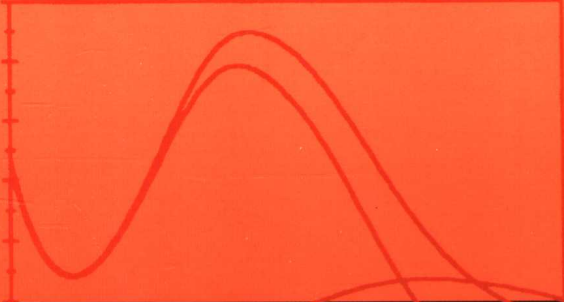




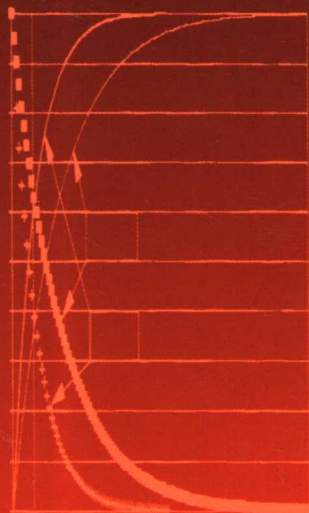
生物体系中的 化学测量

CHEMICAL MEASUREMENTS in BIOLOGICAL SYSTEMS

KENT K. STEWART RICHARD E. EBEL 著

上官棣华 赵 睿 等译

刘国詮 校



化学工业出版社

生物体系中的化学测量

Kent K. Stewart Richard E. Ebel 著

上官棣华 赵 睿 等译

刘国詮 校



化学工业出版社

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物体系中的化学测量/上官棣华, 赵睿等译. 刘国詮校. —北京: 化学工业出版社, 2003. 7
ISBN 7-5025-4684-7

I. 生… II. 上… III. 化学分析-应用-生物学-实验
IV. Q-331

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 059576 号

Chemical Measurements In Biological Systems. Kent
K. Stewart Richard E. Ebel

Copyright © 2000 by John Wiley & Sons, Inc. All
Rights Reserved.

保留所有版权, 授权翻译由威利父子出版的英文版
著作权合同登记号, 图字: 01-2003-0631 号

生物体系中的化学测量

Kent K. Stewart Richard E. Ebel 著

上官棣华 赵睿 等译

刘国詮 校

责任编辑: 任惠敏 王蔚霞

责任校对: 吴桂萍

封面设计: 蒋艳君

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 850 毫米×1168 毫米 1/32 印张 8 $\frac{3}{4}$ 字数 188 千字

2003 年 9 月第 1 版 2003 年 9 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4684-7/Q·66

定 价: 26.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

译 者 序

复杂生物体系中生命物质的化学测量是揭示生命奥秘的重要手段，在疾病的诊断和预防过程中也日益凸显其重要作用。为了方便生物学家进行生物体系中的化学测量，在很多涉及化学分析的生物类书籍中，往往列出了分析过程的详细操作步骤，操作者按图索骥即可完成所需分析工作。但是，由于生物体系的成分复杂，待测物浓度往往较低；若针对不同体系、不同对象或不同要求的样品均采用同一测定程序往往难以得出准确的结果，有时甚至会引起假象，而操作者却并不知晓。如果操作者能清楚地了解测定方法，根据实际情况稍做变通或选用更合适的方法就能避免这种情况的发生。但是，目前多数介绍分析方法的专著或太专或太泛，难以适应从事生命科学工作的读者之需，而结合生物体系的特点介绍生物体系化学测量基本原理和应用技术的著作却寥若晨星。

适逢化学工业出版社任惠敏先生推荐，我们读到了 John Wiley & Sons 公司出版的《生物体系中的化学测量》一书。书中介绍了目前普通生物实验室常用的化学测量技术的基本概念和原理，以及与之密切相关的基础知识（例如水、pH 值和缓冲溶液），同时结合生物体系的特点介绍了各种方法的应用范围和局限性，以及验证方法有效性和数据真实性的评价方法。书中略去了深奥晦涩的理论，多用典型的应用事例，深入浅出，通俗易懂，前后连贯，自成一体。非常适合从事生命科

