

# 食品化学与分析

## 实验指导书

(试用)

北京农学院食品科学系食品化学课程组编写

2007. 9

<b>第一部分 样品预处理方法</b> .....	3
实验一 湿法消化.....	3
实验二 蒸馏.....	4
实验三 色层分离.....	5
<b>第二部分 实验数据处理基础知识</b> .....	8
<b>第三部分 食品化学实验</b> .....	11
实验一 淀粉糊化及酶法制备淀粉糖浆及其葡萄糖值的测定.....	11
实验二 脂肪过氧化值、酸价的测定(滴定法).....	14
实验三 蛋白质的功能性质.....	16
实验四 番茄红素直接测定法.....	19
实验五 酚酶提取及活力测定.....	20
实验七 水果皮颜色和淀粉白度的测量 ——测色色差计的使用.....	31
实验八 绿色果蔬分离叶绿素及其含量测定.....	33
<b>第四部分 食品分析实验</b> .....	35
实验一 用物理方法测定食品中相关组分.....	35
实验二 食品中水分的测定方法.....	36
实验三 总酸的测定.....	37
实验四 脂肪含量的测定.....	39
实验五 食品中淀粉的测定方法.....	41
实验六 食品中蛋白质的测定方法.....	43
实验七 抗坏血酸(维生素C)的测定.....	45
实验八 食品中亚硝酸盐的测定方法.....	53
实验九 钙含量的测定.....	55
实验十 果胶的测定.....	60
实验十一 总灰分的测定.....	63
实验十二 纤维素测定.....	64
实验十三 食品中还原糖的测定方法.....	70
实验十四 食品中蔗糖的测定.....	72
实验十五 pH值的测定.....	73
实验十六 可溶性蛋白质的测定(考马斯亮蓝法).....	74
实验十七 食品中山梨酸、苯甲酸的测定方法.....	76
实验十八 肉制品中食盐的测定.....	82

# 第一部分 样品预处理方法

## 实验一 湿法消化

**【实验目的】**用湿法消化前处理测定蛋白质样品

**【实验原理】**加入强氧化剂（如浓硝酸、高氯酸、高锰酸钾等），使蛋白质样品消化，而被测定含氮物质呈离子状态保存在溶液中。

**【实验试剂】**

硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸（所有试剂均用不含氨的蒸馏水配制）

**【实验步骤】**

- (1) 精密称取 2.0g 玉米粉样品，移入干燥的消化管中。
- (2) 加入 0.2g 硫酸铜，3g 硫酸钾及 20ml 浓硫酸（或直接加入消化片 1 片）。
- (3) 将消化管分别放入消化架的孔内，置于消化炉上。
- (4) 接好排污管，打开抽气三通，使之处于吸气状态（注意三通接法）。
- (5) 再接电源，打开各控制开关，使其消化。
- (6) 在初始阶段，须注意观察防止试样飞溅（缓解方法可在消化至飞溅时关机 5 分钟，再开机继续加热）。
- (7) 至液体呈蓝绿色澄清透明后（加消化片的液体最后呈无色），再继续消化 15min。

**【注意事项】**

- (1) 消化不要用强火，应保持和缓沸腾，利用冷凝酸液将附在瓶壁上的固体残渣洗下并促进其消化完全。
- (2) 样品中若含有脂肪或糖较多时，消化过程易产生大量泡沫，为防止泡沫溢出瓶外，在开始消化时应用小火加热，并不断摇动；或者加入少量辛醇或液体石蜡或硅油消泡剂，并同时注意控制热源强度。
- (3) 若样品消化液不易澄清透明时，可将凯氏烧瓶冷却，缓缓加入 30%过氧化氢 2~3ml 后再继续加热。

## 实验二 蒸馏

【实验目的】 用蒸馏法测定水分含量

【实验原理】 两种互不溶解的液体的二元体系的沸点低于各组分的沸点，加入与水互不混合的试剂于样品中，使水分与试剂共同蒸出，由水分的容量而得到样品的水分含量。

【实验试剂】 甲苯或二甲苯

【实验步骤】

- (1) 准确称取 2.00~5.00g 香料于 250ml 的烧瓶中。
- (2) 加入 50~75ml 的甲苯浸没样品。
- (3) 连接蒸馏装置。
- (4) 从冷凝管顶加入试剂（甲苯或二甲苯），使装满接受器的刻度为止。
- (5) 徐徐加热蒸馏，使水分大部分蒸出后，加快蒸馏速度。
- (6) 当接受器刻度的水量不再增加，关闭热源。
- (7) 从冷凝管顶端注入少量甲苯洗净，使蒸馏器和冷凝管壁上没有水滴。
- (8) 读取刻度管中的水量。

3、计算

$$\text{水分 (\%)} = \frac{v}{w} \times 100$$

式中 v-刻度管中水层的容量 (ml)

W-样品的重量 (g)

## 实验三 色层分离

**【实验目的】** 用柱层析和薄层层析法从番茄中提取番茄红素和 $\beta$ -胡萝卜素。

**【实验原理】** 类胡萝卜素为多烯类色素，不溶于水而溶于脂溶性有机溶剂。本实验先用乙醇将番茄中的水脱去，再用二氯甲烷萃取类胡萝卜素。因为二氯甲烷不与水混溶，故只有除去水分后才能有效地从组织中萃取出类胡萝卜素。根据番茄红素与 $\beta$ -胡萝卜素极性的差别，用柱层析可以将它们分离。分离效果可以用薄层层析进行检验。

### **【实验步骤】**

#### 1、实验材料和试剂

- (1) 新鲜番茄（或番茄酱）。
- (2) 95%乙醇；二氯甲烷；石油醚（60~90℃）；氯仿；中性或酸性氧化铝（柱层析用）；环己烷；硅胶 G；饱和氯化钠溶液；无水硫酸钠。

#### 1、操作方法

##### (1) 原料处理与色素提取

称取新鲜番茄浆 20g 于 100ml 圆底烧瓶中，加 95%乙醇 40ml，摇匀，装上回流冷凝管，在水浴上加热回流 5 分钟，趁热抽滤，滤液备用。向圆底烧瓶内，加入 30ml 二氯甲烷，水浴上加热回流 5 分钟，冷却，滤液备用，向圆底烧瓶内，再加 10ml 二氯甲烷重复萃取一次。合并乙醇和两次二氯甲烷提取液，倒入分液漏斗中，加 5ml 饱和氯化钠溶液（有利分层），振荡，静置分层。分出橙黄色有机相，使其流经一个在颈部塞有疏松棉花且在棉花上铺一层 1cm 厚的无水硫酸钠的三角漏斗，以除去微量水份。将此溶液储存于干燥的有塞子的锥形瓶中。层析之前，将此溶液在通风橱中用热水浴蒸发至干。

##### (2) 柱层析分离

取一支长 15cm 左右内径为 1~1.2cm 的层析柱，柱内装有用石油醚调制的氧化铝。将粗制的类胡萝卜素溶解于 4ml 苯中，用滴管在氧化铝表面附近沿柱壁缓缓加入柱中（留 1-2 滴供以后的薄层层析用），打开活塞，至有色物料在柱顶刚流干时即关闭活塞。用滴管取几毫

升石油醚，沿柱壁洗下色素，并通过放出溶剂至柱顶刚流干，从而使色素吸附在柱上。然后加大量的石油醚洗脱。黄色的β-胡萝卜素在柱中移动较快，红色的番茄红素移动较慢。收集洗脱液至黄色的β-胡萝卜素从柱上完全除去，然后用极性较大的氯仿作洗脱剂洗脱番茄红素（注意更换接收瓶）。将收集到的两个部分在通风橱内用热水浴蒸发至干。将样品分别溶于尽可能少的二氯甲烷中，尽快进行薄层层析。

### (3) 薄层层析检验

在用硅胶G铺成的薄板上距离底边约 1cm处，分别用毛细管点上三个样品，中间点为未分离的混合物，两边分别点上分离得到的β-胡萝卜素和番茄红素。可以多次点样，即点完一次，待溶剂挥发后再在原来的位置上点样。但要注意，必须在同一位置上点，而且样品斑点尽量小。点样时毛细管只要轻轻接触板面即可，切不可划破硅胶层。样品之间的距离为 1-1.5cm。将此板放入装有环己烷作展开剂的层析缸中，盖上盖子。切勿让展开剂浸没样品斑点。待溶剂展开至 10cm左右时，取出层析板。因斑点会氧化而迅速消失，故要用铅笔立即圈出。计算不同样品的 $R_f$ 值，比较不同样品 $R_f$ 值大小的原因以及分离效果。

$$R_f = \frac{\text{溶质最高浓度中心至原点中心的距离}}{\text{溶剂前沿至原点中心的距离}}$$

### (4) 注意

- 1、新鲜番茄浆的制备：将新鲜番茄洗净，用捣碎机捣碎或用市售的番茄酱。
- 2、氧化铝层析柱的装填方法：将层析柱垂直固定于铁架上，铺上一层薄薄的石英砂，关闭活塞。称取 15g 氧化铝置于 50ml 锥形瓶中，加入 15ml 石油醚（顺序不能反）边加边搅，且不断旋摇直至成均匀浆液（稠厚但能流动），向柱内加入溶剂（石油醚）至半满，然后开启活塞让溶剂以每秒一滴的速度流入小锥形瓶中，摇动浆液，不断地逐渐倾入正在流出溶剂的柱子中，不断用木棒或带橡皮管的玻璃棒轻轻敲击柱身，使顶部成水面，将收集到的溶剂在柱内反复循环几次，以保证沉降完全和装紧柱。整个过程不能让柱流干。待溶剂刚好放至柱顶刚变干时即可上样。

3、 硅胶 G 薄层板的制备。将 4g 硅胶 G 置于一小烧杯中，加入 8ml 蒸馏水不断搅拌至浆糊状，倾倒在洗净的玻板上（18×6cm），流平，或用涂布器铺板，并轻轻敲打均匀，在室温放置半小时凉干，然后移入烘箱，缓慢升温至 105-110℃恒温活化半小时，取出放入干燥器中备用。

## 第二部分 实验数据处理基础知识

### 一、 数据取舍

Q-试验:  $Q = \frac{x_2 - x_1}{w}$  式中:  $x_1$ 为可疑值,  $x_2$ 为最接近 $x_1$ 的那一个值,  $w$ 为一组值中最大与最小的差值。

表 2-6 结合取舍的 Q 值表

观察数目	Q 值取舍 (90%水平)
3	0.94
4	0.76
5	0.64
6	0.56
7	0.51
8	0.47
9	0.44
10	0.41

Q-试验就是拿 Q 值与表中的数据比较, 如果计算值大于表中的值, 则可以舍弃该值, 这时置信水平为 90%。例如: 测定汉堡包的水分含量, 平行做了 4 次, 数据分别为 64.53、64.45、64.78、55.31, 明显 55.31 看起来很低, 但能否舍弃呢?

$$x_1=55.31 \quad x_2 =64.45 \quad w =64.78-55.31$$

则  $Q=0.96$ , 通过查表: 0.96 大于 0.76, 这样可以舍弃这个值。

### 二、有效数据处理

有效数据处理是分析中一个重要的问题。处理不好, 直接影响分析结果的正确性。正确的有效数字将给出分析结果的灵敏度和可靠性, 因此, 实验报告应保留一个有效数字。例如,



一个多位数字 58.97，前几位 58.9 应该是真实值，最后一位不确定。原则上说，我们得到的一个有效数字，这个数字与小数点的位置是无关系的。真实值可以包括若干个 0。关于 0 是否为有效数字，应遵循以下原则：

- 1、小数点后面的 0 通常是有效数字：如 56.90
- 2、小数点前面的 0 如果没有其他的数，这个 0 就不是有效数字。0.45
- 3、如果小数点前面没有数字，那么紧接小数点后面的数字就不是有效数字，如 0.0072，有效数字是两个。而 1.0043，有效数字是 5 个。
- 4、除非特别指出，最后的 0 不是有效数字，如 60000，一位有效数字，但 6000.0，是 5 位有效数字。
- 5、无法用上述原则判断，可以将该数字写成幂的形式，如果 0 可以省略，就不是有效数字，如 7000 可写成  $7 \times 10^3$  的形式，一位有效数字，但 7000.0 写成  $7.0000 \times 10^3$ ，因此是 5 位有效数字
- 6、计算过程中有效数字判断最简单的办法是在完成计算后根据算式中位数最少的有效数字来确定。如  $36.54 \times 238 \times 1.1 = 9566.172$ ，因为 1.1 是 2 位有效数字，因此结果报告为 9600。

但当加法和减法中带有小数点的数，最后结果由小数点后面最少那个数的位数决定。如  $7.45 + 8.635 = 16.175$ ，因为 7.45 小数点后有两位，因此，16.175 应写成 16.18。

## 二、实验结果的科学表示

### 1、平均值

$$\bar{X} = (X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n) / n$$

式中：X 为平均值

$X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$  为单个测量值

n 为测定次数

### 2、标准偏差

$$SD = \sqrt{(X - X_1)^2 + (X - X_2)^2 + \dots + (X - X_n)^2}$$

### 3、置信度

$$CI = X + t \times \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

t 值: n=2, t=12.70

n=3, t=4.30

n=4, t=3.18

n=5, t=2.78

4、可信程度: 95%, 在 95%的可信区间内, 真实值在  $X \pm t \times \frac{SD}{\sqrt{n}}$  之间

## 第三部分 食品化学实验

### 实验一 淀粉糊化及酶法制备淀粉糖浆及其葡萄糖值的测定

#### 【实验原理及目的】

淀粉可用酶法、酸法和酸酶法使淀粉水解成糊精、低聚糖和葡萄糖。淀粉糖浆或称液体葡萄糖（DE38~42），主要成分是葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖和糊精，是一种粘稠液体，甜味温和，极易为人体直接吸收，在饼干，糖果生产上广为应用。

双酶法水解淀粉制淀粉糖浆，是先以 $\alpha$ -淀粉酶使淀粉中的 $\alpha$ -1,4糖苷键水解生成小分子糊精、低聚糖和少量葡萄糖然后再用糖化酶将糊精、低聚糖中的 $\alpha$ -1,6糖苷键和 $\alpha$ -1,4糖苷键切断，最后生成葡萄糖。

淀粉糖浆的分析方法是根据国家标准 GB12099-89，采用菲林滴定法测定淀粉水解产品的葡萄糖值（DE），例如 DE 值为 42，表示淀粉糖浆中含 42%的葡萄糖。

本实验的目的

- （1）通过实验，了解淀粉糊化及酶法制备淀粉糖浆的基本原理。
- （2）掌握淀粉双酶法制备淀粉糖浆的实验方法，以及酶的使用。
- （3）熟悉淀粉水解产品的葡萄糖值测定方法。

#### 【实验材料、试剂与仪器】

材料：马铃薯淀粉。

试剂：液化型 $\alpha$ -淀粉酶（酶活力 6000 单位/g），糖化酶（酶活力为 4~5 万单位/g），菲林溶液 A、B，亚甲基蓝指示剂，D-葡萄糖标准溶液。

- （1）碱性酒石酸铜甲液：称取 15g 硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )及 0.05g 亚甲基蓝，溶于水中并稀释至 1000ml。
- （2）碱性酒石酸铜乙液：称取 50g 酒石酸钾钠及 75g 氢氧化钠，溶于水中，再加入 4g 亚铁氰化钾，完全溶解后，用水稀释至 1000ml，贮存于橡胶塞玻璃瓶内。
- （5）葡萄糖标准溶液：精密称取 1.000g 经过 98~100℃干燥至恒量的纯葡萄糖，加水溶

解后加入 5ml 盐酸，并以水稀释至 1000ml。此溶液每毫升相当于 1mg 葡萄糖。

仪器：150ml 锥形瓶，容量瓶（100ml），移液管（1ml，5ml，20ml），25ml 酸滴定管，100ml 量筒，搅拌棒，恒温水浴锅。

### 【实验步骤】

#### 1、淀粉糖浆的制备

10g 淀粉置于 150ml 锥形瓶中，加水 50ml，搅拌均匀，配成淀粉浆，于 80℃ 水浴上加热，并不断搅拌，淀粉浆由开始糊化直到完全成糊，呈透明状，加入液化型  $\alpha$ -淀粉酶 8mg（先溶于 15ml 蒸馏水中，再倒入糊化的淀粉中），不断搅拌使其液化。并使温度保持在 80℃（水浴）温度，搅拌 20 分钟，然后将锥形瓶移至电炉（隔石棉网）加热至沸，灭酶活 2min，4000rpm 离心 10min，滤液冷却至 55℃，加入糖化酶 25mg，于 65℃ 恒温水浴中糖化 40min，加热至沸，沸腾灭酶 2min，即为淀粉糖浆，冷却后测定其体积为 V。冷却后再取 2ml，定容到 100ml（即稀释 50 倍），作为样品液待用。

#### 2、DE 值的测定

(1) 标定碱性酒石酸铜溶液：吸取 5.0ml 碱性酒石酸铜甲液及 5.0ml 乙液，置于 150ml 锥形瓶中，加水 10ml，从滴定管滴加约 9ml 葡萄糖标准溶液，放置在电炉上，控制在 2min 内加热至沸，在电炉上趁沸以每两秒 1 滴的速度继续滴加葡萄糖标准溶液，直至溶液蓝色刚好褪去为终点，记录消耗葡萄糖标准溶液的总体积，同时平行操作三份，取其平均值，计算每 10ml（甲、乙液各 5ml）碱性酒石酸铜溶液相当于葡萄糖的质量（mg）（样品始终放在电炉上沸腾滴定）。

(2) 样品溶液预测：吸取 5.0ml 碱性酒石酸铜甲液及 5.0ml 乙液，置于 150ml 锥形瓶中，加水 10ml，在电炉上控制在 2min 内加热至沸，在电炉上趁沸以先快后慢的速度，从滴定管中滴加样品溶液，并保持溶液沸腾状态，待溶液颜色变浅时，以每两秒 1 滴的速度滴定，直至溶液蓝色刚好褪去为终点，记录样液消耗体积（样品始终放在电炉上沸腾滴定）。

(3) 样品溶液测定：吸取 5.0ml 碱性酒石酸铜甲液及 5.0ml 乙液，置于 150ml 锥形瓶中，加水 10ml，从滴定管滴加比预测体积小 1ml 的样品溶液，使在两分钟内加热至沸，

趁沸继续以每两秒 1 滴的速度滴定，直至蓝色刚好褪去为终点，记录样液消耗体积，同法平行操作三份，得出平均消耗体积。（样品始终放在电炉上沸腾滴定）

$$DE = \frac{1 \times V_1 \times V \times N \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

