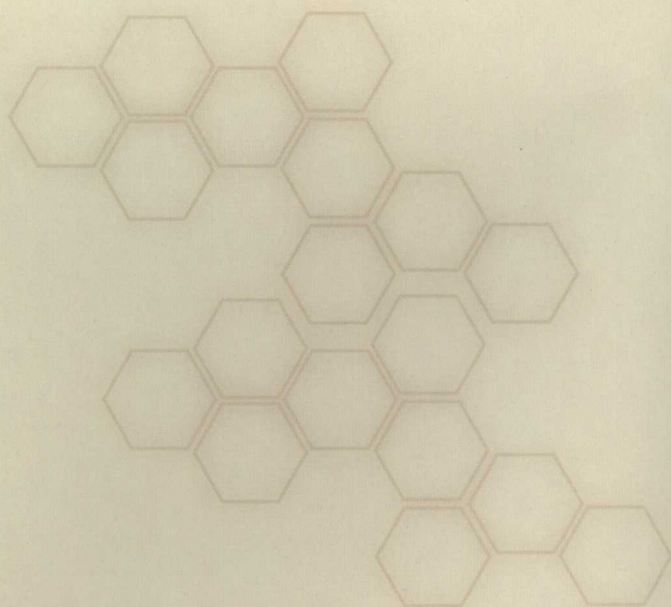


主 编 石渊渊 王玉兰



生物化学实验指导



■ 河南大学出版社

生物化学实验指导

主 编	石渊渊	王玉兰
副主编	张维娟	谷敬丽
编 者	石渊渊	王玉兰
	张维娟	谷敬丽
	赵 伟	王红钢

河南大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/石渊渊,王玉兰等编著. —开封:河南大学出版社,2000.1(2007.6重印)

ISBN 978-7-81041-703-7

I. 生… II. ①石…②王… III. 生物化学—实验—医学
院校—教材 IV. Q5—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(99)第 80113 号

责任编辑 王 慧

封面设计 马 龙

出 版 河南大学出版社

地址:河南省开封市明伦街 85 号 邮编:475001

电话:0378-2825001(营销部) 网址:www.hupress.com

排 版 河南大学出版社印务公司

印 刷 河南省瑞光印务股份有限公司

版 次 2007 年 6 月第 2 版

印 次 2007 年 6 月第 2 次印刷

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 10.75

字 数 248 千字

印 数 3001—5000 册

定 价 20.00 元

(本书如有印装质量问题请与河南大学出版社营销部联系调换)

前 言

生物化学实验是生物化学教学中的重要组成部分。掌握生物化学实验的基本技能与方法,不仅能培养学生科学的工作态度和正确的思维方法,而且还能提高学生分析问题和解决问题的能力;同时对加深、巩固学生所学的基本理论和基本知识也是极为重要的。

随着生物化学学科的迅速发展,生物化学的实验方法和技术也不断更新,它们已成为医药各专业广泛应用的重要实验手段之一,因此,生物化学实验课是医药各学科的必修课。生物化学实验技术发展快、种类多,要在短时间内全面掌握是不现实的。但如果要使学生能对一些常用的基本生物化学实验方法,通过亲手操作而有所认识,显然会大大有助于生物化学理论的学习和理解,并可为将来进一步开展各种生物化学科研工作奠定基础。

本书以培养学生的实际工作能力及严谨求实的科学态度为宗旨,并兼顾本校医、药、护、检验、麻醉、影像等各学科的特点,以生物化学的基本技术和基本技能为重点,结合当前医药各专业发展的需要和生物化学实验开设的实际情况为主要选材内容。其中包括生物化学实验技术的各个方面,特别注重了一些生物化学技术的基本原理。希望读者通过这些实验训练后,能从多方面理解这些技术的意义及用途,能对生物化学技术有较全面的认识。

本书共分四编:第一编是生物化学基本技能及操作,突出了生物化学四个基本技术的原理、应用及使用方法,使学生了解并初步掌握生物化学基本实验技术和实验技能;第二编是生物化学的基础实验,所选实验基本与各专业所学教材相匹配,突出定量概念,为从专业基础实验课向专业课过渡奠定了基础;第三编是生物化学的综合实验,是在前两编的基础上,通过系统的训练,进一步培养学生的逻辑思维及动手操作能力,有的综合实验还可作为毕业论文的参考;第四编是分子生物学实验,随着生物化学与分子生物学知识的飞速发展、实验技术的不断更新和提高,为使学生对分子生物学的研究方法和技术有所了解和得到基本的训练,增加了部分常用分子生物学实验技术。

由于水平有限,难免有遗漏和不妥之处,恳请读者批评指正。

编者

2007年8月

目 录

第一编 生物化学基本技能及操作

实验 1 基本操作和实验室常识	(1)
一、基本操作	(1)
二、实验室常识	(3)
实验 2 光谱光度法	(4)
一、原理	(4)
二、光电比色计和可见分光光度计	(6)
三、紫外分光光度计	(12)
实验 3 层析技术	(13)
一、氨基酸的单向纸上层析	(14)
二、氨基酸的硅胶薄层层析	(17)
三、葡聚糖凝胶柱层析分离核黄素和血红蛋白	(18)
四、凝胶层析分离丙种球蛋白与核黄素	(20)
实验 4 离心技术	(24)
一、离心分离法分离血浆球蛋白和清蛋白	(25)
二、差速离心法分离亚细胞结构	(27)
实验 5 电泳技术	(28)
一、琼脂糖凝胶电泳分离血清脂蛋白	(30)
二、血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	(31)
三、聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质	(34)

