

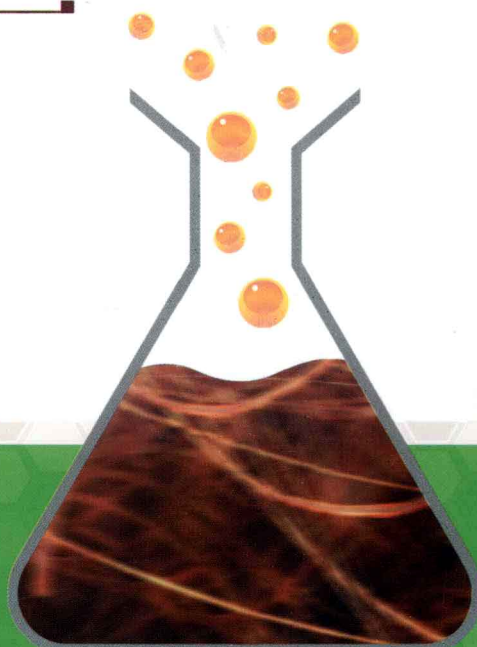


普通高等教育“十二五”规划教材

大学化学实验

丛书主编 张四方

本册主编 刘红



化学创新实验

CHEMISTRY

中国石化出版社

[HTTP://WWW.SINOPEC-PRESS.COM](http://www.sinopec-press.com)

普通高等教育“十二五”规划教材

大学化学实验

主编 张四方

化学创新实验

本册主编 刘红

中国石化出版社

内 容 提 要

本书是根据我国高等教育化学教学改革需要,为高等化学本科教学而编写的实验教材。全书共五个单元,包括食品与药物化学、材料化学、配位化学、合成化学和分离化学。这些内容来自于大学生创新性实验成果、教师科研成果和化学学科研究成果,反映了当今化学学科的新技术、新方法、新成果,其目的在于帮助学生构建化学学科研究意识,提升化学探究能力。

本书可以作为普通高等院校化学、应用化学专业的实验教材使用,也可作为相关人员的参考书使用。

图书在版编目(CIP)数据

化学创新实验/刘红主编.
—北京:中国石化出版社,2012.4
(大学化学实验/张四方主编)
普通高等教育“十二五”规划教材
ISBN 978-7-5114-1297-3

I. ①化… II. ①刘… III. ①化学实验-高等学校-教材
IV. ①O6-3

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第052035

未经本社书面授权,本书任何部分不得被复制、抄袭,或者以任何形式或任何方式传播。版权所有,侵权必究。

中国石化出版社出版发行

地址:北京市东城区安定门外大街58号

邮编:100011 电话:(010)84271850

读者服务部电话:(010)84289974

<http://www.sinopec-press.com>

E-mail:press@sinopec.com

北京科信印刷有限公司印刷

全国各地新华书店经销

*

787×1092毫米16开本15印张378千字
2012年5月第1版 2012年5月第1次印刷
定价:35.00元

序

在过去的 100 多年里, 化学作为一门核心、实用、创造性科学, 为人类认识物质世界和人类文明进步做出了巨大贡献。特别是近几十年来, 数学、物理、生物、计算机学科和量子化学的迅速发展, 以及在化学中的广泛应用, 化学已从描述性学科逐渐走向推理性学科, 化学研究的对象也从传统的原子、分子层次扩展到了原子、分子片、分子、超分子、多分子聚集态层次; 按无机化学、有机化学、分析化学、物理化学、高分子化学划分的化学二级学科体系被打破, 建构起了合成化学、分离化学、分析化学、物理化学、理论化学、化学生物学、纳米(材料)化学、绿色化学、化学信息学新体系; 化学已成为研究从原子、分子片、分子、超分子, 到分子和原子的各种不同尺度和不同复杂程度的聚集态和组装态的合成和反应、分离和分析、结构和形态、物理性能和生物活性及其规律和应用的自然科学。

化学学科的迅速发展, 对化学人才的培养, 特别是高素质创新人才的培养提出了更高的要求。高等院校作为我国高素质化学人才培养的重要基地, 对高素质人才的培养将起到不可替代的作用。然而, 我国高等化学教育长期以来一直沿用“专业化、专门化”的“窄、专、深”课程体系, 使化学实验教学依附化学二级学科, 化学实验的目的重在加深对理论的理解和技能的训练, 人为地削弱了化学学科之间的内在联系与渗透, 学生综合能力得不到有效提高, 严重制约了高素质化学人才的培养。为了适应 21 世纪社会发展对高素质化学人才培养的需求, 全面反映化学学科发展水平, 中国石化出版社组织编写了普通高等教育“十二五”规划教材《大学化学实验》。

普通高等教育“十二五”规划教材《大学化学实验》编写时力求以培养高素质化学人才为宗旨, 提高学生化学综合素质为目标, 打破了传统化学实验教学的旧模式, 建立了以能力培养渐进发展的新模式, 使教材具备以下特点:

新颖性 编写体系上, 根据社会对化学人才的需求和化学学科发展的变化, 打破了传统化学实验教学依附于化学二级学科的实验教学模式, 重建了以能力培养为核心的“技能、基础、综合、探究”能力培养新模式, 强化了高素质化学人才能力培养在普通高等教育中的重要性; 实验体例上, 增加了实验背景、实验指导、实验拓展等内容。实验背景为学生课前准备实验提供了与本实验相关的背景材料, 内容涉及相关物质的性质与用途、研究成果与动态、实验方法与技术等, 旨在启发思维, 拓展视野; 实验拓展为学生实验后提供本实验延伸的

参考思路，内容涉及知识迁移、方法迁移、应用迁移等，旨在举一反三，触类旁通；实验指导为学生在实验过程中如何高质量完成实验提供指导，内容涉及实验安全注意事项、实验操作关键和技巧等，旨在保证安全，提高效率。这些变化使《大学化学实验》与传统教材相比具有了一定的新颖性。

