

第四章 食品添加剂含量的检测

实验一 苯甲酸、山梨酸含量的检测

I、气相色谱法

一、目的与要求

- 1、了解气相色谱仪的基本原理及分析流程。
- 2、掌握气相色谱分析法操作技术。
- 3、掌握外标法定量的方法。

二、原理

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

三、仪器与试剂

1、仪器

- (1) 气相色谱仪，带有氢火焰离子化检测器；
- (2) 具塞量筒；
- (3) 10mL 具塞刻度试管或 10 mL 容量瓶；
- (4) 常用玻璃仪器；

2、试剂：

- (1) 乙醚：不含过氧化物。
- (2) 石油醚：沸程 30~60℃。
- (3) 盐酸（1+1）；
- (4) 石油醚—乙醚（3+1）混合液；
- (5) 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。
- (6) 无水硫酸钠（分析纯）。
- (7) 苯甲酸、山梨酸标准贮备液：
精密称取苯甲酸、山梨酸各 0.2000g，置于 100mL 容量瓶中，用石油醚—乙醚（3+1）混合溶剂溶解后并定容至刻度，混匀，此溶液每毫升相当于 2mg 苯甲酸或山梨酸。
- (8) 材料：饮料

四、测定步骤

1、样品的提取：

吸取 10.00mL 均匀饮料（如样品中含有二氧化碳，先加热除去），放入 150mL 分液漏斗中，加 1: 1 盐酸 2mL，用 15、10mL 乙醚提取两次，每次振摇 1min，将上层醚提取液吸入另一个 25mL 带塞量筒中，合并乙醚提取液。用 3mL 氯化钠酸性溶液（40g/L）洗涤两次，静止 15min，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 5.0mL 乙醚提取液于 10mL 带塞离心管中，置 40℃ 的水浴上挥干，加入 2mL 石油醚-乙醚(3+1)混合溶剂溶解残渣，密塞保存备用。

2、色谱条件

(1) 色谱柱：玻璃柱，内径 3mm，长 2m，内装涂以质量分数为 5%DEGS+1%H₃PO₄ 固定液的 60~80 目 chromosorbWAW。

(2) 气体流速：载气为氮气，50mL/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) 灵敏度：1000

(4) 温度：进样口（气化温度）230℃；柱温 170℃；监测器 230℃。

3、测定

(1) 取 6 支 10mL 容量瓶，编号，并按下表操作记录。

编号	1	2	3	4	5	6
试剂						
取苯甲酸或山梨酸标准溶液 (mL)	0.25	0.5	0.75	1.00	1.25	
相当于苯甲酸或山梨酸量 (μg)	50	100	150	200	250	
取样品乙醚提取液体积 (mL)						2
用石油醚定容 (mL)	10	10	10	10	10	10
进样量 (μL)	2	2	2	2	2	2
测定峰高值						

(2) 以苯甲酸或山梨酸量 (μg) 为横坐标，与其对应的峰高值为纵坐标，绘制标准曲线。

(3) 用样品测得峰高值与标准曲线比较定量。

五、结果计算

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times \frac{5}{25} \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中：

X——样品中苯甲酸或山梨酸的含量，g/kg；

A——测定用样品液中苯甲酸或山梨酸的含量，μg；

V₁——样品提取液残留物定容的体积，mL；

V₂——进样体积，μL；

m——样品质量，g 或 mL；

5/25---测定时吸取乙醚提取液的体积(mL)/样品乙醚提取液的总体积(mL)。

六、注意事项

1、由测得的苯甲酸的量乘以 1.18，即为样品中苯甲酸钠的含量。

2、样品处理时酸化可使山梨酸钾、苯甲酸钠转变为山梨酸、苯甲酸。

3、乙醚提取液应用无水硫酸钠充分脱水，进样溶液中含水会影响测定结果。

4、气相色谱仪的操作按仪器操作说明进行。

注意：点火前严禁打开氮气调节阀，以避免氢气逸出引起爆炸；点火后，不允许再转动放大调零旋钮。

II、薄层色谱法

一、目的与要求

- 1、学习薄层色谱法分离食品中苯甲酸、山梨酸的基本原理。
- 2、掌握薄层色谱法的基本操作技术。

二、实验原理

试样酸化后，用乙醚提取苯甲酸、山梨酸。将试样提取液浓缩，点于聚酰胺薄层板上，展开。显色后，根据薄层板上苯甲酸、山梨酸的比移值。与标准比较定性，并可进行半定量。

三、仪器与试剂

1、仪器

- (1) 吹风机；
- (2) 层析缸；
- (3) 玻璃板：10cm×18cm；
- (4) 微量注射器：10 μ L、100 μ L；
- (5) 喷雾器。

2、试剂

- (1) 异丙醇。
- (2) 正丁醇。
- (3) 石油醚：沸程 30~60 $^{\circ}$ C。
- (4) 乙醚：不含过氧化物。
- (5) 氨水。
- (6) 无水乙醇。
- (7) 聚酰胺粉：200 目。
- (8) 盐酸 (1+1)：取 100mL 盐酸，缓慢倾入水中，并稀释至 200mL。
- (9) 氯化钠酸性溶液 (40g/L)：于氯化钠溶液 (40g/L) 中加入少量盐酸 (1+1) 酸化。
- (10) 展开剂如下：
 - ①正丁醇+氨水+无水乙醇 (7+1+2)
 - ②异丙醇+氨水+无水乙醇 (7+1+2)
- (11) 山梨酸标准溶液：准确称取 0.2000g 山梨酸，用少量乙醇溶解后移入 100mL 容量瓶中，并稀释至刻度，此溶液每毫升相当于 2.0mg 山梨酸。
- (12) 苯甲酸标准溶液：准确称取 0.2000g 苯甲酸，用少量乙醇溶解后移入 100mL 容量瓶中，并稀释至刻度，此溶液每毫升相当于 2.0mg 苯甲酸。
- (13) 显色剂：称取溴甲酚紫 0.04g 以(50%)乙醇溶解并稀释至 100mL,用氢氧化钠溶液 (4g/L) 调至 pH=8。

四、测定步骤

1、样品提取：同色谱法“四、1”

2、样品测定

(1)薄层板的制备：称取 1.6g 聚酰胺粉，加 0.4g 可溶性淀粉，加约 15mL 水，研磨 3min~5min，立刻倒入涂布器内制成 10cm×18cm、厚度 0.3mm 的薄层板两块，室温干燥后，于

80℃干燥 1h，取出，置于干燥器中保存。

(2)点样：在薄层板下端 2cm 的基线上，用微量注射器点 10 μ L, 20 μ L 试样液，同时各点 10 μ L、20 μ L 山梨酸、苯甲酸标准溶液。

(3)展开与显色：将点样后的薄层板放入预先盛有展开剂（10.①或 10.②）的展开槽内，周围贴有滤纸，待溶剂前沿上展至 10cm，取出挥干，喷显色剂，斑点成黄色，背景为蓝色。试样中所含山梨酸、苯甲酸的量与标准斑点比较定量（山梨酸、苯甲酸的比移值依次为 0.82、0.73）。

五、结果计算

试样中苯甲酸或山梨酸的含量按下式进行计算。

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times \frac{10}{25} \times \frac{V_2}{V_1} \times 1000}$$

式中：

X——试样中苯甲酸或山梨酸的含量，单位为克每千克（g/kg）；

A——测定用试样液中苯甲酸或山梨酸的质量，单位为毫克（mg）；

V₁——加入乙醇的体积，单位为毫升（mL）；

V₂——测定时点样的体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

10——测定时吸取乙醚提取液的体积，单位为毫升（mL）；

25——试样乙醚提取液总体积，单位为毫升（mL）；

六、注意事项

- 1、层析用的溶剂系统不可存放太久，否则浓度和极性都会变化，影响分离效果，应新鲜配制。
- 2、在展开之前，展开剂在缸中应预先平衡 1h，使缸内蒸气压饱和，以免出现边缘效应。
- 3、展开剂液层高度不能超过原线高度，约在 0.5~1cm，展开至上端，待溶剂前沿上展至 10cm 时，取出挥干。
- 4、在点样时最好用吹风机边点边吹干，在原线上点，直至点完一定量。且点样点直径不超过 2mm。

思考题：

1. 样品处理时，酸化的目的是什么？
2. 气相色谱法定性的依据是什么？用已知物对照法定性时应注意什么？
3. 气相色谱法测定中用外标法定量有何优缺点？
4. 你对薄层色谱法测定食品中苯甲酸、山梨酸的实验有什么体会？
5. 比较两种方法各有什么优缺点？

实验二 糖精含量的检测(薄层色谱法)

一、目的与要求

1. 学习薄层色谱法测定食品中糖精含量的基本原理。
2. 掌握薄层色谱法的基本操作技术。

二、原理

在酸性条件下，食品中的糖精钠用乙醚提取，浓缩、薄层色谱分离、显色后，与标准比较，进行定性和半定量测定。

三、仪器与试剂

1. 试剂

- (1) 盐酸溶液 (1:1);
- (2) 乙醚 (不含过氧化物);
- (3) 无水硫酸钠: 经 550℃ 灼烧 4h 处理;
- (4) 无水乙醇;
- (5) 展开剂: 苯: 乙酸乙酯: 醋酸=12: 7: 1;
- (6) 糖精钠标准溶液: 称取糖精钠 0.1000g, 用无水乙醇溶解并定容至 100mL。此液含标准糖精钠为 1mg/mL。
- (7) 硅胶 GF254;
- (8) 羧甲基纤维素钠溶液 (0.5%)。

