

# 生物化学实验指导

北京大学生物学系  
生物化学教研室編

高等教育出版社

# 生物化学实验指导

北京大学生物学系  
生物化学教研室編

高等教育出版社

本書是北京大学生物化学教研室的教师根据多年来使用  
Збарский 等所著生物化学实习第一版和第二版的經驗,并参考  
其他生物化学实验指导编写而成的,适用于综合大学生物系各  
专业。

参加本书编写工作的是北京大学生物化学教研室 陈同度、  
朱聖賢和徐長法三位同志。

## 生物化学实验指导

---

北京大学生物学系生物化学教研室編  
高等教育出版社出版 北京宣武門內承恩寺7号  
(北京市書刊出版業營業許可証出字第 054 号)  
京华印書局印刷 新华書店發行

---

統一書号13010·523 開本 850×1168 1/32 印張 21<sup>3</sup>/<sub>16</sub>  
字數 65,000 印數 0001—4,000 定價(10) 0.44  
1958年12月第1版 1958年12月北京第1次印刷

## 序 言

自 1952 年院系調整以來，北京大學生物學系每年都開設生物化學課程，包括實驗課。在學習蘇聯先進經驗、進行教學改革過程中，我們体会到生物化學實驗課的目的有三：（一）使學生獲得對於生物化學基本內容的深刻印象。（二）使學生獲得生物化學操作技術的基本訓練。（三）培養學生獨立工作的能力。我們在教學實踐過程中又認識到無論植物生物化學或動物生物化學，它們有共同的基本內容和共同的實驗室操作技術；這些教學內容對於生物學系任何一種專業的學生來說都是必要的。

我們基於以上的体会和認識，根據我們多年來使用 Збарский 等所著生物化學實習第 1 版(1949)和第 2 版(1954)的經驗，並參考了其他生物化學實驗指導，編輯了這本綜合大學生物系各專業共用的生物化學實驗指導。

陳同度教授擔任了主編的工作。助教朱聖廣同志編寫了酶和組織代謝兩章。助教徐長法同志編寫了其餘各章和附錄。本屆畢業班同學多人又在徐、朱兩同志指導下把每個實驗都做了一遍，作了必要的修正。

我們將十分歡迎使用本書的教師、同學和讀者對本書提出批評和指正。

北京大學生物學系生物化學教研室。

1958年7月15日

# 目 录

序言.....(iv)

## 第一章 糖的化学.....(1)

- 实验一 糖的颜色反应.....(1)
- 实验二 糖的还原作用.....(3)
- 实验三 糖脎的形成.....(5)
- 实验四 糖的定量测定.....(8)

## 第二章 脂肪的化学.....(11)

- 实验五 油脂的组成.....(12)
- 实验六 卵磷脂的提取和检查.....(13)
- 实验七 胆固醇的提取及检查.....(14)
- 实验八 脂肪的定量测定.....(15)
- 实验九 碘值(碘价)的测定.....(17)

## 第三章 蛋白质的化学.....(19)

- 实验十 蛋白质的呈色反应.....(20)
- 实验十一 蛋白质的可逆沉淀反应.....(24)
- 实验十二 蛋白质的不可逆沉淀反应.....(25)
- 实验十三 蛋白质等电点的测定.....(28)
- 实验十四 核蛋白的水解.....(30)
- 实验十五 Sørensen氏甲醛滴定法.....(31)
- 实验十六 总氮量的测定.....(32)

## 第四章 维生素、激素及植物次生物质.....(36)

- 实验十七 维生素A的定性试验.....(37)
- 实验十八 维生素D的苯胺试验.....(38)
- 实验十九 维生素 B<sub>1</sub> 的颜色反应.....(38)
- 实验二十 尼克酸的定性试验.....(40)
- 实验二十一 维生素C的定量测定.....(41)
- 实验二十二 肾上腺素的提取和检查.....(43)
- 实验二十三 胰岛素对血中糖量的影响.....(44)

- 实验二十四 肾上腺素对血中糖量的影响.....(46)
- 实验二十五 鞣质的定性反应.....(46)
- 实验二十六 茶碱的提取和一些性质.....(48)

