

《食品理化与生物材料实验》讲义

实验一 DDCAg 分光光度法测定尿中总砷

一、实验目的

1. 了解测定食品中总砷的意义；掌握 Ag-DDC 银盐分光光度法测定总砷的原理，
2. 熟悉砷化氢发生瓶的使用；
3. 掌握 Ag-DDC 银盐分光光度法测定总砷的原理和计算。

二、实验原理

样品经消化后，所有的砷被氧化为五价砷。用碘化钾、氯化亚锡将高价砷还原为三价砷，然后与新生态氢生成砷化氢，经二乙氨基二硫代甲酸银盐(Ag-DDC)溶液吸收后，形成红色胶态物，与标准系列比较定量。

三、仪器与试剂

分光光度计；测砷装置（见图）。

酸性氯化亚锡溶液：称取 40g 氯化亚锡 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加盐酸溶解并稀释至 100ml，加入数颗金属锡粒。

乙酸铅棉花：用 10% 乙酸铅溶液浸透脱脂棉后、压除多余溶液并使疏松，在 100℃ 以下干燥后，贮存于玻璃瓶中。

二乙氨基二硫代甲酸银-三乙醇胺-三氯甲烷溶液：称取 0.25g 二乙氨基二硫代甲酸银

$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NCS}_2\text{Ag}$ 置于乳钵中，加少量三氯甲烷研磨，移入 100ml 量筒中，加入 1.8ml 三

乙醇胺，再用三氯甲烷分次洗涤乳钵，洗液一并移入量筒中，再用三氯甲烷稀释至 100ml，放置过夜。滤入棕色瓶中贮存。

砷标准溶液：精密称取 0.1320g 在硫酸干燥器中干燥过的或在 100℃ 干燥 2h 的三氧化二砷，加 5ml 200g/L 氢氧化钠溶液，溶解后加 10% 硫酸 25ml。移入 1000ml 容量瓶中，加新煮沸冷却的水稀释至刻度，贮存于棕色玻塞瓶中。此溶液每毫升相当于 0.1mg 砷。

砷标准使用液：吸取 1.0ml 砷标准溶液，置于 100ml 容量瓶中，加 1ml 10% 硫酸，再加

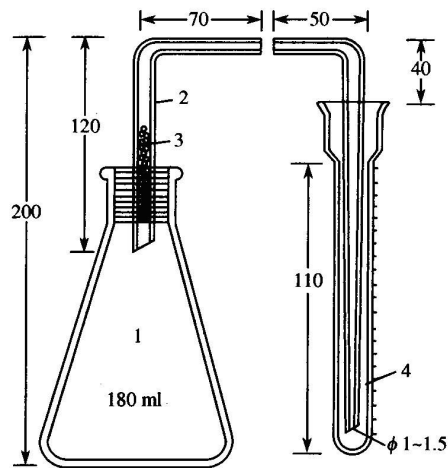


图 测砷装置

1. 砷化氢发生瓶；
2. 导气管；
3. 乙酸铅棉花；
4. 刻度吸收管。

水稀释至刻度，此溶液每毫升相当于 1 μ g 砷。

硝酸-高氯酸混合液(4+1)；150g/L 碘化钾溶液；盐酸(1+1)；200g/L 氢氧化钠溶液；无砷锌粒。

四、操作方法

1. 样品处理（硝酸-高氯酸-硫酸消化法）

称取 5.00g 或 10.00g 的粉碎样品（粮食、粉丝、粉条、豆干制品、糕点、茶叶等），置于 250ml~500ml 凯氏烧瓶中，先加水少许使湿润，加数粒玻璃珠、10ml~15ml 硝酸-高氯酸混合液，放置片刻，小火缓缓加热，待作用缓和，放冷。沿瓶壁加入 5ml 或 10ml 硫酸，再加热至瓶中液体开始变成棕色时，不断沿瓶壁滴加硝酸-高氯酸混合液至有机质分解完全。加大火力，至产生白烟，溶液应澄明无色或微带黄色，放冷。在操作过程中应注意防止爆炸。

加 20ml 水煮沸，除去残余的硝酸至产生白烟为止，驱酸处理两次，放冷。移入 50ml 或 100ml 容量瓶中，用水洗涤凯氏烧瓶，洗液并入容量瓶中，放冷，加水至刻度，混匀。取与消化样品相同量的硝酸-高氯酸混合液和硫酸，作试剂空白试验。

2. 测定

(1) 标准曲线的绘制

吸取 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0ml 砷标准使用液（分别相当于 0、2、4、6、8、10 μ g 砷），分别置于 150ml 砷化氢发生瓶中，加水至 40ml，再加 10ml 1:1 硫酸。

于上述各管中加 150g/L 碘化钾溶液 3ml、酸性氯化亚锡溶液 0.5ml，混匀，静置 15min。再加入 3g 锌粒，立即分别塞上装有乙酸铅棉花的导气管，并使管尖端插入盛有 4ml 银盐溶液的吸收管中的液面下，在常温下反应 45min 后，取下离心管，加三氯甲烷补足 4ml。用 1cm 比色杯，以零管调节零点，于波长 520nm 处测吸光度，以各管砷含量对应其吸光度值绘制标准曲线。

(2) 样品的测定

吸取一定量的消化后的定容溶液(相当于 5g 样品)及同量的试剂空白液，分别置于 150ml 砷化氢发生瓶中，补加硫酸至总量为 5ml，加水至 50ml。

五、计算

$$X = \frac{(A_1 - A_2) \times V_1}{m \times V_2}$$

式中：X 为样品中砷的含量，mg/kg 或 mg/L；A₁ 为测定用样品消化液中砷的含量， μ g；A₂ 为试剂空白液中砷的含量， μ g；m 为样品质量（体积），g (ml)；V₁ 为样品消化液的总

体积, ml; V2 为测定用样品消化液的体积, ml。

六、注意事项

1. 不同形状和规格的无砷锌粒, 因其表面积不同而与酸反应的速度不同, 这样生成的氢气气体流速就不同, 最终将直接影响吸收效率及测定结果。一般确定标准曲线与试样均用同一规格的锌粒为宜。

2. 测砷装置中砷化氢发生瓶与导气管连接时应密封不漏气。

实验二 离子选择电极法测定尿氟

一、实验目的

1. 了解氟离子选择电极法测定尿中氟化物的原理和方法。
2. 掌握测定尿中氟化物含量的卫生学意义。

二、实验原理

氟化镧单晶对氟离子有选择性, 由电极膜分开的两种不同浓度的氟溶液之间存在电位差即膜电位, 其大小与溶液中氟离子活度有关。利用电动势与氟离子活度的线性关系, 可直接求出样品中氟离子活度。

三、实验材料

(一) 仪器: 氟离子选择电极, 饱和甘汞电极, 精密酸度计 (精密度 $\pm 0.1\text{mV}$), 磁力搅拌器。

(二) 试剂: 本方法使用的化学试剂除氟化钠为优级纯外, 其余试剂均用分析纯, 实验用水为双蒸水。

1. 氟标准液

1) 氟化物标准储备液: 氟化钠在 105°C 下干燥 2h, 冷却至室温后称取 0.2210g 用少量的水溶解。将溶液定量转移至 100ml 容量瓶内, 用水稀释至刻度, 混匀倒入聚乙烯瓶中备用。即为成 $1.00\text{ml}=1000\mu\text{g F}^{-}$ 的标准溶液。

2) 氟化物标准工作液 A: 精确吸取氟化物标准储备液 1ml 、 10ml 分别于 2 个 100ml 容量瓶中, 用总离子强度缓冲液与假尿溶液 (1+1) 体积混合的溶液稀释至刻度, 混匀, 储存于聚乙烯瓶中, 此标准溶液的浓度分别为 1ml 含 $10\mu\text{g F}^{-}$ 和 $100\mu\text{g F}^{-}$ 。

3) 氟化物标准工作液 B: 精确吸取氟化物标准储备液 10ml 于 100ml 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀, 储存于聚乙烯瓶中, 此标准溶液的浓度为 1ml 含 $100\mu\text{g F}^{-}$ 。

2. 总离子强度调节缓冲溶液 (TISAB): 称取 58g 氯化钠和 4g 柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 。

2H₂O), 溶解 500ml 水中, 加入 57ml 冰乙酸, 再用 5mol/L 的氢氧化钠溶液调节溶液的 pH 为 5~5.5 后加水稀释至 1000ml, 贮于聚乙烯瓶中。

3. 含氟总离子强度缓冲调节液: 配制同总离子强度缓冲液, 在加水稀释前, 加 2ml 氟化物标准工作液 B, 此液含氟 0.20mg/L。

4. 假尿溶液: 称取 11.60g 氯化钠, 2g 磷酸氢二铵 [(NH₄)₂HPO₄] 于适量的水中, 加 1ml 浓硫酸, 再用水稀释至 1000ml。

四、实验方法

1. 采样: 采集晨尿或随机尿约 20~30ml 于清洁干燥的聚乙烯塑料瓶中, 尽快测定比重。若不能及时分析, 保存于冰箱, 两周内完成测定。

2. 标准曲线法

(1) 标准曲线的绘制: 取 9 个 50ml 的容量瓶, 按表 3-5-1 配制标准系列。

表 3-5-1 氟化物标准系列

容量瓶号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10 µg/ml 标准溶液 A (ml)	0.5	1.0	2.5	5.0					
100 µg/ml 标准溶液 A (ml)					1.0	2.5	5.0	10.0	25.0
用 TISAB 与假尿溶液 (1+1) 体积混合溶液稀释至刻度									
氟含量 (µg/ml)	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10.	20.0	50.0

分别吸取各浓度的氟标准溶液 10ml 于 25ml 烧杯中, 放入一根磁力搅拌棒, 由低浓度开始, 用氟离子选择电极测定溶液的电位值 (mV), 当电位稳定后 (30s 内电位变化小于 0.1 mV) 读取电位值 (mV), 记录测定时的温度, 用半对数坐标纸, 以等距离坐标表示电位值 (mV), 对数坐标表示氟离子浓度, 绘制标准曲线。

3. 样品测定: 准确量取尿液 5ml 于 25ml 烧杯中, 再加入 5ml 总离子强度调节缓冲溶液 (如样品氟含量低于 0.20mg/L, 测定时加入含氟 TISAB), 按测定标准曲线的方法测定电位, 查标准曲线计算氟含量。

4. 标准加入法

样品测定: 样品量取 10ml 尿液于 25ml 烧杯中, 再加入 10ml 总离子强度缓冲液, 按测定标准曲线的方法测定电位 E₁, 再另加入少量含氟化物标准工作液 B (小于 0.40ml) 测定电位值 E₂, 按下式计算样品中氟含量。

2. 计算

(1) 标准曲线法的计算:

$$C_x = C \times 2 \dots\dots\dots (1)$$

$$C_x = (C - 0.1) \times 2 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C_x —尿液氟含量, mg/L;

C —查标准曲线得氟含量, mg/L。

注: 当尿样加含氟 TISAB 测定时, 用公式 (2) 计算样品氟含量。

2. 标准加入法的计算

$$C_x = [(C_s \times V_s / V_x)] / (10^{\frac{\Delta E}{s}} - 1)$$

式中:

C_x —尿液氟含量, mg/L;

C_s —加入的氟化物标准溶液浓度 (应大于被测液浓度的 50~100 倍), $\mu\text{g/ml}$;

V_s —加入的氟化物标准溶液体积 (不应大于被测液体积的 1/50~1/100 倍), ml;

V_x —量取的尿样体积, ml;

s —电极的实测斜率;

