

第一篇 生物化学技术概论

第一章 生物化学实验须知

(A guide to biochemical experiments)

一、实验室规则

- (1) 实验前应认真预习实验讲义,明确实验目的和要求,写出实验设计。
- (2) 自觉遵守课堂纪律,保持室内安静,不得嬉笑取闹,不得无故迟到早退。
- (3) 严格按操作规程进行实验。实验过程中自己不能解决或决定的问题,切勿盲目处理,应及时请教指导老师。实验数据和结果应写在记录本上。实验完毕,应认真书写实验报告,交老师评阅。
- (4) 注意节约试剂、水、电、煤气等。试剂瓶瓶盖应随开随盖,切勿盖错,避免污染,用毕放回原处。使用易燃物品时应远离火源。用试管加热,管口不准对人。严防强酸强碱及有毒物质吸入口内或溅到别人身上。
- (5) 火柴棍、废纸及其它固体废物严禁倒入水槽,而应倒到桶内。废弃液体(强酸强碱必须事先用水稀释)可倒入水槽内,并放水冲走。
- (6) 使用和洗涤仪器时应小心仔细,轻拿轻放。使用贵重仪器应严格遵守操作规程,不许强拉硬拧,发现故障立即报告教员,不要擅自动手检修。
- (7) 损坏仪器器材应及时登记报告。因违反操作规程所造成的损失,由老师酌情决定给予必要的赔偿。
- (8) 任何时候均不得将强酸、强碱、高温、有毒物质抛洒在实验台上。
- (9) 实验完毕,个人应将试剂、器材摆整齐,用过的玻璃仪器应洗刷干净,经教师检查后方可离开实验室。卫生值日生则要认真负责实验室的整洁、卫生,门窗水电的安全等。

二、实验室急救

实验工作常与水、电、煤气、玻璃器材和化学试剂接触,偶一不慎便可能发生意外事件,受到伤害。遇此情形不要惊慌,要根据具体情况及时处理。

(一)触电

当遇到触电情况时,应采取以下急救措施:①关闭电源;②用干木棍使导线与触电者分开;③使触电者和土地分离,急救时急救者必须做好防止触电的安全措施,手或脚必须绝缘。触电者未脱离电源时,切不可直接接触触电者的身体,否则会造成自身触电。

(二)火灾

实验中一旦发生了火灾切不可惊慌失措,应保持镇静。首先立即切断室内一切火源和电源,移走一切易燃物品。根据火势大小,可采用湿抹布、湿工作衣、沙土、铁片覆盖,隔绝空气使之熄灭,或用灭火器、灭水水龙头灭火。但应注意,酒精及其它可溶于水的液体着火时,方可用水灭火;不能与水混合者如汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时,应用石棉布或砂土扑灭,绝对不能用水,否则反而会扩大燃烧面积。衣服着火,切勿奔跑,可用衣服、大衣包裹身体或躺在地上滚动,压住着火部位,再以水浇灭之。导线着火时不能用水及二氧化碳灭火器,应切断电源或用四氯化碳灭火器。

(三)烫伤

烫伤一般用浓的(90%~95%)酒精消毒后,涂上苦味酸软膏。皮肤为药品所侵蚀,绝大多数情况下均用水冲洗,或根据药品的性质加以适当处理后,用硼酸油膏或凡士林涂之。

强碱(如氢氧化钠、氢氧化钾、钠、钾等)触及皮肤而引起灼伤时,要先用大量自来水冲洗,再用0.81mol/L(5%)的硼酸溶液或0.33mol/L(2%)的乙酸溶液涂洗。

强酸、溴等触及皮肤而致灼伤时,应立即用大量自来水冲洗,再以0.60mol/L(5%)的碳酸氢钠溶液或1.42mol/L(5%)的氢氧化铵溶液洗涤。

如酚触及皮肤引起灼伤,可用稀的(5%)酒精洗涤。磷灼伤用0.06mol/L(1%)的 CuSO_4 洗涤。

眼睛被酸性药物所灼伤时,先用水洗,再用0.60mol/L(5%)的 NaHCO_3 洗涤。为碱性药物所伤时,用水洗后再用0.81mol/L(5%)的硼酸水淋洗,后用橄榄油、液体石蜡或考的松眼膏滋润。

(四)割伤

皮肤为玻璃割伤后,首先取出伤口内的玻璃屑,然后以0.10mol/L(2.5%)的碘酒或红汞涂抹(切忌碘酒与红汞混合使用),再涂以凡士林,用纱布包裹。

(五)误服毒性药物

毒物吸入口中立即吐出,切勿咽下,并用清水反复漱口。

氰化物:可服适量0.88mol/L(3%)的过氧化氢溶液,继以洗胃,并静脉注射10g/L(1%)的美蓝溶液及吸入亚硝酸戊酯。

强酸:用0.1mol/L的 NaOH 漱口后,再服用氧化镁、镁乳或石灰水与牛奶混合剂,连续内服多次,即可中和酸液,又可保护粘膜减少刺激。但不能服用 NaHCO_3 ,因 NaHCO_3 会产生气体,影响胃壁。

