

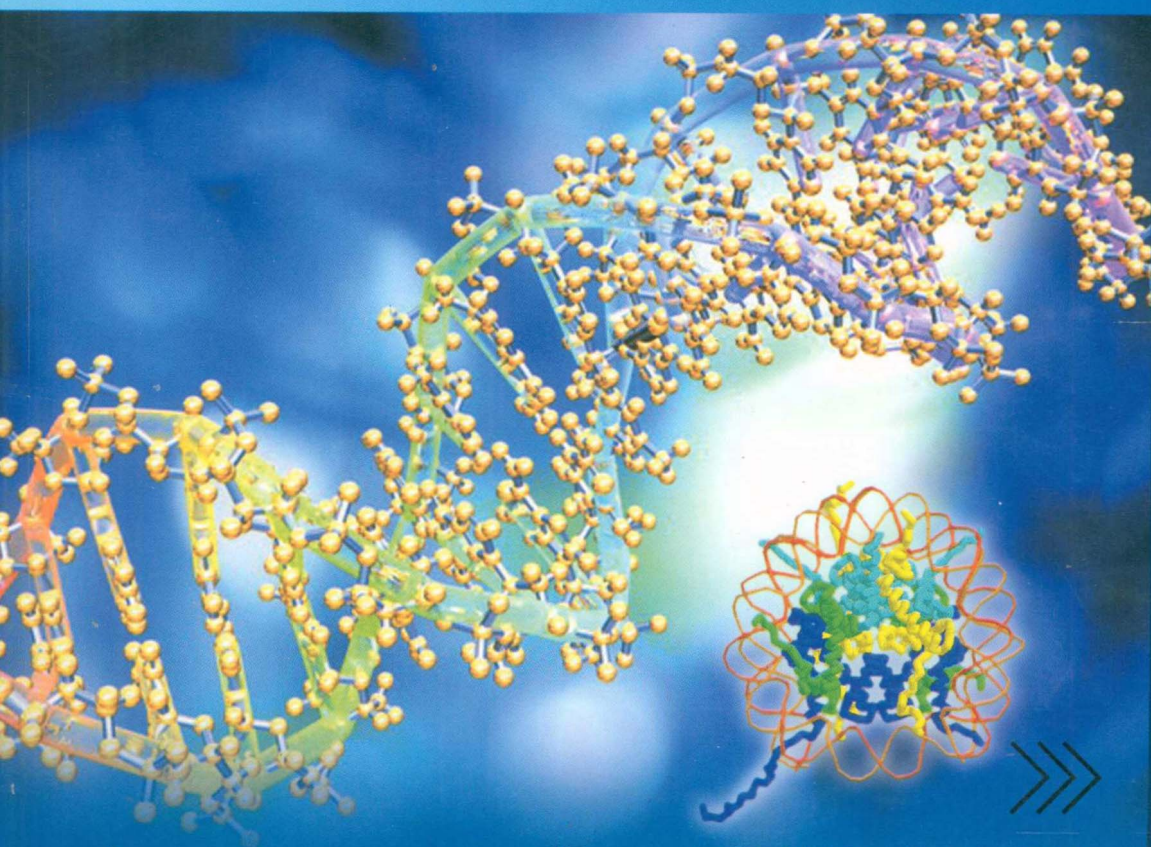


医学实验
技术指导丛书

YIXUE SHIYAN JISHU ZHIDAO CONGSHU

医学生物化学 实验指导

YIXUE SHENGWU HUAXUE
SHIYAN ZHIDAO



何春燕 喻红 主编

湖北科学技术出版社

医学实验
技术指导丛书



YIXUE SHIYAN JISHU ZHIDAO CONGSHU

医学生物化学 实验指导》》》

何春燕 喻红 主编

YIXUE SHENGWU HUAXUE
SHIYAN ZHIDAO

湖北科学技术出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

医学生物化学实验指导 / 何春燕, 喻红主编. -- 武汉 : 湖北科学技术出版社, 2010. 9
ISBN 978-7-5352-4551-9

I. ①医… II. ①何… ②喻… III. ①生物化学—化学实验—医学院校—教学参考资料 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2010) 第168080号

责任编辑: 李大林 熊木忠

封面设计: 戴旻

出版发行: 湖北科学技术出版社

电话: 027-87679468

地 址: 武汉市雄楚大街268号

邮编: 430070

(湖北出版文化城B座12-13层)