E — E_2 与 E_1 之差 (E 为 30~40mV 为宜)。

五、结果意义

氟是常见的大气污染物之一, 可经空气、食物、水进入人体。氟化物对人体危害主要使骨骼受害, 严重的引起氟骨症; 其次是牙齿脆弱, 形成氟斑牙; 也可出现斑点、损害皮肤, 出现疼痛、湿疹及各种皮炎等。进入机体的氟主要通过肾脏以尿的形式排出, 故尿氟的含量可以反映机体的氟负荷水平。儿童正常值小于 $\leq 1.4 \text{ mg/L}$, 成人正常值 $\leq 1.6 \text{ mg/L}$ 。

六、注意事项

1. 本法检测下限为 0.05 mg/L , 可准确检测氟含量大于 0.05 mg/L 尿中无机氟化物含量。
2. 总离子强度缓冲溶液 (TISAB) 既控制了测试液的离子强度, 又调节测试液的 pH 最佳范围, 并有效地消除了 H^+ 、 OH^- 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 等的干扰。

实验三 分光光度法测定尿中马尿酸

一、实验目的

1. 熟悉分光光度法测定尿中马尿酸的原理和方法。
2. 掌握测定尿中马尿酸的卫生学意义。

二、实验原理

尿中马尿酸在吡啶存在下与苯磺酰氯反应生成黄色化合物, 在乙醇溶液中于 470nm 波长下比色定量。

三、实验材料

1. 仪器: 分光光度计, 10mm 比色杯, 旋涡混合器, 10ml 具磨口塞比色瓶, 50ml 、 100ml 容量瓶, 100ml 聚乙烯塑料瓶或玻璃瓶。

2. 试剂

- (1) 蒸馏水或去离子水，马尿酸（优级纯），苯磺酰氯，吡啶，无水乙醇，氯仿。
- (2) 马尿酸标准贮备液：准确称取 0.1000g 马尿酸，用水溶解，转入 100ml 容量瓶内，加水至刻度。此溶液 1ml=1.0mg 马尿酸。在 4℃ 冰箱中可保存一周。
- (3) 马尿酸标准应用液：取 20ml 贮备液于 50ml 容量瓶中，用水稀释至刻度。此溶液 1ml=0.4mg 马尿酸。在 4℃ 冰箱中保存两周。

四、实验方法

1. 采样、运输和保存：用聚乙烯塑料瓶或玻璃瓶收集接触甲苯工人的班末尿约 100ml，尽快测定比重后按（100+1）体积比加入氯仿，充分振摇混合，密闭瓶送至实验室，于 4℃ 冰箱中保存两周。
2. 样品处理：取 5ml 尿样，用水稀释 1~5 倍，视马尿酸的浓度而定。
3. 标准曲线的绘制：取 8 支比色管按表 3-6-1 配制马尿酸标准系列。

表 3-6-1 马尿酸标准系列

管号	1	2	3	4	5	6	7	8
马尿酸标准应用液 (ml)	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.40
水 (ml)	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.10
马尿酸含量 (mg)	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.18

向各管加入 0.50ml 吡啶，混匀后再加入 0.20ml 苯磺酰氯，立刻盖紧管塞，在旋涡混合器上混合 20s（或用手强烈振摇 25~30 次）。在 30±2℃ 条件下避光放置 30min。

再向各管加入 3.80ml 乙醇，混匀，继续避光放置 30min。

用 10mm 比色杯在波长 470nm 下，以试剂空白(0 号管)为参比测量吸光度。以吸光度为纵坐标，马尿酸含量为横坐标，绘制标准曲线。

4. 样品测定：取 0.50ml 稀释尿液两份，分别加入两支比色管内。其中一支比色管按标准管步骤操作，另一支比色管只加 4.50ml 乙醇，作尿样底色测定。若加入乙醇溶液发生混浊，转入离心管，以 4000r/min 离心 10min。用 10mm 比色杯在波长 470nm 下，以试剂空白为参比，分别测量尿样和尿样底色的吸光度。以样品管吸光度值减尿样底色的吸光度值，由标准曲线上查得马尿酸的含量。

5. 计算

- (1) 按下式计算出尿样换算成标准比重（1.020）下的浓度校正系数 k。

$$k = \frac{1.020 - 1.000}{\text{实测比重} - 1.000}$$

- (2) 按下式计算样品中马尿酸的含量：

$$X = \frac{m \times V_1}{0.5 \times V_2} \times k$$

式中：

X —尿中马尿酸的浓度，g / L；

m —由标准曲线查得的马尿酸含量，mg；

0.5—取稀释尿样进行分析的体积，ml；

V_1 —尿样稀释后总体积，ml；

V_2 —取尿样体积，ml；

k —尿样换算成标准比重下的浓度校正系数。

五、结果意义

甲苯进入人体后，主要被氧化成苯甲酸，并与甘氨酸结合生成马尿酸从尿中排出。不接触甲苯者一般尿中马尿酸含量很低，所以测定尿中马尿酸作为甲苯的接触指标以及评价劳动指标有一定价值。用苯磺酰氯比色法测得正常人尿中马尿酸范围在 0.16~0.46mg/ml。

六、注意事项

1. 实验方法中的试剂加入顺序不能颠倒。当苯磺酰氯加完后应立刻进行振摇，各管振摇的强度和ación应控制一致。
2. 根据尿样颜色确定是否需要配尿样底色管。若颜色正常又经多倍稀，可免去此步骤。
3. 本法的检测限为 0.006g/L，线性范围为 0.04~1.60g/L（尿样稀释 1~4 倍），若测得浓度超过本法线性范围，尿样可作适当稀释。
4. 温度、样品含水量和振摇均能影响显色，操作时应严格控制。
5. 加苯磺酰氯后，反应时间不应少于 30min，此时显色才稳定。比色在 1h 内完成，效果较好。显色开始后各项操作应尽量在避光条件下进行。
6. 尿样应新鲜，其颜色深浅不影响比色结果，若过于混浊可加乙醇离心分离后再测定。

实验四 三氯化铁分光光度法测定全血胆碱酯酶活性

一、实验目的

1. 掌握三氯化铁测定全血胆碱酯酶活性的原理和注意事项。
2. 熟悉耳垂采血的方法和全血胆碱酯酶活性的测定方法。
3. 掌握测定全血胆碱酯酶活性的卫生学意义。

二、实验原理

在血液胆碱酯酶作用下，乙酰胆碱发生水解；剩余的乙酰胆碱与碱性羟胺反应生成乙酰羟胺，后者在酸性条件下，与三氯化铁反应生成红棕色羟肟酸铁配合物，呈色强度与剩

余乙酰胆碱的量成正比，在波长 520nm 处比色，间接测定血中胆碱酯酶活性。

三、实验材料

1. 仪器：分光光度计，比色皿，采血针头，恒温水浴箱，离心机，20 μ l 血红蛋白吸管，10ml 比色管，10ml 容量瓶。

1、试剂：实验用水为蒸馏水或具同等纯度的去离子水。

(1) pH 7.20 磷酸盐缓冲液：准确称取 8.36g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)和 1.36g 磷酸二氢钾(K_2HPO_4)，用水溶解并稀释成 500ml；冰箱保存。

(2) 碱性羟胺溶液：临用前，将 139g/L 盐酸羟胺溶液与 140g/L 氢氧化钠溶液等体积混合。

(3) 100g/L 三氯化铁溶液：称取 10g 三氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，加 0.84ml 盐酸溶液，加水溶解并稀释至 100ml。储存于棕色瓶中。

(4) 70 μ mol/L 氯化乙酰胆碱标准溶液：准确称取 1.2716g 氯化乙酰胆碱，用磷酸缓冲溶液溶解，稀释至 100ml。临用前，再稀释成 7.0 μ mol/L 乙酰胆碱标准液。

(5) 浓盐酸 (AR)：1+2 盐酸溶液。

四、实验方法

1. 样品的采集和处理：

用血色素管取 20 μ l 耳垂血，注入预先加入了 0.98ml 磷酸缓冲液的比色管中，立即测定。若不能立即测定，则用 0.5ml 静脉血，注入预先含肝素钠或草酸钾抗凝剂的比色管中，混匀，于冰箱内运输，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可保存 1 周。

2. 样品测定

(1) 标准曲线法

1) 标准曲线的绘制：取 6 支比色管，分别加入 0.0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00ml 标准溶液，加标准缓冲液至 1.0ml，各管加 1.0ml 水，配制成乙酰胆碱含量为 0.0、1.4、2.8、4.2、5.6、7.0 μ mol 的标准溶液系列。向各管中加入 4.0ml 碱性羟胺溶液，振摇 2min。加 2.0ml 盐酸溶液，振摇 2min。加 2.0ml 三氯化铁溶液，振摇，过滤。滤液于 520nm 处，以第 1 管为参比，测定吸光度值。以乙酰胆碱含量 (μ mol) 为横坐标，相应的吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。

2) 样品测定：取两支比色管，分别为 A 管和 B 管。分别向各管加入 0.98ml 水，20 μ l 血样。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 5 min。向 A 管中加入 1.0ml 乙酰胆碱标准溶液。自加入乙酰胆碱开始计时，在 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 准确反应 30min，每间隔 10min 振摇一次。取出比色管，各管

立即加入 4.0ml 碱性羟胺溶液，充分振摇 2min。同时，向 B 管加入 1.0ml 乙酰胆碱标准溶液，充分振摇。然后，A 和 B 管各加 2.0ml 盐酸溶液，振摇 2min。加 2.0ml 三氯化铁溶液，振摇，过滤。滤液于 520nm 处，测定吸光度。从 B 管吸光度减去 A 管吸光度，由标准曲线得被酶水解的乙酰胆碱的含量 C (μmol)；此值为 20 μl 血在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30min 条件下，胆碱酯酶活性绝对值。

(2)公式计算法：配制胆碱酯酶活性测定管：取 4 支比色管，在前 2 管中分别加入 0.98ml 磷酸缓冲液和 0.2ml 血，分别作为样品管 A 和对照管 B；在后 2 管中分别加入 1.0ml 磷酸缓冲液作为标准管 C 和空白管 D；将各管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 5min。按顺序向 A、C 管加入 1.0ml 乙酰胆碱标准溶液，B、D 管加入 1.0ml 水。自加乙酰胆碱开始计时，在 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 准确反应 30min，每间隔 10min 振摇一次。取出比色管，各管按同样顺序加入 4.0ml 碱性羟胺溶液，充分振摇 2min。各管加 2.0ml 盐酸溶液，振摇 2min。加 2.0ml 三氯化铁溶液，振摇，过滤。滤液于 520nm 处，以 D 管为参比，测定吸光度。按下列公式计算样品的酶活性绝对值 (μmol)。

$$C = \frac{(A_c + A_b - A_a)}{A_c} \times 7$$

C 为被酶水解的乙酰胆碱的浓度 (0.02ml 血，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30min)， μmol ； A_a 、 A_b 、 A_c 分别为 A、B、C 的吸光度值。

2、计算

按下式求出胆碱酯酶活性百分数。

$$Y = \frac{C}{C_0} \times 100\%$$

式中：

Y—血液中胆碱酯酶活性，%；

C—被酶水解的乙酰胆碱浓度， μmol ；

C_0 —正常人血液中胆碱酯酶活性绝对值 (0.02ml 血，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30min)， μmol 。

五、结果意义

有机磷酸酯类农药中毒时，主要是抑制胆碱酯酶活性，使其失去分解乙酰胆碱的能力，使乙酰胆碱在体内生理部位积聚，而引发以胆碱能神经过度兴奋为主要表现的神经系统功能紊乱。体内胆碱酯酶活性的抑制情况和临床症状的严重程度密切相关。所以，全血胆碱酯酶活性常作为急性机磷酸酯类农药中毒诊断和分级的重要标准之一。除相应的临床症状