第二编 生物化学的基础实验

实验 1 蛋白质的颜色反应	(42)
实验 2 蛋白质的盐析	(44)
实验 3 蛋白质含量测定——紫外分光光度法	(45)
实验 4 蛋白质含量测定——改良 Lowry 法	(46)
实验 5 血清总蛋白测定——双缩脲法	(50)
实验 6 蛋白质等电点的测定	(52)
实验 7 核酸组分的鉴定	(54)
实验 8 维生素 C 的测定——2,4-二硝基苯肼法	(55)
实验 9 温度、pH 对酶活性的影响	(58)
实验 10 K_m 值测定——脲酶 K_m 值的简易测定法	(60)
实验 11 激动剂和抑制剂对酶活性的影响及酶的特异性	(62)
实验 12 汞盐对脲素酶的抑制作用及其解除	(64)

实验 13	乳酸脱氢酶及其辅酶	(66)
实验 14	血清淀粉酶(AMS)碘-淀粉比色法	(68)
实验 15	细胞色素体系的作用及其抑制与解除	(70)
实验 16	血清葡萄糖的测定	(73)
实验 17	糖耐量试验	(77)
实验 18	胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	(78)
实验 19	血清中胆固醇的测定	(79)
实验 20	血浆中磷脂的测定	(81)
实验 21	酮体的生成及定性实验	(83)
实验 22	血清中谷丙转氨酶的测定	(84)
实验 23	血清中谷草转氨酶的测定	(87)
实验 24	血清中无机磷的测定	(88)
实验 25	血清中尿素氮的测定	(91)
实验 26	血浆(清)中碳酸氢根的测定	(93)
实验 27	血清中钙离子的测定	(94)
实验 28	血清中锌离子的测定	(95)
实验 29	羟基磷灰石柱层析法分离鼠肝中 RNA 和 DNA	(98)
实验 30	氯化物的测定	(99)
第三编 生物化学的综合实验		
实验 1	血清 γ -球蛋白的分离、纯化及鉴定	(102)
实验 2	核酸的提取、分离及鉴定	(106)
实验 3	亚麻子油脂肪酸的制备及定量测定	(110)
实验 4	离子交换层析法——乳汁过氧化物酶的纯化	(114)
第四编 分子生物学实验		
实验 1	SDS 碱裂解法制备质粒 DNA	(123)
实验 2	质粒 DNA 的酶切与琼脂糖电泳鉴定	(128)
实验 3	从琼脂糖凝胶中分离回收 DNA 片段	(130)
实验 4	DNA 片段的连接反应	(135)
实验 5	用重组质粒 DNA 转化大肠杆菌	(136)
实验 6	聚合酶链反应技术(PCR)	(139)
实验 7	蛋白质免疫印迹分析	(142)
实验 8	Southern 印迹法	(147)
实验 9	Northern 印迹法	(152)
附	聚丙烯酰胺凝胶电泳银染分析 DNA	(156)
附录 I	常用缓冲溶液及酸碱指示剂的配制方法	(160)
附录 II	几种动物生化常数表	(164)
附录 III	离心机转速(n)与相对离心力(RCF)的换算	(166)

第一编

生物化学基本技能及操作

实验1 基本操作和实验室常识

生物化学实验中需要多种基本操作,如各种玻璃仪器和测量仪的正确使用;技术操作中样品的混匀、搅拌、振荡、加热、保温、沉淀、过滤、离心等。如果这些操作不规范,将影响实验结果的准确性。因此,应对生物化学实验的一些基本操作深入理解和熟练掌握,这对完成实验是非常重要的。

生物化学的实验方法基本上是化学实验方法,也就是用定性和定量的分析方法来观察物质代谢的规律,必须做到定性的清楚及定量的准确。为了做好实验,应先对一些常用仪器的使用方法和实验过程中的基本操作技术,反复练习,熟练掌握。

一、基本操作

1. 吸量管的使用

常用的吸量管有以下三种:

(1) 刻度吸量管

刻度吸量管有 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0mL 等规格。刻度吸量管又分刻度到尖端和刻度不到尖端两种。使用前者时,要将吸量管中的全部液体放出,才能达到指定体积。使用刻度不到尖端的吸量管时,仅需将吸量管内的液体放到下端指定的刻度时,即达到指定体积。

(2) 移液吸量管

也称容量吸量管或胖肚吸量管,是一种单一刻度的吸量管,中间呈圆柱状膨大,为定量移出整量液体之用。有 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100mL 等规格,其容量是根据液体自内流出量来计算。流放溶液时,将管尖紧靠容器内壁,使液体自行流出,流完后管尖在容器内壁上停留 15~30s 即可,管尖残余液体不要吹出。如管壁刻有吹字,则应吹出。

(3) 奥氏吸量管

也称欧氏吸量管,也是一种单一刻度的吸量管,中下部呈环形膨大,所以液体与吸量管表面接触面积较小,用于吸取血液及胶粘液体。流放标本时,应让其自然地缓慢流出,以减少内壁粘附。若为吹出式,管尖最后一小滴应吹出。在实验室常用的有 1.0, 2.0, 5.0mL 等规格。

