

高等院校试用教材

生物化学实验技术

SHENG WU HUA XUE SHI YAN JI SHU

主编 庞广昌 王清连

河南科学技术出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物化学实验技术

（供生物、医学、农学、林学、环境科学、食品科学、药学、生命科学等相关专业使用）

主编 王学军 副主编 王学军

科学出版社 北京

生物化学实验技术

主 编 庞广昌 王清连

副主编 董淑丽 董发才 袁道强 吕迎辉

冯云献 俞连君 李巧枝

编 委 (按姓氏笔画排列)

王 琳 王清连 王章存 冯云献 吕迎辉

刘翠然 李 英 李巧枝 庞广昌 俞连君

袁道强 徐颂立 舒友琴 薛 毅

河南科学技术出版社

豫新登字 02 号

高等院校试用教材

生物化学实验技术

主 编 庞广昌 王清连

责任编辑 张 鹏

河南科学技术出版社出版发行

(郑州市农业路 73 号)

河南教育印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 15 印张 351 千字

1994 年 9 月第 1 版

1994 年 9 月第一次印刷

印数: 1-5000 册

ISBN7-5349-1710-7/G·428

定价: 8.60 元

实验室规则

一、每个同学都应该自觉地遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退，保持室内安静，不大声谈笑。注意环境卫生，严禁随地吐痰，要讲文明，懂礼貌。

二、在实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上。完成实验后经教师检查同意，方可离开。课后按要求写出实验报告，由课代表收交给教师。

三、环境和仪器的清洁整齐是搞好实验的重要条件。实验台面、试剂药品架上必须保持整洁，仪器药品要井然有序。公用试剂用毕应立即盖严放回原处。勿使试剂药品洒在实验台面和地上。实验完毕，需将药品试剂排列整齐，仪器要洗净倒置放好，将实验台面擦拭干净，经教师验收仪器后，方可离开实验室。

四、使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约，不要使用过量的药品和试剂。应特别注意保持药品和试剂的纯净，严防混杂。不要将滤纸和称量纸做其他用途。使用和洗涤仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发生故障立即报告教员，不要自己动手检修。要爱护国家财产。厉行节约。

五、注意安全。实验室内严禁吸烟！煤气灯应随用随关，必须严格做到：火着人在，人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离火源操作和放置。实验完毕，应立即关好煤气门和水龙头，拉下电闸，各种玻璃器皿应放置稳妥。离开实验室以前应认真负责地进行检查，严防不安全事故。

六、废弃液体(强酸强碱溶液必须先用水稀释)可倒入水槽内，同时放水冲走。废纸、火柴头及其他固体废物和带有渣滓沉淀的废液都应倒入废品缸内，不能倒入水槽或到处乱扔。

七、仪器损坏时，应如实向教员报告，认真填写损坏仪器登记表，然后补领。

八、实验室内一切物品，未经本室负责教员批准严禁携出室外，借物必须办理登记手续。

九、每次实验课由班长安排同学轮流值日，值日生要负责当天实验室的卫生、安全和一些服务性的工作，每次实验完毕，必需拖地，实验中或实验后打蒸馏水。

十、对实验的内容和安排不合理的地方可提出改进意见。对实验中出现的一切反常现象应进行讨论，并大胆提出自己的看法，做到生动、活泼、主动地学习。

实验记录及实验报告

一、实验记录

实验课前应认真预习，将实验名称、目的和要求、原理、实验内容、操作方法和步骤等简单扼要地写在记录本中。

实验记录本应标上页数，不要撕去任何一页，更不要擦抹及涂改，写错时可以准确地划去重写。记录时必须使用钢笔或圆珠笔。

实验中观察到的现象、结果和数据，应该及时地记在记录本上，绝对不可以用单片纸做记录或草稿。原始记录必须准确、简练、详尽、清楚。从实验课开始就应养成这种良好的习惯。

记录时，应做到正确记录实验结果，切忌夹杂主观因素，这是十分重要的。在实验条件下观察到的现象，应如实仔细地记录下来。在定量实验中观测的数据，如称量物的重量、滴定管的读数、光电比色计或分光光度计的读数等，都应设计一定表格准确记下正确的读数，并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如，光密度值为 0.050 不应写成 0.05。每一个结果最少要重复观测两次以上，当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。实验记录上的每一个数字，都是反映每一次的测量结果，所以，重复观测时即使数据完全相同也应如实记录下来。数据的计算也应该写在记录本上。总之，实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、准确的浓度等，都应记录清楚，以便总结实验时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。

如果发现记录的结果有怀疑、遗漏、丢失等，都必须重做实验。因为，将不可靠的结果当做正确的记录，在实际工作中可能造成难于估量的损失。所以，在学习期间就应一丝不苟，努力培养严谨的科学作风。

二、实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验结果，写出实验报告。按照实验内容可分为定性和定量实验两大类。下面分别列举这两类实验报告的格式，仅供参考。

1. 关于定性实验报告

实验(编号) (实验名称)

一. 目的和要求

二. 内容

三. 原理

四. 操作方法

五. 结果与讨论

一般每次实验课做数个定性实验，实验报告中的实验名称和目的要求应该是针对这次实验课的全部内容而必须达到的目的和要求。在写实验报告时，可以按照实验内容分别写原理、操作方法、结果与讨论等。原理部分应简述基本原理。操作方法(或步骤)可以采用工艺流程图的方式或自行设计的表格来表示。某些实验的操作方法可以和结果与讨论部分

合并, 自行设计各种表格综合书写。结果与讨论包括实验结果及观察现象的小结、对实验课遇到的问题和思考题进行探讨以及对实验的改进意见等。

2. 关于定量实验报告

实验(编号) (实验名称)

一. 目的和要求

二. 原理

三. 试剂配制及仪器

四. 操作方法

五. 实验结果

六. 讨论

通常每次实验课只做一个定量实验, 在实验报告中, 目的和要求、原理以及操作部分应简单扼要的叙述, 但是对于实验条件(试剂配制及仪器)和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分, 应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比, 并尽量总结成各种图表, 如原始数据及其处理的表格、标准曲线图以及比较实验组与对照组实验结果的图表等。另外, 还应针对实验结果进行必要的说明和分析。讨论部分可以包括: 关于实验方法(或操作技术)和有关实验的一些问题, 如实验的正常结果和异常现象以及思考题, 进行探讨; 对于实验设计的认识、体会和建议; 对实验课的改进意见等。

前 言

生物学,尤其是生物化学是一门实验科学,几乎其每一个进展、每一项突破、甚至每一份工作基本都依赖于实验方法和技术的突破。随着生命科学向分子水平的不断发展,生物化学实验技术也相对更加重要,因此,“搞生物的”或是学生物的都理所当然地需要一本《生物化学实验技术》。为了提供一本此类的较简要的工具书,也为了理、工、农、牧各专业的专科生、本科生、研究生提供一本普适的实验教材,我们组织河南师范大学、河南大学、郑州轻工学院、河南职业技术师范学院、郑州牧业工程高等专科学校、洛阳农业高等专科学校等六所高校在教学和科研第一线的教师编写了这本书。该书除将各自的教学和科研经验编入各实验之外,在选择实验上也考虑了专科、本科、研究生各个层次理、工、农、牧各专业的需要。虽然本书篇幅不大,但上述各层次、各学科都可以找到适合开设的实验。

此外,为了把许多新技术和新发展在本书中体现出来,在此书的编写过程中,也参考了一些国内外的最新资料。不过,为了适应我省高校的设备和经费条件,我们着重选入了最常用和费用较低的实验编入,这一点望各位专家、教授谅解。

应该说要想编一本全能的和普适的生物化学实验技术是不可能的,在本书的编写过程中,尽管照顾了各学科和各层次的需要,但还是不免存在若干不足之处,又由于参编的人和单位较多,也难免有错误和遗漏之处,恳请各位用户不吝赐教,以便使此书再版时能大踏步走向完美。

编者

1994年9月

目 录

前言	(1)
实验室规则	(2)
实验记录与实验报告	(3)
第一章 糖化学	
实验一 血糖的测定	(1)
实验二 斐林试剂法测定总糖	(5)
实验三 糖的硅胶 G 薄层层析	(8)
实验四 果胶的测定	(12)
实验五 果胶的提取和测定	(15)
实验六 肝糖原的提取和定性	(17)
实验七 肌肉中肌糖原含量的测定	(19)
第二章 脂类的化学	
实验八 粗脂肪的定量测定——索氏(Soxhlet)提取法	(22)
实验九 碘价的测定	(25)
实验十 油脂酸价的测定	(28)
实验十一 过氧化价的测定	(30)
实验十二 卵磷脂的提取和鉴定	(32)
第三章 蛋白质化学	
实验十三 蛋白质及氨基酸的显色反应	(33)
实验十四 蛋白质的沉淀反应	(39)
实验十五 蛋白质的等电点测定	(42)
实验十六 双缩脲法测定蛋白质含量	(45)
实验十七 滤纸法测定蛋白质含量	(47)
实验十八 氨基酸纸层析法分离	(49)
实验十九 从毛发中提取胱氨酸	(59)
实验二十 面粉中赖氨酸含量的测定	(62)
实验二十一 凯氏定氮法测定蛋白质含量	(65)
实验二十二 紫外吸收法测定蛋白质含量	(70)
实验二十三 Folin——酚法测定血清蛋白质含量	(73)
实验二十四 人血清的醋酸纤维薄膜电泳	(75)
实验二十五 酪蛋白的制备	(79)
实验二十六 分步盐析法制备三种球蛋白	(81)
第四章 核酸化学	
实验二十七 酵母核糖核酸的提取与组分鉴定	(84)
实验二十八 定磷法测定核酸含量	(86)

实验二十九	紫外吸收法测定核酸的含量	(89)
实验三十	动(植)物 DNA 的制备与测定	(92)
第五章 酶化学		
实验三十一	米氏常数(K_m)的测定	(95)
实验三十二	温度、pH 值、激活剂和抑制剂对酶活性的影响	(100)
实验三十三	脂肪酶的活力测定	(103)
实验三十四	枯草杆菌蛋白酶活力测定	(105)
实验三十五	淀粉酶的活力及比活力测定	(109)
实验三十六	垂直平板电泳法测定过氧化物同工酶	(111)
实验三十七	琥珀酸脱氢酶及丙二酸的抑制作用	(115)
实验三十八	过氧化氢酶的定性反应	(118)
第六章 维生素		
实验三十九	抗坏血酸(Vc)的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法)	(120)
实验四十	抗坏血酸(Vc)的定量测定(碘量法)	(123)
实验四十一	V_{B2} 的定量测定(荧光法)	(125)
实验四十二	V_{B1} 、 V_{B2} 的定性鉴定	(127)
第七章 代谢		
实验四十三	脂肪酸的 β -氧化	(129)
实验四十四	转氨酶的测定	(132)
实验四十五	胰岛素对血糖含量的调节	(136)
第八章 生化大实验		
实验四十六	SDS-PAGE 测定蛋白质分子量	(138)
实验四十七	分子筛凝胶层析法测定蛋白质的分子量	(145)
实验四十八	ELISA 测定特异性抗原	(154)
实验四十九	离子交换法分离氨基酸	(171)
实验五十	蛋白质电泳的超敏感银染方法	(178)
实验五十一	人血清 IgG 和白蛋白的制备与纯化	(185)
实验五十二	小量制备质粒 DNA	(188)
实验五十三	DNA 的限制性内切酶图谱	(191)
实验五十四	平板凝胶等电聚焦分离蛋白质	(196)
实验五十五	细胞色素 C 的制备与测定	(203)
附录		(207)

实验一 血糖的测定

目的和要求

掌握磷钨酸比色测定血糖的原理及方法。学会制备无蛋白血滤液。

原 理

葡萄糖是一种多羟基的醛类化合物。其醛基具有还原性，与碱性铜试剂混合加热后，葡萄糖分子中的醛基被氧化成羧基，而碱性铜试剂中的二价铜（ Cu^{2+} ）则被还原成红黄色的氧化亚铜（ Cu_2O ）沉淀。氧化亚铜又可使磷钨酸还原，生成钨蓝，使溶液呈蓝色，其蓝色的深度与血滤液中葡萄糖的浓度成正比。可用比色法于 420nm 下测定之。

测定血糖含量时必须先除去血液中的蛋白质，制成无蛋白血滤液，再行检验。向抗凝血（如加入草酸钾的血液）中加入钨酸钠、硫酸锌、氢氧化锌及三氯乙酸等均可制得无蛋白血滤液。现在常用钨酸法，钨酸钠与硫酸作用，生成钨酸：



血液中蛋白质在 pH 小于等电点的溶液中可被钨酸沉淀。沉淀液经过滤或离心，上清液即为无色而透明、pH 约等于 6 的无蛋白滤液。可供非蛋白氮、血糖、氨基酸、尿素、尿酸及氯化物等项测定使用。

操作步骤

一、用钨酸法制备 1:10 全血无蛋白滤液

用奥式吸量管吸取充分混匀之抗凝血 1 份（2g 草酸钾/L 血液），擦去管外血液，将管插到 25ml 锥形瓶的瓶底，缓慢地放出血液，勿使血液粘附于吸量管管壁。

准确加入蒸馏水 7 份，混匀，完全溶血后，再加入 2/3N 硫酸 1 份，随加随摇，再加入 10% 的钨酸钠溶液 1 份，随加随摇。加完后充分摇匀，放置 5-10 分钟，如振摇亦不再发生泡沫，说明蛋白质已完全变性沉淀。用定量滤纸过滤或离心（2500 转/分，10 分钟），即得完全澄清无色之无蛋白血滤液。如滤液不清，需重滤。

如此制得的无蛋白滤液每毫升相当于 1/10ml 全血。

二、测定血糖

取 4 支具有 25ml 刻度的血糖管，编号后按下表进行操作：

试剂	血糖管	空 白 管	低浓度标准管	高浓度标准管	测 定 管
无蛋白滤液 (ml)		—	—	—	1.0
蒸馏水 (ml)		2.0	1.0	—	1.0
标准葡萄糖应用液 (ml)		—	1.0	2.0	—
碱性铜试剂 (ml)		2.0	2.0	2.0	2.0
混匀, 置沸水浴中煮 8 分钟。取出, 用流动自来水冷却 3 分钟 (切勿摇动血糖管)					
磷钼酸试剂 (ml)		2.0	2.0	2.0	2.0
混匀后放置 2 分钟 (使二氧化碳气体逸出)					
1: 4 磷钼酸溶液加至		25	25	25	25

1: 4 磷钼酸溶液加至 25ml 后, 用橡皮塞塞紧管口颠倒混匀, 用空白管调“0”点, 在 420nm 波长处或用蓝色滤光板进行比色, 读取各管光密度值。

三、计算:

高标准管:

$$\frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 0.2 \times \frac{100}{0.1} = \frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 200 = \text{葡萄糖 mg / 100ml}$$

低标准管:

$$\frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 0.2 \times \frac{100}{0.1} = \frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 100 = \text{葡萄糖 mg / 100ml}$$

试剂和器材

一、试剂

(1) 草酸钾粉末 (A.R.)。

(2) 10% 钨酸钠溶液: 称取钨酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100g 溶于少量蒸馏水, 最后加蒸馏水至 1000ml。此液以 1% 酚酞为指示剂试之应为中性 (无色) 或微碱性 (呈粉红色)。否则蛋白质沉淀不完全。其校正方法是取此溶液 10ml, 加入 0.1N 硫酸溶液 0.4ml, 再加入 1% 的酚酞 1 滴, 溶液应呈粉红色。若呈紫红色, 可加入 0.1N 硫酸溶液, 若呈黄色, 需加入 0.1N 氢氧化钠溶液, 直到出现不退色的粉红色的中性反应为止。计算出应加的酸或碱的量。

(3) 2/3N 硫酸溶液。

(4) 葡萄糖标准液:

贮存液: 称取 1000 mg 恒重过的葡萄糖 (A.R.), 溶于水, 稀释到 100ml, 其浓度为 10mg / ml。

应用液: 取 1ml 贮存液置于 100ml 容量瓶中, 用苯甲酸稀释到刻度。浓度为 0.1mg / ml。

(5) 碱性铜试剂: 取无水碳酸钠 40g 溶于 400ml 蒸馏水中; 在 300ml 蒸馏水中加入 7.5g 酒石酸, 在 200ml 蒸馏水中加入 4.5g 硫酸铜结晶, 分别加热使其溶解, 冷却后将酒

石酸溶液倾入碳酸钠溶液中，混合移入到 1000ml 容量瓶中，再将硫酸铜溶液倾入并加水至刻度。此试剂可于室温下长期保存。如有沉淀产生，需过滤后方可使用。

(6) 磷钼酸试剂：在烧杯内加入钼酸 70g，钨酸钠 10g，10% 氢氧化钠溶液 400ml 及水 400ml。煮沸 20—40 分钟，驱去钼酸中可能存在的氨。冷却后加入 250ml 浓磷酸 (85%)，混合，稀释至 1000ml。

(7) 0.25% 苯甲酸溶液：称取苯甲酸 2.5g，加入 1000ml 蒸馏水中，煮沸使之溶解，冷却后补加蒸馏水至 1000ml，贮于瓶中，可以长期保存。

(8) 1: 4 磷钼酸稀释液：取磷钼酸试剂 1 份，加蒸馏水 4 份，混匀即可。

二、器材

(1) 奥式吸量管 (1ml)。

(2) 吸量管 (10ml, 1ml)。

(3) 小漏斗。

(4) 锥形瓶 (25ml)。

(5) 血糖管。

(6) 581-G 光电比色计 (或 721 型分光光度计)。

(7) 试管和试管架。

(8) 水浴锅。

(9) 电炉。

思考题

1、为什么测定血糖必须预先除去蛋白质？

2、正常人空腹血样的含糖量范围是多少？患糖尿病时，血糖含量有何变化？测定的样品为什么要空腹采血？

3、为什么采用离管底不远处有一紧缩收口的血糖管定糖？为什么要选用奥式吸量管取样？

附注

(1) 此方法为磷钼酸显色法 (即福林-吴宪氏法)。此法系根据氧化还原作用，血滤液中除葡萄糖外还含有其他还原性物质，因此测得之血糖含量较实际葡萄糖含量稍高。但此法习用已久，而且用钨酸制备无蛋白血滤液较为方便，所得滤液同时可作血液中其它成分的测定，所以此法目前仍为各实验室所常用。

(2) 血液内含草酸盐抗凝剂过多时，pH 不适当，可使血红蛋白等沉淀不完全，且不易转变为暗棕色，沉淀后上清液不清晰。此是可以滴入 10% 硫酸 1 滴，用力摇匀至转变为暗棕色时，再使之沉淀，过滤。但硫酸切勿加入过多，否则可使血液中尿酸沉淀，葡萄糖分解，而有碍于测定。

(3) 血糖测定应在采血后立即进行，以免血糖分解。但若做成无蛋白滤液后，滤液可在冰箱内贮存。

(4) 血糖管要直接放入沸水中，保持直立使其受热一致。加热时间要准确（8分钟），时间过久，呈色较深；时间不足，颜色过浅，均影响结果的准确性。冷却时，切不可摇动血糖管，以防还原的氧化亚铜被空气中的氧所氧化，降低实际结果。

(5) 加入磷钼酸溶液后所显颜色不稳定，故比色要迅速进行。用红色滤光板（或在600nm波长处）时颜色变化比较明显，用蓝色滤光板（或在420nm波长处）时一般在15分钟内稳定不变，所以虽然反应生成物为蓝色，比色时仍采用蓝色滤光板（或在420nm波长处）。

(6) 标准管与测定管颜色相差过远时，比色易发生误差，故宜同时作高低两种标准管。如果测定管颜色明显深于高标准管，以致无法比色时，可用1:4磷钼酸成倍稀释，比色结果乘以稀释倍数即可。若测定管颜色较低标准管颜色更明显浅时，可再用1:4磷钼酸稀释时，只稀释至12.5刻度处即可，比色后计算结果除以2即可。

实验二 斐林试剂法测定总糖

目的和要求

学会和掌握斐林试剂法的定糖原理和方法。并正确掌握滴定管的使用方法和热滴定的终点。

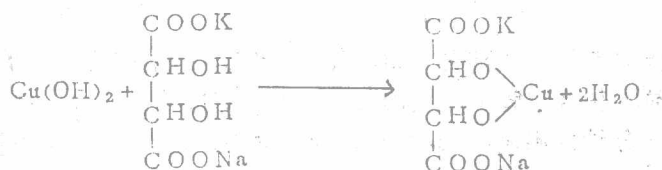
原 理

样品糖类经盐酸水解后全部转变成单糖。还原糖在碱性溶液中能将 Ag^+ 、 Hg^+ 、 Cu^{2+} 等金属离子还原，而糖本身则氧化成各种羧酸，此特性常用于糖的定性和定量测定。

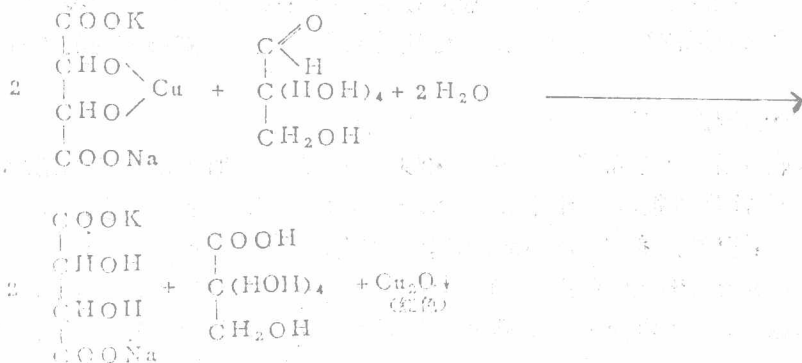
本实验采用斐林试剂热滴定法，氧化剂是斐林试剂，由甲、乙两种溶液组成，试剂甲为硫酸铜，次甲基蓝；试剂乙为氢氧化钠，酒石酸钾钠和亚铁氰化钾。甲、乙两液混合后，硫酸铜与氢氧化钠反应生成天蓝色氢氧化铜沉淀。



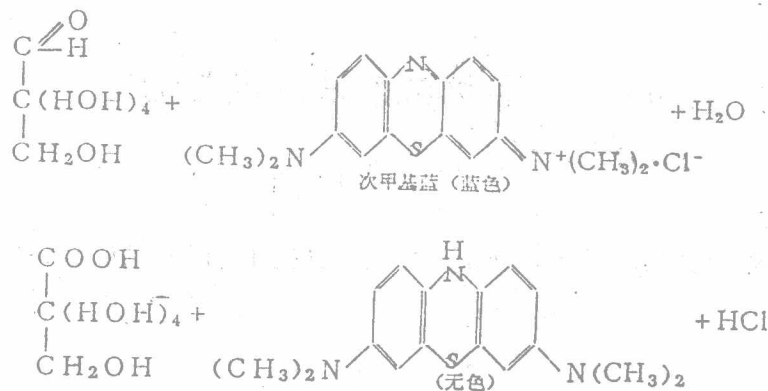
氢氧化铜在酒石酸钾钠存在时呈溶液状态，生成深蓝色的酒石酸钾钠铜。



酒石酸钾钠铜与还原糖共热时，二价铜离子即被还原成一价的氧化亚铜红色沉淀。



斐林试剂中二价铜的还原力比次甲基蓝强，因此所滴入的标准葡萄糖溶液首先使二价铜还原，只有当二价铜被还原完毕后，才能使次甲基蓝还原为无色，测定中以此作为滴定终点。



由于次甲基蓝遇空气即氧化变蓝色，故整个测定过程必须在隔绝空气的情况下进行，加热保持沸腾，使水蒸汽不断逸出，可以防止空气的干扰。但是还不能改善在反应中产生红色或黄色的氧化亚铜沉淀，干扰终点的辨别。为此一方面提高碱性，增加铜盐的溶解度，另一方面加入亚铁氰化钾使生成的氧化亚铜和亚铁氰化钾形成可溶性化合物，而不再析出，使终点敏锐易见，其反应为：



操作步骤

一、空白测定

准确吸取斐林氏试剂甲、乙液各 5ml，置于 125ml 三角烧瓶中，加水 10ml 振荡均匀后，放入玻璃珠 2 粒，从滴定管中一次加入一定量的标准葡萄糖液，将三角烧瓶置 800W 电炉上加热，使其 2 分钟内沸腾，沸腾 30 秒后，立即以每滴 4—5 秒的速度继续滴入标准葡萄糖液直至蓝色消失，溶液呈浅黄色，即为终点。记录消耗标准葡萄糖液总体积，至少应做三份平行测定，取其平均值，为测定空白时耗用的标准葡萄糖液 ml 数。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液，加入溶液的数量，应在正式滴定前的预备滴定试验时确定。

二、总糖的测定

准确称取样品 1g 全部移入 250ml 带塞锥形瓶中，加 6mol/L 盐酸 10ml，蒸馏水 15ml 混匀，然后盖住瓶口，置沸水中煮沸半小时。沸腾结束后，立即置流水中冷却。后于样液中加入酚酞指示剂 1 滴，用 10% 氢氧化钠中和至溶液呈微红色。若水解液本身颜色较深，可用精密 PH 试纸测试，使溶液 PH 约为 7。样液调至中性后，过滤，滤液用 100ml 容量瓶接收，用水充分洗涤残渣，然后用蒸馏水定容至刻度，摇匀，为测定总糖的样品液。

准确吸取样品液 5ml 放于 125ml 锥形瓶内，加入斐林甲、乙液各 5ml，混匀，放入玻璃珠 2 粒；然后从滴定管中加入一定量标准葡萄糖溶液，将锥形瓶置于电炉上加热，使其 2 分钟内沸腾，沸腾结束后，立即继续用标准葡萄糖溶液趁沸在电炉上滴定至蓝色消

失，溶液呈浅黄色，即为终点。记录消耗标准葡萄糖溶液总体积。同样做三份平行测定，取其平均值。

三、计算

$$\text{总糖}(\%) = \frac{(V_1 - V_2) \times \text{标准葡萄糖液浓度}(g/ml) \times \text{稀释倍数}}{\text{称取的样品量}(g)} \times 100$$

式中：

V_1 为测定空白时耗用的标准葡萄糖液 ml 数。

V_2 为测定总糖时耗用标准葡萄糖液的 ml 数。

试剂和器材

一、试剂

(1) 斐林试剂（定量）

① 斐林甲液：称取 15g 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)和 0.05g 次甲基蓝，溶于 1000ml 水中。

② 斐林乙液：称取 50g 酒石酸钾钠，54g 氢氧化钠和 4g 亚铁氧化钾溶于 1000ml 水中。

(2) 标准葡萄糖溶液：称取葡萄糖（预先在 105°C 烘干、恒重）1g，用少量蒸馏水溶解后加入 8ml 浓盐酸（防止微生物生长），再用蒸馏水定容至 1000ml。

(3) 6mol/L 盐酸溶液

(4) 10% 氢氧化钠

(5) 85% 乙醇

(6) 酚酞指示剂

二、器材

(1) 酸式滴定管(25ml)

(2) 带塞锥形瓶(250ml)

(3) 吸量管（5、10ml）及吸量管架。

(4) 容量瓶(100ml)

(5) 电炉(800 或 1000W)

(6) 三角烧瓶(125ml)

(7) 铁台

(8) 石棉网

(9) 万能夹和双顶丝

思考题

1、总糖包括哪些化合物？

2、在本实验中为什么要设计空白测定？