

前 言

在二十世纪有了惊人发展的生物学中，生物化学是最活跃的分支学科之一。促使生物化学迅速发展的一个重要因素，是新技术的开发。

过去一、二十年同生物化学的实验方法日趋专门化和复杂化。其突出特点是微量化、仪器管道化和自动化，牵涉到生化实验工作的领域也越来越多。今天，农业、工业、医学、环境卫生、以及生命科学等的研究都涉及生物化学（或分子生物学）的研究，生化分析技术已成为当前生物科学中常规的实验技术了，并且发展成为独立的技术学科。

在医学教育中如何加强生化实验教学，仍是一个“有争论”的问题。过去强调生化实验必须验证课堂理论和结合临床生化检验，但由于实验内容较陈旧，方法较落后，远不能适应当前分子生物学和生物化学实验技术的飞速发展形势，因此不少生化工作者认为进行实验教学改革已是大势所趋，势在必改，甚至有考虑将生化实验教学改革成为具有一定独立性的分子生物学技术课程。不过多数还认为对生化实验教学既要作适当改革，以适应生化技术的发展，同时也应考虑医学院的教学目的和特点，适当结合临床，也就是我组进行生化实验教学改革和编写本实验教学讲义的基本出发点。再者为了改善我院“以提高为主”的培养方针，在实验教学要求的广度和深度方面都比过去有一定程度的提高。这些认识是否符合实际，还有待实践来检查，但这毕竟是我们进行教学改革的一个尝试。

为了编写本教材，在多年来我组开设的实验课程的基础上，学习和吸取了许多兄弟院校的一些宝贵经验，并对现行的各种实验教材进行了认真研究，有选择地吸取了其中适合我们教学条件的较好的实验方法，对近年发展较快的一些生化技术也作了适当增补，并在81—82年进行初步生化实验改革和取得一定经验的基础上编写了本实验讲义。全书共分三部分。前一部分重点介绍生物化学常用实验技术的基本知识和理论，第二部分共编制了三十个实验，最后将“国际原子量表、酸碱指示剂、缓冲液的配制、常用酸碱浓度及四位对数表等列表附于第三部分附录中。以便利读者查找。

具体实验教学安排是以一天（约七学时）为一个单元，由两名学员编为一组共同完成全部操作，每两周一次实验。

尽管本教材中的大部分实验操作方法都经我组同志们多次摸索和实践，但限于我们的实验条件和水平，缺点与错误在所难免，希广大读者给予批评指正。

本书由卢义钦、朱定尔负责审核，谢慎思、鲁重元负责编排，校对由执笔人包干，并在各有关内容后署名，以明文责。在讲义后附有一些参考资料目录，供同学们课后查阅。

生化教研组

1983年6月

阅读参考书：

前 言

①中山大学生物系微生物教研室编“生化技术导论”人民教育出版社 (1978年版)

②徐晓利主译“生物化学工具”人民卫生出版社 1980年

③蔡武城、袁原积主编“生物物质常用化学分析法”科学出版社1982年8月

④张龙翔、张庭芳等主编《生化实验方法和技术》人民教育出版社, 1981年11月

本教材是根据教育部《生物化学课程教学大纲》(1982年)和《生物化学实验课程教学大纲》(1982年)的要求,由北京、天津、上海、广州等地的生物化学工作者共同编写而成的。在编写过程中,参考了国内外的许多教材和文献,力求做到概念清晰、重点突出、循序渐进、由浅入深,使学生在学完本课程后,能掌握生物化学的基本理论、基本知识和基本技能,并能初步进行生物化学实验和科研工作的能力。本书可作为高等院校生物化学专业及相关专业的教材,也可供从事生物化学工作的科技人员参考。

本书共分八章。第一章为绪论,介绍生物化学的发展概况、生物化学与医学、农业、工业、环境等的关系。第二章至第四章为生物化学的基本理论,包括蛋白质的结构与功能、核酸的结构与功能、酶的性质与功能。第五章至第七章为生物化学的基本知识,包括氨基酸的代谢、糖的代谢、脂类的代谢。第八章为生物化学的基本技能,包括生物化学实验的基本原理和方法、生物化学实验的安全知识、生物化学实验的记录和报告。本书在编写过程中,力求做到概念清晰、重点突出、循序渐进、由浅入深,使学生在学完本课程后,能掌握生物化学的基本理论、基本知识和基本技能,并能初步进行生物化学实验和科研工作的能力。本书可作为高等院校生物化学专业及相关专业的教材,也可供从事生物化学工作的科技人员参考。

本书在编写过程中,参考了国内外的许多教材和文献,力求做到概念清晰、重点突出、循序渐进、由浅入深,使学生在学完本课程后,能掌握生物化学的基本理论、基本知识和基本技能,并能初步进行生物化学实验和科研工作的能力。本书可作为高等院校生物化学专业及相关专业的教材,也可供从事生物化学工作的科技人员参考。

