失，提高了色谱柱的稳定性和使用寿命；(5) 由于牢固的化学键，能耐各种溶剂，有利于梯度淋洗和样品的回收。

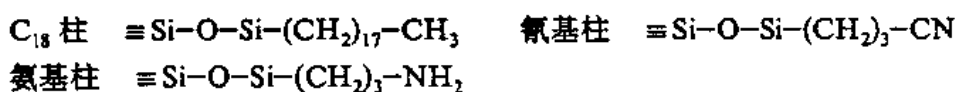
化学键合固定相主要是以硅珠为基质，用化学反应的方法将有机官能团通过化学键结合到填料（硅珠）表面的硅醇基团上。这些官能团的种类有：非极性的烷基硅烷、苯基和极性的醚基、氨基、氰基等。

非极性的烷基包括：甲基、己基、辛基、十六、十八、二十二硅烷基。其中十八硅烷基称 ODS 或 C_{18} 。随碳链的加长可明显地改善分离的选择性，但随着继续加长，这种影响就减弱。ODS 填料适用烃类、酯族化合物等非极性的化合物分离。非极性的苯基填料适用芳香族化合物、脂肪酸、肽类的分离。极性的醚基填料适用羟基化合物的分离。极性的氰基填料适用氢键化合物的分离。极性的氨基填料可进行离子化合物的分离。

键合相有四种类型：

- ① 硅氧碳键型 ($\equiv \text{Si}-\text{O}-\text{C}$)
- ② 硅氧硅碳键型 ($\equiv \text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{C}$)
- ③ 硅碳键型 ($\equiv \text{Si}-\text{C}$)
- ④ 硅氮键型 ($\equiv \text{Si}-\text{N}$)

其中硅氧硅碳键型采用较多，因为它的化学键稳定，如：



三、离子交换色谱固定相

离子交换色谱固定相是在载体上涂渍或化学键合上阳离子或阴离子交换树脂。

经典的多孔型离子交换树脂很少用于高效液相色谱法，因为它们不能承受压力，目前已专门研制了粒度小而均匀、稳定性好、pH 值范围广、交换容量大、能耐高压的离子交换剂。常用的离子交换剂的结构有两种类型：一种类型是以硅胶或玻璃微球为基质，表面涂复一层离子交换树脂，或将离子交换基团键合在硅胶表面而成；另一类是苯乙烯与二乙烯基苯的共聚物，增加聚合物中二乙烯基苯的含量，可以提高机械强度和树脂的交联度，但树脂交联度过大，孔径小，渗透性低，不利于分离。目前采用最为广泛的是中等交联度在 4%~12% 的树脂，最佳范围在 8%~12% 之间。

按离子交换基团的性质将离子交换树脂分为强酸性或弱酸性阳离子交换树脂，强碱性或弱碱性阴离子交换树脂。常见的强酸性阳离子交换树脂的交换基为磺酸基(-SO₃H)，弱酸性的为羧基(-COOH)。强碱性阴离子交换树脂的交换基为季铵盐(-CH₂N(CH₃)₃Cl)，弱碱性的为胺基(-NH(R)₂Cl)。

交换容量是指每克干树脂(或每毫升湿树脂)可以交换的离子的摩尔数。它是离子交换树脂的重要特性指标。交换容量大，进样量大，有利于微量分析和制备分离。交换容量小，要求进样量小及灵敏度高的检测器。但是容量大的离子交换树脂往往能较牢固地保留离子，需要用浓度高的缓冲液作流动相(1~5mol)，才能从柱上洗脱下来。此外，交换容量往往与pH值有关，各种离子交换树脂的最适宜pH值见表9-2。

高效液相色谱常用的离子交换剂有：薄壳玻珠-苯磺酸、薄壳玻珠-乙基苯磺酸、全多孔硅珠-丙氨基丙酸、薄壳玻珠-丙基苄基二甲胺氯等。

四、凝胶色谱固定相

按化学类型可分为软性、半软性和刚性凝胶。

软性凝胶为网状交联的多聚葡萄糖和网状交联的聚丙烯酰胺，以及琼脂糖和网状交联聚合的丙烯酰胺。此类填料不适宜在高压液相色谱中使用。

半刚性凝胶主要是交联的聚苯乙烯，可用于高效液相色谱，但压力不能超过15MPa/cm²，这类凝胶有聚苯乙烯凝胶 styragel 系列，聚醋酸乙烯酯类 merckogel-or 系列等。

表 9-2 离子交换剂的主要类型

类型	强度	母体结构	官能团	pH值	应用
阴离子	强碱性	交联聚苯乙烯	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	2~10	阴离子化合物、卤素、生物碱、脂肪酸
		硅胶	-N ⁺ (CH ₃) ₃	2~8	
	弱碱性	交联聚苯乙烯	-CH ₂ NH ⁺ (CH ₃) ₂	2~6	氨基酸、维生素
		硅胶	双官能团胺	2~8	
阳离子	强酸性	交联聚苯乙烯	-SO ₃ ⁻	2~14	有机和无机阳离子、B族维生素、肽类、氨基酸、铜系化合物
		硅胶	-SO ₃ ⁻	2~8	
	中强酸性	交联聚苯乙烯	-PO ₃ ²⁻	4~14	阳离子化合物、生化分离过渡元素、有机碱、抗菌素、氨基酸
		聚甲基丙烯酸酯	-COO ⁻	8~14	

刚性凝胶主要是硅胶，可用于以水溶液为流动相的凝胶过滤色谱，分离蛋白质、酶、核酸等高分子化合物效果极佳。

第五节 高效液相色谱流动相

与气相色谱不同，在液相色谱中流动相是液体，其对样品组分的溶解能力、粘度和对固定相的作用等对整个分离情况都有极大的影响，因而对高效液相色谱来说，选择固定相是关键，而流动相的选择同样不可忽视，甚至对于同一固定相，通过选择合适的流动相能极大地改善分离能力。

流动相的效能可用分离度方程式来阐明：

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (9-6)$$

由方程式可知，相邻两个峰的分度是由柱效 N ，相对保留值 α ，和容量因子 k' 所决定的。流动相对这三项都有显著的影响，即 N 值与流动相的粘度有关，流动相的粘度会影响试样组分在流动相中的扩散系数。 α 与流动相组成有关，为了获得合适的溶剂强度(极性)，常采用二元或多元组合的溶剂系统作为流动相。 k' 值与流动相强度有关，在液-液色谱中用溶解度参数 δ 、在液-固色谱中用溶剂强度参数 ε° 表示溶剂的极性，数值越大极性越强。因此，在液相色谱中，可以通过选择流动相的组成和强度的办法来改善分离。

1. 对流动相的要求

(1) 纯度

在液相色谱中，溶剂的纯度至为重要，纯度低的溶剂不但能影响分离效果，而且能妨碍检测器的正常工作。比如，用紫外检测器时，不能用紫外吸收干扰较大的溶剂做流动相。用示差折光检测器时，溶剂中的杂质往往能影响检测器的灵敏度。因此，必须经过适当的纯化，方可使用。纯化溶剂的方法包括：①过滤除去固体杂质；②将溶剂适当处理后重蒸馏。例如使溶剂通过活化的硅胶或氧化铝柱可以除去水分和极性大的杂质；③脱气。

(2) 稳定性

溶剂不得与固定相或样品起作用。有些溶剂能与固定相反应，例如碱性氧化铝柱遇到丙酮时，丙酮能缩合成二丙酮醇；碱溶液 ($\text{pH} > 8$) 能逐渐溶解硅胶等。

(3) 粘度

流动相的粘度对色谱过程的直接影响，反映在柱效、压力和分析时间诸方面。粘度低，溶质在流动相中的扩散系数大，则传质快，柱效高。同样，粘度低，色谱柱压降也小，分析的时间短。在实际中最好选用粘度适中的溶剂做流动相。粘度太低的溶剂，通常沸点很低，容易在柱内形成气泡，不利于分离与检测。

2. 溶剂强度

流动相的性质常用溶剂强度这一概念来表示。在不同类型的色谱中这一概念也不完全相同。

在液-固色谱中，溶剂强度参数用 ε° 表示。 ε° 的数值表示该流动相在选定吸附剂

上相对极性的大小, ϵ° 值大表示流动相的极性大, 反之表示流动相的极性小。在不同的吸附剂上 ϵ° 值也不相同, 根据溶剂强度递增次序排列的一系列流动相称为洗脱序列。

在液-液色谱中, 用溶解度参数 δ 衡量溶剂的极性, 因为 δ 值是由静电力、诱导力、色散力和氢键力等分子作用力的总和所决定的, 它不仅能定量地表示溶剂的强度, 而且能从分子作用力的角度正确地解释溶剂的选择性。

由经典的柱色谱经验可知, 溶剂的洗脱能力大致与溶剂的极性顺序相符, 正确选择溶剂极性的最佳范围是 $1 < k' < 10$ 。

表 9-3 为常用溶剂洗脱序列表, 在该序列中, 正戊烷的极性为零, 水的极性最大。

表 9-3 常用溶剂的性质(洗脱序列)

溶剂	ϵ° (Al_2O_3)	折光指数 (N_D^{20})	紫外吸收 (nm)	粘度 ($\times 10^{-3} Pa \cdot s$)	沸点 ($^\circ C$)	溶解度参数 (d)
正戊烷	0.00	1.358	210	0.23	36.0	7.1
正己烷	0.01	1.375	210	0.32	68.7	7.3
环己烷	0.01	1.427	210	1.00	81.0	8.2
四氯化碳	0.18	1.466	265	0.97	76.7	8.6
苯	0.32	1.501	280	0.65	80.1	9.2
乙醚	0.38	1.353	220	0.23	34.6	7.4
氯仿	0.40	1.443	245	0.57	61.2	9.1
二氯甲烷	0.42	1.424	245	0.44	41.0	9.6
四氢呋喃	0.45	1.408	222	0.55	65.0	9.1
二氧六烷	0.56	1.422	220	1.54	104.0	9.8
丙酮	0.56	1.359	330	0.32	56.2	9.4
乙酸乙酯	0.58	1.370	260	0.45	77.1	8.6
乙腈	0.65	1.344	210	0.37	81.6	11.8
甲醇	0.95	1.329	210	0.60	65.0	12.9
水	最大	1.33	200	1.01	100.0	21

3. 混合溶剂流动相

混合溶剂流动相是指两种或多种溶剂混合一起组成的流动相, 实际工作中, 改变流动相的组成往往可以改善色谱系统的选择性, 采用混合溶剂做流动相能获得所需的溶剂强度和溶解度。高效液相色谱的流动相按其所起的作用可分为洗脱剂和调节剂两种。前者的作用是将样品溶解, 并将其中各组分进行分离(分离不一定理想), 后者则是调节保留时间长短, 并改善样品中某些分离不理想的组分的分离状态, 如果只用洗脱剂将样

品分离到合乎要求的程度，则不必再使用调节剂，反之，只用洗脱剂，分离性能达不到要求，则需选加调节剂以改善样品中某些分离不理想的组分的分离状态。例如，在进行棉红铃虫引诱剂分离时，如选用苯作流动相图 9-13，四个异构体虽然得以分离，但第三和第四个异构体保留时间太长，分离样品各组分大约要 30min。这时如果在苯中加入 2.5% 的乙醚作为流动相，则有效地调节了保留时间，分离样品各组分只需 15min(图 9-14)。

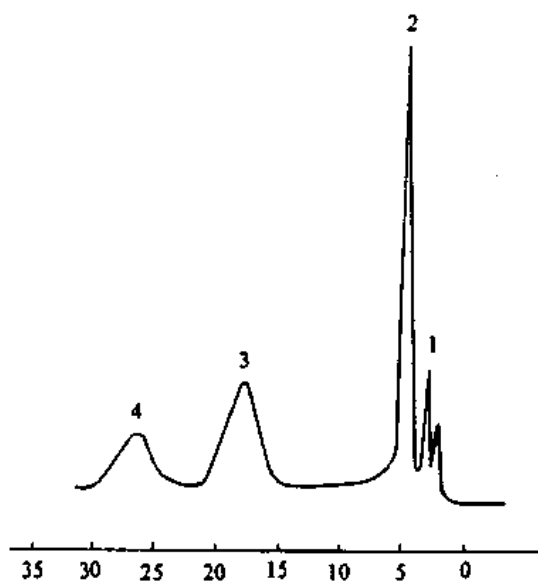


图 9-13 棉红铃虫引诱剂异构体的分离 (一)

操作条件：色谱柱：5×0.45cm(不锈钢)
流动相：苯 流速：0.6mL/min

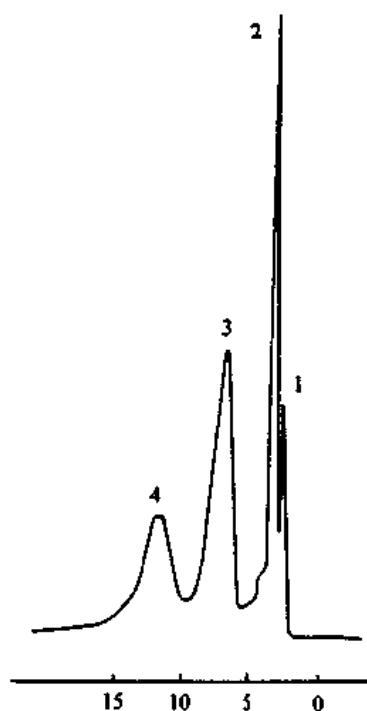


图 9-14 棉红铃虫引诱剂异构体的分离 (二)

操作条件：流动相：2.5%乙醚-苯
其余条件同图 9-13

从上例中我们清楚地看到洗脱剂和调节剂所起的作用，它们的选择和按一定比例进行混合极大地关系着样品的分离效果，必须慎重地进行选择。在正相色谱中，一般是选择低极性的溶剂作为洗脱剂，如苯、正己烷、石油醚等。而调节剂则是根据样品性质(酸、碱、能形成氢键、结合质子和电子的难易等)，选用极性较强的某种溶剂，如醇、醛、酮、酸、酯、醚和胺等。

图 9-15 是以硅胶为吸附剂时两种流动相混合后的 ϵ° 值。从图中可以方便地找到欲选某一溶剂强度的混合流动相时所应取的两种流动相的体积百分数。例如要配制溶剂强度 $\epsilon^\circ = 0.35$ 的混合溶剂，查图 9-15 中乙醚-戊烷系列得：戊烷：乙醚 = 25：75；乙腈-戊烷系列得：戊烷：乙腈 = 96：4。

4. 梯度洗脱

梯度洗脱是在缩短分析时间的同时改善分辨率的技术，它的作用与气相色谱的程序升温相类似。

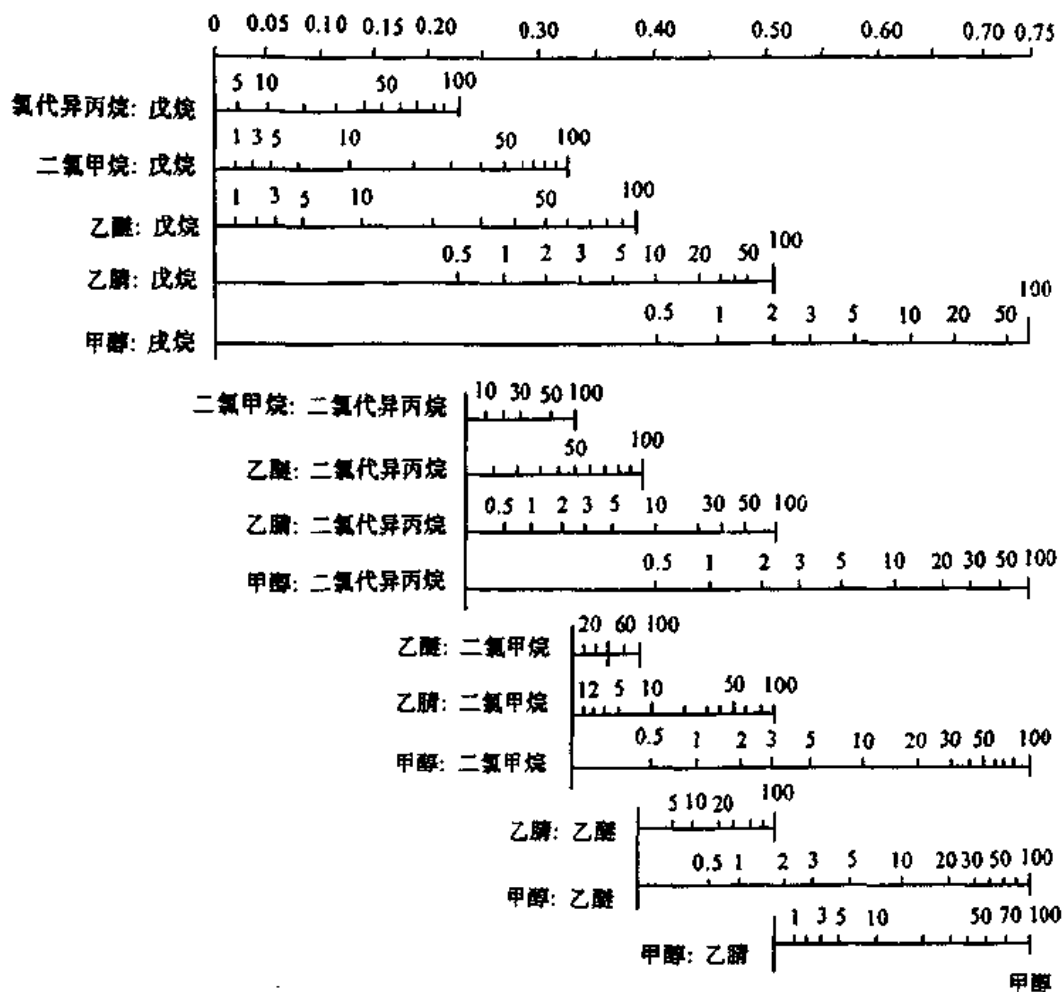


图 9-15 以硅胶为吸附剂时两种流动相混合后的 ϵ° 值

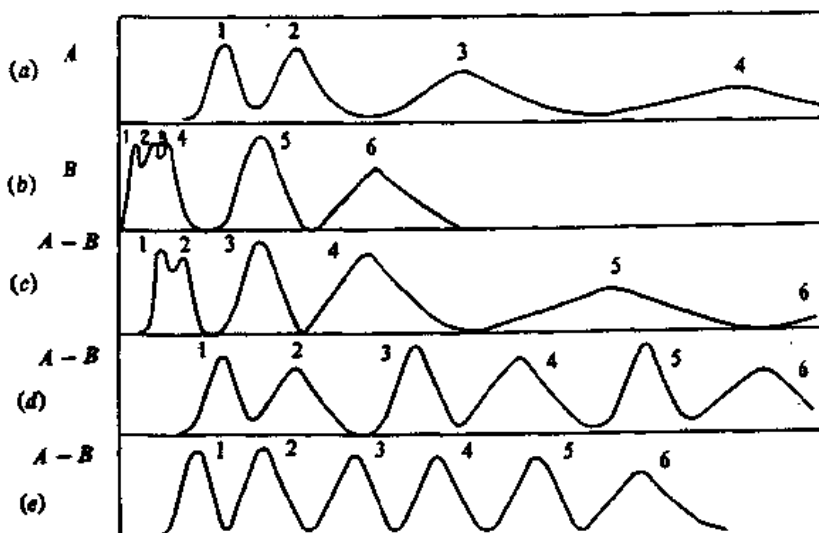


图 9-16 梯度洗脱

在液相色谱中，用单一（或等比混合）溶剂分离复杂的混合物时，样品组分的 k' 值相差很大，结果是流出早的色谱峰 k' 值很小，最后流出的组分则 k' 值又太大。这样，先流出的组分往往分离不好，而流出晚的则保留时间很长，造成峰形扩宽，不易检测，梯度洗脱操作可以解决上述问题。如图 9-16 所示：A 溶液是一种组成的流动相，洗脱时，若样品中各个组分的 k' 相差较大，就会出现 k' 大的组分峰宽而且低，并且分析时间长（见 a）。B 溶液是溶解力强的流动相，洗脱时，各个组分很快被洗脱下来， k' 小的成分达不到分离的目的（见 b）。若将 A、B 溶液适当地混合并找出合适的分析条件，上述情况就会改善（见 c、d）。若样品中各组分的 k' 相差很大，将 A、B 混合流动相的组成随时间改变，也可以缩短分析时间（见 e）。

5. 流动相的选择

(1) 液-固吸附色谱流动相

液-固色谱流动相的选择主要从三个方面考虑：选择最佳的溶剂强度；选择适当的溶剂组成；控制溶剂的含水量。

首先应选择一个最佳的溶剂强度，使流出峰的容量因子均在 $1 < k' < 10$ 范围内，如果一个初始溶剂太强， k' 值太小，就可选择一个较弱溶剂来代替（较小的 ϵ 值），相反亦然，使所有组分的容量因子在 $1 < k' < 10$ 之间。

如果流出峰的 k' 值位于 $1 \sim 10$ 范围内，也就是说，溶剂强度已优化了，仍然有一些组分未能分离，此时，为了改进分离的选择性可改变溶剂组成，但仍需保持原来的溶剂强度，可采用混合溶剂来代替单一溶剂。

液-固吸附色谱可采用中等极性和非极性溶剂做流动相，通常以非极性的有机溶剂为洗脱剂，并加入少量的极性溶剂作调节剂。例如常以戊烷或己烷作洗脱剂，以苯、二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯、甲醇等作调节剂，按一定比例加入洗脱剂中，可以获得强度递增的溶剂序列。注意，精确地控制流动相的含水量，保证分离精度，这点是不能忽视的。

(2) 液-液分配色谱流动相

① 正相色谱 在正相色谱中，极性化合物可在最佳的 k' 值时洗脱。因而，在非极性的流动相中，则需加入一些极性调节剂调节溶剂的强度，以达到适当分离。典型的极性调节剂有甲醇、四氢呋喃、氯仿等。具体调节步骤是：先选择单一的非极性溶剂，使其 k' 值在 $1 \sim 10$ 之间，然后，在已选择好的单一非极性溶剂基础上，加入极性调节剂，以达到组分更好的分离；对 k' 值相差很大的复杂组分，可用梯度洗脱技术。

② 反相色谱 在反相色谱中，非极性的组分可在最佳的 k' 值下洗脱。而且，反相色谱具有分离极性范围较宽的极性组分的能力。水的极性最大，用强溶剂甲醇和乙腈以适当的比例与水混合作流动相，加上适当的其它溶剂，配合梯度洗脱技术就能很好地分离复杂组分。因此，反相色谱的应用范围很广。

③ 离子抑制色谱 离子抑制色谱法的流动相除与反相色谱系统流动相相同外，还要求选择合适的流动相 pH 值范围，这样才能使弱离子化合物得到较好的分离。此外，还要调整好流动相中添加的离子量，抑制试样的解离，提高其存在于非解离状态的几率。

④ 离子对色谱 它又分正相和反相离子对色谱，反相离子对色谱适用性广。

反相色谱不能有效地分离电解质，若在流动相中加入适当的反离子使之与样品离子形成疏水性离子对，就可以在反相系统中分配。因此，改变反离子浓度，可以控制样品的分配系数，得到最佳的 k' 值，从而达到分离的目的。

两个重要的离子对试剂类型有季胺盐离子对试剂和烷基磺酸盐离子对试剂。季胺盐离子对试剂适用于分析酸性物质，常用的有四甲胺、四丁胺、十六烷基三甲胺等。烷基磺酸盐离子对试剂多用于分析碱性物质，常用的有正戊烷基磺酸钠，正己烷基磺酸钠、正庚烷基磺酸钠等。

反相离子对色谱大多使用的是烷基硅胶键合相，流动相的 pH 值应控制在 2~8 范围内，缓冲液的离子浓度也不宜过高。

(3) 离子交换色谱流动相

离子交换色谱过程是在含水介质中进行的，离子交换色谱流动相的选择主要从三方面来考虑：

① pH 值 pH 值对交换基团和样品的离解度有很大的影响。一般来说增加 pH 值，样品的正电性降低，在阳离子交换色谱上样品保留值降低，在阴离子交换色谱上样品保留值增加。

② 离子强度 流动相中离子强度对保留值的影响比 pH 值变化所造成的影响大得多，流动相的离子强度越大，则洗脱能力越强，从而降低组分的保留时间越显著。

③ 缓冲液类型的选择 不同的离子具有不同的离子电荷、离子半径以及离子的溶剂化特性，它们与离子交换基团的作用力也不相同，因而有不同的洗脱能力。例如，阴离子的相对交换能力是：氢氧根离子 > 硫酸根离子 > 柠檬酸根离子 > 酒石酸根离子 > 硝酸根离子 > 磷酸根离子 > 醋酸根离子 > 氯离子。阳离子的相对交换能力是：钡离子 > 钾离子 > 氨离子 > 锂离子 > 氢离子。上述的顺序，对于不同型号树脂会有所不同。

另外，如所用流动相对某组分溶解度增加，则此组分的保留顺序将降低。

(4) 凝胶色谱流动相

凝胶色谱中，多采用粘度低、与样品折光指数相差大的流动相。常用的流动相有四氢呋喃、氯仿、甲苯、水及缓冲液等。

第六节 色谱系统的选择及应用

每一种分离类型都不是万能的，它们各自适用于一定的分离对象。在进行色谱分离时，可根据分析样品本身的特性，如分子量、水溶性或是非水溶性、离子型或是非离子型、极性的或是非极性的、分子结构等来选择。选择方法参见表 9-4。近年来四种类型色谱的应用情况列于表 9-5。

高效液相色谱分析实例

1. 水溶性维生素的分析

色谱条件

色谱柱： μ Bondapak C₁₈ 不锈钢柱，30cm × ϕ 4mm

表 9-4 色谱系统的选择

		分离类型	常用固定相	常用流动相		
试样	分子量大于 2000	溶于水溶液	凝胶过滤色谱	凝胶	水、缓冲液	
		溶于有机溶剂	溶于正己烷和乙醇	凝胶渗透色谱	凝胶	正己烷、乙醇、四氢呋喃
			溶于四氢呋喃和氯仿	凝胶渗透色谱	凝胶	四氢呋喃、氯仿
	分子量子 2000	溶于水溶液	分子量不同的中性化合物	凝胶过滤色谱	凝胶	水
		溶于有机溶剂	非离子型化合物	反相分配色谱	C ₁₈ 柱、C ₈ 柱、苯基柱等	甲醇、乙腈/水
			溶于 NaOH 水溶液	阳离子交换色谱	阳离子交换树脂	缓冲液
			溶于 HCl 水溶液	阴离子交换色谱	阴离子交换树脂	缓冲液
		溶于有机溶剂	离子型	离子抑制色谱(反相)	C ₁₈ 柱、C ₈ 柱、氨基柱、苯基柱等	缓冲液/甲醇、乙腈
				离子对色谱(反相)	C ₁₈ 柱、C ₈ 柱、氨基柱等	反离子/缓冲液
			分子量明显不同	凝胶渗透色谱	凝胶	四氢呋喃、氯仿
			非极性化合物	反相分配色谱	C ₁₈ 柱、C ₈ 柱、苯基柱等	水/甲醇、乙腈
			极性化合物	液-固吸附色谱	硅胶	正己烷、二氯甲烷
		正相分配色谱	氨基柱、氨基柱	正己烷/氯仿、乙醇		

表 9-5 四种类型色谱的应用情况

色谱类型	应用
液-固色谱	前列腺素、激素、激素对映体、止痛药、镇静药、石油化工产品、染料、杀虫剂、抗氧化剂、有机酸、有机碱、芳香族异构体、植物抽提物、动物血液类脂物
液-液色谱	各种维生素、辅酶、激素、甾体化合物、抗生素、中草药成份、医药工业原料石油化工添加剂、杀虫剂、除草剂、环氧树脂、多氯联苯、硝基化合物、偶氮化合物、稀土金属
离子交换色谱	有机酸、酚类、核酸类物质、氨基酸、有机碱、胺类、糖类、细胞代谢物、金属元素
凝胶色谱	肽类、蛋白质、酶的纯化、激素、色素、酚类、芳香酸、类脂体、维生素、烃类、尼龙多聚体

流动相: 甲醇:水 = 25:75, 0.005M 磺基己烷+1%醋酸。

流速: 2mL/min。

检测器: 紫外检测器, 280nm。

结果见图 9-17。

2. 脂溶性维生素的分析

色谱条件

色谱柱：“Permaphase”ODS 不锈钢柱，1m × φ2.1mm

柱温：50℃。

流动相：梯度由 50% CH₃OH / 50% H₂O 到 CH₃OH，以 4% / min 变化。

检测器：紫外-可见光检测器。

结果见图 9-18。

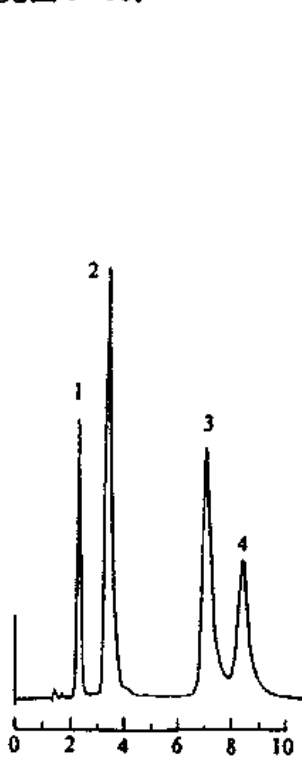


图 9-17 水溶性维生素分析色谱图

1. 烟酰胺 2. 维生素 B₆
3. 维生素 B₁ 4. 维生素 B₂

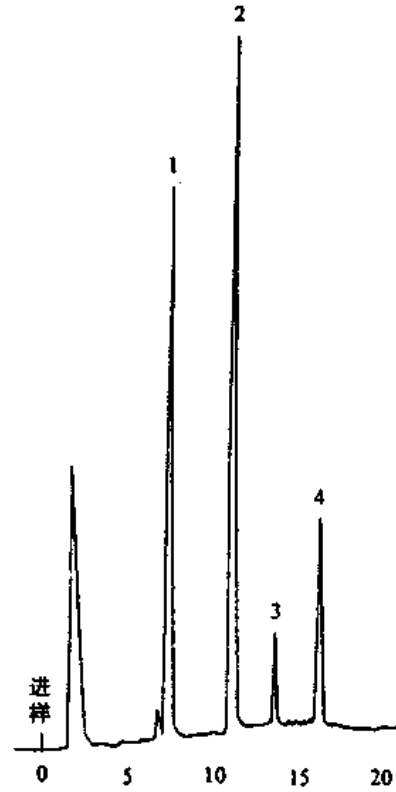


图 9-18 维生素 D₂, A 和 E 乙酸酯的色谱图

1. 苊 2. 维生素 D₂
3. 维生素 E 乙酸酯 4. 维生素 A

3. 糖的分析

色谱条件

色谱柱：Shim-Pack CLC-SIL 不锈钢柱，15cm × φ6.0mm

流动相：0.01%乙二胺的乙腈：水 (72：28.)。

流速：2.0mL / min. 检测器：示差折光检测器。结果见图 9-19

4. 脂溶性色素的分析

色谱条件

色谱柱：碳酸锌柱(不锈钢)，13.5cm × 1 / φ6.3mm

柱温：15℃

流动相：梯度洗脱，贮液槽 1，90mL 己烷，1g BHT (丁基化羟基甲苯)；贮液槽 2，89mL 己烷，1mL 特戊醇；贮液槽 3，65mL 己烷，20mL 特戊醇。

流速：0.5mL / min

检测器：紫外-可见光检测器 (440nm)

结果见图 9-20.

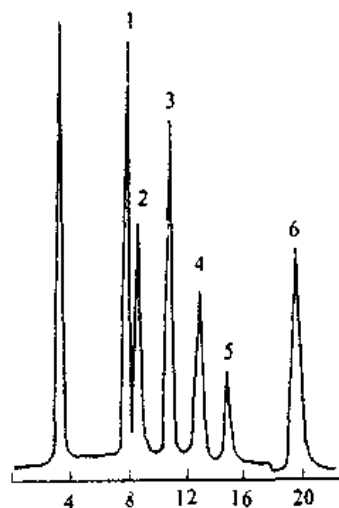


图 9-19 糖标准样品色谱图

1. 果糖 2. 葡萄糖 3. 蔗糖
4. 麦芽糖 5. 乳糖 6. 棉子糖

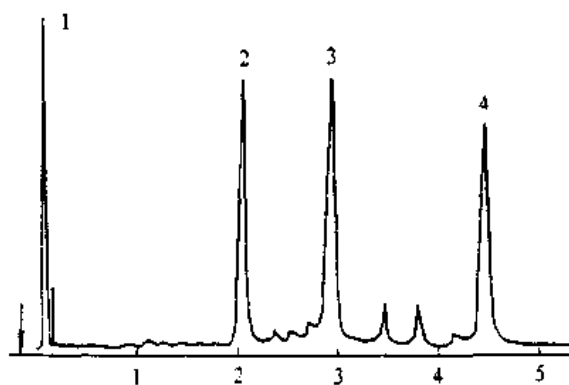


图 9-20 菠菜萃取液的色谱图

1. 胡萝卜素 2. 叶黄素
3. 薑菜黄素 4. 新黄质

5. 五种生物碱的分析

色谱条件

色谱柱： μ -Bondapak C_{18} /Porasil 不锈钢柱，30cm \times ϕ 4mm

流动相： M_1 (25%乙腈的 0.1M NaH_2PO_4 水溶液，pH = 4.8)， M_2 (25%乙腈的 0.1M NaH_2PO_4 水溶液，用 85%的 H_3PO_4 调节到 pH = 2.0)。

流速：1.25mL/min。

检测器：紫外-可见光检测器 (254nm)

结果见图 9-21。

6. 雄性激素的分析

色谱条件

色谱柱：Lichrosorb SI-100- C_{18} 不锈钢柱，30cm \times ϕ 4.2mm

流动相：甲醇：水 (30：20)。

流速：0.3mL/min。

检测器：示差折光检测器。

结果见图 9-22。

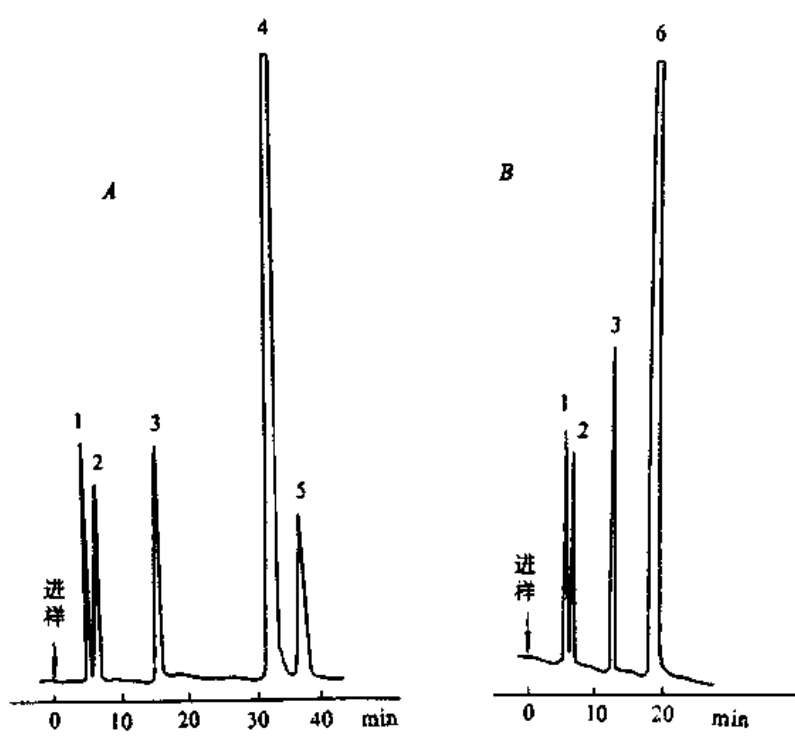


图 9-21 五种生物碱的分离色谱图

A. M_1 作流动相 B. M_2 作流动相

1. 吗啡 2. 可待因 3. 蒂巴因 4. 罂粟碱

5. 1- α -那可汀(noscapine) 6. 蒂巴因和 1- α -那可汀

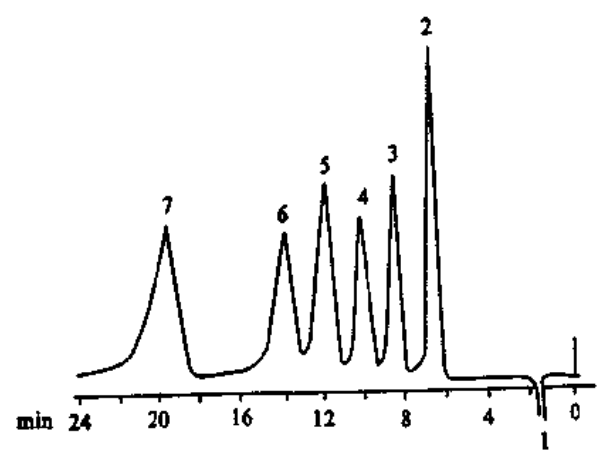


图 9-22 雄性激素的色谱图

- 1. 甲醇 2. 雄甾烯-3, 17-二酮 3. 睾丸甾酮 4. 雄甾烯-3 β , 17 β -二醇
- 5. 5 α -雄甾烷-3, 17-二酮 6. 17 α -甲基-5-雄甾烯-3 β , 17 β -二醇 7. 雄甾醇

第七节 高效液相色谱与氨基酸分析

氨基酸分析是生命科学研究中最重要的技术之一。自从1958年 Spackman stein 和 Moor 建立了最初的氨基酸分析技术以来，随着高效液相色谱技术的发展，氨基酸分析方法也有了很大的进展。反相高效液相色谱法与各种柱前衍生相结合的氨基酸分析技术，显示出各自特有的优越性，构成了具有广泛适用性的现代氨基酸分析技术。

一、氨基酸分析方法、种类和特点

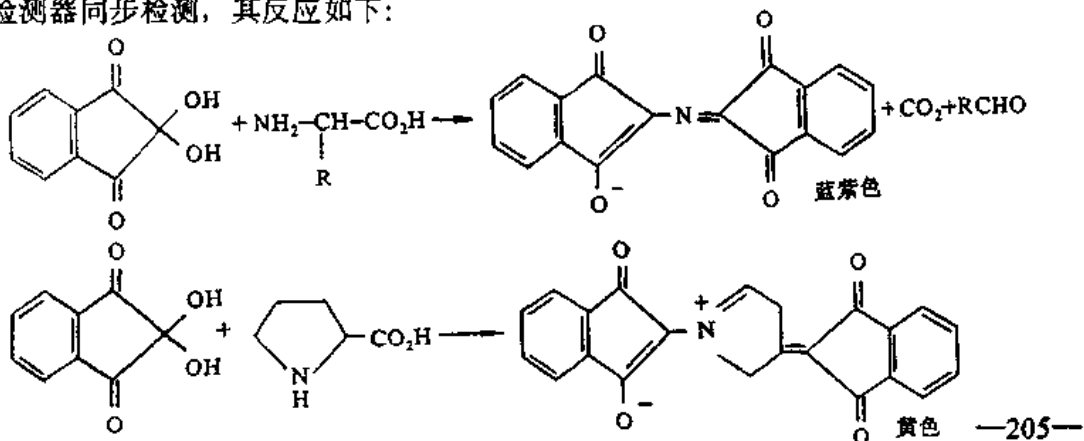
由于大多数氨基酸无紫外吸收和荧光发射特性，示差折射检测器对氨基酸也无足够的灵敏度，为提高分析灵敏度和分离选择性，通常需将氨基衍生，衍生的方式有柱前衍生法和柱后衍生法。

1. 柱后衍生

传统的氨基酸分析技术采用离子交换色谱分离氨基酸，柱后与茚三酮反应。十几年来几经改进方法检测灵敏度已提高到 200~500pmol，分析时间可减至 1h，此法通常需专用的氨基酸分析仪。

用荧光胺 (Fluram) 代替茚三酮能增加氨基酸分析灵敏度，一般几个 pmol 便可进行标准分析 (脯氨酸等亚氨基酸除外)。邻苯二醛 (OPA) 比荧光胺更常用，但 OPA 不直接与脯氨酸反应，需先将脯氨酸用次氯酸钠氧化开环后方可衍生。OPA 法检测下限一般可达 5~10pmol，柱后衍生法的主要缺点是：(1) 色谱仪的结构复杂，需要额外的泵和反应系统以保证柱后衍生试剂与洗脱液均匀混合。(2) 在茚三酮方法中受流速、温度、缓冲液变化的影响较大，检测限在 nmol 以上方为可靠，常需要双波长检测。(3) OPA 法最大的缺陷是不能与亚氨基酸直接反应，而间接氧化步骤需要在脯氨酸被洗脱的瞬间变化柱后试剂，或用不同的试剂分别反应一次。前者不易把握时间，不易校准脯氨酸与邻近氨基酸相对显色值，后者则进一步降低了脯氨酸的检测灵敏度。在 OPA 柱后衍生分析系统中使用高浓度的次氯酸钠，加入与 2-巯基乙醇浓度相同的 3-巯基丙酸，可使脯氨酸等的分析顺利进行。卤素对 OPA 衍生分析系统的腐蚀很严重，要注意分析系统的维护。

当用阳离子交换柱分离出的氨基酸与茚三酮试剂混合，经加热反应后，一级氨基酸与之生成蓝紫色化合物，二级氨基酸与之生成黄色化合物，两种衍生物可用双通道可见光检测器同步检测，其反应如下：



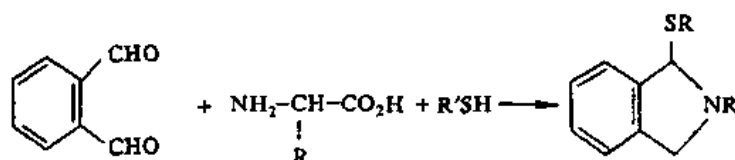
茚三酮柱后衍生法最小检出量为 100pmol, 测定范围在 10nmol, 保留时间重现性 0.2%, 分析精度 1%~2% (CV)

2. 柱前衍生

反相高效液相色谱要求将氨基酸在柱前转化为适于反相色谱分离并能被检测的衍生物, 常用的各种柱前衍生分析法有:

(1) 邻苯二甲醛-巯基乙醇 (OPA) 法

邻苯二甲醛在还原剂巯基乙醇的作用下与一级氨基酸迅速反应生成发荧光的异吲哚衍生物:



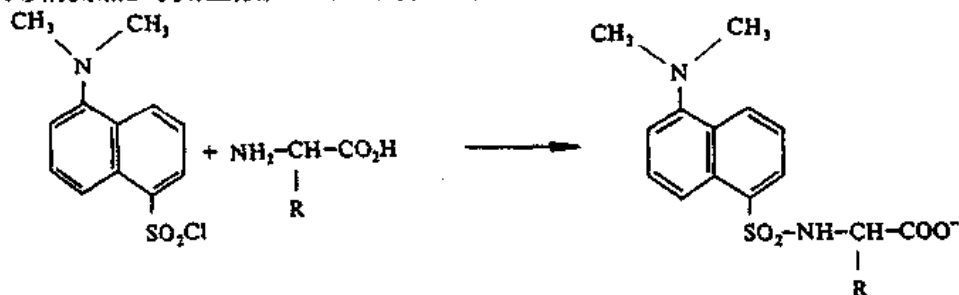
色谱条件是分离柱: Resdve™ 5μm C₁₈ (15cm × 3.9mm), 柱温 25℃.

流动相 A 为 0.05mol/L 醋酸钠和 0.05mol/L 磷酸氢二钠; 甲醇: 四氢呋喃 = 96:2:2; 流动相 B 为 甲醇: 水 = 65:35, 梯度洗脱. 流速: 1.5mL/min, 荧光检测器: Ex 338~340nm, Em 425~450nm.

OPA 柱前衍生法在 27min 内完成 18 种氨基酸分离, 最小检出量为 1pmol 以下. OPA 法的优点是灵敏度和分辨率较高, 过量的衍生试剂无需去除, 缺点是亚氨基酸不能同时检测, 同时在分离过程中会有部分衍生物裂解, 致使 OPA-氨基酸稳定性变差, 尤其是胱氨酸和赖氨酸衍生物的信号衰减很快, 灵敏度较低. 采用 3-巯基丙酸代替 2-巯基乙醇, 可以同时分析脯氨酸等. 由于引入一个 α-羧基, 使氨基酸衍生物的疏水性相对减弱, 由于 OPA-氨基酸衍生物的不稳定, 在分析时多采用全自动在线衍生.

(2) 丹磺酰氯法

丹磺酰氯能与氨基酸反应形成稳定的荧光衍生物:



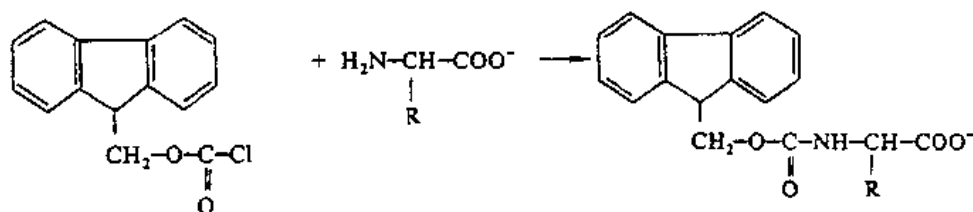
色谱条件: Spherisorb ODS II 3μm (125mm × 4.6mm) 加预柱. 柱温: 25℃. 流动相 A: 15mmol/L 磷酸钠, 3% 四氢呋喃 pH 值 6.3, 流动相 B: 15mmol/L 磷酸钠, 60% 乙腈, pH 值 6.3, 梯度洗脱. 流速: 1.2mL/min. 荧光检测器 Ex: 330nm, Em: 550nm.

