

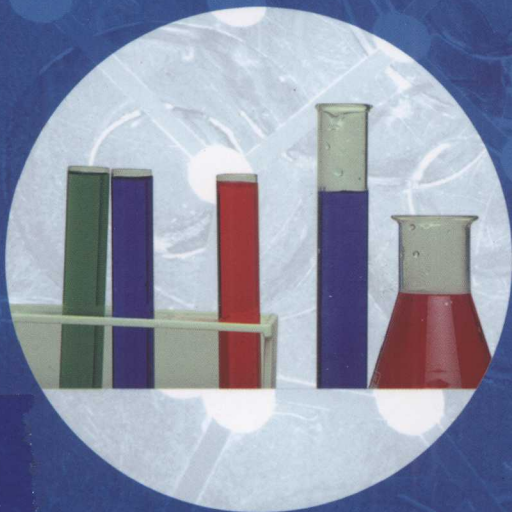
全国普通医学高等院校基础实验规划教材



医学生物化学 与分子生物学实验

YIXUE SHENGWUHUAXUE YU FENZISHENGWUXUE SHIYAN

孙军 主编



-33
5

华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

医学生物化学与分子生物学实验

主 编 孙 军

副主编 段秋红 章 洁

编 者 (按姓氏笔画)

孙 军 张建民 宗义强

屈 伸 段秋红 袁 萍

袁 野 黄 波 章 洁

华中科技大学出版社

中国·武汉

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学实验/孙 军 主编. —武汉:华中科技大学出版社, 2008年4月

ISBN 978-7-5609-4487-6

I. 医… II. 孙… III. ①医用化学:生物化学-实验-医学院校-教材 ②医药学:分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 049980 号

医学生物化学与分子生物学实验

孙 军 主编

责任编辑:陈 鹏

封面设计:刘 卉

责任校对:祝 菲

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)87557437

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中科技大学印刷厂

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:9.5

字数:224 000

版次:2008年4月第1版

印次:2008年4月第1次印刷

定价:19.00元

ISBN 978-7-5609-4487-6/Q·29

(本书若有印装质量问题,请向出版社发行部调换)

前 言

生物化学与分子生物学是生命科学和医学中的前沿学科。其突飞猛进的发展,离不开生物化学与分子生物学技术的进步,从某种意义上说,技术与方法的进步和创新是推动生物化学与分子生物学理论飞速发展的直接动力。

近年来,生物化学与分子生物学新的实验技术和方法层出不穷。毛细管电泳、双向电泳、高效液相色谱-质谱联用、分子克隆、分子杂交、聚合酶链反应(PCR)、生物芯片等技术不仅推动着生物化学与分子生物学的理论飞速发展,而且已广泛地运用于基础医学研究和临床诊断及治疗的各个领域,并不断得到新的充实与发展。

华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系在近 10 年先后编写了 5 个版本的《生物化学实验》和 4 个版本的《分子生物学实验技术》,上述教材在教学中发挥了良好的作用。编者本着继承与创新相结合的精神,吸取了以上几版教材的精华,在我们的实验基础上,总结经验,重新整理编写成这本新的实验教材。

本书以医药、综合性大学、师范和农林院校有关专业的本科生、长学制学生及研究生为对象,也可供其他生物化学与分子生物学实验技术工作者参考。它是一本高等学校生物化学与分子生物学实验教材,也是一本小型生物化学与分子生物学实验技术工具书。全书内容分为生物化学技术基本理论(第一至六章)、分子生物学技术基本理论(第七至九章)、生物化学实验和临床生化检验(14 个实验)以及分子生物学实验(10 个实验)。实验部分共选编了 24 个实验:7 个常用的生化实验和临床生化检验,以及 7 个生物化学综合性实验,主要是培养学生对生物大分子进行分离分析的综合实验技能,同时也包含了实验动物学、药理学、生理学等相关基本知识和基本技能的综合;10 个分子生物学实验以 DNA 重组的基本过程为主线,介绍重组 DNA 技术的各个环节。多年来,这些实验都用于实验教学,并取得了较好的教学效果。

