

第三章 食品中一般成分含量的测定

实验一 食品中水分含量的测定（直接干燥法）

一、目的与要求

1. 学习水分测定的意义和原理。
2. 掌握直接干燥法的操作技术和注意事项。
3. 分析影响测定准确性的因素。

二、原理

在一定的温度（95~105℃）和压力（常压）下，将样品放在烘箱中加热干燥，除去蒸发的水分，干燥前后样品的质量之差即为样品的水分含量。

三、仪器与试剂

1. 仪器

- (1) 电热恒温干燥箱；
- (2) 扁形铝制或玻璃制称量瓶：内径 60mm~70mm，高 35mm 以下；
- (3) 干燥器；
- (4) 分析天平。

2. 试剂

- (1) 盐酸溶液（6 mol/L）：量取 100 mL 盐酸，缓缓倒入水中并稀释至 200 mL；
- (2) 氢氧化钠溶液（6 mol/L）：称取 24g 氢氧化钠，加水溶解并稀释至 100 mL；
- (3) 海砂：取用水洗去泥土的海砂或河砂，先用 6mol/L 盐酸煮沸 0.5h，用水洗至中性，再用 6mol/L 氢氧化钠溶液煮沸 0.5h，用水洗至中性，经 105℃干燥备用。

四、测定步骤

1. 称量瓶的准备

取洁净称量瓶，置于 95~105℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，加热 0.5h~1.0h 后，盖好取出，置干燥器内冷却 0.5h，称量。并重复干燥至恒重。

2. 样品测定

- (1) 固体试样：称取 2.00g~10.00g 切碎或磨细的试样，放入已称至恒重的称量瓶中，试样厚度约为 5mm，弄平，立即加盖，精密称量后，置 95~105℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，干燥 2h~4h 后，盖好取出。放入干燥器内冷却 0.5h 后称量。然后再放入 95~105℃干燥箱中干燥 1h 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。
- (2) 半固体或液体试样：取洁净的蒸发皿，内加 10.0g 海砂及一根小玻棒，置于 95℃~105℃干燥箱中，干燥 0.5h~1.0h 后取出，放入干燥器内冷却 0.5h 后称量，并重复干燥至恒量。然后精密称取 5g~10g 试样，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，置入 95℃~105℃干燥箱中干燥 4h 后，盖好取出，放入干燥器内冷却 0.5h 后称量。以下按（1）自“然后再放入 95℃~105℃干燥箱中干燥 1h 左右……”起依法操作。

五、结果计算

1. 数据记录表

称量瓶质量 /m ₀ /g	烘干前样品和称量瓶 质量/m ₁ /g	烘干后样品和称量瓶质量/m ₂ /g			
		1	2	3	恒重值

2. 计算公式

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

式中：X——样品中的水分含量，g/100g；

m₀——称量瓶的质量，g；

m₁——称量瓶和样品的质量，g；

m₂——称量瓶和样品干燥后的质量，g。

计算结果保留三位有效数字。

六、注意事项

1. 本法适用于在 95~105℃下，不含或含其他挥发性物质甚微且对热稳定的食品；
2. 经加热干燥的称量瓶要迅速放到干燥器中冷却；干燥器内一般采用硅胶作为干燥剂当其颜色由蓝色减退或变成红色时，就及时更新，于 135℃条件下烘干 2~3h 后，再重新使用。
3. 直接干燥法的最低检出限量为 0.002g，当取样量为 2g 时，方法检出限为 0.10g/100g，方法相对误差 ≤5%。

思考题

1. 在下列情况下，水分测定的结果是偏高还是偏低？为什么？
（1）样品粉碎不充分；（2）样品中含较多挥发性成分；（3）脂肪的氧化；（4）样品的吸湿性较强；（5）美拉德反应；（6）样品表面结了硬皮；（7）装有样品的干燥器未密封好；（8）干燥器中硅胶已受潮。
2. 干燥器有什么作用？怎样正确地使用和维护干燥器？
3. 为什么经加热干燥的称量瓶要迅速放到干燥器内冷却后再称量？

实验二 食品中水分活度值的测定（ A_w 测定仪及扩散法）

I、 A_w 测定仪法

一、目的与要求

1. 学习水分活度值的测定意义和原理。
2. 掌握 A_w 测定仪法的基本操作技术及注意事项。

二、原理

在一定的温度下，用标准饱和溶液校正 A_w 测定仪的 A_w 值，在同一条件下测定样品，利用测定仪上的传感器，根据食品中的蒸汽压力的变化，从仪器上的表头上读出指示的水分活度。

三、仪器与试剂

1. A_w 测定仪；
2. 20℃恒温箱；
3. 氯化钡饱和液。

四、测定步骤：

1. 仪器校正：用小镊子将 2 张滤纸浸在 $BaCl_2$ 饱和溶液中，待滤纸均匀地浸湿后，轻轻地把它放在仪器的样品盒内，然后将具有传感器装置的表头放在样品盒上，小心拧紧，移至 20℃恒温箱中，维持恒温 3h 后，再将表头上的校正螺丝拧动使 A_w 值为 9.000，重复上述过程再校正一次。

2. 样品测定：取经 15℃~25℃恒温后的试样 1g 左右，置于仪器样品盒内，保持表面平整而不高于盒内垫圈底部。然后将具有传感器装置的表头置于样品盒上（切勿使表头粘上样品）轻轻地拧紧，移至 20℃恒温箱中，保持恒温放置 2h 以后，不断从仪器表头上观察仪器指针的变化状况，待指针恒定不变时，所指示数值即为此温度下试样的 A_w 值。如果试验条件不在 20℃恒温测定时，可根据表 3-1 所列的 A_w 校正值即可将其校正为 20℃时的数值。

3. 温度的校正：温度的校正方法如下：如在 15℃时测得某样品的 $A_w=0.930$ ，查 A_w 值的温度校正表 3-1，表中 15℃时校正值为-0.010，故样品在 20℃时的 $A_w=0.930+(-0.010)=0.920$ ；反之，在 25℃某样品 $A_w=0.934$ ，查表校正值为+0.010，故该样品在 20℃时的 $A_w=0.940+(+0.010)=0.950$ 。

A_w 值的温度校正表 3-1

温度/℃	校正值	温度/℃	校正值
15	-0.010	21	+0.002
16	-0.008	22	+0.004
17	-0.006	23	+0.006
18	-0.004	24	+0.008
19	-0.002	25	+0.010

五、注意事项：

1. 取样时，对于果蔬类样品应迅速捣碎或按比例取汤汁与固形物，肉和鱼等样品需适当切细。
2. 所用的玻璃器皿应该清洁干燥，否则会影响测量结果。
3. 仪器在常规测量时一般 0.5d 校准一次。当要求测量结果准确度较高时，则每次测量前必须进行校正。

4. 测量头为贵重的精密器件，在测定时，必须轻拿轻放，切勿使表头直接接触样品和水；若不小心接触了液体，需蒸发干燥进行校准后才能使用。

II、扩散法

一、目的与要求

1. 学习水分活度值测定意义和原理。
2. 掌握座标内插法的测定方法。

二、原理

样品在康威氏（Conway）微量扩散皿的密封和恒温条件下，分别在 A_w 较高和较低的标准饱和溶液中扩散平衡后，根据样品质量的增加（在 A_w 较高的标准溶液中扩散平衡）和减少（在 A_w 较低的标准溶液中平衡），以质量的增减为纵坐标，各个标准试剂的水分活度为横坐标，计算样品的水分活度值。该法适用中等及高水分活度（ $A_w > 0.5$ ）的样品。

三、仪器和试剂

1. 仪器：

- (1) 康威氏微量扩散皿：构造见图 3-1；
- (2) 小铝皿或玻璃皿：盛放样品用，直径为 25~28mm、深度为 7mm 的圆形皿；
- (3) 分析天平：感量 0.0001g

2. 试剂

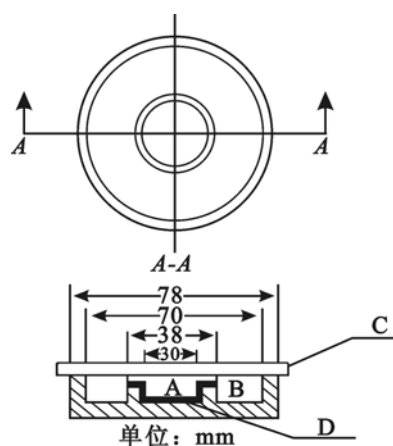
标准水分活度试剂：

用标准试剂配成饱和盐溶液，其在 25°C 时 A_w 值如下表：3-2

试剂名称	A_w	试剂名称	A_w
重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$)	0.986	溴化钠 ($NaBr \cdot 2H_2O$)	0.577
硝酸钾 (KNO_3)	0.924	硝酸镁 [$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$]	0.528
氯化钡 ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.901	硝酸锂 ($LiNO_3 \cdot 3H_2O$)	0.476
氯化钾 (KCl)	0.842	碳酸钾 ($K_2CO_3 \cdot 2H_2O$)	0.427
溴化钾 (KBr)	0.807	氯化镁 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.330
氯化钠 (NaCl)	0.757	乙酸钾 ($KAc \cdot H_2O$)	0.224
硝酸钠 ($NaNO_3$)	0.737	氯化锂 ($LiCl \cdot H_2O$)	0.110
氯化锶 ($SrCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.708	氢氧化钠 ($NaOH \cdot H_2O$)	0.070

四、测定步骤

1. 样品称取：在预先恒重且精确称重的铝皿或玻璃皿中，精确称取 1.00g 均匀样品迅速放入康威氏皿内室中；
2. 饱和标准试剂的装注：在康威氏皿外室预先放入饱和标准试剂 5mL，或用标准的上述各式盐 5.0g，加入少许蒸馏水湿润。通常选择 2~4 种标准饱和试剂，每只铝皿装一种，其中有 1~2 份的



A—内室 B—外室
C—玻璃盖 D—铝器或玻璃器

3-1 康威氏微量扩散皿

A_w 值大于或小于试样的 A_w 值；

3. 加盖密封及平衡：接着在康威氏皿磨口边缘均匀涂上真空脂或凡士林，样品放入后，迅速加盖密封，并移至 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的恒温箱中放置 $2 (\pm 0.5) \text{ h}$ ，（几乎绝大多数样品可在 2h 后测得 A_w ）；

4. 取出铝皿或玻璃皿，用分析天平迅速称量；

5. 再次平衡 0.5h 后，称重，直至恒重。分别计算各样品的质量增减数；

6. 数据记录表

样品质量增减	标准试剂				
样品质量初读数/g					
2h 后样品质量/g					
2.5h 后样品质量/g					
样品质量增减数/mg					

五、结果计算

1. A_w 值测定图绘制

以各种标准饱和溶液在 25°C 时的 A_w 值为横坐标，样品的质量增减数为纵坐标，在坐标纸上作图，将各点连成一条直线，这条线与横坐标的交点即为所测样品的水分活度值。

2. 水分活度值的计算实例

某食品的样品在硝酸钾标准饱和溶液平衡下增重 7mg，为 A 点，在氯化钡标准饱和溶液中增重 3mg，为 B 点，在氯化钾中减重 9mg，为 C 点，在溴化钾中减重 15mg，为 D 点，如图 3-2 所示，把 A、B、C、D 四点连成一线，与横坐标交可 E 点，即可求得其 $A_w=0.878$ 。