丹磺酰氯法在 35min 内可分离 26 种氨基酸, 其线性范围 15~150pmol, 回收率 95% 以上, 该法可以同时分析亚氨基酸, 胱氨酸的测定也能准确. 丹磺酰氯氨基酸衍生物很稳定, 一般在低温避光条件下可稳定 2~3 天. 由于在衍生物形成过程中, 丹磺

酰氯会水解成丹磺酸，氨基酸与丹磺酰氯合适的比例为 1:10。衍生物在紫外光下不稳定，如蛋氨酸衍生物。一般衍生化反应在室温避光反应 40min 左右。

(3) 茚甲氧羰基氯法

茚甲氧羰基氯与氨基酸在 pH 值 7.7 的条件下反应生成有紫外吸收而没有荧光吸收的衍生物。

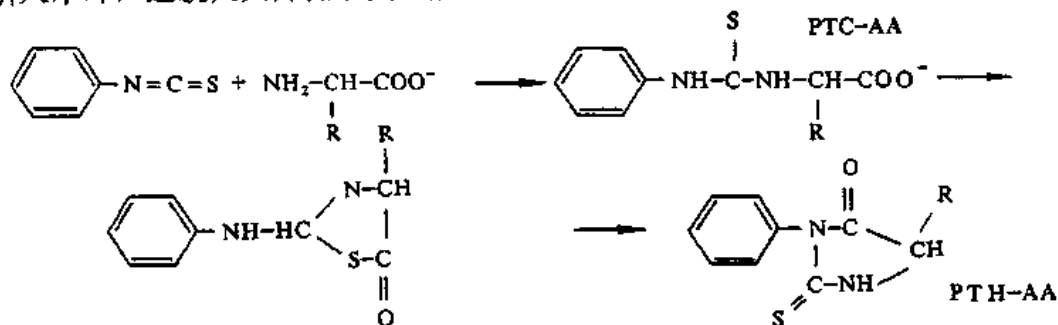


色谱条件：分离柱 Superspher CH-8 (125mm×4.0) 加预柱。柱温：35℃。流动相 A: 50mmol/L 醋酸钠，20% 乙腈，pH 值 4.2。流动相 B: 50mmol/L 醋酸钠，70% 乙腈，pH 值 4.2 梯度洗脱。流速 1.5mL/min。荧光检测器 Ex 265nm, Em 310nm。

使用该方法在 35min 内可分离二十多种氨基酸检测精度 1.9%~3.6% 最小检出量是 1pmol。茚甲氧羰基氯-氨基酸的衍生物稳定性极好，在 4℃ 避光可放置 10 天。该方法的缺点是组氨酸形成单、双衍生物的比例不稳定，影响定量。过量的试剂及其水解产物有荧光干扰，上机前应用戊烷抽提去除，防止茚甲氧羰基氯-氨基酸自发降解，但抽提效率只有 70%。加入胺基金钢烷与过量的茚甲氧羰基氯反应，可去除干扰，替代萃取步骤并简化衍生。

(4) 异硫氰酸苯酯法 PITC

苯乙内酰硫脲氨基酸衍生物 (PTH-AA) 用于蛋白质顺序分析已有几十年历史，异硫氰酸苯酯与氨基酸衍生反应可形成 PIC-氨基酸 (PTC-AA)，在原来的氨基酸结构上引入苯环，这就大大降低了氨基酸的极性，提高了紫外检测灵敏度，衍生反应如下：



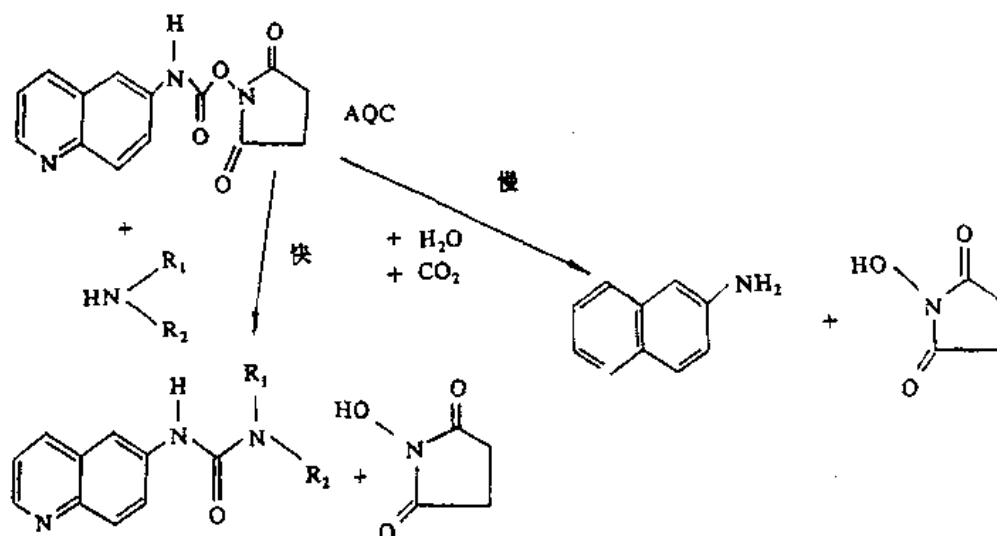
色谱条件：分离柱：PICO·Tag™ 氨基酸分析柱 (3.9mm×1.5cm)。柱温：38℃。流动相 A: 19.0g 三水醋酸钠，0.5mL 三乙胺溶于 1L 水中，冰乙酸调节 pH 值 6.40，940mL 该溶液加入 60mL 乙腈，混合。流动相 B: 60% 乙腈。梯度洗脱。流速 1.0~1.5mL/min。紫外检测器：254nm。

异硫氰酸苯酯衍生法，可以同时与一级和二级氨基酸在 10min 内完成衍生反应，由于 PTC-氨基酸不具荧光，在使用 PICO·Tag 柱时检测限可达 1pmol，并可在

12min 完成蛋白质水解氨基酸的一次色谱分离。重现性 0.5%，分析精度 2%~4%。PIC-氨基酸很稳定，室温下可放置数小时，在 4℃ 可放置数天。异硫氰酸苯酯试剂进入柱子使填料过早老化，因此过量的衍生试剂需真空干燥除掉。

(5) 6-氨基喹啉基-N-羟基-琥珀酰亚胺基甲酸酯法 AQC

AQC 在 (pH 值 8~10) 数秒钟内与氨基酸反应生成稳定的脲类荧光衍生物，由于该衍生物同时带有 6-氨基喹啉基团，使它具有较强的紫外吸收，其反应如下：



色谱条件：分离柱：Waters ACCQ.Tag (3.9mm×15cm C₁₈) 柱。

柱温：37℃。流动相 A：40mmol/L 醋酸钠，17mmol/L 三乙胺，磷酸调节 pH 值为 5.02，流动相 B：60% 乙腈，梯度洗脱。流速：1.0mL/min。荧光检测器 Ex:250nm, Em:395nm。

该方法能同时检测一级和二级氨基酸，胱氨酸的荧光信号相对较弱，最小检出量一般为 1pmol。AQC-氨基酸可在 35min 得到分离，用紫外检测器灵敏度可达 0.06~0.3pmol。过量的 AQC 试剂的水解产物的荧光发射波长与 AQC-氨基酸的荧光发射波长相差 60nm，故不需除去多余衍生试剂和水解产物。分析过程中流动相 A 的 pH 值和洗脱温度要控制准确，pH 值的变化往往会导致天门冬氨酸和谷氨酸分离不佳。温度的变化可使精氨酸和苏氨酸，胱氨酸和酪氨酸分离度变差。

3. 比较和选择

用柱后和柱前衍生化的两大类氨基酸分析方法各具特色，在应用时应根据具体情况灵活选择。经改进和完善的柱后衍生离子交换色谱法仪器已具备很高的自动化水平，被分离的氨基酸在特有的柱后氧化及衍生设备中按固定程序与衍生试剂迅速反应并被检测，消除了由于衍生时间、衍生温度等因素的差异而带来的测试误差，而衍生试剂不直接进入色谱柱使柱寿命延长，同时也可通过种种再生方法延长离子交换树脂固定相的使用时间。茚三酮柱后衍生可以分析几乎所有氨基酸和氨基酸衍生物，蛋白质水解氨基酸之间不存在明显的衍生后灵敏度变化，该类方法的分析技术手段繁多，对样品中可能存在的杂质适应性好，但分析周期时间较长是离子交换色谱法的不足。柱前衍生反相分配

色谱分析法突出的优点是灵敏度高,分析时间短。从仪器分析工作本身的要求出发,高灵敏度带来的精度变差是值得注意的问题,生理体液氨基酸分析,对于(超低量)样品,使用柱前衍生反相色谱分析是合适的,选择PITC和AQC衍生方法,使脯氨酸和胱氨酸能够同步检测。从经济角度出发采用柱前衍生分析氨基酸,有一机多用的优点。

二、氨基酸的分析

高效液相色谱法分析氨基酸的方法很多,这里介绍柱后衍生离子交换色谱法分析蛋白质水解氨基酸,生理体液氨基酸和特殊氨基酸。

在蛋白质水解氨基酸分析中,蛋白质(水解)氨基酸的分析主要有样品水解,去除水解试剂,上机分析三个过程。蛋白质的水解一般采用酸水解法,常用的酸是盐酸和甲烷磺酸。由于色氨酸在盐酸水解时发生破坏,一般采用碱水解法,常用的碱为氢氧化锂和氢氧化钠,甲烷磺酸也可用于含色氨酸蛋白质水解,但价格较高,以盐酸为水解剂的水解条件一般为 6mol/L HCl , 110°C 24h。以氢氧化锂为水解剂的水解条件一般为 4mol/L LiOH , 110°C 20h。提高水解温度可以减少水解时间(如 160°C 4h)。近年来采用微波辅助水解技术,水解时间仅数分钟。

在蛋白质水解过程中,由于氨基酸的侧链结构不同,含有亲水侧链的苏氨酸和丝氨酸容易水解。而异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸这些烷基侧链氨基酸之间的肽键则不易水解。芳香族氨基酸在水解时会由于卤代反应使回收率下降。含硫氨基酸在水解时发生部份氧化也使回收率和分析精度下降,在水解系统中加入还原性试剂和真空或充 N_2 处理,有一定作用,经典的方法是采用过甲酸氧化含硫氨基酸,单独分析含硫氨基酸的氧化衍生物。去除水解试剂(酸)的方法多为在加热真空条件下,反复蒸去盐酸,磺酸和氢氧化锂,由于用量一般较少则采用中和的方法去除。蒸发除酸时的样品转移过程和酸浓度降低后的加热过程引起的褐变反应,可导致回收率降低。上机分析如使用专用的氨基酸分析仪,应注意样品浓度,使之接近标准品的浓度,以保持良好的线性关系。在用没有自动进样系统的仪器分析时应考虑用内标法定量,以减少分析误差。当样品数量较多,而要分析的氨基酸种类只有一个或几个时,可通过改变分析程序,采用所谓的“短程序分析法”即在色谱分离过程中快速洗脱不需检测的氨基酸,当分离被定量分析的氨基酸时,采用正常分离手段,此后再采用快速洗脱方式。这种分析方法主要目的在于节约试剂和减少分析时间。

1. 蛋白质水解氨基酸的分析

采用保护性氧化,盐酸水解蛋白质,在一次水解及分析中同时分析17种氨基酸和3种含硫氨基酸的衍生物,氧化的同时不破坏其它氨基酸并在较短的时间内完成上机分析。

(1) 基本分析过程

样品用2%苯酚0.25mL湿润,再用过甲酸试剂室温氧化1h,氧化完毕,用16.8%偏重亚硫酸钠,0.26mL除去过甲酸并有过剩以维持水解时处于“还原”状态。加 6.67 M HCl 9mL,封管水解 $110^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 24h,水解后在火焰上开管,用(pH值2.0)柠檬酸缓冲液协助洗出水解液,用 6M NaOH 中和至pH值1.5~2.0,过滤后上机分析。

(2) 方法特点

采用过甲酸氧化含硫氨基酸，使回收率提高，加入酚做为卤素的清除剂兼有表面活性剂作用，偏重亚硫酸钠用以去除氧化剂，稍过量的偏重亚硫酸钠所产生的二氧化硫在水解时起到抗氧化作用，含硫氨基酸及其衍生物的同时分析缩短分析时间，也避免了氧化不完全等因素造成的分析误差，采用中和法除酸，减少了转移误差和避免了褐变，提高了分析精度，中和产生的高浓度钠离子，影响色谱分离，调整上机样品的 pH 值 < 2.0，使用酸性的缓冲液创造酸性的色层背景可以克服高浓度钠离子的影响。

2. 色氨酸的短程序分析

采用氢氧化锂水解蛋白质，用短程序分析法分析，色氨酸峰形好，峰的起始点和结束点检出得到明显改善，提高了分析的准确度和精确度。

色氨酸短程序分析的基本过程：

样品置于聚四氟乙烯管中，加入 2mL 4mol/L 氢氧化锂，外套玻璃管，充入 N₂ 后封管，于 110℃ ± 1℃ 水解 20~24h，冷却后开管，用 pH 值 4.0 柠檬酸缓冲液将水解物移入 25mL 容量瓶，并加 4M HCl 2mL 中和、洗涤水解管，最后合并定容至 25mL，用 0.2μm 滤膜过滤后上机分析。

3. PITC 柱前衍生化法分析蛋白质水解氨基酸

试剂：乙腈，三乙胺 (TEA)，异硫氰酸苯酯 (PITC)，盐酸，醋酸钠，甲醇，冰乙酸，超纯水，氨基酸标准品，内标物 α-氨基丁酸。

仪器：ALC204 高效液相色谱仪 (Waters)，2M6000A 型溶剂传送系统，紫外检测器，M720 系统控制器或 840 型数据控制站，M710B Wisp 自动进样器 (waters)，电子天平。

分析：

在分析蛋白质和肽时使用的是盐酸水蒸汽进行水解，而不采用直接加 6M HCl 到样品中，这种水解方法引入的杂质更少，水解后干燥 (除酸) 也更快，在 6 × 50mm 样品小管中加入约 0.5~10μg 蛋白质样品，200μL 含 0.5% 苯酚的 6M HCl 溶液于真空瓶底部 (注意不是加至样品小管内)，经 3 次充 N₂ 抽真空交换操作后，在 114℃ ± 2℃ 水解 24h，冷却后，擦去样品小管外部多余 HCl，真空干燥后待衍生化，如果分析色氨酸则采用碱水解法，取 1~3mg 蛋白质样品置于聚四氟乙烯中，准确加入 20μL 4M 氢氧化钠溶液，将样品管置玻璃管中充 N₂ 后封口，在 110℃ ± 1℃ 水解 24h，冷却后，用过量的乙酸中和，干燥后待衍生化。(PICO, TAG 法) 衍生化：取含有蛋白质水解物的样品小管加入 10μL 再干燥剂 (乙醇或甲醇：水：三乙胺 = 2：2：1)，漩涡搅拌后，真空干燥，干燥后加入 20μL 衍生试剂，(乙醇或甲醇：水：三乙胺：异硫氰酸苯酯 = 7：1：1：1) 搅拌均匀在室温下放置 20min，然后溶解后上机，真空干燥，加入 100μL 稀释液 (2M 的 Na₂HPO₄，5% 乙腈，pH 值 7.4) (当样品不是纯蛋白时，可参考常规样品的酸水解方法，取水解液 10μL 于 6 × 50mm 小管内真空干燥及再干燥后衍生化)。

色谱条件：使用 PICO · TaG 专用分析柱 (Waters) (15cm × 3.9mm) 柱温 38℃，流动相 A 0.14M 醋酸钠溶液含 0.5mL 三乙胺 / L，用冰乙酸调 pH 值至 6.4，过滤后取此溶液 940mL 与 60mL 乙腈混合，流动相 B 取 600mL 乙腈 + 400mL 超纯水混合。(流

动相均以超声脱气后使用)。

梯度洗脱程序: 1.0mL/min, 0.0min 时为 100% A, B 为 0%, 10min 达到 46% B, 10.5min 时达到 100% B 并维持到 11.5min, 12min 时以 1.5mL/min, 100%, 12.5min 回到 100A, 检测器: 紫外检测器 254nm。

样品水解液和标准品在室温下 10h 内是稳定的, 随着衍生物的老化, PTC-氨基酸将转变成 PTH-氨基酸, 给定量造成困难。用 PTC-氨基酸衍生物分析氨基酸线性范围在 20~500pmol, 检测限为 1pmol, 当氨基酸含量约 250pmol 时, 衍生和色谱分离的平均重现性以相对标准偏差 (RSD) 为 1.5%, 分析纯化过的蛋白质样品中氨基酸的总重现性 (包括水解, 衍生和色谱分离) 为 4% (RSD)。

思考题

1. 比较气相色谱与液相色谱的异同点?
2. 简述液-液色谱、液-固色谱、离子交换色谱、凝胶色谱的分离原理。
3. 试述紫外-可见光检测器, 荧光检测器, 示差折光检测器的检测原理及各适用于哪些化合物?
4. 何谓正相色谱, 反相色谱, 离子对色谱, 离子抑制色谱?
5. 采用反相高效液相色谱法测定氨基酸时, 常用的柱前衍生分析法有哪些?
6. 简述柱后衍生离子交换色谱法分析蛋白质水解氨基酸的基本过程。
7. 在高效液相色谱分析中, 选用 ODS 为固定相, 乙腈水溶液为流动相, 判断下列组分的流出顺序, 并简述理由。
①苯甲酸; ②苯甲酸甲酯; ③苯甲酸乙酯; ④苯甲酸丁酯

第十章 薄层色谱法

第一节 概述

薄层色谱 (Thin Layer Chromatography, 简称 TLC) 法是近年来使用较多的一种色谱方法, 1889 年荷兰生物学家 Bogerick 首次进行了实验。1938 年前苏联科学家 Izmailov 和 Schraiber 在玻璃板上涂 Al_2O_3 , 把植物提取液点在薄层板上, 再滴加溶剂至样品中心, 使组分展开成同心圆, 他们称这种色谱为“滴色谱”。50 年代初, Kirchner 等美国化学家对薄层色谱的吸附剂、粘合剂、展开方法以及显色方法进行了研究, 1956 年 Stahl 发表了薄层色谱论文, 他把薄层色谱方法标准化, 并设计了一套仪器, 研究出几种实用的吸附剂, 并使它们商品化, 这些工作使薄层色谱作为一门学科, 得以确认。薄层色谱是在经典柱色谱和纸色谱的基础上发展起来的一种色谱技术, 到 60 年代后才得到广泛的应用。薄层色谱仍属液相色谱法的范畴, 其基本原理和分离方法与液相色谱相同相似, 故薄层色谱被称作“开口柱”, 并广泛应用于化学、生物、医药、环保、卫生、食品、轻工、化工、农林牧等领域, 成为重要的实验技术。

第二节 薄层色谱法的基本原理

一、基本原理

薄层色谱是开放型的色谱法, 它是将固定相均匀地在一个平板表面涂成薄层, 然后将要分离的混合物点在薄层板上, 再将这种薄层板与展开剂接触 (展开剂相当于柱色谱中的流动相), 展开剂则根据薄层中固定相颗粒间隙的毛细作用力在薄层板上浸润扩展, 点在薄层上的样品各组分依不同的速度随展开剂移动, 最后分别停留在点样原点和展开剂浸润前沿之间的不同位置上形成一个个斑点而被分离开。可以根据这些斑点在薄层上的位置定性, 或进一步地借助其它手段定性和定量。薄层色谱按其所用固定相的性质及分离机理可分为吸附薄层色谱、分配薄层色谱、离子交换薄层色谱和凝胶过滤薄层色谱等, 其分离机理也分别与柱色谱的吸附、分配、离子交换、凝胶过滤色谱相似。薄层色谱法中应用较多的是吸附薄层色谱, 所以本章将重点介绍吸附薄层色谱。

二、薄层色谱的特点

薄层色谱具有设备简单, 操作方便, 分离快速, 灵敏度及分辨率高, 显色剂选择性好, 切割色带较柱色谱方便的优点。因此, 在分离、分析及微量制备上基本取代了纸色谱法及经典柱色谱法。薄层色谱法最突出的特点是对许多样品可同时实行分离。薄层色谱的固定相使用一次即弃去, 每个样品都在新的色谱床上分离, 因此没有样品交叉污染及固定相逐渐改变性质的问题。薄层色谱对样品的预处理要求较低, 对固定相和流动相的选择具有较大自由度, 无需考虑流动相对固定相是否有害, 也不必过多考虑流动相的吸收波长, 因为完成分离之后通过干燥即可将其除去。薄层色谱法非常适合于样品中含

有不易从分离介质脱附或含有悬浮微粒以及需要色谱分离后衍生化处理的样品分析。

表 10-1 普通薄层色谱与高效薄层色谱的比较

		TLC	HPTLC
薄层尺寸 cm × cm		20 × 20	10 × 20 10 × 10
吸附剂		硅胶	硅胶
平均粒度 μm		20	5
薄层厚度 μm		100~250	200
点样量 μL		1~5	0.1~0.2
原点直径 mm		3~6	1~1.5
展开后斑点直径 mm		6~15	2~5
展开距离 cm		10~15	3~6
分离时间 min		30~200	5~20
有效塔板数		<600	~5 000
点样数		10	18~36
物质质量/斑点	吸光 μg	约 0.05~5	约 0.005~0.5
	荧光 ng	约 1~1 000	约 0.1~100
检出极限	吸光 μg	0.005~0.05	约 0.000 5~0.005
	荧光 ng	0.1~1	约 0.01~0.1

三、薄层色谱与高效液相色谱的比较

一般认为高效液相色谱法在分析可靠性方面优于薄层色谱法，但是，薄层色谱法在选择性或专属性方面则与高效液相色谱法相当，甚至要优越些，特别是单个样品的分析成本，薄层色谱法就更优于高效液相色谱了。现在，薄层色谱法在材料和技术上得到很大发展，于是有了高效薄层色谱法 (HPTLC)，它使用更细小的固定相微粒制备薄层板，因而在分离容量，分离效率，分析能力，灵敏度和重现性等多方面大大超越了薄层色谱。这些优点使高效薄层色谱可以和气相色谱及高效液相色谱相媲美。在高效液相色谱方法中，一般分离柱很难在最佳条件下操作，样品组分在柱体上的不可逆吸附，往往限制了其应用的普遍性。高效薄层色谱可以提供一种优良、快速、直观、廉价且足够精密的高效液相色谱预试技术。从定量分析的可靠性方面看，一种定量分析方法要获得广泛应用，必须满足三个基本要求：一是其技术原理能充分利用待分析样品化合物的理化特性，二是能够达到所要求的分析精度、灵敏度和选择性，三是操作成本包括设备、材料等应在合理的范围内。仪器化的高效薄层色谱法已在很大程度满足了这些基本要求。

第三节 薄层色谱法的基本技术

薄层色谱法的工作过程是不连续的，是分阶段进行的，其基本步骤如下：

薄层制备→点样→展开→定位→定性定量。

一、常用固定相及其选择：

1. 硅胶是薄层色谱中最常用的一种吸附剂，它的骨架由多孔的硅氧环组成，表面

有许多硅醇-Si-OH基团，其-OH基团与极性化合物及不饱和化合物相互吸引，它还能吸附水分，成为水合硅醇基-Si-OH₂，因而硅胶具有很强的吸附能力。由于硅醇基的解离作用-Si-OH \rightleftharpoons SiO⁻+H⁺，使硅胶呈酸性（pH=4.5）。因此它适合于中性、酸性物质的分离，如酚、醛、生物碱、甙体化合物以及氨基酸类。硅胶不适用于分离带有多个亲水基的高分子化合物。薄层色谱用的硅胶颗粒大小为10~40 μ m，并具有较高的比表面（约600m²/g）。目前商品出售的薄层色谱用硅胶大致有以下几类：含有粘合剂的硅胶（一般含5%~15%的石膏），如硅胶G；不含粘合剂的硅胶，如硅胶H；加入荧光指示剂的硅胶，如硅胶GF₂₅₄，硅胶HF₂₅₄，硅胶HR。

加入粘合剂的目的是增加薄层的强度，加入荧光指示剂是为了创造荧光背景而有利于有紫外吸收的化合物的检出。

2. 氧化铝

氧化铝是一种无机吸附剂，有弱碱性（pH=9）、酸性（pH=4）及中性（pH=7.5）三种。弱碱性氧化铝用来分离中性或碱性化合物，如多环碳氢化合物类、生物碱类、胺类、脂溶性维生素及醛酮类；中性氧化铝适用于酸性及对碱不稳定的化合物的分离；酸性氧化铝可以用于酸性化合物分离。氧化铝的吸附性比硅胶弱，但它能显示出与硅胶不同的分离能力，因此某些在硅胶上不能分离的混合物，能在氧化铝上得到很好的分离，对于某些弱极性的物质如芳香烃类化合物可使用活性大的氧化铝进行分离。值得注意的是某些化合物在氧化铝上发生次级反应。薄层色谱用的氧化铝其颗粒大小一般在40 μ m左右，比表面约为100~250m²/g，它的种类与硅胶相似。

3. 硅藻土

硅藻土是一种无机吸附剂，在薄层色谱法中虽不及硅胶和氧化铝那样被广泛使用，但对于吸附性弱，极性大的亲水物质却有良好的分离能力。它的比表面小，（约1~4m²/g），孔径大，颗粒约60 μ m。硅藻土的种类分为含有粘合剂和不含粘合剂两种。

4. 三硅酸镁（佛罗里土）

三硅酸镁对脂肪、油类及腊质有良好的吸附能力，因此被广泛地应用于柱层析来分离含油、脂肪或腊质较多的样品中的各类农药，后作为薄层色谱的吸附剂。它特别适用从脂肪或油类含量较高的样品中分离有机氯、有机磷及氨基甲酸酯类农药。

5. 纤维素

用于薄层色谱的纤维素品种很多，主要有分配层析用及离子交换层析用两大类。分配层析用的纤维素如普通天然纤维素，微晶纤维素等，它们主要适合于亲水性物质的分离，纤维素薄层的用途与滤纸相似，但在同一条件下，比纸层析分离效果好。

纤维素经化学处理可制成各种改良纤维素，种类有阳离子交换羧甲基纤维素（CMC），阴离子交换的二乙基氨基乙基（DEAE）、三乙氨基（TEAE）以及氨基乙基（AE）纤维素等，离子交换纤维素主要用于核酸及其它物质的分离。商品中也有加了荧光指示剂的纤维素，用于吸收紫外光的化合物的检出。纤维素薄层不适用于破坏性很强的显色剂。

6. 聚酰胺

聚酰胺为有机吸附剂，聚酰胺分子内的酰胺基能与酚类、酸类、醌类及硝基化合物

等形成氢键。由于这些化合物中酚羟基数目及位置的不同，而导致聚酰胺对其产生不同的吸附力，遂使其分离。

7. 葡聚糖凝胶

利用分子筛的原理，在凝胶过滤薄层色谱上分离蛋白质、多肽、核酸、酶与多糖等亲水性大分子物质。

8. 化学键合固定相

将非极性不同碳链长度的烷基共价键合于微粒硅胶表面游离的羟基上，常用的有键合十八烷基 C_{18} 、辛基 C_8 和乙基 C_2 等键合固定相。应用于反相分配薄层色谱时，性能稳定，重现性好，该物质也常用于 HPLC 反相色谱分析。

二、固定相的特点

薄层色谱法可以避免柱层析法中由于柱管壁与吸附剂或吸附剂之间的流速不均一，而造成分离能力下降。薄层色谱中试样与吸附剂的重量比要比柱层析低几百倍，在薄层色谱中板高受吸附剂平均颗粒均匀程度以及薄层质量的影响，当吸附剂颗粒小，流动相展速慢时，容易达到平衡，这时质量传递的阻滞可忽略。用微粒吸附剂制成的薄层在展开速度，点样数，定量精度，检出灵敏度及分离效率等方面比普通薄层方法提高很多，因此被称为高效薄层色谱。薄层色谱用的吸附剂在制成薄层后有以下几个要求：

1. 吸附活性稳定，分离能力强。由于做为固定相的吸附剂的活度直接影响分离能力，因此在吸附薄层色谱中必须严格控制薄层板的活度。

吸附剂的活度是由含水量多少决定的。用湿法制备薄层板加入大量的水，为使吸附剂具有一定的活度，必须严格控制干燥条件，才能确保吸附剂薄层活度的稳定性。

2. 展开时有快速毛细管作用。薄层的毛细管作用对分离效果的影响较大，故薄层应有快速的毛细管构造，对硅胶薄层的检验方法为：在普通展开槽中，以苯为展开剂，展开 10cm 所需的时间应在 45min 以内（一般为 30min），若超过 45min，说明毛细管作用差。粘合剂使用过多会影响毛细管作用。

3. 薄层的表面光洁度要好，厚度均一，并且机械强度高。这些特性影响展开速度和分离效果。表面光洁平整对于光度扫描测定十分重要，由于是采用反射法测定，表面反射性状是很重要的参数。薄层的机械强度直接影响点样、垂直展开、加热、喷雾显色等过程。薄层脱落直接影响定量分析。

三、薄层的制备

将吸附剂均匀涂布在玻璃板、塑料片或铝箔等各种预制板上，薄层有不含粘合剂的软板和含有粘合剂的硬板两种，不含粘合剂的软板疏松，使用不便，硬板是在吸附剂中加入适当粘合剂后用湿法涂敷成薄层板。薄层涂敷装置有两类：一类是手工为动力的涂布器，一类是电动涂布器。粘合剂的加入可以增加薄层的强度，理想的粘合剂要求亲水性好、粘结力强和具有化合惰性。但加入粘合剂的品种和用量会影响薄层色谱分离的效果，应根据实验要求确定，常用的粘合剂如煨石膏一般用量在 12%~14%，对与钙离子有反应的薄层色谱分离则应避免使用。羧甲基纤维素一般在 0.3%~1%；聚乙烯醇 (PVA) 一般在 0.3%~0.5%；亦可以两种粘合剂混合使用。用于预制板的粘合剂有聚乙烯醇，聚丙烯酸或聚丙烯酰胺等高分子化合物。常用吸附剂制备薄层板的方法如下：

1. 硅胶薄层的制备

在研钵中加入 30g 硅胶 G 或硅胶 G₂₅₄，先加入约 50mL 蒸馏水搅匀，再加入约 50mL 蒸馏水研磨混匀呈粥状悬浊液，该悬浊液不能有气泡和块状物，为减少其表面张力，亦可再加入 2~5mL 乙醇在研钵中混匀，倒入涂布器中铺成薄层板。涂布器应预先擦净及水平放置。注意整个操作应在 2~4min 内完成（从第一次加 H₂O 计时），否则硅胶 G 将失去流动性。一般 30g 硅胶 G 可以得到成品薄层板 10×20cm 16 块，厚度 300μm。薄层板晾干后，根据使用要求进行活化（烘干）处理，一般在 100℃~120℃ 加热 30~60min。

不含粘合剂的硅胶 H、硅胶 HF₂₅₄ 等在用湿法涂布时，对玻璃板有一定的固着性。

对于硅胶 G 类或硅胶 H 类吸附剂可以加入粘合剂制成“硬板”，羧甲基纤维素 (CMC) 或聚乙烯醇 (PVA) 是常用的粘合剂。

2. 氧化铝薄层的制备

称取 30g 氧化铝 G 或 GF₂₅₄，加入 50mL 蒸馏水在研钵中研混均匀，再加入约 20mL 蒸馏水研匀，按硅胶 G 的涂布方法制成薄层板，晾干后于 105℃ 活化 30min。用氧化铝 H 或氧化铝 HF₂₅₄ 制备时用水量酌减。

3. 纤维素薄层的制备

在制备纤维素薄层时，玻璃板要求非常的清洁，否则会影响其固着性及分离能力。称取 25g 纤维素放入吸滤瓶中，加入 140mL 蒸馏水，（微晶纤维素为 100mL）混匀放入电动匀浆器在低速下搅拌 1min，如气泡过多，可倒入吸滤瓶中真空抽气 1min 后倒入涂布器中制成薄层板，薄层板在空气中干燥 30min，再于 105℃ 中加热 10min。

4. 薄层的厚度

薄层的厚度对分离效果及展开时间均有一定的影响，实验证明，硅胶薄层厚度在 20~100μm 之间，其 R_f 值变化大，分离能力差，但厚度在 200~300μm 时 R_f 值稳定，分离能力好。制备用薄层要求厚度为 0.5~2mm，用于酶抑制-薄层色谱分析的厚度以 400~500μm 为佳，因为可以喷施较多的酶液保持一定湿度，有助于显色灵敏度的提高。

四、点样

点样是将待测样品溶液点在薄层板上，点样量及点样器的选择决定分析的目的、样品溶液的浓度及被测物质的检出灵敏度。如果仅仅是为了定性分析用内径约 0.5mm 管口平整的毛细管或微量注射器将样品溶液点在距薄层底边约 1~2cm 处，点样直径不超过 5mm，点间距为 1~1.5cm 即可。在进行薄层定量分析时，原点直径的一致性，点样量，点样处薄层破坏的程度，点样距等，都是保证定量精度的关键。为保证点样质量，使用仪器化的专业点样器是必要的。

1. 点状点样。

点状点样可采用定量毛细管、螺旋微米进样器和电动点样等几种方式。毛细管式的微量点样器装在手动的点样器的磁性点样头上，毛细管借恒定的压力接触薄层表面，点间距离由带标尺的装置控制。螺旋微米纳升级进样器及微升级进样器由测微千分尺控

制，以使点样位置精确，电动型的点样装置完全可以与上述各种点样方式配套使用，还可以用于径向展开及反径向展开时薄层的点样。

2. 喷雾带状点样

当样品体积较大时，可以用点样设备进行带状点样，点样端不接触薄层，而是用氮气将注射器针尖的溶液吹落在薄层上，薄层板在针头下面定速移动，可以点成长度为0~199mm的窄带，带状点样展开后的斑点的分辨率高于点状点样。

3. 自动点样

全自动点样装置对吸样、点样、清洗、样品及标准器的点样位置安排，以及点样速度等全部为程序控制，点样量范围在20~100 μ L，这是一种注射器式的点样器，不采取喷雾技术，而是靠调节点样速度控制原点大小的一致。这种点样器特点是快速、准确，但仪器的价格较高。

点样操作时需注意几个问题：

(1) 样品是液体或固体混合物时需要用中等极性的溶剂稀释或溶解成一定浓度的溶液再点样。溶解样品时使用挥发性有机溶剂，以减少样品在板上停留时间，防止过多吸收空气中的水分影响吸附剂的活度。此外使用低极性溶剂且挥发性强的溶剂时，应注意由于溶剂蒸发造成的点样量的变化。若采用极性较大的溶剂配制试样溶液，很可能在点样时由于溶剂的扩散而形成空心圈，使原点直径过大，分离效果降低或造成畸形斑点。

(2) 注意待分离样品的浓度，如果浓度太低，在同一位置反复点样使原点面积扩大，容易破坏原点处薄层的结构，同时展开后斑点扩散过大，使 R_f 值相近的样品斑点相连，影响定性定量分析。如果点样浓度过高会使样品在展开时溶解，展开过程在短时间内不同步进行，出现因浓度过高产生的拖尾现象。相比之下，高效薄层色谱需要的点样浓度高于薄层色谱，点样体积也相应减少。样品原点的直径越小，其分离效果越佳，在原点面积相同时，带状比圆型分离效果好。

(3) 毛细管点样的滞留效应和梯度浓缩效应，是影响点样精度和准确度的常见现象，毛细管材质及表面张力作用，会加速溶液在其表面与重力方向相反的扩散，这种扩散使溶剂蒸发加快，溶质在表面析出，而其物理结构反过来更加速了上述扩散。这样，毛细管内外都有可能存在一层高于溶液浓度的滞留层，溶剂极性、表面能力、溶液粘度都与滞留效应相关，滞留效应会使样品在原点发生梯度浓缩。

五、展开

展开是样品组分得以分离最重要的过程，相当于高效液相色谱的洗脱过程。点样后的薄层置于密闭的层析槽中用合适的展开剂展开，展开剂与薄层点样点下端接触，点样处不能接触展开剂。展开剂靠毛细作用在薄层上浸润扩展，展开时间和距离根据实际需要而定。

1. 展开方式

薄层色谱法中有各式各样的展开方式，但按其类型，大致可分为普通展开、连续展开及特殊展开等，见图10-1。可根据分离化合物的特性选择合适的展开方法。

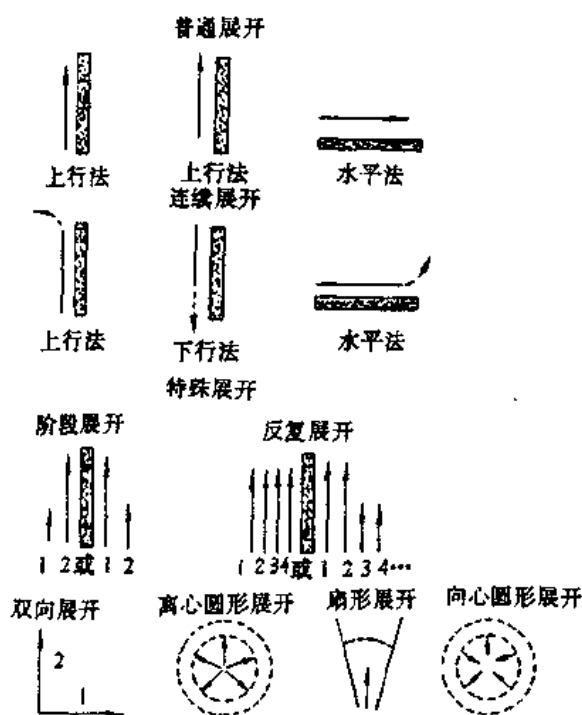


图 10-1 薄层色谱法中的各种展开法

(1) 上行展开法

顾名思义，上行展开法是展开剂系统从薄层板的下端向上展开的方法，它是薄层色谱法中最常用的展开法，适用于加粘合剂的薄层板上分离具有中等 R_f 值的化合物。该法一般使用全玻璃展开槽，要求密闭性能好，为了使展开剂系统尽快地饱合，展开槽不宜过大，其容积应尽量符合薄层板的大小，同时也可节省展开剂。上行展开法宜使用方形或长方型展开槽，见图 10-2。因为若使用圆筒形的展开槽时会使薄层色谱板中心部的溶剂蒸发大于边缘部份，当展开槽内溶剂未充分饱和时，易使前沿线发生变形。

(2) 下行展开法

下行展开法是使展开剂系统由薄层的上端向下流动的展开方法。由于展开剂受重力的作用，展开剂在薄层板上的流动较快，因此对混合物试样中 R_f 值比较接近的化合物，分离效果较差，但是该方法的展开时间比上行法快，可以克服上行法中使用含水展开剂系统或挥发性溶剂展开时间过长而引起斑点扩展的不足。下行展开槽是在薄层板的上方有一个盛放展开剂的玻璃槽，用厚滤纸或棉花条把展开剂引到薄层的上端，实际应用时下行法远不及上行法广泛。

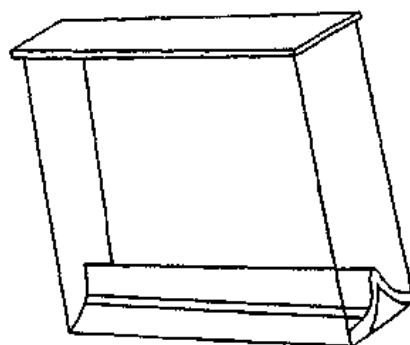


图 10-2 上行法展开槽

(3) 水平展开法

水平展开法弥补上行法和下行法的许多不足之处，该法展开剂用量少，一般为几毫

升。对于干法制的薄层板展开时，只能采用水平展开，水平展开一般有线性展开法、环形展开法及反环形展开法。见图 10-3。

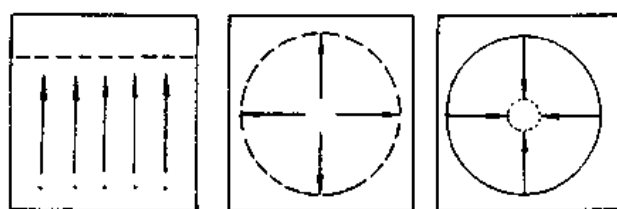


图 10-3 水平展开法的三种展开方式

1. 线性展开 2. 环形展开 3. 反环形展开

可以用通常薄层展开槽进行高效薄层色谱线性展开。如用双池展开槽进行高效薄层色谱线性展开能获得更好效果。先将板放在空池中，另一池中展开剂的蒸气使板预平衡，然后将槽倾斜，展开剂流至空池中，展开开始，见图 10-4。高效薄层色谱线性展

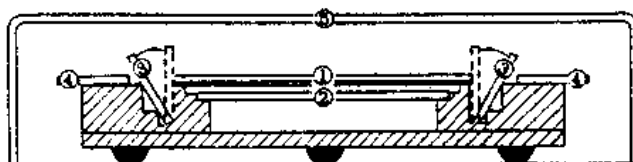


图 10-4 线性展开槽

1. HPTLP 展开板 2. 玻璃板 3. 玻璃条 4. 玻璃条 5. 有机玻璃罩

开槽具有如下优点：节省溶剂，仅耗费层析实际所需溶剂，而且溶剂组成保持不变；展开以夹层形式进行，既可使溶剂蒸汽饱和也可不存在溶剂蒸汽；色谱从两边展开，所以每块板上分离样品数比从一边展开的样品数多一倍；保持最佳分离距离，在特殊场合，如需分离距离 $> 50\text{mm}$ ，可从一边展开；两边展开可提高层析的效率。

① 环形展开

环形展开，又叫径向展开或圆心式展开， R_f 值可用“ RR_f ”或“ R_c ”表示，以区别线性展开所得“ R_f ”，二者关系： $R_f = (RR_f)^2$ 或 $RR_f = \sqrt{R_f(1 + 2r) + r^2} - r$

式中， r 为点样原点与圆心（展开剂进入薄层处）间距离。

图 10-5 为一种 U 型展开槽，很适于高效薄层色谱环形展开。

环形展开有许多优点：快速，硅胶环形展开的最佳距离为 $20 \sim 25\text{mm}$ ，在 $1 \sim 4\text{min}$ 内就完成分离。特别适于低 R_f 值物质的分离，因为 $R_f = (RR_f)^2$ 。当使用相同的溶剂和吸附剂时，其分辨率比线性展开高 $4 \sim 5$ 倍。线性展开中溶剂流速随展距的平方而减小，而环形展开的流速相对不变，在整个分离过程中溶剂组成恒定，因此提高了重现性。环形展开色谱图见图 10-6。

② 反环形展开

和环形展开相反，溶剂以几乎恒定的某一速度精确的从外圆线流向圆心。展开过程

中，未被润湿的薄层面积随着反径向距离的平方而减小，故溶剂移动的线性速度几乎为一常数。这种方法展开速度最快，特别适于高 R_f 值化合物的分离，愈接近圆心斑点愈小，分析的准确性增大，检出灵敏度增加。

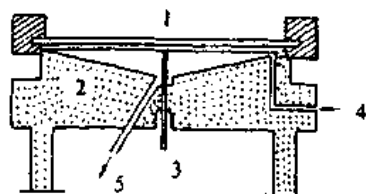


图 10-5 U 型展开槽

1. HPTLP 展开板 2. 槽体
3. 毛细管 4. 气相入口 5. 排出口

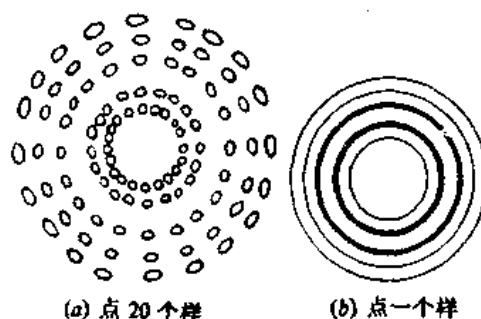


图 10-6 环形展开色谱图

(4) 双向展开

双向展开法是在垂直的两个方向把样品中各组分在两种不同的溶剂系统中以不同速率移动，而使复杂的混合物得到分离。双向展开先注 A 方向展开（展开剂一般称第一溶剂系统），然后再以与 A 方向呈垂直的 B 方向展开，（即在第二溶剂系统中展开）。通常在双向展开法中两个方向均为吸附层析，但有时也可把吸附层析和分配层析结合起来。当混合物在各种单向展开中不能得到完全分离时，可选用双向展开。虽然双向展开法有较高的分离能力，但检测灵敏度较一般展开法低，这是因其展开时间长，斑点易扩散，因而双向展开多用于定性分析。为了使该法有较好的 R_f 值重现性，在第二向（即 B 方向）展开前对薄层的干燥处理非常重要。

(5) 自动程序多次展开

这种展开需要用专用系统，其特点是设计一个展开剂极性很宽的梯度程序，展开剂极性由高到低，每一次展距都比第一次增加，每次展开后自动除去展开剂，不仅每次展开后斑点得到浓缩，而且增加分离容量、改善分离效果，还可以用给定程序在同一块薄层板上分离极性不同的组分。

(6) 加压薄层色谱展开

加压薄层色谱展开法是在空气压力下，使覆盖于吸附剂层上的一层弹性薄膜与吸附剂层紧贴，在非常密闭的无蒸气相的条件下进行展开的方法。

由于该方法是在加压，无蒸气相的条件下进行展开，在某些方面它综合了薄层色谱和高压液相色谱的优点，该法能提高分离效率，节省溶剂。它的主要特点是大大缩短了分离时间，若以分离三种标准染料（靛酚，苏丹 G，奶油黄）所需的展开时间为例，加压薄层色谱展开法仅需 4.5min，而使用一般的展开法则需 30min 或更长的时间。

2. 展开时溶剂蒸汽的影响

溶剂的极性可以用介电常数和偶极矩来衡量，一般介电常数或偶极矩大，溶剂极性也大。溶剂的极性越强，对同一化合物的洗脱能力越大，其 R_f 值越高。反之，溶剂极性小的物质 R_f 值低。因此可以通过调节溶剂的极性改变 R_f 值。通常化合物的极性基团越少，选用极性较弱的展开剂，而化合物的极性基团越多，选用的溶剂极性就相应增加，化合物官能团的极性次序是： $R-H < R-X < R-O-R' < RCO-OR' < R-CO-R' < RCHO < R-CO-N \begin{matrix} R' \\ R'' \end{matrix} < RNH_2, R-NH-R', R-N \begin{matrix} R' \\ R'' \end{matrix} < R-OH < H_2O < Ar-OH < R-COOH$ 。在吸附薄层上往往先用单一的低极性的溶剂展开，然后再更换极性较大的溶剂进行试验，单一溶剂不能分离时，可用两种以上的混合展开剂，并不断改变混合展开剂的组成和比例。

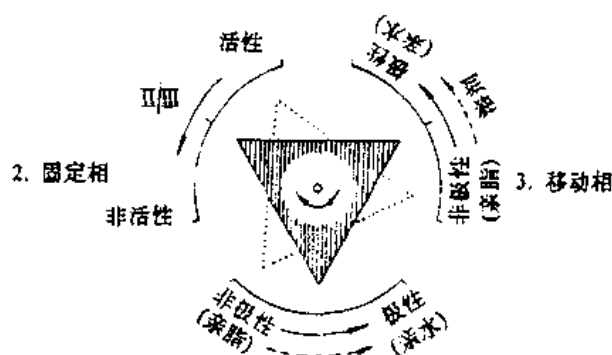


图 10-7 溶剂、吸附剂选择规律

3. 溶剂的选择

在吸附薄层层析中主要根据吸附剂和被分离物质的性质，来选择合适的溶剂。图 10-7 表明了化合物结构、溶剂极性和吸附剂活性三者之间的关系，当三角形转至虚线方位时，样品角和溶剂角指向非极性位置，而吸附剂角指向高活性级位置。也就是说，样品是非极性的，要选择非极性或弱极性的展开剂和活性高的吸附剂，可根据上述原则进行，但对于未知物质的分离，其溶剂选择可采用微量圆环展开技术迅速地对溶剂进行筛选。

每种溶剂在混合展开剂中都有一定作用，展开剂中加入少量酸、碱可以抑制某些化合物的斑点拖尾。展开剂中加入丙酮等中等极性溶剂可使不相混合的溶剂混溶，并可以降低展开剂粘度，加快展速。当样品化合物中带有醛、酮时，可在非极性溶剂中加入少量的丙酮、甲醇，带有羟基时加入少量的醇，有羧基的酸性化合物加入少量甲酸、乙酸，有氨基的碱性化合物加入少量乙二胺、吡啶、氨等溶剂会对样品化合物的分离有很大的帮助。

分配薄层层析中化合物的分离是通过它们在两相之间即流动相和固定相不同的溶解度来实现的，分配薄层有正相和反相分配薄层两种，由于固定相的性质不同，所用的展开剂也不同。用纤维素为支持剂，水做固定相的正相分配薄层，其分离机制与纸色谱相

同。常用的展开剂有水饱和酚、水饱和正丁醇、正丁醇-乙酸-水、异丙醇氢氧化铵水等。用纤维素做支持剂，以亲水的有机相如甲酰胺、丙二醇、聚乙二醇等为固定相的正相分配薄层常用正己烷、己烷-苯、苯-氯仿等为展开剂。

在 C_2 、 C_8 、 C_{18} 等硅胶化学键合相薄层上进行的分配层析是液-固分配层析，展开剂的选择与高效液相色谱的正相或反相分配色谱流动相的选择基本是一致的，应用较多的展开剂是甲醇-水，乙腈-水的混合液，也有用丙酮、四氢呋喃和水的混合物为展开剂的。

4. 离子对薄层色谱用展开剂的选择

在试样中加入合适的反离子，使某些用普通薄层色谱难以使其组分完全分离的离子，形成离子对化合物，再采用薄层色谱实现分离。这种分离离子对物质的薄层色谱称离子对薄层色谱。离子对的分离可用吸附色谱，但更多的用于反相色谱。离子对反相薄层色谱结合了反相色谱和离子对色谱的优点，可在同一条件下分离离子型和非离子型样品。生成离子对物质有三种方式：①形成离子对试剂加至流动相中，②形成离子对试剂掺在薄层中，③形成离子对试剂加至流动相和薄层中。常用的离子对试剂与高效液相色谱离子对色谱所用的离子对试剂类似。不同有机溶剂提取离子对化合物的能力是有差异的，溶剂提取离子对的能力取决于离子对在水相中的水合作用及生成氢键的可能性。在反相薄层色谱中，改变流动相中水的含量，可改变 R_f 值。在反相离子对薄层色谱中，增加流动相中水的含量， R_f 减少；而有机溶剂（甲醇）含量增加、即减少水的含量， R_f 值增大。

5. 离子交换薄层展开剂的选择要依据被分离化合物的酸碱性和离解常数，可用各种类型的缓冲液或盐溶液作展开剂。凝胶薄层常用的展开剂是水或盐溶液及缓冲液等。

六、定位（检出方法）

层析后需要确定各组分的分离效果。有色化合物在薄层色谱板的分离情况无需特殊处理即可观察，而无色化合物需要用物理、化学或生物的显色方法检出。展开后的薄层，可用以下各种方法观察被分离化合物在薄层色谱上的位置。理想的显色方法应具备以下条件：灵敏度高，能使微量成分显色，斑点颜色稳定，斑点与背景之间有一个满意的对比，斑点的产生有一定特异性，斑点的大小和颜色深度与物质的质量成正比；在某些情况下，显色不破坏被检出的化合物。

1. 物理检出法

化合物本身有色，在自然光下观察，有些在可见光下不显色但能够吸收紫外光，在紫外光下显现不同颜色的暗斑（蓝、紫色）。有荧光指示剂的薄层中，背景在 254nm 或 366nm 紫外光下产生黄-绿色荧光背景。通常紫外吸收斑点容易观察，这种方法称为荧光淬灭。某些物质能被能量较高的紫外光照射激发后而产生荧光斑点。在紫外光激发下，许多化合物本身不产生荧光，但是把这些化合物转变为适当的衍生物之后就产生荧光。如在低温下（液氮处理）可以使嘌呤类化合物产生很强的荧光，在高温下许多农药产生很强的荧光。对于具有放射性的物质包括放射性标记可以使用放射性自显影、液体闪烁计数或色谱扫描检出。

2. 化学检出法

采用化学显色剂使无色化合物显色。显色方法有三种：①喷雾法，将显色剂以雾状喷到薄层色谱板上，使被检物显色。②浸泡法，展开后把薄层色谱板浸于显色剂中使被检物显色。③掺入法，制板时把显色剂掺入薄层中。三种方法中喷雾法应用较多。必须强调，显色剂一定要呈细雾状均匀地喷在板上，均匀地显色对色谱的定量特别重要。喷雾显色一般在通风橱中进行。

3. 生物化学和生物法检出

(1) 酶法检出

在薄层色谱板上根据生化原理，进行酶化学反应使待检物显示斑点。酶法应用于薄层色谱有两种类型：①被检物本身是酶化合物，例如淀粉酶，在薄层板上展开后，板上喷淀粉溶液，保温反应，在蓝色背景上显白斑。②被检物本身虽不是酶，但具有抑制酶的性能（如有机磷酸酯杀虫剂），在薄层板上喷酶溶液和酶的底物保持一定温度进行酶解，在被检物斑点处，酶受抑制无色，而背景呈现一定颜色。

(2) 生物法检出

具有特殊生物活性的物质，如抗菌素对微生物有抑制作用，可利用微生物特性来进行显色检出。此法有两类：①在薄层板上直接检出。②将色谱斑点刮下后间接检出。

第四节 薄层色谱的定性定量方法

一、薄层色谱的定性

1. R_f 值鉴定化合物

R_f 值表示溶质（样品）在流动相与固定相中运动的状况，也就是溶质移动和流动相移动的关系，因为两者是在同一时间，同一起点展开，所以可用它们之间移动距离比来表示：

$$R_f = \frac{\text{展开后斑点与原点之间的距离}}{\text{原点与溶剂前缘间的距离}} \quad (10-1)$$

溶质在固定相中溶解度较大，流动相中溶解度小，则 R_f 值小，反之 R_f 值大。在一定色谱条件下，特定化合物的 R_f 值不变，因此可根据化合物的 R_f 值鉴定化合物。由于薄层材料的纯度、颗粒均匀度、薄层的厚度、展开剂的纯度、配比、饱和程度、展开距离等等都要影响最终分析结果，因而重现完全相同的层析条件是重要的，同时也是很困难的。故而相同化合物在两块薄层板上可能有差异，为了消除由于薄层板条件变化引起的 R_f 值的变异，最好使用相对 R_f 值，即用某一已知物作参照，求出 R_m 值：

$$R_m = \frac{\text{待检物斑点至原点距离}}{\text{参考物斑点至原点的距离}} \quad (10-2)$$

影响 R_f 的因素很多，用一种展开剂展开后的 R_f 值与标准物对照一致时，才可认定斑点与标准物是同一化合物。改变吸附剂可得到不同的 R_f 值，综合比较在不同的薄层板上得到的多个 R_f 值，为鉴定化合物提供更可靠依据。对于复杂的混合物可使用双向展开后的两相的 R_f 值来鉴定。具有相同或相近 R_f 值的两个或两个以上化合物，如能选

用使这些化合物呈不同颜色的显色剂，也可以辅助鉴别这些化合物。

2. R_m 值鉴定化合物

在一定层析条件下,可根据化合物的 R_m 值鉴别物质的组成和结构。用不同的展开剂分离同系化合物的衍生物可以得到两组或两组以上的 R_m 值, 各组间的 R_m 呈线性关系, 各直线互相平行, 因此可鉴定未知化合物, 对已知化合物可预测使用某些溶剂时的 R_m 值。

用 ΔR_m 值可以确定某些化合物的取代基团。化合物 A 和 B 的 R_m 值之差就是 ΔR_m 值, 例如在薄层板上用两种展开剂分离酚、苯胺、苯甲醛、硝基苯的衍生物, 发现它们的 ΔR_m 呈线性关系, 可用来预测已知化合物的 R_f 值, 相反可以用 ΔR_m 的线性关系, 鉴定苯环中某一位置上的不同取代基。

3. 薄层色谱扫描鉴定化合物

薄层色谱扫描仪可以对化合物的斑点进行原位扫描, 得到化合物的反射吸收光谱, 由于化合物的透射吸收光谱与其很接近, 因此可用此吸收光谱与 R_f 值结合, 对化合物进行鉴定。需要注意一般色谱仪所用的光谱扫描系统的波长精度、光密度精度要低于分光光度计, 反射光谱法测定的噪声也大于透射光谱法。

薄层色谱的定性能提供物质结构的信息。在有机化合物的同系物中, R_f 值与分子中碳原子数之间呈线性关系, 第二主族和第三主族的金属离子, 镧系离子都表现出线性关系即原子量越大, R_f 值越小, 含氧阴离子的分子量越大, R_f 值越小。在多数情况下对于邻、间、对异构体的 R_f 值的规律是: 邻位化合物的 R_f 值 > 间位化合物 R_f 值 > 对位化合物 R_f 值, 顺式化合物的 R_f 值小于反式化合物的 R_f 值。

二、薄层色谱的定量

通常薄层色谱的定量可采用目测法、斑点面积法和洗脱分离后的间接测定定量法。目测法只能粗略的定量, 现已不用, 斑点面积法根据物质重量的对数与其斑点面积成一定比例关系, 斑点的面积可用微方格法测定, 斑点面积法定量不需要设备, 但误差较大一般为 5%~15%, 为了减少误差, 应使展开后斑点的 R_f 值在 0.3~0.7 之间, 因为在此范围内斑点能得到一定的扩散, 使样品量与斑点面积有较好的线性关系。通常斑点面积定量法中对点样要求较严格, 点样原点的大小及一致性对斑点面积影响较大, 当原点太小时, 虽可得到较好的分离效果, 但会给面积法定量造成困难。

洗脱后的测定法一般先采用非破坏性的技术使斑点定位, 然后把定位部份的吸附剂收集至适当的容器中, 用溶剂从吸附剂上洗脱化合物, 再通过各种分析方法定量, 该方法操作步骤较多, 每个步骤稍不注意就会引起误差, (其误差约为 2%~6%), 这种方法可用于制备性的薄层色谱。

1. 薄层扫描法

(1) 吸收测定法和荧光测定法

吸收测定法 凡在可见光及紫外光区有吸收的化合物, 分别用钨灯和氘灯为光源, 在 200~800nm 范围内选择合适波长, 通过测定斑点和背景的吸光度来定量。

荧光测定法 凡有光吸收时, 能放出更长波长光的化合物可进行荧光测定, 选择适当的激发波长 (E_x) 和发射波长 (E_m), 以氘灯或汞灯为光源, 测定斑点的荧光强度而

