

生化实验的基本技能

一、生化实验的基本操作

1. 玻璃仪器的洗涤

在生化实验中，玻璃仪器清洁与否是获得准确结果的重要一环。清洁的玻璃仪器内壁应十分明亮光洁，无水珠附着在玻壁上。下面介绍一些常用的洗涤方法

(1) 一般仪器，例如烧杯，试管等可用肥皂、合成洗涤剂、去污粉等以毛刷仔细刷洗后，再用自来水冲干净。最后用少量蒸馏水冲洗 2~3 次，倒置晾干或置烤箱烤干后备用。

(2) 容量分析仪器如吸量管、容量瓶、滴定管等不能用毛刷刷洗，可在用毕后，即用自来水冲洗，直至不挂水珠，再用少量蒸馏水冲洗 2~3 次即可备用。若冲洗后的仪器仍挂水珠，则应将其沥干后，再用重铬酸钾洗液浸泡 4~6 小时，然后用自来水冲洗干净，再用少量蒸馏水冲洗 2~3 次。

(3) 粘附有血浆的刻度吸量管，可先用 45% 尿素溶液浸泡，使血浆蛋白溶解，然后用自来水冲洗干净。如尚不能达到清洁要求，则可浸泡于重铬酸钾洗液中 4~6 小时，再用大量自来水冲洗。最后用蒸馏水冲洗 2~3 次。也可用 1% 氨水浸泡，使血浆溶解，然后再依次用 1% 稀盐酸溶液、水、蒸馏水冲洗。

(4) 新购置的玻璃仪器有游离碱存在，须置 1%~2% 稀盐酸中浸泡 2~6 小时 除去游离碱质，再用自来水冲洗干净。最后用蒸馏水冲洗 2~3 次。

(5) 使用重铬酸钾洗液时应注意以下几点：需用重铬酸钾洗液（以下简称洗液）浸泡的容器，在浸泡前应尽量沥干，再用洗液浸泡。否则洗液被稀释而降低洗液的氧化力，甚至失效。② Hg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 等离子能与重铬酸钾洗液作用，可生成不溶性的化合物而沉积在容器壁上，因此凡接触过含有此等离子的容器，应先除去这些离子（可用稀硝酸或 5%~10% EDTA 钠等先行清除），用水冲洗后、沥干，再用洗液浸泡。③ 有机化合物、油类、有机溶剂均可使洗液还原失效，因此容器壁上如附有大量油类、有机物等，应先除去，然后再用洗液浸泡。洗液有很强的酸性和氧化性，使用时应注意千万不要滴落在皮肤或衣物上，以免被烧伤或烧坏。重铬酸还原为硫酸铬时，洗液由原来的深棕色变为绿色，此时洗液就不具有氧化性了，不能继续使用。

2. 吸量管的使用

吸量管是用来转移一定体积溶液的量器，生化实验中常用的吸量管有三种。如图 1。

(1) 刻度吸量管：刻度吸量管有刻度刻到尖端的及不刻到尖端的两种。使用前要仔细辨认。如使用刻度刻到尖端者，将液体放出后，应吹出最后留在管内的少量液体。

(2) 移液吸量管：一般只在上端有一个刻度，将所量取的液体放出后，只需将吸量管的尖端触及受器壁约半分钟即可，不得吹出尖端的液体。有的移液管在下端狭窄处也有一刻度线，则两刻度线间的体积才代表该移液管上所注明的体积。

(3) 奥氏吸量管：准确度最高，使用时必须吹出留在尖端的液体。

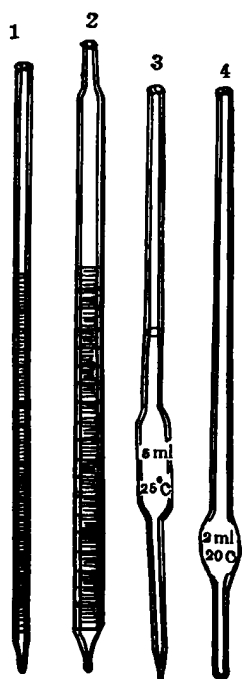


图 1 各种吸量管

1,2.刻度吸量管；3.移液吸量管；4.奥氏吸量管

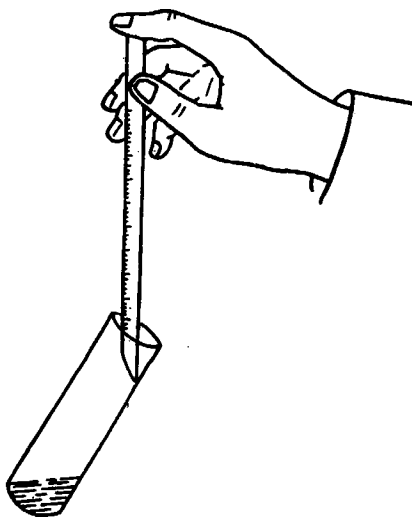


图 2 使用吸量管的姿势

正确的使用方法：使用吸量管时先要看清楚刻度情况，选择适当容量的吸量管（等于或略大于需要的 ml 数）。拿吸量管时，标有刻度的一面要向着自己侧，以便于读取刻度。用右手中指和拇指拿住吸量管上部，把管的尖端插入要取的液体中。左手持洗耳球把容器内液体吸至刻度上方时，立即用右手食指按住吸量管管口，以稳住吸量管内的液面。提起吸量管离开容器，用滤纸片擦干吸量管外壁所沾液体，再以管尖端接触容器内壁，慢慢放松食指，使吸量管内液面的月弯面的最低点下降至所需的刻度处，（眼睛与刻度线要处于同一水平面上）立即用食指堵紧。然后将吸量管插到需加液体的容器中，让其尖端与容器内壁靠紧，松开食指让液体流出。液体流完后再等 15 秒钟，捻动一下吸量管后移去。（如需吹的吸量管，则吹出尖端的液体后再捻转一下吸量管移去）。吸量管的正确持法见图 2。

定量吸（移）液器的使用：定量吸液器是吸量管的革新产品。由塑料制成。它具有使用方便、取、加样迅速、计量准确、不易破损、能吸取多种样品（只换吸嘴即可）、定量吸液器有二种类型：①固定式：只能取加一定容量，不能调节。其规格有 10 μ l、20 μ l、25 μ l、30 μ l、50 μ l、100 μ l、200 μ l、250 μ l、300 μ l、400 μ l、500 μ l、1000 μ l 等。②可调式：在一定容量范围内可根据需要调节取、加量。例如 0~200 μ l 等。

