


教育部高等教育轻工与  
食品学科教学指导委员会推荐教材

# 皮革生产过程分析

**Analyses and Tests in Leather Making Process**

俞从正 主 编  
王坤余 副主编

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

皮革生产过程分析/俞从正主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2006. 9

高等学校专业教材

ISBN 7-5019-5495-X

I. 皮... II. 俞... III. 皮革工业—生产过程—工业分析—高等学校—教材 IV. TS51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 073745 号

责任编辑: 李建华 责任终审: 滕炎福 封面设计: 宋琳媛  
版式设计: 马金路 责任校对: 燕杰 责任监印: 胡兵

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印刷: 印刷厂

经销: 各地新华书店

版次: 2006 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 11.75

字数: 285 千字

书号: ISBN 7-5019-5495-X/TS·3196 定价: 24.00 元

读者服务部邮购热线电话: 010-65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010-85119817 65128898 传真: 85113293

网址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: [club@chlip.com.cn](mailto:club@chlip.com.cn)

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

51266J4X101ZBW

# 前 言

分析检测是实现皮革生产质量全程监控、监测三废治理的重要手段。自从1988年轻工业出版社出版的《皮革理化分析》教材中含有生产过程分析的内容外，本教材是首次将生产过程分析中的内容集中编写成书。本教材是根据教育部高等学校轻化工程专业教学指导分委员会的推荐而撰写的。

本教材内容具有如下特点：

基础理论与专业实践相结合。编者总结了长期教学工作的体会，将四大化学中的基础理论用于专业分析的原理及操作的阐述中，力争使分析方法的学习建筑在基础理论之上，使之成为学生应用基础知识的平台；同时，在此基础上，根据分析方法的需要补充和加深了相关理论知识，使专业课的学习成为在理论上进一步提高的过程。

规范了相关理论的表述。如碱度的测定原理的表述，在碱性条件下测定含铬量的必要性及可能性等，许多分析与阐述问题的视角是第一次提出的。

增添了新的分析方法。首次增加了对表面活性剂、染料及涂饰材料的分析方法，吸收了期刊上发表的、国家标准中的一些新的分析方法；根据编者多年的教学实践，扩大了对不同方法的应用范围，并改进了某些分析步骤，如在微观结构的观测中某些重要显示方法的改进等。

本教材适合于高等学校轻化工程专业皮革方向本科的同类课程及相关课程的教学。同时可以作为研究生、工程技术人员的参考书。

全书共分六章，俞从正教授编写第1、第3章；丁绍兰教授编写第2章；王坤余教授编写了第4章的1、2、4节；戴红副教授编写第4章的第3节，第5章的1、2节；孙根行副教授编写了第5章的3、4、5节及第6章。全书编成后由俞从正教授通读全稿，为章节加注了英文标题。

教材在编写过程中，得到了杨宗邃教授的大力支持，在此表示衷心感谢。

编 者

# 目 录

<b>第 1 章 皮革生产过程中的显微观测 Microscope Observation in Leather Making Process</b> .....	( 1 )
1.1 组织学研究情况简介 Brief Introduction to Present Histology Research .....	( 1 )
1.2 取样、固定及切片 Sampling, Fixation and Cutting .....	( 2 )
1.2.1 取样 .....	( 2 )
1.2.2 固定 .....	( 3 )
1.3 包埋与封固 Embedding and Mounting .....	( 3 )
1.3.1 明胶包埋法 .....	( 4 )
1.3.2 石蜡包埋法 .....	( 4 )
1.3.3 封固 .....	( 6 )
1.4 三色及苏丹Ⅳ染——一种胶原纤维及脂肪的显示方法 Staining with Trichrome and Sudan Ⅳ, One Kind of Methods to Show Collagen Fiber and Fats .....	( 6 )
1.5 苏木素伊红(曙红)染色 Staining with Hematoxylin and Eosin to Demonstrate Nuclear and Collagen Fiber .....	( 8 )
1.6 弹性纤维的染色方法 Demonstration of Elastic Fiber .....	( 10 )
1.6.1 醛品红染色方法 .....	( 10 )
1.6.2 威氏染(Weiger)染弹性纤维 .....	( 11 )
1.7 硫酸耐尔蓝染色法 Nile Blue Sulfate Stain .....	( 12 )
1.8 组织切片中的染色机理及显微测量 Mechanism in Tissue Stain and Microscope Measurement .....	( 13 )
1.8.1 组织学中所用染料知识及染料简介 .....	( 13 )
1.8.2 染色的机理 .....	( 14 )
1.8.3 分化在染色中的应用 .....	( 15 )
1.8.4 显微测量 .....	( 15 )
1.9 电子显微镜在皮革工业中的应用 Application of Electron Microscope to Leather Industry .....	( 17 )
1.9.1 透射电子显微镜 .....	( 17 )
1.9.2 扫描电子显微镜 .....	( 24 )
1.9.3 新型电子显微镜 .....	( 26 )
<b>第 2 章 鞣前分析 Analyses and Tests in Beam House</b> .....	( 29 )
2.1 原材料硫化钠含量的分析 Determination of sodium Sulfide in Raw Material .....	( 29 )

