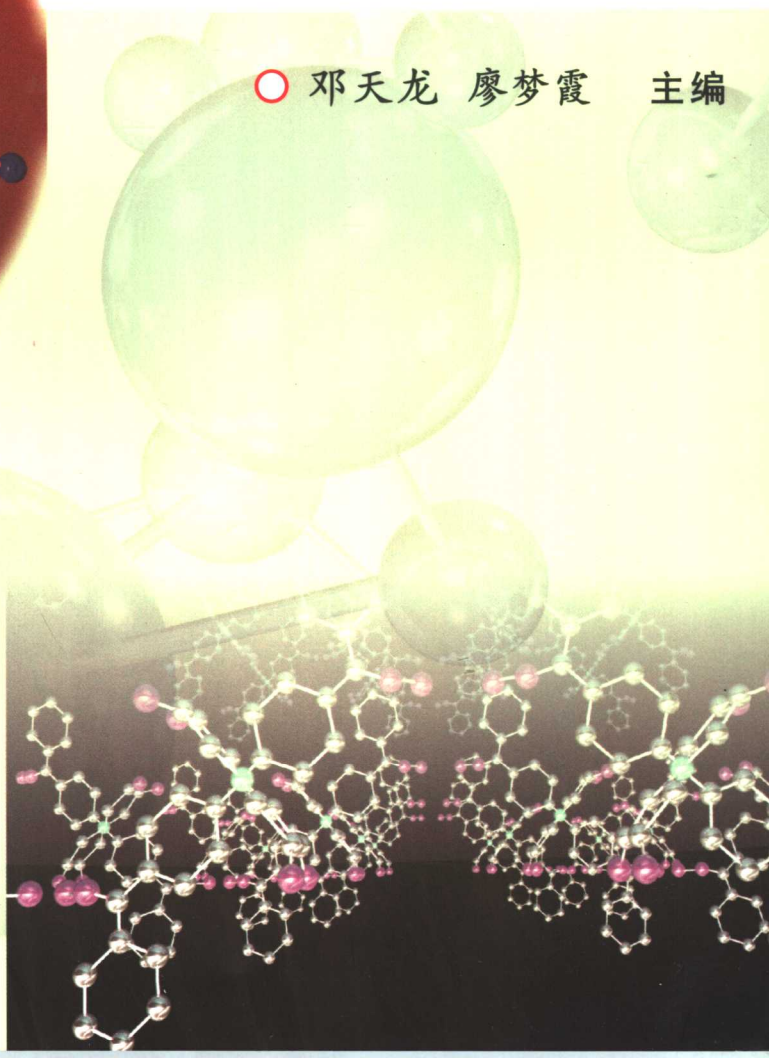
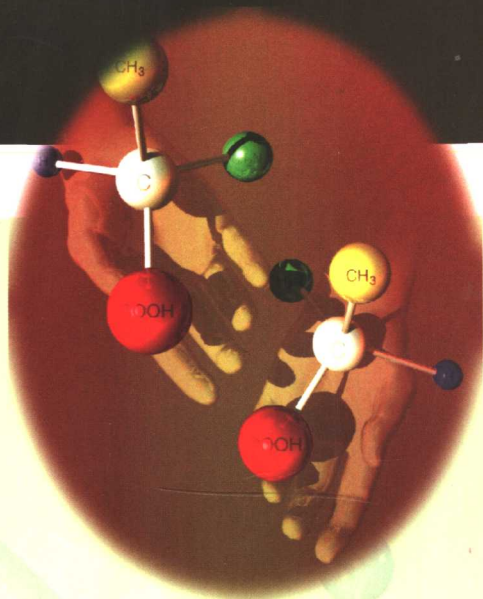


生物化学

SHENGWU HUAXUE
SHIYAN

实验

○ 邓天龙 廖梦霞 主编



电子科技大学出版社

生物化学实验

邓天龙 廖梦霞 主编

电子科技大学出版社

内 容 简 介

本书共七章十四个实验,内容包括蛋白质、酶、核酸、维生素、组织代谢和计算机在生物化学中的应用。选用的方法既有常用的提取与分离、定性、定量分析与鉴定方法,也有近年来国内外广泛应用的新技术和新方法。每一个实验都按实验目的、基本原理、仪器与试剂、方法步骤以及实验报告等条目编写,并附有思考题。

本书是为高等学校化学、应用化学、化工与制药、环境工程以及生物工程等专业本科生编写的实验教材,也可供生物分析化学、生物技术及其应用、生物矿业工程、生物制药技术以及环境生物治理等研究领域的研究生和科技工作者使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验 / 邓天龙, 廖梦霞主编. —成都: 电子科技大学出版社, 2006.9
ISBN 7-81114-281-3

I. 生... II. ①邓...②廖... III. 生物化学—实验
—高等学校—教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 115080 号

生物化学实验

邓天龙 廖梦霞 主编

出 版: 电子科技大学出版社 (成都建设北路二段四号, 邮编: 610054)

