



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

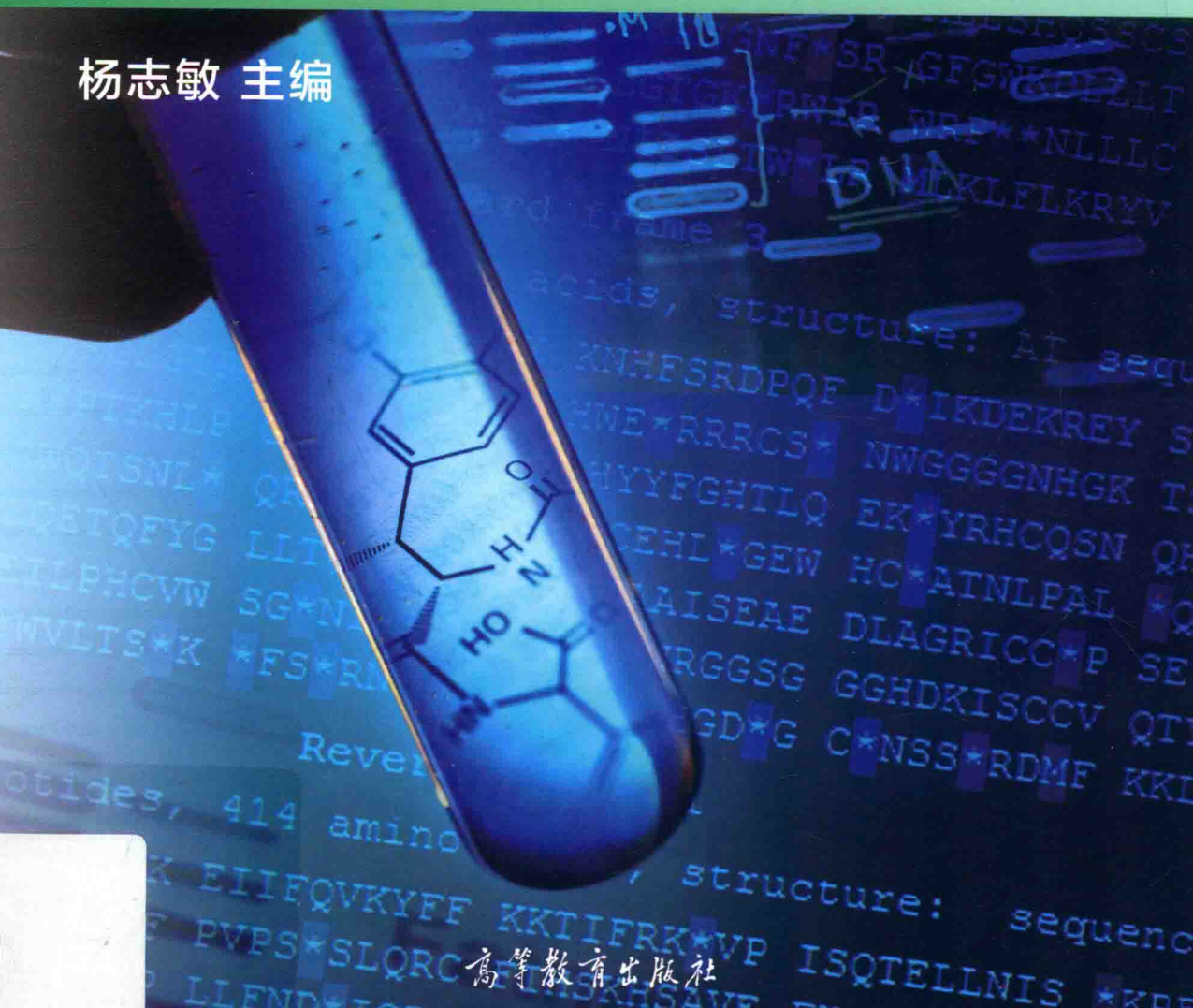


大学生实践教学改革系列教材

生物化学实验

Experiment of Biochemistry

杨志敏 主编



高等教育出版社



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材



大学生实践教学改革系列教材

S H E N G W U H U A X U E S H I Y A N

生物化学实验

Experiment of Biochemistry

主 编 杨志敏（南京农业大学）

副主编（按姓氏笔画排序）

王 征（湖南农业大学）	王松华（安徽科技大学）
陈 熙（南京农业大学）	侯春燕（河北农业大学）
段江燕（山西师范大学）	崔喜艳（吉林农业大学）
阚国仕（沈阳农业大学）	

编 委（按姓氏笔画排序）

王 征（湖南农业大学）	王松华（安徽科技大学）
刘鹏举（沈阳农业大学）	杨志敏（南京农业大学）
芮 琪（南京农业大学）	张 炜（南京农业大学）
张阿英（南京农业大学）	陈 熙（南京农业大学）
陈红漫（沈阳农业大学）	侯春燕（河北农业大学）
段江燕（山西师范大学）	崔喜艳（吉林农业大学）
梁丽琴（山西师范大学）	阚国仕（沈阳农业大学）
谭小云（南京农业大学）	