2.2	脱毛灰液中硫化钠含量的测定 Determination of Sodium Sulfide in Unhairing Liquor	(30)
2.3	蛋白酶活力的测定 Determination of Enzyme Activity	(32)
2.4	胰酶活度的测定 Determination of Activity of Pancreatin	(37)
2.5	浸酸过程中的分析检测 Analysis in Pickling Process	(39)
2.5.1	酸液中酸含量的测定	(40)
2.5.2	浸酸液中氯化钠含量的测定	(40)
2.5.3	毛皮浸酸、浸硝液中芒硝含量的测定	(41)

### 第3章 无机鞣剂和鞣液的分析 Determination of Inorganic Tanning Agents and Liquors

3.1	铬鞣剂的分析 Determination of Chrome Tanning Agents	(46)
3.1.1	新配铬鞣液还原完全与否的检查	(46)
3.1.2	铬鞣液铬含量的测定	(47)
3.1.3	铬鞣液碱度 (Basicity) 的测定	(50)
3.1.4	粉状铬鞣剂中铬含量及其他指标的检测	(53)
3.1.5	粉状铬鞣剂中六价铬离子测定	(54)
3.2	废铬液中铬含量的分析 Determination of Chrome in Spent Chrome Liquid	(56)
3.2.1	铬酸钠比色法	(56)
3.2.2	EDTA 配合比色法	(57)
3.3	铝鞣剂和铝鞣液的分析 Determination of Aluminum Tanning Agents and Liquid	(58)
3.3.1	铝明矾和硫酸铝含量的分析	(58)
3.3.2	铝鞣剂的分析	(61)
3.4	铬铝混合鞣液中铝含量的测定 Determination of Aluminum in Tanning Liquid of Chrome and Aluminum	(63)
3.4.1	配位滴定法测定铬、铝含量	(63)
3.4.2	铬天青 S 直接比色法测铝、铬酸钠比色法测铬	(67)
3.5	锆鞣剂和锆鞣液的分析 Determination of Zirconium Agent and Zirconium Tanning Liquid	(68)
3.5.1	锆鞣剂含量的测定	(68)
3.5.2	锆鞣液的测定	(69)

### 第4章 有机鞣剂和鞣液的分析 Analyses and Tests of Organic Tanning Agents and Liquors

4.1	甲醛和甲醛鞣液的分析 Determination of Formaldehyde and Formaldehyde Tanning Liquor	(70)
4.1.1	甲醛的分析	(70)
4.1.2	甲醛鞣液的分析	(73)
4.2	戊二醛鞣液中戊二醛含量的分析 Determination of Glutaraldehyde Tanning	

Liquor .....	( 74 )
4.2.1 2,4-二硝基苯胼沉淀法 .....	( 74 )
4.2.2 碘滴定法 .....	( 75 )
4.3 合成鞣剂的分析 Determination of Syntan .....	( 76 )
4.3.1 概述 .....	( 76 )
4.3.2 取样和分析试液的配制 .....	( 77 )
4.3.3 测定项目和操作方法 .....	( 77 )
4.4 植物鞣剂及其鞣液的分析 Determination of Vegetable Tan and Tanning	
Liquor .....	( 80 )
4.4.1 取样 .....	( 81 )
4.4.2 定性检测 .....	( 82 )
4.4.3 栲胶的定量分析 .....	( 85 )
4.5 植物鞣质的色谱分析 Determination of Vegetable Tan with	
Chromatogram .....	( 88 )
4.5.1 纸色谱法 .....	( 89 )
4.5.2 薄层色谱法 .....	( 90 )
4.5.3 五倍子鞣质的双向纸色谱分析 .....	( 92 )
4.5.4 (±)-儿茶素和 $\alpha$ -萘酚的薄层色谱分离及鉴定 .....	( 93 )
<b>第 5 章 染整工序的分析检测 Analyses and Tests in Dyeing and Finishing Process</b> .....	( 95 )
5.1 天然油脂的分析检验 Determination of Natural Oils and Fats .....	( 95 )
5.1.1 取样 .....	( 95 )
5.1.2 天然油脂熔点的测定 .....	( 97 )
5.1.3 折射率的测定 .....	( 97 )
5.1.4 水分和挥发物的测定 .....	( 99 )
5.1.5 酸值的测定 .....	( 101 )
5.1.6 皂化值的测定 .....	( 103 )
5.1.7 碘值(碘价)的测定 .....	( 105 )
5.1.8 不皂化物的测定 .....	( 111 )
5.1.9 总脂肪物的测定 .....	( 112 )
5.1.10 氧化脂肪酸的测定 .....	( 113 )
5.2 合成加脂剂的分析检验 Determination of Synthetic Fatliquors .....	( 114 )
5.2.1 取样 .....	( 114 )
5.2.2 测定通则和主要测定项目 .....	( 115 )
5.2.3 色度的测定 .....	( 116 )
5.2.4 水分的测定——甲苯蒸馏法 .....	( 116 )
5.2.5 pH 的测定 .....	( 117 )
5.2.6 相对密度的测定 .....	( 117 )
5.2.7 乳化稳定性的测定 .....	( 119 )
5.2.8 乳化能力的测定 .....	( 120 )

