



普通高等教育“十一 五”国家级规划教材

植物生理学 实验技术

主编 / 张治安 陈展宇



 吉林大学出版社
JILIN UNIVERSITY PRESS

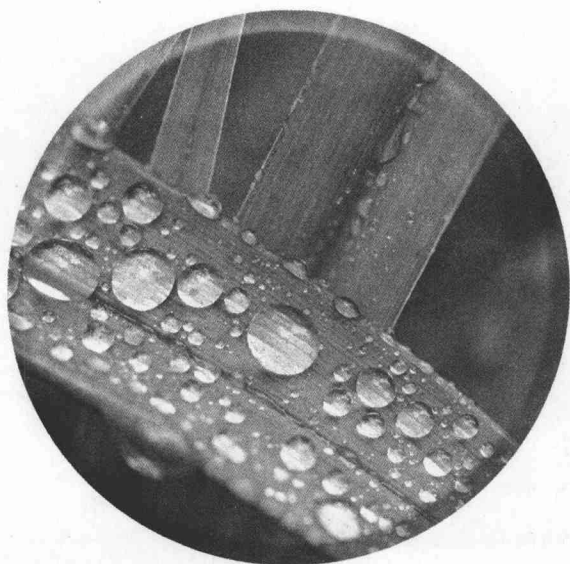
普通高等教育“十一 五”国家级规划教材



植物生理学 实验技术



主编 / 张治安 陈展宇



 吉林大学出版社
JILIN UNIVERSITY PRESS

编 委 会

主 编 张治安 陈展宇

副主编 张美善 马 尧 魏书琴 高 巍

编 委 (以姓氏笔划为序)

马 尧 吕艳杰 李大勇 陈展宇 张治安 张美善 武术杰

武志海 赵颖君 高 巍 蔚荣海 魏书琴

主 审 徐克章

图书在版编目 (CIP) 数据

植物生理学实验技术/张治安, 陈展宇主编. —长春:
吉林大学出版社, 2008.7

ISBN 978-7-5601-2652-4

I. 植... II. ①张... ②陈... III. 植物生理
学—实验—高等学校—教材 IV. Q945-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 104800 号

书 名: 植物生理学实验技术
作 者: 张治安 陈展宇 主编

责任编辑、责任校对: 孟亚黎
吉林大学出版社出版、发行
开本: 787×1092 毫米 1/16
印张: 13.75 字数: 286 千字
ISBN 978-7-5601-2652-4

封面设计: 张沐沉
长春大学印刷厂印刷
2008 年 7 月第 1 版
2008 年 7 月第 1 次印刷
定价: 26.80 元

版权所有 翻印必究
社址: 长春市明德路 421 号 邮编: 130021
发行部电话: 0431-88499826
网址: <http://www.jlup.com.cn>
E-mail: jlup@mail.jlu.edu.cn

前 言

本书为普通高等教育“十一五”国家级规划教材《植物生理学》的配套实验教材。

《植物生理学实验技术》是植物生理学教学的重要组成部分，旨在加深学生对植物生理学理论和实验基本原理的理解。开设植物生理学实验技术课程不仅可以加强学生的实验操作技能，而且可以培养学生严谨的科学作风，在提高学生分析问题、解决问题能力以及独立工作能力方面，具有十分重要的作用。为适应我国普通高等教育教学内容改革和发展的需要，根据多年来的教学经验和植物生理学实验技术的发展趋势，参考了国内最新的植物生理学实验教材，尽力引进一些先进而成熟的实验技术，按照由浅入深、循序渐进的原则，由具有多年教学经验的教师合作编写了这本教材。

本书的内容涉及植物生理学的细胞生理、水分生理、矿质营养、光合作用、呼吸作用、植物有机物质运输与转化、植物生长物质、植物生长发育及抗性生理等实验技术。本书可供高等农林院校、综合性大学、师范院校相关专业的本科生使用，也可供研究生和科技人员阅读参考。

全书由马尧、吕艳杰、李大勇、陈展宇、张治安、张美善、武术杰、武志海、赵颖君、高巍、蔚荣海、魏书琴（以姓氏笔划为序）分头编写，最后，由张治安、陈展宇统稿，徐克章审定。

本书在编写过程中，参考并引用了大量的国内外相关资料，由于篇幅所限，书中不能一一列出，在此一并表示衷心感谢。

由于我们的水平有限，书中缺点错误在所难免，特别是由于近年来植物生理学实验技术日新月异的发展，使我们深感有必要不断充实本书内容。敬请使用者批评指正，以便今后补充修订。

