

卫生部规划教材

高等医药院校 配套教材
全国医学专科学校
(供医学检验专业用)

临床生物化学和 生物化学检验 实验指导

陈正炎 主编

人民卫生出版社

高等医药院校
全国医学专科学校 配套教材

(供医学检验专业用)

临床生物化学和生物化学检验 实验指导

陈正炎 主 编

罗 侃 副主编

编者 (按姓氏笔画为序)

王继红 (重庆医科大学)
田建英 (张家口医学院)
刘 芳 (湖北医科大学)
许淑惠 (华西医科大学)
陈正炎 (湖南医科大学)
陈伯铭 (广州医学院)
陈铭生 (上海第二医科大学)
杨伟宗 (上海第二医科大学)
李志坚 (湖南医科大学)
罗 侃 (解放军兰州医学高等专科学校)
周 新 (湖北医科大学)
祝其锋 (广东医学院)
郝顺祖 (镇江医学院)
陆永绥 (温州医学院)
郭华阳 (第三军医大学)
崔有宏 (解放军兰州医学高等专科学校)
章 尧 (蚌埠医学院)
程腊梅 (湖南医学高等专科学校)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

临床生物化学和生物化学检验实验指导/陈正炎主编.
北京:人民卫生出版社,1999.11(2002重印)

ISBN 7-117-03282-0

I. 临… II. 陈… III. ①临床医学:生物化学-
实验-医学院校-教材②生物化学-医学检验-实验-
医学院校-教材 IV. R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 017057 号

临床生物化学和生物化学检验实验指导

主 编: 陈正炎

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

印 刷: 三河市潮河印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 16.75

字 数: 382 千字

版 次: 1999 年 11 月第 1 版 2002 年 8 月第 1 版第 4 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-03282-0/R·3283

定 价: 18.00 元

著作权所有,请勿擅自用本书制作各类出版物,违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

《临床生物化学和生物化学检验实验指导》是在卫生部教材办公室和医学检验专业教材编审委员会的指导下，作为康格非教授主编《临床生物化学和生物化学检验》的配套实验教材，亦是卫生部教材办公室的规划教材之一。

临床医学的迅速发展，加速了检验医学的发展。目前我国大多数综合医院检验引进了自动化仪器及新技术，开拓了新的检测项目。生化自动分析仪及试剂盒的广泛应用，使临床化学检测项目不断增加，为适应国内外检验医学专业发展的需要，我们参照康格非教授主编《临床生物化学和生物化学检验》的内容，结合各校十余年临床生物化学实验教学的体会，在王霞文教授先后主编的《临床生物化学实验》及《临床生化检验技术》实验教材的基础上，邀请了14所检验医学专业的高等医药院校，18位编者参加编写。18位编者中有长期从事医院检验科临床化学检验的专家，也有对临床生物化学教学具有丰富经验的教授。在对《编写大纲》统一认识之后，正式编写了《临床生物化学和生物化学检验实验指导》这本实验教材。

本教材分十八章及附录一、二，共计133个实验，分生物化学技术实验及临床生物化学检验实验二大部分。每个实验包括原理、试剂、操作步骤、计算、参考值、临床意义、注意事项及评价等八项。该实验教材具有以下特点：①注重学生的基本知识、基本技能的培养。虽然对每种物质的检测介绍了几种方法，但主要选择手工操作的实验方法，以培养学生的基本技能；②加强学生的综合分析能力的培养。第五章酶学基本知识实验选择了ACP的一系列连贯检测实验，这对学生的综合分析能力的提高具有很大的帮助；③培养学生初步的科研能力。教材中介绍了方法学评价中几个重要指标的实验，使学生从实验教学中得到科研能力的初步训练；④适用性广。本实验教材编写了133个实验，对一种物质的检测大多数介绍了2~3种测定方法，既能满足检验医学专业五年制学生的实验教学需要，同时又能适应三年制大专学生的实验教学，各校还可根据本校实际情况选择可开出的实验项目。教材所介绍的实验内容紧密结合医院检验项目，并对商品试剂盒的评价方法及生化自动分析仪的参数进行了介绍。教材还选择了肿瘤标志物的测定、神经递质与其他活性物质的测定、常用治疗性药物监测及分子生物学等实验内容，这对医院检验人员、研究技术人员均具有适用价值。

《临床生物化学和生物化学检验实验指导》虽编写有133个实验内容，我们建议实验学时数80~120学时，实验个数20~30个。

本教材编写过程中，得到了湖南医科大学、广州医学院及解放军兰州医学高等专科学校等单位的校领导及医学检验系的大力支持，在此表示衷心的感谢。编写本实验教材时主要参考了《全国临床检验操作规程》（第二版）、《临床化学方法学评价》（罗佩主编）、《实用医学检验学》（冯仁丰主编）及《临床生化检验》（第二版）（王继贵主编）等资料。

