

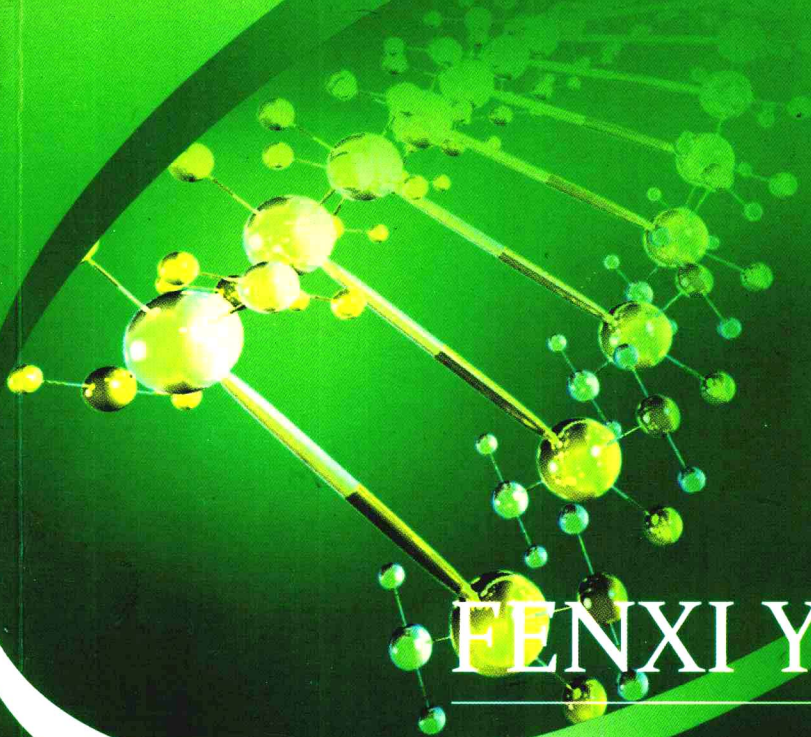


卫生部“十一五”国家级规划教材

医学实验学系列教材

分析与检测实验技术

主编 张文峰 黄林邦



FENXI YU JIANCE

SHIYAN JISHU



卫生部“十一五”国家级规划教材

医学实验学系列教材

分析与检测实验技术

主 编 张文峰 黄林邦

副主编 李青松 范小娜 范启兰 严宜明

陈水亲 赖日勇

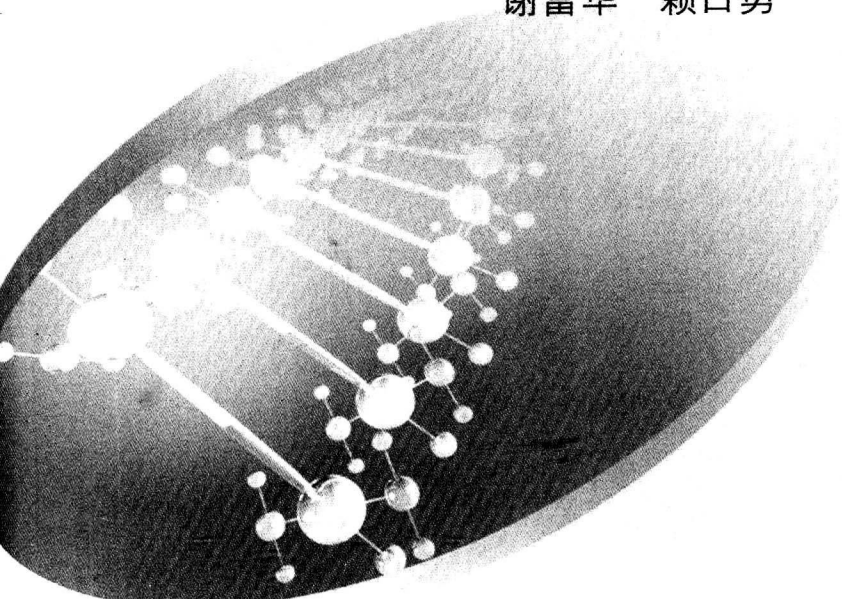
编 委 (以姓氏笔画为序)