## 第五章 酶.....(49)

- 实验二十七 酶的特异性.....(50)
- 实验二十八 唾液淀粉酶的激动和抑制.....(51)
- 实验二十九 温度对酶活性的影响.....(52)
- 实验三十 pH 对酶活性的影响.....(53)
- 实验三十一 脂酶的定性试验.....(55)
- 实验三十二 蛋白酶活性的测定.....(56)
- 实验三十三 氧化酶的定性反应.....(57)
- 实验三十四 琥珀酸脱氢酶活性的测定.....(59)
- 实验三十五 过氧化氢酶的定性反应.....(60)
- 实验三十六 过氧化物酶的定性反应.....(60)

## 第六章 组织代谢.....(61)

- 实验三十七 组织的自溶.....(62)
- 实验三十八 糖元酵解作用.....(63)
- 实验三十九 发酵过程中无机磷的利用.....(64)
- 实验四十 脂肪酸的氧化.....(65)
- 实验四十一 氨基移换反应.....(67)
- 实验四十二 氨基酸的生酮作用.....(70)

## 附录.....(71)

- 实验室规则.....(71)
- 容量仪器使用法.....(73)
- 离心机的使用.....(74)
- 分析天平的使用和保护.....(75)
- 试剂的配制.....(77)

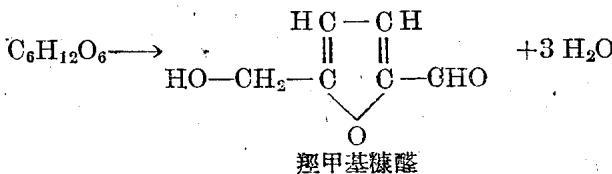
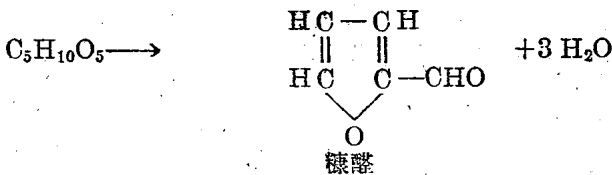
# 第一章 糖的化学

糖为生物界分布最广的有机化合物。在植物组织中，其含量可达干重的 80%，在动物及人体组织中含较少。糖为生命活动的能的主要来源。

糖亦称碳水化合物。按其化学构造，糖是多羟基的醛或酮的衍生物。葡萄糖为一种醛糖，果糖为一种酮糖。通常根据分子中的单糖数目把糖分成三大类：(1)单糖，如葡萄糖、果糖和阿拉伯糖；(2)贰糖，如乳糖、麦芽糖和蔗糖；(3)多糖，如淀粉、糖元和纤维素等。

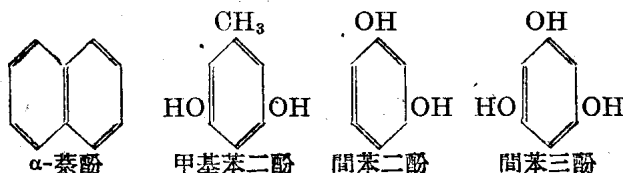
## 实验一 糖的颜色反应

糖经浓无机酸处理脱水产生糠醛或糠醛衍生物（如羟甲基糠醛）。糠醛和糠醛衍生物都能与酚类化合物缩合生成有色物质。



通常使用的无机酸为硫酸，如用盐酸则必须加热。常用的酚

类为  $\alpha$ -萘酚、甲基苯二酚、间苯二酚和间苯三酚等。



- 器材: 1. 試管及試管架;  
2. 水浴鍋。

試剂: 1. 2% 葡萄糖溶液; 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% 蔗糖溶液; 7. 1% 淀粉溶液; 8. 濃硫酸; 9. Molisch 氏試剂<sup>[1]</sup>; 10. Seliwanoff 氏試剂<sup>[2]</sup>; 11. Tollen 氏試剂<sup>[3]</sup>。

(1) Molisch 氏反应 ( $\alpha$ -萘酚試驗): 本試驗为鉴定糖类最常使用的顏色反应, 自由存在的糖和以結合形式存在的糖, 对  $\alpha$ -萘酚試剂均呈阳性反应。此外, 丙酮、甲酸、乳酸、草酸、葡萄糖醛酸和醛等亦呈顏色近似的阳性反应。因此, 阴性反应为无糖类物质存在之确証, 而阳性反应, 則不一定有糖。