强碱：内服 0.83mol/L (5%) 的醋酸、食用醋、柠檬酸等,也可用奶油、橄榄油或其它油脂,使之与碱结合成皂类。

氯化汞(升汞)、硫酸铜 服用生鸡蛋或牛奶,并洗胃。

以上伤势较重者,经急救后,应立即送医院检查和治疗。

三、实验记录及实验报告

(一)实验记录

实验课前应认真预习,写出实验设计。完整的实验记录应包括实验日期、实验题目、材料、操作和结果。

实验记录本应标上页数,不准撕去,原始数据不可涂改,写错时可以划去重写。记录必须用钢笔或圆珠笔。

实验中观察到的现象、结果和数据,应该直接记在记录本上,不要用单片纸做记录或打草稿,更不允许记录在手心等处。原始记录必须准确、简练、详尽、清楚。

记录时应做到如实记录实验结果,切忌夹杂主观因素。在实验条件下观察到的现象,应如实仔细地记录下来。在定量实验中观测的数据,如分光光度计的读数等,都应准确地记录在已设计好的表格内,并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如光密度 0.050 不应写成 0.05 。每一个结果最少要重复观测两次以上,当符合实验要求并确知仪器工作正常后,再写在记录本上。实验记录本上的每一个数据,都反映了每一次的测量结果,所以,重复观测时即使数值完全相同也应如实记录下来。数据的计算也应该写在记录本上。

如发现记录的结果有怀疑、遗漏、丢失,必须重做实验,努力培养严谨的科学作风。

(二)实验报告

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告,并在 24 小时内送交老师评阅。

实验报告应包括实验题目、实验日期、实验材料、实验原理、操作方法、结果(定量实验包括计算)、讨论等项内容。

实验材料是指何种来源的生物样品。原理部分应简明扼要,简述基本原理。操作方法(或步骤)可以采用工艺流程图的方式或自行设计的表格来表示,但对实验条件和操作的关键环节应写清楚。实验结果部分应把所得的实验结果(如观察现象)和数据进行整理、归纳、分析、对比,尽量用图表的形式概括实验的结果,如实验组与对照组实验结果的比较表等(有时对实验结果还可附以必要的说明)。讨论部分不是对结果的重述,而是对实验方法、结果、异常现象进行探讨(如逻辑推论)和评论,以及对实验设计的认识、体会、建议,对实验课的改进意见等。

一般实验,要有结论,结论要简单扼要,说明本次实验所获得的结果。

(杨光彩)

四、实验误差与数据处理

(一)误差

在进行定量分析实验时,很难使测量出来的数值与客观存在的真实值完全相同,而且在多次重复测量时,也很难使所有的测量值都完全相同。真实值与测量值之间的差叫误差,个别测量值与多次重复测量的平均值的差称为偏差,它们分别是衡量测定结果的准确度和精密度的表示方法。

1. 准确度

准确度是实验分析结果与真实值相接近的程度,通常用误差的大小来表示,误差愈小,准确度愈高。误差又可分为绝对误差和相对误差:

绝对误差 = 测定值 - 真实值

$$\text{相对误差}(\%) = \frac{\text{绝对误差}}{\text{真实值}} \times 100\%$$

例如:在分析天平上称得甲、乙两种物质的质量分别为 2.1750g 和 0.2175g,假定两者的真实值分别为 2.1751g 和 0.2176g,则称量的绝对误差应分别为:

$$2.1750 - 2.1751 = -0.0001(\text{g})$$

$$0.2175 - 0.2176 = -0.0001(\text{g})$$

它们的相对误差分别为:

$$\frac{-0.0001}{2.1751} \times 100\% \approx -0.005\%$$

$$\frac{-0.0001}{0.2176} \times 100\% \approx -0.05\%$$

可见,这两种物质称量的绝对误差虽然相等,但当用相对误差表示时,就可看出第一份称量的准确度为第二份的 10 倍。虽然,当被称量物体的质量较大时,称量的准确度就较高。所以应该用相对误差来表示分析结果的准确度。但因真实值是并不知道,因此在实际工作中无法算出分析的准确度,只能用精密度来评价分析的结果。

2. 精密度

精密度是指在相同条件下,进行多次测定后所得数据相近的程度。精密度一般用偏差来表示。偏差也分为绝对偏差和相对偏差:

绝对偏差 = 个别测定值 - 算术平均值(不计正负号)

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{绝对偏差}}{\text{算术平均值}} \times 100\%$$

当然,和误差的表示方法一样,用相对偏差来表示实验的精密度,比用绝对偏差更有意义。

在实验中,对某一样品通常进行多次平行测定,求得其算术平均值,作为该样品的分析结果。对于该结果的精密度常用平均绝对偏差和平均相对偏差来表示。

$$\text{平均绝对偏差} = \frac{\text{个别测量值绝对偏差的绝对值总和}}{\text{测量次数}}$$

$$\text{平均相对偏差} = \frac{\text{平均绝对偏差}}{\text{平均值}} \times 100\%$$

例如 分析某一蛋白质制剂中氮的质量分数,共测五次,其结果分别为:16.1%、15.8%、16.3%、16.2%、15.6%。用来表示精密度的偏差可计算如下:

分析结果 算术平均值 个别测定值的绝对偏差 (不计正负)

16.1%	16.0%	0.1%
15.8%		0.2%
16.3%		0.3%
16.2%		0.2%
15.6%		0.4%

$$\text{平均绝对偏差} = \frac{0.1\% + 0.2\% + 0.3\% + 0.2\% + 0.4\%}{5} = 0.24\%$$

$$\text{平均相对偏差} = \frac{0.24}{16.0} \times 100\% = 1.5\%$$

在分析实验中,有时只做两次平行测定,这时可用下式表达结果的精密度:

$$\frac{\text{二次分析结果的差值}}{\text{平均值}} \times 100\%$$

应该指出,误差和偏差具有不同的含义,误差以真实值为标准,而偏差以平均值为标准。由于物质的真实值一般是无法知道的,我们平时所说的真实值其实只是采用各种方法进行多次平行分析所得到的相对正确平均值。用这一平均值代替真实值来计算误差,得到的结果仍然只是偏差。例如上述蛋白质制剂中氮的质量分数测定结果可用数字 $16.0 \pm 0.24\%$ 来表示。