2. 仪器

- (1) 玻璃板 10×10cm;
- (2) 薄层层析装置; (见图 4-1)
- (3) 微量吸管及吹风筒;
- (4) 紫外检测仪: 波长 254nm。

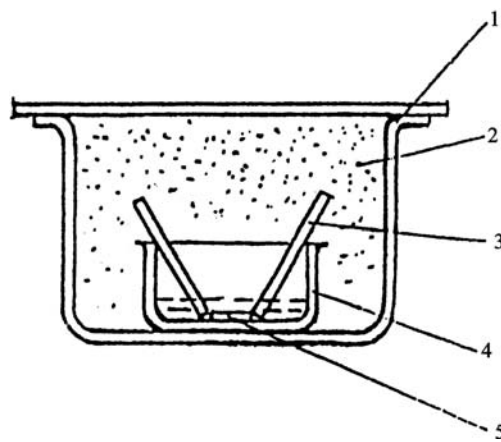


图 4-1 薄层层析装置

1—层析缸; 2—展开剂蒸气; 3—薄层板;
4—盛液皿 (盛展开剂); 5—隔板

四、测定步骤

1. 样品的提取

- (1) 饮料、冰棍、汽水:

取 10.0mL 均匀试样 (如试样中含有二氧化碳, 先加热除去。如试样中含有酒精, 加 4% 氢氧化钠溶液使其呈碱性, 在沸水浴中加热除去), 置于 100mL 分液漏斗中, 加 2mL 盐酸 (1+1), 用 30、20、20mL 乙醚提取三次, 合并乙醚提取液, 用 5mL 盐酸酸化的水洗涤一次, 弃去水层。乙醚层通过无水硫酸钠脱水后, 挥发乙醚, 加 2.0mL 乙醇溶解残留物, 密塞保存, 备用。

- (2) 酱油、果汁、果酱等:

称取 20.0g 或吸取 20.0mL 均匀试样, 置于 100mL 容量瓶中, 加水至约 60mL, 加 20mL

硫酸铜溶液 (100g/L), 混匀, 再加 4.4mL 氢氧化钠溶液 (40g/L), 加水至刻度, 混匀, 静置 30min, 过滤, 取 50mL 滤液置于 150mL 分液漏斗中, 以下按上述样品处理中 (1) 自“加 2mL 盐酸 (1+1) ……”起依法操作。

(3) 固体果汁粉等:

称取 20.0g 磨碎的均匀试样, 置于 200mL 容量瓶中, 加 100mL 水, 加温使溶解, 放冷, 以下按上述样品处理中 (2) 自“加 20mL 硫酸铜溶液 (100g/L) ……”起依法操作。

(4) 糕点、饼干等蛋白、脂肪、淀粉多的食品:

称取 25.0g 均匀试样, 置于透析用玻璃纸中, 放入大小适当的烧杯内, 加 50mL 氢氧化钠溶液 (0.8g/L)。调成糊状, 将玻璃纸口扎紧, 放入盛有 200mL 氢氧化钠溶液 (0.8g/L) 的烧杯中, 盖上表面皿, 透析过液。

量取 125mL 透析液 (相当 12.5g 试样), 加约 0.4mL 盐酸 (1+1) 使成中性, 加 20mL 硫酸铜溶液 (100g/L), 混匀, 再加 4.4mL 氢氧化钠溶液 (40g/L), 混匀, 静置 30min, 过滤。取 120mL (相当 10g 试样), 置于 250mL 分液漏斗中, 以下按 (1) 中自“加 2mL 盐酸 (1+1) ……”起依法操作。

2. 薄层板的制备

(1) 制板前的预处理

制板前应对玻璃板进行预处理, 先用水或洗涤剂充分洗净烘干, 在涂料前用无水乙醇或乙醚的脱脂棉擦净。

(2) 吸附剂的调制

称 1.4g 硅胶 GF254 于小研钵中, 加入 4.5mL, 0.5%CMC-Na 溶液, 充分研匀, 但不宜过于剧烈, 以免产生气泡, 使固化后薄板上引起泡点。

(3) 涂布操作

将研匀的浆液倾注于 10×10cm 玻璃板中间, 然后把玻璃板前后左右缓缓倾斜, 使浆液均匀布满整板玻璃板, 将其置于水平的位置上让其自然干燥后收入薄板架上。

(4) 薄层板的活化和保存

将自然干燥后的薄板放入干燥箱中, 在 100℃活化 1h, 然后放于干燥器中保存, 供一周内使用。

3. 点样

点样前对薄层板进行修整, 然后在薄板下端 2cm 处 (用铅笔轻轻画一直线为原线), 用微量注射器分别点 10 μ L 和 20 μ L 的样液两个点, 同时点 3.0、5.0、7.0、10 μ 糖精钠标准溶, (相当于精钠 3、5、7、10 μ g) 各点间距 1.5cm。

4. 展开与显色

将点好的薄层板放入盛有展开剂的展开槽中, 展开剂液层高度不能超过原线高度, (一般约 0.5~1cm), 展开至上端约 8cm, 取出薄层板, 挥干展开剂, 在紫外光灯下观察, 确定斑点的位置及大小。

5. 检出

(1) 定性 薄层板经斑点显色后, 根据试样点与标准点的比移值 R_f 定性, (见图 4-2) 比移值计算如下:

$$\text{比移值} R_f = \frac{\text{原点至斑点中心的距离}}{\text{原点至溶剂前沿的距离}} = \frac{a}{b}$$

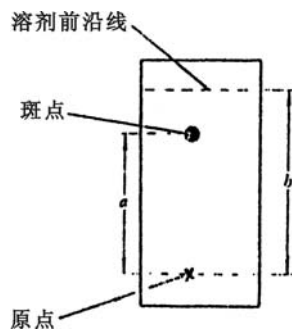


图 4-2 比移值测量示意图

(2) 定量

① 直接半定量法

在薄层板上测量斑点面积或颜色深浅比较作半定量，本实验条件下，可直接根据试样与标准的斑点面积大小及颜色深浅比较，记录其点样体积，进行半定量。

② 洗脱定量法

将吸附剂上的斑点刮入小烧杯中，加入适量的碳酸氢钠浸出后，经离心分离，取清液用比色法、分光光度法等与标准比较定量。

五、结果计算

试样中糖精钠含量计算

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

式中：X——试样中糖精钠的含量，单位为克每千克或克每升（g/kg 或 g/L）；

A——测定用样液中糖精钠的质量，单位为毫克（mg）；

m——试样质量或体积，单位为克或毫升（g 或 mL）；

V_1 ——试样提取液残留物加入乙醇的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——点样液体积，单位为毫升（mL）。

计算结果保留三位有效数字。

六、注意事项

同苯甲酸、山梨酸含量的检测中薄层色谱法“六”

思考题

1. 样品处理时，酸化的目的是什么？
2. 薄层板制备前如何进行预处理？为什么？
3. 点样前为什么要对薄层板进行修整？
4. 展开时用展开剂液层高度为什么不能超过原线高度？
5. 你对薄层色谱法测定糖精的实验有什么体会？

实验三 亚硝酸盐、硝酸盐含量的检测

I、亚硝酸盐含量的检测（盐酸萘乙二胺法）

一、目的与要求

1. 学习肉制品中食品添加剂——亚硝酸盐的检测方法。
2. 掌握盐酸萘乙二胺法的基本操作技术。

二、原理

样品经沉淀蛋白质、除去脂肪后，在弱酸性条件下，亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后，再与盐酸萘乙二胺偶合生成紫红色化合物，颜色的深浅与亚硝酸盐含量成正比，其最大吸收波长为 538nm，可测定吸光度并与标准比较定量。

三、仪器与试剂

1. 仪器

- (1) 721 型分光光度计；（见图 4-3）
- (2) 比色管、各种移液管及常用玻璃仪器；
- (3) 小型绞肉机。

2. 试剂

- (1) 饱和硼砂溶液：溶解 5g 硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)，于 100mL 热水中，冷却后备用。
- (2) 硫酸锌溶液：溶解 30g 硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 于 100mL 水中。
- (3) 对氨基苯磺酸溶液(0.4%)：溶解 0.4g 对氨基苯磺酸于 100mL 20% 盐酸中，避光保存。
- (4) 盐酸萘乙二胺溶液(0.2%)：溶解 0.2g 盐酸萘乙二胺于 100mL 水中，避光保存。
- (5) 亚硝酸钠标准溶液：精确称取 0.1000g 亚硝酸钠（硅胶干燥中干燥 24 小时），加水溶解，移入 500mL 容量瓶，并稀释至刻度，混匀，临用前吸取 5.00mL 于 200mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀，此溶液每毫升相当 $5 \mu\text{g}$ 亚硝酸钠。
- (6) 材料：午餐肉或腊肠。

四、测定步骤

1. 样品中亚硝酸钠的提取

- (1) 称取 2.50g 经绞碎混匀的样品，于 50mL 烧杯中，加硼砂饱和溶液 6.3mL，搅拌均匀。
- (2) 以 70℃ 左右的热水约 150mL 将样品全部洗入 250mL 容量瓶中，置沸水浴加热 15min。
- (3) 取出冷却至室温，一面转动，一面滴加 1.3mL 硫酸锌溶液以沉淀蛋白质，加水至刻度，混匀，放置 30min。

(4) 除去上层脂肪，用滤纸过滤，弃去最初 20mL，滤液备用。

2. 样品测定

(1) 取 6 支 25mL 比色管，编号，按下表顺序加入各试剂及操作。

管号	0	1	2	3	4	5
NaNO ₂ 标准溶液/mL (5 μg/mL)	0	0.20	0.40	0.60	0.80	
相当于亚硝酸钠量 /μg	0	1	2	3	4	
样品提取滤液/mL						20.00
0.4% 对氨基苯磺酸溶液 /mL	1.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	混匀 3~5min					
0.2% 盐酸萘乙二胺溶液 /mL	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
吸光度						

(2) 加水至 25.00mL，混匀，静置 15min，用 2cm 比色皿，以零号管调节零点，于波长 538nm 处测吸光度，记录。

(3) 绘制标准曲线

以亚硝酸钠量 (μg) 为横坐标，与其对应的吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

(4) 用样品提取滤液的吸光度，在以上亚硝酸钠标准曲线上查出亚硝酸钠的量 (μg)。

五、结果计算

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times \frac{20}{250} \times 1000}$$

