

生化实验指导

一九七八年八月

196581



* A0136995 *



生化实验目录

生化实验须知	1
--------	---

第一篇 生化实验常用方法

一、火焰光度法	4
✓二、紫外和可见分光光度法	11
三、层析法简介	26
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (附不连续盘状电泳方法)	37
19五、凝胶过滤	45
六、区带电泳	48

第二篇 生化实验

实验一、蛋白质呈色反应	56
(一) 双缩脲反应	56
(二) 蛋白黄色反应	58
(三) 米伦 (Millon) 氏反应	58
(四) 乙醛酸反应	59
(五) 茚三酮反应	59
(六) 蛋白质中硫的反应	60
实验二、蛋白质的变性和沉淀	61
19 (一) 蛋白质的盐析	61
(二) 用酒精沉淀蛋白质	62
(三) 用生物硷试剂沉淀蛋白质	63
(四) 用无机酸沉淀蛋白质	63
(五) 用有机酸沉淀蛋白质	64
(六) 用重金属盐类沉淀蛋白质	64
(七) 加热沉淀蛋白质	64
实验三、蛋白质等电点	65
实验四、血清蛋白质的定量——kjeldahl 氏定氮法	67
实验五、✓核糖核酸的提取及鉴定	72
(一) 酵母中核糖核酸的制备	73
(二) 核糖核酸及其水解产物的检查	73
实验六、酶作用的特异性	74
实验七、温度对酶活性的影响	76
实验八、pH 对酶活性的影响	77
实验九、有机磷农药对胆硷酯酶的抑制作用和抑制作用的解除	77
✓实验十、血清总蛋白的测定	81

1965/210/01

实验十一、胰岛素和肾上腺素对饥饿24小时家兔血糖水平的影响	83
实验十二、酵母细胞摄取葡萄糖对培养液中 K^+ 和无机磷浓度的影响	86
实验十三、运动对尿中乳酸的影响	87
实验十四、脂肪酸的 β -氧化与酮体的生成和利用	88
实验十五、尿中酮体定性	91
实验十六、血清总胆固醇的测定	91
实验十七、血清蛋白和脂蛋白醋酸纤维薄膜电泳(示教)	93
实验十八、乳酸脱氢酶	97
实验十九、细胞色素氧化酶	99
实验二十、过氧化氢酶	100
实验二十一、过氧化物酶	101
实验二十二、氨基移换作用(纸条层析法)	102
实验二十三、全血非蛋白氮(N.P.N.)测定	104
实验二十四、血清钠、钾的测定——火焰光度法(示教)	106
实验二十五、血浆 CO_2 结合力的测定——量气法(示教)	109
实验二十六、血清谷丙转氨酶活性测定	112
实验二十七、血清乳酸脱氢酶同工酶醋酸纤维薄膜电泳测定	115
实验二十八、ATP对肌纤维收缩的影响	117

附 录

一、国际原子量表	119
二、酸碱指示剂	122
三、缓冲液的配制	123
四、常用的酸碱浓度	124
五、四位对数表	125

生化实验须知

毛主席在《实践论》中教导我们：“感性和理性两者的性质不同，但又不是互相分离的，它们在实践的基础上统一起来了。我们的实践证明：感觉到了的东西，我们不能立刻理解它，只有理解了的东西才更深刻地感觉它。感觉只解决现象问题，理论才解决本质问题。这些问题的解决，一点也不能离开实践，无论何人要认识什么事物，除了同那个事物接触，即生活于（实践于）那个事物的环境中，是没有法子解决的。”毛主席的这一段话是我们学习一切知识的指南，虽然生化实习课远远不是我们专业知识实践的全部，但通过同学亲自动手做实验，就可以加深对课堂讲授的理论知识的认识，印证前人传授下来的一些“间接知识”，为进一步指导将来的临床生化检验的实践打下基础，通过实习课还可以反复训练生化实验的基本技术，培养自己分析问题和解决问题的能力，在基本功上过得硬。因此，实习课是我们生化学习中的一个重要环节，希望每位同学给予高度重视。现将我组对同学进行生化实验时的各方面要求提出如下：

一、明确实验目的：

（一）应用实验所得的事实，证明生物化学的某些基本理论，使同学能将理论与实践密切结合；

（二）较熟练地掌握生化实验的基本操作；

（三）养成研究自然科学的正确态度和思维方法；

（四）每一实验之首均列有“实验目的”一项，阐明怎样将上述要求落实到各个实验中。

二、提高实验效率及准确度：

（一）作好预习，订出计划——同学们在动手作实验之前，必须把将要作的实验预习一遍。着重了解其目的要求，原理和主要操作步骤。并根据这些，计划好整个实验应使用的仪器，操作程序及大致的时间分配。做到心中有数，避免盲目机械地按实习指导操作。有些仪器要用干燥的，还必须在前一次实验即为下一次作好准备。毛主席说：

“不打无准备之仗，不打无把握之仗”，实验课就是为实现我国四个现代化的“战场”，大家应当加强计划性。

（二）严肃认真，有条不紊：实验室必须保持安静，严肃认真专心地进行操作，不得高声喧哗谈笑。并应养成整洁的习惯。除实验所用仪器必须洁净以外，实验台上及柜内，亦必须清洁。各种仪器的放置，要有次序，这样既可防止破损，更能提高效率及准确度。