由于在本书编写过程中增加的内容比较多,也较新颖,难免有不妥之处,希望广大读者提出宝贵意见。

编 者

2007 年 6 月

目 录

第一章 分光光度技术	(1)
第一节 基本原理	(1)
一、光的基本知识	(1)
二、朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律	(2)
三、吸光系数	(3)
第二节 分光光度计的基本结构和使用	(3)
一、分光光度计的基本结构	(3)
二、分光光度计的基本类型	(5)
三、常见分光光度计的使用	(5)
四、使用分光光度计的注意事项	(6)
第三节 分光光度技术的应用	(6)
一、定量分析	(6)
二、定性分析	(7)
第四节 分光光度法的误差	(8)
一、物理性原因产生的误差	(8)
二、化学性原因引起的误差	(8)
第二章 色谱技术	(9)
第一节 概述	(9)
一、色谱法的概念	(9)
二、色谱技术的特点和优点	(9)
三、色谱法的分类	(10)
第二节 常用的色谱方法	(11)
一、吸附色谱(adsorption chromatography)	(11)
二、分配色谱(partition chromatography)	(12)
三、凝胶色谱(gel chromatography)	(12)
四、离子交换色谱(ion exchange chromatography, IEC)	(16)
五、亲和色谱(affinity chromatography)	(18)
六、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)	(18)
第三章 电泳技术	(19)
第一节 基本原理	(19)
一、蛋白质电荷的来源	(19)
二、迁移率(mobility)	(19)
三、影响电泳速度的因素	(20)
第二节 醋酸纤维薄膜电泳	(22)
第三节 琼脂糖凝胶电泳	(22)

一、核酸分子大小与琼脂糖浓度的关系	(22)
二、核酸构象与琼脂糖凝胶电泳分离的关系	(23)
三、琼脂糖凝胶电泳基本方法简介	(23)
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(24)
一、聚丙烯酰胺凝胶聚合原理及相关特性	(25)
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳原理	(26)
三、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳原理	(28)
四、聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳原理	(29)
五、聚丙烯酰胺凝胶双向电泳原理	(29)
第五节 染色方法	(30)
一、蛋白质染色	(30)
二、脂蛋白染色	(31)
三、核酸的染色	(31)
第四章 离心技术	(33)
第一节 离心技术的基本原理	(33)
一、离心力(centrifugal force)	(33)
二、相对离心力(relative centrifugal force)	(33)
三、重力及浮力	(34)
四、介质的摩擦阻力	(34)
五、沉降速度	(34)
六、沉降系数(sedimentation coefficient)	(35)
七、沉降时间(sedimentation time)	(35)
第二节 离心机的分类	(35)
第三节 离心分离的种类	(36)
一、差速离心法	(36)
二、密度梯度离心法	(36)
第四节 离心操作注意事项	(37)
第五章 蛋白质组技术	(39)
第一节 蛋白质组学	(39)
第二节 蛋白质组分离技术	(39)
一、双向凝胶电泳的特点	(40)
二、双向凝胶电泳的基本步骤	(40)
第三节 蛋白质组分析技术	(41)
一、质谱技术的发展及各种类型的质谱仪	(41)
二、质谱技术在蛋白质组研究中的作用	(42)
三、蛋白质组数据库的建立	(43)
四、蛋白质组研究的前景	(43)
第六章 生物大分子制备技术	(44)
第一节 预处理和细胞的分离	(44)
一、选择材料及预处理	(44)

二、细胞的分离	(45)
第二节 细胞的破碎及细胞器的分离	(45)
一、细胞的破碎	(45)
二、细胞器的分离	(47)
第三节 生物大分子的提取、分离纯化和定量	(47)
一、蛋白质的提取	(47)
二、蛋白质的分离纯化	(48)
三、核酸的分离纯化	(50)
四、蛋白质的定量	(51)
五、DNA、RNA 的定量	(53)
第四节 浓缩、干燥及保存	(53)
一、蛋白质的浓缩	(53)
二、核酸的浓缩	(54)
三、干燥	(56)
四、保存	(56)
第七章 重组 DNA 技术	(57)
第一节 目的基因的获取	(57)
一、直接从染色体中分离	(58)
二、化学合成法	(58)
三、RT-PCR	(58)
四、聚合酶链反应(PCR)	(58)
第二节 载体的选择	(58)
一、克隆载体(clone vector)	(58)
二、表达载体(expression vector)	(58)
第三节 分子克隆常用的工具酶	(59)
第四节 限制性内切酶消化 DNA 及片段回收	(60)
一、限制性内切酶的选择和运用	(60)
二、限制性内切酶的酶切	(60)
三、DNA 片段的回收	(61)
第五节 目的基因与载体片段连接	(61)
第六节 重组 DNA 导入宿主细胞	(62)
一、大肠杆菌的转化	(62)
二、电脉冲穿孔法转化大肠杆菌	(63)
第七节 含重组质粒的宿主菌落的筛选与鉴定	(63)
一、利用宿主细胞遗传表型的改变进行筛选	(63)
二、分析重组子分子结构特性进行鉴定	(64)
第八章 核酸分子杂交技术	(66)
第一节 核酸分子杂交的基本理论	(66)
一、DNA 变性	(66)
二、DNA 复性	(66)