还应指出,用精密度来评价分析的结果有一定的局限性。分析结果的精密度很高(即平均相对偏差很小),并不一定说明实验的准确度也很高。因为如果分析过程中存在系统误差,可能并不影响每次测得数值之间的重合程度,即不影响精密度,但此分析结果却必然偏离真实值,也就是分析的准确度不一定很高。当然,如果精密度也不高,则无准确度可言。

(二)产生误差的原因和校正

产生误差的原因很多,一般根据误差的性质和来源,将误差分为系统误差和偶然误差两类。

1. 系统误差

系统误差与分析结果的准确度有关,它是由分析过程中某些经常发生的原因所造成的,对分析结果的影响比较稳定。在重复测定时,常常重复出现。其来源主要有:

(1)方法误差:由分析方法本身所造成,如容量分析中等当点和滴定终点不完全符合等。

(2)仪器误差 因仪器本身不够精密所造成,如天平、砝码、量器等不够准确。

(3)试剂误差:来源于试剂或蒸馏水的不纯。

(4)操作误差:由于每个人掌握操作规程与控制条件常有出入而造成,如不同的操作者对滴定终点颜色变化的判断会有差别等。

为了减少系统误差常采取下列措施:

(1)空白试验 为了消除由试剂等因素引起的分析误差,可在不加样品的情况下,按照与样品测定完全相同的操作步骤,在完全相同的条件下进行分析,所得结果为空白值。将样品分析的结果扣除空白值,可以得到比较准确的结果(参见第三章 752 型紫外光栅分光光度

计)。

(2)回收率测定 作这种测定时,取一标准物质(其中的组分含量是已经精确知道的),添加到待测的未知样品中,与待测的未知样品同时做平行测定。实验测得的标准物量与实际添加标准物量之比的百分率就称为回收率。这种由标准样品测得的回收率可以用来检验、表达某些分析过程的系统误差,因为系统误差愈大,回收率愈低。

(3)仪器校正 对测定仪器(如砝码、量器等)进行校正,以减少误差。

2. 偶然误差

偶然误差与分析结果的精密度有关,它来源于难以预料的因素,或是由于取样不均匀,或是因为测定过程中某些不易控制的外界因素的影响。这些因素是时隐时现的。

为减少偶然误差,一般采取的措施是:

(1)平均取样 动、植物组织可制成匀浆后取样。

(2)多次取样:进行多次平行测定,然后取其算术平均值,就可减少偶然误差。

除上述两类误差外,还有因操作事故引起的“过失误差”,如读错刻度,溶液溅出,加错试剂等,这时可能出现一个很大的“误差值”,在计算算术平均值时,这种数值应弃去不用。

(三)有效数字

1. 有效数字概述

有效数字是指实际能测量到的数字。通常包括全部准确数字和最后一位估计的、不确定的可疑数字。除另有说明外,一般可理解为在可疑数字的位数上有 ± 1 个单位,或在其下一位上有 ± 5 个单位的误差。有效数字的选取,取决于实验方法及所用仪器的精确程度。例如,用分析天平称得某物质重为6.5215g,是5位有效数字;而用一般托盘天平称得该物质重为6.52g,则只有3位有效数字。使用有效数字时,应注意以下几点:

(1)有效数字及其表示法 从0~9这10个数字中,只有0可能是有效数字,也可以是只作定位用的无效数字,其余都是有效数字。例如,在数据0.06050g中,6后面的2个0都是有效数字,而6前面的2个0都不是有效数字,它们只表明这个重量小于 $1/10\text{g}$ 。所以,0.06050g是4位有效数字。很小的数,用0定位不方便,可以用10的方次表示。例如,0.06050g可以写成 $6.050 \times 10^{-2}\text{g}$,仍然是4位有效数字,习惯上小数点前只留1位整数。很大的数也可以采用这种表示方法;有时数字后面的0是否是有效数字不明确,例如, 25000 ± 1000 。为了避免混乱,一般写成标准式: $(2.5 \pm 0.1) \times 10^4$ 、 $(2.50 \pm 0.10) \times 10^4$ 或 $(2.500 \pm 0.100) \times 10^4$,它们的有效数字依次为2,3,4位。

(2)测量值的记录,必须与测量的准确度相符合 记录测量所得数据时,规定只允许数的末位欠准确,而且只能上下差1。例如,用50mL量筒量取25mL溶液,应记成25mL,即要两位有效数字,因为末位上的5已可能有 $\pm 1\text{mL}$ 的误差。使用25mL移液管量取25mL溶液,应记成25.00mL,即要4位有效数字,因为在小数点后第二位上的0才可能有 ± 1 ,即 $\pm 0.01\text{mL}$ 的误差。所以记录测量值时,其位数必须按照有效数字的规定,不应减少位数,也不要增加位数。要明白,记录的位数超过恰当的有效数字的位数再多,也不能提高测量值的实际可靠性,反而给运算带来许多麻烦。

常量分析一般要求4位有效数字,以表明分析结果有千分之一的准确度。使用4位对数表进行计算,可自然保证4位有效数字;使用计算器时,在计算过程中可能保留了过多的

位数,但最后结果仍应记成适当位数,以正确表达应有的准确度。

(3)有效数字的位数反映测量的相对误差:如称量某试剂的质量为 0.5180g,表示该试剂质量是 $(0.5180 \pm 0.0001)\text{g}$,其相对误差

$$\delta/\mu(\%) = \pm 0.0001/0.5180 \times 100\% = \pm 0.02\%$$

式中 δ 为绝对误差, μ 为真值。

如果少取一位有效数字,则表示该试剂的质量是 $(0.518 \pm 0.001)\text{g}$,其相对误差

$$\delta/\mu(\%) = \pm 0.001/0.518 \times 100\% = \pm 0.2\%$$

即测量的准确度前者比后者高 10 倍。因此,记录测量数据时不能因为最后位数的数字是 0 而随意删去。

(4)有效数字与量的使用单位无关:如称得某物的质量 12g,2 位有效数字。若以 mg 为单位时,应记为 $1.2 \times 10^4\text{mg}$,而不应记作 12000mg。若以 kg 为单位,可记为 0.012kg 或 $1.2 \times 10^{-2}\text{kg}$ 。

