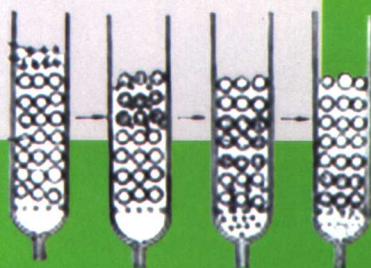


高等医学院校教材

SHENGWU HUAXUE SHIYAN ZHIDAO

生物化学 实验指导



蔡丽芬 主编
湖北科学技术出版社

高等医学院校教材

生物化学 实验指导

SHENGWU HUAXUE SHIYAN ZHIDAO

蔡丽芬 主编
湖北科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/蔡丽芬编. —武汉:湖北科学技术出版社,2006.1

ISBN 7-5352-3512-3

I.生… II.蔡… III.生物化学-实验-高等学校-教材 IV.Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 002833 号

高等医学院校教材
生物化学实验指导

© 蔡丽芬 主编

责任编辑:陈兰平

封面设计:王 梅

出版发行:湖北科学技术出版社

电话:87679468

地 址:武汉市雄楚大街 268 号湖北出版文化城 B 座 12-13 层

邮编:430070

印 刷:荆州市鸿盛印刷厂

邮编:433321

787 毫米×1092 毫米

16 开

9.25 印张

203 千字

2006 年 1 月第 1 版

2006 年 1 月第 1 次印刷

印 数:0 001-3 000

ISBN 7-5352-3512-3/Q·18

定价:15.00 元

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

主 编 蔡丽芬
编 委 周艳艳 徐安莉
徐建民 陈会敏

前 言

21 世纪生命科学取得了突破性进展,生物化学是其中最活跃的学科之一。生物化学是一门实验性很强的学科,生物化学实验技术和方法的迅速发展,为生命科学其他学科的研究创造了必要条件。生物化学实验是生物化学教学的重要组成部分,它与理论教学既相互联系,又是一个相对独立的部分,有其自身的规律和要求。因此,医科学生应系统而完整地掌握生化实验的基本原理和常用方法,为今后从事基础和临床医学研究打下良好的基础。

本实验教材是根据医学生物化学教学大纲编写的,由生化基本操作、实验内容和附录三部分组成。共 40 个实验。在编写中,既考虑到配合课堂理论学习,又着重训练同学们的基本操作和基本技能(如离心、层析、电泳等),并力求每个实验的科学性、实用性和可靠性。本教材可供中医学、中西医结合专业、临床医学、口腔、护理、儿科、检验和药学等专业五年制及七年制本科生使用。

本实验教材是在湖北中医学院生化教研室全体教师多年辛勤实践的基础上,由蔡丽芬、徐建民、周艳艳、徐安莉、陈会敏等教师执笔编写的。由于水平有限,书中疏漏或错误之处,希望通过师生的实践,提出修改意见,以使本教材进一步提高和完善。

编者

2005 年 10 月

目 录

第一部分 实验基本技能	(1)
第一章 吸收光谱法	(1)
第一节 吸收光谱	(1)
第二节 光吸收的基本定律——Lamber-Beer 定律	(4)
第三节 分光光度计简介	(7)
第四节 吸收光谱法的应用	(10)
第二章 电泳技术	(14)
第一节 电泳的基本原理	(14)
第二节 影响电泳速度的因素	(15)
第三节 常用的电泳支持介质	(17)
第四节 电泳后的染色	(20)
第二部分 实验内容	(23)
实验一 茯苓多糖、猪苓多糖和淀粉的水解和鉴定	(23)
实验二 糖的薄层层析	(26)
实验三 中药杏仁脂质成分的提取	(28)
实验四 脂质的薄层层析	(30)
实验五 蛋白质的呈色反应	(31)
实验六 蛋白质的沉淀反应	(34)
实验七 蛋白质等电点的测定	(38)
实验八 凝胶层析法人离血红蛋白与溶菌酶	(40)
实验九 肝组织中核酸的分离与鉴定	(43)
实验十 酶的专一性	(46)
实验十一 温度、pH 值、激活剂、抑制剂对酶活性的影响	(47)
实验十二 丙二酸对琥珀酸脱氢酶活性的影响	(50)
实验十三 碱性磷酸酶米氏常数测定(双倒数作图法)	(52)
实验十四 维生素C 的测定(2,4-二硝基苯肼法)	(55)
实验十五 类胡萝卜素的色层分析及鉴定	(57)
实验十六 饱食和饥饿小白鼠肝糖原含量的比较	(59)