5.2.9	盐分的测定——佛尔哈德法	(120)
5.2.10	油含量的测定	(121)
5.3	染料的分析检验 Analyses and Tests of Dye Stuff	(121)
5.3.1	染料的鉴定	(122)
5.3.2	水溶性染料溶解度的测定——减压过滤法	(123)
5.3.3	染料力份和色光的测定	(124)
5.3.4	染色过程中染料上染率的测定	(125)
5.4	表面活性剂的测定 Determination of Surfactant Agents	(126)
5.4.1	表面活性剂乳化力的测定	(126)
5.4.2	表面活性剂在硬水中稳定性的测定	(128)
5.4.3	表面活性剂羟值的测定——乙酰法	(129)
5.4.4	表面活性剂渗透力的测定	(131)
5.4.5	十二烷基硫酸盐活性物含量的测定	(133)
5.5	涂饰材料的分析检验 Analyses and Tests of Coating Materials	(135)
5.5.1	固形物含量的测定	(135)
5.5.2	薄膜性能的检测	(135)
5.5.3	干酪素颗粒大小的测定	(138)
5.5.4	揩光浆、颜料膏黏度的测定	(139)

## 第6章 制革工业用水及制革工业废水的分析检验 Analyses and Tests of Water and Effluent in Tannery (140)

6.1	水样的采集与保存 Sampling and Keeping of Water in Tannery	(140)
6.1.1	水样的采集	(140)
6.1.2	水样的保存与管理	(141)
6.2	制革工业用水硬度的测定 Determination of the Sum of Calcium and Magnesium of Water for Tannery	(142)
6.3	制革用水铁含量的测定 Determination of Iron of Water for Tannery	(144)
6.3.1	邻二氮菲比色法	(145)
6.3.2	磺基水杨酸比色法	(146)
6.4	制革废水浊度的测定 Determination of Turbidity of Effluent from Tannery	(147)
6.5	制革废水色度的测定 Determination of Colority of Effluent from Tannery	(149)
6.6	制革废水中非过滤性残渣(悬浮物)的测定 Determination of Suspended Solids of Effluent from Tannery	(150)
6.7	制革废水中氯化物含量的测定 Determination of Chloride of Effluent from Tannery	(151)
6.8	制革废水中硫化物含量的测定 Determination of Sulfide of Effluent from Tannery	(153)
6.8.1	概述	(153)

6.8.2	水样的预处理	.....	(153)
6.8.3	过滤碘量法测定硫化物	.....	(154)
6.8.4	制革废水中硫化物的比色测定及电位滴定法测定简介	.....	(156)
6.9	制革废水中总铬含量的测定 Determination of the Sum of Chrome of Effluent from Tannery	.....	(157)
6.10	制革废水中挥发酚的测定 Determination of Volatile Phenolics of Effluent from Tannery	.....	(159)
6.10.1	概述	.....	(159)
6.10.2	4-氨基安替比林-氯仿萃取比色法	.....	(160)
6.10.3	直接光度法	.....	(163)
6.11	制革废水中氨氮的测定 Determination of Ammonia-Nitrogen of Effluent from Tannery	.....	(163)
6.11.1	纳氏试剂比色法	.....	(163)
6.11.2	滴定法	.....	(165)
6.12	制革废水中 $COD_{Cr}$ 的测定 Determination of $COD_{Cr}$ (Chemical Oxygen Demand) of Effluent from Tannery	.....	(166)
6.13	制革废水中溶解氧 (DO) 的测定 Determination of DO (Dissolved Oxygen) of Effluent from Tannery	.....	(168)
6.13.1	碘量法	.....	(168)
6.13.2	膜电极法	.....	(170)
6.14	制革废水中五日生化需氧量的测定 Determination of $BOD_5$ (Biochemical Oxygen Demand) of Effluent from Tannery	.....	(171)
主要参考文献			(176)

# 第 1 章 皮革生产过程中的显微镜测

## Microscope Observation in Leather Making Process

### 1.1 组织学研究情况简介

#### Brief Introduction to Present Histology Research

组织学研究主要借助于生物学和医学上的成果，从微观结构上对皮革加工对象和成品进行研究。这种研究以光学显微镜和电子显微镜为主要手段。

在光学显微镜进行研究时，首先要将研究对象——皮革加工的原料皮、在制品及成品切成  $3\sim 25\mu\text{m}$  的薄片，染色或不染色在显微镜下观察，并利用显微照相机摄制成图片。

另一种是利用电子显微镜进行观察、摄影。电子显微镜分为扫描电子显微镜和透射电子显微镜两种。扫描电子显微镜可以直接对试样表面及切面进行观察，而透射电子显微镜则必须将试样切成超薄切片（一般厚度为  $50\sim 70\text{nm}$ ）放大数千倍甚至数十万倍，进行观察。透射电子显微镜的样品也需染色，这种染色不同于化学着色，它是由于各种不同的结构具有不同的极性。因而对重金属盐类固定状态不一样，使电子束产生不同的穿透率而成像。以显微镜测为主要手段的组织学研究在皮革生产过程控制中主要用于下列方面：

#### (1) 原料皮的特征研究

我国所进行的组织学研究自 20 世纪 70 年代以来，主要有：猪皮组织结构及其加工技术的研究；牦牛皮组织结构及其加工技术的研究；水牛皮组织结构及其加工技术的研究；山羊皮组织结构及其制革技术（汉口路、华北路等）；绵羊皮（土种绵羊、细毛羊、改良过程中形成不同阶段的改良细毛羊皮）组织结构及其加工技术。除此之外，还有鹅皮组织结构的研究，麂皮组织结构的研究，蛇皮组织结构的研究，牛蛙皮组织结构的研究、鸵鸟皮组织结构的研究等，原料皮的研究为我们认识各种不同原料皮组织学的基本组成及特点提供了依据，是正确制定加工工艺的基础。在原料皮的研究中一般研究下述内容：

