

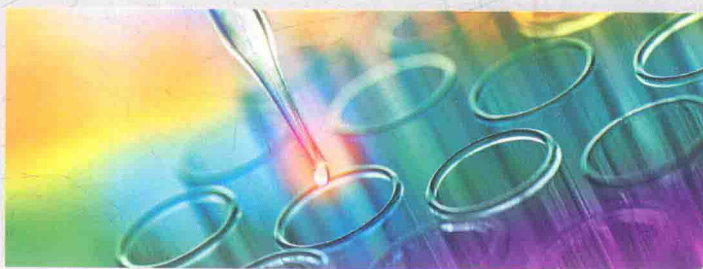


普通高等教育“十三五”规划教材

生物工程 分析与检验

(第二版)

ANALYSIS OF BIOENGINEERING
(2ND EDITION)



王福荣 主编



中国轻工业出版社 | 全国百佳图书出版单位

高等教育“十三五”规划教材

生物工程分析与检验 (第二版)

王福荣 主编

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工程分析与检验/王福荣主编. —2 版. —北京: 中国轻工业出版社, 2018. 1

普通高等教育“十三五”规划教材

ISBN 978 - 7 - 5184 - 1759 - 9

I. ①生… II. ①王… III. ①生物工程—化学分析—高等学校—教材
IV. ①Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 306206 号

责任编辑: 江 娟 车向前 策划编辑: 江 娟 责任终审: 唐是雯
整体设计: 锋尚设计 责任监印: 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 河北鑫兆源印刷有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2018 年 1 月第 2 版第 1 次印刷

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 13.75

字 数: 300 千字

书 号: ISBN 978 - 7 - 5184 - 1759 - 9 定价: 46.00 元

邮购电话: 010 - 65241695

发行电话: 010 - 85119835 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请与我社邮购联系调换

150106J1X201ZBW

前 言

本教材是在 2005 年出版的《生物工程分析与检验》的基础上修订而成,除了对生物工程分析检测技术进行了系统的阐述外,还特别详细深入地介绍了现代分析仪器的联用技术,如气质联用、液质联用及气相—气相、液相—液相二维联用技术,并对相关的典型应用实验做了介绍。为不失教材的完整性,还收集了 2005 年出版的《生物工程分析与检验》中的部分实验以供参考。

本教材由天津科技大学组织编写。第一篇理论部分的第一章、第二章、第三章、第四章由张燕编写,第五章由尹婉嫱编写,第六章由张朝正、王家明与北京市牛栏山酒厂李艳敏编写,第七章、第八章、第九章由张朝正编写。第二篇实验部分由张燕、张朝正、黄琳、尹婉嫱及北京牛栏山酒厂李艳敏编写。全书由王福荣主编,张燕副主编。

在教学过程中,各院校可以根据专业的特点与方向进行选择性的教学。

由于编者水平有限,在编写中难免有不妥之处,望读者批评指正。

编者

目 录

第一篇 理论部分	1
第一章 比色分析与分光光度分析	1
第一节 光的吸收定律	1
第二节 影响比尔定律的因素及消除方法	3
第三节 比色分析与分光光度分析	7
第四节 可见光分光光度计	11
第五节 紫外光分光光度分析	14
第二章 荧光分光光度分析	18
第一节 物质的荧光	18
第二节 荧光分光光度计主要部件及性能	19
第三节 荧光分光光度分析应用	21
第三章 原子吸收光谱分析	23
第一节 原子吸收光谱分析的基础理论	23
第二节 原子吸收光谱仪	25
第三节 原子吸收光谱干扰效应及消除方法	31
第四节 定量分析方法	35
第四章 电感耦合等离子体质谱分析	37
第一节 电感耦合等离子体质谱分析的基本原理	37
第二节 电感耦合等离子体质谱仪	38
第三节 定量分析方法	41
第五章 质谱分析	43
第一节 质谱仪的原理	43
第二节 离子源	46
第三节 质量分析器	50
第四节 质谱的定性与谱图解析	54
第六章 气相色谱分析	58
第一节 气相色谱分析的基本理论	58
第二节 气相色谱仪	63
第三节 定性定量分析方法	71
第四节 气相色谱分析的应用	73
第五节 气质联用仪	73
第七章 高效液相色谱分析	76
第一节 高效液相色谱的基础理论	76