先导性 内容选择上，删除了那些内容陈旧、方法简单，不再适应高素质人才培养需求的实验，增加了能够反映当今化学学科成就的新技术、新方法、新成果，并将新能源、新材料、食品安全、绿色化学等与人类社会关系密切的化学内容纳入到了教材之中，突出了化学对社会所应承担的义务，使《大学化学实验》在内容上具备了一定的先导性

系统性 《大学化学实验》共分6册：《化学技能训练》、《化学基础实验》、《化学综合实验》、《化学探究实验》、《中学化学实验研究》和《化学创新实验》。《化学技能训练》、《化学基础实验》、《化学综合实验》、《化学探究实验》构成了现代高等教育本科化学基本实验教学体系；《中学化学实验研究》为这个实验教学体系提供了教师教育延伸，为未来从事化学教育教学的学生提供专项培养；《化学创新实验》为这个实验教学体系提供了科学研究延伸，为未来从事科学研究和继续深造的学生提供专项培养。一个基本实验教学体系和两个专项培养模块使《大学化学实验》比传统化学实验教材更具系统性。

针对性 《大学化学实验》编写时充分考虑了“985”和“211”院校与一般高等院校人才培养目标和教学条件的差异，将《大学化学实验》使用的对象定位于一般高等院校的化学和应用化学专业。为了更好地适应一般高等院校的使用，教材内容选择不求仪器设备的高精尖，但求实验思路的异新变，教材内容为教学选择留出来足够的余地，使不同层次、不同类型的学校可以根据自身特点和区域特点进行特色办学、个性办学。

《大学化学实验》主要内容介绍如下：

《化学技能训练》 以教育部理科化学教学指导委员会制订的“化学、应用化学专业化学实验教学基本内容”为依据，包括实验安全、实验物品、样品采集、实验操作、测量仪器、数据处理、技能训练等内容，旨在规范和训练学生操作技能。

本册教学建议：教学在第1学期，时数为78学时。

《化学基础实验》 以教育部理科化学教学指导委员会制订的“化学、应用化学专业化学实验教学基本内容”为依据，包括重要常数测定、物质性质检验、无机物质制备、有机物质制备、物质分离鉴定、化学方法分析、仪器方法分析、重要参数测定和化学过程操作等内容，旨在强化化学实验操作和学习解决化学问题的基本方法。

本册教学建议：教学在第2、3、4、5学期，时数为216学时。

《化学综合实验》 内容选择标准有二，一是实验内容的综合性，一个实验含有两个或两个以上知识点的有机结合与渗透；二是实验方法(或手段)的多元性，综合运用两种或两种以上方法和手段来完成同一个实验。包括无机物制备与分析、配合物制备与测定、有机物合成与表征、物质的分离与检测、物质参数控制与测量、新技术训练与应用等内容，旨在强化知识、方法的综合运用，在化学学科层次理解化学。

本册教学建议：教学在第6学期，时数为54学时。

《化学探究实验》 提出课题，给出背景材料，通过学生的创新活动，共同构成学生的科学训练计划。包括合成路线设计、反应过程控制、物质分离提纯、物质结构表征、性能参数测定等内容，旨在帮助学生构建科学研究意识，提升科学探究能力，实现自我价值。

本册教学建议：教学在第7学期，时数为54学时。

《中学化学实验研究》 以中学化学实验教学内容为研究对象，通过科学探究，了解过程与结果之间的关系，为未来从事化学实验教学储备能量。包括典型高中化学实验、典型初中化学实验、改进型化学实验、手持化学实验、综合化学实验和探究化学实验等内容，旨在为学生未来从事化学教学做准备。

本册教学建议：教学在第7学期，时数为51学时。

《化学创新实验》 实验内容来自于教师科研项目成果、大学生创新性实验成果、化学学科的研究成果等。内容包括无机物、有机物、高分子化合物的合成与表征，新型功能性材料的制备与功能研究，食品、环境、化工等领域的化学问题与解决，旨在为学生从事科学研究和研究生学习做准备。

本册教学建议：教学在第7学期或第8学期，时数为54学时。

《大学化学实验》由张四方任总主编。参编院校有：太原师范学院、海南师范大学、晋中学院、忻州师范学院、运城学院和长治学院。所有分册的编写思路、实验内容、实验体例等都由大家共同讨论，充分酝酿确定，是集体智慧的结晶。《大学化学实验》的编写得到了参编院校、中国石化出版社的大力支持，太原师范学院教务处和中国石化出版社任翠霞老师给予了大力协助，在此向他们表示衷心的感谢。在编写过程中，我们参阅了大量文献资料，在此也衷心地向参阅文献的所有作者表示最诚挚谢意。

由于编者水平所限，加之时间仓促，教材中存在不妥之处，真诚希望读者提出宝贵意见。

张四方

2011年6月于太原

前 言

《化学创新实验》是高等教育本科化学基本实验教学体系的一个延伸，是为未来从事化学科学研究和接受研究生教育的学生而设置的一门专业实验课程，旨在将所学的化学知识和方法进行创新性运用，在化学学科层面理解化学、关注化学、关注生活、关注社会、关注自我，为未来的发展进一步夯实基础。

《化学创新实验》的编写是以高等教育改革要求为指导，以全面提高学生综合素质为宗旨。内容的选择主要来自大学生的创新性实验成果、教师的科研成果、化学学科的研究成果等。这些内容集中反映了当今化学学科的新技术、新方法、新成果，涉及材料化学、食品化学、药物化学、分离化学、配位化学、合成化学等，突出了化学对社会所应承担的义务，使《化学创新实验》在内容上具备了一定的前导性；体例设计上，新增了实验背景、实验指导等新体例，给教师教学和学生学习留下了个性发挥空间，使《化学创新实验》具备了一定的新颖性；方法的运用既强调了传统化学方法的不可缺性，又强调了现代化学技术的重要性，使《化学创新实验》在实验方法上具备了一定的先进性。