式中：DE—样品中葡萄糖的含量，%；

1—1ml 葡萄糖标准液相当于 1mg 葡萄糖，mg/ml

$V_1$ —标定碱性酒石酸铜溶液平均消耗葡萄糖标准液的体积，ml；

$V_2$ —测定时平均消耗样品液的体积，ml；

V—糖化后样品液的体积，ml；

N—稀释倍数（50）；

m—样品质量，g

#### 【思考题】

为什么在测定 DE 值的整个滴定过程中，要保持沸腾，蒸汽始终充满烧瓶？

## 实验二 脂肪过氧化值、酸价的测定(滴定法)

### 【实验原理及目的】

实验原理：脂肪氧化的初级产物是氢过氧化物  $\text{ROOH}$ ，因此通过测定脂肪中氢过氧化物的量，可以评价脂肪的氧化程度。同时脂肪氧化的初级产物  $\text{ROOH}$  可进一步分解，产生小分子的醛、酮、酸等，因此酸价也是评价脂肪变质程度的一个重要指标。本实验通过油脂在不同条件下贮藏，并定期测定其过氧化值和酸价，了解影响油脂氧化的主要因素。

实验中过氧化值的测定采用碘量法，即在酸性条件下，脂肪中的过氧化值与过量的  $\text{KI}$  反应生成  $\text{I}_2$ ，用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  滴定生成的  $\text{I}_2$ ，求出 1 千克油中所含过氧化物的毫摩尔数，称为脂肪的过氧化值 (POV)；酸价的测定是利用酸碱中和反应，测出脂肪中游离酸的含量。油脂的酸价以中和 1g 脂肪中游离酸所需消耗的氢氧化钾或氢氧化钠的毫克数表示。

实验目的：(1) 测定油脂的过氧化值

(2) 测定油脂的酸价

### 【实验材料与试剂】

(一) 材料 油脂

(二) 实验试剂

1. 0.01mol/L 硫代硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )：称取 2.6g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  和 0.02g 碳酸钠，加适量新煮沸过的冷水溶解，并稀释至 1000 mL，放置一个月后过滤备用。
2. 氯仿-冰乙酸混合液：取氯仿 40mL 加冰乙酸 60mL，混匀。
3. 饱和碘化钾溶液：取碘化钾 14g，加水 10mL，稍加热溶解，贮于棕色瓶中，如发现溶液变黄，应重新配制。
4. 0.5% 淀粉指示剂：500mg 淀粉加少量冷水调匀，再加一定量热水煮沸，冷却(最后体积约为 100mL)，现用现配。
5. 0.01mol/L  $\text{NaOH}$  (或  $\text{KOH}$ ) 标准溶液：0.4g  $\text{NaOH}$  稀释至 1000mL。
6. 中性乙醚-95%乙醇 (2:1) 混合溶剂：临用前用 0.1mol/L 碱液滴定至中性。
7. 1% 酚酞乙醇溶液。

### 【实验步骤】

1、过氧化值的测定：称取 2g(准至 0.01g) 油脂置于干燥的 250mL 碘量瓶中，加入 20mL 氯仿-冰乙酸混合液，轻轻摇动使油溶解，加入 1mL 饱和碘化钾溶液，摇匀，加塞，置暗处放置 5min。取出立即加水 50mL，充分摇匀，用 0.01mol / L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  滴定至水层呈淡黄，加入 1mL 淀粉指示剂，继续滴定至蓝色消失，记下体积V。

2、酸价的测定：称取油脂 2g(准确至 0.01g) 于 250mL 的锥形瓶中，加入中性乙醚-乙醇混合液 25mL，小心旋转摇动烧瓶使试样溶解，加 3 滴酚酞指示剂，用 0.01mol/L 的碱液滴定至出现微红色在 30s 不消失，记下消耗碱液毫升数(V)。

### 【结果计算】

1、过氧化值

$$POV = \frac{M \times V \times 1000}{W} (\text{mmol} / \text{kg油})$$

式中：M— $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液摩尔浓度 (mol/L)

V—消耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液体积 (ml)

W—称取油脂重量 (g)

2、酸价

$$\text{酸价 (mg NaOH/g 油)} = \frac{M \times V \times 40}{W}$$

式中：M— NaOH 的摩尔浓度

V— 消耗 NaOH 溶液的体积 (mL)

40— NaOH 的毫摩尔

W— 称取油脂重量 (g)

### 【注意事项】

1、 滴定过氧化值时，应充分摇匀溶液，以保证 $\text{I}_2$ 被萃取至水相中。

2、 1%酚酞乙醇溶液在酸性条件下是无色，在碱性条件下是红色

## 实验三 蛋白质的功能性质

### 【实验原理及目的】

蛋白质的功能性质一般是指能使蛋白质成为人们所需要的食品特征而具有的物理化学性质，即对食品的加工、贮藏、销售过程中发生作用的那些性质。蛋白质的功能性质可分为水合性质，表面性质、蛋白质—蛋白质相互作用的有关性质三个主要类型，主要包括有吸水性、溶解性、乳化性、起泡性、凝胶作用等。

本实验的目的：以卵蛋白、大豆蛋白为代表，通过一些定性试验了解

- (1) 蛋白质的水溶性
- (2) 蛋白质的乳化性
- (3) 蛋白质的起泡性
- (4) 蛋白质的凝胶作用

### 【实验材料】

2%蛋清蛋白溶液（取 2g 蛋清加 98g 蒸馏水稀释，过滤取清液）、卵黄蛋白（鸡蛋除蛋清后剩下的蛋黄捣碎）、分离大豆蛋白粉。

### 【实验试剂】

1M 盐酸、1M 氢氧化钠、饱和氯化钠溶液、饱和硫酸铵溶液、酒石酸、硫酸铵、氯化钠、 $\delta$ -葡萄糖酸内酯、氯化钙饱和溶液、水溶性红色素、明胶。

### 【实验步骤】

#### 1、蛋白质的水溶性

(1) 在 50ml 的小烧杯中加入 5 滴蛋清蛋白，加入 5ml 水，摇匀，观察其水溶性，有无沉淀产生。在溶液中逐滴加入饱和氯化钠溶液，摇匀，得到澄清的蛋白质的氯化钠溶液。

取上述蛋白质的氯化钠溶液 3ml，加入 3ml 饱和的硫酸铵溶液，观察球蛋白的沉淀析出，再加入粉末硫酸铵至饱和，摇匀，观察清蛋白从溶液中析出，解释蛋清蛋白在水中及氯化钠溶液中的溶解度以及蛋白质沉淀的原因。



(2) 在四个试管中各加入 0.1g 大豆分离蛋白粉，分别加入 5ml 水，5ml 饱和食盐水，5ml 的 1M 氢氧化钠溶液，5ml 的 1M 盐酸溶液，摇匀，在温水浴中温热片刻，观察大豆蛋白在不同溶液中的溶解度。在第一、第二支试管中加入饱和硫酸铵溶液 3ml，析出大豆球蛋白沉淀。第三、四支试管中分别用 1M 盐酸及 1M 氢氧化钠中和至 pH 4~4.5（用 pH 试纸检测，观察沉淀的生成，解释大豆蛋白的溶解性以及 pH 值对大豆蛋白溶解性的影响。

## 2、蛋白质的乳化性

(1) 取 5g 卵黄蛋白加入 250ml 的烧杯中，加入 95ml 水，0.5g 氯化钠，用电动搅拌器搅匀后，在不断搅拌下滴加植物油 10ml，滴加完后，强烈搅拌 5 分钟使其分散成均匀的乳状液，静置 10 分钟，待泡沫大部分消除后，取出 10ml，加入少量水溶性红色素染色，不断搅拌直至染色均匀，取一滴乳状液在显微镜下仔细观察，被染色部分为水相，未被染色部分为油相，根据显微镜下观察所得到的染料分布，确定该乳状液是属于水包油型还是油包水型并阐述现象。

(2) 配制 5% 的大豆分离蛋白溶液 100ml，加 0.5g 氯化钠，在水浴上温热搅拌均匀，同上法加 10ml 植物油进行乳化。静止 10 分钟后，观察其乳状液的稳定性，同样在显微镜下观察乳状液的类型，确定该乳状液是属于水包油型还是油包水型并阐述现象。

## 3、蛋白质的起泡性

(1) 在三个 250ml 的烧杯中各加入 2% 的蛋清蛋白溶液 50ml，一份用电动搅拌器连续搅拌 1-2 分钟；一份用玻棒不断搅打 1-2 分钟；另一份用玻管不断鼓入空气泡 1-2 分钟，观察泡沫的生成，估计泡沫的多少及泡沫稳定时间的长短。评价不同的搅打方式对蛋白质起泡性的影响并阐述现象。

(2) 取二个 250ml 的烧杯各加入 2% 的蛋清蛋白溶液 50ml，1 份放入冷水或冰箱中冷至 10℃，1 份保持常温（30~35℃），同时以相同的方式搅打 1-2 分钟，观察泡沫产生的数量及泡沫稳定性有何不同并阐述现象。

(3) 取三个 250ml 烧杯各加入 2% 蛋清蛋白溶液 50ml，其中一份加入酒石酸 0.5g，一份加入氯化钠 0.1g，以相同的方式搅拌 1-2 分钟，观察泡沫产生的多少及泡沫稳定性有何不同并阐述现象。

用 2% 的大豆蛋白溶液进行以上的同样实验，比较蛋清蛋白与大豆蛋白的起泡性。

#### 4、蛋白质的凝胶作用

(1) 在试管中取 1ml 蛋清蛋白，加 1ml 水和几滴饱和食盐水至溶解澄清，放入沸水浴中，加热片刻观察凝胶的形成并阐述现象。

(2) 在 100ml 烧杯中加入 2g 大豆分离蛋白粉，40ml 水，在沸水浴中加热不断搅拌均匀，稍冷，将其分成二份，一份加入 5 滴饱和氯化钙，另一份加入 0.1-0.2g  $\delta$ -葡萄糖酸内酯，放置温水浴中数分钟，观察凝胶的生成并阐述现象。

(3) 在试管中加入 0.5g 明胶，5ml 水，水浴中温热溶解形成粘稠溶液，冷后，观察凝胶的生成。

解释在不同情况下凝胶形成的原因。

## 实验四 番茄红素直接测定法

**【实验原理】** 从水果蔬菜及其加工制品中提取类胡萝卜素时，先使用甲醇使试样脱水的同时，可以把叶黄素和胡萝卜素提取出来。提取的残留物用甲苯反复提取，番茄红素即可完全提取出来。适用于胡萝卜、玉米、番茄、西瓜、柑橘等水果蔬菜及其加工制品中番茄红素的测定。

### **【仪器和装置】**

瓷研钵、均质器、溶剂过滤器、棕色容量瓶、刻度吸管、烧杯、玻璃棒、可见光分光光度计。

### **【试剂】**

甲醇、甲苯、苏丹 I 号色素、无水乙醇

### **【实验操作】**

#### 1、 制作标准曲线

准确称取标准苏丹 I 号色素 25.0 mg 溶于无水乙醇，定容至 50 mL，移取 0.26、0.52、0.78、1.04、1.30 mL 该溶液，分别注入 50 mL 容量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度。混合后即相当于 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5  $\mu\text{g/mL}$  番茄红素的苏丹 I 号色素标准溶液，然后，用分光光度计在番茄红素最大吸收波长处(465 nm 左右)分别测定其消光值，测定光压 10V，光径 1cm。以番茄红素每毫升微克数为横坐标，以消光值为纵坐标，绘制番茄红素标准曲线。

#### 2、 样品中番茄红素的抽提

称取一定量的番茄汁(精确到 0.01g)，注入小烧杯中，加入少量甲醇，用玻璃棒充分搅拌，以抽出其黄色素。再将该番茄汁移入溶剂过滤器中抽滤，并用少量甲醇洗涤烧杯。接着加甲醇于玻璃滤器中搅拌后抽滤，重复此操作，直至滤液无色为止。然后，另换一干燥抽滤瓶接受滤液，用甲苯重复上述操作抽提番茄红素，直到滤液无色为止。将抽提液移入 100mL 棕色容量瓶中，加甲苯定容、混合。吸取该溶液 1mL，加甲苯稀释至 20 mL，即为色素抽提液。

#### 3、 样品中番茄红素的测定

将上述处理好的色素抽提液用分光光度计在与制作标准曲线相同的条件下，测其消光值，以蒸馏水作空白对照。经查标准曲线可知番茄红素含量，通过稀释倍数的折算可知样品中番茄红素的含量。

## 实验五 酚酶提取及活力测定

【实验目的】 从香蕉中提取酚酶并测定其活力

【实验原理】 儿茶酚在酚酶作用下发生氧化还原，生成的产物在 420nm 处有吸收，根据生成物的多少，判断酚酶的活力，

【实验材料和试剂】

香蕉、pH7.0 的 0.02M 的磷酸缓冲液、-15℃的冷丙酮、吐温 80、0.1M 儿茶酚溶液

【实验步骤】

(1) 多酚氧化酶提取：

- a、取 100g 香蕉果肉，与 pH7.0 的 0.02M 的磷酸缓冲液混合，组织捣碎机混合（1000rpm, 3min）
- b、然后冷冻离心（-4℃、18000rpm, 15min），取上清液 1
- c、沉淀再用与上述相同的方法处理，冷冻离心后，取上清液 2，清液 1 和 2 混合
- d、缓慢加入-15℃的冷丙酮，搅拌，保持 15min，冷冻离心
- e、取沉淀再与含 1%的吐温 80 的 pH7.0 的 0.02M 的磷酸缓冲液混合（1000rpm, 3min），冷冻离心 15min，取上清液，即是多酚氧化酶。

(2) 酚酶活力测定：

- a、配置 0.1M 儿茶酚溶液，取 2ml，加 20 μ l 的上述提取的酶液
- b、25℃条件下，每隔 10s，测定在 420nm 下的吸光值 A，空白用蒸馏水代替酶液

【计算方法】酶活力用每分钟吸光值 A 的变化表示，规定每分钟吸光值 A 变化 0.001 为一个

$$\text{活力单位。} 1u = \frac{A_2 - A_1}{10} \times 60 \times 1000$$

## 实验六 脂溶性维生素的测定

### 一、维生素 A 的测定

#### (一) 三氯化铋比色法测定维生素 A

**【原理】** 维生素 A 在三氯甲烷溶液中与三氯化铋作用，生成蓝色可溶性络合物，其深浅与溶液中所含维生素 A 的含量成正比。该蓝色物质在 620 nm 波长处有最大吸收峰，可进行比色测定。

#### **【试剂】**

①无水硫酸钠。

②乙酸酐。

③无水乙醚：不含有过氧化物。

A. 过氧化物检查方法：5mL 乙醚中加入 100g/L 碘化钾溶液 1mL，振摇 1min，如有过氧化物则放出游离碘，水层呈黄色，或加 4 滴 5g/L 淀粉液，水层呈蓝色。该乙醚需处理后使用。

B. 去除过氧化物的方法：重蒸乙醚时，瓶中放入纯铁丝或铁末少许。弃去 10% 初馏液和 10% 残馏液。

④无水乙醇：不得含有醛类物质。

A. 检查方法：取 2mL 银氨溶液于试管中，加入少量乙醇，摇匀，再加入 100g/L 氢氧化钠溶液，加热，放冷后，若有银镜反应则表示乙醇中有醛。

B. 脱醛方法：取 2g 硝酸银，溶于少量水中。取 4g 氢氧化钠溶于温乙醇中。将两者倾入 1L 乙醇中，振摇后，放置暗处 2d（不时摇动，促进反应），经过滤，置蒸馏瓶中蒸馏，弃去初蒸出的 50mL。当乙醇中含醛较多时，硝酸银用量适当增加。

⑤三氯甲烷：应不含分解物，否则会破坏维生素 A。

A. 检查方法：三氯甲烷不稳定，放置后易受空气中氧的作用生成氯化氢和光气。检查时可取少量三氯甲烷置试管中加水少许振摇，使氯化氢溶到水层。加入几滴硝酸银溶液，如有白色沉淀即说明三氯甲烷中有分解产物。

B. 处理方法：试剂应先检验是否含有分解产物，如有，则应于分液漏斗中加水洗数次，加无水硫酸钠或氯化钙使之脱水，然后蒸馏。

⑥三氯化铋 - 氮甲烷溶液：250g 三氯化铋用三氯甲烷溶解，并用三氯甲烷定容至 1L，贮于棕色瓶内。

⑦1:1 氢氧化钾溶液：取 50g 氢氧化钾，用 50mL 水溶解。

⑧维生素 A 或视黄醇乙酸酯标准液：视黄醇(纯度 85%)或视黄醇乙酸酯 (纯度 90%)经皂化处理后使用。用脱醛乙醇溶解维生素 A 标准品，使其浓度大约为 1mL 相当于 1mg 视黄醇。临用前用紫外分光光度法标定其准确浓度。标定方法见维生素 A 和维生素 E 的高效液相色谱法相关内容。

⑨酚酞指示剂：用 95%乙醇配制成 10g/L 溶液。

#### 【仪器】

①分光光度计。

②回流冷凝装置。

#### 【操作方法】

①样品处理：根据样品性质，可采用皂化法或研磨法。

A. 皂化法：适用于维生素 A 含量不高的样品，可减少脂溶性物质的干扰，但全部试验过程费时，且易导致维生素 A 损失。

皂化：称取 0.5~5g 样品于三角瓶中，加入 500g / L 氢氧化钾 10 mL 及 20~40mL 乙醇，于电热板上回流 30min，至皂化完全为止。

提取：将皂化瓶内混合物移至分液漏斗中，用 30mL 水洗皂化瓶，洗液并入分液漏斗(如皂化液中有残渣，可经有脱脂棉的漏斗滤入分液漏斗内)。用 50mL 乙醚分 2 次洗皂化瓶，洗液并入分液漏斗中。振摇并注意放气，静置分层后，水层放入第二个分液漏斗内。皂化瓶再用约 30mL 乙醚分 2 次冲洗，洗液倾入第二个分液漏斗中。振摇后，静置分层，水层放入三角瓶中，醚层与第一个分液漏斗合并。重复至水液中无维生素 A 为止。

洗涤：用约 30mL 水加入第一个分液漏斗中，轻轻振摇，静置片刻后，放去水层。加 0.5 mol/L 氢氧化钾液 15~20mL 于分液漏斗中，轻轻振摇后。弃去下层碱液，除去醚溶性酸皂。继续用

水洗涤，每次用水约 30mL，直至洗涤液与酚酞指示剂呈无色为止(约 3 次)。醚层液静置 10~20min，小心放出水层。

浓缩：将醚层液经过无水硫酸钠滤入三角瓶中，再用约 25 mL 乙醚冲洗分液漏斗和硫酸钠两次，洗液并入三角瓶内。置水浴上蒸馏，回收乙醚。待瓶中剩约 5 mL 乙醚时取下，用减压抽气法至干，立即加入一定量的三氯甲烷使样液中维生素 A 含量在适宜浓度范围内。

B. 研磨法：准确称取 2~5g 样品，放入盛有 3~5 倍样品质量的无水硫酸钠研钵中，研磨至样品中水分完全吸收，并均质化，样品移入带盖的三角瓶内，加入 50~100mL 乙醚，压紧盖子，用力振摇 2min，使样品中维生素 A 溶于乙醚中。静置澄清 1-2 h，或在冷水浴中离心澄清。取澄清乙醚液 2~5mL，放入比色管中，在 70~80℃水浴上抽气蒸干，立即加入 1mL 三氯甲烷溶解残渣。

