

卫生检验方法新编

主 编

叶世柏 强卫国 李明元
王维谦 沈小婉 金秀华

北 京 大 学 出 版 社

R115

Y5B

125194

DE11/109

卫生检验方法新编

主 编

叶世柏 强卫国 李明元
王维谦 沈小婉 金秀华



叶世柏	强卫国	韩会欣	李明元
沈小婉	王维谦	金秀华	王静波
陈桂茹	陈艳华	张文德	金 红
贾丽华	王 平	张欣棉	苗鸿飞
刘增辉	常凤启	刘玉欣	刘毅刚
王笠葳	吉建英	邱 锦	王 刚

北 京 大 学 出 版 社



A1C01008370

内 容 简 介

本书由世界范围的 100 多位专家撰写,由国内 20 余位专业技术人员编译。本书全面介绍世界上先进、实用的卫生检验方法。全书共分:一般食物成分、维生素、食品添加剂、无机成分、农药、霉菌毒素、亚硝胺、多环芳烃、化妆品、药品。

本书可供卫生防疫站、食品厂化验室、粮油检验室、环保监测站、商品检验局等单位的分析检验人员参考。

卫生检验方法新编

主 编

叶世柏 强卫国 李明元
王维谦 沈小婉 金秀华

*

北京大学出版社

(北京大学校内)

北京大学印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

787×1092 毫米 16 开本 22.25 印张 527 千字

1993 年 5 月第一版 1993 年 5 月第一次印刷

印数: 0001—3000 册

ISBN 7-301-02015-5/R·11

定价: 18.00 元

编 者 的 话

本书编译自近年来国外出版的卫生检验书籍、刊物等有关内容。将卫生化学的基础和应用科学成果融汇综合到本书中。编者独具匠心,从卫生检验的角度,将有关内容做了适当的归类,从而形成系统、全面而概括的印象,读者可从书中找到所需的有关内容,对照书中介绍的技术方法,可以了解自己实验室在现代分析领域中所处的位置,哪些方法已经落后应当淘汰,应当增加什么技术手段,达到尽可能完善的地步。

本书由于篇幅所限,编者在每一项目的具体编排上,采用了以介绍操作方法的具体步骤及实验条件为主,比较了方法的精确性和准确性,并对每一方法给以注解,以满足初、中、高技术人员的需求。

由于编者水平有限,文中难免有错误和欠妥之处,恳请读者给予批评指正。

叶世柏 强卫国

1993 年3 月

目 录

1. 一般食物成分	(1)
1.1 水分	(1)
1.2 灰分	(3)
1.3 蛋白质	(4)
1.4 脂肪	(9)
1.5 糖	(16)
1.6 淀粉	(20)
1.7 纤维素	(21)
2. 维生素	(23)
2.1 脂溶性维生素	(23)
2.2 水溶性维生素	(31)
2.3 样品测定实例	(50)
3. 食品添加剂	(66)
3.1 抗氧化剂	(66)
3.2 防腐剂	(71)
3.3 着色剂	(73)
3.4 漂白剂	(75)
3.5 甜味剂	(78)
3.6 香料	(81)
3.7 其它	(91)
4. 无机成分	(95)
4.1 砷	(95)
4.2 铅	(98)
4.3 铜	(106)
4.4 铁	(109)
4.5 铝	(112)
4.6 硒	(113)
4.7 碘	(114)
4.8 锰	(115)
4.9 镍	(116)
4.10 钴	(116)
4.11 汞	(116)
4.12 锌	(117)
4.13 其它	(117)

5.	农药	(139)
5.1	有机磷杀虫剂	(139)
5.2	有机氯杀虫剂	(143)
5.3	氨基甲酸酯类杀虫剂	(148)
5.4	除草剂	(158)
5.5	杀菌剂	(161)
5.6	其它	(165)
6	霉菌毒素	(170)
6.1	免疫检验法	(171)
6.2	气相色谱检验法	(177)
6.3	高效液相色谱检验法	(183)
6.4	其它	(196)
7.	亚硝胺、多环芳烃	(199)
7.1	亚硝胺	(199)
7.2	多环芳烃	(201)
8.	化妆品	(213)
8.1	脂族酸	(213)
8.2	羧酸酯	(214)
8.3	香料	(214)
8.4	防腐剂	(216)
8.5	其它化妆品组分	(217)
8.6	染发剂	(218)
8.7	光毒性、香柑油内酯的鉴定	(220)
9.	药品	(223)
9.1	抗菌药	(223)
9.2	驱虫药	(228)
9.3	其它	(230)
10.	其它样品	(232)
10.1	食品样品	(232)
10.2	环境样品	(277)
10.3	生物样品	(332)

1. 一般食物成分

1.1 水分

1.1.1 塑料薄膜法

(一)原理 样品置于聚乙烯薄膜袋中,直接或在添加干燥助剂的情况下加热干燥,以样品的失重计为样品的水分含量。

(二)仪器 ①.恒温烘箱。②.干燥器。③.分析天平。④.聚乙烯薄膜袋:宽5—7.5cm,长12—14cm,厚0.04—0.06mm的硬质聚乙烯薄膜袋,以下简称薄膜袋。

(三)试剂 硅藻土:对于吸湿性小的硅藻土,取约10g,置于铝制称量皿中,在105℃下干燥1h,在干燥器内放置30min后称重。接着在室内取下盖子,每隔1min称重1次,放置3min后,如重量增加不超过0.5mg即可使用。吸湿性大的硅藻土,需放入2倍重量的盐酸(1:1)中,以盐酸沸腾前后的温度加热数小时,然后用水洗至不含盐酸,在135℃左右干燥至恒重。

(四)测定步骤

1.直接法 准确称量薄膜袋(准确至0.1mg),放入1—2.5g(干物重)样品,将口折封好称重,用圆棒在袋外滚动压挤样品成薄层。打开口袋,使袋子鼓起,或用宽约1cm的金属网撑住袋口。置于金属托盘或网上,放入烘箱内,在规定的温度和时间内加热干燥。干燥后将袋口折封好,用回形针将袋口夹住,在干燥器中放置30min,取下回形针称重。反复干燥至恒重(准确至0.1mg)。

2.添加干燥辅助剂薄膜法 将2—3g硅藻土放入薄膜袋内并称重(准确至0.1mg),放入1—1.5g样品(干物重),用手在袋外将硅藻土和样品揉搓均匀(含水多的样品先在烘箱中以规定温度进行预干燥至粘

