

综合化学实验讲义

青岛科技大学化学学院

目 录

实验室规则.....	4
------------	---

实 验 内 容

一、系列有机化合物的合成

1、安息香及其衍生物的合成及表征

(1) 安息香的辅酶合成.....	5
(2) 二苯基乙二酮的制备.....	9
(3) 二苯基苯乙酸的制备.....	11

2、水杨醛及香豆素的合成

(1) 水杨醛的合成.....	13
(2) 香豆素的合成.....	16

二、高分子合成

1、甲基丙烯酸甲酯的减压蒸馏.....	18
2、环氧氯丙烷的阳离子开环聚合.....	22
3、聚甲基丙烯酸铵的合成.....	24
4、高吸水性树脂的制备.....	27
5、丙烯酸酯聚氨酯涂料的制备.....	31
6、气相渗透仪测定聚合物分子量.....	33
7、苯乙烯-丙烯酸酯共聚乳液的制备.....	39

三、从天然产物中提取有机物

1、薄层板的制备及活度测定.....	43
--------------------	----

2、粉防己生物碱的提取分离与鉴定.....	47
3、掌叶防己碱的提取与分离及延胡索乙素制备.....	50
4、虎杖中游离羟基蒽醌成分的提取和分离.....	57
5、芦丁的提取、分离与鉴定.....	60
6、秦皮中七叶苷、七叶内酯的提取、分离和鉴定.....	64
7、薯蓣皂苷元的提取和鉴别.....	66
8、植物化学成份的鉴别法.....	69
9、果胶的提取和果冻的制备.....	76
10、明胶的制备及其胶凝性质.....	77
11、橙皮中提取柠檬烯.....	79
12、从红辣椒中分离红色素.....	80
13、绿叶中色素的提取与分离.....	85
 四、工业分析	
1、食品防腐剂山梨酸和山梨酸钾的测定.....	87
2、水中溶解氧的测定——碘量法.....	92
3、水样中化学耗氧量.....	95
4、水中微量挥发酚的测定.....	98
5、合成氨原料气全分析——吸收容量法.....	101
6、硅酸盐水泥中 SiO_2 、 Fe_2O_3 、 Al_2O_3 、 CaO 、 MgO 的测定.....	105
7、氮肥分析——氨态氮的测定.....	109
8、磷肥分析（有效磷含量的测定）.....	110

9、深色石油产品硫含量测定法（管式炉法）	113
10、硫酸产品中氮氧化合物的测定.....	115
11、铁矿石中全铁量的测定.....	116
12、奶粉中蛋白质的测定（双缩脲法）	117
13、奶粉中蛋白质的测定（Folin—酚测定法）	122
14、奶粉中蛋白质的测定（紫外线（UV）吸收法）	126
15、奶粉中蛋白质的测定（考马斯亮蓝染色法）	129
16、奶粉中蛋白质的测定（凯氏定氮法）	132
17、奶粉中蛋白质的测定（分光光度法）	134
18、奶粉中总糖的测定（裴林氏容量法）	136
19、奶粉中铜、铅的测定（阳极溶出法）	139
20、普鲁士蓝光度法测定奶粉中的铁.....	141
21、奶粉中抗坏血酸含量测定方法.....	143
22、2，6-氯酚靛酚滴定法测定维生素 C 的含量.....	145

附 录

附录 1: 预习报告格式.....	151
附录 2: 实验报告格式.....	152

实验室规则

- 1、实验前必须预习实验指导书，并撰写实验预习报告，方得参加实验。
- 2、实验前须认真检查仪器、试剂、用具及实验材料。如有破损、短缺应立即报告指导教师，经同意后方可调换和补充。对玻璃器皿须做好清洗工作。
- 3、实验过程中不得随便挪动外组的仪器、用具和实验材料。不得随意拨动仪器开关或电源开关，须按实验要求进行。
- 4、实验材料、药品的使用，应在不影响实验结果的前提下注意节约，杜绝浪费。
- 5、实验室应保持肃静，不得谈笑喧哗，不许搞其他动作，以免影响他人实验。
- 6、清洗仪器、用具、材料时，须将固形物倒入指定容器内，不得直接倒入水槽，以免造成水管堵塞。
- 7、实验过程中，须按操作规程仔细操作，注意观察试验结果，应及时记录。不得抄写他人的实验实习记录，否则，须重做。如有疑问，应向指导教师询问清楚后方可进行。
- 8、实验完毕后，须将玻璃仪器、用具等清洗干净，按原来的位置摆设放置，交任课老师检查。如有破损须报告任课教师，并填写仪器损坏登记簿。
- 9、在进行实验过程中，不得随意食用原料和加工品。
- 10、在进行实验过程中，要认真进行实验纪录，实验结束后，让任课老师签字后方可离开。
- 11、实验结束后，由值日生负责打扫实验室，保持室内整洁，注意关上水、电、窗、门。经任课老师检查后，方可离开。

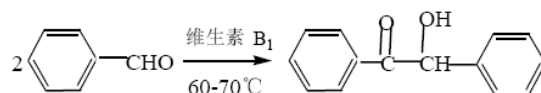
实验一 安息香的辅酶合成

一、实验目的

1. 了解多步骤有机合成的方法
2. 熟悉加热回流、过滤以及重结晶的方法
3. 掌握辅酶合成安息香及安息香转化的原理和方法

二、实验原理

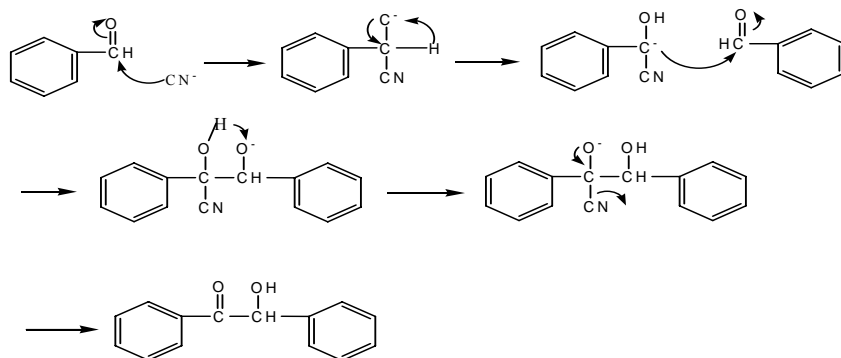
芳香醛在氢化钠(钾)作用下，分子间发生缩合反应生成 α -羟酮。安息香缩合最典型、最简单的例子是苯甲醛的缩合反应。本实验以维生素 B1 替代 NaCN 作催化剂，在碱性条件下，苯甲醛分子间发生缩合反应生成安息香：



反应机制：

1、安息香缩合反应：碳负离子亲核加成反应

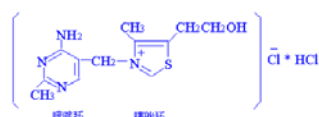
苯甲醛在氰化钠(钾)的作用下，于乙醇中加热回流，两分子苯甲醛之间发生缩合反应，生成二苯乙醇酮，或称安息香，因此把芳香醛的这一类缩合反应称为安息缩合反应，反应机制类似于羟醛缩合反应。该缩合反应是碳负离子对羰基的亲核加成反应。在其中 CN^- 起反应催化剂的作用，首先是无 α -氢的芳香族化合物，如苯甲醛在 CN^- 催化作用下，生成一个负碳离子，然后这个负碳离子亲核进攻另一个苯甲醛分子，生成的加合物同时发生质子的迁移，电子的迁移和 CN^- 的离去，得到安息香产物：



反应中催化剂是剧毒的氰化物，使用不当会有危险，本实验用维生素 B1(Thiamine)盐酸盐代替氰化物催化安息香缩合反应，反应条件温和，无毒，产率较高。

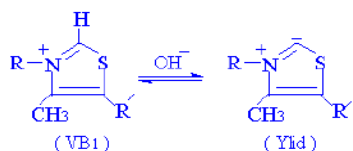
2、辅酶合成机制

维生素 B1 是一种辅酶，化学名称为硫胺素或噻胺，结构式为：

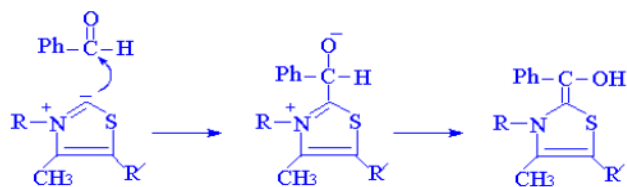


在反应中，维生素 B1 的噻唑环上的氮和硫的邻位氢在碱的作用下被都走，成为碳负离子，形成反应中心，其机制如下：

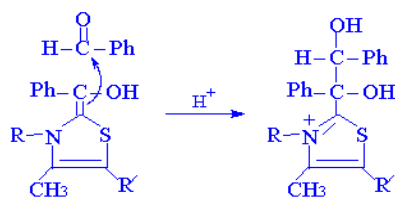
- ① 在碱作用下形成碳负离子，该负碳离子和邻位正氮离子形成一个稳定的位两性离子叶利德 (Ylid)。



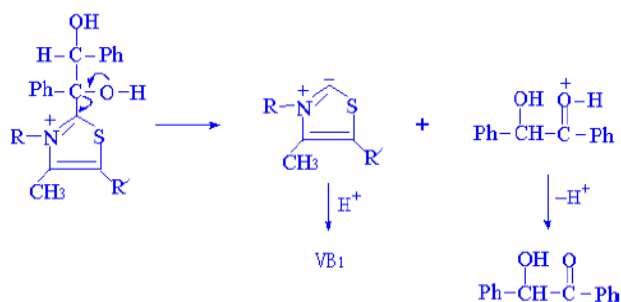
- ② Ylid 与苯甲醛反应，噻唑环上碳负离子与苯甲醛的羰基作用形成烯醇加合物，环氮原子起到调节电荷的作用。



- ③ 烯醇加合物再与另一分子苯甲醛作用形成一个新的辅酶加合物。



- (4) 辅酶加合物分解成安息香，辅酶复原。



三、仪器与试剂

1、**试剂**：苯甲醛，维生素 B1（盐酸硫胺素），95%的乙醇，氢氧化钠（10%）

2、**仪器**：100mL 锥形瓶，10ml 量筒，回流冷凝管，布氏漏斗，抽滤瓶，熔点测定仪

四、实验步骤

将 2.7g 维生素 B1、6mL 蒸馏水、22mL95%乙醇、10mL 新蒸过的苯甲醛加入 100ml 锥形瓶中，用塞子塞上瓶口，将其放在冰盐浴中冷却；用一支试管取 7.5 ml 10% NaOH 溶液，也将其放在冰盐浴中冷却。（冷冻 15 min，务必使之充分冷冻）

15min 后，将冷透的 NaOH 溶液（约-5℃）滴加到冰盐浴中的锥形瓶中，充分摇动使反应混合均匀。然后在锥形瓶上装上回流冷凝管，加几粒沸石，放在温水浴中加热反应，水浴温度控制在 60~70℃之间，勿使反应物剧烈沸腾。反应混合物呈桔黄或桔红色均相溶液。时间保持约 1~1.5h。

撤去水浴，让反应混合物逐渐冷至室温，析出浅黄色结晶，再将锥形瓶放到冰浴中冷却令其结晶完全。如果反应混合物中出现油层，重新加热使其变成均相，再慢慢冷却，重新结晶。必要时可用玻璃棒磨擦锥形瓶内壁，促其结晶。

结晶完全后，用布氏漏斗抽滤，收集粗产物。用 50mL 冷水分两次洗涤结晶，称重。用 80%乙醇进行重结晶，如产物呈黄色，可加少量活性炭脱色。纯产物为白色针状结晶
称重、计算产率。测定熔点，熔点 134~136℃。

五、注意事项：

- 1、学生应按要求复习加热回流反应装置的安装（仪器安装次序，安装要求），抽滤装置的安装使用，重结晶操作，显微熔点测定仪的使用。
- 2、维生素 B1 对热不稳定，使用和保管均应注意，用完保管在冰箱中，不要乱放。
- 3、维生素 B1 在酸性条件下是稳定的，但易吸水，在水溶液中易被空气氧化失效。遇光和 Cu、Fe、Mn 等金属离子均可加速氧化。在 NaOH 溶液中噻唑环易开环失效。因此 VB1 溶液和 NaOH 溶液在反应前必须用冰水充分冷透，否则，VB1 在碱性条件下会分解，这是本实验成败的关键。
- 4、控制 pH，过碱，噻唑环易开环失效，碱性不到，无法形成碳负离子。
- 5、反应过程中，溶液在开始时不必沸腾，反应后期可以适当升高温度至缓慢沸腾

(80~90℃)。

六、思考题

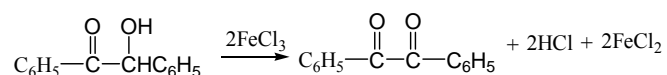
- 1、维生素 B1 在碱性条件下生成负碳离子起催化作用，如所用原料苯甲醛发生氧化，对反应有何影响？
- 2、溶液的 pH 值过高或过低，反应有何影响？
- 3、何为重结晶？进行重结晶的主要步骤？
- 4、安息香缩合、羟醛缩合与歧化反应有何不同？
- 5、安息香缩合反应为什么要控制 pH 值在 9-10 之间，过高或过低对反应有什么影响？

实验二 三氯化铁氧化法制备二苯基乙二酮

一、实验目的

- 1、熟练掌握抽滤、重结晶等操作
- 2、熟悉熔点仪的使用方法
- 3、学习将安息香氧化成苯偶酰(α -二酮)的方法
- 4、掌握 FeCl_3 氧化法制备二苯基乙二酮

二、实验原理



二苯基乙二酮常用作有机合成和杀虫剂的中间体。它对紫外线敏化范围在 480nm 以下，可在很宽的波长区敏化，用于厚膜树脂的固化，而且固化后无色无味，适于制作食品包装用的印刷油墨等。

三、仪器与试剂

- 1、**试剂：**安息香(自制)，冰醋酸，乙醇(95%)， $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 2、**仪器：**100mL 三口烧瓶，回流冷凝管，温度计，电加热套，烧杯，抽滤瓶，布氏漏斗，熔点测定仪

四、操作步骤

- 1、在 100ml 的圆底烧瓶中加入 10ml 冰醋酸，5mL 水，9.0g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，装上回流冷凝管，加热至沸腾。
- 2、再加入 2.1g 安息香，继续加热回流 45~60min。
- 3、加水 30~50ml，煮沸后冷却，则析出黄色固体。
- 4、抽滤得粗产品，用 95%乙醇重结晶。
- 5、称重，计算产率；测熔点，m.p.94~95°C (文献值 95~96°C)。

所得产品可进行元素分析，红外光谱和核磁共振谱证实，并与文献比较。

五、操作要点

- 1、注意电动加热搅拌的加热温度及搅拌速度的控制；
- 2、二苯乙二酮易结块，在冷却析晶时，应用玻璃棒搅动，防止结成大块，包进杂质。

六、思考题

- 1、反应过程以薄层层析监测，根据是什么？（以原料斑点与反应液斑点对照判断反应进行的程度）
- 2、反应中，加水的目的是什么？

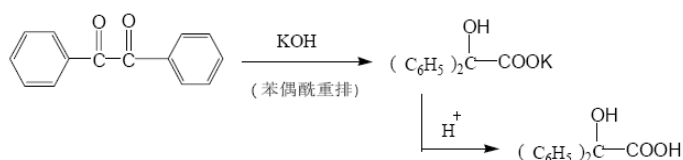
实验三 二苯基羟乙酸的制备

一、实验目的

- 1、了解苯偶酰重排反应机理，学习利用重排反应制备二苯基羟乙酸
- 2、掌握多步骤有机合成的方法

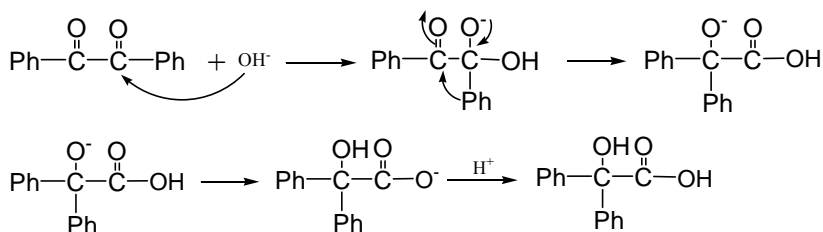
二、实验原理

苯偶酰类化合物在强碱作用下，发生分子内重排生成 α -羟基酸



二苯基乙二酮为 α -二酮，因无 α -氢不能烯醇化，在碱性条件下发生碳架的重排，得到二苯基乙醇酸，以此命名与此类似的一系列重排反应为二苯基乙醇酸重排：

反应首先发生 OH^- 向二苯基乙二酮分子中一个羰基的进攻，形成活性中间体，随后发生苯基带电子向另一个羰基的迁移重排，生成更稳定的产物---二苯基乙醇酸钾，酸化后得到二苯基乙醇酸。



三、试剂

二苯基乙二酮（自制） 氢氧化钾 95%乙醇，浓盐酸，甲苯

四、操作步骤

- 1、在 100ml 三口烧瓶中，溶解 5g 氢氧化钾于 5ml 水中，然后加入 5ml95%的乙醇，混合均匀。

- 2、将 2g 二苯基乙二酮加入其中并振荡，至固体全部溶解，溶液呈深紫色。
- 3、安装回流冷凝管，水浴上煮 15 分钟，加热过程中即有固体析出。
- 4、先室温冷却，再将其放置在冰水中 1 小时。
- 5、抽滤，用少量无水乙醇洗涤固体，得白色二苯基羟乙酸钾盐。
- 6、酸化。将上述酸的钾盐溶于 60ml 水中，若有不溶物，过滤出去，然后将 3ml 浓盐酸与 20ml 水配成的盐酸溶液加于其中，即有白色晶体析出。
- 7、经放置冷却后，抽滤，结晶用冷水洗几次，熔点 147—149℃，用甲苯重结晶，熔点 148-149℃。
- 8、计算产率

五、注意事项

- 1、反应体系中应加入沸石，防止暴沸。
- 2、用甲苯重结晶应用水浴加热，使其完全溶解。

六、思考题

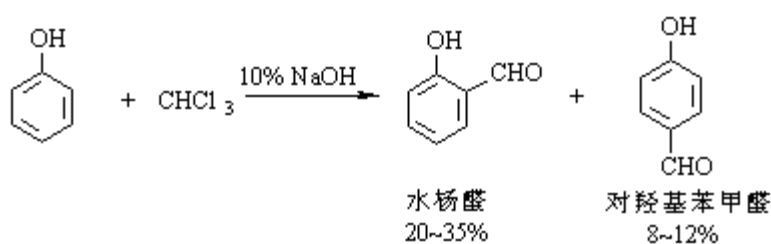
- 1、洗涤沉淀时如果用水代替无水乙醇，结果会怎样？
- 2、生成二苯乙醇盐后，加入 HCl 的目的是什么？

实验四 水杨醛的合成

一、实验目的

- 1、掌握制备水杨醛的原理和方法
- 2、掌握水汽蒸馏的实验方法

二、实验原理:

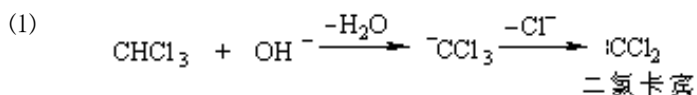


酚与氯仿在碱性溶液中加热生成邻位及对位羟基苯甲醛。含有羟基的喹啉、吡咯、茛等杂环化合物也能进行此反应。

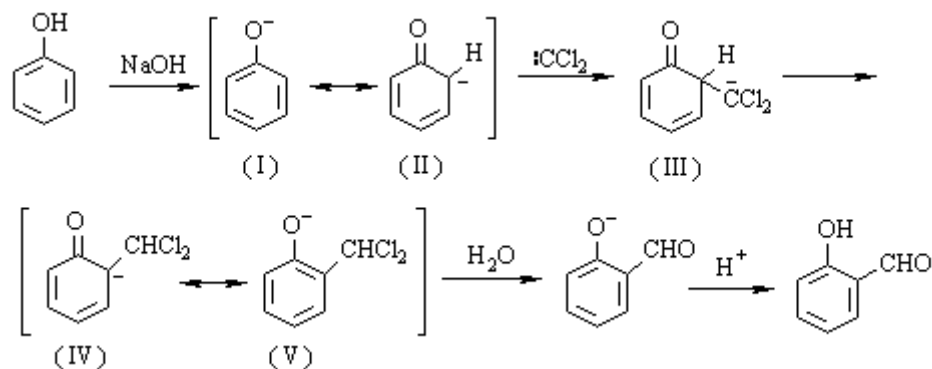
常用的碱溶液是氢氧化钠、碳酸钾、碳酸钠水溶液，产物一般以邻位为主，少量为对位产物。如果两个邻位都被占据则进入对位。不能在水中起反应的化合物可在吡啶中进行，此时只得邻位产物。

Reimer-Tiemann Mechanism: 芳环上的亲电取代反应

首先氯仿在碱溶液中形成二氯卡宾，它是一个缺电子的亲电试剂，与酚的负离子（II）发生亲电取代形成中间体（III），（III）从溶剂或反应体系中获得一个质子，同时羰基的 α -氢离开形成（IV）或（V），（V）经水解得到醛。



(2)



三、仪器与试剂:

1、试剂: 苯酚 氯仿 氢氧化钠 三乙胺 亚硫酸氢钠, 乙酸乙酯, 盐酸, 硫酸

2、仪器: 电动搅拌器 温度计 球形冷凝管 滴液漏斗 恒压滴液漏斗 分液漏斗 250ml 三口烧瓶 布氏漏斗 抽滤瓶 阿贝折光仪

四、操作步骤:

在装有搅拌、温度计、回流冷凝管及滴液漏斗的 250ml 三口瓶中, 加入 38ml 水, 20g 氢氧化钠当其完全溶解后, 降至室温, 搅拌下加入 9.4g 苯酚, 完全溶解后加入 0.16mL (3-6 滴) 三乙胺, 水浴加热至 50°C 时, 在强烈搅拌下, 于 30 分钟内缓缓滴加 16mL 氯仿。滴完后, 继续搅拌回流 1 小时, 此时反应瓶内物料渐由红色变为棕色, 并伴有悬浮着的黄色水杨醛钠盐。

回流完毕, 将反应液冷至室温, 以 1:1 盐酸酸化反应液至 $\text{pH}=2-3$, 静置, 分出有机层, 水层以乙酸乙酯萃取之, 合并有机层, 常压蒸除溶剂后, 残留物水汽蒸馏至无油珠滴出为止, 分出油层, 水层以乙酸乙酯萃取三次, 将油层合并后, 加饱和亚硫酸氢钠溶液。大力振摇后, 滤出水杨醛与亚硫酸氢钠的加成物, 用 10% 硫酸于热水浴上分解加成物, 分出油层, 以无水硫酸钠干燥之, 吸滤后, 将滤液常压蒸馏, 收集 $195-197^\circ\text{C}$ 馏份即得淡黄色水杨醛产品, $n_D^{20} 1.5720$ 。

五、注意事项

- 1、控制好水浴温度。
- 2、16mL 氯仿应在 30min 内缓慢滴加。

六、思考题

- 1、如何将水杨醛与苯酚分离？
- 2、实验中三乙胺有何作用？

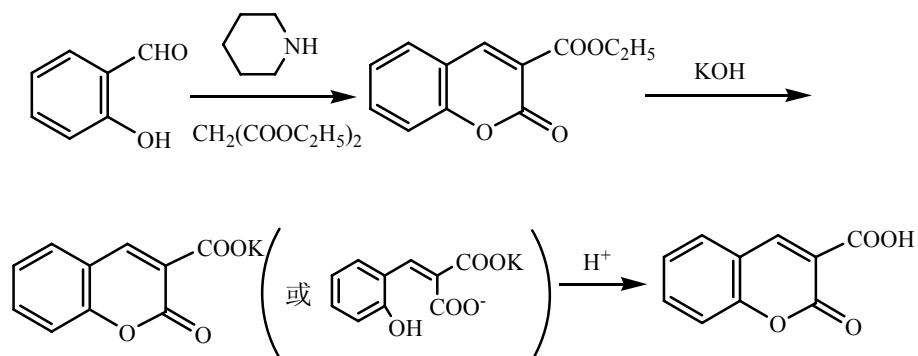
实验五 香豆素-3-羧酸的合成

一、实验目的

- 1、学习利用诺文葛耳 (Knoevenagel) 反应制备香豆素-3-羧酸的原理和实验方法
- 2、了解酯水解法制羧酸
- 3、基本操作训练：回流、抽滤、洗涤、重结晶等基本操作

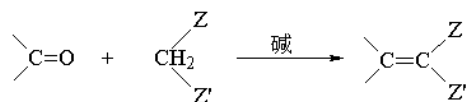
二、实验原理

水杨醛和丙二酸二乙酯在六氢吡啶存在下发生诺文葛耳缩合反应制得香豆素-3-羧酸酯，然后在碱性下水解成酸。



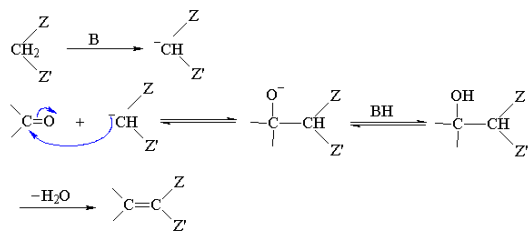
Knoevenagel 反应:

含活泼亚甲基的化合物 (提供烯醇负离子) 与醛或酮在弱碱性催化剂(氨、伯胺、仲胺、吡啶等有机碱)存在下缩合得到 a,b-不饱和化合物。



Z, Z' = -CHO, -COR, -COOR, -CN, -NO₂, -SOR, -SO₂OR

Knoevenagel Mechanism:



三、试剂与仪器

1、**试剂：**水杨醛，丙二酸二乙酯，无水乙醇，六氢吡啶，冰乙酸，浓盐酸，氢氧化钾，无水氯化钙

2、**仪器：**100ml 圆底烧瓶，球形冷凝管，干燥管，抽滤装置

四、实验步骤

1、香豆素-3-羧酸乙酯的制备

在 100mL 圆底烧瓶中依次加入 1mL 水杨醛、1.2mL 丙二酸二乙酯、5mL 无水乙醇和 0.1mL 六氢吡啶(2-4 D)及一滴冰醋酸，在无水条件下搅拌回流 1.5h，待反应物稍冷后拿掉干燥管，从冷凝管顶端加入约 6mL 冷水，待结晶析出后抽滤并用 1mL 被冰水冷却过的 50%乙醇洗两次，得粗产品(白色晶体)；粗品可用 25%乙醇重结晶，干燥后得到香豆素-3-羧酸乙酯，纯品熔点 93℃。

2、香豆素-3-羧酸的制备

在 100mL 圆底烧瓶中加入 0.8g 香豆素-3-羧酸乙酯、0.6g 氢氧化钾、4mL 乙醇和 2mL 水，装上冷凝管加热回流约 15min。趁热将反应产物倒入 20mL 浓盐酸和 10mL 水的混合物中，立即有白色结晶析出，冰浴冷却后过滤，用少量冰水洗涤，干燥后的粗品约 0.3~0.4g，粗产品可用水重结晶，纯香豆素-3-羧酸的熔点 190℃（分解）。

五、注意事项

- 1、本反应的仪器应干燥。
- 2、实验中除了加六氢吡啶外，还加入少量冰醋酸，反应很可能是水杨醛先与六氢吡啶在酸催化下形成亚胺化合物，然后再与丙二酸二乙酯的负离子反应。
- 3、50%乙醇可洗去粗产物中的黄色杂质，用冰过的 50%乙醇洗涤可以减少酯在乙醇中的溶解。

六、思考题

- 1、如何用 Knoevenagel 反应自水杨醛制香豆素-3-羧酸？
- 2、羧酸盐在酸化得羧酸沉淀析出的操作中应如何避免酸的损失，提高酸的产量？

实验六 甲基丙烯酸甲酯的减压蒸馏

甲基丙烯酸甲酯（MMA）、苯乙烯（S）等单体十分活泼，在受热和光照的条件下，容易发生自聚。因此，在作为商品或中间原料的甲基丙烯酸甲酯和苯乙烯等单体中常需加入少量阻聚剂，如对苯二酚等，以防止其自聚。而在单体使用时，加入的阻聚剂必须除去，以保证聚合反应的正常进行。除去阻聚剂的常用方法主要有碱洗和蒸馏等。

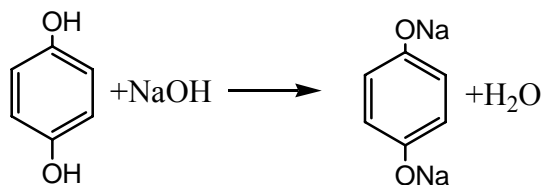
一、目的要求

- 1、掌握甲基丙烯酸甲酯的纯化方法；熟悉减压蒸馏的装置与基本操作技术。
- 2、熟悉阿贝折射仪及其使用方法，掌握检定物质纯度的方法之一。

二、实验原理

1、碱洗

阻聚剂对苯二酚可与氢氧化钠反应，生成溶于水的对苯二酚钠盐。因此，通过水洗可除去大部分的阻聚剂。



2、减压蒸馏

某些物质在进行蒸馏时，会因强烈加热而发生分解或聚合，或会因蒸馏物的沸点甚高而不易蒸馏。在这些情况下，都可应用减压蒸馏。

由于液体表面分子逸出体系所需的能量随外界压力的降低而降低，因此，降低外界压力，便可降低液体的沸点。沸点与真空度之间的关系可近似地用下式表示：

$$\lg P = A + B/T \quad (1-1)$$

式中，P 为真空度，T 为液体的沸点（K），A 和 B 都是常数，可通过测定两个不同外界压力时的沸点求出。

甲基丙烯酸甲酯由于在受热时很容易发生自聚，故可应用减压蒸馏的方法，使其在较低的温度下得到提纯而防止自聚。

三、仪器与药品

1、仪器

标准磨口单颈瓶（250mL/24mm）一只；具活塞接头（24mm）一只；75° 蒸馏头（14mm;24mm×2）一只；温度计套管（14mm）一只，直形冷凝器（400mm/24mm×2）一支；105℃真空接输管（24mm×2）一只；转式真空分配器（24mm;19mm×4）一只；茄形烧杯（100mL/19 mm）四只；温度计（100℃）一只；水银减压计一只；冷阱一只；保温杯一只；真空抽滤瓶（2000mL）一只；气体干燥塔（500mL）一只；真空三通活塞一只；真空二通活塞一只；煤气灯头（真空微调）一只；分液漏斗（500mL）一只；三角漏斗（60mm）一只；烧杯（500mL）一只；广口磨口试剂瓶（125mL）一只；滴管一支；T形管一只；水浴锅一只；真空泵一台；电炉（1000W）一只；超级恒温槽一台；阿贝折射仪一台。

2、药品

甲基丙烯酸甲酯 120mL,聚合级；氢氧化钠溶液 300mL,10%；无水硫酸钠 15g, 化学纯；氯化亚铜 0.1g,化学纯；制冷剂（冰+氯化钠）若干；水银若干；凡士林若干；真空密封胶一支；石蕊试纸若干。

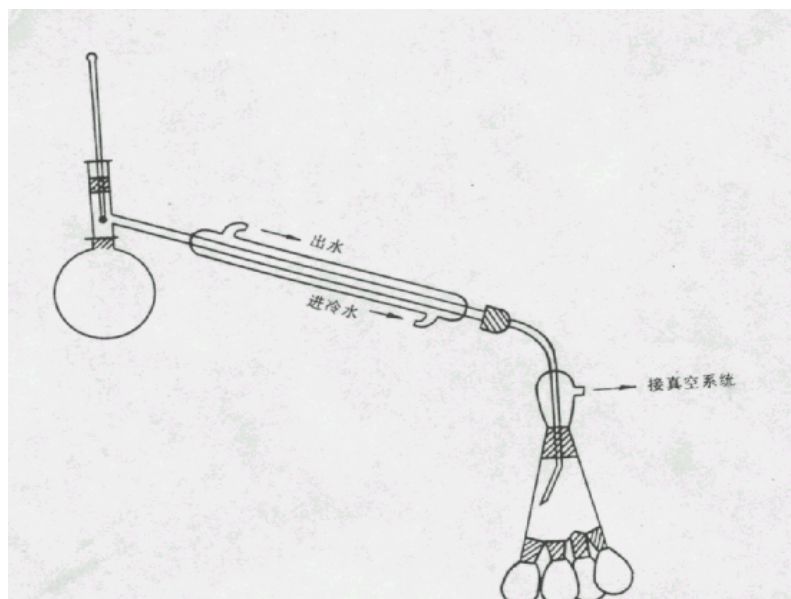


图 1 甲基丙烯酸甲酯的减压蒸馏装置图

四、实验步骤

1、按图 1-1、图 1-2 装好减压蒸馏装置，标准口部须擦凡士林薄层，其余口部用真空密

封胶密封。在温度计套管中加少量水银并用少量水覆盖。水银减压剂与温度计尽可能安装得靠近一些，以便同时观察。

- 2、真空抽滤瓶通大气，打开真空泵抽约 1min,然后关闭真空抽滤瓶活塞。检查减压装置系统是否漏气。调节真空度至 10800Pa(81mmHg)，使其稳定。一切正常后，打开真空抽滤瓶活塞放气，然后关闭真空泵。
- 3、安装减压蒸馏装置的同时，进行洗涤单体的操作。在分液漏斗中加入甲基丙烯酸甲酯 120mL，并加入等体积的 10%氢氧化钠溶液。剧烈摇荡，静置至分层，弃去下层红色洗涤液。重复上述操作数次，直至洗涤液无色为止。然后用去离子水洗至中性。加入无水硫酸钠 5-10g，静置 0.5h。用三角漏斗过滤。洗净的单体置于单颈瓶中，加入氯化亚铜 0.1g。将单颈瓶装入蒸馏装置中。
- 4、开泵抽真空，调稳真空度于 10800Pa。水浴加热达到 40℃，然后慢慢升至 60℃-65℃，使馏出物馏出速度为 1-2 滴/s，同时仔细观察体系压力与温度的变化情况。当压力稳定在 10800Pa、温度稳定在 40℃-41℃时，开始收集馏份。低于 40℃或高于 42℃的馏份另外收集，不要混入所需的馏份中。
- 5、当蒸馏温度以明显速度上升时，表明蒸馏可告结束。先撤去热源，关闭水银减压计。真空泵通大气约 1min，然后切断电源。慢慢打开水银减压计的活塞，使水银液面缓慢回升。
- 6、将阿贝折射仪与超级恒温槽连接，调节温度至 20℃。用滴管吸取少量所需的馏分，置 1-2 滴于阿贝折射仪镜面上，测定折光指数。若折光指数已为 1.4147，表明单体已经纯净。清洗折射仪，擦干后放入箱中。
- 7、拆除蒸馏装置，清洗仪器。冷阱内若有液体，应倒出。
- 8、已提纯的甲基丙烯酸甲酯置于广口磨口试剂瓶中，标明折光指数。若暂时不用，应存于冰箱中。

五、注意事项

- 1、甲基丙烯酸甲酯易挥发，并具有一定的毒性，操作时，注意不要撒出。
- 2、牢记真空泵在开、关前都必须先通大气 1min。
- 3、测定试样折光指数时滴管口不要碰触折射仪镜面，清洗折射仪镜面时，用擦镜纸单

方向轻轻的擦洗。

4、水银减压计复原时，应小心缓慢，防止水银冲破减压计尾端。水银一旦撒出，应及时用硫磺处理。

六、思考题

- 1、熟记减压蒸馏装置中个部件的名称，弄清其作用。
- 2、根据实验体会，指出减压蒸馏的操作要点。
- 3、单体蒸馏提纯后，若不马上使用，应作如何处理？
- 4、减压蒸馏过程中，氯化亚铜起什么作用？

实验七 环氧氯丙烷的阳离子开环聚合

一、目的要求

- 1、加深对离子型开环聚合原理的理解。
- 2、掌握开环聚合的实验室操作方法。

二、实验原理

环状化合物在合适条件下的开环聚合是连锁聚合和逐步聚合之外的又一种重要聚合反应类型，开环聚合一般在离子型引发剂或中性分子的作用下进行。离子型引发剂包括阴离子型和阳离子型两大类，如 RO^- 、 HO^- 、 H^+ 、 Na^+ 、 $\text{BF}_3\text{-H}_2\text{O}$ 等；分子型引发剂如 H_2O 、 ROH 等。

离子型引发剂引发环状化合物的开环聚合在本质上是离子型聚合，表现出许多离子聚合的特点。如聚合过程常常包括引发、增长、终止的基元反应；单体只加到增长链的活性中心上；活性链之间不会反应，等等。但开环聚合过程中分子量的增长却往往是逐步的，分子量随转化率或反应程度的增加而增大，这又具有逐步聚合的特征。此外，开环聚合的产物在结构上往往与逐步聚合产物很相近，但聚合过程却没有低分子副产物生成。所以，简单的将开环聚合归类于连锁聚合或逐步聚合都不是很合适的。目前，越来越多的学者将开环聚合单独作为一种聚合类型加以研究。

能进行开环聚合的单体很多，如环烷烃、环醚、环缩醛、环酯、环酰胺、环硅氧烷等都可成为开环聚合的单体。较为重要的环状单体主要有环氧乙烷、环氧丙烷、己内酰胺、三聚甲醛、四氢呋喃等。许多重要的聚合物，如聚环氧乙烷、聚环氧丙烷、尼龙-6、聚甲醛等，都是通过开环聚合获得的。

环醚类单体的阳离子开环聚合的引发剂主要有质子酸（如 H_2SO_4 、 HClO_4 等）和 Lewis 酸（如 BF_3 、 AlCl_3 、 SnCl_4 等）等。环氧氯丙烷的聚合是活性较大的环醚，而且聚合速度也有较快。加入水等含羟基化合物，可使聚合终止。

与自由基聚合相比，离子型聚合的速度要快得多，因此，常常在低温下进行。

三、仪器与药品

1、仪器

三颈烧瓶（250mL）三只；注射器（10mL）一只；酒精温度计（0-100℃）一只；氮气球一只（5L）一只；电动搅拌机一台，加料漏斗（100mL）一只；恒温水浴槽一个；真空装置（含真

空泵、缓冲瓶、硅胶干燥塔)一套; 马夫炉一台。

2、药品

环氧氯丙烷 100mL, 分析纯; 1,3-丙二醇 0.4mL,分析纯; 1,2-二氯乙烷 78mL, 分析纯, 减压蒸馏; 四氯化锡 0.5mL ; EDTA 四钠盐, 化学纯; 甲醇, 化学纯; 高纯氮气若干; 5A 分子筛。

四、实验步骤

- 1、预先在 250mL 的四颈烧瓶上, 安装机械电动搅拌机、温度计、氮气导气管和加料漏斗。
- 2、通氮气于四颈烧瓶 (250mL) 5mins, 赶走空气中的氧气和水蒸气, 用注射器加入 8mL 干燥的环氧氯丙烷, 然后拔去针头, 用硅胶密封胶密封针眼。同样条件下, 在通氮气下加入 1,3-丙二醇 0.4mL, 搅拌均匀, 然后用注射器再向烧瓶内加入四氯化锡 0.5mL 待温度降至 50℃以下, 40 分钟内将 130mL 环氧氯丙烷单体滴加完毕, 溶液由无色逐渐变至浅黄色的粘稠液体, 最后用水浴控制温度在 50℃左右, 持续反应 3 小时。
- 3、停止反应后, 加入 70mL 1,2-二氯乙烷稀释聚合物, 搅拌均匀。用含 EDTA 四钠盐的 10% 甲醇水溶液(300mL 含 EDTA 6g)洗涤, 烧瓶内出现大量的白色泡沫, 静置分层, 上层水相, 下层为含催化剂的白色泡沫, 下层为有机相。将最下层的有机相转移出来, 用 10% 的甲醇溶液在 60℃下洗涤三次。
- 4、将洗过的有机相倒入圆底烧瓶内, 先用水泵 60℃减压蒸馏 1 小时, 最后用真空泵, 50℃下除溶剂半小时, 最后得浅黄色透明的聚环氧氯丙烷 PECH。

