

# 营养与食品卫生学

## 实验教程

华西医科大学公共卫生学院  
营养与食品卫生学教研室

一九八六年十二月

# 目 录

实验须知	1
第一部分 食物营养成分分析与人体营养状况的评价方法	4
一、食物营养成分分析	4
(一) 采样原则与方法	4
(二) 水份的测定	6
(三) 灰份的测定	7
(四) 蛋白质的测定	8
(五) 色氨酸的测定	10
(六) 脂肪的测定	12
(七) 总糖的测定	13
(八) 粗纤维的测定	15
(九) 钙的测定	17
(十) 磷的测定	18
(十一) 铁的测定	19
(十二) 锌的测定	20
(十三) 维生素D的测定	22
(十四) 蔬菜中胡萝卜素的测定	24
(十五) 硫胺素的测定	26
(十六) 核黄素的测定	28
(十七) 抗坏血酸的测定	30
(十八) 总尼克酸的测定	37
二、人体营养状况的评价方法	39
(一) 膳食调查	39
(二) 营养状况的体格检查	43
(三) 血样的收集和保存	55
(四) 血清总蛋白的测定	57
(五) 血红蛋白的测定	59
(六) 红细胞压积的测定	61
(七) 全血游离原卟啉的测定	62
(八) 血清运铁蛋白的测定	63

(九) 血清总胆固醇的测定	64
(十) 血清甘油三酯的测定	66
(十一) 血清铁蛋白的测定	68
(十二) 头发和血浆中锌、铜、铁的测定	68
(十三) 血清硷性磷酸酶的测定	70
(十四) 血清维生素A的测定	71
(十五) 血清钙的测定	72
(十六) 全血谷胱甘肽还原酶活性系数的测定	73
(十七) 全血转羟乙醛酶活性的测定	75
(十八) 尿样的收集和保存	77
(十九) 尿中硫胺素的测定	77
(二十) 尿中核黄素的测定	79
(二十一) 尿中抗坏血酸的测定	80
(二十二) 尿中N <sup>1</sup> -甲基尼克酰胺的测定	84
(二十三) 尿中肌酐的测定	85
(二十四) 尿中羟辅氨酸的测定	86
(二十五) 评价人体营养状况的生化参考指标	88
(二十六) 食谱的编制	89
<b>第二部分 食品卫生检验和食品卫生学调查</b>	<b>91</b>
一、采样原则与方法	91
二、食品卫生质量的检查	92
(一) 食品感官检验	92
(二) 肉与肉制品中挥发性盐基氮的测定	93
(三) 奶比重的测定	94
(四) 奶脂的测定	96
(五) 奶酸度的测定	97
(六) 奶的消毒效果试验	98
(七) 奶中总汞的测定	99
(八) 乳及乳制品中黄曲霉毒素M <sub>1</sub> 的测定	100
(九) 食品中氯化钠的测定	103
(十) 酒中杂醇油的测定	106
(十一) 酒中甲醇的测定	107
(十二) 食用油酸价的测定	107
(十三) 食用油过氧化值的测定	110
三、食品有害物质的检验	111
(一) 霉菌数的测定	111
(二) 黄曲霉毒素B <sub>1</sub> 的测定	113
(三) 有机氯农药残留量的测定	118

(四) 有机磷农药的测定	121
(五) 鱼类组胺的测定	124
(六) 几种化学毒物的快速测定	126
(七) 硝酸盐及亚硝酸盐含量的测定	134
四、食品添加剂的检验	137
(一) 酱油中苯甲酸钠的测定	137
(二) 糖精钠的测定	138
(三) 人工合成食用色素的测定	141
(四) 饮料中二氧化硫的测定	144
五、食品容器、食具及包装材料中有害物质的检验	146
(一) 样品的采集、处理和计算	146
(二) 塑料制品的检验	149
(三) 搪瓷制品的检验	151
(四) 陶瓷制品的检验	154
(五) 橡胶浸出液的检验	154
(六) 食品包装用纸的检验	156
六、食品的微生物学检验	157
(一) 细菌总数的测定	157
(二) 大肠菌群最近似数的测定	162
七、食品卫生学调查	166
附录:	174
一、元素原子量表	174
二、主要试剂分子量和当量表	177
三、常用指示剂的配制	179
四、常用标准溶液的配制和标定	180
五、常用无机化合物在水中的溶解度	192
六、基准物质的干燥	197
七、常用物质干燥条件	197
八、不同浓度乙醇的配制	199
九、常用酸碱浓度表	200
十、缓冲液的组成与 pH 值	200
十一、实验数据的处理	201
十二、滤光片的选择	202
十三、每日膳食中营养素供给量	203
十四、食品包装材料卫生标准	204
十五、常用洗涤液	207
十六、玻璃容量器皿的校准	208

