

# 生物化学实验指导

《生物化学》编审小组编

人民卫生出版社

**生物化学实验指导**

《生物化学》编审小组 编

人民卫生出版社出版  
(北京市崇文区天坛西里10号)

人民卫生出版社印刷厂印刷  
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米16开本 10印张 231千字

1987年12月第1版 1987年12月第1版第1次印刷

印数：00,001—13,900

ISBN 7-117-00276-2/R·277 定价：1.60元

统一书号：14048·5547

〔科技新书目156—74〕

## 编写说明

卫生部于1981年10月在武汉召开了全国高等医学院校专业教材编审委员会会议，生物化学编审小组决定在重新修订《生物化学》的同时，编写一本《生物化学实验指导》，主要供医学专业使用。于是，编审小组推选郭成才、朱寿民及陈培勋三人负责从国内外实验教材中遴选实验。1982年5月编审小组在北京研讨了所选实验内容，作出编写的分工。1983年3月在杭州，对初稿进行审阅，并按书稿内容重复了若干个实验，提出了修改意见。于1983年5月在成都的教材定稿会上进行了审定。本实验指导的编写虽然经过这样的准备过程，但在使用中不免会发现错误及不当之处，望同道及时指正，使其更臻完善。

本实验指导是按照武汉会议的精神，根据医学院校的培养目标以及国内实际情况选择的实验内容。国内仪器、试剂日趋齐备，但各个医学院校的设备颇为不一，生物化学实验课的水平，一般是不够理想的。为了提高课程质量，必须作到既要能适合多数院校的要求，又要使实验质量有所提高，同时设备差的还应争取添置，使设备水平向更高要求发展。因此，本实验指导的内容包括：重要的生物化学实验方法介绍、实验内容及附录三部分。为使学生对近代生物化学方法有所了解，故选出几种常用的加以较详尽介绍。实验内容是本书的主要部分，其中大多为与理论有关的实验，也有为数较少的临床生物化学检验；为让使用者有所选择，故列出的实验略为多些。附录部分只将常规仪器的规格及其使用以及普通共用试剂的配制，作了一些描述，供使用者参考。

本实验指导的编写，除编审小组之外，小组成员所在单位的生物化学工作者，甚至个别其它单位，亦作出了一定的贡献。小组成员中朱寿民和陈培勋出力尤多；郭成才及童坦君(小组秘书)始终参加筹划，费心不少；编审小组成员以外邵靖宇、刘子贻和姚淑德(浙江医科大学)、沈芳兰、耿芳宗和尹福生(青岛医学院)、高治源(华西医科大学)、李茂深(上海医科大学)和皇甫梅生(温州医学院)均尽了一番努力。为此，本实验指导可算是群策群力的结果。

本实验指导的编写，得到北京医科大学、华西医科大学和浙江医科大学的大力支持，三校生物化学教研室多数同志不辞辛苦，创造良好条件，使各次小组会议得以顺利召开；北京医科大学生物化学教研室许多同志帮助审读、核对、抄写、校对及接送稿件，在此一并致谢。

张昌颖

# 目 录

I. 重要的生物化学实验方法	1
一、吸光分析法	1
二、层析法	11
三、电泳法	17
四、离心分离法	22
II. 实验内容	28
实验一、氨基酸的解离状况与 pH	28
实验二、蛋白质的沉淀反应	29
实验三、蛋白质的盐析与透析	34
实验四、酪蛋白等电点的测定	35
实验五、血清 $\gamma$ 球蛋白的分离与纯化	36
实验六、聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质	39
实验七、微量凯氏定氮法与回收试验	48
实验八、双缩脲法测定蛋白质	51
实验九、酚试剂法测定蛋白质	53
实验十、紫外分光光度法测定蛋白质	54
实验十一、微量血红蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	55
实验十二、组织核酸的分离及定量	58
实验十三、 $^3\text{H}$ 胸苷参入核酸的实验	61
实验十四、蔗糖酶与淀粉酶的专一性	64
实验十五、影响唾液淀粉酶活性的因素	66
实验十六、丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	72
实验十七、硷性磷酸酶 $K_m$ 值的测定	73
实验十八、Folin-吴宪法测定血糖	79
实验十九、Nelson-Somogyi 法测定血糖	81
实验二十、邻甲苯胺法测定血糖	82
实验二十一、糖的酵解作用	84
实验二十二、糖酵解中间产物的鉴定	85
实验二十三、胰岛素及肾上腺素对血糖浓度的影响	88
实验二十四、饱食、饥饿及激素对肝糖原含量的影响	89
实验二十五、剧烈运动对尿中乳酸含量的影响	91
实验二十六、血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	92
实验二十七、 $^{32}\text{P}$ 参入磷脂的作用	94
实验二十八、薄层层析法分离血清脂类	96
实验二十九、氨基移换作用	97

实验三十、精氨酸酶的作用·····	101
实验三十一、三羧酸循环中间产物对酵母耗氧量的影响·····	103
实验三十二、氰化物对细胞色素体系的抑制作用·····	108
实验三十三、胡萝卜素的柱层析分离法·····	109
实验三十四、维生素C的提取及定量·····	111
实验三十五、尿中硫胺素及核黄素的荧光测定·····	112
实验三十六、血浆胆固醇总量的测定(硫铁磷法)·····	115
实验三十七、血清甘油三酯的测定·····	117
实验三十八、血清乳酸脱氢酶同工酶的电泳分离·····	119
实验三十九、血清谷丙转氨酶活性的测定·····	121
实验四十、血中非蛋白氮的测定·····	123
实验四十一、尿中尿素的测定·····	125
实验四十二、血浆二氧化碳结合力的测定·····	127
实验四十三、血钙的测定·····	133
实验四十四、血清无机磷的测定·····	135
实验四十五、尿中异常成分的测定·····	137
实验四十六、尿淀粉酶活性的测定(Winslow法)·····	139
实验四十七、尿中17酮类固醇及17羟类固醇的测定·····	141
<b>III、附录</b> ·····	147
附录一、计量仪器的规格及其使用·····	147
附录二、计量仪器的校正·····	148
附录三、清洁液的配制及正确使用·····	149
附录四、化学试剂的规格与保管·····	150
附录五、常用缓冲液的配制·····	151
附录六、血、尿样本的制备·····	154