学工作的读者阅读，是一本完整而实用的生物分析指导书。读后掩卷，爱不释手，遂将其译成中文，以期对这方面书籍短缺的状况有所补益。

本书的译稿是集体智慧和劳动的结晶，译者均是从事生物分析的化学工作者。他们是赵睿（第一章、第七章及附录一、四）、陈志勇（第二章、第十章）、上官棣华（第三章、第四章、第九章）、刘阳（第五章、第六章）、董钰（第八章、第十一章及附录二、三）等几位同志，最后还请刘国詮教授进行了校阅。译者力求“信、达、雅”的原则。对于原书中少量的错误和不妥之处经过多方考证之后也进行了改正或做出说明。但囿于学识及水平所限，疏漏不妥之处在所难免，恳请同行专家及读者指正。

上官棣华 赵 睿

于中国科学院化学研究所

2003 年 4 月

We dedicate this book to our wives, Peggy and Edie; our children, Elizabeth, Cynthia, Richard, and Robert; and Ed and Beth. Also to our grandchildren, Erin, Laura, David, and Paige; and Alica and Wesley.

致 谢

本书的一些基本构想，是多年来与众多同仁反复讨论而形成的。这里需要特别感谢的是我们在维吉尼亚理工学院和州立大学的同事以及 Kent Stewart 在美国农业部农业研究中心食品成分实验室的同事们。也要特别感谢我们的老师 Lyman Craig 博士，佛罗里达州立大学（KKS）加利福尼亚伯克利分校的老师，以及西北大学和威斯康星大学（REE）的老师。在许多图形的绘制上 Rita Wilkinson 给予了很多帮助。我们感谢所有这些人。

Kent K. Stewart

Richard E. Ebel

序

生命科学正处在由生物化学、分子生物学和生物工艺学的快速发展所带来的巨大变革之中。生物化学是这种变革的基础之一。今天，几乎每一个涉及生命科学的人，不管是处在教育、工业，还是政府机构，都必须有生物化学的基础。这个基础的一个关键内容是对生物学体系中的化学测定方法的了解。本书主要介绍进行生物体系中化学测量的基本概念和原理。旨在向生命科学工作者介绍怎样进行生物体系中的化学测量以及怎样取得和验证所得到的数据，并提供一些能够用来回答生命科学中某些学科重要问题的手段。

作者还没有发现关于生物体系中化学测量方面基础知识的书籍。许多分析化学教科书则着重于重量分析、滴定分析和电化学分析，这些技术在现代生命科学实验室很少用到。传统的分析化学教科书通常着重于无机物的分析或是化学制品中相对简单基质的分析，而对于生物学样品的分析则讨论得很有限。有几本很好的用于仪器分析的书，强调的是仪器而不是分析方法。这些书对从事分析化学的人有用，但对从事生命科学的人用处不大。一些面向技术人员的教科书很好地覆盖了传统的分析技术，但大多数是针对方法或仪器本身的，缺乏对生物体系复杂性以及化学测量基本原理的讨论。除了生物化学实验教科书以外，所有的书对酶测定以及将酶用做反应试剂的基本原理的讨论都不完善或根本没有。同样，免疫化学分析在分析化学

教科书中也很少涉及。对于分析验证及其质量控制必要性的讨论也相当少，通常只在专门的书中才能找到。

本书可供从事生命科学，如生物学、生物技术、微生物学、植物学、动物科学、遗传学、人类和动物营养学、食品科学以及生态学的大学生、研究生和专业人员参考。大多数分析化学著作是面向传统化学行业从业人员的，而本书则面向生命科学和生物技术行业的从业人员。我们相信本书可用于生物化学专业或分析化学专业，但也不局限于这些专业。