吸量管的使用方法:使用吸量管时,操作者左手持橡皮球,右手持吸量管上端,将吸量

管浸入液体内大约 0.1cm 深处,不得过深以免管的外壁粘附的溶液太多,也不可太浅,防止空气突然进入管中,将溶液吸入橡皮球内。当吸取液体至刻度上方时,立即用右手食指按住管口。将吸量管下端提出液面,慢慢放开食指使液面下降至所需刻度处,以管尖端接触瓶壁,去除多余液体。然后将吸量管插入另一容器中,再放开食指,使液体流出。

观察刻度时,应保持吸量管于垂直状态,吸量管的刻度面要面对操作者,操作者的视线应与液面处于同一平面上,使弧形液面应与刻度成切线。

2. 玻璃仪器的洗涤

玻璃仪器用完后,应按下列要求清洗:

① 普通玻璃仪器,如烧杯、烧瓶、锥形瓶、试管等,先用自来水冲洗,再以毛刷蘸肥皂液洗刷数遍,以自来水彻底冲刷,最后以少量蒸馏水冲洗,倒置试管架上。

② 吸量管等量器一般只用自来水冲洗,再以蒸馏水冲洗即可。必要时应该用铬酸洗液浸泡过夜,再以自来水彻底冲刷,最后用蒸馏水冲洗,倒置于吸量管架上,使其自行干燥。

③ 吸取含血液或蛋白质等物质的吸量管或其他容器,必须立即用水冲洗。否则,因凝结不易洗净,如欲浸泡洗液中,也必须先用水冲净、晾干,再浸入其中。

④ 滴定管玻璃塞上如有凡士林,清洗前应将凡士林擦去。

⑤ 一切玻璃仪器洗净后,器皿壁应透明光亮,没有水滴。洗净的仪器不能再布擦其内壁。

铬酸洗液配制法:取重铬酸钾 5g 置于 250mL 烧杯中,加水 5mL,摇动使其尽量溶解,慢慢加入浓硫酸 100mL,随加随摇。冷却后,贮存于广口容器内,加盖防止吸水。

3. 搅拌和振荡

① 配制溶液时,必须随时搅拌或振荡混合。配制完时,必须充分搅拌或振荡混合。

② 搅拌使用的玻璃搅棒,必须两头都烧圆滑。

③ 搅棒的粗细长短,必须与容器的大小和所配制的溶液的多少呈适当比例关系。不能用长而粗的搅棒去搅拌小离心管中的少量溶液。

④ 搅拌时,尽量使搅棒沿着管壁运动,不搅入空气,不使溶液飞溅。

⑤ 倾入液体时,必须沿器壁慢慢倾入,以免有大量空气混入。倾倒表面张力低的溶液(如蛋白质溶液)时,更需缓慢仔细。

⑥ 振荡溶液时,应沿圆圈转动容器,不应上下振荡。

⑦ 振荡混合小离心管中液体时,可将离心管握在手中,以手腕、肘或肩作轴来旋转离心管;也可由一手持离心管上端,用另一手弹动离心管;也可用一手大拇指和食指持管的上端,用其余三个手指弹动离心管。手指持管的松紧要随着振动的幅度变化。还可以把双手掌心相对合拢,夹住离心管,来回搓动。

⑧ 在容量瓶中,混合液体时,应倒持容量瓶摇动,用食指或手心顶住瓶塞,并不时翻转容量瓶。

⑨ 在分液漏斗中振荡溶液时,应用一手在适当角度下倒持漏斗用食指或手心顶住瓶塞,并用另一手控制漏斗的活塞。一边振荡,一边开动活塞,使气体可以随时由漏斗排出。

⑩ 研磨配制胶体溶液时,要使杵棒沿着研钵的单方向进行,不要来回研磨。

4. 沉淀的过滤和洗涤

(1) 沉淀的过滤

① 过滤沉淀一般使用滤纸。

② 应根据沉淀的性质选择不同的滤纸。胶体沉淀,应使用质松孔大的滤纸。一般大小颗粒的结晶形沉淀,应使用孔径较小的致密滤纸。而极细的沉淀,则应使用孔径最小的致密滤纸。滤纸越致密,过滤就越慢。

③ 滤纸的大小要由沉淀量来决定,并不是由溶液的体积来决定。沉淀量应装到滤纸高度的 $1/3$ 左右,最多不超过 $1/2$ 。通常使用直径为 $7\sim 9\text{cm}$ 的圆形滤纸。

④ 折叠滤纸应先整齐的对折,错开一点再对折,打开后形成一边一层,一边三层的圆锥体。折叠尖端时不可过于用力,以免容易出洞。放入漏斗中时,滤纸边缘应与漏斗壁完全吻合。撕去三层一边的外面两层部分的尖端,使滤纸上缘能更好的贴在漏斗的壁上,不留缝隙。而下面部分则有空隙,以利于提高过滤速度。

⑤ 滤纸上缘一般应低于漏斗口上缘 $0.5\sim 1\text{cm}$ 。润湿滤纸时,应用指尖轻压滤纸,赶净滤纸和漏斗间的气泡,使滤纸紧贴漏斗壁。同时漏斗颈内必须充满液体,这样,才可借液柱的重量而对滤液产生吸滤作用。

