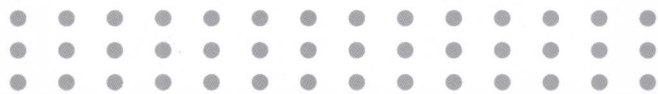




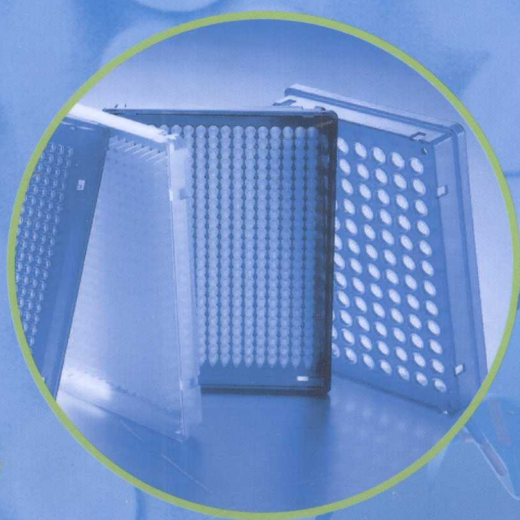
普通高等教育“十二五”规划教材



生物化学与分子生物学 实验技术教程

(第三版)

杨建雄 编著



科学出版社

014032005

Q503
02-3

内 容 简 介

普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学与分子生物学 实验技术教程

(第三版)

编 者 (CIP) 目 录 页 数 年 月

杨建雄 编著



出版 社 名 称 及 地 址

北京航空航天大学出版社

地址：北京航空航天大学

邮编：100191

http://www.buaapress.com

电话：(010) 62412000

科学出版社发行 各地新华书店经销

2003年2月第1版 开本：787×1092 1/16

2009年1月第2版 印张：14.125

2011年3月第3版 印张：14.125

科学出版社

元 88.80 价 定

北 京

(如蒙惠顾 请至北京)



北航

C1720041

Q503
02-3

014035002

内 容 简 介

本书将生物化学实验和分子生物学实验融为一体,前5章按照实验技术自身的体系,简明通俗、图文并茂地讲述了生物化学与分子生物学实验技术理论,既可由教师讲授,也可由学生自学。同时将53个难度不等的基础实验按技术类别分列于5章中,可供不同条件的学校选做。第六章介绍了开设综合性实验和设计性实验的目标和方法,编入3个难度适中的综合性实验。

本书适合于生物科学、生物技术、生物工程等专业和医学院校、农林院校本科生的实验课教学使用,通过讲授和操作结合的模式进行实验课教学。或由学生自学实验技术理论部分,再由实验课对学生进行系统的实验技能培训。本书还可供部分专业硕士研究生实验技术课使用,及作为有关科技人员的参考用书。

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. —3版. —北京:科学出版社, 2014. 3

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-039736-2

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(2014)第023299号

责任编辑:刘 物/责任校对:刘亚琦

责任印制:阎 磊/封面设计:迷底书装

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>

新科印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002年5月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009年4月第 二 版 印张:14 1/2

2014年3月第 三 版 字数:386 000

2014年3月第一次印刷

定价:29.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)



第三版前言

本书第一版于2002年由科学出版社出版,分5章简明通俗地叙述了生物化学与分子生物学实验技术理论。每章编入难度不等的多个实验,可供不同类型和不同层次学校选做。这样的结构有利于将实验课作为独立的课程设置,通过讲授和操作结合的模式进行实验课教学,全面提高学生的实验技能,符合高等学校实验课教学改革的潮流。此外,本书将生物化学实验和分子生物学实验融为一体,内容力求全面,叙述力求简明和通俗。因此,本书出版以来,被包括综合性大学、师范院校、医学院校和农林院校在内的不少高等院校选作教材,得到广大师生的好评。

第二版于2009年出版,在保留第一版特色的基础上,删除了部分陈旧的内容,增加了小分子活性物质制备技术、浓缩和干燥技术、免疫化学测定技术等内容,以及基因芯片、实时定量PCR、基因组学、生物信息学等新知识;增加了一些插图;增加了第六章“综合性实验和设计性实验”,编入6个难度较大的综合性实验。同时,删除了前5章部分较难实施的实验,增加了一些与生物化学制备有关的,较易实施的实验。

