



全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材  
供临床医学、基础医学、护理学、药学等专业使用

丛书主编 秦晓群

# 生物化学与分子生物学实验

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN

主编◎蔡望伟 黄东爱 周代锋



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材

供临床医学、基础医学、护理学、药学等专业使用

丛书主编 秦晓群

# 生物化学与分子生物学实验

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN

主 编 蔡望伟 黄东爱 周代锋

副主编 文朝阳 王继红 余乐涵

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 政 (海南医学院)

王 颖 (海南医学院)

王小英 (海南医学院)

王青松 (海南医学院)

王咸寿 (海南医学院)

王继红 (重庆医科大学)

文朝阳 (首都医科大学)

叶 芳 (海南医学院)

朱明月 (海南医学院)

刘 欣 (天津医科大学)

麦明晓 (海南医学院)

杜冠魁 (海南医学院)

季崇奇 (海南医学院)

肖 曼 (海南医学院)

余乐涵 (南昌大学医学院)

张 纬 (天津医科大学)

张云霞 (海南医学院)

周代锋 (海南医学院)

费小雯 (海南医学院)

黄东爱 (海南医学院)

蔡 苗 (海南医学院)

蔡望伟 (海南医学院)



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

## 内 容 简 介

本书是全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材。

本书分为 10 章,内容涵盖光谱技术、电泳技术、层析技术、离心技术、蛋白质分析技术、酶学分析技术、核酸的提取与分离、核酸的鉴定与分析、核酸测序技术及基因工程等。本书内容全面,实验内容完整,注重理论联系实际,在着重阐述生物化学与分子生物学实验技术基本理论的基础上,各章后面均配有一些相关实验。

本书可供临床医学、基础医学、护理学、药学等专业使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验/蔡望伟,黄东爱,周代锋主编. —武汉:华中科技大学出版社,2013.10  
ISBN 978-7-5609-8087-4

I. ①生… II. ①蔡… ②黄… ③周… III. ①生物化学-实验-医学院校-教材 ②分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 135270 号

生物化学与分子生物学实验

蔡望伟 黄东爱 周代锋 主编

策划编辑:陈 鹏

责任编辑:陈 鹏

封面设计:陈 静

责任校对:祝 菲

责任监印:朱 玟

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321913

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:虎彩印艺股份有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:18.25

字 数:444 千字

版 次:2015 年 8 月第 1 版第 3 次印刷

定 价:39.80 元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换  
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务  
版权所有 侵权必究



# 全国高等医药院校国家级实验教学示范中心 “十二五”规划教材编委会

主任委员 秦晓群

委 员（按姓氏笔画排序）

于 军 第四军医大学  
马志健 海南医学院  
马晓松 深圳大学医学院  
王 军 首都医科大学  
王迎伟 南京医科大学  
王晓梅 深圳大学医学院  
孙玉萍 新疆医科大学  
吴雄文 华中科技大学同济医学院  
吴宜艳 牡丹江医学院  
宋高臣 牡丹江医学院  
张 晓 成都医学院

张晓莉 牡丹江医学院  
陈昌杰 蚌埠医学院  
陈增保 新疆医科大学  
罗自强 中南大学湘雅医学院  
金宏波 哈尔滨医科大学  
周代锋 海南医学院  
秦晓群 中南大学湘雅医学院  
高殿帅 徐州医学院  
高国全 中山大学中山医学院  
康 毅 天津医科大学

# 总序

preface

为了进一步推动高等学校加快实验教学改革,加强实验室建设,培养大学生的实践能力和创新精神,提高教育质量,更好地满足我国经济社会发展和创新型国家建设的需要,教育部于2005年5月启动了高等学校实验教学示范中心建设和评审工作。同时,要求各实验教学示范中心认真总结教学经验,凝练优质实验教学资源,加强实验教学研究,不断开拓创新,探索实验教学改革新思路,引领实验教学改革方向,为全国高等学校实验教学提供示范。在此质量工程实施过程中,一批优秀的国家级医学实验教学示范中心应运而生。