主 审 徐朗莱（南京农业大学）

高等教育出版社·北京

内容提要

本书为“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材《生物化学》的配套实验教材,内容包括糖类、氨基酸、蛋白质、脂质、核酸、酶及维生素等物质的分离与提取、定性鉴定和定量测定,使读者掌握各种电泳、层析、离心及光谱检测技术,独立开展各种综合性和设计性实验。

本书可作为高等院校生物、农林相关专业的生物化学实验课程教材,也可供研究生或科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验 / 杨志敏主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2015.8

ISBN 978-7-04-043134-6

I. ①生… II. ①杨… III. ①生物化学-化学实验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 162800 号

策划编辑 孟 丽 责任编辑 高新景 封面设计 张申申 责任印制 毛斯璐

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印 刷 三河市骏杰印刷有限公司
开 本 787mm × 1092mm 1/16
印 张 8.25
字 数 200千字
购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 2015年8月第1版
印 次 2015年8月第1次印刷
定 价 18.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 43134-00

数字课程 (基础版)

生物化学实验

主编 杨志敏

登录方法:

1. 访问<http://abook.hep.com.cn/43134>, 点击页面右侧的“注册”。已注册的用户直接输入用户名和密码, 点击“进入课程”。
2. 点击页面右上方“充值”, 正确输入教材封底的明码和密码, 进行课程充值。
3. 已充值的数字课程会显示在“我的课程”列表中, 选择本课程并点击“进入课程”即可进行学习。

自充值之日起一年内为本数字课程的有效期
使用本数字课程如有任何问题
请发邮件至: lifescience@pub.hep.cn



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

生物化学实验

主编 杨志敏

用户名 密码 验证码 0930 进入课程

注册

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

生物化学实验数字课程与纸质教材一体化设计, 紧密配合。数字课程涵盖电子教案、拓展资料及网络链接等板块; 充分运用多种形式媒体资源, 丰富知识的呈现形式, 拓展教材内容, 为学生学习提供思维与探索的空间。

相关教材



生物化学 (第3版)
杨志敏

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/43134>

前 言

21 世纪是生命科学高速发展的世纪。同时,生物技术的创新使人类活动发生了巨大的变化,尤其是给农业生产带来了重大的革新,这些变化都离不开生物化学学科的发展。与传统的生物化学概念不同,现代生物化学概念在深度和广度上都有了前所未有的延伸。现代生物化学在分子水平上研究和探索生物体内化学分子的结构与功能,研究生命活动过程中各种分子代谢变化和调节机制。生物学家为了要了解各种生物的生长发育、生理代谢、遗传、衰老、疾病、生命起源和演化等现象,都需要用生物化学的实验、方法对之进行探讨。

生物化学实验技术不仅是生物化学研究的重要内容和基础,也是生物化学研究的重要方法与手段。学生通过生物化学实验课程不仅可以学到生物化学的基本原理、方法、技术(包括各种仪器的使用),还能进一步巩固生物化学的基本理论知识,从而为后继的课程学习打下扎实的基础。

作为《生物化学》(高等教育出版社,杨志敏主编)的配套教材,本书可以为高等院校的学生提供必需的参考。通过本书的学习,学生能掌握糖类、氨基酸、蛋白质、脂质、核酸、酶及维生素等物质的分离与提取、定性鉴定和定量测定,掌握各种电泳、层析、离心及光谱检测技术,独立开展各种综合性和设计性的实验。

本书融会了各兄弟院校(包括南京农业大学、沈阳农业大学、河北农业大学、湖南农业大学、山西师范大学、吉林农业大学、云南农业大学及安徽科技大学等)长期进行的各种成熟的实验内容,具有很好的实际操作性和广泛的适用性。本书可供高等院校生物、农林等专业的学生使用,也可以作为生物化学实验、生物化学分析以及分子生物学实验等课程的教材和参考书。

本书的编写工作得到了各编委所在院校的大力支持。高等教育出版社在立项和编写过程中给予了鼓励与帮助。由于大家共同努力,本教材才得以顺利地完。编者水平有限,书中难免有不足之处,竭诚希望广大读者提出宝贵意见。

