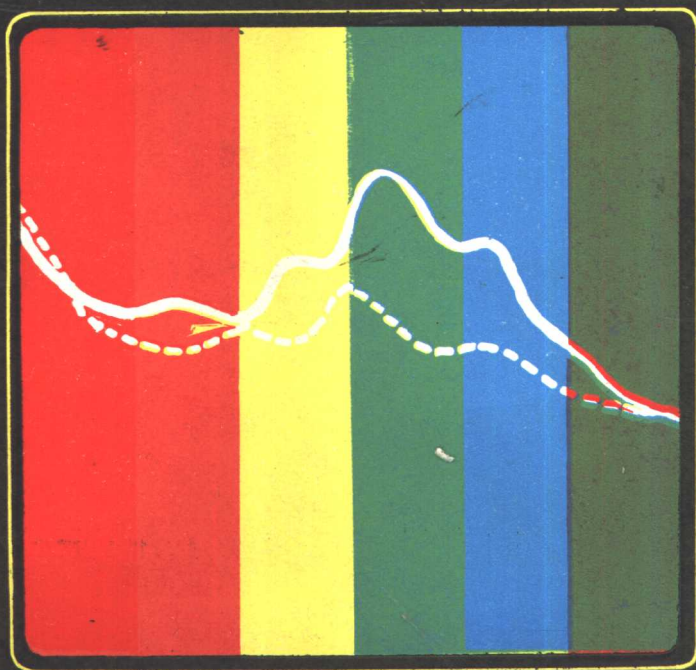


罗国安 邱家学 王义明 编著

可见紫外定量分析 及微机应用



上海科学技术文献出版社

可见紫外定量分析 及微机应用

罗国安 邱家学 王义明 编著

上海科学技术文献出版社

可见紫外定量分析及微机应用

罗国安 邱家学 王义明 编著

*

上海科学技术文献出版社出版发行

(上海市武康路2号)

新华书店经销

昆山亭林印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/32 印张 8.625 字数 208,000

1988年8月第1版 1988年8月第1次印刷

印数: 1—2,200

ISBN 7-80513-156-2/T·92

定价: 4.45 元

《科技新书目》168-293

前 言

可见紫外分光光度法由于所用仪器简单、操作方便、准确度高,因此在无机分析包括冶金、地质、化工、环保、痕量、气体分析等,有机分析包括药物、生化、临床分析等中均得到广泛的应用。但对经典的分光光度法来说,当试样溶液混浊或存在较大背景吸收时,就会产生较大的误差,以至不能准确定量。对多组分混合物的测定,经典分光光度法采用解联立方程法,不但计算复杂,测定误差较大,而且对许多问题往往无法解决。为了解决这些问题,从五十年代初开始,提出并发展了许多新的分光光度分析方法,首先提出并得到广泛应用的就是双波长分光光度法,以后又产生了导数分光光度法、三波长法、正交函数法、最小二乘法、线性规划法、卡尔曼滤波法和因子分析法等。这些新方法大大充实了可见紫外分光光度法的内容,使其得到了更为广泛的应用。这些近代可见紫外定量分析方法大致可分为两大类。一类是采用将共存组分作为干扰组分设法加以消除后对某一组分进行定量测定,属于这一类的有双波长法(包括系数倍率法)、三波长法、正交函数法。另一类是通过测定数据进行数学处理后,同时得出所有共存组分各自的含量(或浓度),如多波长线性回归法、最小二乘法(包括联立方程法)、线性规划法、卡尔曼滤波法和因子分析法。导数分光光度法兼有这两类方法的特征。这些近代定量分析方法共同的特点是不经化学或物理分离,就能解决一些复杂混合物中各组分的含量测定。近代可见紫外定量分析方法的使用和发展与计算机的广泛使用也是分不开的。

尤其是微处理机的普及,解决了使用这些方法时出现的计算较为复杂、计算工作量大等困难,才使这些方法具有较强的生命力。目前微处理机在近代可见紫外定量分析方法中有两种应用,其一是解决有些方法的优化问题,即选择最佳测定条件;其二是有些方法必须用计算机来完成计算工作量。随着微机的进一步应用,不但会促使可见紫外分光光度法从理论和方法上得到较快的发展,而且将促使仪器——分光光度计发生质的变化,即智能化。高级的智能型分光光度计,不但能操作自动化,而且能按分析化学专家的思维方式对不同的分析样品决定分析方法及测定条件。

