

植物生理学实验中朗伯-比尔定律及其推导公式的探讨

李忠光*

云南师范大学生命科学学院, 昆明 650092

在植物生理学实验教学中,对植物某些生物分子如蛋白质、核酸、糖类、光合色素,以及酶活性测定时,常常用到分光光度计,分光光度计定量测定物质的原理是朗伯-比尔定律(Lambert-Beer law)。朗伯-比尔定律包括朗伯定律和比尔定律两部分内容,朗伯定律是指有色溶液的光密度与有色溶液的厚度(L)成正比,其表达式为 $A=KL$;而比尔定律是指有色溶液的光密度与溶液的浓度(C)成正比,其表达式为 $A=KC$ 。朗伯定律和比尔定律合并即得到朗伯-比尔定律,其表达式为 $A=KLC$,式中A表示光密度(optical density, OD),或称吸光度(absorption, A);L表示比色皿的光径,即溶液的厚度,一般用cm表示;C表示溶液的浓度,其单位有百分比浓度(V/W) (0.1% 或 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)或摩尔浓度($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)两种表示方法;K表示吸收系数,是一个特征常数,它有2种表示方法:第一种表示方法是,物质的浓度用百分比浓度表示,即0.1% ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),比色皿的光径为1 cm时,所测得的溶液光密度称为比吸收系数,即 $K=A/LC$,故其单位是 $(\text{g/L})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}=\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (曾泳淮和林数昌 2004)。在测定中,当物质的分子量不确定或难以确定时,一般用比吸收系数,如在淀粉含量测定中,由于淀粉的分子量难以确定,故其吸收系数用比吸收系数,浓度单位用 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 表示。吸收系数的另一种表示方法是 ϵ ,即当物质的浓度是 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,比色皿的光径为1 cm时,所测得的溶液光密度称为摩尔吸收系数,即 $\epsilon=A/LC$,故其单位是 $(\text{mol/L})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}=\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (曾泳淮和林数昌 2004),摩尔吸收系数一般用于已知分子量的生物分子如氨基酸、糖类等的定量测定。从上述可以看出,无论是用百分比浓度表示物质的浓度,还是用摩尔浓度表示物质的浓度,从公式 $A=KLC=L\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\times\text{cm}\times\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,或 $A=\epsilon LC=L\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\times\text{cm}\times\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可知,光密度(OD)或吸光度(A)都没有单位(曾泳淮和林数昌 2004)。

由张志良先生和瞿伟菁(2003)主编的《植物生理学实验指导》与其它多种有关植物生理学实

验指导书中差不多都存在有关朗伯-比尔定律及其推导公式的问题(白宝璋和汤学军 1993; 郝建军等 2007; 李合生 2000),本文仅以张志良先生的书为例进行探讨。在张志良先生等主编的《植物生理学实验指导》第3版(2003)和第4版(2009)中“叶绿素a、叶绿素b含量测定”和“丙二醛的测定”实验中,都涉及到朗伯-比尔定律公式及其推导公式。在“叶绿素a、叶绿素b含量测定”实验中,由于叶绿素溶液是最大吸收峰不同的2个组分(叶绿素a和叶绿素b)的混合液,书中得出它们的质量浓度 r (第3版用 C 表示)与光密度(OD)之间有如下关系: $A_1=\rho_a k_{a1}+\rho_b k_{b1}$, A_1 为在波长 λ_1 时,混合液的OD值; ρ_a 、 ρ_b 分别为组分a、b的质量浓度,单位是 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; k_{a1} 为组分a的比吸收系数,即组分a的质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,于波长 λ_1 时的OD值; k_{b1} 为组分b的比吸收系数,即组分b的质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,相当于波长 λ_1 时的OD值。在教学中我们发现,根据张志良先生等的实验指导书中朗伯-比尔定律的推导公式 $A_1=\rho_a k_{a1}+\rho_b k_{b1}$ 和比吸收系数的定义,学生会得出几种错误的结论:第一种,如果学生忽略该教材中的比吸收系数的定义,直接根据朗伯-比尔定律得知K的单位是 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,当学生把K代入指导书中的公式 $A_1=\rho_a k_{a1}+\rho_b k_{b1}$,即得 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\times\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}+\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\times\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}=\text{cm}^{-1}$,得出光密度(OD)或吸光度(A)的单位是 cm^{-1} 的错误结论。第二种,由朗伯-比尔定律得知 $K=A/LC$,故其单位是 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,K是一个常数,而指导书中对比吸收系数K的定义是“组分a当质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,于波长 λ_1 时的OD值”,即得当 $L=2\text{ cm}$ 时, $K=0.5\text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$;当 $L=1\text{ cm}$ 时, $K=\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$;当 $L=0.5\text{ cm}$ 时, $K=2\text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。学生错误的认为K不是一个常数,它的值随着L的变化而变化,不变的只是它的单位。第3种,由于

收稿 2009-09-23 修定 2009-11-16

资助 云南师范大学综合性和设计性实验研究项目。

* 通讯作者(E-mail: zhongguang_li@163.com; Tel: 0871-5517394)。

实验指导书中对比吸收系数K的定义是“组分a当质量浓度为 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 于波长 λ_1 时的OD值”, 由于定义中没有涉及到比色皿的光径(L), 学生错误地认为OD值与比色皿的光径无关, 即 $A=KC$, 从而得出K的单位是 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ 的错误结论。同理, 在“丙二醛的测定”实验中, 学生仍然会根据实验指导书中朗伯-比尔定律的推导公式 $A_1=C_a\epsilon_{a1}+C_b\epsilon_{b1}$ 及对摩尔吸收系数 ϵ 的定义“ ϵ_{a1} 、 ϵ_{b1} 分别为组分 a、b 浓度为 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 在波长 λ_1 处的OD值”得出上述几种错误的结论。

所以, 建议实验指导书中在运用朗伯-比尔定律及其推导公式测定或计算物质的含量时, 一方面在朗伯-比尔定律公式及推导公式中不能忽略比色皿的光径(L), 即不能将 $A=KLC$ 或 $A_1=k_{a1}L\rho_a+k_{b1}L\rho_b$ 简写为 $A=KC$ 或 $A_1=\rho_ak_{a1}+\rho_bk_{b1}$; 如果要简写, 最好应说明比色皿的光径或液层厚度为 1 cm 时, 才有 $A=KC$ 或 $A_1=\rho_ak_{a1}+\rho_bk_{b1}$; 同时, 在定义比吸收系数或摩尔吸收系数时, 也不能忽略比色皿的光径(L)是

1 cm , 即不能将“当物质的浓度为 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比色皿的光径为 1 cm 时, 所测得的溶液的光密度称为该种物质的比吸收系数或摩尔吸收系数”定义为“当物质的浓度为 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 所测得的溶液的光密度称为该种物质的比吸收系数或摩尔吸收系数”。

参考文献

- 白宝璋, 汤学军(1993). 植物生理学——测试技术. 北京: 中国科学技术出版社, 37~38
- 郝建军, 康宗利, 于洋(2007). 植物生理学实验技术. 北京: 化学工业出版社, 68~70
- 李合生(2000). 植物生理生化实验原理和技术指导. 北京: 高等教育出版社, 134~136
- 曾泳淮, 林数昌(2004). 分析化学(仪器分析部分). 第2版. 北京: 高等教育出版社, 90~119
- 张志良, 瞿伟菁(2003). 植物生理学实验指导. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 67~70
- 张志良, 瞿伟菁, 李小方(2009). 植物生理学实验指导. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 58~60