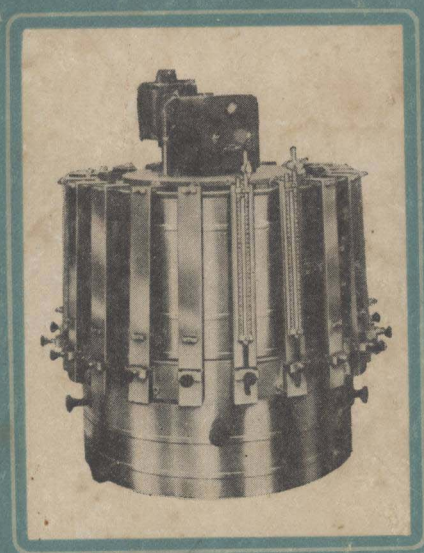


仪器分析

及其在生理科学中的应用

第一册



科学出版社

仪 器 分 析

及其在生理科学中的应用

(原名: 仪器分析及生物化学实验法)

第 一 册

刘培楠 梁植权 宋振玉 重 編
梁晓天 周同惠 金大勋

科 学 出 版 社

1 9 6 5

内 容 简 介

本书是《仪器分析及生物化学实验法》的增订再版,介绍一些常用实验方法的使用原则。对第一版各章都进行了补充、修改或重写,并新增了十几章,再版分册出版。第一册介绍光谱光度法、荧光分析及荧光光谱分析法等十种实验仪器的构造和实验方法的原理。可供生物化学、生理、生物物理、免疫、遗传、实验生物学等研究及教学人员参考。

仪器分析及其在生理科学中的应用

(原名:仪器分析及生物化学实验法)

第 一 册

刘 培 楠 等 重 编

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 117 号

北京市书刊出版业营业许可证出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1957 年 10 月第 一 版 开本: 850×1168 1/32

1965 年 7 月第 二 版 印张: 11 3/4

1965 年 7 月第六次印刷 插页: 3

精装: 0001—2,200 字数: 313,000

平装: 6,712—8,461

统一书号: 13031·2129

本社书号: 3252·13—10

定价: [科六] 精装本 2.30 元
平装本 1.80 元

第二版序言

自从 1956 年中国医学科学院邀请一部分科学家进行有关仪器分析技术方法的介绍，次年又将讲稿汇编成册，由科学出版社出版发行以来，此书颇受欢迎，对于生理科学工作者的进行实验与研究是有一定的帮助的。但目前仪器分析技术上的改进，应用范围及新的项目方面又有许多新的进展。在生物科学的领域内，不但在生物化学的研究工作中，即在生物物理学、免疫学、遗传学、实验生物学、微生物学等方面都在广泛地应用仪器分析，使所观察的现象与所获得的数据更为精密，而且也提供了新的研究途径。所以仪器分析技术的进步与生物学，特别是分子生物学的开展实有密切的关系。

鉴于上述的原因，我们认为有必要将第一版的“仪器分析及生物化学实验法”加以增订，补充新的资料，此外又约请一部分科学家撰写新的项目，并将书名略加变更。由于篇幅增多，我们征得了科学出版社的同意，将此书分册先后出版，以饷读者。

原书中除组织培养法一章外，所有各章多少都进行了补充与修改或重写。同位素一章因内容很多，特将有关放射自显影术部分抽出，另行撰写。

本书所介绍的技术方法都是作者结合自己的工作经验而撰写的，但是还可能有不周之处，希望读者给我们指正，不胜感谢。

重编者：刘培楠、梁植权、宋振玉
梁晓天、周同惠、金大勋

1964 年 10 月

第一冊 目 录

第二版序言	刘培楠等 (iii)
1. 光譜光度法(一)	金大勋 (1)
2. 光譜光度法(二) 紫外光譜在有机化学上的应用	 黄 量 (37)
3. 螢光分析及螢光光譜分析法	王世中 (66)
4. 紅外光譜	梁晓天 (80)
5. 旋光譜和圓二色光譜	黄 量 (121)
6. 极譜分析	周同惠 (183)
7. 質譜	邵国賢 (234)
8. 核磁共振光譜	梁晓天 (274)
9. 光散射法	张福徽、蔡良琬 (313)
10. 气体压力計法	刘培楠 (343)
索 引	(368)

