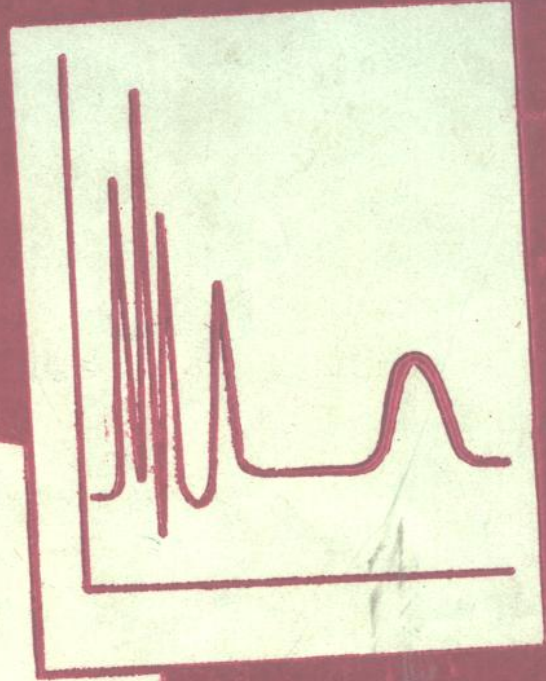
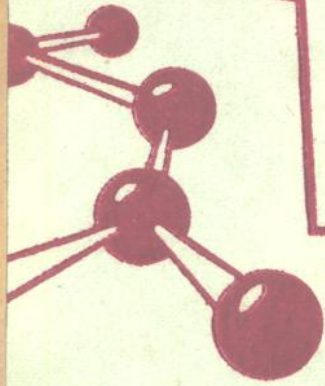


编著



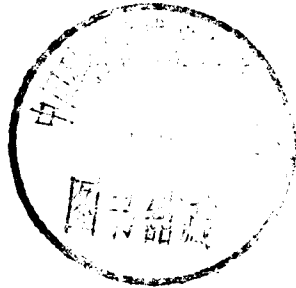
现代生物化学 分析原理

中国科学技术大学

DF21/109

现代生物化学分析原理

张立名 王贤舜 编著



中国科学技术大学出版社

1991·合肥

内 容 简 介

本书为适应综合大学生物系和农林、医药、轻工等大专院校《生化分析》和《仪器分析》课程的需要而编写的教学用书。全书共12章，除讨论缓冲溶液、pH测定和电极、透析、超滤膜过滤、冷冻干燥和蛋白质测定等“常规技术”教学用书，重点介绍离心、电泳，以及气相，高效液相等各类色谱技术，紫外，可见、红外、荧光和原子吸收等分光光度法，在生命科学研究和生物分子分析中的应用原理。

本书可作为大专院校有关专业的教学参考书或教材。也可供有关科技人员参考。

现代生物化学分析原理

张立名 王贤舜 编著

中国科学技术大学出版社出版

(安徽省合肥市金寨路96号，邮政编码：230026)

安徽工学院印刷厂印刷

安徽省新华书店发行

开本：787×1092/16 印张：13.5 字数：368千

1991年4月第1版 1991年4月第1次印刷

印数：1—4000册

ISBN 7-312-00217-X/Q·3 定价：5.50元

8.173
10

序 言

近年来，随着科学技术的飞速发展，现代化建设事业的迫切需要，先进的精密仪器设备在大专院校和科研生产单位逐渐普及，新技术、新设备、日新月异，不仅为探索微观世界提供了更精确的工具，创造了更优越的条件，而且对大学生和各条战线上的技术人员提出了更高的要求。同时，高等院校有关专业的教学内容也要作相应的调整、充实和更新。

为适应上述形势的要求，我们将历年来讲授的“生物化学研究中的仪器分析”课程的讲稿，重新整理，作了全面修订，定名为“现代生物化学分析原理”。本书共12章，第1章主要讨论缓冲溶液、pH测定和电极、透析、超滤膜过滤，冷冻干燥和蛋白质测定等所谓的“常规技术”。第2—7章重点介绍离心、电泳、气相色谱和高效液相色谱等各类层析技术及其在生物分子分离制备和纯化过程中的应用原理。第9—11章主要讨论生物分子的分析鉴定，包括可见-紫外、红外、荧光、原子吸收等分光光度法。第12章是阐明放射性同位素应用于生命科学研究中的基本知识。

本书旨在用作综合性大学生物系和农林、医药、轻工等大专院校有关专业大学生们“生化分析”和“仪器分析”教学参考书或教材。鉴于该类院校的课程设置和大学生们的工作性质，编写过程中，尽量避免繁琐的数学推导和仪器结构原理的阐述，有关的物理化学概念也尽量从简，重点在于“应用原理”的阐述。

中国科学技术大学生物系潘仁瑞同志审阅全书，特此致谢。由于编者水平的限制，不妥与遗漏之处在所难免，期望读者和专家们不吝指正赐教。

编 者

1990年元月

目 录

第一章 生化分析的常规方法

第一节 缓冲溶液、pH测定和电极(1)

- 一、基本概念.....(1)
- 二、pH测定.....(4)
- 三、生化研究中的缓冲溶液.....(7)
- 四、氧电极.....(11)
- 五、离子选择电极.....(15)

第二节 透析.....(16)

- 一、基本原理.....(16)
- 二、透析的应用.....(18)

第三节 微过滤.....(18)

- 一、微过滤的类型.....(18)
- 二、微过滤技术的应用.....(19)

第四节 冷冻干燥.....(21)

第五节 蛋白质溶液的测定.....(21)

- 一、双缩脲反应(Biuret assay).....(21)
- 二、茆里反应(Lowry assay).....(22)
- 三、巴福得测定法(Bradford assay).....(22)
- 四、分光光度法测定蛋白质.....(23)

第二章 离心

第一节 基本原理.....(25)

- 一、离心力和相对离心力.....(26)
- 二、沉降速度.....(27)
- 三、沉降系数.....(27)

第二节 离心技术的类型.....(28)

- 一、均匀介质离心.....(28)
- 二、密度梯度离心.....(30)