1983年8月

目 录

前 言

生化实验须知	(1)
附：实验：基本操作训练	(2)
第一篇：生化实验常用技术	
一、紫外和可见分光光度法	(6)
(一) 基本原理	(7)
(二) 光吸收的测定	(10)
(三) 分光光度计的结构	(13)
(四) 分光光度法的应用	(15)
二、层析技术	(19)
(一) 概述	(20)
(二) 离子交换柱层析	(22)
(三) 薄层层析	(27)
(四) 亲和层析	(29)
三、凝胶过滤	(32)
四、电泳技术	(40)
(一) 基本原理	(41)
(二) 滤纸电泳(又称纸上电泳)	(44)
(三) 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(45)
(四) 凝胶等电聚焦	(49)
五、超离心技术	(51)
六、放射性同位素技术	(56)
七、放射免疫测定法	(65)
八、常用生化仪器的使用方法	(69)
(一) 酸度计	(69)
(二) 721分光光度计的构造及使用	(73)
(三) 751G型分光光度计的构造和使用	(74)
(四) ZBS-1型自动部分收集器	(76)
(五) 恒流泵	(78)
(六) 电泳光密度扫描仪	(78)
(七) 氨基酸自动分析仪简介	(82)
第二篇 生化实验	
一、蛋白质	(85)
实验一：蛋白质的呈色反应	(85)
实验二：蛋白质的沉淀与变性	(89)

实验三：血清总蛋白的定量测定	(94)
① (一) 微量凯氏定氮法	(94)
(二) 紫外分光光度法	(98)
(三) 福林—酚试剂法	(99)
(四) 电位滴定法	(100)
(1) —用氨气敏电极测定血清中蛋白质。	
(S) 二、核酸化学：	(103)
实验四：肝脏RNA的提取（苯酚法）	(104)
② 实验五：酵母RNA的提取（浓盐法）	(105)
(7) 实验六：肝脏DNA的提取（氯仿—异戊醇法）	(106)
(01) 实验七：核酸含量、纯度及成分鑑定	(108)
(U) 三、酶的动力学：	(113)
(21) 实验八：底物浓度对酶活性的影响	(113)
(81) 实验九：抑制剂对酶促反应速度的影响	(116)
(05) 实验十：温度、PH对酶促反应速度的影响	(119)
(SS) 四、分光光度法：	(122)
(55) ③ 实验十一：血红蛋白及其衍生物的吸收光谱及定量测定	(122)
五、层析法 实验十二：氨基酸纸上层析及氨基移换作用	(129)
(55) ⑦ 实验十三：氨基酸离子交换性层析分离混合氨基酸	(132)
(04) ③ 实验十四：凝胶过滤分离蛋白质	(137)
(14) 实验十五：凝胶过滤分离高铁血红蛋白及高铁氰化钾	(141)
(11) 六、电泳法：	(143)
(24) ⑥ 实验十六：血红蛋白醋酸纤维薄膜电泳	(143)
(06) 实验十七：血红蛋白肽链裂解电泳	(144)
(12) 实验十八：血清蛋白和脂蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	(145)
(32) 实验十九：利用醋纤电泳测定血清乳酸脱氢酶同工酶活性	(150)
(24) 实验二十：聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质	(152)
(04) ⑧ 实验二十一：凝胶等电聚焦分离血清蛋白质	(163)
(09) 七、与临床生化有关的实验：	(166)
实验廿二：全血葡萄糖含量测定	(166)
② 实验廿三：血清胆固醇测定	(168)
(05) 实验廿四：全血非蛋白氮含量测定	(170)
(87) 实验廿五：血清谷丙转氨酶 (S-GPT) 活性测定	(172)
(87) 实验廿五：血清钙测定	(174)
(87) 实验廿七：血浆CO ₂ CP测定（量气法）	(177)
(5) 附录：(一) 国际原子量表	(181)
(二) 酸硷指示剂	(184)
(28) (三) 缓冲液配制	(185)
(28) (四) 常用酸碱浓度	(186)
(08) (五) 四位对数表	(187)

生化实验须知

(Remarks and Caution of Biochemical Experiments)

一、实验目的

- (一) 通过实验所得结果以证明、巩固和深化生化某些基本理论与知识。
- (二) 学习和掌握生化的基本技术和研究方法，并为今后的临床医学和实验医学打下基础。
- (三) 培养学生实事求是的工作作风，树立对科学研究的正确态度和科学的思维方法。

二、实验要求

进行科学实验不仅要求高质量(结果良好)而要求高效率。要达到此目的应注意以下几点:

(一) 实验前做好预习，只有在充分做好预习的条件下，实验才能获得较好的结果，这也是培养同学在实验中独立工作的必要的过程。每次实验前必须通过预习着重了解实验目的和要求、实验原理及主要操作步骤，特别要弄清实验设计的原理。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。

(二) 实验室必须保持整洁安静，严肃认真专心地进行操作，细致地观察实验现象，并从实验结果中得出正确的结论，写好实验报告。

三、实验原始记录及报告

除实验报告本外，每人必须准备一个原始记录本，一切观察的现象与实验数据必须记录在记录本上，做实验不能无记录或仅仅凭印象来描述结果，也不准用碎纸记录，更严禁将原始记录涂写在手心上。这关系一种良好的科学习惯的培养。

报告内容应该包括实验日期、名称、原理、主要操作步骤及观察结果、解释与结论。报告要用自己的话来书写，字迹端正整洁，内容简明扼要。报告一般应于当天送交指导教师，老师将批阅报告并登记入册，作为本课程实验考核成绩，因此，不能无故缺交报告。如违反此规定，将酌情扣减实验成绩。

四、实验室规则

- (一) 保持实验室肃静。
- (二) 爱护仪器，尽量避免破损，节约使用药品、蒸馏水、自来水和电。若不慎损坏了仪器，须填写仪器破损单，注明破损原因，并经指导老师同意后，方可到生化供应室换领，并按学院规定赔偿和处理。
- (三) 保护实验台，不要将高温试管直接放在台面上，切勿将强酸、强碱等物洒在台面上。
- (四) 取完试剂应及时将瓶盖盖好，放回原处。千万不要乱拖乱放，以免影响别人做实验。
- (五) 废弃液体可倒入水池，并放水冲走，固体废物应倒入废物缸内。实验动物放在指

定地方。

(六) 每个实验室选出室长一名，负责实验室的有关工作。于开学时排出保安卫生值日。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。

(七) 实验所用仪器包括公用仪器与自己保管仪器。公用仪器不得放入自己的仪器柜内，用毕放回原处。自己保管的仪器，每组一套，现将仪器名称、规格及数量列表如下：

名 称	数 量	名 称	数 量
烧杯(50或100ml)	1	离心管(10ml)	4
烧杯(250或500ml)	1	漏 斗	1
量筒(50ml)	1	滴 管	2
酒精灯 (150ml)	1	玻 棒	2
大试管	12	试 管 夹	1
小试 管	12	试 管 架	1

附实验 基本操作训练

〔实验目的〕

- 1、了解实验室的一般规则。
- 2、清点仪器。
- 3、掌握一般玻璃仪器的洗涤法。
- 4、了解并练习刻度吸量管的使用。
- 5、掌握液体混匀法。

〔器材及药品〕

1. 试管。2. 量筒。3. 吸量管(0.1ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml及10ml各一支)。4. 红墨水。

〔本实验的具体安排〕

一、清点仪器 逐项清点仪器是否完整无缺，若有破损或减少，应向指导老师报告并请求更换或补发。

二、玻璃仪器的洗涤

(一) 一般容器 如试管、量筒及烧杯等，可直接用肥皂水或去污粉刷洗，再用自来水多次冲洗，去尽肥皂水或去污粉，最后用少量蒸馏水冲洗2~3次，倒置沥干备用。洗净的容器内壁应是光洁不沾挂水珠。

(二) 容量分析仪器 如吸量管、量瓶及滴定管等，先用自来水冲洗多次，待沥干后，再用铬酸洗液浸泡数小时，然后用自来水充分冲洗，直到将洗液全部洗净为止，最后用少量蒸馏水冲洗2~3次备用。

三、吸量管 吸量管是生化实验中常用的仪器之一，分为三类(见图1)。

(一) 吸量管的种类

1、奥氏吸量管 奥氏吸量管供准确量取0.5ml、1ml、2ml、3ml、5ml及10ml液体之用。每根吸量管上只有一个刻度，放液时最后须吹出残留在管尖的液体。这类吸量管的

