

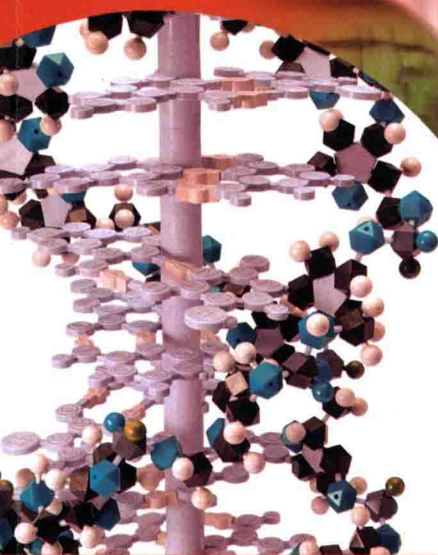


中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

生物化学实验技术

双语版

主编 陈建业 王含彦



科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等医药院校规划教材

生物化学实验技术

双语版

主 编	陈建业	王含彦			
副 主 编	易 芳	杨映雪	宋永砚		
编 者	(以姓氏笔画为序)				
	王含彦	汤建才	杨映雪	宋永砚	
	张秀云	张蜀敏	陈 竞	陈建业	
	陈瑾歆	易 芳	郭冬梅	唐 珍	
编写秘书	郭冬梅				

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书设计为四章:(一)生物化学常规技术训练,介绍生物化学实验常用的离心、比色分析、电泳和层析4大技术,为开展具体的实验操作提供基本的技术支撑。(二)基础性实验,包括4个蛋白质实验、2个酶实验、2个核酸实验和3个代谢性实验,以帮助学生加深对生物化学基础理论和核心内容的理解。(三)综合性实验,有7个实验,涉及蛋白质、核酸的分离、纯化与鉴定,重点培养学生对所学理论知识和多种实验技能的综合运用能力、独立使用能力以及综合分析和解决问题的能力。(四)是2个设计性实验,着重培养学生的科研思维,创新意识与科研能力。最后是附实验室安全常识与防护知识要点。

本书使用中英两种文字编写,是开展双语教学的专用实验教材,同时亦可作为留学生的生物化学实验教材。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验技术:汉英对照/陈建业,王含彦主编:—北京:科学出版社,2015.6

中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等医药院校规划教材
ISBN 978-7-03-044418-9

I. ①生… II. ①陈…②王… III. ①生物化学-实验-医学院校-教材-汉、英 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第110664号

责任编辑:朱 华 / 责任校对:胡小洁

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

大厂书文印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2015年6月第一次印刷 印张:11

字数:257 000

定价:32.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

21 世纪是生命科学世纪,生物化学是生命科学领域中最核心的基础学科和最活跃的研究领域之一。随着生物化学实验方法和技术的不断发展和完善,使其在生命科学的各个学科和领域中得到了迅速而广泛地应用。特别是在医学领域中,生物化学和在其基础上发展起来的分子生物学方法和技术已经成为了揭示疾病本质、服务疾病诊断和治疗的崭新手段,对于基础医学研究和临床诊断治疗都产生了深远影响。

医学生物化学实验主要是以生命科学问题为导向、以实验方法和研究内容为主线,在分子水平上通过科学实验手段来探讨人体正常生理状态下的代谢规律与疾病状态下发生的异常变化,从而为疾病的预防、治疗和预后提供科学的依据和指导。为适应基础医学教学改革的需要,本实验教材在继承生物化学实验核心内容的基础上,更加强调学科间的交叉融合,更加重视新技术的应用,更加注重对学生创新能力的培养。其目的是在对学生进行系统、规范的医学生物化学实验技能训练的同时,强调对学生动手能力、科研素质、探索精神和创新能力的培养,为学生提供一个理论联系实际,大胆实践操作和积极思考的舞台,使学生通过实验的锻炼,掌握医学生物化学实验的基本原理、基本方法和技术,增强科学思维、创新意识、独立思考、综合分析和解决问题的能力。

