

21 世纪高等院校教材(生命科学类)

生物化学与分子生物学 实验技术教程

杨建雄 编著

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书按照实验技术自身的体系,分5章全面系统地讲述生物化学与分子生物学的实验技术原理,并将70个难度不等的实验按技术类别分列于5章中,可供不同条件的学校选做。本书适于用作教材,将生物化学与分子生物学实验技术独立设课,通过讲做结合的模式,对生命科学各专业本科生和部分专业硕士研究生进行系统的生物化学与分子生物学技术训练;也可以供有关科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术教程/杨建雄编著. —北京:科学出版社, 2002.5

21世纪高等院校教材(生命科学类)

ISBN 7-03-009979-6

I. 生… II. 杨… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材 ②分子生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 098286 号

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>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002年5月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2002年5月第一次印刷 印张: 15

印数: 1—4 000 字数: 287 000

定价: 23.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

前 言

生物化学与分子生物学实验技术,具有完整而系统的知识体系,可以构成独立设置的课程,以便于对学生进行实验技术的系统训练。本书按照实验技术自身的体系,分5章全面而系统地讲述实验技术的基本原理,并将70个难度不等的实验按技术类别分列于5章中,可供不同条件的学校选做。特别是一些实验设备和经费有限的院校,可以让学生做一些基本实验,同时,通过教师的讲授和演示,适当配合音像和网络等手段,来提高实验技术的教学层次。书中一些难度较大的实验,可供条件较好的院校选做,也为学校条件的改善和学科的发展留出了适当的余地。希望本书的出版,能够促进生物化学与分子生物学实验技术独立设课的进程,能够有利于提高学生的技术水平和创新能力,也希望本书的出版能促进通过讲做结合的教学模式大范围提高生物化学与分子生物学实验技术的教学水平。

本书将生物化学与分子生物学实验技术融为一体,是由于分子生物学技术可以看作生物化学技术的延伸和扩展,将二者作为一门课来开设,有利于提高教学效率。另外,由于不少院校单独开设分子生物学实验课尚有困难,但在生物化学实验的基础上安排一些分子生物学的基本实验则比较容易,因此,将生物化学与分子生物学技术作为一门课来开设,对于促进分子生物学技术的教育显然是有利的。

本书力求全面系统、深入浅出、简明扼要、注重实用,技术原理的叙述避免与理论课的重复,淡化纯理论(如层析技术中的塔板理论)的叙述。各章的实验均属于同一类型,且已有技术原理的系统叙述,故每个实验的原理均可写得十分简短。每一章的各个实验所用器材相近,且操作步骤中不难找出所需的器材,故本书省去了实验的器材部分,在减小篇幅的同时,突出了操作步骤。经过反复精选和修改,使本书能在较小的篇幅内容纳较多的内容。

本书适合于作为本科生或硕士研究生实验技术课的教材使用,也可供有关科技人员参考。

本书编写过程中得到北京大学张庭芳教授、朱玉贤教授、朱圣庚教授、山东大学张长铠教授、河北大学任国栋教授、北京师范大学魏群教授、东北师范大学张丽萍教授、河南师范大学徐存栓教授、汕头大学韩雅莉教授、内蒙古师范大学齐宝瑛教授、青海农业大学谢令德博士、西北大学景建舟博士、烟台师范学院王晓安博士、汉中师范学院李新生教授、淮北煤炭师范学院马成仓教授等同行专家和高等教育出版社孙素青同志、田军同志的大力支持,朱玉贤教授还提出了宝贵的修改意见,谨表示衷心感谢。

