



QUANGUO GAODENG
NONGYE YUANXIAO
JIAOCAI

全国高等农业院校教材

动物生物化学 实验指导

北京农业大学 主编

畜牧、兽医专业用

中国农业出版社

全国高等农业院校试用教材

动物生物化学实验指导

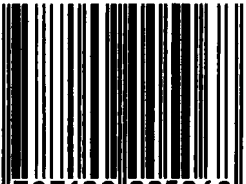
北京农业大学 主编

畜牧 兽医专业用

中国农业出版社

封面设计：赵之公

ISBN 7-109-00506-2



9 787109 005068 >

前 言

这本实验教材是受农业部的委托编写的。1982年在北京召开了动物生物化学教学大纲审订会。本教材基本上是按该次会议制订的大纲编写的。

实验主要是按技术（如光度法、电泳法、层析法等）分类编排的。在每类实验之前对该种技术的原理做了简要的说明，以便使学生对当前常用的生化技术有较全面的了解。但在实际教学中，不一定按这个次序进行。

全书共编写了36个实验，按现在的学时一般是不能全做的。多编一些是为了各兄弟院校根据自己的情况进行选择，也为了其他畜牧、兽医工作者参考。此外，在附录中列举了我们觉得必须提供的实验室常识和常用数据。

在编写过程中，新疆八一农学院郑世昌参加了初稿的全部审查工作；江苏农学院严锦文参加了部分实验的编写工作，特此致谢。

由于编者水平所限，而且为了尽快出版供大家使用，所以匆促编成，因而必然会有许多缺点和错误，渴望读者指正。实验课是培养学生操作技术、科学态度和独立工作能力的重要环节。在编写中我们虽然注意到了这一点，但做得很不够，望大家提出宝贵意见，以便再版时修订。

编 者

1984年6月于北京

目 录

前言

实验室常识	1
实验一 实验基本操作	2
实验二 实验的准确度与精密度	7
实验三 血液样品的处理及组织匀浆的制备	15
实验四 温度、pH 及酶的激活剂、抑制剂对酶活性的影响	20
实验五 维生素 C 的测定	23
实验六 肝糖原的提取与鉴定	26
实验七 血浆游离脂肪酸的微量测定	28
实验八 肝组织的生酮作用	30
实验九 牛乳中蛋白质的提取与鉴定	32
实验十 动物组织中核酸的提取与鉴定	34
实验十一 血清钙的测定	38
实验十二 血清钠的测定	40
实验十三 血浆二氧化碳结合力的测定	42
实验十四 亚硝酸盐引起动物缺氧的观察	47
光度测定法的原理及应用	49
实验十五 有机磷农药对胆碱酯酶的抑制作用	57
实验十六 血清碱性磷酸酶总活性的测定	60
实验十七 转氨酶 (GPT、GOT) 活性的测定——改良金 (King) 氏法	62
实验十八 维生素 B ₁ 简易荧光测定法	66
实验十九 血液葡萄糖的测定——福林 (Folin) —吴宪氏法	68
实验二十 血清总脂测定——香草醛法	70
实验二十一 血清总蛋白、清蛋白及球蛋白的测定	72
实验二十二 血液尿素氮的测定	76
实验二十三 血液非蛋白氮的测定	78
实验二十四 血清无机磷的测定	80
实验二十五 血清钾的测定——比浊法	82
电泳技术的原理及应用	84
实验二十六 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	91
实验二十七 血清碱性磷酸酶同工酶的分离与测定 (聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法)	

