

医学实验学系列教材



医学分析与检测技能学

主编 范启兰 辛赣海



人民卫生出版社

医学实验学系列教材

医学分析与检测技能学

主 编 范启兰 辛赣海

副主编 张 剑 严宜明 陈水亲 赖日勇 罗晓婷

编 委 (以姓氏笔画为序)

丁冶春 许春鹃 陈水亲 李银保 宋 涛
严宜明 辛赣海 张 剑 范启兰 罗晓婷
黄彬红 谢富华 赖日勇

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学分析与检测技能学 / 范启兰, 辛赣海主编. —北京: 人民卫生出版社, 2013

ISBN 978-7-117-18071-9

I. ①医… II. ①范… ②辛… III. ①医学检验—医学院校—教材 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 220170 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

医学分析与检测技能学

主 编: 范启兰 辛赣海

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 北京中新伟业印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 18

字 数: 449 千字

版 次: 2013 年 10 月第 1 版 2013 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-18071-9/R·18072

定 价: 35.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

前 言

实验教学是医学教育的重要组成部分,现代医学是在实验生物医学的基础上建立和发展起来的。自从医学教育成为有组织、有规模的课程化教学以来,实验教学就兼有验证学科理论和进行技能训练的功能,但实验教学模式却一直作为学科的附属部分,依附于医学各学科,按学科设置实验室,并以课程为单位组织教学;在实验教学内容上,多以验证基础理论为主要目的,强调课程自身的完整性和系统性,而相关学科的实验则缺少交叉融合,实验内容单一,医学前沿技术得不到及时的补充和应用,并且常常出现不必要的低水平重复现象;在教学方法上则以灌输式、示教式为主,学生依样画葫芦,实验效率低,等等。随着医学科学的迅猛发展和医学模式的转变,特别是生物医学实验技术的飞速发展,传统的医学实验教学模式的弊端已经凸显出来,这使得学生的实践基本技能和科研能力得不到系统、科学、完整和阶梯性的训练,不利于学生综合实践能力、创新能力的培养及个性发展。

顺应时代发展的需要,尝试进行了临床医学专业实验课程改革。其总体目标和基本思路是:遵循科学发展和教育教学规律,依据国际医学教育标准和中国本科医学教育标准,以及经济社会发展对医学人才培养提出的新要求和专业培养目标,以加强医学生基本技能、专业应用技能和综合应用技能的训练,提高医学生实践工作技能、创新能力和科学素质为根本宗旨,对传统的医学实验教学模式进行带有根本性的比较全面的改革,大胆探索一种全新的医学实验教学体系,构建与理论教学既相对独立,又相互联系、相互渗透的医学实验课程;编写出版一套以反映医学本科教育阶段系统培养学生实践技能为主要内容的医学实验教材;寻求实验教学一体化综合实践训练的教学模式,并通过试运行逐步加以完善。

在实验教学改革大潮的推动下,我们依据医学实验教学的培养目标和构建实验教学体系的原则,构建了《医学实验学》系列化实验技术课程,编写了这套《医学实验学》系列化教材。全套教材包括《医学科研方法概论》、《医学形态技能学》、《医学机能技能学》、《医学分析与检测技能学》、《医学临床基本技能学》五个分册,各分册既有实验基础理论和基本知识的讲授,又有实验技术操作,但以实验技术操作与基本技能训练为主;同时,各部分规定了明确的教学目标,并可依据其教学目标,建立起不同类型的实验教学单元,每个单元可由若干个实验项目组成。各部分的教学目标和基本内容是:

《医学科研方法概论》:基于科学方法论,以医学科学研究的基本理论与方法为主线,立足于构建适合医学本科层次的医学科研方法学知识体系,其内容主要有:医学科研的基本特性、类型与程序;医学科研方法学的概念、内容,以及医学科研中的一般研究方法和思维方式;医学科研设计的基本内容、要素与原则;医学实验设计的基本原则和基本方法;医学实验动物与动物实验的基本操作;临床医学研究设计与方法;医学科研资料的统计学处理;医学文献检索、医学论文写作、科研成果的鉴定与评价等。它是医学科学研究的入门课程和实验教学的基础部分。其教学目标是:使学生初步认识医学科学研究的概貌,初步掌握

医学实验研究的基础理论、基本知识和基本方法,培养学生的科学态度和科学思维能力,为学生架起一座从理论到实践的桥梁。

《医学形态技能学》:以人体和病原生物的形态结构为主线,其内容主要以组织胚胎学、病理学、医用微生物学、人体寄生虫学和诊断学中的“骨髓细胞学检查”等内容为基础,构建包括形态学实验技术总论、组织病理学实验技术、病原生物学实验技术等几部分内容。其教学目标是:使学生初步掌握形态实验技术的基本技能,熟悉形态观察与描述的基本知识,提高对各种形态的观察力和辨析力。

