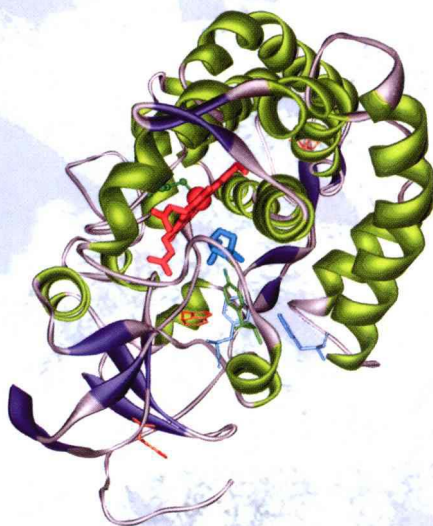


国家精品课程配套教材

陈钧辉 李俊 张太平 编
张冬梅 朱婉华

生物化学实验

(第四版)



科学出版社
www.sciencep.com

普通高等教育生物类专业教材

第 2 版
主编 王 强 副主编 王 强
编委 王 强 王 强 王 强

生物化学实验

（第 2 版）



中国石化出版社
China University of Petroleum Press

国家精品课程配套教材

生物化学实验

(第四版)

陈钧辉 李俊 张太平 编
张冬梅 朱婉华

科学出版社
北京

内 容 简 介

本书在第三版多年使用的基础上进行了修订,增加了生物化学和分子生物学方面的一些新方法、新技术,特别是根据实验教学需要增加了6个综合实验。全书共100多个实验,内容设置与郑集和陈钧辉教授编著的《普通生物化学》第四版教材一致,包括糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、物质代谢与生物氧化以及为培养学生应用和创新能力的综合实验,适合作为本科教学的同步教材。本书可操作性强,内容全面,可供不同学校、不同专业根据具体条件选用。

本书可作为高等院校生命科学、医药卫生相关专业实验教材,也可供有关教师和科研人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/陈钧辉等编. —4版. —北京:科学出版社,2008
(国家精品课程配套教材)

ISBN 978-7-03-021761-5

I. 生… II. 陈… 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(2008)第058526号

责任编辑:单冉东 谢灵玲 王国栋/责任校对:赵燕珍

责任印制:张克忠/封面设计:耕者设计工作室

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>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1988年3月第 二 版 高等教育出版社

2003年4月第 三 版 开本:B5(720×1000)

2008年6月第 四 版 印张:201/2

2008年6月第九次印刷 字数:390 000

印数:39 501—47 500

定价:29.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

第四版前言

本书自 2003 年第三版出版以来，深受高等院校生命科学相关专业学生的欢迎。随着生物化学实验技术的迅猛发展，对人才培养质量提出了新的更高的要求，培养创新意识和创新能力的高质量优秀人才成为高校培养学生的重要任务。为此，我们在第三版的基础上，对部分实验内容进行了更新和补充，更重要的是增加了六个综合实验，这些实验是将科研中一些常用的生物化学和分子生物学方法及技术进行有机的组合，有很强的应用价值，对培养学生的综合应用能力和创新能力很有帮助。对本书的实验，不同学校、不同专业可根据具体条件选做。

在修订过程中，王传怀教授为我们提供了一个综合实验，还有长期参与生物化学实验教学工作的唐惠炜、李学信、焦瑞清、袁达文和卢彦等教师为本书的修订提供了许多帮助。本书是南京大学生物化学国家精品课程的配套教材，在修订过程中还受到教育部下拨的国家精品课程建设经费的资助，在此一并致谢。

由于我们水平有限，书中错误和不足仍属难免，敬请读者批评指正。

南京大学生命科学学院

生物化学系

陈钧辉

2008 年 3 月

第三版前言

本书自 1979 年出第一版, 1988 年出第二版以来, 转眼十多年又过去了, 在这十多年期间, 生物化学的发展极为迅速, 生物化学实验手段和技术不断更新, 分子生物学方法不断渗入到生物化学这个领域中。鉴于以上情况, 我们在第二版的基础上, 对其内容进行了更新, 并补充了近年来发展起来的生物化学和分子生物学方面的一些新方法和新技术。