进行定量。

(2) 反射法和透射法

反射法 用一定波长的光照射在薄层上，光线的一部分被薄层样品吸收，另一部分光照射薄层上发生漫反射，根据 Kubelka-Munk 理论，反射吸光度与入射光波长、薄层中物质含量及物理性质等相关，所以当入射光波长和物质一定时，物质含量与反射吸光度有响应关系，从而测量反射吸光度即可确定物质含量。反射法灵敏度较低，但对薄层厚度要求不高，基线较稳定，使用较多。

透射法 用样品组分的特征吸收波长的光束照射薄层斑点，在薄层背面检测样品斑点的透射吸光度而定量。透射法较反射法灵敏度高，但受薄层不均匀度的影响较大，基线噪声也较大，即使是使用光学玻璃做薄层的载体，由于玻璃对紫外光有吸收，故不能用于紫外吸光度测定。对于高效薄层色谱板，薄层多是由均匀的固定相材料制成，而薄层厚度较薄，仍可用透射法测定。同时使用反射和透射法测定时可以校正基线的波动噪声。目前透射法主要应用于凝胶电泳的扫描测定。

(3) 单光束和双光束

单光束 仅用一束单色光照射在薄层上进行测量，单光束的仪器结构简单，但一般认为其基线不稳，误差较大。事实上用单光束测定时均采用计算机技术，对背景的光度进行存储和扣除。背景自身的噪声也可用双波长和单波长两次测定得到稳定的基线。

双光束 用两束同样波长的单色光，一束扫描样品斑点，另一束扫描斑点邻近平行的空白薄层，测定值是已经扣除了背景的响应值，双光束的测定需要复杂一些的光路，实际上双光束的方法给扫描带来了不少限制，在薄层板上用双光束测定斑点小、密集样品具有不便因素。

(4) 单波长和双波长法

单波长法 用一种波长的光照射薄层，在该波长下选择有代表性的薄层空白区设置光吸收为零，再测定样品斑点与薄层的总响应值，扣除相对为零的空白区吸收，得到样品的测定值。

双波长法 早期的仪器用两种不同波长的光以一定频率交替照射薄层斑点，其中一种波长为斑点的特征吸收波长（测定波长），另一波长是背景的特征吸收波长（参比波长），两种波长测定的吸光度之差即为样品的吸光度。双波长法现在都采用先用参比波长扫描薄层上样品斑点和空白，并存储测定数据，再用另一分析波长重复测定，并同时扣除参比波长的测定值，得到样品的测定值。薄层色谱原位扫描定量时波长选择是非常重要的，因为它直接影响测定的灵敏度，定性的特异性和定量的准确性。

薄层色谱扫描中波长的选择和分光光度法中波长选择相似：以物质的最大吸收波长为样品扫描波长 (λ_s)，但由于介质不同导致化合物在溶剂中的吸收光谱与在薄层上是有差异的，如图 10-8。因此，不能把溶剂的吸收光谱数据作为原位扫描时的样品波长，必须先用扫描仪测定它们在薄层板上的最大吸收波长，作为样品扫描波长 (λ_s)。

在许多场合中，薄层板喷雾显色后底色也会显色。如用磷钼酸显色时，磷脂类、胆汁酸、胆固醇类的斑点呈蓝色，但薄层的底色为黄色；对农药酶抑制斑点显色时，薄层的底色为红紫色，而农药的斑点却为无色或近黄色。

(5) 直线扫描、锯齿形扫描和“飞点”扫描

直线扫描 用一束比斑点直径略长的光束对斑点在单方向作直线扫描。这种扫描法所用测定的时间短，适用于荧光法的测定，但在斑点形状不规则或浓度不均匀时，扫描方向不同，测量结果的误差较大，一些商品薄层扫描仪借助计算机技术，在加大信息采集量的同时，使直线扫描的精度得到很大的提高。

锯齿型扫描 用一个比斑点面积小得多的光束在斑点作锯齿形移动扫描，这种扫描方法由于光束微小到使光束内样品浓度的不均匀性可以忽略，即使在样品斑点形状不规则及浓度不均匀时也能得到准确的测定结果，锯齿型扫描过程具有对斑点进行反复叠加测定的特性，故灵敏度高于直线扫描法，锯齿型扫描受机械动作影响，测定速度较慢。

“飞点”式扫描 飞点扫描是某些薄层扫描仪所

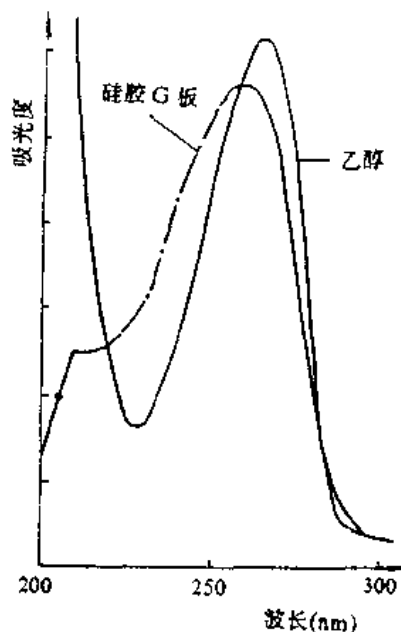


图 10-8 腺嘌呤在乙醇中与硅胶 G 板上的紫外吸收光谱

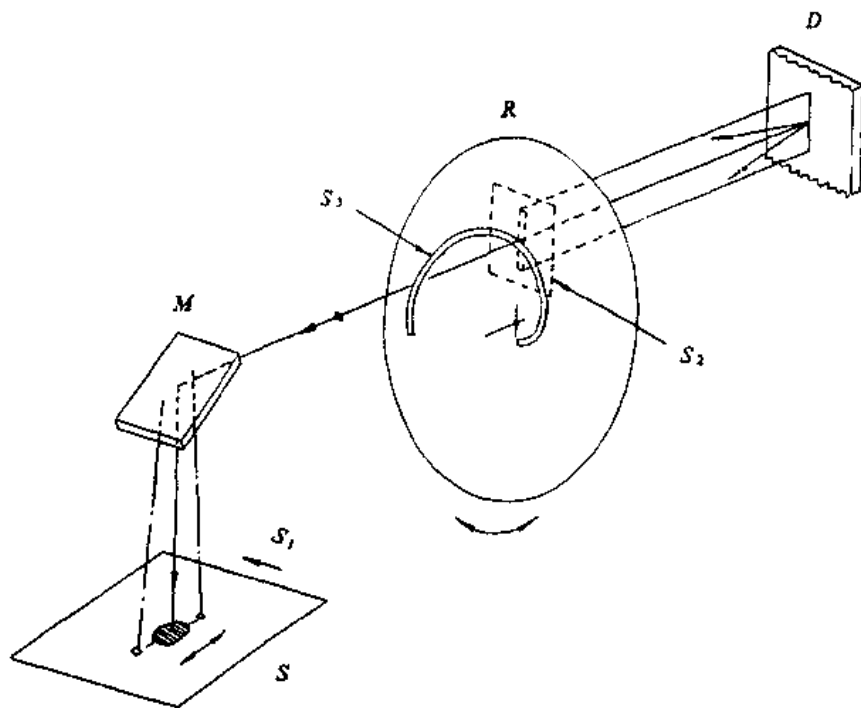


图 10-9 薄层扫描仪的飞点扫描示意图

S. 样品斑点 S_1 . 样品台行程 S_2 . 固定狭缝
 S_3 . 螺旋狭缝 R. 旋转盘 D. 衍射光栅

特有的一种扫描方式，如图 10-9。“飞点”表示在扫描过程中光束的大小不变，但位置作扫描形式的改变，它是靠扫描仪中固定狭缝和旋转盘上的螺旋狭缝配合实现“飞点”扫

描，使样品台呈直线运动，实现锯齿扫描，从而提高了扫描的速度。

2. 扫描方式及光束大小的选择

一般而言，当斑点的形状及大小均匀时，可选用测定时间较短的直线形扫描法，但必须严格地调正通过斑点中心的扫描方向及光束的大小才能得到准确的测定，而当斑点形状大小不规则时，尤其是在紫外光区扫描无色的斑点时，最好采用锯齿形扫描。

在锯齿形扫描时，因为光束很小，所以在光束范围内物质的浓度分布基本上是均匀的，因此积分前吸光度与浓度的曲线关系就可通过线性化仪进行线性程序的补正，使锯齿形扫描所得到的工作曲线呈良好的线性关系。

锯齿形扫描的光束大小是根据实际扫描斑点时光束内的样品浓度含量进行设定的，对高效薄层色谱板，由于点样原点直径小，展开距离短，故斑点的扩散小，因此光束以 $0.4 \times 0.4 \text{mm}^2$ 为宜。

直线形扫描时，光束的高度应与在扫描方向中斑点的最大宽度相同，这对定量的准确与否是非常重要的，但光束的宽度也应适宜，因为光束宽度过于狭窄，会使光量减少，噪声增加，其宽度的选择方法为：长方形的光束扫描圆形斑点时，假定投影是一个等边三角形，峰的吸光度是 1.0 如图 10-10，则半峰宽在薄层板上的距离是 b ，扫描光束的宽度 $a < 0.12 \times b$ ，这样求出的峰面积精确度在 1% 以内，假设图 10-10 中的斑点直径是 10mm 时，光束宽度 a 为 $0.12 \times 10 \text{mm}$ ，但是当峰的吸光度小于 1.0 时，则光束的宽度应大于 0.6mm。薄层扫描仪有一种跟踪扫描方式，这种功能可以自动精确的跟踪斑点，即使斑点中心在 y 轴线上偏差很大，亦可斜斜的扫描路径来保持与斑点中心的跟踪状态，如图 10-11。

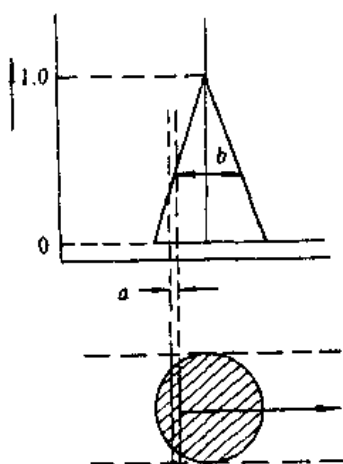


图 10-10 直线形扫描的
光束大小选择法

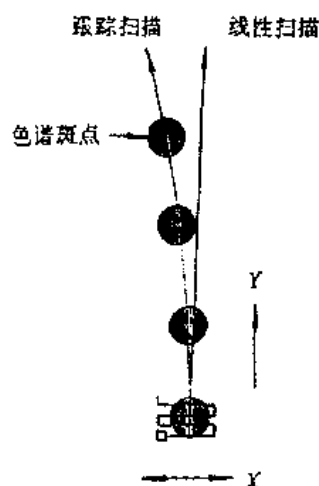


图 10-11 斜线扫描
路径测量色谱斑点

第五节 薄层扫描仪

随着仪器分析技术的发展，新型的薄层扫描仪不断问世，现以功能比较全，国内拥有数量较多的日本岛津 CS-930 型薄层扫描仪为例，介绍薄层扫描仪的构造原理、性能和工作方法。

一、构造原理

图 10-12 为 CS-930 薄层扫描仪光学系统的构造示意图，图中 W 及 D_2 分别为钨灯光源和氙灯光源，前者用于可见光区 370~700nm 波长范围，后者用于紫外区

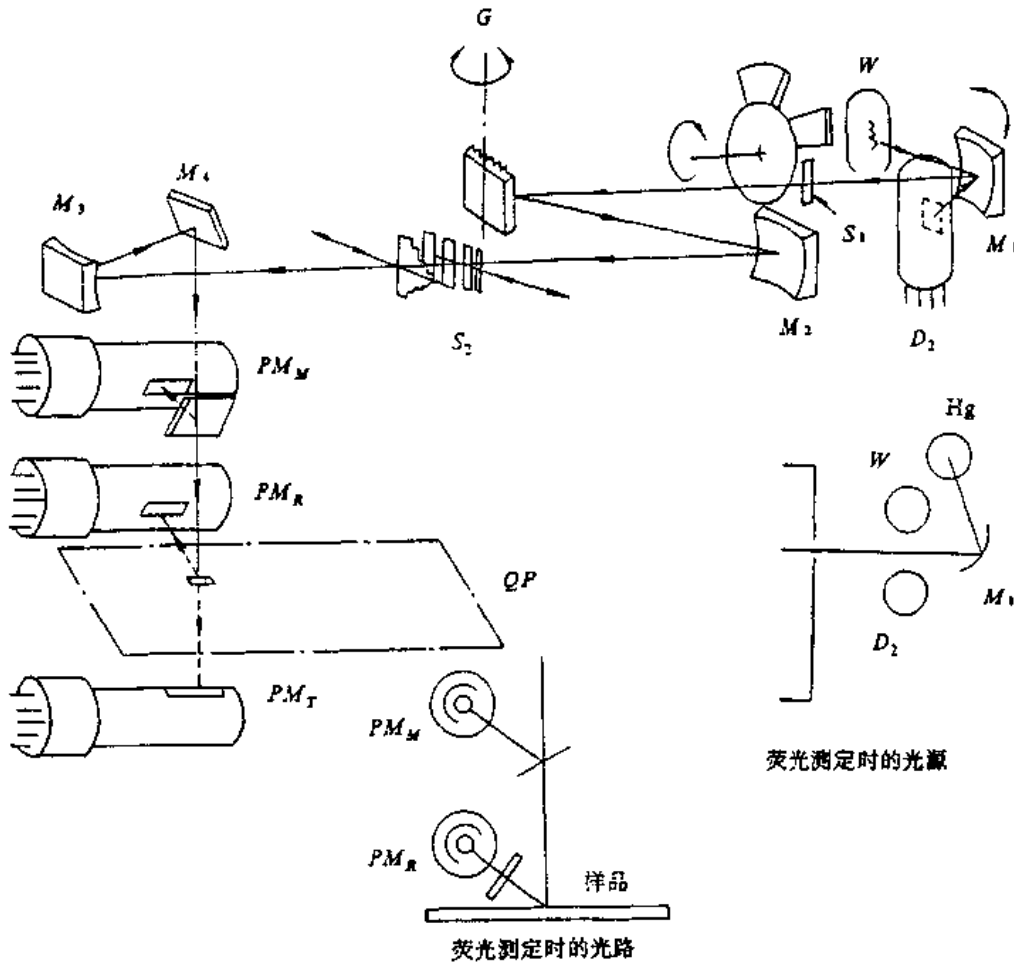


图 10-12 薄层扫描仪示意图

M_1 光源切换镜	S_1 入口狭缝	PM_M 测光光电倍增管	QP 石英板
M_2 单色器准直镜	S_2 出口狭缝	PM_R 反射光光电倍增管	G 光栅
M_3 凹面反射镜	W 钨灯	PM_T 透射光光电倍增管	
M_4 平面反射镜	D_2 氙灯		

200~370nm 波长范围, 两种光源用于光吸收测定。 M_1 为光源转换镜, 转动光源转换镜可选择所用光源, 选用的光源光通过入口狭缝 S_1 至单色器 G (光栅) 形成单色光, 再经准直镜 M_2 , 出口狭缝 S_2 至凹面镜 M_3 及平面镜 M_4 反射到石英片 QP 。当使用反射吸收测定法时, 来自薄层表面的散射光用光电管 PM_R 检测, 同时另一部分光通过石英板 QP 的表面反射至光电倍增管 PM_M , 以检测入射光强度, 将 PM_M 和 PM_R 的输出比用对数形式表示为反射吸光信号, 作为反射测量用。当用透射法测定时, 使用透射光电倍增管 PM_T 检测透过薄层斑点的透射光信号, 并与光电倍增管 PM_M 的输出比用对数形式表示为透射吸光度信号。当用荧光测定法时, 用汞灯或氙灯作光源, (200~700nm), 用反射测量光电倍增管 PM_R 检测薄层 (斑点) 发出的荧光信号, 不用进行对数变换, 可直接用作荧光强度测量的信号。上述三种测量信号经放大后, 由模拟转换器形成数字信号, 再由数据处理机变换成分析数据输出。

CS-930 薄层扫描仪是一种双波长薄层扫描仪, 波长范围为 200~700nm, 可以用透射测量法和反射测量法作吸收测定, 也可作荧光测定。扫描控制、色谱图绘制、定量计算、数据打印均由微处理机控制进行, 薄层扫描仪具有双波长扫描、锯齿形扫描、直线扫描、背景校正、工作曲线线性化等功能。

二、仪器的定量方法

薄层扫描仪可用内标法或外标法对样品斑点进行扫描定量。

1. 外标法 在薄层上同时点上已知浓度的标准品溶液和未知样品溶液, 当工作曲线通过原点时, 可选用一种浓度的标准品溶液, 当工作曲线不通过原点时可选用两个浓度的标准品溶液, 前者称为“一点法”, 后者称“两点法”, 无论是用“一点法”还是“两点法”, 同一浓度的标准样品都应重复点样四次以上, 以取平均值。待测样品的点样数可根据具体情况而定, 平行点样数不应少于 2 个。图 10-13 为外标一点法和两点法

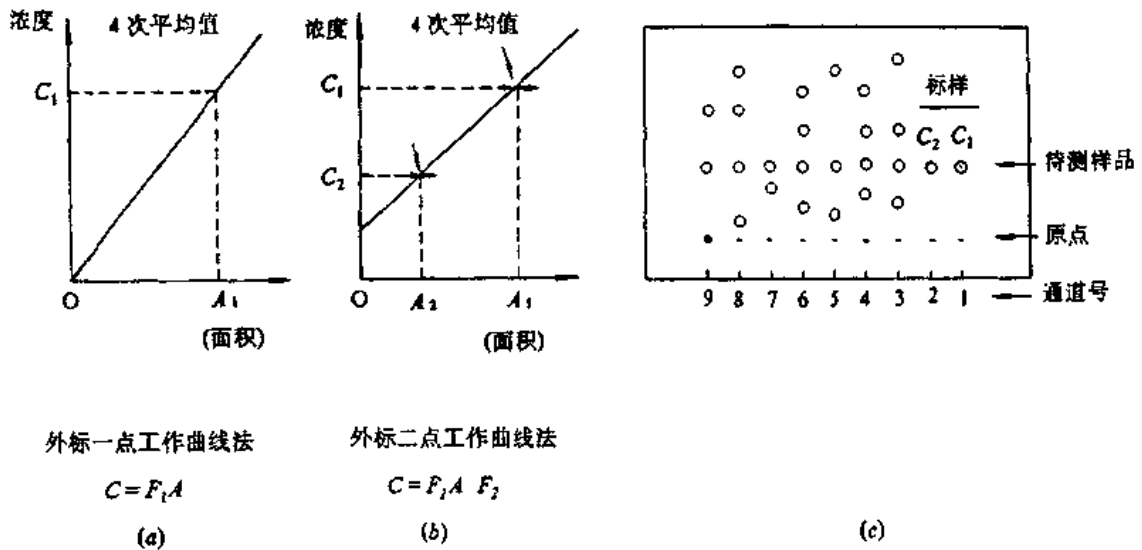


图 10-13 用外标法的工作曲线及薄层展开实例

的标准曲线及用外标两点法定量的薄层板展开实例。当使用一点法时 $C = F_1 A$ ，当使用两点法时 $C = F_1 A + F_2$ ，其中 F_1 为标准曲线的斜率， F_2 为标准曲线在纵轴上的截距。

2. 内标法

内标法与外标法的区别在于外标法时的面积累计值 A_1 、 A_2 用待测样品和内标物的面积比来代替，如内标两点法的计算公式为：

$$C_1 = F_1 A_1 / A_{in} + F_2 \quad (10-8)$$

$$C_2 = F_1 A_2 / A_{in} + F_2 \quad (10-9)$$

$$F_1 = \frac{C_1 - C_2}{A_1 - A_2} \times A_{in} \quad (10-10)$$

$$F_2 = \frac{1}{2}(C_1 + C_2) - \frac{1}{2} \frac{F_1}{A_{in}} (A_1 + A_2) \quad (10-11)$$

式中， C_1 、 C_2 为标样浓度； A_{in} 为内标物面积。

图 10-14 为内标两点法的薄层展开实例。内标物与待测样品在同一通道上，因此要求内标物的吸收波长与被测样品接近，并与被测样品的斑点要完全分开，因此内标物的选择比较困难，所以外标法是更为常用的定量方法。

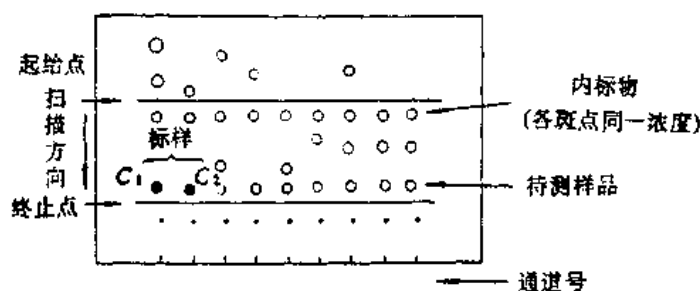


图 10-14 内标两点法定量的薄层展开实例

三、定量薄层色谱需要注意的一些问题

目前用于定量的薄层色谱法主要是指仪器化的高效薄层色谱法，仪器分析可以避免很多人为操作和实验方法带来的系统误差，高效薄层色谱已经解决了薄层色谱定量的诸多问题。

1. 固定相与薄层板

使用高质量的预涂板吸附材料和先进的铺板技术，是定量薄层色谱的首要工作。硅胶已成为最重要的薄层色谱固定相，各种改性固定相也都以硅胶为基质，这一方面扩大了固定相的种类，同时也有利于改善分离的选择性。

2. 点加样

一般说，样品溶液应尽可能浓些，因为高效薄层色谱的点样体积很小。但在生物和药物分析中常需测定基质中微量成分，这时待测物在提取液中浓度太低，不宜在高效薄层色谱上直接点样，而应在点样前经过纯化和浓缩处理。

高效薄层色谱点样是一个重要步骤，与定量误差及重现性关系十分密切，展开后斑

点大小与点样时原点大小直接有关，为了使展开后的斑点小，应使点样原点小些，以1mm为宜。极性较弱的溶剂的点样体积应 $<200\text{nL}$ ，极性较强的溶剂 $<100\text{nL}$ ，可使原点直径 $<1\text{mm}$ 。样品体积大时，可分次点加。

样品原点可为圆点状或条带状，要足够小，以满足高分离效率的要求。样品量不能过载。点样量应准确、重复性好，定位要精确。点样时，不能损伤薄层表面。这些是定量薄层色谱法的基本要求。

薄层板进行光度扫描测定时，结果的重现性取决于如下三点：(1) 点样的一致性，(2) 薄层色谱扫描仪的重现性，(3) 在同一块高效薄层色谱板中的 R_f 值的重现性。

3. 薄层色谱图的显色

采用有机粘合剂的薄层板（包括预涂板）在喷洒含水显色剂时往往会出现两个问题：一是显色剂不易被薄层吸收而发生“溢出”；二是出现麻脸现象，产生这些问题的原因是，有机粘合剂与高含水喷雾剂不相容。解决这一问题的办法是在喷雾剂中加入10%的醇（甲醇、乙醇）、丙酮或其它水溶性的极性溶剂。用于定量分析的显色剂，必须经过优化，以使光密度扫描结果具有更好的重复性。

4. 关于定量校正

薄层色谱定量有两类方法：原位光度法和斑点洗脱法；对于高效薄层色谱板上毫克至微微克量斑点，一般只采用原位光度测量法。由于操作量甚微，故制板、点样、展开、显色和测定等步骤均需仔细操作，并使用专用仪器和设备。薄层的性能（粒度大小、均匀性等）和点样都影响定量结果的精密度和准确度。高效薄层色谱的重现性和灵敏度极限取决于显色的灵敏度。因为荧光法的灵敏度比光度法灵敏度高1~2数量级，所以只要可能，尽量采用荧光测定。当然，荧光测量更适合于定量校正，线性范围一般可达2~3个数量级。

薄层色谱扫描定量的准确性主要取决于线性化校正，使斑点浓度与积分值成直线关系，但是当薄层板背景扫描时基线漂移或积分值零点位置选择不当时，也会产生较大的误差。

积分值零点位置的选择，对减少误差也是个非常重要的因素。由于展开溶剂中杂质的干扰或显色不均匀，扫描斑点时常会引起峰形基线的倾斜，为了得到正确的积分值，首先根据记录下的峰形图谱，决定斑点峰的积分零点起始位置，它与气相色谱中峰面积的积分情况一样。

对紫外或可见光有吸收的样品，采用薄层扫描定量（双波长锯齿扫描，工作曲线线性化校正）的变异系数（C.V值）为0.5%~2%，但是样品的变异系数为3%~5%。

5. 薄层色谱定量分析的误差

薄层色谱扫描定量分析结果的误差，主要来源于点样误差（ σ_p ）、展开误差（ σ_e ）、薄层色谱图扫描中的斑点定位误差（ σ_b ）和扫描仪的测量误差（ σ_m ）。根据误差传递理论，分析结果的总误差（ σ_T ）应为：

$$\sigma_T^2 = \sigma_p^2 + \sigma_e^2 + \sigma_b^2 + \sigma_m^2$$

式中后两项来源于扫描仪。由计算机控制并具有斑点自动定位功能的薄层色谱扫描

仪的定位误差 (σ_p) 实际上可视为零, 对于完全分离的峰按峰面积计算的测量误差一般在 0.5% 左右。当待定量峰完全分离时, 量峰高比量面积的结果误差更小。薄层色谱扫描定量误差, 主要决定于点样误差 (σ_s) 和展开误差 (σ_e)。用仪器化点样装置, 1 μ L 点样水平, 误差可在 0.5% 左右。用双底展开缸进行色谱展开引起的误差往往超过 1%, 但不难控制在 2% 以内。因此, 仪器化薄层色谱定量分析结果的精密度, 一般应在 3.0% 以下, 以添加回收率计算的准确度应在 95%~105% 之间, 即误差约为 $\pm 5\%$ 。

第六节 薄层色谱法的应用

薄层色谱法作为一种常规的分析技术, 广泛地应用于化学化工、药物分析、食品分析、农药残留分析。它与气相色谱, 高效液相色谱并称为三大类色谱技术, 并以其简便、灵活、直观的特点受到分析工作者的重视, 薄层色谱及高效薄层色谱的应用领域实例很多, 举例说明如下:

1. 薄层层析-酶抑制定量分析技术在农药敌敌畏残留量检测中的应用。

敌敌畏易挥发, 紫外吸收较少, 用气相色谱分析时, 容易发生拖尾, 且灵敏度不高。如采用薄层-酶抑制技术可以检测其残留量。取有代表性的蔬菜样品 50g, 加入无水 Na_2SO_4 60~80g, 乙酸乙酯 125mL, 匀浆提取, 提取液倾出, 残渣用 90mL 乙酸乙酯分三次洗涤, 抽滤得滤液与提取液合并, 定容到 200mL, 取 20mL 在装有 Celite 3g, MgO 2g, 活性炭 1.5g, 无水 Na_2SO_4 2g 的净化柱中净化, 净化液吹去溶剂至 1mL 供 TLC 分析。敌敌畏标准品 (每个斑点 1~2ng) 和净化液同时点样于硅胶 G 板 (500 μ m), 用乙酸乙酯: 正庚烷 = 5:1 展开 12cm, 吹干溶剂, 取鼠肝酶液稀释 50 倍, 喷于板上至板近湿, 于 36 $^\circ\text{C}$ 湿度 90%~95% 保湿 30 分钟后取出, 喷显色剂 (25mg 固兰 B 溶于 25mL 水, 32mg α -萘乙酸酯溶于 25mL 乙醇, 用前 3:1 混合) 后干燥, 敌敌畏 R_f 为 0.69~0.72, 背景红紫色, 酶抑制斑点白色。采用双波长法测定, 分析波长 390~420nm, 参比波长 520~530nm, 反射吸收, 锯齿扫描, 线性化参数 $SX=3$, 外标一点法定量, 用该方法检测蔬菜中敌敌畏 (DDVP) 残留量, 检出限量 $2 \times 10^{-10} \sim 3 \times 10^{-10}$ g; 定量的线性范围在 $5 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8}$ g; 最小检出浓度 0.004~0.005 $\mu\text{g/g}$; 方法回收率在 90.6%~97.64% (平均 94.27%), 变异系数 $CV\% = 4.46 \sim 18.00$ 。

2. 低聚半乳糖含量的 HPTLC 分析

酶法合成的低聚半乳糖产品中含有半乳糖, 葡萄糖, 乳糖。这些糖和低聚半乳糖都是还原糖, 用化学方法不能直接定量分析。采用 HPTLC 技术可以在无低聚糖标准品的情况下进行定量分析。

取样品适当稀释后用纳升级点样器, 点样于含有 0.3% CMC, 0.02mol·L 乙酸钠, 500 μ m 的硅胶 G 板 (用前于 100 $^\circ\text{C}$ 活化), 每点 100~200nL, 平行 4 点, 同时取葡萄糖、半乳糖、乳糖 (0.5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}$) 标准品同样点于板上。用 CAMAG HPTLC 线性展开器展开, 展开剂为正丙醇: 水 = 85:15。展开后吹干溶剂喷苯胺和二苯胺磷酸显色剂, 于 110 $^\circ\text{C}$ 加热 10min, 显色。各种糖的 R_f 值: 葡萄糖 0.70, 半乳糖 0.64, 乳

糖 0.47, 低聚糖①0.42, 低聚糖②0.24。各种糖的斑点最大吸收 630nm, 采用锯齿扫描, 线性化参数 $SX=3$, 测定各斑点的面积积分值, 将标准样品中面积积分值与样品重量和样品摩尔质量换算出的摩尔数相除, 得到单位摩尔数的面积积分值 (即每葡萄糖单位的面积积分值), 再以葡萄糖的系数为 0.1, 分别求出半乳糖, 乳糖的相对比值 (即相对每葡萄糖单位的面积积分值比值), 根据低聚糖结构中大部分均有乳糖结构这一现象, 将低聚糖含量先换算成乳糖含量, 分别乘以乳糖单位系数, 得到低聚糖的平均摩尔质量的含量。

3. 高效薄层色谱法测定饲料添加剂 (预混料) 中维生素 B_{12} 含量

饲料添加剂中的 $V_{B_{12}}$ 在贮存、加工过程中受到氧化而破坏, 氧化产物和其它维生素均有荧光, 常规的 $V_{B_{12}}$ 测定多采用荧光法, 但不易区分衍生氧化和自然氧化产生的荧光, 采用 HPTLC 技术可以进行定量分析。

称取 5g 待测样品于 100mL 烧杯中, 加 5mL 提取液 (5% 柠檬酸二氢钠, 20% 草酸钾) 搅拌提取, 提取液过滤于微量离心管中, 离心后取上清液点样, 用含 0.5% CMC 硅胶 60F₂₅₄ HPTLC 板, 用微升级点样器, 每点 0.5~1.0 μ L 样品, 同时点 $V_{B_{12}}$ 标准品, 在 CAMAG HPTLC 线性展开器中展开, 展开剂氯仿: 乙醇 (97%): 水 = 50: 25: 1 (配好后加入 DMSO 至浓度为 1%), 展开后吹干溶剂, 于薄层扫描仪扫描测定, 分析波长 275nm, 锯齿扫描, 外标一点法定量, 加入 DMSO 可以提高 $V_{B_{12}}$ 的 R_f 值, 在 $V_{B_{12}}$ 最大紫外吸收波长下定量, 可与 $V_{B_{12}}$ 的氧化产物 (有荧光) 有良好分离。

思考题

1. 薄层色谱与柱色谱相比有何不同?
2. 高效薄层色谱与薄层色谱相比主要特点是什么?
3. 简述薄层色谱的工作过程。
4. 薄层色谱常用哪些固定相。
5. 解释下列概念:
 - (1) 反射法和透射法
 - (2) 单波长和双波长
 - (3) 直线扫描和锯齿扫描
6. 薄层色谱定量的依据是什么? 有哪些方法?

第十一章 毛细管电泳

第一节 概 述

电泳作为一种分离技术已有近百年历史，早期电泳技术主要为区带电泳 (Zone Electrophoresis)、凝胶电泳 (Gel Electrophoresis)。

区带电泳是在管中盛满电解质的惰性支持物，并在两端施加电压，使带电组分在管中根据带电电荷和分子量的大小产生不同的迁移速度而进行分离。这种技术在早期遇到两大问题即扩散问题和检测问题，用琼脂、纤维素、硅胶等物质作为稳定剂可克服扩散问题，若被检测的物质没有紫外吸收，检测比较困难。

凝胶电泳在生物大分子如蛋白质、核酸、多肽、糖的分析和制备方面具有广泛的应用，但由于凝胶电泳具有准确定量困难、使用寿命短、难于实现自动化等弱点使其应用受到限制。

毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis 简写 CE) 是近十几年来高速发展起来的一种分离分析技术，是电色谱法的一个重要分支。1981年 Jorgenson 和 Lukacs 使用内径为 $75\mu\text{m}$ 的玻璃毛细管，施加 30kV 电压，并采用激光诱导荧光检测器，证明毛细管电泳有超群的分离效能 (40 万理论塔板数)，毛细管内强大的电渗流可使正负离子向同一方向流动，因而在一次进样中可以同时分离测定带正、负电荷离子，分析时间很短，从而开始了毛细管电泳技术在分析化学等领域的发展应用。在以后的时间里，各种有机自由区带电泳技术和装置得到了进一步的发展。由于采用毛细管，克服了传统区带电泳的热扩散和样品扩散问题。当电泳从凝胶板移到毛细管中以后，分析灵敏度大大提高，分离效率可达百万塔板数。同时，仪器装置亦不断改进，各种检测器，包括紫外、荧光、电导等检测器，先后用于毛细管电泳系统，将电泳原理和色谱法相结合的毛细管胶束电动色谱 (CMEC) 的发展，解决了电泳法不能分离中性物质的缺陷，从而大大拓展了毛细管电泳技术的应用范围。

由于传统电泳技术的局限性，当两端电压达到一定值时，会在电解质离子流中产生自热 (也称焦耳热)，这种热会引起径向粘度和速度的梯度变化，从而导致区带展宽，降低效率。而毛细管电泳与传统电泳的根本区别就在于这种自然现象是在散热效率极高的毛细管内 ($10\sim 200\mu\text{m}$) 进行。

毛细管电泳的主要优点：

- (1) 高灵敏度。一般紫外检测器的检测极限在 $10^{-13}\sim 10^{-15}\text{mol}$ 之间，荧光检测可达 $10^{-19}\sim 10^{-21}\text{mol}$ 。
- (2) 高分辨能力。峰分离效率超过 100 万理论塔板数，一般可达几十万。
- (3) 速度快。许多分析在 10min 内完成，有的可在 60s 内完成。
- (4) 进样少。与其它分离方法相比，需要更少的试样量，一般只需毫微升的进样

量。

(5) 成本低。毛细管可长期使用，可自己配制缓冲液。

总之，毛细管电泳法将传统的电泳分离技术和现代的分选技术（如 HPLC、GC 等）中的检测、数据处理技术有机地结合起来，形成了一种新的高效分离技术。就其灵敏度、分离效果和速度以及成本消耗等方面较液相色谱法具有更多的优势和长处，同时，它与液相色谱法具有很好的互补性。

第二节 毛细管电泳基本原理

毛细管电泳仪的基本组成如图 11-1。石英毛细管的两端分别浸在含有电解质的贮液槽中，毛细管内也充满同样的电解质。在毛细管的一端与检测器相连接，如果是光学检测方式，毛细管本身便作为流动池；若是电导或电化学检测器，则是将电极直接插进毛细管中检测。

被分析样品可以用多种进样方式通过毛细管的一头进入。进样方式有：重力法、抽真空法和电迁移法。当样品被引入后，便开始施加电压，操作电压从 5~30kV，一般操作时间为 1~45min。运行开始后，样品中各组分向检测器方向移动。在 CZE 中对溶质的迁移时间由下式决定。

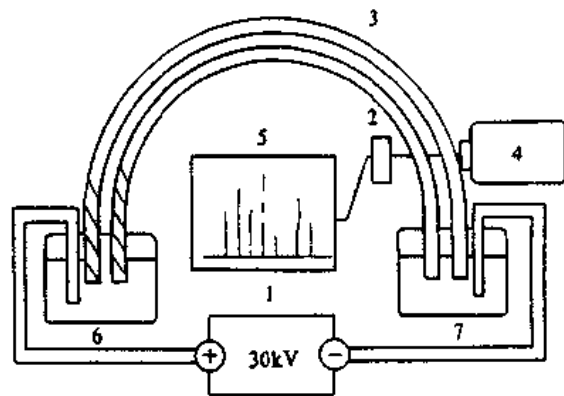


图 11-1 毛细管电泳仪的基本组成

1. 高压电源
2. 光电倍增
3. 毛细管
4. 检测器
5. 数据采集
6. 缓冲液/样品
7. 缓冲液

$$t = L^2 / UV \quad (11-1)$$

式中， t 为迁移时间； L 为毛细管长度； U 为溶质总流速； V 为施加电压。

从式中可以看出，当毛细管长度一定时，迁移时间与溶质总流速及施加电压有关。而溶质总流速又有：

$$U = U_e + U_{e_0} \quad (11-2)$$

由此可看出，溶质总流速 U 组分由两个主要因素决定：第一为电泳速度 U_e 与荷质比有关，在电泳力的作用下，带负电荷的组分向正极移动，带正电荷的组分向负极移动。此外，第二种驱动电解质运动的作用力是由于强电场引起的在毛细管内壁的大量 H^+ 电荷的定向移动所产生的电渗流。因此，电解质的总流速由电泳速度 U_e 和电渗流速度 U_{e_0} 组成。对大多数分子来说，电渗流大于电泳速度，因此不管溶质是阳离子还是阴离子，所有的分子都将向阴极移动，阳离子的流速比电渗流速度快，阴离子的流速比电渗流慢，而中性分子的流速与电渗流一致。因此，可用中性化合物的出峰时间来测定电渗流。由此可见，阴、阳离子可在一次运行中分离。

如图 11-2 所示毛细管电泳是一种在空芯的、微小内径的毛细管中进行大、小分子高效分离过程。根据被分离物之间电荷和体积的不同，各种分子在高电压下被分离。在区带毛细管电泳 (CZE) 中，电泳中电荷移动和电渗流的结合导致了分离。从宏观来看电荷及电渗流迁移大小取决于电场强度、电解质的 pH 值、缓冲液的组成和离子强度、内摩擦和毛细管表面等特点，这些因素能够单一或互相结合地提高分离效果。

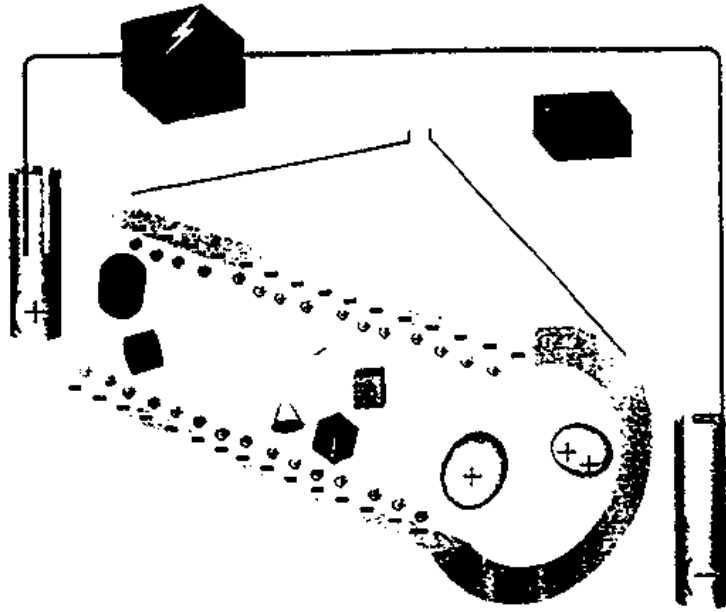


图 11-2 毛细管电泳基本原理图

毛细管电泳具有极高的分离能力。理论塔板数 N 可由下式表示：

$$N = UV / 2D \quad (11-3)$$

式中， U 为溶质流速； V 为施加电压； D 为溶质的扩散系数。

由上式可以看出，理论塔板数 N 与施加电压 V 成正比，即高电压可得到高的柱效。而 N 与溶质的扩散系数 D 成反比，可预测大分子得到高柱效。在理想条件下，理论塔板数可达 100 万。在通常的操作条件下，柱效可达到 10~20 万。

第三节 毛细管电泳的检测器

毛细管电泳最常用的检测器是紫外-可见光检测器，其次是激光诱导荧光检测器及二极管阵列检测器，另外还有电化学检测器和质谱检测器。各种检测器的性能特点见表 11-1。

表 11-1 毛细管电泳检测器的性能特点

检测器	动态范围 [M](S/N=2)	最小检出限 [mol]	应用	优点	缺点
UV~VIS 吸收	$10^{-6} \sim 10^{-3}$	10^{-15}	肽、蛋白质、核 酸药物、小分子	易于使用,相对 来说通用	相对来说灵敏度 较低
荧光检测	$10^{-8} \sim 10^{-5}$	10^{-17}	氨基酸、肽、蛋 白质、核酸	灵敏度和选择性 高于 UV	非通用
激光诱导 荧光检测器	$10^{-12} \sim 10^{-9}$	10^{-21}	微量氨基酸、 肽、蛋白质、核 酸	灵敏度和选择性 都很高	贵,非通用
电导检测	$10^{-6} \sim 10^{-3}$	10^{-16}	离子分析	峰面积和迁移时 间线性相关	灵敏度较低,非 通用
安培检测	$10^{-8} \sim 10^{-5}$	10^{-20}	复杂物质(如液 体)中电活性化 合物分析	灵敏度和选择性 很高	限于电活性物质 的分析,难建装 置
间接 UV- VIS 检测	$10^{-5} \sim 10^{-3}$	10^{-14}	离子分析、碳水 化物	通用	灵敏度较低,缓 冲溶液受限制
间接安培检测	$10^{-8} \sim 10^{-5}$	10^{-20}	同时测定电活性 和非电活性物质	高灵敏度	难建装置
间接荧光检测	$10^{-7} \sim 10^{-1}$	10^{-17}	检测非荧光物质	通用,选择性好	缓冲溶液受限制

第四节 毛细管电泳有关技术术语

1. 电泳迁移

在毛细管中带电粒子在电场作用下作定向移动的现象称之为电泳迁移。

2. 迁移时间

在毛细管中带电粒子在电场作用下作定向移动的时间,单位为 min,用 t 表示。

3. 电泳速度

在单位时间内带电粒子在毛细管中定向移动的距离,单位为 cm/s,用 U_e 表示。

4. 电场强度

在给定长度毛细管的两端施加一个电压后所形成电效应的强度,单位为 V/cm,用 E 表示。

5. 电泳淌度

带电粒子在毛细管中定向移动的速度与所给定电场强度之比,单位为 $\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$,用 μ_{ep} 表示。

$$\mu_{ep} = \frac{U_e}{E} = \frac{L_d/t}{V/L_1} \quad (11-4)$$

式中, U_e 为电泳速度; E 为电场强度; V 为电压; t 为迁移时间; L_d 为毛细管入

口端到检测器窗口的距离； L_t 为毛细管两端总长度。

6. 电渗流

毛细管中，在高电压下，溶液中的正电荷与毛细管壁表面的负电荷之间相互作用，引起流体朝负极方向运动的现象。在毛细管中电渗流总是由正极流向负极如图 11-3。电渗流随着电解质浓度的增加而增加，随着 pH 值的增大而增大。

7. 焦耳热

在高电压下，毛细管中的电解质会产生自热现象即焦耳热，焦耳热的产生与毛细管的管径、缓冲液的浓度有关，管径越细散热越快，缓冲液浓度越高产热越多。

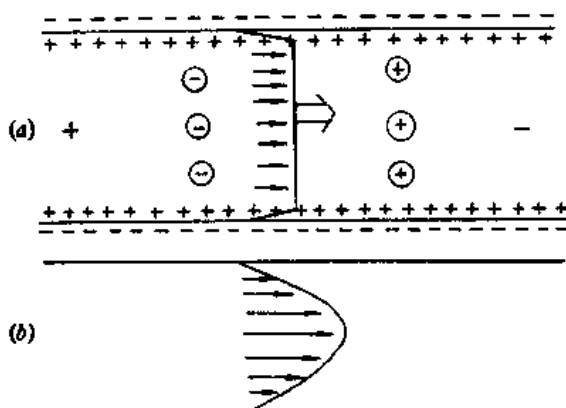


图 11-3 由毛细管壁引起的电渗流

(a) 毛细管中电渗流呈“塞式流”流型；

(b) HPLC 柱中压力驱动呈抛物线流型。

第五节 毛细管电泳技术的分类

毛细管电泳根据其原理可分为：毛细管区带电泳 (CZE)；毛细管凝胶电泳 (CGE)；毛细管胶束电动力学毛细管电泳 (MECC)；毛细管等电聚焦电泳 (IEF)；毛细管等速聚焦电泳 (ITP)。

一、毛细管区带电泳 CZE

原理：毛细管区带电泳也称为自由溶液毛细管电泳，是毛细管电泳中最简单的一种形式。其分离机理是基于各被分离物质的净电荷与质量之间比值的差异，不同离子按照各自表面电荷密度的差异以不同的速度在电解质中移动，而导致分离。毛细管区带电泳要求缓冲液具有均一性，毛细管内各处具有恒定的电场强度。

毛细管区带电泳分离中的有关因素：

1. 工作电压的选择

在一般情况下，毛细管的分离柱效随电压的增大而提高。当超过极点时，随着电压的增大焦耳热的产生加剧，柱效反而会下降。极点的电压值视系统配置和分离组分的不同而不同

2. 缓冲液的选择

一般选择磷酸、醋酸和硼酸缓冲液，但应注意其 pH 值和浓度的控制。

pH 值的选择原则：

(1) 缓冲液的 pH 值必须比被分离物质的等电点高或低 1 个 pH 值单位，以便得到合适的电泳淌度。

(2) 在条件许可的情况下尽可能采用酸性缓冲液, 使得毛细管壁上的吸附和电渗流降低, 提高毛细管涂层的寿命。

表 11-2 毛细管电泳常用缓冲液

	缓冲液	pH 值范围		缓冲液	pH 值范围
两性缓冲液	磷酸盐	1.14~ 3.14	两性缓冲液	MES	5.15~ 7.15
	醋酸盐	3.76~ 5.76		PIPES	5.80~ 7.80
	磷酸盐	6.20~ 8.20		HEPES	6.55~ 8.55
	硼酸盐	8.14~ 10.14		Tricine	7.15~ 9.15
				Tris	7.30~ 9.30

(3) 在分离蛋白质时, 蛋白质的等电点若低于缓冲液 pH 值, 极性放置是 $+\rightarrow-$, 反之应是 $-\rightarrow+$ 。

3. 缓冲液的浓度选择

在一般情况下, 浓度增加被分离物质的迁移速度下降, 有利于分离效果的提高, 尤其是对某些特殊的分离, 但随着缓冲液浓度的增大, 粘度增加, 电渗流和焦耳热增大, 给分离造成反作用。因此, 在实际分离中必须对缓冲液浓度做优化选择。

4. 缓冲液中的不同添加剂选择

在区带电泳中, 不同的缓冲液添加剂可改变分离的选择性, 也可改变电泳淌度。因此, 在区带电泳分离中选用一种合适的缓冲液添加剂是改善分离的极有效方法。图 11-5 是利用区带电泳技术分离维生素图谱。

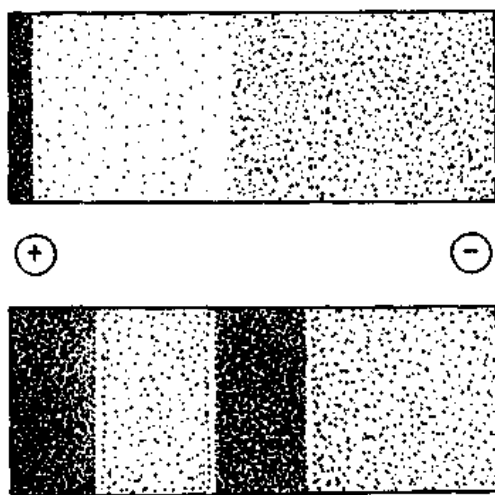


图 11-4 毛细管区带电泳原理图

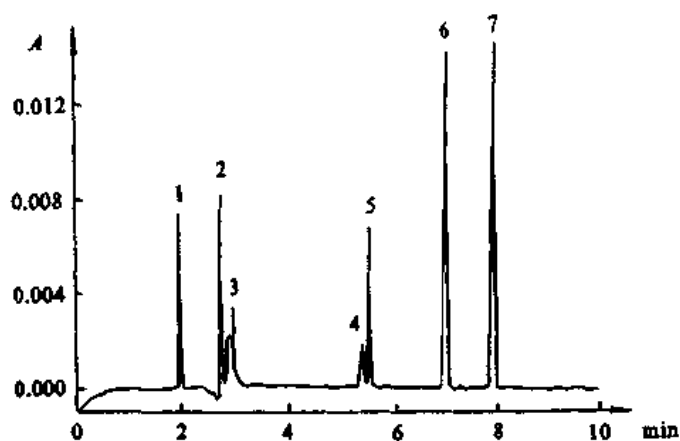


图 11-5 区带电泳进行水溶性维生素的分离图谱

1. B₁ 2. B₁₂ 3. B₆ 4. Vc 5. V_K 6. 烟酸 7. 泛酸

表 11-3 缓冲液中添加剂作用

添加剂	功能	添加剂	功能
无机盐	改变蛋白质结构	阴离子表面活性剂	改变毛细管壁的特性
有机溶剂	增加溶解度,减少电渗流	纤维素衍生物	减少电渗流,提供一个筛滤介质
尿素	增加蛋白质溶解度,使低聚核苷酸变性	胺类	覆盖硅烷基团
磺酸	离子对作用,疏水作用		

二、毛细管凝胶电泳 CGE

原理: 凝胶电泳是用凝胶物质作为支撑物进行分离的区带电泳技术。凝胶是一种固态的分散体系,它具有多孔性,具有类似于分子筛的作用。被分离物质在通过装有凝胶的毛细管时,按照各自分子的体积大小逐一分离,分子体积大的首先被分离出来。如图 11-6 毛细管凝胶材料可分为无机凝胶和有机凝胶或分为物理和化学凝胶。无机凝胶有多孔硅胶、多孔玻璃;有机凝胶有葡聚糖、交联聚丙烯酰胺和环脂糖等。在毛细管凝胶电泳中常用的材料是十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE), 甲基纤维素, 羟基丙基甲基纤维素等。

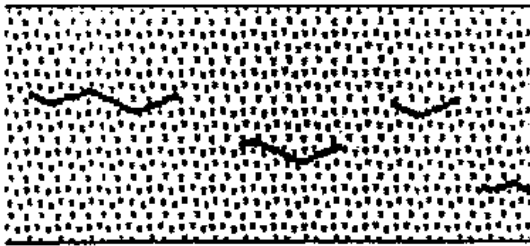


图 11-6 毛细管凝胶电泳原理图

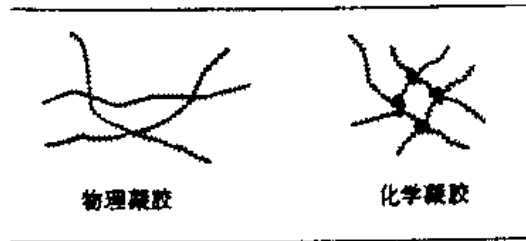


图 11-7 两类不同的凝胶结构

无胶筛分作用,使用粘度低的线性聚合物,如甲基纤维素等取代聚丙烯酰胺。这种聚合物的溶液仍有分子筛的作用,只是不聚合,因而避免了空泡的形成。它与凝胶相比具有方便、柱子寿命长等优点。其功能可通过调节不同的线性聚合物加以变化和扩充,通常只需一根简单毛细管就可对一些分子进行分离,但分辨能力不如凝胶柱。

毛细管凝胶电泳的应用:

1. DNA 的测定

毛细管凝胶电泳和无胶筛分析技术已广泛地用于低聚核酸段、引物、探针和不敏感的低聚 DNA 的高灵敏分析,以及双链 DNA 片段大小的测定,对未经制备的 PCR 产物可进行高灵敏度的检测。由于毛细管凝胶电泳具有低消耗、快速、高效等优点,因此,它极有可能发展成为第二代 DNA 序列测定仪。