撰写本书的基本想法是着重于传授测量方法的基本概念和基本原理而非进行测量所用的仪器，同时也不强调特殊的方法学。分析技术有很多种，而且错综复杂，要想让每个分析工作者熟悉每项技术的每个细节是不现实的。但重要的是，要让分析工作者理解生物体系化学测量的基本概念，从而知道怎样从大量现有的方法中选择合适的分析方法，了解该方法的使用范围和局限性，并能改进现有的方法使它适合于手边的工作，以及严谨地评价从给定基质的给定方法中得到的结果。更重要的是，目前从事于生命科学的分析工作者需要了解并学会使用多个步骤“解决问题的技术”。

对于生物基质中待测物的化学分析，其潜在的问题是基质复杂和待测物浓度低。因此本书强调了空白、质量控制和分析方法确证等主题。本书的目的在于给学生提供充足的背景资料，以使他们能够工作于使用生物化学分析的任何实验室，即使他们读懂和理解方法的概况，能够建立和使用一个给定的分析方法，能够评估从给定的分析中得到的数据，并能够以一种完善而简练的形式表达分析结果。

本书中的专题包括了生物体系化学测量中的常用方法，即

pH 值、缓冲体系、分光光度法、比色反应、酶浓度的测定、酶参数(包括 $V_{\max}$ 、 K 和 K_s)的测定、酶作为反应试剂的使用、基本色谱(包括 TLC、LC、HPLC 和 GLC)、电泳、酶联免疫吸附分析(ELISA)、数据验证和分析质量控制。

本书不包括小分子量或中等分子量天然产物的结构解析,因为这些内容在其他书中已得到很好的阐述。本书有选择地不去讨论许多重要却又专门的主题,如毛细管电泳、GC-MS、LC-MS、SFC、SFE、NMR、荧光光谱、原子光谱、Northern 和 Southern 印迹法、细胞转化、限制性内切酶图谱、克隆、DNA 测序、DNA 指纹和放射性同位素。尽管这些技术对于生命科学很重要,但它们通常只用于专门的实验室,而不适合在这种介绍性的书中讨论,但本书中强调的概念对于这些测量体系同样重要。

大部分读者在实验室中应该都能接触或常规使用计算机。如果读者使用电子制表软件,如 Windows™ 绘图分析、Microsoft® Excel 或 Corel® Quattro-Pro 等,书中所介绍的计算将容易得多。尽管也可以用手工计算,但这些手工计算是单调乏味的,因此我们强烈推荐读者使用电子制表软件进行数据处理和数据表达。

鉴于目前分析化学书籍在生命科学中的状况,作者相信本书各专题的选择是独特的。希望本书能够弥补需要进行生物体系化学测量的生命科学从业者培训中的不足。

Kent K. Stewart

Richard E. Ebel

内 容 提 要

本书主要介绍进行生物体系中化学测量的基本概念和原理,以及与之密切相关的基础知识(如水、pH值和缓冲体系),同时结合生物体系的特点介绍了生物体系化学测量中的常用方法,即分光光度法、比色反应、酶浓度的测定、酶参数的测定,酶作为反应试剂的使用、各种色谱(包括TLC、LC、HPLC和GLC)、电泳、酶联免疫吸附分析(ELISA)、数据验证和分析质量控制。

本书是一本完整而实用的生物分析指导书,可供从事生命科学的工作者以及相关专业的大学、研究生等专业人员参考使用。

目 录

第一章	绪论	1
第二章	水、pH 值和缓冲液	17
第三章	紫外及可见吸收分光光度法和光度测定法	43
第四章	检测反应(比色反应)	71
第五章	酶及其作为试剂的应用	93
第六章	酶活性测定	115
第七章	复杂混合物中样品测定的工具——色谱法	132
第八章	电泳和其他电动分离	161
第九章	酶联免疫吸附测定法	187
第十章	分析方法的质量控制与数据确认	201
第十一章	分析方法的选择	212
附录一	单位	233
附录二	生物学体系中化学分析的统计学	238
附录三	标准曲线和线性回归分析	248
附录四	稀释表	264

