

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套实验教材

食品 生物化学实验

SHIPIN SHENGWU HUAXUE SHIYAN

主 编 韦庆益 高建华 袁尔东
副主编 杨继国 宁正祥 王 周



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

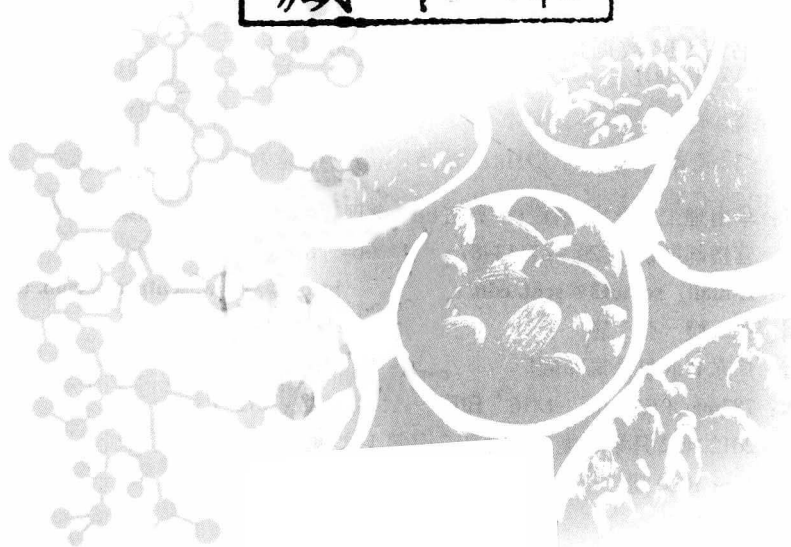
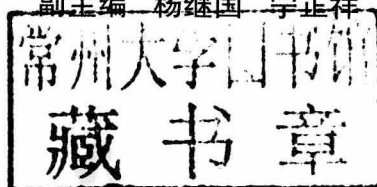
普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套实验教材

食品 生物化学实验

SHIPIN SHENGWU HUAXUE SHIYAN

主 编 韦庆益 高建华 袁尔东

副主编 杨继国 宇正祥 王 周



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

· 广州 ·

内 容 简 介

全书分为第一部分、第二部分和附录。第一部分介绍食品生物化学实验原理和实验技术,共三章,全面扼要地介绍了层析分离技术、电泳技术等生化实验方法的基本原理,另外还介绍了生物活性物质纯度分析及活性检测技术。第二部分介绍食品生物化学实验,共两章,选编了37个实验,涵盖了糖类、脂类、酶类、蛋白质等营养成分及天然活性物质的分离制备、分析检测及功能特性研究等方法与技术。实验内容除了单元操作之外,还增加了综合设计性实验,由浅至深地培养学生掌握更多的研究方法和技能。本教材不仅注重加强学生基本实验方法和技能的训练,还引进了新的生化实验技术,更多的是结合食品领域相关的实验方法和手段。附录包括实验室规则、常用数据表等,供读者参考以及学生独立完成实验。

本书可供综合性大学、师范和农林院校食品相关专业的本科生作为实验课教材,也可供相关教师及科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

食品生物化学实验/韦庆益,高建华,袁尔东主编. —广州:华南理工大学出版社, 2012. 2

ISBN 978 - 7 - 5623 - 3602 - 0

I. ①食… II. ①韦… ②高… ③袁… III. ①食品化学:生物化学-实验-高等学校-教材 IV. TS201.2

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第010608号

总发行:华南理工大学出版社(广州五山华南理工大学17号楼,邮编510640)

营销部电话:020-87113487 87110964 87111048(传真)

E-mail: scutc13@scut.edu.cn

http://www.scutpress.com.cn

责任编辑:张媛 张颖

印刷者:广东省农垦总局印刷厂

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:11.5 字数:273千

版次:2012年2月第1版 2012年2月第1次印刷

印数:1~1000册

定价:20.00元

版权所有 盗版必究

目 录

第一部分 实验原理和实验技术	(1)
第一章 光谱分析实验技术	(1)
第一节 分光光度计法	(1)
第二节 荧光分光分析法	(6)
第二章 生物活性分子的分离技术	(12)
第一节 离心技术	(12)
第二节 层析技术	(19)
第三节 电泳技术	(31)
第四节 蛋白质和酶的分离纯化	(46)
第三章 活性分子及其活性检测	(56)
第一节 含量分析	(56)
第二节 生物活性的评价	(62)
第二部分 实验部分	(67)
第四章 普通实验	(67)
实验一 果胶的制备和特性测定	(67)
实验二 果胶总半乳糖醛酸和酰胺化度的测定	(69)
实验三 焦糖的制备及其性质	(71)
实验四 卵磷脂提取、鉴定及乳化特性试验	(74)
实验五 油脂过氧化物值的测定	(77)
实验六 油脂酸价的测定	(78)
实验七 蛋白质的盐析透析	(79)
实验八 氨基酸纸电泳分离鉴定	(82)
实验九 Folin - 酚法测定蛋白质含量	(84)
实验十 考马斯亮蓝染料比色法测定蛋白质含量	(86)
实验十一 紫外吸收法测定蛋白质浓度	(88)
实验十二 蔗糖酶活力测定	(89)
实验十三 果蔬中过氧化物酶活力测定	(91)
实验十四 酶催化转氨基反应的纸层析鉴定	(93)
实验十五 激活剂、抑制剂、温度及 pH 对酶活性的影响	(95)
实验十六 酶促褐变的抑制及叶绿素的性质	(99)
实验十七 多酚酶的提取及酶抑制剂的抑制作用	(103)
第五章 综合设计性实验	(108)
第一节 酵母蔗糖酶的分离与纯化	(108)

