

基础医学类实验系列丛书

生物化学

实验指导

主编 左绍远



云南民族出版社

基础医学类实验系列丛书

生物化学实验指导

主 编：左绍远

主 审：钱金楸 段利华

云南民族出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验指导/左绍远主编. —昆明:
云南民族出版社, 2007. 7
(基础医学类实验系列丛书)
ISBN 978 - 7 - 5367 - 3784 - 6

I. 生… II. 左 III. 生物化学—实验 IV. Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 127675 号

责任编辑	岳灵玉
装帧设计	云南师范大学印刷厂工作室
出版发行	云南民族出版社 (昆明市环城西路 170 号云南民族大厦 5 楼 邮编: 650032) http://www.ynbook.com ynbook@vip.163.com
印 刷	云南师范大学印刷厂
开 本	787 × 1092 1/16
印 张	(总) 60
字 数	(总) 1460 千
版 次	2007 年 9 月第 1 版
印 次	2007 年 9 月第 1 次
印 数	1 ~ 1000 套
定 价	94.00 元 (全 7 本)
书 号	ISBN 978 - 7 - 5367 - 3784 - 6/R · 114

序

我国的高等教育，从20世纪末逐步进入了大众化教育阶段，高等教育的发展进入了快速发展时期，大学的分类分层也更加明显。

大理学院根据学校的实际和社会的需求，在总结国内外高等教育先进思想的基础上，于2004年教学工作会上，比较早地提出了要培养“思想品德优良、基础理论扎实、个性充分发展、具有较强实践能力和创新精神、能适应地方经济、社会发展需要的高素质应用型人才”的人才培养定位。这个办学理念 and 定位，将把学校带入一个崭新的发展快车道。随着时间的推移，将更加证明它的先进性和正确性，并深刻地影响着学校的未来。

医学教育本来就是一个实践性很强的学科。培养应用型人才，不仅要求教师要重视专业理论教学的传授，更要重视实验教学环节，尤其是综合运用各方面知识解决实际问题的能力，重视学生专业核心技能的培养和实践能力的提高。开展好实验教学工作、让学生有更多的机会练习，在培养合格学生过程中具有重要的、不可替代的作用。

为了推动我校的实验教学改革，培养更多优秀的应用型人才，我校教学科研服务中心牵头，组织编写大理学院医学教辅材料丛书，并与出版社联系出版事宜，无疑是一件大好事。

大理学院医学教辅材料丛书的各个分册，都是各个老师经过多年教学工作的经验总结，有的已经在教学工作中使用了多年，具有很强的实用性，解决了学生部分实验教学和课程练习的问题，为教学提供了比较规范的、有我校特色的教辅材料。希望教师们在学习中，不断修改完善，让它绽放出更绚丽的色彩来。

作为分管教学的副校长，我要感谢为之付出辛勤劳作的编者老师，感谢为把此系列丛书正式出版做出努力的教学科研服务中心的同志们。

大理学院副校长 钱金楦 教授

2007年6月30日

编 写 说 明

本实验指导是根据大理学院医药学类专业《生物化学教学大纲》及培养应用型人才的培养目标的要求，结合生物化学与分子生物学教研室多年来在实验教学中积累的经验编写的。实验内容的选择，既考虑到配合课堂理论学习，又注重学生基本操作和基本技能的训练。力争通过生物化学实验教学，使学生基本掌握分光分析法、电泳技术、离心分离技术及层析技术等常用生物化学实验技术的原理和方法。为满足不同专业的不同教学要求，本实验指导选编了相对较多的实验内容，包括部分综合性及反映现代生物化学与分子生物学技术的实验。在实际教学中，可根据需要适当取舍。由于时间仓促，书中难免有疏漏之处，请同学及教师在使用过程中提出宝贵意见，以便今后进一步更正。

左绍远

2007年6月

目 录

实验室规则	(1)
一、生化实验基本操作	(2)
二、离心分离技术	(5)
三、分光分析原理	(7)
四、层析法	(11)
五、电泳法	(14)
实 验	(18)
实验一 基本实验技术与分光光度计的使用	(18)
实验二 3,5 二硝基水杨酸比色定糖法	(19)
实验三 蛋白质含量测定	(20)
实验四 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白	(24)
实验五 凝胶过滤层析分离血红蛋白和 DNP - 鱼精蛋白	(26)
实验六 凝胶层析法测定蛋白质相对分子量	(28)
实验七 血红蛋白醋酸纤维薄膜电泳	(34)
实验八 肝组织核酸的分离和定性鉴定	(36)
实验九 酶促反应动力学实验	(38)
实验十 碱性磷酸酶米氏常数测定	(43)
实验十一 Folin—吴法测定血糖	(45)
实验十二 胰岛素、肾上腺素对家兔血糖含量的影响	(47)
实验十三 饥饿和饱食对小白鼠肝糖原含量的影响	(47)
实验十四 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(49)
实验十五 血清总胆固醇的测定	(50)
实验十六 氨基移换作用	(52)
实验十七 微量凯氏定氮法	(54)