取五支試管, 标号后, 分別加入 2% 葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、蔗糖和 1% 淀粉等溶液各一毫升。再各加 Molisch 氏試剂 2 滴。混匀, 將試管傾斜, 沿管壁徐徐注入濃硫酸約 1 毫升。硫酸应与糖溶液很清楚地分成两层。随时观察两液面間的紫色环出現。数分鐘內如无顏色变化, 可在水浴中温熱后再行观察。

(2) Seliwanoff 氏反应 (间苯二酚—盐酸試驗): 此为檢定酮糖之特殊反应。当加热時間較长时, 葡萄糖、麦芽糖或蔗糖亦呈阳性反应。这是因为麦芽糖和蔗糖在含有盐酸的 Seliwanoff 氏試剂中水解成葡萄糖或葡萄糖和果糖, 而葡萄糖在盐酸的影响下部

分地转变成果糖。果糖为酮糖，与 Seliwanoff 氏试剂混合加热即呈鲜红色的阳性反应。

取试管四支，各加入 Seliwanoff 氏试剂 1 毫升，再分别加入 2% 果糖、葡萄糖和阿拉伯糖溶液各四滴。混匀后，置沸水浴内。1—2 分钟后观察并记录颜色变化。20 分钟后，再进行观察。

(3) Tollen 氏反应：此反应为戊糖之特殊反应。糖之浓度及加热时间的长短极须注意。否则难得明显结果。戊糖反应很快，所生之朱红色沉淀能溶解于戊醇中。加热时间如过长，则果糖与半乳糖亦呈类似反应。阿拉伯糖先呈紫色，逐渐成深红色，煮得越久，颜色越深。果糖溶液先显桔黄色，后呈棕色。

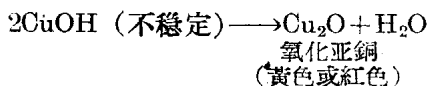
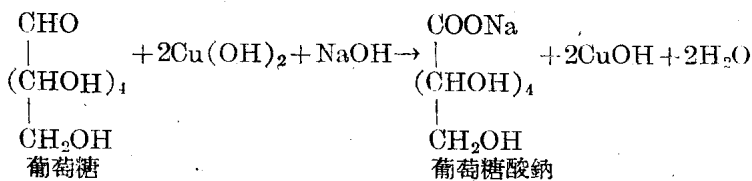
取试管三支，各加入 Tollen 氏试剂 1 毫升，再分别加入 2% 阿拉伯糖、果糖及半乳糖溶液各一滴。将各试管放入沸水浴内煮 2 分钟，观察颜色变化。

## 实验二 糖的还原作用

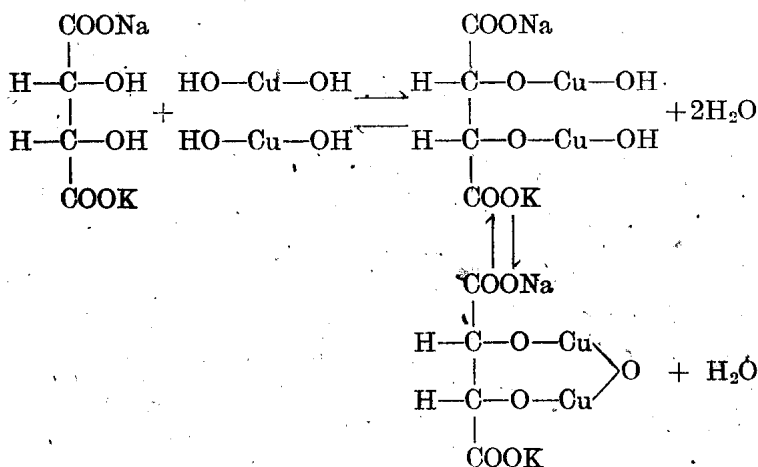
含有自由醛基( $-CHO$ )或酮基( $>C=O$ )的单糖和某些贰糖为还原糖。在碱性溶液中，还原糖能将金属离子(例如，铜、铋、汞、银等)还原，糖本身被氧化成酸类化合物。这种作用在微酸溶液中亦能进行，但速度较慢。硫酸铜与碱溶液混合加热，则生成黑色的氧化铜沉淀。若同时有还原糖存在，则产生黄色或红色的氧化亚铜沉淀。沉淀的颜色决定于  $Cu_2O$  颗粒的大小， $Cu_2O$  颗粒的大小又决定于反应的速度。反应快时，生成的  $Cu_2O$  颗粒较小，呈黄绿色。反应慢时，生成的  $Cu_2O$  颗粒较大，呈红色。实际生成的沉淀含有大小不同的  $Cu_2O$  颗粒<sup>①</sup>。上述反应可用下列方程式表示：