在显微镜下观察原料皮的主要组织成分，如：表皮，毛囊，毛根，纤维组织，脂肪组织，乳头层与网状层的关系，弹性纤维的分布，胶原纤维的分布及排列，纤维束的密度、相互交织程度、织角的大小、各个不同水平面上的排列及交织的规律等。

#### (2) 加工过程中组织结构变化的研究

原料皮原有的缺陷及在保存过程中形成的各种缺陷，可以通过微观结构的观察及摄影明显地表现出来。如皮肤表面的疤痕在显微镜下可观察到其不同于周围组织的致密纤维，因而使得这个区域纤维难以松散，同时对光形成不同的反射与吸收，造成手感和视觉与周围组织的区别。酶脱毛是 20 世纪 70 年代发展的新技术，但是酶是如何作用于毛根的，是从什么渠道进入皮内并作用于毛根的、可以用显微观察的方法显示出来；脱脂的效果，脂腺破坏的情况，脂肪从脂肪细胞中的流出的情况可以通过脂肪的显色表现出来；软化对弹性纤维的作用、对纤维束的作用，加脂对纤维束的分散效果等均可以通过微观结构的观察

形象地表现出来。组织学研究作为人类视线的进一步扩大与延伸能直观地从微观世界观察皮革加工过程中发生的一系列问题与现象，成为研究皮革生产过程不可替代的科学手段。

### (3) 成品的性能与结构的关系及成品缺陷的研究

成品的手感如柔软、丰满、弹性及延伸性等，这些性能与组织结构密切相关。如人们所共知织角的大小与延伸性密切相关，松散程度与柔软密切相关等，人们虽不能用同一个模式来描述什么结构具有什么手感，但是却可以在相互比较中相对地用组织结构的特点来描述结构、组织形态与上述成品物理性能的关系。同样对于成品发生的各种质量问题，都可从微观结构的变化中找到答案。

本章的学习目的：初步掌握常用组织成分及形态的显示原理、方法，掌握组织切片的制作技术，能完成取样—固定—切片—染色—观察—拍片的整个过程。并通过实验，能正确观察、分析综合图谱中的相关内容。我们将上述学习目的总结为：制谱、读谱、解谱、用谱。即能制作出从原料皮到生产过程各个工序的清晰图片，能读出图片中的相关内容，从图片中收集相关信息；能了解各种信息之间的相互关联，从图片看到原料皮、生产过程及成品，做到源于图片、高于图片；最后能从图片中综合出相关信息，对生产做出有参考价值的判断，解决实际问题。

## 1.2 取样、固定及切片

### Sampling, Fixation and Cutting

#### 1.2.1 取样

##### (1) 目的

使切片的样品具有代表性。

##### (2) 取样的部位及大小

猪皮、牛皮取颈、腹、臀；羊皮取颈、背、腹；对特殊需要观察的部分专门取样，如有一种绵羊皮，存在着从背脊向边腹部呈斜线发射的条状隆起，像猪的肋条骨，俗称肋条纹(rib)，在研究这类结构时则专门针对这一特殊结构取样。样块的大小一般为4cm×4cm。

在加工过程中的取样，应根据要求进行，如软化前后、脱脂前后等，为了防止部位差对研究造成的影响，注意一定要取对称部位作为空白。

##### (3) 取样的方法

① 工具和材料 硬纸板裁成长方形小块(作为切取皮样的衬底)，碳素墨水笔，酒精脱脂棉球，去掉火柴头的火柴杆，棉线，刮胡刀片或手术刀片，放有固定液的广口瓶等。

② 割取 将原皮毛面向下、肉面向上平铺在木板上，用酒精棉球擦去血污等物，用锋利的刀片割取样块，将割下的样块放在准备好的硬纸板上。在样块和硬纸板间衬有去头的火柴杆，用棉线将皮固定在纸板上，这样做既可以保证样块在固定过程中是平整的，

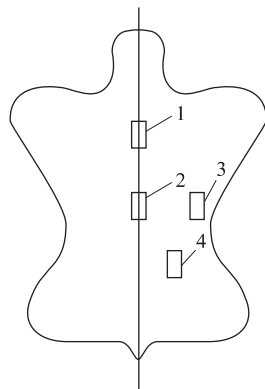


图 1-1 切片取样图

1—颈部 2—背部 3—腹部 4—臀部

同时也可以保证固定液能均匀、彻底地渗入样块。

③ 标记 用碳素墨水在硬纸板上标记，或者用标签纸标记，用棉线固定在样块上。标记的内容应包括：品种、部位、时间、地点等。最好在样块上再用切口做出特殊标记，同时在记录本上做好记录。

④ 固定 将做好标记的样块放入存有固定液的广口瓶中。

### 1.2.2 固定

#### (1) 目的

防止组织变质腐烂，尽可能保持组织的原有形状，增加组织的硬度，使组织内部产生不同的折射率。

#### (2) 常用固定剂

波音氏固定液 (BOUIN)，其特点是渗透迅速，固定均匀，组织收缩小。组成如下：饱和苦味酸溶液 75mL，40%甲醛水溶液 25mL，冰醋酸 5mL。

10%的甲醛水溶液，其特点是渗透快，一般情况下，收缩小，但是在酒精脱水时会产生强烈的收缩。组成如下：10%的甲醛 100mL，蒸馏水 900mL。

#### (3) 方法

将取好并处理好的样块放在已配制好的固定液中，固定 48h。一般在 2~3 个月中可用，如时间太长组织块变脆，不利切片。

#### (4) 切片厚度

未经包埋的冰冻切片为 25 $\mu$ m，石蜡包埋的切片 3~8 $\mu$ m，明胶包埋切片 8~15 $\mu$ m。切片方向分平行于表皮的水平切，垂直于表皮的纵切；因动物的毛均有一定的倾斜方向，为了观察这两种不同的方向，顺着毛的倾斜方向纵切为顺毛切，逆着毛的倾斜方向切为逆毛切。