本教材分为四章:第一章为生物化学常规技术训练,主要介绍生物化学实验常用的四大技术:离心技术、比色分析技术、电泳技术和层析技术,为学生进行具体的实验操作提供基本的技术支撑。第二章为基础性实验,主要包括 4 个蛋白质实验、2 个酶实验、2 个核酸实验和 3 个代谢性实验,以帮助学生加深对生物化学基础理论和核心内容的理解。第三章为综合性实验,共计 7 个实验,涉及蛋白质、核酸的分离、纯化与鉴定,重点培养学生对所学理论知识和多种实验技能的综合运用能力、独立使用能力以及综合分析和解决问题的能力。第四章为 2 个设计性实验,着重培养学生的科研思维、创新意识与科研能力。最后附上生物化学实验基本知识,介绍实验室的一些基本的安全常识与防护知识要点,使学生养成良好的从事实验工作和科学研究的基本规范。本教材使用中英两种文字编写,有利于提高教师的双语教学水平和学生的英语水平,同时亦可作为留学生的生物化学实验教材,提高留学生的专业学习水平。

本书编写人员均为教学、科研的一线教师,长期从事生物化学的理论和实验教学,本教材是他们多年教学实践经验的总结和心得体会。尽管编者用了最大努力来编写本教材,但由于编写时间紧、任务重,加之是编者编写

中英双语教材的首次尝试,错误的地方在所难免,殷切希望在教材使用过程中同行专家和同学们提出宝贵意见,以便不断地完善教材内容、提高教材质量水平。

陈建业 王含彦

2015年3月于南充

目 录

前言

第一章 生物化学常规技术训练	(1)
实验 1 蛋白质的沉淀和分离——离心技术训练	(1)
Experiment 1 Precipitation and Separation of Proteins—Operation of Centrifuge	(4)
实验 2 硫酸铜的浓度测定——比色技术训练	(8)
Experiment 2 Determination of CuSO_4 Concentration—Spectrophotometry Technique	(13)
实验 3 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳定量分析	(19)
Experiment 3 Quantitative Analysis of Serum Proteins by Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis	(29)
实验 4 层析技术训练	(43)
Experiment 4 Ion Exchange Chromatography	(46)
第二章 基础性实验	(50)
实验 5 蛋白质的分段盐析与透析	(50)
Experiment 5 Protein Salt Precipitation and Dialysis	(52)
实验 6 双缩脲法测定血清总蛋白	(55)
Experiment 6 Determination of the Serum Total Proteins by Biuret Method	(57)
实验 7 酪蛋白等电点测定	(60)
Experiment 7 Determination of the Isoelectric Point of Casein	(62)
实验 8 唾液淀粉酶专一性以及温度等因素对酶活性的影响	(64)
Experiment 8 Specificity of Salivary Amylase and the Factors Affecting the Enzyme Activities	(68)
实验 9 乳酸脱氢酶的递氢作用	(72)
Experiment 9 The Hydrogen Transferring Effect of Lactate Dehydrogenase	(74)
实验 10 血浆胆固醇总量的测定(硫铁磷法)	(76)
Experiment 10 Determination of Plasma Total Cholesterol with Sulphur-iron-phosphorus Reagent	(78)
实验 11 血清谷丙转氨酶(GPT/ALT)活性测定	(81)
Experiment 11 Determination of the Activity of Glutamate-Pyruvate Transaminase (GPT / ALT) in Serum	(83)
实验 12 血浆二氧化碳结合力的测定——Van Slyke 酸碱滴定法	(86)
Experiment 12 Determination of CO_2 Combining Power of Plasma—Van Slyke Acid-alkali Titration	(88)
实验 13 酮体的生成和检测	(90)
Experiment 13 Detection of Ketogenesis in Liver	(92)

