



川渝地区医药院校精品实验教材

供护理、临床医学、口腔、药学、影像、
检验等专业使用

生物化学实验与学习指导

第3版

主编 曾 萍 孙厚良



第四军医大学出版社

川渝地区医药院校精品实验教材

供护理、临床医学、口腔、药学、影像、检验等专业使用

生物化学实验与学习指导

第3版

主 编 曾 萍 孙厚良

副主编 田树高 何 丹 张 婷

编 者 (按姓氏笔画排序)

田树高 (重庆医药高等专科学校)

孙厚良 (重庆三峡医药高等专科学校)

李俊萍 (四川中医药高等专科学校)

何 丹 (四川中医药高等专科学校)

何柳兴 (成都大学医护学院)

张 婷 (达州职业技术学院)

罗小莉 (雅安职业技术学院)

姚 婕 (雅安职业技术学院)

曾 萍 (雅安职业技术学院)

熊 书 (重庆三峡医药高等专科学校)

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验与学习指导/曾萍, 孙厚良主编. —3 版. —西安: 第四军医大学出版社, 2015. 7

川渝地区医药院校精品实验教材

ISBN 978 - 7 - 5662 - 0753 - 1

I. ①生… II. ①曾…②孙… III. ①生物化学 - 化学实验 - 医学院校 - 教学参考资料 IV. ①Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 171694 号

shengwu huaxue shiyan yu xuexi zhidao

生物化学实验与学习指导

出版人: 富 明 责任编辑: 朱德强 崔宝莹

出版发行: 第四军医大学出版社

地址: 西安市长乐西路 17 号 邮编: 710032

电话: 029 - 84776765 传真: 029 - 84776764

网址: <http://press.fmmu.edu.cn>

制版: 绝色设计

印刷: 西安市建明工贸有限责任公司

版次: 2015 年 7 月第 3 版 2015 年 7 月第 8 次印刷

开本: 787 × 1092 1/16 印张: 9.25 字数: 220 千字

书号: ISBN 978 - 7 - 5662 - 0753 - 1/Q · 72

定价: 20.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

川渝地区医药院校精品实验教材 建设委员会

主任委员 刘 红 金 虹 谭 工

副主任委员 黄 康 艾继周 伍小飞

委 员 (按姓氏笔画排序)

王 静 史 铀 孙玉锦 孙厚良

杜 斌 李 晶 李成忠 邱 平

沈 力 陈 俊 周 灿 段艮芳

徐 静 郭 兵 黄 琼 彭裕红

曾 萍

前 言

《生物化学实验与学习指导》(第3版)在前两版的基础上,根据使用中发现问题、生物化学实验的进展、编者多年的教学、科研经验及兄弟院校的建议等,对内容进行了必要的调整和修改,并补充了新的实验内容。在编写过程中力求做到简明、扼要、实用性强。本实验主要适用于医学高职教育各专业的生物化学实验指导教学。针对高职培养目标和培养对象,本教材以基础生物化学内容为中心,围绕验证医学高职各专业所需的生物化学知识点取材编写而成。各院校可根据实际情况对实验内容取舍,部分内容可作为学生第二课堂的实验内容。

本教材由两篇组成:上篇为实验指导,下篇为学习指导及习题。其中基础性实验部分重在基本实验技能的培训,综合性实验部分着重实验原理的应用和提高分析能力,涵盖了与生物化学理论相适应的生物化学实验内容和技术,包括实验须知、生物化学实验基本操作技术和血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳等12个生物化学基本实验,实验部分除了生物化学验证性实验外,还列举了综合性实验及拓展性实验。通过实验内容的学习,了解生物化学技术的原理和操作要点,培养学生动手和解决实际问题的能力;学习指导及习题部分主要由学习要求、重点解析、思考练习题和参考答案4个版块组成,通过该部分的指导和练习,加深学生对理论知识的熟悉和掌握。

本教材由主编拟定编写大纲、10位编者集体讨论、分头执笔,主编审阅修改而成。本教材自组织编写至脱稿付印,时间仓促,加之编者学识水平有限,难免存在不足之处,谨请使用本教材的广大师生提出宝贵意见以便修订完善。