《化学创新实验》一书在编写时严格按照教材的编写要求来编写，在保证教材内容科学、严谨、系统的同时，还特别注意了知识的逻辑顺序与学生的心理发展顺序相统一、探究性与模仿性相统一、专业性与社会性相统一，因此，本教材的应用价值集中体现在教育价值、发展价值和导向价值。

《化学创新实验》共有 5 个单元，其内容介绍如下：

单元 1 食品与药物化学 包括食品中苯甲酸和山梨酸的分离与测定、牛奶中蛋白质含量的直接电位测定研究、固相萃取-高效液相色谱测定番茄中的赤霉素 GA3 残留、食品中人工色素的高效液相色谱测定、气-质联用法测定食用油中邻苯二甲酸酯的含量、中药中有机氯农药残留量的测定、硫酸长春碱与 DNA 相互作用的光谱研究、胡椒碱与牛血清蛋白相互作用的研究、益智对紫外线诱发的皮肤光老化的防治作用研究、龙船花对乙酸铅引起氧化压力的抑制作用、益智挥发油红外指纹图谱双指标序列分析、超微粉碎制备灵芝孢子粉工艺优化及破壁效果评价等。

单元 2 材料化学 包括纳米 PbO_2 修饰电极流动注射法测定化学需氧量、自组装纳米金修饰玻碳电极检测亚硝酸根、基于聚吡咯纳米阵列的葡萄糖传感器研究、Au 掺杂 Fe_3O_4 纳米粒子酶传感器在有机磷农药检测中的应用、 $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}/\text{TiO}_2$ 复合材料的制备及光催化活性的研究、含单个噻吩三嵌段 Bola 两亲性

分子的合成及液晶行为研究、硫氧化物红色长余辉稀土发光材料的制备及性能研究、新型磷酸锌微孔化合物的合成及表征、MOF-5 晶体颗粒的合成和表征等。

单元3 配位化学 包括双吡啶基四硫富瓦烯配体及其羧基铈(Ⅰ)配合物的合成与光谱分析、混合配体桥联异金属配合物的合成及其性质研究、含N、S杂原子的大环蒽衍生物的合成及对金属离子的识别、含磷酸酯多联吡啶Pt(Ⅱ)配合物的合成及光物理性质研究、基于铁硫羧基蝶形[FeFe]-氢化酶模型化合物的合成与性质研究、过渡金属钨催化Suzuki偶联反应、环糊精与诺卡酮包含物的研究、3, 5, 7, 3', 4', 5'-六羟基黄酮分子印迹微球制备及工艺优化等。

单元4 合成化学 包括杂双子表面活性剂的合成、CO₂开关型表面活性剂的合成、香豆素的合成及荧光性质研究、亚甲基双膦酸四烷基酯的合成、复合固体超强酸催化香茅醛合成驱蚊剂、核苷的化学合成研究、聚酰胺-胺(PAM-AM)树状大分子的合成、微波合成5-乙基-3-巯基-4-(4-氯苯甲基)亚胺基-1, 2, 4-三唑、D-木糖的选择性保护及脱保护等。

单元5 分离化学 包括浊点萃取-火焰原子吸收光谱法测定水样中痕量钴、西番莲叶黄酮的分离及有关黄酮的测定、离子液体萃取脱除油品中苯并噻吩类硫组分、复方红豆杉颗粒剂中人参皂苷R_{b1}分离工艺优化、壳聚糖模板聚合物分离识别槲皮素的研究、离子交换色谱分离提取麻疯果油粕中毒蛋白及其鉴定、超临界技术萃取分离银杏叶活性物质的研究等。

教材使用建议：教学安排在第7学期或第8学期，教学时数为54学时。

本教材由刘红担任主编，刘红、张四方、李军修改并统校全稿。参加编写的有：海南师范大学刘红、刘炜、李高楠、常勇慧、赵宝娟，研究生卢圣楼参与部分实验的编写工作。太原师范大学、海南师范大学、晋中学院、忻州师范学院、运城学院、长治学院等院校参与了全书的审稿。在编写过程中，我们参阅了大量文献和资料，在此向这些文献和资料的作者表示衷心感谢，中国石化出版社和海南师范大学给予了大力支持，晋中学院白官老师为本书的文字图表加工做了大量工作，在此也对他们表示衷心感谢。

