

检压技术

W. W. 恩布賴特等著

科学出版社



检 压 技 术

W. W. 恩布賴特等著

姚 侃 等 譯

科 学 出 版 社

1 9 6 1

W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS
AND J. F. STAUFFER
MANOMETRIC TECHNIQUES

Burgess Publishing Co.

1957

內 容 簡 介

本书主要叙述应用瓦氏呼吸計研究組織代謝的检压方法。从应用瓦氏呼吸計工作的最基本操作(校准仪器等)到一些特殊的方法均有較詳尽的闡明。此外还扼要地敘述了匀浆技术,細胞顆粒組分的分离,代謝过程中間产物的分离及制备以及一些近代的分析方法如比色及分光光度測量法,色层分析法等。是生物化学實驗室必备的工具书之一。

检 压 技 术

W. W. 恩布賴特等著

姚 侃 等 譯

*

科学出版社出版 (北京朝陽門大街 117 号)

北京市书刊出版业营业許可証出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总經售

*

1961 年 11 月第 一 版

书号: 2417 字数: 364,000

1961 年 11 月第一次印刷

开本: 787×1092 1/48

(京) 0001—5,200

印张: 18

定价: 2.15 元

三 版 序 言

前一版中曾經指出本书在需要的时候将要增訂,現在这种需要是很明显的了。某些部分已經刪去了,并且加入了新的材料。近年来經典的检压方法的应用稍微有些衰落,与此同时分光光度法的应用正稳步的增长着。这种变化并未引起我們对检压技术的信心的任何巨大的降低,但是必須要增加关于分光光度测量方法的一章。关于細胞的微粒組成的分离方法及磷酸化中間代謝物的分析等章的广泛增訂反映出这方面的迅速的进展。第十五章对本书将是一个特別受欢迎的增补,因为它介紹了理解色层分析方法发展的基础。

本书的目的仍然是不变的,就是供給一个在实驗室应用的实用的手册。我們在許多实驗室中看到“检压技术”一书已經磨損并被酸蝕坏,因此更加强了我們增訂并重印此书的信心。

W. W. U.
R. H. B.
J. F. S.

撰 稿 者

J. A. Bain, Ga., Emory 大学医学院, 药理学教授。

H. Beinert, 酶学院副教授。

R. H. Burris, 生物化学教授。

P. P. Cohen, 生理化学教授。

M. J. Johnson, 生物化学教授。

H. A. Lardy, 生物化学和酶学院教授。

G. A. LePage, 肿瘤学教授。

J. M. Lowenstein, 英国, 牛津大学, 生物化学系; Beit 氏纪念基金研究员。

R. W. McGilvery, Charlottesville, Virginia 大学, 生物化学襄教授。

V. R. Potter, 肿瘤学教授。

W. C. Schneider, Md., Bethesda, 国立肿瘤学院, 国立公共卫生学院, 生物学实验室, 化学家。

J. F. Stauffer, 植物学教授。

W. W. Umbreit, N. J., Rahway, Merck 治疗研究所, 副主任。

所有未注明工作地址的撰稿者均属 Wisconsin, Madison, Wisconsin 大学。

目 录

第一章 Warburg 氏定容呼吸計.....	1
第二章 二氧化碳和碳酸氫盐.....	17
第三章 測定 CO ₂ 的直接法和間接法.....	26
第四章 呼吸計的校准.....	41
第五章 检压測量中有用的技术.....	59
第六章 示差检压計及其在研究呼吸作用、发酵作用及光合作用上的应用...	74
第七章 应用检压技术及电测技术的特殊方法.....	89
第八章 測定脫氫酶活性的“Thunberg 氏技术”.....	125
第九章 組織的制备及研究法.....	130
第十章 匀浆技术.....	168
第十一章 細胞的微粒組成的分离方法.....	186
第十二章 代謝物与酶系統的检压測定.....	200
第十三章 比色分析和分光光度分析.....	218
第十四章 化学方法.....	231
第十五章 层析方法的設計.....	240
第十六章 磷酸化的中間代謝物的分析方法.....	263
第十七章 生理上重要的中間产物及代謝物的制备.....	277
参考文献.....	303