编 者

2008年6月

实验室规则

1. 实验前认真预习实验内容。
2. 实验时自觉遵守课堂纪律，严格按操作规程操作，既要独立操作又要与其他同学配合。
3. 实验数据和现象应随时记录在实验本上（不要记在纸片上！）。实验结束后，写实验报告，交实验报告后离开实验室。
4. 精心爱护各种仪器。实验所需的一般仪器按规定借领，归还。完成实验后应将器皿洗净倒置在实验台并排列整齐。如有损坏或遗失需要说明原因，登记后方可补领，并按规定赔偿。
5. 精密贵重仪器每次使用后应登记姓名并记录仪器使用情况。要随时保持仪器的清洁。如发生故障，应立即停止使用并报告辅导教师。
6. 按需要量取用药品及蒸馏水等各种物品，要注意节约。
7. 公用仪器、药品用后放回原处。不要用个人的吸管量取公用药品，多余的药品不得倾入原试剂瓶内。特别注意公用试剂瓶的瓶塞要随开随盖，不要搞错。
8. 保存在冰箱或冷室中的任何物品都应加盖并注明保存者的姓名、班级、日期和内容物。
9. 保持台面、地面、水槽及室内整洁。含强酸强碱的废液应倒入废液缸中。将书包及实验不需衣物放在规定的架上。
10. 不得将含有易燃溶剂的实验容器接近火焰。漏电的设备一律不得使用。注意安全。离开实验室前应检查水、电、门、窗。严禁用口吸取（或用皮肤接触）有毒药品和试剂。凡发生烟雾、有毒气体和不良气味的实验均应在通风橱内进行。通风橱门应紧闭，非必要时勿开。
11. 由学生轮流值日，值日生要负责当天实验室的卫生、安全和服务性的工作。

目 录

第一部分 基本操作

第一章 植物材料的采集、处理、保存与分析方法	(1)
第二章 实验室基本操作	(8)
第三章 常用缓冲溶液的配制	(18)

第二部分 实 验

实验 1 植物组织含水量的测定	(22)
实验 2 植物组织水分饱和和亏的测定	(24)
实验 3 植物组织中自由水和束缚水含量的测定	(25)
实验 4 植物叶片保水力的测定	(28)
实验 5 植物细胞的质壁分离与质壁分离复原	(29)
实验 6 植物细胞渗透势的测定(质壁分离法)	(31)
实验 7 植物组织水势的测定(小液流法)	(33)
实验 8 露点法测定植物叶片水势和渗透势	(35)
实验 9 用恒态气孔计测定叶片蒸腾速率和气孔扩散阻力	(38)
实验 10 植物单叶水分利用效率(WUE)的测定	(43)
实验 11 植物伤流液的收集和伤流量的测定	(44)
I 容积法测定伤流量	(44)
II 重量法测定伤流量	(45)
实验 12 液泡膜及质膜 H^+ -ATPase 活性的测定	(46)
I 液泡膜 H^+ -ATPase 活性的测定	(46)
II 质膜 H^+ -ATPase 活性的测定	(47)
实验 13 植物组织中金属元素的测定(原子吸收分光光度法)	(50)
实验 14 植物的溶液培养及缺素培养	(52)

实验 15	植物体内硝酸还原酶活力的测定	(54)
I	离体法	(54)
II	活体法	(56)
实验 16	植物体内硝态氮含量的测定	(58)
实验 17	植物根系活力的测定(TTC 法)	(60)
实验 18	植物叶绿体的分离制备	(62)
实验 19	希尔反应的观察 ——离体叶绿体对染料的还原作用	(63)
实验 20	叶绿体色素的提取、分离和理化性质	(64)
实验 21	叶绿体色素的定量测定	(66)
实验 22	红外线 CO ₂ 气体分析法测定植物光合速率与呼吸速率	(69)
I	密闭系统落差法	(70)
II	开放式气路系统	(71)
实验 23	LI-6400 型便携式光合仪测定光合作用参数	(73)
实验 24	CB-1101 型光合、蒸腾测定系统测定光合和蒸腾速率	(77)
实验 25	氧电极法测定植物光合速率和呼吸速率	(81)
实验 26	RuBP 羧化酶活性的测定	(86)
实验 27	PEP 羧化酶活性的测定	(89)
实验 28	植物光呼吸的测定	(91)
I	低氧抑制法	(91)
II	CO ₂ 猝发峰法	(92)
实验 29	呼吸商的测定	(93)
实验 30	乙醇酸氧化酶活性的测定(比色法)	(95)
实验 31	植物呼吸酶活性的测定	(97)
实验 32	植物组织中可溶性糖含量的测定	(100)
I	蒽酮法测定可溶性糖	(100)
II	苯酚法测定可溶性糖	(102)
III	3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖	(103)
IV	斐林试剂比色法测定还原糖	(105)
实验 33	植物组织中淀粉含量的测定	(107)
I	蒽酮硫酸法	(107)
II	碘-淀粉比色法	(108)
实验 34	植物组织中可溶性蛋白质含量的测定	(110)