第二节	高效液相色谱仪	79
第三节	超高效液相色谱仪	89
第四节	二维液相色谱技术	90
第五节	高效液相色谱样品的预处理技术	92
第六节	高效液相色谱的数据定量方法	93
第七节	液质联用分析法	94
第八章	离子色谱分析	103
第一节	离子色谱的基础理论	103
第二节	离子色谱仪	112
第三节	分析方法的选择	113
第四节	样品的前处理	119
第九章	氨基酸分析	122
第一节	氨基酸分析的基础理论	122
第二节	氨基酸分析仪	127
第三节	样品的前处理	130
第二篇	实验部分	132
第一章	糖类分析	132
第一节	原料中粗淀粉的测定（斐林法）	132
第二节	发酵液中还原糖的测定（斐林法）	135
第三节	麦芽糖化力的测定（碘量法）	136
第四节	五碳糖的测定（苔黑酚法）	138
第五节	原料中粗纤维素的测定	139
第二章	含氮量分析	141
第一节	原料中粗蛋白质的测定（凯氏定氮法）	141
第二节	酱油中氨基氮的测定（甲醛法）	144
第三节	蛋白质中氨基酸的测定（氨基酸分析法）	147
第三章	有机酸分析	152
第一节	白酒中总酸、挥发酸、非挥发酸的测定（中和法）	152
第二节	啤酒总酸度的测定（电位滴定法）	153
第三节	果醋中酒石酸、苹果酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸的测定（HPLC法）	154
第四章	香气成分分析	156
第一节	白酒中杂醇油测定	156
第二节	白酒中微量成分的测定（GC-MS法）	160
第三节	黄酒中挥发性香气成分的测定（GC-MS法）	162
第四节	葡萄酒中香气成分的测定（GC-MS法）	164
第五章	添加剂分析	167
第一节	食品中核苷酸的测定（HPLC法）	167

第二节 甜味素的测定 (HPLC 法)	169
第三节 糖精钠的测定 (HPLC 法)	172
第六章 元素分析	175
第一节 水硬度的测定 (络合滴定法)	175
第二节 白酒中重金属铅的测定 (原子吸收分光光度法)	178
第三节 白酒中重金属锰的测定 (原子吸收分光光度法)	180
第四节 酱油中重金属的同时测定 (ICP-MS 法)	181
第七章 农药残留及其他有害物分析	184
第一节 啤酒中农药残留的测定 (GC-MS 法)	184
第二节 葡萄酒中农药残留的测定 (GC-MS 法)	186
第三节 黄酒中氨基甲酸乙酯的测定 (GC-MS 法)	189
第四节 氨基甲酸酯类农药残留的测定 (HPLC 法)	190
第五节 酱油中黄曲霉毒素的测定 (HPLC 法)	193
第六节 腐乳中橘霉素的测定 (HPLC 法)	195
第七节 啤酒中无机阴离子的测定 (离子色谱法)	197
第八节 酱油中氯丙醇的测定 (GC-MS 法)	199
第九节 白酒中邻苯二甲酸酯的测定 (GC-MS 法)	200
参考文献	205

第一篇 理论部分

第一章 比色分析与分光光度分析

比色分析是将被测组分转变为有色化合物，并比较其颜色的深浅，以确定被测组分含量的分析方法。比色分析的定量关系是在 1852 年由德国物理学家比尔（Beer）确定的，即比尔定律。1887 年光电效应得到发现，进而产生了光电比色计和分光光度计。随着有机试剂的不断发现与广泛应用、仪器的不断更新，比色分析已成为重要的分析手段之一。

比色分析与分光光度分析都以比尔定律为定量基础，其不同点是比色分析是在可见光范围，用滤色片获得一定波长范围的单色光，而分光光度分析具有单色器，利用棱镜或光栅获得比较纯的单色光，因此，分光光度分析的测定范围可扩展到紫外或红外光区，测定溶液不限于有色溶液。

比色分析与分光光度分析的特点主要有以下三方面：

（1）应用广 不仅所有的金属都能用比色分析测定，而且能广泛应用于阴离子、非金属离子和许多有机化合物的分析中。

（2）简单、快速 在许多场合下，一个组分的存在不妨碍另一组分的测定。

（3）灵敏度高 比色分析测定浓度下限可达 $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ mol/L}$ ，而化学分析仅达 10^{-2} mol/L 。比色分析通常误差约 5%，在微量成分的测定中，其结果的准确度已是令人满意的。

第一节 光的吸收定律

物质的颜色是由对光的选择吸收所引起的。若物质对于通过它的光线（可见光）在全部波长范围的吸收程度相同，则物质呈现白色。若物质对于通过它的光线全部吸收，则物质呈现黑色。

当光线照射到物质上，一般能产生反射、吸收、透射三种情况。透明物质以吸收和透射为主，如红色玻璃能透过红光，并吸收其他颜色的光而呈现红色。不透明物质以反射和吸收为主，如红纸能反射红光，并吸收其他颜色的光而呈现红色。

光是一种电磁波，光量子的能量正比于光的频率，即服从于普朗克（Planck）定律：

$$E = h\nu$$

式中 E ——光量子能量

h ——普朗克常数 ($6.63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s/mol}$)

ν ——频率，Hz

实际工作中频率很少测量，而常用波长（ λ ）和波数（ ω ）表示，其关系为：

$$\lambda = c/\nu$$

式中 c ——光速（ 3×10^{10} cm/s）

λ ——波长，nm

注：1m = 10dm（ 10^{-1} m） = 100cm（ 10^{-2} m） = 1000mm（ 10^{-3} m） = 100 000 μ m（ 10^{-6} m） = 10 000 000nm（ 10^{-9} m） = 100 000 000 $\text{\AA}$ （ 10^{-10} m）