由于作者水平有限,本书难免会有差错和不足,请有关专家和广大读者批评指正。

作 者

2001. 9. 25 于陕西师范大学

目 录

前言

第一章 生物化学与分子生物学中的定量分析	(1)
第一节 滴定分析法	(1)
一、基本原理	(1)
二、标准溶液	(3)
三、滴定分析的计算	(5)
四、减小滴定误差的方法	(6)
第二节 紫外可见分光光度法	(7)
一、基本原理	(7)
二、分光光度计的主要部件	(9)
三、分光光度法的定性和定量	(10)
四、减小测量误差的方法	(11)
第三节 荧光分析法	(12)
一、基本原理	(12)
二、荧光仪的主要部件	(13)
三、荧光分析法的定性和定量	(13)
四、减小测量误差的方法	(14)
第四节 酶活力及动力学数据的测定	(15)
一、酶活力的测定	(15)
二、 K_m 和 V_{max} 的测定	(18)
三、其他动力学数据的测定	(19)
实验 1—1 粗脂肪的提取和定量测定	(20)
实验 1—2 碘价的测定(Hanus 法)	(21)
实验 1—3 皂化价的测定	(22)
实验 1—4 酸价的测定	(23)
实验 1—5 脂肪乙酰价的测定	(24)
实验 1—6 蛋白质的测定(凯氏定氮法)	(25)
实验 1—7 2,6-二氯酚靛酚法测定维生素 C 的含量	(26)
实验 1—8 碘量法测定维生素 C 的含量	(28)
实验 1—9 血糖定量测定(GOD-PAP 法)	(29)
实验 1—10 蒽酮比色定糖法	(30)

实验 1—11	肝素钠的容量测定	(30)
实验 1—12	血清胆固醇的定量测定(磷钼铁法)	(32)
实验 1—13	血清总胆固醇的测定(邻苯二甲醛法)	(33)
实验 1—14	双缩脲法测定蛋白质含量	(33)
实验 1—15	Folin 试剂法(Lowry 法)测定蛋白质含量	(34)
实验 1—16	考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	(35)
实验 1—17	紫外吸收法测定蛋白质含量	(36)
实验 1—18	紫外吸收法测定核酸含量	(37)
实验 1—19	二苯胺显色法测定 DNA 含量	(38)
实验 1—20	地衣酚显色法测定 RNA 含量	(39)
实验 1—21	定磷法测定核酸含量	(40)
实验 1—22	荧光法测定维生素 B ₂ 含量	(42)
实验 1—23	枯草芽孢杆菌蛋白酶活力测定	(43)
实验 1—24	血清丙氨酸氨基移换酶(ALT)的测定	(44)
实验 1—25	酸性磷酸酯酶的测定	(46)
实验 1—26	碱性磷酸酶的反应动力学性质	(46)
第二章	生物大分子的提取、沉淀和离心分离	(49)
第一节	生物大分子的提取	(49)
一、材料的选择与处理		(49)
二、确定测定方法		(50)
三、细胞的破碎		(50)
四、抽提		(52)
第二节	沉淀分离技术	(54)
一、蛋白质的沉淀分离		(54)
二、核酸的提取与沉淀分离		(57)
第三节	离心分离技术	(59)
一、离心机的种类与用途		(59)
二、离心分离方法的选择		(60)
三、离心条件的确定		(61)
实验 2—1	醇脱氢酶的提纯	(63)
实验 2—2	大蒜细胞 SOD 的提取与分离	(65)
实验 2—3	大鼠肝 rRNA 的提取与分离	(66)
实验 2—4	枯草芽孢杆菌碱性磷酸酶的提取与盐析	(67)
实验 2—5	枯草芽孢杆菌 DNA 的提取与分离	(69)
实验 2—6	酵母 RNA 的提取与分离	(70)
实验 2—7	从肝脏中提取 DNA	(71)

实验 2—8 大肠杆菌细胞膜的分离	(72)
实验 2—9 RNA 的蔗糖密度梯度离心分离	(73)
实验 2—10 大鼠肝细胞核的分离	(74)
第三章 层析技术	(75)
第一节 吸附层析	(75)
一、吸附柱层析	(76)
二、聚酰胺薄膜层析	(80)
第二节 分配层析	(80)
一、概述	(80)
二、纸层析	(81)
第三节 凝胶层析	(85)
一、基本原理	(85)
二、凝胶的选择	(86)
三、操作	(87)
第四节 离子交换层析	(88)
一、基本原理	(88)
二、离子交换剂	(89)
三、操作	(92)
第五节 亲和层析	(94)
一、配基与偶联凝胶的选择与处理	(95)
二、亲和层析的操作条件	(96)
第六节 薄层层析	(96)
一、支持剂的选择与处理	(96)
二、薄层板的制作	(97)
三、层析方法	(98)
第七节 气相色谱	(99)
一、基本原理	(99)
二、气相色谱的气路系统	(100)
三、色谱柱	(101)
四、检测器	(102)
五、定性和定量方法	(103)
第八节 高效液相色谱	(104)
一、概述	(104)
二、HPLC 的特点	(104)
三、HPLC 的分类	(105)
四、HPLC 的仪器构成	(107)