责任编辑: 徐 红

发 行: 新华书店经销

印 刷: 成都经纬印务有限公司

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 5.375 字数: 135 千字

版 次: 2006 年 9 月第一版

印 次: 2006 年 9 月第一次印刷

书 号: ISBN 7-81114-281-3/O·15

印 数: 1—1000 册

定 价: 12.30 元

◆ 本书如有缺页、破损、装订错误, 请寄回印刷厂调换。

编写说明

生物化学是化学、应用化学、化工与制药、环境工程、生物工程等本科专业重要的专业基础及专业核心课程之一。实践表明,生物化学的基本理论、基础知识和基本研究方法在化学、化工、医药、环保、生物科学等许多研究领域中有十分重要的作用。

生物化学是一门实验科学,它要通过实验来研究问题。近年来,虽有针对药学和中医专业的生物化学实验指导书,但一直缺乏适合于化学、应用化学、化工与制药、环境工程等本科专业的生物化学实验教材。我们曾编写了《生物化学实验》校内教材,于2001~2006年分别在应用化学、化工与制药、生物工程等本科专业和分析化学、应用化学专业硕士研究生中使用了5年。本实验教材,是依据新编《生物化学》与《生物化学实验》教学大纲的要求,在原教材基础上修编而成。

全书共七章十四个实验,内容包括蛋白质、酶、核酸、维生素、组织代谢和计算机在生物化学中的应用等;注重理论与实践相结合,重点突出学生应掌握的实验技能,重视对学生动手能力、独立分析问题与解决问题能力的培养,注重加强与《生物化学》课堂教材内容的衔接,并保持了该实验教材的相对独立性和完整性。

本书由邓天龙教授、廖梦霞副教授主编,参加编写的有邓天龙、廖梦霞、吴怡和徐青,并由廖梦霞博士统稿和补充附录。成都理工大学阎树旺教授审阅了全稿,并提出了许多的宝贵意见。本教材的出版得到了教务处副处长阳正熙教授、材料与化学化工学院应用化学系和生物技术及其应用研究组人员的大力支持,编者在此一并表示衷心感谢!

限于作者水平有限,加之时间仓促,尽管我们已做了很大的努力,书中仍难免有错误和欠妥之处,真诚地希望使用本实验教材的师生和科技工作者批评指正。

编 者

2006年8月

目 录

第一章 生物化学实验基本技能	1
一、生物化学实验的基本操作	1
二、比色分析法及分光光度计的使用	3
第二章 蛋白质	6
实验一 总氮量的测定——凯氏 (Kjeldahl) 定氮法	6
一、实验目的	6
二、实验原理	6
三、实验药品、实验器材	6
四、实验方法	7
五、实验记录	9
六、实验结果计算	9
七、思考题	9
实验二 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	9
一、实验目的	9
二、实验原理	10
三、实验药品、实验器材	10
四、实验方法	11
五、实验记录	11
六、实验结果计算	11
七、思考题	11
实验三 蛋白质及氨基酸的呈色反应	12
一、呈色反应	12
二、实验目的	12
三、双缩脲反应	12
四、茚三酮反应	14
五、黄色反应	15
六、坂口反应	16
七、乙醛酸反应	17
八、偶氮反应	18
九、醋酸铅反应及亚硝基铁氰化钠反应	19
十、思考题	20

实验四 蛋白质的等电点测定和沉淀反应	20
一、蛋白质等电点的测定	20
二、蛋白质的沉淀及变性	21
三、蛋白质的盐析	22
四、重金属离子沉淀蛋白质	23
五、某些有机酸沉淀蛋白质	23
六、加热沉淀蛋白质	24
七、有机溶剂沉淀蛋白质	25
八、尿蛋白定性与半定量检验	26
九、思考题	28
实验五 蛋白质的定量测定	28
一、双缩脲法	28
二、Folin-酚试剂法 (Lowry 法)	30
三、紫外分光光度法	32
四、染料结合比色法	34
第三章 酶	37
实验六 酶的特性	37
一、实验目的	37
二、温度对酶活性的影响	37
三、pH 对酶活性的影响	38
四、唾液淀粉酶的活化和抑制	39
五、酶的专一性	40
六、思考题	42
第四章 核酸	43
实验七 核酸的分离与提取	43
一、实验目的	43
二、微生物 DNA 的提取	43
三、酵母 RNA 的提取	45
四、思考题	46
实验八 DNA 的定量测定	46
一、实验目的	46
二、二苯胺法	46
三、改良二苯胺法	47
四、吲哚法	48
五、思考题	49
实验九 核酸含量的测定	49
一、定磷法	49