定量吸液器的结构如图 3。

使用方法：吸液前先把吸嘴套在吸引管上，套上后要轻轻地旋紧一下，以保证接合严密。持法如图 4。用大拇指按下按钮到第一停止点，以排出一定容积空气，此时已可吸液。吸液时把吸嘴尖浸入取样液内几 mm 处，徐徐松开大拇指，让按钮慢慢自行复原，即完成取样。

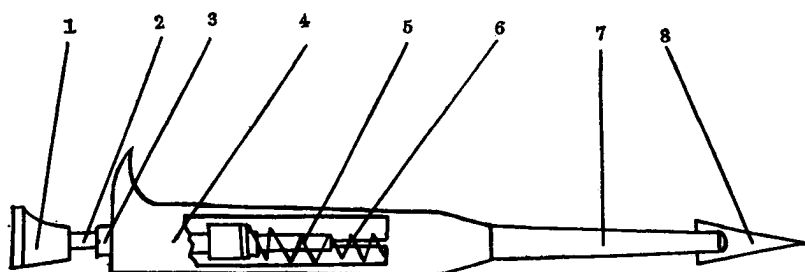


图3 定量吸移液器的结构

1.按钮 2.推杆 3.压盘 4.外壳 5.柱塞 6.弹簧 7.吸引管 8.吸嘴

排液，将吸液器的吸嘴尖置于加样容器壁上，用拇指慢慢地将按钮按下到第一停止点，停留1秒钟（粘性较高的溶液停留时间长些）。然后把按钮按到第二停止点，再让吸嘴沿着容器壁向上滑动。当吸嘴尖与容器壁或溶液不接触时释放按钮，使其返回到初始位置。

3. 溶液的混匀

欲使一反应充分进行，必须使反应体系内各种物质分子很好地互相接触。因此，每加一种试剂后，都必须充分混匀。当溶液稀释时，亦需充分混匀，才能获得浓度均一的溶液。

混匀的方法通常有以下几种：

- （1）使盛器作离心运动。
- （2）左手持试管上端，以右手手指轻击试管下半部，使管内溶液作旋转运动。
- （3）利用旋涡混合器混匀。
- （4）不得已时可用干燥清洁的玻璃棒搅匀。

无论用何种方法混匀，均需防止盛器内液体溅出或被污染，严禁用手指堵塞管口或瓶口震荡混匀。

4. 溶液的过滤

为了要将液体中的固体微粒与液体分离，我们常采用过滤的方法。过滤有普通过滤、减压过滤及保温过滤等。在此仅介绍普通过滤。

过滤前的准备：取一张圆形的滤纸，对折两次，打开（一边为三层，一边为一层）得一圆锥体，把它放入干燥的漏斗中。漏斗的边缘要比滤纸边缘高出大约0.5~1 cm。漏斗壁与滤纸应完全密合。可用欲过滤的液体润湿一下滤纸，并用玻璃棒小心地按压滤纸，使滤纸各处紧密地贴在漏斗壁上。特别注意把滤纸的双摺部分按平，不要让其留有气泡，否则过滤时就会被冲开。

过滤时漏斗必须放正，它的边缘应处于水平面上。漏斗下部的尖端应与接受溶液的容器的内壁接触，这样可避免溶液流下时跳溅。向漏斗内倾注液体时，用一只手拿着玻璃棒（通常是左手），让玻璃棒差不多与滤纸垂直。液体一定要顺着玻璃棒往下流。液体最多允许加到距滤纸边缘5 mm处，液体加得过高，沉淀物则会随溶液浮起沾附于漏斗壁而混入滤液中。向漏斗内加完液体后，要把盛有待滤液体的容器沿着玻璃棒向上滑动一下，以免待滤液体流到容器外面。

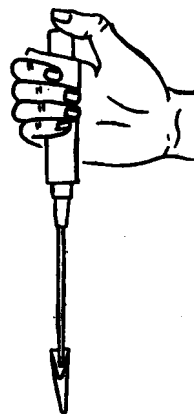


图4 吸移液器的持法

5. 离心机的使用

离心法也是分离沉淀物的一种方法。它是利用离心机转动的离心力，使比重较重的沉淀物沉积在管底部，以达到分离的目的。其上层液体称为上清液。

电动离心机的使用方法：

(1) 将待离心的液体置于离心管或小试管中，并检查离心管（或小试管）的大小与离心机的套管是否相匹配。

(2) 取出离心机中的全部套管，并检查底部是否铺好软垫，套管底部有无碎玻片或漏孔（有碎玻片必须取出，漏孔应用蜡封住）。检查合格后，将盛有离心液的两离心管分别放入套管中，然后连套管一起分置于粗天平两侧，通过往离心管与套管之间滴加水来调节两边重量使之达到平衡。

(3) 将已平衡的两只装有离心管的套管分别放入离心机相互对应的两插孔内。盖上离心机盖。打开电源开关。逐步扭动转速旋钮，缓慢增加离心机转速，直至所需的转速。达到离心所需的时间后，将转速旋钮逐步回零，关了电源，让离心机自然停止转动后（注意不可强迫停转）取出离心管。

6 滴定管的使用

滴定管是容量分析中最基本的一种量器，一般常用的滴定管的容量为 25 ml、50 ml 等。

滴定管有两种：碱式滴定管（即下端装有橡皮管的），此种滴定管一般装碱液及不与橡皮起作用的溶液，如 KCN 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 等。酸式滴定管（其下端为玻璃活塞者），此种滴定管一般盛酸及氧化性物质的溶液，以及会与橡皮起作用的溶液，如 KMnO_4 、 I_2 等。

滴定管的使用方法：

(1) 滴定管在使用前都必须洗净。滴定管的洗涤一般用洗液，也可用热肥皂或 Na_2CO_3 溶液洗涤，再用自来水冲洗，然后再用蒸馏水冲洗 2~3 次。

(2) 滴定管在使用前须检查其是否漏水，且转动是否灵活，否则要重新进行安装。安装方法为：先把滴定管的玻璃活塞拔出，用滤纸将活塞内外擦干，然后在活塞小孔的两旁抹上薄薄的一层凡士林。凡士林用量要适宜，不宜过多，以免将孔塞住，并且凡士林要涂得均匀。安装好后，再用橡皮圈将其扎好。