网 址: <http://www.hbstp.com.cn>

印 刷: 湖北睿智印务有限公司

邮编: 430000

787×1092 1/16

印张: 9.25

200千字

2010 年 9 月第 1 版

2010 年 9 月第 1 次印刷

印 数: 1-3565 册

定价: 17.50元

本书如有印装质量问题 可找本社市场部更换

内 容 简 介

本书共编写三部分内容。第一篇理论篇,共六章,系统介绍生物化学常用技术的基本原理及其在生物大分子研究中的应用。第二篇实验篇,共三章,第一章根据实验教学规划,安排蛋白质含量测定等十余个基础性验证实验,介绍生物化学实验的基本内容,包括实验原理、操作及实验注意事项等;第二章围绕医学领域的主要研究对象,设置七个有代表性的综合性专业实验;第三章为研究设计性实验,提出研究问题,开放型引导学生自主探究,以培养、启发学生的科学思维及综合应用技能。最后附录包括生物化学实验室常见试剂的配制等,以供实践参考。

本书以提高医学本科生的科学实践能力为宗旨,可供医学各专业五年制及七、八年制本科生生物化学实验教学选用,也可供相关学科科技人员参考。

医学生物化学实验指导编委会

主 编 何春燕 喻 红

副主编 李小明 刘万才 唐 微

编 者 (以姓氏拼音为序)

曹 佳	武汉大学基础医学院
陈丽达	武汉大学基础医学院
陈 芳	武汉大学基础医学院
陈舒丽	湖北咸宁学院医学院
陈 晓	湖北咸宁学院医学院
杜 芬	武汉大学基础医学院
何春燕	武汉大学基础医学院
李小明	武汉大学基础医学院
李庆桂	武汉大学中南医院
刘万才	湖北咸宁学院医学院
苗丽霞	武汉大学基础医学院
彭芳芳	武汉大学基础医学院
商 亮	武汉大学基础医学院
孙设宗	湖北医药学院基础医学院
唐 微	湖北医药学院基础医学院
武军驻	武汉大学基础医学院
喻 红	武汉大学基础医学院
张百芳	武汉大学基础医学院
郑 伟	湖北医药学院基础医学院

序 言

生命科学的进展基于观察思考与科学实验。作为生命科学尤其医学研究的基石,生物化学与分子生物学技术与方法自 20 世纪 60 年代后得到了突飞猛进的发展及广泛应用,使人们能够从分子水平更深入解析生命的奥秘、疾病发生的分子机制,并不断创新诊疗方法。对于新世纪开拓性、创新性的医学人才,系统掌握扎实的生物化学与分子生物学基本原理与常用技术是必需的。生物化学实验具有很强的实践性,实践过程不仅提高学生对理论知识的理解,同时也是培养学生动手能力、创新能力和科学素质的过程。

本书根据医学本科生生物化学实验教学大纲的要求编写。在遵循“三基”(基本理论、基本知识、基本技能)原则要求上,更强调内容的实用性、先进性、启发性。以武汉大学基础医学院生物化学与分子生物学系为代表,在多年辛勤教学实践的基础上,结合近年的实验教学改革,修正了经典的“基础性实验”,围绕医学研究对象系统设立了“综合性实验”,并增设了“研究设计性实验”,旨在培养学生实验室基本技能的基础上,引导医学生从整体应用角度针对生物大分子的研究进行科学思考和分析,提高学生自主创新能力和综合科研素质,体现实验教学的真正目的。

生物化学及分子生物学技术日新月异,我们希望在生物化学实验教学中不断改革创新教材内容和模式,在教与学中激发学生的科研兴趣,并期望汇编入本书的实验内容能为学生的应用实践发挥导航作用。

本书编写过程中得到了同行院校和湖北科学技术出版社的大力支持,在此表示衷心的感谢。同时本书的体系与内容还有待师生的进一步实践和完善,书中难免有疏漏和错误之处,还恳请广大读者提出宝贵意见。

