

基礎生物化學實驗法

- (1) **Introduction to the Biochemistry Laboratory**
- (2) **General Laboratory Procedures**
- (3) 化學實驗操作法
- (4) 免疫化學分析之各種方法
- (5) 原子吸光法之基本原理及測定

Introduction to the Biochemistry Laboratory




MODERN EXPERIMENTAL
BIOCHEMISTRY

THIRD EDITION

Rodney Boyer

Hope College



Addison
Wesley
Longman

An imprint of Addison Wesley Longman

San Francisco • Boston • New York
Capetown • Hong Kong • London • Madrid • Mexico City
Montreal • Munich • Paris • Singapore • Sydney • Tokyo • Toronto

General Laboratory Procedures

CHAPTER 1 Introduction to the Biochemistry Laboratory

- A. Safety in the Laboratory
- B. The Laboratory Notebook and Experiment Reports
 - Details of Experimental Write-up*
- C. Cleaning Laboratory Glassware
 - Glassware*
 - Quartz and Glass Cuvettes*
- D. Preparation and Storage of Solutions
 - Water Quality*
 - Solution Preparation*
- E. Quantitative Transfer of Liquids
 - Filling a Pipet*
 - Disposable Pasteur Pipets*
 - Calibrated Pipets*
 - Automatic Pipetting Systems*
 - Cleaning and Drying Pipets*
- F. Statistical Analysis of Experimental Data
 - Analysis of Experimental Data*
 - Determination of the Mean, Sample Deviation, and Standard Deviation*
 - Statistical Analysis in Practice*

Study Problems

Further Reading

On the Web

CHAPTER 2 General Laboratory Procedures

A. pH, Buffers, Electrodes, and Biosensors

Measurement of pH

Biochemical Buffers

Selection of a Biochemical Buffer

The Oxygen Electrode

Ion-Selective Electrodes and Biosensors

B. Measurement of Protein Solutions

The Biuret and Lowry Assays

The Bradford Assay

The BCA Assay

The Spectrophotometric Assay

C. Measurement of Nucleic Acid Solutions

The Spectrophotometric Assay

Other Assays for Nucleic Acids

D. Techniques for Sample Preparation

Dialysis

Ultrafiltration

Lyophilization and Centrifugal Vacuum Concentration

化学実験操作法

上 卷

東京大学名誉教授
薬学博士

緒 方 章 著

東 京 南 江 堂 京 都

I 基本操作

1. 粉碎
2. 混合
3. 溶解
4. 加熱
5. 冷卻
 - (1) 液體之冷卻
 - (2) 固體之冷卻
 - (3) 冷卻劑
6. 攪拌
7. 減壓
8. 蒸發
9. 乾燥
 - (1) 器具之乾燥
 - (2) 乾燥劑
 - (3) 液體之乾燥
 - (4) 固體之乾燥
10. 蒸留

II 分離操作

1. 抽出
 - (1) 水及有機溶劑之相互溶解度
 - (2) 以分液漏斗抽出
 - (3) 以自働抽出器抽出
2. 鹽析
3. 過濾
 - (1) 普通過濾
 - (2) 減壓過濾

Extraction and isolation of pure compounds

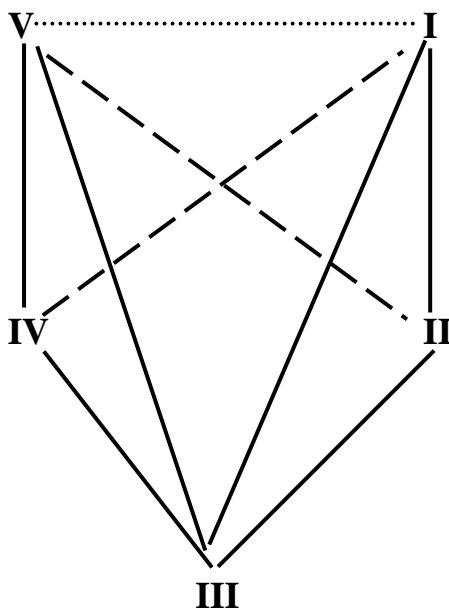
Extraction:

It is customary to separate the components of a previously unknown compounds by extraction with solvents on increasing polarity. With dried material this can be proceed by sublimation and steam distillation on a sample, followed by extraction with the series: light petroleum, ether, chloroform, ethanol (or 80% aqueous ethanol), and water (successively cold, warm, acid and alkaline).

The further fractionation of the extract obtained is a matter which has to be planned according to the requirements of a giving situation bearing in mind the properties of the compounds to be extracted. Except where isolation of essentially one compound by crystallization, distillation, or sublimation is possible, the great variety of chromatographic, electrophoresis, and multiple distribution techniques play vital part in subsequent operations.

heptane
(hydrocarbons,
CS₂, CCl₄...)

CHCl₃
CHCl₂
CH₃CHCl₂,
CH₂Cl·CH₂Cl...



水 (多価 alcohol, ...)

alcohol
(methanol, phenol...)

ether, ketone
aldehyde...

溶媒之分類



完全混合



不完全混合 (少量互溶)



不能混合

免疫組織化學方法 研究 胞外母質及其受體

(Immunohistochemical techniques to study the extracellular matrix and its receptors)

基本方法書

1. Antibodies
(Harlow & Lane,
1988)
2. Using antibodies,
1998)
3. 專書
Immunochemistry
of the extracellular
matrix, Vol. I,
Vol. II
4. Methods in Enz.

