

实验一 滴定分析

滴定(Titration)的最初含义是“纯度的测定”，这种方法是在十八世纪从法国诞生和发展起来的。1729年，法国化学家日夫鲁瓦(Claude Joseph Geoffroy, 1683 ~ 1752)第一次采用了滴定分析原则，他以磷酸钾为基准物质，测定了醋酸的浓度。由于滴定分析法的简便、快速，在工业生产中很快显示出了极大的优越性，受到了广泛欢迎，推动了它的不断完善，到了十九世纪中叶，出现了它发展中的极盛时期，它所使用的仪器已基本具备了我们今天实验室中所用的各种形式。

滴定分析在定量分析中占有十分重要的位置。所谓定量分析，是对所研究的样品中存在的某一或某些指定成分进行含量测定的一类分析方法。它大致可分为容量分析、重量分析和仪器分析。根据滴定的方式不同，滴定分析的方法有直接滴定、间接滴定、返滴定和置换滴定。若根据分析时所利用的化学反应不同，滴定分析法又分为酸碱滴定法、配位滴定法、氧化还原滴定法和沉淀滴定法。这些滴定法简便、快速，并有足够的准确度，因此，在临床检验、医疗卫生分析、工业生产中是一类广泛应用的分析方法。在近代发展起来的滴定分析方法中，许多是利用一些特殊的仪器装置来确定滴定终点，如：电位滴定法、电导滴定法、库仑滴定法、安培滴定法和光度滴定法等等。这些均属于仪器分析的范畴。

(一) 葡萄糖注射液中葡萄糖含量的测定

目的要求

通过葡萄糖注射液中葡萄糖含量的测定，掌握间接碘量法的原理及其操作。

实验原理

I_2 与NaOH溶液作用生成NaIO，NaIO可将葡萄糖定量氧化为葡萄糖酸，在酸性条件下，未与葡萄糖作用的次碘酸钠可转变成单质碘(I_2)析出，因此只要用硫代硫酸钠标准溶液滴定析出的碘，便可计算出葡萄糖的含量。

反应式为： $I_2 + 2NaOH = NaI + NaIO + H_2O$

$CH_2OH(CHOH)_4CHO + NaIO + NaOH \rightarrow$

$CH_2OH(CHOH)_4COONa + NaI + H_2O$

过量的NaIO在酸性条件下与NaI作用又生成 I_2 ：

$NaIO + NaI + H_2SO_4 = Na_2SO_4 + I_2 + H_2O$

析出的 I_2 可用 $Na_2S_2O_3$ 标准溶液进行滴定：

$2Na_2S_2O_3 + I_2 = Na_2S_4O_6 + 2NaI$

由上述反应可得关系式：

$n(I_2) = n(C_6H_{12}O_6) + \frac{1}{2}n(Na_2S_2O_3)$

即：

$$n(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = n(\text{I}_2) - \frac{1}{2} n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$$

注射液中葡萄糖的质量浓度为：

$$\rho(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = \frac{\left[c_{\text{I}_2} \cdot V_{\text{I}_2} - \frac{1}{2} c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \right] M_{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}}{V_{\text{试样}}}$$

仪器、药品

容量瓶(250ml) 移液管(25ml) 碱式滴定管(50ml) 小烧杯 小量筒 锥形瓶(250ml)
碘量瓶(250ml) 洗瓶

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (A.R) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (固) Na_2CO_3 (固) I_2 (固) KI (固) 葡萄糖注射液($50\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) HCl ($6\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) NaOH ($1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) H_2SO_4 ($1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 淀粉指示剂($5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

实验步骤

1. $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液配制与标定

(1) 准确称取 1.0~1.2g(称准至小数点后四位)分析纯 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (150 ~180 烘干 2 小时)于小烧杯中，加少量水溶解并转入 250ml 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，计算其准确浓度。

(2) 称取 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.5g 和 0.05g Na_2CO_3 于小烧杯中，加适量刚煮沸并冷却的蒸馏水溶解，稀释至 500ml，转移至棕色瓶中，放置一周后再进行标定。

(3) 用移液管移取 25.00ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 标准溶液于碘量瓶中，加入 $6\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5ml 和 20% KI 5ml，立即密塞摇匀，在暗处放置 5 分钟用蒸馏水稀释至 100ml，用待标定的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液进行滴定至溶液呈黄绿色时，加入 0.5% 淀粉指示剂 2ml，继续滴定至蓝色恰好消失，而溶液变为 Cr^{3+} 离子的亮绿色。记录所消耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的体积，平行测定 3 次，计算 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的准确浓度。

2. $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘标准溶液的配制与标定

(1) 称取 12.7g 碘研细，转移至小烧杯中用 70% KI 50ml 使之完全溶解，用水稀释至 1000ml，置棕色瓶中备用。

(2) 用移液管准确移取 25.00ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液于锥形瓶中，加 50ml 蒸馏水，加淀粉指示剂 2ml 用 I_2 液滴定至溶液呈蓝色不消失为止。记录所消耗 I_2 溶液的体积，平行测定 3 次，计算碘溶液的准确浓度。

3. 葡萄糖注射液中葡萄糖含量的测定

用移液管吸取 25.00ml $50\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖注射液于 250ml 容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀。用 25.00ml 移液管分别吸取上述溶液 3 份，置于 3 个锥形瓶(或碘量瓶)中，再分别移取 25.00ml I_2 标准溶液于上述 3 个锥形瓶(或碘量瓶)中，摇匀。慢慢加入 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液(约需 4ml)，边加边摇，直至溶液呈淡黄色(附注)。将锥形瓶(或碘量瓶)加塞，摇匀，于暗处放置 10min，再加入 5ml $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液酸化，立即用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液滴定至浅黄色时，加入 2ml $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 淀粉溶液，继续滴定到蓝色消失为止。记录滴定数据，平行滴定 2~3 次。计算葡萄糖注射液的质量浓度。

思考题

1. 用间接碘量法测定葡萄糖注射液的质量浓度时，为什么要先加 NaOH 溶液，后加 H_2SO_4 溶液？

2. 淀粉指示剂的用量为什么要多达 2ml (0.5%) ? 和其他滴定方法一样, 只加几滴行不行?

3. 为什么用 I_2 溶液滴定 $Na_2S_2O_3$ 溶液时应预先加入淀粉指示剂? 而用 $Na_2S_2O_3$ 滴定 I_2 溶液时必须在将近终点之前才加入?

附注

1. 加入 NaOH 溶液的速度不能过快, 否则 NaIO 来不及氧化 $C_6H_{12}O_6$ 而歧化为不与 $C_6H_{12}O_6$ 反应的 $NaIO_3$ 和 NaI, 使测定结果偏低。

(张建萍 编)

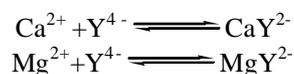
(二) 水的总硬度测定

实验目的

1. 了解配位滴定法的基本原理和方法。
2. 掌握用 EDTA 标准溶液测定水的总硬度的操作方法和测定条件。

基本原理

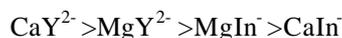
水的硬度的测定可分为水的总硬度的测定和钙镁硬度的测定两种。总硬度的测定是滴定 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的总含量，并以 Ca^{2+} 进行计算。通常以每升水中所含 Ca^{2+} 离子的毫摩尔数表示，规定 1 升水中含 1mmol Ca^{2+} 为 1 度。后一种是分别测定 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的含量。测定水的总硬度，一般采用配位滴定法。最常用的配位剂是乙二胺四乙酸二钠盐，用 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 表示，习惯上称为 EDTA，它在溶液中以 Y^{4-} 的形式与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子配位，形成 1:1 的无色配合物。即：



用 EDTA 滴定时，必须借助于金属指示剂确定滴定终点。常用的指示剂为铬黑 T，它在 pH=10 的缓冲液中，以纯蓝色游离的 HIn^{2-} 形式存在，与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子形成酒红色的配合物，通式为：



Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子与 EDTA 及铬黑 T 形成配合物的稳定性不同，其稳定性大小的顺序为：



测定时，先用 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液调节溶液的 pH=10 左右。滴定前，当加入指示剂铬黑 T 时，它首先与水中少量的 Mg^{2+} 配位形成酒红色的配合物，当用 EDTA 溶液滴定时 EDTA 便分别与水中游离的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子配位，接近终点时，因 MgY^{2-} 的稳定性大于 MgIn^{-} ，故 EDTA 夺取 MgIn^{-} 中的 Mg^{2+} ，使铬黑 T 游离出来，这时溶液由酒红色变为蓝色，指示终点到达。

根据等物质的量反应规则，根据 EDTA 标准溶液的浓度和消耗的体积，可按下式计算水的总硬度。

$$\text{水的总硬度 (mmol}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{c_{\text{EDTA}}V_{\text{EDTA}}}{V_{\text{样}}} \times 1000$$

标定 EDTA 溶液的准确浓度，所用的基准物质有 Zn、 MgCO_3 或 CaCO_3 等，标定条件同前述，计算公式如下：

$$c_{\text{EDTA}} = \frac{m_{\text{Zn}}}{M_{\text{Zn}} V_{\text{EDTA}}} \times 1000$$

仪器、药品

50ml 碱式滴定管 移液管(25ml、50ml) 250ml 锥形瓶 250ml 容量瓶 500ml 试剂瓶
 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液(pH 10) EDTA 标准溶液($0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $9\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 铬黑 T 指

示剂 ($5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 纯锌(分析纯)

实验步骤

1. $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{EDTA}$ 溶液的配制

称取 EDTA (固) 1.87g 于烧杯中, 微热溶解后稀释至 500ml, 存于 500ml 试剂瓶中备用。

2. EDTA 标准溶液的标定

准确称取纯锌 0.16~0.17 (称至小数点后第四位) 于烧杯中, 加 $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 5ml 使其全部溶解, 用 250ml 容量瓶定容。

用移液管吸取上述 Zn^{2+} 标准溶液 25.00ml 至锥形瓶中, 边震荡边缓慢滴加 3~4 滴 $9\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 至有 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 白色沉淀析出, 再加入 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液 10ml 沉淀溶解, 加 2 滴铬黑 T 指示剂, 用 EDTA 溶液滴定至溶液由酒红色刚好变为纯蓝色为终点。再重复滴定 2 次。计算 EDTA 溶液的准确浓度。

3. 水的总硬度测定

准确吸取水样 50.00ml 于锥形瓶中, 加入 3~4 滴 $9\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, 再加入 5ml $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液, 2 滴铬黑 T 指示剂, 用 EDTA 标准溶液滴定至溶液由酒红色刚好变为纯蓝色为终点。记录消耗 EDTA 溶液的体积。再重复滴定 2 次, 计算水的总硬度。

思考题

1. 滴定时为什么要加入 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液?
2. 在配位滴定中, 指示剂应具备什么条件?

附注

1. EDTA 固体含结晶水不稳定, 故不能直接配制其标准溶液。

2. 以 MgCO_3 作基准物质标定 EDTA 溶液: 准确称取 MgCO_3 (于 110 $^\circ\text{C}$ 干燥 2 小时至恒重) 0.20-0.22g (称至小数点后第四位) 置于烧杯中, 加 5 滴蒸馏水润湿, 缓慢滴入 $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 约 3ml, 搅拌溶解, 移入 250ml 容量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀待用。

用移液管吸取上述标准溶液 25.00ml 于锥形瓶中, 滴加 3-4 滴 $9\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, 再加入 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲溶液 10ml, 3 滴铬黑 T 指示剂, 用 EDTA 溶液滴定, 当溶液由酒红色刚好变为纯蓝色时, 即达滴定终点。记录消耗 EDTA 溶液的体积。再重复滴定 2 次。计算 EDTA 溶液的准确浓度。

(贾少辉 编)

实验二 溶液的渗透压及其对细胞形态的影响

最早对渗透压进行半定量研究的是法国生理学家杜特罗夏 (Rene Joachim Henri Dutrochet, 1776 ~ 1847) 在 1830 年左右进行的。他用一个钟罩形的玻璃容器, 下面用羊皮纸封住, 从上面插进一支长玻璃管, 容器中分别放入各种不同浓度、不同物质的溶液, 然后把它浸入水槽中。于是观察到玻璃管内液面上升, 发现其升高值与溶液的浓度成正比。他解释说: 这个压力是由于外面的水通过羊皮纸向溶液方向迁移而产生的。他给这种现象命名为“渗透” (Osmosis)。

渗透压是溶液的四项依数性之一。稀溶液的依数性包括溶液的蒸气压下降、沸点升高、凝固点降低和溶液的渗透压。其中, 溶液渗透压的测定在临床上最为重要, 它对纠正体内水、电解质以及酸碱平衡失调起着十分重要的作用。

动物体内有血液和组织液, 它们总称内环液。内环液浸浴着机体内部组织, 它是组织与外环境实现物质和能量交换的介质。内环液负担着维持体内平衡的功能。

动物细胞或机体必须保持一定量的水分, 脱水或胀水都将引起病变。细胞内外的各种膜都是半透膜, 细胞的水分代谢(进出)就靠内环液有恒定的渗透压来维持平衡。内环液渗透压上升, 细胞将脱水; 反之, 若保持较低的渗透压强, 则细胞吸水胀大。由此, 这就很容易解释将海鱼放养于淡水或淡水鱼放养于海水都将造成死亡的原因。

目的要求

1. 学习利用凝固点降低法测定溶质的相对分子量及溶液的渗透压。
2. 掌握低渗、等渗、高渗溶液的配制。
3. 用显微镜观察细胞在渗透压不同的溶液中的形态。

实验原理

渗透压的测量方法有使用半透膜的直接测量法和不使用半透膜的间接测量法。医学上, 由于人体各种体液内除含有蛋白质外, 大多含有小分子电解质离子 (Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等), 因此常用间接法测量。间接测量渗透压的方法有蒸气压下降、沸点升高和凝固点降低等方法, 其中以凝固点降低的操作最为方便, 且精度高, 测定迅速, 适合于人体各种体液 (如尿、血清、胃液、唾液等) 的测定。

将溶质溶于溶剂中, 溶剂的凝固点则降低, 即溶液的凝固点低于纯溶剂的凝固点。在稀溶液中溶液凝固点的降低值与溶液的质量摩尔浓度成正比。

$$\Delta T_f = T_f^0 - T_f = K_f \cdot m_B \quad (1)$$

式中, ΔT_f 为溶液的凝固点降低值; T_f^0 为纯溶剂的凝固点; T_f 为溶液的凝固点; K_f 为溶剂的摩尔凝固点降低常数; m_B 为溶液的质量摩尔浓度。

若溶质的摩尔质量为 M , 称取溶质 $m(\text{g})$, 溶剂 $W(\text{g})$ 配成稀溶液, 则溶液的质量摩尔浓度为:

$$m_B = \frac{m/M}{W} \times 1000 \quad (2)$$

已知溶剂的 K_f 值, 测得溶液的凝固点降低值 ΔT_f , 可运用 (3) 式计算出溶质的摩尔质量, 即得溶质的相对分子量。

$$M = \frac{K_f}{\Delta T_f} \times \frac{m \times 1000}{W} \quad (3)$$

根据 Vant Hoff 渗透压计算公式及溶液的凝固点降低值，可计算出溶液的渗透压。

$$= m_B RT = \frac{T_f}{K_f} RT \quad (4)$$

式中， R ： $8.314 \times 10^3 \text{Pa} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ， T ：绝对温度。

人体正常红细胞呈扁圆形，边缘厚，中间薄。在等渗溶液中，其形状不变；在低渗液中细胞易溶胀破裂；于高渗液中易皱缩形成血栓。

仪器、药品

凝固点测定装置 0.1 分度温度计 冰 载玻片 盖玻片 吸耳球 滴管 玻璃棒 洗瓶 小试管 血色素吸管(20 μl) 6号注射针头 分析天平 光学显微镜 葡萄糖(分析纯) 粗食盐

5%(W/W)葡萄糖标准溶液 70%酒精消毒棉球 消毒干棉球 擦镜纸 新鲜血液。

实验步骤

1. 凝固点降低法测定葡萄糖相对分子量

(1) 制冰盐水混合物

在玻璃缸或大烧杯中，加自来水适量(约占容器体积 1/3)，放入外搅拌器，加足量小冰块和粗食盐至饱和，控制温度在 $-2 \sim -4$ ，为保持此温度，实验过程中应及时补充冰和粗食盐。

(2) 纯溶剂水的凝固点测定

取蒸馏水 40ml 置冰点管中，按图 6-1 装置，然后均匀地上下搅拌冰点管内的水，同时不断搅动冰水浴，直至管内有冰晶析出。此时温度略有回升，待温度恒定时，记录数据，可借助放大镜观察读数，读取至小数点后第 2 位。

取出冰点管，待冰晶融化，重复测定 1 次，取其平均值即为纯溶剂水的凝固点 T_f^0 。

(3) 葡萄糖溶液的凝固点测定

用待测葡萄糖溶液冲洗冰点管 3 次。取 40ml 5% (W/W) 葡萄糖标准溶液，注入冰点管中，按上述方法测定葡萄糖溶液的凝固点。重复测定 1 次，取其平均值即为葡萄糖溶液的凝固点 T_f 。

(4) 数据处理

测定项目	第一次	第二次	平均值
溶剂水的凝固点			
溶液的凝固点			

葡萄糖的分子量 $M =$

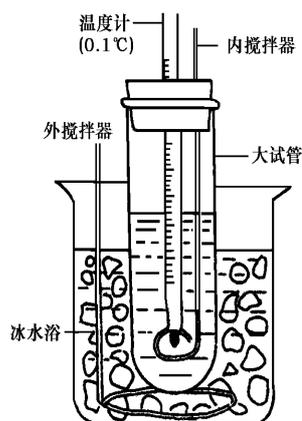


图 2-1 凝固点降低装置

葡萄糖溶液的渗透压 =

2. 红细胞在低渗、等渗和高渗溶液中的形态观察

(1) 配制不同渗透压的溶液

取固体葡萄糖按下表配制成三种浓度的溶液

测定项目	1	2	3
配制浓度(mol·L ⁻¹)	0.10	0.28	0.50
配制体积 (ml)	10	10	10
称取葡萄糖的重量(g)			
mOsm·L ⁻¹			

取三支洁净干燥小试管，分别注入 1ml 上述所配制的溶液备用。

(2) 红细胞混悬液的制备

采血可在手指或耳垂部，通常以耳垂取血较好，不易感染。取血时轻揉耳垂片刻，用 70%酒精消毒棉球擦洗耳垂部，待酒精稍干后，手指夹住耳垂，用消毒注射针头(在酒精灯上烧红亦可)快速刺破耳垂下缘，轻轻挤压耳垂，第一滴血用干棉球擦去，然后用血色素吸管吸取血液，在上述 3 支小试管中分别注入血液 10 μ l，摇匀，即得红细胞混悬液。

(3) 观察红细胞形态

从上述 3 支试管中各取一滴红细胞混悬液，分别滴于载玻片上，盖上盖玻片，置于显微镜载物台上，转动粗调焦轮，使低倍镜(1:10)于最低位置(注意勿将盖玻片压碎)，然后边观察边调节粗调焦轮，使镜头由低向高移动，调至血涂片中红细胞形态清晰，再换用高倍镜(1:45)观察，调节微调焦轮至镜内成像清晰可见。观察比较 3 种浓度溶液中红细胞的形态。必要时，可与标准血涂片比较。

思考题

1. 什么是溶剂的凝固点？什么是溶液的凝固点？什么是过冷现象？
2. 将所测得的葡萄糖分子量与理论值比较，分析造成误差的因素。
3. 如何解释在显微镜下观察到的红细胞在低渗、等渗和高渗溶液中的形态？

附注

1. 在实验过程中，控制适当的过冷温度，需注意以下几点：

- (1) 冰盐水混合物温度以不低于所测液体凝固点 3 为宜。
- (2) 内搅拌器应套在温度计外面，温度计水银球距冰点管底部约 1cm，上下搅拌时，上至液面下至管底部，以每秒约一次的速度均匀搅拌，不宜停顿，尽量不要使液体溅到管壁上，同时避免内搅拌器触及管壁和温度计。
- (3) 过冷程度控制不当，冰点管内液体易在管壁结成冰套。若有冰套形成，应将其取出或暖融，重新操作。

2. 由于溶液渗透压值与冰点降低值呈线性关系，冰点渗透压计已将冰点降低值换算成渗透浓度而显示出来（目前渗透压计仍然以 mOsm·kg⁻¹H₂O 表示渗透浓度）。因此本实验也可用冰点渗透压计测定所配制的低渗、等渗和高渗溶液的渗透浓度值。

(刘君 编)

实验三 缓冲溶液的配制与性质

所谓缓冲溶液，是指能抵抗外加少量酸、碱及稀释，而保持其 pH 值基本不变的溶液。许多化学反应需要在一定的 pH 值条件下进行，为了使所研究的化学反应正常进行，必须加入适当的缓冲溶液，以维持反应体系的 pH 值。显然，缓冲溶液在化学研究中占有非常重要的地位。在生命科学的研究中，缓冲溶液也发挥着举足轻重的作用。人体各种体液的 pH 值都必须维持在一定的范围。如血液的 pH 值要保持在 7.35 ~ 7.45 之间，超出这个范围，就会引起酸中毒或碱中毒，严重时甚至危及生命。此外，测量体液的 pH 值时，需要用一定 pH 值的缓冲溶液作比较来加以测定，微生物的培养、组织切片、细菌的染色和血库中血液的冷藏都需要一定 pH 值的缓冲溶液，研究生物体内的催化剂—酶的催化作用，也需要在一定 pH 值的缓冲溶液中进行，许多药物也需要在一定 pH 值的介质中才能稳定。

因此，掌握缓冲溶液的配制，加强对缓冲溶液性质的理解是非常必要的。缓冲溶液的配制通常有两种方法，一种是近似配制，即确定缓冲对后根据 Henderson-Hasselbalch 方程式计算出所需一定浓度溶液的体积后配制，另一种是直接根据缓冲溶液的配方进行配制。目前，国际上通用的缓冲溶液配方是美国国家标准局制定的 pH=1 ~ 13 的缓冲溶液配方(详见附录七)，按附录七表中所示进行配制缓冲溶液，其 pH 值准确度可达 $\pm 0.02\text{pH}$ 单位。

目的要求

1. 学习缓冲溶液的配制方法。
2. 通过实验加深对缓冲溶液性质的理解。

基本原理

缓冲溶液具有缓冲作用，其特点是：当加入少量强酸、强碱或适当稀释时，其 pH 值不发生明显的改变。依据酸碱质子理论，缓冲溶液是由具有足够浓度、适当比例的共轭酸碱对的两种物质组成，其中的共轭酸为抗碱成分，而共轭碱为抗酸成分。由于缓冲溶液中存在大量的抗酸成分和抗碱成分，通过其共轭酸碱对之间的质子转移平衡的移动，维持 pH 的相对稳定。不同的缓冲溶液具有不同的缓冲范围，配制缓冲溶液时，应根据所需 pH 值选择合适的缓冲对，使所需 pH 值恰好符合在缓冲溶液的缓冲范围内。

缓冲溶液的近似 pH 值可用 Henderson-Hasselbalch 方程式计算：

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{a}} + \lg \frac{[\text{共轭碱}]}{[\text{共轭酸}]} \quad (1)$$

式(1)中， $\text{p}K_{\text{a}}$ 为弱酸解离常数的负对数，[共轭碱]、[共轭酸]为达共轭酸碱对之间的质子转移平衡时的平衡浓度，在近似计算时可以分别用其初始浓度来表示。

若所配制缓冲溶液的共轭酸碱的浓度相同，上式可写为：

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{a}} + \lg \frac{V_{\text{共轭碱}}}{V_{\text{共轭酸}}} \quad (2)$$

由式(2)，根据需要，改变共轭酸碱的体积比，可得到一系列 pH 值不同的缓冲溶液。

应当指出，按上述公式计算、配制出的缓冲溶液的 pH 值是近似值，可能与实测值有偏差。配制精确 pH 值的缓冲溶液，可查阅有关缓冲溶液现成的配方(附录七、十三)，按照附录给出的配方，可配成所要求 pH 值的缓冲溶液。

缓冲溶液的缓冲能力都是有一定限度的。1922 年，生理学家 Donald D. Van Slyke 提出用缓冲容量作为衡量缓冲能力大小的尺度，并给出了定量的表达式。缓冲容量与缓冲溶液的总浓度和缓冲比有关。对于一定的缓冲溶液，当缓冲比为定值时缓冲溶液总浓度愈大，则缓冲

容量愈大。当总浓度相同时，缓冲比愈接近于 1，缓冲容量愈大(且缓冲比等于 1 时，缓冲容量有极大值)。

仪器、药品

酸度计 玻璃电极 饱和甘汞电极 精密 pH 试纸 移液管 容量瓶 NaAc
($0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) HAc($0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NaAc($1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) HAc($1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NaOH ($0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) pH=4
盐酸溶液 甲基红指示剂 NaHCO_3 ($0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NaOH($2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

实验步骤

1. 缓冲溶液配制

利用 Henderson-Hasselbalch 方程式计算 1[#]缓冲溶液所需各组分体积。通过查阅附录七确定 2[#]各组分所需体积。一并填入下表。

缓冲溶液	pH 值	组分体积(ml)	实测 pH 值
1 [#] 配制 30ml	4	HAc($0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的体积 ()	
		NaAc($0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的体积 ()	
2 [#] 配制 50ml	10.00	NaHCO_3 ($0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的体积 ()	
		NaOH($0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的体积 ()	

根据表中用量，在烧杯中配制 1[#]缓冲溶液。配制 2[#]缓冲溶液时，需准确量取所需体积的 NaHCO_3 和 NaOH 溶液于 50ml 容量瓶中，稀释至刻度，摇匀。

用酸度计或精密 pH 试纸测定 1[#]和 2[#]缓冲溶液的 pH 值，记录数据，并与标示值比较。保留 1[#]缓冲溶液备用。

2. 缓冲溶液的性质

取 3 支试管，分别加入 5ml (用量筒)1[#]缓冲溶液，按照下表用量分别加入酸、碱和水，摇匀后用精密 pH 试纸测量 pH 值，并记入表中。

依前述同样步骤，用 pH=4 盐酸 5ml 代替 1[#]缓冲溶液进行试验，将结果记入表中，根据实验结果总结性质并解释原因。

溶 液	加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 4 滴后的 pH 值	加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 4 滴后的 pH 值	加入蒸馏水 5ml 后的 pH 值
1 [#] 缓冲溶液(pH=4)			
盐酸(pH=4)			

3. 缓冲容量

(1) 取 2 支试管，其一加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc 和 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc 各 5ml，另一试管加入 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc 和 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc 各 5ml，混匀后判断两试管 pH 值是否相同？向两管中分别加入甲基红指示剂 2 滴观察溶液颜色。然后分别滴加 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液至溶液刚变黄色。记录各管所加滴数并解释原因。

(2) 在 2 支试管中，分别加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc 和 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc，按表中用量配制 3[#]和 4[#]缓冲溶液，用酸度计或精密 pH 试纸测定 pH 值记录于表。然后分别各加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 1.00ml，混匀后再测其 pH 值。记录数据并解释之。

缓 冲 溶 液	[HAc] : [NaAc]	pH	加碱后 pH	?pH
---------	----------------	----	--------	-----

3 [#]	3.00ml HAc	1:1
	3.00ml NaAc	
4 [#]	1.00ml HAc	1:5
	5.00ml NaAc	

思考题

1. 试解释为什么缓冲溶液具有缓冲作用？
2. 用 Henderson-Hasselbalch 方程式计算的 pH 值为何是近似的？应怎样校正？

(刘君 编)