二、定糖法 (DNA、RNA 含量的测定)	52
三、紫外分光光度法	56
第五章 维生素	59
实验十 还原型维生素 C 的定量测定 (2, 6-二氯酚靛酚法)	59
一、实验目的	59
二、实验原理	59
三、实验药品、实验设备	59
四、实验方法	60
五、实验记录	61
六、思考题	61
实验十一 总维生素 C 的测定 (2, 4-二硝基苯肼法)	61
一、实验目的	61
二、实验原理	61
三、实验药品、实验设备	62
四、实验方法	62
五、实验记录	63
六、思考题	63
第六章 组织代谢	64
实验十二 氨基移换反应 (一) —— 血清中转氨酶活性的测定 (分光光度法)	64
一、实验目的	64
二、实验原理	64
三、实验药品、实验设备	65
四、实验方法	65
五、实验记录	66
六、思考题	66
实验十三 氨基移换反应 (二) —— 谷丙转氨酶活性的测定 (纸层析法)	66
一、实验目的	66
二、实验原理	67
三、实验药品、实验设备	67
四、实验方法	67
五、实验记录	68
六、思考题	68
第七章 计算机在生物化学中的应用	69
实验十四 计算机在蛋白质结构观察和分析中的应用	69
一、实验目的	69
二、实验内容	69

三、实验“材料”	69
四、实验方法	70
五、思考题	70
附录	71
附录一 常用缓冲溶液的配制	71
附录二 离心机转速 N 与相对离心力 (RCF) 的换算	75
附录三 化学试剂纯度分级表	76
附录四 实验室常用酸碱的比重和浓度	76
附录五 常用计量单位及符号	77
附录六 希腊字母表	77
主要参考文献	78

第一章 生物化学实验基本技能

一、生物化学实验的基本操作

(一) 玻璃仪器的洗涤

玻璃仪器的洗涤是生物化学实验的一个重要环节。洁净的玻璃仪器内壁应光洁、明亮、不挂水珠，常用的洗涤方法有：

1. 一般玻璃仪器，如烧杯、试管等，可用肥皂、合成洗涤剂、去污粉等用毛刷仔细刷洗，再用自来水冲洗干净，最后用少量蒸馏水冲洗 2~3 次，置于干燥箱中烘干备用。

2. 容量分析仪器，如移液管、容量瓶、滴定管等，不能用毛刷刷洗，可在用毕后，即用自来水冲洗，直至不挂水珠，再用少量蒸馏水冲洗 2~3 次即可备用。若冲洗后的仪器仍挂水珠，则应将其沥干后，用重铬酸钾洗液浸泡 4~6h，然后用自来水冲洗干净，再用少量蒸馏水冲洗 2~3 次。

3. 黏附有血浆的刻度吸量管，可先用 45% 尿素溶液浸泡，使血浆蛋白溶解，然后用自来水冲洗干净。若仍未清洁，可在重铬酸钾洗液中浸泡 4~6h 后，用自来水冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2~3 次；或者用 1% 氨水浸泡，使血浆溶解，然后依次用 1% 盐酸溶液、自来水、蒸馏水冲洗。

4. 新购置的玻璃仪器有游离碱存在，须在 1%~2% 盐酸中浸泡 2~6h，以除去游离碱后，用自来水冲洗，再用蒸馏水冲洗 2~3 次。

5. 使用重铬酸钾洗液时应注意的事项：

(1) 需用重铬酸钾洗液浸泡的容器，在浸泡前应尽量沥干，再用洗液浸泡。否则，洗液因稀释而降低其氧化力，甚至失效。

(2) 由于 Hg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 等离子易与重铬酸钾洗液反应生成沉淀而黏附在容器壁上，因此凡接触过这些离子的容器，可先用 1% 硝酸或 5%~10% EDTA 润洗除去这些离子，再用水冲洗、沥干后，最后用洗液浸泡。

(3) 有机化合物、油类、有机溶剂均可使洗液还原失效，因此容器壁上若粘附有大量油类、有机物等，应先去除，然后再用洗液浸泡。

(4) 由于洗液有很强的酸性和氧化性，所以使用时应注意不能溅溢在皮肤或衣物上，以免被烧伤或烧坏。

(5) 当洗液颜色由深棕色变为绿色时，是由于重铬酸还原为硫酸铬的原因，所以不能再继续使用。

(二) 移液管的使用

移液管是用来移取定量体积溶液的量器。生物化学实验中常用的移液管有三种，如图

1-1 所示。

1. 刻度移液管：分为刻度刻至尖端和不刻至尖端两种。若使用刻度刻至尖端的移液管时，在将液体放出后，应吹出最后留在管内的少量液体。

2. 奥氏移液管：准确度最高，使用时必须吹出留在尖端的液体。

3. 大肚移液管：一般只在上端有刻度线，将所量取的液体放出后，只需将吸量管的尖端触及器壁约 0.5min 即可，不得吹出尖端的液体。应当注意的是，有的移液管在下端狭窄处还有一刻度线，则两刻度线之间的体积才代表该移液管上所注明的体积。

近年来，使用较多的还有微量移液器（MicroPipette）。它具有使用方便、取加样快速、计量准确、不易破损等优点，其取样尖端由一次性使用的塑料制成，只需更换吸嘴，即可移取不同样品。