# I. 重要的生物化学实验方法

## 一、吸光分析法

吸光分析是生物化学实验室中最常用的实验方法。许多物质的定量测定常采用吸光分析法。

### (一) 原理

光线的本质是电磁波的一种，有不同的波长。肉眼可见的彩色光称为可见光，波长范围在 400~750nm，小于 400nm 的光线称为紫外线，大于 750nm 的光线称为红外线，如下表所示。

光波波长与区带表

光 波		波 长 (λ)	
紫 外 线	真 空	$-10^{-6}(\text{cm})$	10nm
	紫 外	$-10^{-5}$	100nm
		$-2 \times 10^{-5}$	200nm
		$-4 \times 10^{-5}$	400nm
可 见 光 线	近 紫 外		
	紫		420nm
	蓝		490nm
	绿		530nm
	黄		590nm
	橙		650nm
红 外 线	红		750nm
	近红外	$-10^{-4}$	1μm
	中红外	$-10^{-3}$	10μm
	远红外	$-10^{-2}$	100μm

当光线通过透明溶液介质时，其辐射的波长有一部分被吸收，一部分透过，因此光线射出溶液之后，部分光波减少。例如，可见光通过有色溶液后，或红外线通过多种气体后，部分光波被吸收。这种光波的吸收和透过可用于某些物质的定性定量分析。

吸光分析所依据的定律是 Lambert 和 Beer 定律。

1. Lambert 定律 一束单色光通过透明溶液时，一部分波长的光波被吸收，被吸收光波的量与溶液厚度有一定比例关系 (图 1)。

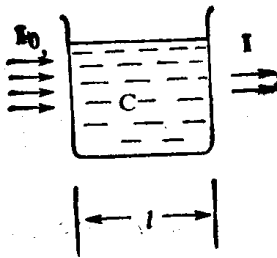


图 1 光线通过溶液示意图

即：

$$\frac{dI}{I} = -a dl$$

将上式积分，得到：

$$\int_0^l \frac{dI}{I} = - \int_0^l a dl$$

$$I = I_0 e^{-al} \dots \dots \dots (1)$$

- 式中  $I_0$  为入射光强度
- $I$  为通过溶液后的光强度
- $l$  为溶液的径长
- $e$  为自然对数的底 2.718
- $a$  为溶液的吸光率

(1) 式可改写为：

$$\ln \frac{I_0}{I} = al \dots \dots \dots (2)$$

将(2)式换算成常用对数式，即：

$$\ln \frac{I_0}{I} : 0.4343 = 0.4343 \cdot al$$

$$\log \frac{I_0}{I} = 0.4343 \cdot al$$

令  $k = 0.4343 \cdot a$

$$\text{则 } \log \frac{I_0}{I} = kl \dots \dots \dots (3)$$

此处以  $k$  为吸光率。

2. Beer 定律 以溶液中溶质浓度变化代替溶液厚度的改变，光波的吸收与溶质浓度的改变有类同的关系。即一束单色光通过溶液时，光波被溶液吸收一部分，吸收多少与溶液中溶质浓度有一定比例关系。依据 Lambert 定律中同样的推导，可得出下式：

$$\log \frac{I_0}{I} = kc \dots \dots \dots (4)$$

式中  $c$  为溶液中溶质的浓度。

Lambert 定律和 Beer 定律合并, 即(3)和(4)式合并为:

$$\log \frac{I_0}{I} = kcl \dots\dots\dots(5)$$

令  $A = \log \frac{I_0}{I}$        $T = \frac{I}{I_0}$

则  $A = kcl \dots\dots\dots(6)$

$$A = -\log T$$

式中A为吸光度, T为透光度

(6) 式为 Lambert-Beer 定律的物理表示式, 其含义为: 一束单色光通过溶液后, 光波被吸收一部分, 吸收多少与溶液中溶质的浓度和溶液厚度成正比。此式为吸光分析法的基本计算式。