感谢海南师范大学学术著作出版基金(ZZ1132)和海南省高等学校优秀中青年骨干教师资助项目资助。

由于编者的水平所限，加之时间仓促，教材的不妥之处，恳请读者提出宝贵意见。

刘 红

2012年1月于海南师范大学

目 录

| | |
|---|-------|
| 单元 1 食品与药物化学 | (1) |
| 实验一 食品中苯甲酸和山梨酸的高效毛细管电泳测定 | (1) |
| 实验二 牛奶中蛋白质含量的直接电位测定研究 | (6) |
| 实验三 固相萃取 - 高效液相色谱测定番茄中的赤霉素 GA3 残留 | (8) |
| 实验四 食品中人工色素的高效液相色谱测定 | (11) |
| 实验五 食用油中邻苯二甲酸酯 GC - MS 的测定研究 | (16) |
| 实验六 凝胶渗透色谱净化 - 气相色谱测定中药中有机氯农药的残留量 | (20) |
| 实验七 硫酸长春碱与 DNA 相互作用的光谱研究 | (25) |
| 实验八 胡椒碱与牛血清蛋白相互作用的研究 | (29) |
| 实验九 益智对紫外线诱发皮肤光老化的防治作用研究 | (35) |
| 实验十 龙船花对乙酸铅引起氧化压力的抑制作用 | (39) |
| 实验十一 超微粉碎制备灵芝孢子粉工艺优化及破壁效果评价 | (40) |
| 实验十二 益智挥发油红外指纹图谱双指标序列分析 | (44) |
| 单元 2 材料化学 | (50) |
| 实验一 纳米 PbO ₂ 修饰电极快速测定化学需氧量的应用 | (50) |
| 实验二 自组装纳米金修饰玻碳电极检测亚硝酸根的应用 | (55) |
| 实验三 基于聚吡咯纳米阵列的葡萄糖传感器研究 | (60) |
| 实验四 Au 掺杂 Fe ₃ O ₄ 纳米粒子酶传感器应用于有机磷农药检测的研究 | (65) |
| 实验五 H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ /TiO ₂ 复合材料的制备及光催化活性研究 | (72) |
| 实验六 含单个噻吩三嵌段 Bola 两亲性分子的合成及液晶行为研究 | (76) |
| 实验七 硫氧化物红色长余辉稀土发光材料的制备及性能研究 | (83) |
| 实验八 新型磷酸锌微孔化合物的合成、表征及合成规律研究 | (88) |
| 实验九 MOF - 5 晶体颗粒的合成和表征 | (90) |
| 单元 3 配位化学 | (94) |
| 实验一 双吡啶基四硫富瓦烯配体及其羰基铈(I)配合物的合成与光谱学 | (94) |
| 实验二 混合配体桥联异金属配合物的合成、结构和磁性质 | (100) |
| 实验三 含 N、S 杂原子的大环葱衍生物的合成及对金属离子的识别 | (104) |
| 实验四 含磷酸酯多联吡啶 Pt(II)配合物的合成及光物理性质 | (107) |
| 实验五 基于铁硫羰基蝶形[FeFe] - 氢化酶模型化合物的合成与性质 | (110) |
| 实验六 过渡金属钨催化的 Suzuki 偶联反应 | (118) |
| 实验七 3,5,7,3',4',5' - 六羟基黄酮分子印迹微球制备及工艺优化 | (125) |
| 实验八 环糊精与诺卡酮包合物的研究 | (129) |

| | |
|---|-------|
| 单元4 合成化学 | (134) |
| 实验一 复合固体超强酸催化香茅醛合成4-羟基- $\alpha,\alpha,4$ -三甲基环己烷甲醇 | (134) |
| 实验二 杂双子表面活性剂的合成 | (138) |
| 实验三 CO_2 开关型表面活性剂的合成 | (145) |
| 实验四 香豆素的合成及荧光性质研究 | (153) |
| 实验五 亚甲基双膦酸四烷基酯的合成 | (160) |
| 实验六 核苷的化学合成研究 | (166) |
| 实验七 聚酰胺-胺(PAMAM)树状大分子的合成 | (173) |
| 实验八 D-木糖的选择性保护及脱保护 | (179) |
| 实验九 微波有机合成法研究 | (184) |
| 实验十 酞菁类化合物的合成与表征 | (189) |
| 实验十一 功能化离子液体的合成 | (194) |
| 单元5 分离化学 | (199) |
| 实验一 浊点萃取预富集火焰原子吸收光谱法测定水样中痕量钴 | (199) |
| 实验二 西番莲叶黄酮的分离及有关黄酮的测定 | (202) |
| 实验三 复方红豆杉颗粒剂中人参皂苷 R_{b1} 分离工艺优化及鉴定 | (205) |
| 实验四 壳聚糖模板聚合物分离识别槲皮素的研究 | (210) |
| 实验五 离子交换色谱分离提取麻疯果油粕中毒蛋白及其鉴定 | (218) |
| 实验六 离子液体萃取脱除油品中苯并噻吩类硫组分 | (222) |
| 实验七 超临界技术萃取分离银杏叶活性物质的研究 | (226) |

单元 1 食品与药物化学

实验一 食品中苯甲酸和山梨酸的高效毛细管电泳测定

实验目的

- (1) 了解毛细管电泳测定的原理；
- (2) 掌握毛细管电泳测定的操作。

实验背景

1. 实验意义

防腐剂是指用于防止食品在储存、流通环节因微生物繁殖引起的变质，或因储存条件不善，食品内在品质发生劣变、色泽下降，为提高保存期、延长食用价值而在食品中使用的添加剂。

到目前为止，我国已批准使用 30 多种食用防腐剂，其中最常用的是苯甲酸和山梨酸两种防腐剂，主要用于酸性食品的防腐。苯甲酸又名安息香酸，它微溶于水，易溶于氯仿、丙酮、乙醇、乙醚等有机溶剂，化学性质较稳定，酸性条件下可随水蒸气蒸馏。苯甲酸随食品进入体内时与甘氨酸结合成马尿酸，从尿液中排出体外，不刺激肾脏。山梨酸，结构式为 $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}$ ，是一种不饱和脂肪酸，进入人体后参与正常新陈代谢，最后转化为二氧化碳和水。生产中多用易溶于水和乙醇的苯甲酸钠、山梨酸钾与酸作用生成苯甲酸、山梨酸。

苯甲酸毒性较山梨酸强，且在相同酸度条件下，抑菌效力仅为山梨酸的 1/3，但价格低廉，因此仍被国内食品行业广泛使用。山梨酸及其盐类抗菌能力较强，毒性小，对食品口味亦无不良影响，被许多国家逐步采用。因价格较高，目前我国仅在少数食品中使用。

欧盟儿童保护集团认为苯甲酸及其钠盐不宜用于儿童食品，日本也做出了严格限制。我国 GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》规定，苯甲酸及其钠盐的使用范围包括酱油、醋、果汁、果酱、蜜饯、葡萄糖汽酒、汽水等食品。山梨酸及其钾盐类可在酱油、醋、果酱类、低盐酱菜类、面酱、蜜饯类等中使用。最大使用剂量依据产品而异，一般在 $0.5 \sim 1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左右。苯甲酸和山梨酸的检测方法有气相色谱法、高效液相色谱法、薄层层析法、紫外分光光度法等。