<sup>①</sup> 亦有人认为生成之沉淀为黄色  $CuOH$  和红色  $Cu_2O$  的混合物。





为了防止铜离子和碱反应生成氢氧化铜或碱性碳酸铜沉淀，可于铜试剂中加入适量的柠檬酸盐或酒石酸钾钠。这些含羟基的有机化合物能与铜离子反应生成可溶性的络离子。反应是可逆的，平衡后，溶液内含有一定浓度的氢氧化铜。以酒石酸钾钠为例，反应式如下：



器材：1. 试管及试管架；2. 水浴锅。

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. 1%硫酸铜溶液；8. 10%氢氧化钠溶液；9. Fehling 氏试剂<sup>(4)</sup>；试剂 A. 试剂 B(临时等量混合)；10. Benedict 氏试剂<sup>(5)</sup>；

## 11. Barfoed-Tauber-Kleiner 試劑〔6〕。

(1) Trommer 氏試驗：取試管四支，分別加入2%葡萄糖、果糖、蔗糖、阿拉伯糖溶液各1毫升。再各加10%氫氧化鈉溶液1毫升。搖勻，滴加1%硫酸銅溶液直至發生輕微混濁為止。放入沸水浴內加熱，觀察有無黃色或紅色沉淀。

(2) Fehling 氏試驗：取五支試管，各加入Fehling氏試劑A和Fehling氏試劑B各一毫升。混勻後，分別加入2%葡萄糖、蔗糖、麥芽糖、阿拉伯糖和1%淀粉溶液各4滴。放入沸水浴內煮2—3分鐘後，冷卻。注意沉淀和顏色的變化。

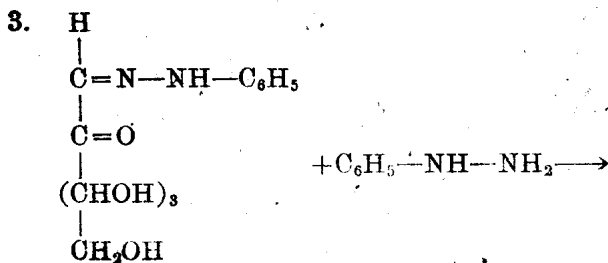
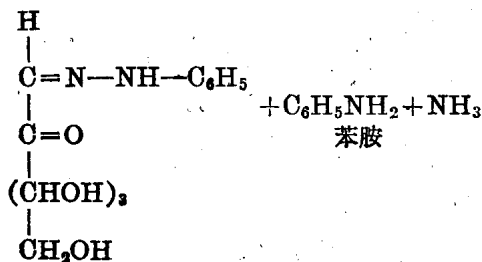
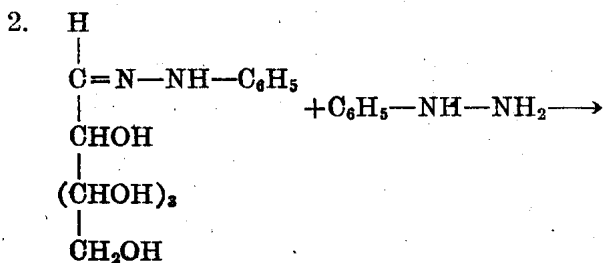
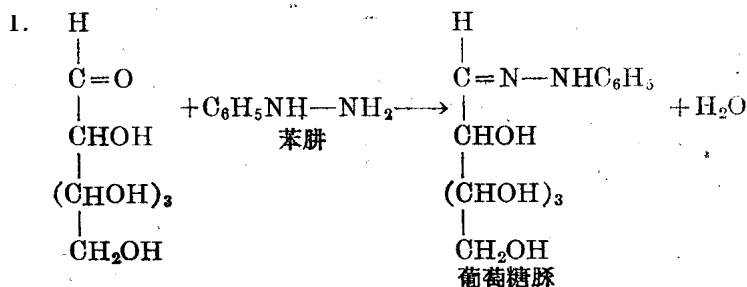
(3) Benedict 氏試驗：于四支試管中先各加入Benedict氏試劑2毫升，再分別加入2%葡萄糖、蔗糖、麥芽糖、果糖各4滴。在沸水浴中煮2—3分鐘。冷卻，觀察變化。

