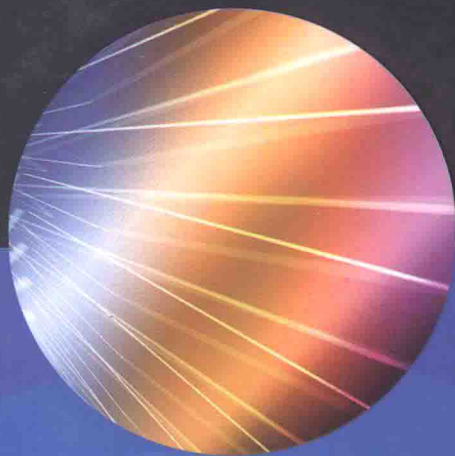


江苏省高校“青蓝工程”科技创新团队项目
江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人项目 联合资助出版
江苏省食品安全快速检测工程技术研究中心

SPECTRUM

光谱分析新方法

司文会 訾言勤 著



科学出版社

江苏省高校“青蓝工程”科技创新团队项目

江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人项目 联合资助出版

江苏省食品安全快速检测工程技术研究开发中心

光谱分析新方法

司文会 訾言勤 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是作者多年科研工作成果的结晶,内容涉及生命大分子物质、亚硝酸根、金属离子、碘、植株还原糖、有机质、抗坏血酸、微量磷的测定及其机理研究等主要方面,多为近年来公开发表或即将发表的研究内容。

本书可作为该领域科研工作者的参考文献,也可作为普通高等学校相关专业师生教学参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

光谱分析新方法/司文会, 瞿言勤著. —北京: 科学出版社, 2011
ISBN 978-7-03-024711-7

I. ①光… II. ①司… ②瞿… III. ①光谱分析-高等学校: 技术学校-教材 IV. ①O433.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 004218 号

责任编辑: 张 斌 / 责任校对: 王万红
责任印制: 吕春珉 / 封面设计: 耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

铭浩彩色印装有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 11 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013 年 11 月第一次印刷 印张: 19 1/4

字数: 456 000

定价: 39.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换 骏杰)

销售部电话 010-62134988 编辑部电话 010-62135235

版权所有, 侵权必究

举报电话: 010-64030229; 010-64034315; 13501151303

作者简介

司文会，男，汉族，安徽明光人，1967年12月生，中共党员，硕士，教授，兼职硕士研究生导师，现任苏州农业职业技术学院食品科学系主任、党总支书记，香港中文大学 Research Assistant Professor，江苏省“六大人才高峰”项目人才，江苏省“333工程”中青年科学技术带头人，江苏省高校“青蓝工程”科技创新团队带头人，江苏省食品安全快速检测工程技术研究开发中心主任、首席专家，江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人，江苏省高校首届“优秀中青年教师和校长境外研修”项目获得者，苏州农业职业技术学院首届教学名师、科技为农服务优秀团队带头人、优秀教学团队带头人、学术委员会委员，多次荣获“优秀科技工作者”称号。历任苏州农业职业技术学院实训中心副主任（主持工作）、人文科学系副主任兼基础部副主任（主持工作）、基础部主任、食品系主任兼基础部主任等职务。主要社会兼职有：中国科学院高职高专教材建设指导委员会主任委员，《食品安全质量检测学报》特约审稿专家，中国化工教育学会教学指导委员会委员，中国化学会会员，中国分析测试学会仪器仪表学会会员等。

主要从事分析化学的教学与科研工作，先后主讲了“分析化学”、“仪器分析”等主干课程，曾主持完成省部级科研项目14项，成果荣获教育部优秀成果奖1项，安徽省高校优秀自然科学成果二等奖1项，天津市科技进步三等奖1项，苏州市自然科学优秀论文三等奖6篇、优秀奖2篇，江苏省教学成果一等奖1项，出版《光谱分析新方法》、《简快分析法》等学术专著2部，主编《现代仪器分析》、《无机及分析化学》、《实用化学》、《基础化学》、《现代分析测试技术与实训》、《食品分析》等全国“十一五”规划教材及统编教材14部，申报、获授国家发明专利34项，在 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*、*Food Chemistry*、*Biological Trace Element Research*、*Journal of Rare Earths* 等学术期刊发表各类研究论文160余篇等。

序

当物质受到光的照射时,会发生光的选择性吸收、反射或透射等现象。光的这些现象与物质的结构有着密切关系,分析这些关系的学科,称为光谱学,即光谱分析。光谱分析是一门近代发展起来的测试技术,是分析化学的重要分支学科,是广泛用于物质无机组分分析最有效的方法之一。与传统分析技术相比,光谱分析特别是紫外-可见光谱分析,具有仪器设备简单、操作简便、测定速度快、过程无污染、测定范围广、灵敏度高等优点,因此发展速度很快,被广泛地应用于环境、食品、医药、工业控制、地质等多个相关领域。随着光谱技术与仪器联用技术的发展,特别是生命科学与信息科学的发展,不断向分析科学提出新的任务,细胞、生物大分子、基因组、蛋白质组、元素形态等的分析检测成了分析化学的热点甚至焦点,要求分析科学能够用更低的消耗,更简单的方法和设备,更快的分析速度提供实时、准确、全面的信息。

