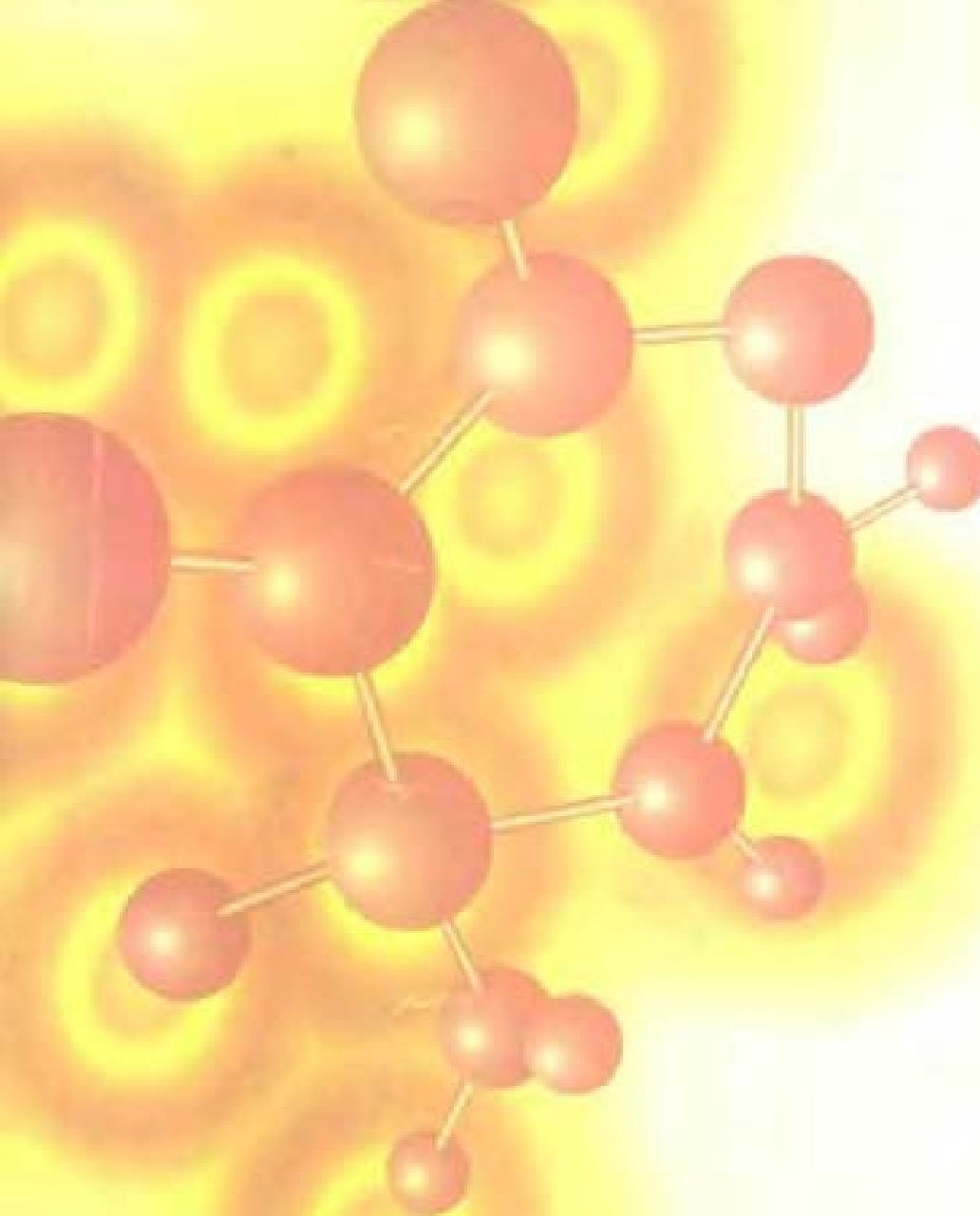




中国轻工业出版社



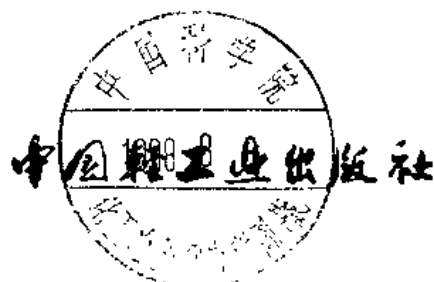
保健食品化学 及其检测技术

● 何照范 张迎清 编著

83-32
204

保健食品化学及其检测技术

何照范 张迪清 编著



图书在版编目 (CIP) 数据

保健食品化学及其检测技术/何照范, 张迪清编著. —
北京: 中国轻工业出版社, 1997

ISBN 7-5019-2173-3

I. 保… II. ①何… ②张… III. ①疗效食品-化学②疗
效食品-食品检验 IV. TS218

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 24795 号

责任编辑: 沈力匀

责任终审: 腾炎福 封面设计: 赵小云

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印刷: 中国人民警官大学印刷厂印刷

经销: 新华书店经销

版次: 1998 年 5 月第 1 版 1998 年 5 月第 1 次印刷

开本: 787×1092 毫米 1/16 印张: 16.5

字数: 384 千字 印数: 1-3000 册

书号: ISBN 7-5019-2173-3/T S·1366 定价: 34.00 元

· 如发现图书残缺请直接与我社发行部联系调换 ·

前 言

随着科学技术的飞速发展，使得通过改善饮食条件和食品组成，发挥食品本身的生理调节功能以达到提高人类健康水平成为可能。当今人类生存环境日趋恶化，疾病谱发生了改变，一些恶性疾病（如肿瘤、脑血管疾病和缺血性心脏病等）的发病率呈明显上升趋势，促使人们更加关注身体健康与饮食的相互关系，保健食品就是在这一背景下出现的。保健食品的问世给食品工业注入了全新的内容，很多人誉之为“21世纪的食品”。

保健食品作为一种特殊食品，除传统的观点认为食品应具有提供营养（第一功能）和感官享受（第二功能）两种功能外，还强调这类食品中的某些成分具有调节人体生理活动，增强免疫能力，预防疾病，促进康复及延缓衰老等调节功能（第三功能）。90年代以来，在世界范围内掀起了一股研究和生产保健食品的热潮。我国保健食品的发展渊源久远，中华药膳和传统疗效饮食有着几千年的历史，而且其富含的功能活性成分材料、资源遍布全国，为国际上所一致公认，这无疑是发展现代保健食品潜力无穷的宝库。作者在集30多年该领域研究所取得的科研成果、积累的知识及收集到的宝贵资料基础上，结合我国实际撰写了《保健食品化学及其检测技术》一书。

本书从保健食品的基本概念，功能成分化学，营养成分化学及检测技术等方面做了较系统地论述，力求反映国内外的先进技术水平和发展趋势，以达到实用的原则。由于社会上人们对某些功能成分的看法、认识不完全一致，加之很多测试技术不够完善，所以许多问题有待进一步研究和发展。

作者在多年的研究工作中得到贵州农学院生化营养研究所全体同仁的帮助和鼓励。没有他们的帮助，本书不可能问世。在此谨向所有关心过本书编辑、出版的领导、专家和同事们致以最衷心的感谢！

目 录

第一部分 总 论

第一章 保健食品的概念	(1)
一、保健食品的定义.....	(1)
二、保健食品种类及功能.....	(2)
三、中国保健食品的现状.....	(4)
四、中国保健食品发展的方向.....	(5)
第二章 保健食品功能成分化学	(7)
一、功能性甜味剂.....	(7)
二、活性低聚糖	(14)
三、活性多糖	(18)
四、活性脂	(26)
五、活性肽及活性蛋白	(30)
六、生物抗氧化剂	(33)
七、其他活性物质及乳酸菌制品	(39)
第三章 保健食品营养成分化学	(43)
一、蛋白质	(43)
二、碳水化合物	(46)
三、脂肪及脂肪酸	(50)
四、维生素	(51)
五、水和矿物质	(59)
六、膳食纤维	(60)

第二部分 功能成分检测技术

第四章 活性低聚糖、多糖	(61)
一、果低聚糖含量的测定 (HPLC 法)	(61)
二、大豆低聚糖含量的测定 (ODS 柱 HPLC 法)	(62)
三、气相色谱法 (GC) 测定大豆中低聚糖含量	(63)
四、麦芽低聚糖组分测定 (HPLC 法)	(64)
五、膳食纤维含量的测定	(66)
六、AACC 推荐的膳食纤维分析法	(67)
七、间接碘量法测定槐耳多糖的含量	(69)

八、分光光度法测定枸杞子多糖含量	(70)
九、高效液相色谱法 (HPLC 法) 测定香菇多糖	(71)
十、分光光度法测定油松果多糖含量	(72)
十一、魔芋葡甘聚糖含量测定	(73)
十二、咔唑比色法测定果胶含量	(74)
十三、气相色谱法 (GC) 测定食品中糖醇及糖的含量	(75)
第五章 活性脂	(77)
一、分光光度法测定磷脂含量	(77)
二、肌醇磷脂微量分析法	(77)
三、间苯二酚法测定神经节苷脂含量	(78)
四、气相色谱法 (GC) 测定花生四烯酸含量	(79)
五、GC/MC 内标法测定蛋黄磷脂中 AA 和 DHA 含量	(80)
六、气相色谱法 (GC) 测定月见草油乳中 γ -亚麻酸含量	(81)
第六章 生物抗氧化成分	(83)
一、邻苯三酚自氧化法测定 SOD (超氧化物歧化酶) 活性	(83)
二、化学发光法测定 SOD 活力及含量	(83)
三、羟胺法测定 SOD 活力及含量	(85)
四、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力测定	(87)
五、三氯化锑比色法测定维生素 A 含量	(89)
六、HPLC 法测定维生素 A 含量	(90)
七、比色法测定总胡萝卜素含量	(91)
八、胡萝卜素含量比色测定	(91)
九、类胡萝卜素含量 HPLC 法测定	(93)
十、 β -胡萝卜素含量 HPLC 法测定	(94)
十一、维生素 E 和胡萝卜素含量测定	(95)
十二、维生素 E 的分光光度法测定	(96)
十三、维生素 E 的荧光测定法	(97)
十四、HPLC 法测定维生素 E 含量	(98)
十五、维生素 C 含量测定 (2,6-二氯酚靛酚滴定法)	(99)
十六、维生素 C 含量测定 (电位法)	(100)
十七、维生素 C 含量测定 (紫外快速测定法)	(101)
十八、总抗坏血酸含量测定 (荧光法)	(102)
十九、维生素 C 含量测定 (HPLC 法)	(103)
二十、分光光度法测定微量硒含量	(104)
二十一、分光光度法测定有机锗含量	(105)
二十二、茶多酚含量测定 (高锰酸钾直接滴定法)	(106)
二十三、多酚类含量测定 (酒石酸铁比色法)	(107)
二十四、儿茶素含量测定 (香荚兰素比色法)	(108)

二十五、茶儿茶素的分离与测定(纸层析法)	(109)
二十六、儿茶素的分离与测定(HPLC法)	(111)
二十七、黄酮类化合物总量的测定(氯化铝比色法)	(112)
二十八、芦丁含量测定(HPLC法)	(112)
二十九、银杏黄酮醇甙含量测定(HPLC法)	(113)
三十、银杏内酯A、B、C及白果内酯HPLC法测定	(114)
三十一、差式分光光度法测定辅酶Q ₁₀ 含量	(115)
三十二、植酸含量测定(分光光度法)	(115)
第七章 活性肽及活性蛋白质	(117)
一、总谷胱甘肽(GSH)含量的测定(循环法)	(117)
二、血清 γ -球蛋白盐析测定法	(118)
三、琼脂扩散法测定血清中IgG、IgA、IgM含量	(119)
四、免疫电泳法测定免疫球蛋白含量	(121)
第八章 其他活性成分	(123)
一、大蒜辣素含量的测定(重量法)	(123)
二、齐墩果酸、熊果酸含量测定(HPLC法)	(124)
三、薄层扫描法测定绿原酸含量	(124)
四、绞股蓝总皂甙含量测定(比色法)	(125)
五、薄层色谱法测定甜菊糖甙含量	(126)
六、STS改良法测定核酸含量	(127)
七、食品中核苷酸含量测定(HPLC法)	(127)
八、甜味素含量测定(RP-HPLC法)	(128)
九、糖精含量测定(比色法)	(129)
十、糖精钠含量测定(HPLC法)	(130)
十一、牛磺酸含量测定(HPLC法)	(131)
十二、甘草苷含量测定(HPLC法)	(132)

第三部分 营养成分检测技术

第九章 蛋白质及氨基酸	(134)
一、凯氏定氮法测定蛋白质含量	(134)
二、染料结合法测定蛋白质含量	(135)
三、改良的双缩脲法快速测定蛋白质含量	(136)
四、蛋白质组分的分离与含量的测定	(137)
五、蛋白氮和非蛋白氮含量的测定	(138)
六、蛋白质效力比值的测定	(139)
七、游离氨基氮甲醛快速滴定法	(140)
八、游离氨基酸总量的测定(茚三酮法)	(141)

九、茚三酮法快速测定赖氨酸含量	(142)
十、2-氯-3,5-二硝基吡啶法测定赖氨酸含量	(143)
十一、氨基酸及赖氨酸含量的测定(三硝基苯磺酸比色法)	(145)
十二、不水解蛋白质直接测定蛋白质中赖氨酸含量	(147)
十三、DBL法测定谷物蛋白赖氨酸含量	(148)
十四、酶解法比色测定色氨酸含量	(150)
十五、酸水解法测定色氨酸含量	(151)
十六、不水解蛋白质直接测定色氨酸含量	(152)
十七、紫外吸收法测定色氨酸含量	(153)
十八、分光光度法测定蛋氨酸含量	(154)
十九、蛋氨酸的比色测定(硝普盐法)	(155)
二十、苯丙氨酸含量的测定	(156)
二十一、多种氨基酸含量的测定(HPLC法)	(157)
二十二、多种氨基酸含量的测定(苯基异硫氰酸酯柱前衍生HPLC法)	(158)
第十章 碳水化合物	(161)
一、旋光法测定谷物种子粗淀粉含量(氯化钙-醋酸法)	(161)
二、旋光法测定粗淀粉含量(盐酸水解法)	(162)
三、比色法快速测定淀粉含量	(163)
四、还原糖、非还原糖及淀粉含量系统分析	(164)
五、蒽酮比色法快速测定葡萄糖、果糖、蔗糖及淀粉含量	(165)
六、还原糖的快速测定法	(168)
七、粗纤维素含量的测定	(169)
八、重量法测定粗纤维的含量	(170)
第十一章 脂肪及脂肪酸	(172)
一、粗脂肪含量的测定(残余法)	(172)
二、折光法测定脂肪含量	(173)
三、反相纸层析快速法测定油脂脂肪酸含量	(174)
四、薄层色谱法分离主要不饱和脂肪酸	(175)
五、游离脂肪酸含量的快速测定	(176)
六、油折光率的测定	(176)
七、油脂酸值的测定	(177)
八、油脂皂化值的测定	(178)
九、油脂碘值的测定	(179)
十、脂肪酸含量的测定(HPLC法)	(180)
十一、脂肪酸含量的测定(GC法)	(181)
第十二章 维生素	(183)
一、维生素A含量的测定(见第六章五六)	(183)
二、维生素D含量的测定(HPLC法)	(183)

三、胡萝卜素含量的测定 (见第六章七~十)	(184)
四、维生素 E 含量的测定 (见第六章十二~十四)	(184)
五、维生素 K ₁ 含量的测定 (HPLC 法)	(184)
六、维生素 K ₃ 含量的测定 (HPLC 法)	(185)
七、维生素 C 含量的测定 (见第六章十五~十九)	(185)
八、维生素 B ₁ (硫胺素) 含量的测定 (荧光法)	(185)
九、维生素 B ₂ (核黄素) 含量的测定 (荧光法)	(187)
十、维生素 B ₁ 、B ₂ 含量的测定 (HPLC 法)	(188)
十一、维生素 B ₆ 含量的测定 (比色法)	(189)
十二、维生素 B ₆ 含量的测定 (HPLC 法)	(190)
十三、烟酸和烟酰胺的测定 (AACC 法)	(192)
十四、烟酸含量测定 (HPLC 法)	(193)
十五、维生素 B _c (叶酸) 含量的测定	(194)
十六、胆碱含量的测定 (雷氏盐法)	(195)
十七、维生素 B ₁₂ 含量的测定 (微生物法)	(196)
十八、泛酸含量的测定 (微生物法)	(198)
十九、泛酸含量的测定 (HPLC 法)	(199)
二十、生物素含量的测定 (微生物法)	(201)
第十三章 水分及矿物元素的测定方法	(203)
一、水分测定法	(203)
二、胶体束缚水及自由水含量的测定	(203)
三、灰分含量的测定	(204)
四、络合滴定法测定钙含量	(205)
五、硫氰酸钾比色法测定铁含量	(206)
六、磷含量比色测定法	(207)
七、铜、锌、钴含量的系统分析法	(208)
八、催化和分光光度法测定痕量碘和锰含量	(214)
九、利用氟离子选择性电极测定氟的含量	(215)
十、硫氰酸比色法测定铝含量	(216)
十一、利用醌茜素试剂比色测定硼	(218)
十二、锌含量的测定 (双硫脲比色法)	(219)
十三、铜含量的测定 (二乙硫代氮甲酸钠比色法)	(221)
十四、铜、锌含量的测定 (原子吸收分光光度法)	(222)
十五、钙、镁、铁、锰、铜、锌含量的测定 (原子吸收法)	(224)
十六、钾和钠含量的测定 (火焰光度法)	(225)

第四部分 有害成分检测技术

第十四章 有害成分	(227)
一、简易鉴定油菜籽芥酸含量的测定.....	(227)
二、油菜籽硫代葡萄糖甙快速测定技术(3,5-二硝基水杨酸法).....	(228)
三、油菜籽(饼)中硫葡萄糖甙总量的快速测定.....	(230)
四、比色法测定单宁的含量.....	(231)
五、快速络合滴定法测定单宁的含量.....	(232)
六、自由棉酚含量的测定(比色法).....	(233)
七、棉籽蛋白中游离和总棉酚含量测定(HPLC法).....	(234)
八、大豆胰蛋白酶抑制物活性的测定(AACC法).....	(235)
九、HPLC法测定黄曲霉毒素B ₁ 的含量.....	(236)
十、比色法测定亚硝胺类化合物.....	(237)
十一、HPLC法测定亚硝胺类化合物的含量.....	(239)
十二、食品中苯并芘的简易快速测定.....	(239)
十三、多环芳烃(PHA)类化合物含量测定(HPLC法).....	(240)
十四、原子吸收分光光度法测定砷的含量.....	(241)
十五、原子吸收分光光度法测定铅的含量.....	(243)
十六、火焰原子吸收法测定痕量铅、镉含量.....	(244)
附录一	
推荐的每日膳食中营养素供给量.....	(245)
附录二	
每日膳食中微量元素和电解质的安全及适宜的摄入量.....	(248)
附录三	
平衡膳食、合理营养、促进健康.....	(248)
主要参考文献	(251)

第一部分 总 论

第一章 保健食品的概念

食品是人类赖以生存的物质基础，人类对食品的要求：一要吃饱，二要吃好。当今，健康长寿已成为人们普遍关注的问题，研究食物的功能成分、营养成分，开发保健食品已成为国际、国内食品研究瞩目的热点和发展趋势。由于人类生存环境日趋恶化，空气、水源污染的情况逐渐严重，疾病谱也发生了改变。肿瘤、脑血管疾病和缺血性心脏病等恶性病呈明显上升，已占死因的前三位。全国现有高血压患者约 6000 万人，糖尿病患者 1500 万人，慢性疾病死亡人数占总死亡人数的 70%。因而对食品的长期疗效功能的选择，将成为消费者选购食品的基本原则。传统观点认为食品主要功能是提供营养和感官享受，保健食品的出现给食品工业注入了全新的内容，很多人誉之为“21 世纪的食品”。目前人类在研究生命的诸多因素中，最重视的是营养环境和调节机体生理活性功能，这就需要我们设计创造出优质的食品。食品检测技术对保证食品质量、安全性、增强人体健康来说是至关重要的，同时通过原料（或基料）的营养、功能成分的检测，可以挖掘出新的食品资源，通过完善生产工艺，可以正确引导保健食品的研制和开发进入新高度，达到新水平。

一、保健食品的定义

保健食品属于食品，食品的基本属性决定了食品必须有营养（第一功能）。就目前所知，人体所需要的营养素约 70 余种（其中必需营养素 40 余种），营养科技工作者将其概括为以下七类：蛋白质、碳水化合物、脂肪、矿物质、水、维生素和膳食纤维。同时保健食品也应使人们在食用时具有感官享受（第二功能），即利用食品の色香味增进食欲。而保健食品更重要的是其具有调节人体生理活性的功能（第三功能），适合于特定人群适用。保健食品的功能成分大致有以下八类：功能性甜味剂、活性低聚糖、活性多糖、活性油脂、生物抗氧化剂、活性多肽、活性蛋白、乳酸菌类及其他活性成分。一些学者提出生产出的保健食品应符合以下几方面要求：（1）由通常食品所使用的材料或成分加工而成。（2）以通常形态和方法摄取。（3）标有生物调整功能的标签、成分和含量。

保健食品应有营养、功效成分的含量及符合食品的通用卫生标准，不能明确功效成分的则须有与保健功能相关的主要原料，并应进行食品安全性毒理学评价及功能学评价，然后按程序申报，经国家卫生部审查确认。对于那些添加非食品原料或非食品成分（除

权威单位规定的允许药食两用的除外),如各种中草药和药物成分而生产的食品,不属于保健食品的范畴。

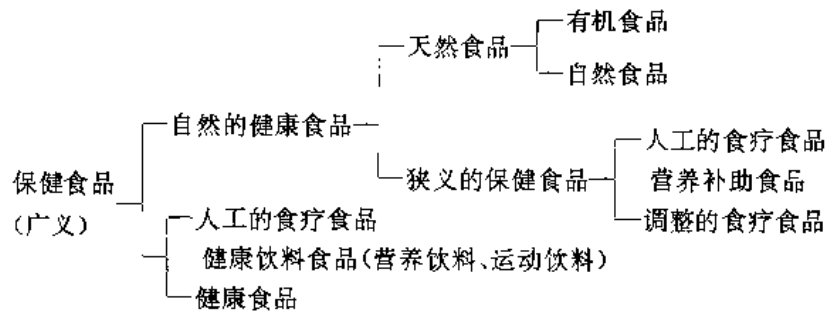
关于保健食品的提法,国际上并无统一定义,世界上各国的提法略有差异。但是强调食品的第二功能这一观点已为全世界公认。早在1962年,日本厚生省文件最早出现功能食品的名词,1989年又将功能食品定义为“具有与生物防御,生物节律调整,防止疾病,恢复健康等有关功能因素,经设计加工,对生物体有明显调整功能的食品”。1991年7月,日本厚生省通过《营养改善法》,将功能食品改为“特定保健食品”(Food for Specified Health Use)。国际上对保健食品曾用过健康食品(Health Foods)、营养食品(Nutritional Foods)、革新食品(Reform Foods)、功能食品(Functional Foods)等名称。中华人民共和国卫生部在1996年3月15日正式定名为保健食品。保健食品有着丰富的内涵,它是食品三大功能的完善体现和结合,比通常所称的功能食品的范围更广义,使用范围更宽。

目前国际上对保健食品的研究已引起许多国家政府的高度重视,开发对人类健康造福的保健食品已成为世界上最有前途、最有生气的行业之一。20世纪90年代初,美国政府投入大量资金,实施一项保健食品开发计划,“用自然界植物制备生理活性物质和微量矿物质营养素关键性食品配料,研制生产短期见效的防癌食品”。1994年,日本国立癌症预防研究所对26万人饮食生活与癌症发生关系的统计资料表明:蔬菜具有一定的防癌作用,并列出了20种对抑癌有着明显效应的蔬菜。德国政府致力于发展保健食品,试图利用天然植物汁液中的有效成分来预防人类某些疾病。现在德国约有2000余家专门销售保健食品的商店。1995年9月,由联合国粮农组织(FAO)、世界卫生组织(WHO)、国际生命科学研究所(ILST)在新加坡共同举办的东西方保健食品第一届国际科研会,会议研究了保健食品的发展现状、科学评价及共同感兴趣的若干问题。同年12月在日本举行的国际防癌食品会上重点讨论了维生素C、维生素E、胡萝卜素、黄酮、黄烷醇等对癌症的预防因子及作用。

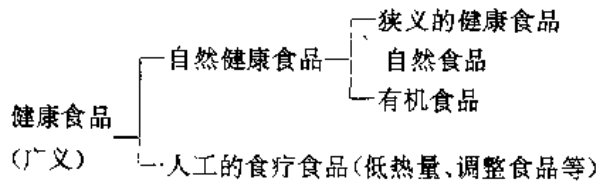
我国保健食品的理论基础之一是中国中医的食疗文化,早在几千年前,中国医药文献中记载有“食疗”、“食养”的若干论述,并提出了合理的膳食原则。用现代技术,对保健食品成分的研究,既是对已知营养素、功能成分的功能作用的研究;又是对未知功能成分的探索。对食物中功能成分的不断探索和揭示,必将会为保健食品的发展,为人类健康带来极重要的影响。

二、保健食品种类及功能

目前世界各国在保健食品的分类上各有差异,日本健康食品协会对保健食品做了如下分类:



美国食品与药品管理局对保健食品的分类：



笔者按其应用范围及食用对象不同，将保健食品分为两大类。一类以健康人为食用对象，以增进人体健康和各项体能为目的的保健食品，即所谓狭义健康食品或称日常保健食品。它是根据各种不同的健康消费群如婴儿、中老年人、学生、孕妇等的生理特点和营养机能调控的需要而设计的，旨在促进生长发育和维持各种机能活力，强调其成分能充分显示身体防御功能和调节生理节律的工程化食品。对于婴儿食用的健康食品，应完美地符合婴儿迅速生长对各种营养素和微量活性物质的要求，补充适量的 DHA、 γ -亚麻酸和免疫球蛋白。对于中老年食用健康食品，应符合“一优三足四低”的要求，即优质蛋白质、足量的膳食纤维、足量的维生素、足量的矿物元素，低能量、低脂肪、低胆固醇和低钠。对于学生食用的保健食品，除满足生长发育需要的各种营养素外，其基本要求是能促进学生智力发育，促进大脑能以旺盛的精力为目标。对于孕妇的食用健康食品则要根据妊娠期生理变化需要来增进营养素的供给量，特别是蛋白质、维生素及钙、铁的补给。其他如井下、高空、低温、高温环境下工作的人群也应有相应的健康食品，以满足他们生理变化的需要。

另一类保健食品是主要供给健康异常的人食用的，以防病为目的的“特种保健食品”。它着眼于某些特殊消费群，如糖尿病患者、肿瘤患者、心脑血管病患者和肥胖人等的特殊身体状况的人，强调食品在预防疾病和促进康复方面的调节功能，以解决所面临的“饮食与健康”问题。目前国际上所热衷研究开发的此类保健食品主要有抗衰老食品、抗肿瘤食品、防心脑血管疾病食品、糖尿病患者食品、减肥食品及护肤食品等。

保健食品中各种营养素的功能，已在各种营养学书籍中有详细论述。随着保健食品第三功能的发掘，一些活性成分的重要调节功能已逐渐被人们认识。恶性肿瘤是当代医学尚未揭示其全部奥秘的严重疾病，食品中能抵抗肿瘤的活性成分还是不少的，目前部分研究工作集中在免疫球蛋白、活性多肽、活性多糖、膳食纤维、维生素及微量元素上。免疫球蛋白是通过提高人体自身的免疫能力而达到抗肿瘤的目的。自 1969 年日本人千原从香菇子实体中提取出具有抗肿瘤的活性多糖以来，大量研究表明，存在于香菇、金针菇、灵芝、猴头菇等食用菌中的一些活性多糖，具有通过刺激人体抗体产生，提高人体自身免疫力而达到抗肿瘤的作用。膳食纤维能诱导肠道内有益菌群大量繁殖，且能结合

肠内有毒物并促其排出体外。功能性寡糖能诱导肠内双歧杆菌大量繁殖,也具有上述作用。膳食中含有两类抗氧化剂——营养性抗氧化剂和非营养性抗氧化剂。前者包括维生素A、维生素E、维生素C、铜、硒、锌、胡萝卜素等营养素;后者包括超氧化物歧化酶、生物类黄酮、多酚类、植酸、肌肽、叶绿素、泛醌(辅酶Q)等。一些主要的老年性退行性疾病均由于氧化损伤影响到蛋白质、脂质、碳水化合物和DNA合成及功能,并能对健康造成氧化损伤。吸烟、慢性炎症部位的吞噬细胞可产生大量活性氧,从而造成组织损伤,引起人类多种疾病。越来越多的研究结果表明,膳食抗氧化剂在减轻氧化损伤方面具有重要作用。多不饱和脂肪酸中,主要有DHA(二十二碳六烯酸),EPA(二十碳五烯酸), γ -亚麻酸等,具有降低中性脂、胆固醇、血压、血小板凝聚力、血粘的作用。可用于预防高血脂、动脉硬化及心脑血管疾病。随着科学研究的不断深入被揭示出的生理活性物质将会越来越多。

三、中国保健食品的现状

中国保健食品的发展与国际发展趋势是相一致的已形成90年代食品以及相关行业科研与生产的新潮流。营养保健食品科学研究方面已涉及到营养保健生理功能的研究范围,概括起来有:(1)增强组织细胞的代谢能力;(2)增强机体免疫功能;(3)维持机体内环境的稳态;(4)提高血睾酮水平;(5)提高大脑皮层的兴奋作用和促进肾上腺素的分泌;(6)提高血清超氧化物歧化酶(SOD)活性;(7)降低血清胆固醇;(8)降低机体乳酸脱氢酶活性。其目的不外乎为调节人体节律、增强人体免疫力、预防心脑血管等疾病、抗肿瘤、延缓衰老、增强抗疲劳的能力、提高智力等。

我国保健食品在生产方面发展的速度更为显著,据不完全统计,目前已有2000多家企业生产保健食品,1993年年销售总额为200亿元。其产品种类有营养液(口服液)、饮料(固体、液体)、茶类、乳类、蛋类、糕点饼干类、糖类以及胶囊、药膳等。这些产品大部分以天然植物或动物为原料加工制成的。通过几年的发展,一些保健食品生产企业已形成了相当的生产规模,创造了较好的经济效益,成为食品工业的一个重要组成部分。

但是,在保健食品快速发展过程中,由于研究和生产尚未纳入科学轨道,使保健食品不可避免地出现了一哄而起,鱼目混珠,粗制滥造,甚至危害人体健康现象。目前我国保健食品的现状业已出现了许多令人担忧的问题。

第一,对保健食品含义理解不清,概念模糊,混淆了食品与药品的本质,把保健食品理解成加药食品。如市场上出现的绞股蓝茶,有机锗口服液,刺五加混合液,天麻口服液等。不少口服液还标有日服三次,每次一瓶的字样,更是与药品无区别。食品与药品的本质区别在于是否存在毒副作用,药物在治病的同时会出现程度不同的副作用,为此才会有一日吃几次,一次吃多少的严格规定。而保健食品则绝不能带任何毒副作用,且要求能满足摄食者心理和生理要求。前面已论述了保健食品应具有三种功能,即营养、享受和调节功能。然而目前市场上一些所谓的保健食品带有明显怪味,也没有标明任何功能成分,如果把添加各种中草药的食品当作保健食品提倡人们大量食用,药物中的毒副成分在体内的积累,尤其是这些特殊消费群本来机体就较虚弱,对毒副成分抵抗力差,更

会出现事与愿违的情况。美国食品与药物管理局现已通过一项药物管理法，决定从1994年1月1日起对中草药进行管制，各种中草药除经严格动物实验外，还要进行三个阶段的人体实验，这一管理办法适用于含中草药的食品添加剂与加工食品。我国在保健食品生产方面也应采取强有力的措施，以保证人民的健康与安全。

第二，我国保健食品目前多为第一代产品，缺乏科学实验依据，大多数产品缺乏功能学评价及安全性毒理学评价资料，产品中更无有效成分及含量标明。且品种单调，共用普及型产品多，专用型产品少。一些老少皆宜的产品不符合人体各年龄段生理和病理及营养的需求的科学规律，显然产品名不符实。更有甚者，便是一些假冒伪劣品，甚至危害人体健康的产品时有充斥市场。其中，有些企业不懂得保健食品的科学原理，不懂得功能因子和对人体调节功能机制，更不懂得通过动物和人体实验来证实其有效性。

第三，缺乏严格的管理办法、生产标准、审批制度和功能评价机构及广告宣传管理。一些企业不负责任的商业广告宣传，业已成为消费者正确选择保健食品的一大公害；有些企业在产品研究鉴定时原料中加足了保健有效成分，而在批量生产时，投入的有效成分微乎其微；也有的企业因受生产技术条件的限制，产品质量难以保证，还有些经销单位销售过期或假冒的保健食品。

保健食品是一项涉及到多部门、多学科、多行业的新兴产业，为使其协调、持续、良好地发展下去，各有关部门要共同努力。

四、中国保健食品发展的方向

1. 加强营养保健食品的基础理论研究和应用技术的研究与推广。将食品科学、生理学、营养学、医学、药学、免疫学、生物化学等学科的理论与技术协同运用，进一步深入进行保健食品功能因子和生理功能机理的研究。根据不同人群、不同生理（包括病理）条件的不同需求，基于营养和生理功能原理，有针对性地设计出具有不同营养成分的食品配方，再经大量反复的动物和人体实验来证实这些不同配方制成的食品确有各自所要求的保健功效。在此我们更需注意发掘我国的中医食疗宝库，研究出具有中国特色的保健食品。

2. 运用现代分离、提取、培植、稳定、评价及制造技术。如膜分离技术、CO₂超临界萃取技术、生物工程和基因工程（酶应用、重组DNA、细胞融合、组织培养等）技术、低温粉碎技术、低温真空技术、微胶囊技术及包装和保鲜技术等实现从原料中提取有效成分剔除有害成分的加工过程。再以各种保健有效成分为原料，根据上述不同的科学配方和产品要求，确定合理的加工工艺，进行科学配制、重组、调味等加工处理，生产出一系列名符其实的科学、营养、健康、方便的食物。要加快我国开发第二代、第三代保健食品。第二代保健食品必须经过动物和人体实验，证明该食品具有某些生理调节功能。第三代保健食品，应具有有效成分明确；含量应可以测定；作用机理清楚；研究资料充实；临床疗效肯定。

3. 保健食品生产企业要有严肃的质量责任感，生产必须实程序化、标准化、规范化，对原料检查、科研、生产、加工、包装、仓储、销售等一系列环节实行全面质量管

理，以确保与保健食品生产有关的各个环节严格管理。

4. 加强对国民营养知识的宣传与指导，使大家对营养与健康、功能因素与机理有所了解，能够正确地指导人们的购买和饮食行为。

总之，在中国这块拥有 14 亿人口的土地上，人民生活水平在不断提高，保健意识在逐渐增强，其保健食品开发的市场潜力是不可估量的，只要把握良机，加大科技投入，就能生产出高档次的保健食品，促进人类健康水平的提高。

第二章 保健食品功能成分化学

一、功能性甜味剂

蔗糖摄入量过多与脂肪摄入量过多一样被认为是一个重要的不健康因子,是人类肥胖症和龋齿的直接原因,还与人们的糖尿病、冠心病等疾病有关。消费者对食品中蔗糖含量很敏感,但又向往纯正可口的甜味刺激。因而低能量甜味剂就必然显示出它在食品工业中的重要地位。

(一) 果糖

果糖是一种重要的功能甜味剂,富含于蜂蜜和许多水果中。在糖类中,果糖具有许多独特的性质:①甜度高,大约是蔗糖的1.73倍,葡萄糖的2.34倍。等甜度下能量值低,约为蔗糖的55%,葡萄糖的43%,可在低能量食品中应用。②代谢途径不受胰岛素制约,可供糖尿病人食用。③不易被口腔微生物利用,对牙齿的不利影响比蔗糖小。近年来,人们纷纷利用异构化酶将葡萄糖转变为果糖,制成不同规格的果葡糖浆(高果糖浆或异构糖)予以应用。世界上肥胖症或与高能量营养型糖有关疾病比较严重的国家,都十分关注这类功能性甜味剂的开发。

果糖是己酮糖,其分子式为 $C_6H_{12}O_6$,相对分子质量180,熔点 $103\sim 105^{\circ}C$,比旋度 $[\alpha]_D^{20}$ 为 $-134^{\circ}\rightarrow 92^{\circ}$ 。晶体中的果糖以呋喃结构形式存在,水溶液中果糖主要以吡喃结构存在,有 α 和 β 异构体与开链结构呈动态平衡。纯净的果糖呈无色针状或三棱形结晶,故称结晶果糖,能使偏振光面左旋,在水溶液中有变旋光现象,吸湿性强,吸湿后呈粘稠状。果糖能与氢氧化钙生成不溶于冷水的复合物 $C_6H_{12}O_6 \cdot Ca(OH)_2 \cdot H_2O$,而从 d -葡萄糖中分离出来。在 $pH3.3$ 时最稳定,对热稳定性较蔗糖和葡萄糖低,具有还原性,能与可溶性氨基化合物发生美拉德褐变。

当果糖溶于水中时,会迅速发生变旋作用,形成互变异构体。溶液温度、 pH 值和浓度是影响果糖水溶液甜度大小的重要因素。其中,只有温度对果糖水溶液的变旋作用有明显的影 响。果糖的甜度与它的变旋行为有关,Shallenberger(1978年)根据构象特性推知呋喃果糖几乎没有甜度。R. Scott(1980年)在各种不同温度下应用核磁共振法测定分析,结果表明果糖甜度的丧失与温度升高时互变异构体系的移动有直接关系。

随着酶工程的重大发展,现在完全可以利用无甜度淀粉转化为高果糖浆,在此基础上,人们采用高级分馏,精制及酶改性技术的研究,已成功地生产出结晶果糖。结晶果糖和高果糖浆在甜度和代谢上差异很大,其主要区别见表2-1。

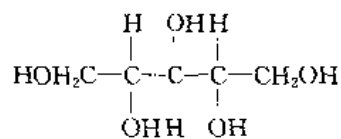
表 2-1 结晶果糖和高果糖浆比较

特性	结晶果糖	42%高果糖浆	55%高果糖浆	90%高果糖浆
物理性状	结晶体	液体	液体	液体
化学组成	已酮糖、纯单糖	葡萄糖、果糖、麦芽糖、异构麦芽糖和更高级糖类混合物	果糖、葡萄糖和更高级糖类混合物	果糖、葡萄糖和更高级糖类混合物
果糖含量/%	99.5	29.8	42.4	69.3
水分含量/%	0.2	29	23	23
相对甜度 (蔗糖为100)	130~180	90~95	95~100	100~130
应称为	果糖或左旋糖	玉米甜味剂 或玉米糖浆	玉米甜味剂 或玉米糖浆	玉米甜味剂 或玉米糖浆
最适合使用的食品	营养食品和低能量食品, 要求特别甜的干混合物	色拉调味料、烘烤食品、果酱和果冻	软饮料、水果、罐头	软饮料、液体营养、保健食品

(二) 糖醇

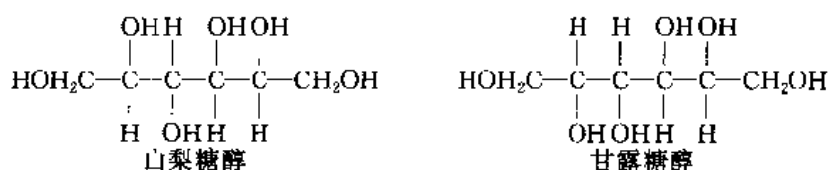
糖醇也称为多元醇, 这类物质是糖的还原产物, 实际上也是糖的一种衍生物。重要的糖醇有木糖醇、山梨醇、甘露醇、麦芽糖醇、乳糖醇、异麦芽酮糖醇和氢化淀粉水解物等。食品工业上常用其代替蔗糖作甜味剂使用, 是一类重要的保健食品基料。糖醇的主要功能体现在: (1) 在人体中代谢途径与胰岛素无关, 摄入后不会引起血液葡萄糖与胰岛素水平大幅度的波动, 可供糖尿病人专用食品生产; (2) 不是口腔微生物适宜作用的底物, 长期摄入糖醇不会引起牙齿龋变; (3) 部分糖醇, 如乳糖醇的代谢特性类似膳食纤维, 具备膳食纤维的部分生理功能; (4) 相比于对应的糖类甜味剂, 糖醇具有甜度、粘度、能量值较低, 不参与美拉德褐变等特点。因而, 此产品在食品工业上, 特别是保健食品生产上有着一定的市场前景。

1. 木糖醇是天然存在于多种水果、蔬菜中的五碳糖醇, 工业上则利用木屑等经水解制成木糖后氢化来获得, 其甜度与蔗糖相等。分子式 $C_5H_{12}O_5$, 相对分子质量 152.15, 其结构式为:



木糖醇为白色结晶状粉末物质, 熔点为 $93\sim 94.5^\circ\text{C}$, 沸点 216°C , 极易溶于水, 微溶于乙醇和甲醇。热稳定性好, 10%水溶液的 pH 值为 $5\sim 7$, 不与可溶性氨基化合物发生美拉德褐变。木糖醇溶于水吸热量是所有糖醇中最大的一种, 食用时有清凉、爽口的口感特性。其代谢利用不受胰岛素调节, 因而可被糖尿病人接受。更突出的是它不会被口腔细菌发酵, 对牙齿完全无害。许多试验表明, 不仅无促龋作用, 还可通过阻止新龋形成和原有龋齿的继续发展, 改善口腔卫生。因而被用作无糖糖果中具有止龋作用的甜味剂。

2. 山梨糖醇和甘露糖醇广泛存在于植物界中, 互为同分异构体, 分子式为 $C_6H_{14}O_6$, 相对分子质量为 182.17。其化学结构式为:

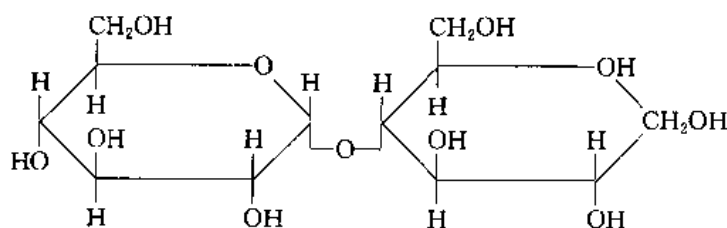


山梨糖醇为无色针状晶体，相对密度为 1.48，熔点 96~97℃，甜度是蔗糖的 60%。易溶于水，微溶于甲醇、乙醇和醋酸等。具有极大的吸湿性，在水溶液不易结晶析出，能螯合各种金属离子。由于分子中无还原基存在，化学性质稳定，不与酸碱起作用，不易受空气氧化和发生美拉德褐变。热稳定性较好，对微生物的抵抗力也比相应的糖强。甘露糖醇是一种白色结晶体，熔点为 165~168℃，甜度是蔗糖的 50%左右，吸湿性低，吸湿后也不会结块。

山梨糖醇在人体中大多被吸收利用，甘露糖醇只有一部分被利用。这两种糖醇食用后在体内代谢不受胰岛素控制，不会引起血糖水平的波动，且不会引起牙齿龋变。因而，世界上许多国家已将山梨糖醇和甘露糖醇作为一种允许使用的甜味剂。

3. 麦芽糖醇 (Maltitol) 是由麦芽糖氢化制得，在工业上则多是由淀粉酶分解出含多种组分的“葡萄糖浆”后再氢化制成。制品中麦芽糖醇含量从 50%到 90%不等，故称麦芽糖醇糖浆 (又称氢化葡萄糖浆)，甜度约为蔗糖的 75%~95%。

麦芽糖醇的化学全名为 4-O- α -D-葡萄糖基-D-葡萄糖醇，分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ ，相对分子质量 344，其化学结构式为：

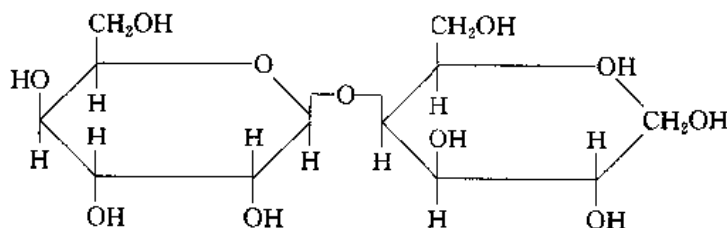


纯净的麦芽糖醇呈无色透明晶体，熔点 135~140℃，对热对酸很稳定，易溶于水，食用时几乎没有凉爽的口感特性。

麦芽糖醇摄入后在小肠内的分解量是同等麦芽糖的 1/10，为非能源物质，不升高血压也不增加胆固醇和中性脂肪含量。因此，它是心血管病、糖尿病等患者作为保健食品用的理想甜味剂。亦不能被口腔中微生物利用，具有较好的防龋作用。

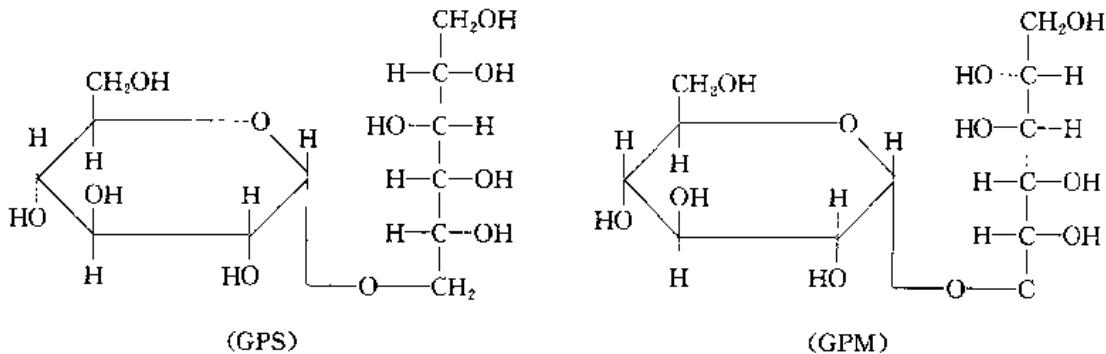
4. 乳糖醇 (Lactitol) 在肠道内几乎不被吸收，能量值极低，且有清爽明快的甜味，甜度是蔗糖的 30%~40%。作为一种功能性甜味剂，可代替蔗糖应用在很多保健食品上，诸如糖尿病食品，防龋齿食品和减肥低能量食品。

乳糖醇的化学名为 4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-葡萄糖醇，分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ ，相对分子质量 344，其化学结构式为：



由于结晶条件的不同,乳糖醇有一水合物和二水合物两种结晶产品。乳糖醇呈白色结晶粉末状,单水合物熔点 120°C ,双水合物熔点 75°C ,对热反应和贮存时的稳定性都很好,易溶于水。由于乳糖醇没有羰基,化学活性要比乳糖稳定得多,在碱性条件下的稳定性较乳糖高,酸性条件下稳定性与乳糖接近。

5. 异麦芽糖醇 (Isomalt) 为 α -D-吡喃葡萄糖基 (1 \rightarrow 6) D-山梨醇 (GPS) 和 α -D-葡萄糖基 (1 \rightarrow 1) D-甘露醇 (GPM) 两种异构体混合物,其化学结构式为:

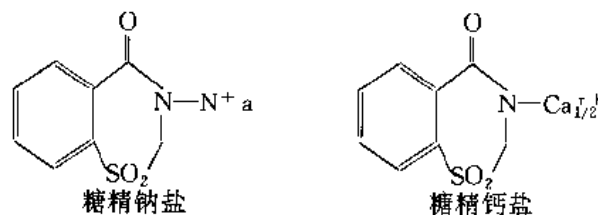


由于具有甜味纯正,低吸湿性,高稳定性,低能量,非致龋齿性,糖尿病人可以食用等优点,是一种有发展前景的功能性甜味剂。

(三) 高甜味剂

高甜味剂又称强力甜味剂,甜度极高,一般是蔗糖的 50 倍以上,有的高达 200~2500 倍,有化学合成和天然提取物两大类。高甜味剂具有甜度高,使用量少,能量值低,不会引起牙齿龋变,可供糖尿病人、肥胖病人、心血管病人和老年人食用。高甜味剂一般与蔗糖等混合使用,以改良食品的风味。

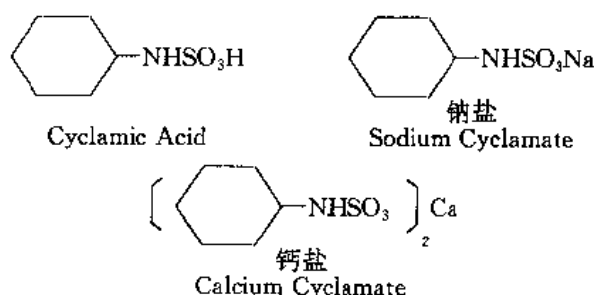
1. 糖精 (Saccharin) 化学名为邻磺苯甲酰胺,分子式为 $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3\text{NS}$,相对分子质量 183.18,其化学结构式为:



糖精为无色或白色结晶或粉末,其钠盐为水溶性,商品糖精主要是糖精钠。

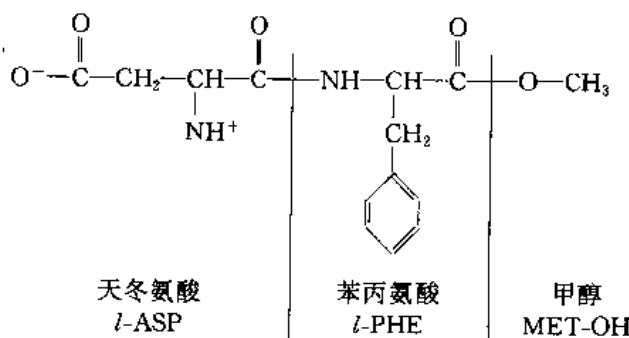
糖精甜度大约是蔗糖的 300 倍,单独使用有金属味和苦涩味。但它与糖(特别是果糖)共用时,风味得到一些改善,也有用糖精、果糖和甘露糖醇混合使用,对食品风味有明显改善。由于糖精的安全性和不良风味等诸多原因,世界上一些国家也在一定范围内使用。仍限制糖精使用量和使用范围。世界食品添加剂联合委员会提出糖精 ADI 值为 $0\sim 2.5\text{mg}/\text{kg}$,并取消了有条件的 $0\sim 15\text{mg}/\text{kg}$ 。

2. 甜蜜素 (Cyclamate) 化学名为环己烷氨基磺酸 ($\text{C}_6\text{H}_{11}\cdot\text{NH}\cdot\text{SO}_3\text{H}$) 的钠盐或钙盐,其化学结构式为:



甜蜜素为白色结晶或结晶粉末、无嗅、具有掩盖苦味的能力。易溶于水，对热稳定，没有吸湿性，甜度大，为蔗糖的 50 倍。作为一种高甜味剂和风味增强剂在食品、医药品和调味品上得到广泛的应用。甜蜜素通常和糖精按 10 比 1 配比使用，掩盖其不良风味而提高混合物的味觉特性。科学家们对甜蜜素进行了大量安全毒理实验，没有发现任何癌变现象。世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会，加拿大健康福利部，英国毒理委员会等世界权威组织最近均对甜蜜素安全问题做了评价，一致认为甜蜜素是安全的。世界食品添加剂联合专家委员会推荐甜蜜素 ADI 值为 11mg/kg。

3. 甜味素 (Aspartame) 是一种二肽类甜味剂，它是天冬氨酸和苯丙氨酸与甲醇结合的 二肽甲酯 (*l*-ASP-*l*-PHE-OME)，呈白色结晶状粉末，微溶于水，甜度大约是蔗糖的 160~220 倍。其化学结构式为：



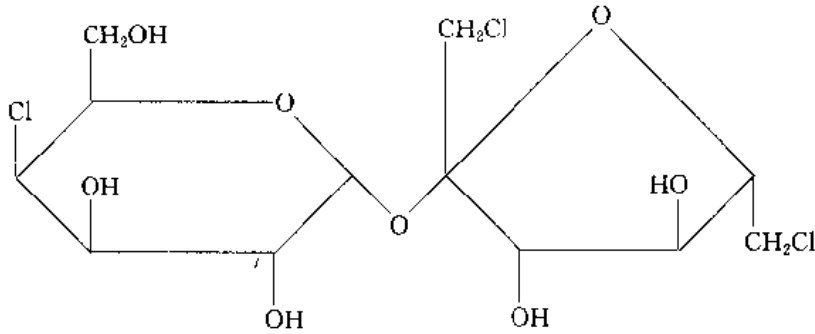
甜味素具有清爽、类似糖一样甜感，没有苦味和金属后味，对一些食品饮料的风味具有增强的作用，对酸性水果香味效果尤佳。干燥的甜味素性能很稳定，但在高温或酸性条件下，易分解导致甜味丧失。目前世界上有 50 多个国家允许在食品饮料上和作为餐桌甜味剂使用，世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会推荐的 ADI 值为 40mg/kg。由于 Aspartame 对酸对热不稳定，国外又推出了新一代二肽甜味剂-Alitame，其甜度是蔗糖的 2000 倍，预计不久会批准使用。

4. 安赛甜 (Acesulfame-K) 是一种氧硫杂环吡嗪酮类化合物，经过长期严格的毒理实验，WHO/FAO 组织提出人体的日摄入量 ADI 值为 0~9mg/kg。目前世界上许多国家均已允许使用。对热、对酸性质稳定，甜度大约是蔗糖的 200 倍，没有不良后味，同时价格便宜。因而倍受人们喜爱，是一种很有发展前景的新型甜味剂。

5. 嗦吗甜 (Thaumatococin) 是从西非洲盛产的一种植物果实中提取出的蛋白质甜味剂，甜味清爽纯正，是一种很好的风味增强剂。甜度大约为蔗糖的 2000~2500 倍，是迄今为止地球上发现的最甜的物质。经过大量毒理实验，证明嗦吗甜是一种安全的天然物质。世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会同意作为安全添加剂，对 ADI 值不做具体规定。

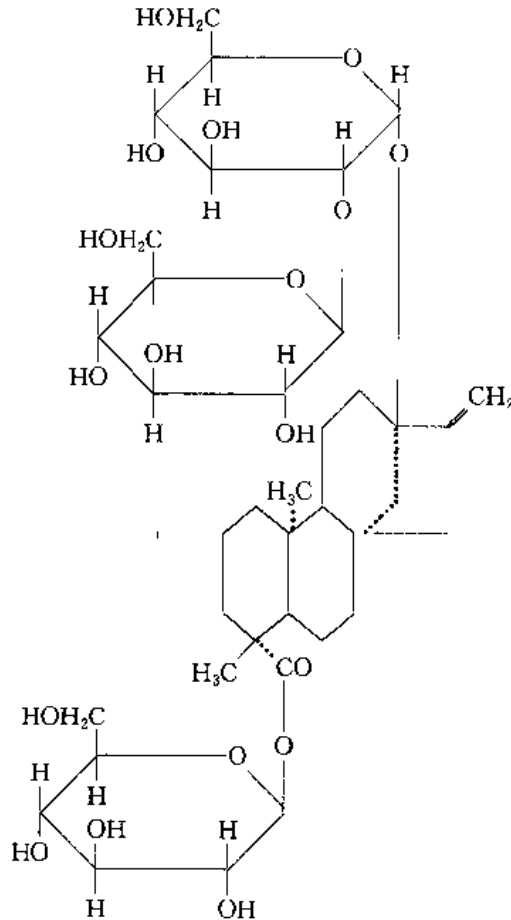
因此嗦吗甜一直广泛应用在食品、饮料、医药品工业上。

6. 三氯蔗糖是以蔗糖为原料经氯化作用制得。化学名为 4, 1', 6'-三氯-4, 1', 6'-三脱氧半乳蔗糖 (4, 1', 6'-Trichloro-galacto-sucrose, 简称三氯蔗糖 TGS)。相对分子质量 397.64, 其化学结构式为:



嗦吗甜外观呈白色晶体粉末状, 极易溶于水和乙醇, 旋光度 $[\alpha]_D^{20} + 85.8^\circ$, 辛醇/水分配系数 0.32 (20°C), 反射系数与浓度成线性关系, 甜度约为蔗糖的 400~800 倍, 甜味纯正, 安全可靠, 是一种比较理想的高甜度剂, 已于 1988 年投放市场。

7. 甜菊苷及甜菊双糖苷 A. 甜菊苷 (Stevioside) 是从菊科草本植物叶中提取出来的, 其分子式为 $C_{38}H_{60}O_{18}$, 相对分子质量为 805, 其化学结构式为:

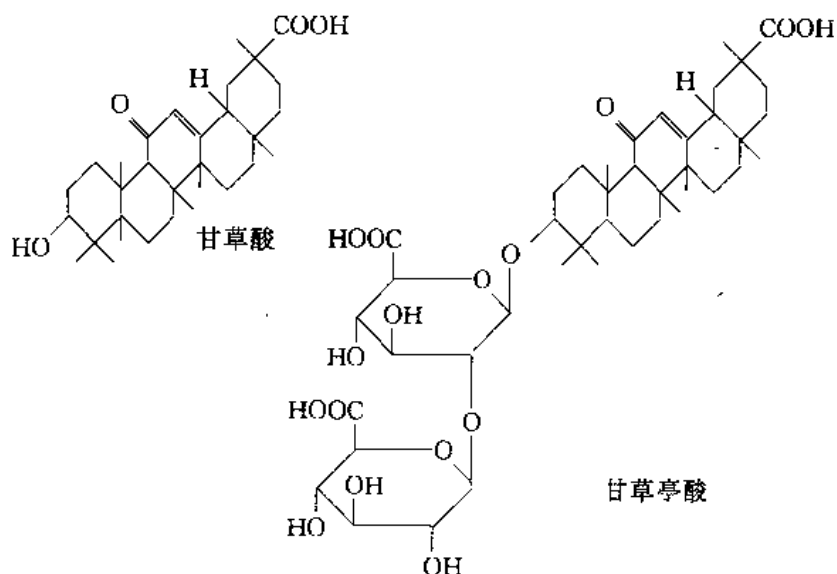


甜菊苷外观呈无色结晶, 熔点 198~202°C, 比旋度 $[\alpha]_D^{20}$ 为 -39.30° (5.7%水溶

液)。在空气中易吸湿，溶于水和乙醇，甜度为蔗糖 200~300 倍，有轻微的薄荷醇苦味及涩味，随产品纯度提高，其苦涩味有所减少，其他甜味特性类似于蔗糖。在酸性溶液或盐溶液中稳定性好。热稳定性强，不易分解，溶液在 pH4~10 范围内于 100℃ 加热 24h 亦无变化。甜菊苷不发生褐变现象，为非发酵糖，没有能量作用。一些国家经长期食用甜菊叶及其提取物后证明其是安全的、无毒性，目前甜菊苷正在挤进世界甜味剂市场。

甜菊双糖苷 A 可从甜菊叶子中提取，也可采用现代生物技术，通过酶水解甜菊苷，再通过一系列化学途径转变成甜菊双糖苷 A。甜度约是蔗糖的 450 倍，甜味特性比甜菊苷更接近于蔗糖。由于甜菊双糖苷 A 甜味特性好，甜度大，世界上许多国家都在致力于将其商业化生产。无可置疑，甜菊双糖苷 A 在甜味、口感、后味及稳定性等方面均比甜菊苷优越，而引起人们浓厚的兴趣，有人预计不久将有纯净的甜菊双糖苷 A 商品出现在世界甜味剂市场。

8. 甘草甜素 (Glycyrrhizin) 是从一种豆科多年生药用植物甘草中分离提取出的，即甘草酸，大约比蔗糖甜 50~100 倍。甘草甜素为三萜系列皂角苷，其糖苷配基连接在糖分子上，在糖苷配基的 C-3 原子上连接有两分子的葡萄糖醛酸，便成为甘草亭酸。经水解，甘草亭酸可分解成糖苷配基 (甘草甜) 和糖分子。其化学结构式为：



甘草和甘草甜作为多用途的药品和食品已有数百年历史。在现代医药工业上，由于甘草具有可口的味感和很强的甜味，而倍受青睐。最近的研究表明：甘草甜能抑制致龋齿细菌而具有抗龋齿的特性。并有抗溃疡、抗炎症和病毒感染的作用。美国食品与药物管理局将甘草甜列入公认的安全物质中最甜的天然甜味剂。

9. 二氢查耳酮是 1963 年在研究橘类的黄酮酮糖苷中发现二种二氢查耳酮，均有很强的甜味。其中新橙皮苷二氢查耳酮分子式为 $C_{28}H_{36}O_{15}$ ，相对分子质量 612.6，性能稳定，无吸湿性，溶于稀碱，水溶性差。据报道其甜度比蔗糖甜 2000 倍。虽具有甜度大，口感凉爽等优点，但由于甜味慢，后味长，有似甘草微苦味，在酸性条件下不稳定，使应用

受到了限制。柚苷二氢查耳酮为白色针状结晶性粉末，分子式为 $C_{27}H_{34}O_{14}$ ，相对分子质量 583.6，相对密度 d_4^{20} 为 0.504，熔点 $166\sim 168^\circ\text{C}$ ，甜度为糖精的 3~5 倍。对以上两种二氢查耳酮所做的毒理实验证明其是安全的，专家预测如果作为高甜味剂也有一定市场。

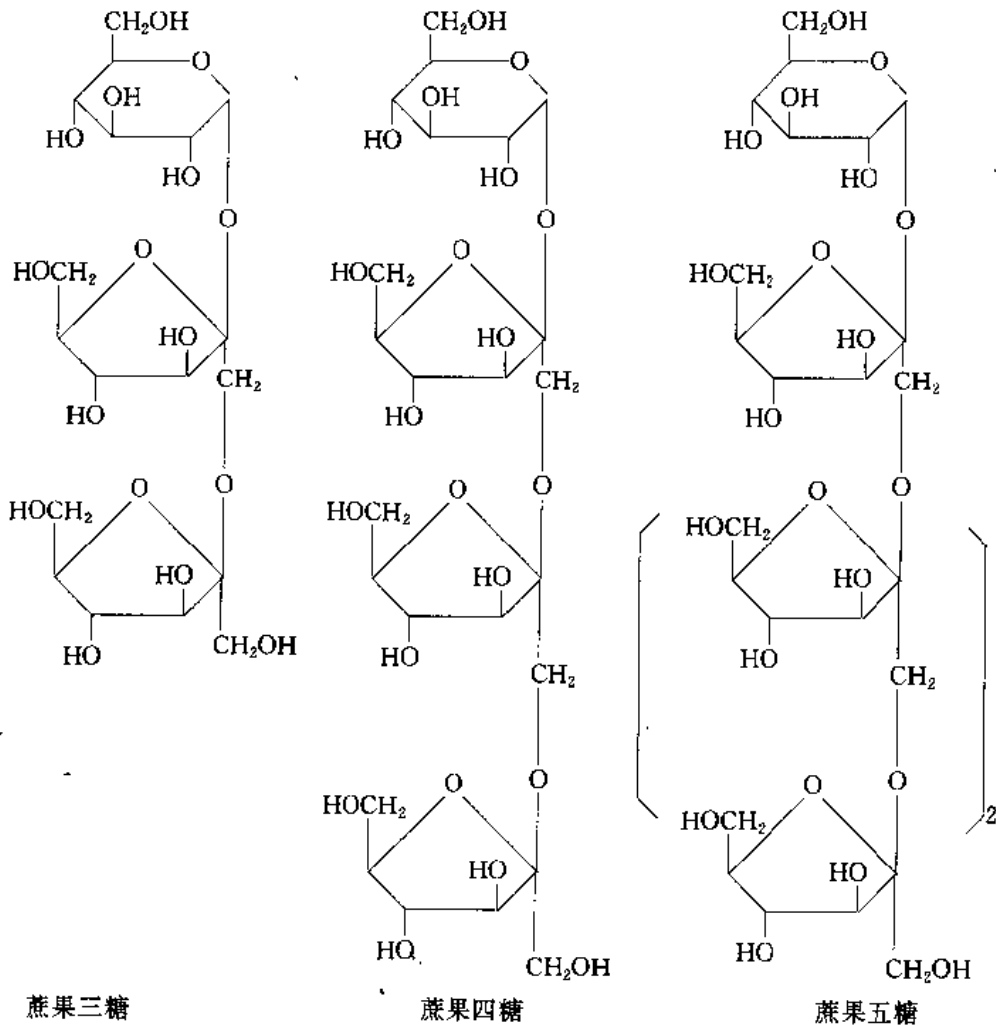
10. 罗汉果甜味剂。葫芦科植物罗汉果 (*Momordica grosvenori swingle*) 是我国广西特产的一种干制水果，传统上作为民间药物应用，性味甘凉，有清凉祛暑，润肺止咳之功效。其甜味物质可用水或者 50% 乙醇提取，再进一步纯化制得。罗汉果甜味剂为白色粉末，甜度约为蔗糖的 300 倍，熔点 $197\sim 210^\circ\text{C}$ (分解)。组成成分为 $C_{60}H_{102}O_{29} \cdot 2H_2O$ ，水解时放出 5 分子葡萄糖，为一带有 5 个葡萄糖单位的三萜糖苷。

二、活性低聚糖

近代的很多文献都证实低聚糖 (寡糖) 的分子中所含的单糖数为 2~10 个。低聚糖分类的标准很多，除按单糖残基分类外，按组成的单糖类型是否相同，可以分为同质和异质低聚糖，按分子中是否存在半缩醛羟基，可将其分为还原性和非还原性低聚糖；按照组成糖单位连接方式，还可以区分为不同的族别；按用途可分为功能性和普通低聚糖两大类。一些学者研究认为具有活性的低聚糖，包括水苏糖、棉籽糖、帕拉金糖 (Palatinse)、乳酮糖、低聚果糖、低聚木糖、低聚半乳糖、低聚乳果糖、低聚异麦芽糖、低聚帕拉金糖和低聚龙胆糖等。这类低聚糖不能被人体肠胃道内酶系酶解，即不被消化吸收而直接进入大肠内为双歧杆菌所利用，称之为肠道有益菌大肠杆菌的增殖因子。除低聚龙胆糖外，均带有甜度不一的甜味。活性低聚糖因其独特的生理功能而成为一类重要的保健食品基料，业已引起各国广泛的关注。现已确认活性低聚糖的主要作用有以下方面：(1) 很难或不被人体消化吸收，提供的能量很低或根本没有，可在低能量食品中发挥作用，供糖尿病人、肥胖病人和低血糖病人食用；(2) 活化肠道内双歧杆菌、促进其生长繁殖；(3) 不会引起牙齿龋变，有利保持口腔卫生；(4) 属于小分子水溶性膳食纤维，具有膳食纤维的部分生理功能，且添加到食品中基本上不会改变食品原有的组织结构及物化性质。

(一) 低聚果糖

低聚果糖 (Fructooligosaccharide) 是指在蔗糖分子果糖残基上结合 1~3 个果糖的糖，通常食用的很多水果、蔬菜中均存在。低聚果糖又称寡果糖或蔗糖三糖族低聚糖。Whalley (1952) 用酵母转化酶作用于蔗糖，首先得到蔗果三糖，天然存在的和酶法生产的低聚果糖几乎都是直链状，在蔗糖分子以 β - (1 \rightarrow 2) 糖苷键与 1~3 个果糖分子结合成的蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖，属于果糖和葡萄糖构成的直链杂低聚糖。它们的化学结构式为：

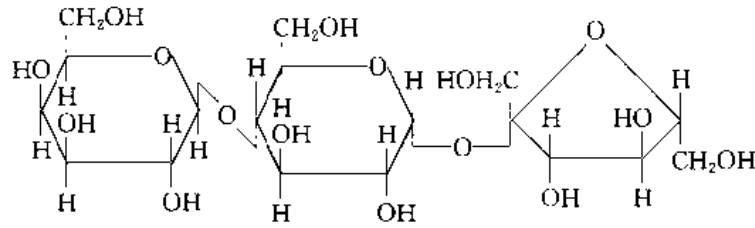


据报道,低聚果糖是良好的双歧杆菌增殖因子,成人每天摄入量5~8g,两周后粪便中双歧杆菌数可增加10~100倍。

目前生产的低聚果糖G和P的甜度约为蔗糖的60%和30%,它们均保持了蔗糖良好的甜味特性。其粘度、保湿性及在中性条件下热稳定性等性质都接近于蔗糖,但在pH 3~4的酸性溶液中加热易分解。根据文献报道,低聚果糖G中糖的组成(干基计):低聚果糖总量为55%(蔗果三糖25%,蔗果四糖25%,蔗果五糖5%),葡萄糖33%,蔗糖为12%;而低聚果糖P中糖的组成(以干基计):低聚果糖95%(蔗果三糖35%,蔗果四糖50%,蔗果五糖10%),葡萄糖2%,蔗糖3%。

(二) 低聚乳果糖

低聚乳果糖(Lactosucrose)是以乳糖和蔗糖(1:1)为原料,利用节杆菌(*Arthrobacter*)产生的 β -呋喃果糖苷酶作用,分解蔗糖生成的果糖基转移到乳糖还原性末端C₁位羟基上,生成半乳糖基蔗糖即低聚乳果糖,它由葡萄糖、果糖和半乳糖三个单糖组成。化学结构式为:



商业化生产的低聚乳果糖产品含 37% 低聚乳果糖、28% 蔗糖、13% 乳糖、17% 葡萄糖及果糖、5% 其他糖。甜味特性接近于蔗糖，甜度约为蔗糖的 70%。该糖是双歧杆菌增殖因子，每天摄入 5g，一周后粪便中双歧杆菌数由摄入前的 10.5% 增加到 32.6%，健康人可达 50% 左右。

(三) 低聚半乳糖

低聚半乳糖 (Galactooligosaccharide) 是由 β -半乳糖苷酶作用于乳糖而制得的 β -低聚半乳糖，在乳糖分子的半乳糖上连接 1~4 个半乳糖，属于葡萄糖和半乳糖组成的杂低聚糖。低聚半乳糖的热稳定性较好，具有很好的双歧杆菌增殖活性。

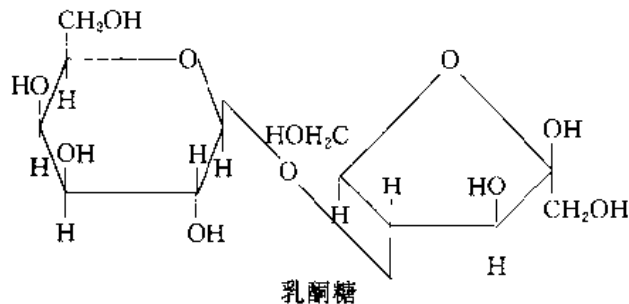
日本生产的低聚半乳糖商品 SA 糖组成为 (干基)：(低聚半乳糖 57.8%，葡萄糖 28.8%，半乳糖 8.9%，乳糖 4.5%)，该产品甜度约为蔗糖 40%。最近日本又成功的研究开发出 α -低聚半乳糖，其重要成分是蜜二糖，为半乳糖与葡萄糖以 α -(1 \rightarrow 6) 糖苷键结合而成的双糖，也是双歧杆菌增殖因子。

(四) 低聚木糖

低聚木糖 (Xylooligosaccharide) 是由 2~7 个木糖以 β -(1 \rightarrow 4) 糖苷键结合而成的低聚糖。甜度接近麦芽糖，约为蔗糖的 40%。热稳定性好，即使在酸性条件下 (pH2.5~7) 加热也基本不分解，适合用在酸性饮料中。具有良好的双歧杆菌增殖活性，每天摄入少量 (如 0.7g)，就有明显效果。

(五) 异构化乳糖

异构乳糖 (Lactulose) 或乳酮糖由乳糖异构而来，并无天然存在。原乳经加热处理可制得含异构乳糖乳制品。异构乳糖是 4-O- β -D 吡喃半乳糖苷基-D-呋喃果糖，即由一分子半乳糖和一分子果糖组成，亦称为异构乳糖。其化学结构式为：

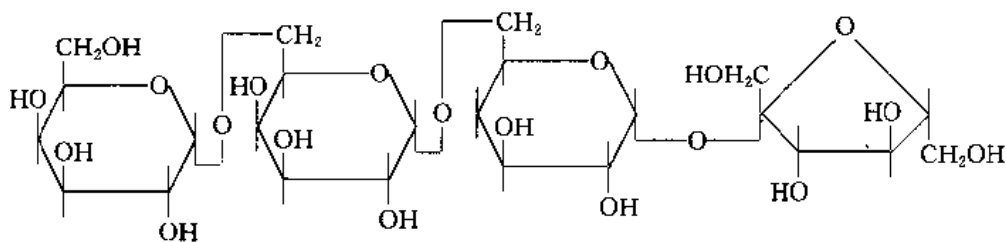


异构化乳糖为白色不规则结晶粉末，相对密度 1.35，熔点 169℃，易溶于水，甜度为蔗糖的 48%~60%，且带有清凉醇味。目前市场上商品有 50% 异构乳糖浆产品，呈淡

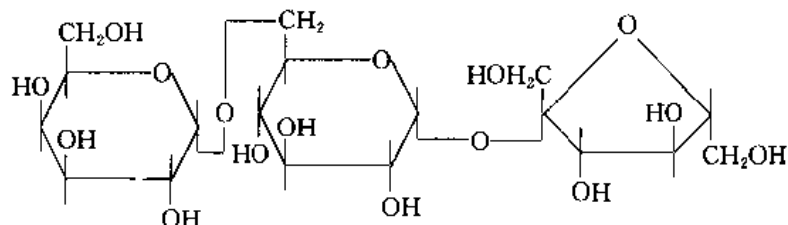
黄色，略为透明，粘度较低。随着分离技术的发展，现已制成高纯度结晶产品。

(六) 大豆低聚糖

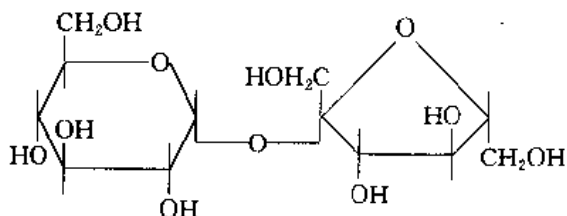
大豆低聚糖 (Soybean oligosaccharide) 广泛存在于植物中，以豆科植物含量居多。从大豆子粒中提取出的大豆低聚糖是一类可溶性低聚糖的混合物，主要成分有水苏糖、棉籽糖和蔗糖。水苏糖和棉籽糖均由半乳糖、葡萄糖和果糖组成的支链杂低聚糖。在蔗糖的葡萄糖基一侧以 α - (1 \rightarrow 6) 糖苷键连接 1 或 2 个半乳糖。其化学结构式为：



水苏糖



棉籽糖



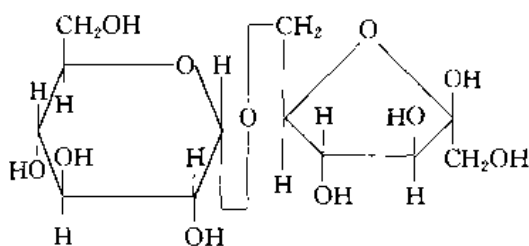
蔗糖

大豆低聚糖的甜味特性接近于蔗糖，甜度为蔗糖的 70% 左右，能量值为蔗糖的 1/2。如果单由水苏糖和棉籽糖组成的改良大豆低聚糖，则甜度为蔗糖的 22%，能量值更低、大豆低聚糖具有很好热稳定性，在 140℃ 高温下也不会分解，对酸的稳定性略优于蔗糖。

目前生产的大豆低聚糖产品主要有大豆低聚糖浆和颗粒状大豆低聚糖。大豆低聚糖中对双歧杆菌有增殖作用的因子水苏糖和棉籽糖，它们在糖浆产品中占 24%，颗粒状产品中占 30%。正井辉久 (1987) 实验表明，成年人每天摄取 10g 大豆低聚糖 (含 70% 水苏糖和 20% 棉籽糖)，一周后每克粪便中的双歧杆菌数由原来的 10^8 增至 $10^{9.6}$ ，而肠内腐败细菌数有所减少。即使少量摄取，也可起到促进双歧杆菌增殖的作用。

(七) 帕拉金糖

Weidenhagen (1957) 等在甜菜制糖过程中发现一种非蔗糖的双糖化合物，即异麦芽酮糖 (Isomaltulose)。继而发现精胺杆菌 (Protaminobacter rubrum) 能将蔗糖转化成帕拉金糖 (Palatinose)。其化学结构式为：



由于具有某些特殊的生物活性及很低的致龋齿特性，人们对这种天然存在的帕拉金糖给予了极大的关注。

帕拉金糖为 6-O- α -D-吡喃葡萄糖基-D-果糖，呈结晶状，为还原性双糖，其结晶体含 1 分子水，失水后不呈结晶状。含水帕拉金糖相对分子质量 360，熔点 122~123℃，比旋度 $[\alpha]_D^{20} 97.2^\circ$ 。具有与蔗糖类似的甜味特性，最强的甜味刺激与蔗糖一样，无异味，甜度为蔗糖的 42%，不随温度变化而改变甜度。大多数细菌和酵母不能发酵利用帕拉金糖，其抗微生物特性使得产品的甜味易于保持。由于帕拉金糖在人体消化道中被消化吸收，故不是双歧杆菌的增殖因子。目前日本科学家利用帕拉金糖为原料，通过化学缩合反应而生成含 2~4 个帕拉金糖分子结合而成的缩合物，含有 4~8 个单糖，称为低聚帕拉金糖，它难以被人体消化酶所水解，具有双歧杆菌增殖活性，同时也是一种低龋齿性低聚糖。

三、活性多糖

活性多糖专指具有某种特殊生物活性的多糖化合物，包含植物多糖、真菌多糖等。这类多糖因有抗肿瘤和增强免疫作用等的生物活性，而越来越引起人们的关注。近年来我国对多糖的研究进展很快，研究的范围涉及多糖分离纯化、结构分析、理化性质、免疫学、药理学及应用等，对其免疫增强作用机理的研究已深入到分子、受体水平。

目前有关多糖抗肿瘤活性的试验，大多是在移植性肿瘤动物身上进行测定的，据 Tokuzen 等人报道，迄今发现的抗肿瘤多糖虽然对移植性肿瘤有较强的抑制活性，但对固有肿瘤却缺乏明显的反应，至今还没有一种可以信赖的多糖可应用于人类肿瘤的治疗上。但作为保健食品的活性成分，重在防而不在治，既然活性多糖能通过提高机体免疫力而达到增强入体的抵御疾病（包括肿瘤）的能力，完全符合保健食品基料的要求。

（一）植物活性多糖

1. 膳食纤维。长期以来，在食品工业领域也一直沿引“粗纤维”这一概念，影响了食物纤维生理功能的研究和发展。Trowell (1972) 首次引入“膳食纤维” (Dietary fibre) 这一全新的名词，1976 年他将膳食纤维定义为“不被人体消化吸收的多糖类碳水化合物和木质素”。通常将膳食中的非淀粉类多糖与木质素合称为膳食纤维，有时，也将植物中那些不被消化吸收、含量较少的糖蛋白、角质、蜡、多酚酯等也列入膳食纤维内。膳食纤维由纤维素，果胶类物质、半纤维素和糖蛋白等，木质素三大部分组成。

纤维素是由 β -吡喃葡萄糖通过 β -(1 \rightarrow 4) 糖苷键连接的聚合物，聚合度大约是数千。呈长链无分支结构，两个糖苷键之间距离为 1.03nm，长链内通过氢键作用增强了葡聚糖链的刚性和稳定性。由于纤维素分子内强烈的氢键作用力，在植物细胞壁中呈结晶状的

微纤维束结构单元。在氢键结合力较弱的位置成非结晶结构，易被溶剂破坏。组成谷物和豆类膳食纤维中的半纤维素主要有阿拉伯木聚糖、木糖葡聚糖、半乳糖甘露聚糖和 β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)-葡聚糖四种。果胶是以 α -(1 \rightarrow 4)糖苷键连接的聚半乳糖醛酸为骨架链，主链中连有-(1 \rightarrow 2)-鼠李糖残基，部分半乳糖醛酸残基甲酯。果胶类物质主要有阿拉伯聚糖、半乳聚糖或阿拉伯半乳聚糖。果胶及果胶类物质均溶于水，在谷物纤维中含量少，豆类及果蔬纤维中含量较高。果胶能形成凝胶，对维持膳食纤维的结构有重要的作用。木质素是由松柏醇、芥子醇和对羟基肉桂醇三种单体组成的大分子化合物。纯净膳食纤维中蛋白含量很少，小麦和大豆纤维中均属于富含羟脯氨酸的糖蛋白，糖部分主要是阿拉伯半乳聚糖。

膳食纤维的化学组成特性由于含有很多亲水基团具有很高的持水力，大致是自身重量的1.5~25倍。很多研究表明，膳食纤维的持水性可以增加人体排便的体积与速度，减轻直肠内压力，亦减轻泌尿系统的压力，从而缓解诸如膀胱炎、结石等疾病的症状，并能使毒物迅速排出体外。由于膳食纤维表面带有很多活性基团，可以螯合吸附胆固醇和胆汁酸之类有机分子及肠道内的有毒物质（内源性有毒物）、化学药品和有毒医药品（外源性有毒物）等，并促进它们排出体外。肠道内膳食纤维含量多时会诱导出大量好气菌群来代替原来存在的厌气菌群，这些好气菌很少产生致癌物，即使有少量毒物产生，也能迅速随膳食纤维排出体外。

近年来，膳食纤维的重要生理功能已为人们所了解并逐渐得到公认，它不仅成为继蛋白质、碳水化合物、脂肪、维生素、矿物质和水之后的第七大营养素。并显示出它具有很多特殊生理活性功能，对预防结肠癌、便秘、冠心病、高血压、动脉硬化、糖尿病等疾病具有明显的作用。上述疾病常见于老年人中，食品中足够数量的膳食纤维会保护老年机体免遭这些疾病的侵害。我国拥有世界上人数最多的老年人，现阶段开发膳食纤维食品更具必要性和紧迫性。

2. 茶多糖。茶叶中，尤其是粗老茶中含有较高能治疗糖尿病的茶多糖，据日本报道，茶多糖是由阿拉伯糖、核糖和葡萄糖组成，相对分子质量约40000，我国近年来研究发现茶多糖(CTPS)是由糖类、蛋白质、果胶和灰分等物质组成，其中糖类约占1/3，果胶及蛋白质约占1/3，水分、灰分及其他约占1/3。其多糖部分为阿拉伯糖、木糖、岩藻糖、葡萄糖和半乳糖等，各单糖组成的比例为5.52:2.21:6.08:44.20:41.99，多糖相对分子质量约为107000。CTPS在沸水中溶解性较好，但不溶于高浓度的乙醇、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂。热稳定性差，在高温或过酸和偏碱条件下，均会使多糖部分水解。

CTPS的药理实验证明：茶多糖具有明显的降血糖，增强免疫功能，促进单核巨噬细胞系统吞噬功能，增强机体自我保护及抗辐射等诸多作用。但由于茶叶的原料、分离纯化方法等不同会造成茶多糖组成成分分子质量的差异，所以它在体内的作用机理有待进一步研究。日本学者对CTPS是治疗糖尿病最有效成分进行了肯定，因而在日本已出现了制成含CTPS的降血糖和抗糖尿病药物及保健食品。

3. 枸杞多糖。(LBP)是枸杞的主要活性成分之一，具有多方面的药理作用及生理功能。从宁夏枸杞(Lyxium barbarum L.)中分离出的枸杞多糖LBP-1，为白色纤维状疏松固体，溶解性很好，极易溶于水，能溶于酒精，不溶于丙酮、氯仿等有机溶剂。LBP-1

中性糖由半乳糖、葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖及木糖组成,其摩尔比为 5.17 : 4.13 : 3.15 : 1.00 : 0.84 : 0.48。相对分子质量大于 20000,中性糖含量为 81.37%,LBP-1 为含半乳糖醛酸的杂多糖,半乳糖醛酸含量 3.69%。LBP-1 中蛋白质含量为 9.42%,表明 LBP-1 为含糖链和蛋白链的糖蛋白。从枸杞子中分离提纯得到中性多糖(LBNP)和酸性多糖(LBAP)。LBNP 由木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、赤藓糖及少量岩藻糖和山梨糖等 8 种糖基组成,前 5 种糖基的摩尔比为 10 : 1 : 1 : 6.7 : 4,多糖呈分支结构,主链包括 1.4 连接的葡萄糖、1.6 连接的半乳糖、1.4 或 1.5 连接的木糖,在 1.4 连接的葡萄糖上 6 位分支形成侧链,侧链末端是木糖和半乳糖,尚含有一种含量较高的未知连接结构。

枸杞多糖 LBP 具有一定的抗衰老抗辐射作用,能激活 T 细胞及 M 细胞,调节机体免疫,抑制小鼠 S-180 肿瘤,促进生长发育等多种功能。实际上枸杞作为有疗效的保健食品基料早以为人们所接受,枸杞多糖的分离提取及产品的开发正日益受到重视。

4. 魔芋葡甘露聚糖 (Glucomannan) 简称 KGM,是从魔芋 (*Amorphophallus Konjac*, K. Koch) 块茎分离提取出的一种复合多糖,外观为白色丝状物,无特殊味道,几乎不为人体消化吸收。它由甘露糖-甘露糖-葡萄糖的长链组成,甘露糖:葡萄糖 \approx 2:1,相对分子质量约 200 万以上,以 β -1.4 糖苷键连接, C₃ 处有分支结构。KGM 是魔芋精粉中的主要成分,含量为 60%~80%。KGM 与水具有很强的亲合力,能自动吸收水分而膨胀形成溶胶,吸水膨胀至 80~100 倍仍能呈溶胶状态,酸性条件下溶胶性能良好,而偏碱性条件下则易发生凝沉现象。膨润物中添加凝固剂氢氧化钠、氢氧化钙、碳酸钠、磷酸三钠等,可促进凝胶的形成而使之失去流动性,随着凝固剂添加量增加,凝胶化速度加快。但凝固剂过多,则凝胶气泡难以排出,研究发现 pH10.8~11 时形成的凝胶最好。当 KGM 在 1.5% 以下时为软凝胶状态,3.5% 以上时,凝胶气泡难以排除,以 1.64%~3.29% 较为理想。温度对凝胶的形成及特性有明显的影响,随温度上升,凝胶粘度值下降,低温下 (8~10℃) 的粘度值几乎为高温下 (80~85℃) 的 2 倍。在膨润的 KGM 凝胶中,加入凝固剂并加热,可使溶胶凝固,温度越高凝固剂作用则强,温度低结合力则弱。

魔芋葡甘露聚糖 (KGM) 是具有重要生物活性的多糖,广泛应用在食品、轻工、医药、化工等领域。在营养保健上是一种理想的膳食纤维,具有减肥、健美、降血压、降低胆固醇、预防糖尿病及防癌等功能。魔芋作为一种新兴食品由于它具有独特的助控体重及保健疗效,很适应当今世界流行的“减肥热”对食物结构的需求,欧洲、美洲、东南亚等地对生产和进口魔芋食品热情倍增。在一个相当长的时期内,国内外魔芋产业发展趋势为大众化系列食品与高附加值、高档次的魔芋保健食品并存,同时魔芋在医学、食品工业上的应用,加速了其高新技术产品的开发利用。

5. 银杏叶多糖。随着银杏叶提取物 GBE 的开发应用,银杏叶中多糖的研究也颇为重视。Kraus, J (1989) 等自银杏叶中分离出一种水溶性多糖,具有对机体增强免疫功能的生物活性。用有机溶剂处理过的银杏叶中分离出多糖混合物,经纯化分离得 1 个中性多糖 (GF₁), 2 个酸性多糖 (GF₂, GF₃)。GF₁ 相对分子质量为 23000,呈中性支链阿拉伯糖聚糖结构,主链由 1.5 糖苷链的阿拉伯残基组成,平均每 12 个阿拉伯糖分子中有 3 个经过 C₂ 或 C₃ 的侧链结构。

GF₂是由GF₂中分离出的一种酸性多糖,相对分子质量57000,由25%鼠李糖、28%甘露糖、10%葡萄糖、22%葡萄糖醛酸、6%半乳糖醛酸和微量阿拉伯糖组成。GF₃相对分子质量为40000,由15%鼠李糖、18%阿拉伯糖、16%半乳糖、30%半乳糖醛酸和15%葡萄糖醛酸组成,其支链为鼠李半乳糖醛酸聚合链,侧链为阿拉伯半乳糖。

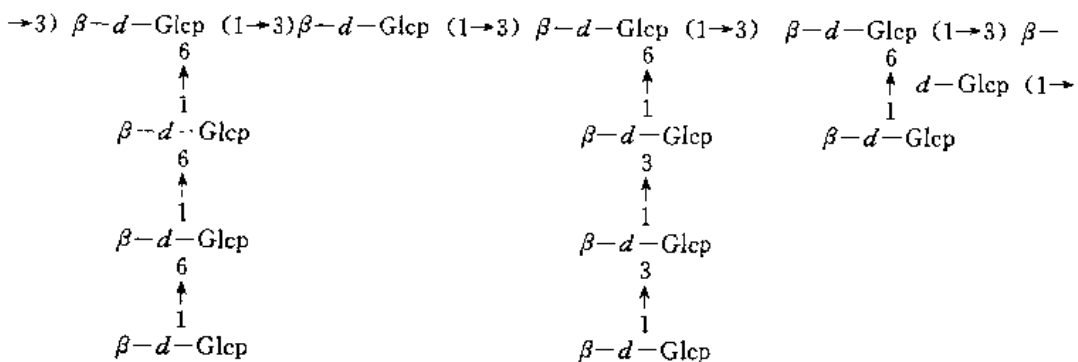
6. 波叶大黄多糖。我国学者首次从波叶大黄中(*Rheum hotaoense*)得到波叶大黄多糖(RHP)经分离、纯化得波叶大黄多糖精品RHP-A和RHP-B,均为单一多糖。RHP-A和RHP-B的糖含量分别为92.43%(含糖醛酸31.2%)和94.15%(含糖醛酸32.4%),平均相对分子质量分别为 7.8×10^4 和 3.9×10^4 。RHP、RHP-A、RHP-B均含*l*-岩藻糖、*l*-阿拉伯糖、*d*-木糖、*d*-甘露糖、*d*-半乳糖和*d*-葡萄糖。其摩尔比分别为RHP=1.03:5.72:0.48:6.87:1.96:1; RHP-A=2.35:10.36:1.88:11.08:1.92:1; RHP-B=1.57:2.13:2.11:1.48:2.52:1。

RHP是一类酸性杂多糖,具有促进机体免疫功能、防治心血管疾病、抗肿瘤、抗衰老和细胞保护作用。其活性作用以RHP-B最强,RHP-A次之,而RHP较差。

7. 浒苔多糖。浒苔自古即为食药两用藻类,从浒苔藻类(*Enteromorpha prolifera*)中提取分离得到的一种活性多糖,为浒苔多糖(EP)呈白色丝状物,总糖含量为88.8%,其中糖醛酸含量为33.6%。单糖组成为*l*-阿拉伯糖、*l*-岩藻糖、*d*-甘露糖、*d*-半乳糖及*d*-葡萄糖,平均相对分子质量为25000。EP半纯品及精制品均不溶于乙醇、丙酮和乙醚等有机溶剂,但可溶于水,尤其易溶于热水,其水溶液为透明粘状液体。EP具有降血脂和抗衰老等生物活性,其他生物活性及生理功能正在继续研究中,可望有较大的开发利用前景。

(二) 真菌活性多糖

1. 香菇多糖。香菇(*Lentinusedodes*)为侧耳科(*Pleurotaceae*)担子菌,是我国最常见的食用菌之一。日本学者千原(1969)首次报道从香菇中分离出一种抗肿瘤多糖,而轰动整个医学药物界,吸引人们从食用或药用真菌中寻找抗肿瘤活性成分。这种香菇多糖(Lentinan)的主链是由 β - $(1 \rightarrow 3)$ 糖苷键的葡聚糖,主链上约有23%的葡萄糖残基通过C₆分支点连有侧链。有三种方式:一种为单一的非还原端Glc(1 \rightarrow 6);另一种是 β - $(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键连接的葡萄糖低聚糖;第三种是 β - $(1 \rightarrow 3)$ 糖苷键连接的葡萄糖低聚糖。其化学结构模型为:

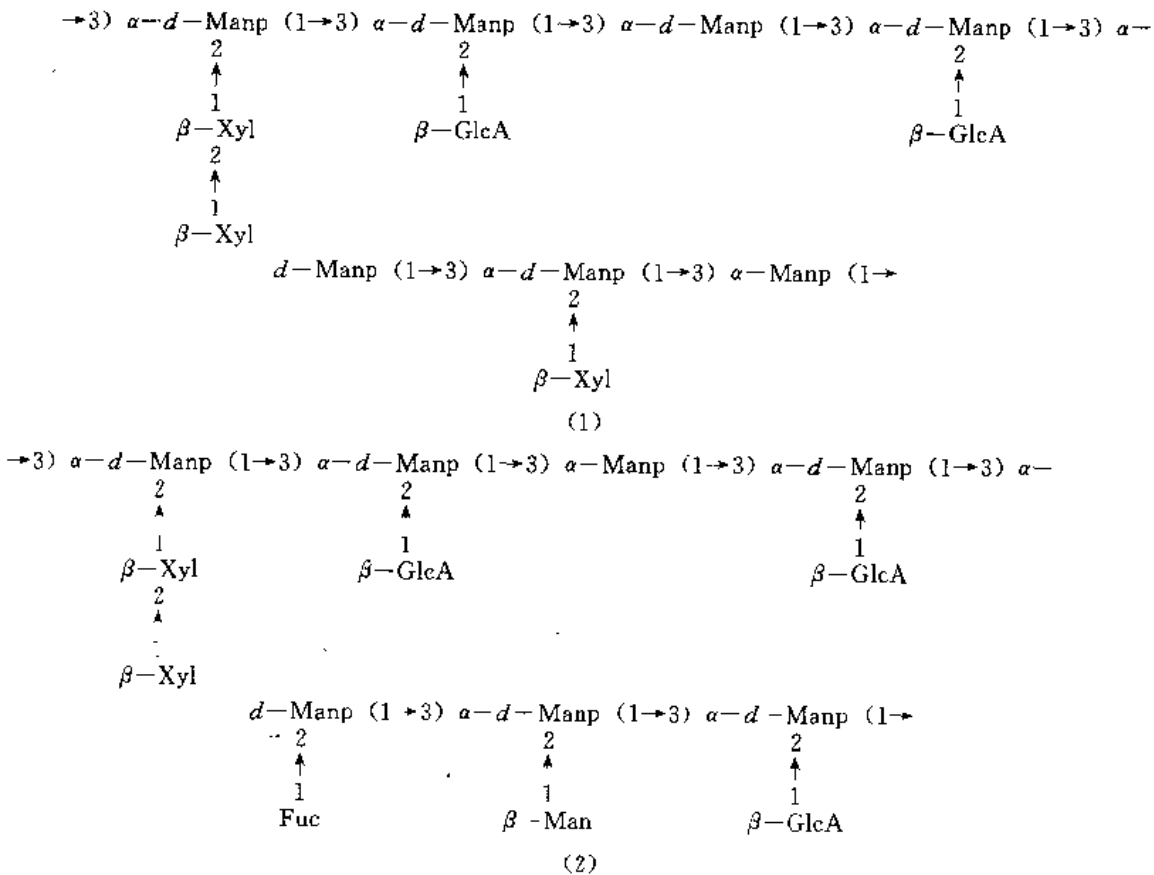


有学者试验用香菇多糖2mg/kg剂量腹腔注射已移植肿瘤的大鼠连续5天,结果表明对肉瘤S₁₈₀的抑制率达83%,经切支水解后得到的较小分子相同剂量的香菇多糖对肉

瘤的抑制率提高到 97% 以上。1980 年 Hamuro 等人用 8 种不同的 β - (1 \rightarrow 3) 葡聚糖进行抗肿瘤活性与结构关系的研究, 确认香菇多糖是一种免疫刺激剂。从脱水香菇下脚料中提出一种 PJFI 多糖, 其组成成分为葡萄糖、半乳糖、甘露糖和木糖等四种单糖组成 (摩尔比为 15 : 2.8 : 1.2 : 1), 经结构分析, 表明它的主链结构也是由 β - (1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的葡聚糖 (只是在侧链上有差异), 具有明显的抗突变作用特性, 保护机体免遭肿瘤侵害的生物活性。

临床上已应用香菇多糖治疗慢性病毒性肝炎和作为原发性肝癌等恶性肿瘤的辅助治疗药物, 可以缓解症状, 提高患者低下的免疫功能, 以及纠正微量元素的代谢失调等。香菇多糖作为活性因子可提高人体免疫体系, 预防多种疾病 (包括肿瘤等), 其作为保健食品基料是很有前途的。

2. 银耳多糖。从银耳 (*Tremella fuciformis* Berk.) 俗称白木耳子实体中得到银耳多糖 (*Tremellam*) 是一种酸性杂多糖, 其主链结构是由 α - (1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的甘露聚糖, 支链由葡萄糖醛酸和木糖组成。存在于银杏深层发酵孢子体中的酸性杂多糖, 主链结构与上述相似, 仅在支链上有所区别。其化学结构式为:



这类多糖有明显的增强免疫功能, 抗放射、升高白血球、降血脂、降血糖、延衰老、抗肝炎、抗突变、抗炎和红细胞凝集、抗溃疡等活性。银耳多糖能显著抑制癌细胞 DNA 合成速率, 对小鼠移植性肉瘤 S₁₈₀ 有显著的抑制作用。研究发现肿瘤组织中 AMP (环腺苷) 含量低于正常值, 而银耳多糖可提高肿瘤细胞中的 AMP 含量, 从而影响核酸和蛋白质代谢, 改变肿瘤细胞的特性使其往正常方向转化, 实现抗肿瘤作用。

3. 金针菇多糖。金针菇 (*Flammulina velutipes* Curt. sing.) 属于伞菌目口蘑科金钱菌属。已有实验表明：金针菇多糖对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 有明显的抑制作用。从水溶性金针菇多糖中进行分级和提纯，得到四种纯组分成分命名为 EA₃、EA₅、EA₆、EA₇。其中 EA₃ 含有 92.5% 葡萄糖，由 β -(1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的葡聚糖，化学结构与香菇多糖相似。1mg/kg 剂量持续 10 天对肉瘤 S₁₈₀ 的抑制率为 82%，5mg/kg 剂量的抑制率为 96%，效果非常明显。EA₅、EA₆、EA₇ 三种组分由葡萄糖及少量的半乳糖，甘露糖、阿拉伯糖和木糖（摩尔比为 18.8 : 13.3 : 5.6 : 3 : 1；7.9 : 18.7 : 9.7 : 4.4 : 1；5.6 : 2.5 : 3.9 : 0.7 : 1）。EA₅ 和 EA₇ 在 1mg/kg 剂量下对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 抑制率为 84% 和 68%。在 5mg/kg 剂量下为 98% 和 87%。EA₆ 是一种糖蛋白，蛋白质含量为 30%，在 1mg/kg 和 5mg/kg 剂量下对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 抑制率仅为 19% 和 25%，但在 300mg/kg 剂量下对肉瘤 S₁₈₀ 和腹水瘤抑制率为 70% 和 80%。

金针菇多糖通过恢复和提高免疫力以达到抑制肿瘤的目的。已有研究结果表明 EA₃ 能增强 T 细胞功能，激活淋巴细胞和吞噬细胞，促进抗体产生并诱导干扰素产生；EA₆ 能增强小鼠对白血病 L₁₂₁₀ 疫苗的抵抗作用，促进 IgM 抗体产生，增强 T 细胞活性，激活淋巴细胞的转化，但不能产生淋巴细胞。EA₆ 对宿主外围肉状淋巴细胞系统没有作用，不能增强单核巨噬细胞的吞噬能力。

4. 云芝多糖。从云芝 (*Polystictus versicolor*) 属子实体中提取的云芝多糖，含有 20% ~ 30% 的蛋白质，多糖主链以 β -(1 \rightarrow 3) 糖苷键为主可能兼有少量 β -(1 \rightarrow 4) 糖苷键连接葡聚糖，带有 β -(1 \rightarrow 6) 糖苷键连接的短链葡聚糖侧链。注射和口服对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 均有抑制作用，是一种良好的免疫增强剂。日本产云芝的孢内多糖 PS-K (Krestin)，明显抑制动物肿瘤，且抗瘤谱广，是近年颇引人注目的抗癌免疫化疗药物。云芝孢外多糖由多种单糖组成的杂多糖，具免疫活性，但无明显抑制肿瘤作用。有文献报道从云芝中提取的蛋白多糖具有降脂，抗动脉粥样硬化的作用。

云芝多糖目前已正式应用于临床治疗上，作为一种抗肿瘤药物可改善患者的自觉症状，增加食欲与体重，对于预防治疗食道癌、肺癌、子宫癌、乳腺癌有一定疗效。对于白血病的治疗也获肯定的疗效，可明显增强机体的细胞免疫功能及对放、化疗的耐受性并减少感染与出血。

5. 冬虫夏草多糖。冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 是虫草属真菌中一种寄生性子囊菌，是寄生于鳞翅目的幼虫头上或体部的子座与虫体复合物，为我国名贵的中药材。日本学者宫琦 (1977) 等人报道了一种水溶性冬虫夏草多糖，为高度分支的半乳糖甘露聚糖，主链为 α -(1 \rightarrow 2) 糖苷键连接的 *d*-呋喃半乳糖基及 (1 \rightarrow 4) 糖苷键连接的 *d*-吡喃半乳糖基，非还原性末端均为 *d*-呋喃半乳糖和 *d*-吡喃甘露糖。1984 年宫琦从大团囊虫草 (*Cordyceps ophioglossoides*) 培养液分离出一种水溶性多糖，确认是 β -葡聚糖，平均相对分子质量为 632000，由 β -(1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的 β -*d*-吡喃葡聚糖组成骨架，每 2 个葡萄糖残基通过 C₆ 分支点连接有一个单糖残基分支。能强烈抑制小白鼠肉瘤 S₁₈₀，由它衍生的多元醇比原多糖抗肿瘤活性更大。

在我国保健品生产行业中已经形成了以虫草为基料的系列保健食品，如虫草酒，虫草精等已显示出对人体多方面的生理功能，展示了它的应用前景。

6. 灵芝多糖。从赤芝(*Ganoderma lucidum*)中分离得水溶性抗肿瘤多糖 GL-1, $[\alpha]_D^{20} + 26^\circ$, $MW = 4.0 \times 10^4$ 。GL-1 单糖组成摩尔比为: 葡萄糖: 木糖: 阿拉伯糖 = 18.8 : 1.5 : 1.0。GL-1 为分支的阿木葡聚糖, 含有一个包括 *d*-Glucopyranosyl (1→4) - α -和 - β -, (1→6) 和 (1→3) - β -键的主链和侧链。GL-1 显著抑制小鼠实体型 S_{180} 生长。赤芝中分离得到的粗多糖 D, 具有免疫促进作用, 还有镇静、强心等作用。从平盖灵芝(*G. applanatum*)中提取出两种 β -葡聚糖, 其中一种在 0.15mg/kg 剂量即显示出较强的抑制肿瘤活性, 是最有效的抗瘤葡聚糖之一。并具有免疫调节效应。这种平盖灵芝多糖 G-Z, 结构为 β -(1→3), (1→4) 连接的 *d*-葡萄糖残基。平盖灵芝中分离出的另一种则基本上不具有抑制肿瘤的活性。分析表明它们均具有 (1→6) 分支的 β -(1→3) 葡聚糖特征。这表明葡聚糖的抗肿瘤活性不仅与其初级结构有关, 更多的与它们的分子大小形状及在水中溶解特性和构象形态有关。

7. 黑木耳多糖。从黑木耳(*Auricularia auricula*)子实体中提取的黑木耳多糖(AA), MW 为 15.5×10^4 , 含岩藻糖(*l*-fuc), *l*-ara, *d*-xyl, 甘露糖(*d*-man), *d*-glu, 葡萄糖醛酸的摩尔比为 0.14 : 0.045 : 0.17 : 1.00 : 0.61 : 0.44。对小鼠肉瘤 S_{180} 抑制率为 42.6%, 可明显促进机体免疫功能, 对组织细胞损伤有保护作用。从黑木耳子实体中分离出一种酸性杂多糖和两种 β -葡聚糖。酸性杂多糖单糖组成为木糖: 甘露糖: 葡萄糖: 葡萄糖醛酸(其摩尔比为 1 : 4.1 : 1.3 : 1.3), 其主链为 (1→3) 糖苷键连接的甘露聚糖, 通过 C_2 或 C_6 分支点连接有木糖、葡萄糖或葡萄糖醛酸作为支链, 其生物活性未予报道。两种 β -葡聚糖的一种水溶性 β -葡聚糖, 由 β -(1→3) 糖苷键连接的葡聚糖作为主链, 平均每 3 个葡萄糖残基通过 C_6 分支点连接有一个葡萄糖残基作为侧链。这种多糖对小鼠移植性肉瘤 S_{180} 有很强的抑制活性。另一种具有 β -(1→3) 葡聚糖主链和 C_6 位单个糖基, 但因有高度分支的侧链, 基本上没有抑制肿瘤活性。

8. 灰树花多糖。灰树花(*Grifola frondosus*)多糖主链是由 β -(1→3) 糖苷键连接的葡聚糖, 侧链主要为 β -(1→6) 糖苷键连接的葡萄糖残基, 少量为 (1→4) 或 (1→3) 糖苷键连接的葡萄糖短链。灰树花多糖可提高小鼠肝脏中谷胱甘肽转移酶(GST)与细胞色素 P-450 酶活性。这表明灰树花多糖具有抗突变作用, Ames 试验和小鼠骨髓微核实验也证实该糖的抗突变作用。浙江医科大学的研究表明, 灰树花多糖对小鼠移植性肉瘤 S_{180} 的抑制率达 48.5%, 与环磷酰胺配合使用时抑制率可提高至 95%, 并具有免疫调节作用。临床试验表明: 灰树花多糖可有效地改善肿瘤患者的主观症状, 显著拮抗放、化疗所引起的免疫功能下降。

9. 雷丸多糖。从雷丸(*Omphalia lopicescens*)中提取的多糖 S-40001, 其化学结构是以 β -(1→3) 糖苷键连接的葡聚糖为主链, 带有 (1→6) 糖苷键连接的葡萄糖支链, $MW = 11.83 \times 10^5$ 。S-40001 对小鼠巴豆油耳炎症, 大鼠琼脂性和酵母性关节肿有明显抑制作用, 是一种抗炎活性很强的多糖。S-40001 还能增强机体免疫功能。将雷丸多糖用乙酸、甲酸、木瓜蛋白酶和盐酸分别水解, 经层析纯化, 得到 4 种 MW 较小的多糖, 依 MW 大小顺序为: 乙酸水解物 > 甲酸水解物 > 酶水解物 > 盐酸水解物; 抗炎活性随 MW 从大到小由强变弱; 同时分子内蛋白质量降低。雷丸多糖水解物抗炎活性随糖链减短而减弱, 也随分子蛋白量降低而减弱。

10. 猪苓多糖。日本已从猪苓 (*Grifora umbellata*) 菌核中分离提取出一种水溶性多糖, 主链是由 β - (1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的葡聚糖, 在主链上每 3~4 个葡萄糖残基间出现一个 β - (1 \rightarrow 6) 糖苷键连接的 β -*d*-吡喃葡萄糖基作为侧链结构。这种多糖具有明显的抗肿瘤特性。此后又从水提取过的猪苓菌残渣中分离出一种碱溶性多糖, 是由 β - (1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的吡喃葡萄糖基组成骨架, 在骨架上每 3 个葡萄糖基通过 C₆ 位置连接一个 β -*d*-葡萄糖基作为侧链。以 2%NaOH 与 2%尿素分别提取的碱溶性猪苓多糖, 后者相对分子质量要大些, 抗肿瘤活性也高。

临床上猪苓多糖适用于原发性肺癌、肝癌、子宫颈癌、鼻炎癌、食道癌和白血病等放、化疗的辅助治疗, 可提高患者的抗病能力, 改善临床症状, 使肝、肺癌患者的生存期延长 2~3 个月。

11. 茯苓多糖。茯苓多糖 (*Pachyman*) 是茯苓菌核的基本组成, 易溶于稀碱而不溶于水, 确认其主链为一种线性的 β - (1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的葡聚糖, 支链由 9~10 个葡萄糖残基通过 β - (1 \rightarrow 6) 糖苷键连接。基本上没有抗癌作用, 可能是含有较长的 β - (1 \rightarrow 6) 糖苷键支链的原因。经高碘酸钠氧化、硼氢化钠还原, 酸部分水解 (Smith 降解) 所提得不含 β - (1 \rightarrow 6) 糖苷键的新多糖, 命名为茯苓异多糖 (*Pachymaran*) 溶于水, 有很强的抗肿瘤活性。其衍生物如羧甲基茯苓多糖, 水溶性增大, 抗肿瘤活性也有增强。

12. 亮菌多糖。从亮菌 (*Armillariella tabescens*) 菌丝体中热水提、醇沉、去蛋白透析, 得单一成分 ATM₃, 呈白色粉末, 比旋度 $[\alpha]_D^{20} + 95.2^\circ$, MW = 14.5×10^4 , 不含 N, 糖苷键为 α -型。ATM₃ 单糖组成: 由 *d*-葡萄糖、*d*-半乳糖、*d*-甘露糖、*l*-木糖、*l*-岩藻糖 (摩尔比为 0.86 : 0.30 : 3.91 : 1.0 : 0.85)。ATM₃ 结构中主要连接键型为 α - (1 \rightarrow 6), 并有少量 α - (1 \rightarrow 3)。对动物半体内抑瘤率为 81%, 体内抑瘤率对 S₁₈₀ 为 26.6%。

13. 针裂蹄多糖。从针裂蹄 (*Phellinus linteus*) 中提取得到的水溶性多糖 (P-Z) MW = 1.3×10^4 , 为一多分支结构, 主链由 β - (1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的葡萄糖基组成, 侧链由 β - (1 \rightarrow 6) 糖苷键连接的葡萄糖基, 在分支或末端存在有少量 β - (1 \rightarrow 4) 糖苷键。P-Z 多糖对移植性小鼠 S₁₈₀ 有明显抑制作用, 且半数肿瘤完全消退而无毒副作用, P-Z 多糖的一些衍生物也具有抑瘤作用。

14. 核盘菌多糖。从核盘菌 (*S. sclerotiorum*) 中分离提取出的多糖, 是一种 β -葡聚糖主链由 β - (1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的葡聚糖, 平均每 2 个葡萄糖残基通过 C₆ 分支点连接单一的葡萄糖残基作为侧链, 该糖具有明显的抗肿瘤活性。另外小核菌属 (*Sclerotium*), 座盘菌属 (*Stromatinia*), 伏革菌属 (*Corticium*) 均能产生类似结构的 β -葡聚糖, 不同的菌种得到的 β -葡聚糖的区别只在侧链的数目和长度上, 在抗肿瘤试验方面也显示出有效的作用。

15. 裂褶多糖 (*Schizophyllan*) 是由裂褶菌属 (*Schizophyllum*) 多孔菌目腐木担子菌子实体中分离出来的。具有由 β - (1 \rightarrow 3) 糖苷键连接的葡聚糖主链, 平均每 3 个葡萄糖残基上即有一个能通过 C₆ 分支点连接的单个葡萄糖残基的侧链。裂褶多糖对细胞免疫和体液免疫均有促进作用, 并具有高度的抗肿瘤活性。对大鼠移植性肉瘤 S₃₇ 及 S₁₈₀, 当剂量为 1.25~5mg/kg 时抑制率为 87%; 对艾氏肉瘤, 当剂量为 0.7mg/kg 时抑制率为 74%。

目前多糖研究,仍大多偏重于提取、分离、精制、化学组成和免疫药理、生化药理、抗肿瘤药理等研究。尽管已有少部分多糖已有商品化产品,但主要是用于辅助性治疗药物,已在提高机体免疫,抗炎及预防癌症等方面显示了它生物活性的有效作用。由此可见作为食品基料,选用这些具有生物活性的多糖,开发新型的保健食品前景可观。

四、活 性 脂

人体脂肪量摄入过多,尤富含饱和脂肪酸的脂肪摄入量过多被认为与严重危害人体健康的肥胖症、动脉硬化和冠心病等密切相关,通常认为脂肪摄入的种类与数量是心血管疾病的一个重要影响因素。现代的消费者对食品中脂肪含量非常敏感,但又不能接受减脂或无脂食品的口感。于是,出现了油脂替代品成了低能量食品的重要基料。多不饱和脂肪酸油脂和磷脂类因具有重要的生物活性,作为保健食品基料,可以达到增强机体健康的目的。

(一) 多不饱和脂肪酸

天然存在的不饱和和多不饱和脂肪酸的种类繁多,其中有3种显得特别重要被称为必需脂肪酸,即亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸。亚油酸在人体内不能自行合成而必须从食物中摄取,其他两种可在体内由亚油酸部分转化,转化率受多种因素的限制。Ensminger (1983) 研究表明,亚麻酸需从膳食中摄取,而花生四烯酸能够由亚油酸转化而得到充分供应,不强求从膳食中供给。

1. 亚油酸是自然界分布最广的一种多不饱和脂肪酸为全顺-9,12-十八碳二烯酸 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}]$ 。易氧化分解,暴露在空气中会氧化分解引起酸败,受热氧化反应会加快,氧化降解物对人体健康有害。亚油酸对胆固醇代谢十分重要,只有当胆固醇与亚油酸结合时才能在体内转运,进行正常代谢。若亚油酸缺乏时,胆固醇将与饱和脂肪酸结合并在人体内沉积。亚油酸有保护皮肤,免受射线损伤的作用,婴儿的发育生长需要有丰富的亚油酸,而成年人一般不易缺乏亚油酸。亚油酸在体内可转化成具有特殊生物活性的 γ -亚麻酸及DH- γ -亚麻酸(DHA)。

含亚油酸丰富的油脂有红花籽油(75%),月见草油(70%),葵花籽油(60%),棉籽油(45%),大豆油(50%),玉米胚芽油(50%),小麦胚芽油(50%),芝麻油(45%),辣椒籽油(72%),米糠油(35%),花生油(25%)等。

2. 常称的亚麻酸是指 α -亚麻酸,为全顺-9,12,15-十八碳三烯酸 $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}]$ 。许多植物油如大麻籽油(35%),亚麻籽油(45%~50%),苏籽油(65%)中富含它。一般动物贮存性脂肪中亚麻酸含量很少($<1\%$),但马脂中含量却高达15%。当油脂中的亚麻酸含量达到35%时,这种油因极易氧化而不能食用。

γ -亚麻酸是 α -亚麻酸的同分异构体,为全顺-6,9,12-十八碳三烯酸,在月见草油中含量极为丰富(3%~15%),母乳中含量较高。由于气相色谱技术通常不能完全将两种异构体分开,因而很难准确测定 γ -亚麻酸含量。据一份研究报告推测,5kg的婴儿每天约从母乳中获得115~325mg的 γ -亚麻酸。美国农业部在威斯康星州Madison实验室,在研

究富含燕麦与大麦的食品能明显降低胆固醇的原因中,发现其除有膳食纤维外,还含有二分子亚油酸和一分子 γ -亚麻酸的甘油三酸酯。随品种不同,燕麦和大麦含有5%~10%类脂物,其中 γ -亚麻酸占0.25%~1.0%。螺旋藻属(*Spirulina*)也富含 γ -亚麻酸,该藻类中含有10%类脂物,其中 γ -亚麻酸占内脂总量的20%~25%。以推算每日10g螺旋藻量计,可获得200~250mg γ -亚麻酸。DH- γ -亚麻酸(廿二碳六烯酸,DHA)是亚油酸或亚麻酸在人体代谢的中间产物,存在于磷脂中,母乳中的DH- γ -亚麻酸含量较多,用母乳喂养婴儿每天每公斤体重约摄入20~26mg量。

γ -亚麻酸是一种活性成分,对血清甘油三脂有降脂作用,是目前报道的治疗高血脂疗效较佳和安全性高,对降低血清胆固醇效果也很好。可恢复被损伤的神经细胞功能,抑制体内血小板的凝集,促进酒精损伤肝功能的恢复,改善过敏性湿疹病人的皮肤状况等。研究表明,人体内 γ -亚麻酸,DHA的不足会引起一系列健康问题,通过补充亚油酸往往是能解决的。为此,各种富含 γ -亚麻酸的营养品或保健食品相继出现在市场上。

3. 花生四烯酸是5,8,11,14-二十碳四烯酸,为亚油酸的中间产物,主要存在于花生油中,母乳中含有一定数量的花生四烯酸,据推算母乳喂养,婴儿每天1kg体重花生四烯酸摄入量为21mg。花生四烯酸广泛分布于动物中性脂肪中,它在牛乳脂、猪脂肪、牛脂肪、血液磷脂、肝磷脂和脑磷脂中的含量约为1%,肾上腺磷脂混合脂肪酸中含量高达15%,日本沙丁鱼油中也有一定数量的花生四烯酸。它和 γ -亚麻酸、DA- γ -亚麻酸一样,对心脏病患者、糖尿病患者、过敏性湿疹患者、老年人等的健康有着重要的作用。

(二) 磷脂

磷脂是含有磷酸根的一类脂化合物,对生物膜的生物活性和机体的正常代谢有着重要的调节作用。磷脂具有促进神经传导,提高大脑活力,促进脂肪代谢,防止出现脂肪肝,降低血清胆固醇,预防心血管疾病等作用。

1. 甘油醇磷脂。磷脂为含磷的单脂衍生物,含甘油醇磷脂和神经氨基醇磷脂两大类。甘油醇磷脂主要有卵磷脂(PC),脑磷脂(PE),肌醇磷脂(PI),丝氨酸磷脂(PS)等。神经氨基醇磷脂主要有神经鞘磷脂、神经醇磷脂等。

卵磷脂广泛存在于动植物体内,动物的脑、精液、肾上腺及细胞中含量尤多,蛋卵黄中含量达8%~10%(干基计)。自然界存在的卵磷脂为*l*- α -卵磷脂即 R_2 -CO基处在甘油碳链的左边为*l*型。卵磷脂分子中 α -碳位上连的几乎全是饱和脂肪酸,而 β 碳位上接的通常为油酸、亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸等不饱和脂肪酸。脑磷脂由动物脑组织和神经组织中提取,常与卵磷脂共存于组织中,约占脑干重的4%~6%。脑磷脂分子结构与卵磷脂相似,只是以氨基乙醇代替了胆碱,有 α , β 两种异构体。丝氨酸磷脂是动物脑组织和红血球中重要的类脂物,由磷脂酸与丝氨酸形成的磷脂,与前二种甘油醇磷脂结构相似。肌醇磷脂的极性部分含有一个六碳环糖醇(肌醇),目前发现的有一磷酸肌醇磷脂,二磷酸肌醇磷脂及三磷酸肌醇磷脂。

2. 神经醇磷脂。鞘磷脂是神经醇磷脂的典型代表,在高等动物组织中含量最丰富,它由神经氨基醇、脂肪酸、磷酸和胆碱组成。它与甘油醇磷脂的组分差异不仅是醇的不同,而且鞘磷脂中的脂肪酸是与神经氨基醇的氨基相连接的,分子中只含一个脂肪酸。

3. 磷脂的重要化学性质。卵磷脂和脑磷脂均为白色蜡状固体,在低温下可结晶,易

吸收水分变成棕黑色胶状物。由于它们的分子中含有大量不饱和脂肪酸，易被空气中氧所氧化，由白色到褐色乃至黑色。磷脂不耐高温，100℃以上氧化分解，280℃生成黑色沉淀。

磷脂难溶于水吸水膨胀成为胶体。磷脂可溶于某些有机溶剂，不同的磷脂，其溶解度差异也很大，卵磷脂和脑磷脂均溶于乙醚，不溶于丙酮和乙酸乙酯，但卵磷脂溶于乙醇而脑磷脂不溶，借此可将二者分离。鞘磷脂不溶于丙酮和乙醚却溶于热乙醇。磷脂为脂类化合物，属非极性化合物，能与油脂完全混溶。磷脂分子中存在有疏水性脂肪酸基和亲水性磷酸脂基，属于优良的两性表面活性剂，具有乳化作用。磷脂可被酸、碱或酶水解，得到各自不同的水解产物。卵磷脂被酸或碱水解后可生成脂肪酸，磷酸甘油和胆碱，而磷酸甘油只能在生物体内经磷酸酯酶水解生成磷酸和甘油。卵磷脂也可被胆碱磷酸酯酶水解，释放胆碱产生磷脂酸。还可被卵磷脂酶水解，失去一分子脂肪酸生成单酰化合物。

（三）油脂替代品

当今低能量食品特别是低脂肪食品的发展极为迅速，过量摄入脂肪是不健康的重要因素，而减少脂肪摄入量被推荐作为提高自身健康的重要途径之一，对降低能量的总摄取水平意义重大。食品配料中脂肪含量的减少会给产品风味质构和口感特性等带来一系列变化，为此出现了油脂替代品作为基料生产食品。油脂替代品是以脂肪酸为基础成分的酯化产品，其酯键不被脂肪酶水解，能量值低或完全没有。

1. 蔗糖聚酯 (Olestra) 是脂肪酸蔗糖聚酯 (SPE) 的商品名，该产品有 5 个酯基团不能被人体消化。实验表明，蔗糖聚酯中的蔗糖还可用赤藓醇、木糖醇、山梨醇和葡萄糖代替，入类最近又成功合成棉籽糖的十一酸酯产品。蔗糖聚酯的性质依分子中脂肪酸组成而定，用通常油脂所含脂肪酸制得的蔗糖聚酯产品类似油脂。蔗糖聚酯能经受反复的加热与冷却处理。因蔗糖聚酯摄入后会引引起脂溶性维生素的不足，国外又制备出高熔点和强化维生素的蔗糖聚酯产品。Procter & Gamble 公司已向美国 FDA 提供了蔗糖聚酯详细的毒理试验报告，综合了一百多次以上的动物实验和 25 次人体临床试验结果，结论均证实蔗糖聚酯是安全无毒的，但尚未见有关审批结果的报道。

2. 羧酸酯是由美国 Nabisco Brands 公司制得，它是由脂肪族功能团与羧基功能团结合而成的两种酯或醚与多元醇再进一步键合而成的复合酯化产物。脂肪酸选用人工合成和天然均可，通过调节脂肪酸组成即可制得质构及熔点特性符合要求的产品。羧酸酯能被人体部分代谢吸收，脂肪酶可迅速水解它的部分组成酯生成脂肪酸，并参与代谢过程，剩余的羧酸酯不被消化酶水解。羧酸酯克服了蔗糖聚酯的某些不利影响（如引起泄漏和脂溶性维生素不足），可部分或全部替代低温、油炸、焙烤食品中的油脂。羧酸酯现处于试制研究之中，还未见有批准在食品中使用的报道。

3. 丙氧基甘油酯 (EPG) 是美国加州 Arco 化学公司的专利产品，是乙酰环氧化物与多元醇的结合物。甘油与丙烯环氧化物在碱催化条件下进行反应，得到丙氧基甘油。第二步丙氧基甘油（带有 2~5 个丙烯氧化物）再与适当的脂肪酸进行酯化反应制得丙氧基甘油酯，所用的脂肪酸可由天然油脂分离制得或通过化学反应来合成。丙氧基甘油酯不被人体消化吸收，也没有毒性。其物理特性介于液体油和固体脂肪及润滑脂之间，有良

好的口感特性。Arco 化学公司正在申报丙氧基油脂替代品食品添加剂。

4. 三烷氧基丙三羧酸酯 (TATCA) 和三烷氧基柠檬酸酯 (TAC)。TATCA 和 TAC 作为低能量油脂替代品, 均带有 2~4 个羧酸基团, 由对热稳定的多元酸与 C_{8-30} 组成线性或带分支的饱和或不饱和醇进行酯化制得。TATCA 呈无色, 澄清的油状, 其酯部分组成比较单一, 主要是 3 个 C_{18} 酯, 醇部分则是随机取代在丙三羧酸分子上。热稳定性较好, 物理及功能性特性类似于玉米油。TAC 各方面特性类似于 TATCA, 热稳定性差。它的主要成分是由脂肪醇与柠檬酸组成的酯产品。目前有关 TAC 及 TATCA 的毒性问题尚不明了。

5. 其他。关于这类油脂替代品还有二元酸酯, 霍霍巴油 (JO), 聚硅氧烷等。二元酸酯为美国 Frito-Lay 公司专利产品。其酯基部分由 12~18 碳原子组成, 烷基由 1~20 碳原子组成, 熔点可通过变化相对分子质量和分子结构而调节。二元酸酯不能被脂肪酶水解, 几乎不被人体消化吸收。霍霍巴油为西蒙得植物 (*Simmondsia chiensis*) 种子油, 这种植物 70 年代引种于我国广西、广东、福建、云南等地栽培。它是由长链单不饱和脂肪酸和脂肪醇组成的线型酯混合物, 其酸和醇部分含 20~22 碳原子和一个不饱和双键。霍霍巴油对脂肪酶较敏感, 用小鼠喂养实验消化率为 20% 左右。有关它的安全问题和使用量尚需确定, 目前仅在少量食品上应用。聚硅氧烷是美国 Dow Corning 公司推出低能量油脂替代品, 为二氧化硅的有机衍生物, 具有线性聚合结构。化学性质很不活泼, 具有抗氧化, 水解和降解作用, 不被人体消化吸收, 用小鼠喂养试验表明, 聚硅氧烷没有毒性。

(四) 油脂模拟品

油脂模拟品是以碳水化合物或蛋白质为基础成分的产品, 它们是以水状液体体系来模拟代替油脂的油状液体体系。碳水化合物或蛋白质原料经物理或化学处理后能以水状液体体系模拟出油脂润滑细腻的口感特性。碳水化合物代脂品的主要作用在于改善水相的结构特性, 产生奶油状润滑的粘稠度以增强脂肪的口感性, 至今还没有一种碳水化合物型油脂模拟品能应用在需经高温处理或仅存一种单一脂肪相的食品体系中, 所以它不能作为食用油的替代品。但可部分替代焙烤食品、蛋黄酱、色拉调味料和冰淇淋等食品中的油脂。蛋白质型油脂模拟品只限于应用在仅需低温或中温处理的食品上。

1. 碳水化合物型油脂模拟品。目前已工业化生产并被批准使用的主要产品有 N-Oil, Maltrin 040, Paselli SA-2, Nutrio P-Fibre, 葡聚糖等。N-Oil 已由美国国立淀粉与化学合作公司于 1984 年推向市场, 由木薯淀粉经酸水解得到的糊精产品, $DE < 5$ 。国际市场上销售的为固体粉末状产品, 推荐用 1 份 N-Oil 加 3 份水来替代 4 份油脂, 使用范围包括冰冻甜点心, 黄油, 酸乳酪, 色拉调味料和早餐腊肠等。Maltrin 040 由美国谷物加工合作公司生产, 产品为清淡可消化的玉米糊精, DE 为 4~7, 有较好的成膜特性和较低的吸湿性, 没有甜味。含该产品 25% 的水溶液于室温下为柔软的白色凝胶状, 类似于起酥油, 受热后呈清澈的溶液。可用于替代色拉调味料, 人造奶油和冰冻甜点心中的部分油脂。Paselli SA-2 是由荷兰 Avebe 公司生产的一种酶改性马铃薯淀粉, DE 值 < 3 , 其浓缩水溶液在适当条件下可形成滑腻类似油脂的质构与口感。德国采用 α -淀粉酶降解马铃薯淀粉, DE 值为 5~8, 生产类似于 Paselli SA-2 的产品。Nutrio P-Fibre 是由丹麦 Danish 糖业加工厂生产的, 用 75~80℃ 热水从豌豆中提取而得到的一种纤维产品, 含 47% 膳食纤维

维(干基计),在比较坚硬或固体产品中其推荐用量为1份 Nutrio P-Fibre 加6份水替代7份油脂,可用于蛋黄酱、色拉调味及糖果、午餐肉等食品上。葡聚糖由美国 Pfizer 公司生产,通常用作填充剂,也可作油脂替代品。国际市场出售的葡聚糖有粉末状, pH 为 2.5~3.5;葡聚糖 N 的 70% 水溶液, pH 为 5~6;葡聚糖 K 的干燥缓冲粉末状,水溶液的 pH 为 5~6。上述产品已被美国 FDA 批准使用在焙烤食品、口香糖、糖果、色拉调味料、冰冻乳制品、布丁等食品上。

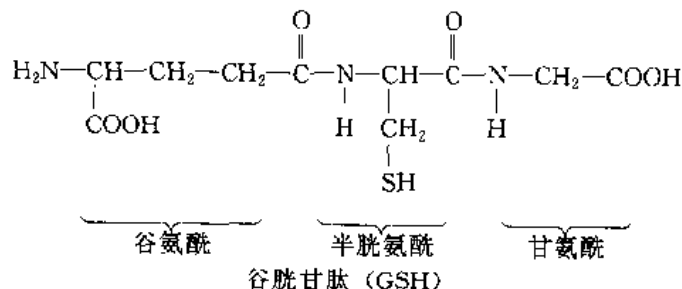
2. 蛋白型油脂模拟品 Simplese、Traiblazer、LITA 三种均为美国公司生产,都是从天然原料中分离制得,呈水分散的蛋白质微粒体系,它的使用范围受到限制,不能应用在那些需经高温处理的食品上。Simplese 是由美国 Nutra-Sweet 公司生产的,以牛乳或鸡蛋蛋白为原料经一种专利技术进行微粒化过程而制得的, FDA 已批准 Simplese 作为安全物质 (GRAS) 应用于冰冻点心中。Traiblazer 是由美国 Kraft 通用食品公司以黄原胶、大豆、鸡蛋、牛乳蛋白和酪蛋白为原料生产出的。该产品对盐、pH 值均较稳定,可用于色拉调味料、冰冻点心中,也可作为肉替代物作为鸡肉、猪肉、螃蟹和龙虾肉的增味剂。LITA 是由美国 Opta 食品公司从玉米中分离出高疏水性蛋白质(如醇溶蛋白经微粒化而制得的。该产品中的组成蛋白不变性,表面呈疏水性。LITA 耐热性高,15%浓度的悬浮液加热至 95℃ 未发现明显的絮凝或沉淀现象。可用于代替蛋黄酱、冰淇淋等涂抹食品中 75%~100% 的油脂。

五、活性肽及活性蛋白

活性肽及活性蛋白质是指那些有特殊生物活性的肽与蛋白质。主要有谷胱甘肽、降血压肽、促进钙吸收肽、易消化吸收肽、免疫球蛋白及抑制胆固醇蛋白等。它们的特殊功能在于清除自由基、降低血压和提高机体免疫力等。

(一) 谷胱甘肽

谷胱甘肽 (GSH) 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的活性三肽,化学名为 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸。化学结构式为:



分子中有一个特殊肽键,即谷氨酸的 γ -羧基 ($-\text{COOH}$) 与半胱氨酸的 α -氨基 ($-\text{NH}_2$) 缩合而成的肽键。GSH 相对分子质量为 307.33,熔点 189~193℃ (分解),晶体呈无色透明细长柱体,等电点 5.93。GSH 分子中含有一个活泼的巯基 $-\text{SH}$,易被氧化脱氢,2 分子的 GSH 脱氢后变为 1 分子的氧化型谷胱甘肽 (GSSG)。在生物体中起重要作用的是 GSH,而 GSSG 需还原成 GSH 才有生物活性。

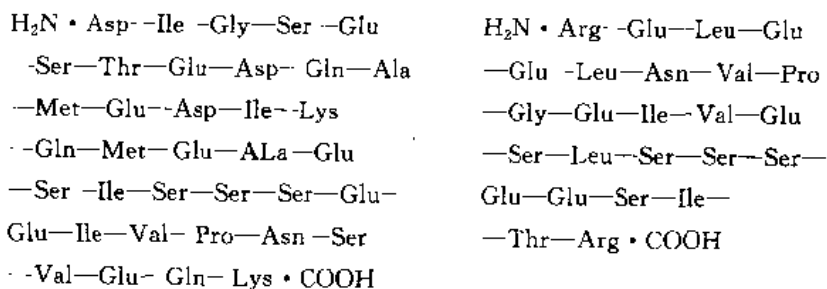
GSH 广泛存在于动、植物中。在面包酵母、小麦胚芽及动物肝脏中含量高达 100~1000mg/100g; 人和动物血液中含有量也较丰富, 为 14~73mg/100g; 许多蔬菜、薯类和谷物中也含有此物。GSH 分子中的活性巯基—SH 在机体中具有重要的生物活性, 当机体代谢和外界刺激产生的过多自由基时, 它会损伤生物膜、破坏生命大分子、促进机体衰老、并诱发肿瘤或动脉硬化的产生。GSH 能清除自由基, 起到保护细胞分子的作用。GSH 对于放射线、放射性药物或由于抗肿瘤药物所引起的血细胞减少等症状, 也具有强有力的保护作用。可与体内的有害物质形成共轭化合物将毒物中合并排出。GSH 可阻止 H_2O_2 氧化血红蛋白, 使血红蛋白能持续发挥输氧功能。此外, GSH 还可抑制乙醇侵害肝脏产生脂肪肝。

(二) 降血压肽

降血压肽是一类 C_2 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_{11} 、 C_{12} 等短肽。大多由食物蛋白质经蛋白酶水解而得, 如来自乳酪蛋白的肽 (C_{12} 、 C_6 、 C_7 肽); 来自鱼虾类的肽 (C_7 、 C_8 、 C_{11} 肽); 以及来自玉米、大豆蛋白肽 (低聚肽) 等。降血压肽是通过抑制血管紧张素转换酶 (ACE) 的活性而使血压降低, 而对血压正常人无降血压作用。这些活性肽通常是在温和条件下, 通过蛋白酶水解蛋白质而获得, 食用安全性极高。

(三) 促进钙吸收肽

这类肽的化学组成为酪蛋白磷肽 (CPP), 其肽链结构式为:



α -CPP

β -CPP

分子内特有丝氨酸-磷酸结构是从乳酪蛋白质中经现代高新技术制取而得到的, 来自 α -酪蛋白的称为 α -CPP, 来自于 β -酪蛋白的称为 β -CPP。在肠道内钙通常与磷复合形成不溶性的盐, 使得小肠对钙的吸收率下降, 一般为 30%~50%。如果小肠中有 CPP 存在, 钙就能与 CPP 上的磷结合使之成为可溶性钙, 以利于小肠对其吸收进而促进儿童骨骼和牙齿的生长发育, 在预防和改善骨质疏松症, 加快骨折患者的康复等方面发挥重要的作用, 在对贫血病人的预防治疗等方面也有明显的效果。

(四) 易消化吸收肽

易消化吸收肽属于低聚肽。是由牛乳、鸡蛋、大豆等蛋白质经蛋白酶水解而制得的肽混合物。近年来的科学研究表明, 多肽可由肠道直接吸收, 吸收途径比氨基酸吸收途径具有更大的输送量。易消化吸收肽中的大豆多肽, 其氨基酸组成几乎与大豆蛋白完全一样, 其必需氨基酸含量平衡、丰富。大豆多肽具有促进肠道内双歧杆菌的生长繁殖的

特殊功能。易消化吸收肽具有易消化吸收的特点尤其适宜由于高温、过劳等引起的肠胃功能降低时；手术后特别是消化道手术的康复期；婴幼儿和高龄人消化功能较弱期及高负荷运动时作为蛋白营养源。

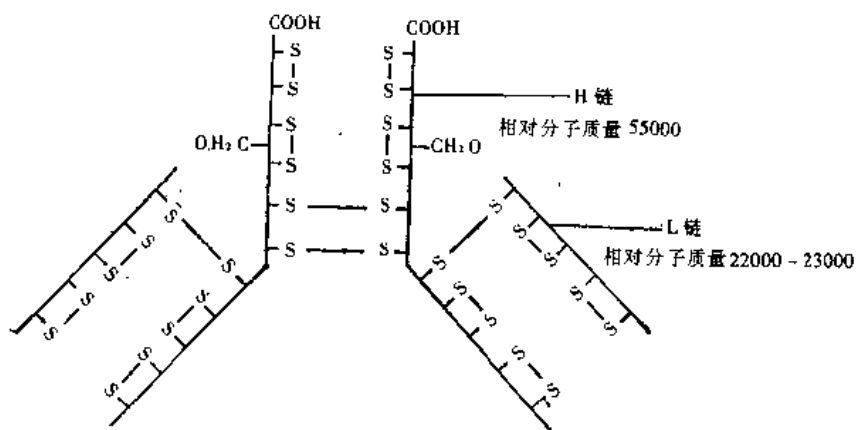
(五) 抑制胆固醇蛋白质

这类活性蛋白主要为大豆蛋白质中的 7s 和 11s 蛋白质，多数为大豆球蛋白。7s 球蛋白是一种糖蛋白，为紧密折叠的四元结构。11s 球蛋白为相同的两个亚基所构成的二聚结构，由六个次亚基组成。

抑制胆固醇蛋白质是从大豆种子中提取的，并经适当改性处理。这种蛋白质具独特而重要的生理功能，能促进肠内胆固醇物质的排泄，与胆内的固醇物质相结合，阻碍固醇物质的吸收，对胆固醇高的人具有明显降低胆固醇值的功效，而对胆固醇值正常的人不起作用，在人们摄取高胆固醇含量的肉、蛋及动物内脏等食物时，能抑制血液胆固醇的升高。

(六) 免疫球蛋白

免疫球蛋白是一类具有抗体活性或化学结构与抗体相似的球蛋白，简称 Ig。人类利用电泳技术证明了血清中的抗体是 γ -球蛋白部分，此后又发现抗体活性不仅存在于 γ -球蛋白的慢移动区，而且一直延伸到 β 、 α -球蛋白的快移动区。因而，抗体球蛋白具有异源性。目前发现的人体免疫球蛋白有 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 等五类。Ig 具有蛋白质的通性，不耐热，加热至 60~70℃ 即被破坏。强酸、强碱等均能破坏抗体活性。亦可被多种蛋白质水解酶破坏，可被中性盐类沉淀。Ig 相对分子质量很大，一般由 1000 个以上的氨基酸连接而成。Ig 的基本结构单位都是由 4 条多肽链组成的对称性结构，即 2 条较长、相对分子质量较大的相同重链 (H 链) 和 2 条较短、相对分子质量较小的相同重链 (L 链)，链间由二硫键和共价键连接形成一个 4 条多肽链的单位分子，因 H 链上结合有不同量的糖，故属于糖蛋白。其结构模式为：



免疫球蛋白模式图

Ig 的功能是由其结构所决定，对抗体来说就是它的活性，抗体能识别抗原，且能发生特异性结合。Ig 具有明显地提高人体免疫功能，其中 IgG 比其他 Ig 更易透过毛细管

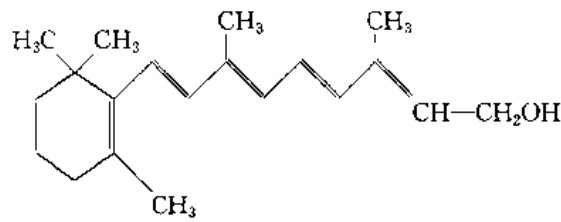
壁,能很好地发挥抗感染,中和毒素及调理等作用。IgM 属于一种细胞毒素抗体,在有补体系统的参与下可破坏肿瘤细胞,是一种高效能的抗体。IgA 有显著的抗菌、抗毒素和抗病毒的作用。IgD 作为 B 淋巴细胞表面的重要受体,在识别抗原、激发 B 淋巴细胞和调节免疫应答中起着重要作用。鸡蛋蛋黄含有较丰富的免疫球蛋白(8~20mg/mL),近些年来,蛋黄作为一种有抗体活性的免疫球蛋白资源已引起人们广泛的兴趣,生产出的 Ig 主要用在婴儿食品和老年食品中,以提高人体免疫力,增强对各种疾病的抵抗力。

六、生物抗氧化剂

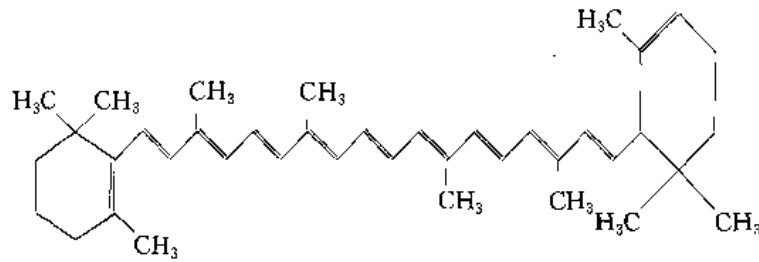
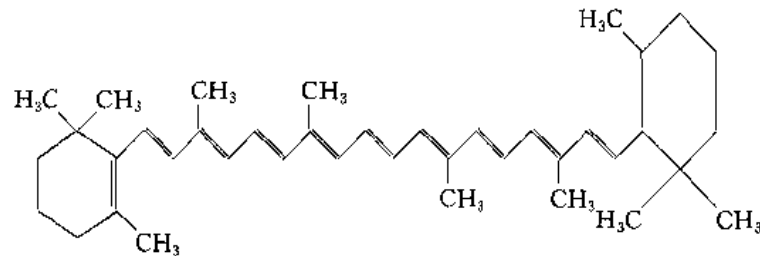
生物抗氧化剂是指机体内直接和间接的具有抗氧化功能的一类物质。食品中含有两类抗氧化剂——营养性抗氧化剂和非营养性抗氧化剂。营养性抗氧化剂包括维生素 A、胡萝卜素、维生素 E、维生素 C、硒、锌、铜等营养素;非营养性抗氧化剂,包括超氧化物歧化酶、生物类黄酮、多酚类、植酸、泛醌(辅酶 Q)等。抗氧化剂与自由基是当前生命科学中十分活跃的研究领域,这主要是因为抗氧化剂在保护人体不受自由基所致的氧化损伤方面具有十分重要的作用。越来越多的研究资料表明:一些主要的老年性疾病均由于氧化损伤所致,直接影响到蛋白质、脂质、碳水化合物和 DNA,对健康造成多种危害。一些学者将生物抗氧化剂在体内作用的可能机制概括为:(1)与氧化剂的相互作用;(2)消除自由基和单线态氧(1O_2);(3)将活性氧与其特异作用部位相隔离;(4)改变氧化酶或促氧化酶活性;(5)提供和维持还原剂的水平;(6)参与已损伤分子的修复或替代。

(一) 营养型抗氧化剂

1. 维生素 A 及 β -胡萝卜素。维生素 A 是脂溶性长链醇,由 β -紫罗酮环与不饱和一元醇所组成,有视黄醇和脱氢视黄醇两种存在形式,后者生理活性是前者的 40%,对人体作用不大。视黄醇呈无色或淡黄色板条状结晶,溶于脂肪和脂肪溶剂,不溶于水。食物中的维生素 A 是以稳定的酯化合物(如棕榈酸视黄酯)形式存在,性质比较稳定,当溶解于油脂中在光照和氧作用下发生变质时,视黄醇可被迅速氧化成醛或酸形式而破坏。植物中不含维生素 A,但广泛存在于绿色果蔬中的胡萝卜素经机体代谢可转化成维生素 A,已知植物中至少有 10 种胡萝卜素可转化成维生素 A,其中以 α -胡萝卜素, β -胡萝卜素和 γ -胡萝卜素的维生素 A 原活性较高。 β -胡萝卜素具有最高的维生素 A 原活性,含有两个 β -紫罗酮环,而 α 、 γ -胡萝卜素只含一个 β -紫罗酮环,其维生素 A 原活性只有 β -胡萝卜素的 1/2。 β -胡萝卜素的分子式为 $C_{40}H_{56}$,分子量 536.88,外观呈深红色至暗红色有光泽的斜方六面体或结晶状粉末。遇氧、热和光不稳定,在弱碱条件下较稳定。不溶于水、甲醇、乙醇、丙二醇、甘油、酸和碱中,溶于二硫化碳、苯、氯仿、己烷、石油醚及植物油中。其分子结构式为:

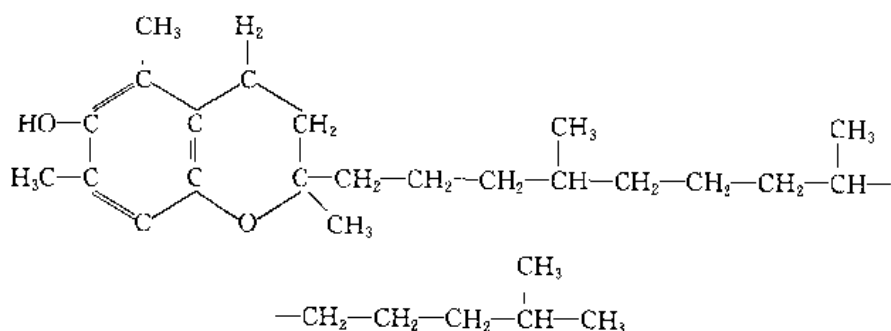


视黄醇

 α -胡萝卜素 β -胡萝卜素

进入肠道中的胡萝卜素被小肠壁吸收率仅是维生素 A 的 $1/3$ ，所吸收的胡萝卜素中，只有 $1/2$ 可转化为维生素 A。以维生素 A（视黄醇）计， β -胡萝卜素只有其活性的 $1/6$ ，即食物中所含的 β -胡萝卜素只有 $1/6$ 可转化为维生素 A。 β -胡萝卜素有很好的抗氧化作用，能通过提供电子抑制活性氧的生成达到清除自由基的目的。 β -胡萝卜素能有效地防护小鼠对抗血卟啉的致死性光敏作用，能清除游离态氧减少光敏作用，也是单线态氧的猝灭剂。美国 Palozza 等人在实验中发现， β -胡萝卜素与维生素 E 在抑制脂质过氧化反应中有协同增效作用。由于 β -胡萝卜素对自由基的清除作用，使得它在延缓衰老、防治心血管疾病和肿瘤方面发挥作用，已成为一种重要的保健食品基料。维生素 A 与胡萝卜素的工业化生产通常包括天然提取、化学合成及生物工程法三种，目前仍以化学合成法为主，世界上最大的生产厂家有美国的罗氏公司 (Hoffmann-la Roche)，AEC 公司及 BASF 公司等。此外还有用蔗糖、麦芽糖为载体生产出水溶性胡萝卜素粉剂。胡萝卜素既是一种生理活性物质，又是天然色素，已在食品、化妆品和医药等工业上得到广泛的应用。

