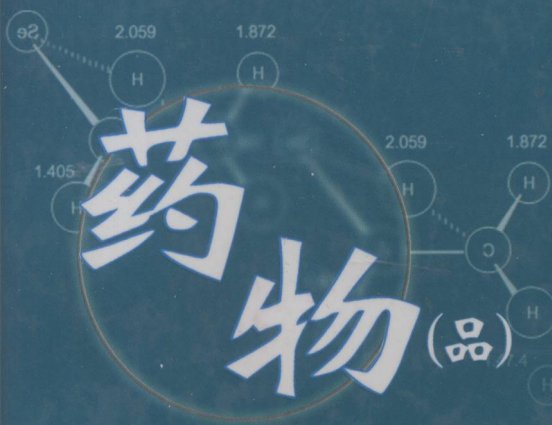
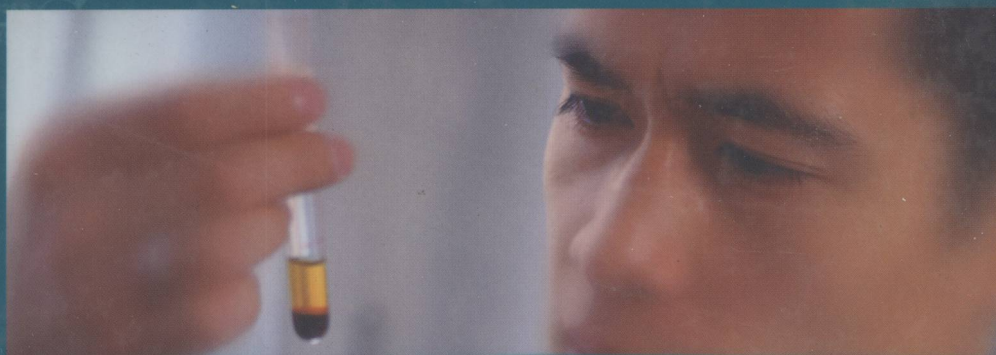


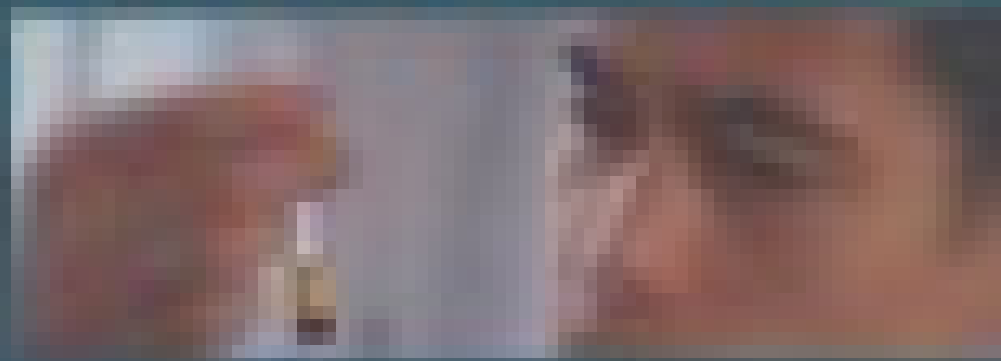


分析测试操作技术标准与 质量检验规范实用手册



药物

分析测试操作技术规范与
质量检验规范应用手册



药物(品)分析测试 操作技术标准与质量 检验规范实用手册

主 编 陈爱莲

下

卷

(二) 系数倍率法

应用双波长法时, 干扰组分的吸收光谱中至少需有一个吸收峰或谷, 这样才有两个不同波长处存在等吸光度值。如干扰组分的吸收光谱中找不出等吸收波长, 就不能用双波长法。例如图 6-2-31 中, 实线代表待测组分, 虚线代表干扰组分, 可以看出图 6-2-31 中①、②、③、④可以用双波长法, 而图 6-2-31 中⑤、⑥、⑦、⑧、⑨、⑩干扰组分的吸收光谱呈陡坡形, 没有吸收峰, 找出不等吸收波长, 双波长法就不能应用。系数倍率法可克服双波长法所遇到的困难。假设某一组分在选定两个波长 λ_1 和 λ_2 处测得吸光度的比值为 K , 即 $A_1/A_2 = K$, 如将该组分在其中一个波长处的吸收值乘以 K , 则该组分在两波长处的 $\Delta A = 0$ 。即 $\Delta A = KA_2 - A_1 = 0$ (或 $\Delta A = A_2 - KA_1 = 0$) K 称掩蔽系数。例如图 6-2-32 中, y 为干扰组分, x 为待测组分, 选定 λ_1 与 λ_2 测定, 因 Y 在 λ_2 处的吸光度值小于在 λ_1 处的吸光度值, 所以可令 $KA_{Y2} = A_{Y1}$ 。则

$$A_2 = K(A_{X2} + A_{Y2}) \quad A_1 = A_{X1} + A_{Y1}$$

$$\Delta A = A_2 - A_1 = K(A_{X2} + A_{Y2}) - (A_{X1} + A_{Y1}) = (KE_{X2} - E_{X1}) \cdot C_x = KC_x$$

(6-2-19)

ΔA 与待测组分 C_x 成正比。

乘掩蔽系数 K 时, 干扰组分和待测组分都放大了 K 倍, 所以使测得的 ΔA 值加大, 从而增大了检量线的斜率, 使灵敏度提高。但当 K 值过大, 因噪声的放大, 使信噪比 S/N 值减小而带来不利, 所以 K 值一般应在 5~7 倍为限。