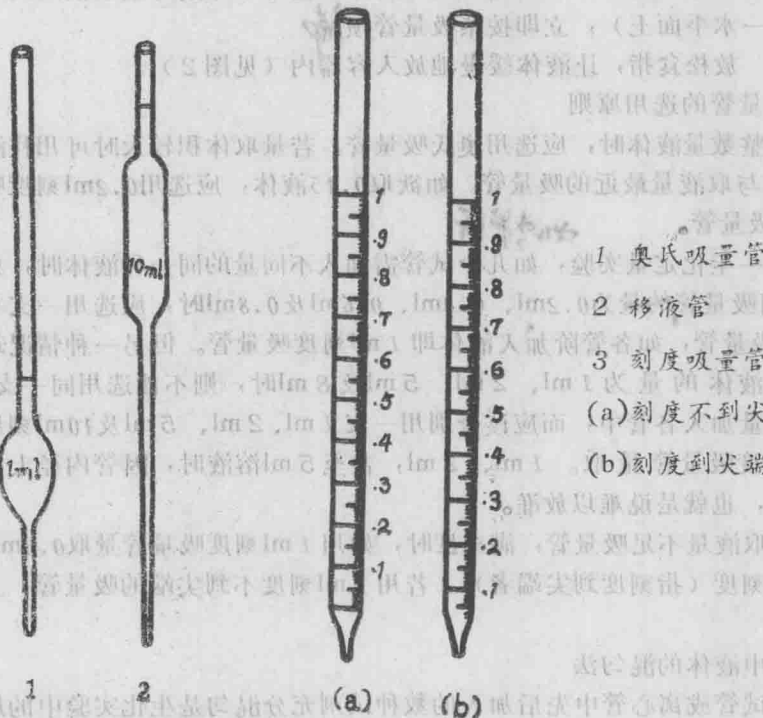


图1 三类吸量管

特点在同一容量的各类吸量管中以它的容量表面积为最小，故准确度最高。它常作为量取精度较大的液体（如血液等）之用。

2、移液管或移液吸量管 移液管供准确量取 1 ml、5 ml、10 ml、20 ml、25 ml、50 ml 及 100 ml 液体之用。每根移液管上也只有一个刻度，放液时待管内液体流出后，吸量管管尖在容器内壁上继续停留 15~30 秒钟，管尖残留液体不得吹出。这类吸量管常作为化学容量分析及定量稀释之用。

3、刻度吸量管 刻度吸量管供量取 10 ml 以下的任意体积的液体之用。有 0.1 ml、0.2 ml、0.25 ml、0.5 ml、1 ml、2 ml、5 ml 及 10 ml 几种。这类吸量管刻度到尖端者与刻度不到尖端者两种。因生产单位不同，有自下而上或自上而下的两种刻度法。因此，使用时应仔细分清，千万不要弄错。若使用刻度到尖端者，则在所量取的液体全部放出后，须将残留在管尖的液体吹出；若使用刻度不到尖端者，则以刻度为准。例如使用 1 ml 吸量管吸取 1 ml 液体时，则将液体恰巧放出至下端刻度即可，决不可放液达到最低的刻度以下。

(二) 吸量管的使用方法

三类吸量管除上述几点不同外，其他操作相同，并简介如下：

1、拿法 将中指和拇指拿住吸量管上端，食指顶住吸量管顶端。

2、取液 将吸量管插入液体内，用嘴或胶皮球吸取液体至最高刻度以上。然后，迅速用食指按紧吸量管顶端，使不致让液体从管内流出。

3、调液刻 将已充满液体的吸量管提出液面，用碎滤纸片抹干吸量管外面的液体。然

后持吸量管与地面保持垂直，放松食指控制液体缓慢地下降刚好至最上刻度（液体凹面、刻度和视线应在一水平面上），立即按紧吸量管顶端

4、放液 放松食指，让液体缓慢地放入容器内（见图2）。

（三）吸量管的选用原则

（1）量取整数量液体时，应选用奥氏吸量管。若量取体积较大时可用移液管。

（2）选用与取液量最近的吸量管。如欲取0.15液体，应选用0.2ml刻度吸量管，而不能
用0.5ml刻度吸量管。

（3）在同一生化定量实验，如几个试管需加入不同量的同一种液体时，要根据加入液体的量酌情选用吸量管的量为0.2ml、0.4ml、0.6ml及0.8ml时，应选用一支与最大的取液量接近的刻度吸量管，如各管阶加入液体即1ml刻度吸量管。但另一种情况却不能这样做，如各管所加入液体的量为1ml、2ml、5ml及8ml时，则不能选用同一支10ml刻度吸量管吸取不同的量加入各管中，而应该分别用一支1ml、2ml、5ml及10ml刻度吸量管吸取。因为用10ml刻度吸量管量取1ml、2ml，甚至5ml溶液时，因管内径太大，其刻度是很难控制得准的，也就是说难以放准。

（四）当取液量不足吸量管，满刻度时，如用1ml刻度吸量管量取0.6ml液体时，应选用吸量管上端刻度（指刻度到尖端者）。若用1ml刻度不到尖端的吸量管，上端或下端刻度都可以使用。