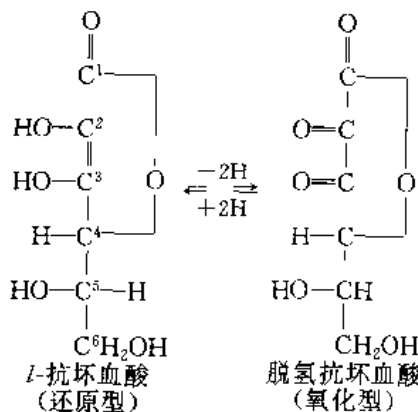
2. 维生素 E。迄今为止，公认存在于自然界的 α -、 β -、 γ -和 δ -生育酚及 α -、 β -、 γ -和 δ -三烯生育酚共八种同族体，统称为维生素 E，均有维生素 E 生理活性。结构支链上无双键的为生育酚，有双键的为三烯生育酚。 α -生育酚是已知生物活性最大的一种生育酚，其化学结构式为：



其他几种生育酚的活性只有它的1%~50%。生育酚和三烯生育酚均是浅黄色的粘性油状物，不溶于水，可溶于乙醇和油脂中。对酸和热较稳定，但暴露在氧、紫外线、碱或铁盐中极易氧化破坏。在正常烹调温度下维生素E损失不大，但在长期高温或酸败的油中维生素E会大量乃至完全破坏。

维生素E是生命机体中一种重要的抗氧化剂，能有效地阻止食物和消化道内脂肪酸败，保护细胞免受不饱和脂肪酸氧化产生毒性物质的伤害。它经过一个自由基中间体氧化成生育醌，将 $\text{ROO}\cdot$ 转变成化学性质较不活泼的 ROOH ，中断了脂类过氧化的连锁反应，有效地抑制了脂类过氧化作用。维生素E和硒，维生素E和维生素C都是抗氧化剂，它们对消除自由基具有协同增效作用。作为一种生物抗氧化剂，维生素E的生物活性可以保护机体组织细胞生物膜上多不饱和脂肪酸免遭自由基攻击而氧化，同时也可以保护生物大分子物质（如DNA）免遭自由基的破坏，是细胞伤害，组织破裂的天然抑制剂，在防止人体包括衰老、肿瘤在内的各种衰退病变及提高机体免疫力等方面起着重要的作用。维生素E的工业化生产方法有合成法和天然提取法两种，合成法所得产品均为消旋型，只含一种生育酚。从天然资源中提取的维生素E为 α 构型（右旋型），是多种生育酚异构体的混合物，其生理活性较合成法产品高。目前世界上维生素E最大合成厂为美国的Hoffmann-la Roche公司及BASF公司。从天然物提取维生素E最大生产厂是德国的Henkel公司及美国的Eastman Kodak公司。

3. 维生素C（抗坏血酸）是一种简单的六碳化合物，在自然界中有两种存在形式，即还原性抗坏血酸和氧化型的脱氢抗坏血酸，两者都有生物活性，脱氢抗坏血酸的活性约为还原性抗坏血酸的80%，均可被机体利用。其化学结构式为：



还原性抗坏血酸和氧化型抗坏血酸之间的氧化还原反应是可逆的，但脱氢抗坏血酸的继续氧化是不可逆的，尤其是在碱性介质中，氧化产物二酮古洛酸没有生理活性。抗

坏血酸呈白色无味晶体粉末状物质,干燥时十分稳定,溶于水,不溶于油脂中。水溶液态的抗坏血酸不稳定,遇空气、热、光、碱性物质、氧化酶及痕量的铜、铁存在均会加速氧化。在酸性、冷藏及空气隔绝环境中,抗坏血酸较稳定。

抗坏血酸是一种重要的自由基清除剂,它通过逐级供给电子而转变成半脱氢抗坏血酸和脱氢抗坏血酸以达到清除超 O_2^- ·(氧阴离子)、 $OH\cdot$ (羟自由基)、 $R\cdot$ (自由基引发剂)、 $RO\cdot$ (烷氧基)、和 $ROO\cdot$ (烷过氧基)等自由基。抗坏血酸能与生育酚自由基反应重新还原成生育酚,反应生成的抗血酸自由基(MDHA·)在一定条件下又可被 $NADH_2$ 体系酶促还原成抗坏血酸。由此可见,抗坏血酸、生育酚和 $NADH$ 还原酶可协同防御脂类的过氧化,其中生育酚是脂溶性的,可消除膜内过氧化脂类自由基,而抗坏血酸是水溶性的,存在于细胞外液和细胞质中起电子传递作用。抗坏血酸能提高巨噬细胞的机能,促进T细胞的分裂增殖,能清除体内过剩的自由基,并有效地阻断强致癌物一亚硝酸胺的生成,从多方面提高机体免疫能力,起到防癌作用。

4. 硒是一种比较稀有的准金属元素,自然界中的硒以-2价(硒化合物)、0价(单质硒)、+4价(亚硒酸及盐类)和+6价(硒酸及盐类)等存在形式。20世纪70年代,由于硒谷胱甘肽过氧化酶的发现,揭示了硒在生命科学中所起的重要作用,具有许多重要生理功能。目前研究集中在硒与癌症的相互关系上,可能会为战胜癌症提供一种新的手段及制剂。

硒是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的必需组成因子,1mol纯酶中约含4mol的硒。GSH-Px是生物体内第一个含硒酶,广泛存在于机体中,能清除正常代谢中所产生的活性氧自由基,在GSH-Px清除活性氧过程中,硒的作用至关重要,是GSH-Px发挥氧化还原催化作用中仅有的原子,硒代半胱氨酸是GSH-Px的催化部分,其中的硒氢基(SeH)代表酶的活性还原形式,以清除过氧化物(活性氧)。磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶(P-HGPx),是已知存在于生命有机体中第二个含硒酶,该酶相对分子质量约为22000,酶的催化活性中心也可能是硒代半胱氨酸残基,1mol的酶约含1mol的Se。PHG-Px通过抑制膜磷的过氧化而起到对生物膜的保护作用,和GSH-Px一样,与其他氧化物酶(如SOD, CAT)一起组成机体内清除活性氧自由基的多级酶体系。很多非酶硒化合物也具有清除自由基和抑制生物膜脂质过氧化的作用,硒化合物中有机硒的清除效果优于无机硒,其顺序为 $Se(CH_2CH_2COOH)_2 > Se(CH_2CH_2CN)_2 > Se(CH_2COOH)_2 > SeO_2$ 。单线态氧(1O_2)是活性氧的存在形式之一,也能攻击生命大分子诱发脂质过氧化而造成细胞损伤,硒化合物能与 1O_2 形成电荷迁移配合物,猝灭单线态氧,抑制单线态氧造成的细胞损伤,硒还能与维生素E协同清除自由基。

(二) 非营养型抗氧化剂

1. 超氧化物歧化酶,简称SOD。SOD是一类含金属的酶,按金属辅基成分可分为三种。最常见的一种含有铜锌金属辅基($Cu \cdot Zn$ -SOD),该酶纯品呈蓝绿色,由2条肽链(亚基)组成,每条肽链含有铜、锌原子各一个,活性中心的核心是铜。第二种含有锰辅基(Mn -SOD),纯品呈粉红色,由4条或2条肽链组成。第三种是 Fe -SOD,纯品呈黄色或黄褐色,由2条肽链组成,多数情况下每一个二聚体含一个 Fe 原子。这三种酶中 $Cu \cdot Zn$ -SOD的研究较为彻底,相对分子质量约为32000,每分子中由二个亚基通过非共

价键的疏水相互作用缔和成二聚体, 肽链内由半胱氨酸 C₅₅ 和 C₁₄₄ 的 -SH 基构成的二硫键对亚基缔合起重要作用。每个亚基活性中心的核心 Cu, 分别与 4 个组氨酸残基配位成扭曲平面四方形构型, Zn 则与 3 个组氨酸和 1 个天门冬氨酸残基配位成畸变的四面体结构, 其中 His-61 的咪唑环氮原子分别与 Cu 和 Zn 配位形成咪唑桥。SOD 广泛存在于动植物和微生物组织细胞中, 可以分离提取出具有生物活性的 SOD 产品, 但目前国内 SOD 的生化制品主要是从动物血液的红细胞中提取的。

SOD 能清除人体内过多的氧自由基 ($O_2^{\cdot -}$), 可延缓衰老, 提高人体免疫力并增强对疾病抵抗力。SOD 作为一种临床药物在治疗由于自由基的损害而引发的多种疾病其效果是显著的。另外其应用范围也在逐渐扩大, 如在治疗自身免疫病、肿瘤、老年性白内障、炎症及肺气肿等疾病方面的研究已经深入, 有的已进入实用阶段。

2. 类黄酮 (Flivonoides) 为具有结构为 2-苯基苯并吡喃酮结构的化合物, 主要包括有黄酮类、黄酮醇类、双黄酮类等。银杏叶提取物 (GBE) 中主要药理成分是银杏黄酮醇甙和萜内酯。银杏黄酮类化合物主要有黄酮醇甙、双黄酮甙等。其中黄酮醇甙组成成分主要有槲皮素、山奈素及异鼠李素。GBE 是一种重要的生物抗氧化剂, 其清除自由基作用主要来自黄酮部分, 它所含的还原性酚基是其发挥清除作用的主要化学基础。GBE 表现出很明显的抗 OH^{\cdot} 特性, 科学家发现 GBE 与尿酸在抗 OH^{\cdot} 方面有类似的作用, 低浓度的 GBE ($<500\mu\text{g}/\text{mL}$) 仍具有不可忽视的活性。GBE 对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用具有量效关系, 这方面的基础研究工作还在不断深入。GBE 作为保健食品的基料, 对预防心脑血管疾病, 增强人体健康有着重要作用。在韩国人们广泛种植银杏树, 银杏叶中的提取物主要用于制药和保健食品中, 是仅次于高丽参的重要产业。在美国市场上银杏叶制剂和含银杏叶提取物的保健食品也十分畅销。在日本, 银杏叶提取物主要用于保健食品。目前世界上有关银杏叶制剂, 保健食品和化妆品的年销售额估计为 40 亿美元左右。作者在 1996 年已开发出银杏叶第四代 GBE 产品, 并投入工业化生产。

3. 银杏萜内酯 (Ginkgolide) 是银杏叶中另一个重要的活性成分, 是专一的血小板活化因子 (PAF) 的拮抗剂。萜内酯是由银杏内酯和白果内酯组成。就目前所知, 银杏内酯有银杏内酯 A、B、C、M、J 五种及两种银杏内酯 A 异构体, 为二萜类内酯, 差别仅是羟基数目的位置不同。从结构上看, 有 6 个五元环, 其中 3 个内酯环, 2 个戊烷环, 1 个四氢呋喃环。戊烷环连接在单个碳原子上形成螺 [4.4] 壬烷碳骨架。银杏内酯的最大特征是在侧链上存在一个叔丁基, 这在天然产物化学结构式中是罕见的。白果内酯为倍半萜化合物, 仅有一个戊烷环。

PAF 具有广泛的病理生理作用, 是迄今发现的最强的血小板聚集诱导剂。可损伤血管壁内皮细胞并使平滑肌细胞增生, 从而加速动脉粥样硬化的形成, 导致心脑血管疾病。PAF 可直接刺激白细胞并产生过氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot -}$), 还可刺激其他活性物质 (如白三烯等) 的释放, 从而产生对细胞及组织的进一步损害。PAF 除导致血栓形成及参与心脑血管疾病的发生和发展外, 还与其他许多疾病的发生有密切的关系。它的生理活性主要是通过与其特异性结合部位 (受体) 结合而产生, 其活性是组胺的 1000 倍。银杏内酯是一种天然的、专一的、高效的 PAF 受体拮抗剂, 可有力阻断 PAF 诱发 $O_2^{\cdot -}$ 和造成机体的损伤, 它不仅是一种 PAF 受体拮抗剂中最有临床应用前景的药物, 也有可能成为保

健食品的基料,在预防心脑血管疾病等多种疾病中起作用,作者在1997年已在实验室分离提取出高纯度萜内酯产品。与有关单位正在联合进行BN-01制剂的开发。

4. 茶多酚 (Tea Polyphenols)。茶叶中多酚类物质占茶嫩梢干重的20%~35%,由约30种以上的酚类物质所组成,通称茶多酚。按其化学结构分为四类:(1)儿茶素类,属黄烷醇类;(2)黄酮及黄酮醇类;(3)花白素及花青素,即羟基-[4]-黄烷醇及其锌盐;(4)酚酸及缩酚酸类。其中以黄烷醇类化合物最重要(占多酚的80%左右)。儿茶素包括(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯(*l*-EGCG),(-)-表儿茶素没食子酸酯(*l*-ECG),(-)-表没食子儿茶素(*l*-EGC),(+)-没食子儿茶素(*d, l*-GC),(-)-表儿茶素(*l*-EC),(+)-儿茶素(*d, l*-C)等。纯儿茶素一般为白色无定形粉末,在空气中极易氧化成棕色物,能溶于水、乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂中。

儿茶素分子中含有较活泼的羟基氢,具有很强的供氢能力,是一种理想的纯天然抗氧化剂。能与脂肪酸自由基结合,使自由基转化为惰性化合物,中止自由基的连锁反应,即中止油脂的自动氧化。实验表明,茶多酚具有清除活性氧自由基的作用,其活性为等量维生素C的4.93倍,对亚硝酸盐的消除率及对*N*-亚硝胺合成的阻断率分别为96.9%和98.6%。且能有效消除脂质过氧化产物丙二醛,具有降血脂的显著功效。还有研究表明,茶多酚还具有抑制痢疾、伤寒、霍乱、金黄色葡萄球菌等有害菌的作用;具有较强的抗放射性作用以及抗衰老,抑制瘤细胞,预防心脑血管疾病等方面都显示出很好的效应,是一种有开发前景的天然抗氧化剂。1988年7月我国卫生部已批准茶多酚为食品添加剂。作者对茶多酚的分离提取工艺进行了多年研究,于1992年建立了大孔吸附-萃取的封闭式管道化生产新工艺,已在福建、贵州等地建起了茶多酚工业化生产线,并开发研制出茶多酚第二代产品即儿茶素(TC)的工业化生产工艺。

5. 泛醌(辅酶Q)是与呼吸链有关的醌类,是一类有生物活性的重要生物抗氧化剂,具有2,3-二对甲氧-5-甲基-6-多异戊烯-*N*-1,4-苯醌结构,作为醌的主要成分,存在着由Q-6到Q-10共5种。其化学结构式为:

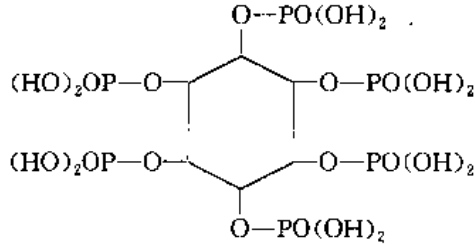


除这些同族体外,还有在化学结构上有些不同的化合物,主要有类异戊二烯侧链的一部分为氢原子所饱和的泛醌、深红醌、环氧泛醌、卡尔达里爱拉醌等。辅酶Q在波长270~290nm处有特殊的吸收光谱,当还原为氢醌后,其特殊的吸收光谱消失,用此特性可对辅酶Q的氧化-还原反应进行定量测定。

辅酶Q₁₀是辅酶Q类重要的成员之一,在人体中主要集中于肝、心肾、肾上腺等组织。细胞内的辅酶Q与线粒体内膜相结合,是呼吸链中的主要递氢体。临床上应用于治疗心脏病和肝病。辅酶Q₁₀为黄色或淡黄色,无臭无味结晶性粉末,易溶于氯仿、苯、四氯化

碳；能溶于丙酮、乙醚、石油醚；微溶于乙醇；不溶于水、甲醇。遇光易分解成微红色物质，对湿度、温度较稳定，熔点 49℃。其生产有化学合成法和生物提取法两种，国内已是从提取细胞色素 C 猪心残渣中来生产辅酶 Q₁₀。

6. 植酸也叫环己六醇六磷酸酯(肌醇六磷酸)是由肌醇和磷酸组成,分子式为 C₆H₁₈O₂₄P₆, 相对分子质量 660.08, 大多以钙、镁、钾的复盐形式存在。其结构式为:



植酸为淡黄色或淡褐色粘稠液体,易溶于水、乙醇和丙酮,不溶于乙醚、苯、氯仿、乙烷等有机溶剂。本品易受热发生水解,植酸在 140℃、1h 内水解率可达 50%,植酸盐在微酸性条件下能被酶分解。植酸有很强的螯合能力,比乙二胺四乙酸有更广泛的 pH 值适应范围,在酸性和中性条件下螯合力较碱性条件下强。植酸盐为无定性粉末,无味无臭,不溶于醇、乙醚、丙酮等有机溶剂,微溶于水,在酸性水溶液中解离而呈现溶解状态。

植酸及其盐类用途很广,目前其生产尚未全面推开。近年来,大量研究表明人体中自由基损伤,特别是线粒体氧化损伤,是许多退行性疾病和衰老的重要原因。如何将抗氧化剂更好的应于减少自由基的损伤,也许是 21 世纪营养学家所面临的挑战之一,这一领域已成为当今营养学和生化学研究中的一个特别热的热点。由于植酸原料丰富,抗氧化性能好,实际无毒,使用安全,有可能在医药、食品工业中得到广泛的应用。

七、其他活性物质及乳酸菌制品

(一) 大蒜素

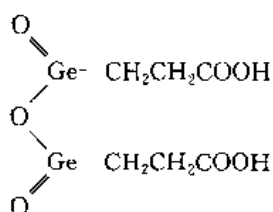
大蒜素是蒜油中的主体成分,由三十多种挥发物质组成,主要有二烯丙基硫代磺酸酯、二烯丙基二硫化物、S-烯丙基甲基硫代磺酸酯、甲基烯丙基二硫化物、二烯丙基硫醚等五种成分。蒜油在 25℃ 时相对密度为 1.091~1.098,折射率为 1.574~1.582,为澄清黄色液体,有强烈的辛辣味,可溶于大多数矿物油及乙醇,不溶于甘油。

新鲜的大蒜中基本上不含大蒜素,只含有大蒜素的前体物——蒜氨酸,当大蒜切碎细胞破裂时,蒜氨酸与蒜酶接触水解形成大蒜素。新鲜大蒜随着放置时间的增长大蒜素含量亦增多。一般采用水蒸气蒸馏法和乙醇提取法生产蒜油(即大蒜素)。其主要生物活性物质被认为是含硫化合物,其中的巯基化合物与亚硝酸盐生成了硫代亚硝酸酯类化合物,阻断了亚硝胺的合成,可抑制亚硝胺的吸收;可使瘤细胞环化腺苷酸(CAMP)水平升高,抑制了肿瘤细胞的生长;还可激活巨噬细胞,刺激体内产生抗癌干扰素,增强机体免疫力;还具有杀菌、消炎、降低胆固醇,防止脑血栓,冠心病等多种效能。有关大蒜素的生理功能因子和作用机理及提纯利用研究已引起人们的重视。目前世界风行大蒜

热，使其身价日增，各国不仅深入研究大蒜的药理功效，而且已经正在开发各种大蒜保健食品。

(二) 活性有机锗化合物

日本在 1968 年首次报道了由他们合成的水溶性 β -羧乙基锗倍半氧化物（即 Ge-132）具有广谱的药理活性，而于 1974 年又合成螺锗化合物具有更高的抗肿瘤活性。近些年来，一些临床试验结果肯定了有机锗的生理活性与医疗保健价值。Ge-132 结构简式为 $(\text{GeCH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2\text{O}_3$ ，其分子中每个 Ge 原子与 3 个桥氧原子连接成 Ge—O—Ge 大环，形成三维网状结构，而羧基间则以氢键连接，其分子式为：



螺锗为 *N*-(3-二甲氨基丙基)-2-氮杂-8,8-二乙基-8-锗杂螺[4,5]十一烷，结构简式为：



螺锗常见的是其二盐酸盐形式，毒性较大。含硫配位的有机锗化合物中有一部分属氨基酸锗、例如四锗 α -氨基- α -羧基乙基巯基是一种细胞生长促进剂，此外还有乳酸-柠檬酸锗、葡萄糖酸锗等。有机锗化合物抑制肿瘤活性的可能机制包括增强机体免疫能力，清除自由基和抗突变等，而无机锗似乎并没有显示出明显而有效的生理活性。

Ge-132 和螺锗具有明显的抗肿瘤活性，且毒性较低，在防治肿瘤和放、化疗方面很有潜力，已进入临床试用阶段。但由于它具有一定的毒性，能否用于保健食品方面还是存有争议的。科学家可望在这一领域中，经过深入研究，寻找出基本上无毒的、而功能效应明显的有机锗化合物用于保健食品。目前市场上已出现了不少富锗食品，诸如富锗豆芽、鸡蛋、牛乳、蜂蜜，富锗功能性奶糖、多糖、富锗饮料口服液等。

(三) 活性有机铬化合物

大量的研究确立了铬是人体和动物必不可少的一种微量物质，是机体内胰岛素作用的辅助因子，可提高胰岛素的效能。糖尿病人、冠心病、中老年人都需要额外补铬。自然界中存在的铬有 9 种可能的氧化态，有生物活性的仅有 +3 价和 +6 价两种，其中 6 价铬对人体有剧毒，可致肿瘤或致死。铬是葡萄糖耐量因子（Glucose tolerance factor, GTF）的组成成分，GTF 被认为是一种类激素水溶性的低分子含铬配位物，由铬和尼克酸组成，可能还含有谷氨酸、甘氨酸和含硫氨基酸等。其生理活性与铬含量具有平行关系，能促进升高的血糖降回到正常值。缺铬会使胰岛素效应降低，能引起糖尿病、肥胖病、动脉粥样硬化的产生等。铬与胰岛素有着十分紧密的关系，共同促进机体内利用各种氨基酸合成蛋白质，提高噬菌白细胞寻找致病细菌的能力，提高眼球晶体状体对葡萄

糖利用率。人们发现铬可降低血清胆固醇含量,同时缩小主动脉的硬化斑点面积。通过对人体的试验表明,补充富铬酵母可显著改善GTF,有助于维持血清胆固醇和甘油三酯的正常水平。铬协同某些必需元素还可稳定核酸(主要是RNA)的结构,以防止其受破坏,有助于阻止细胞内基因物质的突变,即防止人体肿瘤的发生。

有机铬比无机铬(如 CrCl_3)对预防人体糖尿病,冠心病等作用更为明显。啤酒酵母、富铬酵母、海洋水生动植物等都是活性有机铬的良好来源。有试验表明,铬的醇萃取部分的生理活性特别高,较那些不能被醇萃取的铬更容易吸收利用,这意味着象啤酒、葡萄酒之类饮料中的铬对人体来说是高度可利用的。因此用醇萃取富铬酵母或海洋水生动植物(以对铬有强富集作用)生产保健食品是行之有效的途径。目前对于富铬保健食品的研究与开发,人们寄予了很大的希望。

(四) 乳酸菌制品

乳酸菌是一类可发酵利用碳水化合物而产生大量乳酸的细菌。可分为以下5类:(1) 乳酸菌属白乳酸菌一般呈细长的杆状,大小为 $(0.5\sim 1)\mu\text{m}\times(2\sim 10)\mu\text{m}$,常呈链状排列,也有单生。为革兰氏阳性无芽孢菌,具有微需氧性,不能还原硝酸盐,过氧化氢酶反应呈阴性,细胞色素为阴性在DNA中GC含量32%~52%。目前应用的主要有保加利亚乳杆菌(*L. bulgaricus*)、德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、干酪乳杆菌(*L. casei*)等。(2) 链球菌属乳酸菌一般呈短链或长链状排列,为无芽孢革兰氏阳性菌,具有兼性厌氧性,过氧化氢酶反应呈阴性,为化学有机营养型。发酵乳制品生产常用的有乳酸链球菌(*S. lactis*)、丁二酮乳酸链球菌(*S. diacetylactis*)、乳酪链球菌(*S. cremoris*)、嗜热乳链球菌(*S. thermophilus*)等。(3) 明串珠菌属呈圆形或卵圆形,菌体排列成链状,过氧化氢酶为阴性,细胞色素为阴性,GC含量37%~45%。该属乳酸菌是异型发酵菌,可发酵利用葡萄糖产生 CO_2 、乙酸和d-乳酸。在乳制品生产中常用的有肠膜明串珠菌(*Leuc. mesenteroides*)及其乳脂亚种(*Leuc. cremoris*)和葡聚糖亚种(*Leuc. dextranicum*)、蚀橙明串珠菌(*Leuc. citrovorum*)、乳酸明串珠菌(*Leuc. lactis*)和酒明串珠菌(*Leuc. oenos*)等。(4) 双歧杆菌呈分支状,具有无芽孢革兰氏阳性专性厌氧性,过氧化氢酶呈阴性,GC含量55%~67%。能发酵利用葡萄糖产生醋酸和乳酸(3:2),不产生 CO_2 。应用于发酵乳制品生产的有双歧杆菌(*B. bifidum*)、长双歧杆菌(*B. longum*)、短双歧杆菌(*B. breve*)、婴儿双歧杆菌(*B. infantis*)、青春双歧杆菌(*B. adolescentis*)等。(5) 片球菌属乳酸菌的细胞排列呈四联状,用于生产的有乳酸片球菌(*P. acidilactic*)和乳糖片球菌(*P. pentosaceus*)。

乳酸菌是有益于人体健康的细菌,它可以对乳的发酵,将乳糖转变为乳酸和促进蛋白质水解,增加人体对可溶性钙、磷和一些B族维生素吸收,进入肠道后可抑制病原菌和有害于人体健康细菌的生长繁殖。乳酸菌及其代谢产物能促进消化酶的分泌和肠道蠕动,促进食物消化吸收,预防便秘发生。乳酸菌(如嗜酸性乳杆菌)能降低血清胆固醇水平,预防心脏病,还有提高机体免疫力和防癌的功能。尤其是双歧杆菌由于功能更加突出,倍受人们青睐。它是人体肠道内典型的有益细菌,其生长繁殖贯穿在人的整个生命历程中。刚出生的新生儿2~3天后从粪便中就发现有双歧杆菌,到4、5天双歧杆菌数量就占绝对优势。随着年龄的增大,双歧杆菌数逐渐减少,在临死的人肠道中根本不

存在双歧杆菌。显然，肠道中双歧菌数量的多少可作为衡量人体健康的标准。乳酸菌发酵制品通常都是由混合菌株制成并需要足够数量的活菌体来发挥其特有的生理功能。目前利用乳酸菌生产的产品种类繁多，主要有酸奶、乳酸菌饮料、乳酸酪乳、双歧杆菌发酵制品、嗜酸乳杆菌发酵制品等。

第三章 保健食品营养成分化学

每日膳食中营养素的供给量是作为保证正常人身体健康而提出的膳食质量标准,供给量的设定是在人体正常生理需要的基础上,还需考虑群体中存在的个体差异而确定的,以确保群体中的绝大多数人都能得到所需的营养素。将人体需要的 40 多种必需营养素概括为蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、矿物质(包括微量元素)、水和膳食纤维七大类。适宜而平衡的膳食必须由多种食物组成,我国营养学家将食物分五大类:第一类为谷物、薯类、干豆类,主要提供碳水化合物、蛋白质、B 族维生素,也是膳食主要热能来源;第二类为动物性食品,包括肉、禽、蛋、鱼、奶等,主要提供人体蛋白质、脂肪、矿物质、维生素 A 和 B 族维生素;第三类为大豆及其制品,主要提供人体蛋白质、脂肪、膳食纤维、矿物质和 B 族维生素;第四类为蔬菜、水果,主要提供人体膳食纤维、矿物质、维生素 C 和胡萝卜素;第五类为纯热能食物,包括动植物油脂,各种食用糖和酒类,主要提供人体能量。我国膳食食物结构坚持以植物性食物为主,动物性食物为辅,热能来源以粮食为主的是其基本特点。

一、蛋 白 质

蛋白质是人体一切细胞、组织的重要成分,是生命现象的物质基础,因而具有重要的生理学意义。

(一) 蛋白质的种类及理化特性

蛋白质含有碳、氢、氧和氮等元素,有些含有硫、磷元素,少数还含有锌、铁、铜、锰等元素。一般是根据化学组成和溶解度不同,将蛋白质分为单纯蛋白质和结合蛋白质两类。

1. 单纯蛋白质在水解时只产生氨基酸的蛋白质为单纯蛋白质,根据其溶解度不同可分为下列几类:

清蛋白(亦称白蛋白),溶于水及稀盐、稀酸、稀碱溶液加硫酸铵至饱和时,清蛋白从溶液中沉淀出来,加热则凝固。清蛋白普遍存在于动植物组织中,如蛋清蛋白、乳清蛋白、血清蛋白,豌豆清蛋白,麦清蛋白等,一般含色氨酸较多。

球蛋白,不溶于水,可溶于稀盐、酸或碱。加硫酸铵至半饱和时,球蛋白从溶液中沉淀出来。动物球蛋白遇热则凝固,植物球蛋白加热不凝固。球蛋白普遍存在动植物组织中,有血清球蛋白、肌球蛋白、乳球蛋白、棉籽球蛋白、大豆球蛋白、豌豆球蛋白等。在化学组成上,色氨酸含量低,而精氨酸含量较高。

谷蛋白,不溶于水、盐溶液及乙醇,可溶于稀碱和稀酸。仅存在于植物组织中,如麦谷蛋白、米谷蛋白等,在化学组成上含谷氨酸较多。

醇溶蛋白,能溶于 50%~80%乙醇中,不溶于水、盐溶液及无水乙醇,加热不凝固。

仅存在植物组织中，有小麦醇溶蛋白、玉米醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白等。在化学组成上含脯氨酸较多，分子结构中非极性侧链较多。

组蛋白，溶于水、稀酸，能被氨水沉淀。化学组成上含有大量碱性氨基酸（如精氨酸、赖氨酸）。组蛋白常与酸性物质结合成盐类而存在，加热不凝固，属于动物性蛋白，从脑腺和胰腺中可分离得到。

精蛋白，溶于水与稀酸，能被稀氨水沉淀，化学组成上含碱性氨基酸（精氨酸、赖氨酸、组氨酸）比组蛋白更高，加热不凝固，属于动物性蛋白，在鱼精、鱼卵和脑腺等组织中较多。

硬蛋白，不溶于水，盐溶液、稀酸及稀碱等，为动物性蛋白。各种动物支柱组织如骨，软骨、腱、角、毛发、丝等蛋白质都属于硬蛋白。

2. 结合蛋白质是由单纯蛋白质与非蛋白质（辅基）结合而成，按辅基性质不同可分为下列几类。

核蛋白，是由单纯蛋白质与核酸结合而成的一种结合蛋白质，是构成细胞核的主要成分，在生物的生长与繁殖过程中具有独特的功能。

糖蛋白，辅基部分是碳水化合物，如粘蛋白是由粘多糖与单纯蛋白质结合而成，存在于骨骼、肌腱、唾液及其他动物体粘液中。

脂蛋白，辅基部分是脂肪或类脂（磷脂、类固醇等），是脂质贮存和运输的一种形式。存在于血、蛋黄、乳、脑、神经及细胞膜中。

磷蛋白，是由单纯蛋白和磷酸组成的如卵黄磷蛋白，乳酪蛋白。

色蛋白，是由单纯蛋白质与含金属的色素物质组成，如含镁原子的叶绿素与蛋白质结合而成的叶绿蛋白，人体及动物血液中含铁原子的血红色与蛋白质结合而成的血红蛋白和肌肉中的肌红蛋白等。

3. 蛋白质的理化性质。蛋白质大分子存在的自由氨基与羧基（末端或侧链）在碱性溶液中和酸一样解离而带负电荷，在酸溶液中则和碱一样解离而带正电荷。当蛋白质分子上的正负电荷相等（净电荷为零）时，这时溶液的pH值称为蛋白质等电点。一般溶于水的大多数蛋白质，其羧基的解离程度大于氨基的解离程度，故等电点偏酸性。相反，则偏碱性，如精蛋白等。在等电点时，蛋白质溶液的粘度、渗透压、膨胀性及导电能力均降为最低值。

蛋白质是亲水胶体，1g蛋白质可结合0.3~0.5g水。其稳定因素主要是由于蛋白质的水化作用和在一定pH条件下所带的同性电荷的作用。加中性盐类可中和蛋白质分子表面电荷使蛋白质颗粒容易凝集而沉淀，常用盐类有硫酸铵和硫酸钠等。有机溶剂酒精、丙酮等的亲水性大于蛋白质分子，它们可与大量水分子相缔合，使蛋白质脱水沉淀析出。蛋白质在碱性溶液中可与重金属离子 Zn^{++} 、 Cu^{++} 、 Hg^{++} 、 Pb^{++} 、 Fe^{++} 等作用，产生不溶性的重金属蛋白盐沉淀。生物碱沉淀剂、苦味酸、单宁、磷钼酸、三氯醋酸等也能使蛋白质沉淀析出。

蛋白质受到外界化学和物理因素的作用，使构成空间结构的氢键等副键遭受破坏，导致蛋白质的二级、三级结构的变化，使天然蛋白质理化性质改变而失去原有的生理活性。蛋白质的变性作用在食品工业中得到广泛的应用，在乳粉及罐头生产工艺中，利用蛋白

质变性具有的较高的温度系数,采用高温短时间进行杀菌,以保持食品原有风味和外形。例如大豆蛋白变形,其结构由球状变成纤维,可用来制造“人造肉”等。

酸、碱及蛋白水解酶都能破坏蛋白质的肽键,使蛋白质发生水解,生成肽、氨基酸。由于蛋白水解酶如凝乳酶、胃蛋白酶、细菌蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶及菠萝蛋白酶等,是在常温常压(30~60℃, pH2~8)下进行反应的,所得的氨基酸完全不被破坏,不发生构型变化。由于其条件温和、设备简单、符合食品卫生要求,目前广泛应用于食品。

食品中的蛋白质主要分为三类。第一类为肉中蛋白质:肌浆蛋白包括肌溶蛋白和球蛋白两大类,肌原纤维蛋白包括肌球蛋白(肌凝蛋白)、肌动蛋白(肌纤蛋白)、肌动球蛋白(肌纤凝蛋白)和肌原球蛋白等,基质蛋白主要有胶原蛋白和弹性蛋白(均为硬蛋白类)。第二类为胶元和明胶,胶元是皮、骨和结缔组织中的主要蛋白质,明胶是胶元分子热分解产物。工业上常把胶元含量高的组织如皮、骨置于加碱或加酸的热水中长时间提取而制得。第三类为乳蛋白质,主要有酪蛋白、乳清蛋白(β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白)和脂肪球膜蛋白(磷脂蛋白)。第四类为种子蛋白,主要有谷物蛋白和油料种子蛋白质。

(二) 蛋白质的氨基酸组成和营养评价

1. 蛋白质中的氨基酸。人体对蛋白质的需要实际上是对氨基酸的需要,自然界一般蛋白质中含有22种氨基酸。氨基酸在营养上有“必需”和“非必需”二类:必需氨基酸是指人体需要,而体内不能合成或合成速度不能满足机体需要的氨基酸;非必需氨基酸也是蛋白质的构成材料,它能在体内自行合成或由其他氨基酸转变而来。人体的必需氨基酸通常有亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和色氨酸等,对婴儿、成人来说组氨酸亦属必需氨基酸共9种。在必需氨基酸中,胱氨酸可以代替蛋氨酸(代替量可达80%),酪氨酸可代替约70%的苯丙氨酸。非必需氨基酸有:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、胱氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸、精氨酸脯氨酸和羟脯氨酸等13种。从营养学观点看,22种氨基酸均需要,是机体蛋白质的建筑材料,而9种必需氨基酸则是食物蛋白质的关键成分。食物蛋白质中,按照人体需要及其比例关系相对不足的氨基酸,即为限制性氨基酸,限制性氨基酸缺乏最多的为第一限制性氨基酸,最主要的限制性氨基酸在食物中是赖氨酸、蛋氨酸及色氨酸。因而以谷物为基础的婴幼儿食品中常添加适量的赖氨酸予以强化。见表3-1。

2. 蛋白质的营养评价。评价一种食物蛋白质的营养价值,一方面要从“量”上即食物中蛋白质含量多少,同时更要从蛋白质“质”的角度即根据其必需氨基酸的含量及模式来考虑。此外,还要考虑机体对该食物蛋白质的消化、利用程度。食品蛋白质的营养价表示方法有蛋白质价和蛋白质生物价等。蛋白质价乃是把各种食物蛋白质的氨基酸组成与认定的标准蛋白质相比(此标准蛋白含有最高营养价氨基酸组成),从不足的氨基酸所占的相对比例来判定各蛋白质的营养价,最不足的氨基酸(限制氨基酸)与标准蛋白相对应的必需氨基酸之百分比为蛋白价。蛋白质生物价,是根据动物实验而求出的营养价,即体内保留的氮量与吸收的氮量之百分比。由FAO资料可见,蛋白价和生物价之间基本一致。我国目前评价食物蛋白质的营养值通常是测定蛋白质及各种氨基酸(尤其是必需氨基酸)含量。对蛋白质营养价做系统研究或者探索一种新蛋白质资源时,首先应

根据测定的蛋白质含量和氨基酸模式，计算氨基酸酸分，再测定其在体外的消化率。并进一步测定其蛋白质（氨基酸）的利用率，用生物学试验评价蛋白质的质量，并对受试蛋白质进行满足人体需要量方面的检验。

表 3-1 不同年龄者每日每公斤体重必需氨基酸需要量的估计值** 单位：mg

氨基酸	婴儿 (3~4个月)	学龄前儿童 (2岁)	学龄儿童 (10~12岁)	成年人
组氨酸	23	—	—	[8~12]*
异亮氨酸	70	31	30	10
亮氨酸	161	73	45	14
赖氨酸	103	64	60	12
蛋氨酸+胱氨酸	58	27	27	13
苯丙氨酸+酪氨酸	125	69	27	14
苏氨酸	87	37	35	7
色氨酸	17	12.5	4	3.5
缬氨酸	93	38	33	10

* 已有实验表明成人也需要组氨酸。

** 1989年10月24日中国营养学会常务理事会颁布。

二、碳水化合物

碳水化合物（糖类）是食品的重要成分，广泛存在于植物体中，是人和动物体主要供能物质。占全部能量的50%~55%，从能量值看，1g糖类=1g蛋白质=0.44g脂肪，糖可与脂类形成糖脂，是构成神经组织的细胞膜的组成成分；糖还可与蛋白质结合成糖蛋白及粘蛋白，为具有重要生理功能的物质；作为食品加工中重要原辅基料，对食品的感官性状也具有重要的作用。从化学结构特点看，碳水化合物是多羟基的醛、酮或多羟基醛、酮的缩合物。食品中主要的碳水化合物有单糖、寡糖及多糖等。

（一）单糖

1. 葡萄糖是以游离和结合型广泛存在于自然界，游离状态多存在于水果中，尤其是葡萄和无花果中。人类血液中血糖主要为葡萄糖。天然存在的寡糖和多糖中含有葡萄糖的物质甚多，现在工业上用淀粉经酶或酸水解得到葡萄糖。它是机体吸收、利用最好的单糖，机体各器官都能利用它作为能量和制造许多其他重要化合物，如核糖核酸、脱氧核糖核酸中的核糖和脱氧核糖、粘多糖、糖蛋白、糖脂等。据研究发现，大脑每日约需100~120g葡萄糖。肾髓质、肺组织和红细胞等也必需依靠葡萄糖供能使机体血糖（血中葡萄糖）浓度保持相对恒定（正常80~120mg/100mL血）。由此可见，葡萄糖对于保证上述组织能源的供应具有十分重要的意义。

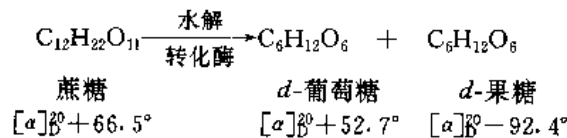
2. 果糖：蜂蜜和许多水果中含有果糖，工业上已利用异构酶将葡萄糖转变为果糖，制成不同浓度的果葡糖浆和高果糖。机体的果糖主要由肠道的二糖酶将蔗糖分解为葡萄糖和果糖而来。肝脏是实际利用果糖的唯一器官，它可将果糖迅速转化为葡萄糖被机体吸收利用。果糖的代谢不受胰岛素制约，故糖尿病人可食用果糖。

果糖的甜度很高，是一般食用糖类中最甜的物质，超过葡萄糖甜度的1倍，因而果糖成为食品工业中重要的甜味物质。

(二) 寡糖 (低聚糖)

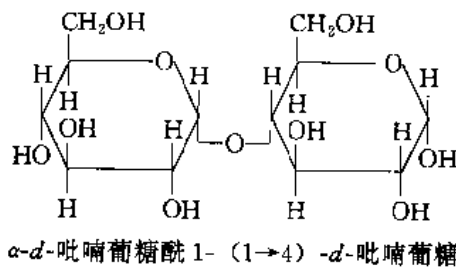
现已知的寡糖有500多种，就营养而言比较有价值的有蔗糖、麦芽糖、乳糖等。

1. 蔗糖在水果、花、种子等植物中广泛存在，尤其以甘蔗、甜菜等最为丰富。工业上由甘蔗或甜菜制备蔗糖，具有较强的甜味，是重要的甜味剂。在人类营养上也有重要意义。在酸或转化酶作用下，水解为d-葡萄糖和果糖：



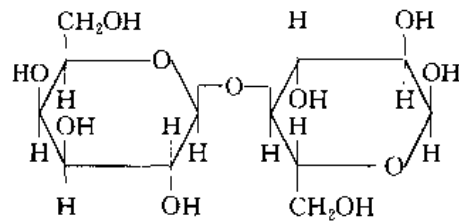
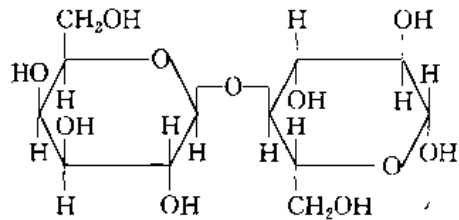
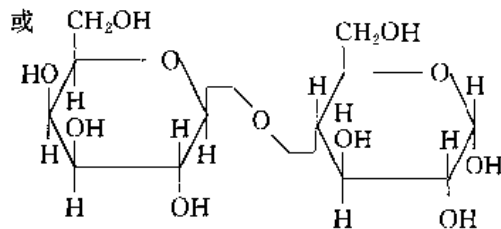
通常，把上述的变化称为蔗糖的转化，其生成物称为转化糖，由于蔗糖本身不显示还原性，而两个单糖具有还原性，在机体小肠内，于酶作用下，酶解为葡萄糖和果糖后吸收。近年来，由于西方国家人们每天食用蔗糖的量高达100g以上，结果发现当地居民体重过高，糖尿病、龋齿及出现动脉硬化和心肌梗塞等发病率也相应增高，蔗糖易于发酵，并可产生溶解牙齿珐琅质和矿物质的物质。它被在牙垢中发现的某些细菌和酵母作用，在牙齿上形成一层粘着力很强的不溶性葡聚糖，同时产生作用于牙齿的酸，引起龋齿。

2. 麦芽糖在植物的叶、发芽的种子里，尤其是在麦芽中含量多，故称为麦芽糖。麦芽糖主要来自淀粉水解，由二分子葡萄糖构成。有还原性，是两分子葡萄糖以α-1,4-糖苷键结合的物质。小肠内有数种麦芽糖酶，可把麦芽糖转变为葡萄糖后吸收。麦芽糖结构式为：



麦芽糖是饴糖的主要成分。食品工业中所用的麦芽糖主要是由淀粉经酶水解而来，是食品工业中重要的糖原料，其甜度约为蔗糖的1/2，在营养上除供热能外尚未见有特殊意义。

3. 乳糖由一分子葡萄糖和一分子半乳糖构成，是哺乳动物乳汁的主要成分，其含量依动物种类而异。通常人乳约含7%，牛乳约5%。有还原性，葡萄糖与半乳糖以β-1,4半乳糖苷键结合的物质。其结构式为：

 α -乳糖 β -乳糖

乳糖

乳糖是婴儿主要食用的糖类物质。在婴儿小肠内， β -半乳糖苷酶分解乳糖为半乳糖和葡萄糖后吸收。在人工合成的营养乳中，若加入 $\alpha : \beta$ (40 : 60) 平衡状态的平衡乳糖，则与母乳一样，婴儿食用时不会引起腹泻而被应用。随着婴儿生长发育，肠道中半乳糖苷酶活性急剧下降，甚至在某些个体中几乎降为 0，因而成年人食用大量乳糖，不易消化，食物中乳糖含量高于 15% 时可导致渗透性腹泻。

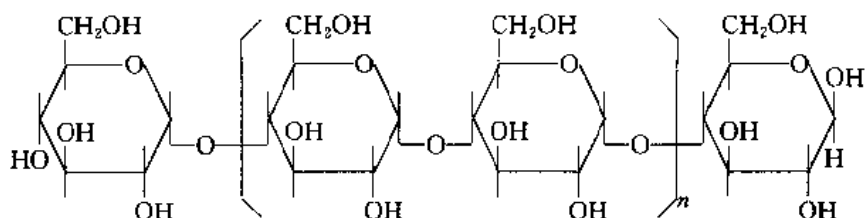
自然界中构成乳糖的 *d*-半乳糖很少单独存在，仅在少数植物中如甜菜中有所发现，无食用意义。但由于半乳糖除作为乳糖的组成成分外，还参与构成许多重要的糖脂（如脑苷脂、神经节苷脂）和糖蛋白，细胞膜亦有含半乳糖的多糖，因而在营养上仍有一定的意义。

(三) 多糖

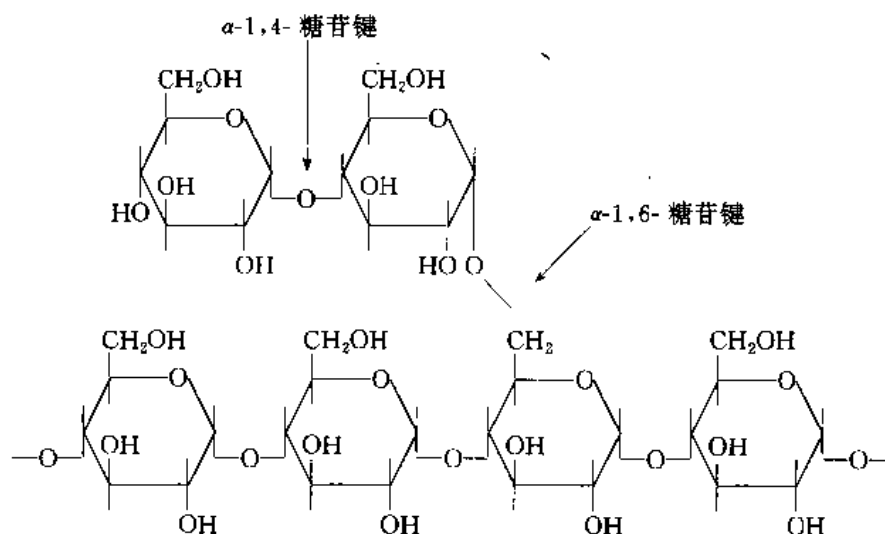
多糖是由许多单糖分子残基构成的大分子化合物，按其化学组成不同，可分为同多糖和杂多糖二类。前者是由同一单糖残基构成，如淀粉则是由单一的葡萄糖所组成；后者则是由不同的单糖分子残基和糖醛酸分子组成，如黄原胶（由微生物产生的多糖胶）即是由 *d*-葡萄糖、*d*-甘露糖和 *d*-葡萄糖醛酸之比为 2 : 2 : 1 构成的多糖，在食品工业中作增稠剂使用。从营养学角度上讲，可被人体消化吸收的多糖主要有淀粉、糊精二种。

1. 淀粉是数量最大的食用糖类，其主要来源是谷物和土豆。煮熟的淀粉往往全部被利用。由于淀粉在肠道中酶解需要一定的时间，因此机体不会突然出现葡萄糖过剩，血糖水平上升缓慢，对健康者食用淀粉后不容易引起糖尿病，并且任何情况下均能很好适应。淀粉是植物的贮存物质，在动物肝脏和肌肉组织中有一类称为“动物淀粉”的糖原，也由葡萄糖组成并可被机体消化吸收。

普通淀粉粒由 15%~30% 直链淀粉、70%~85% 支链淀粉组成。糯米、糯玉米等几乎全由支链淀粉组成，也有含直链淀粉 70%~80% 的高玉米直链淀粉。直链淀粉的聚合度 (\overline{DP}) 为数百至数千；支链淀粉的聚合度 (\overline{DP}) 为数万；支链的平均链长为 20~25 (葡萄糖单位)。淀粉葡萄糖基连接方式如下：