第一章 绪 论

测量：“通过测量，你便可以用数字去谈论并表述某一物体，从而掌握它的某些性质；假如你不能通过数字表达这些性质的话，你的知识还只是属于不完全和较为贫乏的类型；测量，可以看做是认识这一物体的开始，这样，尽管是非常初步的，但已经使你的认识上升到了‘科学’的阶段。”

——罗得·开尔文

生物体系中的化学测量需要兼顾理论与实践两个方面。如果我们陶醉于理论的纯粹并将实践贬低为粗浅的话，那么我们便不可能在生物体系中进行有意义的测量。反之，如果我们忽略理论而只强调实践，毋庸置疑，我们将以对分析数据进行不正确的解释而告终。

生命科学是在生物化学、分子生物学和生物技术快速发展、变革中产生的一门新兴学科。今天，涉及生命科学的几乎每一个人，包括工作在教育界、工业界和政府部门的人们，均需要对生物体系的化学测量过程有一个基本的了解。当分析工作者希望检测一个已知化合物时，他们可以从许多技术中进行选择。问题不再是“样品中一个特定组分的分析方法是什么？”而是“哪一种技术应该用于这一特定组分的分析？”。分析技术有如此之多，且这些技术又相当复杂，因此期望每一位分析工作者都掌握每一种技术是不切实际的。让分析工作者熟悉每一种技术的复杂细节并不重要，重要的是他们应该懂得生物体系

中化学测量的基本概念，这样他们就可以在众多技术中进行明智的选择，就可以对所使用的技术进行比较，就可以对分析结果进行恰如其分的评价。

定义：测量是对一个或一套样品中的一个特定被分析物的含量进行测定的一种方法。

定义：分析是对一个或一套样品中的一个特定被分析物的含量进行测定。

定义：被分析物是需进行分析的物质，如元素、离子或化合物。

定义：分析基质是包含被分析物的样品的化学环境。

进行生物化学分析是为了回答一些特定的问题。生物体系中进行化学分析的典型问题●包括：样品中有没有要检测的物质？样品中这一物质的含量是多少？这个样品中被分析物的浓度大于、小于还是等于另一种样品中同一物质的浓度？产品中所含被分析物的量是否符合规格？一类化合物中独立组分的成分是什么（如，一个蛋白质中的氨基酸组成是什么）？对样品的处理是否会使样品改变？不同样品中被分析物的平均含量是多少？不同样品中被分析物的统计学分布是什么？

1. 生物活性

进行生物体系中化学测量的分析工作者将面临一些特殊的挑战。当一名分析工作者被委托进行生物活性的测定时，向他解释这个问题可能变得比较复杂。那些进行生物体系中化学测

● 关于已知化合物结构测定的书已经有很多，本书将不对此进行讨论。

量的分析工作者需要明白，他们将频繁地工作在生物学与化学的交叉点上。生物学与生命体的刺激和响应有关，而化学则与分子水平的化学结构和化学反应有关。那些进行生物体系化学测量的分析工作者经常涉及两种不同的科学文化，每一种文化都有它们自己的特点。表面上相同的术语在两个科学领域中可以表示不同的意思。此外，在很多情况下，一个单一的生物响应要由许多化学物质引发。也有很多情况，一些生物响应只由单一化学物质引发，如“维生素”的概念即是一种生物活性。有 6 种初级化合物具有维生素 B₆ 的活性，大于 20 种化合物具有维生素 A 的活性。要对具有维生素 B₆ 活性的物质进行化学分析，就不得不分析 6 种不同的化合物。要分析具有维生素 A 活性的物质，就需要分析大约 20 种不同的化合物。