实验十八 维生素 C 的测定	(57)
实验十九 类胡萝卜素的色层分析及鉴定	(59)
实验二十 糖的薄层层析	(60)
综合性实验—质粒 DNA 的提取	(62)
附：实验样品的制备	(65)

实 验 室 规 则

[实验要求]

1. 实验前必须预习,明确实验目的、原理、主要操作步骤、注意事项及预期结果。
2. 实验操作必须严肃认真,注意观察实验过程中出现的现象和结果。
3. 实验现象与结果应及时、如实、客观地记录在专用的记录本上,不能事后补记。原始记录不得更改。

[试剂使用]

1. 仔细辨认试剂标签,看清名称及浓度,不可用错。
2. 使用滴管时,滴管尖端朝下,不可倒置,勿使试剂流入橡皮帽内。
3. 用吸量管取溶液时应用吸耳球吸取,不可用嘴吸。
4. 取出试剂后,立即盖好试剂瓶瓶塞并将试剂瓶放回原处,不可盖错瓶塞。
5. 取标准溶液时,应先将标准液倒入干净试管中,再用吸量管吸取标准溶液,以免污染试剂瓶中标准溶液。

[实验室清洁]

1. 实验室必须保持清洁,不得随地吐痰,乱丢纸屑。
2. 所有固体废弃物,如用过的滤纸等,必须丢弃于垃圾筒中,不可弃于水池。
3. 浓酸必须倒入小钵中,用水冲淡,然后倒入水池中,流水冲洗。
4. 实验结束后要清理实验台面,试剂瓶应摆放整齐。
5. 实验室由值日生打扫卫生,并关好窗户、水龙头,切断电源,并在值日生登记本上签字,经老师检查后,方可离开实验室。

[安全注意事项]

1. 低沸点有机溶剂,如乙醚、乙醇、丙酮等易燃易爆品,使用时应远离火源,若需加热要用水浴加热。
2. 凡属发烟或产生有毒气体的实验,均应在通风橱内进行。
3. 若发生酸碱灼烧事故,先用大量自来水冲洗,酸灼伤者用饱和 NaHCO_3 溶液中和,碱灼伤者用饱和 H_3BO_3 溶液中和,氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 处理。
4. 实验室若起火,根据起火性质分别采用砂、水、 CO_2 或 CCl_4 灭火器扑灭。

[实验报告]

每次实验均要书写实验报告,并于规定的时间内送交指导教师,教师批阅后登记入册,作为平时成绩。实验报告应按照带教老师所要求的项目逐项书写,要求字迹清楚、内容简明。

一、生化实验基本操作

[玻璃仪器的清洗]

生化实验常用各种玻璃仪器,其清洁程度将直接影响测量样品的可靠性和反应的准确性,因此,玻璃仪器的清洁不仅是实验前后的常规工作,而且是一项重要的基本技术。

玻璃仪器的清洗方法很多,需要根据实验的要求以及污物性质,选用不同的清洁方法。洗涤的玻璃仪器要求清洁透明,玻璃表面不含可溶解的物质。水沿器壁自然下流时不挂水珠。

1. 新购仪器的清洗:

新购仪器表面附着油污和灰尘,特别是附着有可游离的金属离子。因此,新购仪器需要用肥皂水刷洗,流水冲洗后,浸于10% Na_2CO_3 溶液中煮沸。用流水冲净后,再浸泡于1%~2% HCl 溶液中过夜。流水洗净酸液,用蒸馏水少量多次冲洗后,干燥备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗:(1)一般非计量玻璃仪器或粗容量仪器如试管、烧杯、量筒等,先用肥皂水刷洗,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗2~3次后,倒置于清洁处晾干。

(2)容量分析仪器如吸管量、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,沥干后,浸于铬酸洗液浸泡数小时。然后用自来水和蒸馏水冲洗干净,干燥备用。

(3)比色杯用毕立即用自来水反复冲洗,如有污物粘附于杯壁,宜用盐酸或适当溶剂清洗,然后用自来水、蒸馏水冲洗干净。切记用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。洗净后,倒置晾干备用。

3. 清洗液的原理及配置与原理:(1)铬酸洗液:广泛用于玻璃仪器的洗涤,其清洁效力来自于它的强氧化性和强酸性。由重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)和浓硫酸配制而成,硫酸越浓,铬酸越多,其清洁效力越强。因洗液具有强腐蚀性,所以使用时,必须注意安全。当洗液由棕红色变为绿色时,不宜再用。