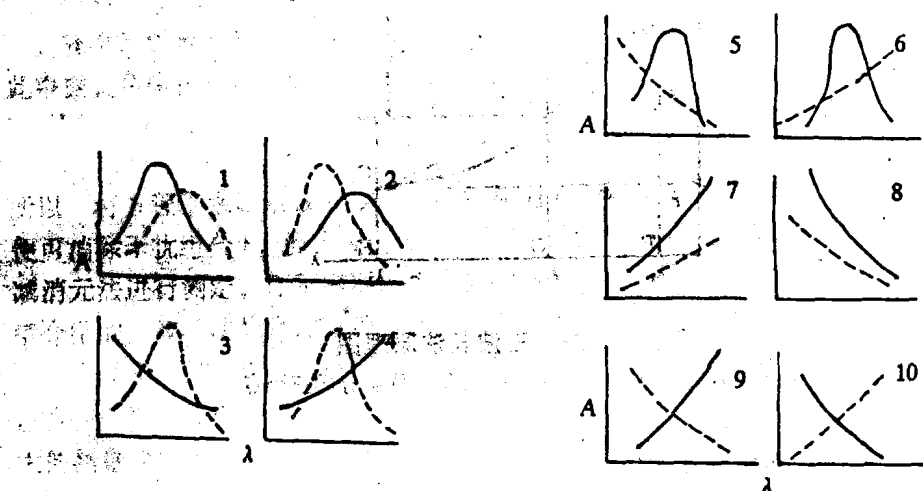


图 6-2-31 几种吸收光谱的组合

(三) 三波长法

三波长法也可以消除浑浊或干扰组分对测定的影响。三波长法中所选定的三个波长点，必须在干扰组分的吸收光谱上为一条直线，如图 6-2-33 所示。根据相似三角形的等比性质，可以推导出所测得的 A_1 、 $A_{\max}$ 和 A_2 的以下关系。

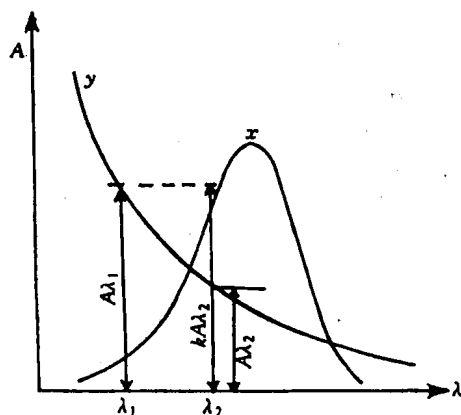


图 6-2-32 系数倍率法

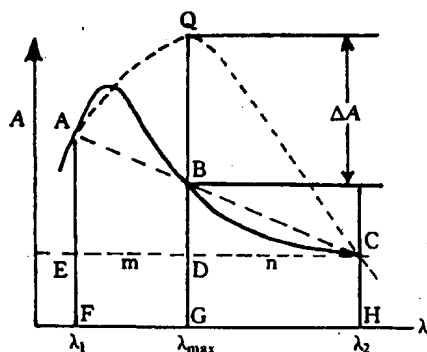


图 6-2-33 三波长法原理图

AQC 为样品吸收光谱 A、B、C 是干扰组分的三个点

三角形 ACE 与三角形 BCD 相似，所以：

$$\frac{DC}{EC} = \frac{BD}{AE}; BD = \frac{DC}{EC} (AF - EF)$$

$$BG = BD + CH; (CH = DG)$$

$$= \frac{DC}{EC} (AF - EF) + CH = \frac{n}{n+m} (A_1 - A_2) + A_2$$

$$QG - BG = \Delta A = A_{\max} \left(\frac{n}{m+n} (A_1 - A_2) + A_2 \right)$$

$$\begin{aligned}
 &= A_{\max} - \frac{mA_2 + nA_1}{m+n} \\
 &= (E_{\max} - \frac{mE_2 + nE_1}{m+n}) C \cdot l \quad (6-2-20)
 \end{aligned}$$

需要指出的是,上述三种图解法的本质是用加减消元法求解线性方程组。

双波长法和系数倍率法求解的是正规方程组 ($m=n$)

在图 6-2-30:

$$\lambda_1 \text{ 处: } E_1^a C_a + E_1^b C_b = A_1 \quad (1)$$

$$\lambda_2 \text{ 处: } E_2^a C_a + E_2^b C_b = A_2 \quad (2)$$

在测定组分 a 时,双波长法是要在组分 b 的吸收光谱上寻找 $E_1^b = E_2^b$ 的波长对 λ_1 、 λ_2 ;在测定组分 b 时,是要在组分 a 的吸收光谱上寻找 $E_a^1 = E_a^2$ 的波长对 λ_1 、 λ_2 ,然后用相应的测定值 A_1 、 A_2 和 E 值,通过加减消元,分别求出 C_a 和 C_b 。如果找不到吸收点,即在选定的 λ_1 、 λ_2 处,因 $E_1^b \neq E_2^b$ (测定组分 a 时) 或 $E_1^a \neq E_2^a$ (测定组分 b 时),采用对方程①乘以 K 系数,使 $KE_1^b = E_2^b$ (或 $KE_1^a = E_2^a$),再通过加减消元,分别求出 C_a 和 C_b 。

三波长法求解的是超定方程组 ($m>n$)

在图 6-2-33:

$$\lambda_1 \text{ 处: } E_1^a C_a + E_1^b C_b = A_1 \quad (1)$$

$$\lambda_{\max} \text{ 处: } E_{\max}^a C_a + E_{\max}^b C_b = A_{\max} \quad (2)$$

$$\lambda_2 \text{ 处: } E_2^a C_a + E_2^b C_b = A_2 \quad (3)$$

在测定组分 a 时,由于所选三个波长点位于干扰组分 b 吸收曲线的一条直线上,因此根据直角坐标平面上线段中某一点的距离公式有:

$$E_{\max}^b = \frac{E_1^b \cdot m}{m+n} + \frac{E_2^b \cdot n}{m+n}$$

所以,将方程①乘以系数 $m/(m+n)$,加上方程③乘以系数 $n/(m+n)$ 再减去方程②便可消除干扰组分 b,测定 a 的含量。从理论上说,可以任选三个波长点,通过上述加减消元法进行测定,而不需要干扰组分的吸收点在一条直线上,所以可以这样认为,文献介绍的三波长法只是加减消元法解超定方程组的一个特例。

