

細胞呼吸及其他生化 过程的量压測定法

顧天爵 譯

上海衛生出版社

細胞呼吸及其他生化 过程的量压測定法

M. 狄克遜 著

顧 天 爵 譯

上海衛生出版社

一九五八年

內 容 提 要

本書原著汇集各种文献中有关細胞呼吸及其他生化过程的气压测定法，整理成册。凡近代所用之此类仪器和方法，叙述清晰，不厌求詳，使操作者能按步进行。若干重要理論和操作要点，文献中尙无記載者，作者根据二十多年的經驗，均加以詳細补充和說明。

本書內容共分二篇九章，第一篇說明各种仪器的結構和原理，第二篇叙述各种方法，包括微量測定法。書尾有附录五則，內有測定法的实例、重要数据和图谱等。在生物化学和医学基础課程的教学、学习及研究工作上，本書可作实验手册之用。

MANOMETRIC METHODS AS APPLIED TO THE MEASUREMENT OF CELL RESPIRATION AND OTHER PROCESSES

英国 Malcolm Dixon
Cambridge University Press
3 ED., 1951

細胞呼吸及其他生化过程的

量 压 測 定 法

顧 天 爵 譯

*

上海 衛 生 出 版 社 出 版

(上海南京西路2004号)

上海市書刊出版业營業許可証出 080 号

上海新华印刷厂印刷 新华書店上海发行所总經售

*

开本 787×1092 耗 1/32 印張 3 1/4 插頁 1 字數 75,000

1958年8月第1版 1958年8月第1次印刷

印數 1-2,000

統一書号 14120·472

定价(9) 0.40 元

緒 言

观察具有气体产生或吸收反应的最方便和正确的方法是气体压力計法,这一类的方法是使反应在密闭瓶中进行,瓶上接一压力計管,管内盛液体,由此可以测定瓶内气体分量的改变。研究細胞呼吸机制的重要依据是测定細胞本身或由細胞分出之氧化-还原体系中氧吸收量或 CO_2 的产生量。在这方面气体压力計法应用最广。此外,如果反应是和含有 CO_2 气体成平衡的碳酸氢盐緩冲液中进行,則酸或硷的生成与消失也可用气体压力計法加以测定。此时,气体压力計能测出相当于一定量酸質产生的 CO_2 分量。气体压力計法还可以用来研究許多水解反应。

事实上气体压力計法很适合的应用到各方面,目前已日益增长地在生物学實驗室中广泛应用。

本書第一篇叙述各种类型气体压力計的結構和原理。第二篇是描写测定細胞呼吸及其他类似过程的各种方法。

目 次

第一篇 常用气体压力計之类型.....	1
第一章 恒压型呼吸計.....	1
第二章 恒体积呼吸計.....	4
第三章 差別型呼吸計.....	12
第二篇 呼吸測定法.....	27
第四章 直接法.....	28
第五章 Dickens 及 Šimer 氏第一法	38
第六章 Warburg 氏間接法	42
第七章 Dickens 及 Šimer 氏第二法	55
第八章 Dixon 及 Keilin 氏法	61
第九章 微量法.....	75
結 語.....	78
附录 I, II, III, IV, V.....	83
参考文献.....	99
对数表.....	101

第一篇 常用气体压力計之类型

常用气体压力計有三种主要类型。第一类，反应瓶中气体的压力由于調节相連接的刻度管中的液体以保持恒定，而讀取刻度管上气体体积的变化。其原理与 Haldane 氏气体分析器相同；Winterstein 氏微量呼吸計即属此类。第二类，反应瓶連接于一个 U 形压力計管的一端，而管的另端开启于空气中。由調节压力計管中液体以保持反应瓶中气体体积的恒定，而讀取压力計管上压力的变化，由此易于算出气体的放出或吸收量。由于 O. Warburg 氏及其学派的广泛应用，故此类通常称为 Warburg 氏型气体压力計，然而首先应归功于 Barcroft 及 Haldane 二氏。第三类或差别型气体压力計，此类型应用时压力与体积均有变化。其压力計管之两端各接一反应瓶，因而避免了由于温度等微弱变化所引起之誤差，此点与 Warburg 氏型的压力計管一端开启于空气中者不同，此类常称为 Barcroft 氏型，因为它主要由 Barcroft 氏所发展，然其原理則早由 E. Warburg 氏在其他工作中应用。以上三种类型将在下面逐一討論。