2. 利用 SDS 分离蛋白质

SDS (十二烷基磺酸钠)是一种阴离子表面活性剂,被分离的蛋白质与 SDS 键合、改性,使蛋白质由球状转变为棒状,而 SDS 分子的负电荷掩盖了蛋白质分子原有的电荷,每克蛋白质可吸附约 1.4g SDS,从而形成有确定的电荷/体积比的蛋白质

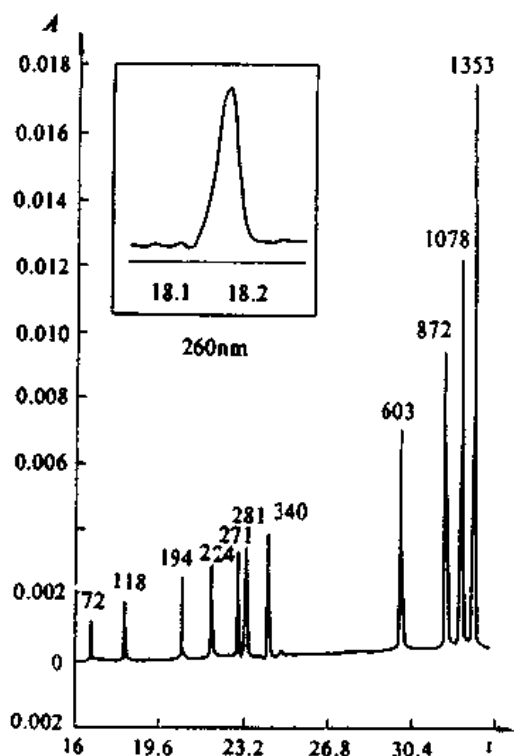


图 11-8 ϕ X174DNA 的 *Hae*III 限制酶切产物的分离图谱

-SDS 络合物，在聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳时，各蛋白质棒状分子具有相等的电荷密度。因此，这种电泳分离是纯粹地按分子体积大小进行的。在蛋白质的测定中，SDS 毛细管凝胶电泳可用于分子量

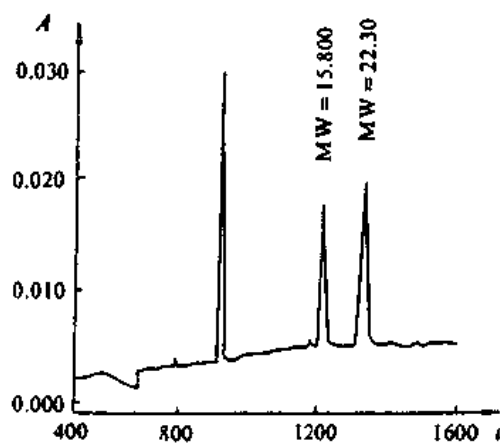


图 11-9 凝胶电泳测定蛋白质的分子量分离图谱

大小的测定。目前市场上有专门测定蛋白质分子量的试剂盒。

三、毛细管胶束电动力学毛细管电泳 MECC

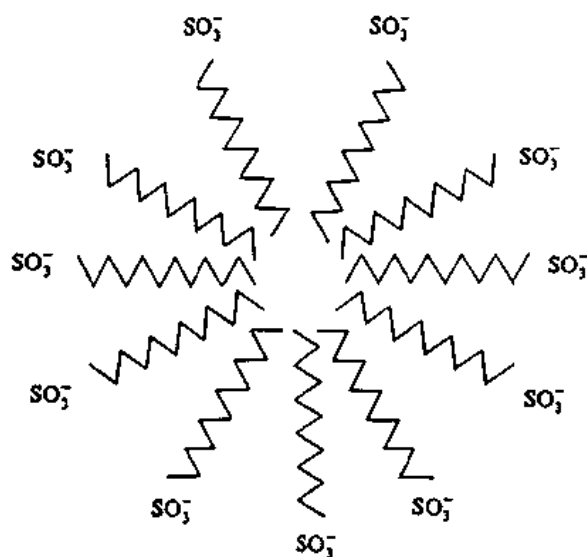


图 11-10 SDS 胶束的结构

毛细管胶束电动力学毛细管技术是近些年刚刚推出的一项新技术，这一技术的最大特点是在应用毛细管电泳分离离子化合物的同时进行中性物质的分离，因此在许多领域特别是在生物制药领域显示了广泛的应用前景。

原理：在 MECC 中，当把离子型表面活性剂加入到缓冲液中，并且其浓度足够大时，其表面活性剂的单体结合在一起，形成一个球体胶束。目前以 SDS 使用最为普遍。如图 11-10。

在 MECC 系统中的两相即流动水相和胶束固定相，当被分离物在这两相之间分配时，由于它们在胶束中具有保留能力而产生不同的保留时间。和区带电泳一样，缓冲液在管壁形成正电，使其显示强烈的向负极移动的电渗流，而 SDS 胶束由于其外壳带负电性，具有向正极迁移的倾向。在一般情况下，电渗流的速度大于胶束的迁移速度。因此，迫使胶束最终以较低的速度向负极移动。图 11-11 为 MECC 原理图。图中 K_1 、 K_2 、 K_3 为分配系数，其数值大小取决于缓冲液的 pH 值和物质结构。电泳淌度分别大

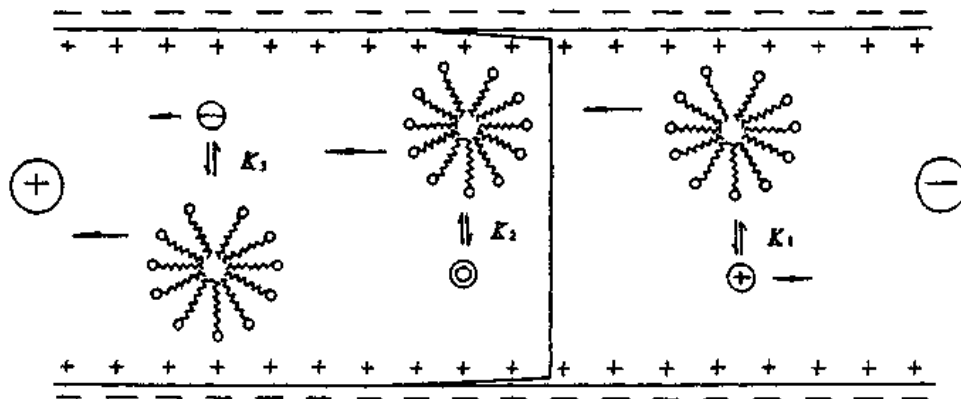


图 11-11 毛细管胶束电动力学毛细管电泳原理图

于阴离子、中性离子、阳离子和胶束的淌度，所以，所有粒子向阴极移动。

MECC 的优点：

1. 具有极高的分离效率，与 HPLC 比较，HPLC 的分离效率为 5 000~25 000 理论塔板数，MECC 可产生 50 000~50 0000 理论塔板数。
2. 分离速度快。对一些复杂成分有时仅需几分钟时间。
3. 可分离中性化合物。

在 MECC 中选择表面活性剂必须符合几个要求：单一粒度非常小；在溶液中稳定性好；粒子表面带负电荷；被分离组分溶质进出非常快。表 11-4 为表面活性剂常见类型。

表 11-4 表面活性剂的分类

类 型	名 称
阴离子 表面活性剂	十烷基硫酸钠 十二烷基硫酸钠(SDS) 十四烷基硫酸钠(STS) 十二烷基磷酸钠
阳离子 表面活性剂	氯化十二烷基三甲基季胺(DTAC) 溴化十二烷基三甲基季胺(DTAB) 氯化十六烷基三甲基季胺(CTAC) 溴化十六烷基三甲基季胺(CTAB)
非胶束型 体 系	2-羟甲基-β-环糊精 磷酸化单分散的聚合物

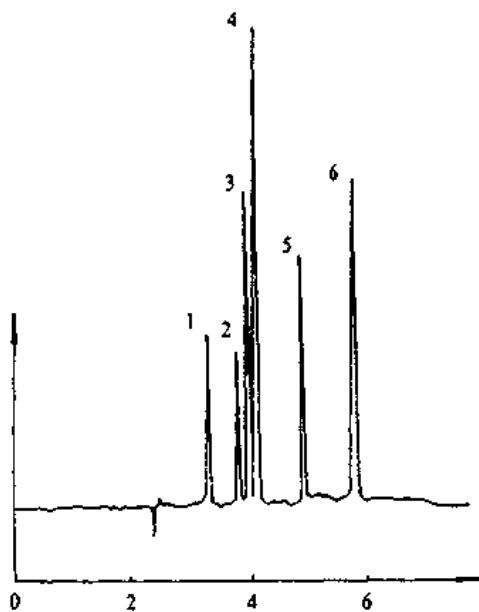


图 11-12 应用胶束电动力学电泳
分离类黄酮的图谱

1. 柚皮苷 2. 芦丁 3. 4',5,7-三羟基黄酮
4. 桔皮素 5. 桑色素 6. 5,7-二羟基黄酮

在 MECC 实际应用中有时可通过改变流动相进行选择性的调节，通常可改变缓冲液的种类、成分、pH 值和离子强度，同时也可添加有机改良剂，如丙醇、甲醇和乙腈等。

四、毛细管等电聚焦电泳 IEF

原理：两性电解质在分离介质中的迁移形成 pH 值梯度，各种具有不同等电点的蛋白质按照这一梯度迁移到其等电点位置，并在该点停留，由此产生一条非常窄的聚焦区带，并使不同的蛋白质聚焦在不同的位置上。如图 11-13。

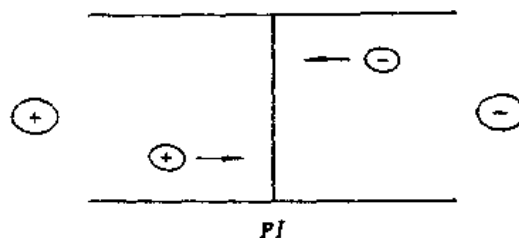


图 11-13 毛细管等电聚焦电泳原理图

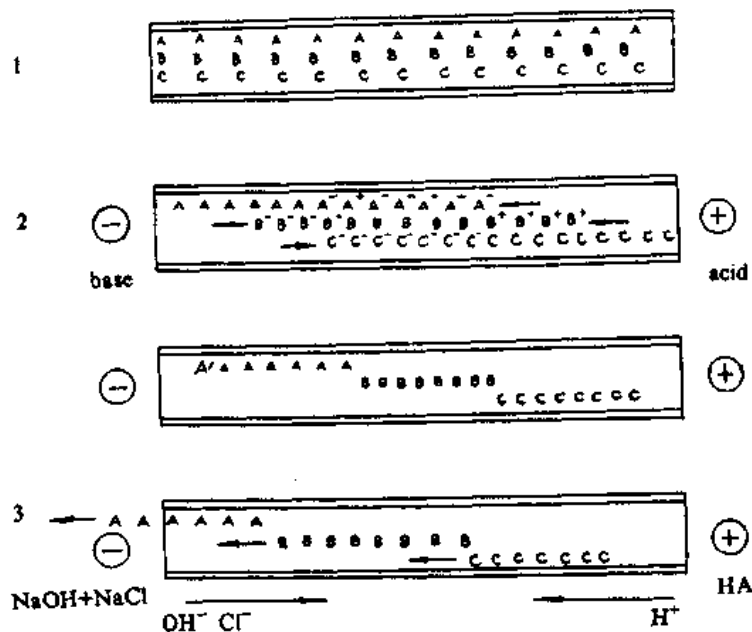


图 11-14 毛细管等电聚焦的电泳分离过程

1. 进样 2. 聚焦 3. 迁移

毛细管等电聚焦的运行过程可分为三个步骤:

1. 进样, 把样品与两性电解质混合。
2. 聚焦, 加高电压 3~4min, 在整个毛细管长度范围内建立一个 pH 值梯度, 以便使样品在毛细管中向各自的等电点聚焦移动, 形成一条由不同组分排列的带子。
3. 迁移, 阴极的缓冲液换成盐类后, 再加上电压, 使末端引起梯度降低, 让组分逐个通过检测器。如图 11-14 所示。

IEF 对于测定蛋白质的等电点是极为有用的, 尤其对免疫球蛋白、变异血红蛋白和经转录变性的重组蛋白的测定更为有效。如图 11-15 所示。

五、毛细管等速聚焦电泳 ITP

原理: 毛细管等速电泳是电泳中唯一的一种在被分离组分与电解质一起向前移动时, 进行聚焦分离的电泳方法。同等电聚焦电泳一样等速聚焦电泳在毛细管中的电渗流为零, 缓冲液系统由前后两种不同淌度的电解质组成。在分离时, 毛细管内首先导入具有比被分离各组分高电泳淌度的前导电解质 (Leading Electrolyte), 然后进样, 随后再导入比各分离组分低电泳淌度的尾随电解质 (Terminating Electrolyte)。在强电场作用下, 各被分离组分在前导电解质与尾随电解质之间的空隙中发生聚焦分离, 如图 11-16 所示。

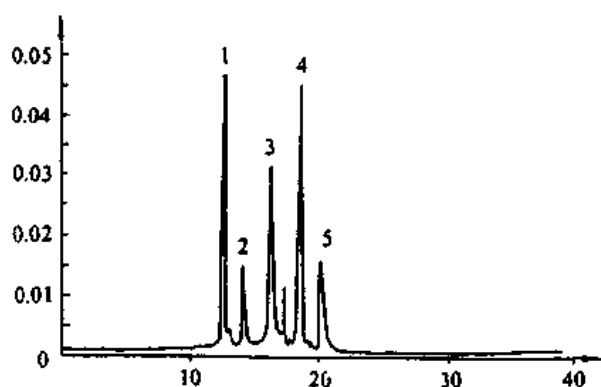


图 11-15 应用等点电聚焦电泳分离蛋白质图谱

1. 马心脏肌红蛋白
2. 马心脏肌红蛋白
3. 人红血球碳酸酐酶
4. 牛红血球碳酸酐酶
5. β -乳球蛋白 A

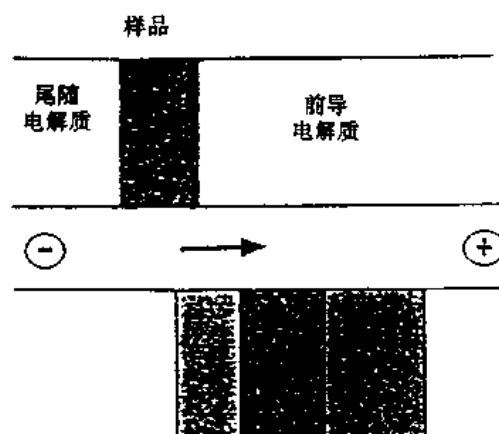


图 11-16 毛细管等速聚焦电泳原理图

等速电泳操作条件的选择:

在实际应用中使用经处理或未处理的硅胶毛细管都可以, 电渗流可用 0.25% 的羟脯氨酸酰甲基纤维素抑制, 一种理想的前导电解质是 5nM 的磷酸。缬氨酸 (100nM 用伯胺调节适当 pH 值) 是一种有效的尾随电解质。在分离开始时, 电流会由于高淌度的电解质完全充满毛细管而迅速增大。当进入分离过程时, 电流会随着低淌度电解质进入毛细管而下降。

第六节 毛细管电泳在生物技术中的应用

一、毛细管电泳分析 DNA 限制片断及 PCR 产物

由限制核酸内切酶消化或聚合酶链反应产物产生的双链 DNA 分子的特性对许多生物分子的研究起着重要作用。对 DNA 片段的大小及浓度的测定传统上是用琼脂糖或聚丙烯酰胺的平板凝胶电泳来完成的。虽然，这种典型的方法可以提供许多有用的资料，但是，这种技术费时、耗工且难于自动化，进一步的定量分析则需电泳分离后的染色、显色及检测技术。

高效毛细管电泳技术（HPCE 法）克服了平板凝胶技术本身的缺点，不需要琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶的制备技术。此外，定量准确，样品间的重现性好及方便的数据管理使得 CE 法在双链 DNA 的分析中比平板凝胶电泳更具魅力。

方法应用的基本条件是：

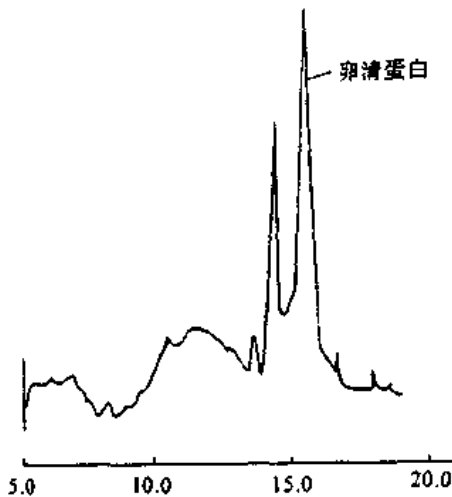


图 11-17 毛细管电泳分析卵清蛋白

样品浓度: 400ppm
缓冲液: 50mM 磷酸, pH 值 2.00
进样方式及时间: 重力法, 15s
电压: 15kV
灵敏度: 0.01
波 长: 214nm

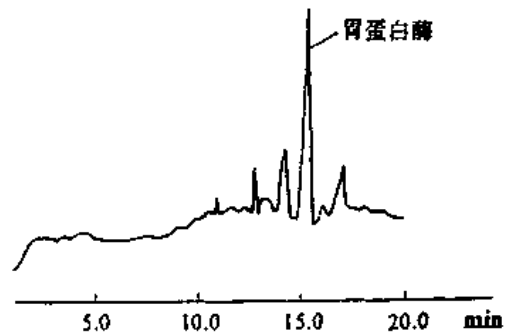


图 11-18 毛细管电泳分析胃蛋白酶

样品浓度: 150ppm
缓冲液: 50mM 磷酸, pH 值 2.00
进样方式及时间: 重力法, 15s
电压: 15kV
灵敏度: 0.01
波 长: 185nm

样品: 1kb DNA 片断 250mg/μL

毛细管: Waters Accusep™ 100μm × 60cm

电解液: 50mM 磷酸钠, 用 0.5% 氢氧化钠甲基纤维素调 pH 值 5.0

进样方式: 5kV 电迁移法 15s

工作电压: 10kV

分析应用时要注意毛细管电泳仪可以提供高分离度的 DNA 片断, 碱基对可以从 50 到 12 000, 不需用商品的凝胶填充毛细管, 虽然用 PCR 技术可以扩增微量的 DNA, 但最终 PCR 产品的浓度可能仍很低, 难于用具有在线 UV 检测的毛细管电泳技术检测。

由于 PCR 反应的混合物中具有比 CE 法所用缓冲液更高的电解质浓度, 因此, 电迁移法或重力法进样均不能满意地增加进样量, 因此, 在进样前, 可以用 Millipore Ultrafree™ MC 的超滤膜 (3 000NMWL) 进行样品处理达到有效脱盐的目的, 然后用电迁移进样可以达到低浓度的检测。

利用 CE 法分析 DNA 片断可在 45min 内完成, 迁移时间及峰面积的相对标准偏差分别为 1.3% 和 5% (4 次重复进样)。

二、蛋白质的分离应用

高效毛细管电泳是一种新型的, 可用于各种溶液样品分析的高效、快速定量分析方法, 对于一些样品比色谱与电泳的分辨率好, 灵敏度高, 进样量少, 特别适用生物样品分离研究。如图所示。

思 考 题

1. 毛细管电泳仪工作原理及特点。
2. 毛细管电泳的分类。

第三篇 电磁波谱法

第十二章 质谱法

第一节 概述

混合的气体（或固体、液体的蒸汽）先被电子束所离子化，然后穿过电场与磁场，按离子的质荷比分开为若干离子束，称为质谱。按质荷比大小顺序收集和记录离子的图谱称为质谱图。根据质谱图中离子质荷比大小和相对强度可对物质进行结构定性和定量分析。

质谱法（Mass Spectrometry, 简写 MS）实质上是分离和测定分子、离子或原子质量的一种物理方法，所以从本质看，质谱与红外、紫外等光谱不同，它不是吸收光谱，而是物质粒子的质量谱。

质谱分析法始于本世纪初，但直到第二次世界大战以后，为了适应原子能和石油化学工业生产的需要才有了迅猛的发展，尤其是在实现了质谱仪和色谱仪联用以及用计算机进行数据处理之后，质谱分析的效能得到进一步提高，在化学及相关学科领域中应用越来越广泛。

质谱法有如下特点：

1. 灵敏度高，一般为 $10^{-9} \sim 10^{-11} \text{g}$ ；
2. 响应时间短，扫描 $1 \sim 1000 \text{u}$ （原子质量单位）一般仅需一至几秒钟，使得它能与气相和液相色谱联用，自动化程度高；
3. 准确度高，当代高分辨的有机质谱计可以精确地测定质量到小数点后 4~5 位；
4. 信息量大，能得到大量的结构信息，此外还可测定分子式。

第二节 质谱法原理

质谱分析法的原理是先将待分析样品变成气态，在具有一定能量的电子束轰击下，成为快速运动的带正电荷的离子，这些离子在电场与磁场作用下，按其质量与电荷的比

式中, m 为离子质量, e 为离子的电荷, v 为离子穿过入射狭缝 S_1 的速度, E_0 为离子穿过 S_0 时的起始动能. 一般说来, 离子起始动能比 eV 小得多, 可以忽略. 因此上式可写为:

$$\frac{1}{2}mv^2 = eV \quad (12-2)$$

设有均匀磁场 H , 方向垂直纸面向上. 离子在磁场 H 中受罗伦茨力 Hev 的作用作圆周运动, 其向心加速度为 $\frac{v^2}{R}$, 由此可得:

$$Hev = \frac{mv^2}{R} \quad (12-3)$$

其中 R 为圆周运动的半径. 从 (12-2) 和 (12-3) 可得到:

$$\frac{m}{e} = \frac{H^2 R^2}{2V} \quad \text{或} \quad R = \sqrt{\frac{2V}{H^2} \cdot \frac{m}{e}} \quad (12-4)$$

(12-4) 式是质谱法的基本方程, 当 H 、 V 一定时, 对某一个质荷比 $\frac{m}{e}$ 的离子, 其 R 一定, $\frac{m}{e}$ 大的 R 大, $\frac{m}{e}$ 小的 R 小, 因此在 180° 处按 $\frac{m}{e}$ 的大小排成谱线. 当我们在 180° 处设一出射狭缝 S_2 及 H 、 V 取某个数值时, 则只有某个一定 $\frac{m}{e}$ 值的离子通过出射狭缝 S_2 , 其它的被挡住. 改变 H 或 V 就可以得到按 $\frac{m}{e}$ 的大小排成的谱线. 大多数质谱仪是将 H 、 R 固定, 调整加速电压 V 进行扫描来得到质谱. 图 12-2 为空气与残余杂质的质谱图.

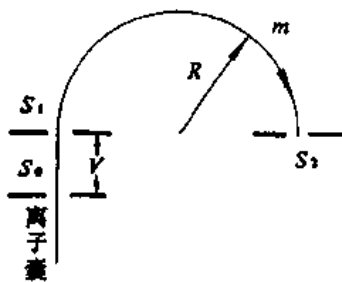


图 12-1 半圆形质谱仪示意图

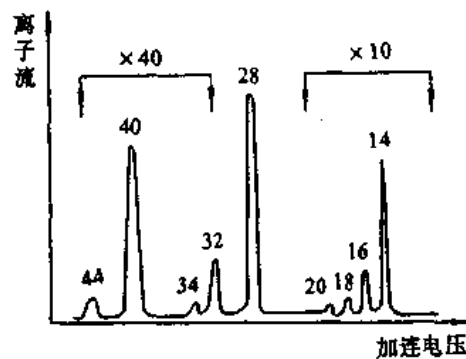


图 12-2 空气与残余杂质的质谱图

1961 年国际上议定以碳的同位素 ^{12}C 原子量的十二分之一为原子质量单位. 我们常用“质量数”来表示质量. 某原子的质量数等于它的原子量的整数值, 也等于该原子核

中质子数和中子数的总和。这种质量数的表示法不怎么精确，但有其方便之处，故常常用它。当离子质量 m 用原子质量单位，电荷用一个电子所带的电荷为单位即一次电离的离子其 $e=1$ ， H 用高斯、 V 用伏特、 R 用厘米作单位，则：

$$\frac{m}{e} = 4.79 \times 10^{-5} \frac{R^2 H^2}{2V}$$

或
$$R = \frac{144}{H} \sqrt{\frac{mV}{e}} \quad (12-5)$$

离子束通过入射狭缝 S_1 进入磁场的方向并不是完全一致的，它们有不同的角度。如图 12-3 所示，设质量、能量都相同的三个离子 1, 2, 3 同时由入射狭缝的某位置 P 进入磁场，离子 1 和离子 3 分别以 α 和 $-\alpha$ 角进入磁场，在磁场作用下散开，在 180° 处并不聚成一点而是散开成 ΔP ，只有再转 180° 才重新聚在点 P 上，也就是说在磁透镜作用下， P 点在 180° 处产生像差 ΔP ，在 360° 处又完全聚焦，没有像差。计算结果表明：

$$\Delta P = Rx^2 - \frac{2R\alpha^4}{4} - \dots$$

这说明在 180° 处的像差只消除 α 的一次项，还有二次项，三次项 \dots 等没有消除。在实际的质谱仪中 α 很小，因此只要能消除 α 的一次项与二次项就达到完全聚焦目的了，能实现方向聚焦的称单聚焦。

由于离子进入狭缝 S_0 的起始动能不同及在加速过程所处位置不同等原因，其动能 $\frac{1}{2}mv^2$ 并不是相同的，也就是说离子的能量不是单一值。进入入射狭缝 S_1 的离子，因能量不同也会造成离子在 180° 处的分散。如果能把不同能量的离子实现聚焦就称为能量聚焦。

既能实现方向聚焦，又能实现能量聚焦称之为双聚焦。

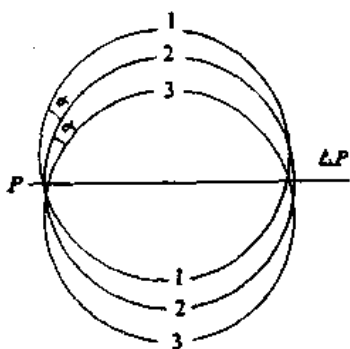


图 12-3 半圆形单聚焦图

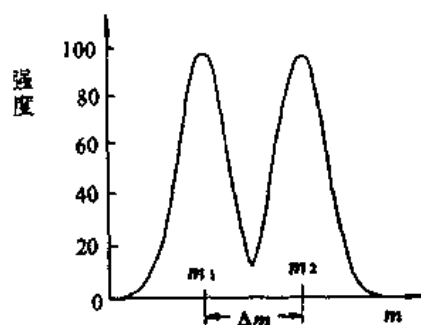


图 12-4 质谱仪的分辨本领图

质谱仪的分辨率表示它能分辨最小质量差的能力。设有两个质量数为 m_1 、 m_2 的质谱峰，如图 12-4 所示。我们规定在两峰交界的“谷”处值为峰值的 10% 时，刚好能够分

开，再靠近些就分不开了。分辨率定义为：

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{m_1(\text{或}m_2)}{m_2 - m_1}$$

对 (12-5) 式微分后可得到：

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{R}{2\Delta R} \quad (12-6)$$

设入射狭缝的宽度为 S_1 ，出射狭缝的宽度为 S_2 ，如果离子束运动过程中没有像差即完全聚焦，则分辨率的理论值为：

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{R}{S_1 + S_2} \quad (12-7)$$

实际上不可能没有像差，设像差为 ΔS ，则

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{R}{S_1 + S_2 + \Delta S} \quad (12-8)$$

第三节 质谱仪

质谱仪有三个主要部分构成。一是离子源，样品在此部件里离子化，离子在电场中加速。二是质量分析器，离子在此部件里按质荷比大小得到分离。三是离子检测器，检测经过质量分析器分离后的离子，产生电讯号。另外真空系统和电子系统也是必要的。离子在质量分析器内运动，由于与其它分子的碰撞会产生能量的变化，会产生散射，这将严重影响质量分析的灵敏度、分辨率，因此必须在真空条件下进行。这样才能大大减少离子与残余气体分子相碰撞。离子源工作压强要求低于 10^{-2}Pa ，质量分析器的工作压强低于 10^{-4}Pa 。

一、离子源

质谱仪是利用电磁原理进行分析的，中性的原子或分子不能起作用，因此必须将样品在离子源中离子化并被加速。离子源将离子会聚成一定几何形状和一定能量的离子束。离子源与质谱仪的灵敏度、分辨率等有极大关系，它是质谱仪的关键性部件。

电离的方法很多，常用电子轰击型离子源。从直热式阴极发射出电子来，此电子轰击样品的气态分子（样品如为固体，需先加热，气化后进入电离室）产生正离子或负离子。另外还有场致电离，化学电离，光致电离等方法。

我们希望从离子源出来的离子束强度大，能量分散小，分散角小。离子束强度的稳定性也相当重要。由于离子源中的很多部件可能产生除样品以外的其它离子，这些其它离子会干扰样品离子的分析，在实际使用中应注意。

二、质量分析器

质量分析器是质谱仪的主体。根据磁场类型不同可分 180° 型及扇形式两种。它们在原理上都是一样的，图 12-5 所示，离子束在 180° 型里，其运动轨迹都在均磁场

中。在扇形式质谱仪里，离子束在扇形磁场中运动。扇形磁场质谱仪具有结构灵活、磁铁轻等优点，其缺点是所占空间大，仪器尺寸较长。180°型质谱仪的磁铁重，分析器的人射和出射狭缝在磁场边缘，因此不易调节，但有结构紧凑，使用简便等优点。

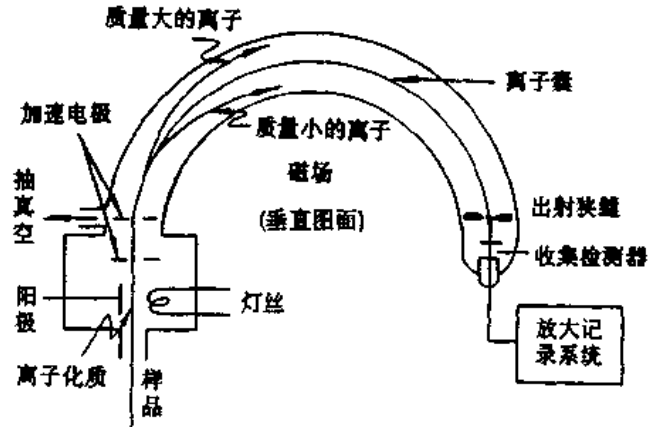


图 12-5 180°型质谱仪简图

在分析某些样品时如要求高分辨率本领，单聚焦质谱仪不能满足此要求。双聚焦质谱仪不仅有方向聚焦而且有能量聚焦，因此分辨本领高，如果我们在磁分析器前加上径向电场 E 就可以达到双聚焦的目的。离子在电场 E 作用下作圆周运动，其半径为 r ，与磁分析器作类似的讨论，其运动方程式为：

$$eE = \frac{mv^2}{r} \quad (12-9)$$

对于一定的 E 、 r 值离子的动能 $\frac{1}{2}mv^2$ 也一定，即通过狭缝 S_2 的离子其动能一定，这就实现了能量聚焦。图 12-6 为双聚焦质谱仪示意图。

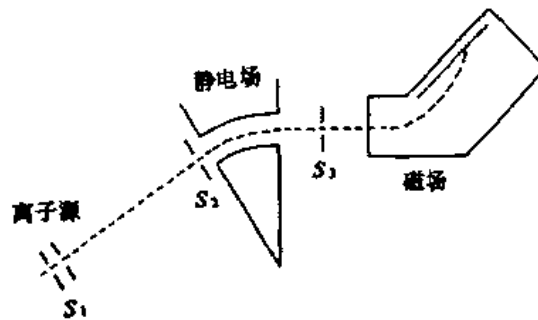


图 12-6 双聚焦质谱仪示意图

前面所讨论的 180°型、扇形式、双聚焦质谱仪属于静态仪器。在这类仪器中的电场、磁场、离子轨道半径等参数都是一定的，我们改变这些参数只是为了记录质谱，并不是质量分离原理所必需。在动态质谱仪中我们使用周期性的交变电场（有时也同时使

用静态磁场)来实现质量分离,飞行时间质谱仪就是这类仪器。从灯丝阴极发射的电子,受到阳极的作用得到加速,这些电子轰击样品的气态分子,使样品分子离子化,离子束受到加速电子栅的作用后得到加速,以速度 v 进入长度为 L 的无电场的自由空间,离子飞越长度为 L 的路程后到达离子阴极收集处,如果离子的电荷和动能相同,则质量小的先到达收集处,质量重的后到达,因此按时间的先后可实现质量分离。忽略离子起始动能,从(12-1)式可得到离子速度为:

$$v = \sqrt{\frac{2eV}{m}} \quad (12-10)$$

离子飞越长度 L 的自由空间所需时间:

$$T = \frac{L}{v} = L\sqrt{\frac{m}{2eV}} \quad (12-11)$$

从(12-11)式可显然看到:当 L 、 V 取一定值,则不同的质荷比 m/e 其飞行时间 T 不同。这种飞行时间质谱仪需处于脉冲工作状态,否则就无法确定离子的起始时间和到达时间,无法区分到达收集处的不同质量的离子。这类仪器不需要笨重的磁铁,结构简单,由于离子在长度 L 中的飞行时间短,因此分析速度快是这类仪器的突出优点。为了在短时间内能快速记录微弱的离子流,仪器对电子器件要求较高。在快速分析中这类仪器有其独特的作用。动态质谱仪还有四极滤质器、单极质谱计、回旋质谱计等。

三、检测器

离子束经质量分析器按质量大小分离后,到达检测或收集系统,根据到达检测或收集系统的离子数量和类型进行质谱分析或同位素制备。其方法主要有:

1. 离子流直接检测法。采用一定型式的收集电极来接受离子流,收集电极与直流放大器的输出端相连接,被接受的离子流就输入到直流放大器里放大和测量。由于离子流一般小于 10^{-9} A,经常只有 $10^{-12} \sim 10^{-15}$ A,这就要求直流放大器的输入电阻较大,放大器的输入电容应尽量小些,否则放大器的时间常数就大了。收集电极也可与静电计等连接使用。在离子束调制的情形里使用交流放大器使最小检测量约为 $10^{-14} \sim 10^{-16}$ A,时间常数约为 $0.1 \sim 1$ s。此法不适宜于快速分析,但测量的线性较好,结构简单。

2. 电子倍增器。与分光光度计里所讲到光电倍增管类似,当离子束轰击阴极表面时可从阴极打出电子来,这些电子又从后面的电极里打击出二次电子来,经过多级电极的作用后,电子倍增器阳极所收集的电子流比离子流放大了很多倍,如多级电极的数目为 $10 \sim 20$,则放大倍数约为 $10^5 \sim 10^8$ 。电子倍增器有多种类型,不同的类型其结构不同。电子倍增器一般能检测 $10^{-17} \sim 10^{-19}$ A 的弱电流,但线性不怎么好,电子倍增器的上升时间约为 $10^{-9} \sim 10^{-11}$ s,宜作快速测量。

3. 照相板法。这种方法与光谱仪器中用照相底片记录光谱相似,我们可以用照相板来记录离子束的强度,这种方法简易,省去了电子学测量仪器,但分析的精度低。

此外还有闪烁体与光电倍增管连用的检测器及半导体检测器,它们可以检测更弱的

例如 10^{-20} A 的离子流。

检测器的好坏影响整个质谱仪的测量灵敏度、测量精度及时间常数，因此必须选择和使用合适的检测器才能取得较好的分析效果。

四、质谱测定

质谱仪可精确的测定离子的质量及其相对含量。

在静态质谱仪中，质荷比 m/e 被 H 、 V 、 R 三个量确定。我们可以固定其中两个量，改变一个量来得到质谱。固定 R 时可采取电扫描方法改变加速电压 V ，或采取磁扫描方法改变磁场强度 H 。电扫描法的优点是：可精确测量电压，改变加速电压适合作快速分析。但在扫描过程中仪器的灵敏度和分辨本领随加速电压的降低而下降，灵敏度是变动的，这是电扫描的缺点。在测量大质量离子时这个缺点就更显著。磁扫描的优点是在扫描过程中仪器的灵敏度和分辨本领保持不变，但精确测量磁场较难，扫描有滞后时间。对于小型质谱仪采用电扫描方便。对于大型质谱仪，测量大质量离子时采用磁扫描有利。也可以固定 V 及 H ，在不同的 R 处检测离子流。在动态质谱中，对时间、电压或频率进行测定，从而确定质荷比 m/e 。我们可以用一系列已知质量的标准样品来对质谱仪进行标定，作测量值（电压或磁场强度等）与标准样品的质量关系曲线，根据标准曲线就可查得待测样品测量值对应的质量。

离子流的强度经过检测器及电子装置后转换成电压值、电流值、电量、脉冲数或照相版的黑度。质谱图曲线可表示为：

$$A = F(x) \quad (12-12)$$

式中 X 可以是电压、磁场强度、距离、时间等。 A 是离子流强度，就是上面讲的电压、脉冲数等。经过标定后可直接表示为离子浓度与质荷比的质谱图。

第四节 质谱分析

质谱图一般采用棒图，如图 12-7 所示。

质谱图的横坐标表示质荷比 m/e ，纵坐标为离子强度，它是以丰度来表示的。丰度有相对丰度和绝对丰度两种表示方法，相对丰度是以强度最大的峰（称为标准峰或基峰）为 100，其余的峰按与标准峰的丰度比表示，也叫百分相对丰度。一般的质谱图都用此种方法表示。绝对丰度是各离子峰的高度占有所有离子峰的高度相加总和的百分数。

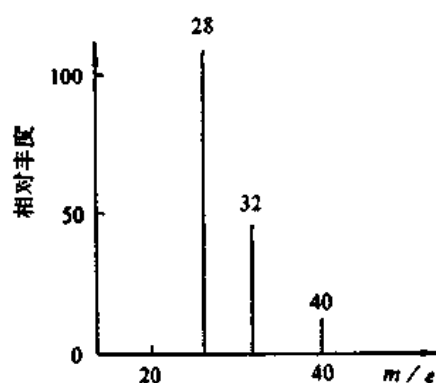
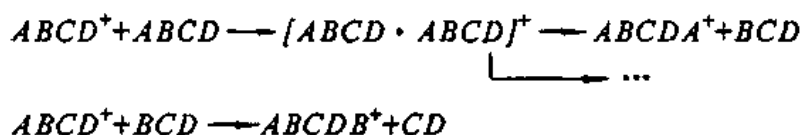


图 12-7 空气质谱图

样品的质谱图测出后，就要分析质谱图中的谱线是什么离子产生的，这些离子又是怎样由样品所形成的。

质谱仪的离子源如果采用电子轰击型，则原子 A 在轰击电子作用下失去一个电



由于是二级反应过程, 发生的可能性小. 在高真空条件下, 可以忽略这种类型的离子. 分子受电子轰击后可失掉两个以上的电子, 形成多电荷离子峰. 在正常离解条件下, 有机化合物只产生单电荷或双电荷峰. 双电荷峰在 $M/2$ 处. 另外, 在上述过程中所形成的离子是处于亚稳状态, 其半衰期大约 $10^{-6}s$. 这些亚稳离子在加速及通过质量分析器的路程中很易再裂解, 从而形成峰形不尖锐的亚稳峰.

对于质谱进行分析是复杂的. 各种化合物的分子离子峰, 碎片离子峰, 同位素, 双电荷峰, 亚稳峰的位置和相对强度均不相同, 各自有其特点. 因此需要有实践经验才能得出正确分析结论.

例如正丁烷 (C_4H_{10} 或写为 $CH_3-CH_2-CH_2-CH_3$) 质谱图, 如图 12-6 所示. 我们称相对强度最大的峰为基峰. 令基峰的相对强度为 100. 这样的质谱图称为归一化质谱图. 为清楚起见, 我们将峰形不画出, 只是用直线表示. 正丁烷的各峰为:

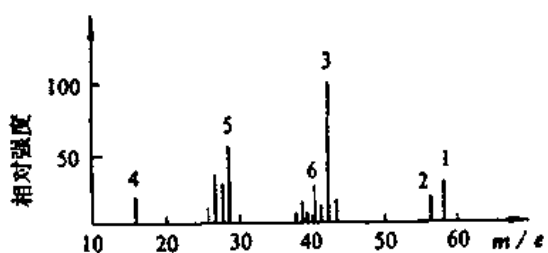
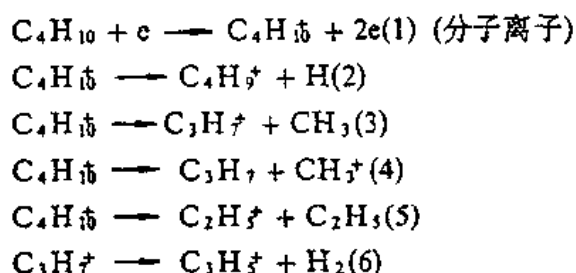


图 12-6 正丁烷质谱图

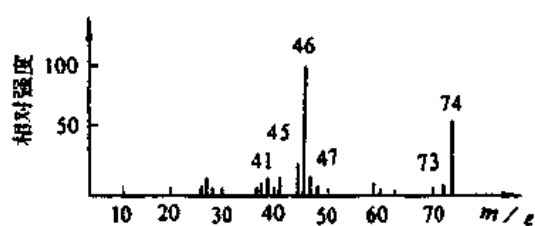


图 12-7 噻环丁烷(C_4H_8S)的质谱图

其它峰为一级产物进一步裂解后形成的如过程 (6) 所示.

又如噻环丁烷 (C_4H_8S) 的质谱图如图 12-7 所示. 它们分别是 $C_4H_8S^+(\frac{m}{e} = 74,$ 分子离子), $C_3H_5S^+(73)$, $CH_3S^+(47)$, $CH_2S^+(46)$, $CHS^+(45)$, $C_3H_5^+(41)$ 的离子峰.

第五节 定性定量分析

一、定性分析

对于元素进行定性分析是将测量到的样品质谱图与各元素标准的同位素质谱图相对照。由于每个元素有它自己的特征同位素质谱图，因此不难判断何种元素存在。对于化合物特别是有机化合物进行定性分析就比较复杂，需对其质谱进行仔细分析才能得到正确分析结论。我们可以通过测量化合物的分子量来帮助判断化合物是什么。例如嘌呤 $C_5H_4N_4$ (分子量为 120.44)，苯基脒 $C_7H_8N_2$ (120.69)，乙基甲苯 C_9H_{12} (120.094)，苯乙酮 C_8H_8O (120.157)，在高分辨的质谱仪中是完全可以分开的，且能精确测定，如果测量值是 120.094，则此化合物很可能是乙基甲苯。另外对化合物的碎片进行分析可以帮助我们判断化合物是何物。

二、定量分析

质谱法是测定同位素含量强有力的工具。可以根据同位素相应峰的高度（或面积）来求出同位素之间的相对含量。 2H 、 ^{13}C 、 ^{18}O 、 ^{15}N 、 ^{34}S 等稳定同位素的相对含量可以从质谱图中的峰高比得到。标记化合物可转变为气体来测定，如氧和碳可转变为 CO_2 ，测 $m/e=46$ 和 $m/e=44$ 之比，测 $m/e=45$ 和 44 之比。

混合物中各组分如果能满足下列条件：(1) 每个组分至少有一个峰与其它组分明显的不同；(2) 各个组分对某个峰的贡献是线性相加的；(3) 有合适的标准样品来校准；(4) 灵敏度有较好的重复性。则混合物可不必预先分离，就可确定各组分的含量。根据所满足的条件我们可以得到联立方程：

$$\begin{aligned}i_{11}P_1+i_{12}P_2+\cdots+i_{1n}P_n &= i_1 \\i_{21}P_1+i_{22}P_2+\cdots+i_{2n}P_n &= i_2 \\&\dots \\i_{n1}P_1+i_{n2}P_2+\cdots+i_{nn}P_n &= i_n\end{aligned}\quad (12-13)$$

式中： $i_1\cdots i_n$ 分别为质量 $m_1, m_2\cdots m_n$ 的峰高（测量值）， $P_1, P_2\cdots P_n$ 分别为组分 1, 组分 2... 的分压， $i_{it}(s, t$ 分别取 1, 2, $\dots, n)$ 为组分 t 的纯样品在单位压力时在质量 m_s 的峰高，它可从纯组分的质谱中计算求出，为一常数。

解上述联立方程可得到各组分分压 P_1, P_2, \dots, P_n 。如果我们选取的各质量峰主要是某一组分的贡献，其它的组分贡献小或没有，则计算出的各组分含量误差小。

思考题

1. 何谓质谱？
2. 简述质谱法的基本原理。
3. 质谱仪的主要组成部分有哪些？

4. 下列为 C_2H_6O 的二异构体质谱主吸收峰, 请鉴定此二化合物。

m/e	%强度	m/e	%强度
46	16	46	61
45	50	45	100
31	100	31	5

第十三章 核磁共振波谱法

核磁共振现象是 1946 年由 Purcell 在哈佛大学和 Bloch 在斯坦福大学分别独立发现的，他们因此分享了 1952 年诺贝尔物理学奖。1953 年第一台商品化仪器问世，70 年代末，高强磁场超导核磁共振技术及脉冲-傅里叶核磁共振波谱仪的问世，极大地推动了 NMR 技术的发展，使得对低丰度、弱磁旋比的磁性核（如¹³C、¹⁵N、³¹P、¹⁹F 等）的测量成为可能。80 年代又出现了核磁共振的成像诊断技术—MRI 和多维 NMR 谱，MRI 已成为医学诊断的重要工具，多维 NMR 技术已能解决一些相当困难的结构、构象分析问题，如蛋白质等生物大分子高级结构。目前，多维 NMR 技术广泛地应用于生物化学、有机分析、天然有机物化学、药物化学等方面，在当代结构“四大谱”分析中，¹³C-NMR 和¹H-NMR 成为有机化合物结构分析鉴定中最重要的手段。

第一节 基本原理

核磁共振波谱（Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy，简称 NMR）分析是利用磁性核在外磁场作用下的核自旋能级间跃迁的原理来研究有机物结构与组成的一种化学物理分析方法。核磁共振是指原子核在磁场中对电磁波产生共振吸收的一种现象。对特定的原子核，在一定强度的外磁场中，共振吸收的电磁波频率与原子核在分子中的微环境有关；共振吸收的强度与产生核磁共振原子核的数量有关。因此由样品分子中某种核的 NMR 谱可得到有关该分子的结构与含量的信息。当原子核所在位置磁场的磁感应强度约 1 特斯拉（1T）时，电磁波共振吸收的频率在无线电波谱区，因此 NMR 分析装载信息的信号是无线电波。NMR 现象可用量子物理解释。

一、原子核的自旋与磁矩

众所周知，如果把一个小磁针放入马蹄形磁铁中，小磁针便要按一定方向偏转，这说明磁铁对小磁针产生了一定作用，这种作用可用磁场对磁矩的作用来解释，这个例子是磁铁有磁场，小磁针代表磁矩。此外，我们还知道，如果把已处于稳定平衡位置上的小磁针转动 180°，使之与原来的方向相反，虽然它也可以静止于此位置上，但只要有微小的扰动，磁针便又要转回到原来的方向，这说明磁针相对于磁场的取向，其稳定程度是不同的。根据电磁学原理，假设有一电流为 i 的微小闭合回路，相当于一个磁针，它的磁矩为 $\mu = iS$ （ S 为回路所包围的面积）。我们知道原子核是带有一定正电荷的微观粒子，其运动规律虽然不服从经典的电动力学，但为了形象化起见，在某种意义上我们也可以认为这些核电荷均匀地分布在原子核内，具有自旋运动的核，由于绕着核轴旋转，这些电荷便形成环形电流，因而产生核磁矩，这就是说有核自旋的原子核具有与小磁针相似的磁性质。

在描写刚体转动运动时有个物理量叫做角动量，相应于核自旋运动的物理量叫做

核自旋角动量。根据量子力学，核自旋角动量为： $P_N = hI / 2\pi = \hbar I$ 。

式中， h 为普朗克常数； $\hbar = h / 2\pi$ ； I 为核的自旋量子数， $I = 0, 1/2, 1, 3/2, \dots$ 。 P_N 的大小取决于 I ， I 只能取零、半整数、整数。

前面已经说过，有核自旋的核便有核磁矩，它们之间的关系为 $\mu_N = \gamma_N P_N = \gamma_N \hbar I$ 。核磁矩 μ_N 与核自旋角动量 P_N 之比 $\gamma_N = \mu_N / P_N$ 叫做核磁旋比，不同的原子核有不同的 γ_N 值。

二、核磁共振条件

如果把具有核磁矩的原子核放进外磁场中，类似于马蹄形磁铁对小磁针的作用，外磁场对磁矩便要施加作用力，使磁矩在磁场中具有一定的能量。根据量子力学，核磁矩置于磁场中它只能有一定的取向，见图 13-1，即所谓空间量子化，自旋量子数为 I 的核有 $2I + 1$ 个取向，与此相应有 $2I + 1$ 个磁量子数 m ，即 m 可取 $I, I-1, \dots, -I$ 个值。磁矩相对于磁场的不同取向有不同的能量，也就是说相应一个 m 值便有一个能级，其能量大小 $E_m = -\gamma_N m \hbar H_0$ 。 H_0 为外磁场的磁场强度。原子核磁矩在外磁场中产生磁能级分裂，处于磁场中不同能级的核磁矩具有不同的能量，处于低能级的核磁矩稳定，处于高能级的核磁矩不稳定。两个相邻能级之间能量差为 $\Delta E_N = \gamma_N \hbar H_0$ 。如果我们在垂直于外磁场方向施加射频波，当射频波的频率 ν 符合 $h\nu = \Delta E$ 时，射频波就与核磁矩发生作用，使处于低能级的核磁矩吸收射频波的能量跃迁至高能级，这种现象叫做核磁共振。由此可知核磁共振的条件为：

$$\nu = \frac{\gamma_N}{2\pi} H_0 \quad (13-1)$$

式中， ν 为共振频率； γ_N 为核磁旋比； H_0 为外磁场强度。

上式是核磁共振最基本的表达式，满足该条件便产生核磁共振。产生共振的射频波其波长 $\lambda = 1000 \sim 10000 \text{cm}$ ，属于电磁波中的射频波段，所以这种电磁波叫做射频波，其电磁场称为射频场。

由上述可见，只有 $I \neq 0$ 的核才出现 NMR 现象。原子核的最基本的特性是它的电荷和质量，核电荷取决于质子和中子数目之和，即元素周期表中的原子序数；而核的质量取决于质子和中子数目之和，也就是原子量。一个原子核 ${}^M X_Z$ 的自旋量子数 I 与其原子序数 Z 及原子量 M 有关。凡是质量数（原子量）为奇数的核，其自旋量子数只能取半整数，如 ${}^1\text{H}$ （氢）、 ${}^{13}\text{C}$ （碳）的 I 均为 $1/2$ ；质量数为偶数，原子序数为奇数的核， I 只能取整数，如 ${}^2\text{H}$ （氘）、 ${}^{14}\text{N}$ （氮）的 I 均为 1 。这两类核都能产生核磁共振，而 M 和 Z 均为偶数的核，其 $I=0$ ，所以 ${}^{12}\text{C}$ 、 ${}^{16}\text{O}$ 等是不出现核磁共振现象的。一些核的性质见表 13-1。