(3) 在装溶液之前，需用少量溶液刷洗滴定管内壁 2 次（每次约 10 ml 左右）。溶液应从试剂瓶直接倒入滴定管。装溶液于滴定管内时要高于零点，然后再放至零点。要注意滴定管尖端处不能留有气泡。如有气泡，则必须排除。排除气泡的方法为：若为酸式滴定管，可让溶液急流过尖端。若为橡皮头的碱式滴定管，则可用手指挤捏橡皮管中的玻璃小球，并将尖端稍向上倾斜，即可排出气泡。

(4) 每次滴定必须从零点开始，这样可以得到较好的精密度。滴定管装置务必垂直。

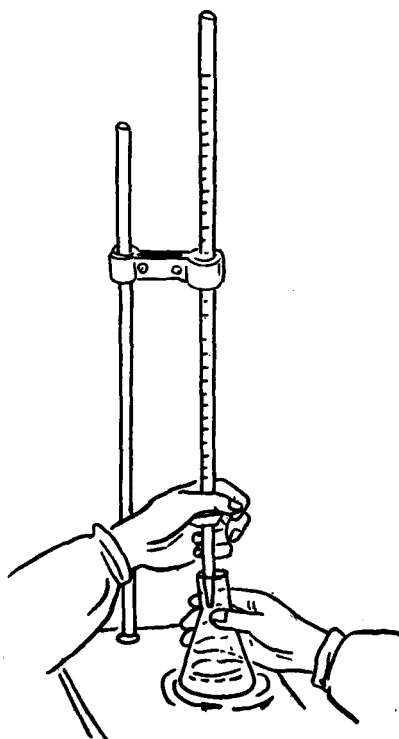


图 5 滴定的姿势

(5) 滴定时的正确姿势如图 5。活塞在右侧,用左手的食、中、拇三指扭转活塞。右手拿锥形瓶时时震摇,而震摇须向一个方向转动,不得左右摇动。在滴定时,溶液从管内滴下的速度在开始可稍快(但不得快于每秒 3~4 滴),当接近终点前的 2~3 ml,滴的速度应放慢,并时时观察终点的改变。

(6) 滴定完毕后,必须待 1~2 分钟后再读刻度读数。读刻度时手指不要接触滴定管,通常将白纸片放在管后,以便观察。溶液在滴定管内的液面呈弯月形,读数时应读取与弯月面相切之点。

(7) 滴定完毕之后,滴定管内的溶液不得倒回原试剂瓶内。倒掉滴定管内溶液,并立刻洗涤清洁后,倒置于滴定管架上,以备下次再用。

二、天平的使用

【原理】

称量是生物化学实验的基本操作方法。实验室常用的称量仪器是台式天平、扭力天平和分析天平等。它们都是根据杠杆原理设计而成的。一般来说,台式天平的感量为 0.1 g;扭力天平的感量为 0.01 g;而分析天平的感量为 0.0001 g。根据对称量的准确度要求不同选用不同类型的天平,这样既能达到实验对准确度的要求,又能节省称量时间,减少不必要的烦琐,也延长分析天平的寿命。

台式天平的结构见图 6。

分析天平根据其称量的灵敏度和准确度,

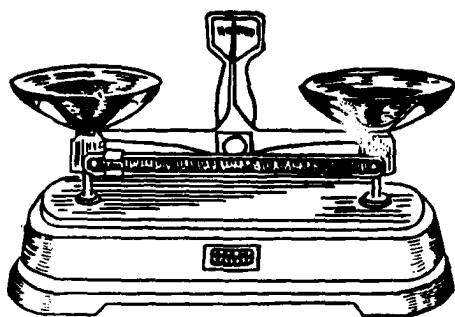


图 6 台式天平

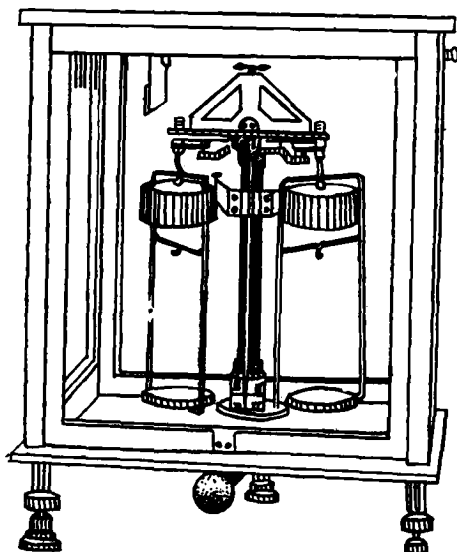


图 7 空气阻尼天平

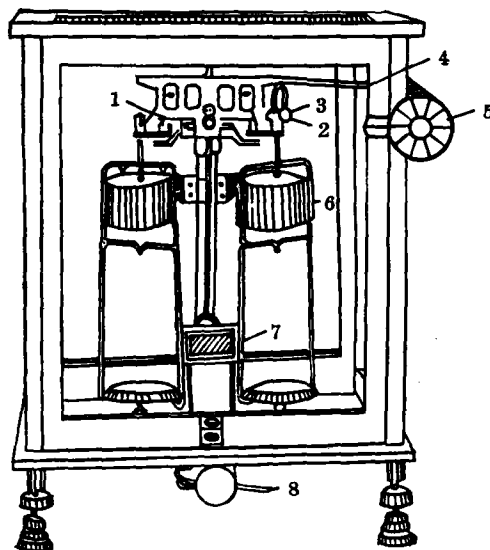


图 8 部分机械加码双盘电光天平

1.天平横梁; 2.骑放环码横杆; 3.环码; 4.5.加放环码的旋转器; 6.空气阻尼器; 7.光幕 8.微调零

可分为不同的等级与型号。下面介绍阻尼天平 and 电光天平的构造。见图 7 和图 8。

一般普通分析天平的主要部件是铝合金制成的三角形梁，梁的中间固定着一个玛瑙三棱柱，刀口向下，它架在一块玛瑙平板上。在梁的两端有两个相同的玛瑙三棱柱，刀口向上，两个挂钩分别架在上面，称盘就挂在这个挂钩上。天平的灵敏性和玛瑙三棱柱刀口的锐利程度以及玛瑙平板的光滑情况有极大的关系。为了保护玛瑙、三棱柱刀口和玛瑙平板，分析天平装有旋钮控制的升降枢，在不使用天平或称物加减砝码时，都要旋好升降枢钮，把天平梁托起，使玛瑙三棱柱和玛瑙平板分开，避免它们的磨损。