(5)计算有效数字的位数时,若第一位数字等于或大于 8,其有效数字应多算一位。例如 9.28mL,表面上是 3 位有效数字,但其相对误差 $= 0.01/9.28 \times 100\% \approx 1/1000 \times 100\% = 0.1\%$,故可以认为它是 4 位有效数字。

(6)简单的计数、分数或倍数属于准确数或自然数,其有效位数是无限的。

(7)化学中常用的 pH、pK 等对数数值,其有效数字的位数取决于小数部分数字的位数,因为整数部分只代表原数值的方次。如 $\text{pH}=8.02$,表示 $[\text{H}^+] = 9.5 \times 10^{-9}\text{mol/L}$,是 2 位有效数字。 $\text{pH}=4.0$,表示 $[\text{H}^+] = 1 \times 10^{-5}\text{mol/L}$,是 1 位有效数字。

2. 有效数字的修约

在多数情况下,测量数据本身并非最后的要求结果,一般需经一系列运算后才能获得所需的结果。在计算一组准确度不等(即有效数字位数不同)的数据之前,应先按照确定的有效数字将多余的数字修约或整化。

过去习惯上用“四舍五入”规则修约数字。为了减少因数字修约人为引进的误差,现在按照国家标准 GB1.1—81 附录 C《数字修约规则》进行修约。通常称为“四舍六入五成双”法则,即当尾数 ≤ 4 时,舍去;尾数 ≥ 6 时,进位;当尾数为 5 时,则应视保留的末位数是奇数还是偶数,5 前为偶数应将 5 舍去,5 前为奇数则将 5 进位。这一法则的具体运用如下。

(1)若被舍弃的第一位数字大于 5 则前一位数字加 1。如 28.2645,取 3 位有效数字时,其被舍弃的第一位数字为 6,大于 5 则有效数字应为 28.3。

(2)若被舍弃的第一位数字等于 5,而其后面的数字全部为 0,则视被保留的末位数字为奇数或偶数(0 视为偶数)而定进或舍。末位是奇数时进 1,末位是偶数时舍弃。如 28.350,28.250,28.050,只取 3 位有效数字时,分别为 28.4,28.2,28.0 将 28.175 和 28.165 处理成 4 位有效数字,分别为 28.18 和 28.16。

(3)若被舍弃的第一位数字为 5,而其后面的数字不全是 0,无论前面数字是偶或奇,皆进 1。如 28.2501,只取 3 位有效数字时,则进 1,成为 28.3。

(4)若被舍弃的数字包括几位数字时,不得对该数进行连续修约,而应根据以上规则仅作一次处理。如 2.154546,只取 3 位有效数字时,应为 2.15,而不得连续修约为 2.16 ($2.154546 \rightarrow 2.15455 \rightarrow 2.1546 \rightarrow 2.155 \rightarrow 2.16$)。

3. 有效数字计算法则

在做数学运算时,有效数字的处理,加减法与乘除法不同。

(1) 加减运算。

做加减运算是各数值绝对误差的传递，所以结果的绝对误差必须与各数据中绝对误差最大的那个相当。通常为了便于计算，可按照小数点后位数最少的那个数，保留其他各数的位数，然后再相加减。例如下面 3 式：

0.5362	10.0051	4.2598
0.0014	1.9724	
+ 0.25	+ 0.0003	- 4.2595
<u>0.79</u>	<u>11.9778</u>	<u>0.0003</u>

在第一式中, 3 个数的绝对误差不同, 结果的有效数字位数只由绝对误差最大的第三个数决定, 即两位。第二、第三两式中, 各数的绝对误差都一样, 故确定结果有效数字的位数很简单。不过也要看到, 第二式中的第三个数只有 1 位有效数字, 而结果有 6 位有效数字。第三式中的 2 个数都有 5 位有效数字, 而结果只有 1 位有效数字。以第一式为例, 可先把 3 个数写成 0.54, 0.00 及 0.25, 然后再相加。

为稳妥起见,也可在修约时多保留 1 位,算完后再修约 1 次。如

第一次修约

第二次修约

$$12.35 + 0.0056 + 7.8903 = 12.35 + 0.006 + 7.890 = 20.246 \approx 20.25$$

(2) 乘除运算。

做乘除运算是各数值相对误差的传递，所以结果的相对误差必须与各数中相对误差最大的那个相当。通常为了便于计算，可按照有效数字位数最少的那个数，保留其他各数的位数，然后再计算。例如， $0.12 \times 7.678234 \div 0.02585$ 的运算中，0.12 的相对误差最大，有效数字位数最少，应以它为标准先进行修约，再计算：

$$0.12 \times 7.7 \div 0.026 = 36$$

或先多保留一位有效数字，算完后再修约一次。

$$0.12 \times 7.68 \div 0.0258 = 35.7 (\text{修约}) = 36$$

若有效数字最少的那个数首位数 ≥ 8 时,则计算所得结果的有效数字可多算 1 位。如

$$8.47 \times 4.236 = 35.88$$

在平方与立方时，底数有几位有效数字，结果中就只保留几位。当底数首位数 ≥ 8 时，结果中可多保留 1 位。

然而，有的数字是准确数，不能运用上述计算法则。例如计算相对分子质量时，各相对原子质量是准确数(相对真值)，没有误差。1个氯原子相对原子质量为 35.457, 3个氯原子相对原子质量为 $35.457 \times 3 = 106.371$, 不能写成 1.1×10^2 。

