

高等学校教学用书

生物化学实验

П. П. 阿斯丹寧著

高等教育出版社

高等学校教学用书



生物化学实验

И. И. 阿斯丹寧著
郝 逢 編 譯

高等教育出版社



本書係根据苏联國立農業書籍出版社 (Государственное издательство сельскохозяйственной литературы) 1951 年出版的阿斯丹寧教授 (Проф. П. П. Астанин) 所著“生物化学实验”(практические занятия по биохимии) 譯出的。原書經苏联高等教育部審定為獸医学院及獸医系教學參考書。

担任本書翻譯工作的為西北畜牧獸医学院郝逢繡同志。

生物化学实验

П. П. 阿斯丹寧著 郝逢繡譯

高等教育出版社出版

北京琉璃廠一七〇號

(北京市書刊出版業營業許可証出字第〇五四號)

京華印書局印刷 新華書店總經售

書號536(課470) 開本850×1168¹/₃₂ 印張5²/₁₆ 字數137,000

一九五六年二月北京第一版

一九五六年二月北京第一次印刷

印數1—2,500 定價(8) ¥ 0.83

目 錄

緒 論	9
第一章 物理化学反应	11
實驗 1 pH 值的比色測定法(应用米哈艾利斯指示剂組)	13
實驗 2 pH 值的电測定法	17
實驗 3 用水稀釋時緩衝溶液 pH 值的測定	22
實驗 4 白明膠溶液对氫离子濃度影响的研究	22
實驗 5 緩衝容量的特性	22
實驗 6 用电解質使氫氧化鈦溶膠沉澱	23
實驗 7 用电解質使乳香溶膠(或松脂)沉澱	23
實驗 8 电解質影响剛戈紅溶膠的特性	24
實驗 9 氯化銀膠体溶液穩定性的測定	25
實驗 10 膠体在氯化銀溶液中的保護作用	25
實驗 11 膠体在剛戈紅溶液中的保護作用	25
實驗 12 对幾种离子系列影响蛋白質沉澱作用的研究	26
實驗 13 在各种不同 pH 數值時酪蛋白沉澱最適點的確定	26
實驗 14 在各种 pH 值時白明膠溶液对酒精灵敏度的測定	27
實驗 15 炭对焦糖的吸附作用	27
實驗 16 炭对顏料的吸附作用	27
實驗 17 炭对醋酸的吸附作用	27
實驗 18 顏料同高嶺土及氧化鎂的吸附作用	28
實驗 19 紙对顏料的吸附作用	28
實驗 20 观察在膠体环境中的擴散作用	28
實驗 21 擴散時, 顏色环的獲得	28
實驗 22 用透析法分离膠体和晶体	29
實驗 23 应用膠棉袋研究膜平衡	29
實驗 24 不使用膠棉袋观察膜平衡	29
第二章 醣、脂肪及蛋白質的分析反应	30
實驗 25 百里香酚試驗	30
實驗 26 α -萘酚反应	31

实验 27	碘試驗	31
实验 28	硝基鉻鹽反应	32
实验 29	在鹼性环境中銅的还原反应(№ 1)	32
实验 30	在鹼性环境中銅的还原反应(№ 2)	32
实验 31	在鹼性环境中銅的还原反应(№ 3)	33
实验 32	酮糖試驗	33
实验 33	謝里瓦諾夫氏反应	34
实验 34	果糖存在的試驗	34
实验 35	甲苯二酚(1:3:5)試驗	35
实验 36	根据顏色反应進行糖性物質的定性檢定	35
实验 37	甲苯二酚(1:3:5)試驗的改良法	35
实验 38	脲的製备反应	36
实验 39	苯胼試驗	37
实验 40	当有別的糖存在時,阿拉伯糖(或木糖)的檢定	38
实验 41	發酵試驗	38
实验 42	形成黏液酸的試驗	39
实验 43	鹼的作用	39
实验 44	还原性式醣的甲胺試驗	39
实验 45	在酸性环境中銅的还原作用	39
实验 46	蔗糖的水解作用	40
实验 47	澱粉的水解作用	40
实验 48	肝醣的製备	41
实验 49	糖的定量測定	41
实验 50	醣類的檢定	42
实验 51	形成丙烯醛的反应	44
实验 52	脂肪溶解度的研究	44
实验 53	脂肪的反应	44
实验 54	乳狀液的獲得	44
实验 55	脂肪的皂化	45
实验 56	脂肪皂化後的溶液反应	45
实验 57	卵磷脂的反应	46
实验 58	薩尔科夫斯基反应	46
实验 59	三氯醋酸試驗	46
实验 60	醋酸酐試驗	46
实验 61	脂肪熔點的測定	46
实验 62	脂肪酸度的測定	47
实验 63	皂化值的測定	47
实验 64	碘值的測定	47