三、核酸分子杂交	(67)
第二节 核酸探针及其标记	(67)
一、核酸探针	(67)
二、探针标记物	(67)
三、探针的标记方法	(68)
第三节 核酸分子杂交	(69)
一、影响杂交的因素	(69)
二、固相杂交法	(70)
第九章 聚合酶链反应(PCR)技术	(73)
第一节 PCR 基本原理和影响因素	(73)
一、基本原理	(73)
二、PCR 反应体系	(73)
三、PCR 反应步骤简介	(75)
四、PCR 引物设计原则	(76)
五、PCR 的影响因素	(76)
六、PCR 扩增过程中的一些疑难问题与解决方法	(79)
第二节 逆转录 PCR 技术	(80)
一、RT-PCR 反应基本步骤	(81)
二、RT-PCR 注意事项	(82)
第三节 PCR 技术进展	(83)
一、定量 PCR	(83)
二、巢式 PCR	(87)
第十章 常用生化实验及临床生化检验	(88)
实验一 血糖的测定	(88)
实验二 蛋白质的定量测定	(90)
实验三 血红蛋白与核黄素的凝胶柱色谱分离	(92)
实验四 氨基酸的离子交换柱色谱分离	(94)
实验五 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	(95)
实验六 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳	(97)
实验七 过氧化氢酶 K_m 值的测定	(99)
实验八 酶的竞争性抑制作用(琥珀酸脱氢酶)	(102)
实验九 四氯化碳对小鼠肝脏的损伤	(103)
实验十 血清总胆固醇的测定	(106)
实验十一 回收实验(尿素氮的回收)	(107)
实验十二 血清白蛋白、 γ -球蛋白的分离纯化及鉴定	(108)
实验十三 碱性磷酸酶的分离纯化	(112)
实验十四 双向电泳	(115)
第十一章 分子生物学实验——重组 DNA 表达载体的构建	(119)
实验一 质粒 DNA 的大量制备与纯化	(119)
实验二 DNA 的纯度、浓度的测定	(122)

实验三	目的基因的获取·····	(124)
实验四	DNA 的限制性内切酶消化·····	(128)
实验五	从琼脂糖凝胶中分离回收 DNA 片段·····	(130)
实验六	DNA 片段的连接反应·····	(131)
实验七	用重组质粒 DNA 转化大肠杆菌·····	(132)
实验八	含重组质粒的细菌菌落的鉴定·····	(133)
实验九	Southern 印迹法·····	(135)
实验十	斑点杂交——地高辛标记核酸探针的斑点杂交(Dot blot)·····	(138)
实验须知	·····	(141)
实验报告的书写	·····	(141)
参考文献	·····	(142)

第一章 分光光度技术

分光光度法(spectrophotometry)是根据物质对不同波长的光线具有选择性吸收,每种物质都具有其特异的吸收光谱,而建立起来的一种定量、定性分析的技术,也称吸收光谱法(absorption spectrometry)。其理论依据是朗伯定律和比尔定律。

分光光度法是比较法的发展。比色法只限于在可见光区,分光光度法则由可见光区扩展到紫外光区和红外光区。比色法用滤光片产生单色光,谱带宽度为40~120 nm,精度不高,而分光光度法则采用棱镜或光栅产生单色光,其光谱带宽最大不超过3~5 nm,且具有较高的波长精度。本章仅讨论紫外光及可见光分光光度技术。

紫外光及可见光分光光度技术是一种分析技术。它不需要把欲分析的样品从混合物中分离开来,即可利用样品特殊的吸收峰或特殊的显色反应,直接进行定性、定量的分析。具有操作简单、灵敏度高、选择性强、定量分析的精密度和准确度都很高的优点。但是直接利用紫外光谱进行定性的能力相对较弱,通常还需与红外线、色谱、质谱等技术结合才能作出可靠的定性鉴定。