直链淀粉的结构



支链淀粉的结构

在溶液中，直链淀粉易聚合沉淀，即老化现象。一般已糊化了的淀粉类食品，其水分含量为 30%~60%，温度 0℃ 附近最易老化（如面包的老化），支链淀粉则无此现象发生。淀粉粒不溶于水，和水一起加热则膨润形成糊状，加稀碱有利于淀粉的溶解和糊化。在 α -淀粉酶、 β -淀粉酶及葡萄糖淀粉酶作用下被分解。在小肠内，由胰脏的 α -淀粉酶将淀粉分解为葡萄糖、寡糖等，再由小肠壁附近的 α -1,6 糖苷酶切断寡糖的 1,6 糖苷键，最后全部成为葡萄糖而被吸收。

淀粉除作为食用供能外，在食品工业中还有多种用途，特别是制造各种类型的改性淀粉如可溶性淀粉、 α -淀粉、羧甲基淀粉、磷酸化淀粉、交联淀粉、接支链淀粉等被广泛应用于食品工业。

2. 糊精也是由多个葡萄糖分子构成，多由液化型淀粉酶水解淀粉，或以稀酸处理淀粉所得。当以糖化型淀粉酶水解支链淀粉至分支点时所生成的糊精称为极限糊精 (Limit dextrin)。糊精分子大小约为淀粉的 1/5。食品工业上常用大麦芽为酶源水解淀粉得到糊精和麦芽糖的混合物，称为饴糖。饴糖是许多甜食品生产的重要糖质原料。人食用后在体内消化，水解为葡萄糖后被利用。

糊精与淀粉不同，它具有易溶于水，强烈保水及易于消化等特点，在食品工业中常

被用来增稠，稳定和保水。同时对一些食品还可起到防止结晶析出，避免外观不良等作用。

三、脂肪及脂肪酸

脂肪是人体重要的组成部分，它以多种形式存在于各种组织中。皮下脂肪是机体的贮存组织，一个体重 65kg 的成人，含脂肪约 9kg，肥胖者体重可高达 100kg 以上。脂肪在营养上有两种功能：作为能量携带者和生物合成用的碳原子提供者和作为脂溶性活性物质（必需脂肪酸，脂溶性维生素）的携带者。脂肪富含能量高达 38kJ/g，这对食物需要量高的重体力劳动者尤为重要。此外，由于停留于胃中时间较长，脂肪令人有高度的饱腹感。一些高生活水平的国家中脂肪食用量不断上升，根据大量及广泛的流行病学调查已经确证，大量食用脂肪是导致发生心肌梗塞和动脉硬化的一个主要危险因素。实际上在人类营养中最重要的必需脂肪酸是亚油酸，在体内可转变为花生四烯酸。机体主要用必需脂肪酸合成磷脂，缺乏必需脂肪酸使线粒体结构发生改变，导致发生严重的代谢紊乱，甚至可引起死亡。必需脂肪酸的另一生理功能是作为前列腺素的原料，由于前列腺素能减少脂肪细胞中的 3',5'-环腺苷酸，因而是脂解作用的强抑制剂。

（一）脂肪的组成

脂肪组成主要是油和油脂，通常是由甘油和三分子脂肪酸组成的三酰甘油酯。日常食用的动、植物油脂如猪油、牛油、豆油、花生油、棉籽油、菜籽油均属此类。自然界约有七八十种不同的脂肪酸，大多数是偶数碳原子的直链脂肪酸，但在微生物产生的脂肪酸中存有相当数量的奇数碳原子脂肪酸，也还有少数含环的脂肪酸和极少数带侧链的脂肪酸。能被人体吸收利用的只有偶数碳原子的脂肪酸。脂肪酸根据碳链中双键数目的多少分成三类：第一类为饱和脂肪酸，分子中不含双键，多存在于动物油脂中，如硬脂酸、软脂酸等。第二类为单不饱和脂肪酸，分子中含一个双键，油酸是最普通的单不饱和脂肪酸。第三类为多不饱和脂肪酸，分子中含二个和二个以上双键，在鱼油和植物种子中含量较多，最普通的是亚油酸。饱和脂肪酸中，碳原子数小于 10 者，在常温下为液态，为低级脂肪酸或挥发性脂肪酸；碳原子数大于 10 者在常温下为固态，称固体脂肪酸。随着脂肪酸碳链的加长，熔点增高，不易消化、吸收。不饱和脂肪酸由于双键存在熔点可大大降低。

脂肪酸还可按其碳链的长短不同分成四类：短链脂肪酸（ $C_8 \sim C_9$ ），主要存在于乳脂和某些棕榈油中；中链脂肪酸（ $C_{10} \sim C_{14}$ ），存在于某些种子油（如椰子油）中；长链脂肪酸（ $C_{15} \sim C_{18}$ ），是脂肪中主要的脂肪酸；超长链脂肪酸（ C_{20} 以上），一般存在于海产油脂中。近年来人们针对脂类的营养作用，特别是对消化、吸收不良病人的营养问题，提出了中链脂肪酸组成的甘油酯在膳食中的重要意义。由于中链脂肪酸组成的三酰甘油酯尚可抑制脂解作用，因而可降低血浆中必需脂肪酸的需要量，减少胆固醇的合成，另外中链脂肪酸不经过淋巴，而经门脉血大量被肝脏截获，不会引起高脂血症。

（二）必需脂肪酸

必需脂肪酸是指不能被机体合成，而又是人体生命活动所必需，一定要由食物中供

给的脂肪酸。长期以来认为,亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸是人体必需脂肪酸。近年来发现亚麻酸虽有一定的促生长作用,但却不能消除亚油酸缺乏所产生的症状。从化学结构进一步分析,认为必需脂肪酸应具备以下三个条件:分子中的二烯甲烷($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$)链节中至少要有二个或二个以上双键;双键构型必须是顺式,即双键两侧的原子或原子团应相同;距离羟基端最远的双键应在由 CH_3 端数起第6,第7碳原子之间。基于以上原因,可以认为亚麻酸虽有一定的必需脂肪酸活性,而并非必需脂肪酸。花生四烯酸可在体内通过亚油酸加长碳链和合成新的双键得到。由此可见,只有亚油酸才是机体内重要的必需脂肪酸。

必需脂肪酸是组织、细胞的组成成分。它对线粒体和细胞膜尤为重要,在体内参与磷脂的合成,并以磷脂的形式存在于线粒体和细胞膜中。必需脂肪酸和胆固醇关系极为密切,只有当胆固醇和必需脂肪酸结合时才能在体内转运,正常代谢,否则会出现胆固醇与饱和脂肪酸结合在体内沉积。体内新组织的生长和受损组织的修复都需要亚油酸,尚可保护皮肤,免受射线损伤。亚油酸的缺乏还会引起动物不孕或哺乳困难。人类中,婴儿易缺乏必需脂肪酸,使其生长发育缓慢,出现皮肤湿疹、干燥、脱屑等。必需脂肪酸在植物油中含量较多,动物脂肪中含量较少。如米糠油、花生油、芝麻油、玉米油、豆油中亚油酸占总脂肪酸量的34%~52%。

(三) 非必需脂肪酸

非必需脂肪酸是指在某些条件下不必要的,或者有可能产生某些问题的成分。其中有氧合脂肪酸,如 α -羟基脂肪酸,在神经组织和脑内含量相当高,而在贮存脂肪中极少,这类脂肪酸在营养上没有什么意义;含环的脂肪酸,在植物中少见,但棉籽油中存在有少量环丙烷脂肪酸,具有一定的毒副作用。现已证明,饱和脂肪酸可增加肝脏合成胆固醇的速度,提高血胆固醇浓度,易在动脉粥样斑块中沉积,对心脑血管病患者来说应尽量少摄入饱和脂肪酸。长链或超长链单烯酸,主要指菜油中芥酸;多不饱和脂肪酸,由于所含双键数较多,食品的稳定性和易受影响,大大限制了它在食品工业中的应用。

四、维生素

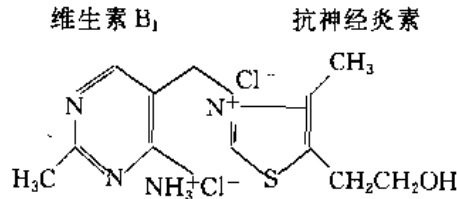
维生素是维持人体正常生理功能所必需的一类有机化合物。维生素及其前体物都在天然食物中存在,不提供体内热能,一般也不是机体的组成成分。它们参与维持机体正常生理功能,需要量极少,通常以毫克,有的甚至以微克计。它们一般不能在体内合成,或合成的量少,不能满足机体需要,必需经常由食物供给。食物中维生素的长期缺乏或不足即可引起代谢紊乱和出现病理状态,形成维生素缺乏症。食物中的维生素种类繁多,性质各异,基本上可分为水溶性维生素和脂溶性维生素二类。

(一) 水溶性维生素

1. 抗坏血酸(维生素C)的化学性质详见第三章六、(一)、3.中所述,抗坏血酸广泛分布于水果、蔬菜中,辣椒的含量可高达100mg/100g以上,水果中以带酸味的水果如柑橘、红果、枣、猕猴桃等含量较高,特别是刺梨中含量可高达2000mg/100g以上。抗坏血酸因有抗坏血病的作用而得名。进入小肠以扩散或主动吸收,通过血液供给机体组

织需要。抗坏血酸的生理作用是可激活羟化酶，促进组织中胶原的形成而促进伤口愈合。还参与类固醇化合物的羟化以及酪氨酸的代谢等。抗坏血酸可参与体内氧化还原反应、体内的氧化型谷胱甘肽可使还原型抗坏血酸氧化成脱氢抗坏血酸，而后者又可被还原型谷胱甘肽转变成还原性抗坏血酸。此外，抗坏血酸可将铁蛋白中的 Fe^{3+} 还原 Fe^{2+} ，促进铁的吸收，对缺铁性贫血有一定的辅助治疗作用，还可提高机体应急能力。

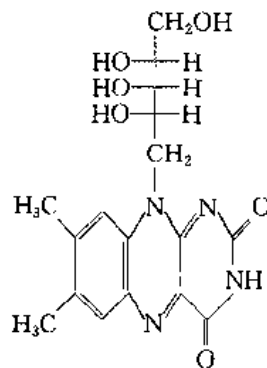
2. 硫胺素（维生素 B_1 ）是由一个嘧啶和一个噻唑环通过亚甲基桥相连组成。广泛分布于整个动、植物界，并且以多种形式存在于食品中。硫胺素的化学结构式为：



硫胺素是水溶性的，呈白色结晶状，在酸性溶液中稳定性很好，甚至加热时也是稳定的。而在中性或碱性溶液中则不稳定，并易受紫外线破坏。

硫胺素在小肠吸收，浓度高时为被动扩散，浓度低时则主动吸收，肠道功能不佳者吸收易受阻。在体内硫胺素不能大量贮存，常出现明显的硫胺素缺乏症，故需经常从食物中补充，健康成人体内总量约为 25mg。硫胺素在体内参与糖类的中间代谢，主要以焦磷酸硫胺素的形式即辅羧化酶参与 α -酮酸的脱羧。若硫胺素不足，则辅羧化酶活性下降，糖代谢受阻碍，并影响整个机体代谢过程。因而会出现相应的神经肌肉症状如多发生神经炎、肌肉萎缩及水肿，严重时还可影响心肌和脑组织结构及功能。

3. 核黄素（维生素 B_2 ）是具有一个核糖醇侧链的异咯嗪的衍生物，也可认为是核糖醇与 6, 7-二甲基异咯嗪二者缩合而成。其化学结构式为：



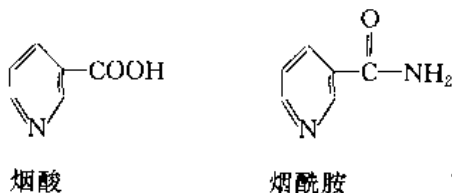
核黄素呈黄色晶体， 280°C 即熔化并分解，不溶于丙酮、苯、氯仿与乙醚，而溶于水，极易溶于碱性溶液中。在酸性和中性溶液中稳定，在碱性溶液较易破坏。核黄素是一种具有绿黄色荧光而对热稳定的两性化合物，等电点为 $\text{pH}6$ ，有旋光性为左旋，在可见光和紫外线照射下（尤其在碱性溶液或高温中）较易破坏。

核黄素广泛存在于各类食品中，动物性食品比植物性食品含量高，其中以内脏含量最为丰富，如肝脏的含量高达 $2\text{mg}/100\text{g}$ ，肾脏约含 $1\text{mg}/100\text{g}$ ，禽蛋类含量也较高，一般蔬菜、谷物含量较少，多在 $0.1\text{mg}/100\text{g}$ 以下。核黄素在自然界中主要以磷酸酯的形式

存在于二种辅酶中,即黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。与此维生素相结合的酶称为黄酶或黄素蛋白。具有氧化还原能力,在化合物如氨基酸和还原性吡啶核苷酸的氧化中起递氢作用。FMN是L-氨基酸氧化酶的组成成分,可将L-氨基酸氧化为 α -酮酸。FAD为琥珀酸脱氢酶、黄嘌呤氧化酶、甘氨酸氧化酶和D-氨基酸氧化酶的组成部分。核黄素呈黄色,加氢后的还原型核黄素则无色。

核黄素很容易由小肠吸收,经血液输送到组织,并可少量贮存在肝、脾、肾和心肌中。由于贮存量少需每日从食物中补充。核黄素是体内黄酶和黄素蛋白的辅酶(FMN和FAD)的重要组成成分,并具有氧化还原特性在生物氧化即组织呼吸中具有十分重要的意义。

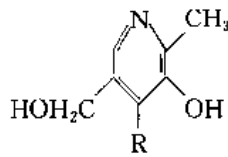
4. 烟酸即维生素PP,又称尼克酸,是吡啶 β -羧酸,烟酰胺则是相应的胺($R=NH_2$),其化学结构式为:



烟酸及烟酰胺均溶于水,呈白色结晶体,它们对热稳定,即使120℃加热20min几乎不被破坏,对光、空气或碱也不敏感。生物体内它是脱氢酶的辅酶,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐($NADP^+$)的重要组成成分。烟酸及其酰胺广泛存在于动、植物体中,但一般含量较少。含量最多的是蘑菇、酵母等。花生、豆类、全谷及动物肝脏中含量也较丰富。

烟酸由小肠吸收并在体内转变成辅酶,广泛分布于全身,但不能贮存。过量的烟酸绝大部分代谢后随尿排出,尿中仅含少量的烟酸和烟酰胺。烟酸在体内以烟酰胺的形式构成呼吸链中的辅酶I(CoI, NAD^+)或辅酶II($CoII, NADP^+$)。是组织中重要的递氢体。在代谢中起重要的作用,特别是参与葡萄糖的酵解,脂类代谢,丙酮酸代谢,戊糖合成及高能磷酸键的形成等实验证实,玉米中大部分为结合型烟酸,占总烟酸量的64%~73%,不能被人体利用。大致分为二类:一类与相对分子质量为120000~13000的肽结合,称烟酰源(Niacinogen);另一类与糖结合,相对分子质量为2370,称烟烯汀(Niacytin),它们相当稳定。在碱性溶液中可分解出游离烟酸,在玉米粉中加入0.6%~1.0% $NaHCO_3$ 做成窝窝头煮熟,烟碱含量可随pH值升高而增加, $NaHCO_3$ 用量为0.6%、0.8%、1.0%时,游离烟酸含量分别占总烟酸量的60%、82%和93%。而玉米粉中 B_1 、 B_2 基本不受影响。经动物和人体试验证明,玉米中结合型烟酸经 $NaHCO_3$ 处理后,其烟酸可以被动物和人体利用,并可预防癞皮病发生。

5. 维生素 B_6 是吡啶的衍生物,有三种形式,即吡哆醛、吡哆醇和吡哆胺。它们可互相转变,都具有维生素 B_6 的活性。其结构式为:

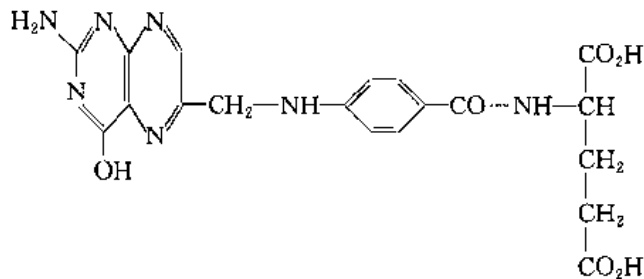


R: —CHO 吡哆醛
 —CH₂OH 吡哆醇
 —CH₂NH₂ 吡哆胺

这些物质的自由碱和盐酸盐均溶于水和醇，呈无色晶体，对热较稳定，但能被碱和紫外光分解。吡哆醇盐酸盐熔点为 204~206℃，并分解。这些化合物以其磷酸盐的形式广泛存在于动、植物体中。蛋黄、肉、鱼、乳、谷类、种子外皮、蔬菜等含量丰富。

维生素 B₆ 在小肠内易被吸收，经磷酸化后以辅酶的形式分布于组织中，通常人体内含约 40~150mg，每日从食物中摄取量为 2~3mg。维生素 B₆ 是体内很多酶的辅酶，其中包括转氨酶、脱羧酶、消旋酶、脱氢酶、合成酶和羟化酶等。它可帮助糖类、脂肪和蛋白质的分解、利用，也帮助糖元由肝脏或肌肉中释放能量。

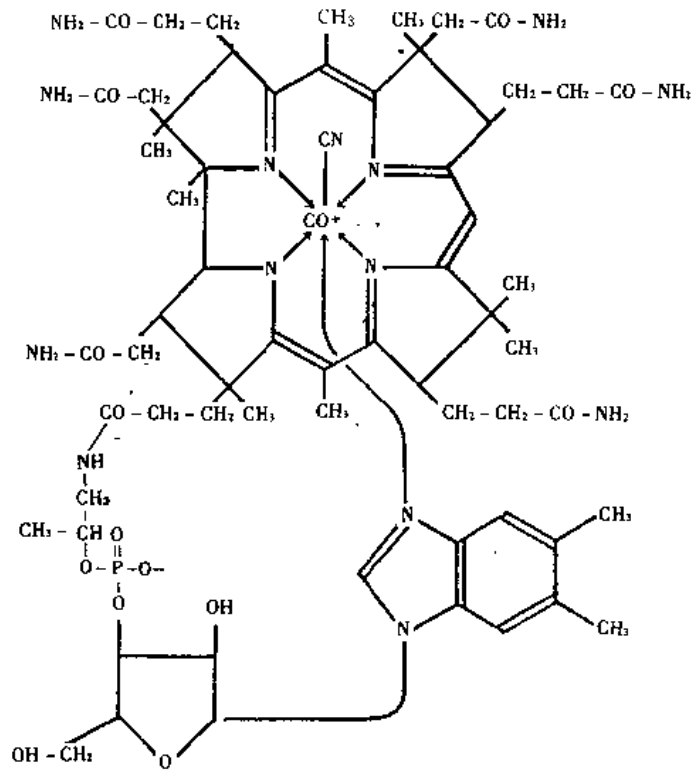
6. 叶酸是一组化合物的名称，又称维生素 B_c，它由蝶酸和谷氨酸结合而成，而蝶酸又是由 2-氨基-4-羟基-6-甲基蝶呤吡和对氨基苯甲酸构成，故又称蝶酰谷氨酸。其结构式为：



叶酸呈橙黄色的结晶状粉末，不溶于醇和乙醚及其他有机溶剂。稍溶于热水，它有一个特异的紫外吸收光谱。在中性和碱性溶液中对热是稳定的，但在酸性溶液中是不稳定的，且对光敏感。如果从叶酸分子结构中去掉谷氨酸，则维生素活性丧失。蝶酸无论是与三个谷氨酸分子（蝶酰三谷氨酸）或是七个谷氨酸分子（蝶酰 7 谷氨酸）相结合，都具有生物活性。叶酸存在于所有的绿叶蔬菜中，而且也存在于肝脏和肾脏中，烹调会大大减少它的含量。

叶酸摄入后在小肠内被上皮细胞分泌的 γ -L-谷氨酸-羧基肽酶水解成谷氨酸和游离叶酸，在小肠上部被主动吸收。叶酸吸收后在维生素 C 和还原型辅酶 II 参与下可转变成具有生物活性的四氢叶酸 (FH₄)，并多以甲基四氢叶酸的形式贮存于肝脏。四氢叶酸参与一碳单位的转移，是体内一碳单位转移酶系统中的辅酶，在氨基酸代谢，嘌呤、嘧啶的合成，进而对核酸和蛋白质的生物合成中都有重要意义。食物中的叶酸绝大部分是多谷氨酸化合物，谷氨酸对叶酸的生物活性极为重要。

7. 维生素 B₁₂ 有两个特性成分，一个是在核苷酸样的结构中，5,6-二甲基苯并咪唑经 α -糖苷键与 d-核糖结合；另一个是中间的环状结构为类似卟啉的“咕啉”环状系统。其化学结构式为：



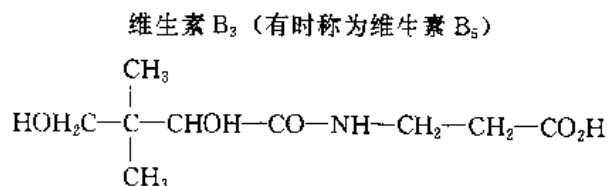
此咕啉环与四个氮原子配位的是一个钴原子(故维生素 B₁₂ 也称钴胺素),通常钴原子的第六个配位键被氰化物占据(氰钴胺素,或药用维生素 B₁₂,或维生素 B_{12a})。在组织中可分离出含羟基的钴胺素(即维生素 B_{12b})及含亚硝基的钴胺素(即维生素 B_{12c})，它们都不是原来存在的形式,但都具有维生素 B₁₂ 的活性。维生素 B₁₂ 在组织中的天然形式为辅酶 B₁₂,即是将氰钴胺素中的氰(CN)换成 5'-脱氧腺苷,为 5'-脱氧腺苷钴胺素。维生素 B₁₂ 是目前所知唯一含有金属的维生素,而其所含金属钴也只有以维生素 B₁₂ 的形式才能发挥必需微量元素的作用。

维生素 B₁₂ 的主要来源为肉类,尤以内脏,鱼类及蛋类为多,其次为乳类,豆制品等。植物性食品一般不含有此维生素。维生素 B₁₂ 的水溶液在室温下稳定, pH 为 4~6 之间最稳定,此时即使经高压灭菌处理也很少损失。但在 pH 值 2 以下或 9 以上即行分解。遇强光或紫外线亦不稳定,易受破坏。氧化剂及还原剂对维生素 B₁₂ 有破坏作用,硫胺素和烟酸并用时对溶液中的维生素 B₁₂ 有缓慢的破坏作用。

维生素 B₁₂ 的吸收需要有正常的胃液分泌,胃酸可促进蛋白质结合的维生素 B₁₂ 分解游离出来,与粘膜分泌的“内因子”的糖蛋白结合后才能不受肠道细菌破坏,才能通过肠壁吸收。常见的维生素 B₁₂ 障碍性恶性贫血就是因为胃粘膜变化引起内因子不足所造成的。维生素 B₁₂ 参与体内一碳单位的代谢,可以通过增加叶酸的利用率来影响核酸和蛋白质的合成,从而促进红血球的发育和成熟。在甲基转移作用中,维生素 B₁₂ 可形成甲基钴胺素,它是活泼甲基的转运者,可将甲基转移给高半胱氨酸变成甲硫氨酸及由乙醇胺合成胆碱等。人体内维生素 B₁₂ 的总量约为 2~10mg,50% 以上存在于线粒体中,当机体的维生素 B₁₂ 含量降至 0.5mg 左右就会出现贫血,即所谓恶性贫血,此时需用维生素 B₁₂ 治疗。

8. 泛酸又名维生素 B₃ (B₅), 遍多酸。它是由 β-丙氨酸借肽键与 α, γ-二羟-β-β 二甲

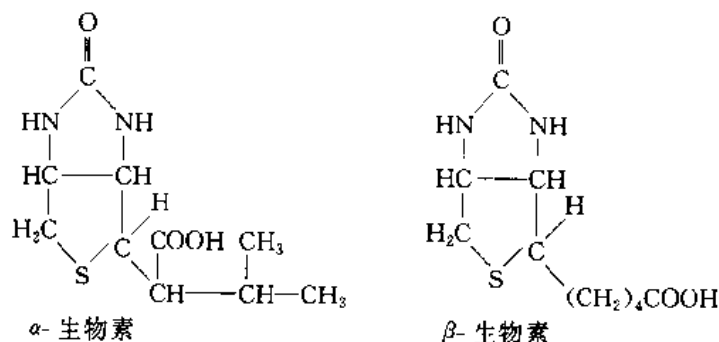
基丁酸缩合而成。其化学结构式为：



泛酸具有旋光性，只有其右旋型才有维生素的效应。其游离酸是一个苍黄色的粘稠油状物，溶于水和乙醇；不溶于苯、氯仿；对酸、碱不稳定；在中性溶液中耐热，pH 值 4~7 时最稳定；对氧化剂和还原剂极为稳定。相应的醇更容易被吸收，而且在体内迅速转变成酸。

泛酸广泛分布于自然界，在动植物组织中全部用来构成辅酶 A。可以说辅酶 A 的作用即是泛酸的生理作用。辅酶 A 是酰基转移酶的辅酶，与糖类、脂类和蛋白质代谢都有密切关系。人类在营养上需要泛酸，但因动、植物食品中都有存在，且肠内细菌亦能合成供人利用，故很少见有缺乏症。

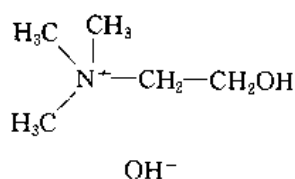
9. 生物素在自然界至少有二种，即 α -生物素和 β -生物素。它们是由尿素和噻吩环形成的二个并合的五圆环和一个不同的戊酸侧链所组成。共有八种不同的异构体。其中只有一种即所谓 *d*-生物素是天然存在的，并具有维生素活性。其化学结构式为：



生物素是一种无色针状晶体，微溶于冷水；溶于乙醇；不溶于有机溶剂；对热、光、空气、酸较稳定，碱性溶液直到 pH 值 9 时都很稳定（最适 pH5~8）。在乙酸中，可被高锰酸盐或过氧化氢氧化产生砷。亚硝酸破坏生物素的活性，甲醛也可钝化此种维生素。

生物素以低浓度广泛分布于所有的动物和植物组织中。在酵母，肝脏和肾脏中含量很高。加上肠道细菌亦能合成供人体需要，因而人体缺乏极为罕见。 α -生物素和 β -生物素的生理作用基本相同，是羧化酶辅酶的组成成分，参与体内 CO_2 的固定（羧化）和转羧基作用，在物质代谢中非常重要。

10. 胆碱是一种食物的附属物质为 (β -羟乙基) 三甲基氨的氢氧化物，通常被列入水溶性维生素之列，可在肝脏中合成，实验证明动物需要从食物中获取胆碱。其化学结构式为：



胆碱是一个强的有机碱，它以磷酸酯或作为乙酰胆碱的形式广泛分布在自然界，它是卵磷脂的关键组成成分，也存在于神经鞘磷脂中。大多数动物组织中的含量较高，蛋黄中胆碱含量最丰富（超过 1700mg/100g），谷物和蔬菜中含量较少（约 100mg/100g）。

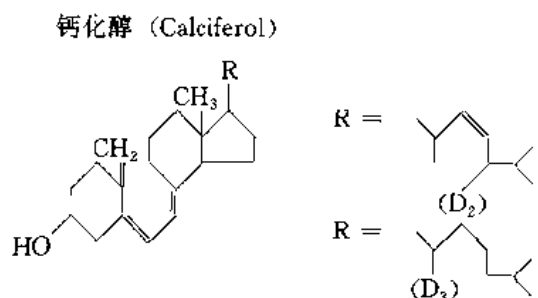
胆碱在营养上有重要价值，在体内胆碱转变成甜菜碱，是许多甲基化作用的一个甲基供体。它被乙酰化形成乙酰胆碱，是神经冲动传的介质。可阻止异常量的脂肪在肝脏中积累，具有抗脂肪肝的作用。胆碱作为胞苷二磷酸胆碱（CDP-胆碱）辅酶的组成部分，在合成神经鞘磷脂与磷脂胆碱（卵磷脂）是必要的，也是生物膜的脂类构成部分。可促进磷脂的生成，防止脂肪肝的形成。胆碱在细胞膜结构和脂蛋白构成上是重要的。体外实验证明很多胆碱脂的活性是一些酶活性的调节者，如溶血磷脂酰胆碱是激活在高尔基体或细胞膜的糖基转移酶所必需。胆碱的亲脂性为医学上所重视，磷脂胆碱作为血浆脂蛋白结构和构型系统中不可分割的部分，在微粒膜中也是如此，它对胆固醇血症作用已引起人们的关注，一些学者认为磷脂胆碱可明显地增加高密度脂蛋白胆固醇，同时降低脂蛋白胆固醇。对于人来说，还没有发现胆碱缺乏症的充足证据。

（二）脂溶性维生素

1. 维生素 A 及 β -胡萝卜素。维生素 A 的分子结构及化学性质详见第二章六、（一）、1. 所述，维生素 A₁（视黄醇），3-脱氢黄醇（维生素 A₂）都具有维生素活性，前者存在于哺乳动物及咸水鱼的肝脏中，后者存在于淡水鱼的肝脏内。植物中的维生素 A 原，往往以酯化形式存在。维生素 A 原醋酸酯和软脂酸酯常应用于医学及营养上。维生素 A，特别是它的游离醇，对氧、酸和紫外线很敏感。植物和真菌中有类胡萝卜素被动物摄取后可转变成维生素 A，并具有维生素 A 活性，称之为维生素 A 原。维生素 A 的最好来源是动物的肝、肾、鸡蛋、鱼卵和全奶等。胡萝卜素主要含在胡萝卜、菠菜、红心甘薯、辣椒以及水果如杏、柿子等中。

食物中的维生素 A 由小肠吸收，在粘膜细胞内与脂肪酸结合成酯后由淋巴运走，被肝脏摄取并贮存，当机体需要时向血中释放。维生素 A 具有促进正常生长与繁殖，维持上皮组织与视力正常的生理功能。维生素 A 醇与维生素 A 醛在体内可互相转化，并具有上述全部作用。维生素 A 醛可进一步氧化形成维生素 A 酸，这是一个不可逆的反应。维生素 A 酸能促进动物生长，但在视觉过程中无活性，也不促进动物正常繁殖。

2. 维生素 D 是类固醇的衍生物，具有维生素 D 活性的化合物约 10 种，主要是维生素 D₂（麦角钙化醇）和 D₃（胆钙化醇），二者结构十分相似，D₂ 比 D₃ 在侧链上多一个双键和甲基。D₂ 的化学式为：



维生素 D₂ 是一种无色结晶，不溶于水，易溶于酒精和其他有机溶剂，在植物油中的

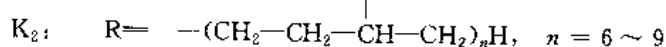
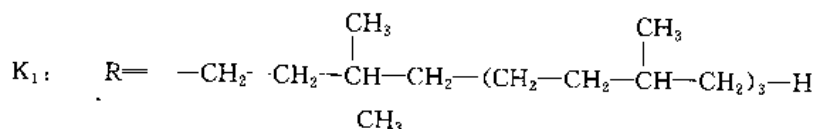
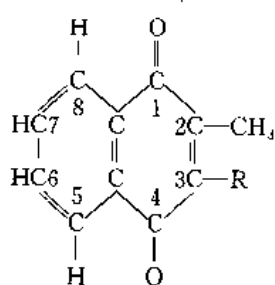
溶解度较小。维生素 D 很稳定，它能耐高温，且不易氧化。如在 130℃ 加热 90min 仍有生理活性。对光敏感，易受紫外线照射而破坏，通常的贮藏，加工或烹调不影响其生理活性。维生素 D 也存在着维生素 D 原，或称前体物，可由光转变成维生素 D。植物中的麦角固醇在日光和紫外线照射后可转变成维生素 D₂，故麦角固醇可称为维生素 D₂ 原；人体皮下存在有 7-脱氢胆固醇在日光和紫外光照射下可以转变为 D₃，因而 7-脱氢胆固醇称为维生素 D₃ 原。由此可见，多晒太阳是防止维生素 D 缺乏的有效方法。

维生素 D 的活性形式在自然界的分布并不很广，主要存在于动物食品中，其中以海水鱼的肝脏含量最为丰富，比目鱼肝脏含量高达 500~1000μg/100g，禽畜肝脏及蛋、奶也含少量维生素 D₃。维生素 D 在小肠内吸收需要有胆汁的参加吸收后由淋巴乳糜微粒运到血液。首先在肝脏经 25-羟化酶作用进行第二次羟化，转变为 1,25-二羟基胆钙化醇 [1,25-(—OH)₂-D₃]。经血液循环输送到有关器官、组织中呈现生理作用。维生素 D 与钙、磷代谢密切相关。其主要作用是促进小肠对钙、磷的吸收；在肾脏内维生素 D 促进对磷的消除。维生素 D 还能使组织柠檬酸的水平增高，增加了柠檬酸的排泄量。上述作用主要是在 1,25-二羟基胆钙化醇激素的控制下改变钙结合蛋白的水平来实现的。

3. 维生素 E 又称生育酚，是所有具有 α-生育酚生物活性化合物的总称。详见第二章六、(一)、2. 所述。

维生素 E 广泛分布于动、植物性食品中。人体所需维生素 E 大多来自谷类和植物油。小麦胚油、棉籽油、花生油、大豆油等都是维生素 E 的良好来源。此外，肉鱼、禽蛋、乳、豆类、水果及所有绿叶蔬菜都含有一定量的维生素 E。维生素 E 和其他脂溶性维生素一样，随脂肪一道由肠吸收（在胆汁存在下），经淋巴系统进入血液。吸收后可贮存于肝脏中，也可存留于脂肪、心脏、肌肉等中。维生素 E 具有抗氧化的功能，保护维生素 A、维生素 C 及不饱和脂肪酸免受氧化。也可保护细胞结构的完整，近年来研究发现，维生素 E 的抗氧化作用与机体的抗衰老有关。

4. 维生素 K 是具有叶绿醌生物活性的 α-甲基-1,4-萘醌衍生物的总称。其化学结构式为：



天然维生素 K 有两种（维生素 K₁，维生素 K₂），维生素 K₁ 存在于绿叶植物中，称叶绿醌；维生素 K₂ 存在于发酵食品中，由细菌所合成。此外，人工合成的某些化合物如

2-甲基-1,4-萘醌也具有维生素 K 的作用,它是维生素的基础结构,称维生素 K₃,其生物活性比维生素 K₁、维生素 K₂ 都高。维生素 K 溶于有机溶剂,对热、空气和水都很稳定,但易被光和碱所破坏。应用最广的是 2-甲基-1,4-萘醌二磷酸四钠盐是一种无色结晶的化合物,溶于水,在溶液中稳定。

维生素 K 在食物中分布很广,以绿叶蔬菜的含量最为丰富,蛋黄、大豆油和猪肝等也是维生素 K 的良好来源。人体肠道细菌可合成维生素 K,并部分被人体利用。维生素 K 的吸收需要胆汁和胰液。其主要作用是促进肝脏生成凝血酶原,并能将凝血酶原前体物转化成凝血原,从而具有促进凝血的作用。

五、水和矿物质

(一) 水

水是人体含量最大的组成成分,约占体重的 2/3,也是维持人体正常生理活动的重要物质。人对水的需要比食品更重要,一个人绝食 1~2 周只要饮水尚可生存,但如绝水则只能存活几天,若长期不进食,体内贮备的糖类,脂肪耗尽,蛋白质也失去一半时机体尚可维持生命而无大的危险,但机体若失水 10% 则情况严重,一旦机体失水达 20%~22% 就无法存活。因此,人们常把水看成是人体最丰富,也是最重要的营养物质。

水是许多有机、无机物质的良好溶剂,即使是不溶于水的脂肪也能在适当条件下分散于水中,成为乳浊液或胶体液,以利营养素的消化、吸收代谢和排泄。水也是体内某些化学反应的反应物,可以说体内的一切代谢活动都必须有水参加。水能调节体温恒定与对机体的润滑作用,水具有比热大,热容量大的特点,不致使体温因内外环境的改变而有显著变化。由于水有润滑作用,可减少体内脏器的摩擦,防止损伤,并可使器官运动灵活。水的需要量随体重、年龄、气候及劳动强度而异,正常成人每日需水量 2400~4000mL,婴儿及青少年的需水量各阶段不同,年龄越大,每公斤体重需水量相对少些,到成年后相对稳定,一般情况下,水的出入量保持平衡。

(二) 矿物质

矿物质又称无机盐,矿物质总量不超过体重的 4%~5%,但却是机体不可缺少的。无机盐不能在体内合成,除了排泄出体外,也有能在体内代谢过程中消失,它在营养中有其特殊性。基于在体内含量和在膳食中的需要不同,人体必需的矿质元素分为二类,第一类为大量元素或常量元素,包括钙、磷、硫、钾、钠、氯和镁七种元素,需要量每天 100mg 以上。第二类为微量元素或痕量元素,每日需要量在 100mg 以下,有的甚至在几微克左右。虽然需要量少,但却很重要,其中一些是人体所必需,称为必需微量元素。现在已知有 14 种微量元素为人和动物所必需,即铁、锌、铜、碘、锰、钼、钴、硒、铬、镍、锡、硅、氟、钒。近年来有人认为砷、铷、溴、锂有可能是必需微量元素。所谓必需元素是指这类元素存在于所有机体的健康组织中,并对机体自身稳定起着十分重要的作用。缺少时可使机体组织与功能出现异常,补充后可恢复正常。但所有必需元素在摄入过量时都会有毒,因而必需元素,尤其必需微量元素的生理作用浓度和中毒剂量间距离很小,这点要特别注意。至于有毒元素则通常指某些重金属元素,其中以汞、镉、铅最

为重要，在正常情况下，它们的分布比较恒定，一般不对人体构成威胁。但当食物受“三废”污染，或在食品加工过程中因设备等受到污染时，大量重金属元素进入食品后可使人体中毒。矿物质元素的研究是许多营养学家们非常感兴趣的课题，也是所有营养素中了解得最少的一个领域，尤其是关于矿质元素在体内的作用，需要量及食品加工过程中对它们的影响需要进一步深入研究。

1. 大量元素。钙易与食物中植酸，草酸等形成不溶性钙盐，不利吸收。维生素D和乳糖可促进吸收。是构成骨骼，牙齿的主要成分，促进血液凝结，帮助体内某些酶的活化，维持正常的神经传导，心跳节律、肌肉收缩、毛细血管渗透压和体内酸碱平衡。磷形成植酸磷后难以被机体吸收，在酸性介质中有利吸收。是构成牙齿，骨骼的主要成分，参与细胞核蛋白和各种酶的组成，帮助葡萄糖、脂肪、蛋白质的代谢，为正常的细胞功能和血液所必需。钾是细胞内液中主要的阳离子，可维持体内的水平衡，渗透压及酸碱平衡。增强肌肉兴奋性，维持心跳规律。参与蛋白质、糖类和热能代谢。钠是细胞外液中主要的阳离子，可维持体内的水平衡、渗透压及酸碱平衡、增强肌肉的兴奋性。镁是细胞内液中重要的阳离子，可激活体内多种酶，维持核酸结构的稳定性。抑制神经的兴奋性，参与体内蛋白质合成，具有使肌肉收缩和体温调节作用。硫是某些维生素，氨基酸的组成成分，有助于毛发、指甲和皮肤的刚性结构。氯是细胞外液的主要阴离子，可维持体内水平衡，渗透压和酸、碱平衡，激活唾液中的淀粉酶。

2. 微量元素。铁的二价状态比三价铁易于吸收维生素C和某些氨基酸。铁是血红蛋白、肌红蛋白和某些酶的重要组成成分，可帮助氧的运输。铜是含铜金属酶的组成成分，促进结缔组织形成和骨骼的正常发育，维持中枢神经系统健康。锰盐难溶，不易吸收。锰可活化硫酸软骨素合成的酶系统，促进人体生长和正常的成骨作用。锌是含锌金属酶和红血球的组成成分，参与机体DNA的合成，并影响RNA和蛋白质的合成。三价铬为人体所必需（六价铬有毒），可帮助维持正常的葡萄糖代谢。钴只能以维生素B₁₂的形式被利用，即钴为维生素B₁₂的重要组成成分。钼构成黄嘌呤氧化酶，是醛氧化酶和亚硫酸氧化酶的重要成分。氟是牙齿和骨骼的组成成分，可预防龋齿和老年性骨质疏松。碘是构成甲状腺素的重要成分。硒是谷胱甘肽过氧化物酶的成分，为保护细胞膜的抗氧化剂。

六、膳食纤维

膳食纤维是指不能被人体利用的碳水化合物，是植物食物中的一种成分。现代研究表明它对人体健康有益，可促使排便，可使一些有害代谢产物较快排出体外，但过多的膳食纤维也将影响矿物质的吸收。它没有营养功能，但人体又是十分需要的，从这点出发，营养科技工作者将膳食纤维列为第七大类营养素。膳食纤维在机体内已经表现的多种生理活性功能，越来越引起人们关注和重视，故本书将它列入功能性成分（活性多糖）似乎更确切，有关内容在前面部分已有详细论述。

第二部分 功能成分检测技术

第四章 活性低聚糖、多糖

一、果低聚糖含量的测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

果低聚糖是以蔗糖为原料经微生物发酵制得的一种转化糖浆，其成分有果糖、葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖 (GF₂)、蔗果四糖 (GF₃)、蔗果五糖 (GF₄)。GF₂、GF₃、GF₄ 统称果低聚糖。以 YWG-NH₂ 色谱柱和 RID 差示折光检测器对果低聚糖进行高效液相色谱法 (HPLC) 分析，具有良好的分离效果，能准确、快速地定性、定量果低聚糖中各组分糖，方法灵敏度高，重现性好，最低检出限在微克级。

(二) 仪器、试剂

1. 仪器。美国 Beckman 332 型高效液相色谱仪，日本岛津 RID-6A 示差折光检测器，A4700 色谱工作站和高速台式离心机。

2. 试剂。乙腈、果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖均为分析纯，果低聚糖及双蒸馏水。

(三) 测定步骤

1. 内标溶液及样品液的配制。内标溶液：准确称取麦芽糖 5.000g，用 20mL 蒸馏水溶解后定容至 50mL。样品液：准确称取 5.000~10.000g 糖浆，用蒸馏水稀释定容至 50mL。精确量取此样液 2.0mL，加入 1.0mL 上述已配好的内标液，混匀，用蒸馏水定容至 10mL。

2. 标准曲线的制备。准确称取果糖、葡萄糖、蔗糖各 5.000g，分别用 20mL 蒸馏水溶解后定容至 50mL。按表所示，精确量取上述已配好的标准糖混合液，并加入 1.0mL 内标液，混匀，用蒸馏水定容至 10mL。见表 4-1，图 4-1。

表 4-1 混合糖中各标准的加入量 单位：mL

编 号	果 糖	葡 萄 糖	蔗 糖
1	0.1	0.4	0.2
2	0.2	0.6	0.4
3	0.3	0.8	0.6
4	0.4	1.0	0.8
5	0.5	1.2	1.0
6	0.6	1.4	1.2

在本实验条件下,将6组标准混合糖进行分析,以组分糖和内标物的峰面积比(A_i/A_s)为横坐标 X ,浓度比(c_i/c_s)为纵坐标 Y ,求出各组分糖的直线回归方程式: $Y=a+bX$ 。根据实验数据求得果糖、葡萄糖和蔗糖的线性回归方程依次为:

$$Y=0.8228X-0.0028 \quad (R=0.994);$$

$$Y=0.9674X-0.0991 \quad (R=0.9997);$$

$$Y=0.9264X-0.0215 \quad (R=0.9998)。$$

3. 色谱条件。色谱柱为 YWG-NH₂, 300mm ×

4.6mm i. d. 不锈钢柱; 流动相: 乙腈-水 (75 : 25), 流速 1.0mL/min; 进样量 20 μ L。

4. 样品糖液的测定。将加入内标液的样品稀释液经过滤和离心后,按标准曲线制备的色谱条件进样 20 μ L 进行测定。

(四) 结果计算

果低聚糖糖浆中各组分糖含量 ($w_i\%$) 按下式计算:

$$w_i (\%) = \frac{\rho_i}{(m/50) \times (2/10) \times 1000} \times 100$$

式中 m : 样品糖浆的质量 (g); ρ_i : 由回归方程式求得的组分糖浓度 (g/L)。

如果无 GF₂、GF₃、GF₄ 标样,果低聚糖的定量采用间接法,即由测得的总糖中减去果糖、葡萄糖和蔗糖的含量,所得的差值就是糖浆中果低聚糖含量。而果低聚糖在其固形物中的相对含量则以峰面积归一化法直接由色谱工作站输出的数据得到。

二、大豆低聚糖含量的测定 (ODS 柱 HPLC 法)

(一) 方法原理

用 HPLC 分离低聚糖,较多使用的是氨基柱。目前已采用氨基柱成功地测定了大豆中低聚糖含量,流动相为乙腈+水 (V:V=70:30)。在使用氨基柱分离糖时一些还原糖容易与固定相的氨基发生化学反应,产生席夫碱: $-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{O}=\text{CH} \rightarrow \text{CH}_2-\text{N}=\text{CH}-$, 因此氨基柱使用寿命短,且乙腈要求纯度高,价格昂贵。使用氨基柱的另一缺点是平衡所需时间较长,一般在 5h 以上。采用 ODS 柱 HPLC 分离,以纯水为洗脱液,用差示折光检测,从而测定了大豆样品中蔗糖、棉籽糖和水苏糖的含量。本法具有流动相价廉,无污染,方法快速简便,且 ODS 柱比氨基柱稳定,使用寿命长。

(二) 仪器试剂

1. 仪器。日立 655 型 HPLC 泵,岛津 RID-2A 差示折光检测器,上海自动仪表厂产 XWT-264 型记录仪 (记录峰面积时用岛津 C-RIB 积分仪)。色谱柱为中科院大连化学物理研究所装填的 ODS 柱 (直径 5mm × 300mm, 颗粒直径 5 μ m)。

2. 试剂。水苏糖标样由中国食品发酵工业研究所提供。D (+) 棉籽糖为进口分装 (AG)。蔗糖为天津市化学试剂一厂出品,其他均为分析纯试剂。

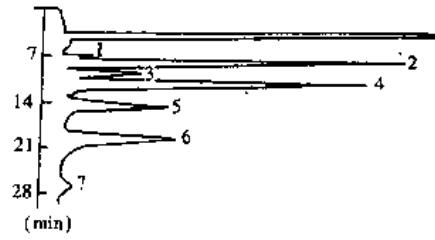


图 4-1 果低聚糖及内标物色谱图

1—果糖 2—葡萄糖 3—蔗糖
4—麦芽糖 (内标物) 5—蔗果三糖
6—蔗果四糖 7—蔗果五糖

(三) 测定步骤

1. 样品前处理。称取大豆粉样品 10g, 在索氏提取器中用乙醚脱脂。挥发去乙醚, 放入 250mL 带塞的锥形瓶中, 加入 80% (体积分数) 乙醇水溶液 100mL 充分混合, 置于恒温水浴中 70℃ 保温 1h。取出经 3000r/min 离心 10min, 再用相同的乙醇水溶液重复提取二次, 上清液合并于一烧杯中。加入饱和醋酸铅 10mL 沉淀蛋白, 此时溶液 pH 应控制在 pH4~5 (大豆蛋白等电点)。多余的铅离子通过加入 0.5mol/L 草酸溶液 6mL 除去。离心除去沉淀, 溶液以 0.5mol/L NaOH 中和至中性。再浓缩至 10mL 左右, 用纯水定容至 50mL。

2. 外标液配制。精确称取经干燥过的标准糖: 水苏糖、棉籽糖及蔗糖均加蒸馏水配制成 10mg/mL 标准液。

3. 色谱条件。柱温 12℃; 流速 1.0mL/min; 进样量 2 μ L。见图 4-2。

4. HPLC 测定。取上述样品提取液及外标液进行 HPLC 测定, 上样体积为 2 μ L, 以纯水为流动相, 流速 1.0mL/min, 柱温 12℃, 用差示折射检测。

(四) 结果计算

根据样品液峰面积与相应的标准蔗糖、水苏糖、棉籽糖峰面积, 计算出样品中蔗糖、水苏糖及棉籽糖的含量。

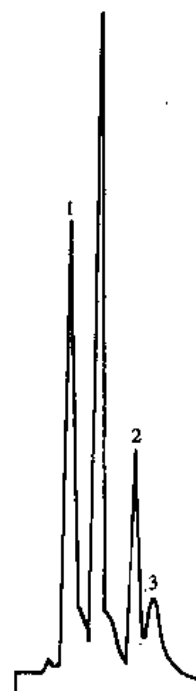


图 4-2 大豆低聚糖 HPLC 图

1—蔗糖 2—水苏糖
3—棉籽糖

三、气相色谱法 (GC) 测定大豆中低聚糖含量

(一) 方法原理

用 GC 对糖进行定量时, 对相对分子质量大的四碳糖、五碳糖的衍生物必须选用在高温下稳定的固定液。本法给定的 TMS 化条件为: 在室温下, 五碳糖完全 TMS 化后, 至少要在 7h 内保持稳定。使用不锈钢柱, 固定液用 2% Silicone OV-17 [担体 Chromosorb W (AW, DMCS)], 采用 10℃/min 的程序升温分析, 进样口温度高达 350℃ 各种低聚糖分离效果良好。方法适用于含有蔗糖、棉籽糖、水苏糖等低聚糖的大豆、小豆、豌豆制品及一般农产食品。