外，急性轻度中毒时，全血胆碱酯酶活性一般在 50%~70%；急性中度中毒时，全血胆碱酯酶活性一般在 30%~50%；急性重度中毒时；全血胆碱酯酶活性一般在 30%以下。

六、注意事项

1. 采血时不应挤压耳垂。因为本法是同时测定真性胆碱酯酶和假性胆碱酯酶；选用的乙酰胆碱的浓度，对真性胆碱酯酶是适宜的。此时在测得的血液胆碱酯酶活性值中，真性胆碱酯酶占 85%，基本上只代表真性胆碱酯酶活性。如果过度挤压耳垂，采集的血样中假性胆碱酯酶和组织液所占的比例过多，使测定结果偏低。

2. 乙酰胆碱水解的温度和时间对测定结果影响很大，故应严格控制。同时测定多个样品时，应排出加入乙酰胆碱的顺序，务必使每个样品的反应时间为 30min 。

3. 加碱性羟胺和 1+2 盐酸时，必须严格控制振摇时间使反应彻底，否则影响测定结果。

4. 加三氯化铁溶液形成的棕色羟肟酸铁络合物易褪色，故必须在 20min 内比色完毕。大批样品分析时，可分批加入三氯化铁溶液。

5. 氯化乙酰胆碱基质不太稳定，故每次测定须作标准管。标准管的读数在同一台光度计上应保持恒定，或变动较小。

6. 计算胆碱酯酶活性百分数，应以本地区正常人全血胆碱酯酶活性为基准，各地区测定正常值，例数不应少于 30 人。

7. 本法最低检测浓度 $2.4\mu\text{mol}/(20\mu\text{l 血样})$ ，测定范围 $2.4\text{--}1000.0\mu\text{mol/L}$ 。

实验五 微量凯氏定氮法测定食品中蛋白质含量

一、实验目的

食物中蛋白质含量是评价食物蛋白质质量的最基本指标。因为食物中尚有尿素氮等非蛋白氮，故该法测定值为食物中蛋白质粗含量。该法还可以用于测定尿氮、粪氮，是计算食物蛋白质消化率和利用率的基础数据。通过本实验有助于了解微量凯氏定氮法测定蛋白质的原理、方法与意义，蛋白质系数在蛋白质含量计算中的应用，以及掌握该法的一般操作过程。

二、实验原理

有机物中的氮在强热和浓硫酸作用下，消化生成硫酸铵，在凯氏定氮器中与碱作用，通过蒸馏释放出氨气，释放的氨气采用硼酸液进行收集，再用已知浓度的盐酸标准溶液滴定，根据盐酸消耗量计算出氮含量，然后乘以相应的系数，计算得到蛋白质含量。

三、实验材料

1. 仪器

- 1) 凯氏定氮装置一套
- 2) 微量滴定管（10mL）一支
- 3) 100mL 三角烧瓶、100mL 容量瓶、10mL 锥形瓶
- 4) 吸管、毛细吸管及玻璃珠
- 5) 凯氏烧瓶、小漏斗及消化架
- 6) 微量滴定管（2mL）。

2. 试剂

- 1) 0.01N 盐酸标准液
- 2) 甲基红-亚甲基蓝混合指示剂
- 3) 浓硫酸
- 4) 10%硫酸铜溶液
- 5) 0.2%硼酸溶液
- 6) 20%氢氧化钠溶液
- 7) 硫酸钾

四、实验方法

1. 取样：准确称取食物样品 200mg。如样品含水量大，应先蒸发或烘干。
2. 消化：凯氏烧瓶内加玻璃珠数粒，一小匙 K_2SO_4 ，10% $CuSO_4$ 2mL 及浓硫酸 5mL，加入 100mL 的凯氏烧瓶；同时准备一份空白对照，摇匀。凯氏烧瓶置于电炉上加热，防止溶液起泡外溅，使样品全部溶于硫酸内。样品中泡沫消失后可适当调高消化温度，直至烧瓶内液体变为透明或淡蓝绿色为止。自然冷却。
 3. 定容：将液体全量转移至 100mL 容量瓶，凯氏烧瓶用蒸馏水冲洗数次，将洗液一并移入容量瓶。待溶液完全冷却后用蒸馏水定容至 100mL 刻度。
 4. 蒸馏：
 - 1) 吸取硼酸溶液 10mL 于锥形瓶中，加入两滴指示剂（甲基红-亚甲基兰混合指示剂）。将锥形瓶置于冷凝管下，氨气收集管口浸入硼酸液中。
 - 2) 准确吸取样品消化液 5mL、20% NaOH 5mL，从加样口进入反应室，少量蒸馏水冲洗加样口，迅速关闭加样口，并加少量蒸馏水封液，防止漏气。
 - 3) 酒精灯加热反应室外套，煮沸至硼酸吸收液变为蓝绿色为止，再加热 3 分钟，将氨气收集管口移出液面，继续加热两分钟，用水冲洗收集管口后移走锥形瓶。
 - 4) 移去热源，趁热从加样口加蒸馏水冲洗反应室三次。

5) 滴定：用 0.0109N 的 HCl 标准液滴定硼酸液，终点以绿色消失为准，终点稍过即为紫红色。

五、实验结果

样品蛋白质含量 (g/100g) = $[(V_2 - V_1) \times M \times 0.014 \times 6.25] \times 100 / (V_3 \times W / 100)$

M: HCl 标准液的摩尔浓度 (M)

V1: 空白滴定消耗 HCl 体积 (mL)

V2: 样品滴定 HCl 体积 (mL)

V3: 样品量 (mL)

W: 样品质量(g)

实习六 索氏提取法测定食品中脂肪含量

一、实验目的

掌握索氏提取法测定脂肪的原理和方法。

二、实验原理

在索氏抽取法中以有机溶剂（石油醚或无水乙醚）提取食物中脂肪。由提取前后的重量之差可测得食品中脂肪含量。应提请注意的是：（1）本法所测得结果为脂肪粗含量。因为除脂肪外，食物中可能还会含有色素及挥发油蜡、树脂等物质。（2）本法抽取所得的脂肪为游离脂肪酸，若测定游离及结合脂肪总量可以采用酸水解法。（3）一般用于谷物、肉类脂肪测定，不适用于奶脂的测定。

三、实验材料

1. 仪器

- (1) 索氏抽取器 (250mL)
- (2) 干燥器
- (3) 扁平称量瓶、表面皿
- (4) 恒温水浴锅
- (5) 经石油醚脱脂的滤纸袋
- (6) 分析天平

2. 试剂：石油醚

四、实验方法

1. 待测样品烘干预处理：称量待测样品烘干前后重量，并计算食物水份含量。

2. 用镊子夹取滤纸袋，准确称量 W，放入干燥器中备用。粗略称取约 2g 已经烘干预处理食物样品，戴手套拿滤纸袋，将样品加入，准确称量加入样品后的滤纸袋重 W1。

3. 将滤纸袋加入索氏提取器中，并加入石油醚（约为接收瓶容积的 2/3 的量），然后装上冷凝器和接收瓶置于 95℃ 恒温水浴锅内加热，提取 45 分钟（提取时间从脂肪回落至烧瓶中开始计时，一般应该 4~12 小时才能够提取完毕），用镊子夹取滤纸袋至洁净瓷盘中挥干 5~10 分钟。

4. 待石油醚挥干后放回原表面皿内，在 100℃~105℃ 的烘箱内烘烤 20 分钟，放入干燥器内冷却 10 分钟，再次准确称重 W2。

5. 回收石油醚并妥善保存。

五、实验结果

样品脂肪含量 (%) = $[(W1-W2) \times (1-\text{水份}\%)] \times 100 / (W1-W)$

六、注意事项

1. 将滤纸袋放入提取器后，添加石油醚的液面高度不能超过虹吸管顶端；在添加石油醚过程中应断电源，以免爆沸，不能一边加热回流一边添加石油醚。

2. 注意水分吸入：称重时动作宜快，称量完毕立即放入干燥器。

3. 有机溶剂易燃，注意防火。

实习七 硫氰酸钾法测定食品中铁含量

一、实验目的

掌握硫氰酸钾测定铁的实验原理及方法。

二、实验原理

样品中的血红素铁和非血红素铁经干消化后即可去除有机物，剩余即为三价铁的金属氧化物及无机盐。Fe³⁺在酸性环境中与 SCN⁻ 离子生成血红色络合物 Fe(SCN)₃，经比色测定，用标准曲线法计算出铁含量。

三、实验材料

1. 仪器

- (1) 高温电炉、电炉
- (2) 30mL 坩埚
- (3) 10mL 比色管
- (4) 吸管

2. 试剂

- (1) 2%高锰酸钾
- (2) 20%硫氰酸钾
- (3) 2%过硫酸钾浓硫酸
- (4) 铁标准溶液 (10ug/mL)

四、实验方法

1. 样品处理: 1g 待测食物样品和 H₂SO₄ 先微火加热再高温灰化, 然后用 6N HCl 溶解, 定容至 25mL。

2. 按以下表格配制各管, 用于制订标准曲线及样品测定。

表 4-4-1 铁标准曲线标准管和样品管的配制 (mL)

管号	0	1	2	3	4	5	样品
标准液	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	-
样品液	-	-	-	-	-	-	1.0
浓 H ₂ SO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
蒸馏水稀释至 5mL 刻度							
过硫酸钾	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
硫氰酸钾	2	2	2	2	2	2	2
蒸馏水定容至 10mL 刻度, 充分混匀							

3. 于 721 分光光度计 485nm 波长比色, 0 管调零, 绘制标准曲线, 从而查得样品对应的铁含量。

五、实验结果

$$\text{样品铁含量 (mg/100g)} = (Q \times V1 \times 100) / (W \times V2 \times 1000)$$

Q: 样品管中铁含量 (μg)

V1: 样品处理液定容数, 本次试验中为 25mL

V2: 从 V1 中取液量, 本次试验中为 1mL

M: 样品重量, 本次试验中为 1g

实验八 荧光分光光度法测定食品/尿中维生素 B₂

一、荧光分光光度法测定食品中维生素 B₂

一、实验目的

1. 了解荧光光度法测定核黄素的原理和方法，熟悉荧光光度计的使用。
2. 掌握食物中维生素 B2 营养价值的评价。

二、实验原理

核黄素溶液在 430-440nm 的蓝光照射下会发出黄绿色荧光，荧光峰为 535nm，在 pH6—7 的溶液中，它的荧光强度最大，在其它条件恒定时，稀溶液的荧光强度与荧光物质的浓度成正比，即 $C=k \cdot A$ 成立。因此，通过标准（工作）曲线确定上述数量关系的基础上，测定样品溶液的荧光强度，就能确定该溶液中荧光物质的含量。同时，核黄素可被 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 还原为非荧光性物质，利用这一特点可消除其它某些荧光物质的干扰，基于上述性质建立了核黄素的荧光测定法。

三、实验材料

1. **仪器**：荧光光度计，高压消毒锅，电热恒温培养箱，核黄素吸附柱核黄素吸附柱（如图 4-6-1）

图 4-6-1

图 4-6-1 核黄素吸附柱

2. 试剂

- 2.1 硅镁吸附剂：60~100 目。
- 2.2 2.5mol/L 无水乙酸钠溶液。
- 2.3 10%木瓜蛋白酶：用 2.5mol/L 乙酸钠溶液配制。使用时现配制。
- 2.4 10%淀粉酶：用 2.5mol/L 乙酸钠溶液配制。使用时现配制。
- 2.5 0.1mol/L 盐酸。
- 2.6 1 mol/L 氢氧化钠。
- 2.7 0.1mol/L 氢氧化钠。
- 2.8 20%低亚硫酸钠溶液：此液同时配配。保存在冰水浴中，4h 内有效。
- 2.9 洗脱液：丙酮：冰乙酸：水（5:2:9）。
- 2.10 0.04%溴甲酚绿指示剂：0.04%溴甲酚绿指示剂：称取 0.1g 溴甲酚绿于小研钵中，加 1.4mL 0.1mol/L 氢氧化钠溶液研磨，加少许水，继续研磨，直至完全溶解。用水稀释至 250mL。