1. Review

- (Methods in
Enz. Vol. 245,
pp.316-346)
2. 參考文獻
 - ① 染色 laminin,
nidogen, 及
collagen type IV
 - ② collagens
 - ③ fibroblast 之
marker thy-1
 - ④ 精子

材料及方法

1. Zn-binding protein 抗體
2. 市售抗體
Collagen I
Collagen III
Collagen IV
Laminin
3. 市售
Immunohisto-
chemical kit
4. poly-lys
5. 96 孔盤
6. 螢光顯微鏡

免疫化學分析之各種方法

1. 染色方法
 - (1) Immunohistochemical (IHC) method
 - a. horseradish peroxidase-labeled reagents
 - b. alkaline phosphate-labeled reagents
 - (2) Immunofluorescence (IF) method

2. immunoassay
(ELISA)

3. 染色材料
 - (1) staining cells
 - (2) staining tissues
 - (3) Immunoblotting

原子吸光法之基本原理 及測定

鄭 森 雄

1974年1月14日初稿

2001年6月13日修正

第一章 原子吸光法之基本原理

1. 原理
2. 原子吸光與原子濃度之關係
3. 原子化步驟

第二章 火焰原子化

第三章 測定

(一) 機器使用時注意事項

1. 光源
2. 測定波長之調整
3. 燃燒器
4. 化霧器
5. 燃料之混合比及氣體系統
 - (1)燃料混合比
 - (2)氣體系統
6. 試料送入量
7. 其它注意事項

(二)容器及其清洗

1. 容器之種類
 - (1)玻璃容器
 - (2)聚乙稀
 - (3)聚四氣乙稀
2. 容器之清洗

(三) 試藥之調製

1. 試藥

(1) 無機酸類

(2) 蒸餾水

2. 標準液

(1) 保存用標準液

(2) 使用之標準液

(3) 標準曲線之製作

(四) 試料之調製

(1) 乾式灰化法

(2) 濕式分解法

(a) 硝酸-硫酸分解法

(b) 硝酸-過氯酸 ($\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$) 分解法

(c) 硝酸-硫酸-過氯酸分解法 (水銀之定量法)

第四章 溶劑之抽出

1. 有機溶劑燃燒時應注意事項

2. 抽出用之有機溶劑

(1) 溶劑之選擇

(2) 溶劑間的互溶性

3. 抽出之操作

4. 有機螯合劑

第一章 原子吸光法之基本原理

1.原理

所有的原子皆會吸收光，但只有在相當於其能量需求之波長方會吸光。例如鈉原子，於 589.0 nm 有非常強烈的吸光現象，因為光在此波長之能量，恰好能使鈉原子轉移 (transform) 至其他電子狀態 (electronic state)。鈉原子之這種電子轉移現象，非常具有特異性，其他元素之原子因與鈉原子不同，其能量需求 (energy requirement) 也就不同，因此在 589.0 nm 波長即不會吸光。當鈉原子吸收光以後，它即由基底狀態 (ground state) 轉移至激起狀態 (excited state)，此時鈉原子仍然是鈉原子，但它含有較多之能量。鈉原子有數種激起狀態，而每一種狀態皆存具特殊之能量。通常，此等能量之大小係以其與基底狀態之差而定。因此，我們可說，對鈉而言，某一特殊激起狀態是高於基底狀態 2.2 eV。此即表示某一原子在激起狀態較基底狀態多了 2.2 eV 之能量。通常我們以 0.0 eV 表示基底狀態。鈉原子之某些能量狀態 (energy state) 如表一所示。

在不同電子能階中，每一種轉移 (transition)，都需要不同之能量，因此有不同之波長。在某一系列之波長中，每一條特定的波長有一個明顯之最大強度 (sharp intensity maximum) 或稱為光譜"線" (spectroscopic line)。原子光譜即由此等特定的線組成。此種光譜與分子所形成之寬帶光譜 (broader bond spectra) 不同。原子吸光法 (atomic absorption spectroscopy) 測定上最有用者係由基底態所產生之線，此種線稱之為共鳴線 (resonance lines)。

每一種元素之原子光譜中包含有數條分離"線"。其中某些線是共鳴線，某些線不由基底態升起，而是由激起狀態升起。在實際原子吸光儀上，樣品之原子多數皆在基底狀態上，因此在原子吸光分析上，我們所利用的，係共鳴線。

2. 原子吸光與原子濃度之關係

原子吸光與濃度之關係可由 Lambert's-Beer's 定律來表示：

$$P_t = P_o e^{-abc}$$

$$\log_{10} P_o / P_t = abc = \text{吸光度 (absorbance)}$$

P_o = 入射光

P_t = 射出光

a = 吸收常數

b = 吸收通路之長度

c = 吸收原子之濃度

因此，假設某一樣品之濃度為 C ，其吸光度 (absorbance) 為 X ；則濃度增加至 $2C$ ，其吸光度將為 $2X$ 。"吸光度"即為測量在某種條件下，光被原子所吸收之量。Lambert-Beer 定律使測定者能夠由吸光度之大小，測量樣品中原子之濃度。

原子吸光儀，即為測定此"吸光度"之裝置，而使測定者能由吸光度求得樣品中原子之濃度。

理論上，我們可由方程式(1)，求得濃度。但在實際上，方程式(1)中之 a 與 b ，皆為常數，通常並不需要測定。原子化法是最廣為人用的方法，所以詳細了解火焰原子化法之機械及化學原理，可說是原子吸光分析之基礎。

3. 原子化步驟

原子吸光儀的燃燒系統，係以下列步驟將試料溶液原子化：

(1) 噴霧 (nebulization)

(2) 顆粒沈下 (droplet precipitation)

(3) 混合 (mixing)