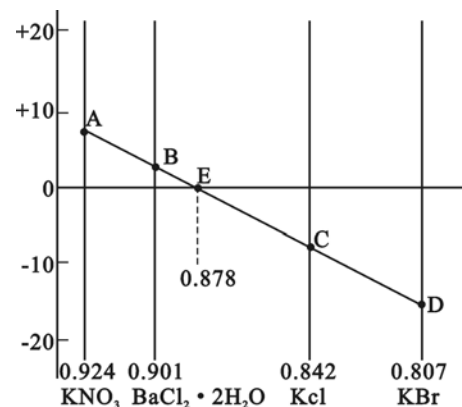


图3-2 A_w 值测定图解

六、注意事项

1. 在测定 A_w 之前，需要对样品进行预处理。

固体、液体或流动的浓稠状样品，可直接取样进行称量；对瓶装固液混合样品可取液体部分称量；对组分复杂的混合样品，则应取有代表性的混合均匀的样品称量。

2. 样品称量应注意精确度，否则会造成测定误差。

3. 取样时应迅速，各份样品称量应在同一条件下进行。

4. 康威氏皿应该具有良好的密封性。

5. 绝大多数样品在 2h 后可测得 A_w ，但有的样品如米饭类、油脂类、油浸烟熏类则需 1~4 天左右时间才能测定。则先测定 2h 后的样品质量，然后间隔一定时间称量，再作坐标求出，为此，需加入样品量 0.2% 的山梨酸作防腐剂，并以其水溶液作空白。

思考题

1. 请阐述水分活度值的概念以及它在食品工业生产中的重要意义。

2. 比较 A_w 测定仪法及扩散法两种方法测定水分活度值，各有什么优缺点？

实验三 食品中总灰分含量的测定

一、目的与要求

1. 学习食品中总灰分测定的意义和原理
2. 掌握称重法测定灰分的基本操作技术及测定条件的选择；
3. 学会用减重法称取试样。

二、原理

将样品经炭化后置于 500~600℃ 高温炉内灼烧，样品中的水分及挥发物质以气态放出，有机物质中的碳、氢、氮等元素与有机物质本身的氧及空气中的氧生成二氧化碳、氮氧化物及水分而散失，无机物以硫酸盐、磷酸盐、碳酸盐、氧化物等无机盐和金属氧化物的形式残留下来，这些残留物即为灰分，称量残留物的质量即可计算出样品中总灰分的含量。

三、仪器

1. 高温电炉（马福炉）；
2. 坩埚钳；
3. 带盖坩埚（石英坩埚或瓷坩埚）
4. 分析天平
5. 干燥器

四、测定步骤：

1. 瓷坩埚的准备

将坩埚用盐酸（1：4）煮 1~2h，洗净晾干后，用三氯化铁与蓝墨水的混合液在坩埚外壁及盖上写上编号，置于马弗炉中，在 550℃±25℃ 下灼烧 0.5h，冷至 200℃ 以下后，取出，放入干燥器中冷至室温，准确称量，并重复灼烧至恒重。（两次称量之差不超过 0.5mg）

2. 样品的预处理

（1）样品的取量：以灰分量 10~100mg 来决定试样的采取量。通常如奶粉、大豆粉、调味料、鱼类及海产品等取 1~2g；谷类食品、肉及肉制品、糕点、牛乳取 3~5g；蔬菜及其制品、糖及糖制品、淀粉及其制品、奶油、蜂蜜等取 5~10g；水果及其制品取 20g；油脂取 50g。

（2）样品的处理

a. 果汁、牛乳等液体试样：准确称取适量试样于已知质量的坩埚中，先在沸水浴上蒸干，再进行炭化。

b. 果蔬、动物组织等含水分较多的试样：先制备成均匀的试样，再准确称取适量试样于已知质量坩埚中，置烘箱中干燥后，再进行炭化。

c. 谷物、豆类等水分含量较少的固体试样：先粉碎成均匀的试样，取适量于已知质量的坩埚中进行炭化。

d. 富含脂肪的样品：把试样制备均匀，准确称取一定量试样，先提取脂肪，再将残留物移入已知质量的坩埚中，进行炭化。

3. 样品的炭化：试样经上述预处理后，以小火加热使试样充分炭化至无烟。

4. 样品的灰化：将炭化后的试样置于马弗炉中，在 550℃±25℃ 灼烧 4h。冷至 200℃ 以下后取出放入干燥器中冷却 30min，在称量前如灼烧残渣有炭粒时，向试样中滴入少许水湿润，使结块松散，

蒸出水分再次灼烧直至无炭粒即灰化完全，冷至 200℃ 以下后，取出放入干燥器中冷却 30min 后，准确称量。重复灼烧至前后两次称量相差不超过 0.5mg 为恒重。

五、结果计算

1. 数据记录表

空坩埚质量 /m ₁ /g	样品和坩埚质量 /m ₂ /g	残灰和坩埚质量/ m ₃ /g			
		1	2	3	恒重值

2. 计算公式

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

式中：

X——样品中总灰分的含量；

m₁——空坩埚的质量，g；

m₂——样品和坩埚的质量，g；

m₃——残灰加和坩埚的质量，g。

计算结果保留三位有效数字。

六、注意事项

1. 样品炭化时要注意热源强度，防止产生大量泡沫溢出坩埚；只有在炭化完全，即不冒烟后才能放入高温电炉中，且灼烧空坩埚与灼烧样品的条件应尽量一致，以消除系统误差。

2. 把坩埚放入高温炉或从炉中取出时，要在炉口停留片刻，使坩埚预热或冷却。防止因温度剧变而使坩埚破裂。

3. 灼烧后的坩埚应冷却到 200℃ 以下再移入干燥器中，否则因热对流作用，易造成残灰飞散，且冷却速度慢，冷却后干燥器内形成较大真空，盖子不易打开；

4. 对于含糖分、淀粉、蛋白质较高的样品，为防止其发泡溢出，炭化前可加数滴纯植物油。

5. 新坩埚在使用前须在盐酸溶液（1+4）中煮沸 1~2h，然后用自来水和蒸馏水分别冲洗干净并烘干。用过的旧坩埚经初步清洗后，可用废盐酸浸泡 20min 左右，再用水冲洗干净。

6. 反复灼烧至恒重是判断灰化是否完全最可靠的方法。因为有些样品即使灰化完全，残留也不一定是白色或灰白色，例如铁含量高的食品，残灰呈褐色；锰、铜含量高的食品，残灰呈蓝绿色；而有时即使灰的表面呈白色或灰白色，但内部仍有炭粒存留。

7. 灼烧温度不能超过 600℃，否则会造成钾、钠、氯等易挥发成分的损失。

思考题：

1. 测定食品的灰分的意义何在？
2. 为什么样品在高温灼烧前，要先炭化至无烟？
3. 样品经长时间灼烧后，灰分中仍有炭粒遗留的主要原因是什么？如何处理？
4. 如何判断样品是否灰化完全？

实验四 食品中总酸度的测定（滴定法）

一、目的与要求

1. 了解食品酸度的测定意义及原理。
2. 掌握滴定分析法的操作技能和正确判断滴定终点。
3. 通过对实验结果的分析、了解影响测定准确性的因素。

二、原理

食品中的酒石酸、苹果酸、柠檬酸、草酸、乙酸等其电离常数均大于 10^{-8} ，可以用强碱标准溶液直接滴定，用酚酞作指示剂，当滴定至终点（ $\text{PH}=8.2$ ，溶液呈浅红色，30s 不退色）时，根据所消耗的标准碱溶液浓度和体积，可计算出样品中总酸含量。

三、仪器与试剂

1. 仪器：

- (1) 滴定装置；
- (2) 移液管（50mL）；
- (3) 分析天平及常用玻璃仪器。
- (4) 研钵。

2. 试剂

(1) NaOH 标准溶液（0.1mol/L）：

- ①配制：称取氢氧化钠（AR）120g 于 250mL 烧杯中，加入蒸馏水 100mL，振摇使其溶解，冷却后置于聚乙烯塑料瓶中，密封，放置数日澄清后，取上清液 5.6mL，加新煮沸过并已冷却的蒸馏水至 1000mL，摇匀。
- ②标定：精密称取 0.6g（准确至 0.0001g）在 $105^{\circ}\text{C}\sim 110^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾，加 50mL 新煮沸过的冷蒸馏水，振摇使其溶解，加二滴酚酞指示剂，用配制的 NaOH 标准溶液滴定至溶液呈微红色 30s 不褪。同时做空白试验。

③精确浓度计算：

$$C = \frac{m \times 1000}{(V_1 - V_2) \times 204.2}$$

式中：C——标准 NaOH 溶液的浓度，mol/L；

m——基准邻苯二甲酸氢钾的质量，g；

V_1 ——标定时所耗 NaOH 标准溶液的体积，mL；

V_2 ——空白试验中所耗 NaOH 标准溶液的体积，mL；

204.2——邻苯二甲酸氢钾的摩尔质量，g/mol。

(2) 酚酞乙醇溶液（0.2%）：称取酚酞 0.2g 溶解于 100mL 95%乙醇中。

(3) 材料：鲜橙粉

四、测定步骤

1. 样品处理

称取 5~10g (精确至 10mg) 鲜橙粉样品, 置于研钵中, 加少量无 CO₂ 蒸馏水, 研磨成糊状, 移入 250 mL 的容量瓶中, 用无 CO₂ 蒸馏水稀释至刻度, 充分摇匀, 过滤, 滤液备用。

2. 样品分析

准确吸取上法制备滤液 50mL 于 250mL 的锥形瓶内, 加酚酞指示剂 3~4 滴, 以 0.1mol/L NaOH 标准溶液至微红色 30s 不退为止。记录消耗 0.1mol/L 氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数 (V₁)。

同一被测样品须测定两次。

3. 空白试验

用水代替试液。以下按 2. 操作。记录消耗 0.1mol/L 氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数 (V₂)。

五、分析结果表达

1. 数据记录表

	第一次	第二次	第三次	平均值
滴定时取样液体积/V/mL				
滴定样品消耗标准 NaOH 溶液体积/ V ₁ /mL				
空白试验消耗标准 NaOH 溶液体积/ V ₂ /mL				

2. 计算公式: 总酸以每公斤 (或每升) 样品中酸的克数表示, 按式

$$X = \frac{c(V_1 - V_2) \times K \times F}{m} \times 1000$$

式中:

X——每公斤 (或每升) 样品中总酸的克数, g/kg (或 g/L);

c——氢氧化钠标准滴定溶液的浓度, mol/L;

V₁——滴定试液时消耗氢氧化钠标准滴定溶液的体积, mL;

V₂——空白试验时消耗氢氧化钠标准滴定溶液的体积, mL;

m——样品质量或体积, g (mL)

F——试液的稀释倍数;

K——酸的换算系数。各种酸的换算系数分别为: 苹果酸, 0.067; 乙酸, 0.060; 酒石酸, 0.075; 柠檬酸, 0.064; 柠檬酸, 0.070 (含一分子结晶水); 乳酸, 0.090; 盐酸, 0.036; 磷酸, 0.033。

六、注意事项

1. 食品中的酸式多种有机弱酸的混合物, 用强碱滴定测其含量时, 滴定突跃不明显, 其滴定终点偏碱, 一般在 pH8.2 左右, 故可选用酚酞作终点指示剂。

2. 对于颜色较深的食品, 因它使终点颜色变化不明显, 可通过加水稀释, 用活性炭脱色等方法

处理后再滴定。若样液颜色过深或浑浊，则宜用电位滴定法。

3. 样品浸渍、稀释用的蒸馏水不能含有 CO_2 ，因为 CO_2 溶于水成为酸性的 H_2CO_3 形式，影响滴定

终点时酚酞颜色变化，对测定有干扰，故在测定之前将其除去，驱除 CO_2 的方法：将蒸馏水煮沸 15min，并迅速冷却备用。必要时须经样液抽真空处理。

4. 样品浸渍、稀释之用水量应根据样品中总酸含量来选择，为使误差不超过允许范围，一般要求滴定时消耗 0.1 mol/L NaOH 溶液不得少于 5mL，最好在 10—15 mL。

5. 计算结果精确到小数点后第二位。如两次测定结果差在允许范围内，则取两测定结果的算术平均值报告结果。同一样品的两次测定值之差，不得超过两次测定平均值的 2%。

思考题：

1. 标准溶液滴定食品总酸，为什么要用酚酞作指示剂？
2. 实验结果若以 mol/L 表示食品总酸浓度，应如何计算？
3. 对于颜色较深的样品，测定总酸度时终点不易观察，如何处理？
4. 食品总酸度测定时，应该注意哪些问题？