由于本实验教材参编单位较多，涉及面较广，加之本人水平有限，难免存在不足之处或错误，敬请同行专家及读者批评指正。

陈正炎

目 录

第一章 光谱技术	1
实验一 紫外分光光度法测定血清蛋白质.....	1
实验二 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱分析.....	2
实验三 荧光光度法测定核黄素的含量.....	3
实验四 原子吸收分光光度法测定血浆锌的含量.....	5
第二章 层析技术	8
实验五 离子交换柱层析法分离混合氨基酸.....	8
实验六 凝胶过滤法分离蛋白质(高铁血红蛋白和高铁氰化钾).....	9
实验七 亲和层析法提取特异性 IgG.....	11
第三章 电泳技术	13
实验八 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质.....	13
实验九 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质.....	16
实验十 等电聚焦电泳分离血清蛋白质.....	18
实验十一 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA.....	20
第四章 免疫化学技术	22
实验十二 ELISA 法测定人绒毛膜促性腺激素.....	22
实验十三 放射免疫法测定癌胚抗原.....	23
实验十四 免疫透射比浊法测定血清 ApoB.....	25
第五章 酶学基本知识实验	28
实验十五 分离纯化酸性磷酸酶.....	28
实验十六 酸性磷酸酶活性测定.....	31
实验十七 酶蛋白含量测定及比活性分析.....	32
实验十八 酸性磷酸酶时间进程曲线.....	34
实验十九 酸性磷酸酶酶浓度-速度曲线.....	35
实验二十 pH-酸性磷酸酶活性曲线.....	35
实验二十一 酸性磷酸酶米氏常数的测定.....	36
实验二十二 磷酸盐对酸性磷酸酶活性的抑制作用.....	37
第六章 分子生物学实验技术	39
实验二十三 从真核细胞中快速制备 DNA.....	39
实验二十四 大肠杆菌质粒转化实验.....	40
实验二十五 碱裂解法从大肠杆菌中制备质粒 DNA.....	41
实验二十六 DNA 限制性图谱的绘制——DNA 的限制性内切酶酶切分析.....	43
实验二十七 Southern 印迹杂交技术.....	44
实验二十八 非放射性核酸探针标记及硝酸纤维素膜固相杂交技术.....	45
实验二十九 PCR 扩增目的 DNA.....	48

第七章 方法学评价实验	51
实验三十 线性范围测定	51
实验三十一 批内重复性试验	53
实验三十二 回收试验	56
实验三十三 干扰试验	58
实验三十四 方法比较试验	61
第八章 血清(浆)蛋白质测定	66
实验三十五 双缩脲法测定血清总蛋白	66
实验三十六 溴甲酚绿法测定血清白蛋白	68
实验三十七 溴甲酚紫法测定血清白蛋白	69
实验三十八 热沉淀比浊法测血浆纤维蛋白原	70
实验三十九 酚试剂法测定血清粘蛋白	72
第九章 糖及其代谢物的测定	74
第一节 血清(浆)葡萄糖测定	74
实验四十 葡萄糖氧化酶法	74
实验四十一 邻甲苯胺法	76
实验四十二 己糖激酶法	78
第二节 血清(浆)糖化蛋白的测定	80
实验四十三 微柱法分离糖化血红蛋白	80
实验四十四 果糖胺法测定糖化血清蛋白	81
第三节 血液其他糖类及糖代谢产物的测定	83
实验四十五 半乳糖氧化酶法测定半乳糖	83
实验四十六 比色法测定全血乳酸	84
实验四十七 乳酸脱氢酶法测定全血乳酸	86
实验四十八 分光光度法测定全血丙酮酸	88
第十章 血清(浆)脂类及脂蛋白测定	91
第一节 血清甘油三酯测定	91
实验四十九 乙酰丙酮显色法	91
实验五十 磷酸甘油氧化酶法	93
第二节 血清胆固醇的测定	94
实验五十一 胆固醇氧化酶法测定血清总胆固醇	94
实验五十二 高铁-硫酸显色法测定血清总胆固醇	96
实验五十三 L-B反应显色法测定血清总胆固醇	97
实验五十四 磷钨酸-镁沉淀法测 HDL-C	98
实验五十五 血清低密度脂蛋白胆固醇测定法	99
第三节 血清脂蛋白及载脂蛋白测定	101
实验五十六 ELISA法测定脂蛋白(a)	101
实验五十七 免疫透射比浊法测定血清 ApoA _I 和 ApoB	102
实验五十八 ELISA法测定血清 ApoA _I 和 ApoB	103