(4) 乾燥 (desolvation)

(5) 分解化合物 (compound decomposition)

首先，試料溶液必須先經氣體噴霧器 (pneumatic nebulizer) 轉變成細小的顆粒。氣體噴霧器之形狀及幾何構成如圖 4 所示。在實際的操作中，氣體 (火焰之氧化劑) 首先通過噴霧器，在通過 venturi 時產生了減壓。因此，試料溶液就以 1-4 ml/min 之速度被吸入 venturi。在碰到流動極快的氣流時，這些試料溶液就被粉碎成直徑 1-100 μm 之微細顆粒。此等水霧被氣流帶入噴霧室 (spray chamber) 時，碰到一個障礙物～通常是可以調節位置的玻璃珠 (glass bead)。當高速度的水霧碰到此玻璃珠時，水霧的速度大變，許多較大的顆粒就變成微細顆粒。然後，微細顆粒即與氧化劑進入噴霧室。

在噴霧室，氧化劑與水霧即與燃料氣體混合。在此處，噴霧室容積、及流向之改變，產生了渦流，因此試料水霧、氧化劑、燃料氣體三者即混合均勻。因為噴霧室形狀，因此，原子吸光法之使用，平常係測定已知濃度標準溶液之吸光度，再將未知樣品之吸光度與此結果比較。其法為，將標準溶液所測得之點連接起來，在 Beer-Lambert 定律下，此曲線為直線，通常稱之為標準曲線 (standard curve) 或校準曲線 (calibration graph)，未知樣品之原子濃度即可由插入法 (interpolation) 求得。如圖 2 所示，此種以標準曲線求得未知樣品之方法，極為方便、準確。

上述標準曲線，通常皆為直線，但在實際上，有許多光譜學上及機器設計上之因素，會使此直線稍為彎曲，尤以在高濃度為甚。此將於下文中詳細述及。

第二章 火焰原子化 (flame atomization)

原子吸光分析方法最主要的測定依據是非結合的原子 (uncombined atom) 會吸收某一特殊波長之光。所以如何使樣品中之元素轉變為自由，不與其他元素結合之基底狀態，即將某一元素原子化 (atomization)，自是原子吸光儀操作能否成功之主要因素。因此，每一個分析者，都必須完全了解此種原子化 (即產生原子群 atom population) 的過程，以求得最佳之分析結果。

基本上，原子化之過程，是將分析溶液，加熱至某一能使化合物分解之溫度，以達到原子化之目的。通常，係以火焰加熱方式供給熱能，雖然在近年來無焰原子化 (non-flame atomization) 的技術也已經有許多人在使用。因為火焰原的關係，混合物渦流即轉變成直線流型 (laminar flow pattern)。此種直線流型使得火焰較為穩定及平靜。

噴霧室另外有一個功用，即分離粗大的顆粒，使其沿噴霧室壁流出。有微細顆粒進入火焰，此等水霧之直徑幾乎皆小於 $5\mu\text{m}$ ，通常在 $2\mu\text{m}$ 以下。完全混合的氧化劑、燃料氣體及試料溶液，經噴霧室後即進入噴燃口 (burner)，進入火焰燃燒。火焰之熱量，足夠乾燥 (desolate) 試樣顆粒之水粒，並能使試樣中之化學化合物分解成具結合的原子。因此在火焰中，即產生一群基底狀態之原子，而原子吸光測定即能進行。

第三章 測定技術上應注意之問題

(一)機器使用時應注意事項：

1.光源：

中空陰極燈管不可通過太大的電流值，否則陰極燈管內因電極中心及外側溫度之不同會產生自身吸收而影響測定結果，同時電流太大會減少燈管的使用壽命。通常，原子吸光儀之使用說明書，記有適當電流，點燈時應從 0 電流值，慢慢升高，至適當電流值後，約等 10~15 分鐘，使光輝安定後再測定。測定終了後，必須使燈管電流恢復至 0，如不小心轉至較高電流，此時會產生異常放電。應將電源即刻轉回 0 處，約候 2 分鐘後，重新點燈。中空陰極管點燈時，外側氣溫之變化會影響其熱平衡。燈管週圍溫度上昇時，陰極管內氣壓會變化而致光線強度降低，故外側需保持一定之溫度。

中空陰極燈管無法點燈的原因有燈管本身不良，燈管電源不良，燈管插座接觸不良等各種情況。

2.測定波長之調整

分析波長的波幅約為 $0.01\sim 0.1 A^0$ 左右，若僅憑目視的標示器來調整並不可能，必須測量該波長附近吸光度之變化，或者以標準溶液測定而找出最適的吸光波長。

在長時間的連續測定後，光源之光度會減少，同時吸收強度亦會降低，有時儀器亦會無法歸零。此現象大都係因為火焰之熱度影響分光器內之溫度而產生波長變動之現象。特別在夏天，無空調設備的實驗中尤易發生。因此在測定期間如發現標準曲線發生改變，則需重析調整波長，或者關閉火焰以去除溫度之影響。

3. 燃燒器 (Burner)

無論全噴霧燃燒器或預先混合燃燒器，燃燒槽 (Burner slot) 上有附著物時，燃燒中會產生雜音，致火焰中之還元焰也會呈不規則之跳動。尤以直接測定尿，血清，廢水等含甚多有機物之試料時，更易發生。此時應將火焰關閉，待燃燒器冷卻後取下，然後以名片 (或儀器附屬之鐵片) 沿著溝槽將附著物刮落，然後以水充分洗淨。水洗後，用吹風機吹乾後使用。上述洗淨之操作不可損傷噴嘴及燃燒槽。