五、注意事项

- 1、加入 SnCl_4 催化剂之前, 必须用氮气将空气中的水蒸气和氧气排出。
- 2、聚环氧氯丙烷溶液若因粘度太大, 可适当加入 1,2-二氯乙烷稀释。

六、思考题

- 1、假如将实验中的催化剂改成 BF_3 的乙醚络合物, 聚合过程和该实验有什么不同。
- 2、如果希望通过环氧氯丙烷阳离子开环聚合得到官能度为 2 以上的端羟基聚醚, 工艺上可采取什么措施?
- 3、假定本实验的聚合反应为阳离子活性聚合, 并且分子量随转化率逐步增加, 试计算当单体 100% 转化时的分子量。

实验八 聚甲基丙烯酸铵的合成

一、实验目的

- 1、掌握溶液法制备聚甲基丙烯酸铵的工艺及其原理；
- 2、掌握测定聚合物溶液粘度的实验技术。

二、实验原理

本实验利用甲基丙烯酸的水溶性和易聚合性，用水溶性的过硫酸铵为引发剂，采用溶液聚合法进行自由基聚合来制备聚甲基丙烯酸，经氨水中和后制备聚甲基丙烯酸铵。

溶液聚合是将单体和引发剂溶于适当溶剂中进行的聚合反应。生成的聚合物溶于溶剂的叫均相溶液聚合，如丙烯腈在二甲基甲酰胺中的聚合；聚合产物不溶于溶剂的叫非均相溶液聚合，如丙烯腈在水中的聚合。溶液聚合具有下列优点：（1）聚合热易扩散，聚合反应温度易控制；（2）体系粘度低，自动加速作用不明显；反应物料易输送；（3）体系中聚合物浓度低，向高分子的链转移生成支化或交联产物较少，因而产物分子量易控制，分子量分布较窄；（4）可以溶液方式直接成品。但是溶液聚合也存有一些缺点，如：（1）由于单体浓度较低，溶液聚合速率较慢，设备生产能力和利用率较低；（2）单体浓度低和向溶剂链转移的结果，使聚合物分子量较低；（3）溶剂分离回收费用高，除尽聚合物中残留溶剂困难，在聚合釜内除尽溶剂后，固体聚合物出料困难，溶剂的使用导致环境污染问题。

三、实验试剂与仪器

试剂： 甲基丙烯酸、浓氨水、去离子水、过硫酸铵。

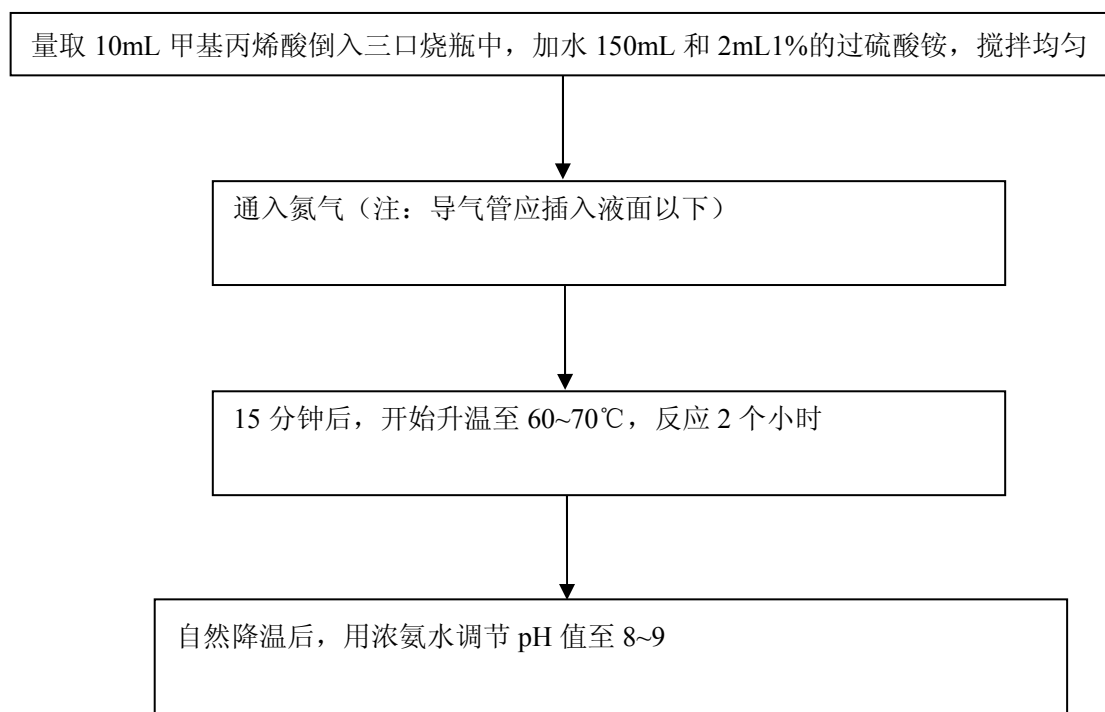
仪器： 三口圆底烧瓶、电动搅拌器、水浴装置一套、氮气袋及氮气、电子天平、球形冷凝管、温度计、量筒。

四、实验步骤

1、搭搅拌装置：按从下到上的顺序将水浴装置、三口烧瓶、聚四氟乙烯搅拌棒、温度计、冷凝管、电动搅拌器依次装好，应确保从正面和侧面看都呈一条直线。

注：1、应保证搅拌棒底部与三口烧瓶底部接触和搅拌翅子打开；2、应先松开搅拌棒的上半部分，然后将下半部分与瓶口塞紧，最后将搅拌棒的上半部分旋紧，保证搅拌棒与瓶口密封，防止溶剂挥发。

2、实验步骤：



五、注意事项

- 1、反应开始时，溶液要充氮充分，以防氧气阻聚；
- 2、中和时，边搅拌边逐渐加入氨水。

六、思考题

- 1、聚甲基丙烯酸的都能应用在哪些方面？这些应用是由什么决定的？
- 2、选择溶液聚合制备聚甲基丙烯酸比用其它三种聚合方法制备有何优点？

3、溶液聚合的优点有什么？

4、溶液聚合的缺点有什么？

5、影响聚甲基丙烯酸铵分子量的因素有哪些？如何影响？

实验九 高吸水性树脂的制备

一、实验目的

- 1、了解高吸水性树脂的基本功能及其用途。
- 2、了解合成聚合物类高吸水性树脂制备的基本方法。
- 3、了解逆向悬浮聚合制备亲水性聚合物的方法。

二、实验原理

该实验以丙烯酸为聚合单体，三乙二醇双丙烯酸酯为交联剂、过硫酸铵为引发剂、单月桂酸山梨糖醇酯为分散剂，在有机溶剂环己烷中进行逆向悬浮聚合。

高吸水树脂的吸水原理：高吸水树脂一般为含有亲水基团和交联结构的高分子电解质。吸水前，高分子链相互靠拢缠在一起，彼此交联成网状结构，从而达到整体上的紧固。与水接触时，因为吸水树脂上含有多个亲水基团，故首先进行水润湿，然后水分子通过毛细作用及扩散作用渗透到树脂中，链上的电离基团在水中电离。由于链上同离子之间的静电斥力而使高分子链伸展溶胀。由于电中性要求，反离子不能迁移到树脂外部，树脂内外部溶液间的离子浓度差形成反渗透压。水在反渗透压的作用下进一步进入树脂中，形成水凝胶。同时，树脂本身的交联网状结构及氢键作用，又限制了凝胶的无限膨胀。

高吸水树脂的吸水性受多种因素制约，归纳起来主要有结构因素、形态因素和外界因素三个方面。结构因素包括亲水基的性质、数量、交联剂种类和交联密度，树脂分子主链的性质等，树脂的结构与生产原料、制备方法有关。交联剂的影响：交联剂用量越大，树脂交联密度越大，树脂不能充分地吸水膨胀；交联剂用量太低时，树脂交联不完全，部分树脂溶解于水中而使吸水率下降。吸水力与水解度的关系：当水解度在 60~85%时，吸收量较大；水解度大于时，吸收量下降，其原因是随着水解度的增加，尽管亲水的羧酸基增多，但交联剂也发生了部分水解，使交联网络被破坏。形态因素主要指高吸水性树脂的主品形态。增大树脂主品的表面，有利于在较短时间内吸收较多的水，达到较高吸水率，因而将树脂制成多孔状或鳞片可保证其吸水性。

外界因素主要指吸收时间和吸收液的性质。随着吸收时间的延长，水分由表面向树脂产品内

部扩散，直至达到饱和。高吸水树脂多为高分子电解质。其吸水性受吸收液性质，特别是离子种类和浓度的制约。在纯水中吸收能力最高；盐类物质的存在，会产生同离子效应，从而显著影响树脂的吸收能力；遇到酸性或碱性物质，吸水能力也会降低。电解质浓度增大，树脂的吸收能力下降。对于二盐离子如，除盐效应外，还可能在树脂的大分子之间羧基上产生交联，阻碍树脂凝胶的溶胀作用，从而影响吸水能力，因而二价金属离子对树脂吸水性的降低将更为显著。

三、试剂与仪器

试剂：丙烯酸、三乙二醇双丙烯酸甲酯、过硫酸铵、单月桂酸山梨糖醇酯、环己烷、氢氧化钠-乙醇溶液

仪器：标准磨口三口瓶、球形冷凝器、温度计（100 °C）、烧杯、培养皿、布氏漏斗、抽滤瓶、恒温水浴槽、电动搅拌器、聚四氟乙烯搅拌棒、干燥器、布袋、滤纸若干

四、实验步骤

1、搭搅拌装置：按从下到上的顺序将水浴装置、三口烧瓶、聚四氟乙烯搅拌棒、温度计、冷凝管、电动搅拌器依次装好，应确保从正面和侧面看都呈一条直线。（注：应保证搅拌棒底部与三口烧瓶底部接触和搅拌翅子打开；应保证搅拌棒与瓶口密封，防止溶剂挥发）

2、实验步骤（见下页图表）

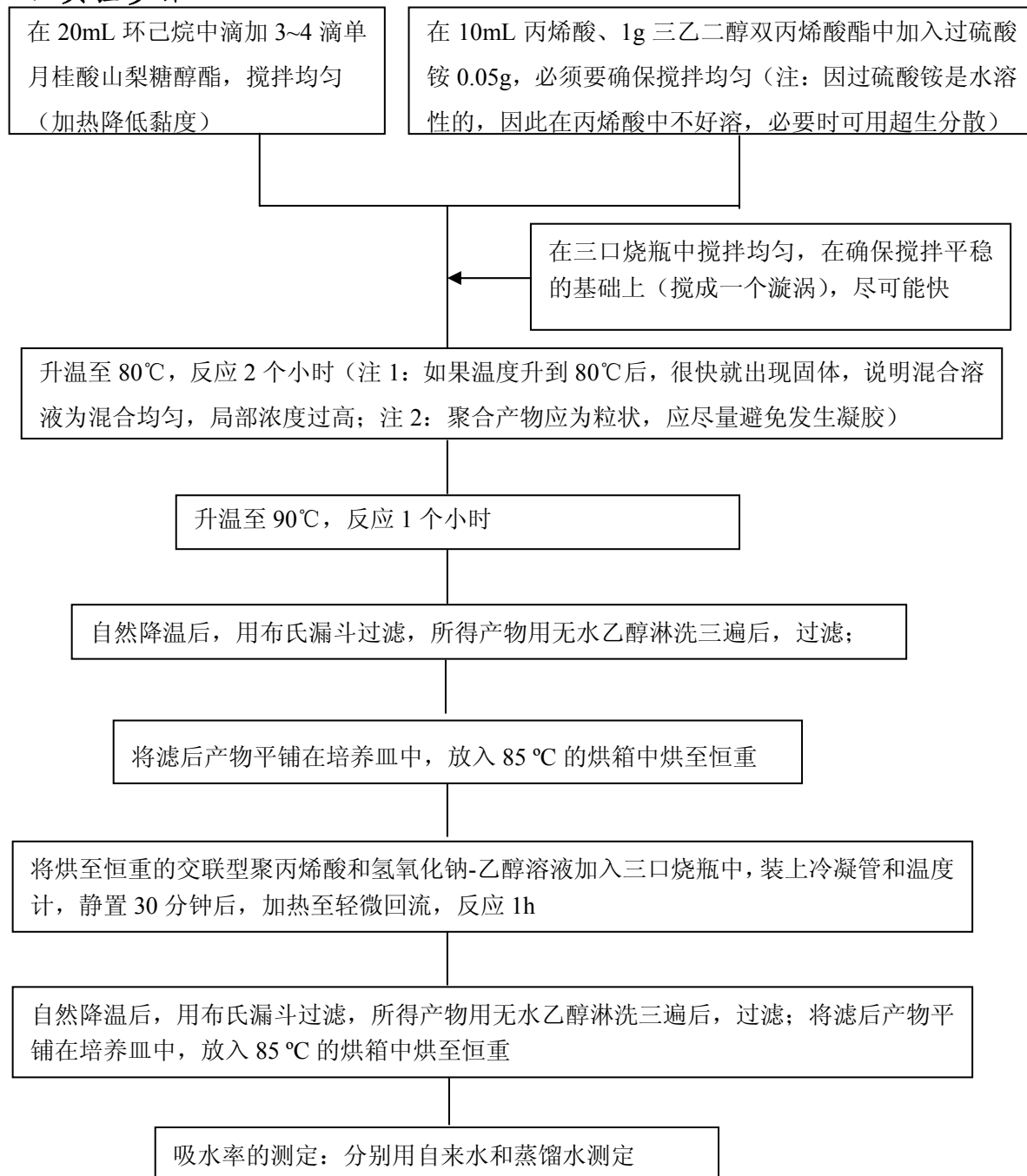
五、注意事项

- 1、逆向悬浮聚合的分散稳定性往往不够好，因此，聚合过程中，搅拌要平稳，千万不要中途停下。
- 2、高吸水性树脂送入烘箱烘干前应尽可能抽干，否则，乙醇含量太高，在烘箱中烘烤易发生危险。
- 3、高吸水性树脂制备过程中避免与水接触。

六、思考题

- 1、讨论高吸水树脂的吸水机理。
- 2、比较高吸水性树脂对自来水与去离子水的吸水率，讨论引起两者差别的原因。
- 3、举出几例你所知道的高吸水性树脂应用的例子。
(卫生及医用材料、农业园艺、土木建设、食品加工和日常用品)
- 4、自由基聚合分为几类？它们分别有什么特点和不同？
- 5、悬浮聚合和反向悬浮聚合的不同之处是什么？

2、实验步骤



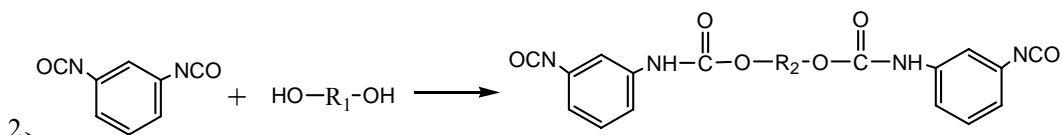
实验十 丙烯酸酯聚氨酯涂料的制备

一、目的要求

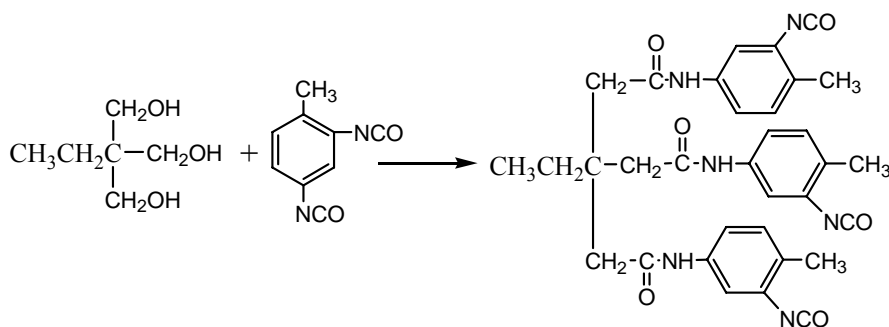
- 1、掌握聚丙烯酸酯活性树脂的制备方法。
- 2、掌握丙烯酸酯聚氨酯涂料的制备方法。

二、实验原理

- 1、在偶氮二异丁腈的引发作用下，单体（丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酸-β-羟乙酯）发生聚合反应。



3



- 4、活性聚丙烯酸酯溶液与异氰酸酯直接混合，聚丙烯酸酯中即可制成丙烯酸酯聚氨酯涂料。

三、实验步骤

(一) 聚丙烯酸酯活性树脂的制备

- 1、将丙烯酸丁酯 25mL，甲基丙烯酸甲酯 15mL，丙烯酸-β-羟乙酯 7mL，丙烯酸 1mL 依次称入烧杯中，加入偶氮二异丁腈 0.25g，用搅拌棒搅拌使溶解，备用。
- 2、在装有搅拌器、温度计、冷凝器的四颈瓶中，加入醋酸丁酯和甲苯各 30mL。装上滴液漏斗，漏斗中加入混合单体。
- 3、开动搅拌器，升温至四颈瓶中溶剂开始回流（约 110℃），注意回流不要太剧烈。从

漏斗中放约 1/4 的混合单体到四颈瓶中，保温反应。

4、约 0.5h 后，可发现四颈瓶中物料的漩涡状发生变化，表明聚合已开始。滴加剩余混合单体，控制滴加速度为 2-3 滴/s，1h 左右滴完。若回流较剧烈，可适当减慢滴加速度。

5、单体滴完后，保温 2h。撤去热源，搅拌下自然冷却至室温得为浅黄色粘稠状液体。

6、准确称取聚合产物 2g 于表面皿上，送入 120℃烘箱中烘至恒重，计算固体含量。然后用醋酸丁酯将固体含量调整至 45%。

（二）聚氨酯预聚体的制备

1.在装有温度计、搅拌器和回流冷凝管的干燥的 250mL 的三口瓶中加入 50mL 醋酸丁酯和 40g TDI。

2. 室温搅拌下迅速加入 10g TMP，水浴加热至 60~70℃，保温 2h。

3.降温至室温，得透明粘稠液体为异氰酸酯预聚体。

（三）丙烯酸酯聚氨酯涂料的制备

1、在烧杯中称取上述所得之活性聚丙烯酸酯溶液 5.0g，分别加入预聚体 2.5g、5.0g、6.0g、7.5g,手工搅拌均匀，得丙烯酸酯聚氨酯清漆。

2、取马口铁板四块，用脱脂棉花蘸取丙酮擦洗干净，晾干。

3、用油漆刷蘸取清漆，均匀涂刷于马口铁上，平放在桌面上。约 2h 后表面可干燥，得透明、光亮之涂层。

四、注意事项

1、此反应为无水反应，应保持在无水条件下进行，仪器洗净干燥后再使用。

2、树脂聚合时，油浴温度一般控制在 120℃左右。油浴温度太高，则回流太剧烈，部分单位体会因挥发而损失。瓶壁上的聚合物也会因温度太高而结焦，使树脂颜色变深。油浴温度太低，则反应速度太慢。

3、甲苯易挥发，滴液漏斗上方应适当堵塞。

4、预聚体制备过程中水浴温度不宜过高，否则会爆聚形成高聚物。

5、铁片应处理磨光，去掉杂质后再使用。

6、涂刷清漆时，应遵循少量多道的原则，即每次用漆刷蘸取少量清漆，在马口铁上反复顺同一方向涂刷，直到形成均匀的涂层为止。

实验十一 气相渗透仪测定聚合物分子量

高分子材料的性能与其分子量密切相关。例如，常见的聚苯乙烯塑料制品，其分子量为十几万。如果聚苯乙烯的分子量降低至几千，就不能成型。相反，太高又难以加工。常温测定聚合物数均分子量的方法有端基滴定、冰点下降，沸点升高、蒸汽压下降，膜渗透法等，这些方法的共同点都是利用稀溶液的依数性原理测定的。本实验所用的气相渗透法（Vapor Phase Osmometer，简称 VPO）具有样品用量少、速度快、可连续测试、温度选择范围大、实验数据可靠性较高等优点。

一、目的与要求

- 1、了解气相渗透仪测定聚合物分子量的基本原理。
- 2、掌握用气相渗透仪测定聚合物数均分子量的方法。

二、实验原理

在一恒温、密封的容器中充有某一种挥发性溶剂的饱和蒸汽，置一滴不挥发性溶质的溶液和一滴纯溶剂悬在饱和蒸汽相中，如图 1 所示。

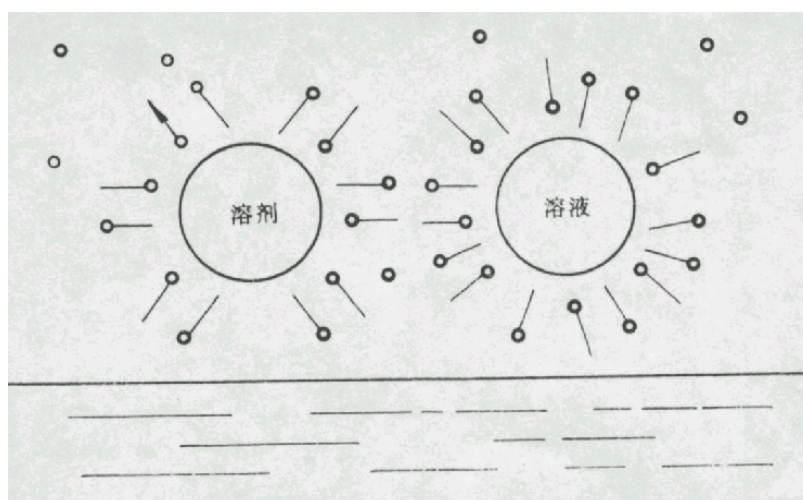


图 1 溶剂和溶液液滴之间气相渗透示意图

从热力学知道，在溶剂的饱和蒸汽压低于纯溶剂的饱和蒸汽压。于是就会有溶剂分子自饱和蒸汽相凝聚在溶液液滴表面，并放出凝聚热，使得溶液液滴的温度升高。当温差建立起

来以后，通过向蒸汽相和测温元件等传导、对流、辐射要损失一部分热量，一旦放热与散热抵消，于是出现“稳态”。在稳态时，测温元件所反应出的温差不再升高，这时，溶液液滴和溶剂液滴之间的温差与溶液中溶质的克分子数成正比：

$$\Delta T = A \cdot m_2$$

式中，A 为比例系数， $m_2 = n_2 / (n_1 + n_2)$ ， n_1 ， n_2 分别为溶剂和溶质的摩尔数。

对于稀溶液，有

$$m_2 = n_2 / (n_1 + n_2) \approx n_2 / n_1 = W_2 M_1 / W_1 M_2 = C_i M_1 / M_2$$

式中 M_1 ， M_2 为溶剂和溶质的分子量；

W_1 ， W_2 为溶剂和溶质的质量；

$C_i = W_2 / W_1$ 为溶液的浓度。

从上面几个式中可以得到

$$\Delta T = A M_1 C_i / M_2$$

上式即为气相渗透法测定分子量的基础。

把两只匹配得很好的热敏电阻 R_1 ， R_2 组成惠斯顿电桥的两个桥臂，置于溶剂的饱和蒸汽相中，另外两个桥臂由固定电阻 R_3 和 R_4 组成， R_3 是匹配电阻， R_5 和 R_6 是调零电阻。如下图：

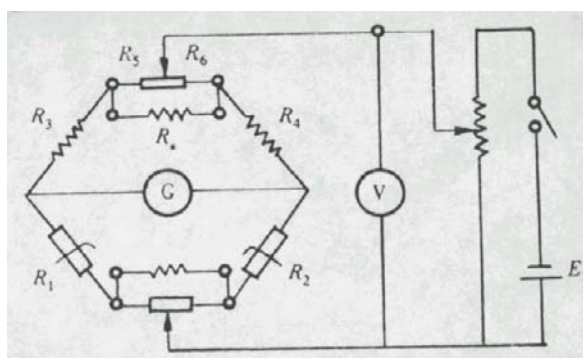


图 2 测量电桥

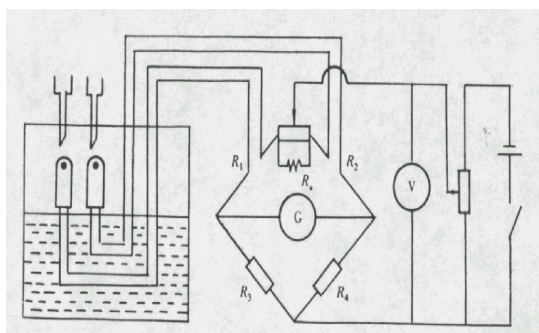


图 3 气相渗透仪工作原理示意图

仪器中选用的是具有负温度系数的热敏电阻，它的阻值和温度的关系如下：

$$R(T) = R_0 \exp(B/T)$$

式中， $R(T)$ 是热敏电阻在绝对温度为 $T(K)$ 时的阻值， R_0 是常数， B 是材料常数。

如果在这两个热敏电阻上各滴一滴溶剂，这时，这两个热敏电阻的温度应当相同，电桥处于平衡状态。现在在一个热敏电阻上滴一滴具有一定浓度的溶液，而在另一个热敏电阻上仍滴一滴溶剂，这时，由于溶剂的蒸汽压而造成两个液滴之间的温差。溶液的温度升高，使得该热敏电阻的阻值下降，导致电桥的不平衡，电桥的不平衡信号可由检测器（检流计）的偏转格数 ΔG 表示， ΔG 和温差呈线性关系，可表示如下：

$$\Delta G = - (BE/4T^2) \Delta T$$

式中， E 是桥电压， B 和 T 的意义同前。

综合上式可得

$$\Delta G = -ABEM_1 C_i / 4T^2 M_2 = K C_i / M_2$$

式中， K 为仪器常数。

在已知常数 K 的情况下，根据溶液的浓度 C_i 和测得的不平衡信号 ΔG ，即可计算出试样的分子量 M_2 ，即聚合物的数均分子量 M_n 。

三、仪器与药品

1、仪器

气相渗透仪（QX-08 型）一台；检流计一只；秒表一只；容量瓶（10mL）十只；移液管（5mL）三支；注射器（1mL）两只；针头两只。

2、药品

未知分子量高聚物样品（如聚苯乙烯、聚乙二醇等）若干，工业级；溶剂（氯仿、苯、丙酮、丁酮任选一种）130mL，分析纯；联苯甲酰或八乙酰蔗糖若干，分析纯。

四、实验步骤

1、仪器准备工作

- (1) 用电源线将仪器接到 220V 交流稳压电源上。
- (2) 将 R_s 调整在所要使用的温度下的最佳值。
- (3) 将“温度选择”开关拨至所使用的温度位置。
- (4) 通过吸液管向气化室注入 30mL 左右溶剂。
- (5) 调整“控温细调”旋钮，恒温稳定 4h 以上。
- (6) 将检流计开关拨向滴样位置，调节“桥电压调节”旋钮，使电压表指示在欲使用温度的电压值上，桥路在测试前稳定 0.5h 以上。
- (7) 调好检流计的机械零点。

2、溶液配制

(1) 溶液的浓度范围视所用的溶剂以及样品的分子量而定。在 10mL 容量瓶中 (瓶重 W_1)，小心加入聚合物样品，准确称重得 W_2 (有效数字三位)，加入溶剂至刻度，称重得 W_3 ，那么，溶液的原始浓度为

$$C = 1000 (W_2 - W_1) / (W_3 - W_2) \quad g/kg$$

(2) 因为 VPO 实验中每个溶液的浓度产生的讯号是彼此独立的，故不能采用逐步稀释或加浓的办法，而要准备 3-5 个不同浓度的溶液，这一系列浓度的溶液，可用稀释法配得，用相对浓度 $C'_i = C_i / C_0$ 表示，可以配置 $C'_i = 1/3, 1/2, 2/3, 1$ 等。

3、仪器常数 K 的标定

仪器常数 K 和测试温度、溶剂种类、桥电压以及汽化室的几何参数有关，而和溶质的化学性质、分子量大小无关。所以，可以通过一已知分子量的标样来标定仪器常数 K，待 K 值确定后即可在相同条件下测定未知物的分子量。标样可以选用联苯甲酰 (分子量为 210.2)，三十二烷 (分子量 450.85)，八乙酰蔗糖 (分子量 687.6) 等易于纯化并有多种溶剂的有机化合物，标定方法是将某一种标样配制成一定浓度 C_i 的溶液，进行测试，得到 ΔG_i 。然后根据下式计算 K 值：

$$K = (\Delta G_i / C_i) M$$

式中。M 为标样的分子量。

4、 ΔG_i 值的测定

1. 检流计放在“ $\times 0.01$ ”档，在两只热敏电阻上各加 3-5 滴（每滴约 0.01mL）纯溶剂，按下秒表，3min 后按下“工作键”，旋转“零点调节”电位器，分流器拨向“ $\times 1$ ”档，并将检流计光点稳定在某位置上，此即为 G_0 值。读毕后，扳回“滴样键”。实验过程中， G_0 值可能会变，为了提高数据可靠性，一般要求每测两个浓度的溶液后，须用纯溶剂校正一次 G_0 值。

2. G_0 值定好后，在仪器左侧滴样孔滴进 3-5 滴溶剂，右侧滴样孔滴进 3-5 滴溶液。3min 后按下工作键，分流器拨向“ $\times 1$ ”档。2min 后，检流计光点稳定在某个位置上，此即为 G_i 值，如此再滴液再读数，重复三次，取三个数的平均值（注意：每次读取 G_i 的时间应该相同，对不同的溶液，时间长短不一定）。

3. 计算 ΔG_i

$$\Delta G_i = G_i - G_0$$

4. 关闭电源，抽出汽化室内溶剂。

5. 结果处理

(1) 把联苯甲酰-苯溶液和聚苯乙烯-苯溶液得到的数据列入下表中：

C_i	0	1/3	1/2	0	2/3	1	0
G_0		-	-		-	-	
G_i	-	1.	1.	-	1.	1.	-
		2.	2.		2.	2.	
		3.	3.		3.	3.	
ΔG_i	-			-			-
$\Delta G_i/C'_i$	-			-			-

(2) 以 $\Delta G_i/C'_i$ 对 C'_i 作图，得一直线，外推到 $C'_i=0$ ，得 $\Delta G_i/C'_i$ 值。

(3) 根据上式计算出聚苯乙烯的数均分子量 M_n 。

五、注意事项

- 1、样品及配置用的溶剂必须先纯化和干燥，所用玻璃仪器必须洗净烘干。
- 2、标定 K 值用的标样必须是易于纯化、溶于多种溶剂和常温下本身蒸汽压很小的物质。
- 3、配置溶液时，须事先估计被测物的分子量大小，配置合适的浓度，以便充分利用检流计的满标尺，以减少实验误差。
- 4、滴样时，为了消除浓度差别带来的影响，每次换溶剂时，每一次滴样量须多加 3-5 滴。

六、思考题

- 1、怎样测定 VPO 的仪器常数？
- 2、在 VPO 测定中，温度对测定的精确度有何影响？
- 3、VPO 测定的灵敏度与所用溶剂的类型有何关系？VPO 能用于测定在水溶液中的分子量？

实验十二 苯乙烯-丙烯酸酯共聚乳液的制备

乳液聚合是链锁聚合反应的又一实施方法，具有十分重要的工业价值。乳液聚合是指单体在水介质中，由乳化剂分散成乳液状态进行的聚合。乳液聚合最简单的配方是由单体、水、水溶性引发剂和乳化剂四部分所组成的。工业上的实际配方可能要复杂的多。

乳液聚合与悬浮聚合不同。首先，乳液聚合产物的颗粒粒径约为 $0.05-1\ \mu\text{m}$ ，比悬浮聚合产物的粒径 ($50-200\ \mu\text{m}$) 要小得多。其次，乳液聚合所用的引发剂是水溶性的，而悬浮聚合的引发剂是油溶性的。第三，在本体、溶液、悬浮聚合中，使聚合速率提高的因素，都将使产物的分子量降低。而在乳液聚合中，聚合速率和分子量可同时提高。

乳液聚合有许多优点，如聚合热容易排除；聚合速度快，同时可获得较高的分子量；在直接使用乳液的场合，可避免重新溶解、配料等工艺操作。乳液聚合的缺点是产品纯度较低；在需要获得固体产品时，存在凝聚、洗涤、干燥等复杂的后处理问题。比较其优缺点可发现，乳液聚合不失为一种制备合成高分子的较好的工艺方法。

乳液聚合在工业上有十分广泛的应用。合成橡胶中产量最大的丁苯橡胶和丁腈橡胶就是采用乳液聚合法生产的。此外，聚氯乙烯糊状树脂、丙烯酸酯乳液等都是乳液聚合的产品。

在丙烯酸酯乳液中，苯丙乳液是较重要的品种之一。苯丙乳液是由苯乙烯和丙烯酸酯(通常为丙烯酸丁酯)通过乳液聚合法共聚而成，具有成膜性能好，耐老化、耐酸碱、耐水、价格低廉等特点，是建筑材料、粘合剂、造纸助剂、皮革助剂、织物处理剂等产品的重要原料。

一、目的要求

- 1、了解乳液聚合的工艺特点，加深对乳液聚合的认识。
- 2、掌握乳液聚合的操作方法。

二、实验原理

乳液聚合的主要组份是单体、分散介质(水)、乳化剂和引发剂。其聚合机理如下：

乳液聚合是指在有乳化剂存在的水介质中，单体进行非均相聚合反应的聚合方法。在乳液聚合最简单的配方中，应有单体、水、水溶性引发剂和乳化剂四种组分。乳化剂通常是一些在分子中既具有亲水基团又具有憎水基团的化合物。如常用的乳化剂十二烷基磺酸钠的磺酸钠基团一端表现为亲水，指向水中，烷基一端则表现憎水而能与单体互溶。因此，乳化剂

溶于水中是以“胶束”的形式存在的，亲水的一端指向水，憎水的一端则背靠背避开水。根据史密斯-埃瓦特（Smith-Ewart）理论，当体系中有单体存在时，一部分单体进入胶束内与乳化剂憎水的一端互溶，而大部分单体则以微珠状态悬浮于水中并被乳化剂包围。随着引发剂（如过硫酸钾）的自由基扩散进入胶束内部，引起单体聚合。同时，单体微珠中的单体分子不断扩散进入胶束，以补充反应掉的单体。如此不断进行，聚合反应得以完成，最终形成高聚物的“胶粒”。这些胶粒由于受到乳化剂分子的保护而稳定，因此，宏观上形成稳定的乳液。向乳液中加入盐类物质(如 NaCl)可使乳液破坏而凝聚，称为破乳。藉此可将高聚物沉淀析出来。

苯丙乳液的主要用途是制备建筑乳胶漆，这类乳液通常由苯乙烯和丙烯酸丁酯共聚而成。丙烯酸丁酯的聚合物具有良好的成膜性和耐老化性，但其玻璃化转化温度仅 -58°C ，不仅能单独用作涂料的基料。将丙烯酸丁酯与苯乙烯共聚后，涂层表面硬度大大增加，生产成本也有所降低。为了提高乳液的稳定性，共聚单体中通常还加入少量丙烯酸。丙烯酸是一种水溶性单体，参加共聚后主要存在于乳胶颗粒表面，羧基指向水相，因此颗粒表面成负电性。同性电荷的作用使得颗粒不容易凝聚结块。此外，适当比例的丙烯酸有利于提高涂料的附着力。

苯丙乳液制备一般采用过硫酸铵或过硫酸钾作为引发剂，十二烷基硫酸钠作为乳化剂。十二烷基硫酸钠是一种阴离子型乳化剂，具有优良的乳化剂效果。用十二烷基硫酸钠作乳化剂制备的乳液机械稳定性较好，但化学稳定性不够理想，与盐类化合物作用易发生破乳凝聚作用。为了改善乳液的化学稳定性，可加入非离子型乳化剂，组合复合型乳化体系。常用的非离子型乳化剂有壬基酚聚氧乙烯醚（OP-10）等。

用于建筑乳胶漆的苯丙乳液的固体含量为 $48\% \pm 2\%$ ，最低成膜温度为 16°C ，成膜后，涂层无色透明。为了使建筑乳胶漆在冬天也能使用，通常还需要加入成膜助剂，如苯甲醇等，使涂料的最低成膜温度达到 5°C 。

三、仪器和药品

1、仪器

标准磨口四颈烧瓶（250mL/24mm×4）一只；球形冷凝器（300mm）一支；Y形连接管（24mm×3）一只；温度计（ 100°C ）一支；分液漏斗（125mL）一只；滴液漏管（125mL、50mL）

各一只；烧杯（100mL）两只、（250mL）一只；量筒（100mL）一只；布氏漏斗（80mm）一只；广口试剂瓶（250mL）一只；平板玻璃（100mm×100mm×3mm）一块；电动搅拌器一套；恒温水浴槽一只。

2、药品

苯乙烯 60g, 聚合级；丙烯酸丁酯 49g, 聚合级；丙烯酸 2g, 聚合级；过硫酸铵 0.5g, 化学纯；十二烷基硫酸钠 0.5g, 化学纯；OP-10 乳化剂 2g, 工业级；氢氧化钠溶液 100mL, 10%；无水硫酸钠 15g, 化学纯。

四、实验步骤

1、将苯乙烯 60g, 置于分液漏斗中, 加入 30mL 氢氧化钠溶液洗涤。静置片刻后, 弃去下层红色洗液。在用同样方法洗涤至洗液不显红色为止, 然后用去离子水洗涤至中性。加入无水硫酸钠 15g, 静置 0.5h, 用布氏漏斗过滤。

2、称取 0.5g 十二烷基硫酸钠置于 100mL 烧杯中, 加 50mL 去离子水, 略加热并手工搅拌使溶解。然后加入 2g OP-10 乳化剂, 混合均匀, 得组分 1。

3、称取 0.5g 过硫酸铵置于 100mL 烧杯中, 加水 20mL, 摇晃使溶解, 得组分 2。

4、在 250mL 烧杯中称入苯乙烯 49g, 丙烯酸丁酯 49g, 丙烯酸 2g, 混合均匀, 得组分 3。

5、在装有搅拌器、冷凝器、温度计和滴液漏斗的四颈瓶中, 加入去离子水 40mL 和全部的组分 1, 搅拌并升温。当温度达到 80℃时, 保温。加入约 30%的组分 3, 体系逐渐呈乳白色。15-30min 后, 液面边缘呈淡蓝色, 同时液面上的泡沫消失, 表明聚合反应已开始。保持 15min, 同时开始滴加组分 2 和组分 3, 二者滴加速度为 1: 5, 使组分 3 略先于组分 2 加完, 控制在 2h 左右滴加完。

6、保温 1h, 撤去热源。搅拌下自然冷却至室温, 装入广口试剂瓶中。

7、取少量所得之乳液涂于洁净的平板玻璃上, 室温下自然放置 2h, 观察其干燥情况, 正常情况下应得一表面坚硬的透明涂层。

五、注意事项

1、乳液聚合对水质要求较高。若聚合不能正常进行, 或产物稳定性不好, 应检查水质是否符合要求。

2、所用的丙烯酸若已有絮状沉淀出现，应先经过过滤才能使用。

3、聚合过程中液面边缘若无淡蓝色现象出现，产物的稳定性将会不好。若遇此种情况，实验应重新进行。

4、聚合反应开始后，有一自动升温过程。应严格控制聚合温度不得高于 85℃，否则，乳化剂的乳化效率将降低，并有溢料的危险。

六、思考题

1、从手册中查出聚苯乙烯和聚丙烯酸丁酯均聚物的玻璃化转变温度，然后计算本实验所得的苯丙共聚物的玻璃化转变温度。

2、根据乳液聚合条件不同，所得的乳液有时泛淡蓝色，有时泛淡绿色，有时甚至泛珍珠色光，通过这些现象，可对乳液的质量作出什么结论？

3、将共聚配方中的丙烯酸换成甲基丙烯酸是否可行？对乳液质量会有什么影响？

4、讨论乳液聚合的工艺特点，指出其优缺点，并与悬浮聚合比较之。

实验十三 薄层板的制备及活度测定

一、目的要求

- 1、掌握薄层板的制备及薄层层析的操作方法
- 2、掌握吸附剂活度测定的原理及方法
- 3、应用薄层层析法检测识中草药化学成分

二、薄层板的制备

1. 不加粘合剂的薄层涂布法

(1) 氧化铝薄层

将吸附剂置于薄层涂布器中，调节涂布器的高度，向前推动，即得均匀薄层。本实验主要用下述简易操作涂布薄层，取表面光滑，直径统一的玻璃一支，依据所制备薄层的宽度、厚度要求，在玻璃棒两端套上厚度为 0.3~1mm 的塑料圈或金属环，并在玻璃棒一端一定距离处套上较厚的塑料圈或金属环，以使玻璃棒向前推动时能保持平行方向，操作时，将氧化铝粉均匀地铺在玻璃板上，匀速向前推动。

