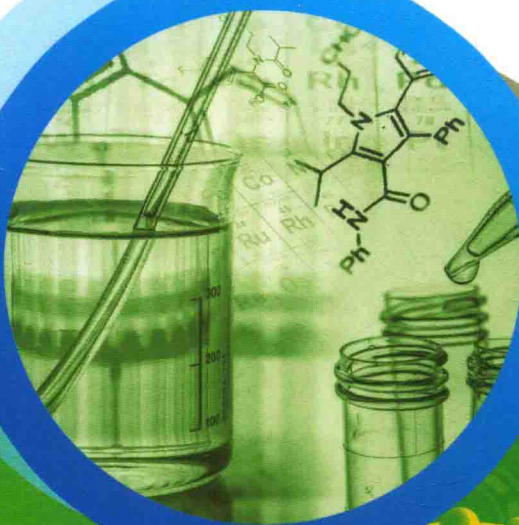


◎供基础、临床、口腔、药学、预防、中医、护理等医学专业用

医学生物化学 实验教程

主 编：郑红花 张云武
副主编：宋 刚 张 弦
黄小花 李东辉



厦门大学出版社
XIAMEN UNIVERSITY PRESS

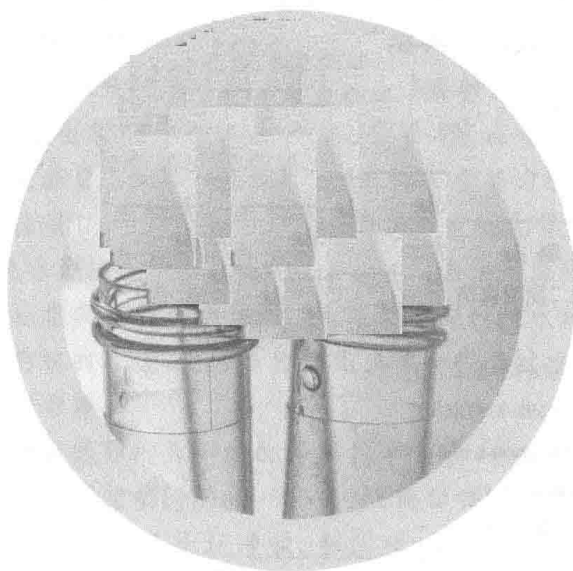
国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

YIXUE SHENGWUHUAXUE SHIYAN JIAOCHENG

医学生物化学 实验教程

主 编：郑红花 张云武

副主编：宋 刚 张 弦 黄小花 李东辉



厦门大学出版社 国家一级出版社
XIAMEN UNIVERSITY PRESS 全国百佳图书出版单位

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学实验教程 / 郑红花, 张云武主编. — 厦门 : 厦门大学出版社, 2018. 8
ISBN 978-7-5615-6894-1

I. ①医… II. ①郑… ②张… III. ①医用化学—生物化学—实验—教材
IV. ①Q5—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 060550 号

出 版 人 郑文礼
责任编辑 陆 蔚 黄雅君
封面设计 蒋卓群
技术编辑 许克华

出版发行 厦门大学出版社
社 址 厦门市软件园二期望海路 39 号
邮政编码 361008
总 编 办 0592-2182177 0592-2181406(传真)
营销中心 0592-2184458 0592-2181365
网 址 <http://www.xmupress.com>
邮 箱 xmup@xmupress.com
印 刷 虎彩印艺股份有限公司

开本 787 mm×1 092 mm 1/16
印张 11
字数 296 千字
版次 2018 年 8 月第 1 版
印次 2018 年 8 月第 1 次印刷
定价 28.00 元

本书如有印装质量问题请直接寄承印厂调换



厦门大学出版社
微信二维码



厦门大学出版社
微博二维码

前 言

医学生物化学实验是一门实践性非常强的课程,是生命科学最重要、最活跃的分支之一,可以帮助我们从分子水平探讨人体生命现象的本质,揭示生命的奥秘。它是重要的医学专业基础课程,与其他医学课程有着广泛而密切的联系。实验课程目的的一方面在于让学生系统地学习、掌握生物化学实验的基础理论知识和基本技术手段,培养学生的动手能力、科研意识和科研能力,启迪其创新思维;另一方面在于培养学生灵活运用生物化学知识在分子水平上探讨病因、阐明发病机理及制定疾病防治措施的能力,即能够测定常规临床生化项目,并能分析其对临床疾病的诊断意义,为后期临床专业课的学习及医学诊疗技术的操作奠定良好的基础。

