

生物化学与分子生物学 实验技术

高等教育出版社

内容提要

本书是教育部“高等教育面向 21 世纪教学内容和课程体系改革计划”的研究成果,是“面向 21 世纪课程教材”。

本书共分四部分,第一、二部分系统地介绍了生物化学与分子生物学基础理论;第三部分设计了 17 个生物化学及分子生物学实验;第四部分附列了实验须知,生物化学与分子生物学常用试剂的配制及参数。可供医学院校本科生、研究生以及从事生物化学与分子生物学工作的医务人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术/杨安钢,毛积芳,
药立波主编. —北京:高等教育出版社,2001
ISBN 7 - 04 - 009129 - 1

. 生... . 杨... 毛... 药... . 生物
化学 - 实验 - 技术 - 高等学校 - 教材 分子生物学 - 实验 - 技
术 - 高等学校 - 教材 . Q5 Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 70703 号

生物化学与分子生物学实验技术
杨安钢 毛积芳 药立波 主编

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号

电 话 010 - 64054588

网 址 [http:// www.hep.edu.cn](http://www.hep.edu.cn)

邮政编码 100009

传 真 010 - 64014048

经 销 新华书店北京发行所
印 刷

开 本 850 × 1168 1/16

印 张 21.75

字 数 400 000

版 次 年 月第 版

印 次 年 月第 次印刷

定 价 23.40 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

责任编辑	田 军	张庆波
封面设计	张 楠	
责任绘图	吴文信	
版式设计	马静如	
责任校对	许月萍	
责任印制		

《生物化学与分子生物学实验技术》

主 编 杨安钢 毛积芳 药立波

副主编 刘新平

陈南春

方定志

王淳本

编 者 (按编写章节顺序排列)

杨安钢 (第四军医大学)

郭立安 (第四军医大学)

毛积芳 (第二军医大学)

冯伟华 (第二军医大学)

方定志 (华西医科大学)

陈 萍 (第四军医大学)

王淳本 (同济医科大学)

陈南春 (第四军医大学)

刘新平 (第四军医大学)

赵忠良 (第四军医大学)

白 怀 (华西医科大学)

朱 红 (华西医科大学)

韩 骅 (第四军医大学)

胡惠民 (第二军医大学)

邹鲁峰 (第二军医大学)

药立波 (第四军医大学)

王国华 (第四军医大学)

前 言

现代生物化学与分子生物学是在生物化学、遗传学、微生物学、生物物理学、免疫学以及信息科学相互渗透融汇的基础上发展起来的,已经成为生命科学和医学中的前沿学科。其突飞猛进的发展,离不开生物化学与分子生物学技术的进步,从某种意义上说,技术与方法的发展、进步和创新是推动生物化学与分子生物学理论飞速发展的直接动力。

自 20 世纪 50 年代分子生物学创立以来,新的实验技术和方法层出不穷,特别是近 20 ~ 30 年来,分子克隆技术日新月异,像分子杂交、聚合酶链反应(PCR)等技术已经越来越广泛并常规地用于基础医学研究和临床诊断治疗的各个领域,并不断得到新的充实与发展。

21 世纪是人类从根本上认识健康与疾病的时代,人类基因组计划的测序工作将在近年内完成,随后的后基因组计划也已开始实施,这意味着人类生命的“全部密码”被解读,严重威胁人类健康的恶性肿瘤、心血管疾病、遗传病等将被攻克,所有这些都建立在现代分子生物学理论与技术创新的基础之上。作为新世纪培养的高等医学院校的大学生,不了解和掌握这些最新的科技成果,就必然会落伍。

为了培养基础扎实、知识面宽、适应性强、有创新意识和能力的高素质人才,1994 年第四军医大学生化教研室在已故苏成芝教授指导和关怀下,编写了“生物化学及分子生物学实验与技术”一书,并在本科生和研究生教学中应用了五年,积累了一些经验和体会。在此基础上,我们本着继承传统实验教学中重视医学基础理论和技能训练的思想,对原书作了修订,精简了纯验证性内容和重复性内容,较多地增加了现代分子生物学技术的基本理论与方法。生物化学与分子生物学实验课不仅要为本专业理论课学习服务,从高素质人才培养的总目标出发,在有限的教学时间内,主要的教学目的还应当使学生掌握作为 21 世纪的医务工作者必须了解和掌握的生物化学与分子生物学实验技术的基本原理和方法,并具有现代化和系统化的知识和技能。