1. 光 譜 光 度 法 (一)

金 大 勛

引言

测定原理

光谱光度计的构造和性能

一、光源

二、色散系统(分光系统)

三、光缝

四、吸收杯

五、受光器

(一)光电管

(二)光电池

光谱光度分析法

一、定性分析

二、定量分析

(一)多组分分析

(二)背景吸收的校正 (Morton
及 Stubb 氏法)

三、差示光谱光度法

四、光谱光度滴定

五、等消光点

影响光度分析的一些因素

一、溶剂

二、浓度

三、pH

四、温度

附录 常用溶剂在紫外线区的吸收
极限

参考文献

引 言

光是电磁波，可以用波长来表示。人眼能够感觉到的光波，其波长约由 $7,600 \text{ \AA}$ 的红色到 $3,900 \text{ \AA}$ 的紫色，在此以外的光波感觉不到。波长短于 $4,000 \text{ \AA}$ 的光波叫做紫外线，约由 $2,000 \text{ \AA}$ 到 $4,000 \text{ \AA}$ 。短于 $2,000 \text{ \AA}$ 的叫远紫外线，再短的光波就是X射线、 γ 射线了。长于红色的光波叫红外线；再长为远红外线，已接近微波和无电的短波波长。人眼看不见的电磁波可以用仪器去检查它的质与量，如照象、光电池、热电偶等。

$\text{\AA}$ 是波长的单位，等于千万分之一毫米。紫外线区和可见光

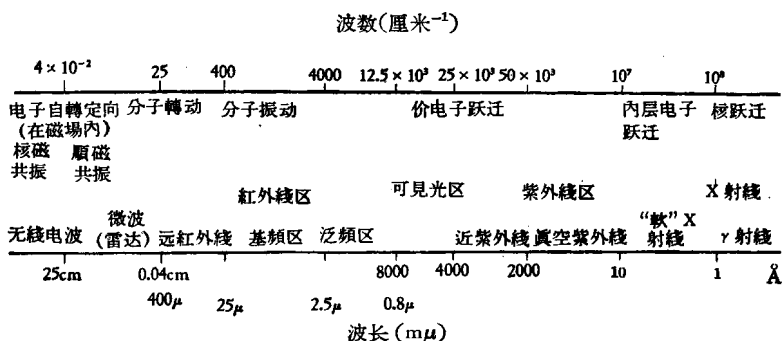


图 1 电磁波谱 (座标不是按比例的, 各区的界线未划分)

区都用此单位, 但现在普遍采用毫微米($m\mu = 10^{-8} \text{ Å}$) 作为这一段光谱的波长单位。红外光谱则以微米($\mu = 1/1,000 \text{ 毫米}$)作单位。波长的符号是“ λ ”。

电磁波除了用波长表示其性质外, 还可以用波数(符号为 $\bar{\nu}$)或频率(符号为 ν)来表示。波数就是在 1 厘米长度中的波数。如, 波长为 $2,000 \text{ Å}$ 的光波, 在 1 厘米长度中的波数是 50,000, 写作 50,000 厘米⁻¹。红外光谱常以此法表示。频率则是在 1 秒钟的时间内经过某一点的波数, 它等于波长 $\times$ 光速。电磁波的运动速率约为 3×10^{10} 厘米/秒; 波长为 $3,000 \text{ Å}$ 的光波, 其频率为 10^{15} 秒^{-1} 。这个数字太大, 所以改用菲涅耳 (fresnel, 符号为 f), 它等于每秒振荡 10^{12} 次。3,000 Å 波长的光波, f 为 1,000。

光谱分作发射光谱和吸收光谱。比如开亮电灯, 就有光射出。此光是不同波长的光波组成的。将此光通过稜镜, 照射到白纸上, 可看到红、橙、黄、绿、蓝、紫等颜色, 此即为发射光谱。物质燃烧时都有发射光谱, 但其光谱不一定是连续的, 其中可以有明有暗, 有的只是几条线。完全明亮的光谱叫做连续光谱。白炽的物体和弧光可以产生连续光谱。有明有暗的叫做非连续光谱。适当地激发原子或分子即可产生非连续光谱。例如, 含钠的物质在燃烧时产生 $5,893 \text{ Å}$ 光波, 是橙黄色的光。