当混合物所含组分数及所选波长点数较少时,通过简单的图解法(加减消元法)可以很快地得到分析结果。但是,要准确测定一些复杂的混合物,由于实际分析中存在较大的测量误差,需要较多的波长点(其数目一般远远大于组分数),而且各组分的吸收系数多数要从校正样品的吸收度中获得,上述简单的消元法则会变得很复杂且往往不能得到准确的分析结果。为此,分析工作者以计算机为工具,从计算数学中引进和发展了另外一系列方法,从不同的角度来求解该方程组,获得分析工作者满意的分析结果。

(四) 偏最小二乘法

根据前面介绍的数值计算法数学模型 $EX = Y$,待测组分的浓度可以通过最简单的

矩阵解法——求逆矩阵法得到（关于矩阵的概念及其基本运算见本书附录一），具体算法如下：

当 $m=n$ 时， E 是 n 阶方阵。在满足一定条件时，可先求 E 的逆矩阵 E^{-1} ，然后同时左乘 E 的逆 E^{-1} ，得到浓度 X ：

$$\begin{aligned} EX &= Y \\ E^{-1}EX &= E^{-1}Y \quad \because E^{-1}E = I \\ \therefore X &= E^{-1}Y \end{aligned} \quad (6-2-21)$$

对于比较复杂的混合体系，为了提高测定准确度，测试点往往远大于 n ，这时 E 不是方阵，需先左乘它的转置，构成协方差方阵 E^TE ，然后求 E^TE 的逆，得到浓度 X 。即：当 $m > n$ ， $EX = Y$

$$\begin{aligned} E^TE X &= E^TY \\ (E^TE)^{-1}(E^TE)X &= (E^TE)^{-1}E^TY \\ X &= (E^TE)^{-1}E^TY \end{aligned}$$

对以上矩阵运算，不少高级语言如“MATLAB”提供了现成的矩阵运算标准函数，直接调用即可解决绝大多数矩阵运算的实际问题。但在实际测定中，如选定波长范围内待测样品各组分光谱几乎完全相同，或虽有差别，可差别很小，这时求解系数矩阵 E （或 E^TE ）的逆矩阵时，会出现病态，或者无解或者虽然有解，但其解无法接受。

偏最小二乘法（Partial Least Squares Method, PLS）是一种较新的多元统计方法，其特点是对校正试样（预先将 n 个纯组分配制成各种不同相对浓度的 P 个标准混合液，其数值计算模型如前述规定为 $EC = A$ ）在 m 个波长处测得的吸光度矩阵 A 和已知浓度 C 阵分别分解为两个小矩阵的乘积：

$$\begin{aligned} A_{p \times m} &= T_{p \times a} B_{a \times m} + E_{p \times m} \\ C_{p \times n} &= U_{p \times a} V_{a \times n} + F_{p \times n} \end{aligned}$$

式中下标 a 是抽象主因子数（例如可取等于或大于组分数 n 个数，即 $a=n$ 或 $n+1$ ）； T 和 U 分别为 A 和 C 的特征向量阵，代表除去了大部分噪声后的吸光度和浓度信息； B 与 V 分别为 A 与 C 的载荷矩阵； E 和 F 是系统模型不能解释的随机误差矩阵，只要因子选择适当， E 和 F 中各元素很小且可忽略。

由 Lambert-Beer 定律揭示的 A 与 C 之间内在联系可表示为由对角矩阵 $D_{a \times a}$ 表示的 T 与 U 之间的内部关系：

$$U_{p \times a} = T_{p \times a} D_{a \times a}$$

于是最终得：

$$C_{p \times n} = T_{p \times a} D_{a \times a} V_{a \times n}$$

式中 T 、 B 、 D 、 V 可由校正试样测试和计算得到。

在测定未知样品时，先测得 P' 个未知试样的吸光度阵 $Y_{p' \times m}$ 代替校正试样的 $A_{p \times m}$ 使成公式 $Y_{p' \times m} = T'_{p' \times a} B_{a \times m}$ ，求得 $T'_{p' \times a}$ ；再由式 $U_{p' \times a} = T'_{p' \times a} D_{a \times a}$ 求出未知样品的浓度阵 X ($X_{p' \times n} = U_{p' \times a} \times V_{a \times n}$)。

由上面的公式可以看出, 偏最小二乘法充分考虑了 A 和 C 的相互关系, 相互利用对方的信息, 增强了模型的辨别能力, 同时 PLS 法采用校正试样来确定参数, 在计算过程中没有经过任何求逆运算, 故具有计算误差小、准确度高、运算速度快等优点, 是目前数值计算中最优秀的方法之一。

(五) 卡尔曼滤波法

卡尔曼滤波法 (Kalman Filtering Method, KF) 是通讯与现代控制论中的一种有效方法, 其目的是从获得的受干扰的信号里尽可能地滤除干扰成分, 分离出所需要的信号; 或者说, 是通过对一系列带有误差的实际测量数据的处理, 得出所需要的各种量的估计值。1979 年, Poulisse 最早将它引入分析化学, 用于分析多组分混合物, 其数学模型 (又称量测方程) 是:

$$y_K = E_K X + e_K \quad (6-2-22)$$

y_K 为待测混合物在第 K 个波长点的吸光度量测值, E_K 是第 K 个波长点各组分的吸光系数阵; X 为混合物中待测各组分的浓度矩阵; e_K 是第 K 个波长点的量测误差。