本书分为四部分,第一部分和第二部分共 14 章,分别详细和系统地介绍了现代生物化学与分子生物学的主要技术理论,可针对不同的教学对象选用,有些章节要求学生掌握,有些章节只作一般了解或作为参考资料,为保持内容的完整与连贯,我们将这部分章节用小号字表示。总之,我们希望给学生提供一个更丰富的独立思考与自学的条件,使他们在继续学习中不断提高。第三部分提供的实验项目,都是我们在教学中采用过的,并取得较好的教学效果,可供选用。第四部分附录汇集了生物化学与分子生物学常用的资料和数据,对独立进行科研的研究生更为需要。

本书由第四军医大学、第二军医大学、华西医科大学和同济医科大学的有关人员共同完成,是愉快合作的结果。由于本书编写过程中增加的内容比较多,也比较新,难免有不妥之处,希望广大读者提出宝贵意见。

编 者

2000 年 3 月

目 录

第一部分 生物化学技术基本理论

第一章 分光光度技术	(3)	二、配体的选择	(24)
第一节 基本原理	(3)	三、配体与载体之间的偶联	(24)
一、光的基本知识	(3)	四、使用方法	(25)
二、朗伯 - 比尔 (Lambert - Beer) 定律	(3)	第五节 高效液相色谱法	(26)
第二节 分光光度计结构简介	(5)	一、高效液相色谱仪	(27)
一、光源	(6)	二、HPLC 的应用及进展	(28)
二、分光系统(单色器)	(6)	第三章 电泳技术	(32)
三、狭缝	(6)	第一节 基本原理	(33)
四、比色杯	(6)	第二节 醋酸纤维薄膜电泳	(35)
五、检测系统	(6)	第三节 琼脂糖凝胶电泳	(36)
第三节 分光光度技术的应用	(7)	第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(37)
一、测定溶液中物质的含量	(7)	第五节 等电聚焦	(39)
二、用紫外光谱鉴定化合物	(7)	第六节 电泳后大分子的检测	(40)
第四节 分光光度法的误差	(8)	第四章 离心技术	(43)
第五节 常见国产分光光度计的使用	(8)	第一节 基本原理	(43)
一、721 型分光光度计	(8)	一、重力场中的沉降	(43)
二、751 型分光光度计	(9)	二、相对离心力	(44)
三、使用分光光度计的注意事项	(10)	三、沉降速度	(45)
第二章 液相色谱技术	(12)	四、沉降系数	(46)
第一节 色谱原理及基本装置	(13)	五、沉降时间	(47)
第二节 凝胶色谱	(14)	第二节 离心机的构造	(47)
一、原理	(14)	一、离心室	(48)
二、凝胶的种类	(15)	二、驱动系统	(48)
三、凝胶色谱使用方法	(18)	三、冷冻系统	(48)
四、应用	(19)	四、真空系统	(48)
第三节 离子交换色谱法	(20)	五、操作系统	(48)
一、基本原理	(20)	第三节 离心转头和离心管	(48)
二、离子交换剂的类型	(20)	一、角度转头	(49)
三、IEC 的方法	(22)	二、甩平转头	(49)
第四节 亲和色谱	(23)	三、垂直转头	(49)
一、固相载体的选择	(24)	四、区带转头	(49)