第一章 恒压型呼吸計

恒压型呼吸計之原理可由图 1 了解。A 为反应瓶，盛呼吸組織及細胞悬液。瓶与刻度管 B 相連，其刻度准确到百分之一毫升。C 为代偿瓶，式样与 A 同，連于压力計管 M 上；M 能指示 A 与 C 間任何压力之差。A 与 C 保持于同温水浴中；B 之温度亦需保持恒定，但不必与 A 及 C 相等（例如，A 及 C 可

保持于 37°C ， B 保持于室温）。讀取讀數之方法如下：將儀器置于水箱中，活塞 T_1 及 T_2 應預先開啟，提高或放低 D 管，將 B 內液體調節至適當位置。待 A 及 C 瓶中之溫度達到水箱溫度後，同時關閉兩活塞，然後正確記下 B 之讀數。經過一定時間後，再調節 D 管，使 M 之兩側液面等高，再記下 B 讀數。前後兩次讀數之差，即為此時間內， A 瓶在 B 管之溫度及關閉活塞時大氣壓力下，吸收氣體的分量。將此量乘以適當因素（見附錄 II 中表 1），即為標準狀態時干氣體之毫升量。

顯然，如果沒有 C 瓶及 M 管，並且僅靠調節 B 與 D 至相同水平而讀取壓力計，那末在實驗進行時水箱溫度或氣壓之任何微小變化，都會影響讀數。所以， C 瓶乃 A 瓶之對照，由此避免了溫度與壓力變化的影響。

Haldane 氏 (1921) 測量血中氣體之儀器從屬於此類型，此為大家熟知者。此儀器之 B ， D ， M 及活塞均裝置于直立板上； A ， C 瓶浸于小水浴中，而以相當長度之橡皮管與儀器連接，因此可用手隨意搖動。此儀器很適于用作測定反應中氣體放出或吸收的總量，但不太適合于測定反應速率及細胞

呼吸，也不適合于同時作幾個比較測定。因此它很少應用于呼吸測定之工作。

在 Winterstein 氏 (1912) 微量呼吸計中， U 形管 M 乃由一水平刻度毛細管所代替，毛細管中有液體一小滴，于每次記取

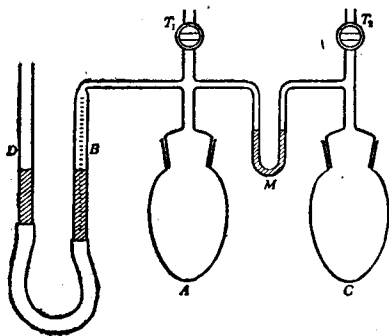


圖 1

① 本書所敘述的溫度，都是攝氏溫度。——譯者

讀數前將此小滴調節至一定位置。 D 管乃由一端閉塞之短橡皮管所代替，管上有螺絲夾，可以壓縮橡皮管。 B 管之孔也較小，因此 B 管中之液體可更正確地被調節。

恒壓式呼吸計在應用中沒有 Warburg 氏與 Barcroft 氏兩種氣體壓力計的方便，故應用較少。可是恒壓式呼吸計有其優點，即原理簡單，而且不必測定“常數”。著者最近設計一恒壓計，第一次發表于此，著者

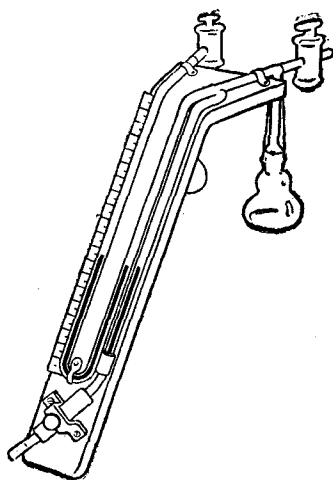


圖 2

認為比其他各式均優^①。式樣見圖 2。此器大体上均與 Barcroft 氏呼吸計相似，僅在 U 形管之側多一個 1 毫升之吸管及螺旋調節器。U 形管內盛染有三號蘇丹 (Sudan III) 紅色之液體石蠟，吸管内盛水銀。每次讀數前調節水銀面，使 U 形管兩臂之液面等高。氣體體積之變化由吸管上讀出并校正至標準狀態。假如不直接接觸吸管，即使反應瓶保持於恒溫 37°，吸管内之溫度仍可保持相當恒定。其餘操作方法與 Barcroft 氏器相似，無須贅述。此呼吸計較 Barcroft 氏器為優，乃因反應瓶之容量可隨意更換，振蕩器的角度可以更改。重新換置液體石蠟時，儀器不必重新校正。事實上，除了吸管刻度之正確性須用水銀校正外，其他部分不須校正。