### 思考题

1. 取样前应做好哪些准备工作？这些工作的必要性是什么？如做不好会给实验带来什么影响？
2. 固定的意义是什么？常用固定剂的主要组成及其特点是什么？

## 1.3 包埋与封固 Embedding and Mounting

包埋的目的是给组织以某种支撑，防止组织在切片和染色的过程中破碎。常用的两种包埋方法是明胶包埋与石蜡包埋。封固的目的是为了切片的较长期保存，根据封固剂的不同，切片的保存时间不同，有的甚至可以达到永久保存的目的。封固剂的折射率最好与组织的折射率相近，封固剂的折射率与透明度成正比，但与未上色的组织识别率成反比。

常用的两种包埋方法的优缺点如下：

① 明胶包埋 不经高温和有机溶剂的处理，组织变形小，脂肪等组织成分不会丢失。适用于原料皮及其加工过程中组织成分和组织结构的观察，也适用于观察成品革的缺陷和进行不同质量成品革的对比研究。缺点是有不少传统的染色方法无法或很难着色，切片不

能切得太薄，如切片厚度小于  $12\mu\text{m}$  易破碎。

② 石蜡包埋 须经  $50\sim 60^{\circ}\text{C}$  的温度和有机溶剂的处理，皮组织的变形和收缩作用剧烈，有些组织成分，如脂肪在包埋中会丢失，这对观察纤维形态的变化会产生很大的干扰。它的优点是易染色，所有经典的染色方法都适用于它，而且可切得很薄 ( $3\mu\text{m}$ )，组织显示清晰。

### 1.3.1 明胶包埋法

#### (1) 试剂的配制

① 10g/L 石炭酸水溶液：苯酚 1g，溶于 100mL 蒸馏水中，24h 以后过滤。

② 100g/L 明胶溶液：明胶 10g，加入 10g/L 石炭酸溶液 100mL，放入带塞的瓶中，加好塞后，在  $37^{\circ}\text{C}$  的烘箱中放置 24h。

③ 250g/L 的明胶溶液：明胶 25g，加入 10g/L 的石炭酸水溶液 100mL，在  $37^{\circ}\text{C}$  的烘箱中放置 24h。配好后暂时不用的明胶溶液应置于冰箱中保存。

#### (2) 方法

① 将欲包埋的样品切成  $0.8\text{cm}\times 1\text{cm}$  小块，进行流水冲洗，洗去组织中的甲醛等固定剂。较厚的皮须洗 24h 以上，较薄的皮洗 2h 即可。如固定剂冲洗不净，则明胶在向内渗透过程中被固定，使后续的明胶无法继续向皮内渗透。

② 浸胶 将欲包埋的皮块投入 100g/L 明胶溶液中，盖好容器的盖子，置于  $37^{\circ}\text{C}$  的烘箱中 24h，到时取出皮块，投入 250g/L 的明胶溶液中，盖好容器的盖子，置于  $37^{\circ}\text{C}$  的烘箱中 24h。

③ 包埋 将已浸过 250g/L 明胶溶液的皮块置于进行包埋的容器中，容器中盛有 250g/L 的明胶溶液（可以是新的，也可以是用过的旧溶液）。将容器置于冰箱的冷冻室内进行冷冻，使之凝固、冻结。

④ 修整 将已凝固的明胶块用小刀加以修整，切去多余的明胶，在空气中放置片刻，使明胶中的水分挥发一部分。冬天可在空气中放置较长时间，夏天因其易熔化不可多放。

⑤ 固定 将已修整好的明胶块投入 10% 的中性福尔马林溶液中（甲醛在长期放置过程中有可能被氧化成甲酸，应以甲基红指示剂检查，如不为黄色，应用 NaOH 滴定至黄色），固定 24h，使之硬化。不马上使用的明胶块可在 10% 的福尔马林溶液中长期保存。切片前用水冲洗一下即可置于冰冻切片机上冰冻，切片。

#### (3) 染色注意事项

经明胶包埋以后的切片染色时，应适当延长染色时间。凡采用染色溶液为 70% 以上酒精或有机溶剂的染色方法均不适用于明胶包埋切片的染色。

### 1.3.2 石蜡包埋法

#### (1) 试剂的配制

① 30%~100%（体积分数）的酒精。

② 酒精：二甲苯为 1:1 的混合溶液。

③ 二甲苯：熔化后的石蜡为 1:1 的混合物或氯仿：熔化后的石蜡为 1:1 的混合物（上述混合物在常温下为固态）。

#### (2) 方法

① 切取  $0.8\text{cm}\times 0.3\text{cm}$  的样块，流水冲洗 24h，洗去其中的固定剂（指处于游离状态

的固定剂)。

② 脱水 将样块经各级不同体积分数的酒精脱水。酒精含量在 80%以下的每级相差 10%，酒精含量在 80%以上的每级相差 5%，用 100%酒精时应浸泡两次。在无水酒精中应放无水  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  或  $\text{CaO}$  的滤纸包，以确保酒精无水。每级酒精的放置时间为 0.5~1h。在进入下一级酒精前应用滤纸片擦干上一级的酒精。脱水是否干净是透明剂能否完全渗入的关键之一。