第三版在第二版的基础上,做了如下修改:

1. 在实验技术理论部分删除了部分陈旧的内容,增加了新一代高通量测序技术等新知识。
2. 考虑到一些学校的生物化学与分子生物学实验课尚未独立设课,第三版在实验技术理论部分删除了一些难度较大,而实用性较小的内容,使其不但适合于教师讲授,而且适合于学生自学。使本书不但适合于将实验课独立设课的学校,也适合于尚未将实验课独立设课的学校。
3. 考虑到不少学校生物化学与分子生物学实验课时和实验条件有限,本书第二版综合性实验中难度较大的实验不易实施,第三版删除了部分难度较大的综合性实验,对前5章实验做了少量调整。前5章的实验由第二版的67个调整为53个,第六章的综合性实验降低了难度,减少为3个,全书篇幅减少了约4万字。
4. 在实验技术理论部分每一节增加了一个生动的插图,概要介绍建立相应研究方法的科学家,及相应研究方法的发展状况。使读者能够了解生物化学与分子生物学研究方法和技术发展的脉络,同时,使本书形式上更加生动活泼。

本书内容充实、简明通俗、图文并茂,有多个实验可供不同类型和不同层次学校选做。希望本书能更广泛地被高等院校选作教材,在提高实验课教学水平,提高学生的实验技能方面发挥更好的作用。同时,希望本书第三版能作为广大科技工作者的参考书发挥更好的作用。

本书难免会有差错和不足,恳请广大读者和有关专家批评指正。

第二版前言

言情对一第

本书的第一版分5章系统地讲述了生物化学与分子生物学实验技术理论，每一章后面有多个实验，可供不同类型和层次学校选做。这样的结构有利于将实验课作为独立的课程设置，全面提高学生的实验技能，符合高等学校实验课教学改革的潮流。此外，本书将生物化学实验和分子生物学实验融为一体，内容力求全面，叙述力求简明和通俗。因此，本书出版以来，被不少高等院校选作教材，得到广大师生的好评。

根据近几年实验课教学改革的情况，第二版在保留第一版特色的基础上，主要做了以下的修改：

1. 为了使学生更全面地掌握生物化学与分子生物学实验技术理论，特别是与生物化学制备相关的技术，在实验技术理论部分增加了多糖和小分子活性成分的提取和分离，膜分离技术，提取物的浓缩、结晶和干燥，免疫分析技术等内容。

2. 根据近几年学科发展的状况，补充和修改了部分内容，如补充了基因芯片、实时定量PCR、用酵母细胞和昆虫杆状病毒表达外源基因、转基因动植物、结构基因组学、功能基因组学、生物信息学等内容。

3. 为了使读者更好地理解本书的有关内容，增加了一些插图。

4. 为满足近几年实验课教学改革的需要，增加了第六章“综合性实验和设计性实验”，叙述了开设综合性实验和设计性实验的目标、方法及设计性实验的实施方案，编入6个难度适中的综合性实验。同时，在前5章的实验部分，删除了19个较难实施的或方法需要更新的实验，增加了10个与生物化学制备有关的、较易实施的或方法被更新的实验，扩大了实验内容的覆盖面，更具先进性和实用性，全书的实验项目总数由第一版的70个调整为67个。

5. 删除第四章的“染色方法”一节，在附录部分增加实验数据的处理、常见生化物质电泳后的染色方法、硫酸铵溶液饱和度计算表和换算转速、相对离心力和转子半径的列线图，以便读者查阅。

6. 增加了参考书目。

希望本书的第二版能更广泛地被高等院校选作教材，在改革实验课教学、提高学生的实验技能方面发挥更好的作用。同时，希望本书第二版能作为广大科技工作者的参考书，发挥更大的作用。

本书难免会有差错和不足，恳请广大读者和有关专家批评指正。

青 岛

编 者

第一版前言

第二版前言

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。

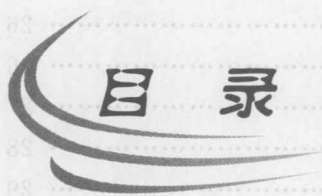
本书力求全面系统、深入浅出、简明扼要、注重实用，技术原理的叙述避免与理论课的重复，淡化纯理论（如层析技术中的塔板理论）的叙述。各章的实验均属于同一类型，且已有技术原理的系统叙述，故每个实验的原理均可写得十分简短。每一章的各个实验所用器材相近，且操作步骤中不难找出所需的器材，故本书省去了实验的器材部分，在减小篇幅的同时，突出了操作步骤。经过反复精选和修改，使本书能在较小的篇幅内容纳较多的内容。