4. 在生化实验中正确运用有效数字及其运算法则

(1)正确记录测量数据。

记录的数据一定要如实地反映实际测量的准确度。例如,分析天平可称至 $\pm 0.0001\text{g}$,若称得某物质为 0.2500g ,就必须记作 0.2500g ,不能记成 0.25g 或 0.250g 。如从滴定管读取滴定液的体积恰为 24mL ,应当记为 24.00mL ,不能记成 24mL 或 24.0mL 。

(2)正确确定样品用量和选用适当的仪器。

常量组分的分析测定常用质量分析或容量分析,其方法的准确度可达 0.1%,因此,整个测量过程中每一步骤的误差都应小于 0.1%。用分析天平称量试样时,试样量一般都应大于 0.2g,才能使称量误差小于 0.1%。若称量大于 3g 的样品,则可使用 1/1000 的天平(即感量为 0.001g)也能满足对称量准确度的要求,其称量误差小于 0.1%。

同理,为使滴定时读数误差小于 0.1%,常量滴定管的刻度精度为 0.1mL,能估读至 $\pm 0.01\text{mL}$,滴定剂的用量至少要大于 20mL,才能使滴定时读数误差小于 0.1%。前后两次读数误差至少为 $\pm 0.02\text{mL}$ 。

(3)正确报告分析结果。

分析结果的准确度要如实地反映各测定步骤的准确度。分析结果的准确度不能高于各测定步骤中误差最大的那一步的准确度。

例如,分析某样品中的含氮量时,称量值为 3.5g,甲、乙二人各作 2 次平行测定,报告结果为:

甲 $N_1\% = 0.042\%$, $N_2\% = 0.041\%$;

乙 $N_1\% = 0.04201\%$, $N_2\% = 0.04109\%$.

显然,甲的报告结果是可取的,而乙的报告结果不合理。因为:

称量相对误差 = $\pm 0.1/3.5 \times 100\% \approx \pm 3\%$

甲的报告相对误差 = $\pm 0.001/0.042 \times 100\% \approx \pm 2\%$

可见甲的报告相对误差与称量的相对误差相符。

乙的报告相对误差 = $\pm 0.00001/0.04201 \times 100\% \approx \pm 0.02\%$

乙的报告相对误差比称量的相对误差小了 100 倍,显然是不可能的,是不合理的。

(4)正确掌握准确度的要求。

生化实验定量分析中的误差是客观存在的,对准确度的要求要根据需要和客观可能而定。常量组分的分析测定常用重量法和容量法,其方法误差约 $\pm 0.1\%$,一般取 4 位有效数字。对于微量物质的分析,分析结果的相对误差能够在 $\pm 2\% \sim \pm 3\%$,就已满足实际需要。因此,在配制这些微量物质的标准溶液时,一般要求称量误差小于 1% 就够了。如用分析天平称量,称量 1.00g,其称量相对误差就小于 1%,不必称至 0.0001g。

(5) 计算器运算结果中有效数字的取舍。

电子计算器的使用已很普及,这给多位数的计算带来很大方便,但记录计算结果时切勿照抄计算器上显示的数字,需按照有效数字修约和计算法则,决定计算器计算结果的数字位数的取舍。

(四)数据处理

对实验中所得到的一系列数值,采取适当的处理方法进行整理、分析,才能准确地反映出被研究对象的数量关系。在生物化学实验中,通常用列表法或作图法来表示实验结果,以使结果表达得清楚、明了,而且还可能减少和弥补某些测定的误差。根据对标准样品的一系列测定,也可以列出表格或绘制标准曲线,再由测定数值直接查出结果。

1. 列表法

将实验所得各数值用适当的表格列出,并表示出它们之间的关系。通常数据的名称和

单位写在标题栏中，表内只填写数字。数据应正确反映测定的有效数字，必要时应计算出误差值。

2. 作图法

实验所得到的一系列数据之间的关系及其变化情况，可以用图线直观地表现出来。作图时应注意以下各点：

- ①按习惯通常把自变量画在横轴（ x 轴）上而把应变变量画在纵轴（ y 轴）上。
- ②图应有明白简洁的标题，清楚地标明两个轴的计量单位。
- ③用简单的数字标明轴上的标度（如使用 10mmol/L 要比 0.01mol/L 或 $10000\text{ }\mu\text{mol/L}$ 好）。
- ④实验中测得的各数值点应用清楚的符号（如○、●、□、■、△、▲等）标注在图纸上，不要用+或一个小点。符号的大小应与测量值的精密度相当。
- ⑤尽可能使各点间的距离相等，不要使各点挤在一起或让它们之间的距离太大。
- ⑥用直线或曲线把各点连接起来。图形必须是很平滑的，可以不通过所有的点，而要求线两旁偏离的点分布较均匀，在画线时，个别偏离过大的点应当舍去，或重复实验校正之。采用作图法时至少要有五个以上的点，否则便没有意义。

（肖应庆 方振伟）

第二章 生化实验样品的制备

(The preparation of samples for biochemical experiments)

在生物化学实验中,无论是分析组织中各种物质的含量,或是探索组织中的物质代谢过程,皆需利用特定的生物样品。由于实验的特殊要求,往往需要将样品预先进行适当处理。掌握此种实验样品的正确处理与制备方法是做好生化实验的先决条件。