卡尔曼滤波法的定性解释可理解为: 把线性方程组中的 m 个方程看作是 m 次观测点。根据任意指定的初始值称由第一次观测点 (即第一个方程) 求得各待测组分浓度的第一个估计值 $X_{(1)}$ 。然后由第二个观测点 (即第二个方程) 计算对第一次估计值的修正项, 并将第一次估计值加上该修正项, 使成为第二次估计值 $X_{(2)}$ 。依次递推, 每递推一次, 都由老估计值加新的修正项得到新的估计值, 直到所有观测点计算完毕, 或新估计值 $X_{(K)}$ 与前一次老估计值 $X_{(K-1)}$ 之间的差异小于某一设定值 ϵ 时终止, 从而获得最终测定结果。

新估计值 = 旧估计值 + 修正值

图 6-2-34 是苯酚等四组分及其混合物的吸收光谱, 欲通过卡尔曼滤波法测定该混合物中四个组分各自的含量。图 6-2-35 所示, 以波长 λ (nm) 为横坐标, 四个组分估计浓度向量 $X_i(\lambda)$ 为纵坐标, 得到估计浓度随滤波进程的变化图, 最初一个阶段相邻点的估计值 $X_i(\lambda)$ 有较大差别, 随着滤波点数增加, 这种差别逐渐减小, 当滤波点增到一定值后 (大于 250nm), 各估计值 $X_i(\lambda)$ 几乎不变, 稳定在一条水平线上, 其时所对应的 $X_i(\lambda)$ 值即是所求的浓度值。

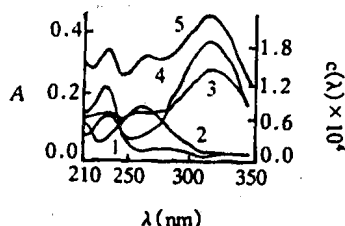
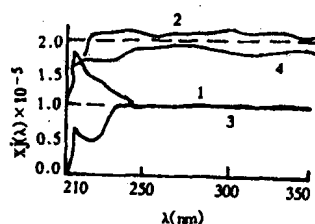


图 6-2-34 苯胺 (1) 硝基苯 (2) 偶氮苯 (3) 氧化偶氮苯 (4) 和混合物 (5) 的 UV 吸收光谱

图 6-2-35 浓度估计值 $X_i(\lambda)$ 随滤波过程的变化

.....真值 -1, 2, 3, 4 同图 12-31

数学变换方法

数学变换法是通过数学处理对以 Beer 定律为基础的吸光度分析作一次数学的抽象, 建立吸收曲线的数学信息与物质的量之间的联系, 并据此对物质进行定性定量的方法。主要的数学变换法有导数光谱法、正交函数法和褶合光谱法三种。

(六) 导数光谱法

导数光谱法又称微分光谱法。

如果把一个吸收光谱写成一个波长的函数:

$$A = CE = Cf(\lambda) \quad (6-2-23)$$

那么, 它的导函数的图像就是导数光谱。自然, 也就可以有一阶、二阶、三阶等各阶导数的导数光谱。

吸收光谱(原函数)是一个难以给出具体形式的复杂函数。所以, 导数光谱亦只能像原函数一样, 是一个逐点描绘而成的函数图像。

从原光谱数据中每隔一个波长小间隔 $\Delta\lambda$ (一般 $1 \sim 2\text{nm}$), 逐点计算出 $\Delta A/\Delta\lambda$ 的值。

$$\left(\frac{\Delta A}{\Delta\lambda}\right)_i = \frac{A_{i+1} - A_i}{\lambda_{i+1} - \lambda_i}$$

用这些值对波长描绘成图像, 就是一阶导数光谱。以同样的方法又可以从导数光谱中取得高一阶的导数光谱。

自 70 年代中期以来, 分光光度计装配了微处理机, 利用它的记忆与数据处理功能, 可以直接存储吸收光谱的数据并加以处理后描绘出一阶、二阶、三阶、四阶等导数光谱。

导数光谱可以给出更多的信息, 可应用于定性鉴别、结构分析以及痕量测定等方面。

1 导数光谱的波型和特点:

用高斯曲线模拟一个吸收峰, 其一至四阶导数函数的图像如图 6-2-36 所示。①零阶光谱的极大在奇数阶 ($n=1, 3\cdots$) 的导数中相应于零。而在偶数阶 ($n=2, 4\cdots$) 的导数中, 相应于一个极值(极小和极大交替出现)。这有助于对吸收曲线峰值的精确测定。②零阶光谱上的拐点, 在奇数阶导数中产生极值, 在偶数阶导数中为零。这对肩

峰的鉴别和分离很有帮助。③随着导数阶数增加,极值数目增加(极值数 = 导数阶数 + 1)。谱带宽度变小,分辨能力增高,可分离和检测两个或两个以上重叠的谱带。

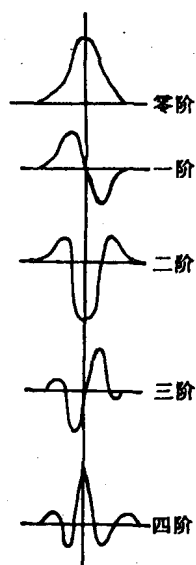


图 6-2-36 高斯谱带的微分

分子光谱中,往往由于相邻吸收带的重叠,使吸收曲线产生峰位移动,峰形不对称,出现肩峰等现象。可因相邻吸收带的强弱差别不同,相隔距离远近以及相重叠的部分多少而千变万化。这种变化,有时在吸收光谱曲线上的表现可以是很微弱而不易辨别的,而在导数谱图上,则有明显的表现。