实验四 离子交换法测定 PbCl_2 的溶度积

离子交换作用一般指在固相和液相之间发生的可逆的离子交换反应,它可用于分离各种可解离的物质。Adams 和 Holmes 在 1935 年通过酚、甲醛和磺酸缩聚成不溶性树脂,制成了第一个人工合成的离子交换材料,从此以后,人工合成的离子交换树脂日见增多。离子交换树脂是分子中含有活性基团并能与其他物质进行离子交换的大分子化合物。含有酸性基团且能与其它物质进行阳离子交换的树脂称为阳离子交换树脂,如强酸型的含有磺酸基($-\text{SO}_3\text{H}$)、中强酸型的含有磷酸基($-\text{PO}_3\text{H}_2$)、亚磷酸基($-\text{PO}_2\text{H}$)等基团;而含有碱性基团且能与其它物质进行阴离子交换的树脂则称为阴离子交换树脂,如强碱型的含季铵 [$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$]、弱碱型的含叔胺 [$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$]、仲胺($-\text{NHCH}_3$)、伯胺($-\text{NH}_2$)等。虽然一般认为离子交换树脂的作用仅仅是通过离子交换过程来分离和交换物质,而实际上也可能存在吸附作用和分子筛作用。离子交换树脂适合分离和交换无机离子和小分子有机物质如氨基酸等,根据离子交换树脂的这一性质,离子交换法可广泛应用于水的净化和离子的分离测定。

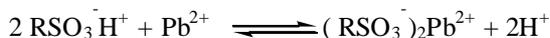
离子交换树脂与被交换(分离)的离子的结合是一种动态平衡,其结合程度取决于树脂的性质、温度、离子强度和溶剂成分,同时还与树脂的电离度和被交换(分离)的物质的性质有关。可以通过改变缓冲液的 pH 值来洗脱被交换(分离)的离子,另外溶剂中的某些(个)其它离子要与结合离子竞争离子交换树脂中的可电离基团,这些(个)离子的浓度越高,就越容易取代结合离子,所以增加离子强度也可将结合离子洗脱。

目的要求

1. 学会用离子交换法测定难溶电解质的溶解度和溶度积。
2. 进一步掌握滴定分析的基本操作。

实验原理

本实验采用强酸型阳离子交换树脂测定二氯化铅饱和溶液中 Pb^{2+} 浓度,进而计算 PbCl_2 溶度积。在进行 Pb^{2+} 交换前,必须将所用的钠型阳离子交换树脂转换为氢型树脂,然后才能进行离子交换:



经过交换后,二氯化铅饱和溶液变成了酸性溶液,用 NaOH 标准溶液滴定之,根据消耗的 NaOH 标准溶液的体积,便可计算出 PbCl_2 饱和溶液中 Pb^{2+} 的浓度和 PbCl_2 的溶度积。



$$K_{sp}^0 = [\text{Pb}^{2+}][\text{Cl}^-]^2 = 4[\text{Pb}^{2+}]^3$$

仪器、药品

50ml 离子交换柱 锥形瓶 移液管 碱式滴定管 15 ~ 20 目强酸型离子交换树脂 溴百里酚兰指示剂 PbCl_2 饱和溶液 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 标准溶液 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HNO}_3$ 。

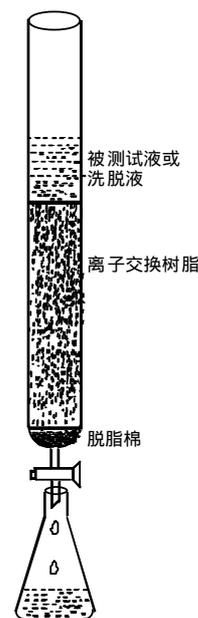


图 4-1 离子交换装置

实验步骤

1. 装柱 将离子交换柱(也可用碱式滴定管代替)洗净,底部填以少量脱脂棉或玻璃纤维。将 15~20 克用去离子水浸泡 24~48 小时并洗净的 15 ~ 20 目强酸型离子交换树脂装入离子交换柱内,调节水的液面略高于离子交换树脂。若出现气泡,可用一长玻璃棒伸入柱内树脂层上下搅拌,将气泡赶出。整个装置如图 4-1 所示。

2. 转型 为了保证 Pb^{2+} 能完全交换出 H^+ , 必须将钠型阳离子交换树脂转换为氢型树脂, 为此, 取 40ml $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 分批加入交换柱中, 控制每分钟 80~85 滴的流速, 让其流过离子交换柱, 此时, 树脂收缩, 高度下降。HCl 溶液流完后, 用蒸馏水(大约 50~70ml)洗涤树脂, 直到流出的洗涤液呈中性(用 pH 试纸检验)。

3. 交换 准确量取 25.00ml PbCl_2 饱和溶液于交换柱内, 为使离子交换完全, 控制交换柱流出液的速度为每分钟 20 ~ 25 滴, 不宜太快, 用 250ml 锥形瓶承接流出液, 待 PbCl_2 饱和溶液液面略高于树脂面时, 用约 50ml 蒸馏水, 分数次洗涤离子交换树脂, 以保证交换出的 H^+ 全部被洗出(用 pH 试纸检验流出液的 pH 值), 流出液一并承接于锥形瓶中。

4. 滴定 用溴百里酚兰作指示剂, 用 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 标准溶液滴定锥形瓶中的收集液, 至溶液由黄色刚好变为蓝色即为滴定终点, 准确记录 NaOH 溶液所消耗的体积。

5. 离子交换树脂的再生 用 30ml $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HNO_3 溶液, 以每分钟 25~30 滴的流速流过离子交换柱, 然后用去离子水淋洗树脂, 直到流出液呈中性。

数据处理

NaOH 标准溶液	准确浓度	耗用体积	
PbCl_2 饱和溶液	溶液温度	溶解度	溶度积

思考题

1. 离子交换过程中, 为什么要控制液体的流速不宜过快? 为什么要自始至终保持液面高于交换树脂层?
2. 若用 PbCl_2 饱和溶液的混浊液进行实验, 溶液中固体 PbCl_2 对实验结果有何影响?

附注

PbCl_2 饱和溶液的制备:

将 1 克分析纯 PbCl_2 固体溶于约 70ml 去离子水(经煮沸除去 CO_2)中, 搅拌 15 分钟, 再放置约 15 分钟, 使之达到平衡, 测量并记录 PbCl_2 饱和溶液的温度, 然后用定量滤纸进行过滤(所用的漏斗、接受器必须是干燥的)。

(马庆苓 编)

实验五 血和尿中某些化学成分的检测

血液是流体性状的结缔组织，充满于心血管系统（循环系统）中，流经体内任何器官。正常人的总血量约占体重的 5%—7% 左右。其中，70%~80% 的血量参与循环，其余的则贮存在肝、脾等“人体血库”内，当人体少量失血时，便会释放出来。

血液由 40%~45% 的血细胞和 55%~60% 的血浆组成。血细胞包括红细胞、白细胞、血小板。红细胞由血红蛋白组成，它的机能是运送氧气，并将代谢产生的二氧化碳送到肺部；白细胞帮助人体抵御细菌、病毒和其他异物的侵袭，是保护人体健康的卫士；血小板有凝血和止血的作用。血浆相当于结缔组织的细胞间质，约占血液容积的 55%，其中 90% 是水，其余为血浆蛋白（白蛋白、球蛋白、纤维蛋白原）、脂蛋白、脂滴、无机盐、酶、激素、维生素和多种代谢产物。血液流出血管后，溶解状态的纤维蛋白原转变为不溶解状态的纤维蛋白，于是凝固成血块。血块静置后即析出淡黄色清明的液体，称血清。在体内血液保持一定的比重（1.050~1.060）、pH 值（7.3~7.4）、渗透压（313 mOsmol·L⁻¹）、粘滞性和化学成分，以维持各种组织和细胞生理活动所需的适宜条件。

尿液通过肾脏生成，它直接来源于血液。尿的生成主要经过 3 个过程：（1）肾小球的滤过作用。血浆经肾小球滤过形成原尿，原尿含有除血细胞和大分子蛋白质外的几乎所有血浆成分，包括少量分子量较小的血浆蛋白。（2）肾小管的重吸收作用。99% 的水和少量葡萄糖、蛋白质、钠离子、氯离子、尿素等被重吸收到血液中；（3）肾小管和集合管的分泌作用。尿中有相当一部分物质是由肾小管和集合管上皮细胞将它们周围毛细血管血液中的一些成分，以及这些细胞本身产生的一些物质分泌或排泄到管腔中，再经乳小管、肾盂等器官进入膀胱形成终尿。

人体排出的尿，其尿量和成分均与滤过、重吸收、分泌三个过程有密切的关系。正常人 24 小时排尿量平均为 1500ml，常呈淡黄色，比重为 1.015~1.025，pH 值为 5.0~7.0 渗透压为 600~1000mmol·L⁻¹。其中 95%~97% 为水，溶质部分占 3%~5%。溶质的一半为尿素，四分之一为氯化钠，其余四分之一为各种无机物（Cl⁻、Na⁺、K⁺、NH₄⁺、PO₄³⁻、HCO₃⁻ 和 SO₄²⁻ 等）和有机物（尿酸、肌酸酐、氨基酸、马尿酸、乳酸、结合葡萄糖醛酸、草酸、羟丁酸、含硫化合物等）。另外，尿中虽有少量蛋白质和糖，由于一般方法检查不出来，所以被看成是生理性的。如在尿中检查出蛋白质和糖则认为是病理性的。

通过对血液和尿液的分析，能得到有关人体健康的许多信息。例如，血红蛋白减少多见于急性、慢性再生障碍性贫血、缺铁性贫血等。尿中出现白蛋白多见于肾脏机能失常或器官受损。通过本实验了解血液和尿液的化学成分以及血液检验和尿液检验的初步知识。

目的要求

1. 熟悉血和尿中某些无机离子和有机化合物的检测方法。
2. 了解血液的颜色反应和尿的病理检验方法。

实验原理

一、血液检测

1. 全血试验

联苯胺试验：血液检验的极灵敏颜色试验是联苯胺试验，本试验灵敏度极高，只需微量试样即可进行，甚至干的血迹或尿中的痕量血都可以检验出来。试验时，取少量试样，依次滴入冰醋酸，联苯胺无水酒精饱和溶液和 3% 的过氧化氢各一滴。如果检材上有血迹存在，就会出现翠蓝色反应。反应原理是，血红蛋白中的铁，具有过氧化物酶的作用，可分解过氧化氢放出氧，使联苯胺氧化呈绿色或蓝色。

溶血和皱缩：红细胞周围由液体包围，它可以失去水分进入到周围的液体中，或从周围

液体中得到水分，以维持正常的渗透压。如果红细胞吸取的水分过多，细胞就会破裂，它的成分分散到周围的液体中，使液体变红色，这就是血球溶解或溶血作用。红细胞向周围液体失去水分称为皱缩。借助于显微镜可清楚的看到红细胞的形态变化。

2. 血液中的无机盐检测

血液中的无机离子主要是 Na^+ 、 Cl^- 、 HCO_3^- ，此外还有较少的、但非常重要的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 PO_4^{3-} 。 HCO_3^- 与 H_2CO_3 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) 对于维持血液内的恒定的 pH 值起重要的作用。

Cl⁻ 检验：向血清中加入 HNO_3 和 AgNO_3 溶液，生成 AgCl 沉淀。该反应灵敏，易于检出。

PO₄³⁻ 检验：向血清中加入 HNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 溶液，微热，观察沉淀生成，反应式为：

$$12(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 + 23\text{HNO}_3 = (\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + 6\text{H}_2\text{O} + 2\text{NaNO}_3 + 21\text{NH}_4\text{NO}_3$$

二、尿液的检测

1. 正常尿试验

SO₄²⁻ 的检验：在酸性环境下向尿样中滴加 BaCl_2 溶液，生成 BaSO_4 沉淀。

Cl⁻ 检验：向尿样中滴加 HNO_3 和 AgNO_3 溶液，生成 AgCl 沉淀。

2. 病态尿试验

酮体试验：亚硝基五氰合铁(III)酸钠 $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{NO})(\text{CN})_5]$ 遇尿分解为 $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 NaNO_2 、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 和 $\text{Fe}(\text{CN})_5^{2-}$ 。如果尿中存在可检出量的酮体（丙酮、乙酰乙酸），在碱性环境下即与试剂作用生成异硝基（ $\text{HOON}=\text{}$ ）或异硝基胺（ $\text{NH}_2\text{OON}=\text{}$ ），后者与 $\text{Fe}(\text{CN})_5^{2-}$ 生成紫红色化合物。

尿蛋白检验：磺基水杨酸是一种生物碱，在酸性条件下，磺基水杨酸的磺酸根离子与蛋白质氨基酸阳离子结合，形成不溶性的蛋白盐沉淀，沉淀生成的程度可反映蛋白质的含量。

尿葡萄糖检验：葡萄糖或其他还原性糖的醛基在热碱性溶液中，能将班氏试剂中的铜离子还原为黄色的氢氧化亚铜，进而形成红色氧化亚铜沉淀。

苯丙酮酸实验：尿中的苯丙酮酸在酸性条件下，与 FeCl_3 溶液作用生成蓝绿色螯合物。磷酸盐有干扰，应事先加含 Mg^{2+} 的沉淀剂把它除去。

仪器、药品

试管 烧杯 瓷蒸发皿 玻璃片 玻璃棒 煤气灯(或酒精灯) 滤纸 pH 试纸 蓝色石蕊试纸 联苯胺 $\text{H}_2\text{O}_2(30\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ $\text{NaCl}(9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}, 100\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ $\text{H}_2\text{SO}_4(3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ $\text{Na}_2\text{WO}_4(100\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ $\text{HNO}_3(6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ $\text{AgNO}_3(0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4(100\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ $\text{HCl}(6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}, 0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ $\text{BaCl}_2(0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 冰醋酸 亚硝基五氰合铁(III)酸钠(0.5g) 磺基水杨酸($200\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 无水碳酸钠(10g) 硫酸铵(10g) $\text{FeCl}_3(100\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ 班氏试剂 葡萄糖($2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}, 5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}, 20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 正常尿样 病态尿样 糖尿病人尿样 血液

实验步骤

一、血液检测

1. 全血试验

将 1 滴血在一张干净的滤纸上展开，晾干，留作以下实验使用。

(1) 血液的颜色试验

在 1 支干净的试管中，加入 10ml 蒸馏水和 1 滴血，充分振荡。

取 3 滴上面制得的稀释血，加到蒸发皿中，加 3 滴联苯胺试剂(联苯胺是致癌物，切勿接触皮肤)，用玻璃棒充分搅拌，加 3 滴 $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液，再用玻璃棒搅拌，观察其颜色。

洗净蒸发皿,用3滴蒸馏水代替3滴稀释血,重复以上操作,对比它们的试验现象。

(2) 溶血作用和皱缩

取3支干净试管,在第一支试管中10ml蒸馏水,在第二支试管中加10ml $9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 溶液,在第三支试管中加10ml $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 溶液。

在上述3支试管中各加入3滴血,充分振荡,静置约5min,观察3支试管的现象,并解释实验现象。

(3) 血渍的除去

用准备好的带血渍的滤纸,撕去血渍外四周的滤纸,将带血渍部分放入1个50ml烧杯中。

加3ml蒸馏水,用玻璃棒搅拌滤纸,为了充分洗出滤纸上的血,将水倾泻至一干净的试管中。

再用3ml蒸馏水再洗涤(如上面操作),将洗涤的水与第一次的合并。

向烧杯内的滤纸上加1ml(约20滴) $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液,观察现象,用玻璃棒搅拌滤纸,使血渍与 H_2O_2 成分接触,滴加3ml蒸馏水,倾泻出水,观察纸上的血渍是否除净。

在洗涤水中加几滴联苯胺试剂,观察颜色的变化。

2. 血液中的无机盐检测

(1) 不含蛋白质的血浆滤液(血清)的制备

在含有2ml血浆的试管中,加入2ml $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$ 、2ml $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{WO}_4$ 溶液和14ml蒸馏水,振荡,静置10min,生成沉淀。过滤出蛋白质沉淀,滤液是什么颜色的?将其留作检验其中 Cl^- 、 PO_4^{3-} 之用。

(2) 检验血清中的 Cl^-

取1ml除去蛋白质的血浆滤液(血清)加入4滴 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HNO}_3$ 和10滴 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{AgNO}_3$ 溶液,观察有无沉淀产生。

(3) 检验血清中的 PO_4^{3-}

在一干净的试管中,取1ml血清,加4滴 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HNO}_3$ 和1ml $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 溶液,在煤气灯(或酒精灯)上小火微热,但不要煮沸,观察有无沉淀生成。

(4) 血浆的缓冲作用

用pH试纸试验血浆的pH值,记录下来。

在一干净的试管中加入1ml血浆,再加1滴 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 溶液,充分混合,用pH试纸测定其pH值。

用pH试纸测定蒸馏水的pH值。

在一干净的试管中加1ml蒸馏水,再加1滴 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 溶液,充分混合,测定其pH值。它与血浆有何不同?血浆有无缓冲作用?

二、尿液的检测

1. 正常尿试验

(1) 尿液pH值的测定

用pH试纸试验正常尿样的pH值,尿呈碱性还是酸性?

(2) SO_4^{2-} 的检验

在一干净的试管中加3ml尿样,逐滴加入 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 溶液,直至石蕊试纸变红,在通风橱内加热至沸,冷却后逐滴加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{BaCl}_2$ 溶液,如果有沉淀生成说明有 SO_4^{2-} 存在。记录实验结果。

(3) Cl^- 的检验

在一干净的试管中加3ml尿样,逐滴加入 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HNO}_3$ 溶液,直至石蕊试纸变红,逐滴加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{AgNO}_3$ 溶液,如果有沉淀生成说明尿中有 Cl^- 存在。记录实验结果。

2. 病态尿试验

(1) 酮体试验

酮体粉的制备：将烘干的亚硝基五氰合铁(III)酸钠 0.5g,无水碳酸钠 10g,硫酸铵 10g混匀研磨，存于棕色磨口瓶内待用。

把少许酮体粉置于玻片上（或试管中）。

滴加尿液于酮体粉上，至完全浸湿。5min 内出现紫色者为阳性。

(2) 尿中血的检验

在一干净的瓷蒸发皿内，加 2 滴病态尿和 3 滴联苯胺试剂，再加 2 滴 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液，用干净的玻璃棒充分搅拌，注意观察有无沉淀或颜色出现。

(3) 尿蛋白质的检验

取 2 支试管，各加清晰尿液 1ml。

在第一支试管中滴加碘基水杨酸溶液 2 滴，轻轻混匀；另一支试管不加试剂作空白对照。1min 内出现沉淀即为阳性。

用正常尿重复上述操作。

(4) 尿葡萄糖检验

在 6 支试管上各贴上 1~6 号标签，向试管内各加约 3ml 班氏试剂。

在试管 1 中加 6 滴正常尿；试管 2 加 6 滴 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液；试管 3 加 6 滴 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液；试管 4 加 6 滴 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液；试管 5 加 6 滴糖尿病人的尿；试管 6 不加任何物质。

将 6 个试管放在沸水浴中加热 10min，观察并记录每支试管中的颜色，有无沉淀产生？估计糖尿病人的尿液中糖的含量。

(5) 苯丙酮酸试验

取几滴特殊的病态尿润湿一片滤纸，在润湿处，滴加 1~2 滴 FeCl_3 溶液，观察和记录颜色的变化。

用正常尿重复上述操作。

思考题

1. 血浆是什么类型的缓冲溶液？
2. 如何用渗透压解释溶血作用和皱缩？
3. 尿蛋白检测还有哪些方法？

（孔繁栋 编）

实验六 化学反应速率和活化能

化学反应速率 (rate of chemical reaction) 是衡量化学反应过程进行的快慢, 即反应体系中各物质的数量随时间的变化率。用反应进度 () 的概念表示, 其定义为: 单位体积内反应进度随时间的变化率。由此可确定一个化学反应的统一反应速率。在实际应用中, 习惯于用反应物的消耗速率来表示反应进行的快慢。由于多数反应的反应速率随时间而改变, 因此就有平均速率和瞬时速率两种表示方式。为什么反应速率有快有慢呢? 经过长期的反应机理研究, 形成了两种较为成熟的速率理论, 碰撞理论和过渡态理论。碰撞理论认为反应物分子间的相互碰撞是反应进行的先决条件, 反应分子有效碰撞的频率越高, 反应速率越快。过渡态理论, 又称为活化络合物理论, 是在量子力学和统计力学的基础上提出来的, 它认为反应物分子的形状和内部结构的变化, 在相互靠近时就已开始, 不仅是在碰撞的一瞬间发生的变化。从外部反应条件看, 影响化学反应速率的因素主要有三个: 浓度, 温度和催化剂。

1. 反应物浓度与速率之间的关系 大量实验表明, 在一定温度下, 增加反应物的浓度可以增大反应速率。因为增加反应物的浓度, 单位体积内活化分子数增多, 从而增加了单位时间内反应物分子的有效碰撞的频率, 导致反应速率加快。这一关系可通过反应速率方程式来表示。

2. 反应温度与速率之间的关系 温度对化学反应速率的影响特别显著。一般来说, 大多数化学反应的速率都随温度的升高而加快。归纳许多实验结果, 如果反应物浓度恒定, 温度每升高 10K, 反应速率大约增加 2~3 倍。这是因为温度升高, 不仅分子间碰撞频率加大, 更重要的是由于温度升高, 活化分子百分数增大, 使反应速率大大的加快。

1889 年阿仑尼乌斯 (Arrhenius) 指出了反应速率常数和温度之间的定量 (见实验原理部分), 该关系式不仅说明了反应速率与温度的关系, 它还说明活化能对反应速率的影响以及活化能和温度两者与反应速率的关系。

3. 催化剂与反应速率的关系 催化剂之所以能增加反应速率, 是因为催化剂能改变反应历程, 降低了反应的活化能。

研究化学反应速率的科学称为化学动力学 (chemical kinetics), 它不仅是化学的研究内容, 而且在临床医学、药学领域也有重要的应用。

目的要求

1. 了解浓度、温度、催化剂对反应速率的影响。
2. 学习测定 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 氧化 KI 的反应速率、速率常数、反应级数及活化能的原理和方法。
3. 练习用计算法、作图法处理实验数据。

实验原理

1. 化学反应速率的测定

在水溶液中, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 与 KI 发生如下反应:

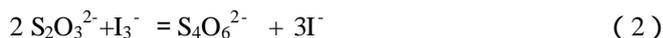


此反应的反应速率与反应物浓度的关系可近似表示为:

$$v = -\frac{\Delta[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]}{\Delta t} = k[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]^m [\text{I}^-]^n$$

式中 $[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]$ 为在 t 时间间隔内反应物 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 浓度的改变量; k 为特定温度下的反应速率常数; $(m+n)$ 为反应级数。

本实验采用初始速率法和“碘钟反应”, 测定反应一开始较短时间 t 内反应物 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 浓度的改变量, 从而求得反应速率。即在碘离子与 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 反应时, 一开始即加入已知的少量 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 与淀粉指示剂, 反应进行时即产生 I_2 , 但 I_2 马上与 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 作用生成 I^- 而不使淀粉显色, 如下式:



反应式(2)为快反应,几乎瞬间完成,而反应式(1)却慢得多,开始时 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 能及时氧化掉生成的 I_2 。当少量的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 消耗完后,再产生的碘分子则会使溶液中的淀粉马上显现出蓝黑色,测出从开始反应至溶液变色的时间差距为 t_0 。

由反应方程式(1)和式(2)不难看出,此时反应物 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 浓度的改变量总是等于加到溶液中的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 浓度减少量的一半,即:

$$-\Delta[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}] = -\frac{\Delta[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]}{2} = \frac{1}{2}[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]$$

由于溶液变为蓝色表明溶液中的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 已消耗殆尽,因此 $[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]$ 实际上就是反应开始时溶液中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的浓度,而本实验中每份反应混合液中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的浓度都是相等的,所以:

$$v = -\frac{\Delta[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]}{2\Delta t} = -\frac{[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]}{2\Delta t}$$

应该指出,速率方程式 $v = k [\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]^m [\text{I}]^n$ 表示的是瞬时反应速率,而 $v = -\frac{\Delta[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]}{\Delta t}$ 为 t 时间内的平均速率。可以用平均速率表示速率方程的前提条件是 $[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}] \ll [\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]$, 因此,实验中所用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的浓度远远小于 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的浓度。

2. 反应级数和反应速率常数的测定

固定反应体系中的 $[\text{I}]$, 改变 $[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]$, 根据 $v = k [\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]^m [\text{I}]^n$, 得:

$$\lg v = m \lg[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}] + n \lg[\text{I}] + \lg k$$

以 $\lg v$ 与 $\lg[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]$ 作图, 直线斜率即为 m 。

同理, 固定浓度 $[\text{S}_2\text{O}_8^{2-}]$, 改变 $[\text{I}]$, 可得到指数 n 。 m 和 n 的数值确定之后, 就可根据速率方程式计算出反应速率常数 k 。

3. 反应活化能的测定

反应在一定温度下进行, 速率常数 k 是不因反应物浓度改变而变化, 而反应温度改变时, k 值将变化, 根据 Arrhenius 方程式

$$\lg k = -\frac{E_a}{2.303RT} + C$$

以 $\lg k$ 对 $1/T$ 作图, 求出直线斜率 $(-\frac{E_a}{2.303R})$, 即可得到活化能 E_a 。

仪器、药品

锥形瓶(150mL) 量筒(20mL, 10mL) 温度计(0~100) 恒温水浴 秒表 电磁搅拌器
 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0.20 mol·L⁻¹) KI (0.20 mol·L⁻¹) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.010 mol·L⁻¹) 淀粉 (0.2%, W/V)
 KNO_3 (0.20 mol·L⁻¹) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.20 mol·L⁻¹) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (0.020 mol·L⁻¹)

实验步骤

1. 浓度对反应速率的影响, 测定反应的速率常数及反应级数

在室温下用 3 个量筒分别量取 KI、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 及淀粉溶液(用量按表 1 中的 1 号实验), 都加入 150mL 锥形瓶中, 混合均匀。再用另一量筒量取所需的 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液, 迅速倒入上述锥形瓶中, 同时启动秒表, 边搅拌、边仔细观察, 待溶液刚出现蓝色时, 立即停止秒表, 记录反应时间 t_0 。按表 1 中 2 至 5 号的试剂量重复上述操作, 将实验结果记入表中。

表 1 浓度对反应速率影响

室温 _____

实验编号		1	2	3	4	5
试剂用量(ml)	KI	10	5	2.5	10	10
	淀粉	2	2	2	2	2

	Na ₂ S ₂ O ₃	4	4	4	2	1
	KNO ₃	0	5	7.5	0	0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0	0	7	10.5
	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	10	10	10	5	2.5
	KI					
起始浓度	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈					
	Na ₂ S ₂ O ₃					
	反应时间(s)					
	反应速率 v					

2. 温度对反应速率的影响, 测定反应的活化能

按表 1 中实验 2 的试剂用量, 改变反应温度, 分别进行比室温低 10 和比室温高 10 时的实验 (如果室温低于 10, 也可在高于室温 10、20 下进行, 要将反应温度控制在 30 以下, 以减小实验误差), 按实验 1 相同的方法进行操作, 将实验结果记入表 2 中。

表 2 温度对反应速率的影响

实验编号	2	6	7
反应温度	室温(t)	($t-10$)	($t+10$)
反应时间			
速率常数(k)			

3. 催化剂对反应速率的影响

室温下按表 3 中 2 号实验的试剂用量按实验 1 相同的方法进行操作, 加入催化剂 Cu(NO₃)₂ 溶液进行实验, 记录反应时间, 加以比较。

表 3 催化剂对反应速率的影响

实验编号	2	8
加 Cu(NO ₃) ₂ 滴数	0	3
反应时间		

数据处理

1. 反应级数和反应速率常数的计算

同一温度下, 固定 [I], 改变 [S₂O₈²⁻] 求出一系列反应速率, 以 $\lg v$ 与 $\lg[S_2O_8^{2-}]$ 作图, 得直线斜率即为 m ; 固定 [S₂O₈²⁻], 以 $\lg v$ 与 $\lg[I]$ 作图可得 n ; 将 m 和 n 代入速率方程式中即可求得反应速率常数 k 。

实验编号	1	2	3	4	5
$\lg v$					
$\lg[S_2O_8^{2-}]$					
$\lg[I]$					
m					
n					
k					

2. 活化能的计算

根据 Arrhenius 方程式, 测定不同温度时的 k 值(表 2)), 以 $\lg k$ 对 $1/T$ 作图, 求出直线斜率, 即可得到活化能 E_a 。

实验编号	2	6	7
k			
$\lg k$			
$1/T$			
反应活化能 E_a			

思考题

1. 在实验编号 2、3 及 4、5 中分别添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及 KNO_3 溶液, 其作用是什么?
2. 若不用 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 而用 I^- 或 I_3^- 的浓度变化来表示反应速率, 反应速率常数是否相同?
3. 本实验中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的用量过多或过少, 对实验结果有何影响?