#### ②测定：

A, 标准曲线绘制：准确称取一定量的维生素 A 标准液于 4 或 5 个容量瓶中，用三氯甲烷配制标准系列。再取相同数量比色管顺次取 1mL 三氯甲烷和标准系列使用液 1mL，各管加入乙酸酐 1 滴，制成标准比色列。于 620nm 波长处，以三氯甲烷作参比，将其他标准比色列按顺序移入光路前，迅速加入 9mL 三氯化铋-三氯甲烷溶液，于 6s 内测定吸光度。以吸光度为纵坐标，维生素 A 含量为横坐标绘制标准曲线图。

样品测定：于一比色管中加入 10mL 三氯甲烷，加入 1 滴乙酸酐为空白液。另一比色管中加入 1mL 三氯甲烷，其余比色管中分别加入 1mL 样品溶液及 1 滴乙酸酐。其余步骤同标准曲线的制备。

#### 【计算】

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

式中：X---样品中含维生素 A 的量，mg / 100 g；

c---由标准曲线上查得样品中维生素 A 的含量，μg / mL；

m---样品质量，g；

V---提取后加三氯甲烷定容的体积，mL；

100---以每 100 g 样品计。

## (二) 荧光分析法

### 【提要】

样品经乙醚提取后，以薄层层析分离出样品中的维生素 A，其斑点溶于正丁醇中，用荧光分光法进行测定，求出样品中的维生素 A。本法适用于动物组织中维生素 A 的测定。

### 【试剂】

无水硅酸钠、乙醚及氯仿、层析用硅胶、环己烷及石油醚。

维生素 A 标准溶液：维生素 A 或视黄醇乙酸酯标准液：视黄醇(纯度 85%)或视黄醇乙酸酯(纯度 90%)经皂化处理后使用。用脱醛乙醇溶解维生素 A 标准品，使其浓度大约为 1mL 相当于 1mg 视黄醇。临用前用紫外分光光度法标定其准确浓度。标定方法见维生素 A 和维生素 E 的高效液相色谱法相关内容。

### 【仪器】

荧光分光光度计具有 340 nm 和 490 nm 波长、硅胶薄层板。

### 【操作方法】

(1) 样品处理：称取含有维生素 A 约为 1 μg 的动物组织样品，用 4 倍重量的无水硅酸钠研磨后，置于有色玻璃试管中，按每克样品中加入 20mL 乙醚，振摇提取，在低温下于高速离心机中离心 20min。将上清液转入另一试管中，以无水硫酸钠去除水分，再将有机相定量地转入另一试管中，通氮气或用真空挥发除去乙醚，残渣溶解于少量的氯仿中，取一定量的氯仿进行薄层层析分离。

(2) 薄层板制备：称取 38g 硅胶，加入 100mL 水，迅速搅拌 15min，调成糊状，再铺于一块 20×20 cm 的玻璃板上，厚度为 0.25mm，将其置于空气中干燥 20min，然后在 90℃下加热活化 1h，冷却后备用。

(3) 层析：用微量移液管移取上述样品氯仿液，点板于离层析板下沿 2cm 的位置上，然后将层析板置于密闭的层析槽中，用环己烷：石油醚：乙醚：=7:3:1 (v/v) 的混合液作为展开剂，置暗处展层 50min。显层后在紫外线灯光下找出维生素 A 的斑点，连同硅胶一起从板上刮下，置于玻璃试管中，加入 5mL 正丁醇，振摇 2min，离心分离硅胶，取上层清液为样品测定液。

(4) 样品测定：先用硫酸奎宁溶液[用 0.1N 硅酸溶液制备成每毫升含有硫酸奎宁 0.3~



0.6 μg (视荧光计灵敏度而定)]校正荧光计, 然后取上层样品离心清液置于荧光比色皿中, 于 340nm 处激发波长, 在 490nm 处测定其荧光强度。同样取一定量的维生素 A 标准浓度系列在同样条件下进行测定, 并绘制维生素 A 的标准曲线。测得样液中荧光强度, 从标准曲线中查出维生素 A 的含量。

**【计算】**

$$\text{每 100 g 动物组织中含维生素 A 的量} = \frac{V_1}{V_2} \times C \times \frac{100}{W}$$

式中 C——从标准曲线中查得的维生素 A 的浓度(I. U. / mL),

$V_1$ ——用正丁醇定容的量(m L),

$V_2$ ——样品测定时所取样液量(mi),

W——样品的重量(g)。

二、维生素 A 和维生素 E 的高效液相色谱法

**【原理】** 样品中的维生素A及维生素E经皂化提取处理后, 将其从不可皂化部分提取至有机溶剂中。用高效液相色谱法 $C_{18}$ 反相柱将维生素A和维生素E分离, 经紫外检测器检测, 并用内标法定量测定。最小检出量分别为维生素A是 0.8 ng;  $\alpha$ -生育酚是 91.8 ng;  $\gamma$ -生育酚是 36.6 ng;  $\delta$ -生育酚是 20.6 ng。

**【试剂】**

- 1、无水乙醚: 不含有过氧化物。检测方法和去除方法见三氯化铋比色法测定维生素 A。
- 2、无水乙醇: 不得含有醛类物质。检测方法和去除方法见三氯化铋比色法测定维生素 A。
- 3、无水硫酸钠。
- 4、甲醇: 重蒸后使用。
- 5、重蒸水: 水中加少量高锰酸钾, 临用前蒸馏。
- 6、100g/L 抗坏血酸溶液: 临用前进行配制。
- 7、50%氢氧化钾溶液: 取 50g 氢氧化钾, 溶于 50g 水中, 混匀。
- 8、100g/L 氢氧化钠溶液: 100g 氢氧化钠, 用水溶解并定容至 1L。
- 9、50g/L 硝酸银溶液。

10、银氨溶液：加氨水至 50 mL 硝酸银溶液中，直至生成的沉淀重新溶解为止，再加 100g/L 氢氧化钠溶液数滴，如发生沉淀，再加氨水直至溶解。

11、维生素 A 标准液：视黄醇(纯度 85%)或视黄醇乙酸酯(纯度 90%)经皂化处理后使用。用脱醛乙醇溶解维生素 A 标准品，使其大约为每毫升相当于 1mg 3 种生育酚。临用前用紫外分光光度法标定其准确浓度。

12、维生素 E 标准液： $\alpha$ -生育酚(纯度 95%)， $\gamma$ -生育酚(纯度 95%)， $\delta$ -生育酚(纯度 95%)，用脱醛乙醇分别溶解以上 3 种维生素 E 标准品，使其浓度大约为每毫升相当于 1mg 三种生育酚。临用前用紫外分光光度法分别标定此 3 种维生素 E 的准确浓度。

13、内标溶液：称取苯并芘(纯度 98%)，用脱醛乙醇配制成每毫升相当于 10  $\mu$ g 苯并芘的内标溶液。

#### 【仪器】

高效液相色谱仪(带紫外分光检测器)、旋转蒸发器、恒温水浴锅、紫外分光光度计、高速离心机。

#### 【操作方法】

##### 1、样品处理：

1) 皂化：取 1~10g 样品(含维生素 A 约 3  $\mu$ g，维生素 E 各异构体约为 40  $\mu$ g)于皂化瓶中，加 30mL 无水乙醇，进行搅拌，直到颗粒物分散均匀为止。加 100g / L 抗坏血酸 5 mL，苯并芘标准液 2.0mL，混匀。加 10mL 氢氧化钾溶液，混匀。于沸水浴上回流 30 min 使皂化完全。皂化后立即放入冰水中冷却。

2) 提取：将皂化后的样品移入分液漏斗中，用 50mL 水分 2 或 3 次洗皂化瓶，洗液并入分液漏斗中。用约 100mL 乙醚分两次洗皂化瓶及其残渣，乙醚液并入分液漏斗中。如有残渣，可将此液通过有少许脱脂棉的漏斗滤入分液漏斗。轻轻振摇分液漏斗 2min，静置分层，弃去水层。

3) 洗涤：用约 50mL 水洗分液漏斗中的乙醚层，用 pH 值试纸检验直至水层不显碱性。

4) 浓缩：将乙醚提取液经过无水硫酸钠(约 5g)滤入旋转蒸发器的蒸发瓶中，用约 10mL 乙醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠 3 次，并入蒸发瓶内，于 55 $^{\circ}$ C 水浴中减压蒸馏并回收乙醚，待瓶

中剩下约 2mL 乙醚时，取下蒸发瓶，立即用氮气吹掉乙醚。加入 2.0 mL 乙醇，充分混合，溶解提取物。

5) 将乙醇液移入一小塑料离心管中，离心 5min (5000r/min)。上清液供色谱分析。如果样品中维生素含量过少，可用氮气将乙醇液吹干后，再用乙醇重新定容。并记下体积比。

## 2、标准曲线绘制：

### 1) 维生素 A 和维生素 E 标准浓度的标定方法。

取维生素 A 和各维生素 E 标准液若干毫升，分别稀释至 3.00 mL 乙醇中，并分别按给定波长测定各维生素的吸光度。用比吸光系数计算出该维生素的质量浓度。测定条件如下表。

标准	加入标准液量 S/ $\mu$ L	比吸光系数 $\Sigma$ 1%cm	波长 $\lambda$ /nm
视黄醇	10.00	1835	325
$\gamma$ -生育酚	100.00	71	294
$\delta$ -生育酚	100.00	92.8	298
$\alpha$ -生育酚	100.00	91.2	298

浓度计算：

$$X_1 = \frac{A}{E} \times \frac{1}{100} \times \frac{3.00}{S \times 10^{-3}}$$

式中： $X_1$ ——某维生素质量浓度，g / mL；

A——维生素的平均紫外吸光值；

S——加入标准的量， $\mu$ L；

E——某种维生素 1% 比吸光系数；

$10^{-3}$  ——标准液稀释倍数。

2) 标准曲线绘制：把一定量的维生素 A、 $\gamma$ -生育酚、 $\alpha$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚及内标苯并芘液混合均匀。选择合适灵敏度，使上述物质的各峰高约为满量程 70%，为高浓度点。高浓度的 7 为低浓度点 (其内标苯并芘的浓度值不变)，用此 2 种浓度的混合标准液进行色谱分析，结果

见色谱图。维生素标准曲线绘制是以维生素峰面积与内标物峰面积之比为纵坐标，维生素浓度为横坐标绘制，或计算直线回归方程。如有微处理机装置，则按仪器说明用二点内标法进行定量。

本方法不能将  $\beta$ -E 和  $\gamma$ -E 分开，故  $\gamma$ -E 峰中包含有  $\beta$ -E 峰。

### 3) 高效液相色谱分析:

色谱条件: 预柱, ultrasphere ODS 10  $\mu$  m,  $\Phi$ 4mm  $\times$  4.5cm; 分析柱, ultrasphere ODS 5  $\mu$  m,  $\Phi$ 4.6mm  $\times$  25cm; 流动相, 甲醇-水(98:2), 混匀, 于临用前脱气; 紫外检测器波长: 300nm, 量程 0.02; 进样量, 20  $\mu$  L; 流速, 1.7mL / min。

4) 样品分析: 取样品浓缩液 20  $\mu$  L, 待绘制出色谱图及色谱参数后, 再进行定性和定量。

①定性: 用标准物色谱峰的保留时间定性。

②定量: 根据色谱图求出某种维生素峰面积与内标物峰面积的比值, 以此值在标准曲线上查到其含量, 或用回归方程求出其含量。

③计算

$$X_2 = \frac{C}{m} \times V \times \frac{100}{1000}$$

式中:  $X_2$  ---- 某种维生素的含量, mg/100 g;

C---- 由标准曲线上查到的某种维生素含量,  $\mu$  g;

V---- 样品浓缩定容体积, mL;

m---- 样品质量, g。

### 三、维生素 E 荧光法

**【原理】** 维生素 E 分子结构中具有苯环, 因此具有荧光, 且其荧光强度与样品中维生素 E 含量成正比。样品经皂化, 把不皂化物溶解在正己烷中, 测定其荧光强度, 并与标准  $\alpha$ -维生素 E 作比较, 从而计算出样品中维生素 E 的含量。

#### **【试剂】**

1、 $\alpha$ -维生素 E 的标准溶液: 精确称取 10mg 标准  $\alpha$ -生育酚, 溶于正己烷中, 用己烷定容至 10mL。此液浓度为 1mg/mL。临用时稀释成 5  $\mu$  g / mL 的  $\alpha$ -生育酚的工作液。当天配制当天使

用。

2、60%氢氧化钾溶液。

3、乙醚。

4、正己烷。

5、无水硫酸钠。

【仪器】 荧光分光光度计。

【操作方法】

1、样液制备：精确称取油样 0.50g(样品中维生素 E 量少于 0.2mg)，置于索氏提取器中，加入 0.9g 维生素 C、12mL 无水乙醇，接上冷凝管，在水浴上加热。当瓶内液体开始沸腾时，加入 60%氢氧化钾水溶液 3mL，旋转索氏提取器，并从加入氢氧化钾起计算时间至 15min。取出，将瓶迅速在流水下冷却，随即加 40mL 蒸馏水，使皂化物溶解，并移入 250mL 分液漏斗中，用乙醚分 4 次抽提不皂化物，每次 40mL，加入乙醚后均须充分振摇 2min，并静置使其完全分层。汇总乙醚液于 500mL 分液漏斗中，用等量水多次洗涤，直至洗涤水不呈碱性。然后将乙醚液通过无水硫酸钠脱水，用 5mL 乙醚分数次洗涤无水硫酸钠，洗液并入。乙醚抽提液在氮气流、真空下蒸干。加入正己烷溶解残渣，在 10mL 容量瓶内定容至刻度。再用吸管吸取 1mL，置于 10 mL 容量瓶中，用正己烷定容，即为样品溶液。

2、测定荧光强度：

仪器工作条件：激发波长 295nm，激发狭缝 3mm；发射波长 324nm，发射狭缝 2mm；灵敏度  $0.3 \times 7$ 。根据上述的仪器工作条件，分别测定  $\alpha$ -生育酚标准使用液和样品溶液的荧光强度。

计算

$$\alpha\text{-生育酚含量 (mg/100g)} = \frac{A_1 \times c \times V}{A_2 \times m} \times \frac{100}{1000}$$

式中： $A_1$ ——样品溶液的荧光强度；

$A_2$  ——标准使用液的荧光强度；

$c$ ——标准使用液的质量浓度， $\mu\text{g} / \text{mL}$ ；

V——样品稀释体积，mL；

m——样品质量，g。

**【说明】**

- 1、由于溶解试样的溶剂的激发波长和发射波长、荧光强度不一样，本法采用正己烷而使用上述的激发波长和发射波长。
- 2、动物、人的血液和脏器中的维生素 E 几乎全部是  $\alpha$ -生育酚。用本法测得的值与真正的总维生素 E 量相近，因此本法的灵敏度比比色法高得多；相反，植物性样品中，一般  $\alpha$ -生育酚的量不多，其他同系物含量多，每一种维生素 E 同系物的激发波长和发射波长的荧光强度又是不相同的。用本法测定的值多数不能表示其真实值，这是由于试样中同系物含量比例不同，造成测定值与真实值有误差，这个误差要比比色法大。
- 3、本法测定的样品为花生油。如测其他食品，须先抽提脂肪，经抽提脂肪后的样品其发射波长改为 330nm。

## 实验七 水果皮颜色和淀粉白度的测量 ——测色色差计的使用

### 【实验目的】

- 1、通过水果皮颜色和淀粉白度的测量，了解自动测色色差计的构造，功能和工作原理。
- 2、通过本实验，掌握一种先进的测色方法。

### 【实验材料与仪器】

柑桔（不同成熟度）三种，香蕉（不同成熟度）三种，淀粉（不同白度）三种。  
TC-P II G 全自动测色色差计。

### 【实验步骤】

#### 1、样品制备

- 1) 在柑桔皮上用小刀划出一个直径大于 25mm 的圆形样品，然后用滤纸把样品上的汁吸干，以免测色时污染仪器。把三种柑桔样品标号为 1#、2#、3#，留待测色用。
- 2) 方法同（1），在香蕉皮上剪出样品，把三种样品标号为 4#、5#、6#，留待测色用。
- 3) 把三种不同白度的淀粉分别装在三个样品盒中，标号为 7#、8#、9#，留待测色用。

#### 2、色差计的使用

- 1) 开机：连接电源，按下 POWER 开关，指示灯亮，表明仪器已有电源输入，同时 ZERO 开关灯闪烁。
- 2) 预热仪器通电后，要预热一小时，使光源和光电探测器稳定。预热时，必须探测器放在工作白板上（注意不能放标准白板，否则标准值改变，测色不准）
- 3) 测定准备：在仪器预热的同时，可作以下测定准备工作：
  - ① 将标准白板的  $X_{10}$ 、 $Y_{10}$ 、 $Z_{10}$  值与数码器设定值核对无误。
  - ② 放好打印纸，注意纸的正反方向，否则打印不出数值。
- 4) 调零：经预热一小时后，开始调零。测反射色时，将探测器部分放在黑筒上，几秒钟后按 ZERO 开关，约 1 秒后，ZERO 开关灯由闪烁到灯灭，此时 ACC 灯闪烁，表示调零结束，数据自动输入到微机系统（若测透射色，调零时，将不透光纸板或胶皮放在固定架中，其余步骤同上）。
- 5) 调标准白板：将探测器部分放在标准白板上，按 ACC 开关，一会儿灯灭，而 MEASU 灯闪烁，此时调标准白板完成，数据自动输入微机系统。（测反射色时，数码器中 X、Y、Z 设定值应和标准白板给出的  $X_{10}$ 、 $Y_{10}$ 、 $Z_{10}$  一致；测透射色时，数码器中 X、Y、Z 设定如下：X=94.83, Y=100.00, Z=107.381。）

#### 3、样品的测色实验

- 1) 将标准白板放在探测器部件下，几秒钟后，按 MEASU 开关，灯固定发光，几秒后，打印机开始工作，并打出 STANDARD（标准）标号及标准白板的颜色参量值，打印机工作结束后

灯灭。

2) 取下标准白板, 将待测样品 1#放好, 几秒后, 按 MEASU 开关, 此时指示灯亮, 一会儿打印机就打出编号 No.001 的第一个待测样品的各个参量值, 2#、3#重复该步骤即可。

3) 4#、5#、6#重复步骤(2)即可得出 No.004, No.005, No.006 的各个参量值。

4) 测定粉白度值时, 只要把样品盒对准探测器的孔, 重复步骤(2), 即可打出 No.007-009 的各个参量值。

5) 关机

当一批样品测色结束后, 关上 POWER 开关, 指示灯灭, 切断电源, 收好标准白板、工作白板、黑筒等, 待仪器冷却到室温, 盖上黑布罩。

#### 【注意事项】

1、预热量, 必须把探测器放在工作白板上, 而不能放标准白板, 否则必将使标准值改变, 提高测量误差。

2、放打印纸时, 要注意正、反方向。

3、每次测量时, 必须严格按照操作步骤, 依序操作, 否则, 不但测量不准, 而且容易损坏仪器。

4、当测粉末样品时(如淀粉), 必须把样品装在样品盒中填满, 并且表面要刮平, 否则, 因表面凹凸不平, 将使测量值不准。

5、当样品量多时, 为了使测量值准确, 使用半小时后, 要求重新调零, 调标准白板。(先按 RESET 复位开关, 再重复色差计使用步骤中的(4)、(5), 唯一不同的是, 按下 ACC 后, MEASU 不再闪烁, 此时调白已完成了, 可继续进行测量工作。

6、工作时千万不能关掉 POWER 开关或输入电源, 否则仪器需重新预热一小时, 不预热, 则测色不准。

7、由于 TC-P II G 全自动测色色差计是精密、贵重的仪器, 使用时, 要十分注意环境的清洁, 不要让仪器或部件粘上污物。

#### 【思考题】

1、TC-P II G 全自动测色色差计的先进性表现在哪些方面?