电磁波波长在 400 ~ 750nm 称为可见光区，200 ~ 400nm 称为紫外区，其中 100 ~ 200nm 称远紫外区，又称真空紫外区，200 ~ 400nm 称近紫外区，750nm 以上称为红外区。

波长与波数关系为：

$$\omega = 1/\lambda = \nu/c$$

光的吸收定律用于表明入射光强度和通过介质后的透射光强度间的关系，它是比色分析与分光光度分析的定量基础。

当一束强度为 I_0 的单色光通过吸收介质时，光的一部分被物质表面所反射（ I_r ），一部分被吸收（ I_a ），还有一部分透过了介质（ I ），其关系为：

$$I_0 = I_r + I_a + I$$

但对光滑的表面而言，光的反射仅占入射光的很小部分，如果用同样的液槽，则由于反射所引起的误差可以相互抵消。

$$I_0 = I_a + I$$

光的吸收与介质的厚度的关系，首先由布格和朗伯分别提出，后由比尔完善，故称朗伯—比尔定律。其内容为：当强度为 I_0 的光束透过一厚度为 dL 的吸收介质时，透射光强度的减弱 dI 与入射光强度及介质厚度成正比。

$$-dI = \mu I dL$$

式中 μ ——吸收系数，负号表示减弱。

将上式改写后再积分：

$$\begin{aligned} dI/I &= -\mu dL \\ \int_{I_0}^I dI/I &= -\mu \int_0^L dL \\ \ln I/I_0 &= -\mu L \\ I/I_0 &= e^{-\mu L} \end{aligned}$$

将自然对数改成常用对数

$$\lg I/I_0 = -0.4343\mu L = -kL$$

或

$$I/I_0 = 10^{-kL} = T$$

式中 k ——消光系数

T ——透光比

将 $I/I_0 = 10^{-kL}$ 改写成 $\lg I_0/I = kL = E$

式中 E ——消光值

这就是布格—朗伯定律。

叙述消光值与浓度间关系的定律称为比尔定律，这是比尔根据各种水溶液对红光的吸收研究中得到，它表明光的消光值与光路中的吸收分子数目有关，即与溶液浓度成正比。经同样推导，可以得到：

$$I / I_0 = 10^{-kc} \quad (\text{设液槽厚度一定})$$

此定律与朗伯—比尔定律合并得：

$$I / I_0 = 10^{-kcl}$$

即，

$$E = \lg I_0 / I = kcl$$

这就是比尔定律的数学表达式。式中 k 称为比消光系数，定义为单位浓度的消光系数，它与入射光波长和被测物质有关。 E 为消光值，其等值符号有 $O.D$ （光密度）与 A （吸收值或吸光度）。

如果溶液浓度以物质的量浓度 mol/L 表示，液层厚度以 cm 表示，则此常数称为摩尔消光系数，用 ε 表示，它的物理意义是：浓度为 1mol/L 的溶液，放在 1cm 的比色皿中，在一定的波长下测得的消光值。

表 1-1

比色分析的浓度极限与 ε 关系

有色物质	ε	浓度下限/(mol/L)	浓度上限/(mol/L)
硫氰化铁	1 000	0.2×10^{-4}	4×10^{-4}
钛与变色酸络合物	5 000	0.4×10^{-5}	8×10^{-5}
金属的双硫脲盐	50 000	4×10^{-7}	8×10^{-6}
花色素苷染料	100 000	2×10^{-7}	4×10^{-6}

ε 是溶液吸收光能力的量度。 ε 越大，单位摩尔浓度的有色化合物的颜色越深，测定灵敏度越高，即可测定的浓度越低。因此， ε 值是判断有色物质能否作为比色分析的重要数据。同时，对每种化合物来讲，在一定波长下的 ε 值又是一个特征常数，故又可作为物质定性的重要数据，往往在药物分析中被采用（表 1-1）。

第二节 影响比尔定律的因素及消除方法

一、显色反应及显色剂

比色分析首先要将被测组分与显色剂作用，通过显色反应转变为有色化合物，而显色反应主要有氧化还原反应及络合物形成反应两大类。

（一）氧化还原反应显色

这类反应是完全反应，所生成的有色化合物几乎不解离。

例如测定锰时，氧化剂可将二价锰氧化为紫红色高锰酸根离子。测定铬时，可将三价铬氧化为黄色的铬酸根（ CrO_4^{2-} ）或重铬酸根（ $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ）离子。又如蛋白酶活力测定时蛋白酶将酪蛋白分解生成酪氨酸，其中酪氨酸中酚基又能将黄色的磷钼酸与磷钨酸中六价钼与六价钨还原生成深蓝色的五价的钼蓝与钨蓝，使溶液颜色明显加深，不但能测定酶活力，而且还能提高测定灵敏度。