许春鹃 李青松 李银保 严宜明

张文峰 陈水亲 范小娜 范启兰

罗晓婷 夏侯国论 徐 静 黄林邦

谢富华 赖日勇



江西高校出版社

图书在版编目(CIP)数据

分析与检测实验技术/张文峰,黄林邦主编. —南昌:
江西高校出版社, 2009.1

(医学实验学系列教材)

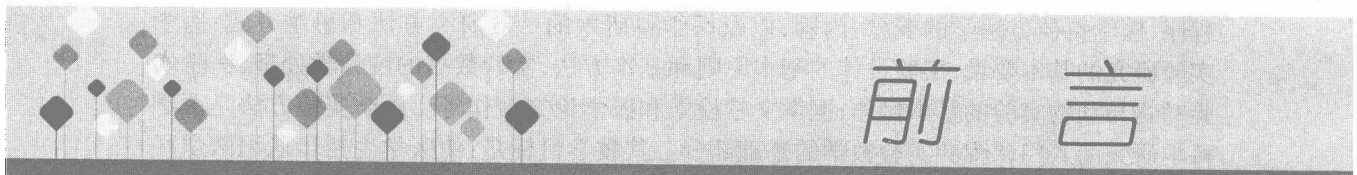
ISBN 978 - 7 - 81132 - 491 - 4

I . 分... II . ①张... ②黄... III . 医学检验 - 实
验 - 医学院校 - 教材 IV . R446 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009) 第 005541 号

出版发行	江西高校出版社
社 址	江西省南昌市洪都北大道 96 号
邮 政 编 码	330046
总编室电话	(0791)8504319
销 售 电 话	(0791)8513417
网 址	www.juacp.com
印 刷	江西教育印刷厂
照 排	江西太元科技有限公司照排部
经 销	各地新华书店
开 本	787mm × 1092mm 1/16
印 张	17.5
字 数	405 千字
版 次	2009 年 2 月第 1 版第 1 次印刷
印 数	1 ~ 5000 册
书 号	ISBN 978 - 7 - 81132 - 491 - 4
定 价	24.60 元

版权所有 侵权必究



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,我们提出了临床医学专业实验课程改革项目。其总体目标和基本思路是:遵循科学发展和教育教学规律,根据 21 世纪社会与科技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实验技术课程,编写了这套医学实验学系列教材。全套教材包括《医学实验方法概论》、《形态实验技术》、《机能实验技术》、《分析与检测实验技术》、《临床基本技能与诊疗技术》五大分册,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,各分册规定了明确的教学目标,并可依据其教学目标,建立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。各分册的教学目标和基本内容是:

《医学实验方法概论》: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;医学实验研究的基本要素,实验设计的基本原则和基本方法,实验数据的统计学处理,医学实验动物与动物实验的基本操作;医学文献检索和医学论文写作等。医学实验方法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:使医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。

《形态实验技术》: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,构建包括常规显微镜的使用与维护,病原学形态观察与显微诊断技术,组织学、细胞学及病理学形态观察与显微诊断技术等几部分内容。其教学目标是:使医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。

《机能实验技术》: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,构建包括实验动物与动物实验的基本知识、常规实验仪器的使用与维护、疾病动物模型的复制、实验指标的测量、实验结果的统计与分析等部分内容。机能实验技术是医学实验研究的基本手段。其教学目标是:使医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。

《分析与检测实验技术》:以常用分析与检测实验技术为主线,以细胞与分子生物学、免疫学、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的有关实验内容划归本分册。其教学目标是:使医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。

《临床基本技能与诊疗技术》: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、眼、耳鼻喉科学及护理学最基本的临床操作技能归入本分册。本分册分为三篇:第一篇临床基本诊疗技术,主要包括临床医学本科生按教学大纲要求必须掌握和熟悉的内容;第二篇临床专科技能,主要供医学生扩展性学习以及实习和住院医师规范化培训阶段参考;第三篇临床实验和技能训练,主要用于指导医学生的临床实验和技能训练。其教学目标是:使医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,以强化医学生的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。

本套教材在编写过程中得到了许多专家、教授的大力支持,并承担各分册的主编、审校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,我们向为本系列教材的出版作出贡献

的所有同志表示诚挚的谢意!