.....	94
实验二十八 血清乳酸脱氢酶同工酶的分离与测定 (琼脂糖凝胶电泳法)	98
层析技术的原理及应用	100
实验二十九 应用纸层析法鉴定酶促转氨基作用	108
实验三十 羊毛的水解及氨基酸组成分析	111
实验三十一 无离子水的制备——离子交换柱层析法	113
实验三十二 发酵过程中无机磷的利用和 ATP 的生成	118
实验三十三 脂质的提取和薄层层析	119
实验三十四 凝胶层析法基础练习	121
实验三十五 血清免疫球蛋白 G 的分离纯化及鉴定	125
实验三十六 环状腺苷酸 (cAMP) 的放射免疫测定	130
附录	133
一、量器的校准	133
二、试剂配制的一般注意事项	134
三、标定当量浓度酸碱溶液的配制	135
四、常用数据表	136
1. 常用元素的原子量表	136
2. 实验室中常用酸碱的比重和浓度的关系	137
3. 常用固态化合物的浓度配制参考表	137
4. 一些常用化合物的溶解度 (20℃)	138
5. 常用基准物质的干燥温度和应用范围	138
6. 常用干燥剂	139
五、常用缓冲溶液的配制方法	139
1. 甘氨酸—盐酸缓冲液	139
2. 邻苯二甲酸—盐酸缓冲液	139
3. 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液	139
4. 柠檬酸—氢氧化钠—盐酸缓冲液	140
5. 柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液	141
6. 乙酸—乙酸钠缓冲液	141
7. 磷酸盐缓冲液	141
8. 磷酸二氢钾—氢氧化钠缓冲液	142
9. 巴比妥钠—盐酸缓冲液	142
10. Tris—盐酸缓冲液	143
11. 硼酸—硼砂缓冲液	143
12. 甘氨酸—氢氧化钠缓冲液	144
13. 硼砂—氢氧化钠缓冲液	144
14. 碳酸—碳酸氢钠缓冲液	144
六、层析法常用的一些数据	145
1. 离子交换纤维素	145
2. 常用离子交换树脂某些物理化学性质表	145
3. 葡聚糖凝胶的某些技术数据	150
4. 葡聚糖凝胶所允许的最大操作压	150

七、SI 换算因数	151
八、一些常用血清酶单位换算为国际单位的因数	151
九、某些常见酶的温度校正因数	152
十、血清中酶在不同储存条件下的稳定性	153
十一、家畜血液成分的正常浓度	153
十二、家畜尿中成分的正常浓度	158
十三、家畜脑脊髓液成分的正常浓度	159
主要参考文献	161

实验室常识

实验室工作是科学实践的重要手段之一。只有严肃认真地进行实验，才能获得可靠的结果，并从中引出反映客观实际的规律来。随随便便、粗心大意是做不出正确的实验结果的。因此，必须从学生时代即养成良好的实验室工作习惯。下面所列是在教学中发现的一些主要问题，望同学们在实验中注意。

1. 挪动干净玻璃仪器时，勿使手指接触仪器内壁。拿吸管时切勿用手触及其尖端需放入液体中的部位。

2. 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的内壁。吸管、搅棒等用后要放在架上或底部垫有干净纱布的烧杯内，切勿乱放在实验台上。实验台要保持清洁整齐。

3. 量瓶是量器，不要用作盛器。

4. 量瓶等带有磨口玻璃塞的仪器的塞子，不要盖错。洗涤时塞子和仪器本身要放在一起，以免弄混。不用时要用纸条把塞子和瓶口隔开。抹过凡士林的磨口玻璃塞要用有机溶剂将凡士林洗净后，再用纸条隔开放置。

5. 不要用滤纸称量药品，也不要滤纸作记录。

6. 不要用石蜡封闭精细药品的瓶口，以免掺混。

7. 标签纸的大小应与容器相称，贴在试剂瓶或烧杯的上2/3处，试管等则贴在上部。标签上应写明物质的名称、规格和浓度、配制的日期和配制人。

8. 标准试剂烘干后，应以称量瓶放在干燥器中。称取后立即放回干燥器备用。

9. 取用试剂和标准溶液后，需立即将试剂瓶塞严，放回原处。取出的试剂和标准溶液如未用尽，切勿倒回瓶内，以免掺混。取标准溶液时，应根据需要倒出一定量于干净烧杯内，再用移液管由烧杯中量取。不能用移液管直接由试剂瓶量取。

10. 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。橱门应关闭，非必要不能打开。

11. 用动物进行实验时，在杀死或解剖等操作中，必需按照规定方法进行。不许戏弄动物，绝对不能用动物、手术器械开玩笑。

12. 在实验室工作时要紧张严肃。不许谈天说笑，更不许大声喧哗或互相打闹。实验室的药品器材，未经允许不得带出实验室。

13. 在实验过程中，要将实验的结果及时如实地记录下来。数据要记在一定的记录本中，不要随便记在纸条上，以免丢失。需要拍照的及时拍照。记录不能随意涂改。

14. 要爱护仪器和节省药品。贵重仪器在使用前应熟知使用方法，使用时，要严格遵守操作规程。发生故障时，应立即停止仪器的运转，告知管理人员。切勿擅自拆修。使用后应按规定登记。