四、试管中液体的混匀法

如何使用试管或离心管中先后加入的数种试剂充分混匀是生化实验中的最常用的基本操作。通常试管内液体的混匀方法有以下几种：

1、旋转法（使试管作满周运动） 液体较多时常采用此法。右手拿试管上端，利用手腕力量使试管作周围运动。顺时针或逆时针方向转动都可以，但必须一个方向（见图3）。



图2. 使用吸量管的姿势

图3 旋转法

2、指弹法 左手持试管上端，使试管大致垂直于地面，再用右手手指轻轻弹动试管（即右手手指与试管壁成切线运动），使管内液体呈旋涡状转动。液体较少时可采用此法。

3、甩动法 右手握住试管上端，将试管倾斜放在桌面上来回迅速甩动，使管内液体呈旋涡状转动。此法只适用于少量液体的混匀。

4、倒转法与玻棒搅拌法 生化实验不常采用这两种方法。

五、实验内容

(一) 识别吸量管的容量、类型、刻度的有效位数，并练习正确使用。

(二) 用 1 ml、2 ml、5 ml 及 10 ml 刻度吸量管准确量取 1 ml、2 ml、3 ml、5 ml 及 10 ml 自来水分别加入五支试管中。然后用 0.5 ml 吸量管量取 0.5 ml 红墨水分别加入上面的试管中（吸量管外面用碎滤纸片抹干净），按上述各种混匀法把各管混匀。

【思考题】1、用 3 ml 蒸馏水清洗一支试管，问用 3 ml 洗一次与用 1 ml 淋洗三次何者清洁？为什么？

2、何谓有效数字？123.0，12.3，0.123，0.0123，0.1230 各有几位有效数字？

3、1 ml 刻度吸量管的最细刻度为 0.01 ml，问有效数字应读至小数点后第几位？

第一篇 生化实验常用技术

(Section I. Techniques generally used in biochemical laboratory)

一、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，分光光度法的测定范围可不局限于可见光区，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4)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；比红外线的波长更长的，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1)。

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，这些方面包括紫外-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1)。

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较好方法；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。

表 1 电磁波谱的性质和光谱分析的应用

量子能量E (电子伏特) eV	波数 ρ cm^{-1}	波长 λ cm	频率V HZ	辐射类型	光谱类型及应用
4.1×10^8	3.3×10^{10}	3×10^{-11}	10^{21}	γ射线	γ-射线发射光谱
4.1×10^4	3.3×10^8	3×10^{-8}	10^{19}	X射线	X-射线吸收发射光谱
4.1×10^1	3.3×10^8	3×10^{-7}	10^{17}	紫外线	紫外线吸收光谱
4.1×10^0	3.3×10^4	3×10^{-6}	10^{15}	可见光	吸收发射光谱 紫外可见 吸收发射光谱 荧光
4.1×10^{-2}	3.3×10^2	3×10^{-3}	10^{13}	红外线	
4.1×10^{-4}	3.3×10^0	3×10^{-0}	10^{11}	微波	微波吸收光谱 拉曼光谱
4.1×10^{-8}	3.3×10^{-2}	3×10^1	10^9	无线电波	顺磁共振光谱
4.1×10^{-8}	3.3×10^{-4}	3×10^3	10^7	无线电波	核磁共振光谱

图 4 太阳光中可见光谱

(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: $C = \lambda \times \nu \approx 3 \times 10^{10} \text{cm/sec}$

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, nano-meter) 为单位表示 ($1 \text{nm} = 10^{-9} \text{m}$); 也曾有用埃 (\AA , angström) 为单位 ($1 \text{\AA} = 10^{-8} \text{cm}$) 数。频率 (V) 是指电磁波源在每秒钟内振动的次数, 单位 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 $\lambda = 6 \times 10^{-5} \text{cm} = 600 \text{nm} = 6000 \text{\AA}$

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

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

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Plank氏常数，等于 6.62×10^{-27} 尔格·秒 (erg·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5)：两向量均为正弦曲线，彼此垂直于波动方向 (图中，X所示)。这就是所控电磁辐射的波动性。

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“光子”或“光子”所构成。物质对光或其他辐射能的吸收也就是光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

当光和其他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6)。

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7)，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支化。



图5 电磁波的电场向量E和磁场向量X与波劳方向的关系

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，发生跃迁或能级变化，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物质的分子具有相同频率时才有光吸收。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。

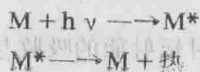


图6. 光吸收的能量变化(恢复时发射荧光或热)