# 实 验 须 知

(一) 经常保持实验室的清洁和整齐是作好实验最基本的条件。

室内要做到地面清洁, 窗明桌净。使用的仪器药品分类有秩序地放在取用方便而不易被碰撞的地方, 用后及时放回原处。药品取用后, 应及时加盖。仪器如吸管、滴管等应放在架上, 绝不能直接放在台面上。

(二) 凡未使用过的仪器, 必须请示教师或仔细看了使用说明之后才许使用。使用时必须按正规操作。

(三) 一切电源仪器在接插头之前必须弄清要求的电压是多少, 接在所需电压的插座上。在接插头之前, 应将仪器上的开关关上, 插头接稳后, 再开仪器上的开关。关仪器时, 应先关仪器开关, 后取电源插头。

(四) 使用冰箱及电热恒温箱、烤箱时, 应注意以下事项:

1. 应轻轻地开关箱门, 物品取放后应马上关闭。
2. 在放入物品之前, 应先看箱上温度计所指示的温度是否与你所需的相符, 若相符则可放入, 若不相符, 则应调整至所需温度后始能放入; 但应注意若箱内已放有他人的物品, 则放入或调整温度都必须取得他人同意后才能进行。
3. 一切放入箱内的物品必须作好标记(包括编号、品名、分析项目、时间、试验者姓名等)。

(五) 凡产生刺激性或毒性气体的实验必须在通风橱中进行。若无通风橱则应在空旷处进行。

(六) 玻璃仪器的洗涤和干燥:

1. 一般玻璃仪器如烧杯、烧瓶、试管、量筒等不必使用洗液, 按下列程序洗涤:
  - (1) 普通自来水冲洗;
  - (2) 用肥皂或洗涤剂刷洗;
  - (3) 用自来水冲净肥皂或洗涤剂;
  - (4) 用蒸馏水冲洗三次;
  - (5) 倒置在适合的架上滴干。
2. 滴定管、吸管、滴管及容量瓶等不宜刷洗或不易刷洗的仪器的洗涤程序如下:
  - (1) 普通自来水冲洗;
  - (2) 洗液浸泡;
  - (3) 取出后, 用自来水冲净洗液;
  - (4) 用蒸馏水冲洗三次(吸管或滴管最好是吸放蒸馏水三次);
  - (5) 倒置适合的架上滴干。
3. 若洗后马上要用, 则不必进行倒放滴干。可根据不同情况作不同的处理。
  - (1) 若器皿需要干燥, 则可用以下方法:
    - a. 先用酒精后用乙醚洗, 最后用热风吹干。
    - b. 放烘箱中烘干。
  - (2) 若器皿中残存水份只是对欲取试剂或样品液的浓度有影响, 此时可用原液冲洗3次即可。
4. 吸取过胶态物质如牛奶, 血液等的吸管应及时用清水或淡硷液预洗后, 再按以

上程序洗涤。

5. 作微生物实验后的吸管, 玻片等小器皿以及不便加热消毒的器皿, 应先于消毒液中浸泡, 其它器皿则应煮沸消毒, 然后再进行洗涤。

6. 必要时按附录选择适当洗涤剂进行洗涤。

(七) 废物处理:

1. 一般实验废液可直接倒入水槽中。

2. 强酸、强碱对水槽及下水道金属管有腐蚀性, 绝不能倒入水槽, 只能倒入特设的废液缸中。

3. 作病原微生物实验后的废物, 必须焚烧或煮沸消毒后才能倒掉。

4. 一切固体废物如滤纸、火柴杆、棉花等绝不能丢在水槽中, 应丢在特设的固体废物框或缸中。

5. 若废物中尚含有大量可以回收使用的成份, 如用过的有机溶剂则应分别倒入待回收的专用瓶中。

(八) 试剂瓶上必须贴上标签(最好先贴后装)。标签应标明试剂名称、浓度、用途、配制日期, 贴在瓶身上部三分之一处。若试液放置时间较长或有腐蚀性, 标签上最好涂上一层石蜡。

(九) 在同一实验中, 使用的器皿应作上标记, 专药专用, 不得混淆。不得直接从标准溶液瓶或大试剂瓶中取用溶液, 应先倒在小烧杯中, 再吸取。已取出而未用完的溶液绝不能倒回原瓶。取用试剂后应马上盖紧瓶塞。易潮解的药品, 取用后马上蜡封。存放浓硷液宜用塑料瓶或在玻璃瓶内壁涂上一层石蜡膜并盖以橡皮塞。稀硷液可盛入带橡皮塞的玻璃瓶中。

(十) 用标准硷溶液滴定时, 必须用硷式滴定管。

(十一) 使用具有玻璃活塞的仪器时(如滴定管、分液漏斗、气体分析器等), 必须事先检查活塞是否已涂油, 是否畅通, 是否漏气, 漏液, 是否旋转灵活。

(十二) 使用吸管前必须事先查明是否要放完, 是否需要吹, 再行使用。流出过慢的吸管, 不适于微生物学实验用。吸管使用后, 应放在吸管架的固定位置上, 吸管尖端应低于上端, 不能直接放在实验台上。