(2) 纤维素薄层

一般取纤维素粉 1 份加水约 5 份，在烧杯中混合均匀后，倒在玻璃板上，轻轻振动，使涂布均匀，水平放置，待水分蒸发至近干，于 $100\pm 2^{\circ}\text{C}$ 干燥 30~60 分钟即得。

(3) 聚酰胺薄层

取锦纶丝（无色干净废丝即可）用乙醇加热浸泡 2~3 次，除去腊质等。称取洗净的锦纶丝 1 克，加 85% 甲酸 ml，在水浴上加热使溶，再加 70% 乙醇 6ml。继续加热使完全溶解成透明胶状溶液。将此溶液适量倒在水平放置的，用清洁液洗净的玻璃片上，并自然向周围推匀，厚度约 0.3mm，薄层太厚时，干后会裂开。将铺好的薄层水平放在盛温水的盘上，使盘中的水蒸汽能熏湿薄层，盘子加玻璃板盖严密，薄板放置约 1 小时完全固化变不透明白色，再放数小时后，泡在流水中洗去甲酸，先在空气中晾干，后在烘箱中 0°C 恒温加热活化 15 分钟，冷后置干燥器中贮存备用。

2. 加粘合剂薄层的涂布法

(1) 硅胶 G 薄层 取硅胶 G 或硅胶 GF 一份，置烧杯中加水约 5 份混合均匀，放置片刻，随即用药匙取一定量，分别倒在一定大小的玻璃片上（或倒入涂布器中，推动涂布），均匀涂布成 0.25~0.5mm 厚度，轻轻振动玻璃板，使薄层面平整均匀，在水平位置放置，待薄层发白近干，于烘箱中 100°C 活化 0.5~1 小时，冷后贮于干燥器内备用。活化温度和时间可依需要调整，一般检识水溶性成分或一些极性大的成分时，所用薄层板只在空气中自然干燥，不经活化即可贮存备用。

(2) 硅胶(H) 羧甲基纤维钠(CMC-Na) 薄层 取羧甲基纤维素 0.2g, 溶于 25ml 水中, 在水浴上加热搅拌使完全溶解, 倒入烧杯中, 加薄层层析用硅胶(颗粒度 10~40 μm 的约 6~8g)。激光照排系统混成均匀的稀糊, 按照硅胶 G 薄层涂布法制备薄层, 或取 0.8% 羧甲基纤维钠 10ml, 倒入广口瓶(高约 10~12cm)中, 然后逐步加入薄层层析用硅胶 3.3 克, 不断振摇成均匀的稀糊, 把两块载玻片面对面结合在一起, 这样每片只有一面与硅胶糊接触, 使薄片浸入硅胶稀糊中, 然后慢慢取出, 分开二块薄片, 将未粘附硅胶糊的那一面水平放在一张清洁的纸上, 让其自然阴干, 100 $^{\circ}\text{C}$ 下烘 30 分钟。冷后于干燥器内备用。未消耗的硅胶稀糊可贮存在广口瓶内, 以供再用。

氧化铝薄层, 氧化铝羧甲基纤维钠薄层的制备方法同上, 一般所需要氧化铝比硅胶稍多。

目前国内外市场有预先制好的薄层板, 底板用玻璃、塑料、铝片等。可按需要用玻璃刀划割, 也有用剪刀剪成所要的大小, 使用方便, 价格贵些。

3. 特殊薄层的制备

根据分离工作的特殊需要, 可制成以下几种特制薄层。

(1) 酸、碱薄层和 pH 缓冲薄层

为了改变吸附剂的酸碱性, 以改进分离效果, 可在吸附剂中加入稀酸溶液(如 0.1~0.5N 草酸溶液)代替水制成酸性氧化铝薄层使用, 硅胶微呈酸性, 可在铺层时用稀碱溶液(如 0.1~0.5N 氢氧化钠溶液)代替水制成碱性的硅胶薄层。当用醋酸钠、磷酸盐等不同 pH 的缓冲液代替水铺层, 制成一定 pH 缓冲的薄层。

羧甲基纤维素钠的溶液一般用 0.5~1%浓度, 宜预先配制后静置, 取其上层澄清溶液应用, 则所制备的薄层表面较为细腻平滑。常用 0.8%浓度。CMC-Na 系中粘度。300~500 厘泊(粘度单位)。CMC-Na 系碳水化合物, 调制时应在水浴上进行。活化温度不应过高, 防止碳化。

(2) 络合薄层

硝酸银薄层的制法, 可在吸附剂中加入 5~25%硝酸银水溶液代替水制成均匀糊状, 再按常法铺成薄层, 制成薄层避光阴干, 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 活化半小时后避光贮存, 制成的薄层以不变成灰色为好, 在三天内应用。也可先把硝酸银用少量水溶解, 再用甲醇稀释成 10%溶液, 把预先制好的硅胶 G 薄层浸入此溶液里约 1 分钟, 取出避光阴干, 按上法活化, 贮存。

三、吸附剂的活度测定

1. 氧化铝活度的测定

一般可用 4~5 种偶氮染料以薄层层析法进行测定。

染料试剂的配制: 取偶氮苯(Azobenzene)50mg, 对甲氧基偶氮苯(P-Methoxyazobenzene), 苏丹黄(Sudan I, Benzeneazo- β -naphthol), 苏丹红(Sudan III Tetrazobenzol- β -naphthol), 对

氨基偶氮苯 (P-Aminoazobenzene) 各 20mg, 分别溶于 50ml 重蒸馏的四氯化碳 (经氢氧化钠干燥) 中。

常法制备不含粘合剂氧化铝薄层, 以铅笔尖或毛细管尖在薄层板一端 2~3 cm 处间隔 1cm 左右轻轻点上 5 个可以看清的小点, 各吸取约 0.02ml 染料试剂分别点滴于原点上, 以四氯化碳为展开剂, 展开时薄层板与容器底部交角为 10~40° 之间, 展开后测出各斑点的 Rf 值, 从表 1 确定氧化铝的活度 (一般高活性氧化铝 I~III 级活度使用本法时, 结果往往偏低)。

另取不含粘合剂氧化铝薄层板一块, 置于水蒸汽饱和容器内, 2~3 小时后取出, 按上述方法测定活度。观察有无变化。

表 1 氧化铝活度与偶氮染料外值关系

偶氮染料	氧化铝活度级 Rf 值			
	二级	三级	四级	五级
偶氮苯	0.59	0.72	0.85	0.95
对甲氧基偶氮苯	0.16	0.45	0.69	0.89
苏丹黄	0.02	0.25	0.87	0.98
苏丹红	0.00	0.10	0.35	0.50
对氨基偶氮苯	0.00	0.05	0.08	0.19

2. 硅胶活度的测定

一般选用三种染料的薄层层析法进行测定。

欧洲药典 1969 年记载用 0.01% 二甲基黄 (Dimethy-yellow. P-Dimethylaminoazobenzene)。苏丹红 (Sudan III), 靛酚蓝 (Indophenol blue 4-Tapnthoquinone-4-dimethyl aminoaniline) 的苯溶液各 10 μ l 点滴于硅胶 G 或硅胶 H 薄层上, 以苯为展开剂, 展开 10cm (约 20 分钟), 三种染料应明显分离, 靛酚蓝斑点接近于起始线。二甲基黄斑点在薄层的当中。苏丹红斑点与二甲基黄斑点之间, 则认为薄层板活性符合要求。

国内青岛海洋化工厂出售薄层层析用的硅胶在吸附剂名称之后加几个字标明的意思是: 硅胶 G (G 是 Gypsum 石膏的缩写。表示加了石膏), 硅胶 H (H 表示不加石膏), 硅胶 GF254 (F254 表示加石膏和波长 254 显绿色荧光的硅酸锌镉)。硅胶 GF365 (表示加石膏和波长 365nm 显黄色荧光的硫化锌镉)。氧化铝则类推。

四、薄层层析的应用

薄层层析法在天然产物化学成分的研究中, 主要应用于化学成分的预试、化学成分的鉴定及探索柱层分离的条件。用薄层层析进行中草药化学成分检识, 可依据各类成分性质及熟

知的条件有针对性地进行。由于在薄层上展开后，可将一些杂质分离，选择性高，可使预试结果更为可靠，不仅可通过显色获知成分类型，而且可初步了解主要成分的数目及其极性大小。

实验十四 粉防己生物碱的提取分离与鉴定

汉防己为防己科千金藤属物 *Stephania tetrandra* S. Moore 的根，是祛风解热镇痛药物，其有效成分为生物碱。主要是汉防己甲素和汉防己乙素。临床上除用作治疗高血压、神经性疼痛、抗阿米巴原虫外，还将粉防己生物碱的碘甲基、或溴甲基化合物作为肌肉松弛剂应用，此外汉防己甲素在动物实验中有抗癌和扩张血管的作用。

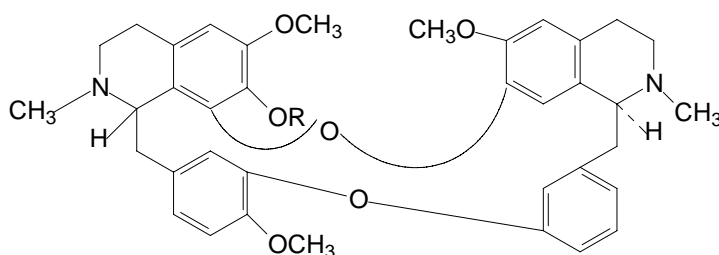
一、目的要求

通过汉防己中几种生物碱的提取分离和鉴定，要求掌握下列知识和技能。

- 1、生物碱的一般提取方法。
- 2、用低压柱层析分离，纯化单体的方法及薄层层析鉴定

二、已知生物碱的结构和性质

汉防己根中总生物碱含量为 1.5~2.3%，主要为汉防己甲素，含量约 1%，汉防己乙素，含量约 0.5%；轮环藤酚碱，含量为 0.2%；以及其它数种微量生物碱。



1. 汉防己甲素 (Tetrandrine, 汉防己碱, 粉防己碱)

无色针晶，不溶于水和石油醚，易溶于乙醇、丙酮、乙酸乙酯、乙醚和氯仿等有机溶剂及稀酸水中，可溶于苯，mp 216℃，有双熔点现象，自丙酮中结晶者，150℃左右熔后加热又固化，至 213℃复熔。

R=CH₃

汉防己甲素

R=H

汉防己乙素

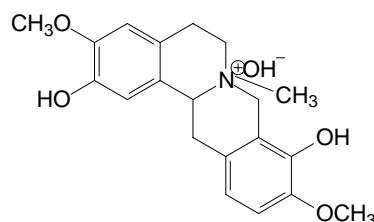
2. 汉防己乙素 (Fangchinoline, 又称防己诺林碱, 去甲粉防己碱)

溶解行为与汉防己甲素相似，因有一个酚羟基，故极性较汉防己甲素稍高，在苯中的溶解度小于汉防己甲素而在乙醇中又大于汉防己甲素。籍此可以相互分离，用不同溶剂重结晶时，其晶形和熔点不同：

乙醇	细棒状结晶	mp 245~40℃
甲醇	细棒状结晶	mp 177~9℃
丙酮	六面粒状晶	mp 134℃
吡啶-甲醇		mp 121~2℃
环己烷-EtOAc		mp 156℃

3. 轮环藤酚碱 (Cylanoline)

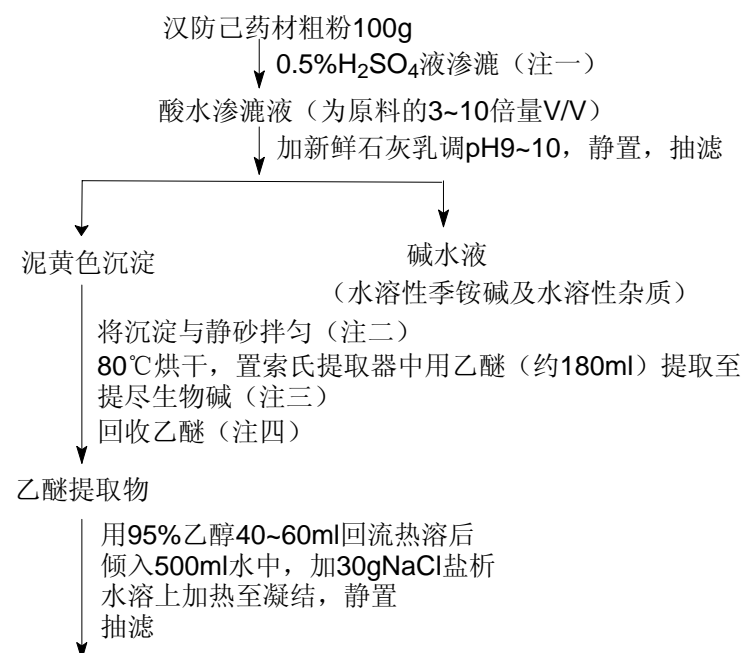
为水溶性季铵生物碱，不溶于极性溶剂，氯化物为无



色，八面体状结晶，mp 214~6℃，碘化物为无色绢丝状结晶，mp185℃；苦味酸盐为黄色结晶，mp154~6℃。

三、生物碱的提取分离

1. 总生物碱的提取和亲脂性与亲水性生物碱的分离



注一：将汉防己粗粉加适量酸水液，以能将生药粉末润湿为度（约 150ml），充分拌匀，放置半小时，均匀而致密地装入渗筒内，用锥形瓶底部或其它平底工具压紧，供渗漉用，流速约 1.5ml/分。

注二：净砂必须事前洗净烘干，拌和量最好不要超过 120g，以免索氏提取器一次装不下或装得过多。提不尽生物碱。

白色沉淀（亲脂性叔铵总碱，以汉防己甲素、乙素为主）

注三：检查生物碱是否提

尽的方法，是取最后一次乙醚提取液约数滴，挥去乙醚，残渣加 5% HCl 0.5ml 溶解后，加改良碘化铋钾试剂一滴，无沉淀析出或明显浑浊时，表明生物碱已提尽，或基本提尽。反之，应继续提取。

注四：先将提取器内滤纸筒取出。然后将提取玻筒内最后一次乙醚提取液倾出（另器贮存），再将提取玻筒安装好，继续加热，回收烧瓶中乙醚于玻筒中，至烧瓶内的乙醚提取液体积较小时，停止回收，将烧瓶中乙醚提取液倾出。

2. 低压柱层析分离汉防己甲素和乙素

低压柱层析在低压下（0.5~3kg/cm²，一般 0.3~1.2 kg/cm²）采用颗粒直径介于经典柱层析（100~200μm）和 HPLC（~37μm）之间的薄层层析用硅胶（或氧化铝）H 或 G（50~75μm）作为填充剂的一种柱层析柱，其基本原理与 HPLC 相同，分离效果也介于经典柱与 HPLC 之间，用减压干法装柱，铺层紧密均匀，层析带分布集中整齐，同时薄层层析的最佳分离溶剂系统可以直接用于低压柱层析，它是一种分离效果较好，设备简单，操作方便，快速的方法。适宜和于天然产物的常量制备性分离。

（1）装柱 减压干法装法，层析柱规格：柱长 30cm，内径 2cm，共装硅胶约 30g（高约 22cm）。

(2) **拌样加样** 取汉防己碱约 150mg，加少量丙酮热溶（刚溶为度）用滴管加到 1.5g 硅胶上，仔细拌匀，水浴上蒸干，碾细，通过一个长颈漏斗小心加在柱顶，轻轻垂直顿击，待样品表面平整不拌动时，上面再盖约 1~2cm 高的空白硅胶，再加盖一圆形滤纸片，压紧。

(3) **洗脱** 先检查从空压机至层析柱各阀门管道是否正常，关紧各个阀门，开动空压机至额定压力（ $5.8\text{kg}/\text{cm}^2$ ）待用。用滴管顺层析柱柱壁仔细加入少量洗脱剂（环己烷-醋酸乙酯-二乙胺/6: 2: 0.8），当液面达到一定高度时，再一次加入其余洗脱剂（共约 250ml），迅速在柱顶上装上玻璃标口塞接头，用铁夹压紧（防加压时接头冲开），小心开启空压机阀门，再开针形阀和空气过滤减压器，（注意：压力过大。玻璃柱会炸，一般 2kg 是安全的，必要时可戴防护面罩）调动所需压力， $0.6\sim 1.2\text{kg}/\text{cm}^2$ ，约 40 分钟后流出，控制流速 1ml/分，每 10 分钟左右一管，收 12~15 份，洗脱全过程约 3 小时。

(4) **检查** 各流份分别移入小玻璃蒸发器中，于水浴上浓缩，分别通过 TLC 检查，吸附剂：硅胶 G，展开剂：环己烷-乙酸乙酯-二乙胺/6: 3: 1，改良碘化铋钾试剂喷雾显色，以汉防己甲素、乙素为标准品对照，合并相同组分，分别获得甲、乙素粗品，用丙酮重结晶，测定 mp。

四、鉴定方法

1. 衍生物制备

取汉防己甲素 0.2g，溶于 2ml（丙酮中，滴加苦味酸饱和水溶液至不再析出黄色沉淀为止，抽滤收集沉淀，顺次以少量水、乙醚洗涤，乙醇重结晶，得汉防己甲素苦味酸盐，mp $235\sim 242^\circ\text{C}$ (dc)。

2. 有机胺碱的 TLC

吸附剂：青岛海洋化工厂薄层层析硅胶 G，用 0.3%CMC-Na 水液制板， 110°C 活化 1 小时。

样品：分出的汉防己甲素①、乙素②、总碱③

展开剂：环己烷- EtoAc-NHEt₂ (6: 2: 1)

显色剂：改良碘化铋钾试剂（展开后用电风吹干再喷显色剂，以免二乙胺干扰）

现象：甲素显色后呈淡棕色，2 小时左右就褪色，而乙素呈棕色，久置不褪色，可帮助其辨认。

实验十五 掌叶防己碱的提取与分离及延胡索乙素制备

掌叶防己碱又称巴马汀 (palmatine), 硫酸延胡索乙素又称消旋四氢巴马汀硫酸盐 (dltetrahydro palmatine sulphate)。

延胡索乙素 (Corydalis B) 为镇静安定药, 用于缓解胃系统的疾病所引起的疼痛, 临产阵痛、头痛、失眠等。

中药延胡索 (元胡, *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang 的块根) 中含延胡索乙素的量很少, 而其脱氢化合物巴马汀在某些植物中含量却很高。在中国华南一带的防己科植物黄藤 (*Fibreursa recisa paerre*) 的根茎中含巴马汀, 再经氢化反应, 制备延胡索乙素。

黄藤曾列入《本草纲目》, 李时珍谓“藤生岭南, 状若防己, 但人常服此藤, 纵饮食有毒, 亦自然不发”。现代民间作为清热消炎药。常用于外伤感染、扁桃体炎、咽喉炎、结膜炎、热痢及黄疸等。

一、实验的目的要求:

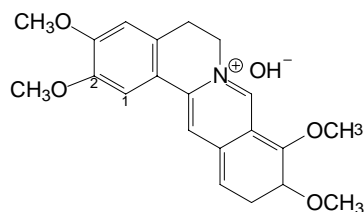
- 1、掌握季铵生物碱的一种提取方法。
- 2、掌握生物碱的一般理化性质及其结构与性质的关系。
- 3、了解黄藤生物碱的结构与性质的关系。
- 4、熟悉生物碱沉淀反应的条件和方法。
- 5、掌握制备生物碱结晶性盐的方法和精制。
- 6、掌握四氢巴马汀的制备方法。

二、黄藤中已知成分的理化性质:

黄藤根茎及根中所含成分主为巴马汀。尚含少量药根碱、黄藤素甲、黄藤素乙、内脂及甾醇。又谓在根茎、根及树皮中含小檗碱。

1、掌叶防己碱 (巴马汀, Palmatine)

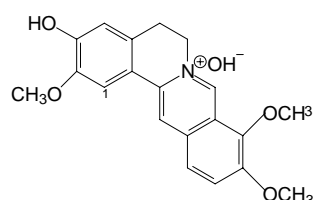
本品系季铵生物碱, 溶于水、乙醇, 几乎不溶于氯仿、乙醚、苯等溶剂, 掌叶防己碱盐酸盐即氯化巴马汀 (palmation Chloride) $C_{21}H_{22}O_4N \cdot Cl \cdot 3H_2O$ 为黄色针状结晶, 熔点 $205^{\circ}C$ (分解)。其理化性质与盐酸小檗碱类似。



巴马汀氢碘酸盐 (palmatine icdide) $C_{21}H_{22}O_4N \cdot I \cdot 2H_2O$ 为橙黄色针状结晶, 熔点 $241^{\circ}C$ (分解)。

2、药根碱 (雅托碱, Jatrorrhizine)

本品系具酚羟基季铵盐, 其理化性质与巴马汀类似, 但较易溶于苛性碱液中, 其盐酸在水中的溶解度亦比盐酸巴马汀为

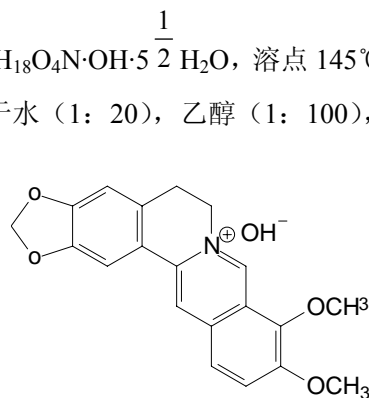


大，可籍此性质予以分离。药根碱盐酸盐（Jatrorrhizine Chloride） $C_{20}H_{20}O_4N \cdot Cl \cdot H_2O$ 为铜色针状结晶，熔点 $204 \sim 206^\circ C$ ，其苦味酸盐（Jatrorrhizine picrate） $C_{20}H_{20}O_4N \cdot C_6H_2O_7N_2$ 为橙黄色柱状结晶，熔点 $217 \sim 220^\circ C$ （分解）。

3、小檗碱（黄连素 Berberine）

本品系季铵生物碱，其游离碱为黄色长针状结晶， $C_{20}H_{18}O_4N \cdot OH \cdot 5 \frac{1}{2} H_2O$ ，熔点 $145^\circ C$ ，在 $100^\circ C$ 干燥，失去结晶水转为棕黄色。小檗碱能缓缓溶于水（1：20），乙醇（1：100），较易溶于热水、热乙醇、微溶于丙酮、氯仿、苯、几乎不溶于石油醚中，小檗碱与氯仿、丙酮、苯均能形成加成物。

小檗碱盐酸盐（Berberine Chloride） $C_{20}H_{16}O_4N \cdot Cl_2 \cdot H_2O$ ，熔点 $205^\circ C$ （分解），微溶于冷水，较易溶于沸水，其硝酸盐及氢碘酸盐，极难溶于水（冷水约 1：2000）。小檗碱的

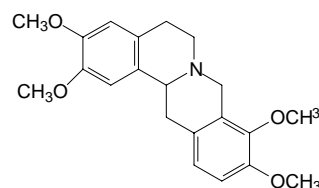


中性硫酸盐、磷酸盐、醋酸盐在水中溶解度较大，小檗碱的盐类在水中的溶解度：

- 盐酸小檗碱 1：500
- 硫酸小檗碱 1：30（酸性盐 1：100）
- 枸橼酸小檗碱 1：125
- 磷酸小檗碱 1：15

4、四氢巴马汀（Tetrahydropalmatine）：

延胡索乙素为消旋四氢巴马汀，系叔胺碱，其游离碱 $C_{21}H_{25}O_4N$ 熔点 $146 \sim 148^\circ C$ ，不溶于水，能溶于热乙醇（在冷乙醇中溶解度较小），易溶于氯仿、苯、乙醚中，延胡索乙素的酸性硫酸盐为无色针状结晶，熔点 $245 \sim 246^\circ C$ ，在冷水中溶解度较小，在热水中较大，其中性硫酸盐为长柱状结晶，熔点 $220^\circ C$ ，在水中溶解度较酸性硫酸盐为大，其盐酸盐难溶于水。



左旋四氢巴马汀即颅痛定（Rotundine）熔点 $141 \sim 142^\circ C$ $[\alpha]_D^{16} -257.5^\circ$ （ $C=1.1$ 氯仿）。本品在华千金藤（Stephania sinica Diels）及圆叶千金藤（S. rotundalour）的块根（山乌龟）中含量较多。

5、黄藤素甲

本品为制备氯化巴马汀的乙醇母液中的少量成分，为季铵碱盐的盐酸盐 $C_{26}H_{29}O_7N \cdot HCl \cdot H_2O$ 熔点 $196 \sim 198^\circ C$ 。 $[\alpha]_D^{15} +273.3^\circ$ （ $C=1$ ，乙醇），其还原物为白色针状结晶，熔点 $134 \sim 186^\circ C$ $[\alpha]_D^{15} +146.6^\circ$ （ $C=1$ ，酸）。

6、黄藤素乙

本品系粗制巴马汀氢化、碱化分去四氯巴马汀后；母液中的微量物质，溶于氯仿。以氯仿-乙醇重结晶得黄色结晶，熔点 192~193℃， $[\alpha]_D^{15} + 233.3^\circ\text{C}$ (C=1, 氯仿)。

7、黄藤内酯

本品得自粗氯化巴马汀重结晶进的不溶于水物质中，反复以酒精、丙酮重结晶，得光亮棱状结晶， $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{O}_9$ ，熔点 273℃， $[\alpha]_D^{15} + 36.60^\circ\text{C}$ (C=1, 乙醇)。

8、黄藤甾醇

本品得制备氯化巴马汀的乙醇母液中，分出的少量油层经 10%KOH 皂化得到的白色针晶，熔点 136~137℃， $[\alpha]_D^{15} + 24.51^\circ\text{C}$ (C=1, 氯仿)。

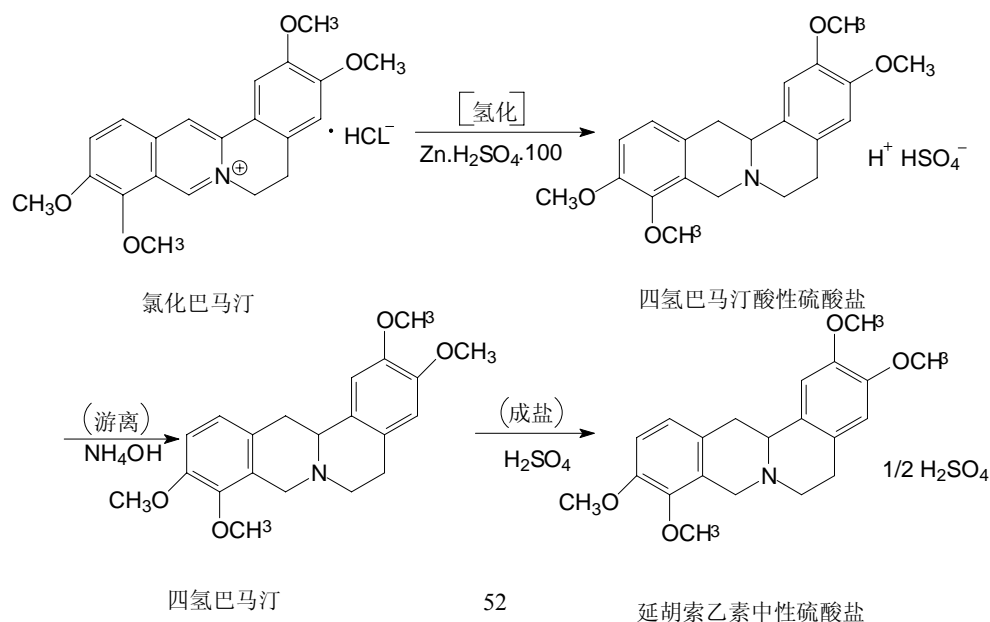
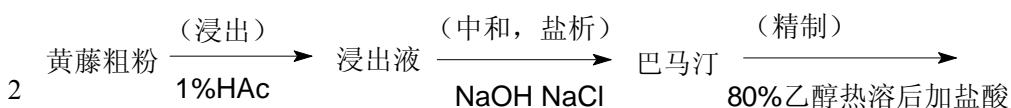
三、巴马汀提取及延胡索素制备的方法

巴马汀为季铵生物碱，溶于水和极性大的有机溶剂（如甲醇、乙醇等）所以可用甲醇、乙醇或水进行提取。然后通过盐析，降低其在水中的溶解度而沉淀，与其它杂质分离。巴马汀是有机碱，尽管它带正电荷，但和水的亲和力仍小于 NaCl，NaCl 和水的强亲和力，降低了巴马汀在水中的溶解度，使它被“挤”出。

巴马汀盐酸在冷水中溶解度小（比盐酸小檗碱略大）可以利用此性质进行分离。

方法：（一）

1、流程



2、工艺

(1) **浸出**：取黄藤粗粉 100g，用 1%醋酸冷浸（以浸没原料为度，约 500ml）1~2 天，尼龙布过滤，药渣再加 15 醋酸冷浸一天，合并滤液（留取 1ml 作生物碱定性反应）。

(2) **盐析、中和**：滤液用 40%NaOH 液调节至 pH9 同时加入 7%精制食盐，即有黄色不溶物析出，80℃保温，使沉淀凝聚，静置，倾出上层清液，用菊形滤纸过滤，得巴马汀游离碱粗品，烘干。

(3) **精制**：将粗巴马汀，加 80%乙醇 100ml，加热回流使溶，约十分钟，乘热抽滤，残渣再加少量乙醇同法处理一次，抽滤最后用滴管取乙醇淋洗布氏漏斗上不溶物，合并滤液并向滤液中滴加 6N 盐酸至 PH2 放置，即有金黄色针状结晶析出，抽滤，再用乙醇重结晶一次，方法，将氯化巴马汀粗晶置三角烧瓶内，用滴管加入 95%乙醇使结晶恰溶解（在水浴上加热），抽滤得澄清液，加塞放置析晶。若滤液在抽滤时已析出结晶，可将它在水浴上加热结晶全溶再加瓶塞放置，这样析出的晶形好。若滤液体积太大，可溶缩至瓶壁边沿略显固体时加塞析晶。母液适当浓缩，又可析出一部分氯化巴马汀。

(4) **还原**：取氯化巴马汀精制品 1g。置 50~100ml 园底烧瓶中加入蒸馏水 10ml，浓硫酸 0.5ml，锌粉 0.7g（工业生产应分批加入锌粉），直火加热保持沸腾，反应 4~5 小时（反应过程加溶液颜色逐渐变淡直至无色），反应完毕，趁热倾出上层清液，再用蒸馏水少许（1~2ml）稍加热洗涤反应瓶及锌渣 1~2 次，合并溶液放冷即有延胡索乙素酸性硫酸盐析出。抽滤，取结晶置 25ml 锥形瓶中，用 70%乙醇 10ml 加热溶解。趁热抽滤，再用少量乙醇（1~2ml）洗涤容器，向热溶液（约 60℃）中滴加氨水至 PH9，立即析出鳞片状结晶，抽滤，用蒸馏水洗（此处所得结晶加水能否溶解？加氯仿能否溶解？）干燥得延胡素乙素游离碱。烘干。

(5) **成盐**：称取延胡索乙素游离碱 0.5 克。置于 25 毫升锥形瓶（或小烧瓶）中加 90%乙醇 4 毫升，在水浴上加热使溶解，用粗毛细管滴加 5%硫酸乙醇液至刚果红试纸呈淡蓝色（PH 约 5）放冷析晶。将微黄柱状结晶，抽滤干 50℃以下干燥，即延胡索乙素中性硫酸盐。可用水重结晶一次，干燥后测熔点。熔点____℃，得率____。

以醋酸水小样提取，一般得率 1~2%，用乙醇回流浸取得率 3~4%，取黄藤粗粉 100g，用 95%乙醇回流浸取三、四次合并乙醇至约 120ml，即可按（3）精制项下操作，加盐酸得氯化巴马汀。

3、提取工艺说明

(1) 黄藤中含有多糖类物质溶于水，往往影响水浸液盐析及中和后的过滤，故宜在静置后先倾泻去大部分澄清液再用布袋过滤收集沉淀，原料药材亦不宜粉碎太细。

(2) 氯化巴马汀为金色针状结晶，并有强烈的黄色萤光。四氯巴马汀为先无色片状结晶，不具萤光。因此，反应液的颜色可作为还原终点的判断。还原开始时，反应液为橙黄色，

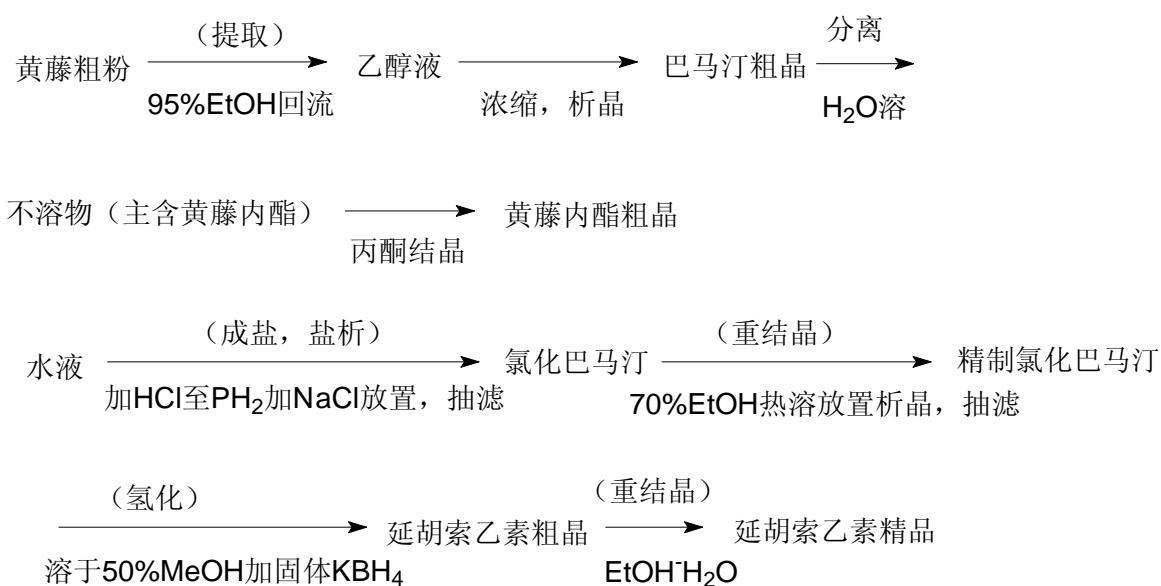
随着还原反应的进行，反应液的颜色逐渐退去，至淡米色或无色即可作为反应的终点。

(3) 四氢巴马汀较易氧化成巴马汀，所以制备过程中应尽快连续操作。

(4) 四氢巴马汀的盐酸盐及酸性硫酸盐在水中的溶解度较小，故一般制成水溶性较大的中性硫酸盐，供配制注射剂使用。

方法二

1. 流程



2、工艺

(1) **提取**: 黄藤粗粉 20g, 用 95%EtOH 回流提取 2 次, 每次 1 小时, 乙醇用量为 100ml, 合并二次醇提取液, 浓缩至 3~4ml, 用吸管转移到 5ml 小锥形瓶中, 放置, 析晶, 抽滤得巴马汀粗晶。

(2) **分离**: 将巴马汀粗晶用 10ml 水溶解后, 抽滤。不溶物主要为黄藤内酯。滤液滴加 HCl 至 PH₂, 再加 10%NaCl 进行盐析放置, 析出黄色不溶物, 抽滤得氯化巴马汀粗晶。

(3) **精制**: 用 70%EtOH 热溶氯化巴马汀粗晶, 过滤, 滤液析晶, 抽滤, 得精制氯化巴马汀。干燥称重_____克, 测熔点_____℃。

(4) **氢化**: 精制氯化巴马汀用 50%甲醇溶液, 加入固体 KBH₂ 约 0.2g, 直到甲醇液迅速由黄变白或微黄色。滴加 HCl 至 PH₂ 并加热使多余的 KBH₄ 分解, 再趁热滴加 NH₄OH 使反应液呈碱性, 立即析出鳞片状四氢巴马汀粗晶, 抽滤得结晶, 红外线灯下干燥, 再用 EtOH-H₂O 重结晶, 得精制四氢巴马汀。干燥称重_____克, 薄层层析检查纯度。熔点_____℃。

3. 巴马汀原位还原反应

在硅胶 CMC- Na 薄层板的起始线上点自制的巴马汀乙醇液，及对照品巴马汀乙醇液及四氢巴马汀乙醇液。然后再在自制的巴马汀的原点加点 2%KBH₄ 甲醇液 2~3 次，吹干，氨缸中饱和后，以 CHCl₂OH(3:1)展开，改良碘化铊钾试液显色。巴马汀 Rf 值 0.4 左右，四氢巴马汀 Rf 值约 0.9，进行原位反应的巴马汀如氢化彻底，应和对照品氢巴马汀的 Rf 值一致，如反应不彻底则出现二个斑点，其 Rf 值分别与对照品巴马汀及四氢巴马汀一致。

四、黄藤中生成碱的检识:

1、生物碱沉淀反应

取黄藤的 15 醋酸浸出液每份 1ml，置小试管中，分别滴加下列各试剂 2~3 滴，观察并记录有无沉淀产生及颜色变化。

- (1) 碘化铊钾试剂
- (2) 硅钨酸试剂
- (3) 苦味酸试剂（样品液需调至中性）
- (4) 鞣酸试剂

2、薄层层析

硅胶-CMC- Na 薄层

样品 巴马汀，小檗碱，药根碱，延胡索乙素，制备巴马汀后的母液，盐析后的水母液
展开剂氯仿-甲醇（3：1），展开前薄层板先在氨缸中饱和 5 分钟。

显色 先在紫外灯下观察萤光下观察萤光，然后再喷以改良碘经铊钾试液显色如果用中性或碱性氧化铝薄层，展开剂可用氯仿。

记录：薄层层析图谱。说明各母液中还有什么化合物。

五、主要提取成分的理化性质:

1、氯化巴马汀:

Mp 209~20°C（分解）

UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm:224,265-273,337-347,430

$\lambda_{\min}^{\text{MeOH}}$ nm: 249, 302, 377

IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹:2940,1600,1510,1450,1362,1329,1270,1230,1215,1190,1135,1105,1062,
1017, 905, 902,882,869,807

NMR (CF₃COOH)³: 3.97(3H,S,OCH₃); 4.03(3H,S,OCH₃); 4.09(3H,S,OCH₃);

4.23(3H,S,OCH₃); 3.26(2H,t,C₅-H); 4.39(2H,t,C₆-H); 6.96(1H,S,Ar-H);

7.54(1H,S,Ar-H); 7.94(2H,S,Ar-H); 8.44(1H,S,C₁₃-H); 9.51(1H,S,C₃-H)

2、消旋四氢巴马汀:

mp 149°C

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (10ge) :232(3.835)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$ 2935, 2915, 2320, 2780, 2715, 1605, 1505, 1487, 1448, 1420,
1335, 1352, 1300, 1266, 1248, 1220, 1204, 1135, 1100, 1075,
1020, 950, 352, 890, 700

NMR(CDCl_3)²: 3.32(12H,S,4×OCH₃); 3.54,4.22(2H,ABq,J=16Hz C₃-H); 6.58(1H,S,Ar-H),
6.70(1H,S,Ar-H); 6.75,6.94(2H,ABq,J=8Hz,Ar-H)

3、巴马汀:

MS m/e 353 (M+1), 337, 332, 307

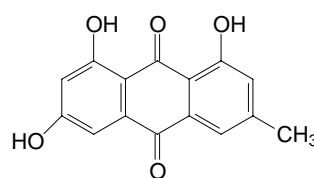
实验十六 虎杖中游离羟基蒽醌成分的提取和分离

虎杖为蓼科植物虎杖 (*Polygonumcus pidatum siedet Zucc*) 的根及根茎。别名阴阳莲, 花斑竹。味苦、性微寒。能清热解毒、祛风利湿、利尿通淋、祛痰、止咳、通经等。主要用于湿热黄疸、风湿痹痛、淋浊带下、经闭、烫伤。

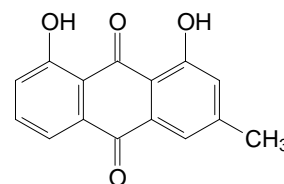
虎杖中含有较多的羟基蒽醌类成分及二苯乙烯类成分。其中主要有大黄素、大黄、大黄素-6-甲醚、大黄素 3-D-葡萄糖苷及 β -谷甾醇、鞣质等。虎杖得主要药理作用有抗菌、抗病毒及镇咳平喘、常用来治疗急性炎症、烧烫伤、肝炎、气管炎等。

一、虎杖中主要成分的结构与性质

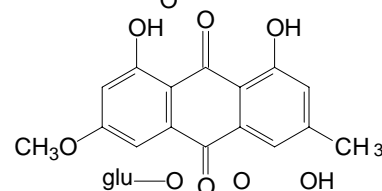
1、大黄素 (Emodin): 橙黄色长针晶 (丙酮中结晶为橙色, 甲醇中结晶为黄色), mp256-257°C。几不溶于水, 对于下列溶剂的溶介度分别为: 四氯化碳 0.01%, 氯仿 0.0718%, 二硫化碳 0.009%, 乙醚 0.14%, 苯 0.0415。易溶于乙醇, 可溶于氨水, 碳酸钠和氢氧化钠水溶液。



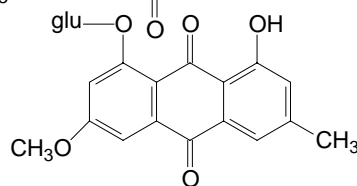
2、大黄酚 (Chrysophanol): 金黄色六角型片状结晶 (丙酮中结晶) 或针状结晶 (乙醇中结晶)。mp 196°C, 能升华。易溶于乙醚、氯仿、苯、冰乙酸、乙醇, 稍溶于甲醇, 难溶于石油醚, 不溶于水、碳酸氢钠和碳酸钠水溶液。可溶氢氧化钠水溶液及热碳酸钠水溶液。



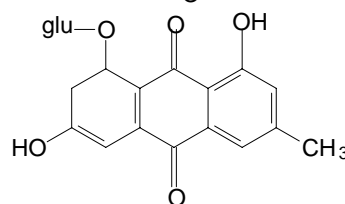
3、大黄素 6-甲醚, (Emodinmonomethyl ether): 金黄色针晶, mp207°C, 能升华。可溶于氢氧化钠水溶液, 溶解度与大黄酚相似。



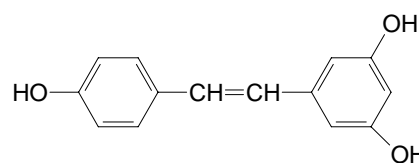
4、大黄素 6-甲醚 6-D-葡萄糖苷 (Anthragsicose A): 黄色针晶 (稀甲醇中结晶) mp230-232°C。



5、大黄素 3-D-葡萄糖苷 (Anthragsicose B): 浅黄色针晶 (稀乙醇中结晶含 1 分子水 mp190-191°C)。

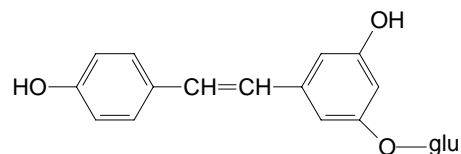


6、白藜芦醇 (Resveratrol): 无色针状结晶, mp256-257°C, 216°C 升华, 易溶于乙醚、氯仿、甲醇、乙醇、丙酮等。



7、白藜芦醇葡萄糖苷 (polydotinpeceid): 无色颗粒状

结晶，双熔点分别为 130-140℃ 225~226℃，易溶于甲醇、乙醇、丙酮、热水，可溶于乙酸乙酯、可溶于碳酸钠和氢氧化钠水溶液中，稍溶于冷水，难溶于乙醚。



8、β-谷甾醇

9、鞣质：属缩合鞣质，可溶于醇及水，不溶于苯、乙醚、氯仿等。

另外。虎杖叶、茎中含少量羟基蒽醌类化合物、有机酸、槲皮苷、异槲皮苷、虎杖黄酮苷、扁蓄苷、金丝桃苷及芸苷、Vtio 等。

二、实验原理：

羟基蒽醌类化合物及二苯乙烯类成分，均可溶于乙醇中，故可用乙醇将它们取出来。羟基蒽醌类易溶于乙醚等弱极性溶剂，白藜芦醇苷在乙醚中溶解度很小，利用它们对乙醚的溶解性差异使羟基蒽醌类与白藜芦醇苷分离，再利用各羟基蒽醌类结构上的不同所表现酸性不同，用 pH 梯度萃取法分离它们。

三、实验方法：

(一) 提取

乙醇总提取物的制备：取虎杖粗粉 200g，于 1000ml 圆底烧瓶中回流，第一次加 500ml 乙醇回流一小时，第二次加 300ml 乙醇回流 30 分钟，第三次加 250ml 乙醇回流 30 分钟，合并三次乙醇提取液，放置，如有沉淀可过滤一次，滤液减压回收乙醇至干，得膏状物。

(二) 分离

1. 亲脂性成分与亲水性成分的分离：

将上述膏状物加水 10ml，乙醚 100ml 充分振摇后放置，将乙醚液倾于 500ml 三角瓶中（水层不可倒出），再于烧瓶中加入 50ml 乙醚振摇，放置，倾出乙醚液，同法操作六次，合并乙醚液即为亲脂性成分——总游离蒽醌，乙醚提取过的剩余物中含水溶性成分。

2. 游离蒽醌分离：

(1) 强酸性成分的分高：将上述含总游离蒽醌的乙醚液置 100ml 分液漏斗中，加 5% 碳酸氢钠水溶液 40ml 萃取（测 5% 碳酸氢钠 PH 值），放置使充分分层，若提取过程中乙醚挥发可补充，分出碱水溶液同法提取二次，合并碱水提取液，在搅拌下缓缓滴加 6N 盐酸调至 pH₂ 注意观察颜色变化，稍放置即可析出沉淀，抽滤，用水洗涤沉淀中性，将沉淀置表面器上干燥，得强酸性成分。

(2) 中等酸性成分——大黄素的分离：碳酸氢钠萃取过的乙醚液用 5% 碳酸钠溶液（测 5% 碳酸钠水溶液的 pH 值）萃取 5~9 次，每次 40ml，直至萃取液较浅为止。合并碳酸钠提取液，小心加盐酸调 pH₃，放置，抽滤，水洗沉淀至中性，抽干，干燥称重。以甲醇—氯仿

或苯—氯仿（1：1）重结晶，得大黄酚和大黄素 6-甲醚混合物。

注：大黄酚和大黄素 6-甲醚二者相互分离比较困难，在本实验薄层条件下为同一斑点，可用层析用磷酸氢钙进行柱层析，以石油醚洗脱，下层黄色带洗脱后，以甲醇重结晶可得大黄酚，上层黄色带洗脱后以甲醇重结晶可得大黄素 6-甲醚。

（3）中性成分——甾醇类化合物分离：氢氧化钠萃取过的乙醚液，用水洗至中性，以无水硫酸钠脱水，回收乙醚得残留物，以甲醇热溶二次（10ml,5ml）过滤合并甲醇液，浓缩，放置结晶，滤取沉淀并用少量石油醚洗涤，再用甲醇重结晶，得 β -谷甾醇，mp136~137℃，取少许结晶，做醋酐——浓硫酸反应，观察现象。

（三）鉴定

化学检识：分别取大黄素、大黄酚等少许，用乙醚溶解，做如下反应：

A：碱液试验：取试液 1ml，加 20%NaOH 数滴，观察颜色。

B. 醋酸镁反应：取试样 1ml，加醋酸镁试剂数滴，观察现象。

2. 薄层鉴定：

吸附剂：硅胶—CMC

展开剂：C₆H₆—EtoAc(3:2 或 97: 9)。

显色剂：（1）氨蒸气熏。（2）5%KOH 喷雾。

实验十七 芦丁的提取、分离与鉴定

槐花米系豆科槐属植物槐树 (*Sophora japonica* L) 的花蕾, 自古用作止血药物。治疗吐血, 痔疮便血、子宫出血、鼻血等症, 所含主要成分为芸香苷, 又称芦丁 (Rutin, 维生素 P), 其含量高达 12~16%, 有调节毛细血管渗透性之作用, 临床用作毛细血管止血药, 如复方芦丁, 也作为高血压的辅助治疗药物。

一、目的要求:

- 1、掌握酸碱法提取黄酮苷类的原理及方法。
- 2、掌握化学鉴别试验、苷水解、衍生物制备、熔点和薄层层检查等手段在苷类结构鉴定上的作用。
- 3、通过 UV、IR、HNMR 和 MS 图谱解析, 了解光谱方法黄酮类化合物结构鉴定中的作用。

二、已知重要成分性质:

1、芦丁 (芸香苷, rutin)

淡黄色针晶, 水中结晶者含 3 分结晶水, $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$ 100mmHg 和 110°C 加热 12 小时后, 变为无水物, 无水物于 25°C 变棕, 115~7°C 软化, 214~5°C 发泡分解, 1g 芦丁溶于约 300ml 冷水, 200ml 沸水, 7ml 沸甲醇, 溶吡啶, 甲酰胺和碱液, 微溶于乙醇、丙酮、乙酸乙酯, 不溶于氯仿, 二硫化碳、乙醚、苯和石油醚。

2、槲皮素 (Quercetin)

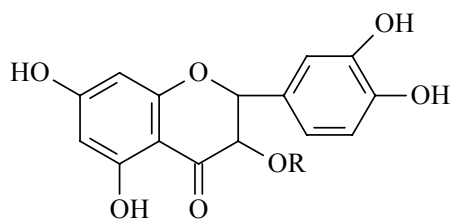
为芦丁的苷元,

$C_{15}H_{10}O_7$, MW302.23;

含二分子结晶水为黄色针晶, (稀乙醇),

5~7°C 失水, 314°C

解, 1g 溶于 290ml 无水乙醇、23ml 沸乙醇, 溶于冰醋一般在碱水中溶解显黄色, 几不溶于水。

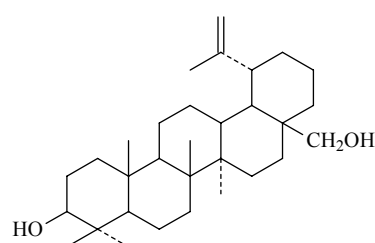
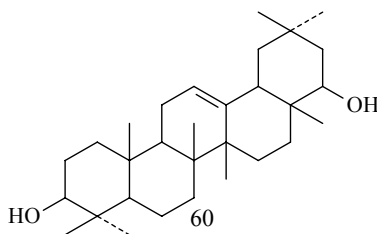


R= — glu— rha 芦丁

R= — OH 槲皮素

3、皂苷 (Saponin)

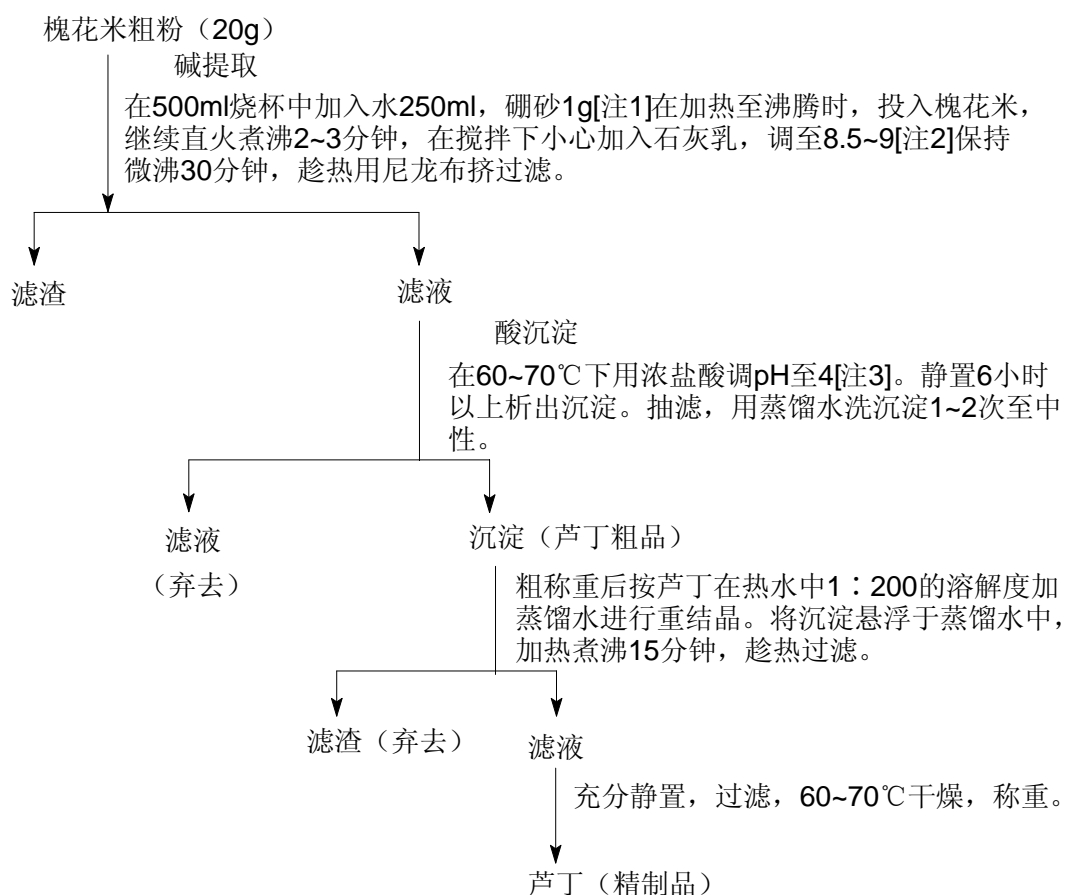
粗品为白色粉末, mp 210°C~20°C (dec)。易溶于吡啶。能溶于 200 倍的甲醇, 酸水解得下列两种苷元及糖。糖为葡萄糖, 葡萄糖醛酸和葡萄糖醛酸内酯。



(1) 白桦酯醇 (Betulin) 无色针晶, mp $215\sim 2^{\circ}\text{C}$, 能溶于醋酸, 丙酮、醋酸乙酯、甲醇、乙醇、氯仿、苯等; 难溶于石油醚和水。

槐花二醇 (Sophoradiol) 无色针晶, mp $219\sim 20^{\circ}\text{C}$ 或 224°C , 溶于石油醚、苯、丙酮、甲醇、难溶于水。

三、提取分离和纯化



注 1: 硼砂因能与芦丁结合, 起保护邻二酚羟基, 不被氧化破坏的作用, 实验证明, 提取时加入硼砂, 产品质量要好些。

注 2: 加石灰乳既能达到碱溶解提取芦丁的目的, 还可以除去槐花米中大量的粘液质和酸性树脂 (形成钙盐沉淀), 但 pH 不能过高和长时间煮沸, 因为会导致芦丁的降解。

注 3: pH 过低会使芦丁形成锌盐而降低收率。

四、芦丁的鉴定

定性反应见附录酮苷的鉴别。

(一) 芦丁的酸水解

称取精制芦丁约 2g, 研细, 加 H_2SO_4 150ml, 投入 500ml 锥形瓶中, 放沸石, 直火沸腾

后，保持 2 小时，放冷后抽滤，滤液保留作糖份的鉴定，水洗沉淀后，粗品用 95%乙醇大约 20ml 回流溶解，趁热过滤，放置，加水至 50%左右浓度，得黄色针晶。

(二) 糖的鉴定

1. 纸层析鉴定：取水解母液 20ml，于水浴上加热，同时于搅拌下加 BaCO_3 细粉中和至中性，滤 BaCO_3 后，滤液在水浴上浓缩至 2~3ml，得样品液，以葡萄糖和鼠李糖标准品作对照。

展开剂：正丁醇-醋酸-水 (BAW) (4: 1: 5) 上层，上行展开。

显色剂：苯胺-邻苯甲酸试液，喷后 105℃烘 10 分钟。显棕红色斑点。

2. 糖脎的制备及鉴定

余下的水解母液小心用 45%NaOH 液中和、滤除棕红色沉液物，水浴上加热浓缩至约 30ml，滤后加 1g 盐酸苯肼和 2gNaAC，沸水浴上加热 30~40 分钟，析出黄混合糖脎，停止加热冷却，取结晶少许，于是显微镜下观察，鼠李糖脎为簇状针晶，葡萄糖脎扫帚状聚针晶，滤取糖结晶，水洗，干燥后，溶于丙酮，滤除不溶物。滤液加水使呈 30%丙酮液，即析出葡萄糖脎抽滤后以少量丙酮重结晶一次，mp209℃，母液加水稀释，析出鼠李糖脎，稀乙醇重结晶，mp135℃。

(三) 芦丁和槲皮素的薄层层析鉴定

吸附剂：青岛硅胶 G (10~400) 以 0.4%CMC-Na 水液制板，105℃活化 1 小时。

展开剂：(1) CHCl_3 -MeOH-HCOOH (15: 5: 1)

(2) CHCl_3 -丁酮-HCOOH (5: 3: 1)

显色剂：1% FeCl_3 和 1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 水溶液，应用时等体积混和。

五、槲皮素五乙酰化物的制备

称取精制的槲皮素 0.2g，置 25ml 干燥的锥形瓶中，加 6ml 醋酐和 1 滴浓 H_2SO_4 ，振荡使完全溶解，接上空气冷管，于水浴上加热 30 分钟放冷，搅拌下倾入 100ml 冰水中，搅至稀油滴消失，得灰白色的粉末沉淀，放置抽滤，洗涤，用 95%乙醇将沉淀重结晶，得无色针晶，为五乙酰化槲皮素，mp192~4℃。

六、光谱鉴定

(一) 紫外光谱

利用紫外吸收光谱，测定黄酮化合物在加入各种电解质或络合剂后吸收峰的位移，根据位移的情况，以判断化合羟基的位置。

1. 试剂配制

(1) 无水甲醇：用分析纯的甲醇，加入 10%CaO，放置 24 小时后，加热回流 1 小时，回流时冷凝管顶端应安装 CaCl_2 干燥管，然后蒸馏得无水甲醇。

(2) 甲醇钠溶液：取金属钠 0.25g，切碎，小心加入无水甲醇 10ml 中，此溶液贮存于玻璃瓶中，用橡皮塞密封。

(3) 氢氧化钠溶液：取 2.0g NaOH，加 10ml 水溶解。

(4) 三氯化铝溶液：2.5g 无水三氯化铝小心地加入无水甲醇 550ml 中，放置 24 小时后全溶即得。

(5) 醋酸钠：用无水粉状醋酸钠。

(6) 硼酸饱和液：将无水硼酸加入适量无水甲醇，制成饱和溶液。

依照上述方法制备的各贮备液，可存放使用 6 个月。

2. 测定方法

精密称取黄酮样品（槲皮素）约 1.2mg，用无水甲醇溶解，再稀释至 100ml。

(1) 黄酮光谱：取样品溶液约 3ml 置于石英杯（1cm）中，在 200~500nm 波段内进行扫描，重测一次，视光谱的重现性。

(2) 氢氧化钠光谱：取样品溶液约 3ml 置于石英杯中，加入氢氧化钠 2~3 滴后，立即进行测定。放置 5 分钟后，再测定一次。

(3) 甲醇钠光谱：取样品溶液约 3ml 置于石英杯中，加入甲醇钠溶液 5~7 滴后，立即进行测定。放置 5 分钟后，再测定一次。

(4) 三氯化铝光谱：在盛有约 3ml 样品溶液的石英杯中，加入 AlCl_3 溶液 6 滴，放置一分钟后进行测定。测定后，加入 3 滴盐酸溶液（浓盐酸：水=1：1），再测定一次。

(5) 醋酸钠光谱：取样品溶液约 3ml 置于石英杯中，加入适量的无水醋酸钠固体，杯底剩有约 2mm 的醋酸钠时，二分钟内进行测定。

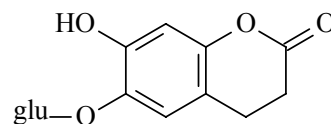
实验十八 秦皮中七叶苷、七叶内酯的提取、分离和鉴定

秦皮为本槲科白蜡树属植物白蜡树 (*Fraxinus Chinensis* Poxb) 或苦沥白蜡树 (*F.rhynchophylla* Hance) 或小叶白蜡树 (*F.bungeana* DC) 的树皮, 味苦, 性微寒。具有清热、燥湿、收涩作用。主治温热痢疾、目赤肿瘤等症。

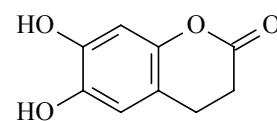
秦皮中含有多种内酯类成分及皂苷、鞣质等, 其中主要有七叶苷、七叶内酯、秦皮苷及秦皮素等。多有抗菌消炎的生理活性, 七叶内酯对细菌性痢疾、急性肠炎有较好治疗效果, 兼有退热作用, 毒付作用小, 几无苦味。适于小儿服用。

一、秦皮中主要成分的结构及性质

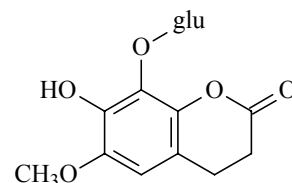
1、七叶苷 (esculin), 又叫马栗树皮苷: 白色粉末状结晶, mp205~206°C。易溶于热水 (1: 15), 可溶于乙醇 (1: 24), 微溶于冷水 (1: 610), 难溶于乙酸乙酯, 不溶于乙醚、氯仿。在稀酸中可水解。水溶液中有蓝色荧光。



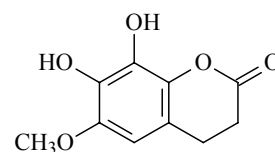
2、七叶内酯 (esculetin): 黄色针状结晶, mp276°C。易溶于沸乙醇及氢氧化钠溶液, 可溶于乙酸乙酯, 稍溶于沸水, 几不溶于乙醚、氯仿。



3、秦皮苷 (fraxin): mp205°C。



4、秦皮素 (fraxetin): mp227~228°C。



二、实验原理

七叶苷、七叶内酯均能溶于沸乙醇, 可用沸乙醇将二者提取出来, 再利用二者在乙酸乙酯中的溶解性不同而分离之。

三、实验方法

(一) 提取: 取秦皮粗粉 150g 于索氏提取器中, 加 400ml 乙醇回流 10-12 小时, 得乙醇提取液, 减压回收溶剂至浸膏状, 即得总提取物。

(二) 分离: 在上述浸膏中加 40ml 水加热溶之。移于分液漏斗中, 以等体积氯仿萃取二次, 将氯仿萃取过的水层蒸去残留氯仿后加等积乙酸乙酯萃取二次, 合并乙酸乙酯液, 以无水硫酸钠脱水, 减压回收溶剂至干, 残留物溶于温热甲醇中, 浓缩至适量, 放置析晶, 即

有黄色针状结晶析出。滤出结晶。甲醇、水反复重结晶，即得七叶内酯。

将乙酸乙酯萃取过的水层浓缩至适量，放置析晶，即有微黄色晶体析出。滤出结晶。以甲醇，水反复重结晶，即得七叶苷。

(三) 鉴定:

1. 化学检识: 取七叶苷、七叶内酯各少许分别置试管中，加乙醇 1ml 溶解。加 1%FeCl₃ 溶液 2—3 滴，显暗绿色，再滴加浓氨水 3 滴，加水 6ml，日光下观察显深红色。

2. 薄层鉴定:

吸附剂: 硅胶 G

样品: 七叶苷、七叶内酯标准品及自制七叶苷、七叶内酯的醇溶液。

展开剂: 甲醇—甲酸乙酯—甲苯 (1: 4: 5)

显色: 1) UV₂₅₄ 灯下观察，七叶苷为灰色荧光，七叶内酯为灰褐色。

2) 以重氮化对硝基苯胺喷雾显色，七叶苷和七叶内酯均呈玛瑙色。

结果: 七叶苷 Rf=0.04, 七叶内酯 Rf=0.28

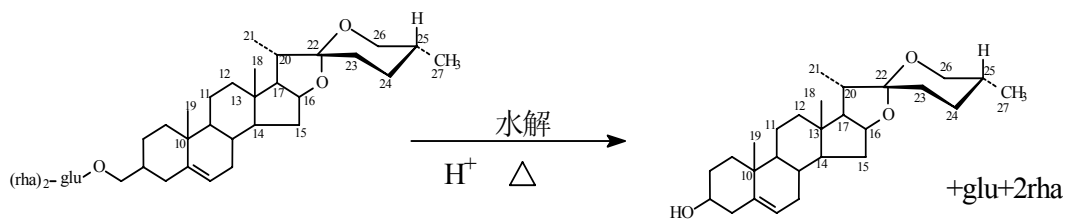
实验十九 薯蓣皂苷元的提取和鉴别

一、目的要求:

- 1、掌握甾体皂苷元（亲脂性和中性成分）的提取方法。
- 2、熟悉薯蓣皂苷元的性质及鉴定法。

二、简介:

薯蓣皂苷元（Diosgenin）是一种甾体皂苷元，分子式（ $C_{27}H_{42}O_{31}$ ），分子量 414.61，为白色结晶， $mp_{204\sim 207}^{\circ}C$ ， $[\alpha]_D^{25}-129.3$ （ $CHCl_3$ ），溶于一般有机溶剂和醋酸，不溶于水。目前，是制造多种甾体药物如口服避孕药（I 号，II 号避孕药片）和甾体激素（如可的松）等的重要原料。在植物界主要分布在薯蓣科薯蓣属（*Dioscorea*）植物中，我国的薯蓣属植物有 80 余种，其中只有薯蓣根茎组（*Stenophora*）的 17 种、I 亚种及一变种才含有甾体皂苷元，其它则含有多量淀粉，无皂苷元。已用于生产的主要有盾叶薯蓣（*D. Zingiberensis* C. H. Wright），穿龙薯蓣（*D. nipponica* Makino），黄山药（*D. panthaica* prain et Burkil），紫黄姜



(*D. nipponica* Makino var *rosthani* prain et Burk)等。在植物体内薯蓣皂苷元是与葡萄糖、鼠李糖结合成薯蓣皂苷（Dioscin）而存在。提取分离时，一般是先用稀酸将薯蓣皂苷水解成薯蓣皂苷元与单糖（葡萄糖、鼠李糖）。因薯蓣皂苷元不溶于水，混存于植物残渣中，故可用有机溶剂（如石油醚）直接从植物残渣中提取出薯蓣皂苷元。

三、提取方法

1、皂苷预试:

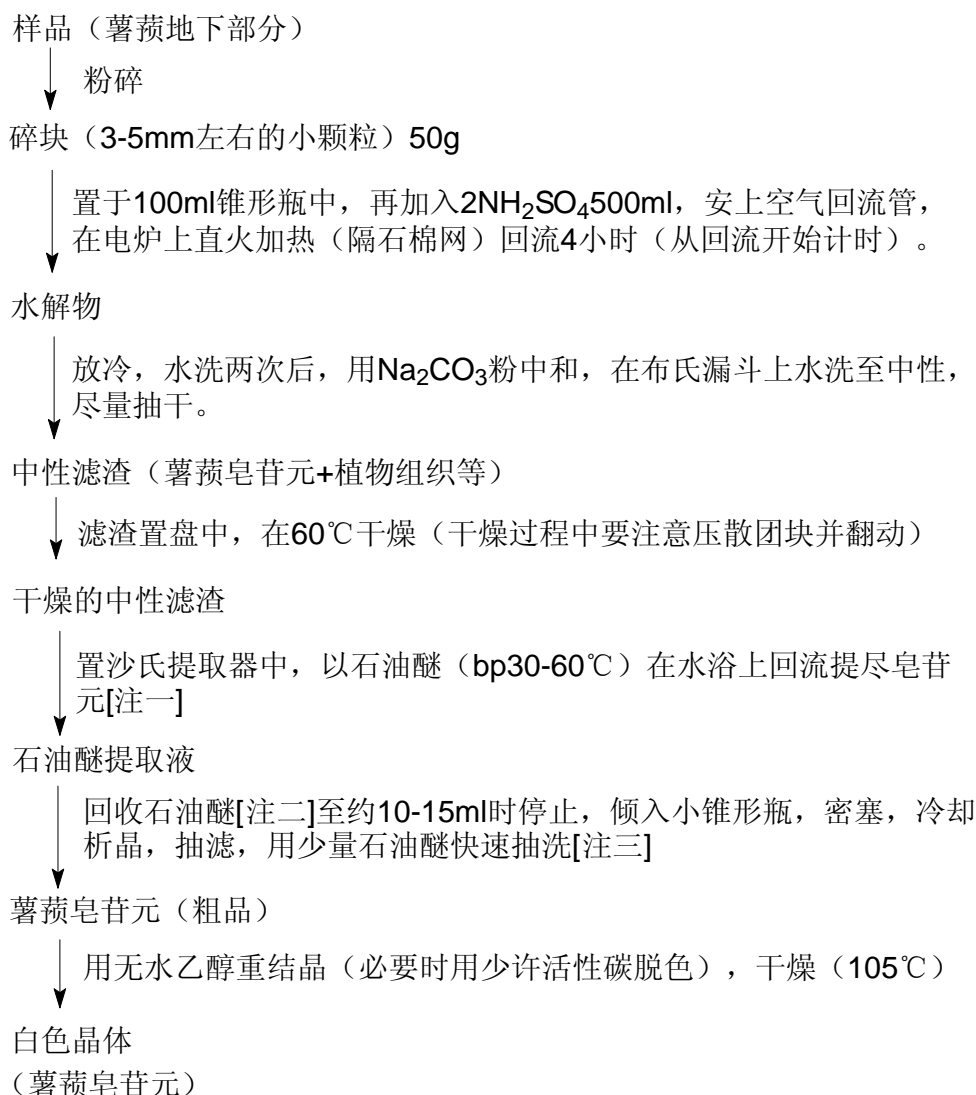
- ①泡沫试验
 - ②李伯曼—布哈德（Liebermann-Burchard）反应
- } 方法见“皂苷的鉴别”

2、薯蓣皂苷元的提取：（见下图）

注一：检查薯蓣皂苷元是否提尽，可用李伯曼反应，参考实验二“注三”项下。

注二：回收石油醚的方法见实验一“注四”项下。

注三：所得薯蓣皂苷元（粗品）用石油醚抽洗后，即可测定熔点，若熔点不合格时，才进行重结晶。



四、薯蓣皂苷元的鉴定

1、熔点测定：204~209℃

2、薄层层析鉴定：

应只呈现一个与标准 Rf 值一致的色斑。

样品：白色结晶的无水醇液

标准品：薯蓣皂苷元无水醇液

1) 吸附剂：Al₂O₃ 软板（中性 100~200 目，活性Ⅲ级）

展开剂：苯-甲醇（9：1）

2) 吸附剂：硅胶 H-CMC 硬板

展开剂：石油醚-乙酸乙酯（7：3）

显色剂：10%磷钼酸乙醇溶液。喷雾后加热 10~20 分钟

3) 化学反应:

①Liebermann-Burchard 反应

②CHCl₃—浓 H₂SO₄ 试验

③五氯化铋反应 (Kahlenberg 反应): 与五氯化铋的氯仿溶液呈紫蓝色。

4) 制备衍生物:

乙酰化物的制法: 取样品 100mg 溶于 3ml 吡啶中, 加入 20ml 醋酐, 煮沸半小时至一小时后, 将反应物倒入冰水中 (冬季操作使用冷水即可)。待析出白色晶体后, 抽滤, 析出物丙酮重结晶即得。mp196~193℃。

5) 紫外吸收光谱的测定:

取样品 5mg, 加入浓 H₂SO₄ 10ml, 在 40℃水浴上加热 1 小时, 放冷, 测定。薯蓣皂苷元应有以下最大吸收峰:

λ_{\max}	271nm	415nm	514nm
10g ϵ	3.99	4.06	3.64

实验二十 植物化学成份的鉴别法

一、生物碱的鉴别

1、检品溶液的制备：

取粉碎的植物样品约 2g，加蒸馏水 20~30ml，并滴加数滴盐酸，使呈酸性。在 60℃ 水浴上加热 15 分钟，过滤，滤液供作以下试验。

2、生物碱类成分的鉴别：

生物碱类成分（除有少数例外）均与多种生物碱沉淀试剂在酸性溶液（水液或稀醇液）中产生沉淀反应。操作如下：

（1）取上备酸水浸液四份（每份 1 ml 左右即可），分别滴加碘-碘化钾、碘化汞钾试剂、碘化铋钾试剂、硅钨酸试剂。若四者均有或大多有沉淀反应，表明该样品可能含有生物碱，再进行下项试验，进一步识别。

（2）取上备其余酸水浸液，加 Na_2CO_3 溶液呈碱性，置分液漏斗中，加入乙醚约 10ml 振摇，静置后分出醚层，再用乙醚 3ml，如前萃取，合并醚液。将乙醚液置分液漏斗中，加酸水液 10ml 振摇，静置分层，分出酸水液，再以酸水液 5ml 如前提取，合并酸水液，如此酸提液四份，分别作以下沉淀反应。

a. 碘化汞钾试剂（Mayer 试剂）：酸水提液滴加碘化汞钾试剂，产生白色沉淀。

b. 碘化铋钾试剂（Dragendorff 试剂）：酸水提液滴加碘化铋钾试剂，产生桔红色或红棕色沉淀。

c. 碘-碘化钾试剂（Wagner 试剂）：酸水提液滴加碘-碘化钾试剂，产生棕色沉淀。

d. 硅钨酸试剂：酸水提取液滴加硅钨酸试剂产生淡黄色或灰白色沉淀。

此酸水提液与以上四种试剂均（或大多）产生沉淀反应，即预示本样品含有生物碱。

（3）备注：以上（1）、（2）沉淀反应结果：沉淀的多少以“+++”，“++”，“+”表示，无沉淀产生则以“—”表示。若（1）项试验全呈负反应，可另选几种生物碱沉淀试剂（可参考有关资料）进行试验，若仍为负反应，则可否定样品中有生物碱的存在，不必再进行（2）项试验。

二、苷类的鉴别

（一）苷的一般鉴别反应

1. 检品溶液的制备：

中草药水浸液：取中草药碎块或粉末 2g，加蒸馏水约 20ml 70℃±水浴，浸渍 10 分钟，过滤，滤液供鉴别用。

中草药醇浸液：取中草药碎块或粉末少许于试管中，加乙醇 10ml，在温水浴上浸渍 10

分钟，过滤，滤液供鉴别用。

2. 鉴别试验：

(1) α -萘酚试验 (Molish) 反应 取醇浸液 1ml，加 10% α -萘酚醇液 1 滴，摇匀，沿管壁缓慢加入浓 H_2SO_4 10 滴，不振摇，观察两液介面间是否出现紫红色杯（此反应检识糖、苷类化合物，反应较灵敏。若有微量滤纸纤维或中草药粉末存在于溶液中，都能产生上述反应，故在过滤时应加以注意）。

(2) 水解反应：

取水浸液 3ml 于试管中，加 10% HCl 1ml 在沸水浴上加热 20 分钟，观察是否有絮状沉淀产生？

(3) 碱性酒石酸铜（斐林试剂 Fehling's test solution）试验

取水浸液 2ml，加入新配制的斐林试剂（甲+乙等量混合）1ml，在沸水浴上加热数分钟，如产生红色的氧化亚铜沉淀，则行过滤，滤液中加 10% HCl 调成酸性，置水浴上加热 10 分钟。进行水解，如有絮状沉淀则滤去。然后用 10% $NaOH$ 中和，再加入斐林试剂 1ml，仍置沸水浴上加热 5 分钟，观察是否有黄色，砖红或棕色沉淀产生？（此反应试多糖，苷类）从反应结果说明供试中草药中是否含有苷？（此试验法亦可采用同体积同浓度的中草药浸液两份，一份先经酸水解过滤碱化后，另一份再同时进行如上的还原反应，对比生成的氧化亚铜量，两份是否有差异来判断，具体方法见系统预试实验）。

注：植物对苷的一般鉴别是正反应，还可进一步作个别苷类的鉴定。具体方法如后。

(二) 蒽苷的鉴别

1、检品溶液的制备：

取大黄粉末 2 克，加乙醇 20ml，在沸水浴上回流浸提 10 分钟，过滤供鉴别用。

2、鉴别试验：

(1) 与碱成盐显色反应 (Borntrager 反应)：取 1ml 乙醇提取液，加入 1ml 10% $NaOH$ 溶液，如产生红色反应，加入少量 30%过氧化氢液，加热后红色不褪，加酸使呈酸性时，则红色消褪再碱化又出现红色。

注：或取大黄粉末少许，置小试管中，加水 1~2ml，加浓 H_2SO_4 2—3 滴，置水浴中加热 10 分钟，冷却，加乙醚 1—2ml 振摇。用吸管吸取醚液（黄色）于另一洁净试管中，加入 $NaOH$ 试液 1ml 振摇，则醚层应褪为无色，碱层（下层）为红色，示有蒽醌类成分存在，如供试的中草药在以上试验中碱水层仅现黄色，可分出碱水溶液，置试管中，加 30% H_2O_2 溶液 1~2 滴，在沸水浴中加热数分钟，混液如能转为橙红色，说明中草药中可能有蒽醌类成分存在。

(2) 升华试验：取大黄粉末少许，置载玻片上，玻片两端各放短木棍一小段，然后另

取一洁净载玻片，放置于小棍上，注意勿触及下面粉末。然后移置在三足架的铁纱网上小心加热（勿使粉末炭化）至玻片上有升华物凝集为止，取下盖片，使升华物面向上，放置于显微镜下观察，可见多数黄色针晶或羽毛状晶体（蒽醌衍生物）。此晶体遇碱液呈红色。

（3）圆形滤纸层析：

样品：大黄醇浸液

显色：1) 于自然光下观察色带

2) 于紫外光下观察荧光环

3) 氨熏，观察是否出现红色环，再置 uv 下观察荧光环

4) 喷 0.5% $MgAC_2$ 甲醇液，于 90℃ 烘 5 分钟，是否出现橙红或紫红色环。

（三）黄酮苷的鉴别

1、检品溶液的制备：

取槐花米约 1 克压碎于试管中加乙醇 10~20ml 在水浴上加热 20 分钟。过滤，滤液供以下试验。

2、鉴别试验：

①取醇浸液 2ml，加浓盐酸 2~3 滴及镁粉少量，放置（或于水浴中微热），产生红色反应。

②取醇浸液 1ml，滴加 $pHAC_2$ 溶液数滴，产生黄色沉淀。

③纸片法：

将醇浸液滴于滤纸上，分别进行以下试验：

①先在紫外灯下观察荧光，然后喷 1% $AlCl_3$ 试剂，再观察荧光是否加强。

②氨熏后出现黄色，棕黄色荧光斑点。

与氨接触而显黄色，或者原呈黄色，但与氨接触后黄色加深，滤纸片离开氨蒸气数分钟，黄色或加深后的黄色又消褪。

③喷以 3% $FeCl_3$ 乙醇溶液，出现绿、兰或棕色斑点。

（四）强心苷的鉴别

1、检品溶液的制备：

取夹竹桃叶碎块粉末 3g，于 100ml 锥形瓶中加 70%乙醇 40ml，水浴上浸煮 5 分钟，放冷，过滤，滤液（或经处理后——方法参照注二）供鉴别用。

[注 1]：强心苷的试验都是在较强的碱性条件下进行，如果样品中含有蒽醌，也具有红色反应，妨碍检查，因此在检查前需先检查有无蒽醌类成分，若有则应先将其除去，即将乙醇浸液在水浴上蒸发，残渣加 $CHCl_3$ 热溶后过滤， $CHCl_3$ 液用 1% $NaOH$ 液振摇，去除蒽醌后， $CHCl_3$ 液供鉴别用。