五、连续流动转头	(50)	第六章 发光分析技术	(85)
六、其他转头	(50)	第一节 分子荧光分析技术	(85)
七、离心转头的常用标记及转头参数	(50)	一、荧光的产生	(85)
八、离心管	(50)	二、荧光检测的类型	(86)
第四节 各型离心机的性能及适用范围	(51)	三、荧光分析的基本参数	(87)
一、低速离心机	(51)	四、环境因素对荧光分析的影响	(89)
二、高速离心机	(52)	五、荧光定量测定的方法	(90)
三、超速离心机	(53)	六、荧光分析仪器的基本结构	(90)
第五节 离心方法	(53)	七、几种不同类型的荧光分析测定装置	(91)
一、差速沉淀离心	(53)	第二节 化学发光分析	(93)
二、速度区带离心	(54)	一、化学发光的一般机制	(93)
三、等密度离心	(57)	二、化学发光定量分析的原理	(94)
四、分析性离心	(58)	三、常用的化学发光物质及反应系统	(96)
五、离心操作要领	(59)	四、化学发光的测定	(97)
第五章 放射性同位素技术	(60)	五、化学发光的应用	(97)
第一节 放射性同位素的性质	(60)	第七章 生物大分子制备技术	(99)
一、放射性同位素的特点	(60)	第一节 选择材料及预处理	(99)
二、放射性强度及其度量单位	(61)	第二节 细胞的破碎及细胞器的分离	(100)
第二节 放射性同位素示踪	(61)	一、细胞的破碎	(100)
一、同位素示踪的基本原理	(61)	二、细胞器的分离	(100)
二、放射性同位素示踪实验具体步骤	(62)	第三节 提取和纯化	(101)
三、几种常用的放射性同位素示踪法	(67)	一、蛋白质(包括酶)的提取	(101)
第三节 放射性测量	(68)	二、蛋白质的分离纯化	(102)
一、闪烁计数器的工作原理	(68)	三、核酸的提取	(103)
二、晶体闪烁计数	(69)	四、核酸的纯化	(104)
三、液体闪烁计数	(70)	五、核酸的浓缩	(104)
四、放射测量的注意事项	(74)	六、DNA、RNA 的定量	(105)
第四节 放射防护	(75)	七、核酸的凝胶电泳和相对分子质量参照物	(105)
一、放射性的危害性及防护的必要性	(75)	第四节 浓缩、干燥及保存	(107)
二、放射防护的三原则	(76)	一、样品的浓缩	(107)
三、内照射和外照射的防护	(76)	二、干燥	(108)
四、放射性污染的清除	(80)	三、保存	(108)
五、合理处理放射性同位素三废	(82)		
第二部分 分子生物学技术基本理论			
第八章 DNA 重组技术	(113)	四、构建和筛选基因组文库及 cDNA 文库	(114)
第一节 目的基因的获取	(114)	五、聚合酶链反应	(115)
一、直接从染色体中分离	(114)	第二节 分子克隆载体与宿主的选择	(116)
二、化学合成法	(114)		
三、用逆转录酶合成 cDNA	(114)		

一、质粒载体.....	(116)	三、宿主细胞.....	(147)
二、噬菌体.....	(118)	四、重组载体导入哺乳动物细胞.....	(147)
三、噬菌粒.....	(118)	五、基因表达产物的检测.....	(148)
四、粘粒.....	(119)	第十章 分子杂交技术.....	(149)
五、宿主细胞.....	(119)	第一节 核酸杂交的基本理论——	
第三节 分子克隆常用的工具酶.....	(119)	DNA 的变性与复性.....	(149)
一、限制性核酸内切酶.....	(120)	一、DNA 变性.....	(149)
二、DNA 聚合酶.....	(122)	二、DNA 复性.....	(150)
三、DNA 连接酶.....	(123)	三、核酸分子杂交.....	(151)
四、末端脱氧核苷酸转移酶.....	(123)	第二节 核酸探针及其标记物.....	(151)
五、核酸酶.....	(123)	一、核酸探针的种类及应用.....	(151)
六、脱氧核糖核酸酶.....	(123)	二、标记物的应用及选择.....	(153)
七、碱性磷酸酶.....	(123)	第三节 放射性同位素标记核酸	
第四节 DNA 限制性内切酶酶切及		探针.....	(154)
片段回收.....	(124)	一、切口平移法(nick translation).....	(154)
一、限制性内切酶运用的设计.....	(124)	二、随机引物法(random primer).....	(155)
二、限制性内切酶的酶切.....	(124)	三、用 T4 多核苷酸激酶标记 DNA 5'	
三、琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 和 DNA		末端.....	(155)
片段的回收.....	(125)	四、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段快速	
四、琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的		标记 DNA 探针末端.....	(155)
纯化.....	(128)	第四节 非放射性物质标记核酸	
第五节 外源基因与载体的连接.....	(129)	探针.....	(156)
一、粘性末端连接.....	(129)	一、生物素(biotin)标记核酸探针.....	(156)
二、平末端的连接.....	(130)	二、地高辛标记核酸探针.....	(156)
三、DNA 的胶内连接.....	(130)	第五节 核酸分子杂交方法.....	(158)
第六节 重组 DNA 导入宿主细胞.....	(131)	一、核酸分子杂交的类型.....	(158)
一、大肠杆菌的转化.....	(131)	二、核酸分子杂交实验因素的优化.....	(163)
二、电脉冲穿孔法转化大肠杆菌.....	(132)	第六节 蛋白质分子杂交.....	(167)
第七节 含重组质粒的宿主菌落的		一、凝胶滞留法(gel retardation assay).....	(168)
筛选与鉴定.....	(133)	二、Southern Western 印迹.....	(168)
一、利用宿主细胞遗传表型的改变进行		三、Western Blotting.....	(168)
筛选.....	(133)	四、免疫沉淀.....	(168)
二、分析重组子分子结构特性进行鉴定.....	(134)	第十一章 cDNA 文库的构建与筛选.....	(170)
第九章 重组 DNA 表达技术.....	(136)	第一节 概述:cDNA 文库概念.....	(170)
第一节 大肠杆菌表达系统.....	(136)	第二节 cDNA 文库构建的策略.....	(171)
一、E. coli 表达载体的结构.....	(136)	一、mRNA 的制备.....	(171)
二、常用的大肠杆菌表达载体.....	(137)	二、cDNA 的制备.....	(173)
三、表达中的其他问题.....	(142)	三、载体的选择.....	(174)
第二节 哺乳动物细胞表达系统.....	(143)	四、连接与转化.....	(175)
一、真核表达载体.....	(143)	五、库容量.....	(175)
二、外源 DNA.....	(147)		

