

生化技术与实验

湖南医学院生化教研室

一九八七年六月

责任编辑与校对：周星光

生化技术与实验

出版：湖南医学院生化教研室编

（内部发行）

印刷：湖南医学院印刷厂

开本：787×1093毫米1/16 印张：12.75

字数：304500 印数1——3000本

1987年8月第1版第1次印刷

印刷成本价：2.10元

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、医学和环境卫生等科学的研究都涉及生物化学的研究，生化分析技术已成为当前生物科学中常规的实验技术，并发展成为独立的技术学科。

为了适应我院“以提高为主”的培养方针，我们曾在82~86年的教学中对生化实验课作了较大幅度的改革，将原来验证课堂理论和临床生化检验为主的实验内容，改为以生化常用技术方法为训练目的内容。经过五年的教学实验证明，这种以技术方法培训为主的方式，对培养学生独立工作能力和解决问题的能力，以及培养学生严谨的科学态度和作风来说，都较改革前的实验更为有效。

根据几年来在实验教学中的经验，我们对实验理论部分进行了重新编写，对实验内容也作了部分增减。全书共分三个部分，第一部分重点介绍生化常用实验技术的基本知识和理论；第二部分共编写了二十个实验，最后附录了一些生化常用表格，以利学习中查阅。

限于我们的实验条件和水平，缺点和错误在所难免，希望批评指正。

生化教研组

1987年6月

目 录

前言

生化实验须知	1
常用生化实验技术	5
1. 分光光度法	5
2. 液相色谱法(层析技术)	21
3. 电泳技术	56
4. 离心技术	80
5. 放射性同位素技术	88
6. 放射免疫测定	97
7. 常用生化仪器	101
生化实验	115
1. 蛋白质定量与分光光度法	115
实验一 Hb 吸收光谱和定量测定	115
实验二 血清蛋白质定量	120
(一) 微量克氏定氮法	120
(二) 紫外分光法	124
(三) Folin—酚试剂法	125
2. 核酸提取与鉴定	127
实验三 酵母 RNA 提取	131
实验四 肝DNA提取	132
实验五 肝RNA提取	134
实验六 核酸成份鉴定和含量测定	135
3. 酶促反应动力学实验	138
实验七 初速度测定	141
实验八 底物和抑制剂对酶促反应速度的影响	142
实验九 温度和pH对酶促反应速度的影响	146
4. 层析技术实验	148
实验十 氨基酸纸层析与转氨反应	148
实验十一 离子交换柱层析分离混合氨基酸	151
实验十二 凝胶过滤	154
(一) Hb 与 CytC 的分离	154
(二) Met Hb 与 $K_3Fe(CN)_6$ 的分离	156
(三) 脲酶的分离纯化与活性测定	158
5. 电泳技术实验	163

实验十三	醋酸纤维薄膜电泳·····	163
	(一) 血清蛋白质和脂蛋白电泳·····	163
	(二) LDH同工酶活性测定·····	166
	(三) Hb电泳·····	167
实验十四	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质·····	169
实验十五	凝胶等电聚焦分离血清蛋白质·····	177
实验十六	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清碱性磷酸酶同工酶·····	179
6.	临床生化实验·····	183
	实验十七 血糖测定·····	183
	实验十八 血清胆固醇含量测定·····	185
	实验十九 血清谷-丙转氨酶活性测定·····	186
	实验二十 全血非蛋白氮测定·····	189
	附录·····	192

生化实验须知

实验目的

1. 学习和掌握生化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。
2. 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。

实验要求

进行科学实验不仅要求高质量(结果良好)而且要求高效率。为此应注意以下各点:

1. 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。

2. 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。

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。

实验室规则

1. 保持实验室肃静。
2. 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。
3. 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。
4. 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。

5. 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。

6. 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。

7. 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 (5ml)	1
烧杯 (250或500ml)	1	漏 斗	1
量筒 (50ml)	1	滴 管	2
酒精灯 (150ml)	1	玻 棒	1
大试管	18	试 管 夹	1
小试管	4	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。点收仪器。