实验五十九 免疫火箭电泳法测定血清 ApoAI 和 ApoB	104
第十一章 血清无机离子及微量元素测定	106
第一节 钾钠离子测定	106
实验六十 火焰发射光谱法	106
实验六十一 离子选择性电极电位法	109
第二节 血清钙测定	112
实验六十二 邻甲酚酞络合酮比色法测血清总钙	112
实验六十三 甲基百里香酚蓝法测血清总钙	113
实验六十四 乙二醇四乙酸二钠络合滴定法测血清总钙	115
实验六十五 离子选择性电极电位法测钙离子	116
第三节 血清磷测定	118
实验六十六 还原钼蓝法	118
第四节 血清镁测定	120
实验六十七 甲基麝香草酚蓝法	120
实验六十八 钙镁试剂比色法	122
实验六十九 原子吸收分光光度法	123
第五节 氯化物测定	124
实验七十 硝酸汞滴定法测血清氯	124
实验七十一 硫氰酸汞比色法测血清氯	126
实验七十二 离子选择性电极法测血清氯	127
第六节 微量元素的测定	128
实验七十三 双环己酮草酰二胺比色法测定血清铜	128
实验七十四 原子吸收分光光度法测定血清铜	129
实验七十五 吡啶偶氮酚比色法测定血清锌	130
实验七十六 亚铁嗪比色法测定血清铁和总铁结合力	131
第十二章 血气分析	134
实验七十七 滴定法测定血浆总二氧化碳	134
实验七十八 血气分析仪操作	135
第十三章 激素代谢产物的测定	139
实验七十九 尿 17-酮类固醇测定	139
实验八十 尿 17-羟皮质类固醇测定	141
实验八十一 荧光法测定尿液儿茶酚胺	143
实验八十二 尿香草扁桃酸测定	145
第十四章 非蛋白含氮化合物及总胆汁酸的测定	148
第一节 血清尿素的测定	148
实验八十三 二乙酰一肟法	148
实验八十四 脲酶-波氏比色法	150
实验八十五 酶偶联速率法	151
第二节 血清肌酐测定	152

实验八十六 除蛋白碱性苦味酸法	152
实验八十七 不除蛋白速率法	154
实验八十八 内生肌酐清除率的测定	154
第三节 血清尿酸测定	155
实验八十九 磷钨酸还原法	155
实验九十 尿酸酶-过氧化物酶偶联比色法	157
第四节 血氨测定	158
实验九十一 酶法测定血浆氨	158
实验九十二 离子选择性电极法测定血浆氨	160
第五节 血清总胆红素和结合胆红素测定	161
实验九十三 改良 J-G 法测定血清总胆红素和结合胆红素	162
实验九十四 胆红素氧化酶法测定总胆红素	164
实验九十五 酶法测定结合胆红素	165
实验九十六 直接分光光度法测定新生儿血清总胆红素	167
第六节 总胆汁酸测定	168
实验九十七 酶法测定血清总胆汁酸	168
第十五章 常用酶类测定	171
第一节 氧化还原酶类	171
实验九十八 连续监测法测定 LD 总活性 (L-P 反应法)	171
实验九十九 连续监测法测定 LD 总活性 (P-L 反应法)	173
实验一〇〇 比色法测定 LD 总活性	174
实验一〇一 琼脂糖电泳法测定 LD 同工酶	175
实验一〇二 连续监测法测定葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	178
实验一〇三 邻联大茴香胺比色法测定血清铜蓝蛋白	179
实验一〇四 苜蓿偶氮萘酚法测定血清单胺氧化酶	181
实验一〇五 邻苯三酚自氧化抑制法测定超氧化物歧化酶	183
第二节 转移酶类测定	185
实验一〇六 赖氏法测定血清丙氨酸氨基转移酶	185
实验一〇七 连续监测法测定血清丙氨酸氨基转移酶	189
实验一〇八 赖氏法测定血清门冬氨酸氨基转移酶	190
实验一〇九 连续监测法测定血清门冬氨酸氨基转移酶	191
实验一一〇 重氮反应比色法测血清 γ -谷氨酰基转移酶	192
实验一一一 连续监测法测定血清 γ -谷氨酰基转移酶	194
实验一一二 肌酸显色法测定血清肌酸激酶	196
实验一一三 连续监测法测定血清肌酸激酶	198
实验一一四 琼脂糖凝胶电泳法测定血清肌酸激酶同工酶	200
第三节 水解酶类的测定	203
实验一一五 比色法测定血清碱性磷酸酶	203
实验一一六 连续监测法测定血清碱性磷酸酶	205

实验一一七	比色法测定酸性磷酸酶	206
实验一一八	比色法测定血清胆碱酯酶	208
实验一一九	碘-淀粉比色法测定淀粉酶	209
实验一二〇	连续监测法测定淀粉酶	211
第十六章	常用治疗性药物监测	213
实验一二一	血清茶碱测定及药代动力学参数计算	213
实验一二二	HPLC法测定血清苯妥英	215
实验一二三	HPLC法测定全血环孢霉素	217
实验一二四	放射免疫法测定血清地高辛	218
第十七章	肿瘤标志物的测定	221
实验一二五	放射免疫(双抗体)法测定甲胎蛋白	221
实验一二六	ELISA法测定癌胚抗原	223
实验一二七	放射免疫分析法测定CA ₁₉₉	225
实验一二八	ELISA法测定前列腺特异性抗原	228
实验一二九	放射免疫分析法测定血清铁蛋白	229
第十八章	神经递质与其他活性物质的测定	232
实验一三〇	放射免疫法测定 β -内啡肽	232
实验一三一	放射免疫法测定血浆P物质	233
实验一三二	HPLC法测定脑脊液 γ -氨基丁酸	234
实验一三三	血清一氧化氮测定	235
附录一	临床化学诊断试剂盒的研制及临床用户评价	239
附录二	生化自动分析仪参数表	251