③ 透明 将已脱水的样块浸入酒精：二甲苯为 1：1 的混合溶液中，再两次浸入纯二甲苯溶液，每种溶液浸入时间以 1h 为宜。

④ 浸蜡 将已透明的样块浸入二甲苯：石蜡为 1：1 的热溶液中，再两次浸入纯石蜡热溶液中，此操作应在烘箱中进行。烘箱的温度应比对应石蜡的熔点高 1~2℃。每种溶液的浸泡时间为 1~2h。

⑤ 包埋 将浸蜡后的组织块放入熔化的石蜡中，并使之冷凝，此时组织即包埋于石蜡中，故称为包埋。包埋的实际操作有许多种方法，这里只介绍一种。

a. 准备好特制的 L 形金属铜框，其长度与载玻片的长度相当，在金属框的一端带有成直角的短边，短边的长度与载玻片的宽度相当，金属框的高度约为 1cm。这样的一对 L 形框可以围成一个长方体。

b. 将金属框在烘箱中预热，取一个载玻片，在载玻片上薄薄地涂一层甘油，将已预热的两个金属框放在载玻片上，围成一个长方体。

c. 在长方体的金属框中插入几个小的已浸过蜡的硬纸板，将金属框分割成 3~4 个更小的长方体。

d. 将欲包埋的样块切面向下分别置于小的长方体中，将系有标签的棉线的一端也置于长方体中。

e. 向各个小长方体中倒入蜡溶液，稍事冷却后，即托住载玻片将整个用金属框架围成的长方体浸入冷水中，使其急剧冷却，以利于事后的切片。冷却 30min 后，取出。将每个小长方体框剥离，皮组织就包埋在石蜡中了。

⑥ 修整 包埋后的石蜡块必须进行修整，以除去组织块周围的过多的石蜡，使每张切片的距离拉近，便于制作连续切片。一般情况下，组织周围的石蜡以留 2mm 为宜，准备固着的一面多留一些石蜡。

⑦ 固着蜡块 准备一个硬木制成的长方形木块，在熔化的石蜡里浸泡 2~3 天。将修整好的石蜡块的待固定面与硬木块接近，在两者之间插入已加热的金属片，使石蜡块待固定面上的石蜡与硬木块上的石蜡熔化，立即抽出金属片，石蜡块即凝固在硬木块上。

⑧ 切片 将粘有蜡块的硬木块夹在石蜡切片机的夹物夹上。调整好切片对组织块的倾角，一般在 5°~10°之间，开始切片，厚度一般为 3~10 $\mu\text{m}$ 。准备一个恒温水浴，温度为 40℃，将切好的蜡带放在水中，蜡带即展开。在载玻片上薄薄地涂一层蛋清和甘油混合而成的敷贴剂，将载玻片紧放在蜡带下面，用刀片或镊子压住需截断的蜡带处，将载玻片轻轻地提起，连续切片就敷贴在载玻片上了。沥去水分，在 37℃的烘箱中烘 24h，切片即牢固地粘在载玻片上了。

⑨ 染色 敷贴烘干的切片，经二甲苯脱蜡后，经 95%酒精至 30%酒精组成的梯度酒精下行至水中，即可按一般方法染色。

### 1.3.3 封固

#### (1) 封固剂种类

封固剂分水溶性的封固剂与非水溶性的封固剂，分别与各种染色方法相对应。在水溶液中染色，未经脱水的切片适用于非水溶性的封固剂；染色后经脱水处理的切片适用于非水溶性的封固剂。水溶性封固剂保存时间较短，而非水溶性的封固剂使切片长期甚至永久保存。常用的两种封固剂为：水溶性的阿拉伯胶，非水溶性的香胶封固剂。

#### (2) 配制方法

① 阿拉伯胶 15g 加 30mL 蒸馏水搅拌，烘箱中过夜，溶解均匀后加甘油 15mL，离心分离，除去气泡。

② 阿拉伯胶 50g，加 500mL 蒸馏水，加热溶解，过滤后蒸发。加小块麝香草酚蓝防腐。

③ 香胶封固剂，用二甲苯溶解块状香胶封固剂，直至香胶溶解，黏稠度适当即可。

#### (3) 操作注意事项

① 封固剂的浓度适当，以刚刚滴下为好。如使用非水溶性封固剂，太稀易产生气泡，太稠不易分散。

② 用量以刚好能封好样品为好，不宜太多，应不溢出盖玻片。

③ 滴加时要轻，防止产生气泡。

④ 非水溶性的封固剂仅适用于经脱水处理的组织切片的封固，切片的脱水必须好，否则会使切片产生雾状。

#### 思考题

1. 明胶包埋与石蜡包埋在适用范围上有什么区别？明胶包埋前应做好哪些准备工作？
2. 石蜡包埋为什么要经各级酒精浸？为什么要先浸软蜡再浸硬蜡？
3. 封固的主要操作要点是什么？它们会给切片带来什么影响？