（三）把精力使用在刀刃上：在深刻的理解各个实验的原理及目的要求的基础上，同学们对实验中各个操作步骤的意义应该有明确的概念。例如，若某一实验需要用几种试剂，何种应用吸量管准确量取？何种用量筒即可？哪些步骤应该用干燥的仪器？哪些步骤可以用湿仪器？都应该有条不紊，知其然且知其所以然，应该用精确仪器的步骤，使用不精确的仪器固然会造成很大的误差；可以用较粗糙的仪器的步骤而强求用精密仪器，亦会徒然分散精力，浪费时间，反而妨碍实验效果。只有概念清晰，把精力集中使用在刀刃上，才能迅速准确地完成实验，并免除操作错误。

(四) 误差太大, 必须重做: 每次实验后均应请老师检查审核。定性实验, 得不到应有的结果; 定量实验, 准确性及精密度达不到要求均必须重做。重做实验, 必须检查错误的原因, 然后动手。

三、实验原始记录本及报告:

除实验报告本外, 每人必须预备一个编好页数的实验原始记录本(不要用活页纸)记录: ①实验数据, ②实验结果, ③观察现象; 并供作演算草稿之用。实验数据(如滴定数据、比色读数等)必须边做边记在记录本上。绝对不许用碎纸片记录实验数据, 更不许记录在手心里。凡属实验的原始数据均不可涂改。定量实验结果, 必须在取得数据后当堂立即计算。数据的计算式及算草, 必须详尽清楚地写在原始记录本上。根据实验结果写出实验报告, 于当日送交老师(至迟不超过24小时)。

四、仪器使用的规则:

(一) 常用仪器, 于第一次实验时按所发仪器清单清点, 签名, 并负责保管, 有缺损应立即向预备室负责同志换取。在使用中如有破损, 应该写破损单, 经指导老师检查并签名向预备室补换。期末按清单点交, 对所破损仪器按赔偿制度进行赔偿。

(二) 贵重仪器如比色计, 离心机等及其他精密仪器, 更应尽力爱护, 使用前应熟读使用方法, 严格遵守操作规程。每次使用后签名登记。

毛主席再三告诫我们, 要节省每一个铜板为着战争和革命事业(《我们的经济政策》), 我们应当牢记伟大领袖的指示, 在实验课中用实际行动节约一厘钱、一度电, 一滴水, 避免或减少仪器破损。

五、试剂使用规则: 试剂一般均放在实验台中架子上。取用时应注意以下几点:

(一) 首先仔细辨认瓶上标签, 确定试剂种类及浓度是否自己所需要的。

(二) 取试剂后, 立即将瓶塞盖好(切勿张冠李戴, 发生差错), 放回原处。自己瓶中取出而未用尽的试剂, 不能倒回瓶内。

(三) 使用滴瓶及其他药滴时。均须注意滴管尖随时向下, 切勿倒持管子使试剂流入橡皮帽内, 以致整瓶溶液污染报废。

(四) 取标准溶液时, 应先将其倒入干净试管中, 再用内外均洁净的吸管从试管中吸取, 以免将水分及杂质带入瓶内。

(五) 取用有毒试剂及浓酸浓碱等液体时, 尽可能用量筒或滴定管。必要时用橡皮球套吸量管吸取。切忌用咀吸取, 以免造成意外。

六、废物的处理: 废物必须根据其性质进行处理。

(一) 一般废液倒入水池内。

(二) 浓酸浓碱溶液不可直接倒入水池, 须倒入磁缸内, 或先经稀释然后倒入水池, 否则将损坏下水道。

(三) 固体废物如滤纸、火柴梗、坏软木塞、橡皮物、沉淀物等等, 必须弃于实验台旁磁缸内, 不得倒入水池以免堵塞水道。

(四) 实验完成后之沉淀, 或溶液中含有可以回收的贵重药品或溶剂者, 不可随意舍弃, 应交指导老师回收。

七、实验室安全守则:

(一) 乙醚、石油醚、苯、乙醇、二硫化碳、丙酮均系易燃物, 不可直接在火上加

热（可用热水浴或电热板加热），使用此类试剂时应隔绝或远离灯火。

（二）勿用移液管吸取强酸强碱或其他有毒物质（如氰化物、苯肼）。可用量筒或药滴量取强酸或强碱。氰化物溶液可用滴定管或借皮球用吸管量取。

（三）对于混合反应剧烈及尚不熟悉其性能的试剂，应特别小心。

（四）试管加热时，管口不可对人，并要经常摇动，以免局部过热发生爆沸现象。

（五）凡属发烟或带恶臭或有毒性气体产生的化学操作，均应在烟柜中进行。 H_2S ， NO_2 均系剧毒气体；苯，甲苯，丙酮，氯仿，汞及多种其他物质的蒸气均有毒。如人体吸入大量有毒的蒸气，就会引起急性中毒。在实验室里可能发生的最严重的情况，是长期吸入小量有毒气体所招致的损害。这种损害有时可能在几个月后方显出症状，苯及甲苯可能使白血球减少。氯仿本身有毒，还可能含小量的光气（ $O:C:Cl_2$ ）。四氯化碳本身有毒，遇热分解产生光气。二硫化碳特别易燃，也有毒。