第一章 光谱技术

光是一种电磁波，它的波长可用纳米（nm）为单位来表示。人的眼睛所能感觉到的波长约由400nm的紫色到760nm的红色，在这段波长范围以外的光就不能看见，故400~760nm之间的光波称为可见光。短于400nm的为紫外线，短于200nm为远紫外线。长于760nm的为红外线，红外线最长可达5mm。

溶液所呈现的颜色是该溶液吸收光谱中透过最多、吸收最少的那部分波长光线的颜色；暗带部分则是该溶液透过最少、吸收最多的那部分波长的光线。

光谱分析法是利用各种物质所具有发射、吸收或散射的特征而建立起来的分析法。发射光谱法是根据物质受到热能或电能等的激发后所发射出的特征光谱线来进行定性及定量分析的一种方法；吸收光谱分析法是根据溶液能吸收由光源发出的某些波长的光所成的光谱，利用这种光谱可鉴定物质的性质和含量的一种方法；散射光谱分析法是测定光线通过溶液混悬颗粒后的光吸收或光散射程度的一种定性或定量分析法。

本章介绍应用吸收光谱原理进行分析的可见及紫外分光光度法、原子吸收分光光度法，以及应用发射光谱原理进行分析的荧光光度法。

实验一 紫外分光光度法测定血清蛋白质

蛋白质定量测定一般利用蛋白质的结构或性质进行，如：①重复的肽键结构；②酪氨酸和色氨酸残基对Folin-ciocateu（酚）试剂反应或紫外吸收；③与色素结合的能力；④沉淀后借浊度或光折射测定。以上这些原理不但适合于总蛋白测定，也可用于分离出来的蛋白质组分的测定。本实验介绍紫外吸收方法。

（一）原理 由于蛋白质中存在着含有共轭双键的酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸，因此蛋白质在270~290nm波长具有吸收紫外光的性质，其中酪氨酸的 λ_{\max} 为275nm，色氨酸的 λ_{\max} 为280nm，苯丙氨酸的 λ_{\max} 为257nm，在此波长范围内，蛋白质溶液的吸收值与其浓度成正比，可作定量测定。由于生物样品中常混有核酸，核酸对紫外光也有吸收，但其峰值在260nm附近，因此可用下列经验公式计算蛋白质浓度。

Lowry-Kalckar公式：

$$\text{蛋白质浓度 (g/L)} = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

Warburg-Christian公式：

$$\text{蛋白质浓度 (g/L)} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$$

将280nm的吸光度与260nm的吸光度各乘以系数相减后即为接近的蛋白质浓度。 A_{280} 与 A_{260} 分别代表光径为1cm时对280nm和260nm的吸光度。

由于蛋白质中肽键的存在，使其在200~225nm远紫外区波长也有光吸收，因此，蛋白质浓度在一定范围内，可用 A_{215} 、 A_{225} 值按下述公式测定。

Waddell经验公式：

$$\text{蛋白质浓度 (g/L)} = 144 \times (A_{215} - A_{225})$$

由于血清中不同类型蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量不同，所以测定270~290nm波

段紫外吸收也会因每个样品中蛋白质氨基酸组成的差异而有较大的变异，因而这个方法不能直接用于血清总蛋白的准确定量。而在远紫外区（200~225nm）的光吸收主要由肽键所致，各种蛋白质具有相同的吸收系数，蛋白质浓度在 120g/L 仍符合 Beer 定律，因而 Ressler 等人建立起 210nm 波长下测定血清总蛋白的实用方法，其准确性与双缩脲法和 Kjeldahl 法有较好的可比性。

(二) 试剂 0.15mol/L NaCl 溶液 精确称取 NaCl 8.766g 溶于 1000ml 容量瓶中，用蒸馏水定容。

(三) 操作步骤

1. Lowry-Kalckar 公式法或 Warburg-Christian 公式法 用 0.15mol/L NaCl 溶液将血清作 100 倍稀释，选用光径为 1cm 的石英比色杯，分别在 280nm 和 260nm 波长两处测定溶液的吸光度 (A)，根据 Lowry-Kalckar 公式或 Warburg-Christian 公式计算此溶液的蛋白质浓度，再乘以稀释倍数 100 得到血清蛋白质的真实浓度。

2. Waddell 公式法 用 0.15mol/L NaCl 溶液将血清作 1 000 倍稀释，选用光径为 1cm 的石英比色杯，分别在 215nm 和 225nm 波长两处测定溶液的吸光度 (A)，根据 Waddell 公式计算此溶液的蛋白质浓度，再乘以稀释倍数 1 000 得到血清蛋白质的真实浓度。