第三节 cDNA 文库的筛选.....	(176)	四、其他领域.....	(192)
第十二章 聚合酶链反应(PCR)技术	(179)	第十三章 DNA 序列测定技术	(194)
第一节 PCR 基本原理和影响因素	(179)	第一节 序列测定的技术和策略	(194)
一、基本原理.....	(179)	一、双脱氧链终止法.....	(194)
二、PCR 各步骤简介	(179)	二、DNA 化学降解法	(197)
三、材料.....	(180)	三、测序策略.....	(198)
四、方法.....	(181)	第二节 Sanger 双脱氧链终止法测	
五、注意事项.....	(181)	序	(199)
六、PCR 条件优化	(183)	一、测序反应.....	(199)
第二节 逆转录 PCR 技术	(184)	二、变性聚丙烯酰胺凝胶.....	(200)
一、原理.....	(184)	三、应用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow	
二、材料.....	(184)	片段进行的双脱氧测序反应.....	(205)
三、方法.....	(184)	第三节 全自动激光荧光 DNA 测序 ...	(207)
四、注意事项.....	(185)	第十四章 蛋白质分子结构测定技术	(209)
第三节 PCR - SSCP 银染技术.....	(185)	第一节 蛋白质一级结构的测定	(210)
一、原理.....	(186)	一、蛋白质或肽的氨基酸组成的定量	
二、材料.....	(186)	测定.....	(211)
三、方法.....	(186)	二、蛋白质或肽的末端测定.....	(212)
四、注意事项.....	(187)	三、亚基拆离、肽链降解和肽段的分离	(216)
第四节 PCR 衍生技术介绍	(188)	四、肽段的氨基酸顺序测定.....	(219)
一、重组 PCR(recombinant PCR, RPCR)	(188)	五、重叠肽法确定肽链的一级结构.....	(220)
二、原位 PCR(in situ PCR)	(188)	六、蛋白质分子中二硫键和酰胺基位置的	
三、固着 PCR(sanchorde PCR, SA-PCR) ...	(188)	确定.....	(221)
四、不对称 PCR(asym metric PCR)	(189)	第二节 蛋白质晶体结构分析	(222)
五、锚定 PCR(anchored PCR)	(189)	第三节 质谱技术	(231)
六、反向 PCR(inverse PCR)	(189)	一、质谱技术简介和原理.....	(231)
七、着色互补 PCR(color complementation		二、质谱技术在蛋白质、多肽结构测定	
PCR)	(190)	中的应用.....	(233)
八、多重 PCR(multiplex PCR)	(190)	第四节 核磁共振技术.....	(234)
第五节 PCR 技术的应用	(190)	一、核磁共振确定蛋白质三维结构的基本	
一、分子生物学科研究领域.....	(190)	原理.....	(234)
二、临床医学领域.....	(191)	二、蛋白质溶液三维结构的计算.....	(237)
三、动植物学的研究.....	(192)		

第三部分 生物化学与分子生物学教学实验

实验一 蛋白质的变性、凝固及沉淀		蛋白质相对分子质量	(248)
反应	(243)	实验四 等电聚焦法测定蛋白质等	
实验二 蛋白质含量测定	(245)	电点	(252)
实验三 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定		实验五 脲酶 K_m 值简易测定	(255)