五、定性定量方法	(107)
实验 3—1 氨基酸的纸层析	(108)
实验 3—2 微晶纤维素薄板层析法分离氨基酸	(109)
实验 3—3 核苷酸的离子交换层析	(110)
实验 3—4 DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析	(112)
实验 3—5 凝胶层析测定蛋白质的 M_r	(113)
实验 3—6 鸡卵类黏蛋白的制备	(115)
实验 3—7 胰蛋白酶的亲和层析	(118)
实验 3—8 醇酯成分的气相层析	(120)
实验 3—9 HPLC 法测定生物类黄酮含量	(121)
实验 3—10 HPLC 法测定维生素 A 含量	(122)
实验 3—11 HPLC 法测定维生素 D 含量	(124)
第四章 电泳技术	(126)
第一节 基本原理	(126)
一、泳动度	(126)
二、影响泳动度的因素	(127)
第二节 醋酸纤维素薄膜电泳	(128)
第三节 琼脂糖凝胶电泳	(129)
一、琼脂糖凝胶的特点	(129)
二、DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(129)
三、印迹转移电泳	(131)
四、交变脉冲电场凝胶电泳	(132)
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(133)
一、聚丙烯酰胺凝胶的特点	(133)
二、凝胶聚合的原理及有关特性	(133)
三、PAGE 原理	(135)
四、SDS-PAGE 原理	(137)
五、聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳原理	(138)
六、聚丙烯酰胺凝胶双向电泳原理	(142)
七、染色方法	(142)
第五节 高效毛细管电泳	(146)
一、基本原理	(146)
二、实验方法	(147)
三、分离类型及应用	(148)
实验 4—1 血清蛋白的醋酸纤维素薄膜电泳	(149)
实验 4—2 垂直板 PAGE 分离血清蛋白	(151)

实验 4—3 SDS-PAGE 测定蛋白质的相对分子质量	(153)
实验 4—4 SDS-PAGE 的银染色法	(155)
实验 4—5 水平超薄型 IEF-PAGE	(156)
实验 4—6 蛋白质的双向凝胶电泳	(159)
实验 4—7 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(160)
实验 4—8 PAGE 分离 RNA	(161)
实验 4—9 对流免疫电泳法测定胎儿甲种球蛋白	(162)
实验 4—10 火箭免疫电泳法测定抗原含量	(164)
第五章 分子生物学基本技术	(165)
第一节 DNA 的体外合成	(165)
一、DNA 的化学合成	(165)
二、聚合酶链反应技术	(166)
第二节 核酸的分子杂交	(170)
一、探针的种类与选择	(170)
二、标记物的选择	(171)
三、探针的放射性同位素标记	(175)
四、探针的非放射性标记	(176)
五、膜上印迹杂交的条件选择	(176)
六、杂交信号的检测	(179)
第三节 基因克隆	(181)
一、目的基因的来源	(181)
二、常用的克隆载体	(182)
三、DNA 分子的体外连接	(184)
四、重组子导入受体细胞	(186)
五、重组子的筛选	(186)
六、基因组文库的构建	(188)
七、cDNA 文库的构建	(190)
第四节 基因表达	(191)
一、原核生物的表达载体	(191)
二、用于原核细胞表达的外源基因	(193)
三、提高表达水平的措施	(193)
四、外源基因在哺乳动物细胞中的表达	(197)
五、转基因植物	(200)
第五节 转录调控研究技术	(201)
一、基因功能状态的研究方法	(201)
二、顺式作用元件与反式作用因子的分析方法	(203)