实验一 实验基本操作

一、玻璃仪器的认识和使用

除一般玻璃仪器外，生化实验中容量瓶和吸管是常用的准确量器。要保证生化实验的准确性，必需学会正确使用这些量器。

(一) 容量瓶 凡要求准确配制一定浓度的溶液时必需使用容量瓶。

容量瓶的容量有大有小，均在瓶上标出（如 50ml、500ml 等）。瓶颈上有一刻度线，表示当液体加到此刻度时就相当于瓶上所标容量。瓶上并标有温度，通常为 20℃，表示瓶上所标容量是在 20℃ 时的容量。室温不在 20℃ 时，容量将会有所增减。

配制溶液时，先将溶质在烧杯中用少量溶剂溶解，再把溶液沿玻璃棒引入容量瓶；用少量溶剂冲液烧杯后也倒入容量瓶，最后再添加溶剂到刻度线。加溶剂时在接近刻度线前，应改用滴管吸取溶剂滴加，以免超过刻度线。装透明溶液时应使液体凹面下线与瓶上刻度线重叠；非透明溶液则应使液体凹面上线与刻度线重叠。

混匀时，一手握瓶颈并按住瓶塞；一手托瓶底，反复颠倒、摇动数次。

为了保证容量瓶的准确度，容量瓶中所装溶液温度应在 20℃ 左右，不可过高或过低，切不可直接加热；用后只能以水冲洗或用铬酸洗液浸泡，切不可放入毛刷直接刷洗；洗净后倒置放干而不能烘干；容量瓶与其瓶塞是成套固定的，不可任意更换，以免不严而漏出液体；当配制蛋白质溶液时，先在烧杯内溶解后再沿瓶壁缓缓加入，在加到刻度后再混匀，以免产生大量气泡影响观察刻度。

(二) 吸量管 是精密的卸量容器。实验室常用的分三种：

1. 刻度吸管 这类吸管的管壁上刻印有多个刻度。刻度分为刻到尖端的及刻度不到尖端的；刻度读数有从上而下及从下而上的，用前必需分清楚。

用刻度吸量管量取液体时，若使用刻度不到尖端的，只要小心将液体放至下端最后刻度处即可。若使用刻度到尖端的吸管则要注意使用规则。北京等地生产的吸管规定：1ml（包括 1ml）以上的刻度管，在放出液体后，尖端遗留的液体不应吹出，只要使管尖紧靠容器内壁转动几秒钟即可；1ml 以下（不包括 1ml）的刻度管则必须把尖端遗留的液体吹入容器内。这类管上一般都印有“吹”字。

若遇不明是否该吹的吸管，可作校正后（其校正法见附录）再行使用，以免产生错误。

2. 移液管 此类管中部有一圆柱状空泡，只有一个刻度。由于卸出量已经固定，所以准确性比刻度吸管大。使用时，将所量取的液体慢慢放出，尖端所余少量液体不应吹出，只须在最后将管尖触及容器内壁转动几秒钟即可。这类管主要作量卸液体之用。

3. 奥氏（Ostwald）吸管 这是一类特殊吸管。管下端有一卵形空泡，上端有一容量刻度。量取液体时，当所量取的液体自行流出后，必须将遗留在管尖内的少量液体吹入容器

内。该管的特点是每单位容量所占管壁的面积最小，而且管内无凸凹处阻碍液体的流出，因此精确度较高。生物化学实验中常用它吸取血液、组织液和组织匀浆等黏度较大的样品。

(三) 吸量管的使用方法

1. 一般使用吸管是用拇指和中指握着管身，刻度数字对着自己，并使管与地面垂直；以食指堵塞吸管上端开口，用以控制液体的放出速度。

2. 吸取液体时，应用橡皮球（洗耳球）吸取，尽量不用嘴吸。特别是浓酸、浓碱及有毒物质，严禁用嘴吸。吸时，应把吸管插入液体的适当深度，以免发生空吸现象。吸取液体的量应超过最高刻度稍许。

3. 当吸管从所吸取的液体中取出后，均须用滤纸片将管外壁抹干净（特别是吸取血液等粘性液体时更需如此）以免影响取量。

4. 吸管用滤纸抹净后，将液体放至起始刻度，弃去多余液体，然后再放至所需刻度。读取刻度时，眼睛要与所读取的刻度平行。刻度一般为圆圈或弧形，平行时只能看到一条线，液体应流至液体的凹面底部正好与该条线重叠。释放液体速度要慢，不可放开食指自由下落，以免液体在管壁内附着过多而造成误差。

5. 为减少误差，要选用恰当的吸管，如量取 1.5ml 时应选用 2ml 的刻度吸管，而不可选用 5ml 或 10ml 的；以 1ml 吸管吸取两次代替 2ml 也会产生误差。