长期以来,各医学院校根据各自的实验条件及教学特点,均拥有自己单独的实验教材。厦门大学医学院于1996年成立以来就设立了临床医学、药学等医学及相关专业课程,一直未曾有自己正式出版的医学生物化学实验教材。因此,我们通过认真研究,制定了一套有厦门大学“研究型大学”特色的、针对性强的基础医学生物化学实验教学体系。本教材突出医学院校本科生学习生物化学的特点,特别是其以临床案例教学为基础的实验课程体系,旨在提高学生对生物化学实验课程的学习兴趣,将基础教学实验课程与理论课程紧密联系在一起,使他们真正领悟到基础生物化学知识对临床学习及临床应用的重要性。

按照复合型人才的培养目标,本教材同时注重学生综合能力和团队协作精神的培养,在内容形式上设计不同实验项目。学生在学习掌握基本的生物化学实验技术的同时,必须学会团队合作、彼此密切配合才能完成整个实验项目,从而由浅入深地学习了解生物化学最新实验技术。本教材在综合类实验项目中采取传统技术与现代技术的结合、多方验证、正反比较等原则进行实验设计内容的改进,由学生协作完成整个实验过程,在此过程中实现学生综合能力和团队协作精神的培养。

参与本教材编写的所有教师均为一线的科研教学人员,具有多年丰富的教学经验。本书的出版由福建省教育厅教研经费(JZ160069)资助,同时得到了厦门大学医学院各级领导的大力支持,还得到了2016级本科生庄净斌、郝玥美、吴一平、王雨燕等同学的帮助以及2017级硕士研究生程宝映、陈颖闽和2018级硕士研究生李欣等同学的大力帮助,在此一并致谢。

我们虽尽力避免,但由于编者水平有限,书中错误在所难免,恳请各位专家读者和同学们批评指正,提出宝贵意见。

郑红花

2018年3月1日于厦门

目 录

第一章 概 述.....	1
第一节 医学生物化学实验课的目的和任务.....	1
第二节 医学生物化学实验室基本要求.....	2
第三节 实验记录及实验报告.....	5
第二章 医学生物化学基本实验技术.....	7
第一节 分光光度技术.....	7
第二节 离心技术	18
第三节 层析技术	22
第四节 电泳技术	33
第三章 医学生物化学实验项目	44
第一节 生物大分子的提取、分离和测定.....	44
实验一 动物组织 DNA 的提取、分离和定量测定	44
实验二 酵母 RNA 的提取、分离和定量测定	48
实验三 肝糖原的提取和鉴定	51
实验四 肝组织总蛋白的提取和鉴定	53
实验五 血红蛋白的提取和分离	57
实验六 凝胶过滤层析纯化血红蛋白	59
实验七 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离血红蛋白	64
实验八 血红蛋白与高铁血红蛋白分子吸收光谱的绘制与比较	68
第二节 酶动力学测定	70
实验一 影响酶活性的因素	70
实验二 碱性磷酸酶米氏常数测定	75
实验三 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	79
实验四 乳酸脱氢酶同工酶的制备及活性测定	81

实验五	等电聚焦电泳技术分离乳酸脱氢酶同工酶	84
实验六	血清丙氨酸氨基转移酶活力测定	88
第三节	血液及肝胆生化检验	91
实验一	胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	91
实验二	糖化血红蛋白的测定	95
实验三	血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	99
实验四	酶法测定血清中的甘油三酯	103
实验五	酶法测定血清中的总胆固醇	108
实验六	动脉硬化指数的计算(血清总胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的测定)	111
实验七	血清过氧化脂质的测定	116
实验八	血清尿素的测定——二乙酰一脒法	120
实验九	血清肌酐测定	122
实验十	改良 J-G 法测定血清总胆红素和结合胆红素	125
实验十一	酮体代谢的检测	129
实验十二	血清总蛋白、白蛋白、球蛋白及白/球比值测定	132
第四节	维生素、无机物和肿瘤标记物检测	137
实验一	2,4-二硝基苯胍比色法——测定血清或尿液维生素 C	137
实验二	甲基百里香酚蓝比色法——测定血清钙	139
实验三	亚铁嗉法——测定血清铁与总铁结合力	142
实验四	四苯硼钠直接比浊法测定血清钾离子浓度	146
实验五	肿瘤相关抗原 CA125 定量测定(化学发光法)	148
实验六	血清甲胎蛋白(AFP)的测定	151
附 录		155
一、实验样品的制备		155
二、实验动物的处理		156
三、实验室常用试剂、缓冲液及其配制		157
参考文献		169