在医学基础课教学中,实验教学占有极其重要的位置,它在培养学生实际动手能力、综合分析问题和解决问题的能力以及科研创新能力等方面发挥着独特的作用。实验教材是实验教学的基础,也是实验教学改革的载体。但目前各高等学校的实验教材建设明显滞后,主要存在以下几个问题:①实验教材建设落后于理论教材,作为高等学校三大建设之一的教材建设多年来一直受到高度重视,但这里的教材建设一般是指理论教材的建设,而实验教材在大多数高等学校一直不受重视,实验教材大多是自编的实验指导,不能满足实验教学的需要;②实验教材没有形成自己的体系,许多实验教材只注重了与理论知识体系配套,而忽视了自身的系统性、科学性和完整性,成为理论教材的附属品,没有形成自己独立的教材体系,表现为实验课大多是为了配合理论课教学,偏重于验证理论,缺乏综合性与设计性的教学内容;③实验教材缺乏创新,表现为验证性实验偏多,缺乏设计性、综合性实验课题,验证性实验可以对学生强化课堂所学的理论知识起到积极作用,但不能充分激发学生的创造性思维,不能较好地培养学生分析问题、解决问题的能力,不利于学生综合素质、创新意识和创新能力的培养;④实验教材管理混乱,由于历史原因,高等学校实验教材在管理上较为混乱,缺少实验教材建设规划,也没有教材使用的统一要求,教材使用相对无序,既有本校教师编写的自印讲义、实验指导书,也有从校外选用的实验教材,从而助长了实验教学的随意性。

为了顺应高等医学教育实验教学改革的新形势和新要求,在认真、细致调研的基础上,在国家级实验教学示范中心医学组的专家们和部分示范院校领导的指导下,华中科技大学出版社组织了全国27所重点医药院校的近200位老师编写了这套全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材。本套教材由12个国家级实验教学示范中心的教学团队引领,有副教授及以上职称的老师占85%,教龄在20年以上的老师占



70%。教材编写过程中,全体主编和参编人员进行了充分的研讨和细致的分工,各主编单位高度重视并大力支持教材的编写工作,编辑和主审专家严谨和忘我的工作,确保了本套教材的编写质量。

本套教材充分反映了各国家级实验教学示范中心的实验教学改革和研究的成果,教材编写体系和编写内容均有所创新,在编写过程中重点突出以下特点。

(1) 教材课程的设置分为三个模式,即传统型课程模式、整合型课程模式、创新型课程模式。

(2) 教材内容体现“三个层次”,即基本训练(基础知识、基本技能训练)、综合型实验、研究型/创新型实验(以问题为导向的实验)。

(3) 既体现基础性,又具有先进性;既体现学科内涵和实验内容的更新,又有反映新技术、新方法、新设备的现代实验技术和手段。

(4) 强调学生的自主性,加强创新能力培养。

本套教材得到了教育部国家级实验示范中心医学组和各院校的大力支持与高度关注,我们衷心希望这套教材能为高等医药院校实验教学体系改革作出应有的贡献,并能对其他院校的实验教学提供有益的借鉴和参考。我们也相信这套教材在使用过程中,通过教学实践的检验和实际问题的解决,能不断得到改进、完善和提高。

**全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材  
编写委员会**

# 前言

foreword

生物化学与分子生物学实验是生物化学与分子生物学课程的重要组成部分,是培养学生科学思维 and 创新能力的一种重要手段。我们根据生物技术和医学教育的特点,编写了《生物化学与分子生物学实验》教材,系统地介绍了生物化学与分子生物学实验技术的基本理论和基本操作技术。本教材分为 10 章,内容涵盖光谱技术、电泳技术、层析技术、离心技术、蛋白质分析技术、酶学分析技术、核酸的提取与分离、核酸的鉴定与分析、核酸测序技术及基因工程等。本教材内容全面,实验内容完整,注重理论联系实际,在着重阐述生物化学与分子生物学实验技术基本理论的基础上,各章后面均配有一些相关实验。