第一章 Warburg 氏定容呼吸計

引言

測定气体的交換的检压方法应用于研究化学的和生物学的反应已經有年代了。已經使用了很多不同的技术并創造了很多型式的仪器。应用最广泛的呼吸計的类型就是几乎人所共知的所謂“Warburg 氏仪器”，然而正如 Warburg 氏 (1926) 所指出的，在他采用并改良以前，此仪器已經应用了。实质上現在的仪器就是 Barcroft 和 Haldane 二氏(1902)或 Brodie 氏(1910)所描述的“血液气体检压計”的改进。其主要的原理是：在定温和定容下，气体量的任何改变可由其压力的改变而測得。此法最常用于耗氧量的測定。因此我們首先以氧的消耗为例說明它的原理然后再叙述此仪器在其他方面的应用。

仪器

F = 反应瓶

S = 側臂

G = 具有气体出口的側臂活塞

C = 中心小杯(用以儲碱)

M = 检压計本体

R = 儲液囊；可借螺旋夹的調节来改变检压計中的液面

T = 三路活塞

检压計之标度刻以厘米(标有数目)及毫米。一般以毫米数記錄。

此仪器(图1)包括一个具有一个或多个側臂(S)的可移去的反应瓶(F)，連接在一个装有已知密度的液体的检压計(M)上。反应瓶沒入恆温水浴中，除了讀数时外此系統一直在搖动以加快液相和气相間的气体交換。并假定未沒入水浴內的检压計的温度与反应瓶的温度相差不大。Burk 和 Milner 二氏(1932)，Dixon 氏(1951)，Perkins 氏(1943)，Warburg 氏(1923, 1924, 1926)及其

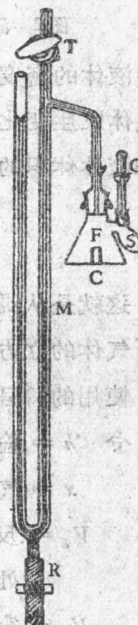


图1 Warburg 氏定容呼吸計

他学者們曾詳細地描述过这个仪器。关于搖动部分的詳細叙述請参看第五章。

如图 1 所示检压計有一开口端和一閉口端。在检压計的閉口端选择一参比点(通常为 150 毫米或 250 毫米),在記錄压力改变之前,必須将检压計閉口端的液面調节至此点。

一 般 原 理

如要测量在反应瓶中所发生的消耗氧气的反应,可在活塞打开的情况下,扭动儲液囊上的螺旋夹調节检压計閉口端的液面至 250 毫米。然后关闭活塞,記錄检压計开口端的讀数(假定为 249 毫米,如图 2)。10 分钟后,閉口端內的液面上升,开口端的液面下降如图所示。再調节閉口端的液面至 250 毫米。这样保持反应瓶內气体体积的恆定。此时开口端的讀数为 220 毫米。

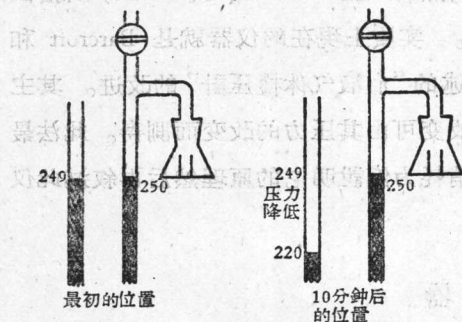


图 2 測定压力变化的图解

由于最初和 10 分钟后在检压計閉口端的液体的讀数均調节至 250 毫米,其間由于反应瓶內氧气的消耗,开口端的讀数由 249 降至 220 毫米(29 毫米)。如果知道反应瓶內气体体积 (V_g),反应瓶內的液体体积 (V_l),操作的温度,交换的气体和检压計中液体的密度,設若只有一种气体在变化就可算出气体的消耗量(或放出量)。(多种气体发生变化时亦有許多方法处理;这些将在以后叙述。)此方法的要点是保持气体和液体体积的恆定并测量气体量发生变化时它的压力的升高或降低。