第一章 概 述

第一节 医学生物化学实验课的目的和任务

医学生物化学是在分子水平上研究生命的科学,所阐述的是人体的化学物质组成、物质代谢及其调控过程以及代谢异常等情况与疾病发生之间的关系等内容。该学科的快速发 展在很大程度上得益于一系列实验技术的创新和仪器设备的发明,如分光光度技术、离心技术、电泳技术、层析技术等,这些技术本身构成了生物化学的重要内容。医学生物化学实验技术(experimental techniques of biochemistry)以生物体系中的分子、离子、亚分子(自由基)为研究对象,通过各种实验手段对其理化性质、组成结构、功能活性以及在生命活动中的作用进行研究。作为一门基础医学实践性课程,医学生物化学的实验技术和方法有其不同于一般生物化学的独有特点,它强调了其作为重要的医学基础课程对医学临床实践的指导意义。医学生物化学实验教学是学生实验技能与创新素质培养不可缺少的一个重要环节,是帮助学生掌握基本实验技能、提高学生独立思考和分析能力的重要手段,是培养学生严谨科研作风和良好科研思维的重要途径,同时也是他们理解临床知识的重要基础。通过对本课程的学习,使他们能够具备一定的科研能力和养成良好的科研素质,使他们能够运用生物化学理论和技术手段,更深刻地理解临床上神经系统疾病、恶性肿瘤疾病、心血管疾病等多种疾病发生的生化机制,并将其用于疾病的诊断、治疗和预防。

(郑红花)



第二节 医学生物化学实验室基本要求

实验室是学生进行技能训练,开展科技活动的重要场所。为保证实验教学安全有序地进行,特制定本实验室规则与基本要求,这是每一位进入实验室的教师和学生均必须遵守的规定。

一、实验室纪律

- (1)每位进入实验室的学生均应穿工作服,扣好扣子。
- (2)每位学生应该自觉地遵守课堂纪律,不迟到,不早退。
- (3)不穿露脚趾的鞋子进入实验室。
- (4)严禁在实验室披头散发。
- (5)自觉维护课堂秩序,保持室内安静,不高声交谈,以免影响他人。
- (6)严禁在实验室嬉戏、打闹。
- (7)不带食物或饮料进实验室。
- (8)不玩手机,不做任何与实验无关的事情。
- (9)禁止做实验时穿高跟鞋。
- (10)及时上交实验报告。

二、严守规范

实验课前应认真预习,将实验名称、目的和要求、原理、实验内容、操作方法和步骤等详细地写在记录本中。实验过程中要认真听讲,听从教师指导,严格按操作规程进行实验。实验过程中应简要、及时准确地将实验观察到的现象、实验结果或数据记录在实验记录本上。同时要认真写好实验报告,不得抄袭或臆造,及时上交,养成良好的科研工作作风。

实验过程中及实验完毕后,严禁乱倒乱扔实验残余的化学试剂或样品,不可把滤纸、胶等固体或半固体物质倒进水槽内;剩余试剂,特别是强酸强碱等腐蚀性或挥发性液体倒入指定容器中集中处理;生物样品如血液,动物尸体等放置于指定地点集中处理。

实验结束后经教师检查同意,方可离开实验室。

三、保持实验台面整洁有序

保持环境整洁和仪器的整齐清洁是做好实验的重要条件,也是每个实验者必须养成的良好的工作习惯。实验室地面、实验台面和试剂药品架都必须保持整洁,严禁随地吐痰、乱抛纸屑杂物等;要有序放置仪器药品,不随意搬动实验仪器设备、器皿、药品等;不要把试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕需将仪器洗净收好,药品试剂按原位摆放整齐,及时清点所有物品用具。离开实验室前,要把实验台面和地面抹擦干净,桌椅摆放整齐,确保实验室整齐清洁后才能离开。