本书可作为高等院校生物技术专业本科生物化学与分子生物学实验教材,也可供医药院校各专业的本科实验教学选用。

由于编者水平有限,书中难免有错误和不足之处,敬请广大读者批评指正。

编者

2013 年 6 月



# 目录

contents

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 第一章 光谱技术                        | /1  |
| 第一节 光谱分析的基础知识                   | /2  |
| 第二节 吸收光谱分析技术                    | /4  |
| 第三节 其他光谱分析技术                    | /15 |
| 实验一 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱分析            | /16 |
| 实验二 血糖定量测定                      | /19 |
| 实验三 血清总三酰甘油测定                   | /25 |
| 实验四 血清总胆固醇含量测定                  | /29 |
| 实验五 二乙酰-脲法测定血清尿素氮               | /32 |
| 实验六 维生素的测定                      | /34 |
| 第二章 电泳技术                        | /43 |
| 第一节 电泳技术的基本原理                   | /43 |
| 第二节 乙酸纤维素薄膜电泳                   | /47 |
| 第三节 琼脂糖凝胶电泳                     | /47 |
| 第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳                   | /48 |
| 第五节 其他电泳技术                      | /52 |
| 实验七 血清蛋白乙酸纤维素薄膜电泳(常量法)          | /56 |
| 实验八 血清脂蛋白琼脂糖电泳                  | /59 |
| 实验九 SDS-聚丙烯酰胺电泳法测定蛋白质<br>相对分子质量 | /60 |
| 实验十 等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点             | /62 |
| 实验十一 蛋白质双向凝胶电泳                  | /64 |
| 第三章 层析技术                        | /68 |
| 第一节 凝胶层析                        | /70 |
| 第二节 离子交换层析                      | /74 |
| 第三节 亲和层析技术                      | /80 |





|            |                                                 |      |
|------------|-------------------------------------------------|------|
| 第四节        | 高效液相色谱                                          | /83  |
| 实验十二       | 葡聚糖 G-25 凝胶过滤去盐                                 | /85  |
| 实验十三       | DEAE-纤维素离子交换色谱分离血清蛋白质                           | /86  |
| 实验十四       | DE-52 分离血清 $\gamma$ -球蛋白                        | /88  |
| 实验十五       | 血红蛋白 A <sub>2</sub> (HbA <sub>2</sub> ) 微量柱层析测定 | /90  |
| ◇          | <b>第四章 离心技术</b>                                 | /92  |
| 第一节        | 离心分离的基本原理                                       | /92  |
| 一、         | 作用在颗粒上的各种力                                      | /93  |
| 第二节        | 离心机的类型                                          | /96  |
| 第三节        | 离心分离的方法                                         | /99  |
| ◇          | <b>第五章 蛋白质分析技术</b>                              | /105 |
| 第一节        | 蛋白质样品的分离纯化                                      | /106 |
| 第二节        | 蛋白质定量检测                                         | /116 |
| 第三节        | 蛋白质组学研究                                         | /121 |
| 实验十六       | 蛋白质含量测定                                         | /127 |
| 实验十七       | 蛋白质的印迹分析(Western 印迹)                            | /137 |
| ◇          | <b>第六章 酶学分析技术</b>                               | /142 |
| 第一节        | 酶活力测定                                           | /142 |
| 第二节        | 影响酶促反应的因素                                       | /150 |
| 第三节        | 同工酶的测定                                          | /154 |
| 第四节        | 酶的分离纯化                                          | /159 |
| 实验十八       | 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定(赖氏法)                          | /174 |
| 实验十九       | 温度、pH 值对酶促反应速率的影响                               | /177 |
| 实验二十       | 底物浓度对酶活力的影响                                     | /180 |
| ——         | 碱性磷酸酶米氏常数的测定                                    | /180 |
| 实验二十一      | 血清乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的测定                              | /183 |
| 实验二十二      | 血清肌酸激酶同工酶测定                                     | /188 |
| (琼脂糖凝胶电泳法) |                                                 | /188 |
| ◇          | <b>第七章 核酸的提取与分离</b>                             | /192 |
| 第一节        | 概述                                              | /192 |
| 第二节        | 真核基因组 DNA 提取与分离的基本实验                            | /195 |
| 原理及方法      |                                                 | /195 |
| 第三节        | 质粒 DNA 的提取与纯化的方法及原理                             | /197 |