实验十七 葡糖氧化酶法测血糖浓度	(61)
实验十八 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响(邻甲苯胺法)	(63)
实验十九 小白鼠注射胰岛素或肾上腺素后血糖浓度的变化	(65)
实验二十 血清三酰甘油测定	(67)
实验二十一 肝的生酮作用及酮体检出	(69)
实验二十二 血清总胆固醇测定	(71)
实验二十三 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(73)
实验二十四 血清谷丙转氨酶(GPT)的测定	(75)
实验二十五 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	(78)
实验二十六 血清尿素氮定量(二乙酰一肟法)	(80)
实验二十七 血清胆红素的定量测定	(82)
实验二十八 血浆二氧化碳结合力测定(滴定法)	(84)
实验二十九 血清肌酐定量(苦味酸法)	(86)
实验三十 中药对家兔实验性高脂血症的影响	(88)
实验三十一 SDS-PAGE 分离蛋白质	(91)
实验三十二 质粒DNA 的微量快速提取	(95)
实验三十三 质粒DNA 的酶切与鉴定	(99)
实验三十四 聚合酶链反应技术	(102)
实验三十五 DNA 重组与鉴定	(106)
实验三十六 DNA 印迹杂交分析	(112)
实验三十七 肝总RNA 的制备	(118)
实验三十八 RNA 杂交分析	(122)
实验三十九 克隆化基因在大肠杆菌的诱导表达	(126)
实验四十 蛋白质印迹免疫分析	(129)
附录一 元素原子量表	(133)
附录二 化学试剂纯度分级表	(134)
附录三 实验室常用酸碱的比重和浓度	(135)
附录四 缓冲溶液的配制	(136)

第一部分 实验基本技能

第一章

吸收光谱法

吸收光谱法(Absorption Spectrometry)是根据物质对不同波长的光具有选择性吸收而建立起来的一种分析方法。它既可对物质进行定性分析也可定量测定物质的含量,包括紫外、可见及红外吸收光谱等。如果在测定时利用单色器(如棱镜)获得的单色光来测定物质对光的吸收能力,则称为分光光度法。

可见/紫外分光光度法是根据物质分子对于200~760nm光区电磁辐射的吸收特性而进行分析的方法,其特点是:

- (1) 灵敏度高,能测定生物试样中的微量物质,可达 $10^{-4} \sim 10^{-7}$ g/mL。
- (2) 选择性较强。由于组分的分子结构不同,他们的吸收光谱也不同,因此只要选择适当的分离步骤和测定条件,就可以进行生物试样中的单组分和多组分的测定。
- (3) 精密度和准确度较高。定量测定的精密度一般为0.5%,若在性能较好并经调试过的仪器上测定,精密度可提高至0.2%,相对误差可减少至1%~2%。
- (4) 仪器设备简单,操作易掌握。
- (5) 定性能力相对较弱,通常还需与红外、色谱、质谱等技术结合才能作出可靠的定性鉴定。

第一节 吸收光谱

一、光的基本性质

光是一种电磁波,同时具有波动性和粒子性。波动性是指光以波动的形式传播,如光的折射、衍射、偏振和干涉等均是光的波动性的表现。描述波动性的重要参数是波长 λ (nm)、频率 ν (Hz),它们与速度的关系是:

$$c = \lambda \cdot \nu$$

一切电磁波在真空中的传播速度都等于 2.9979×10^{10} cm/s,故 λ 与 ν 成反比。

光又具有粒子性,即可把光看作是带有能量的微粒流,这种微粒称为光子或光量子。光电效应、光的吸收和发射等均是光的粒子性的表现。单个光子的能量 E 决定于光的频率:

$$E=h\nu=\frac{hc}{\lambda}$$

式中 E 为光子的能量, h 为普朗克常数($6.626\times 10^{-34}\text{J}\cdot\text{S}$)。能量与频率成正比,与波长成反比。

理论上,将具有单一波长的光称为单色光,单色光由具有相同能量的光子组成。由不同波长的光组成的光称为复合光。

电磁辐射按波长顺序排列称为电磁波谱(见表1-1-1)。当人为地按照波长将电磁波划分为不同的区域时,人眼能产生颜色感觉的光区称可见光区,其波长范围为380~760nm。200~380nm波长的光称为近紫外光。