2. 实验原理

毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 又称高效毛细管电泳 (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE)，是 20 世纪 80 年代中期间世的一种高效液相分离法，是经典电泳技术与现代微柱分离相结合的产物。它是离子或荷电粒子以电场为驱动力，在毛细管中按其淌度或分配系数不同进行高效、快速分离的一种电泳新技术，具有高效、快速、微量

和便于自动化的特点，是继高效液相色谱（HPLC）之后的又一分离新技术。与 HPLC 技术相比，CE 技术具有快速、灵敏、需样量少、避免大量使用有机试剂等优点。因此，在环境化学、农学、表面活性剂和食品化学等多个领域都有很广泛的应用。它使分析科学从微升水平进入纳升水平，为小体积样品分析提供可能，适合于从无机离子到生物大分子的分离分析、从荷电离子到中性分子的分离分析。作为一种重要的分离分析技术，CE 已广泛应用于生命科学的各个领域。

食品成分复杂、种类繁多，所以在分析上要求很高，由于 CE 具有如下三方面的优势：

①具有极高的灵敏度，特别适合进行痕量分析；②对样品的提取、浓缩、纯化和衍生等前处理过程没有严格的要求；③具有多种分离体系，分析方法极具灵活性，可以满足不同样品基质和待测成分的分析要求。因此 CE 作为一种高效分离技术已广泛应用于食品分析的各个方面。

毛细管电泳统指以高压电场为驱动力、以毛细管为分离通道，依据试样中各组分淌度和分配行为上的差异而实现分离的一类分离技术。在电解质溶液中，带电粒子在电场作用下，以不同的速度向其所带电荷相反方向迁移的现象叫电泳。毛细管是由石英硅制成的，在 $\text{pH} > 3$ 的溶液中，其内壁表面硅羟基—Si—OH—会电离成—SiO⁻，它将吸引溶液中的正电荷，使其聚集在自己的周围，在毛细管内壁和溶液之间的固液界面上形成双电层。在外加电场的驱动下，带电离子会同带正电荷的溶剂层一道向负极移动形成电渗流。粒子在电解质中的迁移速度等于电泳和电渗流（EOF）两种速度的矢量和。阳离子的移动方向和电渗流一致，最先流出；中性粒子的电泳流速度为 0，其迁移速度等于电渗流速度，一般都大于电泳速度，它将在阳离子之后流出；阴离子的移动方向和电渗流相反，将在中性粒子之后流出，各种粒子因迁移速度不同而实现分离。

在 HPCE 中，控制电渗流非常重要。改变电渗流的大小和方向可改变分离效率和选择性，如同改变 HPLC 中的流速，电渗流的微小变化影响结果的重现性；HPCE 中影响电渗流的因素有以下几个方面：

（1）电场强度的影响。当毛细管长度一定时，电渗流速度和电场强度成正比，当毛细管长度一定时，电渗流速度正比于工作电压。

（2）毛细管材料的影响。不同材料毛细管的表面电荷特性不同，产生的电渗流大小不同；

（3）电解质溶液性质的影响。①溶液 pH 值的影响。对于石英毛细管，溶液 pH 值增高时，表面电离多，电荷密度增加，管壁 zeta 电势增大，电渗流增大， $\text{pH} = 7$ ，达到最大； $\text{pH} < 3$ 时，完全被氢离子中和，表面电中性，电渗流为零。分析时，采用缓冲溶液来保持 pH 值稳定。②阴离子的影响。在其他条件相同、浓度相同而阴离子不同时，毛细管中的电流有较大差别，产生的焦耳热不同。缓冲溶液离子强度影响双电层的厚度、溶液黏度和工作电流，明显影响电渗流大小，缓冲溶液离子强度增加，电渗流下降。

（4）温度的影响。毛细管内温度的升高，使溶液的黏度下降，电渗流增大。温度变化来自于“焦耳热”（毛细管溶液中有电流通过时产生的热量，与背景电解质的摩尔电导、浓度及电场强度成正比），温度每变化 1℃，将引起背景电解质溶液黏度变化 2% ~ 3%。

（5）添加剂的影响。①加入浓度较大的中性盐，如 K_2SO_4 ，溶液离子强度增大，使溶液的黏度增大，电渗流减小。②加入表面活性剂，可改变电渗流的大小和方向；加入不同阳离子表面活性剂可控制电渗流；加入阴离子表面活性剂，如十二烷基硫酸钠（SDS），可使壁表面负电荷增加，zeta 电势增大，电渗流增大；③加入有机溶剂如甲醇、乙腈，可使电渗流增大。

据试样组分在背景溶液中所起作用的不同，毛细管电泳可分为6种分离模式。

①毛细管区带电泳 (Capillary Zone Electrophoresis, CZE), 是毛细管电泳中最基本、应用最普遍的一种分离模式, 分离是基于样品中各个组分间荷质比的差异, 依据样品中不同离子成分在外加电场作用下电泳淌度的不同而实现分离。常用于对带电离子的分离分析。

②胶束电动毛细管色谱 (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC), 是毛细管电泳中惟一既能分离中性化合物又能分离带电组分的分离模式。在背景电解质中加入表面活性剂 (如十二烷基硫酸钠, SDS), 当其浓度超过临界胶束浓度后就形成一种有疏水内核、外部带负电的胶束。溶质在水相和胶束相之间产生分配, 中性离子按疏水性不同得以分离。

③毛细管等速电泳 (Capillary Isotachopheresis, CITP), 也是依据样品组分淌度的不同进行分离, 是一种较早的分离模式, 常用于分离离子型化合物。

④毛细管凝胶电泳 (Capillary Gel Electrophoresis, CGE), 是各种分离模式中柱效最高的一种模式, 由于毛细管内填充有凝胶, 样品组分在分离中不仅受电场力的作用, 还受凝胶尺寸排阻效应的作用, 而用水溶性的线性高的分子聚合物加在缓冲液中, 用压力充入毛细管中, 是无胶筛分。多用于蛋白质、核苷酸片段的分离。