|                                               |      |
|-----------------------------------------------|------|
| 第四节 RNA 提取的实验原理与方法                            | /200 |
| 实验二十三 动物组织真核基因组 DNA 的提取<br>——蛋白酶 K-苯酚抽提法      | /203 |
| 实验二十四 外周血白细胞 DNA 的提取——SDS 裂解法                 | /205 |
| 实验二十五 质粒 DNA 的提取——碱裂解法(小量制备)                  | /206 |
| 实验二十六 质粒 DNA 的提取——煮沸法(小量制备)                   | /208 |
| 实验二十七 聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA                         | /210 |
| 实验二十八 真核细胞 RNA 的制备<br>——异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法(AGPC 法) | /212 |
| 实验二十九 真核细胞 RNA 的制备——Trizol 抽提法                | /213 |
| 实验三十 寡聚(dT)-纤维素柱层析法分离 mRNA                    | /215 |
| 实验三十一 植物组织 DNA 的提取——CTAB 法                    | /217 |
| <b>第八章 核酸的鉴定与分析</b>                           | /219 |
| 第一节 核酸的定量、定性分析                                | /219 |
| 第二节 核酸凝胶电泳                                    | /220 |
| 第三节 核酸分子杂交技术                                  | /220 |
| 第四节 聚合酶链式反应(PCR)技术                            | /222 |
| 实验三十二 紫外分光光度法分析核酸的纯度及浓度                       | /228 |
| 实验三十三 DNA 的琼脂糖凝胶电泳                            | /229 |
| 实验三十四 RNA 的甲醛变性凝胶电泳                           | /230 |
| 实验三十五 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳                             | /232 |
| 实验三十六 低熔点琼脂糖凝胶挖块回收实验                          | /234 |
| 实验三十七 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 片段的回收实验                    | /235 |
| 实验三十八 DNA 印迹技术及放射性核素探针杂交<br>(Southern 杂交)     | /237 |
| 实验三十九 甲醛变性凝胶电泳分离 RNA 的<br>Northern 印迹杂交       | /238 |
| 实验四十 聚合酶链式反应扩增目的基因片段                          | /241 |
| 实验四十一 反转录 PCR(RT-PCR)扩增目的基因片段                 | /243 |
| <b>第九章 核酸测序技术</b>                             | /248 |
| 第一节 测序技术                                      | /248 |
| 第二节 DNA 序列分析                                  | /252 |



|                         |      |
|-------------------------|------|
| ◇ 第十章 基因工程              | /256 |
| 第一节 基因工程工具酶             | /257 |
| 第二节 基因工程操作步骤            | /266 |
| 实验四十二 DNA 的限制性核酸内切酶酶切反应 | /272 |
| 实验四十三 DNA 的重组连接         | /275 |
| 实验四十四 感受态细胞的制备及质粒的转化    | /276 |
| 实验四十五 外源基因在大肠杆菌中的表达及其检测 | /278 |
| ◇ 参考文献                  | /281 |

## 第一章

# 光谱技术

很多化学物质具有一定的颜色,很多无色物质也可以与显色剂作用,生成有色物质,这些有色化合物颜色的深浅随其自身浓度的变化而改变,浓度越大,颜色越深,反之亦然。因此,可以通过测定某一物质颜色深浅的方法对该有色物质进行定量分析。

最早的比色法是纳氏比色法,它是按浓度从低到高,配好一系列标准管,然后将待测样品与标准管逐个进行比较定量,也就是检验中的比色系列法,如黄疸指数的比色法,就属于这一类。这种方法虽然简单,但是误差很大。后来改用目力比色法进行比色,最先使用的是杜氏目力比色计进行比色定量,其原理和结构是比色计下端有一反光镜,利用目视和电灯光源向上反射,其上方有两个底部透明的相同比色杯,分别盛装标准液和待测液,两杯内浸入透明固定玻璃柱,通过螺旋调节比色杯上下,以改变玻璃柱与比色杯中溶液的距离,经过三棱镜使光进入目镜的视野中,再使两半圆光强相等,读取读数,经换算得出待测液浓度。此方法由于目力的主观因素及多种影响因素的存在,误差也很大。为了克服人为主观因素的误差,进一步用光电池代替人的肉眼观察,从而设计出光电比色计,其原理是一束平行单色光通过一定厚度的有色溶液后光线被吸收一部分,未被吸收的光线透过溶液经光电池接收,从而使电光能转换成电能,用检流计测电流大小,从而计算出待测液的浓度。