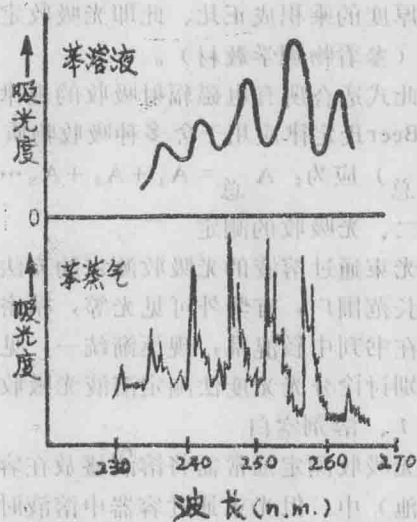


图7. 苯蒸气和苯溶液的吸光光谱

M^* : 表示激发态的原子或分子; $h\nu$ 表示光子能量; 激发状态 M^* 极不稳定, 寿命短暂 ($10^{-8} \sim 10^{-9}$ sec), 它迅速进行恢复, 其恢复过程有三种方式:

- 1) 将激发能转变为热
- 2) M^* 分解生成新物质 (即“光化学反应”)
- 3) 将激发态转换为荧光光谱和磷光辐射 (即“荧光光谱或磷光光谱”)

3、光吸收定律——Beer氏定律

Beer在早期研究辐射能吸收过程中曾指出: 一束单色的辐射能通过介质或溶液后, 有一部分被吸收, 其辐射能的降低与入射光强度或能量和光路中吸收物质的分子数目有关, 这一关系用数学式表示如下 (参见图8)。

$$\log P_0/P = \epsilon bc = A$$

式中 P_0 及 P 分别表示入射光和透射光的辐射能; b 为溶液的厚度或光束通过溶液的距离 (即光程) 以厘米表示。

c 为溶液的浓度, 常以每升的克分子数表示。

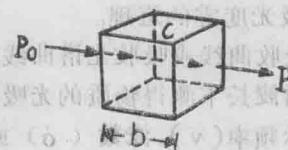


图8 光辐射能通过厚度为 b 的吸收物质。(c 表示克分子浓度)

ϵ 为克分子消光系数或克分子吸光系数、为一常数。(即溶液浓度为1克分子浓度,光程为1厘米时,测得某一定波长下的吸光度,此值反映溶质的特征。)

式 $\log \frac{P_0}{P}$ 表示光线通过溶液时,辐射能被吸收的程度,称为吸光度(A)或“消光度”

(E) 又称为“光密度”(D)。

$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$ 一式的意义是指溶液对辐射能的吸收与溶液中吸与物质的浓度和

溶液厚度的乘积成正比、此即光吸收定律,又称为Lambert-Beer定律、现习惯简称为Beer氏定律(参看物理学教材)。

此式适合所有电磁辐射吸收的规律,不仅适用于溶液、也适用于气体和固体。

Beer氏定律应用于含多种吸收物质的溶液,如果这些物质相互无反应、则总吸光度(A_总)应为: $A_{总} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n = \epsilon_1 bc_1 + \epsilon_2 bc_2 + \epsilon_3 bc_3 + \dots + \epsilon_n bc_n$

二、光吸收的测定

光束通过溶液的光吸收测定的方法有比色法(或光度法)、分光光度法等,而以后者适应波长范围广,有紫外可见光等,精密度较高,是目前最常用的方法。但使用的名词,符号,在书刊中较混乱,现逐渐统一,见表二中第一栏(标记*一栏)为国际统一命名。下面将分别讨论分光光度法测定溶液光吸收的有关问题:

1、溶剂空白

光吸收测定通常需将溶液盛放在容器(或比色池)中,但光束通过容器中溶液时光的衰减,除溶质对光的吸收外,尚有容器界面的反射和散射,溶液中的散射以及溶剂本身等物理过程(如图9)。

为了校正这些因素对光束通过容器中溶液时对入射能量的影响,常用同一容器盛有相同溶剂(空白),并以同样光束通过以进行推较,这样测得的吸光度则非常近似溶液本身的真



图9. 光束通过容器中溶液时光的衰减

实吸光度,即 $A \approx \log \frac{P_{溶剂}}{P_{溶液}}$ 。这就是为什么在测定溶液光吸收时,必须进行溶剂空白以校正

100%T或吸光度零的道理。

2、吸收曲线或吸收光谱曲线:

在不同波长下测得物质的光吸收数据,有各种不同的表示方法,一般在直角坐标系中以横坐标表示频率(ν),波数(σ)或波长(λ);纵坐标表示透光度(或百分透光度T%),吸光度(A)或吸光度的对数($\lg A$)作图。所绘制的曲线如以吸光度表示则称为吸收曲线或吸收光谱曲线或称为吸光度-波长曲线。在紫外-可见分光光度法中常用波长(nm)表示横坐标,吸光度(A)或百分透光度(T%)表示纵坐标来描绘(参见图7)。

图7表示高锰酸钾溶液的光吸收数据的三种不同方式描图;用吸光度表示时,在高吸光

度或高浓度溶液(如中图b与c),显示差别较大(0.8至1.3)。以百分透光度表示,则二者差别很小(<20%)。(下图b与c);而在透光度20~60%范围内却能显示出较大差异(下图a与b)。以lgA描图,光谱细节不见,但此曲线在纵坐标上是等距偏移(与波长无关),因此