⑤毛细管等电聚焦 (Capillary Isoelectric Focus, CIEF), 是依据样品组分的等电点不同而实现分离的电泳技术, 是将普通等电聚焦电泳移到毛细管内进行的。一般用于兼性离子的样品, 等电点仅差 0.001 可分离的物质。

⑥毛细管电色谱 (Capillary Electric Chromatography, CEC), 是将 HPLC 中众多的固定相微粒填充到毛细管中, 以样品与固定相之间的相互作用为分离机制, 以电渗为流动相驱动力的色谱过程。

此外, 利用微乳液做流动相的电动毛细管色谱 (MEEKC)、利用具有动态结构的缠结网聚合物溶液来代替凝胶进行分离的毛细管无胶筛分电泳 (CNGS)、采用纯有机溶剂做非水介质的非水毛细管电泳 (NACE)、毛细管矩形电泳 (CAC) 和芯片式毛细管电泳 (CCE) 等都是根据实际需要发展的 CE 新模式。

由于毛细管内径的限制, 检测信号是 CE 系统最突出的问题。紫外、可见 (UV) 分光光度分析法是 CE 常用的检测方法, 但是受到仪器、单波长等因素的限制。目前应用最广泛的是二极管阵列 (PDA) 检测器, 其检测限为 $10^{-5} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。常规的检测器还有灵敏度很高的激光光热 (LIP) 和荧光 (FL) 检测器, 检测限为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。近些年, 在实际应用中还产生了灵敏度达到 $10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的激光诱导荧光 (LIF)、有良好选择性的安培 (EC)、通用性很好的电导 (CD) 以及可以获得结构信息的质谱 (MS) 等多种检测器。迄今为止, 除了电感耦合等离子体 (ICP) 和红外 (IR) 技术没有和 CE 联用, 其他的检测方法均和 CE 联用并且大部分实现商品化。使用 CE 时应该根据所分析物质的特点, 选择相应分离模式和检测器, 以扬长避短, 得到最佳分析效果。

实验指导

1. 仪器试剂

仪器: 毛细管电泳仪 [Chrom&Spec1.5x 数据处理工作站及紫外检测器 (190 ~ 400nm)] 双光束紫外可见分光光度计 未涂层熔融石英毛细管 ($75 \mu\text{m} \times 65\text{cm}$ 、有效长度

试剂：苯甲酸、山梨酸钾标准储备液（准确称取 200mg 苯甲酸、山梨酸钾样品，用适量的乙醇溶解，于 200mL 棕色容量瓶中定容，配制成 $10\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准储备液置于 4°C 冰箱中保存） 焦性没食子酸标准品

2. 实验过程

(1) 样品前处理 小儿止咳糖浆：准确移取 1.00mL 小儿止咳糖浆到 50mL 容量瓶中，加入 2.5mL $1000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 焦性没食子酸溶液，用硼砂溶液定容。用滤膜过滤后备用。本实验中所有溶液进入毛细管之前均用 $0.45\mu\text{m}$ 纤维素滤膜过滤。

(2) 检测波长的选择 取苯甲酸和山梨酸钾标准溶液在 190 ~ 400nm 范围内扫描，从其紫外吸收光谱图中选择两者吸光度均较大的波长作为检测波长，见图 1 - 1。

(3) 内标物的选择 在选定的缓冲体系中，实验不同的内标物质，选择迁移时间和苯甲酸及山梨酸钾的迁移时间较接近又不重合，且其电泳淌度与被测组分相近，吸收灵敏度高、峰形好的物质作为测定苯甲酸和山梨酸钾的内标。

(4) 缓冲体系的选择 实验浓度均为 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaAc - HAc ($\text{pH} = 4.0$)、柠檬酸 - 柠檬酸钠 ($\text{pH} = 6.2$)、硼砂 - 硼酸 ($\text{pH} = 7.4$)、柠檬酸 - Na_2HPO_4 ($\text{pH} = 7.6$)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 8.0$)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 9.0$)、硼砂 ($\text{pH} = 9.2$) 7 种缓冲溶液对苯甲酸、山梨酸钾和内标物的电渗流和分离效果进行研究。选择对苯甲酸和山梨酸钾的分离效果和灵敏度最好的一种缓冲溶液作为运行溶液。

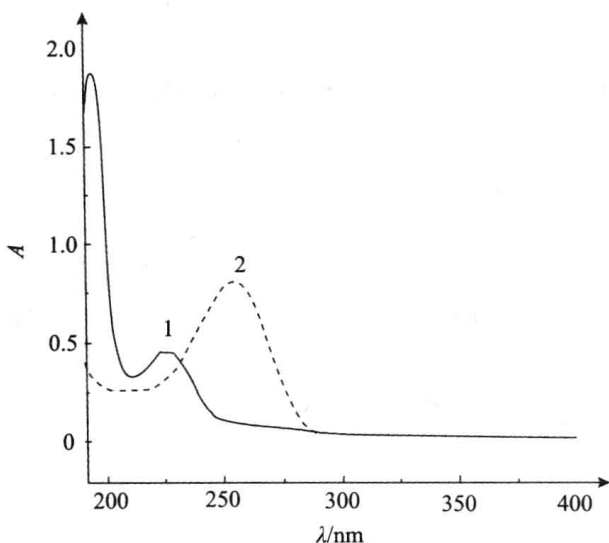


图 1 - 1 苯甲酸和山梨酸钾溶液的紫外吸收谱图
1—苯甲酸；2—山梨酸钾

缓冲溶液作为运行溶液。

(5) 缓冲溶液浓度 实验硼砂缓冲溶液浓度为 10、20、30、40、60、80 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对分离效果的影响。随着缓冲溶液浓度的增大，目标物和内标物的迁移时间增加，综合分离效果和节省分离时间，选择缓冲溶液的最佳浓度。