杨志敏

2015 年 6 月

目 录

第一篇 生物化学基础性实验 / 1

第一章 糖类 / 2

实验 1 3,5-二硝基水杨酸比色法测定样品中还原糖和总糖的含量 / 2

实验 2 糖的薄层层析 / 5

实验 3 蒽酮法测定植物叶片中可溶糖含量 / 9

实验 4 糖酵解中间产物的鉴定 / 11

第二章 氨基酸 / 14

实验 5 氨基酸的分离鉴定——纸层析法 / 14

实验 6 植物组织中氨基酸含量的测定 / 16

第三章 蛋白质 / 19

实验 7 蛋白质含量测定——Folin-酚比色法 / 19

实验 8 蛋白质含量测定——考马斯亮蓝 G-250 法 / 21

实验 9 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离小麦幼苗过氧化物酶同工酶 / 24

实验 10 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白 / 32

实验 11 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白 / 34

实验 12 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析大米蛋白质 / 39

第四章 核酸 / 45

实验 13 醋酸纤维素薄膜电泳分离鉴定三种腺苷酸 / 45

实验 14 植物基因组 DNA 提取(CTAB 法) / 47

实验 15 动物肝 DNA 的提取与检测 / 48

实验 16 酵母 RNA 的提取与制备 / 50

第五章 酶 / 52

实验 17 脲酶 K_m 值的测定 / 52

实验 18 大蒜 SOD 的提取分离与活性测定 / 55

实验 19 淀粉酶活性的测定 / 58

实验 20 硝酸还原酶活性的测定 / 60

实验 21 过氧化氢酶活性的测定 / 63

实验 22 氨基移换反应——血液中转氨酶活力的测定 / 65

第六章 脂质 / 69

实验 23 脂肪酸的 β -氧化 / 69

实验 24 粗脂肪的提取及含量的测定 / 71

实验 25 游离脂肪酸含量的快速测定 / 73

第七章 代谢 / 75

实验 26 植物组织中丙酮酸含量的测定 / 75

实验 27 发酵过程中无机磷的测定 / 76

实验 28 反滴定碘量法对果蔬维生素 C 的测定 / 78

第二篇 生物化学综合性实验 / 81

第八章 综合部分 / 82

实验 29 苯丙氨酸解氨酶的提取、纯化及活性测定 / 82

实验 30 真菌多糖的提取、分离纯化及其还原力测定 / 88

实验 31 葡聚糖凝胶柱层析分离核黄素和血红蛋白 / 91

附录 / 94

附录一 植物样品的采取、处理与保存 / 94

附录二 实验室安全与防护知识及常识 / 97

附录三 基础生物化学实验室常用仪器简介 / 102

附录四 常用缓冲溶液的配制 / 109

附录五 硫酸铵饱和度的常用表 / 116

附录六 氨基酸的一些理化常数 / 118

附录七 常用酸碱和固态化合物的一些数据 / 120

常见缩写词 / 122

参考文献 / 123

第一篇

生物化学基础性实验

第一章 糖 类

实验 1 3,5-二硝基水杨酸比色法测定样品中还原糖和总糖的含量

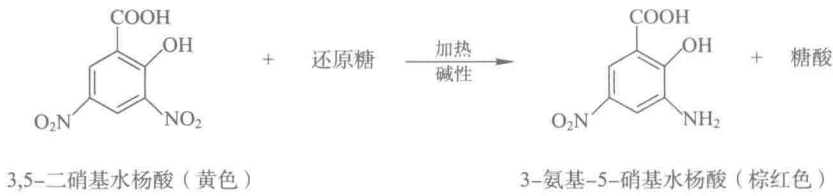
一、目的与要求

- (1) 掌握还原糖测定的基本原理,学习比色法测定还原糖的操作方法和分光光度计的使用。
- (2) 了解 3,5-二硝基水杨酸与还原糖反应条件及产物,以及此法应用领域。
- (3) 查阅相关资料,对比此法与其他测糖方法的区别及优缺点。

二、实验原理

还原糖的测定是糖定量测定的基本方法。还原糖是指含有自由醛基或酮基的糖类,单糖都是还原糖,双糖和多糖不一定是还原糖,其中乳糖和麦芽糖是还原糖,蔗糖和淀粉是非还原糖。利用糖不同的溶解度,可将植物样品中的单糖、双糖和多糖分别提取出来,对没有还原性的双糖和多糖,可用酸水解法使其降解成有还原性的单糖后再进行测定,进而通过公式计算出样品中还原糖的含量(还原糖以葡萄糖含量计),也可进一步计算出总糖含量。

还原糖在碱性条件下加热被氧化成糖酸及其他产物,3,5-二硝基水杨酸则被还原为棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸,反应式如下。



在一定范围内,还原糖的量与棕红色物质颜色的深浅成正比例关系,利用分光光度计,在 540 nm 波长下测定吸光度,查对标准曲线并计算,便可求出样品中还原糖的含量。由于多糖水解为单糖时,每断裂一个糖苷键须加入一分子水,所以在计算多糖含量时应乘以 0.9。

三、实验材料与器材

- (1) 实验材料:小麦面粉,精密 pH 试纸。
- (2) 器材:100 mL 烧杯 × 1,1 000 mL 烧杯 × 1,100 mL 三角瓶 × 1,50 mL 离心管 × 2,100 mL 容量瓶 × 3,1 000 mL 容量瓶 × 1,20 mL 具塞玻璃刻度试管 × 11,1 mL 移液管 × 1,2 mL 移液管 × 2,10 mL 移液管 × 1 或移液器,培养皿等。