本书主要作者司文会教授,现任苏州农业职业技术学院食品科学系主任、党总支书记,香港中文大学 Research Assistant Professor,江苏省“六大人才高峰”项目人才,江苏省“333工程”中青年科学技术带头人,江苏省高校“青蓝工程”科技创新团队带头人,江苏省食品安全快速检测工程技术研究开发中心主任、首席专家,江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人,江苏省高校首届“优秀中青年教师和校长境外研修”项目获得者,苏州农业职业技术学院首届教学名师、科技为农服务优秀团队带头人、优秀教学团队带头人、学术委员会委员,多次荣获“优秀科技工作者”称号。历任苏州农业职业技术学院实训中心副主任(主持工作)、人文科学系副主任兼基础部副主任(主持工作)、基础部主任、食品系主任兼基础部主任等职务。主要社会兼职有:中国科学院高职高专教材建设指导委员会主任委员,《食品安全质量检测学报》特约审稿专家,中国化工教育学会教学指导委员会委员,中国化学会会员,中国分析测试学会仪器仪表学会会员等。司文会教授1990年7月阜阳师范学院化学系毕业,分配至安徽科技学院理学院,从事分析化学教学、科研工作。2001年7月安徽师范大学化学与材料科学学院有机分析专业研究生班结业,2006年9月苏州大学化学化工学院电分析化学专业高级访问学者结业,2009年7月南京农业大学硕士研究生毕业,2012年香港中文大学 Research Assistant。先后主讲了“分析化学”、“仪器分析”、“无机化学”、“普通化学”、“无机及分析化学”、“水污染控制工程”等主干课程,完成省部级科研项目14项,其中,已结题省部级项目有“致癌物质亚硝酸根测定方法及机理研究”、“海水化学耗氧量自动监测系统的研制与应用”、“干旱胁迫条件下小麦抗旱增产剂的研制与应用”、“绿色微型大气监测系统的研制”、“富硒生态养殖及开发”、“植物源农药的研制与开发”、“动物性食品中若干影响安全关键指标快速检测技术集成与产业化”等,取得较广泛的社会效益和经济效益。研究成果荣获教育部优秀成果奖1项,



安徽省高校优秀自然科学成果二等奖 1 项, 天津市科技进步三等奖 1 项, 苏州市自然科学优秀论文三等奖 6 篇、优秀奖 2 篇, 江苏省教学成果一等奖 1 项, 出版《光谱分析新方法》、《简快分析法》等学术专著 2 部, 主编《现代仪器分析》、《无机及分析化学》、《实用化学》、《基础化学》、《现代分析测试技术与实训》、《食品分析》等教育部“十一五”规划、统编教材 14 部, 申报、获授国家发明专利 34 项, 在 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*、*Food Chemistry*、*Biological Trace Element Research*、*Journal of Rare Earths* 等学术期刊独撰或以第一作者发表各类研究论文 160 余篇, 其中, 核心期刊发表论文 86 篇, 14 篇论文被 SCI 收录, 11 篇论文被 EI 收录、5 篇论文被 CA 收录。司教授长期从事生物、食品、环保、矿物等材料的分析、鉴定工作, 积累了大量的第一手资料, 在光度分析、农化分析、资源与环境化学、应用化学等领域做出了较为突出的成绩。

近年来, 光谱分析技术在科研和生产实践中发挥着越来越重要的作用, 尤其在生物大分子、金属离子、微量元素、亚硝酸根、有机质、还原糖、抗坏血酸、毒物残留等物质的分析测定中, 得到了越来越广泛的应用。这些方面, 作者都有较系统的研究, 其研究领域有些达到了国际相关学科的前沿范畴, 取得了一些原创性的成果, 总结这方面的经验和成果并结集出版发行, 是一件颇有意义的事情。

由于光谱分析在线、在位、实时、微型化、自动化、多组分测定及某些灵敏度方面所暴露出来的局限性日益突出, 光谱分析的发展前景已成为分析工作者关注的问题之一。试样前处理、化学分离和富集是传统光谱分析操作中的薄弱环节, 研究与其他分析和分离技术的良好结合是现代光谱分析的热点, 高灵敏、高选择性试剂和反应以及增效试剂和增效途径的探索是最基本和最重要的研究课题。光谱法与各种高效分离方法如色谱法、毛细管电泳的联用和与仿生学、化学计量学的结合将是光谱分析最具前景的研究方法, 且会在生命科学、环境科学、新材料科学及医药学的研究中继续发挥作用。看来, 学科渗透, 技术结合, 取长补短是光谱法发展的必经之路。