2、TC-P II G 全自动测色色差计在测淀粉白度时, 应注意哪些问题?

3、测色时, 白度、黄度、变黄度如何表示, 其数值大小的表示意义如何?



## 实验八 绿色果蔬分离叶绿素及其含量测定

### 【实验原理】

叶绿素存在于果蔬、竹叶等绿色植物中。叶绿素在植物细胞中与蛋白质结合成叶绿体，当细胞死亡后，叶绿素即游离出来，游离叶绿素很不稳定，对光或热较敏感；在酸性条件下生成绿褐色脱镁叶绿素，加热可使反应加速；在稀碱液中可水解为叶绿酸盐（鲜绿色）、叶绿醇和甲醇。高等植物中叶绿素有 a、b 两种，二者都易溶于乙醇、乙醚、丙酮和氯仿中。

叶绿素的含量测定方法多种，其中有：

- (1) 原子吸收光谱法：测定镁含量，可以间接算出叶绿素含量。
- (2) 分光光度法：测定叶绿素提取液的最大吸收波长的光密度，然后通过公式计算获得叶绿素含量数据。此法快速、简便。其原理如下：

叶绿素 a、叶绿素 b 对 645nm 和 663nm 波长的光有吸收高峰，且两吸收曲线相交于 652nm 处。因此，测定提取液在 645nm、663nm、652nm 波长下的光密度，并根据经验公式计算，可分别得到叶绿素含量数据。

$$\text{叶绿素 a 含量} = [12.7(D_{663}) - 2.69(D_{645})] \times \frac{V}{1000 \times W} \text{ (mg/g 鲜重)}$$

$$\text{叶绿素 b 含量} = [22.9(D_{645}) - 4.68(D_{663})] \times \frac{V}{1000 \times W} \text{ (mg/g 鲜重)}$$

$$\text{总叶绿素 a 含量} = [20.0(D_{645}) + 8.02(D_{663})] \times \frac{V}{1000 \times W} \text{ (mg/g 鲜重)}$$

如果只要求测定总叶绿素含量，则只需测定一定浓度提取液在 652nm 波长的光密度。其总叶绿素含量按下式计算：

$$\text{总叶绿素} = \frac{D_{652}}{34.5} \times \frac{V}{1000 \times W} \text{ (mg/g 鲜重)}$$

D——表示在所指定波长下，叶绿素提取液的光密度读数；

V——为叶绿素丙酮提取液的最终体积 (ml)；

W——为所用果蔬组织鲜重 (g)。

### 【实验材料、试剂与仪器】

绿叶青菜，黄瓜，玻璃砂、丙酮、分光光度计

### 【实验步骤】

#### 1、叶绿素提取及含量测定

均匀称取青菜样品 5g 于研钵中，加入少许玻璃砂（约 0.5-1g），充分研磨后倒入 100ml 容量瓶中，然后用丙酮分几次洗涤研钵并倒入容量瓶中，用丙酮定容至 100ml。充分振摇后，用滤纸过滤。取滤液用分光光度计分别于 645nm、663nm 和 652nm 波长下，测定其光密度。以 95% 丙酮作空白对照实验。将测定记录数据列表，按照公式分别计算青菜组织中叶绿素 a、b 和总叶绿素含量。

#### 2、叶绿素在酸碱介质中稳定性实验

分别取 10ml 叶绿素提取液，滴加 0.1M 盐酸和 0.1M NaOH 溶液，观察提取液的颜色变化情况，并记录下颜色变化时的 pH 值。

### 【注意事项】

(1) 所计算出的叶绿素含量单位为 mg/g 鲜重。这一单位有时太小，使用不方便，可乘以 1 000 倍，变为  $\mu$  g/g 鲜重为单位。

(2) 在提取叶绿素中，最终的丙酮液浓度为 95%，因所用材料为菠菜等青菜，含水量极高。5g 样品可视作 5g 水，故研磨后定容至 100ml，丙酮液浓度为 95%。

(3) 若以黄瓜为材料，因叶绿素只存在于黄瓜皮中，取样是用锋利剖刀在黄瓜平整部分轻轻地将绿色表皮削下，然后称取 0.5g 样品研磨，加水 5ml 充分研磨，然后用丙酮洗涤，定容至 100ml，为 95% 丙酮提取液。

(4) 使用分光光度计调零时，必须用 95% 丙酮。

### 【思考题】

1、测定叶绿素含量实验中，使用分光光度计应注意哪些问题？

2、叶绿素在酸碱介质中稳定性如何？

3、试说明日常生活中炒青菜时，若加水熬煮时间过长，或加锅盖或加醋，所炒青菜容易变黄的原因？你认为应该如何才能炒出一盘保持鲜绿可口的青菜。

## 第四部分 食品分析实验

### 实验一 用物理方法测定食品中相关组分

[实验目的] 用阿贝折光仪和糖量计测定果汁中可溶固形物的浓度

[实验原理] 均一物质的折射率是其物理指标。测定样品的折射率，可判断其均一程度和纯度。 $n_1 = n_2 \times \sin \alpha_2$   $\alpha_2$ 随样品的溶液的浓度发生变化，可从棱镜的旋转角度读出，求出被检液的折射率 $n_1$ 。光线折射进入液层，部分被反射，在反射光中得到比较清晰的视野，结果是明暗交界的视野，所对应的读数反映溶液的浓度。

[实验步骤]

#### 1. 阿贝折光仪测定果汁中可溶固形物的浓度

1) 折光仪的校准:用测定蒸馏水折射率的方法来进行校正,温度 20℃下,折射率是 1.332299,折光仪表示蒸馏水含 0%的可溶性固形物,用校正螺旋调整。

#### 2) 折光仪的使用方法:

- 滴加 1-2 滴的液体样品于下面的棱镜上,迅速闭合两块棱镜,调整反射镜,使光线射入棱镜中。
- 由目镜观察,旋转棱镜的旋钮,使视野分成明暗两部分。
- 旋动补偿器旋钮,使视野仅有黑白两色。
- 转动棱镜的旋钮,使明暗分界线在十字线的交叉点。
- 通过放大镜在刻度尺上进行读数,查表得到可溶固形物浓度。
- 测定后,擦拭棱镜表面并使其干燥,若为油类样,用乙醇或乙醚擦拭。

#### 2. 糖量计测定果汁中可溶固形物的浓度

[实验注意事项] 注意零点和温度校正。

## 实验二 食品中水分的测定方法

[实验目的] 用直接干燥法测定样品中的水分含量。

[实验原理] 食品中的水分一般是指在 100℃左右直接干燥的情况下所失去物质的总量。直接干燥法适用于在 95~105℃下不含或含其他挥发性物质甚微的食品。

[实验步骤]

- 1、 取洁净玻璃制的扁形称量瓶,置于 95~105℃干燥箱中,瓶盖斜支于瓶边,加热 0.5~1.0h,取出盖好,置干燥器内冷却 0.5h,称量,并重复干燥至恒量。称取 1~2g 奶粉,放入此称量瓶中,加盖,精密称量后,置 95~105℃干燥箱中,瓶盖斜支于瓶边,干燥 2~4h 后,盖好取出,放入干燥器内冷却 0.5h 后称量。
- 2、 然后再放入 95~105℃干燥箱中干燥 1 h 左右,取出,放干燥器内冷却 0.5h 后再称量。至前后两次质量差不超过 2mg,即为恒重。若有增重,以前一次的重量为准。

[实验结果及分析]

$$X_1 = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m_1 - m_3}$$

式中:  $X_1$ —样品中水分的含量, % ;

$m_1$ —称量瓶和样品的质量, g;

$m_2$ —称量瓶和样品干燥后的质量, g;

$m_3$ —称量瓶的质量, g。

[实验注意事项]

1. 称量瓶在干燥箱中要开着盖,放在干燥器中要盖着盖。
2. 干燥的样品量以称量瓶容积的 1/3 左右为宜。

### 实验三 总酸的测定

[实验目的] 用滴定法测定样品中总酸的含量

[实验原理] 果汁具有酸性反应，这些反应取决于游离态的酸以及酸式盐存在的量。总酸度包括未解离酸的浓度和已解离酸的浓度。酸的浓度以摩尔浓度表示时，称为总酸度。含量用滴定法测定。果蔬种类不同，含有机酸的种类和数量也不同，含酸量测定是根据酸碱中和的原理，即用标定的氢氧化钠溶液滴定。

[实验步骤]

#### 1. 试剂

- 1) 0.1mol/L 氢氧化钠：称 4.0g 氢氧化钠定容至 1000ml，然后用邻苯二甲酸氢钾标定。精密称取约 0.6g 在 105~110℃干燥至恒重的基准邻苯二甲酸钠，加入 80ml 新煮沸过的冷却水，使之尽量溶解，加 2 滴酚酞指示液，用本溶液滴定至溶液浅粉色，0.5 分钟不退色。

$$N = \frac{W}{(V_1 - V_2) \times 0.2042}$$

N — 氢氧化钠标准溶液的摩尔浓度，mol/L；

W — 基准邻苯二甲酸钠的克数，g；

V<sub>1</sub> — 氢氧化钠标准溶液用量，mL；

V<sub>2</sub> — 试剂空白氢氧化钠标准溶液用量，mL；

0.2042—每毫克当量邻苯二甲酸钠的克数。

- 2) 1% 酚酞指示剂：称 1.0g 酚酞，加入 95% 的乙醇 100ml 溶解。

#### 2. 操作方法

准确称取混合均匀磨碎的样品 10.0g (或吸 10.0ml 样品液)，转移到 100ml 容量瓶中，加蒸馏水至刻度、摇匀。用滤纸过滤，准确吸取滤液 20ml 放入 100ml 三角瓶中，加入 1% 酚酞 2 滴，用标定好的氢氧化钠滴定至初显粉色在 0.5min 内不褪色为终点，边滴边摇，记下氢氧化钠用量，重复三次，取平均值。

[实验结果及分析]

$$X = \frac{N \times V_1 \times K \times V_3}{V_2 \times M} \times 100$$

式中：X—总酸度(%)

$V_1$ —消耗氢氧化钠标准液体积(ml)；

$V_2$ —滴定时取样液体积(ml)；

N—氢氧化钠标准液摩尔浓度 (mol/l)；

M—样品质量，g 或 ml

$V_3$ —样品稀释总体积

K—折算系数：即不同有机酸的毫摩尔质量(g/mmol)，食品中的总酸度往往根据所含酸的不同，而取其中一种主要有机酸计量。食品中常见的有机酸及其毫摩尔质量折算系数如下：苹果酸--0.067(苹果、梨、桃、杏、李子、番茄、莴苣)；醋酸--0.060(蔬菜罐头)；酒石酸--0.075(葡萄)；柠檬酸--0.070(柑橘类)；乳酸--0.090(鱼、肉罐头、牛奶)。

## 实验四 脂肪含量的测定

[实验目的] 用索氏提取法测定食品中的脂肪含量

[实验原理] 在加热条件下，利用有机溶剂提取样品中的脂肪，蒸发溶剂后得到的剩余物，再采用重量法，测定其含量。

[实验仪器、试剂和样品]

- 1) 仪器 ZF-06A 脂肪测定仪、分析天平 (0.0001g)、电热恒温箱、100mm 圆形定性滤纸、
- 2) 试剂 石油醚(30-60℃): AR
- 3) 样品 玉米粉

[操作方法]

### 1、操作前准备

- 1) 抽提瓶蒸馏水洗净，干燥箱在 105℃ 烘干 1 小时，取出放入干燥器内，冷却后称重编号备用。
- 2) 水浴锅内注入蒸馏水，使水位高度达到与抽提瓶底部保持接触。将仪器上的冷却水口由自来水相连，出水口放入下水道。
- 3) 先将水预热到实验所需的温度 75℃。
- 4) 打开时间控制器设定所需要的时间，打开电源开关，将温控仪设定到 75℃，等温度加热到所需要的温度时即可进行实验操作。

### 2、具体操作

- 1) 试样包扎：用滤纸准确称量 2g，精确到 0.0001g，叠成滤纸筒样，放入抽提器内，滤纸边缘不能超过抽提瓶上边缘。
- 2) 在抽提瓶内注入约 40ml 石油醚，然后将抽提器套入抽提瓶内，再将抽提器口对准冷凝管口相对接。抽提瓶移入水浴锅使蒸馏水与瓶底相接触。
- 3) 打开冷却水，打开时间控制器设定的时间 1.3 小时，打开电源开关控制温度，样品进入正常的操作。
- 4) 抽提结束：时间控制器自动鸣号，关闭电源。将回收开关关闭（横式），再打开电源开关，

将水浴温度调到 95℃ 蒸干石油醚。将抽提瓶外壁用石油醚清洗干净, 晾干后放入烘箱中 105℃ 烘干 1 小时、冷却、称重计算结果。

5、将回收的石油醚倒入回收瓶中。

[结果计算]

$$X_1 = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_2} \times 100$$

式中：X<sub>1</sub>—样品中脂肪含量（%）

m<sub>1</sub>—抽提瓶和样品的质量，g；

m<sub>2</sub>—抽提瓶和脂肪的质量，g；

m<sub>3</sub>—抽提瓶的质量，g。

[注意事项]

- 1) 水浴锅内的水位要超过电热管，防止空烧，损坏电热管。
- 2) 及时补充水浴锅内的蒸馏水，保证与抽提瓶底部接触。
- 3) 滤纸边缘不能超过抽提瓶上边缘。
- 4) 抽提结束，清洗干净抽提瓶外壁。



## 实验五 食品中淀粉的测定方法

[实验目的] 用直接滴定法测定样品中还原糖的含量。

[实验原理] 淀粉测定可先除去脂肪和可溶性糖，酸化水解生成还原性的葡萄糖，葡萄糖在加热条件下，直接滴定标定过的碱性酒石酸铜液，以次甲基蓝作指示剂，根据样品液消耗体积，计算还原糖量，再乘以换算系数 0.9，即为淀粉的含量。

[实验试剂]

1、碱性酒石酸铜甲液：称取 15g 硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )及 0.05g 次甲基蓝，溶于水中并稀释至 1000ml。

2、碱性酒石酸铜乙液：称取 50g 酒石酸钾钠及 75g 氢氧化钠，溶于水中，再加入 4g 亚铁氰化钾，完全溶解后，用水稀释至 1000ml，贮存于橡胶塞玻璃瓶内。

3、葡萄糖标准溶液：精密称取 1.000g 经过 98~100℃ 干燥至恒量的纯葡萄糖，加水溶解后加入 5ml 盐酸，并以水稀释至 1000ml。此溶液每毫升相当于 1mg 葡萄糖。

[实验步骤]

1、标定碱性酒石酸铜溶液：吸取 5.0ml 碱性酒石酸铜甲液及 5.0ml 乙液，置于 150ml 锥形瓶中，加水 10ml，锥形瓶置于电炉上，从滴定管滴加约 9ml 葡萄糖标准溶液，控制在 2min 内加热至沸，沸腾状态下以每两秒 1 滴的速度继续滴加葡萄糖标准溶液，直至溶液蓝色刚好褪去为终点，记录消耗葡萄糖标准溶液的总体积，同时平行操作三份，取其平均值，计算每 10ml (甲、乙液各 5ml) 碱性酒石酸铜溶液相当于葡萄糖的质量(mg)。

2、样品处理：取土豆淀粉 0.3g，用蒸馏水 50ml 洗入 100ml 的容量瓶中，加入 2.5 ml 浓盐酸，沸水浴中煮 40-60min，取出冷却，加 1% 的酚酞 2-3 滴，然后加 6mol/L 的 NaOH 中和到微红色，定容到 100ml，摇匀后过滤待测。

3、样品溶液预测：吸取 5.0ml 碱性酒石酸铜甲液及 5.0ml 乙液，置于 150ml 锥形瓶中，加水 10ml，控制在 2min 内加热至沸，趁沸以先快后慢的速度，从滴定管中滴加样品溶液，并保持溶液沸腾状态，待溶液颜色变浅时，以每两秒 1 滴的速度滴定，直至溶液蓝色刚好褪去为终点，记录样液消耗体积。

4、样品溶液测定：吸取 5.0ml 碱性酒石酸铜甲液及 5.0ml 乙液，置于 150ml 锥形瓶中，加水 10ml，从滴定管滴加比预测体积少 1ml 的样品溶液，使在两分钟内加热至沸，趁沸继续以每两秒 1 滴的速度滴定，直至蓝色刚好褪去为终点，记录样液消耗体积，同法平行操作三份，得出平均消耗体积。整个滴定操作在 3min 完成。

[实验结果及分析]

$$X = \frac{V_1 \times N \times 100}{m \times V_2 \times 1000} \times 0.9$$

式中 X—样品中淀粉的含量，%；

$V_1$ —标定碱性酒石酸铜溶液平均消耗葡萄糖标准液的体积，ml；

$V_2$ —测定时平均消耗样品液的体积，ml；

N—样品稀释总体积，ml；

m—样品质量，g

[实验注意事项]

- 1、整个滴定过程必须在沸腾条件下进行，其目的是为了加快反应速度和防止空气进入，避免氧化亚铜和还原型的次甲基蓝被空气氧化从而使得耗糖量增加。
- 2、测定中还原糖液浓度、滴定速度、热源强度及煮沸时间等都对测定精密度有很大的影响。
- 3、滴定所消耗的样品液应与消耗的葡萄糖溶液的体积相近，继续滴定至终点的体积数应控制在 0.5~1ml 以保证在 1 分钟内完成滴定的工作。

## 实验六 食品中蛋白质的测定方法

[实验目的] 用凯氏定氮法测定样品中粗蛋白的含量。

[实验原理] 蛋白质食品与硫酸和催化剂一同加热消化，使蛋白质分解，分解的氨与硫酸结合生成硫酸铵，然后碱化蒸馏使氨游离，用硼酸吸收后再以硫酸或盐酸标准溶液滴定，根据酸的消耗量乘以换算系数，即为蛋白质含量。

[实验步骤]