实验 14 PCR 扩增髓鞘碱性蛋白基因	(94)
Experiment 14 Amplification of Myelin Basic Protein Gene by the Polymerase Chain Reaction(PCR)	(96)
实验 15 DNA 琼脂糖凝胶电泳	(99)
Experiment 15 Agarose Gel Electrophoresis of DNA	(101)
第三章 综合性实验	(104)
实验 16 血清免疫球蛋白的分离、纯化和鉴定	(104)
Experiment 16 Separation, Purification and Identification of Serum Immunoglo- bulin	(107)
实验 17 碱性磷酸酶的分离纯化及其 K_m 值测定	(110)
Experiment 17 Isolation of Alkaline Phosphatase and Determination of its Michaelis Constant (K_m)	(115)
实验 18 质粒 DNA 的分离纯化与鉴定	(120)
Experiment 18 Isolation, Purification and Identification of Plasmid DNA	(122)
实验 19 动物肝脏中 DNA 的提取和检测	(124)
Experiment 19 Extraction and Detection of DNA from Liver of Swine	(126)
实验 20 人肝癌细胞株 HepG2 中内参 GAPDH 的免疫印迹检测	(128)
Experiment 20 Expression of Reference GAPDH in Human Hepatoma Cell Lines HepG2 by Western Blot	(132)
实验 21 肌糖原的酵解作用	(136)
Experiment 21 Glycolysis of Muscle Glycogen	(139)
实验 22 水果中维生素 C 的含量测定及多种因素对样品中维生素 C 影响作用的 动态观察	(142)
Experiment 22 The Spoiling Effects of Heat Temperature, Alkali and Heavy Metal Ions on Vitamin C	(146)
第四章 设计性实验	(150)
实验 23 基因克隆技术-人髓鞘碱性蛋白基因(MBP)重组质粒的构建与鉴定 ...	(150)
Experiment 23 DNA Cloning-Construction and Identification of Recombinant Plasmid of Human Myelin Basic Gene(MBP)	(154)
实验 24 人基因多态性分析	(158)
Experiment 24 Genetic Polymorphism Analysis of Human Gene	(163)
参考文献	(168)
附录:实验室安全须知	(169)
Appendix: Laboratory Safety	(169)

第一章 生物化学常规技术训练

实验1 蛋白质的沉淀和分离——离心技术训练

第一部分 蛋白质的沉淀和分离

【实验目的】

- (1) 掌握离心分离的原理及操作程序。
- (2) 熟悉普通离心机的安装调试、安全使用和日常保全。
- (3) 了解普通离心机主机的基本构件和工作原理。

【实验原理】

蛋白质溶液加入有机溶剂如乙醇,则蛋白质会沉淀析出,因为有机溶剂可使蛋白质胶体颗粒脱去水化膜。溶液中若加入少量中性盐如 Na_2SO_4 ,则沉淀更加迅速。

【器材与试剂】

1. 器材

- (1) 普通离心机。
- (2) 试管、药匙、刻度移液管。

2. 试剂

- (1) 蛋白质溶液:称取牛血清白蛋白 0.5g,溶于 100mL 蒸馏水,配成 5mg/mL 的蛋白液。
- (2) 95% 乙醇。
- (3) Na_2SO_4 粉末。

【实验操作】

- (1) 取一支离心管,加入 1mL 蛋白质溶液,再加入少量 Na_2SO_4 粉末,摇动使溶解。
- (2) 向离心管缓慢加入 2mL 95% 乙醇,剧烈振荡,观察有无沉淀析出,之后 4000 rpm 离心 5 分钟,使蛋白迅速沉淀并收集沉淀蛋白。

【思考题】

- (1) 影响离心效率的因素有哪些?
- (2) 普通离心机的主要应用范围有哪些?