⑥ 过滤时,为了防止沉淀堵塞滤纸的孔洞,通常采用倾泻法,即先小心地把溶液倾入漏斗而不使沉淀流入,只在过滤的最后一步才把沉淀转移到漏斗中。

⑦ 过滤时,将玻璃棒直立在三层滤纸的中间部分,其下端接近但不能触及滤纸,并使盛器紧贴玻璃棒,使液体顺玻璃棒缓缓流入漏斗。液体最多加到距滤纸上缘 $3\sim 4\text{mm}$ 处,过多则沉淀会因滤纸的毛细管作用而爬到漏斗壁上。

(2) 沉淀的洗涤

① 在容器中洗涤沉淀一般采用倾注法,洗涤时,采用少量多次的方法最为有效。通常,容易洗涤的粗粒晶体洗 $2\sim 3$ 次,难洗涤的黏稠无定形沉淀则需洗 $5\sim 6$ 次。注意,每次都应尽量倾干以增加洗涤效率,并防止沉淀流失。

② 转移沉淀时,先向沉淀中加入滤纸一次所能容纳量的洗涤液,搅拌成混悬液,不要等待沉淀下沉,立即按倾注清液的同样方式倾入漏斗。容器内剩余的沉淀可以用少量洗涤液按上述方法重复数次,直到全部转移到漏斗内。

③ 在漏斗内洗涤沉淀时,先将沉淀轻轻摊开在漏斗下部,再用滴管(或洗瓶)将洗涤液加入到漏斗上缘稍下的地方,同时转动漏斗,并使洗涤液沿着漏斗不断向下移动,直到洗涤液充满滤纸一半时立即停止。待漏斗中洗涤液完全漏出后,再进行第二次洗涤。通常,完全洗去沉淀所吸附的不挥发物质,约需 $8\sim 10$ 次左右。确知沉淀已经洗净,需要进行必要的检验。必须注意,沉淀的过滤和洗涤工作一定要一次完成,不可间断。

二、实验室常识

① 挪动干净玻璃仪器时,勿使手指接触仪器内部。

② 量瓶是量器,不准用量瓶作盛器。量瓶等带有磨口玻璃塞的塞子,不要盖错。带有玻璃塞的仪器和玻璃瓶等,如果暂时不使用,要用纸条把瓶塞和瓶口隔开。

③ 洗净的仪器要放在架上或干净纱布上晾干,不能用抹布擦拭,更不能用抹布擦拭仪器内壁。

④ 不要用棉花代替橡皮塞或木塞堵瓶口或试管口。

⑤ 不要用纸片覆盖烧杯和锥形瓶等。

⑥ 不要用滤纸称量药品,更不能用滤纸做记录。

⑦ 不要用石蜡封闭精细药品的瓶口,以免掺进杂质。

⑧ 标签纸的大小应与容器相称,或用大小相当的白纸,绝对不能用滤纸。标签上要写明物质的名称、规格(或浓度)、配制的日期及配制人。标签应贴在试剂瓶或烧杯的 $\frac{2}{3}$ 处,试管等细长形容器则贴在上部。

⑨ 使用铅笔写标记时,要在玻璃仪器的磨砂玻璃处。如用玻璃蜡笔,则写在玻璃容器的光滑面上。

⑩ 取用试剂和标准溶液后,需立即将瓶塞严,放回原处。取出的试剂和标准溶液,如未用完,切勿倒回原瓶内,以免掺混。

⑪ 凡是发生烟雾、有毒气体和有臭味气体的实验,均应在通风橱内进行。橱门应紧闭,非必要时不要打开。

⑫ 进行动物实验时,不许戏弄动物。进行杀死或解剖等操作,必须按规定方法进行。绝对不能用动物、手术器械或药品开玩笑。

⑬ 使用贵重仪器,如天平、比色计、离心机等,应十分重视,加倍爱护。使用前,应熟知使用方法,若有问题,随时请指导实验的人员解答。使用时,要严格遵守操作规程。发生故障时,应立即关闭仪器,请示报告,不得擅自拆修。

石渊渊

实验 2 光谱光度法

利用各种化学物质(包括原子、基团、分子)所具有的发射、吸收或散射光谱谱系(带状或线状)的特征来确定其性质、结构及含量的技术,称为光谱光度分析技术。可见光、紫外线及红外线照射某些物质后,引起物质内部分子、电子或原子核间运动状态的变化,消耗一部分能量,然后透射出来,再通过棱镜,可得到一组不连续的光谱,此光谱称为吸收光谱。由物质产生吸收光谱的原理建立的分析方法,有比色法和分光光度法。

应用发射光谱而设计的分析仪器主要有火焰光度计、原子荧光光谱仪和荧光比色计等。根据物质的吸收光谱设计的定量分析仪器有:光电比色计、可见光区分光光度计、紫外光区分光光度计、红外光区分光光度计以及原子吸收分光光度计等。

一、原 理

光是电磁波的一种,具有不同的波长。波长的范围在 $400\sim 750\text{nm}$,肉眼可以观察到

的光叫可见光;波长范围在 200~400nm,肉眼观察不到的光叫紫外光。当一束单色光通过溶液时,溶液吸收了一部分光能,其余部分透过溶液。不同物质的分子其结构不同,对光的吸收能力也不同。在特定的波长条件下,可通过测定溶液的吸光度,对溶液中的物质进行定量测定。

Lambert-Beer 定律阐明了吸光物质对单色光吸收的强弱与该物质溶液的浓度、光径长度之间的定量关系:

$$A = -\lg T = -\lg(I_t/I_0) = Ecl$$

式中: E 为吸光系数;

c 为溶液的浓度;

l 为溶液的厚度;