容器常数的意义及其导出

这就是从观察到的压力变化算出气体的消耗量或放出量(以 0°C 和 760 毫米气压下气体的立方毫米或微升为单位)。

使用的符号如下:

令 h = 检压計中(开口端)讀数的变化,以毫米計。

x = 气体的微升数(0°C , 760 毫米汞柱气压)。

V_g = 反应瓶包括連接管到零点(在检压計閉口端的 150 毫米或 250 毫米处)以內的气相的体积。

V_l = 容器內液体的体积。

P = 容器內被測定气体的最初的压力。实际上就是气体混合物中某一气

体的分压。如果此气体混合物含有水蒸气则被测定气体的分压将少于它在干燥情况下的分压。因此如果将 P 作为干燥气体的压力,那么在潮湿气体的方程式中必须应用 $P - R$ 。

P_0 = (标准气压) 760 毫米汞柱, 或 10,000 毫米 Kreb 氏或 Brodie 氏溶液。

T = 水浴的绝对温度 (= 273 + 摄氏温度)。

α = 容器内气体在液体内的溶解度[以一大气压下(760 毫米汞柱), 温度 T 时每毫升液体中所溶解的气体的毫升数表示]。

R = 温度 T 时水 (或其他液体) 的蒸气压。反应瓶中的液体在气相中产生蒸气压(R), 也有一些气体溶于液体。

在气相中, 温度 T , 压力 $P - R$ ($P - R$ = 气体的分压减去液体的蒸汽压) 下的气体体积 (V_g), 可用以下公式将其换算成标准状态下的体积:

$$PV/T = P'V'/T'$$

(令带撇符号为标准状态, 就是 V' = 标准状态下的气体体积, $P' = P_0 = 760$ 毫米汞柱, $T' = 273 = 0^\circ\text{C}$) 因此在反应瓶中:

$$(P - R)V_g/T = P_0V'/273$$

$$\text{标准状态下气体的体积} = V' = \frac{V_g \frac{273}{T} (P - R)}{P_0}$$

最初有一些气体溶于液体内。液体内气体的量为:

$$V_f \alpha (P - R) / P_0$$

这里 α 为在一大气压的分压下气体的溶解度(气体的毫升数/液体的毫升数), α 乘以 $(P - R)/(P_0)$ 即换算成瓶内实际存在的一个大气压下的溶解度。

这一关系式可以成立, 因为亨利定律指出: “溶解的气体的浓度与加于液体上的浓度(压力)成正比”。因此如果 α 为 P_0 (一大气压) 时的溶解度, 那么瓶内实际的压力 ($P - R$, 即大气压减去水蒸汽压) 下的溶解度应为 $\frac{\alpha(P - R)}{P_0}$ 。实际上, 因为不知道化学结构和气体溶解度之间的关系, 所以必须用经验方法测定溶解度。每一气体在每一溶液中有不同的溶解度。并且知道在气体混合物中某一气体的溶解度与其他气体的压力几乎是无关的, 就是说在一定的压力和温度下, 无论 N_2 , CO_2 或其他气体是否存在, 氧的溶解度不变。

由以上的叙述, 可知开始时的气体体积为气相中的气体与液相中的气体之和或:

$$\text{开始时的气体体积} = \underbrace{V_g \frac{273}{T} \frac{(P - R)}{P_0}}_{\text{气相}} + \underbrace{V_f \alpha \frac{(P - R)}{P_0}}_{\text{液相}}$$