四、节约试剂,杜绝浪费

- (1)使用药品试剂必须注意节约,杜绝浪费,要特别注意保持药品和试剂的纯净,药品用

后须立即将瓶盖塞紧放回原处,从试剂瓶中取出的试剂,标准溶液等,如未用尽切勿倒回瓶内,避免混杂与污染。

(2)任何装有化学药品的容器都必须贴上标签,注明其名称、浓度、配制者及配制时间。

(3)在使用任何化学药品前,一定要熟知该化学药品之性质。

(4)在使用特殊化学药品时,应佩戴必要的个人防护具,如防护服、防护手套等。使用时务必仔细小心。

(5)在使用特殊化学试剂(如危险品或致癌试剂等)时,一定要严格按照老师的要求,做好防护工作。

五、爱护仪器,遵守规程

各种仪器用具均应注意爱护,细心使用,防止损坏,使用分析天平,分光光度计和离心机、电泳仪等贵重精密仪器,要严格遵守操作规程,发现故障应立即报告教师,不要自己动手检修,要爱护公共财产。若因违反操作规程或不听从教师指导而造成损坏,应给予一定赔偿。

六、注意安全,防患未然

为了有效地维护实验室安全,保证实验正常进行,要求:

(1)实验完毕要严格做到关闭火源。

(2)勿使乙醚、丙酮、醇类等易燃液体接近火焰,蒸发或加热此类液体时,必须在水浴上进行,切勿用明火直接加热。

(3)凡比水轻且不与水相混溶之物(如醚、苯、汽油等)着火时,应迅速用湿毛巾覆盖火焰,以隔绝空气使其熄灭,绝不能倒水于其上,以免火焰蔓延,对于易与水混溶之物(如乙醇、丙酮等)着火时,可用灭火器扑灭。

(4)有不少药品是有毒或有腐蚀性的,不可用手直接拿药品,不可将试剂瓶直接对准鼻子嗅闻,更不可品尝药品味道。吸取有毒试剂、强酸和强碱时,均应用洗耳球吸取,严禁用口吸吸管移取。

(5)离开实验室时,要关好水龙头,拉下电闸,锁好门窗,认真仔细地进行检查,严防发生安全事故。

(6)每次实验课由班长安排同学轮流值日,值日生要负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性工作。

七、意外发生,及时处理

(1)如实验过程中出现玻璃割伤、被实验动物咬伤等情况,要及时报告老师,进行消毒处理。严重者及时就医。

(2)发生可控制的火灾时,使用附近的灭火器,应注意灭火器的类型,按以下步骤进行操作:拉开环状保险栓;挤压杠杆;将喷嘴对准火苗底部喷射。

(3)若是衣服着火,可用湿布掩盖,以达到窒息火苗的目的;若是电线失火,应立即关闭电源后灭火。迅速向实验室负责人报告。

(4)当发生无法控制的火灾时,应立即通知实验室其他人员,撤离人员、重要物资等;离

开实验室时应关掉所有电源。立即拨打火警电话。

(5)当发生人身意外伤害时,需要立即送医,并报告实验室安全负责人。

(郑红花)

第三节 实验记录及实验报告

一、实验记录

(1)实验记录本应标上页数,写上记录日期,记录人,不得随意抹擦或涂改,写错时可以准确地划去重写,且必须签名。记录时必须使用钢笔或圆珠笔。

(2)准确详尽记录数据或现象。从实验课开始就应养成良好的科研习惯,即实验中观察到的现象、结果和数据,应该及时地直接记在记录本上,绝对不可以用单片纸做记录或草稿、原始记录必须准确、详尽、清楚。

(3)如实记录所有数据或现象。严禁篡改实验数据!!!篡改实验数据是严重的学术不端行为,要坚决杜绝。记录时,应做到正确记录实验结果,切忌夹杂主观因素,这一点十分重要。在实验条件下观察到的现象,应如实仔细地记录下来。在定量实验中观测到的数据,如物质的质量、滴定管的读数、光电比色计或分光光度计的读数等,都应设计一定的表格准确记下正确的读数,并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如,吸光度为0.010,不应写成0.01。实验记录上的每一个数字,都反映了每一次的测量结果,所以,重复观测时即使数据完全相同也应如实记录下来。数据的计算也应该写在记录本的另一页上,一般写在正式记录左边的一页。总之,实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