稠状),在袋外面用圆棒滚压成薄层。以下按1法进行。

(五)计算

$$\text{样品中的水分(\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

式中: W_0 —薄膜袋重(g)

W_1 —薄膜袋加样品重(g)

W_2 —经干燥后恒重的薄膜袋加样品重(g)

(六)注解 ① 本法适用于粘质状、液状、糊状等含水较多的食品。在常压或真空状态下加热均可,但由于聚乙烯薄膜耐热性能有限,因而温度应控制在105℃以下。② 硬质聚乙烯薄膜吸湿性极小,用于测定食品水分时其吸湿量可以忽略不计,使用时直接称量即可。但其易带静电,带电后称量误差很大,应避免不必要的摩擦。在折封袋口时,不要捋,应用手指按压折封,尽量减少静电的产生。带电的薄膜袋可放在2—3片比其稍大的铝箔上,在称重时,静电产生的影响可以忽略不计。③ 在干燥过程中,样品与硅藻土将粘合成块状,因而应不断取出薄膜袋,从袋外揉碎,尽可能使之成为粉末状,以增大蒸发表面积。④ 除已注明的外,恒重一般以减量不超过0.5mg为标准,有的食品由于对热不稳定而分解,这时可以减量在1mg以下或不大于3mg为标准。

1.1.2 干燥助剂法

(一)原理 将干燥助剂与样品混合,以增大蒸发面积,经干燥恒重,以样品的失重计为水分含量。

(二)仪器 ①—③同1.1.1.(二)。④称量皿:直径75mm,底径70mm,深35mm的铝制或玻璃制容器。每个称量皿配一根可斜放入的玻璃棒,但不要影响容器加盖。

(三)试剂 ①精制硅砂:60—80目,制备方法同1.1.1(三)。②硅藻土:同1.1.1(三)。

(四)测定步骤 取精制的硅砂约30g或硅藻土约10g置于称量皿内,放入玻璃棒,在加热干燥样品时的温度下干燥1—2h,放入干燥器内60min后称重,直至恒重(准确至0.1mg)。加入适量样品后称重,再添加适量水,使干燥助剂湿润,用玻璃棒将干燥助剂与试样充分混合,在水浴上边搅拌边进行预干燥,直至成松散状态。放入烘箱内,在常压或真空状态下加热干燥,干燥后放入干燥器60min后称重,反复操作直至恒重。

(五)计算 同1.1.1(五)。

(六)注解 ①硅藻土较细,表面积较大,因而使用量较少。②样品的加热干燥温度随不同的食品而不同。③使用干燥助剂后,热容量增大,放冷时间需要大于60min。④在60℃水浴上干燥样品时,需要较长时间。搅拌时要注意不要让干燥助剂飞扬。

1.1.3 铝箔法

(一)原理 样品置于铝箔袋中,加热干燥,以样品的失重计为样品的水分含量。

(二)仪器 ①—③同1.1.1(二)。④铝箔袋:用铝箔折成一定形状的袋子。

(三)测定步骤 准确称量铝箔袋重(准确至0.1mg),放入适量试样,将袋口折叠密封,称重(准确至0.1mg)。用圆棒在袋外滚动将样品压成薄状,使其伸展到距袋口与袋底各1.5cm处。然后将铝箔袋展开,使样品不粘附于铝箔上。将铝箔排放在金属托盘或网上,放入烘箱,按规定的温度和时间加热干燥。干燥后折叠袋口使其大体密封。置干燥器内冷却30min,称重。反复加热干燥至恒重(准确至0.1mg)。

(四)计算 同1.1.1(五)。

(五)注解 ①该法适用于各种食品,尤其是不适于一法的食品样品,可以在大于105℃的温度下进行加热干燥。②铝箔几乎没

有吸湿性,在使用前不需恒重。③为避免弄破铝箔,可将铝箔放入适当大小的聚乙烯袋中进行。

1.1.4 蒸馏法

(一)原理 食品中的水分与甲苯或二甲苯共同蒸出,经冷凝管冷凝,收集于接收管内,根据接收管内水的体积计算出样品中水的含量。

(二)仪器 ①水分测定装置(图1-1)。②电热套。

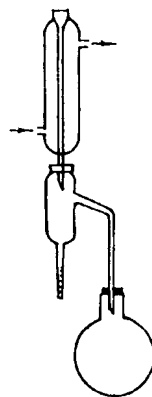


图1-1 水分测定装置

(三)试剂 甲苯或二甲苯:将甲苯或二甲苯加水饱和后弃去水层,进行蒸馏,收集馏出液备用。

(四)测定步骤 称取适当样品(含水2—5ml),放入250ml烧瓶中,加入100ml甲苯或二甲苯,连接冷凝管和接收管,接通冷却水,将电热套套在烧瓶上缓慢加热至内容物沸腾,调节加热套温度,使烧瓶内容物恰好保持沸腾,至少保持1.5h。没有水分流出时,用金属丝或玻璃棒附着在冷凝管及刻度管上部的水驱入刻度管中,或用吸管将溶剂猛烈注入冷凝管,冲落附着的水。停止加热,取下刻度管,待其冷却后,读取管内水的体积(准确至0.05ml)。

(五)计算

$$\text{样品中的水分(\%)} = \frac{V}{W} \times 100$$

式中:V—刻度管内水的体积(ml)

W—取样量(g)

(六)注解 ① 结果表示到小数点后一位。② 本法对含有除水分以外还有大量挥发成分的食品以及含脂肪的食品较适用。③ 加热时也可以用其它热源,但温度不宜过高,以免水附着在管壁上,难以回收。④ 样品为粉状或半流体时,先在瓶底铺满干洁海砂或硅藻土,再加入样品及试剂。⑤ 为避免刻度管和冷凝管壁附着水珠,仪器必须清洗干净。

1.2 灰 分

1.2.1 铝箔杯灰化法

(一)原理 将样品置于铝箔杯中,经灼烧去除有机物,残留有全部无机物重量即为灰分。

(二)仪器 ① 铝箔杯: (a) 中型($\Phi 4 - 5\text{cm}$ 、高 $5 - 5.5\text{cm}$); 将铝箔剪成直径 15cm 的圆形,用手捋成瓶状。(b) 大型($\Phi 6 - 7\text{cm}$ 、高 $7 - 7.5\text{cm}$)。制作两个,重叠使用。② 电炉。③ 马福炉。④ 干燥器。