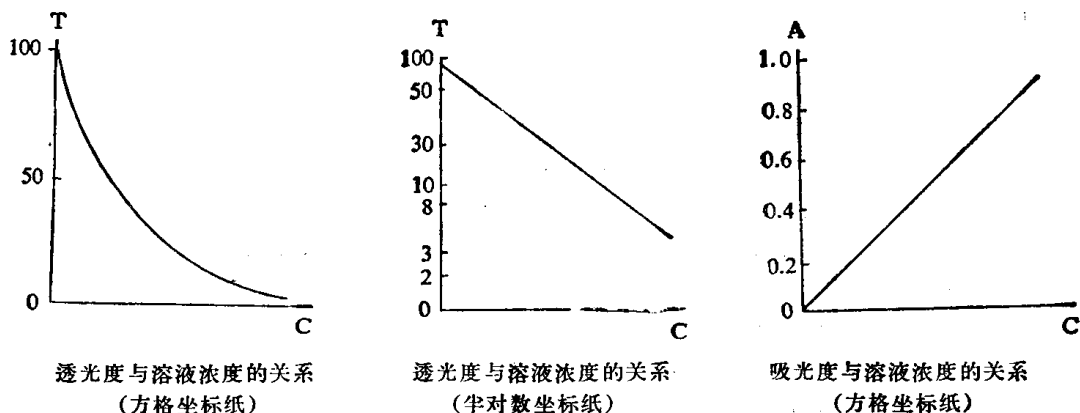


图 2 吸光度(A)、透光度(T)和溶液浓度的关系

图 2 表明, 在溶液径长一定的情况下, 吸光度 (A)、透光度 (T) 和溶液中溶质浓度 (C) 之间的关系。

目前科研和临床实践中常用的吸光分析有光电比色法和吸光光度法等。

### (二) 光电比色法

利用溶液的颜色深浅来测定溶液中物质含量的方法, 称为比色法。用光电池代替眼睛进行比色分析, 又称为光电比色法。光电比色法测定的条件是在可见光范围, 并要求测定物为有色物, 或经过一定的化学处理使无色的测定物变成有色化合物 (如血清非蛋白氮), 或使其溶液变成有色液 (如血葡萄糖), 再进行比色。

1. 仪器介绍 光电比色计种类较多, 一般由光源、滤光片、比色杯、光电池和检流计等组成。现以国产 581-G 型光电比色计为例介绍仪器组成 (图 3)。

由稳压器供给直流电, 6.3V 白灼灯泡作为光源, 光线经透镜通过滤光片后, 得到一较窄波长的光线, 再进入一定厚度装有溶液的比色杯, 光波被部分吸收, 未被吸收的光波透过溶液, 由光电池接受, 产生光电流, 由检流计指示。检流计上刻度读数皆直接使用透光度或吸光度表示, 以便使用和计算。

(1) 光源: 均为直流电电源, 6.3V。

(2) 滤光片: 测定的溶液不同, 对光线有不同的吸收作用。一种溶质对某一种波长的光线具有最大吸收能力, 利用这种特性来测定该物质的浓度最为灵敏。如果溶液中还有



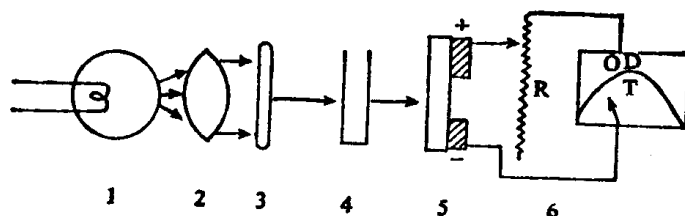


图 3 光电比色计结构模式图

1.光源 2.透镜 3.滤光片 4.比色皿 5.光电池 6.检流计  
T: 透光度 OD: 光密度

其它吸收光波的物质存在时, 可选用一定波长滤光片, 让这种物质对此波长吸收能力最小, 从而可减少它的干扰作用。因此选用适当的滤光片, 对某一物质的测定是首要的条件。滤光片选择的一般原则为: 经此滤光片后的光线, 通过测定溶液时, 呈最大吸收。故滤光片的颜色往往是此溶液的补色。下表所列波长可供选择滤光片时参考。

滤光片选择参考表

$\lambda$ (nm)	滤光片颜色	测定溶液的颜色
400~435	青紫	黄绿
435~480	蓝	黄
480~490	蓝绿	橘红
490~500	绿蓝	红
500~560	绿	紫
560~580	绿黄	蓝紫
580~595	黄	蓝
595~610	橘红	蓝绿
610~750	红	绿蓝

(3) 比色杯: 杯的进光面和出光面皆由光学玻璃组成, 以尽量减少光的散射。

(4) 光电池: 为受光器的一种, 多为硒光电池, 光线照射在含硒光电池表面后, 可产生光电流, 光电流的大小与照射光的强度成正比。光电池对光线的敏感度有一定范围(图 4)。

(5) 检流计: 为悬丝式检流计, 较为灵敏, 应避免振动。

1. 使用方法 将光电比色计置于背光而平稳之台面上, 按规定电压接上电源, 扭动开关使其指向“1”, 预热 10 分钟, 旋转零点调节器, 使读数盘上亮圈中的黑线位于透光度“0”或吸光度“ $\infty$ ”处。然后选择好适当之滤光片插入滤光片插座中。

取清洁比色杯(只拿毛玻璃面)分别盛装空白或对照及测定液约  $\frac{3}{4}$  容积, 杯的外面如有水珠, 必须用软绸布或擦镜纸擦干, 分别放入比色槽中, 防止污染或损坏比色计。

将空白或对照杯置于光路上, 再将开关拨向“2”的位置, 依次利用粗调节及细调节改变电阻, 使读数盘上亮圈中的黑线恰好位于透光度“100”或吸光度“0”处。移动比色槽使测定杯置于光路位置, 读数盘上亮圈发生移动, 待光圈移动停止后, 立即读记亮

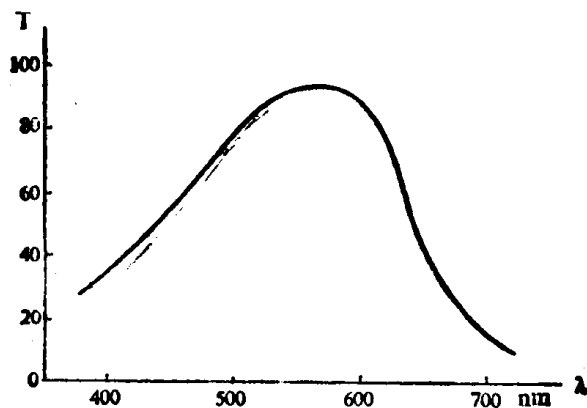


图 4 硒光电池对光的敏感度特性

T: 透光度

$\lambda$ : 波长

圈黑线所指的吸光度数。再重复一次，以求准确。

读数结束后，换置另一测定液杯于光路上，按上述方法继续读取吸光度。如需取出比色杯时，应先将开关拨回到“1”后再进行。

使用结束后，将开关拨回到“0”，关掉电源，取出比色杯要及时清洗，放置晾干。切忌用毛刷刷洗，以免损坏玻璃的透光性。

### (三) 吸光光度法

采用适当的光源、棱镜和适当的光源接受器，可使溶质浓度的测定范围不仅仅局限于可见光，尚可扩大到紫外光区和红外光区。经单色器（棱镜）得到的光源虽然不是纯的单色光，但波长范围更狭窄，更符合 Lambert-Beer 定律，使灵敏度大为提高。