1、试剂 所有试剂均用不含氨的蒸馏水配制

1) 混合指示液：1 滴 0.1% 甲基红乙醇(95%乙醇)溶液与 5 滴 0.1% 溴甲酚绿乙醇溶液临用时混合。使硼酸液呈浅粉色。

2) 0.05N 盐酸标准溶液、2% 硼酸、40% NaOH、浓硫酸

2、操作方法

1) 样品处理(消化)：精密称取 0.1~1g 样品(视含氮量而定)，经粉碎通过 40~60 目筛子，移入干燥的消化管中，加入一片定氮催化片(或 0.4g 硫酸铜和 6g 硫酸钾)及 10ml 浓硫酸，将消化管分别放入消化架的孔内，置于消化炉上，放好排污管，打开抽气三通，使之处于吸气状态，再接电源，打开各控制开关，使其消化，在初始阶段，须注意观察防止试样飞溅(缓解方法可在消化至飞溅时关机 5 分钟，再开机继续加热，至液体呈无色(若加硫酸铜呈蓝绿色)澄清透明后，再消化 15min，取下排污管一起取下，放冷。

2) 蒸馏：用橡胶管连接仪器侧面的各接口。40% NaOH 和水的接口用橡胶管连接到各自的容器内，冷却水的接口和自来水连接，排水阀和出水口连接到水槽内。开机前先观察蒸发炉内水位，不能超过电极底部，如超过先排水，打开排水阀，打开蒸汽开关即可，必须关闭冷却水。

打开电源开关和冷却水，打开蒸汽开关，关掉排水阀，然后观察电流表，当电流表指针升到 5A，关掉蒸汽开关，当电流回到 1A 时再马上打开蒸汽开关，反复开关蒸汽开关 10 次左右，直到蒸汽从蒸馏管内喷出，持续 0.5 分钟左右，关掉蒸汽开关，

以进入待机状态。蒸馏样品前如待机时间过长，可先开一下蒸汽开关，蒸汽喷出后再关掉蒸汽开关。

- 3) 向 250ml 的接收瓶内加入 50ml 2% 硼酸溶液及混合指示液 1 滴，使硼酸吸收液呈粉红色，并使冷凝管的下端插入液面下，将消化管安装到定氮仪上，分别打开水开关，从刻度尺上看加入 20ml 蒸馏水于消化管中，再打开 NaOH 开关，加入 50ml 的 NaOH（消化时硫酸的 5 倍），添加的同时要将接收瓶放好，打开蒸汽开关，开始蒸馏。当三角瓶接收液达 150ml（呈兰色）时，移动接受瓶，使冷凝管下端离开液面，然后用少量水冲洗冷凝管下端外部，再蒸馏 0.5min。取下接收瓶，以 0.05N 盐酸标准溶液滴定至灰色或粉红色为终点。同时空白消化液按(3)操作，空白不加样品。

#### [实验结果及分析]

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 0.014 \times F \times 100}{m}$$

式中 X—样品中蛋白质的含量，%；

$V_1$ —样品消耗盐酸标准液的体积，ml；

$V_2$ —试剂空白消耗盐酸标准液的体积，ml；

N—盐酸标准溶液的当量浓度，0.05N；

0.014—1N 盐酸标准溶液 1 ml 相当于氮的克数；

m—样品的质量，g；

F—氮换算为蛋白质的系数。蛋白质中的氮含量一般为 15~17.6%，按 16%计算乘以 6.25 即为蛋白质。

#### [实验注意事项]

- 1、所用试剂溶液应用无氨蒸馏水配制。
- 2、蒸馏装置不能漏气。
- 3、混合指示剂在碱性溶液中呈蓝色，在中性溶液中呈灰色，在酸性溶液中呈红色。
- 4、每天工作结束后关机，把碱液管从容器中取出，放入蒸馏水瓶中，在蒸馏器前放置一支空消化管，打开碱液开关，抽取约 200ml 蒸馏水清洗碱泵。

## 实验七 抗坏血酸（维生素C）的测定

### 方法 1 2,6-二氯靛酚滴定法

[适用范围] 本标准适用于果品、蔬菜及其加工制品中还原型抗坏血酸的测定(不含二价铁、二价锡、一价铜、二氧化硫、亚硫酸盐或硫代硫酸盐)，不适用于深色样品。

[测定原理] 染料 2,6-二氯靛酚的颜色反应表现两种特性,一是取决于其氧化还原状态,氧化态为深蓝色,还原态变为无色;二是受其介质的酸度影响,在碱性溶液中呈深蓝色,在酸性介质中呈浅红色。用蓝色的碱性染料标准溶液,对含维生素 C 的酸性浸出液进行氧化还原滴定,染料被还原为无色,当到达滴定终点时,多余的染料在酸性介质中则表现为浅红色,由染料用量计算样品中还原型抗坏血酸的含量。

[实验试剂(凡未加说明者均为分析纯)]

- 1、 草酸: 2%溶液(W/V)。
- 2、 抗坏血酸标准溶液(0.1mg/ml): 称取 10mg(准确至 0.1mg)抗坏血酸,溶于 2%草酸溶液中并稀至 100ml,现配现用。
- 3、 2,6-二氯靛酚(2,6-二氯靛酚吡啶酚钠盐)溶液: 称取碳酸氢钠 52mg 溶解在 200ml 热蒸馏水中,然后称取 2,6-二氯靛酚 50mg 溶解在上述碳酸氢钠溶液中。冷却定容至 250ml,过滤至棕色瓶内,保存在冰箱中。每次使用前,用标准抗坏血酸标定其滴定度。即吸取 1ml 抗坏血酸标准溶液于 50ml 锥形瓶中,加入 2%草酸溶液 9ml,摇匀,用 2,6-二氯靛酚溶液滴定至溶液呈粉红色 15s 不褪色为止。同时,另取 2%草酸溶液 10ml 做空白试验。

滴定度按式(1)计算:

$$\text{滴定度 } T(\text{mg/ml}) = \frac{C \times V}{V_1 - V_2}$$

式中: T——每毫升 2,6-二氯靛酚溶液相当于抗坏血酸的毫克数;

C——抗坏血酸的浓度, mg/ml;

V——吸取抗坏血酸的体积, ml;

$V_1$ ——滴定抗坏血酸溶液所用 2,6-二氯靛酚溶液的体积, ml;

$V_2$ ——滴定空白所用 2,6-二氯靛酚溶液的体积, ml。

4、样品测定:称取具有代表性样品的可食部分 100g,放入组织捣碎机中,加 2%草酸溶液 100ml,迅速捣成匀浆。称取 10~40g 浆状样品,用 2%草酸溶液将样品移入 100ml 容量瓶,并稀释至刻度,摇匀过滤。若滤液有色,可按每克样品加 0.4g 白陶土脱色后再过滤。白陶土(或称高岭土)对维生素 C 无吸附性。吸取 10ml 滤液放入 50ml 锥形瓶中,用已标定过的 2,6-二氯靛酚溶液滴定,直至溶液呈粉红色 15s 不褪色为止。取 2%草酸溶液 10ml 做空白试验。

液体样品的测定:取 2~10ml 果汁用 2%草酸定容至 50ml,取 10ml 稀释的果汁置于 100ml 三角瓶中,用标定过的 2,6-二氯靛酚染料滴定至溶液呈粉红色于 15s 内不褪色为止。做三个平行。同时做空白试验。

## 5、 结果计算

### 1) 计算公式

$$\text{维生素C (mg/100g)} = \frac{(V - V_0) \times T}{\frac{W}{V_2} \times V_1} \times 100$$

式中:  $V$  —— 滴定样液时消耗染料溶液的体积, ml;

$V_0$  —— 滴定空白时消耗染料溶液的体积, ml;

$V_1$  —— 滴定样液时所用稀释液的体积, ml;

$V_2$  —— 样品稀释总体积, ml;

$T$  —— 2,6-二氯靛酚染料滴定度, mg/ml;

$W$  —— 样品重量, g。

2) 平行测定的结果用算术平均值表示,取三位有效数字,含量低的保留小数点后两位数字。

3) 平行测定结果的相对相差,在维生素 C 含量大于 20mg/100g 时不得超过 2%,小于 20mg/100g 时不得超过 5%。

## 6、 实验注意事项

1) 一般抗坏血酸纯度为 99.5%以上可不标定。如试剂发黄则弃去不用。

- 2) 所有试剂配制最好用重蒸水。
- 3) 整个操作过程要迅速，防止还原型抗坏血酸被氧化。
- 4) 滴定开始时，染料溶液要迅速加入，直至红色不立即消失，而后尽可能的一滴一滴的加入，并要不断摇动三角烧瓶，直至粉红色于 15 秒内不立即消失为止。样品中有其他杂质也能还原 2,6-二氯靛酚，但一般杂质还原该染料的速度较抗坏血酸慢，所以滴定时以 15 秒粉红色不褪为终点。

## 方法 2 紫外法测定还原性 Vc

**【实验原理】** 还原型维生素C在 263 nm下有最大吸收峰，在 0~450  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内具有良好的线性。 $\text{Cu}^{2+}$  作催化剂，利用溶解氧，将在 263 nm处有最大吸收的还原型维生素C选择性地氧化为 263nm处无吸收峰的氧化型维生素C，实现了对样品中各种紫外干扰成分的本底校正，建立了一种测定果蔬中还原型维生素C的新方法。运用该方法实际测定了样品中的还原型维生素C的含量，回收率在 97.6~100.8%之间，测定结果与荧光法基本一致。

### 【试剂】

- (1) 稀盐酸溶液：取 133ml 盐酸，以蒸馏水定容到 500 ml 的容量瓶中。
- (2) 维生素 C 标准溶液：准确称取 0.0250g 维生素 C，以 10ml 稀盐酸溶解，并以蒸馏水定容到 250ml (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。
- (3)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  溶液：准确称取  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 0.1890\text{g}$ ，以蒸馏水溶解并定容到 500ml 的容量瓶中，使  $\text{Cu}^{2+}$  的质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

材料：猕猴桃

### 【操作方法】

- 1) 标准曲线绘制：分别吸取 0、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 ml 标准维生素 C (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 于 25ml 比色管中，并分别加入 pH3.0 的稀盐酸缓冲液 5.0ml，以水定容至刻度，以未加标准样的空白管为参比，1cm 比色皿在 263nm 处比色测定各管的吸光度值，以维生素 C 含量为横坐标，对应的吸光值为纵坐标绘制工作曲线。

2) 样品处理: 取样品 20g 放入研钵中, 加入 40ml 稀盐酸制成匀浆, 注入 100ml 容量瓶中, 稀释至刻度, 静止几分钟后, 过滤(弃去最初流出的几毫升溶液)。

3) 样品测定: 取 50 ml 的容量瓶, 加入样液 2 ml, 1 ml 稀盐酸, 0.3 ml  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  溶液, 将溶液混合, 取 1ml 混合液, 3ml 稀盐酸。然后在 70℃ 的恒温水浴锅中, 加热 13min 后, 以冰水冷却, 以前标准样为空白, 263nm 下测定吸光度。

### 【计算】

$$\text{还原型维生素 C (mg/100g)} = \frac{C \times V_2 \times F \times 100}{V_1 \times W \times 1000}$$

式中:  $V_1$ —测定用样品体积(ml)

$V_2$ —样品定容总体积(ml)

F—样品处理稀释倍数

W—样品重(g)

C—标准曲线上查得还原型维生素 C 的含量( $\mu\text{g}$ )

## 方法 3 荧光法测定总 Vc

### 【实验原理】

样品中还原型抗坏血酸经活性炭氧化为脱氢抗坏血酸后, 与邻苯二胺反应生成荧光的喹恶啉, 其荧光强度与脱氢抗坏血酸的浓度在一定条件下成正比, 依次测定食物中抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的总量。脱氢抗坏血酸与硼酸可形成复合物而不与邻苯二胺反应, 以此排除样品中荧光杂质产生的干扰。

### 【实验试剂及仪器】

- (1) 活性炭(同 2,4-二硝基苯肼比色法中配法)。
- (2) 1%草酸溶液: 草酸 5g 溶于 500ml 蒸馏水中。
- (3) 2%草酸溶液: 草酸 10g 溶于 500ml 蒸馏水中。
- (4) 乙酸钠溶液: 称取乙酸钠 100g, 溶解于水中, 并定容至 200ml。



- (5) 邻苯二胺：称取 20mg 邻苯二胺溶于 100ml 水中。使用前新鲜配制(避光保存)。
- (6) Vc 标准储备液：称取 100mg Vc，以 1%草酸定容至 100ml，此溶液含 Vc 为 1mg/ml。
- (7) 标准抗坏血酸应用液：准确吸取标准抗坏血酸储备液 10ml 置 100ml 容量瓶中，用 1%草酸溶液稀释至刻度，用时现配。终浓度为每 ml 应用液含抗坏血酸 100 μ g。

**【实验材料】** 猕猴桃

**【操作步骤】**

- 1、样品处理：：取样品 100g 放入研钵中按 1:1(w / v)加入 2%草酸制成匀浆。称取匀浆 10g 于小烧杯中，注入 100ml 容量瓶中，用 1%草酸溶液冲洗烧杯、稀释至刻度，振摇。静置几分钟后，离心机分离(4000rpm, 10min)取上清液。
- 2、氧化：取上述滤液，标准应用液约 50ml 置 100ml 带盖三角瓶中，加活性炭 1g 振摇 1 分钟，离心机分离取上清液。
- 3、制备试液、标液：取 10ml 标准氧化液于 100ml 容量瓶中，标记“标准”；取 10ml 样品氧化液于 100ml 容量瓶中，标记“样品”；于“标准”“样品”各加 5ml 乙酸钠溶液，用水稀释至 100ml，取“样品”10ml 于 100ml 容量瓶中，用水稀释至 100ml，标记“样品 1”；
- 4、标准曲线制备：取“标准”溶液（抗坏血酸含量为 10ug/ml）0.5ml, 1.0ml, 1.5ml, 2.0ml 标准系列置于 10ml 试管，加水补足 2ml，荧光反应。
- 5、荧光反应：取“样品 1”溶液各 2 ml，置于 10ml 试管中。在暗室各管迅速加入 5ml 邻苯二胺溶液，振摇混合，在暗室室温下反应 35 分钟，荧光反应。

负高压：-800V

灯电流：21A

灵敏度：10

激发波长：350nm

发射波长：433nm

扫描波长范围：400-500nm

**【结果与计算】**

$$\text{样品总抗坏血酸含量 (mg/100g)} = \frac{C \times V \times F \times 100}{m \times 1000}$$

式中 V—样品用草酸定容总体积(ml)；

m—样品重(g)

C—标准曲线上查得维生素 C 的含量(ug).

F—样品氧化处理稀释倍数

### 【说明】

荧光法灵敏度高，适于测定总抗坏血酸含量较少的样品，误差原因有：活性炭是一个很好的吸附剂，当活性炭用量过大时，也会对维生素 C 产生吸附作用，降低相对荧光强度，使测定结果偏低。样品与邻苯二胺不断反应，需及时进行比色，否则对准确性造成一定影响。此外，影响荧光强度的因素很多，各次测定条件很难完全一致。因此，标准曲线最好与样品同时做。

### 方法 4 2,4-二硝基苯肼法测定总 Vc

【实验原理】 食物中的总抗坏血酸包括还原型和脱氢型两种形式。当食物陈旧，贮存日久以及经过烹调处理的食物，其中有相当一部分抗坏血酸成为脱氢型，此种形态的抗坏血酸仍有 85%左右的维生素 C 活性，所以对这类食物常常测定总抗坏血酸。测定时须将样品中的还原型抗坏血酸氧化成脱氢型抗坏血酸。在一定条件下脱氢型抗坏血酸与 2,4-二硝基苯肼偶联生成红色的脎，脎的生成量与总抗坏血酸含量成正比。将脎溶于硫酸后即可进行比色定量。

### 【实验试剂】

- 1、4.5mol/L 硫酸：慎重将 125ml 浓硫酸（比重 1.84）缓慢加入 350ml 蒸馏水中，冷却后稀释至 500mL。
- 2、2%的 2,4-二硝基苯肼：溶解 2g 2,4-二硝基苯肼于 100ml 的 4.5mol/L 硫酸中，过滤。4℃保存。每次用前需再过滤，保存时间限于二周。
- 3、85%硫酸：850ml 浓硫酸(比重 1.84)缓慢加入 150ml 水中。
- 4、2%草酸溶液：草酸 10g 溶于 500ml 蒸馏水中。
- 5、1%草酸溶液：草酸 5g 溶于 500ml 蒸馏水中。
- 6、10%硫脲：称取硫脲 10g 溶于 100ml 1%草酸中。
- 7、活性炭：100g 活性炭加 750ml 1N 盐酸回流 1~2 小时，过滤，用蒸馏水反复洗涤活性炭至洗涤滤液中无  $\text{Fe}^{3+}$  为止（取活性炭洗涤滤液少许，加数滴 5%亚铁氢化钾，若不出现蓝色，表示无  $\text{Fe}^{3+}$ ）。然后置烤箱中 110℃ 烘于冷却后置干燥器中备用。

(8) 5%亚铁氰化钾：亚铁氰化钾 5g 溶于 100ml 蒸馏水中

(9) 标准抗坏血酸储备液：精确称取抗坏血酸 100mg，以 1.0% 草酸溶解并定容至 100ml，4℃ 保存。终浓度为每 ml 溶液含抗坏血酸 1.0mg。

(10) 标准抗坏血酸应用液：准确吸取标准抗坏血酸储备液 10ml 置于 100ml 容量瓶中，用 1% 草酸溶液稀释至刻度，用时现配。终浓度为每 ml 应用液含抗坏血酸 100ug。

**【材料】** 猕猴桃

**【器材】**

研钵，分光光度计，回流装置，干燥箱，100ml 容量瓶，锥形瓶，移液管，漏斗，试管若干，HWS24 型电热恒温水浴锅，ALC-210.3 电子天平，WFJ7200 可见分光光度计

**【操作步骤】**

1、样品处理：取样品 100g 放入研钵中按 1: 1(w / v) 加入 2% 草酸制成匀浆。称取匀浆 10g 于小烧杯中，注入 100ml 容量瓶中，用 1% 草酸溶液冲洗烧杯、稀释至刻度，振摇。静置几分钟后，过滤(弃去最初流出的几毫升溶液)。

2、氧化：取上述滤液约 25ml 置 100ml 锥形瓶中，加活性炭 1g 振摇 30S，过滤，取氧化后的滤液 10 毫升置于三角烧瓶中。

3) 脘的形成：取试管四支按下表操作，A 为空白管，B、C、D 为样品管。

管号	A	B	C	D
样品氧化后滤液 (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0
2,4—二硝基苯肼 (ml)	0	0.5	0.5	0.5
滴入 10% 硫脲 (滴)	2	2	2	2

置 37℃ 恒温水浴中保温 3 小时，取出置室温下，A 管加 2% 的 2,4—二硝基苯肼 0.5ml。

4) 脘的溶解：各管置冰浴中缓慢加入 85% 硫酸 2ml，边加边振动，取出试管，室温下放置 30 分钟于 500nm 波长下进行比色，以 A 管调零，测样品管的吸光度。