(十三) 干燥器盖取下后, 不能将涂凡士林的一面放在桌上, 应翻转放。搬动时, 注意防止盖子滑落。

(十四) 防止实验事故及玻璃仪器的破损:

1. 用试管加热时, 应用试管夹夹住加热, 且不能管口对着人, 以免溅出烫伤。

2. 分液漏斗排气时, 也不能对着自己或旁人放气。

3. 非硬质玻璃器皿不能用以烧浓硫酸或干烧。

4. 溶液在加热前, 所用玻璃盛器外壁必须干燥无水。

5. 加热粘稠的液体, 特别是在加热过程中有固体物质不断析出可能粘附于器皿底部的液体(如牛奶、较浓的淀粉溶液及浓糖液等), 在加热过程中, 应随时搅拌或振荡。

6. 防止玻璃器皿因骤冷骤热破裂。

7. 配制硫酸溶液时, 应将酸倒入水中, 切不可把水倒入酸中。

(十五)防止火灾:

1.不能直接用明火(包括电炉,酒精灯等)蒸发乙醚,酒精及其它易燃液体,只能通过水浴,蒸气浴或电热板等间接加热。

2.在向器皿中加入或由器皿中倒出易燃液体时,必须事先将附近的火焰熄灭后,方能进行。

3.不能将挥发性可燃液体放入冰箱,恒温箱和烤箱内。

4.点燃酒精灯时,切不可两灯对点。

(十六)打开水、电、气管开关后,若发现无水、电、气,应立即关上开关,绝不能打开开关等水、电、气来。

(十七)作完实验后应立即将仪器清洗干净放还原处,将实验台抹干净,离开实验室前,注意检查门窗、水、电、气是否关好。

(十八)实验记录应用本子记,不能用单页纸,一切原始资料,原始数据,计算、统计分析资料以及结果报告都应整齐准确地记录,这样才能反映我们从事科学实验工作的完整过程,发现错误时,也便于检查核对。

(十九)在结果未得出之前,应将原始样品及处理过程中各阶段的样品(可能的话)全部保留,切不可边作边倒;以备分析检验有错误时重作。

(二十)对实验报告的要求:

1.原始资料:包括原始数据,观察记录及调查资料等。

2.资料的处理:包括资料的整理计算和统计分析。

3.讨论和结论:对实验结果或调查研究结果加以讨论并提出初步结论。

报告要求简明扼要,说明问题,书写工整,数据准确。

# 第一部分 食物营养成分分析与人体营养状况的评价方法

## 一、食物营养成分分析

### (一) 采样原则与方法

由于分析的目的不同,采样的原则和方法也有一些差异,现分别介绍于下:

1. 为了制定一个地区的食物营养成分表,应按下列原则采样:

自然界影响食物营养成分的因素很多。大而言之,对植物性食品有土壤、气候、施肥、品种等;对动物性食品有品种及饲养条件等;这些都可以大大影响食物的营养成分。因之,即使是属于同一品种,但种植或饲养在不同地区,其营养成分也是不相同的。故不同地区最好有各自的食物营养成分表,在我国至少各大区应有一个。小而言之,即使是属于同一品种又种植或饲养在同一地区,但由于成熟度不同,生长部位不同,甚至同一食物的不同部位,其营养成分也是不相同的。至于储存及加工条件对营养成分的影响更是众所周知的事。因此在作营养成分分析时,必须充分考虑到这些影响因素,正确地进行选择,才能得出有代表性的数据。那种随便到市场上去买点样品,或到田间果园去采点样品来分析的作法是不正规的。兹就蔬果、肉类及粮食等三类主要食物采样原则说明如下:

#### (1) 蔬菜水果的采样原则:

a. 最好是选整棵菜或整个水果进行分析,要求把它们的可食部份按比例全部包括进去,不可食部分予以剔除。若棵大而且要分里、外层的,则应在外、中、里各层分别取样予以混合后分析(如莲花白、大白菜等);若棵小则取整棵进行分析(如葱、菠菜、小白菜等)。对于每一种样品又应对大棵的、中等的、小棵的都选一些,按比例混合后进行测定。

b. 若上市的持续时间较长,则在开始上市时,中期及末期都要按上法采样进行分析。

c. 若全年都有,则应按四季分别进行分析,看它们有无季节性差异;若差异不大,则可全年平均;若差异大,则应分季平均;在食物成分表上也最好分别列出。

d. 同一类型的样品宜多作一些,而且要取自这个地区的不同地方。

分析结束后,求出每种蔬果营养成分的平均值及最小、最大值,这样才能代表一个地区的食物营养成分而被列入食物营养成分表中。

#### (2) 肉类食品的采样原则:

a. 对同一种动物来说,长得肥的、中等的和瘦的都应采样分析。

b. 对同一只动物来说,各个可食部位都要采样分析。



- c. 同一部位的肉全肥的、全瘦的及半肥瘦的应分别予以分析。
- d. 内脏器官应按种类分别进行分析。
- e. 不可食部分（如骨、毛及某些牲畜的皮等）不应包括在内。
- f. 同一类型的样品应多作一些，而且要取自较多的地方。