[注 2]: 夹竹桃叶或毛地黄叶绿素, 常使醇提液带较深的绿色, 影响反应的进行。故需将叶绿素除去, 具体方法如下:

乙醇浸提液在水浴上挥去大部分乙醇 (不让乙醇挥尽), 再加水适量, 使含醇量约 20% 左右, 稍热后即放冷, 过滤, 滤液即可供试验用, 或将滤液在水浴上浓缩至糖浆状, 加入 95%乙醇 10ml 溶解再供试验用。

2、鉴别试验:

(1) **三氯化铁冰醋酸反应 (Keller-Kiliani 反应):** 取醇提液或经处理后的 CHCl_3 或醇液 1ml, 水浴上蒸干, 残渣溶于冰醋酸 2ml 中, 加入 1% FeCl_3 乙醇液 1 滴, 混合均匀, 倾入干燥小试管中, 再沿管壁缓慢加入等体积浓硫酸, 静置, 二液交界处显棕色 (苷元), 渐变为浅绿, 兰色, 最后上面醋酸层全呈兰色或兰绿色 (α -去氧糖)。

(2) **碱性 3,5-二硝基苯甲酸反应 (Kedde 反应):** 取 1ml 醇浸提液, 加入碱性 3,5-二硝基苯甲酸试剂 3~4 滴, 产和红色或红紫色反应。

(3) **亚硝酰铁氰化钠反应 (Legal 反应):** 取 1ml 醇浸提液或经处理后的 CHCl_3 或醇液在水浴上蒸干, 用 1ml 吡淀溶解残渣, 加入 0.3%亚硝酰铁氰化钠溶液 4~5 滴, 混匀, 再加入 NaOH 饱和乙醇液 1—2 滴, 是否呈现红色 (若结果不明显可另一取一份供试液如上操作, 最后加 NaOH 饱和乙醇液 0—5ml, 观察二液交界面有无红色)。

(4) 碱性苦味酸 (Baljet 反应)

取样品醇液 1ml, 加入碱性苦味酸试剂 (苦味酸饱和水液与 5%NaOH 水液等量混合) 数滴, 呈现橙或橙红色。

(五) 皂苷的鉴别

1、检品溶液的制备:

1) 取皂角碎块 1g 于大试管 (或小烧杯) 中, 加蒸馏水 15ml, 于 30~90°水浴上浸渍 15 分钟后过滤, 滤液供鉴别用。

2) 取薯蓣碎块 0.5g 加上法同样制备得薯蓣水浸液。

3) 取薯蓣碎块 0.5g 于大试管或小锥形瓶中加 95%乙醇 10ml 于水浴上温浸 15 分钟, 滤液供鉴别。

2、鉴别试验:

(1) **溶血试验:** 取滤纸片一小块, 于小心处滴加皂角浸液一滴, 待干后于同处再滴加一滴, 如是反复操作至滴加数滴, 干燥后无喷雾血球试液 (取牛血、羊血或兔血一份, 用玻棒或棉签搅和, 除去凝集的血蛋白, 加 pH7.4 磷酸盐缓冲液一份稀释即得), 数分钟后观察在红色的背底中是否出现无红色的黄色 (或透明) 斑点 (中心处皂角浸液原点)。(本反应亦可在试管中进行, 血球试液中草药浸液中的皂苷溶解后, 血球液由浑浊变为澄明。此外还可

在载玻片上进行，并在显微镜下观察血球破裂溶解前后的状况)。

(2) **泡沫试验**：薯蓣浸液，皂角浸液各 2ml，分别置于试管中。用力振摇一分钟后放置，在 10 分钟内观察二管是否都有持久性泡沫产生？

(3) **醋酐浓硫酸试验 (Liebermann-Burchard 反应)**，皂角浸液 5ml，于蒸发皿中在水浴上蒸干，加入 1ml 醋酐使其溶解，滴于干燥比色盘中，从边沿缓缓滴加浓硫酸 1 滴，观察颜色变化。

另取薯蓣浸液 5ml，置于蒸发皿中，在水浴上蒸干，加入 1ml 醋酐溶液，并倾入比色盘中，(试管)沿管壁加入几滴浓硫酸，观察界面间是否有紫红色环产生？

(4) **氯仿—浓硫酸试验 (Salkowski 反应)**：取薯蓣醇浸液 2ml，在水浴上蒸干，有氯仿 1ml 溶解，转入干燥小试管中，沿壁小心加浓硫酸 1ml，氯仿层显红或兰色，硫酸层有绿色荧光，示含甾体皂苷。

(六) 香豆精苷的鉴别

1. 检品溶液的制备：

取秦皮 2 克，加入乙醇 20ml，在水浴上回流 10 分钟，趁热过滤，滤液供鉴别用。

2. 鉴别试验：

(1) **内酯化合物的开环与闭环反应**：取 2ml 乙醇浸出液，加 1—2ml 1% NaOH，于沸水浴中煮沸 3 分钟，冷却后加新配制的重氮化试剂 1~2 滴，显红色。

(2) **脲基羟酯酸铁试验**：取香豆素少许，加酒精 1ml 溶解加 6 滴盐酸羟胺的饱和乙醇液混匀后加入 6 滴 KOH 的饱和乙醇液，使其显强碱性再转入试管中加热 10 分钟左右(有气泡产生)，冷却加 5%盐酸使呈弱酸性 (Ph6 左右)，倾入比色盘或蒸发皿中，沿器壁滴 10%FeCl₃ 溶液，约半分钟后紫色出现或加深(后消失)。(此反应试酯、内酯、香豆精及其苷类。但用中草药浸液试验反应结果不太明显)。

(七) 氰苷的鉴别

取苦杏仁 4~5 粒，研碎，置 50ml 锥形瓶中加入 3ml。

5%硫酸溶液，充分混合，塞好，进行以下(1)、(2)反应。

(1) **苦味酸钠试验**：取滤纸条先滴加饱和苦味酸液浸润，稍干后，再滴加 10%碳酸钠 1~2 滴润湿，干后，悬于上述锥形瓶中，在水浴上加热 10 分钟，滤纸渐变为橙色或砖红色。

(2) 取滤纸条先滴加 3~4 滴愈创木树酯醇溶液润湿，干后，再滴加 1%硫酸钠液 3~4 滴润湿后，悬于同一锥形瓶中，放置，滤纸条渐变为鲜兰色(放置过久色渐褪)。

(3) **亚铁氰化铁反应 (普鲁士兰反应)**：另取苦仁一粒研碎，放入试管中，加水 1~2 滴润湿(切勿过量)，立即用已被 10%NaOH 试剂 1 滴湿润的滤纸条悬于管口置 50℃水浴上约 10 分钟，将滤纸取出，于滤纸上加 10%FeSO₄ 液 1 滴，加 10%HCl 1~2 滴及 1%FeCl₃，试

液 1 滴即显兰色。

四、挥发油的定性鉴别

(1) **外观性状:** 取各种挥发油 (松节油、薄荷油、丁香油、陈皮油及桂皮油) 观察其色泽, 是否有特殊香气, 及辛辣烧灼味感。

(2) **挥发性:** 取滤纸屑一小块, 滴加薄荷油一滴, 放置 2 小时或微热后观察滤纸上有无清晰的油迹 (与菜油作对照实验)。

(3) **pH 检查:** (检游离酸或酚类)。

取样品一滴加乙醇 5 滴, 以预先用蒸馏水湿润的广泛 pH 试纸进行检查, 如显酸性, 示有游离的酸或酚类化合物, 剩下的样品乙醇液供下面 (7) (8) 试验用。

(4) **FeCl₃ 反应 (检酚类):**

取样品一滴, 溶于 1ml 乙醇中, 加入 1% 得 FeCl₃ 醇液 1~2 滴, 如显蓝紫或绿色, 示有酚类。

(5) **苯肼试验 (检酮、醛类)**

取 2, 4—二硝苯肼试液 0.5~1ml, 加 1 滴样品的无醛醇溶液, 用力振摇, 如有酮醛化合物, 应析出黄—橙红色沉淀, 如无反应, 可放置 15min 后再观察之。

(6) **荧光素试验法:**

将样品乙醇液滴在滤纸上, 喷洒 0.05% 荧光素水溶液, 然后趁湿将纸片暴露在 5% Br₂/CoI₄ 蒸汽中, 含有双键的萜类 (如挥发油) 呈黄色; 背景很快转变为浅红色。

(7) **香荚醛——浓硫酸试验:**

取挥发油乙醇液一滴于滤纸上, 滴以新配制的 0.5% 香荚醛的浓硫酸乙酸液, 呈黄色、棕色、红色或兰色反应。

五、鞣质类化合物的鉴别

1、检品溶液的制备:

取五倍子 (含可水解鞣质), 儿茶 (含缩合鞣质), 没食子酸 (鞣质水解产生伪鞣质) 少量 (约 0.1 克) 分别置大试管中, 加蒸馏水约 10ml, 加热煮沸, 过滤, 滤液作以下试验:

2、鞣质的一般反应 (鞣质与伪鞣质的区别鉴定)

(1) **感观试验:** 取制备的鞣质和伪鞣质溶液, 尝其味, 并以石蕊试纸检查溶液是否呈酸性反应。

(2) **三氯化铁反应:** 取制备的鞣质溶液 (五倍子溶液或儿茶溶液) 及伪鞣溶液 (食子酸溶液) 各 1~2ml, 分别加入三氯化铁试液, 鞣质产生绿色或兰黑色反应或沉淀; 伪鞣质产生兰色反应。

(3) **沉淀蛋白反应:** 取鞣质溶液及伪鞣质溶液各 1~2ml, 分别入明胶溶液数滴, 鞣质

立刻产生沉淀反应。

(4) 生物碱反应：取鞣质溶液及伪鞣质溶液各 1~2ml，分别滴加 0.1%咖啡碱水溶液，鞣质液产生沉淀反应，伪鞣质不产生沉淀反应。

3、可水解鞣和缩合鞣质的区别鉴定

(1) 鞣红反应：取五倍子浸液（含可水解鞣质），儿茶浸液（含缩合鞣质）各 2ml，分别加盐酸 0.5ml，加热煮沸 30 分钟左右放冷。可水解鞣质不发生沉淀，缩合鞣质有红色沉淀产生。

(2) 三氯化铁反应：取五倍子浸液及儿茶浸液各 1~2ml，分别加入三氯化铁试液数滴，可水解鞣质显兰色或黑兰色反应，缩合鞣质显黑绿色反应。

(3) 溴水反应：取五倍子浸液及儿茶浸液各 1~2ml，分别加入溴水数滴，可水解鞣质不产生沉淀反应，缩合鞣质产生沉淀。

(4) 石灰水反应：取五倍子浸液及儿茶浸液各 1~2ml，分别加入新制石灰水数滴，可水解鞣质显青灰色沉淀，缩合鞣质显棕色沉淀。

(5) 醋酸溶液中与醋酸铅反应：取五倍子浸液及儿茶浸液各 1~2ml，分别加醋酸液数滴，摇匀后再分别滴加醋酸铅溶液数滴，可水解鞣质产生絮状沉淀，缩合鞣质无沉淀产生。

实验二十一 果胶的提取和果冻的制备

果胶广泛存在于水果和蔬菜中，主要存在于细胞壁间隙中，把纤维素、半纤维素结合在一起，成为细胞壁的组成成份。如苹果中含量为 0.7~1.5%(湿品计)，在蔬菜中以南瓜含量最多，是 7—17%。

果胶基本结构是以 α -1, 4 苷键连结的半乳糖醛酸，其中部分羧基被甲酯化，其余的羧基与钾、钠、铵离子结合成盐。

一、实验材料和试剂

桔皮(新鲜) 0.25%HCl, 95%乙醇, 蔗糖、柠檬

二、实验步骤

1、果胶的提取

(1)原料预处理：称取新鲜柑桔皮 40g(干晶为 8g)用清水洗净以后，放入 500ml 烧杯中加 120ml 水，加热至 90℃保持 10min，使酶失活。用水冲洗后切成 3~5mm 大小的颗粒，用 50℃左右的热水平洗，直至水为无色、果皮无异味为止。每次漂洗必须把果皮用尼龙布挤干，再进行下一次漂洗。

(2)酸水解萃取：将预处理过的果皮粒放入烧杯中，加约 0.25%HCl 120ml，以浸没果皮为度，pH 值调整在 2.0~2.5 之间，加热至 90℃，煮 45 分钟，趁热用尼龙布(100 目)或四层纱布过滤。

(3)脱色：在滤液中加入 0.5%的活性炭于 80℃加热 20min 进行脱色和除异味，趁热抽滤，如抽滤困难可加入 2~4%的硅藻土作助滤剂。如柑桔皮漂洗干净，萃取液为清彻透明，则不用脱色。

(4)沉淀：待萃取液冷却后，用稀氨水调节至 pH 为 3~4，在不断搅拌下加入 95% 乙醇，加入乙醇的量约为原体积的 1.3 倍，使酒精浓度达 50~60%可用酒精汁测定，静置 10 分钟。

(5)过滤、洗涤、烘干：用尼龙不过滤，果胶用 95%乙醇洗涤二次，在 60~70℃烘干。

2、柠檬味果冻的制备

(1)将果胶 0.2g(干品)浸泡在 20ml 水中，软化后在搅拌下慢慢加热至果胶全部溶化。

(2)加入柠檬酸 0.1g，柠檬酸钠 0.1g 和蔗糖 20g，在搅拌下加热至沸，继续熬煮 5 分钟，冷却后即成果冻。

实验二十二 明胶的制备及其胶凝性质

明胶是动物胶元蛋白经部分水解所得到的水溶性蛋白质。分子量约为 10,000~70,000 左右，不溶于冷水但能缓慢吸收 5~10 倍重量的冷水而膨胀软化。能溶于热水；，痲云则凝固成富有弹性的凝胶，凝胶热可逆性，加热时溶化，冷却"m 目，是食品工业广泛应用的胶凝剂、增稠剂、稳定剂。

如果明胶水溶液长时间煮沸，发生分解，冷却后不再形成凝胶。明胶溶液受甲醛作用，会变成不溶于水的不可逆凝朧。几乎所有的蛋白酶都能作用于明胶而使其失去胶凝能力。

胶元是动物体的皮、骨和结缔组织中主要蛋白质，也是制备明胶的主要原料：，芑实验选用新鲜猪皮为原料，经石灰乳处理后，再经中和、水洗后于 60~70℃水解熬炼而制取。

一、实验材料和试剂：

猪皮：将新鲜猪皮，刮去皮下脂肪，经清洗后，在 2~49f 的石灰水中浸泡 2~3 天 (pH 值是 12~12.5)，当猪皮发白松软后取出，用水清洗，切成 1cm' 的小块，备用。

1: 1 盐酸溶液、酚酞指示剂、甲醛、过氧化氢 ‘

二、实验步骤：

1、明胶的制备：

取经石灰乳处理过的鲜猪皮 100g，用自来水反复冲洗，每次洗后用酚酞指示剂 1~2 滴滴在猪皮上试验至呈浅红色。水溶液的 PH 值为 8—9 左右，然后用盐酸水溶液反复洗涤，保持洗涤水的 pH 值为 2.5~3，至洗涤液 pH 值基本上保持不变，然后用清水反复洗净酸液。

将猪皮放入烧杯中，加入 150ml 水，加水量以浸没猪皮而超出 1cm 左右为宜，调节 pH 值为 5.5 左右，将烧杯置于恒温水浴中，保持温度在 60、65℃提胶 6 小时，提胶过程中经常搅拌。提胶完毕，趁热用细尼龙布过滤，除去皮渣，所得胶液在减压下蒸发除去水分，蒸馏温度保持在 60~70℃，至胶液量为 60ml 左右，取出剩余胶液加 2~3 滴过氧化氢，倒入瓷盘中，冷却后凝固，用小刀划成小块放入烘箱中，在 50℃左右烘干，即得透明的明胶片。

2、明胶的性质：

(1)在 100ml 烧杯中，加入 5g 明胶，40mL 水，在 60~70℃水浴中加热，观察明胶溶解成均匀的胶体溶液。取出烧杯放入冷水中充分冷却，观察凝胶的形成，将生成的凝胶再放入温水浴中加热，明胶又溶解，冷后重新胶凝，即明胶的可逆性胶凝现象。

然后将明胶溶液溶解进行以下实验。

(2)取明胶溶液四份，各 5ml，分别加水 5mL,10mL,15mL 20mL 稀释，水浴中温热使其溶解均匀，充分冷却，观察是否形成凝胶以及凝胶强度，解释明胶的浓度对凝胶的形成及凝胶硬度的影响。

(3)取明胶溶液 5ml，滴加饱和硫酸铵溶液 1ml，一观察沉淀的产生，然后在水浴中温热，观察沉淀是否溶解，冷却是否再形成凝胶。

(4)取明胶溶液 5ml 加入甲醛溶液 5 滴，冷却使其胶凝，再在温水浴中加热，观察凝胶是否再溶解，解释凝胶的不可逆性。

三、注意事项：

(1)制备明胶前，皮骨等原料必须经过充分的碱浸，一般使用石灰乳浸，其作用是除去脂肪，使胶原蛋白膨胀，松软，有利于水解。延长浸渍时间可提高明胶的收率。石灰水中加入少量 NaOH 可缩短浸渍时间，但会溶解部分胶原蛋白，降低收率。

(2)提胶温度一般在 60~65℃，温度过高，胶原水解过度，分子量变小，影响明胶的胶凝性，温度太低，则提取率太低。增加提胶时间和次数可提高明胶的收率。

实验二十三 橙皮中提取柠檬烯

一、实验目的:

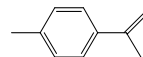
掌握从橙皮中提取柠檬烯

二、实验步骤:

取 2-3 个橙（桔）子的皮[1]剪碎，放入 500ml 三口烧瓶中，加热水 200-250ml，进行水蒸气蒸馏，直到馏出液体达 60ml 左右停止蒸馏。此时可见馏出液上面有一层薄油状物。将馏出液转入分液漏斗中，以 10ml×3 的二氯甲烷萃取，合并萃取液于 50ml 干燥锥形瓶中，加无水硫酸钠 2-3 克干燥。将干燥好的溶液滤入 50ml 的烧瓶中，进行蒸馏（水浴加热蒸去二氯甲烷。见二氯甲烷蒸完时，在接水泵减压蒸去瓶中残余的二氯甲烷，瓶中留下少量橙黄色液体即是橙油[2]。橙油进行气相色谱测定，其中柠檬烯[3]的含量约为 95%。同时可测定折光率和旋光度。

注释:

[1]橙（桔）子皮以新鲜为好、干的也可以但效果较差。



[2]柠檬烯又名苧烯、香芹烯、二聚戊聚、其结构式为

纯柠檬烯是无色液体。沸点： $d_1-176\sim 178\text{ }^\circ\text{C}$ ；比重： $d_1-D4150.8481$ ；折光率： $d-nD201.4701\sim 1.4740$, $d-nD201.4701\sim 1.4706$ ；旋光度： $d-[\alpha]_D+126.6^\circ$, $d-[\alpha]_D-126.3^\circ$ ；它有一种令人愉快的柠檬样香气。可用于软饮料、冰淇淋、糖果、烘烤食品等。

[3]测旋光度时应用 95%乙醇配成 5%橙油溶液进行测定。橙油的量不够时可将几个学生的合一起配置测定液。必要时可取纯样配成溶液对比。

三、思考题:

若将 d-柠檬烯催化加氢（两分子）后产物是什么？还有光学活性吗？为什么？

实验二十四 从红辣椒中分离红色素

一、实验目的

- 1、了解分离天然化合物的技术与方法；
- 2、了解红辣椒所含色素的种类，掌握红色素的分离方法；
- 3、了解薄层色谱板和色谱柱的制作方法，掌握薄层色谱和柱色谱分离的一般步骤。

二、实验原理

色素作为一种着色剂，广泛应用于食品、化妆品等与日常生活密切相关的行业。天然植物色素与人工合成色素相比，因其原料来源充足，对人体无毒副作用，日益受到人们的重视，有着广阔的发展前景。红辣椒是辣椒 *Capsicum annuum* 的成熟果实，含有几种色泽鲜艳的色素，主要为红色素。红辣椒色素以其色泽鲜艳、稳定性好而广泛作为食品着色剂，因此，研究红辣椒色素中红、黄色素的提取、分离和分析方法，将具有重要的现实意义和社会意义。

物质提纯方法主要包括萃取法，色谱分离法和蒸馏法。

萃取法的原理：利用物质在两种互不相溶（或微溶）溶剂中溶解度或分配比的不同来达到分离、提取或纯化目的的一种操作。自固体中萃取化合物，通常是用长期浸出法，靠溶剂长期的浸润溶解而将固体物质中的需要成分浸出来。萃取溶剂的选择，应根据被萃取化合物的溶解度而定，同时要易于和溶质分开，所以最好用低沸点溶剂。每次使用萃取溶剂的体积一般是被萃取液体的 $1/5 \sim 1/3$ ，两者的总体积不应超过分液漏斗总体积的 $2/3$ 。

色谱分离法的原理：根据样品混合物各组分在不同的两相（固定相和流动相）中溶解、解析、吸附、脱附，或其它亲和作用性能的差异，当两相作相对运动时，使各组分在两相中反复多次受到上述各作用力的不同而以不同的速度在固定相上移动，从而得到互相分离。柱色谱（柱上层析）常用的有吸附色谱和分配色谱两类。吸附色谱常用氧化铝和硅胶作固定相；而分配色谱中以硅胶、硅藻土和纤维素作为支持剂，以吸收较大量的液体作固定相，而支持剂本身不起分离作用。吸附柱色谱通常在玻璃管中填入表面积很大经过活化的多孔性或粉状固体吸附剂。当待分离的混合物溶液流过吸附柱时，各种成分同时被吸附在柱的上端。

当洗脱剂流下时，由于不同化合物吸附能力不同，往下洗脱的速度也不同，于是溶质在柱中自上而下按对吸附剂的亲和力大小分别形成若干色带，再用溶剂洗脱时，已经分开的溶质可以从柱上分别洗出并收集。

薄层色谱法简称 TLC，是一种微量、快速、简单的分析分离方法。将吸附剂均匀地涂在玻璃板上作为固定相，经干燥活化后点上样品，以具有适当极性的有机溶剂作为展开剂（即流动相）。当展开剂沿薄层展开时，混合样品中易被固定相吸附的组分（即极性较强的成分）移动较慢，而较难被固定相吸附的组分（即极性较弱的成分）移动较快。经过一定时间的展开后，不同组分彼此分开，形成互相分离的斑点。它不仅适用于少量样品（几到几十微克甚至 0.01 微克）的分离，而且也适用于较大量样品（可达 500 毫克）的纯化。此法对于挥发性较小，或在较高温时易变化而不能用气相色谱法分析的物质特别适用。薄层色谱也可用于鉴别某些有机物。

三、仪器及试剂

仪器：100 ml 圆底烧瓶、薄层色谱板、色谱柱、广口瓶

试剂：二氯甲烷、乙醇等

四、实验步骤

1、粗红色素的制取

称取 3g 红辣椒研碎放入 100ml 的圆底烧瓶中，加入 20ml 二氯甲烷和沸石，加热回流 30 分钟。然后冷却抽滤，滤液用水浴蒸至干，即是粗红色素。

2、粗红色素的薄层层析分析

（1）薄层板的制备：铺板方法有平铺法和倾注法两种，通常使用倾注法。将调好的匀浆等量倾注在两块洗净、晾干的玻璃片上。用食指和拇指拿住玻片两端，前后左右轻轻摇晃，使流动的匀浆均匀地铺在玻璃片上，且表面光洁平整。把铺好的薄板水平放置晾干，再移入烘箱内加热活化，调节烘箱缓缓升温至 110℃ 恒温半小时，取出放在干燥器中冷却备用。

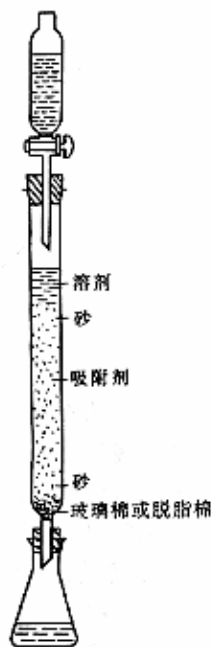
（2）点样：取薄层板，在其一端离边沿 1.0 厘米处用软铅笔轻轻划一点样线。点样时应选

择管口平齐的玻璃毛细管，吸取少量所制得的粗红色素置小锥形瓶中，再加 5~10 滴二氯甲烷配成溶液（也可取上述滤液），以毛细管取溶液点样，轻轻接触薄层板点样处，如一次点样不够，可待样品溶剂挥发后，再点数次，但应控制样品的扩散直径不超过 2 毫米。

（3）展开：薄层色谱需要在密闭的容器中展开（层析缸或广口瓶），将配好的展开剂（石油醚/乙酸乙酯 1：2）倒入层析缸（液层厚度约为 0.5 厘米）。将点好样品的薄层板放入缸内，点样一端在下（注意样品点必须在展开剂液面之上）。盖好缸盖，此时展开剂即沿薄层上升。当展开剂前沿上升到距薄层板顶端 1 厘米左右时，取出薄层板，尽快用铅笔标出前沿位置，然后置通风处晾干，或用吹风筒吹干。

（4）Rf 值的计算：Rf 值也是有机化合物的物理常数。当实验条件严格控制时，每种化合物在选定的固定相和流动相体系中有特定的 Rf 值。因此可利用薄层色谱进行化合物的鉴定。一个化合物在薄层板上升的高度与展开剂上升的高度的比值称为该化合物的 Rf 值：化合物移动的距离/展开剂移动的距离。

3、粗红色素的柱层析分离



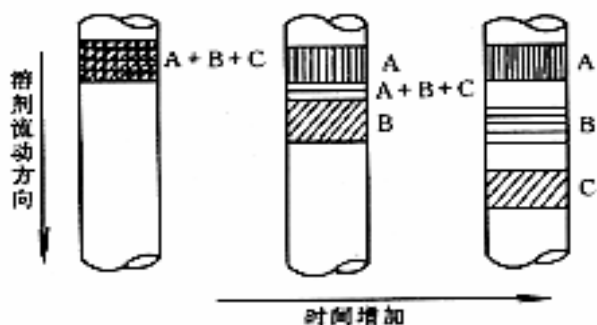
（1）装柱。可以湿柱，也可以干柱。用干法装柱，将 8 克硅胶（100~200 目）装填到以装有 10ml 二氯甲烷的带旋塞的滴管或层析柱中就，排出气泡，添匀添平，再加少许干净的砂粒（约 3min）。然后旋开旋塞放出部分二氯甲烷使其液面降至砂层的上层面。用湿法装柱，将 8 克硅胶用二氯甲烷调成糊状后，徐徐倒入柱中，用橡皮塞轻轻敲打色谱柱下部，使填充紧密，当装柱至 3/4 时，再在上面加一层厚 0.5cm 的石英砂，操作时一直保持上述流速注意不能使液面低于砂子的上层。

（2）加样品。当溶剂液面刚好流至石英砂面时，立即沿柱壁加入 1ml 粗提的辣椒红溶液，当此溶液流至接近石英砂面时，立即用二氯甲烷洗下管壁的有色物质，如此连续 2~3 次，直至洗净为止。上柱子就是样品层比较薄，这样相对的减小了分离的难度。

（3）洗脱。用二氯甲烷淋洗（脱）色素（层析柱中会出现色环）。以二氯甲烷为溶剂洗脱，控制流出速度如前。整个过程都应有洗脱剂覆盖吸附剂。 β 胡萝卜素因极性小首先向下移动，极性较大的叶绿素、叶黄素和辣椒红色素则留在柱的上端，形成不同

的色带。当最先下行的色带快流出时，更换另一接受瓶，继续洗脱，至滴出液近无色为止，再换一接受瓶。收集洗脱液每份 2ml，当红色素洗脱后，可停止淋洗（也可继续淋洗出第二组分黄色素再停）。将含有相同组分的溶液合并蒸至干纯红色素（或黄色素）。

(4) 回收洗脱液。



4、红色素的鉴定

将制得的纯红色素配少量溶液进行薄层析鉴定，如果只有一个点且 R_f 值与前测相同则说明已得到了纯红色素。

五、注意事项

(1) 点样时，样品液的浓度要适宜。浓度太高易引起斑点拖尾，浓度太低则由于体积大引起斑点扩散。点与点之间，相距为 1 厘米左右，斑点大小以直径 2 毫米为宜。

(2) 展开后，取出薄板立即在展开剂前沿划出标记，如不注意，展开剂挥发后，无法确定其上升的高度。也可先划出前沿，待展开剂到达时立即取出。晾干时溶剂仍可扩散一段距离，计算 R_f 值时不计算在内，所以晾干时一定要水平放置，防止出现这种情况。

(3) 薄层吸附色谱展开剂的选择，原则上和吸附柱色谱洗脱剂的选择类似，主要根据样品的极性、溶解度和吸附剂的活性等因素综合考虑。展开剂的极性越大，对化合物的洗脱能力越强， R_f 值也越大。薄层色谱用的展开剂绝大多数是有机溶剂。

(4) 现在的柱子径高比一般在 1: 5~10。无水无氧柱中用的比较多的是用氧化铝作固定相。因为硅胶中有大量的羟基裸露在外，很容易是样品分解，特别是金属有机化合物和含磷化合物，但是比硅胶要贵些。

(5) 柱子下面的活塞一定不要涂润滑剂，会被淋洗剂带到产品中的。

(6) 干法和湿法装柱没什么区别，只要能把柱子装实就行。大多数情况下有些小气泡没太大的影响，柱子更忌讳的是开裂，甬管竖的还是横的，都会影响分离效果，甚至作废！

六、思考题

1、薄层色谱分析中如何选择展开剂？

2、什么是比移值 R_f ？如何计算？

3、装柱时为什么要把硅胶添匀填平？

4、粗红色素提取时，在水浴加热回流实验中为何温度要控制在 50 °C 以下？

5、填充硅胶柱时，为何要在柱子下端塞上脱脂棉？要注意哪些问题？

实验二十五 绿叶中色素的提取与分离

叶绿素存在于果蔬、竹叶等绿色植物中。叶绿素在植物细胞中与蛋白质结合成叶绿体，当细胞死亡后，叶绿素即游离出来，绿叶中的色素包括叶绿素、类胡萝卜素两大类。叶绿素总量比胡萝卜素高四倍，因而叶子在正常情况下呈现绿色。绿叶中这二种色素可采用层析法把它们分离。本实验采用柱层析法将绿叶中色素分离成叶绿素、胡萝卜素和叶黄素等几部分。但要彻底分离，必须采用薄层分析法。

绿叶中色素属于脂溶性色素，溶于丙酮、乙醇、乙醚、氯仿、石油醚等溶剂，因此可以用这些溶剂进行提取。

游离叶绿素很不稳定，对光热均敏感。在稀碱液中可水解为仍有鲜绿色的叶绿酸盐，叶绿醇和甲醇。在酸性条件下卟啉环中的镁离子可被氢离子所取代，生成暗绿色或绿褐色的脱镁叶绿素。

一、实验材料、试剂及仪器；

绿叶蔬菜

玻璃粉：将碎玻璃放在铁研钵中研细后，经 20 网眼筛分出，用浓盐酸去铁处理，然后用氢氧化钠中和酸，最后用蒸馏水洗至中性后，再在烘箱中烘干。

石油醚(30—60℃)、石油醚(60—90℃)、氧化铝(中性 100—1 印目)、无水硫酸钠
丙酮、饱和氯化钠溶液、0.5N 盐酸、0.5N 氢氧化钠、研钵、分液漏斗、蒸发皿、层析管、锥形瓶、漏斗

二、操作步骤：

1、绿叶中色素的提取：

称取均碎的绿叶蔬菜 1—2 克，放在研钵中，加少许玻璃粉研碎，力口 1：1 石油醚—丙酮液 10ml，研磨成糊状，放置沉淀后，用吸管吸取上清液放入分液漏斗中。

向滤液中加入石油醚(30-60℃)10ml，再力口饱和氯化钠溶液 30ml，摇匀分层后，分出盐水层。再用 30ml 饱和食盐水洗涤一次，再分去水层，绿叶色素提取液转移至锥形瓶中加少许无水硫酸钠干燥 15 分钟，将滤液倒入蒸发皿中，在水浴上蒸去溶剂，基本蒸干后，用 2—3ml 石油醚(60—90℃)溶解，即得到绿叶色素浓缩提取液。

2、绿叶色素的柱层析分离：

在洗净的干燥的层析管底部铺一层脱脂棉，在管上放一个漏斗，使氧化铝均匀地经漏斗成一细流慢慢地装入管内，中间不间断，同时轻轻敲打玻璃管，使填装均匀，全部装完后，在装好的氧化铝表面上覆盖一层无水硫酸钠。

吸取提取液注入柱中，在柱长 1 / 4 处见到黄色区带时，用 9: 1 的石油醚—丙酮混合液洗胡萝卜素，类胡萝卜素洗脱下来以后，改用丙酮洗脱叶绿素。洗脱下的叶绿素接于烧杯中。

3、叶绿素的性质：

①与酸作用：取 2—3ml 丙酮提取液加 5 滴稀盐酸，振荡观察现象。

②与碱作用：取 2-3ml 丙酮提取液加 5 滴稀碱液，。振荡观察现象。

三、注意事项：

1、盐水的作用是萃取出可溶于水及丙酮，而不溶于石油醚的物质，加食盐是为了避免石油醚的乳化。

2、层析管的大小和粗细比，一般为 1： 20、30。

3、分离一克样品，需用 A120320、50 克，氧化铝的高度一般为玻璃管高度的 3 / 4。

4、填装的 A120a 必须均匀、致密，不能有裂缝和气泡，否则会影响分离效果。

5、无水 Na 墨 0. 作为干燥剂，同时还可以保持 A120a 层顶部平整，如不平，显层时将产生不规则色带。

实验二十六 食品防腐剂山梨酸和山梨酸钾的测定

一、实验目的

- 1、了解食品防腐剂的种类和用途；
- 2、了解测定食品防腐剂的方法；
- 3、掌握测定山梨酸和山梨酸钾的测定方法；
- 4、掌握 721 分光光度计的使用方法。

二、实验原理

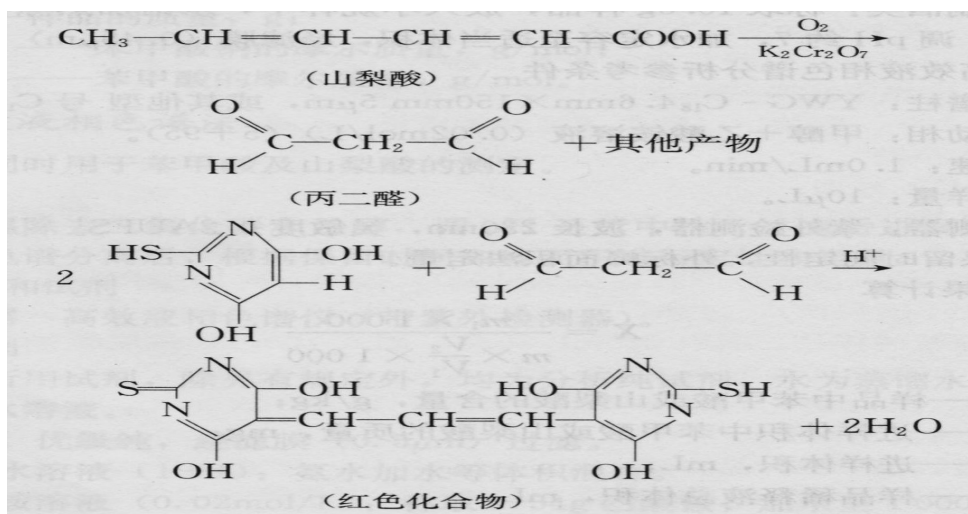
防腐剂是一种能够抑制食品中微生物生长和繁殖的化学物质。如果按照国家规定的数量使用，不仅可以防止食品生霉，而且可以防止食品变质或腐败，并能延长保存时间，同时对食用者也不会引起什么危害。目前，我国允许使用的品种主要有苯甲酸及其钠盐、山梨酸及其钾盐、对羟基苯甲酸乙酯和丙酯、丙酸钠、丙酸钙、脱氢乙酸等。山梨酸是一种直链不饱和脂肪酸，可参与人体内的正常代谢，并被同化而产生 CO_2 和 H_2O ，所以几乎对人体没有毒性。山梨酸与山梨酸钾是目前国际上公认的安全防腐剂，已被很多国家和地区广泛使用。山梨酸及其盐类使用范围：在酱油、醋、果酱类中，最大使用剂量 $1\text{g}/\text{公斤}$ ；对低盐酱菜类、面酱类、蜜饯类等每公斤最多使用 0.5g 。山梨酸为无色、无臭的针状结晶，熔点 134°C ，沸点 228°C 。山梨酸难溶于水，易溶于乙醇、乙醚、氯仿等有机溶剂，在酸性条件下可随水蒸汽蒸馏，化学性质稳定。山梨酸钾易溶于水，难溶于有机溶剂，与酸作用生成山梨酸。

山梨酸及其盐的测定方法主要包括：（1）比色法（硫代巴比妥酸比色法）；（2）紫外分光光度法；（3）薄层层析法；（4）气相色谱法；（5）高压液相色谱法。

该实验采用硫代巴比妥酸比色法。其实验原理为：

样品提取的山梨酸及其盐类，在硫酸及重铬酸钾的氧化作用下产生丙二醛，丙二醛与硫代巴比妥酸作用产生红色化合物，其颜色的深浅与山梨酸含量成正比，并于波长 532nm 处有最大吸收，符合比尔定律，用 721E 分光光度计测定其吸光度，进行定量分析。

反应为：



721E 分光光度计的使用

- 1、接通电源，打开仪器开关，预热 20 分钟。
 - 2、根据所需波长转动波长选择钮。
 - 3、调零(用透光度调零): 将“方式键”(MODE)调至透光度 T 方式，盖好样品室盖，按“100%T”键调 100%透射比，拉半格，按“0%T”键调透射比零，重复两次即可。
 - 4、按“方式键”(MODE)将测试方式设置为吸光度方式，将参比液及测定液分别倒入比色皿 3/4 处，用擦镜纸擦清外壁，捏比色皿毛面，放入样品室内，盖上样品室盖。
 - 5、将参比溶液推入光路中，按“100%T”键调整零 ABS。
 - 6、将被测液推或拉入光路中，显示器上所显示的就是被测样品的吸光度参数。
- 上述操作规程请充分注意，这样仪器可获得满意的测试结果。
- 7.比色完毕，关上电源，取出比色皿洗净，样品室用软布或软纸擦净。

三、实验仪器与试剂

1、仪器

721E 分光光度计、电炉、电热锅、温度计、秒表、分液漏斗、量筒、移液管、25 比色管、烧杯

2、试剂

0.1%NaHCO₃ 溶液、西红柿酱、山梨酸标液(5.00mg/L)、0.5%硫代巴比妥酸溶液、1MHCl、0.15MH₂SO₄、0.5%K₂CrO₇、乙醚

3、溶液的配制

0.5%硫代巴比妥酸溶液：取硫代巴比妥酸 0.5 g，加水 20 ml，1 mol 氢氧化钠溶液 10 ml，搅拌使溶解，再加入 1 mol 盐酸 11 ml，用水稀释至 100 ml，临用前配制。

山梨酸标准溶液：精确称取 105℃干燥至恒重的山梨酸 0.1000g，用 0.1mol 氢氧化钠溶液溶解，移入 1000ml 容量瓶中，并稀释至刻度，摇匀此溶液每毫升相当于山梨酸 0.1mg,临用时精确吸取此溶液 5ml 于 100ml 容量瓶中，并稀释至刻度，混匀，此溶液每升相当于山梨酸 5mg。