（六）在使用浓酸及浓碱后均应洗手。

（七）若使用破口试管及其他残破的玻璃仪器时，应注意避免切伤。

（八）万一发生酸碱灼伤事故，先用大量自来水冲洗。然后用饱和碳酸氢钠溶液中和酸，用饱和硼酸溶液中和碱，用硫代硫酸钠溶液处理氧化剂。

（九）万一有起火事件，则视发火性质分别采用砂，水或 CO_2 灭火器扑灭之。

八、实验室管理制度：

每实验室选出室长一名，负责各实验室的有关工作。于开学时排出保安卫生值日生。每次实验完毕后，值日生应负责打扫实验室，并检查门窗水电保安工作。

室长和小组长还要经常向同学收集对教学的意见，反映给指导老师，并负责收发实验报告。

第一篇 生化实验常用方法

火焰光度法

火焰光度法是光谱分析法的一种，光谱分析法通常包括两大类：即发射光谱法和吸收光谱法。前面介绍的分光光度法是吸收光谱法的一种。火焰光度法则属于发射光谱法。

发射光谱是由于物质的分子，原子或离子在一定条件下被激发而发射出的特性光谱。这样的光谱决定于激发光源，也就是决定于被激发物质的组成元素及元素的外围电子。而吸收光谱是光源通过介质后透过光的光谱。故吸收光谱只决定于介质的化学组成而与光源没有直接关系。

火焰光度法的优点是简便迅速，需样量少，不需特殊试剂，只要适当稀释即可，准确度和稳定度高（误差0.2~0.4%）。易于掌握。故在实验室工作中已广泛采用，特别常用于临床检验中的钠钾含量测定。

第一节 基本原理

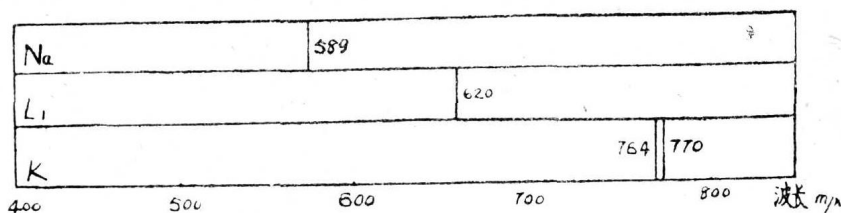
一、火焰对元素的激发及发射光谱的产生：

原子由原子核和绕核旋转的电子所组成，电子因所处轨道不同而具有不同的能级。愈接近原子核的能级愈低，反之离原子核远的，则能级高。电子由低能级轨道跃迁到高能级轨道时需要吸收能量，称为被激发。火焰可以提供激发能跃迁到高能级轨道的电子有返回原来轨道的倾向。返回时将所吸收的能量以光子形式发射出来，显出明亮的光谱线，称为发射光谱。发射光谱的波长决定于激发态的电子轨道与基态轨道之间的能量差。

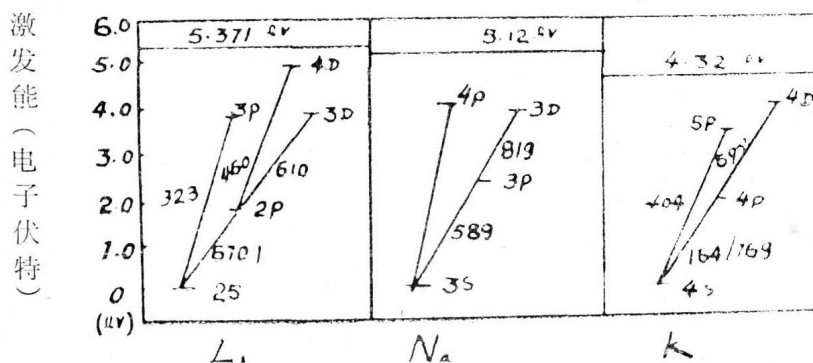
二、发射光谱的特征与物质定性定量测定的关系

由于各元素的原子结构不同，电子跃迁时的能量差也不同，故不同元素各具有其特殊的发射光谱。可作为定性分析的依据。在一定条件下被激发元素的浓度与其发射光的强度成正比，可利用以进行定量测定。

火焰光度法主要是用于定量分析。将被测物质溶液经压缩空气喷雾变成气态后与可燃气体混合而燃烧成火焰，通过滤色片或单色器以获得其特征的单色光，再利用光电效应使光能转化为电流，用检流计或其他检测装置测量光电流的大小。将待测样品的数据与标准液读数相比较即可计算出待测液中所测元素的浓度。