本书介绍了十种近代可见紫外定量分析方法的基本原理、实验方法及步骤、计算公式、计算方法及步骤、程序框图及经过考核的计算程序。给出了应用实例,还介绍了该法应用的有关国内外文献。考虑到目前国内大量使用的仍是手动式单波长分光光度计,因此本书着重介绍了如何使用这类仪器来实现这些近代分析方法,并结合微机应用,以利于进一步推广使用这些新方法,来解决科研、生产上实际问题。本书中大部分应用实例除特别说明外,均使用北京第二光学仪器厂生产的 WFZ800—D₂ 和 WFZ 800—D₃ 单波长分光光度计进行测定。扫描的光谱曲线是采用康强 810 型分光光度计测得。

本书是作者近年来科研工作和授课的部分讲稿的基础上写成的。鉴于作者的学识和实际工作经验有限,本书无论在内容选材,还是在编排方式及文字表达方面,难免会存在缺点和错误,敬请各位专家和广大读者批评、指正。

作者于中国药科大学

1987.2

目 录

前 言

第一章 双波长分光光度法	1
第一节 双波长分光光度法基本原理	1
一、基本原理	1
二、双波长分光光度法的优点	2
三、混浊样品的测定方法	3
四、单组分的测定方法	5
五、混合组分分别定量的方法	7
第二节 双波长等吸收法的测定方法	8
一、两个波长近似值的确定(粗选波长对)	8
二、精选法	9
三、用单波长分光光度计进行双波长法测定的方法	9
第二章 系数倍率法	11
第一节 系数倍率法的基本原理	11
一、使用函数发生器的系数倍率法原理	11
二、系数倍率法在两组分体系中测定原理	13
三、系数倍率法在三组分体系中测定原理	14
四、测定波长对的确定	15
第二节 程序及框图	16
一、程序功能	16
二、计算方法简介	17
三、程序框图	20
四、程序清单	20
五、程序使用说明	23
六、计算实例	24

第三节 测定实例.....	26
一、系数倍率法测定常药降压片中氢氯噻嗪的含量	26
二、系数倍率法用于三组分体系——复方扑热息痛片的含量测定	28
第四节 双波长分光光度法的应用.....	33
参考文献	41
第三章 三波长分光光度法.....	45
第一节 基本原理.....	45
一、基本原理	45
二、波长组合的确定方法	47
三、一种新的算法	50
第二节 框图及程序.....	51
一、三波长法最佳分析波长组合选择程序	52
二、三波长法计算程序	59
第三节 测定方法和实例.....	65
一、溶剂系统的选择	65
二、初选三波长组合	66
三、精选三波长组合	67
四、建立工作曲线回归方程	68
五、样品测定	68
六、选择三波长组合对测定结果的影响	68
第四节 三波长分光光度法的应用.....	69
一、测定两组分混合物的含量	69
二、某些特殊三组分混合物的测定	70
参考文献	72
第四章 导数分光光度法.....	73
第一节 基本原理.....	73
一、导数光谱及获得导数光谱的方法	73
二、导数分光光度法定量测定原理	74
三、导数光谱消除干扰的原理	75

四、导数光谱消除干扰的方法	78
五、导数光谱定量计算方法	79
第二节 测定方法和步骤	85
一、绘制吸收曲线	85
二、确定测定参数	85
三、干扰组分的影响	86
四、测定	86
第三节 框图及程序	86
一、程序功能	86
二、程序框图	87
三、程序清单	88
四、程序使用说明	89
五、计算实例	91
第四节 导数分光光度法的应用	92
一、定量分析	93
二、微量及痕量分析	94
三、气体分析	94
四、定性分析	94
五、其它方面应用	96
参考文献	99
第五章 正交函数分光光度法	103
第一节 基本原理	103
一、吸收曲线的正交多项式回归模型	103
二、正交多项式的正交性	106
三、正交多项式的回归系数 P_j	107
四、吸收曲线的加和性	110
五、正交多项式系数 P_j 与待测组分的定量关系	111
六、 P_j 法	113
七、 ΔP_j 法	114