在天平梁上面的前端装有一个游码标尺，其中间刻度为零，正好处于天平的支点位置上，游码的重量为 10mg ，游码标尺左右两端刻度各为 10 ，每一大格相当于 1mg 每一大格又等分为 10 小格，每一小格相当于 0.1mg 当游码放在 5 上时 相当于加上一个 5mg 的砝码。

空气阻尼天平具有两个空气制摆装置，称阻尼器。由于阻尼器的作用使天平的指针在摆动两三次后很快地停止在平衡点上。阻尼天平一般能称准 $0.1\sim 0.2\text{mg}$ ，最大称量为 100g 或 200g 。每台阻尼天平都有一盒砝码与天平配套使用。

电光天平是在阻尼天平的基础上改进而成的，但增加两个装置，一是机械加砝码装置，二是光学读数装置。砝码由旋转器 5 操纵自动加取，大小砝码全部由旋转器操纵的称为全自动电光分析天平； 1g 以下的砝码由旋转器操纵的称为半自动电光分析天平。在光幕上能直接读出 10mg 以下的重量。电光分析天平一般准确称量至 0.1mg 最大称量为 100g 或 200g 。

【操作】

1. 台式天平的使用方法

(1) 使用前需先把游码放在刻度尺的零处，检查天平的摆动是否平衡。如果平衡，则指针摆动时所指示的标尺上的左右格数应相等，当指针静止时应指在标尺的中线。如果不平衡，可以调节螺旋，使之平衡。未载重天平的平衡点称“零点”。

(2) 称重时，将要称量的物品放在左盘内，然后在右盘内添加砝码。砝码通常以大的加起，如果偏重，就调换小的砝码， 10g 以下的砝码用游码代替，移动游码位置直至天平平衡为止，载重天平的平衡点称“停点”。这时砝码和游码所示的质量就是称量物的质量。

(3) 称固体药品时，应在两盘内各放一张质量相均衡的蜡光纸，然后用药匙将药品放在左盘的纸上，如称 NaOH 、 KOH 等易潮解或具有腐蚀性的固体时，应衬以表面皿。称液体药品时，要用已称过质量的容器盛放药品，称法同前。

2. 分析天平的使用方法

(1) 零点的测定：每次称量前首先要测定其零点，即天平在不载重的情况下处于平衡状态时指针在读数标尺上所指的位置。

阻尼天平零点测定：慢慢地旋动旋钮，开动天平，待天平停止摆动后，观察并记录指针在标牌上所处的格数，读至小数点后一位（如 9.7 ）。然后缓缓地关上天平，再测定一次，其变动应不大。为了便于称量，零点最好恰在正中 10 处（有的天平标尺中间为 0 则零点最好在 0 处），如差别太大可以轻轻地旋动天平调节螺丝。

电光天平零点测定：接通电源，慢慢地旋动旋钮，在天平不载重的情况下，检查光幕标尺位置，如零点与光幕上的标线不重合，可拨动微调零，挪动一下光幕的位置使其重合，若相差较大时，则可旋动平衡螺丝以调节空盘零点的位置。

(2) 物体的称量：可直接称量，即先称取空称量瓶的重量，再将要称的样品放入称量瓶内，再称取重量，以后者重量减去前者即为样品实重。也可用减重法称量，即先称取盛有样品的称量瓶的重量，而后从称量瓶中取出部分样品，再称取称量瓶的重量，以前者的重量减去后者的重量就是样品的实重。

称量方法：一般先将称量物体放在台式天平中称其粗略量，然后置于分析天平左盘中央，右盘加上粗略量砝码，关好侧门，小心放下升降枢，观察天平梁上指针的移动方向，如果指针向右偏移，这就表示所用砝码太轻，应升起升降枢，架稳天平梁，然后在右盘上增加一个砝码，再放下升降枢。如果这次指针向左偏斜，表示已加砝码重了些，此时再架稳天平梁，取下前面所加的砝码放回砝码盒中原来的位置内，换上稍轻的砝码，如此依照砝码由大到小的顺序，直至加入砝码已接近物品的重量。当调节到相差 10 mg 砝码而仍造成过重或过轻的情况下，那就要用游码来调节。调节时可把游码在由小到大的刻度标尺位置上顺次移动，直到指针在天平载重的停点和天平不载重时零点相一致为止。这样盘中砝码和游码的总重量就是被称物品的重量。若用全自动电光天平，则大小砝码全部可由旋转器操纵。半自动电光天平 1 g 以下的砝码由旋转器操纵， 10mg 以下的尾数可全部从光幕上读出。其他方法同上。

(3) 记录结果：若用阻尼天平，应先从砝码盒中的空位置及游码所在的位置，由大至小依次记录其重量，然后将砝码依次放回砝码盒时再核对一遍。若用电光天平，同样可先从砝码盒中的空位置由大至小依次记录其重量，同时还要记录旋转器所指的数字，然后将砝码依次放回砝码盒的原来位置中，将旋转器回复零点，并再一次核对所记录的数字。

【注意事项】

(1) 不得将称量的化学试剂直接放在天平盘上。

(2) 过冷过热的物品都不能在天平上称量（会使水汽凝集在物品上，或引起天平箱内空气对流，影响准确称量）。凡经过干燥或烧灼的物品，必须先放在干燥器内在天平室中冷却至室温后方可称量。

(3) 称量能吸收或放出水分和其他挥发性物品时，必须放在严密盖好的称量瓶中，以尽快速度进行称量。

(4) 无论取放砝码或称量的物品时，都必须关好升降枢钮，使天平梁升起固定，否则会使吊耳或横梁掉落或移位，损坏玛瑙刀口。

(5) 天平各部尽可能不要用手接触，如必须接触时（旋转调节螺丝等），应将手指擦干净，最好是戴手套或手指套进行。

(6) 砝码只能放在天平盘和砝码盒内，不得任意放在其他地方。

(7) 取放物品和砝码时，利用天平两侧的门，读数时，一定要关上天平的门。天平正面的门是为了装卸、修理和清扫天平内部时使用，称量时不要开动。

(8) 保持干燥，天平箱内放有硅胶吸潮，并应及时烘烤除水，保证其吸潮性能。

三、pH 计的使用

【原理】

pH 计是根据电位法测量原理设计的。在实际应用中既可测量各种水溶液的酸度，也能

配以离子性电极来测量溶液中各种离子的活度或浓度。根据结构原理和读数方式不同，pH计可分为直读式和补偿式两类。目前国产pH计大多为直读式。雷磁25型就属于此类型，其结构简单，读数方便，为实验室常用pH计。