2. 掌握一般玻璃仪器的洗涤法和刻度吸量管的使用。

〔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。

〔点收仪器〕 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。

〔玻璃仪器的洗涤〕

1. 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。

2. 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。

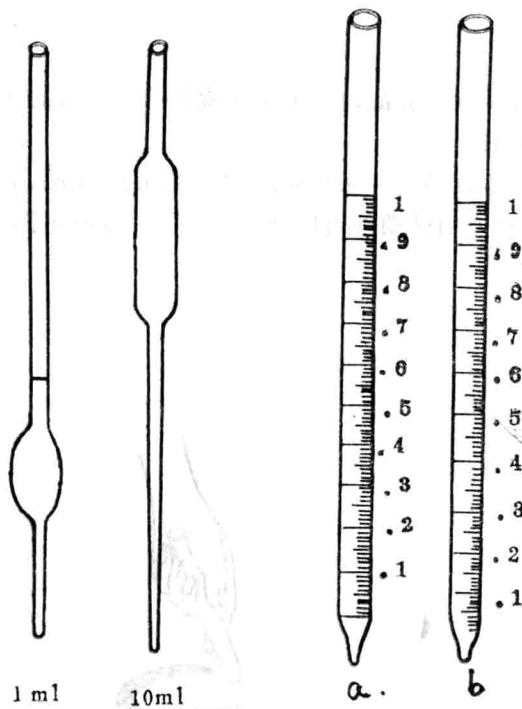
〔吸量管〕

1. 吸量管的种类 (图 1)

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。它常作为量取粘度较大的液体 (如血液等) 之用。

② 移液管或移液吸量管 移液管供准确量取 1ml、5ml、10ml、20ml、25ml、50ml 及 100ml 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。



1. 奥氏吸量管 2. 移液管 3. 刻度吸量管
(a) 刻度不到尖端者 (b) 刻度到尖端者

图1 三类吸量管

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 调度刻 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。

④ 放液 放松食指，让液体缓慢地放入容器内（见图2）。

3. 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，如各管所加入的液体量分别为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，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。

④ 当取液量不足吸量管的满刻度时，如用1ml刻度吸量管量取0.6液体时，应选

③ 刻度吸量管 刻度吸量管供量取10ml以下的任意体积的液体之用。有0.1ml、0.2ml、0.25ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml及10ml几种。这类吸量管分刻度到尖端者与刻度不到尖端者两种。因生产单位不同，有自上而下或自下而上的两种刻度法。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1ml吸量管吸取1ml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。

2. 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。

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。

〔试管中液体的混匀法〕

如何使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）

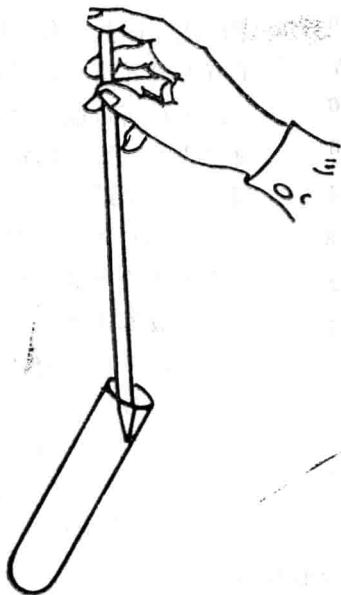


图2 使用吸量管的姿式



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。

〔实验内容〕

1. 识别吸量管的容量、类型、刻度的有效位数，并练习正确使用。
2. 用1ml、2ml、5ml及10ml刻度吸量管准确量取1ml、2ml、3ml、5ml及10ml自来水分别加入五支试管中。然后用0.5ml吸量管量取0.5ml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3ml蒸馏水漱洗一支试管，问用3ml洗一次与用1ml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. 1ml刻度吸量管的最细刻度为0.01ml，问有效数字应读至小数点后第几位？

常用生化实验技术

1 分光光度法

分光光度法是利用单色器（主要是棱镜）获得单色光来测定物质对光吸收能力的方法。物质对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。它测量的波长范围包括紫外光（200—400nm）、可见光（400—700nm）和红外光（ $0.76\text{—}30\mu\text{m}$ $1\mu\text{m}=100\text{nm}$ ）。