实验 5—1	血液标本中 DNA 的提取	(205)
实验 5—2	哺乳动物基因组 DNA 的提取	(206)
实验 5—3	mRNA 提取与纯化	(207)
实验 5—4	脉冲电场电泳分离 DNA	(209)
实验 5—5	大肠杆菌的转化	(210)
实验 5—6	质粒 DNA 的提取	(210)
实验 5—7	质粒 DNA 的酶切及电泳鉴定	(212)
实验 5—8	质粒 DNA 的分子杂交	(213)
实验 5—9	使用光敏生物素探针的 Southern 杂交	(215)
实验 5—10	DNA 重组	(217)
实验 5—11	PCR 扩增 DNA	(218)
实验 5—12	反转录聚合酶链反应(RT-PCR)	(219)
实验 5—13	外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	(220)
附录	常用缓冲液的配制	(221)

第一章 生物化学与分子生物学中的定量分析

生命科学中的许多问题，要通过对物质含量的测定来分析和探索，生物大分子的分离纯化过程中，也经常要对其含量进行分析和测定。生物化学与分子生物学中常用的定量分析方法主要有滴定分析法、分光光度法、荧光分析法、酶活测定法等。层析、电泳、分子杂交等技术，既可用于分离分析，又可用于含量测定，拟在其他章节介绍。放射性同位素技术主要用于分子杂交，免疫学技术主要用于免疫电泳和酶联显色，将在有关章节概要介绍其中与生物化学与分子生物学关系密切的部分内容。

第一节 滴定分析法

一、基本原理

(一) 滴定分析法的概念

“滴定”(titration)是将已知准确浓度的溶液——标准溶液通过滴定管滴加到待测溶液中的过程。待“滴定”进行到化学反应按计量关系完全作用为止，然后根据所用标准溶液的浓度和体积计算出待测物质含量的分析方法称为滴定分析法。因为这类方法是以测量标准溶液的容积为基础的方法，故也称为“容量分析法”(volumetric analysis)。滴定分析法具有快速准确，操作简便，仪器要求低的特点，相对误差一般在0.2%以下，目前仍然是广泛应用的定量分析方法。

当化学反应按计量关系完全作用，即滴入溶液物质的量与待测定组物质的量恰好符合化学反应式所表示的化学计量关系，称为反应到达了化学计量点(stoichiometric point)。适合于滴定分析的化学反应必须具备以下三个条件：

- ① 待测物质与标准溶液之间的反应要有严格的化学计量关系，反应定量完成的程度要达到99.9%以上，这是定量计算的基础；
- ② 反应必须迅速完成，或通过加热、使用催化剂等措施可以迅速完成；
- ③ 必须有适宜的指示剂或其他简便可靠的方法确定终点。

(二) 生物化学与分子生物学中常用的滴定法

根据化学反应类型的不同，滴定分析法可分为酸碱滴定法、沉淀滴定法、配位滴定法和氧化还原滴定法。在生物化学中，使用较多的是酸碱滴定法和氧化还原滴定法。

1. 酸碱滴定法

酸碱滴定法是利用酸碱中和反应的一种容量分析法。一般可按两种方式进行：

(1) 直接法 利用酸或碱的标准溶液直接滴定被测的碱性物质或酸性物质。

(2) 间接法 有些物质由于某些原因不能用酸或碱直接滴定，但可以用间接法测定。例如，测定硫酸铵的含氮量时，可以在硫酸铵溶液中加入浓氢氧化钠溶液，加热，使生成氨，然后用过量的一定体积的标准酸溶液吸收生成的氨，再用标准溶液滴定剩余未作用的标准酸溶液，就可以根据化学计量关系求出氮的含量。

由于一般酸碱反应进行时，无外观变化，因此必须设法确定化学计量点。最常用的方法是在被滴定的溶液中加入指示剂，根据指示剂颜色变化来指示化学计量点。

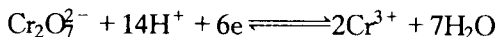
2. 氧化还原滴定法

氧化还原滴定法，是以氧化还原反应为基础的容量分析方法。

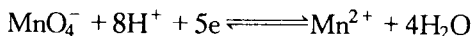
因为多数元素具有不同的氧化态，所以选用合适的氧化剂作为滴定剂，可以测定许多还原性物质；也可以用合适的还原剂测定许多氧化性物质。

依照所用氧化剂或还原剂的不同，常见的氧化还原滴定法分为如下数种。

(1) 重铬酸钾法 重铬酸钾法是用重铬酸钾作为氧化剂，制成标准溶液，用来测定还原性物质的一种氧化还原滴定法。重铬酸钾是强氧化剂，在酸性溶液中，可以获得 6 个电子，本身还原为正三价铬离子：