用本儀器和 Barcroft 氏呼吸計一起測定酵母懸液的耗氧量，所得結果很相符合。

^① Adam 氏 (1920) 呼吸計之原理與此相同，但其式樣完全兩樣。其設計乃為了完整之青蛙肌肉實驗工作，且未被一般採用。

用此种式样测定 CO_2 时需要校正它在液体中溶解度,故不甚适合。

第二章 恒体积呼吸计

图 3 乃 Warburg 氏(1926)呼吸计。此计有 U 形管一根(管之内截面约 1 平方毫米),两臂高约 30 厘米,其上刻有毫米度数^①。U 形管下端有橡皮管,作为储液用,橡皮管之前方有螺旋板,借以调节管内液面(一般用 Brodie 氏液)^②。U 形

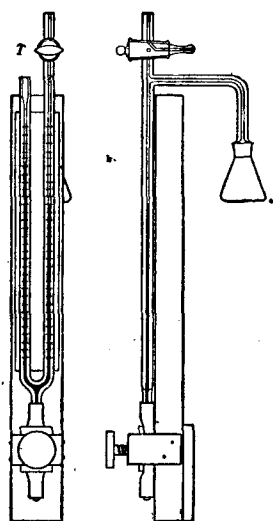


图 3

管之一臂与外界空气相通,另一臂有一活塞 T 及一支管,可装置反应瓶。上述玻璃部分乃装于一块金属板上,由此可连接振荡器(详叙于后)。连接振荡器时,呼吸计上之反应瓶全部浸于水浴中。

Warburg 氏呼吸计之原理如下:在每次读数前,使 U 形管连有反应瓶之臂内液面调节至一定高度(假定为全部刻度之中点即 150 毫米)。然后记下开启臂内之读数,此数减去 150 毫米即为反应瓶与外界空气间之压力差。由所得读数可算出气体之吸收或放出量,其理由俟

① 塑胶制成之刻度板,用久会有缩短现象,故不宜采用。零点可在刻度之中点,而不在下端,这样刻度就由 -150 到 +150 毫米。

② 一种改良之液体 (Krebs 1951, 1) 如下: NaBr (在 110° 干燥) 44 克, Stergene 或 Lissapol N 糖浆 1 克(或 Triton X-100 或 Triton A-20 固体 0.3 克), Evans 蓝 0.3 克,加水至 1 升。

了解下述仪器原理后方可明了。

仪器之原理

习惯上把反应瓶中放出之气体量算作正数，而吸收之气体量为负数，本书也将沿用这一习惯。因此读数前冠以正号或负号各表示气体之放出或吸收。用此仪器时，如开启臂端之液面上升则读数为正。

为了明了起见，将单位统一如下：所有体积均用立方毫米表示，所有长度均用毫米表示，呼吸计中之气体压力用其中液体柱之毫米数表示，气体量为干燥气体在标准条件下之立方毫米数。

现在我们假定反应瓶中含一定分量之液体，并且某种反应在其中进行，而产生一定分量之气体，则此气体之分量可由呼吸计之读数算出如下。在计算时，则假定反应瓶中之空间已由与大气压力相等之反应气体充满。

如 x = 标准条件下放出之气体体积（如果气体被吸收则 x 为负数）。

h = 气压计上对应的读数。

v_G = 反应瓶中空间之体积（此体积包括连接管及气压计封闭臂端之上半部，即 150 毫米刻度以上部分直至 T 活塞之部分）。

v_F = 反应瓶中液体的体积。

T = 水浴之绝对温度。

P = 反应瓶中之始压力（一般等于大气压）。

P_0 = 标准大气压（760 毫米水银柱）（以压力计中液体柱之毫米高度计算）。如果此液体之密度为 D ，

$$\text{则 } P_0 = 760 \times \frac{13.60}{D}$$

$p = T$ 度时之水蒸气压。

α = 放出之气体在反应瓶液体中之溶解度(即当分压等于 P_0 时溶解于液体中气体在标准状态下的体积)。

$$\text{实验开始时空隙之气体量} = v_G \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{P-p}{P_0},$$