在观察阶段之末, 气体 P 改变了数量 x , 结果使压力改变了 h 毫米。如果气体被吸收则 h 为负值; 如果气体被放出则 h 为正值。这里我们假定它被吸收了。那么压力应为 $(P - R - h)$ 而不是开始值 $(P - R)$ 了。

$$\text{因此气相为: } V_g \frac{273}{T} \frac{(P - R - h)}{P_0}$$

$$\text{液相为: } V_f \alpha \frac{(P - R - h)}{P_0}$$

$$\text{終了时气体的体积} = V_g \frac{273}{T} \frac{(P - R - h)}{P_0} + V_f \alpha \frac{(P - R - h)}{P_0}$$

气体被吸收的量(x)为开始的气体体积减去終了时气体的体积。

x = 开始时气体的量 - 終了时气体的量

$$\begin{aligned} x &= \left[V_g \frac{273}{T} \frac{(P - R)}{P_0} + V_f \alpha \frac{(P - R)}{P_0} \right] - \left[V_g \frac{273}{T} \frac{(P - R - h)}{P_0} + V_f \alpha \frac{(P - R - h)}{P_0} \right] \\ &= V_g \frac{273}{T} \frac{(P - R)}{P_0} + V_f \alpha \frac{(P - R)}{P_0} - V_g \frac{273}{T} \frac{(P - R - h)}{P_0} - V_f \alpha \frac{(P - R - h)}{P_0} \\ &= V_g \frac{273}{T} \frac{h}{P_0} + V_f \alpha \frac{h}{P_0} \end{aligned}$$

$$x = h \left[\frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0} \right] = h k$$

注意 V_g , T , α , V_f , 和 P_0 均为已知数, 并且对于一定的实验来说为一常数; 容器常数 k 由这些数值决定, 利用容器常数 k 可由压力的毫米数换算成 O_2 吸收或放出的微升数。

总结: x = 气体变化的量 = h 检压计开口端液面的变化 k 容器常数

$$k = \text{容器常数} = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0}$$

例: 瓦氏反应瓶包括到检压计 250 毫米刻度处的总容积为 12.616 毫升。在此反应瓶中测定酵母在 28°C 时氧的吸收量。加 1 毫升酵母悬浮液, 1 毫升 0.1M 葡萄糖, 1 毫升 M/50 磷酸盐缓冲液。在反应瓶中心小杯中加入 0.2 毫升 10% KOH 以吸收酵母所产生的二氧化碳。我们应该用的容器常数为何?

$$V_f = 3.2 \text{ 毫升} = 3,200 \text{ 微升}$$

$$\begin{aligned} V_g &= \text{容器总体积} - \text{液体体积} = 12.616 \text{ 毫升} - 3.2 \text{ 毫升} = 9.416 \text{ 毫升} \\ &= 9,416 \text{ 微升} \end{aligned}$$

$$T = 273 + 28 = 301 \quad \alpha = 0.027 \quad P_0 = 10,000$$

$$k_{O_2} = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0} = \frac{9,416 \times \frac{273}{301} + 3,200 \times 0.027}{10,000}$$

$$= \frac{8,540 + 86.0}{10,000} = 0.863$$

压力差的毫米数 $\times 0.863 =$ 气体微升数。

(第四章叙述测定容器常数的方法。)

可能有两点混淆不清。第一是 α 值为 0.027, 这将在下节中解释。另外是 $P_0 = 10,000$, 在这种情况下检压计装的是“Brodie 氏溶液”或一相当的检压计液体(参看原书 61 页)这样的检压计液体其密度为 1.033, 与汞的 13.60 相較时

$$P_0 = 760 \times \frac{13.60}{1.033} = 10,000.$$

氧 的 溶 解 度

在表 1 中氧的溶解度以一大气压下每毫升液体中氧之毫升数表示。此一名词 α 有时称为“Bunsen 氏系数”。

某一气体的 α 值受两个因素的影响。首先由表 1 中的数值显然可见, 气体的溶解度因温度升高而降低。其次, 气体的溶解度可因液体中溶解的固体(或液体但不是气体)的存在而有所减少, 想来这是由于溶质的水化(“溶剂化”), 以致剩有较少的自由溶剂来溶解气体。这些影响如表 1 所示。表 1 取材于国际精密数据表(International Critical Tables) 卷 III, 271 页(1928)。除氧以外其他气体的溶解度载于第四章。