(三)测定步骤

1. 铝箔杯称重,装入适量的样品,液体样品先在水浴上蒸发至干,在电炉上碳化至无烟,放入马福炉,在规定的温度下灰化数小时。取出放冷 10s 左右,把杯子上缘折叠密封,放在干燥器内,几分钟后称重。再打开铝箔杯,放入马福炉继续灰化,直至恒重。

2. 当残留有少量碳粒时,可向残灰内滴入几滴去离子水使其溶解,在约 100°C 的温度下干燥,然后在规定的温度灰化数小时,反复进行直至恒重。

3. 如在残渣里仍有较多碳粒时,可按上述方法进行。然后从含有未灰化碳的灰分中减去再灰化后仍未能灰化的碳量,求得真正的灰分量。

(1) 称重铝箔杯重(W_0),将一张定量滤纸折成八折后放入杯内, 105°C 干燥 2h 左右,将铝箔杯上缘折叠密封,在干燥器内放冷 20min ,称重(W_1),求出滤纸的恒重。

(2) 称量另一铝箔杯重(W_0),放入适量试

样,称重(W_1)。按1的方法灰化后称重(W_2),用已恒重的滤纸放在漏斗上。将装灰化样品的铝箔杯打开,把灰倒在滤纸上。如果杯上附有未灰化的碳,可将杯子的折痕伸展开,用玻璃棒在杯的底部打一个孔,用去离子水洗涤杯子数次,同时,用玻璃棒弄下未灰化的碳粒,置于滤纸中。用水充分洗涤滤纸和碳粒,再把滤纸放回(1)所述测定其恒重所用的铝箔杯内,在 105°C 干燥 2h 左右,将杯子密封放冷 20min 后称重(W_3)。打开杯子,滤纸预碳化,然后在规定的温度下灰化 3h ,折封杯子,几min 后称重(W_4)。

(四)计算

$$\text{样品中的灰分}(\%) = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100$$

式中: W_0 — 铝箔杯重(g)

W_1 — 铝箔杯加样品重(g)

W_2 — 铝箔杯加灰分重(g)

对于按 3 进行测定的结果计算如下:

$$\begin{aligned} \text{灰分}(\%) = & \frac{(W_2' - W_0) - \{(W_3 - W_0) - [(W_1' - W_0) + (W_4 - W_0)]\}}{W_1 - W_0} \\ & \times 100 \end{aligned}$$

(五)注解 ① 通常灰化食品多用瓷、石英、玻璃、镍等制成的容器,这些容器较重,冷却效果差,易产生误差。使用铝箔杯,在 $525 - 600^\circ\text{C}$ 的范围内灰化样品比较稳定。尤其适用于灰分量少,取样量大的食品样品。② 在测定前需将铝箔杯在 600°C 加热 2h ,放于干燥器中,在取样前称重。③ 在测定时,最好将两个铝箔杯重叠使用,这样可以避免在干燥液体样品时,液体通过杯子的折痕漏到外边。对于不易灰化的残留碳粒,需用水溶解后再干燥和灰化,双层杯就可以防止漏液的影响。另外,对于加热易膨胀的食品,在碳化时杯子将膨胀,灰化时由于碳化物燃烧,杯子将收缩,往往产生很大的变形。这时两个杯子重叠使用,因外面的杯子变形不大,给后面的操作带来方便。④ 碳化的目的是为了

定温度的马福炉时部分灰分的飞散。⑤马福炉内各部分的温度不同,前部分的温度比设定的温度低得多。一般情况最好将铝箔置于马福炉的中间部分,同时要注意使铝箔杯之间有一定的距离,不能放得太挤。⑥一般食品中灰分的含量较少,应注意称量误差,测定结果一般准确到小数点后第二位。⑦灰化温度一般不宜超过 600℃,否则氯、钾、钠等易挥发而减重,温度过高还会使熔融物包围碳粒,不利于碳化。

1.3 蛋白质

蛋白质复杂的化学成分,使它们难以用简单的理化方法加以鉴别,但是它们的组成氨基酸可以用不同的特定的化学试验,很方便地检测,也可以先将蛋白质水解,然后用纸层析、离子交换或薄层色谱法分离氨基酸,从而定性定量地测定蛋白质。还可以把氨基酸转变成 N-乙酰-n-丙酯,再用气相色谱法分离、鉴别、定量分析而方便地检测。

1.3.1 定性分析

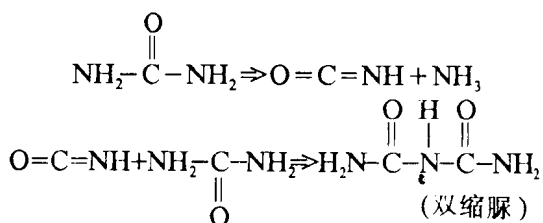
氨基酸和蛋白质具有一些显色反应。可以用来鉴别肽键和特殊氨基酸的存在。这里将介绍三个最常用的蛋白质定性实验。

用于检测的蛋白质一定不能含盐,如氯化物和铵盐。让蛋白质溶液通过葡聚糖(Sephadex)G-2S柱或用透析的方法除盐。除盐后的溶液经冻干,予低温(低于 0℃)保存。蛋清蛋白、乳清蛋白和乳球蛋白是适于这些试验的蛋白。

(一)双缩脲试验

当蛋白质与氢氧化钠溶液和硫酸铜溶液混合后,产生紫色,这是检验肽键的实验,当有两个或更多个肽键存在时,反应呈阳性,颜色是 Cu^{2+} 的配位复合物产生的。在复合物,正常情况下与 Cu^{2+} 配位的 4 个水分子被 α -

氧基所取代,碱的作用是使复合物转变成可溶性的铜盐。蛋白质和多肽中的肽键可与 Cu^{2+} 形成稳定的复合物,其中存在两个五元环。其他化合物,如脲素,也具有阳性的双缩脲反应,形成双缩脲:



步骤 将 1ml 2% 的蛋白质溶液与 1ml 10%NaOH 混合,滴加 0.1% CuSO_4 溶液,混匀,此时应出现紫红色。用 2% 的氨基醋酸(glycine)溶液重复该反应。

(二)米伦(Millon)反应

1. 原理

当一种蛋白质溶液与米伦(Millon)试剂共热时,会产生红色,这是由于蛋白质中酚环基团的存在。酪氨酸是唯一含有酚环基团的普通氨基酸,所以米伦反应是检验氨基酸存在的特征试验。