I	考马斯亮蓝 G-250 染色法	(110)
II	Lowry 法(劳里法)	(111)
III	紫外吸收法	(113)
实验 35	植物组织中游离氨基酸总量的测定(茚三酮显色法)	(116)
实验 36	谷类作物种子中赖氨酸含量的测定	(119)
实验 37	种子粗脂肪的提取和定量测定	(122)
实验 38	果实、蔬菜中有机酸含量的测定	(125)
实验 39	植物组织中维生素 C 含量的测定	(126)
I	2,6-二氯酚靛酚滴定法	(126)
II	钼蓝比色法	(129)
III	荧光比色法	(130)
实验 40	高粱籽粒中单宁含量的测定	(132)
实验 41	植物组织培养	(134)
实验 42	种子生活力的快速测定	(136)
I	氯化三苯基四氮唑法(TTC 法)	(136)
II	溴麝香草酚蓝法(BTB 法)	(137)
III	红墨水染色法	(138)
IV	纸上荧光法	(139)
实验 43	淀粉酶活性的测定	(140)
实验 44	聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离过氧化物酶同工酶	(143)
实验 45	植物激素的提取、分离与纯化	(152)
I	溶剂萃取法	(152)
II	薄层色谱法分离纯化	(155)
III	C ₁₈ 胶柱分离法	(156)
实验 46	酶联免疫吸附检测法(ELISA)测定植物激素含量	(159)
实验 47	吲哚乙酸含量与吲哚乙酸氧化酶活性的测定	(161)
I	吲哚乙酸含量的测定	(161)
II	吲哚乙酸氧化酶活性的测定	(162)
实验 48	IAA 的生物鉴定(芽鞘伸长法)	(164)
实验 49	赤霉素对 α -淀粉酶的诱导形成	(166)
实验 50	细胞分裂素对萝卜子叶的保绿作用	(168)
实验 51	酶联免疫法测定脱落酸(ABA)含量	(169)
实验 52	气相色谱法测定乙烯含量	(171)

实验 53	利用烯效唑(S ₃₃₀₇)培育矮壮幼苗	(173)
实验 54	植物春化作用和光周期现象的观察	(174)
	I 植物春化现象的观察	(174)
	II 植物光周期现象的观察	(175)
实验 55	花粉活力的测定	(176)
	I 碘-碘化钾染色法	(176)
	II 氯化三苯基四氮唑法(TTC法)	(176)
实验 56	逆境对植物细胞膜的伤害(电导仪法)	(178)
实验 57	超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定	(180)
实验 58	过氧化物酶活性的测定(比色法)	(182)
实验 59	植物组织中过氧化氢含量的测定	(184)
实验 60	过氧化氢酶活性的测定	(186)
	I 高锰酸钾滴定法	(186)
	II 紫外吸收法	(187)
实验 61	抗坏血酸过氧化物酶活性的测定	(189)
实验 62	植物体内超氧阴离子自由基含量的测定	(190)
实验 63	植物组织中丙二醛含量的测定	(192)
实验 64	植物体内游离脯氨酸含量的测定	(194)
实验 65	植物体内甜菜碱含量的测定(比色法)	(196)
实验 66	植物体内甜菜碱醛脱氢酶活性的测定	(198)
实验 67	植物膜脂脂肪酸的分析	(200)
实验 68	苯丙氨酸解氨酶活性的测定	(202)
附录		(204)
	一、常用指示剂的配制	(204)
	二、常见植物生长调节物质及其主要性质	(205)
	三、植物组织培养常用培养基	(206)
	四、常用酸碱试液配制及其相对密度、浓度	(207)
	五、常用有机溶剂及其主要性质	(207)
	六、基本常数	(209)
	七、硫酸铵饱和度常用表	(209)
主要参考文献		(211)

第一部分 基本操作

第一章 植物材料的采集、处理、保存与分析方法

植物生理实验使用的材料非常广泛，根据来源可划分为天然的植物材料（如植物幼苗、根、茎、叶、花等器官或组织等）和人工培养、选育的植物材料（如杂交种、诱导突变种、植物组织培养突变型细胞、愈伤组织、酵母等）两大类。按其水分状况、生理状态可划分为新鲜植物材料（如苹果、梨、桃果肉，蔬菜叶片，绿豆、豌豆芽下胚轴，麦芽、谷芽，鳞茎、花椰菜等）和干材料（小麦面粉，玉米粉，大豆粉，根、茎、叶干粉，干酵母等）两大类。因实验目的和条件不同而加以选择。