式中：X——样品中亚硝酸盐的含量，mg/kg；

A——测定用滤液中亚硝酸钠的含量，μg；

m——样品的质量，g

20/250——测定用样液体积 mL/试样处理液总体积 mL。

六、注意事项：

1. 本法适用肉制品中硝酸盐的测定。其方法是把沉淀蛋白质、除脂肪的溶液通过镉柱，使其中的硝酸根离子还原成亚硝酸根离子，按此法测得总量 B 减去试样中亚硝酸盐含量 C，即得试样中硝酸盐（以硝酸钠计）含量 (g/kg) = (B-C) × 1.232

1.232——亚硝酸钠换算到硝酸钠的系数

2. 样品提取时,也可用亚铁氰化钾溶液 2.5mL 和乙酸锌溶液 2.5mL 代替 1.3mL 硫酸锌溶液,以沉淀蛋白质,配法:

(1) 亚铁氰化钾溶液:称取 106g 亚铁氰化钾 $[K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$,溶于水交稀释至 1000mL。

(2) 乙酸锌溶液:称取 220g 乙酸锌 $[Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O]$,加 30mL 冰乙酸溶于水,并稀释至 1000mL。

3. 本法与国标方法大同小异,只是用实验室现有的 25mL 比色管,所有试剂相应减少。

4. 当亚硝酸盐含量高时,过量的亚硝酸盐可以将偶氮化合物氧化变成黄色,而使红色消失,这时可以采取先加入试剂,然后滴加样液,从而避免亚硝酸盐过量。

附:721 型分光光度计操作步骤

1. 在仪器尚未接通电源时,电表的指针必须位于“0”刻线上,若不是这种情况,则可以用电表上的校止螺丝进行调节。

2. 将仪器的电源开关接通,打开比色皿暗箱盖,选择需用的单色波长,调节“0”位旋钮,使电表指“0”,然后将比色皿暗箱盖合上使比色皿座中的蒸馏水进入光程中,旋转 100%(满度)旋钮使屯表指针指到满度刻度附近,并让仪器预热约 20 分钟。

3. 灵敏度有五挡,是逐步增加的,“1”,挡最低。其选择原则是:保证使空白档良好调到“100”的情况下,尽可能采用灵敏度较低档,这样对测量的稳定性和延长仪器使用寿命都有好处。在灵敏度不够时再逐步升高,但改变灵敏度后必须重新校止“0”和“100%”。

4. 预热后,一般按“2”档连续几次调整“0”和“100%”,即可将比色皿座的样品溶液推入光程,读取电表上的指示数。

5. 仪器测定完毕后,应关闭电源开关。

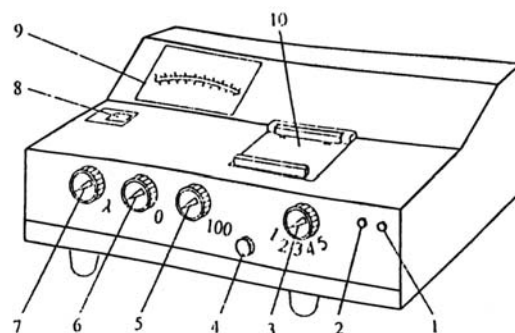


图 4-3 721 分光光度计结构

- 1—指示灯; 2—电源开关; 3—灵敏度选择旋钮;
- 4—比色皿座定位杆; 5—透光率 100 电位旋钮;
- 6—透光率 0 电位器旋钮; 7—波长调节旋钮; 8—波长示窗;

II、硝酸盐含量的检测 (镉柱法)

一、原理

试样经沉淀蛋白质、除去脂肪后,溶液通过镉柱,使其中的硝酸根离子还原成亚硝酸根离子,在弱酸性条件下,亚硝酸根与对氨基苯磺酸重氮化后,再与盐酸萘乙二胺偶

合形成紫红色染料，既得亚硝酸盐总量，由总量减去亚硝酸盐含量即得硝酸盐含量。

二、仪器与试剂

1. 仪器

(1) 镉柱

① 海绵状镉的制备：投入足够的锌皮或锌棒于 500mL 硫酸镉溶液(200g/L)中，经 3h~4h，当其中的镉全部被锌置换后，用玻璃棒轻轻刮下，取出残余锌棒，使镉沉底，倾去上层清液，以水用倾泻法多次洗涤，然后移入组织捣碎机中，加 500mL 水，捣碎约 2s，用水将金属细粒洗至标准筛上，取 20 目~40 目之间的部分。

② 镉柱的装填：如图 1。用水装满镉柱玻璃管，并装入 2cm 高的玻璃棉做垫，将玻璃棉压向柱底时，应将其中所包含的空气全部排出，在轻轻敲击下加入海绵状镉 8cm~10cm 高，上面用 1cm 高的玻璃棉覆盖，上置一贮液漏斗，末端要穿过橡皮塞与镉柱玻璃管紧密连接。(如无上述镉柱玻璃管时，可以 25mL 酸式滴定管代用)。当镉柱填装好后，先用 25mL 盐酸(0.1mol/L)洗涤，再以水洗两次，每次 25mL。镉柱不用时用水封盖，随时都要保持水平面在镉层之上，不得使镉层夹有气泡。

③ 镉柱每次使用完毕后，应先以 25mL 盐酸(0.1mol/L)洗涤，再以水洗两次，两次 25mL，最后用水覆盖镉柱。

④ 镉柱还原效率的测定：吸取 20mL 硝酸钠标准使用液于 50mL 烧杯中，以下按样品测定步骤中 2. (2) 自“加入 5mL 氨缓冲溶液----- (4)”起依法进行操作。根据标准曲线计算测得结果，与加入量一致，还原效率应大于 98%为符合要求。

⑤ 结果计算：还原效率按式下式进行计算。

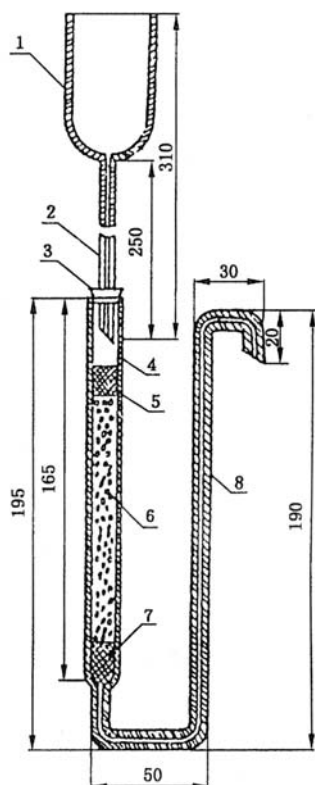
$$X = \frac{A}{10} \times 100\%$$

式中：

X——还原效率；

A——测得亚硝酸钠的质量，单位为微克(μg)；

10——测定用溶液相当亚硝酸钠的质量，单位为微克(μg)。



1——贮液漏斗，内径 35mm，外径 37 mm；

2——进液毛细管，内径 0.4 mm，外径 6 mm；

3——橡皮塞；

4——镉柱玻璃管，内径 12 mm，外径 16 mm；

5、7——玻璃棉；

6——海绵状镉；

8——出液毛细管，内径 2 mm，外径 8 mm。

图 4-4

2. 试剂

(1) 氨缓冲溶液 (pH9.6~9.7): 量取 20mL 盐酸注入 50mL 水中, 混匀后加 50mL 氨水, 再加水稀释至 1000mL, 混匀。

(2) 稀氨缓冲液: 量取 50mL 氨缓冲溶液, 加水稀释至 500mL, 混匀。

(3) 盐酸溶液 (0.1mol/L): 吸取 5mL 盐酸, 注入水中并稀释至 600mL。

(4) 硝酸钠标准溶液: 准确称取 0.1232g 于 110℃~120℃干燥恒重的硝酸钠, 加水溶解, 移于 500mL 容量瓶中, 并稀释至刻度。此溶液每毫升相当于 200 μg 硝酸钠。

(5) 硝酸钠标准使用液: 临用时吸取硝酸钠标准溶液 2.50mL, 置于 100mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度。此溶液每毫升相当于 5 μg 亚硝酸钠。

(6) 亚硝酸钠标准溶液: 同亚硝酸钠含量的检测中二、2.(5)亚硝酸钠标准溶液。

(7) 亚铁氰化钾溶液: 称取 106.0g 亚铁氰化钾 $[K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$, 用水溶解, 并稀释至 1000mL。

(8) 乙酸锌溶液: 称取 220.0g 乙酸锌 $[Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O]$, 加 30mL 冰乙酸溶于水, 并稀释至 1000mL。

(9) 饱和硼砂溶液: 同 I .二、2.(1)

(10) 对氨基苯磺酸溶液 (4g/L): 同 I .二、2.(3)

(11) 盐酸萘乙二胺溶液 (2g/L): 同 I .二、2.(4)

三、分析步骤

1. 试样处理

称取 5.0g 经绞碎混匀的试样, 置于 50mL 烧杯中, 加 12.5mL 硼砂饱和液, 搅拌均匀, 以 70℃左右的水约 300mL 将试样洗入 500mL 容量瓶中, 于沸水浴中加热 15min, 取出后冷却至室温, 然后一面转动, 一面加入 5mL 亚铁氰化钾溶液, 摇匀, 再加入 5mL 乙酸锌溶液, 以沉淀蛋白质。加水至刻度, 摇匀, 放置 0.5h, 除去上层脂肪, 清液用滤纸过滤, 弃去初滤液 30mL, 滤液备用。

2. 样品测定

(1) 先以 25mL 稀氨缓冲液冲洗镉柱, 流速控制在 3mL/5mL/min (以滴定管代替的可控制在 2mL/min~3mL/min)。

(2) 吸取 20mL 处理过的样液于 50mL 烧杯中, 加 5mL 氨缓冲溶液, 混合后注入贮液漏斗, 使流经镉柱还原, 以原烧杯收集流出液, 当贮液漏斗中的样液流完后, 再加 5mL 水置换柱内留存的样液。