$$\text{实验开始时气体溶解量} = v_F \alpha \cdot \frac{P-p}{P_0}.$$

$$\text{实验结束时空隙之气体量} = v_G \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{P-p+h}{P_0},$$

$$\text{实验结束时气体溶解量} = v_F \alpha \cdot \frac{P-p+h}{P_0}.$$

显然, 实验结束时气体的总量等于开始时之气体量加上反应中产生之 x 量:

$$\left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha \right) \frac{P-p+h}{P_0} = \left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha \right) \frac{P-p}{P_0} + x$$

因此

$$x = h \left(\frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha}{P_0} \right) \quad (1)$$

如用某一仪器测定某一气体而保持液体量与温度不变时, 括号内之数值是一个常数。称为仪器常数 (k)。假如 k 值为已知数, 只要将气压计上读数与 k 相乘, 即得标准条件下干燥气体之放出量(立方毫米), 不需任何校正:

$$x = hk$$

当反应瓶中除反应所产生之气体外, 另有其他气体存在时, 上述方程式也可应用, 例如用大气代替纯氧而测定组织之耗氧量, 此时压力计空隙之氮气体量始终不变, 故在方程式中被消除; 溶解之氮气体量是没有改变的。仅反应气体(氧)之分压

发生改变，其数值为 h ，故如前所述氧之溶解量的改变等于 $v_F \alpha \frac{h}{P_0}$ 。所以氮之存在不影响常数值。这也说明为何方程式中之溶解度 α 为反应气体而并非反应瓶中之混合气体之溶解度。

常数值乃决定于吸收或放出之气体性质；呼吸中所包括之两种气体， O_2 及 CO_2 ，其溶解度相差很大，因此即使用同一仪器，所得之 O_2 及 CO_2 的常数值不同。Warburg 氏在他的间接法中。聪明地应用了这一事实。此点以后再谈。

仪器之校正

仪器之校正(由此可测定常数值)可用三种方法：(a)用上列方程式(1)计算；(b)Münzer 及 Neumann 氏法，即用刻度吸管加入或抽去反应瓶中一定量之气体，记取压力计上之读数；(c)在反应瓶中由化学反应放出或吸收已知分量之气体。第一法最为正确，也为 Warburg 氏压力计中应用最广者。著者曾比较三种方法，所得结果很相符合。

方程式中常数项内的 T 及 v_F 为实验条件中已知值，并且在 T 温度的 α 值可由物理常数表(84 页)中查得。因此仅 v_G 及 P_0 需要测定。 P_0 之测定只需用一般方法小心测定压力计中液体之密度 D 。 v_G 可自反应瓶之总容量中减去 v_F 而获得。测定总容量最正确之方法如下^①：在压力计管与反应瓶相接之磨口接头处上方一时处做一记号，将压力计倒置(Brodie 液尚未加入)，关闭活塞 T ，然后自连接反应瓶处之小孔灌入水银，使自 150 毫米刻度处至记号处之管全部填满水银。将水银倒入秤量瓶。将压力计回复至原来垂直位置，并将反应瓶注满水银，套于磨口接头上，适当调节瓶中水银量，

^① 同时参看附录 V。

使套紧于接头后，水銀恰巧上升至記号处。将水銀亦倒入称量瓶，立即記下温度，并秤其全重。水銀重量(毫克)除以此温度时水銀之密度(見 85 頁)即得所求之体积(立方毫米)，此时可計算常数值。簡便之計算譜(nomogram)見附录Ⅳ。

其他二法將于 Barcroft 氏器項下討論。

温度气压計

Warburg 氏压力計在很多方面是方便的，但由于其一端开启于大气中，因此在实验时对于大气压或水浴温度之微小改变均非常敏感。几分之一度的温度变化会使讀数改变数毫米，一小时内大气压之变化能引起 15~20 毫米之讀数变化，甚或造成更多之改变。因此，不仅需要有很灵敏之温度調節器，同时需要外加一只压力計作为温度气压計。后者是一只普通 Warburg 氏压力計，但在其反应瓶中除加少許水外，不加其他物质。将此温度气压計在恒温箱中置于作用气压計之旁。当記取讀数时，此計亦讀取一次，从作用气压計的讀数减去此讀数，即校正了由于外界条件变化所引起之誤差。显然，此計之常数不必知道，因为密閉气体由于温度升高所增加之压力与容器之容积无关，同时大气压之变化相等地作用于两压力計之开启端，由此所引起之讀数差也与容积无关。有了这样校正，讀数之有效值可达 $1/2$ 毫米。