实验一	活性干酵母蔗糖酶的提取	(108)
实验二	蔗糖酶的分级沉淀提取	(110)
实验三	蔗糖酶的葡聚糖凝胶层析法脱盐	(114)
实验四	离子交换柱层析分离纯化蔗糖酶	(116)
实验五	交联葡聚糖凝胶色谱分离纯化蔗糖酶	(121)
实验六	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离测定蔗糖酶纯度	(125)
实验七	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量	(130)
实验八	蔗糖酶的酶活特性研究	(133)
第二节	蛋白酶在食品加工中的应用	(134)
实验一	蛋白酶水解蛋白质	(134)
实验二	蛋白质含量测定	(135)
实验三	电位滴定法测定样品中氨基酸态氮	(141)
实验四	高效液相色谱法测定酶解液氨基酸含量 (异硫氰酸苯酯衍生法)	(144)
第三节	天然活性物质——植物黄酮的提取及应用	(146)
实验一	藤茶植物黄酮的提取	(146)
实验二	重结晶法纯化黄酮提取物	(148)
实验三	植物黄酮重结晶晶体形态观察	(150)
实验四	紫外分光光度法测定总黄酮含量	(152)
实验五	高效液相色谱法测定蛇葡萄属植物黄酮的含量	(154)
实验六	植物黄酮紫外-可见光谱吸收特性及稳定性试验	(159)
实验七	植物黄酮清除自由基的抗氧化活性试验	(161)
实验八	植物黄酮在油脂中的抗氧化活性测定	(163)
附录1	实验室规则及常用实验仪器的使用	(167)
附录2	硫酸铵饱和度变化表	(174)
附录3	缓冲溶液的配制	(176)

第一部分 实验原理和实验技术

第一章 光谱分析实验技术

第一节 分光光度计法

在食品生物化学实验中,对蛋白质、糖、核酸、生物酶活性等的定量分析,探讨天然活性物质有效成分的提取、活性产物的抗氧化、食品贮存过程色泽的保持、防腐剂抗菌等研究中,普遍使用到分光光度计法实验技术。

溶液对光线具有选择性的吸收作用,主要体现在物质其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力不同。因此,每种物质都有其特异的吸收光谱。分光光度计法主要是指利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量分析的实验技术。

一、分光光度计法的实验原理

自然界中存在各种不同波长的电磁波,分光光度计法所使用的光谱范围在 190 ~ 1100nm,其中 190 ~ 400nm 为紫外光区,400 ~ 760nm 为可见光区,760 ~ 1100nm 为红外光区。朗伯 - 比尔定律是分光光度计定量分析的理论依据。

当一束平行单色光(入射光强度为 I_0)照射到任何均匀、非散射的溶液上时,光的一部分被比色皿的表面反射回来(反射光强度 I_r),一部分被溶液吸收(被吸收光强度 I_a),一部分则透过溶液(透光强度为 I_t)。这些数值之间有下列关系:

$$I_0 = I_a + I_t + I_r$$

在分析中采用同种质料的比色皿,其反射光的强度是不变的。由于反射所引起的误差互相抵消,因此上式可简化为:

$$I_0 = I_a + I_t$$

式中, I_a 越大说明对光吸收越强,也就是透过光 I_t 的强度越小,光减弱得越多。因此,分光光度计分析法实质上是测量透过光强度的变化。不同物质的溶液对光的吸收程度(吸光度 A)与溶液的浓度(c)、液层厚度(L)及入射光的波长等因素有关。也就是溶液浓度越大液层越厚,光被吸收的程度亦增加,透射光的强度则减少。透射光强度与入射光强度的比值,称为透光度,以 T 表示。当入射光的波长一定时,其定量关系可用朗伯 - 比尔定律表示,即

$$A = \lg \frac{I_0}{I_t} = \lg \frac{1}{T} = kcL$$

式中, k 为比例常数, 称吸光系数, 有两种表示方法: ①摩尔吸光系数, 是指在一定波长时, 溶液浓度为 1mol/L , 厚度为 1cm 的吸光度, 用 ε 或 EM 表示; ②百分吸光系数或称比吸光系数, 是指在一定波长时, 溶液质量浓度为 1g/mL , 厚度为 1cm 的吸光度, 用 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 表示。