编 者

2010 年 7 月

目 录

第一篇 实验理论

第一章 吸收光谱法	1
第一节 光谱分析基础知识	1
一、光的基本性质	1
二、吸收光谱	2
三、物质颜色与光吸收	2
第二节 光吸收的基本定律	3
一、吸光度与透光率	4
二、吸收光谱分析的基本定律	4
三、吸光系数	4
四、偏离 Beer 定律的因素	5
第三节 吸收光谱法的应用	6
一、定性分析	6
二、定量分析	7
三、吸收光谱分析的条件控制	8
第四节 分光光度计的基本结构和使用	9
一、分光光度计的基本结构	9
二、分光光度计的使用与要求	10
第二章 电泳技术	12
第一节 电泳的基本原理和分类	12
一、电泳的基本原理	12
二、电泳的迁移率	13
三、电泳的分类	13
第二节 电泳的影响因素	14
一、样品的性质	14
二、电场强度	14
三、缓冲液的性质	14
四、支持介质	15
第三节 区带电泳	15
一、醋酸纤维薄膜电泳	15
二、琼脂糖凝胶电泳	16
三、聚丙烯酰胺凝胶电泳	16

第四节 特殊的电泳	21
一、等电聚焦电泳	21
二、双向电泳	21
第五节 电泳后的染色	22
一、蛋白质的染色	22
二、核酸的染色	23
第三章 层析法	24
第一节 层析法的原理与分类	24
一、层析法的基本原理	24
二、层析法的分类	24
三、柱层析的基本组成	25
第二节 常用的层析法	26
一、薄层吸附层析	26
二、分配层析	27
三、离子交换层析	28
四、凝胶层析	29
五、亲和层析	32
六、高效液相层析	33
第四章 酶学分析	34
第一节 酶的分离纯化及鉴定	34
一、酶的分离纯化	34
二、酶制剂的鉴定	34
第二节 酶活性测定	35
一、酶活性测定方法	35
二、酶的活性单位	36
第三节 酶促反应动力学研究	37
一、底物浓度对酶促反应速度的影响	37
二、温度对酶促反应速度的影响	37
三、pH 值对酶促反应速度的影响	38
四、激活剂、抑制剂对酶促反应速度的影响	38
五、酶促反应样品及参比溶液的设定	38
第四节 酶法分析	38
一、单酶反应定量法	39
二、耦联酶反应定量法	40
第五节 同工酶分析	40
第六节 酶在生物医学上的应用	41
一、酶在疾病诊断中的应用	41

二、酶在疾病治疗中应用	42
第五章 蛋白质的分离与纯化	43
第一节 蛋白质分离纯化的原理和基本方法	43
一、沉淀法	43
二、透析与超滤	44
三、超速离心	45
四、层析	45
五、电泳	45
第二节 选择蛋白质分离纯化方法的策略	45
第三节 蛋白质的制备	46
一、材料的选择与预处理	46
二、细胞的破碎	46
三、提取	46
四、分级分离步骤	47
五、结晶	47
第四节 蛋白质的浓缩、干燥和保存	47
一、浓缩	47
二、干燥	48
三、样品的保存	48
第六章 核酸的分离纯化与鉴定分析	49
第一节 核酸分离纯化	49
一、核酸分离纯化的原则及要求	49
二、核酸提取的主要步骤	49
三、核酸的浓缩、沉淀与洗涤	51
第二节 核酸的鉴定与分析	52
一、紫外分光光度法的定量、定性分析	52
二、核酸凝胶电泳	52
三、聚合酶链反应(PCR)技术	54

第二篇 实验篇

第七章 基础性实验	58
实验一 蛋白质含量的测定	58
一、酚试剂法	58
二、BCA 法	60
三、双缩脲法	61
四、紫外吸收法	62
实验二 核酸含量的测定	64