四、溶液配制

1. 1 mg/mL 葡萄糖标准液的配制

用分析天平准确称取 80 ℃ 烘至恒重的分析纯葡萄糖 100 mg,置于 100 mL 小烧杯中,加少量蒸馏水溶解后,转移到 100 mL 容量瓶中,将溶解用的小烧杯洗涤三次,合并洗液至容量瓶中,

再用蒸馏水小心定容至 100 mL,混匀,4℃冰箱中保存备用。

2. 3,5-二硝基水杨酸(DNS)的配制

将 6.3 g DNS 和 262 mL 2 mol/L NaOH 溶液,加到 500 mL 含有 185 g 酒石酸钾钠的热水溶液中,再加 5 g 结晶酚和 5 g 亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后加蒸馏水定容至 1 000 mL,储于棕色瓶中,在室温下放置 7~10 天后使用。

3. 碘-碘化钾溶液的配制

称取 5 g 碘和 10 g 碘化钾,溶于 100 mL 蒸馏水中。

4. 酚酞指示剂的配制

称取 0.1 g 酚酞,溶于 250 mL 70% 乙醇溶液中。

5. 100 mL 6 mol/L HCl 的配制

取 50 mL HCl(商品 HCl 试剂为 12 mol/L),贴壁缓慢小心加入 50 mL 蒸馏水即为 6 mol/L HCl。

6. 100 mL 6 mol/L NaOH 的配制

量取 80 mL 去离子水置于 100~200 mL 塑料烧杯中(NaOH 溶解过程中大量放热,有可能使玻璃烧杯炸裂)。称取 24 g NaOH 小心地逐渐加入到塑料烧杯中,边加边搅拌。待 NaOH 完全溶解后,用去离子水将溶液体积定容至 100 mL。将溶液转移至塑料容器中后,室温保存。

五、仪器与设备

离心机,分光光度计,恒温水浴锅,沸水浴锅,分析天平,扭力天平等。

六、基本步骤

1. 制作葡萄糖标准曲线

取 7 支 20 mL 具塞刻度试管编号,按表 1-1 分别加入浓度为 1 mg/mL 的葡萄糖标准液、蒸馏水和 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂,配成不同葡萄糖含量的反应液。

表 1-1 葡萄糖标准曲线制作

管号	1 mg/mL 葡萄糖 标准液/mL	蒸馏水/mL	DNS/mL	葡萄糖含量 /mg	吸光度 A_{540}
0	0	2	1.5	0	
1	0.2	1.8	1.5	0.2	
2	0.4	1.6	1.5	0.4	
3	0.6	1.4	1.5	0.6	
4	0.8	1.2	1.5	0.8	
5	1.0	1.0	1.5	1.0	
6	1.2	0.8	1.5	1.2	

将加好反应液的各管充分摇匀,在沸水浴中准确加热 5 min,取出,冷却至室温,分别用蒸馏水定容至 20 mL,加塞后颠倒混匀,在分光光度计上进行比色。调波长 540 nm,用 0 号管调零点,测出 1~6 号管的吸光度。以吸光度为纵坐标,葡萄糖含量(mg)为横坐标,在坐标纸上绘出

葡萄糖标准曲线。

2. 样品中还原糖和总糖的测定

(1) 还原糖的提取:准确称取 3.00 g 食用面粉,放入 100 mL 烧杯中,先用少量蒸馏水调成糊状,然后加入 50 mL 蒸馏水,搅匀,置于 50 ℃ 恒温水浴中保温 20 min,使还原糖浸出。将浸出液(含沉淀)转移到 50 mL 离心管中,于 4 000 r/min 下离心 5 min,沉淀可用 20 mL 蒸馏水洗一次,再离心,将二次离心的上清液收集在 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至 100 mL,混匀,作为还原糖待测液。

(2) 总糖的水解和提取:准确称取 1.00 g 食用面粉,放入 100 mL 三角瓶中,加 15 mL 蒸馏水及 10 mL 6 mol/L HCl,置沸水浴中加热水解 30 min(水解是否完全可用碘-碘化钾溶液检测)。待三角瓶中的水解液冷却后,加入 1 滴酚酞指示剂,用 6 mol/L NaOH 中和至微红色,用蒸馏水定容在 100 mL 容量瓶中,混匀。将定容后的水解液过滤,取滤液 10 mL,移入另一 100 mL 容量瓶中定容,混匀,作为总糖待测液。

(3) 显色和比色:取 4 支 20 mL 具塞刻度试管,编号,按表 1-2 所示分别加入待测液和显色剂,空白调零可使用制作标准曲线的 0 号管。加热、定容和比色等其余操作与制作标准曲线的各项操作相同。