当太阳光或日光通过一石英和玻璃棱镜，将被分解或色散为一系列有色光带称为光谱。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，即所谓“连续光谱”。这种光谱能为肉眼所见，称可见光。除可见光外，还有肉眼看不见的紫外光、红外光、X射线、 γ 射线、微波和无线电波等。所有这些都是电磁辐射，它们组成的波谱称为“电磁波谱”。

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，这些方法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及其它光谱等等。不同波长的电磁辐射的能量及由之建立的相应分析方法如表1—1所示。

紫外光是波长为10~400nm的电磁辐射，它可分为远紫外光（10~200nm）和近紫外光（200~400nm）。远紫外光能被大气中的水气、氧、氮和二氧化碳等所吸收，所以研究远紫外光必须在真空中进行（远紫外光亦有“真空紫外光”之称），限于实验条件，实际应用甚少。本文讨论的紫外光，仅指近紫外光。

由于紫外光和可见光所具有的能量主要是与物质中原子的价电子的能级跃迁相适应，它可以导致这些电子的跃迁，所以紫外和可见吸收光谱也有“电子光谱”之称。

当被研究的物质为气（基）态原子时，它吸收紫外光或可见光可以得到锐线的原子吸收光谱，相应建立的分析方法为原子吸收光谱分析法，本文讨论溶液中的分子或离子的吸收特性和基于这种吸收建立的分析方法——紫外和可见吸收光度分析法。

紫外和可见吸收光度分析法，按所用的或测量的光的“单色程度”（即所含波长范围的宽窄程度）可分为“分光光度法”和“比色法”。分光光度法是指应用波长范围很窄的光（即较纯的单色光）与被测物质作用而建立的分析方法。按所用的光的波谱区域不同，又可分为“紫外吸收分光光度法”和“可见吸收分光光度法”两种，合称为“紫外和可见吸收分光光度法”或“紫外和可见吸收光谱分析法”。比色法是指应用单色性较差的光（即包含相当宽的波长范围的光）与被测物质作用而建立的分析方法，它只在可见光区域内使用。

紫外分光光度法、可见分光光度法、目视比色法和光电比色法之间的异同，可以概括在表1—2中。

表 1—1 电磁辐射的波长与能量的关系及其对物质的作用和所建立的相应分析方法

能量		波数 cm ⁻¹	波长 cm	频率 ν Hz	辐射 类型	光谱类型	量子跃 迁类型
kcal/mol	电子伏特 eV						
9.4×10^7	4.1×10^6	3.3×10^{10}	3×10^{-11}	10^{21}	γ 射线		
9.4×10^5	4.1×10^4	3.3×10^8	3×10^{-9}	10^{19}	X 射线		
9.4×10^3	4.1×10^2	3.3×10^6	3×10^{-7}	10^{17}	紫外		
9.4×10^1	4.1×10^0	3.3×10^4	3×10^{-5}	10^{15}	可见		
9.4×10^{-1}	4.1×10^{-2}	3.3×10^2	3×10^{-3}	10^{13}	红外		
9.4×10^{-3}	4.1×10^{-4}	3.3×10^0	3×10^{-1}	10^{11}	微波		
9.4×10^{-5}	4.1×10^{-6}	3.3×10^{-2}	3×10^1	10^9	无线电波		
9.4×10^{-7}	4.1×10^{-8}	3.3×10^{-4}	3×10^3	10^7	无线电波		

表 1—2 紫外和可见吸收光度分析法的方法分类

方法名称		共同性	特殊性 (各种方法之间的差别)
分光光度法	紫外分光光度法	基于研究和测量溶液对紫外或可见光区域中的单色光的吸收的分析方法	基于研究和测量溶液对紫外光区域 (200~400nm) 中较纯的单色光的吸收的分析方法
	可见分光光度法		基于研究和测量溶液对可见光区域 (400~780nm) 中较纯的单色光的吸收的分析方法
比色法	目视比色法	基于研究和测量溶液对可见光区域中较不纯的单色光的吸收, 用人眼作光的检测器的分析方法	同目视比色法, 但用光电转换器件代替人眼作光的检测器
	光电比色法		