2. 试剂

米伦试剂的制备:将一定量的汞溶解在冷的发烟硝酸中,用两倍体积的水稀释,几小时之后将上清液小心地倾出到另一瓶中,备用。

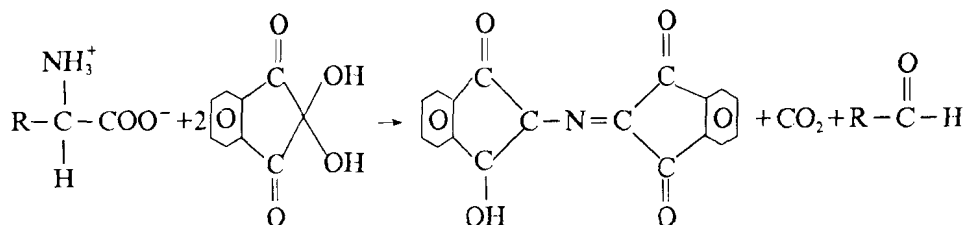
3. 步骤

取少量蛋白质粉末放在点滴板上,加 5 滴米伦试剂,置放,观察出现的红色。可用固体的酪氨酸重复该试验:向含有 1ml 2% 的蛋白质溶液中加 5 滴米伦试剂,温热直到红色出现。

(三)茚三酮反应

1. 原理

茚三酮(Ninhydrin)与氨基酸中的自由氨基反应产生不同深浅的蓝色或紫色;但脯氨酸和羟脯氨酸除外,二者产生黄色。茚三酮与 α -氨基酸的反应可表示如下:



在 570nm 下测定产物的吸光度,可作为氨基酸和某些肽的定量分析。也有用市售的以茚三酮反应为依据的自动化装置测定氨基酸。

2. 步骤

调 0.5% 的蛋白质溶液的 pH 到 7, 取 1ml 该溶液于试管中, 加 10 滴 0.2% 茚三酮溶液, 在 100℃ 水浴中加热 10min, 观察颜色。用浓的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或部分水解的蛋白质溶液重复该试验。

(四) 纸层析

1. 原理

蛋白质水解产生的氨基酸, 可用纸层析来分离, 然后喷洒茚三酮使分离后的化合物显色, 通过将未知样与已知的氨基酸的迁移率 (R_f 值) 相比较, 可以鉴别出未知样中的氨基酸成分。

2. 材料和试剂

(1) Whatman 1 号层析纸普通定性滤纸即可 (46cm × 57cm)。

(2) 层析缸 (直径 30cm, 高 60cm)。

(3) 展开剂: (a) 丁醇: 乙酸: 水 = 6:1:2 (体积比) (b) 苯酚 (色谱纯) 的饱和水溶液。

(4) 蛋白质水解样的制备如下面的定量茚三酮法相同。

(5) 氨基酸溶液: 溶解 100 mg 已知氨基酸于 100ml 水中。

(6) 茚三酮喷雾器: 溶解 200 mg 茚三酮于 100ml 乙醇, 装入市售喷雾器中。

3. 步骤

在离两边各 6cm 的滤纸角上, 点上蛋白质水解样品; 卷起滤纸, 用棉线 (不带颜色的) 把边缘缝好 (用纸条固定会损坏和使滤纸退色), 在层析缸中倒入高约 2 cm 的展开剂

(a), 滤纸放入缸中, 允许溶剂前沿上升到离纸端 5 cm 处; 当溶剂前沿达到所需要高度时, 移开滤纸, 画下前沿位置, 空气中干燥滤纸 (小心, 不要用手触摸滤纸, 因手上有氨基酸, 要带上橡皮手套或用镊子)。喷上茚三酮, 空气中晾干, 茚三酮与氨基酸反应, 现出蓝紫色斑点。用同样的程序层析已知氨基酸, 最好是已知样与未知样在同一张滤纸上进行。

如果需要更准确地鉴别, 可采用双向纸层析, 此时, 点样方式不变: 先用酚-水溶剂展开, 晾干滤纸, 用乙醚洗去酚; 滤纸转向 90℃ 后放回层析缸, 在另一方向上用丁醇-乙酸-水展开; 显色方式不变。未知样与已知样同时操作, 并比较它们显现出的斑点的位置, 用这种方法可以较准确地鉴别出蛋白质水解产物中的氨基酸。

4. 注解

酸水解会破坏色氨酸, 损失部分丝氨酸和苏氨酸。

1.3.2 定量分析

双缩脲和茚三酮反应均可用于蛋白质的定量测定, 凯氏定氮法用于测样品中氮的含量, 从而计算蛋白质的含量。

(一) 定量双缩脲法

1. 原理

样品与标准蛋白质溶液同时分别进行双缩脲反应, 然后比较它们在 550 nm 处的吸光度而测定出样品中蛋白质的含量。

2. 步骤

配制 10mg/ml 的标准牛清蛋白溶液, 分别取出 0.25ml、0.5ml、0.75ml 于三个试管中, 各补加蒸馏水至 1ml, 再加入 4ml 双缩脲 (Biuret)

试剂,混匀,30 min后在 550nm处以空白(1ml 水加 4ml 双缩脲)为参比测定吸光度。待测蛋白质溶液的浓度应在 5-10 mg/ml 范围内,所以可以将未知含量的样品做成几个稀释度,以保证至少有两个落在牛清蛋白的标准曲线之内。

(二)定量茚三酮法

1. 原理

样品中的氨基酸水解后与茚三酮试剂反应,在 570 nm处测吸光度,与已知浓度甘氨酸溶液与茚三酮反应后 570nm处的吸光值相比较而定量。

2. 步骤

样品经除盐、冻干后,配制成 100 mg/ml 的(8mol/L H_2SO_4 介质)溶液,装入适当的容器内,在 15 磅/英寸即 103420 kPa 的压力下约蒸 5h。

用固体 $Ba(OH)_2$ 中和水解产物,这时生成 $BaSO_4$ 沉淀,不要加过量,以 pH=5 为适宜,将溶液离心,倾出上清液(保留),用 10ml 热水洗沉淀,洗液并入上清液后调到 30 ml,弃去沉淀。