实验五 食品中粗脂肪含量的测定（索氏抽提法）

一、目的与要求

1. 学习索氏抽提法测定脂肪的原理与方法。
2. 掌握索氏抽提法基本操作要点及影响因素。

二、原理

利用脂肪能溶于有机溶剂的性质，在索氏提取器中将样品用无水乙醚或石油醚等溶剂反复萃取，提取样品中的脂肪后，蒸去溶剂，所得的物质即为脂肪或称粗脂肪。

三、仪器与试剂

1、仪器

- (1)、索氏提取器 如图 3-3 所示
- (2)、电热恒温鼓风干燥箱
- (3)、干燥器
- (4)、恒温水浴箱

2、试剂

- (1) 无水乙醚（不含过氧化物）或石油醚（沸程 30-60° C）
- (2) 滤纸筒

四、测定步骤

1、样品处理

- (1) 固体样品：准确称取均匀样品 2-5g（精确至 0.01mg），装入滤纸筒内。
- (2) 液体或半固体：准确称取均匀样品 5-10g（精确至 0.01mg），

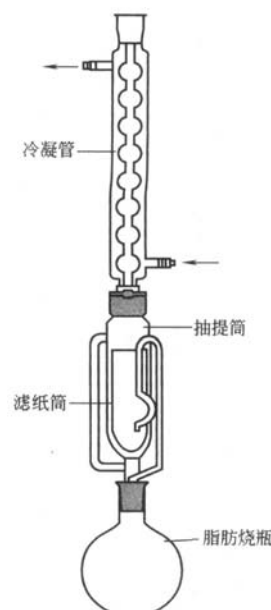


图 3-3 索氏提取器

置于蒸发皿中,加入海砂约 20 g,搅匀后于沸水浴上蒸干,然后在 95-105° C 下干燥。研细后全部转入滤纸筒内,用沾有乙醚的脱脂棉擦净所用器皿,并将棉花也放入滤纸筒内。

2、索氏提取器的清洗

将索氏提取器各部位充分洗涤并用蒸馏水清洗后烘干。脂肪烧瓶在 103° C±2° C 的烘箱内干燥至恒重(前后两次称量差不超过 2mg)。

3、样品测定

(1) 将滤纸筒放入索氏提取器的抽提筒内,连接已干燥至恒重的脂肪烧瓶,由抽提器冷凝管上端加入乙醚或石油醚至瓶内容积的 2/3 处,通入冷凝水,将底瓶浸没在水浴中加热,用一小团脱脂棉轻轻塞入冷凝管上口。

(2) 抽提温度的控制:水浴温度应控制在使提取液在每 6-8min 回流一次为宜。

(3) 抽提时间的控制:抽提时间视试样中粗脂肪含量而定,一般样品提取 6-12h,坚果样品提取约 16h。提取结束时,用毛玻璃板接取一滴提取液,如无油斑则表明提取完毕。

(4) 提取完毕。取下脂肪烧瓶,回收乙醚或石油醚。待烧瓶内乙醚仅剩下 1-2mL 时,在水浴上赶尽残留的溶剂,于 95-105° C 下干燥 2h 后,置于干燥器中冷却至室温,称量。继续干燥 30min 后冷却称量,反复干燥至恒重(前后两次称量差不超过 2mg)。

五、结果计算

1. 数据记录表

1、 计 算 公 式	样品的质量 m/g	脂肪烧瓶的质量 m ₀ /g	脂肪和脂肪烧瓶的质量 m ₁ /g			
			第一次	第二次	第三次	恒重值

$$X = \frac{m_1 - m_0}{m} \times 100$$

式中: X---样品中粗脂肪的质量分数, %;

m---样品的质量, g;

m₀---脂肪烧瓶的质量, g;

m₁---脂肪和脂肪烧瓶的质量, g.

六、注意事项

- 1、抽提剂乙醚是易燃,易爆物质,应注意通风并且不能有火源。
- 2、样品滤纸色的高度不能超过虹吸管,否则上部脂肪不能提尽而造成误差。
- 3、样品和醚浸出物在烘箱中干燥时,时间不能过长,以防止极不饱和的脂肪酸受热氧化而增加质量。
- 4、脂肪烧瓶在烘箱中干燥时,瓶口侧放,以利空气流通。而且先不要关上烘箱门,与 90° C 以下鼓风干燥 10-20min,驱尽残余溶剂后再将烘箱门关紧,升至所需温度。
- 5、乙醚若放置时间过长,会产生过氧化物。过氧化物不稳定,当蒸馏或干燥时会发生爆炸,故使用前应严格检查,并除去过氧化物。

(1) 检查方法:取 5mL 乙醚于试管中,加 KI(100g/L)溶液 1mL,充分振摇 1min。静置分层。若有过氧化物则放出游离碘,水层是黄色(或加 4 滴 5 g/L 淀粉指示剂显蓝色),

则该乙醚需处理后使用。

(2) 去除过氧化物的方法：将乙醚倒入蒸馏瓶中加一段无锈铁丝或铝丝，收集重蒸馏乙醚。

6、反复加热可能会因脂类氧化而增重，质量增加时，以增重前的质量为恒重。

思考题：

- 1、简述索氏抽提器的提取原理及应用范围？
- 2、潮湿的样品可否采用乙醚直接提取？为什么？
- 3、使用乙醚作脂肪提取溶剂时，应注意的事项有哪些？为什么？

实验六 鲜牛乳中总脂肪含量的测定（巴布科克法）

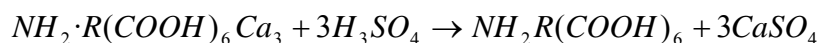
一、目的与要求

- 1、学习巴布科克法测定鲜牛奶中脂肪含量的原理与方法。
- 2、观察产生测定误差的现象并分析原因。

二、原理

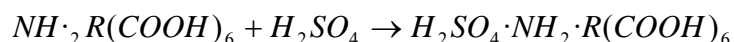
利用硫酸溶解中的非脂成分，将牛奶中的酪蛋白钙盐变成可溶性的重硫酸酪蛋白化合物，使脂肪球被破坏，脂肪游离出来，再经加热和离心，促使脂肪完全分离，直接读取脂肪层的数值，便可计算出被测乳的含脂率。

过程的主要反应如下：



酪蛋白钙盐

酪蛋白



重硫酸酪蛋白

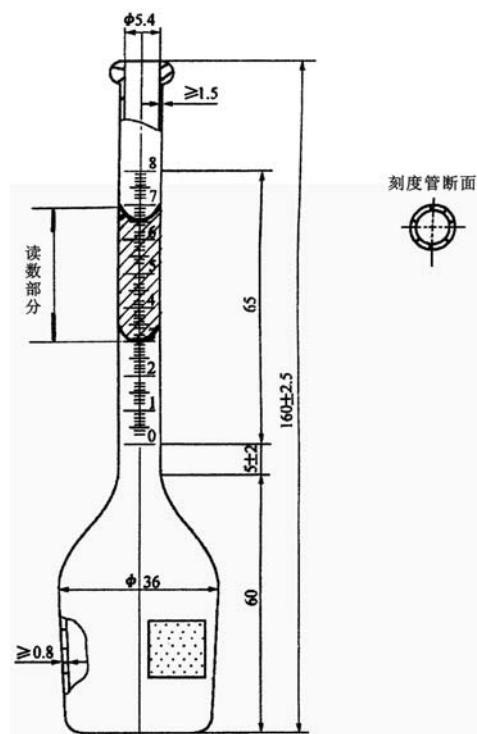
三、仪器与试剂

1、仪器

- (1) 巴布科克氏乳脂瓶 0-8%；（见图 3-4）
- (2) 乳脂离心机；
- (3) 牛乳吸管：17.6mL；
- (4) 量杯：20mL。

2、试剂及材料

- (1) 硫酸：相对密度为 d_4^{20} 1.820—1.825
- (2) 消毒鲜牛乳（市售）



四、测定步骤

- 1、用牛乳吸管吸取均匀的牛乳 17.6mL 注入巴布科克氏乳脂瓶中（注意吸管应提起，不能塞住乳脂瓶口）。
- 2、量取硫酸 17.5mL，沿瓶颈缓慢流入瓶内，手持瓶颈回旋摇动 2-3min 使硫酸与牛乳充分混合，至溶液呈均匀棕黑色，不可有块粒存在。
- 3、将乳脂瓶放入离心机，以每分钟 1000 转的转速离心 5min。
- 4、取出，加入 80° C 的热水，使瓶内液体至瓶颈基部，再离心 2min 取出，再加入 80° C 热水至液面接近 2 或 5 刻度处，再离心 1min。
- 5、取出，置于 55-60° C 水浴中水浴 5min（水浴的水面必须高于乳脂瓶中的脂肪层），取出后立即读取脂肪层最高与最低点所占的格数，即为样品含脂肪的质量百分率。

五、实验结果计算

将测定结果记录于下表：

样品名称	编号	上刻度	下刻度	结果 (%)	平均值

六、注意事项

- 1、每组按编号取两个乳脂瓶进行测定。放入离心机时，必须对称放置。
- 2、硫酸的浓度和用量必须严格按照规定，沿瓶壁慢慢加入，回旋摇动，使充分混合，否则易使脂肪层产生黑色块粒。
- 3、平行试验误差不要过大，若脂肪层有黑色块，不能用平均值表示结果。

思考题

- 1、充分掌握和理解测定步骤和注意事项。
- 2、一般鲜牛乳的 d_4^{20} 平均为 1.030，测定时，吸取 17.6 mL 牛乳，其脂肪的相对密度平均为 0.9，乳脂瓶的 8 个刻度的容积为 1.6mL，试计算每一刻度表示的脂肪含量？
- 3、根据你实验的结果，分析影响实验的因素，探讨实验的经验或教训。

实验七 食品中还原糖含量的测定

方法一：直接滴定法

一、目的与要求

- 1、学习直接滴定法测定还原糖的原理，并掌握其测定的操作技术。
- 2、通过对实验结果的分析，了解影响测定准确性的因素。

二、原理

将等量的碱性酒石酸铜甲液，乙液混合时，立即生成天蓝色的氢氧化铜沉淀，这种沉淀立即与酒石酸钾钠反应，生成深蓝色的可溶性酒石酸钾钠铜络合物。此络合物与还原糖共热时，二价铜即被还原糖还原为一价的氧化亚铜沉淀，氧化亚铜与亚铁氰化钾反应，生成可溶性化合物，达到终点时，稍微过量的还原糖将蓝色的次甲基蓝还原成无色，溶液呈淡黄色而指示滴定终点。根据还原糖标准溶液标定碱性酒石酸铜溶液相当于还原糖的质量，以及测定样品液所消耗的体积，计算还原糖含量。

三、仪器与试剂

(一) 试剂

- 1、盐酸。
- 2、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。
- 3、碱性酒石酸铜乙液：称取 50g 酒石酸钾钠、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中。
- 4、乙酸锌溶液：称取 21.9g 乙酸锌，加 3mL 冰乙酸，加水溶解并稀释至 100mL。
- 5、亚铁氰化钾溶液：称取 10.6g 亚铁氰化钾，加水溶解并稀释至 100mL。
- 6、葡萄糖标准溶液：准确称取 1.0000g 至 $96^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 干燥 2h 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 1.0mg 葡萄糖。
- 7、果糖标准溶液：按试剂 6 配制操作，配制每毫升标准溶液相当于 1.0mg 果糖。
- 8、乳糖标准溶液：按试剂 6 配制操作，配制每毫升标准溶液相当于 1.0mg 的乳糖。
- 9、转化糖标准溶液：准确称取 0.9500g 纯蔗糖，用 100mL 水溶解，置于具塞三角瓶中加入 6mol/L 盐酸 5mL，在 $68^\circ\text{C} \sim 70^\circ\text{C}$ 水浴中加热 15min，放置至室温定容至 1000mL，每毫升标准溶液相当于 1.0mg 转化糖。

