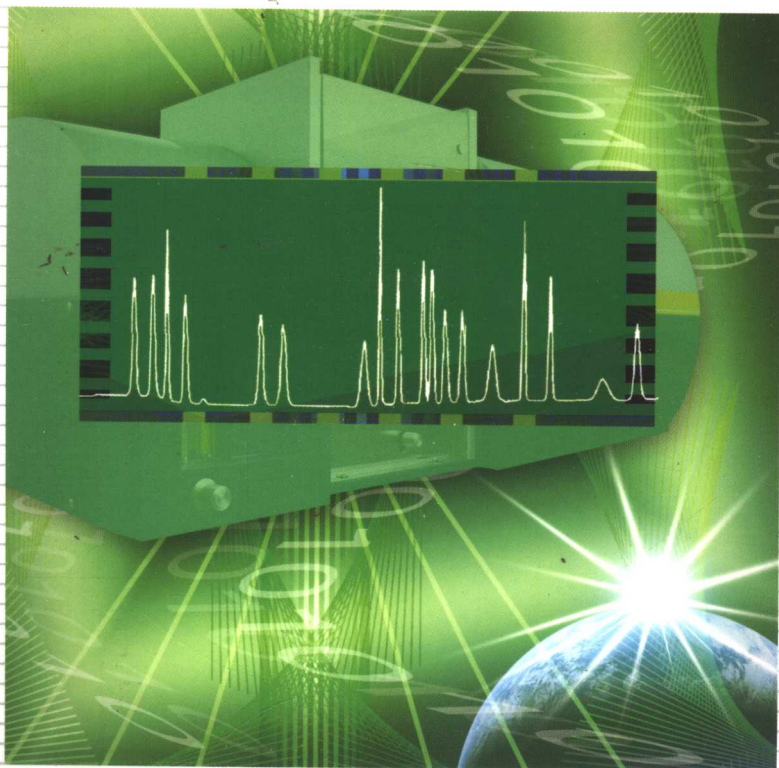


高等学校教材

工业发酵分析

吴国峰 李国全 马永强 主编
贾树彪 主审



化学工业出版社
高等教育教材出版中心

高等学校教材

工业发酵分析

吴国峰 李国全 马永强 主编
贾树彪 主审



化学工业出版社
高等教育教材出版中心

·北京·

图书在版编目 (CIP) 数据

工业发酵分析/吴国峰, 李国全, 马永强主编. —北京: 化学工业出版社, 2006. 6
高等学校教材
ISBN 7-5025-8930-9

I. 工… II. ①吴…②李…③马… III. 工业发酵-分析-教材 IV. TQ920.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 066405 号

高等学校教材

工业发酵分析

吴国峰 李国全 马永强 主编

贾树彪 主审

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 周 侗

责任校对: 边 涛

封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社 出版发行
高等教育教材出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市宇新装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 17 字数 443 千字

2006 年 8 月第 1 版 2006 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8930-9

定 价: 29.50 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

工业发酵分析是生物工程、生物制药、食品科学与工程等专业的学生在完成物理学、无机化学、有机化学、分析化学和生物化学、微生物学课程后学习的早期专业课程。

工业发酵生产的产品主要有燃料酒精、食用酒精、谷氨酸钠、柠檬酸、抗生素、维生素C、蒸馏酒、酿造酒、活性干酵母、酶制剂和发酵调味品等。在大规模的工业化生产中,对原料、发酵过程和成品进行分析检测已成为保证产品质量最为重要的关键环节,而且工业发酵分析已从传统的原料、中间产品和成品分析发展到对生产过程的全程监控分析,这对促进生产工艺进步和实现自控生产的意义是极大的。

近20多年,我国在生物工程技术产业上出现了世界上规模最大的谷氨酸钠(味精)产业、柠檬酸产业和亚洲最大、位居世界第二位的酒精产业。抗生素类产业已成为世界主体,较大数量出口国外。2002年开始我国的啤酒产业跃居世界第一位,现代大型淀粉糖产业、活性干酵母产业相继诞生。这种生物工程技术产业的快速发展和工艺技术的进步,使得工业化发酵产品呈现出多样化,与此同时用于控制生产原料、工艺、半成品和成品的分析检测对象也日渐增多。我们深知,生产设备、生产工艺及分析检测手段是制约、促进和发展发酵工业的主要因素。随着生产设备的更新、生产规模的扩大、生产工艺的不断进步以及分析仪器的推陈出新,检测方法也在不断地发生变化,尤其是伴随着生产设备和工艺水平的提高,与之相应的检测指标要求也越来越高。

工业发酵分析是在学生掌握一定的基础理论知识后培养其独立分析问题、解决问题的能力,使其深入了解并掌握现代研究的手段与方法,从而进一步对发酵设备、工艺、检测能有所创新的基础。未来社会对大学生的要求应该是不但具有发现问题的能力,更要有解决问题的能力,工业发酵分析恰恰体现出二者的有机结合。

基于此,我们组织黑龙江大学、齐齐哈尔大学、哈尔滨商业大学和东北农业大学4所院校的相关教师并参考国内外资料编写了这本《工业发酵分析》。在这本书中将原工业发酵分析方法与大部分仪器分析内容——气相色谱、高效液相色谱、原子吸收分光光度法、氨基酸自动分析仪、气相色谱-质谱联用仪和荧光分光光度法归并在一起,突出各部分的内在联系,使内容更好地整合,节省学时,比较适合现代教学改革的要求。这是本书有别于其他工业发酵分析之处,也是对邓楠同志2006年提出的教材改革意见的体现,因为中国教材正面临着与世界接轨。