以不同波长的单色光作为入射光，测定某一溶液的吸光度，然后以入射光的不同波长为横轴，各相应的吸光度为纵轴作图，可得到溶液的吸收光谱曲线。不同的物质，分子结构不同，其吸收光谱曲线也有其特殊形状，如图 5 所示。许多动、植物组织中所含组分用化学方法不易分离，此组分可借助于吸光光度法测定出不同的吸收光谱曲线，用以确定几种组分的性质和含量。此种优点是光电比色法不可比拟的，由于分光光度计波长范围较大（200~1000nm），既可用于可见光，也可用于紫外光或红外光的吸光测定。又由于吸光光度法可利用物质特有的吸收光谱曲线进行定性定量，因此，测定物质既可为有色物，也可无色物，从而使测定手续简化，有时标本还可回收，减少消耗。

下面介绍几种常用的分光光度计：

1. 72 型分光光度计 由稳压电源、单色光器和检流计三大部件组成，结构如图 6。

由 10V 或 5.5V 的白炽钨丝灯作为光源（稳压器供给直流电），经单色器中透镜聚光到棱镜，色散成不同波长的单色光，过狭缝，作为入射光通过盛有比色液的比色杯。未被吸收的光线透出，进入光电池产生光电流，使检流计指针偏转，可直接读出吸光度，以此算出溶液中测定物的含量。

此仪器波长范围为 420~700nm，与 581-G 型光电比色计相同，也以光电池作为受光器，但入射光经棱镜色散后，其波长的范围比滤光片波长的范围更窄，故灵敏度比 581-G 型光电比色计高。

使用时先将单色光器分别与电磁稳压器及检流计连接好，然后将电磁稳压器及检流

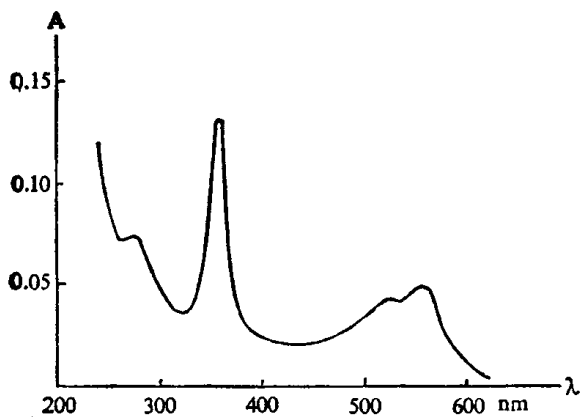


图5 维生素B<sub>12</sub>水溶液的吸收光谱

A: 吸光度  
λ: 波长

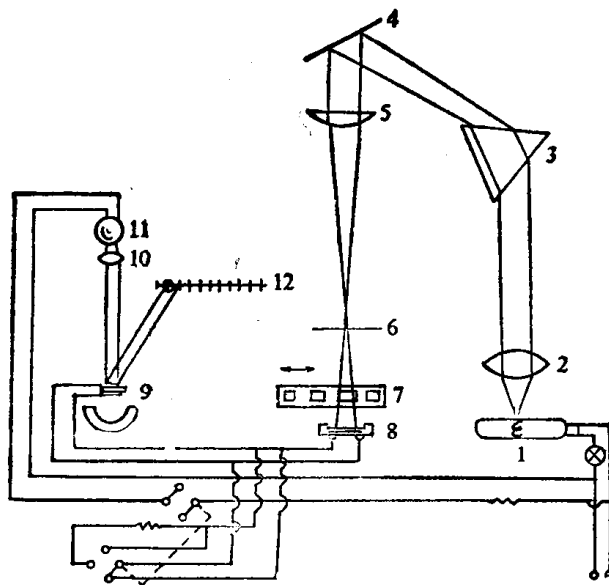


图6 72型分光光度计结构示意图

1.光源 2.透镜 3.光学棱镜 4.光学平面镜  
5.透镜 6.狭缝 7.比色杯 8.硒光电池 9.检流计  
10.透镜 11.检流计光源 12.读数盘

计之电源分别与电压适合之交流电相接，依次打开三大部件的电源开关，使全部仪器通电，预热 10 分钟。

将空白或对照液及测定液分别装入比色杯内，并将比色杯外壁擦干，置于比色盒中。通常将空白液置于近端第一位置，相当于光路上位置，测定液置于远端两个位置。将比色盒再放入比色箱中，检查是否放稳妥，随即盖好箱盖。

将单色光器波长盘调至所需之波长，再调节检流计上之零点调节器，使读数盘上指针所指的吸光度为“∞”或透光度为“0”。

打开单色光器上之光通路开关，使光线射入，然后用光量调节器改变狭缝之宽度，使检流计上的指针移动到吸光度“0”或透光度“100%”。待检流计指针稳定时，逐步拉出比色槽滑杆，使测定液依次进入光路，同时读取检流计上的吸光度。