实验六	碱性磷酸酶的分离纯化	(257)	实验十一	核酸的琼脂糖凝胶电泳	(273)
实验七	血清白蛋白、 γ -球蛋白的 分离纯化及鉴定	(261)	实验十二	DNA 与 RNA 的定量测定	(274)
实验八	胰凝乳蛋白酶的制备及活力 测定	(267)	实验十三	RNA 的合成及其抑制	(277)
实验九	蛋清溶菌酶的分离	(269)	实验十四	质粒 DNA 的提取	(280)
实验十	组织 DNA 与 RNA 的分离和 提纯	(271)	实验十五	聚合酶链反应	(283)
			实验十六	分子杂交实验	(284)
			实验十七	DNA 重组实验	(289)

第四部分 附 录

实验须知	(297)	常用参数	(317)
前言	(297)	一、一些化学试剂的分级	(317)
一、实验室规则	(297)	二、易变质及需要特殊方法保存的试剂	(317)
二、实验室常识	(297)	三、常用酸碱的相对密度和质量分数、 物质的量浓度的关系	(318)
三、实验室安全	(298)	四、常用酸碱体积分数、相对密度和物质 的量浓度的关系	(318)
四、实验室急救	(299)	五、一些常用化合物的溶解度(20)	(320)
五、移液器的使用及注意事项	(299)	六、某些有机溶剂的主要物理常数	(320)
六、玻璃仪器的清洗及各种溶液的配制	(301)	七、冷却剂和干燥剂	(321)
七、实验误差与数据处理	(302)	八、常用蛋白质(酶)的理化特性	(322)
生物化学与分子生物学常用试剂 的配制及参数	(305)	九、层析法常用资料	(327)
试剂的配制	(305)	十、同位素衰减表	(330)
一、溶液浓度的表示与计算	(305)	十一、离心机转速与相对离心力的换算	(330)
二、常用缓冲溶液的配制	(308)	十二、数字词头	(331)
三、体积分数酸、碱溶液的配制	(313)	十三、常用药品中英文对照及分子式、 相对分子质量表	(331)
四、闪烁液的配方	(313)		
五、硫酸铵饱和度的常见表	(314)		

第一部分

生物化学技术基本理论

第一章

分光光度技术

有色溶液对光线有选择性的吸收作用,不同物质由于其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力也不同,因此,每种物质都具有其特异的吸收光谱。有些无色溶液,虽对可见光无吸收作用,但所含物质可以吸收特定波长的紫外线或红外线。分光光度技术(分光光度法)主要是指利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的技术,其理论依据是 Lambert 和 Beer 定律。

分光光度法是比色法的发展。比色法只限于在可见光区,分光光度法则可以扩展到紫外光区和红外光区。比色法用的单色光通过滤光片产生,谱带宽度为 40 ~ 120 nm,精度不高,而分光光度法则要求近于真正单色光,其光谱带宽最大不超过 3 ~ 5 nm,在紫外光区可到 1 nm 以下。单色光通过棱镜或光栅产生,具有较高的精度。

第一节 基本原理

一、光的基本知识

光是由光量子组成的,具有二重性,即不连续的微粒性和连续的波动性。波长和频率是光的波动性的特征,可用下式表示:

$$\lambda = c / \nu$$

式中 λ 为波长,具有相同的振动相位的相邻两点间的距离叫波长。 ν 为频率,即每秒钟振动次数。 c 为光速,等于 $299\,770 \pm 4\text{ km/s}$ 。光属于电磁波。

自然界中存在各种不同波长的电磁波,列成表 1 - 1 所示的波谱图。分光光度法所使用的光谱范围在 200 nm ~ 10 μm (1 μm = 1 000 nm) 之间。其中 200 ~ 400 nm 为紫外光区,400 ~ 760 nm 为可见光区,760 ~ 10 000 nm 为红外光区。

二、朗伯 - 比尔 (Lambert - Beer) 定律

朗伯 - 比尔定律是比色分析的基本原理,这个定律是讨论有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。此定律是由朗伯定律和比尔定律归纳而得。