第二节 核磁共振波谱仪

根据上述的核磁共振条件可知，NMR 波谱仪必须有个外磁体和产生射频波的振荡器。其余部分应与其它光谱仪相类似，如样品系统（即探头系统）、射频波接受器、扫

描发生器和记录器。示意图如图 13-2 所示。

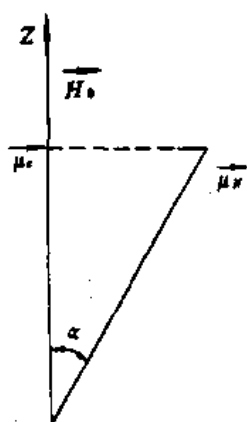


图 13-1 处在外磁场 H_0 中的核磁矩 μ_N

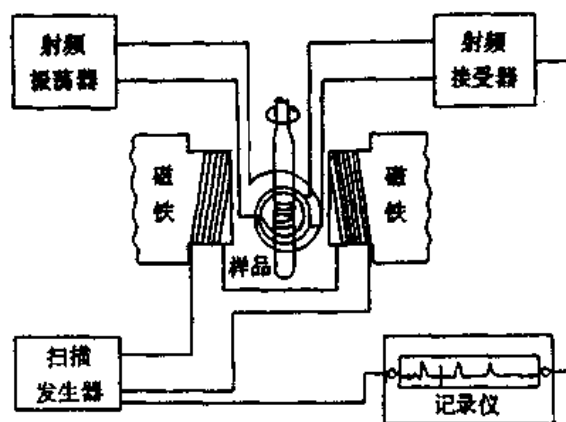


图 13-2 核磁共振波谱仪示意图

表 13-1 一些核的性质

原子序数 Z	原子量 M	原子核 MX_Z	自旋数 I	核磁矩 (核磁子) μ_N	1 特斯拉 NMR 共振频率, MHz ν	天然丰度 %
偶数	偶数	$^{12}\text{C}_6$	0	-	-	98.90
		$^{16}\text{O}_8$	0	-	-	99.76
		$^{32}\text{S}_{16}$	0	-	-	95.06
奇数	奇数	$^1\text{H}_1$	1/2	2.79268	42.5759	99.98
		$^{31}\text{P}_{15}$	1/2	1.1305	17.235	100
		$^{55}\text{Mn}_{25}$	5/2	3.468	10.501	100
		$^{113}\text{In}_{49}$	9/2	5.4960	9.3099	4.28
偶数	奇数	$^{13}\text{C}_6$	1/2	0.702199	10.7054	1.108
		$^9\text{Be}_4$	3/2	-1.774	5.9834	100
		$^{43}\text{Ca}_{20}$	7/2	-1.3153	2.8648	0.145
		$^{73}\text{Ge}_{32}$	9/2	-0.87679	1.4852	(7.76)
奇数	偶数	$^1\text{H}_1$	1	0.857387	6.53566	1.56×10^{-2}
		$^{14}\text{H}_7$	1	0.4047	3.0756	99.635
		$^{10}\text{B}_5$	3	1.8007	4.5754	19.58
		$^{50}\text{V}_{23}$	6	3.3413	4.2450	0.24

外磁场的磁体分为永磁铁、电磁铁和超导磁体三种，永磁铁磁场强度固定不能改变，通常多固定在 1.4T 或 60MHz (指在该磁场强度下质子的共振频率)，用于简易型仪器；电磁铁强度可调，最高可达 2.35T 或 100MHz，目前大多数仪器采用电磁铁；超

导磁体是用超导材料制成的，需浸在液氮中，磁场强度可高达几个、十几个特斯拉，100MHz 以上的仪器其磁体均采用超导磁体，由于价格昂贵和必须用液氮，目前还不普及。

射频振荡器产生的射频波，经过调制进入探头，探头位于磁铁间隙，探头中装有样品管和向样品发射以及从样品接受射频波的线圈。外磁场、射频发射器和射频接受器三者的方向相互垂直。射频振荡器发射射频波时，扫描发生器可采用固定外磁场强度改变射频波频率，使它由低于共振频率开始向高于共振频率范围连续扫描，称为扫频；也可以采用固定射频波频率而改变外磁场强度，使它从低于共振条件的磁场强度连续地向高于共振条件的磁场强度扫描，称为扫场。将得到的信息经射频波接受器检测、放大，送入记录器绘制出 NMR 谱图。

仪器可分为连续波核磁共振 (CW-NMR) 波谱仪和脉冲付里叶变换核磁共振 (PFT-NMR) 波谱仪两种。前者是射频振荡器发出的射频波按其频率的大小，有顺序地连续地照射样品，这种方式相当于单通道照射样品，可得到频率谱，即通常的 NMR 谱。后者射频振荡器发出的射频波是以窄脉冲方式照射样品，这相当于多通道同时照射样品，得到的是时间谱即自由衰减信号 (FID)。时间谱与频率谱是一对付里叶变换对，经过付里叶变换可得到频率谱。由于是多通道，所以脉冲付里叶变换核磁共振波谱仪效率高。但是，为了把时间谱变换为频率谱需要计算机进行付里叶变换，由于这类仪器必须备有计算机，价格比较昂贵。

第三节 核磁共振波谱的特征性和化学结构

一、化学位移

根据 NMR 条件 (13-1) 式可知，共振频率 ν 只取决于磁旋比 γ_N 和外磁场强度 H_0 ，因此同一种核只可能有一个共振频率，在谱图上出现一个共振吸收峰。可是，实践中发现同一种核由于处于分子中的不同部位，有不同的共振频率，谱图上可出现多个吸收峰。这种现象表明，共振频率不完全取决于核本身，还与被测核在分子中所处的化学环境有关。我们知道分子中的原子核其周围不是没有电子的“裸露”核，而是核外还有电子。上述的 NMR 条件是指“裸露”核的共振条件。核外电子除绕核旋转外还有自旋，如同地球围绕太阳公转外还有自转。由于核外电子的运动也产生磁矩，其方向与外磁场方向相反，抵消了一部分外磁场，这种作用叫做磁屏蔽。磁屏蔽使原子核实际感受到的磁场强度小于外磁场强度。因此，分子中原子核共振条件可改写成如下形式

$$\nu = \frac{\gamma_N}{2\pi} H_0 (1 - \sigma) \quad (13-2)$$

式中， σ 为屏蔽常数。由此可见，同一种核由于处在分子中的部位不同，也就是化学环境不同，核外电子云密度有差异，则其核受到的屏蔽大小也就不同，由此引起共振频率有差异，在谱图上共振吸收峰出现的位置就不同。这种由于磁屏蔽作用引起吸收峰位置的变化叫做化学位移。根据这一点，我们可以把 NMR 与化学结构联系起来。例

如图 13-3 是用低分辨仪器测定的乙醇的质子核磁共振 (^1H NMR)谱。乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 有 6 个质子, 如果没有磁屏蔽作用, 它应该只出现一个吸收峰, 实际上谱图出现三个吸收峰。我们如果把这三个吸收峰与乙醇分子结构中的 OH、 CH_2 和 CH_3 基团里的质子联系起来, 就容易理解了。 H_c 与电负性强的氧原子相连, 由于氧原子吸电子强, 使 H_c 的电子云密度比 H_b 、 H_a 都小, 其核受到的磁屏蔽作用也小, 扫描时它首先在低场处出现共振吸收峰; H_b 由于离氧较近仍然受到电负性强的氧吸电子的影响, 使 H_b 受到的磁屏蔽降低了些, 使它的共振吸收峰出现在磁场稍强处。至于 H_a 远离氧原子, 受到氧吸电子的影响最小, 所以 H_a 的共振吸收峰出现在最高场。从低场到高场三个吸收峰的面积比或者强度比为 1:2:3, 这与分子中 OH、 CH_2 、 CH_3 三个基团中的质子数相应。由此可见, 磁屏蔽效应能够反映出氢原子在分子中所处的部位; 吸收峰的相对强度与对应的质子数成正比。显然, 这些信息都能与分子的结构关联起来。



图 13-3 乙醇的结构与它的 ^1H NMR 谱

二、化学位移的表示方法

由于磁屏蔽常数 σ 值很小, 因此, 不论采取扫频的方法或者扫场的方法, 对处于不同化学环境的质子的不同共振吸收峰, 所对应的射频频率或者磁场强度的差别都非常微小, 要准确测定其绝对值非常困难, 但测定其相对值比较容易, 一般都以适当的化合物做标准, 最常用的是四甲基硅 (TMS), 按下式进行计算。

$$\delta = \frac{H_{\text{样品}} - H_{\text{标准}}}{H_{\text{标准}}} \times 10^6 = \frac{\nu_{\text{样品}} - \nu_{\text{标准}}}{\nu_{\text{标准}}} \times 10^6 \quad (13-3)$$

式中, δ 表示化学位移, 乘以 10^6 是为了得数易读, δ 的单位为 ppm, δ 值既可表示扫场法又可表示扫频法得到的化学位移值, 它与仪器条件无关, 不同规格的仪器测得的化学位移值可以直接进行比较、相互借用。核磁共振波谱仪的记录, 都是把磁场强度高的一端画在右边, 即磁场强度从左向右的方向增加, 而以参照物 TMS 的谱峰为原点, 即参照物的 $\delta = 0\text{ppm}$, 在此峰之左的峰为正值, 在此峰之右的峰为负值。现在均采用 δ 值, 过去曾采用过 π 值表示化学位移, 而取 TMS 的 $\pi = 10.00\text{ppm}$, 所以 $\pi = 10 - \delta$ 。化学位移是 NMR 研究分子化学结构的三大信息之一, 其余的两个信息是谱峰的相对强度和谱峰的分裂。因此, 熟悉各化学基团出现的化学位移范围, 对分析 NMR 谱图来说是十分重要的。图 13-4 列出了一些化学基团的质子化学位移范围。

三、自旋-自旋耦合

低分辨的乙醇的 ^1H NMR 谱 (见图 13-3)只出现三个吸收峰, 但如果用高分辨的仪器, 则得到如图 13-5 那样的乙醇 ^1H NMR 谱, 在此谱图上我们看到谱峰分裂后出现了相应的三重峰、四重峰和单峰 (暂不考虑 OH 峰的分裂)。这种谱峰分裂的现象是

CH₂、CH₃ 中的质子之间的自旋相互作用引起的，称为自旋-自旋耦合，简称自旋耦合。由于自旋耦合使谱峰增多的现象叫做自旋-自旋分裂，简称自旋分裂。偶合是分裂的原因，分裂是偶合的结果。自旋耦合与自旋分裂只能在高分辨 NMR 谱仪上才能观测到。

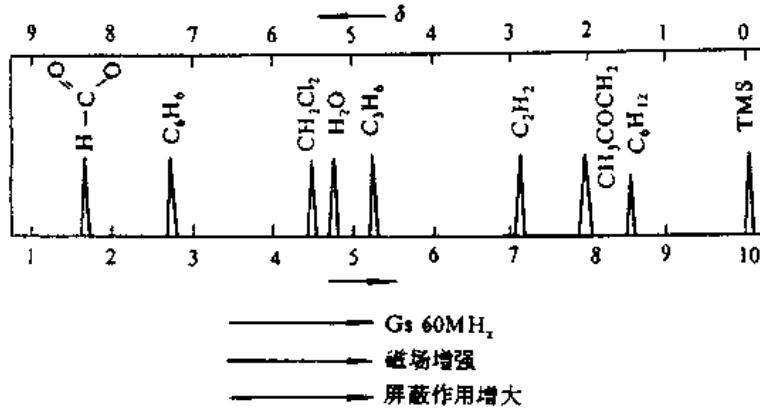


图 13-4 δ 、 π 与一些物质基团关系

$$1G_s(\text{高斯}) = 10^4 T(\text{特斯拉})$$

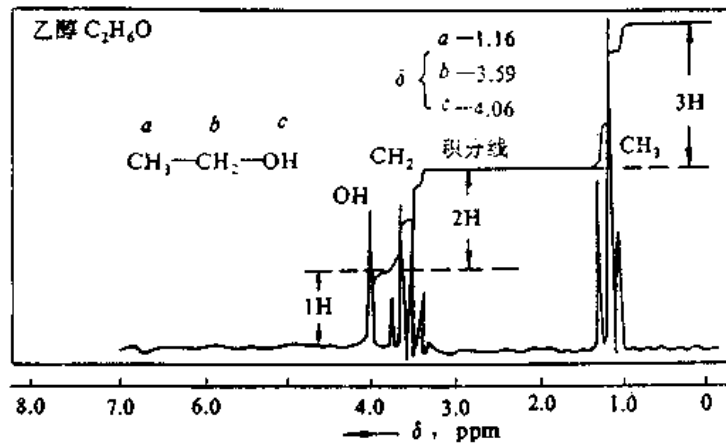


图 13-5 乙醇的(自旋分裂) ¹H NMR 谱

关于自旋耦合的来源，我们以 CH₃-CH₂- (乙基) 为例进行说明。首先看 CH₂ 对 CH₃ 的偶合，氢核的自旋量子数为 $I = 1/2$ ，其磁量子数 $m = \pm 1/2$ ，所以质子在外磁场中只有两种自旋取向，用 \uparrow 与 \downarrow 表示。CH₂ 中的两个质子，可以自旋取向相同也可以自旋取向相反，总共有四种排列方式，即 $\uparrow\uparrow$ ； $\downarrow\uparrow$ ； $\uparrow\downarrow$ ； $\downarrow\downarrow$ ，但第二种和第三种排列由于两个质子的等价性，因此这两种排列方式可归为一种，即表现上只有三种排列方式，它们出现的机会是 1:2:1。同理 CH₃ 对 CH₂ 的偶合，使 CH₂ 的谱峰分裂为四重峰，强度比为 1:3:3:1，如图 13-6 所示。自旋分裂的大小是由分子结构决定的，与外磁场强度无关。偶合大小用偶合常数 J 表示，是从分裂峰的间距等测得的，单位为赫 (Hz)。表 13-2 列出一些化合物的质子-质子自旋偶合常数，乙醇的 $J = 7\text{Hz}$ 与该表相符。

表 13-2 自旋-自旋偶合常数

化合物类型	J, Hz	化合物类型	J, Hz
	12~15		5
	6~8		0~3
	(顺)6~14 (反)11~18		(邻)7~8 (间)2~3 (对)0~1
	1~3		10~13
	6		1~2

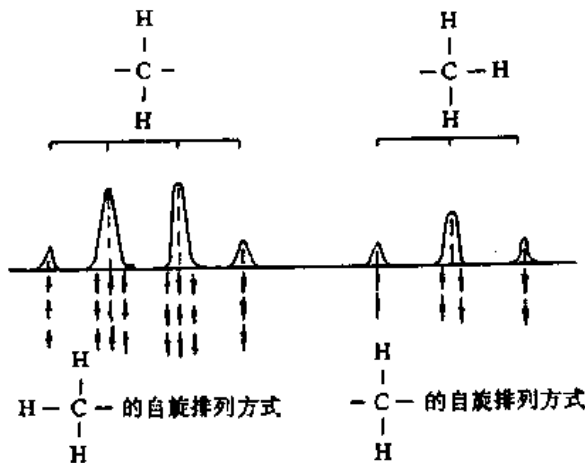


图 13-6 乙醇中的 CH_3 与 CH_2 的自旋偶合



图 13-7 丁酮的 ^1H NMR 谱

在弱偶合的情况下，即化学位移比偶合常数大很多时，谱峰分裂的数目服从 $2n+1$ 规律，也就是 $n+1$ 规律，即有 n 个相邻氢，则被分裂峰的数目为 $n+1$ 个；其分裂峰强度比为二项式 $(a+b)^n$ 展开式的各项系数比，根据此规律我们很容易预测待测试样谱峰

分裂的数目及其强度比。例如丁酮，羰基 C=O 右边的乙基中，甲基有 3 个质子 $n=3$ ，根据 $n+1$ 规律， $3+1=4$ ，则使亚甲基分裂为四重峰，其强度比为 $(a+b)^3 = a^3+3a^2b+3ab^2+b^3$ 的系数比，即 1:3:3:1。同理亚甲基有 2 个质子，使甲基分裂为三重峰，其强度比为 1:2:1。而羰基左边的甲基由于远离其它质子，仪器的分辨率不高时，仍然只出现单峰。其 ^1H NMR 谱列入图 13-7。从偶合常数和谱峰分裂数目，可了解测定的氢在分子中所处的部位和它的邻近官能团的性质。

四、积分曲线

各个谱峰的强度是反映样品中处于不同化学环境的质子数目。这里所讲的谱峰是指由化学位移引起的共振吸收峰（包括了由于自旋偶合所形成的分裂峰），谱峰的相对强度可由积分曲线直接求出。见图 13-5 和图 13-7。根据谱峰的相对强度积分曲线可进行定量分析。

化学位移值和偶合常数，在 NMR 波谱学各专著中都列有详细数据表，供谱图解析和研究分子结构使用。在这里仅列出一个简单的化学位移表，见表 13-3，前面已列出一些化合物的偶合常数简表。如果我们要鉴定的化合物属于验证性的，可查赛特勒 (Srdtler) 标准谱图。若谱峰数目、峰形、相对强度完全相符合，则验证完毕。假如鉴定的化合物是个新化合物，无标准谱图可对照时，必须对每个谱峰及其分裂峰进行解析，还要尽可能多的收集由其它方法得来的信息，进行综合分析，也要参考标准谱图中化学结构相近的有用的谱峰信息，来研究推断出新化合物的分子结构。必要时还要进行化学性质试验，甚至进行合成试验来验证。但是，用 ^1H NMR 进行有机化合物分子结构鉴定远不如 ^{13}C NMR 波谱法。

第四节 ^{13}C 核磁共振

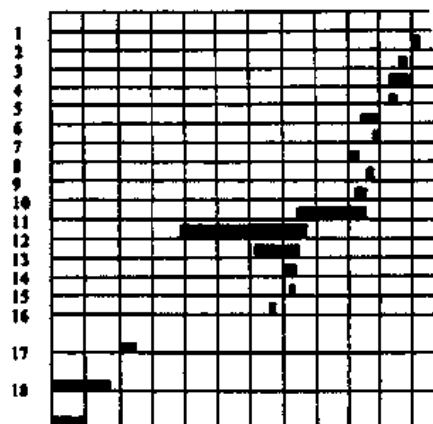
根据表 13-1 原子核的性质， ^{12}C 不存在核磁共振现象，但 ^{13}C 核却是 NMR 研究的对象，称为碳-13NMR (写成 ^{13}C NMR)。 ^{13}C 核应象 ^1H 核一样有它自己的化学位移、偶合常数和谱峰分裂等现象。但也有不同之处，其中的一个差别就是 ^{13}C 的灵敏度太低，就一个 ^{13}C 与一个 ^1H 而言， ^{13}C 的灵敏度约为 ^1H 的 1/64，加上 ^{13}C 的自然丰度仅为总碳的 1% 左右，所以 ^{13}C 不在富集的情况下，其灵敏度约为 ^1H 的 1/6000。1957 年首次观测到 ^{13}C NMR 现象，真正的突破是在 70 年代从技术上解决了宽带去偶和付里叶变换以后，才获得迅速发展。

一、双共振技术

前面所涉及的 NMR 技术是将氢样品放在外磁场中并在其垂直于外磁场的方向上施加射频波，当满足共振条件 (13-2) 式时就产生共振现象。这样得到的谱图，由于核之间相互偶合，谱峰重迭严重。如测定 ^{13}C 谱时， ^1H 对 ^{13}C 的偶合就是这样，谱峰重迭严重，解析非常困难。为了解决这个难题提出了双共振技术。所谓双共振技术，就是在同一样品中有 A 和 B 两种原子核，做 NMR 实验时，使用第一个射频振荡器发射的射频波满足 A 核共振，同时使第二个射频振荡器发射的射频波满足 B 核的共振，即采

表 13-3 各种基团¹HNMR 谱化学位移表

1.(CH ₃) ₃ Si	10.HC=C
2.CH ₃ CH ₂ CH	11.CH=CH(共轭)
3.CH ₃ CH ₂	12.非共轭
4.CH ₃	13.CH ₂ =C
5.(CH ₃) ₂ CH	14.CH ₂ =C(CH ₃) ₂
6.(CH ₃ CO) ₂ O	15.(CH ₃) ₂ C=CHCH ₃
7.CH ₃ CN	16.RCOH
8.CH ₂ NH ₂	17.RCOOH
9.CH ₃ Ph	18.RSO ₃ H



用两个射频振荡器发射的两组射频波同时照射样品，满足两种核共振条件的技术叫做双共振技术，目前已普遍应用于¹³C 等核的 NMR 测定中。

二、宽带质子去偶¹³C

宽带质子去偶¹³CNMR 谱就是采用双共振技术得到的。第一个射频振荡器发射的射频波，其中心频率为 ν_1 ，它的频率宽度稍大于质子共振频率宽度，连续地均匀地照射样品，使质子全部饱和，便消除了质子对碳的耦合；同时第二个射频振荡器发射的射频波也照射样品，使其频率 ν_2 满足¹³C 共振条件，得到¹³CNMR 谱。这样得到的¹³C 谱，称为宽带质子去偶¹³C 谱。谱线简单，容易解析。又由于质子处于饱和状态时，产生核欧沃豪斯（核 Overhause）效应（简称 NOE），其结果使直接与氢相联结的碳（季碳除外）的谱线强度几乎增强近 3 倍，提高了信噪比也就是提高了灵敏度。这对于灵敏度低的¹³C 谱来讲是个突出的优点。由于 NOE 的影响，¹³CNMR 谱不能像¹HNMR 谱那样，根据谱峰强度直接进行定量分析。

三、偏共振质子去偶¹³C 值

宽带质子去偶谱虽然有上述许多优点，但却丧失了全部有关氢的信息。为了弥补这一缺点，让第一个射频振荡器发射出一个单一的正弦射频波，使它稍偏离质子的共振频率照射样品，第二个射频振荡器照常工作，这样得到的谱图就能够保留着与碳直接相连的氢的耦合信息，并可根据谱线分析的数目确定碳上直接连结氢的个数。

由于¹³C 的自旋量子数同¹H 一样都是 1/2，所以偏共振去偶的¹³C 谱，其谱线分裂的数目也遵守 $n+1$ 规律，强度比也服从二项式 $(a+b)^n$ 展开式的系数比。但是，需注意这里所指的 n 是指直接与碳相联结的氢的数目。例如甲基 CH₃ 有 3 个氢，所以甲基碳的¹³C 谱线被分裂为四重峰 ($3+1=4$)，其强度比为 $(a+b)^3$ 的展开系数比 1:3:3:1；同理亚甲基 CH₂ 有两个氢，则亚甲基碳的¹³C 谱线被分裂为三重峰 ($2+1=3$)，强度比为 1:2:1。依此类推。

宽带质子去偶和偏共振质子去偶法，是 ^{13}C NMR测定中最基本的也是最常用的两种技术。几乎每个样品都要进行这两种方法的测定。前者可提供样品的碳信息，后者可提供与碳直接连的氢个数的信息，是有机化合物结构分析中最重要的基础数据。宽带质子去偶 ^{13}C 谱和偏共振质子去偶 ^{13}C 谱如图13-8(a)、(b)。除此之外，还有门控去偶、反门控去偶和选择去偶 ^{13}C 谱等。它们的具体方法和用途就不在此说明了。在这里仅指出一点，反门控质子去偶 ^{13}C 谱，已消除了NOE，其谱线强度与碳的数目成正比，可以象 ^1H 谱那样，依据谱线强度的积分曲线进行定量分析。

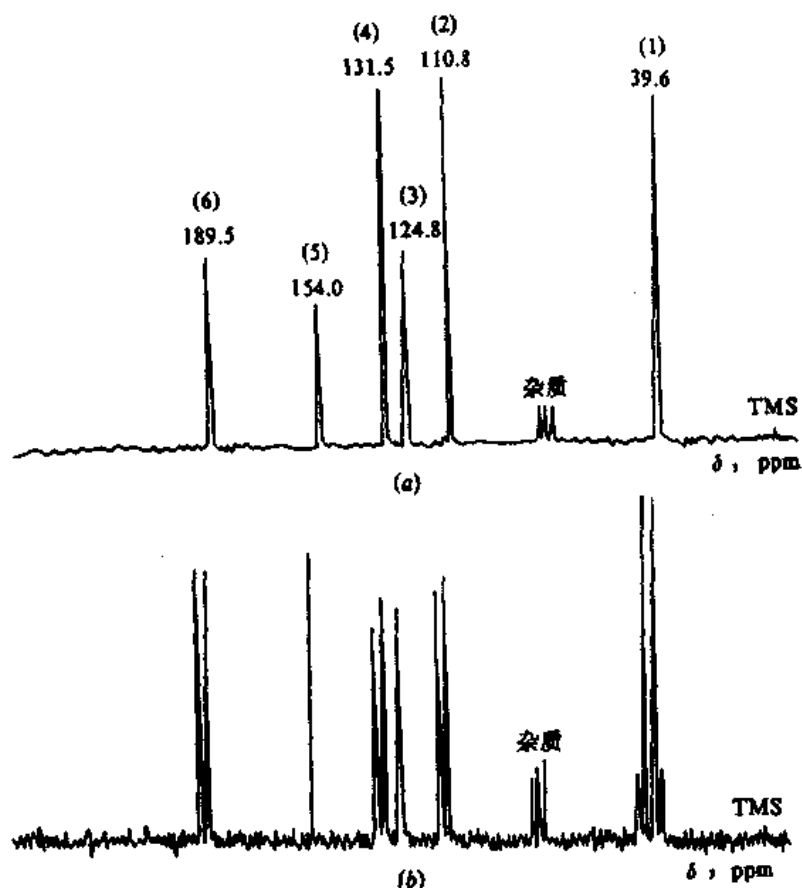
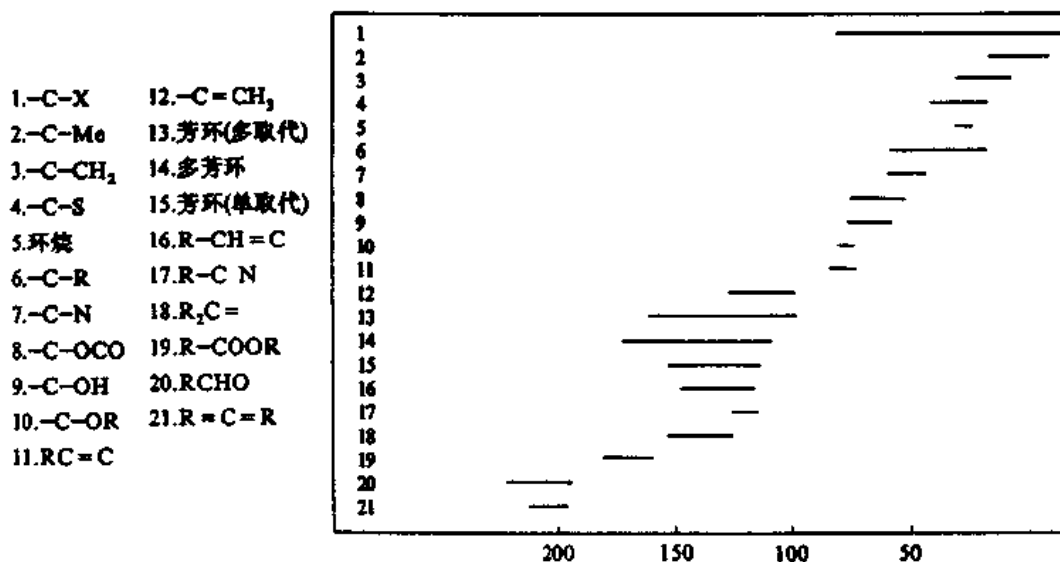


图 13-8 (a)宽带质子去偶 ^{13}C NMR谱
(b)偏共振质子去偶 ^{13}C NMR谱

在这里我们给出一个有机化合物各种基团 ^{13}C NMR谱线的化学位移范围，见表13-4，其细表从略，需要时请查阅专著。与表13-3相比较可见， ^{13}C 谱化学位移分布范围比 ^1H 谱宽广得多。因此， ^{13}C 谱比 ^1H 谱分辨率高，谱线更清晰。例如一个未知物，用 ^{13}C 谱推断其分子结构比用 ^1H 谱方便得多。该未知物的 ^{13}C NMR谱如图13-9所示，这里仅给出宽带质子去偶 ^{13}C 谱，而偏共振质子去偶 ^{13}C 谱未给出，但将偏共振谱得到的谱线分裂数目标在括号里（四、三、二），即偏共振谱得到该峰分裂为四重峰、三重峰和二重峰。并从高场向低场写出谱峰顺序号。

由谱图可见共有 8 条谱线，其强度相差不多，说明有 $8n$ 个碳原子。

表 13-4 各种基团¹³CNMR 化学位移总表



第 1、2、3 这三条谱线均分裂为四重峰，说明它们是甲基 CH_3 碳的吸收谱线；第 4、5、6、8 四条谱线均分裂为三重峰，是亚甲基 CH_2 碳的共振吸收谱线；第 7 条谱线分裂为二重峰，是次甲基 >CH 碳的吸收谱线。共计有 $18n$ 个氢，则分子式为 C_8H_{18n} 。已知未知物分子量为 114，则实际分子式应为 C_8H_{18} 。

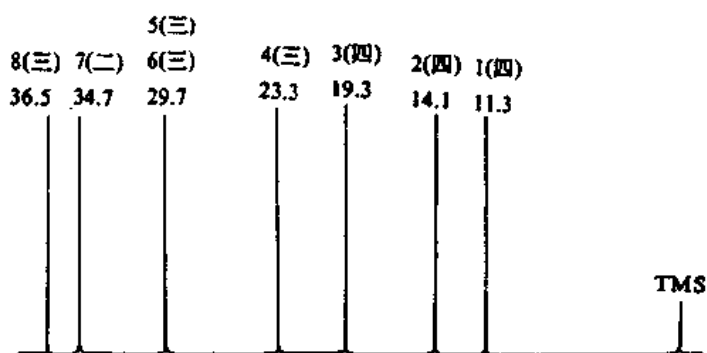
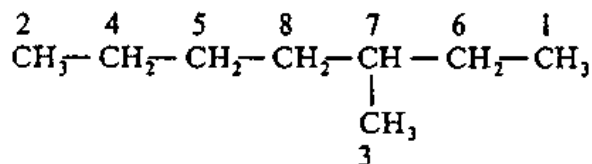


图 13-9 未知物的¹³CNMR 谱

从化学位移表（细表，我们未给出）可知，第 1 条谱线 $\delta = 11.3\text{ppm}$ 可归属为 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}<$ 的共振吸收谱线；第 2 条谱线 $\delta = 14.1\text{ppm}$ ，为 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 的共振吸收谱线；第 3 条谱线 $\delta = 19.3\text{ppm}$ ，推断为 $\text{CH}_3\text{CH}<$ 共振吸收谱线。

参考甲基碳的解析结果，对亚甲基 CH_2 进行归属。第 4 条谱线 $\delta = 23.3\text{ppm}$ ，由化学位移表确定是 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 的共振吸收；第 5 条和第 6 条谱线 $\delta = 29.7\text{ppm}$ ，推断为 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}<$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 的共振吸收；第 8 条谱线 $\delta = 36.5\text{ppm}$ ，为 $\text{>CHCH}_2\text{CH}_2-$ 的共振吸收谱线。第 7 条谱线 $\delta = 34.7\text{ppm}$ ，为 $\text{>CH}-$ 的共振吸收谱线。

综上所述，该未知化合物的分子结构为：



^{13}C 核灵敏度太低，试样要尽量采用浓溶液甚至是原样， ^{13}C NMR谱只有脉冲傅里叶变换核磁共振波谱仪才能测定，这种仪器需要用氘D信号锁场，所谓锁场就是使磁场与射频波稳定同步。因此，要使用氘代溶剂，如氘水也叫重水 D_2O 、氘代氯仿 CHCl_3 、氘代苯 C_6D_6 …等。

有机化合物主要是碳-碳相连接，从上述例子可见， ^{13}C 谱能够提供有机化合物骨架结构信息，还能提供氢及碳-氢偶合信息，显然比 ^1H 谱提供的信息更重要、用途更多。 ^{13}C NMR在结构测定、异构体判别、动态过程的探讨、分子构像分析、反应机理研究、高聚物的立体构型和序列分布的阐明以及定量分析方面等，都显示出巨大威力，已成为了化学、石油化工、生物、医药等领域不可缺少的工具。

四、核磁共振方法应用实例

核磁共振(NMR)法用来测定润滑油降凝剂烷基萘的化学结构是一种有效的手段。用休氏反应，以三氯化铝为催化剂，使萘和氯化石蜡进行烷基化反应，生产烷基萘降凝剂，但产品是二烷基萘还是多烷基萘聚合物，很难辨别。借助于 ^{13}C 核磁共振法分析，推断它是以为3~4个烷基为主的多烷基萘聚合物。

下面以样品82-12-4和样品P-149-4降凝剂有效组分测定为例，进一步阐述如下：

用VarianFT-80A核磁共振波谱仪，以氯仿为溶剂，内管法以 D_2O 锁场，得到两个样品有效组分的反门控质子去偶 ^{13}C 谱，即定量 ^{13}C NMR谱(见图13-10和图13-11)。

由图分析可知，芳烃碳 ^{13}C 吸收峰出现在低场，烷基碳的 ^{13}C 谱出现在高场，确系烷基萘化合物。

此外，从图13-10和图13-11积分曲线分别可知，样品82-12-4的芳烃碳数与烷基碳数比为10:51；样品P-149-4的芳烃碳数与烷基碳数比为10:45。二样品均为3~4个烷基取代为主的多烷基萘聚合物。

再通过APT程序实验(见图13-12)得知低场处的吸收峰； $\delta 122\sim 124\text{ppm}$ 为萘环上的叔碳吸收峰； $\delta 133\sim 144\text{ppm}$ 为萘环上季碳的吸收峰。

样品82-12-4的 $\delta 130\sim 144\text{ppm}$ 峰面积与 $\delta 122\sim 124\text{ppm}$ 峰面积之比为5.7:4.3，若有三个烷基取代，其谱峰面积比为5:5；若有四个烷基取代，其谱峰面积比为6:4。所以该样品为3~4个烷基取代为主的多烷基萘。

样品P-149-4的 $\delta 130\sim 144$ 谱峰面积与 $\delta 122\sim 124\text{ppm}$ 峰面积之比为5.5:4.5，所以该样品也是3~4个烷基取代为主的多烷基萘。通过上述分析，再结合分子量测定可以确定未知物。

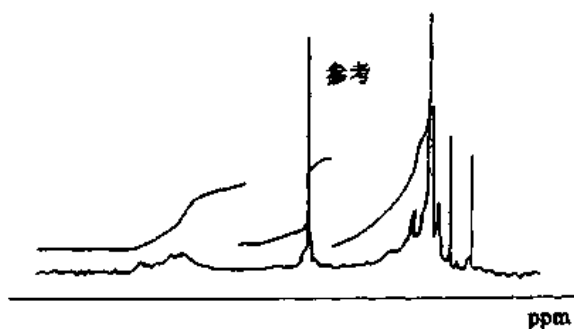


图 13-10 82-12-4 的反门控质子去偶¹³C 谱

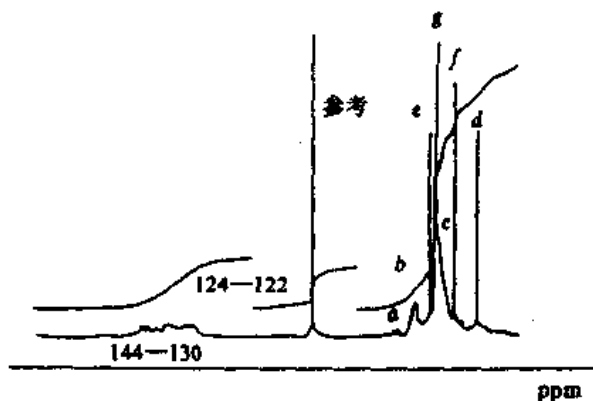


图 13-11 P-149-4 的反门控质子去偶¹³C 谱

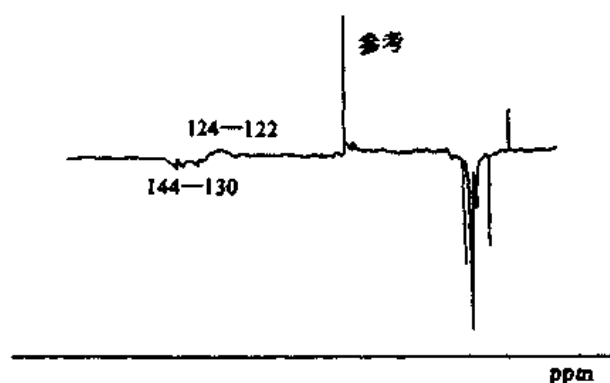


图 13-12 82-12-3 的 APT¹³C 谱

思考题

1. ¹³C-NMR 与 ¹H-NMR 相比具有哪些异同点?
2. CH₂=CH-O-CH₃ 和 CH₂=CH-CH₂-CH₃ 中的 CH₂ 质子与 CH₂=CH₂ 质子相比是处于低场还是高场?
3. 试画出甲苯、二乙醚的氢谱, 标出各峰的化学位移, 分裂峰数及相对强度。

第四篇 电化学法

第十四章 电化学法导论

第一节 概 述

电化学是研究物质化学能与电能之间相互转化的一门学科。电化学是以被测溶液的电学和电学性质为基础的一类分析方法。这类方法的共同特点是在进行测定时用待测溶液做为一个组成部分和放置于此溶液中的两个电极共同构成化学电池，然后测量这个电池的某一电物理量或其改变量来进行定性和定量分析。

一般而言，体系物质量及其变化与电物理量之间关系较明确，其电物理量的控制与测量的操作步骤是连续化、自动化的。电化学分析法总的来说是一种快速、准确、方便、有效的仪器分析方法。随着电化学理论的发展及各类电子仪器产品的不断更新，电化学分析仍处在不断发展之中。

根据电化学体系较复杂，测量的电物理量较多，以及测试手段和研究方法的多样性，电化学分析法可分为电导分析法、电位分析法、伏安法、极谱法、电解分析法及库仑分析法等。

根据分析、测量原理，通常又可分成以下三类方法：

1. 某一物理量与试液浓度有一定关系，通过测定某特定实验条件下该物理量便可对待测物进行定量。如电导分析法和离子选择性电极分析法等。

2. 测定某一电物理量的突变作为容量分析中的终点指示，故又称为电容量分析法。如电导滴定法、电位滴定法和电流滴定法。

3. 将试液中某一待测组分转化为金属或其氧化物，然后由工作电极上析出的金属或其氧化物的重量来确定该组分的量。这类方法实质上是一种重量分析法，故称为电重量分析法。如电解分析法。

第二节 电化学分析基础

一、化学电池

化学电池是化学能与电能相互转换的一种装置。它可分为原电池和电解池两种。这两种电池在电化学分析中都被采用。

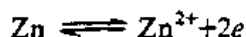
1. 原电池

原电池包括两个浸在溶液中的电极和电解液。如图 14-1 所示的铜锌原电池。

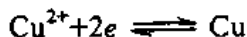
在盛有 $ZnSO_4$ 溶液的容器中，插入一锌片电极组成一个半电池，在另一个盛有 $CuSO_4$ 溶液的容器中，插入一铜片作电极组成另一个半电池，在两个半电池之间用一支倒置的 U 型玻璃管连接起来，管中装满饱和 KCl 的琼脂凝胶液作“盐桥”。

当用导线将锌片和铜片接通时，则导线上串联的安培计的指针就会发生偏转，这说明导线上有电流通过。同时还可观察到锌电极上有锌溶解，铜电极上有铜析出。

根据金属活泼顺序可知，锌比铜活泼，锌容易失去两个电子本身被氧化成 Zn^{2+} 离子而进入溶液：

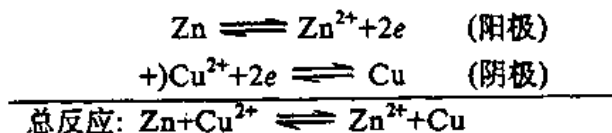


而电子留在锌极上，使锌极带负电荷成为负极。电子从负极通过导线流向铜电极，这时 $CuSO_4$ 溶液中的 Cu^{2+} 就从铜电极上获得电子而被还原为金属铜在铜电极上析出：



铜电极就称为正极。为了保持两个容器溶液中的离子电荷平衡，盐桥中的 Cl^- 就扩散到 $ZnSO_4$ 溶液中去，与锌电极溶解下来的多余 Zn^{2+} 正电荷相平衡；而盐桥中的 K^+ 离子就扩散到 $CuSO_4$ 溶液中去，与因 Cu^{2+} 的析出而留下多余的 SO_4^{2-} 负电荷相平衡。这样，就可使锌的溶解和铜的析出不断进行，电流得以继续流通。从这里我们可以知道，在外电路金属导体中是由自由电子的运动运载电荷；在溶液中是由离子的迁移运载电荷；而在电极和溶液界面上则是通过氧化还原反应而产生的电子转移。

根据电化学中的规定，凡是发生氧化反应的电极称为阳极；凡是发生还原反应的电极称为阴极。这样，在铜锌原电池中，锌电极既是负极又是阳极；铜电极既是正极又是阴极。电池的总反应为阳极与阴极两个半电池反应之和：



可见，电池的总反应与锌从 Cu^{2+} 溶液中置换出铜的化学反应是相同的。

2. 电解池

电解池是将电能转变为化学能的一种装置，如图 14-2 所示。

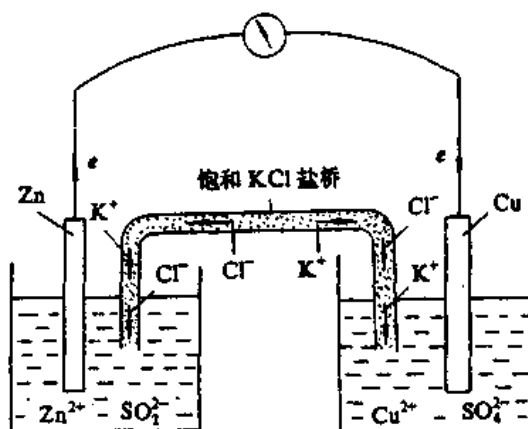


图 14-1 铜锌原电池示意图

将两块铂片插在氯化铜的溶液中，并把两块铂片分别接在一定电压的外电源的正负极上，与外电源负极相连的铂片上可以看到有金属铜沉积，发生了还原反应：



同外电源正极相连的铂片上则有氯气放出，发生了氧化反应：

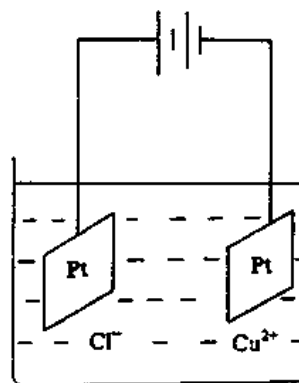
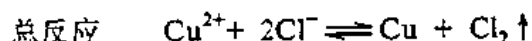
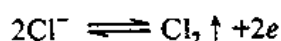
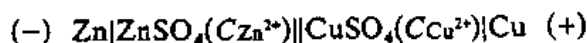


图 14-2 电解池示意图

上述反应是在电解池中实现了由电能到化学能的转换。在电解池中，和外电源负极相连的电极称为阴极，和外电源正极相连的电极称为阳极。电子从电源的负极沿导线流入电解池的阴极，另一方面，电子又从电解池阳极离开，沿导线流回电源的正极。这样，在阴极上电子过剩，在阳极上电子缺少，因此，溶液中正离子移向阴极，在阴极上得到电子，进行还原反应，阴离子移向阳极，在阳极上失去电子，进行氧化反应。

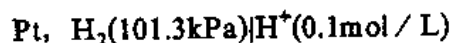
3. 电池的表示法

为了简便起见，化学电池可用一定的符号来表示。例如图 14-1 铜锌原电池可用下式表示：



习惯上规定：把负极和有关的溶液体系（注明浓度）写在式子的左边；正极和有关的溶液体系（注明浓度）写在式子的右边。也就是规定左边的电极进行氧化反应；右边的电极进行还原反应。每一竖线“|”表示两相间的界面（有时也用“,”表示）。在上例中，左边的“|”线表示锌电极和硫酸锌溶液两相的界面，右边的“|”线表示铜电极和硫酸铜溶液两相的界面。盐桥用双竖线“||”表示，因为盐桥存在两个接界面，即硫酸锌溶液与盐桥之间的界面和盐桥与硫酸铜溶液之间的界面。

气体（如氢）是不能直接作为电极的，需要附着在不活泼金属（如铂）的表面上，书写气体电极时，必须注明气体压力。例如，氢电极应写为：



若把惰性金属插入含有氧化还原反应的氧化态和还原态物质的溶液中，就构成了氧化还原电极。如 $\text{Pt} | \text{M}^{m+}, \text{M}^{(m-n)+}$ 电极，其电极反应为：



式中 M^{n+} 、 $M^{(n-1)+}$ 分别为氧化态和还原态物质，如 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 。在此，惰性金属本身不参与氧化还原反应，只是起传递电子的作用。

二、电极电位

1. 电极电位产生的机理

当一种金属插入该金属离子的溶液中，就构成了电池的一个电极。因为金属中含有金属离子和电子，所以金属表面上的金属离子受到水溶液中极性水分子的吸引，有进入溶液的趋向，金属越活泼，溶液的浓度越小，这种趋向就越大。同时，溶液中的金属离子也有从溶液中沉积到金属表面上的趋向，溶液浓度越大，这种趋向越大。当这两种以相反方向进行的过程达到动态平衡时，如果前一种趋向大于后一种趋向，则金属表面带负电荷，由于异电相吸，在金属表面的溶液中聚集较多的金属离子，形成双电层，如图 14-3 所示。因而在金属与溶液界面之间产生了电位差，这电位差就称为该金属的电极电位。如果前一种趋向小于后一种趋向，则金属带正电荷，而与金属表面接触的溶液带负电荷，此时，金属与溶液界面之间形成双电层，产生电位差。

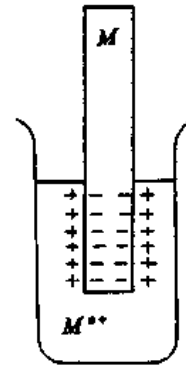


图 14-3 双电层示意图
M. 金属 M^{n+} . 金属离子

例如，锌插入硫酸锌溶液中，铜插入硫酸铜溶液中，组成铜锌原电池。因锌比铜活泼，对锌电极来说，前一种趋向大于后一种趋向，故锌电极带负电荷，电极电位为负值；对铜电极来说，情况则相反，电极电位为正值，所以此电池两极之间就产生电位差，当两极用导线连接起来就产生电流。原电池的电动势也就是两个电极之间的电位差。

单一电极电位的绝对值是无法测量的。但是若把待测电极与标准氢电极组成一个原电池，测量这个原电池的电动势，就可求得待测电极的电极电位。

2. 标准氢电极

标准氢电极如图 14-4 所示。将镀有一层铂黑的铂片插入氢离子浓度（严格说应为活度）为 1mol/L 的溶液中，并不断地通入压力为 101.3kPa 的纯氢气流，就构成了一个标准氢电极。

这时，溶液中的氢离子与铂黑上所吸附的氢气建立了如下的动态平衡：

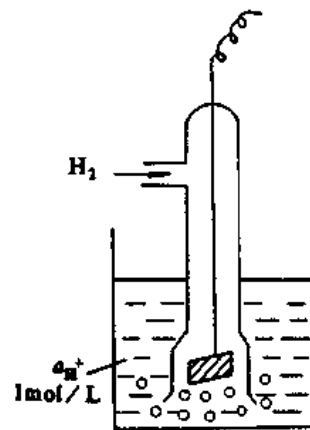
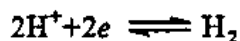


图 14-4 标准氢电极

这样，吸附氢气达到饱和的铂黑界面和 H^+ 离子浓度（活）度为 1mol/L 的溶液之间所产生的电位差，就称为标准氢电极的电极电位，并规定在任何温度下其值为零。

3. 电极电位的测定

将待测电极和标准氢电极组成一个原电池，测量这个原电池的电动势，根据下式就可求得待测电极的电极电位。

$$E_{\text{电池}} = E_{\text{正}} - E_{\text{负}} \quad \text{或} \quad E_{\text{电池}} = E_{\text{阴}} - E_{\text{阳}} \quad (14-1)$$

式中， $E_{\text{电池}}$ 为原电池的电动势； $E_{\text{正}}$ 、 $E_{\text{负}}$ 分别为正极和负极的电极电位； $E_{\text{阴}}$ 、 $E_{\text{阳}}$ 分别为阴极和阳极的电极电位。

以金属电极为例，在某一温度（常为 25℃）时，将某金属插入该金属离子浓度为 1mol/L 溶液中，并和标准氢电极组成一个原电池，测得此电池的电动势，根据式 (14-1) 即可求得该电极电位值，此值就称为某一温度下该金属电极的标准电极电位。表 14-1 列出一些常见电极在 25℃ 时的标准电极电位值，一般电极电位可由能斯特方程计算得到。

三、电极电位与离子活度的关系

由上面讨论可知，不同的电极其电极电位不同，同一电极在不同条件下，其电极电位也不同，它主要与该电极反应中氧化态和还原态的活度有关。能斯特方程式表达了电极电位和活度之间的关系（或电池电动势与活度之间的关系），它是电位分析的理论基础。例如某电极反应为： $Ox + ne \rightleftharpoons Red$

其电极电位用能斯特方程可表示为：

$$E_{Ox/Red} = E_{Ox/Red}^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (14-2)$$

式中， $E_{Ox/Red}$ 为电对 Ox/Red 的电极电位； $E_{Ox/Red}^{\circ}$ 为电对 Ox/Red 的标准电极电位； R 为气体常数 ($8.31445 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)； T 为热力学温度 ($273+t$)K； F 为法拉第常数 ($96487 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)； n 为电极反应中转移的电子数； a_{Ox} 为电对氧化态 Ox 的活度 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ； a_{Red} 为电对还原态 Red 的活度 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

由式 (14-2) 可知，电极电位值与温度有关，常用的温度是 25℃，若将上述有关常数代入式 (14-2)，且溶液浓度又较稀时，用浓度代替活度，上式可写成：

$$E_{Ox/Red} = E_{Ox/Red}^{\circ} + \frac{0.059}{n} \lg \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (14-3)$$

对于复杂的氧化还原电对，能斯特方程式中应包括有关反应物和生成物的浓度。对于固体、水或溶剂，因浓度改变不大，可视为 1。例如，某金属 M 插入该金属离子 M^{n+} 的溶液中，电对的还原态为固体金属，则其电极反应为：



电极电位为：

$$E_{M^{n+}/M} = E_{M^{n+}/M}^{\circ} + \frac{0.059}{n} \lg [M^{n+}] \quad (14-4)$$

表 14-1 25°C 时一些电极的标准电极电位

电 极	电 极 反 应	E°, V
Li ⁺ Li	Li ⁺ +e \rightleftharpoons Li	-3.045
K ⁺ K	K ⁺ +e \rightleftharpoons K	-2.925
Ba ²⁺ Ba	Ba ²⁺ +2e \rightleftharpoons Ba	-2.906
Ca ²⁺ Ca	Ca ²⁺ +2e \rightleftharpoons Ca	-2.866
Na ⁺ Na	Na ⁺ +e \rightleftharpoons Na	-2.714
Mg ²⁺ Mg	Mg ²⁺ +2e \rightleftharpoons Mg	-2.363
Al ³⁺ Al	Al ³⁺ +3e \rightleftharpoons Al	-1.662
Mn ²⁺ Mn	Mn ²⁺ +2e \rightleftharpoons Mn	-1.180
Zn ²⁺ Zn	Zn ²⁺ +2e \rightleftharpoons Zn	-0.763
Cr ³⁺ Cr	Cr ³⁺ +3e \rightleftharpoons Cr	-0.744
Fe ²⁺ Fe	Fe ²⁺ +2e \rightleftharpoons Fe	-0.440
Cr ³⁺ , Cr ²⁺ Pt	Cr ³⁺ +e \rightleftharpoons Cr ²⁺	-0.408
Cd ²⁺ Cd	Cd ²⁺ +2e \rightleftharpoons Cd	-0.403
Co ²⁺ Co	Co ²⁺ +2e \rightleftharpoons Co	-0.277
Ni ²⁺ Ni	Ni ²⁺ +2e \rightleftharpoons Ni	-0.250
Sn ²⁺ Sn	Sn ²⁺ +2e \rightleftharpoons Sn	-0.136
Pb ²⁺ Pb	Pb ²⁺ +2e \rightleftharpoons Pb	-0.126
Ti ⁴⁺ , Ti ³⁺ Pt	Ti ⁴⁺ +e \rightleftharpoons Ti ³⁺	-0.04
H ⁺ H ₂ , Pt	H ⁺ +e \rightleftharpoons 1/2H ₂	0.000
Sn ⁴⁺ , Sn ²⁺ Pt	Sn ⁴⁺ +2e \rightleftharpoons Sn ²⁺	+0.15
Cu ²⁺ , Cu ⁺ Pt	Cu ²⁺ +e \rightleftharpoons Cu ⁺	+0.153
Cu ²⁺ Cu	Cu ²⁺ +2e \rightleftharpoons Cu	+0.345
OH ⁻ O ₂ , Pt	1/2O ₂ +H ₂ O+2e \rightleftharpoons 2OH ⁻	+0.401
Cu ⁺ Cu	Cu ⁺ +e \rightleftharpoons Cu	+0.521
I ⁻ I ₂ , Pt	I ₂ +2e \rightleftharpoons 2I ⁻	+0.536
MnO ₄ ⁻ , MnO ₄ ²⁻ Pt	MnO ₄ ⁻ +e \rightleftharpoons MnO ₄ ²⁻	+0.564
Fe ³⁺ , Fe ²⁺ Pt	Fe ³⁺ +e \rightleftharpoons Fe ²⁺	+0.771
Hg ₂ ²⁺ Hg	Hg ₂ ²⁺ +2e \rightleftharpoons 2Hg	+0.788
Ag ⁺ Ag	Ag ⁺ +e \rightleftharpoons Ag	+0.799
Hg ₂ ²⁺ Hg	Hg ₂ ²⁺ +2e \rightleftharpoons Hg	+0.854
Hg ²⁺ , Hg ⁺ Pt	Hg ²⁺ +e \rightleftharpoons Hg ⁺	+0.91
Br ⁻ Br ₂ , Pt	Br ₂ +2e \rightleftharpoons 2Br ⁻	+1.065
Mn ²⁺ , H ⁺ MnO ₂ , Pt	MnO ₂ +4H ⁺ +2e \rightleftharpoons Mn ²⁺ +2H ₂ O	+1.23
Cr ²⁺ , Cr ₂ O ₇ ²⁻ , H ⁺ Pt	Cr ₂ O ₇ ²⁻ +14H ⁺ +6e \rightleftharpoons 2Cr ³⁺ +7H ₂ O	+1.33
Cl ⁻ Cl ₂ , Pt	Cl ₂ +2e \rightleftharpoons 2Cl ⁻	+1.36
Au ³⁺ Au	Au ³⁺ +3e \rightleftharpoons Au	+1.498
Ce ⁴⁺ , Ce ³⁺ Pt	Ce ⁴⁺ +e \rightleftharpoons Ce ³⁺	+1.61
Au ⁺ Au	Au ⁺ +e \rightleftharpoons Au	+1.69
F ⁻ F ₂ , Pt	F ₂ +2e \rightleftharpoons 2F ⁻	+2.87