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。

编者



第三版前言	1
第二版前言	1
第一版前言	1
第一章 定量分析技术	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	4
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	8
三、分光光度法的定性和定量	9
四、减小测定误差的方法	10
第三节 荧光分析法	11
一、基本原理	11
二、荧光仪的主要部件	12
三、荧光分析法的定性和定量	12
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	14
一、酶活力的测定	15
二、 K_m 和 V_{max} 的测定	17
三、其他动力学数据的测定	17
实验 1-1 粗脂肪的提取和定量测定	18
实验 1-2 碘价的测定 (Hanus 法)	19
实验 1-3 皂化价的测定	20
实验 1-4 酸价的测定	21
实验 1-5 蛋白质的测定 (凯氏定氮法)	21
实验 1-6 2,6-二氯酚靛酚法测定维生素 C 的含量	23
实验 1-7 碘量法测定维生素 C 的含量	24
实验 1-8 血糖定量测定 (GOD-PAP 法)	25

实验 1-9	蒽酮比色定糖法	26
实验 1-10	3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖含量	26
实验 1-11	血清胆固醇的定量测定 (磷钼铁法)	27
实验 1-12	血清总胆固醇的测定 (邻苯二甲醛法)	28
实验 1-13	双缩脲法测定蛋白质含量	29
实验 1-14	Folin 试剂法 (Lowry 法) 测定蛋白质含量	29
实验 1-15	考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	30
实验 1-16	紫外吸收法测定蛋白质含量	31
实验 1-17	紫外吸收法测定核酸含量	32
实验 1-18	二苯胺显色法测定 DNA 含量	33
实验 1-19	地衣酚显色法测定 RNA 含量	34
实验 1-20	荧光法测定维生素 B ₂ 含量	34
实验 1-21	血清丙氨酸氨基移换酶 (ALT) 的测定	35
实验 1-22	酸性磷酸酯酶的测定	37
第二章	提取、沉淀和离心分离技术	38
第一节	提取技术	38
一、	材料的选择与处理	38
二、	细胞的破碎	39
三、	抽提	40
第二节	沉淀分离技术	42
一、	蛋白质的沉淀分离	42
二、	核酸的提取与沉淀分离	45
三、	多糖的提取和分离	46
四、	小分子活性成分的提取和分离	48
第三节	膜分离技术	56
一、	膜分离技术的分类	56
二、	膜的分类	57
三、	膜的使用寿命	57
四、	透析	58
五、	微滤、超滤和反渗透	59
第四节	提取物的浓缩、结晶和干燥	60
一、	浓缩	60
二、	结晶	62
三、	干燥	63
第五节	离心分离技术	64
一、	离心机的种类与用途	64
二、	离心分离方法的选择	65
三、	离心条件的确定	66
四、	离心操作的注意事项	68
实验 2-1	香菇多糖的制备	68

101	实验 2-2 卵磷脂的制备	69
201	实验 2-3 大蒜 SOD 的提取与分离	71
301	实验 2-4 菜花(花椰菜)中核酸的分离和鉴定	72
401	实验 2-5 酵母 RNA 的提取与分离	73
501	实验 2-6 从肝脏中提取 DNA	74
	第三章 层析技术	76
611	第一节 吸附层析	76
711	一、吸附柱层析	77
811	二、大孔吸附树脂和聚酰胺柱层析	80
911	三、聚酰胺薄膜层析	81
1011	第二节 分配层析	82
1111	一、概述	82
1211	二、纸层析	83
1311	第三节 凝胶层析	86
1411	一、基本原理	86
1511	二、凝胶的选择	87
1611	三、操作	88
1711	第四节 离子交换层析	89
1811	一、基本原理	89
1911	二、离子交换剂	90
2011	三、操作	93
2111	第五节 亲和层析	95
2211	一、配基与偶联凝胶的选择与处理	95
2311	二、亲和层析的操作条件	96
2411	第六节 薄层层析	96
2511	一、支持剂的选择与处理	97
2611	二、薄层板的制作	97
2711	三、层析方法	98
2811	第七节 气相色谱	99
2911	一、基本原理	99
3011	二、气相色谱的气路系统	100
3111	三、色谱柱	100
3211	四、检测器	102
3311	五、定性和定量方法	102
3411	第八节 高效液相色谱	103
3511	一、概述	103
3611	二、HPLC 的特点	103
3711	三、HPLC 的分类	104
3811	四、HPLC 的仪器构成	105
3911	五、定性定量方法	106