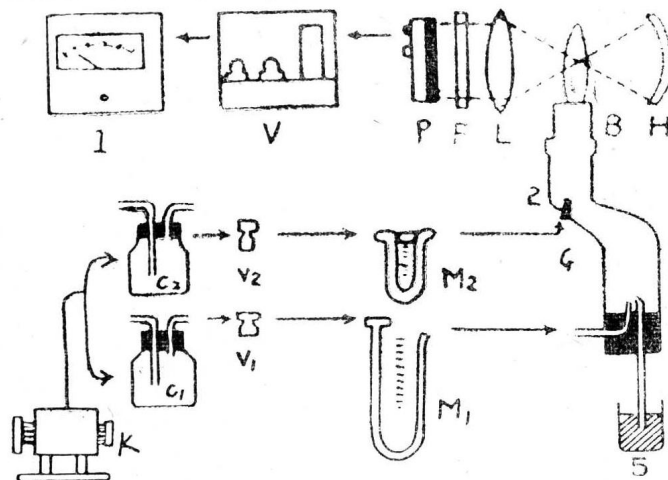
图一 几种金属的主要火焰发射光谱线



图二 几种主要金属元素的外层电子能级以及电子在这些能级间跃迁所产生的谱线波长最强的谱线: Na: $589.3m\mu$ Li: $670.7m\mu$ K: $764/769m\mu$

第二节 火焰光度计的基本结构

火焰光度计的种类很多, 精确程度不一, 但基本结构相同。主要包括三个部分: 喷雾-燃烧系统, 光学系统及光学测量系统。其基本结构见图。



图三 火焰光度计结构简图

喷雾-燃烧系统: B—灯头 G—气体燃料入口 S—待测液 M_1 、 M_2 —压力计
 V_1 、 V_2 —调节螺丝 C_1 —燃烧气体瓶 C_2 —空气缓冲瓶 K—空气压缩机
 光学系统: H—反光镜 L—透镜 F—滤光片
 光学测量系统: P—光电池 V—放大器 I—检流计

现将火焰光度计的各个部件分述如下：

一、气体燃料及助燃气：

常用的有乙炔-空气，煤气-空气或天然气-空气等，国内在缺乏这些燃料供应的地区常用汽油或石油醚蒸气代替，以空气作为助燃气体。

汽油（或石油醚）蒸气和空气是借空气压缩压（一般抽气机反接亦可代替）压入喷雾器之内，在压缩机与喷雾器之间连接压力计以控制气流的大小，并连接几个大瓶作为缓冲瓶以调节和稳定压力并除去空气中的灰尘。

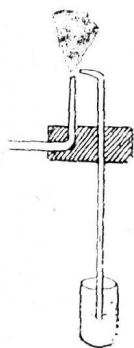


图四 缓冲瓶及燃烧气体供应系统

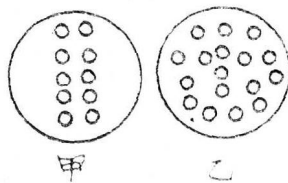
（注意：入气玻管深入瓶底，出气玻管则较短）

二、喷雾器：

喷雾器由两根互相垂直的毛细管组成，当进入喷雾器的压缩空气压力约超过 0.4 个大气压时，即将待测液吸出喷成雾状气流，然后与燃烧气体之蒸气混合一同到达灯头而燃烧。



图五 喷雾器的示意图



图六 灯头气孔的排列

三、灯头：

灯头是由金属制成，它上面的金属纱网防止火焰“回烧”，纱网上气孔的排列方式有两种。



四、光学系统及光学测量系统

气体燃料和待测溶液的喷雾在灯头内混合后，点火燃烧所生成的火焰被反光镜反射集中，经透镜变成平行光后，通过滤光片照射到光电池上。电路中产生的光电流用检流器读出。

第三节 影响准确度的因素及其减免方法

从火焰光度法的基本原理可以了解影响测定的主要因素在于激发条件的稳定程度及被激发物质的情况。亦即只有在火焰的燃烧情况恒定，温度恒定，同时被测物质所处条件及分散程度一致的情况下，才能得出良好的结果。现将影响以上两个方面的一些因素分述于下：

一、影响火焰的因素

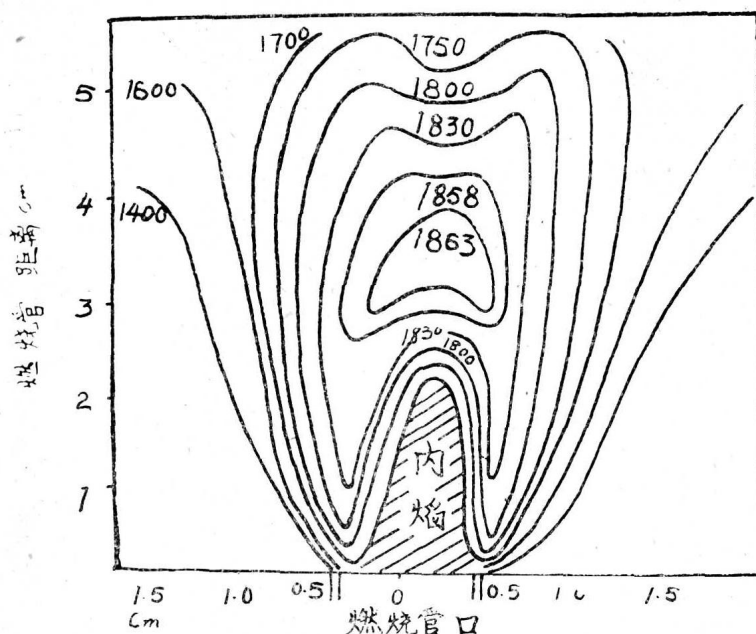
1. 燃烧气与助燃气的组成：

燃烧气与助燃气的组成对火焰的温度影响很大，不同的燃烧气在同一种助燃气中及同一种燃烧气在不同的助燃气中燃烧的焰温各不相同（表一），而焰温对于将液体样品转化为蒸气状态的速度，对于样品中待测原子或分子被激发的数目及激发的程度均有明显影响。因此在同一批实验中应尽可能采取同一种燃烧气及助燃气。同时，燃烧气及助燃气均应纯净，否则所含杂质使火焰带色，影响准确度。