本书参编人员除从事工业发酵分析教学和实验的相关教师外,还有专门从事该专业研究的研究所专业人员。同时还得到了发酵酒精企业和制药企业从事生产和分析的工程技术人员的大力支持。

本书编写人员有吴国峰(第1章、第2章、第13章~第19章、第21章、第30章、第34章、第35章);李国全(第4章、第20章、第29章、第36章、附录一);马永强(第8章~第10章、第26章、第28章、第38章);康德福(第3章、第40章、第41章);曾伟民(第5章~第7章、第22章~第25章、第32章、第33章、第42章);江成英(第37章);慕兴华(第11章、第12章、第39章、附录二);邵淑丽(第27章、第31章)。吴国峰和贾树彪负责全书内容的策划、组稿;李盛贤审阅各章初稿,为保证本书的质量起了一定

的作用；吴国峰完成全书的整体编排、文字定稿及书稿校阅；贾树彪对全书进行了审定。

本书编写得到各协作单位的积极配合，化学工业出版社对本书的出版给予支持并提出宝贵的修改意见和建议；黑龙江大学生命科学学院院长平文祥教授、副院长李海英教授，齐齐哈尔大学生命科学与工程学院副院长邵淑丽教授，哈尔滨商业大学食品科学与工程学院院长石彦国教授，东北农业大学工程学院院长李文哲教授给予了大力支持；雷虹、张军、聂纤、付世江、丁明文、靳玉双、姜开荣、张妍妍、谢晓丹等同志为本书的编写提供了很多帮助，在此一并表示诚挚的谢意。

本书编写中虽经多次修改，但由于编者水平有限，还会存在不足和错误，恳请读者批评指正。

编者
于黑龙江大学
2006年5月

目 录

1 水分的测定	1	8.2 仪器和试剂	35
1.1 谷物原料中水分的测定	1	8.3 测定方法	36
1.2 啤酒花中水分的测定	2	8.4 计算	36
1.3 奶酪中水分的测定	3	8.5 讨论	36
1.4 燃料用无水乙醇中微量水分的测定	4	9 糖化酶活力的测定	38
2 糖类的测定	8	9.1 原理	38
2.1 淀粉质原料中粗淀粉的测定	8	9.2 仪器和试剂	38
2.2 糖化醪中还原糖、总糖的测定	11	9.3 测定方法	39
2.3 发酵成熟醪中残还原糖、残总糖的测定	12	9.4 计算	40
3 发酵原料中粗蛋白质的测定	15	9.5 讨论	40
3.1 常量凯氏定氮法	15	10 蛋白酶活力的测定	43
3.2 半微量凯氏定氮法	19	10.1 原理	43
3.3 最新的 AOAC 凯氏定氮测定公认标准方法 (2001)	19	10.2 仪器和试剂	43
4 脂肪的测定	22	10.3 测定方法	44
4.1 玉米胚中脂肪的测定	22	10.4 计算	45
4.2 发酵乳中脂肪的测定	23	10.5 讨论	45
4.3 自动脂肪检测仪简介	25	11 酒母醪质量的分析控制	47
5 糖蜜灰分的测定	26	11.1 糖度和外观耗糖率的测定	47
5.1 原理	26	11.2 酒母醪酸度的测定	48
5.2 仪器和试剂	26	11.3 残还原糖的测定	48
5.3 测定方法	27	12 淀粉糖浆 DE 值的测定	49
5.4 计算	27	12.1 原理	49
5.5 讨论	27	12.2 仪器和试剂	49
6 玉米粉及玉米秸秆中粗纤维素的测定	29	12.3 测定方法	49
6.1 原理	29	12.4 计算	49
6.2 仪器和试剂	29	12.5 讨论	50
6.3 测定方法	29	13 淀粉水解物中低聚糖的分析	52
6.4 讨论	30	13.1 原理	52
7 酿造用水硬度的测定	31	13.2 仪器和试剂	52
7.1 原理	32	13.3 测定方法	52
7.2 试剂	32	13.4 计算	52
7.3 测定方法	33	14 玉米糖浆中糖的定量测定	53
7.4 计算	33	14.1 原理	53
7.5 讨论	33	14.2 仪器和试剂	53
8 耐高温 α-淀粉酶活力的测定	35	14.3 测定方法	53
8.1 原理	35	14.4 计算	53
8.2 仪器和试剂	35	15 糖蜜含糖的测定 (糖锤度计法)	54
8.3 测定方法	36	15.1 原理	54
8.4 计算	36	15.2 仪器	54
8.5 讨论	36		