由于本系列教材涉及面广,参考资料多,在编写过程中未能将参考文献一一列出,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;加之本系列教材涵盖的学科广,参编人员多,编写时间紧,特别是编者水平有限,因此,本套教材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

2008年8月

目 录

第一篇 常用分析与检测实验技术

第一章 光谱分析	(2)
第一节 光谱分析的基本原理	(2)
第二节 常用光谱分析的方法及应用	(3)
第二章 电泳原理与技术	(10)
第一节 电泳的基本原理	(10)
第二节 电泳的基本装置	(12)
第三节 电泳支持物	(12)
第四节 电泳后的固定、染色和脱色	(12)
第五节 结果的记录与定量分析	(13)
第三章 层析原理与技术	(21)
第一节 层析的基本原理	(21)
第二节 常用的层析方法及应用	(22)
第四章 离心技术	(32)
第一节 离心技术的基本原理	(32)
第二节 离心设备	(36)
第三节 常用离心方法及应用	(39)
第五章 基因工程原理与技术	(44)
第一节 基因工程的基本原理	(44)
第二节 基因工程载体的种类和选择	(45)
第三节 基因工程中常用的工具酶	(47)
第四节 目的基因的获取	(50)
第五节 目的基因和载体的连接	(51)
第六节 重组 DNA 分子导入宿主细胞	(52)
第七节 重组分子的筛选与鉴定	(52)
第六章 聚合酶链反应(PCR)技术	(55)
第一节 PCR 技术基本原理	(55)

第二节	PCR 反应体系中的成分及其作用	(56)
第三节	PCR 引物设计的一般原则	(58)
第四节	PCR 相关技术	(59)
第七章	DNA 序列分析技术	(64)
第一节	DNA 序列测定的原理和技术	(64)
第二节	全自动激光荧光 DNA 测序	(67)
第八章	免疫学实验技术	(73)
第一节	抗原抗体反应	(73)
第二节	免疫细胞检测技术	(79)
第三节	细胞因子及受体检测技术	(84)

第二篇 常用分析与检测基本装置和实验

第一章	常用分析与检测装置及操作	(87)
第一节	常用分析与检测玻璃仪器及装置	(87)
第二节	分析与检测实验技术基本操作	(91)
第三节	分析与检测基本仪器	(115)
第二章	分析与检测基本实验	(127)
实验一	滴定分析	(127)
实验二	常压蒸馏和沸点的测定	(132)
实验三	离子分离与鉴定	(134)
实验四	阿司匹林的合成	(141)
实验五	乙酸乙酯的合成	(143)
实验六	苯甲酸乙酯的合成	(144)
实验七	熔点测定	(146)
实验八	苯甲酸钠红外光谱测定	(150)
实验九	原子吸收光谱法测定血清锌	(151)
实验十	柱层析法分离甲基橙和亚甲基蓝	(152)
实验十一	蛋白质含量的测定	(153)
实验十二	纸层析法鉴定谷丙转氨酶的作用	(164)
实验十三	复方新诺明中磺胺甲基唑(SMZ)和甲氧苄氨嘧啶(TMP)的分离与鉴定	(167)
实验十四	醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白	(168)
实验十五	琼脂糖凝胶电泳分离血清脂蛋白	(171)
实验十六	SDS-聚丙烯酰胺凝胶的制备与电泳	(173)
实验十七	糖酵解中间产物的鉴定	(176)
实验十八	血糖的测定与激素对血糖浓度的影响	(178)
实验十九	酮体的生成及定性	(179)
实验二十	血清脂类的测定	(181)

实验二十一 抗原抗体反应技术	(183)
实验二十二 细胞毒试验	(193)
实验二十三 免疫细胞检测技术	(195)
实验二十四 白细胞介素-2 的活性测定	(202)

第三篇 分析与检测技术综合性实验

实验一 从茶叶中提取咖啡因	(205)
实验二 从番茄酱中提取番茄红素及 β -胡萝卜素	(206)
实验三 血清 γ -球蛋白的分离纯化、含量测定及纯度鉴定	(208)
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	(213)
实验五 分子生物学实验技术	(223)