曾 萍

2015年3月

目 录

上篇 生物化学实验指导

生物化学实验须知	(2)
第一部分 生物化学实验技术简介	(4)
第一节 生物化学实验基本操作技术	(4)
第二节 光度法原理和分光光度计的使用	(8)
第三节 层析法简介	(13)
第四节 电泳法简介	(15)
第五节 生物化学实验样品的制备	(16)
第二部分 实验项目	(19)
实验一 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	(19)
实验二 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量	(22)
实验三 温度、pH、激活剂与抑制剂对酶促反应的影响	(23)
实验四 琥珀酸脱氢酶的作用及竞争性抑制的观察	(26)
实验五 激素对血糖的影响及血糖的测定	(27)
实验六 血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 测定 (赖氏法)	(29)
实验七 肝脏中酮体的生成	(32)
实验八 脲酶-波氏比色法测定血清尿素	(33)
实验九 血清总胆固醇的测定 (胆固醇氧化酶法)	(35)
实验十 紫外吸收法测定 DNA 含量	(37)
实验十一 脂肪含量及碘值的测定	(38)
实验十二 乳酸脱氢酶同工酶琼脂糖凝胶电泳	(42)

下篇 生物化学学习指导及习题

第一章 蛋白质的结构与功能	(46)
第二章 核酸结构与功能	(52)
第三章 酶	(56)
第四章 维生素	(62)
第五章 生物氧化	(67)

第六章 糖代谢	(72)
第七章 脂代谢	(79)
第八章 蛋白质分解代谢	(83)
第九章 核酸代谢	(87)
第十章 基因信息的传递	(90)
第十一章 肝的生物化学	(99)
第十二章 水和无机盐代谢	(103)
第十三章 酸碱平衡	(107)
综合测试题 (一)	(110)
综合测试题 (二)	(116)
参考答案	(122)
参考文献	(138)
附录 临床生化正常值	(139)



上篇

生物化学实验指导

生物化学实验须知

【实验目的】

1. 学习基础生物化学实验方法，通过实验从实践中进一步学习，掌握和运用学过的生物化学基本理论。
2. 学习并掌握生物化学基本操作技术和基本操作技能，学会运用生物化学理论分析实验过程中的各种现象和问题，培养、训练学生科学的思维方法及分析和解决问题的能力。
3. 培养学生爱护财物、爱护集体、团队合作的优良品质。

【实验室规则】

1. 实验课前认真预习，进入实验室要穿好工作服，自觉遵守课堂纪律，维护课堂秩序。
2. 在实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验。爱护实验器材，不了解器材操作方法时不得贸然使用，使用精密仪器时，应严格遵守操作规程。公共仪器（如分光光度计、电动离心机等）使用时间不宜过长，以免妨碍他人工作。发现故障应立即报告教师，不得擅自动手修理。
3. 实验台、试剂药品架必须保持整洁，仪器药品摆放井然有序。注意保持药品和试剂的纯净，严防混杂污染。使用药品、试剂和各种物品必须注意节约。使用和洗涤仪器时，应小心谨慎，防止损坏仪器。
4. 注意安全 实验时使用水、电、火、易燃易爆、腐蚀性试剂等应注意安全，杜绝事故发生。使用电器设备如恒温水浴锅、离心机、电炉等，不要用湿手去打开电闸和电器开关，严防触电。
5. 实验中观察要仔细，记录要详尽、客观真实。无论实验成功与失败，都应直接记录在实验报告本中，不得于实验后追记。对于失败的实验，要分析其原因。课后写出实验报告，由课代表收齐交给教师。
6. 实验完毕，需将药品、试剂排列整齐，仪器洗净倒置放好，实验台面抹拭干净，经教师验收仪器后，方可离开实验室。
7. 废弃物的处理 固体舍弃物（如用过的滤纸、损坏的软木塞及橡皮物、玻璃碴、火柴梗等）必须放入废物筒或篓中，切勿丢入水槽中。废硫酸或洗液应先倾入大量水中，再倒入水槽中，并以大量水冲走。实验完成后的沉淀或混合物，若含有可提取或收回的贵重物品者，不可随意舍弃，应放入教师指定的回收器中。
8. 每次实验课安排同学轮流值日，值日生要负责实验室当天的卫生和安全检查。