15.3 测定方法	54	23.2 仪器和试剂	76
15.4 计算	55	23.3 测定方法	77
15.5 讨论	55	23.4 计算	77
16 乙醇浓度(酒精度)的测定	56	23.5 讨论	78
16.1 原理	56	24 蒸馏酒中总醛的测定	79
16.2 仪器和试剂	56	24.1 气相色谱法	79
16.3 测定方法	56	24.2 化学分析法	80
16.4 计算	57	25 蒸馏酒中铅的测定	82
16.5 讨论	57	25.1 氢化物原子荧光光谱法(第一法)	82
17 成品酒精中甲醇、醛、高级醇、酯的测定	59	25.2 石墨炉原子吸收光谱法(第二法)	84
17.1 原理	59	26 柠檬酸含量的测定	86
17.2 仪器和试剂	59	26.1 成品柠檬酸含量的测定	86
17.3 操作条件	60	26.2 发酵醪液中柠檬酸含量的测定	87
17.4 测定步骤	60	27 乳酸含量的测定	89
17.5 计算	60	27.1 L-乳酸占总酸含量的测定	89
17.6 讨论	60	27.2 乳酸含量(纯度)的测定	90
18 酒精的硫酸试验	61	28 维生素C含量的测定	92
18.1 目视比色法	61	28.1 高效液相色谱法测定多种维生素含量	93
18.2 分光光度法	62	28.2 碘量法测定维生素C的含量	94
19 酒精的氧化时间试验	65	28.3 2,6-二氯酚酚滴定法测定维生素C的含量	95
19.1 原理	65	29 酱油中氨基酸态氮的测定	97
19.2 仪器和试剂	65	29.1 原理	97
19.3 测定方法	66	29.2 仪器和试剂	97
19.4 讨论	67	29.3 测定方法	97
20 啤酒原麦汁浓度的测定	68	29.4 计算	98
20.1 原理	68	29.5 讨论	98
20.2 仪器	68	30 味精成品纯度的测定	100
20.3 测定方法	68	30.1 原理	100
20.4 计算	69	30.2 仪器和试剂	100
20.5 讨论	69	30.3 测定方法	101
21 啤酒中双乙酰的测定	71	30.4 计算	101
21.1 原理	71	30.5 讨论	101
21.2 仪器和试剂	71	31 抗生素效价的测定	103
21.3 测定方法	71	31.1 微生物检定法	103
21.4 计算	72	31.2 理化方法	105
21.5 讨论	72	31.3 某药厂青霉素发酵液的效价测定方法	107
22 啤酒中甲醛残留量的测定	73	32 青霉素发酵液中苯乙酸残留量的测定	109
22.1 测定原理	73	32.1 原理	109
22.2 仪器和试剂	73	32.2 仪器和试剂	109
22.3 测定方法	74	32.3 色谱条件	109
22.4 计算	75	32.4 测定	109
22.5 讨论	75		
23 蒸馏酒中总酯的测定	76		
23.1 原理	76		

32.5 计算	110	39.2 荧光分光光度计的结构及各部件功能	193
32.6 讨论	110	39.3 荧光分光光度计的使用	196
33 酸牛乳中山梨酸、苯甲酸的测定	111	39.4 荧光分光光度分析的影响因素	199
33.1 气相色谱法(第一法)	111	39.5 注意事项	199
33.2 高效液相色谱法(第二法)	112	40 原子吸收分光光度法	200
34 乳酸酸菜质量的检测	115	40.1 原子吸收分光光度计的基本结构	201
34.1 乳酸酸菜中亚硝酸盐含量的测定	115	40.2 原子吸收分光光度计的工作原理	209
34.2 乳酸酸菜中乳酸含量的测定	117	40.3 原子吸收分析的实验技术	210
34.3 乳酸酸菜中挥发酸的测定	117	40.4 原子吸收分析中的干扰效应及抑制方法	214
35 气相色谱	119	40.5 原子吸收的定量分析方法	218
35.1 气相色谱的基本理论	119	40.6 原子吸收分光光度计使用注意事项	219
35.2 气相色谱仪	126	40.7 国内外原子吸收分光光度计发展简介	222
35.3 气相色谱的应用	136	41 样品的采集与处理	224
36 气相色谱-质谱联用仪	144	41.1 样品的代表性	224
36.1 GC-MS联用仪的定义及分类	144	41.2 样品处理的原则及方法	224
36.2 GC-MS联用仪的结构及其工作原理	144	42 实验数据处理与分析结果的可靠性评价	228
36.3 GC-MS联用仪对GC和MS的要求	148	42.1 分析结果的可靠性评价	228
36.4 GC-MS法的优点	149	42.2 实验数据处理	231
36.5 GC-MS联用仪操作要点	150	42.3 有限量实验数据的统计检验	233
36.6 GC-MS联用仪的应用	150	42.4 相关与回归	237
37 高效液相色谱	152	附录一	240
37.1 高效液相色谱的基本理论	153	附表1 费林试剂糖量表(廉-爱农法)	240
37.2 高效液相色谱仪的主要结构与性能	155	附表2 吸光度与测试 α -淀粉酶浓度对照表(QB 1805.1-93)	240
37.3 高效液相色谱的固定相	165	附表3 糖锤度测定值与温度校正值	243
37.4 高效液相色谱的流动相	166	附表4 酒精计示值换算成20℃时的乙醇浓度(酒精度)	245
37.5 高效液相色谱在发酵工业中的应用	173	附表5 20℃时酒精体积分数、质量分数、密度对照表	246
38 氨基酸自动分析仪	175	附表6 相对密度和可溶性浸出物对照表	252
38.1 基本原理	175	附表7 压力换算表	256
38.2 氨基酸分析仪的结构性能	180	附录二 工业发酵分析中关键词中英文对照	257
38.3 试样的前处理方法	183	参考文献	264
38.4 Hitachi L-8800型全自动氨基酸分析仪操作程序	186		
38.5 使用氨基酸分析仪的注意事项	187		
38.6 用Hitachi L-8800型全自动氨基酸分析仪测定啤酒中的游离氨基酸	189		
38.7 反相分配色谱氨基酸分析仪	190		
39 荧光分光光度分析	193		
39.1 分子荧光概述	193		

1 水分的测定

水分测定在工业发酵中是一个极为重要的分析项目。原料中的水分对原料的品质与保存影响甚大。水分过高，原料贮藏时容易发霉变质，使其利用率下降。对于发酵产品，如味精、活性干酵母、奶酪等，水分是其重要的质量指标。

