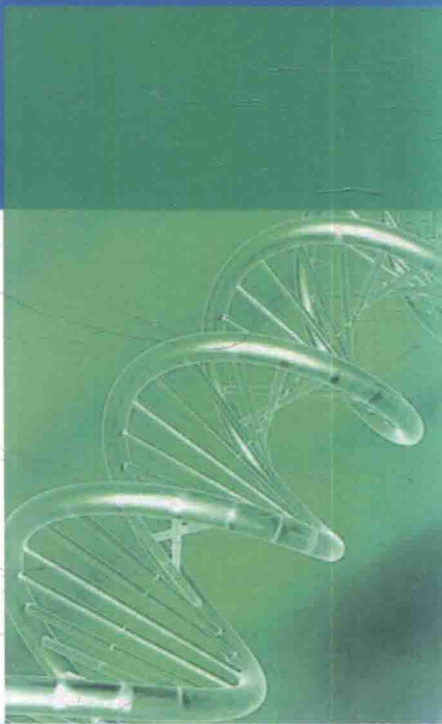


全国高等学校“十三五”农林规划教材  
生物学实践教学改革系列教材

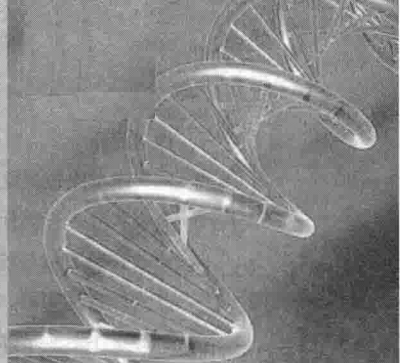
# 生物化学实验

主编 高玲 易晓华



高等教育出版社

全国高等学校“十三五”农林规划教材  
生物学实践教学改革系列教材



# 生物化学实验

主 编 高 玲 易晓华

副主编 王清吉 张 勇

孙 新 孙晓红

编 者 (按姓氏笔画为序)

王 忠 王清吉 孙晓红

孙 新 张 丽 张 弢

张 勇 易晓华 侯晓敏

莫旭华 高 玲 唐 超

视频编辑 袁振宁 薛寿鹏

视频解说 张艳萍



高等教育出版社·北京

## 内容简介

本书比较系统全面地介绍了农林院校生物化学常用实验技术与方法。全书共分为三部分:第一部分为基础性实验,精选了最能代表生物化学特点的实验方法与技术,使学生掌握相应的基本知识与基本技能。第二部分为综合性实验,由多种实验手段与技术及多层次的实验内容组成,主要训练学生对所学知识和实验技能的综合运用能力、独立操作能力,以及对实验结果的分析能力。第三部分为研究性实验,用于培养学生的独立科研能力。为了方便学生自主学习,一些实验项目配套了彩图、教学视频等数字化资源,大大提高了教材的教学适用性。

本书可供高等院校生物科学类和农林类相关专业的本、专科学生使用,也可供相关科研人员参考使用。

## 图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验 / 高玲, 易晓华主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2018. 2

生物学实践教学改革系列教材

ISBN 978-7-04-047702-3

I. ①生… II. ①高… ②易… III. ①生物化学—化学实验—高等学校—教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 248774 号

## Shengwuhuaxue Shiyān

策划编辑 孟丽 责任编辑 孟丽 特约编辑 赵晓玉 封面设计 张志奇  
责任印制 田甜

出版发行 高等教育出版社  
社址 北京市西城区德外大街4号  
邮政编码 100120  
印刷 三河市宏图印务有限公司  
开本 850mm×1168mm 1/16  
印张 8.25  
字数 185千字  
购书热线 010-58581118  
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>  
<http://www.hepmall.com>  
<http://www.hepmall.cn>  
版 次 2018年2月第1版  
印 次 2018年2月第1次印刷  
定 价 20.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换  
版权所有 侵权必究  
物料号 47702-00

数字课程 (基础版)