一、二苯胺法测定 DNA 含量	64
二、地衣酚法测定 RNA 含量	65
三、紫外分光光度法分析核酸的纯度及浓度	66
实验三 肾上腺素与胰岛素对血糖浓度的影响——邻甲苯胺法测定血糖浓度	68
实验四 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	70
实验五 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	72
实验六 SDS-PAGE 测定蛋白质分子量	74
实验七 氨基酸的纸层析	77
实验八 离子交换层析分离混合氨基酸	78
实验九 凝胶层析分离血红蛋白与鱼精蛋白	80
实验十 血清谷丙转氨酶活性测定(改良 Mohun 法)	82
实验十一 底物浓度对酶活性的影响——碱性磷酸酶 K_m 值的测定	85
实验十二 温度和 pH 值对酶活性的影响	87
实验十三 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	89
第八章 综合性实验	91
实验十四 常见血液生化指标的酶终点法分析	91
一、酶法测定血清甘油三酯	91
二、酶法测血清胆固醇	93
三、磷钨酸—镁沉淀法(PTA- Mg^{2+} 法)测定血清 HDL-C 含量	94
四、酶法测定血液葡萄糖	95
实验十五 乳酸脱氢酶(LDH)的分析	97
一、血清乳酸脱氢酶(LDH)总活性测定	97
二、血清乳酸脱氢酶同工酶分离——琼脂糖凝胶电泳法	98
实验十六 血清免疫球蛋白 IgG 的分离纯化与鉴定	101
一、IgG 的分离与纯化	101
二、IgG 制品鉴定法	103
实验十七 谷胱甘肽巯基转移酶融合蛋白的表达及纯化	105
一、细菌转化、培养和 GST 融合蛋白的诱导表达	105
二、Western blotting 检测 GST 融合蛋白表达	106
三、亲和层析纯化 GST 融合蛋白	108
四、SDS-PAGE 鉴定 GST 融合蛋白的纯度	109
实验十八 外周血白细胞基因组 DNA 的分离纯化、鉴定与分析	110
一、外周血白细胞 DNA 的提取(NaI 法)	110
二、紫外分光光度法分析 DNA 的纯度及浓度	111
三、DNA 的琼脂糖凝胶电泳	111
四、聚合酶链反应(PCR)	112
实验十九 小鼠肝组织细胞 RNA 的分离纯化、鉴定与分析	114

一、TRIzol 法提取 RNA	114
二、紫外分光光度法分析 RNA 的纯度及浓度	115
三、RNA 的甲醛变性凝胶电泳	115
四、逆转录 PCR(RT-PCR)	116
实验二十 质粒 DNA 的提取、酶切和电泳分析	118
一、SDS-碱裂解法小量制备质粒 DNA	118
二、质粒 DNA 限制性内切酶酶切分析	120
三、质粒 DNA 酶切产物的非变性 PAGE 分析	120
第九章 研究设计性实验	122
实验二十一 碱性磷酸酶的分离纯化、鉴定及酶动力学实验	122
实验二十二 载脂蛋白 AI 的原核表达、分离纯化及鉴定分析	123
附 录	124
附录一 生物化学实验须知	124
附录二 实验室基本操作	125
附录三 试剂分级及常用酸碱溶液	129
附录四 常用缓冲液和试剂的配制	130
参考文献	136

第一篇 实验理论

第一章 吸收光谱法

光谱法 (spectrometry) 是根据物质发射的辐射能或辐射能与物质的相互作用, 通过获得的原子和分子光谱数据而检测物质性质和含量的一项分析技术。按光谱产生的方式可分为发射光谱法、吸收光谱法和散射光谱法。目前建立的常用光谱法包括原子发射光谱法、荧光光谱法、紫外及可见分光光度法、原子吸收分光光度法、红外光谱法、比浊法等。光谱技术具有灵敏度高、精密度和准确度高、选择性好、操作简便快速等诸多优点, 是科学研究工作中鉴定物质成分及含量测定中应用最广泛、最基本的分析方法。

吸收光谱法 (absorption spectrometry) 是基于物质对不同波长的光具有选择性吸收而建立起来的一种对物质进行定性、定量分析的方法。不同物质的分子结构不同, 对不同波长的光波的吸收能力不同, 每种物质都具有其特异的吸收光谱。其中比色法是利用滤光片产生的单色光测定物质的吸光能力, 谱带宽, 精度不高; 利用分光器 (如棱镜、光栅等) 获得纯度较高的单色光测定物质对光的吸收程度, 则称为分光光度法 (spectrophotometry)。如紫外及可见分光光度法就是根据物质对 200~760 nm 光区电磁波的吸收特性而进行的分析方法。其不需分离纯化混合样品中的待测物, 即可利用物质特定的吸收峰或特殊的显色反应达到定性定量分析的目的, 该法已广泛应用于医学科研和临床生化检验中。