(孔繁栋 编)

实验七 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

带电质点在电场中移动的现象称为电泳。早在十九世纪初期人们发现了电泳现象，并应用于胶体化学中，但是电泳技术的开始应用则在二十世纪四十年代左右。

1937年 Tiselius 利用 U 形玻璃管进行血清蛋白质电泳，电泳后用光学系统使各种蛋白质所形成界面折光率差别成为曲线图像，发现血清蛋白质可分为 4~5 个高峰，即白蛋白、 α_1 、 α_2 、 β 和 γ 球蛋白。但这类电泳仪结构较复杂，价值昂贵，不宜推广。1948年 Wieland 和 König 等用滤纸作为支持物，使电泳技术大为简化，而且可以使许多组份相互分离为区带，所以这类电泳被成为区带电泳，而 Tiselius 的电泳装置则称为界面自由电泳。纸上电泳发明以后，在临床上得到广泛应用。1950年发展为琼脂凝胶电泳。1955年 Smithies 以淀粉胶为支持物进行血清蛋白质电泳分离，结果可分为十余条区带，这是由于淀粉胶尚具有分子筛作用使蛋白质更有效地分离。1959年 Davis 发明聚丙烯酰胺凝胶电泳，可以制备出不同孔径的凝胶，作为分子筛，对于蛋白质和核酸等大分子物质的分离，提供了有用的技术。六十年代以来，由于与光学系统和自动部分收集器相结合，又出现了等电聚焦仪、等速电泳仪等等，大大地发展和扩大了电泳技术的应用范围。在电泳形式上更是丰富多样，有在溶液中进行，有将支持物做成薄膜或薄层的，也有平板的或柱状的。

在凝胶电泳中，琼脂凝胶电泳是最早得到广泛应用的。因为它具有下列优点：1. 在琼脂凝胶中含有琼脂 1~1.5%，其余都是水。在这种凝胶中电泳，近似自由界面电泳，可是样品扩散又比自由界面电泳小。2. 琼脂凝胶电泳，支持物均匀，电泳区带整齐，分辨率高，重复性好。3. 液相与固相界面无明显界限，电泳速度快。4. 琼脂凝胶透明而不吸收紫外线，可以直接用紫外检测仪测定。5. 区带容易染色，样品容易洗脱，利于制备。6. 干膜可以长期保存。但是琼脂凝胶电泳也有它的不足之处，琼脂是一种强酸性物质，能造成严重的电渗现象，而且琼脂中所含可溶性杂质难以除去。

琼脂凝胶电泳有平板式和柱式两种，一般多采用平板式。

电泳技术主要用于分离各种有机物(如氨基酸、多肽、蛋白质、酶、脂类、核苷、核苷酸、核酸等)和无机盐。也可用于分析某种物质纯度，还可用于分子量的测定。电泳技术与其它分离技术(如层析法)结合，可用于蛋白质结构的分析，指纹法就是电泳法与层析法的结合产物。用免疫原理测试电泳结果，提高了对蛋白质的鉴别能力。电泳与酶学技术结合发现了同工酶，对于酶的催化和调节功能有了更深入的了解，所以电泳技术是医学科学中的重要研究技术。

目的要求

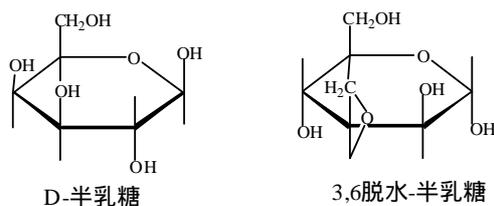
1. 掌握凝胶电泳的原理。
2. 掌握凝胶电泳的一般方法。

实验原理

DNA 分子在 pH 高于其等电点的溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。DNA 分子在电场中通过凝胶介质而泳动，除电荷效应外，凝胶介质还有分子筛效应，与分子大小及构象有关。由于 DNA 分子或 DNA 片段的 M_r 差别，电泳后呈现迁移位置的差异。当超螺旋的 DNA 转变成同一 M_r 的开环或线状 DNA 时，电泳后迁移位置明显不同。

琼脂糖是以经过挑选质地较纯的琼脂作为原料而制成的。琼脂在化学上是由琼脂糖和琼脂胶组成的复合物。琼脂胶是一种含有硫酸根的多糖，带负电荷，具有离子交换性质，这种性质会给电泳及凝胶过滤以不良的影响。琼脂糖是直链多糖，它是由 D-半乳糖和 3,6-脱水

半乳糖的残基交替排列组成的。

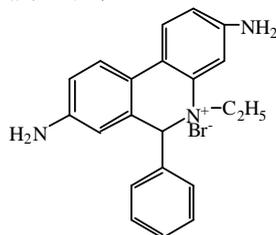


琼脂糖凝胶对 DNA 的分离范围较广，用各种浓度的琼脂糖凝胶可以分离长度为 200~50kb 的 DNA(见表 1)。琼脂糖凝胶电泳通常采用电流方向恒定的条件下进行 DNA 的分离。长度达 10 000kb 的更大的 DNA 可以通过电流方向呈周期性变化的脉冲电泳进行分离，而分离小片段 DNA(5~500kb)则采用聚丙烯酰胺凝胶电泳，其分辨力极高，能分离相差 1kb 的 DNA 片段。

表 7-1 不同浓度琼脂糖凝胶分离 DNA 的范围

凝胶中琼脂糖含量[% (W/V)]	线状 DNA 分子的有效分离范围(kb)
0.3	5~60
0.6	1~20
0.7	0.8~10
0.9	0.5~7
1.2	0.4~6
1.5	0.2~3
2.0	0.1~2

溴乙啶染色原理及其灵敏度：溴乙啶(ethidium bromide，简称 EB)分子结构式如下：



观察琼脂糖凝胶中 DNA 的最简便的方法是利用荧光染料 EB 染色。EB 是一种扁平分子，它可以嵌入核酸双链的配对碱基之间，在紫外线激发下，发出红色荧光。激发荧光的能量来源于两个方面，一是核酸吸收 254nm 的紫外线后将能量传给 EB，二是结合在 DNA 分子中的 EB 本身吸收波长为 302nm 和 360nm 的紫外线的能量。来源于这两个方面的能量，最终激发 EB 发射出波长为 590nm 的可见光谱红橙区的红色荧光。EB-DNA 复合物中的 EB 发出的荧光，比游离的凝胶中的 EB 本身发出的荧光强度大 10 倍，因此不需要洗净凝胶中游离的 EB 也可以检测出 DNA 的条带。若核酸量很少，而 EB 造成背景太深致使带型不清时，则需进行背景的脱色，它可检出 10ng 或更少的 DNA 含量。

EB 可用于单链(DNA 或 RNA)或双链核酸的检测，但染料对单链核酸的亲合力相对较小，荧光产率也相对较低。

仪器、药品

垂直柱型电泳槽或垂直板型电泳槽装置 直流稳压电源(0~600V，0~50mA) 家庭用小型高压锅 微量取液器(100 μ L 或 20 μ L) 254nm 或 302nm 波长紫外分析仪 一次性手套 照相设备 红色滤色镜 DNA 样品：新制备的线粒体 DNA 或质粒 DNA 全色胶卷

pH8.3 Tris-硼酸-EDTA 缓冲液 0.5 g·ml⁻¹ 溴乙啶染色液 已知分子量的标准 DNA 溴酚蓝-甘油溶液(0.05% 溴酚蓝-50% 甘油溶液) 琼脂糖

实验步骤

1. 琼脂糖胶液的制备

称取 0.7g(或 1g)琼脂糖,置于锥形瓶中,加入 100ml pH8.3 Tris-硼酸-EDTA 缓冲液(附注 1),瓶口扣一个小烧杯,置于家庭用小型高压锅内,加热冒出大量蒸汽时扣阀,维持 8~10min,琼脂糖即可全部融化于缓冲液中,取出摇匀,即成为 0.7%(或 1%)琼脂糖胶液。

2. 凝胶柱的制备

若采用垂直柱型电泳,则需制备凝胶柱。取数支 10cm×0.6cm 的玻璃管,其一端用一小段乳胶管套住,并塞以玻璃球,使玻璃管底部密封,并在管底部放 1~2 滴 50% 甘油。

向管中加入熔化的琼脂糖胶液直至管口,待胶液凝固后,将管的顶端用尼龙纱网套住,倒转放置,此时尼龙纱网位于下端,使凝胶不致滑出。去掉灌胶前套上的乳胶管,将凝胶柱横放,使凝胶滑出管口少许,用刀片修平,使凝胶长度恰为 9cm,然后将胶条滑回管中。将凝胶管安装到电泳槽上,灌入上、下槽电极缓冲液,备用。

3. 凝胶板的制备

平板型凝胶电泳可分为水平板型和垂直板型两种。

水平板型电泳槽是目前进行琼脂糖凝胶电泳使用最普遍的装置。水平板型凝胶通常在一块可安放于电泳槽平台的玻璃板或两侧带有挡板的胶模上灌制。如用玻璃板,则灌胶前需用胶带纸或医用胶带将四周贴成一个围墙,以防胶液渗漏。如使用与电泳槽配套购置的制胶模,则只需在灌胶前封住两端。

将熔化的胶液冷却至约 60℃ 时,灌注于胶模上以后,立即将梳子插在胶膜的一端,注意梳齿两侧不能带入气泡。如在玻璃板上制胶,则用两个书夹侧立于台面上,夹住梳子两端,使梳子固定,并垂直立于凝胶液中,但梳齿必需与胶膜底部保持约 1~2mm 的距离,室温放置 15~20min 后,凝胶液冷却形成凝胶块。使用前轻轻拔下梳子,即可见到加样品用的孔格,孔格的底部应有 1~2mm 的凝胶,保持样品不会泄漏。电泳前切记撕去胶带,使凝胶与正、负电极槽相通。

垂直板型电泳的灌胶方法如下:预先装置好的垂直板型电泳槽的凝胶模底部加适量的琼脂糖凝胶,待其冷却后,即可将胶模底部的缝隙堵住。待其余的琼脂糖胶液温度降至 60

℃ 时,立即灌入凝胶模中。迅速将样品槽模板插入胶液顶部。在室温放置 0.5~1h,待胶液全部凝结后,轻轻拔出样品槽模板,则在胶的顶部形成互相隔开的样品槽。为防止琼脂糖凝胶中水分蒸发而造成裂缝,应将电极槽内灌好电极缓冲液,并同时检查有无渗漏之处。

4. 加样

线粒体 DNA 经某种内切酶水解后,得到分子量不同的大小片段。为检测酶切后形成几个片段以及各片段的 M_r 范围,可将此样品溶液混入溴酚蓝-甘油溶液(样品溶液:染料溶液=4:1, V/V)(附注 2)进行电泳。同时另取一个 ?DNA EcoRI 酶水解液作为已知分子量的标准(附注 4),在同一凝胶板上进行电泳。

为得到清晰的电泳图谱,一般 DNA 样品量最好在 0.5~1μg 之间。用微量注射器将分离的样品注入凝胶柱顶部或平板胶的样品槽中。混合在样品中的甘油可增加样品液的比重,因此样品可以自然平铺于样品槽中,并且不易扩散,由于溴酚蓝染料的存在,可直接观察到加样的情况,而且染料在电泳过程中可作为指示标志。

5. 电泳

(1) 0.7% 琼脂糖凝胶柱(9cm×0.6cm); pH8.3 Tris-硼酸-EDTA 缓冲液,通电维持电压降 11V·cm⁻¹, 2.2mA/管,约 1.5h。

(2) 1% 琼脂糖凝胶板(13cm~11cm×0.2cm)；pH8.3 Tris-硼酸-EDTA 缓冲液，通电维持电压降 30V，7mA，约 3~4h。

观察染料距凝胶底部 1~2cm 时断电。

6. 染色及观察

电泳完毕，将电泳管底部的尼龙网取下，凝胶柱即可滑出；如为板型电泳，则取出凝胶模，揭去其中一侧的玻璃板，将凝胶推到一块干净的玻璃板上，浸于 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 溴乙啶溶液(附注 3)中，浸 0.5h 后取出。于 254nm 或 302nm 波长紫外灯下进行观察，DNA 存在的位置呈现橙黄色的荧光，放置时间超过 4~6h 后荧光减弱。因此，初步观察后，应立即照相。采用全色胶卷，拍照时加红色滤色镜。根据照片，可将样品 DNA 片段迁移位置与 λ DNA EcoRI 酶水解片段相对照，初步估计样品中各 DNA 片段的 M_r 范围。

不同波长紫外灯在相同条件下照射 EB-DNA 复合物对染色的灵敏以及 DNA 产生断裂缺口等影响不同。

注意 溴乙啶是较强的致突变剂，配制和使用溴乙啶溶液时要戴一次性手套或橡皮手套，勿将溶液滴洒在台面或地面上。对于含有溴乙啶的溶液也不应该直接倒入下水道，应进行净化处理，淬灭溴乙啶的致突变能力(附注 5)。待操作熟练后，可将胶液中预先加入溴乙啶，使其浓度达到 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，电泳完毕，取出，可立即在紫外灯下观察。

思考题

1. 凝胶电泳的基本原理是什么？
2. 利用琼脂糖做凝胶电泳有何优点？

附注

1. pH8.3 Tris-硼酸-EDTA 缓冲液 [$89\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, $89\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸, $2.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA]：取 10.78g Tris, 5.500g 硼酸, 0.930g EDTA- Na_2 溶于去离子水，定容至 1000ml。

2. 溴酚蓝-甘油溶液(0.05% 溴酚蓝-50% 甘油溶液)：先配制 0.1% 溴酚蓝水溶液，然后取等体积的甘油与之混合即成。

3. $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 溴乙啶染色液：称取 5mg 溴乙啶，用去离子水溶解，定容至 10ml，再稀释 1000 倍即可。

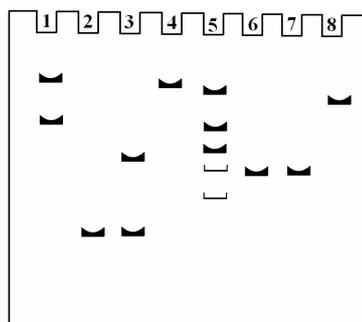


图 7-1 各种不同 M_r 及不同构象 DNA 电泳图谱(示意图)

1 和 3 分别为 *E. coli* pCRI 和 pBR322，为 -20℃ 储存 5 个月后的样品，除共价闭环(超螺旋)分子(下面的条带外)，出现了开环分子(上面的条带)；2 为 pUB110 共价闭环分子；6、7、8 分别为经 EcoRI 充分消化后的 pBR322, pUB110 及 pCRI(全部转变成线状分子)；4 为 λ c1857s7DNA；5 为 λ c1857s7DNA 经 EcoRI 消化后的片断，自上而下，各片断的 M_r 分别为 13.7×10^6 、 4.74×10^6 、 3.73×10^6 、 3.48×10^6 、 3.02×10^6 、 2.13×10^6 。电泳条件：1% 琼脂糖凝胶；凝胶板；11.5cm × 13.5cm × 0.36cm；在 Tris-乙酸盐缓冲溶液($40\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠, $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA- Na_2 ，用冰醋酸调到 pH8.0) 中进行电泳；电压降 $3.5\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，电流强度 35mA，室温。

4. 已知分子量的标准 DNA：每 μg DNA 加入 1 单位的 EcoRI，在 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

MgCl_2 - $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl - $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH7.5 Tris-HCl 缓冲液(简称为 MST 缓冲液)内, 37 消化 30min, 然后在 65~70 加热 10min 使该酶失活。经 EcoRI 水解后, ?DNA 形成 6 个已知 M_r 的线型 DNA 片段, 其电泳图谱见图 7-1。

5. 溴乙啶的净化处理:

- (1) 每 100ml 溶液中加入 100mg 活性炭;
- (2) 于室温下放置 1h, 不时振摇;
- (3) 用 Whatman 1 号滤纸过滤溶液, 丢弃滤液;
- (4) 用塑料袋封装滤纸和活性炭, 作为有害废弃物予以丢弃。

(凌爱霞 编)

实验八 胶体的制备与性质

胶体分散系在生物界和非生物界都普遍存在,在实际生活和生产中占有重要的地位。如在石油、冶金、造纸、橡胶、塑料、纤维、肥皂等工业部门,以及其它学科如生物学、土壤学、医学、气象、地质学等中都广泛地接触到与胶体分散系有关的问题。

生活中溶胶处处可见,如牛奶、石油、油漆等是液溶胶;泡沫塑料、珍珠、某些宝石、合金、有色玻璃等是固溶胶;雾是细小水滴分散在空气中的气溶胶,烟、粉尘是固体粒子分散在空气中的气溶胶。预防医学中很重视气溶胶问题。如欲防止悬浮在空气中微生物、病毒或尘埃的污染,则需净化空气,做到无菌无尘操作。在工农业生产中形成的生产性粉尘会长期飘浮在大气中,污染环境,危害人们的身体健康。飘浮在大气中的尘粒,90%以上是荷电的。一般认为,带电尘粒易被机体滞留,小于50nm的尘粒会进入肺泡。人们长期吸入生产性粉尘而引起以心肺组织纤维化为主的全身性疾病称为尘肺,如长期吸入游离的二氧化硅粉尘(一种结晶形粉尘)可引起矽肺,是尘肺中病情发展最快,危害最为严重的一种。

溶胶的许多性质都有非常重要的应用价值。例如,渗析在工业上还广泛用于污水处理、海水淡化等;在生物化学中可用于测定蛋白质分子、酶分子以及病毒和细菌分子的大小;在医药工业上常用来去除中草药中的淀粉、多聚糖等高分子杂质,从而提取其有效成分并制成针剂;人们还利用渗析原理,用人工合成的高分子膜(如聚丙烯腈薄膜等)制成了人工肾,帮助肾功能衰竭的患者去除血液中的毒素和水分,用于严重肾脏病患者的“血透”方法就是基于这种原理让患者的血液在体外通过装有特制膜的装置从而将血液中的有害物质除去。

电泳技术是医学科学中的重要研究技术,主要用于分离各种有机物(如氨基酸、多肽、蛋白质、酶、脂类、核苷、核苷酸、核酸等)和无机盐。也可用于分析某种物质的纯度以及分子量的测定等。

目的要求

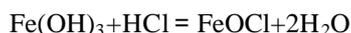
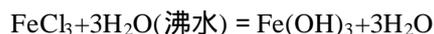
1. 掌握溶胶制备和净化的一般方法。
2. 掌握溶胶的光学性质、电学性质。
3. 观察电解质对溶胶稳定性的影响。
4. 观察动物胶对溶胶的保护作用及其膨胀现象。

实验原理

胶体与大分子化合物都属于胶体分散系,其分散相粒子的大小在1~100nm之间。大分子溶液为均相体系,而溶胶为多相体系。

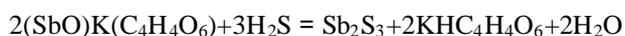
胶体的制备方法有分散法和凝聚法。

1. $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 溶胶的制备:

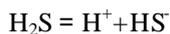


$\text{Fe}(\text{OH})_3$ 胶核因选择吸附 FeO^+ 离子而带正电荷,形成正溶胶。

2. Sb_2S_3 溶胶的制备:



过量的 H_2S 解离



Sb_2S_3 胶核因选择吸附 HS^- 离子而带负电荷，形成负溶胶。

制得的溶胶常有电解质等离子存在，影响溶胶的稳定性。根据胶粒不能透过半透膜，而其它杂质离子易透过半透膜的特点，常用渗析法净化溶胶。

溶胶具有较强的光散射现象。当一束光线照射溶胶时，在其垂直方向可看到一束光锥，此现象称为丁铎尔(Tyndall)现象。

胶粒表面带有电荷，在外加电场作用下，胶粒定向迁移，产生电泳现象。研究胶粒的电性，能深入了解胶粒形成过程及其结构。电泳在蛋白质、氨基酸等物质的分离和鉴定方面有极其重要的应用，如纸上电泳。

溶胶稳定的主要原因是胶粒带电荷，若所带电荷全部或部分地被中和，溶胶易聚集变大而沉降。在溶胶中加入一定量电解质或带相反电荷的溶胶均可使溶胶聚沉。

大分子溶液对溶胶具有保护作用，即若在溶胶中加入大分子溶液，可以增加溶胶的稳定性。但是若加入的量不足反而会降低溶胶的稳定性，使其聚沉，此现象称为敏化作用。

动物胶吸收介质(水)体积胀大的现象称溶胀，动物胶在等电点时的水化能力最小，溶胀力最差。

仪器、药品

电分散法制银溶胶装置 电泳仪和电泳管 Tyndall 效应实验装置 刻度试管
 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{FeCl}_3$ 硫的乙醇饱和溶液 饱和 H_2S 溶液 0.4% 酒石酸锑钾 饱和 NaCl
 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$ $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{AlCl}_3$ $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KI}$ 火棉胶 pH 试纸
 干动物胶粉 新配制的 3% 动物胶溶液 淀粉溶液 pH 为 3.8, 4.8, 5.8 的缓冲溶液
 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘液 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{AgNO}_3$

实验步骤

1. 胶体的制备

注意：保留本实验所制得的各种溶胶供后面实验用。

(1) 水解法制备 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 溶胶

取 15ml 蒸馏水于小烧杯中，加热至沸，然后边搅拌边滴加 2ml $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{FeCl}_3$ ，继续煮沸 1~2min，观察颜色变化。写出其胶团的结构式。

(2) 复分解反应法制备 Sb_2S_3 溶胶

往盛有 0.4% 酒石酸锑钾溶液的大试管中滴加饱和 H_2S 溶液，边滴边摇匀，直至溶液变为橙红色为止。写出其胶团的结构式。

(3) 改变溶剂法制备硫溶胶

往盛有 5ml 蒸馏水的大试管中滴加硫的乙醇饱和溶液 4~5d，摇匀即得硫溶胶，试解释硫溶胶生成的原因。

(4) 电分散法制备银溶胶

加蒸馏水 50ml 于 100ml 的小烧杯中，将两支套有玻电极插入水中(勿使两电极接触，如图 8-1 所示)，接通电极，使电极迅速接触，之产生电次，即可得

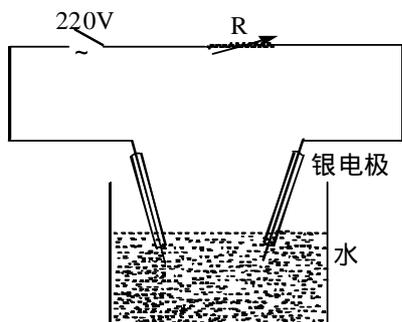


图 8-1 电分散法制备银溶胶



玻璃管的银源，将两立即分火花，连银溶胶。

2. 溶胶的性质

(1) 溶胶的光学性质——Tyndall 现象

将上述实验制备的溶胶，分别置于 Tyndall 现象实验装置中，对准光束，从垂直光束方向观察 Tyndall 现象。也可用手电在暗处照射溶液观察现象。

(2) 溶胶的电学性质——电泳

简单的电泳管是一 U 形管(如图 8-2 所示)。向 U 形管中注入 Sb_2S_3 溶胶或新配制的 AgI 溶胶(配制方法见附注 4)，沿 U 形管两侧管壁慢慢加入蒸馏水，使水与溶胶间有明显的界面(界面不清晰需重做)，水层厚约 1~2cm。将金属电极分别插入水层，接通直流电源，调节电压在 30~110V，半小时后观察。根据溶胶界面移动的方向，判断胶粒所带电荷。

(3) 胶体的净化——渗析

火棉胶袋的制作方法见附注 1。

在火棉胶袋内加适量淀粉溶液，再滴加 2 滴饱和 NaCl 溶液，将火棉胶袋浸入装有蒸馏水的小烧杯中。十分钟后，取胶袋外液适量用 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 溶液检查 Cl^- ，再分别取少量胶袋内液与胶袋外液，各滴加 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘液，检查有无淀粉，解释说明实验结果。

净化自制的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 溶胶，方法见附注 2。

3. 溶胶的聚沉

(1) 取三支干燥试管，各加入 2ml Sb_2S_3 溶胶，然后在 1 号管滴加 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl ，在 2 号管滴加 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 ，在 3 号管滴加 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 ，每加一滴立刻振荡试管，直至溶液刚刚呈现混浊。记录各管所加溶液的滴数，比较三种电解质的聚沉能力的大小并解释之。

(2) 2 ml $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 溶胶与 2ml Sb_2S_3 溶胶混合，振荡，观察现象并解释之。

4. 大分子化合物对溶胶的保护作用

取两支大试管，在一支试管中加入 2ml 蒸馏水，在另一支试管中加入 2ml 新配制的 3% 动物胶溶液，然后在每支试管中各加入 4ml Sb_2S_3 溶胶，小心振荡试管，放置约 3min 后，向两支试管中滴加饱和 NaCl 溶液，观察两试管中溶胶聚沉现象的差别并解释之。

5. pH 值对动物胶溶胀的影响

取三支刻度试管，各加入干燥动物胶 1g，然后分别加入 pH 为 3.8, 4.8 和 5.8 的缓冲溶液各 5ml 后，搅拌后记下各管内动物胶的体积，静置 10~20 分钟，记录溶胀后的动物胶体积。根据动物胶体积的变化，判断动物胶的等电点 pH 范围。

溶液的 pH 值	3.8	4.8	5.8
动物胶溶胀的体积			

思考题

1. 制备 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 溶胶时，为什么需将 FeCl_3 溶液滴入沸水中？
2. 为什么在等电点时，动物胶的水化能力最差？

附注

1. $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 溶胶的 Tyndall 现象常不明显，可滴加 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 调节 pH3~4，或加水稀释。

2. 火棉胶袋的制作方法

将适量火棉胶注入洁净的容器中(50ml 短颈烧瓶、表面皿和大试管皆可)慢慢地转动容器，使火棉胶在器壁上形成均匀的薄层，倾出多余的火棉胶，继续旋转容器，使火棉胶均匀附于器壁，待乙醚溶剂蒸发尽后，小心地用蒸馏水冲洗容器，然后轻轻地将火棉胶膜与容器口分离，注水于容器壁与膜之间，膜即可脱离容器壁，慢慢取出，注意不要撕破。