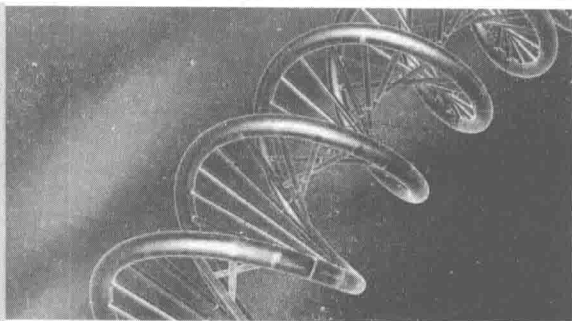
# 生物化学 实验

主编 高玲 易晓华

## 登录方法:

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/47702>, 或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录, 进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号 (20 位密码, 刮开涂层可见), 或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码, 完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”, 开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至:  
[lifescience@pub.hep.cn](mailto:lifescience@pub.hep.cn)



## 生物化学实验

生物化学实验数字课程与纸质教材配套使用, 是纸质教材的拓展和补充。数字课程内容包括实验操作的视频以及彩色图片等, 非常有利于教师教学和学生学习。

用户名:  密码:  验证码:  **5360** 忘记密码?

<http://abook.hep.com.cn/47702>

扫描二维码, 下载 Abook 应用



## ► 前 言

“生物化学实验”不仅是生物化学课程教学的重要组成部分，而且也是培养学生发现问题、分析问题、解决问题等能力的主要途径与手段之一。进入 21 世纪以来，我国高等教育的发展改革步伐加快，高等农林院校的发展规模逐步扩大，“生物化学”作为一门重要的专业基础课，在培养学生严谨的科学态度和独立的工作能力方面起着非常重要的作用，为此，青岛农业大学相关教师结合多年来的教学经验，共同编写了本教材。

本教材从基础性实验、综合性实验、研究性实验三个层次进行内容的编排。基础性实验精选最能体现“生物化学实验”课程关键知识的代表性实验，使学生掌握相应的基本知识与基本技能。综合性实验部分是由多种实验手段与技术及多层次的实验内容组成，主要训练学生对所学知识和实验技能的综合运用能力、独立操作能力以及对实验结果的分析能力。研究性实验是在学生完成基础性实验、综合性实验的基础上，与相关专业的知识相联系，由学生独立自主设计实验方案，撰写研究性课程论文，为开展毕业论文工作打下坚实基础。

本教材针对性、目的性、实用性强，涵盖了参编院校多年来在实验教学开设的重复性好、稳定性强、结果明显的实验项目。但由于编者水平有限，难免会存在错误与不足之处，敬请同行指教。

编 者

2017 年 1 月 1 日于青岛

# 目 录

绪论 .....	1
一、生物化学实验室安全与防护 .....	1
二、实验样品的制备 .....	4
三、缓冲液的配制原理及方法 .....	6
四、常用实验仪器介绍 .....	13

## 第一部分 基础性实验

实验 1 双向纸层析法分离氨基酸 .....	25
实验 2 谷类作物种子中赖氨酸含量的测定 .....	28
实验 3 双缩脲法测定蛋白质含量 .....	30
实验 4 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量 .....	32
实验 5 紫外吸收法测定蛋白质含量 .....	34
实验 6 蛋白质的等电点测定和沉淀反应 .....	36
实验 7 血清蛋白乙酸纤维素薄膜电泳 .....	39
实验 8 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离蛋白质 .....	42
实验 9 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质的等电点 .....	46
实验 10 凝胶过滤分离血红蛋白与硫酸铜 .....	50
实验 11 蛋白质凝胶过滤法脱盐 .....	53
实验 12 蛋白质透析法脱盐 .....	55
实验 13 血液葡萄糖含量的测定 (Folin-Wu 法) .....	57
实验 14 纸电泳法分离核苷酸 .....	60
实验 15 离子交换柱层析分离单核苷酸 .....	62
实验 16 酵母 RNA 的提制 (浓盐法) .....	64
实验 17 酶的基本性质测定 .....	66
实验 18 脲酶 $K_m$ 值的测定 .....	71