6. 吸管用毕，应立即用水冲洗，特别吸血液、组织匀浆等含蛋白质溶液的吸管，因蛋白质干固后将堵塞吸管的尖端。水冲后，晾干，再泡入铬酸洗液中 1h 以上，最后取出洗净烘干。

7. 使用过程中要防止吸管尖端和上口碰破，尖端碰破残缺，则吸量不准；上口破残，则不易控制流量。均不能使用。

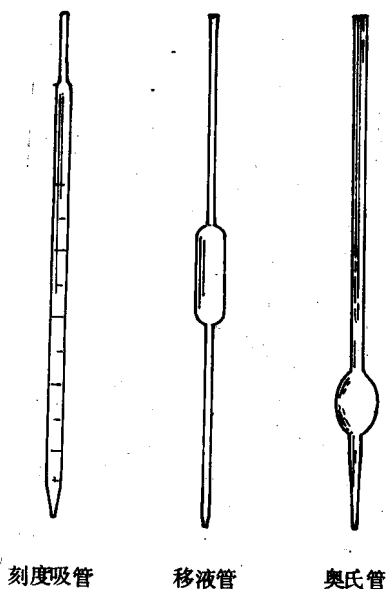


图 1 各类吸管

二、玻璃仪器的洗涤方法

玻璃仪器是生物化学实验的主要工具之一。清洁与否，直接影响实验的结果，如因为仪器不清洁或污染引起蛋白质变性或抑制酶的活性，造成错误的实验结果等。因此玻璃仪器的洗涤清洁工作是非常重要的。在实验的过程中每个人都要逐步养成保持所用玻璃仪器清洁、放置整齐的良好习惯。其清洗方法如下：

(一) 一般玻璃仪器 如试管、烧杯、量筒和锥形瓶等。先用自来水冲去污物，浸于洗衣粉或肥皂水内，用毛刷细心地刷洗内外（也可用毛刷抹肥皂或洗衣粉刷洗）务使多生泡沫，再用自来水冲洗，察看器壁上是否沾有水珠，沾有小水球表示未洗干净，应重复洗涤，直至不沾水珠为止。最后用蒸馏水少量冲洗 2~3 次。洗净之器皿倒置干净处晾干或烘箱烤干（量筒不可烘烤）。

(二) 量度玻璃仪器 如吸管、滴定管和容量瓶等。使用后，应立即用清水冲洗除去血

液、试剂等残留物(千万勿使干固),晾干后,再浸泡于铬酸清洁液中4~6h或过夜。然后用水充分冲洗,并察看是否洗净(方法同前),如已洗净再用少量蒸馏水冲洗2~3次,除吸管可烘干外,其它只能倒置晾干。

操作:每个人按上述方法刷洗5支试管及烧杯、锥形瓶各1~2个。洗净后请教师检查。

(三)洗涤液 实验室中除用水、洗衣粉和肥皂外,还使用一些化合物的溶液洗涤玻璃仪器。这些溶液称为洗涤液,其种类很多。现介绍如下几种:

1. 铬酸洗液(重铬酸钾—硫酸洗液,简称洗液) 这是实验室中使用最广泛的一种洗涤液。配方很多,可根据情况选用。现例举两种配方:

(1) 称取重铬酸钾50g,溶于100ml水中,再慢慢边加边搅动地加入浓硫酸(工业用)400ml,若中途温度过高,则暂停待稍冷后再加。冷却后即可使用。

(2) 称取重铬酸钾5g,加水5ml,搅拌,使其溶解,慢慢加入浓硫酸(工业用)100ml。待冷却后即可使用。

铬酸洗液具有强烈的腐蚀性。皮肤、衣物等要避免与之接触。洗液应保存在密闭容器中,以防吸水。良好的洗液应呈褐红色,若溶液变成黑绿色表示已失效,无氧化能力,应更换。

2. 10%~20%尿素溶液 是蛋白质的良好溶剂,用以洗涤盛过血液等含蛋白质的器皿。

3. 硝酸洗涤液 用水和浓硝酸按1:1配成的硝酸溶液,可用以洗涤二氧化碳测定仪等。

三、实验室常用仪器的认识及使用

生化实验中离心机、分光光度计(或光电比色计)、酸度计是最常用的仪器。

(一) 电动离心机 离心机是利用离心力把溶液中比重不同的物质或将固体和液体分离开的仪器。类型很多,有低速、高速、超速之分。一般实验室中常用低速离心机,最高速度为4000r/min。分为小型台式和落地式两种。基本操作如下:

1. 使用前先检查离心管外套管,应完整不漏,底部应有皮垫。

2. 将待离心溶液转移到合适的离心管内。盛量以不超过离心管的2/3为宜。再将离心管放入外套管内。

3. 将装有离心管的套管成对地放在已经平衡好的台称上平衡,若不平衡,可在离心管与套管之间加水或调节离心管内容物的量使之达到平衡。

每次离心时一定要严格执行此平衡操作。否则不能放入离心机内离心。因为若不平衡,离心时将损伤离心机的轴以至造成严重事故。应该十分警惕。

4. 将已平衡好的离心管和套管成对地按对称方向放入离心机中,并取出不用的空套管,盖上离心机盖。

5. 开动离心机前,应检查变速旋钮,看是否在“0”位置。再打开电源开关,并慢慢转动变速旋钮,逐步增加速度。停止时,将旋钮慢慢回到“0”位置。待离心机自动停止后,才能打开离心机盖取出样品,绝对不能用手阻止离心机转动,以免发生事故。

6. 用毕,倒去套管中的水。取出皮垫,并倒置套管使其干燥。

7. 使用时还应该注意:

(1) 在离心过程中, 若听到特殊响声, 应立即停止离心。若是玻璃离心管破碎, 应更换新的, 平衡后再行离心。

(2) 离心酸碱及腐蚀性溶液时, 应避免洒落在套管内。若遇此情况应立即洗净, 以免腐蚀套管。

(3) 离心机不宜连续使用时间过长, 约 40min 后应休息约 20min, 以免过热。

(4) 离心机应定期检修。每年检查一次离心机内电动机的电刷与整流子磨损情况。若有损坏应更换。

(二) 分光光度计 (或光电比色计) 分光光度计的原理及操作详见: 光度测定法的原理及应用。

(三) 酸度计 酸度计是测定溶液 pH 的重要仪器。目前常用的有国产雷磁 25 型酸度计、pHS-2 型酸度计等。现以雷磁 25 型为例说明:

1. 原理 当把一玻璃电极浸入具有一定 pH 的溶液中时, 即产生一电极电位。其值大小与溶液的氢离子浓度有直接关系。但是无法测定出单一电极的电位。所以只能由两个不同电位的电极组成一电池, 测定出其电动势, 也就是两极电位的差值。为此, 人为地选择一个电极作为标准, 与此电极的差值就是该电极的电极电位。

在酸度计中, 采用甘汞电极作为参比 (标准) 电极, 其电极电位不受被测溶液氢离子浓度的影响。另一电极是玻璃电极也称指示电极。它由特殊玻璃膜制成, 玻璃膜内装满一种电解质如 0.1mol/L 盐酸。当此玻膜浸入被测溶液时, 因膜两边氢离子浓度不同, 则产生相应的电极电位, 在不同氢离子的溶液中, 产生不同的电极电位。并与甘汞电极组成电池, 测定出电动势, 即可根据测得的电动势计算出被测溶液的 pH。

2. 仪器结构 雷磁 25 型酸度计的结构如下页图 2。

3. 使用方法

(1) 安装电极。甘汞电极要摘去两个皮帽并擦净再装; 玻璃电极极易碰破, 为防止测定过程中与烧杯底碰撞。因此, 安装时要装在略高于甘汞电极的位置。

(2) 将“pH-mV”开关拨到“pH”位置。打开电源, 指示灯亮后预热 5min。

(3) 选用与被测溶液 pH 近似的标准缓冲液, 倒入小烧杯中并插入电极。溶液至少要淹没过玻膜球部 1/2 处。

(4) 调节“温度补偿器”使之与标准缓冲液温度相同 (一般是将已配好贮存于冰箱的标准液取出后, 平衡至室温)。

(5) 根据标准缓冲液的 pH, 将量程拨至“0~7”或“7~14”。

(6) 旋转“零”点调节器, 使指针指在 pH7.0 处。

(7) 按下“读数开关”, 指针偏转, 调节“定位调节”, 使指针恰好指在当时温度下标准溶液的 pH 处。重复此操作几次, 直至读数值不变为止。并切勿再动“定位调节”的旋钮。