第一节 基本原理

一、光的基本知识

光是由光量子组成的,具有二重性,即不连续的微粒性和连续的波动性。波长和频率是光的波动性的特征,可用下式表示:

$$\lambda = c/\nu$$

式中, λ 为波长,具有相同的振动相位的相邻两点间的距离称为波长; ν 为频率,即每秒钟振动次数; c 为光速,等于299 770±4 km/s。光属于电磁波。

自然界中存在各种不同波长的电磁波,如表1-1所示。分光光度法所使用的光谱范围在200 nm~10 μ m(1 μ m=1 000 nm)之间。其中200~400 nm为紫外光区,400~760 nm为可见光区,760~10 000 nm为红外光区。

表 1-1 电磁波谱

区 域	波 长		来 源
	λ /m	常用单位	
γ射线	$10^{-12} \sim 10^{-10}$	0.001~0.1 nm	原子核
X射线	$10^{-18} \sim 10^{-10}$	0.1~10 nm	内层电子
远紫外光	$10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	10~200 nm	中层电子
紫外光	$2 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-7}$	200~400 nm	外层价电子

续表

区 域	波 长		来 源
	λ/m	常用单位	
可见光	$4 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-7}$	400~760 nm	外层价电子
红外光	$7.6 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5}$	0.76~50 μm	分子振动与分子转动
远红外光	$5 \times 10^{-5} \sim 10^{-3}$	50~1 000 μm	分子振动与分子转动
微波	$10^{-3} \sim 1$	0.1~100 cm	分子转动
无线电波	$1 \sim 10^3$	1~1 000 m	核磁共振

二、朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律

利用分光光度技术来进行定量分析,测定物质含量的基本原理是朗伯-比尔定律,该定律讨论了有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。

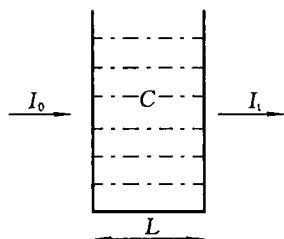


图 1-1 光吸收示意图

(1) 朗伯定律:一束单色光通过溶液后,由于溶液吸收了一部分光能,光的强度就要减弱。若溶液浓度不变,则溶液的厚度越大(即光在溶液中所经过的途径越长),光的强度减弱也越显著,见图 1-1。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光的强度),通过液层厚为 L 溶液后,光的强度为 I_1 (透过光的强度),则 $\frac{I_1}{I_0}$ 表示透过光的强度是入射光强度的几分之几,称为透光度(transmittance),用 T 表示。透光度随溶液厚度的增加而减少,但实践证明,透光度和溶液层厚度间并不存在简单的定量关系,只有透光度的负对数($-\lg T$)才随着溶液厚度的增加而成正比例增加,即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_1}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_1} \propto L$$

将上述比例写成等式,得到 $\lg \frac{I_0}{I_1} = K_1 L$

式中, $\lg \frac{I_0}{I_1}$ 称为吸光度(absorbance, A), 又称为消光度 (degree of extinction, E) 或光密度 (optical density, OD), 所以

$$A = K_1 L$$

式中, K_1 为比例系数,其值取决于入射光的波长、溶液的性质和浓度以及溶液的温度等。

上式表明,当溶液的浓度不变时,吸光度与溶液液层的厚度成正比,这就是朗伯定律。

(2) 比尔定律:当一束单色光通过有色溶液后,溶液液层的厚度不变而浓度不同时,溶液浓度越大,则透射光的强度越弱,其定量关系为:

$$\lg \frac{I_0}{I_1} = K_2 C$$

$$A = K_2 C$$

式中, C 为有色物质溶液的浓度; K_2 为比例系数,其值取决于入射光的波长、溶液的性质和液层的厚度以及溶液的温度等。

上式表明,当溶液液层的厚度不变时,吸光度与溶液的浓度成正比,这就是比尔定律。

(3) 朗伯-比尔定律:如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响,将朗伯定律和比尔定律合并起来,得到

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = KLC$$

$$A = KLC$$

这就是朗伯-比尔定律,它表示溶液的吸光度与溶液浓度和液层厚度的乘积成正比。式中, K 是比例常数,若 L 用 cm 表示, C 用 g/L 表示,比例常数 K 称为吸光系数;若 L 用 cm 表示, C 用 mol/L 表示,比例常数 K 称为摩尔吸光系数。

三、吸光系数

吸光系数的物理意义是吸光物质在单位浓度及单位液层厚度时的吸光度。在给定条件(单色光波长、溶剂、温度、 pH 值)下,吸光系数是物质的特征量,它和该物质分子在基态和激发态之间的跃迁几率有关。不同物质对同一波长的单色光,可有不同的吸光系数。吸光系数通常有两种表示方式。