希望作者在该书的基础上, 吸收、借鉴、融合、创新, 在光谱分析新技术研究与应用领域取得更大的成就, 同时, 期冀着更多、更好的相关专著面世。

是为序。

同济大学教授, 博士生导师

2012 年 12 月 16 日

目 录

序

第 1 部分 生命大分子物质测定	1
1.1 甲基紫分光光度法测定核糖核酸	4
1.2 中性红光度法测定核糖核酸	9
1.3 吡啶黄光度法测定脱氧核糖核酸	13
1.4 亚甲蓝光度法测定脱氧核糖核酸	17
1.5 曙红亚甲蓝光度法测定核糖核酸	21
1.6 夜蓝光度法测定肝素钠	27
1.7 天青 A 光度法测定核糖核酸	30
1.8 紫外分光光度法测定腺嘌呤、甲氨蝶呤和 5'-磷酸腺苷、三磷酸腺苷二钠	36
1.9 天青 I 分光光度法测定脱氧核糖核酸	40
1.10 夜蓝光度法测定核糖核酸	44
1.11 夜蓝光度法测定脱氧核糖核酸	49
1.12 中性红分光光度法测定脱氧核糖核酸	53
1.13 乙基紫标记分光光度法测定核糖核酸	56
1.14 流动注射化学发光增强法测定硫嘌呤	59
1.15 鲁米诺-H ₂ O ₂ 体系流动注射-化学发光增强法测定胰蛋白酶	63
第 2 部分 亚硝酸根的测定及反应机理	68
2.1 多波长负吸收退色光度法测定微量亚硝酸根	69
2.2 三波长负吸收催化光度法测定痕量亚硝酸根	72
2.3 四波长负吸收催化光度法测定痕量亚硝酸根	75
2.4 微波消解催化退色光度法测定亚硝酸根	78
2.5 溴酸钾氧化吡啶黄催化退色光度法测定痕量亚硝酸根	81
2.6 伯胺结构碱性染料光度法测定亚硝酸根	85
2.7 催化退色光度法测定痕量亚硝酸根	90
2.8 反相流动注射催化光度法测定废水中亚硝酸根	93
2.9 反相流动注射催化光度法测定亚硝酸根	95
2.10 非平衡流动注射光度法测定微量亚硝酸根	98
2.11 三波长光度法测定微量亚硝酸根	100
2.12 双波长负吸收催化光度法测定痕量亚硝酸根	104
2.13 四波长光度法测定微量亚硝酸根	107
2.14 溴酸钾氧化二甲苯蓝 FF 催化光度法测定痕量亚硝酸根	109



2.15	催化动力学极谱法测定亚硝酸根	113
2.16	流动注射催化光度法测定痕量亚硝酸根	115
2.17	萘酚绿 B 光度法测定微量亚硝酸根	117
2.18	反相流动注射光度法测定微量亚硝酸根	120
第 3 部分	金属离子测定	122
3.1	3,3'-二甲基酚酞新分光光度法快速测定食品中的钙	128
3.2	铁、锰、锌、铜快速分光光度法测定	132
3.3	微波密闭消解-原子吸收光度法测定粮食与饲料中的铜	137
3.4	双乙醛草酰二胍直接快速分光光度法测定粮食及饲料中的铜	142
3.5	微波密闭消解-原子吸收光度法测定食品中镉	145
3.6	双硫脲萃取光度法测定锌	150
3.7	脱脂棉分离-二乙基二硫代氨基甲酸钠萃取光度法测定痕量铜	151
3.8	巯基棉富集-Cu(DDTC) ₂ -萃取光度法测定饲料铜	153
3.9	饲料中锌的 2-羧基-2'-羟基-5'-磺基甲胍基苯直接快速光度法测定	156
3.10	双乙醛草酰二胍直接快速光度法测定食品中痕量铜	160
3.11	双乙醛草酰二胍直接快速光度法测定痕量铜	163
3.12	脱脂棉分离-二乙基二硫代氨基甲酸钠萃取光度法测定痕量铜	166
3.13	光纤压力自控微波消解铅试剂光度法测定肉骨粉中铅	170
3.14	微孔滤膜富集-双硫脲四氯化碳一次萃取混色光度法测定锌	173
3.15	微波密闭消解-石墨炉原子吸收光度法测定骨粉饲料镉	176
3.16	压力自控微波密闭消解铅试剂光度法测定食品中铅	178
3.17	微波密闭消解-原子吸收光度法测定饲料铜	183
3.18	高灵敏度催化光度法测定超痕量铜	185
3.19	碱性染料催化光度法测定痕量锰	189
3.20	流动注射催化光度法测定痕量钒	194
3.21	Fe-H ₂ O ₂ -次甲基绿催化分光光度法测定痕量铁(Ⅲ)	197
3.22	卟琳显色剂同时测定多组分——导数光谱法同时测定痕量铜和锌	200
3.23	超痕量锰的催化光度法测定	206
3.24	催化光度法测痕量锰——Mn(Ⅱ)-NTA-NR-KIO ₄ 体系	210
3.25	煌焦油蓝-高碘酸钾体系催化光度法测痕量锰的研究	214
3.26	吡罗红 Y 催化动力学荧光熄灭法测定痕量钒	218
3.27	催化光度法测定痕量铜	221
3.28	催化光度法测定痕量铜——Cu(Ⅱ)-亮绿 SF-H ₂ O ₂ 体系	222
3.29	流动注射催化光度法测定痕量锰	226
3.30	流动注射催化光度法测定痕量铜	229
3.31	流动注射分光光度法同时测定岩矿中痕量钴和锰	231
3.32	逆最小二乘法-导数光谱同时测定锌、镉、汞和铅	234
3.33	痕量铜(Ⅱ)的催化光度法测定——铜(Ⅱ)-溴甲酚紫-过氧化氢体系	237

3.34	催化光度法测定痕量钒	238
3.35	藏红 O-高碘酸钾体系催化光度法测定痕量锰	241
3.36	高碘酸钾氧化乙基紫催化光度法测定痕量锰	243
3.37	铬天青 S-过氧化氢体系催化光度法测定痕量钴 (II)	246
3.38	人发中微量铜的催化光度法测定	249
3.39	铜-双环己酮草酰二胺配位吸附波法测定铜	252
3.40	Cu (II) 铬天青 S-过氧化氢体系催化光度法测定痕量铜	255
3.41	非平衡流动注射分光光度法在线测定痕量铅	258
第 4 部分	碘的测定及其机理研究	261
4.1	吡啶橙催化光度法测定痕量碘	262
4.2	二溴邻硝基偶氮胂催化退色动力学光度法测定食品中碘	264
4.3	微波消解催化退色光度法测定痕量碘	268
4.4	新催化退色光度法高灵敏测定食品中痕量碘	271
第 5 部分	植株还原糖的测定	276
5.1	植株微量糖的测定	276
5.2	焦硫酸钾-三硝基酚-还原糖光度法直接测定全血中痕量糖	280
第 6 部分	微量磷的测定	285
第 7 部分	抗坏血酸的测定	289
第 8 部分	有机质的测定	292
	主要参考文献	296