第三节 离心技术的应用.....(32)

- 一、制备性离心和分析性离心.....(32)
- 二、离心技术测定物质分子量.....(33)
- 三、离心操作必须注意的几个问题.....(34)

第三章 层析法

第一节 纸层析和薄层层析.....(37)

- 一、纸层析.....(37)
- 二、薄层层析.....(40)
- 三、纸层析和薄层层析的实际应用.....(42)

第二节 柱层析.....(43)

- 一、装柱.....(45)
- 二、上样.....(45)
- 三、展层、洗脱.....(45)

- 四、洗脱液的分部收集.....(46)
- 五、洗脱液的检测.....(46)
- 六、柱层析的优点和限度.....(46)

第三节 离子交换层析.....(47)

- 一、基本原理.....(47)
- 二、离子交换剂.....(49)
- 三、离子交换剂的选择.....(52)
- 四、缓冲液的选择.....(54)
- 五、离子交换剂的制备.....(55)
- 六、离子交换层析的应用.....(56)
- 七、离子交换剂的贮存.....(57)
- 八、交换容量的测定.....(57)

第四节 凝胶排阻层析.....(58)

- 一、基本原理.....(58)
- 二、凝胶层析的物理特性.....(59)
- 三、凝胶的化学性质.....(60)
- 四、凝胶的选择.....(62)
- 五、凝胶的制备和贮存.....(62)
- 六、凝胶柱层析的实验操作.....(62)
- 七、凝胶排阻层析的应用.....(63)

第五节 亲和层析.....(67)

- 一、基本原理.....(67)
- 二、固相支持介质.....(68)
- 三、配基.....(69)
- 四、配基和载体的结合.....(69)
- 五、亲和层析的实验过程.....(72)

第四章 气相色谱法

第一节 基本原理.....(74)

- 一、保留值.....(74)
- 二、保留值与分配系数之间的关系.....(77)
- 三、分辨率.....(78)
- 四、基线.....(78)
- 五、区域宽度.....(79)

第二节 气相色谱系统.....(79)

- 一、载气系统.....(79)
- 二、层析柱系统.....(80)
- 三、数据处理系统.....(80)

第三节 操作条件的选择.....(83)

- 一、层析柱的选择.....(83)
- 二、柱温的选择.....(84)
- 三、载气的流速.....(85)

• ■ •

第四节 气相色谱的数据处理····· (85)	第五节 纸电泳和醋酸纤维薄膜电泳····· (112)
一、定性鉴定····· (85)	一、纸电泳····· (112)
二、定量分析····· (86)	二、醋酸纤维薄膜电泳····· (114)
第五节 气相色谱的应用及其优点和局限性····· (88)	第六节 试剂····· (114)
一、气相色谱的优点和局限性····· (88)	第七章 分光光度法的光学原理
二、气相色谱在生物化学上的应用····· (88)	第一节 光学原理····· (116)
三、气相色谱在其它领域的应用····· (89)	一、光的本质····· (116)
第五章 高效液相色谱	二、光学几个主要参数····· (117)
第一节 仪器概述····· (91)	三、电磁辐射与原子结构····· (118)
一、溶剂瓶····· (91)	第二节 光谱与生物化学分析····· (118)
二、泵系统····· (91)	一、分光光度法····· (120)
三、进样装置····· (92)	二、分光光度法进行物质定性分析和定量测定的基本原理····· (122)
四、层析柱····· (92)	三、物质特征性吸收曲线和最大吸收峰····· (125)
五、检测器····· (92)	第八章 紫外-可见分光光度法
六、高效液相色谱的数据处理····· (93)	第一节 概论····· (127)
第二节 HPLC的固定相····· (93)	一、紫外-可见吸收光谱的产生····· (127)
一、液-固层析····· (94)	二、有机化合物的吸收光谱····· (128)
二、液-液分配层析····· (94)	第二节 仪器工作原理····· (131)
三、离子交换高效液相色谱层析····· (95)	一、光源····· (132)
四、凝胶排阻高效液相色谱层析····· (96)	二、单色器····· (132)
第三节 流动相和梯度洗脱····· (96)	三、狭缝····· (133)
一、流动相····· (96)	四、样品室····· (133)
二、高效液相色谱的梯度洗脱····· (98)	五、检测系统····· (134)
三、高效液相色谱操作条件的选择····· (99)	六、遮光门····· (135)
第六章 电泳	七、数据处理系统····· (135)
第一节 基本原理····· (101)	八、分光光度计的类型····· (135)
第二节 电泳分离有关的内外因素····· (102)	第三节 UV-VIS分光光度计的应用····· (136)
一、物质本身的结构和性质····· (102)	一、溶液浓度的测定····· (137)
二、外部因素····· (102)	二、生物分子的定性鉴定····· (139)
第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳····· (104)	三、化学反应动力学研究····· (139)
一、聚丙烯酰胺的结构和性质····· (104)	四、生物大分子特性的研究····· (140)
二、凝胶电泳装置简介····· (106)	五、溶剂效应····· (142)
三、不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳····· (107)	六、分光光度法的限度····· (142)
四、SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳····· (108)	第九章 红外分光光度法
五、蛋白质的等电聚焦电泳····· (108)	第一节 基本原理····· (145)
六、SDS等电聚焦凝胶电泳····· (110)	第二节 红外光谱测定技术····· (150)
第四节 琼脂糖凝胶电泳····· (110)	一、红外分光光度计····· (150)
一、限制性核酸内切酶切DNA片段的分析····· (111)	二、红外光谱测定技术····· (151)
二、DNA超螺旋结构的鉴别····· (111)	第三节 红外光谱的应用····· (158)
	一、定性分析····· (158)