植物材料的采集和处理，是植物生理研究测定中的重要环节。在实际工作中，往往容易把注意力集中在具体的仪器测定上，而对于如何正确地采集和处理样品却不够注意，结果导致了较大的实验误差，甚至造成整个测定结果的失败。因此，必须对样品的采集、处理与保存给予足够的重视。

一、植物材料的采集

植物生理研究测定结果的可靠性（或准确性），首先取决于试验材料对总体的代表性，如果采样缺乏代表性，那么测定所得数据再精确也没有意义。所以，样品的采集除必须遵循田间试验抽样技术的一般原则外，还要根据不同测定项目的具体要求，正确采集所需试验材料。目前，随着研究技术的不断发展，应该不断提高采样技术的水平。

在作物苗期的许多生理测定项目中都需要采集整株的试材样品，在作物中、后期的一些生理测定项目中，如作物群体物质生产的研究，也需要采集整株的试材样品，有时虽然是测定植株的部分器官，但为了维持器官的正常生理状态，也需要进行整株采样。

除研究作物群体物质生产外，对于作物生理过程的研究来说，许多生理指标测定中的整株采样，也只是对地上部分的采样，没有必要连根采样，当然对根系的研究测定例外。采样时间因研究目的而不同，如按生育时期或某一特殊需要的时间进行。除逆境生理研究等特殊需要外，所取植株应是能代表试验小区正常生育无损伤的健康植株。

为了保证植物材料的代表性，必须运用科学方法采取材料。从大田或实验地、实验器皿中采取的植物材料，称为“原始样品”，再按原始样品的种类（如植物的根、茎、叶、

花、果实、种子等)分别选出“平均样品”,然后根据分析的目的、要求和样品种类的特征,采用适当的方法,从“平均样品”中选出供分析用的“分析样品”。

1. 原始样品的取样法

1) 随机取样

在试验区(或大田)中选择有代表性的取样点,取样点的数目视田块的大小而定。选好点后,随机采取一定数量的样株,或在每一个取样点上按规定的面积从中采取样株。

2) 对角线取样

在试验区(或大田)可按对角线选定5个取样点,然后在每个点上随机取一定数量的样株,或在每个取样点上按规定的面积从中采取样株。

2. 平均样品的取样法

1) 混合取样法

一般颗粒状(如种子等)或已碾磨成粉末状的样品可以采取混合取样法进行。具体的做法为:将供采取样品的材料铺在木板(或玻璃板、牛皮纸)上摊成均匀的一层,按照对角线划分为4等份。取对角的两份为进一步取样的材料,而将其余的对角两份淘汰。再将已取中的两份样品充分混合后重复上述方法取样。反复操作,每次均淘汰50%的样品,直至所取样品达到所要求的数量为止。这种取样的方法叫做“四分法”。

一般禾谷类、豆类及油料作物的种子均可采用这种方法采取平均样品,但注意样品中不要混有未成熟的种子及其他混杂物。

2) 按比例取样法

有些作物、果品等材料,在生长不均等的情况下,应将原始样品按不同类型的比例选取平均样品。例如,对甘薯、甜菜、马铃薯等块根、块茎材料选取平均样品时,应按大、中、小不同类型的样品的比例取样,然后再将每一单个样品纵切割开,每个切取 $1/4$ 、 $1/8$ 或 $1/16$,混在一起组成平均样品。

在采取果实的平均样品时,如桃、梨、苹果、柑橘等果实,即使是从同一株果树上取样,也应考虑到果枝在树冠上的各个不同方位和部位以及果实体积的大、中、小和成熟度上的差异,按各自相关的比例取样,再混合成平均样品。

3. 取样注意事项

(1) 取样的地点,一般在距田埂或地边一定距离的株行取样,或在特定的取样区内取样。取样点的四周不应该有缺株的现象。

(2) 取样后,按分析的目的分成各部分(如根、茎、叶、果等),然后捆齐,并附上标签,装入纸袋。有些多汁果实取样时,应用锋利的不锈钢刀剖切,并注意勿使果汁流失。

(3) 对于多汁的瓜、果、蔬菜及幼嫩器官等样品,因含水分较多,容易变质或霉烂,可以在冰箱中冷藏,或进行灭菌处理或烘干以供分析之用。

(4) 选取平均样品的数量应当不少于供分析用样品的两倍。

(5) 为了动态地了解供试验用的植物在不同生育期的生理状况,常按植物不同的生育期采取样品进行分析。取样方法系在植物的不同生育时期先调查植株的生育状况并区分为若干类型,计算出各种类型植株所占的百分比,再按此比例采取相应数目的样株作为平均样品。