2.11 3%高锰酸钾溶液。

2.12 3%过氧化氢溶液。

2.13 核黄素标准液的配制。(纯度 98%)。

2.13.1 核黄素标准储备液 (25 μ g/mL): 将标准品核黄素粉状结晶置于真空干燥器或盛有硫酸的干燥器中。经过 24h 后, 准确称取 50mg, 置于 2L 容量瓶中, 加入 2.4mL 冰乙酸和 1.5L 水。将容量瓶置于温水中摇动, 待其溶解, 冷至室温, 稀释至 2L, 移至棕色瓶内, 加少许甲苯盖于溶液表面, 于冰箱中保存。

2.13.2 核黄素标准使用液: 吸取 2.00mL 核黄素标准储备液, 置于 50mL 棕色容量瓶中, 用水稀释至刻度。避光, 贮于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 可保存一周。此溶液每毫升相当于 1.00 μ g 核黄素。

四、实验方法

1. 食物样品处理: 将样品用磨粉机、研钵磨成粉末或用打碎机打成匀浆。称取 2-10g 食物 (约含 10~200 μ g 核黄素) 于锥形瓶中, 加入 50ml 的 0.1mol/L 的盐酸, 搅拌样品充分分散, 置于 6.8Kg (15 磅) 高压锅内水解样品 30min。冷却后用 4%的氢氧化钠调 pH 至 4.5 (取少许水解液, 用溴甲酚绿检验, 溶液呈草绿色即可)。

2. 酶解样品: 食物样品中的淀粉和蛋白质均需要去除。富含淀粉的食物加入 3ml 的 10% 淀粉酶溶液, 于 37~40 $^{\circ}$ C 保温 16h, 富含蛋白质的食物加入 3ml 的 10%木瓜蛋白酶溶液, 于 37~40 $^{\circ}$ C 保温 16h。水解完成后定容至 100ml, 过滤备用 (4 $^{\circ}$ C 可以保存一周)。对于脂肪量高的食物, 可用乙醚提取, 以除去脂肪。

3. 氧化去杂质: 视样品中核黄素的含量取一定体积的样品提取液及核黄素标准使用液 (约含 1~10 μ g 核黄素) 分别于 20mL 的带盖刻度试管中, 加水至 15mL。各管加 0.5mL 冰乙酸, 混匀。加 3%高锰酸钾溶液 0.5mL, 混匀, 放置 2min, 使氧化去杂质。滴加 3%双氧水溶液数滴, 直至高锰酸钾的颜色褪掉。剧烈振摇此管, 使多余的氧气逸出。

4. 核黄素的吸附和洗脱

4.1 核黄素吸附柱: 硅镁吸附剂约 1g 用湿法装入柱, 占柱长 1/2~2/3 (约 5cm) 为宜) 吸附柱下端用一小团脱脂棉垫上), 勿使柱内产生气泡, 调节流速为 60 滴/min。

4.2 过柱与洗脱: 将全部氧化后的样液及标准液通过吸附柱后, 用约 20mL 热水洗去样液中的杂质, 然后用 5.00mL 洗脱液将样品中核黄素洗脱并收集于一带盖 10mL 刻度试管中, 再用水洗吸附柱, 收集洗出之液体并定容至 10, 混匀后待测荧光。

5. 测定

5.1 于激发光波长 440nm, 发射光波长 525nm, 测量样品管及标准管的荧光值。

5.2 待样品及标准的荧光值测量后，在各管的剩余液（约 5~7mL）中加 0.1mL20%低亚硫酸钠溶液，立即混匀，在 20s 内测出各管的荧光值，作为各自的空白值。

6. 计算

$$x_2 = \frac{(A - B) \times S}{(C - D) \times M} \times f \times \frac{100}{1000}$$

式中：X₂——样品中含核黄素的量，mg/100g；

A——样品管荧光值；

B——样品管空白荧光值；

C——标准管荧光值；

D——标准管空白荧光值；

f——稀释倍数；

m——样品的质量，g；

S——标准管中核黄素含量，μg；

$\frac{100}{1000}$ ——将样品中核黄素量由 μg / g 折算成 μg / 100g 的折算系数。

五、实验结果

该测定结果可以和同类食品比较，分析和比较该食物核黄素的营养价值。

六、注意事项：

因核黄素易被日光和紫外线破坏，故一切操作要在暗室内进行。

过氧化氢不宜多加，因其会产生气泡影响比色。

如加入高锰酸钾后有因氧化锰导致的溶液浑浊，可以离心处理。

玻璃器材不能用皂粉等洗涤，

二、荧光分光光度法测定负荷尿中维生素 B₂

一、教学目标：

1. 了解负荷试验评价维生素 B₂ 的原理和方法。

二、实验原理：

（参见食品中核黄素测定）

三、仪器与试剂

1， 仪器：荧光光度计

2、试剂

2.1 20%低亚硫酸钠溶液：此液同时配配。保存在冰水浴中，4h 内有效。

2.2 核黄素标准液的配制。

2.2.1 核黄素标准贮备液（100ml/L）：精确称取 100ml 核黄素，用少量 1%醋酸溶解，需要时可加热助溶，溶解后转移至 1000ml 容量瓶中，再用 1%的醋酸稀释至刻度，移至棕色瓶中备用。

2.2.3 核黄素标准应用液（10ml/L）：精确吸取 100ml 核黄素标准贮备液 5ml，置于 50ml 容量瓶中，用 1%醋酸稀释至刻度，此溶液临用时配制。。

2.3 酸性水：取浓硫酸 3ml，加水至 2000ml。

四、操作步骤

1、样品采集：口服核黄素 5mg，收集四小时尿液总量，记录总尿液体积，备用。

2、配制标准系列：取 8 只 20ml 比色管（或容量瓶）分别编上号码，按表 4-6-1 配制标准系列。

表 4-6-1 标准液配制表

编号	0	1	2	3	4	5	6	7
尿样（ml）	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
核黄素标准液 （10ml / L）体积（ml）	0.00	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00

最后用酸性水稀释至 20.0ml 刻线。

3、测定

3.1 将配制好的标准系列，按浓度从低到高依次逐一置“测量池”中，测出荧光强度，记下读数分别为 F_n 、 F_1 、 F_2 F_7 。

3.2 在测过 F_a 的“0”号管中，加低亚硫酸钠溶液 8—10ml，轻轻摇动试管至低亚硫酸钠溶液完全溶解，再测一次荧光强度，记下读数为 F_B 。

4、结果计算

1. 绘制标准曲线：以测得各管的荧光强度（ F_n — F_B ）作纵坐标，以各管中加入标准液量作横标绘制 F — C 标准曲线。

2. 用外推法求出尿样中核黄素的含量，乘以服药后 4h 尿液总量，即得尿中核黄素含量（ $\mu\text{g}/4\text{h}$ ）。

五、结果意义：

若 4h 尿液测得核黄素含量低于 350 μg ，为核黄素缺乏症，口服核黄素 5mg 后 4h 尿中排出 1250 μg 为饱和。

六、注意事项:

1, 因核黄素易被日光和紫外线破坏, 故一切操作要在暗室内进行。

2, 如果尿液浑浊, 可以将尿液按 1:19 稀释, 过硅镁层析柱 (参见食品中核黄素测定) 后在进行测定。

实验九 食用油脂的卫生检验

一、实验目的

熟悉食用油脂的卫生标准, 掌握反映食用油脂卫生的理化指标的测定方法。

二、检验项目

(一) 感官检查

1. 色泽

(1) 仪器

烧杯: 直径 50mm, 杯高 100mm。

(2) 分析步骤

将样品混匀并过滤, 然后倒入烧杯中, 油层高度不得小于 5mm, 在室温下先对着自然光观察, 然后再置于白色背景前借其反射光线观察并按下列词句记述: 白色、灰白色、柠檬色、黄色、橙色、棕黄色、棕红色、棕褐色等。

2. 气味及滋味

分析步骤: 将样品倒入 150mL 烧杯中, 置于水浴上, 加热至 50 $^{\circ}\text{C}$, 以玻璃棒迅速搅拌。嗅其气味, 并蘸取少许样品, 辨尝其滋味, 然后按正常、焦糊、酸败、苦辣等词句记述。

(二) 理化指标

1. 酸价

(1) 原理

植物油中的游离脂肪酸用氢氧化钾标准溶液滴定, 每克植物油消耗氢氧化钾的毫克数, 称为酸价。

(2) 试剂

① 乙醚-乙醇混合液: 按乙醚-乙醇 (2+1) 混合。用氢氧化钾溶液 (3g / L) 中和至酚酞指示剂呈中性。

②氢氧化钾标准滴定溶液：[c (KOH) =0.05mol/L]。

③酚酞指示剂：10g / L 乙醇溶液。

(3) 分析步骤

准确称取 3.00~5.00g 样品，置于锥形瓶中，加入 50ml 中性乙醚-乙醇混合液，振摇使油溶解，必要时可置热水中，温热促其溶解。冷至室温，加入酚酞指示剂 2~3 滴，以氢氧化钾标准滴定溶液 (0.05mol / L) 滴定，至初现微红色，且 0.5min 内不褪色为终点。

(4) 结果计算:

$$\text{公式1: } X_1 = \frac{V_1 \times c_1 \times 56.11}{m_1}$$

式中:

X_1 : 样品的酸价;

V_1 : 样品消耗氢氧化钾标准滴定溶液体积, mL;

c_1 : 氢氧化钾标准滴定溶液的实际浓度, mol / L;

m_1 : 样品质量, g;

56.11: 与1.0mL氢氧化钾标准滴定溶液[c (KOH) = 1.000mol / L]相当的氢氧化钾毫克数。

2.过氧化值

(1) 原理

油脂氧化过程中产生过氧化物，与碘化钾作用，生成游离碘，以硫代硫酸钠溶液滴定，计算含量。

(2) 试剂

①饱和碘化钾溶液：称取 14g 碘化钾，加 10mL 水溶解，必要时微热使其溶解，冷却后贮于棕色瓶中。

②三氯甲烷-冰乙酸混合液：量取 40ml 三氯甲烷，加 60ml 冰乙酸，混匀。

③硫代硫酸钠标准确定溶液 [C (Na₂S₂O₄) =0.002mol/L]。

④淀粉指示剂 (10g / L)：称取可溶性淀粉 0.5g，加少许水，调成糊状，倒入 50ml 沸水中调匀，煮沸。临用时现配。

(3) 分析步骤

称取 2.00~3.00g 混匀 (必要时过滤) 的样品，置于 250ml 碘瓶中，加入 30ml 三氯甲烷-冰乙酸混合液，使样品完全溶解。加入 1.00mL 饱和碘化钾溶液，紧密塞好瓶盖，并轻轻

振摇 0.5min, 然后在暗处放置 3min。取出加 100mL 水, 摇匀, 立即用硫代硫酸钠标准滴定溶液 (0.002mol / L) 滴定, 至淡黄色时, 加 1ml 淀粉指示剂, 继续滴定至蓝色消失为终点, 取相同量三氯甲烷-冰乙酸混合液、碘化钾溶液、水, 按同一方法, 作试剂空白实验。