实验 19	谷丙转氨酶活性的测定	74
实验 20	淀粉酶活性的测定	76
实验 21	丙酮酸含量的测定	79
实验 22	粗脂肪含量的测定——索氏抽提法	81

## 第二部分 综合性实验

实验 23	直链淀粉和支链淀粉含量的测定	85
实验 24	发酵过程中无机磷的利用	88
实验 25	高等植物材料丙酮粉的制备	90
实验 26	细胞色素 c 的制备及测定	92
实验 27	SOD 提取及活性测定	95
实验 28	SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量	99

## 第三部分 研究性实验

实验 29	果实菠萝蛋白酶的动力学测定	103
实验 30	利用 AKTA prime plus 蛋白纯化系统纯化鸡蛋清溶菌酶	107
实验 31	产淀粉酶微生物的筛选	110
实验 32	木瓜蛋白酶的活性分析	112
实验 33	不同处理条件下果胶酶对苹果汁澄清的影响	114
实验 34	有机溶剂沉淀法制备大豆脲酶及活性测定	116
实验 35	酵母细胞的固定化	119
参考文献		122

# 绪论

## 一、生物化学实验室安全与防护

在生物化学实验室中，安全的内容主要包括人身安全、仪器设备安全、试剂安全以及环境安全等。在上述安全中，人身安全最为重要，一切安全和防护救治措施的实施都要以人为本而设计。但仪器设备、试剂和环境的安全也绝不可忽视，而且人身安全常与这两者联系在一起，操作者在使用仪器设备、试剂时由于操作不当或失误，轻者造成仪器设备的损毁和试剂的浪费以及环境的污染，重者会造成人身伤害。

就人身安全而言，着火、爆炸、中毒、触电、外伤等是生物化学实验室中易发生的危险程度比较高的安全事故。下面分别予以简要介绍。

### (一) 着火

由于实验的需要，生物化学实验室中经常使用电炉、酒精灯、微波炉等火（热）源，同时经常大量使用有机溶剂，如甲醇、乙醇、丙酮、氯仿等，因此，稍加不慎极易发生火灾。常用有机溶剂的易燃性列于表 1-1-1。

名称	沸点 / $^{\circ}\text{C}$	闪点 / $^{\circ}\text{C}$	自燃点 / $^{\circ}\text{C}$
乙醚	34.5	-40	180
丙酮	56	-17	538
二硫化碳	46	-30	100
苯	80	-11	550
95%乙醇	78	12	400

注：闪点是液体表面的蒸汽和空气的混合物在遇明火或火花时着火的最低温度，自燃点是液体蒸汽在空气中自燃时的温度。

低闪点液体的蒸汽只需接触红热物体的表面便会着火，由表 1-1-1 可以看出，乙醚、二硫化碳、丙酮和苯的闪点很低，因此不得存放于可能会产生电火花的普通冰箱内。

·表 1-1-1 常见有机溶剂的易燃性



### 1. 预防火灾必须严格遵守以下操作规程

(1) 严禁在开口容器和密闭体系中用明火或微波炉加热有机溶剂，只能使用加热套或水浴加热。

(2) 有机溶剂废液不得倒入废物桶，只能倒入回收瓶，之后再集中处理。废液量较少时可用水稀释后排入下水道（此操作应尽量避免）。

(3) 不得在烘箱内存放、干燥、烘干有机溶剂。

(4) 在有明火的实验台上有机溶剂容器须封口，也不允许倾倒有机溶剂。

### 2. 灭火方法

实验室中一旦发生火灾切不可惊慌失措，要保持冷静，并根据具体情况正确进行灭火或立即报火警。

(1) 容器中的易燃物着火时，用灭火毯盖灭。因为已经确证石棉有致癌性，故改用玻璃纤维布作灭火毯。

(2) 乙醇、丙酮等溶于水的有机溶剂着火时可用水灭火。汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时不能用水灭火，只能用灭火毯和砂土盖灭。