实验 65	在索克斯列特氏儀器中脂肪性物質的提取	48
实验 66	相对表面張力的測定	49
实验 67	脂肪的檢定	49
实验 68	用重金屬使蛋白質沉澱	51
实验 69	用对植物鹼作用的試劑使蛋白質沉澱	51
实验 70	用濃無機酸使蛋白質沉澱	51
实验 71	用酒精使蛋白質沉澱	51
实验 72	蛋白質的鹽析作用	52
实验 73	蛋白質的加熱凝固	52
实验 74	縮式脲反应	52
实验 75	酪氨酸試驗	53
实验 76	色氨酸試驗	53
实验 77	硫氨基試驗	53
实验 78	蛋白黃反应	54
实验 79	精氨酸試驗	54
实验 80	α -萘酚試驗	54
实验 81	蛋白質的檢定	55
第三章 消化、酶及維生素		58
实验 82	黏蛋白的檢定	58
实验 83	澱粉的酶水解作用	58
实验 84	電解質对唾液素活性的影响	58
实验 85	溫度对唾液素活性的影响	58
实验 86	酸及鹼对唾液素活性的影响	59
实验 87	用胃蛋白酶水解蛋白質	59
实验 88	反应环境对胃蛋白酶活性的影响	59
实验 89	溫度对胃蛋白酶活性的影响	59
实验 90	鹽酸对胃蛋白酶活性作用的鑑定	60
实验 91	凝乳酶的檢定	60
实验 92	胃液中游离鹽酸的檢定	60
实验 93	当無游离鹽酸存在時,乳酸的檢定	61
实验 94	当有鹽酸存在時,乳酸的檢定	61
实验 95	總酸度,游离的及結合的鹽酸的定量測定	62
实验 96	胃液中氯化物含量的測定	63
实验 97	無機氯化物的測定	64
实验 98	胃液的氯化物及酸度的電測法	64
实验 99	酶活性的定量測定	66
实验 100	甲醛縮定法	68

实验 101	糠醛与胆汁酸缩合的有色产物的生成	69
实验 102	表面张力的减低	69
实验 103	胰的沉淀作用	69
实验 104	胆红素的氧化作用	69
实验 105	碘试验	70
实验 106	松节油试验	70
实验 107	重氮化反应	70
实验 108	胆色素的检验	70
实验 109	胆汁中胆甾醇的检定	71
实验 110	氯化铁试验	71
实验 111	三氯化锑试验	71
实验 112	硫酸试验	71
实验 113	溴-氯仿试验	71
实验 114	维生素 D 的苯胺试验	71
实验 115	2,6-二氯酚试验	72
实验 116	普鲁士蓝的形成试验	72
实验 117	血液中抗坏血酸的定量测定	73
实验 118	血液中胡蘿蔔素的定量测定	74
第四章	血液	75
实验 119	血液的血清蛋白质的沉淀	75
实验 120	氯化血红素结晶的制备	75
实验 121	联苯胺反应	76
实验 122	瘰创树脂试验	76
实验 123	血液的分光分析	76
实验 124	红血球抵抗力的测定	78
实验 125	血液相对粘度的测定	79
实验 126	血浆 pH 值的比色测定	81
实验 127	储备碱度的滴定测定法	83
实验 128	储备碱度的气量计测定	84
实验 129	氧容量的研究	86
实验 130	冰点降低测定	90
实验 131	尿素分子量的测定	92
实验 132	根据血液的比重鉴定其成分	95
实验 133	总蛋白质量及蛋白质部分的定量测定	98
实验 134	非蛋白氮的测定	102
实验 135	尿素的定量测定	105
实验 136	尿素含量的近似测定	109