在基础生化实验中,最常用的样品是人或动物的全血、血清、血浆或无蛋白血滤液,有时也采用尿液做实验。组织样品则常用肝、肾、胰、胃粘膜或肌肉等组织制作组织匀浆、组织切片或组织浸出液等。

关于这些样品的制备方法,扼要介绍如下。

一、血液样品

收集动物或人的血液时应使用清洁干燥的容器以防溶血。

1. 采血时间及部位

由于消化吸收对血液成分有影响,所以一般采用早晨空腹静脉血做样品,若急需,可于饭后 4~6h 采取。一般由肘前正中静脉取血,如用少量血可由手指或耳垂采血,但应注意毛细血管血液的某些成分与静脉血略有不同。若用动脉血,可由股动脉穿刺获得。

2. 各种血液样品的制备

(1)血清。

收集的血液不加任何抗凝剂,在室温下 5~20min 即自行凝固,通常在 3h 后,血块收缩而分出血清。血块收缩后,应及早分离出血清,以免血块中血球溶血。若血块粘着容器壁过紧,血清不易分离出来,可用细玻璃棒轻轻剥离。将血液离心,可使血清分离得较快、较多,时间缩短。最好在血凝后半小时内进行离心分离血清。

(2)全血。

需用全血时,应加入适当的抗凝剂以防止血液凝固。一般将血液取出后,迅速注入含有抗凝剂的容器内,轻轻摇动或以两手搓动容器,使血液与抗凝剂充分混合,以免形成凝血小块(剧烈摇动会引起溶血)。全血制备后如不立即进行试验,应储存于冰箱中。

抗凝剂种类很多,常用的有草酸盐、柠檬酸盐、氟化钠和肝素等。选用何种抗凝剂要视实验要求而定。一般常用廉价的草酸盐,但在测定钙时不宜使用。在做钠、钾及有关氨的测定时,分别不宜用草酸钠、草酸钾和草酸铵。氟化钠是测定血糖时的良好抗凝剂,因为兼有抑制糖酵解的作用,可防止血糖分解。但氟化钠能抑制脲酶,故用脲酶测定尿素时不能应用。肝素为最佳抗凝剂,但其价格昂贵,尚不能普遍应用。

抗凝剂用量过少,则抗凝效果差,用量过多会影响实验结果。通常 1mL 血液加草酸盐 1~2mg 或柠檬酸钠 5mg,或氟化钠 5~10mg,或肝素 0.01~0.2mg(相当于 1~20 国际单

位,1mg 相当于 125 国际单位)。使用时可先配成适当浓度的水溶液 [0.54mol/L(10%)草酸钾 0.1mL 可抗凝 5mL 血液;5g/L(0.5%)肝素 0.1mL 可抗凝 5~10mL 血液],按需要量加到盛血的容器中,并涂布于器壁,烘干蒸发备用(肝素不超过 50℃,其它不超过 80℃)。

(3)血浆。

将抗凝之全血离心分离,其上清液即为血浆。分离血浆时应严格防止溶血,除采血的一切用具都需要清洁干燥外,取出的血液也不能剧烈振摇。

(4)无蛋白血滤液。

分析血液中非蛋白质的各种成分(如非蛋白氮、葡萄糖、肌酸等)时,为了避免蛋白质的干扰,须预先除去血中的蛋白质成分。蛋白质发生沉淀的血液经过滤或离心,得上清液,这种除去蛋白质的滤液叫做无蛋白血滤液。

除去蛋白质的方法很多,一般分成两类:一类是使蛋白质经脱水而沉淀,如有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮等)及中性盐(硫酸铵、硫酸钠、氯化钠等)沉淀法。另一类是使蛋白质形成不溶性的盐而沉淀,常用的沉淀剂有三氯乙酸、钨酸、磷钨酸、苦味酸以及金属离子 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 等。

二、尿液样品

一般定性实验可以用随时收集的新鲜尿液,但以早晨第一次排出的尿最为合适,因为这是夜间积存在膀胱内的尿,经过浓缩,成分比较稳定。如作定量分析,应准确收集 24h 尿液,混合后再取样,分析结果应以 24h 尿中含量表示,任意采集一次尿液作定量分析没有实际意义。

收集方法,一般在早晨一定时间排出残余尿而弃去,以后每次尿均收集于清洁大玻璃瓶中,到第二天早晨同一时间收集最后一次尿即可。把收集的 24h 尿液充分混合后用量筒量准其总体积,然后取样分析。

尿液是一种良好的细菌培养基,如不冷藏或防腐,细菌会很快繁殖而引起尿素分解,所以尿液收集后应尽快分析。若必须推迟检查或收集 24h 尿液,则应放冰箱冷藏或加入防腐剂,常用的防腐剂有甲苯(1mL/100mL 尿)、氯仿(尿液加氯仿少许使其饱和,未溶的自行沉到瓶底,效果比甲苯好)、麝香草酚(1g/L 尿)、硼酸(2g/L 尿)、浓盐酸(1mL/100mL 尿)等。

三、组织样品

在生物化学实验中,常常利用离体组织研究各种物质代谢的途径与酶系的作用,也可以从组织提取各种代谢物质或酶进行研究。

但是生物组织离体过久,其所含物质的含量和生物活性都将发生变化。因此,利用离体组织作为提取材料或代谢研究材料时,应在冰冷条件下迅速取出所需组织,并尽快进行提取或测定。

一般采用断头法(或注射空气于动物心脏)处死动物,放出血液,立即取出实验所需之脏器或组织,去除外层的脂肪及结缔组织后,用冰冷的生理盐水洗去血液,必要时也可用冰冷的生理盐水灌注脏器以洗去血液,再用滤纸吸干。迅速称重后,根据实验的不同要求,用以