(3) 导线、电器和仪器着火时不能用水和二氧化碳灭火器灭火，应先切断电源，然后用 1211 灭火器（内装二氟一氯一溴甲烷）灭火。

(4) 个人衣服着火时，切勿慌张奔跑，以免风助火势，应迅速脱衣，用水龙头浇水灭火，火势过大时可就地卧倒打滚压灭火焰。

### (二) 爆炸

生物化学实验室防止爆炸事故极为重要，一旦爆炸其毁坏力极大，后果将十分严重。生物化学实验室常用的易燃物蒸气在空气中的爆炸极限（体积分数）见表 1-1-2。

名称	爆炸极限 /%	名称	爆炸极限 /%
乙醚	1.9 ~ 36.5	丙酮	2.6 ~ 13
甲醇	6.7 ~ 36.5	乙醇	3.3 ~ 19
氢气	4.1 ~ 74.2	乙炔	3.0 ~ 82

表 1-1-2 易燃物质蒸气在空气中的爆炸极限

加热时会发生爆炸的混合物包括有机化合物 - 氧化铜、浓硫酸 - 高锰酸钾、三氯甲烷 - 丙酮等。

常见的引起爆炸事故的原因如下：①随意混合化学药品，并使其受热、摩擦和撞击；②在密闭的体系中进行蒸馏、回流等加热操作；③在加压或减压实验中使用了不耐压的玻璃仪器，或实验反应过于剧烈而失去控制；④易燃易爆气体大量逸入室内；⑤高压气瓶减压阀损坏或失灵；⑥用微波炉加热金属物品。

### (三) 中毒

生物化学实验室常见的化学致癌物有石棉、砷化物、铬酸盐、溴化乙锭、芳香族化合物、丙烯酰胺等。剧毒物有氰化物、砷化物、乙腈、甲醇、汞及其化合物等。中毒的

原因主要是不慎吸入、误食或由皮肤渗入。

#### 1. 中毒的预防

(1) 使用有毒或有刺激性气体时要保护好眼睛，必须佩戴防护眼镜，并应在通风橱内进行。

(2) 取用有毒化学药品时必须戴橡皮手套。

(3) 严禁用嘴吸移液管，在实验室内严禁饮水、进食、吸烟，禁止赤膊和穿拖鞋。

(4) 不要用乙醇等有机溶剂擦洗溅洒在皮肤上的药品。

#### 2. 中毒的急救方法

(1) 误食了酸和碱，不要催吐，可先立即大量饮水，误食碱者再喝些牛奶，误食酸者饮水后再服  $Mg(OH)_2$  乳剂，最后饮些牛奶。

(2) 吸入了有毒气体，应立即转移至室外，解开衣领，休克者应施以人工呼吸，但不要对口法。

(3) 砷和汞中毒或中毒严重者应立即送医院急救。

#### (四) 触电

生物化学实验室要使用大量的仪器，如烘箱和电炉等，因此每位实验人员都必须熟练地安全用电，避免发生用电事故，当 50 Hz 电源下 25 mA 电流通过人体时会造成呼吸困难，电流达到 100 mA 以上时则会致死。