如果在电灯和稜镜之间放一个装有溶液的试管, 则在此连续

光譜中出現一處或幾處暗的部分，這種光譜即稱之為吸收光譜。因為此溶液吸收了燈光中某一段或幾段波長的光能。

光的發射和吸收是因為原子或分子中能量的改變。在平時其能量級是一定的，是為基態。但當原子或分子在被光、熱或電能的激發下，其能量級可以被提高一級或數級，隨激發的條件而不同。此時某一個或某幾個一定頻率的光，亦即是一定波長的光就被吸收，因之在光譜中即不出現這一個波長的光。反之，能量級亦可由高轉低，其損失的能量將轉化為光能而發射出來。此光能仍是有固定頻率的，所以其光譜上亦只有一定波長的光。

不同分子的原子團和原子，它們的發射光譜或吸收光譜皆不同，所以根據光譜可以推測樣品的結構。

化學家多利用吸收光譜，無論是可見到的或看不到的，作定性或定量分析。紅外線的吸收光譜雖然也可用於定量分析，但主要是供研究分子的結構。其測定方法已非為光度法。本講只限於紫外線和可見光的光度分析。

測定原理

當光經過均勻而透明的媒質時，透過的光的強度即減弱。因為有一部分光在媒質的表面分散或反射，一部分為媒質所吸收，只有一部分可透過媒質。今假定照射的光強度為 I_0 ，反射的光為 I_R ，被吸收的光為 I_A ，透過去的光為 I_T ，則

$$I_0 = I_R + I_A + I_T$$

如果按照一般的化學分析方法，以一個“空白”去校正反射的光，則反射光的損失可以不計，即

$$I_0 = I_A + I_T$$

按 Lambert 定律¹⁾，在經過空白的校正後， I_0 與 I_T 的比例和 I_0 的光強度無關。如吸收媒質的長度 l 為一個單位，則

1) 有的書中指出是 Bouguer 氏最先發現，故寫作 Bouguer 氏定律。

$$\frac{I_T}{I_0} = T \quad T \text{ 为吸收媒质的透射比}$$

假定图 2 中的五个长方形是同一个吸收媒质，每一个长方形的长度为一个单位，每一个长方形所透过的光度皆为其照射光度的一半，也就是 $T = \frac{1}{2}$ 。则在经过第一个长方形时， $I_T = \frac{1}{2} I_0$ ，在经过第二个长方形时， $I_T = \left(\frac{1}{2}\right)^2 I_0 \cdots$ ，在经过五个长方形后，则 $I_T = \left(\frac{1}{2}\right)^5 I_0$ 。

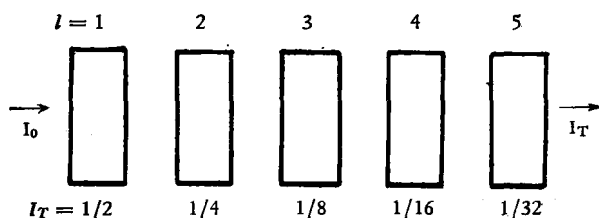


图 2

由此可见透过的光 I_T 与照射光 I_0 的关系，可用下列公式表示：

$$I_T = I_0 T^l$$

这就是 Lambert 定律。

如图 3 所示，当照射光射入媒质中到 $1/K$ 长的地方，其光强度适为照射光的 $1/10$ ；则照射光透过全长 l 时，其透过的光强度

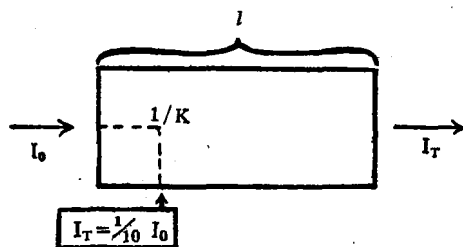


图 3

应为

$$I_T = I_0 \left(\frac{1}{10} \right)^{Kl} = I_0 \cdot 10^{-Kl}$$

亦可写做

$$\log \frac{I_T}{I_0} = -Kl$$

或

$$\log \frac{I_0}{I_T} = Kl$$

K 是媒质在单位长度时的吸收系数, 依媒质而异。

在应用时, I_0 是透过“空白”的光强度, I_T 是透过样品的光强度, $\frac{I_T}{I_0}$ 是透射比, 符号为 T , 以百分数表示 ($\%T$)。 $\log \frac{I_0}{I_T}$ 是光密度, 符号为 D $\left[\log \frac{I_0}{I_T} \right]$ 现也被称作吸收 (Absorbance), 符号为 A 。