《医学机能技能学》:以人体机能及其变化为主线,以生理学、病理生理学、药理学等内容为基础,构建成包括机能学实验技术总论、机能学基本技能训练、综合创新技能训练等从基础-能力-提高三个层次的内容体系。它是医学实验研究的基本手段,其教学目标是:使学生掌握基本的技术方法和规范的基本操作技能,掌握实验原理和常规仪器的工作原理、主要技术参数及其意义,并能对实验结果进行正确的分析,得出科学的结论,从而初步完成对医学生科研能力的全程训练。

《医学分析与检测技能学》:以常用分析与检测实验技术为主线,以医用化学、生物化学与分子生物学、医学免疫学、医学遗传学等学科内容为基础,并将诊断学和临床各科的“实验诊断”中的常用检验诊断技术相关实验内容划归本分册。其主要内容有常用医学分析与检测实验技术、常用分析与检测仪器与基本实验、综合性实验等。其教学目标是:使学生初步掌握常用分析与检测实验技术的基本知识和基本技能,常规仪器设备的使用和保养,了解现代分子生物学技术的基本知识,熟悉各种检测指标的临床意义。

《医学临床基本技能学》:以临床基本技能和基本操作为主线,以诊断学和外科总论的内容为基础,将妇产科学、麻醉科学、眼耳鼻喉科学和儿科学所特有的临床基本操作技能归入这部分。其教学目标是:使学生在进入临床实习前受到系统而规范的临床基本操作和技能的训练,掌握临床诊断的理论原则和思维方法,熟悉其工作程序;能独立进行系统的病史采集和规范的体格检查,书写规范的完整病历和病历摘要;能初步掌握心电图机的操作和心电图的图形分析,了解常用影像学检查结果的临床意义;掌握无菌术、外科手术的基本技术和技能等。

此外,各分册还构建了学科间相互交叉的综合性或设计性实验项目,以强化医学生科研能力的全程训练,检验学生运用所学知识进行观察、分析和解决问题的能力。

本教材在编写过程中得到了许多专家、教授的大力支持,并承担各部分的主编、审校任务和主要章节的编写工作;编辑委员会的同志为教材的统稿、定稿和编辑、出版做了大量的工作,使全套教材能够如期与学生见面。在此,我们向为本教材的出版作出贡献的所有同志表示诚挚的谢意!

由于本教材涉及面广,参考资料多,在编写过程中未能将主要参考文献一一列出,敬请有关作者谅解,并向他们致以崇高的敬意和衷心的感谢!

编写出版《医学实验学》系列化教材是我校深化实验教学改革中的一个大胆尝试,随着医学模式的转变和现代医学科学的蓬勃发展,医学科学研究的内容和方法也将不断地更新和发展;加之本教材涵盖的学科广,参编人员多,编写时间紧,特别是编者水平有限,理解不深,因此,在教材中难免有谬误和不足之处,欢迎广大教师和读者提出宝贵意见,我们将不胜感谢!

医学实验学系列教材编写组

2013年6月

目 录

第一篇 常用医学分析与检测实验技术

第一章 光谱分析技术	1
第一节 光谱分析的基本原理.....	1
第二节 常用光谱分析的方法及应用.....	2
一、紫外-可见分光光度法	2
二、红外光谱法.....	5
三、原子吸收分光光度法.....	7
四、分子荧光光谱法.....	8
五、原子荧光光谱法.....	9
六、旋光仪法.....	10
第二章 电泳技术	12
第一节 电泳的基本原理.....	12
一、基本原理.....	12
二、影响电泳速度的因素.....	13
三、电泳的基本装置.....	14
四、电泳后的固定、染色和脱色	14
五、电泳结果的定量分析.....	15
第二节 常用的电泳方法及应用.....	15
一、聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	15
二、等电聚焦电泳.....	17
三、双向电泳.....	18
四、毛细管电泳.....	18
五、脉冲场凝胶电泳.....	19
六、免疫电泳.....	20
第三章 层析技术	21
第一节 层析的基本原理.....	21
一、分配平衡.....	21
二、塔板理论.....	22