(四) 注意事项

1. 270~290nm 紫外法对测定蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质溶液，有一定的误差。
2. 本法需用高质量石英比色杯。
3. 紫外分光光度计使用前需对其波长进行校正。
4. 样液的蛋白质浓度控制在 15~25g/L 范围内。
5. 注意溶液 pH 值，这是由于蛋白质的紫外吸收峰会随 pH 的改变而变化。
6. 受非蛋白质因素的干扰严重，除核酸外，游离的色氨酸、酪氨酸、尿酸、核苷酸、嘌呤、嘧啶和胆红素等均有干扰。

实验二 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱分析

(一) 原理 血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 溶液在空气中充分接触氧气而成氧合血红蛋白 (oxyhemoglobin, HbO₂)。Hb 溶液中通入一氧化碳 (CO)，Hb 与 CO 结合而成碳氧血红蛋白 (carboxyhemoglobin, COHb)，CO 结合在 Hb 中的亚铁原子上，COHb 呈樱桃红色，它的吸收光谱同 HbO₂ 非常接近。高铁氰化钾 [K₃Fe (CN)₆] 在酸性或中性环境中，可使 Hb 中的亚铁离子失去一个电子，氧化成高铁离子而成为棕色的高铁血红蛋白 (methemoglobin, MHb)。由于这些物质的组成成分不同，其分子结构也不同，故具有各自的吸收光谱可资鉴别，其吸收光谱特征归纳于表 1-1。

利用分光光度计测定不同波长的光线通过溶液时的吸光度，以波长为横坐标，相应的吸光度为纵坐标，绘制吸收光谱曲线。

(二) 试剂

1. 100g/L 高铁氰化钾溶液 称取高铁氰化钾 1g 置 10ml 容量瓶中，用蒸馏水定容，临用前配制。

表 1-1 血红蛋白及衍生物吸收光谱波长

	吸收峰数	吸收峰波长 (nm)			
HbO ₂	2	578	540		
COHb	2	572	535		
MHb (pH6.4)	4	630	578	540	500

2. 0.15mol/L NaCl 溶液 精确称取 NaCl 8.766g 溶于 1 000ml 容量瓶中, 用蒸馏水定容。

(三) 操作步骤

1. Hb 溶液的制备 静脉采血 4~5ml, 置于抗凝管中, 各种抗凝剂均可使用, 离心分离血浆, 吸去血浆, 用生理盐水将压积红细胞约作 10 倍稀释洗涤, 混和, 离心, 吸出上清液, 如此洗涤 3~4 次, 除去血浆蛋白质。将洗过的压积红细胞一份, 加蒸馏水一份和氯仿半份, 加塞, 猛力振摇约 5min, 离心沉淀, 除去细胞膜等残渣, 分离 Hb 溶液。Hb 溶液分离后, 测定其含量并调节至 100g/L。

2. 样品的制备

(1) HbO₂ 溶液: 取 Hb 溶液 4 滴, 加蒸馏水 5ml。

(2) COHb 溶液: 取 Hb 溶液 3 滴, 加蒸馏水 5ml, 再加辛醇 1 滴, 摇匀, 用滴管通入 CO 2~3min 呈樱桃红色。

(3) MHb 溶液: 取 Hb 溶液 3 滴, 加蒸馏水 5ml, 加新鲜配制的 100g/L 高铁氰化钾 3 滴, 混匀, 呈棕色, 尽可能快比色。

3. 测定 分别取上述溶液 3ml 盛于比色杯内, 以蒸馏水作空白, 在波长 470~650nm 范围内, 每隔 20nm 测吸光度一次, 在接近吸收高峰时, 每隔 2nm 测吸光度一次。每测一次波长, 必须重新校正零点, 再测吸光度。以入射光波长为横坐标, 各相应的吸光度为纵坐标, 分别绘出各物质的吸收光谱曲线。

(四) 注意事项

1. 必须对所用的分光光度计进行波长校正。
2. 高铁氰化钾临用前配制, 贮存于棕色瓶中。
3. 如果没有 CO 发生器, 可用煤气替代。

实验三 荧光光度法测定核黄素的含量

(一) 原理 荧光的产生是物质受光激发后由基态转变为激发态, 此过程中有能量(包括光能)的吸收。由激发态返回基态时释放出能量, 如果是光能, 即为发射光。其间吸收的能量必须大于发射的能量, 所以在荧光分析时, 必须有激发光源, 而检测时是测量发射光强度, 而非光吸收强度。有人将荧光计的读数也称为吸光度, 这完全是一种误解。

物质浓度 C 和荧光强度 F 之间定量关系用下式表示:

$$F = \Phi_f I_0 \epsilon bc = KC$$

式中 Φ_f 为待测物质的荧光效率, I_0 为激发光强度, ϵ 为激发波长处的摩尔吸光系数, b 为光径(即溶液厚度), c 为物质浓度, 式中 Φ_f 、 I_0 、 ϵ 、 b 都可以是常数用 K 表示。此

式是分子荧光光谱法的定量基础，但上式只有浓度 C 很低时才能成立，即 C 低时才与 F 呈线性关系，荧光分析法的灵敏度常较比色法大 1 000 倍。荧光分析法与比色法不同，是测定发射光强度，受众多因素影响，所测指标是相对荧光强度，必须同时进行标准物的测定。