2 导数光谱的定量原理:

保持入射光的强度在整个测量波长范围内为一个常数,则根据 Beer 定律可得到吸光度 (A) 与波长的一阶导数:

$$\frac{dA}{d\lambda} = \frac{d\epsilon}{d\lambda} \cdot C \cdot l \quad (6-2-24)$$

因吸光系数是波长的函数,当一定波长时,吸光系数是一定值。所以 $\frac{dA}{d\lambda}$ 也是定值,一阶导数的值与试样浓度成线性关系。光谱曲线斜率 $\frac{dA}{d\lambda}$ 愈大,灵敏度也愈高。

同样,可以得到各高阶导数:

二阶导数

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = \frac{d^2 \epsilon}{d\lambda^2} \cdot C \cdot l \quad (6-2-25)$$

三阶导数

$$\frac{d^3 A}{d\lambda^3} = \frac{d^3 \epsilon}{d\lambda^3} \cdot C \cdot l \quad (6-2-26)$$

因此,在任意一波长处,导数光谱的数值与浓度成正比。这是导数光谱用作定量的理论依据。

3 导数光谱法对干扰吸收的消除:

导数光谱法可以有效地消除共存组分的干扰吸收。如果能把干扰吸收表达为一个幂函数

$$A_{\text{干}} = a_0 + a_1\lambda + a_2\lambda^2 + a_3\lambda^3 + \cdots + a_n\lambda^n$$

, 则待测组分吸收 U_λ 与干扰组分共存时:

$$A_\lambda = a_0 + a_1\lambda + a_2\lambda^2 + a_3\lambda^3 + \cdots + U_\lambda \quad (6-2-27)$$

求一阶导数后:

$$A'_\lambda = a_1 + 2a_2\lambda + 3a_3\lambda^2 + \cdots + U'_\lambda \quad (6-2-28)$$

原式(6-2-29)中,常数项 a_0 等于零,线性项 $a_1\lambda$ 变成常数 a_1 ,这意味着干扰背景将随求导阶次的增加而逐步降幂乃至消除。

4 导数光谱法定量数据的测量:

导数信号与待测物的浓度成正比,因此从导数光谱上测出定量用的数据,就可以进行定量测定。其测量方法可分为几何法和代数法,本节主要介绍几何法。

几何法:几何法是采用导数光谱上适宜的振幅作为定量信息的方法,常用的有以下几种(图6-2-37):

(1) 基线法(或正切法):对两个邻近的极大(峰)或极小(谷)作切线,然后测量中间极值到切线的距离 d 。

(2) 峰谷法:测量两相邻峰谷之间的距离 p (p_2 或 p_1),作为定量测定值。

(3) 峰零法:利用极值到零线之间的垂直距离 Z 。

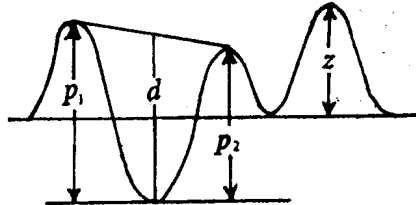


图 6-2-37 导数光谱的求导

p. 峰谷法 d. 正切法 z. 峰-零法

在实际工作中,由于仪器的性能与精度所限,测定中,波长、谱带宽度、吸收度等数值都有一定的变动范围;而这些数值的变动引起导数光谱的变异是很灵敏的,尤其是对高阶导数光谱。同时还由于求导条件不同,例如所取 $\Delta\lambda$ 的值不同,使导函数的值变异。所以,导数光谱上的数值与浓度之间的比值,不能像吸收系数那样求出一个能通用的常数,随时用来计算浓度。用导数光谱进行定量,需用标准对比的方法。

测定前需用标准品在选定的条件下,求得测量值与浓度间的线性关系(工作曲线或直线方程),而后在相同条件下测定。

(七) 褶合光谱法简介

1. 褶合光谱法 (Convolution Spectrometry) 的原理

褶合光谱法是在 Glenn's 正交函数法的基础上发展起来的一种信号分析方法, 信号分析的主要目的是寻找一种简单有效的信号变换方法, 使信号所含量的重要特征能显示出来。褶合光谱法的基本指导思想是通过褶合变换对原始吸收光谱进行以正交多项式为基的正交变换和正交分解, 显示出原始吸收光谱在构成上的局部细节特征, 从而为化学结构相似物质紫外吸收光谱的定性鉴别提供新的手段; 由新变量构成的褶合光谱表现出来的异变性减少了混合物中共存各组分之间的相关性, 以褶合光谱为基础运用 PLS 法等测定共存组分的含量可获得更为准确的结果。

褶合变换 (convolution transform, CT) 的本质是与一种被人称之为“数学显微镜”的离散小波变换 (wavelet transform, WT)^① 相一致的数学变换技术, 是对以时域函数形式的原始吸收光谱 (从仪器获得的过程, 可以看作时域信号) 实施频域函数的局域变换, 因而能有效地从信号中提取信息, 通过伸缩和平移等运算功能对信号进行多尺度细化分析 (multiscale analysis), 较之 Fourier 变换的整体刻画, 不能反映各自在局部区域上的特征, CT 在光谱分析中有其特殊的意义。

褶合变换的定性解释可理解为:

(1) 根据调和原理, 可将任意波长区间 (λ_i) 内一段吸收光谱 $A(\lambda_i)$ 表示为一组标准正交函数 ($\phi_0, \phi_1, \phi_2 \dots \phi_j$) 加权 ($Q_0, Q_1, Q_2 \dots Q_j$) 求和:

$$A(\lambda_i) = Q_0\phi_0 + Q_1\phi_1(\lambda_i) + Q_2\phi_2(\lambda_i) + \dots + Q_j\phi_j(\lambda_i) + \dots \quad (6-2-29)$$