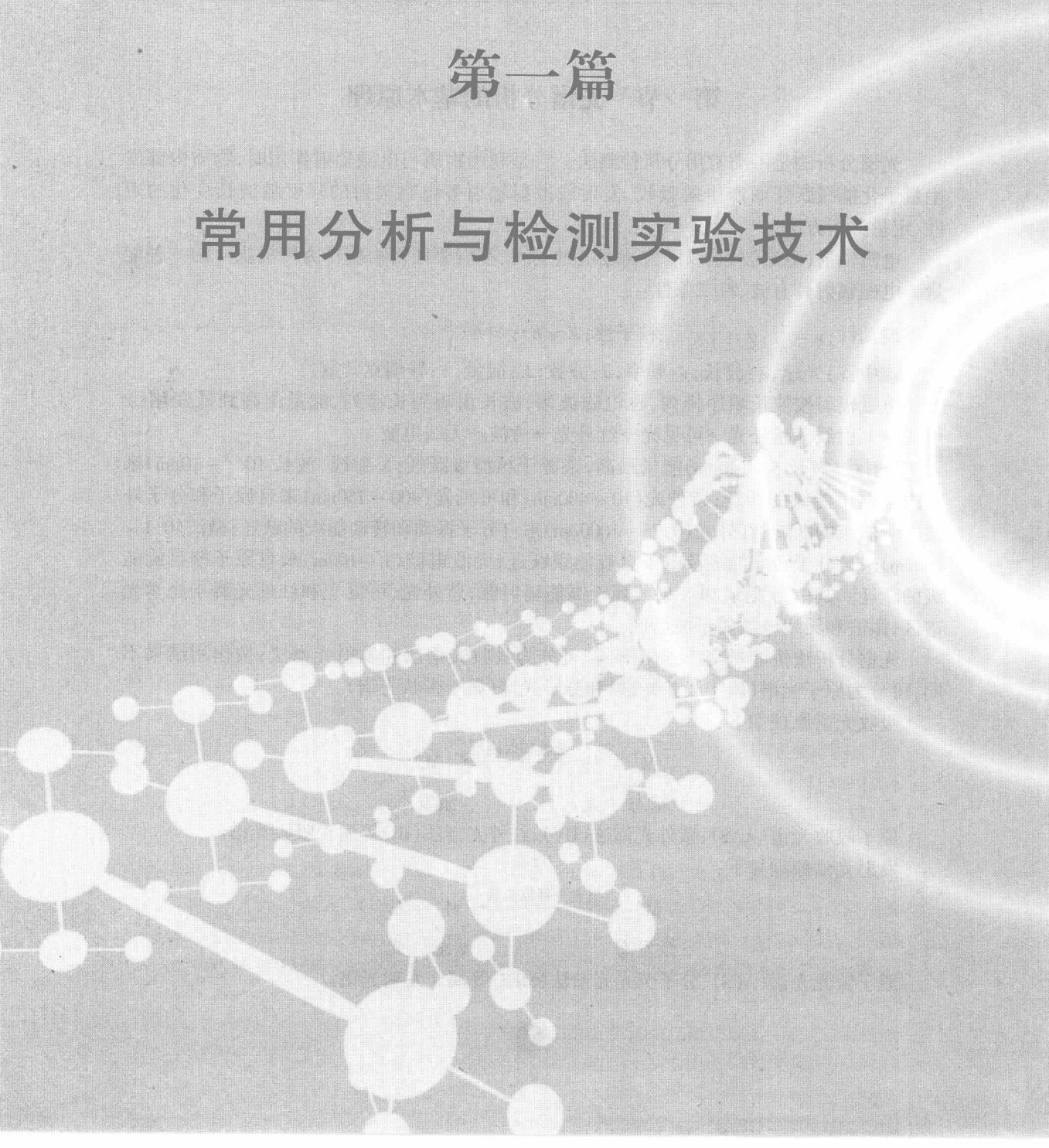
附录	(256)
----------	-------

一、实验室规则	(256)
二、实验室常识	(256)
三、实验室安全及防护	(257)
四、常用有机溶剂的沸点、密度表	(258)
五、常见的酸碱指示剂	(258)
六、热浴用的液体介质	(259)
七、国产试剂的规格	(259)
八、常用缓冲液的配制方法	(260)
九、硫酸铵饱和度常用表	(264)
十、层析数据表	(266)

主要参考文献	(270)
--------------	-------

第一篇

常用分析与检测实验技术



第一章

光谱分析

第一节 光谱分析的基本原理

光谱分析法是一类常用分析检测法。它是利用物质与电磁辐射作用时,物质内部发生量子化能级跃迁而产生的吸收、发射或散射辐射等电磁辐射的强度随波长变化的定性、定量分析方法。