(3) 将全部收集液如前再经镉柱还原一次, 第二次流出液收集于 100mL 容量瓶中, 继以水流经镉柱洗涤三次, 每次 20mL, 洗液一并收集于同一容量瓶中, 加水至刻度, 混匀。

(4) 亚硝酸钠总量的测定: 吸取 10mL~20mL 还原后的样液于 50mL 带塞比色管中, 另吸取 0.00、0.20、0.40、0.80、1.00、1.50、2.00、2.50mL 亚硝酸钠标准使用液 (相当于 0、1、2、4、5、7.5、10、12.5 μg 亚硝酸钠), 分别置于 50mL 带塞比色管中, 于标准管与试样管中分别加入 2mL 对氨基苯磺酸溶液 (4g/L), 混匀, 静置 3~5min 后各入 1mL 盐酸萘

乙二胺溶液 (2g/L)，加水至刻度，混匀，静置 15min，用 2cm 比色杯，以零管调节零点，于波长 538nm 处测吸光度，绘制标准曲线比较，同时做试剂空白。

(5) 亚硝酸钠的测定：吸取 40mL 经试带处理的样液于 50mL 带塞比色管中，以下按 (4) 自“另吸取 0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00……”起依法操作。

四、结果计算

试样中硝酸盐的含量按下式进行计算。

$$X = \left(\frac{A_1 \times 1000}{m \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{V_4}{V_3} \times 1000} - \frac{A_2 \times 1000}{m \times \frac{V_6}{V_5} \times 1000} \right) \times 1.232$$

式中：

X——试样中硝酸钠的含量，单位为毫克每千克 (mg/kg)；

m——试样的质量，单位为克 (g)；

A₁——经镉粉还原后测得亚硝酸钠的质量，单位为微克 (μg)；

A₂——直接测得亚硝酸钠的质量，单位为微克 (μg)；

1.232——亚硝酸钠换算成硝酸钠的系数；

V₁——测总亚硝酸钠的试样处理液总体积，单位为毫升 (mL)；

V₂——测总亚硝酸钠的测定用样液体积，单位为毫升 (mL)；

V₃——经镉柱还原后样液的测定用样液体积，单位为毫升 (mL)；

V₄——经镉柱还原后样液的测定用样液体积，单位为毫升 (mL)；

V₅——直接测亚硝酸钠的试样处理液总体积，单位为毫升 (mL)；

V₆——直接测亚硝酸钠的试样处理液的测定用样液体积，单位为毫升 (mL)；

计算结果保留两位有效数字。

五、精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

六、注意事项

1. 本方法为国家标准方法 (GB/T5009.33—2003)，适用于食品中硝酸盐的测定，最低检出限为 1.4mg/1cg；

2. 在制取消绵状镉和装填镉柱时最好在水中进行，勿使金属粒暴露于空气中的免氧化。镉柱每次使用完毕后，应先以 25mL 0.1mol/L HCL 洗涤，再以水洗 2 次，每次 25mL，最后用水覆盖镉柱；

3. 为保证硝酸盐测定结果准确，镉柱还原效率应当经常检查。镉柱维护得当，使用一年效能尚无显著变化；

4. 镉是有害的元素之一，在制作消绵状镉或处理镉柱时，其废弃液中含有大量的镉，不能将这些有害的镉放入下水道污染源和农田，要经过处理之后再放入下水道。另外不要

用手直接接触镉，同时不要弄到皮肤上，一旦接触，应立即用水冲洗；

5. 其他说明同亚硝酸钠含量的检测。

思考题：

1. 若从标准曲线上查不到滤液所相当的亚硝酸钠量（即大于 $4\mu\text{g}$ ）是，如何改进本实验？
2. 采用回归方程计算与从校正曲线直接求得亚硝酸钠的含量，各有什么优缺点？
3. 为什么要用试剂空白作参比溶液？
4. 简述硝酸盐和亚硝酸盐的护色机理是什么？
5. 镉柱法测定硝酸盐时，如何防止镉柱被氧化？

实验四 食品中合成着色素的测定

方法一 高效液相色谱法

一、目的要求

学习高效液相色谱法分离测定食品中合成着色素的实验原理，熟悉各类测试样品的提取操作方法以及高效液相色谱的分离技术。

二、实验原理

食品中人工合成着色素经聚酰胺吸附法或液-液分配提取，制备成水溶液，注入高效液相色谱仪，经反相色谱分离，根据保留时间定性和峰面积比较进行定量。

三、仪器与试剂

（一）试剂

- 1、正己烷。
- 2、盐酸。
- 3、乙酸。
- 4、甲醇：经 $0.5\mu\text{m}$ 滤膜过滤。
- 5、聚酰胺粉（尼龙6）；过 200 目筛。
- 6、 0.02 mol/L 乙酸铵溶液：称取 1.54 g 乙酸铵，加水溶解至 1000 mL ，经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤。
- 7、氨水：量取氨水 2 mL ，加水至 100 mL 混匀。
- 8、 0.02 mol/L 氨水-乙酸铵溶液：量取氨水 0.5 mL ，加 0.02 mol/L 乙酸铵溶液至 1000 mL 。
- 9、甲醇-甲酸（6+4）溶液：量取甲醇 60 mL ，甲酸 40 mL ，混匀。

10、柠檬酸溶液：称取 20g 柠檬酸，加水至 100 mL，溶解混匀。

11、无水乙醇-氨水-水（7+2+1）溶液：量取无水乙醇 70 mL，氨水 20 mL，水 10mL，混匀。

12、5% 三正辛胺正丁醇溶液：量取三正辛胺 5 mL，加正丁醇至 100 mL，混匀。

13、饱和硫酸钠溶液。

14、0.2%硫酸钠溶液。

15、pH6 的水：水加柠檬酸溶液调 PH 值到 6。

16、合成着色剂标准溶液：准确称取按其纯度折算为 100%质量的柠檬黄、日落黄、苋菜红、胭脂红、新红、赤藓红、亮蓝、靛蓝各 0.100 g，置 100 mL 容量瓶中，加 pH 6 水到刻度，配成浓度为 1.00 mg/mL 的着色剂水溶液。

17、合成着色剂标准使用液：临用时将上述溶液加水稀释 20 倍，经 0.45 μm 滤膜过滤，配成每毫升相当于 50.0 μg 的合成着色剂。

（二）仪器：

高效液相色谱仪，带紫外检测器，254nm 波长。

四、实验步骤

（一）样品处理

1、桔子汁、果味水、果子露汽水等：称取 20.0g~40.0g, 放入 100mL 烧杯中, 含二氧化碳试样加热驱除二氧化碳。

2、配制酒类：称取 20.0g~40.0g, 放入 100mL 烧杯中，加小碎瓷片数片，加热驱除乙醇。

3、硬糖、蜜饯类、淀粉软糖等：称取 5.00g~10.00g 粉碎试样，放入 100mL 小烧杯中，加水 30mL，温热溶解，若试样溶液 PH 值较高，用柠檬酸溶液调 pH 值到 6 左右。

4、巧克力豆及着色糖衣制品：称取 5.00g~10.00g 放入 100mL 小烧杯中，用水反复洗涤色素，到试样无色素为止，合并色素漂洗液为试样溶液。

（二）色素提取

1、聚酰胺吸附法：试样溶液加柠檬酸溶液 pH 值到 6，加热至 60℃，将 1g 聚酰胺粉加少许水调成粥状，倒入试样溶液中，搅拌片刻，以 G3 垂融漏斗抽滤，用 60℃pH=4 的水洗涤 3~5 次，然后用甲醇-甲酸混合溶液洗涤 3 次~5 次（含赤藓红的试样用 2 法处理），再用水洗至中性，用乙醇-氨水-水混合溶液解吸 3 次~5 次，每次 5 mL，收集解吸液，加乙酸中和，蒸发至近干，加水溶解，定容至 5 mL。约 0.45 μm 滤膜过滤，取 10 μL 进高效液

相色谱仪分析。

2、液-液分配法（适用于含赤藓红的试样）“将制备好的试样溶液放入分液漏斗中，加 2 mL 盐酸、5% 三正辛胺正丁醇溶液 10mL~20mL，振摇提取分取有机相，重复提取至有机相无色，合并有机相，用饱和硫酸钠溶液洗 2 次，每次 10mL，分取有机相，放蒸发皿中，水浴加热浓缩至 10mL，转移至分液漏斗中，加 60 mL 正己烷，混匀，加氨水提取 2 次~3 次，每次 5 mL，合并氨水溶液层（含水溶性酸性色素），用正己烷洗 2 次，氨水层加乙酸调成中性，水浴加热蒸发至近干，加水定容至 5mL。经滤膜 0.45 μ m 过滤，取 10 μ L 进高效液相色谱仪。

（三）样品测定

1、高效液相色谱检测样品参考条件：

（1）柱：YWG-C₁₈，10 μ m 不锈钢柱，4.6×250mm

（2）流动相：甲醇：乙酸铵溶液（PH=4.0, 0.02 mol/L）。

（3）梯度洗脱：甲醇：20%~35%，3%/min；35%~98%，9%/min；98% 继续 6 min。

（4）流速：1mL/min。

（5）检测波长：254nm。

2、测定

取相同体积样液和合成着色剂标准使用液分别注入高效液相色谱仪，根据保留时间定性，外标峰面积法定量。

五、结果计算

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times V_2 / V_1 \times 1000 \times 1000}$$

式中 X——试样中着色剂的含量（g/kg）；

A——样液中着色剂的质量（μ g）；

V₂——进样体积（mL）；

V₁——试样稀释总体积（mL）；

m——试样质量（g）。

计算结果保留两位有效数字。

六、实验说明及注意事项

1、本实验法的检出限：新红 5ng、柠檬黄 4ng、苋菜红 6ng、胭脂红 8ng、日落黄 7ng、赤藓红 18ng、亮蓝 26ng、当进样量相当 0.025g 时，检出浓度分别为 0.2mg/kg；16mg/kg；