(4)记录仪器使用情况。实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、准确的浓度等,都应记录清楚,以便总结实验进行校对和作为查找成败原因的参考依据。每个仪器使用者在仪器使用结束后都必须对仪器的使用情况与状态进行登记,并签名。

(5)如果发现对记录的实验结果有怀疑、遗漏、丢失等,都必须重做实验。因为,将不可靠的结果当作正确的记录,在实际工作中可能造成难以估计的损失,所以,在学习期间就应努力培养一丝不苟、严谨的科研作风。

二、实验报告

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告,实验报告的格式可供参考如下:

实验编号: _____ 实验名称: _____

实验日期: _____ 实验者及其成员: _____

(一)实验目的:写明本次实验课要达到的目的,为什么要做这个实验。

(二)实验原理:即本次实验的理论依据是什么。原理部分用自己理解的语言简述基本原理即可。

(三)实验材料、试剂和仪器:本次实验用到的实验原材料、特殊或常用的试剂,需要依靠哪些仪器才能完成。

(四)实验步骤:实验是如何实施的。可以采用工艺流程图的方式或自行设计的表格来表示(某些实验的操作方法可以和结果与讨论部分合并,自行设计各种表格综合书写),操作的关键环节必须写清楚。

(五)实验结果:包括观察到的实验现象,得到的实验结果。某些情况下需要将获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比,并尽量总结成各种图表,如原始数据及其处理的表格、标准曲线图(以及对比实验组与对照组实验结果的图表)等。

(六)讨论与分析:针对前述的实验结果得出什么样的结论,该结论说明什么问题。此部分主要涉及对实验的正常结果和异常现象(以及思考题)进行探讨,对实验设计的认识、体会和建议,对实验课遇到的问题(和思考题)进行探讨以及对实验的改进意见等,同时分析对临床疾病的诊断或治疗意义。

(郑红花)

第二章 医学生物化学基本实验技术

第一节 分光光度技术

一、分子光谱学基础知识

光谱学研究物质的吸收和辐射。最容易理解的光吸收现象是在可见光波段具有吸收能力的物质所显示出的颜色。例如,某物质的吸收发生在红色光谱区域,则该物质显示出蓝色。

光吸收强度和波长的测量是进行灵敏检测和建立定量分析方法的基础。吸收光谱是分子定量分析中最常用的一种方法,是许多元素定量测定的重要技术,也是生物化学中最常用的技术之一。

光是能量的一种形式,包含电和磁的性质,它可以被视为是由一连串的电磁波构成。

光可以用两种与光谱测量相关的方式定义。

(1) **波长(λ)**: 定义为连续两个电磁峰之间的距离,以米为单位进行测量,最常用的单位是纳米(nm, 即 10^{-9} m)。

(2) **频率(ν)**: 定义为 1 s 内连续经过同一点电磁峰的数目。

因此,两者之间的关系是:

$$\nu \propto \frac{1}{\lambda} \quad (2-1-1)$$

可见光区波长范围在 400~750 nm,较短的波长在光谱的蓝端,较长的波长在光谱的红端。波长在 200~400 nm 的为近紫外区,而波长在 750~2000 nm (2 μ m) 的范围为近红外区。

光的能量与频率直接相关,因此与波长成反比。它可以用下式计算:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2-1-2)$$

式中 h ——普朗克常数(6.626×10^{-34} J $\cdot$ s);

ν ——辐射频率;

λ ——光的波长;

c ——光速(3×10^8 m $\cdot$ s $^{-1}$)。

物质的光吸收包含能量的交换,为了理解这种交换的原理,有必要了解能量在一个原子或分子内的分布。

分子内部的能量至少来源于 3 个方面:

(1) 与电子相关的能量。

(2)与原子之间的振动相关的能量。

(3)与其他基团相邻的分子内的各种原子的转动相关的能量。

分子的上述能量水平可因分子对光的吸收而改变。分子从一个能级跃迁到另一个能级所需要的精确能量,由具有特定频率的光子提供,换言之,光被分子选择性地吸收。

研究分子所吸收光的波长(或频率)提供有关其“身份”的信息,称为定性光谱,最常见的形式就是以波长表示的吸收光谱。测量光的总量则给出产生光吸收的分子数量的信息,称为定量光谱。