电磁辐射(电磁波)是以巨大速度通过空间、不需要任何物质作为传播媒介的一种能量。电磁辐射具有波、粒二象性。

$$\text{波动性: } \nu = \frac{c}{\lambda}, \sigma = \frac{1}{\lambda} \quad \text{粒子性: } E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

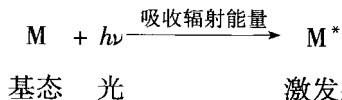
式中: c :光速, λ :波长, ν :频率, σ :波数, E :能量, h :普朗克常数。

电磁辐射按波长顺序排列,称电磁波谱,波长由短到长排列,能量由高到低变化: γ 射线 $\rightarrow$ X射线 $\rightarrow$ 紫外光 $\rightarrow$ 可见光 $\rightarrow$ 红外光 $\rightarrow$ 微波 $\rightarrow$ 无线电波。

γ 射线(波长 $5 \sim 140\text{pm}$)能量最高,来源于核能级跃迁;X射线(波长 $10^{-3} \sim 10\text{nm}$)来自内层电子能级的跃迁;紫外光($10 \sim 400\text{nm}$)和可见光($400 \sim 750\text{nm}$)来自原子和分子外层电子能级的跃迁;红外光($0.75 \sim 1000\mu\text{m}$)来自分子振动和转动能级的跃迁;微波($0.1 \sim 100\text{cm}$)来自分子转动能级及电子自旋能级跃迁;无线电波($1 \sim 100\text{m}$)来自原子核自旋能级的跃迁。其中, γ 射线和X射线属于高能辐射区,紫外光、可见光和红外光属于光学光谱区,微波和无线电波属于波谱区。

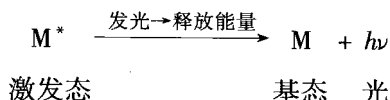
光谱分析法按能量交换方向不同,可分为吸收光谱法和发射光谱法;按作用结果不同,可分为原子光谱(属于线状光谱)和分子光谱(属于带状光谱)。

吸收光谱原理如下:



原子吸收光谱(AAS)、紫外光谱法(UV)、红外光谱法(IR)等属于吸收光谱。

发射光谱原理如下:



原子荧光光谱(AFS)、分子荧光光谱法(MFS)等属于发射光谱。

常见的原子光谱有原子吸收光谱(AAS)、原子发射光谱(AES)、原子荧光光谱(AFS)、X射线荧光光谱(XFS)等,常见的分子光谱有紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、分子荧光光谱(MFS)、分子磷光光谱(MPS)、核磁共振(NMR)等。

利用光谱法进行分析都有相应的仪器,多数光谱法仪器由五个部件单元组成:光源、单色器、样品池、检测器、记录装置。目前光谱法仪器都能与电脑联机,实现仪器操作和处理数据自动化。随着技术的发展,光谱法仪器朝着以下几个方向改良:选用新光源,提高灵敏度;采用联用技术;应用新材料;改进检测器等。

(夏侯国论)

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

1. 基本原理及应用。

紫外—可见分光光度法(Ultraviolet and Visible Spectrophotometry)是通过测定物质对紫外和可见光的吸收,求出物质的含量或对物质进行定性的方法。它的优点是选择性好,灵敏度高,一般物质可测到 $10^{-3} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其相对误差虽比滴定分析大,但对微量分析而言,绝对误差极小,符合分析准确度好的要求。仪器设备简单,操作便捷,应用广泛,在化工、环保、医药、卫生、生物等领域中常用来分析物质的组成和结构,测定化合物的含量及研究生化过程等。

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(吸收能量 = 两个跃迁能级之差),所以也将其称为电子光谱方法。不同物质由于结构上的差异,所需跃迁能量不同,于是呈现出不同的吸收光谱。通过分子的吸收光谱可以研究分子结构并进行定性和定量分析。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,分别测得不同波长下的吸收程度,即吸光度(Absorbance) A 。然后以波长 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)。如图 1.1 所示的 KMnO_4 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 $\lambda_{\max}$ 表示(图 1.1 中 $\lambda_{\max}$ 为 525nm)。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 525nm。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测定吸光度,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 $\lambda_{\max}$ 波长作为入射波长。