紫外和可见吸收光度分析法是一种很好的且在仪器分析中应用最广泛的分析方法之一。它具有很多优点，主要的有：

第一，灵敏度高。一般可测定微克 (μg) 量级或浓度为 $10^{-4} \sim 10^{-5} \text{M}$ 的物质。在某些条件下，甚至可测定纳克 (ng) 量级或浓度为 10^{-7}M 的物质。因此，它特别适应于测定低含量和微量组分。

第二，选择性较好。一般可在多种组分共存的溶液中，不经分离而测定某种欲测定的组分。

第三，通用性强，用途广泛。不但可以进行定量分析，而且可用于测定有关的化学或物理化学常数，如平衡常数，络合物的络合比（配位体数）。同时也可用于定性分析和有机化合物中官能团的鉴定。

第四，设备和操作简单、分析速度快。在仪器分析中，紫外和可见吸收光度分析法所用的仪器是比较简单的，价格是低廉的，分析操作也很简便。因此，便于推广应用。分析速度相当快，一般可在数分钟内得出结果。

第五，准确度较好。一般情况下，相对误差约为 2%。因此，它适用于微量成分的测定，而不适用于测定中、高含量的组分。但是采取适当技术措施，可提高准确度，相对误差可减少到 0.2%（例如差示分析法），可用于高含量组分的测定。

1.1 基本原理

光的一般概念

光的本质是不连续的微粒性和连续的波动性矛盾的对立和统一，即光具有二重性。

波长和频率是光的波动性的特征，可用下式表示：

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (1)$$

式中 λ 为波长，具有相同振动相位的相邻两点间的距离叫波长，如图 1-1 所示。 ν 为频率，即每秒钟振动次数。 c 为光速，等于 $2.99792 \times 10^{10} \text{cm/sec}$ （近似 $3 \times 10^{10} \text{cm/sec}$ ）。

光子或光量子的能量值是光的微粒性的特征，符合普朗克(Planck)假设：

$$E = h\nu \quad (2)$$

式中 E 为单个光子的能量， h 为普朗克常数，等于 6.624×10^{-27} 尔格·秒。

光子既有波动性，也有微粒性。合并式①、②得：

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h\nu \quad (3)$$

由式③可见，光子的能量与光的波长成反比，与频率成正比。亦即不同频率（或波长）的光具有不同的能量。

光的电磁理论

光和无线电波相似，同属于电磁波。电磁波可由电场强度向量E与磁场强度向量H两个向量振动来表示，这两个向量以相同的位相在两个相互垂直的平面内振动。它的传播方向v与向量E及H的方向垂直如图1-1。

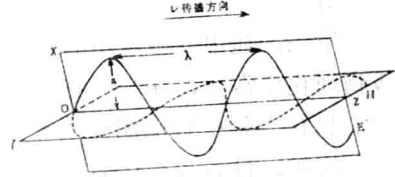


图1-1 电磁波

光吸收基本定律—Beer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，有一部份被吸收，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见图(1-2)

$$\log \frac{P_0}{P} = \epsilon b C = A$$

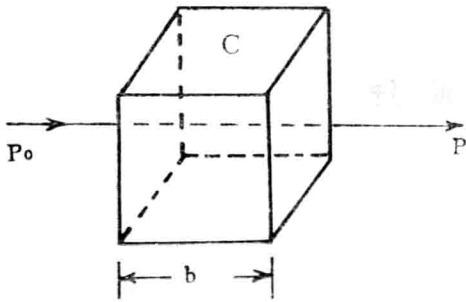


图1-2 光辐射能通过厚度为b的吸收物质
(c表示克分子浓度)

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 为溶液的浓度常以克分子数/升表示。 ϵ 为克分子消光系数或克分子吸收系数为一常数。（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，此值反映溶质特征。）

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

$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon b C$ 一式的意义是指溶液对辐射能的吸收与溶液中的吸收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、简称为Beer定律。