## 1.4 三色及苏丹Ⅳ染——一种胶原纤维及脂肪的显示方法 Staining with Trichrome and Sudan Ⅳ, One Kind of Methods to Show Collagen Fiber and Fats

#### (1) 染料及助剂

酸性复红，也称酸性品红，是酸性染料，主要用于表皮着色和套染。苯胺蓝，酸性染料，主要用于胶原纤维及其他结缔组织的染色。橘黄 G，酸性染料，主要用于套染。苏丹Ⅳ，严格讲不是染料，因为无助色团，不溶于水，只是溶解在脂肪中使脂肪显色。磷钼酸，是一种杂多酸，由磷与钼配位而形成，在染色中用作酸性助剂。不同含量的酒精，用于脱水和提供介质条件。

#### (2) 配制方法

① 5g/L 的水溶液 称取酸性复红、苯胺蓝、橘黄 G、磷钼酸各 0.5g 溶于 100mL 蒸馏水中，用前过滤。

② 苏丹Ⅳ 将 70% 的酒精 100mL 和丙酮溶液 100mL 混合，称取苏丹Ⅳ 0.5g 溶于上述溶液中，24h 后过滤。

### (3) 染色方法

切片水洗—酸性复红 0.5min—橘黄 G 0.5min—磷钼酸 1min—苯胺蓝 2min—蒸馏水洗—30%酒精速洗—50%酒精速洗—70%酒精 1min—苏丹Ⅳ 0.5~1min—50%酒精速洗—30%酒精速洗—水洗—阿拉伯胶封固。

### (4) 说明

① 磷钼酸作为一种酸可以促进酸性染料苯胺蓝的上色，所浸时间的长短应根据所需颜色的深浅而定。但所浸时间也不可太长，否则会影响苯胺蓝的上色。

如苯胺蓝太深，50%的酒精可以起分色作用。在特殊情况下，可以用 0.1%的氨水作为褪色剂使用。

② 磷钨酸可以代替磷钼酸。在染色过程中，这两种酸的使用方法不同，产生不同的效果。如果先用 PMA（磷钼酸）或 PTA（磷钨酸）处理，然后用低浓度的匀染性染料染色，除红血球外，其他组织都不会上色。当切片首先用匀染性染料或其他小分子的阴离子染料染色，然后用 PMA 或 PTA 处理，PMA 或 PTA 会和上述染料发生竞争，而充分接近胶原纤维，即对小分子染料染色起分化作用。PMA、PTA 可以作为酸性试剂，给组织提供酸性介质，在促进大分子染料上染的同时，还使某些结构缓染或浅染。所以将 PMA 和 PTA 在苯胺蓝之前使用，可产生不同层次的染色效果。

③ 苏丹Ⅳ的着色机理 苏丹Ⅳ的—OH 基邻位有一偶氮基—N=N—，因此易发生重排成为醌型化合物，此化合物无助色团，不能作为普通染色剂用，但它能溶于油类，借助物理作用使油类着色，溶解于脂肪中。为了与苏丹Ⅳ染液配制的条件一致，组织需经不同含量的酒精达到 70%酒精的溶液中，这样有利于苏丹Ⅳ在脂肪中的溶解。染色以后用不同含量的酒精清洗，便于苏丹Ⅳ在脂肪中的保留。

苏丹Ⅳ结构的变化如图 1-2 所示。

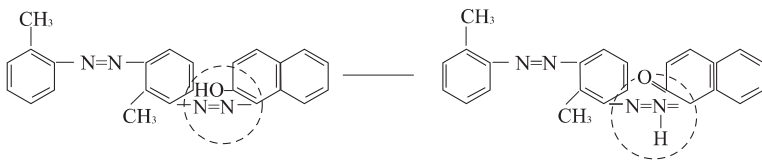


图 1-2 苏丹Ⅳ结构变化

④ 70%的酒精可以对苯胺蓝所上颜色起分化作用。

### (5) 染色效果

胶原纤维及其他结缔组织，蓝色；脂肪，暗红；脂肪细胞，鲜红；表皮，紫红；毛根，如用 BOUIN 固定液固定，则显固定剂的颜色，黄色。

原料皮的各种结构见图 1-3 至图 1-5。图 1-3 显示了细毛羊皮各种组成成分与结构的关系（32 倍），图 1-4 显示了细毛羊皮中的肋条纹结构，图 1-5 清晰显示了夹杂在纤维中的竖毛肌（160 倍）。



图 1-3 明胶包埋，三色染，纵切片

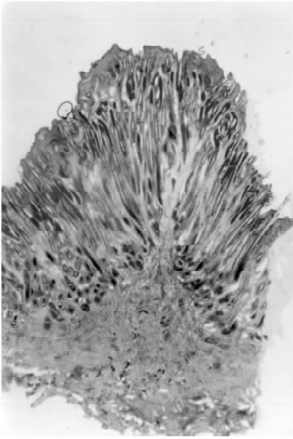


图 1-4 明胶包埋，三色染

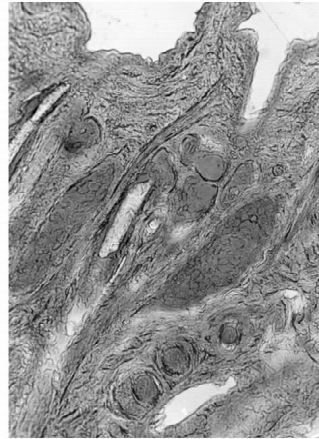


图 1-5 明胶包埋，三色染

### 思考题

1. 在本染色方法中苯胺蓝的着色条件是什么？为什么要在染色中用磷钼酸？可以用其他酸代替吗？原因是什么？
2. 苏丹Ⅳ的着色机理是什么？是如何配制的？为了使其上色采取了哪些措施？