【实验记录与实验报告】

实验过程中，要将实验中观察到的现象、结果和得出的数据，及时记在记录本上，以便书写实验报告。实验报告的内容包括实验名称、实验日期、实验目的、实验原理、实验步骤、实验记录、计算、讨论或小结。书写实验报告要字迹工整，语句通顺，严禁互相抄袭。

(姚 婕)

第一部分 生物化学实验技术简介

第一节 生物化学实验基本操作技术

一、玻璃仪器的洗涤和干燥

在生化实验中,玻璃仪器洁净与否,是获得准确结果的重要环节。玻璃仪器的洗涤方法很多,需根据实验要求选用不同的清洁方法。

1. 使用过的玻璃仪器的洗涤 (即常规洗涤方法)

(1) 一般仪器 如烧杯、试管等可用毛刷蘸肥皂液、合成洗涤剂仔细刷洗。然后用自来水反复冲洗,最后用少量蒸馏水冲洗2~3次,倒置在器皿架上晾干。

(2) 容量分析仪器 如吸量管、滴定管、容量瓶等,不能用毛刷刷洗。先用自来水多次冲洗,细心检查洁净程度,根据挂不挂水珠采取不同处理方法。如不挂水珠,用蒸馏水冲洗、干燥,方法同上;如挂水珠,则沥干后用重铬酸钾洗液浸泡数小时,用自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗,最后干燥。酶学实验时,玻璃仪器经上述方法洗涤后,还需用稀盐酸或稀硝酸洗涤,以除去其他金属离子,后用自来水、蒸馏水清洗、干燥。

(3) 比色皿 使用后应立即用蒸馏水充分冲洗,不能用试管刷或粗糙的布(纸)擦拭,倒置晾干。不能用氢氧化钾的乙醇溶液及其他强碱洗涤液清洗比色皿,因为这样会导致比色皿的严重腐蚀。

2. 新购置的玻璃仪器的清洗 新购置的玻璃仪器表面常附着油污、灰尘或碱性物质,可先用去垢剂(0.5%水溶液)或肥皂水洗刷,再用自来水洗净。后浸泡1%~2% HCl溶液中过夜,次日取出用自来水充分冲洗,最后再用蒸馏水漂洗数次,干燥备用。

玻璃仪器清洁的判断方法:洗涤后倒置容器,其内壁无挂珠;干燥后器壁内外干净、无污物痕迹。

3. 干燥方法 玻璃仪器的干燥方法可根据不同的仪器种类而定。一般情况下,洗净的玻璃仪器倒置放在晾架上自然干燥。若有急用,可放在烘箱中烤干。但容量玻璃仪器,如吸量管、滴定管、容量瓶等严禁烘烤。

【注意事项】

1. 洗涤用的毛刷,使用前先检查顶端的铁丝是否裸露,洗刷时不可用力过猛,以免破坏仪器。

2. 凡用过的玻璃仪器,均应立即洗涤,久置干涸后洗涤十分困难。

二、吸量管的使用

吸量管是生物化学常用的仪器,用来准确移取一定体积溶液。

1. 生化实验中常用的吸量管的分类 (图1-1-1)

(1) 刻度吸量管 用于量取10ml以内的液体,有0.1ml、0.2ml、0.5ml、1.0ml、

2.0ml、5.0ml、10.0ml 等规格。刻度吸量管有刻度到尖端的及不刻到尖端的两种,使用前仔细分清。使用不刻到尖端者,将尖端轻触容器的内壁,让液体自然流出,不得吹出尖端的液体;如使用刻到尖端者(吸量管上通常标有“吹”字样),放出液体后,应吹出最后留在管内的少量液体。

(2) 奥氏吸量管 准确量取 0.5ml、1ml、2ml、5ml 液体所用。这种吸量管只有一个刻度,并且在其下端有一个膨大部分。准确度最大,使用时必须吹出留在尖端的液体。

(3) 移液管 常用来量取 1ml、2ml、5ml、10ml、25ml、50ml 的液体,此吸量管只有一个刻度,放液时将所量取的液体放出后,不得吹出尖端的液体。

2. 吸量管的使用 (图 1-1-2)

(1) 选用原则 准确量取整数量液体时,量取黏度较大的液体如血液、血清等时,应当使用奥氏吸管。量取大体积液体时用移液管。量取任意体积的液体时,选用刻度吸量管的总容量最好等于或稍大于最大取液量,临用前要看清容量和刻度。