預先混合之燃燒器在連續使用時，燃燒器頭部之溫度會上昇，促使逆火產生造成雜音。此時，應該等待燃燒器冷卻後。方可再繼續使用。目前一般的燃燒器均附有冷卻裝置，冷卻水一定要保持充分地流動。若冷卻不完全，連續使用後會產生雜音。

燃燒器在燃燒前必須調整光線完全通過溝槽的上方，方能使光線完全通過火焰之中心。有時靈敏度太高時，亦可移動燃燒器與光線呈一夾角，即可縮短光線通過火焰之距離。另一方面隨著測定物質、溶劑、燃料、助燃劑及燃料混合比之不同，燃燒器之高度也是需要經過調整，以得到最高之吸光度。

4. 化霧器

測定過程中，分析靈敏度的下降及雜音的產生，常常係化霧器的孔塞住所致，尤以預先混合燃燒器產生的影響。最為顯著。此時注意試料之送入速度即可知道是否有塞住現象。

化霧器之噴嘴的位置不正確也有相同的現象，特別是聚四氯乙烯 (Teflon) 製之化霧器，在長時間連續使用下，火焰產生之熱含使預先混合室之溫度上升，聚四氯乙烯則因熱而膨脹，而致噴嘴的位置發生改變，影響噴霧之能力。化霧器若有化霧球 (dispenser glass bead) 時，其與噴嘴距離不適當亦會引起雜音。另外，預先混合室的底部，排出廢液不完全時，液體會留在預混室之底部，亦會引起雜音。

燃燒器在使用完畢後，應即取下，以丙酮 (acetone)，水流過，將預混室洗滌乾淨。

5. 燃料之混合比及氣體系統

(1) 燃料混合比

元素能否完全原子化，受到火焰中熱解及其他種種因素所支配。燃料混合比不同時，火焰內所生成的自由基種類及數量亦異，火焰中之發光光譜也會有所改變。火焰中發光成分與溶劑有無流入大有差異，且受到溶劑送入量及霧狀顆之大小所影響。因此，測定吸光度時，需注意溶媒之不同，而求最適燃料混合比。

(2) 氣體系統

使用空氣作為助燃氣體時，一般是由壓縮機供給。此等壓縮機大部份都附有緩衝槽，其目的在防止壓縮機的空氣壓力發生改變。同時緩衝槽中多帶有過濾器以除去空氣中所帶有之灰塵及水分。如過濾器堵住，或積有多量水氣時，會使火焰產生雜音，此時應將過濾器清洗，或除去水氣。另外，如能在壓縮機前置一矽膠管 (Silica gel tube) 或玻璃維纖過濾器，則有助於空氣之淨化及除去水份。

6. 試料送入量

當火焰之熱量充分時，元素之原子化即能完全，因此試料之噴霧量與吸光度係成比例增加。但是，因為火焰具有一定熱量，試料送入量繼續增加時，由於水之蒸發及分解等會消耗火焰之熱能，促使元素原子化無法完全，結果乃使吸光度降低。如圖 6.4 所示，各種溶媒，元素各有其最適宜之送入量。

許多市販儀器其試料送入量之多寡係受到助燃氣體的流速所左右。因此，可以定量的溶媒調節助燃氣體的流量，以馬錶測定時間，即可知樣品之吸入量，分別測定其吸光度，可知何種流量最適宜。

7.其它注意事項

儀器本身、壓縮機及抽風機等之電源應各自獨立，否則因壓縮機的發動及停止會造成雜音。同時儀器周圍如有高週波發生時，也會產生雜音。

在進行測定時，燃燒時之火焰會產生許多有害氣體，因此測定場所應該設置良好的抽風系統，維持良好的通風。為知排氣系統是否良好，可以 parafin 浸拜拜用的"線香"，而觀流線之狀態。尤其有毒的水銀分析，應採用 L 焰還原氣化法 b 密閉系統下分析。

以標準液燃燒時，雜音甚少，但以試料溶液燃燒時，試液中之高濃度的鹽類及不溶性的微粒物，常會造成雜音，散光而引起測定誤差。此時應針對前處理之各方法詳加研討。不溶性物質，則應將試料以 0.45μ 以下之 membrane filter 過濾。

(二)容器及其清洗

在化學分析工作上，玻璃器具，試藥及溶劑之使用占有相當重要之地位，尤其對重金屬之測定更為不容視之問題。

1.容器之種類：

在重金屬分析過程中必須使用各式各樣之玻璃容器以利各種操作之進行，因此容器性質之了解與選擇非常重要。目前最常用之容器根據其原料之不同可分為玻璃、聚乙烯 (polyethylene) 及聚四氯乙烯 (Teflon) 三種。

(1)玻璃容器：

玻璃是最常使用的容器，其主要原料為硅砂，硅石粉。但是為了提高玻璃容器對化學藥劑之耐久性，耐熱性，或為製成各種不同顏色，常在製造過程中加入各種化合物及著色劑，此等物質常含有金屬