二、分析样品的处理和保存

1. 鲜湿样品的处理与保存

从田间采取的植株样品，如是从植株上采取的器官组织样品，在正式测定之前的一段时间里，如何正确妥善的保存和处理是很重要的，它关系到测定结果的准确性。

一般测定中，所取植株样品应该是生育正常无损伤的健康材料。取下的植株样品或器官组织样品，必须放入事先准备好的保湿容器中，以维持试样的水分状况和未取下之前基本一致。否则，由于取样后的失水，特别是在田间取样带回室内的过程中，由于强烈失水，使离体材料的许多生理过程发生明显的变化，用这样的试材进行测定，就不可能得到正确可靠的结果。为了保持正常的水分状况，在剪取植株样品后，应立即插入有水的桶中，对于枝条，还应该立即在水中进行第二次剪切，即将第一次切口上方的一段在水中剪去，以防输导组织中水柱被拉断，影响正常的水分运输。对于器官组织样品，如叶片或叶组织，在取样后就应立即放入已铺有湿纱布带盖的瓷盘中，或铺有湿滤纸的培养皿中。对于干旱研究的有关试材，应尽可能维持其原来的水分状况。

采回的新鲜样品（平均样品）在做分析之前，一般先要经过净化、杀青、烘干（或风干）等一系列处理。

1) 净化

新鲜样品从田间或试验地取回时，常沾有泥土等杂质，应用柔软湿布擦净，不应用水冲洗。

2) 杀青

为了保持样品化学成分不发生转变和损耗，应将样品置于 105℃ 的烘箱中烘 15 min 以终止样品中酶的活动。

3) 烘干

样品经过杀青之后，应立即降低烘箱的温度，维持在 70~80℃，直到烘至恒重。烘干所需的时间因样品数量和含水量、烘箱的容积和通风性能而定。在无烘箱的条件下，也可将样品置蒸笼中以蒸汽杀青，而后于阴凉通风处风干。但在蒸汽杀青过程中，常有可溶性物质的外渗损失，因此，此法仅可作为测量大量样品干重时的变通方法，在进行成分分析时应尽量避免。烘干时应注意温度不可过高，否则会把样品烤焦，特别是含糖较多的样品，更易在高温下焦化。为了更精密地分析，避免某些成分的损失（如蛋白质、维生素、糖等），在条件许可的情况下最好采用真空干燥法。

此外，在测定植物材料中酶的活性或某些成分（如维生素 C、DNA、RNA 等）的含量时，需要用新鲜样品。取样时注意保鲜，取样后应立即进行待测组分提取；也可采用液氮中冷冻保存或冰冻真空干燥法得到干燥的制品。干燥的制品放在 0~4℃ 冰箱中保存即可。在鲜样已进行了匀浆，尚未完成提取、纯化，不能进行分析测定等特殊情况下，也可加入防腐剂（甲苯、苯甲酸），以液态保存在缓冲液中，置于 0~4℃ 冰箱即可。但保存时间不宜过长。

2. 干样品的处理与保存

已经烘干（或风干）的样品，可根据样品的种类、特点进行以下处理。

1) 种子样品的处理

一般种子(如禾谷类种子)的平均样品清除杂质后要进行磨碎,在磨碎样品前后都应彻底清除磨粉机(或其他碾磨用具)内部的残留物,以免不同样品之间的机械混杂,也可将最初磨出的少量样品弃去,然后正式磨碎,最后使样品全部无损地通过1 mm筛孔的筛子,混合均匀作为分析样品贮存于具有磨口玻塞的广口瓶中,贴上标签,注明样品的采取地点、试验处理、采样日期和采样人姓名等。长期保存的样品,贮存瓶上的标签还需要涂蜡。为防止样品在贮存期间生虫,可在瓶中放置一点樟脑或对位二氯甲苯。

对于油料作物种子(如芝麻、亚麻、花生、蓖麻等)需要测定其含油量时,不应当用磨粉机磨碎,否则样品中所含的油分吸附在磨粉机上将明显地影响分析的准确性。所以,对于油料种子应将少量样品放在研钵内研碎或用切片机切成薄片作为分析样品。

2) 茎秆样品的处理

烘干(或风干)的茎秆样品,均要进行磨碎,磨茎秆用的电磨与磨种子的磨粉机结构不同,不宜用磨种子的电磨来磨碎茎秆。如果茎秆样品的含水量偏高而不利于磨碎时,应进一步烘干后再进行磨碎。