5) 制作标准曲线：

①取标准抗坏血酸应用液约 25ml 于 100ml 锥形瓶中加入活性炭 0.5g，振摇一分钟过滤。

②取上述滤液 10ml 置 100ml 容量瓶中，加入 5g 硫脲，用 1% 草酸稀释至刻度。终浓度为 1ml

含抗坏血酸 10 微克 (ug)。

③取试管五支，按下列顺序操作：

管 号	0	1	2	3	4
抗坏血酸标准液(10ug / ml) (ml)	0	0.5	1.0	1.5	2.0
各管抗坏血酸含量(μg)	0	5	10	15	20
1%草酸(ml)	2.0	1.5	1.0	0.5	0
2%的 2,4—二硝基苯肼(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
滴入 10%硫脲(滴)	2	2	2	2	2

置 37℃保温 3 小时，取出后置室温下，至室温后各管置冰浴中缓慢加入 85%硫酸 2ml，振摇混匀，室温下放置 30 分钟后于 500nm 波长比色。以吸光度为纵坐标，以抗坏血酸含量为横坐标绘制标准曲线。

**【计算】**

$$\text{样品中总抗坏血酸含量的计算 (mg/100g)} = \frac{C \times V \times F \times 100}{m \times 1000}$$

式中 V—样品用草酸定容总体积(ml)；

m—样品重(g)

C—标准曲线上查得维生素 C 的含量(ug)。

F—样品氧化处理稀释倍数

## 实验八 食品中亚硝酸盐的测定方法

[实验目的]用格里斯试剂比色法测定自制样品中亚硝酸盐的含量。亚硝酸盐检出限为 1mg/kg。

[实验原理]样品经沉淀蛋白质、除去脂肪后，在弱酸条件下亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后，再与 N-1-萘基乙二胺偶合形成紫红色染料，与标准比较定量。

### [实验试剂]

- 1、实验用水为蒸馏水，试剂不加说明者，均为分析纯试剂。
- 2、氯化铵缓冲液：1L 容量瓶中加入 500mL 水，准确加入 20.0ml 盐酸，振荡混匀，准确加入 50mL 氢氧化铵，用水稀释至刻度。必要时用稀盐酸和稀氢氧化铵调试至 pH9.6~9.7。
- 3、硫酸锌溶液(0.42mol/L)：称取 120g硫酸锌( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )，用水溶解，并稀释至 1000mL。
- 4、氢氧化钠溶液(20g/L)：称取 20g 氢氧化钠用水溶解，稀释至 1L。
- 5、对氨基苯磺酸溶液：称取 10g 对氨基苯磺酸，溶于 700mL 水和 300mL 冰乙酸中，置棕色瓶中混匀，室温保存。不易溶解时可具塞水浴加热。
- 6、N-1-萘基乙二胺溶液(1g/L)：称取 N-1-萘基乙二胺 0.1 g，加 60%乙酸溶解并稀释至 100mL，混匀后，置棕色瓶中，在冰箱中保存，一周内稳定。
- 7、显色剂：临用前将 N-1-萘基乙二胺溶液(1g/L)和对氨基苯磺酸溶液等体积混合。
- 8、亚硝酸钠标准溶液：准确称取 250.0mg 于硅胶干燥器中干燥 24h 的亚硝酸钠，加水溶解移入 500mL 容量瓶中，加 100mL 氯化铵缓冲液，加水稀释至刻度，混匀，在 4℃避光保存。此溶液每毫升相当于 500  $\mu$ g 的亚硝酸钠。
- 9、亚硝酸钠标准使用液：临用前，吸取亚硝酸钠标准溶液 1.00mL，置于 100mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，此溶液每毫升相当于 5.0  $\mu$ g 亚硝酸钠。

### [实验步骤]

- 1、样品处理：称取约 10.00g 样品加入 20mL 水研磨，转移至 200mL 容量瓶中，用 50mL 水冲洗研钵，一并移入容量瓶中，混匀，用氢氧化钠溶液(20g/L)调 pH=8，加 10mL 硫酸锌溶液，混匀，如不产生白色沉淀，再补加 2~5mL 氢氧化钠，混匀。置 60℃水浴中加热 10min，取出后冷至室温，加水至刻度，混匀。放置 0.5h，用滤纸过滤，弃去初滤液 20mL，收集滤液备用。

2、亚硝酸盐标准曲线的制备：吸取 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mL 亚硝酸钠标准使用液(相当于 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25g 亚硝酸钠)，分别置于 25mL 带塞比色管中。于各标准管中分别加入 4.5mL 氯化铵缓冲液，加 2.5mL 的 60%乙酸后立即加入 5.0mL 显色剂，加水至刻度，混匀，在暗处静置 25min，用 1cm 比色杯(灵敏度低时可换 2cm 比色杯)，以零管调节零点，于波长 550nm 处测吸光度，绘制标准曲线。

3、样品测定：吸取 10.0mL 上述滤液(1)于 25mL 带塞比色管中，自 (1)“于标准管中分别加入 4.5mL 氯化铵缓冲液”起依法操作。同时做试剂空白。

#### [实验结果及分析]

$$X_1 = \frac{m_2 \times 1000}{m_1 \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中：X<sub>1</sub>—样品中亚硝酸盐的含量，mg / kg；

m<sub>1</sub>—样品质量，g；

m<sub>2</sub>—测定用样液中亚硝酸盐的质量，μg；

V<sub>1</sub>—样品处理液总体积，mL；

V<sub>2</sub>—测定用样液体积，mL。

#### [实验注意事项]

1、样品处理时，加氢氧化钠除脂肪，加硫酸锌除蛋白质，如不产生白色沉淀需加大氢氧化钠或硫酸锌的用量，或减少样品用量，否则对结果有影响。

2、对氨基苯磺酸不易溶解时，可在具塞瓶中温水浴加热溶解。

3、显色时间应控制在 25min 左右，不可时间太长。

## 实验九 钙含量的测定

### 方法 1 高锰酸钾滴定法测定牛奶中钙的含量

**【实验原理】** 样品经灰化后，在酸性溶液中，钙与草酸生成草酸钙，经硫酸溶解后，用高锰酸钾标准溶液滴定，从而计算出钙的含量

**【实验试剂】** 1:1 盐酸溶液、0.1%甲基红指示剂（95%乙醇溶液）、1:4 醋酸溶液、1:4 氢氧化铵溶液、2N 硫酸溶液、4%草酸铵溶液、1%高锰酸钾溶液

#### **【实验步骤】**

- 1、样品处理：称取 0.50g 样品，放于 50ml 凯氏烧瓶中，加入 1 片消化片，浓硫酸 15ml，开始用小火，10min 后加大火力进行消化，直到样品溶液呈透明无黑粒为止。冷却，将凯氏烧瓶中内容物移入 500ml 容量瓶中，加水至刻度，混匀。
- 2、样品分析：准确吸取样品溶液 5ml，移入 15ml 离心管中，加入甲基红指示剂 1 滴，4%草酸铵溶液 2ml、1:4 醋酸溶液 0.5ml，振摇均匀。用 1:4 氢氧化铵溶液将溶液调到微黄色，再用 1:4 醋酸溶液调到微红色，放置 1h，使沉淀完全析出。离心 15min，小心倾去上层清液，在沉淀中加入 2N 硫酸 2ml 摇匀，置于 70~80℃热水浴中，用 1N 高锰酸钾溶液进行滴定到淡红色为止。

#### **【计算方法】**

钙 (mg/100g) =  $N \times V \times 20 \times 100 / W \times 5 / 100$

N-高锰酸钾溶液的当量浓度

V-滴定所消耗高锰酸钾标准溶液的量 (ml)

W-样品的重量 (g)

20-1N 高锰酸钾标准溶液 1ml 相当于钙的量 (mg)

**【注意】** 用高锰酸钾滴定时要不断振摇使溶液均匀。

## 方法2 乙二胺四乙酸（EDTA）滴定法

**【实验原理】** 钙与 EDTA 能够定量地形成金属络合物，稳定性比钙与指示剂所形成的络合物强，在适当的 pH 值范围内（12-14），用 EDTA 滴定，EDTA 从指示剂络合物中逐步夺取钙离子而与钙结合，在到达等当点时，溶液呈游离指示剂的颜色（为终点）。根据 EDTA 的用量，计算钙的含量。

[实验试剂]

- 1、 EDTA 标准溶液：称取 EDTA-2Na 约 10g，溶解在热水中，冷却后用水稀释到 1L
- 2、 钙标准溶液：将碳酸钙经 105℃干燥后，精确称取 1.2500g 碳酸钙于烧杯中，加水 100ml，加盐酸溶液（1：4）使之溶解，放电炉上低温煮沸 2min 去除 CO<sub>2</sub>，待冷却后，用 10% 氢氧化钠中和到 pH6-8，然后用水稀释到 500ml。此溶液含钙 1mg/ml。
- 3、 指示剂：称取 0.30g 紫脲酸胺和 100g 干燥的氯化钠或氯化钾，混合磨匀，贮存在瓶内塞紧，备用。

标定：吸取钙的标准溶液 25ml，用水稀释到 50ml，用 2mol/L 氢氧化钠溶液调到 pH7 左右，再加入 2mol/L 氢氧化钠溶液 10ml，然后加入钙指示剂 0.2g，立即 EDTA 滴定，溶液由葡萄酒红变为纯兰色为滴定终点。则 EDTA 每 ml 相当于钙的 mg 数：

$$X=25 \times 1.0 / V$$

X—每ml EDTA 溶液相当 Ca<sup>2+</sup> 的 mg 数

V—滴定消耗 EDTA 的溶液体积（ml）

25—钙标准溶液的体积（ml）

1.0—钙标准溶液的浓度（mg）

**【实验步骤】**

- 1、 样品处理：同高锰酸钾法
- 2、 样品测定：精确吸取处理后的样液 5mL，加水 20ml，用 2mol/l 氢氧化钠中和后，用水稀释到 50mL，加入 1% 氰化钾溶液 1 滴、2mol/L 氢氧化钠溶液 2ml 及钙指示剂 0.2g，用 EDTA 标准溶液滴定到兰色，同时做空白试验。



### 3、计算

$$\text{钙含量 (mg/100g)} = (V - V_0) \times X \times V_1 / m \times V_2 \times 100$$

式中：X—每mlEDTA溶液相当Ca<sup>2+</sup>的mg数

m—样品质量 (g)

V—滴定消耗 EDTA 的溶液体积 (ml)

V<sub>1</sub>—mg样品经处理后定容的体积 (ml)

V<sub>2</sub>—测定用样液的体积 (ml)

V<sub>0</sub>—空白滴定时消耗EDTA之体积 (ml)

### 方法 3 火焰原子吸收光谱法测定钙、铁元素

#### 【实验原理】

样品先经干灰化，将有机物质彻底分解后，加酸使无机元素全部溶解，直接吸入空气与乙炔中原子化，并在光路中直接测定钙、铁，钙原子对其空心阴极灯发射的谱线在 4227 埃有吸收，铁在 2483 埃有吸收。测定钙时，需加镧作为释放剂，以消除磷酸等物质的干扰。

#### 【实验试剂】

- 1、 盐酸
- 2、 过氧化氢
- 3、 5%氧化镧：称取 29.32 氧化镧，用 25ml 水湿润后，仔细地慢慢添加 125ml 浓盐酸使其溶解后，用水稀释到 500mL
- 4、 钙的标准溶液 钙的标准贮备液（1000  $\mu$  g/ml）：准确称取 2.4972g 硫酸钙，溶解在少量 1:1 盐酸溶液中，再以 1%盐酸稀释到 1000mL  
钙的标准工作液：用 1%的盐酸溶液逐级稀释到 100  $\mu$  g/ml
- 5、 铁的标准溶液 铁的标准贮备液（1000  $\mu$  g/ml）：准确称取 4.9788g 七水硫酸亚铁，溶解在 1%盐酸溶液中，并稀释到 1000mL，摇匀。  
铁的标准工作液：用 1%的盐酸溶液将铁的标准贮备液逐级稀释到 100  $\mu$  g/ml

#### 【操作方法】

- 1、 样品处理：准确称取均匀样品 2.0g，置于 30ml 石英坩埚或瓷坩埚中，置于煤气灯或电炉上小火炭化后，移入高温灰化炉中进行灰化，灰化温度 500~550℃，待样品灰化成白色灰烬后，取出，冷却，加入 1:1 盐酸 5ml，加热蒸干后，加入 5%盐酸使之溶解，定量地移入 25ml 容量瓶中，并稀释到刻度，摇匀。同时做试剂空白。如果样品溶液测定钙元素，要添加 2.5ml 的 5%的氧化镧溶液，使其浓度保持在 0.5%。
- 2、 标准曲线绘制：取出 25mL 容量瓶 6 只，分别移入铁、钙标准工作溶液（100  $\mu$  g/ml）0.0、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25ml（即在 25ml 容量瓶溶液中，每 ml 溶液相当 0、1、2、3、4、5  $\mu$  g 的钙），加入 5%的氧化镧溶液 2.5ml，用 5%盐酸定容，配制成系列

混合标准溶液，按照原子吸收分光光度计的工作条件，将仪器调好灵敏度后，用进样毛细管吸去离子水调零，分别测定标准溶液中铁、钙的吸光度，扣除空白的吸光度，绘制铁、钙的标准曲线。

- 3、 样品测定：按照铁、钙标准曲线绘制的系统工作条件测定样品溶液及试剂空白值的吸光度，从曲线中查出铁、钙的含量

**【计算】**

钙，铁 (mg/100g) =  $C/W \times 100$

式中：C-从标准曲线中查出铁、钙的含量 (mg)

W-测定时所取样品溶液相当样品的重量 (g)

## 实验十 果胶的测定

### 一、重量法

#### 【实验原理】

利用果胶酸钙不溶于水的特性，先使果胶质从样品中提取出来，再加氯化钙使成果胶酸钙沉淀，测定重量并换算成果胶质重量。

#### 【实验试剂】

- 1、1N 醋酸溶液：取 58.3ml 冰醋酸加水到 1L。
- 2、2N 氯化钙溶液：取 111.2g 无水氯化钙加水溶解成 500ml。
- 3、0.1N 氢氧化钠溶液：称取 4g 氢氧化钠加水溶解成 1L。

#### 【操作方法】

准确称取样品 30.0~50.0g (干样品 5.00~10.00g) 于 250mL 烧杯中，加 150ml 水，加热煮沸 1h (不时搅拌并加水补充蒸发损失)，冷却，移入 250ml 容量瓶中，加水至刻度，摇匀。用干滤纸抽滤 (最好用古氏坩埚抽滤)。吸取滤液 25ml 于 500ml 烧杯中，加入 0.1N 氢氧化钠溶液 100ml，放置 0.5h，再加入 1N 醋酸溶液 50ml。5min 后加入 2N 氯化钙溶液 50ml，放置 1h，加热沸腾 5min 后，立即用烘干至恒重的滤纸过滤，用热水洗涤至无氯离子为止 (可用硝酸银溶液检查无白色沉淀)。然后把带滤渣的滤纸放在预先烘干至恒重的称量瓶内，105℃ 烘箱中烘至恒重。按下式计算：

$$\text{果胶质}(\%) = 0.9235 \times \frac{G}{W} \times \frac{25}{250} \times 100$$

式中 G——滤渣重量 (g)，

W——样品重量 (S)，

0.9235——果胶酸铵换算为果胶质的系数。

## 二、比色法

### 【实验原理】

果胶质经水解后生成半乳糖醛酸，在强酸中与吡啶的缩合反应生成紫红色化合物，由此可以比色定量测定。

### 【实验试剂】

- 1、精制乙醇：取无水乙醇 1000ml，加入锌粉 4g 和硫酸(1:1)4ml，在水浴中回流 10h 后，用全玻璃仪器蒸馏，馏出液每 1000ml 加入锌粉和氢氧化钾各 4g 重新蒸馏一次。
- 2、0.15%吡啶乙醇溶液：准确称取 0.15g 吡啶溶解于精制乙醇中，稀释至 100ml。
- 3、硫酸。
- 4、0.05N 盐酸溶液。
- 5、半乳糖醛酸标准溶液：称取分装的半乳糖醛酸 100mg，溶解于水中，用水稀释至 100ml，此溶液每毫升相当于 1mg 的半乳糖醛酸标准溶液。

【实验仪器】分光光度计。

### 【操作方法】

- 1、标准曲线的绘制，吸取每毫升相当于 1mg 的半乳糖醛酸标准溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0ml，分别移入 100ml 容量瓶中用水稀释至刻度。分别吸取 2ml 不同浓度的半乳糖醛酸溶液于预先加入了 12ml 冷却的浓硫酸的试管中，标准溶液加入时，边加入边进行冷却。充分混和后，再置冰水浴中冷却。然后在沸水浴中加热 10min。冷却至室温后，分别加入 1ml 0.15%吡啶溶液，充分混和。静置 30min，于分光光度计波长 530nm 处测定吸光度，以测得吸光度为纵坐标，每毫升半乳糖醛酸含量为横坐标绘标准曲线。
- 2、样品的测定：称取番茄酱 4.00g 或番茄汁 20.00g 于 250ml 烧杯中，加入无水乙醇 100ml 充分搅拌混和后，盖上表面皿，在 85~90℃恒温水浴上加热 20min，冷却，并静置 1h，用三号砂芯玻璃滤器在轻微抽气下过滤，弃去含糖的乙醇溶液。沉淀物用乙醇分数次洗涤，除去糖分直至滤液无色为止。取滤液 1ml 于小试管中，加入 3~5 滴 5%的  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液，充分混和，此时溶液稍有白色混浊。徐徐加入 1ml 浓硫酸，静置后若两液层界面产生紫红色色环，说明滤液还有糖分，还需继续过滤。然后将沉淀物移入 250ml 三角烧瓶中，用 150ml 加热至

沸的 0.05N 盐酸溶液将滤器上残留的沉淀物无损地移入同一烧瓶中，摇匀，按上回流冷凝器，在沸水浴上提取 1h，冷却至室温，用水定容至 200ml，混和后先用脱脂棉粗滤，后用滤纸过滤。吸取滤液 10ml 移入 100ml 容量瓶中，用水稀释到刻度。然后吸取稀释液 2ml，按标准曲线绘制的操作方法测定吸光度，并从标准曲线查出样品稀释液中每毫升的半乳糖醛酸的微克数。

**【计算】**

$$\text{果胶物质总量 (\%)} = C \times \frac{100}{W} \times \frac{10}{200} \times 10000$$

式中 C—从标准曲线查出测定液半乳糖醛酸浓度(μg / ml)

W—样品重量(g)。

**【说明】**

(1) 本法以半乳糖醛酸表示果胶质总量。实际测定中，以 0.05N 盐酸分解或热水溶解后，分别测定样品中可溶性果胶和原果胶中的半乳糖醛酸含量。不同果实果胶中半乳糖醛酸的含量不同：糖用甜菜 78.1%，甜橙 77.7%，柠檬 94.2%，柑桔 96%，苹果 72~75%。这样可相应地换算真实果实的含量。

(2) 本法糖分必须除尽，否则结果偏高，硫酸浓度对显色有影响，必须保持硫酸浓度一致，样品需脱脂，否则果胶质中甲氧基存在会阻碍硫酸—半乳糖醛酸液与咔唑试剂的显色。但番茄样品加碱脱脂与否对结果无影响。