$\log \frac{I_0}{I_T}$ 亦可以写成 $\log_{10} \frac{1}{T}$ 。由此可见光密度与透射比的关系。

Beer 指出, 媒质吸收光能的情况, 只和其中所含的能够吸收光的分子数目有关。故媒质浓度与透射比的关系正如上述的媒质长度与透射比的关系一样。其实, 增加浓度亦就相当于增加长度。故 Beer 定律亦可以用下列公式表示:

$$I_T = I_0 T^c \quad c = \text{浓度}$$

将 Lambert 定律和 Beer 定律合并, 则为:

$$I_T = I_0 T^{lc}$$

设若以 E 表示媒质在单位浓度和单位长度时的消光系数, 即 $E = K/c$, 则 Lambert 定律可改写为:

$$I_T = I_0 \cdot 10^{-Kl} = I_0 \cdot 10^{-Elc}$$

此式亦可写做:

$$\log_{10} \frac{I_T}{I_0} = -Elc$$

故

$$D = Elc^{1)}$$

1) 此式现已被写做 $A = abc$; A 为吸收, a 为媒质的吸收系数 (即消光系数), b 为长度, c 为浓度。

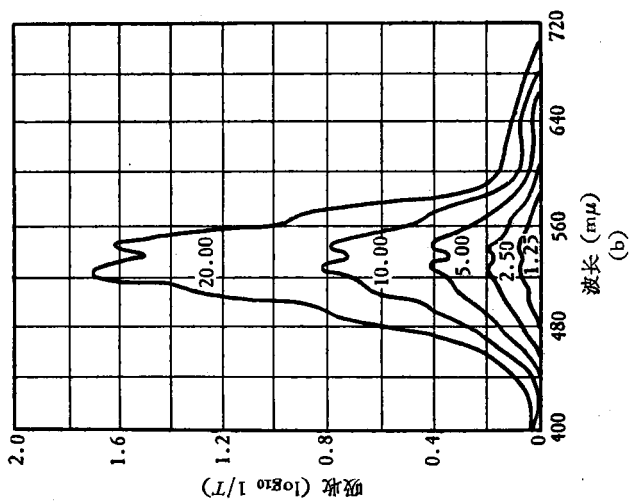
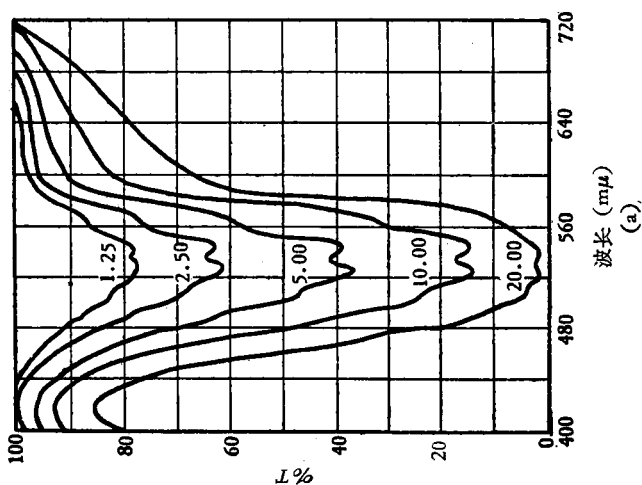


图4 过锰酸钾溶液的光谱曲线
(a) 透射比 (b) 光密度
浓度 ppm, 溶剂 1.5N H_2SO_4

如果浓度和长度皆为一个单位,则 E 即等于光密度。

按 Lambert-Beer 定律,就可以进行定量分析。样品的长度 l 可以用盛溶液的器皿来规定,只需测量光密度(或透射比 $\%T$) 即可根据 E 值算出溶解物在溶液中的浓度。

但分子对不同波长的光的吸收程度不同,它只对某一个或几个光波吸收最强;这是分子的物理特性。所以在进行定量测定时,就要选择吸收最强的光波,并且最好是使用单色光(即某一波长的光),如果光不纯,则结果不精确。