(2) 高锰酸钾法 高锰酸钾是一种强氧化剂，在酸性溶液中获得 5 个电子被还原为正二价锰离子：

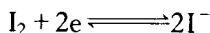


在中性或微酸性溶液中，高锰酸钾也可以被还原，获得 3 个电子还原为二氧化锰：

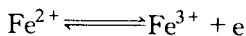


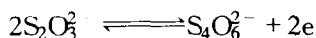
在氧化还原滴定中，一般采用酸性溶液中的反应。

(3) 碘量法 用碘作为氧化剂，制成标准溶液，一个碘原子可以获得 1 个电子形成碘离子：

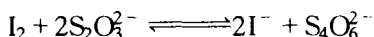


在氧化还原滴定中，硫酸亚铁常作为还原剂与高锰酸钾或重铬酸钾配合使用。硫代硫酸钠常与碘配合使用。亚铁离子氧化成高铁离子。硫代硫酸钠氧化为连四硫酸钠：





碘和硫代硫酸钠的反应是碘量法的基本反应：



因为许多强的还原剂容易被空气中的氧氧化，所以氧化还原滴定法中氧化剂应用较多。氧化还原滴定中所用的氧化剂都是比较稳定的。在分析过程中，氧化剂的选择要依分析的对象和任务而定。作为分析反应主要应考虑到反应能否进行、反应进行完全的程度、反应的速度以及如何提高反应的选择性等因素。

(三) 滴定方式

根据滴定方式可将滴定分析法分为以下几种。

(1) 直接滴定法 所用化学反应能满足滴定要求时，可直接用标准溶液滴定被测物质，称为直接滴定法，如用盐酸标准溶液滴定氢氧化钠试样溶液等。

(2) 返滴定法 又称剩余滴定法或回滴定法。若反应速度较慢或者反应物是固体，滴定剂加入样品后反应无法在瞬时定量完成，可先加入一定量的过量标准溶液，待反应定量完成后用另外一种标准溶液作为滴定剂滴定剩余的标准溶液。如固体碳酸钙的测定可先加入一定量的过量盐酸标准溶液至试样中，加热使样品完全溶解，冷却后再用氢氧化钠标准溶液返滴定剩余的盐酸。

(3) 置换滴定法 对于不按确定化学计量关系反应（如伴有副反应）的物质有时可通过其他化学反应间接进行滴定，即加入适当试剂与待测物质反应，使其被定量地置换成另外一种可直接滴定的物质，再用标准溶液滴定此生成物。如硫代硫酸钠不能直接滴定重铬酸钾或其他强氧化剂，因为强氧化剂能将 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 氧化成 $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ 和 SO_4^{2-} 的混合物，化学计量关系不确定，故无法采用直接滴定法测定。若在酸性重铬酸钾溶液中加入过量 KI，使 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 定量反应生成 I_2 ，再用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液直接滴定，可用此法定量测定重铬酸钾及其他氧化剂。

(4) 间接滴定法 除了返滴定法和置换法，有时还应用其他的化学反应间接进行测定，如对 Ca^{2+} 的测定可通过生成 CaC_2O_4 沉淀的反应，将沉淀过滤洗净后溶于酸，用 KMnO_4 标准溶液滴定草酸而间接测定 Ca^{2+} 的含量。

二、标准溶液

(一) 标准溶液与基准物质

在滴定分析中，不论采用何种滴定方式，都离不开标准溶液。标准溶液的配制分为直接法和间接法。

1. 直接法

标准溶液的直接配制需要使用基准物质，即能用来直接配制标准溶液的物质。基准物质应该符合下列条件：

- ① 试剂组成和化学式完全相符；
- ② 试剂的纯度一般应在 99.9% 以上，且稳定，不发生副反应；
- ③ 试剂最好有较大的摩尔质量，以便减少称量误差。

用于配制标准溶液的常用基准物质有重铬酸钾、氯化钠、硝酸银等。

配制方法是准确称取一定量的基准物质，用一定溶剂溶解后定量转移到容量瓶中，稀释至刻度；根据称取的基准物质的质量和容量瓶的容积，即可算出该标准溶液的准确浓度。

2. 间接法

当无法找到基准物质时需先配制成大致浓度的溶液，再利用该物质与基准物质或者另外一种已知浓度的溶液的反应测定出该溶液的准确浓度。

用配制溶液滴定基准物质计算其准确浓度的方法称为标定 (standardization)。大多数标准溶液是通过标定确定其准确浓度的。邻苯二甲酸氢钾、无水碳酸钠、重铬酸钾、氧化锌等可制得基准物质用于标定标准溶液。