二、定量分析.....	(163)
第十章 荧光分光光度法	
第一节 基本原理	(169)
一、荧光的两个重要特性.....	(169)
二、量子产量.....	(170)
第二节 荧光分光光度计及荧光分析	(171)
一、仪器组件.....	(171)
二、荧光分析方法.....	(172)
三、荧光分析技术及其应用.....	(172)
四、荧光分析中的几个问题.....	(173)
第十一章 原子吸收分光光度法	
第一节 概论	(176)
一、原子吸收分光光度法的特点.....	(176)
二、原子吸收分光光度法基本原理.....	(177)
第二节 仪器装置	(180)
一、光源.....	(180)
二、原子化器.....	(181)
三、分光器.....	(184)
四、检测器和数据处理系统.....	(184)
第三节 原子吸收分光光度分析法操作技术	(184)
一、样品处理.....	(184)
二、操作条件的选择.....	(184)
三、分析方法.....	(185)
四、干扰及其消除方法.....	(187)
五、灵敏度、精密度和准确度.....	(188)

第四节 原子吸收分光光度法的应用	(189)
一、植物分析.....	(189)
二、肥料分析.....	(189)
三、土壤分析.....	(189)
四、食品饲料分析和生物化学分析.....	(190)
第十二章 放射性同位素	
第一节 放射性的性质和放射源	(191)
一、放射性衰变的类型.....	(192)
二、 α 、 β 粒子和 γ 辐射的特性.....	(192)
三、衰变常数和半衰期.....	(193)
四、放射性测量的单位.....	(194)
五、生物化学研究所用的同位素.....	(195)
第二节 放射性的测量	(196)
一、液体闪烁计数.....	(196)
二、闪烁计数的实际应用.....	(199)
三、放射性的盖氏管计数.....	(202)
第三节 放射性同位素的应用	(203)
一、同位素示踪法.....	(203)
二、同位素稀释法.....	(204)
三、放射性同位素的其它用途.....	(204)
第四节 同位素实验的安全	(204)
一、射线剂量.....	(205)
二、实验准备.....	(205)
三、注意事项.....	(206)

参考文献

第一章 生化分析的常规方法

生物化学、生物工程和分子生物学实验室的日常工作中，无论是教学、科学研究或工业领域内，有些实验技术几乎每天都会用到。这些实验技术看起来简单，但实际应用时，要能做到得心应手却并非易事。而且稍有差错，往往关系到整个实验工作成败的大局。这些实验技术主要有缓冲溶液的应用，pH测定和各类电极的正确选择和使用，透析技术，超滤膜过滤，冷冻干燥，蛋白质测定方法等。下面就其有关的理论和实践作一概括的阐述。

第一节 缓冲溶液、pH测定和电极

生物体内，细胞和组织中所进行的各种生物化学反应过程，都是在特定的条件下进行的。其中最突出的一点是，生命过程中所有的生物化学反应，都受制于氢离子浓度精确而又严格的调控。生物体系内部具有完善的天然缓冲系统，使生物体系内的pH值保持在一个特定的范围内。体外研究生命活动的有关过程时，要使所得结果能真正反应体系内的真实情况，就必须模拟体内的天然环境制备人工介质，其中至关重要的一点是模拟体内环境的pH值。这是因为生物化学反应与反应条件中的pH值，具有严格的依赖关系。所以，人工介质的pH值和细胞内环境中的pH值必须保持一致。如果人工介质的pH值选择得不合适，或是pH测定的结果不精确，以致于人工介质中的pH值和体内环境中的pH值差异较大，就会使实验得出错误的结果，甚至于导致整个实验的失败。除此之外，在天然产物的分离纯化和分析鉴定过程中（如蛋白质或酶的电泳分析），也需要选用合适而又具有特定pH值的缓冲溶液；以便使样品物质处于特定的存在状态，有利于分离纯化或分析鉴定。

所以，深入了解缓冲剂的性质，制备合适的缓冲溶液，并准确测定其pH值，是生命科学有关领域的实验研究工作中，一项至关重要的基础性工作。

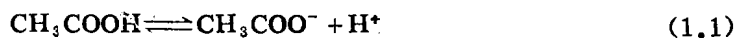
一、基本概念

在讨论缓冲溶液及pH等问题之前，有必要重温一下化学方面有关的理论知识。

（一）Brsted-Lowry 的酸碱理论

什么是酸，什么是碱，Brsted 给了一个简要而明确的定义：凡是在溶液中能释放出质子（ H^+ ）的化合物称之为酸，或者说酸是质子的供体（donor）；凡是在溶液中能接受质子的物质称之为碱，或者说碱是质子的受体（accepter）

例如乙酸在水溶液中的解离：



按照 Brsted 的酸碱理论， CH_3COOH 是酸，因为它在水溶液中解离，并释放出一个质子（ H^+ ）。 CH_3COO^- 是它的共轭碱，因为它能接受一个质子。同理，凡是在溶液

中解离产生氢氧根离子的化合物都是碱。即： $\text{BOH} \rightleftharpoons \text{B}^+ + \text{OH}^-$ 。

再如盐酸在水溶液中的解离：

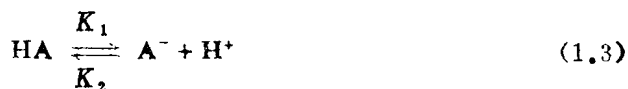


HCl是酸，而 Cl^- 是它的共轭碱。

(二) Henderson-Hassel-Balch方程

强电解质如NaCl, NaOH, HCl等，溶于水时，几乎全部解离成正、负离子。没有分子形式的化合物存在于溶液中。弱电解质溶于水时，则不完全解离，只有部分的分子解离出正、负离子，其余以分子形式存在于溶液中。所以，电解质的强弱主要是根据它们在水溶液中的解离程度而定。

酸和碱也是电解质，溶于水时也发生解离。以弱酸为例，当某种弱酸(HA)溶于水时，只有部分的HA解离成 H^+ 和 A^- 。而其余部分仍以分子形式的HA存在于溶液中。一定摩尔浓度的HA，在水溶液中解离出的 A^- , H^+ 摩尔浓度越大，则未解离的HA摩尔浓度越小，酸性越强；如解离出来的 H^+ , A^- 摩尔浓度越小，则未解离的HA摩尔浓度越大，酸性越弱。强酸(如HCl, H_2SO_4)在水溶液中几乎全部解离。如方程(1.2)所示，若HCl的浓度为0.1M，则在水溶液中解离产生的 H^+ 浓度也是0.1M。上述的弱酸HA，在水溶液中解离，根据质量作用定律，当反应达到平衡时，三者关系可以下式表示：



$$\frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = K_a \quad (1.4)$$

$$[\text{H}^+] = K_a \cdot \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (1.5)$$