由于这个原因,在测定某一种物质时,必须测量其吸收光谱。测定吸收光谱的方法为从一个有连续光谱的光源,逐步分出其各个波长的光,使之透射过拟测定的物质纯溶液(已知浓度),量出在不同波长时的 D 或 $\%T$ 。然后以波长为横坐标,以 D 或 $\%T$ 为纵坐标,画出一个吸收曲线(图 4)。挑选曲线上的一个吸收最显著的波长,按其光密度、浓度及长度算成 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 的值。同样在此波长处测定样品的光密度,由 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 的值,即可算出样品含量。

在文献中常可看到如下的写法:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} 325\text{m}\mu = 20$$

其意即为此样品在 $325\text{m}\mu$ 波长的光照射下,样品的长度为 1 厘米,浓度为 1% (按重量/容积计算),其 E 值是 20。如浓度不以%计算,而用每升溶液中的克分子数,则 E 改写为 ϵ ,以示区别。 ϵ 就是克分子消光系数,它不因长度和浓度的不同而异。

应用最高吸收光波来做定量分析有两个好处:(1)灵敏度大,这将在下面提到;(2)可以避免干扰物质。图 5a 中的 A 曲线为样品的吸收曲线, B 曲线为干扰物质的吸收曲线。 λ_A 为样品最高吸收峰的波长。显然,用 λ_A 的波长来进行样品分析时,可完全避免了 B 物质的干扰。但有时也会遇到象图 5b 的情况。假如这个物质 B 也是已知的,可用多组分分析方法进行定量分析(见后)。

任何液体、气体或固体,只要它在光能的激发下有吸收光谱,它又是均匀而透明的,就可应用光谱光度分析法。不透明的固体有时也可用反光法进行光谱光度分析。

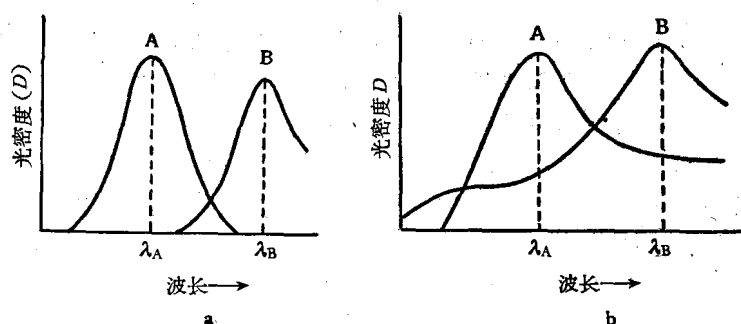


图 5

不同物質其吸收曲線亦不同，故用已知純物質的吸收曲線和樣品的吸收曲線相對照，亦可以推測樣品為何物。

所以如果有一個能產生連續發射光譜的光源，和一個能夠分離光譜的各個光波的裝置，再加上一個檢查光密度或透射比的儀器，就可以進行光譜光度分析。

光譜光度計的構造和性能

光譜光度計就是將分光鏡和光度計合併而成的。包括光源、色散系統（分光系統）、吸收杯和受光器幾個主要部分。現在只就一般常見的儀器上所採用的作簡單介紹。

一、光源

可見光的連續光譜可由白熾的鎢，也就是一般的電燈泡發射出來。其光譜約由 $3,200 \text{ \AA}$ — 5μ ，但燈泡的玻璃不同，其光譜的範圍亦有差異。儀器上皆採用幻燈泡或汽車燈泡，因為這類燈泡的燈絲是直的螺旋圈。將燈絲對準儀器中光學裝置的軸綫時，能夠在出光狹縫的平面上投射直綫影象，光亮均勻。儀器中使用的燈泡多是“預先校準焦點”的，亦就是預先將燈泡安裝在一個特制燈座上；使用時燈絲的位置恰好對準入光狹縫。

紫外綫的連續光譜是含氫放电灯泡，其光譜范围約在 $1,600-4,000 \text{ \AA}$ 。因为玻璃吸收紫外綫，故灯泡是石英制的或在放光处用一石英窗。

短于 $1,600 \text{ \AA}$ 的紫外綫，为空气中的氧所吸收，故須在无氧或真空中使用。所需的色散系統和受光器亦不同。

二、色散系統(分光系統)