表一 燃烧气与助燃气与焰温的关系

燃 料	最大焰温 (°C)	
	空 气 中	氧 中
照 明 气	1700	2700
丙 烷	1925	2800
丁 烷	1900	2900
H ₂	2100	2780
乙 炔	2200	3050

2. 燃烧气与压缩空气的压力：焰温的分布在火焰的不同部位是不相同的，（如图七），产生发射光最强处在内焰稍上方气体压力不稳或过大过小将严重影响火焰的稳定度，以及火焰的大小，焰温的高低。同时还将影响样品喷雾的情况。例如，以空气助燃并喷雾时。若空气压大，燃烧气压不足则火焰常被吹熄不能起燃，反之，燃烧气压大，空气压不足，不仅喷雾效果不好，而且燃烧不充分，出现黄色焰心，焰温变低，不能进行测定。因此燃烧气压及助燃气压不仅要恒定还要保持一定比例。这种比例常随所用仪器类型及燃料和待测液性质而异，只能通过实践测得。



图七 天然气在空气中燃烧的焰温分析

二、标本的情况:

1. 标本溶液的理化性质: 溶液的表面张力, 粘度、比重等可影响喷雾的性质, 影响样品分散的程度, 从而影响测定灵敏度。例如, 含糖太多的样品, 粘度太大, 即不易喷成细雾。溶液的温度对火焰的温度亦有影响。从冰箱中刚刚取出的样品应在室温中先放置一阵再测。否则降低焰温。

2. 溶剂: 水作溶剂效果不及有机溶剂, 因水份蒸发时有冷却效应, 有机溶液(如醇类)可降低表面张力, 有利于喷雾, 同时醇又可燃烧能增加燃烧温度。加强发射强度。故可增加物质测定灵敏度。

3. 非测定成份的影响: 某些阴离子阳离子或非电解质发射的谱线波长与待测元素所发射的相近, 有的又可抑制待测样品的激发, 因此溶剂及试剂均要用高纯品。在待测样品中存在非测定成份时需制备含非测定成份与待测样品近似的混合标准液, 这样可以抵消非测定成份的影响。

4. 待测样品的浓度: 火焰光度法的灵敏度高。若样品中待测物质浓度过大, 则有可能出现自吸现象, 即一个被激发原子回到基态时所辐射的光能为另一原子所吸收, 使另一原子被激发。故火焰光度法常采用尽可能低的浓度。一般浓度范围为 Na: 0 ~ 5 ppm; K: 0 ~ 10 ppm; Li: 0 ~ 15 ppm; Ca: 0 ~ 50 ppm。

三、火焰光度计仪器的情况:

1. 喷雾灯头的位置: 喷雾灯头上缘与聚光镜下缘要在同一水平位置上, 移动后必须校正。

2. 喷雾器、喷灯及气体通过管道的清楚度: 管道中若凝集了细滴溶液将使火焰起

伏不定。灰尘对以上各部件的污染将影响读数的准确性。故每次测定后必须用蒸馏水和酒精喷雾冲洗，每隔一定时间还要用适宜的无机酸或有机溶液喷雾冲洗。以保持各部件清楚。

3. 光电池灵敏度：光电池连续使用太久会产生光电疲劳现象而产生误差，故应停一段时间，待光电池恢复效能后再使用。

四、其他：

主要为器具，水，环境的清洁与否。例如：玻璃上的钠溶入标本液，吸烟时烟雾中所含的钾等。因火焰光度法灵敏度高，微量杂质可造成很大的误差。故一般配制的标准液应贮放塑料瓶内。本法所用水均须经重蒸馏。实验环境要求尽可能清洁。

五、减免误差的办法：

1. 采用混合标准溶液：如前所述，为抵消待测样品中非测定元素的影响，尽可能使分析溶液与标准溶液的组成一致。例如：测血清中钾钠时所用混合标准液为：钠143.5mEq/l；钾5.1mEq/l；钙5.1mEq/l。

