

矿的定量测定

光 京 大 学

1979.

目 录

一、糖的分离测定	1
二、脂的分离测定	18
三、血清蛋白和脂蛋白的脂酰纤维薄膜电泳	23
四、核酸的制备	35
五、总氮的测定	54
六、转氨酶(SGPT SGOT) 测定	63
七、细胞色素C的制备和分离测定	68
附录、细胞色素C的制备和性质	75

精的足身測是

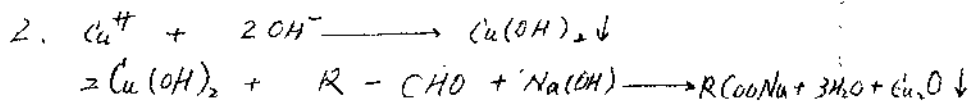
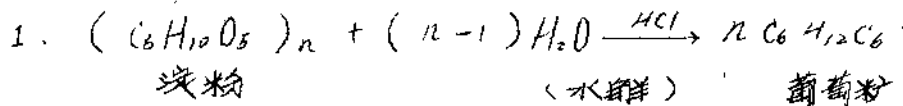
粉料定氮测定方法很多，但都是以粉的物理性质和化学性质为基础的。根据粉溶液的折射率，比重，旋光活性，可分别用折光仪，波美比重计，旋光仪来测定粉的含氮。根据粉的化学性质设计了滴定法，比色法进行定氮测定。近年来又建立起电位法，酶电极等快速微量的定粉法。在实际工作中要根据需要和可能来选择适当的方法定粉。下面介绍铜试剂法，斐林试剂法，旋光测定三种方法。

一. 铜试剂法 (半微量测定法)

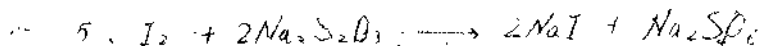
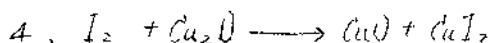
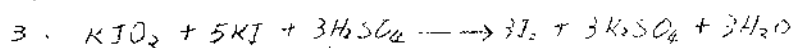
原理

粉又称碳水化合物。按其化学构造，粉是多羟醛或多羟酮或多羟醇，或水解产生多羟醛或多羟酮的化合物。还原粉是指含有自由醛基的单粉类；从某些二粉（如乳粉、麦芽粉等）在碱性溶液中，还原粉能将 Ag^+ 、 Hg^+ 、 Cu^{++} 等金属离子还原，而粉本身则被氧化成多种羟酸，根据此特性，作为用化学方法测定粉含量的基础。

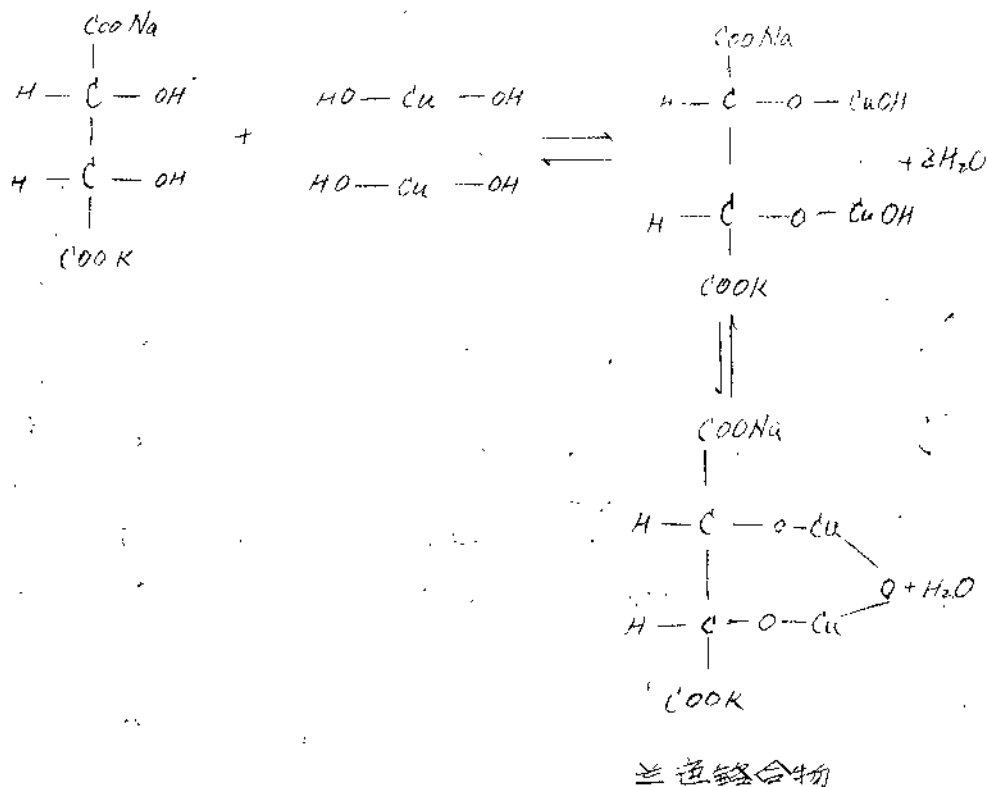
本实验是根据还原粉将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ ，而 Cu^+ 又被铜试剂中的双氧氧化成高价铜，最后用硫代硫酸钠滴定反应液中剩余的碘。还原粉与滴定时用的硫代硫酸钠有定量关系，根据硫代硫酸钠的用量及浓度可推算出样品中粉的含量。将主要反应如下：



(黄色和红色)



由于铜离子在碱性条件下，会生成氢氧化铜或碱性碳酸铜沉淀。为了防止沉淀的形成，可在铜试剂中加入是酒石酸铜钠柠檬酸盐或甘油。这些含羟基的化合物能与铜离子反应生成可溶性的络离子。反应是可逆的，平衡后，溶液中含有一定浓度的氢氧化铜。它与酒石酸铜钠的反应如下：



铜试剂法测定淀粉的含铜范围从 0.1 —— 2 毫克为宜。

试剂和器材

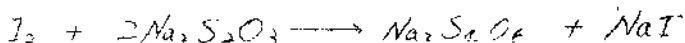
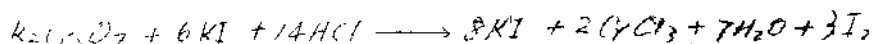
试剂：1. 硫代硫酸钠溶液的配制和标定：先配制0.05 N 硫代硫酸钠溶液，标完后使用前再稀释成0.005 N。

(1) 0.05 N 硫代硫酸钠溶液的配制：称取0.5克结晶硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶于300毫升新煮沸放冷的蒸馏水中。加入0.5克碳酸钠，摇匀后放置在棕色瓶内，盖紧避免与空气和日光接触，过8—14天在标定。

(2) 0.05 N 重铬酸钾溶液的配制：将分析纯的重铬酸钾在130—200℃下烘干，准确称取0.615克，用少量水溶解后，定容到250毫升。

(3) 标定：用吸量管吸取10毫升重铬酸钾溶液于碘瓶中，加入7毫升2 N 盐酸、0.32克碘化钾，立刻塞好玻璃塞，摇匀，并在玻璃塞与瓶颈之间加数滴水封闭空隙，以免碘挥发损失。然后置暗处5分钟。用10毫升蒸馏水稀释。立刻用待标定的硫代硫酸钠溶液滴到溶液呈黄色，加入数滴淀粉指示剂，继续滴定到兰色刚刚消失即为终点。记下所用硫代硫酸钠溶液的体积V，再重复两次要达到的数据平行。

(4) 计算硫代硫酸钠溶液的当量浓度：上述滴定的反应过程如下：



重铬酸钾溶液的当量浓度：重铬酸钾的氧化还原当量为

$$\frac{294.22}{6} = 49.03, \text{ 所配重铬酸钾溶液的浓度为}$$

$$\frac{0.615 \text{ 克}}{49.03 \text{ (克)} \times 0.25 \text{ (升)}} = 0.0502 \text{ N}$$

硫代硫酸钠溶液的标准液：

$$N = \frac{10 \times 0.0506}{\checkmark}$$

说明：√ 代表滴定时所消耗硫代硫酸钠溶液的毫升数。

2. 铜试剂：称取硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 35克溶于50毫升蒸馏水中；酒石酸钾钠 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 25克溶于200毫升蒸馏水中；碳酸钠 (Na_2CO_3) 25克溶于200毫升蒸馏水中；碳酸氢钠 (NaHCO_3) 20克溶于300毫升蒸馏水中；碘化钾5克溶于50毫升蒸馏水中；碘酸钾 (KIO_3) 0.535克(称准)溶于200毫升蒸馏水中。分别溶解后，依次混合均匀，过滤后放置两天方可应用。

3. 3N氢氧化钠，0.5N氢氧化钠，1N硫酸，0.1N硫酸，3N盐酸，10%硫酸铜。

4. 淀粉指示剂：称取0.5克可溶性淀粉，用10毫升蒸馏水调成糊状，倒入正在沸腾的95毫升蒸馏水中，边倒边搅拌，继续沸腾几分钟到透明为止。取下冷至室温，倒入100毫升滴瓶，加甲苯数滴，摇匀。

- 器材：
1. 碘瓶
 2. 吸氧管
 3. 容量瓶
 4. 锥形瓶
 5. 碱式滴定管
 6. 台式离心机
 7. 水浴

操作方法

(一) 标准曲线的制备

(二) 淀粉的测定 (以发酵液为例)

1、样品稀释：用大口吸鼻管吸取发酵液5毫升，置于25毫升容量瓶中。（平行作三分样）用蒸馏水稀释到刻度，摇匀（注意将液管内壁上的发酵液要洗入容量瓶，外壁上的发酵液用纸擦去，如有泡沫可先加酒精消沫，再稀释至刻度）。

2、加热水解：用吸鼻管吸取上述稀释好的样品0.5毫升，置于50毫升容量瓶中，加5毫升3N盐酸，放入沸水浴中加热10—45分钟。（视淀粉含量而定）。

3、除去蛋白质：冷却后的水解液，加10毫升10%硫酸铜溶液，加3滴0.5%酚酞指示剂。先用3N氢氧化钠中和溶液的酸度，由小心地用0.5N氢氧化钠调至微红色（若调过红，可用0.1N硫酸调回）。稀释至刻度，摇匀，过滤，滤液直接收集于干燥的小烧杯中，待用。

4、与铜试剂反应：取5个50毫升的锥形瓶，3个作样品，2个作空白。标号后按下表操作。

项目 \ 数量	样品1	样品2	样品3	空白1	空白2	
蒸馏水 (毫升)	5	5	5	0	0	
蒸馏水 (毫升)	0	0	0	5	5	
铜试剂 (毫升)	5	5	5	5	5	
加热 (分钟)	均加热20分钟					
冷却	均冷却至室温					
1N硫酸	5	5	5	5	5	
0.005N硫化砷溶液 毫升数		A		B		

准确称取 1.600 克分析纯的无水葡萄糖 (予先在 105℃ 干燥至恒重) 用蒸馏水溶解后移至 100 毫升容量瓶中, 并用蒸馏水洗称量瓶数次, 以洗全部葡萄糖转入容量瓶中; 最后定容到刻度, 摇匀。吸取 5 毫升至另一个 100 毫升容量瓶中, 再稀释到刻度; 其浓度为 0.2 毫克/毫升。

瓶号 空白	空白	1	2	3	4	5	6
标准葡萄糖 (毫升)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
标准葡萄糖 (毫克)	0	0.15	0.30	0.45	0.60	0.75	0.90
蒸馏水 (毫升)	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0
铜试剂 (毫升)	5	5	5	5	5	5	5
加热 (分钟)	20	20	20	20	20	20	20
冷却至室温							
1N 硫酸 (毫升)	5	5	5	5	5	5	5
0.005N 亚硫酸钠 溶液 (毫升)	a	b	c	d	e	f	g
空白对照 亚硫酸钠溶液 (毫升)	X	a-b	a-c	a-d	a-e	a-f	a-g

按上表所列, 取 6 只 50 毫升锥形瓶, 瓶号, 依次用吸管准确吸取各项试剂加入各号锥形瓶内, 将锥形瓶于沸水浴上加热 20 分钟, 各锥形瓶均冷却至室温, 后两步操作先一个再作第二个, 加入硫酸后, 振荡, 待其中红色 (或黄色) 沉淀溶解后, 立即用 0.005N 的亚硫酸钠溶液滴定, 至溶液到浅黄色, 加入 5 滴淀粉指示剂, 继续用亚硫酸钠溶液滴定至蓝色刚刚消失, 即为终点。上次试验再重复两次。做标准曲线时以空白试样, 得出的亚硫酸钠毫升数为纵坐标, 以葡萄糖毫克数为横坐标, 于坐

纸上绘出标准曲线。

测定方法同测定标准曲线时，求出平均值A（毫升）或B（毫升）。根据B-A的差数，查标准曲线，并考虑稀释倍数，即可标出发酵液中总粉的克百分含量（克/100 ml或克%）。

（三）还原粉的测定：

1、取样：取前述稀释5倍的发酵液10毫升，在3500转/分下离心10分钟。

2、除去蛋白质：取离心后的上清液5毫升，加50毫升蒸馏水中，加10毫升10%硫酸铜，加3滴0.5%酚酞指示剂，用0.5N氢氧化钠调至微红色，稀释到刻度，过滤，取滤液测定。

3、与铜试剂反应：操作同总粉测定。用空白一样的差值，直接查标准曲线表，即得还原粉的克百分含量（克%）

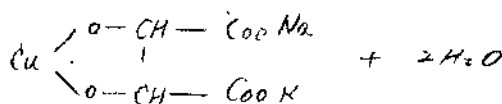
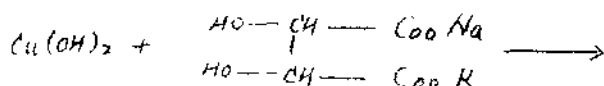
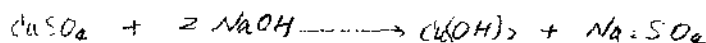
（二）费林（Fehling）试剂法

用费林试剂测定还原粉的方法是产粉的最常用最广泛的方法。因此对于费林试剂有多种改良的配方，本实验使用最基本的配方。该方法测定粉量的范围大约为10—60毫克/毫升。最适于工业发酵液中粉含量测定。此方法的特点是准确可靠 干扰少。

原理：

还原粉在碱性溶液中，将硫酸铜的 Cu^{++} 还原成 Cu^+ （ Cu_2O ）。多余的 Cu^{++} 在碱性溶液中与酒化钾作用析出碱，用标准硫代硫酸钠溶液滴定所析出的碘，这样可根据硫代硫酸钠的用量从标准粉表中查出相应的粉含量。

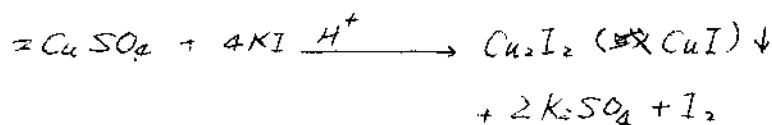
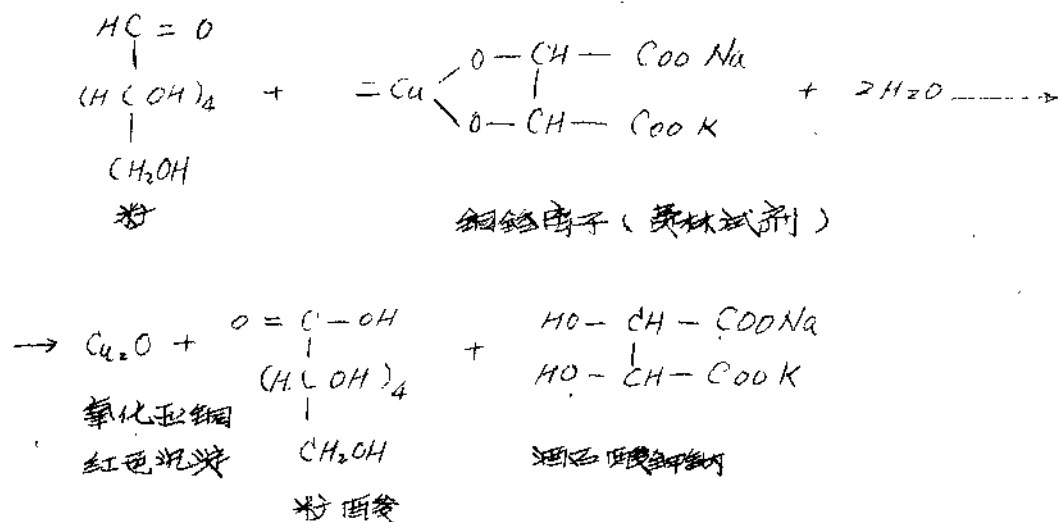
有关化学反应式如下：



以上反应是费林试剂 (A 液 B) 混合以后产生的。费林试剂为了长期保存分成二部分配制, 即费林试剂 A (只含硫酸铜) 与费林试剂 B (含有酒石酸钾钠和氢氧化钠)。临用前等体积混合。

A 中的硫酸铜主要用于定氮供给 Cu^{++} , B 中酒石酸钾钠主要作用是使 Cu^{++} 形成络离子而成胶体, 不发生沉淀。NaOH 用来满足溶液的碱性需要。

费林试剂与粉加热作用后, 从该在测定过程中有关的化学反应如下:



试剂：1. 费林试剂，A：称 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (C.p.)

30克溶于500毫升蒸馏水中。B：称酒石酸钾钠 (C.p.)

93.8克与 NaOH (C.p.) 62.5克溶于500毫升蒸馏水中。临用前准确地将A与B等体积混合，有时为了简化操作步骤，可将30% KI 溶液预先加入费林试剂中，混合比为费林试剂与30% KI溶液的体积比为4:1。

2. 1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的配制：

取60克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (C.p.) 固体，加入2克碳酸钠溶于1升新煮沸而冷却的蒸馏水中，保存在棕色瓶中，放置2-8天后，取上清液进行标定。

3. 1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的标定或0.1000 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的配制：

用移液管准确吸取上述1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液25毫升，放入250 ml 容量瓶中，用蒸馏水稀释到刻度。用移液管吸取250毫升0.1 N $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 基准溶液于锥形瓶中，放入15毫升 HCl ，10克固体KI，摇匀后放入暗处5分钟，用100毫升水稀释，用0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定，当溶液由棕色变黄绿色时加入5毫升0.2% 淀粉溶液，继续滴定至溶液由兰绿色至亮绿色（ Cr^{III} 的颜色）为终点，重复滴定3次。

$$N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{N_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} \times V_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}}{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}$$

按标定的硫代硫酸钠浓度将它准确稀释成0.1000 N 备用。

4. 淀粉溶液的配制：取0.2克可溶性淀粉，加入少量水调成糊状，溶于100毫升沸水中。

(二) 还原粉的测定：以发酵粉为例。

一般样品中主要含有发粉和单粉。单粉为还原粉，如果不经水解，直接测定，所得的总粉量为样品中还原粉的总量而大部分发粉的总量不能测出。

取样品（按标准）数毫升，用固体草酸钠氧化至 pH 1.8~2.0，用滤纸过滤（或用离心机离心），得滤液。

取 1 毫升滤液（视含粉量增减）三份分别移入三个锥形瓶中，分别标号，按下表操作：

数 目 项	标 号	空 白	样 品 ₍₁₎	样 品 ₍₂₎
		1 1 1	2 2 2	3 3 3
离心滤液 ml		0 0 0	1 1 1	1 1 1
费林试剂 ml		均精确量取 20 ml		
加热沸腾		均加热 3 分钟 (水浴加热)		
冷 却		均冷至室温		
加稀硫酸		均加入 15 ml 4N H_2SO_4		
0.1000 N $Na_2S_2O_3$ (ml)		A	B	C
与空白比较				
$Na_2S_2O_3$ 差值 (ml)				

求平均值 A (ml), B (ml), C (ml)。据空白减样品的差数 (ml)，直接查标准粉表，即得还原粉 mg/ml 含氮。

此项操作所加费林试剂一定要过量，因此在沸腾以后滤液应微呈兰色。如果没有兰色全部变成红色的 Cu_2O 就不能保证滤液中所有的粉全部被氧化，则不能得到准确的结果。在这种情况下必须增加费林试剂或稀释剂使粉滤液未减少粉含量，如果增加费林试剂就要变动其它试剂的用量，涉及范围较大，一般从减少粉含量

来解决这个矛盾比较困难。

进行样品测定时，因样品中可能有许多有色物质，所以颜色不如标准溶液明显，费林试剂呈兰色，与样品加热后呈绿色，加热物指示剂后转变成紫黑色，随样品不同，滴定终点时，溶液混浊呈灰白色。必要时先进行予滴定，然后进行正式滴定。

三、总粉的测定：先将样品水解，使所有多粉转变成单粉，再测还原粉，即为粉的总量。

取样品（按稀释液）数毫升，用固体单酸酸化至 $\text{pH } 1.8-2.0$ 用滤纸过滤（或离心），得滤液。取0.5毫升滤液三份分别转入三个250毫升锥形瓶中，每一锥形瓶加10毫升蒸馏水与5毫升4N H_2SO_4 ，在电炉上加热到沸腾，沸腾三分钟，立即在冷水中冷却，使样品中多粉变为单粉。

然后每一锥形瓶中加入4N NaOH 溶液中和样品中的酸，精确吸取费林试剂加入锥形瓶中，摇匀，在水浴上加热到沸腾，沸腾三分钟。此时溶液中必须有剩余的费林试剂呈兰色。否则样品需要稀释，用冷水立即冷至室温，进行滴定，从下表中查。

粉 标准曲线数据表

上海三丁

	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
0	0.00	0.03	0.06	0.10	0.13	0.16	0.19	0.22
1	0.32	0.35	0.38	0.42	0.45	0.48	0.51	0.54
2	0.64	0.67	0.71	0.74	0.77	0.81	0.84	0.87
3	0.92	1.00	1.04	1.07	1.10	1.14	1.17	1.20
4	1.30	1.34	1.37	1.40	1.44	1.47	1.50	1.54

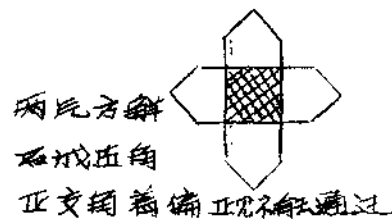
续上表

5	1.64	1.68	1.71	1.75	1.78	1.82	1.85	1.89
6	1.99	2.03	2.08	2.10	2.13	2.17	2.20	2.24
7	2.34	2.38	2.41	2.45	2.48	2.52	2.56	2.59
8	2.70	2.74	2.77	2.81	2.85	2.89	2.92	2.96
9	3.07	3.11	3.15	3.18	3.22	3.26	3.30	3.34
10	3.44	3.48	3.52	3.55	3.59	3.63	3.67	3.71
11	3.82	3.86	3.90	3.94	4.08	4.02	4.05	4.09
12	4.21	4.25	4.29	4.33	4.37	4.41	4.45	4.49
13	4.61	4.65	4.69	4.73	4.77	4.82	4.86	4.90
14	5.02	5.06	5.10	5.14	5.18	5.23	5.27	5.31

三 籽的旋光测定

原理

当光线通过方解石 (calcite 纯碳酸钙, 或尼可尔棱镜 Nicol prism) 后, 成为只在一个平面内振动的光称为偏振光。如果把两片方解石平行地重叠放置, 方解石形成的偏振光的前进方向被另一方解石所阻挡而不能通过。参看原因:



如果把具有旋光活性的物质的溶液装在玻璃管中，放到两个平行的尼可尔棱镜之间，发现光线不能通过，只要将第二个尼可尔棱镜向左或向右旋转若干度，就可使光线通过。这是由于旋光物质有旋转偏振光的振动面的性质，有的可使偏振光向右旋转，叫右旋；有的可使偏振光向左旋转，叫左旋。不但旋光的方向有不同，旋光的角度也有大小的差别，具有此种能力的物质叫有旋光活性的物质。一种旋光活性物质旋光性的大小和管内所放物质的性质及浓度、温度、旋光管的长度、光的波长、溶剂的性质（若为溶液）有关。比较两种物质的旋光度，可用比旋度 $[\alpha]$ 表示。具有旋光性的物质，都有一定的比旋度，是一物理常数。可定义为：当溶液的浓度为每毫升含一克旋光活性物质，溶液置一分米（1厘米）长的旋光管中，所测得的旋光度称为比旋度。测定旋光度的温度一般为 20°C ，光源常为钠光用符号 D 来表示，钠光的波长为 $5880\text{\AA}$ ，因而比旋度用符号 $[\alpha]_D^{20}$ 表示，用旋光仪测得任一浓度溶液的旋光度后，都可以用以下公式计算出比旋度：

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{a \cdot 100}{l \cdot g}$$

上式， $[\alpha]_D^{20}$ 表示在温度为 20°C 时用钠光灯做为光源比旋度。

a 表示旋光仪测得的溶液旋光度。

l 表示旋光仪测定管的长度，以分米为单位。

g 表示每100毫升溶液中所含溶质的克数。

根据上述原理，若已知某溶液的比旋度，可利用下式求得该溶液的百分浓度。

$$p = \frac{a}{[\alpha]_D^{20} \cdot l} \times 100\%$$

$$\rho = \frac{a}{[\alpha]_D^{20} \cdot L} \times 100\%$$

式中 ρ 为溶液的百分浓度

a 为由实验所测得的旋光度

$[\alpha]_D^{20}$ 为比旋度

例如：某溶液的葡萄糖，它的旋光度测得是 $+3.4^\circ$
它的比旋光度查得为 $+52.5^\circ$ ，若管长为一分米，则由
上式可计算该溶液的浓度。

$$\rho = \frac{+3.4}{+52.5 \times 1} \times 100\% = 6.48\%$$

单粉、二粉、三粉、四粉以及淀粉的分解产物糊精都有旋光性。如果把这些物质的溶液放在旋光仪内，则可发现它们都能使偏振光右旋或左旋；如果粉的浓度愈大则旋光能力也愈大。各种粉都有一定的比旋度，应用旋光度的测定，应用上列公式就可以知道粉的含另。

表 1-1 常见粉类的比旋度

名 称	比旋度	名 称	比旋度
D—葡萄粉	+ 32.5°	蔗 粉	+ 56.5°
D—果粉	- 92.3°	乳 粉	+ 52.5°
D—半乳粉	+ 81.5°	麦芽粉	+ 137.0°
D—甘露粉	+ 14.2°	糊 精	+ 104.0°
L—阿拉伯粉	+ 104.5°	淀 粉	+ 195.0°
D—木粉	+ 15.8°	(可溶性)	+ 196.0°

旋光仪的基本结构

测定旋光物质旋光度的仪器，叫旋光仪（图 1-1，1-2）。仪器的主要部分是两电气区，一端电气区是固定的，叫做偏振光源可以从这一端进入，另一端的电气区是可以左右旋转的，叫作检偏器。旋光仪的前端有一块在焦点的目镜。刻度盘可以读出溶液旋光的度数。在两电气区间放置一定长度一般为一分米的玻璃管（或瓷管）管中盛一定浓度的被测溶液。旋光仪内还有一枚正 0 点的刻度组，在 0 点时左右两半视野的明暗度应相等。

操作方法