对生物化学而言,基于分子的紫外和可见光区吸收的分子吸收光谱是定量生物化学领域令人十分感兴趣的技术手段。分子对光的吸收依赖于化合物的电子结构,在这一波长区域的光谱吸收促使电子从分子的成键轨道跃迁到能量较高的分子的反键轨道。

二、紫外-可见分光光度法原理

(一)概述

吸光光度法是基于物质对光的选择性吸收而建立的光谱学分析方法。其涉及的光谱区域包括近紫外区、可见光区和近红外区,所覆盖的波长区间分别为 200~400 nm、400~750 nm 和 750~2500 nm。

天然的和人工合成的物质中,许多具有颜色,如 CuSO_4 的水溶液是蓝色的,叶绿素溶液呈现绿色,而新提取的血红蛋白溶液为鲜红色等。具有颜色的物质其溶液的浓度改变时,溶液颜色的深浅也随之发生改变。溶液越浓,颜色越深;溶液越稀,颜色越浅。比色分析法就是通过比较溶液颜色的深浅来分析溶液中的有色物质,并确定其含量。

早期,人们在实验中观察到有色物质溶液的颜色随其浓度的提高而加深,继而发展出“目视比色法”。进一步的研究发现,溶液的颜色是由于有色物质对光的选择性吸收而产生的。采用滤光片进行分光并以光电池作为检测器可以定量测定溶液的浓度,即“光电比色法”。随着现代测试仪器、技术的发展,出现新一代的仪器——分光光度计,取代了比色计,分光光度法由此诞生。

纵观现代仪器分析技术的发展,紫外-可见分光光度法无疑是应用最广泛的仪器分析法之一。这一技术之所以得到了广泛的应用,是因为紫外-可见分光光度法具有以下特点:

首先,具有较高的灵敏度。分光光度法通常用于测定试样中含量在 0.001%~1% 的微量、半微量成分,测定 10^{-7} ~ 10^{-6} 浓度的痕量成分也很常见。

其次,具有较高的准确度。分光光度法测定的相对误差为 2%~5%,如采用更精密的科研级分光光度计进行分析、测量,其相对误差可进一步减少至 1%~2%。对于常量组分的测定,分光光度法的准确度不及重量法和滴定法,但对于微量组分的分析、测定已能完全满足实际工作的要求。因为微量组分含量低,标准试剂消耗太少,难以采用滴定法或重量法进行测定。一般而言,分光光度法适于微量或低含量成分的测定,不适于高含量组分的测定。不过,采取适当的方法学处理,如采用示差光度法,也可实现高含量组分的分析、测定。

再次,适用范围广。分光光度技术经过长期的发展,目前已经能够测定几乎所有的无机阴离子、阳离子,大量的有机化合物也经常直接或间接地使用吸光光度法进行定性、定量分析。

最后,分光光度法操作简便,易于掌握,仪器价格适中,技术普及性好。紫外-可见分光

光度法以其使用方便、准确、迅速等优点而成为在实际工作中应用最为普遍的分子光谱技术。在生产实践中,紫外-可见分光光度法广泛应用于农、林、牧、副、渔、医、药、环保、海洋、地矿、冶金、材料、物理、化工、钢铁等行业领域,成为工业实验室检测(监测)、质检(质控)必备的分析技术;在科学研究与科技开发领域,紫外-可见分光光度法是定性与定量分析、物性考察、机理研究、传感检测、结果效果评价等工作不可或缺的研究手段;在教育领域,紫外-可见分光光度法是教学尤其是实验教学最重要的实验手段和教学工具之一。

(二)分光光度法的基本原理

1. 吸收光谱的分类

光是一种电磁波,其按波长排列,可以得到表 2-1-1 所列的电磁波谱。

表 2-1-1 电磁波谱范围

光谱名称	波长范围	跃迁类型	分析方法
X 射线	$10^{-1} \sim 10 \text{ nm}$	K 和 L 层电子	X 射线光谱法
远紫外线	$10 \sim 200 \text{ nm}$	中层电子	真空紫外光度法
近紫外线	$200 \sim 400 \text{ nm}$	价电子	紫外光度法
可见线	$400 \sim 750 \text{ nm}$	价电子	比色及可见光度法
近红外线	$0.75 \sim 2.50 \text{ }\mu\text{m}$	分子振动	近红外光度法
中红外线	$2.5 \sim 5.0 \text{ }\mu\text{m}$	分子振动	中红外光度法
远红外线	$5.0 \sim 1000.0 \text{ }\mu\text{m}$	分子转动和低位振动	远红外光度法
微波	$0.1 \sim 100.0 \text{ }\mu\text{m}$	分子转动	微波光谱法
无线电波	$10 \sim 1000 \text{ nm}$		核磁共振光谱法