I_0 为入射光强度;

I_t 为出射光强度;

I_t/I_0 称为透光率,用 T 表示。

在实际应用中,为了方便用 A 代表 $-\lg T$,并称为吸光度。Lambert-Beer 定律不仅适用于可见光,也适用于紫外光和红外光。

从 Lambert-Beer 定律可知,吸光度与吸光物质溶液的浓度和溶液的厚度的乘积成正比关系。当待测物质与标准物质溶液的成分相同时,吸光系数 E 相等,而待测物质与标准物质溶液的厚度也相等时,吸光度则与溶液的浓度呈正比。在实际工作中,常用已知浓度求算法和标准曲线法测定物质溶液的浓度。

1. 已知浓度求算法

在相同的条件下测定已知浓度(c_1)标准溶液的吸光度(A_1),同时测定未知浓度(c_2)样品溶液(待测溶液)的吸光度(A_2),如一种物质的两种不同浓度的溶液,与吸光度的关系则为:

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{c_1}{c_2}$$

在测得待测溶液和标准溶液的吸光度后,即可算出待测溶液的浓度:

$$c_2 = \frac{A_2}{A_1} c_1$$

2. 标准曲线法

配制已知浓度的标准物质的梯度溶液(呈梯度递增的不同已知浓度),用与被测溶液相同的方法处理显色,分别读取特定波长下各已知浓度的标准溶液的吸光度。以各已知浓度为横坐标,以其相应的吸光度为纵坐标,在坐标纸上作图即得标准曲线。依据待测溶液的吸光度在标准曲线上便可查找到其对应浓度。

已知浓度求算法比标准曲线法的误差小。标准曲线法适合于大批量样品的测定,可节约人力和试剂。但应注意,制作标准曲线时,标准溶液的测定必须与待测溶液的测定在同一台仪器上进行,而且要求操作步骤和其他条件完全一致,否则,会引起很大误差。另外,所作标准曲线只能供短期使用,且应定期进行校验。

二、光电比色计和可见光分光光度计

1. 581-G 光电比色计

光电比色计种类较多,一般由光源、滤光片、比色杯、光电池和检流计五个部分组成。现以国产 581-G 型光电比色计为例,介绍仪器的基本结构和使用。

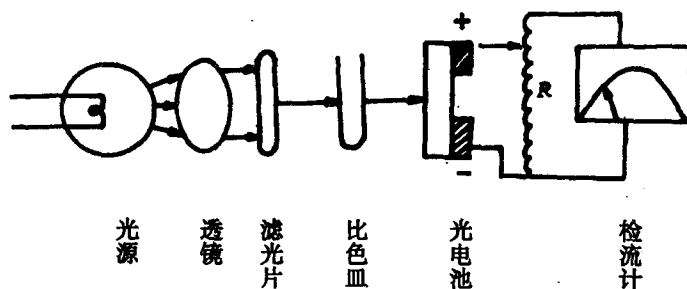


图 1-1 光电比色计结构示意图

操作方法如下:

(1) 光源

最常用的是 6~12V 的钨丝灯泡。由交流电通过变压器供电或由蓄电池供电。为了得到准确的测量结果,电源的电压应尽可能保持稳定,因此一般光电比色计都附有稳压装置。

(2) 滤光片

有色溶液对大多数波长的光线都可吸收一部分,但对某种波长的光线吸收特别多。这种现象称为最大吸收。滤光片可除去有色溶液吸收不多的光波,而让溶液吸收最多的光透过。滤光片不能从混合光中选出纯的单色光,而只是某一波长范围的光。操作时,根据测定液的颜色选择滤光片。原则是:滤光片的颜色应与溶液的颜色互为补色。所谓补色就是指两种能合并为白光的有色光。例如,橘红色和蓝绿色互为补色,青紫色和黄绿色互为补色等。当滤光片和测定液二者的颜色互为补色时,滤光片透过率最大的光波便是溶液吸收最大的光波,这样有利于测定。下表供选择滤光片时参考。

滤光片选择参考表

溶液颜色	滤光片颜色	滤光片透过率最大的光波(nm)
黄 绿	青 紫	400~435
黄	蓝	435~480
橘 红	蓝 绿	480~490
红	绿 蓝	490~500
紫	绿	500~560
蓝 紫	绿 黄	560~580
蓝	黄	580~595
蓝 绿	橘 红	595~610
绿 蓝	红	610~750

(3) 比色皿

比色皿用来盛待测液,一般比色计都配有不同规格的比色皿供选用;如果同时使用几个比色皿,它们的规格必须相同。

(4) 光电池

光电池能将照射到其上的光能转变为电能。有些物质受光照射可产生电流,这一现象称为光电效应,这些物质称为光敏物质。半导体硒就是一种光敏物质。光电比色计中的光电池就是硒光电池。光电池受光照射产生的光电流的强度与照射光的强度成正比。硒光电池对 400~650nm 之间的光敏感,对红外光和紫外光则不敏感,所以,光电池仅用于可见光范围。

操作

将光电比色计置于背光而平稳的台面上,按规定电压接上电源,拨开关使其指向“1”,预热 10min,旋转零点调节器,使读数盘上亮圈中的黑线位于透光率“0”或吸光度“ ∞ ”处。然后选择合适的滤光片插入滤光片插座中。