（二）络合反应显色

这类反应在比色分析中应用最多，通过使被测物质与试剂生成络合物或螯合物（内络合物），而显示较深的颜色。

例如, 浅蓝色的二价铜离子在氨水溶液中生成铜氨络离子而呈现深蓝色。二价镍与乙二酞二肟 (丁二肟) 生成红色螯合物。

(三) 显色剂

可分为无机显色剂与有机显色剂两大类。

1. 无机显色剂

最常用的无机显色剂有硫氰酸盐 (可测定铁、钼、钴等)、过氧化氢 (可测定钛、钒等)、钼酸铵 (可测定磷、硅等)。由于无机显色剂的选择性与灵敏度不高, 故应用不广泛。

2. 有机显色剂

有机显色剂在比色分析中应用极为广泛, 大部分元素的比色分析测定都应用有机显色剂, 它与金属离子一般能生成比较稳定的螯合物, 而且具有特征颜色, 选择性与灵敏度都较高。不少螯合物又易溶于有机溶剂, 它们在有机溶剂中的溶解度往往比在水中大得多, 而离解度比在水中小得多, 故用有机溶剂萃取后颜色加深, 可使测定灵敏度提高, 同时还可分离干扰离子, 提高比色分析的选择性。这种通过有机溶剂萃取进行比色分析的方法称为萃取比色法。

有机显色剂种类很多, 现已应用于比色分析中的有 600 多种, 其结构大致可分为三类。

(1) 含羟基 ($-\text{OH}$) 的有机酸或染料 它们能与金属离子形成稳定的螯合物, 如水杨酸、磺基水杨酸测定铁, 茜素测定铝等。

(2) 含巯基 ($-\text{SH}$) 的有机试剂 它们能与许多金属形成络合物, 如双硫腙测定白酒中铅、锌。

(3) 含氮 ($=\text{NH}$, $-\text{NOH}$, $-\text{NO}$, $-\text{N}=\text{N}-$) 的有机试剂 如 8-羟基喹啉测定铝、铁等。

二、影响显色反应的因素及消除方法

比尔定律仅回答吸光度与浓度的关系, 它不能回答形成有色物质的条件, 能影响显色反应的因素很多, 主要有以下几方面:

(一) 络合物解离度的影响

设 XR 为有色络合物, X 为被测物质, R 为显色剂, 则 XR 的解离平衡为:



对 AB 型有色络合物而言, 设络合物浓度为 C , 离解度为 α ,



$$(1 - \alpha) C \quad \alpha C \quad \alpha C$$

$$K = (\alpha C)^2 / (1 - \alpha) C$$

式中 XR 浓度 $(1 - \alpha) C$ 近似 C , 即解离的浓度对络合物的影响较小, 则

$$K = (\alpha C)^2 / C = \alpha^2 C$$

$$\alpha = \sqrt{K/C}$$

式中 K ——有色络合物解离常数, 为一固定值, 故有色溶液在进行稀释时 α 就增大, 有色络合物分子数就减少, 测得吸光度 A 就低, 从而产生误差 (Δ)。

$$\Delta = (A_0 - A_n) / A_0$$

式中 A_0 ——稀释前有色物质吸光度

A_n ——稀释 n 倍后有色物质吸光度。可以推导：

$$\Delta = \alpha_n - \alpha_0$$

式中 α_0 ——稀释前有色络合物解离度

α_n ——稀释 n 倍后有色络合物解离度

从上式可知，稀释能使有色络合物解离度增大，因此，稀释度越大，测定误差越大。为减小有色络合物解离度的影响，应注意以下几点：

- (1) 选择有色络合物解离度应越小越好，即 XR 应很稳定。
- (2) 若有色络合物解离度较大，可采用有机溶剂萃取入有机层进行比色。
- (3) 形成有色络合物后，最好不稀释而直接进行比色测定。

(二) 试剂浓度影响

试剂浓度主要影响有色络合物的解离度。一般来讲，试剂需过量，但大量过量时应考虑到络合物配位数的改变和别的组分是否也能形成有色络合物，故在每次测量时的试剂浓度应为一个定值，以减少误差。

例如，铁与硫氰酸根形成硫氰酸铁络合物时生成 $\text{Fe}(\text{CNS})^{2+}$ ，当试剂过量 10 倍时影响不大，但过量 100 倍时，由于形成较多的配位数的络合物，如 $\text{Fe}(\text{CNS})_2^+$ 、 $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ 等，而使颜色逐渐加深。当稀释时，由于溶液中硫氰酸根离子的绝对浓度减小，配位又向少的方向移动，色泽变浅。但当溶液中 CNS^- 浓度控制在 0.025mol/L 时，吸光度保持不变。