第二节 常用的层析方法及应用	22
一、吸附层析	22
二、分配层析	23
三、离子交换层析	24
四、凝胶过滤层析	26
五、亲和层析	28
六、薄层层析	29
七、高效液相层析	30
第四章 离心技术	31
第一节 离心的基本原理	31
一、离心的一般原理	31
二、离心力和相对离心力	31
三、沉降速度	33
四、沉降系数	33
五、沉降时间	33
六、测定相对分子质量	34
第二节 离心设备	34
一、离心机	34
二、离心机的基本构造	35
三、离心转头	35
四、离心管	36
五、离心机使用注意事项	36
第三节 常用离心方法及应用	37
一、制备离心技术	37
二、分析超速离心技术	41
第五章 基因工程技术	42
第一节 基因工程的基本原理和步骤	42
第二节 基因工程载体	43
一、质粒载体	43
二、噬菌体载体	44
三、动物病毒载体	44
四、酵母人工染色体载体	45
第三节 基因工程中常用的工具酶	45
一、限制性核酸内切酶的概念	45
二、限制性核酸内切酶的分类	46
三、限制性核酸内切酶的命名	46
四、限制性核酸内切酶的作用机制	46
第四节 目的基因的获取	47

一、人工化学合成	47
二、基因组 DNA 文库	48
三、cDNA 文库	48
四、聚合酶链反应	48
第五节 目的基因与载体的连接	48
一、黏性末端连接	49
二、平端连接	49
三、人工接头连接	49
第六节 重组 DNA 分子导入宿主细胞	49
一、转化	50
二、转染和感染	50
第七节 重组分子的筛选与鉴定	50
一、根据重组载体的标志进行筛选	50
二、核酸分子杂交法	51
三、免疫学方法	51
四、DNA 限制性内切酶图谱分析	51
五、核苷酸序列测定	51
第六章 聚合酶链反应技术	52
第一节 PCR 的基本原理	52
第二节 PCR 反应体系中的成分及其作用	53
一、寡核苷酸引物	53
二、DNA 模板	53
三、缓冲液	53
四、DNA 聚合酶	53
五、脱氧核苷三磷酸	54
第三节 PCR 引物设计的一般原则	55
一、引物长度	55
二、引物末端	55
三、引物的 G、C 含量和 T_m 值	55
四、引物的位置	56
第四节 PCR 相关技术	56
一、通用 PCR	56
二、逆转录 PCR	57
三、原位 PCR	57
四、重组 PCR	57
五、巢式 PCR	58
六、不对称 PCR	58
七、实时荧光定量 PCR	59

第七章 DNA 序列分析技术	61
第一节 DNA 序列测定的原理和技术	61
一、DNA 测序原理	61
二、DNA 测序策略	62
三、DNA 测序的常用技术	63
第二节 全自动激光荧光 DNA 测序	63
一、全自动激光荧光 DNA 测序原理	64
二、全自动激光荧光 DNA 测序注意事项	65
三、自动激光荧光 DNA 测序程序	65
第八章 免疫学检测技术	69
第一节 抗原 - 抗体反应	69
一、抗原 - 抗体反应的原理	69
二、抗原 - 抗体反应的特点	70
三、影响抗原 - 抗体反应的因素	71
四、抗原 - 抗体反应的类型	72
第二节 免疫细胞检测技术	77
一、淋巴细胞的分离与类型鉴定	77
二、白细胞功能测定	79
第三节 免疫学检测方法的应用	81
一、免疫学检测方法的评估与选择	81
二、疾病的诊断	82
三、免疫学监测	82

第二篇 常用分析与检测仪器和基本实验

第九章 常用分析与检测仪器及基本操作	83
第一节 常用分析与检测仪器	83
一、常用玻璃仪器	83
二、电子天平	85
三、酸度计	87
四、熔点仪	90
第二节 分析与检测实验装置及基本操作	93
一、化学试剂的取用	93
二、玻璃量器的使用	94
三、常用加热器具及其使用	103
四、蒸发、结晶、固液分离	109
五、干燥及干燥剂的使用	113
六、温度计的使用	117
七、试纸的使用	118