光电比色计只适合在有限波长下测量,而且波长的半宽度大。因此,它不能满足不同分析工作的需要。使用多个截止滤光片虽然可以满足需要,但却很昂贵。另外,光电比色计的灵敏度也较低,并且只限于在可见光波段。为了克服以上不足,发展了性能更好的分析方法即分光光度法。

分光光度法可以将分析区域扩展到红外和紫外波段。这样,许多用比色法无法进行分析的无色物质,只要在红外或紫外区域内有适当的吸收峰,便可以用相应的分光光度法加以测定。从而大大扩展了物质的测定范围,尤其是扩大了该法在有机化合物检测方面的应用。

分光光度法既可以应用于吸收光谱仪器,也可以用于发射光谱仪器。发射光谱仪器主要有光栅光谱仪、荧光分光光度计和火焰(分光)光度计等。

利用物质具有吸收、发射或散射光谱谱系的特征,对物质进行定性、定量分析的技术称为光谱分析技术。光谱分析的种类很多,可按光谱产生的方式进行分类:基于发射光谱特征的主要有原子发射光谱法、火焰光度法和荧光光谱法等;基于吸收光谱特征的主要有紫外-可见分光光度法、原子吸收分光光度法和红外光谱法等;基于散射光谱特征的有比



浊法等。上述分析技术在广义上均称为光谱法。

光谱技术在生化检验和科研中,是一种最基本的、应用最广泛的分析技术,它具有灵敏、快速、准确、简便和不破坏样品等优点。光谱分析包括发射光谱分析、吸收光谱分析和散射光谱分析三大类。在方法上有的侧重物质的定性及结构分析,有的侧重物质定量测定。本章将主要介绍定量测定方法即紫外可见分光光度法、荧光法,同时简要介绍原子吸收光谱法、火焰光度法及比浊法等。

## 第一节 光谱分析的基础知识

### 一、光的基本性质

光既能像波浪一样向前传播,有时又表现出粒子的特征。因此光具有“波粒二象性”。

光是一种电磁辐射,属于电磁波,是能的一种表现形式,是一种以巨大速度通过空间传播的光量子流,在不同的介质处发生反射、折射、衍射、色散和偏振等现象。光具有波动性,按波动的形式进行传播,并可用波长、频率、传播速度等参数来描述。光波于两个波峰或波谷之间的距离称为波长( $\lambda$ ,单位为 nm),而单位时间内通过某一点的波的数目称为频率( $\nu$ ,单位为 Hz),它们与光速( $c$ ,单位为 cm/s)之间的关系如下面公式所述。

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (1-1)$$

一切光(电磁波)在真空中的传播速度( $c$ )都等于  $2.997 \times 10^{10}$  cm/s,故  $\lambda$  与  $\nu$  成反比。

同时光也具有微粒性,即把光看做带有能量的微粒流,这种微粒称为光子或光量子。光电效应、光的吸收和发射等均是粒子性的表现。根据量子理论:分子从光波中吸收能量是以不连续的微小能量单位,即“光量子”形式进行的。每一个光量子的能量与光的频率成正比。即

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1-2)$$

式中: $E$  代表光量子的能量; $h$  为普朗克(planck)常量( $6.626 \times 10^{-34}$  J·s)。

光量子是一种具有能量的物质,由式(1-2)可看出,不同波长的光具有不同的能量,光子的能量与光的波长成反比,与频率成正比,波长越长(频率越低),能量越低;反之,则能量越高。

人眼所能感觉到的波长范围为 380 nm 的紫色光到 760 nm 的红色光,该波长段以外的光则看不见,故 380~760 nm 的光称为可见光。短于 380 nm 的光称为紫外光(紫外线),短于 200 nm 的光称为远紫外光(远紫外线)。长于 760 nm 的光称为红外光(红外线)。紫外光的波长小于可见光和红外光的波长,因此紫外光的能量大于可见光和红外光的能量。

### 二、单色光、复合光、光的色散与光谱

单色光是一种单一波长的光,不同波长的光具有不同的颜色。复合光是由不同颜色

的单色光按一定光强比例混合而成的，显白色，如太阳光、白炽灯就是复合光。让复合光通过三棱镜，可以分解成红、橙、黄、绿、青、蓝、紫七种颜色，这种现象称为光的色散。色散后的单色光按一定顺序排成一幅光的色谱称为光谱。