第一节 光谱分析基础知识

一、光的基本性质

光是一种电磁波, 具有二重性, 即连续的波动性和不连续的粒子性。

波动性是指光是以波动的形式传播, 如光的折射、衍射、偏振和干涉等均是光的波动性的表现。所有光波在真空中的传播速度即光速 (C) 为 299 792 km/s。波长和频率是描述波动性的重要参数, 波长 (λ , 单位为 nm) 即相同的振动相位的相邻两点间的距离, 频率 (ν , 单位为 Hz) 即每秒钟振动次数。它们与光速 (C) 的关系是:

$$C = \lambda \cdot \nu$$

光还具有粒子性, 即把光看做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粒子性的表现。单个光子的能量 E 决定于光的频率:

$$E = h \cdot \nu = hC/\lambda$$

式中 E 为光子的能量, h 为普朗克常数 ($6.626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{S}$)。光量子是一种具有能量的物质, 不同波长的光具有不同的能量, 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, 光子的能量与光的波长成反比, 与频率成正比。

如图 1-1, 电磁波按波长顺序排列就构成了电磁波谱 (electromagnetic spectrum)。无线电波、红外线、可见光、紫外线、X 射线、 γ 射线都是电磁波。人眼所能感觉到的波长范围为 380nm 的紫色光到 760nm 的红色光, 该波长段以外的光看不见, 故 380~760nm 之间的光称为可见光。短于 380nm 的光称为紫外光 (其中 200~380nm 为近紫外光, 12.5~200 nm 称为远紫外光)。长于 760nm 光称为红外光 (红外线)。

不同波长的光组成复合光, 让复合光通过棱镜或光栅可分解成不同波长的单色光而形成光谱的现象称为光的色散。如太阳或白炽灯泡发出的可见光就是复合光, 发生光的色散后, 红、橙、黄、绿、青、蓝、紫等单色光按一定顺序排成, 形成一幅光的色谱, 称为光谱。

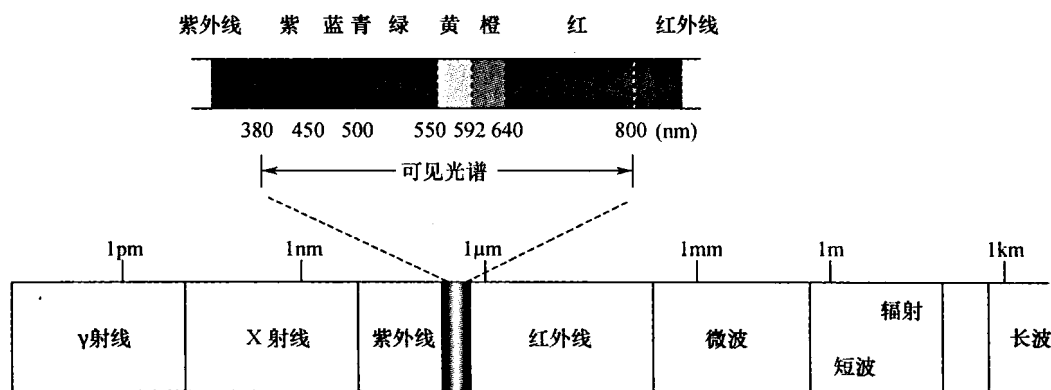


图 1-1 电磁波谱及可见光谱

二、吸收光谱

具有连续光谱的光通过某些吸光物质, 物质的原子或分子吸收一些特定波长的辐射能后, 从基态和低激发态跃迁至较高的能态, 出现按波长排列的吸收线或吸收带, 这种物质对辐射能的选择性吸收而得到的原子或分子光谱称为吸收光谱。不同物质的分子结构不同, 所产生的吸收光谱就不同。利用光谱仪器记录物质特征的吸收光谱用以检测物质成分的方法称吸收光谱法。以紫外区或可见光区辐射能作为光源建立的分析方法分别称紫外/可见分光光度法; 以红外区 (常用中红外区) 辐射能作为光源建立起来的分析方法称为红外光谱法; 基于基态气态原子蒸气对该元素共振线的吸收而建立的分析方法称为原子吸收分光光度法。