实验 3-1	氨基酸的纸层析	107
实验 3-2	微晶纤维素薄板层析法分离氨基酸	108
实验 3-3	核苷酸的离子交换层析	109
实验 3-4	DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析	110
实验 3-5	凝胶层析测定蛋白质的 M_r	111
实验 3-6	胰蛋白酶的亲和层析	112
实验 3-7	HPLC 法测定生物类黄酮含量	113
实验 3-8	HPLC 法测定维生素 A 含量	114
第四章	电泳技术	115
第一节	基本原理	115
一、泳动度	115
二、影响泳动度的因素	116
第二节	乙酸纤维素薄膜电泳	117
第三节	琼脂糖凝胶电泳	118
一、琼脂糖凝胶的特点	118
二、DNA 的琼脂糖凝胶电泳	119
三、印迹转移电泳	120
四、交变脉冲电场凝胶电泳	120
第四节	聚丙烯酰胺凝胶电泳	121
一、聚丙烯酰胺凝胶的特点	121
二、凝胶聚合的原理及有关特性	122
三、PAGE 原理	124
四、SDS-PAGE 原理	125
五、聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳原理	126
六、聚丙烯酰胺凝胶双向电泳原理	129
第五节	高效毛细管电泳	130
一、基本原理	130
二、实验方法	131
三、分离类型及应用	132
第六节	免疫分析技术	133
一、抗体的性质和制备	133
二、抗原抗体反应	137
实验 4-1	血清蛋白的乙酸纤维素薄膜电泳	141
实验 4-2	垂直板 PAGE 分离血清蛋白	143
实验 4-3	SDS-PAGE 测定蛋白质的相对分子质量	144
实验 4-4	等电聚焦电泳测定血清蛋白质等电点	145
实验 4-5	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	147
实验 4-6	PAGE 分离 RNA	148
实验 4-7	对流免疫电泳法测定胎儿甲种球蛋白	149
实验 4-8	火箭免疫电泳法测定抗原含量	150

第五章 分子生物学基本技术	151
第一节 DNA 的体外合成	151
一、DNA 的化学合成	151
二、聚合酶链反应技术	152
第二节 核酸的分子杂交	156
一、探针的种类与选择	156
二、标记物的选择	157
三、探针的放射性同位素标记	158
四、探针的非放射性标记	158
五、膜上印迹杂交的条件选择	159
六、杂交信号的检测	161
七、DNA 芯片技术及应用	162
第三节 基因克隆	163
一、目的基因的来源	163
二、常用的克隆载体	164
三、DNA 分子的体外连接	166
四、重组子导入受体细胞	167
五、重组子的筛选	167
六、基因组文库的构建	169
七、cDNA 文库的构建	170
第四节 基因表达	172
一、原核生物的表达载体	173
二、用于原核细胞表达的外源基因	174
三、提高表达水平的措施	174
四、外源基因在酵母细胞中的表达	177
五、外源基因在昆虫杆状病毒中的表达	178
六、外源基因在哺乳动物细胞中的表达	179
第五节 转基因植物和转基因动物	182
一、转基因植物	182
二、转基因动物	183
第六节 核酸的序列测定	185
一、链终止法	186
二、新一代高通量测序技术	186
实验 5-1 植物基因组 DNA 的提取	188
实验 5-2 动物基因组 DNA 的提取	190
实验 5-3 细菌基因组 DNA 的提取	191
实验 5-4 质粒 DNA 的提取	192
实验 5-5 聚合酶链式反应 (PCR)	194
实验 5-6 质粒 DNA 的酶切及电泳鉴定	195