表 1 氧之溶解度数据为一大气压下每毫升液体溶解气体的毫升数(α 值)

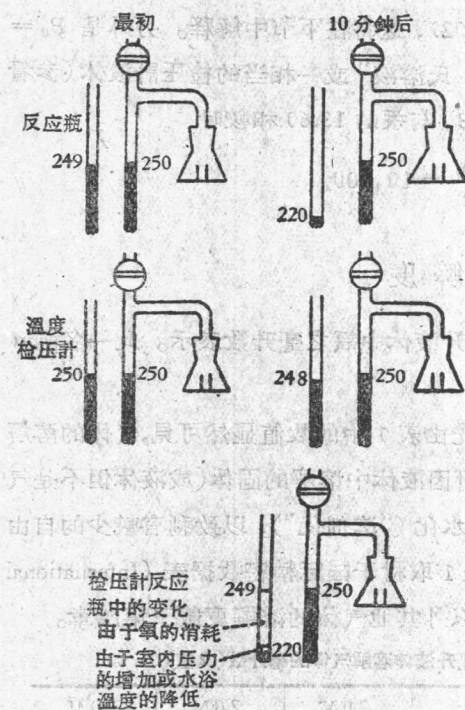
温度 $^{\circ}\text{C}$	Ringer 氏液	水	2.0 N HCl	2.0 N H_2SO_4	2.0 M NaCl
0		0.04872			0.023
10	0.0480	0.03793			0.019
15	0.0340	0.03441	0.028		0.017
20	0.0310	0.03091			0.016
25	0.0285	0.02822	0.025	0.023	0.015
30	0.0260	0.02612			0.014
35	0.0245	国际精密数据表(1928)			
40	0.0230				
	Dixon 氏(1943)				

虽然盐对氧溶解度的影响看来很大, 实际它对氧消耗量的容器常数影响很小。例如从纯水变为 2 M NaCl 溶液时 α 值从 0.028 变为 0.016。这使容器常数变小

$\frac{0.012 \times V_f}{10,000}$ 。在上述情况下,对 2 M NaCl 来说 k 不是 0.863 而是 0.859。

温度检压计

在推导容器常数 k 时应用一 P 值并假定其在某一阶段中从开始到終了为一常数。此“ P ”代表最初的大气压。然而室内的压力和水浴的温度多半是变化的,这变化可由温度检压计校正。温度检压计只是一个 Warburg 氏检压计带一个装有水的反应瓶;水的体积无甚关系。



先看图 3, 最初, 在第一次读数时; 反应瓶读数为 249, 温度检压计为 250。一定时间之后, 反应瓶读数降至 220, 就是下降 29 毫米。与此同时水浴温度的变化或室内压力的增加使温度检压计的读数降至 248, 就是降低了 2 毫米。观察到的压力变化由于两种原因: 在反应瓶内空间中的氧被用去了一些 (27 毫米) 和外部的温度和压力引起的变化 (2 毫米)。简要地研究一下说明实际的实验数据的表 2 之后, 即可了解如何从温度检压计记录的变化得到读数的校正。

如果温度检压计开口端的液面上升了, 那就是室内的压力降低了或水浴的温度升高了。如果反应瓶记录压力的降低, 则观察的降低值比实际的降低值小, 小于

表 2 用温度检压计的变化进行校正

时间	温度检压计	第一法 呼吸瓶 1	第二法 呼吸瓶 1
	变化(总的)	读数 变化 真实变化	读数 变化 真实变化 和
0	250 毫米	249	249
60	257 毫米 (+ 7)	248 - 1 - 8	248 - 1 - 8 - 8
120 分钟	259 毫米 (+ 2)	243 - 6 - 15	243 - 5 - 7 - 15
0	250	249	
60	236 - 14	111 - 138 - 124	