(1) 摩尔吸光系数:指浓度为 1 mol/L 的溶液在厚度为 1 cm 时,在某一特定波长下的吸光度,用 ϵ 或 E_M 表示。

(2) 百分吸光系数:其意义指某物质的质量浓度为 10 g/L 的溶液,在厚度为 1 cm 时,在某一特定波长下的吸光度,用 $E^{1\%}$ 来表示。两种吸光系数表示方式之间的关系是

$$\epsilon = \frac{M}{10} \cdot E^{1\%}$$

式中, M 是吸光物质的分子质量。摩尔吸光系数一般不超过 10^5 数量级,通常把 ϵ 值达到 10^4 的划分为强吸收,小于 10^2 的划为弱吸收,介于两者之间的为中强吸收。

吸光系数 ϵ 和 $E^{1\%}$ 一般都不能直接测得,需用已知准确浓度的稀溶液测得吸光度后经换算而得到。例如,质量浓度为 28.9 mg/L 的尿苷三磷酸钠盐二水合物($M=586$)的水溶液,在波长 262 nm ,用 1 cm 光径吸收池测得吸光度 A 为 0.507 。则

$$E^{1\%} = \frac{A}{C \times L} = \frac{0.507}{28.9 \times 10^{-3} \times 1} = 175.4$$

$$\epsilon = \frac{M}{10} \cdot E^{1\%} = \frac{586}{10} \times 175.4 = 1.028 \times 10^4$$

不同的物质可能会有相同的最大吸收波长,但其吸光系数不一定相同,可以作为定性分析的依据之一。 ϵ 或 $E^{1\%}$ 值越大,说明该物质溶液对光吸收越强烈,则分光分析测定的灵敏度越高。

第二节 分光光度计的基本结构和使用

一、分光光度计的基本结构

分光光度计由5个基本部分组成,即光源、单色器、狭缝、样品池、检测及显示系统。

(一) 光源

要求能提供所需波长范围的连续光谱,稳定而有足够的强度。常用的有白炽灯(如钨丝灯、卤钨灯等),气体放电灯(如氢灯、氙灯及氙灯等),金属弧灯(如各种汞灯)等多种。钨灯和卤钨灯用作可见光分光光度计的光源。氢灯和氙灯可用作紫外光区分光光度计的光源。汞灯发射的不是连续光谱,一般作波长校正用。

(二) 单色器(分光系统)

单色器是指能从混合光波中分解出所需波长光线的装置,有棱镜和光栅两种类型。

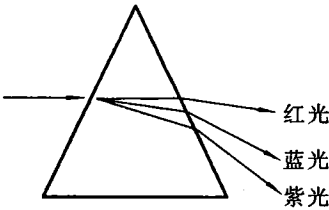


图 1-2 棱镜分光器

用玻璃制成的棱镜色散力强,但只能在可见光区工作,石英棱镜工作波长范围为 185~4 000 nm,在紫外光区有较好的分辨率,而且也适用于可见光区和近红外光区。棱镜的特点是波长越短,色散程度越好,越向长波一侧色散程度越差。所以用棱镜的分光光度计,其波长刻度是不均匀的,在紫外光区可达到 0.2 nm,而在长波段只能达到 5 nm(见图 1-2)。

另一类分光系统是衍射光栅,即在石英或玻璃的表面上刻划许多平行线(1 000~2 400 线/mm),刻线处不透光,通过光的干涉和衍射现象,较长的光波偏折的角度大,较短的光波偏折的角度小而形成光谱。光栅与棱镜不同,它的色散能力在不同的波长区域都是一致的。所以采用光栅的分光光度计,其波长刻度是均匀的,适宜用计算机控制,自动设置分析波长或进行波长扫描。

(三) 狭缝

狭缝是指由一对隔板在光通路上形成的缝隙,用来调节入射单色光的纯度和强度,也直接影响分辨率。狭缝宽时,允许通过光线的带宽大,则光能强但纯度较差,反之则单色性好而强度较弱。采用光栅的分光光度计的狭缝宽度以允许通过光线的带宽来描述。

(四) 比色杯

比色杯也叫样品池、吸收器或比色皿,用来盛待测溶液。标准比色杯的光径为 10 mm,也有 5 mm、20 mm 等其他规格,还有带有自动进样装置的流动池。玻璃比色杯只适用于可见光区,在紫外光区测定时要用石英比色杯。

(五) 检测及显示系统

把光信号转变成电信号的装置称为光电检测器。有许多物质在光的照射下能产生电流,光线越强电流越大,这就是光电效应。光电检测器有 3 种类型:光电池、光电管、光电二极管。