(二) 仪器

- 1、定糖滴定装置（150mL 三角瓶，匹配的胶塞，25mL 酸式滴定管）。如图 3- 所示。
- 2、电炉：500W。

四、实验步聚

(一) 样品处理

- 1、水果硬糖：称取样品约 2g 左右（精确至 100mg）

加水溶解并定容至 250mL，摇匀后备用。

- 2、乳类、乳制品及含蛋白质的冷食类：称取约 2.50g~5.00g 固体试样（吸取 25.00mL~50.00mL 液体

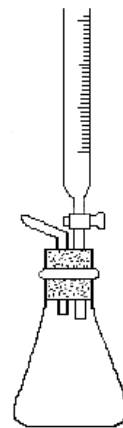


图 3- 还原糖测定滴定装置

试样), 置于 250mL 容量瓶中, 加 50mL 水, 慢慢加入 5mL 乙酸锌溶液及 5mL 亚铁氰化钾溶液, 加水至刻度, 混匀, 沉淀, 静置 30min, 用干燥滤纸过滤, 弃去初滤液, 滤液备用。

3、酒精性饮料: 吸取 100.0mL 试样, 置于蒸发皿中, 用氢氧化钠 (40g/L) 溶液中和至中性, 在水浴上蒸发至原体积的四分之一后, 移入 250mL 容量瓶中, 加水至刻度。

4、含大量淀粉的食品: 称取 10.00g~20.00g 试样置于 250mL 容量瓶中, 加 200mL 水, 在 45℃ 水浴中加热 1h, 并时时振摇。冷却后加水至刻度, 混匀, 沉淀。吸取 200mL 上清液于另一 250mL 容量瓶中, 以下按[(一) 2.]自“慢慢加入 5mL 乙酸锌溶液……”起依法操作。

5、汽水等含有二氧化碳的饮料: 吸取 100.0mL 试样置于蒸发皿中, 在水浴上除去二氧化碳后, 移入 250mL 容量瓶中, 并用水洗涤蒸发皿, 洗液并入容量瓶中, 加入至刻度, 混匀后备用。

(二) 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 150mL 三角锥形瓶中, 加水 10mL, 加入玻璃珠 2 粒, 从滴定管滴加约 9mL 葡萄糖或其他还原糖标准溶液, 摇匀, 置于电炉上加热至沸 (要求控制在 2mm 内沸腾), 然而趁热以每两秒 1 滴的速度继续滴加葡萄糖或其他还原糖标准溶液, 直至溶液蓝色刚好褪去, 显示淡黄色即为终点, 记录消耗葡萄糖或其他还原糖标准溶液的总体积。

同时平行操作三份, 后滴定的葡萄糖或其他还原糖标准溶液的体积应控制在 0.5~1.0mL 以内, 否则。增加预加量, 重新滴定。

(三) 样品溶液预备滴定

吸取 5.0mL 碱性酒石酸铜甲液及 5.0mL 乙液, 置于 150mL 三角锥形瓶, 加水 10mL, 加入玻璃珠 2 粒, 摇匀, 在电炉上加热至沸, 趁热以先快后慢的速度, 从滴定管中滴加试样溶液, 并保持溶液沸腾状态, 待溶液颜色变浅时, 以每两秒 1 滴的迅速滴定, 直至溶液蓝色刚好褪去为终点, 记录样品溶液消耗体积。当样液中还原糖浓度过高时应适当稀释, 再进行测定, 使每次滴定消耗样液的体积控制在与标定碱性酒石酸铜溶液时所消耗的还原糖标准溶液的体积相近, 约在 10mL 左右, 记录消耗样液的总体积, 作为正式滴定参考用。

(四)、样品溶液正式滴定

吸取 5.0mL 碱性酒石酸甲液及 5.0mL 乙液, 置于 150mL 三角锥形瓶, 加水 10mL, 加入玻璃珠 2 粒, 从滴定管加入比预备测定体积少 1mL 的样品溶液至三角锥形瓶, 摇匀, 同上法滴定至终点。同法平行操作三份。

五、结果计算

$$X = \frac{A}{m \times \frac{V}{250}} \times 100$$

式中 X——试样中还原糖的含量（以某种还原糖计），单位为克每百克（g/100g）；

A——碱性酒石酸铜溶液（甲、乙液各 5mL）相当于某种还原糖的质量（mg）；

m——样品的质量（g）；

V——测定时平均消耗样品溶液的体积（mL）。

计算结果表示到小数点后一位。

实验数据记录

项 目	序号	标准还原糖溶液 预加体积（mL）	消耗标准还原糖 溶液总体积（mL）	后滴加标准还原 糖溶液体积（mL）	平均值 （mL）
标定碱性酒 石酸铜甲、乙 液	1				
	2				
	3				
项 目	序号	样品溶液预加 体积（mL）	消耗样品溶液 总体积（mL）	后滴加样口溶液 体积（mL）	平均值 （mL）
样品滴定	1				
	2				
	3				

六、注意事项及说明

- 1、实验中的加热温度、时间及滴定时间对测定结果有很大影响，在碱性酒石酸铜溶液标定和样品滴定时，应严格遵守实验条件，力求一致。
- 2、加热温度应使溶液在 2min 内沸腾，若煮沸的时间延长，耗糖量增加。滴定过程滴定装置不能离开热源，让上升的蒸汽阻止空气侵入溶液，以免影响滴定终点的判断。
- 3、甲、乙液应分别存放，临用时以等量混合。
- 4、本法是与定量的酒石酸铜作用，铜离子是定量的基础，故样品处理时，不能用铜盐作蛋白质沉淀剂。
- 5、滴定速度应尽量控制 2 秒钟 1 滴，滴定速度快，耗糖多；滴速慢，耗糖少。滴定时间应在 1min 内，滴定时间延长，耗糖少。因此预加糖液量应使继续滴定时耗糖量在 0.5~1.0mL 以内。
- 6、为了提高测定的准确度，根据待测样品中所含还原糖的主要成分，要求用哪种还原糖表示结果，

就用相应的还原糖标准溶液标定碱性酒石酸铜溶液。如用乳糖表示结果就用乳糖标准溶液标定碱性酒石酸铜溶液。

7、本法对样品溶液中还原糖浓度有一定要求，即希望每次滴定消耗样品溶液体积与标定时所消耗的葡萄糖标准液或其他还原糖标准液的体积相近，所以当样品溶解浓度过低时，可直接吸取 10mL 样品液，免去加水 10mL，用标准葡萄糖溶液或其他还原糖标准液直接滴至终点。这时样品中还原糖含量按下式计算：

$$\text{还原糖 (以某种还原糖计, g/100g)} = \frac{(V_1 - V_2) \times c}{m \times \frac{V_3}{250}} \times 100$$

式中 V_1 ——标定碱性酒石酸铜溶液消耗标准葡萄糖或其他标准还原糖溶液的体积 (mL)；

V_2 ——样品滴定消耗标准葡萄糖或其他标准还原糖溶液的体积 (mL)；

c ——标准葡萄糖或其他标准还原糖溶液的浓度 (0.1%)；

V_3 ——测定时吸取样品溶液的体积 (mL)；

m ——样品质量 (g)。

七、思考题

- 1、预习测定步骤，思考正确完成实验的操作要点是什么？
- 2、为什么要进行预备滴定？
- 3、为什么滴定过程要保持沸腾？
- 4、滴定至终点，蓝色消失，溶液呈淡黄色，过后又重新变为蓝紫色，为什么？
- 5、根据实验结果及实际操作中的问题进行分析讨论。
- 6、若要测定蔗糖、糊精、淀粉含量，应如何进行？

方法二 高锰酸钾滴定法

一、目的要求

学习高锰酸钾滴定法测定还原糖的原理，学会其测定方法及结果计算。

二、原理

试样经除去蛋白质后，将一定量的样液与过量的碱性酒石酸铜溶液反应，在加热条件下，还原糖把二价的铜盐还原为氧化亚铜，加入酸性硫酸铁，氧化亚铁被氧化为铜盐而溶解，用高锰酸钾标准溶液滴定氧化作用后生成的亚铁盐，根据高锰酸钾标准溶液的消耗量，计算氧化亚铜含量，再

查表得还原糖量。

三、仪器与试剂

(一) 试剂

- 1、碱性酒石酸铜甲液：称取 34.639g 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)，加适量水溶解，加 0.5mL 硫酸，再加水稀释至 500mL，用精制石棉过滤。
- 2、碱性酒石酸铜乙液：称取 173g 酒石酸钾钠与 50g 氢氧化钠，加适量水溶解，并稀释至 500mL，用精制石棉滤，贮存于橡胶塞玻璃瓶内。
- 3、精制石棉：取石棉先用 3mol/L 盐酸浸泡 2d~3d，用水洗净，再加浓度为 400g/L 氢氧化钠溶液浸泡 2d~3d，倾去溶液、再用热碱性酒石酸铜乙液浸泡数小时，用水洗净。再以 3mol/L 盐酸浸泡数小时，以水洗至不呈酸性。然后加水振摇，使成细嫩的浆状软纤维，用水浸泡并贮存于玻璃瓶中，即可作填充古氏坩埚用。
- 4、 $c[(1/5 \text{KMnO}_4), \text{mol/L}]$ 高锰酸钾标准溶液。
- 5、氢氧化钠溶液 (40g/L)：称取 4g 氢氧化钠，加水溶解并稀释至 100mL。
- 6、硫酸铁溶液：称取 50g 硫酸铁，加入 200mL 水溶解后，慢慢加入 100mL 硫酸，冷后加水稀释至 1000mL。
- 7、3mol/L 盐酸：量取 30mL 盐酸，加水稀释至 120mL。

(二) 仪器

- 1、真空泵或水泵。
- 2、可调电炉

四、实验步骤

(一) 样品处理

- 1、乳类、乳制品及蛋白质的冷食类：称取 2.00g~5.00g 固体试样（吸取 25.0mL~50.0mL 液体试样），置于 250mL 容量瓶中，加水 50mL，摇匀后加 10mL 碱性酒石酸铜甲液及 4mL 氢氧化钠溶液(40g/L)，加水至刻度，混匀。静置 30min，用干燥滤纸过滤，弃去初滤液，滤液备用。
- 2、酒精性饮料：吸取 100.0mL 试样，置于蒸发皿中，用 40g/L 浓度的氢氧化钠溶液中和至中性，在水浴上蒸发至原体积的四分之一后，移入 250mL 容量瓶中。加 50mL 水，混合。以下按[（一）1.]自“加 10mL 碱性酒石酸铜甲液……”起依法操作。
- 3、含多量淀粉的食品：称取 10.00g~20.00g 试样，置于 250mL 容量瓶中，加 200mL 水，在 45℃ 水浴中加热 1h，并时时振摇。冷后加水至刻度，混匀，静置。吸取 200mL 上清液于另一 250mL 容量瓶，以下按[（一）1.]自“加 10mL 碱性酒石酸铜甲液……”起依法操作。

4、汽水等含有二氧化碳的饮料：吸取 100.0mL 试样置于蒸发皿中，在水浴上除二氧化碳后，移入 250mL 容量瓶中，并用水洗涤蒸发皿，洗液并入容量瓶中，再加水至刻度，混匀后，备用。

（二）样品测定

吸取 50.00mL 处理后的试样溶液，于 400mL 烧杯内，加入 25mL 碱性酒石酸铜甲液及 25mL 乙液于烧杯上盖一表面皿，加热，控制在 4min 内沸腾，再准确煮沸 2min，趁热用铺好石棉的古氏坩埚或 G4 垂融坩埚抽滤，并用 60℃ 热水洗涤烧杯及沉淀，至洗液不呈碱性为止。将古氏坩埚或垂融坩埚放回原 400mL 烧杯中，加 25mL 硫酸铁溶液及 25mL 水，用玻璃搅拌使氧化亚铜完全溶解，以锰酸钾标准溶液滴定至微红色为终点。