定量移液器是由钮、杆、压盘、外壳、柱塞、弹簧、吸引管、吸嘴等部分构成，如图 1-2 所示，可分为两种类型：

(1) 固定式：只能取加一定容量，不能调节。其规格有 10 μ L、20 μ L、25 μ L、30 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L、250 μ L、300 μ L、400 μ L、500 μ L、1000 μ L 等。

(2) 可调式：在其容量量程范围内，可根据需要调节取样和加样的量。例如 0~200 μ L，10 μ L~100 μ L，100 μ L~1000 μ L，500 μ L~2500 μ L。

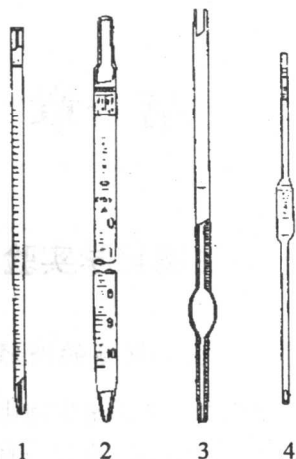
使用方法：吸液前先把吸嘴套在吸引管上，并轻轻旋紧，以保证接合严密。用大拇指按下按钮到第一停止点，以排出一定容积的空气，此时即可吸液。吸液时把吸嘴尖浸入取样液内几毫米处，徐徐松开大拇指，让按钮慢慢自行复原，即完成取样。

排液，将吸液器的吸嘴尖置于加样容器壁上，用拇指慢慢地将按钮按下去到第一停止点，停留 1s，黏性较高的溶液停留 5~10s，然后把按钮按到第二停止点，再让吸嘴沿着容器壁向上滑动。当吸嘴尖与容器壁或与溶液不接触时，释放按钮，使其返回到初始位置。

(三) 溶液的混匀

某一反应的充分进行，必须使反应的体系内各种物质分子充分接触。因此，每加入一种试剂后，均须充分混匀。当溶液稀释时，亦需充分混匀，才能获得浓度均一的溶液。溶液混匀的方法通常有以下几种：

1. 使盛器作离心运动。
2. 左手持试管上端，以右手指轻击试管下半部，使管内溶液作旋转运动。
3. 利用漩涡混合器混匀，如图 1-3 所示。



1、2 为刻度移液管；3 为奥氏移液管；4 为大肚移液管

图 1-1 各种移液管

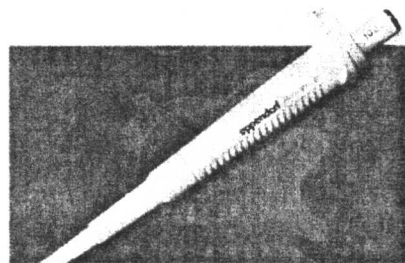


图 1-2 定量移液器的结构

4. 不得已时, 可用干燥清洁的玻璃棒搅匀。

无论用何种方法混匀, 均需防止盛器内液体溅出或被污染 (Contamination), 严禁用手指堵塞管口或瓶口震荡混匀。

(四) 溶液的过滤

过滤有普通过滤、减压过滤及保温过滤等。在此仅介绍普通过滤。

过滤前的准备: 取一张圆形的滤纸, 对折两次, 打开成一圆锥体 (一边为三层, 一边为一层), 把它放入干燥的漏斗中。漏斗的边缘要比滤纸边缘高出大约 0.5~1cm。漏斗壁与滤纸应完全密合。可用欲过滤的

液体润湿滤纸, 并用玻璃棒小心地按压滤纸, 使滤纸各处紧密地贴在漏斗壁上, 尤其应注意把滤纸的三层部分按平, 不要让其留有小气泡, 否则过滤时易于冲开。

过滤时放正漏斗, 其边缘应处于水平面上。漏斗下部的尖端应与接收溶液的容器内壁接触, 以避免溶液流下时飞溅。向漏斗内倾注液体时, 用左手拿着玻棒, 并让玻棒与滤纸近于垂直, 液体沿玻棒往下引流。液体最多允许加至距滤纸边缘 5mm 处, 液体加得过多, 沉淀物则会随溶液上浮而粘附于漏斗壁并混入滤液中。向漏斗内加完液体后, 要把盛有待滤液体的容器沿着玻棒向上滑动一下, 以免待滤液体流到容器外面。

(五) 离心机的使用

离心法也是分离沉淀物的一种方法。它是利用离心机转动的离心力, 使比重较重的沉淀物沉积在离心管底部, 以达到分离的目的。其上层液体称为上清液。

电动离心机的使用方法:

1. 将待离心的液体置于离心管或小试管中, 并检查离心管 (或小试管) 的大小与离心机的套管是否相匹配。

2. 取出离心机中的全部套管, 并检查底部是否铺好软垫, 套管底部有无碎玻片或漏孔 (有碎玻片必须取出, 漏孔应用蜡封住)。检查合格后, 将盛有离心液的两离心管分别放入套管中, 然后连套管一起分置于粗天平两侧, 通过往离心管与套管之间滴加水来调节两边重量使之达到平衡。