(二) 仪器、试剂

1. 仪器。气相色谱仪: 带有火焰电离检测器 (FID); 柱子: 2 根直径 3mm×5mm 的不锈钢柱; 旋转式汽化器: 使用 25mL 圆底烧瓶; 微量注射器。

2. 试剂。糖标准品: 蔗糖、棉籽糖、水苏糖; 吡啶; 用氢氧化钾干燥后蒸馏; 苾: 作内标物用; 六甲基二硅胺烷 (hexamethyl disilazan, HMDS); 三氟乙酸 (TFA)。

(三) 测定步骤

1. 试液溶液的制备。准确称取粉碎粒径在 0.5mm 以下均匀试样 1g, 放入 50mL 具塞玻璃离心沉降管中, 加正己烷 10mL, 充分振摇后离心分离, 用倾注法弃去正己烷层,

再重复一次。将试样中残存的正己烷蒸发除去。加入 80% (体积分数) 乙醇 10mL, 并放沸石, 装好冷凝管在水浴上回流 30min, 离心分离将乙醇层倾入 200mL 容量瓶中, 残渣再用 80% 乙醇 10mL, 充分混匀, 离心分离, 乙醇层并入 200mL 容量瓶中 (反复操作 3~4 次)。以 80% 乙醇稀释定容至 200mL, 取此液 10mL 浓缩至干, 作 TMS 化试样。

2. 色谱条件。柱子: 2% Silicone OV-17, Chromosorb W (AW, DMCS 60~80 目, 直径 3mm×0.5m) 不锈钢柱; 柱温: 120~340℃ (升温); 升温速度: 10℃/min; 进样口检测器温度: 350℃; 氮气流量: 60mL/min; FID, 氢气流量: 50mL/min; FID, 空气流量: 1L/min。

3. TMS 衍生物的制备。取 TMS 化试样, 加入内标物苈的吡啶溶液 (40mg/50mL) 500 μ L, 再加 HDS0.45mL、TFA0.05mL, 加塞充分振摇混匀, 使糖溶解, 在室温下放置 15~60min, 即为 TMS 衍生物溶液。注入 1 μ L, 进行 GC 分析。见图 4-3。

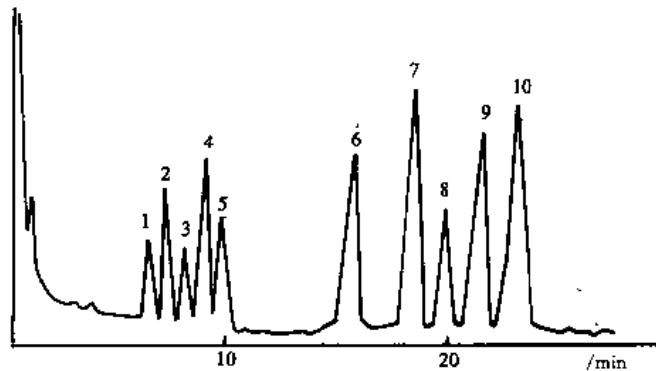


图 4-3 使用 TMS 衍生物测定低聚糖的气相色谱图

Silicone OV-17, 10℃/min; 1, 2—果糖 3, 4—葡萄糖 5—内标物苈 6—蔗糖 7—棉籽糖 8—水苏糖

4. 标准曲线制备。用蔗糖、棉籽糖、水苏糖等标准糖 (70℃下减压干燥) 制备 1mg/mL 标准液。取适量标准溶液 (每种糖含量 0~3mg), 置于磨口容器内, 冷冻干燥。采用 2 法操作、制备标准糖的 TMS 衍生物溶液。注入 1 μ L 按色谱条件进行 GC 分析。从得到的色谱图计算糖和内标物的面积。设 X 为重量比 (TMS 衍生物溶液中糖的 mg 量/TMS 衍生物中内标物 mg 量) Y 为面积比 (糖的峰面积/内标物峰面积), 根据最小 2 乘法求回归直线即为工作曲线。

(四) 结果计算

首先求出样品 GC 色谱图上各种糖的峰面积与内标物峰面积之比, 然后再从标准糖制成的工作曲线上查出样品中的各种糖含量。

四、麦芽低聚糖组分测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

麦芽低聚糖是由淀粉采用酶水解得到的含 2~10 个葡萄糖聚合物的混合物, 是一种

新型淀粉糖，具有低甜度、低渗透压、水分活度低、耐热性强、保湿性好、抗结晶和抑菌性高等特点。长期食用低聚糖（主要是 G_3 和 G_4 ），能增进健康，延年益寿。因此，麦芽低聚糖可代替蔗糖、葡萄糖和淀粉糖浆，广泛用于营养保健功能食品。

低聚糖中各组分的分离可用纸色谱法，薄层色谱法和高效液相色谱法。高效液相色谱法分析麦芽低聚糖的方法快速、准确，可用于研究或生产麦芽低聚糖的质量分析控制。

（二）仪器与试剂

1. 仪器。LC-4A 高效液相色谱仪，RID-2AS 示差折光检测器，C-R2AX 数据处理机（以上均为日本岛津产品）。

2. 试剂。①无水葡萄糖（上海试剂厂），麦芽糖（北京化工厂），麦芽三糖，麦芽四糖，麦芽五糖，麦芽六糖（以上四种糖均为生化试剂，日本和光纯药工业株式会社）。以上六种糖作为标准参照物用于样品中各组分的定量分析。②标准储备液：精确称取无水葡萄糖、麦芽糖以及麦芽三糖、四糖、五糖、六糖（以下依次用 G_1 、 G_2 、 G_3 、 G_4 、 G_5 、 G_6 代表）各10mg， G_1 用4.00mL蒸馏水溶解，其他各糖用2.50mL蒸馏水溶解。③标准工作液：从 G_1 ~ G_4 储备液中分别吸取100 μ L，从 G_5 、 G_6 储备液中分别吸取150 μ L于小瓶中，混匀，备用。

（三）测定步骤

1. 色谱条件。折光检测器灵敏度： $\times 0.5$ ；柱：Nucleosil C-18，直径4.6mm i. d. $\times 250$ mm，粒度为7 μ m（中国科学院大连化学物理研究所）；流动相：蒸馏水，流速：0.8mL/min；柱温：室温。

2. 标准曲线制备。分别吸取六种糖混合液5、10、15、20、25 μ L进样，绘制各峰面积与进样量的定量校正曲线。

3. 样品处理。称取麦芽低聚糖粉末约0.2g，放入10mL容量瓶中，用蒸馏水溶解后，稀释至刻度，摇匀，放置片刻，用0.45 μ m滤膜过滤，取20 μ L滤液进样做色谱分析。见图4-4。

（四）结果计算

峰的确定及计算由数据处理自动完成，手工计算方法如下。

各种糖分别用下式计算：

$$\text{样品中糖含量 (g/100g)} = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \times 100$$

式中 ρ ：根据糖的峰面积查校正曲线并计算出样液浓度（mg/mL）； V ：样液体积（mL）； m ：样品质量（g）。

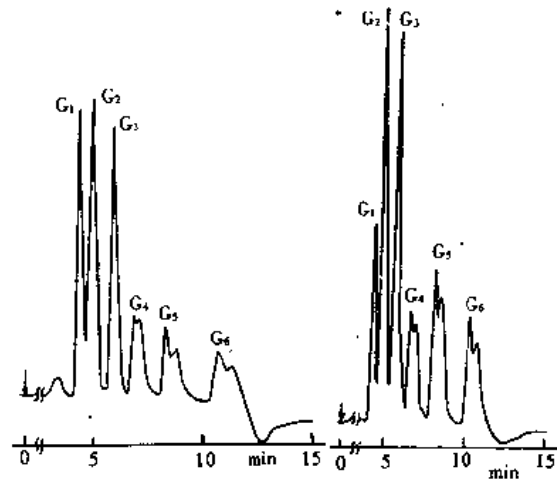


图 4-4

G_1 ~ G_6 混合标样色谱图 麦芽低聚糖样品色谱图

五、膳食纤维含量的测定

膳食纤维的分析方法与传统粗纤维的分析方法完全不同。“粗纤维”是指植物经一定浓度的酸、碱、醇、醚等溶剂作用后的剩余残渣物量，强烈的溶剂处理导致了几乎100%的水溶性纤维、50%~60%半纤维素和10%~30%的纤维素被溶解损失掉。因此，必须建立全新的膳食纤维分析方法。已报道的膳食纤维分析方法很多，主要有洗涤剂法和酶法两大类。洗涤剂法简单方便，但只能得到不溶性纤维含量；酶法能同时分析出可溶性纤维与不溶性纤维含量，但分析过程复杂且成本较高。

(一) NDF 法 (neutral detergent fiber)

1. 分析原理。样品在硫酸月桂酯钠存在下，细胞内容物被溶出，洗脱后测定其残渣。该法又叫中性洗涤剂纤维素法。NDF 测得值包括纤维素、半纤维素、木质素的总量。

2. 试剂。中性洗涤剂溶液：称取 30g 硫酸月桂酯钠，18.61g EDTA·2Na·2H₂O，6.81g 硼酸钠（含 10 个结晶水），4.56g 磷酸氢二钠，10mL 甘油单醚，加水至 1L。用碳酸钠或盐酸调 pH 为 6.9~7.1。该液低温保存时析出结晶，可加热溶解后再用。萘烷，无水亚硫酸钠、丙酮等。

3. 测定步骤。称到 0.5~1.0g 风干粉碎样品（一般用 20~30 目为宜）置于广口三角烧瓶中，加入 100mL 中性洗涤剂溶液，10mL 萘烷，0.5g 亚硫酸钠，加热回流，使之在 5min 内沸腾，并维持微沸 60min。抽滤，开始时慢慢抽滤。用 90~95℃ 热蒸馏水充分洗残渣，再用丙酮洗二次，风干后，于 100~105℃ 下干燥至恒重。然后放在 500℃ 高温炉中灰化 3h，求其质量，前后质量之差即为 DNF 量。

4. 结果计算

$$\text{DNF} (\%) = \frac{\text{DNF 质量 (g)}}{\text{样品质量 (g)}}$$

说明：(1) 脂肪含量高的样品在测定时产泡特别多，影响过滤应先脱脂。(2) 淀粉含量高的样品，煮沸后过滤困难，且淀粉中也包含 DNF，使测定值偏高。一般应先用胰酶处理：取 0.5g 样品置于广口瓶中，加蒸馏水煮沸 5min，冷却后加 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 30mL (pH6.8)，20mL 10g/L 胰酶溶液，加氯化钠使反应时浓度达 10mmol/L，再加 2~3 滴苯，40℃ 保温 24h，3000r/min 离心，弃去上清液残渣移入锥形瓶中，按常规测定 DNF 值。

(二) ADF 法 (acid detergent fiber)

1. 分析原理。样品在十六烷基三甲氨溴化物存在下处理，除去细胞内容物，测定残渣，该法又叫酸性洗涤剂纤维素法。ADF 测得值包括纤维素、木质素的量。

2. 试剂。酸性洗涤剂溶液：称取 20g 溴化十六烷基三甲氨 (CTAB)，加温溶于 0.5mol/L 硫酸溶液中至 1L。萘烷、丙酮。

3. 测定步骤。称 1.0g 风干粉碎样品（以 20~30 目为宜）置于广口三角烧瓶中，加 100mL 酸性洗涤剂、2mL 萘烷，回流煮沸 60min，移入铺有玻璃纤维滤纸的古氏坩埚中，抽滤，残渣用热蒸馏水、丙酮洗净，按 NDF 法同样处理。干燥，灰化称重，求 ADF 值。

如果求半纤维素则可用 NDF-ADF 即得。

(三) ADF-木质素法

1. 试剂。酸性洗涤剂溶液：见 ADF 法；1177g/L 硫酸溶液：取相对密度 1.84 的硫酸 1177g，加入水中至 1L（相对密度 1.63）。

2. 测定步骤。称取 1.0g 样品，按 ADF 法同样用酸性洗涤剂煮沸 60min 用 G₃ 玻璃滤器的古氏坩埚过滤，残渣用热水和丙酮洗净后，风干移入至 100mL 烧杯中。向烧杯中加入 1177g/L 硫酸溶液 20mL，搅拌后 20℃ 放置 4h，使硫酸流过玻璃滤器，再重复一次。最后将滤器和烧杯中内容物用流过的硫酸将其洗到 500mL 烧杯中。滤器和烧杯用蒸馏水流充分洗净，液量约成 400mL。放置一夜，移入铺有玻璃纤维滤纸的古氏坩埚中，抽滤。以下同 NDF 一样干燥，灰化，称重，即为 ADF-木质素的量。

六、AACC 推荐的膳食纤维分析法

(一) 总膳食纤维含量分析法 (AACC 32-07)

本方法为 AOAC 43. A14-43. A20 的改良法。用 MES/TRIS 缓冲液取代磷酸盐缓冲液；用 0.205mol/L NaOH 代替 2.275mol/L NaOH；酶处理前先将样品加热至 95~100℃ 预凝胶化 20min。适用于分析加工食品及食品原料中的总膳食纤维含量。

1. 主要的玻璃仪器及其处理。①400mL 高腰烧杯。用常规洗涤剂对烧杯清洗干净后再用去离子水冲洗并烘干，分析前置于 130℃ 的烘箱中烘干 45~60min，冷却后待用。②多孔坩埚：置于马福炉中（525℃）灰化过夜，用真空泵抽去可能含有的硅藻土及灰分。然后浸泡于 29g/L 的 Micro 洗涤溶液中维持 1h，取出经去离子水冲洗 4 次并用 15mL 清洗一次后空气晾干。加入 0.5~1.0g 的硅藻土置于 130℃ 烘箱中烘至恒重冷却后存于干燥器内待用。

2. 主要试剂。①美国 Sigma 公司生产的耐热型 α -淀粉酶 (A0164)、蛋白酶 (P390) 和糖化酶 (A9913)。②美国 Sigma 公司生产的 MES [2-(N-吗啉)乙烷磺酸, M8250] 和 TRIS [三(羟基甲基)氨基甲烷, T1503]。③ 0.05mol/L MES/TRIS 缓冲液 (pH6.0) 的配制：在 1L 去离子水中溶解 39.04g MES 和 24.2g TRIS，用 6.0mol/L 的 HCl 调 pH 至 6.0，稀释至 4L。

3. 分析步骤。①在整个分析中，准备两个空白试验，以扣除试剂带来的影响。②精确称取 $1.000g \pm 0.010g$ 的样品 2 份，分别放入 400mL 的高腰烧杯中，加入 50mL MES/TRIS 缓冲液，磁力搅拌使物料均匀分散。③用铝箔纸将装有样品和 MES/TRIS 缓冲液的烧杯口封住。④置于 95~100℃ 水浴锅上磁力搅拌 20min。⑤去掉铝箔纸，加入 200 μ L α -淀粉酶，低速磁力搅拌 10s，再用新铝箔纸将开口封住。⑥置于 95~100℃ 水浴锅上磁力搅拌 30min。⑦取出烧杯浸在自来水中冷却至 60℃，去掉铝箔封口。⑧打开磁力搅拌器，搅拌加入 10mL 0.205mol/L NaOH 水溶液，用稀 NaOH 或 HCl 调 pH 至 7.5 ± 0.3 范围内，之后添加 100 μ L 蛋白酶液。⑨重新封上铝箔纸，在 $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴上不停搅拌 30min。⑩取出烧杯，去掉铝箔封口。⑪搅拌加入 10mL 0.325mol/L HCl，检查 pH 值是否在 4.3~5.0 范围内，若不是，滴加 5% NaOH 或 HCl 溶液加以调节。⑫搅拌加入 300 μ L 糖化酶，

重新封口。⑬置于 $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴上搅拌 30min。⑭往每份样品中加入 285mL 预热至 60°C 的 95% 乙醇水溶液, 乙醇与样品的体积比应是 4:1, 波动范围不得超过 4.1:1。⑮用一张大铝箔纸将所有样品口盖上, 保持 60min 使之自然冷却至室温。⑯装上具有环状橡皮接头的过滤烧瓶。⑰称取约含 0.5~1.0g 硅藻土烧结多孔坩埚的皮重, 套上过滤烧瓶的橡胶接头, 用 15mL 78% 乙醇液预过滤一次使硅藻土更紧密地贴在坩埚底, 以利于过滤后取出滤渣样品供蛋白质分析。⑱经酶处理的试样液通过含硅藻土的多孔坩埚进行过滤, 此操作是在 $16.9\text{kPa} \pm 6.7\text{kPa}$ 的真空条件下进行。⑲用 78% 乙醇清洗烧杯, 并用橡胶刮勺定量转移任何残留的颗粒至过滤坩埚内。⑳用 $15\text{mL} \times 2$ 的 78% 乙醇通过真空抽滤清洗滤渣数次, 之后用 $15\text{mL} \times 2$ 的 95% 乙醇和 $15\text{mL} \times 2$ 的丙酮清洗。此时某些样品可能会形成薄胶膜, 可用橡胶刮勺轻轻搅动一下所形成的胶膜层, 但不可搅动硅藻土层。㉑置于 103°C 烘箱中将坩埚残渣烘干过夜至恒重。㉒放在干燥器内冷却 1h, 称重并扣除在 (17) 步骤中的坩埚皮重, 计算出滤渣的重量, 精确至 0.1mg。㉓用凯氏定氮法测定滤渣的蛋白质含量, 换算系数取值 6.25。㉔在 525°C 马福炉中煅烧过滤残渣 5h, 称量测定灰分, 精确至 0.1mg。

4. 结果计算

$$\text{膳食纤维}(\%) = \frac{(R_1 + R_2) / 2 - P - A - B}{(m_1 + m_2) / 2} \times 100$$

式中 m_1 : 1号样品质量 (g); m_2 : 2号样品质量 (g); R_1 : 1号样品处理后过滤残渣的质量 (g); R_2 : 2号样品残渣的质量 (g); A : 残渣 R_1 的灰分 (g); P : 残渣 R_2 的蛋白质含量 (g); B : 空白对照值 (g)。

(二) 水溶与水不溶膳食纤维含量的快速分析法 (AACC32-06)

本方法是利用中性洗涤剂法测定样品中的不溶性纤维素含量, 利用酶法测定水溶性纤维素含量。它适宜于分析加工食品, 食品原料 (包括饲料) 中的水溶与水不溶纤维含量。

1. 主要仪器。①高压湿热处理装置或加压蒸煮器。②冷冻干燥机。

2. 主要试剂。①中性洗涤剂: 在 3L 水中溶解 150g 十二烷基硫酸钠和 50mL 2-乙氧基乙醇。在 1L 水中混合 93.05g 乙烯胍四醋酸二钠和 34.05g 硼酸钠 10 水分子并加热促使溶解。在 1L 水中溶解 22.8g 无水磷酸氢二钠。将上述三种溶液混合均匀, 保持 pH6.2~7.1 间。②0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0)。将 61mL 0.1mol/L 磷酸氢二钠水溶液与 39mL 0.1mol/L 磷酸二氢钠水溶液混合均匀。③2.0mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH4.5)。将 40mL 2.0mol/L 醋酸钠水溶液与 60mL 2.0mol/L 醋酸水溶液混合均匀。④ α -淀粉酶液。将 5g α -淀粉酶 (Sigma 公司 A-6880) 分散于 100mL 0.1mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液中保持 15min, 在 1500r/min 下离心 10min, 并通过粗玻璃坩埚过滤取滤液, 于分析当日配制保存在冰箱中。⑤Novo 公司生产的蛋白酶 No. 7367503 和 Sigma 生产的耐热性 α -淀粉酶 A-0164。

3. 样品的预处理。新鲜样品需经冷冻干燥, 并粉碎至通过 20 目筛 (不能太细, 以防过滤时穿滤)。若样品中脂肪含量超过 5%, 则需要 4 倍体积的丙酮萃取 1h。

4. 不溶性膳食纤维分析步骤。①称取 0.5g 样品 (精确至 0.1mg) 两份, 分别置于

600mL 高腰烧杯中, 加入 100mL 中性洗涤剂溶液。②加热 5~10min 达到沸腾后, 缓慢加热保持溶液处于回流状态 60min。③通过多孔玻璃坩埚过滤, 并用不少于 100mL 95~100℃热水冲洗。过滤时遇到操作困难, 可采用下列措施促滤: 加压或抽滤; 滴加 100 μ L 耐热性淀粉酶 (不需回流, 仅做短时间处理); 添加硅藻土; 将样品数量减少至 0.3g, 但需平行分析三个样品; 清洗坩埚或换一个新的坩埚。④加 10mL 冷 α -淀粉酶和 15mL 95~100℃热水, 保持 5min 后吸滤去掉酶液, 并用热水冲洗。⑤再加入 15mL 95~100℃热水和 10mL 冷 α -淀粉酶液, 在 55℃水浴上保持 1h。⑥通过多孔坩埚进行吸滤, 并用不少于 100mL 热水冲洗滤渣, 最后用 20mL 丙酮冲洗 2 次。⑦在 105℃烘箱中干燥过夜, 取出置于干燥器内冷却至室温, 称重 m_1 ; 再在 525℃马福炉中灰化 4h, 冷却后称重 m_2 。

⑧结果计算: 不溶性膳食纤维 (%) = $\frac{m_1 - m_2}{\text{样品质量}} \times 100$

5. 可溶性膳食纤维的分析步骤。①备一试剂空白试验。②称取 0.5g 样品 (精确至 0.1mg) 两份, 分别放在 50mL 带磨口塞试管中, 加入 20mL 水和 2mL 2mol/L 醋酸盐缓冲液, 混匀后在 120℃, 1.3×10^5 Pa 条件下加热处理 60min, 注意不要将磨口塞子塞得太紧以防爆破。③加入 100 μ L 耐热型 α -淀粉酶 (A-0164), 盖上塞子置于沸水浴保持 30min。④经多孔坩埚过滤分离出可溶性膳食纤维, 用烧杯收集滤液。⑤用 10mL 热水冲洗试管倒入坩埚内过滤, 清除去掉不溶性滤渣, 用 5mL 热水冲洗坩埚。⑥往滤液中顺次加入: 4mL 2.0mol/L 醋酸钠溶液, 搅匀 (pH5.2); 50 μ L 糖化酶, 塞紧瓶塞, 置于 60℃水浴上保持 30min; 20 μ L 蛋白酶, 混匀于 60℃水浴上保持 30min。⑦加入 4 倍体积的无水乙醇 (165mL), 混匀后塞紧瓶塞后静置 60min 促使沉淀生成。⑧用中孔坩埚过滤并添加玻璃棉作助滤剂, 以 20mL 80%乙醇冲洗沉淀二次, 后经 20mL 丙酮清洗一次。⑨置于 105℃烘箱中过夜, 取出放入干燥器内冷却至室温称重 m_3 , 经 52℃灰化 4h 后再称重 m_4 。⑩

结果计算: 可溶性膳食纤维 (%) = $\frac{m_3 - m_4 - \text{空白值}}{\text{样品质量}} \times 100$

式中 空白值 = 坩埚质量 + 空白对照残渣质量 - 灰化后坩埚质量

七、间接碘量法测定槐耳多糖的含量

(一) 分析原理

槐耳多糖为多孔菌科、栓菌属真菌槐栓菌的人工培养菌丝体, 经水提醇沉淀精制而得。根据槐耳多糖气相色谱分析结果, 槐耳多糖中单糖组分摩尔比: 岩藻糖-阿拉伯糖-木糖-甘露糖-葡萄糖-半乳糖为: 1.26 : 1.58 : 1.56 : 1 : 1.97 : 1.2。采用间接碘量法, 根据槐耳多糖中单糖组分比例混合单糖, 制成单糖混合液, 制备工作曲线测定槐耳多糖含量。测定槐耳多糖含量, 方法简便、快速, 不受还原性杂质干扰, 本身颜色基本不干扰, 测定结果令人满意。

(二) 试剂

1. 岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖均为生化试剂, 其余为分析纯试剂。

2. 混合试液由甲、乙、丙液组成 (甲: 硫酸铜 6.25g, 加蒸馏水至 100mL; 乙: 酒

石酸钾钠 18.79g, 氢氧化钠 12.5g, 加蒸馏水至 100mL; 丙: 碘化钾 15g, 加蒸馏水至 50mL), 临用前先混匀甲、乙, 再加入丙混匀。

3. 0.2% 淀粉溶液: 1g 淀粉溶于 500mL 沸蒸馏水中。

4. 6mol/L 盐酸溶液。

5. 0.1mol/L 硫代硫酸钠标准液。

(三) 测定步骤

1. 工作曲线的制备。按槐耳多糖中单糖的组分比例精确称取各种单糖 (于 105℃ 干燥至恒重), 制成 5mg/mL 的标准单糖混合液。吸取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0mL, 分别置 250mL 三角瓶中, 加入混合试液 20mL, 在水浴煮沸 5min, 放冷, 加 10mL 6mol/L 盐酸, 立即以 0.1mol/L 硫代硫酸钠滴定至淡黄色, 加新配制淀粉指示液 2mL, 继续滴定至蓝色消失。同时做空白对照。求得标准混合单糖回归方程 $Y=AX-B$ (X 为标准混合单糖毫克数, Y 为空白与样品消耗的硫代硫酸钠液毫升数之差)。

2. 样品测定。精密称取槐耳多糖样品 I (做总糖测定) 20mg, 样品 II (做还原性杂质测定) 50mg, 分别置 250mL 三角瓶中, 样品 I 加蒸馏水 5mL, 加 6mol/L 盐酸 5mL, 沸水浴中加热回流 30min 水解, 放冷。加酚酞指示剂 3 滴, 用 6mol/L 氢氧化钠调至粉红色。连同样品 II (加水 5mL) 和空白, 均加混合试液 20mL, 水浴煮沸 5min, 放冷, 加 10mL 6mol/L 盐酸, 立即以 0.1mol/L 硫代硫酸钠滴定至淡黄色, 加新制的淀粉指示液 2mL, 继续滴定至蓝色消失。样品 I 消耗的硫代硫酸钠毫升数为 V_1 , 样品 II 消耗的硫代硫酸钠毫升数为 V_2 , 空白消耗的硫代硫酸钠毫升数为 $V_空$ 。

(四) 结果计算

将 $V_空 - V_1$ 代入回归方程式 $Y=AX-B$ 中, 则可计算出样液中总糖的毫克数, 再换算成样品总糖百分含量; $V_空 - V_2$ 代入回归方程式 $Y=AX-B$ 中则查出计算出样液中还原性杂质的毫克数, 再换算成样品总还原性杂质百分含量; 样品中多糖的百分含量 = 样品中总糖百分含量 - 样品中总还原性杂质百分含量。

八、分光光度法测定枸杞子多糖含量

(一) 方法原理

先用 80% 乙醇提取以除去单糖、低聚糖、甙类及生物碱等干扰成分, 然后用蒸馏水提取其中所含的多糖类成分。多糖在硫酸作用下, 水解成单糖, 并迅速脱水生成糠醛衍生物, 与苯酚缩合成有色化合物, 用分光光度法测定其枸杞子多糖含量。本法简便, 显色稳定, 灵敏度高重现性好。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。721 型 (或其他型) 分光光度计。

2. 试剂。①葡萄糖标准液: 精确称取 105℃ 干燥恒重的标准葡萄糖 100mg, 置 100mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度。②苯酚液: 取苯酚 100g, 加铝片 0.1g, 碳酸氢钠 0.05g, 蒸馏收集 182℃ 馏分, 称取此馏分 10g, 加蒸馏水 150g, 置棕色瓶中备用。

(三) 测定步骤

1. 枸杞多糖的提取与精制。称取剪碎的枸杞子 100g, 经石油醚 (60~90℃) 500mL 回流脱脂二次, 每次 2h, 回收石油醚。再用 80% 乙醚 500mL 浸泡过夜, 回流提取二次, 每次 2h。将滤渣加蒸馏水 3000mL, 90℃ 热提取 1h, 滤液减压浓缩至 300mL, 用氯仿多次萃取, 以除去蛋白质, 加活性炭 1% 脱色, 抽滤, 滤液加入 95% 乙醇, 使含醇量达 80%, 静置过夜。过滤, 沉淀物用无水乙醇、丙醇、乙醚多次洗涤, 真空干燥, 即得枸杞多糖。

2. 标准曲线制备。吸取葡萄糖标准液 10、20、40、60、80、100 μ L, 分置于具塞试管中, 各加蒸馏水使体积为 2.0mL, 再加苯酚试液 1.0mL, 摇匀, 迅速滴加浓硫酸 5.0mL, 摇匀后放置 5min, 置沸水浴中加热 15min, 取出冷却至室温; 另以蒸馏水 2mL, 加苯酚和硫酸, 同上操作做空白对照。于 490nm 处测吸光度, 绘制标准曲线。

3. 换算因素的测定。精确称取枸杞多糖 20mg, 置 100mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度 (贮备液)。吸取贮备液 200 μ L, 照标准曲线制备项下的方法测定吸光度, 从标准曲线中求出供试液中葡萄糖的含量, 按下式计算因素 $F = m / (\rho \times D)$, 式中 m 为多糖质量 (μ g), ρ 为多糖液中葡萄糖的浓度, D 为多糖的稀释因素。测得 $F = 3.19$ 。

4. 样品溶液的制备。精确称取样品粉末 0.2g, 置于圆底烧瓶中, 加 80% 乙醇 100mL 回流提取 1h, 趁热过滤, 残渣用 80% 乙醇洗涤 (10mL \times 3)。残渣连同滤纸置于烧瓶中, 加蒸馏水 100mL, 加热提取 1h, 趁热过滤, 残渣用热水洗涤 (10mL \times 3), 洗液并入滤液, 放冷后移入 250mL 量瓶中, 稀释至刻度, 备用。

5. 样品中多糖含量测定。吸取适量样品液, 加蒸馏水至 2mL, 按标准曲线制备项下方法测定吸光度。查标准曲线得样品液中葡萄糖含量 (μ g/mL)。

(四) 结果计算

按下式计算样中多糖含量。

$$\text{多糖含量 (\%)} = \frac{\rho \times D \times F}{m} \times 100$$

式中 ρ : 样液葡萄糖浓度 (μ g/mL); D : 样品液稀释因素; F : 换算因素; m : 样品质量 (μ g)。

九、高效液相色谱法 (HPLC 法) 测定香菇多糖

(一) 方法原理

采用高效色谱法分析香菇多糖, 选用 TSK SW 凝胶排斥色谱柱为分离柱, 香菇样品经简单的预处理, 在示差折光检测器中进行检测, 以不同分子量标准右旋糖酐 (Dextran) 作标准, 同时测定样中多糖的分子量分布情况及含量。该方法较其他多糖测定法具有快速、简便、准确等优点, 是目前较为行之有效的测定方法。

(二) 仪器试剂

1. 仪器。美国贝克曼黄金系统高效液相色谱仪, 包括 126 双溶剂微流量泵, 156 示差折光检测器, System Gold 控制及数据处理系统 (带有分子量计算辅助软件)。分离柱: 4000SW Spherogel TSK (i. d. 13 μ m, 直径 7.5mm \times 300mm)。带微孔过滤器 (带 0.3 μ m 微孔滤膜)。实验室常用玻璃器皿。

2. 试剂。右旋糖酐 (Dextran) Sigma 公司生产, MW2000T、MW500T、MW178T、MW71T、MW39T。无水硫酸钠、醋酸钠、碳酸氢钠、氯化钠等均为 AR 级。双蒸馏水 HPLC 级。

(三) 测定步骤

1. 分子量标准曲线制备。精确称取不同分子量的右旋糖酐标准品 0.100g, 用流动相溶解并定容至 10mL。分别进样 20 μ L, 由分离得到各色谱峰的保留时间, 将其数字输入分子量软件中, 经校准后建立分子量对数值 ($\log mW$) 与保留时间 (RT) 的标准曲线。结果表明, 分子量在 200×10^6 至 3.9×10^4 范围内具有良好线性。

2. 色谱条件。流动相: 0.2mol/L 硫酸钠溶液, 流速: 0.8mL/min。检测条件: 示差检测器 (以流动相作参比液, 灵敏度 16AUFS)。

3. 标准工作曲线。精确称取相对分子质量 50000 在右旋糖酐 0.100g, 定容在 5mL 定量瓶中, 再进一步稀释为 10、5、2、1mg/mL 标准液。分别进样, 根据浓度与峰面积关系绘制曲线。

4. 样品预处理和测定。称取一定量样品 (多糖含量应大于 1mg), 用流动相溶解并定容至 100mL, 混匀后经 0.3 μ m 的微孔滤膜过滤后即可进样。若样液不易过滤, 可将其移入离心管中, 在 5000r/min 下离心 20min, 吸取 5mL 左右的上清液, 再经 0.3 μ m 的抽孔滤膜过滤, 收集少量滤液按色谱条件进样测定。

(四) 结果计算

1. 分子量分布计算。待测样品经分离后得到不同分子量峰的保留时间值, 通过分子量标准工作曲线即可计算出多糖分子量分布。该计算程序由分子量辅助软件自动进行。

2. 多糖含量计算。选择与待测样品多糖分子量相近标准右旋糖酐为基准物质, 用峰面积外标法定量, 计算公式如下:

$$\text{含量 [mg/100g (或 mL)]} = \frac{\rho \times V}{m} \times 100$$

(以右旋糖酐计)

式中 ρ : 进样样液多糖浓度 (mg/mL); m : 样品质量 (g 或 mL); V : 提取液的体积 mL。

十、分光光度法测定油松果多糖含量

(一) 方法原理

多糖在强酸作用下水解生成单糖, 并迅速脱水成糠醛, 糠醛与酚性物质如苯酚缩合成有色化合物。用分光光度法在合适波长处测定多糖含量。最低检测浓度为 0.5 μ g/mL。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。WF2-800D₂ 型或其他型紫外可见分光光度计, XW-80 型旋涡混合器, 超声处理器, 恒温水浴锅等。

2. 试剂。①苯酚、葡萄糖、浓硫酸均为 A.R 级。②5%苯酚溶液: 取苯酚适量, 沙浴蒸馏, 收集 180~182 $^{\circ}$ C 馏分, 称取此馏分 12.5g, 置 250mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 混匀, 避光冷藏。③标准葡萄糖液: 精确称取 105 $^{\circ}$ C 干燥恒重的葡萄糖 9.92mg,

置 100mL 容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度，混匀（99.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

（三）测定步骤

1. 标准曲线的制备。吸取葡萄糖标准溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7mL 置 10mL 容量瓶中，分别加蒸馏水成 1mL，再加入 5% 苯酚溶液 1.6mL，于旋涡混合器上充分混合，然后加浓硫酸 7mL，再于旋涡混合器上充分混合，放置 10min，加蒸馏水至刻度，混匀，置 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温 15min。取出冷至室温。另取 10mL 容量瓶加蒸馏水 1mL，5% 苯酚液 1.6mL，浓硫酸 7mL。按上述方法操作制得的溶液作空白，在 490nm 测定吸光度。并制备葡萄糖浓度-吸光度工作曲线。

2. 样品含量测定。精确称取样品 30mg 置 100mL 容量瓶中，加蒸馏水溶解并稀释至刻度，超声 10min，过滤，取滤液 1mL 按标准曲线项下方法操作测定样液吸光度。由标准曲线查得样液中葡萄糖含量。

（四）结果计算

$$\text{含量}(\%) = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \times 100$$

式中 m ：样品质量 (mg)； ρ ：样品液葡萄糖浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)； V ：样液体积 mL。

十一、魔芋葡甘聚糖含量测定

（一）方法原理

在剧烈搅拌下，葡甘聚糖于冷水中能膨胀 50 倍以上，可形成稳定的胶体溶液，而淀粉在冷水中几乎不溶解，即使有少量淀粉游离出来，也可通过离心沉淀，使之与葡甘聚糖分离。葡甘聚糖在浓硫酸中加热，迅速水解生成糠醛，糠醛与蒽酮作用生成一种蓝绿色化合物，在一定的范围内，颜色深浅与葡甘聚糖含量成正比。

（二）仪器及试剂

1. 仪器。分光光度计，离心机，分析天平，电磁搅拌器等。
2. 试剂。蒽酮 硫酸溶液：称 0.4g 蒽酮溶于 100mL 88% 硫酸（约 84 份体积 97% 浓硫酸与 16 份体积水混合）中，装入磨口瓶中，冷至室温备用，此液应当天配制。

（三）测定步骤

1. 葡甘聚糖的分离、纯化取适量魔芋精粉置于 200~250 倍（体积分数）pH5.0~5.5 的蒸馏水中，于室温下搅拌 2.0~2.5h 呈胶体液，以 4000r/min 离心 30min，除去不溶物。在不断搅拌下，缓缓加入与胶体溶液等体积的无水乙醇，葡甘聚糖脱水沉淀。取沉淀物同上操用方法溶解，重复去杂。将沉淀物移入砂芯漏斗中抽气过滤除去大部分水，再用无水乙醇，丙酮多次脱水，真空干燥，得纯白色絮状物，即为魔芋葡甘聚糖纯品（纯度为 98.5%）。

2. 葡甘聚糖标准曲线制备。取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葡甘聚糖标准液 0~1.2mL。于 15mL 具塞试管中，均加蒸馏水至 2mL，再加蒽酮-硫酸液 6.0mL，放在沸水浴中准确加热 7min，取出迅速冷却至室温，于 630nm 处测定各管吸光度。以吸光度与对应的葡甘聚糖微克量计算回归直线方程式。

3. 样品测定。准确称取 100mg 左右粉碎过 60 目筛样品（或精粉）置于 250mL 烧杯中，加入 50mL 蒸馏水，在电磁搅拌器上搅拌 2h，无损地将烧杯内容物转移到 100mL 容量瓶中，加蒸馏水定量至刻度，摇匀。将溶液在 4000r/min 离心 15min，取上清液 5mL，加蒸馏水至 50mL，摇匀。取 1~2mL 样品稀释液，加蒸馏水至 2mL 于 15mL 具塞试管中，加蒽酮-硫酸液 6.0mL，同上制备标准曲线操作测定样品液吸光度。

（四）结果计算

$$\text{葡甘聚糖含量 (\%)} = \frac{A}{V} \times \frac{100 \times 50}{5} \times \frac{100}{m \times 10^3} = \frac{100A}{V \times m}$$

式中 A：回归直线方程式计算得测定液葡甘聚糖含量 (μg)；V：样品测定液体积 (mL)；m：样品质量 (mg)。

十二、咪唑比色法测定果胶含量

（一）方法原理

果胶物质水解生成半乳糖醛酸，在硫酸溶液中与咪唑试剂进行缩合反应，形成紫红色化合物，其呈色强度与半乳糖醛酸浓度呈成正比，故可定量测定。颜色在反应 1~2h 呈现最深，在 530nm 处测其吸光度。

（二）仪器及试剂

1. 仪器设备。分光光度计回流装置容量瓶，刻度试管，移液管，漏斗等。
2. 试剂。0.15% 咪唑：称取 0.15g 咪唑，加入 95% 的乙醇溶解并定容至 100mL，半乳糖醛酸标准液：准确称取 7.5mg 半乳糖醛酸，加蒸馏水溶解，定容至 100mL，浓硫酸 (A.R.)；95% 乙醇；0.5mol/L 硫酸。

（三）测定步骤

1. 标准曲线的制备。于 6 支 20mL 刻度试管中，分别加入 0~1.0mL 半乳糖醛酸标准液，均加蒸馏水至 1mL，然后各滴加 6.0mL 浓硫酸，在沸水浴中加热 20min，取出冷至室温，再加入 0.2mL 咪唑乙醇液，摇匀，在暗处放置 2h。于 530nm 处测定吸光度。以吸光度及对应的半乳糖醛酸浓度建立回归直线方程。

2. 样品测定。称取样品 1.0~5.0g，置于 150mL 三角瓶中，加入 50mL 95% 乙醇，在沸水浴加热回流 30~40min，过滤除去糖分及杂质（重复 2~3 次），沉淀物移入原三角瓶中，加蒸馏水 40mL，在水浴上加热 50℃ 并保持 30min 以溶解果胶，过滤，用少量蒸馏水洗涤滤底和沉淀物，滤液移入 50mL 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀。此为可溶性果胶测定液。

沉淀物放入原三角瓶中，加 0.5mol/L 硫酸 100mL，在沸水浴上加热 1h，以水解原果胶，冷却移入 100mL 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀。此为原果胶测定液。

吸取可溶性果胶及原果胶测定液各 1mL，加入到 20mL 刻度试管中，按标准曲线的操作方法进行测定。

（四）结果计算

果胶 (%) = 原果胶 (%) + 可溶性果胶 %

$$\text{果胶 (\%)} = \frac{\rho \times V \times 100}{m \times 10^3}$$

式中 ρ : 从回归直线方程式计算得样品液中半乳糖醛酸含量 ($\mu\text{g/mL}$); V : 样品的最终体积 (mL); m : 样品的质量 (g)。

原果胶与可溶性果胶都按上述公式计算, 最终体积按二者最后各自定容的体积算。

十三、气相色谱法 (GC) 测定食品中糖醇及糖的含量

(一) 分析原理

加工食品中的糖类主要有葡萄糖、果糖、蔗糖、及麦芽糖。而糖醇类如山梨糖醇、麦芽糖醇、甘露糖醇等是保健食品中的重要功能成分, 因此对其定量是十分必要的。用气相色谱法 (GC), 设定适宜的条件, 一次就能对多种糖及糖醇进行分析。GC 法中重要的是制备 TMS 衍生物, 固定相用 2% Silicone DC QF-1 [担体: Chromosorb W (AW, DMCS)], 程序升温约 20min, 可以分离定量果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖醇、山梨糖醇及麦芽糖醇。当甘露糖醇与山梨糖醇共存时可以用 TFA 衍生物和 5% Silicone XE-60 固定液 [担体: Chromosorb W (AW, DMCS)] 的组合进行 GC 分析, 将两者分离定量。也可用乙酰衍生物和 5% ECNSS-M 固定液 [担体: Chromosorb W (AW, DMCS)] 的组合来鉴定。

(二) 仪器、试剂

1. 仪器及装置。气相色谱仪: 带有火焰电离检测器 (FID); 柱子: 2 根直径 3mm × 3m 的玻璃柱; 旋转式汽化器: 使用 25mL 圆底烧瓶; 微量注射器。

2. 试剂。糖标准品: 山梨糖醇、麦芽糖醇、甘露糖醇、果糖、葡萄糖、蔗糖及麦芽糖等, 吡啶: 用氢氧化钾干燥后蒸馏, 苊: 作内标物用, 六甲基二硅胺烷 (HMDS), 三氟乙酸 (TFA)。

(三) 测定步骤

1. 试样溶液的制备。果汁用原液 (适量), 加蒸馏水 50mL。果酱取均匀试样 0.2g, 置于 200mL 烧杯中, 加 50mL 蒸馏水, 用分散混合器处理使试样分散。以氢氧化钾溶液调至 pH 到 7.0, 再用蒸馏水稀释至 200mL, 离心分离, 取上清液作试样溶液。含脂肪的食品, 取均匀样品 2g, 放入 50mL 具塞玻璃离心沉降管中, 加正己烷 20mL 混匀, 离心去掉正己烷层, 重复 2 次, 将残存的正己烷蒸发去掉。残渣加入 20mL 80% 乙醇 (体积分数) 溶液, 在水浴上加热回流 30min, 过滤, 用蒸馏水洗涤并定容至 250mL, 混匀。

2. 色谱条件。柱子: 3% Silicone DC OF-1 (Chromosorb W (AW, DMCS) 60~80 目, 直径 3mm × 3m 玻璃柱, 柱温: 120~240°C (升温), 升温速度: 6°C/min, 进样检查器温度 250°C, 氮气流量: 60mL/min; FID 氢气流量: 50mL/min, FID 空气流量: 1L/min。

3. TMS 衍生物的制备。取适量的试样溶液 (相当于 10mg 总糖量) 放入 25mL 磨口圆底烧瓶中, 在低温下 (40°C 左右) 减压干燥, 并用 99.5% 乙醇溶液共沸脱水。加入内

标物苊的吡啶溶液(40mg/50mL) 500 μ L, 再加 HMDS 0.45mL, TFA 0.05mL, 加塞, 充分摇匀, 使糖溶解, 在室温下放置 15~60min 即为 TMS 衍生物溶液。取 1 μ L, 按色谱条件进行 GC 分析。见图 4-5。

4. 工作曲线的制备。将各种糖醇及糖标准品, 在 70 $^{\circ}$ C 减压干燥。制备标准液 (1mg/mL), 取适量的标准液 (每种糖含量 0~3mg), 置于磨口容器中, 冷冻干燥, 按 TMS 衍生物制备法进行 TMS 化, 注入 1 μ L, 在设定的色谱条件下进行 GC 分析。从得到的色谱图算出各种糖及内标物的面积。设 X 为质量分数 (TMS 衍生物中糖的 mg 量/TMS 衍生物中内标物的 mg 量), Y 为面积比 (糖的峰面积/内标物的峰面积) 根据最小二乘法求回归直线即为工作曲线。

(四) 结果计算

首先求出试样 GC 图上各种糖醇、糖的峰面积与内标物峰面积之比, 然后再从制作的工作曲线上求得试样中糖醇、糖的含量。

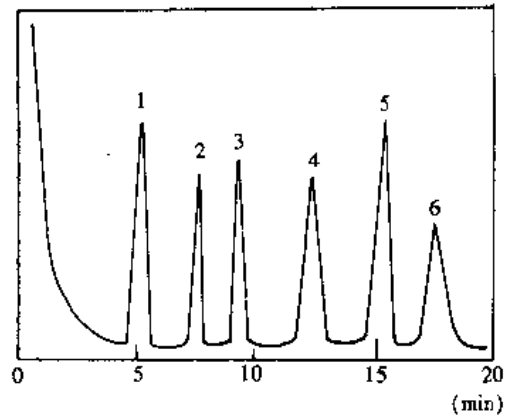


图 4-5 各种糖醇 TMS 衍生物色谱图

- 1—木糖醇 2— β -木糖 3—果糖
4— α -葡萄糖 5—山梨糖醇
6—甘露糖醇

第五章 活性脂

一、分光光度法测定磷脂含量

(一) 分析原理

样品中磷脂，经消化后定量生成磷，加钼酸铵反应生成钼蓝，其颜色深浅与磷含量（即磷脂含量）在一定范围内成正比，借此可定量磷脂。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。分光光度计，消化装置等。
2. 试剂。72%高氯酸。5%钼酸铵溶液。1% 2, 4-二氯酚溶液：取 0.5g 2, 4-二氯酚盐酸盐溶于 20%亚硫酸氢钠溶液 50mL 中，过滤，滤液备用，临用现配。磷酸盐标准溶液：取干燥的磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 溶于蒸馏水并稀释至 100mL，用时用水 100 倍稀释，配制成含磷 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液。

(三) 测定步骤

1. 脂质的提取。将供检样品粉碎，脱脂，再过柱（将活化的硅胶，按每分离 1g 样品用 8g 的比例，用正己烷混匀装柱），以苯：乙醚（9：1）、乙醚各 300mL 依次洗脱溶出中性质。用 200mL 三氯甲烷、100mL 含 5%丙酮的三氯甲烷洗脱，溶出糖质。再用 100mL 含 10%甲醇的丙酮，400mL 甲醇洗脱，得磷脂，供分析用。

2. 消化。取含磷约 $0.5\sim 10\mu\text{g}$ 的磷脂置于硬质玻璃消化管中，挥去溶剂，加 0.4mL 高氯酸加热至消化完全，若不够再补加 0.4mL 高氯酸继续消化至完全。

3. 测定。向消化好试管中加 4.2mL 蒸馏水，0.2mL 钼酸铵溶液，0.2mL 二氯酚溶液。试管口上盖一小烧杯，放在沸水浴中加热 7min，冷却 15min 后，移入 1cm 比色皿中，于波长 630nm 处测定吸光度。同时用磷标准 $0\sim 14\mu\text{g}$ 制作工作曲线，求磷的含量。