此式适合所有电磁辐射吸收规律，不仅适用于溶液、也适用于气体和固体。

吸收定律是紫外和可见吸收光度分析法进行定量分析的理论基础，必须对它的意义和使用条件有充分的认识 and 正确的理解。为此，应该着重指出：

第一，必须是在使用适当波长的单色光为入射光的条件下，吸收定律才成立。单色光越纯，吸收定律越准确。

第二，并非任何浓度的溶液都遵守吸收定律。稀溶液都遵守吸收定律，浓度过大时，将产生偏离（是由于偏离比耳定律所致）。

第三，吸收定律能够用于那些彼此不相互作用的多组分的溶液，它们的吸光度具有加合性：

$$A_{\Sigma} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n$$

$$= \epsilon_1 C_1 b + \epsilon_2 C_2 b + \epsilon_3 C_3 b + \dots + \epsilon_n C_n b$$

式中，右下角的标号表示组分。

第四，吸收定律中的比例常数 ϵ 称为“吸收系数”或“吸光系数”。吸收系数与多种因素有关，包括入射光的波长、温度、溶剂性质及吸收物质的性质等。如果上述因素中除吸收物质外，其他因素皆固定不变，则 ϵ 值只与吸收物质的性质有关，可作为该吸收物质的吸光能力大小的特征数据，所以一般常在固定前四个因素的条件下求得 ϵ 值。

1.2 光吸收的测定

溶剂空白

Beer定律可直接用于化学分析，但无论 P 和 P_0 都不能象定义那样容易在实验室中加以测量，因为欲研究的溶液必须装在某种容器中。辐射和器壁间的相互作用是不可避免的，从而会因反射或可能因吸收而在每一个界面造成辐射功率的损伤。另外，光束在通过溶液期间也可因被大分子或不均匀性散射而引起辐射功率的减小。这些现象在图 1—3 中都有描述。

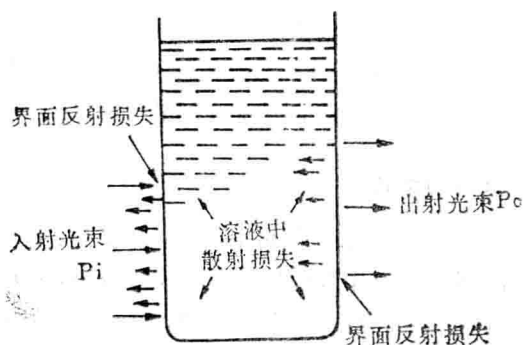


图 1—3 使通过溶液的辐射衰减的各种过程〔出射光束的辐射功率 P_e 小于入射光束的辐射功率 P_i ，因为(1)空气-壁，壁-溶液，溶液-壁和壁-空气界面的反射；(2)两壁的吸收；(3)溶液中的散射；(4)溶液中各组分的吸收〕

为了校正这些效应可将透过所研究溶液后的辐射功率与透过含有试样溶剂的相同吸收池后的辐射功率加以比较。然后就可计算出一个非常接近于溶液真正吸收光度值的实验吸光度值；即

$$A \approx \log \frac{P_{\text{溶剂}}}{P_{\text{溶液}}} \approx \log \frac{P_0}{P}$$

当这样用时， P_0 是指通过一含有待测组分溶剂的吸收池后光束的辐射功率。

吸收曲线或吸收光谱曲线

概念

在不同波长下测得物质的光吸收数据可用几种方法表示。一般在直角坐标系中用频率、波数或波长作横坐标。纵坐标则常用透光率或(百分透光率)、吸光度或吸光度的对数为单位。所绘制的曲线如以“ A ”表示则称为吸收曲线。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。

图 1—4 用三种不同的方法表示了三种高锰酸盐溶液的光谱数据。其浓度比为 1:

2:3。注意采用吸光度时在高吸光度(0.8~1.3)和低透光率(<20%)区域可产生最大的差别。相反,透光率曲线则在透光率为20~60%范围内有较大的差别。而对于logA光谱图,这种细节则趋于消失;但另一方面,这种图对于比较不同浓度溶液的曲线却是特别方便的,因为不管波长如何各曲线都沿纵坐标位移了一个相同的量。