同时平行操作三份，以平均值参加计算。

同时吸取 50mL 水，加入与测定试样时相同的碱性酒石酸铜甲液、乙液、硫酸铁溶液及水，按同一方法做空白试验。

五、结果计算

试样中还原糖质量相当于氧化亚铜的质量按下式计算：

$$X = (V - V_0) \times c \times 71.54$$

式中 X——试样中还原糖质量相当于氧化亚铜的质量（mg）；

V——测定用试样消耗高锰酸钾标准溶液的体积（mL）；

V₀——试剂空白消耗高锰酸钾标准溶液的体积（mL）；

c——高锰酸钾标准溶液的实际浓度 [c(1/5 KMnO₄)=1.000 mol/L] 相当于氧化亚铜的质量（mg）。

根据上式计算所得氧化亚铜质量，查表，再按下式计算样品中还原糖含量：

$$X = \frac{m_1}{m_2 \times \frac{V}{250} \times 1000} \times 100$$

式中 X——样品中还原糖的含量（g/100g）；

m₁——查表得还原糖质量（mg）；

m₂——样品质量或体积（g 或 mL）；

V——测定用样品溶液的体积（mL）；

250——样品处理后的总体积（mL）。

六、注意事项及说明

1、本法以测定过程中产生的铁离子为计算依据，因此在样品处理时，不能用乙酸锌和亚铁氰化钾作

为澄清剂。另外所用碱性酒石酸铜溶液是过量的，即保证把所有的还原糖全部氧化后，还有过量的铜离子存在。所以煮沸后的反应液应呈蓝色，如不呈蓝色，说明样液糖浓度过高，应调整样液浓度。

2、测定时必须严格按照规定的操作条件进行，保证在 4min 内待测样液加热至沸，否则误差很大。

3、在过滤及洗涤氧化亚铜沉淀的过程中，应使沉淀始终在液面以下，以避免氧化亚铜暴露于空气中而被氧化。

七、思考题

1、比较直接滴定法及高锰酸钾滴定法定糖的适用范围及特点。

2、可采用什么方法预调控好加热源，以保证样液在检测时 4min 内加热至沸？

3、样品测定时，为何要用水洗涤处理样品用过的烧杯及沉淀，至洗液不呈碱性为止？

实验八 食品中总糖含量的测定（蒽酮比色法）

一、目的要求

了解蒽酮比色法测定总糖含量的实验原理，及学习其测定方法。

二、实验原理

单糖类遇浓硫酸时，脱水生成糠醛衍生物，糠醛衍生物与蒽酮缩合成蓝色的化合物，在一定糖含量的范围内，其呈色强度与溶液中的糖含量成正比，可用于比色定量。

三、仪器与试剂

（一）试剂

- 1、标准葡萄糖贮备液：准确称取干燥至恒重的葡萄糖 1.0000g，用水溶解并定容至 1000mL，浓度为 1mg / mL。
- 2、标准葡萄糖工作液：吸取标准葡萄糖贮备液 10mL，移入 100mL 容量瓶并加水至刻度，浓度为 0.1mg / mL，备用。
- 3、72%硫酸：量取 72mL 浓硫酸，缓缓倒入 28mL 水中。
- 4、0.1%蒽酮显色液：称取 0.1g 蒽酮和 1.0g 硫脲，溶于 100mL 72%硫酸中，贮存于棕色瓶，于 0℃～4℃ 下存放 2 天，最好现配现用。

（二）仪器

分光光度计。

四、实验步骤

1、样品处理

称取 0.100g 麦芽糊精用水溶解并稀释至 1000mL。过滤备用。

2、测定

分别吸取标准葡萄糖工作液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mL、样品溶液 1.0mL（含糖 40 μg~100 μg），放入 8 根具塞比色管中，并补水至 2mL。然后沿管壁徐徐加入蒽酮试剂各 10mL，摇匀，置沸水浴中准确加热 10min，取出，用冷水迅速冷却至室温，在暗处放置 10min，用 1cm 比色皿，以零号管调节仪器零点，在 620nm 波长下测定吸光值，绘制标准曲线或计算回归方程，根据测定样品溶液的吸光值查标准曲线，得出糖含量。

五、结果计算

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

式中 X——样品总糖含量（以葡萄糖计，mg/100g）；
c——从标准曲线查得测定用样品的糖含量（mg）；
m——测定时相当于样品的量（g）。

六、注意事项及说明

- 1、反应液中硫酸的浓度高，在沸水浴加热时，可使双糖、淀粉等发生水解，再与蒽酮发生显色反应。因此测定结果是样品中单糖、双糖和淀粉的总量。
- 2、如果要求测定结果包括淀粉，则样品处理时应采用 52%高氯酸作提取剂。如要求测定结果不包括淀粉，应该用 80%乙醇提取，以免淀粉和糊精溶出。此外，在测定条件下，纤维素也会与蒽酮试剂发生一定程度的反应，因此应避免样液中含有纤维素。
- 3、比色法要求样液必须清澈透明，如果提取液中存在较多可溶性蛋白，影响比色时可用氢氧化钡作为沉淀剂。若样液较深，可用活性炭脱色。
- 4、避免样液遇水出现退色或浑浊现象影响测定结果，比色皿可用待测样液冲洗。

七、思考题

- 1、配制蒽酮试剂时，加入适量硫脲的作用是什么？
- 2、影响检测准确性的主要因素有哪些？

实验九 食品中蛋白质含量测定（凯氏定氮法）

一、目的与要求

- 1、学习凯氏定氮法测定蛋白质的原理。
- 2、掌握凯氏定氮法的操作技术，包括样品的消化处理、蒸馏、滴定及蛋白质含量计算等。

二、实验原理

蛋白质是含氮的化合物。食品与浓硫酸和催化剂共同加热消化，使蛋白质分解，产生的氨与硫酸结合生成硫酸铵，留在消化液中，然后加碱蒸馏使氨游离，用硼酸吸收后，再用盐酸标准溶液滴定，根据酸的消耗量来乘以蛋白质换算系数，即得蛋白质含量。

因为食品中除蛋白质外，还含有其它含氮物质，所以此蛋白质称为粗蛋白。

三、仪器与试剂

（一）试剂

- 1、硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 2、硫酸钾
- 3、硫酸 (密度为 1.8419g/L)
- 4、硼酸溶液 (20g/L)
- 5、氢氧化钠溶液 (400g/L)
- 6、 0.01mol/L 盐酸标准滴定溶液。
- 7、混合指示试剂: 0.1% 甲基红乙醇溶液 1 份, 与 0.1% 溴甲酚绿乙醇溶液 5 份临用时混合。
- 8、黄豆粉。

(二) 仪器

微量定氮蒸馏装置: 如图 3- 所示。

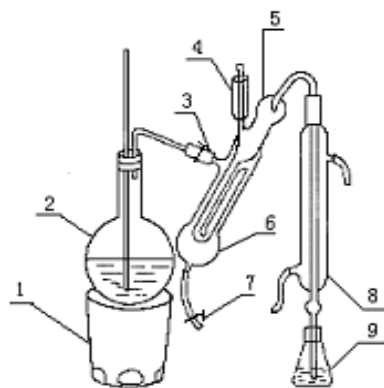


图 3- 微量凯氏定氮装置

- 1、电炉; 2、水蒸气发生器 (2L 平底烧瓶); 3、螺旋夹 a;
- 4、小漏斗及棒状玻璃塞 (样品入口处); 5、反应室; 6、反应室外层;
- 7、橡皮管及螺旋夹 b; 8、冷凝管; 9、蒸馏液接收瓶。

四、实验步骤

1、样品消化

称取黄豆粉约 0.3g ($\pm 0.001\text{g}$), 移入干燥的 100mL 凯氏烧瓶中, 加入 0.2g 硫酸铜和 6g 硫酸钾, 稍摇匀后瓶口放一小漏斗, 加入 20mL 浓硫酸, 将瓶以 45° 角斜支于有小孔的石棉网上, 使用万用电炉, 在通风橱中加热消化, 开始时用低温加热, 待内容物全部炭化, 泡沫停止后, 再升高温度保持微沸, 消化至液体呈蓝绿色澄清透明后, 继续加热 0.5h , 取下放冷, 小心加 20mL 水, 放冷后, 无损地转移到 100mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 混匀备用, 即为消化液。

试剂空白实验: 取与样品消化相同的硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸, 按以上同样方法进行消化,

冷却，加水定容至 100mL，得试剂空白消化液。

2、定氮装置的检查与洗涤

检查微量定氮装置是否装好。在蒸气发生瓶内装水约三分之二，加甲基红指示剂数滴及数毫升硫酸，以保持水呈酸性，加入数粒玻璃珠（或沸石）以防止暴沸。

测定前定氮装置如下法洗涤 2~3 次：从样品进口入加水适量（约占反应管三分之一体积）通入蒸汽煮沸，产生的蒸汽冲洗冷凝管，数分钟后关闭夹子 a，使反应管中的废液倒吸流到反应室外层，打开夹子 b 由橡皮管排出，如此数次，即可使用。

3、碱化蒸馏

量取硼酸试剂 20mL 于三角瓶中，加入混合指示剂 2~3 滴，并使冷凝管的下端插入硼酸液面下，在螺旋夹 a 关闭，螺旋夹 b 开启的状态下，准确吸取 10.0mL 样品消化液，由小漏斗流入反应室，并以 10mL 蒸馏水洗涤进样口流入反应室，棒状玻塞塞紧。使 10mL 氢氧化钠溶液倒入小玻杯，提起玻塞使其缓缓流入反应室，用少量水冲洗立即将玻塞盖紧，并加水于小玻杯以防漏气，开启螺旋夹 a，关闭螺旋夹 b，开始蒸馏。通入蒸汽蒸腾 10min 后，移动接收瓶，液面离开凝管下端，再蒸馏 2min。然后用少量水冲洗冷凝管下端外部，取下三角瓶，准备滴定。

同时吸取 10.0mL 试剂空白消化液按上法蒸馏操作。

4、样品滴定

以 0.01mol/L 盐酸标准溶液滴定至灰色为终点。

5、数据记录

项 目	第一次	第二次	第三次
样品消化液 (mL)			
滴定消耗盐酸标准溶液 (mL)			
消耗盐酸标准溶液平均值 (mL)			

五、结果计算

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.0140}{\frac{m}{100} \times 10} \times F \times 100$$

式中 X——样品蛋白质含量 (g/100g)；

V_1 ——样品滴定消耗盐酸标准溶液体积 (mL)；

V_2 ——空白滴定消耗盐酸标准溶液体积 (mL)；

c——盐酸标准滴定溶液浓度 (mol/L)；

0.0140 ——1.0mL 盐酸 $[c(HCl) = 1.000mol/L]$ 标准滴定溶液相当的氮的质量 (g);

m——样品的质量 (g);

F——氮换算为蛋白质的系数, 一般食物为 6.25; 乳制品为 6.38; 面粉为 5.70;

高粱为 6.24; 花生为 5.46; 米为 5.95; 大豆及其制品为 5.71; 肉与肉制品为 6.25; 大麦、小米、燕麦、裸麦为 5.83; 芝麻、向日葵 5.30。

计算结果保留三位有效数字。

六、注意事项及说明

- 1、本法也适用于半固体试样以及液体样品检测。半固体试样一般取样范围为 2.00g~5.00g; 液体样品取样 10.0mL~25.0mL (约相当氮 30mg~40mg)。若检测液体样品, 结果以 g/100mL 表示。
- 2、消化时, 若样品含糖高或含脂及较多时, 注意控制加热温度, 以免大量泡沫喷出凯氏烧瓶, 造成样品损失。可加入少量辛醇或液体石蜡, 或硅消泡剂减少泡沫产生。
- 3、消化时应注意旋转凯氏烧瓶, 将附在瓶壁上的碳粒冲下, 对样品彻底消化。若样品不易消化至澄清透明, 可将凯氏烧瓶中溶液冷却, 加入数滴过氧化氢后, 再继续加热消化至完全。
- 4、硼酸吸收液的温度不应超过 40℃, 否则氮吸收减弱, 造成检测结果偏低。可把接收瓶置于冷水浴中。
- 5、在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%

七、思考题

- 1、预习凯氏定氮法测定蛋白质的原理及操作。
- 2、蒸馏时为什么要加入氢氧化钠溶液? 加入量对测定结果有何影响?
- 3、在蒸汽发生瓶水中、加甲基红指示剂数滴及数毫升硫酸的作用是什么? 若在蒸馏过程中才发现蒸汽发生瓶中的水变为黄色, 马上补加硫酸行吗?
- 4、实验操作过程中, 影响测定准确性的因素有哪些?

