



关于生化物质的测定方法



第二部分 生化实验技术

PART 2 BIOCHEMICAL EXPERIMENTAL TECHNIQUE

- 生化物质的分析检测方法
- 生化物质的制备和分离纯化
- 蛋白质的分子结构与性质研究
- 免疫学方法在生化实验中的应用



第七章 生化物质的分析检测方法

- ◆ 滴定分析法
- ◆ 光谱学方法
- ◆ 放射性同位素方法
- ◆ 一些特定生化物质的分析检测



7-1 滴定分析法

- ◆ 适合滴定分析的条件
- ◆ 常用的滴定方法
- ◆ 注意事项



适合滴定分析的条件

- ◆ 反应有严格的化学计量关系
- ◆ 反应能够迅速完成
- ◆ 有合适方法确定滴定终点



常用的滴定方法

- ◆ **酸碱滴定**

- ◆ 直接滴定、间接滴定

- ◆ **氧化还原滴定**

- ◆ 重铬酸钾法、高锰酸钾法、碘量法

- ◆ 沉淀滴定

- ◆ 配位滴定



注意事项

- ◆ 标准溶液与基准物质
- ◆ 反应条件的控制
- ◆ 反应的适用范围
- ◆ 滴定终点的判断
- ◆ 反应干扰因素的消除
- ◆ 结果的正确计算



7-2 光谱学方法

- ◆ 电磁辐射与光谱
- ◆ 光吸收的定量
- ◆ 紫外与可见光光谱法
- ◆ 荧光光度法
- ◆ 红外光谱法
- ◆ 核磁共振法



电磁辐射与光谱

- ◆ 光属于电磁波
- ◆ 自然界中存在各种不同波长的电磁波
- ◆ 分光光度法所使用的光谱范围在200nm-10 μ （1 μ =1,000nm）之间
- ◆ 200nm—400nm为紫外光区
- ◆ 400nm—760nm为可见光区
- ◆ 760nm—10,000nm为红外光区



光吸收的定量

◆ Lambert-Beer's Law

◆ $-\lg T = A = D = a C L$

◆ T: transmittance; A: absorbance ; D: optical density

◆ a: absorbance coefficient (摩尔吸光系数/百分吸光系数)

◆ L: distance/thickness



分光光度计基本结构简介

- ◆ 分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外光区、可见光区、红外光区以及万用（全波段）分光光度计等。
- ◆ 无论哪一类分光光度计都由下列五部分组成，即光源、单色器、狭缝、样品池，检测器系统

光源

- ◆ 钨灯和卤钨灯发射320—2000nm连续光谱，最适宜工作范围为360—1000nm，稳定性好，用作可见光分光光度计的光源。
- ◆ 氢灯和氘灯能发射150—400nm的紫外结，可用作紫外光区分光光度计的光源。
- ◆ 红外线光源则由纳恩斯特（Nernst）棒产生，此棒由 $ZrO_2:Y_2O_3=17:3$ （Zr为锆，Y为钇）或 Y_2O_3, GeO_2 （Ge为铈）及 ThO_2 （Th为钍）之混合物制成。

分光系统（单色器）与狭缝

- ◆ 单色器是指能从混合光波中分解出来所需单一波长光的装置，由棱镜或光栅构成。
- ◆
- ◆ 狭缝是指由一对隔板在光通路上形成的缝隙，用来调节入射单色光的纯度和强度，也直接影响分辨力。

比色环

- ◆ 比色环也叫样品池，吸收器或比色皿，用来盛溶液，各个杯子壁厚度等规格应尽可能完全相等，否则将产生测定误差。
- ◆ 玻璃比色杯只适用于可见光区，在紫外区测定时要用石英比色杯。
- ◆ 不能用手指拿比色杯的光学面，
- ◆ 用后要及时洗涤，可用温水或稀盐酸，乙醇以至铬酸洗液（浓酸中浸泡不要超过15分钟），表面只能用柔软的绒布或拭镜头纸擦净。

检测器系统

- ◆ 检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟的或数字的结果，模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器及与计算机联用等，数字输出则通过模拟 / 数字转换装置如数字式电压表等。



紫外与可见光光谱法

- ◆ 定量方法：
- ◆ 吸光系数法、标准曲线法、对照法
- ◆ 注意事项：
- ◆ 选择合适的仪器和比色皿
- ◆ 尽可能在吸光度0.1~1.0的范围内测定
- ◆ 选择合适的灵敏度
- ◆ 尽可能做吸收光谱
- ◆ 做空白与对照实验



荧光光度法

- ◆ 激发光/发射光（荧光fluorescence）
- ◆ 定量方法：
 - ◆ 直接测定法：标准曲线法、对照法
 - ◆ 间接测定法：化学转化法、荧光淬灭法、敏化发光法



- ◆ 注意事项:
- ◆ 选择合适的仪器和比色皿
- ◆ 控制好测定的溶剂、浓度、酸度、**温度**、时间，并尽量消除干扰因素
- ◆ 选择合适的激发波长和发射波长
- ◆ 做空白与对照实验
- ◆ 荧光光度法比紫外可见光度法灵敏1 000~10 000倍



红外光谱法、核磁共振法

- ◆ 主要进行物质结构和成分的分析



分光光度技术的基本应用

- ◆ 测定溶液中物质的含量
- ◆ 用紫外光谱等鉴定化合物



用紫外光谱鉴定化合物

- ◆ 使用分光光度计可以绘制**吸收光谱曲线**。
- ◆ 方法是用各种波长不同的单色光分别通过某一浓度的溶液，测定此溶液对每一种单色光的吸光度，然后以波长为横座标，以吸光度为纵座标绘制吸光度—波长曲线，此曲线即吸收光谱曲线。
- ◆ 各种物质有它自己一定的吸收光谱曲线，因此用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。