洗液的配制有下列3种方法:

①常用铬酸洗液,浓度为3%~5%。配制方法如下:称取重铬酸钾5g置250ml烧杯之中,加入热水5ml搅拌。为使其尽量溶解,在烧杯下放一石棉网,向烧杯中缓慢注入工业用浓硫酸100ml,随加随搅拌,注意不要溅出来。因为放热较多,硫酸不宜加入过快。此时溶液由红黄色变为黑褐色。冷却后装瓶备用。盖严加防吸水。

②取100ml工业用浓硫酸置烧杯中,小心加热,然后慢慢加入5g重铬酸钾粉,边加边搅拌,待全部溶解后冷却,贮于具塞的细口瓶中。

③取80g重铬酸钾溶于1000ml水中,慢慢加入工业用硫酸,边加边搅拌,冷却后备用。

(2)肥皂水和洗衣粉溶液:这是最常用的洗涤剂,主要是利用其乳化作用除去污垢,一般玻璃仪器均可用其刷洗。

(3)5% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 水溶液:碱性,可用于洗涤油污。所洗仪器不可用于磷的测定。

(4)乙二胺四乙酸二钠(EDTA二钠)洗液:浓度为5%~10%的EDTA二钠洗液,加热

煮沸,可去除玻璃器皿内部钙镁盐类的白色沉淀和不易溶解的重金属盐类。

(5) 尿素洗液:45%的尿素溶液是清洗血污和蛋白质的良好溶剂。

(6) 草酸洗液:称取5~10g草酸,溶于100ml水中,加入少量硫酸或浓盐酸,可洗脱高锰酸钾的痕迹。

(7) 盐酸-乙醇洗液:3%的盐酸-乙醇可以除去玻璃器皿上的染料附着物。

(8) 乙醇-硝酸混合液:用于清洗一般方法难以洗净的有机物。最适合于清洗滴定管。

[吸量管的种类和使用]

吸量管是生化实验最常用的仪器之一,测定的准确度和吸量管的正确选择及使用有密切关系。

1. 吸量管的分类:

常用的吸量管可以分为3种:

(1) 奥氏吸量管:供准确量取0.50ml、1.0ml、2.0ml、3.0ml液体所用。此种吸量管只有1个刻度,当放出所量取的液体时,管尖余留的液体必须吹入容器内。

(2) 移液管:常用来量取50.0ml、25.0ml、10.0ml、5.0ml、2.0ml、1.0ml的液体,这种吸量管只有1个刻度,量取的液体自然流出后,管尖需在盛器内壁停留15s。注意管尖残留液体不要吹出。

(3) 刻度吸量管:供量取10ml以下任意体积的溶液。一般刻度包括尖端部分。将所量液体全部放出后,还需要吹出残留于管尖的溶液。此类吸量管为“吹出式”,吸量管上端标有“吹”或“快”字。未标“吹”或“快”字的吸量管,则不必吸出管尖的残留液体。

2. 吸量管的使用:

(1) 选用原则:量取整数量体积液体,并且取量要求准确时,应选用奥氏吸量管。量取大体积液体时,要用移液管。量取任意体积的液体时,应选用取液量最接近的吸量管。例如,欲取0.15ml液体,应选用0.2ml的刻度吸量管。

同一量试验中,如欲加同种试剂于不同管中,并且取量不同时,应选择1支与最大取液量接近的刻度吸量管。例如各试管应加的试剂量为0.30ml、0.50ml、0.70ml、0.9ml时,应选用1支1.0ml刻度吸量管。

(2) 吸量管的使用:中指和拇指拿住吸管上端,食指顶住吸量管顶端;用橡皮球吸液体至刻度上,眼睛看着液面上升;吸完后用食指顶住吸量管上端,并用滤纸擦干其外壁;吸量管保持垂直,下口与试剂瓶接触,用食指控制液体下降至所需体积的刻度处,液体凹面、刻度和视线应在同一水平面上;吸量管移入准备接受溶液的容器中,其出口尖端接触器壁,并成一角度,吸量管仍保持垂直;放开食指,使液体自动流出。

3. 微量吸液器的使用:

(1) 操作:将吸嘴牢固地装在吸引管上,装上后轻轻地扭转一下,以保证气密;扳按钮到第一停止点,把吸嘴头尖浸入取样液内几毫米,释放按钮,使之慢慢返回到初始位置,停留1s;把吸嘴沿样容器壁滑动从取样液内取出,用滤纸擦去吸嘴外面的溶液,注意不要接触到头尖孔;把吸液器的吸嘴头尖置于加样容器壁上,用拇指慢慢地将按钮扳到第一停止点,停留1s(粘性较高的溶液停留时间长些);然后撤到第二停止点,再让吸嘴沿着容器壁向上滑动,当吸嘴头尖与容器壁或溶液不接触时释放按钮,使其返回到初始位置。

2. 注意事项:

①当吸液器吸取溶液时(尤其是血清蛋白质和有机溶液),在吸嘴的内壁将会有个薄膜形成,如果吸嘴仅填充1次会导致比规定值大的误差。因为这个薄膜在同一吸嘴连续取同样溶液时能保持相对的常量,则在以后重复填充该吸嘴时能获得较高的精度。所以取样之前通过该溶液预先清洗吸嘴这个方法对获得较好的精度将是很重要的。

②提高移液精度的操作要点:吸液和排液的速度尽可能一致,切忌“啪”地一下释放按钮;取样时尽可能每次浸入相同的深度(不得超过5mm),尽可能保持吸液器垂直向下;吸取过冷过热的样品时,应使吸嘴温度与样品温度相近,以免样品热胀冷缩。

③注意不要接触会损害吸嘴的溶液,如硝酸或硫酸。

④吸液器不宜高温消毒,吸嘴可以。

[溶液的混匀]

生化实验中,为保证化学反应的充分进行,加入试剂后,充分混匀,是保证试验成功的又一重要步骤,混匀方式大致有以下几种:

1. 使试管作圆周运动:右手持试管上端,利用手腕的旋转,使试管作圆周运动。
2. 指弹混匀:左手持试管上端,试管与地面垂直。右手手指呈切线方向轻拨试管下部,使管内液体呈旋涡状转动。
3. 吸量管均匀:用吸量管将溶液反复吹吸数次,使溶液混匀。
4. 倒转混匀:适用于具塞量筒和容量瓶、试管内容物的混匀。一般试管内容物的混匀,可用聚乙烯等薄膜封口,再用手按住管口,倒转混匀。
5. 玻棒搅动:本法适于烧杯内容物(如固体试剂)的混匀,在生化实验中很少应用。
6. 电磁搅拌混匀:用电磁搅拌器进行混匀,具体操作按电磁搅拌器说明书进行。
7. 振荡器混匀:混匀操作时,应防止管内液体溅出,以免造成液体损失。同时严禁用手指堵住试管口混匀液体,防止污染和标样的损失。

[过 滤]

过滤用于收集滤液、沉淀或洗涤沉淀。在生化实验中如用于收集滤液,应选用干滤纸,不应将滤纸先弄湿,湿滤纸将影响滤液的稀释比例。滤纸过滤一般采用平折法(即对折后,再对折),并且使滤纸上缘与漏斗壁完全吻合,不留缝隙。向漏斗内加液时,要用玻棒引导而且不应倒入过快,勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸。有时以离心沉淀法代替过滤法,可达到省时、快捷的目的。

[离心机的使用方法]

欲使沉淀与母液分开,过滤和离心都可以达到目的,但是当沉淀粘稠,或颗粒小得可以通过滤纸时,则需选用离心法。特别是溶液量小又需定量测定时,离心分离法更具优越性。

离心机种类很多。一般实验室具备的离心机是最大转速为4 000r/min的台式或落地式离心机。本节将简要叙述一般离心机的使用方法(特殊用途的离心机请参阅有关的说明书)。

1. 将待离心的液体置于玻璃离心管中。

2. 平衡:两只装有待离心液的离心管分别装入两个完整的并且配备了橡皮软垫的离心套管之中。置天平两侧配平,在较轻一侧离心管和套管之间用滴管加水,直至平衡。

3. 离心分离:检查离心机,机内应无异物和无用的套管,并且运转平稳,将已配平的两个套管对称地放置于离心机的离心平台上。盖好上盖,开启电源。

慢慢推动转速调节杆,增加离心机转速。当离心机转速达到要求时,记录离心时间。

4. 停止:达到离心时间后,逐渐减速,断开电源,当离心机自然停止后,取出离心管和离心套管。倒去离心套管内的平衡用水,倒置干燥处晾干。

二、离心分离技术

离心技术是现代生物学、遗传工程、医学、检验学、制药学等领域中不可缺少的分离纯化、分析手段。利用离心力将悬浮液中的悬浮微粒快速沉降,借以分离相对密度不同的各种物质成分的方法,是实验室常规采用的技术。

[原理及计算]