第二部分 离心技术简介

一、离心机的基本原理

1. 离心力及其作用

当悬浮液绕轴旋转时,悬浮中的微粒就同时受到背向转轴方向的离心力和正向转轴方向的介质浮力的双向作用,微粒的运动轨迹取决于所受合力的方向。根据物理学原理推导可知: $F_{\text{合}} = F_{\text{离}} - F_{\text{介}} = V\rho \times 4\pi^2 N^2 r / 3600 - V\sigma \times 4\pi^2 N^2 r / 3600 = V4\pi^2 N^2 r / 3600 \times (\rho - \sigma)$, 式中 V 表示微粒的体积, N 表示每分钟的转数, r 表示微粒至转轴的距离, ρ 与 σ 分别表示微粒与其介质的密度。显然,当 $\rho = \sigma$ 时, $F_{\text{合}} = 0$, 微粒受力平衡,故将维持距转轴恒定的距离转动,也就不可能被分离开;当 $\rho < \sigma$ 时, $F_{\text{合}} < 0$, 微粒主要受向心力作用,故而将向转轴方向移动,直至浮到介质表面;当 $\rho > \sigma$ 时, $F_{\text{合}} > 0$, 微粒主要受离心力作用而向远离转轴方向移动,直至沉淀到容器底部。因此, $\rho > \sigma$ 是微粒从悬浮液中进行离心分离的基本条件。使用普通离心机的根本目的就在于使这样的微粒从悬浮液中分离出来。

从理论上讲,凡是能通过离心分离的微粒在悬浮液静置时,受重力与浮力的共同作用也能自动沉降而得以分离,只是分离所需时间较长,效果较差,沉降本领较弱。一般常用相对离心力(RCF)的大小来表示离心分离的本领强弱。相对离心力是指微粒在离心分离时所受的合力($F_{\text{合}}$)与在静置分离时所受合力($F'_{\text{合}}$)的比值,而 $F'_{\text{合}} = V\rho \times g - V\sigma \times g = Vg \times (\rho - \sigma)$, 式中 g 为重力加速度,故 $RCF = F_{\text{合}} / F'_{\text{合}} = 4\pi^2 N^2 r / (3600g)$, 由于 $4\pi^2 N^2 r / 3600$ 就是微粒处的角加速度,所以相对离心力又是微粒在离心时的角加速度与在静置时的重力加速度之比。很明显,只要调节 N 或 r 就可影响 RCF 的值,从而改变其离心分离本领。

2. 离心力与作用时间的积累效应

微粒在悬浮液中被分离的速度快慢除与转动的转数大小有关外,还与离心时间长短有关,即离心力作用于微粒上具有时间积累效应。

由此可见,对同一悬浮液可以在较低转速、较长时间得到较高转速、较短时间相同的分离效果。但是,若转速相差太大,则会受扩散作用影响而使较低转速离心的分离效果下降。

二、离心机的组成

根据具体的实验要求选择水平式离心机或斜角式离心机,普通离心机分水平式和斜角式两种,其构造简单、功能单一,只适用于一般物质的离心分离。实验室常用的离心机主要由离心机盖、离心机腔及套筒、显示表盘及调节按钮,电源和平衡附件等部分组成。

1. 离心套筒

离心管放置于离心套筒内进行离心,检查离心套筒内是否有橡皮缓冲胶垫,胶垫上若附着碎玻璃等杂物应清除。

2. 电源

电源应选择与离心机使用说明书相吻合的电源,电源插座必须有地线以保证离心安全。若实验室没有合适的电源,则应重新安装电源线,电源插座应靠近离心机以方便操作。

3. 平衡附件

(1) 天平:普通离心机离心以前,需将转子上的负载平衡。

(2) 烧杯与吸管:烧瓶用来盛配平液,吸管用来吸配平液进行配平。

三、离心操作

离心之前应检查离心机安放是否平稳,转轴是否牢固,润滑是否良好,离心机腔内有无异物,离心机盖能否锁紧等。在以上准备完成以后,应先让离心机进行空载运转,观察空载运转情况是否正常,在无异常时方可进行离心。