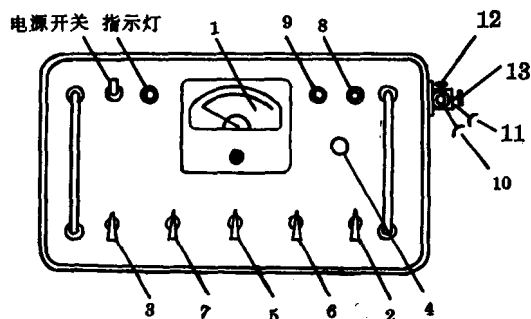


图9 雷磁25型酸度计

1. 指示电表 2. 零点调节器 3. 定位调节器 4. 读数开关
5. pH—mV 开关 6. 量程选择开关 7. 温度补偿器 8. 玻璃电极插孔 9. 参比电极接线柱 10. 大电极夹 11. 小电极夹 12. 螺丝（紧固电极夹） 13. 螺丝（紧固电极器）

【操作】

1. 安装电极

把甘汞电极的金属帽夹在大电极夹“10”上，由于甘汞电极的帽子是金属的，省去了电极与“9”的连接线，因为实际上电极夹与“9”在仪器内都是通的。玻璃电极的塑料帽夹在小电极夹“11”上，玻璃电极的插头全部插在插孔“8”内，用插孔上的小螺丝固定紧。电极的高度可以利用电极夹上的支头螺丝任意调节。

2. 用已知pH值的缓冲液进行校正

- (1) 接通电源（220 V±10%）打开电源开关，指示灯亮，预热10分钟。
- (2) 将pH—mV开关“5”转至pH位置。
- (3) 将适当之标准缓冲溶液注入小烧杯内，调节支头螺丝使玻璃电极与甘汞电极的毛细管全部浸入溶液中，并轻轻摇动烧杯使溶液均匀。
- (4) 转动温度补偿器“7”的旋钮至溶液温度的位置。
- (5) 根据标准缓冲溶液pH值的大小，将量程选择开关“6”转至该pH值的范围内（0~7或7~14）。
- (6) 调节零点调节器“2”，使指针位于pH 7处。
- (7) 按下读数开关“4”，调整定位器“3”使指针指在标准缓冲液的pH值上。放松读数开关“4”，指针即回到pH 7处。如有变化，可调节零点调节器“2”，使指针指到pH 7上。然后重复前一操作步骤。仪器经校正定位以后，不应再触动定位调节器。
- (8) 校正结束后，用蒸馏水将电极小心冲净，并用滤纸吸去水珠。

3. 测pH值

- (1) 用样品液将电极冲洗2~3次，再将电极插入样品液中，轻轻混匀烧杯中溶液。
- (2) 调节温度补偿器“7”使与被测溶液的温度一致。

(3) 注意指针零点是否在 pH 7 上, 否则应调节零点。

(4) 按下读数开关“4”, 指针所指读数即为样品液的 pH 值。如指针超出刻度范围, 应转换量程开关“6”并重复前面两步操作步骤。

(5) 测量完毕 放开读数开关 关掉电源 取出电极 用蒸馏水冲洗干净 用滤纸吸去水珠 甘汞电极戴上胶套。

【注意事项】

(1) 玻璃电极的主要部分为下端的一个玻璃泡, 此泡为一层较薄的特种玻璃制成, 切忌与硬物接触, 一旦发生破裂, 则电极完全失去其测量作用。

(2) 在初次使用时, 应把玻璃电极球泡先置于蒸馏水中浸泡数小时至一昼夜, 以稳定其不对称电位。不用时也最好把它置于蒸馏水中, 以便下次使用时, 可简化浸泡手续。

(3) 电极插头上的有机玻璃管具有优良的绝缘性能, 切忌与化学药品或油污接触, 否则将影响转换系数。

(4) 在测强碱溶液时, 应尽快操作, 测定完后, 立即用水洗净, 以免强碱溶液的腐蚀。

(5) 甘汞电极在使用时应注意使氯化钾溶液浸没内部小玻璃管的下口, 在弯管内不许有气泡将溶液隔断。电极的下端为一塞有石棉丝的毛细孔。在测量时, 允许有少量氯化钾溶液流出, 但决不许有被测溶液流入, 因为如有其他溶液流入将影响其读数的重现性, 致使测定结果不准确。

(6) 在不用时, 可用橡皮套将下端毛细孔套住, 或浸在饱和的氯化钾溶液中, 但不能与玻璃电极同时浸在蒸馏水中。

四、比色分析法及 721 型分光光度计的使用

重量分析法和容量分析法往往不能测定极微量的物质, 而比色分析法则能胜任。此外, 比色分析法操作过程亦较简便, 所以它是生物化学实验中最常用的一种定量方法, 也是目前临床生化检验中常用的定量方法。

【原理】

比色分析法是通过比较有色物质溶液颜色的深浅, 来测知该物质浓度的方法。有些被检测的物质溶液本身就具有颜色, 而有些物质虽不具有颜色, 但可于试样中加入某种适宜的试剂, 使其产生有色化合物。其颜色的深浅与试样中该化学成分的含量成正比。借助于光电比色计或分光光度计将未知含量的有色溶液与已知含量的有色标准溶液进行比色, 通过计算就可求出未知溶液的含量。其基本原理即根据 Lambert 定律和 Beer 定律, 比色分析法的计算公式亦根据此二定律推导而得。

Lambert 定律: 一束单色光线通过一有色溶液后, 由于溶液吸收了一部分光, 所以光线的强度就要减弱。当溶液浓度(c)不变时, 光透过的液层愈厚, 则光线强度的减弱就愈显著。见图 10,

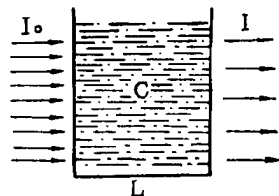


图 10 光的吸收示意图

若 I_0 = 光线通过溶液前的强度 (入射光强度)

I = 光线通过溶液后的强度 (透过光强度)

L = 溶液的厚度

而 $\frac{I}{I_0}$ 表示光线透过溶液的程度, 称为透光度用 T 表示。则 $T = \frac{I}{I_0}$

Lambert 定律证明, $-\lg \frac{I}{I_0} \propto L$, 即 $-\lg T \propto L$

写成等式为 $-\lg \frac{I}{I_0} = K_1 L$

$-\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I}$, 故上式可写成 $\lg \frac{I_0}{I} = KL$