表 1-1-1

电磁波谱

波谱区名称	波长范围	光子能量	分析方法
γ 射线	0.005~0.14nm	$4.0\times 10^{-13}\sim 1.3\times 10^{-15}$	γ 射线光谱法
X射线	0.001~10nm	$1.9\times 10^{-13}\sim 2.0\times 10^{-17}$	X射线光谱法
远紫外区	10~200nm	$2.0\times 10^{-17}\sim 9.6\times 10^{-19}$	紫外光光谱法
近紫外区	200~380nm	$9.6\times 10^{-17}\sim 5.0\times 10^{-19}$	紫外光光谱法
可见光区	380~760nm	$5.0\times 10^{-19}\sim 2.7\times 10^{-21}$	比色或可见分光光度法
红外区	0.75~1000 μm	$2.7\times 10^{-21}\sim 6.8\times 10^{-23}$	红外光谱法
微波区	0.1~100cm	$6.8\times 10^{-23}\sim 6.4\times 10^{-26}$	微波光子谱法
射频区	1~100m	$6.4\times 10^{-26}\sim 6.4\times 10^{-29}$	核磁共振法

二、物质对光的选择性吸收

太阳或白炽灯泡(钨灯)发出的可见光,是一种许多不同波长的光所组成的宽广光谱,若将它通过三棱镜分光,则可看到红、橙、黄、绿、青、蓝、紫等颜色。白光是混合光,它是由多种不同波长范围的单色光按一定的比例混合而成的。如果把两种适当颜色的光按一定比例混合,也可得到白光,则这两种光的颜色就互称为互补色。

物质对光具有选择性吸收的能力。同一物质对不同波长光的吸收能力不同,不同物质对同一波长光的吸收能力也不相同。物质所呈现的颜色,正是由于它对光的选择性吸收而产生的。当一束光照射到某一物质的溶液时,若该溶液对可见光谱各种颜色的光几乎都不吸收,则溶液呈透明无色状;若几乎全部吸收,则溶液呈黑色;若对各种颜色的光都能均匀地吸收一部分,则溶液呈灰色。若溶液对其中某些波长的光吸收较多,透过较少,而对另一些波长的光吸收较少,透过较多,则溶液就呈现这种吸收较少而透过较多的光的颜色,即溶液的颜色是它所吸收色光的互补色。例如, KMnO_4 水溶液选择性吸收可见光中的大部分黄绿色光,故呈紫色;硫酸铜溶液能选择性地吸收黄光而呈蓝色。物质的颜色与吸收光颜色、波长的关系见表1-1-2。

表 1-1-2

物质颜色与吸收光颜色、波长的关系

物质颜色	吸收光	
	颜色	波长(nm)
黄绿	紫	400~450
黄	蓝	450~480
橙	绿	480~490
红	蓝绿	490~500
紫红	绿	500~560
紫	黄绿	560~580
蓝	黄	580~600
蓝绿	橙	600~650
蓝绿	红	650~750

三、吸收光谱

以上只是粗略地用物质呈现的颜色来说明物质对各种色光的选择性吸收。如果测量某种物质对不同波长光的吸收程度,以波长为横坐标,以吸光度为纵坐标作图,则可以得到一条曲线,称为光吸收曲线,也称可见/紫外吸收光谱,它能更清楚地描述物质对光的吸收情况。

由于有机化合物发色团和助色团的种类、数目及其在分子中所处的位置和环境不同,因此测到的吸收光谱不同。依据物质吸收光谱的形状和特性可作该物质的鉴别、纯度检查和初步结构分析等。

四、吸收光谱的产生

物质对不同的色光具有选择性吸收能力,即一种物质主要吸收一定波长的光(互补吸收),其原因就在于物质本身的分子、原子都处在属于一定能级的运动状态,当物质吸收某种波长的辐射能以后,会发生能级的跃迁,产生吸收光谱。物质的分子内部有三种能级运动状态,分述如下。