(1) 调平称量天平。将置于离心机对称位置上的离心套筒、离心管及内盛物配平,相差不超过0.1克。

(2) 将平衡好的离心套筒放于离心机对称位置。

(3) 检查离心机是否安放平稳。

(4) 关上离心机盖,锁牢。

(5) 插上电源插头,打开离心机开关。

(6) 调节离心转速,时间。

(7) 离心完毕,关离心机,拔下电源插头,任离心机自停。

(8) 待离心机完全停止转动后,打开盖,取出离心管。

(9) 清洁离心套筒、离心管及离心腔,关盖。

四、注意事项

(1) 离心前必须将放置于对称位置上的离心套筒、离心管及离心液进行精确平衡,重量差不超过0.1克。对于高速和超速离心机,不仅要求重量平衡,而且要求配平液的密度与离心液的密度相等,以达到力矩平衡。

(2) 离心机安放要求水平、稳固,转轴润滑良好,保证离心机的正常运转。

(3) 离心管盛液不宜超过四分之三,避免腐蚀性液体溅出腐蚀离心机,同时造成离心不平衡。

(4) 放入离心套筒后应紧盖、锁牢,防止意外事故的发生。离心完毕应关离心机、拔掉电源插头任机自停,严禁用手助停,以免伤人损机,使沉淀泛起。

(5) 注意离心机的保养。离心机使用完毕,要及时清除离心机内水滴、污物及碎玻璃渣,擦净离心腔、套筒及机座。经常做好离心机的防潮、防过冷、防过热、防腐蚀药品污染,延长使用寿命。

(6) 离心过程若发现异常情况应立即拔下电源插头,然后再进行检查。如听到碎玻璃渣声响,可能是试管被打碎,应重新更换试管。

(唐 珍 陈建业)

Experiment 1 Precipitation and Separation of Proteins—Operation of Centrifuge

Part One Precipitation and Separation of Proteins

【 Purpose 】

- (1) To master the basic principle and operational procedures of centrifuge.
- (2) To understand the installation and debugging, safe use and daily preservation of centrifuge.
- (3) To know the basic components and daily maintenance of centrifuge.

【 Principle 】

Proteins do not dissolve in some organic solvents, so proteins can be precipitated out if the organic solvent (such as alcohol) reaches to a certain concentration. Organic solvents decrease protein stability by dehydration of protein colloidal particles in water solution. Precipitation will be more quick and complete when a small amount of neutral salts (such as Na_2SO_4) is also added in the solution.

【 Apparatus and Reagents 】

1. Apparatus

- (1) Centrifuge and filter paper.
- (2) Centrifuge tubes, medicine spoon, graduated pipettes.

2. Reagents

- (1) Protein solution: dissolve 0.5g standard bovine serum albumin (BSA) in 100mL dH_2O to get a 5mg/mL protein solution.
- (2) 95% ethanol.
- (3) Na_2SO_4 powder.

【 Procedure 】

- (1) Add 1mL protein solution in a centrifuge tube and then add a small amount of Na_2SO_4 powder, shake to dissolve.
- (2) Then add 2mL 95% ethanol slowly and shake violently, observe whether there is pre-

precipitate formed. Centrifuge the solution at 4000 rpm for 5 minutes and collect the precipitation.

【Questions】

- (1) List the factors which affect the centrifugation efficiency?
- (2) What fields do the centrifuges be applied?

Part Two Introduction of Centrifugation

I. Centrifuge Principle

1. Centrifugal force

Centrifugation is one of the preferred methods for separating various biological macromolecules, for example, cells, nucleic acids and proteins. When the suspended particles rotate around the centrifugal axis, they will be affected by the centrifugal force and media buoyancy at the same time. The movement trajectory of the suspended particles depends on the direction of the resultant force. According to the principle of physics, it leads to the following physical formula,

$$F_R = F_C - F_M = V\rho \times 4\pi^2 N^2 r / 3600 - V\sigma \times 4\pi^2 N^2 r / 3600 = V/4 \pi^2 N^2 r / 3600 \times (\rho - \sigma)$$

F_R : Resultant force; F_C : Centrifugal force; F_M : Media buoyancy; V : particle volume; N : revolutions per minute; R : distance from the particles to the axis; ρ and σ : particles density and the medium density.