成分。因此，不宜以有色玻璃瓶保存試葯或標準溶液。玻璃器皿依其組成，可分為：

- a. 鈉玻璃：實驗室常用的試管、漏斗、分液漏斗、燒杯等大多係鈉玻璃製成。其組成為 SiO_2 65-75%， Na_2O 10-20%， CaO 5-15%， Al_2O_3 0.5-4%， MgO 0.5-4%， $\text{Fe}_2\text{O}_3 < 2\%$ 。此類玻璃具有耐酸性、耐水性、但對鹼的抵抗很弱，不宜做為標準液及試料保存之用。
- b. 鉀玻璃：鈉玻璃中之 Na_2O 成份以 K_2O 取代之玻璃稱之為鉀玻璃。此種玻璃之透明度較佳，且耐化學性及耐熱性亦較強。但是為使其便於加工，多添加有 PbO 。因此使用舊的分解瓶時，瓶中常含溶出之 Pb 。
- c. 硼硅酸玻璃：此類玻璃質硬且耐熱，耐化學作用極強，亦不具吸附金屬性，當其中硼酸之含量愈高時，耐熱、耐化學性愈強。Pyrex 玻璃即屬此類玻璃。
- d. 石英玻璃：透明的石英玻璃係以合成的（ ）及水晶熔融而成。不透明者係以硅砂為原料製成，石英玻璃所含之金屬甚少，耐酸性特強。但是對鹼較弱，且價格高昂為其缺點。

由上所述，可知任何玻璃對酸都有耐性，但對稀酸及鹼，特別是熱鹼之抵抗力極弱。另外，玻璃之內部極易受傷。尤其是鈉玻璃，長期使用後，如果其內面受到損傷，表面構造即被破壞，因此會與溶液中的金屬發生吸附、離子交換的現象。如果以此種玻璃做為容器，分析所得的實驗結果，會忽高忽低，參差不齊，特別是微量金屬的分析為然。

(2) 聚乙稀 (polyethylene)：

聚乙稀不易破裂。金屬成分之溶出亦極少，然而，其表面吸附力甚強。 Hg ， Ag ， Au 等金屬會被吸附，尤以微薄溶液更易被吸收。

為避免表面吸附，試料之保存及運送，最好將試瓶洗後，添加鹽酸或硝酸（依測定目的金屬之種類而定），在 pH 1.0-2.0 酸性下保存。

(3) 聚四氟乙烯 (Teflon)

聚四氟乙烯在使用中，幾乎沒有金屬之溶出，且耐熱性較聚乙烯 (70-90°C) 為高，可耐熱至 220-300°C 但與聚乙烯一樣，表面吸著性較硼硅玻璃為高，故應避免強熱及表面受傷，不在洗液中長期放置，洗淨後速將其反轉乾燥保存。

綜合上述，可知在重金屬之分析中，容器之選擇極為重要。其中以硼硅酸玻璃（例如 Pyrex 玻璃）較為理想。然而 pyrex 玻璃價格較貴，如果所有的容器皆使用 pyrex 玻璃，實驗室負擔將極重。此時可考慮各種器皿的特性，如分解瓶，加熱使用的器皿，長期存放樣品的容器，方使用 pyrex 玻璃。僅短時間存放，稀釋時，實驗室常用之鈉玻璃，如吸管，量瓶等，亦可使用。另外，依據筆者之經驗，磁製漏斗或容器極易吸附重金屬，最好避免使用。又，一般使用者常將新舊之分解瓶一起放入抽屜之中，但是不同廠商製分解瓶其組成不一，使用之前歷亦不相同，溶出之成分即有差異，因此需特別注意。最好將測定微量金屬用之玻璃器皿，分批保管。

2. 容器之清洗：

往昔均習慣使用重鉻酸鉀—硫酸混合液來浸洗玻璃器具，此混合液可以洗除大部分的有機物質，但對飽和的碳氯化合物及安定的無機化合物卻不容易洗淨。而且經過此液浸泡之容器，取出後即使充分地水洗，器內仍然會殘留多量的鉻，尤其是容器內部有傷痕時更易發生。又一般粗製重鉻酸鉀都混有重金屬成分，故重金屬分析用之器具不宜採用此種混合液浸洗。

濃硫酸—濃硝酸 (1:1) 混合液之氧化力很強，可以充分地除去有機物質，用於清洗含有大量蛋白質、脂肪之血清或生體組織等試料的

器具有很好的效果。只是本液會溢出酸的蒸氣，因此通常是把洗液盛於聚氯乙烯 (vinyl chloride polymer) 製成的有蓋大型容器內，再將欲清洗之玻璃器具浸入其中，蓋上蓋子。浸泡之器具較少時，則用較小的聚氯乙烯容器並放置於毒氣室內或通風處所即可。

盛過有機物質之玻璃容器，急著使用時，可添加 5 滴左右的亞硝酸鈉入濃硫酸後，加熱，洗淨使用。盛過水溶性試料及試葯的玻璃或聚乙烯等器皿之洗滌，可先將試料丟棄，水洗，然後浸入 20% 硝酸溶液中，則污物可以去除。如仍有污物可再浸入 30% 鹽酸中，則剩餘之污物可以完全去除。使用過 MIBK 等有機溶劑之玻璃器皿，可先將其浸入洗滌用之丙酮液，水洗，再以 20% 硝酸洗淨。盛過血清、內臟等含有脂肪及蛋白質之容器，水洗後，可以市販之洗劑洗滌。合成洗劑之洗淨力以在 50-60°C 時最強，而且洗除合成洗劑時亦必須使用溫水。利用合成洗劑浸洗器具時，同時要考慮到洗劑本身吸附玻璃之作用，以及污水殘存之情形。因此較高精密度之實驗，於合成洗劑預洗後，必須再放入硫酸—硝酸溶液或 20% 硝酸中浸泡。洗淨後之玻璃容器最好利用自然乾燥法使其乾燥。玻璃加熱時極易溶出 Na，而且加熱器內壁塗料所含之鐵及鎳鉻線所含之 Fe、Cr、Mn、Mo、W 等亦會污染器具，特別是鐵的污染最為顯著。