三、物质颜色与光吸收

物质对光具有选择性吸收的能力。物质在溶液中呈现不同的颜色正是由溶液中的质点 (离子或分子) 对不同波长的光具有选择性吸收而引起的。一种物质呈现何种颜色, 与入射光的组成和物质本身的结构密切相关。白光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。当一束白光照射到含某一物质的溶液时, 若该溶液对可见光谱中各种颜色的光几乎都不吸收, 溶液呈透明无色; 若几乎全部吸收, 则溶液呈黑色; 当白光通过某一有色物质的溶液时, 该溶液会选择性地吸收某些波长的光, 而让未被吸收的另一些波长的光透过, 溶液则呈现透过光的颜色, 亦即溶液的颜色是它所吸收色光的互补色。例如, 高锰酸钾 (KMnO_4) 水溶液选择吸收了白光中的大部分绿色光 (500~560 nm), 与绿色光互补

的紫红色光因未被吸收而透过溶液，故 KMnO_4 溶液呈现紫红色；硫酸铜溶液能选择性吸收黄光而呈蓝色。如果一对互补色的单色光按一定比例混合，也可得到白色光。物质的颜色与吸收光的颜色及其波长的关系见表 1-1。

表 1-1 物质颜色与吸收光的颜色及其波长的关系

物质颜色	吸 收 光	
	颜 色	波 长 (nm)
黄绿	紫	400~450
黄	蓝	450~480
橙	绿蓝	480~490
红	蓝绿	490~500
紫红	绿	500~560
紫	黄绿	560~580
蓝	黄	580~610
绿蓝	橙	610~650
蓝绿	红	650~760

物质的呈色可以粗略地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单色光的吸收程度（吸光度），然后以单色光的波长为横坐标，以吸光度为纵坐标作图，绘制得到一条曲线，即光吸收曲线（或称吸收光谱曲线），它能更精确地描述物质对光的吸收情况。如图 1-2 所示， KMnO_4 溶液的光吸收曲线反映其对可见光区不同波长的光选择性吸收特性，光吸收值最大的波长称为最大吸收波长（ $\lambda_{\max}$ ）， KMnO_4 溶液的 $\lambda_{\max}$ 为绿色光范围内的 525 nm。不同浓度 KMnO_4 溶液的光吸收曲线形状和 $\lambda_{\max}$ 都相同，但浓度越高的溶液对同一个波长的光吸收越多，在 $\lambda_{\max}$ 处吸光度的差值最大，所以通常选用 $\lambda_{\max}$ 进行物质含量的测定。

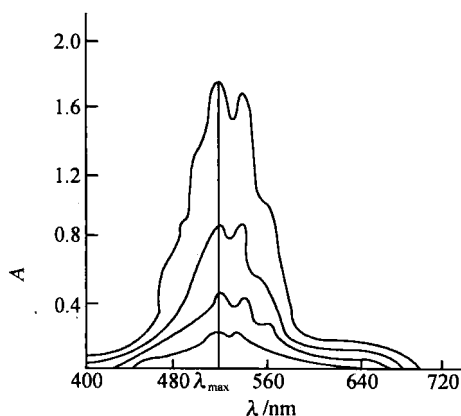


图 1-2 不同浓度高锰酸钾溶液的光吸收曲线

第二节 光吸收的基本定律

不同物质对同一波长的光吸收能力不相同，同一物质对不同波长的光吸收能力也不相同。这些物质所产生的吸收光谱的特性，是吸收光谱法进行物质定性、定量分析的依据。

一、吸光度与透光率

当一束单色平行光通过均匀而透明的溶液时（如图 1-3 所示），则一部分光被容器的表面散射或反射；一部分光被吸收；还有一部分光透过溶液。设入射光的强度为 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，测量时采用同样材质的比色皿，反射光强度基本不变，影响互相抵消，于是上式可简化为：

$$I_0 = I_a + I_t$$

设透光率（transmittance, T ）为透过光的强度 I_t 与入射光的强度 I_0 之比，即 $T = I_t/I_0$ ，常以百分数（%）表示；物质对光的吸收程度可用吸光度（absorbance, A ）表示， A 与透光率 T 之间并非简单的定量关系，而是 A 为 T 的负对数，即：

$$A = -\lg T = \lg I_0/I_t$$

由上式可见，溶液对光的吸收越多， T 值越小， A 值越大。

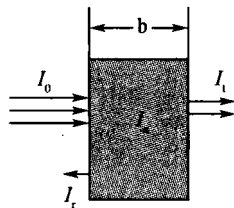


图 1-3 光吸收示意图

二、吸收光谱分析的基本定律

Lambert（朗伯）和 Beer（比尔）两位科学家，分别于 1760 年和 1852 年研究了有色溶液对单色光的吸光度与溶液的液层厚度和溶液浓度间的定量关系，总结出 Lambert 定律和 Beer 定律。