表 1-2 样品还原糖测定

管号	还原糖待测液 /mL	总糖待测液 /mL	蒸馏水 /mL	DNS /mL	吸光度 A_{540}	利用葡萄糖标准 曲线查得待测液中 葡萄糖含量/mg
7	0.5		1.5	1.5		
8	0.5		1.5	1.5		
9		1	1	1.5		
10		1	1	1.5		

七、结果与计算

计算出 7、8 号管吸光度的平均值和 9、10 号管吸光度的平均值,在标准曲线上分别查出相应的还原糖质量(mg),按下式计算出样品中还原糖和总糖的百分含量。

$$\text{还原糖}(\%) = \frac{\text{查曲线所得葡萄糖质量}(\text{mg}) \times \frac{\text{提取液总体积}(\text{mL})}{\text{测定时取用体积}(\text{mL})}}{\text{样品质量}(\text{mg})} \times 100$$
$$\text{总糖}(\%) = \frac{\text{查曲线所得水解后还原糖质量}(\text{mg}) \times \text{稀释倍数}}{\text{样品质量}(\text{mg})} \times 0.9 \times 100$$

八、注意事项

- (1) 配制葡萄糖标准液时,一定要 80 ℃ 烘至恒重。
- (2) 3,5-二硝基水杨酸(DNS)要储于棕色瓶中,在室温下放置 7~10 天后使用。
- (3) 在定容时一定要沿容量瓶壁或试管壁等滑水,否则将会产生很多泡沫,影响实验结果。

(4) 注意沸水浴时,不要烫伤,一旦烫伤,应立即用凉水冲洗,降低烧伤度,之后再到医院就诊。

(5) 按操作方法正确使用分光光度计和拿取比色杯。

(6) 在实验未结束时,应保存好 0 号管的试液。

(7) 在沸水浴时,注意试管的捆绑,不要倾倒在水浴锅中。

(8) 离心时对称位置的离心管必须配平。

(9) 标准曲线制作与样品测定应同时进行显色,并使用同一空白调零点和比色。

(10) 面粉中还原糖含量较少,计算总糖时可将其合并入多糖一起考虑。

九、实践应用

(1) 在科研实践中,测定各样品中的还原糖含量。

(2) 在生产实践中,测定产品中的还原糖含量。

十、思考与探索

(1) 3,5-二硝基水杨酸比色法是如何对总糖进行测定的?

(2) 如何正确绘制和使用标准曲线?

实验 2 糖的薄层层析

一、目的与要求

(1) 了解并初步掌握吸附层析的原理。

(2) 学习薄层层析的一般操作及定性鉴定的方法。

(3) 学会使用硅胶板薄层层析。

二、实验原理

薄层层析是一种广泛应用于氨基酸、多肽、核苷酸、脂肪类、糖脂和生物碱等多种物质的分离和鉴定的层析方法。由于层析是在吸附剂或支持介质均匀涂布的薄层上进行的,所以称为薄层层析。

薄层层析的原理:根据样品组分与吸附剂的吸附力,及其在展层溶剂中的分配系数不同而使混合物分离。当展层溶剂移动时,会带着混合样品中的各组分一起移动,并不断发生吸附与解吸附作用以及反复分配作用。根据各组分在溶剂中溶解度不同和吸附剂对样品各组分的吸附能力的差异,最终将混合物分离成一系列的斑点。如果把标准样品在同一层析薄板上一起展开,便可通过在同一薄板上的已知标准样品的 R_f 值和未知样品各组分的 R_f 值进行对照,就可初步鉴定未知样品各组分的成分。

糖的分离鉴定:可用吸附剂或支持剂中添加适宜的黏合剂后,再涂布于支持板上,可使薄层黏牢在玻璃板(或涤纶片基)这类基底上。

硅胶 G 是一种已添加了黏合剂——石膏(CaSO_4)的硅胶粉,糖在硅胶 G 薄层上的移动速率与糖的相对分子质量和羟基数等有关。经适当的溶剂展开后,糖在硅胶 G 薄板上的移动距离为戊糖 > 己糖 > 双糖 > 三糖。若采用硼酸溶液代替水调制硅胶 G 制成的薄板,可提高糖的分离效果。如对已分开的斑点显色,而将与它位置相当的另一个未显色的斑点,从薄层上与硅胶

G 一起刮下,以适当的溶液将糖从硅胶 G 上洗脱下来,就可用糖的定量测定方法,测出样品中各组分的糖含量。

薄层层析的展层方式有上行、下行和近水平等。一般采用上行法,即在具有密闭盖子的玻璃缸(即层析缸)中进行,将适量的展层溶液倒于缸底,把点有样品的薄层板放入缸中即可。保证层析缸内有充分展层溶剂的饱和蒸气是实验成功的关键。