(2) 吸量管的使用

①执管:用拇指和中指(辅以无名指),持吸量管上部,用食指堵住上口并控制液体流速,刻度数字要对向自己。

②取液:用另一只手捏压橡皮球,将管的下端插入液体里,用吸球吸入液体至需要刻度的标线上 1~2cm 处(插入液面下的部分不可太深,以免管的外壁黏附的溶液太多;也不可太浅,防止空气突然进入管内,将溶液吸入吸球内),将已充满液体的吸量管提出液面,用小片滤纸拭去管外黏附的溶液。

③调准刻度:用食指控制液体缓慢下降至所需刻度(此时液体凹面,视线和刻度应在同一水面上),并立即按紧吸量管上口。

④放溶液:放松食指,使液体自然流入容器内,吸量管尖端轻触吸容器之壁。最后再根据规定吹出或者不吹出尖端的一滴。

3. 可调式移液器的使用 可调式移液器用来量取 μl 级别的液体,操作简单,

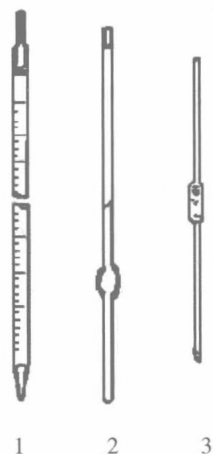
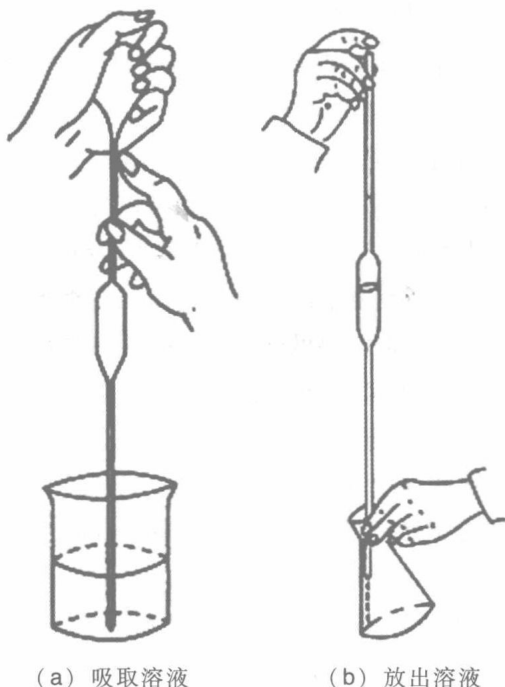


图 1-1-1 三类吸量管简图

1. 刻度吸量管; 2. 奥氏吸量管;
3. 移液管



(a) 吸取溶液

(b) 放出溶液

图 1-1-2 吸量管的使用

有 $10\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 $500\mu\text{l}$ 的规格。

(1) 可调式移液器的结构 (图 1-1-3)。

(2) 可调式移液器的操作 (图 1-1-4)。



图 1-1-3 可调式移液器的结构



图 1-1-4 手持可调式移液器的姿势

注：推动按钮内部的活塞分 2 段行程，第一档为吸液，第二档为放液，手感十分清楚

调按钮（调节轮）至所需体积值，套上吸头，旋紧。垂直持握可调式移液器用大拇指按至第一档，将吸头插入溶液，徐徐松开大拇指，使其复原，将可调式移液器移出液面，必要时可用纱布或滤纸拭去附于吸头表面的液体（注意不要接触吸头孔口）。排放时，重新将大拇指按下，至第一档后，继续按至第二档以排空液体。

注意：移取另一样品时，按卸吸头按钮弃掉吸头并更换新吸头。

三、试剂的取用

使用试剂前应仔细辨认标签，看清名称及浓度。

1. 固体试剂的取用 用干净的药勺取用。用过的药勺必须洗净和擦干后才能使用，以免沾污试剂。取用试剂后立即盖紧瓶盖，防止药剂与空气中的氧气等起反应。取多的药品，不能倒回原瓶（因为取出已经接触空气，有可能已经受到污染，再倒回去容易污染瓶里的其他药剂）。一般的固体试剂可以放在干净的纸或表面皿上称量。具有腐蚀性、强氧化性或易潮解的固体试剂不能在纸上称量，应放在玻璃容器（如烧杯）内称量。有毒的药品称取时要做好防护措施（如戴好口罩、手套等），并在老师的指导下取用。