- ◆ 当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线开关一样时，则很可能它们是同一物质。
- ◆ 一定物质在不同浓度时，其吸收光谱曲线中，峰值的大小不同，但形状相似，即吸收高峰和低峰的波长是一定不变的。
- ◆ 紫外吸收光谱比较简单，同一种物质的紫外吸收光谱应完全一致，但具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。
- ◆ 除了特殊情况外，单独依靠紫外吸收光谱决定一个未知物结构，必须与其它方法配合。紫外吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。



7-3放射性同位素方法

- ◆ α -、 β -、 γ -、 X -
 - ◆ β -: ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{131}I
 - ◆ α -: ^{235}U 、 ^{238}U 、
 - ◆ γ -: ^{60}Co
-
- ◆ 液体闪烁计数器法
 - ◆ 放射自显影法



常用同位素的特征

同位素	符号	半衰期	β 射线能量 (MeV)
氢-3	^3H	12.3年	0.018
碳-14	^{14}C	5720年	0.156
磷-32	^{32}P	14.3天	1.71
硫-35	^{35}S	87.1天	0.167
碘-131	^{131}I	8.05天	0.605

各种射线的特点

- ◆ α 射线通过物质时，主要是通过电离和激发把它的辐射能量转移给物质，
- ◆ 其射程很短，一个1兆电子伏（1MeV）的 α 射线，在空气中的射程约1.0厘米，在铅金属中只有23微米（ μm ），一张普通纸就能将 α 射线完全挡住，
- ◆ 但 α 射线的能量能被组织和器官全部吸收

。



- ◆ **β射线**也能引起物质电离和激发，与α射线的能量相同的β射线，在同一物质中的射程比α要长得多，如 $>1\text{MeV}$ β射线，在空气中的射程是10米，高能量快速运动的β粒子，如磷-32，能量为 1.71MeV 遇到物质，特别是突然被原子序数高的物质（如铅，原子序数为82）阻止后，运动方向会发生改变，产生轫致辐射。
- ◆ 轫致辐射是一种连续的电磁辐射，它发生的几率与β射线的能量和物质的原子序数成正比，因此在防护上采用低密度材料，以减少轫致辐射。
- ◆ β射线能被不太厚的铝层等吸收。



- ◆ γ 射线的穿透力最强，射程最大，
- ◆ 1MeV的 γ 射线在空气中的射程约有米之远， γ 射线作用于物质可产生光电效应、康普顿效应和电子对效应，它不会被物质完全吸收，只会随着物质厚度的增加而逐渐减弱。

放射性强度及其度量单位

- ◆。放射性同位素不断地衰变，它在单位时间内发生衰变的原子数目叫做放射性强度（radioactivity），放射性强度的常用单位是居里（curie），表示在1秒钟内发生 3.7×10^{10} 次核衰变，符号为Ci。

$$1\text{Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{dps} = 2.22 \times 10^{12} \text{dpm}$$

$$1\text{mCi} = 3.7 \times 10^7 \text{dps} = 2.22 \times 10^9 \text{dpm}$$

$$1 \mu\text{Ci} = 3.7 \times 10^4 \text{dps} = 2.22 \times 10^6 \text{dpm}$$



- ◆ 1977年国际放射防护委员会（ICRP）发表的第26号出版物中，根据国际辐射单位与测量委员会（ICRU）的建议，对放射性强度等计算单位采用了国际单位制（SI），我国于1986年正式执行。
- ◆ 在SI中，放射性强度单位用贝柯勒尔（becquerel）表示，简称贝可，为1秒钟内发生一次核衰变，符号为 Bq。
 $1\text{Bq}=1\text{dps}=2.703\times 10^{-11}\text{Ci}$
- ◆ 该单位在实际应用中减少了换算步骤，方便了使用。

放射防护

- ◆ 就外照射而言，由于各种射线穿透能力不同， γ 射线照射对机体的危害大于 β 射线，而 β 射线的危害性又大于 α 射线。
- ◆ 受照射部位不同，受害程度出不同，对某种放射性同位素蓄积率高的组织或器官，必然受害严重。



- ◆ 当放射性物质进入了体内，对机体造成内照射的情形下，
- ◆ α 射线由于射程很短，其危害性大于 β 射线和 γ 射线的危害，
- ◆ 而 β 射线的内照射危害又大于 γ 射线。
- ◆ 放射防护的必要性在于保护操作者本人免受辐射损伤，防止了必要的射线照射，保护周围人群的健康和安全，做好放射性污物、污水的收集与处理，避免环境污染，保证实验能够正常进行，取得的结果可靠。



放射防护的三原则

◆ 1.放射实践的正当化

在进行任何放射性工作时，都应当代价和利益的分析，要求任何放射实践，对人群和环境可能产生的危害比起个人和社会从中获得的利益来，应当是很小的，即效益明显大于付出的全部代价时，所进行的放射性工作就是正当的，是值得进行的。



◆ 2.放射防护的最优化

使放射性和照射量在可以合理达到的尽可能低的水平，避免一些不必要的照射，要求对放射实践选择防护水平时，必须在由放射实践带来的利益与所付出和健康损害的代价之间权衡利弊，以期用最小的代价获取最大的净利益。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/488037010075007007>