(2) 褶合变换就是用这一组标准正交函数作为基, 通过平移和尺度伸缩等运算功能, 去分解这一段吸收曲线, 把相应的权函数 Q_{ij} 求出来。褶合变换公式:

$$Q_{ij} = \sum_{i=1}^n A(\lambda_i) \cdot \phi_{ij} / N_j^{\frac{1}{2}} \quad (6-2-30)$$

式中: $A(\lambda_i)$ 为待变换的一段波长区间内的吸收光谱值

ϕ_{ij} 、 N_j 为数学模型参数

褶合光谱上的每一个值, 都与一段波长区间内物质的吸光特性相对应。所以, 与吸收光谱一样, 褶合光谱同样具有定性定量的特征, 其基本定量关系为:

$$Q_{ij} = Q_{ij1\text{cm}}^{1\%} \cdot C \cdot l \quad (6-2-31)$$

式中, Q_{ij} 为褶合光谱值; $Q_{ij1\text{cm}}^{1\%}$ 为褶合系数 (浓度 C 为 1%, 液厚为 1cm 时的 Q_{ij} 值)

(3) 将不同尺度 ($N=2 \sim 30$) 下, 通过平移求得的主成分不同权函数值 ($Q_0, Q_1, Q_2 \dots Q_5$), 对应于该尺度范围波长区间的平均波长 λ_m 记录下来, 即得到褶合光谱 (图 6-2-38)。不同物质相应的褶合光谱之间的差异性可用于定性鉴别; 以混合物和其中各纯组分的褶合光谱为基础, 运用 PLS 法等可用于混合物定量分析。

① 小波分析是近几年国际科技界和众多学术团体高度关注的的前沿领域, 是继傅里叶分析方法之后的重大突破。

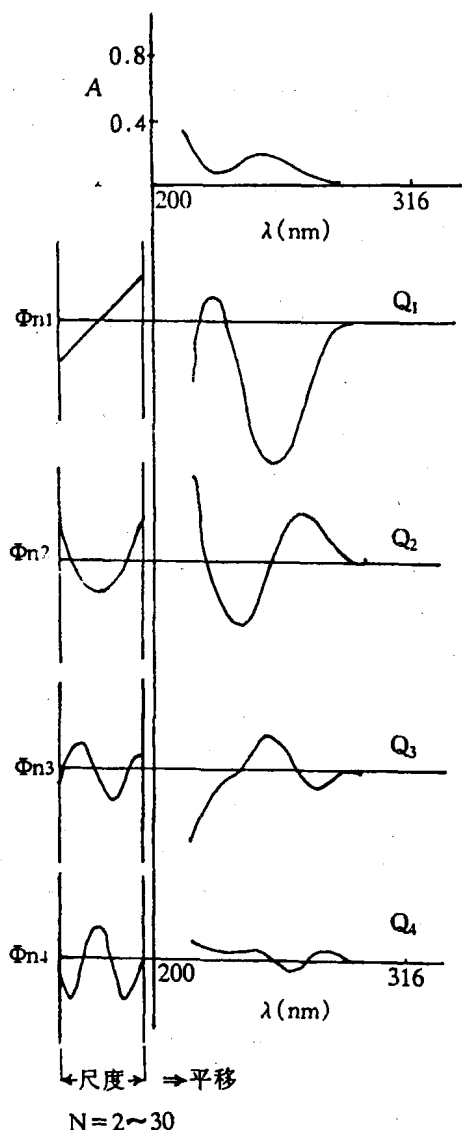


图 6-2-38 吸收光谱褶合变换示意图

综合褶合光谱产生的原理，可得到褶合光谱法如下几条基本特征：

(1) 信息量大：一条吸收光谱通过褶合变换可以得到成百上千条褶合光谱，形成新的独立的光谱体系，为定性定量分析提供了大量可供选择的新信息。

(2) 同时包容了导数光谱法和正交函数法：当尺度大小为两个和三个波长点时，所得到的 Q_1 褶合光谱即为导数光谱；而当尺度大小为三个及三个以上的波长点时，对应的褶合光谱是同阶次导数光谱的线性组合。因此，褶合光谱法不仅包容并发展了导数光谱法和正交函数法，不仅同时具备这两种方法的一切优点及其理论基础，而且具有更广

泛的实用价值。

(3) 提高信噪比和分辨率：褶合光谱的平滑效果使得高阶褶合光谱的信噪比提高，这一点是导数光谱所不及的；褶合光谱显露了物质对光吸收特性的细微变化以及放大了不同物质对光吸收特性变化的差异，明显提高了重叠峰的分辨能力，减少了共存组分吸收光谱的相关性。

2. 褶合光谱的定性技术

经典分光光度法对物质进行定性主要是根据吸收光谱的峰、谷或者它们的比值的差异来判断是否为同一物质。它存在如下几点的局限性：

(1) 信息量少：物质的结构特性在吸收光谱的全波长范围内都能得到反映，因此仅用峰、谷及其比值这几个参数所得到的定性信息不能完全反映物质结构的本质特征。

(2) 细微差异被宽带吸收所掩盖：紫外可见光谱为宽带吸收，曲线形状一般变化不大，不同化合物的吸收光谱的细微差异被其相同部分所掩盖，使传统的分光光度技术很难将它们区分开来。

(3) 即使是同一种物质，由于测量误差的存在，在同一台仪器上测量所得到的光谱也不完全一样，尤其是其浓度不相同，所得光谱差异性较大，因此用单一对照的“光谱一致性”来判断两种化合物是否为同一种化合物缺乏可操作性。