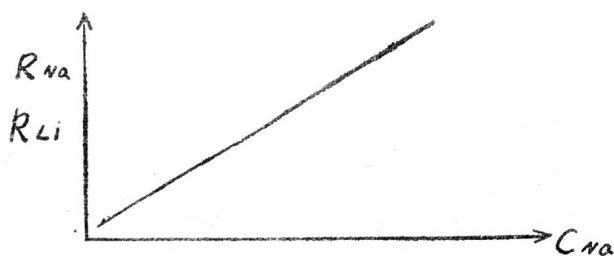
2. 内标法：向待测液及标准液中同时加入等量的待测液中并不存在的元素。如测钾钠时，加入锂作内标元素，每次喷雾用钠滤片和锂滤片各读一次数。求两读数之比，用这个比值对浓度作图（图八）即以元素发射谱线的相对强度代替绝对强度作图，如此可消除各种不易控制的影响因素（如操作中空气，燃料气压力的稍微改变喷雾速度，液滴大小等）。因在每次喷雾中这些条件的变化对两种元素的读数都产生相同的影响，取两种读数的比值作图，实际上约去了影响因素的干扰。

$$\frac{X \cdot E_{Na}}{X \cdot E_{Li}} = \frac{E_{Na}}{E_{Li}}$$

X 一条件变化对读数所造成的影响。

E_{Na} —钠的幅射光强

E_{Li} —锂的幅射光强



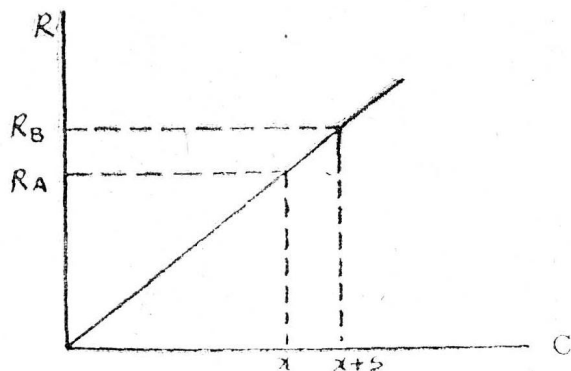
图八 内标准曲线

R_{Na} 钠的读数

R_{Li} 锂的读数

C_{Na} 钠标准液浓度

3. 加入法：将待测样分为A、B两份，于B中加入已知量的标准溶液S，再稀释成等体积，分别测定得读数 R_A ， R_B 。另由纯标准液作一工作曲线。从工作曲线上求出 R_A 及 R_B 所对应的浓度，计算加入值与测定值之比作为校正因子。以校正待测样品读数。



图九 加入法测定图

计算得： $R_A = K X$ 测定值

$R_B = K (X + S)$ 测定值

$R_B - R_A = K S$ 测定值

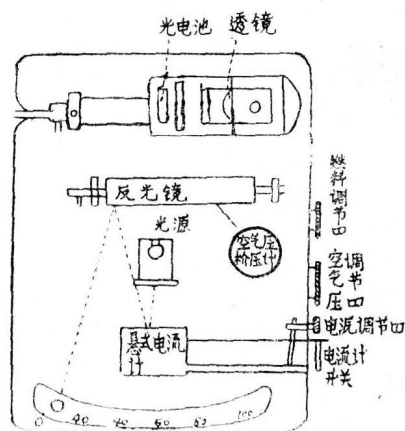
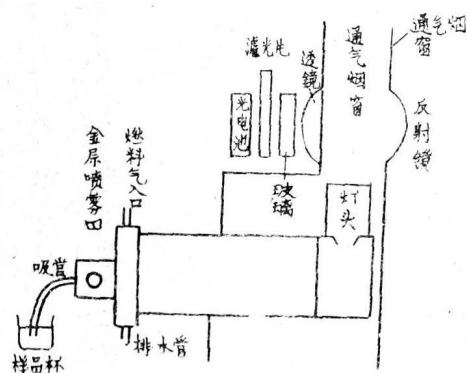
若有干扰则所计算得的S测定值 $\approx$ S加入值

故： $X_{\text{真实值}} = X_{\text{测定值}} \cdot \frac{S_{\text{加入值}}}{S_{\text{测定值}}}$

此法可消除待测样品中所含非测定成分对读数的干扰。

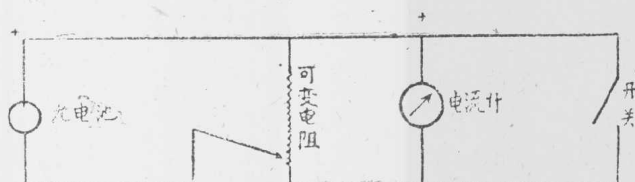
附：EEL型火焰光度计的结构图及操作方法

(一) 剖面图及检测部份的线路：



图十 EEL型火焰光度计纵剖面图

图十一 EEL型火焰光度计横剖面图



图十二 EEL型火焰光度计检测部份线路图

(二) 操作:

1. 检查灵敏度控制器是否扭到指向右下方。(即逆时钟方向扭向尽头)。
2. 检查是否插入了适当的滤光片。
3. 通过燃烧器的内盒孔插入点燃的火柴,同时扭开气体控制器,点火。
4. 打开空气开关,供应空气,调节空气控制器,使压力计读数为10 lb。
5. 用小烧环装满蒸馏水,放好,置仪器侧面使吸样管插入水面以下。
6. 观察火焰情况,调节燃烧气压及空气压,先将燃烧气开大使得一大焰锥,再慢慢关小,使火焰恰好分裂成小焰锥。(兰焰锥过大示燃料气过多,兰焰锥过小示气体过少)。
7. 灵敏度的零点校正:
 - a. 调节满度:用标准液喷雾,校正电位计调节电流计光点至近满刻度偏转。
 - b. 调节零点:换用蒸馏水喷雾,调仪器右侧的零点调节器,将检流计对光点调节到读数为零。
 - c. 再调满度:再喷雾标准液,重新调电位计使电流计读数准确在满度上。
 - d. 再调零点:再喷雾蒸馏水,检查零点读数。