1. 价电子运动

即电子相对于原子核的运动。当电子吸收辐射能后可从原来的基态跃迁到激发态。由于电子跃迁所需的能量较大,所以电子只有吸收如紫外线等高辐射能量的光线以后才能发生跃迁。假设基态电子能量为 E_1 ,跃迁后达到激发态时的能量为 E_2 ,电子从基态到激发态之间的能量差 ΔE 一般为 $1\sim 20\text{eV}$,相应的波长为 $60\sim 1250\text{nm}$,可表示为:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$$

电子跃迁所形成的光谱称为紫外吸收光谱或电子光谱,适用于紫外线和可见光区的

光谱分析,这是本章主要讨论的光谱区。

2. 分子内原子在平衡位置附近的振动

振动能级跃迁所需能量较上述为小,波长为 $2\sim 250\mu\text{m}$,位于红外区,所形成的光谱为红外吸收光谱。

3. 分子本身绕其重心的转动

转动能级跃迁所需的能量较小,约为分子振动所需能量的1%。从 $\Delta E=h\nu$ 可看出,能量 ΔE 与波长成反比,转动能级跃迁因所需能量小,故适应的波长就长些,为 $50\sim 1\,000\mu\text{m}$,所形成的光谱位于远红外区,称远红外吸收光谱,分析上一般较少应用。

以上说明了分子内部三种运动状态,即三种能级,分别简称为电子能级、振动能级和转动能级。虽然分子吸收辐射能之后受到激发就要从基态能级 E_1 (能量较低)跃迁到新的激发态能级 E_2 ,同时产生吸收光谱,但是分子只能吸收恰好是两个能级 E_1 、 E_2 之差的能量 ΔE ,这种性质叫做量子化特征。例如电子跃迁时所需能量 ΔE 必须恰与电磁波中某一光子的能量或其波长相一致,即必须是:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = 1\sim 20\text{eV}$$

这就说明了由于物质结构不同只能选择性吸收一定波长光子的原因(互补原因)。正因为物质对光的吸收具有选择性,所以当连续光谱中能量不同的光子(λ 不同)被物质吸收后就产生了吸收光谱。

第二节 光吸收的基本定律——Lamber-Beer 定律

可见/紫外吸收光谱的最主要用途是定量分析,即通过吸收光谱选择一个或几个测定波长,测定试样中一个或几个组分的含量。可见/紫外吸收光谱定量分析的基础是Lamber-Beer(朗伯-比耳)定律,它说明了吸光物质对单色光吸收的程度与该物质的浓度与厚度之间的关系,是吸收光谱法的基本定律。

一、吸光度与透光率

当一束平行单色光照射到任何均匀、透明的溶液时,光的一部分被吸收,一部分被容器的表面反射,一部分透过溶液。如果入射光的强度为 I_0 ,吸收光的强度为 I_a ,透过光的强度为 I_t ,反射光的强度为 I_r ,则:

$$I_0 = I_a + I_t + I_r$$

在吸收光谱法分析中,测量时采用同样质料的比色皿,反射光强度基本不变,影响互相抵消,于是上式可简化为:

$$I_0 = I_a + I_t$$

透过光的强度 I_t 与入射光的强度 I_0 之比称为透光度或透光率,用 T 表示:

$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

溶液的透光率越大,说明对光的吸收越少;反之,透光率越小,说明对光的吸收越多。 T 的数值一般小于1,常用百分数表示。

实际工作中常用吸光度 A 表示物质对光的吸收程度。吸光度与透光率的关系是:

$$A = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I_t}$$

由上式可见,溶液对光的吸收越多, T 值越小, A 值越大。

二、Lamber-Beer(朗伯-比耳)定律

朗伯(Lamber)经过多次实验提出了一个定律:在其他情况相同时,同一厚度的液层总是以相同的百分率吸收照射到它的人射光。有一厚度为 b 的液层,假设它是由许多相同厚度的薄层所组成。当强度为 I_0 的人射光透过第一个薄层后,假设有25%的 I_0 被吸收,剩余的75%进入第二个薄层后又有25%被吸收,剩余的56.25%(即75%~75%×25%)进入第三个薄层后有25%被吸收,……,依此进行,通过液层厚度为 b 后,最后透射光强度为 P 。可见,透射光强度的分数是随液层厚度按指数规律递变,因此,可以用指数形式表示:

$$T = \frac{I_t}{I_0} = 10^{-K'b}$$

式中 K' 是常数。将上式改为对数形式:

$$\lg T = \lg \frac{I_t}{I_0} = -K'b$$

其后,比尔(Beer)发现了一个相似的定律:当单色光通过厚度一定、均匀的吸收溶液时,该溶液对光的吸收程度与溶液中物质的浓度 C 成正比,即:

$$T = \frac{I_t}{I_0} = 10^{-K''c}$$

式中 K'' 是常数。将上式改为对数形式:

$$\lg T = \lg \frac{I_t}{I_0} = -K''C$$

将朗伯定律和比尔定律结合起来,则可写成:

$$\lg T = -KbC$$

或

$$-\lg T = KbC$$

即

$$A = KbC$$

上式称朗伯-比耳定律的数学表达式,式中 b 代表溶液厚度(cm), C 为吸光物质的浓度, K 称为吸光系数,它与物质的性质、温度及入射光的波长等有关。上式的物理意义为:当一束平行的单色光通过均匀透明溶液时,该溶液对光的吸收程度与溶液中物质的浓度和光通过的液层厚度的乘积成正比。朗伯-比耳定律不仅适用于可见光区,也适用于紫外及红外光区;不仅适用于溶液,也适用于其他均匀的、非散射的吸光物质(包括气体和液体),是各类吸光光度法的定量依据。

三、吸光系数

吸光系数 K 的物理意义是吸光物质在单位浓度及单位厚度时的吸光度。在给定的条件(单色光波长、溶剂、温度等)下,吸光系数是物质的特征性常数,它只与该物质分子在基态和激发态之间的跃迁几率有关。不同物质对同一波长的单色光有不同的吸光系数,可作为定性的依据。在吸光度与浓度(厚度)之间的直线关系中,吸光系数是斜率,其值越大,则测定的灵敏度越高。

吸光系数常有两种表达方式:

1. 摩尔吸光系数

用 ϵ 或 E_M 表示。其意义是 1 摩尔浓度的溶液在厚度为 1cm 时的吸光度。

2. 比吸光系数或称百分吸光系数

用 $E^{1\%}$ 表示,是指浓度为 1%(W/V) 的溶液,在厚度为 1cm 时的吸光度。一般常在化合物成分不明、分子量无从知道的情况下采用。

两种吸光系数表示方式之间的关系是:

$$\epsilon = \frac{M}{10} E^{1\%}$$

式中 M 是吸光物质的摩尔质量。摩尔吸光系数一般不超过 10^5 数量级。通常将 ϵ 值达 10^4 的划为强吸收,小于 10^2 的划为弱吸收,介于二者之间的划为中强吸收。

四、偏离 Beer 定律的因素

根据 Beer 定律,当波长和强度一定的人射光通过液层厚度一定的溶液时,吸光度和吸光物质的浓度成正比。因此,在固定液层厚度及入射光强度和波长的条件下,测定一系列已知浓度标准溶液的吸光度时,以吸光度为纵坐标,以浓度为横坐标,应得到一条通过原点的直线(称标准曲线或工作曲线)。但在实际工作中,特别是溶液浓度较高时,标准曲线常呈现弯曲,这种现象称为对 Beer 定律的偏离。对浓度不是太高的溶液,这并不是由于 Beer 定律不严格所引起,因此属于表观偏离。

引起这种偏离的因素很多,大致可分为两类:一类是物理性因素,即仪器的因素;另一类是化学性因素。

1. 物理性因素

由物理性因素引起的偏离包括入射光非真正的单色光,杂散光,单光器的内反射,以及因光源的波动、检测器灵敏度波动等引起的偏离,其中最主要的是非单色光作为入射光引起的偏离。

Beer 定律成立一个重要前提就是单色光,即只有一种波长的光。但在实际测定中,使用的入射光并不是严格单色的,常有不同波长的辐射同时存在。多色辐射可以使吸光度变化而偏离 Beer 定律,其主要原因是由于物质对不同波长的光有不同的吸收系数。

单色光的纯度可用谱带宽度(bandwidth)来衡量。在实际工作中,单色光源是由单色

器或滤光片从连续光谱的多色光中选择的包括最大吸收波长在内的一小段波长范围的复合光。谱带宽度的值越小,单色光越纯,对Beer定律的偏离就越小。若用同一谱带宽度作为光源,但谱带处于吸光谱上的尖峰锐谷或陡度大的曲线部分,则由于相邻波长处的吸收系数相差较大,测定值易受到影响。因此用宽而锐的吸收峰的 $\lambda_{\max}$ 作测定波长,吸光度 A 与浓度 C 之间容易保持良好的线性关系。