由于入射光经过的介质不同，产生的谱线也不同，因此光谱又可分为发射光谱、吸收光谱和散射光谱。

1. 发射光谱

物体(发光体)发光直接产生的光谱或处于高能级的原子或分子在向较低能级跃回时产生辐射，将多余的能量发射出去形成的光谱，称为发射光谱。不同的发光体(即光源)有其独特的发射光谱。根据物质受到热能或电能等激发后所发射出的特征光谱线可以对物质进行定性及定量分析。

2. 吸收光谱

吸收光谱是由物质的原子或分子对光源辐射选择吸收而得到的原子或分子光谱。

三、物质的颜色与吸收光颜色的关系

物质对光的吸收具有选择性。同一物质对不同波长光的吸收能力不同，不同物质对同一波长光的吸收能力也不同。

物质所呈现的颜色，正是由于它对光的选择性吸收而产生的。对固体物质来说，当白光照射到物质上时，物质对于不同波长的光吸收、透射、反射、折射的程度不同而使物质呈现不同的颜色。物质对各种波长的光完全吸收，则呈现黑色；如果完全反射，则呈现白色；如果对各种波长的光吸收程度差不多，则呈现灰色。若选择性吸收某些波长的光，则这种物质的颜色就由它所反射或透过光的颜色来决定。表 1-1 列出了物质的颜色与吸收光的颜色之间的关系。实验证明，如果把适当的两种单色光按一定强度混合，也可以成为白光，所以把任意两种能合成白光的单色光，称为互补光(或互补色)，如表 1-1 中绿色光与紫色光按一定的比例混合，可以成为白光，因此这两种光称为互补光。表 1-1 中的蓝色光与黄色光也是互补光。

表 1-1 物质的颜色与吸收光的颜色之间的关系

| 物质的颜色 | 吸收光 |         |
|-------|-----|---------|
|       | 颜色  | 波长/nm   |
| 黄、绿   | 紫   | 400~450 |
| 黄     | 蓝   | 450~480 |
| 橙     | 青、蓝 | 480~490 |
| 红     | 青   | 490~500 |
| 紫、红   | 绿   | 500~560 |
| 紫     | 黄、绿 | 560~580 |
| 蓝     | 黄   | 580~600 |
| 青、蓝   | 橙   | 600~650 |
| 青     | 红   | 650~750 |



对溶液来说,溶液呈现不同的颜色,是由于溶液中的质点(分子或离子)选择性地吸收某种颜色的光所引起的。当一束光照射到某一物质的溶液时,若该溶液对可见光谱中各种颜色的光几乎都不吸收,则溶液呈透明无色;若几乎全部吸收,则溶液呈黑色;若对各种颜色的光都能均匀地吸收一部分,则溶液呈灰色。若溶液对其中某些波长的光吸收较多、透过较少,而对另一些波长的光吸收较少、透过较多,则溶液就呈现这种吸收较少而透过较多的光的颜色,即溶液的颜色是它所吸收光的互补光的颜色。例如,高锰酸钾水溶液选择性吸收可见光中的大部分黄绿色光,故呈紫色;硫酸铜溶液选择性地吸收黄光而呈蓝色。任何一种溶液,对不同波长的光的吸收程度是不同的。如果将各种波长的单色光依次通过一定浓度的某一溶液,测量该溶液对各种单色光的吸收程度,以波长为横坐标,吸光度为纵坐标,可以得到一条曲线,即吸收光谱曲线或吸收曲线。

## ..... 第二节 吸收光谱分析技术 .....

不同的物质所产生的吸收光谱不同,即使同一物质对各种波长的光吸收程度也不相同。这些都是物质在光吸收方面的特性,是物质吸收光谱定性、定量分析的依据。物质吸收单色光量的多少与液层的厚度、溶液的浓度两个因素密切相关。