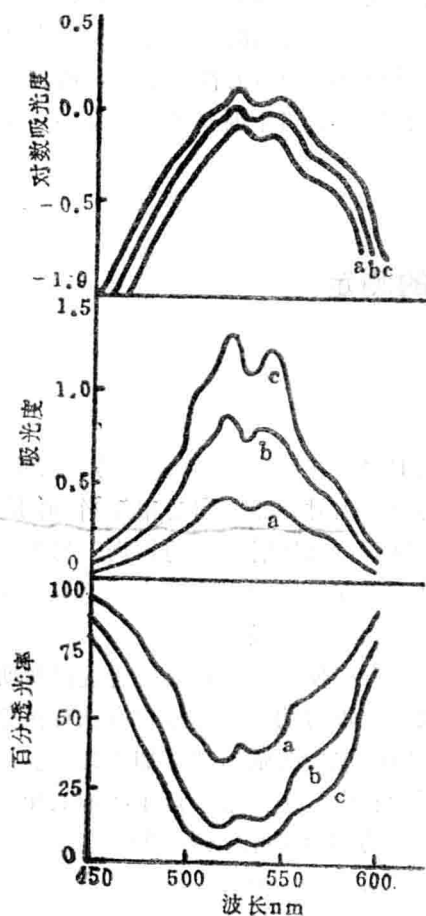


图1-4 光谱数据作图方浓(浓度关系 a: b:c=1:2:3)

的吸光度值最大,因此,可得到最大的灵敏度。此外,吸收曲线在这个区域常常是平坦的,因此在上述情况下,预期会很好遵从Beer定律。最后,测量对由于不能精密重复仪器的波长调节而产生的不确定性也不怎么敏感。

如果有吸收光谱图的话,对选择光度分析的最合适滤光片是有帮助的。

为了避免来自其他吸收物质的干扰,对于某种特殊的分析也可选用非峰值处的波长。在这种情况下,如果可能的话,应选择一个其吸收系数随波长的改变不太大的区域。

影响吸光度的变量

影响一种物质吸收光谱的常见变量有溶剂的性质、溶液的pH值、温度、高电解质浓度和存在的干扰物质等。必须了解这些变量的影响而且必须选择一组适当的分析条

曲线却是特别方便的,因为不管波长如何各曲线都沿纵坐标位移了一个相同的量。

吸收光谱的应用

紫外和可见光的吸收光谱在一定条件下与吸收物质的性质和结构有密切的关系。因此通过研究和测量吸收光谱的性质(波长和吸光度),可进行定性分析、结构分析(官能团的测定)、定量分析及有关物理化学常数的测定。

在吸收曲线上常表现一个或多个吸收峰(光吸收最大处),最大吸收峰波长称为 λ_{max} (λ_{max} 常用以作定性分析的基础。

定量分析及计算

在着手光度分析或分光光度分析之前,必须选择一组工作条件并制作一条说明浓度和吸光度间关系的标准曲线。

波长的选择

在分光光度分析中,吸光度的测量通常都在对应于吸收峰的波长处(λ_{max})进行,因为在此点每单位浓度所改变的

件，以使吸光度值实质上不致受这些变量数值上的一些微小而未加控制的变化所影响。

吸光度和浓度间关系的确定（标准曲线的绘制）

在确定了一组分析条件之后，必须用一系列标准溶液制作一条标准曲线。这些标准的整个组成应该接近于实际试样，并且应包括被测物质的一个相当大的浓度范围。只用单个标准来测定摩尔吸收系数往往并不可靠。将分析结果建立在摩尔吸收系数的文献数值上则更不慎重。

标准曲线就是用数个（一般需5个以上）已知浓度的标准溶液，（设其浓度分别为 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、及 C_5 ），分别测定其吸光度（设分别为 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 和 A_5 ）。然后以吸光度为纵坐标，浓度为横坐标作图。若该溶液遵守吸收定律，且实验和操作正确，那么作图所得到的为一经过原点的直线。此直线称为“工作曲线”或“标准曲线”，又称“C-A曲线”（参见图1—5）。