2. 化学性因素

Beer定律的讨论范围仅局限于物理学方面,并没有考虑溶液必须在什么化学条件下才能保持吸光度与浓度间的正比关系。化学因素如浓度、pH值、溶剂和温度等的影响,主要是对化学平衡所产生的影响。因被测物的离解、缔合、与溶剂作用或形成的有色络合物离解等原因,可导致溶解液的组成各组分间的比例发生变化。若各组分的吸收光谱或吸收系数的差别较大,则浓度与吸光度之间的关系偏离直线。浓度对Beer定律偏离的另一原因是,在被测物浓度较大(通常大于 0.01mol/L)时,吸光微粒间的平均距离减小,使相邻微粒的电荷分布互相影响,从而改变了它对光的吸收能力。因此,Beer定律一般适用于稀溶液的测定,并要求其吸光度在 $0.2\sim 0.7$ (或透光度 $20\%\sim 65\%$)之间,使测定结果的相对误差控制在一个合理范围内。

第三节 分光光度计简介

前已叙及,如果利用单色器获得的单色光来测定物质对光的吸收能力,则称为分光光度法,所使用的仪器则称为分光光度计。分光光度计按仪器光谱覆盖范围的差异分为紫外分光光度计系列及红外分光光度计系列两大类,分界点处的波长为 $2.5\mu\text{m}$,前者波长覆盖的范围为 $190\text{nm}\sim 2.5\mu\text{m}$,后者为 $2.5\sim 50\mu\text{m}$ 。紫外系列分光光度计的光谱范围实际上包括近紫外($200\sim 380\text{nm}$)、可见($380\sim 760\text{nm}$)、近红外($700\text{nm}\sim 3\mu\text{m}$)三个光谱带。因而可见分光光度计(VIS)的工作波长范围为 $340\sim 850\text{nm}$,紫外-可见分光光度计(UV-VIS)的工作波长范围为 $190\sim 850\text{nm}$,紫外-可见-近红外分光光度计(UV-VIS-NIR)的工作波长范围为 $190\text{nm}\sim 2.5\mu\text{m}$,而纯紫外的通用分光光度计目前极少见。习惯上称的紫外分光光度计一般是指紫外-可见分光光度计。

一、紫外系列分光光度计的基本结构及技术参数

紫外-可见分光光度计种类很多,其基本结构都由五个部分组成,见图1-1-1所示。



图 1-1-1 分光光度计基本组成

图1-1-1中每一基本单元的基本结构、元件选择以及方法原理的变化将直接导致整机技术规格、性能参数的变化,从而形成目前市场上紫外系列分光光度计的各种不同等级、不同规格的商品仪器,以满足各领域使用者的不同要求。

1. 光源

光源必须具有稳定的、有足够强度的连续光谱,并经聚光镜使之成为平行光。普通白炽光(即钨灯)可用以提供可见光光源,可应用的光谱范围为 $320\sim 2500\text{nm}$ 。为保证光源稳定,通常装配稳压电源。氢弧灯(又称氢灯)的常用灯为低压氢灯,具有石英窗,能提供紫外光,光谱为 $180\sim 375\text{nm}$,但实际上只用于 360nm 以下。氢灯灯丝需预热,点燃后灯丝停止加热,故需配有热开关控制的专用稳压器。其他光源还有碘钨灯、弧汞灯、氦灯、激光等。

2. 单色器

它是分光光度计的“心脏”部分,是一种将来自光源的混合光分解为单色光,并能任意改变波长的装置,包括分光系统、光路狭缝和波长调节器等部件。光源的光束经入光狭缝进入单色器,经准直镜反射至棱镜,经过棱镜色散分光并反射返回准直镜,又再反射经出光狭缝投射出来。