分析化验结束后，分别求出肉及各种内脏器官营养成分的平均值、最小、最大值。分别列入食物营养成分表中。

### （3）粮食类的采样原则：

- a. 对新陈度不同的粮食都要采样。
- b. 对加工方法不同的粮食也应分别采样进行分析。
- c. 若市售粮食有固定的等级或规格，则应对不同等级及不同规格的样品分别采样进行分析。
- d. 同一类型的样品应多作一些，而且要取自较多的地方。

分析化验结束后，可按粮食的不同等级或不同规格分别求出其营养成分的平均值及最小、最大值。

其它食物的采样原则与以上三者基本类似。

### 2. 为了了解某批食品的营养成分，则应按下列原则采样：

（1）若为一大堆食物，应从堆的上、中、下层各取若干样品。这些样品若感官性质基本一致，则可予以混合后再取混合样品进行分析；若感官性质显然不同，则不混合而予以分别分析。

（2）若为很多较大的包装食品，则应从几个甚至几十个包装中（视包装数量多少而定）分别于其上、中、下层各采若干样品。至于是否混合分析，原则同上。

（3）若为较小的包装食品，则取若干整个包装；混合与否，原则同上。

通过以上不同方式采来的样品称为“送检样品”。

### 3. 从“送检样品”中制备“检验样品”的方法：

#### （1）液体食物或粉状食物：

这类食物从表面上看，似乎是很均匀的，但实际上未必十分均匀，当体积很大时，尤其如此；故在采“检验样品”前，仍须充分混合，混合方法如下：

a. 若为小型包装的液体食物，可在至少大于全部样品体积一倍以上的容器里旋转振摇，或是从一个容器中倒入另一个容器中，反复数次，然后再从其中采“检验样品”。

b. 若为大型包装的液体食物，可用搅拌器上下提动及左右前后摆动予以混匀。切忌猛烈搅拌，以免混入过多的空气，造成食物的氧化变质。搅拌后，可用吸管在容器四角及中心的几处徐徐插下，吸取“检验样品”。

c. 若为小型包装的粉末或小粒食物，则可从选来的包装中倒出，用“四分法”取样，操作程序如下：将食物置于一张大方纸（或塑料布）上，然后提起纸的一角，使粉末流向对角，又提起对角，使粉末流回；如法将纸的四角反复多次提起，使粉末在纸中向左、右、前、后反复移动，以达到混合的目的。混匀后，将粉末铺平成正方形，并划出其两对角线，将样品分成四瓣；除去对角两瓣，将剩余两瓣如法混合后，再分成四瓣，再去掉对角两瓣；重复以上操作，直到剩余量与化验需要量相近为止。

d. 大量的粒状食物或谷物也可在清洁的地板上堆成锥形，然后用铲把堆移至另一

处；移动时，将后一铲倒在前一铲之上，则粒由上向下流至周围；如此将堆移动几次，则可混合均匀。

e. 若为不便倒出混合的食品，则可用适宜的采样器分别在容器的上、中、下层多处采样后而予以混合。

## (2) 蔬菜、水果、肉类：

采这类食物的“检验样品”是比较困难的，因为每棵蔬菜，每个水果或每块肉的差异是很大的，而且无法混匀；在这种情况下，只有按比例挑选有代表性的各几个予以切碎（或磨碎），混匀后，再从中取“检验样品”。以蔬菜为例加以说明。若选来的样品中有大棵的、中等的及小棵的，它们所占的百分比分别约为20%，50%及30%，则可在大棵中选2棵，在中等中选5棵，在小棵中选3棵予以切碎混匀，从中取“检验样品”。若每棵菜体积较大（如青菜、莲花白等），将10棵菜全部切碎混匀有困难时，可把每棵通过中心剖开成二个、四个或八个对称部分，而各取一部分来切碎混匀。若每棵菜体积很小（如葱、菠菜等），则每种类型可多选几棵，只要三者比例保持2:5:3即行。肉类除块有大小外，还有肥瘦的差异，也可按上法处理。总之，一个原则，就是要使“检验样品”有代表性。