1.1 谷物原料中水分的测定

工业发酵用谷物原料主要有玉米、豆粕、小麦、大米、大麦和高粱等，其水分测定采用常压干燥法。

1.1.1 原理

发酵原料（或食品）中的水分是指在常压下、100~105℃加热，或在减压条件下、55~70℃加热后所失去的物质的质量。但实际上在此温度下所失去的是水和挥发性物质的总量，而不完全是水。同时应指出，在该条件下除去样品中的结合水是困难的。因此对水分更精确的描述，宜用水分活度值。

1.1.2 仪器

电热恒温鼓风干燥箱；电子天平（0.1mg）；干燥器；称量瓶。

1.1.3 测定方法

将试样粉碎后，过40目筛。

取洁净的扁形称量瓶，置于（100±5）℃电热恒温鼓风干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，干燥2h，盖好取出，立即放入干燥器内冷却30min，称重。再放入（100±5）℃干燥箱中干燥1h，取出，放入干燥器内冷却30min后称重。重复干燥至恒重（前后两次质量差不超过0.5mg）。

准确称取2~5g样品于上述已恒重的称量瓶中（样品厚度不宜超过5mm），置（100±5）℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，干燥3h，盖好取出，立即放入干燥器内冷却30min后称重。再放入（100±5）℃干燥箱中干燥2h，取出后立即置于干燥器内冷却30min，称重。重复干燥至恒重。

1.1.4 计算

$$\text{水分} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100\%$$

式中 m_0 ——称量瓶的质量，g；

m_1 ——称量瓶和样品干燥前的质量，g；

m_2 ——称量瓶和样品干燥后的质量，g。

1.1.5 讨论

① 本法操作简单，结果准确，但比较费时，且不适合胶体、高脂肪、高糖样品及含有

较多的高温易氧化、易挥发物质的样品。

② 本法测得的水分实际上还应包括微量的芳香油、醇、有机酸等挥发性物质。

③ 本法操作时，须戴干净的白细线手套接触称量瓶，否则手上的汗渍、油渍等将导致称量瓶难以恒重。

④ 当原料中的水分大于 16% 时，在原料粉碎过程中水分会有较大损失，因此需在低温下（约 60℃）预先将水分干燥至 12%~14%，此时测得的水分称为前水分。然后将原料粉碎，准确测定其水分，此时测得的水分称为后水分。原料总水分为：

$$\text{总水分} = [1 - (1 - \text{后水分}\%) \times (1 - \text{前水分}\%)] \times 100\%$$

⑤ 发酵工业生产中常用的活性干酵母含水量为 5%~8%，属含水量较低的产品，其水分测定采用该方法时需要注意样品开封后应及时测定，以免吸湿；干燥温度不宜高于 103℃；初次干燥时间以 5h 为宜（见中华人民共和国轻工行业标准 QB 2074—95）。

⑥ 本方法最低检出量为 0.002g，取样量为 2g 时，方法检出限为 0.10g/100g，方法相对误差 ≤5%。

1.2 啤酒花中水分的测定

啤酒花中含有易挥发的芳香油，如用常压干燥法测定水分，不可避免地将这部分挥发性物质连同水分失去，造成分析上的误差。此外，啤酒花中的 α-酸等在干燥过程中，会部分发生氧化等化学反应，这也是造成误差的因素之一。所以测定啤酒花中的水分宜采用减压（真空）干燥法。

1.2.1 原理

在减压条件下，水的沸点降低，可在比较低的温度下进行干燥以排除水分，样品质量减少的量即为样品中的水分含量。本法适用于在 100℃ 以上加热容易变质及含有不易除去结合水的样品，测定结果比较接近样品所含的真实水分。

1.2.2 仪器

真空干燥箱；电子天平（0.1mg）；干燥器；称量瓶。

1.2.3 测定方法

啤酒花经粉碎，过 40 目筛后，准确称取该啤酒花试样 3~5g，置入已干燥至恒重的称量瓶中，再放入真空干燥箱内。启动真空泵，抽出干燥箱内空气至所需压力（一般为 40~53kPa），同时打开电源，加热至所需温度（55±5）℃，关闭真空泵的开关，停止抽真空，使干燥箱内保持该温度及压力 3h。打开真空泵开关，使空气经干燥装置缓缓通入干燥箱内，待干燥箱内恢复常压后再打开箱门。取出称量瓶，立即放入干燥器中冷却 30min 后称重。再于相同条件下干燥 2h，同上操作，直至恒重。

1.2.4 计算

同 1.1.4 节。

1.2.5 讨论

① 本法适用于胶状样品、高温易分解的样品及含水量较多的样品，如淀粉制品、豆制品、味精、玉米糖浆等。由于采用较低的蒸发温度，可防止含脂肪高的样品中的脂肪在高温下氧化；含糖高的样品在高温下脱水炭化；也可防止含高温易分解成分的样品在高温下分解。

② 本法一般选择压力为 40~53kPa，温度为 50~60℃。但实际应用时可根据样品性质

及干燥箱耐压能力不同而调整压力和温度。如美国官方分析化学家协会 (AOAC) 的方法中咖啡: 3.3kPa 和 98~100℃; 奶粉: 13.3kPa 和 100℃; 干果: 13.3kPa 和 70℃; 坚果和坚果制品: 13.3kPa 和 95~100℃; 糖及蜂蜜: 6.7kPa 和 60℃等。

1.3 奶酪中水分的测定

奶酪含水量较高又易发生油脂氧化, 宜用蒸馏法, 即采用水与与其不相溶的有机溶剂组成的二元或三元共沸体系进行蒸馏, 其沸点低于体系中各组分的沸点, 从而保持样品中易挥发、易氧化成分不受损失。