八、复合多项式法	115
第二节 测定方法	116
一、实验步骤	116
二、参数选择方法	117
三、应用实例	119
第三节 框图及程序	121
一、正交函数法最佳测定条件选择程序	121
二、正交函数 P_j 法计算程序	129
第四节 正交函数分光光度法的应用	134
一、 P_j 法的应用	135
二、 ΔP_j 法的应用	141
三、 P_w 法的应用	142
四、正交函数法在差示分光光度法中的应用—— $P_{j(r)}$ 法	144
五、多组分分析中的应用	144
六、其它方面的应用	144
参考文献	145
第六章 多波长线性回归法	148
第一节 原理与方法	148
一、多波长线性回归法在两组分体系中测定原理	148
二、多波长线性回归法在三组分体系中测定原理	149
第二节 框图和程序	151
一、程序功能	151
二、计算方法简介	151
三、程序框图	153
四、程序清单	153
五、程序使用说明	161
第三节 测定实例	163
一、多波长线性回归法用于两组分体系	163
二、多波长线性回归法用于三组分体系	163

参考文献	164
第七章 最小二乘法	165
第一节 解联立方程组法	165
第二节 最小二乘法原理与计算方法	166
一、计算方法简介	166
二、最小二乘紫外分光光度法	172
三、多元线性回归	172
四、最小二乘法测定波长位置的选择	173
第三节 框图及程序	175
一、程序功能	175
二、程序框图	175
三、程序清单	176
四、程序使用说明	178
五、处理实例及打印结果	179
第八章 线性规划法	181
第一节 基本原理	181
一、线性规划数学模型	181
二、适用于研究混合组分含量的线性规划模型及对偶线性规划模型	182
第二节 单纯形法及对偶单纯形法	185
一、单纯形法简介	185
二、对偶单纯形法简介	190
第三节 框图及程序	197
一、单纯形法框图	197
二、用于计算混合物中各组分含量的对偶单纯形法	197
三、程序清单	199
四、程序使用说明	203
五、计算实例	203
第四节 最小二乘法和线性规划法的应用	203

参考文献	205
第九章 卡尔曼滤波分光光度法	207
第一节 基本原理	207
一、数学模型	208
二、先决条件	209
三、递推公式	210
四、初始条件及噪声的确定	211
五、卡尔曼滤波公式表	211
第二节 框图及程序	212
一、程序功能	212
二、计算方法简介	212
三、程序框图	213
四、程序清单	214
五、程序使用说明	217
六、计算实例	218
第三节 测定方法及实例	219
一、确定溶剂系统	219
二、确定系数矩阵	220
三、样品测定	220
第四节 卡尔曼滤波分光光度法的应用	220
一、多组分混合物的同时测定	220
二、存在系统误差时多组分混合物的同时测定	221
三、组分数和浓度的同时测定	223
四、解决测量中线性漂移问题	224
五、其它方面的应用	225
参考文献	225
第十章 因子分析法	227
第一节 基本原理	227
一、概述	227

二、数学原理.....	228
第二节 框图及程序	232
一、程序功能.....	232
二、程序框图.....	232
三、程序清单.....	232
四、程序使用说明.....	243
第三节 测定实例及应用简介	244
一、测定实例.....	244
二、应用简介.....	249
参考文献.....	250
附录 矩阵代数一般知识	252

第一章 双波长分光光度法

第一节 双波长分光光度法基本原理

一、基本原理

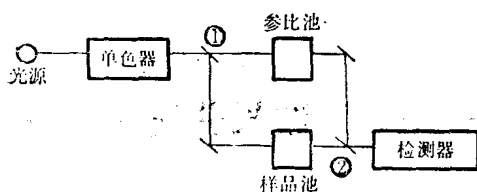
双波长分光光度法 (Dual-wavelength Spectrophotometry) 和经典的单波长分光光度法 (Single-wavelength Spectrophotometry) 相比, 在基本原理乃至仪器设计上均有根本不同。经典分光光度法中 [见图 1-1(a)], 入射光是同一波长的单色光, 分别通过样品池和参比池, 得到的信号是相对于参比溶液吸收为零的吸光度, 即