(6) 分离电压 分别配制苯甲酸和山梨酸钾的质量浓度均为 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、内标物质量浓度为 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合标准溶液。在选定波长、进样时间、电压和缓冲体系的电泳条件下，改变电压 (12 ~ 22kV) 进行电泳分析，并考察目标物的分离情况。苯甲酸和山梨酸钾迁移时间随着分离电压的增大而逐渐减少，同时，电压增高，电流增大，产生焦耳热，使谱线变宽，综合考虑选择最佳分离电压。

(7) 进样时间 采用进样压力为 3kPa 时，实验进样时间 5、10、15、20、25、30s 时的分离效果和灵敏度。进样时间越长，苯甲酸和山梨酸钾峰高越大，灵敏度增大，当进样时间较大时，其峰形会展宽，时间较小时灵敏度偏小，综合考虑选择最佳进样时间。

(8) 操作温度 实验在 20 ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 之间改变柱温，温度升高，迁移时间增大，同时，基线会产生漂移，考虑迁移时间以及基线的稳定等因素，选择最佳分离温度。

(9) 线性范围、检出限及精密性 分别配制 1、10、100、200、400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯甲酸和

山梨酸钾的混合溶液（内含 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的焦性没食子酸），在选定条件下进行电泳分析。以苯甲酸的相对峰面积和山梨酸钾的相对峰面积（即被测物的峰面积与内标物的峰面积之比）分别对它们的质量浓度（ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ）进行线性回归分析，得出苯甲酸和山梨酸钾的线性范围和线性回归方程，以噪音的 3 倍（ $S/N = 3$ ）推算得出苯甲酸和山梨酸钾的检出限。在上述最佳条件下，取 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯甲酸和山梨酸钾的混合溶液（含有 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的焦性没食子酸）连续进样 7 次，测定迁移时间和峰面积的相对标准偏差（ RSD ）。

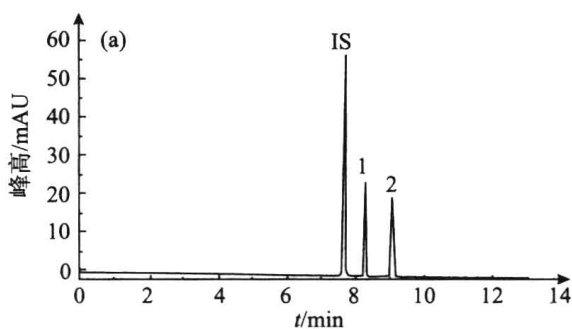


图 1-2 苯甲酸和山梨酸钾标准溶液及加标样品的毛细管电泳谱图

1—山梨酸钾；2—苯甲酸；IS—焦性没食子酸

(10) 样品分析与加标回收率 将待测样品按实验方法测定，并进行加标回收率实验。苯甲酸和山梨酸钾标准溶液及加标样品的毛细管电泳谱图见图 1-2。

实验思考

1. 毛细管电泳分离的原理是什么？
2. 如何选择内标物？
3. 毛细管电泳中影响电渗流的因素有哪些？怎样影响？

参 考 文 献

1. 孟祥平, 刘建学. 毛细管电泳在食品分析中的应用进展 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31 (11): 88 ~ 92
2. 赵新颖, 任占军, 孙杰, 谷学新. 毛细管电泳技术及其应用进展 [J]. 上海工程技术大学学报, 2006, 20 (2): 140 ~ 143
3. 涂逢樟, 姚辉梅, 吴华等. 高效毛细管电泳法同时测定药品中苯甲酸和山梨酸钾 [J]. 分析试验室, 2010, 29 (4): 99 ~ 102
4. 李伟, 柴金玲, 阿里木江·艾拜都拉等. 区带毛细管电泳分离测定大黄提取液中游离蒽醌化合物 [J]. 分析科学学报, 2006, 22 (1): 68 ~ 70
5. 彭友元. 毛细管电泳手性拆分研究及应用进展 [J]. 泉州师范学院学报, 2004, 22 (1): 62 ~ 67
6. 王敏, 屈锋, 林金明. 毛细管电泳在低分子量有机酸分析中的应用 [J]. 分析科学学报, 2005, 21 (4): 454 ~ 458
7. 张兰, 林子俺, 谢增鸿. 毛细管电泳用于水产品中五种抗生素的同时测定 [J]. 分析测试技术与仪器, 2004, 10 (1): 18 ~ 23
8. 陈天豹, 邓文汉, 卢苑华等. 毛细管电泳法检测蜂蜜中残留的抗生素 [J]. 色谱, 2001, 19 (1): 91 ~ 93
9. 杨晓泉, 王学兵, 张水平等. 毛细管电泳在食品分析中的应用 [J]. 食品与发酵工业, 1998, 25 (5): 58 ~ 63
10. Jimidar M, Hartmann C, Cousement N, et al. Determination of nitrate and nitrite in vegetables by capillary electrophoresis with indirect detection [J]. Chromatogr A, 1995, 706: 479 ~ 492
11. Cancelon P F, Bryann C R. Use of capillary electrophoresis for monitoring citrus juice composition [J]. Chromatogr, 1993, 652: 551 ~ 553
12. Kennet B F. Determination of organic acids in food samples by capillary electrophoresis [J]. Chromatogr, 1991,

13. Pantai T. The determination of sorbic acid and benzoic acid in variety of beverages and food by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Food Chem, 1995, 52: 219 ~ 226
14. Silva C L, Lima E C, Tavares M E. Investigation of preconcentration strategies for the trace analysis of multi-residue pesticides in real by capillary electrophoresis [J]. Chromatogr A, 2003, 1014 (1 ~ 2): 109 ~ 116