0.24mg/kg; 0.32mg/kg; 0.28mg/kg; 0.72mg/kg; 1.04mg/kg。

2、检测精密度：在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

3、八种着色剂色谱分离图如图4- 所示。

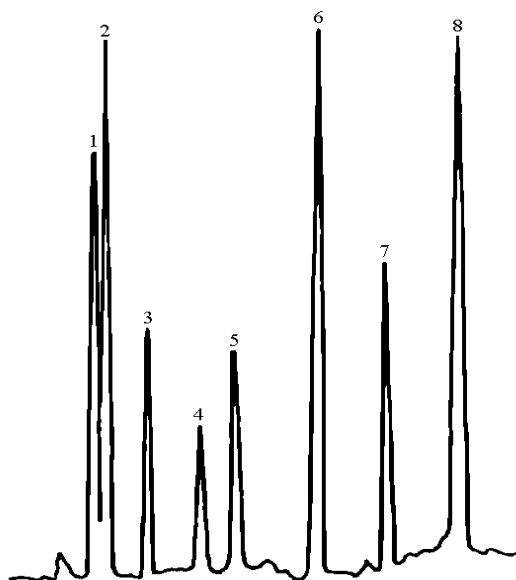


图4- 八种食用着色剂色谱分离图

1—新红； 2—柠檬黄； 3—苋菜红； 4—靛蓝； 5—胭脂红；
6—日落红； 7—亮蓝； 8—赤藓红。

4、样品测定时，测定一个样品后，将流动相中甲醇浓度恢复至20%，平衡系统20min后，再开始测定第二个样品。

七、思考题

- 1、用聚酰胺粉吸附提取色素时，用柠檬酸调整样液的pH值到6的目的是什么？
- 2、如何解吸被聚酰胺粉吸附的色素？

方法二 薄层层析法

一、目的要求

了解薄层层析法分离鉴定，定量测定合成色素的实验原理，掌握薄层层析分离

检测技术。

二、实验原理

样品经处理后，水溶性酸性合成着色剂在酸性条件下被聚酰胺吸附，然后在碱性条件下解吸附，再用纸色谱法或薄层色谱法进行分离，与标准样品比较定性、定量。

三、仪器与试剂

(一) 试剂

1、石油醚：沸程 60℃~90℃。

2、甲醇。

3、聚酰胺粉（尼龙 6）：200 目。

4、硅胶 G。

5、硫酸：(1+10)。

6、甲醇-甲酸溶液：(6+4)。

7、氢氧化钠溶液（50g/L）。

8、海砂：先用盐酸（1+10）煮沸 15 min，用水洗至中性，再用氢氧化钠溶液（50g/L）煮沸 15min，用水洗至中性，再于 105℃干燥，贮于具玻璃塞的瓶中，备用。

9、50%乙醇。

10、乙醇-氨溶液：取 1mL 氨水，加 70%乙醇至 100 mL。

11、pH6 的水：用 20%柠檬酸溶液调节至 pH=6。

12、盐酸（1+10）。

13、柠檬酸溶液（200g/L）。

14、钨酸钠溶液（100g/L）。

15、碎瓷片：处理方法与处理海砂方法相同。

16、展开剂

(1) 正丁醇-无水乙醇-1%氨水（6+2+3）：供纸色谱用。

(2) 正丁醇-吡啶-1%氨水（6+3+4）：供纸色谱用。

(3) 甲乙酮-丙酮-水（7+3+3）：供纸色谱用。

(4) 甲醇-乙二胺-氨水（10+3+2）：供薄层色谱用。

(5) 甲醇-氨水-乙醇（5+1+10）：供薄层色谱用。

(6) 柠檬酸钠溶液（25g/L）-氨水-乙醇（8+1+2）：供薄层色谱用。

17、合成着色剂标准溶液：准确称取按其纯度折算为 100%质量的各种着色剂，分别置于

100 mL 容量瓶中，加 pH6 的水到刻度，配成 1.0mg/mL 浓度的标准溶液。

18、着色剂标准使用液：临用时吸取色素标准溶液各 5.0mL，分别置于 50mL 容量瓶中，加 pH6 的水稀释至刻度。此溶液相当于 0.10 mg/mL 着色剂。

（二）仪器

- 1、可见光分光光度计。
- 2、展开槽：25cm×6cm×4cm。
- 3、层析缸。
- 4、水泵。
- 5、玻璃板：5cm×20cm。
- 6、滤纸：中速滤纸、纸色谱用。
- 7、血色素吸管和电吹风。

四、实验步骤

（一）样品处理

- 1、果味水、果子露、汽水：称取 50.0g 样品于 100mL 烧杯中。汽水需加热驱除二氧化碳。
- 2、配制酒：称取 100.0g 样品于 100mL 烧杯中，加碎瓷片数块，加热驱除乙醇。
- 3、硬糖、蜜饯类、淀粉软糖：称取 5.00g 或 10.0g 粉碎的试样，加 30mL 水，温热溶解，若样液 pH 值较高，用柠檬酸溶液(200g/L)，调整至 pH4 左右。

（二）样品吸附分离

将处理后所得的溶液加热至 70℃，加入 0.5g ~ 1.0g 聚酰胺粉充分搅拌，用柠檬酸溶液（200g/L）调 pH 至 4，使着色剂完全被吸附，如溶液还有颜色，可以再加一些聚酰胺粉。将吸附着色剂的聚酰胺全部转入 G3 垂融漏斗中过滤(如用 G3 垂融漏斗过滤可以用水泵慢慢地抽滤)。用 pH4 的 70℃水反复洗涤，每次 20mL，边洗边搅拌，若含有天然着色剂，再用甲醇—甲酸溶液洗涤 1 次~ 3 次，每次 20mL，至洗液无色为止。再用 70℃水多次洗涤至流出的溶液为中性。洗涤过程中应充分搅拌。然后用乙醇氨溶液分次解吸全部着色剂，收集全部解吸液，于水浴上驱氨。如果为单色，则用水准确稀释至 50mL，用分光光度法进行测定。如果为多种着色剂混合液，则进行纸色谱或薄层色谱法分离后测定，即将上述溶液置水浴上浓缩至 2mL 后移入 5mL 容量瓶中，用 50%乙醇洗涤容器，洗液并入容量瓶中并稀释至刻度。

（三）着色剂的定性

1、纸色谱定性着色剂

按层析缸大小裁剪一定规格的滤纸条，在距底边 2cm 的起始线上分别点 $3\mu\text{L}\sim 10\mu\text{L}$ 试样溶液， $1\mu\text{L}\sim 2\mu\text{L}$ 着色剂柱准液，挂于分别盛有：正丁醇-无水乙醇-氨水；以及正丁醇-吡啶-氨水展开剂的层析缸中，用上行法展开，等溶剂前沿展至 15cm 处，将滤纸取出于空气中晾干，与标准斑比较定性。

2、薄层色谱定性着色剂

(1) 薄层板的制备

称取 1.6g 聚酰胺粉，0.4g 可溶性淀粉及 2g 硅胶 G；置于合适的研钵中，加 15mL 水研匀后，立即置于玻璃板中均匀涂布铺成 0.3mm 的薄板。在室温晾干后，于 80°C 干燥 1h，置于干燥器中备用。

(2) 点样

点样前对玻璃板进行修整。然后离板底边 2cm 处将 0.5mL 样液从左到右点成与底边平行的条状，板的左边点 2 μL 色素标准溶液。

(3) 展开

苋菜红与胭脂红用：甲醇-乙二胺-氨水展开剂；靛蓝与亮蓝用：甲醇-氨水-乙醇展开剂；柠檬黄与其他着色剂用：柠檬酸钠-氨水-乙醇展开剂。取适量展开剂倒入展开槽中，将薄层析放入展开，等着色剂明显分开后取出，晾干，与标准斑比较， R_f 值相同的即为同一色素。

(四) 着色剂的定量测定

1、样品测定

将纸色谱中相关的色斑分别剪下，用少量热水洗涤数次，合并洗液，移入 10mL 比色管中，并加水稀释至刻度。

将薄层色谱相关的色斑（包括有扩散的部分），分别用刮刀刮下，移入漏斗中，用乙醇-氨溶液解吸着色剂，少量反复多次至解吸，解吸液并入蒸发皿中，于水浴上挥去氨，移入 10mL 比色管中，加水至刻度，作比色用。

2、标准曲线制备

分别吸取 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 胭脂红、苋菜红、柠檬黄、日落黄色素标准使用溶液，或 0、0.2、0.6、0.8、1.0mL 亮蓝、靛蓝色素标准使用溶液，分别置于 10mL 比色管中，各加水稀释至刻度。

上述试样与标准管分别用 1cm 比色杯，以零管调节零点，于一定波长下(胭脂红 510nm，

苋菜红 520nm, 柠檬黄 430nm, 日落黄 482nm, 亮蓝 627nm, 靛蓝 620nm), 测定吸光度, 分别绘制标准曲线, 与标准曲线比较, 计算样品着色素含量。

五、结果计算

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times V_2 / V_1 \times 1000}$$

式中 X——样品中着色剂的含量 (g/kg);

A——测定用样液中色素含量 (mg);

m——试样质量或体积 (g 或 mL);

V_1 ——试样解吸后部体积 (mL);

V_2 ——样液点板 (纸) 的体积 (mL)。

计算结果保留两位有效数字。

六、注意事项及说明

- 1、本实验法的最低检出量为 50 μ g, 点样量为 1 μ L 时, 检出浓度约为 50mg/kg。
- 2、奶糖、蛋糕类样品前处理, 可参照国标 GB/T 5009.35-2003 相应的处理方法。
- 3、纸色谱展开时, 为避免靛蓝在碱性条件下易褪色, 可选用甲乙酮-丙酮-水展开剂。
- 4、点样前对薄层板进行修整: 即用刮刀垂直由下往上刮去上行展开薄层板两侧约 0.5cm 的硅胶层。目的是防止薄板展开时产生边缘效应, 影响 Rf 值。

七、思考题

- 1、薄层层析法中的点样展开操作, 应注意什么问题?
- 2、薄层层析法是怎样进行定性和定量?