(四) 结果计算

$$\text{总磷}(\%) = \frac{\text{供试磷脂的总磷量}(\text{mg})}{\text{供试磷脂的质量}(\text{mg})} \times 100$$

$$\text{磷脂含量}(\%) = \text{总磷}(\%) \times 25$$

说明：脂肪中磷脂占 24.6%，糖脂占 9.6%，中性质占 65.8%。

二、肌醇磷脂微量分析法

(一) 分析原理

肌醇磷脂代谢参与的细胞外信号跨膜传递在细胞的增殖、分化及许多活动中所发挥调节作用已引起广泛的关注。简便有效的肌醇磷脂定量法是先从中性有机溶剂体系提取多磷酸肌醇 (PPI) 磷脂组分，最后将 PPI 磷脂样品提取液在合适的展开体系中进行单向

薄层层析后, 磷脂组分进行液闪计数或定量测定。

(二) 仪器、设备及试剂

1. 仪器、设备。高效层析薄板(德国 E. Merck 公司), 液闪计数器, 放射自显影仪等。

2. 试剂。无载体³²P(中国原子能研究院同位素所), 各种磷脂标样(Sigma 公司), 其余试剂均为国产 A. R., 各种有机溶剂使用前重蒸。

(三) 测定步骤

1. PPI 磷脂的提取。用³²P 标记培养的细胞, 以 20mmol/L pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液洗两次, 向细胞加入氯仿(C): 甲醇(M): 水(W) = 8: 4: 3(体积比) 7.5mL, 混合后静置分层, 3000r/min 离心去掉下相。上相再依次用 4.5mL 氯仿, 4.5mL 氯仿提取 2 次, 除去非 PPI 磷脂组分, 再用 4.5mL C: M: HCl (100: 50: 1) 提取 PPI 磷脂组分, 收集提取的下相, 用氮气吹干, 得 PPI 磷脂样品, 样品定容于 50mL 氯仿中。非同位素标记的组织样品 0.25g, 加蒸馏水 1.25mL 匀浆, 同上用中性溶剂提取 3 次除去非 PPI 磷脂, 再用酸性有机溶剂, 即 C: M: HCl (100: 50: 1) 提取 PPI 磷脂组分, 同上溶于氯仿中。

2. 薄层层析: 将 PPI 磷脂氯仿液 25 μ L 点样于高效层析薄板上, 以 C: M: W: NH₄OH (40: 48: 10: 5) 溶剂体系展开, 用来分离 PPI 磷脂组分, 层析后将层析板上放 X 光感胶片一张, 置暗盒中曝光 2 天, 待胶片感光后将层析板以碘蒸气显色, 刮下磷脂组分条带处的硅胶, 进行液闪计数(同位素标记)。对于非同位素标记的组织 PPI 磷脂层析展开后的层析板以醋酸铜-磷酸试剂显色(取醋酸铜 3g, 加入 8% 磷酸至 100mL 即为显色液), 将层析板于显色液中浸湿后, 于 160 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤至磷脂条带显色。

(四) 结果计算

根据样液中 PPI 磷脂中 [³²P] PI 放射强度, 即可计算出待测细胞中 PPI 磷脂的量。对于非同位素标记的组织样品, 可用标样作比较进行定性定量。

三、间苯二酚法测定神经节苷脂含量

(一) 分析原理

神经节苷脂是含有单糖和唾液酸(SA)的神经酰胺寡糖苷类物质, 各类动物脑中含量丰富, 是膜结构的重要成分, 具有多种生理活性, 尤对神经系统, 改善脑功能有良好的作用。神经节苷脂通常可以用唾液酸部分的含量表示, 唾液酸定量的方法早期是通过唾液酸与某些试剂如地衣酚, 二甲氨基苯醛, 间苯二酚等生成特殊的颜色进行比色测定, 目前广泛应用的是经 Jourdion 改进的间苯二酚法, 可测定结合的及游离的唾液酸含量。本法灵敏度较高, 可测定 5~15 μ g 量。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。分光光度计, 捣碎匀浆器, 减压蒸发器, 冰冻干燥机等。

2. 试剂。间苯二酚-盐酸试剂: 经苯重结晶的间苯二酚 2g, 溶于 100mL 蒸馏水中, 此为贮存液, 可于 4 $^{\circ}$ C 保存数月。取贮存液 10mL, 加含 0.1mol/L 硫酸铜水溶液 0.25mL,

浓 HCl 80mL, 加蒸馏水至 100mL, 混匀置室温 4h 后贮于 4℃, 此为工作液, 溶液为黄色, 若变绿应重配; 正丁醇酯, 正丁醇, 氯仿, 甲醇等均为 A.R. 级。

(三) 测定步骤

1. 神经节苷脂分离、纯化。新鲜脑组织加 19 倍体积氯仿 (C)-甲醇 (M) (2:1 体积分数), 用捣碎器制成匀浆, 置冰浴中致冷后过滤 (滤纸先用氯仿洗涤除去中脂质), 收集滤液, 滤渣再加 10 倍体积的 C-M (2:1) 内含 5% H₂O, 提取一次, 过滤 (再重复一次), 合并三次抽提滤液。向滤液中加入 0.2 倍体积 0.1mol/L KCl 或 NaCl 溶液, 充分混合后静置或低速离心使分层, 吸出上层液, 体积为 V₁, 下层液中加入氯仿-甲醇-0.58% NaCl 或 0.74% KCl 液 (3:48:47) 混合, 加入量为补足吸去的 V₁, 充分混匀, 再静置或低速离心分层, 吸出上层液为 V₂, 重复处理得 V₃, 合并 V₁, V₂, V₃ 液, 在旋转减压蒸发器上蒸馏至半量 (可加少量正丁醇或甲苯防止泡沫), 冰冻干燥至白色粉末状, 冻干物加少量蒸馏水, 移入透析袋, 对蒸馏水透析 1~2 天。即为 SA 纯化提取液。

2. 唾液酸含量测定。吸取含唾液酸 10~30μg 样品液 2mL 放入具塞试管中, 加间苯二酚-盐酸试剂 2mL 加盖于 100℃ 煮沸 15min, 迅速冷却, 再加醋酸正丁醇酯: 正丁醇 (85:14) 4mL, 振荡提取后于冰浴中静置 15min (或加入 5mL 新蒸戊醇, 剧烈振荡后, 于冰浴中静置 10min), 离心取上层有机相在 580nm 测定吸光度。并同时以标准品 (含唾液酸 5~15μg) 制备工作曲线。如样品中混有己糖或其他糖类, 则应同时测定 450nm 处吸光度, 则用下式公式校正:

$$A_{580} = \frac{(A_{580} \times RH - A_{450}) \times RS}{RS \times RH - 1}$$

式中 A: 吸光度; RS: 唾液在 580nm 及 450nm 的吸光度比值; RH: 干扰色素在 450nm 及 580nm 的吸光度比值。

在测定神经节苷脂纯品并以相应的标准品为标准时, 则不用校正。近年来有报道用 620nm 测定吸光度比 580nm 的测定结果为好, 可减少其他糖的干扰。用牛或大鼠脑神经节苷脂的混合物为标准品 (其纯品中唾液酸含量为 30%~32%)。

(四) 结果计算

根据待测液吸光度查工作曲线得待测液中唾液酸含量, 再换算成样品中唾液酸含量。

四、气相色谱法 (GC) 测定花生四烯酸含量

(一) 分析原理

花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 为二十碳不饱和脂肪酸, 在体内能转化成一系列生物活性物质, 如前列腺素, 血栓素, 白三烯等, 具有重要的生理功能。AA 含量测定可利用有机溶剂将组织中的花生四烯酸分离提取出来, 经甲酯化, 采用气相色谱法测定。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。HP5840A 型气相色谱仪。分离柱为长 2m 内径 4mm 螺旋形玻璃管, 载体: Chromosorb W AW, DMCS, 80~100 目; 固定液: 10% DEGS (乙二醇丁酸

酯), 柱温: 190℃, 检测器: FID, 温度 300℃, 气化温度 280℃, 载气: 高纯氮; 流速 60mL/min, 燃气: 高纯氢, 30mL/min, 助燃气: 压缩空气, 250mL/min, 记录速度 5mm/min。

2. 试剂。花生四烯酸甲酯 (Sigma 公司); 氯仿; 甲醇; KOH (A. R.); 0.5mol/L KOH-甲醇溶液。

(三) 测定步骤

1. 样品 AA 提取及甲酯化。血中红细胞膜样品制备: 以血离心去血浆层得红细胞, 用等渗溶液洗三次, 再用 10mmol/L Tris 缓冲液溶血, 离心去血红蛋白。红细胞膜以相同的缓冲液洗三次, 得到乳白色红细胞膜。取适量待测样品, 放入到带塞玻璃试管中, 加 2.5mL 氯仿-甲醇混合液 (2:1 体积分数), 振摇 1min, 以 3500r/min 离心 12min, 小心吸出全部液体, 将其转移到另一试管中, 氮气吹干, 再用 1mL 磷脂溶液溶解, 将溶解液转移至 10mL 容量瓶中, 加入 1mL 0.5mol/L KOH-甲醇溶液, 振荡 1min, 室温放置 15min, 加蒸馏水至刻度, 摇匀, 静置分层, 取 1μL 进行气相色谱分析。

2. 标准样品。标准花生四烯酸甲酯 1mg/mL, 进样 1μL。

(四) 结果计算

将待测样品与标准样保留时间比较定性, 采用外标定量。见图 5-1。

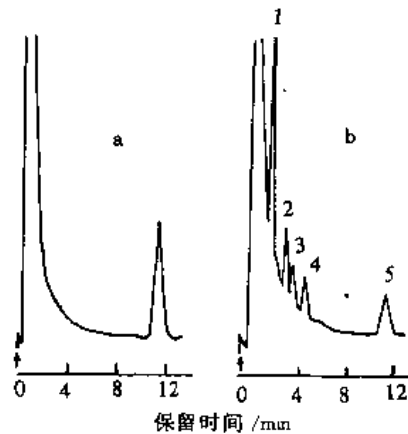


图 5-1 花生四烯酸色谱图

a—标准花生四烯酸甲酯
b—大鼠红细胞膜磷脂酸 峰 5—AA

五、GC/MC 内标法测定蛋黄磷脂中 AA 和 DHA 含量

(一) 分析原理

磷脂中不饱和脂肪酸是体内多烯脂酸的重要来源, 尤其是花生四烯酸 (AA, $C_{20,4}$), 二十二碳六烯酸 (DHA, $C_{22,6}$) 等在生物体内具有多种生物学功能。采用 GC/MC 内标法对脂肪酸中 AA、DHA 进行定量测定, 较好排除和避免了分析过程中的干扰因素和影响, 相对偏差 $\leq 0.14\%$ 。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。气相色谱/质谱 (GC/MS) 联用仪, 美国 Perkin Elmer Qmass-910; NIST 数据谱库, 美国 National Institute of Standards and Technology 软件, 薄层色谱仪, 日本 Shimadzu 930 等。

2. 试剂及试样。蛋黄磷脂 (超临界 CO_2 萃取法), 脂肪酸甲酯及脂肪酸标准品 (Sigma 公司), 甲醇, 氢氧化钾为 A. R. 级。

3. 实验条件。Bestec SE 毛细管柱 30m \times 0.25mm, 0.25μm; 程序升温为: 170℃ (3min) $\xrightarrow{8^\circ C/min}$ 220℃ (14min) $\xrightarrow{10^\circ C/min}$ 285℃ (10min) 进样口温度 270℃,

传输线温度 250℃, 离子源温度 200℃, 扫描速度 500u/s, 电离方式 70eV。

(三) 测定步骤

1. 脂肪酸及蛋黄磷脂甲酯化。参照 Bousquet (1994) 等方法进行, 用 TLC 法鉴定酯化结果, 检查条件为: 将酯化和未酯化 1mg/mL 样品各取 10 μ L, 点在已活化的硅胶板上, 用石油醚-乙醚-乙酸 (70:30:1) 展开, 碘蒸气显色, 根据 R_f 值检查酯化是否完全。

2. 确定内标。由 TIC 图谱及 NIST 数据库检索得出, 蛋黄磷脂中脂肪酸组分中不含 $C_{20,0}$ 和 $C_{24,1}$, 分别与 AA、DHA 组分接近, 选 $C_{20,0}$ 为 AA 的内标, $C_{24,1}$ 为 DHA 的内标, 在本实验条件下其浓度分别为 100ng/ μ L 及 40ng/ μ L。

3. 标准曲线制备。在上述 GC/MS 条件下, 将 AA 和 DHA 甲酯标准品 (1mg/mL) 稀释成含 25、50、75、100、150mg/ μ L, 各取 0.5mL 放入试管中, 均加入等量内标液 ($C_{20,0}$ 1mg/mL 及 $C_{24,1}$ 0.4mg/mL) 0.05mL, 使每种溶液中均含内标 $C_{20,0}$ 100mg/mL 和 $C_{24,1}$ 40mg/ μ L, 各取 1 μ L 进行 GC/MS 分析, 在 25~125ng/ μ L 范围内, 标准曲线呈良好线性。回归方程式 AA 甲酯: $Y=0.008X-0.118$ ($r=0.9992$); DHA 甲酯: $Y=0.027X-0.452$ ($r=0.9983$)。

4. 蛋黄磷脂中 AA、DHA 测定。精密吸取酯化蛋黄磷脂样品液 (1mg/mL) 1 μ L (含内标 $C_{20,0}$ 和 $C_{24,1}$ 各为 100ng 及 40ng), 进行 GC/MS 分析。

(四) 结果计算

由样品强度与内标强度比值, 从标准曲线计算含量。

六、气相色谱法 (GC) 测定月见草油乳中 γ -亚麻酸含量

(一) 分析原理

采用硫酸钠将其乳化破坏后, 用正己烷提取 γ -亚麻酸, 经甲酯化, 用气相色谱法测定其含量, 方法可靠, 组分分离效果良好。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。岛津 GC-9A 气相色谱仪, C-R2AX 数据处理机等。

2. 试剂。 γ -亚麻酸甲酯 (含量 90%); 正辛烷; 正己烷; 三氟化硼乙醚溶液; 甲醇; 氢氧化钾均为 A.R. 级。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线制备。精确称到 γ -亚麻酸甲酯适量, 配成每 1mL 含 3mg 的正辛烷溶液, 按色谱实验条件分别进样 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 μ L, 得气相色谱图及相应的峰面积, 以进样量 (μ L) 对峰面积分值得回归方程式为 $Y=9+2.4X$ ($r=0.9998$)。

2. 色谱条件。色谱柱: 直径 3mm \times 2.1m 玻璃柱; 固定液:



图 5-2 月见草油脂肪酸衍生物色谱图

12%丁二酸二乙二醇聚酯 (DEGS); 担体: Chromosorb W (AW-DMCS) 80~100 目; 柱温: 180℃; 检查器: FID; 温度: 230℃; 载气: 氮气; 流速为 40mL/min。

3. 样品测定。取月见草油乳 10mL, 加硫酸钠 2g, 并加热使乳化破坏后, 冷却, 用正己烷提取 3 次, 每次 15mL, 合并提取液, 放入 50mL 容量瓶中, 加正己烷至刻度, 摇匀。取正己烷提取液 2mL, 置水浴上加热使正己烷完全挥发后, 加 0.5mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液 2mL, 60℃水浴放置 15min, 再加 15/5 三氟化硼乙醚液 2mL, 60℃水浴中放置 2min。加正辛烷 2mL 振摇提取, 加饱和氯化钠水溶液 2mL 混匀, 取上层液 1μL 进样分析。见图 5-2。

(四) 结果计算

根据待测样品液的峰面积, 从标准回归方程中求出 γ -亚麻酸含量, 再换算成样品中百分含量。

第六章 生物抗氧化成分

一、邻苯三酚自氧化法测定 SOD（超氧化物歧化酶）活性

（一）分析原理

利用邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化，释放出 $\cdot O_2^-$ ，生成带色的中间产物。反应开始后先变成黄绿色，几分钟后转为黄色，线性时间维持在3~4min。加入酶液则抑制其自氧化速度，在325nm处测定溶液的光密度。酶活性单位采用1mL反应液中每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达50%时的酶定量为一个活力单位。

（二）仪器及试剂

1. 仪器。UV-260 自动紫外分光光度计（或其他型号），透析袋，玻璃设备等。
2. 试剂。50mmol/L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液：50mL 50mmol/L Tris + 20mL 50mmol/L HCl，以蒸馏水定容于100mL，调pH至8.20；50mmol/L KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液：5mL 0.2mol/L KH_2PO_4 + 4.5mL 0.2mol/L NaOH，以蒸馏水稀至20mL，调pH至7.8；10mmol/L HCl；50mmol/L 邻苯三酚溶液：用10mmol/L HCl配制。

（三）测定步骤

1. 样品液制备。称取5.0g鲜样，加10mL 50mmol/L pH7.8 磷酸盐缓冲液，匀浆，过滤，滤液置透析袋内，于5~7℃冰箱内动态透析6~8h（亦可每小时换透析液一次，透析液为pH7.8 磷酸盐缓冲液。若样品为溶液，可直接加pH7.8 磷酸盐缓冲液透析。

2. 邻苯三酚自氧化速率的测定：在室温下（20~22℃），取5mL 50mmol/L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液，加5 μ L 50mmol/L 邻苯三酚，摇匀，在325nm下立即测定（i. d. = 10mm），每隔0.5min测光密度一次（以pH8.2 Tris-HCl 缓冲液为空白），自氧化速率控制在0.060~0.065 O. D. /min（一般以测定3.5min平均计）。

3. 样品中SOD测定：取5mL 50mmol/L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液，加待测样品透析液5~20 μ L，加5 μ L 50mmol/L 邻苯三酚，摇匀，立即同上测定。

（四）结果计算

$$\text{样液酶活性 (U/mL)} = \frac{V_0 - V_1}{V_0 \times 50\%} \times V \times \frac{n}{V'}$$

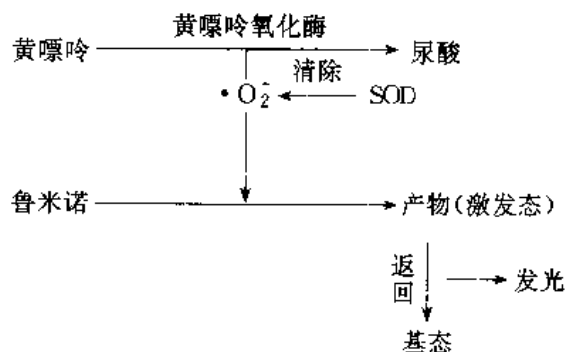
式中 V_0 ：自氧化速率 OD； V_1 ：样液速率 OD； n ：稀释倍数； V ：反应液总体积 (mL)； V' ：样液体积 (mL)。

二、化学发光法测定 SOD 活力及含量

（一）原理

黄嘌呤氧化酶在有氧条件下催化底物黄嘌呤或次黄嘌呤氧化生成尿酸的同时产

生 $\cdot O_2^-$ ， $\cdot O_2^-$ 与化学发光剂鲁米诺(氨基苯二酰胺)反应生成激发态的中间物，当中间物返回基态时，以光辐射的能量产生发光现象，由于SOD能清除 $\cdot O_2^-$ ，所以抑制鲁米诺的化学发光，其抑制程度与酶活力大小有关。



(二) 试剂和仪器

1. 仪器。生物化学发光仪，微量加样器。

2. 试剂。(1)0.05mol/L碳酸盐缓冲液(含0.1mmol/L EDTA, pH10.2): Na_2CO_3 3.68g + $NaHCO_3$ 1.28g + EDTA 37.22mg, 加双蒸水至1000mL, 4℃储存1~2月。(2)0.05mol/L磷酸盐缓冲液(含0.1mmol/L EDTA, pH7.8): K_2HPO_4 7.970g + KH_2PO_4 0.579g + EDTA 37.22mg, 加双蒸水至1000mL, 室温放置1周。(3)0.1mmol/L黄嘌呤(xanthine): 黄嘌呤3.8mg加0.05mol/L碳酸盐缓冲液pH10.2至250mL新鲜配制。(4)0.1mmol/L鲁米诺(Luminol): 鲁米诺4.45mg加0.05mol/L碳酸盐缓冲液pH10.2至250mL新鲜配制黄嘌呤-鲁米诺混合液(1:1), 用前新鲜配制。(5)黄嘌呤氧化酶(0.1mg/mL): 黄嘌呤氧化酶(46mg/mL) 22 μ L加入0.05mol/L磷酸盐缓冲液pH7.8 10mL, 用前新鲜配制(黄嘌呤氧化酶也可根据酶活性大小配成适当浓度, 以在发光仪上空白300~400mV的读数为宜)。(6)超氧化物歧化酶标准品。

(三) 实验步骤

1. SOD标准曲线制作。将标准品SOD用0.05mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.8)稀释成2、4、6、8、10ng/mL, 取不同浓度SOD液10 μ L, 加黄嘌呤氧化酶10 μ L, 再加鲁米诺-黄嘌呤混合液980 μ L, 测反应1min后6s的发光值(mV), 空白对照用0.05mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.8)10 μ L代替, 以空白对照的发光强度为100%, 抑制发光程度为纵坐标, SOD浓度为横坐标, 绘制曲线, 求出抑制50%发光程度时SOD的浓度 C_{50} (mg/mL)。

2. 样品测定取血样10 μ L加入到0.5mL双蒸水中, 充分振摇使之溶血(1:50), 待测。

表 6-1

试剂	样品管	空白管
溶血液量/ μ L	10	
0.05mol/L磷酸盐缓冲液量/ μ L		10
黄嘌呤氧化酶量/ μ L	10	10
鲁米诺-黄嘌呤混合液量/ μ L	980	980

按上表顺序加样，混匀后立即计时，测 1min 后 6s 的发光值 (mV) 或积分值。

(四) 计算

在 25℃ 条件下，抑制 50% 发光程度时所需的 SOD 的浓度 ρ_{50} (ng/mL) 为 1 个活力单位。

$$\text{发光抑制率 (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中 A_0 : 空白 mV; A_1 : 样品 mV。

根据发光抑制率在标准曲线上查出样品的 SOD 含量 (ng/mL)

$$\begin{aligned} \text{SOD 单位活力 (U/mL 全血)} &= \frac{\text{样品 SOD 含量 (ng/mL)}}{\text{标准品 SOD}_{\rho_{50}} \text{ (ng/mL)}} \times \text{样品稀释倍数} \\ &= \frac{\text{实测样品抑制发光 \%}}{50\%} \times \text{样品稀释倍数 (5000)} \end{aligned}$$

$$\text{SOD 比活力 (U/gHb)} = \frac{\text{单位活力 (全血)}}{\text{gHb/100mL 全血}}$$

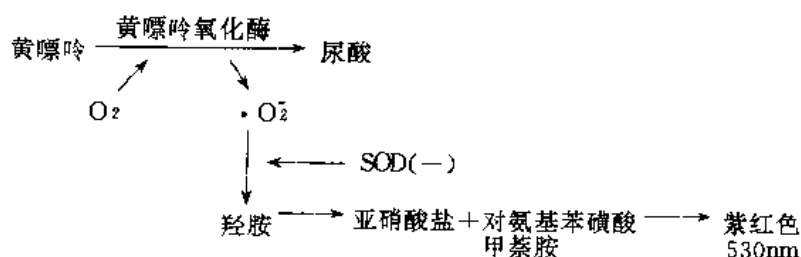
溶血液及黄嘌呤氧化酶的加样量可根据酶活性大小调整，但每次试验各组加样量要一致，最终反应体积为 1mL，可在加混合液前用蒸馏水补齐。

SOD 活力测定方法灵敏度的高低取决于 pH 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 稳态浓度 (即黄嘌呤氧化酶的量)。

三、羟胺法测定 SOD 活力及含量

(一) 原理

$\cdot\text{O}_2^-$ 氧化羟基的最终产物为亚硝酸盐，后者在对氨基苯磺酸及甲萘胺作用下呈现紫红色；在波长 530nm 处有最大吸收峰，可用分光光度法进行测定，当 SOD 消除 $\cdot\text{O}_2^-$ 后形成的亚硝酸盐减少。



(二) 仪器与试剂

1. 仪器。721 分光光度计，离心机，恒温水浴，匀浆器。
2. 试剂。(1) 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.8。(2) 10mmol/L 盐酸羟胺：盐酸羟胺 6.95mg，加水至 10mL。(3) 7.5mmol 黄嘌呤：黄嘌呤 11.41mg，加水至 10mL。(4) 0.023U/mL 黄嘌呤氧化酶：25U/0.9mL 黄嘌呤氧化酶 8.4μL 加 pH7.8 磷酸盐缓冲液至 10mL。(5) 10g/L 甲萘胺；3.3g/L 对氨基苯磺酸；3g/L 磺基水杨酸；SOD 标准品。(6) 三氯甲烷；95%乙醇 (体积分数)。

(三) 实验步骤

1. 红细胞抽提液制备。50 μ L 全血冲入 0.5mL 生理盐水, 2000r/min 离心 3min, 弃上清, 加冰冷的双蒸水 0.2mL 混匀, 加入 95% 乙醇 0.1mL, 振荡 30s, 加入三氯甲烷 0.1mL, 置快速混合器抽提 1min。4000r/min 离心 3min, 分层, 上层为 SOD 抽提液, 中层为血红蛋白沉淀物, 下层为三氯甲烷, 记录上清液体积待测。

2. 组织匀浆的制备。剪取一定量的所需脏器, 生理盐水冲洗、拭干、称重、剪碎, 至玻璃匀浆器中加入冷生理盐水 20000r/min 匀浆 10s, 间歇 30s, 反复进行三次, 制成 10% 组织匀浆 (最好用超声波发生器处理 30s), 使线粒体振破, 以中性红-詹纳氏绿 B 染色证明线粒体已振碎, 以 4000r/min 离心 5min, 取上清液 20 μ L 待测。

3. 样品测定

表 6-2

试剂	测定管	对照管
1/15mol/L 磷酸盐缓冲液量 (pH7.8) /mL	1.0	1.0
样品液	A*	
10mmol/L 盐酸羟胺量/mL	0.1	0.1
7.5mmol/L 黄嘌呤量/mL	0.1	0.1
0.023U/mL 黄嘌呤氧化酶量/mL	0.1	0.1
双蒸水量/mL	0.5	0.5
混匀, 37℃ 恒温水浴 30min		
3.3g/L 对氨基苯磺酸量/mL	2.0	2.0
10g/L 甲苯胺量/mL	2.0	2.0

混匀 15min 后, 倒入 1cm 光径比色杯, 以蒸馏水调零, 530nm 处比色测定 OD 值

* A 为所用样品的量 红细胞抽提液: 5~10 μ L; 血清 (或血浆): 20 μ L; 组织匀浆: 5~10 μ L。

4. SOD 标准抑制曲线。将 SOD 标准品用磷酸盐缓冲液配制成 750U/mL 的溶液, 再稀释到 50 倍, 即 SOD 量为 15U/mL (1.5 μ g/mL), 用本法测定不同量的 SOD 标准液的百分抑制率, 以百分抑制率为纵坐标, 以 SOD 活力单位 U/min 为横坐标绘制标准曲线。

$$\text{SOD 抑制率 (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

式中 A: 对照管 OD; B: 测定管 OD。

(四) 结果计算

每 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个单位。

$$\text{SOD 活力 (U/mL)} = \frac{(A-B) \times 100\%}{50\% \times A} \times \frac{V}{V'} \times N$$

式中 A: 对照管 OD; B: 测定管 OD; V: 反应液总量 (mL); N: 样品稀释倍; V': 取

液量 (mL)。

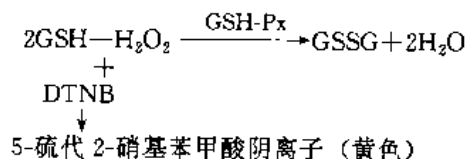
也可用酶比活法即以每管样品的百分抑制率从 SOD 标准曲线查出相应的 SODU/mL, 乘以稀释倍数 (1mL/取样量)。

若样品为组织匀浆液, 根据匀浆浓度或组织蛋白质含量, 将单位换算为 U/g 组织或 U/mg 蛋白。

四、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力测定

(一) 原理

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 是体内存在的一种含硒清除自由基和抑制自由基反应的系统, 对防止体内自由基引起膜脂过氧化特别重要, 其活力以催化 GSH 氧化的反应速度及单位时间内 GSH 减少的量来表示, GSH 和 5, 5'-二硫对硝基苯甲酸 (DTNB) 反应在 GSH-Px 催化下可生成黄色的 5-硫代 2-硝基苯甲酸阴离子, 于 423nm 波长有最大吸收峰, 测定该离子浓度, 即可计算出 GSH 减少的量。由于 GSH 能进行非酶反应氧化, 所以最后计算酶活力时, 必须扣除非酶反应所引起的 GSH 减少。



(二) 试剂和仪器

1. 仪器。721 分光光度计, 低温高速离心机, 匀浆器, 恒温水浴锅, 微量加样器。
2. 试剂。①叠氮钠磷酸缓冲液 pH7.0: NaN_3 16.25mg, 终浓度 2.5mmol/L + EDTA- Na_2 7.44mg, 终浓度 0.2mmol/L + Na_2HPO_4 1.732g, 终浓度 0.2mmol/L + NaH_2PO_4 1.076g, 终浓度 0.2mmol/L + 加蒸馏水至 100mL, 用少量 HCl、NaOH 调 pH7.0, 4℃ 保存; ②1mmol/L 谷胱甘肽 (还原型 GSH) 溶液: GSH 30.7mg 加叠氮钠磷酸缓冲液至 100mL, 临用前配制, 冰冻保存 1~2 日。③1.25~1.5mmol/L H_2O_2 溶液: 取 30% H_2O_2 0.15~0.17mL, 用双蒸水稀释至 100mL, 作为贮备液, 4℃ 避光保存, 临用前将贮备液用双蒸水稀释 10 倍即可。④偏磷酸沉淀液: HPO_3 16.7g (先用蒸馏水溶解) + EDTA 0.5g + NaCl 280g, 加蒸馏水至 1000mL, 用普通滤纸过滤, 室温保存。⑤0.32mol/L Na_2HPO_4 溶液: Na_2HPO_4 22.7g 加蒸馏水至 500mL, 室温保存。⑥DTNB 显色液: DTNB 40mg、柠檬酸三钠 1.0g、加蒸馏水至 100mL, 4℃ 避光保存 1 个月。

(三) 样品制备

1. 血样稀释液。取血样 10 μ L 加入到 1mL 双蒸水, 充分振摇, 使之全部溶血 1:100 待测, 4h 内测定酶活力。若当天来不及测定, 将肝素抗凝全血置 -20℃ 冻存, 3 天内测定, 若 4℃ 存放, 28h 内必须测完。测前取出样品室温自然解冻, 按 1:100 制备溶血液样品。

2. 标准曲线的制作。取 1.0mmol/L GSH 溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL, 分

别置于 10mL 小容器瓶中, 各加入偏磷酸沉淀剂 8mL, 用双蒸水稀释至 10mL 刻度, 即得到浓度为 0、20、40、60、80、100 μ mol/L 的 GSH 标准液。

取上述不同浓度标准液各 2mL, 放入试管中, 加入 0.32mol/L Na_2HPO_4 2.5mL, 比色前加入 DTNB 显色液 0.5mL 用光径 1cm 杯, 5min 内在可见光 423nm 波长测 OD 值, 以蒸馏水调零点。

以 GSH 含量 (μ mol/L) 为横坐标, OD₄₂₃ 值为纵坐标, 绘制标准曲线。

(四) 测定步骤

表 6-3

试剂	样品管体积/mL	非酶管体积/mL	空白管体积/mL
1.0mmol/L GSH	0.4	0.4	
血样稀释液	0.4		
双蒸水		0.4	
37°C 水浴预温 5min			
H_2O_2 (37°C 预热)	0.2	0.2	
37°C 水浴准确反应 3min			
偏磷酸沉淀液	4	4	
3000r/min 离心 10min			
离心上清液	2	2	
双蒸水			0.4
偏磷酸沉淀液			0.16
0.32mol/L Na_2HPO_4	2.5	2.5	2.5
DTNB 显色液	0.5	0.5	0.5
显色反应 1min 后于 423nm 波长 (1cm 光径), 读 OD 值, 5min 之内读数准确			

(五) 结果计算

血样 GSH-Px 活力单位, 规定每 1mL 血样, 每分钟, 扣除非酶反应的 log [GSH] 降低后, 使 log [GSH] 降低 1 为一个酶活力单位。

$$\text{血样 GSH-Px 活力单位 (U/mL)} = \frac{\log (A-C) - \log (B-C)}{3\text{min} \times 0.004\text{mL}}$$

式中 A: 非酶管 OD; B: 样品管 OD; C: 空白管 OD。

注意事项: (1) 由于 H_2O_2 易分解导致浓度改变, 临用时取贮备液用分光光度计测其浓度, 取贮备液 3mL, 测定 1cm 光径的 240nm 处 OD 值。

$$\text{浓度 (mmol/L)} = \frac{OD}{0.036 \text{ (消光系数)}}$$

若 OD 值为 0.45, 则表明 H_2O_2 浓度为 1.5mmol/L。

(2) 5-硫代 2-硝基苯甲酸阴离子的显色不仅与整个反应体系中氢离子浓度有关, 还受反应时间限制。加入显色剂后, 反应体系 pH 为 6.5 时, 1min 开始显色, 此时比色 5min 内读数准确。

五、三氯化铋比色法测定维生素 A 含量

(一) 方法原理

样品中维生素 A 经提取后在三氯甲烷中能与三氯化铋形成蓝色物质。蓝色深浅与维生素 A 的含量成正比。此蓝色物质虽不甚稳定, 但仍可在 6min 内与标准比较定量。

(二) 仪器和试剂

1. 仪器。分光光度计, 回流提取装置, 减压浓缩器。

2. 试剂。①50%氢氧化钾溶液, 乙醚 (G.R.), 乙醇 (G.R.), 三氯甲烷 (G.R.), 无水硫酸钠。②酚酞指示剂: 1%乙醇溶液。③20%~25%三氯化铋三氯甲烷溶液: 溶解 20~25g 三氯化铋于三氯甲烷, 移入 10mL 容量瓶中并加三氯甲烷至刻度, 再加 10g 无水硫酸钠, 贮于棕色瓶中, 上清液使用, 临用前配制。④乙酸酐, 95%乙醇, 氨水。⑤0.5mol/L 氢氧化钾溶液: 称取 14g 氢氧化钾加蒸馏水溶解并稀释至 50mL。⑥维生素 A 标准溶液: 临用前配制, 精密称取 0.1000g 维生素 A, 以三氯甲烷溶解后移入 100mL 容量瓶中, 再以少量三氯甲烷洗涤容器 3~5 次, 洗液并入原容量瓶中, 用三氯甲烷稀释至刻度。⑦维生素 A 标准使用液: 吸取 5.0mL 维生素 A 标准液, 置于 50mL 容量瓶中, 用三氯甲烷稀释至刻度, 再稀释至溶液浓度为 10 μ g/mL。

(三) 操作步骤

1. 皂化。称取 0.5~5.0g 样品于锥形瓶中, 加 10mL 50%氢氧化钾溶液及 10~40mL 无水乙醇, 加热低温回流 30min 至皂化完全。

2. 提取。将皂化瓶内的混合液移入 500mL 分液漏斗中, 用 40~60mL 温水 (30~40 $^{\circ}$ C) 洗皂化瓶, 洗液并入分液漏斗中。如有残渣, 可将皂化后的混合液, 经放有少许脱脂棉的漏斗滤入分液漏斗内。用 50mL 乙醚分两次洗皂化瓶, 并入分液漏斗中, 振摇抽提, 静置分层, 乙醚收集于另一分液漏斗中。在振摇过程中, 不要用力过猛, 否则易成乳状, 难于分离, 如遇此情况, 可加少量无水乙醇消除。若仍无效, 可加蒸馏水数毫升即可分层。于盛皂化液的分液漏斗内, 继续用 50mL 乙醚振摇提取 1~2 次或至水溶液中无维生素 A 为止。将提取液全部收集于 500mL 分液漏斗中。

3. 洗涤。加 15~20mL 0.5mol/L 氢氧化钾溶液于盛醚提取液的分液漏斗中, 轻轻振摇后, 弃去下层碱液, 经此洗涤后, 可除去醚溶性酸皂。然后用蒸馏水洗涤, 每次约 30mL, 直至最后洗液与酚酞指示剂无颜色反应为止 (大约三次即可)。弃去最后一次水层后, 将醚层静置 10~20min, 小心弃去水层。

4. 浓缩。将醚提取液经过无水硫酸钠滤入 250mL 锥形瓶中, 再用约 25mL 乙醚冲洗分液漏斗及硫酸钠两次, 洗液并入锥形瓶内, 置于水浴上蒸馏, 回收醚液。待瓶内剩约 5mL 时取下, 再减压抽气至恰干, 立即加入 5mL 三氯甲烷于锥形瓶中, 然后将三氯甲烷移入 25mL 具塞试管中, 加三氯甲烷至刻度。

5. 测定。取 1mL 样品三氯甲烷液于 1cm 比色杯中, 加入 1 滴乙酸酐。另取 1mL 三氯甲烷于 1cm 比色杯中, 加入 1 滴乙酸酐作为试剂对照 (预先于试剂对照比色杯中, 加入 3mL 三氯化铈三氯甲烷液), 用细玻璃棒迅速搅拌均匀, 在波长 620nm 处, 调节零点。然后于样品比色杯中加入 3mL 三氯化铈三氯甲烷液, 用玻璃棒迅速搅拌均匀, 立即读取最大吸光度值, 根据测得样品的吸光度, 从标准线查得相应维生素 A 的含量。

6. 标准曲线的绘制。吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 维生素 A 标准使用液, 分别置于 10mL 容量瓶中, 加三氯甲烷至刻度。分别吸取上述各管标准液 1mL (相当于 1、2、3、4、5 μ g 维生素 A)。另取 1mL 三氯甲烷为空白。分别置于 1cm 比色杯中, 以下按“5”测定自“加入 1 滴乙酸酐”起依法操作, 根据测得的吸光度绘制标准曲线。

(四) 结果计算

$$\text{食品中维生素 A 的含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \rho \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{100}{m}$$

式中 ρ : 样品管维生素 A 的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); V_1 : 样品稀释液的体积 (mL); V_2 : 测定时取样品稀释液的体积 (mL); m : 样品的质量 (g)。

六、HPLC 法测定维生素 A 含量

维生素 A 具有强荧光性的特性 (乙醇溶液中激发波长 325nm, 荧光波长 470nm), 比紫外吸收检测 (乙醇中吸收峰为 325nm) 灵敏度高, 干扰物少。用反相色谱分离出维生素 A, 用荧光检测器测定其含量。样品中维生素含量较高时, 可用紫外检测器。

(一) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪, 积分仪或记录仪, 磁力加热器, 旋转蒸发器, 恒温水浴, 分析天平, 回流冷凝管, 分液漏斗 (150mL)。

2. 试剂。甲醇, 50% 氢氧化钾, 乙醇, 乙醚或己烷, BHT (丁基化羟基甲苯), 无水硫酸钠, 维生素 A 标准 (美国 Sigma 公司)。

(二) 操作步骤

1. 样品处理。取牛奶 50mL 或蛋黄 5g 于标准口三角瓶中, 加 95% 乙醇 60mL、50% 氢氧化钾 50mL, 接上冷凝管, 于磁力搅拌器上加热回流 30min, 取分液漏斗两个, 固定在铁架上, 一个加 50mL 乙醚或己烷做第一次提取用, 另一个加 30mL 乙醚做第二次提取用。然后塞好盖子。样品皂化完后, 取下三角瓶并用蒸馏水将冷凝管口冲洗, 洗液并入三角瓶。样品冷却到室温后, 慢慢倒入第一个分液漏斗中, 并用蒸馏水洗三角瓶 2~3 次洗液并入分液漏斗, 振摇片刻后静止待分层, 取下层移入第二次提取液中, 同上处理后弃去下层。将两次提取液合并, 同时用乙醚将另一分液漏斗冲洗三次, 然后用蒸馏水洗涤提取液, 以除去氢氧化钾和乙醇, 直至蒸馏水用 pH 试纸试为中性时为止。

在 100mL 棕色容量瓶中加 0.2g BHT, 瓶上放漏斗、滤纸及无水硫酸钠, 将提取液通过无水硫酸钠脱水, 用乙醚冲洗分液漏斗, 最后定容至 100mL, 摇匀待用。上机分析前, 取 10mL 于鸡心瓶中, 在 50 $^{\circ}$ C 恒温水浴中旋转蒸发至干, 取下后立即用 1.0mL 无水甲醇溶解, 摇匀后上机测定。

2. 标准样品的处理。精确称取一定量的维生素 A 醋酸酯或棕榈酸酯，皂化及提取方法同样品，最后使上机的标样浓度为 5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3. 色谱条件。色谱柱： μ -Bondapak C-18 (300mm \times 3.9mm)；流动相：90%甲醇；检测器：紫外 325nm 或荧光 EM=480nm；EX=325nm；流速：1.0mL/min；纸速：0.5cm/min；柱温：室温；进样量：20 μL 。

(三) 计算

根据标准维生素 A 的保留时间定性，根据标准样品的面积积分值或峰高计算样品中维生素 A 的含量。

注意事项：维生素 A 见光易分解，整个操作过程应避免阳光直射或半暗室中进行。

七、比色法测定总胡萝卜素含量

(一) 方法原理

样品通过石油醚-丙酮 (1:0.5 体积比) 混合溶液萃取，使之与非类胡萝卜素成分分离，在 451nm 波长下测定萃取溶液的消光度，可以计算出食品中总胡萝卜素的含量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。可见分光光度计，分液漏斗，容量瓶等。
2. 试剂。石油醚，丙酮，无水硫酸钠，石英砂，饱和氯化钠溶液。

(三) 操作步骤

1. 样品处理。称取 5g 已捣碎混匀的样品置研钵内，加石油醚、丙酮 (1:0.5) 混合溶液 10mL，石英砂少量，研磨提取，然后将提取液过滤至 100mL 容量瓶中。如此反复提取残渣 3~4 次，并过滤，直至提取液无色。将几次滤液从 100mL 三角瓶移至 150mL 梨形分液漏斗中，并用蒸馏水洗涤石油醚层，出现乳化时，加饱和 NaCl 溶液 3~5mL，剧烈振荡，待液相分层后，弃去下层水相，重复 2~3 次。将石油醚层定量转移至 50mL 容量瓶中，用无水硫酸钠过滤，以石油醚定容，摇匀。置暗处供比色用。

2. 测定。用 1cm 比色皿以石油醚作空白，在 451nm 波长处测定消光度。

(四) 计算

$$\text{总胡萝卜素 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{E \times V \times 100 \times 1000 \times 1000}{E_1 \times m \times 100} = \frac{E}{m} \times 20000$$

式中 E ：样品在 451nm 波长下消光值； E_1 ：1% β -胡萝卜素石油醚溶液在 451nm 波长下的消光值，即 2500； V ：样品中总胡萝卜素石油醚提取液定容体积 (mL)； m ：样品质量 (g)。

八、胡萝卜素含量比色测定

(一) 方法原理

胡萝卜素常和叶绿素、叶黄素等共存于植物中。这些色素都能被有机溶剂所提取，所以测定时一定要将胡萝卜素与其他色素分开。目前广泛使用的方法是柱层析分析法：利

用一定的吸附剂对不同色素的不同吸着能力,将样品提取液中有生理价值的胡萝卜素从类胡萝卜素中分出来。在适当条件下,各种色素被吸在吸附柱的不同位置上,形成色谱。然后用洗脱剂将所需要的胡萝卜素洗下,在吸收光最多的波长下测定其浓度,从而计算出样品中所含胡萝卜素含量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。工业天平(感量0.01g),带回流装置的三角烧瓶,分液漏斗(250mL),色层分离管,电热板或其他加热装置,72型分光光度计,抽气机。

2. 试剂。①吸附剂:纯氧化镁,用前将氧化镁通过80~100目网眼筛子筛过,然后置烘箱(80~900℃)中烘3h备用。②无水硫酸钠:(不应有吸着胡萝卜素的能力)。③石油醚(沸点应为80~100℃):此石油醚应不含水分及杂质。沸点限度及纯度均不够标准的市售品,应重行蒸馏后再用。④活塞滑润剂:22g甘油加9g可溶性淀粉,加热至140℃后放置1.5h,倒出上层,静置隔夜即可用。⑤洗脱剂:3%丙酮的石油醚溶液。一般用3mL丙酮加入97mL石油醚(80~100℃部分)中作洗脱剂。加入丙酮的量可随情况在2%~10%间改变。丙酮越多,洗脱力越大,但必须注意只使胡萝卜素冲洗下来,而不使其他色素下来。⑥胡萝卜素标准液:溶20mg晶体标准胡萝卜素于少量氯仿中,然后以石油醚稀释至50mL。再稀释至做标准曲线所需要的各种浓度。此标准液于临用时配制(2~3天内就会破坏)。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线绘制。将胡萝卜素标准液配制不同浓度的标准液(0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$),于分光比色计上440nm波长处测定光密度。以标准液的不同浓度为横坐标,对应的光密度值为纵坐标做标准曲线。

2. 提取。称取样品0.5~5g于锥形瓶中,加入20mL3:7丙酮石油醚混合液,加热回流1h,或加上塞子,置室温暗处过夜(至少15h)或研磨提取。将混合液倒入一盛有约100mL蒸馏水的分液漏斗中,每次以5~8mL石油醚冲洗残渣数次,将冲洗液合并于分液漏斗中。摇动分液漏斗1min,静置,待分层后,将水液层放入另一分液漏斗中,以少量蒸馏水冲洗盛有石油醚的分液漏斗3~4次,将水液全部集中在另一分液漏斗中。向盛水液的分液漏斗加入5mL石油醚,摇动,弃去水液层,把石油醚液合并于样品漏斗中。向合并的石油醚样品溶液中,加少许无水硫酸钠,摇振后装入层析管进行分离。

3. 柱层析管的制备。装少许玻璃棉或脱脂棉于层离管尖部,压紧后装入活化的氧化镁约10cm高,装时以手轻击管柱,可使其更加均匀。将层离管接在抽气管上抽气。管内的氧化镁装至约高8cm后,将表面压平。加入约1cm高的无水硫酸钠。再加入10~20mL石油醚于层离管内,使吸着剂湿透并赶走其中的空气。抽气瓶内可放一试管或离心管以接纳上面流下的液体。

4. 分层及洗脱。当硫酸钠上面还有少许石油醚时,即将提取液自分液漏斗中倒入层离管,立即抽气。用5~10mL洗脱剂洗分液漏斗,待提取液几乎全部进入硫酸钠时,连续用洗脱剂洗层离管至胡萝卜素随溶剂洗下,溶液出现黄色。将此黄色液接纳于试管或离心管中。继续冲洗至滤液由黄色变无色为止。集中全部黄色液体在一量瓶内,用石油醚稀释至刻度,浓度最好在1mL含1~2 μg 。

5. 测定。在 72 型分光光度计上于波长 440nm 处测定溶液的光密度值, 以石油醚作空白对照。

(四) 结果计算

将样品液测得的光密度值查标准曲线, 得出样品测定液中胡萝卜素含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

$$\text{胡萝卜素 (mg/100g)} = V \times A \times \frac{100}{m \times 1000} = \frac{V \times A}{10 \times m}$$

式中 V : 收集滤液稀释后的总体积 (mL); A : 查标准曲线所得样品测定液中胡萝卜素含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); m : 样品质量 (g)。

注意事项: 胡萝卜素易为阳光破坏, 所以在实验进行中应避免阳光照射, 在普通较暗的室中即可。

九、类胡萝卜素含量 HPLC 法测定

(一) 原理

各种类胡萝卜素在 450nm 可见光波长条件下都有不同浓度的吸收, 样品中的类胡萝卜素经有机溶剂提取后, 利用 HPLC 反相色谱柱进行分离测定, 根据保留时间和峰高(或峰面积)与标准比较而定性和定量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪, 紫外检测器, 记录仪, 回流皂化冷凝装置等。
2. 试剂。丙酮, 石油醚 (30~60℃, 60~90℃), 甲醇, 正己烷, 95%乙醇, 无水乙醇, 乙腈 (色谱纯), 二氯甲烷, 20%及 50%的 KOH 甲醇溶液, 无水硫酸钠, BHT (叔丁基羟基甲苯), 氮气, (以上试剂均为分析纯)。各种类胡萝卜素标准: α -c, β -c, γ -c, lycopene, Canthaxanthin 均来自 Sigma 公司。