### 一、透光度与吸光度

当一束单色平行光通过均匀而透明的溶液时可分成几部分:一部分被容器的表面散射或反射;还有一部分被吸收;仅有一部分透过溶液(透射)。设入射光的强度为  $I_0$ ,反射光的强度为  $I_r$ ,吸收光的强度为  $I_a$ ,透射光的强度为  $I$ ,则

$$I_0 = I_r + I_a + I \tag{1-3}$$

在吸收光谱法分析中,测量时采用同样材质的比色皿,反射光强度基本不变,影响相互抵消,于是式(1-3)可简化为

$$I_0 = I_a + I \tag{1-4}$$

透射光强度  $I$  与入射光强度  $I_0$  之比称为透光度,用  $T$  表示,则

$$T = I/I_0 \tag{1-5}$$

透光度  $T$  的负对数称为吸光度,用  $A$  表示。则吸光度  $A$  与透光度  $T$  之间的关系是:

$$A = -\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I} \tag{1-6}$$

实际工作中常用吸光度  $A$  表示物质对光的吸收程度,由上式可见,溶液对光的吸收越多, $T$  值越小, $A$  值越大。

### 二、吸收光谱分析法的基本定律

#### 1. Lambert-Beer(朗伯-比尔)定律

Lambert-Beer(朗伯-比尔)定律是讨论吸收光与溶液浓度和液层厚度之间关系的基本定律,它是分光分析的理论基础。当入射光波长一定时,溶液的吸光度  $A$  只与溶液的



浓度和液层厚度有关。Lambert(朗伯)和 Beer(比尔)分别于 1760 年和 1852 年研究了溶液的吸光度与液层厚度和溶液浓度间的定量关系。

Lambert 定律表述为当一束平行的单色光照射一固定浓度的溶液时,溶液的吸光度与光透过的液层厚度成正比,即

$$A = KL \quad (1-7)$$

式中:  $L$  为液层厚度;  $K$  为吸光系数。

Beer 定律表述为当一束平行的单色光照射一溶液时,若液层厚度一定,则溶液的吸光度与溶液浓度成正比,即

$$A = Kc \quad (1-8)$$

式中:  $c$  为溶液浓度;  $K$  为吸光系数。

将 Lambert 定律和 Beer 定律合并,可得 Lambert-Beer 定律,即

$$A = KcL \quad (1-9)$$

式(1-9)称为 Lambert-Beer 定律的数学表达式。式中的  $k$  称为吸光系数,它是吸光物质在单位浓度、单位液层厚度时的吸光度,与溶液的性质、温度及入射光的波长等有关。Lambert-Beer 定律的物理意义:当一束平行的单色光通过均匀透明的溶液时,该溶液对光的吸收程度与溶液中物质的浓度和光通过的液层厚度的乘积成正比。

朗伯-比尔定律不仅适用于可见光区,也适用于紫外光区和红外光区;不仅适用于溶液,也适用于其他均匀的、非散射的吸光物质(包括气体和液体),是各类吸光光度法定量的依据。

## 2. 吸光系数

Lambert-Beer 定律中的吸光系数  $K$  的物理意义:吸光物质在单位浓度及单位液层厚度时的吸光度。在给定条件(单色光波长、溶剂、温度等)下,  $K$  是物质的特征常数,只与该物质分子在基态和激发态之间的跃迁几率有关。若溶液的浓度  $c$  以  $\text{g/L}$  为单位,  $b$  为吸光池厚度即光通过溶液的距离,以  $\text{cm}$  为单位,则吸光系数  $K$  的单位为  $\text{L}/(\text{g} \cdot \text{cm})$ 。不同物质对同一波长的单色光有不同的  $K$ ,它可作为物质定性的依据。在吸光度与浓度及液层厚度之间的直线关系中,  $K$  是斜率,是定量的依据,  $K$  值越大,则测定的灵敏度越高。  $K$  常有以下两种表示方法。

### 1) 摩尔吸光系数

摩尔吸光系数用  $\epsilon$  表示,其物理意义是  $1 \text{ mol/L}$  浓度的溶液在液层厚度为  $1 \text{ cm}$  时的吸光度。

### 2) 比吸光系数(或称百分吸光系数)

比吸光系数用  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  表示,是指浓度为  $1\%$  ( $1 \text{ g}/100 \text{ mL}$ ) 的溶液在液层厚度为  $1 \text{ cm}$  时的吸光度。一般常在化合物成分不明、相对分子质量未知的情况下采用。