核黄素在 440~500nm 波长激发下产生黄绿色的荧光。这种荧光的强弱与核黄素的含量在一定范围内呈正比关系。测定时先用硅镁吸附剂 (florisil) 将核黄素吸附以除去杂质，然后对洗脱液中被纯化的核黄素进行荧光测定。

(二) 试剂

1. 核黄素标准贮存液 (0.133 μ mol/L) 称取核黄素结晶粉 50mg，加蒸馏水约 500ml 及冰醋酸 1.2ml 溶解，于温水浴中助溶，冷却至室温后用蒸馏水定容至 1 000ml。配制好的标准液贮存于棕色瓶内，加少许甲苯置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，可使用数月。

2. 核黄素标准应用液 (0.0013 μ mol/L) 取贮存液 1.0ml 注入 100ml 棕色容量瓶中，用 0.01mol/L 盐酸定容。配制好的应用液贮存于棕色瓶内，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，可稳定 3 天。

3. 荧光素钠贮存液 (0.1g/L) 称取荧光素钠 50mg，用蒸馏水溶解并定容至 500ml，置 4 $^{\circ}$ C 可稳定 6 个月。

4. 荧光素钠应用液 (0.05mg/L) 取荧光素钠贮存液 0.5ml，以蒸馏水定容至 100ml，于 4 $^{\circ}$ C 保存，可稳定 2~3 个月。

5. 洗脱液 按体积之比，将 5 份丙酮，2 份冰醋酸和 9 份蒸馏水混合在一起。

6. 硅镁吸附剂 (60~100 目)。

(三) 操作步骤

1. 收集 24h 尿液 用 10% 硫酸约 20ml 防腐并作保护剂，样品需避光保存，操作时亦需注意避光。

2. 装柱 柱底用少量玻璃棉阻住后，柱内加入少量蒸馏水，接着将事先用蒸馏水混合的硅镁吸附剂装入柱中，约 1/2 长度即可，流速约为 60 滴/min 为宜。

3. 加样 视尿液中核黄素含量取 2、5 或 10ml 入吸附管中，待尿样完全通过柱后，用热蒸馏水 20ml 洗柱。作标准管及空白管：标准管取 0.0013 μ mol/L 核黄素应用液 1ml 代替尿液过柱。空白管则以热蒸馏水 20ml 过柱。

4. 洗脱 各管先加洗脱液 5ml，待全部流出后，再加蒸馏水 5ml，均分别收集于 10ml 带塞刻度试管中，然后以蒸馏水补足至 10ml 刻度，混匀。

5. 荧光测定 用激发波长 440~500nm 和发射波长 560nm 检测。先以荧光素钠应用液校正荧光计固定在某一定读数 (一般在 50~80)，然后读取空白管、测定管和标准管读数，每次读数时都应先用荧光素钠应用液校正荧光计。

(四) 计算 若荧光计线性良好，则可按下列公式计算 24 小时尿中核黄素含量：

$$\text{尿中核黄素} (\mu\text{mol}/24\text{h 尿}) = \frac{\text{标本荧光} - \text{空白荧光}}{\text{标准荧光} - \text{空白荧光}} \times 0.0013 \times \frac{24\text{h 尿量}}{\text{实际用尿量}}$$

(五) 正常参考值 见表 1-2。

(六) 注意事项

1. 荧光分析法灵敏度远远高于分光光度法，故对溶剂的纯度及玻璃仪器、样品池

的洁净程度要求均较高。蒸馏水应用重蒸馏水。

表 1-2 尿中核黄素排出量

	年龄	缺乏	不足	正常	充裕
$\mu\text{mol}/24\text{h}$	成人	<0.108	$0.108\sim0.321$	≥ 0.324	
$\mu\text{mol}/6\text{h}$	成人	<0.027	$0.027\sim0.078$	≥ 0.081	
$\mu\text{mol}/4\text{h}$	成人	<1.08	$1.08\sim2.157$	$2.16\sim3.12$	≥ 3.12

2. 测定溶液不宜长时间受光照射，以免荧光强度降低。实验中应严格遵循平行操作的原则。

(七) 临床意义 成年人每日核黄素排出量降低见于：摄入不足，吸收障碍，核黄素活化障碍，肠内细菌合成减少。在作核黄素负荷实验时，口服核黄素 3~5mg，24h 内至少排出 20%，否则亦提示核黄素缺乏症。核黄素排出量升高多见于过量服用核黄素。