令 $\lg \frac{I_0}{I}$ 为吸光度 (A), 或称为消光度 (E), 或称光密度 (OD 或 D), 所以 $A = K_1 L$

.....(1)

由 (1) 式可知, 当溶液的浓度不变, 溶液的吸光度 A 与溶液液层的厚度成正比 这就是 Lambert 定律。

上式中的 K_1 为常数, 其数值与入射光的波长和溶液的性质有关。

Beer 定律: 一束单色光线通过一有色溶液后, 若溶液的厚度不变, 其透过光的强度与溶液的浓度 (C) 有关, 溶液的浓度愈大, 则透过光的强度愈弱, 它们的关系为:

$$-\lg \frac{I}{I_0} \propto C, \quad -\lg \frac{I}{I_0} = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I} = A$$

故 $A \propto C$ 写成等式为 $A = K_2 C$(2)

K_2 亦是常数, 其数值随入射光的波长和溶液的性质而改变。

合并上述 (1), (2) 两式, 得 $A = KCL$(3)

这就是 Lambert-Beer 定律。即溶液的吸光度与溶液的浓度和液层厚度的乘积成正比。

在比色分析中, 在相同条件下对两个性质相同而浓度不同的溶液进行测定, 一个为已知浓度的标准溶液, 一个为未知浓度的溶液。

设 C_1 为标准溶液的浓度

C_2 为未知液的浓度

A_1 为测得的标准液的吸光度

A_2 为测得的未知液的吸光度

按 (3) 式 则 $A_1 = KC_1 L_1$; $A_2 = KC_2 L_2$

$$\text{移项得 } \frac{A_1}{C_1} = KL_1; \quad \frac{A_2}{C_2} = KL_2$$

在使用光电比色计或分光光度计时, 溶液放在固定的比色杯中进行比色, 故 $L_1 = L_2$ 又因是同一种溶液, K 值相同 上两式的左侧相等 故

$$\frac{A_1}{C_1} = \frac{A_2}{C_2} \quad \text{移项得 } C_2 = \frac{A_2}{A_1} \times C_1 \text{.....(4)}$$

(4) 式是比色分析中常用的重要公式, 只要再乘以样品的稀释倍数, 就可求得该物质的含量。在以后的实验中要经常用到它, 须牢记。

【光电比色计的结构与使用方法】

1. 仪器简介

光电比色计种类较多，一般由光源、滤光片、比色皿、光电池、检流计等组成。现以国产581型光电比色计为例介绍仪器的组成结构。见图11。

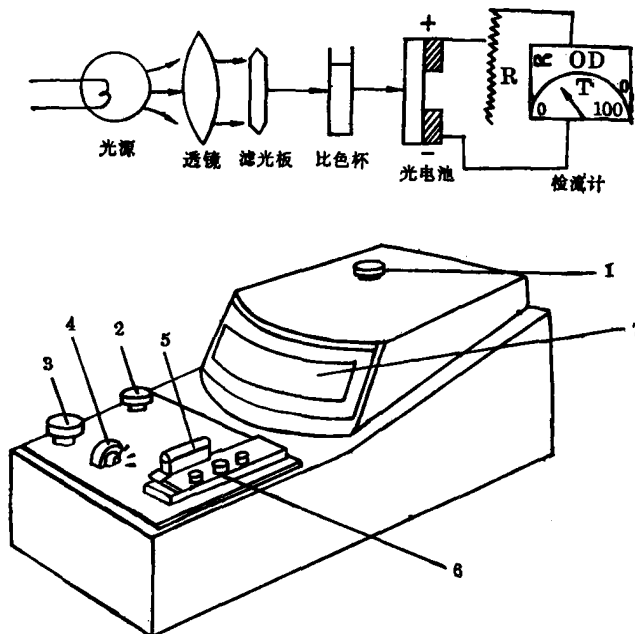


图 11 光电比色计结构模式图与仪器图

1. 仪器零点调节器； 2. 粗调节器； 3. 细调节器， 4. 开关（有0,1,2三档）； 5. 滤光片 6 比色杯槽， 7. 刻度（上为 T，下为 A）

（1）光源：一个好的光源要求具备发光强度高、光亮、稳定、光谱范围较宽和使用寿命长等特点，一般比色计上用 6~8V 的灯泡，使照射到光电池上的强度适中。

（2）滤光片：测定溶液物质种类不同，对光线有不同的吸收作用，一种物质仅对某一种波长的光线具有最大吸收能力，利用这最大吸收的光来测定该物质的浓度最为灵敏。这最大吸收光的颜色就是溶液颜色的互补色。所以滤光片选择的原则即选溶液的互补色。

互补色表中各颜色均编有号码，每相隔 5 个号的二色为互补色

互 补 色 表

颜 色	紫	蓝	绿	蓝	绿	黄	绿	黄	橙	橙	红	紫	红
号 码	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

用法列举如下：

需要比色的溶液颜色			应选择滤光片的颜色	
蓝	色	2号	2+5=7号	即黄橙色
红	色	9号	9+5=14	即4号蓝绿色
绿	色	5号	5+5=10号	即紫红色

而 581 型光电比色计只备有三片，它的用法见下表：

滤光片的颜色		适用溶液的颜色
蓝色	波长 425 nm	红、淡红、橙黄
绿色	波长 525 nm	青紫、红紫
红色	波长 650 nm	蓝、青、紫红、紫绿

(3) 比色皿：是用来盛放测定溶液的器皿，其进光面和出光面为光学玻璃制成，以尽量减少光的散射，且厚薄一致。使用时要主意其清洁和防止其磨损以影响光的透过。所以在拿取比色皿时不能拿取比色皿的透光面。用后要及时先用水冲洗，再用蒸馏水冲洗后将其倒置于滤纸上晾干，以备下次使用。比色皿不能用毛刷洗刷，以免使玻璃发毛，影响透光度。

(4) 光电池：多为硒光电池，光线照射在硒光电池表面后，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的波长范围，一般为 400~650 nm 之间。对红外线和紫外线都不敏感。由光电池出来的光电流不易放大。光电池有疲劳现象，因此，比色计使用时应使其光电池受照射的时间尽可能短一些。