本实验由刘炜执笔

实验二 牛奶中蛋白质含量的直接电位测定研究

实验目的

- (1) 了解蛋白质含量的直接电位测定原理；
- (2) 掌握蛋白质含量的直接电位测定操作。

实验背景

1. 实验意义

牛奶中的蛋白质含量是衡量其营养价值高低的一项重要指标，因此有关牛奶蛋白质的分析检测对于乳品企业来说就显得尤为重要。目前国内外所采用的有关牛奶中蛋白质含量检测的方法主要有凯氏定氮法、紫外吸收法、双缩脲分光光度法、染料结合分光光度法、Lowry 法（Folin - 酚试剂法）、Bradford 法（考马斯亮蓝法）、毛细管电泳分析法、罗丹明生物探针法以及高效光谱遥感技术分析法等几种方法。其中经典的凯氏定氮法以其测定结果的准确稳定及重复性强等方面的优点而被国内外广泛采用和认可。其原理是将含有蛋白质的待测样品同浓硫酸一起加热消化，使氮变成氨，同时形成铵盐，在消化液中加入过量的碱，再加热将氨蒸馏出来，并收集于硼酸溶液中，最后用酸碱滴定法测定其总氮量，再乘以一定的系数换算成蛋白质的含量。但该方法存在着操作繁琐，试剂消耗量大，操作过程费水、费电、费时等缺点，在消化的同时排放出来的二氧化硫以及硫化氢等有害气体，还会造成环境污染，危害人体健康。其他的几种方法则存在着需要有专门的仪器或特定的试剂等方面的原因，目前还很难适应大规模工业生产的需要，因此，研究开发出一种新的简便、快速测定蛋白质的方法尤为重要。

2. 实验原理

氨基酸是由具有酸性的羧基（ $-\text{COOH}$ ）和碱性的氨基（ $-\text{NH}_2$ ）相互作用而形成的一种中性内盐。当在碱性条件下加入甲醛溶液时，氨基酸便与甲醛反应，形成一种化合物，该化合物氨基上的两个氢原子被次甲基所取代，便失去了氨基的碱性特性，从而使其呈酸性的羧基释放出来，并使其溶液的电化学特性发生变化。由于该化学反应是可逆的，而且一定要有适当过量的甲醛存在，才能使该反应充分并迅速地达到化学反应平衡状态，这样就可以利用直接电位方法来求出牛奶中的游离氨基酸的含量，再根据生鲜牛奶中的游离氨基酸与其蛋白质之间总量保持恒定比例关系的原理，利用电位法就可直接求出牛奶中蛋白质的含量。这种方法的最大的特点就是采用常规的检测仪器及试剂，通过电位值的测定再经过标准曲线回归方程的计算，即可获得令人满意的测定结果。

但是，由于牛奶本身胶体体系的复杂多变性以及直接电位法在测定中易受其他因素的干

扰影响等诸多原因, 使得其测定值与实际含量之间可能存在着较大的偏差。因此, 可采用凯氏定氮法所测定的牛奶中蛋白质的含量对牛奶与甲醛溶液在反应后的平衡电位值作图, 得出牛奶中蛋白质的含量与其最终平衡电位值之间的线性回归关系方程, 这样就可以通过测定其电位值, 并经过标准曲线的线性回归方程的计算直接得到牛奶中蛋白质的含量。

实验指导

1. 仪器试剂

仪器: 碱式滴定管 PHS-3 型数字式精密酸度计 电子天平 KDJ-1 型蛋白质测定仪

试剂: NaOH 溶液 ($0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 碱性甲醛溶液 (40%, $\text{pH} = 9.20$)

2. 实验过程

(1) 甲醛溶液的处理 目前市场上销售的甲醛溶液中常含有微量的甲酸, 应当除去, 否则易产生正误差, 容易使牛奶中蛋白质含量的测定结果偏高。具体的处理办法为: 用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液中和甲醛溶液, 同时用酸度计控制其溶液的 pH 值, 直到 $\text{pH} = 9.20$ 为止。

(2) 蛋白质测定条件的确定 甲醛溶液的用量、反应平衡时间、测定的温度范围等因素都将直接影响到 pH 值的测定, 并最终影响到牛奶中蛋白质含量测定结果的准确性。在固定其他因素不变的情况下, 对其中的每一个因素进行最佳测定条件的选择试验。通过一系列的实验最终所确定的牛奶中蛋白质含量的测定条件为 40% 碱性甲醛溶液的用量为 5mL、甲醛溶液与牛奶的反应时间为 2min、pH 值的测定温度范围 $10 \sim 20^\circ\text{C}$ 。此处甲醛溶液的用量较其理论计算值的需要量偏大, 主要是考虑到氨基酸与甲醛溶液的反应本身是一个化学平衡反应, 加大甲醛溶液的用量可以缩短反应平衡所需要的时间。另外, 在加入甲醛溶液后, 混合搅拌的时间也不宜超过 1min, 主要是因为甲醛在搅拌的过程中容易与空气中的氧气发生化学反应产生甲酸, 从而使牛奶中蛋白质含量的测定结果偏高。

(3) 蛋白质测定计算公式的确定 分别取不同蛋白质含量的生鲜牛奶样品, 按照最佳测定条件测其与甲醛溶液混合后的最终 pH 值, 同时用 GB 5009.5—2010 中的凯氏定氮法测定每个样品中的蛋白质含量, 以 pH 值对蛋白质含量作图, 得出蛋白质的含量与其最终平衡 pH 值之间的线性回归方程、线性范围及相关系数 R 。

(4) 测定方法的精密度试验 取一份生鲜牛奶样品, 在 15°C 的温度条件下按照直接电位测定方法对其蛋白质的含量依次平行测定 7 次, 计算测定结果的相对标准偏差, 从而测定此方法精密度。

(5) 回收率试验 取一份生鲜牛奶样品, 用凯氏定氮法测得其蛋白质的含量, 将其分成 5 份, 分别添加不同量的全脂淡奶粉 (蛋白质的含量已预先测定), 混合均匀后再用直接电位法测定其蛋白质含量, 并计算其回收率。

实验思考

1. 为什么可以通过电位测定来检测蛋白质的含量?
2. 加入甲醛时应注意什么问题?

参 考 文 献

1. GB 5009.5—2010
2. 宁正祥. 食品分析技术手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998