用水按 1:100 稀释水解液,这样溶液中将含有相当于 0.033mg/ml 原始蛋白质的水解物。一般使用 1-mM(75 μ g/ml)的甘氨酸标准溶液绘制标准曲线,按表 1-1 准备分析试样。将试管中物质混匀,100 $^{\circ}C$ 水浴加热 20min,加 8ml 50% 的 1-丙醇,即正丙醇,混匀,10min后在 570nm处,空白为参比测吸光值。

表 1-1 定量茚三酮法中分析试管中的成分

组分	组分的体积 / ml							
	1	2	3	4	5	6	7	8
标准甘氨酸	0.5	0.25	0.1	-	-	-	-	-
H_2O	-	0.25	0.4	-	0.25	0.4	0.45	2.0
水解样				0.5	0.25	0.1	0.05	-
茚三酮试剂	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
注意:在加 1-丙醇之前要混匀,加热。								
50%1-丙醇	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

(三)凯氏定氮法

在本实验中,样品的消化以金属汞或 HgO 作催化剂,在蒸馏氨气之前用硫化物或硫代硫酸盐去沉淀汞以将其除掉,否则汞与氨形成络合物,甚至加 $NaOH$ 也不会将它除掉,必将导致不能蒸出全部氨而使结果偏低。硝酸在本实验条件下也生成氨,所以不能使用。

1. 防护措施

加硫酸时,一定要将 H_2SO_4 加入到 H_2O 中,加时戴上面具和厚橡胶手套,以防溅上酸;汞与 NH_3 、卤素和碱接触后是有害的,汞蒸气毒性更大并能累积,如果汞洒到热物上面,应立刻擦去,在其上面洒上硫粉会对清除汞的污染有益处,如果必须蒸发汞,一定要使用有效的除汞蒸气的装置。

2. 步骤

称 0.7-2.2g 试样于消化瓶中,加 0.7g HgO 或 0.65g 金属汞、15g K_2SO_4 粉末或无水 Na_2SO_4 、25ml 浓 H_2SO_4 ,如果样品超过 2.2g,每超过 1g 补加 10ml H_2SO_4 。斜放烧瓶于热源,缓慢加热直到泡沫消失(如必要,可加少量石蜡以减少泡沫),煮沸样品直到溶液澄清,再加热 30min。如样品中含有有机物质,差不多需 2h。

3. 冷却

加大约 200ml 水于瓶中,冷却到 25 $^{\circ}C$ 以下,加 25ml K_2S (40g 稀释到 1L)或硫代硫酸钠(80g 稀释到 1L)以沉淀汞,加少许锌粒以防暴沸,在不搅动的情况下加一层 $NaOH$ (每 10ml H_2SO_4 或相当于这些量的稀硫酸,加 15g 固体 $NaOH$ 或足够量的溶液,以使试样溶液呈强碱性,硫代硫酸盐或硫化物在加入到烧瓶之前,也可以预先与 $NaOH$ 混和)。立即将烧瓶连到蒸馏瓶上,接上冷凝管,冷凝管的尖端插入到装有标准酸溶液和 5-7 滴指示剂的锥形瓶的液面中,摇动烧瓶,混匀内容物,加热,直到蒸出全部 NH_3 。移开锥形瓶,并蒸馏水冲洗冷凝管尖端,用标准 $NaOH$ 滴定多余的酸,测定试剂空白。

4. 计算

蒸出的 NH_3 的毫克当量 (meq) 等于起始标准酸的毫克当量减去多余酸的毫克当量, 后者用标准 NaOH 溶液滴定测得。蛋白质中 N 的毫克当量与 NH_3 的毫克当量相等, N 的克数等于 N 的毫克当量 $\times 0.014007$, 样品中含氮量的百分数可由下式计算:

$$\text{N \%} = \frac{[(\text{标准酸ml数} \times \text{酸的浓度}) - (\text{标准碱ml数} \times \text{碱的浓度})] \times 1.4}{\text{样品质量 (g)}}$$

我们知道氮的质量乘以适当的系数可得蛋白质的质量, 这个系数通常是 6.25, 尽管这个值因蛋白质的来源不同而稍有差异。

下面用一个实例来说明如何计算食品中蛋白质的百分含量:

假定样品质量为 1.0 g; 起始酸为 0.1121 mol/L (HCl), 50ml; 标准 NaOH 被用去 20ml (0.1231mol/L), 那么:

$$\begin{aligned}\text{NH}_3 \text{ meq} &= (50\text{ml} \times 0.1121\text{mol/L}) - (20\text{ml} \times 0.1231\text{mol/L}) \\ &= 5.605\text{meq(酸)} - 2.462\text{meq(碱)} \\ &= 3.143\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{N, g} &= 3.143\text{meq} \times 0.014007\text{g/meq} \\ &= 0.0440\text{g}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{蛋白质, g} &= 0.0440\text{g(N)} \times 6.25\text{g(蛋白质)/g(N)} \\ &= 0.275\text{g}\end{aligned}$$

$$\text{蛋白质, \%} = \frac{0.275\text{g}}{1.0\text{g}} \times 100 = 27.5\%$$

(四) 半微量改良凯氏定氮法

1. 原理 样品中加入二氧化钛、硫酸铜、硫酸钾及浓硫酸, 加热分解, 蛋白质及有机氮化合物中的氮形成氨, 在强碱条件下用水蒸汽蒸馏, 蒸馏出的氨用硼酸溶液吸收, 用酸标准溶液滴定。得到的氮含量乘以相应的氮—蛋白质换算系数即为蛋白质含量。

2. 仪器 同半微量凯氏定氮法。

3. 试剂 除二氧化钛外, 其余同半微量凯氏定氮法。

4. 测定步骤 称取 0.2 — 2.0 g 固体样品或 2 — 5 g 半固体样品或吸取 10 — 20 ml 液体样品 (相当于氮 30 — 40mg), 移入凯氏烧瓶中, 加入 3g 硫酸钾、0.25g 二氧化钛 (常量法加 0.5g)、0.25g 硫酸铜及 90ml 浓硫酸, 轻轻振摇使硫酸浸透样品, 于瓶口放一小漏斗, 将瓶以 45 度斜支于有小孔的石棉网上, 小心加热, 待内容物全部碳化, 泡沫完全停止后, 加强火力, 并保持瓶内液体微沸, 至液体呈蓝绿色澄清透明后, 再继续加热 30min。以下操作同半微量凯氏定氮法。