1.3.1 原理

在水分测定蒸馏器中加入比水轻且与水互不相溶的有机溶剂和样品, 加热时使水分与有机溶剂共同蒸出, 水冷凝回流落入接收管的下部, 有机溶剂浮在水面。当流入接收管的有机溶剂液面高于接收管的支管时, 就流回至烧瓶中。待水分体积不再增加, 读取其体积即得到样品的水分含量。

常用的试剂有甲苯 (111℃, 相对密度 0.8669) 和二甲苯 (140℃, 相对密度 0.8685)、正戊醇 (137.8℃, 相对密度 0.812~0.819)。由于一些样品中含有大量的挥发性物质, 如醚类、芳香油、挥发酸、氨和 CO₂ 等, 用干燥法测定误差较大, 使用蒸馏法较为准确。

1.3.2 仪器和试剂

(1) 仪器 水分测定蒸馏器 (如图 1-1 所示)。

(2) 试剂 二甲苯+正戊醇 (1+1): 取二甲苯、正戊醇各 50mL, 先以水饱和后, 分去水层, 进行蒸馏, 收集馏出液备用。

1.3.3 测定方法

将楔形块状奶酪切成条, 用食品切碎机切 3 次; 或将楔形奶酪放在食品切碎机中捣碎, 也可切成细条再混匀。

准确称取适量样品 (含水 2~5mL), 放入水分测定蒸馏器的烧瓶中, 加 75mL 新蒸馏的二甲苯+正戊醇 (1+1), 连接水分测定蒸馏器装置。从冷凝管顶端注入二甲苯+正戊醇 (1+1), 装满水分接收管。加热, 缓慢蒸馏 (每秒馏出约 2 滴), 待大部分水分蒸出后, 加快蒸馏速度至 4 滴/s, 待水分全部蒸出, 接收管内的水分体积不再增加时, 从冷凝管顶端加入二甲苯+正戊醇 (1+1) 冲洗。如冷凝管壁附有水滴, 再蒸馏片刻, 直至接收管上部及冷凝管壁无水滴附着为止。准确读取接收管内水层的体积。

1.3.4 计算

$$\text{水分} = \frac{0.9982 \times V}{W} \times 100\%$$

式中 V——水分测定蒸馏器接收管中水的体积, mL;

W——样品的质量, g;

0.9982——20℃时水的密度, g/mL。

1.3.5 讨论

① 本法与干燥法有较大的差别, 干燥法是以经干燥后样品减少的质量为依据, 而蒸馏法是以蒸馏收集到的样品中的水量为准, 避免了挥发性物质减少及脂肪氧化对水分测定的误

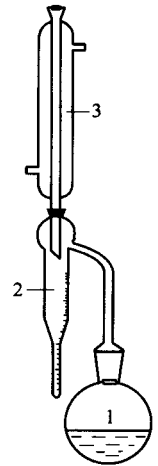


图 1-1 水分测定蒸馏器

1—250mL 蒸馏烧瓶;

2—水分刻度接收管;

3—冷凝管

差。因此适用于含水分较多又有较多挥发性成分的发酵食品及香辛料等。蒸馏法是香料唯一公认的水分检验分析方法。

② 一般加热时要用石棉网，如样品含糖量高，用油浴加热较好。

③ 样品如为粉状或半流体，须先将瓶底铺满干净海沙，再加入样品及共沸溶剂。

④ 所用共沸溶剂必须无水，可取甲苯或二甲苯，先以水饱和后，分去水层，进行蒸馏，收集馏出液备用；也可将甲苯或二甲苯经过氯化钙或无水硫酸钠干燥，过滤蒸馏，弃去最初馏液，收集澄清透明溶液得无水甲苯、二甲苯。

⑤ 所用仪器必须刷洗干净，否则接收管和冷凝管壁将附着水珠。

⑥ 加热温度不宜太高，温度太高使冷凝管上端的水蒸气难以全部回收；蒸馏时间因样品而异，一般需 2~3h。

⑦ 有机溶剂用后，可用蒸馏法回收，以备再用。

⑧ 水与甲苯形成共沸物，84.1℃ 沸腾；水与二甲苯形成共沸物，92℃ 沸腾；水与苯形成共沸物，69.4℃ 沸腾。

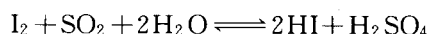
⑨ 对不同的样品，可以选择不同的蒸馏共沸溶剂。甲苯多用于测定大多数香辛料；己烷用于测定含糖高的香辛料；对于高温易分解的样品用苯做共沸溶剂。

1.4 燃料用无水乙醇中微量水分的测定

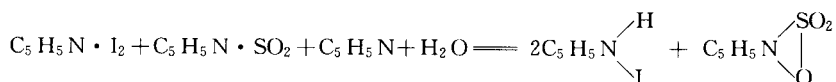
燃料用无水乙醇中含水量以不超过 0.8%（体积分数）为合格，所以燃料用无水乙醇的含水量宜采用适于微量水分测定的卡尔费休（Karl Fischer）法来测定。

1.4.1 原理

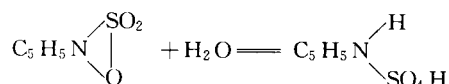
Karl Fischer 法测定微量水分，是碘量法在非水滴定中的一种应用。基本原理是当碘氧化二氧化硫时，需要定量的 H_2O ，反应如下：



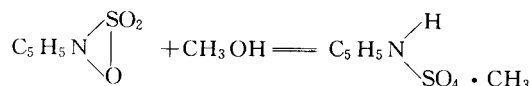
该反应是可逆的，欲使反应向右进行，应在碱性条件下。一般采用吡啶（ C_5H_5N ）做溶剂，发生下列反应：