第三节 电极的类型

电化学分析所用的电极种类很多，从用途上可以分为指示电极和参比电极，从结构上又可分为金属基电极和薄膜电极。指示电极是利用电极电位随溶液中离子活度改变而改变的特性指示溶液的活度；而参比电极则是力图固定某些参数（例如离子活度、溶液温度、总离子强度和溶液组分等）以使其电位保持不变。一些金属电极以及各种离子选择性电极是常用的指示电极，而氢电极、甘汞电极、银-氯化银电极常用作参比电极。但在必要时，任何电极既可作指示电极也可作参比电极。

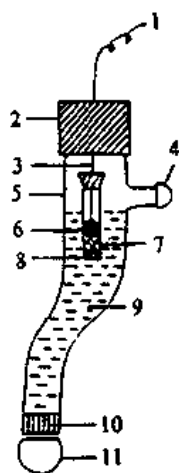


图 14-5 甘汞电极

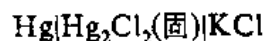
1. 电线 2. 绝缘体 3. 铂丝
4. 胶塞 5. 玻璃管 6. Hg 7. Hg₂Cl₂+Hg;
8、10. 多孔物质 9. KCl 溶液 11. 胶帽

一、参比电极

标准氢电极是一个精确的参比电极，但因制作麻烦，条件不易控制，使用不便，所以在实际分析工作中常用的是甘汞电极或银-氯化银电极。

1. 甘汞电极

甘汞电极是由金属汞、甘汞 (Hg₂Cl₂) 及氯化钾溶液所构成。其构造如图 14-5 所示。甘汞电极半电池的组成为：



电极反应为：



甘汞电极的电位取决于电极表面 Hg₂²⁺ 的活度，其电极电位可表示为：

$$E_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}} = E^0_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}} + \frac{0.059}{2} \lg a_{\text{Hg}_2^{2+}}$$

而 $a_{\text{Hg}_2^{2+}}$ 可通过 Hg₂Cl₂ 的活度积求得：



$$a_{\text{Hg}_2^{2+}} = \frac{K_{sp}(\text{Hg}_2\text{Cl}_2)}{a_{\text{Cl}^-}^2}$$

$$E_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}} = E^0_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}} + \frac{0.059}{2} \lg \frac{K_{sp}(\text{Hg}_2\text{Cl}_2)}{a_{\text{Cl}^-}^2}$$

$$\text{令 } E^0_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}} = E^0_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}} + \frac{0.059}{2} \lg K_{sp}(\text{Hg}_2\text{Cl}_2)$$

$$\text{故: } E_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}} = E_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}}^0 - 0.0591 \lg a_{\text{Cl}^-} \quad (14-5)$$

由上式可知, 当温度和 Cl^- 离子活度 (或浓度) 一定时, 甘汞电极的电位是恒定的, 而与溶液中的其它离子浓度无关。25℃ 时不同浓度 KCl 的甘汞电极电位列于表 14-2。

表 14-2 25℃ 时甘汞电极的电极电位(对 NHE^{*})

名 称	KCl 溶液浓度, mol/L	电极电位, V
0.1mol/L 甘汞电极	0.1	0.3365
标准甘汞电极(NCE)	1.0	0.2828
饱和甘汞电极(SCE)	饱和溶液	0.2438

* “对 NHE”表示相对于标准氢电极电位

2. 银-氯化银电极

银-氯化银电极是银丝上镀一层氯化银, 并浸在一定浓度的氯化钾溶液中所构成, 其半电池的组成为:



电极反应为:



在 25℃ 时, 其电极电位为:

$$E_{\text{AgCl}/\text{Ag}} = E_{\text{AgCl}/\text{Ag}}^0 - 0.0591 \lg a_{\text{Cl}^-} \quad (14-6)$$

由上式可知, 在一定温度下, 当 Cl^- 离子的活度 (或浓度) 一定时, 其电极电位是恒定的。25℃ 时, 不同浓度 KCl 溶液的银-氯化银电极的电极电位列于表 14-3。

表 14-3 25℃ 时银-氯化银电极电位

KCl 溶液浓度 mol/L	0.1	1.0	饱 和
电极电位(对 NHE) V	0.2880	0.2223	0.2000

二、指示电极

根据结构的不同, 指示电极可分为以下几类:

1. 金属-金属离子电极

此电极又称为金属电极。它是由金属插入该金属离子的溶液中而组成的。金属表面与金属离子之间能发生可逆的氧化还原反应, 其电极电位的变化能准确地反映溶液中金属离子活度的变化。例如, 将金属银插入硝酸银溶液中所组成的银电极, 其电极反应

为:



在 25℃ 时, 其电极电位为:

$$E_{\text{Ag}^+ / \text{Ag}} = E_{\text{Ag}^+ / \text{Ag}}^\ominus + 0.059 \lg a_{\text{Ag}^+} \quad (14-7)$$

此电极可用于测定溶液中的银离子浓(活)度, 或指示溶液中银离子浓(活)度的变化情况。

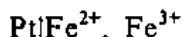
铜、锌、铅等金属可组成这类电极, 而有些金属(如铁、铬等)易受表面氧化膜的影响, 使其电极电位重现性差, 不可用作指示电极。

2. 金属-金属难溶盐电极

此电极是由金属表面覆盖一层该金属的难溶盐, 并浸在与其难溶盐具有相同阴离子的溶液中所组成, 如前所述的银-氯化银电极即属此类电极。其电极电位与溶液中难溶盐的阴离子活度有关。

3. 惰性金属电极

此类电极是由铂、金等惰性金属, 插入同一元素具有不同价态的离子对的均匀溶液中所组成。例如将铂插入 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 溶液中, 电极组成可表示为:



其电极反应为:



电极电位取决于溶液中氧化态(Fe^{3+})和还原态(Fe^{2+})活度的比值:

$$E_{\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}} = E_{\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}}^\ominus + 0.059 \lg \frac{a_{\text{Fe}^{3+}}}{a_{\text{Fe}^{2+}}} \quad (14-8)$$

惰性金属电极本身不参与电极反应, 只是起着氧化还原反应过程中传递电子的作用。

4. 薄膜电极

它是由对某一种离子具有不同程度的选择性响应的膜所构成, 膜的一边与被测离子的溶液相接触, 膜的另一边则是离子活度一定的溶液和合适的参比电极。pH 玻璃电极即是最早被应用的薄膜电极, 它的电极膜就是对氢离子有响应的玻璃膜。下面以 pH 玻璃电极为例说明薄膜电极膜电位产生的机理。

(1) pH 玻璃电极的构造

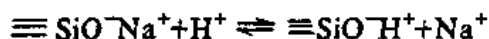
此电极简称为玻璃电极, 其构造如图 14-6 所示。

pH 玻璃电极的关键部位是电极下端的球形玻璃膜, 它是由一种特殊成分的玻璃所组成的, 膜厚约为 0.03~0.1mm, 膜内装有 pH 值一定的缓冲溶液作内参比溶液, 其中

插入一支银-氯化银电极作内参比电极，这样就构成了玻璃电极。

(2) 玻璃膜电位产生的机理

为了使玻璃电极能指示溶液中 H^+ 活度的变化，使用前需将玻璃电极放在蒸馏水中浸泡一定的时间，以活化电极。这时玻璃膜外表面结构中的 Na^+ 与水中的 H^+ 发生交换反应：



反应平衡常数很大，有利于反应向右进行。所以在水中浸泡后的玻璃电极，在其膜表面上的 Na^+ 点位几乎都被 H^+ 所占据，而形成一层很薄的水化硅胶层。同理，在玻璃膜内表面也形成一水化硅胶层。图 14-7 是一支浸泡过的玻璃膜截面分层示意图。

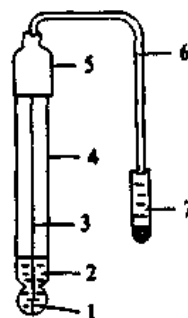


图 14-6 玻璃电极

1. 玻璃膜 2. 内参比溶液 3. 内参比电极 4. 玻璃管 5. 绝缘体 6. 屏蔽线 7. 屏蔽插头

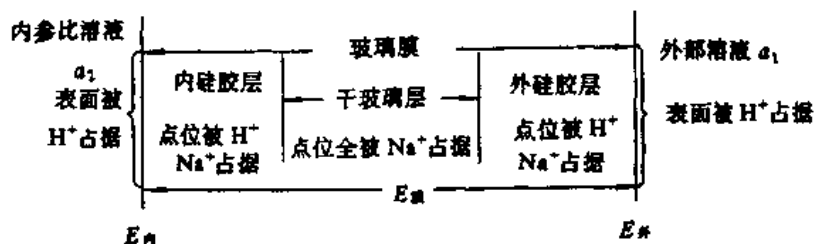


图 14-7 浸泡过的玻璃膜截面分层示意图

玻璃电极膜能导电，是因为在硅胶层与溶液界面之间靠 H^+ 转移而传送电荷；在硅胶层内，则由 H^+ 和碱金属离子（如 Na^+ ）传送电荷；在干玻璃层，则由碱金属离子传导，这一层内阳离子的移动很困难，所以玻璃电极的内阻很大，一般在 $50 \sim 500 M\Omega$ 之间。

当浸泡好的玻璃电极放入试液中，玻璃膜就将内参比溶液与外部试液隔开，因为膜内、外溶液中的 H^+ 活度与内、外侧硅胶层中的 H^+ 活度不同，则 H^+ 活度大的一方必向活度小的一方扩散，其结果改变了胶-液两相界面原来正、负电荷分布的均匀性，因而在两相界面形成了双电层，产生了电位差，这就称为相界电位。外硅胶层与外部溶液形成的相界电位 $E_{外}$ 和内硅胶层与内参比溶液形成的相界电位 $E_{内}$ ，分别与外、内硅胶层上的 H^+ 活度和外、内两种溶液的 H^+ 活度有着如下的关系：

$$E_{外} = K_1 + 0.059 \lg \frac{a_1}{a_1} \quad (14-9)$$

$$E_{内} = K_2 + 0.059 \lg \frac{a_2}{a_2} \quad (14-10)$$

式中, K_1 、 K_2 为分别与玻璃膜外、内表面性质有关的常数;

a_1 、 a_2 分别为外部溶液和内参比溶液中的 H^+ 活度;

a'_1 、 a'_2 分别为玻璃膜外、内两侧硅胶层中的 H^+ 活度。

因为玻璃膜内、外表面的性质基本相同, 所以, $K_1 = K_2$ 。又因玻璃膜内、外硅胶层表面的 Na^+ , 几乎都被 H^+ 所占据, 故 $a'_1 = a'_2$ 。这时, 玻璃膜外、内的相界电位差, 就称为玻璃电极的膜电位。其表示式为:

$$E_{膜} = E_{外} - E_{内} = 0.059 \lg \frac{a_1}{a_2} \quad (14-11)$$

因为内参比溶液中的 H^+ 活度 a_2 是定值, 故可令 $K = -0.059 \lg a_2$, 则 (式 13-11) 可写成:

$$E_{膜} = K + 0.059 \lg a_1 \quad (14-12)$$

又因玻璃电极内装有 $Ag-AgCl$ 内参比电极, 其电极电位 $E_{AgCl/Ag}$ 是恒定的。所以整个玻璃电极的电位 $E_{玻}$ 应为:

$$E_{玻} = E_{AgCl/Ag} + E_{膜} = E_{AgCl/Ag} + K + 0.059 \lg a_1$$

令 $E_{AgCl/Ag} + K = K_{玻}$

故 $E_{玻} = K_{玻} + 0.059 \lg a_1 = K_{玻} - 0.059 \text{pH}$ (14-13)

式中, $E_{玻}$ 为玻璃电极的电位; $K_{玻}$ 为玻璃电极常数。

对一个玻璃电极来说, $K_{玻}$ 值是一定的, 它由玻璃电极本身的性质所决定。由 (式 14-13) 可知, 玻璃电极的电位与溶液的 pH 值呈线性关系, 它具有指示溶液中 H^+ 离子浓度的功能, 所以玻璃电极能作为测定 pH 值的指示电极。

(3) 玻璃电极的性能

① 不对称电位 由式 (14-11) 可知, 当 $a_1 = a_2$ 时, $E_{膜}$ 应为零, 实际上并非如此, 玻璃膜两侧仍有一定的电位差, 这一电位差称为不对称电位, 它已包含在 $K_{玻}$ 值中。不对称电位产生的原因可能是在吹制玻璃膜时, 膜内、外两侧所受的张力不同, 或外表面受机械的、化学的损伤或受其它物质的沾污等因素而引起的。为了减少不对称电位对测定的影响, 在使用前应将电极放在去离子水中充分浸泡 (24h 以上), 使不对称电位达到最小和稳定的一个数值, 并在测定时用标准 pH 值缓冲溶液校正的方法加以消除。

② 碱差 一般玻璃电极测定 pH 值范围为 1~9, 当溶液的 pH > 9 时, 电位 $E_{玻}$ 与 pH 值不呈线性关系, 测得的 pH 值比实际的数值低, 此种现象称为碱差 (或钠差)。这是由于在碱度过大的溶液中, H^+ 离子活度太小, 在胶-液界面间不但有 H^+ 离子参加交换, 而且还有其它阳离子尤其是 Na^+ 参加交换的缘故。为了减少碱差, 目前已生产一种锂玻璃电极, 仅在 pH 值大于 13 时, 才产生碱差。

③酸差 当玻璃电极在测定 $\text{pH} < 1$ 时, 也出现偏差, 即测得的 pH 值比实际值偏高, 这现象称为酸差。它可能是由于在强酸中, 水分子活度减少, 而 H^+ 是靠 H_3O^+ 传递的, 这样达到电极表面的 H^+ 减少, 故 pH 值增加。

④玻璃电极的内阻很大 因此要用输入阻抗大的仪器来测量, 并注意电极导线的高度绝缘和屏蔽, 以免漏电及静电干扰。此外, 温度对内阻的影响很大, 一般只在 $5^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 之间使用。

⑤“老化”现象 玻璃电极长期使用后会发生“老化”现象, 响应迟钝, 性能变差。

玻璃电极膜电位的产生是由于 H^+ 在界面间进行迁移的结果, 并非电子的交换。因此它不受溶液中氧化剂、还原剂的影响, 且可用于有色、混浊、胶态溶液 pH 值的测定。缺点是玻璃球泡很薄, 容易碰坏, 所以, 在使用过程中要特别小心。另外, 玻璃电极也不宜用于含氟较高溶液中 pH 值的测量。

思考题

1. 何谓电化学分析法?
2. 化学电池可分为哪两种? 它们之间有何区别?
3. 电极电位产生的机理是什么? 它如何测得?
4. 把下列氧化还原反应组成原电池, 并用符号表示。
 - (1) $\text{Zn} + 2\text{Ag}^+ \rightleftharpoons \text{Zn}^{2+} + 2\text{Ag}$
 - (2) $\text{Fe} + 2\text{HCl} \rightleftharpoons \text{FeCl}_2 + \text{H}_2$
5. 写出下列原电池的总反应式
 - (1) $(-) \text{Ni} | \text{NiSO}_4 || \text{CuSO}_4 | \text{Cu} (+)$
 - (2) $(-) \text{Pt} | \text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+} || \text{Ag}^+ | \text{Ag} (+)$
6. 求下列半电池的电极电位
 - (1) $\text{Cu} | \text{Cu}^{2+} (0.10 \text{ mol/L})$;
 - (2) $\text{Pt} | \text{Fe}^{3+} (2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}), \text{Fe}^{2+} (0.10 \text{ mol/L})$
7. 判断下列原电池的正、负极, 并计算其电动势。
 - (1) $\text{Zn} | \text{Zn}^{2+} (1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}) || \text{Zn}^{2+} (1.0 \text{ mol/L}) | \text{Zn}$;
 - (2) $\text{Cu} | \text{CuSO}_4 (0.020 \text{ mol/L}) || \text{Fe}^{2+} (0.20 \text{ mol/L}), \text{Fe}^{3+} (0.010 \text{ mol/L}), \text{HCl} (1.0 \text{ mol/L}) | \text{Pt}$

第十五章 离子选择性电极法

第一节 概 述

离子选择性电极是分析溶液中离子的活度或浓度的一种新的分析工具，是过去 30 年来发展最迅速的分析技术之一。应用离子选择性电极除了可以直接测量多种离子外，也可以利用间接测量技术，测量许多不能直接测量的组分。目前，离子选择性电极主要品种已达五十多种，可分析的离子也达到八十种以上，而且还正在不断地增长。在 60 年代后期，离子选择性电极还被看作是一种新奇的东西，可是时至今日，这门技术几乎在工农业生产和科学技术的所有部门都获得了实际应用。

什么是离子选择性电极？国际纯粹化学与应用化学协会 (IUPAC) 分析化学命名委员会所推荐的定义是：离子选择性电极是电化学敏感体，它的电位与溶液中给定离子的活度的对数成线性关系，这种装置不同于氧化还原反应的体系。

图 15-1 是离子选择性电极分析测量原理示意图，其中离子选择性电极包含有由特殊的电活性物质组成的敏感膜，对溶液中某种离子的活度（浓度）具有选择性响应，从而产生一定的平衡电位，同时浸在溶液中的参比电极产生固定的参比电位。根据离子电极与参比电极组成的电池的电动势，就可以计算出被测溶液中某种离子组分的活度（浓度）。

与其它分析方法相比较，离子选择性电极分析法具有许多独特的优点。

(1) 离子选择性电极是一种直接的、非破坏性的分析方法，它不受样品溶液的颜色、浑浊、悬浮物或粘度的影响，用少量样品即可实现测量。

(2) 离子选择性电极分析法所需设备简单、操作方便，仪器及电极均可携带，适合现场测定不需要很多的设备费用及维护费用。

(3) 离子选择性电极分析速度快，每次分析只需 1~2min，通常样品中加入必要的试剂在搅拌条件下将电极浸入 1min 后即可读数。工作时电极可以反复测量，以便获得最佳的测定结果。

(4) 电极输出为电信号，不需要经过转换就可以直接放大及测量记录，因此采用电极法容易实现自动、连续测量及控制。

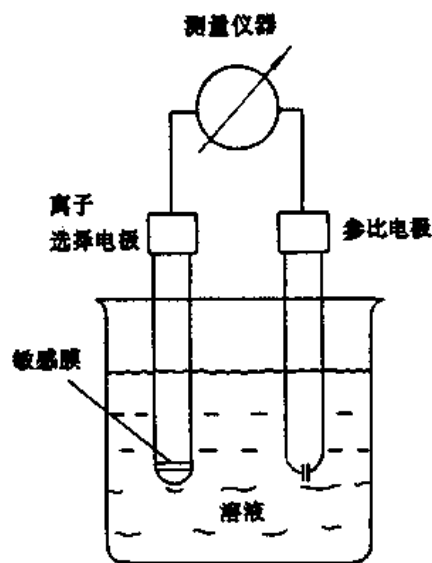


图 15-1 离子选择电极测量原理示意图

(5) 电极法测量的范围宽广，灵敏度也高，一般可达4~6个浓度数量级范围，而且电极的响应为对数特性，因此在整个测量范围具有同样的准确程度。

总的来说，虽然有许多方法可以用来测定溶液中各种离子及其它组分，但离子选择性电极法是用较少的时间、人力和物力就能实现精确、灵敏的测量，这些优点是其他方法无法与之相比拟的。

许多离子电极分析法已被采纳作为标准分析方法。例如饮用水中氟含量的测定，过去用冗长繁琐的比色法，现在采用离子电极法，操作简便、快速，测量准确度优于分光光度法及化学滴定法。目前，离子选择性电极的主要应用范围可以归纳为下列三大类：实验室的分析；工业流程的分析；医药分析。如水、土壤、植物中氨或硝酸盐含量的测定，工业废水中氯化物的测定，电厂及动力锅炉供水、蒸汽凝结水中的钠及氯化物的测定，水中及污泥中硫化物的测定，大气中氟化氢及二氧化硫的测定，石油化工催化剂中氯含量的分析，血液中的钾、钙及氯化物测定等。

离子选择性电极还应用于色谱检测器、海洋污染遥测传感器、宇宙航行生理分析仪等方面。具体说来，离子选择性电极已应用于许多生产部门，在科学研究上离子电极是一种不可缺少的实验工具，包括溶液平衡、络合物、反应动力学的研究等等。

第二节 离子选择性电极的膜电位

离子选择性电极的种类虽然很多，其膜电位产生的机理也不尽相同，但大多是基于电极膜与溶液之间离子交换的结果，改变了两相界面原来电荷分布的均匀性，在两相界面间形成了双电层，出现了电位差，由此而产生了膜电位，这与玻璃电极的膜电位极为相似，其值的大小与溶液中相应的离子活度有关。对多数离子选择电极而言，在25℃时，

$$E_{\text{膜}} = K \pm \frac{0.059}{n} \lg a \quad (15-1)$$

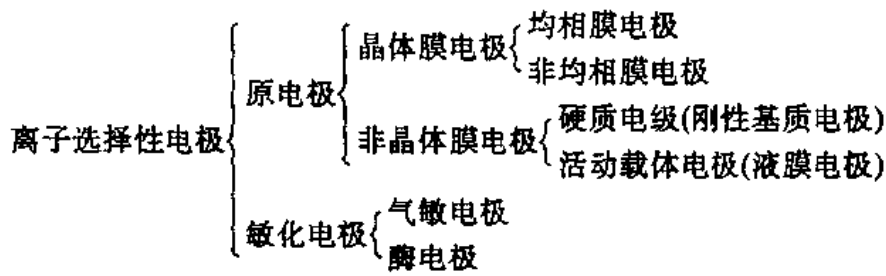
在一般情况下，应写成：

$$E_{\text{膜}} = K \pm \frac{2.303RT}{nF} \lg a \quad (15-2)$$

式中， a 为溶液中正离子或负离子的活度。其余符号含义同前。正、负符号取决于离子的电荷，阳离子取正号，阴离子取负号。式(15-2)表示在一定的条件下，离子选择性电极的膜电位与溶液中被测离子活度的对数值成线性关系，这是离子选择性电极分析法的定量依据。

第三节 离子选择性电极的类型

按国际纯粹化学与应用化学协会的建议，将离子选择性电极分为以下几类：



现以一些典型的离子选择性电极作一简单的介绍。

一、晶体膜电极

1. 均相膜电极

这类电极的敏感膜是由难溶盐的单晶或混合晶体粉末模压成片制成的。目前广泛应用的氟离子选择性电极(简称氟电极)就是这类电极的典型代表。其膜是由氟化镧(LaF_3)单晶片密封在聚氯乙烯或聚四氟乙烯塑料电极管的一端,管内以 $\text{Ag}-\text{AgCl}$ 为内参比电极,以 0.1mol/L NaCl 和 NaF 溶液为内参比溶液,即构成氟电极,其结构如图15-2所示。

氟电极之所以能响应溶液中 F^- 离子活度,是由于氟化镧单晶中的 F^- 与溶液中 F^- 交换的缘故。对氟离子选择性电极产生干扰的离子主要是 OH^- ,其干扰原因有两种说法:一种是 OH^- 离子的半径与电荷和 F^- 相近似所造成;另一种是 OH^- 在电极表面上发生如下反应:

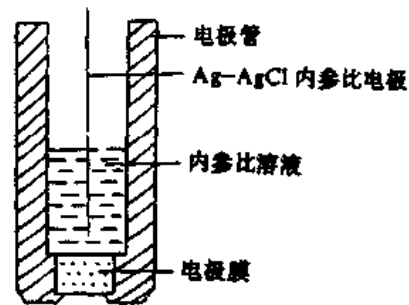


图 15-2 氟离子选择性电极

反应生成的 F^- 离子为电极本身所响应引起的干扰。当酸度较高时,因生成 HF_2^- 而降低 F^- 的活度,所以在测定时,应控制溶液 pH 值在 $5\sim 6$ 之间。此外,凡能与 F^- 离子形成稳定络合物或难溶盐的离子(如 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 等)也有干扰。因此在测定时为了消除这些干扰,常加入适当的掩蔽剂(如柠檬酸等)。氟电极可用于水中 F^- 含量的测定,其测定浓度可达 $1\sim 5 \times 10^{-7}\text{mol/L}$ 。

又如,卤素电极的敏感膜是由不同卤化银(AgCl 、 AgBr 、 AgI)和硫化银晶体粉末混匀后,在 980MPa (10t/cm^2)压制而成。它们可分别制成 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 离子电极。为了增强卤化银的机械强度和减少对光的敏感性,故在卤化银中渗入硫化银。

2. 非均相膜电极

此类电极的敏感膜是将电活性的难溶盐粉末均匀分散在惰性载体(如硅橡胶、塑料等)中而制成的。凡能用来制作晶体膜的电活性物质,一般都用来制作非均相膜。例

如，碘离子选择性电极是由 AgI 微粒均匀分散在硅橡胶中而制成的。属于这类电极的还有 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 Cl^- 、 Br^- 、 S^{2-} 等电极。

晶体膜电极在使用前需用被测离子的稀溶液或蒸馏水浸泡几小时，使敏感膜活化后，再用空白溶液洗至电位值稳定不变，才能插入试液中进行测量。

二、非晶体膜电极

1. 硬质电极

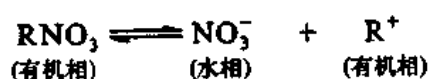
这类电极的敏感膜是由特殊玻璃制成的，根据玻璃组成的不同，可制成对 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 等离子有响应的离子选择性电极，见表 15-1。这类电极除玻璃膜组成不同外，它们的内参比溶液也不同。例如，玻璃电极的内参比溶液是 HCl 溶液，而 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 离子电极，它们的内参比溶液分别为 NaCl、KCl、LiCl 溶液，但内参比电极大多用 Ag-AgCl 电极。

表 15-1 不同电极的玻璃膜组成

电 极	玻璃膜的化学组成,% (mol)	电 极	玻璃膜的化学组成,% (mol)
玻璃电极	$22\text{Na}_2\text{O}-6\text{CaO}-72\text{SiO}_2$	钠 电 极	$11\text{Na}_2\text{O}-18\text{Al}_2\text{O}_3-71\text{SiO}_2$
锂 电 极	$15\text{Li}_2\text{O}-25\text{Al}_2\text{O}_3-60\text{SiO}_2$	钾 电 极	$27\text{Na}_2\text{O}-5\text{Al}_2\text{O}_3-68\text{SiO}_2$

2. 液膜电极

这类电极的敏感膜是由被测离子与有机螯合剂生成螯合物后，溶于一种不与水混溶的有机溶剂中，成为一种液体离子交换剂，再将此有机溶剂渗入惰性的微孔膜中所制成。电极的构造如图 15-3 所示。以 NO_3^- 电极为例，电极分内外层，内层套管中装有由 $0.1\text{mol/L NaNO}_3-0.1\text{mol/L NaCl}-3\%$ 琼脂制成内参比溶液，内参比电极为 Ag-AgCl 电极，外管中装液体离子交换剂，季铵类硝酸盐溶于邻硝基苯十二烷醚中，此溶液就支撑在惰性的聚偏二氟乙烯微孔膜上，形成一层薄膜，在膜的两侧发生如下的离子交换而产生膜电位：



其膜电位为：

$$E_{\text{膜}} = K - 0.0591 \lg a_{\text{NO}_3^-} \quad (25^\circ\text{C}) \quad (15-3)$$

属于这类电极有带正电荷的载体电极、带负电荷的载体电极、中性载体电极。硝酸根电极就是带正电荷的载体电极，钙电极带负电荷的载体电极，钾电极带中性载体电极。

三、气敏电极

这类电极属敏化的离子选择性电极，由离子电极与透气膜相结合组成对气体组分敏感的膜电极。由于在离子电极表面加上了辅助层，因此电极结构稍复杂，但可以提高电极的选择性以及扩大电极应用范围。

气敏电极的结构如图 15-4 所示。透气膜具有疏水性，它将样品溶液与中间电解液分隔开。中间电解质溶液在离子敏感膜与透气膜之间形成一层薄膜，样品中的待测气体组分可以扩散通过透气膜，在中间电解质薄膜层中建立平衡，从而改变电极敏感膜表面的离子活度，建立起与被测气体分压成正比的电极电位。由于在中间电解质溶液中已安装有参比电极，因此用气敏电极测量时，不需要外加参比电极。

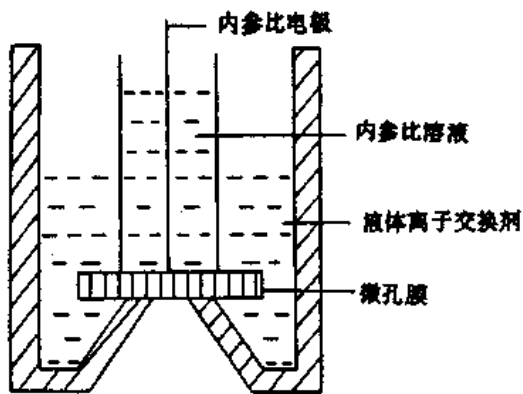


图 15-3 液膜电极

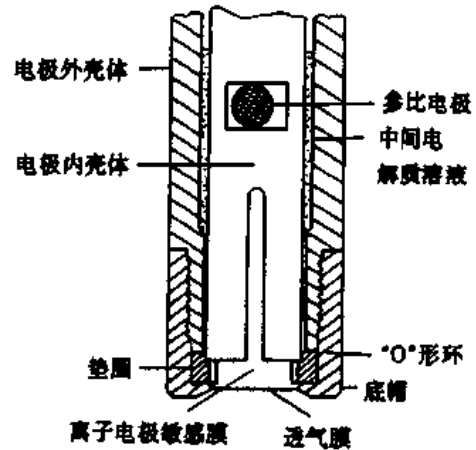


图 15-4 气敏电极

以二氧化碳气敏电极为例，中间电解质可由 10^{-2}M NaHCO_3 与 10^{-2}M NaCl 溶液组成，用微孔滤膜作为透气膜。 CO_2 分子扩散通过膜，在中间电解质薄膜层中建立起下列平衡。



反应的平衡常数为

$$K = \frac{a_{\text{HCO}_3^-} \cdot a_{\text{H}^+}}{a_{\text{CO}_2}} \quad (15-4)$$

由于中间溶液含有足够的 NaHCO_3 ，故 HCO_3^- 的浓度是恒定的，于是可得到

$$a_{\text{H}^+} = K' \cdot a_{\text{CO}_2} \quad (15-5)$$

式中 $K' = \frac{K}{a_{\text{HCO}_3^-}}$ 。当采用 pH 值玻璃电极作为敏感电极时，电极电位可表示为：

$$\begin{aligned} E &= E^0 + \frac{2.303RT}{F} \lg a_{\text{H}^+} = E^0 + \frac{2.303RT}{F} \lg K' \cdot a_{\text{CO}_2} \\ &= \text{常数} + \frac{2.303RT}{F} \lg a_{\text{CO}_2} = \text{常数} + \frac{2.303RT}{F} \lg P_{\text{CO}_2} \end{aligned} \quad (15-6)$$

电极电位与样品中的 CO_2 分压成正比，且遵循能斯特公式。

同样，制备氨气敏电极采用 $10^{-2}\text{M NH}_4\text{Cl} + 0.1\text{M KNO}_3$ 作为中间电解质溶液，用聚四氟乙烯微孔薄膜作为透气膜。气液反应为：



平衡常数为

$$K = \frac{a_{\text{NH}_4^+} \cdot a_{\text{OH}^-}}{a_{\text{NH}_3}} = \frac{K_{\text{H}_2\text{O}} \cdot a_{\text{NH}_4^+}}{a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{NH}_3}} \quad (15-7)$$

则
$$a_{\text{H}^+} = \frac{K_{\text{H}_2\text{O}} \cdot a_{\text{NH}_4^+}}{K \cdot a_{\text{NH}_3}} \quad (15-8)$$

式中, $K_{\text{H}_2\text{O}}$ 为水的离子积, $a_{\text{NH}_4^+}$ 是恒定的, 同样用 pH 玻璃电极作为敏感电极, 可得:

$$E = \text{常数} - \frac{2.303RT}{F} \lg a_{\text{NH}_3} \quad (15-9)$$

电极电位与 NH_3 活度(浓度)呈线性关系, 测量范围为 $1 \sim 10^6 \text{MNH}_3$, 挥发性胺对其有干扰。

能够用气敏电极测定的气体有 NH_3 、 CO_2 、 SO_2 、 NO_2 、 H_2S 、 HCN 、 HF 、 Cl_2 、 Br_2 、 I_2 等。表 15-2 列举了可用来制作气敏电极的各种平衡体系。

表 15-2 可用于气敏电极的平衡体系

待测气体	平衡体系	敏感电极
NH_3	$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$	H^+
	$X\text{NH}_3 + M^{n+} \rightleftharpoons M(\text{NH}_3)_x^{n+}$	$M = \text{Ag}^+, \text{Cd}^{2+}, \text{Cu}^{2+}$
SO_2	$\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HSO}_3^- + \text{H}^+$	H^+
NO_2	$2\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+$	H^+ 或 NO_2^-
H_2S	$\text{H}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HS}^- + \text{H}_3\text{O}^+$	S^{2-}
HCN	$\text{Ag}(\text{CN})_2^- \rightleftharpoons \text{Ag}^+ + 2\text{CN}^-$	Ag^+
HF	$\text{HF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{F}^-$	F^-
	$\text{FeF}_x^{2-x} \rightleftharpoons \text{FeF}_x^{3-x} + (x-y)\text{F}^-$	Pt (氧化还原)
HOAc	$\text{CH}_3\text{COOH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$	H^+
Cl_2	$\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + \text{ClO}^- + \text{Cl}^-$	H^+, Cl^-
CO_2	$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$	H^+
X_2	$\text{X}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + \text{XO}^- + \text{X}^-$	$\text{X}^- = \text{I}^-, \text{Br}^-$

四、酶电极

酶电极是另一类敏化的离子选择电极。是离子选择性电极研究的最活跃领域之一。它由离子敏感膜和覆盖在膜表面的涂层所组成。涂层中含有对待测物质具有专一性反应的酶, 而敏感膜对酶反应的产物有选择性响应图 15-5。这类电极在生物、生理过程及医学研究中具有重要意义。

研制酶电极的关键是找出一个合适的酶反应, 这个反应必须有确定的产物且可用离子电极检测出来。例如, 用于血液中尿素含量测定的尿素酶电极是基于下列酶催化水解

反应:



生成的 NH_4^+ 可用玻璃膜 NH_4^+ 电极或 CO_2 气敏电极检出。

普遍应用的葡萄糖电极是一种以氧电极为基体的酶电极。从原理上说，氧电极并不属于离子选择性电极，而是一种伏安法敏感器件。由于葡萄糖电极的重要性，在此稍加说明。在葡萄糖电极中葡萄糖氧化酶涂于氧电极表面，见图 15-6，所发生的酶催化反应为：

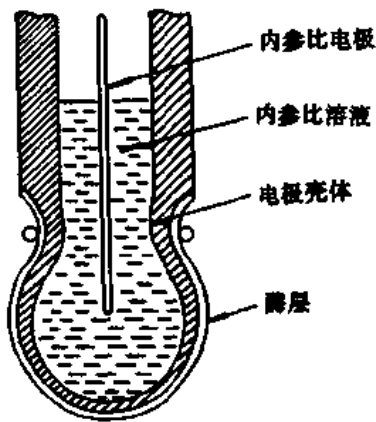


图 15-5 酶电极

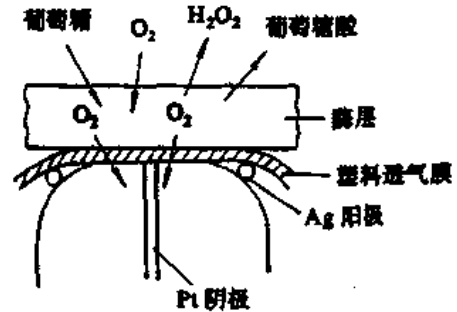


图 15-6 葡萄糖电极

氧量的减小可用氧电极测出，从而可计算出样品中葡萄糖浓度。此法已广泛用于临床生化测量。方法快速、准确，一分钟可得到测定结果，适用于抢救危重病人。

由于酶的种类极其繁多，酶反应的特效性好，目前已发展了许多种酶电极，表 15-3 列出了部分酶电极。酶电极已成为最有发展前途的电极之一。

表 15-3 酶电极

测定对象	酶	离子选择性电极
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	Γ , pH
尿素	脲酶	NH_3 , CO_2 , pH
L-氨基酸	L-氨基酸酶	NH_4^+ , Γ
L-精氨酸	精氨酸酶	NH_3
L-谷氨酸	谷氨酸脱氢酶	NH_4^+ , CO_2
中性脂质	蛋白脂酶	pH
青霉素	青霉素酶	pH
苦杏仁苷	苦杏仁苷酶	CN^-
亚硝基化合物	亚硝基还原酶	NH_3

五、其它种类电极

除了上述电极外，还有其它一些种类的离子选择性电极，其中比较重要的是硫属玻璃（半导体）电极及离子敏感场效应器件。特别是后者利用电子器件原理构成电化学敏感器件，已引起人们的重视。

1. 硫属玻璃（半导体）电极

采用含有 60%Se、28%Ge 及 12%Sb（摩尔百分数）在 900℃~1000℃下熔融制成玻璃称为硫属玻璃（商品名称称为 1173 玻璃），玻璃具有半导体性质且不易被氧化。在玻璃中加入 2.0%的纯铁，经过重新熔融后切成膜片制作电极，对 $10^{-1} \sim 10^{-5} \text{M}$ 的三价铁离子显示能斯特电位响应，斜率为 60mV/数量级。电极过程的研究表明，这种电极响应机理是氧化还原反应，测出的是下列反应的平衡电位。



因此电极斜率与一价离子电极近似相同。值得注意的是这种电极对 Fe^{2+} 没有响应，因此这种电极可用于在含有 Fe^{2+} 条件下测定 Fe^{3+} 。

在 Fe^{3+} 不存在时，上述电极也可以用来测定 Cu^{2+} ，电极对 Cu^{2+} 线性响应斜率为 30mV/数量级。这表明电极反应也为氧化还原过程。强氧化剂以及有待测离子形成络合物的阴离子对测定有干扰。

2. 离子敏感场效应器件

离子敏感场效应器件（简称 ISFET）是一种将离子选择电极敏感膜与半导体场效应器件结合起来的离子（或分子）敏感器件。这种器件利用离子或分子选择性敏感膜层取代金属-氧化物-半导体场效应器件（MOSFET）的金属栅极。当绝缘层直接与溶液接触，可获得离子选择性响应特性。例如，用 SiO_2 作为敏感层时，器件对溶液中的 Na^+ 敏感，当 Na^+ 浓度范围在 0.002~1M 时，漏源电流 I_D 与 Na^+ 活度的对数呈线性关系。当用 Si_3N_4 作绝缘层或 pH 敏感玻璃作为敏感层，则器件对 (H^+) pH 值响应。如果将制备离子选择电极的活性材料沉积在氧化物绝缘层上，例如将缬氨霉素 PVC 膜沉积到栅极绝缘体氧化物上，形成一薄层 ($>100\mu\text{m}$) 的 K^+ 选择性膜，则漏源电流 I_D 正比于 K^+ 活度的对数，其基值在 $10\mu\text{A}$ 以上，无需放大即可用动圈式电流仪直接测量。等效栅压相当于 50~60mV/数量级，表明具有能斯特响应特性。此种电极结构如图 15-7 所示，电极对 Na^+ 的选择性系数 $K_{\text{K},\text{Na}}$ 大约为 10^{-3} 。

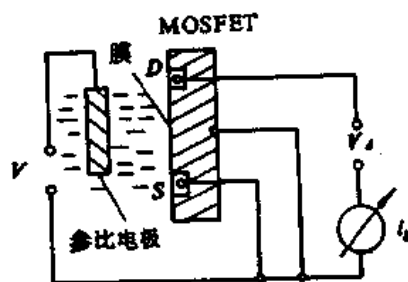


图 15-7 离子敏感场效应器件

与 PVC 膜 K^+ 选择电极相比较，样品中存在蛋白质时对此种器件没有干扰，因此可用于直接测定血中的 K^+ 含量，且结果与火焰光度法相一致。将 AgBr 淀积在氧化硅或氮化硅绝缘层上，制得对 Ag^+ 或 Br^- 敏感的场效应器件。

离子敏感场效应器件的响应机理是由于敏感层与溶液离子之间的离子交换、电子传递、吸附或偶极矩定向排列等作用建立起膜电位。所产生的电场类似于加在场效应器件金属栅极上的栅源电压。因此所引起的漏源电流正比于溶液中的离子活度。显然，在膜界面上产生的仍然是平衡电位，电流并没有通过敏感膜。因此在敏感膜上不会引起极化电位。

离子敏感场效应器件的出现开辟了离子选择性电极的新领域。

第四节 离子选择性电极的基本特征

一、选择性

从理论上讲，对任何离子都可以制备出具有电位响应的离子电极。例如用阴、阳离子制作的交换膜电极分别对任何阴、阳离子都有响应。问题是只有那些对待测离子具有选择性响应的电极才能获得实际应用。因此选择性是离子电极最重要的性能指标之一。电极的选择性用选择性系数来描述。

理想化的离子选择性电极只对待测离子产生响应。实际的离子选择性电极在不同程度上受到共存离子—干扰离子的影响。电极的选择性主要是由电极膜材料的性质所决定。电极的选择性是根据膜的相界面上的电极过程产生的相界电位和（或）膜内电荷迁移决定的，如果共存离子参与这两种过程，就会产生干扰作用。

设 i 为某离子选择性电极的待测离子， j 为共存离子，考虑干扰作用的膜电位公式为：

$$E_{\text{膜}} = \text{常数} \pm \frac{RT}{n_i F} \ln(a_i + K_{ij} a_j^{n_i/n_j}) \quad (15-10)$$

式中， a_i 为待测离子的活度； a_j 为共存离子的活度； n_i, n_j 为离子 i 及 j 的价数； K_{ij} 为电极的选择性系数。

K_{ij} 的意义为在其它条件相同时提供相同电位的待测离子活度 a_i 和干扰离子 a_j 的比值。以最常用的离子选择性电极 pH 玻璃电极为例，它对 Na^+ 的选择性系数 $K_{\text{H}^+, \text{Na}^+}$ 的系数为 10^{-11} ，即此电极对 H^+ 的响应比对 Na^+ 的响应灵敏 10^{11} 倍。也就是说，对任何一个离子选择性电极来说， K_{ij} 值越小电极选择性越强。一般 K_{ij} 值在 10^{-4} 以下不呈现干扰， K_{ij} 值应至少接近 10^{-2} ，否则不宜使用。

应该注意， K_{ij} 值并非是一真实的常数，其值随实验条件及测定方法不同，数值也有差异，在实际应用中要注意 K_{ij} 的变化因素。

二、线性范围及检测下限

以电池的电动势 E 对 $-\lg a$ 作图，即可得到如图 15-8 所示的曲线。

曲线的直线部分 BC 称为离子选择性电极响应的线性范围，或称为离子选择性电极的校正曲线或工作曲线，它是定量的依据。当然，此范围越宽越好。一般电极的线性响应范围在 4~7 个数量级之间。直线的斜率为 $2.303 \times 10^3 RT / nF$ (mV)。它表示离子活

度变化 10 倍时，所引起电动势的变化值。在 25℃ 时，一价离子 ($n=1$) 为 59mV；二价离子 ($n=2$) 为 29.5mV。显然，随离子电荷数的增加，测定的灵敏度就降低。所以离子选择性电极法更多用于低价离子浓度的测定。由图 15-8 可知，当离子活度低至一定程度时， E 值与 $\lg a$ 不再呈线性关系，当离子活度降至图中的 A 区间， E 值就不再随离子的活度而变化。这时 BC 线与 A 段延长线的交点 D 所对应活度或浓度，即称为离子选择性电极的最小检出限。当溶液中的离子活度或浓度低于最小检出限时，就不能用该电极进行测量，所以最小检出限是离子选择性电极的一个性能指标。

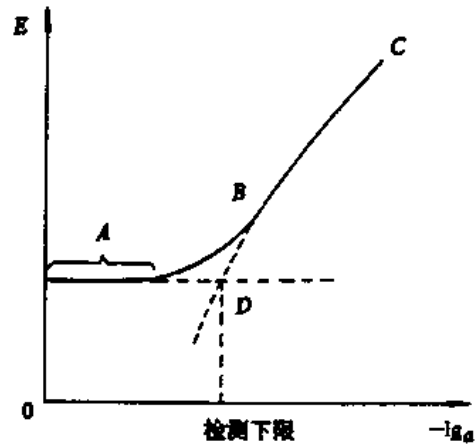


图 15-8 离子选择性电极的线性范围和检测下限

电极的最小检出限与膜的表面状况、测量前的预处理及清洗，测量时的搅拌及溶液的基体组成等条件都有关系。在指出电极的最小检出限时，必须注明这些条件。

三、响应时间、稳定性和迟滞效应

1976 年 IUPAC 建议离子选择性电极的响应时间，是指离子选择性电极和参比电极一起接触待测液的瞬间算起，或选与离子选择性电极和参比电极处于平衡的溶液的活度突然变化的瞬间算起，至电池电动势的变化稳定在 1mV 以内所经过的时间。

响应时间可用来表示电极达到动态平衡的快慢，它可以提供电极反应机理和膜内电荷传导过程中的某些信息。在实际应用中，可根据响应时间设定读取和记录测量的电动势时间，因此，响应时间是离子选择性电极的重要性能指标，一支响应时间过长的电极是没有实用价值的。

不同的离子选择性电极的响应时间差别很大，主要的影响因素是敏感膜的结构和性质、响应离子活度、搅拌速度、共存离子的种类与活度、测定时温度等条件。一般情况下，离子选择性电极敏感膜的厚度越薄、响应时间越短；敏感膜光洁度越高，响应时间越短；固体膜电极的响应速度较快，液膜电极的响应时间较长。同一支离子选择性电极浸于同种离子的不同活度的溶液中时，浓溶液中比稀溶液中响应快；此外，活度改变的方向也影响电极响应时间，从低活度变到高活度的响应时间比从高活度变到低活度的响应时间短，也就是说，进行分析时，应该从最低活度的溶液开始测定。搅拌可以加速待测离子到达电极表面的速度，升高温度可以加快待测离子的热运动，缩短响应时间。有时共存离子存在时，可起调节作用，往往可以缩短响应时间，而共存离子为干扰离子时将增加响应时间，例如，测定 F^- 时，加入氯化钠离子可以缩短响应时间，加入 OH^- 离子则使其响应变得迟钝。

离子选择性电极的稳定性是指在恒温条件下，电池电动势保持相对恒定的时间。稳定性的好坏关系到能否进行准确测量。稳定性可以用电池电动势在一定时间内的漂移和重现性来衡量。

用 10^{-3}M 的溶液观测电池电动势漂移情况，如果仪器零点漂移可以忽略不计，参比电极的电位恒定，则稳定性很好的电极 24h 漂移应小于 2mV，特别优良的电极可达 1mV 左右。

电极的迟滞效应是与响应时间相关的，即对同一活度的待测离子溶液，测出的电池电动势与电极在测定前接触的试液成分有关。此现象也称为电极存储效应，它是离子选择性电极分析法误差的重要来源之一，减小此误差的方法之一，就是控制电极的测定前预处理条件。

四、电极的使用寿命

离子选择电极经过长期使用会老化，此时电极响应时间变慢，斜率偏低，电极逐渐失效。一般来说，液膜电极使用寿命最短，只能用几周至 1~2 月，原因是液态活性物质不断挥发及渗漏损失。PVC 塑料膜电极可用半年至一年，玻璃膜电极可用二至三年，至于固态膜电极可以不断重新抛光使用，寿命可达几年以上。当然电极的连续或断续使用、使用时的温度、溶液组成以及电极的保存、维护条件等对使用寿命均有影响。下面列出不同类型离子选择电极的正确保存方法。

1. 玻璃膜电极 浸放于 pH 缓冲溶液（对 pH 玻璃电极）或待测离子溶液（对其它阳离子玻璃电极）中。长期不使用时也可洗净后干放。

2. 固态膜电极 洗净后干放。

3. 液态（PVC）膜电极 短时可浸放在待测离子溶液中，长期保存应洗净干放。

4. 气敏电极 不宜存放在空气中，应按照电极生产厂提供的保存条件存放（浸放于合适的溶液中）。

5. 复合电极 浸放于含 KCl 的 pH 缓冲液（对 pH 复合电极）或含 KCl 的待测离子溶液（对其它复合电极）中，也可以将内充液倒出，洗净后干放。

第五节 离子选择性电极的定量方法

离子选择性电极的定量基础就是膜电位与待测离子活度的关系符合能斯特公式，而组成电池的参比电极的电位是恒定的，由此，电池电动势与待测离子（以阳离子为例）活度的关系也符合能斯特公式，

$$E = \text{常数} + \frac{2.303RT}{nF} \lg a \quad (15-11)$$

根据上式，可以得到不同的定量方法，如标准曲线法、标准加入法和格氏（Gran）作图法等。

一、标准曲线法

离子选择性电极与参比电极插入一系列配制好的标准溶液中，组成一完整电池，用 pH 计或离子计测定电池电动势随离子活度（或浓度）的变化情况，然后以测得的第 i 号标准溶液的电池电动势 E_i 值对相应的 $\lg a_i$ （或 $\lg C_i$ ）值绘制标准曲线（校正曲线），或对 E_i 与 $\lg a_i$ 进行线性回归。在相同条件下测定待测液的电池电动势 E_x ，就可从标准

曲线上查出待测离子活度 a_x ，或把 E_x 代入回归方程计算出 a_x 。

一般在分析时要测定离子浓度，这就要求标准溶液和待测液有相同的离子强度，要求活度系数 f_i 相同，因为从德拜-休格耳离子互吸理论，活度系数 f_i 与离子强度 μ 有如下关系式：

$$-\lg f_i = \frac{0.5085z_i^2\sqrt{\mu}}{1 + 0.3281\alpha_i\sqrt{\mu}} \quad (15-12)$$