八、搅拌与搅拌器·····	119
九、蒸馏与回流·····	120
第十章 分析与检测基本实验·····	126
实验一 滴定分析·····	126
实验二 缓冲溶液的性质与应用·····	134
实验三 离子的分离与鉴定·····	138
实验四 有机化合物物理常数的测定·····	146
实验五 有机化合物的合成·····	150
实验六 羧酸的化学性质·····	153
实验七 苯甲酸钠的红外光谱测定·····	155
实验八 原子吸收光谱法测定血清中锌的含量·····	156
实验九 色谱法·····	157
实验十 蛋白质含量测定·····	160
实验十一 温度、pH、激活剂和抑制剂对酶活性的影响 ·····	171
实验十二 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质 ·····	173
实验十三 琼脂糖凝胶电泳分离血清脂蛋白·····	175
实验十四 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的制备与电泳 ·····	177
实验十五 糖酵解中间产物的鉴定·····	180
实验十六 血糖浓度的测定与胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响 ·····	181
实验十七 酮体的生成及定性·····	184
实验十八 血清脂类的测定·····	185
实验十九 纸层析法鉴定谷丙转氨酶的作用·····	188
实验二十 动物细胞减数分裂过程的观察·····	190
实验二十一 人类非显带染色体核型分析·····	192
实验二十二 PTC(苯硫脲)尝味试验 ·····	194
实验二十三 X染色质标本的制作和观察·····	195
实验二十四 抗原抗体反应·····	196
实验二十五 细胞毒试验——补体介导的细胞毒试验·····	205
实验二十六 免疫细胞检测·····	207
实验二十七 细胞因子的检测——白细胞介素2活性测定·····	214

第三篇 综合性实验

第十一章 综合性实验·····	217
实验一 茶叶中咖啡因的提取·····	217
实验二 番茄酱中番茄红素和 β -胡萝卜素的提取与鉴别 ·····	219
实验三 血清 γ 球蛋白的分离纯化、含量测定及纯度鉴定 ·····	221
实验四 碱性磷酸酶的分离纯化、比活性测定与酶促反应动力学 ·····	225
实验五 DNA的提取、鉴定与目的基因的扩增·····	234

实验六 RNA 的提取与组分鉴定	245
实验七 mRNA 的制备与 cDNA 的合成	250
实验八 核酸浓度的测定	252
实验九 DNA 的限制性核酸内切酶消化与 DNA 分子的体外连接	253
实验十 细菌感受态细胞的制备、重组质粒的转化及筛选	256
实验十一 核酸印迹杂交	259
 附录	 264
一、实验室规则	264
二、实验室常识	264
三、实验室安全及防护	265
四、常用有机溶剂的沸点、密度表	265
五、常见的酸碱指示剂	266
六、热浴用的液体介质	267
七、国产试剂的规格	267
八、常用缓冲液的配制方法	267
九、硫酸铵饱和度常用表	271
十、层析数据表	273
 主要参考文献	 276

第一篇 常用医学分析与检测实验技术

第一章

光谱分析技术

第一节 光谱分析的基本原理

光谱分析法是基于物质与电磁辐射作用时,物质内部发生量子化的能级之间的跃迁所产生的发射、吸收或散射辐射的波长和强度进行分析的方法,通过检测光谱的波长和强度进行定性、定量和结构分析。它是一类常用的分析检测方法,在生物、医学、农业、环保、食品卫生等领域有着极其广泛的应用。

电磁辐射是一种以巨大速度通过空间而不需要任何物质作为传播媒介的光子流。电磁辐射具有波粒二象性。

波动性:电磁辐射是横波,其传播及反射、衍射、干涉等现象,都与其波动性有关。

$$\nu = \frac{c}{\lambda}, \sigma = \frac{1}{\lambda}$$

粒子性:电磁辐射的吸收与发射等同物质的相互作用的现象,则必须看做是不连续的能量微粒(光子或光量子),即具有粒子性。电磁辐射具有能量,其辐射能量与波长成反比。

$$E = h \cdot \nu = \frac{hc}{\lambda}$$

注: ν : 频率; c : 光速; λ : 波长; σ : 波数; E : 能量; h : 普朗克常数

从广义讲,各种电磁辐射都属于光谱,一般按其波长可分为:

γ 射线	1~100pm	} 高能辐射区
X射线	0.01~10nm	
真空紫外区	10~200nm	} 光学光谱区
近紫外区	200~380nm	
可见光谱区	380~780nm	
近红外光谱	0.78~3 μ m	
远红外光谱	3~300 μ m	} 波谱区
微波波谱区	0.1~100cm	
射频区	1~1000m	

将电磁辐射按波长顺序依次排列成为电磁波谱。各种电磁辐射不仅波长不同,产生机制也不同,根据能量高低可将电磁波谱主要分为三个区域:

1. 高能辐射区 包括 γ 射线和 X 射线,其中 γ 射线来源于核能级跃迁,而 X 射线来自

内层电子能级的跃迁。

2. 光学光谱区 包括真空紫外区、近紫外区、可见光谱区、近红外光谱区及远红外光谱区,来源于原子和分子外层电子能级的跃迁,以及分子振动和转动能级的跃迁。

3. 波谱区 包括微波和射频区,适用于分子振动能级、电子自旋磁能级以及原子核自旋能级的跃迁。

根据电磁辐射传递方式的不同,光谱分析法主要分为吸收光谱法和发射光谱法。

吸收光谱法是指物质吸收相应的辐射能,由低能级向高能级跃迁时所产生的特征吸收光谱,并依其特征谱图进行定性、定量分析的方法,其光谱产生的必要条件是所提供的辐射能量恰好满足该吸收物质两能级间跃迁所需的能量。X射线荧光光谱法(XFS)、原子吸收光谱法(AAS)、紫外-可见分光光度法(UV-Vis)、红外光谱法(IR)和磁共振波谱法(NMR)均属于吸收光谱。

发射光谱法是指利用构成物质的原子、离子或分子受到辐射能、热能、电能或化学能的激发跃迁到激发态后,由激发态回到基态时以辐射的方式释放能量而产生的特征发射光谱进行定性、定量及结构分析的方法。常见的原子发射光谱法(AES)、原子荧光光谱法(AFS)和分子荧光光谱法(MFS)等均属于发射光谱。

根据电磁辐射本质的不同,光谱分析法又可分为原子光谱法和分子光谱法。

原子光谱法是由原子外层或内层电子能级的变化产生的,它的表现形式为线状光谱。属于这类分析方法的有原子发射光谱法(AES)、原子吸收光谱法(AAS),原子荧光光谱法(AFS)以及X射线荧光光谱法(XFS)等。

分子光谱法是由分子中电子能级、振动和转动能级的变化产生的,表现形式为带状光谱。属于这类分析方法的有紫外-可见分光光度法(UV-Vis)、红外光谱法(IR)、分子荧光光谱法(MFS)和分子磷光光谱法(MPS)等。

光谱分析法中,用来研究吸收、发射或荧光的电磁辐射的强度和波长的关系的仪器叫做光谱仪或分光光度计。这一类仪器一般包括五个基本单元:①光源;②单色器;③样品池;④检测器;⑤信号显示系统。

随着科学技术的进步和社会经济的发展,学科之间日益相互渗透、相互促进、相互结合,以及像三维立体技术、激光技术等新技术的迅猛发展与融合,使得光谱分析法也在不断的趋于完善且开阔新的领域,并且呈现出高灵敏度、高选择性、样品无损化、各种联用技术同时应用、在线实时分析,以及仪器的微型化、固态化等特点。例如等离子体、傅里叶变换、激光技术和光导纤维传感器技术的引入,出现了电感耦合高频等离子体-原子发射光谱(ICP-AES)、傅里叶变换-红外光谱(FT-IR)、等离子体质谱(ICP-MS)等一系列新的光谱分析技术。

第二节 常用光谱分析的方法及应用

一、紫外-可见分光光度法

(一) 基本原理

分光光度法(spectrophotometry)是通过测定物质在特定波长处或一定波长范围内光的吸光度或发光强度,对物质进行定性、定量分析的一种分析方法。根据所用光源波长的不同,分光光度法又分为:可见分光光度法(380~780nm)、紫外分光光度法(10~380nm,常

用的波长范围为 $200\sim 380\text{nm}$) 和红外分光光度法 ($780\sim 3\times 10^5\text{nm}$)。

紫外 - 可见分光光度法即指根据测定物质在紫外光和可见光 ($200\sim 780\text{nm}$) 这一范围内光的吸光度或发光强度所建立起来的一种定性、定量的分析方法。该法应用十分广泛, 几乎化学元素周期表上的所有元素 (除少数放射性元素和惰性元素之外) 的分析均可采用此法。此方法有如下特点: 一是灵敏度高, 被测物质的最低可测浓度可达 $(10^{-6}\sim 10^{-5})\text{mol/L}$, 特别适用于微量及痕量组分的测定; 二是准确度高, 测量的相对误差一般为 $2\%\sim 5\%$, 精密的仪器可减至 1% 左右; 三是分析成本低, 操作简便、快速。因此, 它已成为当前医药、卫生、环保、化工、食品、制药等部门及环境监测系统常用的分析方法之一。

物质的吸收光谱本质上就是物质中的分子和原子吸收了入射光中的某些特定波长的光能量, 相应地发生了分子振动能级跃迁和电子能级跃迁的结果。由于各种物质具有各自不同的分子、原子和不同的分子空间结构, 其吸收光能量的情况也就不会相同, 因此, 每种物质就有其特有的、固定的吸收光谱曲线。可根据吸收光谱上的某些特征波长处的吸光度的高低判别或测定该物质的含量, 这就是分光光度法定性和定量分析的基础。