(4) Barfoed 氏試驗：本試驗的特點為還原作用在酸性溶液中进行，可以用來區別單糖與還原性貳糖。單糖呈陽性反應，還原性貳糖不呈陽性反應。但應注意加熱不能過久，否則貳糖亦呈陽性反應。此外，還原性貳糖濃度過高時，亦會產生陽性反應。

取兩支試管，分別加入2%葡萄糖、麥芽糖溶液各3滴，再各加Barfoed-Tauber-Kleiner 試劑1毫升。在沸水浴中加熱3分鐘。冷卻後，觀察變化。

### 實驗三 糖脲的形成

Fischer 氏第一個指出許多糖在稀醋酸溶液中能與苯脒化合物生成脲。後來發現這些糖為含有自由醛基或酮基的還原糖。不同還原糖所生成的脲，化學構造不同，晶形、熔點和溶解度亦各不相同。因此，成脲反應可用來鑒別各種還原糖。果糖、葡萄糖和甘露糖的脲，則均為葡萄糖脲。成脲的化學反應如下：



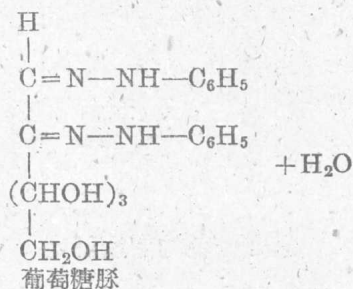


表 1. 脲的晶形和熔点

名 称	半乳糖脲	葡萄糖脲	麦芽糖脲	乳糖脲	阿拉伯糖脲
结 晶 形	长薄片状	黄色细针状	长薄片状	细针状	长线和各种曲线状
熔 点	214°	204°—205°	205°—206°	200°	167°

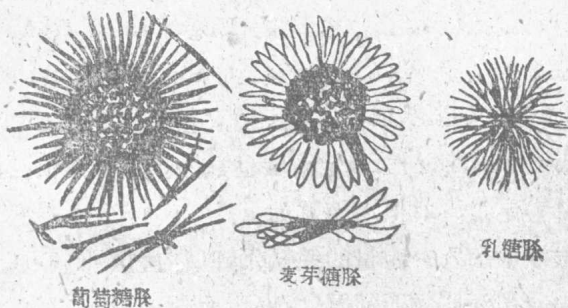


图 1. 脲的晶形。

器材：1. 试管及试管架；2. 水浴锅。

试剂：1. 盐酸苯脲——醋酸钠混合物(比例 2:3)<sup>[7]</sup>；2. 2% 葡萄糖溶液；3. 2% 麦芽糖溶液；4. 2% 乳糖溶液；5. 2% 蔗糖溶液。

操作：

取试管四支，分别加入 2% 葡萄糖、麦芽糖、乳糖和蔗糖溶液 2

毫升。再各加入新配制的盐酸苯胍—醋酸鈉混合物約 0.5 克。混勻，置沸水浴中。隨時將出現沉淀的試管取出，並記錄時間。煮 30 分鐘後，將所有試管取出，在室溫下徐徐冷卻。注意有無沉淀產生。用顯微鏡觀察並繪出沉淀的結晶形狀。

#### 實驗四 糖的定量測定

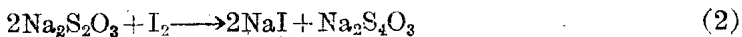
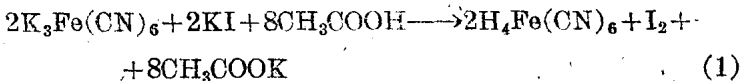
(Hagedorn-Jensen 二氏定糖法)