2. 液体试剂的取用

(1) 从滴瓶中取液体试剂时，要用滴瓶中的滴管，滴管不能伸入所用的容器中，以免接触器壁而沾污药品。从试剂瓶中取少量液体试剂时，则需使用专用滴管。装有药品的滴管不得横置或滴管口向上斜放，以免液体滴入滴管的胶皮帽中，腐蚀胶皮帽，再取试剂时受到污染。

(2) 从试剂瓶中取出液体试剂时，用倾注法。先将瓶塞取下，仰放在桌面上，手握试剂瓶上贴标签的一面，逐渐倾斜瓶子，让试剂沿着洁净的管壁流入试管或沿着洁净的玻璃棒注入烧杯中。取出所需量后，将试剂瓶扣在容器上靠一下，再逐渐竖起

瓶子，以免遗留在瓶口的液体滴流到瓶的外壁，然后盖上瓶塞。

(3) 定量取用液体时，用量筒或移液管取。量筒用于量度一定体积的液体，可根据需要选用不同量度的量筒，而取用准确的量时必须使用吸量管。

四、混匀

样品和试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效措施。为使反应体系内各物质迅速地接触，必须借助于外力的机械作用。常用的混匀方法有以下几种：

1. 旋转混匀法 手持容器，使溶液做离心旋转。适用于盛满液体的试管或小口器皿，如锥形瓶等。

2. 指弹混匀法 一手执试管上端，另一只手轻弹试管下部，使管内溶液做旋涡运动。

3. 倒转混匀法 适用于有玻璃塞的瓶子，如容量瓶等。

4. 搅动混匀法 适用烧杯等大口容器，使用玻璃棒搅匀，多用于溶解烧杯中的固体。

5. 混匀器混匀法 将容器置于混匀器的振动盘上，逐渐用力下压，使内容物旋转。

【注意事项】

1. 防止盛器内的液体溅出或被污染。

2. 严禁用手指堵塞管口或瓶口震荡混匀。

五、保温与加热

1. 保温 将容器放入恒温水浴箱，调节温度设定钮至所需温度。水浴箱中水分要充足，实验过程中要随时监测温度，并及时调节。

2. 加热 加热常用两种方法，一是直接把试管、烧杯等器皿在酒精灯、电炉或煤气火焰上加热；二是在水浴中加热或煮沸，应根据实验的要求而定。

六、过滤

过滤的目的是将沉淀与液体分开，收集滤液，收集沉淀或洗涤沉淀，可用滤纸、棉花、纱布等。在生化实验中如收集滤液应选用干滤纸，不应将滤纸先弄湿，湿滤纸将影响滤液的稀释比例。滤纸过滤一般采用平析法（即对折后，再对折）并且使滤纸上缘与漏斗壁完全吻合，不留缝隙。向漏斗内加液时，要用玻棒引流而且不应倒入过快，勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸。有时以离心沉淀法代替过滤。

七、离心沉淀法

离心法是分离沉淀的一种方法。它是利用离心机转动产生的离心力，使比重较大的物质沉积在管底，以达到与液体分离的目的。因液体在沉淀的上部，故称清亮的液体部分为上清液。欲使沉淀与母液分开，过滤和离心都可以达到目的，但是当沉淀黏稠，或颗粒小得可以通过滤纸时，则需选用离心法。特别是溶液量小又需定量测定时，离心分离法更具优越性。

离心机种类很多，根据转速可分为：低速离心机（转速少于 6000r/min），高速离

心机（转速低于 25 000r/min），超速离心机（转速超过 30 000r/min）。根据离心机的用途不同，还可以将离心机分为分析离心机和制备离心机。其中制备离心技术又分为分级离心技术和密度梯度离心技术，还有超速离心技术（用于生物大分子分离的）。本节将简要叙述一般离心机的使用方法（特殊用途的离心机请参阅相关使用说明书）。