实验十 电位滴定法食品中氨基酸总量

一、目的与要求

学习电位滴定法测定食品中氨基酸总量的基本原理和操作方法

二、实验原理

利用氨基酸两性电解质作用，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，以酸度计控制测定终点。

三、仪器与试剂

(一) 试剂

- 1、36%甲醛：应不含有聚合物。
- 2、0.050mol/L 氢氧化钠标准溶液。

(二) 仪器

- 1、酸度计。
- 2、磁力搅拌器。
- 3、10mL 微量滴定管。

四、实验步骤

1、样品处理

吸取酱油 5.0mL，加水稀释并定容至 100mL。

2、样品测定

吸取 20.0mL 试样，置于 200mL 烧杯中，加 60mL 蒸馏水，开动磁力搅拌器，待搅拌稳定后把酸度计的复合电极小心放入烧杯的合适位置，用氢氧化钠标准溶液滴定至酸度计指示 pH8.2，记下消耗氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数，可计算总酸含量。

准确加入 10.00mL 甲醛溶液，混匀，再用氢氧化钠标准滴定溶液继续滴定至 pH9.2，记录消耗氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数。

同时量取 80mL 水，先用 0.05mol/L 氢氧化钠溶液调节至 pH 为 8.2，再加入 10.00mL 甲醛溶液，用氢氧化钠标准滴定溶液滴定至 9.2，作为试剂空白试验。

3、实验数据记录

项 目	第一次	第二次	第三次	平均值
滴定至 pH8.2 消耗 NaOH 体积				
滴定至 pH9.2 消耗 NaOH 体积				

五、结果计算

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.014}{\frac{5}{100} \times 20} \times 100$$

式中 X——样品中氨基酸态氮的含量 (g/100mL)；

V_1 ——测定样品在加入甲醛后滴定至终点 (pH9.2) 所消耗氢氧化钠标准溶液的体积 (mL)；

V_2 ——空白试验加入甲醛后滴定至终点所消耗氢氧化钠标准溶液的体积 (mL)；

c ——氢氧化钠标准溶液的浓度 (mol/L)；

0.014——与 1.00mL 氢氧化钠标准滴定溶液 [$c(\text{NaOH})=1.000\text{mol/L}$] 相当的氮的质量 (g)。

计算结果保留两位有效数字。

六、注意事项及说明

- 1、本法具有准确快速的特点，可用于各类食品游离氨基酸含量测定。
 - 2、对固体样品一般应进行粉碎，准确称样后加适量水在 50℃ 水浴中萃取 0.5h，再进行检测。
 - 3、对于混浊和色深样品可不经处理而直接测定。
 - 4、检测结果的准确性与所使用的酸度计是否准确密切相关。因此在检测前应检查复合电极的可靠性，用标准缓冲液对酸度计进行校正，使用完毕需用蒸馏水冲洗电极，浸泡在饱和 KCl 溶液的保存。
- 检测用酸度计精度要求为 ±0.01pH。

七、思考题

- 1、检测时为什么要加入甲醛？选用何种玻璃仪器加量甲醛？
- 2、根据实验结果，探讨产生实验误差的因素。

实验十一 食品中维生素 C 含量的测定

方法一 2,4 - 二硝基苯肼比色法测定抗坏血酸总量

一、目的要求

理解 2,4 - 二硝基苯肼比色法测定抗坏血酸总量的基本原理。学习其操作方法和了解影响测定准确性的因素。

二、实验原理

总抗坏血酸包括还原型、脱氢型和二酮古乐糖酸，样品中还原型抗坏血酸经活性炭氧化为脱氢抗坏血酸，再与 2,4 - 二硝基苯肼作用生成红色脎，其呈色强度与总抗坏血酸含量呈正比，可进行比色定量。

三、仪器与试剂

(一) 试剂

- 1、4.5mol/L 硫酸：量取 250mL 浓硫酸小心加入 700mL 水中，冷却后用水稀释至 1000mL。
- 2、85%硫酸：小心加 900mL 浓硫酸于 100mL 水中。
- 3、2% 2,4 - 二硝基苯肼：溶解 2,4 - 二硝基苯肼 2g 于 100mL 4.5mol/L 硫酸中，过滤。不用时存于冰箱内，每次使用前必须过滤。
- 4、2%草酸溶液。
- 5、1%草酸溶液。
- 6、1%硫脲溶液：溶解 1g 硫脲于 100mL 1%草酸溶液中。
- 7、2%硫脲溶液：溶解 2g 硫脲于 100mL 1%草酸溶液中。
- 8、1mol/L 盐酸：取 100mL 盐酸，加入水中，并稀释至 1200mL。
- 9、抗坏血酸标准溶液：称取 100mg 纯抗坏血酸溶解于 100mL 2%草酸溶液中，此溶液每毫升相当于 1mg 抗坏血酸。
- 10、活性炭：将 100g 活性炭加到 750mL 1mol/L 盐酸中，回流 1h~2h，过滤，用水洗数次，至滤液中无铁离子 (Fe^{3+}) 为止，然后置于 110℃烘箱中烘干。

(三) 仪器

- 1、恒温箱或电热恒温水浴锅。
- 2、可见光分光光度计。
- 3、捣碎机。

四、实验步骤

1、样品处理（全部实验过程应避光）。

(1) 鲜样的制备：称取 100g 鲜样即加入 100mL 2%草酸溶液，倒入捣碎机中打成匀浆，称取 10.0g~40.0g 匀浆（含 1mg~2mg 抗坏血酸）倒入 100mL 容量瓶，用 1%草酸溶液稀释至刻度，混匀。过滤，滤液备用。

(2) 干样制备：称取 1g~4g 干样（含 1mg~2mg 抗坏血酸）放入乳钵内，加入等量的 1%草酸溶液磨成匀浆，连固形物一起倒入 100mL 容量瓶内，用 1%草酸溶液稀释至刻度，混匀。过滤备用。

2、样品还原型抗坏血酸的氧化处理

量取 25.0mL 上述滤液，加入 2g 活性炭，振摇 1min，过滤，弃去最初数毫升滤液。吸取 10.0mL 此氧化提取液，加入 10.0mL 2%硫脲溶液，混匀，此试样为稀释液。

3、呈色反应

(1) 取 3 支试管，各加入 4mL 经氧化处理的样品稀释液。基中一支试管作为空白，向其余两试管加入 1.0mL 2%2,4 - 二硝基苯肼溶液，将所有试管放入 37°C ± 0.5°C 恒温箱或恒温水浴中，保温 3h。

(2) 3h 后取出，除空白管外，将所有试管放入冰水中。空白管取出后使其冷到室温，然后加入 2%2,4 - 二硝基苯肼溶液 1.0mL，在室温中放置 10min~15min，后放入冰水内。其余步骤同试样。

4、85%硫酸处理

当试管放入冰水冷却后，向每一试管（连同空白管）中加入 85%硫酸 5mL，滴加时间至少需要 1min，需边加边摇动试管。将试管自冰水中取出，在室温放置 30min 后比色。

5、样品比色测定

用 1cm 比色皿，以空白液调零点，于 500nm 波长测定吸光值。

6、标准曲线绘制

(1) 加 2g 活性炭于 50mL 标准溶液中，振动 1min 后过滤。吸取 10.00mL 滤液放入 500mL 容量瓶中加 5.0g 硫脲，用 1%草酸溶液稀释至刻度。抗坏血酸浓度 20 μg/mL。

吸取 5, 10, 20, 25, 40, 50, 60mL 稀释液，分别放入 7 个 100mL 容量瓶中，用 1%硫脲溶液稀释至刻度，使最后稀释液中抗坏血酸的深度分别为 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12 μg/mL，为抗坏血酸标准使用液。

(2) 分别吸取 4mL 各不同深度的抗坏血酸标准使用液，于 7 个试管中，吸取 4mL 水于试剂空白管，各加入 1.0mL 2%2,4 - 二硝基苯肼溶液，混匀，将全部试管放入 37°C ± 5°C 恒温箱或恒温水浴中，保温 3h。

3h 后将 8 个试管取出，全部放入冰水冷却后，向每一试管中加入 5mL 85%硫酸，滴加时间至少需要 1min，边加边摇。将试管自冰水取出，在室温放置 30min 后，以试剂空白管调零，并比色测定。

以吸光值为纵坐标，抗坏血酸含量 (mg) 为横坐标绘制标准曲线或计算回归方程。

五、结果计算

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

式中 X——样品中总抗坏血酸含量[mg/100g];

c——由标准曲线查得或由回归方程算得试样测定液总抗坏血酸含量 (mg);

m ——测定时所取滤液相当于样品的用量 (g)。

计算结果表示到小数点后两位。

六、注意事项及说明

- 1、利用普鲁士蓝反应可对铁离子存在与否进行检验：将 2%亚铁氰化钾与 1%盐酸等量混合，将需检测的样液滴入，如有铁离子则产生蓝色沉淀。
- 2、硫脲的作用在于防止抗坏血酸的继续被氧化和有助于脲的形成。
- 3、加硫酸显色后，溶液颜色可随时间的延长而加深，因此，在加入硫酸溶液 30min 后，应即立比色测定。
- 4、检测过程中，测定样的吸光值不落在标准曲线上，可重新调整测定样品的量或标准曲线的浓度范围。
- 5、本实验法在 $1\ \mu\text{g/ml}\sim 12\ \mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸范围内呈良好线性关系，最低检出限为 $0.1\ \mu\text{g/mL}$ 。
- 6、本实验适用于水果、蔬菜及其制品中总抗坏血酸的测定。
- 7、食品分析中的总抗坏血酸是指抗坏血酸和脱氢抗坏血酸二者的总量，若食品中本身含有二酮古乐糖酸抗坏血酸的氧化产物，则导致检测总抗坏血酸含量偏高。

七、考思考题

- 1、试样制备过程为何要避光处理？
- 2、为何加入 85%硫酸溶液时，速度要慢而且需在冰水浴条件下完成？解释若加酸速度过快使样品管中液体变黑的原因。
- 3、样品比色测定时，用样品空白管调零的目的何在？

方法二 固蓝盐比色法测定还原型抗坏血酸

一、目的要求

学习固蓝盐比色法测定食品中还原型抗坏血酸含量测定的原理以及其检测方法。

二、实验原理

在乙酸溶液中，抗坏血酸与固蓝盐 B 反应生成黄色的草酰肼 - 2 - 羟基丁酰内酯衍生物。在最大吸收波长 420nm 处测定吸光度，与标准系列比较定量。

三、仪器与试剂

(一) 试剂

1、2mol/L 乙酸溶液：吸取 11.6mL 冰乙酸，加水稀释至 100mL。

2、0.5mol/L 乙酸溶液：吸取 2.9mL 冰乙酸，加水稀释至 100mL。

3、0.25mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液：称取 9.3g 乙二胺四乙酸二钠[C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ · 2H₂O]于水中，加热使之溶解后，放冷，并稀释至 100mL。