(5) 检流计：为悬丝式检流计，较为灵敏，应避免震动。

2. 581 型光电比色计的使用方法

(1) 取比色皿 3 支 小心使用 切勿损坏) 分别加入空白液、测定液和标准液至比色皿的 3/4 高度处。

(2) 将空白比色皿和标准液比色皿分别放入比色皿滑动槽的两个孔内，并将空白比色皿对准光路。用遮光盖盖好，以免其他光源影响。

(3) 将选择好的滤光片插入滤光片槽“5”中。

(4) 接电源，转动开关“4”到 1 档处，此时电表上的浮标明亮，表示电源已通，转动仪器零点调节器“1”，使浮标中的指针恰指在透光度（即上一排刻度）的 0 度上，0 点校正后不必时常检查，但每逢比色计搬动位置时，必须重新校正。

(5) 先将粗调节器“2”逆时针方向旋转到底，使电阻最大，再将开关“4”转到 2 档处，用粗调节器“2”将指针调节至透光度 100 度左右，再用细调节器“3”使指针恰指到透光度 100 度处（即吸光度为 0）。

(6) 轻推滑动槽，使盛标准液的比色皿对准光路，读出其吸光度 A_1 ，再将空白管推回对准光路，此时指针应恰回到吸光度为 0 处 如不在 0 处，调整之，重新再读取 A_1 。

(7) 将开关“4”转回 1 档处（不在读数时，开关“4”不要留在 2 档处，否则光电池受照射时间太久，其灵敏度会降低）。

(8) 取出标准管，换上未知管，把开关“4”开到 2 档处并按操作“6”读取 A_x 。

【721 型分光光度计的结构与使用方法】

1. 仪器简介

721 型分光光度计的设计原理及仪器的外形如图 12。

分光光度计的基本原理与光电比色计的基本原理相同。所不同之处，一是以棱镜和光栅来代替滤光片，这样可在 420~700 nm 波长范围内任意选择测定所需的波长，并且可以得到很狭的波长范围的光（接近单色光），这样就提高了仪器的灵敏度，使测定的结果更精确。二是以真空光电管或光电倍增管替代了硒光电池，并应用放大装置以提高灵敏度。

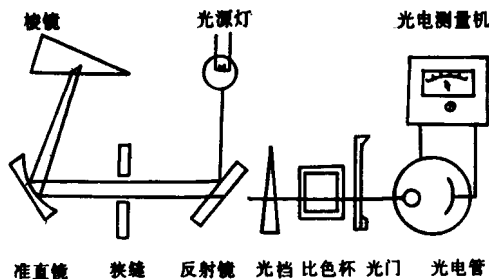


图 12 721 型分光光度计原理图及仪器图

1. 波长选择钮；2. “0”电位钮；3. “100”电位钮；
4. 比色杯拉杆；5. 灵敏选择钮；6. 电源开关；
7. 电源指示灯；8. 暗箱盖；9. 读数表；10. 波长读数窗

2. 721 型分光光度计的使用方法

(1) 使用前应检查仪器各部件是否正常，各旋钮应位于起始位置。

(2) 检查电源电压是否与仪器要求相符。

(3) 接通电源，打开比色槽暗箱盖“8”，调节 0 电位钮，使电表指针位于透光度 (T) 于 0 处 预热 10 分钟。

(4) 旋动波长选择钮“1”选择适当波长。用灵敏选择钮“5”选择相应的放大灵敏度（灵敏度选择钮先调 1 档 如调不到 0 则再逐步增加高档）

(5) 取三只比色杯，分别装入空白液，标准液和测定液，依次放入比色槽内。

(6) 盖上比色槽盖，将空白管置于光路上，调节 100 电位钮“3”使指针指到透光度为 100 处。

(7) 打开比色槽盖，使指针回到 0 位，再盖上比色槽盖看指针是否到 100 位处。如调节好后 此“2”、“3”二钮就不可再随意转动。

(8) 拉动比色杯拉杆“4”，依次将标准液和测定液对准光路，分别读出吸光度数。

(9) 使用完毕后，将“2”、“3”二钮恢复到起始位，切断电源。

(10) 清洗比色杯，倒置于滤纸上晾干，以供下次使用。

【操作练习】

(1) 将波长选择钮“1”置于 690 nm 处。

(2) 以蒸馏水作为空白液，测定 0.2%、0.4%、0.6%、0.8% (g/l) 不同浓度的硫酸铜溶液，分别记下它们的吸光度 A。每一浓度必须重复测 2 次 取其平均值。

(3) 以浓度为横坐标，以吸光度为纵座标，绘制标准曲线。

(4) 重复上述操作，测定未知浓度的硫酸铜溶液的吸光度，在上述标准曲线中求出未知液的浓度。

【计算练习】

(1) 以上面测定的 0.6% CuSO₄ 溶液和未知浓度 CuSO₄ 溶液的吸光度，来计算该未知液的浓度。

(2) 请计算以下例题

取全血量 0.1 ml , 制备成血滤液时的总体积为 2 ml , (即此血滤液之稀释倍数为 $2/0.1 = 20$ 倍) 测糖时 取上述血滤液 1 ml (相当于全血 0.05 ml) 加显色剂后 其总体积为 10 ml 用以比色。