低速离心机的使用：

1. 离心前检查 离心机放在稳定的台面上，检查是否放平、放稳。取出所有套管，启动空载的离心机，检查离心机转动状态是否平稳，以确定离心机的性能。检查套管与离心管大小是否相配，离心管应能在套管内自由转动不至太紧，套管软垫（用棉花或橡皮）是否铺好，内部有无异物。套管底部是否有碎玻璃片或漏孔（玻璃片必须取出，漏孔经修补好后才能使用）。

2. 离心原则

（1）平衡 将一对离心管放入一对套管中，置于天平两侧，使两侧的总重量平衡（包括离心管、离心套管、离心管内装溶液的重量的总和），用滴管向较轻的一侧离心管与套管之间加水，直至天平两侧彼此相等为止。

（2）对称 将已平衡好的一对套管置于离心机中的对称位置。

3. 离心操作

（1）对称放置配平的一对套管后，盖严离心机盖，开启电源。

（2）调节转速调节钮，逐渐增加转速，直至所需数值。

（3）达到离心时间后，缓慢将转速调回零。关闭电源，让离心机自然停止转动后（不可人为制动），取出离心套管。

（4）倒去离心套管内的平衡用水，倒置于干燥处晾干。

【注意事项】

1. 离心机的启动、停止都要慢，否则离心管易破碎或液体从离心管中溅出。

2. 离心过程中，如果机身不稳或声音不均匀时，应立即停止离心，检查离心管是否对称和离心机是否放平稳。若离心时玻璃管、套管打碎应立即清除，重新配平后再离心。

3. 在配平时，勿使离心管套外部沾水，否则会影响结果。

（姚 婕）

第二节 光度法原理和分光光度计的使用

在生化的定性与定量试验中，常用到光度法（spectrophotometry）。光度法是根据物质的分子对光选择性吸收而建立起来的分析方法，包括比色法和分光光度法。比色法以比较有色溶液颜色深浅来测定其中有色物质含量的方法；分光光度法是分光光度计测量溶液在某一波长下吸光度以确定溶液中被测物质含量的分析方法，它主要包括紫外分光光度法和可见分光光度法。分光光度法具有灵敏度高、准确度高、仪器设备要求简单、操作简便、测定迅速等特点，因此应用十分广泛。

一、原理

(一) 吸收光谱

当一束光照射到某物质或某溶液时,组成该物质的分子、原子或离子等粒子与光子作用,光子的能量发生转移,使这些粒子由低能量轨道跃迁到高能量轨道,即由基态转变为激发态,这个过程即是物质对光的吸收。由于分子、原子或离子的能级是量子化、不连续的,只有光子的能量与被照射物质粒子的基态和激发态能量之差相等时,才能被吸收。不同物质的基态和激发态能量差不同,选择吸收光子的能量也不同,即吸收波长不同。由于分子、原子和电子运动着,具有能量,且吸收能量也有差别。在不同波长下测定物质对光吸收的程度,以波长为横坐标,吸收度为纵坐标所绘曲线,称为吸收曲线或吸收光谱。如图 1-1-5 所示。

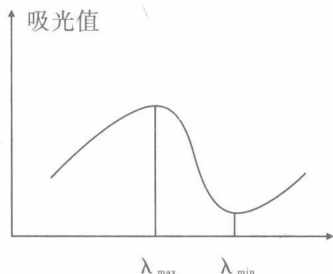


图 1-1-5 吸收光谱

在吸收曲线上,吸收曲线的峰称为吸收峰,它对应的波长称为最大吸收波长用 $\lambda_{\max}$ 表示。表示该物质对此波长的光吸收程度最大。峰与峰之间的最低部位叫谷,该处的波长称为最小吸收波长,用 $\lambda_{\min}$ 表示。物质不同,其分子结构不同,则吸收曲线不同, $\lambda_{\max}$ 不同。因此,吸收曲线的形状是物质定性鉴别的依据。我们可根据吸收曲线选择测定的适当波长,对物质进行定量分析和结构分析。

(二) 朗伯 - 比尔定律

当一束入射光强度为 I_0 ,单色光通过液层厚度为 l ,浓度为 c 的均匀溶液时,其透射光强度为 I_t ,实验表明它们之间有下列关系:

$$A = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \epsilon cl$$

该式被称为朗伯 - 比尔定律,式中 A 称为吸光度,表示光线通过溶液时被吸收的程度, I_t/I_0 为透光度,用 T 表示,它表示光线通过溶液的程度。式中 l 的单位为 cm , c 为物质的量浓度($\text{mol} \times \text{L}^{-1}$), ϵ 为摩尔吸光系数,单位为 $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 。