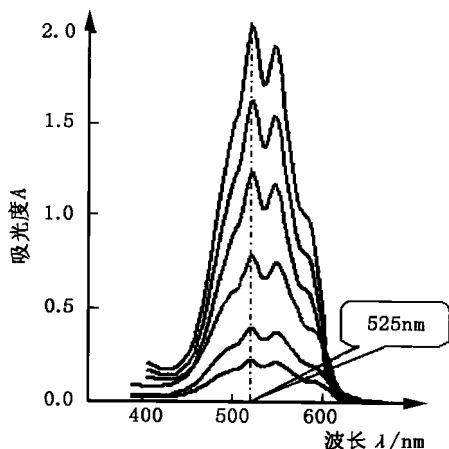


图 1.1 KMnO_4 吸收光谱

吸收光谱的定性依据是其光谱特征,包括吸收光谱的形状、吸收峰的数目、吸收峰的位置(波长)、吸收峰的强度、相应的吸光系数。通过紫外—可见吸收光谱,可进行两种定性分析,即定性鉴别和纯度检查。定性方法有:①对比吸收光谱的一致性。同一测定条件下,将待测物与标准对照物谱图或标准谱图进行对照比较。目前有 46 000 种化合物紫外光谱的标准谱图。②对比吸收光谱的特征值。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)。

吸收光谱的定量依据是朗伯—比耳定律,该定律表达式为: $A = \epsilon cl$, 其中 ϵ 为摩尔吸光系数,单位为 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, c 为物质的量浓度,单位为 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, l 为液层厚度,单位为 cm ,在相同仪器条件下, ϵ 和 l 是定值,吸光度 A 与物质的量浓度 c 呈正比,故由吸光度的值可确定浓度。注意,为了减小误差,吸光度 A 的值应控制在 $0.2 \sim 0.7$ 之间。

2. 测定方法。

定量分析法有:吸光系数法、标准曲线法、标准对照法。

(1) 吸光系数法。

又称绝对法,在已知吸光系数、吸收池厚度以及吸光度的前提下,直接套用朗伯—比耳定律表达式,可将浓度求算出来。

(2) 标准曲线法。

标准曲线法是分光光度法中最为常用的方法: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 $\lambda_{\max}$),用同一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,得一直线——标准曲线(Standard Curve)。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浓度。该方法对于经常性批量测定十分方便。此外,由于被检测的样品浓度实际上是与多个标准溶液的浓度相比较而得出的结果,所以更准确和可信。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。

(3) 标准对照法。

也称外标一点法,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 $\lambda_{\max}$ 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. 仪器基本构造。

紫外—可见分光光度计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。钨灯或卤钨灯产生可见光源($350 \sim 1\,000\text{nm}$);氢灯或氘灯产生紫外光源($200 \sim 360\text{nm}$)。

(2) 单色器。

将光源发射的复合光分解成单色光并可从中选出任一波长单色光的光学系统。包括狭缝、准直镜、色散元件等。

(3)吸收池(比色皿)。

玻璃吸收池能吸收 UV 光,仅适用于可见光区;石英吸收池不吸收紫外光,适用于紫外和可见光区。一对吸收池要求具有匹配性,即对光的吸收和反射应一致。

(4)检测器。

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等。

(5)记录装置。

包括讯号处理和显示系统,由微机进行仪器自动控制和结果处理。

(夏侯国论)

二、红外光谱法

1.基本原理及应用。

红外光谱法(Infrared Absorption Spectroscopy)是指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($0.78 \sim 2.5\mu\text{m}$)、中红外区($2.5 \sim 25\mu\text{m}$)、远红外区($25 \sim 500\mu\text{m}$)。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。

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)}$$

式中: k 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。

红外光谱吸收峰分为两大区域:特征谱带区($4\,000 \sim 1\,330\text{cm}^{-1}$),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, $1\,330 \sim 650\text{cm}^{-1}$),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。