三、实验材料与器材

硅胶 G 粉,烧杯,玻璃板(8 cm × 12 cm),微量吸头或毛细管($\phi 0.5$ mm),直尺,铅笔,玻璃棒等。

四、溶液配制

(1) 10 g/L 糖标准溶液:取木糖(或棉子糖)、葡萄糖、蔗糖各 1 g,分别用 75% 乙醇溶解并定容到 100 mL。

(2) 10 g/L 糖标准混合溶剂:取上述各种糖各 1 g,混合后用 75% 乙醇溶解并定容至 100 mL。

(3) 0.1 mol/L 硼酸(H_3BO_3)溶液。

(4) 展层溶剂:氯仿:甲醇 = 60:40(V/V)。

(5) 苯胺-二苯胺-磷酸显色剂:1 g 二苯胺溶于由 1 mL 苯胺、5 mL 85% 磷酸溶液、50 mL 丙酮组成的混合溶液中。

五、仪器与设备

层析缸($\phi 15$ cm × 30 cm),喷雾器,烘箱,干燥器等。

六、基本步骤

1. 硅胶 G 薄层板的制备

(1) 将制备薄层用的玻璃板预先用洗液洗干净并烘干,玻璃板要求表面光滑。

(2) 称取硅胶 G 粉 6 g,加入 12 mL 0.1 mol/L 硼酸溶液,用玻璃棒在烧杯中慢慢搅拌至硅胶浆液分散均匀、黏稠度适中。然后倾倒在干净、干燥的玻璃板上,倾斜玻璃或用玻璃棒将硅胶 G 由一端向另一端推动,使硅胶 G 铺成厚薄均匀的薄层。待薄板表面水分干燥后置于烘箱内,待温度升至 110 °C 后活化 30 min。冷却至室温后取出,置于干燥器中备用(注意:避免薄板骤热、骤冷使薄层断裂或在展层过程中脱落)。制成的薄层板,要求表面平整,厚薄均匀。

(3) 手工涂布薄板的方法

① 玻璃棒涂布:选用一根直径为 1 ~ 1.2 cm 的玻璃棒或玻璃管在两端绕几圈胶布,胶布的圈数视薄层的厚度而定,常用厚度为 0.56 ~ 1.0 mm,把吸附剂倒在玻璃板上,用这根玻璃棒在玻璃上将吸附剂向一个方向推动,即成薄板,如图 1-1 所示。

② 倾斜涂布:将吸附剂浆液倒在玻璃上,然后倾斜使吸附剂漫布于玻璃板上成薄层。

2. 点样

取制备好的薄板一块,在距底边 1.5 cm 处画一条直线,在直线上每隔 1.5 ~ 2 cm 作一记号(用铅笔轻点一下,不可将薄层刺破),共 4 个点。用 0.5 mm 直径的毛细管,吸取糖样品量 5 ~ 50 μ g,点样体积 1 ~ 1.5 μ L,可分次滴加,控制点样斑点直径不超过 2 mm。在点样过程中可用吹风机,冷热风交替吹干样品,也可以让点的样自然干燥。

3. 展层

将已点样的薄板点样一端,放入盛有展层溶剂的层析缸中(图 1-2),展层液面不得超过点样线。层析缸密闭,自下向上展层,当展层溶剂到达距薄析顶端约 1 cm 处时取出薄板,前沿用铅笔或小针作一记号。60 ℃ 烘箱内烘干或晾干。

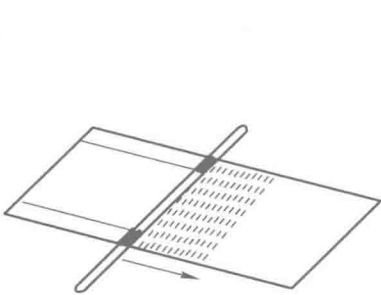


图 1-1 用玻璃棒涂铺薄层

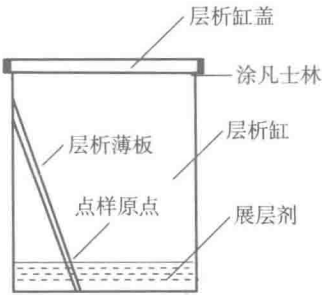


图 1-2 层析装置

4. 显色

将苯胺-二苯胺-磷酸显色剂,均匀喷雾在薄层上,置 85 ℃ 烘箱内加热至层析斑点显现(见图 1-1),此显色剂可使各种糖显现出不同的颜色,如表 1-3 所示。

表 1-3 各种糖的颜色

糖的种类	木糖	葡萄糖	蔗糖
显色	黄绿	灰蓝色绿	蓝褐

5. 样品中糖定性鉴定

(1) 薄层显色后,根据各显色斑点的颜色相对位置,测算 R_f 值:将混合样品图谱与标准样品图谱相比较或通过混合样品与标准样品 R_f 值的比较(图 1-3),确定混合样品中所分离的各个斑点分别为何种糖。