(8) 取下标准缓冲液, 用蒸馏水冲洗电极, 并用滤纸片轻轻吸干。

(9) 换上待测溶液, 轻轻晃动几次, 以便电极与溶液接触均匀。待测液的温度应与标准溶液一致。

(10) 掀下“读数开关”，指针所指的数值即为待测溶液的 pH。重复此操作几次直至读数不变为止。

(11) 测毕。将电极洗净，玻璃电极浸泡入蒸馏水中保存备用；甘汞电极套上皮帽放入电极盒。

(12) 关闭电源。

4. 注意事项

(1) 玻璃电极初次使用前，必须在蒸馏水中浸泡 24h 以上。用后浸泡于蒸馏水中以供随时可用。

(2) 玻璃电极易损坏。使用时避免碰撞或用力推擦。玻璃电极不应与强酸、碱接触太久，应尽快操作，用毕迅速以水洗净。

(3) 甘汞电极内 KCl 溶液应保持饱和状态（即有少许结晶出现），液柱要接触电极丝。每次用后要及时套上两个皮帽，以免挥发。使用时不能在水中浸泡时间过长，以防 KCl 稀释。

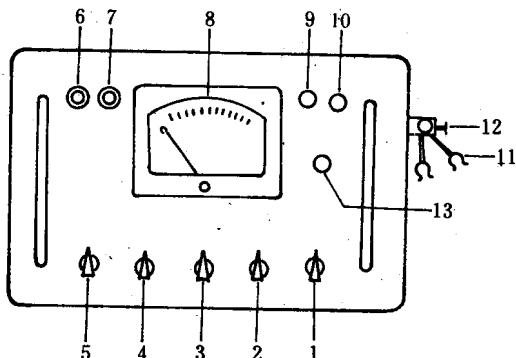


图 2 雷磁 25 型 pH 计板面图

1. 零点调节器
2. 量程开关
3. pH-mV 开关
4. 温度补偿器
5. 定位调节器
6. 电源开关
7. 指示灯
8. 指示电表
9. 甘汞电极接线柱
10. 玻璃电极插座
11. 电极夹
12. 固定螺丝
13. 读数开关

四、缓冲溶液的配制

生物化学反应往往需要具有一定 pH 的缓冲溶液作为环境条件。因此，必须掌握具有一定 pH 缓冲溶液的配制方法。目前，实验室中常用的各种缓冲溶液的配制法已制成表（见附录）。只要按表中要求即可配出具有一定 pH 的缓冲溶液。缓冲溶液配好后应用酸度计作校正，符合要求后才能使用。

操作：按附录配制 0.2mol/L Na_2HPO_4 — NaH_2PO_4 pH6.9 的缓冲溶液 50ml。并用酸度计测定校正。

实验二 实验的准确度与精密度

在生物化学分析工作中，无论怎样谨慎地操作，测定结果总会产生误差，那么怎样评价实验的精确性呢？通常是用准确度与精度来衡量，掌握准确度与精密度实验，是进行分析工作的基础。

(一) 实验误差 在实际的分析工作中，由于仪器的性能，实验的技巧以及化学反应是否完全等原因，使测得的结果往往不是客观的真实值，只能是与真实值接近，所以称测得值为近似值。

测得的近似值与真实值之间的差别称为误差。近似值比真实值大时误差为正，比真实值小时误差为负。表示误差的方法有绝对误差和相对误差。

1. 绝对误差 测得值与真实值的差值称为绝对误差。以 A 表示真实值， a 表示近似值， r 表示绝对误差，则

$$r = a - A$$

例如，滴定读数为 20.24ml，而其真实体积为 20.23ml，则绝对误差为：

$$r = 20.24 - 20.23 = +0.01 \text{ (ml)}$$

而另一滴定读数为 2.033ml，其真实体积为 2.023ml，其绝对误差为：

$$r = 2.033 - 2.023 = +0.01 \text{ (ml)}$$

两份测定的绝对误差均为 0.01，但两份测定的体积相差 10 倍，可见 r 不能反映问题的全面，因此又有另一种表示误差的方式——相对误差。

2. 相对误差 绝对误差占真实值的百分数为相对误差。相对误差用 R 表示，即：

$$R (\%) = \frac{a - A}{A} \times 100 = \frac{r}{A} \times 100$$

例如，上例滴定读数的相对误差为：

$$R_1 (\%) = \frac{r}{A} \times 100 = \frac{0.01}{20.23} \times 100 = 0.05\%$$

$$R_2 (\%) = \frac{r}{A} \times 100 = \frac{0.01}{2.023} \times 100 = 0.5\%$$

由此可见，两份滴定读数的绝对误差虽然相等，但当用相对误差表示时，第一份滴定比第二份滴定的准确度大 10 倍。显然，当被测定的量较大时， R 就越小，测定的准确度也就较高。所以应该用相对误差来表示分析结果的准确度。