根据物质沉降系数、质量、浮力因子等不同,利用离心机产生强大离心力来分离具有不同沉降系数的物质。离心机产生的离心力 F 通常用下式计算:

$$F = \frac{4\pi^2 v^2 r}{g}$$

式中 F 为离心力,单位以地心引力的倍数 g (或 $\times g$) 来表示。 g 为重力加速度,等于 980.6 cm/s^2 ; r 通常指自离心管中轴底部内壁到离心转轴中心之间的距离 (cm); v 为转速,即离心机每秒的转数,若用每分钟转数 (即 rpm 或 r/min) 表示,上式应改为:

$$F = \frac{4\pi^2 v^2 r}{g} \times \left(\frac{1}{60}\right)^2$$

$$u(r/\text{min}) = \sqrt{\frac{Fg \cdot 60^2}{4\pi^2 r}} = \frac{60 \times 31.28}{2 \times 3.14} \times \sqrt{F/r}$$

$$u = (r/\text{min}) = 298.9 \sqrt{F/r}$$

由上可知,离心机每分钟转数 $u(r/\text{min})$ 可以和离心力 $F(g$ 或 $\times g)$ 相互换算。一般情况下,低速离心常用 rpm 表示,超速离心是则用 g (或 $\times g$) 表示。

沉降系数是指单位离心力作用下颗粒沉降的速度。沉降系数用 Svedberg 表示,简称 S 。1S 相当于 $1 \times 10^{-13} S$ 。近代生物化学的许多文献中经常出现沉降系数这一概念,用以描述某些生物高分子或亚细胞器的大小,如 16S RNA、70S 核蛋白体等,蛋白质的沉降系数值常在 1 ~ 200S 之间。沉降系数与物质质点的大小、形状、密度以及介质的密度和粘度等因素有关,当我们对某些生物高分子或亚细胞器组分的化学结构、相对分子质量等还不了解时,可以用沉降系数对它们的物理特性进行初步描述、将它们区别开来。沉降系数可用下式计算:

$$S = \frac{\text{沉降速度}}{\text{单位离心力}} = \frac{dX/dt}{\omega^2 \chi}$$

式中 ω 是角速度, t 为时间(S), 变化着的时间用微分 dt 表示, x 是指粒子运动的距离(cm), 它和粒子的大小、形状、所处介质密度和粘度有关。

[分类及离心方法]

离心机的转速不同, 转速低于 6 000r/min 的为低速离心机, 转速高于 6 000r/min、低于 25 000r/min 的为高速离心机, 转速超过 30 000r/min 是超速离心机。根据用途不同, 超速离心机又分为制备型超速离心机、分析型超速离心机。制备型超速离心机主要用于最大限度地从样品中分离出高纯度的所需组分。分析型超速离心机用于研究生物大分子的沉降特征和结构, 离心机附设有光学系统和电脑, 可将大分子沉降行为以扫描或照相形成记录下来。

根据离心原理, 超速离心法分为差速离心法和密度梯度离心法两大类。现分别介绍如下。

1. 差速离心法: 利用逐渐增加离心速度, 使样品中沉降不同的颗粒逐步分离的方法, 称为差速离心法, 又称分级离心法。若悬浮液中的颗粒是不均一组分开, 可以选用不同的离心速度, 由低速到高速分阶段离心, 将不同颗粒大小的微粒分批沉降析出, 留取所需成分。

差数离心法适用于相对分子质量或沉降系数相差较大, 不稳定、易变化、易受梯度介质损伤的颗粒, 主要用于从组织匀浆中分离细胞及病毒。

差速离心法的优点是操作简便, 可用于大量样品的粗分离, 其缺点是分离效果差, 回收率不高。

2. 密度梯度离心法: 样品溶液在密度梯度介质中进行离心沉降, 在一定的离心力作用下把各组分的颗粒分配到梯度液中相应位置上, 形成不同区带的分离方法, 称为密度梯度离心法。根据操作不同, 密度梯度离心法又可分为速度区带离心法和等密度离心法, 两者的差别见表 1。

表 1 速度区带离心法和等密度离心法的比较

速度区带离心法	等密度离心法
1. 沉降速度主要依赖于颗粒的形状和大小	1. 区带沉降主要依赖于颗粒的密度, 与大小及形状无关
2. 颗粒密度不一定等于周围介质密度	2. 沉降平衡时, 颗粒密度一定等于周围介质密度
3. 转速一般比较高, 离心时间短, 若时间过长, 颗粒可沉至管底	3. 转速一般较低, 离心时间长, 颗粒进入等密度区带就不再沉降

(1) 速度区带离心法: 混合样品中不同颗粒的大小的沉降速度不同, 在一定的离心力作用下, 沉降的颗粒各自以一定的速度沉降而逐渐分开, 在密度梯度的不同位置上分别形成界面清楚的不连续区带的方法, 称为速度区带离心法。颗粒的沉降系数(S)越大, 往下沉降越快, 分离效果也越好。