吸光系数两种表示方式之间的关系是:

$$\varepsilon = \frac{M_i}{10} \times E_{1\text{cm}}^{1\%}$$

式中, M_i 是吸光物质的摩尔质量。吸光系数 ε 或 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 不能直接测得, 需用已知准确浓度的稀溶液测得吸光值换算而得到。例如氯霉素 ($M_i = 323.15$) 的水溶液在 278nm 处有吸收峰。设用纯品配制 100mL 含 2mg 的溶液, 以 1.00cm 厚的比色皿在 278nm 处测得透光率为 24.3% , 吸光值为 0.614 , 则

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{A}{c \times L} = \frac{0.614}{0.002} = 307 \quad \varepsilon = \frac{323.15}{10} \times E_{1\text{cm}}^{1\%} = 9920$$

二、影响吸光系数的因素

(1) 物质不同, 吸光系数不同, 所以吸光系数可作为物质的特性常数。在分光光度法中, 常用摩尔吸光系数 ε 来衡量显示反应的灵敏度, ε 值越大, 灵敏度越高。

(2) 溶剂不同, 其吸光系数不同。说明某一物质的吸光系数时, 应注明所使用的溶剂。

(3) 光的波长不同, 其吸光系数也不同。物质的定量需在最适的波长下测定其吸光值, 因为在此处测定的灵敏度最高。

(4) 单色光的纯度对吸光系数的影响。如果单色光源不纯, 使吸收峰变圆钝, 吸光值降低。严格来说, 朗伯-比尔定律只要当入射光是单色光时才完全适合, 因此物质的吸光系数与使用仪器的精度密切相关, 滤光片的分光性能较差, 故测得的吸光系数值要比真实值小得多。

三、分光光度计法的定量分析和定性检测应用

1. 定量分析

实际的分析研究中, 常用标准曲线定量法 (或工作曲线法) 和比较定量法。标准曲线定量法: 先配置一系列浓度已知的待测物标准溶液, 分别加入显示剂 (若物质在紫外区有显示基团, 则不必显色, 待测定样品也一样), 在一定波长条件下测定溶液的吸光值, 在坐标纸上绘制标准溶液的浓度与吸光值的标准曲线或计算标准工作曲线的回归方程。然后, 用同样的显色方法, 在相同操作条件下 (相同的试剂和相同的波长) 测定样品试液的吸光值, 根据标准工作曲线或标准工作曲线的回归方程, 进行定量计算 (如图 1 所示)。

单标准比较定量法: 若标准曲线通过原点, 且呈线性, 则可按照 $\frac{A_x}{A_s} = \frac{c_x}{c_s}$ 的比例关系求 c_x 。式中 A_s 、 c_s 分别为某个标准工作曲线的吸光值和浓度。

另外, 因为分光光度计法可以任意选择某种波长的单色光, 因此可以利用各种组分

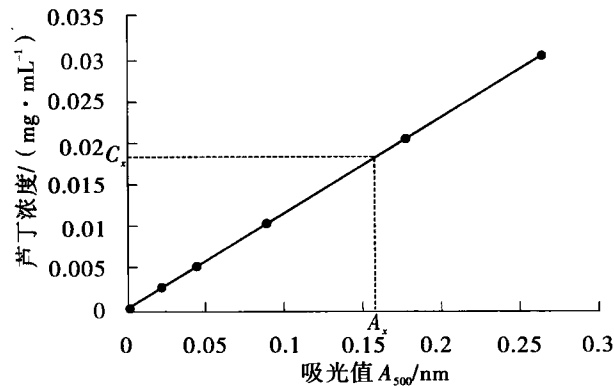


图 1 芦丁标准工作曲线

吸光度的加和性，在指定条件下进行混合物中各自含量的测定。

2. 定性检测

应用紫外可见分光光度计法，依据物质在某特定波长条件下具有对应关系的吸收光谱，与物质的标准谱图对照，定性测定某些化合物。

(1) 紫外可见吸收光谱在蛋白质快速测定中的应用。蛋白质中含有共轭双键的酪氨酸和色氨酸，在 280nm 处有最大吸收峰，可用紫外可见分光光度计法，对溶液进行吸收光谱扫描，根据吸收光谱图快速鉴别蛋白质的存在与否。

(2) 紫外可见吸收光谱在植物含有黄酮天然活性物质的分析鉴定中的应用。植物黄酮类化合物的提取及应用研究是食品生物化学研究的前沿。黄酮类物质由于结构中发色基团的位置不同，各物质在紫外可见光区存在不同的吸收光谱曲线，根据吸收光谱曲线图可对黄酮类化合物的鉴别及其氧化模式提供重要信息（见表 1）。

表 1 黄酮类化合物的紫外可见吸收光谱段范围

带 II（吸收峰波长/nm）	带 I（吸收峰波长/nm）	黄酮类型
250 ~ 280	310 ~ 350	黄酮类物质
250 ~ 280	330 ~ 360	黄酮醇类（3 - OH 取代）
250 ~ 280	350 ~ 385	黄酮醇类（3 - OH 自由）
245 ~ 275	310 ~ 330（肩峰）	异黄酮类
275 ~ 295	300 ~ 330	黄烷酮和双氢黄酮醇类
230 ~ 270（低强度）	340 ~ 390	查耳酮
230 ~ 270（低强度）	380 ~ 430	噢哢类
270 ~ 280	465 ~ 560	花色素类和花色苷类
260 ~ 270	320 ~ 340	山茶苷