吸收光谱分为原子吸收光谱和分子吸收光谱。原子吸收光谱是由原子外层电子对某些波长的电磁波的选择性吸收引起的。相比而言,分子吸收光谱较为复杂。在分子的能级中,同一电子能级中包含多个振动能级,同一振动能级中又有多个转动能级。由电子能级间的跃迁所产生的光谱波长范围位于紫外或可见光区,这种由价电子跃迁而产生的分子光谱称为电子光谱。

电子能级发生变化的同时,伴随着分子振动能级的变化。因此,分子的电子光谱比原子的线状光谱复杂,所得到的分子吸收光谱由于谱线之间的波长间隔只有 0.25 nm ,几乎是连续的,其形状呈现为带状,故分子光谱为带状光谱。

若用红外线激发分子,其能量只能引起分子振动能级和转动能级的跃迁,所得到的吸收光谱称为振动-转动光谱或红外吸收光谱。

2. 溶液颜色与光吸收的关系

物质所呈现的颜色与光有着直接的关系。所谓颜色,是人对不同波长的可见光的视觉效应。日常所见的白光,如阳光、日光灯所发出的光,都是混合光。混合光是由波长在 $400 \sim 750 \text{ nm}$ 的电磁波按适当强度和比例混合而成的。这段波长范围的光是人的视觉系统可感知的,故称为可见光。波长小于 400 nm 的称为紫外光,大于 750 nm 的称为红外光,都是人们视觉不能感知的光。实际上,由于人们视觉系统对光的分辨力有限,因此人们看到的某种

颜色的光是处于一定波长范围的光。

将两种颜色的光按合适的强度比例混合，可以形成白光，这两种色光就称为互补色。图 2-1-1 中处于直线关系的两色光为互补色，如绿色光和紫色光是互补色，黄色光和蓝色光是互补色。溶液呈现的颜色是与它主要吸收的光相互补的光的颜色，溶液吸收的光越多，呈现的颜色越深。

一束白光通过某溶液时，如果该溶液对可见光区的光都没有吸收，也即入射光全部通过溶液，则该溶液呈无色透明。若可见光被该溶液完全吸收，则该溶液呈黑色。若溶液选择性地吸收可见光区某波段的光，则该溶液即呈现出与被吸收波段的光相互补的光的颜色。例如，一束白光通过 KMnO_4 溶液，溶液选择性地吸收了绿色波长的光，而其他的色光因未被吸收仍互补成白光而通过，只剩下紫红色光，所以 KMnO_4 溶液呈现紫色。

为精确地说明物质具有选择吸收不同波段光的特性，通常用光吸收曲线来描述。具体做法是：让不同波长的光依次通过有色溶液，测出该溶液对各种波长光的吸收程度（用吸光度 A 表示）。以波长为横坐标，吸光度为纵坐标，画出曲线，所得曲线就称为光的吸收曲线（即吸收光谱，图 2-1-2）。