## (二) 水分的测定（直接干燥法）

### 1. 原理：

食物中的水分存在有三种形式，即游离水，吸附在蛋白质、淀粉及细胞膜上的水，以及与糖和盐结合的水。一般用100~105°C烘干法测定，以样品的失重计算。

### 2. 试剂：（测半固体或液体样品时才配制）

(1) 6N盐酸溶液

(2) 6N氢氧化钠溶液

(3) 海砂：取海砂（或河砂）用水洗净再用6N盐酸煮沸半小时，用水洗净后，再用6N氢氧化钠溶液煮沸半小时，用蒸馏水洗至pH值不变，105°C烘干后备用。

### 3. 仪器：

(1) 铝碟或扁平的玻璃称量瓶

(2) 恒温干燥箱

(3) 干燥器

(4) 分析天平

### 4. 操作方法：

(1) 固体样品：将磨细或切碎的样品混匀，精确称取2~10g（视样品性质或水分含量而定），置于已干燥、冷却并称至恒重的有盖铝碟或称量瓶中，移入100~105°C烘箱中，开盖，经2~4小时后取出，加盖置干燥器内冷却半小时后称重。再烘1小时，又冷却半小时称重。重复此操作，直至前后两次重量差不超过0.002g即算恒重。

(2) 半固体或液体样品：碟内先加一定量海砂及小玻棒一根，置100~105°C烘箱半小时后取出，放干燥器内冷却半小时称重，然后精确称取5~10g样品于碟内，用小玻棒拌匀，在沸水浴上蒸干后，置100~105°C烘箱中，以下步骤按固体样品操作。

5. 计算：
$$\text{水分}(\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_3} \times 100$$

式中： $W_1$ —铝碟（包括海砂、玻棒）和样品的克数

$W_2$ —铝碟（包括海砂、玻棒）和样品干燥后的克数

$W_3$ —铝碟（包括海砂、玻棒）的克数

6. 注意事项：

(1) 蔬菜、水果样品，应先洗去泥沙后，用蒸馏水冲洗一次，再用纱布吸去上面的水，然后在玻璃板上切碎混匀。

(2) 干燥器中的干燥剂要定期更换，保持效力。

(3) 样品放入干燥器的次序应与称重的次序一致，即先放先称，后放后称，以利于恒重。

(4) 高温易分解的食品如糖类、味精等，及含有易挥发性物质较多的食品如油脂等，不宜用此法测定。前者可用减压干燥法测定，后者可用蒸馏法测定。

(5) 测定后的样品，可供测脂肪，灰分用。

### (三) 灰分的测定

1. 原理：

食品的灰分指食品经高温灼烧后遗留下的无机物，主要是氧化物或盐类，故亦称为无机物或矿物盐。

2. 试剂：

(1) 浓硝酸

(2) 硝酸铵

(3) 30% 过氧化氢

(4) 辛醇

3. 仪器

(1) 分析天平

(2) 坩埚钳

(3) 干燥器

(4) 高温电炉

(5) 瓷坩埚

4. 操作步骤

(1) 坩埚处理：将用稀盐酸(1:4)煮过1~2小时的瓷坩埚洗净，置高温电炉中，升温至550~600°C，维持30分钟，稍冷后，取出，置干燥器内冷却30分钟，迅速取出精确称重，重新置于高温电炉550~600°C维持30分钟，重复上述步骤，称至恒重，记录坩埚号及其准确重量( $W_1$ )。

(2) 样品处理：在坩埚内准确称取样品2~5克(W)（如果为湿样品可多取量），并置水浴或烘箱内干燥，微火小心炭化至无烟。如果样品中含糖量较高，炭化时易疏松膨胀溢出坩埚，可预先加数滴辛醇消泡。

(3) 高温灰化：将样品炭化好的坩埚移入550~600°C 高温电炉中灰化至白灰为止，约需2~3小时。如灰化不完全，可取出冷却后加数滴硝酸或30%过氧化氢或10%硝酸铵等强氧化剂，蒸干后再移入高温电炉中烧至白灰为止。灰化后，取出放干燥器中冷却，称至恒重（前后两次重量之差不超过0.0005g），记录重量（W<sub>2</sub>）。

