



生物化学实验

生物大分子定量测定技术

3.2 紫外-可见吸收光谱分析

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- **分光光度法：也称光谱法，是以原子和分子的光谱学为基础建立起来的分析方法。该法能利用光谱特性对生物大分子的含量和结构进行测定分析，具有灵敏度高、分析速度快、应用范围广等优点，是生物大分子制备和分离纯化过程中必备的常用方法。**
- **常见的光谱有：**
 - **1) 吸收光谱：紫外-可见光谱和红外光谱**
 - **2) 发射光谱：原子、分子、荧光、化学和生物发光光谱**

紫外-可见吸收光谱分析

- 紫外-可见吸收光谱分析：是利用物质的分子或离子对紫外和可见光的吸收所产生的**紫外-可见吸收光谱**（190~800 nm）对物质的组成、含量和结构进行测定的分析方法，是光谱分析中最早用于物质分析鉴定的物理分析方法之一。
- **优点**：灵敏度高、准确度高、选择性好、操作方便、分析速度快。
- **应用广泛**：生物大分子的定性、定量分析、酶活力及动力学参数测定等。

分子吸收光谱

- **分子吸收光谱**：某些有机化合物和生物大分子在吸收了光能后产生价电子和分子轨道上电子在能级间的跃迁而形成的吸收光谱。利用吸收光谱这一特性，可以对无机/有机化合物、生物大分子进行定性和定量分析。
- **电子跃迁**：分子由原子组成，原子中的电子绕原子核不停运动。当分子中的电子受到光、热、电等刺激时，分子中的总动能会发生变化，电子从一个能级转到另一个能级，从低能级转到高能级的现象叫电子跃迁。
- 当电子吸收外来辐射能，自身能量比原来的能量高，低能级的电子会跃迁到较高能级，分子能级的状态**由基态变为激发态**，在吸能过程中产生了相应的吸收光谱。

常用光谱分析术语

- **光吸收：**当一定波长的光通过某介质时，该介质有选择的吸收某一波长的光，使入射光的强度减弱，这种现象叫做光吸收。
- **吸收光谱：**一束连续光经棱镜色散后所得到的光谱中，出现一处或几处暗的部分谱带。这种通过介质的光为出射光。透过介质产生的光谱称为吸收光谱。
- **消光度：**又称光密度OD或吸光值A，表示溶液吸收光的强弱或吸收程度。消光度越高，溶液对光吸收的程度就越大。
- **消光系数：**是溶液对光吸收的比例常数，指在一定的浓度和波长等条件下物质的吸光值，用K表示。K值取决于溶质性质、入射光波长和温度。

消光系数的物理意义及表示方法

- **消光系数的物理意义：**是吸光物质在单位浓度及单位厚度时的吸光值。消光系数愈大，表明物质的吸光能力愈强，灵敏度愈高，因此消光系数是生物大分子定性和定量的依据。
- 常用表示方法：
 - **摩尔消光系数：**在一定波长下，溶液浓度为1 mol/L，光程厚度为1 cm时的消光系数，单位是L/(mol·cm)，用 ϵ 表示。
 - **百分消光系数：**又称比消光系数，指被测物质的浓度以百分比 (m/V) 表示时的消光系数。即当溶液浓度为1% (1g/100mL)，光程为1cm时的消光系数，单位是100 mL/ (g · cm)，用 $E_{1cm}^{1\%}$ 表示。

$E_{1cm}^{1\%}$ 是生物大分子常用的消光系数，是表示生物大分子的一个特征常数。

光吸收的基本定律：朗伯-比尔定律

- **朗伯-比尔 (Lambert-Beer)定律**

也称光吸收定律。在一定的条件下，一束光通过一定厚度的介质后，由于介质吸收了一部分光能，透射光的强度减弱。吸收介质的浓度愈大，介质的厚度愈大，则光强度的减弱愈显著。

- **朗伯-比尔定律的物理意义：**当一束平行单色光垂直通过某一均匀非散射的吸光物质时，其吸光度与吸收介质的厚度和吸光物质的浓度成正比。关系式为：

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T} = K \times C \times L$$

A: 吸光值

I_0 : 入射光的强度

I: 透射光的强度

T: 透射比，或透光度

K: 常数

C: 溶液浓度

L: 光程

朗伯-比尔定律反映了溶液厚度L和浓度C对光吸收的关系，其数值随光的波长、溶液浓度、溶液性质变化而变化。

紫外-可见吸收光谱的主要应用

1. 定性分析

比较未知物与已知化合物的光谱特征吸收，确定未知物的基本性质。

2. 纯度测定

测定蛋白质和核酸的纯度 (A_{260}/A_{280} 比值)

3. 定量分析

蛋白质、核酸、多糖含量的定量测定

4. 参数测定

DNA的 T_m 值、**酶活力**、**米氏常数 K_m 值**