用另外一种标准溶液滴定一定量的配制溶液或用该溶液滴定另外一种标准溶液确定其浓度的方法称为比较法。比较法一般不及标定法应用得普遍。

(二) 标准溶液浓度的表示方法

1. 物质的量浓度

设 V_B 为溶液的体积 (L 或 mL)， n_B 为溶液中溶质 B 物质的量 (mol 或 mmol)， C_B 表示溶质 B 物质的量浓度 (mol/L 或 mmol/mL)，则 C_B 可由下式求得：

$$C_B = \frac{n_B}{V_B}$$

物质的量使用的单位摩尔 (mol) 或毫摩尔 (mmol) 是我国法定使用的国际单位制 (SI) 中的基本单位。

若物质 B 的质量为 m_B 则 C_B 、溶液的体积 V_B 和摩尔质量 M_B 间的关系为

$$C_B = \frac{m_B}{M_B \cdot V_B} \quad \text{或} \quad m_B = C_B \cdot V_B \cdot M_B$$

2. 滴定度

在生产实践中经常需要滴定分析大批试样中某组分的含量，为了计算方便，常用滴定度 (titer) 表示标准溶液的浓度。

滴定度有以下两种表示方法。

① 以每毫升标准溶液中所含溶质的质量表示。例如 $T_{\text{HCl}} = 0.00364 \text{ g/mL}$ ，表示每毫升 HCl 溶液中含 HCl 的质量为 0.00364 g。

② 以每毫升标准溶液所能滴定的被测物质的质量表示。例如 $T_{\text{NaOH/HCl}} = 0.00364 \text{ g/mL}$ ，表示每毫升 NaOH 标准溶液恰能与 0.00364 g HCl 反应。这种滴定度的表示方法的一般形式为 $T_{T/A}$ ，T 表示滴定剂，A 表示被测物质。

三、滴定分析的计算

对于任一滴定反应



这里 T 为滴定剂, A 为待测物质, P 为生成物。当滴定达到化学计量点时, $t\text{molT}$ 恰好与 $a\text{molA}$ 完全作用, 即

$$n_T : n_A = t : a$$

$$n_A = \frac{a}{t} n_T \quad n_T = \frac{t}{a} n_A$$

设待测物质和滴定剂溶液的体积分别为 V_A 、 V_T , 浓度为 C_A 、 C_T , 可导出达到化学计量点时物质的量 (mol 或 mmol) 的计算式:

$$C_A \cdot V_A = \frac{a}{t} C_T \cdot V_T$$

对固体物质的质量 m_A 和标准溶液间的关系, 有

$$n_T = C_T V_T \quad n_A = m_A / M_A$$

$$m_A = \frac{a}{t} C_T \cdot V_T \cdot M_A \quad (1)$$

式中 V_T 以 L 计量, M_A 为 A 的摩尔质量 (g/mol), m_A 的单位为 g。

在滴定分析中, 体积常以 mL 为单位计量, 将物质的摩尔质量 M_A 化为 $\frac{M_A}{1000}$, 其单位为 g/mmol, 则式 (1) 可写为

$$m_A = \frac{a}{t} C_T \cdot V_T \cdot \frac{M_A}{1000} \quad (2)$$

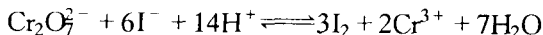
由式 (2) 和滴定度的定义可得计算滴定度的公式为:

$$T_{T/A} = \frac{a}{t} C_T \cdot \frac{M_A}{1000} \quad (3)$$

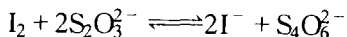
这里关键是根据反应式搞清滴定剂和待测物的量的关系。对应用返滴定法、置换滴定法及其他间接滴定法测定的样品, 搞清这个关系要从两个以上的反应找出实际参加反应的物质的量之间的关系。