全书共 98 个实验, 内容包括糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、生物代谢与生物氧化, 在修订过程中保留了第二版中的基础性实验, 又增加了 20 多个新实验。这些新增加的实验大多是从科研中的一些新技术和新方法“转化”而来的, 使实验内容尽量与现代科学研究和应用相联系, 更具有先进性、实用性, 另外还增加了一些综合性实验。

本书内容丰富, 涉及面广, 还有一些较大型的实验, 不同学校、不同专业可根据具体条件选做其中的部分实验。

在修订过程中, 王传怀教授为我们提供了两个实验内容, 还有长期参与生物化学实验教学工作的张太平、李学信、焦瑞清、张冬梅、袁达文和唐惠炜等教师和技术人员给本书的修订提供了许多帮助。本书在修订过程中还受到国家基础科学人才培养基金和南京大学创建世界高水平大学教材建设项目的资助, 在此一并致谢。

由于我们水平有限, 书中错误和不足在所难免, 敬请读者批评指正。

南京大学生命科学学院

生物化学系

陈钧辉

2002 年 7 月 26 日

目 录

第四版前言

第三版前言

第一章 糖类	1
实验 1 糖的颜色反应	1
实验 2 糖的还原作用	4
实验 3 血糖的定量测定(Folin-Wu 法)	5
实验 4 血糖的定量测定(Folin-Malmros 法)	8
实验 5 血糖的定量测定(葡萄糖氧化酶法)	11
实验 6 血液中葡萄糖的测定(邻甲苯胺法)	13
实验 7 葡萄糖含量测定(苯酚法)	15
实验 8 蒽酮比色定糖法	16
实验 9 植物组织中可溶性总糖的测定(蒽酮比色法)	18
实验 10 总糖和还原糖的测定(3,5-二硝基水杨酸法)	20
实验 11 多糖的试验	22
实验 12 肝素钠的定量测定	24
实验 13 糖的旋光性和变旋现象	26
第二章 脂类	29
实验 14 脂肪的组成	29
实验 15 卵磷脂的提取和鉴定	31
实验 16 粗脂肪含量的测定(Soxhlet 抽提法)	32
实验 17 碘价的测定(Hanus 法)	35
实验 18 皂化价的测定	37
实验 19 脂肪酸价的测定	39
实验 20 脂肪乙酰价的测定	40
实验 21 血清胆固醇的定量测定(磷硫铁法)	42
实验 22 血清总胆固醇的测定(邻苯二甲醛法)	44
实验 23 血清胆固醇的定量测定(醋酸酐法)	45
实验 24 血清甘油三酯简易测定法	47

实验 25 血清甘油三酯的测定(GPO-PAP 法)	49
实验 26 丙二醛(MDA)的测定	51
第三章 蛋白质	54
实验 27 蛋白质的颜色反应	54
实验 28 蛋白质的沉淀反应	57
实验 29 蛋白质浓度测定(微量凯氏定氮法)	59
实验 30 蛋白质浓度测定(双缩脲法)	63
实验 31 蛋白质浓度测定(Folin-酚试剂法)	64
实验 32 蛋白质浓度测定(紫外光吸收法)	66
实验 33 蛋白质浓度测定(考马斯亮蓝结合法)	67
实验 34 非蛋白氮(NPN)的测定	69
实验 35 甲醛滴定法	71
实验 36 DNP-氨基酸的制备和鉴定	72
实验 37 DNS-氨基酸的制备和鉴定	76
实验 38 用 DNS 法鉴定蛋白质或多肽的 N-端氨基酸	78
实验 39 用 DNS 法测定多肽的氨基酸组成	81
实验 40 肽的序列分析(PTH 法)	83
实验 41 甲硫氨酰甘氨酸二肽的合成	86
实验 42 尿素对蛋白质的变性作用	89
实验 43 氨基酸纸层析法	92
实验 44 氨基酸微晶纤维素薄板层析法	95
实验 45 离子交换柱层析法分离氨基酸	97
实验 46 血清白蛋白的分离与纯化	98
实验 47 凝胶层析法分离纯化蛋白质	101
实验 48 DEAE-Sephadex A-25 分离纯化多肽	103
实验 49 亲和层析法分离纯化单克隆抗体	106
实验 50 醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质	108
实验 51 血清糖蛋白醋酸纤维薄膜电泳	111
实验 52 牛乳中酪蛋白和乳糖的制备与鉴定	113
实验 53 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法分离血清蛋白质	115
实验 54 聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法鉴定胰岛素	119
实验 55 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量	122
实验 56 用等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点	126
实验 57 对流免疫电泳法测定胎儿甲种蛋白质	128
实验 58 火箭免疫电泳法	130