## 实验十一 总灰分的测定

### 【实验原理】

总灰分是指食品样品中矿物质和无机盐或其他混杂物质。在一定的温度下把样品中的有机物质灼烧氧化后，将残余的白色物质称重，即得总灰分重量。

### 【操作方法】

先用 1:1 盐酸烧煮过的瓷坩埚洗净，置高温炉中升温至 550℃ 左右，维持 30min，稍冷后，取出，移入干燥器内冷却，称重。在坩埚内准确称取样品 2.00~5.00g (如系湿样，可多取样品并置水浴上干燥)。用电炉或煤气灯将样品炭化至无烟，移入 550~600℃ 高温炉中灰化至白色灰烬为止。如灰化不完全，可取出冷却后，加入数滴硝酸或过氧化氢等强氧化剂，蒸干后再移入高温炉中灰化至白色。如果样品中含糖量较高，样品灰化时易疏松膨胀溢出坩埚，可预先加数滴纯植物油后再灰化，待炉温降到 200℃ 以下，将坩埚移入干燥器内，冷至室温，称重，再次灼烧至恒重，前后相差不超过 0.002g 为止。

### 【计算】

$$\text{总灰分(\%)} = \frac{A_2 - A_1}{W} \times 100$$

式中  $A_1$ ——恒重后坩埚重量(g)，

$A_2$ ——恒重后坩埚和灰分重量(g)，

$W$  —— 样品重量(g)。

## 实验十二 纤维素测定

### 一、粗纤维（CF）的测定

#### 【实验试剂】

- 1、硫酸溶液：(0.1275±0.005) mol/L（每 100mL 蒸馏水含硫酸 1.25g）：吸取比重 1.84 的浓硫酸 6.89mL，注入 800mL 水中，冷却后稀释至 1000mL。
- 2、氢氧化钠溶液：(0.313±0.005)mol/L：（每 100mL 蒸馏水含氢氧化钠 1.25g）：迅速称取分析纯氢氧化钠 12.5g，溶于 100mL 水中，准确定容至 1000mL。
- 3、丙酮：无色，无挥发残渣。

注意：配制硫酸溶液时，要将硫酸缓慢加入水中，处理酸碱溶液时要戴上防护器具。

#### 【实验仪器】

- 1、ANKOM 220 纤维分析仪
- 2、F57 专用滤袋
- 3、封口机
- 4、干燥器
- 5、实验室常规仪器

#### 【实验步骤】

- 1、装袋(每批 24 个)
  - 1) 称取滤袋质量( $m_1$ )
  - 2) 称取 1.0g(±0.05g) 风干样品(样品需粉碎通过 1mm 筛孔(20-40 目))( $m_2$ )，装入滤袋。同时称取空白滤袋质量( $C_1$ )，做空白测定。
  - 3) 距滤袋边缘 0.5cm 处封口。
- 2、脱脂 将盛有样品并封口的滤袋，置于 500mL 广口瓶中，加入丙酮没过样品，摇动 10 次，浸提 10min，弃去丙酮。用新鲜丙酮重复此操作至脱脂完全。将盛有样品的滤袋风干(约 5min)，然后均匀地铺展滤袋中的样品。
- 3、酸煮 将样品摆放到样品架上，放入 ANKOM 220 纤维分析仪的消煮罐中，加入 1900~2000mL



的硫酸溶液，浸没所有滤袋。设定消煮温度为 100℃，按下搅拌和加热按钮，确保搅拌良好后，锁紧上盖，待温度上升到 100℃时，启动定时器，定时 45min。

4、水洗 待定时器鸣叫后，停止搅拌和加热，打开排液阀将酸液排出。注意：一定要先排液后打开盖。关闭排液阀，打开上盖，加入 1900~2000mL 热蒸馏水(90~100℃)，锁好上盖(不必太紧)，搅拌 3~5 min，排液。重复洗涤 2 次以上。

5、碱煮 加入 1900~2000mL 的氢氧化钠溶液，设定消煮温度为 100℃，按下搅拌和加热按钮，确保搅拌良好后，锁紧上盖，待温度上升到 100℃，启动定时器，定时 45min。

6、水洗 同步骤 4。

7、丙酮洗 取出样品，轻轻挤压使水流出，置样品于 250mL 烧杯中，加入丙酮没过样品，浸泡 2~3 min 取出，轻轻挤压使丙酮流出，风干样品。

8、烘干称重 将风干后的样品于 105℃的烘箱中干燥 2~4h，取出置于干燥器中降至室温后称重(m<sub>3</sub>)。注意：放入烘箱前应确保丙酮挥发干净。

9、灰化称重将干燥称重后的样品置于预先恒重(m<sub>4</sub>)的坩埚中，于 550℃马福炉中灰化 2h，取出置于干燥器中降至室温后称重(m<sub>5</sub>)。

### 【结果计算】

测定步骤	装样		煮后干燥	灰化后	
样品编号	袋重	样重	样+袋	坩埚重	灰份+坩埚
样品	m <sub>1</sub>	m <sub>2</sub>	m <sub>3</sub>	m <sub>4</sub>	m <sub>5</sub>
空白	C <sub>1</sub>	---	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>

$$CF(\text{风干基础})\% = \{[(m_3 - m_1) - (C_3 - C_1)] - [(m_5 - m_4) - (C_5 - C_4)]\} \times 100 / m_2$$

## 二、中性洗涤纤维的测定

### 【实验试剂】

1、中性洗涤液 (ND): 称取 18.61g 乙二胺四乙酸二钠和 6.81g 四硼酸钠 (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O) 同放

入 1000mL 烧杯中，加少量水加热溶解后，再加入 30.0g 十二烷基硫酸钠和 10.0mL 三甘醇或乙二醇乙醚。称取 4.65g 无水磷酸氢二钠，置于另一烧杯中，加少量水，微微加热溶解后倾入第一个烧杯中，用蒸馏水稀释至 1000mL。此溶液 pH 在 6.9~7.1 (pH 一般不需要调节。)

2、耐高温  $\alpha$ -淀粉酶：340,000U / mL 的活性 (1 个活性单位表示能将 1mg 可溶性淀粉用 30min 水解)

3、无水亚硫酸钠、丙酮。

【实验仪器】 (同粗纤维的测定)

【实验步骤】

1、装袋 称取滤袋质量  $m_1$ ，称取  $(0.5 \pm 0.05)$  g 风干样品 (样品需粉碎通过 1mm 筛孔) ( $m_2$ )，装入滤袋。同时，称取空白滤袋质量 ( $c_1$ )。

距滤袋边缘 0.5cm 处封口。

2、脱脂 样品含有大豆产品或脂肪含量  $>5\%$ ，脱脂方法同粗纤维的测定，烘烤大豆要用丙酮浸泡 12h。

3、消煮 加入 1900~2000mL 中性洗涤液到消煮罐中，如果一批消煮的样品数量少于 24 个，为保证洗涤液完全浸没滤袋，至少应加入 1500mL 洗涤液。加入无水亚硫酸钠 (0.5g / 50mLND) 和 4.0mL 耐高温的  $\alpha$ -淀粉酶。将样品架置入消煮罐中，锁紧上盖。按下搅拌和加热按钮，定时 75min，待温度升到 100℃ 时，启动定时器，倒计时。

4、水洗：同粗纤维的测定。

5、丙酮洗：同粗纤维的测定。

6、烘干称重：同粗纤维的测定。 注意：放入烘箱前应确保丙酮挥发于净。

【结果计算】

测定步骤	装样		煮后干燥
	滤袋质量	样品质量	袋+样质量
样品	$m_1$	$m$	$m_2$
空白	$C_1$		$C_2$

$$\text{NDF}\% (\text{原样基础}) = [(m_2 - m_1) - (C_2 - C_1)] \times 100 / m$$

### 三、酸性洗涤纤维的测定

#### 【实验试剂】

1、酸性洗涤剂溶液：称取 20g 十六烷三甲基溴化胺(CTAB)，溶于 1000mL 已标定过的 0.50mol/L，硫酸溶液中，加热搅拌使其溶解。

2、0.50 mol/L 硫酸溶液：取 49g(约 27mL)浓硫酸，慢慢加入已装有 500mL 水的烧杯中，冷却后注入 1000mL 容量瓶中，加水至刻度，标定。

硫酸的配制和标定：

0.5 mol/L 硫酸标准液：量取 15ml 浓硫酸，缓慢注入水中，冷却至室温后用水稀释至 1000mL，摇匀。

溴甲酚绿—甲基红混合指示液：量取 30mL0.2%溴甲酚绿乙醇溶液，加入 20mL0.1%的甲基红乙醇溶液，摇匀。

标定：0.5mol/L 的硫酸溶液：精密称取约 1.5g 在 270—300℃干燥至恒重的基准无水碳酸钠，加入 50mL 水使之溶解，加 10 滴溴甲酚绿—甲基红混合指示液，用本溶液滴定至溶液由绿色主转变为紫红色，煮沸 2 分钟，冷却至室温，继续滴定至溶液由绿色变为暗红色。

$$N = \frac{W}{(V_1 - V_2) \times 0.0530}$$

式中：

N— 硫酸标准溶液的摩尔浓度，mol/L；

W — 基准无水碳酸钠的克数，g；

V<sub>1</sub> — 硫酸标准溶液用量， mL；

V<sub>2</sub> — 试剂空白硫酸标准溶液用量， mL；

0.0530—每毫克当量无水碳酸钠的克数。

【注意事项】同粗纤维的测定

【实验仪器】同粗纤维测定

【实验步骤】

1、装样(每批 24 个)

- 1) 称取滤袋质量 ( $m_1$ )
- 2) 称取 0.5g ( $\pm 0.05$  g) 风干样品 (样品需粉碎通过1mm筛孔) ( $m_2$ ), 装入滤袋。同时称
- 3) 空白滤袋质量 ( $C_1$ )

距滤袋边缘 0.5cm 处封口 (同粗纤维的测定)

2、脱脂：样品含有大豆产品或脂肪含量  $> 5\%$ ，脱脂方法同粗纤维的测定： 烘烤大豆要用丙酮浸泡 12h。

3、酸煮 (同粗纤维的测定)

4、水洗 (同粗纤维的测定)

5、丙酮洗 (同粗纤维的测定)

6、烘干称重 (同粗纤维的测定) 注意：放入烘箱前应确保丙酮挥发干净

	装样	煮后干燥	
样品编号	滤袋质量	杆品质量	袋+样质量
样品	$m_1$	$m$	$m_2$
空白	$C_1$	$C_2$	

$$ADF\% (\text{原样基础}) = [(m_2 - m_1) - (C_2 - C_1)] \times 100 / m$$

#### 四、 酸性洗涤木质素 (ADL) 的测定

##### 【实验试剂】

72%硫酸：取 734.69mL 浓硫酸，倒入 200mL 水中，冷却后稀释到 1000mL。

##### 【实验步骤】

- 1、酸泡 测定完 ADF 后，接着将干的滤袋放入 3000mL 的烧杯中，加 72%硫酸没过样品 (约 250mL)。滤袋 (样品) 必须完全干燥，否则样品将被炭化，影响测定结果。放 1 个 2000mL 的烧杯于其中，上下按动搅动样品 30min。浸泡 3h。
- 2、水洗 用 90~100℃ 蒸馏水洗至中性。
- 3、丙酮洗 (同前)
- 4、烘干称重 105℃ 4h, 称重  $m_3$

5、灰化 将样品置于 50mL烧杯中，525℃灰化 3h，冷却称重 $m_5$

**【结果计算】**

测定步骤	装袋		酸浸泡后干燥		灰化后
	滤袋质量	样品质量	残渣+ 袋质量	坩锅质量	残渣+坩锅质量
样品 1	$m_1$	$m_2$	$m_3$	$m_4$	$m_5$
空白	$C_1$		$C_3$	$C_4$	$C_5$

$$\text{ADL (原样基础) \%} = \{ [(m_3 - m_1) - (C_3 - C_1)] - [(m_5 - m_4) - (C_5 - C_4)] \} \times 100 / m_2$$

## 实验十三 食品中还原糖的测定方法

**[实验目的]** 用直接滴定法测定样品中还原糖的含量。

**[实验原理]** 在加热条件下，直接滴定标定过的碱性酒石酸铜液，以次甲基蓝作指示剂，根据样品液消耗体积，计算还原糖量。

**[实验步骤]**

### 1. 试剂

- (1) 碱性酒石酸铜甲液：称取 15g 硫酸铜 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 及 0.05g 次甲基蓝，溶于水中并稀释至 1000ml。
- (2) 碱性酒石酸铜乙液：称取 50g 酒石酸钾钠及 75g 氢氧化钠，溶于水中，再加入 4g 亚铁氰化钾，完全溶解后，用水稀释至 1000ml，贮存于橡胶塞玻璃瓶内。
- (3) 葡萄糖标准溶液：精密称取 1.000g 经过 98~100℃ 干燥至恒量的纯葡萄糖，加水溶解后加入 5ml 盐酸，并以水稀释至 1000ml。此溶液每毫升相当于 1mg 葡萄糖。

### 2. 操作方法

- (1) 标定碱性酒石酸铜溶液：吸取 5.0ml 碱性酒石酸铜甲液及 5.0ml 乙液，置于 150ml 锥形瓶中，加水 10ml，从滴定管滴加约 9ml 葡萄糖标准溶液，控制在 2min 内加热至沸，趁沸以每两秒 1 滴的速度继续滴加葡萄糖标准溶液，直至溶液蓝色刚好褪去为终点，记录消耗葡萄糖标准溶液的总体积，同时平行操作三份，取其平均值，计算每 10ml (甲、乙液各 5ml) 碱性酒石酸铜溶液相当于葡萄糖的质量 (mg)。
- (2) 样品处理：称取粉碎后的固体样品 2.5~5g，或吸取液体样品 25~50mL，置于 250mL 容量瓶中，加 50mL 水，摇匀后慢慢加入 5mL 乙酸锌及 5mL 亚铁氰化钾溶液，以除去样品中的蛋白质，边加边摇，用干燥滤纸过滤，弃去初滤液，滤液备用。
- (3) 样品溶液预测：吸取 5.0ml 碱性酒石酸铜甲液及 5.0ml 乙液，置于 150ml 锥形瓶中，加水 10ml，控制在 2min 内加热至沸，趁沸以先快后慢的速度，从滴定管中滴加样品溶液，并保持溶液沸腾状态，待溶液颜色变浅时，以每两秒 1 滴的速度滴定，直至溶液蓝色刚好褪去为终点，记录样液消耗体积。

(4) 样品溶液测定：吸取 5.0ml 碱性酒石酸铜甲液及 5.0ml 乙液，置于 150ml 锥形瓶中，加水 10ml，从滴定管滴加比预测体积少 1ml 的样品溶液，使在两分钟内加热至沸，趁沸继续以每两秒 1 滴的速度滴定，直至蓝色刚好褪去为终点，记录样液消耗体积，同法平行操作三份，得出平均消耗体积。

#### [实验结果及分析]

$$X = \frac{V_1 \times V_3 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

式中 X—样品中还原糖的含量，%；

$V_1$ —标定碱性酒石酸铜溶液平均消耗葡萄糖标准液的体积，ml；

$V_2$ —测定时平均消耗样品液的体积，ml；

$V_3$ —样品稀释总体积，ml；

m—样品质量，g

#### [实验注意事项]

- 1、整个滴定过程必须在沸腾条件下进行，其目的是为了加快反应速度和防止空气进入，避免氧化亚铜和还原型的次甲基蓝被空气氧化从而使得耗糖量增加。
- 2、测定中还原糖液浓度、滴定速度、热源强度及煮沸时间等都对测定精密度有很大的影响。
- 3、滴定所消耗的样品液应与消耗的葡萄糖溶液的体积相近，继续滴定至终点的体积数应控制在 0.5~1ml 以保证在 1 分钟内完成滴定的工作。

## 实验十四 蔗糖的测定

**【实验原理】** 样品除去蛋白质后, 其中的蔗糖经盐酸水解转化为 还原糖, 再按还原糖测定, 水解前后还原糖的差值为蔗糖含量。

### 【实验试剂】

1、6mol/L/L 盐酸: 量取 50mL 盐酸, 加水稀释至 100mL。

2、甲基红指示液: 0.1%的乙醇溶液。

3、20%氢氧化钠溶液。

其余试剂同“还原糖的测定”中直接滴定法。

### 【实验步骤】

吸取两份 50mL 按还原糖的测定中直接滴定法制备的样品处理液, 置于 100mL 的容量瓶中; 一份加入 6mol/L 的盐酸 5mL, 在 60~70℃的水浴中加热 15 分钟, 冷却后加入 2 滴甲基红指示液, 用 20%的氢氧化钠中和至中性, 加水至刻度, 混匀。另 1 份直接加水稀释至 100mL, 按还原糖的测定方法测定还原糖。

### 【实验计算】

$$X = (R_2 - R_1) \times 0.95$$

式中: X - 样品中的蔗糖含量, %

$R_2$  - 水解处理后的还原糖含量, %

$R_1$  - 不经水解处理的还原糖含量, %

0.95 - 还原糖(以葡萄糖计)换算为蔗糖的系数

**【注意事项】** 计算蔗糖时, 根据蔗糖水解反应, 水解产物中增加的 1 分子水, 使产物分子量综合加大, 故应将测得的还原糖乘以 0.95 的校正系数。



## 实验十五 pH值的测定

**[实验目的]** 用 pH 值计法测定果汁的 pH 值

**[实验原理]** 在食品酸度测定中，有效酸度(pH值)的测定往往比测定总酸度更具有实际意义，更能说明问题。pH值是溶液中H<sup>+</sup>活度(近似认为浓度)的负对数，其大小说明了食品介质的酸碱性。常用的pH试纸就属于这一类。电化学法是将一支能指示溶液pH值的玻璃电极做指示电极，用甘汞电极做参比电极组成一个电池，浸入被测试液中，此时所组成的电池将产生一个电动势，电动势的大小与溶液中的氢离子浓度，亦即与pH值有直接关系。每相差一个pH值单位，就产生 59.1mV的电极电位。pH值可在仪器的刻度表上直接读出，现在常用的是玻璃甘汞复合电极。

**【实验试剂】** pH(4.00, 6.86, 9.22)标准缓冲液(按缓冲液袋上的说明配)。

**[实验步骤]**

### 1、pH 计的校正

- 1) 将 pH 计上的开关置于“pH”位置。置温度补偿器旋钮指示溶液的温度。
- 2) 用标准液洗涤烧杯和电极两次。
- 3) 调节电位调节器，使指针指在缓冲液的 pH 值。

### 2、测定

- 1) 先用蒸馏水洗涤电极和烧杯，用镜头纸小心将电极擦干，再用样品液洗一遍，然后将电极插入样品液中，轻轻摇动烧杯使溶液均匀。
- 2) 调节温度补偿器至被测溶液温度。
- 3) 按下读数开关，指针所指之值，即为样品液 pH 值。
- 4) 测量完毕后，将电极和烧杯洗净，并将电极放于 3M 氯化钾溶液中保存，经常加入蒸馏水，以防止干燥。