取清洁比色皿(手只能拿其毛玻璃面)分别盛空白、标准及测定液,各溶液只盛满比色杯的 3/4 容积。皿外壁如有水珠,必须用软绸布或擦镜纸擦干,分别放入比色槽内。

将空白液置于光路上,再将开关拨至“2”的位置,依次用粗调节和细调节改变电阻,使读数盘上亮圈中的黑线恰好位于透光率“100”或吸光度为“0”处。移动比色槽使测定液置于光路上,这时读数盘上亮圈发生移动,等亮圈稳定后,读记亮圈中黑线所指示的吸光度值。然后重测一次,以求准确。再换置另一测定液于光路上,按上述步骤继续测定。在取出比色皿时,应先将开关拨回“1”。

操作完毕,将开关拨回到“0”,拔去电源插头,取出比色皿,及时清洗,晾干。切忌用毛刷刷洗,以免损坏玻璃的透光性。

2. 可见光分光光度计

分光光度法用于物质的定量分析时,基本原理和光电比色法相同,但具有以下特点:

① 光电比色法由滤光片获得的是近似单色光,分光光度法则利用棱镜或光栅得到单色光。而 Lambert-Beer 定律严格地说只适用于单色光。因此,分光光度法比光电比色法的灵敏度、准确度和选择性都高;

② 光电比色法只限于利用可见光范围的光波进行分析,分光光度法不仅可用于可见光,还可用于紫外光区($<400\text{nm}$)和红外光区($>750\text{nm}$)的光波进行分析,对无色溶液也可以测定,因而扩大了应用范围;

③ 利用分光光度法可以测定共存于同一溶液中的两种或两种以上的物质。这是由于不同的物质对光有不同的最大吸收波长,分光光度计能从混合光中细分出各种不同波长的光,根据溶液中所含物质和种类选择各物质吸收量大的波长,即可测定两种以上不同的物质;

④ 分光光度法不仅可以测定溶液中物质的含量,还可以借助测定物质的吸收光谱以鉴定物质的种类。调节分光棱镜能使不同波长的光分别通过被测溶液,记录被测溶液对每一波长光的吸光度(即光密度),便可绘制吸收光谱曲线。不同的物质有不同的光谱曲线。

(1) 721 型分光光度计

721 型分光光度计是一种国产可见光分光光度计(测定范围 400~750nm)。该仪器系棱镜分光,用光电管作检测器,光电流放大后,用一高阻毫伏计,直接指示读数。仪器的外形如图 1-2 所示。

721 型分光光度计以 12V、25W 白炽钨丝灯为光源,经透镜聚光后射入单色光器内,经棱镜分散,反射到准直镜,得到光波范围更窄的光进入比色皿,透出的光由光电管接收,产生电流,再经放大,然后由微安表测定电流强度,并直接读出吸光度。如图 1-3 所示。

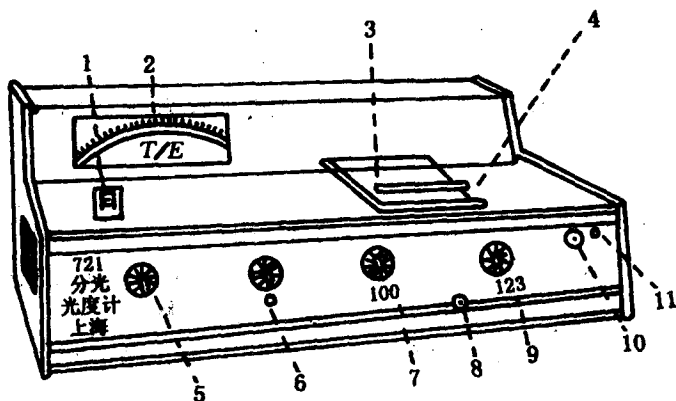


图 1-2 721 型分光光度计外形

1. 波长读数窗 2. 电表 3. 比色器暗箱盖 4. 光门 5. 波长旋钮
6. 零位调节旋钮 7. 光量调节旋钮 8. 比色皿拉杆 9. 灵敏度旋钮
10. 开关 11. 指示灯