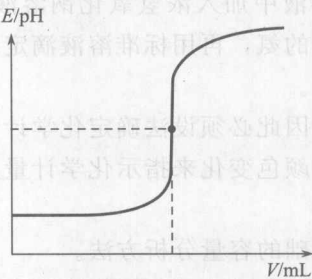
实验 5-7	DNA 重组	196
实验 5-8	大肠杆菌的转化	196
实验 5-9	外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	197
第六章	综合性实验和设计性实验	198
实验 6-1	超氧化物歧化酶的分离纯化和同工酶分析	199
实验 6-2	蛋白质印迹分析	203
实验 6-3	蛋白质的双向凝胶电泳	205
附录一	实验数据的处理	206
附录二	调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (25℃)	211
附录三	常见生化物质电泳后的染色方法	212
附录四	常用缓冲液的配制	215
参考书目	220

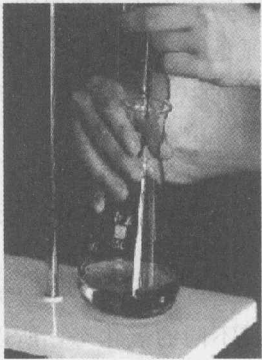
第一章

定量分析技术

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及分子生物学关系密切的部分内容。

第一节 滴定分析法





滴定分析法只需要简单的玻璃器皿，或简单的仪器，可较准确地测定溶液中常量成分的含量，在化学化工领域，及食品和药品的理化检验中应用较广。

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。

滴定分析法适合于测定溶液中常量成分的含量,在食品和药品的理化检验,及化学化工领域应用较广。灵敏度更高的紫外可见分光光度法、荧光分析法、气相色谱和高效液相色谱法适合于测定溶液中微量成分的含量。一般来说,微量分析法相对误差较大。若将待测成分含量较高的溶液高度稀释,再用相对误差较大的微量成分分析法测定其含量,乘以稀释倍数,会扩大误差,使测定结果不准确。选择测定方法的原则是,常量成分的测定用常量分析法,微量成分的测定用微量分析法。因此,滴定分析法在工业领域应用较广。

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分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。

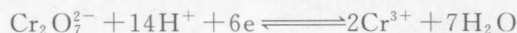
2. 氧化还原滴定法

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。

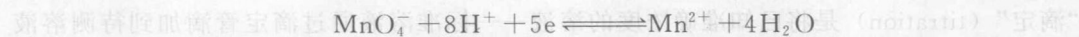
因为多数元素具有不同的氧化态,所以选用合适的氧化剂作为滴定剂,可以测定许多还原性物质;也可以用合适的还原剂测定许多氧化性物质。

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 用重铬酸钾作为氧化剂,测定还原性物质。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,可以获得3个电子还原为二氧化锰:

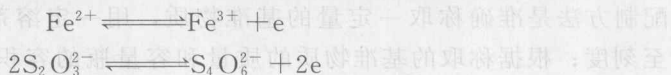


在氧化还原滴定中,一般采用酸性溶液中的反应。

(3) 碘量法 用碘作为氧化剂,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 $S_2O_3^{2-}$ 氧化成 $S_4O_6^{2-}$ 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 $K_2Cr_2O_7$ 定量反应生成 I_2 ，再用 $Na_2S_2O_3$ 标准溶液直接滴定，可定量测定重铬酸钾及其他氧化剂。

(4) 间接滴定法 有时还应用其他化学反应间接测定待测物，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。

经标定的标准液, 其浓度大致等于预设浓度即可。如预设浓度为 0.10 mol/L, 标定结果为 0.08~0.12 mol/L 任一数据均可。后续用实际标定的浓度进行计算, 可得正确结果, 不必将标准液浓度刻意调整为 0.10 mol/L。

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 (g), 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



式中, 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, $t \text{ mol}$ T 恰好与 $a \text{ mol}$ A 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

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

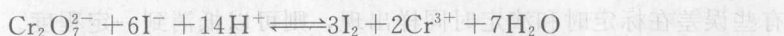
由式 (2) 和滴定度的定义可得计算滴定度的公式为:

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

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 $Na_2S_2O_3$ 浓度的公式为

$$C_{Na_2S_2O_3} = 6 \times \frac{m_{K_2Cr_2O_7}}{\frac{M_{K_2Cr_2O_7}}{1000} \cdot V_{Na_2S_2O_3}}$$

若称取试样 S 克, 测得被测物的质量为 m_A g, 则被测物 A 的百分含量是