实验五 食品中苏丹红染料的测定 (高效液相色谱法)

一、目的要求

学习食品中苏丹红染料测定的原理和方法。

二、实验原理

苏丹红色素是应用于油彩蜡、地板蜡和香皂等化工产品中的一种非生物合成的着色剂, 非食用色素, 长期食用具有致癌致畸作用。苏丹红色素一般不溶于水易溶于有机溶剂, 待测

样品经有机溶剂提取，经浓缩及氧化铝柱层析萃取净化，用反相高效液相色谱—紫外可见光检测器进行色谱分析，采用外标法定量。

三、仪器与试剂

(一) 试剂

- 1、乙腈 色谱纯
- 2、丙酮 色谱纯、分析纯
- 3、甲酸 分析纯
- 4、乙醚 分析纯
- 5、正己烷 分析纯
- 6、无水硫酸钠 分析纯
- 7、层析柱管：1cm (内径)×5cm (高)的注射器管。
- 8、层析用氧化铝（中性 100 目~200 目）：105℃干燥 2h，于干燥器中冷至室温，每 100g 中加入 2mL 水降活，均匀后密封，放置 12h 后使用。
- 9、氧化铝层析柱：在层析柱管底部塞入一薄层脱脂棉，干法装入处理过的氧化铝至 3cm 高，经敲实后加一薄层脱脂棉，用 10mL 正己烷预淋洗，洗净柱杂质后，备用。
- 10、5%丙酮的正己烷溶液：吸取 50mL 丙酮用正己烷定容至 1L。
- 11、标准物质：苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV；纯度≥95%。
- 12、标准贮备液：分别称取苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III 及苏丹红 IV 各 10.0mg（按实际含量折算），用乙醚溶解后用正己烷定容至 250mL。

(二) 仪器

- 1、高效液相色谱仪（配有紫外可见光检测器）
- 2、分析天平：感量 0.1mg
- 3、旋转蒸发器
- 4、均质机或匀浆机
- 5、粉碎机
- 6、离心机
- 7、0.45 μm 有机滤膜

四、实验步骤

(一) 样品制备：将液体、浆状样品混合均匀，固体样品需粉碎磨细。

(二) 样品处理：

1、红辣椒粉等粉状样品

称取 1g ~ 2g (准确至 0.001 g) 样品于三角瓶中, 加入 10mL ~20mL 正己烷, 超声处理 5min, 过滤, 用 10 mL 正己烷洗涤残渣数次, 至洗出液无色, 合并正己烷液, 用旋转蒸发仪浓缩至 5 mL 以下, 慢慢加入氧化铝层析柱中, 为保证层析效果, 在柱中保持正己烷液面为 2mm 左右时上样, 在全程的层析过程中不应使柱干涸, 用正己烷少量多次淋洗浓缩瓶, 一并注入层析柱。控制氧化铝表面吸附的色素带宽宜小于 0.5cm, 待样液完全流出后, 视样品中含油类杂质的多少用 10mL ~30mL 正己烷洗柱, 直至流出液无色, 弃去全部正己烷淋洗液, 用含 5% 丙酮的正己烷液 60mL 洗脱, 收集、浓缩后, 用丙酮转移并定容至 5mL, 经 0.45 μ m 有机滤膜过滤后待测。

2、红辣椒油、火锅料、奶油等油状样品

称取 0.5g~2g (准确至 0.001 g) 样品于小烧杯中, 加入约 1mL ~ 10mL 正己烷溶解, 难溶解的样品可于正己烷中加温溶解。然后按 1 中“慢慢加入氧化铝层析柱……经 0.45 μ m 有机滤膜过滤后待测”操作。

3、辣椒酱、番茄沙司等含水量较大的样品

称取 10g ~ 20g (准确至 0.01g) 样品于离心管中, 加 10mL ~20mL 水将其分散成糊状, 含增稠剂的样品多加水, 加入 30mL 正己烷 : 丙酮 = 3 : 1, 匀浆 5min, 3000 rpm 离心 10min, 吸出正己烷层, 于下层再加入 20mL × 2 次正己烷匀浆, 过滤。合并 3 次正己烷, 加入无水硫酸钠 5g 脱水, 过滤后于旋转蒸发仪上蒸干并保持 5 分钟, 用 5mL 正己烷溶解残渣后, 按 1 中“慢慢加入氧化铝层析柱……经 0.45 μ m 有机滤膜过滤后待测”操作。

4、香肠等肉制品

称取粉碎样品 10g ~ 20g (准确至 0.01g) 于三角瓶中, 加入 60mL 正己烷充分匀浆 5min, 滤出清液, 再以 20mL × 2 次正己烷匀浆, 过滤。合并 3 次滤液, 加入 5g 无水硫酸钠脱水, 过滤后于旋转蒸发仪上蒸至 5mL 以下, 按 1 中“慢慢加入氧化铝层析柱……经 0.45 μ m 有机滤膜过滤后待测”操作。

(三) 测定

1、色谱检测条件

(1) 色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ 3.5 μ m 4.6mm × 150mm (或相当型号色谱柱)

(2) 流动相:

溶剂 A 0.1% 甲酸的水溶液 : 乙腈 = 85 : 15

溶剂 B 0.1% 甲酸的乙腈溶液 : 丙酮 = 80 : 20

(3) 梯度洗脱条件

流速 (mL/min)	时间 (min)	流动相		曲线
		A%	B%	
1.0	0	25	75	线性
1.0	10.0	25	75	线性
1.0	25.0	0	100	线性
1.0	32.0	0	100	线性
1.0	35.0	25	75	线性
1.0	40.0	25	75	线性

(4) 柱温: 30°C

(5) 检测波长: 苏丹红 I 478nm ; 苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV 520nm ; 于苏丹红 I 出峰后切换。

2、标准曲线制备

吸取标准贮备液 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6mL , 用正己烷定容至 25mL , 此标准系列浓度为 0、0.16、0.32、0.64、1.28、2.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 各进样量 10 μL , 绘制标准曲线。

3、样品测定: 吸取 10 μL 样品处理液, 按标准曲线制备检测色谱条件对样品进行测定。与标样对照, 根据峰保留时间定性以及相应峰面积定量。

五、结果计算

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

式中 X——样品中苏丹红含量 (mg / kg);

c——由标准曲线得出的样液中苏丹红的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V——样液定容体积 (mL);

m——样品质量 (g)。

六、实验注意事项及说明

1、不同厂家和不同批号氧化铝的活度有差异, 须根据具体购置的氧化铝产品略作调整, 活度的调整采用标准溶液过柱, 将 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苏丹红的混合标准溶液 1 mL 加到柱中, 用 5% 丙酮正己烷溶液 60 mL 完全洗脱为准, 4 种苏丹红在层析柱上的流出顺序为苏丹红 II、苏丹红 IV、苏丹红 I、苏丹红 III, 可根据每种苏丹红回收率作出判断。苏丹红 II、苏丹红 IV 的回收率较低表明氧化铝活性偏低, 苏丹红 III 的回收率偏低时表明活性偏高。

2、苏丹红色素色谱分离图如图 4- 所示:

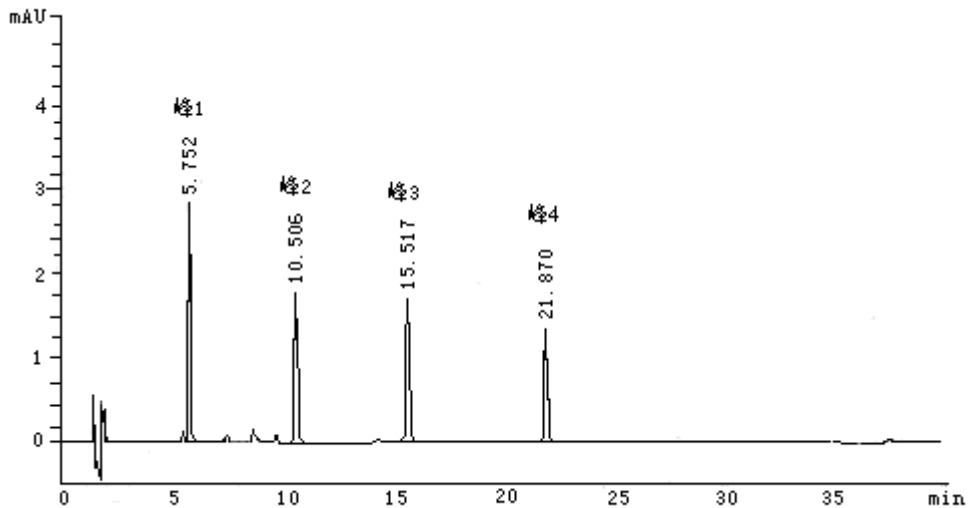


图 4- 苏丹红色素色谱分离图

峰 1——苏丹红 I ； 峰 2——苏丹红 II ； 峰 3——苏丹红 III ； 峰 4——苏丹红 IV

七、思考题

样品前处理时，使色素提取液过氧化铝层析柱可去除哪些杂质？

实验六 食品中二氧化硫含量测定

一、目的要求

学习盐酸副玫瑰苯胺显色比色法测定食品中亚硫酸盐的实验原理，掌握实验的操作要点及测定方法。

二、实验原理

亚硫酸盐与四氯汞钠反应，生成稳定的络合物，再与甲醛及盐酸副玫瑰苯胺作用生成紫红色络合物，此络合物于波长 550nm 处有最大吸收峰，且在一定范围内其颜色的深浅与亚硫酸盐的浓度成正比，可以比色定量。结果以试样中二氧化硫的含量表示。