两边取负对数：

$$-\log[\text{H}^+] = -\log K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1.6)$$

式中： $[\text{H}^+]$, $[\text{A}^-]$ 为HA解离出来的氢离子浓度及其共轭碱的离子浓度， $[\text{HA}]$ 为弱酸的浓度， K_1 为酸解离的速度常数， K_2 为 A^- 和 H^+ 相缔合的速度常数， K_a 为方程1.3达到平衡时，HA的解离平衡常数。

HA的 $\text{p}K_a$ 定义为 $-\log K_a$ 。HA溶液的pH定义为 $-\log[\text{H}^+]$ 。

则方程(1.6)可写成：

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1.7)$$

方程1.7称为Henderson-Hassel-Balch方程。这一方程对于生物化学、分子生物学和生物工程等学科来说，无论是理论上或实践上都具有重要意义。这在有关各学科的教科书中都有详细的论述，在此不再重复。必须提及的一点是， $\text{p}K$ 值是电解质的一个

特征性常数，弱酸的 pK_a 值也不例外。从方程1.7可以看出，该方程表示溶液pH与溶质中可解离基团 pK_a 之间的关系，也就是表示溶液pH与溶质荷电性质之间的关系。很显然，当 $[A^-] = [HA]$ 时，

$$\begin{aligned} \text{则} \quad & \log[A^-]/[HA] = 0 \\ \text{于是} \quad & \text{pH} = pK_a \end{aligned}$$

这就意味着当 $[HA]$ 有一半解离时，溶液的pH等于 pK_a 。

弱酸解离的上述各种关系式也适用于弱碱（BOH）。即弱碱水溶液中，也有下列方程：



不过，相应的解离平衡常数以 K_b 表示，其负对数值为 pK_b 。和酸一样，强碱在水溶液中几乎全部解离。如方程1.8所示，若0.01MBOH，水溶液中解离生成的 OH^- 浓度也是0.01M。碱的强弱也取决于它们在水溶液中的解离程度。如 $[\text{BOH}]$ 解离生成 $[\text{B}^+]$ 和 $[\text{OH}^-]$ 浓度越大，则 $[\text{BOH}]$ 浓度越小，碱性越强；如解离出来的 $[\text{B}^+]$ 和 $[\text{OH}^-]$ 浓度越小，余下的 $[\text{BOH}]$ 浓度越大，碱性越弱。

水也有极微弱的解离，25℃时，电导测定其氢离子浓度约为 10^{-7}M/L 。



由于纯水中，水 $[\text{H}_2\text{O}]$ 的浓度几乎是恒定的，并且， $[\text{H}_2\text{O}]$ 的浓度大大高于 $[\text{H}^+]$ 和 $[\text{OH}^-]$ 浓度所以：

$$\begin{aligned} K_{\text{水}} & = [\text{H}^+][\text{OH}^-] \\ & = 10^{-7} \times 10^{-7} = 10^{-14} \end{aligned} \quad (1.10)$$

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] = 7 \quad (1.11)$$

25℃时，纯水的离子积为 10^{-14} ，pH为7。中性纯水的pH值，随着温度的变化而略有变化。水温低于25℃时，pH值略有增加，高于25℃时，pH值略有降低。

pH这一术语是丹麦化学家S.P.L. Sørensen于1909年首先提出来的，借以表示溶液中的氢离子活度或氢离子有效浓度。所谓pH，是溶液中的氢离子活度（有效浓度）的负对数值。

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

按Sørensen的pH定义，0.01M HCl溶液的pH值应是：

因为 0.01M HCl溶液的氢离子浓度为0.01M (10^{-2})

所以 $\text{pH} = -\log(10^{-2}) = 2$

从上面的推算可知0.01M HCl水溶液中，其 $[\text{H}^+]$ 为0.01M，pH等于2。而0.01M强碱，其pH值如何计算，这要和水解离联系起来考虑。从水的解离平衡常数可知，

$$K_{\text{水}} = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$$

水溶液中， $[\text{H}^+]$ 浓度和 $[\text{OH}^-]$ 浓度二者的浓度积必须保持一个恒定值（ 10^{-14} ），其中一个因数增加，另一个因数必然相应的降低。因此，若是0.01M NaOH水溶液，（ $[\text{OH}^-] = 10^{-2}$ ），氢离子浓度：

$$[\text{H}^+] = \frac{K_{\text{水}}}{[\text{H}_2\text{O}]} = \frac{10^{-14}}{10^{-2}} = 10^{-12}$$

$$\text{pH} = -\log[10^{-12}] = 12$$

离子活度和离子浓度是两个不能混淆的概念。在实际应用中，经常不大注意这两个概念的区别。这是因为除强酸外，溶液的氢离子活度近似等于氢离子浓度。之所以说离子浓度和离子活度是两个不同的概念，可从两个角度来说明。以氢离子浓度为例，0.01M HCl溶于水中，氢离子浓度 $[\text{H}^+]$ 为0.01M。这一浓度是理论上氢离子浓度。因为离子在溶液中处于不同的运动中，当溶液中不同离子相互接触时就会发生相互作用。若溶液中离子浓度很稀的情况下，彼此相距很远，相互接触而发生相互作用的机会很少，溶液中氢离子的实际浓度，通常叫做氢离子活度或有效浓度，就越接近于理论浓度。随着溶液中离子浓度的增加，彼此之间的距离越小，相互接触的机会越多，因而发生各离子间的相互作用的机会越多，此时氢离子的实际浓度，也就是氢离子的有效浓度（活度）越来越小于理论上的氢离子浓度。氢离子活度与理论上的氢离子浓度之间的关系可以下式表示。

$$A_i = f_i [i] \quad (1.12)$$

式中： A_i 为*i*离子的活度（*i*离子有效浓度）， f_i 为*i*离子的活度系数， $[i]$ 为*i*离子的离子浓度（理论上的离子浓度）。

从方程 1.12可以看出，只有在离子浓度极稀的情况下，活度系数 f_i 才接近于1，离子活度 A_i 才近似等于理论上的离子浓度 $[i]$ 。随着离子浓度的增加，活度系数越来越小，离子活度也随之降低，离子活度与理论上的离子浓度之间的差距也越来越大。从另一个角度来看，pH计测得的溶液中的pH值，事实上是溶液中实际氢离子有效浓度的负对数值，也就是氢离子活度的负对数值，而不是理论上的氢离子浓度的负对数值。