**[注意事项]** 复合电极的顶端为一层极薄的易透过的玻璃膜，使用时务必小心，勿使其直接触到烧杯底部。

## 实验十六 可溶性蛋白质的测定(考马斯亮蓝法)

### [实验原理]

考马斯亮蓝 G-250 以两种不同颜色存在, 红色与蓝色, 当染色剂与蛋白质结合时, 红色就转变为蓝色。这种蛋白质染色剂复合物有较高的消光系数。因此, 用这种方法测定蛋白质含量灵敏度比较高, 这种染色剂和蛋白质的结合过程迅速, 大约 2min, 而且这种蛋白质—染色剂复合物能在溶液中保持稳定 1 小时之久。

### [仪器与试剂]

1、仪器: 分光光度计、分析天平、容量瓶、移液管、具塞刻度试管

2、试剂

1) 考马斯亮蓝 G—250 蛋白试剂: 称取 100mg 考马斯亮 G-250, 溶于 50ml 90%乙醇中, 加入 85%正磷酸 100ml, 最后加蒸馏水至 1000ml, 此溶液可在常温下放置一个月。

2) 蛋白质标准液: 称取 100mg 牛血清蛋白, 溶于 100ml 蒸馏水中, 制成 1000 $\mu$ g / ml 贮备液。再按下表比例配制成每毫升分别含 200, 400, 600, 800, 1000 $\mu$ g 蛋白标准液及每毫升分别含 20, 40, 60, 80, 100 $\mu$ g 蛋白的标准液。

表 1

蛋白浓度( $\mu$ g / ml)	200	400	600	800	1000
加贮备液(ml)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
加蒸馏水(ml)	1.6	1.2	0.8	0.4	0

表 2

蛋白浓度( $\mu$ g / ml)	20	40	60	80	100
加贮备液(ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
加蒸馏水(ml)	9.8	9.6	9.4	9.2	9.0

## [操作步骤]

### 1、标准曲线的制作

- 1) 100~1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$  蛋白标准曲线：准确吸取含有 200, 400, 600, 800, 1000 $\mu\text{g}$  的牛血清蛋白标准液 0.1ml, 分别放入 10 ml 刻度试管中, 加入 5.0 ml 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂, 将溶液混匀, 2min 后在 595nm 处测其消光值, 空白以蒸馏水代替标准液, 其它操作同上。
  - 2) 0~100 $\mu\text{g} / \text{ml}$  蛋白标准曲线：准确吸取 0.5 ml 含 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}$  牛血清蛋白标准液, 分别放入 10ml 具塞刻度试管中, 加入 5.0 ml 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂, 其它操作同上。以消光值为纵坐标, 蛋白含量为横坐标, 作标准曲线。
- 2、样品中蛋白质浓度的测定：样品中蛋白质浓度的测定除加入标准溶液作为样品液外, 其余操作完全相同, 通过标准曲线即可查得每毫升溶液中蛋白质的含量。

## 实验十七 食品中山梨酸、苯甲酸的测定方法

### 【主题内容与适用范围】

标准规定了酱油、果汁、果酱等食品中山梨酸、苯甲酸含量的测定方法。

本标准适用于酱油、果汁、果酱等食品中山梨酸、苯甲酸含量的测定。

最低检出浓度：气相色谱法最低检出量为  $1\mu\text{g}$ ，用于色谱分析的样品为  $1\text{g}$  时，最低检出浓度为  $1\text{mg}/\text{kg}$ 。

### 第一法 气相色谱法

#### 【实验原理】

样品酸化后，用乙醚提取山梨酸、苯甲酸，用附氢火焰离子化检测器的气相色谱仪进行分离测定，与标准系列比较定量。

#### 【试剂】

- 1、 乙醚：不含过氧化物。
- 2、 石油醚：沸点  $30\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。
- 3、 盐酸。
- 4、 无水硫酸钠。
- 5、 盐酸(1:1)：取  $100\text{mL}$  盐酸，加水稀释至  $200\text{mL}$ 。
- 6、 氯化钠酸性溶液(40g/L)：于氯化钠溶液(40g / L)中加少量盐酸(1+1)酸化。
- 7、 山梨酸、苯甲酸标准溶液：准确称取山梨酸、苯甲酸各  $0.2000\text{g}$  置于  $100\text{mL}$  容量瓶中，用石油醚-乙醚(3:1)混合溶剂溶解后并稀释至刻度。此溶液每毫升相当于  $2.0\text{mg}$  山梨酸或苯甲酸。
- 8、 山梨酸、苯甲酸标准使用液：吸取适量的山梨酸、苯甲酸标准溶液，以石油醚-乙醚(3:1)混合溶剂稀释至每毫升相当于  $50, 100, 150, 200, 250\text{mg}$  山梨酸或苯甲酸。

#### 【仪器】

气相色谱仪：具有氢火焰离子化检测器。

#### 【分析步骤】

## 1、 样品提取

称取 2.50 g 事先混合均匀的样品，置于 25 mL 带塞量筒中，加 0.5 mL 盐酸 (1:1) 酸化，用 15, 10 mL 乙醚提取两次，每次振摇 1 min，将上层乙醚提取液吸入另一于 25 mL 带塞量筒中。合并乙醚提取液。用 3 mL 氯化钠酸性溶液 (40g / L) 洗涤两次，静置 15 min，用滴管将乙醚层通过无水硫酸钠滤入 25mL 容量瓶中，加乙醚至刻度，混匀。准确吸取 5 mL 乙醚提取液于 5mL 带塞刻度试管中，置于 40℃ 水浴上挥干，加入 2 mL 石油醚-乙醚 (3+1) 混合溶剂溶解残渣，备用。

## 2、 色谱参考条件

1 ) 色谱柱：玻璃柱，内径 3 mm，长 2 m，内装涂以 5% (m / m) DEGS + 1% (m / m) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>；固定液的 60-80 目 Chromosorb W AW。

2 ) 气流速度：载气为氮气，50 mL / min (氮气和空气、氢气之比按各仪器型号不同选择各自的最佳比例条件)。

3 ) 温度：进样口 230℃；检测器 230℃，柱温 170℃。

## 3、 测定

进样 2 μL 标准系列中各浓度标准使用液于气相色谱仪中，可测得不同浓度山梨酸、苯甲酸的峰高，以浓度为横坐标，相应的峰高值为纵坐标，绘制标准曲线。

同时进样 2 μL 样品溶液。测得峰高与标准曲线比较定量。

## 4、 计算

$$X_1 = \frac{m_1 \times 1000}{m_2 \times \frac{5}{25} \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中，X<sub>1</sub>—样品中山梨酸或苯甲酸的含量，g / kg；

m<sub>1</sub>—测定用样品液中山梨酸或苯甲酸的质量，μg；

V<sub>1</sub>—加入石油醚-乙醚 (3+1) 混合溶剂的体积，mL；

V<sub>2</sub>—测定时进样的体积，L；

m<sub>2</sub>—样品的质量，g；

5—测定时吸取乙醚提取液的体积，mL；

25—样品乙醚提取液的总体积，mL。

由测得苯甲酸的量乘以 1.18，即为样品中苯甲酸钠的含量。

结果的表述：报告算术平均值的二位有效数。

#### 5、 允许差

相对相差 $\leq$ 10%。

#### 6、 其他

在色谱图中山梨酸保留时间为 2 分 53 秒；苯甲酸保留时间为 6 分 8 秒。

## 第二法 高效液相色谱法

### 【实验原理】

样品加温除去二氧化碳和乙醇，调 pH 至近中性，过滤后进高效液相色谱仪，经反相色谱分离后，根据保留时间和峰面积进行定性和定量。

### 【实验试剂】

方法中所用试剂，除另有规定外，均为分析纯试剂，水为蒸馏水或同等纯度水，溶液为水溶液。

- 1、 甲醇；经滤膜(0.5  $\mu$ m)过滤。
- 2、 稀氨水(1:1)；氨水加水等体积混合。
- 3、 乙酸铵溶液(0.02 mol/L)：称取 1.54 g 乙酸铵，加水至 1000 mL，溶解，经滤膜(0.45  $\mu$ m)过滤。
- 4、 碳酸氢钠溶液(20g/L)：称取 2g 碳酸氢钠(优级纯)，加水至 100mL，振摇溶解。
- 5、 苯甲酸标准储备溶液：准确称取 0.1000g 苯甲酸，加碳酸氢钠溶液(20g / L) 5mL，加热溶解，移入 100mL 容量瓶中，加水定容至 100mL，苯甲酸含量为 1mg / mL，作为储备溶液。
- 6、 山梨酸标准储备溶液：准确称取 0.1000g 山梨酸，加碳酸氢钠溶液(20g / L) 5mL，加热溶解，移入 100mL 容量瓶中，加水定容至 100mL，山梨酸含量为 1mg / mL，作为储备溶液。
- 7、 苯甲酸、山梨酸标准混合使用液：取苯甲酸、山梨酸标准储备溶液各 10.0 mL，放入 100

mL 容量瓶中，加水至刻度。此溶液含苯甲酸、山梨酸各 0.1 mg / mL。经滤膜(0.45 μ m)过滤  
(同时测定糖精钠时可加 GB/T5009.28 中 3.4 糖精钠标准储备溶液)。

【仪器】高效液相色谱仪(带紫外检测器)。

【实验步骤】

1、 样品处理

- 1) 汽水：称取 5.00~10.00g 样品，放入小烧杯中，微温搅拌除去二氧化碳，用氨水(1:1)调 pH 约 7，加水定容至 10~20 mL，经滤膜(0.45 μ m)过滤。
- 2) 果汁类：称取 5.00~10.00 g 样品，用氨水(1:1)调 pH 约 7，加水定容至适当体积，离心沉淀，上清液经滤膜(0.45 μ m)过滤。
- 3) 配制酒类：称取 10.00g 样品，放入小烧杯中水浴加热除去乙醇，用氨水(1:1)调 pH 约 7，加水定容至适当体积，经滤膜(0.45 μ m)过滤。

2、 高效液相色谱参考条件

- 1) 色谱柱：YWG—C<sub>18</sub> 4.6mm×250 mm的 10 μ m 不锈钢柱。
- 2) 流动相：甲醇:乙酸铵溶液(0.02mol / L) (5:95)。
- 3) 流速：1 mL / min。
- 4) 进样量：10 μ L。
- 5) 检测器：紫外检测器，波长 230nm. 灵敏度 0.2AUFS。

根据保留时间定性，外标峰面积法定量。

3、 计算

$$X_2 = \frac{m_3 \times 1000}{m_4 \times \frac{V_4}{V_3} \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：X<sub>2</sub>----样品中苯甲酸或山梨酸的含量，g / kg；

m<sub>3</sub>----进样体积中苯甲酸或山梨酸的质量，mg；

V<sub>4</sub>----进样体积，mL；

V<sub>3</sub>----样品稀释液总体积，mL；

$m_4$ ——样品质量, g.

结果的表述: 报告算术平均值的二位有效数。

4、允许差: 相对相差 $\leq 10\%$ 。

注: 本方法可同时测定糖精钠。

### 第三法 苯甲酸钠含量的测定(紫外法)

**【实验原理】** 苯甲酸及其钠盐是食品中常用的防腐剂。苯甲酸、苯甲酸钠盐在酸性溶液中, 用蒸馏法蒸出, 在重铬酸钾硫酸溶液中氧化除去挥发性杂质及山梨酸, 再进行蒸馏分离。苯甲酸钠在波长 225 nm 处有最大的吸收, 根据其消光值与浓度的关系作标准曲线, 然后求出苯甲酸的含量。

#### **【材料、仪器与试剂】**

1、仪器: 蒸馏瓶(250 mL)、容量瓶(100 mL, 50 mL)、紫外分光光度计。

2、试剂

1) 无水硫酸钠

2) 35%磷酸

3) 1mol / L 氢氧化钠溶液

4) 0.1mol / L 氢氧化钠溶液

5) 0.01mol / L 氢氧化钠溶液

6) 0.034mol / L 重铬酸钾溶液: 4.9g 重铬酸钾溶于蒸馏水中, 并定容至 500mL

7) 2mol / L 硫酸: 取 66.5g 浓硫酸稀释至 500mL

8) 苯甲酸标准溶液: 称取 105℃干燥的 0.100g 苯甲酸, 溶于 0.1mol / L 氢氧化钠溶液中, 移入 1000mL 容量瓶中, 并定容至刻度, 每毫升相当苯甲酸 0.1mg。吸取此液 10mL 于 50mL 容量瓶中, 用 0.01mol / L 氢氧化钠定容至刻度, 混匀, 每毫升相当苯甲酸 20  $\mu$ g。

#### **【实验步骤】**

1、样品处理: 吸取 10mL 试样, 置于 250 mL 蒸馏瓶中, 加 1 mL 磷酸, 20 g 无水硫酸钠, 70 mL



水，进行蒸馏，用盛有 0.1mol / L 氢氧化钠溶液 10mL 的 100mL 容量瓶进行吸收，至蒸馏液约 45mL，蒸馏瓶中开始暴沸时停止蒸馏，放冷，由蒸馏瓶顶端加蒸馏水 20mL，反复蒸馏三次，用 5mL 水洗涤冷凝管，洗液并入容量瓶中，并定容至刻度，混匀，为甲液。

吸取甲液 25mL 置于 250mL 蒸馏瓶中，加入 25mL 0.034mol / L 重铬酸钾溶液，6.5 mL 的 2mol / L 硫酸，连接蒸馏装置，在沸水浴上准确加热 10min，冷却，加 1mL 磷酸，20g 无水硫酸钠，蒸馏水 30mL 进行蒸馏，用盛有 0.1mol / L 氢氧化钠溶液 10mL 的 100mL 容量瓶进行吸收，全蒸馏液约 45mL，停止蒸馏，放冷，由蒸馏瓶顶端加水 20mL，再反复蒸馏 1~2 次，蒸馏完毕，用蒸馏水洗涤冷凝管，洗液并入容量瓶中，并定容至刻度，混匀，为乙液。

2、空白试验：吸取 10mL 样品置 250mL 蒸馏瓶中，加 1mol / L 氢氧化钠溶液 5mL，20g 无水硫酸钠，65mL 水进行蒸馏，用盛有 0.1mol / L 氢氧化钠溶液 10mL 的 100mL 容量瓶进行吸收，至蒸馏瓶约 45mL，蒸馏瓶中开始暴沸时停止蒸馏，放冷，由蒸馏瓶顶端加蒸馏水 20mL 重复蒸馏三次，用蒸馏水 5mL 洗涤冷凝管，洗液并入容量瓶中，并稀释至刻度，混匀，为甲液，以下按试样处理操作制备乙液。

3、测定：吸取苯甲酸标准液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL（相当苯甲酸 0、20、40、60、80、100 μ g）分别置于 50mL 容量瓶中，用 0.01mol / L 氢氧化钠溶液，定容至刻度，混匀，以对照管调节零点，用 1cm 比色杯在 225nm 波长处测吸光值，绘制标准曲线。

吸取“试样处理”和“空白试验”项的乙液各 10~20 mL，与标准液相同条件下，测定吸光值。

#### 【计算】

$$\text{苯甲酸(g / L)} = (A_1 - A_2) \times \frac{100}{V_1} \times \frac{100}{V_2} \times \frac{100}{V_3} \times \frac{1}{1000}$$

式中：A<sub>1</sub>----样品乙液相当苯甲酸毫克数

A<sub>2</sub>----空白乙液相当苯甲酸毫克数

V<sub>1</sub>----吸取样品乙液毫升数

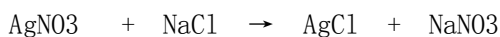
V<sub>2</sub>----吸取样品甲液毫升数

V<sub>3</sub>----样品毫升数。

## 实验十八 肉制品中食盐的测定

### 【实验原理】

样品中的食盐采用炭化浸出法或灰化浸出法浸出。在中性溶液中，氯离子与硝酸银作用生成白色氯化银沉淀，当样液中的氯化钠与硝酸银全部作用完时，以铬酸钾作指示剂，过量的硝酸银与铬酸钾作用生成橘红色铬酸银沉淀，表示已到达终点。根据消耗硝酸银标准溶液的量，可以计算出样品中氯化钠的含量。反应式如下：



白色氯化银沉淀



橘红色铬酸银沉淀

### 【实验试剂】

- 1、5%铬酸钾指示剂：称取5g分析纯铬酸钾，加入蒸馏水溶解，定容至100ml。
- 2、0.1 mol/L硝酸银标准溶液：准确称取分析纯的硝酸银17g，加蒸馏水至1000ml，按以下

### 【试剂标定】

精密称取已于110℃干燥至恒重的氯化钠2.9225g，加入少量蒸馏水使之溶解，移入500ml容量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀，此溶液为0.1000mol/L氯化钠标准溶液。

准确吸取25ml氯化钠标准溶液，置于250ml三角瓶中，加入铬酸钾指示剂0.5ml，用硝酸银溶液滴定至显橘红色为终点。

$$\text{硝酸银 (mol/L)} = \frac{\text{氯化钠毫升数} \times \text{氯化钠摩尔数}}{\text{滴定消耗硝酸银溶液体积 (ml)}}$$

### 【实验步骤】

#### 1、样品处理

- 1) 炭化浸出法：称取2g切碎的香肠样品，置于瓷蒸发皿中，用小火炭化完全至不冒烟，炭分用玻璃棒轻轻研碎。然后，加25~30ml水，用小火煮沸冷却，过滤于100ml容量瓶中，并

以热水少量分次洗涤残渣及滤器，洗液并入容量瓶中。冷至室温，加水至刻度，混匀备用。

2) 灰化浸出法：称取 1~10g 切碎均匀的样品，在瓷蒸发皿中，用小火炭化，再移入高温炉中于 500~550℃ 灰化，冷后取出。残渣用 50ml 热水分数次浸渍溶解，每次浸渍后过滤于 250ml 容量瓶中。冷至室温，加水至刻度，混匀备用。

2、滴定：吸取 25ml 滤液于瓷蒸发皿中，加 5% 铬酸钾溶液 1ml，搅匀。用 0.1000N 硝酸银标准溶液滴定至出现砖红色为终点。同时做试剂空白试验。

3、计算：

$$X_1 = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 0.0585}{m_1 \times \frac{25}{100}} \times 100$$

$$X_2 = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 0.0585}{m_2 \times \frac{25}{250}} \times 100$$

式中  $X_1$  —— 炭化浸出法测得样品中食盐的含量（以 NaCl 计）%；

$X_2$  —— 灰化浸出法测得样品中食盐的含量（以 NaCl 计）%；

$N$  —— 硝酸银标准溶液的摩尔浓度，mol/L；

$V_1$  —— 样品消耗硝酸银标准溶液的体积，ml；

$V_2$  —— 试剂空白消耗硝酸银标准溶液的体积，ml；

0.0585 —— 1N 硝酸银标准溶液 1ml 相当于氯化钠的克数；

$m_1$  —— 炭化浸出法称取的样品质量，g；

$m_2$  —— 灰化浸出法称取的样品质量，g。