2. 浓度

引起生物响应的化学物质的浓度范围是相当宽的。在许多生物体系中，水的浓度达到 55mol/L。当生物物质达到水的浓度，且水的活性[●]小于 0.2 时，许多生命过程便中止了。麦角酸酰二胺在每 70kg 体重 1 μ g 的浓度，即相当于一千亿分之一时，能引起相当剧烈的人体反应。在许多情况下，一个纳摩/升浓度的特殊化合物将引起一种生物响应。这是因为在如此低浓度下进行化学分析是很难的。有人可能想，简单的解决方法就是进行这些被分析物生物活性的测定，以达到生物测量的目的。可是经验告诉我们，生物测量是非常复杂的。生物响应经常随着化合物浓度的变化而变化。因为生物测量是高度可变的，所以经常需要进行大量的试验以获得期望的分析精度，但是大量的试验几乎总是导致高成本。

● 参见第二章，关于水的活性有更详细的讨论。

许多生物响应随着时间的延长而慢慢出现，所以生物试验经常需要很长的周期。生物响应通常具有种属专一性，从一个种属获得的结果不一定与从另一个种属获得的结果完全相同，因此生物测量通常只在不得不做的时候才进行。一般选择用化学和物理的方法来测定已确定生物活性组分的浓度。迄今为止，仍有许多被分析物，它们在很低的浓度下已经具有生物活性，但是却没有有效的化学或物理分析方法，得到令人满意的测定结果，此时生物分析是惟一可用的方法（例如，小鼠毒性分析仍然是活性波特淋菌毒素分析的最好方法）。

3. 准确度和精密度

对于生物体系中待分析物的无论什么分析方法，我们所期望的均是准确和精密。准确度和精密度的区别如图 1.1 所示。

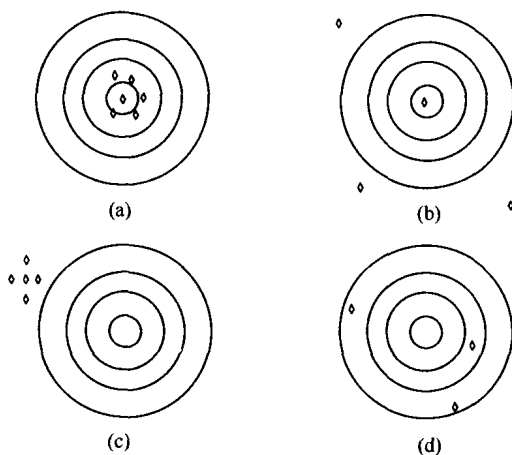


图 1.1 准确度和精密度

(a) 准确和精密；(b) 准确，但不精密；(c) 不准确，但精密；(d) 不准确和不精密

定义：一个结果的准确度是指这个结果如何接近真值的程度。

定义：一个结果的精密度是指它的重复性（重现性）。

准确的分析方法应该具有选择性，能够产生只针对于目的物的结果。不准确的分析方法则可以产生或部分产生针对于非目的物的结果。误差经常由系统误差引起，它通常不是随机的。系统误差由污染物、漂移、不正确的校准、计算，以及报告错误等因素引起。干扰化合物存在时的通常结果是获得的值偏高。不是非常频繁，但仍普遍存在的是一些化合物抑制响应，使结果偏低，一个例子是食品中具有抗菌活性的同效维生素[●]的微生物分析。在非常低的信噪比条件下工作，可能是造成结果不准确的另一个重要原因。

确定一个分析方法的准确度可能非常困难，通常的惯例是当分析的准确度可以被质疑时，它就不能被确认。分析工作者仍然有许多工作要做，以提高分析结果准确的概率。至少分析工作者应该确定，所使用的分析方法对于被分析物在所关心的范围内的浓度改变，可以给出成比例的响应。在分析未知浓度样品的同时，经常对已知浓度的样品进行分析，以确定分析方法的准确度。

应该使用适当的空白和标准对照，以证实基质中的其他组分既没有给出一个假的正响应，也没有干扰分析体系的响应。可以将已知量的被分析物多次加入至样品中，通过测定其回收率以证实原始结果的准确性。确证方法准确度的概念将在本书中进行更详细的讨论。用于鉴定分析方法之间偏差的统计测试

● 同效维生素（vitamer）是指引起维生素生物活性的一组化学物质。