紫外 - 可见吸收光谱主要产生于分子中价电子 (或外层电子) 的能级间的跃迁, 故亦称为电子光谱法。可见光谱常用于有色物质含量的测定, 紫外光谱常用于具有紫外吸收基团的无色物质含量的测定。

将不同波长的单色光依次通过被分析的物质溶液, 分别测量该溶液对不同波长的单色光的吸收程度, 即吸光度 A (absorbance), 然后以入射光波长 λ 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标作图, 可得一曲线, 即为吸收光谱 (absorption spectrum)。图 1-1 所示为不同浓度的三 (邻二氟菲) 合铁 (II) 离子的吸收光谱。

吸收光谱中, 吸光度最大处的波长为最大吸收波长, 用 λ_{max} 表示 (图中 λ_{max} 为 508nm)。图中的几条曲线分别代表不同浓度时的吸收光谱, 它们的形状基本相同, 最大吸收波长均为 508nm 。溶液浓度愈大, 吸收光谱的峰值愈高, 两者成正比关系。若采用最大吸收波长作为入射光测定其吸光度, 则灵敏度最高 (响应值随浓度的变化幅度最大), 所以一般定量测定时选择 λ_{max} 波长作为入射波长。吸收光谱体现了物质的特性, 是进行定性、定量分析的基础。

使用可见 - 紫外吸收光谱进行定性分析时, 通常是根据化合物吸收光谱的形状、吸收峰的位置及数目、最大吸收波长的位置及最大摩尔吸收系数等进行定性鉴定, 也可以进行光谱比较。利用可见 - 紫外吸收光谱, 可进行定性鉴别、纯度检验、推测化合物分子结构及氢键强度测定等分析。主要方法有:

1. 对比吸收光谱的特征值 根据吸收光谱图上的一些特征吸收, 特别是最大吸收波长和摩尔吸收系数是鉴定物质的常用物理参数。

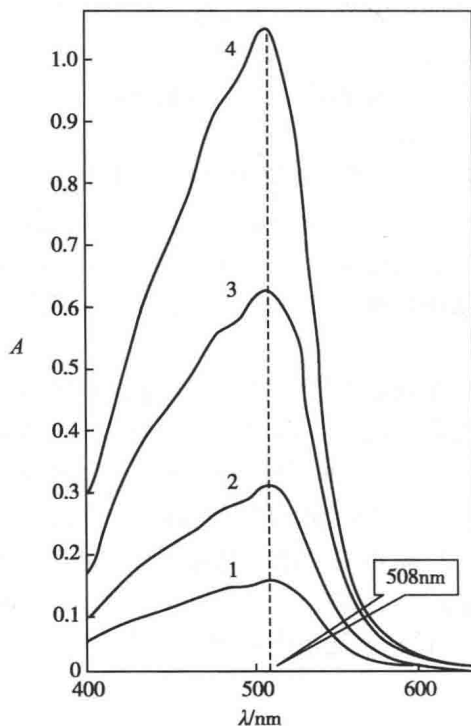


图 1-1 三 (邻二氟菲) 合铁 (II) 离子的吸收光谱

2. 与标准物及标准图谱对照 将分析样品和标准样品以相同浓度、相同溶剂配制, 在同一条件下分别测定可见—紫外吸收光谱。若两者是同一物质, 则两者的光谱图应完全一致。如果没有标样, 也可以和现成的标准谱图对照进行比较。

3. 对比吸光度或吸光系数的比值。

4. 根据峰位重叠情况, 进行纯度检查(杂质检查)。如果化合物在可见—紫外光区没有明显的吸收峰, 而它的杂质在可见—紫外区内有较强的吸收峰, 就可以检测出化合物中的杂质。

紫外—可见分光光度法的定量分析基础是朗伯—比尔(Lambert-Beer)定律, 即物质的吸光度与其浓度及其吸收介质的厚度呈正比。该定律的表达式为:

$$A = \varepsilon cl$$

其中 ε 为摩尔吸光系数, 单位为 $L/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; c 为被测物溶液物质的量浓度, 单位为 mol/L ; l 为液层厚度, 单位为 cm 。在相同仪器条件下, ε 和 l 为定值, 吸光度 A 与物质的量浓度 c 成正比, 故由吸光度的值可确定浓度。