(三) 氢离子浓度影响

氢离子浓度对氧化还原反应和络合物形成显色反应都有影响，这里仅对络合物形成显色反应加以讨论。

1. 酸度不同，能形成不同配位数的有色络合物。

例如，水杨酸与铁形成络合物时：

pH < 4 生成 $\text{Fe}(\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_3)^{2+}$ 呈紫色

pH 4 ~ 9 生成 $\text{Fe}(\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_3)_2^+$ 呈红色

pH 9 ~ 11.5 生成 $\text{Fe}(\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_3)_3$ 呈黄色

2. 酸度降低，能引起金属离子水解。

上例中，当 pH > 12 时， Fe^{3+} 水解生成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀，无法进行比色测定。

3. 酸度升高，能使有色络合物分离，特别是金属与弱酸阴离子所形成的有色络合物。所以，酸度在比色分析中一定要严格控制。

(四) 放置时间影响

被测物质与显色剂的显色反应，一般来讲并不是立即完成。若将显色时间与有色络合物的吸光度作图，此曲线称为发色曲线。发色曲线一般有下列三种类型（图 1-1）。

图 1-1 (1) 表示，当加入显色剂后立即显色而且色泽很稳定。这种情况下可在加入显色剂后立即进行比色测定，但在 120min 后颜色渐渐褪去。因此，比色分析需在 120min 内完成。

图 1-1 (2) 表示，当显色剂加入后，颜色随时间延长而加深，至 15min 后，色泽才

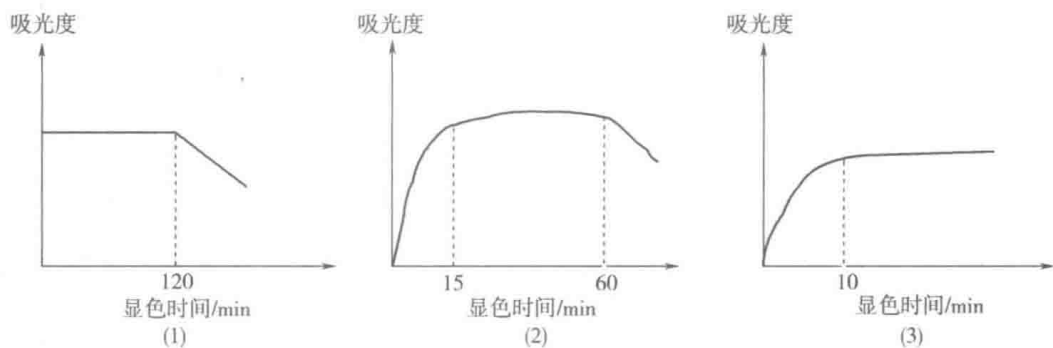


图 1-1 三种典型发色曲线

趋于稳定，直至 60min 后，颜色渐褪，故比色分析应在加入显色剂后 15min 至 60min 之间完成。

图 1-1（3）表示，当加入显色剂后，颜色需 10min 后才稳定，而且稳定时间很长。

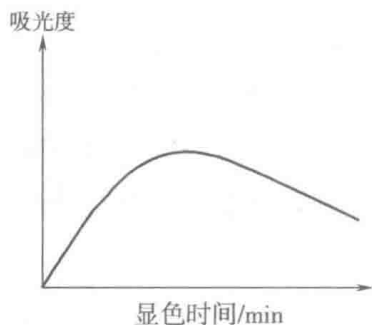


图 1-2 特殊发色曲线

另一种情况是发色曲线上无明显稳定段（图 1-2），这种情况一般不宜用于比色分析。若需进行比色测定，则标准样与试样应在同一时间内尽快完成，该情况实例为白酒中甲醇亚硫酸品红比色测定的吸收曲线。

（五）温度影响

温度对有色络合物的发色曲线影响最大。一般来讲，提高显色温度，能加快色泽达到稳定的速度。

例如，蛋白酶活力测定时，钼蓝与钨蓝的显色需在 40℃ 水浴中，经 20min 后色泽稳定。

但甲醇与亚硫酸品红的显色反应若超过 40℃，则色泽很快褪去。

（六）干扰离子影响

干扰离子的影响归纳起来可分为以下几个方面。

（1）干扰离子与显色剂也能形成有色络合物 如水杨酸测定铁时与铜离子也能形成有色络合物而干扰测定。这种情况下可采用控制显色剂用量来解决，但前提是水杨酸铁比水杨酸铜络合物更稳定。若显色剂是弱酸阴离子，则可控制溶液酸度（ pH ）来解决。

（2）干扰离子与显色试剂结合，妨碍与被测组分形成有色络合物 如水杨酸测铁时，铝离子能与水杨酸形成无色络合物，从而妨碍了水杨酸与铁形成有色络合物，这种情况下可采用过量显色剂来解决。

（3）干扰离子本身具有颜色 这种情况下可将被测组分的有色络合物萃取入有机层中比色。若干扰离子的颜色与被测组分的有色络合物颜色不一样时，可选择合适波长，以消除干扰离子的色泽影响。