实验四 原子吸收分光光度法测定血浆锌的含量

锌是人体重要的必需微量元素之一，其检测方法有：双硫脲比色法，这是早期使用的方法，操作费时且特异性较低。1963 年 Seafie 采用加酸消化锌离子与双硫脲络合滴定的终点比色法，方法简便，但其准确度尚难肯定。Mahanand 等推荐加入阿拉伯树胶使锌-羟基喹啉复合物稳定在激发波长 375nm，发射波长 517nm 下有强荧光的锌-羟基喹啉的荧光光度法，常因设备的限制亦未能推广。相当一个时期，锌的阳极溶出伏安法国内有不少文献报道，此法利用在电极上的锌溶出后，测定所产生的阳极电流，但样品的前处理给测定工作带来了复杂化。中子活化法根据中子轰击后， ^{68}Zn 转变为不稳定的 ^{69}Zn ， ^{69}Zn 随之发射 γ 射线而衰变，在 0.439MeV 计数，此法只在专门研究中心采用的权威性的方法。目前推荐的火焰或无火焰原子吸收分光光度法，是较好测定锌的方法。它与紫外吸收分光光度法的主要区别在于前者测量的是气态中基态原子对光吸收的强弱，而后者测量的是溶液中分子对光吸收的强弱。

(一) 原理 在使用锐线光源和稀溶液的情况下，基态原子蒸气对共振线的吸收符合 Beer 定律：

$$A = \lg(I_0/I) = KLN_0$$

式中 A 为吸光度， I_0 为入射光强度，I 为经原子蒸气吸收后的投射光强度，K 为吸收系数，L 为辐射光所穿过的原子蒸气的长度， N_0 为基态原子密度。

在锌原子蒸气中，待测锌元素的基态原子数与它对 213.9nm 波长的能量吸收成正比。在血浆锌被原子化、火焰的绝对温度低于 3 000K 时，可以认为锌原子蒸气中锌基态原子的数目实际上接近或等于锌原子总数，在固定的实验条件下，锌原子总数与血浆锌浓度 (C) 的比例是一定的。因此，上式可写成：

$$A = KC$$

这是原子吸收分光光度法进行血浆锌定量分析的基本公式。

实验中使用火焰法，将血浆锌原子化，采用校正曲线定量。

(二) 试剂

1. 锌标准贮存液 (15.3mmol/L) 取浓硝酸 10ml 加入到去离子水 50ml 中。精确称取纯锌粉 1.000g 溶于此溶液中, 待溶解后, 用去离子水定容至 1 000 ml。室温稳定 1 年。

2. 锌标准中间液 (153 μ mol/L) 取锌标准贮存液 1.0ml 加入 100ml 容量瓶内, 用去离子水定容。临用前配制。

3. 锌标准应用液 (3.82、7.65、15.3、30.6 μ mol/L) 分别在 4 个 100ml 容量瓶中加入锌标准中间液 2.5、5、10、20ml, 并用去离子水定容, 临用前配制。

4. 1.53mol/L 三氯乙酸 称取三氯乙酸 25g 溶于去离子水中, 稀释至 100ml, 室温稳定 1 年。

(三) 操作步骤

1. 仪器的分析参数 波长 213.9nm; 锌空心阴极灯工作电流 15mA; 狭缝 0.1mm; 火焰为空气/乙炔, 富燃; 气流量, 空转子流量计 55m 单位; 乙炔转子流量计 30m 单位; 燃烧器, 带预混合喷雾器, 有一个 10.16cm 狭缝; 记录范围 10mV。原子吸收分光光度计的具体操作, 视所用仪器的型号而定。

2. 仪器操作

(1) 打开电源开关。

(2) 装上锌空心阴极灯, 调节灯的位置, 使灯的最亮斑点聚焦在狭缝上, 并预热 30min。

(3) 将狭缝宽度、燃烧器高度、灯电流及波长鼓轮读数旋至所选定的条件。

(4) 接通空气压缩机、乙炔钢瓶, 按规定条件调节其流量, 并在燃烧器上方点火, 预热 5min (注意: 先开空气, 后开乙炔, 再点火)。

(5) 用蒸馏水作空白溶液喷雾 2~3min, 调节透光度至 100%。

(6) 样品测完后, 用蒸馏水喷雾 2~3min, 然后先关闭乙炔, 再关空气源开关, 切断电源将各旋钮转至零位。

3. 各取去离子水 1ml, 标准应用液, 对照和血浆 (尿) 加入到标明试管中。

4. 在各试管中加入 1.53mol/L 三氯乙酸 9ml, 旋转混匀, 室温静置 10min。2 000r/min 离心 5min。

5. 用空白调零, 直到数值稳定。按选定的工作条件, 由稀到浓依次测定各标准应用液溶液的吸光度, 将吸光度对浓度作图, 得校正曲线。按同样条件进行测定血浆 (尿) 上清液。然后在校正曲线上查出锌的含量。

(四) 参考值

血浆锌 10~17.6 μ mol/L。

尿锌 2.3~18.3 μ mol/L。

脑脊液锌 0.11~0.17 μ mol/L。

(五) 注意事项

1. 关机时要先关乙炔后关空气, 并检查乙炔钢瓶总开关关闭后压力表指针是否回到零, 否则表示未关紧。

2. 在进行喷雾时, 要保证助燃气和燃气压力不变, 否则影响吸收值的准确性。

3. 控制从样品采集到测定各个环节中锌的污染, 甚至是空气污染, 所有的容器、

注射器、用具均须经过稀硝酸浸泡和去离子水清洗。

4. 橡胶制品含锌较高，故标本不可用橡皮塞，容量瓶不可用橡皮筋栓系，去离子水不可用橡皮管引流。如用橡皮吸球取试剂时，吸管口要塞以棉花，临床广泛用的胶布含氧化锌，要严防接触。