(1) 分光系统:有棱镜和光栅两种,使光源色散产生宽广光谱。

棱镜:由玻璃或石英制成,形状和用法在不同仪器中各有不同。

光栅:在石英或玻璃表面上刻上许多等距离的平行线(一般每毫米上千条),通过光的“干涉”而分成光谱。

(2) 光缝:分入光狭缝和出光狭缝。一般两者宽度一致。狭缝愈窄,光束波纯度愈高。狭缝宽度常用实际宽度(以毫米为单位)表示。

(3) 波长调节器:一般是调节准直镜位置以选择分光光谱的波长。

3. 吸收池

(1) 吸收池的种类:吸收池有各种不同的容量和光程规格,常用吸收池(又称比色杯)的光程有 1cm 、 2cm 、 10cm 等,形状有方形、长方形和圆柱形等。玻璃吸收池用于可见分光光度测定。因为玻璃能吸收紫外线 $\lambda < 350\text{nm}$,故不能用于紫外分光光度测定。石英吸收池既可用于紫外分光光度测定,也可用于可见分光光度测定。

对于准确度要求较高的分析,需用配对吸收池(配对标准以读数相对偏差 $< 2\%$ 为宜),一般可固定使用以消除误差。吸收池架也应固定方向。使用时均应注意维护,保持其精度。

(2) 吸收池的使用和清洁:吸收池四面仅有两面光滑透明,具有光学性质;另两面则无,它们常以磨砂玻璃为材料,以示区别。吸收池光学表面不能有任何污损,否则会引起光吸收的增加。例如,吸收池上看不出的指纹或残迹即能引起UV区高达 1.0A 的光吸收。故拿取吸收池时只能捏住磨砂玻璃的两面。

每次使用完毕,应立即倒空吸收池,然后以溶剂(常用水)冲洗 $3\sim 4$ 次,最后可用甲醇冲洗;用蘸有洗涤剂的海绵清洗,效果也较好。如果这样的清洁步骤仍无效时,可将吸收池在铬酸或 50% 硝酸中短时间浸泡,再用水充分冲洗。

4. 检测器

检测器的主要作用是接受透射光信号以转换成电能,必要时加以放大。检测器有下列三种类型:

(1) 光电池:它由三层物质组成,即导电性良好的金属(如银)层——作为光电池负极,半导体硒薄层和铁层——作为光电池的正极。它们所组成的圆形或长方形的薄片装在

一个特别的匣子里面。当光电池受光照射以后,半导体硒的表面逸出电子。由于电子向正极方向移动,因此,在上、下两金属片间产生一个电位差,线路连通时,即产生电流。光电流的大小与光电池受到光照的强度成正比。光电池受光照时间持续太久或受强光照射时,将导致光电池产生“疲劳”现象而降低其灵敏度。

(2) 光电管:它由封装在真空透明套里的一个半圆柱形负极和一个丝正极组成。负极凹面上有一层光电发射材料,此种物质经光照射可发射电子。当在两极间加有电压时,发射出来的电子就流向丝正极而产生光电流。由于光电管具有很高的电阻,所以产生的电流容易放大,其灵敏度比光电池高。

(3) 光电倍增管:它远比普通的光电管优越,它可将第一次发射的电子数目放大到数百万倍。与光电管相似,光电倍增管的负极表面在光照射下可发射电子。电子被带有正电的兼性正极所吸引,并向着它加速运动。当电子打在兼性正极上时,能引起更多的电子自表面射出。这些射出的电子又被第二个兼性正极所吸引,同样再产生更多的电子。这样的过程重复9次后,每个光子可形成 $10^6 \sim 10^7$ 个电子。这些电子最后被收集在正极上,所得的倍增电流可进一步加以放大和测量。光电倍增管的灵敏度比光电管高200多倍。

5. 信号显示系统

早期的分光光度计多采用检流计,以微安表作显示装置,直接读出吸光度或透光率。近代的分光光度计则多采用数字电压表等显示,用X-Y记录仪直接绘出吸收(或透射)曲线,并配有计算机数据处理器。

分光光度计的型号很多,按其光学系统可分为单波长分光光度计和双波长分光光度计。其中单波长分光光度计又分为单光束和双光束分光光度计两种。目前国内广泛采用的单波长单光束分光光度计是721型分光光度计。

二、分析条件的选择

1. 入射光波长

通常都是选择显色溶液的 $\lambda_{\max}$ 的入射光作测量波长。这不仅能获得高的灵敏度,而且由于在 $\lambda_{\max}$ 附近吸光度随波长的变化较小,入射光波长的稍许偏移和非单色性引起的吸光度变化较小,从而对比耳定律的偏离较小。当然,若在 $\lambda_{\max}$ 附近有其他峰谱(如显色剂、共存组分吸收峰)干扰时,则只能选用其他的测量波长。有时在测定高浓度组分时,为使工作曲线有足够的线形范围,宁可选用其他灵敏度较低的吸收峰波长作为分析测量波长。