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} c L \quad (1-1)$$

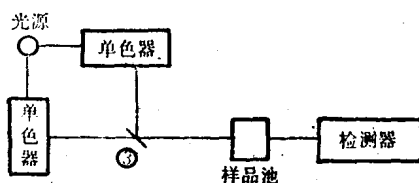
式中 A_{λ} 是样品溶液在某测定波长 λ 时的吸光度, L 是吸收池的厚度, c 是溶液中待测物质的浓度。此时, 由于吸收池的位置, 吸收池常数以及试样溶液和参比溶液之间的差别 (例如混浊度和溶液组成的差别) 等因素, 可能引起较大误差。但双波长分光光度法则不同, 从图 1-1(b) 中可见, 从光源发射出来的光线, 分别经过两个单色器 (光栅), 得到两道具具有不同波长 (λ_1 和 λ_2) 的单色光束, 并利用斩光器使这两道单色光分时交替通过同一盛有试样的吸收池, 得到的信号是试样溶液对两种单色光的吸光度的差值 ΔA , 即

$$\begin{aligned} \Delta A &= A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2} = \varepsilon_{\lambda_1} c L - \varepsilon_{\lambda_2} c L \\ &= (\varepsilon_{\lambda_1} - \varepsilon_{\lambda_2}) c L \end{aligned} \quad (1-2)$$

式(1-2)表明, 试样溶液在两个波长 λ_2, λ_1 的吸光度的差值



(a) 单波长



(b) 双波长

①, ②, ③为斩光器

图 1-1 双波长测定原理

44, 与溶液中待测物质的浓度成正比, 这就是双波长法进行定量测定的依据。

二、双波长分光光度法的优点

双波长分光光度法的最大特征是采用一个吸收池和两道不同波长的单光束(测定波长 λ_2 和参比波长 λ_1)来进行测量, 因而具有如下优点:

(1) 不用参比液池而只用一个液池进行测量, 能够消除由于两个吸收池位置的微小差异、池参数、池的污染及试样溶液和参比溶液之间的差别等因素引起的误差, 有利于提高测定的精确度。

(2) 只要适当选择两个波长 λ_1 和 λ_2 , 便能消除背景吸收的影响, 使高浓度试样和混浊试样的测定能够顺利进行。

(3) 依靠波长的适当组合,可以消除共存干扰组分的影响,大大简化了混合物同时测定的手续及其数据处理,并可提高测定的灵敏度和准确度。由此而派生出了双波长等吸收点法和双波长系数倍率法(见第二章),这两种方法用于混合物的测定。

(4) 对混浊试样的测定,在不能得到参比溶液时,可采用固定一个波长而另一个波长进行扫描的方法记录吸收光谱进行定量,故可用于混浊试样和随时间变化的混浊试样的测定。

(5) 如果用两个很接近(通常相差 $1\sim 2\text{ nm}$) 的波长 λ_1 和 λ_2 同时进行扫描,可以得到吸收曲线的一阶导数吸收光谱(即 $dA/d\lambda-\lambda$ 的曲线),还可以使用附属的导数光谱测定装置,得到电学上的二次、三次及四次导数光谱。利用导数光谱来进行定量测定,进一步扩大了分光光度法的应用范围(见第四章)。

(6) 应用双波长分光光度计,在 $0.01\sim 0.005$ 以下的吸光度也能检测出来,因而可以进行痕量物质的测定。

(7) 将 λ_1, λ_2 波长单独选定,用双笔记录仪,可对同一试样溶液中进行的两种化学反应同时测定。

(8) 用切换开关,仍可作为普通的单波长分光光度计使用,进行单波长分光光度法测定。

三、混浊样品的测定方法

如前所述双波长法对混浊样品测定有很好效果,目前这种方法已广泛应用到生化测定中。常用如下两种办法。

1. 用波长固定法测定

图 1-2 为细胞色素 C 的氧化还原反应各阶段的吸收光谱,为观测不同时间反应的变化情况,可选在反应进行中吸光度变化最大的波长 λ_2 作测定波长,并在附近的等吸收点处再选择作为参比波长 λ_1 ,这样测得的细胞色素的 ΔA 就可用于定量。