(2) 影响 R_f 值的因素

① 展层溶剂的样品组分的性质:样品组分若在固定相中溶解度较大,在流动相中溶解度小,则 R_f 值小;反之, R_f 值大。

② 吸附剂的性质和质量:不同批号和厂家的产品,其性质和质量不尽相同。

③ 吸附剂的活度。

④ 薄层的厚度。

⑤ 层析槽的形状、大小和饱和度。

⑥ 展层方式。

⑦ 杂质的存在和量的多少。

⑧ 展层的距离。

⑨ 样品量。

⑩ 温度。

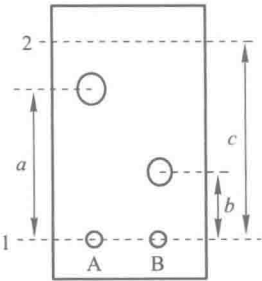


图 1-3 R_f 值测量示意

1. 点样起始线;2. 展层剂前沿

由于影响 R_f 值的因素很多,故不能仅根据 R_f 值来鉴定未知样品组分。一般采用几种薄层层析法来确证样品的未知组分。如一种用吸附薄层层析,另一种用聚酰胺薄层层析等。在实践中,也可把未知样品与标准品混合点样,然后进行薄层层析。在几个不同类型的薄层层析中,如果两者都不发生分离,则可证明这两个化合物是相同的。

七、注意事项

(1) 制备薄板时,薄板的厚度及均一性,对样品的分离效果和 R_f 值的重复作用影响很大,普通薄层厚度以 $250\ \mu\text{m}$ 为宜。若用薄层层析法制备少量的纯物质时,薄厚度可稍大些,常见为 $500\sim 700\ \mu\text{m}$,甚至 $1\sim 2\ \text{mm}$ 。

(2) 活化后的薄板在空气中不能放置太久,否则会因吸潮降低活性。

(3) 用于薄层层析的样品溶液的质量要求非常高,样品中必须不含盐,否则会引起严重的拖尾现象,甚至有时得不到正确的分离效果。

(4) 样品溶液应具有一定的浓度,一般为 $1\sim 5\ \text{g/L}$ 。若样品太稀,点样次数太多,就会影响分离效果,所以必须进行浓缩处理。

(5) 样品的溶剂最好使用挥发性的有机溶液(如乙醇、氯仿等),不宜用水溶液,因为水分子与吸附剂的相互作用力较弱,当它占据了吸附表面上的活性位置时,就会使吸附剂的活性降低,从而使斑点扩散。

(6) 样品点样量不宜太多,若点样量超载(即超过该吸附剂负载能力),则会降低 R_f 值,层析斑点的形状被破坏。点样量一般为几微克到几十微克,体积为 $1\sim 20\ \mu\text{L}$ 。

(7) 展层必须在装闭的器皿中进行,器皿事先应用展层溶液剂饱和,把薄板的点样端浸入展层剂中,深度为 $0.5\sim 1.0\ \text{cm}$ 。千万勿使点样斑点浸入展层溶剂中。

(8) 展层溶剂的选择

① 根据溶剂的结构、性质的不同而定,主要以溶液剂的极性大小为依据。在同一吸附剂上,溶剂极性越大,对同一性质的化合物的洗脱能力也越大,即在薄层板上把这一化合物推进越远, R_f 值也越大。如果发现用一种溶液只展开某一化合物,其 R_f 值太小,则可考虑换用另一种极性较大的溶剂,或在原来的溶剂中加入一定量极性较大的溶液进行展层。溶液极性大小次序如下:水 > 甲醇 > 正丙醇 > 丙酮 > 乙酸甲酯 > 乙酸乙酯 > 乙醚 > 氯仿 > 三氯甲烷 > 苯 > 三氯乙烯 > 四氯化碳 > 二硫化碳 > 石油醚。

② 根据被分离物质的极性和吸附剂的性质而定。在同一吸附剂上,不同化合物的吸附规律是:饱和碳氢化合物不易吸附或吸附不牢;不饱和碳氢化合物被吸附,含双键越多,吸附得越牢;碳氢化合物被一个功能基取代后,其吸附性增大。

③ 若样品组分具有酸碱性,则可将展层的 pH 作适当调整。若样品组分为碱性,则调节展层溶剂 pH 为碱性,以增加展层溶液的分辨率,使样品在薄板上展层后,斑点圆而集中,避免拖尾现象,反之亦然。

(9) 在薄层层析时,层析缸溶剂饱和度对分离效果影响较大,在不饱和层析缸中,展层易引起边缘效应,因为极性较弱的溶液和沸点较低的溶剂在边缘挥发得快,从而使样品组分在边缘的 R_f 值高于中部的 R_f 值,用饱和的层析缸可以消除边缘效应。

八、实践应用

薄层层析样品用量少(微克级)、时间短,可分离各种化合物,其应用范围主要在生物化学、医药卫生、化学工业、工业生产、食品和毒理分析等领域,对于天然化合物的分离和鉴定也已广泛应用。

九、思考与探索

- (1) 要获得良好的分离效果,实验操作上应注意哪些方面?
- (2) 薄层层析是根据被分离物质的哪些性质进行分离的?