2. 测量狭缝的选择

测量狭缝越窄,虽然得到的单色光波长范围越窄,单色光“越纯”,分辨率越高,但同时入射光强度也越弱,势必需要提高检测器的增益,随之而来的仪器噪声增大,对测量不利。若狭缝过宽,则非吸收光的吸入将导致测量灵敏度的下降和工作曲线关系的变差。特别在分析组分较复杂的样品时,可能引入干扰组分的吸收光谱,使选择性变差。故测量时应选择合适的狭缝宽度。

3. 适当控制吸光度的测量范围

吸收曲线的斜率随浓度的增大而增大,浓度越高,不纯的单色光引起的对比耳定律的

偏离程度越大,而且,任何分光光度计都有一定的测量误差,其中透光率的读数误差是主要因素。大多数分光光度计的透光率读数的变动范围为1%~0.2%。0.2%被认为是实际能达到的读数准确度极限。对一给定的分光光度计,其透光度读数 ΔT 是一常数。但由于透光度与浓度的关系并非直线,在不同的透光率的读数范围,同样大小的 ΔT 所引起的浓度误差 ΔC 是不同的。当 T 大时, ΔC 小,但此时浓度很低,相对误差 $\frac{\Delta C}{C}$ 较大;当 T 小时, ΔC 大,此时虽然 C 较大,但 $\frac{\Delta C}{C}$ 仍较大。只有当透光率适中时,也就是测量浓度适中时, $\frac{\Delta C}{C}$ 才较小。可以证明,当 $T=36.8\%$ ($A=0.434$)时,测量的相对误差最小。一个几乎固定的最小误差出现在 T 为20%~65%(A 为0.7~0.2)的范围内。因此,为避免出现大的误差,必须设计好样品用量和它在测量过程中的稀释度。

4. 参比溶液的选择

将朗伯-比耳定律关系应用于实际分析时,所研究的溶液必须在吸收池中。由于吸收池表面的反射和吸收,入射光的强度要受到一定的损失。此外,由于溶液的某种不均匀性引起的散射,光强也可能减弱。另外,因过量显色剂或其他试剂(缓冲剂、掩蔽剂等)甚至溶剂本身所引起的吸收,也会影响对所测吸光物质吸光度的测量。因此,必须对这些影响因素进行校正,以消除或尽可能减小这种影响。最常用的校正方法是扣除参比溶液(空白溶液)在相同仪器条件下,用相同的(或性能参数十分相近的)吸收池测得的吸光度。参比溶液浓度的选择应视具体情况而定。

(1) 当试液、显色剂及所用其他试剂在测定波长处都无吸收时,可用纯溶剂(如蒸馏水)作参比溶液。

(2) 当试液无吸收,而显色剂或其他试剂在测定波长处有吸收时,可用试样的“试剂空白”作参比溶液。

(3) 若待测试液本身在测量波长处有吸收,而显色剂无吸收,则可用不加显色剂的“试剂空白”作参比溶液。

(4) 若试液和显色剂在测量波长处都有吸收,可将一份溶液加入适当掩蔽试剂,将待测组分掩蔽起来,使之不再与显色剂反应,然后按相同步骤加入显色剂和其他试剂,以此溶液作参比溶液。

在进行样品测量前,先将参比溶液装入吸收池中,在测定波长处利用分光光度计的 $T=100\%$ 旋钮将透光率调至100%($A=0$)处,然后进行样品的吸光度测量。

第四节 吸收光谱法的应用

分光光度分析方法日趋完善,它是物质定性和定量分析中不可缺少的重要手段。只要被测物质在紫外-可见-近红外波段中有吸收光谱,就可以用光谱光度分析方法来进行定性和定量分析。此外,还可追踪酶与底物反应随时间而发生的吸光度变化以此来研究酶的动力学,利用比浊法对培养的细胞、细菌或免疫复合物进行定量测定,使用双波长测定法来排除由于样品混浊而产生的背景吸收的影响,以及用导数光谱法来解决多组分混合物的重叠吸收带和痕量成分的定性、定量分析等。