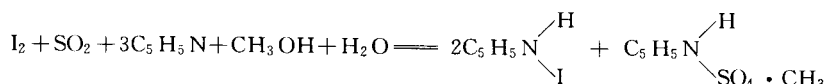
生成的硫酸酐吡啶 $\left[C_5H_5N \begin{array}{l} \diagup SO_2 \\ \diagdown O \end{array} \right]$ 很不稳定，可与水发生副反应，消耗一部分水，因而干扰测定。



若有无水 CH_3OH 存在，可防止上述副反应发生。



故滴定时的标准溶液是含有 I_2 、 SO_2 、 C_5H_5N 及无水 CH_3OH 的混合溶液，此溶液称为 Karl Fischer 试剂，总反应式为：



通常用纯水作为基准物标定 Karl Fischer 试剂，以 I_2 为自身（Karl Fischer 试剂的）指示剂。Karl Fischer 试剂具有 I_2 的棕色，与 H_2O 反应时，棕色立即褪去，当溶液中再次出现棕色时，表示到达终点。

从反应式可以看出 1mol H_2O 需要 1mol I_2 、1mol SO_2 和 3mol C_5H_5N 及 1mol 无水 CH_3OH ，反应生成 2mol 氢碘酸吡啶、1mol 甲基硫酸氢吡啶。反应结束后多余的游离碘呈现红棕色，即可确定为终点。这种确定终点的方法适用于含有 1% 或更低水分的样品，误差很小。

测定样品中微量水分或测定深色样品时常用“永停法”来确定终点。其原理是浸入溶液中的电极加 10~25mV 电压，当溶液中全部为碘化合物而无游离碘时，电极间极化无电流通过；当溶液中有游离碘时，体系呈去极化，溶液导电，有电流通过，微安表指针偏转至一定刻度并保持不变，即为终点。上海化工研究院研制的 KF-1 型微量水分测定仪具有“永停法”装置。梅特勒托利多（METTLER TOLEDO）生产的微量水分测定仪也应用了该原理。

1.4.2 仪器和试剂

(1) 仪器 自动 Karl Fischer 滴定仪（见图 1-2）；电子天平（0.1mg）；微量注射器 25 μ L、50 μ L。

(2) 试剂

① Karl Fischer 试剂 稳定性好，每毫升试剂约相当于 5mg 水，须用可靠的成品。

② 无水甲醇 水分含量小于 0.05%（质量分数）。

③ 水标准溶液 普通蒸馏水经石英亚沸蒸馏器再次蒸馏的重蒸水或三次蒸馏水。

④ 水-甲醇标准溶液（1mL 溶液含 10mg 水）准确吸取 1.00mL 水标准溶液于预先充分干燥、盛有约 50mL 无水甲醇溶剂的 100mL 容量瓶中，用无水甲醇定容，混匀备用。

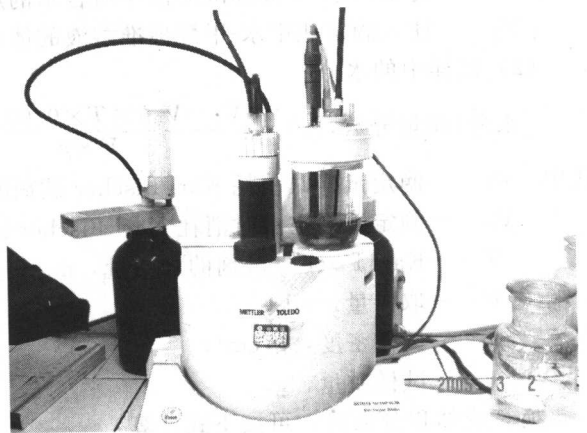


图 1-2 自动 Karl Fischer 滴定仪

1.4.3 测定方法

(1) 标定 Karl Fischer 试剂 可用水标准溶液或水-甲醇标准溶液进行标定。

吸取 25~50mL 无水甲醇加入到无水洁净的滴定瓶中，按照滴定仪操作说明书进行溶剂的预滴定，直至滴定终点。

按质量法称取水标准溶液或按体积法吸取水-甲醇标准溶液。

① 按质量法称取水标准溶液 用微量注射器吸取约 20 μ L 水标准溶液，用滤纸揩去针头外部附着的微量水滴，将注射器放入与仪器配套的电子天平中称量，然后迅速打开进样口的塞子，将其注入到滴定瓶中（注意：最后一滴水应吸回针管中，不要残留在针头外），将微量注射器重新放回电子天平中称量，用减量法算得实际加入水标准溶液的质量，精确至 0.0001g，输入到仪器中，设定和启动用水标定时参数和程序进行自动滴定直至终点。Karl Fischer 试剂的消耗量及水当量结果自动显示或打印出来。

② 按体积法吸取水-甲醇标准溶液 准确吸取 2.00mL 水-甲醇标准溶液，迅速打开进样口的塞子，将其注入到滴定瓶中，设定和启动用水-甲醇标准溶液进行标定时参数和程序

进行自动滴定直至终点。Karl Fischer 试剂的消耗量及水当量结果自动显示或打印出来。

(2) 测定 准确吸取 5.00mL 燃料乙醇试样，同标定时一样，先量取 25~50mL 无水甲醇加入到无水洁净的滴定瓶中，按仪器操作说明书要求，启动样品测定程序，用 Karl Fischer 试剂滴定直至终点。消耗 Karl Fischer 试剂的体积和试样的含水量以质量分数 (%) 自动显示并打印出来。

