

学校编号: 10384 分类号_____ 密级_____

学 号: 9525007 UDC _____

厦门大学学位论文

荧光分析的数值与计算机方法

吴剑鸣

指 导 老 师 : 赵一兵 副教授

申请学位级别: 硕士

专 业 名 称 : 分析化学

论文提交日期: 1998.7

论文答辩日期: 1998.8

学位授予单位和日期: 厦门大学 1998 年 月 日

答辩委员会主席: 教授

评阅人:

1998 年 月 日

Digital & Computer Methods of Fluorescence Analysis

A dissertation submitted for the degree of
Master of Science
at Xiamen University

by

Wu Jianming

Supervisor: Associate Professor Zhao Yi-Bing

July, 1998

摘 要

本论文根据可变角同步荧光技术理论，利用数值与计算机方法对仪器产生的荧光激发发射光谱矩阵进行再处理，获得可变角同步荧光光谱以及非线性可变角同步荧光光谱。

本论文由以下三部分组成：

- 第一部分 可变角同步荧光光谱
- 第二部分 Fluowave 的研制与功能介绍
- 第三部分 Fluowave 在多组份体系中的应用

第一部分全面深入地阐述了可变角同步荧光光谱技术理论。同步扫描荧光光谱是由 Lloyd^[1] 首先提出的以同步波长扫描技术所获得的荧光光谱。同步波长扫描技术，即是指在扫描过程中，激发和发射单色器以相同或不同速率同时进行扫描。同步扫描荧光光谱可以分为三类：

- 固定波长同步荧光光谱(CWSSF)
- 恒能量同步荧光光谱(CESSF)
- 可变角同步荧光光谱(VASSF)

VASSF 还可以分为的可变波数同步荧光光谱(VAESSF)和波长域中的可变波长同步荧光光谱(VAWSSF)。在能量域中的荧光光谱，无论是激发、发射光谱，CESSF，还是 VAESSF 都呈高斯分布，可以分别用不同的高斯分布函数来表示。CWSSF 与部分 VAWSSF 在能量域中的中可以近似为高斯分布，因此可以用高斯分布函数来构造这些同步荧光光谱，但仍然无法构造各种情况下的荧光光谱。相对于 CESSF 的 VAESSF 的有利之处不在于它可能使“峰变窄”，而是它有能力使扫描路径经过混合物中某荧光物质的峰值处，或者避开原有的干扰峰，有利于改善方法的选择性。非线性 VAESSF/VAWSSF 大都采用折线为扫描路径，它可以在一次扫描过程中，扫描经过所有待测峰，并可以有选择地避开干扰峰，有利于多组份同时测定。

导数技术的引入可以提高这些同步光谱方法用于实际分析的分辨率和选择性。

第二部分全面介绍了自行开发的 Fluowave 三维荧光光谱可边角处理软件的 α 版本的功能和研制开发过程。由于用于恒能量和可变角同步荧光法的荧光

分光计难以获得，且在仪器设计方面，要实现这些功能比起普通的荧光计难度要大许多，因而限制了这方面的研究和应用。我们自行研制的 Fluowave 在现有的仪器条件所产生的三维荧光激发发射矩阵数据中，按照所需的可变角路径截取荧光数据，并绘制可变角荧光光谱。它使今后的荧光分析工作者无需再特别购置额外的用于可边角同步荧光法的荧光分光计，而可以直接实现所需功能。Fluowave 的设计思路早在 1984 年就由 Clark 等人提出，但被认为是耗时的和不利于实际应用的。这是由于当初计算机的计算能力远不如现在的强大。同时光谱新技术的推出使得获得三维光谱的时间大为缩短。原来需要几个小时甚至更多的时间来获得的三维光谱数据现在只要转眼间即可获得。现在普通微机的计算能力绝不亚于当时的小型机甚至接近中型计算机的计算能力。处理这些三维数据所需时间也在转瞬之间。并且软件技术的发展使得 Fluowave 能够使用户无需作特殊训练即可轻松操作使用。

该软件以 VB5.0 为开发环境，以 Windows 95 为运行环境，用户界面友好，全鼠标操作。Fluowave 以荧光分光光度计上（现阶段为 Hitachi F-4500 荧光分光光度计）产生的原始的三维荧光数据文件为数据来源，绘制三维等高线荧光光谱，并可以利用鼠标在该等高线荧光光谱或其它荧光光谱上的随意位置获取当前位置的激发、发射坐标及相应的荧光值；以及绘制当前鼠标位置所在的激发光谱、发射光谱；用鼠标在该等高线图上划直线和折线所相应产生的可变角同步荧光光谱和非线性可变角同步荧光光谱；所产生的三维、可变角、非线性可变角谱图数值可以以 ASCII 码形式输出，谱图坐标可随意更改；具有同等参数的谱图可重叠显示；可变角/非线性可变角路径可存储并反复调用；可以即时扣除三维背景。