核糖核酸 (RNA)、脱氧核糖核酸 (DNA)、腺嘌呤、胰蛋白酶作为重要的生物大分子物质, 一直受到化学、生物和医药等诸多学科的极大关注, 是生命科学研究的重点和热点, 其研究成果将成为制服病毒和癌症的强大工具。

定量方法是研究 RNA 的基础, 常见的方法有紫外分光光度法、显微分光光度法、定磷法、地衣酚法等。应用阳离子染料与 DNA 作用的分子光谱法测定 DNA 有较多的研究, 但应用阳离子染料与 RNA 作用的研究甚少。研究 RNA 与阳离子染料作用机理对揭示 RNA 与阳离子染料作用的物理化学本质、改进生理学中基因传输载体、提高转染效率十分重要。由于 DNA 是双螺旋结构, RNA 常为单链结构, 与某些阳离子染料的作用表现不同的光谱行为, 用甲基紫测定 RNA 的分光光度法尚未见报道。甲基紫与 RNA 作用使甲基紫显著退色, 558nm 处的退色程度与浓度呈良好的线性关系, 据此可建立测定新方法。中性红与 RNA 作用溶液有沉淀生成, 在显微镜下可看到圆球状晶体, 在波长 535nm 处紫移程度在一定范围内随 RNA 量的增加而增大, 535nm 处的最大吸收值与 RNA 的含量呈良好的线性关系, 据此可建立测定 RNA 含量方法。研究 RNA 与阳离子染料作用机理对揭示 RNA 与阳离子染料作用的物理化学本质, 改进生理学中基因传输载体, 提高转染效率十分重要。用曙红亚甲蓝测定 RNA 的分光光度法尚未见报道。曙红亚甲蓝与 RNA 之间相互作用使曙红亚甲蓝显著退色, 在 662nm 处的最大吸收值的下降程度与 RNA 的含量呈良好的线性关系, 建立了测定 RNA 的新方法。经研究发现, 天青 A 与 RNA 之间作用使天青 A 显著退色, 626nm 处紫移程度在一定范围内随 RNA 量的增加而增大, 626nm 处的最大吸收值与 RNA 的含量呈良好的线性关系。该方法简便、快速, 具有较高的灵敏度。在弱酸性介质中小分子天青 A 与生物大分子核糖核酸强烈相互作用, 导致分子构象的变化, 引起分子光谱最大吸收波长和吸收值的变化。夜蓝与 RNA 之间作用使夜蓝显著退色, 602nm 处紫移程度在一定范围内随 RNA 量的增加而增大, 表明夜蓝和 RNA 相互作用有氢键形成。602nm 处的最大吸收值与 RNA 的含量呈良好的线性关系, 应用于样品分析获得满意结果。在弱酸性条件下, 采用乙基紫碱性染料标记核糖核酸, 应用分光光度法研究标记反应的最佳条件, 基于加入核糖核酸使乙基紫最大吸收峰在 595nm 处吸光度降低的现象, 可建立测定核糖核酸的新方法, 用于高活性干酵母样品分析, 结果满意。

脱氧核糖核酸 (DNA) 的定量分析是研究 DNA 的基础, 以前常用的方法是放射性标记, 现在常用溴化乙啶法, 但两者都因对人体和环境造成危害而受到很大限制。因此, 灵敏、简单、快速、无污染的分析方法成为研究的重点。近年见诸报道的分光



光度法、磷光法及荧光分析法,多采用小分子与 DNA 作用。作者优化了微量脱氧核糖核酸与吖啶黄加合反应的条件,基于脱氧核糖核酸浓度与吖啶黄最大吸收波长 444nm 处的吸光度线性降低的关系,建立了测定微量 DNA 的新方法。对亚甲蓝与脱氧核糖核酸(DNA)作用的可见吸收光谱研究发现,在 pH 6.5 的伯瑞坦-罗比森(B-R)缓冲溶液中,0.02%亚甲蓝与 DNA 作用后 666nm 处最大吸收峰显著下降,下降程度与 DNA 含量呈线性关系。据此,我们考察浓度、温度、酸度和时间等影响因素,拟定了测定 DNA 的新分光光度法。在追求简便、高灵敏度且无毒分析方法的情况下,我们在研究 $200\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 天青 I 与 DNA 之间作用时发现,当加入 DNA 后, $200\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 天青 I 在 630nm 最大吸收峰显著下降,下降程度与 DNA 的含量呈线性关系。作者又考察了酸度、试剂浓度、温度和反应时间等因素对反应速度的影响,确定了实验的最佳条件。基于天青 I 最大吸收峰降低程度与加入脱氧核糖核酸浓度呈良好的线性关系,建立了测定 DNA 的新分光光度法。夜蓝与 DNA 作用在 614nm 处有最大吸收峰,其吸光值与 DNA 的浓度呈线性关系。利用这一原理我们建立了夜蓝分光光度法测定 DNA 的方法,简便、快速。文献报道了脱氧核糖核酸对有机染料中性红的共振光散射的增强效应拟定的一种测定 DNA 的共振光散射法,用于混合样品的分析。分光光度法具有操作简单、准确与快速等特点。目前,利用某些染料作为标记物,如乙基紫、维多利亚蓝 B 等测定 DNA,取得了较好的效果。研究发现,有机染料中性红与脱氧核糖核酸(DNA)的结合反应在波长 530nm 处吸收峰下降的程度,可用于定量测定 DNA,该方法具有较高的灵敏度和选择性。