在鹼性溶液中，還原糖容易把  $\text{Cu}^{++}$  和  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{--}$  等氧化劑還原成  $\text{Cu}^+$  和  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{--}$  等離子。測定還原作用生成  $\text{Cu}^+$  或  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{--}$  的數量，就可以計算還原糖的數量。Folin-吳究二氏定糖法就是根據這個原理。如在實驗中使用一定量的  $\text{Cu}^{++}$  或  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{--}$  氧化劑，在反應完了後，測定剩餘的  $\text{Cu}^{++}$  或  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{--}$  數量亦可計算還原糖的數量。這就是 Hagedorn-Jensen 二氏定糖法的理論根據。但是，必須注意，溶液中同時含有的其他還原性物質亦常能使  $\text{Cu}^{++}$ 、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{--}$  等還原，造成誤差。

Hagedorn-Jensen 二氏定糖法也是一個微量定糖法，常用於血糖（葡萄糖）定量。其原理簡述如下：

於被檢液中加入一定量的鐵氰化鉀（紅血鹽， $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ）。紅血鹽的一部分被還原成亞鐵氰化鉀（黃血鹽， $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ）。

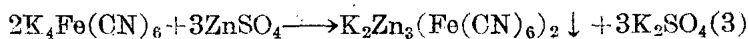
在一定實驗條件下，糖與被還原的紅血鹽具有一定數量關係。用碘滴定法測量剩餘之紅血鹽，即能計算用去的紅血鹽數量和被檢液中糖的含量。其反應式如下：



還原糖多，剩餘的  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  就少，產生出來的游離碘也就少，滴定碘的硫代硫酸鈉用量亦少。由此可見，糖量和硫代硫酸鈉

用量成相反关系。但这种关系并不是精确地反比关系。这可能是由于还原糖与红血盐的反应程度受这两种物质相对浓度的影响。硫代硫酸钠用量和还原糖数量的相反关系是由经验确定下来的。因此,本实验要求严格地执行操作规程,如使用的温度和加热时间长短等。

为了保证反应(1)进行完全,用硫酸锌从反应体系中除去生成的黄血盐。硫酸锌与黄血盐反应生成不溶性亚铁氰酸钾锌复盐。



器材: 1. 试管及试管架; 2. 0.1毫升微量吸量管2支; 3. 水浴锅; 4. 金属架(放试管及锥形瓶用); 5. 小玻璃漏斗四个; 6. 50毫升锥形瓶四个; 7. 1、2、3和5毫升的吸量管各一个; 8. 2毫升微量滴定管; 9. 脱脂棉花。

试剂: 1. 0.45%硫酸锌溶液; 2. 0.1N氢氧化钠溶液; 3. 血液<sup>[8]</sup>; 4. 0.005 N 标准铁氰化钾碱性溶液<sup>[9]</sup>; 5. 氯化物-硫酸锌-碘化钾溶液<sup>[10]</sup>; 6. 3%醋酸溶液; 7. 1%淀粉溶液(溶于饱和 NaCl 溶液中); 8. 0.005 N 标准硫代硫酸钠溶液<sup>[11]</sup>。

#### 操作:

取四支试管, 记上1、2、3、4四个号码, 各加入0.45%硫酸锌溶液5毫升及0.1N氢氧化钠溶液1毫升。混匀。这样制备的氢氧化锌胶体溶液, 可以沉淀除去血液中的蛋白质。

向1、2号两试管内, 用微量吸量管各量入血液0.1毫升。仔细地反复吸入并放出氢氧化锌胶体溶液3—4次以洗净微量吸量管中残存的血液。第3、4号两试管为空白对照, 不加血液。将上述四支试管一起放入沸水浴中加热4分钟(精确)。

冷却后, 通入塞有小棉花球(不要太紧)的小漏斗, 将试管内容物分别滤入标有1、2、3、4号码的四个50毫升锥形瓶内。用蒸馏

水冲洗沉淀 2 次，每次用 3 毫升。将洗液通过棉花球滤入锥形瓶内与滤液合并。

向每个锥形瓶内，用微量滴定管，精确地加入碱性红血盐溶液 2 毫升。

将四个锥形瓶放入沸水中煮 15 分钟(精确)。冷却后，各加氯化物-硫酸锌-碘化钾溶液 3 毫升及 3% 醋酸 2 毫升。混匀。

将锥形瓶放在白磁板上，由微量滴定管用 0.005 N 硫代硫酸钠溶液滴定。俟瓶内黄色变得很浅后，加 1% 淀粉溶液 2 滴。继续滴定至瓶内蓝色恰恰消失为止(滴定终点)。