光电池的种类繁多,最常见的是硒光电池和硅光电池。硒光电池存在有疲劳效应,当连续照射一段时间后会产生产生光电流下降的现象,因此使用时不宜长时间照射,应随用随关,以防止光电池因疲劳而产生误差。新型的硅光电池已经克服了疲劳效应,正逐渐取代硒光电池。

光电管装有一个阴极和一个阳极,阴极是用对光敏感的金属做成,当光射到阴极且达到一定能量时,金属原子中的电子发射出来,被吸引到阳极上而产生电流。光电管产生电流很小,所以需要放大,光电管也存在有疲劳效应。

检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟的或数字的信号,由电流表、电压表、记录器、数码显示器等装置显示出结果,有的是利用计算机处理后输出测试结果。

二、分光光度计的基本类型

分光光度计有 2 种基本类型,一类是单波长分光光度计,另一类是双波长分光光度计。

单波长分光光度计又可分为单光束和双光束两类。分光光度计的基本类型是单光束分光光度计,它的光路中只有一束光线,根据使用的波长范围不同,分为可见光分光光度计和紫外/可见光分光光度计,紫外/可见光分光光度计的整个光路系统全部是由光学石英玻璃制成。

双光束分光光度计是由切光器把入射单色光分裂为两束,一束通过样品吸收池,另一束通过参比吸收池,这样它可以自动地扣除参比空白的影响,直接得到样品的吸光度差 ΔA 或吸收光谱。双光束分光光度计是一种应用最为便捷的分光光度计,采用计算机自动控制及处理。

此外,分光光度计还有另一种类型,即二极管阵列快速扫描分光光度计,它的检测器由数百个光电二极管组成阵列,同时检测不同波长上的吸光度。所以它的扫描速度极快,从紫外光到近红外光(190~1 000 nm)的全波长扫描,仅需 0.15 s。

当样品中含有两种吸收光谱互相重叠的成分时,采用单波长分光光度计单独测量待测成分的吸光度将遇到很大的困难。双波长分光光度计是让两束不同波长的单色光经切光器分别交替通过同一样品吸收池,而直接读出在这两个波长的吸光度差 ΔA 的仪器,它可以方便地由 ΔA 值求出样品中被测组分的含量。选择适当的波长,双波长分光光度计可以在有干扰组分的存在下,不经分离而测出被测组分的含量。

三、常见分光光度计的使用

722S 型分光光度计

这是一种数码显示的可见光分光光度计,采用衍射光栅作为单色器,卤素灯作光源,使用波长范围为 340~1 000 nm。除了可直接进行透光率 $T(\%)$ 和吸光度 A 的测定,还具有浓度因子设定和浓度直读的功能。

使用方法如下(吸光度的测定)。

(1) 开机预热 15 min 以上。

(2) 转动波长选择钮,选取所需的波长。

(3) 将装有空白、标准、样品的比色杯放入比色杯架,使空白管对准光路。

(4) 打开样品室暗箱盖(光门自动关闭),按 $\boxed{0\%ADJ}$ 键,即能自动进行机械零点的调整,数码显示为 0.000。

(5) 盖好比色杯暗箱盖(光门自动开启),按 $\boxed{100\%ADJ}$ 键,即能自动进行空白零点的调整,数码显示为 100.0(一次如有误差可再按一次)。

(6) 按 \boxed{MODE} 键选择吸光度测定模式(ABS 灯亮),数码显示自动转换为吸光度值 0.000。

(7) 拉动比色杯架的拉杆,使测定杯进入光路,从数码显示上即可读出样品的吸光度。

(8) 比色完毕后,关上电源开关,取出比色杯,将比色杯暗箱盖好,清洗比色杯并晾干。

【注意事项】

第(5)步调整 100%时,整机的自动增益系统的调整可能影响到 0%,调整后请检查 0%,

如有变动,可重复(5)、(6)两步操作。

四、使用分光光度计的注意事项

(1) 分光光度计必须放置在固定而且不受振动的仪器台上,不能随意搬动,严防振动,潮湿和强光直射。分光光度计内需放有硅胶干燥袋,且需定期更换。

(2) 开机预热 15 min,待仪器稳定以后再开始进行测定。每年需定期进行波长校准。

(3) 必须保证测试样品为澄清的溶液,肉眼几乎看不出来的轻微浊度也能引起读数的严重误差,必要时可通过离心来去除微粒。检测细菌培养液的光吸收时例外。

(4) 从冰箱中取出的样品一定要恢复到室温后再进行检测,否则低温会使水蒸气在比色皿表面凝结,引起读数持续漂移上升。

(5) 比色杯盛液量以达到杯容积 2/3 左右为宜。若不慎将溶液流到比色杯的外表面,则必须先用滤纸吸干,再用擦镜纸或绸布擦净,然后才能把比色杯放入比色杯槽内。拉动比色杯槽要轻,以防溶液溅出,腐蚀机件。