肝素(hep)为葡糖胺聚糖,在人体内存在于血液中,在体内外均有延缓或阻止血液凝固的作用。作为经典的抗凝血药物,肝素在临床上的应用已达 60 年之久,目前仍是心血管和血栓病人的首选抗凝血药。肝素是由葡萄糖胺磺酸、葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸组成的,具有不同链长的多糖链混合物。在水溶液中由于其酸性基团的离解而成为带多个负电荷的大阴离子,肝素的检测方法有生物方法和化学方法两大类。生物方法因受生物个体的影响较大,不易掌握,化学方法有分光光度法、HPLC 法、毛细管电泳法、电化学传感器法等。其中分光光度法因具有操作简便、快速、仪器价廉、灵敏度较高的优点而得到广泛的应用,进一步研究灵敏度高、选择性好的新分光光度法有重要的意义。研究发现,在 pH 4.5 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中,肝素钠与夜蓝碱性染料形成离子缔合物时,染料发生明显退色,在最大吸收波长 620nm 处的吸光度显著下降程度与肝素钠的含量呈线性关系。应用光谱法进一步研究反应体系酸度、夜蓝用量、反应时间对相互作用的影响,建立了测定痕量肝素钠含量的新方法,其线性范围 $0.10 \sim 1.80\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$,相关系数为 0.9996,该法简便、快速,具有较高的选择性和灵敏度,对样品中肝素钠的测定令人满意。初步探讨其作用机理可认为是碱性阳离子夜蓝与酸性生物大分子肝素强烈相互作用,导致分子构象的变化,引起分子光谱最大吸收波长 620nm 处吸收值的变化。同时,对夜蓝分子上的正电荷与凝聚在肝素分子链上的负电荷进行静电吸引作用,使分子间发生反离子交换。然后,以协同方式与肝素分子发生键合,使夜蓝 π -电子叠合程度降低,颜色变浅,吸收值降低,最大吸收波长紫移。

嘌呤类和腺苷类化合物作为一类重要的化学治疗药物,在核酸化学中具有重要意义。见诸报道的测定方法包括纸基质室温磷光法、毛细管电泳法和高效液相色谱法等,用分光光度法测量尚未见报道。本研究选用醋酸-醋酸钠作缓冲溶液,运用分光光度法测微量嘌呤类和腺苷类化合物。腺嘌呤的最大吸收波长为 260nm,甲氨蝶呤的最大吸收波长为 303nm, 5'-磷酸腺苷和三磷酸腺苷二钠的最大吸收波长为 209nm,它们在 $(1.0 \times 10^{-5}) \sim (1.0 \times 10^{-3}) \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 范围内与吸光度 A 呈良好的线性关系。巯基嘌呤(又称巯嘌呤, 62Mercaptopurine, 缩写为 62MP)是嘌呤类抗代谢型抗癌药物,在体内受次黄嘌呤核苷焦磷酸酶催化,转化为有活性的硫代次黄嘌呤核苷酸和硫代肌苷酸,从而组织 DNA 与 RNA 合成。临床上主要用于治疗急性白血病、绒毛膜皮癌、恶性葡萄胎等,也可作为免疫抑制剂,治疗血小板减少性紫癜、红斑狼疮和器官移植。这种药物的药理之一是认为它与人体内的 Cu^{2+} 形成稳定的配合物,从而改变 Cu^{2+} 对黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)的抑制作用,建立准确快速测定 62MP 的分析方法对 62MP 的药理研究,临床应用及其生产都具有重要的意义。目前,62MP 的分析主要有光度法、高效液相色谱法、磷光法、极谱法、溶出伏安法等,但这些方法一般都存在某种不足。有的要对样品进行处理,改变了 62MP 原有的存在状态,不利于它的药理研究;有的操作烦琐、费时、检测灵敏度不高;有的方法所用仪器价格较贵而且需要自行组装。尽管 62MP 具有光学方面的性质,但用流动注射-化学发光法测定 62MP 的报道甚少。研究发现,62MP 对鲁米诺(Luminol)- H_2O_2 -NaOH 化学发光体系有很强的增敏效应,并将之发展成为一种测定痕量 62MP 的新方法。