图 2-1-1 光的互补

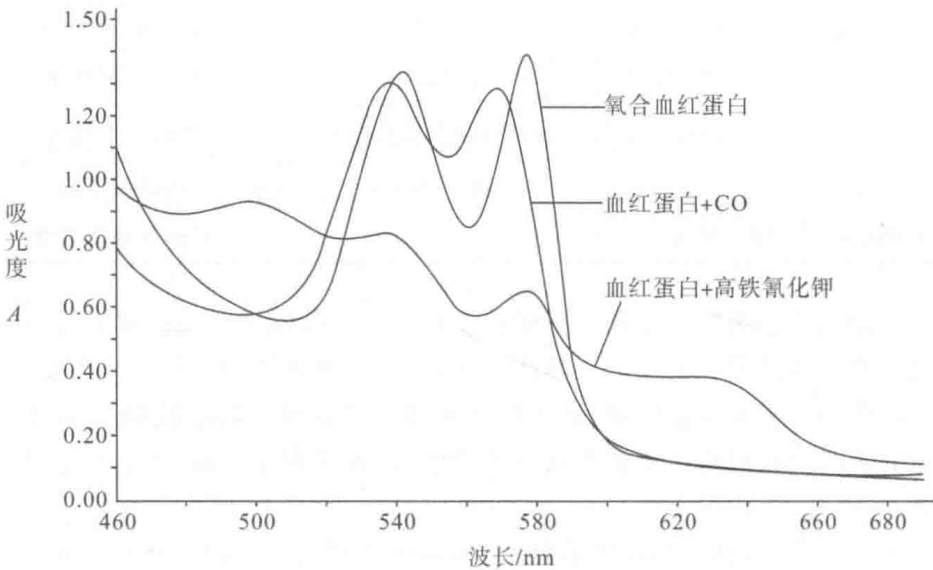


图 2-1-2 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱

任何一种有色溶液，其光吸收曲线都可以被测出。光吸收程度最大处的波长称为最大吸收波长，以 $\lambda_{\max}$ 表示，如图 2-1-2 所示的氧合血红蛋白的吸收峰有两个，分别为 540 nm 和 578 nm，即 $\lambda_{\max}=540\text{ nm}, 578\text{ nm}$ 。物质的浓度不同不改变其最大吸收波长，但浓度越大，光的吸收程度越大，其吸收峰就越高。

3. 光吸收定律

当一束波长为 λ 的平行光照射到一均匀有色溶液后，光可分成 3 部分：一部分被比色皿的表面反射，一部分被溶液吸收，一部分则透过溶液，如图 2-1-3 所示。

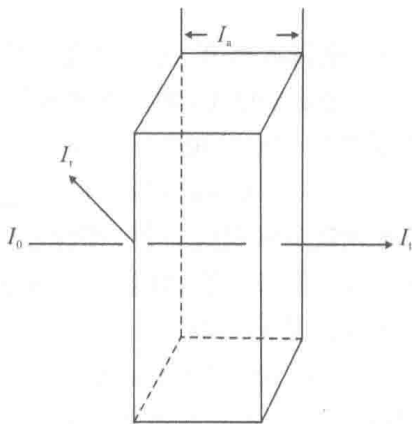


图 2-1-3 入射光与各成分光的关系

它们存在如下关系：

$$I_0 = I_a + I_r + I_t \quad (2-1-3)$$

式中 I_0 ——入射光的强度；
 I_a ——被吸收光的强度；
 I_r ——反射光的强度；
 I_t ——透射光的强度。

在分光光度分析中，由于参比与样品溶液所用的比色皿的材质相同，比色池的反射光强度相同，反射所引起的误差可互相抵消，因此式(2-1-3)可简化为：

$$I_0 = I_a + I_t \quad (2-1-4)$$

I_a 越大说明溶液对光的吸收越强，即透射光 I_t 越小，光减弱越多。透射光强度的改变与有色溶液的浓度 c 和液层厚度 b 有关。上述关系指出，溶液浓度愈大，液层愈厚，透过的光愈少，入射光的强度减弱愈显著。这就是光吸收定律的意义，可用数学表达式表示为：

$$\lg(I_0/I_t) = Kbc \quad (2-1-5)$$

式中 $\lg(I_0/I_t)$ ——光线通过溶液被吸收的程度，称为吸光度，以 A 表示。

K ——比例常数，与入射光的波长和物质性质有关，而与光的强度、溶液的浓度及液层厚度无关；
 b ——液层厚度；
 c ——溶液浓度。

按吸光度的定义，式(2-1-5)可写成：

$$A = Kbc \quad (2-1-6)$$

光吸收定律也称为朗伯—比尔定律。朗伯定律指出光的吸收与吸收层厚度成正比，而比尔定律说明光的吸收与溶液浓度成正比。同时考虑吸收层的厚度和溶液的浓度对单色光吸收率的影响，则得到朗伯—比尔定律。朗伯—比尔定律构成了分光光度分析的理论基础。

透射光强度 I_t 与入射光强度 I_0 之比称为透射比，用 T 表示：

$$T = I_t/I_0 \quad (2-1-7)$$

吸光度与透射比的关系为：

$$A = \lg(I_0/I_t) = \lg(1/T) \quad (2-1-8)$$