

生物物质常用化学分析法

蔡武城 袁厚积 主编

科学出版社

内 容 简 介

本书介绍糖类、脂肪类、蛋白质类、核酸类、维生素类、激素类和辅酶类等物质的化学分析法。选用的方法包括生产(医、工、农)、教学和科学研究中常用的、经典的、半微量的或微量的方法以及近年来广泛应用的新方法。每种方法的编写分原理、试剂配制和操作程序。内容具体,切实可行。

本书可供生物化学、生物学、制药工业、医学临床和化验工作的科技人员及有关高等院校师生参考。

生物化学实验技术丛书 生物物质常用化学分析法

蔡武城 袁厚秋 主编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1982年8月第一版 开本:787×1092 1/16
1982年8月第一次印刷 印张:13 1/4 插页:1
印数:0001—7,600 字数:302,000

统一书号:13031·1965

本社书号:2671·13—10

定 价: 2.15 元

编 者 的 话

在二十世纪有了惊人发展的生物学中,生物化学是最活跃的分支学科之一。促使生物化学迅速发展的重要因素之一是新技术的开发。

过去一、二十年间生物化学的实验方法日趋专门化和复杂化,牵涉到生化实验工作的领域也越来越多。今天,农业、工业、医学、环境以及生命科学等的研究都涉及生物化学研究,生化实验已成为常规的实验操作了。因此,对于开始进行生化研究的工作者,或者要开拓自身专业领域以外生化研究领域的工作者来讲,都希望能有一本合适的实验指导书。有鉴于此,科学出版社于1977年夏委托中山大学在广州召开了由国内从事生化工作的部分研究所(生物化学研究所、微生物研究所)、大学(中山大学、北京大学、武汉大学、南开大学、南京大学、复旦大学)、工厂(江门甘蔗化工厂、生物化学研究所东风生化试剂厂)参加座谈会,拟定了编写一套切实可行,供有关工作者随时查阅参考的《生物化学实验技术丛书》。

本《丛书》各册编写的内容是建国以来国内已经应用、开展或正在开展的生化技术。随着我国生化研究工作的进展,国外新技术的引进,国内独创技术的开展,将不断补充新的内容。

本《丛书》着重在实验技术,各册内容力求做到:

- (1) 理论部分简洁明了;实验部分力求重复性高;
- (2) 直接触及实验设计的各项要领;
- (3) 指出实验操作中应注意的地方;
- (4) 尽可能多的举例说明。

本《丛书》的编写,虽经大家共同努力,但缺点错误在所难免,热情希望读者批评指正。如果本《丛书》的出版,能为我国赶超世界先进水平,推动生物化学的进展,实现科学技术现代化作出一些贡献,编者将感到十分高兴。

前 言

本分册《生物物质常用化学分析法》包括糖类、脂肪类、蛋白质类、核酸类、维生素类、激素类和辅酶类等物质常用的化学测定方法。各类物质的定性和定量分析着重于化学的分析法,选用的方法包括国内生产(包括医、工和农)、教学和科学研究上常用的、经典的、半微量的或微量的方法,也有近年来广泛应用的新方法。每种方法的编写主要分原理、试剂配制及操作步骤三个部分,并对需要特别注意或解释之处加以说明。编写过程中力求切实可行,有时同一种物质介绍数种方法,读者可根据自己的要求、实验室条件进行适当的选择。

参加本分册编写的有:复旦大学蔡武城、**袁厚积**、赵志安、朱俭、曹凯鸣;南开大学王诚一、马明、蒋谷人、李翠凤;生物化学研究所东风生化试剂厂顾涵英。复旦大学沈仁权(第二、三和七章);生物化学研究所王德宝(第四章)、潘家秀(第三章)、孙玉昆(第七章);南开大学李建民(第六章);上海第一医学院附属中山医院刘泽民(第二章第三节);上海商品检验局张志贤(第二章第一、二节)等同志在百忙中给予审阅,在此我们谨向这些同志和其他曾给予支持和帮助的许多同志表示衷心感谢。

由于我们业务水平有限,实验经验不足,本书肯定有不少缺点甚至错误,恳请读者批评指出。

蔡武城 **袁厚积**

1980年3月

目 录

第一章 糖类	1
一、还原糖的测定	1
(一) 斐林试剂热滴定法	1
(二) 斐林试剂比色法	3
(三) 蒽酮比色法	4
(四) 纳尔逊-索模吉试剂比色法	4
(五) 金氏(King)定糖法	5
(六) 哈丁试剂滴定法	6
(七) 3,5-二硝基水杨酸目测法	7
(八) 3,5-二硝基水杨酸比色法	8
二、含醛基糖的测定	9
(一) 次亚碘酸滴定法	9
(二) 邻甲苯胺比色法	11
三、葡萄糖的测定	12
(一) 葡萄糖氧化酶测定法	12
(二) 在硅胶G薄层上的分离鉴定及定量测定	13
四、果糖的测定——钼酸铵比色法	14
五、蔗糖的测定——Roe比色法	15
六、五碳糖的测定——苔黑酚比色法	16
七、氨基葡萄糖的测定	16
八、生物材料中糖类物质的分析	17
(一) 生物材料的预处理的一般方法	17
(二) 苹果中糖类的分离鉴定及定量测定	19
(三) 小麦籽粒中可溶性糖的鉴定及定量测定	21
参考资料	22
第二章 脂质类	23
第一节 脂肪化学性质的测定	23
一、碘值	23
二、皂化值	25
三、不皂化值	27
四、酸值	29
第二节 粗脂肪的定量测定	30
第三节 血清中脂质类的测定	31
一、血清 β -脂蛋白	31
二、血清胆固醇	32
(一) 邻苯二甲醛法	32
(二) 改良 Abell 氏法	34
三、血清甘油三酯	35
(一) 直接法	35
(二) 快速法	36

四、血清脂蛋白电泳	38
(一) 醋酸纤维薄膜脂蛋白电泳	38
(二) 聚丙烯酰胺脂蛋白电泳	40
参考资料	42
第三章 蛋白质类	43
第一节 氨基酸和蛋白质的定性测定	43
一、氨基酸的定性测定	43
(一) 氨基酸的一般显色反应	43
(二) 个别氨基酸的显色反应	46
二、蛋白质的定性测定	49
(一) 蛋白质的一般显色反应	49
(二) 复合蛋白质的显色反应	51
第二节 氨基酸的定量测定	52
一、氨基酸的一般定量测定	52
(一) 茚三酮法	52
(二) 三硝基苯磺酸法	54
(三) 铜复合物紫外吸收法	57
(四) 邻苯二甲醛法	58
(五) 甲醛滴定法	59
(六) 非水溶液滴定法	60
(七) 量气法	62
(八) 酰胺氮测定法	65
二、个别氨基酸的定量测定	68
(一) 赖氨酸的测定	68
(二) 色氨酸的测定	70
(三) 亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的联合测定	74
(四) 苯丙氨酸的测定	77
(五) 酪氨酸的测定	79
(六) 脯氨酸的测定	80
(七) 羟脯氨酸的测定	81
(八) 胱氨酸的测定	83
(九) 谷氨酸的测定	84
(十) 谷氨酰胺的测定	86
(十一) 巯基的测定	88
第三节 蛋白质的定量测定	89
一、克氏定氮法	89
(一) 总氮量的测定法	89
(二) 微量克氏定氮-茚三酮法	92
二、福林-酚试剂法	93
(一) Lowry 基本法	93
(二) 在有干扰物质存在下的改良测定法	94
(三) 简易测定法	95
三、双缩脲法	95
(一) 双缩脲常量法	96
(二) 双缩脲半微量法	96
四、紫外吸收法	97
(一) 280 毫微米的光吸收法	97
(二) 280 毫微米和 260 毫微米的吸收差法	98

(三) 215 毫微米和 225 毫微米的吸收差法	99
(四) 肽键测定法	90
五、考马斯亮蓝染色测定法	99
第四节 蛋白质的末端测定	101
一、N-末端测定——二甲氨基萘磺酰氯法	101
二、C-末端测定——肼解法	105
参考资料	108
第四章 核酸类	110
第一节 核酸的分离提取	110
一、DNA 的提取	111
(一) 小牛胸腺 DNA 的提取	111
(二) 微生物 DNA 的提取	112
二、RNA 的提取	113
(一) 肝脏 RNA 的提取	113
(二) 酵母 RNA 的提取	114
第二节 核酸及其组分的定量测定	115
一、定磷法	115
(一) 酸解脱磷法	115
(二) 过碘酸氧化脱磷法	117
二、定糖法	118
(一) RNA 的定量测定	118
(二) DNA 的定量测定	120
三、紫外吸收法	122
(一) 标准值测定法	123
(二) 比消光系数法	124
(三) 克分子消光系数法	125
(四) 克原子磷消光系数 (ϵ_{P}) 法	125
四、荧光法	126
(一) 微量测定寡核糖核苷酸 3'-末端	126
(二) 微量测定双链核酸	127
五、DNA 中 GC 克分子百分率 [(G + C)%] 的测定	128
(一) 化学方法	128
(二) 物理方法	128
第三节 核酸的水解	130
一、化学水解法	130
(一) DNA 的水解	130
(二) RNA 的水解	130
二、酶促水解法	131
第四节 核酸水解产物的分离鉴定	131
一、层析分离鉴定	131
(一) 纸层析法	131
(二) 薄层层析法	135
(三) 离子交换树脂柱层析法	139
二、电泳分离鉴定	144
(一) 纸电泳分离核苷酸	144

(二) 琼脂糖凝胶电泳分离核苷酸	145
(三) 琼脂糖凝胶圆盘电泳分离 ECoRI 酶解 λ DNA 片段	146
第五节 组织中核酸含量的测定	147
一、组织材料的预处理	147
(一) Schneider 测定法(酸处理法)	148
(二) Schmidt 和 Thannhauser 法(碱处理法)	148
二、大白鼠肝组织核酸含量的测定	148
附录 常用核酸类物质的常数表	151
参考资料	153
第五章 维生素类	154
一、维生素 A 比色测定法	154
二、维生素 B ₁ (硫胺素) 荧光测定法	157
三、维生素 B ₂ (核黄素) 荧光测定法	159
四、维生素 B ₆ (盐酸吡哆醇) 比色测定法	161
五、维生素 C (抗坏血酸) 定量测定法	162
(一) 2,6-二氯酚靛酚滴定法	162
(二) 2,4-二硝基苯肼法	163
(三) 碘滴定法	165
六、维生素 D 比色测定法	166
参考资料	168
第六章 激素类	169
一、甾类激素——直接紫外分光光度法	169
二、甾酮——异菸肼反应法	172
三、甾酮——2,4-二硝基苯肼反应法	174
四、次甲基酮-碱性二硝基苯反应法	176
五、17,21-二羟基皮(甾)醇——盐酸苯肼反应法	179
六、 α -醇酮基——高碘酸氧化反应法	181
七、 α -醇酮基——四氮唑盐反应法	183
八、甾类酯类——碱性羟胺反应法	184
九、雌激素——铁-酚试剂反应法	185
十、尿中雌(甾)酮、雌(甾)二醇、雌(甾)三醇——Brown 测定法	187
十一、尿中孕(甾)二醇——Kiopfer 测定法	190
参考资料	192
第七章 辅酶类	193
一、辅酶 I——醇脱氢酶法	193
二、还原型辅酶 I——乳酸脱氢酶法	195
三、辅酶 II——葡萄糖-6-磷酸脱氢酶法	196
四、还原型辅酶 II——谷胱甘肽还原酶法	198
五、黄素腺嘌呤二核苷酸——光吸收法	199
六、硫胺素焦磷酸——纸层析法和光吸收法	200
七、磷酸吡哆醇——纸层析法和光吸收法	200
八、磷酸吡哆胺——纸层析法和光吸收法	201
九、辅酶 A——乙酰化酶-磺胺法	202
参考资料	204

第一章 糖 类

朱 俭 曹凯鸣 袁厚积

糖类是自然界分布很广,数量最多的有机化合物,也是生物体生命活动能量的主要来源和生物体必需的组成物质。例如,核酸的骨架中有 D-核糖;某些蛋白质中有糖的成分;细胞膜,细胞壁也有糖类化合物参加构成。特别在植物组织中约有 85—90% 的糖类,它不仅构成植物的躯体和细胞,而且在植物的种子(谷类)和瓜果中都含有大量的糖类。在动物体中糖的含量约占 2%,动物的血液,肝脏、肌肉中都有丰富的糖类物质,因此在生化物质分析中糖类的测定就显得十分重要。

糖类是多羟醛或多羟酮及其缩聚物和它的某些衍生物的总称。通常根据分子中的单糖数目把糖分成三类:(1)单糖,如葡萄糖、果糖和 D-核糖等;(2)二糖、三糖等低聚物,如乳糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖等;(3)多聚糖,是由多个分子的单糖或其衍生物所组成,如淀粉、纤维素、糖原、半纤维素和粘多糖等。

本章介绍还原糖的多种测定方法及含醛基糖、五碳糖的测定方法,并介绍葡萄糖、果糖、蔗糖和氨基葡萄糖专一测定的方法,最后以苹果肉及小麦籽粒为例介绍生物材料中可溶性糖的分离鉴定及定量测定方法。

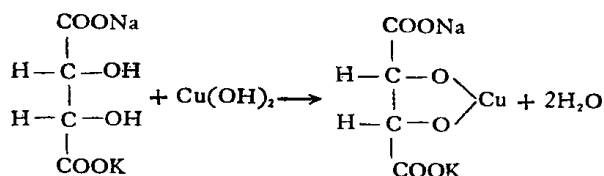
一、还原糖的测定

(一) 斐林试剂热滴定法

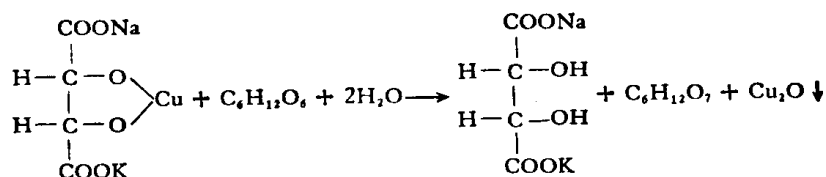
原理

还原糖是指含有自由醛基和酮基的单糖类以及某些二糖如乳糖、麦芽糖。在碱性溶液中还原糖能将两价铜离子等金属离子还原,而糖本身氧化成各种羟酸,以此特性作为糖的定量测定。

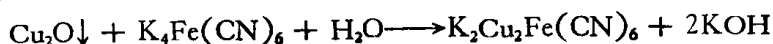
本法采用斐林试剂热滴定法,氧化剂是斐林试剂,它由甲、乙二种溶液组成。甲液含有硫酸铜和次甲基蓝;乙液含有氢氧化钠,酒石酸钾钠和亚铁氰化钾。当甲、乙两液混合时,硫酸铜与氢氧化钠起作用生成天蓝色氢氧化铜沉淀,而酒石酸钾钠在碱性溶液中使沉淀的氢氧化铜溶解而成络合物。



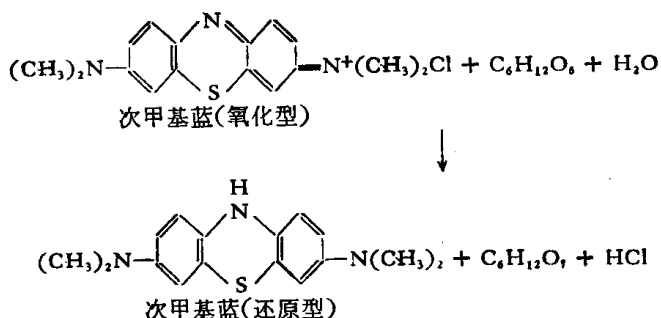
此络合物与还原糖共热时,两价铜即被还原为一价氧化亚铜(红色沉淀)。



氧化亚铜与试剂中亚铁氰化钾反应生成可溶性化合物而不复析出。



斐林试剂中两价铜的还原能力比次甲基蓝强，因此所滴定的葡萄糖溶液首先使两价铜还原，只有当二价铜被还原完毕后才能使次甲基蓝还原为无色，故次甲基蓝在此作为指示剂。



在实验时先做一对照管(不加样品)，用标准葡萄糖滴定一定体积斐林试剂中两价铜和次甲基蓝的量，即测定对照管消耗标准葡萄糖的量(A)。然后做样品管，样品中还原糖消耗斐林试剂中一部分两价铜，剩余的量再用标准葡萄糖滴定，即样品消耗标准葡萄糖量(B)，将(A)减去(B)即可求得样品中还原糖量。

试剂

1. 斐林试剂甲液 称取15克硫酸铜，0.05克次甲基蓝溶于蒸馏水中并定容至1升。
2. 斐林试剂乙液 称50克酒石酸钾钠，54克氢氧化钠，4克亚铁氰化钾溶于蒸馏水中并定容至1升。
3. 标准葡萄糖溶液(0.1%) 精确称取葡萄糖(在105℃干燥至恒重)1克溶于蒸馏水中并定容至1升。
4. 6N盐酸 量取浓盐酸(35—38%)500毫升加蒸馏水至1升。
5. 6N氢氧化钠 称取氢氧化钠240克溶于蒸馏水并定容至1升。

操作步骤

1. 空白管测定 取斐林试剂甲、乙液各5毫升，置250毫升三角瓶中，由滴定管加适量0.1%标准葡萄糖溶液，在电炉上加热至沸，然后以4—5秒一滴的速度继续自滴定管中加入标准葡萄糖溶液，滴定至蓝色消失，记下总共所消耗的葡萄糖体积(A)。

2. 样品测定 6—7毫升待测样品溶液(含糖量在3—4毫克/6—7毫升)，加斐林试剂甲、乙液各5毫升，置250毫升三角瓶中，同空白测定一样操作，记下所耗标准葡萄糖体积(B)。

3. 计算

$$\text{还原糖}\% = \frac{(A - B) \times \text{葡萄糖浓度毫克/毫升} \times \text{稀释倍数}}{\text{吸取毫升数} \times \text{样品称量}} \times 100$$

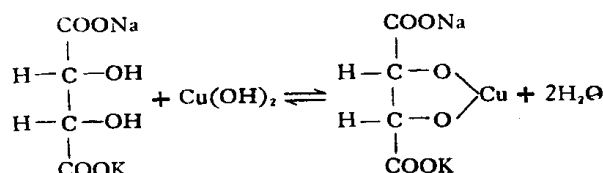
式中：A 为测定空白时耗用的标准葡萄糖毫升数。B 为测定样品时耗用的标准葡萄糖毫升数。

(二) 斐林试剂比色法^[1]

原理

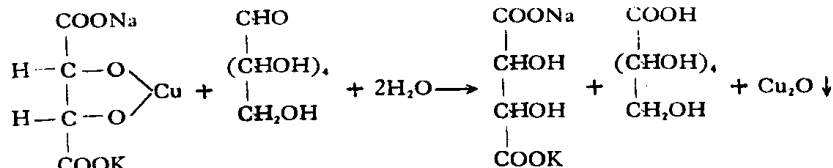
斐林试剂脱色法是热滴定法的一个改进。

斐林试剂是由甲、乙二种溶液混合而成，甲液含有硫酸铜，乙液含有氢氧化钠和酒石酸钾钠。硫酸铜与氢氧化钠作用生成天蓝色的氢氧化铜沉淀 ($\text{CuSO}_4 + 2\text{NaOH} \rightarrow \text{Cu}(\text{OH})_2 + \text{Na}_2\text{SO}_4$)。而酒石酸钾钠在碱性溶液中使氢氧化铜溶解生成复杂的化合物（一种络合物）。其反应如下：



此复杂的化合物具有与普通铜盐略有不同的天蓝色，但仍有铜盐所有的普通反应。

单糖和多糖的水解物都含有醛基或酮基，在碱性条件下煮沸能使斐林试剂中的二价铜离子还原为一价的氧化亚铜，而使蓝色的斐林试剂脱色，脱色的程度与溶液中含糖量成正比。



此法的优点是操作简便，斐林试剂可不作定量配制，测定误差在 $\pm 0.02\%$ ，但须经常作标准曲线校正。本法测定范围在 0.1—0.5 毫克/毫升还原糖，如果含糖量超过本范围误差显著增大。

试剂

1. 斐林试剂甲 40 克硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶解于蒸馏水并定容至 1 升。
2. 斐林试剂乙 200 克酒石酸钾钠 ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 与 150 克氢氧化钠溶于蒸馏水并定容至 1 升。

在使用前取 20 毫升甲液，加入等体积的乙液。

3. 0.1% 葡萄糖标准液 取 105℃ 干燥 2 小时的恒重葡萄糖 0.1 克，加蒸馏水溶解并定容至 100 毫升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 在各试管中分别加入 0.1% 葡萄糖标准液 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 毫升，并分别加蒸馏水补足到 6 毫升，每管含葡萄糖各为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 毫克，分别在各管中加入 4 毫升斐林试剂，混和后，在试管口用玻璃球盖好，放入沸水浴加热 15 分钟，

取出后在流水中冷却,再经 1500 转/分离心 5 分钟,取上清液在 590 毫微米波长处进行比色测定,以蒸馏水作比色时的对照,读取含不同浓度糖的各管的光密度值和空白管的光密度值。然后把空白管的光密度值减去各管不同浓度糖的光密度值,并以此差值作纵座标,各相对的糖含量作横座标,绘制标准曲线。

2. 样品测定 6 毫升待测样品溶液(适当稀释至 0.5 毫克/毫升左右还原糖量)加 4 毫升斐林试剂并和标准曲线同样操作,在 590 毫微米波长处测出光密度值。最后把不含样品(即不含糖)的空白管光密度值减去样品测得的光密度值,根据此差值在标准曲线上查得糖的含量并乘以样品稀释倍数,计算出单位体积(或重量)样品中的含糖百分量。

(三) 蒽酮比色法

原理

糖在浓硫酸作用下生成糖醛,糖醛与蒽酮 $C_6H_4COC_6H_4CH_2$ 作用能产生一种蓝绿色的物质。蒽酮法适用于己酮糖和己醛糖的测定,在 10~100 微克范围内其颜色的深浅与糖的量成正比关系。由于蒽酮试剂与糖的反应显色强度随时间而变化,因此为使显色强度一致必须在反应后立即进行测定。

试剂

1. 蒽酮试剂 100 毫克蒽酮溶于 100 毫升 98% 硫酸中,呈淡黄色。此试剂须现配现用。

2. 糖标准溶液 精确称取 10 毫克葡萄糖、果糖、木糖或蔗糖,分别以蒸馏水定容到 100 毫升,使成 100 微克/毫升溶液。

操作步骤

1. 糖的标准曲线的制作 取 6 支试管,分别加入 100 微克/毫升的糖标准溶液 0、0.15、0.30、0.45、0.60、0.75 毫升,以蒸馏水补充体积到 2 毫升,使每管内含糖量分别为 0、15、30、45、60、75 微克。加 4 毫升蒽酮试剂,摇匀,沸水浴加热 15 分钟,流动水冷却后测 OD_{620} 值。以含糖量微克数为横座标, OD_{620} 为纵座标制作标准曲线。每一种糖可各自作出相应的标准曲线。

木糖在 620nm 处吸收值较小,采用 580nm 测其 OD 值。

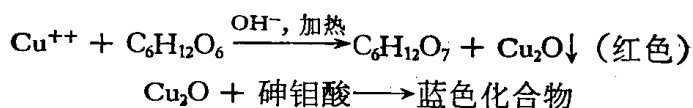
2. 样品含糖量的测定 取待测样品溶液 2 毫升(内含糖 30—60 微克/2 毫升为宜)置于试管内,加 4 毫升蒽酮试剂,摇匀后沸水浴加热 15 分钟,反应完毕以流动水冷却,立即在分光光度计上于波长 620nm 处读取 OD 值。以 2 毫升水代替样品液,如上同样操作并作为空白对照。利用标准曲线计算样品中含糖量。

(四) 纳尔逊-索模吉试剂比色法^[2,3]

原理

纳尔逊-索模吉(Nelson-Somogyi)试剂由硫酸铜、碳酸钠和砷钼酸等组成。葡萄糖在碱性条件下能使二价铜离子还原成低价的红色氧化亚铜,再以砷钼酸溶解并形成蓝色化合物,蓝色的深浅与糖浓度成线性关系,所以可作比色定量测定。

反应如下:



试剂

1. (A)液 称取纯酒石酸钾钠 12 克, 无水碳酸钠 24 克, 加水 250 毫升, 搅匀后向此液中缓慢加入 10% 硫酸铜溶液 40 毫升和碳酸氢钠 16 克。另取 500 毫升热水, 加入无水硫酸钠 180 克, 煮沸驱逐溶解的气体, 冷却后二液注入 1 升容量瓶中混和, 并用蒸馏水定容至 1 升。长期存放后, 如有少量红色氧化亚铜沉淀, 可过滤去除, 滤液可放室温长期保存。

2. (B)液(纳尔逊显色剂) 称取钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 25 克溶于 450 毫升蒸馏水, 再缓慢加入浓硫酸 21 毫升。另取 25 毫升蒸馏水溶解砷酸氢二钠 $(\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 3 克(也可应用砷酸 $\text{H}_4\text{As}_2\text{O}_7$, $M = 265.96$, 1.28 克溶于 19.24 毫升 1 N 氢氧化钠中, 再加水 4.75 毫升), 然后慢慢加入到上述溶液中, 充分混和, 37°C 放 24—48 小时, 溶液逐渐变黄色, 移到棕色瓶中保存。

3. 葡萄糖标准液(100 微克/毫升) 精确称取 10 毫克葡萄糖, 加蒸馏水定容到 100 毫升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 取 100 微克/毫升的葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 毫升, 分别加入各试管, 再以蒸馏水补足各管到 1 毫升。加入 (A) 液 1 毫升, 置沸水浴煮沸 10 分钟, 冷却后加入 (B) 液 1 毫升, 再加蒸馏水 9.5 毫升, 摇匀后在 620 毫微米波长比色测定, 读取光密度值。然后以糖的含量作横座标, 相对应的光密度值作纵座标绘制标准曲线。

2. 样品测定 取 1 毫升待测样品, 含糖量控制在 40—80 微克/毫升。加入试剂量 and 操作方法同标准曲线制作。测得的光密度值在标准曲线上查出含糖量。

(五) 金氏 (King) 定糖法^[4]

原理

还原糖与碱性铜试剂在加热时能使二价铜还原成一价铜的红色沉淀, 然后用纳尔逊 (Nelson) 试剂(含有砷钼酸的试剂)溶解, 使之成为稳定的蓝绿色化合物。蓝绿色的深浅程度与还原糖浓度成正比, 所以可用比色法测定含糖量。

试剂

1. 铜试剂

(A) 液(硫酸铜溶液 0.6%): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.6 克以蒸馏水溶解后定容至 100 毫升。

(B) 液: 700 毫升水中溶解碳酸氢钠 50 克, 再加入无水碳酸钠 40 克, 使完全溶解。另用 120 毫升热水溶解草酸钾 $[\text{K}(\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ 36.8 克。再另用 100 毫升水溶解酒石酸钾钠 $[\text{KNa}(\text{CHOHCOO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 24 克, 此二液加入到上述溶液中, 最后定容至 1 升。

使用前 A、B 二液等量相混, 但 A 液必须逐滴加到 B 液中, 并边加边摇匀。

2. 纳尔逊显色剂 450 毫升水中加入钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ $M = 1236.30$

25 克,使溶解之。缓慢加入浓硫酸 21 毫升,并摇匀。另用 25 毫升水溶解砷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3 克(也可用砷酸 $\text{H}_4\text{As}_2\text{O}_7$, $M = 265.96$, 1.28 克以 1N 氢氧化钠溶液 19.24 毫升溶解,再加入水 4.75 毫升,代替此液)。二液混和后在 37°C 保温 24—48 小时,溶液逐渐变黄,最后移入棕色瓶中保存。使用前以 1 体积试剂加入 2 体积蒸馏水稀释之。

3. 葡萄糖贮存液 1 毫克/毫升 0.1 克葡萄糖先用蒸馏水溶解,再定容至 100 毫升。

4. 测定用葡萄糖标准液 100 微克/毫升 取 10 毫升上述贮存液,用蒸馏水定容至 100 毫升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 分别取 100 微克/毫升葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 毫升,加入到各试管中,并用蒸馏水补足至 1 毫升,再分别加入铜试剂 1 毫升,混合后在管口盖一玻璃球,然后放在沸水浴上加热 10 分钟,迅速冷却到室温,加入 3 毫升纳尔逊试剂,即产生蓝绿色,再加入蒸馏水 3 毫升,摇匀后在 620nm 波长下比色测定,以不含糖的空白管作为比色测定时的对照,读取各测定管的 OD_{620} 值。以葡萄糖含量为横座标,相应的光密度值为纵座标,制作标准曲线。

2. 样品测定 取待测样品 1 毫升(含糖量控制在 40—60 微克/毫升),以后操作完全同标准曲线。样品测定可并列作三个以便纠正误差。将样品所测的光密度值,在标准曲线上查得含糖量,然后按样品的稀释倍数计算出单位体积(或重量)中糖的含量。

(六) 哈丁试剂滴定法^[5]

原理

本法是采用哈丁(Harding)试剂来测定葡萄糖的一种滴定法。哈丁试剂有二部分组成: A 液中有硫酸铜; B 液是含有碘酸钾的酒石酸盐溶液,具有缓冲作用。在测定前 A 液与 B 液等量相混。在加热条件下,试剂和葡萄糖反应,使二价铜还原为一价铜,而一价的低铜又被试剂中碘重氧化。所以只要用硫代硫酸钠滴定法测定反应体系中碘的消耗量即可求得糖的量。

试剂

1. 哈丁试剂

A 液: 0.6% 硫酸铜溶液, 6 克 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 以蒸馏水溶解并定容至 100 毫升。

B 液: 用分析纯试剂配制,每 1 升中含有:

24 克 酒石酸钾钠
40 克 无水碳酸钠
50 克 碳酸氢钠
36.8 克 草酸钾
1.4 克 碘酸钾

碳酸氢钠放在约 700 毫升蒸馏水中溶解,再加入碳酸钠使混和溶解。草酸钾另用 120 毫升温水溶解,并加入到上述溶液中。酒石酸钾钠用 100 毫升水溶解,也加入到上述溶液

中。最后加入固体碘酸钾,使完全溶解,并用蒸馏水将溶液定容至 1 升,静置后可能有沉淀析出,但对试剂性质不影响,可过滤去除。

应用前 A、B 二液等量混合,但必须将 A 液在边加边摇状况下逐滴地加入到 B 液中。

2. 2% 碘化钾溶液 2 克碘化钾溶解后加水至 100 毫升。此试剂需新鲜配制。

3. 2N 硫酸

4. 0.1N 硫代硫酸钠溶液 25 克硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $M = 248.2$) 溶解在水中后定容至 1 升(每升中加入 1 毫升 20% 碳酸钠和 10 毫升戊醇可以防腐)。此液用碘量法来标定,但在本法中可以不必要标定。

5. 0.005N 硫代硫酸钠溶液 25 毫升 0.1N 硫代硫酸钠溶液用蒸馏水稀释至 500 毫升。此液一般不能长期保存。

6. 葡萄糖标准溶液 (1 毫克/毫升) 精确称 100 毫克干燥恒重的纯葡萄糖,以蒸馏水溶解后定容至 100 毫升。

7. 淀粉指示剂 1 克淀粉先用少量冷水溶解,然后加入到 100 毫升沸水中,继续煮沸数分钟成透明液

操作步骤

1. 标准曲线制作 分别吸取标准葡萄糖液 (1 毫克/毫升) 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 毫升加到各大试管中,并用蒸馏水补足到 3 毫升。各管含糖量分别为 200、300、400、500 和 600 微克。各管分别加入 Harding 试剂 1 毫升,在管口盖一玻璃球,沸水浴加热 10 分钟后在流水中冷却,再加入碘化钾溶液 1 毫升,2N 硫酸 1 毫升,摇匀后,用 0.005N 硫代硫酸钠溶液滴定,待溶液呈淡黄色时,加入淀粉指示剂一滴,这时溶液呈蓝色,然后继续滴定至蓝色消失,记下各管所耗的硫代硫酸钠量。空白管滴定值(A)是反映试剂中含有的碘量,不同浓度标准葡萄糖测定管所耗的硫代硫酸钠量(B)是反映剩余的碘量,只要将(A)减(B)即为某一浓度葡萄糖和 Harding 试剂反应时所耗的碘量。

以葡萄糖的微克数为横座标,相对应葡萄糖各含量所耗的碘量为纵座标,作出标准曲线。

2. 样品测定 取待测样品 3 毫升(含糖量在 300—500 微克/3 毫升),和标准曲线制作一样操作,把测样品所得的硫代硫酸钠滴定值(B)和空白管(A)的差值,在标准曲线上查出糖量,并按样品稀释倍数计算出单位体积中糖的含量。

(七) 3, 5-二硝基水杨酸目测法^[6]

原理

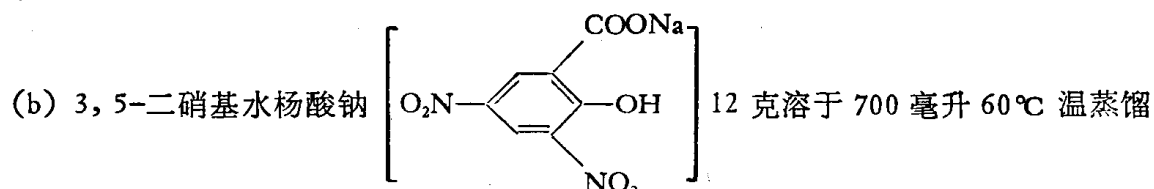
葡萄糖能与 3, 5-二硝基水杨酸钠盐在碱性条件下产生颜色反应,颜色深浅与糖的含量成正比。依据不同浓度的标准葡萄糖溶液与 3, 5-二硝基水杨酸钠盐作用后的标准色管可作比色测定。

试剂

1. 标准葡萄糖溶液(0.2%) 精确称取 200 毫克葡萄糖,以水溶解并定容至 100 毫升。

2.3, 5-二硝基水杨酸钠盐溶液

(a) 酒石酸钾钠结晶 400 克溶解于 600 毫升温蒸馏水中。结晶苯酚 13 克加热使溶并与前者混和,以水定容至 1 升。



水中,加入到上述溶液中,混和后会有黄色沉淀产生。

(c) 再加入亚硫酸氢钠 6 克,使充分混和。

(d) 加入 2.5N 氢氧化钠 300 毫升,充分混和,使黄色沉淀溶解。溶液贮存于棕色瓶中,一周后使用。放置 4—5 月后,可能产生沉淀,可过滤后取滤液使用。

操作步骤

(1) 标准葡萄糖比色管制作: 分别取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 毫升 0.2% 葡萄糖标准溶液,用煮沸并冷却的蒸馏水补足到 4 毫升,各管含糖量分别为 1、2、3、4、5、6 毫克,再分别加入 3, 5-二硝基水杨酸钠盐试剂 4.0 毫升,混和后在沸水浴上加热 3 分钟,放入流动水中冷却。颜色反应随糖量增加而加深,有真黄,浓黄,黄褐,赤褐变化,可将试管封口后作为标准比色管。

(2) 取待测样品 4 毫升(糖含量可控制在标准比色管糖浓度范围内),加入 3, 5-二硝基水杨酸钠试剂 4 毫升,沸水浴加热三分钟,放流动水中冷却后与标准比色管比较,即可求知糖的量。

(八) 3, 5-二硝基水杨酸比色法

原理

单糖都是还原糖,双糖和多糖就不一定是还原糖、根据单糖、双糖和多糖的溶解度不同的性质可以把还原糖和非还原性糖分离开,再利用酸使没有还原性的双糖和多糖彻底水解成具还原性的单糖,通过 3, 5-二硝基水杨酸试剂与还原糖的呈色反应,即可以分光光度法测定样品中还原糖和总糖的含量。

多糖水解后,葡萄糖分子残基上加了一份水,因而在结果计算中须扣除已加入的水量,测定所得总糖量乘以 0.9 即为实际样品中总糖量。

试剂

1. 0.1% 葡萄糖标准液 精确称取 90℃ 烘至恒重的葡萄糖 100 毫克,以蒸馏水溶解并定容到 100 毫升,使成 1000 微克/毫升。

2. 3, 5-二硝基水杨酸试剂 6.3 克 3, 5-二硝基水杨酸和 262 毫升 2N NaOH 加到酒石酸钾钠的热溶液中(182 克酒石酸钾钠溶于 500 毫升蒸馏水),再加 5 克重蒸酚和 5 克亚硫酸钠于上述溶液内,搅拌使溶解。冷却后以蒸馏水定容到 1000 毫升,贮于棕色瓶中。

3. 6N HCl。

4. 6N NaOH。

操作步骤

1. 葡萄糖标准曲线的制作 取5支试管,分别加入1000微克/毫升的标准葡萄糖溶液1、2、4、6、8毫升,以蒸馏水补体积到10毫升。得到一系列不同浓度的标准葡萄糖溶液,他们的浓度各是100、200、400、600、800微克/毫升。

分别吸取上述不同浓度葡萄糖溶液0.5毫升于5支试管内,另取1支试管加入0.5毫升蒸馏水。于上述6管内均加入0.5毫升3,5-二硝基水杨酸试剂并混合均匀。沸水浴加热5分钟后取出以流动水冷却,每管内再加蒸馏水4毫升,摇匀。在分光光度计上于540毫微米处读取光密度值。

以葡萄糖含量(微克)为横坐标,相应光密度值为纵坐标作出标准曲线。

2. 山芋粉样品中还原糖的提取 精确称取山芋粉1克,放在小烧杯中,先以少量水调成糊状,然后加50—60毫升水,50℃保温20分钟后,以水定容到100毫升,过滤、滤液为还原糖提取液,待测。

3. 山芋粉样品中总糖的水解及提取 精确称取山芋粉0.5克,放在大试管中,加6N HCl 10毫升,水15毫升,沸水浴加热半小时,冷却后以6N NaOH调pH至中性(以pH试纸检查)。以水定容到100毫升,过滤。吸取滤液10毫升于100毫升容量瓶内,再以水定容到100毫升,待测。

4. 山芋粉样品中含糖量测定 取7支试管,3支试管内加0.5毫升还原糖提取液,3支试管内加0.5毫升总糖水解液,1支试管内加0.5毫升水,然后同标准曲线一样操作,并在标准曲线上求得相应的还原糖含量并按下式计算出山芋粉内所含还原糖与总糖的百分比。

$$\text{还原糖}\% = \frac{\text{还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品毫克数} \times 0.5} \times 100$$

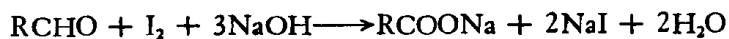
$$\text{总糖}\% = \frac{\text{水解后还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品毫克数} \times 0.5} \times 0.9 \times 100$$

二、含醛基糖的测定

(一) 次亚碘酸滴定法^[1]

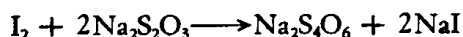
原理

碘在碱性溶液中生成具有强氧化性的次碘酸盐,它能与醛糖反应,使葡萄糖氧化生成葡萄糖酸。对酮糖无反应,因此本法不能用来测定果糖。



醛糖

糖酸盐



利用过量的碘在碱性条件下氧化醛糖,形成糖酸。然后用硫代硫酸钠滴定剩余的碘,即可求知葡萄糖量。

本法可测定1—6毫克葡萄糖量,常应用来测定糖化型淀粉酶活力。