洗淨、乾燥後之玻璃器具為了避免環境之污染，最好使用葯包紙或鋁箔紙封口後保存。聚乙烯及聚四氯乙烯所製成之容器表面吸著性較強，不可長期存放試料或其他溶液，而且水洗、乾燥後，必須放入大型之乾燥箱內保存。

(三) 試葯之調製

1. 試葯

(1) 無機酸類：

無機酸類廣泛地應用於試料之分解、溶出、抽出，其純度之高低將影響測定結果之準確度。市販之特級試藥也常常含有微量之 Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn 等金屬。特別是硫酸中所含有不純物較硝酸、鹽酸為高。而且不同時間出廠之試藥，其不純物之含量亦有差異，特別是 Hg 含量之差異更大。

重金屬測定時，在灰化分解等過程中，由於必須反覆添加無機酸，如果無機酸中含有金屬，則最後灰化物中將含有許多酸所帶來的金屬。則最後灰化物中將含有許多酸所帶來的金屬。例如分析食品中之 Hg 需使用大量之硫酸，如不小心使用試藥，最後之測定結果將頗不精確。雖然無機酸類可利用各種方法加以精製純化，但一般說來，其過程繁雜並不適合在實驗室操作，所以一般重金屬分析所使用之酸係採用精密分析用藥品 (super special grade)，而不再精製。操作過程中，再同時進行空白試驗，作為消除誤差之方法。

綜上所述，為了消除藥品之污染，無機酸之使用必須(1)選擇純度較高之特級試藥(2)採用同一批出廠之試藥，最好整批試藥預先一起混合後使用(3)儘量減少酸之使用量，以免引入雜質(4)同時進行數個空白試驗。

(2)蒸餾水：

蒸餾水為實驗室中使用量最多之溶劑，所以蒸餾水水質之優劣影響實驗結果甚巨，尤其是微量之重金屬分析更需特別注意。一般蒸餾水係利用銅製或玻璃製等蒸餾器製造，而以銅製之蒸餾效率較高，但銅製者在蒸餾時，很容易溶出 Cu, Sn, Zn等金屬。特別是舊的蒸餾器，重金屬極易溶出，故銅製蒸餾器製出之蒸餾水不適用於原子吸光分析用。另外，玻璃製蒸餾器蒸餾時，亦會溶出鹼金屬。為了獲得高純度之蒸餾水，最好先將水經過蒸餾器蒸餾，再通過離子交換樹脂，如此不但可獲得高純度之蒸餾水，而且可使樹脂具有較長之耐久性。

如果配合石英玻璃 (特級 No.4 以上)製之蒸餾器,則可獲得高純度之蒸餾水,原子吸光分析係樣品與標準溶液之相對測定,故所使用之蒸餾水,如導電率在 $1.0 \mu \Omega/\text{cm}$ 左右,用之應無問題。

2.標準液:

(1)保存用標準液 (stock standard solution)

保存用標準液係由純金屬或吸濕性較小的金屬鹽類調配而成,其中純金屬為了防止氧化必須存放於充氮氣的容器中。配製時純金屬用鹽酸或硝酸溶解,不能用硫酸或磷酸以避免測定時產生干擾。以金屬鹽配製時,須加入 3 ml 左右之稀硝酸 (1:1) 使溶液之 pH 保持在 2-3 左右。一般標準溶液均配成 1000 ppm 之濃度作為貯存液備用,並維持一定的酸度以防止容器表面之大量吸著。現在,市面上已有配好之保存用標準金屬溶液出售,可直接購買之。

(2)使用之標準液

使用之標準液通常在實驗當日配製。以 Zn 為例,通常取 1,000 ppm 標準溶液 1.00 ml,加 2% HCl 至 100 ml 量瓶,先製成 10 ppm 溶液 (此溶液原則上在 1 週內可再用)。再取 10 ppm 之 Zn 溶液 5.0 ml,加 H_2O to 25 ml,製成 2 ppm 之溶液。接著再以 2 ppm 溶液,配成各種使用之標準液。例如下表:

配製用之標準液	使用之標準液
---------	--------

$$2 \text{ ppm} \times 0.2 \text{ ml} = 0.1 \text{ ppm} \times 4 \text{ ml}$$

$$2 \text{ ppm} \times 0.4 \text{ ml} = 0.2 \text{ ppm} \times 4 \text{ ml}$$

$$2 \text{ ppm} \times 0.8 \text{ ml} = 0.4 \text{ ppm} \times 4 \text{ ml}$$

$$2 \text{ ppm} \times 1.2 \text{ ml} = 0.6 \text{ ppm} \times 4 \text{ ml}$$

$$2 \text{ ppm} \times 1.6 \text{ ml} = 0.8 \text{ ppm} \times 4 \text{ ml}$$

$$2 \text{ ppm} \times 2.0 \text{ ml} = 1.0 \text{ ppm} \times 4 \text{ ml}$$

$$2 \text{ ppm} \times 3.0 \text{ ml} = 1.5 \text{ ppm} \times 4 \text{ ml}$$

(3)標準曲線之製作

以 0.1 至 2.0 ppm 之使用標準液，測定其吸光值，而得標準曲線。

四、試料之調製

試料的分解和抽出等一連串步驟，為重金屬分析最重要之純化過程，亦是使用原子吸光儀測定無機元素所必須之前處理；通常純化步驟隨著測定項目之不同而略有差異。

為測定原子吸光，需先將試料分解，主要可分為乾式灰化法及濕式分解法。

(1)乾式灰化法：

將試料比照食品之灰化法。將試料先灰化，再測定之。此法因需較長時間（1 夜或 1 日），使用較不廣。

(2)濕式分解法：

本法係利用硝酸、過氯酸、過氧化氫及硫酸，進行低溫氧化分解。與乾式灰化法比較，金屬之揮散，吸著，及不溶性矽酸成分之生成及其吸著情形均較少，且分解時間亦快。但是 As、B、Ge、Hg、P、Sb、Se、Sn 等容易揮散，特別是有鹵素共同存在時更為容易。