例如, 在酸性溶液中以 $K_2Cr_2O_7$ 为基准物质标定 $Na_2S_2O_3$ 溶液的浓度时, 反应是分两步进行的。

首先, 在酸性溶液中 $K_2Cr_2O_7$ 与过量的 KI 反应析出 I_2 :



然后用 $Na_2S_2O_3$ 标准溶液滴定析出的 I_2 :



在第一个反应中 1 mol $K_2Cr_2O_7$ 产生 3 mol I_2 , 而第二个反应中 1 mol I_2 和 2 mol $Na_2S_2O_3$ 反应。由此可见, $K_2Cr_2O_7$ 与 $Na_2S_2O_3$ 间接反应的摩尔比为 1:6,

即

$$\frac{a}{t} = \frac{1}{6}$$

由式 (2) 可得计算 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 浓度的公式为

$$C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = 6 \times \frac{m_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}}{\frac{M_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}}{1000} \cdot V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}$$

若称取试样 S 克, 测得被测物的质量为 m_{Ag} , 则被测物 A 的百分含量是

$$A\% = \frac{m_A}{S} \times 100\%$$

在滴定分析中, 该式为

$$A\% = \frac{\frac{a}{t} C_T \cdot V_T \cdot \frac{M_A}{1000}}{S} \times 100\%$$

若已知标准溶液的滴定度 $T_{T/A}$, 可根据式 (3) 导出

$$A\% = \frac{T_{T/A} \cdot V_T}{S} \times 100\%$$

四、减小滴定误差的方法

一般来说, 滴定分析的准确度在 0.2% 左右。要达到这样的准确度, 就应该了解分析过程中可能出现的误差来源以及如何避免。

1. 量器误差

在滴定分析中用滴定管、移液管和量瓶来测量溶液的体积, 如果严格遵守量器使用规则, 可使这一误差不超过 0.2%。

滴定管读数误差为 ± 0.02 mL, 因此读数不准所引起的相对误差的大小决定于标准溶液的用量。

$$\text{读数相对误差}\% = \frac{0.02}{\text{标准溶液用量}} \times 100\%$$

如要求相对误差为 0.1% 时, 则标准溶液的用量至少要 20 mL。故一般标准溶液用量为 20~30 mL 左右。

2. 方法误差

主要是终点确定的误差。其原因有: ① 指示剂终点和化学计量点不符合, 只要正确选择指示剂就可以减小这种误差; ② 滴定时, 溶液是一滴一滴地加入的, 不可能恰好在化学计量点结束滴定, 一般会超过一些, 因此, 滴定到极近等化学计量点时要半滴半滴地加入; ③ 指示剂本身是弱酸或弱碱, 氧化剂或还原剂, 在滴定过程中会消耗一部分标准溶液, 因此, 指示剂用量不宜过多; ④ 某些杂质在滴定中可能消耗标准溶液或产生其他副反应等。

有些误差在标定时和滴定时同样出现,则可以抵消到一定程度。因此,应尽可能使标定和测定在相同条件下进行。

此外,有一部分由于操作的疏忽所产生的误差,列举如下。

① 由于溶液混合不均匀产生的误差。容量分析中所用的标准溶液和未知液必须混合均匀,否则取其一部分滴定时,这一部分的浓度不能代表整个溶液的浓度。

② 标准溶液保存不当而使浓度改变。

③ 由于仪器洗涤不当引起的误差。未洗净的仪器不但能引入杂质,也会造成量出体积不准(液面不规则和挂液滴)。所以仪器必须洗至不挂水珠。必须了解哪些仪器要用所取溶液淋洗以防浓度改变,哪些仪器则不能用溶液淋洗。

④ 由于操作不当引起的误差。例如,滴定管漏水、未赶去气泡、滴定速度过快、读数方法不正确等。

这些误差只要细心操作,是可以避免的。除了上述一般误差外,各类容量分析还有它们特殊的误差,应当予以重视。

第二节 紫外可见分光光度法

一、基本原理

(一) 朗伯-比尔定律

根据物质对光的吸收特征和吸收强度,对物质进行定性和定量的分析方法,称为分光光度法(spectrophotometry),常用紫外可见分光光度法。该法具有一定的灵敏度和准确度,分析手续较简便快速,仪器设备也不复杂,故应用很广。