5. 计算：

$$\text{灰分}(\%) = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100$$

6. 注意事项：

(1) 温度过高可造成Fe、Sb、Pb、Sn等的挥发损失，同时Fe、Cu等与瓷坩埚形成不溶性硅酸盐而损失；温度过低灰化不完全。

(2) 若遇碳粒包裹时，应将坩埚冷却后，加入稀硝酸，在沸水浴上加热，溶解无机物，使被包藏的炭粒游离出来，然后蒸干，再继续灰化。

(3) 瓷坩埚的编号方法：

取FeCl<sub>3</sub>数克加入少量蓝墨水中，调匀制成过饱和溶液，用毛笔在瓷坩埚上面编号，晾干后置入800°C高温电炉中灼烧120分钟即成。

(4) 若取自测水分后的样品，其重量应换算为样品原重（W）即：

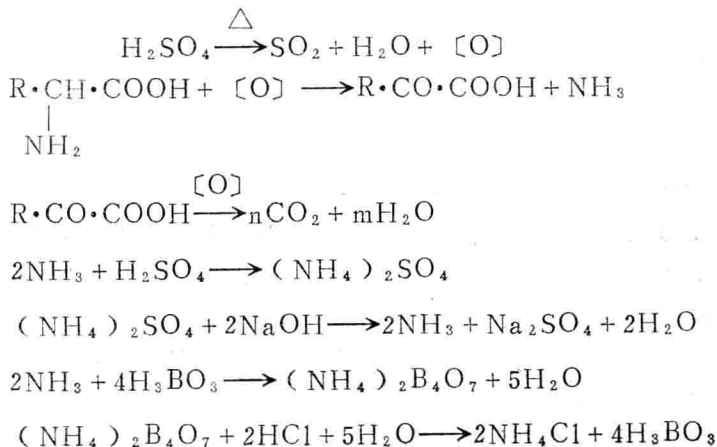
$$W = \frac{\text{测水分后干样重}}{1 - \text{水分}^*}$$

\*水分以小数表示

#### (四) 蛋白质的测定（微量凯氏定氮法Microkjeldahl Method）

1. 原理：

有机物在热浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的作用下可以被消化(分解)生成CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>与NaOH作用，通过蒸汽蒸馏将氨放出；收集于硼酸吸收液中，用已知浓度的HCl标准液滴定吸收液中的硼酸铵，计算出含氮重，再乘上转换系数，即得蛋白质含量。其反应式如下：



## 2. 试剂:

(1) 0.01N 盐酸标准溶液

(2) 浓硫酸

(3) 1% 硼酸吸收液

(4) 10% 硫酸铜溶液

(5) 硫酸钾

(6) 25% 氢氧化钠溶液

(7) 甲基红-次甲基蓝混合指示剂: 将0.2%的甲基红酒精溶液与0.1%次甲基蓝的水溶液等量混合即成。

## 3. 仪器:

(1) 凯氏定氮器

(2) 微量滴定管

(3) 容量瓶(100ml)

(4) 锥形瓶(50ml)

## 4. 操作方法:

(1) 样品称重和消化:

称取混匀样品 100—500mg 放入 100ml 凯氏烧瓶内, 再加入硫酸钾 0.3g, 10%  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  2ml 及浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3ml。同时作一空白对照。在通风橱里, 置烧瓶于垫有铁丝网的电炉上直接加热。待泡沫消失后, 然后加大火力, 随时转动烧瓶, 使瓶壁上的内容物全部回流入消化液中, 烧至溶液透明, 沉淀灰白, 取下待冷。沿瓶壁加 10ml 蒸馏水于烧瓶内, 转入 100ml 容量瓶内, 以蒸馏水冲洗烧瓶数次, 洗液并入容量瓶中, 待冷后稀释至刻度备用。

(2) 测定:

1. 电炉
2. 蒸汽发生瓶
3. 橡皮管
4. 进样口
5. 反应室
6. 反应室外层
7. 橡皮管及螺旋夹
8. 冷凝器
9. 蒸馏液吸收瓶
10. 棒状玻塞

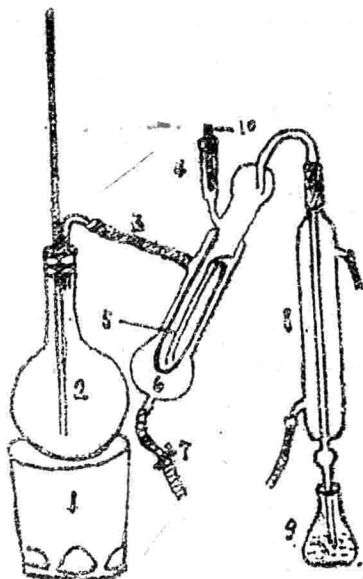


图1 微量凯氏定氮装置

按图装好微量凯氏定氮装置。煮沸(2)中之蒸馏水。于50ml锥形瓶内加入10 ml 1% 硼酸吸收液, 3滴混合指示剂, 置于(8)下端, 使管口浸入硼酸液内。夹紧(7), 取10ml样品稀释液或空白液由(4)注入(5), 以5ml蒸馏水冲洗(4), 用量筒取5ml 25% NaOH迅速倒入(4)立即塞好, 加水于(4), 以防氨逸出。开始计时, 蒸馏3分钟, 移动(9)使硼酸液面离开冷凝管口, 再蒸馏1分钟然后用蒸馏水冲洗冷凝管下端外部, 取下吸收瓶, 用0.01N HCl滴定至灰色。记录用量。

继续夹紧(7)提起(10), 使蒸馏水流入(5), 捏紧(3), 以断绝蒸汽源, 于是(5)中之废液自动吸出, 如此反复冲洗干净(5), 将(7)打开, 使(6)中废液排出。

### 5. 计算:

$$\text{蛋白质}(\%) = \frac{(V_2 - V_1) N \times 0.014 \times \text{转换系数}}{V_3 \times W} \times 100 \times 100$$