胰蛋白酶(trypsin)是人和动物肠道中一种重要的蛋白水解酶,含有 229 个氨基酸残基,有 5 个二硫键,相对分子量 24000,空间结构呈“口袋型”,活性中心存在保守的 His、Asp 和 Ser 活性三联体。在酒类和饮料的澄清、畜蛋白质的水解、胰蛋白酶制备、皮革加工和生丝处理等方面显示了广泛的应用前景。该酶被发现以来,人们对其进行了大量研究,关于胰蛋白酶的定量分析不仅在化学、生物等学科中备受关注,同时也是医药、生命科学等学科研究的重点和热点。常用的分析方法有紫外分光光度法、可见分光光度法、速率散射比浊法和共振光散射法。可见,光化学分析方法是定量测定胰蛋白酶的常用方法,对胰蛋白酶含量的测定,丰富了生物大分子含量测定的内容。目前,利用流动注射-化学发光测定胰蛋白酶的研究未见报道。化学发光法以其操作简便、线性范围宽和灵敏度高而广泛地应用于分析中,但由于化学发光现象一般比较短暂且随时间变化较大,在使用间歇式手工操作时较难取得良好精度,流动注射系统(FIA)很好地适用于这类反应,FI-CL 分析不仅保存了一般 CL 法的优点而且具备 FIA 的一般优点。本书研究了胰蛋白酶对鲁米诺- H_2O_2 化学发光体系的影响。在碱性条件下,胰蛋白酶对鲁米诺- H_2O_2 体系的化学发光体系具有显著的增强作用,据此建立了流动注射-化学发光增强法测定胰蛋白酶新方法。该法简便、快速、线性范围宽,在优化的实验条件下,测定胰蛋白酶在 $1.0 \sim 50.0 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 的浓度范围内相对发光强度与其浓度呈良好的线性关系,检出限可达 $0.26 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$,对浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 的胰蛋白



酶进行平行测定其相对标准偏差 (RSD) 为 0.7% ($n=11$), 成功地用于合成样品中胰蛋白酶的测定, 回收率在 90.1%~104.1%, 结果令人满意。

第 1 部分主要介绍核糖核酸、脱氧核糖核酸、肝素、腺嘌呤、胰蛋白酶几种生物大分子物质测定新方法。

1.1 甲基紫分光光度法测定核糖核酸

用甲基紫测定 RNA 的分光光度法未见报道。实验发现, 甲基紫与 RNA 作用使甲基紫显著退色, 558nm 处的退色程度与浓度呈良好的线性关系, 线性范围为 $1.0 \sim 8.0 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 检测限量 $0.52 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 相关系数 r 为 0.9999。该方法简便、快速, 具有较高的灵敏度, 实际样品分析结果满意。对反应机理进行了探讨, 初步认为, 甲基紫分子与凝聚在 RNA 分子链上的反离子之间发生静电缔合作用, 然后以协同方式与 RNA 分子发生键合, 甲基紫平面结构受到破坏, π -电子叠合程度降低, 吸收值降低, 最大吸收波长红移。

1.1.1 实验部分

1.1.1.1 主要试剂与仪器

UV-756 紫外可见光度计 (上海精密科学仪器有限公司), 722S 光栅光度计 (上海精密科学仪器有限公司), FA2004 电子天平 (上海精科天平厂), pH5-3C 数显酸度计 (上海雷磁仪器厂), SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器 (江苏金坛金城实验仪器厂)。

核糖核酸标准溶液: $50 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 储备液, 冰箱内保存, 用时逐级稀释; 伯瑞坦-罗比森 (B-R) 缓冲溶液: 在 100cm^3 三酸混合液 (磷酸 + 乙酸 + 盐酸, 浓度均为 $0.04 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 中, 加入指定量的 $0.2 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 NaOH 溶液, 调整所需 pH, 用酸度计测定; 甲基紫溶液: $1.0 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 水溶液。

实验用水为二次石英亚沸蒸馏水, 试剂均为 A. R. 级或 G. R. 级。

1.1.1.2 实验方法

在 25cm^3 比色管中依次加入 pH=6.0 的 B-R 缓冲溶液 6.5cm^3 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 甲基紫溶液 2.5cm^3 、 $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ RNA 2.0cm^3 , 稀释至刻度, 摇匀, 反应 20min, 以水作参比, 在 400~800nm 波长范围内在 UV-756 紫外可见光度计上扫描得吸收光谱, 测其最大吸收波长 558nm 处空白溶液吸光度 A_0 和样品溶液吸光度 A , 计算吸光度差 $\Delta A = A_0 - A$ 。

1.1.2 结果处理

1.1.2.1 吸收光谱

在 5 支 25cm^3 比色管中, 加入 pH=6.0 的 B-R 缓冲溶液 6.5cm^3 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 甲

基紫溶液 2.5cm^3 ，然后依次加入 $0.0\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 、 $2.0\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 、 $4.0\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 、 $6.0\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ RNA 溶液 2.0cm^3 ，以水作参比，在相同的波长范围内测定其紫外-可见吸收光谱，如图 1-1 所示，测得最大吸收波长 $\lambda_{\text{max}} = 558\text{nm}$ 。

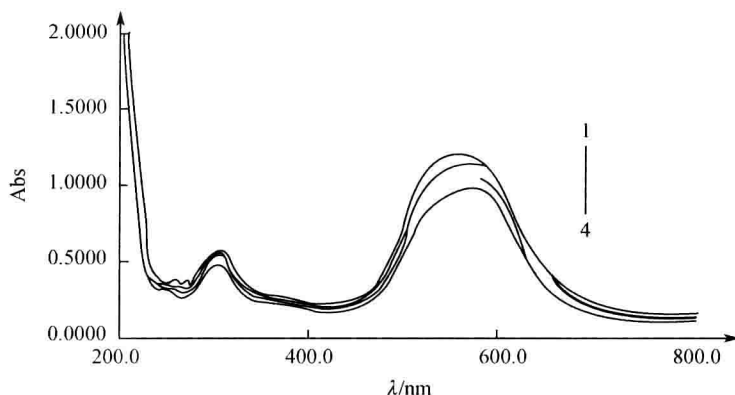


图 1-1 吸收光谱

由实验可知，当向甲基紫溶液中加入 RNA 后，溶液由紫色变为蓝紫色，最大吸收波长向长波方向移动，发生红移，且吸光值下降。

1.1.2.2 pH 对反应体系的影响

介质 pH 不仅影响反应的进行，而且对染料本身的存在型体有着直接的影响。改变反应体系的 $\text{pH} = 5 \sim 10$ ，依本法在最大吸收波长处分别测其吸光度。实验表明，在 $\text{pH} = 6.0$ 时为该体系的最佳 pH，如图 1-2 所示。