综上所述，只有离子浓度极稀的情况下，离子活度（有效浓度）才近似等于离子浓度。

二、pH测定

测定溶液pH值常用的设备是pH计。pH计进行电位测量是测定pH最精确的方法之一，精确度可达0.005pH单位。所谓电位测量是测量电化学电池所产生的电动势。

pH测定时需要两种电极，一种是玻璃电极，对溶液中的氢离子浓度敏感。另一种是参比电极，与样品溶液的氢离子浓度没有依赖关系。当两种电极同时浸入样品溶液中，两电极之间产生电位差，这一电位差与样品溶液的pH值存在一定的依赖关系，可以方程 1.13表示：

$$V = E_{\text{const}} + \frac{2.303RT}{F} \text{pH}_s \quad (1.13)$$

式中： V 为闭路电位差， E_{const} 为参比电极电位， R 为气体常数， T 为绝对温度， F 为法拉第常数（电量单位，96520C）。

从方程（1.13）可以看出，参比电极电位 E_{const} 为非pH敏感电位的总和，是一个

定稳的电位，是一常数。而 R ， F 也是一个常数。所以全电池电位差 V 是样品溶液 pH ，和温度 T 的函数。 pH 计测定 pH 的装置如图1.1所示。

样品溶液测定之前，先用已知 pH 的缓冲液校正，用于校正（标定）的标准缓冲液如表1.1所示。

玻璃电极的功能是对样品溶液中的氢离子活度变化作出反应。即电极电位随着样品溶液中氢离子活度的变化而变化。玻璃电极底部由薄玻璃泡构成，装有 $0.1M/L$ 稀盐酸溶液。内部由银-氯化银和铂金丝联结，银-氯化银电极浸入稀盐酸溶液中。当玻璃电极浸入样品溶液时，只有薄玻璃泡对样品溶液氢离子活度发生反应。薄玻璃泡膜内外两侧的电位差取决于样品溶液的 pH ，由此而构成所谓“半电池”。

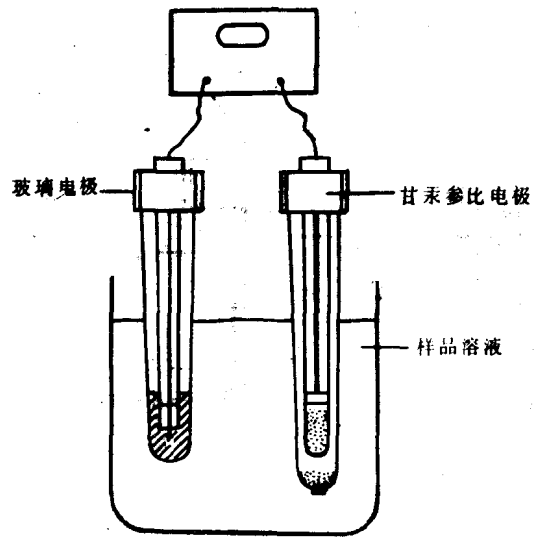


图 1.1 pH 计测定 pH 的仪器装置

表 1.1 NBS主要参比标准缓冲溶液 pH 值

温度 $t/^\circ\text{C}$	酸性酒石酸钾	$0.05M$ 酸性苯二甲酸钾	$0.025M$ KH_2PO_4 $0.025M$ Na_2HPO_4	$0.0087M$ KH_2PO_4 $0.0302M$ Na_2HPO_4	$0.01M$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
0		4.01	6.98	7.53	9.46
10		4.00	6.92	7.47	9.33
15		4.00	6.90	7.45	9.27
20		4.00	6.88	7.43	9.23
25	3.56	4.01	6.86	7.41	9.18
30	3.55	4.02	6.85	7.40	9.14
35	3.55	4.03	6.84	7.38	9.08
40	3.55	4.04	6.84	7.38	9.07
50	3.55	4.06	6.83	7.37	9.01

参比电极的功能是提供一个恒定的电位，作为测量各种偏差电位的对照。因此，参比电极电位是一个常数，它与样品溶液 pH 变化无关。常用的参比电极有两种，即甘汞电极和银-氯化银电极。甘汞电极是由固体氯化亚汞（甘汞）和汞以及饱和氯化钾溶液