恒温器与振荡器

水浴之早期式样以及早期的振荡装置見图 4。此器中反应瓶乃受垂直圆盘轉动而成小弧形之振摆，在此振荡板上可装置六套压力計。假如对側亦有振荡板則每次可装十二套压力計。攪拌器及两振荡板同由一部馬达带动。記取讀数前，只需將傳动帶移向空滑輪，振荡器即停止摆动。

近年来有各种設計。其改进之主要方面如下：(a)攪拌器及两振荡板分別用三部較小馬达轉动，即应用直接轉动而舍弃了傳动带；(b)采取使反应瓶成水平直綫摆动之方式，因此避

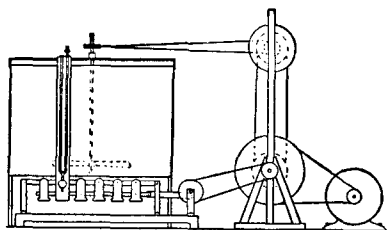


图 4

免了在每次讀数时使压力計成垂直位置之手續；(c)使仪器同时适用于 Warburg 及 Barcroft 氏两种压力計；(d)减小水箱使温度更趋一致；(e)采取电热代替煤气；特别是使用扩大的加热器，使全部底面受热，如此代替局部电热器；(f)使用改良温度調节器及小型之轉速每分鐘 1200 周之攪拌器。

市場上現有多种式样之仪器，大部分均有上述改进中之若干点。特別值得注意的乃一种具圓形水浴式样，有十八支压力計裝于振荡板上圍成一圈，振荡板可任意轉动，因此可使任一压力計移于工作者之前。其另一优点乃占地位小。

本實驗室采用一种設計較簡單，造价較廉且兼有上列(a)至(f)各优点之式样，应用上也很滿意，其式样見图5。仪器架乃由三角鉄构成，馬达为 $\frac{1}{10}$ 匹馬力，振荡周率固定为每分鐘 105 次，振幅 4 厘米。依照我們的經驗，在一般工作中此种振率及振幅最为适宜，很少情况不适合此种条件。因此不必有調节振率与振幅之設備，只需有一单程(single-stage)螺旋齒輪与驅動即可。

加热器^①为六根直徑 $\frac{1}{4}$ 吋、长 1 米之管，成平行等距离排

① 一般浸于液体中之加热器电力較高〔如 1 千瓦特 (kw)〕而直徑較小，因而引起水在局部流动使温度高于其他部分，因而压力計之讀数不稳定，对本裝置不实用。

列于水浴中，置于两只电木横栅上，使高于水浴底 $\frac{1}{4}$ 吋。管之两端向上弯曲，以便搁于两横栅两端之横档上。每一管内装75 瓦特之镍合金丝(nichrome wire)并灌满液体石蜡（医用者）以传热及避免金属丝之局部过热现象。

加热管可用内径约5 毫米之玻管。金属丝可用V 型丝，易于盘绕在直径3 毫米之轆轤轴上成为线圈，然后将其取下，拉成所需长度。电压为200 伏特者，用32 号丝在棒上紧密绕成1 呎长之线圈〔约540 欧姆(ohm)〕。线圈之两端需拉直约3 吋，使线圈部分开始于水面附近。

在电路上应该连通几个加热器，则视实验室之室温而定。在本实验室中，维持水浴 38° 时，可将加热器1、3 及5 直接连于总电路，而2、4 及6 则通过由甲苯温度调节器控制之热丝真空开关(“Sunvic”替续器)连接于电路上。这样装置可得很