(6) 不可用手拿比色杯的光学面,禁止用毛刷等物摩擦比色杯的光学面。

(7) 用完比色杯后应立即用自来水冲洗,再用蒸馏水洗净,也可用甲醇冲洗。若用上法洗不净时,可用 5% 的中性皂溶液或洗衣粉稀溶液浸泡,也可用新配制的重铬酸钾-硫酸洗液短时间浸泡,之后立即用水冲洗干净。洗涤后应把比色杯倒置晾干或用滤纸条将水吸去,再用擦镜纸轻轻揩干。

(8) 一般应把溶液浓度尽量控制在吸光度值为 0.2~0.7 的范围内进行测定。这样所测得的读数误差较小。如吸光度不在此范围内,可调节样品溶液浓度,适当稀释或加浓,使其在仪器准确度较高的范围内进行测定。

第三节 分光光度技术的应用

分光光度分析是获得物质光吸收特性及定量、定性信息的重要手段。所有的样品物质都必须溶解在一定的溶剂中,配成一定浓度的溶液。虽然分析方法多种多样,但归根结底可分为两类:一是在固定波长下测定物质溶液的吸光度,进行定量分析;二是在一定的波长范围内,测定波长对光密度的函数——吸收光谱,进行定性分析。

一、定量分析

紫外、可见光分光光度技术最主要的应用是在定量分析方面。按照朗伯-比尔定律,溶液中溶质的吸光度正比于溶质的浓度。在一特定长单色光下测出溶液的吸光度,即可计算出溶液的浓度。

在使用紫外、可见光分光光度技术进行定量分析时,一般采用下列方法。

(1) 标准曲线(工作曲线)法:配制含有与被测组分相同的一系列标准溶液,在被测组分的 λ_{\max} 波长下,测定各标准溶液的 A 值,以 A 值为纵坐标,浓度为横坐标,绘出 $A-C$ 曲线。将样品溶液在相同条件下测定 $A_{\#}$ 值,从横坐标上找出与此 $A_{\#}$ 值相对应的浓度,即为样品溶液的

浓度。标准曲线应根据几次实验测得值的平均值进行绘制,这种方法对于大量样品分析或例行测定是比较方便的。在仪器和方法都固定不变的条件下,绘制好标准曲线后可多次使用,不必每次实验都再进行绘制。但如果测定的条件有所改变,如仪器经搬动后灵敏度有所改变、试剂用完后重新配制、温度有较大变化等,则需对标准曲线进行校正或重新绘制。

在实际工作中,测定标准系列的吸光度 A 值后绘制 $A-C$ 曲线时,常出现标准曲线只在一定浓度范围内呈直线关系,当浓度超过一定数值时,其吸光度的增加逐渐趋缓,不再遵守比尔定律。这时可以此浓度作为上限,重新调整标准系列的浓度并绘制标准曲线。但如果被测溶液浓度在曲线的直线范围内,也可直接进行定量测定。

标准曲线的制备不仅可用于样品的直接定量,而且在一定程度上还可检定所用的方法是否符合朗伯-比尔定律,对于实验技术人员(尤其是初始工作人员)来讲,也可检定其操作技术及实验条件等的控制是否正确无误。同时通过标准曲线的制备还可确定被测样品的最大浓度范围。

(2) 对比法:分光光度法可用对比法测定溶液中物质的含量。它只需要在空白调零后,分别测定标准溶液(浓度已知的溶液)和样品溶液(浓度待测定的溶液)的吸光度,然后进行比较。

$$\frac{A_x}{A_s} = \frac{KC_xL}{KC_sL} = \frac{C_x}{C_s}, \quad \text{即} \quad C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s$$

式中, C_x 代表样品溶液的浓度, C_s 代表标准溶液的浓度, A_x 和 A_s 分别代表样品液和标准液所测得的吸光度值,式中只有 C_x 是未知的,可由上式计算得之。