3) 多汁样品的处理

柔嫩多汁样品(如浆果、瓜、菜、块根、块茎、球茎等)的成分(如蛋白质、可溶性糖、维生素、色素等)很容易发生代谢变化和损失,因此常用其新鲜样品直接进行各项测定及分析。一般应将新鲜的平均样品切成小块,置于电动捣碎机的玻璃缸内进行捣碎。若样品含水量不够(如甜菜、甘薯等)可以根据样品重加入0.1~1倍的蒸馏水。充分捣碎后的样品应成浆状,从中取出混合均匀的样品进行分析。如果不能及时分析,最好不要急于将其捣碎,以免其中化学成分发生变化而难以准确测定。

有些蔬菜(如含水分不太多的叶菜类、豆类、干菜等)的平均样品可以经过干燥磨碎,也可以直接用新鲜样品进行分析。若采用新鲜样品,可采用上述方法在电动捣碎机内捣碎,也可用研钵(必要时加少许干净的石英砂)充分研磨成匀浆,再进行分析。

在进行新鲜材料的活性成分(如酶活性)测定时,样品的匀浆、研磨一定要在冰浴上或低温室内操作。新鲜样品采后来不及测定的,可放入液氮中速冻,再放入-70℃冰箱中保存。

供试样品一般应该在暗处保存,但是,对于供光合、蒸腾、气孔阻力等的测定样品,在光照下保存更为合理。一般可将这些供试样品保存在室内光照度下,但从测定前的0.5—1.0 h开始,应对这些材料进行测定前的光照预处理,也叫光照前处理。这不仅是为了使气孔能正常开放,也是为了使一些光合酶类能预先被激活,以便在测定时能获得正常水平的值,而且还能缩短测定时间。光照前处理的光照度,一般应和测定时的光照条件一致。

测定材料在取样后,一般应在当天测定使用,不应该过夜保存。需要过夜时,也应在较低温度下保存,但在测定前应使材料温度恢复到测定条件的温度。

对于采集的籽粒样品,在剔除杂质和破损籽粒后,一般可用风干法进行干燥。但有时根据研究的要求,也可立即烘干。对叶片等组织样品,在取样后则应立即烘干。为了加速烘干,对于茎秆、果穗等器官组织应事先切成细条或碎块。

三、待测植物样品的分析方法

植物生理学研究经常采用的分析方法有化学分析法和仪器分析法两种，其中化学分析方法是利用一种物质与另一种物质能够发生化学反应所建立起来的相应分析方法。例如测定植物叶片中糖或淀粉含量时，可以根据糖与蒽酮- H_2SO_4 试剂或其他化学试剂发生的显色反应，建立一种相应的化学分析方法。在测定呼吸速率时，可以利用稀碱液吸收呼吸过程产生的 CO_2 ，再用酸去滴定剩余的碱，从而间接地进行测定。

仪器分析方法大致可分两类，一类是根据某些反应产物的消长情况，直接利用它的理化性质加以检测，例如红外线 CO_2 分析仪检测光合、呼吸过程中 CO_2 的消长就属此类。另一类是利用偶联反应体系进行间接检测，例如分光光度法、荧光法、色谱法、旋光测定法等。这些方法需要在样品上机之前，进行一系列的预处理，使样品在处理过程中进行化学反应出现颜色改变，或转变成仪器可以识别形态，产生特异信号，才能使仪器作出反应，达到检测的目的。

四、实验结果的数据处理与分析

在实验中不仅要认真操作，如实记录实验数据，还必须对实验结果进行科学合理的处理与分析。这是科学研究中的一个重要环节。它可帮助我们分析结果的正确性，检查产生误差的原因，提高分析测定的可靠程度，指导分析研究工作中的实验设计和质量控制。

1. 有效数字及其运算

测定的有效数字是指分析测定中实际能测量到的数据。记录数据和计算结果，都应以测定方法和所用仪器准确程度来决定。所保留的有效数字中，只有最后一位是可疑数字或不定数字。例如在千分之一分析天平上称得某药品 0.560 g，就不能记为 0.56 g 或 0.560 0 g，而只能记为 0.560 g。0.560 0 g 药品需要用万分之一分析天平称取，而 0.56 g 药品只需要用百分之一天平称取就可以。10 mL 移液管读数到小数第二位，如 6.40 mL，0.1 mL 移液管可读数到小数第四位，如 0.060 0 mL。

实验数据记录及运算的一般规则是：

(1) 记录实验数据时，只应保留一位不定数字。

(2) 在运算中去掉多余尾数后进位或弃取，以“四舍五入”或“四舍六入五留双”为原则。

(3) 运算中表示倍数或分数关系的自然数不含不定数，看做无限有效。pH、 $\log K$ 等对数值，其有效数字的位数仅取决于小数部分的位数。

(4) 几个数相加减或相乘除时，应取有效数字的位数按绝对误差最大者为准，即依小数点后位数最少的一个数据决定。例如： $0.340 (\pm 0.001) + 9.25 (\pm 0.01) - 1.236 5 (\pm 0.000 1)$ 三个数据中 9.25 的绝对误差最大，是 0.01，故应为： $0.94 + 9.25 - 1.24 = 8.35$ 。