第三部分 Fluowave 在多组份体系中的应用是以现实体系——蒽、胺蒽与 Perylene 的混合体系为例来更细致的讲述 Fluowave 的实际用途。分别对各个单组份的三维等高线荧光光谱以及它们相互重叠的情况进行研究，我们选择出一条较合适的非线性可变角路径，对三个组份进行测定，结果良好。接着，通过考察被测定点在不同浓度的干扰物质存在时的荧光强度值变化情况，对该方法进行可靠性评估。三个组份相互间的干扰都没有趋势性，属偶然误差。在不考虑其它存在物质的干扰下，用以上所选择的 NLVAW 路径可以对蒽、胺蒽和 Perylene 进行同时测定。

另外，还可以选择不同的 NLVAW 扫描路径，分别进行评估比较，找出最好的扫描路径用于定量测定。

总之，Fluowave 以其友好的界面，简单的操作以及特有的，无需特殊仪器，

即可获得 VAW 和 NLVAW 光谱的功能，为分析工作者们提供了一个灵活的工具和有力的方法。配合其它一些图形软件以及数据处理软件，或者是加入导数、多元线性分析等化学计量学方法，可以使 Fluowave 更好地发挥他的功能。同时也将因此推动 VAWSSF 及 NLVAWSSF 的进一步研究和推广。Fluowave 现在仅为 1.0 α 版本，许多功能尚未开发，同时也存在不少问题需要不断修正。

目 录

第一部分 可变角同步荧光光谱	7
第一章 前 言.....	7
一. 同步荧光光谱	8
二. 同步荧光光谱的种类.....	11
1 固定波长同步荧光光谱(CWSSF).....	11
2 恒能量同步荧光光谱(CESSF).....	13
3 可变角同步荧光光谱(VASSF).....	14
第二章 同步荧光光谱理论	17
一. 恒能量同步荧光光谱(CESSF).....	20
二. 可变波数同步荧光光谱	26
三. 能量域与波长域中的 CWSSF 和 VAWSSF.....	33
四. 多组份体系中的分辨率	42
第二部分 Fluowave 的研制与功能介绍	54
第一章 前 言.....	54
第二章 Fluowave 的研制与开发.....	56
一. 软硬件条件.....	56
1. 硬件	56
2. 软件	56
二. 数据文件解码	57
1. 数据来源及解码的必要性.....	57
2. 数据文件分析	57
1) 分析解码目标	57
2) 参数分析原理（文件头分析）	60
3) 荧光数据分析（EEM 分析）.....	60
4) 编制 Visual Basic 文件解析子程序 analdata().....	60
三. 三维等高线光谱(Contour)绘制原理.....	63
四. 激发、发射光谱绘制原理.....	64

五.	VAW 光谱绘制原理	66
六.	非线性 VAW 光谱绘制原理	67
第三章	Fluowave 功能介绍及使用说明	68
一.	运行环境及其安装	68
1.	运行环境	68
1)	硬件条件	68
2)	软件条件 (操作系统)	68
2.	安装	68
二.	主要功能介绍	70
1.	简介	70
2.	基本程序界面	70
1)	标题栏	71
2)	主菜单	71
3)	样品名称及说明 (sample & Comment).....	74
4)	等高线图区 (contour 区)	75
5)	激发光谱区和发射光谱区	75
6)	参数表示板	77
7)	消息框	78
8)	系统时间	78
9)	弹出式菜单 (popup menu): 等高线荧光光谱图及可 变角荧光光谱功能菜单。	79
A.	VAWSSF: 激活 VAWSSF 截取功能	79
B.	NLVAWSSF: 激活 NLVAWSSF 截取功能	79
C.	Contour steps: 设置等高线图的阶数	80
D.	Redraw contour: 重新绘制等高线荧光光谱	80
E.	Input Function: 输入可变角线性方程	82
F.	Save Function: 存储方程	82
G.	Load Function: 调入方程	83
3.	功能展示	83
第三部分	Fluowave 在多组份体系中的应用	98
第一章	单组份及混合组份的三维荧光光谱	98
一.	各个单组份的三维荧光等高线光谱	98
1.	葱的三维等高线荧光光谱	98
2.	胺葱的三维等高线荧光光谱	100
3.	Perylene 的三维等高线荧光光谱	101
4.	溶剂 (环己烷) 为背景的三维等高线荧光光谱	102