当一束单色光通过溶液时,由于溶液吸收了一部分光能,光的强度就会减弱。设入射光的强度为 I_0 ,透过浓度为 c ,液层厚度为 b 的溶液后,透射光的强度 I 必定小于 I_0 ,随着浓度和厚度的增加,光被吸收的程度亦增加,透射光的强度则减小。透射光强度与入射光强度的比值,称为透光度(transmittance),以 T 表示。实验证明,当液层厚度 b 和溶液浓度 c 按算术级数增加时,透光度 T 按几何级数减小,数学式为:

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-abc}$$

如两端各取负对数,得:

$$-\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T} = abc$$

$-\lg T$ 代表吸收光的程度,称为吸光度 A (absorbance)、又称为消光 E (extinction)或光密度 D (optical density)。即: $A = E = D = abc$

当 a 、 c 一定时, 吸光度 A 与液层厚度 b 成正比, 称为朗伯定律 (Lambert's law)。

当 a 、 b 一定时, 吸光度 A 与溶液浓度 c 成正比, 称为比尔定律 (Beer's law)。

吸光度与液层厚度和溶液浓度的乘积成正比, 称为朗伯-比尔定律, 简称比尔定律, 即光的吸收定律。其数学表达式为: $A = abc$

式中的 a 为比例常数, 称吸光系数, 有两种表示方式:

① 摩尔吸光系数, 是指在一定波长时, 溶液浓度为 1 mol/L , 厚度为 1 cm 的吸光度, 用 ϵ 或 E_M 表示;

② 百分吸光系数或称比吸光系数, 是指在一定波长时, 溶液浓度为 1% (m/V), 厚度为 1 cm 的吸光度, 用 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 表示。

吸光系数两种表示方式之间的关系是: $\epsilon = \frac{M_r}{10} \cdot E_{1\text{cm}}^{1\%}$

式中 M_r 是吸光物质的摩尔质量。摩尔吸光系数一般不超过 10^5 数量级, 通常 ϵ 在 $10^4 \sim 10^5$ 之间为强吸收, 小于 10^2 为弱吸收, 介于两者之间称中强吸收, 吸光系数 ϵ 或 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 不能直接测得, 需用已知准确浓度的稀溶液测得吸光度换算而得到。例如氯霉素 (M_r 为 323.15) 的水溶液在 278 nm 处有吸收峰。设用纯品配制 100 mL 含有 2.00 mg 的溶液, 以 1.00 cm 厚的吸收池在 278 nm 处测得透光率为 24.3% 。则:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{-\lg T}{C \cdot l} = \frac{0.614}{0.002} = 307 \quad \epsilon = \frac{323.15}{10} \times E_{1\text{cm}}^{1\%} = 9920$$

(二) 影响吸光系数的因素

ϵ 的大小, 取决于物质 (溶质、溶剂) 的本性和光的波长。

① 物质不同, 则吸光系数不同, 所以吸光系数可作为物质的特性常数。在分光光度法中, 常用摩尔吸光系数 ϵ 来衡量显色反应的灵敏度, ϵ 值越大, 灵敏度越高。

② 溶剂不同, 其吸光系数亦不同, 所以在说明某一物质的吸光系数时, 应注明溶剂。

③ 光的波长不同, 其吸光系数亦不同。如将不同波长的单色光依次通过被分析物质, 分别测得吸光度, 然后绘制吸光度-波长曲线, 称为吸收曲线 (absorption curve), 又称吸收光谱 (absorption spectrum)。由吸收曲线可以看出物质的吸收特征。吸收曲线上有极大值的部分, 称为吸收峰。吸收峰所对应的波长, 称为最大吸收波长, 以符号 λ_{max} 表示, 这是物质定性的依据之一。物质的定量也常选择在 λ_{max} 处测定其吸光度, 因为在此处测定的灵敏度最高。

④ 单色光的纯度也影响吸光系数。单色光越纯, 即经单色器分光后的波长