结果与计算

〔1. 测定吸光度（A值）法：（标准管法）〕

设同一物质的两种不同浓度的溶液，其浓度分别为 C_1 和 C_2 ，盛在相同厚度的比色皿中，透光厚度 b 相同。用同一个单色光源，测得其吸光度分别为 A_1 和 A_2 ，则有：

$$A_1 = \epsilon b C_1$$

$$A_2 = \epsilon b C_2$$

两式相除

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{\epsilon b C_1}{\epsilon b C_2}$$

即
$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{C_1}{C_2} \quad \text{或} \quad C_1 = \frac{A_1}{A_2} \times C_2$$

此式为测定吸光度法的计算公式，其意义为：同一物质的两种不同浓度的溶液，盛于相同厚度的比色皿中，用同一单色光源照射时，两溶液的吸光度之比与两溶液的浓度之比相等。式中 A_1 和 A_2 都为实验数据，是已知的。设 C_2 为标准溶液的浓度，也是已知的，则待测溶液的浓度 C_1 可按上式计算求得。

〔2. 查表法：（标准曲线法）〕

如图1—5所示，在测定一未知浓度的溶液时，测得其吸光度（设为 A_x ），即可由标准曲线查得其浓度 C_x ，如图1—5实线所示。应该指出，应用标准曲线法时，测定未知溶液的条件（所用仪器及测定条件如温度等）应与制作标准曲线的条件完全一致，否则就会产生误差。标准曲线法比标准管法精确，它可以消除由于各种原因所引起的偏离吸收定律而造成的误差；并可判别待测溶液适用的测定浓度范围。虽然制作标准曲线比较费时，但对于成批样品的测定却有简便省时的优点。所以在一般实际工作中，广泛应用这种方法。

与吸收测量有关的术语

近几年来，曾尝试提出一种与辐射吸收有关的各种物理量的标准命名法。表1—3列出了美国试验材料协会所推荐的术语和经常遇到的一些代用名称和符号。此表中的一个重要术语是透光率 T ，它的定义是

$$T = \frac{P}{P_0}$$

透光率是溶液所透过的入射辐射份数；它往往用百分数表示。透光率与吸光度的关系如下：

$$A = -\lg T$$

$$-\log T = -\lg \frac{P}{P_0} = \lg \frac{P_0}{P} = A$$

表1—3 在吸收测量中使用的重要术语和符号

术语和符号 ^a	定义	可代用名称和符号
辐射功率 P 、 P_0	每秒钟到达检测器某一给定面积上的辐射能量	辐射强度 I 、 I_0
吸光度 A	$\log \frac{P_0}{P}$	光密度 D ，消光值 E
透光率 T	$\frac{P}{P_0}$	透射 T
辐射光程长度， b (以cm为单位)	—	l 、 d
摩尔吸收系数 ^b ， ϵ	$\frac{A}{bc}$	摩尔消光系数
吸收系数 ^c ， a	$\frac{A}{bc}$	消光系数， k

a. 选自 Anal. Chem, 24, 1349 (1952)；

b, c 可用 mol/l 为单位表示；

c, e 可用 g/l 或其他专用浓度单位表示；b 可用 cm 或其它长度单位表示。

吸收定律的局限性

吸收定律是一个科学定律，它已得到理论和大量实验工作的证实。但是，它的应用

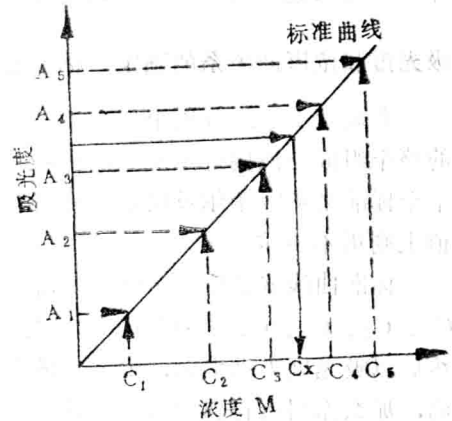


图1—5 标准曲线（工作曲线）的作法和应用