表 1 - 1 电 磁 波 谱

区 域	波 长		来 源
	m	常 用 单 位	
γ 射线	$10^{-12} \sim 10^{-10}$	$10^{-3} \sim 0.1 \text{ nm}$	原子核
X 射线	$10^{-10} \sim 10^{-8}$	$0.1 \sim 10 \text{ nm}$	内层电子
远紫外	$10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	$10 \sim 200 \text{ nm}$	中层电子
紫外	$2 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-7}$	$200 \sim 400 \text{ nm}$	外层价电子
可见	$4 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-7}$	$400 \sim 760 \text{ nm}$	外层价电子
红外	$7.6 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5}$	$0.76 \sim 50 \mu\text{m}$	分子振动与分子转动
远红外	$5 \times 10^{-5} \sim 10^{-3}$	$50 \sim 1\,000 \mu\text{m}$	分子振动与分子转动
微波	$10^{-3} \sim 1$	$0.1 \sim 100 \text{ cm}$	分子转动
无线电波	$1 \sim 10^3$	$1 \sim 1\,000 \text{ m}$	核磁共振

1. 朗伯定律 一束单色光通过溶液后,由于溶液吸收了一部分光能,光的强度就要减弱:若溶液浓度不变,则溶液的厚度愈大(即光在溶液中所经过的途径愈长),光的强度减低也愈显著。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光的强度),通过液层厚为 L 溶液后,光的强度为 I_t (透过光的强度),则 $\frac{I_t}{I_0}$ 表示透过光的强度是入射光强度的几分之几,称为透光度(transmittance),用 T 表示。透光度随溶液厚度的增加而减少,但实践证明,透光度和溶液层厚度间并不存在简单的定量关系,只有透光度的负对数($-\lg T$)才随着溶液层厚度的增加而成正比例地增加,即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_t} \quad L$$

将上述比例式写成等式,得到

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_1 L$$

式中 $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 称为吸光度(A)(absorbance),又称为消光度(E)(degree of extinction)或光密度(D)(optical density)。所以

$$A = K_1 L$$

式中 K_1 为比例系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和浓度以及溶液的温度等。

上式表明,当溶液的浓度不变时,吸光度与溶液液层的厚度成正比,这就是朗伯定律。

2 比尔定律 当一束单色光通过有色溶液后,溶液液层的厚度不变而浓度不同时,溶液的浓度愈大,则透射光的强度愈弱,其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_2 C$$

$$A = K_2 C$$

式中 C 为有色物质溶液的浓度; K_2 为比例系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和液层的

厚度,以及溶液的温度等。

上式表明,当溶液液层的厚度不变时,吸光度与溶液的浓度成正比,这就是比尔定律。

3 朗伯 - 比尔定律 如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响,则必须将朗伯定律和比尔定律合并起来,得

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K L C$$
$$A = K L C$$

即吸光度与溶液的浓度和液层的厚度的乘积成正比,这就是朗伯 - 比尔定律。

在上式中,若 L 用厘米表示, C 用克/升表示,则比例常数 K 称为吸光系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和温度等,而与光的强度、溶液的浓度及液层的厚度无关。

若 L 用厘米表示, C 用摩尔/升表示,则上式中的比例常数用 ε 表示,得到

$$A = \varepsilon L C$$

式中 ε 称为物质的摩尔吸光率 (molar absorptivity) 或摩尔吸光系数 (molar absorption coefficient), 其值相当于 $L = 1 \text{ cm}$, $C = 1 \text{ mol/L}$ 时,在一定波长下的吸光度,它是物质的特性常数。

$$A = \varepsilon L C = \varepsilon \times 1 \times 1 = \varepsilon$$

不同的物质可能会有相同的最大吸收波长,但其摩尔吸光系数不一定相同。 ε 值愈大,说明该物质溶液对光吸收愈强烈,则比色测定的灵敏度愈高。

第二节 分光光度计结构简介

能从含有各种波长的混合光中将每一单色光分离出来,并测量其强度的仪器称为分光光度计。

分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外光区、可见光区、红外光区以及万用(全波段)分光光度计等。无论哪一类分光光度计都由下列五部分组成,即光源、单色器、狭缝、样品池,检测系统。如图 1 - 1 所示。