共同组成。银-氯化银电极是由银和氯化银以及饱和氯化钾溶液共同组成。玻璃电极和参比电极如图1.2所示。

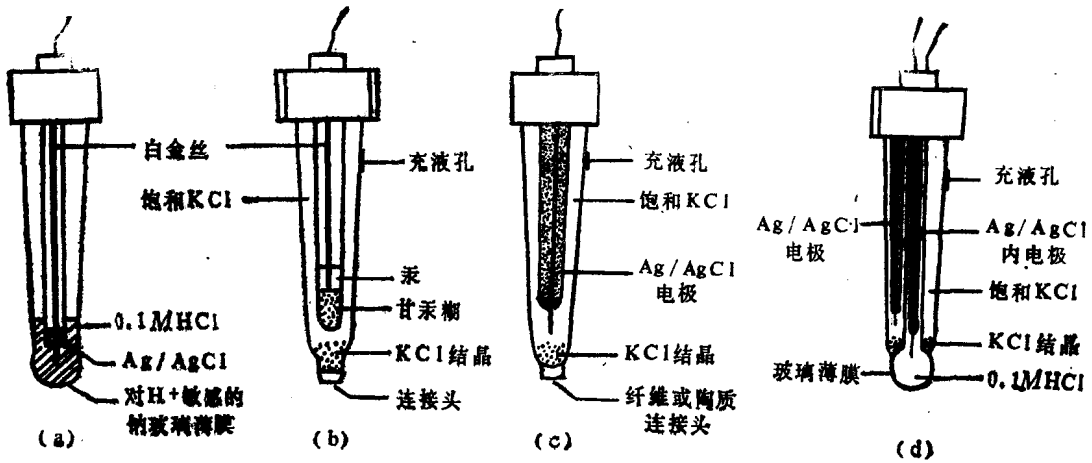


图 1.2 玻璃电极、参比电极、联合电极

- (a) 玻璃电极 (c) 参比电极II甘汞电极
 (b) 参比电极I银-氯化银电极 (d) 联合电极

参比电极电位是氯离子浓度的函数。之所以用饱和氯化钾溶液，是为了保持电极内具有恒定的氯离子浓度。为了保持恒定的饱和氯化钾溶液，在溶液内沉积有部分氯化钾结晶，这就使得氯化钾的饱和溶液不致于受温度和湿度的影响。当湿度变大时，结晶氯化钾溶解；当湿度变小时，溶液中多余的氯化钾沉淀下来，由此而使得电极内部具有恒定的氯离子浓度，参比电极电位也将是恒定的。

pH测定时，当玻璃电极和参比电极同时浸入样品溶液中就成“全电池”。全电池的电位等于指示电极（玻璃电极）和参比电极（甘汞电极或银-氯化银电极）的代数和：

$$E = E_{ref} + E_{glass}$$

如温度恒定，则全电池电位随样品溶液的 pH 变化而变化。全电池的组成如图1.3所示。

现在，大多数 pH 值的测定都是用单一的联合电极（combination electrode），如图 1.2 (d)所示。它是将参比电极和玻璃电极共同组装在同一玻璃管内，这种电极虽然价格较高，但使用起来较为方便，当测定小量溶液时尤其是如此。实际使用

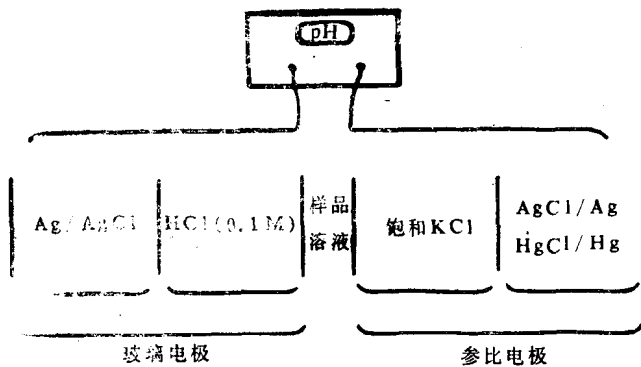


图 1.3 玻璃电极、样品溶液、参比电极组成全电池

时，必须注意如下问题。使用前，先检查电极内饱和氯化钾液面水平，如发现液面过低，必须补充到规定位置。接着将温度控制旋钮调到标准缓冲液和样品溶液的温度，再将功能键指向pH。测定之后，清洗电极并浸入蒸馏水或缓冲液内保存。当使用时，电极从蒸馏水或缓冲液中取出之后，必须用蒸馏水淋洗干净，然后用脱脂棉擦干，再浸入到标准缓冲液内校正。通常的标准缓冲液pH为4，7或10，精度为±0.02pH单位。电极下端的球部必须完全浸入到溶液中。

在使用玻璃电极时，因为玻璃电极易碎，操作时应十分小心。测定蛋白质溶液时，电极表面很容易覆盖一层蛋白质膜。如发现这种情况，可用0.1NHCl浸泡后除去，再用蒸馏水仔细清洗。

pH测定时，总是会产生一定程度的误差，产生误差的原因主要有下面几个方面。

1. 钠离子干扰 大多数玻璃联合电极对Na⁺和H⁺都非常敏感。尤其在高pH值溶液测定时，Na⁺的干扰更加明显。样品溶液中，当Na⁺浓度为0.1N时，可使测得的pH值降低0.4—0.5个单位。为减少Na⁺对pH测定的干扰，商品电极一般都附有校正Na⁺干扰的标准曲线。现在商品供应的较新式的玻璃电极具有对Na⁺不透过性的性能。如果既没有Na⁺干扰的校正标准曲线，又没有对Na⁺不透过性的玻璃电极，可以用钠盐来代替钾盐。

2. 浓度效应 溶液pH值随着溶液中的缓冲离子浓度和其他盐离子浓度的变化而变化。这是因为溶液pH取决于溶液中离子的活度(activity)，而不是浓度。所谓活度，如前所述，是一个热力学术语。用来描述一个非理想化溶液的存在状态。在很稀的溶液中，一种离子的离子活度等于它的浓度。而在一个有限稀的溶液中，离子活度并不等于它的浓度。

生物化学实验时，通常是先制备浓度较大的“母液”，使用时再稀释到所需要的适当浓度。由于上述浓度效应的原因，必须在稀释之后再校正溶液的pH。

3. 温度效应 缓冲溶液的pH也受温度的影响。这种影响的原因在于溶液中离子的解离常数(pK_a)是随着温度的变化而变化。通常所用的“Tris”缓冲剂，其pH值随温度的变化而变化尤为显著，可达 $\Delta pK_a / ^\circ C = 0.031$ 。这就意味着4°C时pH=7.0的Tris缓冲剂，在37°C时其pH=5.95。避免温度效应对pH值影响的最好方法是，配制缓冲剂，用电极标定缓冲剂和使用缓冲剂时，尽可能在同一温度条件下进行。

三、生化研究中的缓冲溶液

两种化合物溶于同一溶剂中(通常是纯水)所得的溶液，当加入酸或碱，只要不超过一定限度，溶液的氢离子浓度，不致于由此而发生变化，或变化很小，这一溶液称之为缓冲溶液。溶液所起的这种抗pH变化作用称为缓冲作用。溶液内所溶解的溶质(化合物)，称之为缓冲剂。调节缓冲剂的配比即可制得不同pH的缓冲液。