##### 1. 防止触电

(1) 不能用湿手接触电器。

(2) 电源裸露部分应做绝缘处理。

(3) 损坏的接头、插头、插座和接触不良的导线应及时更换。

(4) 开启仪器时先接好线路再插接电源，关闭仪器时先关电源再拆线路。

(5) 仪器使用前要先检查外壳是否带电。

##### 2. 防止电器着火

(1) 保险丝、电源线的截面积，以及插头和插座都要与使用的额定电源相匹配。

(2) 三条相线要平均用电。

(3) 生锈的电器、接触不良的导线接头要及时处理。

(4) 电炉、烘箱等电热设备（高温状态下）不可过夜使用。

(5) 仪器长时间不使用要及时拔下插头。

#### (五) 外伤

##### 1. 化学灼伤

(1) 眼睛灼伤 眼睛内若溅入化学药品，应立即用大量水冲洗 15 min，不可用稀酸或稀碱冲洗。

(2) 皮肤灼伤 ①酸灼伤：可先用大量水冲洗，再用稀  $NaHCO_3$  或稀氨水浸洗，最后再用水洗；②碱灼伤：可先用大量水冲洗，再用 1% 硼酸或 2% 乙酸浸洗，最后再用水洗；③溴灼伤：溴灼伤很危险，且伤口不易愈合，一旦灼伤，立即用 20% 硫代硫酸钠冲洗，再用大量水冲洗，包上消毒纱布后就医。

## 2. 烫伤

接触火焰、蒸汽、红热的玻璃和金属时如果发生烫伤，应立即用大量水冲洗和浸泡，若起水泡不可挑破，应包上纱布后就医，轻度烫伤可涂抹鱼肝油和烫伤油膏等。

## 3. 割伤

割伤是生物化学实验室常见的外伤，要特别注意预防，尤其向橡皮塞中插入温度计、玻璃管时一定要用水或甘油润滑，用布包住玻璃管轻轻旋入，切不可用力过猛，若发生严重割伤时要立即包扎止血，并迅速就医。

## 4. 异物进入眼睛

若有玻璃碎片进入眼睛内则十分危险，必须十分小心谨慎，不可自取，不可转动眼球，可任其流泪。若碎片不出，则用纱布轻轻包住眼睛紧急送医院处理。若有木屑、尘粒等异物进入，可由他人翻开眼睑，用消毒棉签轻轻取出或任其流泪，待异物排出后再滴几滴鱼肝油。

实验室应准备一个完备的小药箱，专供急救时使用。药箱内备有医用酒精、红药水、紫药水、止血粉、创可贴、烫伤油膏（或万花油）、鱼肝油、1%硼酸溶液（或2%乙酸溶液）、1%碳酸氢钠溶液、20%硫代硫酸钠溶液、医用镊子、剪刀、纱布、药棉、棉签、绷带等。

### （六）仪器设备安全

正确使用各种仪器设备，特别是大型和贵重仪器设备，是保证仪器设备安全的根本。有关生物化学实验室常用仪器的正确使用方法请参考“仪器介绍”部分内容。

### （七）环境安全

严禁将微生物（包括病原性和非病原性微生物以及病原性未知的微生物）逸出实验室，避免对人和其他动物造成直接或潜在的危险。剧毒性化学试剂和某些有机溶剂（如氯仿、苯酚等）不得倒入下水道。避免对空气、水源和土壤等造成污染和危害。

上述安全事故，稍一疏忽就可能发生，并造成不必要的损失。因此，每一位在生物化学实验室工作的人员都必须具有充分的安全意识、严格的防范措施和丰富实用的防护救治知识，以便发生意外能够正确地进行处理。

## 二、实验样品的制备

生物化学实验所用的材料通常包括组织样品、血液样品或尿液样品。组织样品常采用动物的肝、肾、胰、心或肌肉组织；植物的叶片、幼芽；酵母或培养的微生物，如大肠杆菌等。人或动物的血液样品常采用全血、血浆、血清或血滤液。现将这些样品的制备方法介绍如下。

### （一）组织样品

生物组织离体过久，其所含物质的含量和生物活性都将发生变化。因此，当以离体组织作为提取材料或代谢研究材料时，应在低温条件下尽快处理。一般采用断头法杀死实验动物，立即取出器官或组织，除去外层脂肪及结缔组织，并用冰冷的生理盐水洗去