图 1 - 1 分光光度计各部分示意图

一、光源

要求能提供所需波长范围的连续光谱,稳定而有足够的强度。常用的有白炽灯(钨丝灯、卤钨灯等),气体放电灯(氢灯、氘灯及氙灯等),金属弧灯(各种汞灯)等多种。

钨灯和卤钨灯发射 320 ~ 2 000 nm 连续光谱,最适宜工作范围为 360 ~ 1 000 nm,稳定性好,可用作可见光分光光度计的光源。氢灯和氘灯能发射 150 ~ 400 nm 的紫外线,可用作紫外光区分光光度计的光源。红外线光源则由纳恩斯特(Nernst)棒产生,此棒由 $ZrO_2 \cdot Y_2O_3 = 17:3$ (Zr 为锆, Y 为钇)或 Y_2O_3 , GeO_2 (Ge 为锗)及 ThO_2 (Th 为钍)之混合物制成。汞灯发射的不是连续光谱,能量绝大部分集中在 253.6 nm 波长处,一般作波长校正用。

钨灯在出现灯管发黑时应及时更换,如换用的灯型不同,还需要调节灯座的位置和焦距,氢灯及氘灯的灯管或窗口是石英的,且有固定的发射方向,安装时必须仔细校正。接触灯管时应戴手套以防留下污迹。

二、分光系统(单色器)

单色器是指能从混合光波中分解出所需单一波长光的装置,由棱镜或光栅构成。

用玻璃制成的棱镜色散力强,但只能在可见光区工作,石英棱镜工作波长范围为 185 ~ 4 000 nm,在紫外光区有较好的分辨率,而且也适用于可见光区和近红外光区。棱镜的特点是波长越短,色散程度越好,越向长波一侧色散程度越差。所以用棱镜的分光光度计,其波长刻度在紫外区可达到 0.2 nm,而在长波段只能达到 5 nm。

有的分光系统是衍射光栅,即在石英或玻璃的表面上刻划许多平行线,刻线处不透光,于是通过光的干涉和衍射现象,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。

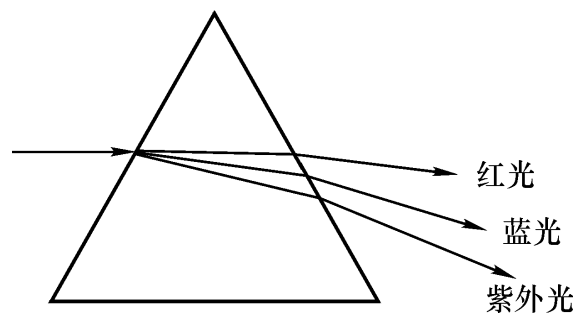


图 1 - 2 棱镜分光器

三、狭缝

狭缝是指由一对隔板在光通路上形成的缝隙,用来调节入射单色光的纯度和强度,也直接影响分辨率。狭缝可在 0 ~ 2 nm 宽度内调节,由于棱镜色散力随波长不同而变化,较先进的分光光度计的狭缝宽度可随波长一起被调节。

四、比色杯

比色杯也叫样品池、吸收器或比色皿,用来盛测定溶液,各个杯子壁厚度等规格应尽可能完全相等,否则将产生测定误差。玻璃比色杯只适用于可见光区,在紫外光区测定时要用石英比色杯。不能用手指拿比色杯的光学面,用后要及时洗涤,可用温水或稀盐酸、乙醇以至铬酸洗液(在浓酸中浸泡时不要超过 15 min),表面只能用柔软的绒布或拭镜头纸擦净。

五、检测系统

有许多金属能在光的照射下产生电流,光愈强电流愈大,此即光电效应。因光照射而产生的电

流叫做光电流。受光器有两种,一是光电池,二是光电管。光电池的组成种类繁多,最常见的是硒光电池。光电池受光照射产生的电流较强,可直接用微电流计量出。但是,当连续照射一段时间后会疲劳现象而使光电流下降,要在暗中放置一段时间才能恢复。因此使用时不宜长期照射,随用随关,以防止光电池因疲劳而产生误差。

光电管装有一个阴极和一个阳极,阴极是用对光敏感的金属(多为碱土金属的氧化物)做成,当光射到阴极且达到一定能量时,金属原子中的电子发射出来。光愈强,光波的振幅愈大,电子放出愈多。电子是带负电的,被吸引到阳极上而产生电流。光电管产生电流很小,所以需要放大。分光光度计中常用电子倍增光电管,在光照射下产生的电流比其他光电管要大得多,这就提高了测定的灵敏度。

检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟的或数字的结果,模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器及与计算机连用等,数字输出则通过模拟/数字转换装置如数字式电压表等进行。