下不同的方法制成不同的组织样品。

(一)组织糜

将组织用剪刀迅速剪碎，或用绞肉机碎成糜状即可。处理过程中，应保持低温。组织剪成糜状后，大多数细胞仍保持完整，且组织已成碎块，可以加速代谢物质进出细胞的速度，有利于代谢反应的进行。故利用组织糜可观察完整细胞的代谢情况。

(二)组织匀浆

向剪碎的新鲜组织中加入适量冰冷的匀浆制备液，用高速电动匀浆器或玻璃匀浆器制成匀浆。常用的玻璃匀浆器有 5mL 和 10mL 两种，由一个磨砂玻璃套管和一个带有磨砂玻璃杵头的杵组成。玻璃杵的外壁必须紧靠玻璃套管的内壁，用时将套管放入冰浴中，玻璃杵与调速马达连接，将剪碎的组织悬浮于匀浆制备液中并倾入套管中后，再把玻璃杵插入套管中。开动马达并调节杵的转速，小心地用手扶住套管口部，不断上下移动，直至组织碎块磨成匀浆为止。若组织量较少时可用乳钵加少量海砂（经洗涤处理）研磨。

常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液或 0.25mol/L 蔗糖液等，可根据实验的不同要求加以选择。

(三)组织浸出液

将上法制成的组织匀浆加以离心或过滤，其上清液即为组织浸出液。浸出液中含有组织细胞中的各种可溶性物质及可溶性酶类，常用作个别酶或酶系统活性研究。

(杨光彩)

第三章 分光光度法及比色分析法

(Spectrophotometric methods and colorimetric methods)

一、基本原理

光是由光子组成的,光线也就是高速向前运动的光子流。它和其它电磁波一样,传播过程也呈波动性质,并且有波长和频率的特征。光子的能量有大有小,光子的能量越大,振动的频率也越高,而波长则越短。换言之,光子的能量与频率成正比,而与波长成反比。肉眼可见的光线称为可见光,它的波长范围是 400~760nm。不同波长的可见光线的颜色不同,随着波长的增大,光线可呈紫、蓝、绿、黄、橙到红等不同的颜色,波长小于 400nm 的光线称为紫外线,大于 760nm 的则称为红外线。

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(200~400nm)、可见(400~760nm)和红外(760~10000nm)波长范围内光的吸收分析法。分光光度法和比色分析法都是光吸收分析法,两者的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所不同。物质颜色与其所吸收的光颜色的关系见表 1-3-1。

表 1-3-1 物质颜色与其吸收的光的颜色关系表

物质颜色	吸 收 光	
	颜 色	波长范围(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	580~600
绿蓝	橙	600~650
蓝绿	红	650~750

许多化学物质的溶液具有颜色(无色化合物也可以加显色剂经反应生成有色物质),而且颜色的深浅与物质质量浓度呈正比,因此,可以用比较溶液颜色深浅的方法来测定有色溶液的质量浓度,这种方法叫做比色分析法。光电比色法用光电比色计进行测定,由滤光片来获得近似的单色光,滤光片的波长范围宽达 20~35nm 以上。分光光度计是利用棱镜或光栅来取得单色光的,其获得的单色光波长范围可达几个毫微米甚至更窄。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。同时由于棱镜或光栅分出的光更

接近于单色光,从而使溶液的光密度增加,这样可以大大减少其它具有光吸收的物质的干扰,因此分光光度法较一般比色法的灵敏度、准确度和选择性都要高。

(一) Lambert-Beer 定律

当一束单色光通过有色溶液时,入射光线的一部分被器皿反射回来,一部分被溶液吸收,另一部分则通过溶液,如图 1-3-1 所示。它们之间有以下关系:

$$I_o = I_a + I_r + I_t \quad (1)$$

式中 I_o 为入射光强度; I_a 为吸收光强度; I_r 为反射光强度; I_t 为透过光强度。

由于在实际测定时,所用的比色皿是同质料同规格的。反射光的强度为一定值,不会引起测量误差,所以反射光的影响可以不加考虑。故上式可简化为:

$$I_o = I_a + I_t \quad (2)$$

从式②可知:当入射光强度 I_o 为一定时,被吸收光强度 I_a 愈大,则透过光强度 I_t 愈小。也就是说:光强度的减弱仅与有色溶液对光线的吸收有关。那么,溶液对光线的吸收与哪些因素有关呢?实验证明:溶液的质量浓度 C 愈大,液层厚度 L 愈厚(即光线在溶液中所经过的路程愈长),则溶液对光线吸收得愈多。它们之间的关系由下式决定:

$$\lg \frac{I_o}{I_t} = KCL \quad (3)$$

这个公式就是 Lambert-Beer 定律。

(二) Lambert-Beer 定律的物理意义

(1) 公式中“ $\lg \frac{I_o}{I_t}$ ”的含义:

① 当 $I_t = I_o$ 时, $\lg \frac{I_o}{I_t} = 0$, 表示溶液完全不吸收光线, 即溶液为无色透明;

② 当 $I_t \ll I_o$ 时, $\lg \frac{I_o}{I_t}$ 值很大, 表示溶液对光线吸收较多, 即溶液颜色较深;

③ 当 $I_t = 0$ 时, $\lg \frac{I_o}{I_t}$ 为无穷大, 表示光线被溶液完全吸收, 即溶液完全不透光。

可见, $\lg \frac{I_o}{I_t}$ 表示了溶液对光线的吸收程度, 一般称它为“吸光度 (Absorbance), 用 A 表示或称为‘光密度’ (Optical density), 用 OD 或 D 表示也有称之为‘消光度或消光值’ (Extinction), 用 E 表示。前者系国际命名, 中间者为习惯用名, 后者为旧用名, 三者的意义相同。于是式③可改写为:

$$A = KCL \quad (4)$$

(2) 公式中的 K 称为吸光系数:

将式④移项可得: $K = \frac{A}{CL}$, 它表示有色溶液在单位质量浓度和单位厚度时的吸光度。在入射光的波长、溶液种类和温度一定的条件下, K 为定值。吸光系数是有色化合物的重要特性之一, 在比色分析中有重要意义。 K 值愈大, 表示该物质对光的吸收能力愈强, 质量

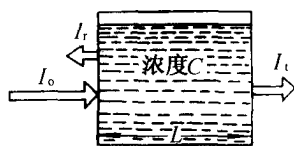


图 1-3-1 光的吸收示意图

浓度改变时引起吸光度的改变愈显著，因此比色测定时灵敏度愈高。

(3)在比色分析中,常把 $\frac{I_t}{I_0}$ 称为透光度,用 T 表示,即 $T = \frac{I_t}{I_0}$ 。透光度亦可用百分数表示,如 $T = 0.3$,可写为: $T = 30\%$;“ $100 \times T$ ”则称为百分透光度,如 $T = 0.3$,其百分透光度为: $100 \times 0.3 = 30$ 。于是式③可改写为:

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

或

$$A = -\lg T = KCL \quad (5)$$

式⑤说明,吸光度(或光密度)等于透光度的负对数。

应用 Lambert-Beer 定律时所用的符号与名称见表 1-3-2。

表 1-3-2 Lambert-Beer 定律所用的符号与名称

符 号	意 义	名 称	附 注
T	I_t/I_0	透光度	或称透光率,也称透射比
A	$\lg(I_0/I_t)$	吸光度	或称消光值(E),或称光密度(OD 或 D)
K	A/CL	吸光系数	C 的单位为克/升, L 的单位为厘米
ϵ	A/CL	摩尔吸光系数	C 的单位为摩尔/升, L 为厘米
E	A/CL	比吸光系数	C 的单位为% (W/V), L 为厘米

(三)计算

待测溶液的质量浓度可用下述方法求得。

1. 利用标准管计算测定物含量

假定有两个含有同种物质的有色溶液,其中一个已知质量浓度的标准溶液,另一个是待测溶液。根据公式⑤有:

在标准溶液中,

$$A_1 = K_1 C_1 L_1 \quad (6)$$

在待测溶液中,

$$A_2 = K_2 C_2 L_2 \quad (7)$$

将式⑥与式⑦比较,即式⑥除以式⑦可得:

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{K_1 C_1 L_1}{K_2 C_2 L_2}$$

如果上述两种溶液的液层厚度相等,温度相同而且是同一种物质的两种不同浓度的溶液,测定时所选用的单色光的波长亦相同,则有 $L_1 = L_2$ 、 $K_1 = K_2$,代入式⑧可得:

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

可见,在上述条件下,吸光度与质量浓度成正比。这一关系式是比色分析法的依据,也是比色分析的基本计算公式之一。式中标准溶液的质量浓度 C_1 为已知, A_1 和 A_2 可用光电比色计或分光光度计测量出来,则待测溶液的质量浓度 C_2 即可求出:

$$C_2 = \frac{A_2}{A_1} \times C_1$$

在实际测定时，通常标准溶液和待测溶液都要加以稀释，而在报告结果时多以 1000mL 中的质量浓度来表示。因此，在实际计算时需在上式中乘上稀释倍数。

2. 利用标准曲线求得测定物浓度

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，分别读取各管光密度，以各管光密度为纵坐标，各管浓度为横坐标，在方格坐标纸上作图得标准曲线。以后在条件相同的情况下进行测定时，就不需再作标准管，以测定管光密度从标准曲线上可求得测定物浓度。

一般认为，标准曲线范围以测定物浓度的一半到二倍之间，并使光密度在 0.05~1.0 范围为宜。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，否则尽管仪器型号相同，操作条件也完全一样，因不是同一台仪器，其结果仍可能会有一定误差。

3. 利用消光系数求取测定物浓度

消光系数的常用表示方法为摩尔消光系数 (ϵ)，即浓度以 mol/L 来表示的消光系数，实际上它就是当溶液浓度为 1mol/L，液层厚度为 1.0cm 时的光密度。

用消光系数计算浓度的公式是：

$$C = \frac{A}{\epsilon} (\text{mol/L})$$

不同物质，其摩尔消光系数各不相同。 ϵ 值愈大，说明该物质溶液对光吸收愈强，则比色测定的灵敏度愈高。

二、仪器基本结构

分光光度计及光电比色计的基本结构是由四个部分组成的：①光源；②单色光器；③吸收杯；④测光机构（即应用光电效应原理来测量光线强度）。

（一）光源

钨丝灯作为光源适用于测量可见光波长范围的光线，而测紫外线时则通常用充氢气或氙气的放电灯泡（氢弧灯或氙弧灯）。为了使发出的光线稳定，光源的供电需要由稳压电源或稳流电源供给。

（二）单色光器

分光光度计的单色光器（即分光系统）有棱镜及衍射光栅两种，通过这分光系统可根据需要选择一定波长范围的单色光，单色光的波长范围愈窄，测量的结果愈可靠。光电比色计所用的单色光器为仅能较好地透过一定波长范围的光线的滤光片（有颜色的玻璃片），因为它透过的光线光谱范围要比棱镜或光栅单色光器宽得多，所以光电比色计实际上就是比较粗糙的简易分光光度计，对比色分析来说一般还是可以得到满意的结果。

（三）吸收杯（比色杯，比色皿）

在可见光范围内选用玻璃吸收杯，而在紫外线范围内则要采用石英吸收杯。