（4）干扰离子是一种阴离子，它能与被测组分形成稳定的难解离的化合物 这种情况下可采用在标准溶液中加入相同量的阴离子，但一般来讲，阴离子的干扰较小。

若通过上述办法仍未能消除干扰离子的影响,则只能通过试样前处理,使用消化(湿法或干法)、沉淀、共沉淀、萃取、蒸馏、层析、离子交换树脂等办法消除干扰离子的影响。

第三节 比色分析与分光光度分析

一、单色光的必要性与波长的选择

比尔定律仅适用于单色光,在入射光为单色光的条件下,吸光度与浓度呈线性关系,图 1-3 所示为高锰酸钾水溶液的吸收曲线。

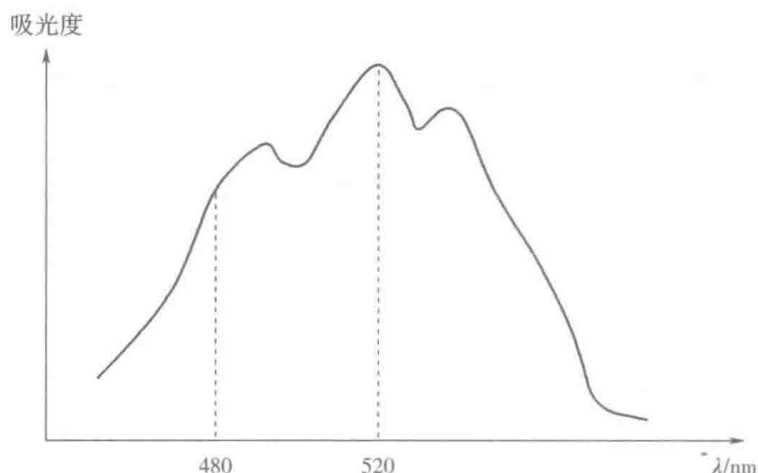


图 1-3 高锰酸钾水溶液的吸收曲线

合适的单色光选择可以提高比色分析的灵敏度,并扩大比色分析的可能性。一般来讲,比色分析能适用于任何一定波长的单色光,但不同波长的单色光所测得的吸光度都不相同,且相差很大。图 1-3 中,用 480nm 测得的吸光度较 520nm 测得的吸光度值要小得多。因此,在 480nm 的工作曲线斜率比 520nm 的工作曲线斜率要小,也就是说,在 480nm 波长进行高锰酸钾溶液的比色测定,其灵敏度较 520nm 波长处低得多。因此,为提高测定灵敏度,单色光的波长选择应是吸收曲线中吸光度最大处的波长。

纯粹的单色光仅是理想状况,很难得到。比色分析与分光光度分析中所用的滤色片、棱镜、光栅等获得的单色光都是具有一定波长范围的“波带”,若在此“波带”范围内,有色物质的吸光系数相差不大,则仍能符合比尔定律。

二、定性分析

溶液的吸光度随波长变化的曲线称为吸收曲线。物质的吸收曲线可以有一个吸收峰,也可有多个吸收峰。在一定条件下,物质的吸收曲线是一定的,它可作为物质定性分析的依据,即具有相似吸收曲线的物质可以初步视为同一物质。

对具有多个吸收峰的吸收曲线来讲,吸收峰下的吸收系数之比可作为该物质的定性指标。如维生素 B₁₂ 水溶液具有三个吸收峰,分别为 278nm、361nm 和 550nm,它们相应的

1% 吸收系数之比是定值，这可以作为定性维生素 B_{12} 依据。不同波长下的 1% 吸收系数：278nm 时为 119，361nm 时为 207，550nm 时为 63。药典规定鉴别条件为：361nm/278nm 下 1% 吸收系数比值为 1.70 ~ 1.88，361nm/550nm 下 1% 吸收系数比值为 3.15 ~ 3.45，即可确定为维生素 B_{12} 。

三、定量分析

1. 工作曲线

对单一物质的比色分析或分光光度分析的定量一般采用标准曲线法。配制一系列浓度梯度的标准溶液，并按一定条件显色，测得相应的吸光度，绘制标准溶液浓度对吸光度的曲线，即为标准曲线。试样也在相同条件下显色，并测定吸光度，从标准曲线中可以求得试样组分浓度，也可用标准曲线的回归方程求得试样组分浓度。

理想的工作曲线应是通过原点的直线。但在实际工作中，工作曲线往往发生弯曲，不通过原点，甚至重现性差。这些偏差的原因主要有入射光不是单色光、溶液浓度过大或过小、有色络合物质的组成改变或发生解离、仪器的重现性差等。