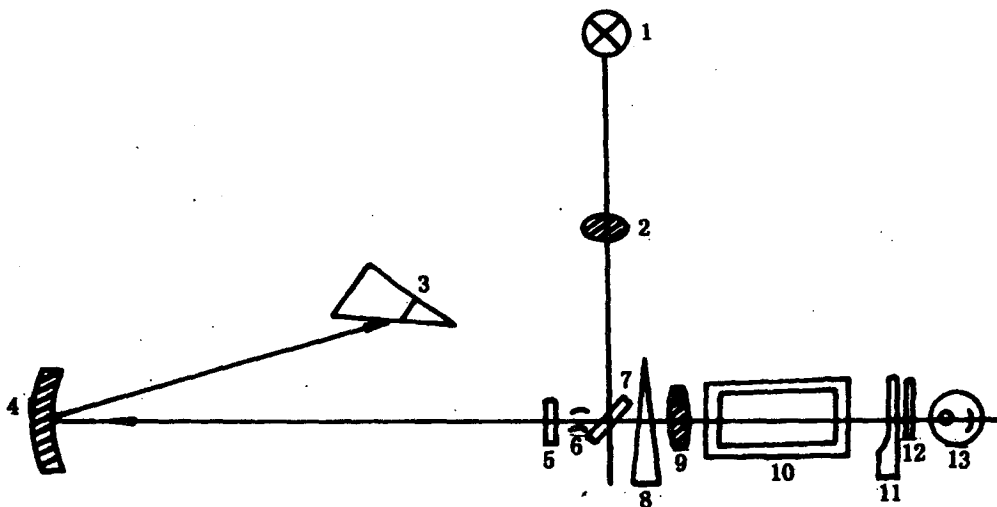


图 1-3 721 型分光光度计结构示意图

1. 光源灯 2. 透镜聚光 3. 色散棱镜 4. 准直镜 5. 保护玻璃 6. 狭缝 7. 反射镜 8. 光栏
9. 聚光透镜 10. 比色皿 11、12. 光门 13. 光电管

721 型分光光度计的操作

① 仪器未接电源时,电表指针必须位于刻度“0”上,否则,可用电表上的校正螺丝进行调节。

② 接通电源(220V),打开样品室的盖板,使电表指针指示“0”位,预热约 20min,再选择需用单色光波长和相应的放大灵敏档,调节“0”电位器,校正“0”位。

③ 将比色皿分别盛空白液、标准液和待测液,放入暗箱中的正确位置。先置空白管于光路上,打开光门,旋转光亮调节器,使电表指针准确指向 $T\ 100\%$ 。反复几次调整“0”及 100% 透光率。

④ 将比色器架依次拉出,使标准管和待测管分别进入光路,读记吸光度值。每次测定完毕或换盛比色液时,必须打开样品室的盖板,以免光电管持续曝光。

(2) 72 型分光光度计

72 型分光光度计是可见光分光光度计,其波长范围为 $420\sim 720\text{nm}$ 。

操作方法:

① 按照接线要求,将稳压器和检流计连接在单色器上。注意,将检流计与单色器相接时,应按三股接线的颜色准确连接。而稳压器的输出接线柱与单色器相接。

② 在电源电压与仪器要求的电压相符时,分别插上稳压器和检流计的电源插头。

③ 将单色器的光路闸门拨到黑点(关闭光路的指示)位置后,再将检流计上的电源开关旋到“开”处,指示光点即出现在标尺上,用零点调节器将光点中线准确地调至透光率标尺的“0”位上。

④ 打开稳压器的电源开关和单色器的光源开关,10min 后再使用仪器。

⑤ 将比色皿架暗厢盖打开,取出比色皿架,将 4 支比色皿中的 1 支装入空白溶液或蒸馏水。其余 3 支装入待测液。将比色皿置于架上,空白溶液皿应放在第一格内,放回暗厢内,盖好暗厢盖。此时空白溶液皿应在光路上。

⑥ 旋转波长调节器,将所需波长对准红线。把光路闸门拨到红点(打开光路的指示)位置上,并以顺时针方向旋动光点调节器,使光点中线移至透光率“100”的刻度处。数分钟后,待光电池趋于稳定,再轻轻转动光点调节器,使光点中线准确地处于透光率“100”的位置。

⑦ 将单色器的光路闸门拨回黑点处,校正检流计的光点中线于“0”位上。然后,立即开启光路闸门,拨至红点处,校正检流计光点中线对准透光率“100”刻度上。

⑧ 调节好后,可以进行样品溶液的测定。将比色皿定位装置的拉杆轻轻地拉出一格,使第二个比色皿内的待测液进入光路。此时检流计标尺上光点中心线所指示的读数,即为该溶液的吸光度或透光率。依此测定第二、第三个待测液,并读出数据。重复 2~3 次后,取其平均值。