4、蛋白质沉淀剂：

(1) 乙酸锌溶液：称取 22.0g 乙酸锌[Zn(CH₃COO)₂ · 2H₂O]，加 3mL 冰乙酸溶于水，并稀释至 100mL。

(2) 亚铁氰化钾溶液：称取 10.6g 亚铁氰化钾[K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O]，加水溶解至 100mL。

5、显色剂固蓝盐 B (Fast Blue Salt B) 溶液：准确称取 0.2g 固蓝盐 B，加水溶解于 100mL 棕色容量瓶中，并稀释至刻度。该溶液在室温下贮存可稳定 3 天以上。

6、抗坏血酸标准储备溶液：精密称取 0.2000g 抗坏血酸，加 20mL 2mol/L 乙酸溶液溶解后移入 100mL 棕色容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀。此溶液相当于 2.0mg/mL 抗坏血酸（10℃下冰箱内贮存在 2 天内稳定）。

7、抗坏血酸标准使用溶液：用移液管精密吸取 5.0mL 抗坏血酸标准储备溶液于 100mL 棕色容量瓶内。加 5mL 2mol/L 乙酸溶液，用水稀释至刻度。此溶液相当于 100 μg/mL 抗坏血酸（临用时配制）。

(二) 仪器

1、可见光分光光度计。

2、捣碎机

3、离心机。

四、实验步骤

(一) 样品溶液的制备

1、非蛋白性食品

(1) 液体试样：抗坏血酸含量在 0.2g/L 以下的试样，混匀后可直接取样测定；抗坏血酸含量 0.2g/L 以上的试样，用水适量稀释后测定。

(2) 水溶性固体试样：准确称取 1.0g~5.0g，精确至 0.001g 放入乳研中，加 5mL 2mol/L 乙酸溶液研磨溶解后，移入 100mL 棕色容量瓶内，加水稀释至刻度。

(3) 蔬菜、水果样品：称取鲜样可食部分 20.00g~50.00g 于捣碎机内，加等量的 2mol/L 乙酸溶液捣成匀浆。称取 10.0g~20.0g 匀浆于 100mL 棕色容量瓶内，加 5 mL 2mol/L 乙酸溶液，用水稀释至刻度，混匀。滤纸过滤，滤液备用。不易过滤的样液可用离心机离心分离，上清液供测定用。

2、蛋白性食品：固体试样混匀后精密称取 5.0g~10.0g，精密至 0.001g；液体试样用移液管精密吸取 5.0mL~10.0mL 于 100mL 棕色容量瓶内。加 10mL 2mol/L 乙酸溶液、乙酸锌溶液和亚铁氰化钾溶液各 7.5mL，加水至刻度，混匀。将全部溶液移入离心管内，以 3000r/min 离心 10min，上清液供测定用。同时取与处理试样相同量的乙酸溶液、乙酸锌溶液和亚铁氰化钾溶液，按同一方法做试剂空白试验。

(二) 标准曲线绘制

取一套 10mL 比色管，编号，按下表加入各试剂及操作。

管 号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
抗坏血酸标准使用液 (ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0
相当抗坏血酸含量 (μg)	0	10.0	20.0	40.0	60.0	80.0	100.0	150.0	200.0
乙二胺四乙酸二钠溶液	各管加 0.03ml								
0.5mol/L 乙酸溶液	各管加 0.5ml								
固蓝盐 B 溶液	各管加 1.25ml								
吸光值									

加水稀释至 10mL，混匀，室温下放置 20min 后，用 1cm 比色皿，以零号管调节零点，于波长 420nm 处测定吸光值。

以抗坏血酸量 (μg) 为横坐标，与其对应的吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

(三) 样品测定

1、非蛋白试样的测定：精密吸取按非蛋白性食品方法处理的样液 0.5mL~5.0mL（约相当于抗坏血酸 200 μg 以下）和等量蒸馏水，各于 10mL 比色管内，以下按标准曲线测定方法依次加入其它试剂。加水稀释至 10mL，混匀，室温下放置 20min 后，以零号管调节零点，测定样品吸光值，从标准曲线上查出抗坏血酸含量。

2、蛋白性试样的测定：精密吸取按蛋白性食品方法制备的样液（约相当于抗坏血酸 200 μg 以下）和等体积试剂空白溶液，各于 10mL 比色管内。各加入 1.5mL 乙二胺四乙酸二钠溶液、0.5mol/L 乙醇溶液 1.0mL、1.25mL 固蓝盐 B 溶液，加水至刻度，混匀。室温下放置 3min 后，移入 1cm 比色皿，以试剂空白管调节零点，于波长 420nm 处测定吸光值。从标准曲线上查出抗坏血酸含量。

五、结果计算

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

式中 X——样品中抗坏血酸含量[mg/100g 或 mg/100mL]；

c——试样测定液中抗坏血酸含量（μg）；

m——试样质量或体积（g 或 mL）；

V₂——试样处理液总体积（mL）；

V₁——测定时所取溶液体积（mL）。

计算结果表示到小数点后二位。

六、注意事项及说明

- 1、蛋白性食品常指奶粉、豆粉、乳饮料、强化食品等。
- 2、蛋白性试样比色测定时，以试剂空白管调节零点的目的，在于消除蛋白质沉淀剂可能产生的呈色物质，避免实验误差产生。

七、思考题

- 1、比较 2·4 - 二硝基苯肼法与固蓝盐 B 比色法测定抗坏血酸的适用性。
- 2、样品溶液制备时加入乙酸溶液的目的是什么？对蛋白性食品若不进行除蛋白步骤，会对实验产生什么影响？

方法三 2,6 - 二氯酚测定法测定还原型抗坏血酸

一、目的要求

学会用滴定法测定还原型抗坏血酸。

二、实验原理

还原型抗坏血酸能定量地还原染料 2,6 - 二氯酚。该染料在中性或碱性溶液中呈蓝色，酸性溶液中呈粉红色，滴定时还原型抗坏血酸将染料还原为无色，本身被氧化为脱氢抗坏血酸，终点时过量的染料在溶液中呈粉红色，在没有杂质干扰时，样品提取液所还原的标准染料量与样品中的还原型抗坏血酸量成正比。

三、试剂材料及仪器

1、2%草酸溶液：溶解 20g 草酸于 1000mL 水中。

2、1%草酸溶液。

3、抗坏血酸标准溶液：准确称取 20mg 分析纯抗坏血酸溶于 1%草酸溶液中，移入 100mL 容量瓶，用 1%草酸溶液稀释至刻度，摇匀，于冰箱中保存。使用时用 1%草酸溶液稀释 10 倍。此标准使用液相当 0.02mg/mL 维生素 C。也可用下法标定：吸取维生素 C 使用液 20.00mL 于三角瓶中，加入 6% 碘化钾溶液 0.5mL，1%淀粉溶液 3 滴，使用微量滴定管，用 0.001mol/L 碘酸钾标准溶液滴定，终点为淡蓝色，计算如下：

$$\text{抗坏血酸浓度 (mg/mL)} = \frac{V_1 \times 0.088}{V_2}$$

式中 V_1 ——消耗 0.001mol/L 碘酸钾标准溶液的量 (mL)

V_2 ——吸取抗坏血酸使用液的量 (mL)

0.088——1ml 0.001mol/L 碘酸钾标准溶液相当于 0.088mg 抗坏血酸。

4、2,6 - 二氯酚钠溶液：称取 2,6 - 二氯酚钠 50mg，溶解并稀释至 250mL，此液应贮于棕色瓶中并冷藏，用时依下法标定：吸取 20.00mL 已知浓度的抗坏血酸标准溶液于锥形瓶中，用 2,6 - 二氯酚钠溶液滴定至溶液呈粉红色，15s 不褪色为滴定终点，计算染料溶液对抗坏血酸的滴定度 T ：

$$T = \frac{c \times V_1}{V_2}$$

式中： c ——抗坏血酸的浓度 (mg/mL)；

V_1 ——吸取抗坏血酸的体积 (mL)；

V_2 ——消耗染料溶液的体积 (mL)。

5、0.100mol/L 碘酸钾溶液：精确称取干燥的碘酸钾 0.3567g，用水溶解并定容于 100mL 容量瓶，混匀。

6、0.001mol/L 碘酸钾溶液：吸取 0.100mol/L 碘酸钾溶液 1.00mL，用水稀释至 100mL，此溶液相当于抗坏血酸 0.088mg/mL。

7、1%淀粉溶液。

8、6%碘化钾溶液。

9、圆椒或柑橙。

10、微量滴定管。

四、实验步骤

1、称取可食用部分样品 10~20g，迅速切碎后放在研钵中，加等量 2%草酸溶液浸样品。

2、捣成匀浆，移入 200mL 容量瓶中，用 1%草酸溶液稀释至刻度，摇匀。

3、将样液过滤，弃去最初数毫升滤液。

4、吸取滤液 10~20mL 于锥形瓶中，用标定过的染料溶液滴定至粉红色，15 秒不退为终点。

五、结果计算

$$\text{抗坏血酸含量 (mg/100g 样品)} = \frac{VT}{m} \times 100$$

式中 V——滴定时所耗染料的体积 (mL)；

T——1ml 染料溶液相当于抗坏血酸的毫克数 (即滴定度)

m——滴定时所吸取的滤液相当于样品的量 (g)

结果取三位有效数字，含量低的保留小数点后两位数字。

六、注意事项及说明

1、整个操作过程要迅速，防止还原型抗坏血酸氧化。

2、样品处理过程若打碎的浆泡沫过多，在稀释时可加辛醇数滴，使去掉泡沫。

3、滴定可始时，染料要迅速加入，直至红色不立即消失，而后逐滴加入，并不断摇动锥形瓶直至终点，整个滴定过程不宜超过 2min。

4、样品中可能有其它杂质也能还原染料，但速度较抗坏血酸慢，所以滴定以 15 秒粉红色不退为终点。

5、若滤液颜色很深，终点不易辨别，可用白陶土脱色后再滴定，但应选择脱色力强而对抗坏血酸无损失的白陶土。有的资料介绍用试样滤液来滴定染料溶液至红色为终点 (此种方法标定染料时也应用标准抗坏血酸溶液滴定染料液)。

6、分析新鲜果蔬时，用 1%草酸不能使酶失去活力，不能稳定抗坏血酸，故用 2%草酸。

7、2,6 - 二氯酚钠溶液，可置于冰箱中保存，但需定期标定，以保证溶液的准确性。

七、思考题

1、此法能否用于测定食品中维生素 C 的总量？

2、抗坏血酸标准溶液使用前为何必须进行标定？

实验十二 食品中胡萝卜素含量的测定

方法一 纸层析法

一、目的要求

1、学习从食品中分离、提纯出胡萝卜素的方法，了解样品处理过程的一般要求。

2、掌握纸层析分离检测的基本操作要点。

二、实验原理

样品经过皂化后，用石油醚提取食品中的胡萝卜素及其他植物色素，以石油醚为展开剂进行纸层析，胡萝卜素极性最小，移动速度最快，从而与其他色素分离，剪下含胡萝卜素的区带，洗脱后于 450nm 波长下定量测定。

三、仪器与试剂

(一) 试剂

1、石油醚（沸程 30℃~60℃）；同时是展开剂。

2、氢氧化钾溶液：取 50g 氢氧化钾溶于 50mL 水中。

3、无水乙醇：不得含有醛类物质。

5、β-胡萝卜素标准溶液：

(1) β 胡萝卜素标准贮备液：准备称取 50.0mg β 胡萝卜素标准品，溶于 100.0mL 三氯甲烷中，浓度约为 500 μ g/mL，准确测定其浓度。标定浓度的方法如下：

吸取标准贮备液 10.0 μ L，加正己烷 3.00mL，混匀。用 1cm 比色皿，以正己烷为空白，在 450nm 波长测其吸光度值，平行测定三份取平均值。

按下式计算浓度：

$$X = \frac{A}{E} \times \frac{3.01}{0.01}$$

式中 X—胡萝卜素标准溶液浓度 ($\mu\text{g/mL}$);

A—吸光值;