第三节 分光光度技术的应用

一、测定溶液中物质的含量

可见或紫外分光光度法都可用于测定溶液中物质的含量。这需要测定标准溶液(浓度已知的溶液)和未知液(浓度待测定的溶液)的吸光度,将两者进行比较。由于所用吸收池的厚度是一样的,可用下式进行计算。

$$\frac{A_x}{A_s} = \frac{K C_x L}{K C_s L} = \frac{C_x}{C_s}, \text{即 } C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s$$

式中 C_x 代表未知液的浓度, C_s 代表标准液的浓度, A_x 和 A_s 分别代表未知液和标准液所测得的吸光度值,式中只有 C_x 是未知的,可由上式计算得之。

也可以先测出不同浓度的标准液的吸光度,绘制标准曲线,在选定的浓度范围内标准曲线应该是一条直线,然后测定出未知液的吸光度,即可从标准曲线上查到其相对应的浓度。

含量测定时所用波长通常要选择被测物质的最大吸收波长,这样做有两个好处: 灵敏度大,物质在含量上的稍许变化将引起较大的吸光度差异; 可以避免其他物质的干扰。

还可利用摩尔吸光率(ϵ)求得测定物质的浓度,由于物质的 ϵ 是已知的,读取光径(液层厚度)为 1 cm 时溶液的吸光度(A),则可以用下式计算溶液中物质的浓度(C):

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

此式常在紫外光吸收法时应用,无需显色反应,操作方便。

二、用紫外光谱鉴定化合物

使用分光光度计可以绘制吸收光谱曲线。方法是用各种波长不同的单色光分别通过某一浓度

的溶液,测定此溶液对每一种单色光的吸光度,然后以波长为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制吸光度—波长曲线,此曲线即吸收光谱曲线。

各种物质有它自己一定的吸收光谱曲线,因此用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时,则很可能它们是同一物质。一定物质在不同浓度时,其吸收光谱曲线中峰值的大小不同,但形状相似,即吸收高峰和低谷的波长是一定不变的。

紫外光吸收是由不饱和的结构造成的,含有双键的化合物能表现出吸收峰。紫外光吸收光谱比较简单,同一种物质的紫外光吸收光谱应完全一致,但具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。除了特殊情况外,单独依靠紫外光吸收光谱不能决定一个未知物的结构,必须与其他方法配合。紫外光吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。

第四节 分光光度法的误差

在分光光度法中,即使将各种因素都控制好,对于浓度过大或过小的样品,误差仍然很大。因为浓度过大的样品,其吸光度过高,影响检测器的灵敏度,且读数标尺刻度的精度差,误差亦大,故难于准确。浓度过低的样品,其吸光度小,则因与仪器本身因素有关,也容易引起检测器标尺上的读数误差。例如光源波动的影响:当光源强度改变 1%、吸光度为 1.0 时,只有 0.4% 的误差,但在吸光度为 0.045 时,则可产生 9.6% 的误差。实际上,在整个透光度(或吸光度)范围的不同部分均有不同的误差。从理论上推算,相对误差的最小的部分在透光度为 36.8% 处(或吸光度为 0.4343 处),故通常认为测定值在吸光度 0.20 ~ 0.80 范围内(透光度为 20% ~ 65%)误差较小,超出此范围,相对误差均会增大。

影响分光光度法精确度的主要原因还有光谱纯度。分光光度计应能正确选出光源光谱中所需部分波长作为入射光,一般应保持光谱带宽度在 10 nm 以下,如果测定样品有很狭窄的吸收峰,就必须有更小的光谱宽度,所以分光光度计大多均有可调的狭缝。在实际使用中,用较大狭缝虽可提高重现性,但由于加大光谱宽度反而降低了准确度。

散射光也是引起误差的重要因素。这里所说的散射光是指一切未经过测定溶液吸收,而又落到检测器上引起干扰的光,如室内自然光,经过某些漏洞进入仪器而明显增大了透光度,故高灵敏度的分光光度计宜安装的光线较暗的室内。散射光也包括能透过比色皿的非测定需要的其他波长的光,实际上是光谱不纯,但因效果与散射光一样,故也称为散射光干扰。散射光干扰对高浓度测定特别有害,能使吸光度降低,标准曲线的高浓度部分向下弯曲。

第五节 常见国产分光光度计的使用

一、721 型分光光度计

这一种采用光电管为受光器的较高级可见光分光光度计。其波长范围为 360 ~ 800 nm,在 410