读数完毕，立即关闭光通路开关，再取出比色盒，将比色杯冲洗干净。

2. 721 型分光光度计 光谱范围在 360~800nm，所有部件均在一部主机里，操作方便，灵敏度较高（图 7）。

以 12V 25W 白炽钨丝灯泡为光源，经透镜聚光后射入单色光器内，经棱镜色散，反射到准直镜，穿狭缝得到波长范围更窄的光波作为入射光，进入比色杯，透出的光波被受光器光电管接受，产生光电流，再经放大，在微安表上反映出电流大小，可直接读出吸光度。

此仪器比 72 型分光光度计更为灵敏，其最大特点为受光器不是光电池，而是光电管。光电管的阴极表面（光电面），有一层对光灵敏的物质，当光照射到光电管后，会发射出光电子，此光电子向阳极运动，形成光电流。光电管灵敏度虽比光电池小，但经光电管出来的光电流可以放大，而经光电池出来的光电流不易放大，并且光电池易疲乏，故较高级的分光光度计均采用光电管作为出射光线的受光器。

使用时接通电源，打开比色箱盖，使检流计指针处于“0”位，预热 10 分钟，用波

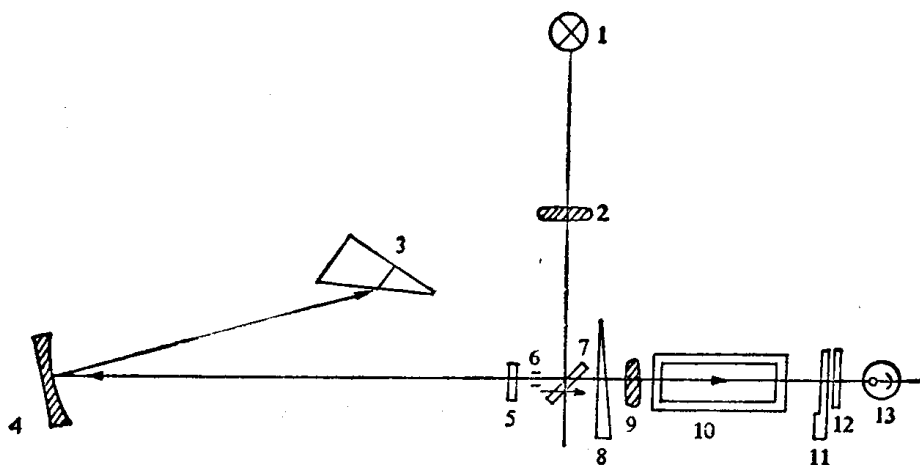


图 7 721 型分光光度计结构示意图

1.光源灯 2.透镜聚光 3.色散棱镜 4.准直镜 5.保护玻璃 6.狭缝 7.反射镜 8.光栏 9.聚光透镜 10.比色杯 11、12.光门 13.光电管

长调节器选用所需的波长。

将空白液或对照液及测定液分别装入比色杯内，擦干后置于比色盒中，再放入比色箱内，放妥盖好。此时空白液应在光路上，光电管感光。旋转光量调节器，使检流计指针正确地指在透光度“100%”或吸光度“0”上。轻轻拉动比色槽滑杆，使其他比色杯依次处于光路上，同时读取检流计上吸光度。

使用时可根据不同波长、光量分别选用放大器灵敏度档，使空白液处于光路上时，可以利用光量调节器将吸光度调整到“0”。其灵敏度范围是第一档×1倍，第二档×10倍，第三档×20倍。

√3. 751 型分光光度计 光谱范围 200~1000nm，可测定各种物质在紫外区、可见光区及红外区的吸收光谱。在波长 300~1000nm 范围内用白炽钨丝灯作光源，在 200~320nm 范围内用氢弧灯作光源。光学系统中棱镜及透镜由石英制成，对可见光及紫外光很少吸收，适于紫外光通过，光量可通过狭缝宽度从 0~2mm 连续调节。光电管暗盒内装有蓝敏光电管，适用于波长 200~625nm；又有红敏光电管，适用于波长 625~1000nm (图 8)。

使用时，先接通电源，预热 10 分钟。选择相当于波长的光源、比色杯及光电管。灵敏度旋钮则从左面“停止”位置顺时针方向旋转 3~5 圈。

将选择开关扭到“校正”处，波长旋扭转到所需波长，调节暗电流使检流计指针位于“0”。

将空白或对照液及测定液分别装入比色杯，置于比色盒中，放入比色箱。先使空白液对准光路，扳动选择开关到“×1”，拉开闸门，使单色光进入光电管。调节狭缝，使检流计指针回到“0”位，必要时用灵敏度旋钮调节。