常见偏离比尔定律的工作曲线有以下几种（图 1-4）：

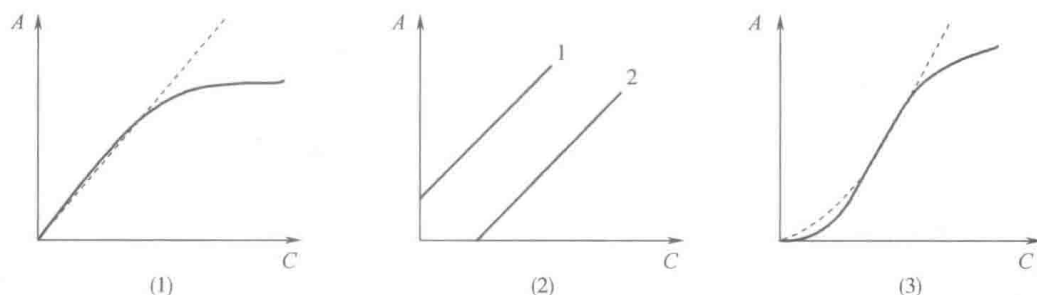


图 1-4 常见偏离比尔定律的工作曲线

工作曲线 (1)：当浓度高时，工作曲线发生弯曲。其原因是单色光不纯、被测物浓度太高使有色化合物发生解离、缔合和形成新的有色化合物等。如定磷法测定核酸时，工作曲线似 (1)，拐点处磷的浓度为 $10\mu\text{g/mL}$ 。对于这类工作曲线，其被测物质浓度一定要在拐点以下，否则测定结果偏低。

工作曲线 (2)：工作曲线不通过原点。其中曲线 1 可能是由于空白溶液的选择不当引起。这种情况可通过试剂空白加以克服，即空白溶液中除被测组分外，应加入同样量的各种试剂。曲线 2 可能是由于被测物浓度太低，显色反应灵敏度不够，这种情况下应提高被测物质浓度的测量范围，或寻找更灵敏的显色剂。

工作曲线 (3)：在低浓度与高浓度下都偏离比尔定律，仅在一定浓度范围内符合比尔定律。亚硫酸品红测定白酒中甲醇的工作曲线形状如工作曲线 (3) 所示，二个拐点处甲醇浓度分别为 0.06% 和 0.12%，这种情况只能采用直线段测定甲醇含量。然而白酒中甲醇含量甚低，其要求是落在下段弯曲处，故白酒中甲醇亚硫酸品红法测定工作曲线为下段弯曲曲线。

以上讨论仅是初步的，实际工作中，要求工作曲线斜率大、重现性好，否则应从试

剂、温度、酸度、操作技术、仪器性能等检查原因。

2. 吸收系数或摩尔吸收系数定量

当物质的浓度为 1%，比色皿厚度约为 1cm 时，在一定波长下测得的物质吸光度值称为 1% 吸收系数，又称比吸收系数，用 $A_{1\text{cm}}^{1\%}\lambda$ 表示。同样当物质的浓度为 1mol/L 时，比色皿厚度为 1cm，此时的吸光度称为摩尔吸收系数，用 ε 表示。两者的关系为：

$$A_{1\text{cm}}^{1\%}\lambda = \varepsilon \times \frac{10}{M}$$

式中 M ——该物质的摩尔质量

知道了物质的比吸收系数或摩尔吸收系数，就可直接通过计算求得被测物质的含量。

$$C(\text{g}/100\text{mL}) = \frac{A_{1\text{cm}}^C}{A_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

式中 $A_{1\text{cm}}^{1\%}\lambda$ ——物质的比吸收系数

$A_{1\text{cm}}^C$ ——被测物质在相同条件下的吸光度

$$\text{或} \quad C(\text{g}/\text{L}) = \frac{A_{1\text{cm}}^C \times M \times 1(\%) }{\varepsilon}$$

式中 $A_{1\text{cm}}^C$ ——被测物质在相同条件下的吸光度

M ——被测物质的摩尔质量 (g/mol)

ε ——被测物质的摩尔吸收系数

例，AMP（腺嘌呤核苷 5'-单磷酸）溶液，在 260nm 处测得的吸光度为 0.300，已知 AMP 摩尔质量为 347.22g， ε 为 14200，求 AMP 溶液浓度。

$$C(\text{g}/\text{L}) = \frac{A_{1\text{cm}}^C \times M \times 1}{\varepsilon} = \frac{0.300 \times 347.22 \times 1}{14200} = 7.34 \times 10^{-3}$$

若以比吸收系数计算：

$$C(\text{g}/100\text{mL}) = \frac{A_{1\text{cm}}^C}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} = \frac{A_{1\text{cm}}^C}{\varepsilon \times \frac{10}{M}} = \frac{0.300}{14200 \times \frac{10}{347.22}} = 7.34 \times 10^{-4}$$

3. 多波长定量方法

(1) 解联立方程法，又称二点法

使用该方法作为混合物测定时必须知道每组分纯品在一定波长下的比吸收系数或摩尔吸收系数。图 1-5 是二组分的吸收曲线，它们相互重叠，用单一波长测定其中某一组分含量时，另一组分明显有干扰。但可根据吸光度的加和原则，在 a 和 b 两条吸收曲线的最大吸收波长 λ_1 和 λ_2 处分别测定混合物的吸光度 $A_{\lambda_1}^{a+b}$ 和 $A_{\lambda_2}^{a+b}$ 。