如此,火焰光度计已准备好备用,不要再用电位计。将待测样及不同浓度的标准液分别读数,绘制标准曲线,计算待测样品浓度。在使用中可经常定时喷雾标准液,检查电位计是否满度偏转,必要时再进行调整。

紫外和可见分光光度法

(Ultra-violet and visible spectrophotometry)

物质对于不同波长的光波具有选择吸收的特性,分光光度法就是基于物质的这种特性而建立起来的分析方法。通常分光光度法是指紫外(200~400毫微米)、可见(400~760毫微米)和红外(0.76~30微米;1微米=1000毫微米)波长范围内光的吸收分析。但实际上近代分光光谱分析的应用波长范围远较此为广泛。

分光光度法和比色分析法的原理是类似的,都是光吸收的分析法,主要不同是使用的仪器构造和分析的灵敏度、准确度以及应用范围有不同。

比色分析是用光电比色计进行测定,是由滤光片来获得近似的单色光,滤光片的波长范围宽达20~35毫微米以上。分光光度计是利用棱镜或光栅来取得单色光的,其波长范围可达几个毫微米甚至更窄的单色光,因此分光光度法可以在物质的吸收曲线上选择最合适的波长来进行测定。同时由于比耳定律要求单色光通过溶液,而棱镜或光栅分出

的光更接近于单色光，从而使溶液的吸光度(或光密度)增加，溶液中具有其他有光吸收的干扰物质的干扰作用可以大大减少或消除，因此分光光度法较一般比色法的灵敏度、准确度和选择性都高。而且分光光度法还可以在一个试样中同时测定两种或两种以上组分。甚至样品可不经分离或显色，就能进行直接的分析测定，操作简易方便。分光光度法的测量范围不似比色法的局限于可见光区，这也就大大扩展了吸收光度法的应用范围。另外，物质的吸收峰的波长及其形状均与各该物质的结构有关，因此还可以利用分光光度计测得的吸收曲线(或称吸收光谱)来进行定性分析和结构研究。

当太阳光或日光通过一石英或玻璃棱镜，将被分解或色散为一系列有色光带称为“光谱(Spectrum)”。光谱的一端为兰紫色、一端为红色、即呈红、橙、黄、绿、青、兰、紫连续无明显分界的光谱(图一)这即所谓“连续光谱”。这种光谱能为肉眼所见，又称“可见光”，在可见光区两端外，还有一些不可见。但能用其它方法(如感光底片感光)查出的辐射，在兰紫色端以外的称为“紫外线”；在红色端外的称为“红外线”。除上述辐射外，自然界还有比紫外线波长更短的X-射线， γ -射线；比红外线波长更长的，也还有微波、无线电波等。所有这些辐射都属于电磁辐射，它们组成的波谱称为“电磁波谱”(参考表一)。

表 电磁波谱的性质和光谱分析的应用

量子能量E (电子伏特)	波数 σ cm^{-1}	波长 λ cm	频率 ν Hz	辐射类型	光谱类型及应用
4.1×10^6	33×10^{10}	3×10^{-11}	10^{21}	γ -射线	γ -射线发射光谱
2.1×10^6	33×10^8	3×10^{-9}	10^{19}	X-射线	X-射线吸收光谱 X-射线发射光谱
4.1×10^2	33×10^6	3×10^{-7}	10^{17}	紫外	紫外吸收光谱
4.1×10^0	33×10^4	3×10^{-5}	10^{15}	可见	可见吸收光谱 可见发射光谱
4.1×10^{-2}	33×10^2	3×10^{-3}	10^{13}	红外	红外吸收光谱
4.1×10^{-8}	33×10^0	3×10^{-1}	10^{11}	微波	微波吸收光谱
4.1×10^{-16}	33×10^{-2}	3×10^1	10^9	无线电	无线电发射光谱
4.1×10^{-18}	33×10^{-4}	3×10^3	10^7		

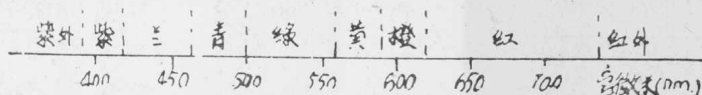


图 1 太阳光中可见光谱

利用物质对不同波长范围的电磁辐射能量的吸收、进行各种分光光谱分析、已成为近代化学和许多其它现代科学研究领域中对物质的定量分析和结构研究的重要实验手段，这些方法包括紫外-可见分光光度法，红外吸收光谱，微波吸收光谱和核磁共振光谱及其它光谱等等（参见表一）。

根据样品的性质，结构和研究目的的不同，选择不同分光光度法，一般核磁共振、微波分光光谱可研究某些物质的细微结构，红外分光光谱法也是研究分子结构的最好方法；但是紫外-可见分光光度法不能研究分子的细微结构，仅能提示某些基团的特征，譬如物质分子的共轭双键，并常用于作样品的定量分析、这里重点介绍紫外-可见分光光度法作定量分析有关的基本原理，仪器构造和应用等。