轻轻拉动比色槽滑杆，使其他比色杯依次位于光路上。每次皆旋转读数电位器，使检流计指针回到“0”位，同时从电位器上读取吸光度或透光度。随即关掉闸门，以保护光电管。

透光度小于 10% 时，可选用“×0.1”的选择开关，以便获得较精确的数值。但读

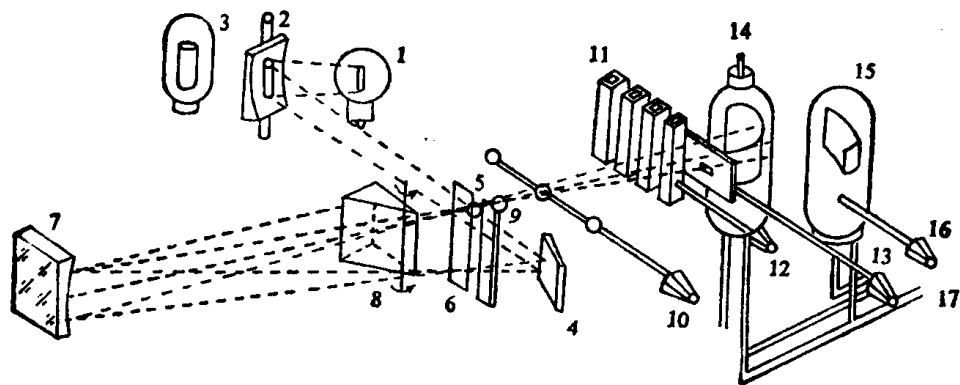


图 8 751 型分光光度计结构示意图

- 光源：1. 钨丝灯 2. 凹面镜 3. 氢弧灯  
 单色器：4. 平面镜 5. 石英窗 6. 弯曲狭缝 7. 准直镜  
 8. 石英棱镜 9. 石英透镜  
 测试室：10. 滤光片架 11. 试样槽 12. 试样槽拉杆  
 接受部分：13. 暗电流控制闸门 14. 蓝敏光电管 15. 红敏光电管  
 16. 光电管滑动架 17. 接放大器

出的透光度要除以 10，相应的吸光度要加上 1。

4. 752 型紫外光栅分光光度计 光谱范围 220~800nm。光源由钨卤素灯 (W) 和氢灯 (H) 组成，在旋转单色光器波长手轮时，可自动切换光源，不必再分别拉用蓝敏或红敏光电管。单色光器利用平面光栅 (1200 线/mm) 作为色散原件以代替棱镜，克服了非线性色散。检流计的微弱光电流通过放大器放大后用数字显示器表示吸光度或透光度，乃至直接读出物质浓度。使用比较方便，整个仪器体积也小 (图 9)。

使用时，接通电源预热 10 分钟后，将选择开关置于“T”挡，打开样品室盖，以空白液置于光路上，选择所需波长，再将灵敏度转盘由低到高逐步增加，每次均调节“0”旋钮，最终使数字显示为 0；再将样品室盖上，调节“100”旋钮，使数字显示透光度为 100。将待测样品移进光路，即可从数字表上读出样品液的透光度。如将选择开关置于

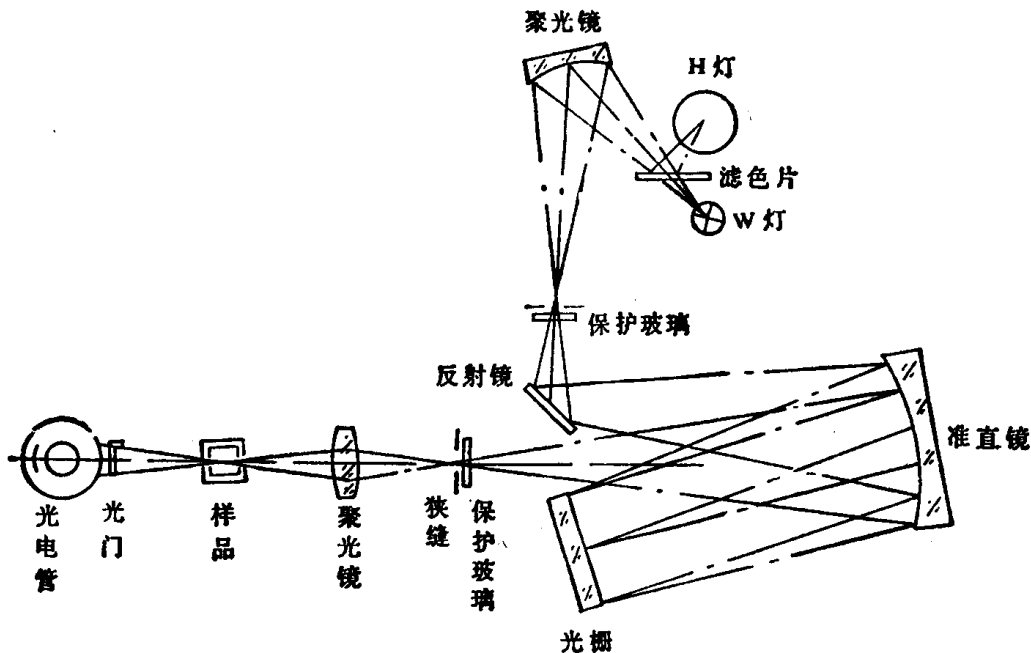


图 9 752 型紫外光栅分光光度计工作原理示意图

“A”档（空白液时调节消光“0”旋钮为吸光度0）即可从数字表上读出吸光度A值。

如要测定样品浓度，可将标准管移入光路，调节浓度旋钮“C”使数字表上显示出相应的标准值；再将待测样品移入光路，即可从数字表上读出样品的浓度值。

#### （四）计算

1. 利用标准管计算测定物含量 实际测定过程中，用一已知浓度的测定物按测定管同样处理显色，读取吸光度，再根据(6)式计算，即

$$A_1 = k_1 c_1 l_1$$

$$A_2 = k_2 c_2 l_2$$

式中  $A_1$ 、 $A_2$  分别为已知浓度标准管和未知浓度测定管吸光度。

$c_1$ 、 $c_2$  分别为已知浓度标准管和未知浓度测定管中测定物浓度。

因盛标准液和测定液的比色杯径长相同 ( $l_1 = l_2$ )，故上二式可写成：

$$\frac{A_1}{k_1 c_1} = \frac{A_2}{k_2 c_2} \dots \dots \dots (7)$$

因标准液和测定液中溶质为同一物，k值相同，即：

$$k_1 = k_2$$

(7) 式可换算成下式：

$$c_2 = \frac{A_2}{A_1} c_1 \dots \dots \dots (8)$$

因测定液和标准液在处理过程中体积相同，故(8)式可写成：

$$m_2 = \frac{A_2}{A_1} \cdot m_1 \dots \dots \dots (9)$$

式中  $m_1$ 、 $m_2$  分别表示标准液和测定液中测定物的含量。(9) 式为实验操作中常用计算式。

2. 利用标准曲线进行换算 先配制一系列已知不同浓度的测定物溶液，按测定管同样方法处理显色，分别读取各管吸光度，以各管吸光度为纵轴，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，就无需再作标准管，以测定管吸光度从标准曲线上可求得测定物的浓度。