3. 自制 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 溶胶的渗析

将 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 溶胶注入火棉胶袋，袋口用线扎紧，置于盛有蒸馏水的烧杯中(袋口不要浸入水中)10 分钟后，取 1ml 袋外溶液，分别用 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 和 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KSCN 溶液检测 Cl^- 和 Fe^{3+} 离子。

4. AgI 溶胶的制备

取 50ml 蒸馏水于小烧杯中，加 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 2ml，混匀，逐滴加入 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI 溶液，边滴边搅拌，直到生成 AgI 溶胶(浅黄色)能出现乳光现象即可(不宜久置)。

5. $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘溶液的配制

方法一：称取 13g 碘放入盛有 100ml 36% KI 溶液的乳钵中研磨使之完全溶解，转移至烧杯中，加盐酸 3 滴，蒸馏水适量。使成 1000ml，过滤即可。

方法二：称取 13g 碘于乳钵中研细，转移至烧杯中用 72% KI 溶液 50ml 使之溶解完全，稀释至 1000ml 即可。

(孔令栋 编)

实验九 氧化还原反应与电化学

早在 1600 年吉尔白特(William Gibert, 1544~1603, 伊丽莎白女王的医生)观察到用毛皮擦过的琥珀有吸引其它轻微小物体的能力, 就用“electric”(希腊语“琥珀”)来描述这样的行为。1799 年伏打(Alessandro Volta, 1745~1827, 意大利物理学家)从银片、锌片交替的叠堆中成功地产生了可见火花, 才提供了用直流电源进行广泛研究的可能性。1807 年戴维(H. Davy, 1778~1829, 英国化学家)用电解成功地从钠、钾的氢氧化物中分离出了金属钠和钾。1833 年法拉第(Michael Faraday, 1791~1867, 英国物理学家和化学家)归纳出著名的法拉第定律, 为电化学的定量研究和为以后的电解工业奠定了理论基础。1870 年人们发明了发电机后, 电解被广泛地应用于工业中。

许多有色金属以及稀有金属的冶炼和精炼都采用电解的方法, 例如铝、镁、钾、钠、钨和锂都是用电解法来冶炼的。利用电解方法可以制备许多基本的化工产品, 如氢氧化钠、氯气、氯酸钾、过氧化氢以及一些有机化合物等, 在化工生产中也广泛采用电催化和电合成反应。此外, 近年来工业上发展很快的电镀、电解加工、电铸、电抛光、铝的氧化保护、电着色以及电泳喷漆法等也都是采用电化学方法。

化学电源是电化学在工业上应用的另一个重要方面。锌锰干电池、铅酸蓄电池等以其稳定又便于移动的特点在日常生活和汽车工业等方面已起了重要作用。随着尖端科技如火箭、宇宙飞船、半导体、集成电路、大规模集成电路等的迅速发展对化学电源提出了新的要求, 故能连续工作的燃料电池, 各种体积小、重量轻, 即安全又便于存放的新型高能电池、微型电池不断地被研制、开发, 使得它们在照明、宇航、通讯、生化、医学等方面得到了越来越广泛的应用。

生物体的每一个细胞都被细胞膜所包围着, 细胞膜内外都充满液体, 在液体中都溶有一定量的电解质。由于膜两侧离子浓度不等而引起的电势差称为膜电势。实验测出神经细胞的膜电势约为-70mV。实验表明, 当一个刺激沿神经细胞传递时, 或当肌肉细胞收缩时, 细胞膜电势会暂时变为正值。通过神经细胞膜电势的变化而传递这种神经刺激。肌肉细胞膜电势的改变会引起肌肉收缩。我们的思维以及通过视觉、听觉和触觉器官接受外界的感觉, 所有这些过程都与膜电势的变化有关。心动电流图(Electrocardiogram, ECG, 简称心电图)就是测量人体表面几组对称点之间的电势差随时间的变化情况, 从而判断心脏工作是否正常。类似的还有监测骨架肌肉电活性的肌动电流图(Electromyogram, EMG), 监测头皮上两点之间的电势差随时间的变化从而了解大脑中神经细胞的电活性的脑电图(Electroencephalogram, EEG)等。

目的要求

1. 掌握电极电势与氧化还原反应方向的关系; 明确介质的酸度和反应物浓度对氧化还原反应的影响。
2. 了解浓度对电极电势的影响。
3. 通过实验加深对氧化还原反应可逆性的理解。

实验原理

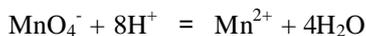
氧化还原反应的实质是电子的转移, 物质在溶液中得失电子能力的强弱由氧化还原电对的电极电势决定, 电极电势越大, 氧化型物质的氧化能力越强, 还原型物质的还原能力越弱, 反之亦然。根据氧化还原电对的电极电势相对大小, 可判断电对中氧化型或还原型物质的氧化能力或还原能力的相对强弱, 进一步判断氧化还原反应进行的方向。

电极电势的大小与物质的本性有关。浓度、温度、介质酸度等条件的变化均可导致电极电势的变化。

浓度与电极电势之间的关系(T 为 298.15K)可用能斯特(Nernst)方程式表示：

$$j = j^{\circ} + \frac{0.05916}{n} \lg \frac{[\text{氧化型}]}{[\text{还原型}]}$$

对于有含氧酸根离子参加的氧化还原反应常有 H^+ 参加，如：



$$j_{\text{MnO}_4^-/\text{Mn}^{2+}} = j_{\text{MnO}_4^-/\text{Mn}^{2+}}^{\circ} + \frac{0.05916}{5} \lg \frac{[\text{MnO}_4^-][\text{H}^+]^8}{[\text{Mn}^{2+}]}$$

可见， $[\text{H}^+]$ 浓度增大， $j_{\text{MnO}_4^-/\text{Mn}^{2+}}$ 值增大，因此， MnO_4^- 的氧化性随 $[\text{H}^+]$ 增大而增强。

仪器、药品

酸度计 锌片 铜片 碳棒 盐桥 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KBr $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnSO_4 CCl_4 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KSCN $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$ 溴水 $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KMnO_4 $10\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 碘液 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3AsO_4 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ I_2 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3AsO_3 浓氨水 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SO_4 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4F 浓盐酸

实验步骤

1. 电极电势与氧化还原反应的关系

(1) 在两支小试管中分别加入 5 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI 溶液和 5 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KBr 溶液，再分别加入 2 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 溶液，摇匀后再分别加入 5 滴 CCl_4 ，充分振荡，观察 CCl_4 颜色有何变化，写出化学反应式。

(2) 在试管中加入 10 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 和数滴溴水，振荡后滴加 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KSCN ，观察现象并写出化学反应式。

用碘液代替溴水进行同样的实验，反应能否进行？根据实验结果，定性比较 $j_{\text{Br}_2/\text{Br}^-}$ 、 $j_{\text{I}_2/\text{I}^-}$ 、 $j_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ 三者的相对高低，并指出哪个物质是最强的氧化剂，哪个物质是最强的还原剂，说明电极电势与氧化还原反应方向的关系。

2. 浓度、酸度对电极电势的影响

(1) 浓度

取两只 50ml 烧杯，分别加入 20ml $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 和 20ml $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnSO_4 溶液，在 ZnSO_4 溶液插入锌片，在 CuSO_4 溶液插入铜片，组成两个电极，用盐桥把两溶液连通。

通过电线把锌片和铜片分别与酸度计的负极和正极相连，测量两极间的电势差。

在不断搅拌下，向 CuSO_4 溶液中加入浓氨水至生成的沉淀完全溶解为止，观察原电池两极间电势差有何变化。

在不断搅拌下，向 ZnSO_4 溶液中加入浓氨水至生成的沉淀完全溶解为止，观察原电池两极间电势差有何变化。

利用 Nernst 方程来解释实验现象。

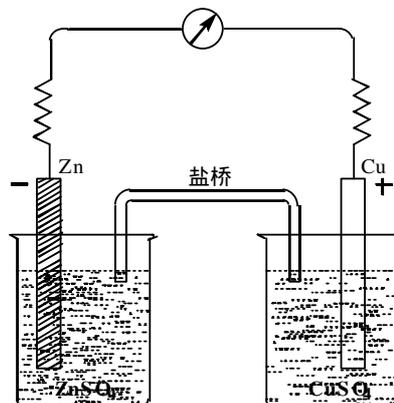


图 9-1 原电池

(2) 酸度

在两个各盛有 10 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KBr 的试管中, 分别加入 0.5ml $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SO_4 和 0.5ml $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc, 然后再分别加入 2 滴 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KMnO_4 , 观察并比较两试管中紫色消失的快慢, 写出化学方程并加以解释。

3. 浓度、酸度对氧化还原反应方向的影响

(1) 浓度

在试管中加入 1ml $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$, 1ml $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI 和 0.5ml CCl_4 溶液, 摇匀后观察 CCl_4 层的颜色, 然后加入 1ml $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4F 溶液, 充分振荡, 观察 CCl_4 的颜色变化。解释原因。

(2) 酸度

取两只 50ml 烧杯, 在一烧杯中加入 10ml $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3AsO_4 和 10ml $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3AsO_3 , 在另一烧杯中加入 10ml $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI 和 10ml $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ I_2 溶液。每一烧杯中各插入一根碳棒, 以盐桥相连两溶液, 用导线将两电极分别与酸度计的负极和正极相连。在前一烧杯中逐滴加入浓盐酸, 观察指针的移动方向, 再在该溶液中滴加 $10\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 观察电流方向的改变。

思考题

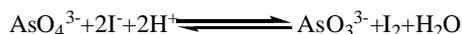
1. 通过本实验总结出影响电极电势的因素。
2. 说明浓度、酸度是如何影响氧化还原反应方向的?

附注

1. 盐桥的制法

称取 1g 琼脂, 放在 100ml 饱和的 KCl 溶液中浸泡片刻, 加热搅拌使成糊状, 趁热倒入 U 型玻璃管中(里面不能有气泡), 冷却后即成。

更为简便的方法是用饱和 KCl 溶液装满 U 型玻璃管, 两管以脱脂棉球塞住(里面不能有气泡), 即可使用。

2. AsO_4^{3-} 与 I 发生如下反应:

此反应是可逆的, 在酸性溶液中反应向右进行, 在中性或碱性溶液中($\text{pH}=8$)反应向左进行。

(孔令栋 编)

实验十 配位化合物的性质

历史上有记载的最早发现的第一个配合物就是我们很熟悉的亚铁氰化钾(普鲁士蓝)。它是1704年普鲁士人狄斯巴赫在染料作坊中为了寻找蓝色染料,而将兽皮、兽血同碳酸钠在铁锅中强烈煮沸而得到的,后经研究确定其化学式为 $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ 。

配位化学所涉及的范围和应用是非常广泛的。金属的分离和提取、分析技术、化工合成上的配位催化、无机高分子材料、染料电镀、鞣革、医药等方面,都与配合物有密切的关系。与配合物相关的学科也很多,例如生物无机化学、药理学、有机化学、分析化学、结构化学等。

原子能、半导体、火箭等尖端技术的发展,需要大量核燃料、稀有金属以及高纯化合物,这些需要大大促进了分离技术和分离方法的研究,而溶液中任何分离方法(如溶剂萃取法、离子交换法、沉淀法等),以及许多分析方法(如配位滴定法、比色法、分光光度法、极谱法等)几乎都与配合物密切相关。它们都是利用生成配合物的倾向不同而达到分离和分析的目的。

生物体中许多金属元素都是以配合物的形式存在的。如血红素是铁的配合物,它与呼吸作用有密切的关系。叶绿素是镁的配合物,是进行光合作用的关键物质。最近人们已经普遍注意到各种金属元素在人体和动植物内部起着很重要的作用。如各种酶分子,维生素 B_{12} (钴的配合物),几乎都含有以配合物形态存在的金属元素,它们控制着生物体内极其重要的化学作用。配合物在药物治疗中也日益显示出强大的生命力。例如,EDTA的钙盐是排除人体内铀、钷、钷等放射性元素的高效解毒剂。顺式二氯·二氨合铂(II)是抗癌药物。

目前已证明对人体有特殊生理功能的必需微量元素有Mn、Fe、Co、Mo、I、Zn等;还有初步查明的必需元素有V、Cr、F、Si、Ni、Se、Sn等。它们是以配合物的形式存在于人体内的。微量元素在体内的分布极不均匀。如甲状腺中的碘,红细胞中的铁,造血器官中的钴,脂肪组织中的钒,肌肉组织中的锌,都是脏器的组成部分之一,并且具有极其重要的特异生理功能。有些必要的微量元素是酶和蛋白质的关键成分(如Fe、Cu、Zn等),有些参与激素的作用(如Zn参与促进性腺激素的作用,Ni促进胰腺作用);有些则影响核酸的代谢作用(如V、Cr、Ni、Fe、Cu等)。可见微量元素不仅对人体的正常生长、发育是必需的,而且对人体的其它生命活动有着极为重要的作用。研究它们的配合物的性能和结构也是大有用处的。

目的要求

1. 了解配合物的生成与组成,配离子与简单离子的区别。
2. 比较配离子的稳定性。了解配位平衡与沉淀平衡、氧化-还原平衡、及溶液酸碱度之间的关系。

实验原理

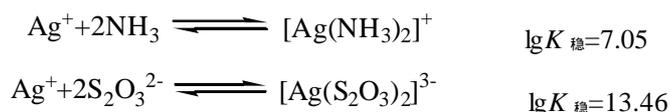
金属离子(或原子)与一定数目的中性分子或负离子以配位键相结合形成的离子称为配离子。含有配离子的化合物以及中性配位分子统称为配合物。

若某个配体可同时提供两个或两个以上的配位原子与中心原子(离子)结合,形成具有环状结构的配位化合物,称为螯合物。

配离子在溶液中或多或少地能离解成简单离子,并在一定条件下达到配位平衡。配离子的稳定性用配位平衡常数 $K_{\text{稳}}$ 表示,也常用其对数值表示。

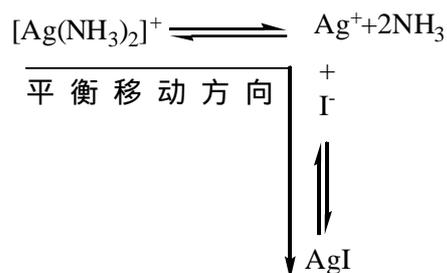
同种类型的配离子,其稳定性可直接根据 $K_{\text{稳}}$ 值大小判断, $K_{\text{稳}}$ 值越大,表明配离子越

稳定。如：



比较可知， $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ 的稳定性小于 $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$ ，溶液中游离的 Ag^+ 浓度前者远大于后者。

当配位平衡条件(如浓度、酸度等)发生变化时，配位平衡将发生移动。例如，在含有 $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ 的溶液中加入 KI 溶液，配位平衡被破坏，反应为：



仪器、药品

试管 试管架 试管刷 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NiSO_4 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KSCN
 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI
 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
 K_2CrO_4 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ CCl_4 $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SO_4 饱和
 水杨酸 0.5ml $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ 1% 丁二酮肟(镍试剂) pH 试纸 滤纸 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

实验步骤

1. 配合物的生成

(1) 在试管中加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 1ml，逐滴加入 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ，至产生沉淀后继续滴加 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ，观察现象并解释。保存溶液备用。

(2) 在试管中加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 3 滴，然后加入饱和水杨酸 5 滴，观察有机螯合物的生成。

(3) 在瓷反应板上加 2 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NiSO_4 、2 滴 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 和 2 滴 1% 丁二酮肟，观察有何现象。

2. 配离子与简单离子的区别

(1) 在试管中加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 1ml，逐滴加入 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ，至产生沉淀后继续滴加 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ，直至变为深蓝色溶液。将此溶液分为两份，分别滴加少量 NaOH 、 BaCl_2 溶液，有何现象？将此现象与 CuSO_4 溶液中分别滴加 NaOH 、 BaCl_2 溶液的现象进行比较。解释这些现象。

(2) 取两支试管，各加入 1ml $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NiSO_4 溶液，在另一支试管中逐滴加入 $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ，边滴加边振荡，待沉淀溶解后，再继续滴加 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 2~3 滴，然后向两支试管中各加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 3 滴，观察并解释现象。

3. 配离子稳定性比较

取两支试管，各加入 2 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 溶液，在一支试管中加 10 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ，另一支试管中加 10 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，充分振荡，然后各加入 2 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI 溶液，记录并解释现象。

4. 配位平衡的移动

(1) 配位平衡与沉淀平衡的关系

在试管中加入 10 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 溶液, 加入 1~2 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液, 生成白色沉淀, 然后加入 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 使沉淀溶解, 将溶液分别置于两支试管中, 于一支试管中加 2 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液, 另一支试管中加 2 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI 溶液, 观察并解释现象。

(2) 配位平衡与氧化还原平衡的关系

在两支试管中分别加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 2 滴, 其中一支试管中加 3 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI 溶液, 加入 1ml CCl_4 后充分振荡, 观察 CCl_4 层颜色并解释。于另一支试管中加 3 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF 溶液至溶液无色, 再加入 3 滴 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI 溶液, 振荡后观察 CCl_4 层颜色并解释。

(3) 配位平衡与酸碱介质的关系

在自制的硫酸四氨合铜溶液中(实验 1(1)中制备), 滴加 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液酸化, 振荡, 观察现象, 如继续加入 H_2SO_4 又有何现象并解释。

取 0.5ml $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ 溶液, 逐滴加入 $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 振荡试管, 有何现象。

解释酸碱性对配位平衡的影响。

5. 配位剂的掩蔽作用

取两支小试管, 各加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液 2 滴, 于一支试管中加 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 溶液 6 滴, 另一支试管中加蒸馏水 6 滴, 然后分别加入 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2CrO_4 溶液 2 滴, 观察并解释现象。

思考题

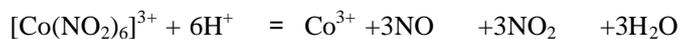
1. 总结本实验所观察到的现象, 说明配离子与简单离子的区别。
2. 怎样比较水溶液中配离子的稳定性?
3. 通过实验, 总结影响配合平衡的因素。

附注

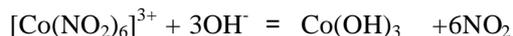
1. 银氨配合物不能储存, 因放置时(高温时不到一天)会析出有强爆炸性的氮化银 Ag_3N 沉淀。为了破坏溶液中的银氨配离子, 可加盐酸, 使其转化为氯化银, 回收。

2. $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ 的配制: 溶解 230g NaNO_2 于 500ml H_2O 中, 加入 165ml $6\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc 和 30g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 放置 24h, 取其清液, 稀释至 1L, 并保存在棕色瓶中。此溶液呈橙色, 若变黄色, 表示已分解, 应重新配制。

3. 对 $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ 溶液, 酸和碱均能分解其中的 $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3+}$ 配离子, 在酸中:



在碱中:



(张波 编)

实验十一 仪器分析

(一) 电位滴定法测定水中氯

在各种容量分析中，都研究了滴定过程中被测物质浓度与消耗的标准溶液体积的关系，即滴定曲线；如中和法是用 pH-V 的关系来说明的，沉淀法中用 pAg-V、配位滴定法中用 pM-V、氧化还原法中用 E-V 等。由此可见，只要用适当的指示电极配合参比电极与滴定溶液组成电池，测定电池的电动势，根据 Nernst 方程式，电动势的变化直接反映了溶液中 pH、pAg、pM、E 等参数的变化。因此在电位滴定中，以滴定剂体积对电动势作图，得到的 E-V 曲线即滴定曲线，便可用来确定滴定的终点。

由于电位滴定不用指示剂确定终点，因此不受溶液颜色或溶液浑浊的限制，也适合于滴定分析中没有适当指示剂的滴定，因此电位滴定法有其独特的应用价值。电位滴定中终点是以电信号显示的，因此很容易用此电信号来控制滴定系统，达到滴定自动化的目的。目前，自动滴定中电位滴定用得最多。

电位滴定不仅用于确定滴定终点，还可用于确定一些热力学常数，诸如弱酸、弱碱的电离常数，配离子的稳定常数等。

国产 ZD-2 型自动电位滴定仪是由电位滴定的指示电极与参比电极输入信号，电子仪器部分包括电子电位计与控制器部分。电子电位计部分与一般的 pH-mV 计相同，把由来自电池的电位信号放大后由电表指示出溶液的 pH 或电池的电动势。控制器部分可以由操作者把结束滴定的 pH 或 mV 值预先设定好，当电表指示值达到设定好的 pH 或 mV 值时，控制器部分即刻使滴定管的电磁阀关闭而结束滴定。滴定终点的 pV 或 mV 值可以由计算或作电位滴定曲线来确定。此外，自动电位滴定仪还可以采用微分电路，对滴定曲线作一次微分或二次微分，用微分后的信号进行终点控制。这种方法对控制滴定终点、减少误差很有好处。国外已有不少实验室采用此方法进行滴定分析。

目的要求

1. 掌握电位滴定的原理和方法。
2. 学习自动电位滴定仪的使用。

实验原理

本实验用银—氯化银电极作指示电极，饱和甘汞电极作参比电极，与被测自来水组成电池，用 AgNO₃ 溶液作滴定剂。银—氯化银电极电位：

$$j_{\text{AgCl/Ag}} = j_{\text{AgCl/Ag}}^{\ominus} + \frac{2.303RT}{F} \lg \frac{1}{[\text{Cl}^-]}$$

随着滴定的进行，[Cl⁻]逐渐改变， $j_{\text{AgCl/Ag}}$ 及电池电动势亦随之变化。测定终点可由电位滴定曲线(电池电动势对滴定剂体积作图)来确定。使用 ZD-2 型自动电位滴定仪，当滴定至预定终点时，滴定仪自动停止滴定，由消耗的标准物质 AgNO₃ 的量可计算出水中氯离子的含量。

仪器、药品

DZ-1 型滴定装置 ZD-2 型自动电位滴定仪 216 型银—氯化银电极 酸式滴定管 容

量瓶 217 型饱和甘汞电极 500ml 棕色试剂瓶 移液管 NaCl(分析纯) AgNO₃ (分析纯) 浓硝酸

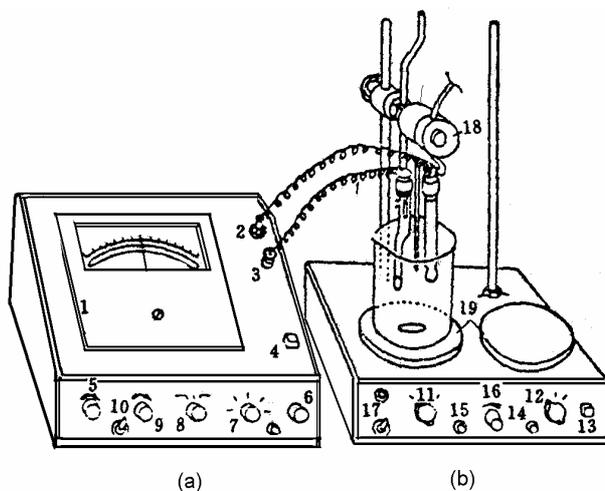


图11-1-1 ZD-2型自动电位滴定仪

(a) ZD-2型自动电位滴定仪 (b) DZ-1型滴定装置

- 1.指示电表 2.电极插孔 3.电极接线柱 4.读数开关 5.预控制调节器 6.校正器
7.温度补偿调节器 8.选择器 9.预定终点调节器 10.滴液开关
11.电磁阀选择开关 12.工作开关 13.滴定开始按键 14.终点指示灯 15.滴定指示灯
16.搅拌转速调节器 17.搅拌开关及指示灯 18.电磁阀 19.磁力搅拌器

实验步骤

1. 溶液配制

(1) 硝酸银溶液的配制 称取约 1.3 克分析纯 AgNO₃ 溶解在 500ml 不含 Cl 的蒸馏水中，置于暗处保存。

(2) 氯化钠标准溶液的配制 准确称取 0.43—0.44 克(称至小数点后第四位)预先干燥的分析纯 NaCl，置于小烧杯中，用蒸馏水溶解后转入 500ml 容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀。计算 NaCl 标准溶液的浓度。

2. 硝酸银滴定液的标定

(1) 调节仪器 自动电位滴定仪的外部结构如图 11-1-1 所示。将甘汞电极接在“接线柱 3”上，银-氯化银电极接在“电极插孔 2”的接线器上，连接滴定计及滴定装置仪器后背的“单元组合”配套插座，开启电源开关(在仪器背面)。

为了校正滴定计的“指示电表 1”，将“选择器开关 8”置于“mV 滴定”处，松开电极插孔的电极，按下“读数开关 4”，旋动“校正器 6”调节电表指针于 0mV 处。校正结束后，勿再旋动校正器，否则必需重新校正。

(2) 标定 用移液管移取 25.00ml 标准 NaCl 溶液于洁净的 250ml 烧杯中，用蒸馏水稀释至 100ml 左右，加入 2ml 浓硝酸，放入一洁净的搅拌磁子，随后将烧杯置于滴定装置的搅拌器平台上，将装有 AgNO₃ 滴定液的滴定管夹在滴定管架上，并将滴定管下端尖嘴插入“电磁阀 18”上的细橡胶管的上端，细橡胶管的下端与滴定毛细管连接，然后旋松滴定架上的固定螺丝，使电极和毛细管刚好插入溶液中，而又不与搅拌磁子相碰，旋紧固定螺丝，打开“搅拌开关 17”，此时，搅拌指示灯亮，转动“搅拌转速调节器 16”，使搅拌调至合适的速度，打开滴定管活塞，将“工作开关 12”拨向手动档，按下“滴定开始按键 13”进行滴定，起初，滴加 AgNO₃ 的体积可大些(大约 5ml)，每加一次 AgNO₃ 溶液后，要放开“滴

定按键 13”，待电位值稳定后，读取滴定液体积和相应的电位值。滴定电位有较明显变化时，应每隔 0.2 毫升记录一次电位值。最后以电位值为纵坐标，以消耗的 AgNO_3 溶液体积为横坐标绘出滴定曲线，并由滴定曲线找出终点电位值及所需 AgNO_3 体积，然后求算 AgNO_3 溶液的浓度。

3. 自来水中氯离子含量的测定

(1) 调节仪器 将“选择器 8”拨至终点档，按下“读数开关 4”，用“预定终点调节器 9”将表头指针调至终点电位处，调好后，在整个滴定过程中勿再旋动终点调节器，否则将因终点值的变化而影响分析结果的准确性。随后将“选择器 8”再拨向“mV”滴定档，用于控制滴定速度的“预控制调节器 5”调至中间位置。

(2) 滴定 移取 100.00ml 自来水样于 250ml 烧杯中，再加入 2ml 浓硝酸，同上法安装滴定管和电极，将滴定装置上的“工作开关 12”拨向“控制”位置，打开滴定管活塞，“滴液开关 10”拨至“+”，按下“滴定开始按键 13”，约 2 秒钟时“终点指示灯 14”亮，“滴定指示灯 15”时亮时暗，滴定液自动滴下，电表指针逐渐向终点电位值接近。在接近终点时，滴定指示灯亮得时间短，当电表指针到达滴定终点时，电磁阀自动关闭，滴定指示灯熄灭，约 10 秒钟后，终点指示灯熄灭，滴定即告结束。记录消耗的 AgNO_3 溶液的体积。

以空白溶液(不含 Cl^- 的蒸馏水)代替自来水，按同样的操作步骤进行空白实验。

滴定结束后，关闭全部开关及滴定活塞，放松电磁阀的支头螺丝。升起电极架，用蒸馏水淋洗电极表面，洗净滴定管和小橡皮管内的残留液。

自来水中 Cl^- 的含量按下式计算：

$$\text{水中 Cl}^- \text{ 的含量}(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{(V_1 - V_2) \times c_{\text{AgNO}_3} \times 35.5}{V_3} \times 1000$$