一、基本原理：

1. 电磁辐射的特性：

所有电磁辐射在真空中都是以同一速度（C）传播，即通常所谓的光速。准确测得其数值为 $2.99792 \times 10^{10} \text{ cm/sec}$ （近似 $3 \times 10^{10} \text{ cm/sec}$ ），光速与波长（ λ ）和频率（ ν ）有如下关系，即： $C = \lambda \times \nu \cong 3 \times 10^{10} \text{ cm/sec}$

波长（ λ ）是指电磁波的二个连续的波峰或波谷的距离、常以毫微米（nm, nanometer 或 $\text{m}\mu$, millimicron）为单位表示（ $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ）也曾有用埃（ $\text{\AA}$, angström）为单位表示（ $1 \text{\AA} = 10^{-8} \text{ cm}$ ）。

频率（ ν ）是指电磁波源在每秒钟内振动的次数，单位为 sec^{-1} ，由于频率数值太大，故常用波数（ σ ）每厘米内含波的数目来表示，其单位是 cm^{-1} 。

$$\sigma = \frac{1}{\lambda} \text{ cm}^{-1}$$

例如：黄光 $\lambda = 6 \times 10^{-5} \text{ cm} = 600 \text{ nm} = 6000 \text{\AA}$

$$\nu = \frac{C}{\lambda} = \frac{3 \times 10^{10}}{6 \times 10^{-5}} = 5 \times 10^{14} \text{ sec}^{-1}$$

$$\sigma = \frac{1}{6 \times 10^{-5}} = 1.67 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$$

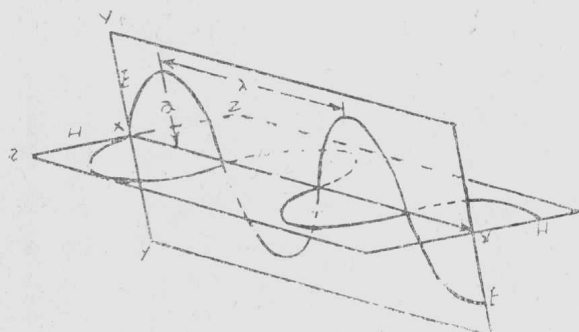
不同波长的光或电磁辐射具有不同的能量，每一种波长的光的能量，都有一最小单位，称为光子或光子，此单位能用 E 表示：

$$E = h\nu \quad \text{或} \quad E = \frac{hc}{\lambda}$$

式中 h 为 Planck 氏常数，等于 6.62×10^{-27} 尔格·秒（ $\text{erg} \cdot \text{sec}$ ）由上式可见，不同波长的电磁辐射的量子能量与波长成反比。

各种不同电磁辐射的主要性质的参数（波长、频率、波数及量子能量等）参看表一。

根据电磁波的理论，认为电磁辐射是能量的一种形式，电磁波的传播就是变化电磁场的传播。常将电磁辐射比喻在空间的交流电场（ E ）和垂直电场方向的变化磁场（ H ），图示如右（图二）：两向量均为正弦曲线，彼此垂直于波动方向（图二中， X 所示）。这就是所谓电磁辐射的波动性。



图二 电磁波的电场向量 E 和磁场向量 H 与波动方向 X 的关系

电磁辐射作用于物质也主要由于电场的作用。但是电磁辐射的波动性不能完全解释辐射能的吸收和发射以及光电效应等。因此又提出光子学说：即认为光和其他电磁辐射都是由具有能量的微粒称为“光量子”或“光子”所构成。物质对光或其他辐射能的吸收也就是光量子或光子能量的被吸收。因此可以认为电磁辐射的本质是具有波动性和微粒性双重特性（即波、粒二象性）。

2. 光吸收的本质

当光和其它电磁辐射通过任何均匀的透明介质时，它透射出来后，辐射能量将降低，这因为部分光可在界面散射，部分在介质内散射，部分在界面反射，其余则被介质吸收。介质所以吸收光的辐射能，是与其分子或原子结构有关。

各种物质的分子，都具有一系列的能级，各能级之间相差不大，当自某一能级（基态）跃迁到能级较高的另一能级（激发态），它必须吸收等于这两个能级的能量差的辐射能（ $h\nu = E_2 - E_1$ ）。部份分子吸收了相应频率的辐射能，跃迁至较高能级而成为激发分子，而出现吸收光谱（参看图三）。

气态样品的吸收光谱常表现为系列尖锐狭窄的吸收峰，但在溶液分子中的吸收光谱，常表现为较宽广的吸收带（参见图四），这因为在电子跃迁能量变化的同时，伴随有分子振动和转动能级的变化。

紫外和可见光辐射具有足够的能量，能使分子中电子被激发，使发生电子跃迁或能级变化，而产生吸收光谱。由于物质的分子结构不同，本身也具有特有的频率，只有当照射的光线和被照射的物质的分子具有相同的频率时，才有光吸收。因此，不同物质具有不同的吸收光谱。这也是利用吸收光谱作为定性分析的物理学基础。

如某物质 M ，吸收光或其它电磁波辐射能时，可以认为是进行下列两个不可逆反应。