一般认为，标准曲线范围在测定物浓度的一半到二倍之间，并使吸光度在 0.05~1.0 范围内为宜。所作标准曲线仅供短期使用。标准曲线制作与测定管测定应在同一台仪器上进行，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. 利用克分子吸光率  $\epsilon$  求取测定物浓度 (6)式中 k 为吸光率，当浓度 c 为 1mol/L，溶液厚度 l 为 1cm 时，则称为克分子吸光率，以  $\epsilon$  表示，此时  $\epsilon$  与 A 相等。实际应用中测定物常以 g/ml 作浓度单位。

已知  $\epsilon$  情况下，读取测定液径长为 1cm 时的吸光度，根据下式可求出测定液的物质浓度。

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

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 时的克分子吸光率，再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。

二种以上待测物的混合液未被单独分离的情况下，也可利用  $\epsilon$  不同，进行定量测定。例如，有 a 和 b 两种物质混合的溶液，需要分别测定其含量。

设 a 和 b 在波长  $\lambda_1$  时，克分子吸光率分别为  $\epsilon_{a1}$  和  $\epsilon_{b1}$ ，在波长  $\lambda_2$  时，克分子吸光率分别为  $\epsilon_{a2}$  和  $\epsilon_{b2}$ ，a 和 b 混合的溶液在  $\lambda_1$  时吸光度为  $A_1$ ，在  $\lambda_2$  时的吸光度为  $A_2$  (图 10)。各自浓度分别为  $c_a$  和  $c_b$ ，根据(6)式可列出下式：

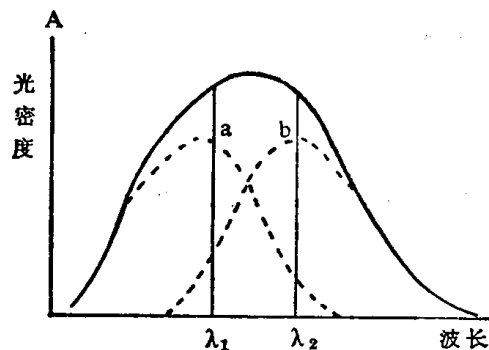


图 10 a、b 二成分混合溶液的吸收光谱

附表：国际纯化学与应用化学联合会(IUPAC)对统一吸收光度学名词的意见

推荐的名词	符号	定义	曾用的名词和符号
吸光度 (absorbance)	A	$-\log T$	光密度 (Optical density, O. D.) 消光值 (extinction) 吸光值 (absorbancy)
吸光率 (absorptivity)	a	$= A/bc$ (浓度c以克/升为单位)	吸光指数 (absorbancy index, absorbing index)
径长 (path length)	b	杯内经长或样本长度 (cm)	l 或 d
克分子吸光率 (molar absorptivity)	$\epsilon$	$= A/bc$ (浓度c以克分子/升为单 位)	克分子吸光指数 (molar absorbancy index) 克分子消光系数 (molar extinction coefficient) 克分子吸光系数 (molar absorption coefficient)
透光度 (transmittance)	T	$I/I_0$	transmittancy
波长单位	nm	$10^{-9}m$	$m\mu$ (millimicron)
最大吸收波长	$\lambda_{max}$	最大吸收波长	—

$$A_1 = \varepsilon_{a1}c_a + \varepsilon_{b1}c_b \dots \dots \dots (10)$$

$$A_2 = \varepsilon_{a2}c_a + \varepsilon_{b2}c_b \dots \dots \dots (11)$$

根据(10)和(11)式组成的联立方程式，求解得 a 和 b 两物的浓度 ( $c_a$  和  $c_b$ )：

$$c_a = \frac{\varepsilon_{b2}A_1 - \varepsilon_{b1}A_2}{\varepsilon_{a1}\varepsilon_{b2} - \varepsilon_{a2}\varepsilon_{b1}}$$

$$c_b = \frac{\varepsilon_{a1}A_2 - \varepsilon_{a2}A_1}{\varepsilon_{a1}\varepsilon_{b2} - \varepsilon_{a2}\varepsilon_{b1}}$$

如有三种以上成分的混合液，也可通过三种不同波长情况下的吸光度，以各自特有的  $\varepsilon$  值，依据三元一次方程，同样可求出未分离的三种混合物的各自浓度。

## 二、层析法

层析法是利用混合物中各组份物理化学性质的差别（如吸附力、溶解度、分子形状、分子大小以及分子极性等），使各组份以不同的程度分布在两个相中。其中固定不动的称固定相，流过此固定相的液体或气体称流动相，从而使各组份以不同的速度随流动相向前移动而达到分离的目的。

本世纪初发现植物中各种颜色的色素可以在吸附柱上流动后排列成色谱，从而可以分离提取植物色素，故称为色层分离法。后来无色物质也可利用吸附柱分离，就改称为层析法。1944 年开始用滤纸作为固定相而出现了纸层析后，层析法不断发展，成为生物化学中最常用的方法之一。根据作用性质及操作方式，层析法可分成多种类型。现将常用的层析法分别作简单的介绍。