3. 将已平衡的两只装有离心管的套管分别放入离心机相互对应的两插孔内; 盖上离心机盖; 打开电源开关; 逐步扭动转速旋钮, 先缓慢增加离心机转速, 然后调到所需的转速; 达到离心所需的时间后, 将转速旋钮逐步回零, 关了电源, 让离心机自然停止转动后 (注意不可强迫停转) 取出离心管。

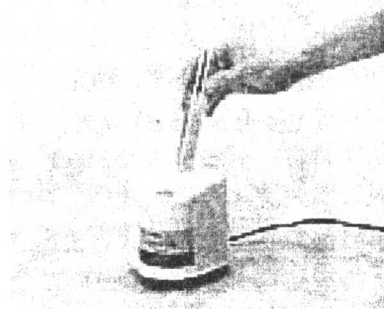


图 1-3 旋涡混合器混匀

二、比色分析法及分光光度计的使用

分光光度法是根据物质对光选择性吸收而进行分析的方法。分光光度法具有较高的灵敏度和一定的准确度, 特别适宜于微量成分的测定, 并具有操作简便、快速、适用范围广

等特点，在生物化学中占有重要的地位。

吸光光度法使用的仪器，主要由如图 1-4 所示的五部分组成。目前，常用的 581G 光电比色计，72 型、721 型、722 型及 751G 型等分光光度计，都是在上述五个部件的基础上，增加了灵敏度、准确度、稳定性和各种自动化装置的、具有不同性能的分光光度计。

下面主要介绍 751G 分光光度计的构造和使用方法。

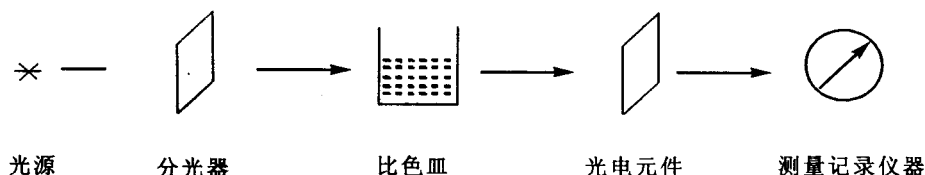


图 1-4 吸光光度法的基本组成部件

（一）构造

751G 型分光光度计是可见光和紫外光分光光度计，其波长范围为 200~1000nm，在波长为 300~1000nm 范围内用钨灯作光源，在波长为 200~320nm 范围内用氢灯作光源。因此可广泛用于测定紫外光区、可见光及近红外区有吸收光谱的物质，进行定性及定量分析。

751G 型分光光度计为 20 世纪 70 年代产品。80 年代以来，随着科学技术的发展，各种新型产品不断涌现，新型仪器操作方便，有自动显示测定数字及打印装置等如 53WB 紫外可见光分光光度计。考虑到目前更普遍使用的还是 751G 型，因此本教材仍着重介绍它的使用方法。仪器结构图如图 1-5 所示。

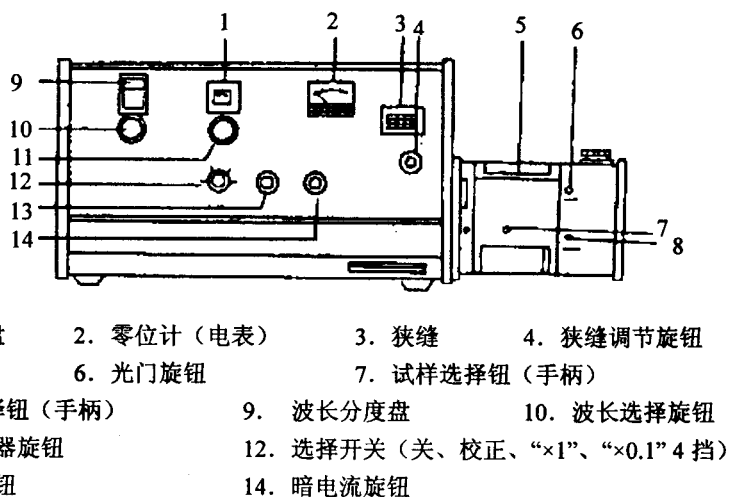


图 1-5 751G 型分光光度计结构示意图（正视）

（二）使用方法

1. 将 751G 型分光光度计与稳压电源相连，插上电源插头。

2. 仪器主机有 2 个光源, 根据使用波长可选用氢灯或钨灯, 拨动主机背面的光源选择杆到所需的光源方向, 使光源灯置于光路中。

3. 在打开仪器的各种开关前, 仔细检查各种开关及旋钮是否均处于关闭位置, 打开稳压电源, 当电压达到 220V 时, 再打开放大器电源和所需的灯源开关, 仪器预热 20min, 当氢灯稳压电源工作电流达到 300mA 时仪器即可正常工作。