三、仪器与试剂

(一) 试剂

1、四氯汞钠吸收液：称取 13.6g 氯化高汞及 6.0g 氯化钠，溶于水中并稀释至 1000mL 放置过夜，过滤后备用。

2、1.2 % 氨基磺酸铵溶液(12g/L)。

3、甲醛溶液 (2g/L)：吸取 0.55 mL 无聚合沉淀的甲醛 (36%)，加水稀释至 100 mL，混

匀。

4、淀粉指示液：称取 1g 可溶性淀粉，用少许水调成糊状，缓缓倾入 100 mL 沸水中，搅拌煮沸，放冷备用，此溶液临用时配制。

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 100 mL

6、乙酸锌溶液：称取 22g 乙酸锌溶于少量水中，加入 3mL 冰乙酸，加水稀释至 100 mL。

7、盐酸副玫瑰苯胺溶液：称取 0.1g 盐酸副玫瑰苯胺 ($C_{19}H_{18}N_2Cl \cdot 4H_2O$:p-rosaniline hydrochloride) 于研钵中，加少量水研磨使溶解并稀释至 100 mL。取出 20mL，置于 100 mL 容量瓶中，加盐酸 (1+1) 充分摇匀后使溶液由红变黄，如不变黄再滴加少量盐酸至出现黄色，再加水稀释至刻度，混匀备用。

8、碘溶液 [$c(1/2I_2)=0.100 \text{ mol/L}$]。

9、硫代硫酸钠标准溶液 [$c(Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O)=0.100 \text{ mol/L}$]。

10、二氧化硫标准溶液：称取 0.5g 亚硫酸氢钠，溶于 200 mL 四氯汞钠吸收液中，放置过夜，上清液用定量滤纸过滤备用。

吸取 10.0 mL 亚硫酸氢钠-四氯汞钠溶液于 250mL 碘量瓶中，加 100 mL 水，准确加入 20.00 mL 碘溶液 (0.1mol/L)，5 mL 冰乙酸，摇匀，放置于暗处，2min 后迅速以 0.100mol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色，加 0.5 mL 淀粉指示剂，继续滴定至无色。另取 100 mL 水，准确加入 0.1mol/L 碘溶液 20.0 mL、5mL 冰醋酸，按同一方法做试剂空白试验。

二氧化硫标准溶液的浓度按下式进行计算：

$$X = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 32.3}{10}$$

式中 X——二氧化硫标准溶液浓度 (mg/mL)；

V_1 ——测定用亚硫酸氢钠-四氯汞钠溶液消耗硫代硫酸钠标准溶液体积 (mL)；

V_2 ——试剂空白消耗硫代硫酸钠标准溶液体积 (mL)；

C——硫代硫酸钠标准溶液的摩尔浓度 (mol/L)；

32.03——每毫升硫代硫酸钠 [$c(Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O)=1.000 \text{ mol/L}$] 标准溶液相当于二氧化硫的质量 (mg)。

11、二氧化硫使用液：临用前将二氧化硫标准溶液以四氯汞钠吸收液稀释成每毫升相当于 $2 \mu \text{g}$ 二氧化硫。

12、氢氧化钠溶液 (20g/L)。

13、硫酸 (1+71)。

(二)、仪器

分光光度计。

四、实验步骤

(一)、样品处理

1、水溶性固体试样如白砂糖等可称取约 10.00g 均匀试样（试样量可视含量高低而定），以少量水溶解，置于 100 mL 容量瓶中，加入 4mL 氢氧化钠溶液（20g/L），5min 后加入 4mL 硫酸（1+71），然后加入 20mL 四氯汞钠吸收液，以水稀释至刻度。

2、固体试样如饼干、粉丝等可称取 5.0g~10.0g 研磨均匀的试样，以少量水湿润并移入 100 mL 容量瓶中，然后加入 20mL 四氯汞钠吸收液，浸泡 4 h 以上，若上层溶液不澄清可加入亚铁氰化钾溶液 及乙酸锌溶液各 2.5mL，最后用水稀释至 100 mL 刻度，过滤后备用。

3、液体试样如葡萄酒等可直接吸取 5.0~10.0 mL 试样，置于 100mL 容量瓶中，以少量水稀释，加 20 mL 四氯汞钠吸收液，摇匀，最后加水至刻度，混匀，必要时过滤备用。

(二)、测定

吸取 0.50ml~5.0 mL 上述试样处理液于 25 mL 带塞比色管中。

另吸取 0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.50、2.00 mL 二氧化硫标准使用液（相当于 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、3.0、4.0 μ g 二氧化硫），分别置于 25mL 带塞比色管中。

于试样及标准管中各加入四氯汞钠吸收液至 10 mL，然后再加入 1 mL 氨基磺酸铵溶液（12g/L）、1mL 甲醛溶液（2g/L）及 1 mL 盐酸副玫瑰苯胺溶液，摇匀，放置 20 min。用 1cm 比色杯，以零管调节零点，于波长 550 nm 处测吸光度，绘制标准曲线比较。

五、结果计算

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

式中 X——测试样中二氧化硫的含量（g/kg）；

A——测定用样液中二氧化硫的质量（ μ g）；

m——试样质量（g）；

V——测定用样液的体积（mL）。

计算结果表示到三位有效数字。

六、注意事项及说明

1、本实验法检出浓度为 1mg/kg。

2、要求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 10%。

3、亚硫酸和食品中的醛、酮和糖相结合，以结合型的亚硫酸存在于食品中。加碱是将食品中的二氧化硫释放出来，加硫酸是为了中和碱，这是因为总的显色反应是在微酸性条件下进行的。

4、显色时间时显色有影响，所以在显色时要严格控制显色时间。

5、盐酸副玫瑰苯胺的精制方法如下：称取 20g 盐副玫瑰苯胺于 400mL 水中，用 50mL 盐酸（1+5）酸化，徐徐搅拌，加 4g~5g 活性炭，加热煮沸 2mm。将混合物倒入大漏斗中，过滤（用保温漏斗趁热过滤）。滤液放置过夜，出现结晶，然后再用布氏漏斗抽滤，将结晶再悬浮于 1000mL 乙醚-乙醇（10:1）的混合液中，振摇 3min~5min，以布氏漏斗抽滤，再用乙醚反复洗涤至醚层不带色为止，于硫酸干燥器中干燥，研细后贮于棕色瓶中保存。

6、如无盐酸副玫瑰苯胺可用盐酸品红代替。

7、氯化高汞试剂有毒，使用时应注意。

8、氨基磺酸铵溶液不稳定，宜随配随用，隔绝空气保存，可稳定一周。

七、思考题

1、二氧化硫标准溶液使用时为何要对其浓度进行标定？

2、饼干、粉丝等样品处理时，加入亚铁氰化钾溶液以及乙酸锌溶液的目的是什么？

做好本实验的操作要点是什么？

实验七 食品中 BHA 与 BHT 的测定

方法一 气相色谱法

一、目的要求

学习气相色谱法测定 BHA 与 BHT 的实验原理和方法，掌握气相色谱法检测技术。

二、实验原理

样品中的叔丁羟基茴香醚（BHA）和 2,6-二叔丁基对甲酚（BHT）用石油醚提取，通过层析柱使 BHA 和 BHT 净化，浓缩后，经气相色谱分离后用氢火焰离子化检测器检测，根据试样峰高与标准峰高比较定量。

三、仪器与试剂

（一）试剂

1、石油醚：沸程 30℃~60℃。

2、二氯甲烷，分析纯。

3、二硫化碳，分析纯。

4、无水硫酸钠，分析纯。

5、硅胶 G：60 目~80 目于 120℃活化 4h 放干燥器中备用。

6、弗罗里矽土 (Florisil)：60 目~80 目于 120℃活化 4h 放干燥器中备用。

7、BHA、BHT 混合标准储备液：准确称取 BHA、BHT（纯度为 99.0%）各 0.1g 混合后用二硫化碳溶解，定容至 100 mL 容量瓶中，此溶液分别为每毫升含 1.0 mg BHA、BHT，置冰箱保存。

8、BHA、BHT 混合标准使用液：吸取标准储备液 4.0mL 于 100 mL 容量瓶中，用二硫化碳定容至 100 mL 容量瓶中，此溶液分别为每毫升含 0.040mg BHA、BHT，置冰箱中保存。

（二）仪器

1、气相色谱仪：附 FID 检测器。

2、蒸发器：容积 200mL。

3、振荡器。

4、层析柱：1cm×30cm 玻璃柱，带活塞。

5、气相色谱柱：柱长 1.5m，内径 3mm 的玻璃柱内装涂质量分数为 10%的 QF-1 Gas Chrom Q (80~100 目)。

四、实验步骤

（一）固体样品的制备

称取 500g 含油脂较多的试样，含油脂少的试样取 1000g，然后用对角线取四之二或六分之二，或根据试样情况取有代表性试样，在玻璃乳钵中研碎，混合均匀后放置广口瓶内保存于冰箱中。

1、脂肪的提取

(1) 含油脂高的试样（如桃酥）：称取 50g，混合均匀，置于 250mL 具塞锥形瓶中，加 50mL 石油醚（沸程为 30℃~60℃），放置过夜，用快速滤纸过滤后，减压回收溶剂，残留脂肪备用。

(2) 含油脂中等的试样（如蛋糕）：称取 100g 左右，混合均匀，置于 500mL 具塞锥形瓶中，加 100mL~200mL 石油醚（沸程为 30℃~60℃），放置过夜，用快速滤纸过滤后，减压回收溶剂，残留脂肪备用。

(3) 含油脂少的试样（如面包、饼干等）：称取 250g~300g，混合均匀后，用于 500mL 具塞锥形瓶中，加入适量石油醚浸泡试样，放置过夜，用快速滤纸过滤后，减压回收溶剂残留