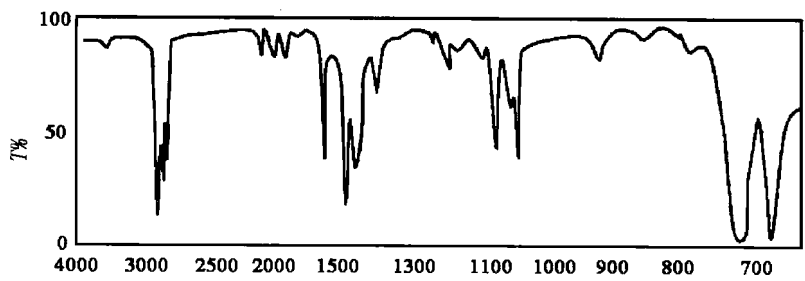


图 1.2 甲苯的红外光谱

表 1.1 红外光谱的主要区段

波数(cm^{-1})	化学键	化合物类别
3 750 ~ 3 000	O - H	醇、酚、胺、酰胺
3 300 ~ 3 000	C - H (- C $\equiv$ C - H, > C = C < H, Ar - H)	炔、烯、芳香化合物
3 000 ~ 2 700	C - H (- CH ₃ , > CH ₂ , > CH - , - CHO)	烷、醛
2 400 ~ 2 100	C $\equiv$ C, C $\equiv$ N	炔、腈
1 900 ~ 1 650	C = O	醛、酮、羧酸、酯
1 675 ~ 1 500	C = C (脂、芳族), N = O	烯、芳香族、硝基类
1 475 ~ 1 300	C - H	烷
1 300 ~ 1 000	C - O, C - N	醇、醚、羧酸、酯、胺
1 000 ~ 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要有:电子效应(诱导效应、共轭效应)、空间效应(场效应、空间位阻、环张力)、氢键效应(分子内氢键、分子间氢键)。

红外光谱广泛应用于有机定性分析、定量分析和有机分子结构的测定。定性分析常用标准品对照法和标准图谱查对法;定量分析则根据朗伯一比耳定律,由特征峰的强度来确定试样浓度;由特征峰波长可推测官能团,从而判断有机分子结构。

2. 仪器基本构造。

红外光谱仪分为两类:色散型和干涉型(傅里叶变换红外光谱仪)。色散型红外光谱仪的主要部件有:光源(能斯特灯)、单色器(光栅)、样品室、检测器(真空热电偶)、计算机。傅里叶变换红外光谱仪不需要分光,其结构单元为:光源、干涉仪、样品室、检测器(热释电 TGS 和碲镉汞 MCT 检测器)、计算机。

目前普遍使用傅立叶变换红外光谱仪。其原理是光源发出的辐射经干涉仪转变为干涉光,通过试样后,包含的光信息需要经过数学上的傅立叶变换解析成普通的谱图。

仪器特点:①扫描速度极快(1s),适合仪器联用。②不需要分光,信号强,灵敏度很高。③仪器小巧。

红外光谱法可测定气体、固体和液体试样。不同性质的试样有不同的制样方法,制样的好坏直接影响测试效果。气体试样在气体池中测试;液体可以直接放入液体池中测试,对于沸点远大于 80℃ 的难挥发液体可以采用液膜法;固体可以采用薄膜法、研磨法(液体石蜡法)和 KBr 压片法。

联用技术是仪器发展的趋势,目前红外光谱主要有如下联用方式:气相色谱—红外光谱联用(GC-FTIR)、液相色谱—红外光谱联用(LC-FTIR)、光声红外光谱(PAS-FTIR)、显微红外光谱(MIC-FTIR)。

(范小娜)

三、原子吸收分光光度法

1. 基本原理及应用。

原子吸收分光光度法(Atomic Absorption Spectrometry)是基于被测元素基态原子在蒸气状态对其原子共振辐射的吸收进行元素定量分析的方法。当有辐射通过自由原子蒸气,且入射辐射的频率等于原子中的电子由基态跃迁到较高能态所需要的能量频率时,原子就从辐射场中吸收能量,产生吸收,电子由基态跃迁到激发态,同时伴随着原子吸收光谱的产生。原子吸收光谱位于光谱的紫外区和可见区。

原子吸收光谱法的测定对象为金属元素及少数非金属元素,也可以用间接法测定有机化合物,在化工、医药、环境、食品、农业、生物化学等方面应用广泛。该光谱法具有如下特点:①检出限低,达 $10^{-10} \sim 10^{-14} \text{g}$ 。②准确度高,达 1% ~ 5%。③选择性高,一般情况下共存元素不干扰。④应用广,可测定 70 多种元素。⑤局限性在于:难熔元素、非金属元素测定困难,不能多元素同时测定。