2. 误差和实验结果的可靠性

在分析测定过程中，误差是绝对存在的，必须应用统计学的方法分析实验结果的正确性，并判断其可靠程度。实验中，每种处理至少要设 3 次重复，否则无法进行统计检测。

测得值与真实值之间的差值称为误差。测得值大于真实值，误差为正；反之，误差为

负。由于方法误差、仪器误差、试剂误差及操作误差等一些经常性的原因所引起的误差称为系统误差；由于一些偶然的外因所引起的误差称为偶然误差。系统误差可以通过校正仪器，设置标准物对照和设置空白实验来尽可能地消除；偶然误差随机发生呈正态分布，可采取平均取样或多次取样的方法减少。前者影响分析结果的准确度，后者影响分析结果的精密度。准确度和精密度共同影响分析结果的可靠性。

所谓准确度是指测得值与真实值符合的程度，它用误差来表示。误差分为绝对误差和相对误差。所谓精密度是指测定结果的再现性，即几次重复测定彼此间符合的程度，它用偏差来表示。偏差也分为绝对偏差和相对偏差。

3. 误差分析

在对实验结果进行分析时，对同一样品所得到的多个实验数据，最简单的办法是计算其算术平均值 (\bar{X})，但这还不能很好地反映测定结果的可靠性，还需要计算出偏差或相对偏差。在分析中，当数据不多时，用算术平均偏差或相对平均偏差表示精密度较简便；而当数据较多或分散程度较大时，用标准偏差即均方差 S 或相对标准偏差即变异系数 CV 表示精密度则更可靠。为了检测某一样品所属总体平均数和某指定的同类样品总体平均数之间，或两种处理取样所属的总体平均数之间有无显著差异时，在总体方差未知，又是小样本情况下，可以用 t 测验，再根据设定显著水平和自由度大小，从 t 值表中查得概率值 P ，即可推断不同样品或同一样品的不同处理之间是否具有显著差异性及其差异水平。

所谓 t 值，实质上是差数的 5% 和 1% 置信区间；它只适用于检测两个相互独立的样品平均数。要明确多个平均数之间的差异显著性，还必须对各平均数进行多重比较。在进行多重比较时，多采用最小显著极差法 (LSR 法)，这一方法的特点是不同平均数之间的比较采用不同的显著差数标准，可用于平均数间所有相互比较，其常用方法有新复极差测验和 q 测验两种。各平均数经多重比较后，常采用标记字母法表示，在平均数之间，凡有一个相同标记字母的即为差异不显著，凡具有不同字母标记的即为差异显著。用小写字母 a 、 b 、 c 等表示 $\alpha=0.05$ 显著水平，大写字母 A 、 B 、 C 等表示 $\alpha=0.01$ 显著水平。差异显著性也可用标号的方法表示，凡达到 $\alpha=0.05$ 水平 (差异显著) 的数据，在其右上角标一个 “*” 号，凡达到 $\alpha=0.01$ 水平 (差异显著) 的数据，在其右上角标两个 “**” 号，凡未达到 $\alpha=0.05$ 水平的数据，则不予标记。

4. 方差分析的基本步骤

(1) 将资料总变异的自由度和平方和分解为各变异因素的自由度和平方和，进而算出均方差。

(2) 计算均方比，作出 F 测验，以明了各变异因素的重要程度。

(3) 对各平均数进行多重比较。具体方法可参考有关专业书籍。

5. 一元线性回归

在仪器分析中，常常需要把待测物质的标准含量对测得的物理量绘制成标准曲线，然后再根据标准曲线去查出待测样品的含量。这种方法比较繁琐，而且查出的数值也不够精确。用一元线性回归法计算则显得更为方便省时。这样不仅能用相关系数的大小表示线性关系的程度，而且能连续运算出最终结果。

在进行一元线性回归法计算时，一般用 x 表示待测的物质质量， y 表示测得的物理量，一元线性回归方程为： $y=a+bx$ ，式中 a 称为回归截距， b 称为回归系数。

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$$y = \bar{y} - b\bar{x}$$

式中, y_i : 制作标准曲线的各标准溶液测得的物理量, \bar{y} : 这几个物理量的算术平均值; x_i : y_i 相对应的物理量, \bar{x} : 这几个物理量的算术平均值。用 r 代表相关系数, 表示为:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