计算：

根据血糖换算表，将样品滴定值和空白对照滴定值折合成糖值。此两糖值相减，即得 100 毫升血液中所含葡萄糖毫克数。

表 2. Hagedorn-Jensen 二氏血糖换算表

0.005N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  用量(毫升)和血液中葡萄糖含量(毫升/100毫升)的换算关系

硫代硫酸钠毫升数	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0.1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0.2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0.3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0.4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0.5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0.6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0.7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0.8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197

0.9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1.0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1.1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1.2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1.3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1.4	106	104	102	101	99	97	95	93	92	90
1.5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72
1.6	70	68	66	65	63	61	59	57	56	54
1.7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
1.8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19
1.9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2

## 第二章 脂肪的化学

在人类、动物和植物组织的基本组成成份中，除了蛋白质和糖之外，尚有脂肪和类脂质。类脂质是在化学或物理性质上类似脂肪的物质。

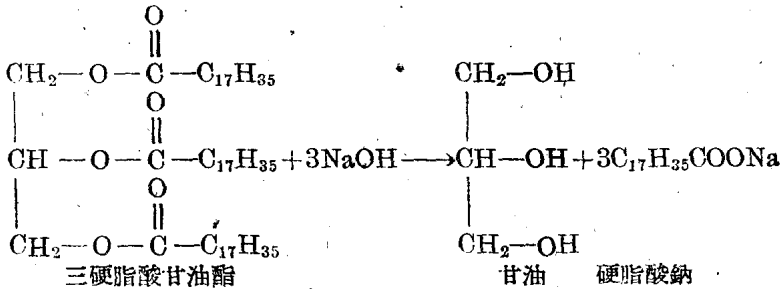
脂肪及类脂质总称为脂肪类化合物。脂肪类化合物溶于脂肪溶剂，如乙醚、石油醚、二硫化碳、氯仿和苯等，但不溶于水或微溶于水。

根据化学成分，脂肪类化合物可分为三类：(1)单纯脂肪——脂肪酸与醇和固醇构成的酯。油、脂及蜡属之。(2)复合脂肪——除脂肪酸与醇之外尚含有其他成分的酯。磷脂、糖脂等属之。(3)衍生脂肪——脂肪类化合物的水解产物。脂肪酸、脂肪族之高分子醇及固醇属之。

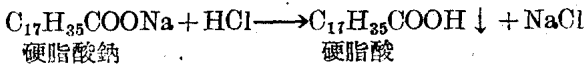


## 实验五 油脂的组成

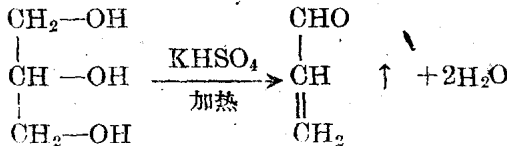
油和脂亦称真脂，均为中性脂肪，为高级脂肪酸与甘油构成的甘油酯。在酸、碱或酯酶催化作用下，易被水解。用氢氧化钠或氢氧化钾作水解催化剂时，水解产物为甘油和能溶于水的脂肪酸钠盐或钾盐（即肥皂）。这种水解过程常称为皂化作用。



用无机酸酸化皂化液，则难溶于水的高级脂肪酸分离析出。



甘油与脱水剂（如  $\text{KHSO}_4$ 、 $\text{P}_2\text{O}_5$  或  $\text{CuCl}_2$ ）共热，或单独热至  $450^\circ\text{C}$  以上时，则脱水生成丙烯醛。丙烯醛有刺激性和特臭，可供辨别。



器材：1. 试管及试管架；2. 100 毫升锥形瓶；3. 10 毫升量筒；4. 水浴锅；5. 玻璃漏斗。

试剂：1. 提炼过的猪油；2. 0.5 N 氢氧化钠酒精溶液<sup>[12]</sup>；3. 10% 盐酸；4. 3N 氢氧化钠溶液；5. 甘油；6. 固体硫酸氢