式中 V_1 为滴定水样消耗的 AgNO_3 溶液的体积， V_2 为滴定空白溶液所消耗的 AgNO_3 溶液的体积， V_3 为水样的体积， c_{AgNO_3} 为 AgNO_3 溶液的浓度。

思考题

1. 试述自动电位滴定的基本原理和过程。
2. 自动电位滴定操作时应注意哪些问题？

(李振泉 编)

(二) 配位化合物的组成和稳定常数的测定

研究配位化学有一整套物理实验方法,如测定稳定常数就可采用 pH 法、电位法、极谱法、分光光度法、溶剂萃取法、离子交换法等,这些方法对于配合物的组成、结构和构象的研究是十分有效的,并且从 40 年代起就开始应用于生物配合物的研究,陆续报道了各种生命金属与各种 α -氨基酸、生物配体(如抗坏血酸、核黄素、脱氧核糖核酸等)、羧肽酶和碳酸酐酶配合物的稳定常数。从这些研究中得到了许多有关生物配体的新信息。50 年代起,许多新的物理方法开始广泛应用于配合物电子结构和空间结构的研究,如 X 射线晶体结构测定法、电子光谱、红外光谱、电子顺磁共振谱等。对于金属蛋白和金属酶来说,最直接也最可靠的方法是 X 射线晶体结构测定法。1926 年 Summer 得到了世界上第一个酶的晶体—尿酶(Urease),这是一种具有催化功能的纯蛋白,但直到 1975 年,由于 X 射线晶体结构测定法的应用,Lerner 才确定尿酶是一种 Ni(II)的金属蛋白。60 年代,配合物的研究方法又有了新的进展。一方面出现了全新的物理方法,如 Mössbauer(穆斯堡尔)谱;另一方面对原有的方法作了改进,扩大了研究范围,如 Raman(拉曼)光谱采用了激光源,提高了光谱强度,并可研究带色配合物;核磁共振谱因位移试剂的应用,提高了分辨率。这些方法被用于生物体内酶的结构和催化反应的研究以及化学模拟的研究。70 年代起,包括中子活化分析、各种电子显微探针、中子衍射、磁圆二色谱等等,几乎每一种用于配合物的结构分析方法都很快地被应用于金属蛋白和金属酶的结构测定。

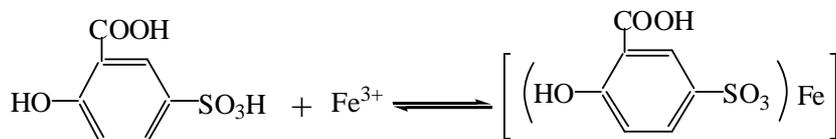
目的要求

1. 了解等摩尔系列法测定配合物组成和稳定常数的原理和方法。
2. 掌握分光光度计的使用方法。

实验原理

磺基水杨酸(简式为 H_3R)与 Fe^{3+} 可以形成稳定的有色配位化合物,据控制溶液的 pH 值不同,所形成的配合物的组成和颜色均不相同。在 pH 值为 10 左右时,可以形成 1:3 的配合物,呈黄色;在 pH 值为 4~10 之间时,生成红色的 1:2 配合物;在 $pH < 4$ 时,形成 1:1 的配合物,呈红褐色。

本实验是在 $pH < 2.5$ 时测定 Fe^{3+} 离子与磺基水杨酸(H_3R)形成配合物的组成和表观稳定常数 $K'_{稳}$ 。



根据 Lambert-Beer 定律,溶液的吸光度与有色物质的浓度成正比。选择一定波长的单色光,采用等摩尔系列法测定一系列不同组分溶液的吸光度,即在保持溶液中金属离子浓度 C_M 与配位体浓度 C_L 之和不变,改变 C_M 与 C_L 的相对量(中心原子 M 和配体 L 的总物质的量保持不变,而 M 和 L 的摩尔分数连续变化),配制一系列溶液,测定其吸光度。当溶液中配位体与金属离子物质的量之比与配合物组成相一致时,配合物的浓度最大。当溶液中配位体与金属离子物质的量之比与配合物组成相一致时,配合物的浓度才能最大。在所测溶液中,磺基水杨酸为无色, Fe^{3+} 浓度很稀,近乎无色,对光几乎不吸收,所以配合物的浓度最大时,其吸光度值 A 也最大。以吸光度 A 为纵坐标,配位体摩尔分数 X_L 为横坐标绘图(见图 11-2-1),配合物的组成 n 就等于最大吸收峰处金属离子与配位体摩尔分数之比。

$$n = \frac{X_L}{1 - X_L}$$

X_L 和 $(1 - X_L)$ 分别为最大吸收峰处的配位体摩尔分数和金属离子摩尔分数。

将图中曲线两侧的直线部分延长并相交于 B 点，可认为是金属离子 M 与配体 L 全部生成配合物 ML_n 时的吸光度，但由于 ML_n 有部分解离，而实际测得最大吸光度为 D 处。因此，配合物的离解度为：

$$a = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

若 $ML_n = M + nL$

起始浓度 $C \quad 0 \quad 0$

平衡浓度 $C - Ca \quad Ca \quad nCa$

配合物的表观稳定常数计算公式为：

$$K'_{\text{稳}} = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n} = \frac{1 - a}{n^n C^n a^{n+1}}$$

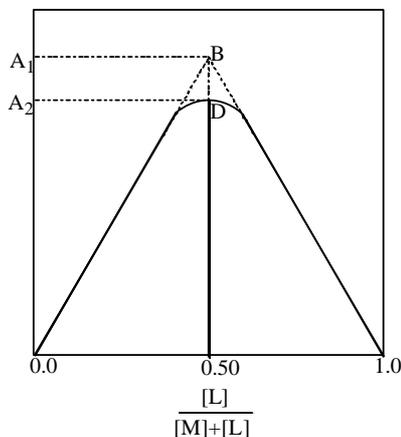


图 11-2-1 等摩尔系列法

C 为最大吸光度处 ML_n 的起始浓度，也是组成 ML_n 的金属离子的浓度。

当 $n=1$ 时 $K'_{\text{稳}} = \frac{1 - a}{Ca^2}$

仪器、药品

吸量管 容量瓶 722 型(721 型)分光光度计

$0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HClO}_4$ $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磺基水杨酸 $0.0100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$

实验步骤

1. 配制 $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$ 溶液和 $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磺基水杨酸溶液

准确吸取 $0.0100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$ 溶液 10.00ml 于 100ml 容量瓶中，用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HClO}_4$ 溶液稀释至刻度，摇匀备用。

同法由 $0.0100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磺基水杨酸溶液配制 $0.0010 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磺基水杨酸溶液。

2. 配制等摩尔系列溶液

按下表用量分别吸取 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HClO}_4$ 溶液、 $0.0010 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$ 溶液和 $0.0010 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磺基水杨酸溶液，逐一注入 11 只 50ml 烧杯中，摇匀。

溶液编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$\text{HClO}_4(\text{ml})$	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
$\text{Fe}^{3+}(\text{ml})$	10.00	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00	3.00	2.00	1.00	0.00
磺基水杨酸(ml)	0.00	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00
配体摩尔分数	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
吸光度											

3. 测定吸光度

在 500nm 波长下分别测定上述溶液的吸光度，将所得数据记录于表。以吸光度对磺基

水杨酸的摩尔分数作图，从图中找出最大吸收，算出配合物的组成和表观稳定常数。

思考题

1. 为什么溶液的酸度对配合物的生成会有影响？在不同酸度下测得的配合物组成和 $K'_{\text{稳}}$ 是否相同？

2. 等摩尔系列法测定配合物组成的原理是什么？

附注

1. 本实验是测定磺基水杨酸合铁()的表观稳定常数，没有考虑溶液中存在着 Fe^{3+} 的水解和磺基水杨酸的离解平衡，故与实际 $K_{\text{稳}}$ 值有差别。若将所测 $K'_{\text{稳}}$ 加以校正，便可与实际 $K_{\text{稳}}$ 值相同。校正公式为 $\lg K_{\text{稳}} = \lg K'_{\text{稳}} + \lg a$ ，当溶液 pH 值在 2.0 左右时， $\lg a = 10.3$ 。

2. HClO_4 的作用：试验中高氯酸的作用一方面是控制溶液的酸度，另一方面在溶液中 ClO_4^- 离子对金属离子的配位倾向很小，所以在配合物水溶液的试验中，利用它造成的一定离子强度，避免其它阴离子对配位反应的干扰。

(丁林 编)

(三) 配合物中心原子 d 轨道分裂能的测定

配合物约占无机化合物总数的 75%，其组成复杂应用广泛，是现代化学的主要研究领域之一，也成为化学工作者研究的重心之一。生物体内的许多必需微量元素都是以配合物形式存在，而且某些药物本身就是配合物，所以配合物与生物体本身和医学的关系很紧密。因此了解配合物的结构和性质是十分必要的。为了说明配合物的各种错综复杂的立体结构、反应、光谱和磁性等性质，化学家们相继提出了各种配合物成键的理论来概括配合物形成的本质。1893 年，瑞士苏黎世大学年仅 27 岁的维尔纳(Werner, A. 1866~1919)提出自己的配位理论，用立体化学的观点成功地解释了配合物的空间构型，从而奠定了配位化学的基础，他也因此而获得了诺贝尔化学奖。

目前配合物的化学键理论主要有：价键理论、晶体场理论、分子轨道理论、晶体场理论与分子轨道理论相结合的配位场理论，以及新近发展的将分子轨道能量参数化的角重迭模型。

1910~1940 年间许多现代研究方法应用到配合物研究中，如红外、紫外、X 射线、电子衍射与磁学测量等，1930 年鲍林(Pauling)用 X 射线测定了配合物的结构，在此基础上提出了价键理论，这个理论取得了很大的成功，而且直观易懂，至今仍然广泛地使用。

晶体场理论早在 1929 年由皮塞(H. Bethe)和范弗里克(J. H. Van Vlack)提出，但是由于当时人们未了解其重要意义而被忽视，直到 1951 年，晶体场理论在解释过渡元素配合物的颜色方面取得了成功后才得到广泛应用，后来又进一步发展成为比较完整的配位场理论。

1958 年山寺用角重迭模型来简化分子轨道的处理方法，可以得出晶体场的若干参数，后来经焦更生(J. Rgensen)等人整理成为一般的理论，称为角重迭模型。

目的要求

1. 掌握测定吸收光谱曲线及最大吸收波长的方法。
2. 熟悉配合物中心原子 d 轨道分裂能的测定方法。
3. 掌握 721 分光光度计的使用。

实验原理

在八面体场中，配合物中心原子的 5 个简并 d 轨道在配体的作用下，可发生能级分裂，分裂成能量相差较大的两组轨道，一组是能量较高的 $d_{x^2-y^2}$ 、 d_{z^2} 二重简并轨道，称为 e_g 轨道；一组是能量较低的 d_{xy} 、 d_{yz} 、 d_{xz} 三重简并轨道，称为 t_{2g} 轨道。最高能级 e_g 轨道与最低能量 t_{2g} 轨道之差，称为分裂能，记作 Δ_o ，它在数值上相当于 1 个电子在 e_g 和 t_{2g} 间跃迁所需的能量。

当中心原子的 d 轨道未被电子填满时，电子吸收了一定能量后就从 t_{2g} 轨道跃迁到 e_g 轨道上，称为 $d-d$ 跃迁。这种跃迁所需的能量一般在可见光区内。可以利用分光光度计测定其吸收波长，进一步算出晶体场稳定化能(CFSE)。

具有一定频率或波长的光的能量为：

$$E = \frac{h\nu}{g} = h \frac{c}{l}$$

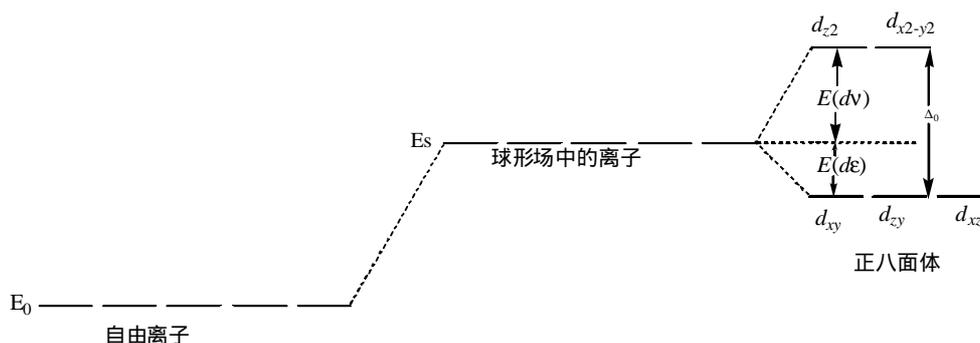


图 11-3-1 中心原子 d 轨道在正八面体场中的能级分裂

d 轨道的分裂能为：

$$\Delta = h \frac{c}{\lambda}$$

式中, h 为普朗克常数 (Planck constant), 其值为 $6.626 \times 10^{-34} \text{J}\cdot\text{s}$; c 为光速, 其值为 $3.00 \times 10^8 \text{m}\cdot\text{s}^{-1}$; λ 为波长, 单位为 nm。由于 h 与 c 都是常数, 当 1mol 电子跃迁时, 则 $h\nu=1$ 。

故

$$\Delta = \frac{1}{\lambda} (\text{nm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda} \times 10^{-7} (\text{cm}^{-1})$$

选取一定浓度的配合物溶液, 用分光光度计测出在不同波长下的吸光度 A , 以 A 为纵坐标, λ 为横坐标作图, 可得吸收曲线。利用曲线最高峰所对应的波长 λ_{max} 来计算? 值

$$\Delta = \frac{1}{\lambda_{\text{max}}} \times 10^{-7} (\text{cm}^{-1})$$

仪器、药品

721 型分光光度计 移液管(10ml、5ml) 容量瓶(50ml) 0.01mol·L⁻¹ CuSO₄ 溶液
0.5mol·L⁻¹ 氨水 乙二胺水溶液($\varphi=0.2$) 去离子水

实验步骤

1. 溶液的配制

用移液管移取 5.00ml 0.01mol·L⁻¹ CuSO₄ 溶液置于 50ml 容量瓶中, 再加入 10ml 0.5mol·L⁻¹ 的氨水, 摇匀, 得到 [Cu(NH₃)₄]²⁺ 配离子溶液。

用移液管移取 5.00ml 0.01mol·L⁻¹ CuSO₄ 溶液置于 50ml 容量瓶中, 再加入 φ 为 0.2 的乙二胺水溶液, 摇匀, 得到 [Cu(en)₂]²⁺ 配离子溶液。

2. 吸光度 A 的测定

以去离子水为参比溶液, 用 721 型分光光度计在波长 500~700nm 范围内, 每间隔 10nm 测一次配离子溶液的吸光度, 在接近峰值附近, 每间隔 5nm 测一次数据。

3. 数据处理

(1) 测试记录 (填入下表)

(2) 以 A 为纵坐标, λ 为横坐标, 作配离子的吸收曲线。

(3) 在吸收曲线上找出最高峰所对应的波长 λ_{max} , 计算配合物的分裂能?。

$\lambda(\text{nm})$	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
----------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

 $0.0033\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ $0.0033\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}[\text{Cu}(\text{en})_2]^{2+}$

$\lambda(\text{nm})$	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	610
$0.0033\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$											
$0.0033\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}[\text{Cu}(\text{en})_2]^{2+}$											

思考题

1. 配合物的颜色与分裂能的大小有什么关系？
2. 配合物分裂能与跃迁稳定性有什么联系？

(凌爱霞 编)

(四) 荧光法测定水中铝

铝在自然界里的丰度甚高，且又广泛存在于动植物体内。以前人们认为铝的毒性不大，所以把铝列为无毒的微量元素。近年来研究发现，人和动物摄入过多的铝，均可引起异常变化。铝的毒性作用首先由慢性肾功能衰竭得到证实。人体免疫系统对 Al^{3+} 的毒性亦很敏感，淋巴细胞对 Al^{3+} 的亲合力相当强，故而认为铝对机体有免疫抑制作用。研究发现，与铝中毒有关的老年性痴呆、帕金森氏症也属于免疫系统紊乱性疾病。铝对造血系统也有毒性，铝致骨软化患者有时发生红细胞低色素性贫血症(不缺铁)。关于铝的神经毒性，已证明铝与脑内钙调蛋白的结合，可改变钙调蛋白的构型和其他蛋白的互相作用，铝加速琥珀酸脱氢酶细胞色素系统的摄氧速率及增加乙酰胆碱的水解和乙酰胆碱酶的活性。铝的神经毒性的临床症状表现为语言障碍、定向障碍、肌痉挛、癫痫发作、幻觉、痴呆，以及症状出现后 6~8 个月死亡。同时流行病学调查发现，老年痴呆症发病率与饮水中铝的含量有关。

铝的生化与临床研究依赖于分析方法的准确度。生物样品是含有大量有机物和无机物的复杂体系。因此，给微量铝的测量带来一定困难。铝是环境中无处不在的元素。在生物体内含量又很低。所以，在样品采集、贮存、前处理和分析测定的过程中要避免受到污染。在测定方法上，就必须探求最合适的条件。根据资料显示，铝的测定方法目前最常用的有比色法、荧光法、中子活化分析法、原子发射光谱法(AES)、电化学法、原子吸收法(AAS)、高效液相色谱法(HPLC)和气相色谱法(GC)。与其他方法相比，荧光法的主要优点是：灵敏度高，检出限低；光谱比较简单，干扰因素相对较少。因此用荧光法测定生物样品或饮用水中的铝是一个简便可行的方法。

目的要求

1. 掌握荧光法测定水中铝的原理。
2. 掌握荧光测量、萃取等基本操作。

实验原理

铝离子能与许多有机试剂形成会发光的荧光络合物，其中 8-羟基喹啉是较常用的试剂，它与铝离子所生成的络合物能被氯仿萃取，萃取液在 365nm 紫外光照射下，会产生荧光，峰值波长在 530nm 处，以此建立铝的荧光测定方法。其测定范围为 $0.002\sim 0.24\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 铝。 Ga^{3+} 及 In^{3+} 会与该试剂形成会发光的荧光络合物，应加以校正。存在大量的 Fe^{3+} 、 Ti^{4+} 、 VO_3^- 会使荧光强度降低，应加以分离。

实验使用标准硫酸奎宁溶液作为荧光强度的基准。

仪器、试剂

930 型荧光光度计(附液槽 1 对、滤光片 1 盒) 50ml 容量瓶 7 个 2ml、5ml 吸量管各 1 支 5ml、100ml 量筒各 1 个 125ml 分液漏斗 7 个 漏斗 7 个 $1.000\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝储存标准液(附注 2) $2.00\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝工作标准液(附注 3) 2% 8-羟基喹啉溶液(附注 4) $\text{NH}_4\text{Ac}-\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 缓冲溶液(附注 5) $50.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 奎宁标准溶液(附注 6) 氯仿

实验步骤

1. 系列标准溶液的配制

取 6 个 125ml 分液漏斗，各加入 40~50ml 蒸馏水，分别加入 0, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 及 5.00ml $2.00\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 铝的工作标准液。沿壁加入 2ml 2% 8-羟基喹啉溶液和 2ml 缓冲溶液至

以上各分液漏斗中。每个溶液均用 20ml 氯仿萃取 2 次。氯仿萃取溶液通过脱脂棉滤入 50ml 容量瓶中，并用少量氯仿洗涤脱脂棉，用氯仿稀释至刻度，摇匀。

2. 荧光强度的测量

选择合适的激发滤光片及荧光滤光片。用奎宁标准溶液调节荧光强度读数为 100。然后分别测量标准系列溶液各自的荧光强度。

3. 未知试液的测定

取一定体积未知试液，按步骤 1、2 方法处理并测量（附注 1）

4. 数据及处理

- (1) 记录系列标准溶液的荧光强度，并绘出标准曲线。
- (2) 记录未知试样的荧光强度，由标准曲线求得未知试样的铝浓度。

思考题

影响荧光强度的外界因素有哪些？

附注

1. 若样品浓度超出线性范围，应稀释适当的倍数，使其浓度在线性范围内。
2. $1.000\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝储存标准液：溶解 17.57g 硫酸铝钾 $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3\cdot\text{K}_2\text{SO}_4\cdot24\text{H}_2\text{O}]$ 于水中，滴加 1:1 硫酸至溶液清澈，移至 1L 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。
3. $2.00\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝工作标准液：取 2.00ml 铝的储存标准液于 1L 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。
4. 2% 8-羟基喹啉溶液：溶解 2g 8-羟基喹啉于 6ml 冰醋酸中，用水稀释至 100ml。
5. 缓冲溶液：每升含 NH_4Ac 200g 及浓 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 70ml。
6. $50.0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 奎宁标准溶液：0.500g 奎宁硫酸盐溶液在 1L $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸中，再取此溶液 10ml，用 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸稀释到 100ml。

（陈中道 编）

(五) 对羟基苯甲酸酯类混合物的反相高效液相色谱分析

高效液相色谱法 (HPLC) 是指在液相色谱中, 采用颗粒十分细的高效固定相, 并采用高压泵输送流动相, 全部工作通过仪器来完成。固定相亦称填料或吸附剂等, 液相色谱所用的填料是经典的多孔无定形硅胶。到 60 年代中后期, 发展出薄壳形填料。1972 年以后, 发展出了多孔微球硅胶。由于细粒度有利于减小涡流扩散效应, 缩短了溶质在两相间的传质扩散过程, 从而提高了色谱柱的分离效率。因此, 目前人们所采用的 HPLC 固定相绝大部分是这类填料。HPLC 固定相主要有液-固吸附、键合相和液-液分配固定相三种类型。按照键合有机硅烷的官能团分类, 键合相可分为非极性、极性和离子交换键合相等。而反相色谱通常是以具有非极性标明的载体为固定相, 以比固定相极性更强的溶液为流动相的色谱分离系统。其中, 十八烷基键合硅胶固定相是反相高效液相色谱中应用最广泛的一种。

与气相色谱法比较, 液相色谱法不受样品挥发度和热稳定性的限制, 只要被分析物质在流动相溶剂中 (各式各样) 中有一定的溶解度, 便可以分析。所以液相色谱特别适合于分离和分析那些沸点高、极性高、热稳定性差的生物大分子、离子型化合物、不稳定的天然产物以及其它各种高分子化合物等。此外, 液相色谱中的流动相不仅起到使样品沿色谱柱移动的作用, 而且与固定相一样, 与样品分子发生选择性的相互作用, 这就为控制和改善分离条件提供了一个额外的可变因素。

高效液相色谱法是 70 年代以来发展最快的一个分析化学分支学科, 现已称为生化、医学、药物临床、化学化工、食品卫生、环保检测、商检和法检等领域最常用的分离分析手段。高效液相色谱在生物样品纯化、手性药物拆分等方面也具有非常重要的作用。

目的要求

1. 学习高效液相色谱保留值定性方法和归一化法定量。
2. 熟悉高效液相色谱分析操作。

实验原理

在对羟基苯甲酸酯类混合物中含有对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯, 它们都是强极性化合物, 可采用反相液相色谱进行分析, 选用非极性的 C-18 烷基键合相作固定相, 甲醇的水溶液作流动相。

由于在一定的实验条件下, 酯类各组分的保留值保持恒定, 因此在同样条件下, 将测得的未知物的各组分保留时间, 与已知纯酯类各组分的保留时间进行对照, 即可确定未知物中各组分存在与否。这种利用纯物质对照进行定性的方法, 适用于来源已知, 且组分简单的混合物。

本实验采用归一化法定量, 归一化法适用于试样中各个组分都能完全分离, 且都能出峰的情况, 计算公式为:

$$\% C_i = \frac{f_i A_i}{\sum_{i=1}^n f_i A_i} \times 100$$

对羟基苯甲酸酯类混合物属同系物, 具有相同的生色团和助色团, 因此它们在紫外光度监测器上具有相同的校正因子, 故上式可简化为:

$$\%C_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100$$

仪器、试剂

岛津高效液相色谱仪(岛津 SPD-10A 检测器 岛津 C-R6A 数据处理仪) 微量进样器：
25ul 超声波发生器

对羟基苯甲酸甲酯 对羟基苯甲酸乙酯 对羟基苯甲酸丙酯 对羟基苯甲酸丁酯甲醇
等均为分析纯 去离子水 色谱纯甲醇

实验步骤

1. 标准溶液的配制

(1) 标准贮备液 分别于四只 100mL 容量瓶中，配制浓度均为 $1000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的上述四种酯类化合物的甲醇溶液。

(2) 标准使用液 用上述四种标准贮备液分别于四只 10mL 容量瓶中，配制浓度均为 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的四种酯类化合物的甲醇溶液，摇匀备用。

(3) 标准混合使用液 于一只 10mL 容量瓶中，用上述四种标准贮备液，配制浓度均含 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的酯类混合物的甲醇溶液，混匀备用。

2. 实验条件的选择

(1) 色谱柱 长 15cm、内径 3mm，装填 C_{18} 烷基键合相，颗粒度为 10um 的固定相。

(2) 流动相 甲醇：水 (55 : 45)，流量 $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

(3) 监测器 紫外光度监测器，254nm，灵敏度 0.04

(4) 记录仪 量程 5mV，纸速 $480\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$

(5) 进样量 3uL

3. 测定

(1) 将配制好的流动相甲醇水溶液置于超声波发生器上脱气 15min。

(2) 根据实验条件，将高效液相色谱仪按照操作步骤调节至进样状态，待仪器液路和电路系统达到平衡时，记录仪基线呈平直，即可进样。

(3) 依次分别吸取 3uL 的四种标准使用液及标准混合使用液和未知试液进样，记录各色谱图，并各重复 2 次，在每次进样后，于进样信号附近标明进样溶液的名称。

数据及处理

1. 记录实验条件

- (1) 色谱柱与固定相
- (2) 流动相及其流量
- (3) 监测器及其灵敏度
- (4) 记录仪量程及纸速
- (5) 进样量

2. 测量四种对羟基苯甲酸酯化合物色谱图的保留时间 t_R 值，并填于下表中。

保留时间	t_R/min			
测定次数	1	2	3	平均值

对羟基苯甲酸甲酯

对羟基苯甲酸乙酯

对羟基苯甲酸丙酯

对羟基苯甲酸丁酯

3. 依次测量标准混合液色谱图上各色谱峰的保留时间 t_R 值，并填于下表中，然后与上表中的 t_R 值对照，确定各色谱峰代表何种化合物，填入下表中。

保留时间 测定次数	t_R/min			平均值	相应化合物的名称
	1	2	3		
峰 1					
峰 2					
峰 3					
峰 4					

4. 测量未知试样色谱图上各组分的峰高 h 、半峰宽 $W_{1/2}$ ，并计算各组分峰面积 A 及其含量 $C_i\%$ ，并将数据列于下表中。

组 分	次数	h/mm	$W_{1/2}/\text{mm}$	$A/\text{uV}\cdot\text{s}$	$A_i/\text{uV}\cdot\text{s}$	$C_i/\%$
对羟基苯甲酸甲酯	1					
	2					
	3					
对羟基苯甲酸乙酯	1					
	2					
	3					
对羟基苯甲酸丙酯	1					
	2					
	3					
对羟基苯甲酸丁酯	1					
	2					
	3					

思考题

1. 高效液相色谱分析采用归一化法定量有何优缺点？本实验为什么可以不用相对质量校正因子？
2. 在高效液相色谱中，为什么可利用保留值定性？这种定性方法你认为可靠吗？
3. 本实验为什么采用反相液相色谱法，试说明理由。
4. 高效液相色谱分析中流动相为何要脱气，不脱气对实验有何妨碍？