溫度檢壓計液體所上升的那么多；因此溫度檢壓計上升的讀數要加在觀察的壓力降低值之上。如果反應瓶記錄壓力的上升值，溫度檢壓計上升的值要從觀察的上升值中減去，說明這幾個例子的例子見表 2 和表 3。

溫度控制

水浴溫度的控制應該準確到什么程度？必須考慮兩種情況：

1. 水浴的溫度是恆定的，但是比用以計算的溫度低了 1 度。溫度檢壓計可對這一溫度的降低作相應的校正，所以主要的誤差是由于用了錯誤的容器常數所致。設如在表 3 所述的情況下，全部水浴的溫度降低到 27°C 而數據按 28°C 計算。在 28°C 時 k_{O_2} 是 0.942，在 27°C 時是 0.945。如果測定實際是在 27°C 時做的，但用的是 28°C 的因數，那就會產生約 0.3% 的誤差。

2. 如果水浴的溫度是不均勻的，有一個反應瓶比其他反應瓶的溫度高 1°C，則所指出的壓力相當於每 10 毫升氣體體積要多出 33 微升 (0.05°C 的差數 = 1.7 微升)。

因此有兩個重要的因素；第一溫度要保持在所需要的度數上，其次更重要的是全部水浴的溫度要保持均勻一致，相差不超過 0.05°C。後一因素需要劇烈攪動水浴中的水。

應用 Warburg 氏儀器測量活細胞的呼吸

“呼吸”一詞在生理學上有兩種意義。舊的意義是指氣態氧的實際消耗，後來確定了氧化作用可以不消耗氣態的氧（脫氫或移去電子），所以呼吸一詞的意義就擴大到包括細胞獲得能的任一反應，不管有沒有氣態氧的參加。由於不同研究者對此名詞含義有不同理解而引起某些混亂。為了明確起見，我們引用下列的定義：

呼吸：氧氣的消耗。

發酵：發生在活細胞內的（或由其來源的酶的）不消耗氣態氧的變化。

和許多酶制劑不同多數細胞利用氧時放出二氧化碳。如果只此二氣體 (CO_2, O_2) 參加，那就可以用鹼吸收放出的二氧化碳以測量呼吸 (O_2 消耗)。由於鹼的存在，在測量範圍內二氧化碳在空氣中的壓力為零。由呼吸所發生的氣體的變化是氧的吸收和二氧化碳的放出。但是鹼保持二氧化碳的壓力為零，因此檢壓計上所見的变化只是由於氧的利用，當然溶液中過量的二氧化碳繼續逸出而溶入鹼中，但這並不影響觀察的壓力變化。

样 品 計 算

表 3 內的数据說明从观察的温度检压計和反应瓶检压計內液面的变化計算氧氣消耗的微升数的方法。下面有两种計算方法:

总消耗法:

这个方法的应用在表 3 的 4、5、6 和 7 縱行中說明。消耗的毫米数由所有以后讀数減去最初讀数(246)來計算(第四縱行)。温度检压計的校正数由所有以后讀数減去最初讀数(265)得到(第五縱行)。在 10^{55} 到 11^{00} 間隔里反应瓶內的总消耗为 19 毫米, 因为其中一部分(1 毫米)是由于温度和气压的改变的結果, 所以真实的消耗量是 $19 - 1 = 18$ 毫米(第六縱行)。这一数值乘上实验条件下的容器常数就得氧消耗的微升数(第七縱行)。

表 3 从檢压計讀数計算氧的消耗

時間	溫度檢 压計讀 数 (毫米)	反应 瓶讀 数 (毫米)	总 消 耗 法				間 隔 消 耗 法				
			变 化, 毫 米	溫度檢压 計 校 正	实际变 化,毫米	O ₂ 消耗	变 化, 毫 米	溫度檢压 計 校 正	实际变 化,毫米	消 耗 氧微升	总和
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10^{55}	265	246	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11^{00}	264	227	-19	-1	-18	17.0	-19	-1	-18	17.0	17.0
11^{05}	264	194	-52	-1	-51	48.1	-33	0	-33	31.1	48.1
11^{10}	264	159	-87	-1	-86	81.0	-35	0	-35	32.9	81.0
11^{15}	264	122	-124	-1	-123	115.9	-37	0	-37	34.9	115.9