(3) 天然色素的提取及稳定性研究。果蔬植物中含有丰富的天然色素，经提取制备后可供食品充当天然的着色剂。天然色素按化学结构不同可分为吡咯色素、多烯色素、酚类色素、吡啶色素、醌酮色素等，其对光、热、酸、碱等条件的稳定性研究，常

用的方法是分光光度计法。检测的方法为：对色素原液进行光谱扫描，确定色素光谱曲线吸收峰的位置，并测定初始色素溶液在最大吸收峰波长下的吸光值；然后定期抽样测定色素在不同处理方法、不同贮存条件下色素溶液的吸光值以及进行吸收光谱曲线扫描。性质稳定的色素溶液，其样液的吸光值大小、扫描吸收光谱最大吸收峰所对应的波长基本保持不变。根据吸光值大小的变化、吸收光谱曲线最大吸收峰所对应波长位置的变化与否，综合评价天然色素色泽稳定的条件。

四、使用分光光度计的注意事项

(1) 定性定量检测时，样品的吸光值尽可能控制在 0.1 ~ 1.0 范围，以减少吸光度误差。样品在进行光谱扫描过程中，高浓度的样液，无法真实反映样品的吸收光谱曲线，光谱带中的吸收峰值无法正确检出。

(2) 稳定透明的样液是定性定量分析的前提（测定溶液的澄清度除外），选择合适的显色剂、最佳的试剂加入量、显色时间，检测样品与标准尽可能在相同条件下进行检测，可提高检测重现性。

(3) 使用成套性的比色皿、仪器波长的准确性、光源电压的稳定性等，是获取准确、可靠的分析结果的保障。进行分光光度计法检测时，同批次检测样品尽可能在同一台分光光度计中完成检测。

(4) 比色皿成套性的检测。

① 光学玻璃比色皿成套性检查。波长置于 600nm，在一组比色皿中加入适量蒸馏水，以其中任一比色皿为参比，调整透光率为 95%，测定并记录其他各比色皿的透光率值。比色皿间的透光率偏差小于 0.5% 的即视为同一套。

② 石英比色皿成套性检查。将波长置于 220nm，在一组比色皿中加入适量蒸馏水。检查方法同上。

(5) 石英比色皿的鉴别。将待鉴别的比色皿放入紫外可见分光光度计，选择紫外光区波长，以空气调节仪器零点，测定比色皿的吸光值，因玻璃吸收紫外光，导致比色皿空气吸光示值无穷大，无法检出，可确定此器皿是玻璃比色皿。

五、分光光度计的主要部件

分光光度计法所使用的仪器是分光光度计，根据测定选用的波长范围不同，分为可见光分光光度计和紫外可见分光光度计。仪器的种类繁多、型号各异、性能及精度等级不同，但主要的部件大致相同，均由光源、分光系统（单色器）、样品池、检测器、数显示值系统组成（如图 2 所示）。

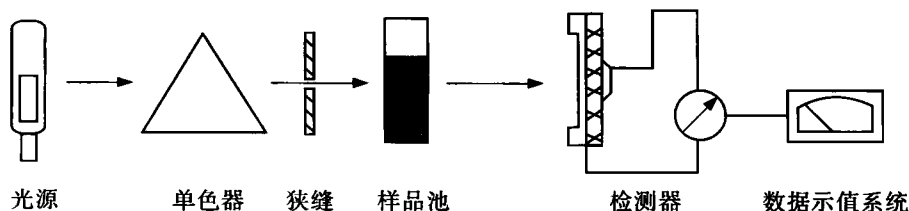


图 2 分光光度计仪器结构组成示意图

1. 光源

要求能提供检测所需波长范围的连续光源, 稳定而有足够的强度。常用的有白炽灯(钨丝灯、卤钨灯等)、气体放电灯(氢灯、氘灯等)、金属弧灯(各种汞灯)等多种灯。

钨灯能发射 350 ~ 2000nm 波长的连续光谱, 是科技感光度计的光源, 适用于可见光和近红外光区的测量。氢灯或氘灯能发射 150 ~ 400nm 波长的连续光谱, 是紫外分光光度计的光源, 因为玻璃吸收紫外光, 故灯泡必须用石英材料制成或用石英窗隔离。为保证仪器检测过程中光源的稳定, 仪器配有稳压装置。

2. 分光系统(单色器)

分光系统的核心部件是单色器, 其主要功能是将光源发出的光分离成所需要的单色光。单色器由入射光狭缝、准直镜、色散元件、聚焦元件(物镜)和出射光狭缝构成。常用的色散元件有棱镜和光栅。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, 也直接影响分辨力。光源通过入光狭缝使光线成为细长条照射到准直镜, 准直镜可使入射光成为平行光射到色散元件, 色散后的光再经聚光镜聚焦到出光狭缝, 转动棱镜或光栅可使所需要的单色光从出光狭缝分出。狭缝的宽度一般在 0 ~ 2nm 内可调。出射狭缝的宽度通常有两种表示方法: 一为狭缝的实际宽度, 以毫米(mm)表示, 另一种为光谱频带宽度, 即指由出射狭缝射出光束的光谱宽度, 以毫微米(nm)表示。