色散系統是指能将混合的光波分散为个别光波的装置，前面所提及的稜鏡即是。当光波經過一个媒質(如空气)而射入另一个媒質(如玻璃)时，其传播的速度即改变。如果光是斜着射入后一媒質，則它的传播方向亦改变，改变的情况可用折射率表示之。对于同一媒質，光的折射率又因其波长而异。波长較短的光波在媒質中的传播速度亦較慢，折射率亦大。这样就可将混合光中所包含的各个光波分散而成光譜。稜鏡所产生的光譜，其光波由紫外綫端到紅色端愈来愈密。

稜鏡的質料多用特制的玻璃，折射率大的玻璃，色散亦大，分辨能力就強。但玻璃吸收紫外綫，只能应用在 $3,500 \text{ \AA}-3\mu$ 的范围。紫外綫光譜須用石英稜鏡，其光譜范围在 $1,950 \text{ \AA}-4\mu$ 。石英的折射率低于玻璃，故色散稍差。所以仅限于可見光范围使用的光譜光度計仍用玻璃稜鏡。

稜鏡的形状亦不一样，有的是 $30^\circ-60^\circ-90^\circ$ 角(图 6b)，有的是三个角都是 60° 角(图 6a)，有的是“恆偏向”稜鏡(图 6c)。稜鏡的用法也不同，有的是透射的，有的是反射的。反射的是在稜鏡的一面上鍍一层鋁，光柱射到鋁面又反射回去。用鋁比用銀好，因为鋁对于紫外綫的反射力強，不致于过多地減弱紫外綫的光強度。

另一种色散系統是繞射光柵，即是在石英或玻璃的表面上刻划許多等距离的平行綫，大約每英寸刻 $15,000-30,000$ 条綫。刻綫处不透光，光只能在两条刻綫中間的平面处透过去。这些平面形成极微小的縫，光透过小縫时即产生繞射現象，使每个小縫都

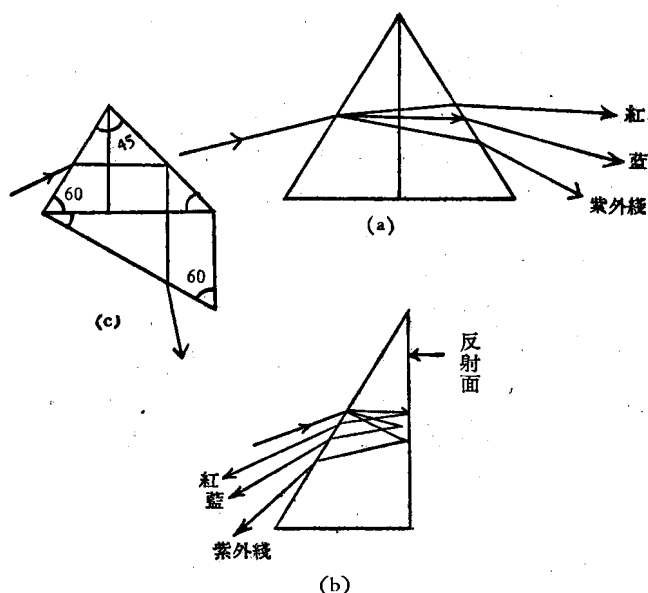


图6 不同式样的稜鏡

自成一个光源，将光向各方射出。从各小缝射出的光波在传播的过程中又引起光波的干涉；一部分光波因互相干涉而减弱或抵消，一部分光波因互相加强而保留。保留的光波，其传播方向与光波的波长有关，较长的光波偏折的角度大，较短的光波偏折的角度小，因而形成光谱。光栅形成的光谱与稜鏡不同之处是光波由紫端到红端不随波长而有疏密的变化。刻的线愈密，色散亦就愈大。但经光栅形成的光谱常有数级，在某一位置应为 $8,000 \text{ \AA}$ 光波时，同时也掺杂有较弱的 $4,000 \text{ \AA}$ 的光波和更弱的 $2,000 \text{ \AA}$ 光波（图7）。级数愈高，色散愈大，光度愈弱。

当然不希望有这些级的光谱同时存在，可以用划线的方法保留某一级的光谱。如红外光栅（echelett grating）的绕射光谱约有80%集中在第一级；但最好是用另一个光栅或用滤光器除去之。有一种叫做重摹光栅（replica grating）的，是在原光栅上涂塑胶，俟其凝固后剥下来即成。实际就是翻版的光栅。光栅亦有透射和