E— β -胡萝卜素在正己烷溶液中,检测波长为 450nm,比色杯厚度 1cm,溶液浓度为 1mg/L 的吸光系数,为 0.2638;

$\frac{3.01}{0.01}$ ——测定过程中稀释倍数的换算系数。

(2) β -胡萝卜素标准使用液:将已标定的标准液用石油醚准确稀释 10 倍,使其浓度为 $50\mu\text{g/mL}$,避光保存于冰箱中。

(二) 仪器

- 1、旋转蒸发器:配套 150mL 球形瓶。
- 2、恒温水浴锅。
- 3、分光光度计。
- 4、皂化回流装置。
- 5、玻璃层析缸。

四、实验步骤

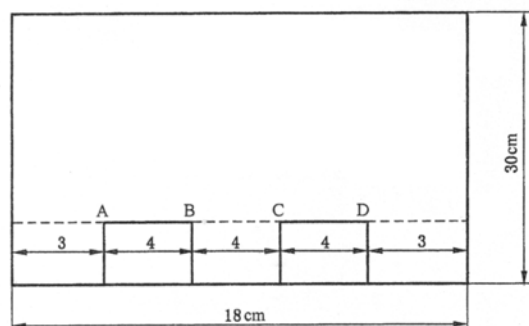
(一) 样品预处理

- 1、皂化:植物样品称取可食部分 1g~5g (含胡萝卜素约 $20\mu\text{g}$ ~ $80\mu\text{g}$) 匀浆;粮食样品视其胡萝卜素含量而定,固体样品需粉碎;植物油和高脂肪样品取样量不超过 10g。置于 100mL 带塞锥形瓶中,加脱醛乙醇 30mL,再加 10mL 氢氧化钾溶液,回流加热 30min,然后用冰水使之迅速冷却。
- 2、提取:取下皂化瓶,将皂化后试样液移入分液漏斗,以少量水洗涤锥形瓶,再用 30mL 石油醚分两次洗涤锥形瓶,全部洗液合并于分液漏斗中,轻摇分液漏斗 1~2min,适时开塞排气,静置分层,将水液放入第二个分液漏斗中。向第二个分液漏斗中加入 25mL 石油醚,振摇,静置分层,将水溶液放入原锥形瓶中,醚层并入第一个分液漏斗中。再加入 25mL 石油醚,重复提取水相,直至醚层中不显黄色为止。
- 3、洗涤合并石油醚提取液于分液漏斗,用水洗涤至中性,将石油醚提取液通过盛有 10g 无水硫酸钠的小漏斗,漏入球形瓶,用少量石油醚分数次洗净分液漏斗和无水硫酸钠层内的色素,洗涤液并入球形瓶内。
- 4、浓缩与定容

将上述球形瓶内的石油醚提取液于旋转蒸发器上减压蒸发,水浴温度为 60°C ,蒸发至剩 1mL 时,取下球形瓶,用氮气吹干,立即用 2.00mL 石油醚定容。备层折用。

(二) 样品纸层折

- 1、点样：在 18cm×30cm 滤纸下端距底边 4cm 处作一基线，在基线上取 A、B、C、D 四点（见示意图），用微量注射器吸取 0.100mL~0.400mL 浓缩样品液在 AB 和 CD 间迅速点样。



层析点样示意图

- 2、层开：待纸上所点样液自然挥发干后，将滤纸卷成圆筒状，置于预先用石油醚润湿的层析缸中，进行上行展开。
- 3、洗脱：待胡萝卜素与其它色素完全分开后，取出滤纸，自然挥发干石油醚，将位于展开剂前沿的胡萝卜素层析带剪下，立即放入盛有 5mL 石油醚的具塞试管中，用力振摇，使胡萝卜素完全溶于试剂中。

(三) 比色测定

1、样品测定

用 1cm 比色皿，以石油醚调零点，于 450nm 波长下，测定洗脱液的吸光值，以其值从标准曲线上查出 β -胡萝卜素的含量。

2、标准曲线绘制

吸取 β -胡萝卜素标准使用液 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 6.00, 8.00mL，分别置于 100mL 具塞锥形瓶中，按试样分析步骤进行预处理和纸层析，点样体积为 0.100mL，标准曲线各点含量依次为 2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、20.0 μg 。为测定低含量试样，可在 0 至 2.5 μg 间加做几点，以 β -胡萝卜素含量为横坐标，以吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

五、结果计算

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

式中 X——样品中胡萝卜素的含量（以 β -胡萝卜素计， $\mu\text{g}/100\text{g}$ ）；

c——在标准曲线上查得的胡萝卜素质量（ μg ）；

V_1 ——点样体积 (mL);

V_2 ——试样提取液浓缩后的定容体积 (mL);

m ——试样质量 (g);

计算结果保留三位有效数字。

六、注意事项及说明

1、操作时需在避光条件下进行。

2、乙醇中含醛类物质的检验法。

(1) 配制银氨溶液：加浓氨水于 5%硝酸银溶液中，直至氧化银沉淀溶解，加入 2.5mol/L 氢氧化钠溶液数滴，如发生沉淀，再加浓氨水溶解之。

(2) 银镜反应检测醛类物物：加 2mL 银氨溶液于试管内，加入几滴乙醇摇匀，加入少许 2.5mol/L 氢氧化钠溶液加热，如乙醇中无醛，则没有银沉淀，否则有银镜反应。

3、乙醇脱醛方法：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，暗处放置两天，不时摇动，促进反应。过滤，滤液倾入蒸馏瓶中蒸馏，弃去初蒸的 50mL。乙醇中含醛较多时，硝酸银用量适当增加。

4、通常标准品 β -胡萝卜素不能全溶解于有机溶剂中，必要时应先将标准品皂化，再用有机溶剂提取，用蒸馏水洗涤至中性后，溶缩定容，再进行标定。

由于胡萝卜素很容易分解，所以每次使用前，所用标准品均需标定，在测定试样时需带标准品同步操作。

5、纸层析法不能区分 α -、 β -和 γ -胡萝卜素，虽然标准品为 β -胡萝卜素，但实际结果为总胡萝卜素。天然食品中大部分为 β -胡萝卜素，故对结果影响不大。

6、本法胡萝卜素的检出限为 0.11 μ g。

七、思考题

1、参考食品化学等资料，了解胡萝卜素的理化性质及在食物中的含量。

2、复习减压蒸馏、萃取与洗涤等单元实验技术与注意事项。

方法二 高效液相色谱法

一、目的要求

学习高效液相色谱测定胡萝卜素的方法，了解样品的提取方法及适用范围。

二、实验原理

样品中的 β -胡萝卜素，用石油醚与丙酮（80+20）混合液提取，经三氧化二铝柱纯化，然后以高效液相色谱法测定，根据保留时间定性，以峰高或峰面积定量计算。

三、仪器与试剂

（一）试剂

- 1、石油醚、沸程 30℃~60℃。
- 2、甲醇：色谱纯。
- 3、乙腈：色谱纯。
- 4、丙醇。
- 5、己烷。
- 6、四氢呋喃。
- 7、三氯甲烷。
- 8、三氧化二铝：层析用，100目~200目，140℃活化 2h，取出放入干燥器备用。
- 9、含碘异辛烷溶液：精确称取碘 1mg，用异辛烷溶解并稀释至 25mL，摇匀备用。
- 10、 α -胡萝卜素标准溶液：精确称取 1mg α -胡萝卜素，加入少量三氯甲烷溶解，然后用石油醚溶解并洗涤烧杯数次溶液转入 25mL 容量瓶中，用石油醚定容，浓度为 40 μ g/mL，于-18℃储存备用。
- 11、 β -胡萝卜素标准溶液：精确称取 β -胡萝卜素 12.5mg 于烧杯中，先用少量三氯甲烷溶解，再用石油醚溶解并洗涤烧杯数次，溶液转入 50mL 容量瓶中，用石油醚定容，浓度为 250 μ g/mL，-18℃储存备用。两个月内稳定。根据所需浓度取一定量的 β -胡萝卜素标准液用流动相稀释成 100 μ g/mL。
- 12、 β -胡萝卜素标准使用液：分别吸取 β -胡萝卜素标准溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 于 10mL 容量瓶中，各加流动相至刻度，摇匀后，即得 β -胡萝卜素标准系列，分别含 β -胡萝卜素 5、10、20、30、40、50 μ g/mL。
- 13、 β -胡萝卜素异构体：精确称取 1.5mg β -胡萝卜素于 10mL 容量瓶中，充入氮气，快速加入含碘异辛烷溶液 10mL，盖上塞子，在距 20W 的荧光灯 30cm 处照射 5min，然后在避光处用真空泵抽去溶剂，用少量三氯甲烷溶解结晶，再用石油醚溶解并定容至刻度，浓度为 150 μ g/mL，-18℃保存。

（二）仪器

- 1、高效液相色谱仪。
- 2、离心机。
- 3、旋转蒸发器。

四、实验步骤

(一) 试样提取

1、淀粉类食品：称取 10.0g 试样于 25mL 具塞量筒中，用石油醚或石油醚+丙酮（80+20）混合液振荡提取，吸取上层黄色醚提取液并转入旋转蒸发器蒸发瓶中，重复用石油醚或醚酮混合液提取样品，直至提取液无色。合并提取液，于旋转蒸发器（水浴温度为 30℃）蒸发至干。

2、液体食品：吸取 10.0mL 试样于 250mL 分液漏斗中，加入石油醚+丙酮(80+20)20mL 提取，然后静置分层，将下层水溶液入另一分液漏斗中再提取，直至提取液无色为止。合并提取液，于旋转蒸发器上蒸发至干（水浴温度为 40℃）。

3、油类食品：称取 10.0g 试样于 25mL 带塞量筒中，加入石油醚+丙酮（80+20）提取。反复提取，直至上层提取液无色。合并提取液，于旋转蒸发器上蒸发至干。

(二) 试样纯化

将试样提取液干燥物用少量石油醚溶解，然后进行氧化铝柱层析。氧化铝柱为 1.5cm(内径)×4cm(高)。先用洗脱液丙酮+石油醚（5+95）洗氧化铝柱，然后再加入溶解试样提取液的溶液，用丙酮+石油醚（5+95）洗脱β胡萝卜素，控制流速为 20 滴/min，收集于 10mL 容量瓶中，用洗脱液定容至刻度。用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤，滤液供 HPLC 分析用。

(三) 样品测定

1、HPLC 参考条件：

色谱柱：SpherisorbC₁₈ 柱，4.6mm×150mm；

流动相：甲醇+乙腈（90+10）；

流速：1.2mL/min；

波长：448nm。

2、试样测定：吸取已纯化的溶液 20 μ L，进行 HPLC 分析，从标准曲线查得或加归方程求得所含β-胡萝卜素的量。

3、标准曲线制备：分别进不同浓度的标准使用液各 20 μ L 进行 HPLC 分析，以面积对β-胡萝卜素浓度作标准曲线。

五、结果计算

$$X = \frac{V \times c}{m} \times 1000 \times \frac{1}{1000 \times 1000}$$

式中 X—试样中β-胡萝卜素的含量（g/kg 或 g/L）；

V—样品经纯化后定容的体积（mL）；

m —试样的量 (g 或 mL);

c —在标准曲线上查得试样测定液中 β -胡萝卜素的浓度 ($\mu\text{L/mL}$)。

计算结果保留两位有效数字。

六、注意事项及说明

- 1、本法检出限为 5.0 mg/kg(L)，线性范围为 0mg/L~100mg/L。
- 2、进样 α -胡萝卜素标准溶液及 β -胡萝卜素异构体标准溶液，可定性定量测定样品中各相应的组分。
- 3、在重复条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不易超过算术平均值的 10%。

七、思考题

- 1、试样提取过程中，用石油醚萃取胡萝卜素的操作要点是什么？
- 2、试样纯化过柱时，为何要控制洗脱液流速？
- 3、进行 HPLC 分析时，样品检测液为何要预选经 0.45 μm 微孔滤膜过滤处理？