二.	各个单组份的三维荧光等高线光谱重叠比较.....	103
1.	葱与胺葱的三维等高线荧光光谱重叠比较	103
2.	葱与 Perylene 的三维等高线荧光光谱重叠比较	104
3.	Perylene 与胺葱的三维等高线荧光光谱重叠比较.....	105
4.	葱、胺葱和 Perylene 的三维等高线荧光光谱重叠比较.....	106
第二章	实验结果与讨论.....	108
一.	NLVAW 扫描路径.....	108
二.	各组份测定结果.....	109
1.	混合组份中测葱.....	109
2.	混合组份中测胺葱.....	110
3.	混合组份中测 Perylene	112
三.	方法的可靠性评估	113
1.	葱对胺葱与 Perylene 的干扰情况	113
2.	胺葱对葱与 Perylene 的干扰情况	114
3.	Perylene 对葱与胺葱的干扰情况	116
四.	讨论	118
1.	灵敏度.....	118
2.	检测限.....	118
3.	多组扫描路径	118
参考文献	120

第一部分 可变角同步荧光光谱

第一章 前言

常用的发光（荧光或磷光）分析中，一般只获得两种基本类型的光谱：激发光谱和发射光谱。同步扫描荧光光谱是由 Lloyd^[1] 首先提出的以同步波长扫描技术所获得的荧光光谱。同步波长扫描技术，即是指在扫描过程中，激发和发射单色器以相同或不同速率同时进行扫描，后者亦

称为可变角同步荧光扫描技术。

一. 同步荧光光谱

分子的荧光强度是激发波长、发射波长和荧光寿命三个独立变量的方程。因而潜在地，荧光分析法的选择性较分光光度法好，但事实证明，这一理论上的选择性优势常难以实现。其原因在于激发和发射光谱的特征峰较宽，而且在时域中测量需要有特殊的仪器。因而长期以来，人

们一直在探索如何发挥荧光光谱可测量参量多，选择性好的潜在优势。

比较显著的研究成果有：

- 1 利用低温使谱带变窄^[3]
- 2 获取完整的激发、发射光谱矩阵^[4]
- 3 导数光谱^[5]
- 4 同步扫描技术^[1, 6-9]

同步荧光光谱可以由荧光强度对光子能量(cm^{-1})的高斯分布来

构造。其峰位置，峰宽和荧光强度可以通过在能量域中的固定波长同步扫描和可变角同步扫描获得。激发和发射光谱的线性变换和乘积也可产生适当的同步荧光光谱。在波长域中也可获得类似的结果，因为在波长域中产生的激发-发射光谱矩阵(以下称 EEM)中的一条直线在能量域的 EEM 中大致是一条直线。仅仅基于被分析物的激发和发射光谱，分析家们就可以选择这些

不同的扫描条件，以在多组份分析中获得更强的信号值和更好的分辨率。 [2]

二. 同步荧光光谱的种类

1 固定波长同步荧光光谱(CWSSF)

这是为首先被提出^[1]，且最为常用的同步扫描方法。其特点是在扫描过程中保持激发波长和发射波长的差额为一个恒定值 Dl 。这种光谱技术是最容易实现的，因为大多数荧光分

光光度计上的单色器都是可以以相同的扫描速度 (nm/s) 进行扫描，只需设置各自的初始波长，然后同时进行扫描即可不依靠计算机的控制而获得 CWSSF 光谱。CWSSF 与常规荧光光谱比较，具有光谱简化、特征峰变窄的优点，可以有效地减小光谱重量和散射光的影响。

2 恒能量同步荧光光谱(CESSF)

与 CWSSF 相应, CESSF 是将 CWSSF 中的波长域换成了能量域。即在扫描过程中, 激发光与发射光保持恒定的能量 (cm^{-1}) 差别; Dn° 常数, 该技术最早由 Inman 和 Winefordner 等提出^[10]。CESSF 在理论上比 CWSSF 更为简单化。但是可能是由于仪器的原因, CESSF 的研究开发较少^[9]。

3 可变角同步荧光光谱(VASSF)

CESSF 和 CWSSF 在扫描过程中，激发和发射光分别保持其能量 (cm^{-1}) 或波长 (nm) 差恒定，且分别在能域中或波长域中的 EEM 上，表示成斜率为 1 的直线。可变角则是这一特例的扩展，即它不再拘泥于斜率为 1 的直线，而是斜率可变的直线。不同的斜率代表着不同的激发和发射单色器的扫描速率之比。VASSF 还可以分为能

域中的可变波数同步荧光光谱 (VAESSF) 和波长域中的可变波长同步荧光光谱 (VAWSSF)。

以下将讨论 3 个主要问题：

- (1) Inman 等应用于 CESSF^[6] 的由 Lloyd & Evett 提出的高斯模型^[11]是如何扩展用于 VAESSF。
- (2) CESSF 和 VAESSF 方程是如何用来近似 CWSSF 和 VAWSSF。^[2]

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库