⑨ 在测定过程中,应经常关闭光路闸门,核对检流计的零点位置。如有改变,及时用零点调节器校准。

⑩ 测定完毕,将每个旋钮、开关和调节器等复原或关闭。拔掉电源插头,切断电源,并盖好仪器罩。

(3) 722 型光栅分光光度计

722 型光栅分光光度计由光源、单色器、试样室、光电管、线性运算放大器、对数运算放大器及数字显示器等部件组成。见图 1-4 所示。

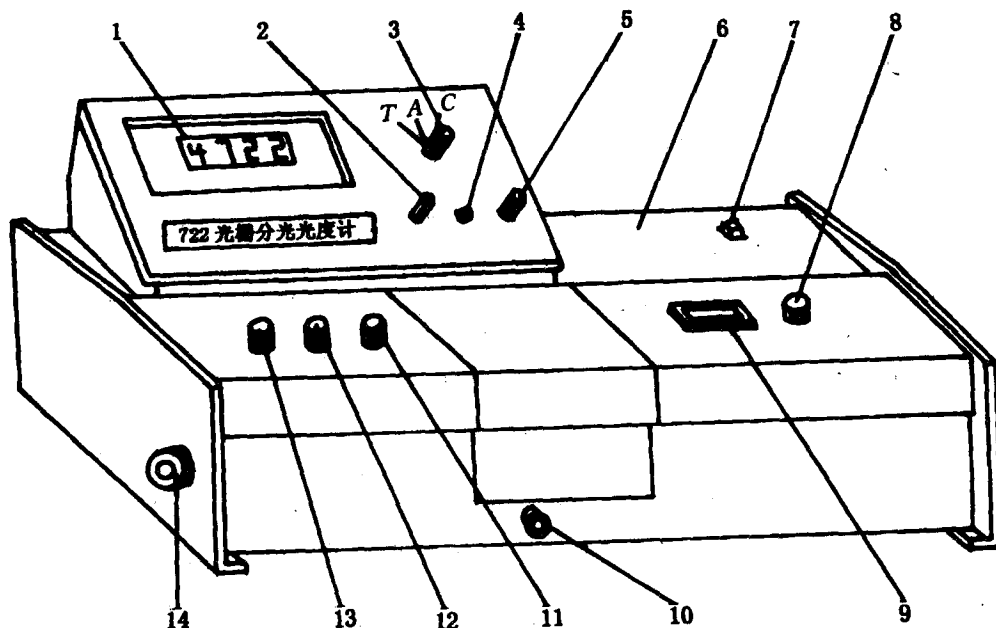


图 1-4 722 型光栅分光光度计外形

1. 数字显示器 2. 吸光度调节旋钮(消光零) 3. 选择开关 4. 吸光度调斜率电位器
5. 浓度旋钮 6. 光源室 7. 电源开关 8. 波长旋钮 9. 波长刻度窗 10. 试样架拉手
11. 100% T 旋钮 12. 0 T 旋钮(0 旋钮) 13. 灵敏度调节旋钮 14. 干燥器

操作方法：

- ① 调节灵敏度 将灵敏度旋钮置于放大倍数最小的“1”档；
- ② 预热仪器 开启电源，开亮指示灯，使仪器预热 20min，将选择开关置于“T”位；
- ③ 调透光率“0” 打开试样室盖(光门自动关闭)，调节“0”旋钮，使数字显示为“00.0”；
- ④ 放置比色皿 将盛有溶液的比色皿置于比色皿架中；
- ⑤ 调节波长 旋动波长旋钮，调节所需波长；
- ⑥ 调节透光率“100” 合上试样室盖，推动试样架拉手，使空白溶液或对照溶液比色皿置于光路，调节“100”旋钮，使数字显示为“100.0”(若显示不到，适当增大灵敏度档位，重新调节步骤③后，再按步骤⑥操作，保证“00.0”和“100.0”分别到位)；
- ⑦ 测定透光率 T 推动试样架拉手，将标准溶液或被测溶液置于光路，数字显示器即显示出位于光路溶液的透光率(T)；
- ⑧ 测定吸光度 A 参照步骤③和⑥分别调整仪器的“00.0”和“100.0”，将选择开关置于“A”，把空白或对照溶液置于光路，旋动“消光零”旋钮，使数字显示器即显示为“00.0”，再将标准溶液或被测溶液移入光路，在数字显示器上读取吸光度(A)；
- ⑨ 测定浓度 c 参照步骤③和⑥分别调整仪器的“00.0”和“100.0”，把选择开关置于

“C”,将标准溶液推入光路,调节浓度旋钮。使数字显示为其浓度值,再将被测溶液推入光路,数字显示器上即显示出被测溶液的浓度。

3. 硫酸铜溶液的测定

(1) 硫酸铜溶液的测定

用蒸馏水作空白,调节波长 690nm,581-G 光电比色计,用红色透光片按步骤操作(不同的仪器按不同的操作方法),分别读取系列标准硫酸铜溶液和待测溶液的吸光度,每一数据重复读取 3 次,取平均值。

(2) 结果处理

① 标准浓度求算法

将 6g/L 标准硫酸铜溶液的吸光度和待测硫酸铜溶液的吸光度代入以下公式,求出待测硫酸铜溶液的浓度

$$c_2 = \frac{A_2}{A_1} \times c_1$$

② 标准曲线法

在坐标纸上,以各标准硫酸铜溶液的浓度为横坐标,以各浓度相应的吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。用待测浓度的硫酸铜溶液的吸光度便可在标准曲线上查得相应的浓度。

(3) 注意事项

① 预热是保证仪器准确、稳定的重要步骤。

② 比色皿的清洁程度,直接影响实验结果。比色皿一定要清洗干净,先用自来水反复冲洗,然后用蒸馏水淋洗,倒立于滤纸片上晾干,切忌用毛刷刷洗,以免损坏玻璃的透光性。

③ 比色皿与分光光度计应配套使用,否则,会引起较大的实验误差。

④ 比色皿内盛液应为其容量的 2/3,过少会影响实验结果,过多易在测量过程中外溢,污染仪器。

⑤ 拿放比色皿时,应持其“毛面”,杜绝接触光路通过的“光面”。如比色皿外表面有液体,应用绸布或擦镜纸拭干,以保证光路通过时不受影响。

⑥ 仪器连续使用不应超过 2h,每次使用后需要间歇 0.5h 以上才能再用。

⑦ 测定某未知待测液时,先制作该溶液的吸收光谱曲线,再选择最大吸收峰的波长作为测定波长。每次读数后将空白皿推入光路,检流计光点中线仍位于透光率“100”,则读数有效。

(4) 实验材料

① 试剂

a. 已知浓度系列的标准硫酸铜溶液 配制浓度分别为 1,2,4,6,8g/L 的硫酸铜溶液备用。

b. 空白溶液(蒸馏水)。

c. 待测浓度硫酸铜溶液 配制浓度范围为 4~8g/L 的硫酸铜溶液备用。

② 器材

581-G 光电比色计,721 型分光光度计,72 型分光光度计,722 型光栅分光光度计。

(根据情况选用)