标准液的制备 , 取标准糖溶液 (其浓度为 0.025 g/L) 2 ml , 加显色剂后的总体积为 10 ml , 用以比色。

比色结果为 : 标准管 $A = 0.25$

未知管 $A = 0.2$

请求出该血样品血糖的百分浓度

【试剂】

(1) 0.2% 、 0.4% 、 0.6% 、 0.8% CuSO_4 溶液。

(2) 未知 CuSO_4 溶液。

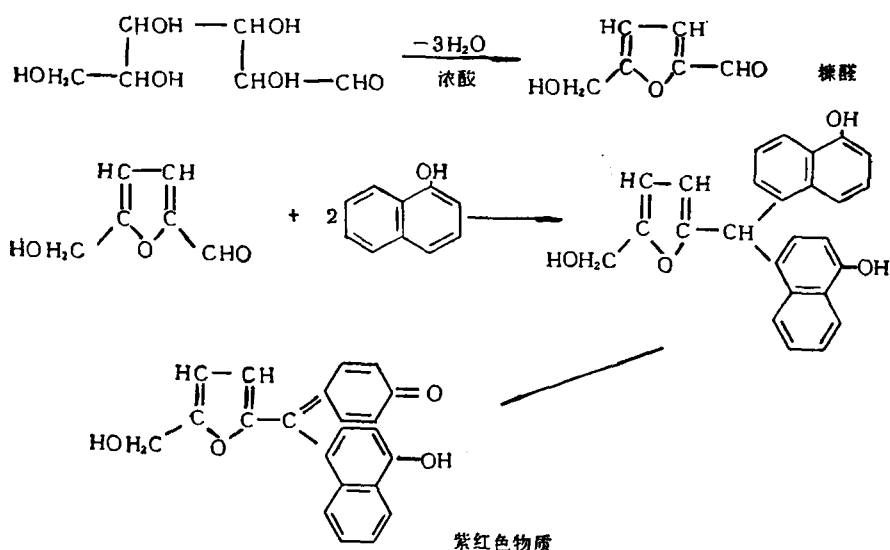
实 验 内 容

实验 1 茯苓多糖、猪苓多糖和淀粉的水解和鉴定

(一) 茯苓多糖和猪苓多糖水解和鉴定

【原理】

茯苓多糖和猪苓多糖，分别是中药茯苓和猪苓的主要成分。茯苓多糖是含有 β -1, 3 糖苷键和 β -1, 6 糖苷键的葡聚糖。猪苓多糖是水溶性多聚糖。它们经浓硫酸脱水产生糠醛或糠醛衍生物，它们在浓无机酸作用下，能与 α -萘酚生成紫红色缩合物 (molish 反应)。



茯苓多糖和猪苓多糖都是无还原性多糖，当它们用酸水解后，则生成还原性单糖。利用班氏试剂与其作用，可分别生成氧化亚铜砖红色沉淀，以反映其水解。

【操作】

(1) 分别取 2% 茯苓悬浊液和 2% 猪苓悬浊液 1 ml 置于小试管中，加莫氏 (molich) 试剂 3 滴，混匀，将试管倾斜，沿管壁逐滴加入浓硫酸 15 滴，慢慢直立试管，观察两层处有否紫红色环出现。

(2) 分别取 2% 茯苓悬浊液和 2% 猪苓悬浊液 2 ml 置试管内，加浓盐酸 10 滴，置沸水浴中 10 分钟，然后加 20% NaOH 中和之 (用 pH 试纸检测)，此即为两种不同的水解液。

(3) 取试管 4 支 编号 按下表加入试剂。

试 管 号	1	2	3	4
2%茯苓悬浊液(ml)	1	—	—	—
2%茯苓水解液(ml)	—	1	—	—
2%猪苓悬浊液(ml)	—	—	1	—
2%猪苓水解液(ml)	—	—	—	1
班氏试剂(ml)	1	1	1	1

混匀，置沸水浴中 3~5 分钟，观察其变化并解释之。

【试剂】

(1) 2%茯苓悬浊液：称取 1 g 茯苓粉，加水调匀，倾入沸水，边加边搅，总水量为 100 ml 煎煮至 50 ml。

(2) 2%猪苓悬浊液：制备方法同茯苓悬浊液。

(3) 莫氏 (molich) 试剂：称取 α -萘酚 5 g 溶于 95% 酒精中并稀释到 100 ml，需新鲜配制。

(4) 浓硫酸。

(5) 浓盐酸。

(6) 20%NaOH 溶液。

(7) pH 试纸。

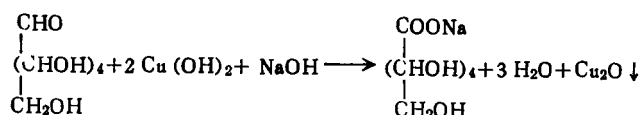
(8) 班氏试剂：取硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 17.3 g 溶于 100 ml 水中，另以柠檬酸钠 173 g 无水碳酸钠 100 g 溶于 700 ml 水中。将上述两溶液合并，用水稀释至 1000 ml。

(二) 淀粉的水解和鉴定

【原理】

淀粉是多糖，由多个葡萄糖分子聚合而成，它遇碘呈蓝色（在中性或酸性环境中）。淀粉在酸或酶的作用下，水解成不同程度的寡糖，最终水解为葡萄糖（或麦芽糖）。后者具有还原性，可使碱性硫酸铜还原生成砖红色或棕黄色的氧化亚铜沉淀。通过单糖的还原作用可判断多糖的水解。其反应过程如下：

淀粉 → 糊精 → 麦芽糖 → 葡萄糖



【操作】

取 1% 淀粉液 10 ml 置于小烧杯内，加入浓盐酸 8 滴，放在石棉网上加热，每隔 2 分钟，用滴管取出 1 小滴放在白瓷板上，加碘液 1 滴，观察其颜色，直到无蓝色为止。然后取下烧杯加入 20%NaOH 中和前述加入的盐酸（用 pH 试纸检测）。再取试管 2 支 编号 按下表加入试剂。

试 管 号	1	2
1%淀粉液 (ml)	—	1
淀粉水解液 (ml)	1	—
班氏试剂 (ml)	2	2

置沸水浴中 3 分钟，观察颜色变化并解释之。

【附注】

氧化亚铜沉淀由于其沉淀速度、颗粒大小不同而有颜色的差别，颗粒大的为红色、小的为黄色。

【试剂】

(1) 1%淀粉液：称取淀粉 (AR) 1 g 置于烧杯内，加水 100 ml 边加热边搅拌，呈透明溶液为止。

(2) 碘试剂：称取碘化钾 20 g 及碘 10 g 溶于 100 ml 水中。使用时再稀释 10 倍。

(3) 班氏试剂：同前。

(4) 浓盐酸。

(5) 20%NaOH 溶液。

(6) pH 试纸。

实验 2 糖的薄层层析

【原理】

层析法是利用混合物中各组分物理化学性质的差别（如吸附力、溶解度、分子形状、大小和极性等），使各组分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。从而使各组分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。1944 年开始用滤纸做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。根据其层析过程的机理不同，层析可分为以下几种：

(1) 吸附层析：利用吸附剂对各种物质吸附能力的不同，来达到分离的目的。

(2) 分配层析：利用各种不同的物质在二种不同溶剂中的分配系数的不同而达到分离的目的。

(3) 离子交换层析：是利用离子交换剂对需要分离的各种离子有不同的亲和力，而使其达到分离的目的。

(4) 凝胶层析（分子筛层析）：是根据混合物中各种分子的大小及形状不同，通过凝胶时，分子的扩散移动速率各异，而使大小不同的分子得到分离。

(5) 亲和层析：是利用高分子物质能与相应的配基特异性的可逆结合的原理而进行