表2 分光光度法与有关名词及符号

名称及符号	定义	其它名称和符号
辐射功率P, P ₀ (Radiant Power)	每秒钟到达检测器一定面积的辐射能	辐射强度I, I ₀ (Radiation intensity)
吸光度 A (Absorbance)	$\log \frac{P_0}{P}$ (= -logI)	光密度, D; (Optical density) 消光度 E; (Extinction)
透光度 T (Transmittance)	$\frac{P}{P_0}$	透射比 T (Transmission)
辐射程长程, b, (cm)	/	I; d.
克分子吸光系数 ε (Molar absorptivity)	$\frac{A}{bc}$ (c为克分子浓度)	克分子消光系数 ε (Molar extinction coefficient)
吸光系数, a (Absorptivity)	$\frac{A}{bc}$ (c用其它浓度表示)	消光系数, K. (Extinction coefficient)

便于比较不同浓度。

某物质的吸收曲线,常具有特殊的形状并表现有一个或多个吸收峰(光吸收最大处),最大的吸收峰的波长称为λ_{最大}(或λ_{max})。

吸光度曲线的最大吸收峰朝上,而在透光度曲线则向下。吸收曲线特殊的形状和吸收峰的波长(λ_{max})常用以作定性分析的基础(如鉴定某一纯物质或检查其纯度)。

3、定量分析及计算:

用分光光度法进行定量分析的过程和比色法相似,即在选定波长下测定待测溶液的吸光度与一系列已知浓度溶液(或标准液)的吸光度进行比较,根据Beer氏定律计算待测液的浓度。

(1) 吸光度与浓度关系的测定:通常进行一系列浓度的标准液的吸光度测定,绘制出吸光度曲线(又称为校正曲线)(图10)。由此了解吸光度与浓度的关系。理想的浓度-吸光度曲线应成直线。这表明溶液对光的吸收的遵守Beer氏定律。同时此曲线也是大批定量分析

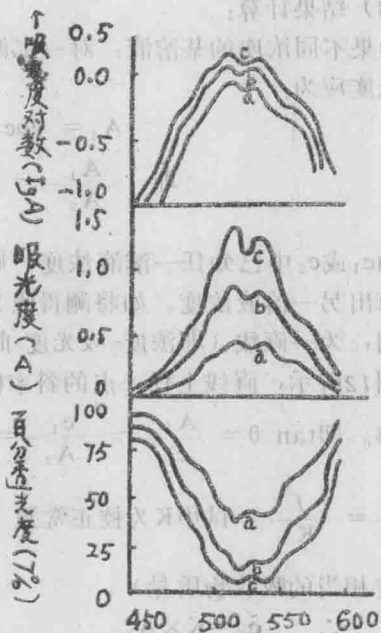


图10. 光吸收数据的描图方法

(KMnO₄液, 浓度比, a:b:c=1:2:3)

中计算结果的基础。在制作浓度-吸光度曲线时，对标准液浓度的选择，一般选择4~6种依次递增浓度的溶液，并且它们能大致包括所有待测定样品的浓度，彼此浓度间应呈一定比例关系(通常使呈等差数列的关系，如设最小浓度为x，则其他浓度应选择为2x, 3x, 4x...等，这样便于统计和作图。为使仪器读数误差最小，标准液的吸光度读数最好控制介于0.2~0.8之间较好(详后)。

(2) 波长的选择：一般是选择待测物质最大吸收峰的波长(λ_{max})。因在 λ_{max} 测定吸光度，由于仪器单色光纯度不够带来的偏差最小(参见图8)。在吸收峰波长处测吸光度，波长变化影响最小(如图11A带)；而在其他波长处(如B带)，(波长变化对吸光度影响大，甚至使测得浓度-吸光度曲线不呈直线。

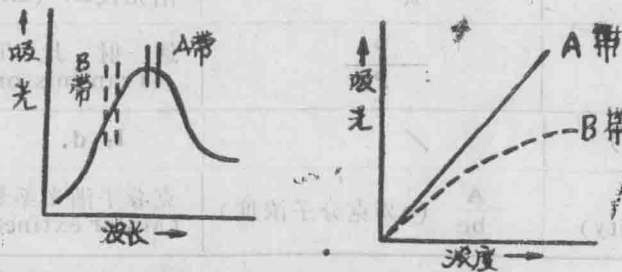


图11. 多色光辐射对Beer氏定律关系的影响

(3) 结果计算：

如果不同浓度的某溶液，对一定波长的紫外或可见光吸收遵守Beer氏定律，则分别测得其吸光度应为：

$$A_1 = \epsilon b c_1$$

$$A_2 = \epsilon b c_2$$

即 $\frac{A_1}{A_2} = \frac{c_1}{c_2}$

$$c_2 = \frac{A_1}{A_2} \times c_1$$

如 c_1 或 c_2 中已知任一溶液浓度，则可从上式计算出另一溶液浓度。如将测得吸光度对浓度作图，为一直线(即浓度-吸光度曲线)所示如图12所示，直线上任一点的斜率($\tan \theta$)