式中， z_i 和 α_i 分别为待测离子的电荷数和水合离子有效直径。

待测离子的活度 a_i 与浓度 C_i 的关系为：

$$a_i = f_i C_i \quad (15-13)$$

所以当离子强度 μ 一定时， f_i 就是定值，活度可以用浓度代替。

$$E = \text{常数} \pm \frac{2.303RT}{nF} \lg C \quad (15-14)$$

表 15-4 几种常用的离子调节缓冲液

测定对象	离子强度调节缓冲液
气敏电极测定氨、铵盐 碘化银电极测定氟离子	10M NaOH (0.25)
晶体电极测定溴、氯、铜、 碘、银、硫氰根等离子	5M NaNO ₃ (0.5)
活动载体电极测定钙离子	4M KCl (0.5)
气敏电极测定二氧化碳	1M 柠檬酸钠缓冲液，或每 500mL 试样中加 0.25mL、1M Na ₂ SO ₄ 后流经氢式阳离子交换柱，送入电极流通槽
氯离子的测定	1M 柠檬酸钠，或 10% 钒铁试剂(试液内加 15mL，稀释至 50mL)
活动载体电极测定 BF ₄ ⁻ 及 ClO ₄ ⁻	10M NH ₄ F (0.25)
硫化物测定	调整试液的 NaOH 浓度为 1M，抗坏血酸浓度为 5mg/mL
铅电极测定铅	5M NaClO ₄ (0.5)再加等体积 2 × 10 ⁻³ M 甲醛的甲醇溶液
碘化银电极测定汞 (II)	5M NaClO ₄ (0.5)
活动载体电极测定硝酸根	2M (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.5)
活动载体电极测定 K ⁺ 离子	6M NaCl (0.5)
玻璃膜钠电极测定 Na ⁺ 离子	4M NH ₄ Cl-1M NH ₄ OH (0.5)

* 括号内数字为取 25mL 试液测定时加入的缓冲液毫升数

在实际分析时，为了使标准溶液与待测液的离子强度相同，要调节溶液的最佳 pH 值消除干扰离子的影响，在标准溶液和待测液中加入一定量的总离子强度调节缓冲液。

总离子强度调节缓冲液是除含维持离子强度稳定不变的中性电解质外，还有缓冲液和掩蔽剂。其具体成分随分析对象而变化，例如：测定水中氟离子时，1.0M 的 NaCl

用以维持离子强度恒定，0.25M HAc-0.75M NaAc 则维持测定的最佳 pH 值 5.5，并消除 H^+ 和 OH^- 的干扰，0.001M 的柠檬酸钠作为掩蔽剂，常用的总离子强度调节缓冲液列于表 15-4。

二、标准加入法

标准加入法又叫做已知增量法或一次标准加入法。当待测液组分复杂，离子强度比

设 C_x 和 V_x 分别为试液的浓度和体积; C_s 和 V_s 分别为加入被测离子的标准溶液浓度和体积。当加入标准溶液 V_s 后, 测得电动势 E 为:

$$E = K' + S \lg f \frac{C_x V_x + C_s V_s}{V_x + V_s} \quad (15-20)$$

$$10^{(E-K')/S} = f \frac{C_x V_x + C_s V_s}{V_x + V_s} \quad (15-21)$$

$$10^{E/S} = 10^{K'/S} \cdot f \frac{C_x V_x + C_s V_s}{V_x + V_s} \quad (15-22)$$

因 $10^{K'/S} \cdot f$ 为常数, 设它为 K , 故式 (15-22) 可改写成:

$$(V_x + V_s) 10^{E/S} = K(C_x V_x + C_s V_s) \quad (15-23)$$

在每次加入标准溶液 V_s 后测量 E 值, 按上式求出 $(V_x + V_s) 10^{E/S}$, 以它为纵坐标, V_s 为横坐标作图得一直线, 如图 15-9 所示。

若将直线延长, 则交于横坐标轴得 V_s 值, 此时 $(V_x + V_s) 10^{E/S} = 0$ 根据式 (15-23) 可得:

$$\begin{aligned} C_x V_x + C_s V_s &= 0 \\ C_x &= -\frac{C_s V_s}{V_x} \end{aligned} \quad (15-24)$$

显然, 按上述作图法是很麻烦。

若规定所取试液的体积为 100mL, 加入标准溶液体积为 1~10mL, 为此在有 10% 体积校正的半反对数坐标纸上作图, 这样就可将 $(V_x + V_s) 10^{E/S}$ 与 V_s 的关系转变为 E 与 V_s 的线性关系, 使用起来就方便了, 这就是格氏作图法。其横坐标为加入标准溶液的毫升数, 每大格代表 1mL; 纵坐标为每次测定的电动势 E (mV), 每大格对一价离子为 5mV; 对二价离子为 2.5mV, 纵坐标的毫伏标度可任意设定, 通常对阳离子电极, 纵坐标自上往下是由大到小进行标度; 对阴离子电极, 纵坐标自上往下由小到大进行标度, 如图 15-10 所示。在测定中为了消除斜率变化对结果的影响, 一般要做空白试验加以校正。

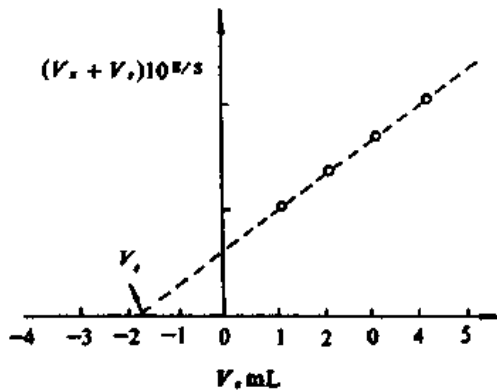


图 15-9 $(V_x + V_s) 10^{E/S}$ 与 V_s 关系图

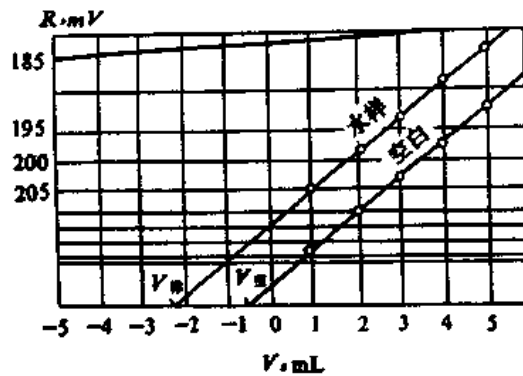


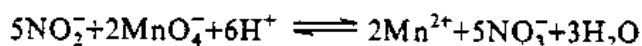
图 15-10 测定水中 F^- 的格氏作图法

第六节 离子选择性电极分析法的应用

目前, 离子选择性电极分析法已广泛应用于环境监测、石油化工、冶金、地质、生化、食品及农业分析等各个领域, 可测定的对象已达近百种, 包括 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 CN^- 、 SCN^- 、 S^{2-} 、 ClO_4^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 SO_3^{2-} 、 BF_4^- 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 、 Tl^+ 、 Fe^{3+} 、 $AuCl_4^-$ 、 ReO_4^- 、三氟乙酸根、苯磺酸根、维生素 B_1 、维生素 B_6 、色氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、谷氨酸、乙酰胆碱、 NH_3 、 CO_2 、 SO_2 、 H_2S 、 NO 等。

一、亚硝酸根的测定

溶液中的 NO_2^- 可在酸性介质中用 $KMnO_4$ 将其氧化为 NO_3^- , 然后用 NO_3^- 电极测定, 其氧化反应为



样品中原有的 NO_3^- 可预先测出, 最后将测得的 $NO_2^- + NO_3^-$ 总量减去原有的 NO_3^- , 即得到样品中 NO_2^- 含量, 故此法可同时分析样品中的 NO_3^- 及 NO_2^- 。具体操作步骤为:

1. NO_3^- 的测定 取浓度为 C_1 的标准溶液, 用电极 (PVC 膜 NO_3^- 电极及双接界参比电极, 外室充液为 0.1M NaCl) 测出稳定电势值 E_1 。然后将样品用 1:4 H_3PO_4 或 NaOH 调整 pH 值为 5~6, 测出稳定电势值 E_x 。最后取另一标准溶液 C_2 (注意样品浓度 C_x 应在 C_1 与 C_2 之间), 同样测出稳定电势值 E_2 。按照下式计算样品中 NO_3^- 浓度 C_x 。

$$\lg C_x = \lg C_1 + \frac{(\lg C_1 - \lg C_2) \cdot (E_x - E_1)}{(E_1 - E_2)}$$

2. $NO_3^- + NO_2^-$ 的测定 试样用 1:4 H_3PO_4 或 NaOH 调整 pH 值为 4~6, 在不断摇动下加入 $KMnO_4$ ($10^{-2}M$ 数量级的 NO_2^- 用 0.1M $KMnO_4$, $10^{-3}M$ 数量级的 NO_2^- 用 0.01M $KMnO_4$) 直至粉红色保持 1min 不褪色为止, 用 0.2M Na_2HPO_4 稀释至 50mL, 此时 NO_2^- 已全部氧化为 NO_3^- 。

按照上述 1 的操作步骤测出试样 $NO_3^- + NO_2^-$ 总量, 标准溶液也应加入同量的 Na_2HPO_4 。

将 $NO_3^- + NO_2^-$ 总量减去步骤 1 得出的 NO_3^- 量, 就可得到溶液中 NO_2^- 含量。测量时标准溶液与样品溶液温度应保持相同, 温度相差不应超过 1℃。

二、钙的测定

1. 水中钙的测定

水中钙可以用 PVC 膜 Ca^{2+} 电极直接测定, 应用一种恒定络合缓冲剂 (CCB), 其中含有亚氨基乙二酸二钠, 保持恒定的络合程度, 含有的乙酰丙酮掩蔽镁的干扰, 并含有缓冲剂调节离子强度及 pH 值。CCB 配制方法为: 称取 40.4g 分析纯 KNO_3 、3.6g

亚氨基二乙酸二钠及 160mL 0.5M 的乙酰丙酮、2mL 10M 氨水及 1.67gNH₄Cl, 配成 1L 溶液。Ca²⁺标准液用 Ca(NO₃)₂ 或 CaCl₂ 配制。采用 0.1M 或 1M 甘汞电极作为参比电极。测量按标准曲线法进行。

(1) 标准曲线制作 取 50mL CCB 加到 50mL 纯水中, 用 0.2mL 移液管将 Ca²⁺ 标准液按照计算量加到溶液中, 在匀速搅拌下测量各浓度下稳定电势值, 在半对数作图纸上做出 E-lgC 标准曲线。

(2) 样品测定 在 50mL 样品中加入 50mL CCB 溶液, 浸入电极, 匀速搅拌, 读取稳定电势, 从 E-lgC 标准曲线求出 Ca²⁺ 含量。本法可测 20~800mg/L 的 Ca²⁺。

2. 土壤中钙的测定

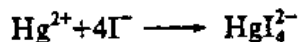
以 0.2M NaAc 或 0.5M KCl 溶液为本底, 分别配制 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻²M Ca²⁺ 标准溶液。在均匀搅拌下测量 (PVC 膜 Ca²⁺ 电极及 0.1M 甘汞电极) 在上述溶液中的稳定电势值, 在半对数作图纸上作出 E-lgC 标准曲线。然后称取 5g 风干的土壤加入 0.2M NaAc 或 0.5M KCl 25mL, 振荡 5min, 过滤。取一定量提取液, 在均匀搅拌下测出稳定电势值, 从标准曲线上求出 Ca²⁺ 含量。电极表面如出现结垢, 可用 EDTA 溶液浸洗除去。

三、废水中汞的测定

虽然有用 HgS 或 HgSe 等制作的 Hg²⁺ 电极, 但在实际应用中 Hg²⁺ 的测定大多采用 AgI 固态膜或 Ag₂HgI₄ 固态膜 Γ 电极。其原理是形成汞-碘络合物并释放出 Ag⁺。



Hg²⁺ 浓度低时 n ≈ 1, 而在 Hg²⁺ 浓度高时 n ≈ 2, 因此电极呈现非能斯特响应特性。当 pH = 1, Hg²⁺ 浓度在 10⁻⁴ ~ 10⁻⁵M 之间的曲线斜率为 47mV, 但电极的检测下限可达 10⁻⁸M。CN⁻, Br⁻ 及 Cl⁻ 由于与 Hg²⁺ 形成稳定络合物而有干扰, Ag⁺ 的干扰 (K_{Hg²⁺, Ag⁺} ≈ 1) 可用控制 pH 值测量的方法去解决。在 pH > 7 时, Hg²⁺ 形成 HgO 沉淀或与 OH⁻ 形成络合物, 从而与 Ag⁺ 分离, 此时可测得 Ag⁺ 单独量。Ag₂S 电极对 Hg²⁺ 也有响应, 其斜率也是非能斯特响应的。另一种测定 Hg²⁺ 的方便方法, 是应用 I⁻ 的已知减量法。将含 Hg²⁺ 的样品溶液加到过量的 I⁻ 溶液中, 由于发生下列反应:



使 I⁻ 定量地减少, 用 AgI 膜电极测出剩余的 I⁻, 即可得到 Hg²⁺ 含量。碱性染料 HgI₄²⁻ 电极也已用于汞的测定。

1. 用 I⁻ 电极直接测定 用 1M HNO₃ 稀释配制 10⁻³ ~ 10⁻⁸M Hg²⁺ 标准溶液, 用 AgI 电极及双接界甘汞参比电极 (外室充液为 1M KNO₃) 测出各溶液中的电势值, 做出 E-lgC 标准曲线。样品加 HNO₃ 酸化, 测出电池电势值。从标准曲线上求出 Hg²⁺ 含量, F⁻, Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Cr³⁺, Cr⁶⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ 等均不干扰测定。

2. 已知减量法 10mL 水样, 加 10mL 1M 的 KMnO₄ 及 15mL 5% 的 H₂SO₄ (如 KMnO₄ 退色, 可再加数毫升), 加热回流 30min, 然后滴加 NaNO₂ 溶液还原剩余的

KMnO_4 ，再加热煮沸 10min，冷却后转入 100mL 容量瓶中，加入 10mL 浓度约为水样汞浓度 10 倍量的标准 KI 溶液，混匀后，用 NaOH 中和至 $\text{pH} \approx 3$ ，取出部分溶液按照标准加入法测出剩余 I^- 含量，由此计算样品中汞含量。加 KMnO_4 及 H_2SO_4 消煮时，金属汞、亚汞及甲基汞均转化为 Hg^{2+} ，故此法可测得总汞量。如不经过此预处理，则测出的是游离 Hg^{2+} 浓度。加入 KI 量对测量回收率影响较大，合适的范围为样品含汞量（按摩尔计算）的 5~20 倍。

思考题

1. 何谓离子选择性电极？其响应机理是什么？
2. 应用离子选择性电极进行电位分析时，应注意哪些影响因素？
3. 离子选择性电极分析法的结果如何计算？
4. 25℃ 时，用钙离子选择性电极和饱和甘汞电极插入浓度为 $1.8 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 钙离子溶液中，测得电池的电动势为 0.411V，再用 Ca^{2+} 试液代替已知浓度的 Ca^{2+} 溶液，测得电动势为 0.439V，试计算试液中 Ca^{2+} 浓度为多少？
5. 用氟离子选择性电极测定水中的 F^- 含量时，分别取 $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 氟离子标准溶液 1, 3, 5, 7, 9mL 及水样 25mL，分别置于六个 50mL 容量瓶中，又各加入总离子强度调节缓冲液 10mL 后，用去离子水稀释至刻度，混匀，分别测得它们的电位值为 80, 50, 35, 27, 20, 30mV。试计算水中 F^- 含量为多少？
6. 在 25℃ 下，将饱和甘汞电极和钙离子选择性电极插入 100mL 水样中，用电位法测定水中的 Ca^{2+} 离子。若测得电池的电动势为 -0.0617V，然后加入 0.00735mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 标准溶液 1.00mL，测得电池的电动势为 -0.512V，求原水样中 Ca^{2+} 离子浓度为多少？

第十六章 极谱分析法

第一节 概 述

极谱分析法是一种特殊形式的电解方法，它可使可还原物质或可氧化物质在滴汞电极上电解，由浓差极化形成电流-电压极化曲线，根据电流-电压曲线进行定性、定量分析，这种方法又称为以滴汞电极为极化电极的“伏安法”。

极谱分析法首先由捷克斯洛伐克物理化学家海洛夫斯基 (J. Heyrovsky) 于 1922 年创立，至 1945 年前后被广泛应用于实际分析工作中。自 60 年代以来，又在原经典极谱法的基础上进一步发展。至今已形成了一系列的极谱方法和技术，成为电化学分析中最常用的方法之一。它的应用相当广泛，凡能在电极上被氧化、还原的无机离子以及有机物，一般均可用此法测定。许多不能在电极上氧化还原的物质，也可用间接法加以测定。极谱法亦常用作理论研究，如化学动力学、电极过程及化学平衡研究等。

极谱分析法具有如下一些优点。

- (1) 灵敏度较高，测定浓度范围广，从 $10^{-5} \sim 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。
- (2) 准确性较高，测定相对误差一般在 $2\% \sim 5\%$ 。
- (3) 分析时由于表面不断更新，滴汞电极上进行的反应具较好的重现性。
- (4) 电极是微电极，因此通过电解池的电流很小（一般 $I = 10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ A}$ ），故不会因电解而引起物质浓度改变，即不会破坏待测液。
- (5) 进行多种元素测定时，可同时并连续进行，不必事先进行分离。
- (6) 分析时所需试样极少，仅需几毫升甚至到一滴。
- (7) 化学稳定性高，使用范围极广。

第二节 仪器基本装置和方法简介

极谱分析的基本装置如图 16-1 所示。装置主要由三部分组成：

(1) 电解池部分

电解池内插入两个电极，极谱分析的特殊性表现在两个电极上，一个表面积相对较大的参比电极和一个面积很小的滴汞电极。滴汞电极上端为一贮汞器，通过橡皮管与一长度约为 10cm，内径约为 $50 \sim 80 \mu\text{m}$ 毛细管相连。贮汞器置于一定高度，在汞柱压力下，汞滴由毛细管末端有规则地滴入电解池中，悬在毛细管端的汞滴作为电极，该电极因表面积较小，电解时电流密度较大，易于产生浓差极化现象。参比电极常采用饱和甘汞电极，其表面积很大，电解时电流密度小，不易出现浓差极化现象。

(2) 电压测量装置

由直流电源 B 、可变电阻 R 和滑线电阻 AB 构成电位计线路。滑线电阻两端与电

源 D 相连，接触键 C 在 AB 之间滑动，以调解 AC 间的电位差 $V_{外}$ （一般从 $0 \sim 2.5V$ ），并从电位差计上读出，此电压即为电解池电压。

(3) 电流测量装置

电压改变过程中电流变化由检流计检出，记录电流-电压曲线称为极谱波。

分析时，将待分析试液，如低浓度的 Pb^{2+} （约 $10^{-3}M$ ）溶液，加入到电解池中，在保持溶液静止的情况下，滑动接触键 C ，使电解池两电极间的电压从 $0.2V$ 开始逐渐增加至 $0.7V$ 左右，每加一次电压观察一次电流，记录外加电压及相应的电流值，并以电流为纵坐标，电压为横坐标作图。这样就得到电解 Pb^{2+} 的电流-电压极化曲线，也称为极谱曲线或极谱波。如图 16-2 所示。要想得到如图 16-2 所示的典型

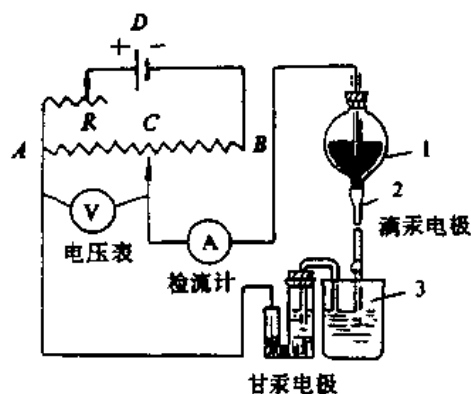


图 16-1 极谱分析装置

1. 贮汞器 2. 橡皮管 3. 玻璃毛细管

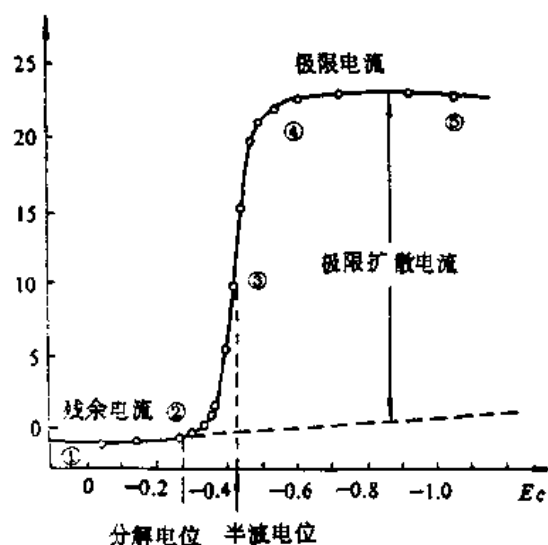
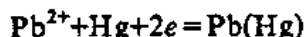
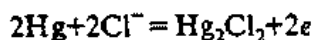


图 16-2 铅离子的极谱图

极谱曲线，电解液中除了含 Pb^{2+} 离子外，还必须加入适当的其它物质，这样的溶液称为底液。上法中要加入大量的 KCl （支持电解质），使其浓度至少为 $0.1M$ ，加入动物胶（极大抑制剂），使其浓度约为 0.005% ，通入氢气数分钟逐出溶液中的溶解氧，或加入 1% 左右的亚硫酸钠（除氧剂）。从图 16-2 可以看出：在外加电压未达到铅离子的析出电位之前（图中①至②范围内），只有微小的电流通过检流计即残余电流。当外加电压达到铅离子的析出电位后（图中②以后），电流急剧增加，此时滴汞电极上有铅离子还原生成汞齐：



在甘汞电极上，汞氧化生成 Hg_2Cl_2 ：



电压每增加一微小量，电流增加较大，在③的位置时，电流随电压改变的比值最大，在

极谱波④至⑤的阶段中，电压增加，电流趋于平稳，达到一极限值，相应的电流称为极限电流，从极限电流中减去残余电流称为极限扩散电流，简称扩散电流。扩散电流的大小与试样中铅离子浓度成正比。这就是极谱定量分析的基础。极谱波中点对应的滴汞电极的电位称为半波电位，是离子性质的特征，因此它是极谱定性分析的依据。

第三节 极谱定量分析原理

一、尤考维奇扩散电流方程式

1. 扩散电流方程式

滴汞电极的扩散电流方程式由捷克科学家尤考维奇于1934年推导得到，后经实验证实。

在推导公式之前，首先假定一个理想的汞滴具有如下一些性质：

(1) 其形状始终为球形。虽然汞滴在即将滴落的一段时间内因重力的作用而呈梨形，只有在开始形成后的一段时间内才接近球形。但由于汞滴从毛细管口开始形成，长大直至脱落的整个滴落周期不过2~6s，在如此短的时间内形成的汞滴尺寸很小，不超过1mm，所以球形的假设应是合理的。

(2) 在汞滴生长过程中汞滴内部及其附近溶液中无切向搅拌作用而仅有径向运动。这一假设有时会引起一些误差。在讨论所谓“极大”现象时将会涉及。

(3) 每一汞滴都在完全相同的条件下成长。这一点与实际情况亦有些偏差，特别是电解开始的一段时间内。

不管怎样，以上近似处理还是被认为较合理的，特别是以上几方面的偏差往往相互补偿、抵消。

同时假设在被测定的溶液中，滴汞电极上进行的电极过程是由扩散控制的，当有大量惰性电解质存在时，则所得电流为扩散电流：

$$I = iA = nFDA \frac{C^{\circ} - C'}{\delta} \quad (16-1)$$

式中， I 为滴汞电极上测得的电流强度； i 为电流密度； A 为电极面积； δ 为滴汞电极表面液层中扩散层厚度； D 为扩散系数； C° 为电极表面溶液的浓度； C' 为溶液中的浓度。

设定滴汞为球形，其表面积与体积分别为 $A = 4\pi r^2$ ， $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ ，由扩散定律可以证明，对于球形，有效扩散层厚度 δ 与时间 t 关系为：

$$\delta = \sqrt{\frac{3}{7}\pi Dt} \quad (16-2)$$

在极限扩散时，极限扩散电流为：

$$i_{d,t} = nFA \cdot D \frac{C}{\sqrt{\frac{3}{7} \pi D t}} \quad (16-3)$$

若以 r_t 表示汞滴在 t 时刻时半径, m 为单位时间滴落的汞重, ρ 为汞密度, 则 t 时刻内有关系式:

$$\frac{m \cdot t}{\rho} = \frac{4}{3} \pi r_t^3 \quad \text{或} \quad r_t = \left(\frac{3mt}{4\pi\rho} \right)^{1/3} \quad (16-4)$$

$$A_t = 4\pi r_t^2 = 4\pi \left(\frac{3mt}{4\pi\rho} \right)^{2/3} = 8.50 \times 10^{-3} m^{2/3} \cdot t^{2/3} \cdot C \quad (16-5)$$

推导上式时已将汞密度数值 $\rho_{\text{Hg}} = 13.53 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 代入。

将 A_t 值代入 $i_{d,t}$ 公式, 得:

$$\begin{aligned} i_{d,t} &= nFA \cdot D \frac{C}{\sqrt{\frac{3}{7} \pi D t}} = 8.50 \times 10^{-3} \times 96500 \cdot n \cdot m^{2/3} t^{2/3} \cdot D \frac{C}{\sqrt{\frac{3}{7} \pi D t}} \\ &= 706nD^{1/2} \cdot m^{2/3} t^{1/6} \cdot C \end{aligned} \quad (16-6)$$

上式为汞滴滴落过程中瞬时扩散电流密度公式。由公式可见 $i_{d,t} \propto t^{1/6}$, $i_{d,t}$ 与 t 关系曲线如图 16-3 所示。当 $t=0$ (滴落开始) 时 $i_{d,0}=0$, $t=\tau$ (滴汞从开始至滴落一个周期时间) 时:

$$i_{d,\max} = 706nD^{1/2} m^{2/3} \cdot \tau^{1/6} \cdot C$$



显然此时 $i_{d,t}$ 值最大。滴汞落下后, 电流又急剧下降至零, 然后又逐渐上升至 $i_{d,\max}$, 如此反复, 周期进行。

图 16-3 滴汞电极电流-时间曲线

2. 平均扩散电流

理论及实验证明, 滴汞最适当的 τ 约为 3~6s。一般情况下, 要在周期如此短时间内测量出扩散电流如此大的变化, 难以精确做到。如果测量仪的响应时间与 τ 相当, 甚至更长, 则指示仪表无法跟踪瞬时电流的瞬间变化。因而通常总是记录在汞滴滴下时间的平均扩散电流:

$$\bar{i}_d = \frac{1}{\tau} \int_0^{\tau} i_{d,t} dt = 607nD^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot \tau^{1/6} \cdot C \quad (16-7)$$

上式即尤考维奇公式。一般极谱分析中提到的扩散电流均指的是如上式的周期平均扩散电流 \bar{i}_d 。

上式中 $607nD^{1/2}$ 一项称为扩散电流常数, 它与毛细管特性无关, 它是待测物质

在一定溶液体系中所测量的数据。由上式可知，当实验条件固定时 $\bar{i}_d \propto C$ ，即周期极限扩散电流与被分析物质 i 浓度成正比， $\bar{i}_d = KC$ 。这就是极谱定量分析基础，通过测定极限扩散电流大小而求出待测组分含量。

一些组分的滴汞电极实验表明，尤考维奇公式往往与实验结果颇为吻合。尽管尤考维奇从一些近似的假设推出了他的公式，推导有不甚严密之处，但如前所述，往往由于不同偏差的相互补偿、抵消，最后结果仍是较准确的。

随后，考捷茨基等人推出更精确的公式：

$$\bar{i}_d = 607nD^{1/2}m^{2/3}\tau^{1/6}\left(1 + \frac{39D^{1/2}\tau^{1/6}}{m^{1/3}}\right)C \quad (16-8)$$

但由于该式较复杂，且修正项的贡献不超过 10%，故一般实验工作仍采用尤考维奇公式。

二、影响扩散电流的主要因素

在尤考维奇公式中， \bar{i}_d 与 C 成正比，设比例系数为 K

$$\bar{i}_d = KC \quad (16-9)$$

只有当 K 真正为常数时， \bar{i}_d 才能保证与 C 成正比。而在实际实验条件下， K 受诸多因素的影响。

1. 毛细管特性的影响

m 、 τ 均由毛细管特性所决定， $m^{2/3}\tau^{1/6}$ 称为毛细管常数。其主要取决于毛细管的大小及滴汞压力 ρ 。

通常汞流速度 m 与汞柱压力 ρ 成正比，而 ρ 又与贮汞器汞面至滴汞电极末端之间汞高成正比，

$$m = kh \quad (16-10)$$

而滴汞周期 τ 与 ρ (或 h) 成反比，即汞压越高，滴下越快。

$$\tau = k'/h \quad (16-11)$$

所以，

$$m^{2/3}\tau^{1/6} = (kh)^{2/3}(k'h^{-1})^{1/6} = k''h^{1/2} \quad (16-12)$$

因而，

$$\bar{i}_d \propto m^{2/3}\tau^{1/6} \propto h^{1/2} \quad (16-13)$$

在实验中，为使毛细管常数恒定应使用同一支毛细管，且保持汞高不变，方能准确测定含量。另外，利用 \bar{i}_d 是否与 $h^{1/2}$ 成正比，可以检验电极反应是否符合尤考维奇公式。

2. 温度的影响

尤考维奇公式中，除了 n ，可以说其余各项均受温度的影响，其中尤以扩散系数 D 受温度影响大。理论上讨论过于复杂，影响大小一般由实验确定。实验表明室温时扩散

电流的温度系数约为 0.013，即温度每升高一度，扩散电流约增加 1.3%。因而实验中温度变化一般不得超过 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。否则由此引起的实验误差将超过 1%。但若标准液和待测液在同一条件下测试，温度的影响可抵消一部分。

3. 溶液组分的影响

当溶液组成不同时，其粘度也不同。而溶液的粘度严重影响扩散系数 D ，扩散电流与 $D^{1/2}$ 成正比，因此，溶液粘度越大，扩散系数 D 越小，扩散电流也随之减少。所以在极谱分析中，应尽量使标准溶液和试样溶液的组分保持一致，以减少因粘度变化导致 D 的显著变化。

4. 滴汞电极电位的影响

滴汞电极电位的改变对汞流速度 m 影响不大，但在不同电位时滴汞周期 τ 值不同，这是因为不同电位时汞同溶液间的表面张力不同。研究电极电位同汞及溶液间的表面张力关系的曲线称为电毛细管曲线，见图 16-4。

从图上可以看出，汞滴周期 τ 随着电极电位不同而改变，在约 -0.56V （对饱和甘汞电极）处有极大值，而 $m^{2/3}\tau^{1/6}$ 也差不多在此处有极大值。可见电极电位对 m 影响不太大。在 $0 \sim -1.0\text{V}$ 时， $m^{2/3}\tau^{1/6}$ 变化平缓，其变化不足 $\pm 1\%$ 。所以电极电位对扩散电流的影响在这一范围内可忽略不计。但在 -1.0V 以后， $m^{2/3}\tau^{1/6}$ 的变化较显著， $m^{2/3}\tau^{1/6}$ （亦即 \bar{i}_d ）的减小必须予以考虑。

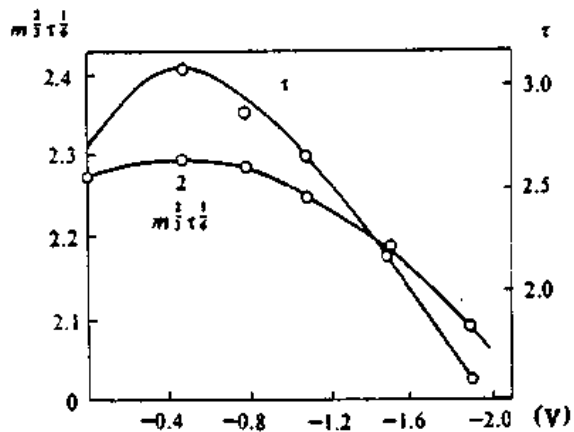


图 16-4 电极电位对 $m \cdot \tau$ 的影响

另外，毛细管倾斜会使汞滴生成不规则，会影响 m 及 τ 值。在测定过程中应尽可能保持毛细管位置一致且一般倾斜不超过 5° 。

5. 其它影响

极谱分析的基础是 \bar{i}_d 与 C 成正比，当电极反应可逆，电流只受扩散控制时，极谱波能较好符合尤考维奇方程式，极谱分析结果可靠。但当溶液中不仅有扩散，还有化学反应等复杂情况下，尤考维奇公式不能成立。故而考虑能否对一特定试样采用极谱方法或制定分析方法前，应先试验电流与浓度之间是否呈线性关系。

另外，滴汞时间不能太短，否则快速滴定的搅动，干扰了扩散层，产生了较大的电流， \bar{i}_d 与 C 不成正比。但滴汞亦不宜太慢，否则检流器的振荡太大，一般滴下时间限定在 $3 \sim 6\text{s}$ 。

三、极谱分析中的干扰电流及消除方法

在极谱分析中，除了我们已讨论过的扩散电流外，还存在其它因素所引起的干扰电流。这些干扰电流与扩散电流有根本的区别，与被测物质浓度间无本质上的关系，且严重干扰分析，必须设法除去。

干扰电流包括残余电流、迁移电流、极大、氧波、氢波、前波以及叠波等。

1. 残余电流

极谱分析中，外加电压尚未达到欲测物质分解电压时，仍有微小电流通过电解池，这种电流称之为残余电流。

尽管残余电流不大，数量级为 10^{-7} A，但当测量对象为微量物质小于 10^{-3} mol/L 时，残余电流可能会比待测物质的扩散电流还大，以致被测物质的极谱波被掩蔽而使测定无法进行。所以残余电流是提高极谱分析灵敏度的主要障碍。

残余电流主要由电解电流和电容电流两部分组成。前者主要是溶液中存在的易于在滴汞电极上先于待测物质还原的少量杂质所引起的，如 O_2 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 等。若待测液及试剂经过仔细提纯，以除去这些杂质，这部分电流可降到十分微小。电容电流或称充电电流，是残余电流的主要组成部分，它来源于滴汞电极同溶液界面上双电层的充电过程。

应用极谱分析装置，在去氧的 0.1M KCl 溶液的电解池中得到的极谱曲线如图 16-5 所示。图中 *b* 点电位应是钾离子的还原电位，*b* 点以上的电流是钾的还原电流。由 *a* 至 *b* 为残余电流。除去可能引起电解电流的杂质后，这部分电流可全部算作残余电流。其产生主要是由于滴汞电极的面积不断变化，滴汞电极和溶液的两个界面间存在双电层，电容量随滴汞面积变化而变化，当双电层两端存在一定电位差时，电容量的不断改变，必然在电路上产生电流，这种电流不是电极反应的结果，所以称之为电容电流。可以

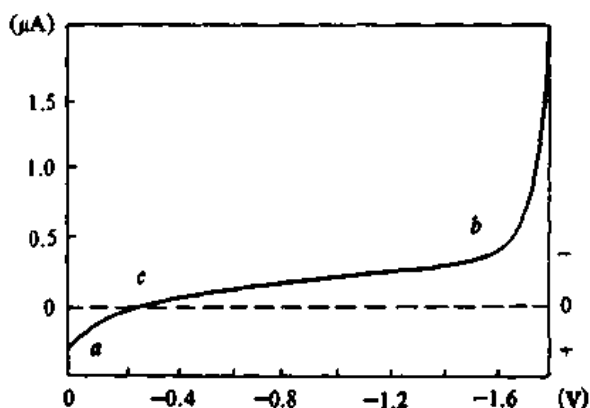


图 16-5 1mol/L KCl 溶液的残余电流 (V)

设想，当滴汞电极不与外电源或电极接通时，其电位和其周围的溶液是一致的，滴汞电极上并不带电。当滴汞电极与甘汞电极直接接通时，尽管外加电压为零，但由于甘汞电极上带正电荷，甘汞电极就向滴汞电极上充电，使汞滴表面带正电荷，并吸引其周围溶液中的负离子形成双电层。如果滴汞面积不变（这不是真实情况）这种充电过程可在瞬间完成。但由于汞滴不断更换，汞滴面积不断变化，所以充电过程必须不断进行，这就产生了连续不断的充电电流。这种电流的方向与通常的还原电流的方向相反。当外加电压由零逐渐增大时，由于滴汞电极在电解过程中充作阴极（负极），其正电荷逐渐减少，因而电容电流亦逐渐减少。当到达图中 *C* 点位置，滴汞处于零电荷点，其正电荷恰减至零，电容电流为零。继续增大外电压，汞滴上带负电荷，汞滴按先前相反方向充电，在滴汞电极上产生了反向电流，之后随着反向电压增大，电容电流亦增大，这一充电电流随着汞滴表面的变化而发生周期性的变化。

在实际工作中，一般采取作图法扣除残余电流或使用仪器的残余电流补偿装置加以消除。

2. 迁移电流

在电解质溶液中，引起离子运动的方式有三种：扩散、对流和电迁移。离子的运动也就是电荷的运动，因而制造了相应的电流。扩散电流正是我们要测定的。对流运动，只要保持溶液相对静止，不受搅动便可加以避免。三种方式中能对极谱分析产生干扰的，只有迁移电流。

电迁移（简称迁移）是由于电极带电，吸引相反离子向其方向迁移而产生的。例如，当滴汞电极电位比参比电极电位更负时，它将对阳离子产生静电引力，吸引更多的阳离子趋向于滴汞电极表面。阳离子（带正电荷）的这种定向运动（电迁移）便造成了电荷的定向运动——电流。这就使观察到的电流比扩散电流实际上要大些。当然，如果在滴汞电极上反应的是负离子，则负的电极电位要阻碍其向滴汞方向迁移，这样就减少了扩散电流。这种由于电极对被分析离子的库仑力而产生的电流称为迁移电流。扩散电流与迁移电流是两个不同的概念。扩散指的是由浓度差而引起的离子运动，它只能从高浓度向低浓度方向进行，而迁移是受静电场作用的离子运动。

消除迁移电流的方法是向待测液中加入大量电解质，称为支持电解质。由于它在分析过程中不能发生氧化还原反应，故又称惰性电解质。支持电解质的浓度常为待测离子浓度的 50~100 倍，浓度可高达 0.1~1 mol/L。加入后，大量支持电解质中的正离子包围了负电极，使之对待测离子的静电引力大为减弱，迁移电流大为减少，甚至趋于零而被消除。极谱分析中常用支持电解质有 KCl、KOH、NH₄Cl、HCl、Na₂SO₄、H₂SO₄ 等。

3. 极谱极大

在极谱分析中，常有一种特殊的现象发生。电解开始时，电流随电压的增加而迅速增大到一个极大值，而后又下降至扩散电流区域，电流恢复正常。这种不正常的现象称为极谱极大现象。图 16-6 列出了一些离子的极谱极大现象。大多数离子的极谱波上都会出现极谱极大现象。半波电位在汞的零电点（对甘汞电极）之前产生的称为“正极大”，在零电点之后产生的，称为“负极大”。当半波电位靠近零电位时，无极大现象发生。例如 Cd²⁺ 离子在 1 mol/L KCl 溶液中没有极大。极大现象在极化曲线上具有再现性。有些极大的形状不如上图那么尖锐，而是较为平坦或呈弧状。极大的高度与被测物质浓度有关，但又不是简单关系，因此不易加以理论扣除。

汞滴表面各部分在电解过程中电流密度可能不均匀，因而还原离子在汞滴不同部位的还原速度不尽相同，也就造成了表面电位在不同表面部分的差异。由电毛细现象可知，汞滴在不同电位下有不同表面张力。汞滴表面张力的不均匀使汞滴生长过程产生了切向运动，同时搅动了表面附近的溶液，加剧了解析物质急剧到达表面，所以电流急剧上升。当电流上升到极大值后，此时被还原离子因迅速被消耗，在电极表面附近浓度重新趋于零，电解过程又处于完全浓差极化状态，电流

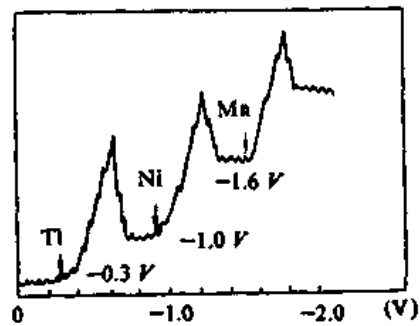


图 16-6 钽、镍、镓离子的极大

处于正常的扩散电流区域。这就是产生极大的原因。

若能在溶液中加入少量表面活性物质，吸附在汞滴表面，使其表面张力下降，这就避免了表面切向运动，使极大现象得到消除。常用的表面活性剂有明胶、聚乙烯醇等。使用这些表面活性剂时应注意使用浓度不能太高，否则会使溶液粘度过大，扩散系数下降，从而降低了扩散电流，甚至使极谱波变形，明胶的加入量一般不超过0.01%。

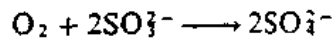
4. 氧波

氧波实质上是氧发生电解反应产生的极谱波。室温时，溶液中溶解的少量氧容易在滴汞电极上按如下形式还原，产生两个极谱波：

- (1) $O_2 + 2H^+ + 2e \rightarrow H_2O_2$ (酸性液)
 $O_2 + 2H_2O + 2e \rightarrow H_2O_2 + 2OH^-$ (中性或碱性液)
- (2) $H_2O_2 + 2H^+ + 2e \rightarrow 2H_2O$ (酸性液)
 $H_2O_2 + 2e \rightarrow 2OH^-$ (碱性液)

其半波电位分别约为-0.2V及-0.8V。这两个波谱覆盖在从0~-1.2V整个电位区间，而这个区间正是极谱分析的重要区间，氧波叠加在被测物质的极谱波上，干扰了被测物质的分析，故应设法除氧。

为了除氧，可往溶液中通入一些惰性气体（如 H_2 、 N_2 等）约10~20min，在极酸性液中可加入少量亚硫酸钠：



微酸溶液中可加入少量抗坏血酸。强酸溶液中加入少量铁粉，由于铁与酸作用产生氢气，可除去溶液中氧。

5. 氢波、前波、叠波

氢波是氢离子在滴汞电极上还原产生的极谱波。酸性液中，氢离子约在-1.2~-1.4V处放电，故半波电位低于-1.2V物质不能在酸性溶液中测定。在中性或碱性溶液中， H^+ 浓度大为减少，故氢波一般没有干扰。如钾离子半波电位为-2.13V，小于-1.2V，可在0.1mol/L的季铵碱如 $N(CH_3)_4OH$ 溶液中用极谱法测定。

前波干扰是由于溶液中存在大量（大于10倍待测物浓度）的半波电位较正的还原物质，先于待测物质在电极上还原而产生一个前波，对待测物质的极谱分析产生干扰。极谱分析中常遇到的是 Cu^{2+} 波与 Fe^{3+} 波，应设法将其除去。

叠波是由于两种物质的半波电位相差较小（不到0.2V），则两个极谱波发生重叠，不易分辨。为了消除叠波，常于溶液中加入适当的络合剂，改变极谱波的半波电位，使波分开，或采用化学方法除去干扰物质使之不再干扰分析。

6. 极谱分析“底液”的选择

以上各类干扰，除残余电流干扰可用作图法扣除外，其余均需设法在被分析溶液中解决。为此需在溶液中加入支持电解质、表面活性剂、络合剂、掩蔽剂等等，并控制适当酸度而加入缓冲剂等等。这类经加入适当试剂的溶液称为极谱分析的“底液”。

选择适当“底液”的原则应是（1）使极谱波的波形好，最好是可逆波，波高与浓度线性关系好；（2）干扰少；（3）操作简便。各种元素极谱分析的底液构成和在不同底液

中的半波电位以及波谱情况，在专门的分析化学手册中可查到。

四、极谱定量分析方法

1. 波高的测量

极谱定量分析中，波谱的波高代表极限电流的大小，从而对应着相应物质的浓度。实际分析中往往只要求测量相对波高（常以毫米表示）而不必换算成扩散电流的绝对值。准确测量波高可减少分析中的误差。测量波高的方法很多，通常有平行线法、三切线法和矩形法。

(1) 平行线法

当波形良好时，可通过极谱波上残余电流部分和极限电流部分延长作两条平行线，测量两线间的垂直距离 h 即为所求波高，如图 16-7 所示。在实际工作中，极谱波残余电流和极限电流往往不平行，故不能采用此法。

(2) 三切线法

通过残余电流、极限电流和电流上升部分作三条切线 AB 、 CD 、 EF ，两两相交得交点 P 、 O ，两点高度的差值 h 即为波高，见图 16-8。该法简便，适应性强，故被广泛采用。

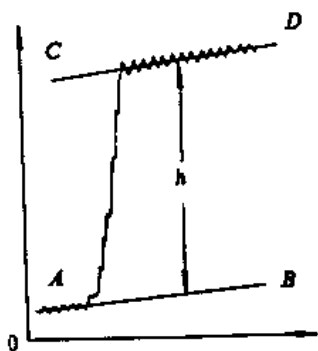


图 16-7 平行线法测量波高

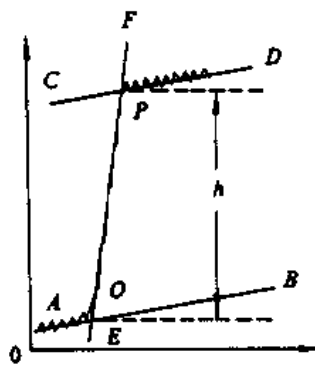


图 16-8 三切线法测量波高

(3) 矩形法

如图 16-9 所示。将残余电流与扩散电流中点延长得 AB 、 CD 。再作电流上升部分切线 EF 。在 EF 上找到 K 点，使之与 AB 及 CD 等距 (K 实际上为半波电位)，过 K 点垂直于横轴作直线与 AB 及 CD 分别交于 L 及 M 。 LM 即为波高。

2. 定量分析方法

(1) 直接比较法

在相同实验条件下分别测得标准溶液（浓度为 C_1 ）和待测溶液（其浓度为 C_2 ）波高为 h_1 和 h_2 ，则有

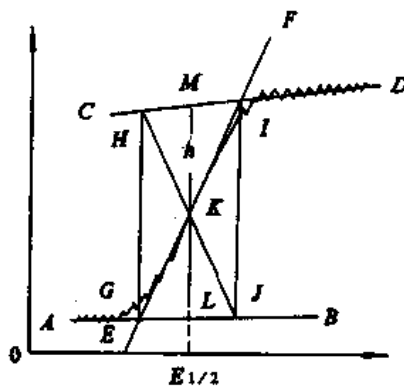


图 16-9 矩形法测量波高

$$h_i : h_x = C_i : C_x, \text{ 即 } C_x = \frac{C_i h_x}{h_i} \quad (16-13)$$

(2) 工作曲线法

配制一系列含不同浓度待测物质的标准溶液，在相同的实验条件下测定，作波高-浓度工作曲线。对未知样分析时，只要测出其波高，便可在工作曲线上查得相应的浓度。此法用作批量分析特别方便。

(3) 标准溶液加入法

首先测量体积为 V 的未知溶液 C_x 极谱波高 h ，然后加入体积为 V_s 、浓度已知为 C_s 的标准溶液，在同一实验条件下测得其波高 H ，由波高与浓度的关系 $h = KC_x$ 知：

$$H = K\left(\frac{VC_x + V_s C_s}{V + V_s}\right) \quad (16-14)$$

可解出待测溶液浓度：

$$C_x = \frac{C_s V_s h}{H(V + V_s) - hV} \quad (16-15)$$

标准溶液加入法准确度较高，但加入量应适当控制，加入量太少，波高增加不显著，加入量太多有可能引起底液浓度的改变，而使扩散电流改变。一般当试样的体积为 10mL 时，加入 0.5~1.0mL 标准液，波高增加 0.5~1 倍为宜。

第四节 极谱定性分析原理

一、极谱波的类型

极谱波可以分成两类：可逆波与不可逆波。其根本区别在于前者的电极反应主要受浓差极化影响，后者主要受电化学极化影响。

1. 可逆波

电极反应很快，放电物质迁移到电极上，立刻发生电化学反应。整个反应速度受扩散控制，因而可逆波又称扩散控制波。

由于过程可逆，因而在任一电位下，放电物质的氧化态、还原态迅速达到平衡，可逆极谱波的波形较好。其电极电位与溶液中氧化态与还原态浓度间关系符合能斯特方程。

2. 不可逆波

电极反应的速度相对较慢，扩散到电极附近的反应物质来不及反应，极谱波开始时受电极反应速度的控制，随着电位增加，电极反应速度加快，极谱电流慢慢被扩散速度控制，最后完全受扩散控制，此极谱波称为不可逆波。不可逆波的波形较差，延伸较长。此波不能简单地应用能斯特公式描述电极电位与溶液中氧化态与还原态的浓度。

其实，电极的可逆与否并非绝对的。一般认为电极反应速度常数 K 值大于 10^{-2} 时为可逆，小于 10^{-3} 时为不可逆，介于二者之间为部分可逆。

由于不可逆波不易测量，且易受干扰，对分析不利，在极谱分析中，常加入合适的

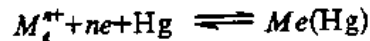
络合剂使不可逆波变为可逆波，以利于极谱分析。

二、极谱波方程式

极谱波方程式是滴汞电极电位 $E_{d,e}$ 和扩散电流 i 的定量关系式。假定滴汞电极上进行的电极过程是以扩散步骤控制的，且溶液中存在大量惰性电解质，放电离子的迁移电流为零。由于放电离子流向电极完全靠扩散，而扩散又慢，因此滴汞电极的电极电位和电流的关系表现出浓差极化的特征。这里我们仅讨论两种情况，即简单离子的极谱波和络合物的极谱波。

1. 简单离子的极谱波方程式

金属离子在滴汞电极上还原为金属，金属溶于汞而生成汞齐，其电极反应为：



假设电极反应是可逆的，电化学反应进行得非常快，那么滴汞电极电位与作用物质活度可用能斯特方程表示：

$$E_{d,e} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_1 [M_e^{n+}]^0}{f_2 [M_e(\text{Hg})]^0} \quad (16-16)$$

式中， f_1 、 f_2 分别为 M_e 在溶液中和汞齐中的活度系数； E^0 为此电极反应的标准汞齐电极电位； $[M_e^{n+}]^0$ 为金属离子在电极附近溶液中浓度； $[M_e(\text{Hg})]^0$ 为金属在汞齐中的浓度。

当电流受溶液中反应物质的扩散速度控制而又未达到极限扩散电流时，扩散电流

$$i = K_d \{ [M_e^{n+}] - [M_e^{n+}]^0 \}$$

式中， $[M_e^{n+}]$ 为金属离子在溶液中的浓度。

同时考虑金属离子从滴汞电极表面向滴汞中心扩散。由于滴汞生成周期很短，可认为滴汞中心金属浓度 $[M_e(\text{Hg})] = 0$ 。同时从“流量平衡”观点看，单位时间扩散到电极表面的金属离子数应等于在电极表面生成的金属原子数，亦应等于由滴汞电极汞齐表面扩散到汞滴内部的金属原子数。所以扩散电流也同时遵守下列方程式：

$$i = K_a \{ [M_e(\text{Hg})]^0 - [M_e(\text{Hg})] \} = K_a [M_e(\text{Hg})]^0 = K_s \{ [M_e^{n+}] - [M_e^{n+}]^0 \}$$

根据尤考维奇方程，式中：

$$K_s = 607nD_e^{1/2} m^{2/3} \tau^{1/6}; \quad K_a = 607nD_e^{1/2} m^{2/3} \tau^{1/6} \quad (16-17)$$

代入到 i 的公式中，解出 $[M_e^{n+}]^0$ ：

$$[M_e^{n+}]^0 = \frac{K_s [M_e^{n+}] - i}{K_s} = \frac{i_d - i}{K_s} \quad (16-18)$$

其中 i_d 为极限扩散电流，因在极限扩散时：

$$i_d = K_s [M_e^{n+}]; \quad [M_e^{n+}]^0 = \frac{i_d - i}{607nD_e^{1/2} m^{2/3} \tau^{1/6}} \quad (16-19)$$

$$\text{而} \quad [M_e(\text{Hg})]^0 = \frac{i}{K_e} = \frac{i}{607nD_e^{1/2}m^{2/3}\tau^{1/6}} \quad (16-20)$$

将 $[M^{z+}]^0$ 及 $[M_e(\text{Hg})]^0$ 的上述关系式代入能斯特方程, 可得到:

$$E_{d,e} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_e D_e^{1/2}}{f_a D_a^{1/2}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_d - i}{i} \quad (16-21)$$

半波电位 $E_{1/2}$ 定义为当 $i = \frac{1}{2} i_d$ 时的电极电位, 此时:

$$\ln \frac{i_d - i}{i} = 0 \quad (16-22)$$

$$E_{1/2} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_e D_e^{1/2}}{f_a D_a^{1/2}} \quad (16-23)$$

上式中不再出现浓度关系, 在一定的实验条件下, 当浓度范围变化不大时, f_e 、 f_a 、 D_e 、 D_a 均可视作常数. 半波电位 $E_{1/2}$ 仅与特定的反应有关, 而与反应物质浓度无关. 可见半波电位可以作为定性分析的依据, 这一结论对其它类型的反应亦是适用的. 一些金属离子在不同底液中的半波电位如表 16-1 所示.