Lambert 定律表述为：当某一适当波长的单色光照射一固定浓度的溶液时，其吸光度 A 与光透过的溶层厚度（length, L ）成正比，即

$$A = k_1 L$$

k_1 是比例系数，其与溶液的性质和浓度、温度及入射光波长等有关。

Beer 定律表述为：当某一适当波长的单色光照射到液层厚度一定的溶液时，则吸光度 A 与溶液浓度（concentration, C ）成正比，即

$$A = k_2 C$$

k_2 为比例常数，其与溶液的性质和液层厚度、温度及入射光的波长等有关。

如同时考虑溶液的浓度和液层厚度对光吸收的影响，将上述两式合并即可得 Lambert-Beer（朗伯-比尔）定律：

$$A = kLC$$

式中 k 是特定条件下物质吸光的特征性常数，当 L 用厘米（cm）表示， C 用 g/L 表示， k 称为吸光系数，它与溶液的性质、温度及入射光的波长等有关。 k 的单位为 $(\text{g/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。Lambert-Beer 定律的物理意义为：当一束平行的单色光通过均匀透明的溶液时，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。Lambert-Beer 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），是各类吸收光谱法定量的依据。

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液层厚度时的吸光度。在一定

条件（单色光波长、溶剂、温度等）下， k 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概率有关。不同物质对同一波长的单色光有不同的 k ，可作为物质定性的依据。 k 值越大，说明该物质溶液对光吸收越强烈，则分光光度法测定的灵敏度越高。 k 还有常用的两种表达方式。

1. 摩尔吸光系数

指浓度为 1 mol/L 的溶液在厚度为 1 cm 时，在某一特定波长下的吸光度值。用 ϵ 或 E_M 表示，单位为 $(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。 ϵ 一般不超过 10^5 数量级。通常将 ϵ 值达 10^4 数量级的划为强吸收，小于 10^2 数量级的划为弱吸收，介于两者之间的划为中强吸收。

2. 比吸光系数或称百分吸光系数

是指物质的质量浓度为 1% ($\text{g}/100\text{ml}$ ，百分浓度) 的溶液，在厚度为 1 cm 时，在某一特定波长下的吸光度值。用 $E^{1\%}$ 表示。一般常在化合物成分不明、分子量未知的情况下采用。

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。 ϵ 或 $E^{1\%}$ 一般不能直接测得，需用一定条件下已知准确浓度的稀溶液测出 A 值后换算而得。特定条件下， ϵ 或 $E^{1\%}$ 是物质的特征性常数。

四、偏离 Beer 定律的因素

Beer 定律反映特定条件下，物质的吸光度 A 与其浓度 C 成正比。因此，当入射光强度和波长、液层厚度一定时，测定一系列已知浓度标准溶液的 A ，然后以 A 为纵坐标，以浓度 C 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）。但实际上此直线并不能无限延长，当溶液浓度超出一定范围时，标准曲线常呈现弯曲，出现偏离 Beer 定律的现象（图 1-4）。其次，某些测量条件的不准确也会造成浓度不是太高的溶液出现对 Beer 定律的表现偏离。引起偏离 Beer 定律的因素很多，大致可分为两类：物理性因素和化学性因素。

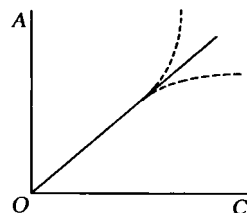


图 1-4 标准曲线和对 Beer 定律的偏离

1-4)。其次，某些测量条件的不准确也会造成浓度不是太高的溶液出现对 Beer 定律的表现偏离。引起偏离 Beer 定律的因素很多，大致可分为两类：物理性因素和化学性因素。