一种缓冲溶液，其缓冲作用的大小，按照Van Slyke的意见，以缓冲能力或缓冲值表示，即缓冲溶液pH值变化1个单位时，所需加入酸或碱的量。

$$\beta = \frac{\Delta b m}{\Delta p H} \quad (1.14)$$

式中 $\Delta b m$ 为每升缓冲液中，加入强酸或强碱的摩尔增量， $\Delta p H$ 为加入 $\Delta b m$ 的强酸或强碱时，使缓冲液的pH发生变化的增量(增加或降低)， β 为缓冲溶液的缓冲能力(缓冲值)。

在讨论缓冲剂的缓冲作用前，先回顾一下前面所提到的 Henderson-Hassel-Balch 方程。

$$\text{pH} = K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

从方程中可以看出，弱酸溶液中，弱酸与其解离出来的共轭碱二者之间的比率与溶液 pH 之间的关系。从 Henderson-Hassel-Balch 方程还可以看出，如果缓冲离子的摩尔比率 ($[\text{H}^+]/[\text{HA}]$) 为已知，HA 的 $\text{p}K_a$ 为已知，可以计算出溶液的 pH 值。另外，如果 $\text{p}K_a$ 为已知，配制特定的 pH 溶液，也可计算出 HA 对 A^- 的摩尔比率。

一个溶液同时含有 HA 和 A^- 时，就具有阻止 pH 变化的能力，也就是说能起缓冲剂的作用。当酸 (H^+) 加到缓冲液中，将和缓冲液中的 A^- 起中和作用。



当碱 (OH^-) 加到缓冲液中，将和缓冲液中的 HA 起中和反应。



例如，某一缓冲溶液由弱酸 (HA) 和该弱酸和强碱所生成的盐 (BA) 共同组成。在水溶液中解离方程如下：



当加入 NaOH 时，发生如下反应：

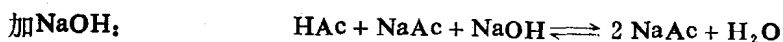
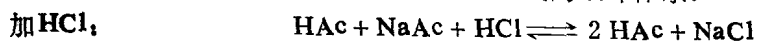


当加入 HCl 时，反应如下：

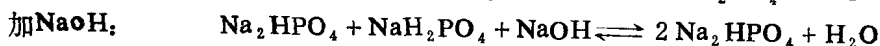
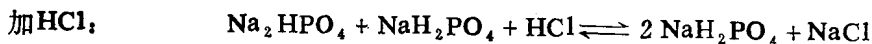


从上述方程可以看出，酸或碱的加入，溶液中所发生的主要变化是，导致溶液中的弱酸 (HA) 浓度的增减。由于弱酸的解离度很小，所以弱酸的增减对溶液中的氢离子浓度影响甚微，由此而起缓冲作用。

如醋酸钠 (NaAc) 和醋酸 (HAc) 组成的缓冲体系：



又如磷酸氢二钠和磷酸二氢钠缓冲体系：



当一个缓冲系统含有酸 (HA) 及其共轭碱 (A^-) 的浓度相等时，缓冲作用最好。因为，按 Henderson-Hassel-Balch 方程，当 $[\text{HA}]$ 和 $[\text{A}^-]$ 相等时，溶液的 pH 等于 $\text{p}K_a$ 。因此，弱酸-碱缓冲体系的 $\text{p}K_a$ 即代表缓冲范围的中点。一个缓冲体系有效缓冲范围，通常是在 $\text{p}K_a$ 值为中点的两个 pH 单位。即：

缓冲剂的有效 pH 范围 = $\text{p}K_a \pm 1$ 。

所以，当缓冲溶液的 pH 等于溶液的 $\text{p}K_a$ 时，缓冲能力最大。从 Henderson-Hassel-Balch 方程可以看出，缓冲系统的 pH 取决于两个因素，一个是缓冲系统的 $\text{p}K$ 值，另一个是缓冲剂之间的比率。

实际上，所有的生物化学研究都必须在缓冲溶液中进行。生物分子和细胞内的各种组份在细胞内的天然体系中，受致于pH严格的控制。当这些组份从细胞内提取出来之后，通常保存在pH为6—8的范围内最为稳定。

虽然大多数生物化学所需要的pH缓冲体系，其有效范围在6—8之间。但在某些少数情况下，需要缓冲体系的pH要扩大到2—12。很显然，没有任何单一的酸-共轭碱体系能全部达到这一范围。然而有几个缓冲体系，它们在2—12的pH区域内，具有各自不同的有效缓冲范围，可供选择。图1.4列出常用的生物学缓冲剂及其有效缓冲范围。在此，还必须注意，有些缓冲剂如磷酸盐(phosphate)，琥珀酸盐(succinate)，柠檬酸盐(citrate)等缓冲液具有一个以上的pK_a值，所以它们可用于不同的pH范围。有些缓冲剂只在生物pH范围内(6—8)有效。如图1.4所示。