(4) 结果计算:

$$\text{公式2: } X_2 = \frac{(V_2 - V_3) \times c_2 \times 0.1269}{m_2} \times 100$$

$$\text{公式3: } X_3 = X_2 \times 78.8$$

式中:

X_2 : 样品的过氧化值, $g/100g$;

X_3 : 样品的过氧化值, meq/kg ;

V_2 : 样品消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液体积, mL ;

V_3 : 试剂空白消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液体积, mL ;

c_2 : 硫代硫酸钠标准滴定溶液的浓度, mol/L ;

m_2 : 样品质量, g ;

0.1269: 与1.00mL硫代硫酸钠标准滴定溶液 [$c(Na_2S_2O_4) = 1.000mol/L$] 相当的碘的质量, g ;

78.8: 换算因子。

实验十 气相色谱法和品红亚硫酸法测定酒中甲醇

一、酒中甲醇测定 (品红亚硫酸法)

一、教学目标

1. 了解酒中甲醇的来源途径。
2. 掌握酒中甲醇测定的一般方法。
3. 掌握甲醇主要毒性作用和卫生学意义。

二、实验原理

酒中甲醇在磷酸溶液中被高锰酸钾氧化成甲醛, 过量的高锰酸钾及在反应中产生的二氧化锰用硫酸草酸溶液除去, 甲醛与品红亚硫酸作用生成蓝紫色醞型色素, 与标准系列比较定量。

三、仪器与试剂

1. 仪器

1.1 分光光度计

1.2 恒温水浴锅

2. 试剂

2.1. 高锰酸钾—磷酸溶液 称取 3g 高锰酸钾，加入 15ml 85% 磷酸溶液及 70ml 水的混合液中，待高锰酸钾溶解后用水定容至 100ml。贮于棕色瓶中备用。

2.2. 草酸—硫酸溶液 称取 5g 无水草酸 ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 或 7g 含 2 个结晶水的草酸 ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，溶于 1:1 冷硫酸中，并用 1:1 冷硫酸定容至 100ml。混匀后，贮于棕色瓶中备用。

2.3. 品红亚硫酸溶液 称取 0.1g 研细的碱性品红，分次加水 (80℃) 共 60ml，边加水边研磨使其溶解，待其充分溶解后滤于 100ml 容量瓶中，冷却后加 10ml (10%) 亚硫酸钠溶液，1ml 盐酸，再加水至刻度，充分混匀，放置过夜。如溶液有颜色，可加少量活性炭搅拌后过滤，贮于棕色瓶中，置暗处保存。溶液呈红色时应弃去重新配制。

2.4. 甲醇标准溶液 准确称取 1.000g 甲醇 (相当于 1.27ml) 置于预先装有少量蒸馏水的 100ml 容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。此溶液每毫升相当于 10mg 甲醇，置低温保存。

2.5. 甲醇标准应用液 吸取 10.0ml 甲醇标准溶液置于 100ml 容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。此溶液每毫升相当于 1mg 甲醇。

2.6. 无甲醇无甲醛的乙醇制备 取 300ml 无水乙醇，加高锰酸钾少许，振摇后放置 24 小时，蒸馏，最初和最后的 1/10 蒸馏液弃去，收集中间的蒸馏部分即可。

2.7. 10% 亚硫酸钠溶液

四、操作步骤

1. 根据待测白酒中含乙醇多少适当取样 (含乙醇 30% 取 1.0ml; 40% 取 0.8ml; 50% 取 0.6ml; 60% 取 0.5ml) 于 25ml 具塞比色管中。

2. 精确吸取 0.0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00ml 甲醇标准应用液 (相当于 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg 甲醇) 分别置于 25ml 具塞比色管中，各加入 0.3ml 无甲醇无甲醛的乙醇。

3. 于样品管及标准管中各加水至 5ml，混匀，各管加入 2ml 高锰酸钾—磷酸溶液，混匀，放置 10min。

4. 各管加 2ml 草酸—硫酸溶液，混匀后静置，使溶液褪色。

5. 各管再加入 5ml 品红亚硫酸溶液，混匀，于 20℃ 以上静置 0.5h。

6. 以 0 管调零点，于 590nm 波长处测吸光度，与标准曲线比较定量。

(五) 结果计算

$$X = \frac{m}{V \times 1000} \times 100$$

式中：X--- 样品中甲醇的含量，g/100ml

m--- 测定样品中所含的甲醇相当于标准的毫克数，mg

V---样品的取样体积

五、结果意义：

通过查阅文献，依据国家最新的颁布的限量标准对所测样品中的甲醇含量作出相应的卫生学评价。

六、注意事项

1. 亚硫酸品红溶液呈红色时应重新配制，新配制的亚硫酸品红溶液放冰箱中 24~48 小时后再用为好。

2. 白酒中其他醛类以及经高锰酸钾氧化后由醇类变成的醛类（如乙醛、丙醛等），与品红亚硫酸作用也显色，但在一定浓度的硫酸酸性溶液中，除甲醛可形成经久不褪的紫色外，其他醛类则历时不久即行消退或不显色，故无干扰。因此操作中时间条件必须严格控制。

3. 酒样和标准溶液中的乙醇浓度对比色有一定的影响，故样品与标准管中乙醇含量要大致相等。

二、酒中甲醇测定（气相色谱法）

一、教学目标

1. 了解气相色谱仪（FID）的使用方法。
2. 掌握内标法定量的原理。
3. 了解气相色谱法在产品质量控制中的应用。

二、实验原理

试样被气化后，随同载气进入色谱柱，由于不同组分在流动相（载气）和固定相间分配系数的差异，当两相作相对运动时，各组分在两相间经多次分配而被分离。利用气相色谱可分离、检测白酒中的甲醇含量。在相同的操作条件下，分别将等量的试样和含甲醇的标准样进行色谱分析，由保留时间可确定试样中是否含有甲醇，比较试样和标准样中甲醇峰的峰面积，可确定试样中甲醇的含量。

内标法是一种间接或相对的校准方法。在分析测定样品中某组分含量时，加入一种内标物质以校准和消除出于操作条件的波动而对分析结果产生的影响，以提高分析结果的准确度。内标物应当是一个能得到纯样的已知化合物，这样它能以准确、已知的量加到样品中去，它应当和被分析的样品组分有基本相同或尽可能一致的物理化学性质(如化学结构、极性、挥发度及在溶剂中的溶解度等)、色谱行为和响应特征，最好是被分析物质的一个同系物。

当然，在色谱分析条件下，内标物必须能与样品中各组分充分分离。在用内标法做色谱定量分析时，先配制一定重量比的被测组分和内标样品的混合物做色谱分析，测量峰面积，做重量比和面积比的关系曲线，此曲线即为标准曲线。

三、仪器与试剂

1. 仪器

1.1 气相色谱仪，火焰离子化检测器。

1.2 色谱柱：HP-5（30m×0.32mm×0.25μm）

1.3 1μL 微量注射器

2. 试剂

2.1 甲醇（色谱纯）

2.2 无甲醇的乙醇，制备方法参见品红亚硫酸法中的描述。

四、操作步骤

1. 样品前处理方法：酒样稀释 3 倍，添加内标 4-甲基-2 戊醇（浓度为 161.6mg/L）。

2. 甲醛标准溶液的配制：用体积分数为 15%的乙醇水溶液为溶剂，分别配制浓度为 189.50mg/L、401.12mg/L 和 601.68mg/L 的甲醇标准溶液。

3. 测定甲醛标准液和样品：进样量为 0.5μl，气相色谱程序为：35℃保持 4min，以 10℃/min 升温至 150℃，保持 10min，在以 20℃/min 升温至 220℃，并保持 10min。

4. 以甲醇色谱峰面积和内标物质色谱峰面积之比为纵坐标，甲醇含量和内标物质含量之比为横坐标绘制标准曲线和计算回归方程，根据样品甲醇峰面积和内标物质色谱峰面积之比，计算样品中的甲醇含量和内标物质含量之比 R。

5. 结果计算

$$C(\text{g/L}) = (A \times R \times D) \div 1000$$

式中：C——白酒样品中甲醇的质量浓度。

A——白酒样品稀释倍数。

R——甲醇含量和内标物质质量之比。

D——内标物质的浓度。

五、结果意义

通过查阅文献，依据国家最新的颁布的限量标准对所测样品中的甲醇含量作出相应的卫生学评价。

六、注意事项

酒中的醛类以及经高锰酸钾氧化其他醇生成的醛（乙醛、丙醛等），与亚硫酸品红作用也显色。但是在一定浓度的硫酸酸性下，除甲醛可以形成经久不变的紫色外，其他醛所形成的色泽会慢慢消退。因此必须严格遵守显色半小时后，测定吸光度的规程。

实习十一 纸层析法测定饮料中人工合成色素

一、实验目的

1. 了解食品中常见合成色素的类型。
2. 熟悉纸层析法操作方法。
3. 掌握纸层析法进行定性、定量检测食品中合成色素的原理。

二、实验原理

聚酰胺是一种高分子化合物，又称“尼龙 6”，在酸性条件下聚酰胺可吸附色素，使与食品中其他成分分离，经过滤、洗涤，并在碱性溶液中解吸后用纸层析法进行分离鉴别，并与标准比较予以定性和半定量。

纸层析法又称纸上层析，是以滤纸作惰性支持物的分配层析法。层析溶剂由有机溶剂和水组成。纸纤维上的 OH 一具有亲水性，因此能吸附一定的水作为固定相，而有机溶剂作为流动相。由于不同物质的极性不同，随流动相迁移的距离不同，所以可将混合物分离开来。物质被分离后在纸层析图谱上的位置是用 Rf 值(比移值)来表示的。Rf 值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、层析滤纸的质量和层析温度等因素有关。

三、实验材料

1. 仪器

- (1) 纸层析装置 展层缸（可用标本缸代替）、中速层析滤纸（勿皱折）
- (2) 样品处理的器材 恒温水浴；白瓷蒸发皿；研钵；G3 玻砂垂熔漏斗及抽滤装置；电吹风等。
- (3) 点样装置 血红蛋白吸管或微量注射器

2. 试剂

- (1) 聚酰胺粉（尼龙 6）200 目，使用前于 100℃活化 1h，放冷密塞备用。
- (2) 常用定性展开剂（临用前配制）
 - 1) 正丁醇+无水乙醇+1%氨水（6+2+3）
 - 2) 快速展开剂：氯化钠 0.25g 加浓氨水（比重 0.9）2ml 加蒸馏水至 200ml。

- 3) 正丁醇+吡啶+1%氨水 (6+3+4)
- 4) 甲乙酮+丙酮+水 (7+3+3)
- (3) 定量展开剂
 - 1) 正丁醇+吡啶+5%氨水 (6+6+4, 适用于分离靛蓝)
 - 2) 2.5%柠檬酸钠+浓氨水 (4+3, 适用于分离柠檬黄)
 - 3) 甲醇+乙二胺+浓氨水 (10+3+4, 适用于分离胭脂红和苋菜红)
 - (4) 乙醇-氨溶液: 取 1ml 氨水, 加 70%乙醇至 100ml
 - (5) 200g/L 柠檬酸 取分析纯柠檬酸 20g 加蒸馏水溶解, 并稀释至 100ml
 - (6) pH6 的水 (用 200g/L 柠檬酸调节至 pH6)
 - (7) 50%的乙醇溶液
 - (8) 甲醇-甲酸溶液 (6+4)
 - (9) 1+10 硫酸 取分析纯浓硫酸 10ml, 慢慢加入 100ml 蒸馏水中, 放冷即可
 - (10) 甲醇-氢氧化钠 1g 氢氧化钠溶于 70%甲醇 1000ml
 - (11) 2.5%柠檬酸钠溶液: 取分析纯柠檬酸钠 2.5g 加蒸馏水溶解, 并稀释至 100ml
 - (12) 淀粉酶
 - (13) 石油醚: 沸程 90°C~120°C。
 - (14) 海砂 (过 20 目筛, 经酸碱处理和漂洗)
 - (15) 10%钨酸钠溶液
 - (16) 色素标准贮备液 (1 mg / ml): 精确称取商品色素 (诱惑红、苋菜红、胭脂红、赤藓红、新红、日落黄、柠檬黄、靛蓝、亮蓝等) 各 0.100g, 分别用 pH6 的水溶液, 各移入 100ml 容量瓶中稀释至刻度。
 - (17) 色素标准应用液 (0.1mg / ml): 临用时准确吸取 0.1%色素标准贮备液 10ml 于 100ml 容量瓶中, 加 pH6 的水稀释至刻度。