1.1.2.3 缓冲溶液用量对反应的影响

依本法，改变缓冲溶液用量，以试剂空白作参比，在最大吸收波长处测其吸光度。实验表明，在 $V = 6.5\text{cm}^3$ 时为该体系的最佳缓冲溶液用量，如图 1-3 所示。

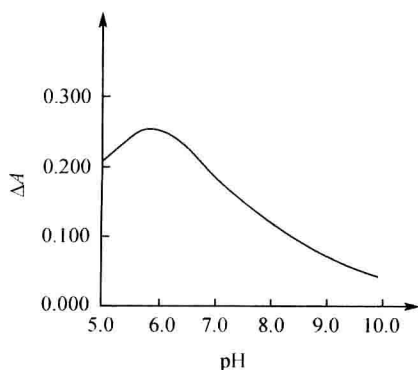


图 1-2 pH 的影响

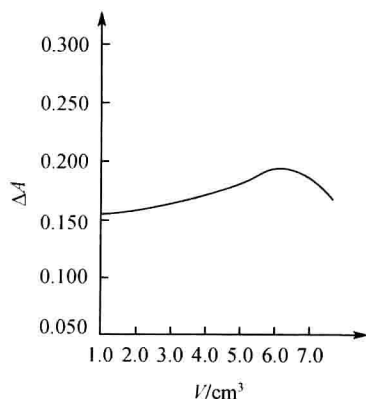


图 1-3 缓冲溶液用量的影响

1.1.2.4 甲基紫溶液用量对反应体系的影响

依本法, 改变甲基紫溶液用量, 实验表明, 在 $V=2.5\text{cm}^3$ 时为该体系最佳染料用量, 如图 1-4 所示。

1.1.2.5 反应时间的影响

在优化条件下配制溶液, 于最大吸收波长 $\lambda_{\text{max}}=558\text{nm}$ 处进行时间扫描, 并按同样方法对试剂空白进行扫描。从时间扫描结果分析, 甲基紫与 RNA 反应瞬间完成, 且吸收强度在 $0\sim1000\text{s}$ 内吸光度随时间下降, 但变化无规律; 在 2000s 后吸光值略有下降, 基本呈一直线, ΔA 随时间变化很小, 结果如图 1-5 所示, 因此, 实验选择 20min 后测定。

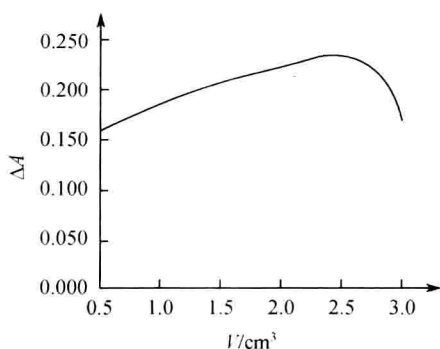


图 1-4 甲基紫用量影响

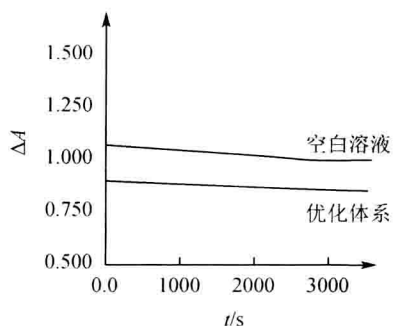


图 1-5 时间扫描

1.1.2.6 离子强度对反应体系的影响

在 25cm^3 比色管中加入 6.5cm^3 B-R 缓冲溶液、 2.5cm^3 甲基紫溶液、 2.0cm^3 RNA 溶液, 再在此溶液中加入 $0.1000\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl 溶液 0.5cm^3 、 1.0cm^3 、 1.5cm^3 、 2.0cm^3 , 测其吸光度值。结果显示, 在固定体积下, 随着体系离子强度的增大, 其光度值呈下降趋势, 但影响不大, 说明在该体系中, Na^+ 、 Cl^- 分别对甲基紫溶液和 RNA 的结合有竞争、屏蔽作用。由此可见, 离子强度的增大对体系灵敏度的影响也越大。因此, 实验中应避免使用高浓度的强电解质。

1.1.2.7 干扰实验

在 25cm^3 比色管中, 移取甲基紫溶液 2.5cm^3 、 $\text{pH}=6.0$ 的 B-R 缓冲溶液 6.5cm^3 、RNA 2.0cm^3 , 按实验方法, 考查了 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、牛血清蛋白、溶菌酶、胰蛋白酶、脱氧核糖核酸 (DNA) 等共存物质对测定的干扰。结果表明, 在这些干扰组分中, 除 DNA 干扰较小外 ($2.0\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$), 其余物质均产生较大干扰, 其中金属离子的干扰最严重, 在相对标准偏差小于 $\pm 5\%$ 的条件下, 最大允许浓度均小于 $0.4\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 。

这些干扰物质对体系均产生正干扰，可能是甲基紫与其发生和核糖核酸类似的作用。

1.1.2.8 标准工作曲线

按照实验步骤，绘制工作曲线，如图 1-6 所示。

由图可知，体系吸光度值与 RNA 浓度的线性回归方程为 $\Delta A = -0.0029 + 0.11675c$ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)，相关系数为 0.9999。