实验 137	肌酐	109
实验 138	胆紅素	112
实验 139	糖	113
实验 140	凝血酶原指數	116
实验 141	过氧化氫酶	117
实验 142	鉄	118
实验 143	鈣	120
实验 144	氯	122
实验 145	無机磷	124
实验 146	硫酰胺類	126
第五章 乳、尿		128
实验 147	全乳及脫脂乳比重的測定	128
实验 148	酪蛋白及脂肪的沉澱	128
实验 149	在沉澱中檢定蛋白質	128
实验 150	在沉澱中檢定脂肪	128
实验 151	乳中乳清蛋白的檢定	128
实验 152	乳糖的檢定	128
实验 153	乳糖脲的製备	129
实验 154	磷酸鈣的檢定	129
实验 155	乳中脂肪的測定	129
实验 156	熱鹼的作用	129
实验 157	联苯胺的过氧化物酶反应	129
实验 158	酸度的測定	130
实验 159	尿中氮量的測定	134
实验 160	氯化物的定量測定	134
实验 161	磷酸鹽的定性試驗	135
实验 162	無机硫酸鹽的定性試驗	135
实验 163	有机硫酸鹽的定性試驗	135
实验 164	尿素的製备	136
实验 165	加熱对乾燥尿素的影响	137
实验 166	尿素的气量計測定法	138
实验 167	馬尿酸的分离	142
实验 168	尿酸的分离	143
实验 169	紫尿酸銨試驗	143
实验 170	尿酸的还原特性	144
实验 171	肌酐的定量測定	144
实验 172	用硝酸的試驗	146

实验 173	煮沸試驗	147
实验 174	尿中蛋白質數量的比濁測定	147
实验 175	蛋白質的定量測定	148
实验 176	用氫 - 鎳溶液試驗豚(蛋白豚)	148
实验 177	用磷鎢酸試驗豚	149
实验 178	联苯胺反应	149
实验 179	癒創樹脂反应	149
实验 180	匹拉米董反应	149
实验 181	糖的定性試驗	149
实验 182	含糖的尿的旋光測定法	150
实验 183	乙醚乙酸的檢定	154
实验 184	檢定乙醚乙酸及丙酮的一亞硝基鉄氰化物反应	154
实验 185	丙酮的特殊試驗	155
实验 186	尿胆素及尿胆素原的波戈莫洛夫反应	155
实验 187	螢光实验	155
附錄		156
基本的吹玻璃工作		156
溶液的濃度		162
關於滴定溶液的一些参考知識		164
稀釋的規則		166
蛋白質部分的計算圖表		167
某些試劑及製劑的製备		168
参考表		170

緒 論

根据教学計劃，獸医学院的生物化学及物理化学与膠体化学原理实验課的時数分配为 56 小時。这就說明了本書篇幅不大的原因。为了对所希望的实验項目的配合有选择的可能性，所以書中所列的实验比一个学期內所能完成的多一些。

在敘述物理化学反应的時候，對於獸医實驗室裏廣泛应用的 pH 值的測定法和一些說明膠粒習性的实验法应特別加以注意。

在第二章裏敘述了醣、脂肪及蛋白質的分析反应，並附有系統分析表。

第三章裏所列的实验，使我們弄清楚消化液的成分，酶作用的規律性及維生素的反应。

第四章，敘述血液的物理化学的和生物学的特性。在这一章內主要地敘述了微量法，这种微量法便於綜合的測定血液的成分，在頗大的程度內提高了生物化学標誌的診斷意义。从生物化学方法中得出一些方法，这些方法的特点是具有精確性，簡易性，且执行起來不需要很多的時間。它們的多样性对学生是有很大的教育意义的。

布拉特科夫斯基 (Р. Х. Братковский) 的著作中对实验課(及对臨床檢查)特別有關的是：第一，在測定血液非蛋白氮 (остаточный азот) 時，不需在消化及蒸餾上花費時間；第二，可測定十分之幾毫升血漿中的總蛋白質及清蛋白部分的量。在一些方法裏使用一系列標準有色溶液來作比色測定法，大大的便利了实验的進行。

血液的铁及氧容积的测定,使学生們有可能獲得檢驗血紅蛋白計讀數的技能;这种血紅蛋白計,學生們在臨床實踐上必須使用。

乳及尿的分析列在第五章。

在敘述許多方法時,曾說明了这些方法在獸医科学研究上及臨床工作上的意义。書中所介紹的是家畜血液及尿的成分的平均數值。但应注意到由於家畜的飼养、飼料及研究所用方法的多样性,試驗時所獲得的數值不可能希望和文献上所列的數值完全符合。因此通常應該在对照動物組或在實驗期前進行平行觀察。