(马庆苓 编)

实验十四 蒸馏和分馏

有机合成与人类息息相关，看看周围五彩缤纷的世界，从鲜艳的颜色，到用途广泛的塑料，治疗疾病的药物，沁人心脾的香料大多是有机合成的结果。孕育生命的自然界也无时无刻不在进行着有机合成。有机合成前程似锦，而与之相适应的分离技术也是前景光明。常见的有机物分离方法有：对固态有机化合物而言，分离方法为重结晶、过滤、升华等，而对液态有机化合物的分离和提纯来说，应用最广泛的方法是蒸馏，其中包括常压蒸馏、减压蒸馏、分馏以及水蒸汽蒸馏等。这几种蒸馏被称为液态有机化合物分离和提纯的四大方法。蒸馏技术广泛应用于石油炼制、炼焦化工、有机合成等化工生产以及中草药有效成分的分离技术中。关于蒸馏技术的发展大约可追溯到公元一世纪时，希腊的炼金术就已有简单的蒸馏设备，到十一、十二世纪，随着多国酿酒工业的发展，中外都独立地发明了蒸馏酒的技术。苏格兰人蒸馏麦酒发明了威士忌(Whiskey)，俄国人制作了伏特加(Vodka)，荷兰人蒸馏葡萄酒制得白兰地(Brandy)。但是蒸馏常用于分离提纯混合物中沸点差达 30 以上的物质，但在蒸馏沸点比较接近的混合物时各物质的混合蒸汽将同时蒸出，只不过低沸点的多一些，故难以达到较好的分离提纯的效果，此时只有采用分馏才能达到较好的分离提纯效果。

(一) 蒸 馏

目的要求

1. 了解沸点测定的意义；
2. 掌握常压蒸馏的原理和操作方法。

实验原理

把液体加热变成蒸汽，然后使蒸汽经过冷凝变成液体的过程叫蒸馏。蒸馏广泛地应用于分离和提纯液体有机化合物，也可以测定化合物的沸点及了解有机物的纯度，还可以回收溶剂或蒸出部分溶剂以浓缩溶液。

液体受热后，当它的蒸汽压和液面上所受的大气压相等时的温度叫沸点。蒸馏时从第一滴馏出液开始至蒸发完全时的温度范围叫沸点距。在一定压力下，纯物质具有恒定的沸点，沸点距很小，一般在 0.5~1 。而混合物(共沸物除外)则不同，没有恒定的沸点，沸点距也较大，所以通过蒸馏可以测定物质的沸点。由于沸点是物质固有的物理常数，故可以通过测定沸点来鉴别物质和判断其纯度。

为了消除在蒸馏过程中的过热现象和保证沸腾的平稳状态，常加入素烧瓷片或沸石，因为他们都能防止加热时的暴沸现象，故把他们叫做止暴剂。在加热前应加入止暴剂。当加热后发觉未加止暴剂或原有止暴剂失效时，千万不能匆忙投入止暴剂。因为当液体在沸腾时投入止暴剂，将会引起剧烈的暴沸，液体易冲出瓶口，若是易燃物，将会引起火灾。所以，应使沸腾的液体冷却至沸点以下才能加入止暴剂。

仪器、药品

250ml 电热套 100ml 蒸馏烧瓶 1 只 蒸馏头 1 个 直形冷凝器 1 只 50ml 接受瓶 1 只 尾接管 1 个 温度计(100)1 只 温度计套管 1 个 50ml 量筒 1 只 长颈漏斗 1 只 烧杯 1 只 铁架台 升降台 橡胶管 沸石 95% 乙醇

实验步骤

1. 仪器安装(仪器装置见图 14 - 1)

蒸馏仪器主要由蒸馏瓶、蒸馏头、温度计、温度计套管、冷凝器、尾接管、接受器组成。安装的顺序一般是“由上而下，由左而右”，根据热源的位置，依次安装铁架台、电热套和蒸馏烧瓶等。蒸馏烧瓶用铁夹垂直夹好，在瓶口插入蒸馏头；在另一铁架台上用铁夹夹住连有橡胶管的冷凝器的中部，调整冷凝器的位置(高低和角度)使其与蒸馏头侧管在同一直线上，然后旋松冷凝管中部的夹子，使冷凝管沿此直线上移与蒸馏头侧管连接好，旋紧冷凝管上的夹子(各铁夹不应夹得太紧或太松，以夹住后稍用力尚能转动为宜)。在冷凝器下端连接尾接管，其末端插入接受器。在蒸馏头上塞上插有温度计的温度计套管，调整温度计位置，使温度计水银球的上缘恰好与蒸馏头侧管接口的下缘在同一水平线上。冷凝水由冷凝器的下端流入，上端流出。

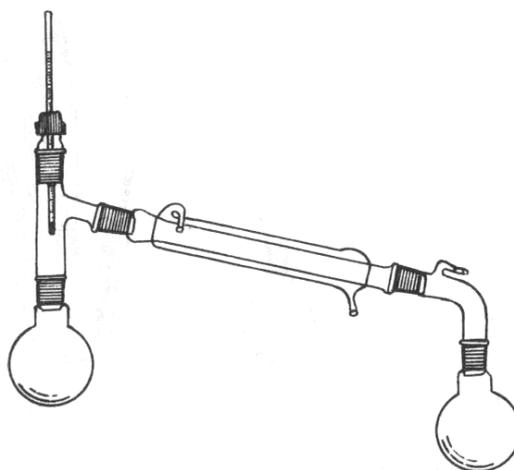


图 14 - 1 常压蒸馏装置

整套仪器要做到与大气相通、准确端正，不论从侧面看或正面看，各仪器的中心都要在一直线上。

2. 蒸馏操作及沸点的测定

(1)用干燥量筒量取 95%乙醇 50ml，经长颈漏斗倒入干燥的蒸馏瓶中，加入沸石 2~3 粒，打开冷凝水，调节中等水流，检查装置的正确性与气密性，一切正常后，将蒸馏瓶置于电热套中加热至沸腾(最初宜用小火，以免蒸馏烧瓶因局部受热而破裂；慢慢增大电压使之沸腾)，当第一滴蒸馏液落于接受器中时，观察并记录此时的温度，调节电热套电压继续加热，保持蒸馏速度为每秒 1~2 滴，直至蒸馏瓶中仅存少量液体时(不要蒸干)，停止加热，并观察记录最后的温度；起始及最终的温度代表液体的沸程。最后停止通水，将收集的乙醇倒入回收瓶。

(2)另取 50%乙醇 50ml 同步骤(1)进行蒸馏，并记录结果。蒸馏结束，拆卸仪器，其顺序与安装时相反。

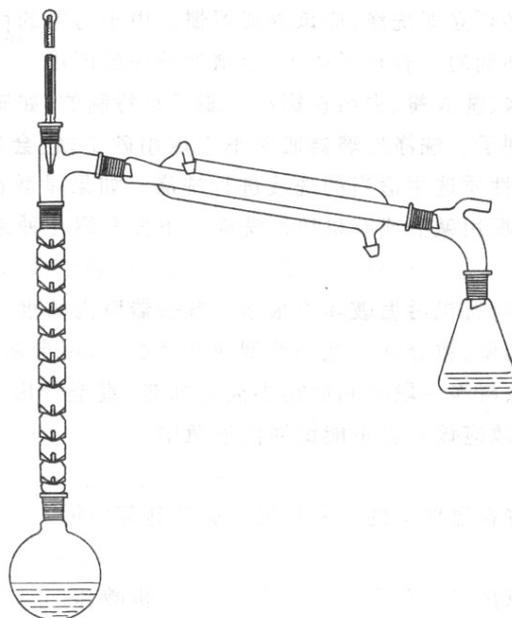
(二) 分 馏

目的要求

1. 明确分馏的意义。
2. 掌握分馏的原理及操作方法。

实验原理

分馏又叫精馏，是多次蒸馏的过程，在常压蒸馏装置上安装一支分馏柱，其作用就是使沸腾着的混合液的蒸汽进入分馏柱时，由于柱外空气的冷却，蒸汽中高沸点的组分就被冷却为液体，回流



入蒸馏瓶中，故上升的蒸汽中低沸点组分的相对量便较多了。当冷凝液回流途中遇到上升的蒸汽时，二者便进行热交换，上升的蒸汽中沸点高的组分又被冷凝，因此蒸汽中低沸点组分又增加了。如此在分馏柱内反复进行着汽化、冷凝、回流等程序。在分馏柱效率相当高且操作正确时则在分馏柱上部逸出的蒸汽就接近于低沸点的组分，再向下回流入蒸馏瓶的液体则接近于高沸点的组分，从而达到分离和提纯的目的。实际上分馏就是利用分馏柱来达到多次重复的蒸馏过程，将沸点相差很近的两组分分开(形成共沸点的混合物除外)。

仪器、药品

蒸馏瓶 分馏柱(vigreux 韦氏) 冷凝管 接受器 水浴锅 温度计 沸石 丙酮 乙醇

实验步骤

分馏采用如图 14 - 2 所示的装置，主要仪器包括：蒸馏烧瓶、分馏柱、冷凝管、接受器四个部分。安装顺序从热源开始按照“由下而上，由左及右”地进行。安装时首先在铁架台上固定好蒸馏烧瓶的位置，然后，在蒸馏烧瓶上装上普通分馏柱。分馏柱顶端插上温度计，使温度计水银球上缘恰与分馏柱支管接口的下缘相平齐。分馏柱的支管与冷凝管相连，冷凝管固定在另一铁架台上，其斜度应与分馏柱支管的斜度相同。冷凝管下端与牛角管相连接，牛角管末端伸入接受器中。冷却水由冷凝器下口导入，上口导出。在蒸馏前先通入冷却水。

用量筒量取 15ml 丙酮，15ml 乙醇经小漏斗倒入干燥的蒸馏瓶中，加入 2~3 粒沸石(止爆剂)。根据被分馏液体的沸点范围选用合适的热浴加热，图 14 - 2 分馏装置图，密切注意浴温，控制流出液的速度为 1 滴/2~3 秒，收集流出液。当第一个组分开始蒸出时，会产生沸点的迅速上升。

思考题

1. 为什么整套装置不能密闭，而蒸馏部分和冷凝部分必须要密闭？
2. 利用沸点的测定，怎样判断一种液体物质是否纯净；如果此液体具有恒定的沸点，能否证明它就是纯净物呢？
3. 把橡胶管套进冷凝管侧管时，怎样才能防止折断其侧管；当加热后有馏出液出来时，才发现冷凝管没有通水，能否马上通水，若不行，该怎么办？
4. 试简述分馏的原理及意义？
5. 如果分馏的速度过快或过慢对分馏结果有什么影响？

附注

1. 蒸馏易挥发、易燃物质(如乙醚)不能用明火加热，以避免火灾。
2. 分馏的关键是选择分馏柱和分馏装置，一般说来被分馏的液体混合物，沸点相差愈大，则对分馏柱的要求愈低。液体混合物的沸点相差 100 以上，可以不用分馏柱；相差 25 左右，可用一般分馏装置；相差 10 左右则需要更精细的分馏装置。
3. 分馏的热源要求能够控制并保持稳定。加热过快，蒸馏速度太快，上升的蒸汽会把凝结在分馏柱内的液体顶上去，破坏了回流，使分馏效率降低，这种现象叫做“液泛”。加热太慢，分馏柱就变成了回流冷凝器，而蒸不出任何组分。

(全先高 编)

实验十五 有机物的层析

色谱法是 20 世纪初由俄国植物学家 M.Tswtt 在研究植物色素成分时发现的一种物理化学分离方法。为了分离提纯植物色素，他将碳酸钙装填在玻璃管中做吸附剂，将色素石油醚提取液从柱顶加入，再用纯石油醚做为洗脱剂进行洗脱。由于碳酸钙对各种色素成分的吸附力不同，各种成分被分离，在柱内不同的部位形成颜色不同的色带，然后对不同的色带进行定性定量分析，这种分离方法被命名为色谱法，并沿用至今。

20 多年后，色谱法迅速发展，经不断改进，已成功的发展为各种类型的色谱分析方法。相继有了薄层色谱和纸色谱法，并提出了色谱的塔板理论。50 年代以后，色谱法发展更加迅速和广泛，推出了气相色谱法和高分离效率的毛细管色谱法。60 年代又创立了凝胶色谱法和高效液相色谱法。高效液相色谱法的创立弥补了气相色谱法不能直接分析难挥发、热不稳定及高分子化合物样品的缺陷，使色谱法的应用范围更加广泛。80 年代又创建了超临界液体色谱法和毛细管电泳法。至此，色谱法已发展成为一门新兴的科学——色谱学。目前，这门具有强大生命力的分离技术正继续向着智能化、联用技术和多维色谱法的方向快速发展，成为生命科学及其他许多研究领域不可缺少的重要分离手段。

薄层色谱和柱色谱是有机物分离常采用的两种方法，柱色谱、薄层色谱和纸色谱在原理和操作上是相似的。主要是用于化合物的分离、纯化和鉴定，也常用于制备性分离。柱色谱在分离时一般承载样品量较大，所用时间也较长，不适用较小量样品的分离。纸色谱只适用于较小样品量的分离，其灵敏度较低。而薄层色谱同时兼备了柱色谱和纸色谱两者的优点，既适用于小量样品的分离，又能对较大量样品进行分离、精制。而且它分离时间较短(几十分钟)。这样迅速而有效的分离效果是柱色谱和纸色谱所不能比拟的。由于薄层色谱具有以上优点，而且操作方便、设备简单。所以，薄层色谱发展很快，广泛应用于生物制药、化工、生物医学等领域。

(一) 薄层色谱

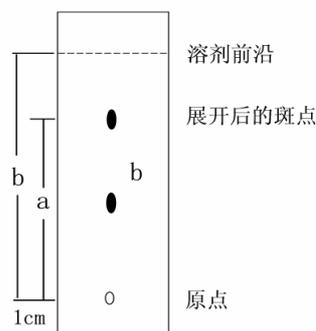
目的要求

1. 学习薄层色谱分析的原理和方法。
2. 掌握薄层色谱法分离、鉴定有机化合物的操作技术。

实验原理

薄层色谱法(Thin Layer Chromatography, TLC),也叫薄层层析法,它是一种快速、简便和应用广泛的层析方法。薄层色谱法是把吸附剂(固定相)均匀的涂铺在表面光洁的玻璃板(称薄层板)上,把待分析样品滴加在薄层板的一端,放在密闭的容器中用合适的展开剂(流动相)展开。由于样品中各个组分对吸附剂的吸附能力和在展开剂中的溶解度不同,当展开剂流经吸附剂时,发生无数次吸附和解吸过程,吸附力弱的组分随流动相向前移动快,吸附力强的组分滞留在后。经过一段时间展开后,吸附能力不同的组分会彼此分离。如组分为无色物质,可用物理或化学方法显色定位。

各组分斑点移动的速率可用比移值 R_f 表示。



$$R_f = \frac{\text{原点中心至斑点中心的距离}}{\text{原点中心至溶剂前沿的距离}}$$

R_f 值随分离化合物的结构、固定相与流动相的性质、温度等因素的不同而变化。当实验条件固定时, R_f 值为一特定的常数, 因而可作为定性分析的依据。但由于影响 R_f 值的因素很多, 实验数据往往与文献记载不完全相同, 因此在鉴定时常用标准样品对照分析。

薄层色谱主要用于有机化合物的分离和鉴定, 也可用于半微量制备。此外, 薄层色谱也经常用于寻找柱色谱的最佳分离条件。

仪器、药品

层析缸 玻璃板(12×5cm) 毛细管 喷雾器 电吹风 台秤

硅胶 G 0.1% 羧甲基纤维素钠 0.1% 精氨酸 0.05% 丙氨酸 待分离溶液(丙氨酸+精氨酸混合溶液) 展开剂(正丁醇:冰醋酸:乙醇:水=4:1:1:2) 0.5% 茚三酮丙酮溶液

实验步骤

1. 制备薄板

取 12×5cm 的玻璃板两块, 洗净晾干。

称取 3g 硅胶 G 置于小烧杯内, 加 0.1% 羧甲基纤维素钠 8ml, 充分搅拌, 调成均匀的糊状, 分倒在上述两块洁净的玻璃板上, 用玻璃棒快速涂平后, 立即用拇指和食指拿住玻璃板作前后左右摇晃摆动, 使流动的硅胶 G 均匀的平铺在玻璃板上^[1], 也可将玻璃板在台面上轻轻跌落数次。然后将玻璃板放于水平的台面上室温晾半小时(基本收干水分), 移入烘箱内缓慢升温至 110°C, 活化半小时, 稍冷后, 置于干燥器中备用。

2. 点样

在薄层板一端, 距边沿 1.0cm 处, 用铅笔轻轻划一直线作为点样线, 取管口平整的毛细管点加样品^[2], 样品斑点的扩散直径以 2~3mm 为宜, 一次点样不够时, 应在溶剂挥发后再点一次。各样品点样点之间的距离为 1.5cm。

3. 展开

在密闭洁净的层析缸内加入展开剂 30ml, 使溶剂蒸汽饱和 5~10 分钟, 再将已点加样品的薄板倾斜放入层析缸内, 点样一端朝下, 浸入展开剂约 0.5cm(注意勿使样品浸入展开剂中), 密闭层析缸。当展开剂前沿上升至薄板上端约 1.0cm 处或各组分已明显分开时, 取出薄板, 尽快用铅笔在展开剂上升的前沿处划一记号^[3], 晾干, 也可用电吹风吹干, 但应吹反面(即没有硅胶 G 的一面), 以免吹掉硅胶层。

4. 显色

将薄板喷上茚三酮溶液, 用电吹风均匀加热可显紫红色斑点。

5. 比移值 R_f 的计算

测量点样中心到斑点中心的距离, 分别计算 R_f 值。

思考题

1. 为什么在一定条件下, 可用 R_f 值来鉴定化合物?
2. 展开剂的高度超过了点样线, 对薄层色谱有何影响?

附注

1. 薄板要尽量铺的均匀, 否则, 展开剂前沿不齐, 色谱结果也不易重复。

2. 点样时，使毛细管刚好接触薄层即可，切勿点样过重而使薄层破坏。
3. 如不及时划上记号，等展开剂挥发后，就无法确定展开剂上升的高度。

(徐志强 编)

(二) 柱色谱

目的要求

1. 掌握柱色谱的原理和基本操作。
2. 学会利用柱色谱的方法分离和提纯有机化合物。

实验原理

柱色谱(Column Chromatography), 又称柱层析, 是用来分离和提纯有机化合物的一种色谱分析方法。根据固定相的不同, 将柱层析分为吸附柱层析和分配柱层析两类。吸附柱层析常用氧化铝或硅胶作固定相。分配柱层析则以硅胶或硅藻土与纤维素等为支持剂, 以吸收较大液体为固定相。本实验为吸附柱层析。

吸附柱层析是利用固体吸附剂对被分离混合物中不同组分的吸附力大小不同而达到分离的柱上层析法。通常是在玻璃柱中装填比表面积很大、经过活化的多孔或粉末状固体吸附剂, 将待分离混合物溶液加在柱的顶端, 混合物被吸附剂所吸附, 然后不断从上端加入适当的溶剂(洗脱剂)进行洗脱, 由于各组分被吸附的能力不同, 所以随洗脱剂下移的速度也不同, 随着洗脱的不断进行, 各组分被分成不同的层次, 若被分离的是有色物质, 则在柱中形成若干个色带, 继续洗脱, 已经分开的组分可从柱下逐一流出, 分别加以收集, 对于柱上不显色的化合物, 可对流出部分分段收集, 再进行光谱等鉴定。

柱层析常用来分离和提纯少量有机化合物, 但制备性分离的应用也越来越广泛。

仪器、药品

层析柱(20×1.5cm) 铁架台 小漏斗 100ml 滴液漏斗 100ml 烧杯 100ml 锥形瓶 1ml 移液管 脱脂棉 滤纸 剪刀。

0.05% 甲基橙与 0.25% 次甲基蓝混合乙醇溶液
100~200 目中性层吸用氧化铝 95% 乙醇

实验步骤

1. 装柱

取一根洗净的层析柱垂直固定在铁架台上, 以锥形瓶作洗脱液接收器, 柱底部用少量脱脂棉轻轻塞住, 在脱脂棉的上面铺一张比柱内经略小的滤纸, 关闭活塞, 向柱中加入 95% 乙醇 15ml。

称取 10g 中性氧化铝于 100ml 烧杯中, 加入 95% 乙醇 15ml, 用玻棒调成糊状。打开活塞, 控制流速 1 滴/秒, 然后将糊状氧化铝通过小漏斗慢慢加入到层析柱内, 边加边轻轻敲打柱身下部, 使氧化铝沉降均匀、平整, 填装紧密, 待沉降结束后, 在氧化铝上面放一圆形滤纸, 装柱结束。注意不能让柱顶变干。

2. 加样

当柱中乙醇液面下降至与氧化铝表面约 1mm 时, 关闭活塞, 立即用移液管加入 1ml 次甲基蓝和甲基橙的混和溶液。

3. 洗脱

打开柱活塞, 并控制流速 1 滴/秒, 从滴液漏斗中滴加 95% 乙醇进行吸脱。随着乙醇的

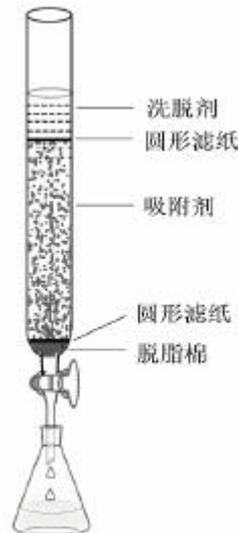


图 15-2 柱层析装置图

不断滴入，在柱上形成了两个明显的色带，当次甲基蓝到达柱底时，更换接收器，接收全部色带溶液。关闭柱活塞，更换滴液漏斗中的乙醇为蒸馏水，继续重复上述操作，收集全部甲基橙水溶液。

思考题

1. 装柱时应注意什么事项？
2. 柱层析中为什么极性大的组分要用极性大的溶液来洗脱？

(卢英华 编)

实验十六 萃取和洗涤

萃取是分离混合物的一项比较经典的方法,它是利用物质在两种互不相溶的溶剂中溶解度不同而实现分离的。它的形成可以追溯到十八世纪后期,当时一位药剂师名叫舍勒,他用石灰水提取安息香树胶中的安息香酸获得成功,后来用类似的方法提取了草酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、没食子酸、马尿酸等纯净物。从此以后人们对萃取方法进行了深入的理论研究和应用研究,使萃取方法的应用越来越广,不但在有机化学、分析化学、植物化学、生物化学和医学领域广泛使用,在稀土化学、配位化学、化学动力学研究领域里也是不可缺少的重要手段。同时萃取技术和方法也在不断的发展。例如,发明了索氏提取器,使中草药中有效成分的提取效率得到很大提高;而与现代技术相结合的超声萃取、微波辐射诱导萃取、超临界流体萃取等新技术应用,标志着经典的萃取技术已经发展到一个新的水平,它们的应用不但使萃取效率大大提高,而且萃取的应用范围得以扩大。通过下面的萃取实验,学员可以了解萃取的基本原理,掌握萃取的基本操作,为以后使用这一有用的技术打下初步的基础。

目的要求

1. 了解萃取和洗涤的基本原理。
2. 明确分次萃取比一次萃取的效率高。
3. 掌握分液漏斗的使用方法。

实验原理

萃取和洗涤是提取、分离和纯化有机化合物的一种常用方法。它是利用物质在两种互不相溶的溶剂中的溶解度不同来进行分离的。萃取和洗涤的原理相同,但目的不一样,据此原理从混合物中提取所需要的物质叫做萃取,而洗掉不需要的物质就叫做洗涤。

萃取分为固-液萃取和液-液萃取,前者适用于固体混合物的分离,而后者适用溶液中混合物的分离。本实验着重介绍液-液萃取。

液-液萃取的理论基础是分配定律,即溶质在两种互不相溶的溶剂中的分配系数 K 等于该溶质在两种溶剂中的溶解度之比。

$$K = \frac{\text{溶质在溶剂A中的溶解度(g/100ml溶剂A)}}{\text{溶质在溶剂B中的溶解度(g/100ml溶剂B)}} = \frac{C_A \text{ (g/ml)}}{C_B \text{ (g/ml)}}$$

K 值越大,说明溶质在溶剂 A 中的溶解度大,在溶剂 B 中的溶解度小,那么用溶剂 A 进行从溶剂 B 的溶液中萃取溶质的效率越高。另外,一定量的溶剂作一次萃取不如作分次萃取的萃取效率高。例如,在一萃取过程中,假设 $K=4$,溶质的最初质量为 6.0 克,将其溶解在 100ml 水中,用 50ml 四氯化碳萃取,则:

$$K = \frac{W_{\text{四氯化碳}}/50}{(6.0 - W_{\text{四氯化碳}})/100} = 4$$

$$\text{萃取量 } W_{\text{四氯化碳}} = 4.0 \text{ g}$$

如果把 50ml 四氯化碳分两次萃取(每次 25ml),则第一次萃取为

$$K = \frac{W'_{\text{四氯化碳}} / 25}{(6.0 - W'_{\text{四氯化碳}}) / 100} = 4$$

$$\text{萃取量 } W'_{\text{四氯化碳}} = 3.0 \text{ g},$$

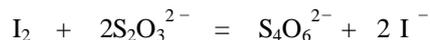
水中还剩余 $6.0 - 3.0 = 3.0 \text{ g}$ ，第二次再用 25 ml 四氯化碳萃取，则；

$$K = \frac{W''_{\text{四氯化碳}} / 25}{(3.0 - W''_{\text{四氯化碳}}) / 100} = 4$$

$$\text{萃取量 } W''_{\text{四氯化碳}} = 1.5 \text{ g}$$

两次萃取的总量为 $W'_{\text{四氯化碳}} + W''_{\text{四氯化碳}} = 3.0 + 1.5 = 4.5 \text{ g}$ 。50ml 四氯化碳一次萃取量为 4.0 g ，如果 50 ml 四氯化碳分两次萃取(每次 25 ml)，萃取量为 4.5 g 。萃取效率提高 12.5% ，如果 50 ml 四氯化碳分四次萃取，萃取效率将提高 20.25% 。

本实验是用四氯化碳萃取水中的 I_2 。用标准 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定每次萃取后水中剩余 I_2 的量，以此判断萃取效果，反应式为：



最后将萃取 I_2 的四氯化碳溶液收集在一起，用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 将其中的 I_2 还原成 I^- ，再将 I^- 反萃到水溶液中，使四氯化碳得到纯化，实现四氯化碳的回收再利用，以减少污染，保护环境。

仪器、药品

分液漏斗 铁架台 50ml 烧杯 碱式滴定管 10ml 移液管 量筒 漏斗 150ml 锥形瓶

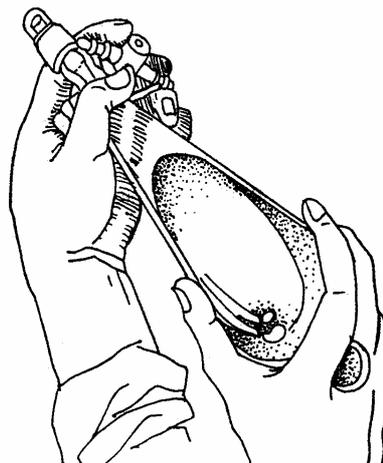
$0.4\% \text{ I}_2$ 溶液 CCl_4 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 淀粉指示剂