四、操作步骤

1. 样品前处理

- (1) 果子露、汽水类样品: 精确取样品 50ml (或 25ml) 于 100ml 烧杯中, 汽水需在小火上加热驱除 CO₂。
- (2) 配制酒: 取样品 50ml (或 25ml) 于 100ml 烧杯中, 在小火上加热驱除酒精。
- (3) 硬糖、蜜饯类: 称取粉碎混匀样品 5g (或 10g), 加水 30ml 加热溶解。若样品 pH 较高, 用 200g/L 柠檬酸溶液调至 pH4 左右。

(4) 含淀粉制品如淀粉软糖等：称取粉碎均匀样品 10g，加水 50ml 加热溶解，用 200g/L 柠檬酸调匀，于 88~90℃ 加淀粉酶溶液 5ml，搅匀后保温 5~10min，溶液澄清后取出。

(5) 含奶制品如奶糖、蛋糕等：称取粉碎均匀样品 10g。加海砂少许用热风吹干。加石油醚 30ml 搅拌，放置片刻，倾出石油醚，以除去脂肪。如此重复处理 3 次，再用电风吹干，研成细粉，全部移入 G3 玻砂垂熔漏斗中，通过缓慢抽滤，用乙醇-氨提取色素，用玻棒搅动漏斗中内容物，直至色素全部提取完毕。立即用 1+10 硫酸调至微酸性多加 1ml，置水浴上浓缩至约 20ml，加 100g/L 钨酸钠溶液 1ml，使蛋白质沉淀。用 G3 玻砂垂熔漏斗慢慢抽滤，少量水洗，收集洗滤液。

2. 吸附去杂质：称取聚酰胺粉 1g 置小烧杯中，直接倒入（加少量水调成糊状后倒入）前处理的 70℃ 样品中，充分搅拌，使样液的色素全部被吸附（聚酰胺不足时可补加直至完全吸附），将吸附色素的聚酰胺粉全部移入 G₃ 玻砂垂熔漏斗，抽滤，用 pH4（200g/L 柠檬酸溶液酸化）的 70℃ 热蒸馏水约 200ml 分多次洗涤，边洗边搅拌。如果样品中含天然色素则用甲醇-甲酸液反复洗涤，每次 20ml，以除去天然色素。再用 70℃ pH4 的热蒸馏水 300ml 分多次洗涤直至洗液 pH 为中性为止（洗涤过程中必须充分搅拌，使所用的各洗涤液与聚酰胺粉充分接触）。

3. 解吸附：用乙醇-氨溶液 15ml 分 3 次解吸色素，解吸过程时时搅拌直至滤出液无色为止并收集全部解吸液。

4. 浓缩：将色素解吸液置于蒸发皿中置 80℃ 水浴上浓缩至 4ml（或 0.5ml），转入 5ml 刻度试管中（或 2ml 刻度试管），用少量 50% 乙醇洗涤蒸发皿，洗液并入刻度试管中至 5ml 刻度（或 2ml 刻度）。

5. 纸层析：取中速层析滤纸（20cm×15cm），在距底边 2cm 的基线上点样，各点间距 2cm，点样直径不超过 0.5cm，点样量 5~20μl。同时根据样液颜色点上色素标准溶液（1mg/ml）点做对照。将点好的滤纸挂于装有展开剂的展开槽中进行展开（展开前层析缸及滤纸先用相应的溶剂系统平衡 10min 后再展开）。待溶剂前沿到达离起始线 12cm 处，将滤纸取出于空气中晾干，测量各色素的 R_f 值（也可将样液与疑似标准色素点在同一点上，展开后以观察斑点是否重合）。

$$\text{Rf 值（比移值）} = \frac{\text{斑点移动距离}}{\text{溶剂前沿距离}}$$

以样品展开的各色素斑点的 R_f 值与同样条件下展开的标准色素斑点的 R_f 值对比，即可确定样品的色素为何种色素，进行定性分析。

6.定量测定：①剪下纸色谱的条状色斑并剪成碎片，用少量热水多次洗涤溶解层析滤纸上的色素，洗液移入 10ml 比色管中，冷后加水至刻度，此液作比色测定用。②分别吸取 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0ml 胭脂红、苋菜红、柠檬黄、日落黄色素标准应用液或 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml 亮蓝、靛蓝色素标准应用液，分别置于 10ml 比色管中，各加水稀释至刻度。③色素标准系列与样品洗出液在一定波长下（胭脂红 510nm，苋菜红 520nm，柠檬黄 430nm，日落黄 482nm，亮蓝 627nm，靛蓝 620nm）测定吸光度，分别绘制标准曲线或拟合回归方程，查出测定样液中色素的含量（A），计算样品色素含量（X）。

五、结果意义

1.计算

$$\text{样品中色素含量 (g / kg 或 g / L)} = \frac{A}{m \times \frac{V_2}{V_1}}$$

式中 A：测定样液中色素的含量（mg）

m：样品质量或体积（g 或 ml）

V₁：样品解吸后总体积（ml）

V₂：样液点纸体积（ml）

2.结果意义

根据定性分析结果，可以确定样品中是否存在色素以及是何种色素。

根据定量分析结果，可以确定样液中色素的含量，并可以与有关标准进行比较。

六、注意事项

1. 吸附时要求一定的温度与时间，因为分子中酰胺链能与色素中磺酸基以氢键的形式结合。聚酰胺吸附酸性色素的条件是：温度：70~80℃，pH 值为 4 左右，作用时间 5~10min，操作时需注意掌握。聚酰胺粉在样品中吸附色素后需 70~80℃热蒸馏水洗涤，以去除可溶性杂质，蒸馏水保持酸性（pH=4）以防部分色素解吸附。

2. 样液在加聚酰胺粉吸附前，不可过浓，因为国产色素都是色素钠盐，水少时钠离子与磺酸基不易解离，不易被聚酰胺粉吸附。因聚酰胺是高分子化合物，在酸性介质中才能吸附酸性色素，为防止色素分解，水要保持酸性。

3. 样液前处理及提纯过程应充分去除杂质（油脂、蛋白、糖）、酸类（脂酸）、醇类（乙醇、甘油等），以免影响吸附及层析分离效果。如水溶性成分（糖、盐、甜味剂、香精等）可在吸附色素后抽滤时，用酸性热水洗涤去除。明胶果胶也可通过大量热水洗除。油脂类用

丙酮或石油醚冲洗脱脂，油脂含量高者，可在研钵中加丙酮等研磨或用索氏脂肪抽提器除去，蛋白质及淀粉可用 10% 钨酸钠及淀粉酶水解后除去，天然色素可用甲醇—甲酸洗去。

4. 层析用纸不可折皱，应顺纹上行展开。

5. 玻砂垂熔漏斗用完后立即冲洗，可先用 10—20ml 盐酸少量多次冲洗几遍，再用清水及蒸馏水洗净。

实验十二 高效液相色谱法测定饮料中糖精钠、苯甲酸和山梨酸

一、实验目的

1. 了解饮料中糖精钠、苯甲酸和山梨酸测定的卫生学意义
2. 熟悉高效液相色谱仪的原理及其使用方法。
3. 掌握高效液相色谱法测定饮料中糖精钠、苯甲酸和山梨酸的基本原理和方法。

二、实验原理

样品加温除去二氧化碳，调 pH 至近中性，过滤后进高效液相色谱仪，经反向 C₁₈ 液相色谱分离后，紫外检测器检测，根据保留时间和峰面积进行定性和定量分析。

三、实验材料

高效液相色谱仪附紫外检测器；超声波清洗器；pH 广泛试纸；0.45 μ m 亲水性微孔滤膜。

5.0mg/ml 苯甲酸标准储备溶液：准确称取 0.2500g 苯甲酸，加碳酸氢钠溶液 25ml，加热溶解，移入 50ml 容量瓶中，并稀释至刻度。

5.0mg/ml 山梨酸标准储备溶液：准确称取 0.2500g 山梨酸，加碳酸氢钠溶液 25ml，加热溶解，移入 50ml 容量瓶中，并稀释至刻度。

10.0mg/ml 糖精钠标准储备溶液：准确称取 0.4255g 经 120℃ 烘干 4 小时后的糖精钠 (C₆H₄CONNaSO₂·2H₂O) 加水溶解定容至 50ml。

0.5mg/ml 苯甲酸、0.5mg/ml 山梨酸、1.0mg/ml 糖精钠标准混合使用液：各取标准储备液 5.0ml 于 50ml 容量瓶中，加水定容。

0.02mol/L 乙酸铵溶液：称取乙酸铵 0.771g，用水溶解并定容至 500ml 容量瓶中。稀氨水 (1+1)；20g/L 碳酸氢钠溶液；色谱纯甲醇。

以上所用水为去离子水，所用试剂除知名外均为分析纯 (AR)。

四、实验方法

1. 样品处理

取 10ml 汽水，放入小烧杯中，微温搅拌除去二氧化碳，用稀氨水调 pH 约为 7。加水定

容至 50ml，经 0.45 μ m 滤膜过滤，取 20 μ l 样品滤液进样，得样品溶液色谱图，进行定量分析。

2.测定

参考色谱条件：C₁₈ 色谱柱，150mm \times 6.0mm（内径）；流动相：甲醇+0.02mol/L 乙酸铵（12+18）；流速 1ml/min；检测波长：UV230nm；进样量：20 μ l。

取标准混合溶液 0.250、0.50、1.0、2.0、4.0ml 于 10ml 容量瓶中，定容。标准系列浓度分别为苯酸钾、山梨酸 12.50、25.0、50.0、100.0、200.0 和糖精钠 25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 μ g/ml。每管均进样 20 μ l，在上述色谱条件进行 HPLC 分离测定。以各标准溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线或进行线性回归。

五、结果意义

1.计算

用标准曲线法进行定量，以样品的峰面积在标准曲线上查出相应的苯甲酸、山梨酸、糖精钠含量，再根据取样量和稀释倍数计算出样品中的含量。

$$X = \frac{c \times V_0}{V \times 1000}$$

式中：X 为样品中苯甲酸或山梨酸或糖精钠的含量，mg/ml；c 在标准曲线上查出相应的苯甲酸、山梨酸、糖精钠含量， μ g/ml；V₀ 样品定容体积，ml；V 为取样体积，ml。

2.结果意义

（1）国家标准允许最大使用量：苯甲酸、山梨酸 \leq 0.2g/kg，糖精钠 \leq 0.15g/kg。

六、注意事项

1.如果被测溶液含有气泡，对测定和仪器的使用均有影响，因此需将被测样液微温搅拌除去二氧化碳。

2.被测溶液 pH 值对测定和色谱柱使用寿命均有影响，pH $>$ 8 或 pH $<$ 2 时影响被测组分的保留时间，对仪器有腐蚀作用，因此被测溶液需用稀氨水调节 pH 至近中性，方可进样。