1.1.2.9 合成样品测定

按实验方法对合成样品中的 RNA 进行测定，取高活性干酵母 1.0g，溶于 100cm³ 容量瓶中，静置 24h，控制温度在 0~4℃，取上层清液，采用加标回收法测量。在 25cm³ 比色管中加入 7.0cm³ pH 6.0 的 B-R 缓冲溶液、2.5cm³ 甲基紫溶液，取 2.0cm³ 的样品溶液，加入 200 $\mu\text{g} \cdot (25\text{cm}^3)^{-1}$ 的 RNA 溶液，测其吸光度，分析结果如表 1-1 所示。

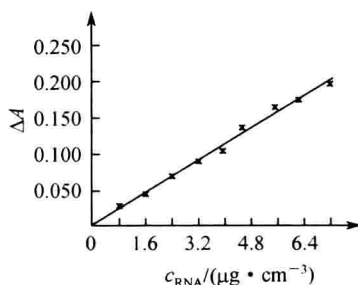


图 1-6 标准工作曲线

表 1-1 样品中 RNA 含量及其回收率 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $n=5$)

样品	样品含量	加标量	测量值	回收率/%	相对标准偏差/%
1	0.221	4.00	4.74	96.44	1.22
2	0.141	4.00	4.45	97.18	1.43
3	0.128	4.00	4.34	95.71	1.36

1.1.3 甲基紫与 RNA 作用机理分析

有机染料小分子与核酸之间主要有静电吸附、沟区和嵌插等几种作用。实验发现，根据其吸收光谱图可知，甲基紫与 RNA 作用，其吸收强度降低，但吸收峰的位置并没有发生位移，可见甲基紫与 RNA 作用不是嵌入作用。反应产物的显微照片如图 1-7 所示。

甲基紫在 pH=6.0 的溶液中以质子化的正离子形式存在，与 RNA 所带负电荷相反。因此甲基紫与 RNA 之间可能发生静电作用。静电吸附作用易受外界环境影响，这与实验中离子强度对测定体系的影响相一致，因此，初步判断甲基紫与 RNA 的作用可能为静电结合，如图 1-8 所示。

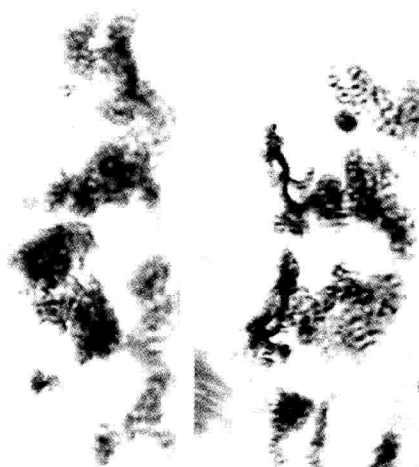


图 1-7 反应产物照片

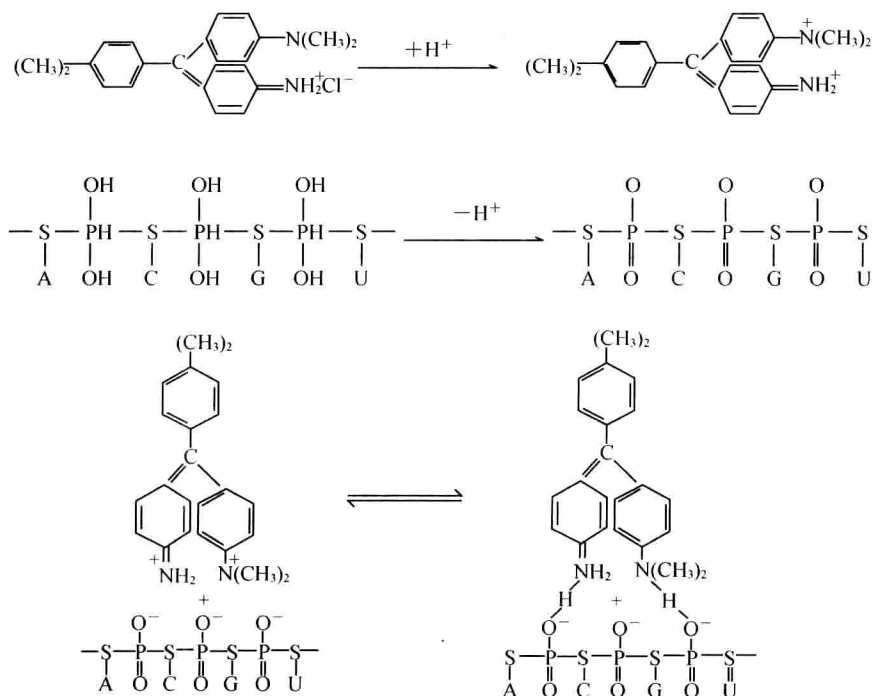


图 1-8 RNA 片段和甲基紫相互作用过程示意图

在弱酸性介质中甲基紫以质子化的正离子与 RNA 磷酸基团表面负离子发生静电吸附作用，但静电吸附作用易受外界环境影响，这说明静电吸附作用不明显，可认为甲基紫与 RNA 主要是静电缔合作用。然后，以协同方式与 RNA 分子发生键合，使甲基紫平面结构受到破坏， π -电子叠合程度降低，颜色变浅，吸收值降低，最大吸收波长