5. 计算 同半微量凯氏定氮法。

6. 注解 (1) 本法增加了二氧化钛作催化剂, 比单独使用硫酸铜效果好, 可缩短分析时间 1 — 2 倍。(2) 试样在加热分解时, 如果起泡剧烈, 可以按下述进行: ① 减低热源。② 使用 500 — 1000ml 分解烧瓶。③ 加入少量石蜡。(3) 取样量最好是所取的样品中含氮在 14 — 140mg 之间, 即 100ml 试样分解溶液中取 10 — 50 ml 时, 用 0.05 mol/L 酸标准溶液滴定的量在 10 — 20 ml 之间。(4) 在消化过程中, 添加少量的硫酸钾与硫酸反应生成硫酸氢钾, 可提高反应的温度, 加速其消化。也可加硫酸钠或氯化钾等盐类提高沸点。(5) 如在消化过程中不易得到澄清溶液时, 可将定氮瓶取下放冷后, 缓缓加入 30% 过氧化氢 2 — 3 ml, 促进消化。不要加入过氯酸, 以免生成氮的氯化物损失, 使结果偏低。(6) 加入 40% 氢氧化钠是否足量, 可借硫酸铜在碱性情况下生成的褐色沉淀或深蓝色的铜氨络离子指示。若溶液的颜色不变, 则说明所加的碱液不足。(7) 如样品含脂肪较多, 可适当增加硫酸量, 因硫酸量少时, 过多的硫酸钾会形成硫酸氢钾而不与氨作用, 导致氨的损失。(8) 蒸馏装置应严密, 不得漏气, 蒸馏中途不能停火断气, 否则发生倒吸。碱的加入要足量、迅速, 防止氨损失。碱液不得污染冷凝管和接收管。(9) 冷凝管出口必须浸入吸收液中, 防止氨挥发损失。蒸馏结束后, 先将吸收

液离开冷凝管口,以免发生倒吸,再蒸馏 1min,蒸馏是否完全,可用精密 pH 试纸测试冷凝管口的冷凝液来确定。(10)通常使用的混合指示剂有:① 0.1% 甲基红乙醇溶液 + 0.1% 溴甲酚绿乙醇溶液(1:5),酸性为酒红色,碱性为绿色,变色点为 pH5.1。② 0.2% 甲基红乙醇溶液与 0.1% 次甲基蓝水溶液等体积混合,酸性紫红色,碱性为蓝绿色,变色点为 pH5.4 显灰色。

(五)施氏(Stutzer)法

1. 原理 食品中的蛋白质与 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 形成沉淀,用凯氏定氮法对沉淀进行测定,并定量蛋白质含量。

2. 仪器 同凯氏定氮法。

3. 试剂 施氏试剂:将 100g 硫酸铜溶于 5000ml 水中,加入 2.5g 甘油,搅拌混合。加入 10% NaOH 至微碱性,使 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀充分,将上清液通过放有滤纸的漏斗,向沉淀中加入 0.5% 的甘油水溶液,充分搅拌洗涤,并通过上述滤纸过滤,如此反复几次。最后将沉淀移到滤纸上,用甘油水溶液洗至滤液不呈碱性。将沉淀移入乳钵中,加 10% 甘油水溶液研磨均匀,浓度控制在可用移液管吸取为准,将此溶液贮藏于试剂瓶中。使用时将其振摇混匀后取 10ml,蒸发至干,灼烧至恒重,预先求出 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 的含量。

其余试剂同凯氏定氮法。

4. 测定步骤 称取适量样品(参见一法)于 300ml 烧杯内(含淀粉较多的食品,事先在 65℃ 以下水浴上加热 10 min,使淀粉糊化),加 100ml 水,煮沸。加入相当于 0.3—0.4g $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 的施氏试剂,充分搅拌,使蛋白质完全沉淀。待其冷却后,过滤,沉淀用水洗涤几次。然后将滤纸随同沉淀移入凯氏烧瓶中,用凯氏定氮法测定氮的含量。

5. 计算 同凯氏定氮法。

6. 注解 (1)常用的凯氏定氮法由于测定值包含了非蛋白质氮的含量,因而若要准确知道富含非蛋白质氮的食品中蛋白质的含量,应

事先对蛋白质进行分离。本法即起到这一作用,最后的结果为纯蛋白质的含量。(2)施氏试剂密闭保存于暗处,可以使用一年。使用甘油是为了防止 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 被氧化。(3)对于含淀粉较多的样品,会因成糊状而难以过滤,因而先在 65℃ 以下水浴上加热糊化。(4)种籽、油渣、糖类等含大量磷酸盐的样品,在生成磷酸铜的同时,又生成游离碱,使蛋白质溶解,阻碍了沉淀的生成。所以,对于这种样品,在加施氏试剂之前,应先加入不含氨的 10% 明矾($\text{Al} \cdot \text{K}(\text{SO}_4)_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)溶液 1—2ml,使磷酸与明矾作用生成磷酸铝,碱与硫酸化合就不再生成游离碱。(5)含有难溶性生物碱的样品,如茶叶等,可取 1—2g 于烧杯内,加入 100ml 无水乙醇和 1ml 乙酸,在水浴上加热至沸。然后过滤除去生物碱,在过滤时应注意别将不溶物落在滤纸上,烧杯内的残留物再用 100ml 水煮沸,加入施氏试剂,再按前述方法进行。

(六)三氯醋酸沉淀法

1. 原理 食品中的蛋白质与三氯醋酸形成沉淀,用凯氏定氮法对沉淀进行测定,并定量蛋白质含量。

2. 仪器 同凯氏定氮法。

3. 试剂 a. 12% 三氯醋酸溶液,低温保存。b. 2.5% 三氯醋酸溶液,低温保存。

其它试剂同凯氏定氮法。

4. 测定步骤 取 1—2g 样品置于烧杯中,加入 75ml 水,煮沸后放冷。加入 25ml 12% 三氯醋酸溶液,充分搅拌使沉淀完全,将上清液用滤纸过滤,再用 2.5% 三氯醋酸洗涤沉淀数次,洗液在上述滤纸上过滤,将沉淀移入滤纸中,80℃ 烘干,用凯氏定氮法测定氮的含量。

5. 计算 同凯氏定氮法。

6. 注解 (1)食品中的蛋白质与三氯醋酸形成沉淀后,从而与食品中的氨态氮等无机含氮化合物、游离氨基酸及其它胺类分离,使测定更为准确。(2)用稀三氯醋酸洗涤沉淀数次的目的是将高浓度三氯醋酸沉淀下来的核酸溶于稀溶液中,以消除核酸的干扰。