实验步骤

1. 分液漏斗的使用

(1) 选用容积是要分离液体体积二倍以上的分液漏斗。使用前要在活塞处涂上凡士林防止漏液，具体方法是，用小棒取一点凡士林涂在活塞的粗端，用手指把粗端涂匀，再在漏斗活塞孔的小端均匀地涂上凡士林(切忌涂的太多，以免堵塞小孔)，把活塞安上，旋转活塞使涂凡士林处均匀透明，然后套上橡皮筋，防止活塞松动脱落，最后用水检查活塞和上端的塞子处是否漏水。

(2) 向分液漏斗注入液体时，先将其架在铁圈内或漏斗架上，活塞关闭，将溶液和萃取剂经一普通漏斗从分液漏斗的上口注入，盖塞(这时不要将分液漏斗上口上的小孔与塞子上的小槽对准，以免漏斗内的液体流出)。按图 16-1 所示 双手握住分液漏斗振荡，充分混合，然后将漏斗的上端放低，使漏斗内的液体离开



活塞部分，慢慢打开活塞放气，关闭活塞。重复振摇—放气—关闭活塞的过程直到没有气体放出为止，此时混合已达平衡。将漏斗竖置于铁圈内或漏斗架上，将漏斗塞子上的槽对准漏斗上口上的小孔(若漏斗没有孔和槽，可将塞子拿掉)，静置，待完全分层后，打开活塞使下层液体流出。留在漏斗内的液体要从分液漏斗的上口倾出。

2. 萃取效果的比较

(1) 一次萃取

用移液管向分液漏斗内准确加入 0.4% I_2 溶液 15.00ml，再用量筒加入 15ml 四氯化碳，盖上塞子，重复振摇—放气—关闭活塞过程直至混合达到平衡，静置分层后，将下层四氯化碳放入一容器内，上层溶液从上口倒入 150ml 的锥形瓶中，用 $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液滴定至溶液呈黄色，加入 3~5 滴淀粉溶液作指示剂，溶液立即呈蓝色，继续用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液滴定至蓝色恰好褪去，即为滴定终点，记录所用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液的体积，计算出溶液中 I_2 的剩余量。

(2) 分次萃取

用移液管向分液漏斗内准确加入 0.4% I_2 溶液 15.00ml，将 15ml 四氯化碳分三次(每次 5ml) 萃取，萃取操作同(1)。三次萃取完成后，按上述方法用 $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液滴定上层水溶液中的 I_2 ，记录所用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的体积，计算出溶液中 I_2 的剩余量。比较一次萃取和分次萃取的效果。

3. 回收四氯化碳

将萃取后紫色的四氯化碳溶液倒入分液漏斗内，加入 30ml $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，萃取操作同(1)。如紫色不褪，再加入 2ml $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液进行萃取，如紫色仍不褪，再重复上一步骤，直到紫色褪去，静置分层，把下层四氯化碳放出，收集于指定的容器中。

思考题

1. 萃取和洗涤有何异同点？萃取和洗涤常用什么仪器？使用时应注意哪些事项？
2. 萃取达到平衡的标志是什么？
3. 若用有机溶剂萃取某水溶液，当不能确定哪一层是有机溶剂层时，怎样迅速作出判断？

(李兆楼 编)

实验十七 有机物的化学性质

一个化合物的性质决定于整个分子中原子的种类、数目以及它们之间连接的方式和顺序,也就是决定于整个分子的化学结构。如果知道了一个化合物的化学结构即可预见它的化学性质;要确定一个化合物的化学结构,也可以依靠化学性质即该化合物所能进行的化学反应。例如,根据与三氯化铁的颜色反应可推断有酚结构或烯醇结构存在;根据卤仿反应可推断具有活泼甲基的醇、醛或酮的存在。分子中各原子、原子团之间、原子和原子团之间也是相互影响的。例如,氯乙酸的电离度明显高于乙酸,又如羟基与不同基团相连时,表现出的性质各异:与脂肪烃相连的羟基显中性,如乙醇;与苯环相连的羟基显弱酸性,如苯酚;而与羰基相连的羟基显酸性,如羧酸。

醇、酚、醛和酮属于重要的基本有机化合物,有的在医药上可用作消毒剂、防腐剂、溶剂,有的是有机合成中的常用原料。醇和酚的分子中虽然都含有相同的官能团—羟基,但酚中的羟基直接连在芳香环上,所以这种结构上的特点使酚的性质与醇不完全相同。醛和酮分子中都含有活泼的羰基,由于结构上的共同特点,使这两类化合物具有许多相似的化学性质。但是醛基和酮基的结构并不完全相同,因此,醛和酮的化学性质也就表现出了差异。一般说来,醛比酮更活泼,往往可以发生某些反应,而酮则不能。本实验的完成,将有助于加深有机化合物的结构与性质之间的关系。

(一) 醇和酚的化学性质

目的要求

1. 观察醇和酚的一些重要反应,加深理解分子结构与化学性质的关系。
2. 掌握醇和酚的主要化学性质及鉴别方法。

实验原理

醇类和酚类均含有共同的官能团——羟基,但由于所连烃基的不同,因此它们的化学性质有相似之处,也有很大差异。

1. 醇类:一元醇是中性化合物,与碱的水溶液不起作用,但醇羟基上的氢易被金属钠取代,放出氢气生成醇钠。这个反应有时也可用作醇的鉴定,但必须指出这一反应必须在无水的条件下进行。生成的醇钠遇水分解成原来的醇和氢氧化钠。

在酸性高锰酸钾或重铬酸钾的作用下,伯醇很容易被氧化成醛并进一步被氧化成酸,仲醇可被氧化成酮,叔醇在相似的条件很难被氧化。

醇与氢卤酸作用时,醇中的羟基可被卤素取代生成卤代烃。不同类型的醇,其羟基被卤素取代的速度不同。

多元醇由于分子中羟基数目的增多,羟基中氢的电离度增大,因此,多元醇具有很弱的酸性。多元醇弱酸性很难用指示剂来检查,但可与重金属的氢氧化物发生反应。例如:甘油和氢氧化铜作用生成甘油铜。此反应可作为多元醇的定性检验。

2. 酚类:酚具有弱酸性,能与氢氧化钠作用生成酚钠,酚钠遇较强的酸则分解而生成酚。

由于酚羟基能使苯环活化,因而在其邻、对位上容易发生亲电取代反应。

酚类能与三氯化铁发生特殊的颜色反应,产生颜色的原因主要是生成了酚铁络离子,但具有烯醇结构的化合物也有这个反应。

酚类易被氧化,氧化产物由于条件的不同而不同,多元酚更易被氧化,因此是强还原剂。例如对苯二酚可被重铬酸钾的硫酸溶液氧化成对苯醌。

仪器、药品

小试管 酒精灯 玻璃蜡笔

无水乙醇 正丁醇 金属钠 1%酚酞 95%乙醇 异丙醇 叔丁醇 0.5%重铬酸钾
 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$ 浓盐酸 $2\%\text{CuSO}_4$ $5\%\text{NaOH}$ 甘油 苯酚 2%苯酚 饱和溴水 1%间
 苯二酚 0.2%邻苯二酚 0.5%1,2,3-苯三酚 $1\%\text{FeCl}_3$ 4%对苯二酚 5%重铬酸钾

实验步骤

1. 醇的化学性质

(1).醇钠的生成及水解

取两支干燥的小试管,分别加入 1 ml 无水乙醇和 1ml 正丁醇,再各加入一粒绿豆大小并用滤纸擦干的金属钠,用拇指按住试管口,观察反应速度有何差异。待试管内生成的气体聚集到一定量时,将试管口靠近灯焰,放开拇指,观察有何现象?

待金属钠与乙醇全部作用完后^[1],微热使多余的醇蒸发,即有固体析出,滴 2~3 滴水于固体上使其溶解,然后滴加 1%的酚酞 1 滴,观察现象。

(2).醇的氧化

取三支小试管,编号后各加入 0.5%重铬酸钾溶液 2 滴和 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$ 1 滴,然后分别加入 10 滴乙醇、异丙醇和叔丁醇,将各试管摇匀,3min 后观察有何现象。

(3)醇羟基被卤素的取代

取叔丁醇 10 滴于干燥试管中,加入浓盐酸 1ml,在室温振摇数分钟,静置并观察反应物是否变混浊,有无分层现象。

(4)多元醇与氢氧化铜的作用

取两支小试管,各加入 6 滴 2%的 CuSO_4 溶液,5 滴 5%NaOH 溶液,使 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 完全沉淀下来,然后在两支试管中分别加入 2 滴甘油和乙醇,摇匀后观察结果,并加以比较。

2. 酚的化学性质

(1).酚的酸性

取一支试管,加蒸馏水 1ml,再加入 3 滴液体苯酚^[2],充分振荡,有何现象?然后滴入 5%NaOH 溶液 1~2 滴,则溶液澄清(为什么?),在此澄清液再滴加 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$ 2~3 滴使其呈酸性,观察有何变化?

(2).酚的取代

取 2%苯酚溶液 5 滴于一小试管中,慢慢加饱和溴水 1~2 滴^[3],振荡后观察现象。

(3).酚与 FeCl_3 溶液的反应

取四支小试管编上号,分别加入 2%苯酚、1%间苯二酚、0.2%邻苯二酚、0.5%1,2,3-苯三酚各 10 滴,再在每支试管中各加入 1 滴 $1\%\text{FeCl}_3$ 溶液,摇匀后观察现象。

(4).酚的氧化

在一试管中加入 4%对苯二酚溶液 10 滴,再滴加 2 滴 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$,边振荡边慢慢滴加 $5\%\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 6~7 滴,观察黄色结晶的析出^[4]。

思考题

1. 做乙醇与钠的实验时,为什么要用无水乙醇,而做醇的氧化实验时则可用 95%的乙醇?

2. 如何用化学方法区别甘油和苯酚两种化合物?

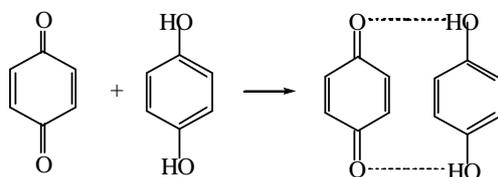
附注

1. 乙醇与钠作用时, 溶液逐渐变稠, 金属钠外面包上一层乙醇钠, 反应逐渐变慢, 这时稍微加热或摇动试管可使反应加快。如果反应停止后溶液中仍有残余的钠, 可用镊子将钠取出放在乙醇中销毁, 切不可丢入水中。

2. 将固体苯酚放入滴瓶中, 再把滴瓶放入 50~60 热水中加热即成液体苯酚。

3. 溴水是溴化剂, 也是氧化剂, 当苯酚的水溶液发生溴代作用时, 很快产生白色的 2,4,6-三溴苯酚, 如果继续与过量的溴水作用, 可变为淡黄色难溶于水的四溴化合物。

4. 对苯二酚可被重铬酸钾的硫酸溶液氧化成对苯醌。对苯二酚无色, 对苯醌是黄色晶体, 具有特殊的刺激性臭味, 难溶于水。但在反应过程中首先生成许多黑绿色的沉淀, 此系氧化产物对苯醌与反应液中尚未作用的对苯二酚借分子间氢键形成的络合物对苯醌合对苯二酚(醌氢醌)。



这个络合物可继续氧化为对苯醌, 继续滴加重铬酸盐溶液, 直到试管壁和液面上出现黄色晶体(对苯醌)为止。

(卢英华 编)

(二) 醛和酮的化学性质

目的要求

1. 掌握醛、酮的分子结构与其化学性质的关系。
2. 掌握醛、酮的化学反应及鉴别方法。

实验原理

醛、酮分子中都有羰基，它们的化学性质有许多相似之处。例如醛和甲基酮能与饱和亚硫酸氢钠发生加成反应，加成产物在低温时呈白色晶体析出。若与稀酸或稀碱共热时，又分解为原来的醛和酮。醛、酮均能与 2,4-二硝基苯肼缩合，生成黄色结晶 2,4-二硝基苯腙，故常用来鉴别醛和酮。乙醛和甲基酮均能在碱性溶液中与碘作用生成碘仿，碘仿为黄色固体，有特殊刺激性气味，易识别，称此反应为碘仿反应。具有“ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})-$ ”结构的醇也能发生碘仿反应。

由于醛分子中羰基上连有一个氢原子，而酮没有，故醛的化学性质比酮活泼，易被弱氧化剂氧化。如：醛能与托伦(Tollen)试剂作用发生银镜反应，与斐林(Fehling)试剂作用生成氧化亚铜，但芳香醛与斐林试剂不反应，可用此反应来区别脂肪醛和芳香醛；与品红亚硫酸试剂发生灵敏的显色反应，而酮则不发生这些反应，这些反应常用来鉴别醛、酮。

有些醛、酮还可表现出某些特殊的反应，例如，丙酮在碱性溶液中能与亚硝基铁氰化钠发生颜色反应，此反应用作检验丙酮的存在。

仪器、药品

大试管 小试管 250ml 烧杯 酒精灯 石棉网 玻璃棒 试管夹。

乙醛 丙酮 饱和亚硫酸氢钠 95%乙醇 10% Na_2CO_3 2,4-二硝基苯肼 异丙醇 碘溶液 10% NaOH 5% AgNO_3 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨水 斐林试剂 斐林试剂 苯甲醛 品红亚硫酸试剂 1:20 丙酮 1%亚硝基铁氰化钠。

实验步骤

1. 醛和酮相同的化学性质

(1) 与亚硫酸氢钠的加成

在两支干燥试管中，各加入 1ml 新配制的饱和亚硫酸氢钠溶液，再分别加入 10 滴乙醛、丙酮，用力振荡后，在冰浴中放置 5min^[1]，观察有无晶体析出。必要时加 1ml 乙醇再用力振荡，以促使晶体析出(因加成物不溶于乙醇)，静置 5min，观察现象。然后将两试管上清液倾去，各加入 10% Na_2CO_3 溶液 1ml，加热，观察现象。

(2) 与 2,4-二硝基苯肼的反应

取两支试管，各加入 1ml 2,4-二硝基苯肼溶液，再分别加入 3~4 滴乙醛和丙酮，振荡后，观察有无结晶析出。

(3) 碘仿反应

取三支试管，分别加入 2 滴乙醛、丙酮与异丙醇，然后各滴加碘试液 10 滴，摇匀后再各滴加 10% NaOH 至碘的颜色退去为止。观察有何现象？为什么？

2. 醛和酮不同的化学性质

(1) 与托伦试剂的反应

在一洁净的试管中加入 5% AgNO_3 溶液 1ml 和 10% NaOH 溶液 1 滴，此时试管中立即有棕黑色的沉淀出现，然后在振荡下逐滴加入 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨水至析出的氢氧化银沉淀恰好刚刚溶

解为止。将此制得的托伦试剂^[2]分置于两个洁净的试管中，分别加入 1 滴乙醛、丙酮，摇匀后放置 1 min，如无变化可在 50~60 的水浴中加热 2 min 再观察现象，并比较结果^[3]。

(2) 与斐林试剂反应

取三支试管，分别加入斐林试剂 和斐林试剂 各 10 滴，摇匀后，再分别加入 4 滴乙醛、苯甲醛与丙酮，摇匀后，在沸水浴中加热 3~5min^[4]，观察并比较实验现象。

(3) 与品红亚硫酸试剂反应

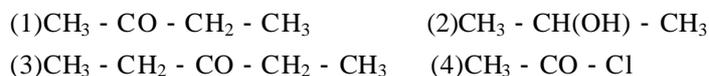
取两支试管，各加入 10 滴品红亚硫酸试剂，再分别加入 2 滴乙醛、丙酮。摇匀观察两试管有何现象。

(4) 丙酮的检查

取一支试管，加入 1:20 丙酮溶液 5 滴，然后加入亚硝基铁氰化钠和 10%NaOH 各 2 滴，观察呈何种颜色。

思考题

1. 鉴别醛、酮有哪些简便方法？
2. 下面的化合物中哪些可以产生碘仿反应？



附注

1. 振荡可使反应物均匀混合，加成作用发生后有热量放出，故需将稍微发热的混合液在冰水中冷却片刻。

2. 防止加入过量的氨水，否则将生成雷酸银，雷酸银受热容易引起爆炸，试剂本身还将失去灵敏性。托伦试剂久置后，将析出黑色的氮化银(Ag_3N)沉淀，它受震动时分解，发生猛烈的爆炸，有时潮湿的氮化银也能引起爆炸。因此，托伦试剂必须在临用时配制，不宜贮存备用。

3. 此实验试管一定洗刷干净，否则在试管壁上生不成银镜，只是产生银的黑色细粒沉淀。实验完毕，可用稀硝酸少许将试管中银镜洗去，以免反应液久置产生雷酸银。

4. 此实验加热时间不宜过长，加热时间过长，斐林试剂亦会生成少量氧化亚铜砖红色沉淀。

5. 试剂配制

(1) 饱和亚硫酸氢钠：将 208g 亚硫酸氢钠溶于 500ml 水中，再加入 125ml 乙醇，放置沉淀完全，过滤备用。此试剂需新鲜配制，并塞紧瓶塞。

(2) 2,4-二硝基苯肼试剂：取 2,4-二硝基苯肼 1g 溶于 7.5ml 浓硫酸中，将此酸性溶液加到 75ml 95% 乙醇中，随加随搅拌，最后用蒸馏水稀释至 250ml，必要时过滤备用。此试剂对水溶性和非水溶性的样品皆适用，因其中含有乙醇。

(3) 碘溶液：将 2g 碘和 5g 碘化钾溶于 100g 水中。

(4) 斐林试剂：斐林试剂 ，将 175g 硫酸铜晶体($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)溶于 500ml 蒸馏水中，加浓硫酸 0.5ml 混合均匀。斐林试剂 ，将 173g 酒石酸钾钠晶体($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)和 70g 氢氧化钠溶于 500ml 蒸馏水中。两种溶液分别保存，使用时取等体积混合。

(5) 品红亚硫酸试剂：将 0.2g 品红盐酸盐(也叫碱性品红或盐基品红)研细，溶于含 2ml 浓盐酸的 200ml 蒸馏水中，再加 2g 亚硫酸氢钠，搅拌后静置过滤，至红色褪去。如果溶液最后仍呈黄色，则加入 0.5g 活性炭搅拌过滤，贮存于严密的棕色瓶中。

(卢英华 编)

实验十八 有机化合物的光学性质

当物质中的原子、分子或离子与辐射能相互作用时，根据原子、分子或离子的大小、密度和辐射能的波长等情况不同，可以产生辐射的吸收、发射、散射、折射、反射、干涉和衍射等情况。通过不断的研究和探索，利用这些不同的情况，人们建立了很多分析测定物质的方法，以期打开物质的结构、组成、性质、含量的奥秘。这些方法分为两类：光谱法。如原子吸收光谱法、原子发射光谱法、紫外分光光度法、可见分光光度法、红外分光光度法、核磁共振波谱法、X-射线光谱法等，非光谱法。如折射法、旋光法、光散射法、干涉法、衍射法等。

利用某种或某一些方法可以得到有关物质结构、性质、浓度等方面的信息。例如，利用X-衍射法可以得到晶体物质中晶核间的距离，晶胞的大小等数据，以确定晶体结构；利用某种物质对某一单色紫外光的吸收强度可以测定其含量的大小；有机地综合利用“有机四谱”：紫外分光光度法、红外分光光度法和核磁共振光谱法和质谱法，可以测定有机化合物的结构。

在有机化学中常常利用折光法和旋光法来进行手性分子的旋光度的测定和物质折光率的测定。只在一个平面内振动的光叫做偏振光，当偏振光与手性分子(不对称分子)相互作用时，由于手性分子的基团产生的电磁场不对称，使偏振光的振动平面发生旋转，转动角度即旋光度的大小与物质本质和测定条件有关，当测定条件固定以后，旋光度的大小只与物质本身有关，这时的旋光度称为比旋光度，比旋光度是物质的物理常数。因此，测定比旋光度可以鉴定物质。对于已知比旋光度的物质，通过测定旋光度可以计算手性化合物的浓度。光线由一种介质进入另一种介质时要发生折射，当测定条件和一种介质固定以后，折射角的大小就决定于一种介质的性质，根据折射角的大小就可以鉴定物质。把折射角换算成折光率，折光率也是物质的物理常数。

(一) 比旋光度的测定

目的要求

1. 掌握旋光度的测定原理。
2. 熟悉旋光仪的结构和旋光度的测定方法。

实验原理

当偏振光通过具有旋光性的物质时，光的偏振面便会发生旋转，谓之旋光。偏振面旋转的角度即为旋光度。每一种手性物质在一定条件下都具有一定的旋光度，旋光度就象各种物质的熔点、沸点、密度等一样，是物质本身所固有的一个物理常数。因此，通过测定旋光度不仅可以鉴定旋光性物质，而且可以检测其纯度及含量。

旋光性物质的旋光度有正负之分，并且其大小，与溶剂的性质、溶液的浓度、旋光管的长度、测定时的温度及光波的波长等诸因素有关。因此为了能比较物质的旋光性能，通常用比旋光度来表示物质的旋光性，即在一定温度下，含 $1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 旋光性物质的溶液在 1 dm 长的旋光管中测得的旋光度。其公式为：
$$[\alpha]_D^t = \frac{\alpha}{c \times l}$$
 式中， α 为旋光仪测得旋光度； l 为旋光管的长度，单位为 dm ； D 为所用光源波长，通常用的是钠光源 ($D = 589.3 \text{ nm}$)，以 D 表示； t

为测定时的温度；c 为溶液浓度，单位为 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

如果被测物质本身是液体，可直接放入旋光管中测定。纯液体的比旋光度用下式表示：

$$[\alpha]_t^l = \frac{\alpha}{l \times d}$$

式中 d 为纯液体的密度，单位是 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 。

以上两公式不仅可以计算物质的比旋光度，也可以在已知比旋光度的情况下，测定物质的浓度或纯度。测定物质旋光度的仪器就是旋光仪，又称量糖计，实验室常用 WXG-4 小型旋光仪，其外形及光学系统如图 18-1 和 18-2 所示：

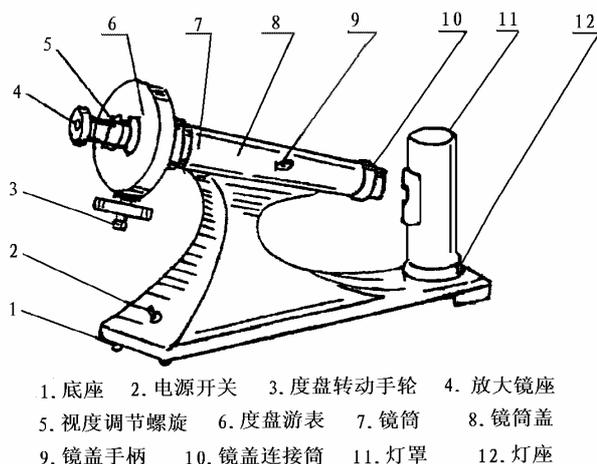


图 18 - 1 WXG - 4 型旋光仪的外形图

本仪器主要部件是两块尼科尔棱镜，位于测量管的两端，第一块是固定的尼科尔棱镜即起偏镜(5)，它的功用是把通过聚光镜(3)及滤光片(4)的光变成平面偏振光；然后在半波片(6)处产生三分视场，检偏镜(8)用于检测偏振光的旋转角度。如图 18-2 所示；当整个视场的三部分有同等最大限度的偏振光通过时，整个视场亮度是一致的，即为零点视场，如图 18-3 中(b)所示；否则整个视场显出明亮不同的三部分，如图 18-3 中(a)和(c)所示。

仪器、药品

旋光仪 50ml 烧杯 擦镜纸 10.0% 葡萄糖 10.0% 的果糖。

实验步骤

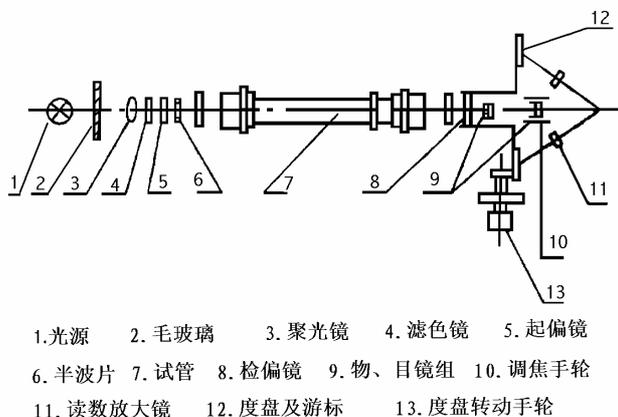


图 18 - 2 WXG - 4 型旋光仪的光学系统图

1. 接通电源，预热 3~5 分钟使灯光稳定(附注 1)。

2. 零点的校正：用蒸馏水洗涤旋光管数次，然后装满蒸馏水，使液面刚刚突出管口，取玻璃盖轻轻平推盖好，保证管中无气泡，然后旋上螺丝帽盖不使其漏液(但也不能过紧，否则因盖子产生扭力使管内有空隙，影响旋光度)。擦干样品管外的液体将其放入旋光仪。转动检偏镜在视场中找出两种不同影式(图 18-3 中(a)和(c)所示)，在(a)和(c)之间转动旋钮，使视场达到亮度一致(附注 2)，即零点视场(图 18-3 中(b)所示)，观察读数盘是否在零点，如果不在零点，应记下读数(附注 3)，此即为零点校正值，测样品时加上或减去该数值。

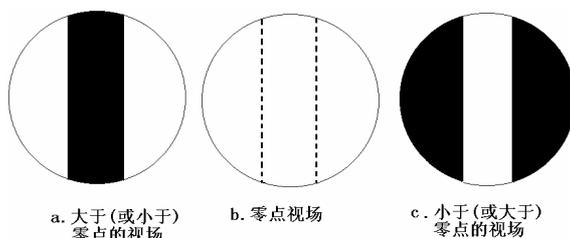


图 18 - 3 三分视场变示意图

3. 样品的测定：用待测液冲洗旋光管 2~3 次，然后加满待测液；找出零点视场，记下读数，然后另取一只小旋光管(或降低待测液浓度)，用相同的方法测得读数，比较两个数的大小，如果第二次读数降低，则说明这个化合物是右旋，且该数值即为其旋光度。反之，若第二次读数增大，则该化合物为左旋，用读数减去 180° 即为其旋光度(附注 4)。

用上述方法分别测定 10.0% 葡萄糖、10.0% 的果糖的旋光度，然后计算它们的比旋光度。

4. 实验结束以后切断电源；用蒸馏水冲洗旋光管，用软布揩干(附注 5)。

思考题

1. 简述旋光仪的构造及其功能。

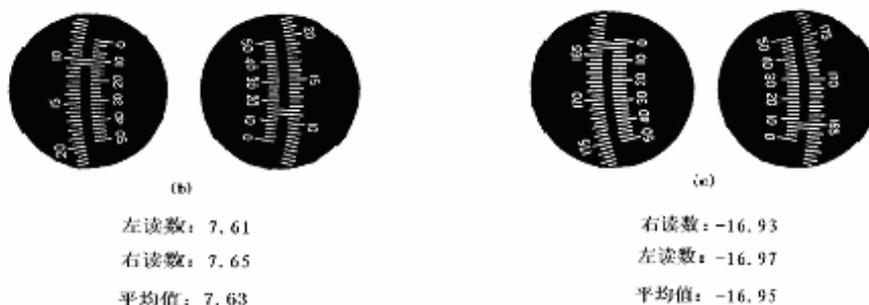
1. 测定物质的旋光度有何意义和作用？

附注

1. 钠光灯连续使用时间不宜过久(不超过 4h)，在连续使用时，中间最好关灯 15~20min，待钠光灯冷却后再用，以免影响其寿命。

2. 在旋光仪视场中，有一明亮且亮度一致的视场(它的特点是不灵敏)，这不是零点视场，不要与零点视场混淆。

3. 读数方法：刻度盘分为 360 等份，并有固定的游标分为 20 等份。读数时先看游标的 0 落在刻度盘上的位置，记下整数值，再看它的刻度线与刻度盘上等刻度线相平行的点，记下游标上的读数作为小数点以后的数值。(如图 18-4(a)所示。)如果两个游标窗读数不同，则取其平均值。(图 18-4(b)、(c)是 WZX-1 型旋光仪的读数示意图)。