此法适用 $A-C$ 线性良好,且通过原点的情况,由于实际工作中所得到的 $A-C$ 直线往往并非十分理想,为了减少误差,所用标准溶液的浓度应尽可能地与样品液的浓度相接近。

(3) 算法:在实际工作中,有时会遇上标准物缺乏或不易获得的情况,此时可根据文献所提供的摩尔吸光率(ϵ)或在制备标准曲线时所求得平均吸收系数,在相同的方法和条件下,直接测定样品在光径(液层厚度)为 10 mm 时溶液的吸光度(A),按下式计算出样品的浓度(C):

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

二、定性分析

使用分光光度计可以绘制吸收光谱曲线。方法是用各种不同波长的单色光分别通过某一浓度的溶液,测定此溶液对每一种单色光的吸光度,然后以波长为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制吸光度-波长曲线,此曲线即吸收光谱曲线。中、高档次的分光光度计均可通过波长扫描,自动绘制出样品的吸收光谱曲线。

各种物质都有各自一定的吸收光谱曲线,因此用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时,则很可能它们是同一物质。一定物质在不同浓度时,其吸收光谱曲线中峰值的大小不同,但形状相似,即吸收高峰和低谷的波长是不变的。

紫外光吸收是由不饱和的结构造成的,含有双键的化合物能表现出吸收峰。紫外光吸收光谱比较简单,同一种物质的紫外光吸收光谱应完全一致,但具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。除了特殊情况外,单独依靠紫外光吸收光谱不能决定一个未知物的结构,需要与红外光、质谱等其他方法相配合。紫外光吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。若发现样品的吸收光谱存在异常吸收峰,则可以认为这异常吸收峰是由于样品中存

在的杂质所致。

第四节 分光光度法的误差

在分光光度法的实际应用中,测定结果往往会出现一些误差。引起这种偏离的原因很多,大致可分为两类:一类是物理性原因;一类是化学性原因。

一、物理性原因产生的误差

物理性原因引起的误差,主要指由分光光度计仪器本身引起的误差,包括入射光波长不准确、入射光的单色性不好、微量的杂散光以及因光源的波动、检测器灵敏度波动等引起的偏离等。即使是经过仔细调校的分光光度计,仍要注意以下原因引起的误差。

(1) 入射光的纯度:比尔定律成立的一个重要前提是要采用单色光。但分光光度计实际使用的入射光并不是严格的单色光,而是由单色器从连续光谱中选择出的一窄段范围的复合光,仍有不同波长的辐射光同时存在。带宽越窄,单色光愈纯,对比尔定律的偏差就愈小。

(2) 杂散光的干扰:散射光也是引起误差的重要因素。这里所说的散射光是指一切未经测定溶液吸收,而又落到检测器上引起干扰的光,如室内自然光,经过某些漏洞进入仪器而明显增大了透光度,故高灵敏度的分光光度计宜安装的光线较暗的室内。散射光也包括能透过比色杯的非测定需要的其他波长的光,因效果与散射光一样,故也称为散射光干扰。散射光干扰对高浓度测定特别有害,能使吸光度降低,标准曲线的高浓度部分向下弯曲。

(3) 适当的吸光度测定范围:即使将各种因素都控制好,对于浓度过大或过小的样品,误差仍然很大。因为浓度过大的样品,其吸光度过高,影响检测器的灵敏度,且读数标尺刻度的精度差,误差亦大,故难于准确。浓度过低的样品,其吸光度小,则因与仪器本身因素有关,也容易引起检测器标尺上的读数误差。从理论上推算,相对误差的最小的部分在透光度为36.8%处(或吸光度为0.434 3处),故通常认为测定值在吸光度0.20~0.70范围内(透光度为20%~65%)误差较小,超出此范围,相对误差均会增大。

二、化学性原因引起的误差

比尔定律的讨论范围仅局限于物理学方面,并没有考虑溶液在什么化学条件下才能保持吸光度与浓度间的正比关系,例如,溶液的浓度、pH值、溶剂、温度等对化学平衡所产生的影响。由于样品的离解、缔合、与溶剂间产生作用、形成络合物等原因,导致溶液的各组分间的比例发生变化。若这些组分的吸收光谱或吸光系数的差别较大,则导致浓度C与吸光度A之间的关系偏离直线。

浓度对比尔定律偏离的另一原因是,在被测物浓度较大时(通常 $>0.01 \text{ mol/L}$),吸光微粒间的平均距离减小,使相邻微粒的电荷分布互相影响,从而改变了它对光吸收的能力。因此比尔定律一般适用于稀溶液的测定。

(章 洁)