### (一) 分配层析

分配层析是利用混合物在二种或二种以上的不同溶剂中的分配系数不同而使物质分离的方法，相当于一种连续性的溶剂抽提方法。如用带水的材料（载体）作为一种液相（固定相），加入与水不相混合或仅部分混合的溶剂为另一种液相（流动相），则混合物各组份在两相中发生不同的分配现象而逐渐分开，形成层析谱。

载体在分配层析中只起负载固定相的作用，它们是一些吸附力小、反应性弱的惰性物质如淀粉、纤维素粉、滤纸等。固定相除水外，也可用稀硫酸、甲醇、仲酰胺等强极性溶液。流动相则采用比固定相极性小或非极性的有机溶剂。

纸层析是最广泛应用的一种分配层析，以滤纸为载体，滤纸上吸附着水（约含 20~22%），是经常使用的固定相。某些有机溶剂如醇、酚等为常用的流动相。把欲分离的物质加在纸的一端，使流动相溶剂经此移动，这样就在两相间发生分配现象。由于样品中各物质的分配系数不同，就逐渐在纸上分别集中于不同的部位。在固定相中分配趋势较大的成分，随流动相移动的速度较慢；反之，在流动相中分配趋势较大的成分，移动速度就较快。物质在纸上的移动速率可以用比移值  $R_f$  表示。

$$R_f = \frac{\text{色斑中心至原点中心的距离}}{\text{溶剂前缘至原点中心的距离}}$$

物质在一定溶剂中的分配系数是一定的，移动速率 ( $R_f$  值) 也恒定，因此可以根据  $R_f$  值来鉴定被分离的物质。



纸层析法按操作方法分成两类，即垂直型和水平型。垂直型是将滤纸条悬起，使流动相向上或向下扩散。水平型是将圆型滤纸置于水平位置，溶剂由中心向四周扩散。

垂直型使用较广，按分离物质的多寡，将滤纸截成长条，在某一端离边缘2~4cm处点样，待干后，将点样端边缘与溶液接触，在密盖的玻璃缸内展开（图11）。

上述方法只用一种溶剂系统进行一次展开，称为单向层析。如果样品成分较多，而且彼此的  $R_f$  值相近，单向层析分离效果不佳，此时可采用双向层析法，即在长方形或方型滤纸的一角点样，卷成圆筒形，先用第一种溶剂系统展开；展开完毕吹干后，转90°，再放于另一种溶剂系统中，向另一方向进行第二次展开，如此可使各成分的分较为清晰（图12）。

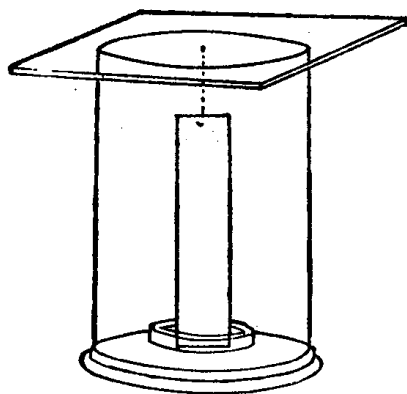


图11 垂直型纸层析

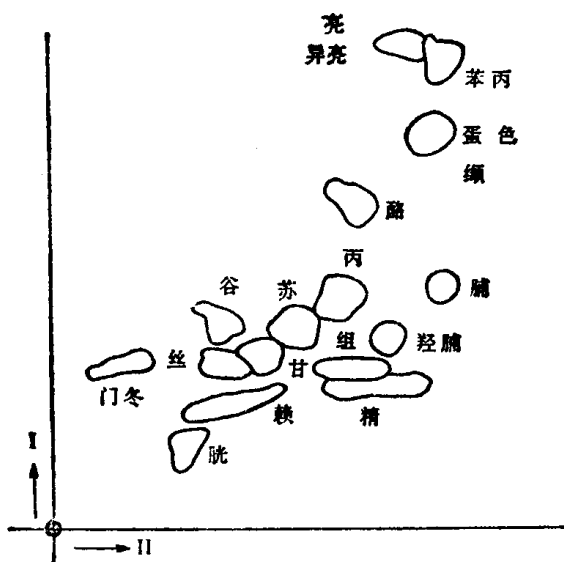


图12 氨基酸双向纸层析色谱

I、正丁醇:冰醋酸:水=4:1:5(v/v)

II、酚:水=8:2(w/w)

## (二) 吸附层析

某种物质如氧化铝、硅胶等具有吸附其它一些物质的性质，而且对各种被吸附物质的吸附能力不同，利用这种差异可将混合物分离。吸附力的强弱，除与吸附剂本身的性质有关外，也与被吸附物质有关。根据操作方式的不同，吸附层析可分为柱层析与薄层层析两种。

1. 柱层析 柱层析是用一根玻璃管柱，下端铺垫棉花或玻璃棉，管内加吸附剂粉末，用一种溶剂润湿后，即成为吸附柱。然后在柱顶部加入要分离的样品溶液。假如样品内含两种成分A与B，则二者被吸附在柱上端，形成色圈。样品溶液全部流入吸附柱中之后，接着就加入合适的溶剂洗脱，A与B也就随着溶剂以不同的移动速率向下流动，最后可使A与B分离（图13）。

在洗脱过程中，管内连续发生溶解、吸附、再溶解、再吸附的现象。例如，被吸附的A粒子被溶解（解吸作用）而随溶剂下移，但遇到新的吸附剂，又将A吸附，随后，新溶剂又使A溶解下移。按照同样道理，由于溶剂与吸附剂对A与B的溶解力与吸附力不完全相同，A与B移动的距离也不同，经过一定时间，如此反复地溶解与吸附，可形成两个环带，每一环带是一种纯物质。如A与B有颜色，就可看到色层；如样品无色，