(二) 测定方法

应用紫外光谱法进行定量分析的方法很多, 如标准曲线法、标准对照法、比吸光系数比较法及双波长分光光度法。

1. 标准曲线法 标准曲线法是分光光度法中最为常用的方法。其方法是: 取标准品配成一系列已知浓度的标准溶液, 在选定波长处(通常为 λ_{max}), 用同样厚度的吸收池分别测定其吸光度, 以吸光度为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标作图, 得一通过坐标原点的直线——标准曲线。然后将被测溶液置于吸收池中, 在相同条件下, 测量其吸光度, 根据吸光度即可在标准曲线上查得其对应的含量。该方法对于经常性批量测定十分方便, 采用此法时, 应注意使标准溶液与被测溶液在相同条件下进行测量, 且溶液的浓度应在标准曲线的线性范围内。

在测定溶液吸光度时, 为了消除溶剂或其他物质对入射光的吸收, 以及光在溶液中的散射和吸收池界面对光的反射等与被测物吸收无关的因素的影响, 必须采用空白溶液(又称参比溶液)作对照。常用的空白溶液有溶剂空白、试剂空白和试样空白三种。同时为了减小误差, 吸光度 A 的值应控制在 $0.2 \sim 0.7$ 之间。

2. 标准对照法 亦称外标一点法。具体操作为: 先配制一个与被测溶液浓度相近的标准溶液(其浓度用 c_s 表示), 在 λ_{max} 处测出吸光度 A_s , 在相同条件下测出试样溶液的吸光度 A_x , 则试样溶液浓度 c_x 可按下式求得:

$$c_x = \frac{A_x}{A_s} \times c_s$$

此方法适用于非经常性的分析工作。

3. 比吸光系数比较法 比吸光系数比较法是利用标准的 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 值进行定量测定的, 我国药典(2010年版)中规定某些药物的测定一般采用此法。即将样品的比吸光系数与标准物质的比吸光系数(可从手册上查得)比较, 计算出样品含量(质量分数或体积分数)。如: 呋喃妥因的 $E_{1\text{cm}}^{1\%}(367\text{nm}) = 766$, 在相同条件下, 测定呋喃妥因样品的 $E_{1\text{cm}}^{1\%}(367\text{nm}) = 739$, 因此, 该样品中呋喃妥因的质量分数为 $\frac{739}{766} = 0.9906$ 。

4. 双波长分光光度法 在单位时间内有两条波长不同的光束 λ_1 和 λ_2 交替照射同一个

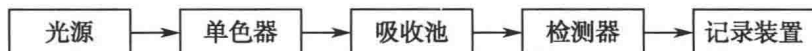
溶液,由检测器测出的吸收度是这两个波长下吸收度的差值 ΔA 。 ΔA 与被测定物质的浓度成正比,这种方法称为双波长分光光度法。

双波长分光光度法的关键是正确选择两波长 λ_1 、 λ_2 ,要求被测组分 D 在两波长处的 ΔA 足够大,而干扰组分 G 和背景在两波长应有相同的吸光度 ($\Delta A = 0$)。为满足上述要求,一般是将 λ_2 选在待测组分的最大吸收波长, λ_1 是选在干扰组分等吸收波长。

此法可测定混浊样品,也可测定吸收光谱相互重叠的混合物样品,也是当杂质使主峰产生肩峰时测定主峰物质的较好定量方法。

(三) 仪器基本构造

紫外—可见分光光度计有多种型号,但其基本结构相似,其基本结构主要由以下五个部分组成。



1. 光源 在整个紫外光区或可见光谱区可以发射连续光谱,具有足够的辐射强度、较好的稳定性、较长的使用寿命,辐射能量随波长的变化尽可能小。

在可见光区,采用钨灯作为光源,其辐射波长范围在 320~2500nm,而在紫外区,使用氢灯或氘灯作为光源,可发射 185~400nm 的连续光谱。

2. 单色器 是将光源发射的复合光分解成单色光并可从中选出一任波长单色光的光学系统,包括棱镜或光栅、狭缝和准直镜等部分。

3. 吸收池 又称比色皿,是用于盛放分析试样和决定透光液层厚度的器皿,一般有石英和玻璃材料两种。玻璃吸收池能吸收紫外光,故仅适用于可见光区,而石英池适用于可见光区及紫外光区。一对吸收池要求具有高度匹配性,即对光的吸收和反射应一致。紫外-可见分光光度计常用的吸收池规格有: 0.5cm、1.0cm、2.0cm、3.0cm、5.0cm 等。