2. 用波长扫描法测定

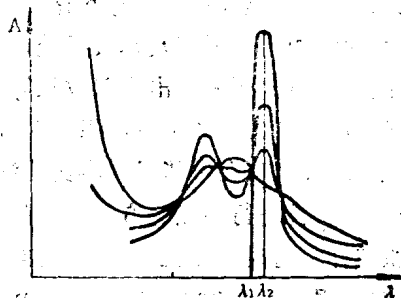


图 1-2 细胞色素 C 的吸收光谱

图 1-3 表示高混浊度胶片中钛的测定。图 1-3(a) 是增加混浊度所作的吸收光谱，随混浊度增加基线逐渐上升。如以 560 nm 作参比波长而加以固定后，另一波长在 520~580 nm 范围内进行扫描，就可扣除混浊度的影响即消去本底高而得到钛的吸收光谱，如图 1-3(b) 所示。当然也可用导数光谱来消除混浊的影响，具体见第四章。

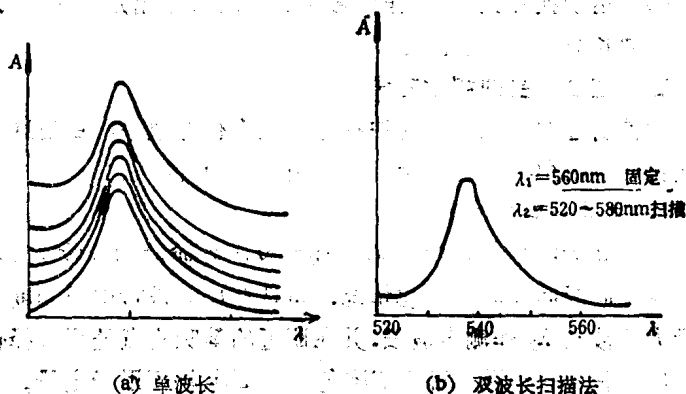


图 1-3 钛的测定

四、单组分的测定方法

双波长法在无机分析中应用甚广，除了消除混浊背景采用双波长法之外，双波长法还和胶束增溶分光光度法相结合，产生很好效果。胶束增溶分光光度法能大大提高测定灵敏度，与双波长法结合使用，不仅可以再提高灵敏度，而且可以提高方法的选择性。双波长法还广泛应用于金属离子与显色剂反应后的定量测定中，其中最为常用的就是双峰双波长法。为了进行双波长法测定，需要解决如何选择合适的波长 λ_1 和 λ_2 ，通常有如下三种方法。

1. λ_1 (络合物的最大吸收)—— λ_2 (等吸收点)

当金属离子与适当的显色剂进行显色反应时，在一组吸收曲线中通常具有一个或几个等吸收点。两个波长的合适位置通常可选择测定波长在络合物的最大吸收波长，而将参比波长选择在等吸收点。例如用羧基偶氮胂测定镉时，吸收曲线如图 1-4 所示，可选 $\lambda_1 = 590 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 660 \text{ nm}$ 。

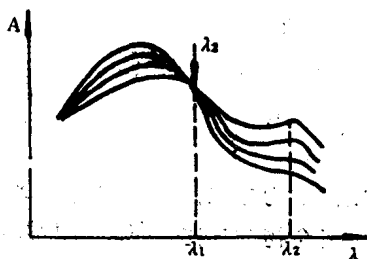


图 1-4 镉-羧基偶氮胂体系的吸收曲线

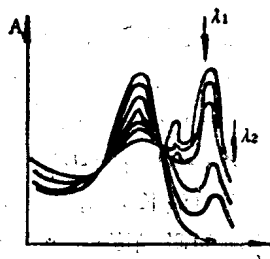


图 1-5 锌-偶氮胂体系吸收曲线

2. λ_1 (络合物最大吸收)—— λ_2 (吸收曲线下端的某一波长)

对于一个特定的有色体系，倘若没有可利用的等吸收点，或等