速度区带离心法适用于大小不同而密度相似的颗粒, 如核酸、蛋白质、脂蛋白以及整细胞等。要使离心成功, 离心管中密度梯度介质从管底到顶部要形成一个连续密度梯度或非连续密度梯度分布; 将混合样品铺于密度梯度液柱顶部时, 要严防空气泡进入梯度, 由于样品颗粒要在密度梯度液中沉降, 它的密度必须大于密度梯度柱中任何一点的密度; 离心必

须在最前面的沉降区带到达离心管底部之前结束。

(2) 等密度离心法: 当样品中不同颗粒存在密度差时, 在离心力作用下, 颗粒在密度梯度介质中或者上浮或者下沉, 各种颗粒按密度大小不同而移动到与它们密度相等的位置 (即等密度点) 形成区带, 此区带的位置、形状不因离心时间的延长而改变。这种按颗粒密度差在相应的等密度点形成区带的分离方法称为等密度离心法。

超速离心法多用于亚细胞结构的分离制备和生物大分子的制备。生物大分子在超离心力场作用下, 离心力大于分子扩散力, 生物大分子便逐渐沉降。分子质量和分子形状不同, 其沉降的速度就不同, 因而被分离。就目前对核酸及蛋白质等高分子生物活性物质的研究情况来看, 越来越趋向于探讨物质结构间的细微差别, 因此密度梯度离心法已成为超速离心技术中使用最广泛的方法。

三、分光分析原理

分光光度法是利用物质特有的吸收光谱, 进行物质鉴定及测定其含量的一种技术。光是由光子所组成的, 光线就是高速向前运动的光子流, 光的本质是一种电磁波, 传播过程呈波动性质, 具有波长和频率的特征。

将电磁波按波长 (或) 频率顺序排列起来, 即得:

γ 射线	X 射线	紫外线	可见光	红外线	无线电用电磁波
-------------	------	-----	-----	-----	---------

人肉眼可见的光线称可见光, 波长范围在 400 ~ 760nm, 波长小于 400nm 的光线叫紫外线, 波长大于 760nm 的叫红外线。可见光区的电磁波因波长不同而呈现不同的颜色, 这些不同颜色的电磁波称为单色光, 太阳及钨灯发出的白光, 是各种单色光的混合光 (复合光), 利用棱镜可将白光分成按波长顺序排列的各种单色光, 即红、橙、黄、绿、青、蓝、紫等, 这就是光谱。

一切物质都会对某些波长的光进行吸收, 这一性质称为选择性吸收。有色溶液之所以呈现不同颜色, 就是由于这种对光的选择性吸收所致。某些无色物质虽对可见光无吸收作用, 但能选择性吸收特定波长的紫外线或红外线。物质的吸收光谱与它们本身的分子结构有关, 不同物质由于其分子结构不同, 对不同波长光线的吸收能力也不同, 因此每种物质都具有特异的吸收光谱的能力, 在一定条件下, 其吸收程度与该物质浓度成正比。故可利用各种物质不同的吸收光谱及其强度, 对不同物质进行定性和定量的分析。

分光光度法所依据的原理是 Lambert - Beer 定律, 该定律阐明了溶液对单色光吸收的多少与溶液浓度及溶液厚度之间的关系。

[Lambert - Beer 定律及其应用]

1. Lambert 定律: 当一束单色光垂直通过一均匀的溶液时, 由于一部分光被溶液吸收, 所以光线的强度减弱。当溶液的浓度不变, 则透过溶液的厚度愈大, 光线强度的减弱愈显著。设: 入射光强度为 I_0 , 溶液的厚度为 L , 出射光即透过光强度为 I , 则 I/I_0 表示光线透过溶液

的程度,称为透光度,同 T 表示:

$$(1) \quad T = \frac{I}{I_0}$$

透光度的负对数 ($-\lg T$) 与溶液的厚度 L 成正比,即:

$$-\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I} \propto L \text{ 由此得:}$$

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_1 L$$

K_1 是常数,受光线波长、溶液性质、溶液浓度的影响。

2. Beer 定律:当一束单色光通过溶液介质时,若溶液的厚度不变而浓度不同时,溶液的浓度愈大,则光吸收愈大,透射光的强度愈弱,其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_2 C$$

式中, K_2 为吸收系数,是常数, C 为溶液的浓度。溶液的吸光度与溶液浓度成正比。

3. Lambert - Beer 定律:将(1)式与(2)式合并,则:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K C L \quad \text{令 } A = \lg \frac{I_0}{I}, \quad T = \frac{I}{I_0}$$