4. 检测器 是检测光信号的一种装置。它们利用光电效应将透过吸收池的光信号变成可测的电信号,常用的有光电池、光电管或光电倍增管。

5. 记录装置 包括讯号处理和显示系统,由计算机进行仪器自动控制和结果处理。

二、红外光谱法

(一) 基本原理及应用

红外光谱法(infrared absorption spectroscopy, IR)是利用分子中基团吸收红外光产生的振动—转动吸收光谱进行定量分析和有机化合物结构分析的方法。

分子中化学键的键长、键角不是固定不变的,而是像用弹簧连接起来的一组小球,化学键及整个分子在不停地振动着。红外光可使分子振动能级发生跃迁。如果用不同波长的红外光照射样品,当红外光的频率与分子中某一化学键的振动频率相同时,分子就会吸收红外光,产生吸收峰。

红外光可分为三个区段:近红外区(0.78~2.5 μm)、中红外区(2.5~25 μm)、远红外区(25~500 μm)。红外吸收光谱产生需满足两个条件:①辐射应具有能满足物质产生振动跃迁所需的能量;②辐射与物质间有相互耦合作用。

分子中的一个化学键可有几种不同的振动形式,每种振动形式都可产生红外吸收峰。化学键的振动形式分为两大类:伸缩振动和弯曲振动。

分子中成键原子间的振动可以近似地用经典力学来描述。其中最简单的伸缩振动的频

率可以近似地用下式计算:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)} \quad k \text{ 为力常数}$$

成键原子质量越小, 力常数越大, 该键的振动频率越高。

红外光谱图以波长 $\lambda(\mu\text{m})$ 或波数 $\sigma(\text{cm}^{-1})$ 为横坐标, 以透光度 T 为纵坐标, 吸收峰表现为谷。谱图可以用峰数、峰位、峰形、峰强来描述。图 1-2 为甲苯的红外光谱。

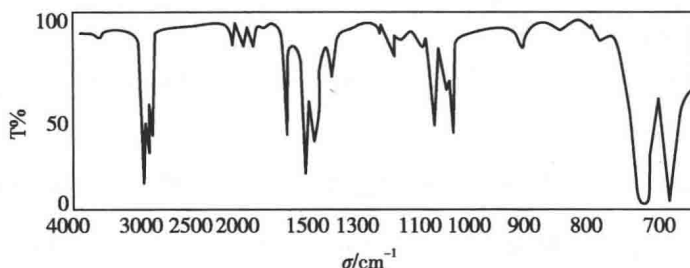


图 1-2 甲苯的红外光谱

红外光谱吸收峰分为两大区域: 特征谱带区 ($4000 \sim 1330 \text{cm}^{-1}$), 或称为官能团区 (functional group region), 官能团的特征吸收峰较多, 是解析红外光谱的主要依据; 指纹区 (fingerprint region, $1330 \sim 650 \text{cm}^{-1}$), 单键的伸缩振动和弯曲振动所产生的吸收峰, 分子结构的细微变化, 都会引起吸收峰位置和强度的明显改变, 对分子结构的鉴定提供重要信息。若用红外光谱确定两种化合物是否相同时, 两个谱图不仅在官能团区的吸收峰完全吻合, 而且在指纹区范围内亦要完全一致。红外光谱的主要区段见表 1-1。

表 1-1 红外光谱的主要区段

波数 / cm^{-1}	化学键	化合物类别
3750~3000	O—H	醇、酚、胺、酰胺
3300~3000	C—H (—C≡C—H, >C=C<H, Ar-H)	炔、烯、芳香化合物
3000~2700	C—H (—CH ₃ , >CH ₂ , >CH—, —CHO)	烷、醛
2400~2100	C≡C, C≡N	炔、腈
1900~1650	C=O	醛、酮、羧酸、酯
1675~1500	C=C (脂、芳族), N=O	烯、芳香族、硝基类
1475~1300	C—H	烷
1300~1000	C—O, C—N	醇、醚、羧酸、酯、胺
1000~650	C—H, Ar—H	取代烯烃、取代苯

红外光谱的解析是一个比较复杂的过程, 尽管红外光谱仪附带的软件能辅助解析, 但是人工解析依然起着关键作用。红外谱图解析应遵循如下程序: 先特征、后指纹; 先强峰, 后次强峰; 先粗查, 后细找; 先否定, 后肯定; 先寻找有关一组相关峰, 再佐证。即先识别特征区的第一强峰, 找出其相关峰, 并进行峰归属, 再识别特征区的第二强峰, 找出其相关峰, 并进行峰归属。

值得注意的是, 相同基团的特征吸收并不总在一个固定频率上。这是因为化学键的振动频率不仅与其性质有关, 还受分子的内部结构和外部因素影响。影响峰位变化的因素主