3. 样品池(比色皿)

比色皿是无色透明的, 用来盛测定溶液的专用器皿。分光光度计配有不同厚度(0.5cm, 1cm, 2cm 等)的比色皿, 可供选用。玻璃比色皿只适用可见光区, 紫外光区应使用石英比色皿。比色皿光学面上的指纹、油渍、气泡及沉淀物都会对透光性能产生影响。由冰箱取出而未解冻到室温的溶液, 易在比色皿光学面壁产生雾气而影响检测结果, 应引起注意。

4. 检测器

紫外分光光度计常用光电管和光电倍增管作检测器, 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。

光越强, 光波的振幅越大, 电子放出越多。光电管产生电流较小, 透射光变成的电信号需要放大处理。目前分光光度计通常使用电子倍增光电管, 在光照射下产生的电流比其他光电管要大得多, 可提高测定的灵敏度。

5. 数据示值系统

分光光度计示值仪表有指针式和数显式, 有百分透光率(T)和吸光度(A)两种表示法, 现有不少分光光度计配有浓度直读装置。

分光光度计的种类很多, 使用功能不断增强, 操作界面和操作方法不尽相同, 要仔细阅读使用说明书, 按说明书的要求使用仪器。不过, 各类型仪器的操作均包括以下步骤: ①打开仪器电源, 预热仪器。②选择合适的波长。③将待测液倒入比色皿 2/3 的高度, 用擦镜纸将透光面外部擦净。④将比色皿垂直有序放入比色架, 光路要通过透光

面。⑤将参比溶液放入,进行 T 调零和 A 调零。⑥依次测定样品的吸光值。多个样品测定,注意保留参比对照溶液。

第二节 荧光分光分析法

一、物质荧光

物质分子中具有一系列的能级,在光线的照射下,分子吸收了能量,从基态能级跃迁到较高能级呈激发分子。激发分子不稳定,在很短暂的时间内(约 10^{-9}s),首先由于分子碰撞而以热的形式损失掉一部分能量,从所处的激发能级下降至较低能级(第一电子激发态),然后再下降至基态能级,并将能量以光的形式释放出来。当物质分子从第一电子激发态的能级立即下降至基态的能级时,激发分子将以光的形式释放出所吸收的能量,所发射出的光称为荧光。只有能产生荧光的物质才被称为荧光物质。

荧光所发出的能量比入射光所吸收的能量略小些,荧光波长比入射波长长些。

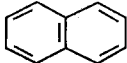
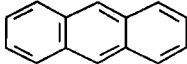
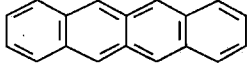
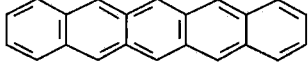
二、分子结构与荧光强度

已知的大量物质中,仅有少部分物质能发生强的荧光,它们的荧光光谱和荧光强度都和它们的结构有密切的关系。一个强荧光物质需要具备以下三个结构特征:

1. 具有较大的共轭 π 键结构

大量研究表明,化合物的共轭 π 键达到一定程度才会发射荧光。共轭体系越大,离域 π 电子越容易被激发,相应的荧光较易产生。一般说来,芳香体系越大,其荧光峰越向长波方向移动,而且荧光强度往往也加强。但芳香环或共轭体系增加到一定程度时,只要荧光发射波长向长波方向红移,荧光量子产率不但没有增加,反而下降,这一现象主要是受共轭大 π 键共平面及刚性的影响(见表1)。

表1 几种线状多环芳烃的荧光

化合物	荧光量子效率 (φ_f)	激发波长 $\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	荧光波长 $\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$
	0.11	205	278
	0.29	286	321
	0.46	365	400
	0.60	390	480
	0.52	580	640

2. 具有较为刚性的结构，特别是平面结构

具有较为刚性的结构特别是平面结构的化合物有着较好的荧光特性。荧光素呈平面构型，是强荧光物质，而酚酞没有氧桥，其分子不易保持平面，不是荧光物质。

刚性结构的增强，也可以由有机配合剂与非过渡金属离子组成配合物时荧光强度加强的现象来说明。如 8-羟基喹啉是在分析中常用的配位试剂，荧光量子产率极低，几乎可以认为不发荧光，在其与铝离子配位后，形成 8-羟基喹啉铝具有很好的荧光性能。利用分子氢键也可以提高分子的刚性程度，例如水杨酸的水溶液，由于羧基与羟基可以形成分子内氢键，其分子荧光要比间位或对位的异构体要强。

3. 取代基团中有较多的供电子取代基

化合物的共轭体系上具有强的供电子基团，如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ ，可以在一定程度上加强化合物的荧光，因为含这类基团的荧光体，激发态常由环外的羟基或氨基上的电子激发转移到环上而产生。由于它们的电子云与芳环上的轨道平行，实际上是共享了共轭电子结构，同时扩大了其共轭双键体系。