实验 59	Western 印迹	132
实验 60	酶联免疫吸附测定 (ELISA)	134
第四章	核酸	137
实验 61	核酸的定量测定(定磷法)	137
实验 62	酵母 RNA 的提取	139
实验 63	RNA 的定量测定(苔黑酚法)	141
实验 64	动物肝脏中 DNA 的提取	142
实验 65	DNA 的定量测定(二苯胺法)	144
实验 66	5'-核苷酸的定量测定(过碘酸氧化法)	145
实验 67	DEAE-纤维素薄板层析法测定核苷酸	148
实验 68	腺苷三磷酸的定量测定(纸电泳法)	150
实验 69	核酸的酶法降解以及葡聚糖凝胶层析法制备 5'-单核苷酸	152
实验 70	质粒 DNA 的提取	154
实验 71	DNA 琼脂糖凝胶电泳	156
第五章	酶	160
实验 72	过氧化氢酶的作用	160
实验 73	过氧化物酶的作用	161
实验 74	细胞色素氧化酶的作用	162
实验 75	乳酸脱氢酶及其辅酶的作用	163
实验 76	影响酶促反应的因素——温度、pH、激活剂及抑制剂	165
实验 77	胰蛋白酶米氏常数的测定	168
实验 78	胆碱酯酶米氏常数的测定	171
实验 79	过氧化氢酶米氏常数的测定	174
实验 80	用正交法测定几种因素对酶活力的影响	175
实验 81	溶菌酶的提纯结晶和活力测定	179
实验 82	猪胰糜蛋白酶的制备和纯度鉴定	181
实验 83	大肠杆菌碱性磷酸酶的制备	184
实验 84	碱性磷酸酶的提取和分离及比活力测定	187
实验 85	琼脂糖凝胶电泳法分离乳酸脱氢酶同工酶	192
实验 86	聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离乳酸脱氢酶同工酶	194
实验 87	肝脏谷丙转氨酶活力测定	197
实验 88	血清谷丙转氨酶活力测定	200
实验 89	固定化 5'-磷酸二酯酶的制备及其在分离核苷酸中的应用	202
第六章	维生素	208
实验 90	维生素 A 的定性测定	208

实验 91 维生素 B ₁ 的定性测定	209
实验 92 维生素 C 的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法)	210
实验 93 维生素 C 的定量测定(磷钼酸法)	212
实验 94 核黄素(维生素 B ₂)荧光光度定量测定法	214
实验 95 荧光法测定核黄素结合蛋白-核黄素的解离常数	217
第七章 激素	220
实验 96 尿中 17-羟皮质类固醇的测定(Porter-Silber 法)	220
第八章 物质代谢与生物氧化	223
实验 97 肌糖原的酵解作用	223
实验 98 脂肪酸的 β -氧化	225
实验 99 华氏(Warburg)呼吸仪瓶常数的测定	228
实验 100 L-谷氨酸的酶促脱羧作用(测压法测定 L-谷氨酸)	230
实验 101 发酵过程中无机磷的被利用和 ATP 的生成(ATP 的生物合成)	233
第九章 综合实验	235
实验 102 酵母醇脱氢酶的提纯及其性质的研究	235
实验 102.1 酵母醇脱氢酶的提纯	235
实验 102.2 酵母醇脱氢酶的凝胶层析	238
实验 102.3 酵母醇脱氢酶的专一性	239
实验 102.4 酵母醇脱氢酶的动力学研究	241
实验 103 α -淀粉酶的分离纯化、鉴定和 K_m 、 V_{max} 的测定	248
实验 103.1 α -淀粉酶的活力测定	248
实验 103.2 α -淀粉酶的疏水层析	251
实验 103.3 α -淀粉酶的离子交换柱层析	253
实验 103.4 聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法鉴定 α -淀粉酶	255
实验 103.5 米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_{max}) 的测定	257
实验 104 螺旋藻藻蓝蛋白的分离、纯化与鉴定	260
实验 104.1 螺旋藻粗藻蓝蛋白的制备	260
实验 104.2 离子交换柱层析法分离藻蓝蛋白	261
实验 105 原花色素的提取、纯化与测定	263
实验 105.1 山楂原花色素的提取	263
实验 105.2 原花色素的测定(I)	264
实验 105.3 原花色素的测定(II)	266
实验 106 熊果酸的制备和测定	268
实验 106.1 山楂熊果酸的制备	268