4. 选用比色杯, 350nm 以上用玻璃比色杯, 350nm 以下用石英比色杯。将待测溶液 (1 个空白液, 3 个被测液) 盛入比色杯中约为杯体积的 3/4, 不要太满, 以免拉动试样选择手柄时比色杯中液体溢出, 损坏仪器。用擦镜纸将沾在比色杯外的液体擦净。将比色杯垂直放入比色架上, 打开样品室盖 5, 使比色架对准暗箱的钉梢放稳后, 盖上样品室盖。移动试样选择手柄 7, 使装空白液体的比色杯移入光路中。注意, 移动滑板应处于定位槽中。

5. 转动波长选择旋钮 10 至波长分度盘对准所需波长。

6. 根据测定波长选择光电管。波长为 200~625nm 时选用蓝敏光电管, 将光电管选择手柄 8 推入。波长为 625~1000nm 时选用红敏光电管, 则将光电管选择手柄 8 拉出。

7. 将选择开关 12 由关闭位置拨至校正位置后调节暗电流旋钮 14, 使电表 2 指针对准“0”位置。为了使测定正确, 每测量一次均应用暗电流旋钮校正电表 2, 使指针在“0”的位置。

8. 调节灵敏度旋钮 13, 在正常情况下, 从关闭位置起沿顺时针方向转动 3~5 圈。

9. 转动读数电位器旋钮 11, 使测量读数盘光吸收准确处于“0”的位置 (透光率为 100%)。

10. 将选择开关拨到“×1”的位置, 拉开光门旋钮 6, 使单色光进入光电管 (此时绝对不要打开样品槽盖 5 以保护光电管), 这时电表指针偏移“0”位, 用狭缝调节旋钮 4, 使电表指针大致到达“0”位附近, 再用灵敏度旋钮 13 仔细调节, 使电表指针正确地指在“0”位置上。

11. 完成上述操作后, 立即拉开试样选择手柄 7。使第二个待测样品的比色杯处于光路中。注意, 滑板应准确位于定位槽中, 此时电表指针偏离“0”位, 旋转读数电位器旋钮 11, 使电表指针重新对准“0”位, 立即从测量读数盘 1 上读出光吸收值 (A)。再拉出试样选择手柄 7, 读取第二、第三个样品溶液的光吸收值。

12. 完成上述测量后, 立即关上 (推入) 光门旋钮 6, 以保护光电管, 只有处于这种状态才能打开样品槽盖, 更换待测溶液, 使空白样品处于光路中, 重复第 7~12 步骤, 继续测定。

13. 当被测定溶液光吸收值大于 1.0, 透光率小于 10% 时, 把选择开关 12 拨到“×0.1”的位置上, 转动读数电位器旋钮, 重新读数, 读得光吸收值应加上 1.0, 透光率则除以 10。

14. 测定完毕, 将每个开关、旋钮、手柄等恢复原状 (均处于关闭状态), 拔掉电源插头以切断电源, 盖好仪器罩。

(三) 注意事项

1. 若外电路电压波动较大, 应外接一台电压稳压器, 以增加仪器的稳定性。

2. 比色杯误差的校正: 在 4 个比色杯中注入蒸馏水, 在相同波长下测定 4 个比色杯的光吸收值。若相互间差异较大, 则应在读数后加上或减去相应差值。

3. 比色杯的清洗, 用 0.1mol/L HCl 和乙醇溶液浸泡去污, 用蒸馏水充分清洗干净、晾干备用。

第二章 蛋 白 质

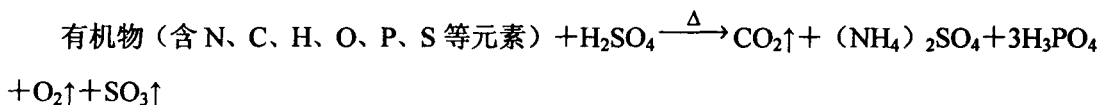
实验一 总氮量的测定——凯氏 (Kjeldahl) 定氮法

一、实验目的

掌握凯氏 (Kjeldahl) 定氮法的原理和操作技术。

二、实验原理

常用凯氏定氮法测定天然有机物, 如蛋白质、核酸及氨基酸等的含氮量。含氮的有机物与浓硫酸共热时, 其中的碳、氢被氧化为二氧化碳和水, 而氮则转变为氨, 再与硫酸作用生成硫酸铵, 此过程通常称为“消化”。消化过程可表示如下:



但是, 上述反应进行得很缓慢, 常加催化剂加速反应。硫酸铜是常用的催化剂, 硫酸钾或硫酸钠能提高反应液的沸点, 两者常混合使用, 起着加速氧化、促进有机物分解的作用。

浓碱可使消化液中的硫酸铵分解, 游离出氨, 借水蒸汽将产生的氨蒸馏到一定量的硼酸溶液中, 硼酸吸收氨后使溶液中氢离子浓度降低, 然后用酸定量滴定, 最后根据所耗酸的量计算出待测物中的总氮量。