三、分析条件对分子荧光的影响

1. 溶剂的影响

溶剂对荧光的影响除溶剂本身折射率和价电常数的影响外，主要是指荧光分子与溶剂分子间的特殊作用（如氢键的生产或配位作用），这种作用取决于荧光分子基态和激发态的极性及其溶剂对其稳定性的程度。

对于 $\pi \rightarrow \pi$ 跃迁，分子激发态的极性远大于基态的极性，随着溶剂极性的增加，对分子激发态的稳定程度增大，而对于分子基态的影响很小，导致荧光发射的能量下降，发射波长红移。

对于 $n \rightarrow \pi$ 跃迁，分子基态的极性远大于激发态的极性，随着溶剂极性的增加，对分子基态的稳定性程度增大，而对于分子激发态的影响很小，导致荧光发射的能量升高，发射波长蓝移。

可见，溶剂能影响荧光效率，改变荧光波长，因此在测定时必须要用同一溶剂。

2. 温度的影响

随着体系温度的升高，荧光物质的荧光量子产率通常是下降的，这是因为温度升高会加快分子运动速度，增加分子间的碰撞，这种碰撞可能发生在荧光物质与溶剂分子之间，也可能发生在荧光分子之间，当处于激发态的分子与另一荧光分子或溶剂分子相碰撞时，就会发生能量转移，造成发射光谱减弱。因此，有些荧光仪的试样液槽配有低温装置，使荧光增大，以提高检测的灵敏度。在高级的荧光仪中，液槽四周有冷凝水并附有恒温装置，使检测过程的温度尽可能恒定。

3. pH 值的影响

对于含有酸性或碱性功能基团的荧光化合物，pH 的变化将影响化合物呈现弱酸或弱碱的离解，对其荧光光谱产生影响。例如 2-萘酚在水溶液中的荧光发射谱带在 259nm，但萘酚盐阴离子的荧光发射谱带在 429nm。

4. 氢键的影响

荧光分子与溶剂间氢键的作用可以以多种形式影响分子的荧光，如氢键可使分子中

杂原子的非键电子更加稳定，氢键也可增加荧光体系中内部能量的转换，造成荧光能量或波长的改变。

5. 时间的影响

鉴于荧光物质分子结构或实验条件的改变，其荧光物质的形成时间不同，有些荧光物质在激发光较长时间的照射下才会发生分解。因此，过早或过晚测定物质的荧光都会给实验带来误差，必须通过系列试验确定适宜的检测时间，保证获取最大且稳定的荧光强度。为了避免光分解所引起的误差，应在荧光测定的短时间才打开光闸，其余时间应该是关闭的。

6. 环境光线的影响

长时间的光照，可能造成荧光物质的降解，对大批量物质荧光检测时，应对试样进行避光保存。

7. 共存干扰物的影响

干扰物和荧光分子作用使荧光强度显著下降，这种现象称为荧光的淬灭。实验过程中若存在干扰物应设法去除，使用纯度高的溶剂和试剂。

四、荧光分析法

荧光分析法是测定物质吸收了一定频率的光以后，物质所发射的光的强度的方法。物质吸收的光，称为激发光；物质吸收光后发出的光，称为发射光或荧光。

将激发光用单色器分光后，连续顺次测定每一波长由激发光所引起的荧光强度，然后以荧光强度为纵坐标、以激发光波长为横坐标作图所得到的曲线，称为该物质的激发光谱。实际上荧光物质的激发光谱就是它的吸收光谱。激发光谱中最高峰处的波长能使荧光物质发射出最强的荧光。若保持激发光的波长和强度不变，让物质所发射的荧光通过单色器照射到检测器上，依次调节单色器至各种波长，并测定相应的荧光强度，然后以荧光强度为纵坐标，以相应的荧光波长为横坐标，所得曲线称为该荧光物质的荧光发射光谱，简称荧光光谱。在建立荧光分析法时，必须根据荧光光谱来选择适当的测定光谱。

1. 荧光分光光度法定量分析

对于某荧光物质的稀释液，在一定波长和一定强度的人射光照射下，当溶液层的厚度不变时，在一定浓度范围内，所发生的荧光强度和该溶液的浓度成正比。

应用标准曲线法，将已知的标准品经过和样品同样的处理后，配成系列标准溶液，测定其荧光强度，以荧光强度对荧光物质含量绘制标准曲线，再测定样品的荧光强度。可根据标准工作曲线，定量分析未知荧光样品的浓度。

B 族维生素、稠环芳烃（如 3, 4 - 苯并芘）、黄曲霉毒素等都具有荧光特性，其定量分析适用荧光分光光度法。

熏烤的食品直接与炭火接触（如熏鱼、火腿、熏豆腐干、烤鸭），即可受到苯并芘的污染或产生苯并芘。苯并芘的含量因加工烹调方法不同，其含量差异很大，毒素对人体的主要危害是致癌作用。稠环芳烃 3, 4 - 苯并芘具有独特的激发波长（369nm）和发射波长（405nm）。