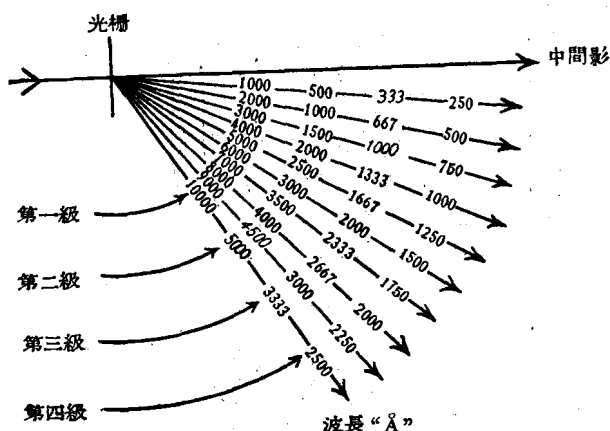


图 7 光柵光谱的级数重迭

反射两种。

再有一种方法是采用滤光器。它不是将光色散形成光谱，而是可透过复合光中某一段光谱，其余的光被反射或被吸收。滤光器的缺点是不能任意挑选光波波长，且只能用于可见光区。

滤光器皆是有颜色的玻璃或是含有染料的胶蛋白制成。胶蛋白滤光器在吸收光波区和透过光波区之间的界限是很分明的。但保存不易，水和热都容易损坏它。

图 8 为几种滤光器对不同光波的透光区和它的透射比。市售的滤光器多注明波长数，如写明 625 即是指出它对 625m μ 的光波透射比最大。有时滤光器未注明波长，可以用光谱光度计作一波长与透射比的曲线，即可知其性能。

将有色溶液装在平面的玻璃杯内，也可以作滤光器用。但须用上法检查其性能。如四氯化碳的碘溶液和亚硝酸钠的水溶液分置于两个平面杯中，其透过光波是 436m μ 。

三、光缝

在光源照射到色散系统之前，要先经过一个入光狭缝，使光成

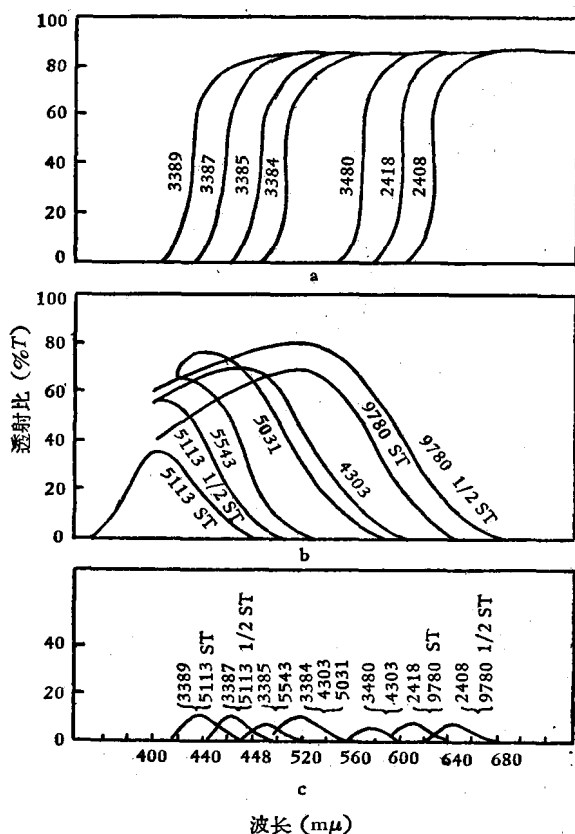


图8 滤光器的透射曲线，图中数字为商品号

为一个细的光柱照射到平行光镜，则光成为平行的光线投射到色散系统。经过色散系统的光再经另一平行光镜，则可在该平行光镜的焦点处得一清楚的光谱图。在焦点处放一个出光狭缝，转动稜镜或光栅，就使光谱移动，所需要的光波即可由出光狭缝处分出。象这样一套装置常被称为单色光器，因为由出光狭缝出来的光是单色光。

事实上由出光狭缝出来的光并不是某一个波长的光，狭缝愈宽所包括的光波愈多。如果色散系统是稜镜，则在长波光谱中包