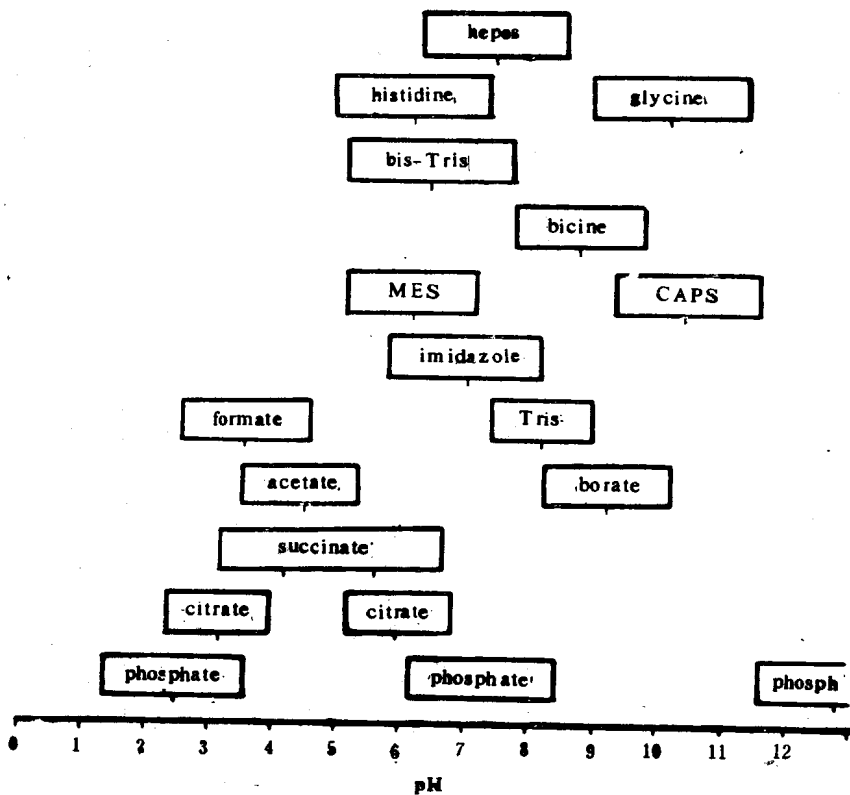


图 1.4 常用的生物学缓冲剂及其有效pH范围

在某一项生物化学研究中，选择合适的缓冲体系，关键在于，选定之前，必须对缓冲体系的特性能充分的了解。

具体选择时，必须考虑到下面几个问题：

- (1) 缓冲剂的pK_a值。其pK_a值最好在所需要的pH值±0.5—1.0的范围内。
- (2) 缓冲剂的理化性质，如溶解度等。例如磷酸盐缓冲液，钾盐比钠盐好，因为

钠盐在低温下溶解度很低。同时，磷酸钾缓冲系统中，不能加入十二烷基硫酸钠(SDS)，因为形成的十二烷基硫酸钾非常难溶。

(3) 若用离子交换层析法分离纯化物质时，最好选用挥发性缓冲剂。因为它们在分离纯化后很容易除去。为此目的，就不能选用弱酸和强碱所组成的缓冲系统。这是因为所有的强碱都是不挥发的。而要选择挥发性的弱酸和挥发性的弱碱所组成的缓冲系统。

(4) 酶促反应时，所选用的缓冲剂不参与酶促反应，对酶也不具有抑制作用。这类缓冲剂主要有磷酸盐、焦磷酸盐和砷酸盐等。下面将几种常用的缓冲剂及其特性作一概括的阐述。

(a) 磷酸盐缓冲剂，磷酸盐缓冲剂是广泛应用的一种缓冲剂。有效的pH范围在6.5—7.5之间，具有较好的缓冲性能。各种浓度的磷酸钾和磷酸钠都很容易配制。主要的缺点有二。一是易于和生物体系内阳离子(Ca^{2+} , Mg^{2+})发生缔合，并易于发生沉淀。另一个缺点是对某些生物化学过程具有抑制作用，包括对某些酶的催化作用会产生某种程度的抑制作用。在重金属存在的条件下，重金属会以磷酸盐的形式沉淀下来。

(b) Tris缓冲剂，目前，Tris缓冲剂的应用广泛程度有大于磷酸盐缓冲剂的趋势。它的有效pH范围为7.5—8.5之间。化学名称为N-三(羟甲基)氨基甲烷[N-Tris(hydroxymethyl)-amino methane]，常简写成Tris或THAM。Tris缓冲液的配制也很方便。如配1升0.1M溶液，可称12.11g(0.1M) Tris碱溶于950—975ml蒸馏水中，一面搅拌一面滴加HCl，直至所要求的pH，即成为Tris-HCl缓冲液。然后加水定容至1升的体积。Tris是种伯胺，但对生物化学过程干扰很小，而且不与钙离子发生沉淀。重金属盐存在的条件，也不受干扰。但是Tris缓冲剂也有缺点，使用时也要考虑到这些缺点。一个缺点是Tris缓冲剂的pH取决于溶液的浓度，每稀释10倍，pH降低0.1个单位。第二个缺点是和某些pH电极发生一定程度的干扰作用。第三个缺点是与其它大多数缓冲剂相比， $\Delta pK_a/\text{°C}$ 的比值较大。为使这些不利因素降到最小限度，可采取下列措施：i. 将缓冲液稀释到适当浓度之后再调节pH。ii. 使用和Tris具有兼容性的电极。iii. 在制备缓冲液时，使制备时温度和使用时的温度相同。

(c) 羧酸缓冲剂，这种类型的缓冲剂中，用得最广泛的羧酸盐有乙酸盐、甲酸盐、柠檬酸盐和琥珀酸盐。这类缓冲剂的有效pH范围在3—6之间。所有这些羧酸都是天然的代谢物。因而对生化反应过程可能发生干扰作用。另外，柠檬酸盐和琥珀酸盐也可能和溶液中存在的过渡金属离子(Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 等)结合而受到干扰。在这类缓冲剂中，甲酸铵特别有用，因为它具挥发性，可在减压的条件下除去。另外一点是，这类缓冲剂很容易和钙离子结合，当样品中存在有钙离子时，不能使用这种缓冲剂。

(d) 硼酸盐缓冲剂，其有效pH范围在8.5—10.0之间。主要缺点是会与很多代谢物形成络合物，尤其是糖类物质。能和糖类物质的羟基反应生成稳定的复合物。

(e) 氨基酸缓冲剂，最常用的氨基酸缓冲剂是甘氨酸(pH 2—3, 9.5—10.5)、组氨酸(pH 5.5—6.5)，甘氨酸胺(pH 7.8—8.8)和甘氨酸甘氨酸(pH 8—9)。这类缓冲剂突出的特点是给细胞组份和提取液提供更接近的天然环境。但是，和羧酸盐及磷酸盐缓冲体系相类似，也会与某些生命过程相互作用而发生干扰作用。