式中:  $V_2$ —滴定样液耗HCl毫升数

$V_1$ —滴定空白液耗HCl毫升数

$V_3$ —蒸馏时吸取释液毫升数

W—样品克数

N—HCl当量浓度

0.014—1N盐酸标准液1ml相当氮的克数

*Handwritten notes:*  
 转换系数 6.25  
 3.05 12.5  
 0.1 3.00 12.31  
 10ml  
 N = 0.0097

### 6. 注意事项:

(1) 蛋白质转换系数来源, 一般食物蛋白质平均含氮16%, 故从已知氮量求蛋白质时应乘上系数  $\frac{100}{16} = 6.25$ , 不同食物其系数不同, 如奶为6.38, 大豆为5.71, 大米为5.95。

(2) 消化时硫酸钾与硫酸反应生成硫酸氢钾, 可提高反应温度(纯 $H_2SO_4$ 沸点为 $330^\circ C$ , 添加硫酸钾后可达 $400^\circ C$ ), 加速反应过程。

(3) 硫酸铜为催化剂, 并可在蒸馏时作硷性反应的指示剂。

(4) 加NaOH液以前, 检查(8)下端是否插入硼酸液内。快加NaOH, 快塞(10), 以免氨逸出。

(5) 甲基红一次甲基蓝指示剂的终点为灰色, 超过终点为紫红色, 不到终点为绿色。

(6) 操作过程中, 严防酸硷污染硼酸吸收液。

(7) 蒸馏时火焰稳定, 不得中途停火。

(8) 本测定所使用的蒸馏水应为无氨蒸馏水, 即用硫酸化后再重蒸一次的蒸馏水。或用无氨的去离子水。

### (五) 色氨酸的测定(氰离子激活木瓜蛋白酶法)

#### 1. 原理:

色氨酸的吲哚环可和醛基在硫酸存在情况下反应生成紫红色化合物。借此反应可用

比色法定量测定蛋白质中的色氨酸。本法用氰离子激活木瓜蛋白酶，水解样品蛋白质。利用铁离子在硫酸存在情况下氧化乙酸生成乙醛酸，乙醛酸与色氨酸的吲哚环反应生成紫红色化合物。

## 2. 试剂:

(1) 木瓜蛋白酶溶液: 木瓜蛋白酶溶于pH7.4的0.2M磷酸盐缓冲液中。临用时配制, 普通滤纸过滤后使用。

(2) 10%氰化钾(实验室试剂)水溶液。临用时配制。

(3) 显色剂

a、30N硫酸(分析纯)。

b、称 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (化学纯)27mg, 以1滴水溶解, 另取醋酸酐(分析纯)2ml加冰醋酸(分析纯)98ml, 混匀, 再与 $\text{FeCl}_3$ 混溶均匀。

临用前将a、b两液等体积混匀。

(4) 精确称取色氨酸(L型或DL型均可)标准品25mg, 以约5ml 0.1N氢氧化钠溶解, 加水至1000ml, 色氨酸含量为 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 。于 $4^\circ\text{C}$ 保存。

## 3. 仪器:

(1) 721型分光光度计。

(2) 电热恒温箱。

(3) 恒温水浴箱。

## 4. 操作:

(1) 样品处理: 将样品粉碎, 过120目筛, 然后再脱水脱脂(脱脂样品易于酶解)。

(2) 水解: 精确称取脱水脱脂样品适量(估计含色氨酸 $50\sim 100\mu\text{g}$ ), 加酶溶液5ml及10%氰化钾1滴, 于 $65\sim 70^\circ\text{C}$ 保温24小时。

(3) 酶溶液空白: 取酶溶液5ml, 加10%氰化钾1滴, 与样品同样条件保温。

(4) 定容: 保温后取出冷却至室温, 加蒸馏水至10ml, 混匀过滤。

(5) 显色: 取滤液1ml, 加显色剂4ml, 混匀, 于 $60^\circ\text{C}$ 水浴中保温显色15分钟, 取出后用冷水冷却。

(6) 标准曲线: 取 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 的色氨酸标准液0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0ml分别放入试管中, 各管均加蒸馏水至1ml, 加显色剂4ml, 与样品和酶空白同样方法显色。在波长 $545\text{nm}$ , 光径1cm下比色, 绘制标准曲线。