Obviously, it can be concluded as follows from the above formula. First, when $\rho = \sigma$ and $F_R = 0$, all kinds of forces loading on the particles are balance, the particles will maintain a fixed distance and a constant speed rotating around the centrifugal axis and can not be separated. Second, when $\rho < \sigma$ and $F < 0$, the particles are mainly subjected by the effect of centripetal force and will move in the direction of centrifugal axis until floating to the medium surface. Third, when $\rho > \sigma$ and $F_R > 0$, the particles are mainly subjected by the effect of centrifugal force and will move away from the direction of centrifugal axis until precipitating to the bottom of centrifuge tube. Therefore, $\rho > \sigma$ is the basic condition of centrifugal separation particles from suspension liquid. The main purpose of using centrifuge is to separate such particles from suspended solution.

Theoretically, all the particles which can be separated by the centrifugal method, can be also separated by the gravity automatically under the action of gravity and buoyancy together, but it results in more time and poor efficiency. The relative centrifugal force (RCF) is commonly used to represent the centrifugal separation ability. $RCF = F_R / F'_R = 4\pi^2 N^2 r / 3600g$

F_R : Resultant force when the suspended particles are separated by centrifuge; F'_R : Resultant force when the suspended particles are separated by standing, and $F'_R = V_p \times g = Vg \times (\rho - \sigma)$; g : gravitational acceleration.

The RCF value can be affected by the regulation of N and /or r , which results in the change of centrifugal separation ability.

2. Accumulation effects of the centrifugal force and the time

The separation speed of suspended particles in solution is not only related to the rotating rev-

olution but also to the centrifugal time. That is to say there are some time accumulation effects of centrifugal force on the suspended particles. The same separation efficiency can be achieved by centrifuge at higher speed for a shorter period of time or lower speed for a longer period of time. But if the rotating speed is too slow, the diffusion will weaken the separation efficiency.

II. Component of Centrifuge

There are various centrifuges for separation different particles. For example, a horizontal or angle centrifuge is selected according to the experimental requirements. All the centrifuges consist of centrifugal lid, centrifugal cavity and sleeves, panel, centrifugal power and appendixes for balance, etc.

1. Sleeve of centrifuge

Sleeves should be checked to make sure the presence of the rubber buffer pad inside of them. If there are broken glasses or other debris inside the sleeves they should be cleared completely.

2. Centrifuge power

Power supply should be selected and used according to the instruction of centrifuge. The socket must have power grounding for safety. The power line should be installed if no proper power is available in lab, and the socket should be installed near from the centrifuge in order to operate easily.

3. Appendixes for balance

(1) Balance scale: ordinary centrifuge uses 1/1000 balance scale to balance. The two beakers with same weight are fixed on balance scale for use.

(2) Beaker and suction tube: beaker is used for holding the balance solution, and suction tube is used to balance.

III. Operation of Centrifuge

Before centrifuging, examine the centrifuge and the following staff: the stability of centrifuge, the firmness and lubrication of the rotating shaft, the absence of foreign matters inside the sleeves, the lock of the lid.

After examination, do a test run and observe the centrifuge without samples, and centrifugation is carried out if everything is normal.

(1) Balance: after balanced, put the centrifuge sleeves and centrifuge tubes with samples at the symmetrical positions. The weight difference between the two opposite centrifuge tubes should not exceed 0.1 gram.

(2) Put the balanced centrifuge sleeves at the symmetrical positions of centrifuge.

(3) Check the stability of centrifuge.

(4) Close and lock the centrifuge lid.

(5) Insert the power plug and turn on the power.

(6) Set up the speed and time of centrifugation.

- (7) When the centrifugation is finished, close the centrifuge, take off the power plug and let the centrifuge stop automatically.
- (8) When the centrifuge is stopped completely, open the lid and take out the tubes.
- (9) Clean the centrifuge sleeves, tubes and cavity, close the lid.

IV. Attention

(1) The centrifuge sleeves, tubes and solutions at the symmetrical positions must be balanced accurately. The weight difference between the two opposite centrifuge tubes should not exceed 0.1 gram. For high speed or ultracentrifugation, not only the weight, but also the density of the samples should be similar in order to achieve the balance of torque.

(2) Centrifuge should be placed horizontally and stably, the spin axis should run smoothly with good lubricating property.

(3) The solution in centrifuge tubes should be less than three-quarter of the full volume.

(4) The lid should be closed and locked tightly. When the centrifugation is finished, turn off the centrifuge, unplug the power, and let it stop automatically. It is prohibited to stop the machine by hand, which may cause accidents and stir the precipitates.

(5) Pay attention to the maintenance of centrifuge. After using, clear the cavity, sleeves and engine base. Keep centrifuge from moisture, extreme temperature and corrosive solution.

(6) Unplug the power immediately if there is abnormal situation happened in the process of centrifugation. Check again to figure out the problem. For example, the tube may be broken if glass sound is heard. In this condition, the tube should be replaced.

(唐 珍 陈建业)

实验2 硫酸铜的浓度测定——比色技术训练

第一部分 硫酸铜的浓度测定

【目的要求】

- (1) 掌握 721A 型分光光度计的使用。
- (2) 熟悉朗伯-比尔定律及其计算公式的推导和应用。
- (3) 了解 721A 型分光光度计的构造和工作原理。

【实验原理】

光的本质是电磁波。不同的光有不同的波长。肉眼可见的彩色光称为可见光,波长范围在 400 ~ 750nm,小于 400nm 的光线为紫外线,大于 750nm 的光线称为红外线。

同一物质对不同波长的光吸收能力不同,不同物质对同一波长的光吸收能力也不同,这称为物质对光的选择性吸收。所以物质呈现出的颜色正是它对光选择性吸收所产生的视觉反映。有色物质溶液颜色的深浅与溶液浓度有关,浓度越大,颜色越深,即物质吸收的光越多。若定量分析,溶液浓度与吸光度之间的关系可用朗伯-比尔定律(Lambert-Beer Law)来描述:

若保持特定入射光(即特定波长 λ),则

$$A = \epsilon cl \quad (2-1)$$

A:吸光度; ϵ :比例常数,亦称为吸光系数,是物质的特征常数; c :溶液浓度; l :溶液层厚度。此式(2-1)说明:当一束单色光通过含有吸光物质的均匀透明的溶液时,溶液的吸光度与物质的浓度及溶液层厚度的乘积成正比。这正是分光光度法对物质进行定量分析的理论基础。

【器材与试剂】

1. 器材

- (1) 擦镜纸和滤纸片。
- (2) 721A 型分光光度计(配置 1 厘米厚比色皿)。
- (3) 试管。
- (4) 刻度移液管。

2. 试剂

- (1) dH_2O 。
- (2) 标准液 S(5% CuSO_4):称取 50.00g CuSO_4 溶解于 1000mL 室温蒸馏水中。
- (3) 待测液 U:未知浓度的 $x\%$ CuSO_4 。

【实验操作】

1. 标准曲线法

- (1) 绘制标准曲线。

1) 向 6 支试管添加试剂,按表 2-1 操作。

表 2-1 CuSO₄ 溶液的标准曲线制作

试剂	试管					
	1	2	3	4	5	6
5% CuSO ₄ /mL	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
dH ₂ O/mL	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0
浓度(%)						
吸光度(A)						

2) 计算出各管溶液浓度,填入表中。

3) 混匀各管样品,以 1 号管作为空白对照,在 721A 型分光光度计上于波长 650nm 处,测各管吸光度 A,记入表中。

4) 以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

(2) 测定样品:在波长 650nm 处测待测 CuSO₄ 液的吸光度 A,并从标准曲线上查出浓度。

2. 标准对照法

(1) 测量:在波长 650nm 处,测标准溶液 5% CuSO₄ 吸光度 A_s 和待测液 x% CuSO₄ 的吸光度 A_u。

(2) 计算:根据朗伯-比尔定律,标准液 $A_s = \varepsilon c_s l$

待测液 $A_u = \varepsilon c_u l$

故, $c_u = (A_u/A_s) \times c_s$

【思考题】

比较标准曲线法和标准对照法的实验结果,分析两种方法产生误差的原因及减小方法。

第二部分 分光光度技术简介

一、基本原理

当一束平行的单色光通过某种物质的溶液时,由于部分光被吸收,透过溶液的光强度减弱。若设入射光强度为 I₀,吸收光为 I_a,透射光强度为 I_t,则

$$I_0 = I_a + I_t$$

而且溶液对光的吸收与溶液的浓度和通过溶液层的厚度都有关,科学家朗伯(Lambert JH)和比尔(Beer A)分别研究了光吸收度与两者的关系。

1. 朗伯定律(Lambert Law)

朗伯(Lambert JH)于 1766 年研究了单色光的吸收强度与溶液层厚度的定量关系。设 I 为通过溶液后的光强度, I₀ 为入射光强度, l 为溶液的厚度,

$$I = I_0 e^{-k_1 l} \tag{2-2}$$

其中 e 为自然对数, k_1 为消光系数, 是物质的特征常数。式(2-2)说明单色光通过溶液时, 其光强度随吸光介质的厚度 l 增长而呈指数减少。

2. 比尔定律(Beer Law)

比尔(Beer A)于1852年研究了单色光的吸收强度与溶液浓度的定量关系。设 c 为溶液浓度,

$$I = I_0 e^{-k_2 c} \quad (2-3)$$

式(2-3)说明单色光通过溶液时, 光强度随物质浓度 c 的增加而呈指数减少。

将上述两个定律合并起来, 即得到朗伯-比尔定律(Lambert-Beer Law)

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\varepsilon c l} \quad (2-4)$$

式(2-4)中, ε 是常数, 也叫摩尔吸光度, 是每种吸收物质在特定波长和特定溶剂中的特征, 波长和溶剂改变时, ε 随之改变。比率 I/I_0 是透光率(transmittance, T), 通常以百分率表示。所以

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\varepsilon c l}$$

取对数, $-\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \varepsilon c l$

透光率 T 的负对数为吸光度(absorbance, A), 则

$$A = \varepsilon c l \quad (2-5)$$

说明溶液对光的吸光度只与溶液的浓度和溶液层的厚度有关, 或者说吸光度与浓度成正比。因此若能测得标准品与待测品的吸光度, 就可以通过标准曲线法或者标准对照法测定未知溶液的浓度。

二、分光光度计的基本结构

测定不同的光谱有不同的光谱分析仪, 但是各类光谱分析仪器都包括五个基本组成部分: 光源/电磁波信号发射系统、分光系统、样品池、光谱信号检测系统和显示/记录仪(图2-1)。

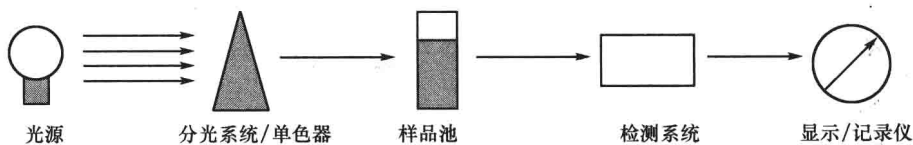


图2-1 分光光度计的基本构造

1. 光源

在样品分析所要求的波长范围内, 光源必须要能发射出稳定的、足够光能的光。通常使用钨灯和氘灯两种光源, 前者适于400~900nm的光谱分析, 后者适于200~400nm的范围。即在可见光区、近紫外光区和近红外光区常用钨灯, 在紫外光区常用氘灯。

通常, 用紫外光源测定无色物质, 称为紫外分光光度法, 用可见光光源测定有色物质, 称为可见光光度法。

2. 分光系统

由很多棱镜或反射光栅、狭缝、聚焦镜、准光镜等排列而成, 以选择理想波长的光, 并将