## 1.5 苏木素伊红（曙红）染色

### Staining with Hematoxylin and Eosin to Demonstrate Nuclear and Collagen Fiber

#### (1) 适用范围

苏木伊红染色法可显示细胞核、表皮、毛囊、肌肉、胶原纤维等组织成分及其构型，适用于石蜡包埋切片。染色效果：细胞核呈深蓝色，胶原纤维呈粉红色，表皮呈蓝色，肌肉呈紫红色，毛囊呈蓝色。

#### (2) 染料及染液的配制

苏木素是由一种名为苏木的植物芯材浸制而得的染料，它产于墨西哥。配合适当的媒染剂它才具有良好的染色能力，媒染剂为铵明矾、钾明矾和铁明矾等。

苏木素具有对醌式发色团，但因没有助色团，故需媒染，显色和媒染机理如图 1-6 所示。

伊红为酸性染料，其结构如图 1-7 所示。

#### ① 哈氏 (Harris) 苏木素的配制方法

甲液：苏木素 1g，纯酒精 10mL

乙液：铵明矾  $[\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$  20g，蒸馏水 200mL

先将铵明矾或钾明矾  $[\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$  溶于蒸馏水，苏木素溶于纯酒精，然后将苏木素酒精溶液倒入明矾溶液中，加热煮沸约 1min。离火缓缓地加入  $\text{HgO}$  0.5~1g，在不断搅拌下继续加热煮沸，至溶液呈紫色 (1~2min)，立即移入冷水中冷却，静置一夜，过滤，密闭保存。如染色效果不好，可加冰醋酸 4~6mL。此液可长期保存，但

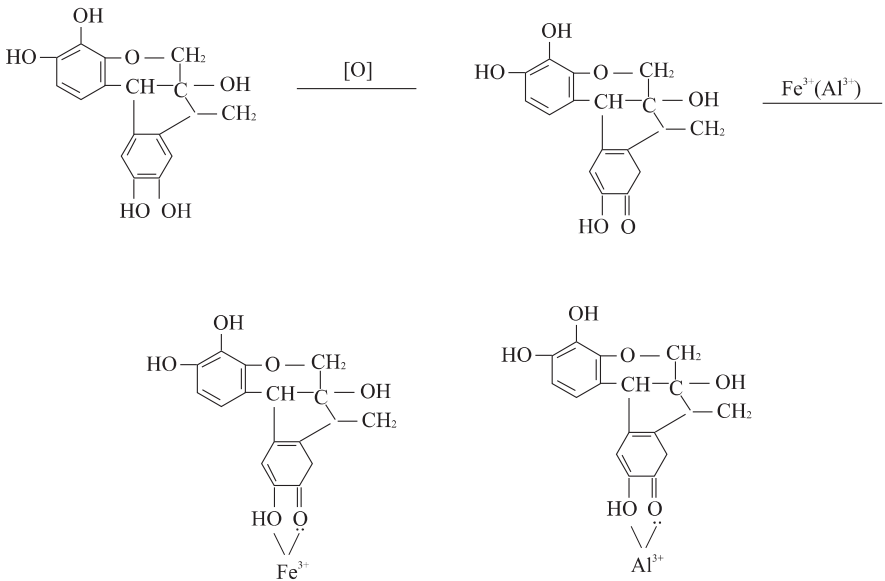


图 1-6 苏木素显色及媒染的机理示意图

在2~3月后，染色效果减弱，不宜多配。

## ② 伊红染液及其他溶液的配制

- a. 水溶性伊红 1g 溶于 100mL 蒸馏水中，24h 后过滤备用。
- b. 0.1% 酸酒精溶液：将 0.1mL 浓盐酸加入到 100mL 70% 酒精溶液中。
- c. 0.5% 氨水溶液：在 100mL 蒸馏水中加入氨水 0.5mL。

## (3) 染色方法

① 操作 切片经蒸馏水洗，在哈氏苏木染液中染 10~15min，自来水洗至切片发蓝，用 0.1% 酸酒精溶液分化至切片呈粉红色，蒸馏水洗去浮色，0.5% 氨水溶液蓝化数分钟至切片发蓝为止。经自来水洗后，用伊红染液染 1~2min。从 30% 酒精开始脱水操作，经 50%，70%，85%，90%，95% 酒精至 100% 酒精两次，再至 100% 酒精：二甲苯=1:1 的溶液中，再至纯二甲苯中 1~2min，以香胶封固剂封固。

## ② 说明或解释

a. 苏木素经氧化并用 Al<sup>3+</sup> 媒染后，染料带正电荷，其性质如碱性染料。向染色的溶液中加入酸，使组织带较多的正电荷，对碱性染料的染色起分化或褪色作用；加氨水使组织带较多负电荷，对碱性染料的染色起固色作用。自来水相对于蒸馏水来说，略显碱性。

b. 酸酒精的分化是本染色方法的关键，分化过度，胞核浅；分化不够，颜色深而片子被污染。

染色图片如图 1-8、图 1-9 所示。

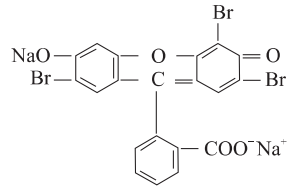


图 1-7 伊红结构式