根据误差产生的原因和性质，可分为两大类，一类是系统误差，另一类是偶然误差。

(二) 系统误差与回收率实验

1. 系统误差 系统误差是由分析过程中经常性的原因造成的，在每次测定中都比较稳定的重复出现，它与分析结果的准确度有关，主要产生的原因有：

① 方法误差 由于分析方法本身所造成的，如容量分析中等当点与滴定终点不完全符

合等。

②仪器误差 由于仪器不够精密，或未进行校正所造成的。

③试剂误差 试剂或蒸馏水不纯。

④操作误差 每个人对实验条件控制不同而造成，如不同操作者对滴定终点颜色变化的判断不同等。同时在操作中尚存在一些不可避免的损耗及污染，如奥氏吸管，用的再精心，也免不了有少量的样品沾壁而损耗，用滤纸滤过也是如此。

由于上述种种原因引起的系统误差，其特点是无论重复做多少次试验，都是经常反复出现，同真实数值之间的差距是比较一定的，并有相同的符号，(+)或(-)。为了检验系统误差的大小，衡量测定的准确程度，常用回收率实验来表达。

2. 回收率实验 回收率实验是在要测定的溶液中添加已知量的标准被测物，与待测的未知样品同时做平行测定，测得的添加标准物量与所添加的标准物量之比的百分率就称为回收率。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{(\text{样品} + \text{标准物}) \text{测定值} - \text{样品测定值}}{\text{添加标准物量}} \times 100$$

系统误差越大，回收率越低；回收率越接近100%，系统误差越小。

由于系统误差对分析结果的影响比较稳定，重复测定可以重复出现，因而可以设法减少或校正。

3. 系统误差的减免及校正 为了减免系统误差常采用下列措施：

①仪器的校正 对所用的测量仪器（如砝码、容量仪器）进行校正，以减少误差。

②做空白实验 由于试剂中含有影响测定结果的杂质或侵蚀器皿等而发生误差，可用空白实验来校正。其方法是用空白样品（即不含被测物的试剂溶液）与被测样品在完全相同的条件下进行测定，最后将被测样品所得的测定值，减去空白实验的测得值，可以得到比较准确的结果。

③用回收率实验对测得值进行校正 按上述方法求出回收率之后，对测得值可用下式进行校正：

$$\text{被测样品的实际含量} = \frac{\text{样品的分析结果}(\text{含量})}{\text{回收率}}$$

应该指出，由于真实值是无法知道的，因此在实际工作中无法求出真正的准确度，只得用精密度来评价分析的结果。

(三) 偶然误差与精密度

1. 偶然误差 偶然误差是指在某项测定中由于偶然的一些因素引起的误差，这些因素时隐时现，如仪器的临时故障，天平两侧温度不一，电压不稳定，取样不均匀等。另外，操作者不细心也是产生偶然误差的原因，如吸量血液后管外擦的不净，或放出的速度不均匀等。偶然误差的大小通常用精密度来衡量。

2. 精密度 精密度是指对同一样品在同一条件下多次测定结果之间接近的程度。同一样品的一系列测值越是接近，精密度越高，表明偶然误差越小。若测定高低不一，表明偶然误差很大，精密度很低。

· 精密度一般用偏差来表示。偏差也分为绝对偏差和相对偏差：

绝对偏差 = 个别测定值 - 测定值的算术平均值 (不计正负号)

$$\text{相对偏差 (\%)} = \frac{\text{绝对偏差}}{\text{算术平均值}} \times 100$$

精密度的表示法和误差的表示方法一样, 用相对偏差表示比绝对偏差更有意义。

在实验中, 对某一样品通常须进行多次平行测定, 求得其算术平均值, 作为该样品的分析结果。对于该结果的精密度则有多种表示方法。

(1) 平均绝对偏差和平均相对偏差的表示法:

例如 一份血样共作 4 次血氯测定, 其结果如下:

测定结果 (t)	算术平均值	个别测值的绝对偏差 (d)
566mg%	575mg%	9mg%
584mg%		9mg%
570mg%		5mg%
580mg%		5mg%

$$\text{平均绝对偏差 } (\bar{d}) = \frac{9+9+5+5}{4} = 7\text{mg}\%$$

$$\text{平均相对偏差} = \frac{7}{575} = 1.2\%$$

在实验中, 有时只做两次测定, 精确度可用下式计算:

$$\frac{\text{两次分析结果的差值}}{\text{平均值}} \times 100\%$$

不同的实验方法, 允许误差的要求不相同。例如, 用滴定法对同一样品进行平行测定时, 其各测值之间的允许误差不应超过 0.2%。

(2) 标准偏差或均方根偏差: 利用绝对偏差 (d) 和测定次数 (n) 可计算出标准偏差 ($S.D$):

$$S.D = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$$

标准偏差表示所测定的这些样品中待测物的含量变化范围。这是从生物统计推导来的一种精密度表示法, 标准差越小表示样品中各个测值的变异度 (集中或分散的程度) 越小。表示越精确。其结果可以用平均值 (\bar{x}) \pm 标准偏差 ($S.D$) 来表示。

3. 偶然误差的减免及校正 偶然误差与分析结果的精密度有关, 它来源于难以预料和不固定的因素。例如, 或是由于取样不均匀, 或是由于测定过程中某些不易控制的外界因素的影响等。在生物测定法中, 由于影响生物的因素是多方面的, 往往还会造成较大的误差。为了减少偶然误差, 一般采取的措施是:

(1) 均匀取样 动、植物新鲜组织可制成匀浆后取样; 细菌通常制成悬液, 经玻璃球打散摇匀后, 再量取一定体积的菌体样品进行分析; 固体样品极不均匀, 应于取样前先行粉碎、混匀。

(2) 多次取样 根据偶然误差出现的规律, 如果进行多次平行测定, 然后取其算术平均值, 就可以减少偶然误差。平行测定的次数愈多, 其平均偶然误差就愈少。

关于上述的系统误差, 偶然误差及准确度和精密度的问题, 有几个问题再进一步说明。

①除系统误差、偶然误差之外, 还有因错误操作引起的“过失误差”, 如读错刻度、溶液溅出, 加错试剂等。这时可能出现一个很大的误差值, 此种数值应弃去不用。

②误差与偏差具有不同的含义, 误差以真实值为标准, 而偏差是以平均值为标准。由于物质的真实值一般是无法知道的, 所以我们平时所说的真实值实际上只是采用各种方法进行多次平行分析所得的相对正确的平均值。用这一平均值代替真实值来计算误差, 得到结果仍然只是偏差。

③用精密度来评价分析的结果也有一定局限性。如分析结果的精密度很高(即平均相对偏差很小), 并不一定说明实验的准确度也很高。因为如果分析过程中存在有系统误差, 可能并不影响每次测定数值之间的重合程度, 即不影响精密度。但此分析结果却必然偏离真实值较大, 也就是分析的准确度并不一定很高。当然, 若是精密度也不高, 则无准确度而言。

④在实际的分析工作中, 应根据需要的准确度选择测量手段(仪器及方法)。例如分析样品时, 要求准确度到 0.1g, 只需使用台称, 不必使用分析天平。如果需要较高的准确度, 又无适宜的仪器设备, 则可用提高样品用量的方法来达到。

(四) 有效数字 在生化定量分析中, 除了要求尽量准确外, 应该在记录数据和进行运算时注意有效数字的取舍。

1. 有效数字的概念 有效数字是实际可能测量到的数字, 它包括全部的确切数字加上第一位“欠准数字”(存疑数字)。应该选取几位有效数字, 取决于实验方法与所用的仪器的精确程度。例如, 读取 50ml 滴定管的液面刻度为 16.25ml, 是四位有效数字, 最后一位数字是估计的, 称为“欠准数字”, 也叫估计值, 其它的数值均是准确的“确切数字”。

数字 1、2、3……9 都可作为有效数字, 只有“0”特殊, 它在数字中间或数字后面时, 是有效数字; 但在数字前面时, 它只是定位数字, 用来表示小数点的位置, 而不是有效数字。

例如	1.26014	六位有效数字
	12.001	五位有效数字
	21.00	四位有效数字
	0.0212	三位有效数字
	0.0010	二位有效数字
	200	有效数字不明确

在 200 中, 后面的“0”可能是有效数字, 也可能是定位数字。为了避免混乱, 一般写成标准式: 如 65000 ± 1000 可写成 $(6.5 \pm 0.1) \times 10^4$ 或 $(6.5 \pm 0.10) \times 10^4$ 或 $(6.500 \pm 0.100) \times 10^4$, 它们的有效数字依次为二、三、四位。如果在实验中使用的仪器及采用的实验方法, 误差比较大, 但测得的数值位数比较多, 就可以采用这种标准式来, 确切表达有效数字的位数。

2. 在运算中有效数字的确定: