

全国高等农业院校试用教材

西北农业大学 主编

陕西科学技术出版社

全国高等农业院校试用教材

基础生物化学实验指导

西北农业大学主编

农学类专业用

陕西科学技术出版社出版

(西安北大街 131 号)

陕西省新华书店发行 解放军 7226 工厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 9.75 印张 220 千字

1986 年 5 月第 1 版 1986 年 5 月第 1 次印刷

统一书号: 16202·147 定价: 1.57 元

主 编:	汪沛洪	(西北农业大学)
副 主 编:	陈毓荃	(西北农业大学)
编写人员:	马仁懿、王秀珍、郭静成、	
	梁鸿秋、滕晓月	(北京农业大学)
	叶茂炳	(南京农业大学)
	曹淡君	(沈阳农业大学)
	张国珍	(山东农业大学)
	徐 同	(华中农业大学)
	王 康	(西南农业大学)
	金惠芬、敖良德	(甘肃农业大学)
	景菊娣	(浙江农业大学)
	朱美琪、沈明泉	(上海农学院)
	罗泽民	(湖南农学院)
	焦鸿俊	(广西农学院)
	靳华芬、沈 杨	(贵州农学院)
	陈毓荃、郭蔼光、文树基、	
	冯栓士、范英杰	(西北农业大学)
审 定:	赵武玲	(北京农业大学)
	裘子君	(浙江农业大学)
	孙湘宁	(华中农业大学)
	靳华芬	(贵州农学院)
	汪沛洪、陈毓荃、文树基	(西北农业大学)

前 言

近年来,生物化学实验技术发展很快,不仅已经成为生物科学研究的重要手段,而且与工业、农业、医药、食品等各个方面有十分广泛而密切的联系。所以,生物化学实验在高等院校有关专业均列为必修课程。

根据高等农业院校农学类专业教学计划,基础生物化学课程于一九七九年以后开始单独开设。一九八三年四月,《基础生物化学教学大纲》审订会拟定了《基础生物化学实验指导》目录,由全国十四所高等农业院校分头执笔,最后由西北农业大学植物生理生化教研组整理汇编而成。《基础生物化学实验指导》(初稿)于一九八四年三月印出,同年六月在西北农业大学召开的全国高等农业院校基础生物化学实验技术研讨会上进行了交流,经过预做和讨论,许多兄弟院校代表对“初稿”提出了很好的修改意见。会后又经三十多所院校试用,基本上肯定了“初稿”的适用性,同时也提出了进一步修改的意见。在这个基础上,受农牧渔业部委托,一九八五年七月在西北农业大学召开了部分院校参加的《基础生物化学实验指导》审订会。根据与会代表的建议和意见,再次对“初稿”进行了修改和增补,编成这本试用教材。

本教材主要是配合阎隆飞、李明启教授主编的《基础生物化学》通用教材,供高等农业院校农学类专业使用。实验多以植物性材料为主要研究对象;以蛋白质、酶、核酸等生物大分子为主要研究内容。在实验内容安排上,既有定性实验,又有定量实验;既有常规方法,又介绍较新的生化技术。力求反映当前国内生化实验技术水平。本教材共分八个部分。前七部分各列出许多实验项目,包括几种不同的方法,供各院校根据自己的条件选择使用。每一实验都分为目的、原理、实验材料、仪器和试剂、操作步骤、结果计算等几部分阐述。特别需要注意和解释之处,用附注加以说明。力求做到原理阐述简明扼要,方法操作具体详尽,以适应学生初学的要求。最后一部分为附录。

由于我们的经验和水平有限,本教材难免存在不少缺点,希望读者不吝指正,以便今后修改时参考。

编 者

一九八五年十二月

目 录

实验室规则	(1)
实验记录及实验报告	(2)
植物样品的采取、处理与保存	(4)
碳水化合物	(6)
实验一、还原糖和总糖的测定(3,5-二硝基水杨酸比色法)	(6)
实验二、还原糖的测定(斐林试剂比色法)	(8)
实验三、还原糖的测定(斐林——碘量法)	(10)
实验四、还原糖含量的测定(砷钼酸比色法)	(13)
实验五、糖定量测定(蒽酮法)	(16)
实验六、植物组织淀粉和纤维素含量的测定	(18)
实验七、谷物淀粉含量的测定(旋光法)	(20)
实验八、可溶性糖的硅胶G薄层层析	(23)
核 酸	(26)
实验九、酵母核糖核酸的提制	(26)
实验十、植物组织中核酸的提取和测定	(28)
实验十一、单核苷酸的离子交换树脂柱层析分析	(35)
实验十二、三种腺苷酸分离鉴定(纸电泳法)	(39)
脂 类	(41)
实验十三、脂肪浸提——兰氏脂肪测定法	(41)
实验十四、脂肪酸纸层析法	(42)
蛋白质及氨基酸	(44)
实验十五、甘氨酸两性性质的测定	(44)
实验十六、氨基酸的纸层析法	(47)
实验十七、植物组织中氨基酸总量的测定——茚三酮溶液显色法	(51)
实验十八、玉米种子中赖氨酸含量的测定	(53)
实验十九、脯氨酸含量的测定	(55)
实验二十、谷物种子中色氨酸含量的测定	(56)
实验二十一、蛋白质的两性性质及等电点的测定	(57)
实验二十二、总氮量的测定——微量凯氏定氮法	(59)
实验二十三、双缩脲法测定蛋白质含量	(63)
实验二十四、蛋白质含量测定法(Folin—酚法)	(64)
实验二十五、蛋白质含量测定——考马斯亮蓝G-250法	(66)
实验二十六、色素结合法测定谷物蛋白质含量	(68)
实验二十七、紫外吸收法测定蛋白质含量	(70)

实验二十八、凝胶层析脱盐·····	(71)
实验二十九、SDS——聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量·····	(74)
酶 ·····	(78)
实验三十、酶的基本性质·····	(78)
实验三十一、淀粉酶活性的测定·····	(83)
实验三十二、硝酸还原酶活性的测定·····	(85)
实验三十三、植物组织中蔗糖酶活性的测定·····	(88)
实验三十四、琥珀酸脱氢酶活性测定·····	(90)
实验三十五、过氧化氢酶活性测定(碘量法)·····	(92)
实验三十六、过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	(93)
实验三十七、脲酶 K_m 值简易测定法·····	(101)
实验三十八、酸性磷酸酯酶的动力学测定·····	(104)
维生素 ·····	(108)
实验三十九、维生素C含量的测定·····	(108)
代 谢 ·····	(110)
实验四十、植物组织中丙酮酸含量的测定·····	(110)
实验四十一、植物体内的转氨基作用·····	(111)
实验四十二、糖酵解中间产物的鉴定·····	(113)
附录 ·····	(116)
附录一、实验室安全及防护知识·····	(116)
附录二、常用缓冲溶液的配制·····	(118)
附录三、层析法常用资料表·····	(125)
附录四、常用数据表·····	(132)
附录五、常用参考蛋白质的分子量·····	(136)
附录六、常见蛋白质等电点参考值·····	(137)
附录七、色谱显色剂·····	(138)
附录八、数据处理·····	(143)

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。

(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。课后写出简要的报告，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，将实验台面抹拭干净，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，严防混杂污染。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，发现故障立即报告教员，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物都应倒入废品缸内，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。

(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,应该及时地直接记在记录本上,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,都应设计一定的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的另一页上,一般写在正式记录左边的一页。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。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计的损失。因此,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)

(1) 目的和要求

(2) 内容

(3) 原理

(4) 操作方法

(5) 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与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)

- (1) 目的和要求
- (2) 原理
- (3) 试剂配制及仪器
- (4) 操作方法
- (5) 实验结果
- (6) 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、原理以及操作方法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。

植物样品的采取、处理与保存

生物化学分析的准确性，除取决于分析方法的选择是否合适以及全部分析工作是否严格按照要求进行外，在很大程度上还取决于样品的采取是否有最大的代表性。如果不遵循科学方法采样，样品缺乏代表性，即使分析工作严谨无误，也得不到正确的结论。因此，必须对样品的采取、处理和保存给予足够的重视。

从大田或实验田采回的样品，一般数量较大，称为“原始样品”。再按原始样品的种类（如根、茎、叶、花、果实等）分别选出“平均样品”。再根据分析任务的要求和样品的特征，从平均样品中选出供分析用的“分析样品”。由此可见，分析样品的获得须经一系列复杂而仔细的步骤，在实际工作中一定要以高度认真负责的态度对待。

一、原始样品及平均样品的采取、处理与保存：

原始样品及平均样品的采取，按分析目的可有两种方法：一种是为了鉴定品质而进行的混合取样；另一种是按植物生育期取样。

1. 混合取样法：

一般种子样品可用混合取样法。把代表一定面积的收获物先经脱粒，然后在木板或牛皮纸上铺成均匀的一层，再按对角线把样品分成四个三角形，取两个相对的三角形的样品，而将另外两个三角形的样品淘汰。如此操作，一直淘汰到所要求的数量为止。这个取样法叫做“四分法”，这样取得的平均样品在实验室经适当处理即可制成分析样品。

豆类及油料种子选取平均样品的方法与谷类种子取样法相同。注意：样品中不要有未成熟的种子或混杂物，不要将簸出去的种子加到平均样品中。

如果直接从田里采取植株样品，在生长均一的情况下，可按对角线或沿平行的直线等距离采样。如果植株长势不均匀，则应根据生长的强弱，按比例采取大约五个点的样品后混合。每个样点采取的植株数随植物的种类和采样的时间有所不同。如小麦等密植型作物或其它作物幼苗，可按面积采取或采取样品束（一束样品的植株数视需要而定），象玉米、甘蔗等作物，每个样点采取一株就够了。

选取甘薯、马铃薯、甜菜、萝卜等块根、块茎的平均样品时，必须注意到大、中、小三类样品的比例。然后纵切取其一部分（二分之一至四分之一）组织平均样品，否则就失去其应有的代表性。

一般蔬菜样品也按对角线法采取。番茄样品应选择簇位相同、成熟程度一致的果实，取果实的1/4组成平均样品。

采取苹果、梨、桃、柑橘等水果的平均样品时，一般选1~3株果树为代表，从植株的全部收获物中选取大、中、小以及向阳、背阳部分的果实混合成平均样品。葡萄等浆果，采取时可在不同地点的5~10株植物上的各个部位包括向阳、背阳以及上、下各部位采样。

2. 按生育期取样法：

在幼苗期取样，因植株较小，采取的株数就比较多，尽管各种作物有所不同，总的原则

是所取样品的干重应当是分析用量的二倍。

植株逐渐长大，每次采取的株数也相应减少，但绝不能采单株作样品。在各个生育期取样时，都应作观察记录。

取样地点一般在边行区，取样点的四周不应有缺株现象。

取样后，按分析目的分成各个部分，如根、茎、叶、穗等，然后捆好，附上标签，分别装入样品袋。

瓜果、蔬菜取回后因水分较多，容易霉烂，可在冰箱中冷藏，或用干燥灭菌，或用酒精处理或烘干，以供分析之用。

二、分析样品的处理与保存：

采回的新鲜植株样品如果混有泥土，不应用水冲洗，可用湿布擦净，然后置空气流通处风干或烘干。烘干样品时，可把植株放入 80℃ 烘箱中，以停止酶活动并驱除水分。注意温度不能过高，以免把植株烤焦。最好不要晒，以免灰尘沾染或被风刮走。全植株样品应按根、茎、叶、种子等分开。果实必须剖出时，要用锋利的不锈钢刀子，不允许将其中汁液流失。

为了避免糖、蛋白质、维生素等成分的损失，可采用真空干燥或冷冻真空干燥法。

风干或烘干的样品，根据其特点分别进行以下处理：

1. 种子样品的处理：

一般谷物种子的平均样品可用电动样品粉碎机粉碎。事先要把机器内收拾干净，最初粉碎出的少量样品可弃去不用，然后正式粉碎，使全部样品通过一定筛孔的筛子，混合均匀，按四分法取出一定数量的样品细粉作为分析样品，贮存于干燥的磨口广口瓶中，同时贴上标签，注明样品的名称、编号、采取地点、处理、采样日期的采样人姓名等。长期保存时，标签应涂石蜡，并在样品中加适当的防腐剂。

蓖麻、芝麻等油料种子应取少量样品在研钵内研碎，以免脂类损失。

2. 茎秆样品的处理：

干燥后的茎秆样品也要磨碎。粉碎茎秆的粉碎机不同于种子粉碎机，其切割部分由几付排列方向相反的刀片组成。粉碎后的样品按上法保存。

3. 多汁样品的处理：

一般多汁样品，如瓜果蔬菜等，其化学成分（糖、蛋白质、维生素等）在保存中易发生变化，往往多用新鲜样品进行各项测定。将它们的平均样品切成小块，放入电动捣碎机中打成匀浆，如果样品含水量较少，可按样品重量加入适量水，然后捣碎。样品量少时可用手持匀浆器或在研钵内研磨，必要时可在研钵内加少量石英砂。如果所测物质不稳定（如某些维生素和酶等），则上述操作均应在低温下进行。样品匀浆如来不及测定，可暂存冰箱内，或灭菌后密封保存。

4. 丙酮干粉的制备：

在分离、提纯或测定某种酶的活力时，丙酮干粉法是常用的有效方法之一。将新鲜材料打成匀浆，放入布氏漏斗，按匀浆重量缓缓加入 10 倍在低温冰箱内冷却到 -15—-20℃ 的丙酮，迅速抽气过滤，再用 5 倍冷丙酮洗三次，在室温下放置 1 小时左右至无丙酮气味，然后移至盛五氧化二磷的真空干燥器内干燥。丙酮干粉的制备在低温下完成，所得丙酮干粉可长期保存于低温冰箱。用这种方法能有效地抽提出细胞中的物质，还能除掉脂类物质，免除脂类干扰，而且使得某些原先难溶的酶变得溶解于水。

碳水化合物

实验一 还原糖和总糖的测定

(3,5-二硝基水杨酸比色法)

一、目的:

掌握还原糖和总糖定量测定的基本原理,学习比色定糖法的基本操作,熟悉 721 型分光光度计的使用方法。

二、原理:

各种单糖和麦芽糖是还原糖,蔗糖和淀粉是非还原糖。利用溶解度不同,可将植物样品中的单糖、双糖和多糖分别提取出来,再用酸水解法使没有还原性的双糖和多糖彻底水解成有还原性的单糖。

在碱性条件下,还原糖与 3,5-二硝基水杨酸共热,3,5-二硝基水杨酸被还原为 3-氨基-5-硝基水杨酸(棕红色物质),还原糖则被氧化成糖酸及其他产物。在一定范围内,还原糖的量与棕红色物质颜色深浅的程度成一定的比例关系,在 540nm 波长下测定棕红色物质的消光值,查对标准曲线并计算,便可分别求出样品中还原糖和总糖的含量。多糖水解时,在单糖残基上加了一分子水,因而在计算中须扣除已加入的水量,测定所得的总糖量乘以 0.9 即为实际的总糖量。

三、实验材料、仪器和试剂:

1. 实验材料:

面粉

2. 仪器:

(1) 25 毫升血糖管或刻度试管 × 11

(2) 大离心管或玻璃漏斗 × 2

(3) 烧杯: 100 毫升 × 1

(4) 三角瓶: 100 毫升 × 1

(5) 容量瓶: 100 毫升 × 3

(6) 刻度吸管: 1 毫升 × 1, 2 毫升 × 4, 10 毫升 × 1

(7) 恒温水浴

(8) 沸水浴

(9) 离心机(过滤法不用此设备)

(10) 扭力天平

(11) 分光光度计

3. 试剂

(1) 1 毫克/毫升葡萄糖标准液: 准确称取 100 毫克分析纯葡萄糖 (预先在 80°C 烘至恒重), 置于小烧杯中, 用少量蒸馏水溶解后, 定量转移到 100 毫升的容量瓶中, 以蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 冰箱中保存备用。

(2) 3,5-二硝基水杨酸试剂: 将 6.3 克 3,5-二硝基水杨酸和 262 毫升 2N NaOH 溶液, 加到 500 毫升含有 185 克酒石酸钾钠的热水溶液中, 再加 5 克结晶酚和 5 克亚硫酸钠, 搅拌溶解。冷却后加蒸馏水定容至 1000 毫升, 贮于棕色瓶中备用。

(3) 碘-碘化钾溶液: 称取 5 克碘和 10 克碘化钾, 溶于 100 毫升蒸馏水中。

(4) 酚酞指示剂: 称取 0.1 克酚酞, 溶于 250 毫升 70% 乙醇中。

(5) 6N HCl

(6) 6N NaOH

四、操作步骤:

1. 制作葡萄糖标准曲线:

取 7 支具有 25 毫升刻度的血糖管或刻度试管, 编号, 按下表所示的量, 精确加入浓度为 1 毫克/毫升的葡萄糖标准液和 3,5-二硝基水杨酸试剂。

项目 \ 管号	0	1	2	3	4	5	6
葡萄糖标准液 (毫升)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水 (毫升)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
3,5-二硝基水杨酸试剂 (毫升)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

将各管摇匀, 在沸水浴中加热 5 分钟, 取出后立即放入盛有冷水的烧杯中冷却至室温, 再以蒸馏水定容至 25 毫升刻度处, 用橡皮塞塞住管口, 颠倒混匀 (如用大试管, 则向每管加入 21.5 毫升蒸馏水, 混匀)。在 540nm 波长下, 用 0 号管调零, 分别读取 1~6 号管的消光值。以消光值为纵坐标, 葡萄糖毫克数为横坐标, 绘制标准曲线。

2. 样品中还原糖和总糖含量的测定:

(1) 样品中还原糖的提取: 准确称取 3 克食用面粉, 放在 100 毫升的烧杯中, 先以少量蒸馏水调成糊状, 然后加 50 毫升蒸馏水, 搅匀, 置于 50°C 恒温水浴中保温 20 分钟, 使还原糖浸出。离心或过滤, 用 20 毫升蒸馏水洗残渣, 再离心或过滤, 将两次离心的上清液或滤液全部收集在 100 毫升的容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 混匀, 作为还原糖待测液。

(2) 样品中总糖的水解和提取: 准确称取 1 克食用面粉, 放在 100 毫升的三角瓶中, 加入 10 毫升 6N HCl 及 15 毫升蒸馏水, 置于沸水浴中加热水解 30 分钟。取 1~2 滴水解液于白瓷板上, 加 1 滴碘-碘化钾溶液, 检查水解是否完全。如已水解完全, 则不显蓝色。待三角瓶中的水解液冷却后, 加入 1 滴酚酞指示剂, 以 6N NaOH 中和至微红色, 过滤, 再用少量蒸馏水冲洗三角瓶及滤纸, 将滤液全部收集在 100 毫升的容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 混匀。精确吸取 10 毫升定容过的水解液, 移入另一 100 毫升的容量瓶中, 定容, 混匀, 作

为总糖待测液。

(3) 显色和比色：取 4 支具有 25 毫升刻度的血糖管或刻度试管，编号，按下表所示的量，精确加入待测液和试剂。

项 目	管 号	还原糖测定管号		总糖测定管号	
		①	②	I	II
还原糖待测液（毫升）		2	2	0	0
总糖待测液（毫升）		0	0	1	1
蒸 馏 水（毫升）		0	0	1	1
3,5-二硝基水杨酸试剂（毫升）		1.5	1.5	1.5	1.5

加完试剂后，其余操作均与制作葡萄糖标准曲线时相同，测定各管消光值。

五、结果与计算：

以管①、②的消光值平均值和管 I、II 的消光值平均值，分别在标准曲线上查出相应的还原糖毫克数。按下式计算出样品中还原糖和总糖的百分含量。

$$\text{还原糖}\% = \frac{\text{查曲线所得还原糖毫克数} \times \frac{\text{提取液总体积}}{\text{测定时取用体积}}}{\text{样品毫克数}} \times 100$$

$$\text{总糖}\% = \frac{\text{查曲线所得水解后还原糖毫克数} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品毫克数}} \times 0.9 \times 100$$

六、附注：

1. 用血糖管比大试管方便。
2. 离心比过滤易得清液。
3. 标准曲线制作与样品含糖量测定应同时进行，一起显色和比色。

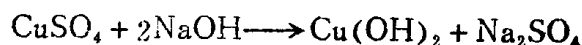
实验二 还原糖的测定（斐林试剂比色法）

一、目的：

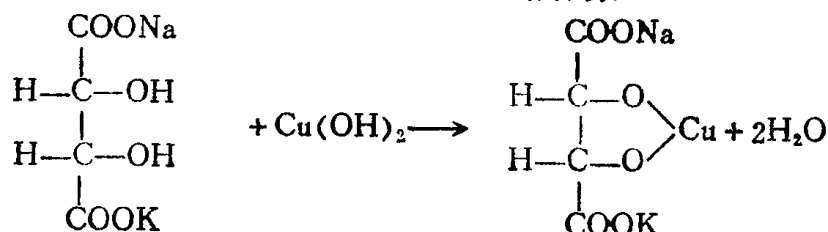
掌握斐林试剂比色法测定还原糖的原理和方法。

二、原理：

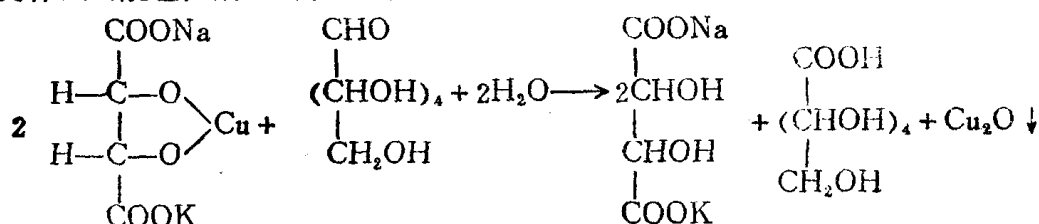
斐林试剂由甲、乙两种溶液混合而成，甲液含有硫酸铜，乙液含有氢氧化钠和酒石酸钾钠。硫酸铜与氢氧化钠作用生成天蓝色的氢氧化铜沉淀：



在碱性溶液中酒石酸钾钠使氢氧化铜溶解生成一种络合物：



还原糖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。



三、仪器和试剂：

1. 仪器：

- (1) 具塞刻度试管：20毫升×10
- (2) 刻度吸管：10毫升×1，5毫升×2，1毫升×1
- (3) 药物天平
- (4) 研钵
- (5) 容量瓶：250毫升×1
- (6) 分析天平
- (7) 恒温水浴
- (8) 分光光度计
- (9) 离心机

2. 试剂：

(1) 0.1%葡萄糖标准液：取80℃下烘至恒重的葡萄糖0.1000克，加蒸馏水溶解并定容至100毫升。

(2) 斐林试剂甲：40克硫酸铜(CuSO₄·5H₂O)溶解于蒸馏水并定容至1升。

(3) 斐林试剂乙：200克酒石酸钾钠(C₄H₄O₆·KNa·4H₂O)与150克氢氧化钠溶于蒸馏水并定容至1升。

使用前甲、乙液等体积混和。

- (4) 0.1N NaOH
- (5) 甲基红指示剂：0.1克钠盐溶于250毫升水
- (6) 10% Pb(Ac)₂
- (7) 饱和Na₂SO₄

四、操作步骤：

1. 还原糖标准曲线制作：

取7支刻度试管，在各管中分别加入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，混合后加塞，于沸水浴中加热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590nm波长下比色，以蒸馏水作对照。用空白管的消光值减去各管不同浓度糖的消光值，以此差值作纵坐标，各相对的糖含量作横坐标，绘制标准曲线。

2. 样品中还原糖的提取：

将新鲜植物样品洗净擦干，剪碎，迅速称取10.00克，置研钵中研成匀浆，用水洗入250

毫升容量瓶中。当体积近 150 毫升左右时，加 2～3 滴甲基红指示剂，如呈红色可用 0.1N NaOH 中和至微黄色。若用已经磨细的风干样品，可准确称取 3.00 克，先在烧杯中用少量水湿润，然后用水洗入 250 毫升容量瓶中，如显酸性用上法进行中和。

然后将容量瓶置于 80℃ 恒温水浴中保温 30 分钟，其间摇动数次，使还原糖充分浸提出来。对含蛋白质较多的样品，此间可滴加 10% Pb(Ac)₂，除去蛋白质。至不再产生白色絮状沉淀时，加饱和 Na₂SO₄ 除去多余的铅离子。30 分钟后取出冷却，定容至刻度，摇匀后过滤待测。

3. 样品测定：

吸取 6 毫升待测样品溶液加 4 毫升斐林试剂并和标准曲线同样操作，在 590nm 波长下比色。最后用不含样品（即不含糖）的空白管消光值减去样品管的消光值，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，计算出单位重量样品中的还原糖百分含量。

五、结果与计算：

$$\text{还原糖}(\%) = \frac{\text{样品中含糖毫克数} \times \frac{\text{样液总体积}}{\text{测定时取用体积}}}{\text{样品重} \times 1000} \times 100$$

六、附注：

(1) 此法是斐林试剂热滴定法的一个改进。优点是操作简便，斐林试剂可不作定量配制，测定误差小（±0.02%）。本法测定范围在 0.1～0.5 毫克/毫升还原糖，如样品过浓需适当稀释。

(2) 总糖的测定亦可用此方法，但需用 HCl 将多糖水解，转化成还原糖并适当稀释后测定。

实验三 还原糖的测定（斐林—碘量法）

一、目的：

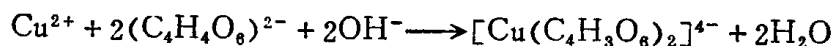
掌握用斐林—碘量法测定还原糖的原理和方法。

二、原理：

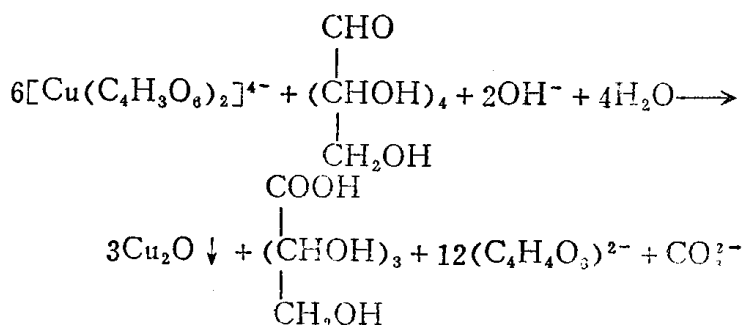
还原糖在碱性溶液中将二价铜离子还原成一价亚铜离子。多余的铜离子在酸性溶液中与碘化钾作用析出碘。用标准硫代硫酸钠溶液滴定所析出的碘，这样就可推算出还原糖的含量。

定糖用的斐林试剂，为便于长期保存，分成两部分配制（即 A 液与 B 液），临用前等体积混和。

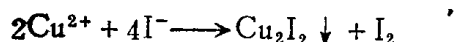
斐林溶液 A 中的硫酸铜主要用于定量地供给 Cu²⁺，斐林溶液 B 中的酒石酸钾钠主要作用是使 Cu²⁺ 形成络离子，而不致生成氢氧化铜沉淀。氢氧化钠则是用来满足溶液碱化的需要。



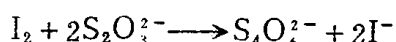
还原糖与斐林溶液的氧化还原反应，须在沸热的条件下进行。此时斐林试剂使还原糖氧化和降解（脱羧），生成葡萄糖酸和 CO₃²⁻，同时二价铜还原为氧化亚铜沉淀



上述反应完成后，将溶液酸化并加入 KI，由剩余斐林试剂中的 Cu^{2+} 与 I^- 作用，析出 I_2 和 Cu_2I_2 淡黄色沉淀：



生成的 I_2 可用标准 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定



最后，由试剂空白标定与样品测定时所用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液毫升之差，查标准曲线即得还原糖的含量。

三、仪器和试剂：

1. 仪器：

- (1) 酸式滴定管
- (2) 碘量瓶或三角瓶 (100 毫升)
- (3) 容量瓶：250 毫升
- (4) 烧杯：100 毫升
- (5) 研钵
- (6) 刻度吸管：1 毫升 $\times$ 1，2 毫升 $\times$ 1，5 毫升 $\times$ 4，10 毫升 $\times$ 2
- (7) 电热恒温水浴
- (8) 电炉

2. 试剂：

(1) 斐林 A 溶液： $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50 克，加水溶解，过滤，加 0.5 毫升浓 H_2SO_4 ，定容于 1000 毫升容量瓶。

(2) 斐林 B 溶液： NaOH 150 克，酒石酸钾钠 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 200 克，溶解后定容于 1000 毫升容量瓶。

(3) 25% 碘化钾溶液：125 克碘化钾 KI 溶解于水中，加 3N NaOH 1 毫升，加水至 500 毫升，贮存于冷暗处。

(4) 6N H_2SO_4 ：将 167 毫升浓 H_2SO_4 缓缓注入 833 毫升的水中。

(5) 0.5% 淀粉指示剂：淀粉 1 克加少量水拌匀，缓缓倾入 200 毫升沸水中，搅拌成稀度透明液。

(6) 2 毫克/毫升标准葡萄糖溶液：称取干燥的葡萄糖 0.2000 克，加少量水溶解，定量转移至 100 毫升容量瓶中，定容至刻度。

(7) 0.05N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ：先配制 1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，即将 260 克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于煮沸后已冷却的蒸馏水中，另加无水碳酸钠 2 克，定容至 1000 毫升。然后取 1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 250 毫升，加碘化汞 50 毫克，用水稀释成 5 升，溶液贮于棕色瓶中放置暗处。