必須在一部分的實驗課中,講解操作方法精確度的檢查法。在这方面由學生們親自製备任何物質的標準溶液,且使試驗獲得的結果和理論上的數值相符合,这对學生們是大有教益的。这些練習使初学的人拋棄执行分析的老一套办法。

在實驗課程的末尾,使學生們养成吹玻璃的基本技術,因而使他們能在以後的實驗室工作中使用已有的一套玻璃材料,迅速裝置必要的設備,設計新的儀器,修理量筒,吸量管,滴定管,試管等等,这是有益的。这样不僅使工作方便,而且節省實驗室的經費開支。

阿斯丹寧教授

第一章 物理化学反应

米哈艾利斯(Михаэлис)指示剂的特性 指示剂颜色的改变决定于溶液的 pH 值。这是由于它们分子结构的变化及电离作用所致。

硝基酚类指示剂之结构:

间-硝基酚;

对-硝基酚;

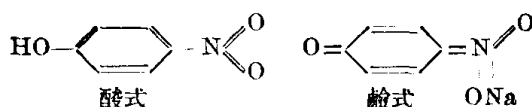
γ -二硝基酚(1-羟-2,5-二硝基酚);

α -二硝基酚(1-羟-2,4-二硝基酚);

β -二硝基酚(1-羟-2,6-二硝基酚)。

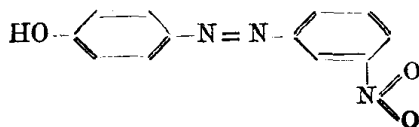
这些指示剂在碱式时具有醌型结构,且为对硝基酚互变酸 (нитрофеновая кислота) 的盐类。

对硝基酚



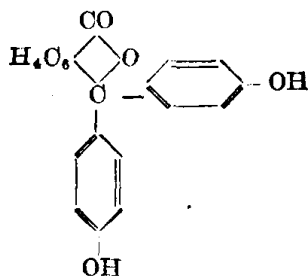
茜素指示剂当转变为碱式时,生成了相似的对硝基酚互变酸的盐。

这个指示剂的酸式结构为:

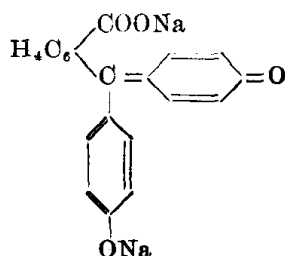


酚酞是苯二甲酸的衍生物。

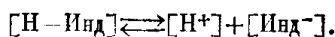
酚酞的酸性无色式:



酚酞的鹼性有色式：



米哈艾利斯的單色指示剂，依照下列方程式电离：



酸式

鹼式

根据質量作用定律，指示剂的电离常数为：

$$K = \frac{[\text{H}^+] \times [\text{Инд}^-]}{[\text{H}-\text{Инд}]},$$

由此得出

$$[\text{H}^+] = K \frac{[\text{H}-\text{Инд}]}{[\text{Инд}^-]}.$$

兩边各取对數並將符号改变，則得

$$-\log [\text{H}^+] = -\log K + \log \frac{[\text{Инд}^-]}{[\text{H}-\text{Инд}]},$$

即

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{鹼式}}{\text{酸式}}.$$

若 pH 等於 pK 的話，那麼酸式的濃度就等於鹼式的濃度。

当將 pH 值減少一个單位時，指示剂的鹼式的量就減少到十分之一。

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{1}{10} = \text{pK} - 1.$$

当將 pH 值增加一个單位時，指示剂的酸式的量就減少到十分之一。

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{10}{1} = \text{pK} + 1.$$

由此可知，在环境酸化時，指示剂的电离作用減低，在环境鹼化時，則增高。

每种指示剂的敏感度僅表現在 pH 值的一定範圍內，如表 1 所示。

表 1. 米哈艾利斯指示剂的特性

指 示 剂	pK	在变色區外酸式方面的溶液	变色範圍的 pH	在变色區外鹼式方面的溶液
β-二硝基酚	3.69	無色	2.2 - 4.0	黃色
α-二硝基酚	4.06	無色	2.8 - 4.5	黃黃色
γ-二硝基酚	5.15	無色	4.0 - 5.5	黃黃色
对-硝基酚	7.18	無色	5.2 - 7.0	黃黃色
間-硝基酚	8.33	無色	6.7 - 8.4	紅色
酚酞	9.73	無色	8.5 - 10.5	紅色
茜 草 黃	11.16	無色	10.0 - 12.0	黃色