则

$$A = K C L \quad A = -\lg T$$

式中, T 为透光度, A 为吸光度(光密度、消光度), K 为常数,又称消光系数,表示物质对光线吸收的能力,受物质种类和光线波长的影响。对于相同物质和相同波长的单色光则消光系数不变。

4. Lambert - Beer 定律的应用:

(1) 利用标准管计算测定物含量:实际测量过程中,用一已知浓度的标准液和一个未知浓度的待测液同样处理显色,读取吸光度,就可以得出下列算式:

$$A_1 = K_1 C_1 L_1 \quad A_2 = K_2 C_2 L_2$$

式中, A_1 、 A_2 分别是已知浓度标准管和未知浓度待测管的吸光度, C_1 、 C_2 分别为已知浓度标准管和未知浓度待测管的浓度。因为标准液和测定液比色杯径相同($L_1 = L_2$),又因为标准液与待测溶质为同一物质($K_1 = K_2$),故以上两式可写成:

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{K_1 C_1 L_1}{K_2 C_2 L_2} \quad C_2 = \frac{A_2}{A_1} \cdot C_1$$

根据上式可知,对于相同物质和相同波长的单色光来说,溶液的吸光度和溶液的浓度呈正比。故已知标准溶液的浓度及吸光度就可按公式算出待测样品的浓度。

(2) 利用标准曲线进行换算 先配制一系列不同浓度的标准溶液,按测定管同样方法处理显色,在最大吸收波长($\lambda \cdots$)处读取各管吸光度,以各管吸光度 A 为纵轴,各管溶液浓度为横轴,在方格坐标纸上作图得标准曲线。以后进行测定时,只要待测样品以相同条件在 $\lambda \cdots$ 处读取吸光度 A ,就可从标准曲线上查得改样品的相应浓度。

标准曲线范围选择在待测物浓度的 0.5 ~ 2 倍之间较好,并使吸光度在 0.05 ~ 1.0 范围为宜。所作标准曲线仅供短期使用。标准曲线制作与待测管测定应在同一台仪器上进行,有时尽管型号相同,操作条件完全一样,因不是同一台仪器,其结果会有一定误差。

(3) 利用摩尔消光系数 ϵ 求取测定物浓度: 当溶液浓度为 1mol/l 、溶液厚度 1cm 时的吸光度值称为摩尔消光系数, 以 ϵ 表示, 此时 ϵ 与 A 相等。

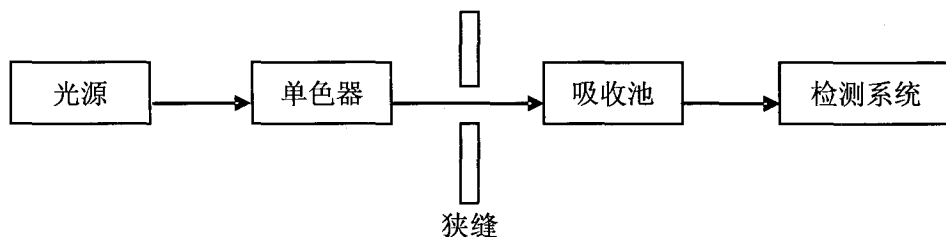
已知 ϵ 情况下, 读取待测液径长为 1cm 时的吸光度 A , 根据下式可求出测定的物质浓度:

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

此计算式常用于紫外吸收法, 如蛋白质溶液含量测定, 因蛋白质在波长 280nm 下具有最大吸收峰, 利用已知蛋白质在波长 280nm 时的摩尔消光系数, 在读取待测蛋白质溶液的吸光度, 即可算出待测蛋白质的浓度, 无需显色, 操作简便。

[仪器介绍与操作]

分光光度计的种类很多, 其原理及结构基本相似, 一般都包括以下几个部件:



分光光度计上常用的光源有钨灯和氘灯, 前者适用于 $340 \sim 900\text{nm}$ 波长范围, 后者适用于 $200 \sim 360\text{nm}$ 的紫外光区, 为了使发出的光线稳定, 光源的供电需要由稳压电源供给。

单色器是将混合光波分解为单一波长光的装置, 多用棱镜或光栅作为色散元件, 通过色散系统可根据需要选择一定波长范围的单色光, 单色光波长范围愈狭, 仪器的敏感性愈高, 测定的结果愈可靠。

狭缝是由一对隔板在光通路上形成的缝隙, 通过调节缝隙的大小调节入射光的强度, 并使入射光形成平行光线, 适应检测的需要。

吸收池即比色杯(比色皿), 一般由玻璃或石英制成。在可见光范围内测量时, 选用光学玻璃吸收池; 在紫外线范围内测量时必须用石英池。比色杯上的指纹、油腻都会显著影响透光性, 因此要仔细操作并保持清洁。