实验 106.2 熊果酸含量测定	269
实验 107 镍化合物诱导人 Jurkat 细胞凋亡途径的研究	271
实验 107.1 Jurkat 细胞的培养	271
实验 107.2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡	273
实验 107.3 RT-PCR 检测凋亡相关基因 <i>bcl-2</i> 的表达	274
实验 107.4 酶联免疫吸附检测 Bcl-2 蛋白表达水平	277
附录	279
一、生物化学实验须知	279
二、玻璃仪器的洗涤及一些常用的洗涤剂	281
三、移液器的使用	282
四、吸管的使用	284
五、过滤和离心	284
六、722 型分光光度计的使用	285
七、930 型荧光光度计的使用	288
八、UV-9100 型紫外可见分光光度计的使用	290
九、实验室常用酸碱的比重和浓度	295
十、常用酸碱指示剂	295
十一、缓冲液的配制	296
十二、恒沸盐酸的制备	303
十三、大肠杆菌丙酮粉的制备	303
十四、生物化学中某些重要化合物的 M_r 及 pK 值	304
十五、氨基酸的一些物理常数	306
十六、某些蛋白质的物理性质	308
十七、化学元素的相对原子质量表	309
十八、离心机转速(r/min)与相对离心力(RCF)的换算	310
十九、硫酸铵饱和度的常用表	312
二十、常用离子交换剂	313
二十一、常用凝胶过滤层析介质	316
二十二、汞的密度	318

第一章 糖 类

实验 1 糖的颜色反应

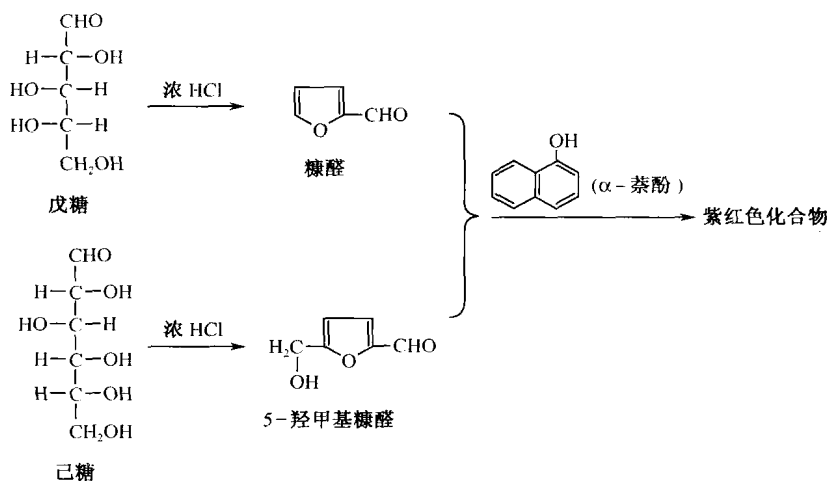
A. 莫氏试验^①

一、目的

掌握莫氏(Molisch)试验鉴定糖的原理和方法。

二、原理

糖经浓无机酸(浓硫酸、浓盐酸)脱水产生糠醛或糠醛衍生物,后者在浓无机酸作用下,能与 α -萘酚^②生成紫红色缩合物:



利用这一性质可以鉴定糖。

三、实验器材

1. 棉花或滤纸。

① 一些非糖物质(如糠醛、糖醛酸等)亦呈阳性反应。此外,样液中如含高浓度有机化合物,将因浓硫酸的焦化作用,而出现红色,故试样浓度不宜过高。

② 亦可用麝香草酚或其他苯酚化合物代替 α -萘酚,麝香草酚的优点是溶液比较稳定,且灵敏度与萘酚一样。

2. 吸管 1.0ml(×4)、2.0ml(×1)。

3. 试管 1.5cm×15cm(×4)。

四、实验试剂

1. 莫氏试剂：称取 α -萘酚 5g，溶于 95%乙醇并稀释至 100ml。此试剂需新鲜配制，并贮于棕色试剂瓶中。

2. 1%蔗糖溶液：称取蔗糖 1g，溶于蒸馏水并定容至 100ml。

3. 1%葡萄糖溶液：称取葡萄糖 1g，溶于蒸馏水并定容至 100ml。

4. 1%淀粉溶液：将 1g 可溶性淀粉与少量冷蒸馏水混和成薄浆状物，然后缓缓倾入沸蒸馏水中，边加边搅，最后以沸蒸馏水稀释至 100ml。

五、操作

于 4 支试管中，分别加入 1ml 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液、1%淀粉溶液和少许纤维素(棉花或滤纸浸在 1ml 水中)，然后各加莫氏试剂 2 滴^①，摇匀，将试管倾斜，沿管壁慢慢加入浓硫酸 1.5ml(切勿振摇!)，硫酸层沉于试管底部与糖溶液分成两层，观察液面交界处有无紫红色环出现。

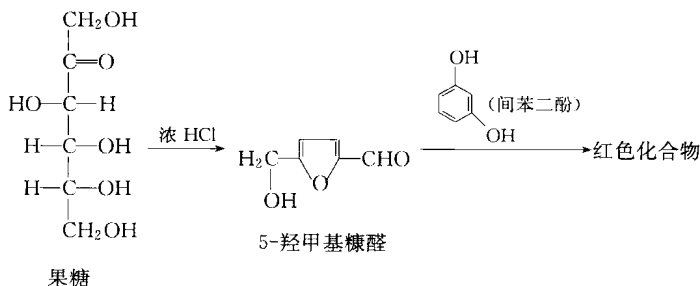
B. 塞氏试验

一、目的

掌握塞氏(Seliwanoff)试验鉴定酮糖的原理和方法。

二、原理

酮糖在浓酸的作用下，脱水生成 5-羟甲基糠醛，后者与间苯二酚作用，呈红色反应；有时亦同时产生棕色沉淀，此沉淀溶于乙醇，成鲜红色溶液^②。以果糖为例，其反应如下：



① 莫氏试剂应直接滴入试液中，勿使试剂接触试管壁，否则试剂会与硫酸接触生成绿色而掩盖紫色环。

② 在此实验条件下，蔗糖有可能水解成果糖与葡萄糖，而呈阳性反应。葡萄糖与麦芽糖亦呈阳性反应，但呈色反应的速度较酮糖缓慢。果糖的红色出现及沉淀的产生，应在加热后 20~30s 内，生成的沉淀能溶于乙醇并成红色溶液。

三、实验器材

1. 吸管 0.50ml(×3)、5.0ml(×1)。
2. 试管 1.5cm×15cm(×3)。
3. 水浴锅。

四、实验试剂

1. 塞氏试剂：溶 50mg 间苯二酚于 100ml 盐酸中 $[V(H_2O) : V(HCl) = 2 : 1]$ ，临用时配制。
2. 1%果糖溶液：称取果糖 1g，溶于蒸馏水并定容至 100ml。
3. 1%葡萄糖溶液：见试验 A。
4. 1%蔗糖溶液：见试验 A。

五、操作

于 3 支试管中分别加入 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和 1%果糖溶液各 0.5ml，各加塞氏试剂 2.5ml，摇匀，同时置沸水浴内。比较各管颜色变化及红色出现的先后次序。

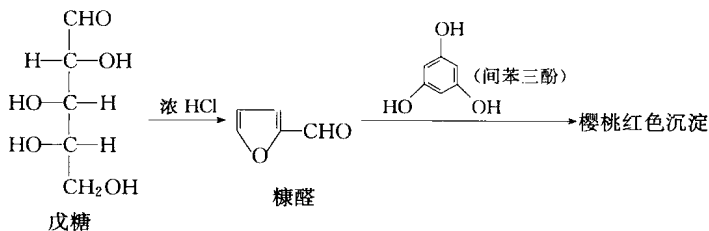
C. 杜氏试验

一、目的

掌握杜氏(Tollen)试验鉴定戊糖的原理和方法。

二、原理

戊糖在浓酸溶液中脱水生成糠醛，后者与间苯三酚结合成樱桃红色物质：



本试验虽常用以鉴定戊糖，但并非戊糖的特有反应。果糖、半乳糖和糖醛酸等都呈阳性反应。戊糖反应最快，通常在 45s 内即产生樱桃红色沉淀。

三、实验器材

1. 吸管 1.0ml(×3)。
2. 试管 1.5cm×15cm(×3)。
3. 水浴锅。

四、实验试剂

1. 杜氏试剂：2%间苯三酚乙醇溶液(2g 间苯三酚溶于 100ml 95%乙醇中) 3ml，缓缓加入浓盐酸 15ml 及蒸馏水 9ml 即得，临用时配制。

- ## 五、操作

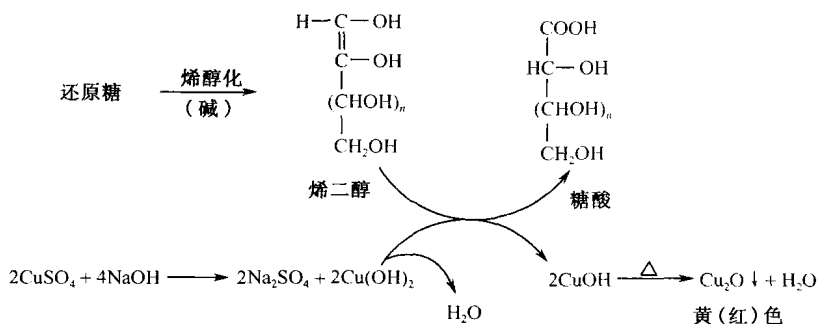
实验 2 糖的还原作用

一、目的

掌握用糖的还原反应来鉴定糖的原理和方法。

二、原理

费林(Fehling)试剂和本尼迪特(Benedict)试剂均为含 Cu^{2+} 的碱性溶液,能使具有自由醛基或酮基的糖氧化,其本身则被还原成红色或黄色的 Cu_2O ①。此法常用作还原糖的定性或定量测定。其反应表示如下:



目前临床上多用本尼迪特法，因此法具有以下优点：①试剂稳定，不需临用时配制；②不因氯仿的存在而被干扰；③肌酐或肌酸等物质所产生的干扰程度远较费林试剂小。

三、实验器材

1. 吸管 1.0ml($\times 5$)、2.0ml($\times 1$)。
2. 试管 1.5cm $\times$ 15cm($\times 6$)。
3. 水浴锅。

① 由于沉淀速度不同,形成的颗粒大小不同,颗粒大的为红色,小的为黄色。

四、实验试剂

1. 费林试剂

试剂 A: 称取硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)34.5g, 溶于蒸馏水并稀释至 500ml。

试剂 B: 称取氢氧化钠 125g, 酒石酸钾钠^① 137g, 溶于蒸馏水并稀释至 500ml。

临用时将试剂 A 与试剂 B 等体积混合。

2. 本尼迪特试剂: 称取 85g 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$)及 50g 无水碳酸钠, 溶解于 400ml 蒸馏水中。另溶解 8.5g 硫酸铜于 50ml 热水中。将硫酸铜溶液缓缓倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中, 边加边搅, 如有沉淀可过滤。此混合液可长期使用^②。

3. 1%淀粉溶液: 见实验 1。

4. 1%蔗糖溶液^③: 见实验 1。

5. 1%葡萄糖溶液: 见实验 1。

五、操作

于 3 支试管中加入费林试剂 A 和 B 各 1ml, 混匀, 分别加入 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和 1%淀粉溶液 1ml, 置沸水浴中加热数分钟, 取出, 冷却, 观察各管的变化。

另取 3 支试管, 分别加入 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和 1%淀粉溶液 1ml, 然后每管加本尼迪特试剂 2ml, 置沸水浴中加热数分钟, 取出, 冷却, 和上面结果比较。

实验 3 血糖的定量测定(Folin-Wu 法)

一、目的

1. 掌握 Folin-Wu 法测定血糖含量的原理和方法。

2. 学会制备无蛋白血滤液。

二、原理

无蛋白血滤液中的葡萄糖与碱性硫酸铜溶液共热, Cu^{2+} 即被血滤液中的葡萄糖还原成 Cu^+ (Cu_2O), Cu_2O 又使钼酸试剂还原成低价的蓝色钼化合物(钼

① 酒石酸钾钠的作用是防止反应产生的氢氧化铜或碳酸铜沉淀, 使之变为可溶性的而又略能解离的复合物, 从而保证继续供给 Cu^{2+} 。

② 如因存放较久而产生沉淀, 可取上清液使用, 不必重新配制。存放较久的本尼迪特试剂较新配制的更好。

③ 所用蔗糖应用 C. P. 以上规格, 且应事先以本尼迪特试剂检验合格再用, 否则将因药品不纯, 或部分分解而有还原性。

蓝)。血液的糖含量和产生的 Cu_2O 成正比, Cu_2O 的量与形成钼化合物的量成正比, 可用比色测定法。

三、实验器材

1. 全血。
2. 滤纸。
3. 722 型(或 7220 型)分光光度计。
4. 血糖管 25ml($\times 3$)。
5. 奥氏吸管 1.0ml($\times 3$)、2.0ml($\times 1$)。
6. 吸管 2.0ml($\times 3$)、10.0ml($\times 1$)、5.0ml($\times 4$)。
7. 锥形瓶 20ml($\times 1$)。
8. 表面皿 $\phi 6\text{cm}$ ($\times 1$)。
9. 漏斗 $\phi 5\text{cm}$ ($\times 1$)。
10. 水浴锅。
11. 电炉(或煤气灯)。

四、实验试剂

1. 标准葡萄糖溶液

(1) 1%葡萄糖母液(10mg/ml): 称取 1.000g 葡萄糖(A. R.), 溶于蒸馏水并稀释至 100ml。

(2) 葡萄糖标准液(0.1mg/ml): 取 1.0ml 葡萄糖母液置 100ml 容量瓶内, 加蒸馏水至刻度。

2. 碱性硫酸铜溶液

A 液: 称取无水碳酸钠 35g, 酒石酸钠 13g 及碳酸氢钠 11g, 溶于蒸馏水后, 稀释至约 700ml, 待溶液清晰后再稀释至 1 000ml。

B 液: 称取硫酸铜晶体 5g, 溶于蒸馏水并稀释至 100ml, 加浓硫酸数滴作稳定剂。

临用时, 取 A 液 25ml, B 液 5ml, 混合后, 再加 A 液至 50ml, 摇匀。此混合液置冰箱内可保存数日, 如暴露于阳光下, 数小时即失效。

3. 酸性钼酸盐溶液: 称取钼酸钠 600g, 置烧杯内, 加入少量蒸馏水, 溶解后倾入 2 000ml 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 摇匀, 倾入另一较大的试剂瓶中,

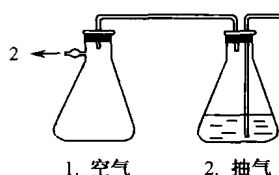


图 1 赶溴装置

加溴水 0.5ml, 摇匀, 静置数小时。取上清液 500ml, 置于 1 000ml 容量瓶中, 徐徐加入 225ml 85%磷酸, 边加边摇匀。再加 150ml 25%硫酸, 置暗处至次日, 用空气将剩余的溴赶去(见图 1), 然后加入 75ml 冰醋酸, 摇匀, 用蒸馏水稀释至 1 000ml, 贮于棕色瓶中。