应用该定律需要注意以下几点:

1. 仅适用于单色光。入射光的波长范围越宽,则测定结果越容易偏离朗伯 - 比尔定律。
2. 吸收过程中各物质应无相互作用,但各物质的吸光度具有加和性。
3. 最好选择入射光的波长为 $\lambda_{\max}$,这样测得的数据最准确。
4. 仅适用于微量组分的测定。溶液浓度太高,结果会偏离朗伯 - 比尔定律。

(三) 分光光度计基本原理

分光光度法利用分光光度计测定溶液对某一单色光的吸收程度进行定量分析的方法。它采用棱镜或光栅这类色散元件所构成的单色器得到纯度较高单色光。普通分光光度计的单色光波长范围为 $5 \sim 10\text{nm}$,性能更好仪器的单色光波长范围可达 2nm ,甚至更小。分光光度计种类和型号较多,实验室常用的有 72 型、721 型、752 型等。各种

类型的分光光度计的结构和原理基本相同，一般包括光源、单色器、比色杯、检测器和显示器五大部分。

1. 光源 是指可以发射出供溶液或吸收物质选择性吸收的光。光源应在一定光谱区域内发射出连续光谱，并有足够的强度和良好的稳定性，在整个光谱区域内光强度不应随波长有明显的变化。实际上许多光源的强度都随波长变化而变化。为了解决这一问题，在分光光度计内装有光强度补偿装置，使不同波长的光强度达到一致。可见光分光光度计常用光源是钨灯，能发射 350 ~ 2500nm 波长范围的连续光谱，适用范围是 360 ~ 1000nm。紫外光光度计常用氢灯作为光源，其发射波长的范围为 150 ~ 400nm。因为玻璃吸收紫外光而石英不吸收紫外光，因而氢灯灯壳用石英制成。为了使光源稳定，分光光度计均配有稳压装置。

2. 单色器 将来自光源的复合光分散为单色光的装置称为分光系统或单色器。单色器可分成滤光片、棱镜和光栅。滤光片能让某一波长的光透过，而其他波长的光被吸收，滤光片可分成吸收滤光片、截止滤光片、复合滤光片和干涉滤光片。棱镜是用玻璃或石英材料制成的一种分光装置，其原理是利用光从一种介质进入另一种介质时，光的波长不同在棱镜内传播速度不同，其折射率不同将不同波长的光分开。玻璃棱镜色散能力大，分光性能好，能吸收紫外线而用于可见光分光光度计；石英棱镜可用于可见光和紫外光分光光度计。光栅是分光光度计常用的一种分光装置，其特点是波长范围宽，可用于紫外、可见和近红外光区，且分光能力强，光谱中各谱线的宽度均匀一致。

3. 比色杯 比色杯又称为吸收池或比色皿。比色杯常用无色透明、耐腐蚀和耐酸碱的玻璃或石英材料做成，用于盛放待比色溶液的一种装置。玻璃比色杯用于可见光区，而石英比色杯用于紫外光区，比色杯的光径 0.1 ~ 10cm，一般为 1cm。同一台分光光度计上的比色杯，其透光度应一致，在同一波长和相同溶液下，比色杯间的透光度误差应小于 0.5%，使用时应对比色杯进行校准。

4. 检测器 是将透过溶液的光信号转换为电信号，并将电信号放大的装置。常用的检测器为光电管和光电倍增管。

5. 显示器 是将光电管或光电倍增管放大的电流通过仪表显示出来的装置。常用的显示器有检流计、微安表、记录器和数字显示器。检流计和微安表可显示透光度 ($T\%$) 和吸光度 (A)。数字显示器可显示 $T\%$ 、 A 和 c (浓度)。

(四) 仪器及使用说明

1. 721 型分光光度计 其光学结构系统如图 1-1-6 所示：

以 721-A 型分光光度计为例，其基本的操作步骤如下：

(1) 打开 721-A 分光光度计的开关，将比色池的盖子打开，通电 20min 使仪器预热。

(2) 将波长旋至测定的波长。

(3) 将空白液、校准液或待测液放入比色池，将空白液置于光路中。