脂肪备用。

2、试样的净化处理

(1)层析柱制备:于层析柱底部加入少量玻璃棉,少量无水硫酸钠,将硅胶-弗罗里矽土(6+4)共 10g,用石油醚湿法混合装柱,柱顶部再加入少量无水硫酸钠。

(2)脂肪提取物净化处理:称取经上述方法提取的脂肪 1.50g~2.00g,放入 50 mL 烧杯中,加 30mL 石油醚溶解,转移到层析柱上,再用 10 mL 石油醚分数次洗涤烧杯,并转入到层析柱,用 100 mL 三氯甲烷分五次淋洗,合并淋洗液,减压浓缩近干,用二硫化碳定容至 2.0 mL,该溶液为待测溶液。

(二) 植物油试样的制备:直接称取混合均匀的试样 2.00g,放入 50 mL 烧杯,样品净化方法与固体样品脂肪提取物净化处理方法相同。

(三) 测定

气相色谱条件:

检测器: FID

温度: 检测室温度 200℃, 进样口温度 200℃, 柱温 140℃。

载气流量: 氮气 70mL/min; 氢气 50 mL/min; 空气 500 mL/min。

分别注入气相色谱标准使用液 3.0 μL, 以及 3.0 μL 样品净化待测溶液(按试样的含量而定), 样品与标准品峰高或面积比较计算含量。

五、结果计算

1、待测溶液 BHA(或 BHT)的质量计算:

$$m_1 = \frac{h_i}{h_s} \times \frac{V_m}{V_i} \times V_s \times C_s$$

式中 m_1 —待测溶液 BHA (或 BHT) 的质量 (mg);

h_i ——注入色谱试样中 BHA (或 BHT) 的峰高或面积;

h_s ——标准使用液中 BHA (或 BHT) 的峰高或面积;

V_i ——注入色谱试样溶液的体积 (mL);

V_m ——待测试样定容的体积 (mL);

V_s ——注入色谱中标准使用液的体积 (mL);

C_s ——标准使用液的浓度 (mg/mL)。

2、食品中以脂肪计 BHA (或 BHT) 的含量计算:

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

式中 x_1 —食品中以脂肪计 BHA（或 BHT）的含量（g/kg）；

m_1 —待测溶液中 BHA（或 BHT）的质量（mg）；

m_2 —油脂（或食品中脂肪）的质量（g）。

计算结果保留三位有效数字。

六、注意事项及说明

1、本实验法检出限为 $2.0 \mu\text{g}$ ，油脂取样量为 0.50 时检出浓度为 4.0mg/kg 。气相色谱最佳线性范围为 $0.0 \mu\text{g} \sim 100.0 \mu\text{g}$ 。

2、BHA、BHT 气相色谱参考谱图如图 4- 所示。

3、抗氧化剂本身又是氧化剂，随存放时间延长，其含量逐渐下降，因此采集来的样品应及时检测，不宜久存。

4、脂肪过柱净化处理时应注意：待湿法装柱后石油醚自层析柱停止流出时，立即将样品提取液倾入柱内，以防止时间过长柱层龟裂。影响净化效果。

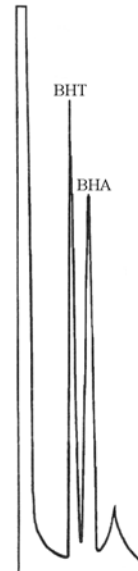


图 4- BHA、BHT 气相色谱图

七、思考题

- 1、气相色谱实验技术的操作要点是什么？
- 2、简述氢火焰离子化检测器的工作原理。
- 2、为预防实验过程氢气可能发生泄漏，实验室具体防火安全措施有哪些？

方法二 薄层层析法

一、目的要求

学习薄层层析分离鉴定食品 BHT、BHA 的实验技术。

二、实验原理

用甲醇提取油脂或食品中抗氧化剂，用薄层色谱定性，根据其在薄层板上显色的最低检出量与标准品最低检出量比较而概略定量，对高脂肪食品中的 BHT、BHA 能定性检出。

三、仪器与试剂

（一）试剂

- 1、甲醇。

2、石油醚（30℃~60℃）。

3、异辛烷。

4、丙酮。

5、冰乙酸。

6、正己烷。

7、二氧六环。

8、硅胶 G：薄层用。

9、BHT、BHA、混合标准溶液配制：分别准确称取 BHT、BHA、（纯度为 99.9 % 以上）各 10mg，分别用丙酮溶解，转入三个 10mL 容量瓶中，用丙酮稀释至刻度。每毫升含 1.0mgBHT、BHA，吸取 BHT（1.0mg/mL）1.0mL，BHA（1.0mg/mL）各 0.3mL 置同一 5mL 容量瓶中，用丙酮稀释至刻度。此溶液每毫升含 0.20 mgBHT、0.060 mgBHA。

10、显色剂：2,6-二氯醌-氯亚胺的乙醇溶液（2g/L）。放棕色瓶保存。11、展开剂：正己烷-二氧六环-乙酸（42+6+3），异辛烷-丙酮-乙酸（70+5+12）。

（二）仪器

1、减压蒸馏装置。

2、具有刻度尾管的浓缩瓶。

3、玻璃板：5cm×20cm。

4、层析槽。

5、微量注射器：10 μ L。

四、实验步骤

（一）样品提取处理

1、植物油（花生油、豆油、菜籽油、芝麻油）样品处理：称取 5.00g 油置 10mL 具塞离心管中，加入 5.0 mL 甲醇，密塞振摇 5 min，放置 2 min，离心（3000r/min~3500r/min）吸取上层清液置 25 mL 容量瓶中，如此重复提取共五次，合并每次甲醇提取液，用甲醇稀释至刻度。吸取 5.0 mL 甲醇提取液置于浓缩瓶中，于 40℃水浴上减压浓缩至 0.5 mL，留作薄层色谱用。

2、猪油样品处理：称取 5.00g 猪油置 50 mL 具磨口的锥形瓶中，加入 25.0mL 甲醇，装上冷凝管于 75℃水浴上放置 5min，待猪油完全溶化后将锥形瓶连同冷凝管一起自水浴中取出，振摇 30s，再放入水浴 30s；如此振摇三次后放入 75℃水浴，使甲醇层与油层分清后，将锥形瓶边同冷凝管一起置冰水浴中冷却，猪油凝固，甲醇提取液通过滤纸滤入 50 mL 容量

瓶中，再自冷凝管顶端加入 25mL 甲醇，重复振摇提取一次，合并二次甲醇提取液，将该容量瓶置暗处放置，待升至室温后，用甲醇稀释至刻度。吸取 10mL 甲醇提取液置一浓缩瓶中，于 40℃ 水浴上减压浓缩 0.5 mL，留作薄层色谱用。

(三) 薄层层析

1、薄层层析板制备：

称取 1.4g 硅胶 G 置玻璃乳钵中，加 3.5 mL 水。研磨至粘稠状，体态均匀后，铺成 5cm × 20cm 薄层板，置空气中干燥后于 80℃ 烘 1 h，存放于干燥器中。

2、点样：

用 10 μL 微量注射器在硅胶 G 薄层板上距下端 2.5cm 处等间距三点：

(1) 标准溶液 5.0 μL；

(2) 试样提取液 1.5 μL ~ 3.6 μL；

(3) 试样提取液加标准溶液[点样量与 (1) (2) 相同]。

3、展开

把点样的硅胶 G 薄层板，放入预先经溶剂饱和的展开槽内展开 16cm。

4、显色

将硅胶板自层析槽中取出，薄层板置通风橱中借助于吹风筒挥干溶剂，喷显色剂，置 110℃ 烘箱中加热 10 min。比较色斑颜色及深浅。趁热将板置氨气蒸气槽中放置 30 min，观察各颜色点的变化。

五、结果评定

1、结果定性评定：

根据试样中显示出的 BHT、BHA 与标准 BHT、BHA 点比较 R_f 值和显色后斑点的颜色反应定性。如果样液点显示检出某种抗氧化剂，则试样中抗氧化剂的斑点应与加入内标的抗氧化剂斑点重叠。

2、概略定量

根据薄层板上样液点抗氧化剂所显示的色斑深浅与标准抗氧化剂色斑比较而估算含量。样品中抗氧化剂（以脂肪计）的含量计算：

$$X = \frac{m_1 \times D \times 1000}{m_2 \times V_2 / V_1 \times 1000 \times 1000}$$

式中 X——试样中抗氧化剂 BHA、BHT(以脂肪计)的含量 (g/kg)；

m_1 ——薄层板上测得试样点抗氧化剂的质量 (μg)；

V_1 ——供薄层层析用点样液定容后的体积 (mL);

V_2 ——点加样液的体积 (mL);

D ——样液的稀释倍数;

m_2 ——定容后的薄层层析用样液相当于试样脂肪质量 (g)。

六、注意事项及结果说

1、此法也适用于其它含油食品的测定。对于油炸花生米、酥糖、巧克力、饼干等食品的处理如下：首先测定脂肪含量，与气相色谱法中固体样品提取脂肪方法相同。而后称取约 2.00g 的脂肪，视提取的油脂是植物油还是动物油而决定提取方法。

2、BHT、BHA 薄层层析最低检出量 R_f 值及斑点颜色变化如下表所示。

抗氧化剂	硅胶 G 板结果		
	R_f 值	最低检出量% μg	色斑颜色
BHT	0.73	1.00	桔红→紫红
BHA	0.37	0.30	紫红→蓝紫

3、如果试样点的色斑颜色较标准点深，可稀释后重新点样，估算含量。

4、显色剂溶液见光易变质，应将此溶液配制后存于棕色瓶，最好临用时配制。配制的溶液保存于冰箱中可供 3 天使用。

5、若点样量较大，可采取边点样边用吹风筒吹干，点上一滴吹干后再继续点加。以免样点过大，影响层析展开结果。

七、思考题

- 1、提取猪油抗氧化剂操作中，为何把合并甲醇提取液的容器置于暗处？
- 2、点样时，在样品液中加入抗氧化剂标准溶液的目的是什么？
- 3、为了使测定结果比较准确，实验操作应注意哪些问题？