根据比尔定律建立联立方程：

$$\begin{aligned} A_{\lambda_1}^{a+b} &= A_{\lambda_1}^a + A_{\lambda_1}^b = [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_1}^a \times C_a + [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_1}^b \times C_b \\ A_{\lambda_2}^{a+b} &= A_{\lambda_2}^a + A_{\lambda_2}^b = [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_2}^a \times C_a + [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_2}^b \times C_b \end{aligned}$$

解联立方程得

$$\begin{aligned} C_a &= \frac{A_{\lambda_1}^{a+b} \times [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_2}^b - A_{\lambda_2}^{a+b} \times [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_1}^b}{[A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_1}^a \times [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_2}^b - [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_2}^a \times [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_1}^b} \\ C_b &= \frac{A_{\lambda_2}^{a+b} \times [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_1}^b - A_{\lambda_1}^{a+b} \times [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_2}^b}{[A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_1}^a \times [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_2}^b - [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_2}^a \times [A_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_1}^b} \end{aligned}$$

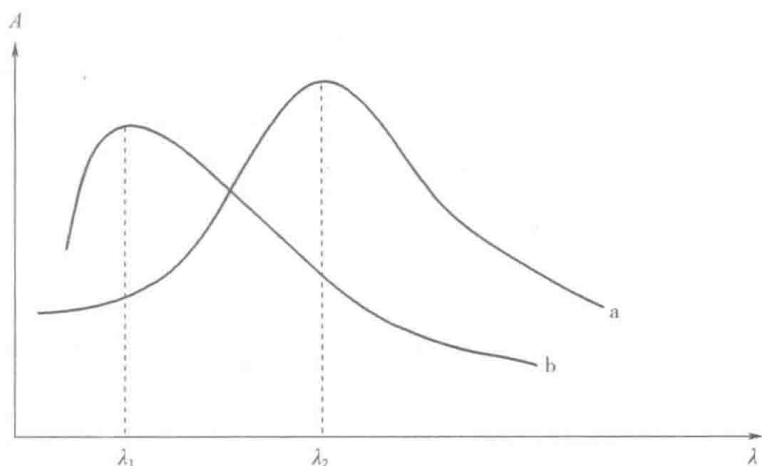


图 1-5 吸收曲线

例，高锰酸钾和重铬酸钾混合溶液的分析

先分别在波长 $\lambda_{450\text{nm}}$ 和 $\lambda_{520\text{nm}}$ 测定高锰酸钾和重铬酸钾的 1% 比吸收系数，然后，测定两个波长下的未知混合溶液的吸光度，进而分别求得混合液中高锰酸钾与重铬酸钾的含量。

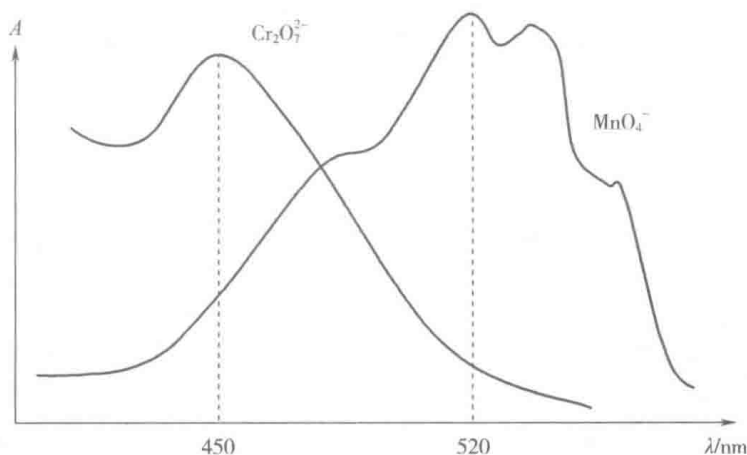


图 1-6 高锰酸钾与重铬酸钾水溶液吸收曲线

(2) 四波长分析法

例：高粱中直链淀粉与支链淀粉的测定

高粱经脱脂后，用氢氧化钾于沸水浴中提取淀粉，在 pH3.5 下用碘显色，其中直链淀粉呈蓝色，支链淀粉呈橙色。直链淀粉与支链淀粉吸收曲线见图 1-7 所示。

从图 1-7 可以看出，取 λ_1 与 λ_2 时吸光度值差，反映出支链淀粉（1）的吸光度差值，而 λ_4 与 λ_3 时吸光度值差，反映出直链淀粉（2）的吸光度差值。故可用标准支链淀粉和直链淀粉经碘显色后分别用 $A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$ 及 $A_{\lambda_4} - A_{\lambda_3}$ 作支链淀粉与直链淀粉标准曲线，然后将高粱淀粉的 $A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$ 及 $A_{\lambda_4} - A_{\lambda_3}$ 值，分别从标准曲线中求得高粱淀粉中支链淀粉和直链淀粉含量。