四、实验步骤

1、样品处理：

1) 取西红柿酱 5mL 于 125mL 分液漏斗中，加入 1mL1MHCl，摇匀。（目的：酸化得山梨酸，利于萃取，山梨酸钾在乙醚中溶解度小）

2) 每次用 10mL 乙醚萃取，萃取三次(萃取时强力振荡 1min 以上，使醚相和水相充分混合)，合并乙醚相。

3) 醚相加入 10mL 蒸馏水洗涤一次，弃去水层。

（目的：洗去水溶性物质）

4) 醚层每次加入 5mL0.1% NaHCO₃ 萃取，萃取两次（萃取时强力振荡 1min 以上）

（目的：加 NaHCO₃ 溶液得山梨酸盐，山梨酸盐易溶于水，难溶于有机溶剂，由醚相转移到水相）

5) 水层放入 25mL 比色管中，于 40~50℃水浴保温 2~3min（除乙醚），取出冷却至室温，稀释至 25mL。

2、测定：取 5mL 试样提取液于 25mL 比色管内，加 1mL0.5%K₂CrO₇ 溶液和 0.15MH₂SO₄2.5mL 混匀，置沸水中准确加热 5min（秒表计时），再加 0.5%硫代巴比妥酸溶液 2 mL，摇匀，再置沸水中准确加热 10min（秒表计时），冷却，加水至 25ml 刻度线，混

匀，用 1 cm 比色皿于波长 532nm 处测定吸光度。(平行做三组)

3、标准曲线的制作：取 6 支 25mL 比色管，分别加入 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 山梨酸标液(5.00mg/L)后，分别加入 0.5%K₂CrO₇mL 和 0.15MH₂SO₄2.5mL(同 2 操作)，以山梨酸浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，制标准曲线。

4、利用标准曲线，计算出西红柿酱中 SA 的含量。

五、数据处理

1、结果记录

1) 标液

编 号	1	2	3	4	5	6
浓度 (mg/L)						
吸光度						

2) 样品

编 号	1	2	3
吸光度 A			
吸光度平均值			

2、绘制工作曲线

3、计算 SA 含量

六、注意事项

1、样品用乙醚萃取时应大力振荡，使醚相与水相充分混合，使之萃取完全

2、反应为平行实验，应保持相同的条件如：加热的时间、温度，比色皿的厚度。

- 3、测定试样时，一定要在沸水中加热，且比色管管口敞开，不要朝向人。
- 4、乙醚要回收。

七、思考题

- 1、简述测定食品防腐剂山梨酸的测定原理？
- 2、样品处理时，用 0.1% NaHCO_3 的作用？
- 3、测定过程中为什么同时加 0.5% K_2CrO_7 溶液和 0.15M H_2SO_4 ？
- 4、实验中三次加热的目的？
- 5、食品中山梨酸及其盐类使用范围？

实验二十七 水中溶解氧的测定——碘量法

一、实验目的

- 1、了解并掌握测定水中含氧量的方法；
- 2、重新熟悉滴定实验的操作步骤。

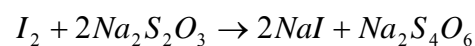
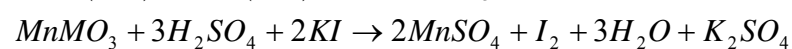
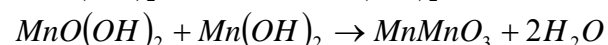
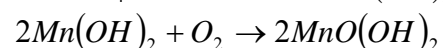
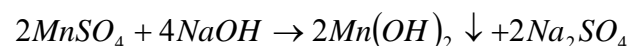
二、实验原理

碘量法测定溶解氧的依据是利用氧的氧化性。在碱性环境中将低价锰氧化成高价锰。生成四价锰的氢氧化物沉淀，加碘后，氢氧化物沉淀溶解并与碘离子反应释出游离碘，以淀粉作指示剂，用硫代硫酸钠标准溶液滴定释出的碘，可计算溶解氧的含量。

碘量法是测定水中溶解氧的基准方法。在没有干扰的情况下，此方法适用于各种溶解氧浓度大于 0.2mg/L 和小于氧的饱和浓度两倍(约 20mg/L)的水样。

水中溶解氧的含量与大气压力、水温及含盐量等因素有关。大气压力下降、水温升高、含盐量增加，都会导致溶解氧含量降低。

反应按下列各式进行：



三、试剂和仪器

试剂：

硫酸锰、氢氧化钠、碘化钾、可溶性淀粉、硫酸、重铬酸钾、盐酸、硫代硫酸钠、高锰酸钾、草酸钾

仪器： 碘量瓶、滴定管、移液管、水桶

四、实验步骤

1、取样：自来水取样，将橡皮管一端接水龙头，另一端插入碘量瓶底，待样品装满，并溢出几分钟后，取出橡皮管，迅速塞紧瓶塞，瓶内不得留有气泡。

（注：车速不能太快，避免空气中的氧进入。）

2、测定：取下碘量瓶塞，将移液管紧靠瓶口内壁，插入样品液面以下约 0.5 厘米，精确加入浓硫酸 0.7ml，高锰酸钾溶液 1ml，立即塞紧瓶塞（瓶中不得留有气泡）反复颠倒测定瓶，充分混合均匀，静置 5 分钟红色不消失（如红色消失，应再补加高锰酸钾溶液 0.5ml。在静置 5 分钟）为止。用刻度吸量管同上法，精确加入草酸钾溶液 1ml，充分混合，待红色消失后，同上法加入硫酸锰溶液 1ml，碱性碘化钾溶液 3ml，紧塞瓶塞，反复颠倒测定瓶，充分混合均匀，静置五分钟，待沉淀沉降到瓶底，同上法加入硫酸 1ml，紧塞瓶塞，反复颠倒充分混合均匀。静置 5 分钟。精确移取溶液 100ml，于 250ml 锥形瓶中，以 0.01M 硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色，加 0.5%淀粉溶液 2ml，继续滴定至蓝色恰好消失。

3、按下式计算溶解氧含量

$$\text{溶解氧 (mg/l)} = \frac{V_1 \times M \times 8 \times 1000}{V}$$

式中 V_1 ——滴定消耗留待硫酸钠的体积，ml

M ——硫代硫酸钠标准溶液的摩尔浓度

V ——样品溶液的体积，ml

五、注意事项

1、如果样品是一般未受还原性杂质污染的水，则可略去处理杂质的过程。而直接加入硫酸锰及碱性碘化钾溶液。

2、由于加入试剂，样品会由测定瓶中溢出，但由于损失的量很小，在一般工业分析中，可以不必进行样品体积的校正。

3、如果是受污染的地面水或工业废水，必须采用修正的碘量法，小样中含有亚硝酸盐，可

加入萱氮化钠，是水中亚硝酸盐分解而消除干扰，在不含其他氧化还原性物质，水样中含有 Fe^{3+} 达 100-200mg 可加 140% 氟化钾溶液消除 Fe^{3+} 的干扰，也可以用磷酸代替硫酸酸化后测定。

六、思考题

- 1、简述用碘量法测定自来水中溶解氧反应中的取水过程。
- 2、用碘量法测水中溶解氧时，可测的使用范围是多少？
- 3、在滴定过程中，如果加入淀粉过早，会有什么影响？
- 4、取水样时，瓶内为什么不能含有气泡？
- 5、加硫酸时为什么要插入液面以下？
- 6、当碘析出时为什么把溶解氧的瓶放置暗处 5 分钟？

实验二十八 水样中化学耗氧量

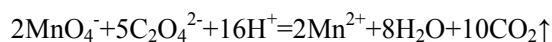
水中化学耗氧量的大小是水质污染程度的主要指标之一。因水中含有无机还原性物质（如 NO_2^- 、 S^{2-} 、 Fe^{2+} 等）外，还可能含有少量有机物质。如有机腐烂促使水中微生物繁殖，则污染水质影响人体健康。如果工业用此水也不利，因为 COD 量高的水常呈现黄色，并有明显的酸性，对蒸汽锅炉有侵蚀作用，所以水中 COD 量的测定是很重要的。

化学耗氧量的测定，目前多采用 KMnO_4 和 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 二种方法。 KMnO_4 法适合测定地面水、河水等污染不十分严重的水质，此方法简单、快速。 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 法适合于测定污染较严重的水。而 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 法氧化率高，重现性好。

酸性 KMnO_4 法

一、原理：

在酸性溶液中，加入过量的 KMnO_4 溶液，加热使水中有机物充分与之作用后，加入过量的 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 使与 KMnO_4 充分作用。剩余的 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 再用 KMnO_4 溶液返滴定，反应式如下：



水样中若含 Cl^- 量大于 300 mg/L，将使测定结果偏高，可加纯水适当稀释，消除干扰。或加入 Ag_2SO_4 ，使 Cl^- 生成沉淀。通常加入 Ag_2SO_4 1g，可消除 200 mg Cl^- 的干扰。水样中如有 Fe^{2+} 、 H_2S 、 NO_2^- 等还原性物质干扰测定，但它们在室温条件下，就能被 KMnO_4 氧化，因此水样在室温条件下先用 KMnO_4 溶液滴定。除去干扰离子，此 MnO_4^- 的量不应记数。水中耗氧量主要指有机物质所消耗的 MnO_4^- 的量。

取水样后应立即进行分析，如有特殊情况要放置时，可加入少量硫酸铜以抑制生物对有机物的分解。必要时，应取与水样同量的蒸馏水，测定空白值，加以校正。

水中耗氧量的计算如下：

$$\text{COD}(\text{O}_2 \text{ mg/L}) = \frac{8 \times 1000}{V_{\text{样}}} (5MV_{\text{KMnO}_4} - 2MV_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4})$$

二、试剂

- 1、KMnO₄ 溶液 0.002 mol/L
- 2、Na₂C₂O₄ 溶液 0.005 mol/L
- 3、Ag₂SO₄ 固体
- 4、CuSO₄ 固体
- 5、硫酸(1：3)

三、分析步骤

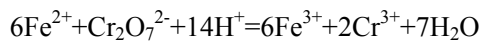
取 100 mL 水样于 250 mL 锥形瓶中，加 5 mLH₂SO₄ (1：3)，并准确加入 10 mL 0.002 mol/L KMnO₄ 溶液，立即加热至沸。煮沸 5 min 溶液应为浅红色。趁热立即用吸管加入 0.005000 mol/L Na₂C₂O₄ 标准溶液 10 mL。溶液应无色。用 0.002 mol/L KMnO₄ 标准溶液滴定由无色变为淡红色为终点。

另取蒸馏水 100 mL，同上述操作，求空白试验值。

重铬酸钾法

一、原理：

在酸性溶液中，加入一定量的 K₂Cr₂O₇，煮沸并回流。水样中的还原性物质被氧化。消耗一定量的氧化剂。剩余的氧化剂用硫酸亚铁铵标准溶液滴定，根据加入的 K₂Cr₂O₇ 及消耗硫酸亚铁铵的量，可求出水样中的耗氧量，反应式如下：



如水样中存在大量的 Cl⁻，则干扰测定，可加入 HgSO₄ 使与 Cl⁻ 生成 HgCl₂ 络合物，从而抑制 Cl⁻ 的干扰。氧化率与加热的时间有关，加热 1.0~1.5 小时，氧化率几乎是一致的。如污染严重，可加入 Ag₂SO₄ 促进氧化，时间也可长一点。如污染不十分严重，加热时间缩短至半小时。

二、仪器和试剂

- 1、磨口回流冷凝器的圆底烧瓶或三角瓶。
- 2、H₂SO₄
- 3、邻菲咯啉-亚铁溶液：称取邻菲咯啉 C₁₂H₈N₂•H₂O 1.8 g 和硫酸亚铁 FeSO₄•7H₂O 0.70 g 溶于 100 mL 水中。

4、重铬酸钾标准溶液 $1/6 \times 0.02500 \text{ mol/L}$: 准确称取 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1.2210 g 溶于水中, 定量转入 1000 mL 容量瓶中, 加入水稀至刻度、摇匀。

5、硫酸亚铁铵溶液: $0.025 \text{ mol/L FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 9.8 g 溶于 500 mL 水中, 加浓 H_2SO_4 4 mL, 加水稀释至 1 L, 摇匀。按下述方法标定: 用移液管准确移取 $1/6 \times 0.02500 \text{ mol/L K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液 25.00 mL 于 500 mL 锥形瓶中, 加水稀至 250 mL。待冷却后, 滴加邻菲咯啉-亚铁液指示剂 2~3 滴, 用待标定的硫酸亚铁铵溶液滴定, 当溶液由深绿色变为深红色即为终点。

6、硫酸汞 HgSO_4

7、硫酸银 Ag_2SO_4

三、分析步骤

- 1、移取适量水样于 300 mL 圆底烧瓶或三角烧瓶中, 加水使其总量为 50 mL。
- 2、加 HgSO_4 0.4 g, 加入浓 H_2SO_4 5 mL, 充分摇匀。
- 3、用移液管准确加入 $1/6 \times 0.02500 \text{ mol/L K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 标准溶液 25 mL, 再加 H_2SO_4 70 mL, 摇匀。
- 4、加入 Ag_2SO_4 1g, 充分摇动后, 加入几颗沸石防止暴沸。
- 5、将带有磨口的回流冷凝器装于烧瓶之上, 加热煮沸 1.5 小时。
- 6、待烧瓶冷却后, 用约 25 mL 水洗涤冷凝器, 然后取下冷凝器, 将烧瓶中溶液转移于 500 mL 三角瓶中, 用水洗涤烧瓶几次。
- 7、加水稀释至约 350 mL, 加邻菲咯啉-亚铁指示剂 2~3 滴, 过剩的 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 用硫酸亚铁铵标准溶液返滴定。溶液由深绿色变为深红色即为终点。
- 8、用 50 mL 蒸馏水代替水样, 同上操作, 求空白试验的返滴定值。

实验二十九 水中微量挥发酚的测定

一、原理:

酚类是单环和稠环芳烃的单元、二元或多元的羟基衍生物。其中，单元酚类毒性较多元酚高，且能随水蒸气一起挥发而和其它酚类化合物分离。因此通常称之为挥发酚，本实验采用比色法测定。

4-氨基安替比林法简称 4-AAP 法。酚类化合物与 4-APP 在碱性溶液中，用铁氰化钾作氧化剂，产生红色的安替比林染料。

其色度在水中能稳定 30 min，若用氯仿萃取，可使颜色稳定 4 小时，并能提高测定的灵敏度。在对位有取代基的酚类不能和 4-APP 起显色反应，在邻位或间位有取代基的酚类和 4-APP 的显色反应也不完全。

该法的一般测定浓度为 0.05~2 mg/L。如果分析的水样体积为 500 mL 时，经氯仿萃取后，最低浓度可达 0.001~0.002 mg/L。

二、仪器和试剂:

- 1、挥发酚蒸馏装置
- 2、721 型分光光度计
- 3、无酚蒸馏水：将一般蒸馏水通过活性炭柱，以除去蒸馏水中痕量的酚类及其它有机化合物。
- 4、10%硫酸铜溶液
- 5、1:3 硫酸
- 6、甲基橙指示剂溶液
- 7、氨性氯化铵缓冲溶液 PH=9.8，称取 20 g 氯化铵 (NH_4Cl) 溶于 100 mL 浓氨水中，贮存于橡皮塞瓶中，并保存在冰箱中。
- 8、8%铁氰化钾溶液，称取分析纯铁氰化钾 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 溶于无酚蒸馏水中，最后稀释至 100 mL，贮藏于棕色瓶中，一周内有效。
- 9、2%4-氨基安替比林溶液：称取 2 g 分析纯 4-氨基安替比林 ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ON}_2$) 溶于无酚蒸馏水中，稀释至 100 mL，浑浊时用滤纸过滤使用，溶液必须临用时配制。
- 10、氯仿（分析纯）

11、标准酚的贮备液

酚的精制：将苯酚于温水中溶化，小心倒入蒸馏瓶中，在蒸馏瓶口塞以包有锡纸的橡皮塞，塞中插有一支 250°C 水银温度计，分馏支管连接一根空气冷凝器，用干燥的 25 mL 锥形烧瓶作为受器，用冷水冷却受器。

在通风橱中加热蒸馏。将开始蒸出的带色馏出液弃去，收集 182~184°C 的馏出液。密塞、暗处贮存。

称取 1.00 g 经精制后苯酚，用无酚蒸馏水溶解，转移至 1 升褐色容量瓶中，用无酚蒸馏水稀释至刻度，此溶液 1mL 相当于 1 mg 苯酚。

11、标准酚的工作溶液：标准酚工作溶液可以将酚贮备液适当稀释配制而成。

三、测定步骤

1、水样的预处理

(1) 取 500 mL (或 250 mL) 水样，置于 1000 mL (或 500 mL) 克氏烧瓶中，以甲基橙为指示剂。用 1:3 硫酸调节 pH 值约为 4.0，加入 5 mL 硫酸铜溶液，在电炉上加热蒸馏。

(2) 待蒸出约 450 mL (或 200 mL) 馏出液后，停止加热至不再沸腾后再加入 50 mL 无酚蒸馏水，继续蒸馏，直至馏出液总体积接近 500 mL (或 250 mL 为止)。

(3) 将全部馏出液转移至 1000 mL (或 500~250 mL) 容量瓶中，用无酚蒸馏水稀释至刻度线，摇匀。

2、直接比色测定法

(1) 标准曲线的制作

① 在 100 mL 容量瓶中，各移入标准酚的工作溶液 (1.0 mL 相当于 0.01 mg 酚)，0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、15.0 mL

② 补加无酚蒸馏水至总体积约为 90 mL，然后依次加入 0.5 mL 氨性缓冲溶液，1 mL 2%4-APP 溶液和 1 mL 8%铁氰化钾溶液，最后补加蒸馏水至刻度线，迅速振摇以均匀混合，静置 15 min 发色。

③ 用 3 cm 比色皿在 510 nm 测定光密度，绘出标准曲线。

(2) 水样的测定

① 按水样预处理的步骤，得到蒸馏液，从中取出适量水样，置于 100 mL 容量瓶中，补加蒸馏水至总体积 90 mL 左右。

② 依次加入 0.5 mL 氨性缓冲溶液，1 mL 2% 的 4-APP 溶液，1 mL 8% 铁氰化钾溶液，补加蒸馏水至刻线，迅速混合摇匀放置 15 min 发色。

③ 用 3 cm 比色皿在 510 nm 处测出其光密度。

(3) 计算

$$\text{酚含量, 毫克/升} = \frac{av_2 \times 1000}{V \times V_1}$$

式中：a—相当于水样光密度的酚含量，mg；

V—取水样体积，mL；

V₁—比色时所取溶液体积，mL；

V₂—接受馏出溶液容量瓶的体积，mL。

实验三十 合成氨原料气全分析——吸收容量法

一、原理:

利用气体的化学特性,使总体混合物和特定试剂接触,则混合总体中的待测组分和试剂由于发生化学反应而被定量吸收,其它组分则不发生反应,在吸收前、后条件一致的情况下,根据吸收前、后的体积之差,计算某组分的含量,对于性质比较稳定,与一般化学试剂较难发生化学反应但可燃烧的气体,则可根据燃烧前后的体积缩减和定量的反应关系求出其含量。

二、仪器及试剂

- 1、QF-100 型奥氏气体分析仪
- 2、33%KOH 溶液: 1 份重量的 KOH 溶解于 2 份重量水中。
- 3、焦性没食子酸溶液: 5 g 焦性没食子酸溶解于 15 mL 水中。40 g KOH 溶解于 32 mL 水中。临用将两种溶液混合,装入吸收瓶中。
- 4、氯化亚铜铵性溶液: 250 g 氯化铵溶解于 750 mL 水中,加 200 g 氯化亚铜,溶解后,迅速转移于预先装有铜丝的试剂瓶中几乎充满。用橡皮塞塞紧(溶液应无色)。临用时,用溶液体积二倍的、比重 0.9 的氨水稀释。
- 5、硫酸银的硫酸溶液: 4 g 硫酸银溶解于 65 mL 水中,在不断搅拌下,缓缓加入浓硫酸 400 mL。
- 6、封闭液: 5% H_2SO_4 中加入 Na_2SO_4 或 $NaCl$ 配成饱和溶液,加甲基橙指示剂数滴至微红色。

三、分析步骤

(一) 准备工作

1、将洗涤清洁干燥的气体分析仪部件按图 4-1 安装好。旋塞涂好凡士林油。将吸收液及封闭液分别注入吸收瓶,量气管及燃烧瓶中。对于煤气或半水煤气的分析,吸收瓶 1 中注入 KOH 溶液,瓶 2 注入硫酸溶液,瓶 3 注入焦性没食子酸钾的碱性溶液,瓶 4 及瓶 5 中注入氯化亚铜的氨性溶液。吸收液的注入量,应稍大于吸收瓶总容积的 1/2。向吸收瓶的承受部分中,注入 5~8 毫升液体石蜡,以隔绝空气,量气管的水套中注入水,同时罩好爆炸球外的金属网安全罩,以防发生意外。

2、检查气密性: 旋转旋塞 5 及 6,使量气管通大气,提高水准瓶,排除量气管内的空

气，直至管内封闭液的液面升至顶端标线，关闭旋塞 6，旋开旋塞 7，降低水准瓶。吸出爆炸管 6 内的空气，直至爆炸管内封闭液面升至顶端标线。再旋开旋塞 6，关闭旋塞 7，提高水准瓶，排除量气管内的空气，关闭旋塞 6。用同样方法排除吸收管 1—5 中的空气，最后使封闭液升至量气管顶端标线，关闭旋塞 6，置水准瓶于仪器底板上，如果这时量气管内的液面只是稍微下降后即保持稳定，表明仪器不漏气。反之，如果液面下降，表明仪器漏气，应检查排除。在仪器完好的情况下，一般漏气事故往往是由于旋塞橡皮管连接处不严密所致。

(二) 取样

调整量气管、爆炸管、吸收瓶内的液面恰好在顶端标线处。将气体导入管接取样器（球胆）。转动旋塞 5，使量气管接取样器，降低水准瓶，让气体（样品气）进入量气管约 20 毫升。转动旋塞 6，使量气管接梳形管，旋开旋塞 6，提高水准瓶，排气体于大气，用同样的方法吸入样品气，再排入大气 2 至 3 次，则可以完成气体置换。

关闭旋塞 6，转动旋塞 5，再使量气管接取样器，降低水准瓶，将样品气吸入量气管中至封闭液面降至“100”刻度以下约 5 毫升处。

转动旋塞 5，使量气管通梳形管，旋开旋塞 6，移水准瓶和量气管并列，并使水准瓶内液面和量气管内液面在同一水平面，小心缓缓提高水准瓶，排除多余气体。使量气管内液面恰好在“100”刻度处，即为样品气的体积。关闭旋塞 6，测定恒温水套及大气压力。

(三) 吸收

旋开吸收瓶 1 的旋塞 8，提高水准瓶，排样品气入 KOH 溶液吸收 CO_2 ，将量气管内的封闭液升至标线时，关闭旋塞 8。

移水准瓶和量气管并列，上下移动 2 至 3 次后，使液面在同一水平，等 1 min，读取量气管刻度。

按上述操作，依次吸收不饱和烃和 CO，吸收完 CO，将气体送入硫酸银的硫酸溶液吸收瓶 2 中，反复 2~3 次除去氨气后，再读取量气管读数。

(四) 爆炸

旋开旋塞 9，缓升水准瓶，排气体入吸收瓶 2 贮存，至量气管中准确残留气体恰为 25.0 毫升时关闭旋塞 9，转动旋塞 5，使量气管旋塞 5 背面的硅胶、碱石灰干燥管（图中未绘出）通大气。缓缓降低水准瓶，吸入干燥并除去 CO_2 的空气 75.0 毫升（总体积 100 毫升），转动旋塞 5，使量气管接梳形管，旋开旋塞 7，提升水准瓶，排混合气体入爆炸瓶，至量气管内

液面升至顶端标线，关闭旋塞 7。

掀动点火器开火，则铂丝间隙产生火花，混合气体爆炸燃烧，待瓶内水面停止振荡，旋开旋塞 7，降低水准瓶，将引爆燃烧后的气体抽回量气管，至爆炸瓶内封闭液面升至顶端标线。关闭旋塞 7，测量剩余气体体积，然后把气体再送入吸收瓶 1 中，吸收生成的 CO_2 ，再测量残余气体体积。

(五) 计算

设取样 100 毫升，则各组分的百分含量

$$(1) \text{CO}_2\% = \frac{100 - V_1}{100} \times 100\%$$

式中 V_1 为用 KOH 溶液吸收后的读数 mL。

$$(2) \text{CnHm}\% = \frac{V_1 - V_2}{100} \times 100\%$$

式中 V_2 为用硫酸银硫酸溶液吸收后的读数 mL

$$(3) \text{O}_2\% = \frac{V_2 - V_3}{100} \times 100\%$$

式中 V_3 为用焦性没食子酸钾吸收后的读数 mL

$$(4) \text{O}\% = \frac{V_3 - V_4}{100} \times 100\%$$

式中 V_4 为用氯化亚铜氨性溶液吸收后的读数 mL

(5) CH_4 和 H_2 含量

① CH_4 含量：应考虑是由吸收余气中 25.0 mL。加空气燃烧后生成的 CO_2 的体积计算。

$$(1) \text{CH}_4\% = \frac{V_{\text{CO}_2}^0 \times \frac{V_4}{V_5}}{100} \times 100\%$$

式中 V_5 为爆炸时所取残余气体体积 (25.0mL)

$V_{\text{CO}_2}^0$ 为爆炸后用 KOH 吸收得出的 CO_2 体积 (mL)

② H_2 含量，首先考虑体积缩减。

$$H\% = \frac{(V_{\text{缩}} - 2V_{\text{CO}_2}^0) \times 2/3 \times V_4 / V_5}{100} \times 100\%$$

式中 $V_{\text{缩}}$ 为爆炸后缩减体积 (mL)

四、注意事项:

- 1、升降水准瓶时，要注视上升液面，绝对防止吸收液或封闭液进入梳形管中。
- 2、转动旋塞不得用力过猛，以防折断玻璃管。
- 3、爆炸前应根据气体中 H_2 及 CH_4 的大致含量确定送去爆炸残气体积和添加的空气量。
- 4、爆炸燃烧时，如果不产生火花，可能是由于铂丝上沾有油污，应清洗。也可能是由于铂丝间隙不合要求或电路不通，应检查调整。
- 5、仪器暂停使用，应经常转动碱性吸收液的吸收管旋塞，以免被碱腐蚀而粘连。

实验三十一 硅酸盐水泥中 SiO_2 、 Fe_2O_3 、 Al_2O_3 、 CaO 、 MgO 的测定

一、原理:

水泥主要由硅酸盐组成,按我国规定,分成硅酸盐水泥(纯熟料水泥)、矿渣硅酸盐水泥(矿渣水泥)、火山灰质硅酸盐水泥(火山灰水泥),粉煤灰硅酸盐水泥(煤灰水泥)五种。水泥熟料是由水泥生料经 1400°C 以上高温煅烧而成。硅酸盐水泥由熟料加入适量石膏,其成分均与水泥熟料相似,可按水泥熟料化学分析法进行。

水泥熟料,未掺混合材料的硅酸盐水泥,碱性矿渣水泥,可采用酸分解法。不溶性含量较高的水泥熟料、酸性矿渣水泥,火山灰质水泥等酸性氧化物较高的物质,可采用碱熔融法。本实验采用硅酸盐水泥,一般较易为酸所分解。

SiO_2 的测定,可分成容量法和重量法。重量法又因使硅酸盐凝聚所用的物质的不同分为盐酸干涸法、动物胶法、 NH_4Cl 法等。本实验用 NH_4Cl 法,将试样与 7~8 倍固体 NH_4Cl 混匀后,再加入 HCl 分解试样。经沉淀分离、过滤、洗涤后的 SiO_2 在瓷坩锅中 950°C 灼烧恒重。经 HF 处理后,测定结果与标准法结果误差小于 0.1%,生产上 SiO_2 的快速分析常采用氟硅酸钾容量法。

如不需测定 SiO_2 ,则试样用 HCl 分解后,用氨水沉淀法使 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 分离。沉淀用 HCl 溶解。调节溶液的 pH 值为 2~2.5,以磺基水杨酸作指示剂。用 EDTA 滴定 Fe^{3+} ; 然后加入一定量过量的 EDTA,煮沸,待 Al^{3+} 与 EDTA 完全络合后,再调节溶液的 $\text{pH}\approx 4.2$,以 PAN 作指示剂, CuSO_4 标准溶液滴定过量的 EDTA,从而分别测得 Fe_2O_3 和 Al_2O_3 的含量。但在样品中如果含有 Ti, CuSO_4 回滴法所测实际上是 Al、Ti 含量。若要测定 TiO_2 含量,可加入苦杏仁酸解蔽剂,从 TiY 中夺出 Ti^{4+} ,再用标准 CuSO_4 滴定释放的 EDTA。

滤液中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 按常法在 $\text{pH}=10$ 时用 EDTA 滴定,测得 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量; 再在 $\text{pH}=12$ 时,用 EDTA 滴定,测得 CaO 的含量,用差减法计算 MgO 的含量。生产上通常未经上述沉淀分离,加入三乙醇胺、氟化钾等作掩蔽剂,直接用 EDTA 进行滴定。

二、试剂:

- 1、甲基红 0.2%: 60% 的乙醇溶液或其钠盐的水溶液。
- 2、磺基水杨酸钠指示剂 10%: 10 g 磺基水杨酸钠溶于 100 mL 水中。

- 3、PAN 指示剂 0.3%：0.3 g PAN 溶于 100 mL 乙醇中。
- 4、HAC-NaAC 缓冲溶液 (pH≈4.2)，把 32 g 无水 NaAC 溶于水中，加入 50 mL 冰醋酸，用水稀释至 1L。
- 5、EDTA 标准溶液 0.025 mol/L
配制：称取 10 g EDTA 溶于温水中，用稀释至 1 L。
标定：准确称取 0.35~0.40 g CaCO₃ 放入 250 毫升烧杯中，用少量水润湿，盖上表面皿，慢慢加入 1 : 1 HCl 溶液 10~20 mL，加热溶解，将溶液转入 250 毫升容量瓶中，用水稀释至刻度。摇匀。移取 25.00 mL 于锥形瓶中，加入 20 mL pH≈10 的氨性缓冲溶液，2~3 滴 K-B 指示剂，用 0.025 mol/L EDTA 溶液滴定至溶液由紫红色变为兰绿色即为终点。
- 6、CuSO₄ 标准溶液 0.025 mol/L
配制：称 6.24 g CuSO₄ · 5H₂O 溶于水中，加 4~5 滴 1 : 1 H₂SO₄，用水稀释至 1 L。
体积比的测定：准确移取 10.00 mL 0.025 mol/L EDTA，加水稀释至 150 mL 左右，加 10 mL pH≈4.2 的 HAC-NaAC 缓冲溶液，加热至 80~90°C，加入 PAN 指示剂 4~6 滴，用 CuSO₄ 溶液滴定至红色不变即为终点。计算 1 mL CuSO₄ 溶液相当于 0.025 mol/L EDTA 标准溶液的毫升数。
- 7、K-B 指示剂，称取 0.2 g 酸性铬兰 K，0.4 g 萘酚绿 B 于烧杯中，加水溶解后，稀释至 100 mL。也可采用如下方法配制，将 1 g 酸性铬兰 K，2 g 萘酚绿 B 和 40 g KCl 研细混匀，装入小广口瓶中，置于干燥器中备用。注意试剂质量常有变化，故应根据具体情况确定最适宜的指示剂比例。
- 8、三乙醇胺 1 : 2
- 9、HCl 溶液 1 : 1
- 10、NaOH 溶液 20%
- 11、CaCO₃：将基准 CaCO₃ 置于 120°C 烘箱中，干燥 2 小时，稍冷后，置于干燥器中冷却至室温，备用。

三、分析步骤

1、SiO₂ 的测定：

准确称取 0.4 g 试样，置于干燥的 50 mL 烧杯中，加入 2.5~3 g 固体 NH₄Cl，用玻璃棒混匀，滴加浓 HCl 至试样全部润湿（一般约 2 mL），并滴定浓 HNO₃ 2~3 滴，搅匀。小心

压碎块状物，盖上表面皿，置于沸水浴上，加热 10 min，加热水约 40 mL，搅动，以溶解可溶性盐类，过滤。用热水洗涤烧杯和滤纸，直到滤液中无 Cl^- 为止（以 AgNO_3 检查）弃去滤液。

将沉淀连同滤纸放入已恒重的瓷坩锅中，低温炭化并灰化后，于 950°C 约烧 30 min。取下，置于干燥器中冷却至室温，称重。再灼烧冷至室温，再称重，直至恒温。计算试样中 SiO_2 的含量。

2、 Fe_2O_3 、 Al_2O_3 、 CaO 、 MgO 的测定：

准确称取 0.25 g 试样置于 250 mL 烧杯中，加少许水润湿，加 15 mL 1 : 1 HCl 和 3~5 滴浓 HNO_3 ，加热煮沸。待试样分解完全后，用水稀释至 150 mL 左右。加热至沸，取下。加 2 滴甲基红指示剂，在搅拌下慢慢滴加 1 : 1 氨水至溶液呈黄色，并略有氨味后，再加热煮沸，取下。待溶液澄清后，趁热用快速滤纸过滤，沉淀用 1% NH_4NO_3 热溶液充分洗涤，至流出液中无 Cl^- 为止。滤液盛于 250 mL 容量瓶中，冷至室温，用水稀释至刻度，供测定 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 用。

① Fe_2O_3 的测定：滴加 1 : 1 HCl 于滤纸上，使氢氧化物沉淀溶解于原烧杯中，滤纸用热水洗涤数次后弃去。将溶液煮沸以溶解可能存在的氢氧化物沉淀。冷却、滴加 1 : 1 氨水至溶液的 pH 值为 2~2.5（用 pH 试纸检验），加热至 $50\sim 60^\circ\text{C}$ ，加 10 滴磺基水杨酸指示剂，用 EDTA 标准溶液滴定至溶液由紫红色变为淡黄色为终点。记下 EDTA 用量，计算试样中 Fe_2O_3 的含量，测 Fe 后的溶液供测 Al 用。

② Al_2O_3 的测定：在滴定 Fe^{3+} 后的溶液中，准确加入 20.00 mL EDTA 标准溶液，滴加 1 : 1 氨水至溶液 pH 值约为 4，加入 10 mL HAC-NaAC 缓冲溶液，煮沸 1 min，取下稍冷。加 6~8 滴 PAN 指示剂，用 CuSO_4 标准溶液滴定至溶液显红色即为终点。记下 CuSO_4 溶液的用量，计算试样中 Al_2O_3 的含量。

③ CaO 、 MgO 含量的测定：移取 25 mL 或 50 mL 分离氢氧化物沉淀后的滤液，中和后，加 20 mL pH \approx 10 的 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液，2~3 滴 K-B 指示剂，用 EDTA 标准溶液滴定至由紫红色转变为纯蓝色即为终点。记下 EDTA 滴定 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量的用量。

④ 移取 25 mL 或 50 mL 分离氢氧化物沉淀后的滤液。用 20% NaOH 溶液调节至溶液的 pH 值为 12~12.5（用 pH 试纸检验），加 2~3 滴 K-B 指示剂，用 EDTA 标准溶液滴定至溶液由紫红色变为纯蓝色即为终点。记下 EDTA 的用量，计算 CaO 的量。

用差减法计算 MgO 的含量。

备注：

1、可以用尿素代替 NH_3 分离 R_2O_3 ，使用尿素作沉淀剂可形成均匀沉淀 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ，减少对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的吸附。

2、EDTA 滴定 Fe^{3+} 时，溶液最高许可酸度为 $\text{pH}=1.5$ 。 $\text{pH}<1.5$ 络合不完全，结果偏低； $\text{pH}>3$ ， Al^{3+} 有干扰，使结果偏高。若试样为矾土水泥，含 Al_2O_3 量高，则滴定 Fe^{3+} 时的 pH 值应控制在 $1.5\sim 2.0$ 之间，以减少大量 Al^{3+} 干扰。

3、若试样 Fe_2O_3 、 Al_2O_3 含量不高，可不经分离直接用 EDTA 滴定 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ，即将过滤 SiO_2 后溶液稀释至 250 mL，取出 100 mL 连续滴定 Fe^{3+} 、 Al^{3+} ，取出 50 mL 滴定 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量，另取出 25 mL 滴定 Ca^{2+} 。但滴定 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量时，需用酒石酸钾和三乙醇胺（或氟化钾+三乙醇胺）联合掩蔽 Fe^{3+} 、 Al^{3+} ，滴定 Ca^{2+} 时，需用三乙醇胺掩蔽 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 。

4、在滴定 Fe^{3+} 时，近终点应放慢滴定速度，注意操作，仔细观察。滴定终点随铁的含量不同而不同，特别是含铁量低的样品，终点更难观察。当滴定至淡紫色时，每加入一滴，应摇动片刻，必要时再加热（滴完溶液温度约 60°C ），小心滴定至亮黄色。因为此处滴定不佳，不但影响 Fe 的测定，还影响 Al 的测定结果。

5、以 PAN 为指示剂，用 CuSO_4 滴定 EDTA 时，终点往往不清晰，应该注意操作条件。滴定温度控制在 $80\sim 85^\circ\text{C}$ 为宜，温度过低，PAN 指示剂和 Cu-PAN 在水中溶解度降低；温度太高，终点不稳定。为改善终点，还可以加入适量乙醇。PAN 指示剂加入的量也要适当。

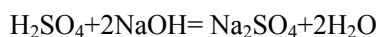
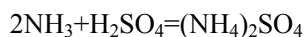
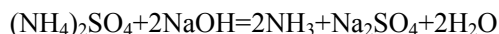
实验三十二 氮肥分析—氨态氮的测定

一、原理:

氨态氮的测定可选用甲醛法或蒸馏法测定。氨水及碳酸氢铵则可用酸碱滴定法直接测定。甲醛法操作简单、迅速,但必须严格控制操作条件,否则结果易偏低。蒸馏法操作简单,但该方法准确可靠,是经典方法。

蒸馏法的基本原理

在有过量 NaOH 存在时,所用铵盐都能被分解而放出游离氨。经蒸馏,使生成的游离氨全部吸收在定量的标准酸溶液中,然后用标准碱回滴过量的酸,从而计算试样中氨态氮含量。以硫酸铵为例,整个测定过程包括下列化学反应:



二、试剂

- 1、硫酸标准溶液 (0.25 mol/L)
- 2、氢氧化钠标准溶液 (0.5 mol/L)
- 3、40% NaOH 溶液
- 4、甲基红指示剂 (0.1%乙醇溶液)
- 5、酚酞指示剂 (1%乙醇溶液)

三、分析步骤:

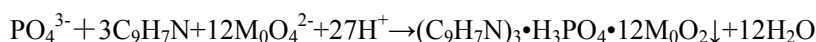
精确称取试样 1 g (精确至 0.001 g) 溶解后移入 500 mL 定氮瓶中,将瓶与安全球及冷凝管连接妥当,冷凝管的另一端通过一接管浸入锥形瓶内的液面以下,瓶内盛有 50.00 mL H_2SO_4 标准溶液及甲基红指示剂 2 滴。将定氮瓶打开,用长径漏斗加入 5 mol/L 40% NaOH 溶液,立即将瓶塞塞紧,慢慢加热蒸馏使瓶内溶液约有 2/3 被蒸出为止。用蒸馏水冲洗冷凝管及接管,洗液并入馏出液。蒸馏液用 NaOH 标准溶液滴定过量的酸至呈现黄色,同时作空白实验,计算含氮量。

注:吸收酸液也可采用 4% 硼酸溶液代替硫酸溶液,在此情况下,蒸馏完毕,应用硫酸标准溶液直接滴定吸收液即可计算含氮量。

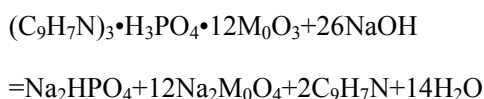
实验三十四 磷肥分析（有效磷含量的测定）

一、原理

磷肥试样用水萃取，此时游离磷酸和 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 进入溶液，过滤后，残渣用柠檬酸铵溶液萃取，此时较难溶的 Ca_2HPO_4 也进入溶液，过滤后，加喹钼柠酮试剂，与 PO_4^{3-} 形成磷钼酸喹啉沉淀。



将沉淀过滤、洗涤（pH 约为 9），然后用已知量过量的 NaOH 标准溶液溶解，过量的 NaOH 用 HCl 标准溶液滴定。根据 NaOH 的实际作用量，即可得出试样中 P_2O_5 含量。