表 16-1 某些离子在不同底液下的半波电位 V(对饱和甘汞电极)

金属离子	1M KCl	1M HCl	1M KOH (NaOH)	2M HAc + 2M NH ₄ Ac	1M NH ₄ ⁺ 1M NH ₄ Cl
Al ³⁺	-1.75	-	-	-	-
Fe ³⁺	>0	>0	-	>0	-
Fe ²⁺	-1.30	-	1.46 (-0.9)	-	1.49 (-0.34)
Cr ³⁺	-0.85 -1.47	-0.99 -1.26	-0.92	-1.2	-1.43 -1.71
Mn ²⁺	-1.51	-	-1.70	-	-1.66
Co ²⁺	-1.30	-	-1.43	-1.14	-1.29
Ni ²⁺	-1.10	-	-	-1.10	-1.10
Zn ²⁺	-1.00	-	-1.48	-1.10	-1.35
In ²⁺	-0.60	-0.60	-1.09	-0.71	-
Cd ²⁺	-0.64	-0.64	-0.76	-0.65	-0.81
Pb ²⁺	-0.44	-0.44	-0.76	-0.50	-
Tl ⁺	-0.48	-0.48	-0.46	-0.47	-0.48
Cu ²⁺	-0.04 -0.22	+0.04 -0.22	-0.41	-0.07	-0.24 -0.51
Bi ³⁺	-	-0.09	-0.6	-0.25	-

注: 括号内为氧化波, 两个数值的表示两级还原, - 表示在氢波后或发生水解、沉淀现象.

将 $E_{1/2}$ 的公式代入 $E_{d,c}$ 计算公式,可以得到:

$$E_{d,c} = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_d - i}{i} \quad (16-24)$$

此式即为简单金属离子的极谱波方程式.

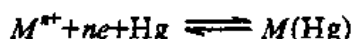
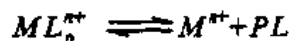
2. 络合物的极谱波方程式

极谱分析中,为了改善分析条件、掩蔽干扰、分开相近物质极谱波等,加入适当络合剂,与金属离子形成络合物.形成络合物后,金属络离子的极谱行为发生变化.其半波电位发生移动,半波电位除上面谈到的因素外,还与络离子的稳定常数、配位数及络合剂的浓度等因素有关.此处仅讨论最简单的一种情况:



这里 M 代表金属离子; L 代表配位体; P 为配位数.

上述反应视作以下两反应之和:



第一个反应为络合平衡反应,平衡稳定常数:

$$\beta = \frac{[ML_p^{n+}] f_{ML}}{[M^{n+}][L]^p \cdot f_L \cdot f_L} \quad (16-25)$$

通常络合剂 L 浓度足够高,可以认为其在电极表面浓度和溶液中浓度相等,所以

$$\beta = \frac{[ML_p^{n+}]^0 f_{ML}}{[M^{n+}]^0 [L]^p \cdot f_L \cdot f_L} \quad (16-26)$$

代入到能斯特方程:

$$E_{d,c} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[M^{n+}]^0 f_L}{[M(Hg)]^0 f_L} \quad (16-27)$$

$$E_{d,c} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \beta - \frac{PRT}{nF} \ln [L] \cdot f_L + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ML_p^{n+}]^0 f_{ML}}{[M(Hg)]^0 f_L} \quad (16-28)$$

采用前面同样的处理方法,可得:

$$\begin{aligned} E_{d,c} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \beta - \frac{PRT}{nF} \ln [L] f_L \\ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_{ML}}{f_L} \frac{D^{1/2}}{D \sqrt{t}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_d - i}{i} \end{aligned} \quad (16-29)$$

半波电位

$$E_{1/2L} = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \beta - \frac{PRT}{nF} \ln [L] f_L + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_{ML} D_0^{1/2}}{f_0 D_M^{1/2}} \quad (16-30)$$

比较简单金属离子半波电位公式:

$$E_{1/2} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_i D_0^{1/2}}{f_0 D_i^{1/2}} \quad (16-31)$$

并考虑到一般情况下 $D_i = D_{ML}$, $f_i = f_{ML}$, 可得到:

$$\Delta E_{1/2} = E_{1/2L} - E_{1/2} = -\frac{RT}{nF} \ln \beta - \frac{PRT}{nF} \ln [L] f_L \quad (16-32)$$

可见, 络合物越稳定 (β 越大), 配位体浓度 L 越大, 络合物半波电位向负的方向移动越多。

3. 极谱定性分析

由于极谱波的半波电位仅取决于反应物质的本质 (标准电极电位 E° 、扩散系数 D 等), 它既与反应离子浓度无关, 又与仪器特性、毛细管参数 (m 、 τ 等) 无关。因此半波电位是一个特征电位。每一种金属离子 (络离子、有机化合物等) 在极谱电极上还原 (或氧化) 都有自己特定的半波电位。因此根据半波电位的数值, 可以判断参于反应的物质, 这就是极谱定性分析的依据。

如果溶液存在好几种能在滴汞电极上还原的物质, 则在一次实验中, 可在 $E-i$ 曲线上依次出现多个极谱波。可以通过一次实验测定多种物质的半波电位和极限电流, 从而对多种组分同时进行定性、定量分析。

实验中, 测出极谱波 $E-i$ 曲线后, 可采用对数分析法计算半波电位 $E_{1/2}$ 。根据公式:

$$E_{d,e} = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_d - i}{i} \quad (16-33)$$

以 $E_{d,e} \sim \ln \frac{i_d - i}{i}$ 作图可得一直线, 直线的截距即为 $E_{1/2}$ 。由直线的斜率 $\frac{RT}{nF}$

还可求出电极反应中电子转移数 n 。求得 $E_{1/2}$ 后, 再在分析化学手册上可查到相应于该 $E_{1/2}$ 的是何种物质。严格讲, $E_{1/2}$ 往往还与电解质浓度、温度等有关。因而说到某物质的 $E_{1/2}$ 时, 应注明底液的组成、浓度及温度。

第五节 其他极谱分析及方法

前面所讨论的极谱分析法, 通称为经典极谱法。经过了 70 多年的发展, 极谱法无论在仪器设备的完善程度或者是理论研究以及分析技术等方面都取得了很大的进步。近几十年来发展迅速并广为应用的极谱新技术有溶出伏安法, 催化极谱法, 示波极谱法, 脉冲极谱法, 半微分半积分极谱法, 放射极谱法等等。

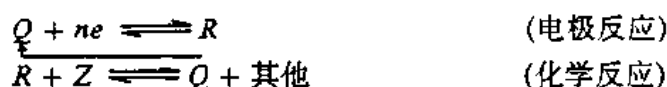
一、极谱催化波法

极谱催化波是在某种特定条件下，在特殊电位处所出现的极谱波。它是由于某一特殊原因产生的比同浓度电活性物质的扩散电流大得多的催化电流。在一定范围内，催化电流的大小与待测物质浓度成比例，因此可以用于微量、痕量元素的测定。催化波的种类很多，机理比较复杂，有些极谱催化波产生的机理尚不完全清楚，它涉及到物质的扩散和电迁移过程、电极反应过程、化学反应过程以及表面吸附和解吸过程等等。现将几种类型的极谱催化波作一简单介绍。

1. 化学反应与电极反应相平行的催化波

在极谱电解过程中，电流的大小不是决定于去极化剂扩散的速度或电极反应的速度，而是决定于在电极周围反应层内的化学反应速度，我们把这种极谱电流统称为动力电流或动力波。动力波可分为三大类型，即化学反应超前于电极反应的前行动力波；化学反应随后于电极反应的后行动力波；化学反应平行于电极反应的平行催化波。前两类动力波对极谱定量分析的意义不大，它们不能提高极谱分析的灵敏度。而第三类动力波通常比相同浓度去极化剂的扩散波要大10~100倍，所以对于痕量物质的测定有着特别重要的意义。

(1) 催化电流的产生 平行催化波的产生是由于电活性物质 Q 在电极上被还原，其产物为还原态 R 。在 R 还来不及扩散出反应层时，便被溶液中存在的某种氧化剂 Z 氧化而再生出电活性物质 Q ，再生的 Q 又参与电极反应。如此循环往复，使极谱电流大大增加，其反应模式如下：



由于电极反应和化学反应平行进行，反应的结果，电活性物质 Q 的浓度在反应前后实际上没有变化，而消耗的却是氧化剂 Z 。因此，电活性物质 Q 只起一种催化剂的作用，它催化了物质 Z 的还原。对于这样的电流，我们称为催化电流。通常电极反应速度是快速的，催化电流的大小主要决定于化学反应速度。

物质 Z 应该是一种相当强的氧化剂，能迅速地将电极反应产物 R 氧化而再生出 Q ，但它本身在 Q 被还原的电位下又不能能在电极上被还原，因此它又是一种超电位较大的物质。

例如过氧化氢就是一种很好的氧化剂，它在电极上还原时具有较大的超电位，而它又能迅速地将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 。当过氧化氢与 Fe^{3+} 共存时，就会产生一良好的平行催化波。其反应机理大致如下：



高铁离子在电极上被还原为亚铁离子，此亚铁离子又与过氧化氢相作用，再生成高铁离子以及自由基 OH ，该自由基又能氧化亚铁离子为高铁离子，再在电极上被还原。

式 (16-34) 和式 (16-36) 进行是很快的, 只有式 (16-35) 反应比较慢, 决定整个化学反应的速度, 也决定催化电流的大小。

目前常用的氧化剂除过氧化氢外, 还有氯酸盐、高氯酸及其盐、硝酸盐、亚硝酸盐、盐酸羟胺、硫酸羟胺, 四价钒等。

(2) 催化电流的性质 对于一级化学反应, 催化电流的大小可用下式表示:

$$i_c = 0.51nFD^{1/2}m^{2/3}\tau^{2/3}k^{1/2}C_1^{1/2}C_2 \quad (16-37)$$

式中, i_c 为催化电流; C 及 C_2 分别为物质 Q 及物质 Z 在溶液中的浓度; k 为化学反应的速度常数; D 为物质 Q 的扩散系数, 当物质 Z 的浓度一定时, 催化电流与物质 Q 的浓度成正比, 这是催化极谱法定量测定的理论根据。

从 (16-37) 式可以看出, 催化电流与汞流速 m 和滴汞周期 τ 的 $2/3$ 次方成比例, 而 m 与汞柱高 h 成正比, τ 与 h 成反比, 所以催化电流与汞柱高无关, 这是催化电流不同于扩散电流的地方 ($i_c \propto h^{1/2}$)。

催化电流的大小还取决于化学反应的速度, 所以当 k 值愈大, 催化电流也愈大, 由于化学反应速度的温度系数较大, 因此催化电流温度系数一般也较扩散电流为高, 约为 $4\% \sim 5\%$, 这是催化电流的另一特征。

2. 氢催化波

氢催化波是在极谱分析应用中比平行催化波更为重要的一种催化波, 因为它的灵敏度很高, 选择性也很好, 很有实用价值。虽然反应机理很复杂、理论研究也不够成熟, 但是有一共同特征, 即在电极反应过程中有氢气析出。我们知道, 氢离子在滴汞电极上还原时, 有很大的超电位, 在酸性溶液中达到 $-1.2V$ 以后才能析出氢, 产生正常氢波, 然而氢催化波是在正常氢波之前出现的, 可见, 氢催化波的产生必然是溶液中存在有能降低氢的超电位的物质, 催化了氢离子使之提前放电的结果。这种能降低氢的超电位的物质称为催化剂。催化氢波虽然比正常氢波小, 但比催化剂本身的扩散波大得多, 在一定范围内, 催化电流随催化剂浓度成比例地增加, 因此可以用于痕量元素 (催化剂) 的测定。

按能降低氢的超电位的物质不同, 可以将氢催化波分为两大类, 一类是去极化剂在电极上还原, 沉积出催化活性物质, 附着在电极表面催化了氢的还原所产生的氢催化波, 另一类是具有与 H^+ 离子结合的基团, 并能吸附在电极上的有机化合物或金属络合物的氢催化波。

3. 吸附催化波

有些金属络合物能吸附于电极表面, 并产生一个灵敏度较高的呈尖峰状波形的极谱波, 我们把这类极谱波称为吸附催化波。它不同于平行催化波和氢催化波, 因为它既不发生催化循环反应, 也不析出氢。之所以将它归于催化波类, 是由于吸附加速了电极反应, 提高了测定灵敏度。由于吸附催化波是在特定电位下, 电活性物质在电极表面发生特性吸附, 产生波形尖锐、跨度小, 因而具有良好的选择性和分辨率, 其灵敏度比同浓度的扩散波高 $1 \sim 2$ 个数量级。

二、直流示波极谱法

直流示波极谱法是根据极谱分析原理而建立起来的一种快速极谱测定方法。早在 50 年代以前的极谱分析是按照图 16-1 装置进行电流、电压测定的。加在电解池两电极间的极化电压是一个慢变化的直流电压，极谱电流是采用检流计或自动平衡记录器来记录。由于极化电压变化速度很慢，对于一滴汞而言，其电极电位几乎不变，故称恒电位极谱法，又称为普通极谱法或经典极谱法。由于恒电位极谱法作一条完整的极谱曲线需要数十滴汞才能完成，因而很费时间。所得的极谱曲线是呈锯齿形波动的阶梯状图形，导致对相邻波的分辨能力很差， $\Delta E_{1/2}$ 大于 200mV 的两相邻波才能分开。由于汞滴表面积不断改变而引起的双电层电容电流（充电电流）较大，使其测定灵敏度受到限制。所以恒电位极谱法在分析速度、测定灵敏度和分辨率等方面都存在着缺点。为了克服恒电位极谱法的缺点，J.K.B.Randles 和 L.Airey 等人提出了直流示波极谱法（简称示波极谱）。它是使用一支长周期（例如 7s 或更长）的滴汞电极作工作电极，在直流电压（可调）的基础上叠加一锯齿波电压作极化电压，在汞滴生长的后期加上该极化电压并用阴极射线示波器来记录 $i-E$ 曲线，从而可在一滴汞上完成一次极谱测定。

1. 示波极谱法的基本原理

示波极谱法的基本原理如图 16-10 所示。它是在一直流可调电压上叠加一间隙性的锯齿波电压通过测量电阻 R 后加到滴汞电极和参比电极之间作为扫描电压（极化电压），产生的电解电流（极谱电流）从测量电阻 R 上通过，在 R 两端产生电压降 IR 经垂直偏转放大器放大后加到示波器的垂直偏转板上，作为垂直偏转电压。将滴汞电极和参比电极间的扫描电压经水平偏转放大器放大后加到示波器的水平偏转板上，作为水平偏转电压，于是荧光屏上光点在纵坐标方向移动的距离就表示 IR 降的大小，当 R 为一定值时，就代表电解电流的大小，光点在横坐标方向移动的距离就代表滴汞电极电位的大小（对参比电极而言），因此可以在荧光屏上观察到一条清晰的电流-电压曲线（极谱波），并直接在荧光屏上读取极谱波高的数值。

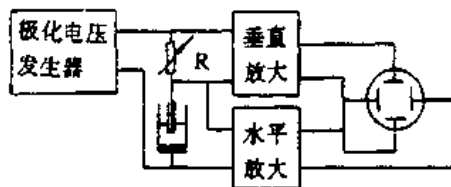


图 16-10 示波极谱法基本原理

由于极化电压变化速度很快，而示波器对周期为几秒的变化信号几乎无惯性，因此在一滴汞上就要完成一次电流-电压曲线的测量。所获得的电流-电压曲线是一条完全光滑的呈单峰状的极谱曲线，如图 16-11 所示。曲线中的 ab 段称为基线，波峰（ C 点）对应的电流与基线对应的电流之差称为峰电流，用 i_p 表示，波峰对应的电位称为峰电位，用 E_p 表示。曲线中的 de 段称为波尾。在一定实验条件下，峰电流 i_p 与被测离子浓度 C 成比例。这就是直流示波极谱法定量分析的基础。

在示波极谱中，如果电极反应可逆，则所获得的极谱曲线呈不对称的尖峰状图形；如果电极反应不可逆，则波峰变得较平缓，有时甚至不起波，如图 16-12 所示，可

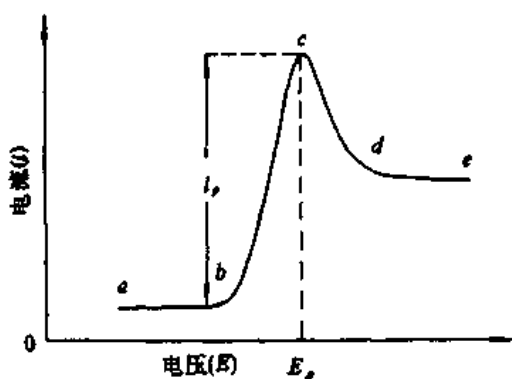


图 16-11 单扫描示波极谱曲线

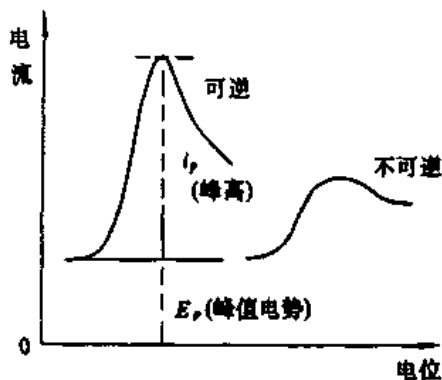


图 16-12 可逆电极反应与不可逆电极反应极谱波

逆电极反应之所以会出现尖峰状波形，其原因是：当迅速变化的锯齿波电压扫过被测离子的还原电位时，电极表面的被测离子瞬息之间都在电极上还原，产生很大的电流（但不是极谱极大），因此曲线急剧上升（图 16-11 中 *bc* 段）；由于电极周围被测离子浓度急剧下降而出现一个贫乏层，层外溶液中被测离子又来不及扩散到电极表面补充，导致电流下降而呈现出峰状，直到电极反应速度与扩散速度达到平衡状态时，电流就维持不变（图 16-11 中 *de* 段），此时电流大小完全受扩散速度所控制。

如果电极反应不太快或很慢，当锯齿波电压扫过去极化剂还原电位时，产生的电流必然很小，甚至不发生电极反应而无电流，因而极谱波较平坦，甚至无极谱波出现。

2. 峰电流和峰电位

由于示波极谱的峰电流 i_p 是电极表面可还原物质于瞬间全部还原而产生的，因而峰电流不服从尤考维奇方程。对于可逆电极反应，峰电流 i_p 可用如下公式表示：

$$i_p = K F^{3/2} D^{1/2} V^{1/2} A C \quad (16-38)$$

式中， K 为常数； i_p 为峰电流； n 为电极反应中的电子转移数； F 为法拉第常； D 为扩散系数 (cm^2/s)； V 为极化电压变化速度 (V/s)； A 为电极表面积 (cm^2)； C 为去极剂的浓度 (mol/L)。

由此可见，峰电流与极化电压变化速度、电极表面积等因素有关，只有在电极表面积固定不变，极化速度为一定值时，峰电流才与去极化剂浓度成比例。极化速度愈大，则峰电流愈大。但是极化速度变大时，在电极与溶液界面处的双电层上将产生较大的电容电流，这对极谱分析是极为不利的因素。因此，一般极化速度采用 $0.2 \sim 0.3 \text{V}/\text{s}$ 为宜。

用滴汞电极时，由于汞滴的表面积是

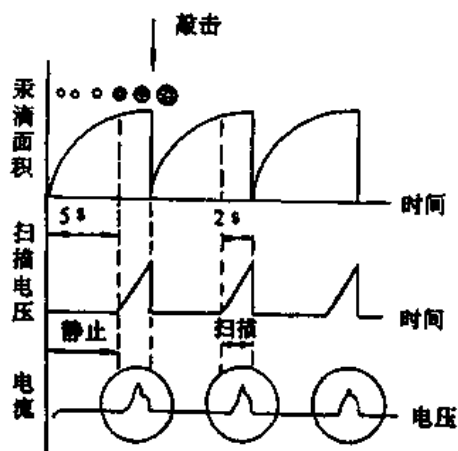


图 16-13 滴汞周期和扫描周期静止周期的关系

随时间而变化的，若扫描开始的时间不同，则峰电流的大小也不相同，其结果在荧光屏上不能获得一条清晰的曲线，考虑到汞滴生长的前期表面积变化较大，而在汞滴生长的后期表面积变化甚微，可以视为基本不变的情况，使用长周期（7s）滴汞电极，并在汞滴生长的后期（5s以后）施加线性变化的锯齿波电压作为极化电压，前5s称为静止时间，后2s称为扫描时间，这样可以在每一滴汞上完成一次极谱测量，并在荧光屏上获得一条清晰的极谱曲线，此外，为了保证测量的重现性，配以一个机械敲击同步装置，在扫描结束时强迫汞滴落下，使扫描电压周期与汞滴周期同步，如图16-13所示，由于采用长周期（7s）滴汞电极间隙性锯齿波扫描电压以及同步敲击装置后，16-35式便可以应用于滴汞电极。

3. 示波极谱法的电容电流

由于示波极谱法极化电压变化速度快，在电极与溶液界面间的双电层上产生另一种不可忽视的电容电流，我们可以把电极与溶液界面间的双电层看成是面积正在不断涨大的平行板电容器。

滴汞电极的平均电容约为 $0.3\mu\text{F}$ ，如果加入极化电压的速度为 0.3V/s ，则

$$i_c = 0.3 \times 10^{-6} \times 0.3 = 0.09 \times 10^{-6} \approx 1 \times 10^{-7} \text{A}$$

这一电容电流已相当于 10^{-5}M 溶液产生的电解电流，它限制了示波极谱灵敏度的进一步提高。

4. 直流示波极谱法的特点

直流示波极谱法与恒电位极谱法比较，有如下一些特点。

(1) 直流示波极谱法测定速度快，特别适合于大批试样的常规分析，因为恒电位极谱法要获得一条极谱曲线需要40~80滴汞才能完成，而示波极谱法只需一滴汞就能获得一条极谱曲线，因此，当配好试液后仅需几秒钟至十几秒钟就可得到测定结果。

(2) 恒电位极谱法测量的是扩散电流，而示波极谱法是测量峰值电流，如果使用相同的毛细管，示波极谱的极化电压变化速度 0.25V/s ，按照(16-35)式计算，当 $n=1$ 时， i_p 比 i_d 约大3.3倍，当 $n=2$ 时， i_p 比 i_d 约大5倍，因此，示波极谱法测定下限比恒定电位极谱法低，恒电位极谱法最低只能测定 10^{-5}M ，而示波极谱法可以达到 10^{-7}M 。

(3) 示波极谱曲线呈峰状的图形，因而相邻两波的峰电位相差40mV以上，便可以分开，而恒电位极谱法是呈台阶式的波状图形， $\Delta E_{1/2} > 200\text{mV}$ 以上才能分开，所以示波极谱法的分辨率比恒电位极谱法高，如果使用导数示波极谱测定，还可以进一步提高其分辨率。

(4) 因为示波极谱法仅测量峰值，所以即使电容电流比电解电流大数十倍，仍可觉察出波峰的存在并进行测量，这一点恒电位极谱法是办不到的。

三、交流极谱及方波极谱法

1. 交流极谱

交流极谱是在普通极谱的线性慢变化直流极化电压上，叠加一个小振幅正弦波交变

电压 (频率 5~50Hz, 振幅 15~30mV) 而得到的, 因此通过电解池的电流, 除了直流成分之外, 还有交流成分。在不同外加直流电压时测量交流电流的大小, 得到 i (交流电流) - E (直流电压) 曲线, 即为交流极谱曲线, 根据交流极谱曲线的分析可做定量测定。

(1) 交流极谱的基本原理 交流极谱的基本装置如图 16-14 所示。其中 E_d 为直流电源, E_a 为交流电源。通过滑线电阻可控制在不同直流电压时加入恒振幅交流电压。电解池两端加上电压后, 电流流经电阻 R 时, 在电阻两端产生相应的电压信号。由于电容器 C 有隔直流的作用, 因而只有交流成分被输入到放大器 A 进行电压放大, 经检波以后即可用灵敏电流计测量。

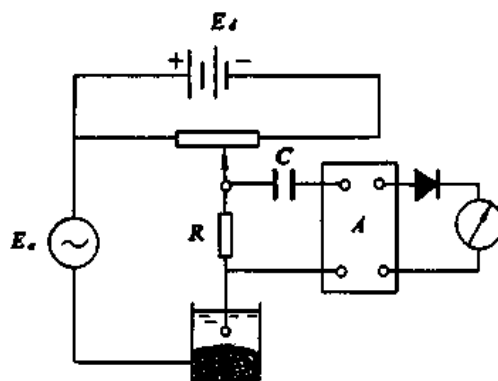


图 16-14 交流极谱装置图

(2) 交流极谱的特点

①灵敏度较普通极谱法稍高, 可测量浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-4} M$ 。但由于交流电压变化速度大, 故有较大的充电电流, 它限制了测量灵敏度的提高, 如有消除充电电流的装置, 灵敏度可达 10^{-7} 左右。

②由于交流极谱曲线呈峰状, 分辨率大, 普通极谱只能分辨半波电位相差 0.15~0.20V 以上的两种物质, 而交流极谱法可以分辨峰电位仅相差 40mV 的两种物质。

③当半波电位较正的物质大量存在时可分析半波电位较负的微量物质, 例如大量镉存在时微量锌的测定 (镉: 锌 = 100: 1)。采用普通极谱法由于小的锌波之前有一大的镉波, 限于记录器的测量范围, 致使锌波无法测量, 采用交流极谱, 得到的是峰状极谱曲线, 当大的镉波出现之后, 即可准确地测量到锌波的峰电流。

④氧波干扰不大, 氧在滴汞电极上还原的电极反应是不可逆的, 所以在交流极谱中氧的峰电流很小, 分析 $10^{-4} M$ 以上的物质, 基本上没有干扰作用, 故可以不除氧。

⑤许多有机化合物具有表面活性, 当它们在滴汞电极上产生吸附或解吸作用时, 使双电层的电容发生突然的变化, 因而交流电流亦产生突然的变化, 形成所谓“电容峰”。

⑥电极反应为不可逆的物质, 这是用交流极谱法进行测定的不便之处。

2. 方波极谱

交流极谱具有一定的优点, 但充电电流较大, 曾经采用过多种方法来消除充电电流, 其中最成功的是方波极谱。

(1) 基本原理 将交流极谱中叠加在直流极化电压上的正弦波电压改换成方波电压, 当通过电解池的交变电流与直流组分分开之后, 进行放大, 并利用仪器中特殊的时间开关, 在每一次加入方波电压之后, 等待一段时间, 直到充电电流减至很小数值时, 记录电解电流, 从而达到消除充电电流的目的, 因为充电电流在方波升起的初期虽然较大, 但衰减很快, 当它衰减接近于零时, 电解电流还有相当大的数值, 这时所测量的电

流则几乎全为电解电流。如图 16-15 曲线 (3) 所示, 阴影部分代表消除充电电流之后的电解电流。

在未发生电极反应时, 电解池的等效电路相当于一个电容器和一个电阻串连, 如图 16-16 所示, C 表示滴汞电极的双电层电容, R 表示包括溶液内阻在内的整个回路的电阻。当方波电压加于滴汞电极上时, 双电层电容立即充电, 所以产生大的充电电流 i_c , 随着 C 被充电的过程, 电容器两极上的电压不断增高, 充电电流不断减小, 直到 C 被充满时 (电容器两极间的电压等于外加电压) 充电电流为零; 当方波电压变化至另一半周时, 双电层电容 C 立即放电, 产生很大的放电电流, 并立即进入反充电 (电容器改变极性充电)。负半周充电情况与正半周一样, 反充电电流也是随时间增加而减小, 方波电压不断地周期性改变, 充电和反充电的过程也不断发生。

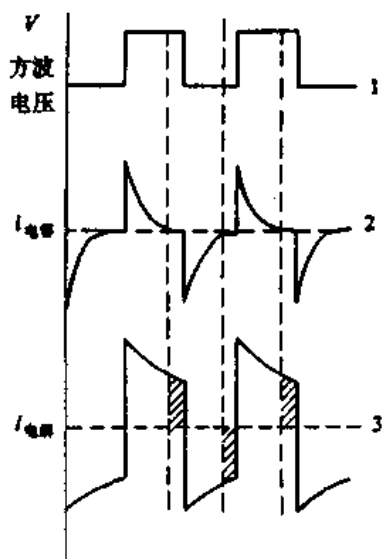


图 16-15 方波极谱法消除电容电流的原理

1. 方波电压 2. 电容电流 3. 电解电流

如果溶液中有可还原的金属离子存在, 而且直流电压加在起波之后, 则当方波电压加于滴汞电极上时, 除了充电电流之外, 金属离子在电极上还原, 所以还要增加一部分电解电流, 但是随着时间的增加, 电极表面附近的金属离子愈来愈少。由于方波频率很快, 溶液中金属离子来不及补充至电极表面附近, 因此电解电流中的交流成分也是随时间下降的。但这部分电解电流是按时间的平方根而衰减, 如图 16-15 中曲线 (3) 的上半部分所示。同样, 当方波电压变化至另一半周时, 除了双电层的反充电以外, 还由于已被沉积于电极上的金属 (汞齐) 的迅速氧化, 所以产生反向的电解电流, 如曲线 (3) 的下半部所示。

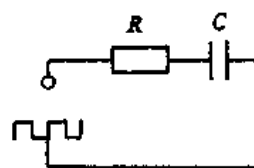


图 16-16 未电解时电解池的等效电路

在进行方波极谱分析时, 如果采用连续方波电压作为极化电压, 而且在每一个方波电压改变方向前记录讯号, 则可以得到连续方波极谱曲线。如果采用断续方波电压作极化电压, 即在每滴汞生长到一预定时间后, 才加上方波电压, 并记录讯号, 则得到台阶状断续方波极谱曲线, 这样可以避免由于汞滴表面积变化而带来的锯齿状振荡的影响, 使极谱图形更便于测量。

(2) 方波极谱的特点

①方波极谱的灵敏度很高, 一般可达 $10^{-7} \sim 10^{-8} \text{M}$, 对于电极反应部分可逆的物质, 其灵敏度也可以达到 10^{-6}M 左右。

②当有 2 万倍先还原物质存在时, 能测定微量的析出电位较负的物质。

③当物质在某种底液中本来是可逆电极反应，由于方波极谱极化速度很快，而成为不可逆的反应，因此，待测溶液中存在有干扰物质时，可选择底液，使其成为不可逆反应，这样可以免去事先分离的手续，大大缩短分析过程。

此外，在实验工作中应注意：

①底液浓度一般要大于 0.2M，以保证电解池具有较小的内阻，使充电电流有较小的时间常数。

②由于灵敏度高，因此，要求分析试剂，蒸馏水及汞中杂质小于 $10^{-8} \sim 10^{-9}M$ ，必要时须进行试剂的提纯工作。

③底液中不应存在毛细管活性物质，因为它们在方波电压变化过程中会产生吸附和解吸附的过程，使充电电流不断变化，这会在电路上产生不能被消除的充电电流。

④毛细管内径要小于 0.05mm，因为毛细管内径过粗，会在方波电压突然改变时，引起毛细管口处汞滴形状发生突变，溶液可能进入毛细管，引起电流的不稳定。

方波极谱主要用于测定微量成分，分析对象多为 Pb、Zn、Cd、Cu、Ni、Sn、Tl、Se、Te 等电极反应很快的物质。

四、脉冲极谱法

方波极谱基本上消除了电容电流，把灵敏度提高到 $10^{-7}M$ 数量级以上，但进一步提高，则受到毛细管噪音的影响。毛细管噪音产生的原因是由于每滴汞落下时毛细管汞线的收缩，在靠近溶液的毛细管管壁上引进溶液，溶液与汞线形成一个很薄的不规则的液层，因而产生不规则的电解电流和电容电流，而液层对于所有滴汞来说又是不同的，因此就以噪音的形式显示出来。毛细管噪音比整个仪器的噪音高几倍，只有克服这种噪音才能使灵敏度得到进一步提高。另一方面方波极谱工作时，为了使电容电流迅速衰减，要求溶液内阻要小（一般不大于 50Ω ）即支持电解质浓度要大，这就要求试剂的纯度特别高，不致沾污样品溶液。

针对方波极谱的这些缺陷，提出了脉冲极谱。脉冲极谱是在方波极谱基础上改进而成的，对可逆反应的去极剂如 In^{3+} 至少可检出 $1 \times 10^{-9}M$ 浓度，一般可检测至 $1 \times 10^{-8}M$ ，而且所用支持电解质浓度可以很稀，在低于 0.01M KCl 溶液中仍可测定。如果用三电极装置，在没有支持电解质存在下亦可测定，分辨率为 25mV，前放电物质与后放电物质的允许量为 50 000 : 1。脉冲极谱灵敏度的进一步提高则受振动电流等因素影响。

脉冲极谱按所加脉冲电压的方式不同，可分为常规脉冲极谱（又称积分脉冲极谱）和导数脉冲极谱（又称微分脉冲极谱）两种类型。

导数脉冲极谱是在每一汞滴增长到一定期间时，在直流线性扫描电压上迭加 2~100mV 的脉冲电压。脉冲电压的持续时间为 4~8ms，在脉冲后期测量电解电流，使干扰的电容电流和毛细管噪音充分衰减。

由于脉冲周期比汞滴下落时间短得多，因此脉冲极谱所测量交流电流变化的极限值要比普通极谱的极限扩散电流大得多。若再附加残余电流的补偿装置，可使脉冲极谱灵敏度得到更明显的提高。

五、溶出伏安法

1. 方法原理

溶出伏安法是以恒电位电解富集和伏安法相结合的一种极谱分析新方法。它是首先将欲测物质在适当电位下进行恒电位电解，并富集在固定表面积的特殊电极上，然后反向改变电位，让富集在电极上的物质重新溶出，同时记录电流-电压曲线。在一定实验条件下，根据溶出峰电流的大小进行定量分析，这种方法突出的优点是测定灵敏度极高，通常可达 $10^{-8} \sim 10^{-9} \text{M}$ 。

例如在盐酸底液中测定微量 Cu^{2+} 、 Pd^{2+} 、 Cd^{2+} 时，首先在 -0.8V 电位下（对 Ag-AgCl 电极）预电解5min，并不断搅拌试液，使试液中的部分 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 在电极上还原生成汞齐而富集在悬汞电极上。然后使电位由负向正均匀地改变，让它们在电极上发生氧化反应而溶出，从而产生很大的氧化电流，形成氧化峰，如图16-17所示。

峰状曲线的形成是由于电位由负向正变化到镉的氧化电位时，电极表面的镉首先被氧化产生氧化电流，随着电位的变化，电极表面的金属镉浓度迅速降低，导致汞滴内部的金属镉来不及补充，氧化电流便逐渐减小，因此出现镉的溶出峰。随着电极电位继续变正，达到铅和铜的氧化电位时，也将得到铅和铜的溶出峰。当电极电位再继续变正时，悬汞电极本身发生氧化，便产生极大的汞氧化电流，此时，溶出过程即告结束。

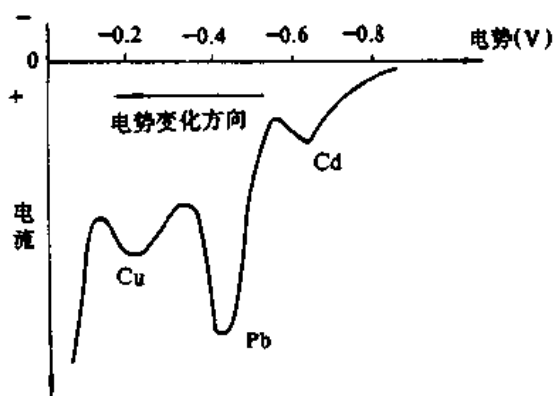


图 16-17 微量镉、铅、铜的溶出伏安图 (V)

溶出伏安法可根据工作电极上发生的反应不同，区分为阳极溶出法和阴极溶出法两大类。前者在电解富集时电极上发生的是还原反应，溶出过程中电极上发生氧化反应，后一类方法则与前一类方法相反。被测物质在电极上预电解富集的形式大致可归纳为两大类，一类是以汞电极为工作电极，被测物质以汞齐或以汞盐形式富集在电极上，另一类是以非汞电极为工作电极，被测物质以金属薄膜或难溶盐的形式富集在电极上。由于溶出伏安法的电解富集过程是在控制电位下进行，为消除干扰，提高极谱方法的选择性等方面提供了独特的工作条件。溶出伏安法在常规极谱法的基本设备条件下，配以固定表面积的工作电极、搅拌器及计时秒表即可开展工作。因此目前溶出伏安法已被广泛地应用于纯金属材料、半导体材料、生物制品、水质、土壤以及化学试剂等痕量杂质元素的测定。

2. 影响溶出峰电流的因素

溶出伏安法有两个过程，一是富集过程，二是溶出过程，影响这两个过程进行的一切因素都将影响溶出峰电流的大小。在实际工作中，根据分析对象的化学性质，须选择适当的电极做工作电极，并严格地控制各种条件，才能获得良好的分析结果。

在实际工作中对于某一样品试液，在底液组成、电极的形状等条件一定时，欲通过电解富集获得较高的汞齐浓度，须加快搅拌速度和延长富集时间。有时常增大搅拌速度到悬汞电极尚能挂住的临界值，以及固体电极能承受最大的溶液的旋转力（溶液漩涡）。

对于悬汞电极，影响阳极溶出峰电流的因素很多，诸如溶液的组成，电极的半径，搅拌速度，富集时间以极化电压变化速率等等，必须严格控制测定条件，才能获得良好的结果。由于加快极化电压变化速率，可以增大峰电流，因此将溶出伏安法与示波极谱仪、脉冲极谱仪等配合使用，可以测定 ppb 级的微量元素。

3. 溶出伏安法中常用的工作电极

无论是阳极溶出伏安法还是阴极溶出伏安法，都不能使用滴汞电极，而是使用表面积恒定的汞电极或非汞固体电极。常用的电极有如下几种：

(1) 机械挤压式悬汞电极 其结构如图 16-18(a) 所示，玻璃毛细管上端连接于密封的贮汞器中，使用时，由旋转顶针的圈数来控制汞滴的体积。每次只挤出一滴汞，有较好的重现性，但电解富集时，因溶液搅拌而容易脱落。

(2) 卧汞电极 其结构如图 16-18 (b) 所示，它是将汞滴卧躺在毛细管上，这样的电极在搅拌速度较快时，汞滴也不易脱落。

(3) 镀汞电极 这种电极是借助于电解饱和硝酸汞的酸性溶液，使一定量的汞沉积在铂球（铂丝）上而成。由于在铂球上均匀地镀上很薄的一层汞难度较大，可先镀上一层银，然后沾上一层汞，如图 16-18 (c) 所示。这样的电极又叫铂镀银沾汞电极。

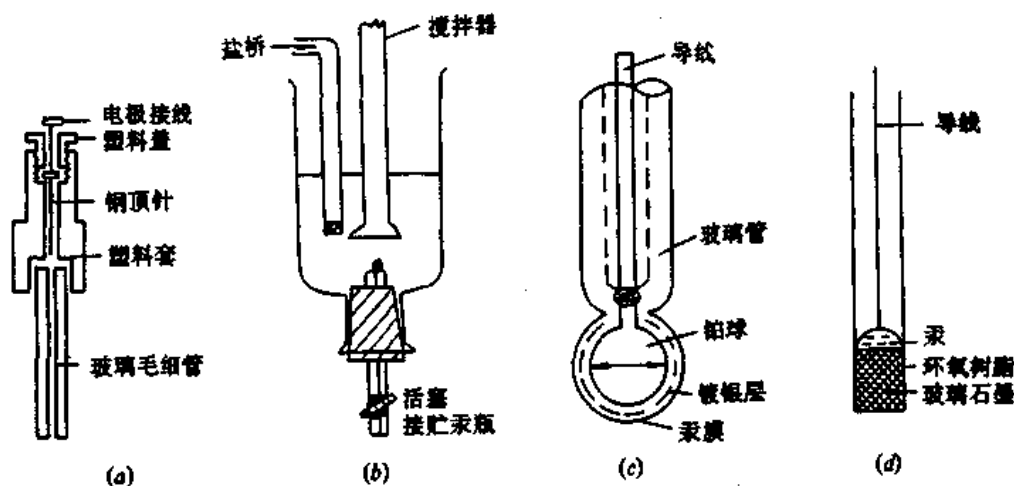


图 16-18 溶出伏安法电极

(a) 挤压式悬汞电极 (b) 卧汞电极 (c) 镀汞电极 (d) 玻璃石墨电极

(4) 固体微电极 这类固体微电极有铂丝、石墨、玻璃石墨电极等，这些能导电但其电化学性质惰性的电极在正电位下，不起电化学反应，因此，可以富集氧化产物，然后作阴极溶出。其中玻璃石墨电极的结构致密，离子或原子不容易渗透到电极内部去，因此，电极使用时间长，而且重现性好，其构造如图 16-18 (d) 所示。将玻璃石墨加

工成直径约 3mm、高约 5mm 的小圆柱体，用环氧树脂封于 150~200mm 长、内径约 4mm 的玻璃管一端。玻璃石墨表面用金相砂纸和碳化硼抛光成镜。玻璃管中放入少量汞，漫入一根铂丝作导线。此玻璃管围绕铂丝旋转，转速一般为 1500r/min，电极处理和纯化要非常小心。

玻璃石墨电极是近年来提出的一种新型电极，它具有很多优点，如氢的超电位高，抗化学腐蚀性强，导电性好。若在此电极上镀一层汞膜，则分辨率、灵敏度、再现性都比石墨电极好，称为“镀汞膜石墨电极”。

溶出伏安法的灵敏度高，设备简单，因此，在超纯物质和环境监测分析中获得了广泛应用。

第六节 极谱分析法的应用

极谱方法可以测定周期表中的大部分元素。经常用极谱方法分析的元素主要有铜、铅、锌、镉、砷、铋、铊、铁、钴、镍、铬、锰、铟、铊、锡、硒等。这些元素的还原或氧化电位都集中在一定的范围，故往往可以同时测定几种元素离子，例如在 0.1M KCl 溶液中可以同时测定铊、镉、锌、钴、锰。

铅、镉、金常在强碱性溶液中测定，而砷(III)、铋(III)、铊(III)的化合物由于易水解，故只有在强酸性溶液中测定才能获得较满意的结果。

碱金属、碱土金属、稀土元素以及钪、锆、铪、钽等，由于它们的还原电位相当负，一般很难用极谱法测定。

铜系元素中的铀和稀土元素中的铈(III)常用极谱方法测定。钒、铬、钼、钨等元素在溶液中有多种氧化态，因此电极反应过程复杂，但实际工作中只要选择合适的条件也可用极谱法测定。

钛、钒、铌、钽、铬、钨、钨、锰、铼、钴、铈、铈、铂、钯元素用普通的极谱方法分析时干扰多或灵敏度不高，难以在实际中应用，但用它们的催化极谱波可以大大提高灵敏度或选择性，因此常可用于实际分析。

Cl^- 、 Br^- 、 I^- (用氧化电流定量)， CN^- 、 S^{2-} 、 SO_3^{2-} 等阴离子也可以用极谱方法测定。

在有机极谱分析中，凡能在电极上进行氧化或还原反应的有机物，就有可能应用极谱方法测定。其中有卤代物、醌类化合物、醛、酮、维生素、甾体、激素、巯基化合物、硝基和亚硝基化合物、偶氮和偶氮羟基化合物、不饱和烃化合物以及其他许多化合物。

1. 示波极谱法测定铜

示波极谱是利用电子学方法，有效地消除了滴汞电极的充电电流，并用示波技术对未知试样进行定量分析的一种近代极谱法。

样品经 HCl 与 HNO_3 分解后，在 NH_4OH 与 NH_4Cl 介质中，以动物胶为极大抑制剂，以 Na_2SO_3 除氧，可获得良好的铜的示波极谱波，峰电位 $E = -0.58\text{V}$ 。当氨性底液较浓时， $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 对 Cu^{2+} 吸附不严重， Pb^{2+} 不起波，而 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 皆起波于

Cu²⁺后，峰电位相差较大，故均不干扰 Cu²⁺的测定。Cu²⁺含量在 1mg/mL 以下时，波高与浓度呈线性关系。

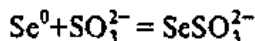
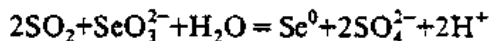
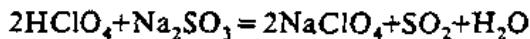
用示波极谱仪测定铜的具体步骤如下：

(1) 标准曲线的制作 分别准确吸取标准铜溶液(1mg/mL) 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mL 于 50mL 容量瓶中，加底液 (230g NH₄Cl 及 40g 无水 Na₂SO₃ 溶于 1 000mL 浓氨水中)10mL, 0.5%动物胶 1mL,用蒸馏水稀释至刻度，用极谱仪分别测得波高，由波高和含量绘出标准曲线。

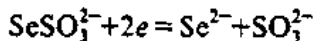
(2) 样品测定 准确称取一定量的试样 (如矿物) 于小烧杯中，加少量水润湿，加浓 HCl，煮沸，再加 1mL 浓 HNO₃，缓慢加热，使样品完全分解，蒸发至糊状，加水 10mL 溶解，冷却，移入 50mL 容量瓶中，稀释至刻度，然后再吸取该试液 5mL 至另一 50mL 容量瓶中，加底液 10mL，动物胶 1mL，以水稀释至刻度，摇匀，在与 (1) 相同条件下测波高，从标准曲线上查得对应的铜含量。

2. 微分脉冲催化极谱法测定硒

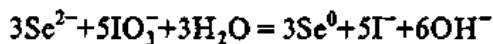
极谱法测定硒其反应机理大致如下：



上述反应生成的 SeSO₃²⁻ 在滴汞电极上首先被吸附，并立即被还原，



在氨性底液中新生的 Se²⁻ 立即与 KIO₃ 作用生成 Se⁰，



一旦有 Se⁰ 生成就可形成 SeSO₃²⁻ 而被电极吸附还原，溶液中大量的 IO₃⁻ 不断地使电极还原物 Se²⁻ 转化为 Se⁰，如此反复循环，使电解电流急剧增加，所得的极谱波为吸附平行催化波，其波高与含硒量在一定范围内呈线性关系。

样品测定 称取烘干或风干样品 (蔬菜、谷物、矿物等) 1~5g 于烧杯中，加 HNO₃ : HClO₄ = 5 : 2 混合溶液，在恒温电热板上加热消化至样品液呈透明亮绿色，继续蒸发至小体积，用蒸馏水定容于 15mL 容量瓶中 (视样品中含硒量可适当增加定容体积)。

取 1mL 上述样品消化液于刻度试管中，加 5 滴高氯酸，2mL 20% Na₂SO₃ 溶液，摇匀，加 5mL 底液 (50g NH₄Cl 加 5g EDTA 二钠盐，溶于 300mL 水中，再加入 200mL 氨水)，加 3mL 3% KIO₃ 溶液，摇匀，测定出波高。同法做试剂空白及标准加入试验，用标准加入法公式计算出样品硒含量。

思 考 题

1. 何谓极谱分析?
2. 试简要说明影响扩散电流的因素有哪些? 在极谱分析中如何控制这些影响因素才能使扩散电流和浓度成正比?
3. 半波电位在极谱分析中有何意义?
4. 溶解 0.2g 含镉试样, 测得其极谱波的波高为 41.7mm, 在相同实验条件下测得含镉 150, 250, 350, 500 μg 的标准溶液的波高分别为 19.3, 32.1, 45.0, 64.3mm, 计算试样中镉的百分率。
5. 用标准加入法极谱测定 In, 若得下列数据, 求每升试液中含 In(III)的毫克数。

溶 液	在-0.70V 处测得的电流(μA)
(a) 0.40MKCl25.00mL 稀释至 100.00mL	8.7
(b) 0.40MKCl25.00mL和20.00mL试液稀释至100.00mL	49.1
(c) 0.40MKCl25.00mL, 20.00mL试样和 $2.0 \times 10^{-4}\text{M}$ In(III)10.00mL 稀释至 100.00mL	64.6



参 考 文 献

- (1) 严衍录. 现代仪器分析, 北京农业大学出版社, 1995
- (2) 严国光等. 仪器分析原理及其在农业中的应用, 科学出版社, 1982
- (3) 方肇伦. 仪器分析在土壤学和生物学中的应用, 科学出版社, 1982
- (4) 刘培楠等. 仪器分析及其在生理科学中的应用, 科学出版社, 1965
- (5) 温铁坚. 仪器分析, 中国石化出版社, 1995
- (6) 王化正等. 分析仪器检修指南, 中国石化出版社, 1994
- (7) D·A斯库克等. 仪器分析问题详解, 晓园出版社世界图书出版公司, 1992
- (8) 余生等编译. 数理统计在化学、光谱分析中的应用, 高等教育出版社, 1987
- (9) 李长治. 分子光谱新技术, 科学出版社, 1986
- (10) 陈允魁. 仪器分析, 上海交通大学出版社, 1992
- (11) 李国珍等. 紫外-可见光分光光度法, 原子能出版社, 1983, 5
- (12) 石中玉. 紫外线光源及其应用, 轻工业出版社, 1984, 12
- (13) 刘耀. 现代毒物分析新技术, 群众出版社, 1987
- (14) 陆明刚等. 分子光谱新法引论, 中国科学技术大学出版社, 1973
- (15) 王宗明等. 实用红外光谱学, 石油工业出版社, 1982
- (16) 李超. 食品分析原理与技术, 科学技术文献出版社, 1987
- (17) 辛仁轩. 电感耦合等离子体光源-原理、装置和应用, 光谱实验室编辑部, 1984
- (18) 田中诚之. 有机化合物的结构测定方法-利用¹³C-NMR、¹H-NMR、IR和MS图谱的综合解析, 化学工业出版社, 1986
- (19) M·汤普森等, 符斌等译. ICP光谱分析指南, 冶金工业出版社, 1991
- (20) 沈淑娟等. 波谱分析的基本原理及应用, 高等教育出版社, 1988
- (21) 吕春梅等. 化验室工作手册, 江苏科学技术出版社, 1994.4
- (22) H·M·Kingston等, 郭振库等译. 分析化学中的微波制样技术原理及应用, 高豪出版社, 1992
- (23) 孙传经. 气相色谱分析原理与技术, 化学工业出版社, 1981
- (24) 陈国珍等. 荧光分析法, 科学出版社, 1990
- (25) 华家桤等. 实用蛋白质化学技术, 上海科技出版社, 1982
- (26) 张震南等. 薄层色谱分析及其最新进展, 云南科技出版社, 1989
- (27) A.Zlatkis等, 林珍安译. 高效薄层色谱, 上海科技出版社, 1984
- (28) 洪棣坤等译. 层析理论与应用, 上海科技出版社, 1981
- (29) 张慧明等. 电分析化学, 重庆出版社, 1987
- (30) 蒲国刚等. 电分析化学, 中国科学技术大学出版社, 1993
- (31) 谢声洛. 离子选择电极分析技术, 化学工业出版社, 1985