黄曲霉毒素是一类结构和理化性质相似的真菌次级代谢产物，具有极强的毒性。其基本结构单位是二呋喃香豆素衍生物，主要有黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2 等 6 种。黄曲霉毒素 B1 是这类衍生物中毒性及致癌性最强的物质，其分子结构为共轭双键的芳香稠环结构，具有荧光性质，利用荧光分光光度法在激发波长 365nm 和发射波长 406nm (± 5 nm) 进行定量分析，为食品质量和生物降解黄曲霉毒素的研究建立检测方法。

维生素是维持生物正常生命过程所必需的一类有机物质，需要量很少，但对维持人体健康却十分重要。人体一般不能合成它们，必须从食物中摄取。维生素的主要功能是通过作为辅酶的成分调节机体代谢，在食品中被誉为第四营养素。使用荧光分光光度法可对 B 族维生素进行定量分析，例如，经分离提取后维生素 B1 结构中的芳香杂环化合物具有荧光性质，在激发波长 365nm、发射波长 435nm 被检测；维生素 B2 在激发波长 440nm、发射波长 560nm 被检测。

2. 物质的定性分析研究

食品生物化学实验中应用荧光光谱分析法，可定性分析蛋白质在提取、加工或变性后，蛋白质疏水性、憎水性的变化；研究有机小分子、离子及无机化合物与蛋白质的相互作用，获取对蛋白质结构及功能性质变化的信息等。

在蛋白质结构中存在三种芳香族氨基酸，即色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和苯丙氨酸 (Phe)，能发出内源荧光。这些氨基酸的结构不同，其荧光强度比为 100:9:0.5，因此，大多数情况下，可以认为蛋白质所显示的荧光主要来自色氨酸残基的贡献，色氨酸荧光光谱主要反映色氨酸微环境极性的变化，是一种比较灵敏的在三级结构水平反映蛋白质构象变化的技术手段。一般而言，荧光峰红移表明荧光发射基团暴露于溶剂，蛋白分子伸展；若荧光峰位置没有发生偏移，仅仅有荧光峰信号增强或减弱，则不能将其判断为明显的蛋白构象改变。

测定蛋白质性质时，可对蛋白质对照液进行荧光光谱扫描，确定样液最适的发射波长，然后测定处理样品荧光发射光谱，根据发射光谱最大发射波长的位置，判断蛋白质构象变化。若最大荧光发射波长红移，表示蛋白质残基所处环境的极性增加；蓝移则表明蛋白质疏水性增加。

例如，在微射流处理对芸豆分离蛋白乳化特性影响的研究中，对微射流处理芸豆分离蛋白前后的样品进行荧光光谱扫描，发现经微射流处理的样品荧光强度稍有增加，但荧光峰的位置没有明显改变，表明微射流处理对蛋白的三级结构没有明显的影响（如图 1 所示）。

荧光分光光度法还可用于蛋白质水解的研究。比如，在酶对蛋白质的水解作用过程中，随着酶解时间的延长，对酶液进行荧光光谱分析时，发现其荧光峰发生红移，表明酶解液中可溶性蛋白质含量增加。

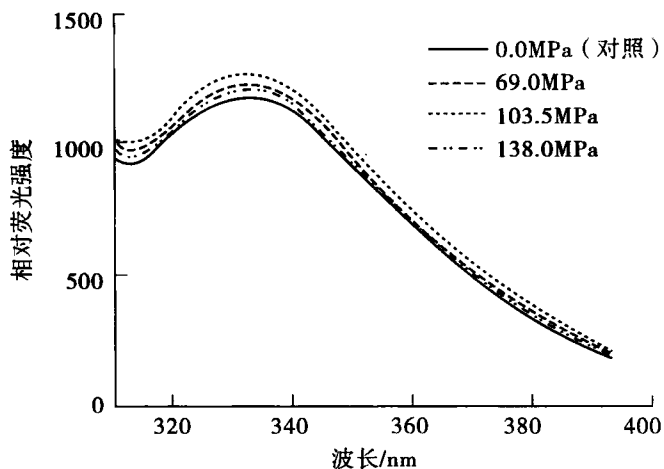


图1 微射流处理芸豆分离蛋白荧光发射光谱

五、荧光分光光度计的主要部件

测定荧光的仪器有荧光计和荧光分光光度计。前者结构简单，价格便宜，配套滤光片可获得适当波长的单色光，用光电池或光电管做检测器；高级的荧光分光光度计，不仅构造精细，而且光谱连续，波长范围宽，配备自动扫描及数据处理软件，定量测定的灵敏度和选择性高（如图2所示）。

1. 光源

理想的激发光源应能发出含有各种波长的紫外光和可见光，光的强度足够大，并在整个波长范围内强度一致。但理想的光源不易得到，目前应用较多的光源是汞灯、氙弧灯等。氙弧灯所发射的光谱线强度最大，为连续光谱，波长范围200 ~ 800nm。