可是另一方面，氧化劑或氧化補助劑可能造成之污染必須加以考慮，尤其是如同上述硫酸在實驗室很不容易精製，常含有 Cd，Ni，Zn，Cu，Pb，Hg 等不純物質。因此含有不純物較多之發煙硝酸，發煙硫酸不可使用。又硫酸之採用必須是同一批藥品，最好事先進行空白試驗。氧化補助劑之使用則儘量避免，就是使用也必須減至以往規定量的 1/5 到 1/10。又 Pb，As 容易從玻璃容器內溶出而污染試料，容器必須使用硼硅酸玻璃之製品。而且玻璃之前歷必須詳加考慮，因為陳舊之容器會吸著或溶出重金屬，採用濕式分解時，不論試料多寡，應同時做(1)空白試驗及(2)添加標準液之試驗，而且氧化劑之添加量須與試料一致，前處理之方式亦須完全相同。為知濕式分解所使用之硫酸及其它氧化劑，是否會干擾測定，應該先行空白試驗，確認沒有影響後，方才用以分解試料。

(a)硝酸—硫酸分解法：(原子吸光分析 p.249，Rf.8)

使用於動植物組織，食品等有機性試料，動物內臟等最好經冷凍乾燥後再行分解。

分解過程為乾燥試料 2-4 g 或濕試料 10 g 左右放入硬質分解瓶或硼硅酸玻璃製之燒杯內，慢慢加入 10-40 ml 硝酸 (依試料量決定所需硝酸之量)，放置於毒氣櫃內先行分解 (最好在前一夜加入硝酸，以便反應進行)，待反應停止時，再移至電熱板上慢慢加熱分解。當激烈反應終了，赤褐色煙漸少時，取出放冷，再加入 10-20 ml 硫酸。此時硫酸必須緩慢地添加，避免反應過於劇烈。接著繼續放在電

熱板上加熱，直到分解液成暗紅色時，加入 1-2 ml 硝酸使顏色轉淡。如此反覆加熱至有硫酸之白色煙霧出現，試料亦不再變為褐色時，即為分解完成，可用再製蒸餾水將其定容至一定之體積而作成供試液。

(b)硝酸—過氯酸 (HNO₃--HClO₄) 分解法：

此法回收率好且分解速度快，只是容易因乾涸而引起爆炸，因此必須防止試料在分解過程中乾涸。本法可用來分析脂肪含量少之動植物組織，蛋白質及碳水化合物中之微量金屬，但水銀不適合採用此法。

取約 1-2 g 之乾燥試料放入分解瓶內，慢慢地加入 25 ml 硝酸(最好在前一夜放置，令其在常溫先進行分解反應)。移至電熱板上緩緩加熱，保持輕微沸騰之溫度約 30 分鐘，冷卻後，加 15 ml 之 60% 過氯酸，然後再慢慢加熱，使其沸騰，但決不可使其產生急烈之沸騰。加熱至溶液透明時即為分解完成 (約 1 小時)。如果加入過氯酸後亦無法使溶液的暗黑色消失，需再加入少量之硝酸，並繼續加熱至溶液呈透明。但需特別注意，無論如何不能使分解瓶內乾涸，以防爆炸。

(c)硝酸—硫酸—過氯酸分解法 (水銀之定量法):

為 AOAC 測定水銀之試料分解方法，一直廣泛地被採用，為了促進氧化之進行需加入硒末 (selenium)。本法適用於除去油脂之試料。

動植物組織切碎後取出 50 g 均質，米則取粒狀 20 g，種子則取 10 g，此等試料放入分解瓶時，必須再加入純硒末 0.1 g，同時為了防止突沸可加入玻璃球。分解前先接上還流冷卻器，接著由分解瓶之側管慢慢地加入 25 ml 之硝酸—硫酸 (1:1) 之混合液，前後約需 10 分鐘。等其反應液冷卻後，再追加 10-20 ml 之硝酸，置於加熱包 (mental heater) 中緩慢地加熱 30 分鐘。

試料完全被溶解後，則加入 75% 過氯酸 15 ml，並繼續還流加熱 1 小時，至分解液呈無色或淡黃色時即分解完畢。取出供試液前，應待整個裝置冷卻，並用 H₂O 慢慢地清洗冷卻管內壁。洗後則一起沖入分解瓶中與分解液混合。

第三章 溶劑之抽出

調製原子吸光用之試料，除了將試料氧化分解成供試液外，有些元素分析尚須利用溶劑進行測定元素之抽出，其目的在除去水溶液中的陰離子及共同存在的非測定元素之干擾。一般較常用的是金屬螯合劑一有機溶劑抽出法，本法之優點為利用螯合劑與試料水溶液中金屬作用生成金屬螯合物，然後再加入有機溶劑抽出螯合物，如此即可很容易地除去試料中陰離子之干擾。另外，選擇不同之螯合劑及調節不同的 pH 值。則可以除掉共存元素之干擾。不受其它元素干擾之金屬元素直接以水溶液測定，不需經過抽出。水溶液試料添加乙醇、醋酸、丙酮等有機溶劑，在燃燒測定時會產生增感效果（有機溶劑效果）致使測定感度（吸光度）上昇、增感效果所以會產生，乃是由於有機溶劑之添加使試液之表面張力下降，則經噴霧出來之顆粒直徑因而減小，故送至燃燒槽（Bunner slot）之顆粒數隨之增加為其主要之原因。顆粒之平均半徑與試液的表面張力 γ 及密度 ρ 的大約關係式如下所示：