检测系统由受光器和测量器两部分组成, 常用的受光器有光电池, 真空光电管或光电倍增管等。它们可将接受到的光能转变为电能, 并应用放大装置将弱电流放大, 提高灵敏度, 通过电流计显示出电流的大小, 在仪表上可直接读得 A 值、 T 值。

下面介绍几种常用的分光光度计。

1. 721 型分光光度计: 波长范围 $360 \sim 800\text{nm}$, 在 $410 \sim 710\text{nm}$ 灵敏度较好。该仪器用棱镜分光, 光电管作检测器, 光电流放大后, 用一高阻豪伏计直接指示读数。

721 型分光光度计的操作方法如下:

(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 20min , 转动波长选择钮, 选择所需波长, 用灵敏度选择钮选用相应的放大灵敏度档(其灵敏度范围是: 第一档, 1 倍; 第二档, 2 倍; 第三档, 20 倍), 调节“0”电位器校正“0”位。

(3) 将比色杯分别盛空白液、标准液和待测液,放入暗箱中的比色杯架,先置空白液于光路上,打开光门,旋转“100”电钮位,使电表指针准确指向 T 100%。反复几次调整“0”及 100% 透光度。

(4) 将比色杯架依次拉出,使标准液和待测液分别进入光路,读取吸光度值。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. 722 型分光光度计:近年我国在 721 型基础上新生产的 722 型分光光度计,其特点是用液晶板直接显示透光度和吸光度,用光栅作单色器,使用方便,稳定性提高。

722 型分光光度操作方法如下:

(1) 检查 722 型分光光度计的旋钮,使选择钮指向透光度“T”,灵敏度钮置 1 档(此时放大倍率最小)。

(2) 接通电源,打开检测室盖(此时光门自动关闭),打开电源开关,指示灯亮,预热 20min。

(3) 调节波长旋钮至所需波长。

(4) 比色杯分别盛装空白液、标准液和待测液,依次放入检测室比色杯架内,使空白管对准光路。

(5) 打开检测室盖,调节“0”旋钮,使数字显示为“0.00”,盖上检测室盖(光门打开),调节透过率“100”旋钮,使数字显示为“100.0”,重复数次,直至达到稳定。

(6) 吸光度 A 的测量:选择钮拨向“A”,显示为“.000”。如果不是此值,可调节消光零钮,使其达到要求。在移动拉杆,使标准液和待测液分别置于光路,读取“A”值,然后再使空白液对准光路,如 A 值仍为“.000”,则以上标准液与待测液读数有效。

(7) 打开检测室盖,取出比色皿,倾去比色液,用水冲洗干净,倒置于铺有滤纸的平皿中。

(8) 浓度 C 的测定:选择开关由“A”旋置“C”,将已标定浓度的标准液放入光路,调节浓度旋钮,使数字显示为标定值,再将待测液放入光路,即可读出待测液的浓度值。

(9) 关上电源开关,拔出电源插头,取出比色皿架,检查检测室内是否有液体溅出并擦净。检测室内放入硅胶袋,盖上盖后套上仪器布罩。

3. 注意事项:

(1) 仪器需安装在稳固不受震动的工作台上,不能随意搬动。严防震动、潮湿和强光直射。

(2) 比色皿先用蒸馏水洗后,再用比色液润洗才能装比色液。盛装比色液时,约达比色皿 2/3 体积,不宜过多或过少。若不慎使溶液流至比色皿外面,须用棉花或拭镜纸擦干,才能放入比色架。拉比色杆时要轻,以防溶液溅出,腐蚀机件。

(3) 千万不可用手或滤纸等摩擦比色皿的透光面。

(4) 比色皿用后应立即用自来水冲洗干净,若不能洗净,用 5% 中性皂溶液或洗衣粉稀溶液浸泡,也可用新鲜配置的重铬酸钾洗液短时间浸泡,然后用水冲洗干净,倒置晾干。

(5) 每套分光光度计上的比色皿和比色皿架不得随意更换。

(6) 试管架或试剂不得放置于仪器上,以防试剂溅出腐蚀机壳。

(7) 如果试剂溅在仪器上,应立即用棉花或纱布擦干。

(8) 测定溶液浓度的光密度值在 0.1 ~ 0.7 之间最符合吸收定律,线性好,读数误差较小。如光密度超过 0.1 ~ 1.0 范围,可调节比色液浓度,适当稀释或加浓,再进行比色。

(9) 合上检测室连续工作时间不宜过长,以防光电管疲乏。每次读完比色架内的一组