(七) 醋酸铜沉淀法

1. 原理 用醋酸铜沉淀样品中的蛋白质,再用凯氏定氮法对沉淀进行测定,并定量蛋白质含量。

2. 仪器 同凯氏定氮法。

3. 试剂 ① 3% 醋酸铜溶液。② 10% 硫酸铝钾溶液。③ 硅酮消泡剂。

其它试剂同凯氏定氮法。

4. 测定步骤 称取适量样品(参见一法)于烧杯内,在水浴上加热到 40℃,轻摇,冷却至 20℃,放入凯氏烧瓶中,加入约 50ml 水,几粒玻璃珠和一至二滴硅酮消泡剂。徐徐加温煮沸,消化 30 min(切勿煮干)。乘消化液尚热时,加入 2ml 10% 硫酸铝钾溶液,摇匀。重新加热至刚好沸腾,加入 50ml 3% 醋酸铜溶液,充分混匀。冷却,内容物用滤纸过滤,用 50ml 水分数次洗涤烧瓶及沉淀,将滤纸连同沉淀移入烧瓶中,用凯氏定氮法测定氮的含量。

5. 计算 同凯氏定氮法。

6. 注解 用于测定的样品量最好含蛋白质 25 - 50%。

(八) 自动定氮仪测定法

该法的原理是基于凯氏定氮法。仪器均为自动定氮,由于各个厂家及生产型号的不同,其自动化程度也有不同,有的将加热分解、蒸馏、吸收、滴定过程自动完成。有的先进行加热分解,然后再接到仪器上进行蒸馏、吸收、滴定。有些仪器尚可将氮的含量或蛋白质的含量直接显示并打印出来,实为一种快速、准确、简便的方法。具体的操作根据说明书进行。由于该法取样量较少(1 - 2g),因而,对含氮量较少的样品就有一定影响。

1.4 脂 肪

1.4.1 脂类分析

用于脂肪理化分析的样品制备,通常包

括固体脂肪的熔化和热过滤;油样如果不澄清,也需事先过滤。样品应密封后在低温避光下保存,这样可以推迟酸败的发生。

(一) 物理分析

1. 水分和挥发物

将装有软化了的试样(不是熔化)的铝容器连同其轻质盖子一起称重,称取 5 ± 0.2 g 样品,置于真空干燥箱中,在工作压力(≤ 13332.2 Pa)及比水的沸点高 20 - 25℃ 的均一温度下,干燥 1h,然后放入干燥器冷却 30min,称重,重复一次再称重,两次称重的重量相差 $\leq 0.05\%$,即认为恒重。样品质量减少的百分比,就是水分和挥发物的含量。

2. 比重

将预冷到 20℃ 左右的样品装入到已经标定好的比重瓶中使之充满,放在 25℃ 的恒温水浴箱中保持 30 min,取出后擦干,称之恒重。按下式计算 25°/25℃ 的比重

$$\text{比重} = \frac{\text{装满油的比重瓶质量} - \text{空比重瓶质量}}{25^\circ\text{C 时水的质量}}$$

3. 折光指数

任何标准的折射仪都可用来测定折光指数,测定温度应该为 20℃ 或 25℃ (油),40℃ (脂)。仪器放在适当的位置,以便利用散射日光或非自然光照明。要有温度适宜的恒温循环水流经棱镜。乳脂折射仪读数的近似修正值,由下式计算:

$$R = R_t + K(T_t - T)$$

R - 还原剂标准温度下的读数; R_t - 测定温度下的读数; T_t - 测定时的温度; T - 标准温度; K - 修正系数,0.55(脂肪)或 0.58(油)

4. 熔点

通常用毛细管法来测定脂肪和脂肪酸的熔点。在这一过程中,将熔化并过滤后的脂肪吸入到直径 1mm 的薄壁毛细管中,使其高度为 10mm,小心地用小火封住毛细管的末端,不要燃着内装的脂肪。装有脂肪的毛细管存放于 4 - 10℃ 过夜(约 16h)。

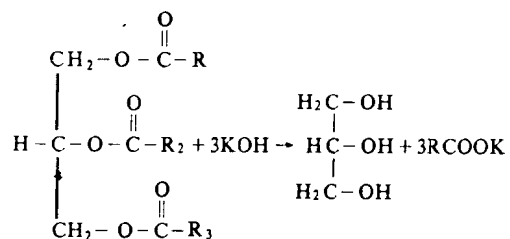
将毛细管系在一个精确的温度计上,温度刻度准确到 0.2℃。毛细管的末端与水银球相平,温度计悬垂在 600 ml 内装半瓶水的烧瓶中。开始加热可以快些,到离熔点还差 8°-10° 时,调节火焰使每分钟升温 0.5℃,当毛细管内物质透明时温度计的读数就是熔点,三次实验测得值之差不得大于 0.5℃。天然脂肪和油脂的熔点列入表 1-2。

表 1-2 某些天然脂肪和油脂的分析常数

脂肪/油	碘 值	皂化 值	熔点/℃
椰子	7.5-10.5	250-264	23-26
玉米	103-128	187-193	-12--10
棉子	99-113	189-198	-2-2
葡萄子	135	190	-10
亚麻子	155-205	188-196	-20
橄榄	80-88	188-196	-3-0
棕榈	44-54	195-205	27-50
大豆	120-141	189-195	-23--20
黄油	25-42	233-240	28-35
猪油	53-77	190-202	33-46

(二) 皂化值和皂化当量

皂化值的定义是:皂化 1g 脂肪所需要的 KOH 的毫克数。三酰甘油酯的皂化反应一般表示为:



皂化值是甘油酯平均分子量的指数,如果甘油酯基中脂肪酸的分子量小(短链酸),那么每克脂肪中甘油酯的分子数就多,而每个分子三酰甘油酯的皂化需三个分子的氢氧化钾,所以这样的甘油酯皂化值就高。例如:β-油烯基-α,α'-二软脂酸酯的分子量为 833.3,皂化值为 202.0;而 α,α'-二乙酰基-β-丁酯的分子量为 358.5,皂化值为 469.5。象牛羊脂肪和猪油这样的脂肪,主要

是高分子量脂肪酸的甘油酯,皂化值在 195 左右,而象乳脂和椰子油等脂类,含有一定数量低分子量脂肪酸甘油酯,它们的皂化值在 230-250。许多天然脂肪和油脂的皂化值在表 1-2 中已列出。