表 2. 米哈艾利斯指示剂储备溶液的浓度

指 示 剂	指示剂的量(克)	溶剂的量(毫升)	
		水	酒精
β -二硝基酚	0.1	300	—
α -二硝基酚	0.1	200	—
γ -二硝基酚	0.1	200	—
对-硝基酚	0.1	100	—
间-硝基酚	0.3	100	—
酚酞	0.04	70	30
茜草黄	0.05	50	50

实验 1. pH 值的比色测定法 (应用米哈艾利斯指示剂组)

米哈艾利斯指示剂永久标准系的制备 在直径相等而具有供封闭用的细颈的无色试管上,以标籤标明与试管中溶液颜色相当的 pH 值。於每一试管中按照表 3 所指示的数量加入指示剂的储备溶液(用水稀释 1:9)。加入 0.1N 的碳酸钠溶液使液体的体积至 7 毫升,然後將各试管封闭。

表 3. 为组成颜色系所需储备溶液的数量①

系 别	1	2	3	4	5	6	7	8	9
间硝基酚									
毫升	5.2	4.2	3.0	2.3	1.5	1.0	0.66	0.43	0.27
pH	8.4	8.2	8.0	7.8	7.6	7.4	7.2	7.0	6.8
对硝基酚									
毫升	4.05	3.0	2.0	1.4	0.94	0.63	0.40	0.25	0.16
pH	7.0	6.8	6.6	6.4	6.2	6.0	5.8	5.6	5.4
γ -二硝基酚									
毫升	6.6	5.5	4.5	3.4	2.4	1.65	1.1	0.74	—
pH	5.4	5.2	5.0	4.8	4.6	4.4	4.2	4.0	—
α -二硝基酚									
毫升	6.7	5.7	4.6	3.4	2.5	1.74	1.20	0.78	0.51
pH	4.4	4.2	4.0	3.8	3.6	3.4	3.2	3.0	2.8
β -二硝基酚									
毫升	2.44	1.68	1.15	0.75	0.49	—	—	—	—
pH	3.2	3.0	2.8	2.6	2.4	—	—	—	—

① 預先將储备液用水精確地按 1:9 稀释。

有色液体(帶有米哈艾利斯指示剂) pH 之比色測定, 祇可能

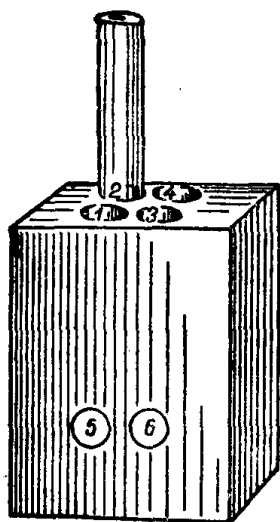


圖 1. 比色器。

在比色器(圖 1)中進行。比色器是一个長方形的木塊,由上而下鑽四个洞,於此插入試管,並且在与这些洞成垂直的方向鑽两个直徑較小的洞(5 及 6, 在試管下部 $\frac{1}{3}$ 处)用以觀察前面二个試管中液体顏色之差異。光線从光源通过毛玻璃發射出來。

比色器中試管的佈置是这样的: 第一个洞——含有指示剂之被試溶液; 第二洞——水; 第三洞——指示剂之标准溶液及第四洞——無指示剂之試驗溶液。

前面的一对試管放在第一及第三洞, 後面的一对放置在第二及第四洞。当試管这样佈置時, 觀看的效果同样地決定於被試溶液及指示剂的混合顏色。

具有强烈緩衝作用的液体,用蒸餾水或鹽溶液加以稀釋,可以使它原來的顏色減弱。如以 2% 的氯化鈉稀釋尿 1:2—3; 以 0.85% 的氯化鈉稀釋血漿或血清 1:9; 以同样的溶液稀釋培养基 1:2—3 (細菌渾濁物不妨碍測定)。測定稠濃培养基(瓊脂,白明膠)的 pH 值時,先在水浴上熔化,且必要時用水稀釋。取液体培养基 6 毫升,加 1 毫升适当的指示剂溶液,並冷却至膠凍生成为止,膠凍並不妨碍在比色器中的觀察。

pH 值的比色測定以 0.85% 的氯化鈉溶液按 1:2 稀釋培养基,將 6 毫升的培养基及 1 毫升的間硝基酚混合置於比色器的 №1 試管中。注 7 毫升水於 №2 試管,在 №4 試管注入 6 毫升已被稀釋的培养基及 1 毫升水。將标准試管之一放置於 №3 洞中。

若被試溶液(帶有指示剂)的顏色与标准系極端試管溶液的顏色相似,应重複地比較被試溶液的顏色与隣近的标准系試管溶液的顏色。

假定被試溶液的 $\text{pH} > 8.4$, 就應該用酚酞(pH 值由 8.45 到 10.3)或黃茜草(pH 值由 10.0 到 12.0), 依照米哈艾里斯的滴定法測定之。为此注 10 毫升被試溶液及 1 毫升指示剂溶液(假定为酚酞)於一試管中。指示剂的一部分就电离,且使溶液呈現顏色。於另一試管中注 9—10 毫升 0.01 N 苛性鈉溶液(新由 0.1 N 配製的), 由微量滴定管用酚酞(被稀釋为 1:9)溶液滴定至与被試溶液顏色相同为止。必要時使用比色器。加 0.01 N 鹼溶液於第二試管,使其液体容積成为 11 毫升。因此必須選擇指示剂的稀釋度並重新滴定之。

在 0.01 N 鹼溶液中,指示剂完全电离。这样利用滴定,可以知道指示剂在被試溶液中之电离部分,从而使用表 4 來確定 pH 值。表中 F 代表滴定第二試管中 0.01 N 鹼液時所消耗的未稀釋的指示剂的毫升數。

表 4. F 及 pH 值間的对比關係(在 18° 時)

F	pH	F	pH	F	pH
酚 酞					
0.010	8.45	0.16	9.10	0.55	9.80
0.014	8.50	0.21	9.20	0.60	9.90
0.080	8.60	0.27	9.30	0.65	10.00
0.047	8.70	0.34	9.40	0.70	10.10
0.069	8.80	0.40	9.50	0.75	10.20
0.090	8.90	0.45	9.60	0.80	10.30
0.120	9.00	0.50	9.70		
茜 黃 草					
0.18	10.00	0.36	10.80	0.66	11.40
0.16	10.20	0.46	11.00	0.75	11.60
0.22	10.40	0.51	11.10	0.83	11.80
0.29	10.60	0.56	11.20	0.88	12.00

应用这些指示剂進行測定時,若溫度高於 18° , 則 pH 值就減

低：溫度每升高一度，酚酞減低 0.011，茜草黃減低 0.013。

当沒有米哈艾利斯标准色系時，也可利用硝基酚系指示剂，根据上述方法進行滴定。在这裏利用下列的方程式來算出 pH 值：

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{F}{1-F},$$

式中 F —指示剂之鹼式量；

$1-F$ —指示剂之酸式量；

pK —指示剂电离常数的負对數。不同溫度的 pK 值列於表 5。

假定滴定鹼溶液，用去了稀釋至 10 倍的間硝基酚 1 毫升(即沒有稀釋的溶液 0.1 毫升)。因此，被試溶液之 pH 值將等於(当 18° 時)：

$$\begin{aligned} 8.33 + \log \frac{0.1}{1-0.1} &= 8.33 + \log \frac{1}{9} = \\ &= 8.33 - \log 9 = 8.33 - 0.95 = 7.38. \end{aligned}$$

为簡化計算，在表 6 引入 Z 的數值：

$$Z = \log \frac{F}{1-F}.$$

相应的 F 的數值，是藉实验的方法求得的。

表 5. 不同溫度時指示剂的 pK 值

溫度(°C)	β -二硝基酚	α -二硝基酚	γ -二硝基酚	对硝基酚	間硝基酚
0	3.79	4.16	5.24	7.39	8.47
5	3.76	4.13	5.21	7.33	8.43
10	3.74	4.11	5.18	7.27	8.39
15	3.71	4.08	5.16	7.22	8.35
18	3.69	4.06	5.15	7.18	8.33
20	3.68	4.05	5.14	7.16	8.31
25	3.65	4.02	5.11	7.10	8.27
30	3.62	3.99	5.09	7.04	8.22
35	3.59	3.96	5.07	6.98	8.18
40	3.56	3.93	5.04	6.93	8.15
45	3.54	3.91	5.02	6.87	8.11
50	3.51	3.88	4.99	6.81	8.07