血液后，用滤纸吸干生理盐水。迅速称量后，根据实验的不同要求，按以下方法制成实验样品。

### 1. 动物组织

(1) 组织糜 将动物组织用剪刀或绞肉机迅速制成糜状。

(2) 组织匀浆 向剪碎的动物组织中加入适量预冷的匀浆制备液，进一步制成组织匀浆。

制作组织匀浆是提取分离细胞内目的物的必经步骤，依据破碎原理的不同，可分为物理方法、化学方法和生物学方法。①物理方法：利用机械破碎法、研磨法或超声波造成空穴，产生压力冲击（如超声波破碎）、渗透压突变造成细胞内压力差（如稀释法）和反复冻融法等方法而引起细胞的破碎；②化学方法：采用改变细胞壁或细胞膜的通透性，使目的产物释放（如有机溶剂法和表面活性剂法）；③生物学方法：经酶（如溶菌酶、蜗牛酶、纤维素酶、果胶酶等）的作用破坏细胞壁或细胞膜，使细胞内产物释放。

匀浆制备液通常为生理盐水、0.25 mol/L 蔗糖溶液或适当的缓冲液。

(3) 组织浸出液 组织匀浆离心后所得的上清液即组织浸出液。

### 2. 微生物

微生物细胞具有繁殖速度快、种类多、培养方便等特点，是制备生物大分子物质的主要宿主。利用培养一段时间的微生物菌种，离心后收集上清液，浓缩后即可用于制备胞外有效成分。若将菌体破碎后亦可提取胞内有效成分。如培养液不立即使用，可放置于4℃低温保存1周左右。

### 3. 植物

新鲜的植物组织常在称量后置于研钵中，再加入少量的介质和清洁的细砂研磨成匀浆，最后稀释到需要的浓度。测定植物种子中不易变化的成分时，常用烘干的粉末作为样品。

## (二) 血液样品

收集动物或人的血液时应使用干燥的器皿，以防止溶血。

### 1. 全血

取出血液后，迅速盛于含有抗凝剂的干燥试管内，混匀（注意避免激烈振荡），即得全血。

常用的抗凝剂有草酸盐、柠檬酸盐、氟化钠、肝素等，根据实验的要求而定，一般情况下使用草酸盐。抗凝剂的使用量不宜过多，通常每毫升血液加1~2 mg 草酸盐，5 mg 柠檬酸盐、5~10 mg 氟化钠或0.01~0.2 mg 肝素。可将抗凝剂配制成适当浓度的水溶液，然后取0.5 mL放在收集血液的小试管中并横放蒸干（用肝素作为抗凝剂时，蒸干温度不应超过30℃）备用。

### 2. 血浆

全血离心后的上清液即为血浆。

### 3. 血清

不加抗凝剂的血液在室温下自行凝固后约需3 h可分离出血清，也可离心分离以缩

短时间。应及早分离血清以避免溶血。

#### 4. 无蛋白血滤液

分析血液中某些成分时,要避免蛋白质的干扰,故须预先除去血液中的蛋白质成分,制成无蛋白血滤液。可以根据实验的特殊要求选用不同的蛋白沉降剂。常用的蛋白沉降剂有钨酸、三氯乙酸和氢氧化锌。

### 三、缓冲液的配制原理及方法

#### (一) 缓冲液配制原理

由一定物质组成的溶液,在加入一定量的酸或碱时,其 pH 改变甚微或不改变,此溶液称为缓冲液。在许多生物化学实验中,为了准确控制 pH 的变化,必须使用缓冲液。

典型的缓冲液具有下列性质:①在缓冲液中加入少量的强酸或强碱,溶液的 pH 基本不变;②缓冲液稀释前后的 pH 基本不变。

由 Henderson - Hasselbalch 公式:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \lg (c_{\text{盐}}/c_{\text{酸}})$$

可以看出,缓冲液的 pH 取决于两个因素,一是弱酸的  $\text{pK}_a$ ,即取决于弱酸的电离常数的大小,另一个是酸与盐的浓度比。由于在同一种缓冲液中, $\text{pK}_a$  是一个常数,因此溶液的 pH 就决定于  $c_{\text{盐}}/c_{\text{酸}}$  的比值。适当改变它们的比例,就可以配制各种不同 pH 的缓冲液。