三、实验药品、实验器材

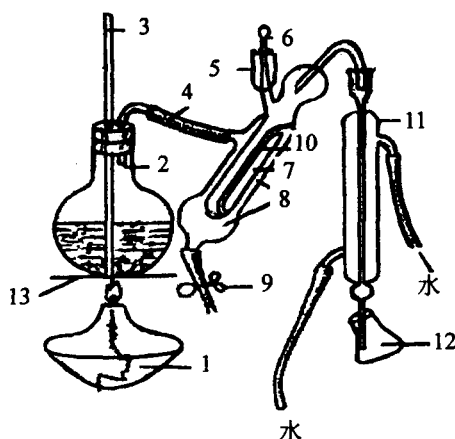
1. 浓硫酸 (分析纯);
2. 粉末硫酸钾-硫酸铜混合物: K_2SO_4 与 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 按 3 : 1 混合研磨, 16g;
3. 30% (wt/v) 氢氧化钠溶液;
4. 0.01mol/L 盐酸标准溶液;
5. 田氏混合指示剂: 由 50mL 0.1% 甲烯蓝乙醇溶液与 200mL 0.1% 甲基红乙醇溶液混合配成, 贮于棕色瓶中备用, 这种指示剂酸性时为紫红色, 碱性时为绿色, 变色范围窄且灵敏;
6. 市售标准面粉, 2g;
7. 100mL 凯氏烧瓶, 凯氏定氮蒸馏装置, 50mL 容量瓶, 3mL 微量滴定管, 分析天平,

烘箱, 电炉, 1000mL 蒸馏烧瓶, 小玻璃珠。

四、实验方法

(一) 凯氏定氮仪的构造和安装

凯氏定氮仪主要由蒸汽发生器、反应管及冷凝器三部分组成, 见图 2-1。



- | | | | | |
|---------|---------|----------|--------|------------|
| 1. 热源 | 2. 圆底烧瓶 | 3. 玻璃管 | 4. 橡皮管 | 5. 玻璃杯 |
| 6. 棒状玻塞 | 7. 反应室 | 8. 反应室外壳 | 9. 皮管夹 | 10. 反应室中插管 |
| 11. 冷凝管 | 12. 锥形瓶 | 13. 石棉网 | | |

图 2-1 凯氏蒸馏装置

蒸汽发生器包括热源及一个 1~2L 容积的烧瓶 (见图 2-1 中 1、2)。蒸汽发生器借橡皮管 (见图 2-1 中 4) 与反应管相连, 反应管上端有一个玻璃杯 (见图 2-1 中 5), 样品和碱液可由此加入到反应室 (见图 2-1 中 7) 中, 反应室中心有一长玻璃管, 其上端通过反应室外层 (见图 2-1 中 8) 与蒸汽发生器相连, 下端靠近反应室的底部。反应室外层下端有一开口, 上有一皮管夹 (见图 2-1 中 9), 由此可放出冷凝水及反应废液。反应产生的氨可通过反应室上端细管及冷凝器 (见图 2-1 中 11) 收集到吸收瓶 (见图 2-1 中 12) 中, 反应管及冷凝器之间借磨口塞连接起来, 防止漏气。

安装仪器时, 先将冷凝器垂直地固定在铁架台上, 冷凝器下端不要距离实验台太近, 以免放不下吸收瓶。再将反应管通过磨口塞与冷凝器相连, 根据仪器本身的角度将反应管固定在另一铁架台上, 这点请务必注意, 否则容易引起氨的散失及反应室上端弯管折断。然后将蒸汽发生器放在电炉上, 并用橡皮管把蒸汽发生器与反应管连接起来, 安装完毕后, 不得轻易移动, 以免仪器损坏。

(二) 样品处理

某一固体样品中的含氮量是用 100g 该物质 (干重) 中所含氮的克数来表示 (%). 因此在定氮前, 应先将固体样品中游离的水分除掉。在称量瓶中称入一定量磨细的样品, 然后置于 105℃ 的烘箱内干燥 4h。用坩埚钳将称量瓶放入干燥器内, 待降至室温后称重, 按

上述操作继续烘干样品。每干燥 1h 后, 称重 1 次, 直到恒重。

若样品为液体(如血清等), 可取一定体积样品直接消化测定。

准确称取 0.1g 左右的干燥面粉作为本次实验的样品。

(三) 样品的消化

取 4 个 100mL 凯氏烧瓶并标号。各加 1 粒玻璃珠, 在 1 及 2 号瓶中各加样品 0.1g, 催化剂 0.2g, 浓硫酸 5mL, 注意将样品直接加入烧瓶底部, 勿沾于瓶口和瓶颈上。在 3 及 4 号瓶中各加入 0.1mL 蒸馏水和与 1 及 2 号瓶相同量的催化剂和浓硫酸, 作为对照, 用以测定试剂中可能含有的微量含氮物质。每个瓶口放一漏斗, 在通风橱内的电炉上消化。

在消化开始时应控制好加热温度, 不要使液体冲到瓶颈。待瓶内水汽蒸完, 硫酸开始分解并放出 SO_3 白烟后, 适当升高温度, 继续消化, 直至消化液呈透明淡绿色为止。消化完毕, 待烧瓶冷却至室温后, 在摇动下徐徐加入蒸馏水 10mL。冷却后加入 50mL 的容量瓶中, 并以蒸馏水洗烧瓶数次, 将洗液一并加入容量瓶, 用水稀释至刻度, 混匀备用。