两种吸光系数之间的关系为

$$\epsilon = \frac{M}{10} \cdot E_{1\%}^{1\text{cm}} \quad (1-10)$$

式中:  $M$  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。通常将  $\epsilon$  值达到  $10^4$  的划为强吸收,小于  $10^2$



的划为弱吸收,介于两者之间的划为中强吸收。

三、偏离朗伯-比尔定律的因素

根据 Lambert-Beer 定律,当波长和强度一定的入射光通过液层厚度一定的溶液时,物质的吸光度与其浓度成正比。因此,在固定液层厚度及入射光强度和波长的条件下,测定一系列已知浓度标准溶液的吸光度时,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,应得到一条通过原点的直线(称为标准曲线或工作曲线)。但在实际测定中,特别是溶液浓度较高时,标准曲线容易出现弯曲,这种偏离直线的现象称为对 Lambert-Beer 定律的偏离。导致偏离的因素很多,主要有光学和化学方面的因素。

1. 光学因素

Lambert-Beer 定律成立的重要前提是单色光,但在实际测定中,使用的入射光并不是严格的单色光,常有其他波长的杂光混入,非单色光是引起偏离的主要因素,其原因是物质溶液对不同波长光的吸收率是不同的,一种有色溶液只对某一波长的光产生最大吸收,见图 1-1(a)。

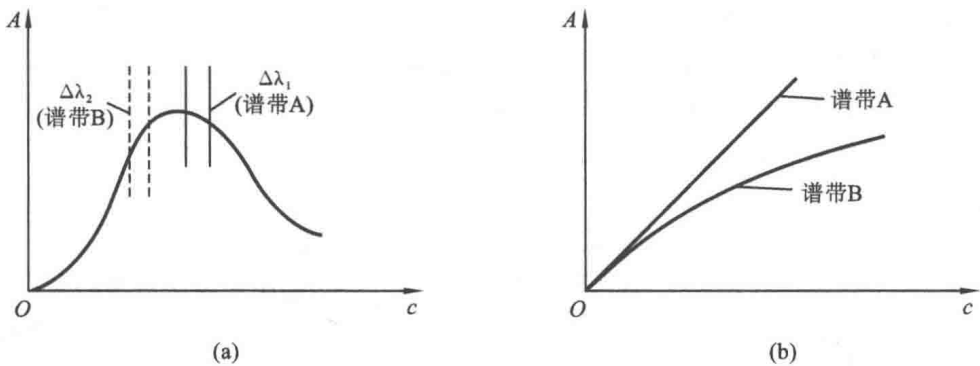


图 1-1 入射光的非单色性对吸收定律的影响

谱带 A 和谱带 B,宽度虽然相同( $\Delta\lambda_1 = \Delta\lambda_2$ ),但吸光度不同,从图 1-1(b)可知,谱带 A 的吸光度与之间浓度之间呈线性关系,而谱带 B 得到的吸光度与浓度关系曲线呈现弯曲,无线性关系。光吸收程度最大处的波长称为最大吸收波长,常用  $\lambda_{\max}$  表示。偏离  $\lambda_{\max}$  愈远,则对 Lambert-Beer 定律偏差愈大,只有用  $\lambda_{\max}$  作测定波长,吸光度与浓度之间才能保持良好的线性关系。在实际测定中,为了保证得到足够的光强度,分光光度计的狭缝必须保持一定的宽度,因此经由出射狭缝投到待测物质上的光,并不是严格的单色光,而是包括一定波长范围的有限宽度的谱带,这里就存在一个潜在偏离 Lambert-Beer 定律的因素。在仪器设计上,用滤光片所得的入射光的谱带宽,在采用分光器的分光光度计的入射光的谱带较狭窄,当然分光光度计的检测原理更符合 Lambert-Beer 定律,而结果也更准确。使用滤光片的比色计,检测结果准确性就较差。不难理解,非单色光通过待测溶液后,吸光度与浓度不呈线性关系。只有其中任一单色光波长才能真正符合 Lambert-Beer 定律。

在光学因素中除单色光外,杂散光、散射光、反射光、非平行光等均有可能导致偏离 Lambert-Beer 定律。