3.山梨酸的灵敏波长为 254nm,在此波长测苯甲酸、糖精钠灵敏度较低；苯甲酸、糖精钠的灵敏波长为 230nm,为照顾三种被测组分灵敏度，方法采用波长为 230nm。出峰顺序为苯甲酸、山梨酸和糖精钠。

实验十三 直接干燥法测定食品中水分的含量

一、实验目的

1. 了解水分含量测定的方法和意义
2. 熟悉直接干燥法测定食品中水分的操作方法
3. 掌握直接干燥法测定食品中水分的原理和相关计算

二、实验原理

食品在常压于 $101^{\circ}\text{C}\sim 105^{\circ}\text{C}$ 进行烘烤，所含的水分从食品中蒸发出来，直至样品质量不再减轻，即达恒重为止。根据样品所减失的质量，计算样品中水分的含量。

三、实验材料

1. 仪器

电热恒温干燥箱；扁形铝制或玻璃制称量瓶；干燥器；分析天平；

2. 试剂

(1) 盐酸溶液（ 6mol/L ） 量取 50mL 盐酸，加水稀释至 100mL 。

(2) 氢氧化钠溶液（ 6mol/L ） 称取 24g 氢氧化钠，加水溶解并稀释至 100mL 。

(3) 海砂 取用水洗去泥土的海砂或河砂，先用盐酸溶液煮沸 0.5h ，用水洗至中性，再用氢氧化钠溶液煮沸 0.5h ，用水洗至中性，经 105°C 干燥备用。

四、实验方法

1. 固体样品 取洁净铝制或玻璃制的扁形称量瓶，置于 $101^{\circ}\text{C}\sim 105^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中，瓶盖斜支于瓶旁边，加热 1.0h ，取出盖好，置干燥器内冷却 0.5h ，称量，并重复干燥至恒重。将混合均匀的试样迅速磨细至颗粒小于 2mm ，不易研磨的样品应尽可能切碎，称取 $2\text{g}\sim 10\text{g}$ 试样（精确至 0.0001g ），放入此称量瓶中，试样厚度不超过 5mm ，如为疏松试样，厚度不超过 10mm ，加盖，精密称量后，置 $101^{\circ}\text{C}\sim 105^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中，瓶盖斜支于瓶旁边，干燥 $2\text{h}\sim 4\text{h}$ 后，盖好取出，放入干燥器内冷却 30min 后称量。然后再放入 $101^{\circ}\text{C}\sim 105^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中干燥 1h 左右，取出，放入干燥器内冷却 30min 后再称量。重复干燥和称重操作至恒重。

2. 液体样品或半固体样品 取洁净的称量瓶，内加 10g 海砂及一根小玻棒，置于 $101^{\circ}\text{C}\sim 105^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中，干燥 1.0h 后取出，放入干燥器内冷却 30min 后称量。重复干燥和称重称重至恒重。然后称取 $5\text{g}\sim 10\text{g}$ 试样（精确至 0.0001g ），置于蒸发皿中，用小玻棒搅匀放在沸水浴上蒸干，并随时搅拌，擦去皿底的水滴，置 $101^{\circ}\text{C}\sim 105^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中干燥 4h 后盖好取出，放入干燥器内冷却 30min 后称量。然后再放入 $101^{\circ}\text{C}\sim 105^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中干燥 1h 左右，取出，放入干燥器内冷却 30min 后再称量。并重复以上操作至恒重。

五、结果与意义

1. 计算

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \times 100$$

式中：

X 为试样中水分的含量（%）；

m_1 为称量瓶(加海砂、玻棒)和试样的质量（g）；

m_2 为称量瓶(加海砂、玻棒)和试样干燥后的质量（g）；

m_3 为称量瓶(加海砂、玻棒)的质量（g）。

2. 测定意义

食品中水分有游离水和结合水两种存在形式，结合水是指在食品中与其它成分结合在一起形成食品胶体状态的水，如与蛋白质、淀粉水合作用和膨润吸收的水分，以及某些盐类的结晶水等。

食品中的水分含量较多时食品容易腐败变质，所以对食品的水分含量有质量标准。可参考食品国家卫生标准或食物成分表。

六、注意事项

1. 测定水分时，称量恒重是指一份样品连续两次称量之差不超过 2mg。
2. 食品中的挥发性成分在干燥过程中也将被减失，因此，直接干燥法是以测定干燥温度下不易分解、不易被氧化和含挥发性物质较少的样品。如谷物及其制品、豆制品、卤菜制品、肉制品等。
3. 对容易分解或易焦化的样品，应采取较低的烘烤温度和较短的烘焙时间或采用减压干燥法进行测定。

实验十四 直接滴定法测定还原糖

一、实验目的

1. 了解测定食品中还原糖的方法和测定意义
2. 熟悉直接滴定法测定还原糖的操作技能
3. 掌握直接滴定法测定还原糖的原理及实验所涉及的计算

二、实验原理

以亚甲蓝为指示剂，在加热的条件下，用经处理后的样品液直接滴定用葡萄糖标准溶液标定过的碱性酒石酸铜液（斐林试剂）。还原糖将斐林试剂中的二价铜还原成氧化亚铜，稍

过量的还原糖使亚甲蓝指示剂褪色，表示终点到达。根据样品液消耗体积，计算还原糖含量。

三、实验材料

1. 仪器 微量滴定管等。

2. 试剂

(1) 碱性酒石酸铜甲液 称取结晶硫酸铜15g，亚甲蓝0.05g，溶于纯水并稀释至1000ml。

(2) 碱性酒石酸铜乙液 称取酒石酸钾钠50g，氢氧化钠54g，溶于纯水中，再加亚铁氰化钾4g，溶解后稀释至1000ml。

(3) 1mg/ml 葡萄糖标准溶液 精密称取在98℃~100℃，干燥至恒重的无水葡萄糖1.000g，加水溶解后，加入5ml 盐酸，并加水至1000ml。

四、实验方法

1. 样品处理 精密称取适量样品，加适量蒸馏水溶解后定容至一定体积，使样品液 1ml 约含还原糖 2 mg~4mg。例如，蜂蜜样品取 2.0g，溶解后定容至 1000ml。

2. 标定碱性酒石酸铜溶液 吸取碱性酒石酸铜甲液和乙液各 5.0ml，置于 150ml 锥形瓶中，加入纯水 10ml，小玻珠 3 粒。从滴定管滴加约 9ml 葡萄糖标准液，摇匀，放置于电炉上加热，控制在 2min 内沸腾，趁热以每两秒一滴的速度继续滴加葡萄糖标准液，直到蓝色刚好退去为终点，记录消耗的葡萄糖标准液的总体积。平行操作二份，取其平均值。计算 10ml（甲、乙液各 5ml）碱性酒石酸铜溶液相当于葡萄糖的毫克数。

3. 样品液预测：吸取碱性酒石酸铜甲液及乙液各 5.0ml，置于 150ml 锥形瓶中，加纯水 10ml，小玻珠 3 粒，放置于电炉上加热，控制在 2min 内沸腾，趁热以先快后慢的速度，从滴定管中滴加样品处理液，并保持溶液沸腾状态，待蓝色变浅时，以每两秒 1 滴的速度滴定，直至蓝色刚好退去为终点，记录消耗的样品液体积。

4. 样品液测定：吸取碱性酒石酸铜甲液及乙液各 5.0ml，置于 150ml 锥形瓶中，加纯水 10ml，小玻珠 3 粒。从滴定管滴加比预测体积少 1ml 的样品液，放置于电炉上加热，控制在 2min 内沸腾，并保持沸腾 10s，然后趁热以每两秒 1 滴的速度继续滴定至蓝色刚退去为终点，记录消耗的样品液总体积。同法平行操作二份，取其平均值。

五、结果与意义

1. 计算结果

$$X = \frac{m_1}{m \times \frac{v_2}{v_1} \times 1000} \times 100$$

式中：X为试样中还原糖（以葡萄糖计）的含量（%）；

m为样品质量(g)；

m_1 为10ml碱性酒石酸铜液（斐林试剂）相当于还原糖的质量(mg)；

v_1 为样品处理液总体积(ml)；

v_2 为测定时消耗的样品处理液体积(ml)。

2. 测定意义

碳水化合物的测定均以还原糖的测定方法为基础，还原糖是碳水化合物中最简单的单糖，主要有葡萄糖、果糖和半乳糖。碳水化合物中的双糖或多糖均必须在一定条件下将其水解为单糖进行测定，然后由计算得出其含量。

六、注意事项

1. 滴定速度、锥形瓶壁厚度和热源的稳定等，对测定精密度影响很大，因此，在标定、预测、测定过程中，其实验条件都应力求一致。

2. 加热沸腾后，要始终保持在微沸状态下滴定。样品滴定时，继续滴至终点的毫升数应控制在1ml左右。

3. 样品液中还原糖浓度不宜过高或过低，根据预测试验结果，调节样品中还原糖的含量在1mg/ml左右为好。

4. 滴定至终点蓝色退去后，溶液呈现黄色，此后约10秒又重新变为蓝色，不应再进行滴定。因为亚甲蓝指示剂被糖还原后蓝色消失，当接触空气中的氧之后被氧化重现蓝色。

5. 还原糖与碱性酒石酸铜试剂反应速度较慢，必须加热到沸的情况下进行滴定。为防止烧伤及便于滴定，须戴上隔热线手套操作。

实验十五 火焰原子吸收光度法测定食品中锌和铜

一、实验目的

1. 了解火焰原子吸收光谱仪的基本构造。
2. 熟悉食品样品的湿消化法；及最佳测定条件的选择方法
3. 掌握原子吸收光度法测定食品中锌和铜原理；掌握本实验所涉及的各种计算。

二、实验原理

食品样品经硝酸和硫酸湿法消化后，有机物被破坏，其中的锌和铜转变成离子状态。用

稀酸溶解并稀释样品消化液后，取样品液喷入火焰原子器进行原子化，分别在锌 213.8nm 和铜 324.8nm 波长下测定吸光度，标准曲线法定量。

三、实验材料

1. 仪器 原子吸收分光光度计（附火焰原子器和锌铜空心阴极灯）；电炉。

2. 试剂

(1) 1000 $\mu\text{g/ml}$ 锌标准储备液 用5ml~10ml盐酸溶解1.0000g纯锌，蒸发至近干，用水稀释至1L。

(2) 50 $\mu\text{g/ml}$ 锌标准应用液 取适量标准储备液用硫酸（1+49）稀释配成。

(3) 1000 $\mu\text{g/ml}$ 铜标准储备液 用20ml硝酸将1.000g纯铜溶解，放冷后，用水稀释至1L。

(4) 50 $\mu\text{g/ml}$ 铜标准应用液 取适量标准储备液用硫酸（1+49）稀释配成。

(5) 混合标准溶液 于100ml容量瓶中，用硫酸（1+49）配成一系列含0、0.1、0.3、0.5、0.7和1.0 μg 锌和铜的混合溶液。

(6) 分析纯硝酸

(7) 分析纯硫酸

四、实验方法

1. 样品处理

准备称取 5.0~10.0g 食品样品，放入 250ml 锥形瓶中（如为液体样品，应先浓缩，加入 2~3 粒小玻璃珠，5.0ml 浓硝酸，微热。待剧烈反应平息后，加入 2.0ml 硫酸继续加热。将硝酸完全驱除。放冷，用 20ml 纯水稀释后，转入 100ml 容量瓶中（如有沉淀物，可用快速滤纸过滤），用纯水稀释至刻度。必要时再用硫酸（1+49）进一步稀释。同时做消化试剂空白。