为统一萃取液柠檬酸铵溶液的浓度，国家标准规定：在 1 L 柠檬酸铵溶液中，应含有 173 g 未风化的天然柠檬酸（相当于 0.9 mol/L）和 42 g 铵态氮（或 51 g 氨，相当于 3 mol/L）。配制溶液时先将 NH_3 水溶液标定，准确配制。才能保证分析结果的重现性。

沉淀剂喹钼柠酮试剂，内含喹啉、钼酸钠、柠檬酸、丙酮。其中柠檬酸的作用是在溶液中与钼酸络和，以降低钼酸浓度，避免析出硅钼酸喹啉沉淀，干扰测定；同时还防止钼酸钠水解析出 M_0O_3 ，丙酮的作用是使沉淀颗粒增大，疏松，便于洗涤溶解。

二、试剂

1、1 : 1 HNO_3

2、2 : 3 NH_3 水

3、0.2% 甲基红指示剂

4、喹钼柠酮试剂：按下列顺序配制：

① 溶解 70 g 钼酸钠于 150 mL 水中。

② 溶解 60g 柠檬酸于 85 mL 浓 HNO_3 与 150 mL 水的混合溶液中。

③ 在不断搅拌下，将溶液①缓缓加②中。

④ 量取 5 mL 喹啉，溶于 35 mL 浓 HNO_3 和 100 mL 水的混合溶液中，后缓缓加入③中，混匀，放置 24 h，过滤。滤液中加入 280 mL 丙酮，用水稀释至 1000 mL，储存于聚乙烯瓶中。

5、碱性柠檬酸铵溶液的配制

①先配制一瓶 2 : 3 氨水，按下法标定：取 500 mL 容量瓶，加水约 450 mL，用移液管吸取 2 : 3 NH₃ 水 10 mL 于容量瓶中，以水冲至刻度，摇匀。

吸取 25.00 mL，加水 25 mL，甲基红指示剂 2d，然后用 0.05 mol/L H₂SO₄ 标准溶液（浓度为 M₁）滴定至红色（消耗体积为 V₁）

$$\text{则 NH}_3 \text{ 水浓度 (M}_2\text{)} = \frac{ZM_1V_1}{10 \times \frac{25}{500}} = 4M_1V_1$$

为配制含 NH₃ 浓度 3 mol/L 的溶液 1 L，需 2 : 3 NH₃ 水体积 (V₂) 为：

$$3 \times 1000 = M_2 V_2$$

$$V_2 = \frac{3000}{M_2}$$

② 称取 173 g 未风化的无水柠檬酸，溶于 200 mL 水中。如果柠檬酸已风化，应测其风化程度，根据风化程度，计算所需柠檬酸的量。

风化沉淀的测定方法：称取 200 g 柠檬酸试样，研细。称取 2 g 平均试样，用水溶解并移入 250 mL 容量瓶中，定容、混匀。

用移液管移取 2 份各 25.00 mL，分别放入 250 毫升锥形瓶中，加热至 60~70℃。加酚酞指示剂 2 滴，用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定至粉红色。按下式分别计算两份的风化程度（百分含量），并计算平均含量。

$$\text{柠檬酸 \%} = \frac{(MV)NaOH \cdot E_{\text{柠}}}{G \times \frac{25}{250} \times 1000} * 100 = \frac{(M \cdot V)NaOH \cdot E_{\text{柠}}}{G}$$

无水柠檬酸 (CH₂•CO₂H)₂•COH•CO₂ 分子量 192.126。173g 柠檬酸，由于风化而实际应称

$$\text{取量 (W) 为: } 100: \frac{(M \cdot V)NaOH \cdot E_{\text{柠}}}{G} = W: 173$$

$$\text{所以, } W = \frac{173 \times 100}{\frac{MV \times E_{\text{柠}}}{G}} = \frac{G \times 173 \times 100}{MV \times E_{\text{柠}}} = \frac{G \times 270.1}{MV}$$

③ 在 1000 mL 容量瓶中，加入 V_2 计算量的 2 : 3 氨水；再将柠檬酸溶液慢慢注入，以水定容，摇匀，静置 2 昼夜后使用。

④ 混合指示剂：3 份 0.1% 百里酚兰溶液 + 2 份 0.1% 酚酞溶液。

三、分析步骤：

1、有效磷的萃取：准确称取磷肥试样 2.5 g 于 75 mL 蒸皿中，加水 25 mL。用玻璃棒将块状物研碎，将清液倾注过滤于预先加有 5 mL 1 : 1 HNO_3 的 250 mL 容量瓶中，如此水溶重复 3 次以上，再用水转移和洗涤残渣到滤纸上，滤液用水稀释至刻度，摇匀，此为试液甲。

仔细将残渣和滤纸转入另一个 250 mL 的容量瓶中，加入柠檬酸铵溶液 100 mL，加塞振荡，至滤纸碎成纸浆。将容量瓶放入 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中保温 1 h，时刻摇荡，然后冷至室温，水稀释至刻度，摇匀，用干燥容器和过滤器，弃去最初的浑浊溶液，将清液保留，即为试液乙。

2、测定：用移液管分别移取试液甲、乙各 20.00 mL 于同一个 400 mL 烧杯中，加入 10 mL 1 : 1 HNO_3 ，用水稀释至约 100 mL，加热近沸，加入 35 mL 喹钼柠酮试剂煮沸 1 min，摇动，冷至室温，然后静置澄清。

将沉淀用 G_4 砂芯坩锅抽滤，用水洗涤 3~4 次，并将沉淀完全转移到砂芯坩锅内，继续用水洗涤沉淀到 pH9 左右（检查：取 20 mL 滤液，加 1 滴混合指示剂和 1 滴 0.25 mol/L NaOH 标准溶液，呈现紫色）。将沉淀仔细用水（必要时用热水）洗涤到原烧杯中（溶液体积约为 100 mL），加入过量约 8~10 mL 的 0.5 mol/L NaOH 标准溶液（具体加入量要实验确定，以全部沉淀溶解，再过量 8~10 毫升为度）。待沉淀完全溶解后，加 1 mL 混合指示剂，用 0.25 mol/L HCl 标准溶液滴定至溶液从紫色经兰灰色，转为黄色即为终点。

3、空白实验：按照上述手续，平行做空白实验。

4、结果计算：

$$\text{P}_2\text{O}_5\% = \frac{[M_{\text{NaOH}}(V_{\text{NaOH}} - V_{\text{空}}^1) - M_{\text{HCl}}(V_{\text{HCl}} - V_{\text{空}}^1)] \times \frac{1}{2 \times 26} \times M_P}{G \times \frac{20.0 + 20.0}{250.0 + 250.0} \times 1000}$$

式中：G—试样重 (g)

$M_{\text{P}_2\text{O}_5}$ 的分子量 (141.9)

实验三十五 深色石油产品硫含量测定法（管式炉法）

一、原理：

本方法适用于测定润滑油、原油、焦炭和残渣油等石油产品中的硫含量。是将试样在空气中燃烧，用过氧化氢和硫酸的溶液将所生成的亚硫酸酐和硫酸酐吸收起来，进行测定。

二、仪器与试剂

- 1、水平型的管式电炉：能保证加热到 900~950℃。
- 2、高温毫伏计，带热电偶。
- 3、燃烧用瓷舟，瓷管等。
- 4、硫酸 0.01 mol/L 水溶液
- 5、40%氢氧化钠水溶液和 0.02 mol/L 水溶液
- 6、混合指示剂：0.2%甲基红乙醇溶液和 0.1%次甲基蓝乙醇的混合物体积比 1：1。
- 7、30% H_2O_2
- 8、高锰酸钾 0.1 mol/L 水溶液
- 9、细砂、煅烧脱硫后经 100~160 目筛筛过；或耐火粘土，经 900~950℃煅烧脱硫，并在瓷钵中磨细。

三、准备工作：

- 1、在试验前将接收器、洗气瓶、瓷管等用蒸馏水洗净并干燥。
- 2、在空气净化装置前，将 0.1 mol/L KMnO_4 溶液注入洗气瓶 1 中，达其容量一半，将 40% NaOH 溶液注入洗气瓶 2 中，后连接干燥塔，然后用橡皮管将它们连接。

在接收器中注入 150 mL 蒸馏水，5 mL 30%过氧化氢和 7 mL 0.01 mol/L 硫酸溶液，然后连接好。试验前，先检查设备的密闭性。

四、实验步骤：

- 1、在瓷舟中称试样 0.05~0.2 g，准确至 0.0002 g，该试样应均匀地分布在瓷舟的底部。
测定石油焦中硫含量时须从分析样品中称量 0.2~0.5 g，并在玻璃或瓷钵中研细。
- 2、瓷舟中的试样须用细砂覆盖，将瓷舟放进瓷管高温处，然后，很快塞好塞子，送入空气，空气流量用流量计测定，500 mL/min。试样的燃烧须在 900~950℃下进行，时间为 30~40 min。

3、当燃烧完毕时，取下接收器，并用蒸馏水冲洗玻璃弯管，加入 8 滴指示剂，用 0.02 mol/L 氢氧化钠标准溶液进行滴定，直到紫红色变为暗绿色为止。

实验前需做空白

试样硫含量按下式计算

$$S_1\% = \frac{M(V - V_1) \times 0.01603}{G} \times 100$$

式中：V—燃烧试样时滴定接受器中溶液所消耗的 NaOH 体积，mL

V₁—空白消耗 NaOH 体积，mL

M—NaOH 摩尔浓度

平行测定两个结果间的差数，不应超过最小结果的 5%，但试样中硫含量小 0.5% 时，平行测定两个结果间的差数，允许不超过较小结果 10%，取平行测定结果的算术平均值作为实验结果。

实验三十六 硫酸产品中氮氧化合物的测定

一、原理

硫酸中的氮的氧化物，主要以 HNO_2 状态存在，在含乙酸约 0.1% 的乙酸溶液中，亚硝酸和对氨基苯磺酸发生重氮化反应生成重氮盐，然后和 1-萘胺偶合，生成红色偶氮染料，红色的深度和亚硝酸含量成正比。用标准色阶比色或在 550 nm 测量吸光度。

二、试剂

1、NaOH 溶液 2、1% 酚酞指示剂

3、氮的氧化物标准溶液：精确称取亚硝酸钠 0.1816 g，溶解并稀释至 1000 mL，然后，精确移取所得溶液 10.00 mL 于 1000 mL 容量瓶中，稀释至刻度。此溶液每 1 mL 中含 N_2O_3 0.001 mg。

4、格里斯试剂：0.1 g 1-萘胺溶解于 100 mL 热水中，冷却后，加 80% 乙酸 6 mL，储存于有色试剂瓶中，置阴暗处，另取 1 g 对氨基苯磺酸溶解于 100 mL 水中，于临使用时，取两种溶液等体积混合。

5、0.5 mol/L 乙酸溶液

三、分析步骤

取 50 毫升比色管 14 支，各加水 25 毫升，以刻度吸管顺次加入氮的氧化物标准溶液 0.025、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00...6.00 毫升。

取 50 毫升水于 100 毫升容量瓶中，精确加入样品 1.00 毫升，冷却至室温，稀释至刻度，混合均匀。精确移取所得溶液 10.00 毫升于 50 毫升比色管中，加入 1% 酚酞指示剂 2 滴，缓缓加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液至稳定的红色，再缓缓滴入 0.5 mol/L 乙酸溶液对红色又恰恰消失。

向所有的比色管中，精确加入 5.00 毫升新制备的格里斯试剂，稀释至刻度，充分搅拌混合均匀，15 分钟后比色。按下式计算氮氧化物含量。

$$\text{氮的氧化物 (以 } \text{N}_2\text{O}_3 \text{) 计 \%} = \frac{V \times 0.001}{0.1 \times D \times 1000} \times 100$$

式中：V—和样品溶液呈色相同的标准色管中氮的氧化物标准溶液的体积，毫升；

D—样品的比重。

实验三十七 铁矿石中全铁量的测定

一、原理

试样以盐酸氟化钠溶解，氯化亚锡还原大部分铁后，三氯化钛还原剩余铁为低价，过量三氯化钛用重铬酸钾回滴，以二苯胺磺酸钠作指示剂，用标准重铬酸钾溶液滴定铁，求得试样铁含量。

二、试剂

浓盐酸

氟化钠（固体）

6%氯化亚锡：6g 氯化亚锡溶于 20 毫升盐酸中，用水稀释至 100 毫升

硫磷混酸：硫酸+硫酸+水=2+3+5

25%钨酸钠：1+20 磷酸溶液

1+19 三氯化钛：取 15%~20%三氯化钛用 1+9 盐酸稀释后加一层液体石蜡保护（或现用现配）

重铬酸钾标准溶液：1/6 0.05mol/L

三、分析步骤

称取试样 0.2 g 两份于 300 毫升三角瓶中，加少许水使其散开，加氟化钠 0.3 g，盐酸 20 毫升，低温加热溶解，滴加二氯化锡至溶液呈现浅黄色，继续加热 10~20 min（体积约 10 毫升）取下，加水 150~200 毫升，加钨酸钠 15 d，用三氯化钛还原兰色出现，用重铬酸钾标准溶液滴至兰色消失（不计读数），立即加硫磷混液 10 毫升，二苯胺磺酸钠 5 d，用重铬酸钾标准溶液滴定至紫色为终点，记下消耗重铬酸钾溶液的毫升数 V，则：

$$\text{Fe}\% = \frac{6MV \times 55.85}{G \times 1000} \times 100$$

式中：M—重铬酸钾溶液浓度

V—滴定消耗重铬酸钾溶液毫升数。

实验三十八 双缩脲法测定蛋白质浓度

一、目的:

学习双缩脲法测定蛋白质的原理和方法。

二、原理:

具有两个或两个以上肽键的化合物皆有双缩脲反应,因此蛋白质在碱性溶液中,也能与 Cu^{2+} 形成紫红色络合物,颜色深浅与蛋白质浓度成正比,故可用来测定蛋白质的浓度。在一定条件下,未知样品的溶液与标准蛋白质溶液同时反应,并于 540nm 下比色,可以通过标准蛋白质的标准曲线求出未知样品的蛋白质浓度。

关于分光光度法测定物质含量的原理介绍如下:

分光光度法是利用物质所特有的吸收光谱来鉴别物质或测定其含量的技术。因为分光光度法极为灵敏、精确、快速和简便,在复杂组分的系统中,不需要分离,即能检测出其中所含的极少量物质,因此分光光度法目前已成为生物化学研究中广泛使用的方法之一。

如果用加热、放电、射线照射等方法来激发物质,可使物质发光。物质所发射的光是具有电磁本质的物质,它既有波动性,又有微粒性。

光波和其他波一样,具有一定的频率(ν)。不同单色光的颜色不同,就是因为其频率不同。但不同频率的光在真空中的传播速度(c)相同,都是 $3 \times 10^8 \text{m/s}$ 。根据光的速度(c)和频率(ν)可计算出它的波长(λ)

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

人眼可见的光只占电磁波谱的很小一部分(400~760nm)。它是一种频率较大的电磁波。

电磁波按频率大小,从频率最小的无线电波到频率最大的 γ 射线排成一列,即组成电磁波的波谱,如图 5—1 所示。

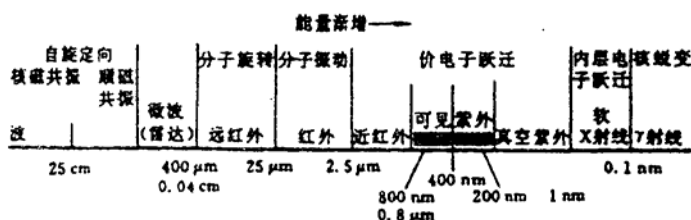


图 5-1 电磁波谱的图解

我们所讨论的光谱范围,包括波长范围为 400~760nm 的可见光区和波长范围为 200~400nm 的紫外光区。

钨灯光源所发的光通过三棱镜折射后，在另一侧面的屏上可得到由红、橙、黄、绿、蓝、靛、紫组成的连续色谱。这个色谱就是钨灯的发射光谱。各种不同的光源都有其特有的发射光谱，因此可采用不同的发光体作为仪器的光源。如钨灯能发出 400~760nm 波长的光谱，可作为可见光分光光度计的光源。氢灯能发出 185~400nm 波长的光谱，可作为紫外分光光度计的光源。

如果在光源和棱镜之间放上某种物质的溶液，此时在屏上所显示的光谱已不再是光源的光谱，它出现了几条暗线，即光源发射光谱中某些波长的光因溶液吸收而消失，这种被溶液吸收后的光谱称为该溶液的吸收光谱。不同物质的吸收光谱是不同的。因此根据吸收光谱，可以鉴别溶液中所含的物质。

分子中的每一个电子往往处于基态，但在一定条件下它们可以获得能量，上升为激发态。为了使它们从基态跃迁到激发态，必须吸收一个恰好等于跃迁所需能量的量子来增加电子的能量。所以当光线穿过这一物质时，某些量子化的能即传递给该物质，使它的电子提升到较高的能级状态。同样，当激发态的电子回到基态时，它发射出特征波长的辐射。能量与频率的关系式如下：

$$E = E_1 - E_2 = h\nu$$

E 为分子吸收或发射的辐射能；

E_1 为电子在起始能级的能量；

E_2 为电子在最终能级的能量；

h 为普朗克常数= 6.63×10^{-34} J(焦耳)·秒^①。

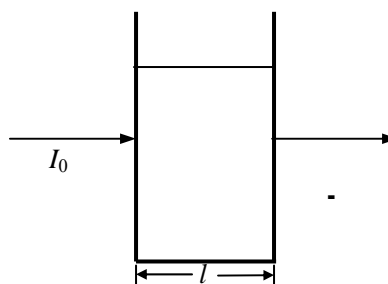
当光线通过某种物质的溶液时，透过的光的强度减弱。因为有一部分光在溶液的表面反射或分散，一部分光被组成此溶液的物质所吸收，只有一部分光可透过溶液。

$$\text{入射光} = \text{反射光} + \text{分散光} + \text{吸收光} + \text{透过光}$$

如果我们用蒸馏水（或组成此溶液的溶剂）作为“空白”去校正反射，分散等因素造成的入射光的损失，则

$$\text{入射光} = \text{吸收光} + \text{透过光}$$

I_0 为经过空白校正后入射光的强度；



① 1 erg (尔格) = 10^{-7} J。过过去曾这样表示： h = 普朗克常数 = 6.63×10^{-27} 尔格·秒

I 为透过光的强度。

根据实验得知

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon cl}$$

式中, c 表示吸收物质的摩尔浓度; l 表示吸收物质的光径, 用 cm 表示; ϵ 表示吸收物质的摩尔消光系数, 它表示物质对光的吸收特性, 不同物质的 ϵ 数值不同。

所以
$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon cl}$$

令 T (透射比) $= \frac{I}{I_0}$, 则 $T\% = \frac{I}{I_0} \times 100$

$$\therefore T = 10^{-\epsilon cl}$$

若以 T 对吸收物质的浓度作图, 则得图 5—2 中的图形。由上式可得

$$\lg \frac{1}{T} = \epsilon cl$$

$\lg \frac{1}{T}$ 为物质的消光值 (E) 或吸光度 (A)。

$$\therefore A = \epsilon cl$$

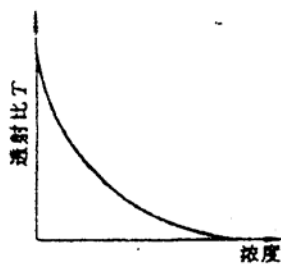


图 5-2 透射比与物质浓度的关系

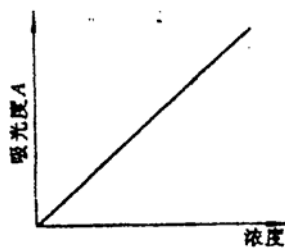


图 5-3 吸光度与物质浓度的关系

若以 A 对物质的浓度作图, 则得图 5—3 中的直线。

上式说明了物质的吸光度与吸收物质的浓度和液层的厚度成正比, 这就是 Beer—Lambert 定律。

三、器材及试剂:

1. 器材:

- ①试管
- ②试管架
- ③恒温水浴锅
- ④722 型分光光度计

2. 试剂:

①标准酪蛋白溶液 ($10\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$): 用 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液配制。

②双缩脲试剂: 溶解 $1.50\text{gCuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $6.0\text{gNaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 于 500ml 水中, 在搅拌下加入 $300\text{ml}10\%\text{NaOH}$ 溶解, 用水稀释到 1 升, 贮存在冰箱中, 备用。

③血清稀释液: 取新鲜血清稀释 10 倍。

四、操作步骤:

1. 标准曲线的绘制

取 12 支干试管分成两组, 按下表平行操作。

	0	1	2	3	4	5
标准蛋白 (ml)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
双缩脲试剂 (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
充分混匀后, 室温下 ($20-25^\circ\text{C}$) 放置 30min						
A_{540}						
蛋白质含量 (mg)	0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0

取两组测定的 A_{540} 值的平均值, 以 A_{540} 为纵坐标, 蛋白质含量为横坐标, 绘制标准曲线。

2. 样品测定

取 4 支试管分成两组, 按下表平行操作

管号	0	1
血清稀释液 (ml)	0	0.5
蒸馏水 (ml)	1.0	0.5
双缩脲试剂 (ml)	4.0	4.0
充分混匀后, 室温下 ($20-25^\circ\text{C}$) 放置 30min		
A_{540}		

五、结果与讨论:

1、绘制标准曲线

2、计算

取两组测定的平均值计算。

$$\text{血清样品蛋白质含量 (g/100ml 血清)} = \frac{Y \times N}{V} \times 10^{-3} \times 100$$

其中，Y 为标准曲线查得蛋白质的含量 (mg)，N 为稀释倍数本实验为 10，V 为血清样品所取的体积 (ml)，本实验为 0.5ml。

3、干扰本实验的因素有哪些？

4、简述分光光度计的基本使用方法。

六、注意事项

(1) 本法应用范围，因不同书籍报道，数值不一。本实验方法测定范围 1—10mg 蛋白质。

(2) 须于显色后 30min 内比色测定。30min 后，可有雾状沉淀发生。各管由显色到比色的时间应尽可能一致。

(3) 有大量脂肪性物质同时存在时，会产生混浊的反应混合物，这时可用乙醇或石油醚使溶液澄清后离心，取上清液再测定。

实验三十九 Folin—酚测定法测蛋白质含量

一、目的:

1. 学习 Folin—酚法测定蛋白质含量的原理及方法。
2. 制备标准曲线, 测定未知样品中蛋白质含量。

二、原理:

目前蛋白质含量测定有两类方法, 一类是利用蛋白质的物理化学性质, 如折射率、比重、紫外吸收等测定得知; 另一类是利用化学方法测定蛋白质含量, 如微量凯氏定氮、双缩脲反应、Folin—酚试剂法(Lowry 法)。这两类方法各有优缺点, 选用何种方法测定蛋白质含量, 可根据实验要求及实验室条件进行选择。目前实验室多用 Folin—酚法测定蛋白质含量, 此法的优点是操作简单, 迅速, 不需特殊仪器设备, 灵敏度高, 较紫外吸收法灵敏 10—20 倍, 较双缩脲法灵敏 100 倍, 反应 15min 内有最大显色, 并至少可稳定几小时。其不足之处是此反应受多种因素干扰。在测试时应排除干扰因素或做空白试验消除。

此法是在 Folin—酚法的基础上引入双缩脲试剂, 因此凡干扰双缩脲反应的基团, 如 $-\text{CO}-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $-\text{CS}-\text{NH}_2$ 以及在性质上是氨基酸或肽的缓冲剂, 如 Tris 缓冲剂以及蔗糖、硫酸铵、巯基化物均可干扰 Folin—酚反应。此外, 所测的蛋白质样品中, 若含有酚类及柠檬酸, 均对此反应有干扰作用。而浓度较低的尿素 (约 0.5% 左右)、胍 (0.5% 左右)、硫酸钠 (1%)、硝酸钠 (1%)、三氯乙酸 (0.5%)、乙醇 (5%)、乙醚 (5%)、丙酮 (0.5%) 对显色无影响, 这些物质在所测样品中含量较高时, 则需做校正曲线。若所测的样品中含硫酸铵, 则需增加碳酸钠—氢氧化钠浓度即可显色测定。若样品酸度较高, 也需提高碳酸钠—氢氧化钠的浓度 1—2 倍, 这样即可纠正显色后色浅的弊病。

Folin—酚试剂由甲试剂与乙试剂组成。甲试剂由碳酸钠、氢氧化钠、硫酸铜及酒石酸钾钠组成。蛋白质中的肽键在碱性条件下, 与酒石酸钾钠铜盐溶液起作用, 生成紫红色络合物。乙试剂是由磷钼酸和磷钨酸、硫酸、溴等组成。此试剂在碱性条件下, 易被蛋白质中酪氨酸的酚基还原呈蓝色反应, 其色泽深浅与蛋白质含量成正比。此法也适用于测定酪氨酸、色氨酸含量。

本法可测定范围是 25—250 μg 蛋白质。

三、试剂及器材:

1、试剂:

①标准蛋白质溶液

结晶牛血清白蛋白或酪蛋白, 预先经微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量, 根据其配纯度配制成 $150 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 蛋白溶液。

②Folin—酚试剂

试剂 A:

- (1) 4%碳酸钠溶液
- (2) $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液
- (3) 1%硫酸铜溶液
- (4) 2%酒石酸钾钠溶液

临用前将(1)与(2)等体积配制碳酸钠—氢氧化钠溶液。(3)与(4)等体积配合成硫酸铜—酒石酸钾钠溶液。然后这两种试剂按 50:1 的比例配合, 即成 Folin—酚试剂 A。此试剂临用前配制, 一天内有效。

试剂 B:

称钨酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100g、钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25g 置 2000ml 磨口回流装置内, 加蒸馏水 700ml, 85%磷酸 50ml 和浓盐酸 100ml。充分混匀, 使其溶解。小火加热, 回流 10 小时(烧瓶内加小玻璃珠数颗, 以防溶液溢出), 再加入硫酸锂(LiSO_4)150g, 蒸馏水 50ml 及液溴数滴。在通风橱中开口煮沸 15min, 以除去多余的溴。冷却后定容至 1000ml, 过滤即成 Folin—酚试剂 B 贮存液, 此液应为鲜黄色, 不带任何绿色。置棕色瓶中, 可在冰箱长期保存。若此贮存液使用过久, 颜色由黄变绿, 可加几滴液溴, 煮沸数分钟, 恢复原色仍可继续使用。

试剂 B 贮存液在使用前应确定其酸度。以之滴定标准氢氧化钠溶液 ($1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右), 以酚酞为指示剂, 当溶液颜色由红→紫红→紫灰→墨绿时即为滴定终点。该试剂的酸度应为 $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, 将之稀释至相当于 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酸度应用。

③测试样品

血清, 使用前稀释 100 倍。

2. 器材

①试管及试管架, ②0.5, 1 及 5mL 吸量管, ③恒温水浴锅, ④722 型分光光度计。

四、操作步骤:

1、制备 Folin—酚法标准曲线

取 14 支试管，分两组按下表平行操作。

试 剂 处 理 \ 试 管 编 号	1	2	3	4	5	6	7
标准蛋白溶液/ml	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水/mL	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Folin—酚甲试剂/mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
混匀，于 20—25℃ 放置 10min							
Folin—酚乙试剂/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
迅速混匀，于 30℃（或室温 20—25℃）水浴保温 30min，以蒸馏水为空白，在 640nm 处比色							
\bar{A}_{640}							

* 由于这种呈色化合物组成尚未确立，它在可见光红光区呈现较宽吸收峰区，不同书籍选用不同的波长，有选用 500 或 540nm，有选用 660，700 或 750nm。选用较高波长，样品呈现较大的光吸收。本实验选用波长 640nm。

绘制标准曲线：以 A_{640} 值为纵坐标，标准蛋白含量为横坐标，在坐标纸上绘制标准曲线。

2、测定示知样品蛋白质浓度

取 4 支试管，分 2 组，按下表平行操作。

试 剂 处 理 \ 试 管 编 组	空 白 管 ×2	样 品 管 ×2
血清稀释液/ml	0.0	0.2
蒸馏水/ml	1.0	0.8
Folin—酚甲试剂/ml	5.0	5.0
混匀，于 20—25℃ 放置 10min		
Folin—酚乙试剂/ml	0.5	0.5

迅速混匀，于 30℃（或室温 20—25℃）水浴保温 30min，以蒸馏水为空白，在 640nm 处比色

\bar{A}_{640}		
-----------------	--	--

五、结果与讨论:

1、绘制标准曲线

2、计算:

蛋白质含量 (g/100ml 血清)

$$= \frac{A_{640} \text{ 值对应标准曲线蛋白质含量}(\mu\text{g}) \times 10^{-6}}{\text{测定时用稀释血清的 ml 数}} \times \text{血清稀释倍数} \times 100$$

六、注意事项

(1) Folin—酚乙试剂在酸性条件下稳定，而 Folin—酚甲试剂是在碱性条件下与蛋白质作用生成碱性的铜—蛋白质溶液。当 Folin—酚乙试剂加入后，应迅速摇匀（加—管摇—管），使还原反应产生在磷钼酸—磷钨酸试剂被破坏之前。

(2) 血清稀释的倍数应使蛋白质含量在标准曲线范围之内，若超过此范围则需将血清酌情稀释。

七、思考题

- 1、Folin—酚测定蛋白的原理是什么？
- 2、有哪些因素可干扰 Folin—酚测定蛋白含量？
- 3、作为标准蛋白的牛血清清蛋白或酪蛋白在应用时有何要求？

实验四十 紫外线 (UV) 吸收法测蛋白质的含量

一、目的:

- 1、了解紫外线吸收法测定蛋白质含量的原理。
- 2、了解紫外分光光度计的构造原理，掌握它的使用方法。

二、原理:

由于蛋白质分子中苯丙氨酸酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键，因此蛋白质具有吸收紫外线的性质，吸收高峰在 280nm 波长处。在此波长范围内，蛋白质溶液的光吸收值 (A_{280}) 与其含量呈正比关系，可用作定量测定。

利用紫外线吸收法测定蛋白质含量的优点是迅速、简便、不消耗样品，低浓度盐类不干扰测定。因此，在蛋白质和酶的生化制备中（特别是在柱层析分离中）广泛应用。此法的缺点是：(1) 对于测定那些与标准蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质，有一定的误差；(2) 若样品中含有嘌呤、嘧啶等吸收紫外线的物质，会出现较大的干扰。

不同的蛋白质和核酸的紫外线吸收是不相同的，即使经过校正，测定结果也还存在一定的误差。但可作为初步定量的依据。

三、试剂及器材:

1、试剂:

①标准蛋白溶液

准确称取经微量凯氏定氮法校正的标准蛋白质，配制成浓度为 $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的溶液。

②待测蛋白溶液

配制成浓度约为 $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的溶液。

2、器材:

①紫外分光光度计

②试管和试管架

③吸量管

四、操作步骤:

(一) 标准曲线法

1、标准曲线的绘制

按下表分别向每支试管加入各种试剂，摇匀。选用光程为 1cm 的石英比色杯，在 280nm 波长处分别测定各管溶液的 A_{280} 值。以 A_{280} 值为纵坐标，蛋白质浓度为横坐标，绘制标准曲线。

	1	2	3	4	5	6	7	8
标准蛋白质溶液/ml	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
蒸馏水/ml	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.0
蛋白质浓度/(mg·ml ⁻¹)	0.0	0.125	0.250	0.375	0.500	0.625	0.750	1.00
A_{280}								

2. 样品测定：

取待测蛋白质溶液 1ml，加入蒸馏水 3ml，摇匀，按上述方法在 280nm 波长处测定光吸收值，并从标准曲线上查出待测蛋白质的浓度。

(二) 其他方法

1. 将待测蛋白质溶液适当稀释，在波长 260nm 和 280nm 处分别测出 A 值，然后利用 280nm 及 260nm 下的吸收差求出蛋白质的浓度。

计算

$$\text{蛋白质浓度 (mg} \cdot \text{ml}^{-1}) = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

式 A_{280} 和 A_{260} 分别是蛋白质溶液在 280nm 和 260nm 波长下测得的光吸收值。

此外，也可先计算出 A_{280}/A_{260} 的比值后，从表 5-1 中查出校正因为“ F ”值，同时可查出样品中混杂的核酸的百分含量，将“ F ”值代入，再由下述经验公式直接计算出该溶液的蛋白质浓度。

表 5-1 紫外吸收法测定蛋白质含量的校正因子

280/260	核酸/(%)	因子 (F)	280/260	核酸/(%)	因子 (F)
1.75	0.00	1.116	0.846	5.50	0.656
1.63	0.25	1.081	0.822	6.00	0.632
1.52	0.50	1.054	0.804	6.50	0.607
1.40	0.75	1.023	0.784	7.00	0.585
1.36	1.00	0.994	0.767	7.50	0.565
1.30	1.25	0.970	0.753	8.00	0.545

1. 25	1. 50	0. 944	0. 730	9. 00	0. 508
1. 16	2. 00	0. 899	0. 705	10. 00	0. 478
1. 09	2. 50	0. 852	0. 671	12. 00	0. 422
1. 03	3. 00	0. 814	0. 644	14. 00	0. 377
0. 979	3. 50	0. 776	0. 615	17. 00	0. 322
0. 939	4. 00	0. 743	0. 595	20. 00	0. 278
0. 874	5. 00	0. 682			

注：一般纯蛋白质的光吸收比值 (A_{280}/A_{260}) 约为 1.8，而纯核酸的比值约为 0.5。

$$\text{蛋白质浓度 (mg} \cdot \text{ml}^{-1}) = F \times \frac{1}{d} \times A_{280} \times N$$

式中 A_{280} 为该溶液在 280nm 下测得的光吸收值； d 为石英比色杯的厚度 (cm)； N 为溶液的稀释倍数。

2. 对于稀蛋白质溶液，还可用 215nm 和 225nm 有吸收差来测定浓度。从吸收差 ΔA 与蛋白质含量的标准曲线即可求出浓度。

$$\text{吸收差 } \Delta A = A_{215} - A_{225}$$

式中的 A_{215} 和 A_{225} 分别是蛋白质溶液在 215nm 和 225nm 波长下测得的光吸收值。

此法在蛋白质含量达 20—100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的范围内，是服从 Beer 定律的。氯化钠、硫酸铵以及 $1 \times 10^{-1} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸、硼酸和三羟甲基氨基甲烷等缓冲液都无显著干扰作用。但是 $1 \times 10^{-1} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸、琥珀酸、邻苯二甲酸以及巴比妥等缓冲液在 215nm 波长下的吸收较大，不能应用，必须降至 $5 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 才无显著影响。由于蛋白质的紫外吸收高峰常因 pH 的改变而有高低，故应用紫外吸收法时要注意溶液的 pH，最好与标准曲线制订时的 pH 一致。

(3) 如果已知某一蛋白质在 280nm 波长处的吸收值 [$A_{1\text{cm}}^{1\%}$]，则取该蛋白质溶液于 280nm 处测定光吸收值后，便可直接求出蛋白质的浓度。

五、结果与讨论:

六、思考题

- 1、本法与其他测定蛋白质含量方法相比，有哪此优缺点？
- 2、若样品中含有干扰测定的杂质，应如何校正实验结果？

实验四十一 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量

一、目的:

学习考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue)法测定蛋白质浓度的原理和方法。

二、原理:

考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度,是利用蛋白质—染料结合的原理,定量地测定微量蛋白质浓度的快速、灵敏的方法。

考马斯亮蓝 G—250 存在着两种不同的颜色形式,红色和蓝色。它和蛋白质通过范德瓦耳键(van der Waals'bond)结合,在一定蛋白质浓度范围内,蛋白质和染料结合符合比尔定律(Beer's law)。此染料与蛋白质结合后颜色由红色形式转变成蓝色形式,最大光吸收由465nm 变成 595nm,通过测定 595nm 处光吸收的增加量可知与其结合蛋白质的量。

蛋白质和染料结合是一个很快的过程,约 2min 即可反应完全,呈现最大光吸收,并可稳定 1h,之后,蛋白质—染料复合物发生聚合并沉淀出来。蛋白质—染料复合物具有很高的消光系数,使得在测定蛋白质浓度时灵敏度很高,在测定溶液中含蛋白质 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时就有 0.275 光吸收值的变化,比 Lowry 法灵敏 4 倍,测定范围为 10—100 μg 蛋白质,微量测定范围是 1~10 μg 蛋白质,此反应重复性好,精确度高,线性关系好。标准曲线在蛋白质浓度较大时稍有弯曲,这是由于染料本身的两种颜色形式光谱有重叠,试剂背景值随更多染料与蛋白质结合而不断降低,但直线弯曲程度很轻,不影响测定。

此方法干扰物少,研究表明:NaCl, KCl, MgCl_2 , 乙醇, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 无干扰。强碱缓冲剂在测定中有一些颜色干扰,这可以用适当的缓冲液对照扣除其影响。Tris, 乙酸, 2-巯基乙醇, 蔗糖, 甘油, EDTA 及微量的去污剂如 Triton X-100, SDS, 玻璃去污剂有少量颜色干扰,用适当的缓冲液对照很容易除掉。但是,大量去污剂的存在对颜色影响太大而不易消除。

三、试剂与器材:

1. 试剂:

① 考马斯亮蓝试剂

考马斯亮蓝 G—250 100mg 溶于 50ml95%乙醇中,加入 100ml85%磷酸,用蒸馏水稀释至 1000mL,滤纸过滤。最终试剂中含 0.01% (W/V) 考马斯亮蓝 G—250, 4.7% (W/V) 乙

醇，8.5% (W/V) 磷酸。

② 标准蛋白质溶液

结晶牛血清清蛋白，预先经微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量，根据其纯度用 $0.15\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 配制成 $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ， $0.1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 蛋白溶液。

③ 未知蛋白质溶液。

2. 器材

①试管及试管架，②吸量管 (0.1ml 及 5ml)，③722 型分光光度计。

四、操作步骤

1. 标准法制定标准曲线

取 14 支试管，分两组按下表平等操作。

试管编号	0	1	2	3	4	5	6
$1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准蛋白溶液/ml	0. 0	0. 01	0. 02	0. 03	0. 04	0. 05	0. 06
$0. 15\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaCl}$ /ml	0. 10	0. 09	0. 08	0. 07	0. 06	0. 05	0. 04
考马斯亮蓝试剂/ml	5ml						
摇匀，1h 内以 0 号试管为空白对照，在 595nm 处比色							
$A_{595\text{nm}}$							

绘制标准曲线：以 $A_{595\text{nm}}$ 为纵坐标，标准蛋白含量为横坐标，在坐标纸上绘制标准曲线。

2. 微量法制定标准曲线

取 12 支试管，分两组按下表平行操作。

试管编号	0	1	2	3	4	5
$0.1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准蛋白溶液/ml	0	0. 01	0. 03	0. 05	0. 07	0. 09
$0.15\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaCl}$ /ml	0. 10	0. 09	0. 07	0. 05	0. 03	0. 01
考马斯亮蓝试剂/ml	1ml					
摇匀，1h 内以 0 号试管为空白对照，在 595nm 处比色						
$A_{595\text{nm}}$						

绘制标准曲线：以 $A_{595\text{nm}}$ 为纵坐标，标准蛋白含量为横坐标，在坐标纸上绘制标准曲线。

3. 测定未知样品蛋白质浓度

测定方法同上，取合适的未知样品体积，使其测定值在标准曲线的直线范围内。根据所

测定的 $A_{595\text{nm}}$ 值，在标准曲线上查出其相当于标准蛋白的量，从而计算出未知样品的蛋白质浓度 ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)。