原子吸收分光光度法的定量依据是 $A = Kc$,即在相同实验条件下,吸光度 A 与浓度 c 成正比,由吸光度的值可确定浓度。

2. 仪器基本构造。

原子吸收光谱仪主要由五部分组成:光源、原子化系统、单色器、检测系统、显示记录装置。原子吸收光谱法的流程如图 1.3 所示。

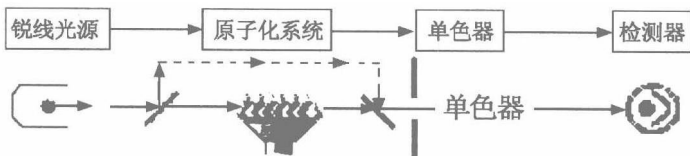


图 1.3 原子吸收光谱法的流程

光源为空心阴极灯,能发射待测元素的共振线,发射锐线。每测一种元素需更换相应的灯。

原子化系统能将试样中的离子转变成原子蒸气。原子化方法主要有火焰法和石墨炉法。在火焰法中,火焰温度取决于燃气与助燃气类型,常用空气—乙炔,可测定 30 多种元素。若用 N_2O —乙炔火焰可提高火焰温度,从而使可测定的元素增加到 70 多种。石墨炉法是无火焰法,需用石墨炉原子化装置完成。原子化过程分为干燥、灰化(去除基

体)、原子化、净化(去除残渣)四个阶段。石墨炉法的优点是原子化程度高,试样用量少($1 \sim 100 \mu\text{l}$),可测固体及黏稠试样,灵敏度高,检测极限 $10^{-12} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;其缺点是精密度差,测定速度慢,操作不够简便,装置复杂。除上述两种方法外,还有低温原子化法,该方法的原子化温度为 $700 \sim 900^\circ\text{C}$,主要应用于 As、Sb、Bi、Sn、Ge、Se、Pb、Ti 等元素的检测;冷原子化法,常温测量,用于 Hg 元素的检测。

单色器能将待测元素的共振线与邻近线分开。其组件包括色散元件(棱镜、光栅)、凹凸镜、狭缝等。

检测系统主要由检测器、放大器、对数变换器组成。

显示记录装置目前多采用计算机。

(范小娜)

四、分子荧光光谱法

1. 基本原理及应用。

处于基态的分子吸收能量(电、热、化学和光能等)被激发至激发态,然后从不稳定的激发态返回至基态并发射出光子,这种现象称为分子发光。发光分析包括荧光、磷光、化学发光、生物发光等。其中,荧光是最为常见的发光现象。分子荧光光谱法(Molecular Fluorescence Spectrometry)是指某些物质被紫外光照射激发后,在回到基态的过程中发射出比原激发波长更长的荧光,通过物质的荧光光谱特性来进行定性和定量分析的方法。

分子荧光分析法被广泛应用于无机、有机、生化、医药和临床检验等各个领域。在无机化合物中,能直接产生荧光并应用于测定的为数不多,但与有机试剂形成络合物后进行荧光分析的元素已达到 60 余种;脂肪族有机化合物本身会产生荧光的很少,只有与其他有机试剂作用后可产生荧光;芳香族化合物具有不饱和的共轭体系,多数能发生荧光。许多重要的生化物质、药物及致癌物质(如某些稠环芳烃)都有荧光现象。因此,荧光光谱法在医药和临床分析,特别是在药物的体内代谢研究中具有特殊的地位。

分子荧光法的优点在于:①灵敏度高,可测到 $10^{-10} \sim 10^{-12} \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。②选择性好,可同时用激发光谱和荧光发射光谱定性。③结构信息量多,包括物质激发光谱、发射光谱、光强、荧光量子效率、荧光寿命等。该法的不足之处在于:应用不广泛,主要是由于能发荧光的物质不具普遍性、增强荧光的方法有限、外界环境对荧光量子效率影响大、干扰测量的因素较多。

2. 仪器基本构造。

荧光分光光度计由四个基本部分组成,如图 1.4 所示,主要包括光源、样品池、单色器、检测器等。

光源常用氙灯,能够在 $250 \sim 700 \text{nm}$ 之间连续发强光。

样品池采用石英池,四壁透明。

单色器有两个,分置于样品池前后。置于样品池前的为激发单色器(选择激发光单色器),置于样品池后的为发射单色器(分离荧光单色器)。

检测器采用光电倍增管,与激发光成直角的方向检测荧光。