应相等。即 $\tan \theta = \frac{A_1}{c_1} = \frac{c_1}{A_2} = \dots =$

$$\frac{A_x}{c_x} = \frac{1}{K}$$

试中K为校正常数 即单位

吸光度相当的吸收物质量)。

$$\therefore c_x = K \times A_x$$

通过浓度-吸光度的测定，求得校正常数K值。也可从上式计算出待测样品的浓度。也可从浓度-吸光度曲线上直接查得待测样品的浓度。

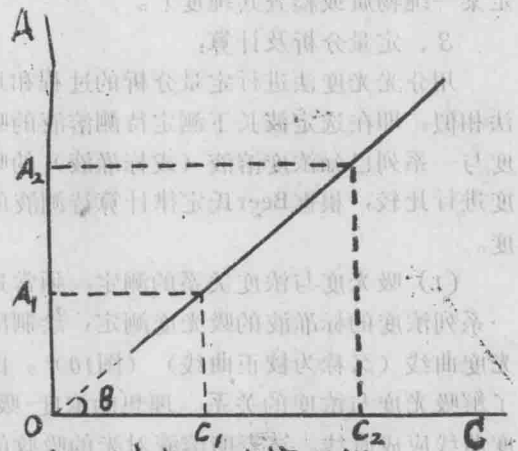


图12 浓度-吸光度曲线

浓度-吸光度曲线的斜率 ($\tan \theta$) 的物理意义是指吸光系数或克分子吸光系数 (光程 $b = 1 \text{ cm}$ 时), $\epsilon = \frac{A}{bc} = \frac{A}{c} = \tan \theta$; 因此, $\frac{I}{K} = \epsilon$, 所以根据已知吸光系数, 也可

计算待测样品浓度 ($c = \frac{A}{\epsilon b}$)

由于 $A = \lg \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$; $\frac{P_0}{P}$ 表示光线透过比色池, 辐射能吸收的比例, 称为透光度 (或透射比), 以 T 表示, 即 $T = \frac{P}{P_0}$ 。

因此, $A = \lg \frac{P_0}{P} = \lg \frac{I}{T} = -\lg T = \epsilon bc$

此式表明透光度与溶液浓度关系是一负对数关系, 如以直角坐标作图, 为一双曲线的一臂 (图13), 但如用对数坐标作图, 则为一直线, 二者均可用于查知或计算结果。又一般仪器刻度尺常以百分数表示透光度, 称为百分透光度, 并以 $T\%$ 表示, 则上式可改为:

$$A = \lg \frac{100}{T} = 2 - \lg T$$

此式表示刻度尺上吸光度读数与百分透光度的关系式, 可用以对二者进行互换计算。

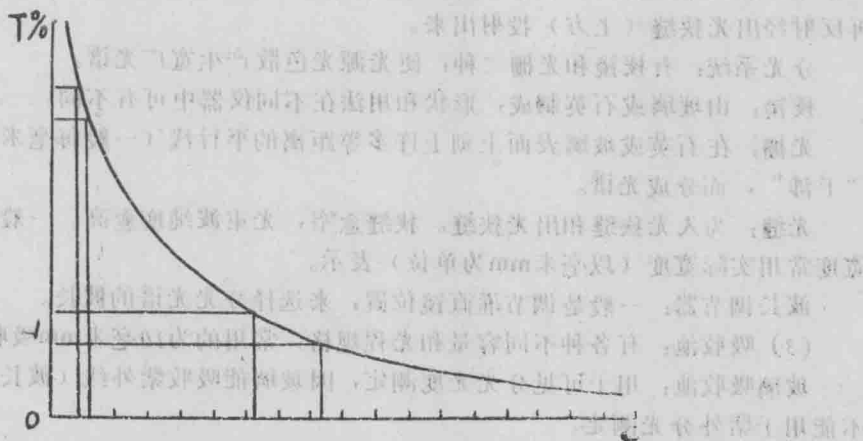


图13 浓度-透光度曲线

(三) 分光光度计的结构

分光光度计一般可根据波长范围分为两类:

紫外-可见光光度计: 如国产751G型。

可见分光光度计: 如国产721型。根据光学系统结构不同又分为单光束和双光束二类;

根据操作和记录方式可分为手动式和自动记录二类;