#### (二) 常用缓冲液配制方法

下面以配 1 L pH 4.6 的乙酸缓冲液为例说明缓冲液的配制步骤。

(1) 配制 1 L 与乙酸缓冲液相同浓度的乙酸溶液。

(2) 配制 1 L 与乙酸缓冲液相同浓度的乙酸钠溶液。

(3) 根据 Henderson-Hasselbalch 公式计算出一定 pH 下乙酸与乙酸钠的浓度比,从而计算出乙酸缓冲液中乙酸与乙酸钠溶液的体积分数。

(4) 由乙酸与乙酸钠溶液的体积分数计算出 1 L 缓冲液中应加入的同浓度的乙酸与乙酸钠的体积,并按此分别量取乙酸与乙酸钠溶液。将两者混合,即为乙酸缓冲液。

(5) 用精密 pH 计测量缓冲液的 pH,如果低于 4.6,则向缓冲液中滴加乙酸钠溶液,并不断搅拌,直至 pH 为 4.6。同理,如果测量的 pH 高于 4.6,则用乙酸溶液将 pH 调至 4.6。

注意:实际工作中,为了简便操作,在完成 1、2 步后,可直接将上述两种溶液相互混加,用 pH 计测量直至达到所需缓冲液的 pH 即可。

##### 1. 甘氨酸 - 盐酸缓冲液 (0.05 mol/L)

$X$  mL 0.2 mol/L 甘氨酸溶液 +  $Y$  mL 0.2 mol/L HCl 溶液,再加水稀释至 200 mL。

pH	X/mL	Y/mL	pH	X/mL	Y/mL
2.2	50	44.0	3.0	50	11.4
2.4	50	32.4	3.2	50	8.2
2.6	50	24.2	3.4	50	6.4
2.8	50	16.8	3.6	50	5.0

注：甘氨酸相对分子质量 = 75.07，0.2 mol/L 甘氨酸溶液为 15.01 g/L。

## 2. 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液

pH	0.2 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /mL	0.1 mol/L 柠檬酸 /mL	pH	0.2 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /mL	0.1 mol/L 柠檬酸 /mL
2.2	0.40	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.75	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.38	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	20.45	0.55

注：磷酸氢二钠 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 相对分子质量 = 141.98，0.2 mol/L 溶液含 28.40 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 相对分子质量 = 178.05，0.2 mol/L 溶液含 35.61 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O。

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O 相对分子质量 = 210.14，0.1 mol/L 溶液含 21.01 g/L C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O。

## 3. 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液 (0.1 mol/L)

pH	0.1 mol/L 柠檬酸 /mL	0.1 mol/L 柠檬酸钠 /mL	pH	0.1 mol/L 柠檬酸 /mL	0.1 mol/L 柠檬酸钠 /mL
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7

续表

pH	0.1 mol/L 柠檬酸 /mL	0.1 mol/L 柠檬酸钠 /mL	pH	0.1 mol/L 柠檬酸 /mL	0.1 mol/L 柠檬酸钠 /mL
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

注：柠檬酸  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  相对分子质量 = 210.14, 0.1 mol/L 溶液含 21.01 mg/L 柠檬酸。

柠檬酸钠  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  相对分子质量 = 294.12, 0.1 mol/L 溶液含 29.41 g/L 柠檬酸钠。

#### 4. 乙酸 - 乙酸钠缓冲液 (0.2 mol/L、18℃)

pH (18℃)	0.2 mol/L 乙酸钠 /mL	0.2 mol/L 乙酸 /mL	pH (18℃)	0.2 mol/L 乙酸钠 /mL	0.2 mol/L 乙酸 /mL
3.6	0.75	9.35	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

注：乙酸钠  $NaAc \cdot 3H_2O$  相对分子质量 = 136.09, 0.2 mol/L 溶液含 27.22 g  $NaAc \cdot 3H_2O$ 。