以上局限性使得经典分光光度法很难将结构相似的化合物区分开来，且对相同的物质有时也难得到准确的同一性结果。

针对上述不足，褶合光谱定性技术充分利用整条光谱所含的结构信息对物质定性。它首先通过褶合变换将紫外可见吸收光谱分解成百上升条褶合光谱，然后将逐条褶合光谱进行配对比较，只要是不同物质，它们的差异便会在褶合光谱中的高分辨域中得到反映。

为了克服测量误差所带来的虚假信号，方法设计了相应的标准对照自我训练系统，即首先获取在不同测定条件下（包括不同时间和不同温度）待测物对照品的吸收光谱，通过褶合变换，得到相应的褶合光谱，通过作自我比较，并借助于统计学处理，得到待测物对照品褶合光谱的标准区域，接着将待测物的褶合光谱与标准区域比较，如果待测物的褶合光谱落在该区域外，则认定它们不是同一物质，反之，则可认为它们可能是同一种物质。而且，不落在该区域内的褶合光谱点越多，两个物质的结构差异越大。

3. 褶合光谱的定量技术

根据测定对象的不同，褶合光谱的定量技术有干扰背景共存下的单组分定量和多组分（二个组分以上）混合物定量技术。

(1) 单组分定量：与经典分光光度法不同的是：褶合光谱法单组分定量分析是指含有背景干扰的样品分析。褶合光谱的产生原理告诉我们：当背景干扰褶合光谱的某个数学分量没有贡献而待测组分的有贡献时，我们就可以认为背景干扰已被消除。这一点是经典紫外-可见吸收光谱法所没有的。由于浑浊背景（比如片刻辅料的影响）通常只有常数项贡献，因此，应用褶合光谱法可以不对样品进行预先分离，也可以将它消除。具体测量过程同经典分光光度法测定单组分的相似，由于褶合光谱信息量大，还可以从许

多分析条件中优选最佳分析结果。

(2) 多组分定量: 对多组分混合物, 根据褶合光谱与吸收光谱同样具有线性和加合性的特点, 以褶合光谱为基础, 结合偏最小二乘法求解。研究表明, 不同数值计算方法的舍入误差对结果影响甚小, 对结果误差影响最大的是待测组分的分析信号与其分析信号的重叠程度 (数学上称这为相关性): 当它们相关性越大 (即信号的重叠程度越大), 分析结果越不理想。考虑到褶合光谱能放大化合物吸收光谱所存在的细微差异, 减少数学相关性, 加上褶合光谱信息量大, 在褶合光谱基础上应用偏最小二乘法对它进行定量分析, 即可从中筛选出最佳结果。

总之, 褶合光谱分析法的实质是一种信号处理技术, 它对所处理的信号有两条基础要求: 线性, 即信号与待分析物的浓度成正比; 加合性, 即混合物的分析信号等于所含各组分的信号之和。换言之, 符合这两条的任何分析信号均可用褶合变换分析技术处理。因此, 褶合光谱分析法不仅适用于紫外-可见吸收光谱, 它也同样适用于红外、近红外光谱、荧光、核磁共振及色谱分析仪等分析信号的处理。

三、光电比色法

可见分光光度法对于能吸收可见光的有色溶液的测定方法, 通常也称为光电比色法。光电比色法之所以能被广泛采用, 除了方法本身有灵敏、简便等优点以外, 最主要的原因是许多不吸收可见光的无色物质可以用显色反应变成有色物质, 使之能用光电比色法测定, 而且能提高测定灵敏度和选择性。显色反应有各种类型, 如络合反应、氧化还原反应、缩合反应等。其中应用最广的是络合反应。

(一) 显色反应及其条件

金属离子与配位体可形成稳定的有色络合物或络离子, 吸收系数 ϵ 值可高达 10^5 , 灵敏度高, 且常有较好的选择性, 适用于微量比色分析。配位体多为有机物, 已经有大量的有机试剂用于比色分析。也可利用金属离子作试剂测定具有配位体性质的有机物, 例如用铝或锆测定黄酮类化合物。

金属离子与两种或两种以上配位体形成的络合物称为多元络合物, 用得较多的是与二种配位体形成的三元络合物, 有提高比色分析选择性与灵敏度的作用。

一些表面活性剂参与金属离子和显色剂的反应时能形成胶束状化合物, 可使吸收峰移向长波段, 且使吸收系数增大。表面活性剂多为长碳链的季胺盐类, 以及动物胶与聚乙烯醇等。

形成离子对 (离子缔合物) 的反应也被应用于比色法。例如生物碱类与酸性染料或雷氏盐, 金属络合阴离子与阳离子表面活性剂等形成的离子对都可用于比色分析。

显色反应的有色产物, 若能溶于有机溶剂, 则可萃取后进行比色测定, 有利于排除干扰和提高灵敏度。

1 显色反应须能符合下述要求:

(1) 被测物质与所生成的有色物质之间, 必须有确定的定量关系, 方能使反应产物对光的吸收度准确地反映被测物的含量。

(2) 反应产物必须有足够的稳定性, 以保证测得的吸收度有一定的重现性。

(3) 如试剂本身有色, 则反应产物的颜色与试剂颜色须有明显的差别, 即产物与试剂对光的最大吸收波长应有较大差异, 才能分辨产物的吸收与试剂的吸收。

(4) 反应产物的摩尔吸收系数足够大 ($10^3 \sim 10^5$), 才能有一定的灵敏度。

(5) 显色反应须有较好的选择性, 才能减免干扰因素。对于萃取比色法, 应有足够大的分配比, 以保证萃取完全。

2 反应条件的影响:

关于显色反应能否达到上述要求, 与反应条件有很大关系。对显色反应影响较大的因素主要有: 试剂与溶剂、酸碱度、反应时间及温度等。

试剂与溶剂 选用试剂不但应依据显色反应的灵敏度、显色的稳定性和反应的选择性, 同时还应考虑试剂的用量。为使反应能进行完全, 常需有过量的显色试剂, 但试剂的用量, 可影响产物的组成。例如, Fe^{3+} 与 SCN^- 的络合反应, 可生成多种不同组成的络离子。 SCN^- 的浓度低时, 主要产物是 FeSCN^{2+} , 当 SCN^- 为 0.1mol/L 左右时生成 $\text{Fe}(\text{SCN})_2^+$, 若 SCN^- 的浓度大于 0.2mol/L 时则生成 $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{4-}$ 等阴离子。为使产物组成一定, 应控制试剂的浓度。

溶剂的性质可影响物质对光的吸收, 使之呈现不同的颜色。例如, 苦味酸在水溶液中呈黄色, 而在氯仿中则几乎无色。溶剂也与显色反应产物的稳定性有关, 例如硫氰化铁红色络合物在丁醇中比在水中稳定。在萃取比色中, 则应选用分配比高的萃取溶剂。

溶碱度 许多有色物质的颜色, 随溶液中的氢离子浓度而改变, 同时显色反应的历程也多与溶液的酸碱度有关。例如, 络合反应中所用络合剂多为弱酸, 溶液的酸度也会阻碍络合剂离解, 酸度过小又可使金属离子水解沉淀。由于酸度影响络合剂的离解, 在不同酸度时, 可生成不同组成的络离子。如 Fe^{3+} 与碘基水杨酸根 ($\text{C}_7\text{H}_4\text{SO}_6^-$) 的络合, 在 $\text{pH}1.8 \sim 2.5$ 时, 生成 $\text{Fe}(\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_6\text{S})^+$ (红褐色); $\text{pH}4 \sim 8$ 时, 生成 $\text{Fe}(\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_6\text{S})_2^-$ (褐钩); $\text{pH}8 \sim 11.5$ 时形成 $\text{Fe}(\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_6\text{S})_3^{3-}$ (黄色); $\text{pH} > 12$ 时, 生成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀。其它反应, 如氧化还原反应, 缩合反应等, 溶液的酸碱性也是重要条件之一, 有些反应对溶液的酸碱性很敏感, 需用缓冲溶液来保持溶液的 pH 值。

时间 由于反应速度不同, 完成反应所需时间常有较大差异。有色产物也会在放置过程中发生变化。有的反应显色后经过短时间放置即逐渐减退; 有的显色反应颜色慢慢加深, 需经过一定时间才能充分显色。有的反应颜色能保持较长时间稳定不变; 有的只能维持短暂的稳定时间。对于一个显色反应中各个步骤所需时间和颜色能稳定地保持多久, 常须通过实验确定。

温度及其它 很多显色反应在室温下进行, 室温的变动一般结果影响不大。有此涉及氧化还原或缩合等的反应, 常需考虑温度; 提高温度可促进反应, 但也可产生副反应, 需在适当的温度下进行。有些反应与溶解度有关, 也要考虑温度; 提高温度促进溶解, 以利反应进行; 或降低温度以避免沉淀溶解, 都应根据具体的反应考虑适当的温

度。

其它如见光易变质的产物，放置过程中应避光；易受空气中氧干扰的，应密闭放置。

3. 反应条件的控制：

确定显色反应的最适宜条件，须通过实验验证。对于已经制定的比色方法，不应随意更改条件。需要改变条件，或新建方法中要考查某一条件对比色的影响时，可通过实验描绘吸光度 - 条件曲线，或不同条件下的吸光度 - 浓度曲线，从中选定适宜的条件。例如考察显色稳定的时间，可在显色后每隔一段时间测一次吸光度，测量多次；从所得到的吸光度 - 时间曲线上可找到显色稳定的时间范围；从而可制订最适宜的时间。又如考察试剂用量这一条件与灵敏度和准确度的关系，可按照制备标准曲线的方法，固定其它条件，改变试剂用量。其它条件如酸碱度、温度等，均可仿此。

(二) 测定方法

有色溶液的测定可用前述各种类型的紫外可见分光光度计和相应的各种测定方法。除此以外，如用低档分光光度计或光电比色计时，比例常数 K 值不是普适常数，所以，必须先用标准品找出吸光度 A 与浓度 C 间的关系。方法是配制一系列浓度不同的标准品溶液，分别测定吸光度；考查实验所得数据中浓度与吸光度之间是呈直线关系还是有明显的弯曲。若是弯曲的，则可在坐标纸上描绘成适中的光滑曲线，即标准曲线或工作曲线。以后在测得样品溶液吸光度时，就从这一曲线上查对得到所求的浓度。如果标准溶液的测得值显示吸光度与浓度之间有明显的直线关系，则可将实验数据用直线回归的方法，求出回归直线方程，供以后测定中计算浓度。一般情况下，通过实验条件的探索和改进，大都可以得到一个比较满意的操作方法，使吸光度与浓度间的关系在一定的浓度范围内有较好的直线关系。

第五节 紫外光谱与药物分子结构之间的关系

人们在长期的实践中发现，含有共轭体系化合物如共轭烯烃， α ， β 不饱和羰基化合物，芳香族化合物等的紫外吸收光谱与其分子结构有一定的关系，并得出一些定量计算的规律。这些规律可用于计算吸收峰的位置，确定分子的结构，不过这毕规律至今仍是一些经验规律，有待进一步理论探讨。

一、共轭烯烃类药物的紫外光谱

Woodward 在总结了大量数据后，发现共轭体系中的氢原子被各种官能团取代后 $\lambda_{\max}$ 有规律的改变，据此，他提出了共轭体系 K 带的 $\lambda_{\max}^{\text{已烧}}$ 的计算规律，随后 Fieser 等进行了补充。