含一定数量的不能被皂化的物质的脂肪(如固醇),具有较低的皂化值。另一方面,含不饱和脂肪酸甘油酯的脂肪要比含饱和脂肪酸甘油酯的脂肪皂化值高。这是因为不饱和脂肪酸的氧化会造成双键的断裂而产生短链的羧酸,这些羧酸在皂化时与 KOH 反应造成皂化值升高。

1. 原理

将准确称量的样品与一定体积的 KOH 乙醇溶液共热使之皂化,用标准酸回滴多余的 KOH,同时做空白,从样品量、样品及空白的滴定值可计算皂化值。

2. 试剂

(1) 不含醛的 KOH 乙醇溶液:为了制备无醛醇,将 1200 ml 95% 乙醇,10g KOH,6g 铝箔的混合物回流 30 min,蒸馏并弃去最初的 50ml 蒸馏液,继续蒸馏并收集 1 L 乙醇。溶解 40 g 高纯 KOH(碳酸盐的含量要很低)于 1 L 无醛乙醇中,溶液于 15℃ 以下存放,保持澄清,共浓度约为 0.7mol/L。

(2) 0.5 mol/L 标准盐酸溶液。

(3) 指示剂: (a) 酚酞指示剂:溶解 1g 酚酞于 50 ml 95% 乙醇中,用水稀至 100ml; (b) 碱性蓝 6B 指示剂:将 2g 三苯基副玫瑰苯胺三磺酸的钠盐(sodium salt of triphenyl-pararosaniline trisulfonic acid)放入 100ml 已回流过 2h 的乙醇中煮沸,然后过滤。

3. 步骤

将要分析的样品放入带有小滴管的小称量瓶中,称重;用滴管取约 5g 脂肪放入 300 ml 的烧瓶中,再次称重,两次称得的质量差值即为样品质量,一般 40-50 滴相当 1g。每份样品应测双样。

用移液管或量筒准确量取 50 ml KOH 乙

醇溶液,加入到烧瓶中,在烧瓶顶口接上一个空气冷凝管,在空气浴中回流 30 min,皂化完全通常需 15 min,所以加热 30 min 是足够的。然而如果物质皂化困难,则需要更长的加热时间。当溶液变成十分均相时,皂化达到完全,冷却烧瓶。

加 1 ml 酚酞指示剂,用 0.5 mol/L HCl 滴定多余的 KOH。如果皂化时溶液变成红棕色,则在滴定前还需要加 1 ml 碱性蓝 6B 溶液。酚酞和碱性蓝 6B 在碱性溶液中都呈红色,但在酸性溶液中,酚酞无色,而碱性蓝 6B 呈蓝色。

在做样品的同时要做两个空白,实验条件与操作样品时完全一致,空白的滴定值用于确定 KOH 的量,因此它与样品同样重要。

4. 计算

从样品的称重值、空白及样品的滴定结果可以计算出皂化值。为了使结果可信,要平行做三次试验,认真和富有经验地操作,才能得准确的结果。

当用于空白和样品的 KOH 乙醇的体积相同时,可用下式计算皂化值(S.V):

$$S.V = \frac{(\text{空白滴定值} - \text{样品滴定值}) \times \text{酸的摩尔浓度}}{\text{样品质量 (g)}} \times 56.1$$

注意事项:

用于制备 KOH 乙醇溶液的乙醇一定要除去醛,这样才能使皂化过程中出现的树脂化及随之而来的颜色减少到最低限度。应该选用高纯度的 KOH,其中所含的碳酸盐甚微,以免干扰用酚酞作指示剂时的滴定。皂化和滴定时尽量减少与空气接触,以防止碱液对 CO₂ 的吸收。

空气冷凝用于防止皂化过程中醇的损失,在滴定完成时,醇的浓度仍应接近 50%,以防止肥皂的水解,如果皂化时损失了醇,应补加不含醛的醇,以保证其 50% 的浓度。

皂化当量(平均分子量)可直接表示一种脂肪的或脂肪酸酯的平均分子量,而皂化值仅是分子量的一个参数。

在计算一种脂肪的皂化值时,我们假定

它全都是三酰甘油酯,而不含不能被皂化及其他不纯的物质,则可由所测得的皂化值的数据,用下面的公式计算出脂肪的或简单酯的皂化当量(S.E)。

$$\text{脂肪的皂化当量 (S.E)} = \frac{\text{样品质量} \times 3000}{(\text{空白滴定值} - \text{样品滴定值}) \times \text{酸的摩尔浓度}}$$

$$\text{简单酯的皂化当量 (S.E)} = \frac{\text{样品质量} \times 1000}{(\text{空白滴定值} - \text{样品滴定值}) \times \text{酸的摩尔浓度}}$$

如果已知皂化值,可以用皂化时所消耗的 KOH 分子的量除以皂化值(以 g 表示,即 S.V × 0.001),而计算出皂化当量。例如,α, α' - 二乙酰基-β-丁酸酯的皂化值为 469.5,它是三酰甘油酯,使其一个分子皂化需要三个分子的 KOH (168.3g), 168.3 ÷ 0.4695 = 358.5,这就是它的皂化当量或分子量。再如甲基软脂酸酯,皂化时只需一分子 KOH (56.1g),它们之间的关系可用下式表示:

$$\text{脂肪的皂化当量} = \frac{168300}{S.V}$$

$$\text{简单酯的皂化当量} = \frac{56100}{S.V}$$

(三) 碘值

碘值定义为: 1g 脂肪吸收碘的厘克数 (centigrams)。含有不饱和脂肪酸的甘油酯在适当的条件下,可定量地与卤素(以碘计)起加成反应;而饱和脂肪酸的酯不会发生加成反应。所以,碘值是脂肪不饱和程度(双键数目)的度量。

因为作为食用油酯中主要成分的不饱和脂肪酸,在室温下是液体,可以将碘值与熔点或硬度连系起来。例如,玉米油含有 83% 的不饱和脂肪酸,熔点 -10° - 12℃, 碘值 103 - 128; 而猪油含约 54% 的不饱和脂肪酸,熔点 33° - 46℃, 碘值 53 - 77。有证据表明大多数硬脂肪(主要是长链饱和酸甘油酯)在体内被消化的程度远不如含一定不饱和和酸的软脂类。由于氧化而造成的脂肪变质也与碘值有一定的关系,含有二个和三个双键的不饱和甘油酯很容易氧化变质;而含有