0.2 mol/L 乙酸  $HAc$ : 11.8 mL 无水乙酸稀释至 1 L (需标定)。

#### 5. 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液 (0.2 mol/L)

pH	0.2 mol/L $Na_2HPO_4$ /mL	0.2 mol/L $NaH_2PO_4$ /mL	pH	0.2 mol/L $Na_2HPO_4$ /mL	0.2 mol/L $NaH_2PO_4$ /mL
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0

续表

pH	0.2 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /mL	0.2 mol/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /mL	pH	0.2 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /mL	0.2 mol/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /mL
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.5			

注: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 相对分子质量 = 178.05; 0.2 mol/L 溶液含 35.61 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O。  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 相对分子质量 = 358.22; 0.2 mol/L 溶液含 71.64 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O。  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 相对分子质量 = 138.01; 0.2 mol/L 溶液含 27.6 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O。  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 相对分子质量 = 156.03; 0.2 mol/L 溶液含 31.21 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O。

## 6. 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钾缓冲液 (1/15 mol/L)

pH	1/15 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /mL	1/15 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /mL	pH	1/15 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /mL	1/15 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /mL
4.92	0.10	9.90	7.17	7.00	3.00
5.29	0.50	9.50	7.38	8.00	2.00
5.91	1.00	9.00	7.73	9.00	1.00
6.24	2.00	8.00	8.04	9.50	0.50
6.47	3.00	7.00	8.34	9.75	0.25
6.64	4.00	6.00	8.67	9.90	0.10
6.81	5.00	5.00	9.18	10.00	0.00
6.98	6.00	4.00			

注: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 相对分子质量 = 178.05; 1/15 mol/L 溶液含 11.876 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O。  
 磷酸二氢钾 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 相对分子质量 = 136.09; 1/15 mol/L 溶液含 9.078 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。

## 7. 巴比妥钠 - 盐酸缓冲液 (18℃)

pH	0.04 mol/L 巴比妥钠/mL	0.2 mol/L 盐酸/mL	pH	0.04 mol/L 巴比妥钠/mL	0.2 mol/L 盐酸/mL
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65



续表

pH	0.04 mol/L 巴比妥钠 /mL	0.2 mol/L 盐酸 /mL	pH	0.04 mol/L 巴比妥钠 /mL	0.2 mol/L 盐酸 /mL
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21			

注：巴比妥钠相对分子质量 = 206.18；0.04 mol/L 溶液含 8.25 g/L 巴比妥钠。

8. Tris- 盐酸缓冲液 (0.05 mol/L, 25℃)

50 mL 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液与  $X$  mL 0.1 mol/L 盐酸混匀后, 加水稀释至 100 mL。

pH	$X$ /mL	pH	$X$ /mL	pH	$X$ /mL
7.10	45.7	7.80	34.5	8.40	17.2
7.20	44.7	7.90	32.0	8.50	14.7
7.30	43.4	8.00	29.2	8.60	12.4
7.40	42.0	8.10	26.2	8.70	10.3
7.50	40.3	8.20	22.9	8.80	8.5
7.60	38.5	8.30	19.9	8.90	7.0
7.70	36.6				

注：Tris 的相对分子质量 = 121.14；0.1 mol/L 溶液含 12.114 g/L Tris。

Tris 溶液可从空气中吸收二氧化碳, 使用时注意将瓶子盖严。

9. 硼砂 - 盐酸缓冲液 (0.05 mol/L)

50 mL 0.025 mol/L 硼砂 +  $X$  mL 0.1 mol/L 盐酸, 加水稀释至 100 mL。

pH	$X$ /mL	pH	$X$ /mL	pH	$X$ /mL
8.00	20.5	8.40	16.6	8.80	9.4
8.10	19.7	8.50	15.2	8.90	7.1
8.20	18.8	8.60	13.5	9.00	4.6
8.30	17.7	8.70	11.6	9.10	2.0

注：硼砂  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  的相对分子质量 = 381.43, 0.025 mol/L 溶液含 9.53 g/L 硼砂。