五、结果与讨论

1. 绘出标准曲线
2. 求出未知蛋白质浓度

六、注意事项

(1) 如果测定要求很严格，可以在试剂加入后的 5—20min 内测定光吸收，因为在这段时间内颜色最稳定。

(2) 测定中，蛋白—染料复合物会有少部分吸附于比色杯壁上，实验证明此复合物的吸附量是可以忽略的。测定完后可用乙醇将蓝色的比色杯洗干净。

七、思考题

根据下列所给的条件和要求，选择一种或几种常用蛋白质定量方法测定蛋白质浓度：

- 1、样品不易溶解，但要求结果较准确。
- 2、要求在半天内测定 60 个样品。
- 3、要求很迅速地测定一系列试管（30 支）中溶液的蛋白质浓度。

实验四十二 奶粉中蛋白质的测定（凯氏定氮法）

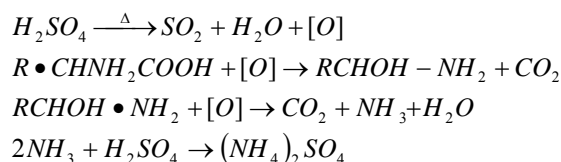
一、实验目的

了解凯氏定氮装置

掌握掌握奶粉中蛋白质含量测定的方法

二、实验原理

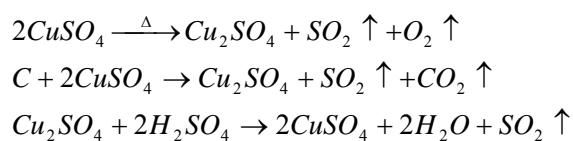
奶粉样品与硫酸一同加热硝化，硫酸使有机物脱水，破坏有机物，有机物中的碳和氢氧化成二氧化碳和水逸出，而蛋白质分解成氨，则与硫酸结合成硫酸铵留在酸性溶液中，其反应式如下：



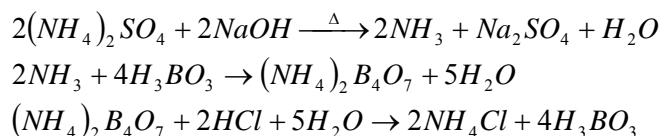
在硝化过程中添加硫酸钾可以提高温度加快有机物的分解，它与硫酸反应生成硫酸氢钾，可提高反应温度，一般纯硫酸加热沸点 330℃，而添加硫酸钾后，温度可达 400℃，加速了整个反应过程。



为了加速反应过程，还加入硫酸铜作为催化剂。



样液中的硫酸铵在碱性条件下释放出氨，用硼酸溶液吸收后，用标准盐酸溶液直接滴定。



三、试剂和仪器

浓硫酸、硫酸钾、硫酸铜、40%氢氧化钠、4%硼酸、0.05M 盐酸。

甲基红-次甲基蓝混合指示剂：将 0.2% 甲基红酒精溶液与 0.1% 次甲基蓝水溶液等量混合

三、操作步骤

- 1、准确称取奶粉样品 0.5g 置于凯氏烧瓶内，加入 5g 硫酸钾、0.4g 五水硫酸铜及 15mL 浓硫酸，再放入几粒玻璃珠，缓慢加热，尽量减少泡沫产生，防止溶液外溅，使样品全部浸入硫酸溶液内。待泡沫消失后再加大火力至溶液澄清，继续加热约 1 小时，然后冷却至室温。沿瓶壁加入 50mL 水溶解盐类，冷却后定量转移至 100mL 容量瓶内，用水稀释至标线，摇匀；
- 2、装好凯氏定氮装置，向蒸汽发生瓶的水中加入数滴甲基红指示剂，几滴硫酸及数粒沸石，在整个蒸馏过程中需保持此液为橙红色，否则应补充硫酸。接受液是 20mL 硼酸溶液，其中加入 2 滴混合指示剂，接收时要使冷凝管下口浸入吸收液的液面之下；
- 3、移取 25mL 样品消化液，从进样口注入反应室内，用少量水冲洗进样口，然后加入 30mL 氢氧化钠溶液，立即盖紧塞子，以防止氨气逸出。从开始回流计时，蒸馏 4min，移动冷凝管下口使其脱离接收液，再蒸馏 1min，用水冲洗冷凝管下口，洗液流入接收液内；
- 4、用盐酸标准溶液滴定接收液至变成暗红色为终点。以相同的操作做一次空白试验，计算奶粉中蛋白质的含量。

五、数据处理

$$x(\%) = \frac{(V_1 - V_0)M \times 0.014}{W / 4} \times F \times 100$$

X: 蛋白质含量

V₀: 空白试验消耗的标准盐酸的量 mL

V₁: 样品溶液消耗标准盐酸的量 mL

M: 盐酸标准溶液的浓度

F: 氮转化为蛋白质的系数，奶制品为 6.38，一般食品为 6.25

W: 样品重量

六、思考题

1、指出下列试剂的作用

- ①消化时使用浓硫酸、硫酸钾及硫酸铜粉末。
- ②蒸馏与滴定中的 40%NaOH、2%硼酸溶液及指示剂。

2、指出本测定方法产生误差的原因。

3、写出下述各步反应式：①蛋白质消化；②氨的蒸馏；③氨的滴定。

实验四十三 奶粉中蛋白质的测定（分光光度法）

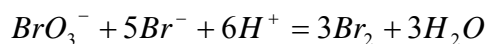
一、实验目的

了解分光光度法测定掌握奶粉中蛋白质含量测定的方法

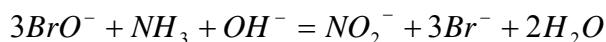
二、实验原理

在碱性溶液中用次溴酸盐将氨氧化成亚硝酸盐，在 $\text{pH}\approx 2$ 的溶液中，亚硝酸根与磺胺反应生成重氮化物，再与萘乙二胺反应生成偶氮染料，呈紫红色，最大吸收波长为 543nm，其摩尔吸光系数为 5×10^4 ，浓度在 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内符合比尔定律。

溴酸钾和溴化钾制备次溴酸盐的反应：



在碱性溶液中次溴酸盐与氨的反应：



磺胺与亚硝酸的反应：

生成偶氮染料的反应：

三、试剂及仪器

盐酸溶液：1+1 用无氨的水配制

氢氧化钠溶液：10M，用无氨的水配制，安装碱石灰管

制备无氨的水：取新制备的二次水置于细口瓶中，加入少量强酸性阳离子交换树脂（ $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ），摇动，待树脂下降后装上虹吸管。

磺胺溶液（1.0%）：称取 10g 磺胺，溶于 1L 稀盐酸溶液（ $1.0\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）中，转入棕色细口瓶中存放；

萘乙二胺盐酸盐溶液（0.20%）：称取 2.0g N-1-萘乙二胺盐酸盐，溶于 1L 水中，转入棕色细口瓶中存放，在冰箱中冷藏可稳定 1 个月；

KBr-KBrO₃ 溶液：称取 1.4g 溴酸钾和 10g 溴化钾，溶于 500mL 无氨的水中，转入棕色细口瓶中存放，在冰箱中冷藏可稳定半年；

次溴酸盐溶液：称取 2mL KBr-KBrO₃ 溶液置于棕色细口瓶中，加入 45mL 无氨的水和 3mL 盐酸溶液，立即盖好瓶塞，摇匀，放置 5min，再加入 48mL 氢氧化钠溶液(10M)，放置 30min 后即可使用，此溶液 10h 内有效。

氨态氮标准溶液：(1) 贮备液 (0.200mg·mL⁻¹)：称取 0.382g 氯化铵（已在 105℃干燥 2h），用无氨的水溶解后定容于 500mL 容量瓶中；(2) 工作液 (0.05μg·mL⁻¹)：量取 5.00mL 贮备液于 100mL 容量瓶中，用无氨的水定容。此溶液一周内有效。

四、实验步骤：

1、氨态氮标准曲线的制作：

洗净 7 支 10mL 比色管，分别加入 0、0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00mL 氨态氮标准溶液(工作液)，用无氨的水稀释至 10mL，各加入 2.0mL 次溴酸盐溶液，混匀后放置 30min。各加 1.0mL 磺胺溶液及 1.5mL 盐酸溶液，混匀后放置 5min。各加 1.0mL 萘乙二胺溶液，加水至标线，混匀后放置 15min。以水为参比，在 540nm 波长处测定各溶液的吸光度。然后算出两份空白溶液吸光度的平均值，从各标准溶液的吸光度中扣除空白，绘制标准曲线或求出回归直线方程。

2、接收液的测定：将接收液定量转移到 100mL 容量瓶中，并加入一定的氢氧化钠，使溶液呈碱性。移取刚配好的溶液 2.0mL 至 25mL 容量瓶中，再加入 2.0mL 次溴酸盐溶液，混匀后放置 10min，再加入 1.0mL 磺胺溶液及 1.5mL 盐酸，混匀后放置 5min，最后加 1.0mL 萘乙二胺溶液，加水至刻度线，摇匀后放置 15min，以水为参比，在 540nm 处测其吸光度。利用校准曲线或回归直线方程，计算接收液中氮的含量和奶粉中蛋白质的含量。

五、数据处理

六、思考题

1、在蛋白质的测定中，对比凯氏定氮法和比色法两种方法的测定结果，说明哪种方法比较适用于奶粉中蛋白质的测定？哪种方法的测量准确度高？哪种方法的测量灵敏度高？

实验四十四 奶粉中总糖的测定（斐林氏容量法）

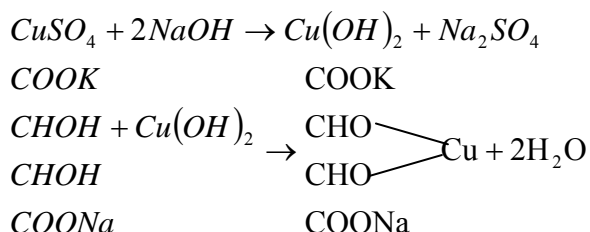
一、实验目的

了解利用斐林氏容量法测定奶粉中总糖的方法

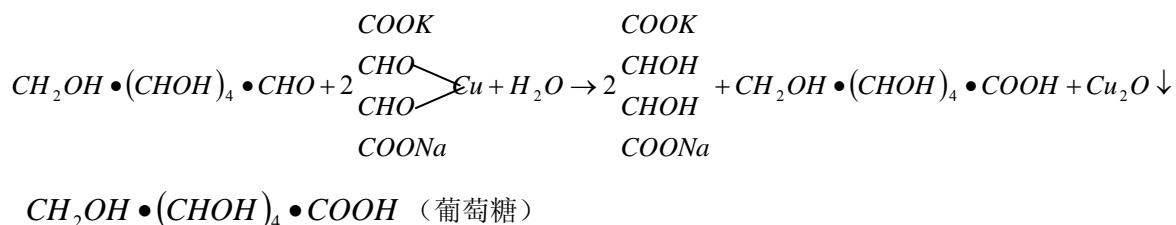
二、实验原理：

奶粉中主要含有乳糖和蔗糖，样品中原有的和水解后产生的转化糖具有还原性，可用斐林试剂滴定，从而计算出含糖量。

斐林氏 A、B 液混合时，生成天蓝色氢氧化铜沉淀立即与酒石酸钾钠起反应，生成深蓝色的氧化铜和酒石酸钾钠的络合物—酒石酸钾钠铜，反应式如下：



酒石酸钾钠铜被葡萄糖和果糖还原，生成红色的氧化亚铜沉淀。



达到终点时，稍微过量的转化糖将蓝色的次甲基蓝指示剂还原为无色的隐色体，而显出氧化亚铜的鲜红色。（隐色体易为空气中的氧所氧化并重新变为次甲基蓝染色体）。

三、试剂

1%次甲基蓝指示剂、1：1 盐酸、20%醋酸铅、10%硫酸钠、40%氢氧化钠、蔗糖（A.R）

斐林氏 A 液：溶解 69.28g 化学纯五水硫酸铜于 1000mL 水中，过滤备用

斐林氏 B 液：溶解 346g 酒石酸钾钠和 100g 氢氧化钠于 100mL 水中，过滤备用

四、实验步骤：

1、斐林氏溶液的标定：

称取经 105℃ 烘干并冷却的分析纯蔗糖 0.2~0.3g，用 50mL 蒸馏水溶解，并移入 100mL

容量瓶中，加 1:1 盐酸溶液 5mL，摇匀。置于水中加热，使溶液在 2~2.5min 内升温至 67~69℃，保持 7.5~8min，使全部加热时间为 10min。取出，迅速冷却至室温。用 40%氢氧化钠溶液中和，加水至刻度，摇匀，注入滴定管中（必要时过滤）。

准确吸取斐林氏 A、B 液各 2mL 于 250mL 锥形瓶中，加水约 40mL，置于电炉上加热至沸，保持 1min，加入次甲基蓝指示剂 1~2 滴，再煮沸 1min 立即用配制好的糖液滴定至蓝色退去呈鲜红色为终点，正式滴定时先加入比预测时少约 0.5mL 的糖液，煮沸 1min 加指示剂 1~2 滴，再煮沸 1min，继续用糖液在 1min 内滴定至终点。按下式计算其浓度。

$$A = \frac{W \times V}{100 \times 0.95}$$

A: 相当于 4mL 斐林氏 A 和 B 混合液的转化糖量 (g)

W: 称取的纯蔗糖的量 (g)

V: 滴定时消耗的糖液量 (mL)

0.95: 换算系数 (0.95g 蔗糖可转化为 1g 转化糖)

2、样品测定

称取样品 0.8~1.2g (视含糖量而增减)，用 50mL 左右的水洗入 100mL 容量瓶中，加入 20%醋酸铅溶液 3~5mL 和 10%硫酸钠溶液 3~5mL，至不再产生沉淀为止 (沉淀剂的加入量视蛋白质质量而定)，加水至刻度，摇匀，过滤。

取过滤液 50mL 于 100mL 容量瓶中，按前述斐林氏 A 和 B 液标定方法进行转化，中和，将检液注入滴定管中，吸取斐林氏 A 和 B 液各 2mL 于 250mL 锥形瓶中，按斐林氏溶液的标定方法 (仅以检液代替标准糖液，操作完全相同) 进行滴定，按下式计算样品含糖量：

$$X(\%) = \frac{A \times 200}{W_1 \times V_1} \times 100$$

X: 总糖 (以转化糖计)

W₁: 称取的样品量

V₁: 滴定时消耗样液量 (mL)

五、数据处理

六、思考题

- 1、在糖度测定中，为什么要在液体沸腾的状态下滴定？
- 2、本实验所使用的费林试剂含有什么化学成分？它们的作用是什么？
- 3、为什么要做空白测定？试说明该法实验误差的来源及消除方法。
- 4、如何应用该法测定植物材料的淀粉含量？

实验四十五 奶粉中铜、铅的测定（阳极溶出法）

一、实验目的

掌握奶粉中测定铅含量的方法

二、实验原理

铜是人体必需的微量元素，它参与酶催化功能，也是人体血液，肝脏和脑组织等铜蛋白质的组成部分，缺铜会引起贫血，是因为出现血管性硬蛋白结缔组织和骨酪元蛋白的合成障碍的结果，成年人每日最低铜摄取量为 2~3mg，但摄取过量会引起肝脏损害，出现慢性和活动性肝炎症状，所以食品中铜的允许量一般不超过 5~20mg/kg。

铅不是人类营养所必需的元素，经口摄入过量的铅可发生中毒，若通过各种途径长期摄入铅则引起铅的慢性中毒，症状主要有神经衰弱症，中毒性多发神经炎和中毒性脑病等。所以对食品中铅的含量控制比较严格，一般食品中铅的允许量在 0.5~2mg/kg。

在一定的电极电位下，通过电解、富集，使溶液中有关金属离子沉积在汞膜电极上，然后再向正电位方向连续变化电位，记录金属溶出的电流—电压曲线，曲线呈峰形，在其它实验条件固定下，峰电流与溶液中金属离子浓度成正比。

影响峰电流大小的因素有（1）电极面积应恒定；（2）富集时间，一般为 0.5~30 分钟，由实验选择；（3）电解时搅拌速度，要固定；（4）休止时间，需恒定，0.5 或 1 分钟，使电极物分布均匀；（5）电位变化速率，恒定；（6）解脱电位和时间，解脱电位—0.1V，解脱时间为 1 或 2 分钟，应恒定。

三、实验仪器和试剂

阳极溶出伏安仪、附汞膜电极、饱和甘汞电极、铂电极、XWT104 型记录仪

洗气瓶（内装高锰酸钾，焦性没食子酸—氢氧化钠，水，空瓶）4 只

0.1M 盐酸

0.1mg/mL 标准 pb²⁺溶液：称取硝酸铜 0.1598g，用适量水溶解，滴加 2~3 滴浓硝酸，移入 1000mL 容量瓶中，用二次蒸馏水稀释至刻度。存于塑料瓶中。

四、实验步骤

1、样品处理:

称取奶粉样品 4.0g 于 50mL 凯氏烧瓶中，加浓硫酸 3mL、浓硝酸 5mL，在通风橱中，先用小火加热，待剧烈作用停止后，加大火并不断滴加浓硝酸直至溶液透明不再转黑为止。每当消化溶液颜色变深时，立即添加硝酸，否则难以消化完全。待溶液不再转黑后，继续加热数分钟至有浓白烟逸出，冷却，后加入 5mL 水，继续加热不再转黑后，继续加热至显白烟为止，冷却。将内容物移入 50mL 容量瓶中，并以水稀释至刻度，摇匀，备用。

2、样品测定

a: 预电解电位, -0.9V

b: 电位扫描范围, -0.9~0.1V

c: 溶出电位峰, -0.46V

测定过程: 吸取 1mL 样品溶液置于电解池中，加 0.1M 盐酸溶液 20mL，将汞膜电极、铂电极和甘汞电极插入溶液中，选择适当的灵敏度，调节好仪器，开始通氮气，把起始电位调节在所选定的富集电位 (-0.9V) 上，同时开始搅拌器和按下秒表，富集 3 分钟，停止搅拌，静止 30 秒，调节记录仪走纸的速度 2mm/S，在氮气保护气氛中然后开始扫描，记录阳极溶出极谱图。

用微量注射器将一定体积的标准 Pb^{2+} 溶液加入电解池中，按上述步骤记录阳极溶出谱图。重复上述操作，用标准加入法计算溶液中 Pb^{2+} 的含量。

必要时校正空白。Pb 含量以 mg/kg 计。

在上述条件下，铜的溶出伏安峰在 -0.2V 处。

五、数据处理

实验四十六 普鲁士蓝光度法测定奶粉中的铁

一、实验目的

掌握普鲁士蓝光度法测定奶粉中铁含量的方法

二、实验原理

铁是人体必需的微量元素之一，人体内铁数量不足会导致缺铁性疾患。牛乳中的铁含量通常为 100~900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，比人乳中铁含量少，不能够满足喂养幼儿的需要，因此，市销奶粉常强化一定量的营养元素 Fe。测定奶粉中铁的主要方法有原子吸收法、比色法等。本文利用铁(III)与亚铁氰化钾反应生成普鲁士蓝(PB)，再用光度法测定铁的含量，该法用于食品中铁的测定尚未见报道。研究表明，本法操作简便、快速、重复性好，一般可不经掩蔽干扰离子而直接用于乳粉中铁的测定，结果令人满意。

三、仪器和试剂

UV-721 紫外可见分光光度计

Fe(III) 储备液(0.1mg/mL) 准确称取 0.4317g $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于 10mL HNO_3 中，转入 500mL 容量瓶中，用水稀释至刻度；

Fe(III) 标准工作液 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

亚铁氰化钾溶液 1mg/mL

HNO_3 溶液 1mol/L

二次蒸馏水

四、实验步骤

在 25mL 容量瓶中，依次加入一定量的 Fe(III) 标准工作液，1mL HNO_3 溶液(1mol/L) 和 3mL 亚铁氰化钾溶液，用水稀释至刻度，摇匀，以试剂空白作参比，用 1cm 比色皿，于波长 700nm 波长处测定吸光度。

1、样品处理

准确称取约 10g 奶粉于瓷坩埚中，先在电炉上小火加热炭化无烟后，移入高温电阻炉中，

于 480℃灰化，直至样品灰化完全。冷却加入 2mL 浓硝酸溶解，使铁以 Fe（III）离子形式存在，然后加水过滤，于 100mL 容量瓶中定容。

2、标准曲线的绘制

取 7 个 25mL 容量瓶，分别加入 0、1、5、7.5、10、12.5、15mL 铁标准工作液，按实验方法显色操作。此溶液分别含铁 0、0.2、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，于 700nm 处，1cm 比色皿中测定吸光度，绘制标准曲线。

五、数据处理

实验四十七 奶粉中抗坏血酸含量测定方法

一、实验目的

掌握奶粉中抗坏血酸含量测定方法。

二、实验原理

抗坏血酸(即维生素 C) 的缺乏不仅能引起坏血病,还与炎症、动脉硬化、肿瘤等多种疾患有关。因此,将人工合成维生素 C 添加到奶粉中,制成适合不同年龄、不同人群以及不同含量的维生素 C 强化奶粉,可以补充体内维生素 C 的缺乏。为快速、准确地测定奶粉中维生素 C 的含量,将“人乳中抗坏血酸的含量测定方法-2.4 二硝基苯胂法”运用到奶粉中测定抗坏血酸含量,并对方法进行了长期摸索、实践。通过对标准曲线范围、精密度实验、回收率试验观察,均得到较好效果。

将奶粉中的还原型抗坏血酸用硫酸铜溶液氧化成脱氢型抗坏血酸,然后,使之与 2,4-二硝基苯胂作用,生成红色的脎。脎的含量与总抗坏血酸量成正比。将脎溶于硫酸后进行比色,由标准曲线计算抗坏血酸的含量。

三、仪器及试剂

恒温箱: $(37 \pm 0.15)^\circ\text{C}$ 、UV-721 分光光度计。

2,4-二硝基苯胂硫脲及硫酸铜混合试剂(下称混合试剂)、硫酸(9+1)。50 g/L 三氯乙酸。抗坏血酸标准物、4.5 mol/L 硫酸溶液。

四、操作步骤

1、标准曲线

精确称取 0.100 0 g 抗坏血酸标准物,加水稀释至 100 mL (1 mg/mL)。吸取此液 2.00 mL,以 50 g/L 三氯乙酸稀释至 100 mL (20 μg /mL)。吸取 20 μg /mL 抗坏血酸标准溶液 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 mL(相当于 0, 5, 10, 15, 20 μg)于试管中,分别依次加入 50 g/L 三氯乙酸 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0 mL,于各管中分别加入混合试剂各 0.25 mL。混合后,于 $(37 \pm 0.15)^\circ\text{C}$, 恒温 3h 后,于冰水中,各加硫酸(9+1)1.25 mL。室温放置 0.5h,用 721 分光光度计,490 nm 波长,0 管调仪器零点,读各管光密度值。

2、样品处理与测定

样品处理：精密称取样品约 0.2 g(准确至 0.0001g) ，加 50 g/L 三氯乙酸溶液 6 mL (或根据样品中抗坏血酸含量适当增加)，加塞振摇 2 min，放置 10 min 后，过滤、去蛋白。

保温：取滤液 1.0 mL 3 份，1 份作样品空白管，其余 2 管(平行样) 各加混合试剂 0.25 mL，混合后，3 支试管均于(37 ± 0.15) °C，恒温 3h 后，置冰浴中，于样品空白管加混合试剂 0.25mL，混匀。

然后于每支试管中缓缓加入硫酸(9+1)1.25 mL，边加边摇。比色：将上述各管于室温放置 0.5h，用 721 分光光度计，至 490 nm 波长下，以样品空白管调 0，读样品之光密度。

由标准曲线计算样品中抗坏血酸的含量。

五、数据处理

$$X = \frac{R}{W} \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{100}{1000}$$

X: 奶粉中抗坏血酸含量 (mg/100g)

R: 样品管光密度于标准曲线上查得相当于抗坏血酸量(μg)

W: 取样量(g)

V₁: 稀释总体积(mL)

V₂: 吸取样液体积(mL)

实验四十八 2, 6-氯酚靛酚滴定法测定维生素 C 的含量

一、目的:

1. 学习维生素 C 定量测定的一般原理, 掌握用 2, 6-二氯酚靛酚滴定法定量测定食物和生物体液中维生素 C 的基本操作技术。

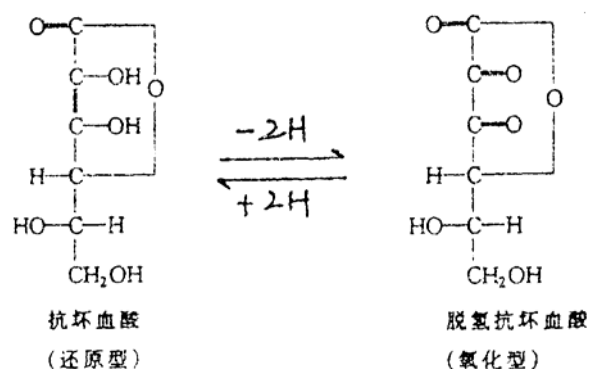
2. 概括了解维生素 C 的生理意义及其在新鲜水果和蔬菜中的含量。

二、原理:

维生素 C 是人类膳食中必需的维生素之一, 如果缺乏维生素 C, 将导致坏血病发生。因此, 维生素 C 又称为抗坏血酸, 有防治坏血病的功效。抗坏血酸在自然界分布十分广泛, 存在于新鲜水果和蔬菜中, 尤其是柠檬果实和一些绿色植物(如青辣椒、菠菜等)中含量特别丰富。

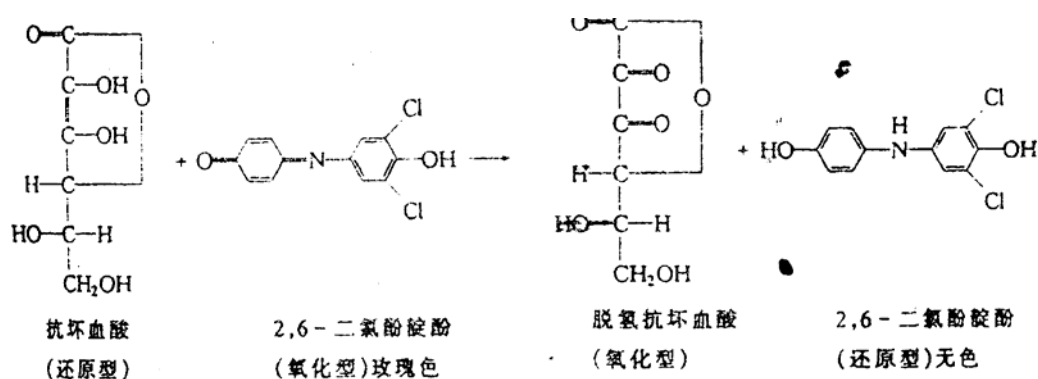
抗坏血酸在机体同具有广泛的生理功能, 已知体内许多重要物质的代谢反应都需要抗坏血酸的参与。它是脯氨酸羟化酶的辅酶, 故有增进胶原蛋白合成的作用。机体中许多含巯基的酶, 需要依赖于作为还原剂的抗坏血酸的保护, 使酶分子的巯基处于还原状态, 从而维持其催化活性。由于抗坏血酸的氧化还原作用, 它可促进免疫球蛋白的合成, 增强机体的抵抗力。同时还能使氧化型谷胱甘肽转化为还原型谷胱甘肽(简称 GSH), 而 GSH 可与重金属结合而排出体外, 因此维生素 C 常用于重金属的解毒。此外, 抗坏血酸尚有许多其他生理功能, 但其作用机理还不十分清楚。

抗坏血酸是一种不饱和的多羟基内酯化合物, 稍有酸味的糖类白色晶体, 易溶于水, 故属于水溶性维生素。在溶液中其分子内 C₂ 和 C₃ 之间的烯醇式羟基上的氢极易解离并释放出 H⁺, 而被氧化成脱氢抗坏血酸, 氧化后仍具有维生素 C 的生理活性, 但它易分解为二酮古洛糖酸, 此化合物不再具有维生素 C 的生理活性。维生素 C 有很强的还原性, 在碱性溶液中加热并有氧化剂存在时, 易被氧化而破坏。还原型和氧化型抗坏血酸可以互相转变, 在生物组织中自成一氧化还原系统。



由于维生素在营养学和临床方面的重要意义,故对食物和生物材料中维生素含量的测定是十分必须的。抗坏血酸的定量测定方法很多,有 2, 6-二氯酚靛酚(简称 DCIP)滴定法、碘滴定法、2, 4-二硝基苯肼法、Folin 试剂比色法、紫外吸收法等。其中广泛采用的是 DCIP 滴定法,它具有简便、快速、比较准确等优点,适用于许多不同类型样品的分析。缺点是不能直接测定样品中的脱氢抗坏血酸及结合抗坏血酸的含量,易受其他还原物质的干扰。如果样品中含有色素类物质,将给滴定终点的观察造成困难。

在酸性环境中,抗坏血酸(还原型)能将染料 2, 6-DCIP 还原成无色的还原型 2, 6-DCIP, 而抗坏血酸则被氧化成脱氢抗坏血酸。氧化型的 2, 6-DCIP 在中性或碱性溶液中呈蓝色,但在酸性溶液中则呈粉红色。因此,当用 2, 6-DCIP 滴定含有抗坏血酸的酸性溶液时,在抗坏血酸未被全部氧化前,滴下的 2, 6-DCIP 立即被还原成无色,一旦溶液中的抗坏血酸全部被氧化时,则滴下微量过剩的 2, 6-DCIP 便立即使溶液显示淡粉红色或微红色,此时即为滴定终点,表示溶液中的抗坏血酸刚刚全部被氧化。依据滴定时 2, 6-DCIP 标准溶液的消耗量(ml),可以计算出被测样品中抗坏血酸的含量。氧化型 2, 6-DCIP 与还原型抗坏血酸常在稀草酸或偏磷酸溶液中进行反应。即先将样品溶于一定浓度的酸性溶液或经抽提后,再用 2, 6-DCIP 标准溶液滴定至终点。其反应式如下:



食物和生物材料中常含有其他还原物质,其中有些还原物质可使 2, 6-DCIP 还原脱色。为了消除这些还原物质对定量测定的干扰,可用抗坏血酸氧化酶处理,破坏样品中还原型抗坏血酸后,再用 2, 6-DCIP 滴定样品中其他还原物质。然后从滴定未经酶处理样品时 2, 6-DCIP 标准溶液的总消耗量中,减去滴定非抗坏血酸还原物质 2, 6-DCIP 标准溶液的消

耗量，即为滴定抗坏血酸实际所消耗的 2, 6-DCIP 标准溶液的体积，由此可以计算出样品中抗坏血酸的含量。另外，还可利用抗坏血酸和其他还原物质与 2, 6-DCIP 反应速度的差别，并通过控制样品溶液在 PH1—3 范围内，进行快速滴定，可以消除或减少其他还原物质的作用，一般在这样的条件下，干扰物质与 2, 6-DCIP 的反应是很慢的或受到抑制。

生物体液（如血液、尿等）中的抗坏血酸的测定比较困难，因为这些样品中抗坏血酸的含量很低，并且存在许多还原物质的干扰，同时还必须预先进行脱蛋白处理。在生物体液中 含有巯基、亚硫酸盐及硫代硫酸盐等物质，它们都能与 DCIP 反应，但反应速度比抗坏血酸慢得多。样品中巯基物质对定量测定的干扰，通常可以藉加入对-氯汞苯甲酸（简称 PCMB）而得到消除。

本实验采用 2, 6-二氯酚靛酚滴定法，以新鲜水果、蔬菜和生物体液为分析材料，进行抗坏血酸含量测定。

三、器材及试剂

1. 器材：

- ①松针、新鲜蔬菜（辣椒、青菜、西红柿等）、新鲜水果（桔子、柑子、橙、柚等）
- ②吸管
- ③容量瓶
- ④锥形瓶
- ⑤微量滴定管
- ⑥台天平
- ⑦组织捣碎机。
- ⑧抽滤装置

2. 试剂：

- ①2%草酸溶液：草酸 2g，溶于 100ml 蒸馏水。
（2%草酸液可用 4%偏磷酸—醋酸溶液代替）
- ②1%草酸溶液：溶 1g 草酸于 100ml 蒸馏水。
- ③标准抗坏血酸溶液：准确称取 50.0mg 纯抗坏血酸，溶于 1%草酸溶液，并稀至 500ml。贮棕色瓶、冷藏，最好临用时配制。
- ④1%HCl 溶液。
- ⑤0.1%2, 6-二氯酚靛酚溶液：溶 250mg2, 6-二氯酚靛酚于 150ml 含有 52mgNaHCO₃ 热水中，冷却后加水稀释至 250ml，滤去不溶物，贮棕色瓶内，冷藏（4℃约可保存一至三周）。每次临用时稀释 10 倍，并以标准抗坏血酸溶液标定。

⑥对-氯汞苯甲酸（简称 PCMB）溶液（ $2\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）称取 100mgPCMB 溶于 50ml $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液中，过滤后滤液保存备用。（分析尿液样品用）

⑦抗坏血酸氧化酶（ -20°C 保存）

⑧水果汁（桔子汁、柠檬汁、番茄汁等）

⑨新鲜水果（桔柑类、橙、柚、柠檬、草莓、山楂、番茄等）

⑩新鲜蔬菜（辣椒、菠菜、青菜等）

⑪松针

⑫生物体液（血清、血浆等）

四、操作步骤:

1. 不同样品用不同方法提取后滴定

(1) 水果汁样品

将果汁充分摇匀后，取 5ml 样品放入 50ml 容量瓶中，用 2%草酸溶液（或 4%偏磷酸-醋酸）溶液稀释，并定容至 50ml，混匀后通过快速滤纸过滤（或离心）。取滤液 10ml 放入锥形瓶内，立即用已标定过的 2, 6-DCIP 溶液快速滴定至样品液呈现玫瑰色，并保持 15—20s 不变即为终点，记录所消耗的 2, 6-DCIP 溶液的体积(ml)。样品液中抗坏血酸含量宜在 $0.1—0.2\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内，如果偏高或偏低则可酌情增减样品用量或进行适当稀释。另取 10ml 蒸馏水作空白对照滴定。样品液和空白对照均至少各做 3 份，滴定结果取平均值，随时分别做好数据记录。

检测果汁（或其他样品）中干扰物质的存在，可取 5ml 新鲜果汁放入 50ml 容量瓶中，加少许抗坏血酸氧化酶晶体，轻轻混匀，放置 10min，藉以破坏还原型抗坏血酸。然后再中入 2%草酸（或 4%偏磷酸-醋酸）溶液释稀至刻度，混匀后过滤，取这种滤液 10ml 用 2, 6-DCIP 进行滴定，记下消耗的 DCIP 溶液体积（ml）。

(2) 水果样品

将新鲜水果去皮，可食部分切成小块，称取 25—50g 样品置于匀浆器中或研钵内，加入 25ml 2%草酸（或 4%偏磷酸-醋酸）溶液研磨，抽提液倾入 100ml 容量瓶中，残渣再加 25ml 2%草酸（或 4%偏磷酸-醋酸）溶液研磨和抽提两次，每次抽提液均倾入容量瓶中，最后用 2%草酸（或 4%偏磷酸-醋酸）溶液定容至 100ml。混匀后用快速滤纸过滤（最初数 ml 滤液弃

去)或离心,取滤液或上清液 10ml 放入 50ml 锥形瓶内,随即用 2, 6-DCIP 溶液快速滴定至终点,取 10ml2%草酸(或 4%偏磷酸-醋酸)溶液作空白对照滴定,样品液和空白对照的各平行做 3 份。

(3) 蔬菜样品

称取新鲜蔬菜 100—200g,洗净后淋干并用纱布拭去其表面水份,切成碎块置于组织捣碎器内,加入 100ml2%草酸(或 4%偏磷酸-醋酸)溶液,捣碎 1—2min。称取匀浆 20—50g 倾入 100ml 容量瓶中,用 2%草酸(或 4%偏磷酸-醋酸)溶液洗涤匀浆容器数次,洗液均转入容量瓶中,最后稀释至刻度。混匀后用快速滤纸过滤(或离心),弃去最初滤出的滤液。如果样品颜色太深,可采用白陶土进行脱色处理。吸取滤液 5—10ml 放入锥形瓶中,立即用标定过的 2, 6—DCIP 深液进行快速滴定。同时用 2%草酸(或 4%偏磷酸-醋酸)溶液作空白对照,分别记下各次滴定所消耗的染料溶液的体积(ml)。

(4) 松针样品

称取松针 1g 用水洗净,淋干并用滤纸吸去表面水分,放在研钵中,加入适量 1%HCl 溶液,充分研磨,静置后将上层抽提液倾入 100ml 容量瓶中。如此反复研磨抽提 2—3 次,最后用 1%HCl 溶液稀释定容至刻度。混匀后过滤或离心,取滤液 5ml 放入锥形瓶中,随即用 2, 6-DCIP 溶液滴定。另取 5ml1%HCl 溶液作出空白对照滴定。

(5) 生物体液样品

生物体液中维生素 C 的含量测定应采用新鲜样品,分析前必须制备成无蛋白质样品。向离心管中先加入 4ml 血清(血浆、尿液等),再加入 6ml2%草酸(或 4%偏磷酸-醋酸)溶液,充分混匀,离心(3500rpm) 10min。取上清液 8—9ml 放入锥形瓶内,可直接用 2, 6-DCIP 标准溶液进行滴定。样品和空白对照至少平行各做 3 份,取其平均值。

尿液样品在滴定前还必须用 PCMB 处理,即取 9ml 无蛋白上清液放入离心管中,再加 1mlPCMB 溶液($2\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$),混匀后放置 5—10min。然后离心 10min,取上清液 8—9ml 放入锥形瓶内,用 2, 4-DCIP 溶液滴定之。

注意:各样品滴定过程宜迅速,一般不超过 2 分钟。滴定所用的染料不应少于 1ml 或多于 4ml,如果样品含抗坏血酸太高或太低时,可酌量增减样液。

2. 2, 6-二氯酚靛酚溶液的标定

准确吸取标准抗坏血酸溶液 1.0ml(含 0.1mg 抗坏血酸)置 100ml 锥形瓶中,加 9ml1%

草酸，用微量滴定管以稀释 10 倍的 2, 6-二氯酚靛酚滴定至淡红色，并保持 15 秒钟不褪色即为终点。由所用染料的体积计算出 1ml 染料相当于多少 mg 抗坏血酸。

五、结果与讨论:

1. 计算:

$$\text{抗坏血酸 (mg/100g 样品)} = \frac{(V_A - V_B) \times T}{W} \times 100$$

T=1ml 染料能氧化抗坏血酸 mg 数。

W=10ml 样液相当于含样品之 g 数。

V_A 为滴定样品时所消耗的染料 ml 数 (平均值); V_B 为滴定空白时所消耗染料的 ml 数。

2. 讨论:

本法测定 V_C 的利与弊。

注: ①2%草酸可抑制抗坏血酸氧化酶, 1%草酸因浓度低不能完成上述作用。偏磷酸有同样功效。若样品中含有大量 Fe^{2+} 可用 8%醋酸溶液提取, 如仍用偏磷酸或草酸为提取剂, Fe^{2+} 可以还原二氯酚靛酚, 如用醋酸则 Fe^{2+} 不会很快与染料起作用。故可用 4%偏磷酸-醋酸液代替 2%草酸液。

②如浆状物泡沫很多, 可加数滴辛醇或丁醇。

③若浆状物不易过滤, 可离心取上清液测定。

④如滤液颜色太深, 滴定时不易辨别终点, 可先用白陶土脱色。

⑤样品中某些杂质亦能还原二氯酚靛酚, 但速度均较抗坏血酸慢, 故终点以淡红色存在 15 秒钟为准。

六、思考题

1、提取 V_C 时, 加入 2%草或 4%偏磷酸-醋酸液的作用是什么?

2、如果提取液颜色太深而又无法脱尽, 严重影响滴定终点判断时, 是否有其它办法能准确判断出终点? (提示: 借助仪器)

3、提取液中的抗坏血酸氧化酶是否会影响本实验结果? 能否加热消除该酶的影响?

预习报告格式

- 1、实验目的
- 2、实验原理
- 3、实验步骤：
 - (1) 要求将实验内容分拆，并画出流程图
 - (2) 要求写明各试剂的用途和各步骤的目的和实验原理
- 4、回答指导教师提出的问题

实验报告格式

- 1、组号 同组人
- 2、实验目的
- 3、实验原理
- 4、实验步骤：
 - (1) 要求将实验内容分拆，并画出流程图
 - (2) 要求写明各试剂的用量和加入时间
 - (2) 要求写明各试剂的用途和各步骤的目的和实验原理
- 5、回答指导教师提出的问题