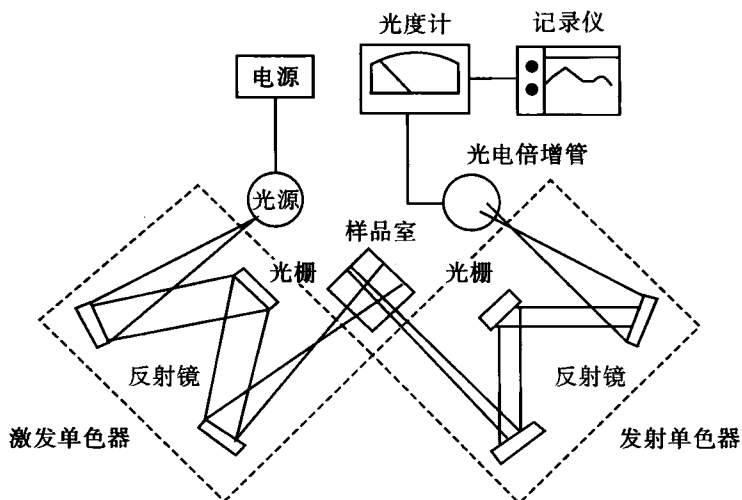


图2 荧光分光光度计内部光路结构示意图

2. 单色器

单色器是荧光分光光度计的主要部件,其作用是将入射光色散为各种不同波长的单色光,使用的单色器主要为棱镜和光栅。测定荧光的仪器须有两个单色器,第一单色器放在光源和液槽之间,其作用是滤去非特征波长的激发光;第二单色器放在液槽和检测器之间,以滤去反射光、散射光和杂荧光,让特征波长的荧光通过。荧光分光光度计采用石英棱镜或光栅作为单色器,分光能量强,从而提高了分析检测的灵敏度和选择性。第二单色器和检测器与光源呈 90° 分布,是为了防止透射光对荧光强度的干扰。

3. 样品室

样品室由比色皿和比色皿架组成,精度高的荧光分光光度计,样品室具有恒温装置。比色皿由四壁透光的石英材料制成。

4. 检测器

荧光分光光度计采用光电倍增管作为检测器,将接收到的光信号转变为电信号。不同类型的光阴极的光电倍增管,可获得不同响应的荧光光谱。

5. 记录系统

经光电倍增管放大的电信号由记录器记录荧光强度。配备软件自动分析处理系统,为荧光光谱曲线分析,以定量计算的方式提供了简便和多样化的选择。

参考文献

- [1] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [2] 杨安钢, 刘新平, 药立波. 生物化学与分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [3] 穆华荣, 陈志超. 仪器分析实验 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [4] 刘珍. 化验员读本 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1983.
- [5] 朱为宏. 有机波普及性能分析 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [6] 党玉丽. 牛血清白蛋白与叶酸相互作用的荧光光谱法在蛋白质含量测定中的应用 [J]. 河南农业大学学报, 2010, 44 (5): 538 - 540.
- [7] 尹寿伟, 唐传核, 温其标, 等. 微射流处理对芸豆分离蛋白构象和功能特性的影响 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2009, 37 (10): 112 - 116.

第二章 生物活性分子的分离技术

生物体内的物质分子种类繁多,要对各种活性物质的功能、结构以及各种理化特性进行研究,首先必须把它们从生物体中提取出来,然后采用各种有效的分离技术对提取物进行分离纯化,获得某类或者某种物质分子。生物活性物质的分离技术有很多种,本书主要介绍离心技术、层析技术、电泳技术、沉淀技术等几种常用的分离技术。

第一节 离心技术

离心技术是利用物体高速旋转时产生强大的离心力,使置于旋转体中的悬浮颗粒发生沉降或漂浮,从而使某些颗粒达到浓缩或与其他颗粒分离的目的。当物体围绕某一中心轴做圆周运动时,运动物体就受到离心力的作用,旋转速度越高,运动物体所受到的离心力越大。如果装有悬浮液或高分子溶液的容器进行高速水平旋转,强大的离心力作用于溶剂中的悬浮颗粒或高分子,会使其沿着离心力方向运动而逐渐背离中心轴。在相同转速条件下,容器中不同大小的悬浮颗粒或高分子溶质会以不同的速率沉降。经过一定时间的离心操作,就有可能实现不同悬浮颗粒或高分子溶质的有效分离。在工业生产和实验室分析研究中广泛使用的离心机就是基于上述基本原理来设计的。

一、基本原理

1. 离心力

物体做圆周运动时,受到一个指向轴心的向心力作用,离心力(F)就是向心力的反作用力,其大小可表示为:

$$F = m\omega^2 r \quad (2-1)$$

式中 m ——物体的质量, kg;

ω ——物体做圆周运动的角速度, rad/s;

r ——旋转半径,即物体距轴心的距离, m。

在说明离心条件时,一般低速离心用离心机转速(n , r/min)表示,如 4000 r/min;高速离心,特别是超高速离心时,习惯上以相对离心力(RCF)即离心加速度 $\omega^2 r$ 与重力加速度 g 的比值来表示。RCF的大小由重力加速度 g 的倍数来表示,如 $10\,000 \times g$, $30\,000 \times g$ 等。

$$\text{RCF} = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (2-2)$$

上式中的角速度 ω 不便测量,而角速度 ω 与离心机转速 n 之间有如下关系:

$$\omega = \frac{2\pi n}{60} = \frac{\pi n}{30} \quad (2-3)$$

因此 RCF 可用式(2-4)表示,