$$d=c(\gamma/\rho)^{0.25} \quad d=\text{平均半徑} \quad c=\text{常數}$$

水溶液試料之 γ/ρ 值一定時，其吸光度之增加率則視添加之有機溶劑而有差異，通常吸光度之增加與 γ/ρ 值呈正比的直線關係。

1. 有機溶劑燃燒時應注意事項

不論抽出或添加的有機溶劑與燃料混合燃燒時，火焰將成為多燃料系，使火焰之本質大大地改變、此時火焰由於本身構造之改變和試液送入量之不同，其火焰層的流動亦發生變化，以致火焰層中原子之密度及其分佈與水溶性試料不同，因而測定條件亦異。是故以最適當的燃料—溶劑混合比與單獨以水溶液測定時，其吸光度有很大的差異。又加入的有機溶劑或測定之金屬種類不同時，吸光度也會有差異。

試料用之溶劑本身也是燃料，故有機溶劑試料的送入速度對火鋸之燃燒狀態會有影響。而噴霧器的目及吸引試料的毛細管彎曲度會改變試料之送入速度，對燃燒狀態有很大的影響。含有有機溶劑的試料溶液之最適當的送入速度與水溶液不同，因而其送入量必須作適當的調整。另外火鋸上下之間原子密度之分佈亦因溶劑之不同而有差異，必須調整燃燒器 (Bunner) 的位置，才能得到較高之感度。

2. 抽出用之有機溶劑：

(1) 溶劑之選擇：原子吸光分析用之有機溶劑與比色用之溶劑不同，必須具備下列條件：

- a. 對所欲測同之金屬元素有良好的抽出效果。
- b. 燃燒時不會產生毒氣。
- c. 必須能夠完全燃燒。有些不能完全燃燒之溶劑，可調節燃料之混合比、流速以及試料送入量，使其能完全地燃燒。
- d. 燃燒時之火鋸必須保持穩定。
- e. 對所欲測定之波長不會產生吸收。

(2) 溶劑間的互溶性：水溶液試料與有機溶劑混合振盪進行抽出時，水層及有機層彼此會產生互相溶解之現象，致使有機層含量在抽出操作後會發生改變。當大量的水溶液試料以少量的有機溶劑進行反覆抽出時，有機層的量將顯著地降低。因此在抽出操作後可利用遠心分離使水層及有機層分開。並儘量地吸取有機層，然後再用溶劑補至應有的含量以避免產生誤差，但同時存有很多種金屬的試料，或者每次測定的試料不同時，不要使用選擇性低的金屬整合劑，以防止造成誤差。

為了減低互相溶解性之影響，必須先將水溶液試料之酸濃度、pH 值及鹽析劑濃度等抽出條件作一定之調整，使其預先達到平衡後再進行抽出。溶劑抽出液若含有水分，則在測定時會產生雜音，並且金屬

螯合物容易遭受加水分解。因此抽出液可經由濾紙過濾，以分離水分而減少雜音。

3.抽出之操作

Badge 法為最廣用而且簡易的抽出操作，此法係使用分液漏斗進行抽出及分離之工作。其過程為將分解液定量地放入分液漏斗內，接著調整 pH 值、添加鹽溶液及有機溶劑，然後振盪抽出，抽出液即可直接測定。使用分液漏斗時，由於潤滑劑會受有機溶劑之作用，溶解生成混濁物質。因此漏斗之蓋子及活栓不可塗抹凡士林等潤滑劑，用水使之密合即可。最好採用聚四氯乙稀 (Teflon) 製之活栓及蓋子，可得到良好的密合效果。

在微量試料測定時，使用活射器進行抽出，可以很輕易的分離水層及有機層。又在大量分析時，注射器也可以用來分離離心後的水分。

試料水溶液與溶劑之比例對抽出百分率有很大的影響，使用溶劑反覆抽出可以較充分的抽出金屬螯合物。抽出時振盪時間之長短與抽出率亦有關係，一般用手需急烈振動 2-3 分鐘，使用振盪機則須 20 分鐘。

金屬螯合物在水層及有機溶劑層中具有一定之分配比，因此為抽出完全可加入容易與水結合之金屬鹽類，藉以提高抽出率。另外，水層及有機溶劑層之臨界面常會產生乳化作用，乳化膜會吸附金屬螯合物，導致抽出率下降。在試液中添加飽和硫酸銨或氯化鈉結晶體等試藥即可防止乳化作用之產生。

4.有機螯合劑

分析採用之有機螯合劑，對金屬之選擇性均較低。因此一般之螯合劑，在週期表上除了 IA、IIA、IIIA 以外的大部分金屬皆能在 pH 值小於 7 的廣大酸性範圍進行螯合作用，所形成的螯合物容易由 MIBK (Methyl Isobutyl ketone) 及 MAK () 等酮類抽

出，並適合原子吸光分析工作。此乃有機螯合劑的選擇性較低之優點，廣用於試料之前處理。

一般常用的有機螯合劑有 (1)APDC (Aminonium pyrrolidine dithiocarbamate)，(2)DDTC (Sodium diethyldithiocarbamate)，(3)Dithizone (Diphenylthiocarbazone)。其等使用時，應視測定之金屬種類而加以調整 pH 值，以得到最高之抽出率。