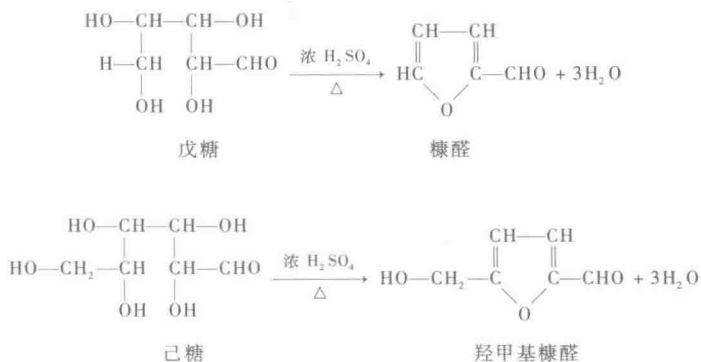
实验 3 蒽酮法测定植物叶片中可溶糖含量

一、目的与要求

- (1) 掌握可见光分光光度计的原理和操作方法。
- (2) 学习蒽酮法测定糖含量的原理和方法。
- (3) 了解其他糖含量测定方法。

二、实验原理

糖类遇浓硫酸将脱水生成糠醛或其衍生物,反应式如下:



糠醛或羟甲基糠醛进一步与蒽酮试剂缩合产生蓝绿色物质,其在可见光区 620 nm 波长处有最大吸收,且其光吸收值在一定范围内与糖的含量成正比关系。

此法可用于单糖、寡糖等可溶性糖类含量的测定,并具有灵敏度高,简便快捷,适用于微量样品的测定等优点。

三、实验材料与器材

- (1) 实验材料:小白菜或柑橘。
- (2) 器材:20 mL 具塞刻度试管(3 支),漏斗,100 mL 容量瓶,刻度试管,试管架,剪刀,研钵等。

四、溶液配制

- (1) 200 μg/mL 标准葡萄糖:AR 级 D-葡萄糖 100 mg,蒸馏水溶解,定容至 500 mL。

(2) 蒽酮试剂:1 g 蒽酮,用乙酸乙酯溶解,定容至 50 mL,棕色瓶避光处储藏。

(3) 浓硫酸(H_2SO_4)。

五、仪器与设备

可见光分光光度计,恒温水箱等。

六、基本步骤

1. 葡萄糖标准曲线的制作

取 6 支 20 mL 具塞试管,编号,按表 1-4 数据配制一系列不同浓度的标准葡萄糖溶液。

在每支管中均加入 0.5 mL 蒽酮试剂,再缓慢地加入 5 mL 浓硫酸,摇匀后,打开试管塞,置于沸水浴中煮沸 10 min,取出冷却至室温,在 620 nm 波长下比色,测定各管溶液的吸光度(A),以标准葡萄糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,作出标准曲线。

表 1-4 标准葡萄糖溶液的配制

管号	1	2	3	4	5	6
标准葡萄糖原液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水/mL	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
葡萄糖含量/ μg	0	40	80	120	160	200

2. 样品中可溶性糖的提取

称取 1 g 白菜叶,剪碎,置于研钵中,加入少量蒸馏水,研磨成匀浆,然后转入 20 mL 刻度试管中,用 10 mL 蒸馏水分次洗涤研钵,洗液一并转入刻度试管中。置沸水浴中加盖煮沸 10 min,冷却后过滤,滤液收集于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀备用。

3. 糖含量测定

用移液管吸取 1 mL 提取液于 20 mL 具塞试管中,加 1 mL 水和 0.5 mL 蒽酮试剂。再缓慢加入 5 mL 浓 H_2SO_4 (注意:浓硫酸遇水会产生大量的热),盖上试管塞后,轻轻摇匀,再置沸水浴中保温 10 min(比色空白用 2 mL 蒸馏水与 0.5 mL 蒽酮试剂混合,并一同于沸水浴保温 10 min)。冷却至室温后,在波长 620 nm 下比色,记录吸光度。查标准曲线上得知对应的葡萄糖含量(μg)。

七、结果与计算

$$\text{样品含糖量}(\text{g}/100\text{ g 鲜重}) = \frac{\text{查表所得糖含量}(\mu\text{g}) \times \text{稀释倍数}}{\text{样品质量}(\text{g}) \times 10^6} \times 100$$

八、注意事项

(1) 加浓 H_2SO_4 时应缓慢加入,以免产生大量热量而爆沸,灼伤皮肤,如出现上述情况,应迅速用大量自来水冲洗。

(2) 水浴加热时应松开试管塞,管口不要对着他人或自己。

九、实践应用

(1) 蒽酮法是常用的植物可溶性糖测定方法,可以鉴定水果、蔬菜品质的高低,研究植物