反应瓶: 1 毫升酵母悬浮液, 1 毫升 $M/200$ KH_2PO_4 , pH4.5, 0.5 毫升水, 0.5 毫升 0.32 M 葡萄糖; 葡萄糖置側臂中, 在 10^{55} 傾入。

瓶容积 = 13.5 毫升; $k_{O_2} = 0.942$; 温度 $28^\circ C$; 中心小杯中有 0.2 毫升 KOH 。

間隔消耗法:

表 3 的第八至十二縱行說明此法在計算上的应用。每一个讀数从它的后边一个讀数中減去(就是 227 減 246; 194 減 227 等), 即得到一定時間間隔內的变化(第八縱行)。对于温度检压計用同样方法計算(第九縱行), 由此可立即得出实际的变化(第十縱行)。这些間隔数值乘上容器常数即得到每一間隔的消耗量(第十一縱行)再相加即得到总消耗量(第十二縱行)。

虽然这个方法很麻煩, 但它有一些优点, 特别是当氧消耗速率变化的时候。例如在这种情况下, 在第一个 5 分钟內的消耗量(17.0 微升)和以后五分钟間隔的消耗量不同, 因为在此过程中速率有增加的趋势。当用“总消耗法”來計算的时候这种增加是不很明显的, 甚至在作图时也被忽略。

許多實驗室發現用油印或印刷的表格形式記錄檢壓數據是很方便的。此數據可永久記在上邊或在未做成適當的報告謄到一個永久的筆記本上以前暫時的記錄在上邊。圖 4 就是兩種數據記錄表。上面的表是印在一張 $8\frac{1}{2} \times 11$ 吋繪圖紙背面的复制樣本，可訂在活頁的筆記本上。數據在印頁上記錄并計算。將結果在反面的繪圖紙上作圖。反應瓶的讀數均在表上橫寫下來。圖 4 的下面部分是一個油印的表，反應瓶的數據都記錄在直行內。

容器常數應記在卡片上，將卡片用膠紙條粘在筆記本的封面或封底內。此卡片能翻轉露出封面之外，以便利在計算結果時參考。

氧 的 吸 收

被呼吸組織所吸收的氧氣幾乎完全得自溶液中的氧。搖動呼吸計的主要理由就是要得到為氣相飽和的液相。但是在實際的情況下，必須注意組織消耗氧的速率不能大於氧氣由氣相向液體擴散所補充的量。如果氧氣消耗的速率快，那麼觀察到的呼吸的速率決定於氧氣擴散入液體的速率而與反應本身的速率無關了。

氣體向液體擴散的速率決定於液體的表面。可以設想氣體通過表面的膜移動，這種擴散學說已經很好地建立了。Roughton 氏(1941)曾敘述過校正擴散誤差的方法。然而實際上對所有的呼吸測量來說是足夠用了，由於反應瓶的搖動，瓶內液體的攪動使新的表面繼續不斷的暴露於氣體中。因此，搖動的速率越大，氣體擴散入液體中的速率越大，可測定的呼吸的速率越大，並不會有擴散的誤差。

Dixon 和 Tunncliffe 二氏(1923)以及 Dixon 和 Elliott 二氏(1930)曾研究了在 Barcroft 氏示差檢壓計(參閱第六章)內的這些影響，認為當振盪的速率為每分鐘 100 次時測量每小時 600—700 微升的氧的消耗可保證沒有擴散誤差(在速率每分鐘 138 次時可超過 1,500 微升 O_2 /小時)。Meyers 及 Matsen 二氏(1955)已作了關於在 Warburg 呼吸計中氣體交換動力學的詳細的分析。