4. 对未知旋光度的化合物必须测定其旋光方向，这种方法称为两次测定法。对已知化合物则不必两次测定，只测一次即可。

5. 旋光管使用后及时将溶液倒出，清洗干净并擦干后放入样品盒中。旋光管洗涤后不可置于烘箱内干燥，因玻璃与金属的膨胀系数不同，将造成破裂，用后可晾干或用乙醚冲洗数次便干。此外，旋光管两端的圆玻片，为光学玻璃，必须小心用软纸擦，以免磨损。

图 18 - 4 读数示意图 (李兆楼 编)

(二) 折光率的测定

目的要求

1. 掌握物质折光率的测定方法。
2. 熟悉阿贝折光仪的原理、结构。

实验原理

折光率与熔点、沸点一样是物质的物理常数，固体、液体和气体物质都有折光率，液体的折光率记载较多。折光率可以作为检验物质纯度的方法，也可以用来鉴定未知物，在很多情况下，鉴定液体有机化合物或测其纯度，用测折光率的方法比测其沸点更可靠。折光率的大小不仅与被测物质的结构和入射光的波长有关，而且与温度、压力也有关，不过通常的大气压变化影响不大。所以，表示物质的折光率时，应注明入射光的波长和测定温度。例如，乙酰乙酸乙酯的折光率 $n_D^{20.5} = 1.4180$ 式中 n 表示折光率，20.5 表示测定时的温度(摄氏度)， D 表示波长为钠光(589.3nm)。通常的折光仪用的都是白光，经棱镜系统加以补偿，所用的依然是钠光。

当光线以非垂直于界面的角度由一种透明介质射向另一种透明介质时，在界面上一部分光发生反射现象，另一部分光发生折射现象(如图 18-5 所示)。根据折射定律，入射角(α)与折射角(β)的正弦之比和这两个介质的折光率 N (介质 A 的)、 n (介质 B 的)成反比，即： $\sin \alpha / \sin \beta = n / N$ ，若介质 A 是真空，则定其 $N=1$ ，于是 $n = \sin \alpha / \sin \beta$ ，所以一个介质的折光率，就是光线从真空进入这个介质时的入射角和折射角的正弦之比。这种折光率称为该介质的绝对折光率。通常测定的折光率，都是以空气作为比较的标准。

由于被测液体的折光率比棱镜的折光率小，故光线由被测液体射入棱镜时，要发生折射，其入射角 α 必定大于折射角 β 。入射角增大时，折射角也必然相应增大。当入射角 $\alpha = 90^\circ$ 时， $\sin \alpha = 1$ ，这时折射角达到最大值，称为临界角，用 α_0 表示。根据折射定律可得： $n_A \sin \alpha = n_B \sin \beta$ 当 $\alpha = \alpha_0 = 90^\circ$ 时， $\beta = \beta_0$ 则 $n_A = n_B \sin \beta_0$ 介质不同，临界角也不同，介质的折光率也就不同。测定了临界角可由公式计算出折光率。

为了测定临界角，阿贝折光仪采用了“半明半暗”的方法，就是让单色光由 $0 \sim 90^\circ$ 的所有角度从介质 A 射入介质 B，这时介质 B 中临界角以内的整个区域均有光线通过，因而是明亮的；而临界角以外的全部区域没有光线通过，因而是暗的，明暗两区域的界线十分清楚。如果在介质 B 的上方用一目镜观测，就可以看见一个界线十分清晰的半明半暗的图像。若使明暗两区的界线与“十”字交叉线的交点重合，此时，在另一个目镜中就可以直接读出该物质的折光率(仪器本身已将临界角换算成了折光率)。图 18-6 为实验室常用得 WZS-1 型阿贝折光仪的外形图。

仪器、药品

WZS-1 型阿贝折光仪

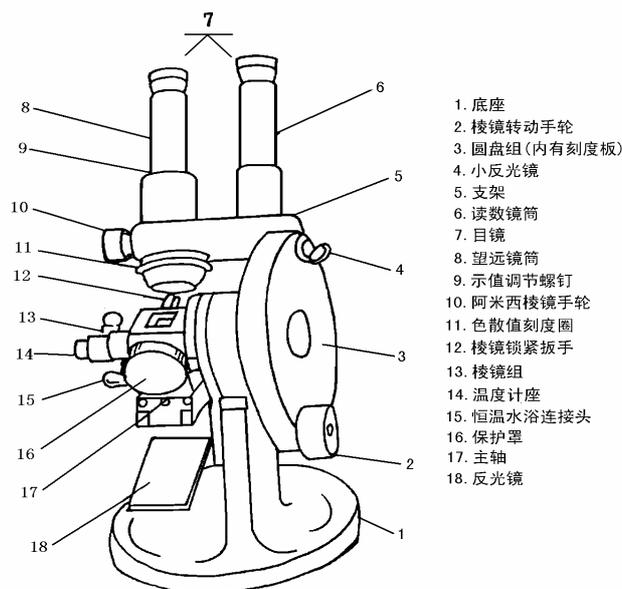


图 18 - 6 WZS - 1 型阿贝折光仪的外形图

95% 乙醇 丁香油 乙酸乙酯 蒸馏水。

实验步骤

1. 将折光仪和恒温水浴相连^[1], 选择量程合适的温度计并将其安装在温度计座(14)上, 调节至所需温度(通常为 20⁰C 或 25⁰C), 恒温^[2]。

2. 恒温后, 旋松棱镜锁紧扳手(12), 打开直角棱镜组(13)(两块直角棱镜, 上面一块是光滑的, 下面一块是磨砂的, 待测液体夹在两棱镜之间形成一层均匀的液膜), 用擦镜纸沾少量 95%乙醇擦洗上下棱镜表面^[3], 风干后将 2-3 滴丁香油^[4]均匀地滴于下面的磨砂棱镜面上, 旋紧棱镜锁紧扳手, 转动反光镜(18)使光线射入^[5]。

3. 调节棱镜转动手轮(2), 在右镜筒内找到明暗分界线或彩色光带, 再转动右侧阿米西棱镜手轮(10), 消除色散便能看到清晰的明暗分界线。

4. 再次调节棱镜转动手轮(2), 使右镜筒内的明暗分界线与“十”字线交点重合, 打开读数用的小反光镜(4), 在左镜筒内读出折光率^[6]。重复操作两次, 取平均值。

5. 按(二)擦洗上下棱镜, 用同样的方法测定蒸馏水及乙酸乙酯的折光率。

6. 实验完毕, 用乙醇将上下棱镜清洗干净, 卸下温度计, 脱离水浴, 将仪器表面擦净, 晾干后装箱。

思考题

1. 折光率的测定原理是什么? 折光率的测定有何意义?
2. 使用折光仪应注意哪些事项?
3. 测定折光率时有哪些因素会影响结果?

附注

1. 新仪器和长时间放置不用的仪器, 使用前要进行校正。校正方法是: 恒温后把仪器的棱镜用丙酮洗净, 用蒸馏水或已知折光率的标准折光玻璃块进行校正。

2. 如折光仪不与恒温水浴进行恒温, 要进行温度校正: 温度增加 1°C , 液体有机化合物的折光率减少约 4×10^{-4} 。

3. 擦洗棱镜时, 要单向擦, 不要来回擦, 以免在镜面上造成痕迹。

4. 滴加液体时, 滴管的末端切不可触及棱镜。若样品易挥发, 则可在两棱镜接近闭合时从加液小槽中加入, 然后闭合两棱镜。

5. 被测液体放得少或成膜分布不均, 明暗分界线看不清楚。对于易挥发的液体, 测定速度要快。

6. 阿贝折光仪有消色散的装置, 故可直接使用日光, 测定结果与使用钠光灯结果一样。

(张新颖 编)

实验十九 乙酰水杨酸的制备

对于公众来说,乙酰水杨酸(Acetylsalicylic Acid)为何物,知道的人大概不多,可是其俗称阿司匹林(Aspirin)却是家喻户晓。早在 1763 年,人们从柳树皮中分离出的一种活性成分,具有止痛、退热和抗炎的作用,这种成分称为水杨酸。但作为一种药物,它的副作用比较大,严重刺激口腔、食道和胃粘膜,以致大多数病人不愿服用它。直到 1893 年,拜耳(Bayer)公司的化学家 Felix Hoffmann 对水杨酸进行了结构修饰,合成了乙酰水杨酸,并把其称之为阿司匹林,这是世界上首次人工合成出来的具有药用价值的有机化合物。阿司匹林的作用方式在最近几年逐渐得到阐明,一组叫做前列腺素的化合物已被证明与身体的免疫反应有关。当机体功能的正常运行受到外来物质或受到不习惯的刺激时,会激发前列腺素的合成,这类物质与广泛的生理过程有关,并被认为能引起疼痛、发烧和局部发炎。阿司匹林能阻碍体内合成前列腺素,因而能减弱身体的免疫反应的症状,如发烧、疼痛和发炎。随着医学研究的不断深入,人们对于阿司匹林又有了新的认识。

1971 年,伦敦皇家外科医学会的约翰·文(John R.Vane)在研究中发现,阿司匹林能抑制诱发心脏病和中风的血液凝块的形成。约翰·文因此而获得诺贝尔奖。

1989 年,哈佛大学的一项研究证明,每天服用一片阿司匹林能使心脏病患者的发作率大大下降。同时,阿司匹林也有助于防止血栓症和中风。随后,哈佛大学对 14 万病人的阿司匹林临床实验结果进行了宏观分析并得出结论:如果 70 岁以下有患心脏病危险的人若能经常服用阿司匹林,全球死于心脏病的人数每年将减少 10 万。

1992 年,波士顿大学的研究则表明:服用阿司匹林会使肠癌的发生率减少 30%~50%。

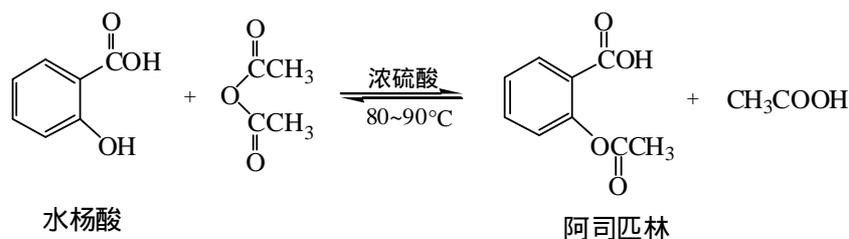
上述情况表明,虽然阿司匹林问世已有百年历史,但其药用价值似乎还未穷尽。现在我们所用的复方乙酰水杨酸(APC)含阿司匹林、非那西丁和咖啡因三种成分,APC 是取 Aspirin、Phenacetin 和 Caffein 三者之字首合并而成。

目的要求

1. 了解固体有机化合物制备、提纯的一般方法。
2. 掌握减压过滤及混合溶剂重结晶的操作。
3. 理解酰化反应原理。

实验原理

制备乙酰水杨酸最常用的方法是水杨酸与酰化试剂乙酸酐作用。水杨酸是一个具有双官能团的化合物,一个是酚羟基,一个是羧基。羟基和羧基都可发生酯化反应,在乙酸酐存在下发生的是乙酰化反应,生成乙酰水杨酸。反应式如下:



水杨酸的分子内氢键使羟基的活性降低,故在酰化时加入浓硫酸破坏氢键,从而促进乙酰化的进行。

由于水杨酸既有羟基又有羧基,使反应复杂化,在乙酰化的同时发生一些副反应,生成少量聚合物,成为杂质。产物中的其它杂质还有未作用完全的水杨酸、乙酸酐及生成的乙酸。乙酸酐在水中分解成乙酸。乙酸溶于水,水杨酸和乙酰水杨酸不溶于水,据此可除去产物中的大部分乙酸酐及乙酸。在反应时乙酸酐是过量的,故酰化进行的比较完全,未作用完的水杨酸很少,可用乙醇-水的混合溶剂用重结晶的方法将其除去,重结晶时,残留的乙酸也同时除去。

水杨酸有一个酚羟基,可与三氯化铁形成深色配合物,乙酰水杨酸中的酚羟基已被酰化,不再发生颜色反应,故可用三氯化铁检验提纯效果。

仪器、药品

50ml 锥形瓶 1 只 100 温度计 1 只 25ml 量筒 1 只 10ml 量筒 1 只 500ml 烧杯 1 只 50ml 烧杯 1 只 抽滤瓶 布氏漏斗 滤纸 玻璃棒 台秤 真空泵
水杨酸 乙酸酐 浓硫酸 95% 乙醇 蒸馏水 10% 碳酸氢钠水溶液 20% 盐酸
0.1% 三氯化铁溶液

实验步骤

1. 在干燥的 50ml 锥形瓶中依次加入 1g 水杨酸、50 滴乙酸酐和 3 滴浓硫酸,摇匀,使水杨酸溶解。

将锥形瓶置于 80~90 的水浴中,加热 10 分钟,并不时地振摇。然后,停止加热,待反应混合物冷却至室温后,加入 1ml 水以分解过剩的乙酸酐,分解完后(不再有气泡),分 4 次加入 10ml 水(边加边振摇),摇匀后置冷水浴中冷却至大量晶体析出,转移至布氏漏斗中抽滤,用滤液冲洗锥形瓶,将瓶中沉淀全部转移至布氏漏斗中,用 10ml 冷蒸馏水分两次洗涤晶体,抽干,得乙酰水杨酸粗产品。

2. 将粗产品转入 100ml 烧杯中,加入 10% 碳酸氢钠水溶液,边加边搅拌,直到不再有二氧化碳产生为止。抽滤,除去不溶性聚合物。再将滤液倒入 100ml 烧杯中,缓缓加入 5ml 20% 盐酸,边加边搅拌,这时会有晶体逐渐析出。将反应混合物置于冰水浴中,使晶体尽量析出。抽滤,用少量冷水洗涤 2~3 次,然后抽滤至干。

3. 取少量乙酰水杨酸放入试管中,加几滴乙醇使之溶解,加入 1 滴 0.1% 三氯化铁水溶液,检查水杨酸的存在。

4. 在 50ml 烧杯中将粗产品溶于 3ml 95% 的乙醇中,在 60 水浴上加热溶解,加入 10ml 水,静置冷却至大量晶体析出(约 30 分钟),抽滤,用滤液将烧杯中晶体全部转移至布氏漏斗中,抽干。用 5ml 水~乙醇混合液(水:乙醇=4:1)分两次润洗晶体,抽干。

用 0.1% 三氯化铁溶液检查纯品中是否含有水杨酸。

思考题

1. 酰化反应中使用浓硫酸的目的何在?
2. 乙酰水杨酸在沸水中受热时,分解而得到一种溶液,后者在三氯化铁实验中呈阳性实验,这是为什么?发生了什么反应?写出这个反应的方程式。
3. 如反应温度过高,反应中可能有哪些聚合副产物?

附注

1. 乙酸酐和浓硫酸均具有强腐蚀性,量取时要当心。若不慎溅及皮肤,立

即用大量水冲洗。

2. 由于剩余的乙酸酐发生水解，反应瓶会变热，有时反应混合物甚至会沸腾，操作应当心。

3. 乙酰水杨酸在水中能缓慢分解，应尽量减少与水的接触时间，若对产品纯度要求较高，可用乙醚~石油醚或苯作为溶剂重结晶。

4. 若无结晶析出，可用玻璃棒磨擦瓶内底部然后再静止一会儿。若气温较高则须用冰水浴冷却。

5. 减压过滤

(1) 滤纸放入漏斗内，用少量水湿润滤纸，按图所示，安装抽滤装置(注意布氏漏斗斜口应对着吸滤瓶的吸气嘴)，开启真空泵(调节抽气速度不至太快)，使滤纸紧贴在布氏漏斗上。

(2) 混合物沿玻璃棒缓缓倾入漏斗(溶液不要超过漏斗总量的 $\frac{2}{3}$)，然后加快抽气速度，将沉淀全部转移并平铺在漏斗中，抽滤至无滤液滴出。吸滤瓶中滤液高度不得超过吸气嘴。

(3) 过滤完毕后，先打开安全瓶通大气活塞，然后关泵，在布氏漏斗中加入少量洗涤液润湿沉淀，再开泵，关上活塞，让洗涤液慢慢透过沉淀，抽干。

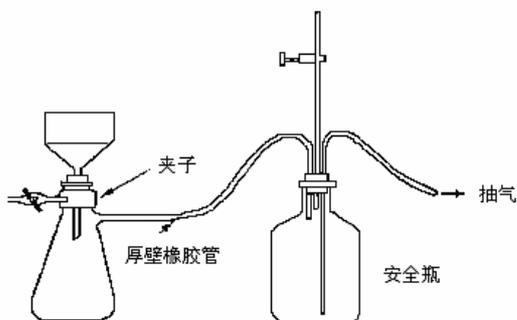


图 19 - 1 减压过滤装置

(温新民 编)

实验二十 乙酸乙酯的制备

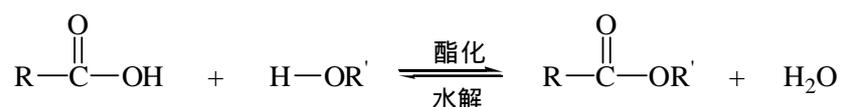
酯是一类广泛分布于自然界的化合物，较简单的酯大多具有令人愉快的气味，花和水果的特殊香味多数是由带有酯官能团的化合物造成的。如：乙酸异戊酯有香蕉香味、丁酸乙酯有菠萝香味、乙酸辛酯有橙柑香味、邻氨基苯甲酸甲酯有葡萄香味、乙酸正丙酯有梨子香味、丁酸甲酯有苹果香味等。食品和饮料制造商对这些酯类非常熟悉并往往把它们用作添加剂以点缀甜点或饮料的香味。虽然酯的“果香”气味令人愉快，它们却很少用于制造香料或香水，其原因是酯基对于人体的汗液来说不像较贵的香油成分那样稳定，香油通常都是从天然资源萃取出来的萜类、酮类和醚类，可以制备香料和香水，酯只能用于制备最便宜的花露水，因为酯与人体汗液接触后会发生水解反应，生成有机酸，这些酸不像它们的前体酯，一般不具令人愉快的气味。酯的香甜的水果气味也有不利之处，那就是它会把觅食的果蝇和其它昆虫吸引过来。这方面，乙酸异戊酯，即人们熟知的被称为香蕉油的物质，特别有趣，它与蜜蜂的警戒信息素居然完全相同，当一只工蜂蛰刺一个入侵者时，就随着蛰刺毒汁一起分泌出一种警戒信息素，后者部分是由乙酸异戊酯组成。这个化合物招引其它蜜蜂成群涌向入侵者，向入侵者发动进攻，因此，如果穿着具有乙酸异戊酯香味的衣服去接近蜂箱，显然是不聪明之举。

目的要求

1. 了解从有机酸合成酯的一般原理及方法。
2. 掌握蒸馏的操作技术及分液漏斗的使用方法。

实验原理

酸和醇反应生成酯，此反应称为酯化反应，其逆反应为酯的水解反应，它们形成下列动态平衡：



在无催化剂的情况下，酯化反应进行的非常缓慢，需要很长时间才能达到平衡，用催化剂和加热的方法可以使反应迅速达到平衡，但是不能改变平衡混合物的比例关系。为提高酯的产率，根据平衡移动原理应采用以下措施：一是增加反应物的浓度，二是减少生成物的浓度。本实验用冰醋酸和乙醇为原料，以浓硫酸为催化剂，加热制取乙酸乙酯；采用乙醇过量和同时不断蒸出乙酸乙酯及利用浓硫酸的吸水作用使酯化反应顺利进行。乙酸乙酯和水形成共沸混合物(bp: 70.4)比乙醇(bp: 78)和乙酸(bp: 118)的沸点都低，很容易蒸出。

首次蒸出的粗制品常有少量杂质，如未作用的醋酸、乙醇以及乙醚、亚硫酸等，通过精制可除去这些杂质。

仪器、药品

圆底烧瓶(100ml) 温度计(150) 直形冷凝管 分液漏斗 锥形瓶 尾接管 量筒
烧杯 漏斗 玻璃棒 沸石

95%乙醇 冰醋酸 浓硫酸 饱和碳酸钠溶液 饱和氯化钙溶液 饱和食盐水 pH 试纸 无水硫酸镁。

实验步骤

1. 在干燥的 100ml 圆底烧瓶中加入 10ml 冰醋酸及 15ml95%乙醇，边振摇边慢慢加入 2ml 浓硫酸(注意：浓硫酸的加入速度要缓慢，不然混合液的温度迅速上升，小心烫伤)，摇匀后加几粒沸石，蒸馏，100ml 锥形瓶为接受器。

温度升至 90 时，检查反应生成的酯是否完全蒸出(用试管接收几滴馏出液，加入几滴水，观察是否分层)，如不分层，证明酯已完全蒸出，停止蒸馏；若分层，继续蒸馏，可蒸馏到 110 左右。

2. 将馏出液(包括乙酸乙酯、水、乙醇、醋酸及少量亚硫酸)倒入分液漏斗中，加入 5ml 饱和碳酸钠溶液洗涤，放出水层(用 pH 试纸检验，酯层应呈中性)，再依次用 5ml 饱和食盐水和 5ml 饱和氯化钙溶液洗涤。将粗制乙酸乙酯转移到一个干燥的锥形瓶内，加 2g 无水硫酸镁干燥。将干燥后的乙酸乙酯粗品滤入 60ml 蒸馏瓶中，加入沸石后在水浴上进行蒸馏，收集 73~78 的馏分，产率在 60%左右。

纯乙酸乙酯为无色而有香味的液体，沸点为 77.06 ，折光率为 1.3723。

附注

1. 温度不宜过高，否则会增加副产物乙醚的量。
2. 碳酸钠必须洗去，否则下一步用饱和氯化钙溶液洗去醇时，会产生絮状的碳酸钙沉淀，造成分离的困难。为减少乙酸乙酯在水中的损失，这里选用饱和食盐水洗涤。

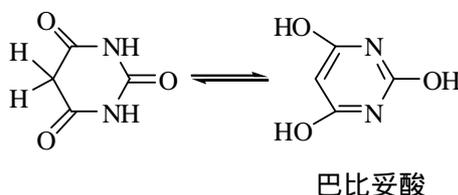
思考题

1. 本实验中浓硫酸起什么作用？
2. 为什么要用过量的乙醇？
3. 蒸出的粗乙酸乙酯中有哪些杂质？
4. 能否用浓氢氧化钠溶液代替饱和碳酸钠溶液洗涤蒸出液？
5. 用饱和氯化钙溶液洗涤，能除去什么？是否可用水代替？

(温新民 编)

实验二十一 巴比妥酸的制备

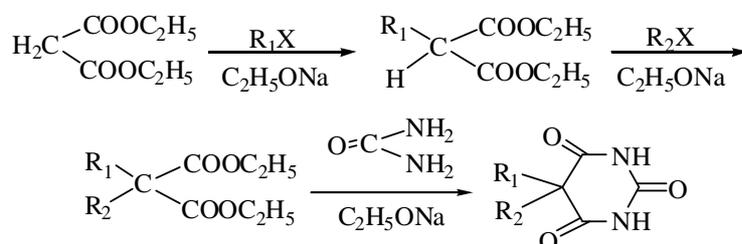
丙二酸二乙酯在乙醇钠的催化下能与尿素发生缩合反应，反应的产物为丙二酰脲。其烯醇式结构显示比醋酸($pK_a = 4.76$)还强的酸性($pK_a = 3.98$)，故又称巴比妥酸。



巴比妥酸本身并无生理作用，其 5 号碳上的氢原子被烃基取代后，才显示生理活性。所以说巴比妥酸是巴比妥类镇静催眠药物的最重要的基础化合物，是医药工业重要的中间体。C₅ 上的取代基不同，药物的起效快慢和作用时间不同。临床上应用较多的有苯巴比妥，异戊巴比妥、司可巴比妥、硫喷钠等。

研究表明巴比妥类镇静催眠药物主要作用于中枢神经系统，作用于网状兴奋系统的突触传递过程。它能促进中枢抑制性递质——氨基丁酸(GABA)能神经的功能，选择性地抑制脑干网状结构上行激活系统的功能，抑制弥散性扩散，使大脑皮层细胞兴奋性降低，产生镇静催眠和麻醉作用。生物化学研究发现多数巴比妥类药物有解偶联氧化磷酸化作用和抑制电子传递作用，从而降低了脑中的氧化代谢过程及脑的功能活动性。临床上除用于镇静和催眠外，还用于抗惊厥、抗癫痫及手术麻醉等，是一类重要的镇静催眠药物。但该类长期服用易产生依赖性和耐受性，大剂量使用时可对中枢神经系统产生严重抑制。

巴比妥类药物的合成一般用丙二酸二乙酯为原料，在醇钠作用下与相应的卤代烃发生酯的——氢取代反应，再与脲在醇钠催化下缩合制备。



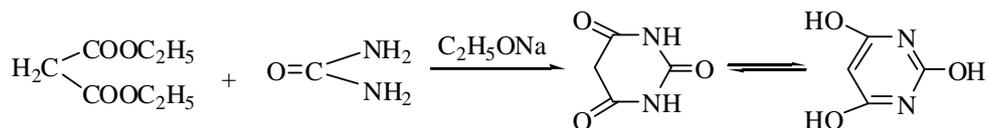
巴比妥类药物在空气中性质稳定，由于可互变为烯醇型，故显现较强的酸性，可与碱形成可溶性盐类，其注射用药一般制成钠盐，但其水溶液不稳定，放置过久易发生水解，故一般制成钠盐的粉末制剂供药用。

实验目的：

1. 了解杂环化合物的合成
2. 练习无水实验操作

实验原理：

巴比妥酸是一类重要的镇静药物的中间体。用丙二酸二乙酯在乙醇钠存在下与尿素作用形成双酰胺环互变为嘧啶环可制得巴比妥酸。



仪器、药品

三口烧瓶 冷凝管 直角干燥管 吸滤瓶 电磁加热搅拌器 熔点仪
丙二酸二乙酯 金属钠 尿素(干燥) 无水乙醇 浓盐酸 无水氯化钙

实验步骤

在三口烧瓶中加入 5ml 无水乙醇，装好冷凝管，上端装无水 CaCl_2 干燥管，从另一瓶口处加入切成小块的 0.25g 金属钠，同时开动电磁搅拌。待反应完成后，准确量取 1.6ml(0.01mol) 丙二酸二乙酯，加入烧瓶中搅拌均匀，再加 0.6g 尿素，用 3.5ml 无水乙醇冲洗瓶口后盖上瓶塞。在电磁搅拌下水浴回流约 1.5 小时使反应完全。

往反应瓶中加入 7ml 热水，滴加浓盐酸酸化以得到澄清溶液，趁热抽滤。冷却滤液使结晶析出，再抽滤，用少量冰水洗涤结晶，得白色棱柱形结晶。干燥后称重，计算产率。

取少量干燥后的固体产物，测其熔点，熔点应为 245 。

思考题：

1. 从巴比妥酸的结构性质说明将其称为酸的原因？
2. 为什么实验中仪器和药品均应保证无水？

附注：本实验为半微量合成实验，若改为常量合成实验，需将试剂用量适当增大即可。

(朱军 编)