1.4.4 计算

(1) Karl Fischer 试剂的水当量 (T)

$$T = \frac{m_1}{V_1}$$

或

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

式中 T ——Karl Fischer 试剂的水当量，mg H₂O/mL；

m_1 ——注入滴定瓶中水的质量，mg；

V_1 ——标定时消耗 Karl Fischer 试剂的体积，mL；

c ——每毫升水-甲醇标准溶液中所含水的质量，mg/mL；

V_2 ——注入滴定瓶中水-甲醇标准溶液的体积，mL。

(2) 试样中的水分

$$\text{水分(质量分数, \%)} = \frac{(V_1 - V_0) \times T \times 0.001 \times 100}{V \times \rho} = \frac{(V_1 - V_0) \times T \times 0.001 \times 100}{m}$$

式中 V_1 ——滴定试样时消耗 Karl Fischer 试剂的体积，mL；

V_0 ——滴定试剂空白时消耗 Karl Fischer 试剂的体积，mL；

T ——Karl Fischer 试剂的水当量，mg H₂O/mL；

V ——取样量，mL；

ρ ——试样密度，g/cm³；

m ——试样质量，g。

换算成体积分数时，可按下式计算：

$$\text{水分(体积分数, \%)} = \frac{\text{水分(质量分数, \%)} \times \rho_1}{\rho_2}$$

式中 ρ_1 ——20℃时试样的密度，g/cm³；

ρ_2 ——20℃时水的密度，g/cm³。

取两次重复测定结果的算术平均值作为试样中水分含量，精确至 0.01% (体积分数)。

1.4.5 讨论

① Karl Fischer 法只要有现成仪器及配制试剂，它是迅速而准确测定水分的方法，是化工产品水分测定的主要方法之一，常被作为水分特别是痕量水分的标准测定方法。

② Karl Fischer 法属于非水滴定法，所用容器均需按程序严格净化、干燥。

③ 本方法源于 GB 18350—2001 (采用无吡啶 Karl Fischer 试剂和自动滴定仪)，作者略有修改。

④ 该方法重现性：在同一实验室，同一分析者使用同一台仪器分析同一样品，重复测定所得结果之差不应超过 0.008% (体积分数)。

⑤ 测定时取样量可根据样品水分含量高低的情况增减，一般水分含量在 0.2% (质量分数) 左右时，取样 5.00mL；水分含量在 0.5% (质量分数) 左右时，可取样 2.00mL。

⑥ Karl Fischer 试剂需每天标定。

⑦ Karl Fischer 试剂的制备。

a. 无水甲醇 (CH_3OH): 含水量 $< 0.05\%$ 。量取甲醇 200mL 置干燥圆底烧瓶中, 加光洁镁条 15g 与碘 0.5g, 安装冷凝装置, 冷凝管的顶端和接受器支管上要装上氯化钙干燥管, 当加热回流至金属镁开始转变为白色絮状时, 再加入甲醇 800mL, 继续回流至镁条溶解。分馏, 用干燥的吸滤瓶做接收器, 收集 $64\sim 65^\circ\text{C}$ 馏出的甲醇。

b. 无水吡啶 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$): 含水量 $< 0.1\%$ 。吸取吡啶 200mL, 置于干燥的蒸馏瓶中, 加 40mL 苯 (C_6H_6), 加热蒸馏, 收集 $110\sim 116^\circ\text{C}$ 馏出的吡啶。

c. 碘 (I_2): 将碘置于硫酸干燥器内干燥 48h 以上。

d. 无水硫酸钠 (Na_2SO_4): 无水甲醇和无水吡啶宜加入无水 Na_2SO_4 保存。

e. 硫酸 (H_2SO_4)。

f. 二氧化硫 (SO_2): 钢瓶装的 SO_2 (SO_2 压缩气体) 或 H_2SO_4 分解亚硫酸钠 (Na_2SO_3) 制得。

g. 5A 分子筛。

h. Karl Fischer 试剂: 称取 85g 碘于干燥的 1L 具塞棕色玻璃试剂瓶中, 加入 670mL 无水甲醇, 盖上瓶塞, 摇动至碘全部溶解后, 加入 270mL 无水吡啶混匀, 然后置于冰水浴中冷却, 通入干燥的 SO_2 气体 $60\sim 70\text{g}$, 通气完毕后塞上瓶塞, 放置暗处至少 24h 后使用。

⑧ 试验表明, Karl Fischer 法测定样品的水分等于烘箱干燥法测定的水分加上干燥法烘过的样品经 Karl Fischer 法测定的残留水分, 说明 Karl Fischer 法测定水分也能将样品中的结合水测定出来, 反映样品实际水分含量。所以测定样品中水分活度值也可按照此方法的原理进行。

2 糖类的测定

糖类是发酵微生物所需要的主要碳源，工业发酵中的糖类主要有淀粉、糊精、双糖、单糖等。

糖类的测定在工业发酵中具有特别重要的意义。原料中淀粉含量是原料的重要质量指标；发酵过程中可以根据糖量的变化判断发酵是否正常；发酵（如谷氨酸等）生产中，也需测定发酵醪中的残糖含量以确定发酵终止时间。此外，淀粉酶、糖化酶的活力测定实际上也是通过测定糖量进行计算的。