在 Warburg 氏呼吸計中所用的反應瓶一般比 Barcroft 氏呼吸計中所用的，所以暴露於氣體的表面亦少；因此達到氧氣消耗的限制速率較快。在下述的實驗中測定了在含有 3 毫升液體的 15 毫升反應瓶中可以測量而不產生誤差的實際速率。這種方法可用來測定在所得到的任何結果中氧氣擴散的速率是不是限制因素(圖 5)。

實驗的原理敘述如下：氧從氣相向液相擴散的速率決定於界面。較快搖動時界面的變化更快，使得氧氣交換更快。假如更快的搖動(這樣氧氣交換更快了)不能增加氧消耗的速率，那麼氧氣擴散的速率在此被研究的系統里就不是限制因素了。

另外一个可以用到的（只在某些情况下）原理依赖于这样的事实，气体浓度愈大时，它扩散到液体中的速率愈大。因此，可以改变液体上气相中氧的百分数，应用不同量的组织，并在扩散因素起作用前，测定氧消耗所能达到的最高速率。然而这个方法不仅麻烦而且复杂，因为有些报告指出某些类型的呼吸可受氧压力本身的影响。所以改变摇动的速率是较好的方法。可是当发现必须使充分的氧气透过组织片时，增加氧压是有用的。在这种情况下，向液体中的扩散就不是限制因素，但向呼吸固体的扩散就控制了在它中心的氧气的水平。显然增加摇动不能改变这些表面，所以唯一的实际解决办法就是增加氧气的压力。这些在第九章“组织薄片”中讨论。

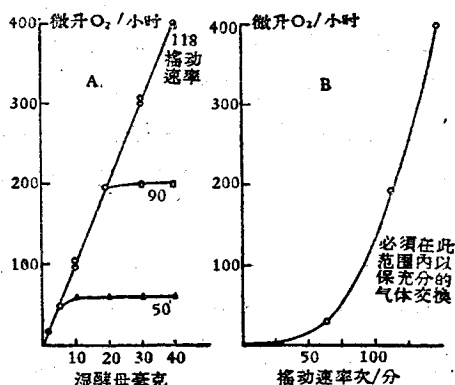


图5 摇动对在15毫升容积反应瓶内的氧气消耗速率的影响。A——每个反应瓶内含有横轴所示量的酵母，其体积用0.02 M KH_2PO_4 (pH 4.8) 加至2毫升，1毫升3%葡萄糖；中心小杯内有0.2毫升20% KOH 在28°C 时每分钟摇动50、90和118次，来回2厘米长。B——由A中的数据画图，它指出在所述的条件下适宜的摇动速率

有时发现一个反应决定于颗粒之间的接触而摇动可扰乱这种接触。已报告过一个这样的例子，就是细菌对硫的氧化作用 (Vogler, LePage and Umbreit, 1942) 这里在氧化作用能够发生以前必须先要细菌和固体硫颗粒接触 (Vogler and Umbreit, 1941; Umbreit, Vogel and Vogler, 1942)。快速的摇动实际扰乱了这样的接触，结果降低氧化作用。然而要注意的是如果所用的氧消耗的速率低于扩散作用的限制（就是每分钟100次时，300微升 O₂ / 小时）那么随着摇动速率增加的氧消耗速率的任何变化与氧的扩散无关，因为液体已经被饱和了。所以常常希望测定摇动速率变化的影响以确定结果与摇动的速率无关。如果不是这样，就可以用比较氧气消耗速率的方法确定摇动速率是否影响氧的扩散或其他因素（如接触），这可在所用的条件下避免扩散作用的影响测得。常常可用这样的方法得到反应本质的重要线索。

二氧化碳的吸收

在 Warburg 氏“直接法”中因为活组织在消耗 O₂ 的同时放出 CO₂，故在测定氧消耗量的过程中可将 CO₂ 连续地用碱吸收掉。如果所用的碱不能立刻完全地吸收 CO₂，气相中 CO₂ 的压力就不是零，检压计的读数就不能代表真正的氧的消耗量，在 Brock, Druckrey 和 Richter 三氏 (1939) 的报告中举了一个这种情况的例子；他们观