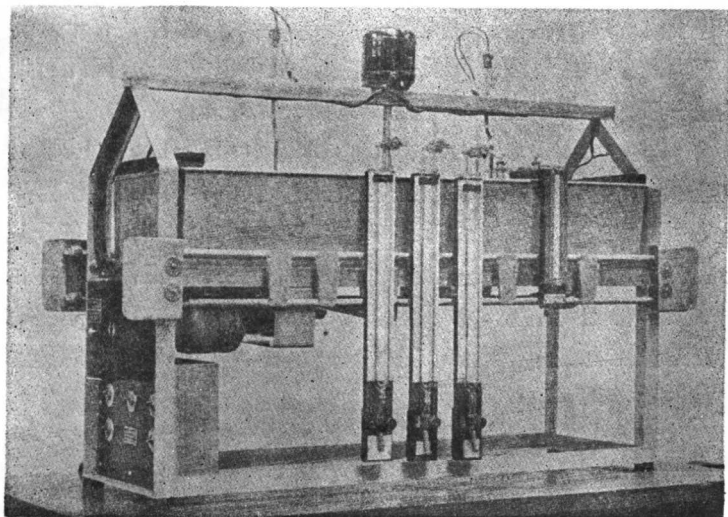


图 5

均匀之温度。

如果装置一转动之转辙器(step switch)以连接加热管与总电路及替續器，則可使需要直接接通之加热管数目任意选择，以适合于任何水浴及室温。欲得最适之温度控制，必需尽量将加热器直接連于总电路上。

温度调节器如有两只則較為方便(见图 5) 两者用于调节不同温度(如 30° 及 38°)，因此仅需撥动連接于替續器上之小开关时，即可由一种温度变至另一温度。

改进后之甲苯温度调节器，是一种最满意的式样，调节器之螺旋至少需儲甲苯 80 毫升以获得优良之灵敏度；一般使用之形式对温度之微小变化反应太慢。因此，螺旋应由 1 米长，直径 1 厘米之玻管制成，并弯成扁平螺旋状如图 5a。由于所有甲苯都与水相隔不超过数毫米。因此反应很快。

温度调节器头部之設計应该达到极高灵敏度，结构簡單而又易于调节的要求。管 A 为軀干，内徑約 5 毫米。活塞上連接 B 及 C 管。两者之末端有白金絲封閉，其中并盛有少量

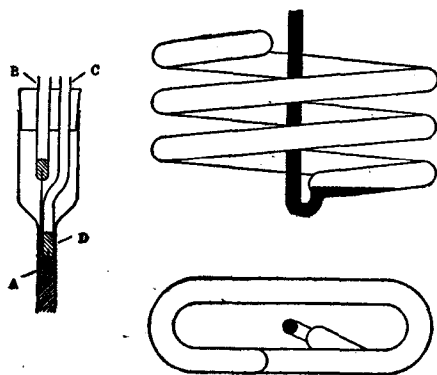


图 5a

水銀以与替續器之导点相接^①。C管之外徑略小于A管之內徑，并且放置时稍偏一側，以留一窄道容納B管末端之白金絲。C在D处与A接触。当A管中之水銀升至C管末端后，即很快經過窄道上升与B管上白金絲接触，使替續器中之电流流通。如此装置灵敏度很大。上下移动C管即可很正确地达到所需温度；較大之調节可改变A管中之水銀量。此器如与上述加热管共同使用，則可保持水浴温度在百分之一度以内。

整个仪器应安放在便于讀数之适当高度。每次讀数时視綫必須成水平，以免視差。关于此点，應該指出，假如在讀数前用手指触动压力計下端之橡皮儲液管片刻，則讀数較為正确。这样能使管内液面少許摆动而减少了表面張力之誤差。

第三章 差別型呼吸計

Barcroft 氏(1908)与 Warburg 氏計之主要差別是前者压力計之两端均不与空气相通，而接于两反应瓶上。因此，实验过程中温度与气压之变化不再影响讀数。因为温度的变化将等量地影响两反应瓶与压力計之兩側，故就讀数而論，可以互消；同时仪器为一关闭系統，当然不受外界压力变化的影响。第二个差別就是 Barcroft 氏压力計仅为一U形管，无螺旋以調节管内液体，实验时液体在管之两臂內移动；讀数如前，仍为两臂之差。因为两反应瓶中之气体压力与体积均有变化，故 Barcroft 氏計之原理比較复杂。

由于 Barcroft 氏計原理之复杂，尤其是計算差別压力計

^① 水銀在絕緣下易于在銅絲之表面上移行，如在銅絲末端焊上白金絲一时，仅使白金与水銀接触即可避免此現象。