2.1 淀粉质原料中粗淀粉的测定

测定淀粉质原料（玉米、小麦、大麦、马铃薯、甘薯、木薯等）中淀粉含量的目的是掌握购进原料的质量（可利用性），进而估计原料的成品产率，如玉米的酒精产率等。

测定原料中淀粉含量的方法较多，但均需将淀粉水解成单糖，通过测定单糖含量计算原料中淀粉的含量。

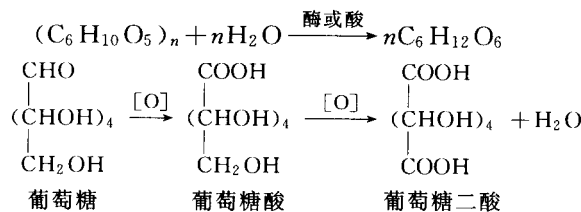
淀粉是多糖类物质，可逐步水解为短链淀粉、糊精、麦芽糖、葡萄糖。工业上将淀粉水解成糖常用的方法曾有 3 种：酸解法、酸酶法和双酶法。其中，双酶法制糖因具有葡萄糖值（DE 值）高的优势，在发酵企业已取代了酸解法和酸酶法而成为常规工艺。根据淀粉糖生产企业资料，不同的糖化工艺所得糖化液（醪）的葡萄糖值（DE 值）不同——酸解法 91%、酸酶法 95%、双酶法 98%。可以看出，双酶法葡萄糖值最高、糖液杂质（灰分、羟甲基糠醛、色素等）最少，糖的精制较容易。

依据上述资料分析，并通过实验室比对实验已认定，淀粉质原料中淀粉含量的测定，其淀粉水解以双酶法为宜，因它可提高淀粉含量测定的准确度。但廉-爱农（Lane-Eynon）法仍是测定糖类最经典的传统方法，现在也是国内发酵企业的通用方法。

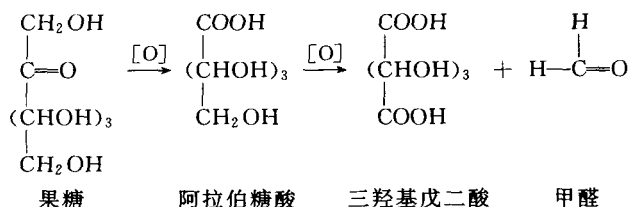
2.1.1 廉-爱农法测糖原理

葡萄糖（或还原糖）能还原铜盐类（以酒石酸钾钠铜为最显著）为氧化亚铜（ Cu_2O ）红色沉淀。主要反应如下。

① 淀粉经水解生成葡萄糖，葡萄糖中的醛基易被氧化。



② 对于果糖的比例大致相同，即果糖会变成甲醛和三羟基戊二酸。反应式如下：

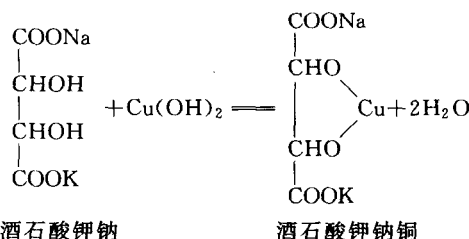


视氧化能力的不同，氧化作用还可继续进行，结果是碳链断裂（最后成为 CO_2 ）。

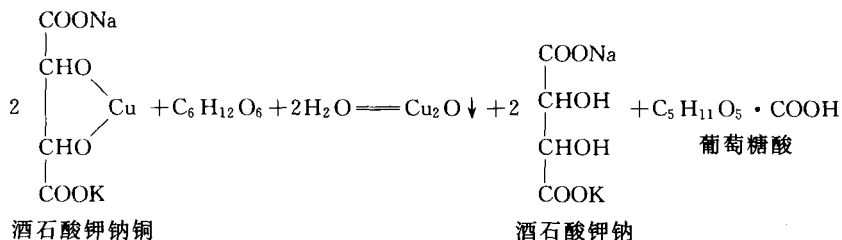
③ 费林（Fehling）试剂是一种氧化剂，由甲液和乙液组成，甲液为 CuSO_4 溶液，乙液为 NaOH 和酒石酸钾钠（ $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ）溶液，平时甲液、乙液分别贮存，使用时等体积混合。混合后， CuSO_4 和 NaOH 反应，生成蓝色的 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀。



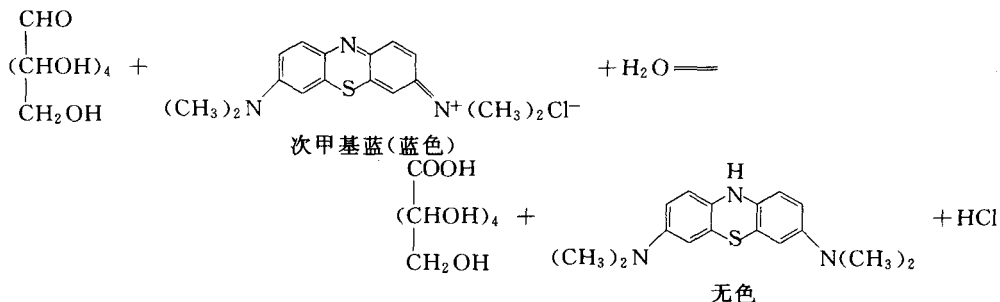
生成的 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀与酒石酸钾钠反应，生成天蓝色的酒石酸钾钠铜配合物，使 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 溶解。



该配合物与还原性物质共热时，二价铜被还原成一价的 Cu_2O 红色沉淀。此沉淀不溶于碱性的费林试剂，它在刚开始沉淀时，沉淀物常因微粒太小而呈黄色或绿色，颗粒加大则变成红色（有某种非糖物质存在时，沉淀仍保持黄色）。



反应终点用次甲基蓝指示剂显示。因次甲基蓝氧化能力较二价铜弱，故待二价铜全部还原后，过量一滴还原糖即使次甲基蓝还原，溶液蓝色消失以示终点。



2.1.2 仪器和试剂

- (1) 仪器 电子天平（0.1mg）；电热恒温水浴锅；回流装置（250mL）；调温电热套。
- (2) 试剂

① 费林试剂 甲液：称取 69.3g 硫酸铜（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ），用水溶解并稀释至