2. 参考测定条件

锌灯电流 6mA，波长 213.8nm，狭缝 0.38 nm，空气流量 10L/min，乙炔流量 2.3L/min；铜灯电流 3mA~6mA，波长 324.8nm，狭缝 0.5nm，空气流量 9L/min，乙炔流量 2L/min。

3. 测定

调节仪器至最佳状态，测定样品液和混合标准溶液的吸光度值，每次读数后用水喷洗燃烧头，并检查零点。根据锌或铜的浓度和相应的吸光度值绘制标准曲线，从标准曲线上查得样品中锌（或铜）的浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）。

五、结果与意义

1. 计算结果

$$X = \frac{c \times 100}{m}$$

式中：

X 为样品中锌或铜的含量 (mg/kg)；

c 为锌（或铜）的浓度 (μg/ml)；

m 为样品的质量 (g)。

100 为样品稀释后的体积 (ml)

2. 测定意义

锌是许多酶的活性中心，在人体内已确定的含锌酶大约有 70 多种，参与人体的大多数新陈代谢，是人体必须的微量元素。锌缺乏时，可表现为味觉和嗅觉异常、厌食、小儿发育欠佳、生长减缓等。但摄入过多会引起急性肠炎和呕吐等中毒为预防儿童缺锌，1986 年国家已批准锌可作为营养强化剂使用。

铜存在于血浆铜蓝蛋白中，是体内多种氧化还原酶的成分，是一种生物催化剂。一般食物中都含铜，尤以动物内脏、豆类是铜的良好来源。人体很少缺铜，但经常食入含铜较高的食品，会因蓄积而中毒。

六、注意事项

1. 应同时作消化试剂空白，并从测定结果中扣除空白值。
2. 所有玻璃器皿及小玻珠在使用前应以稀硝酸浸泡或热稀硝酸彻底清洗。
3. 样品消化时，应尽量先低温下碳化，再高温消化完全。这样可以避免样品溅失或附着在瓶内壁上，难于被消化完全，造成结果偏低。

实验十六 分光光度法测定海带中碘含量

一、实验目的

1. 了解海带食品中碘含量的测定方法
2. 熟悉干灰化处理方法和液液萃取操作技能
3. 掌握分光光度法测定食品中碘的原理和实验中所涉及的各种计算。

二、实验原理

在碱性和 550℃ 高温条件下灰化海带样品，海带中碘生成碘化物。碘化物在酸性条件下被重铬酸钾氧化析出游离碘，用三氯甲烷提取游离碘呈紫红色，于 510nm 波长下测定其吸光度值。碘化物的浓度与吸光度值成正比，以标准曲线法定量。

三、实验材料

1. 仪器 分光光度计、分液漏斗、瓷坩埚和高温电炉等。

2. 试剂

(1) 碘标准溶液：准确称取经 105°C 烘1h干燥器中冷却30min的分析纯碘化钾0.1308g，加纯水溶解并稀释至1000ml。此溶液每毫升含碘0.100mg。

(2) 10mol/L KOH溶液 快速称取56g 分析纯KOH溶于100ml纯水中。

(3) 0.03mol/L $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液 准确称取1.4700g分析纯 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶于纯水中并稀释至1000ml。

(4) 分析纯 H_2SO_4 ；

(5) 分析纯三氯甲烷。

四、实验方法

1. 样品处理

准确称取切碎的均匀海带 0.10~0.15g，移入瓷坩埚中，加入 10mol/L KOH 溶液 1ml，置于电炉上碳化，然后置 550°C 高温炉灰化 30min，取出放至室温。以 40ml 水分数次洗涤坩埚，将洗涤液一并转入分液漏斗中。同时作灰化空白。

2. 测定

(1) 在 6 个已编号的分液漏斗中分别加入纯水 39 、 37 、 35 、 33 、 31 、 29ml；再加碘标准溶液 0、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00ml。然后再 KOH1.0ml（与样品灰化的碱性条件一致）。

(2) 在加有碘标准溶液、样品液及灰化空白的分液漏斗中，依次加入 0.5ml H_2SO_4 和 0.03mol/L $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液 10ml。摇匀，放置 30min。又分别加入 10ml 三氯甲烷（ CHCl_3 ），振荡提取 1min。静置分层，让 CHCl_3 层通过棉花栓过滤，于 10ml 比色管中。

(3) 以三氯甲烷溶剂调零，用 2cm 的比色皿在吸收波长 510nm 处，分别测定标准系列、样品和灰化空白的吸光度值。

(4) 以碘的含量为 X 变量，其相应的吸光度为 Y 变量，绘制标准曲线或进行线性回归。根据样品和灰化空白的吸光度值，从标准曲线查出相应的碘含量，计算每公斤海带中的碘含量。

五、结果与意义

1. 计算结果

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m}$$

式中：

X 为样品中碘含量 (g/kg)；

m_1 为由标准曲线上查出的样液的含碘量 (mg)；

m_2 为由标准曲线上查出的灰化空白的含量 (mg)；

m 为样品的质量 (g)。

2. 测定意义

碘是人体必需的微量元素之一，缺碘会导致碘缺乏病，同样摄入过多的碘，同样可以引起甲状腺功能有关的多种疾病。海产品中含碘较多，其中又以海带含碘量最高，平均为 5.13g/kg (以干重计)。

六、注意事项

1. 海带样品应切碎混匀后称量，放入坩埚中应先置于电炉碳化，然后再放入高温炉灰化。
2. 在作标准系列和转入样液前，应先检查所有用的分液漏斗是否漏液，避免在用 CHCl_3 振摇取时，标准和样品中碘的损失。

实验十七 酱油的卫生检验

一、实验目的

1. 了解酱油的卫生问题、检测指标和卫生标准。
2. 熟悉酱油感官检查、相对密度测定的方法；熟悉总酸、氨基酸态氮的测定方法。
3. 掌握酱油总酸、氨基酸态氮的测定原理和本实验所涉及的各种计算。

二、实验原理

1. 总酸：酱油中含有许多有机酸，用氢氧化钠标准溶液滴定，以酸度计测定终点，结果以乳酸表示。
2. 氨基酸态氮：利用氨基酸的两性作用，加入甲醛以固定氨基的碱性，使羧基显示出酸性，用氢氧化钠标准溶液滴定后定量，以酸度计测定终点。

三、实验材料

1. 仪器

(1) 比重计或波美计 上部细管中有刻度标签表示相对密度读数，下端球形内部装有汞或铅粒。

(2) 温度计、酸度计、磁力搅拌器及微量滴定管等。

2. 试剂

(1) 0.050mol/L 氢氧化钠标准溶液

(2) 36%甲醛溶液。

四、实验方法

1. 感官检查

(1) 量取 2ml 样品，置于 25ml 具塞比色管中，加水至刻度，振摇混匀，观察色泽、透明度，应不浑浊，无沉淀物。

(2) 量取 30ml 样品于 50ml 烧杯中观察，应无霉味，无霉花浮膜。

(3) 用玻棒搅拌上述烧杯中的样品，尝其味，不得有酸、涩、苦等异味。

2. 相对密度的测定

将样品摇匀，置于 100ml 干燥量筒中，记录样液温度。将比重计洗净擦干，缓缓沉入待测的样品中，待静止后，再轻轻按下少许，然后让其上升。再次静止后，观察酱油水平液面与比重计相交处的读数，即为样品的相对密度。不可读取因附着力而升起的液面接触比重计的刻度。还要注意比重计放入后，不能触及容器的四周和底部。

相对密度值要求在 20℃测定，如样品测定温度不是 20℃时，则测定结果应按表 4-28-1 校正后报告。

表4-28-1 不同温度时相对密度补正值

温度℃	补正值	温度℃	补正值	温度℃	补正值
30	+0.0046	21	+0.0005	12	-0.0034
29	+0.0041	20	0	11	-0.0038
28	+0.0036	19	-0.0004	10	-0.0042
27	+0.0031	18	-0.0009	9	-0.0047
26	+0.0026	17	-0.0013	8	-0.0051
25	+0.0022	16	-0.0018	7	-0.0056
24	+0.0018	15	-0.0022	6	-0.0061

说明：为了使用方便，生产上常用波美计测定酱油的相对密度。波美计的构造与比重计相同，但刻度标签为波美度(Be)，两者换算关系如下：

$$\text{相对密度} = \frac{145}{145 - \text{波美度}}$$

$$\text{波美度} = 145 - \frac{145}{\text{相对密度}}$$

3. 总酸和氨基酸态氮

(1) 总酸测定 准确吸取酱油 5.0ml, 置于 100ml 容量瓶中, 加水至刻度, 混匀。吸取此稀释液 20ml 于 200ml 烧杯中, 加水 60ml, 插入酸度计指示电极和参比电极。开动磁力搅拌器, 用氢氧化钠标准溶液滴定至酸度计指示 pH8.2, 记录用去的氢氧化钠标准液体积, 按总酸计算公式计算总酸。

(2) 氨基酸态氮测定 向上述溶液中准确加入甲醛溶液 10ml, 混匀, 继续用氢氧化钠标准液滴定至酸度计指示 pH9.2, 记录用去的氢氧化钠标准液体积, 供计算氨基酸态氮含量用。

(3) 空白试验 取纯水 80ml, 先用氢氧化钠标准液滴定至 pH8.2, 记录用去标准液体积, 此为测定总酸的空白试验消耗标准液体积。再准确加入甲醛溶液 10ml, 继续用氢氧化钠标准液滴定至 pH9.2, 记录第二次所用标准液体积, 此为测定氨基酸态氮的试剂空白试验。

五、结果与意义

1. 计算结果

$$X_1 = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 0.090}{5 \times V_3 / 100} \times 100$$

$$X_2 = \frac{(V_4 - V_5) \times C \times 0.014}{5 \times V_3 / 100} \times 100$$

式中:

X_1 为试样中总酸(以乳酸计)的含量(g/100ml);

X_2 为试样中氨基酸态氮的含量(g/100ml);

V_1 为测定总酸消耗氢氧化钠溶液体积(ml);

V_2 为总酸空白试验消耗氢氧化钠溶液体积(ml);

V_3 用于测定的样品稀释液体积(ml);

V_4 为测定氨基酸态氮消耗氢氧化钠溶液体积(ml)

V5 为氨基酸态氮空白试验消耗氢氧化钠溶液体积(ml);

0.090 为乳酸的摩尔质量 (g);

0.014 为氮的摩尔质量 (g)。

2. 测定意义

酱油中含有多种有机酸, 形成酱油特有的风味。但酸度过高, 不但滋味不好也说明已经酸败。酱油的总酸度用乳酸含量表示, 国家现行标准规定酱油总酸度 $\leq 2.5\text{g/L}$ 。

氨基酸态氮是酱油鲜味的重要来源之一, 也是决定酱油质量等级及营养价值的重要指标。酱油中的氨基酸系原料中富含的蛋白质经发酵酿造分解的产物, 是酱油的主要营养成分之一。酱油根据氨基酸态氮的含量来区别质量等级, 可分为特级、一级、二级和三级等四个等级。氨基酸态氮含量越高质量越好。特级酱油氨基酸态氮含量 ≥ 1.2 克/100mL, 一级酱油氨基酸态氮含量为 0.8 克/100mL~1.2 克/100mL, 二级为 0.5 克/100mL~0.7 克/100mL。三级为 ≥ 0.4 克, 最常见的酱油是三级酱油。

六、注意事项

1. 使用的甲醛溶液不应有聚合物, 如果含有, 可过滤澄明后使用。
2. 据报道酱油中铵盐可使氨基酸测定偏高, 若能扣除铵盐氮, 结果较为可靠。