(四) 氨的蒸气蒸馏

1. 蒸馏器的洗涤

蒸汽发生器中盛有几滴硫酸酸化的蒸馏水。关闭皮管夹 9, 加热使蒸汽发生器中的水沸腾, 让蒸气通过整个装置。约 15min 后, 在冷凝器下端放置一个盛有 5mL 2% 硼酸溶液和 1~2 滴田氏指示剂的锥形瓶。位置倾斜如图 2-1, 冷凝器下端应完全浸没在液体中, 继续蒸气洗涤 1~2min, 观察锥形瓶内的溶液是否变色, 如不变色则表明蒸馏装置内部已洗涤干净。向下移动锥形瓶, 使硼酸液面离开冷凝管口约 1cm, 继续通蒸气 1min。最后用水冲洗冷凝管口, 然后用手捏紧橡皮管 4, 由于反应室外层蒸气冷缩, 压力减低, 反应室内凝结的水可自动吸出进入反应室外层 8, 打开皮夹 9, 将废水排出。

2. 蒸馏

取 50mL 锥形瓶数个, 各加 5mL 硼酸和 1~2 滴田氏指示剂, 溶液呈紫色, 用表面皿覆盖备用。

准确吸取 10mL 消化液, 细心地由蒸馏器小玻杯注入反应室, 塞紧玻棒状玻璃塞。将一个含有硼酸和指示剂的锥形瓶放在冷凝器下, 使冷凝器下端浸没在液体内部。

取 30% 的氢氧化钠溶液 10mL 放入小玻璃杯中(见图 2-1 中 5), 轻提棒状玻璃塞使之流入反应室(为了防止冷凝管倒吸, 液体流入反应室必须缓慢)。尚未完全流入时, 将棒状玻璃塞盖紧, 向玻璃杯中加入蒸馏水约 5mL。再轻提棒状玻璃塞, 使一半蒸馏水慢慢流入反应室, 一半留在玻璃杯中作水封。加热水蒸气发生器, 沸腾后夹紧夹子 9 开始蒸馏。此时锥形瓶中的酸溶液由紫色变成绿色。自变色时开始记时, 蒸馏 3~5min。移动锥形瓶, 使硼酸液面离开冷凝管约 1cm, 并用少量蒸馏水洗涤冷凝管口外壁。继续蒸馏 1min, 移开锥形瓶, 用表面皿复盖锥形瓶。

蒸馏完毕后, 须将反应室洗涤干净。在小玻璃杯中倒入蒸馏水, 待蒸气很足、反应室外壳 8 温度很高时, 一手轻提棒状玻璃塞使冷水流入反应室, 同时立即用另一只手捏紧橡皮管 4, 则 8 内蒸气冷缩, 可将 7 中残液自动吸出, 再用蒸馏水自 5 倒入 7, 重复上述操作。如此冲洗几次后, 将 9 打开, 将 8 中废液排出。再继续下一个蒸馏操作。

待样品和空白消化液均蒸馏完毕后, 同时进行滴定。

(五) 氨的滴定

全部蒸馏完毕后, 用盐酸标准溶液滴定各锥形瓶中收集的氨量, 溶液由绿变淡紫色为滴定终点。

五、实验记录

盐酸标准溶液 物质的量浓度 (mol/L)	滴定样品所耗盐 酸标准溶液体积 (mL)	滴定空白所耗盐 酸标准溶液体积 (mL)	所取样品 重量 (g)	消化液 总体积 (mL)	蒸馏时消化 液用量 (mL)
$M=$	$V_1=$	$V_2=$	$W=$	$V_3=$	$V_4=$

六、实验结果计算

$$\text{总氮量}(\%) = \frac{M(V_1 - V_2) \times 0.014 \times 100}{W} \times \frac{V_3}{V_4} \times 100$$

若测定的样品含氮部分只是蛋白质, 从经验可知, 各种蛋白质含氮量大多数在 16% 左右 (15%~17%), 将含氮量乘以 6.25, 即得蛋白质的量。

$$\text{样品中蛋白质含量}(\%) = \text{总氮量} \times 6.25$$

若样品中除有蛋白质外, 尚有其他含氮物质, 则需向样品中加入三氯乙酸, 然后测定未加三氯乙酸的样品及加入三氯乙酸后的样品上清液中的含氮量, 得出非蛋白氮及总氮量, 从而计算出蛋白氮, 再进一步算出蛋白质含量。

$$\text{蛋白氮} = \text{总氮} - \text{非蛋白氮}$$

$$\text{蛋白质含量}(\%) = \text{蛋白氮} \times 6.25$$

七、思考题

天然有机物的“消化”过程中, 加入硫酸、硫酸钾和硫酸铜的作用分别是什么?

实验二 氨基酸的分离鉴定——纸层析法

一、实验目的

通过氨基酸的分离, 学习纸层析法的基本原理及实验方法。