## 5. 计算:

样品管光密度减去酶空白管光密度, 用所得数值在标准曲线上查出色氨酸量(也可用标准比色液光密度值与相应色氨酸量计算回归方程, 将样品管光密度减去酶空白管光密度所得数值代入回归方程, 计算出色氨酸含量)。计算出脱水脱脂样品中色氨酸含量, 再折算出原样品的色氨酸含量。

$$A = M \times \frac{1}{N} \times K$$

A—原样品色氨酸含量(mg/100g)。

M—从标准曲线查出或由回归方程计算出的色氨酸量( $\mu\text{g}$ )。

N—酶水解所取样品量 (g)。

K—脱水脱脂样品重量与原样品重量之比。

#### 6. 注意事项:

(1) 显色后1小时内比色稳定。

(2) 木瓜蛋白酶不易溶解,可在乳钵内细细研磨,直至溶解完全,然后过滤使用。

### (六) 脂肪的测定 (索氏提取法 Soxhlet method)

#### 1. 原理:

在索氏脂肪提取器中,以有机溶剂如乙醚或石油醚等提取食物中的脂肪,然后称残留物的重量,即可测得样品的脂肪含量。用本法测得的结果称为粗脂肪,因其中除脂肪外尚有游离脂肪酸、蜡、固醇、树脂及色素等脂溶性物质。

#### 2. 仪器:

(1) 索氏提取器

(2) 分析天平

(3) 干燥器

(4) 铝碟 (或扁平称量瓶)

(5) 恒温水浴箱

(6) 用乙醚脱脂过的滤纸袋 (3×9 cm)

及大头针

#### 3. 试剂:

无水乙醚

#### 4. 操作步骤:

(1) 将铝碟 (内放有事先用乙醚浸泡过的滤纸袋一个及大头针一根) 置100~105°C的烘箱内烘至恒重 (W)。

(2) 称取刚测过水分的干燥样品约2g (未测水分者应先烘烤,除去水分后始能进行以下步骤) 放入滤纸袋内,用大头针别好放铝碟中称重 (W<sub>1</sub>)。

(3) 将封好的样品包放入索氏提取器之漉筒内,滤纸包的高度不要超过漉筒之虹吸管,加无水乙醚于漉筒内 (约为接收瓶容积2/3的量),然后装上冷凝器和接收瓶,置于45°C左右的恒温水浴箱内加热提取 (大约20分钟左右使乙醚循环一次),当漉筒内乙醚无色时可停止提取,但一般常进行4~16小时。

(4) 提取完毕后将滤纸袋取出,待乙醚挥干后,放回原称样铝碟内,在100~105°C的温度下烘至恒重 (W<sub>2</sub>, 相邻两次称重之差不超过0.001g)。

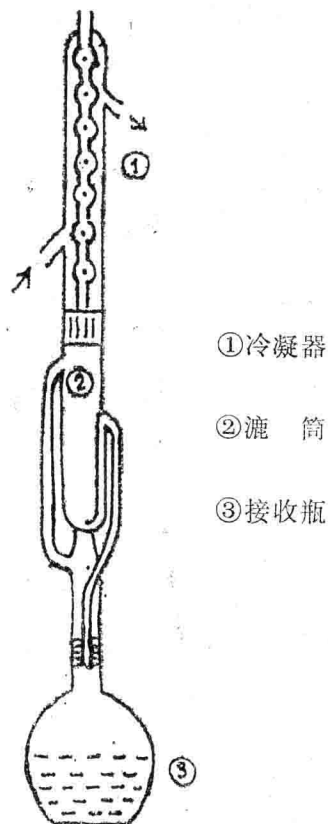


图2 索氏提取器



5. 计算:

$$\text{脂肪}(\%) = \frac{(W_1 - W_2) \times (1 - \text{水分})}{(W_1 - W)} \times 100$$

式中: W—铝碟、滤纸袋和大头针的克数

W<sub>1</sub>—W和干样品的克数

W<sub>2</sub>—W和提取脂肪以后的样品的克数

水分—样品水分以小数表示

6. 注意事项:

(1) 乙醚易燃, 注意防火。添加乙醚时, 一定要关上电源, 停止加热, 待稍冷后再添加, 不得边回流边加乙醚。

(2) 样品要细而干燥, 否则不能准确测定。

(3) 索氏提取法一般用于谷物及蔬菜的脂肪测定, 不适于奶脂测定。

(七) 总糖测定(改良斐林氏试剂直接滴定法)

1. 原理:

样品糖类经盐酸水解后全部转成单糖, 当其完全与定量的斐林氏试剂反应后, 再加入1滴单糖溶液, 即使氧化型的次甲基蓝(蓝色)变成还原型(无色), 溶液蓝色消失即为终点。然后与标准葡萄糖滴定结果比较定量。

当斐林氏甲、乙两液混合时, 生成天蓝色氢氧化铜沉淀, 与酒石酸钾钠立即起反应, 生成深蓝色的酒石酸钾钠铜, 再被单糖还原, 生成红色的氧化亚铜沉淀。Cu<sub>2</sub>O与亚铁氰化钾反应生成淡黄色可溶性化合物而不复析出。

斐林氏试剂中Cu<sup>2+</sup>的氧化能力比次甲基蓝强, 因此只有当Cu<sup>2+</sup>被完全还原后才能使次甲基蓝还原为无色, 故次甲基蓝在此作为指示剂。

反应式如下:

