

生物化学实验指导

郑昌学 匡贵秋 黄建 编



中央广播电视大学出版社

生物化学实验指导

郑昌学 匡贵秋 黄 建 编

中央广播电视大学出版社

生物化学实验指导

郑昌学 匡贵秋 黄建 编

*

中央广播电视大学出版社出版

新华书店北京发行所发行

人民教育出版社印刷厂印装

*

开本 787×1092 1/16 印张 3.5 千字 86

1987 年 6 月第 1 版 1987 年 9 月第 1 次印刷

印数 1—5500

定价 0.70 元

ISBN7-304-00029-5/Q·2

前 言

生物化学是一门实验科学,它的发展在很大程度上取决于实验技术和研究方法的进步,近代物理学、化学和电子学的发展,为生物化学研究提供了许多灵敏、准确而快速的分离技术和分析方法(如电泳技术、层析技术、离心技术、分光光度技术,同位素技术等)。学习生物化学不仅应当懂得生物化学的研究方法和实验技术的原理,而且应该掌握这些原理和方法并应用它解决实践中遇到的生物化学问题。

由于教学时数和设备条件的限制,我们选择了一些常用的生物化学实验技术和方法作为实验的内容,编成这本《生物化学实验指导》。在这本书中,有一部分实验是验证课堂理论的,通过这部分实验使学生加深对生物化学理论的理解;另一部分实验是重要的生物化学测定方法和分离技术(如几大类生物物质的定量测定法,电泳技术、分光光度技术等),通过这部分实验为学员提供练习和操作的机会,同时也为培养学生科学的严谨的工作作风提供实践的场所。

本书内容参考了许多国内外生物化学实验和研究方法的书籍。但由于编写的时间仓促,加上编者水平的限制,在实验的挑选和内容的编写中难免有不当之处,欢迎读者批评指正。复旦大学生物化学教研室主任顾其敏教授提出了许多宝贵意见,同时提供了 Bradford 法测定蛋白质的方法。我们向她及所有提供材料和提出过编写意见的同志们致以诚挚的感谢!

编 者

1987 年 6 月

目 录

实验一	糖的颜色反应·····	(2)
实验二	糖的还原性检验·····	(5)
实验三	费林试剂热滴定定糖法·····	(8)
实验四	索氏 Soxhlet 提取法测定脂类·····	(11)
实验五	卵黄中卵磷脂的提取和鉴定·····	(13)
实验六	蛋白质的呈色反应、等电点、沉淀反应·····	(14)
实验七	Folin 酚法和 Bradford 法测定蛋白质浓度·····	(22)
实验八	酶的催化效率——过氧化氢酶·····	(25)
实验九	酶的特异性(专一性)·····	(27)
实验十	温度、pH、激活剂和抑制剂对酶活性的影响·····	(29)
实验十一	植物过氧化物同功酶聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	(32)
实验十二	核酸的提取与颜色反应·····	(36)
实验十三	维生素C 的测定·····	(38)
实验十四	细胞色素C 的制备及测定·····	(41)
实验十五	酶活力的测定·····	(44)
实验十六	血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳·····	(47)

生物化学实验须知

生物化学实验是生物化学课的重要组成部分，生物化学实验技术是生物科学研究的重要手段，每位同学都必须高度重视实验。

一、实验前必须复习与实验有关的理论，预习实验指导，写出预习笔记(用24开练习簿写明实验编号及实验名称、写出实验原理和实验操作要点及预习中未弄清的问题)，经教师检查预习笔记后，方可进入实验室。

二、在实验过程中，必须听从教师指导，严肃认真地按操作规程进行实验。仔细观察实验现象，多思考，勤记录，在预习本上准确如实地记下实验结果和数据。完成实验后经教师检查同意，方可离开。课后写出实验报告。

三、环境和仪器的清洁是做好实验的重要条件。实验台面、试剂药品架上必须保持整洁，仪器药品要排列有序。公用试剂用毕应立即盖严放回原处，勿使试剂洒在实验台面和地上。实验完毕，需将实验台面擦拭干净，药品试剂排列整齐，仪器要洗净倒置放好。

四、使用药品和试剂必须注意节约。不要使用过量的试剂和药品，应特别注意保持试剂和药品的纯净，严防混杂污染；不要将滤纸和称量纸作其它用途。使用和洗涤仪器时要小心仔细，防止损坏仪器，使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障立即报告教师，千万不要自己动手检修。

五、注意安全，实验室内严禁吸烟！乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并且要远离火源操作和放置。

六、废弃液体(强酸强碱液必须先用水稀释)可倒入槽内，同时放水冲走。固体废物和带有渣滓沉淀的废物都应倒入废品缸内，不能倒入水槽或到处乱扔。

附：实验报告的一般格式

实验 实验名称

一、目的和要求 扼要说明本次实验必须达到的目的和要求。

二、实验原理 用简明文字或反应式说明本实验的基本原理。

三、操作步骤 可用自行设计的流程图或表格来表示。

四、结果与讨论 这部分是实验报告的主要内容，包括对实验观察到的现象和实验结果与数据的记录；对实验现象和结果的分析讨论；对实验数据的处理和计算；对实验中所遇到的问题的探讨以及对实验的改进意见等。

五、思考题 每个实验所列的思考题是否在实验报告中书面回答，由教师根据具体情况决定。

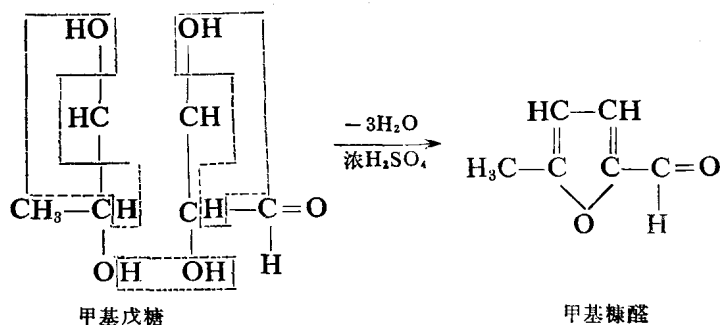
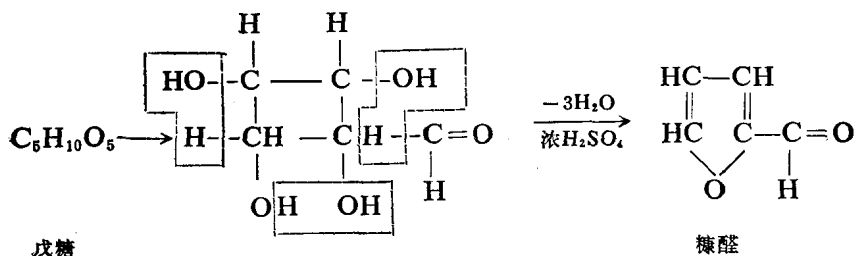
实验一 糖的颜色反应

一、目的和要求

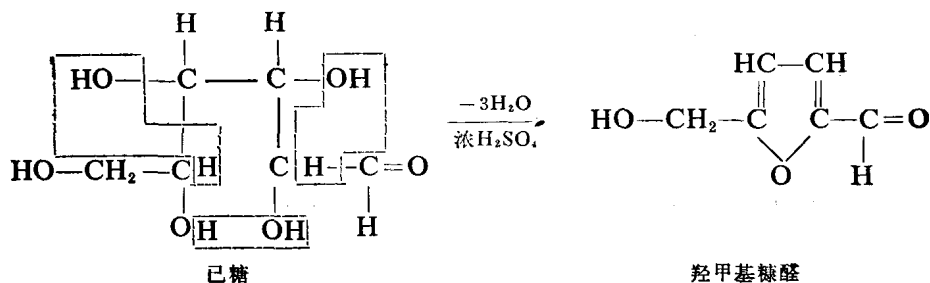
了解鉴定糖类及区分酮糖和醛糖的方法。

二、原理

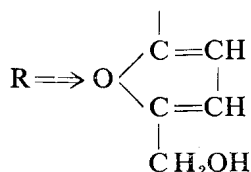
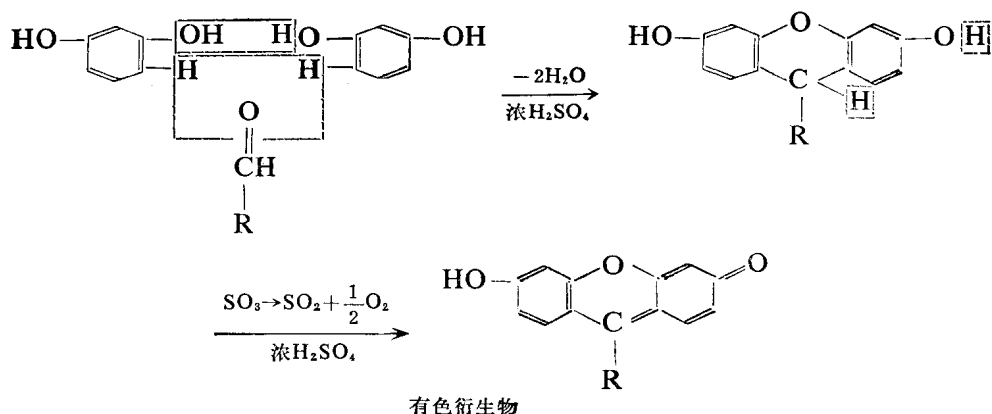
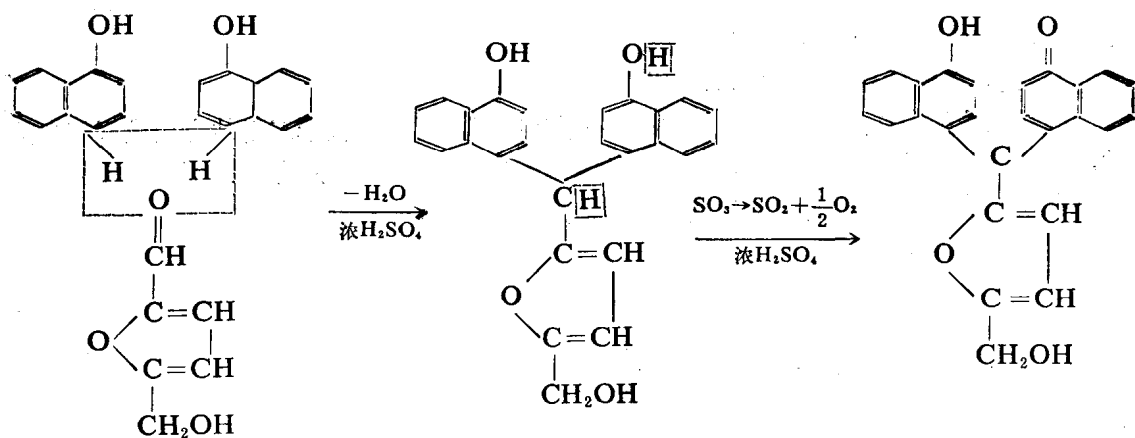
糖类在浓无机酸作用下,脱水生成糠醛或糠醛衍生物。如:戊糖脱水可以生成糠醛;甲基戊糖脱水生成甲基糠醛。



同理,己糖也能发生这类反应。



这些糠醛和糠醛衍生物在浓无机酸作用下,能与酚类化合物缩合成有色物质。与一元酚如 α -萘酚作用生成三芳香环甲基有色物质;与多元酚如间苯二酚作用则形成氧杂蒽有色物质。



通常使用的无机酸为硫酸。如果用盐酸则必须加热。常用的酚类有 α -萘酚 (鉴定糖类)、间苯二酚 (区分醛糖和酮糖)、甲基苯二酚和间苯三酚 (检验戊糖) 等。有时也用芳香胺、胆酸、某些吲哚衍生物和一些嘧啶类化合物。

三、操作方法

1. α -萘酚反应 (Molish 反应)

糖类经浓硫酸脱水生成糠醛或其衍生物, 后者与 α -萘酚结合生成红紫色物质。在糖溶液和浓硫酸液面间出现紫环, 因此又叫紫环反应。此外, 丙酮、甲酸、乳酸、草酸、葡萄糖醛酸和醛类等也呈颜色近似的阳性反应。所以, 在试剂为阳性反应时, 尚须进一步作其它糖的定性测定, 才能确定糖类的存在。

取 8 支试管, 编号后分别加入 2% 的葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、蔗糖、1% 淀粉、梨汁和丙酮各 1 毫升 (约 15 滴)。再各加入 α -萘酚试剂 2 滴、混匀。逐一将试管倾斜, 分别沿管壁慢慢加入浓硫酸各约 1 毫升, 然后, 小心地竖起试管, 使硫酸与糖溶液清楚地分为两层。注意观察两液面间紫色环的出现 (糖液过浓将呈红褐色)。如数分钟内无颜色变化, 可在热水浴中温热几

分钟。记录各管出现的颜色,说明原因。

2. 间苯二酚反应(Seliwanoff 反应)。

酮糖在浓盐酸作用下,可脱水生成4-羟甲基糠醛,后者与间苯二酚结合生成鲜红色的物质,反应迅速,仅需20~30秒,这是酮糖的特殊反应。在同样条件下,醛糖形成羟甲基糠醛较慢只有在糖浓度较高、或者煮沸时间较长时,才出现微弱的阳性反应。蔗糖被盐酸水解生成果糖也能出现阳性反应。

取5支试管,分别加入1%葡萄糖、果糖、2%半乳糖、麦芽糖、蔗糖等溶液各5滴,再各加入间苯二酚盐酸试剂1毫升,混合均匀后,同时将5支试管放入沸水浴中,注意各管首先出现颜色的时间,再继续煮沸15分钟,每隔5分钟观察一次,记录各管的颜色变化和有无沉淀,分析说明原因。

作为酮糖的阳性反应标准还应注意下述各点。

- (1) 若用盐酸,则浓度不能超过12%。
- (2) 红色出现及沉淀的生成必须在沸腾后二十~三十秒钟内观察到。
- (3) 溶液葡萄糖含量不能超过2%。
- (4) 生成的沉淀必须能溶于乙醇并呈鲜红色。

四、试剂与器材

试剂

- | | |
|---|--------------|
| (1) 2%葡萄糖液 | (2) 2%果糖溶液 |
| (3) 2%半乳糖溶液 | (4) 2%阿拉伯糖溶液 |
| (5) 2%麦芽糖溶液 | (6) 2%乳糖溶液 |
| (7) 1%淀粉溶液 | (8) 0.1%糠醛溶液 |
| (9) 浓硫酸 | (10) 梨汁 |
| (11) 丙酮 | (12) 蔗糖 |
| (13) α -萘酚试剂 α -萘酚2克溶于95%酒精稀释至100毫升,临用时配制 | |
| (14) 间苯二酚-盐酸试剂 间苯二酚0.05克溶于50毫升浓盐酸内,再用蒸馏水稀释至 | |

100毫升

器材

- | | |
|------------|---------|
| (1) 试管及试管架 | (2) 水浴锅 |
| (3) 滴管 | |

五、思考题

1. α -萘酚及间苯二酚的结构是什么?应用这两个反应分析未知样品时,应注意些什么问题?
2. 为什么糖蛋白与上述试剂反应呈阳性结果?

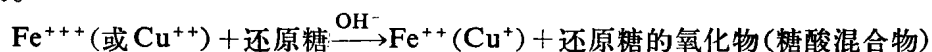
实验二 糖的还原性检验

一、目的和要求

了解鉴定还原糖的原理及其方法。

二、原理

含有自由醛基($-\text{CHO}$)或酮基($>\text{C}=\text{O}$)的单糖和双糖叫还原糖。例如葡萄糖、果糖、麦芽糖。在碱性溶液中,还原糖能将某些高价金属离子(铜、铋、汞、银)还原,糖本身被氧化成酸类化合物。

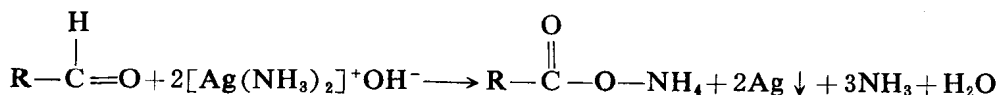
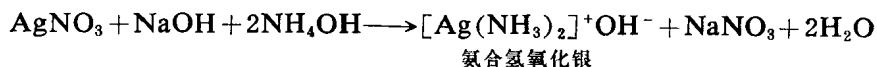


这种作用在微酸性溶液中也能进行,但反应速度很慢。此反应常用于检验糖的还原性,并且常成为测定还原糖含量的各种方法的依据。

三、操作方法

1. 与杜伦(Tollen)试剂的反应

杜伦试剂是硝酸银和氢氧化铵配成的银氨络离子溶液(氨合氢氧化银溶液)。它是一种温和氧化剂。一般条件下可以使醛(包括脂肪醛、芳香醛)和醛糖及酮糖发生氧化生成相同碳原子数的酸,而酮则不被氧化。被还原的金属银附着在试管壁上,象镜子一样,因此称该反应为银镜反应。

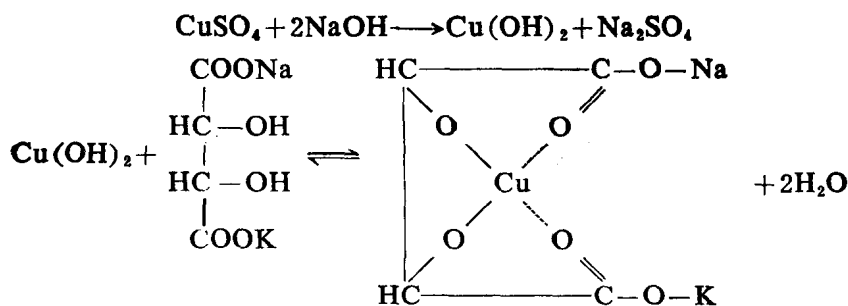


取4支洗净的试管,各加入1毫升5%硝酸银和1滴3N氢氧化钠溶液,混匀,然后再逐滴地加入1N氢氧化铵溶液,并不断摇动,直到生成氢氧化银沉淀恰好溶解为止(过量的氢氧化铵会降低杜伦试剂的灵敏度)。接着,将4支试管编号。按序分别加入2滴乙醛、2滴2%葡萄糖溶液、2滴丙酮、2滴2%果糖溶液,各自摇匀后,在室温下放置几分钟。如果试管上没有银镜形成,可再放入沸水浴中稍热几分钟(加热时间不可过久)。再观察各管有无银镜形成。

注意:杜伦试剂放置久了会析出黑色的氯化银(AgN)沉淀。干的氯化银受震动易发生分解爆炸。另外,加热时间过长、氨水的量加太多或用火直接加热,都会生成易爆炸的雷酸银($\text{Ag}_2\text{C}_2\text{N}_2\text{O}_2$)。所以该试剂一定要临用时配制。在反应完毕后,立即将试管洗净。若放置较久,应用1:1的硝酸分解后,再用水洗净。

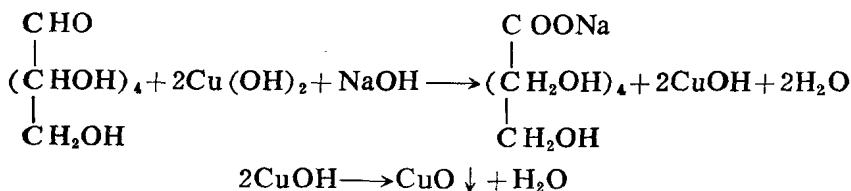
2. 与费林(Fehling)试剂的反应

费林试剂是含硫酸铜与酒石酸钾钠的氢氧化钠溶液。与酒石酸钾钠形成络合状态的 Cu^{++} 可以将还原糖和脂肪醛氧化成相应的酸类化合物, Cu^{++} 被还原成 Cu^+ ,即兰色硫酸铜溶液被还原产生砖红色的氧化亚铜沉淀。费林试剂是比杜伦试剂还弱的氧化剂。它不与酮和芳香醛发生反应。



酒石酸钾钠络合铜离子

酒石酸钾钠络合铜离子是可溶性的络离子,该反应是可逆的。平衡后,溶液内有一定浓度的氢氧化铜。



在碱性条件下,糖不仅发生烯醇化,异构化等作用,也能发生糖分子的分解、氧化、还原或多聚作用。由这些作用所形成的复杂混合物具有强烈的还原作用,也能使金属离子还原。因此,企图用简单的氧化还原作用来写出其反应平衡式是不可能的。

取试管6支,加入费林试剂A和费林试剂B各1毫升,混匀后分别加入2%葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖、1%淀粉溶液和梨汁各4滴。放入沸水浴中煮2—3分钟后,取出冷却,观察沉淀和颜色变化。(注意是否为红色沉淀)

3. 与班氏(Benedict)试剂的反应

班氏试剂是含硫酸铜和柠檬酸钠的碳酸钠溶液。它是费林试剂的改良,它用柠檬酸钠作为 Cu^{++} 的络合剂,碱性比费林试剂弱,灵敏度比费林试剂高,所以实际应用优势更多。

取6支试管,各加入2毫升班氏试剂,再分别加入2%的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖、果糖溶液和梨汁各4滴,在沸水浴中加热2—3分钟,取出后冷却,观察变化。

4. 与巴沃氏(Barfoed)试剂反应

巴沃氏试剂是由结晶醋酸铜和醋酸溶液混合而成。该实验的特点是还原作用在酸性溶液中进行。在这种情况下,单糖和还原式糖的还原速度有明显的差异,单糖在3分钟内就能将二价铜离子氧化成氧化亚铜红色沉淀,而还原式糖则需10分钟以上。该反应可用来区分单糖和还原式糖。加热时间过长,非还原性双糖亦能水解呈还原反应,如蔗糖在10分钟内水解而发生反应,还原式糖浓度过高也会很快呈阳性反应。

取试管4支,分别加入2%葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖溶液各3滴,再加入巴沃氏试剂10滴,混匀,在沸水浴中加热3分钟,取出冷却后,观察变化。此反应产生的 Cu_2O 沉淀聚集在试管底部,溶液仍为深蓝色,与一般还原性试验把反应液变为红色或黄色不同。

四、试剂与器材

试剂

- | | |
|--------------|-------------|
| (1) 2%葡萄糖溶液 | (2) 2%果糖溶液 |
| (3) 2%阿拉伯糖溶液 | (4) 2%麦芽糖溶液 |

- (5) 2% 蔗糖溶液
- (6) 1% 淀粉溶液
- (7) 乙醛
- (8) 丙酮
- (9) 3N 氢氧化钠溶液
- (10) 5% 硫酸银溶液
- (11) 1N 氢氧化铵
- (12) 定性费林试剂

试剂 A(硫酸铜溶液) 将 34.5 克结晶硫酸铜($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)溶于 500 毫升蒸馏水中,加 0.5 毫升浓硫酸,混合均匀

试剂 B(酒石酸钾钠碱性溶液) 将 125 克氢氧化钠和 137 克酒石酸钾钠溶于 500 毫升蒸馏水中,贮于带橡皮的瓶内。

临用时将试剂 A 与试剂 B 等量混合。

(13) 定性班氏试剂 将硫酸铜 17.3 克溶于 100 毫升热蒸馏水中。冷后,稀释至 150 毫升。取柠檬酸钠 173 克及碳酸钠($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)100 克,加水 600 毫升,加热使之溶解,冷后,稀释至 850 毫升。最后,把硫酸铜溶液缓缓倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中。混匀后,用细口瓶贮存。此试剂可保存很久。

(14) 巴沃氏试剂 将结晶醋酸铜 13.3 克溶于 200 毫升蒸馏水中,再加 38% 醋酸溶液(冰醋酸 18 毫升加蒸馏水 50 毫升) 5 毫升,混匀备用。该试剂应临用时配制。

器材

- (1) 试管及试管架
- (2) 竹试管夹
- (3) 水浴锅
- (4) 煤气灯或电炉

五、思考题

1. 哪些糖叫还原糖(举例说明)?
2. 还原糖、杜伦试剂、费林试剂、班氏试剂、巴沃氏试剂反应的阳性结果都发生了什么化学变化? 上述反应的阴性结果是否表明不存在糖或碳水化合物? 为什么?
3. 费林反应、班氏反应、巴沃氏反应的阳性结果有何异同? 为什么?

实验时加入过量的铜试剂,铜试剂除与上述样品中的糖反应外,剩余的铜试剂用标准葡萄糖(具有自由醛基或半缩醛基,有还原性)溶液滴定。当铜试剂的 Cu^{++} 被完全作用后,稍微过量的标准葡萄糖液就把碱性铜试剂中作为指示剂的次甲基兰还原,使溶液由蓝色变成无色,此为滴定终点。同时通过空白对照便可测出样品的含糖量。(因本法定以次甲基兰作为指示剂,故又称为次甲基兰法)这种测定糖含量的方法比较简单、方便,已被广泛地应用于发酵工业、食品工业、临床病理检查、种子品质鉴定、越冬昆虫营养体状况检查以及饲料营养成分等有关糖的分析。

三、操作步骤

1. 空白测定

准确吸取费林试剂 A、B 溶液各 5 毫升和蒸馏水 5 毫升放入 250 毫升的锥形瓶中,再用滴定管加入一定量的标准葡萄糖溶液,混匀后放在石棉网上加热,应使瓶内溶液在 2 分钟内达到沸腾,以每 4~5 秒一滴的速度由滴定管滴入标准葡萄糖溶液直至蓝色消失为止。(已还原的次甲基兰遇空气中的氧将迅速被氧化而恢复蓝色,因此,当滴定至蓝色消失黄色刚出现时,应立即停止滴定。)沸腾前加入的标准葡萄糖溶液量与沸腾后滴定时所用的标准葡萄糖溶液量的总和,就是空白测定时耗用的标准葡萄糖溶液毫升数(V_1)。

全部滴定过程必须在沸腾状态下快速进行,一般应在 3 分钟内完成。因此,除控制滴定速度外,滴定前需加入一部分标准葡萄糖溶液,加入该液的数量,应在正式滴定前的预备滴定试验时确定,同时练习掌握操作条件。

2. 还原糖的测定

准确称取山芋粉 4 克放入 250 毫升锥形瓶中,加入 85% 乙醇 50 毫升,在 50°C 恒温水浴内浸提半小时,并经常搅拌,过滤,收集滤液。滤渣按上法再用 85% 乙醇处理二次,过滤,用 50°C 85% 的乙醇洗涤残渣。合并上述滤液和洗涤液,蒸去乙醇,移入 100 毫升容量瓶内,用蒸馏水定容至刻度,即为测定还原糖的样品液。

应用乙醇(80~85%)提取待测样品的还原糖,是因为水(甚至用冰水)或稀乙醇(10%)提取时,可溶性淀粉均能和还原糖一起溶解,从而导致测出的还原糖含量偏高,而淀粉含量偏低。若待测样品内无可溶性淀粉(遇碘呈蓝色),则可用水提取还原糖。采用 85% 乙醇提取是假定样品是干燥的,如果样品含水量高,则乙醇浓度需相应提高。

准确吸取样品液 5 毫升放在 250 毫升锥形瓶中,加入费林试剂 A、B 液各 5 毫升,在电炉上加热至沸,然后按空白测定的滴定速度滴入标准葡萄糖溶液直至蓝色消失,记下滴定的毫升数。

氧化作用与温度、煮沸时间、溶液浓度和酸碱度等条件有密切关系,除准确量取试剂外还应严格操作。在滴定样品时,应与空白测定的操作条件尽可能一致。

3. 总糖的测定

样品液的配制 准确称取山芋粉 1 克,加入 6N 盐酸 10 毫升,蒸馏水 15 毫升,混匀。沸水浴加热半小时后,取出几滴水解液用碘化钾-碘溶液检查水解是否完全,若已水解完全,则不呈蓝色。冷却后加入酚酞指示剂 1 滴,用 10% 氢氧化钠中和至溶液呈微红色,过滤,滤液定容至 100 毫升。准确吸取该溶液 10 毫升,移入 100 毫升容量瓶内并定容至刻度,即为测定总糖的样品液。

按下表进行操作,准确吸取样品液 5 毫升放于 250 毫升锥形瓶内,加入费林 A、B 溶液各 5

毫升,混匀,然后按测定还原糖的操作进行滴定,记下耗用标准葡萄糖的毫升数。

测定样品及编号		取样量 ml	费林试剂 ml		标准葡萄糖液的耗用量 ml
			A	B	
空 白	1	5	5	5	
	2	5	5	5	
	3	5	5	5	
还原糖	1	5	5	5	
	2	5	5	5	
	3	5	5	5	
总 糖	1	5	5	5	
	2	5	5	5	
	3	5	5	5	

计算

$$\text{还原糖(或总糖)\%} = \frac{(V_1 - V_2) \times \text{标准葡萄糖液浓度(克/毫升)} \times \text{稀释倍数}}{\text{称取样品量(克)}} \times 100$$

式中 V_1 为测定空白时耗用的标准葡萄糖溶液的毫升数。 V_2 为测定还原糖或总糖时耗用的标准葡萄糖的毫升数。

四、试剂和器材

试剂

(1) 费林试剂

A 液: 称取 15 克硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)和 0.05 克次甲基蓝,溶于 1000 毫升水中。

B 液: 称取 50 克酒石酸钾钠,54 克氢氧化钠和 4 克亚铁氰化钾溶于 1000 毫升水中。

本试剂与上个实验的定性费林试剂不同,后者试剂中无次甲基蓝及亚铁氰化钾。

(2) 标准葡萄糖溶液称取葡萄糖(预先在 105°C 在烘箱内烘干至恒重) 1 克,用少量蒸馏水溶解后加入 8 毫升浓盐酸(防止微生物生长),再用蒸馏水定容至 1000 毫升。

(3) 6N 盐酸溶液

(4) 10% 氢氧化钠

(5) 85% 乙醇

(6) 酚酞指示剂

(7) 碘试剂(碘化钾-碘溶液)将碘化钾 20 克及碘 10 克溶于 100 毫升水中。使用前需稀释 10 倍。

器材

(1) 酸滴定管(25 毫升)

(2) 吸量管(5, 10 毫升)及吸量管架

(3) 容量瓶(100 毫升)

(4) 电炉或煤气灯

(5) 石棉网

(6) 铁台

(7) 万能夹和双顶丝

(8) 锥形瓶(250 毫升)

(9) 滴管

五、思考题

1. 本实验所用的费林试剂含什么化学成分?其作用是什么?

2. 为什么要做空白测定?

实验四 索氏 Soxhlet 提取法测定脂类

一、目的和要求

1. 学习和掌握粗脂肪提取的原理和方法。
2. 熟悉和掌握重量分析的基本操作,包括样品的处理、定量转移、烘干、恒重等。

二、原理

本法为重量法,用脂肪溶剂将脂肪提出后进行称重。该法适用于固体和液体样品。通常将样品浸于脂肪溶剂,如乙醚或沸点为 30°C — 60°C 的石油醚,借助于索氏提取器进行循环抽提。用本法提取的脂溶性物质为脂肪类物质的混合物,其中含有脂肪、游离脂肪酸、磷脂、酯、固醇、芳香油、某些色素以及有机酸等。因此称为粗脂肪。

用该法测定样品含量时,通常采用沸点低于 60°C 的有机溶剂作为脂肪溶剂,此时,样品中结合状态的脂类(主要是脂蛋白)不能直接提取出来,所以该法又称为游离脂类的定量测定法。

三、操作步骤

1. 样品的采取或取样,例如花生。从花生种子中均匀取大、中、小颗粒约 1~2 斤,先磨碎,然后置 100°C 烘箱内烘干至恒重(最好在减压情况下烘干)。又例如含油量较少的稻、麦、蔬菜、水果等烘干(与此同时取少量如 2~5 克做水分测定)后应全部过 60 眼筛。已磨碎过筛的样品,再在 100°C 烘箱烘 4~6 小时(因烘干后磨碎,过筛过程中会吸收空气的水分),然后就可用作脂肪测定(也可用作灰分、蛋白质、磷、钙、铁等的测定)。

称取样品的重量根据材料中脂肪的含量而定,通常脂肪含量在 10% 以下的称取样品 10~12 克,脂肪含量为 50~60% 的称取样品 2~4 克。

几种干物质种子和种仁中油脂的百分含量

样 品	含 油 量	样 品	含 油 量
向日葵种籽	23.5~45.0	大豆种籽	10.0~25.0
向日葵种仁	40.0~67.8	油桐种仁	47.8~68.9
蓖麻种籽	45.1~58.5	玉米谷粒	3.0~9.0
蓖麻种仁	50.7~72.0	小麦谷粒	1.6~2.6
芝麻种籽	46.2~61.0	稻子谷粒	1.3~2.4
油菜种籽	41.1~42.9	豌豆种籽	0.7~1.9
花生种仁	40.2~60.7		

2. 准备用来包样品的脱脂滤纸放在称瓶里面,塞子竖放在称瓶口上并置于 100°C 烘箱中烘 6 小时,取出,放入干燥器内待完全冷却后称重,再烘半小时,重复烘干及称重,直至恒重为止。

3. 把经磨成粉末并烘干至恒重的样品,准确称取一定量(按上例标准)两份,包在上述烘

干至恒重的脱脂滤纸内放入索氏提取管内。样品中若有少量水分存在,则能使糖份溶出而流入脂肪提取器中,影响实验结果,故以上各步应严格注意干燥,以免水分出现。

4. 在已知重量的提取瓶内,从冷凝管顶端开口处注入无水乙醚至半满(即占脂肪提取瓶容积的1/2)或2/3瓶体积。然后将提取瓶各部分连接好,(注意磨口连接部分不能涂凡士林,为什么?)接口处涂上甘油淀粉,使之密闭。

5. 将抽提器置于电热水浴器中加热至水浴温度在40~50℃时进行提取。因乙醚、石油醚极易着火燃烧,水浴温度不宜过高,切勿用火焰直接加热,也不能用明火烧水浴(即不用酒精灯或煤气灯火焰烧水浴)。乙醚蒸气由联接管上升至冷凝器,凝结成液体,滴入提取瓶,到一定水平后溶有脂肪的乙醚经虹吸管流入提取瓶内。调节好水浴温度,使乙醚在提取器内的循环速度以每小时3~4次为宜。提取时间视样品的性质而定,通常8~16小时,一般稻、麦种子等4小时即够。带有叶绿素的干菜类样品则需16小时左右。提取是否完全可以用抽提器流出的溶剂少量放在蒸发器内蒸发后无残渣油滴即可。提取完毕后,取出滤纸包,置原称瓶中,先在电热水浴锅中加热赶走乙醚,再在100℃烘箱中烘干至恒重,然后称重。

四、计算

$$\begin{aligned}\text{样品重量} &= (\text{称瓶} + \text{滤纸} + \text{样品}) - (\text{称瓶} + \text{滤纸}) \\ \text{残余物质重量} &= \text{抽提连称瓶重量} - (\text{称瓶} + \text{滤纸}) \\ \text{粗脂肪重量} &= \text{样品重量} - \text{残余物重量} \\ \text{粗脂肪含量(克/100克样品)} \\ &= (\text{粗脂肪重量} / \text{样品重量}) \times 100\end{aligned}$$

五、试剂与器材

试剂

- (1) 无水乙醚约700毫升
- (2) 样品: 芝麻、花生、大豆等中的一种或若干种。

器材

- | | |
|------------|-----------|
| (1) 索氏抽提器 | (2) 电热水浴器 |
| (3) 100℃烘箱 | (4) 分析天平 |
| (5) 脱脂棉花 | (6) 称量瓶 |

- (7) 橡皮管

六、思考题

1. 写出2~3种良好的脂肪溶剂。
2. 指出含油量较高的食物、包括蔬菜、水果、肉类和谷物等。

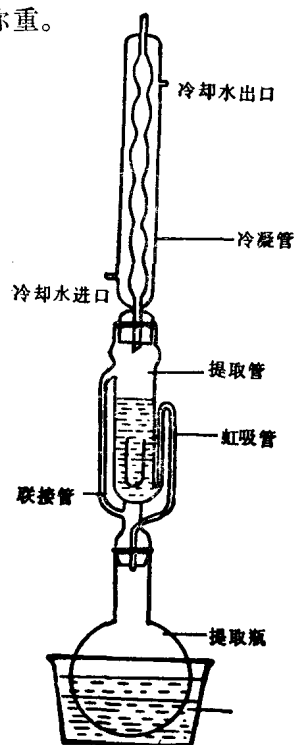


图1 索氏抽提器示意图