5. 测定锌的血标本最好用空腹血，由于红细胞含锌比血浆高5倍，故取血后立即分离血浆。血凝固时，锌可从血小板释放，致使测定结果偏高。故此血浆锌的测定结果比血清更可靠。

(六) 临床意义

1. 血浆锌增高 主要见于工业污染引起的急性锌中毒。也见于创伤、溶血性贫血、红细胞增多症、嗜酸性粒细胞增多症和甲状腺功能亢进等疾病。

2. 血浆锌降低 常见于酒精中毒等肝硬化、原发性肝癌、慢性活动性肝炎、胃肠吸收障碍、慢性肾病以及其他慢性消耗性疾病。亦见于镰形细胞贫血、心肌梗死等患者。血浆锌降低，可出现生长迟缓，男性生殖功能低下，食欲减退，昏睡，伤口愈合迟缓等临床表现。严重缺锌时可导致腹泻、脱发、神志紊乱及反复感染等现象。

3. 铜/锌比值 一般为 1.09 ± 0.36 。除慢性迁延性肝炎外，各型肝炎都明显高于参考值，某些肿瘤、糖尿病、皮肤病、肺心病患者的血清铜/锌比值都高于参考值。冠心病铜/锌比值降低。

(倪培华 杨伟宗)

第二章 层析技术

实验五 离子交换柱层析法分离混合氨基酸

(一) 原理 分离氨基酸常用聚乙烯强酸型阳离子交换树脂，它含有带负电荷的磺酸基团，能够与带正电荷的阳离子发生可逆的离子交换反应。当混合氨基酸样品溶液为酸性时，氨基酸主要以阳离子形式存在，上柱后与树脂上的钠离子发生交换而与树脂“结合”，由于氨基酸彼此等电点不同，与树脂的亲合力不同，可选择适当 pH 和离子强度的缓冲液将它们依次洗脱，酸性较大的氨基酸先被洗脱下来，接着是中性氨基酸，最后是碱性氨基酸。

本实验是分离谷氨酸 ($pI = 3.22$)、苯丙氨酸 ($pI = 5.48$) 及赖氨酸 ($pI = 9.74$) 的混合样品，采取 $pH = 5.28$ 的柠檬酸缓冲溶液为洗脱液。在 $pH = 5.28$ 时，谷氨酸带负电荷，不与树脂结合，首先被洗脱出来；赖氨酸带正电荷，与树脂结合较紧，洗脱最慢；苯丙氨酸带正电荷较弱，与树脂的结合力介于前二者之间，所以在前二者之中洗脱出来。洗脱液用茚三酮- $TiCl_3$ 液进行比色测定。

(二) 试剂

1. 树脂 Zerolit 225 型 (相当于国产强酸 732 型树脂) 阳离子交换树脂，浮选流速为 $480\text{ml}/\text{min}$ 。

2. 洗脱液 $pH 5.28$ 柠檬酸缓冲液。

柠檬酸 ($C_6O_7H_8 \cdot H_2O$)	28.5g
NaOH	18.6g
HCl ($12\text{mol}/\text{L}$)	10.5ml
用蒸馏水稀释到 $1\ 000\text{ml}$ 。	

3. 样品液 精确称取谷氨酸 14.70mg ，苯丙氨酸 16.50mg ，赖氨酸 14.60mg ，溶于 $0.2\text{mol}/\text{L}$ HCl 10.0ml 中，充分溶解，混匀后其浓度为 $5\text{mmol}/\text{L}$ 的混合液，冰箱保存。

4. 60% 乙醇溶液。

5. 显色液 1% 茚三酮- $TiCl_3$ 溶液。

(1) 称取无水醋酸钠 48.9g 及柠檬酸 0.6g ，溶于蒸馏水 11ml 中，再加冰醋酸 19ml ，然后用蒸馏水稀释至 150ml ，用柠檬酸钠调 pH 至 5.5 。

(2) 称取茚三酮 10g ，溶于乙二醇 350ml 中，加三氯化钛 3.7ml ，通 N_2 混匀，存冰箱中。

(三) 操作步骤

1. 树脂的处理 对于市售干树脂，先经水充分溶胀后，经浮选得到颗粒大小适合的树脂，然后加 3 倍量的 $2\text{mol}/\text{L}$ HCl 溶液，在水浴中不断搅拌加热到 80°C ， 30min 后自水浴中取出，倾去酸液，用蒸馏水洗至中性，然后用 $2\text{mol}/\text{L}$ NaOH 溶液，同上洗树脂 30min 后，用蒸馏水洗至中性，这样用酸碱反复轮洗，直到溶液无黄色为止。以