1. 物理性因素

由物理性因素引起的偏离，主要来自分析仪器造成的误差，包括入射光波长不准确、入射光的单色性不好、杂散光、单色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，其中最主要是非单色光作为入射光所引起的偏离。

Beer 定律成立的一个重要前提是单色光，单色光的纯度可用谱带宽度来表示。但分光光度计实际使用的入射光并不是严格的单色光，而是由单色器分选的一定狭窄范围波长的谱带，常有不同波长的辐射光同时存在。由于物质对不同波长的光有不同的吸收系数，多色辐射可以使吸光度变化而偏离 Beer 定律，故带宽越窄，单色光越纯，偏离越小。用吸收峰的 $\lambda_{\max}$ 作为测定波长，相邻波长间的吸收系数相差较小，吸光度 A 与浓度 C 之间容易保持良好的线性关系。

检测器受散射光的干扰也是引起误差的重要原因，如外界自然光直接漏进仪器，照到检测器上，增大了透光度。散射光对高浓度溶液的测定干扰大，能使吸光度降低，标准曲

线向下弯曲。

溶液的吸光度测定范围与检测器灵敏度有关。浓度过高的样品影响检测器灵敏度, A 值读数的精度差, 难以准确; 浓度过低的样品, 也容易引起检测器 A 值读数的误差, 故一般认为测定的 A 值在 $0.1 \sim 0.7$ 范围内, 相对误差较小。

2. 化学性因素

化学因素如浓度、pH 值、溶剂和温度等会对化学平衡产生影响, 因被测物的解离、缔合、与溶剂作用或形成的有色络合物等原因, 溶液的组成或各组分间的比例发生变化, 若导致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。其次, 在被测物浓度较大 (通常 $> 0.01 \text{ mol/L}$) 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, 从而改变物质微粒对光吸收的能力, 因此 Beer 定律一般适用于稀溶液的测定。

第三节 吸收光谱法的应用

吸收光谱法成熟, 仪器日趋精密, 只要被测物质在紫外—可见—近红外波段中有吸收光谱, 就可以用吸收光谱法来进行物质的定性和定量分析。目前紫外/可见分光光度法已是体内各种代谢物定性和定量分析不可缺少的重要手段。此外还可追踪酶与底物反应随时间而发生的吸光度变化来研究酶的动力学; 利用比浊法对培养的细胞、细菌或免疫复合物定量测定; 使用双波长测定来排除由于样品浑浊而产生的背景吸收的影响。

一、定性分析

物质的吸收光谱曲线即光吸收曲线, 是指在一定波长范围内某溶液连续性对每一种波长的入射光进行吸收的特征性曲线。它和分子结构有严格的对应关系故可作为定性分析的依据。可用自动扫描记录的分光光度计快速而准确地获得样品的吸收光谱曲线。根据光谱的 λ_{max} 、 ϵ 以及曲线的形状, 在相同条件下, 与已知物质的吸收光谱曲线进行对比, 就可知道它们是否为同一物质。其次比较样品与标准品的吸收光谱常用于物质纯度的鉴定, 若发现样品的吸收光谱出现异常吸收峰, 可判定样品中存在杂质。定性分析的常见方法如下。

1. 比较物质吸收光谱的一致性

不同的物质分子的结构不同, 其吸收光谱曲线有其特殊形状。同一物质, 在同一条件下其吸收光谱应完全一致。在鉴定时, 可利用数据库中的标准光谱图或标准纯品的吸收光谱曲线, 比较一定波长范围内测定物与标准物样品的吸收峰数目、位置、相对强度和形状, 如两者完全一致, 可初步确定两者可能为同一化合物。

2. 比较物质的 λ_{max} 及 ϵ 的一致性

有些物质具有相同的发光基团, 虽然分子结构不同也可能会导致吸收光谱相似, 但它们的吸光系数是有差别的, 因此在比较整个光谱曲线形状的同时, 还要结合标准品, 比较物质的最大吸收波长 λ_{max} 和摩尔吸光系数 ϵ 的一致性, 对测定物质进行准确定性分析。

3. 与其他方法结合分析

因为大多数化合物的可见、紫外吸收光谱吸收峰的谱带较宽, 特征性不明显, 因此仅