这样, 根据样品测得的物理量 y , 便可以从回归方程计算出它的相对应的物理量 x 。

$$x = \frac{y - a}{b}$$

下面以脯氨酸测定为例, 说明用两组若干观测值, 通过 Excel 求得直线回归的方程 $y = a + bx$ 。

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8
10 μ g/mL Pro 用量/ mL	0.0	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	1.8	2.0
蒸馏水/ mL	2.0	1.8	1.6	1.2	0.8	0.4	0.2	0.0
每管 Pro 含量/ μ g	0.0	2.0	4.0	8.0	12.0	16.0	18.0	20.0
A_{520}	0	0.025	0.057	0.116	0.175	0.236	0.271	0.308

上表中, A_{520} 是在分光光度计上测定得到的已知系列脯氨酸含量的吸光值。现在以每管脯氨酸含量为 y 轴, 以 A_{520} 系列为 x 轴, 计算回归方程。

(1) 打开 Excel, 将每管 Pro 量 (μ g) 和 A_{520} 的数据横向输入到 Excel 的两行单元格中, 将鼠标移至空单元格中。

(2) 点击“插入”中的“ $f(x)$ ”, 然后选择对话框中“选择类别”下拉菜单中的“统计”。再在“选择函数 (N)”中, 点击“LINEST”。

相关系数 (r) 是表示两个变量 (x, y) 之间线性关系密切程度的指标, 其值在 -1 至 1 间。如两者呈正相关, r 为正值, $r=1$ 时为完全正相关; 如两者呈负相关则 r 为负值, 而 $r=-1$ 时为完全负相关。完全正相关或负相关时, 所有图点都在直线回归线上; 点的分布在直线回归线上下越离散, r 的绝对值越小。 r 的绝对值越接近 1, 相关越密切; 越接近于 0, 相关越不密切。当 $r=0$ 时, 说明 x 和 y 两个变量之间无直线关系。

第二章 实验室基本操作

一、玻璃仪器的洗涤

将新购买的玻璃仪器用自来水冲洗其表面的泥污，然后浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜。待用自来水冲净后再进一步洗涤。

使用过的玻璃仪器先用自来水冲洗，然后将所有待洗的玻璃仪器放在含有洗衣粉的温水中细心刷洗。待用自来水充分冲洗后用少量蒸馏水刷洗数次。凡洗净的玻璃仪器其内外壁上都不应带有水珠，否则表示未洗干净。仪器上的洗衣粉必须冲净，因为洗衣粉可能干扰某些实验。

比较脏的器皿或不便刷洗的仪器（如吸管）先用软纸擦去可能存在的凡士林或其他油污，用有机溶剂（如苯、煤油等）擦净后，用自来水冲洗后控干，再放入铬酸洗液中浸泡过夜。取出后用自来水反复冲洗直至除去痕量的洗液。最后用蒸馏水刷洗数次。

普通玻璃仪器可在烘箱内烘干，但定量的玻璃仪器不能加热，一般采用控干或依次用少量酒精、乙醚刷洗后用温热的气流吹干。

铬酸洗液的配制方法有多种，现介绍常用的一种方法：小心加热100 mL工业用浓硫酸，同时缓慢加入5 g工业用重铬酸钾粉末。边加边搅拌，待全部重铬酸钾溶解后，冷却备用。洗液应贮入带塞的玻璃器皿中，玻璃器皿底部最好垫有玻璃纤维以减少仪器破损。此洗液可反复使用多次，如洗液变为绿色或过于稀释则失效。

二、搅拌和振荡

配制溶液时，必须充分搅拌或振荡混匀。常用的溶液混匀方法有以下3种。

1. 搅拌式

搅拌式适用于烧杯内溶液的混匀。

- (1) 搅拌使用的玻璃棒必须两头都烧圆滑。
- (2) 搅棒的粗细长短，必须与容器的大小和所配制的溶液的多少成适当比例关系。
- (3) 搅拌时，尽量使搅棒沿着器壁运动，不搅入空气，不使溶液飞溅。
- (4) 倾入液体时，必须沿器壁慢慢倾入，以免有大量空气混入。倾倒表面张力低的液体（如蛋白质溶液）时，更须缓慢仔细。
- (5) 研磨配制胶体溶液时，要使杵棒沿着研钵的一个方向进行，不要来回研磨。

2. 旋转式

旋转式适用于锥形瓶、大试管内溶液的混匀。振荡溶液时，手握住容器后以手腕、肘或肩做轴旋转容器，不应上下振荡。

3. 弹打式

弹打式适用于离心管、小试管内溶液的混匀。由一只手持管的上端，用另一只手的手指弹动离心管。也可用同一只手的大拇指和食指持管的上端，用其余手指弹动离心管。手