(三) 操作步骤

1. 样品提取。①新鲜蔬菜和水果 (番茄、胡萝卜等): 称取 5~10g 新鲜样品于研钵中。加入 1:1 丙酮-石油醚 (30~60℃) 约 10mL, 0.1mg BHT, 以适量石英砂研磨提取, 上清液倾入盛有 100mL 蒸馏水的分液漏斗中。每次用 5mL 丙酮石油醚混合液多次提取, 提取液移入上分液漏斗, 直至浸提液无色。摇动分液漏斗 1min, 静置分层, 将下层水溶液放入另一分液漏斗, 再向原分液漏斗中加蒸馏水 30mL, 摇动, 静止分层, 将下层水液合并到另一分液漏斗中, 如此重复 3~4 次, 直至丙酮完全清除。向第二个分液漏斗中加入石油醚 5~10mL, 摇动提取, 弃去下层水液, 提取液合并于第一分液漏斗中, 所得提取液经无水硫酸钠过滤后, 置于 10mL 容量瓶中, 用石油醚定容后待用。②干制菜果: 称取磨碎 (40 目以上) 样品 5~10g 于磨口三角瓶中。用 3:7 丙酮-石油醚 (60~90℃) 混合液, 并于水浴中回流提取。后续操作同①。③脂肪含量高的动物食品 (如牛奶、鸡肝等): 皂化: 称取磨碎样品 5~10g 于 250mL 磨口三角瓶中, 加入 50%KOH 甲醇溶液 40mL, 乙醇 50mL 及少量 BHT, 于水浴上 75℃回流 30min, 使皂化完全。提取: 冷却后, 用石油醚分次提取, 提取过程同①。洗涤: 用蒸馏水多次洗涤提取液, 直至洗到中性为止 (pH 滤纸为 6)。将石油醚提取液经无水硫酸钠完全转入 50mL 容量瓶中, 用石油醚定

容后待用。

2. 标样的配制。①单一标样的配制：准确称取各类胡萝卜素 5mg，先用少量乙酸乙酯溶解，再用甲醇定容至 50mL 容量瓶中，得浓度为 100 μ g/mL 母液，贮备于冰箱中。使用前配成浓度为 5~10 μ g/mL 的工作液。②混合标样的配制：将单一标准溶液按比例混合，得各类胡萝卜素浓度为 5~10 μ g/mL 的混合标准工作液。③样品上机液的制备：吸取 5~10mL 样品提取液减压蒸干或氮气吸干，迅速加 1mL 甲醇或乙酸乙酯溶解，经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后作上机液。

3. 色谱条件。色谱柱： μ -Bondapak C-18（直径 3.9mm \times 150mm），流动相：乙腈-二氯甲烷-甲醇（85：10：5）（上机前超声波中脱气 30min），流速：0.6mL/min；检测器：450nm，进样量：20 μ L，纸速：4mm/min，柱温：室温。

（四）结果计算

根据标样保留时间而定性，根据峰高或峰面积进行外标法定量。

注意事项：①皂化时需加入足够量的碱液和乙醇，并控制皂化温度和时间使皂化完全。②在分液漏斗中提取时若分层不清，可加入少量无水乙醇处理。③蒸馏水洗提取液一定要充分，上机液不能呈碱性，以免影响柱子寿命。④整个过程要快速，避光操作，标准工作液需临时配制。

十、 β -胡萝卜素含量 HPLC 法测定

（一）方法原理

β -胡萝卜素为脂溶性维生素 A 的前体，存在各种动植物体中，所以可直接用有机溶剂提取后进行检测。利用反相色谱法分析。

（二）仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪，紫外检测器，记录仪或积分仪，分析天平等。

2. 试剂。①己烷，甲醇，无水硫酸钠，乙酸乙酯，BHT（叔丁基羟基甲苯）（以上均为分析纯试剂），氮气。②20%氢氧化钾的甲醇溶液：称 20g 氢氧化钾溶于 100mL 甲醇中。③ β -胡萝卜素标准液：准确称取标样 5.000mg，乙酸乙酯溶解并定容 50mL。冰箱中保存，上机前再稀释 50 倍。

（三）操作步骤

1. 样品处理。取样品的可食部分洗净切碎，置组织捣碎机中捣碎成浆状，称 5~10g 样品，放入研钵中，同时加少量甲醇、己烷研磨，然后倒入布氏漏斗抽滤，并不断用甲醇、己烷冲洗研钵及残渣，直至残渣为白色。将含有样品的溶液倒入事先装有 50mL 己烷的分液漏斗中，用蒸馏水冲洗抽滤瓶 2~3 次，洗液并入分液漏斗，振摇分液漏斗后静置分层，将下层溶液放入装有 30mL 正己烷的另一分液漏斗中，向第一分液漏斗中加 10mL 20%氢氧化钾的甲醇溶液，振摇后分层，上层为黄色溶液。将下层放入另一分液漏斗中，处理同上。合并二次正己烷提取液，用蒸馏水洗至中性，然后用无水硫酸钠脱水，提取液转移到 100mL 棕色容量瓶中，加 0.1g BHT，并用己烷冲洗分液漏斗数次，最后定容至刻度。上机前取 1~2mL 提取液于小试管中，氮气吹干，用 1.0mL 乙酸乙酯溶解后

上机。

2. 色谱条件。色谱柱： μ -Bondapak C-18 (直径 300mm \times 3.9mm)，流动相：100% 甲醇，流速：1.2mL/min，检测器：可见光 440nm，衰减：0.08AT，纸速：0.4cm/min，柱温：室温，进样量：20 μ L。

(四) 计算

根据标准样品的保留时间定性，标准的峰高或峰面积与样品峰的比较而定量。

注意事项： β -胡萝卜素遇光和氧都会迅速破坏，所以样品应避光保存，所用标准 β -胡萝卜素必须临时配制。

十一、维生素 E 和胡萝卜素含量测定

(一) 方法原理

采用石油醚直接冷磨匀浆法提取，不需皂化等操作手续，样品提取液通过氧化铝柱后，维生素 E、胡萝卜素被定量吸附，用乙酸乙酯-石油醚混合溶剂分次洗脱出维生素 E、胡萝卜素，提高了分离效果，可进行两种维生素含量测定。适合脂肪含量低的食物分析。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。岛津 RF-510 荧光分光光度计，721 型分光光度计 (或其他光电比色计)。

2. 主要试剂。①标准品：*dl*- α -生育酚 (E. Merck) 以石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C) 稀释至 5 μ g/mL。②试剂：乙酸乙酯，石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C)，氧化铝，无水硫酸钠，石英砂。③氧化铝层析柱：使用前先做维生素 E、胡萝卜素吸附洗脱回收实验，必要时需活化处理。取 25~27cm 层析柱 (层析部分：内径 0.8cm，长 9cm) 在细颈端填塞脱脂棉，装入氧化铝 3~4g 至低于细颈上端 0.5cm 处，用手轻轻拍柱使氧化铝均匀，上加 0.5g 无水硫酸钠，在层析分离时先用部分石油醚过柱，再加样品液。

(三) 测定步骤

1. 样品液制备。称取 5~10g 植物样品 (或其他食品)，加一定量无水硫酸钠和石英砂，再加石油醚，在玻璃乳钵内磨匀成浆，静置，用玻璃吸管取上清液，移入 50mL 容量瓶中，重复提取 4~5 次至刻度。

2. 上柱。取 5mL 石油醚提取液加到氧化铝柱内，开启水泵让石油醚提取液过柱，弃去石油醚流下液。改用含 3% 乙酸乙酯的石油醚洗脱，弃去部分洗脱液 (约 3mL)，收集洗脱液至 15mL，即为样品胡萝卜素测定液。再用含 90% 乙酸乙酯的石油醚洗脱，弃去部分洗脱液 (约 3mL)，收集洗脱液至 15mL，即为样品维生素 E 测定液。取 2.5mL 胡萝卜素标准液 (5 μ g/mL) 和 2.5mL 维生素 E 标准液 (5 μ g/mL) 混合液，按上操作，收集即为标准测定液。另取 5mL 石油醚代替 5mL 标准混合液，同上处理，即为试剂空白液。

3. 测定。在岛津 RF-510 荧光分光光度计上，激发波长 295nm，荧光波长 325nm，狭缝 10nm，灵敏度开关置于 50 (狭缝和灵敏度开关根据需要调节)，用 1cm 比色皿 (以试剂空白调荧光强度为零)，读样品测定液和标准测定液荧光强度，测定维生素 E。在 721 型或其他分光光度计上，波长为 448nm，2cm 比色皿 (以试剂空白调光密度为零)，读样品测定液和标准液光密度，测定胡萝卜素。

(四) 结果计算

$$\text{样品维生素 E 含量 (mg/100g)} = \frac{5 \times A}{B} \times \frac{50 \times 100}{m \times 1000}$$

$$\text{样品胡萝卜素含量 (mg/100g)} = \frac{5 \times C}{D} \times \frac{50 \times 100}{m \times 1000}$$

式中 A: 样品液荧光强度; B: 维生素 E 标准液荧光强度; C: 样品液光密度值; D: 胡萝卜素标准液光密度值; m: 样品质量 (g)。

十二、维生素 E (生育酚) 的分光光度法测定

(一) 方法原理

生育酚还原三价铁离子成二价铁离子, 而二价铁离子与 4,7-二苯基-1,10-二氮杂菲试剂产生有色反应, 于 534nm 下具有最大吸收。在一定浓度范围内, 其吸收值与生育酚含量成正比例。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。工业天平 (感量 0.01g), 索氏抽提装置, 水浴锅, 磨口三角瓶 (100mL), 分液漏斗, 有塞试管 (10mL), 721 型分光光度计。

2. 试剂。6.0mmol/L 4,7-二苯基-1,10-二氮杂菲溶液 (以 95%乙醇配制); 放入有色瓶内, 贮于冰箱中备用, 1.0mmol/L 三氯化铁乙醇溶液 (临用前配制): 为了避免光化学反应, 直接在棕色试剂瓶内配制; 0.5 (g/L) 标准生育酚乙醇溶液: 贮存于冰箱中, 在分析时, 以乙醇稀释至 2μg/mL; 40mmol/L 磷酸乙醇溶液。

(三) 测定步骤

1. 工作曲线。取标准生育酚溶液 (2μg/mL) 0~3.5mL 放入试管中, 均以乙醇稀释至 3.5mL, 加 0.5mL 6.0mmol/L 4,7-二苯基-1,10-二氮杂菲试剂, 轻轻摇动试管片刻, 混匀, 再加入 0.5mL 1.0mmol/L 三氯化铁溶液, 15s 后, 立即加入 0.5mL 40mmol/L 磷酸溶液, 混匀。在光电比色计上于 540nm 下测定有色溶液光密度值。以光密度值为纵坐标, 相应的生育酚含量 (μg) 为横坐标绘制工作曲线。

2. 样品中生育酚提取皂化。称取粉碎过 60 目筛的样品 1~2g (含生育酚 50~100μg) 放入索氏抽提器中, 加无水乙醇 50mL、抗坏血酸 0.3g, 充入氮气, 置水浴加热回流提取 16~18h, 收集提取液, 用无水乙醇稀释至 50mL。吸取 10~20mL 抽提液, 充入氮气后加 1mL 饱和氢氧化钾溶液, 置水浴中加热回流皂化 15min。将皂化后的氢氧化钾-乙醇溶液全部倾入盛有 40mL 蒸馏水的分液漏斗中, 加乙醚 30mL 振摇抽提, 分层后, 将下层水相再用 20mL 乙醚抽提两次, 合并乙醚提取液, 于另一干净的分液漏斗中。以蒸馏水洗去碱液, 用无水硫酸钠干燥, 过滤到烧瓶中, 在二氧化碳气流下将溶剂乙醚蒸干, 所得残渣加乙醇 20mL, 在水浴上加热溶解, 冷却, 以乙醇稀释至 25mL。

3. 测定。取样品液 1~3mL, 以乙醇稀释至 3.5mL。按制备工作曲线操作, 加 4,7-二苯基-1,10-二氮杂菲、三氯化铁及磷酸溶液, 测定样品液光密度。

(四) 结果计算

由样品测定液光密度查工作曲线得样品液生育酚含量 (μg)。

$$\text{生育酚含量 (mg/100g)} = \frac{A}{V} \times \frac{25 \times 100}{m \times 1000} = \frac{2.5A}{V \times m}$$

式中 A : 样品测定液生育酚含量 (μg); V : 样品测定液体积 (mL); m : 样品质量 (g)。

除 4,7-二苯基-1,10-二氮杂菲外,生育酚的显色试剂还有双吡啶氮苯、菲绕啉(1,10-二氮杂菲)、2,2',2''-三吡啶氮苯、2,4,6-三吡啶 S-三吡啶、0-亚硝基间苯二酚甲基醚。磷酸是阻止 Fe^{+++} 在光照下发生光化学反应,由于光化学反应吸收值变化很小(0.001~0.005),测定可不必在暗室中进行。

十三、维生素 E 的荧光测定法

(一) 方法原理

动、植物材料中生育酚经有机溶剂萃取后能产生荧光,激发波长为 295nm,荧光波长为 325nm。在一定浓度范围内,荧光强度与生育酚含量成正比例关系。某些干扰物质可通过氧化铝柱去掉。维生素 A 含量较高时会产生荧光熄灭现象而严重干扰测定,加入硫酸干扰即可消除而不影响生育酚的荧光强度。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。日立 MPF-4 型荧光分光光度计(或其他荧光比色计),索氏抽提器,回流冷凝器,实验用粉碎机,工业天平(感量 0.01g),玻璃分离柱(长 30~50cm,内径 1cm)等。

2. 试剂。①正己烷(A.R.): 500mL 中加 5~6mL 浓硫酸,摇动数次直至浓硫酸不呈黄色,然后加固体氢氧化钠重蒸馏。②无水乙醇(A.R.): 加铝粉和固体氢氧化钾重蒸馏。③无水乙醚(A.R.): 重蒸馏。④含 7%无水乙醚正己烷洗脱液。⑤固体抗坏血酸(A.R.)。⑥中性氧化铝: 70~325 目,加 10%水,在圆底烧瓶中振荡 2h,贮于带塞容器中过夜备用。⑦氢氧化钾(G.R.): 制成饱和溶液。⑧dl- α -生育酚: 制成 1mg/mL 无水乙醇贮备液,置于棕色瓶内在 4℃以下保存,每 3 个月重新配制一次,使用时稀释至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 工作液,每瓶需重新配制。⑨60%硫酸溶液。⑩高纯氮气。

(三) 测定步骤

1. 样品制备。将动植物、粮食、饲料等用粉碎机粉碎,直至全部通过 60~80 目筛,混匀后于低温下保存备用。

2. 样品的前处理。准确称取含 100 至 200 μg 生育酚的样品(一般约 3~5g)放入索氏抽提器中,加无水乙醇 30~50mL 和抗坏血酸 0.3g,充入高纯氮气,立即用小烧杯将抽提器顶部盖住,再套一个适宜尺寸的乳胶薄膜套,用橡皮筋捆在抽提器顶部使提取物完全与空气隔绝,然后将抽提器置沸水浴上回流抽提 16~18h,为了避免乳胶薄膜被乙醇蒸气胀破,应使乳胶薄膜有伸缩余地。此外,抽提器外部需用黑布遮盖,以防止强烈光线照射使生育酚产生光氧化,抽提结束后,将抽提器置于冷水中冷却至室温,以少量无水乙醇淋洗抽提器内壁并定量至原体积。

吸取 10~20mL 抽提液置于磨口三角烧瓶中,加 0.3g 抗坏血酸,充入氮气后加 1mL 饱和氢氧化钾溶液,立即装上带有同抽提器一样密封装置的回流冷凝管,置沸水浴上回流皂化 15min。取下三角瓶加塞在冷水中冷却至室温,加 15~20mL 蒸馏水,并准确加入 10mL 正己烷,振荡萃取 8min,于分液漏斗中分离弃去乙醇-水相。加二滴 60% 硫酸,用三倍体积的水洗涤正己烷相数次,直至洗涤水呈中性,保留正己烷相备用。

按上述相同步骤进行含生育酚 100 至 200 μ g 的标准样品操作,并用无水乙醇代替样品作空白。

定量吸取正己烷萃取液,缓慢地加至装有 8g 氧化铝的柱内,用 50mL 正己烷以 1~2mL/min 的流速洗脱,弃去正己烷洗脱液,改用含 7% 无水乙醚的正己烷,以同样流速洗脱,收集前 80mL 洗脱液以测定其荧光强度。

(四) 结果计算

在荧光分光光度计上用 1cm 比色皿测定样品溶液的荧光强度。激发光波长 295nm,荧光波长 325nm,狭缝 5nm,灵敏度开关置于“10”(狭缝和灵敏度可视荧光强度相应调节)。生育酚含量依下式计算。

$$\text{生育酚 } (\mu\text{g/g 或 mL}) = \frac{A-C}{B-C} \times \frac{S}{m}$$

式中 A: 样品荧光强度; B: 标准生育酚荧光强度; C: 空白荧光强度; S: 标准生育酚加入量 (μ g); m: 样品质量 (g 或 mL)。

注意事项: ①氧化铝种类对吸附效能有明显影响,甚至有的完全不吸附生育酚,因此在使用时应以标准生育酚试验其吸附和洗脱效果。②为了保持试样的最佳皂化条件和皂化混合物萃取溶剂的比例,通常须使皂化混合物中氢氧化钾最终浓度为 2.5mol/L,乙醇最终浓度为 12.5%。过量或不足均产生误差,皂化混合物和正己烷的比例大致应为 1:1,降低正己烷用量可提高灵敏度,但增大了荧光熄灭的可能性。③生育酚在碱性条件下加热极易被氧化破坏,因此加入抗氧化剂是避免生育酚在皂化时不被破坏的重要条件,抗坏血酸作为抗氧化剂效果最好,在皂化混合物中抗坏血酸的浓度应保持在 3.1%。④当试剂中含有还原性物质或其他荧光杂质时,均可使空白值偏高而降低方法灵敏度。在整个实验过程中必须防止接触橡胶和塑料制品,以免引起污染。

十四、HPLC 法测定维生素 E 含量

(一) 方法原理

测定食品中的脂溶性维生素时,一般都是将样品先皂化,由酯型转化为游离型,再进行测定。但也有为节省时间简化前处理步骤,免去皂化,直接提取后进行测定的。但需要注意的是因食品基质不同,会影响提取而造成误差。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪,积分仪,组织捣碎机,旋转蒸发仪,磁力加热搅拌器,回流装置等。

2. 试剂。①50%氢氧化钾溶液,无水乙醇,乙醚(无过氧化物),BHT(叔丁基羟基

甲苯), 异辛烷, 1,4-二噁烷(以上均为分析纯试剂)。②维生素 E 标准溶液: 精确称取一定量的维生素 E 标准液, 溶于异辛烷中, 使最终浓度为 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(三) 操作步骤

1. 样品处理。取待测样品于组织捣碎机中捣碎, 准确称取 $5\sim 10\text{g}$ 于三角瓶中, 加 20mL 50% 的氢氧化钾溶液, 60mL 无水乙醇、混匀。接上冷凝管, 于磁力加热搅拌器上 70°C 条件下回流皂化 30min , 可通氮气或加少量抗坏血酸以减少维生素 E 的氧化, 回流结束后, 取下三角瓶, 用少量乙醇或重蒸馏水漂洗冷凝管接口。样品冷却到 40°C 左右后, 移入到预先加入约 100mL 乙醚的分液漏斗中, 并用少量蒸馏水冲洗三角瓶。剧烈摇动分液漏斗后静止分层, 把下层液体转入第二个分液漏斗中, 用 100mL 乙醚重新提取一次, 并用蒸馏水洗至提取液至中性。经无水硫酸钠脱水后、提取液移入 250mL 容量瓶中, 加入 100mg 抗氧化剂 BHT, 待 BHT 溶解后定容至刻度, 混匀。吸取 10mL 提取液于鸡心瓶中, 在 50°C 水浴中旋转蒸发干燥, 用 2.0mL 异辛烷溶解, 低温下保存。

2. 色谱条件。色谱柱: Lichrosorb Si-60 $250\text{mm}\times 4\text{mm}$; 流动相: 含 0.4% 1,4-二噁烷的异辛烷, 流速: $1.0\sim 1.5\text{mL}/\text{min}$, 检测器: 紫外 280nm , 柱温: 室温, 纸速: $0.5\text{cm}/\text{min}$, 进样量: $20\mu\text{L}$ 。

(四) 计算

根据维生素 E 标准的保留时间定性, 根据样品的峰高或峰面积积分值定量。

注意事项: ①若蔬菜、水果等低脂肪样品, 可不经皂化, 直接提取。②若植物油等样品, 可稀释后过滤直接上机。

十五、维生素 C 含量测定 (2,6-二氯酚靛酚滴定法)

(一) 方法原理

抗坏血酸(维生素 C)具有一 $\text{C}=\text{C}$ 一基, 有还原性。它的测定方法很多, 最常用的是 2,6-二氯酚靛酚滴定法。本法的原理是: 还原型抗坏血酸能还原染料 2,6-二氯酚靛酚。该染料在酸性溶液中呈红色, 被还原后红色失去。还原性抗坏血酸还原染料后, 本身被氧化成脱氢抗坏血酸。一定量的样品提取液还原标准染料的数量与样品中所含抗坏血酸量成正比例。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。烧杯 (500mL , 100mL), 高速组织捣浆机(或研钵), 漏斗, 容量瓶 (100mL , 50mL), 三角瓶 (100mL), 微量滴定管, 吸管 (5mL , 10mL), 滤纸。

2. 试剂 2% 草酸。溶解 20g 化学纯草酸于 700mL 蒸馏水中, 稀释至 1000mL ; 1% 草酸: 将上述 2% 草酸 500mL 稀释至 1000mL ; 标准抗坏血酸溶液: 溶解 20mg 标准抗坏血酸结晶于 1% 草酸中, 稀释至 100mL , 再取 5mL 又稀释至 50mL , 标定染料; 0.02% 2,6-二氯酚靛酚 (2,6-dichlorophenol indophenol) 溶液: 溶解 50mg 2,6-二氯酚靛酚于约 200mL 含有 52mg 碳酸钠的热水中。冷后稀释至 250mL 。过滤后装于棕色瓶内, 贮于冰箱中, 每一星期标定一次, 标定方法如下: 取 5mL 标准抗坏血酸液, 加 5mL 1% 草酸, 用上述 2,6-二氯酚靛酚溶液滴定之, 至粉红色能存在 15s 为终点。所用的 2,6-二氯酚靛酚

溶液之体积相当于 0.1mg 抗坏血酸。由此求出 1mL 溶液相当于抗坏血酸多少毫克。

(三) 测定步骤

1. 提取。称 100g 样品，加 100g 2% 草酸，倒入高速捣浆机打成均匀的浆状。称出 10~30g 浆状物（使其含有抗坏血酸 1~5mg），倒入 100mL 量瓶中，并以 1% 草酸稀释至 100mL，进行过滤，弃去最初数毫升滤液。

2. 测定。以吸管吸取 5~10mL 滤液于 100mL 三角瓶内（若样品每百克中含 5mg 或低于 5mg 时，可取 20mL，立即用标定过的 2,6-二氯酚靛酚染料溶液滴定之，直到淡粉红色能存在 15s 为止。滴定开始时染料溶液须很快加入，直到红色不立即消失，而后一滴一滴加入，并不时摇动三角瓶，直到粉红色存在 15s 以上。样品中可能有其他杂质也能还原 2,6-二氯酚靛酚，但一般杂质还原该染料的速度均较抗坏血酸慢，所以终点定为粉红色存在 15s。

(四) 结果计算

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

式中 V ：滴定时所用去染料溶液的体积 (mL)； T ：1mL 染料溶液所能氧化抗坏血酸的量 (mg)； m ：滴定时所用滤液中样品的质量 (g)。

十六、维生素 C 含量测定 (电位法)

(一) 原理

果蔬及饮料中的维生素 C 通常用 2,6-二氯酚靛酚的滴定法。根据维生素 C 的氧化还原性质，从样品液由蓝色转变为粉红色来辨别其终点的到达。但是多数水果蔬菜样品其提取液都具有一定的色泽，有的即使用硅藻土也很难脱色，因此，滴定终点不易辨认。根据 2,6-二氯酚靛酚和维生素 C 具有不同的电位（2,6-二氯酚靛酚的氧化还原电位为 150mV，维生素 C 的氧化还原电位为 100mV）。利用铂和氯化银复合电极测定其电位差的变化，可准确地测定果蔬中维生素 C 的含量。本法尤其适合含色泽样品的测定。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。记录仪（上海大华仪器厂），铂银复合电极（瑞典），电磁搅拌器，烧杯（100mL），滴定管（25mL）。

2. 试剂。① 1.5% 草酸；② 标准维生素 C 液：精确称取抗坏血酸 50mg，用 5% 草酸溶解，小心转移到 250mL 容量瓶中，并加草酸稀释至刻度，最终浓度为 200 μ g/mL；③ 2,6-二氯酚靛酚溶液标定：称取 2,6-二氯酚靛酚钠盐 50mg，溶于 50mL 热水中，冷却后定容到 250mL，过滤后置于棕色瓶中。同时用新配制的标准维生素 C 标定，计算出每毫升染料溶液相当的维生素 C 毫克数。

(三) 操作步骤

1. 称取均匀磨碎的样品 5.0~10.0g，加入 5% 的草酸溶液定容至 50mL，过滤，滤液待用。

2. 将烧杯放在电磁搅拌器上，杯内放入小磁棒，记录仪与电极的插头相连接，并将

电极插入烧杯内，尽量靠近杯壁。注意磁棒和电极应保持一定距离避免接触，吸入 5~20mL 样品液于烧杯内，打开记录仪与搅拌器，并开始用 2,6-二氯酚靛酚进行滴定，观察记录仪上曲线的变化，并记录滴定结果。随着 2,6-二氯酚靛酚的滴入，记录仪上的曲线呈平缓的上升趋势，当到达终点时，电位突然升高，曲线突然升高然后很快下降，呈现尖峰形，峰的顶点即为终点。根据滴定液用量，计算样品中维生素 C 含量。

(四) 计算

$$m = \frac{V \times A}{B} \times \frac{b}{a} \times 100$$

式中 m : 100g 样品中含维生素 C 质量 (mg); V : 滴定样品所用染料体积 (mL); A : 1mL 染料相当于抗坏血酸毫克数; B : 滴定时吸取样品液体积 (mL); b : 样品稀释后体积 (mL); a : 样品质量 (g)。

十七、维生素 C 含量测定 (紫外快速测定法)

(一) 原理

维生素 C 的 2,6-二氯酚靛酚容量法，操作步骤较烦琐，而且受其他还原性物质、样品色素颜色和测定时间的影响。紫外快速测定法，是根据维生素 C 具有对紫外产生吸收和对碱不稳定的特性，于 243nm 处测定样品液与碱处理样品液两者消光值之差，通过查标准曲线，即可计算样品中维生素 C 的含量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。紫外分光光度计，离心机，分析天平等。

2. 试剂。①10%盐酸：取浓盐酸 133mL，加水稀释至 500mL。②1%盐酸：将 10%盐酸再加蒸馏水稀释 10 倍。③1mol/L 氢氧化钠溶液：称取 40gNaOH，加蒸馏水，不断搅拌至溶解，然后定容至 1000mL。

(三) 操作步骤

1. 标准曲线的制作。准确称取抗坏血酸 10mg，加 2mL10%盐酸，加蒸馏水定容至 100mL，混匀，此抗坏血酸溶液的浓度为 100 μ g/mL。取带塞刻度试管 8 支分别加入标准抗坏血酸 (100 μ g/mL) 0.1~1.0mL，均加蒸馏水至 10mL。以蒸馏水为空白，在 243nm 处测定标准系列抗坏血酸溶液的消光值，以抗坏血酸的含量 (μ g) 为横坐标，以相应的消光值为纵坐标作标准曲线。

2. 样品的测定。①样液的提取：将果蔬样品洗净、擦干、切碎、混匀。称取 5.00g 于研钵中，加入 2~5mL 1%盐酸，匀浆，转移到 25mL 容量瓶中，稀释至刻度。若提取液澄清透明，则可直接取样测定，若有浑浊现象，可通过离心 (10000g, 10min) 来消除。②样液的测定：取 0.1~0.2mL 提取液，放入盛有 0.2~0.4mL 10%盐酸的 10mL 容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度后摇匀。以蒸馏水为空白，在 243nm 处测定其消光值。③待测碱处理样液的测定：分别吸取 0.1~0.2mL 提取液、2mL 蒸馏水和 0.6~0.8mL 1mol/L 氢氧化钠溶液依次放入 10mL 容量瓶中，混匀，15min 后加入 0.6~0.8mL 10%盐酸，混匀，并定容至刻度。以蒸馏水为空白，在 243nm 处测定其消光值。

(四) 结果计算

由待测样品与待测碱处理样品的消光值之差查标准曲线,即可计算出样品中维生素C的含量。也可直接以待测碱处理液为空白,测出待测液的消光值,通过查标准曲线,计算出样品的维生素C的含量。

$$\text{维生素C的含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{m \times V_{\text{总}}}{V_1 \times m_{\text{总}}}$$

式中 m : 从标准曲线上查得的抗坏血酸的含量 (μg); V_1 : 测消光值时吸取样品溶液的体积 (mL); $V_{\text{总}}$: 样品定容体积 (mL); $m_{\text{总}}$: 称样质量 (g)。

十八、总抗坏血酸含量测定 (荧光法)

(一) 方法原理

样品中的还原性抗坏血酸经活性炭处理氧化为脱氢抗坏血酸,然后与邻苯二胺反应生成有荧光的喹啉 (Quinoxaline)。荧光的强度与脱氢抗坏血酸的浓度成正比。测定时应用荧光计的激发波长为 350nm,发射波长为 430nm。

食物中的有些成分如丙酮酸与邻苯二胺也能形成荧光物质而造成干扰。脱氢抗坏血酸与硼酸形成复合物后就不能与邻苯二胺产生荧光物质。利用上述反应特点,可在样品中先加入硼酸,然后再加入邻苯二胺,即可作为空白来校正干扰物质所产生的荧光。此法具有较强的专一性。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。荧光分光光度计,具塞三角瓶 (100mL),容量瓶,具塞试管。

2. 试剂。①偏磷酸-醋酸溶液:称取 15g 偏磷酸 (HPO_3) 溶于 40mL 冰醋酸中,加蒸馏水定容至 500mL。②偏磷酸-醋酸-硫酸溶液:称取 30g 偏磷酸,溶于 80mL 冰醋酸中,加入 0.06mol/L 硫酸定容至 1000mL。③50%醋酸钠溶液。④硼酸-醋酸钠溶液:3.0g 硼酸溶于 100mL 50%醋酸钠溶液中,临用前配制。⑤邻苯二胺溶液:20mg 邻苯二胺溶于 100mL 蒸馏水中,用前配制。⑥抗坏血酸标准溶液:准确称取 50mg 抗坏血酸,用偏磷酸-醋酸溶液溶解并定容至 50mL,其含量为 1mg/mL。吸取 5mL,置 50mL 容量瓶中,加入偏磷酸-醋酸溶液定容,其含量为 100 μg /mL。临用前配制。⑦百里酚蓝指示剂:称取 0.100g 百里酚蓝,溶于 10.75mL 0.02mol/L 氢氧化钠中,加蒸馏水至 200mL (变色范围: pH2 时显红色, pH2.8 时显黄色, pH4 以上显蓝色)。⑧0.02mol/L 氢氧化钠溶液。⑨10% 盐酸溶液。⑩活性炭的加工处理,取 100g 活性炭溶于 500mL 10% 的盐酸中,加热至沸腾,过滤,用蒸馏水洗涤至无氯离子为止 (以亚铁氰化钾检查)。

(三) 操作步骤

1. 样品处理:称取样品 3.00~5.00g 置研钵中,加入适量的偏磷酸-醋酸溶液,研磨成匀浆,过滤至 100mL 容量瓶中,用少量偏磷酸-醋酸液洗涤研钵及滤纸数次,加入 1 滴百里酚蓝指示剂,如溶液变黄或蓝色,加偏磷酸-醋酸-硫酸至溶液变红色,再用偏磷酸-醋酸定容至刻度。取 2 个 100mL 三角瓶,各加入 1g 活性炭,分别加入 50mL 抗坏血酸应用液 (100 μg /mL) 和 50mL 样品提取液,剧烈振荡 3min,过滤。

2. 样品测定: 取四个 100mL 容量瓶, 分别标为“标准”、“标准空白”、“样品”、“样品空白”, 各加入上述滤液 5mL, 然后向“标准空白”和“样品空白”中各加入 5mL 硼酸-醋酸钠溶液, 15min 后加蒸馏水定容。向“标准”和“样品”中各加入 5mL 醋酸钠溶液, 用蒸馏水定容。取四支试管, 分别加入上述四种溶液 2mL, 在避光或暗室中, 立即向各管加入 5mL 邻苯二胺, 摇匀后放置 35min。

调节荧光计激发波长为 350nm, 荧光波长为 430nm, 测定各管荧光值。

(四) 计算

$$\text{总抗坏血酸 (mg/100g)} = \frac{A-B}{D-E} \times C \times \frac{V}{m \times 1000} \times 100$$

式中 A: “样品”荧光值; B: “样品空白”荧光值; D: “标准”荧光值; E: “标准空白”荧光值; C: 抗坏血酸标准液浓度 ($\mu\text{g/mL}$); V: 提取液的体积 (mL); m: 样品质量 (g)。

邻苯二胺加入后, 如不避光会影响结果。样品提取液中抗坏血酸浓度为 $100\mu\text{g/mL}$ 左右, 应根据此浓度酌情取样。

十九、维生素 C 含量测定 (HPLC 法)

(一) 原理

新鲜蔬菜、水果、饮料中的维生素 C 经 0.1% 草酸溶液迅速提取后, 在反相色谱柱上分离定量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪, 紫外检测器, 积分仪等。
2. 试剂。0.1% 草酸; 标准溶液配制: 精确称取维生素 C 标样 2mg 于 50mL 容量瓶中, 用 0.1% 草酸溶解定容, 摇匀备用。

(三) 操作步骤

1. 样品处理。①液体样品: 取原液 5mL 于 25mL 容量瓶中, 用 0.1% 草酸定容, 摇匀后经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后待测。②固体样品: 称 1g 于研钵中用 5mL 0.1% 草酸迅速研磨, 过滤, 残渣用 0.1% 草酸洗涤、过滤, 合并滤液于 25mL 容量瓶中, 蒸馏水定容, 摇匀后经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 清液待测。

2. 测定。取 $5\mu\text{L}$ 标准溶液进行色谱分析, 重复进样三次, 取标样峰面积平均值, 然后在相同条件下, 取 $5\mu\text{L}$ 样品液进行分析, 以相应峰面积计算含量。

3. 色谱条件。色谱柱: $\mu\text{-Bondapak C-18}$ (直径 $3.9\text{mm} \times 300\text{mm}$); 流动相: 0.1% $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$; 流速: 1.0mL/min ; 检测器: 紫外 254nm; 进样量: $5\mu\text{L}$ 。

(四) 结果计算

$$\text{外标法定量 } m = \frac{m_1 \times A_2 \times V_2 \times 100}{m_2 \times A_1 \times V_1}$$

式中 m : 100g (mL) 样品中维生素 C 含量 (mg); m_1 : 标样进样体积中维生素 C 含量 (μg); m_2 : 样品称样质量 (g 或 mL); A_1 : 标样峰面积平均值; A_2 : 样品峰面积;

V_1 : 样品进样质量 (μL); V_2 : 样品定容体积 (mL)。

维生素 C 极易分解, 样品提取后应立即分析; 分析过程中应用新配维生素 C 标样校正。

二十、分光光度法测定微量硒含量

(一) 方法原理

硼氢化钾在酸性溶液中 (1.5~4.0mol/L 盐酸浓度) 使硒 (IV) 还原成 H_2Se 挥发分离出来, 用邻菲罗啉铁 (III) 溶液吸收。 H_2Se 再还原邻菲罗啉铁生成橙红色邻菲罗啉亚铁, 其颜色深度与硒的浓度在一定范围内符合比尔定律。用氢化物分离—邻菲罗啉铁分光光度法测定微量硒含量的方法, 操作较简便, 干扰离子少, 相对误差在 1% 以下, 最低检出限为 0.2 μg 。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g), 721 型分光光度计 (或其他分光光度计), 氢化物发生及吸收装置, 其中 U 型玻璃吸收管为北京宣武区玻璃仪器厂生产, 凯氏消化瓶 (50mL), 砂浴或控温电炉。

2. 试剂。① 硒标准溶液: 将光谱纯硒溶于少量硝酸中, 加水配成 1.00mg/mL 硒贮备液, 使用时用 0.05mol/L H_2SO_4 稀释成 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硒的标准液。② 硼氢化钾溶液 (3%): 将硼氢化钾 3g 溶于 100mL 0.5% KOH 的水溶液, 滤去不溶物, 贮于聚乙烯瓶中。③ 硒化氢吸收液: 在 50mL 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH4) 中, 加入 75mL 0.2% 邻菲罗啉水溶液及 5mL 含 Fe^{+++} 2mg/mL 的硫酸铁铵水溶液, 加蒸馏水至 500mL。④ pH4 的醋酸-醋酸钠缓冲液: 0.2mol/L NaAC 18mL 与 0.2mol/L HAC 82mL 混合即成。⑤ 200g/L 亚铁氰化钾溶液。⑥ 5mol/L HCl 溶液。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线制备。取 0~10 μg 硒 (IV) 标准液, 依次加到氢化物发生及吸收装置的反应瓶中, 均加 5mol/L 盐酸 15mL, 以蒸馏水补充至 30mL。在 U 型玻璃吸收管中装入 7.0mL 吸收液, 按图 6-1 连接好装置, 在筒形加液漏斗中加入 KBH_4 溶液 20mL, 盖好塞子, 通氮气 (或用给气球打气) 加压, 缓缓开启活塞, 让 KBH_4 溶液在 3.5~4min 内全部加到反应瓶中, 控制加入速度以保持吸收液气泡升至吸收管半球部为宜。加完后, 鼓气约 1min, 有助于将可能残存的 H_2Se 自反应液中带出。吸收完后, 于 25 $^\circ\text{C}$ 室温下放置 15min, 颜色可达稳定, 在 508nm 下测定吸收液的光密度。以光密度为纵坐标, 相应硒含量为横坐标制备工作曲线。

2. 样品液制备及硒的测定。称取 1~2g 粉碎样品, 放入 50mL 凯氏消化瓶中, 加硝酸-硫酸 (2:1) 10mL, 在砂浴或电炉上消化至溶液呈现亮绿色, 冷却, 转移到 50mL 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 混匀。取样品液 5~10mL (依硒含量而异) 置于反应瓶中, 加

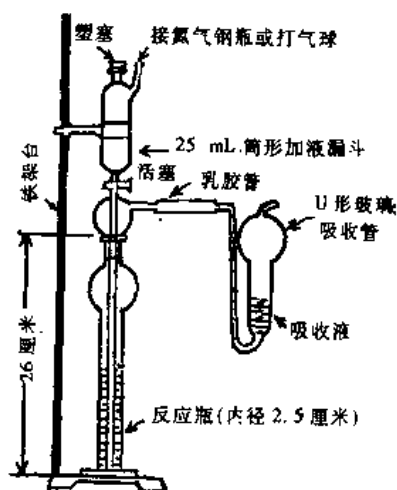


图 6-1 氢化物发生及吸收装置

1mL 200g/L 亚铁氰化钾溶液及 15mL 5mol/L 盐酸, 加蒸馏水至 30mL, 接好发生装置, 通气 3~4min 后, 再接上吸收管, 从筒形加液漏斗中加入 KBH_4 溶液 20mL, 按制备标准曲线操作, 盖上塞子, (通氮气/或用给气球打气) 加压, 缓缓开启活塞, 把 KBH_4 溶液加入反应瓶中, 加完后, 鼓气约 1min, 15min 后在 508nm 下, 以试剂空白作参比测定样品液光密度。查标准曲线即可计算出样品中硒含量。

(四) 结果计算

$$Y = \frac{A \times 50}{V \times m} \times 100$$

式中 Y: 样品中硒含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$); A: 查标准曲线得样品测定液中硒量 (μg); V: 用于测定的样品液体积 (mL); m: 样品质量 (g)。

注意事项: ①精细地消化样品是准确测定微量硒的关键所在, 若消化不到终点则结果偏高, 加热时间过长, 或温度太高又会造成硒的逸失 (温度控制在 100°C 左右)。一般以溶液呈现亮绿色为宜。②大部分离子不干扰硒的测定, Cu^{2+} 和大于 $1000\mu\text{gFe}^{3+}$ 的干扰可直接在反应瓶中加入 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液, 使它们生成沉淀而掩蔽; Ag^+ 可以在处理样品时加入 NaCl 溶液使之沉淀, 过滤除去, I^- 、 S^{2-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 SCN^- 有较严重干扰, 但可在样品消化处理时除去, 反应液中存在硝酸、硫酸时不干扰硒的测定。③反应液中 KBH_4 量在 0.4~0.7g 时, 吸收值有较稳定的最高值。吸收完后, 于 25°C 室温下放置 15min 颜色达到稳定, 24h 不变。

二十一、分光光度法测定有机锗含量

(一) 分析原理

用混酸 (发烟硝酸+浓硫酸) 回流消化, 或用于灰化法 ($600\sim 650^\circ\text{C}$ 灰化完全) 灰化样品, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 共沉淀富集锗, 苯基荧光酮-溴化十六烷基三甲胺 (CTMAB) 胶束增溶分光光度法测定锗含量。本法灵敏度高, 检出限为 $198\text{ng}/\text{g}$, 方法操作简便, 精密度好。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。751 紫外可见分光光度计 (或其他型号), 酸度计, 磁力搅拌器, 样品消化装置, 玻璃设备等。

2. 试剂。① $9\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 , $1.5\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 , $9\text{mol}/\text{L}$ HCl , 3.8% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, H_2O_2 , CCl_4 , 发烟硝酸, H_2SO_4 等试剂 (A. R.), GeO_2 (光谱纯), 苯基荧光酮 (CTMAB, A. R.)。② 0.03% 苯基荧光酮 (CTMAB): 称 0.03g 溶于 50mL 无水乙醇中, 加 5mL $1.5\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 1mL , 再加去离子水定容至 100mL 。③ 0.9% CTMAB: 0.9g CTMAB 溶于去离子水中, 加 $9\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 1mL , 再加去离子水定容至 100mL 。

(三) 测定步骤

1. 样品液的制备。称取粉碎样品 3.0g , 置 250mL 圆底消化瓶中, 加混酸 (5mL 浓硫酸, 15mL 发烟硝酸) 小火回流消化至不冒 NO_2 烟雾, 消化液呈淡黄色, 如试样难消化, 可补加发烟硝酸 $3\sim 5\text{mL}$ 继续消化。将消化液冷至室温, 加 5mL H_2O_2 (30%), 小火加热, 反应完毕后, 即消化液呈透明无色, 冷至室温。完全转移至烧杯中, 于冰浴中, 滴

加饱和 NaOH 中和至 pH2~4, 加 10mL 3.8% Fe₂(SO₄)₃ 于中和液中, 在 pH 计控制磁力搅拌下, 用稀 NaOH 溶液调 pH 至 7.5, 此时铁与锆一起共沉淀, 继续搅拌 5min 使沉淀完全, 2000r/min 离心 10min, 弃上清液得共沉淀物。将沉淀物用少量 3mol/L HCl 溶解, 并完全转移至 125mL 分液漏斗中, 加浓 HCl 使 HCl 浓度为 9mol/L, 充分摇匀后用 10mL CCl₄ 萃取 2 次, 合并 CCl₄ 层萃取液, 以 9mol/L HCl 洗涤, 除掉上层洗液。准确移取 10.0mL 去离子水于 CCl₄ 层中进行反萃取。

2. 工作曲线制备。精确称取 0.1400g GeO₂ (光谱纯, 称前于 110℃ 干燥 2h), 制备成 5μg/mL 的锆标准液。准确称取不同量标准液 (0~0.5μg/mL), 于 10mL 试管中, 均加去离子水至 5mL, 加 0.03% 苯基荧光酮 2mL, 0.9% CTMAB 1.5mL, 9mol/L H₂SO₄ 1mL, 混匀, 补加去离子水至刻度。放置 10min 后于 514nm 测定吸光度。以锆的不同浓度与对应的吸光度制作工作曲线。

3. 样品液测定。精确吸取 5mL 水层萃取液放入 10mL 具塞试管中, 同工作曲线操作加苯基荧光酮, CTMAB, H₂SO₄ 及测定吸光度。

(四) 结果计算

由工作曲线查得样品液中锆含量 (μg/mL)

$$\text{样品中锆含量 } (\mu\text{g/g}) = \frac{\rho \times V}{m}$$

式中 m : 样品质量 (g); ρ : 查工作曲线得样品液中锆含量 (μg/mL); V : 样品液体积 (mL)。

二十二、茶多酚含量测定 (高锰酸钾直接滴定法)

(一) 方法原理

茶叶茶多酚易溶于热水中, 在用靛红作指示剂的情况下, 样液中能被高锰酸钾氧化的物质基本上都属于茶多酚类物质。根据消耗 1mL 0.318g/100mL 的高锰酸钾相当于 5.82mg 茶多酚的换算常数, 计算出茶多酚的含量。

(二) 主要设备和试剂

1. 仪器。分析天平, 电热水浴锅, 真空泵, 电动搅拌机, 250mL 抽滤瓶 (附 65mm 细孔漏斗), 500mL 有柄白瓷皿, 100mL 容量瓶, 200mL 三角烧瓶, 5mL 胖肚吸管等。

2. 试剂。①0.1% 靛红溶液: 称取靛红 (G.R.) 1g 加入少量水搅匀后, 再慢慢加入相对密度 1.84 的浓硫酸 50mL, 冷后用蒸馏水稀释至 1000mL。如果靛红不纯, 滴定终点将会不敏锐, 可用下法碘化处理: 称取靛红 1g, 加浓硫酸 50mL, 在 80℃ 烘箱或水浴中碘化 4~6h, 用蒸馏水定容至 1000mL, 过滤后贮存于棕色试剂瓶中。②0.630% 草酸溶液: 准确称取草酸 (H₂C₂O₄ · 2H₂O) 6.3034g, 用蒸馏水溶解后定容至 1000mL。③0.127% 高锰酸钾溶液的配制及标定: 称取 AR 的 KMnO₄ 1.27g, 用蒸馏水溶解后定容至 1000mL, 按下面方法标定。

准确吸取 0.630% 草酸 10mL 放在 250mL 三角瓶中 (重复 2 份), 加入蒸馏水 50mL, 再加入浓硫酸 (相对密度 1.84) 10mL, 摇匀, 在 70~80℃ 水浴中保温 5min, 取出后用

已配好的高锰酸钾溶液进行滴定。开始慢滴，待红色消失后再滴第 2 滴，以后可逐渐加快，边滴边摇动，待溶液出现淡红色保持 1min 不变即为终点（约需 25mL 左右）。按下式计算高锰酸钾的当量数。（1mL 0.630% 草酸消耗 2.5mL 0.127% 高锰酸钾）

$$10 \times 0.630\% = \text{耗用 KMnO}_4 \text{ 毫升数} \times w$$

$$w (\text{KMnO}_4 \text{ 浓度, \%}) = \frac{10 \times 0.63}{\text{KMnO}_4 \text{ 毫升数}}$$

（三）实验步骤

1. 供试液的制备。准确称取茶叶磨碎样品 1g，放在 200mL 三角烧瓶中，加入沸蒸馏水 80mL，在沸水浴中浸提 30min，然后过滤、洗涤，滤液倒入 100mL 容量瓶中，冷至室温，最后用蒸馏水定容至 100mL 刻度，摇匀，即为供试液。

2. 测定。取 200mL 蒸馏水放在有柄瓷皿中，加入 0.1% 靛红溶液 5mL，再加入供试液 5mL。开动搅拌器，用已标定的 KMnO_4 溶液进行边搅拌边滴定，滴定速度不宜太快，一般以 1s1 滴为宜，接近滴定终点时再应慢滴。滴定溶液由深蓝色转变为亮黄色为止，记下消耗高锰酸钾的毫升数为 A 值。为避免视觉误差，应重复二次滴定取其平均值，然后用蒸馏水代替试液，做靛红空白滴定，所耗用高锰酸钾的毫升数为 B 值，按下式计算茶多酚含量。

$$\text{茶多酚含量 (\%)} = \frac{(A-B) \times \frac{w}{0.318} \times 0.00582}{m \times \frac{V}{T}} \times 100$$

式中 B：空白液消耗 KMnO_4 量 (mL)；A：样品深消耗 KMnO_4 量 (mL)；w： KMnO_4 浓度 (%)；m：样品质量 (g)；V：吸取样品液量 (mL)；T：提取样品液量 (mL)。

注意事项：①配制好的高锰酸钾溶液必须避光保存，使用前需重新标定。一般情况下，一星期标定一次。②滴定终点的掌握上以出现亮黄色为止，溶液颜色的变化是由蓝变绿，由绿逐渐变黄。在观察时，以绿色的感觉消失开始出现亮黄为终点。红茶的终点颜色稍深（土黄色），绿茶的终点颜色稍浅（浅黄色）。③制备好的供试液不宜久放，否则引起茶多酚自动氧化，测定数值将会偏低。

二十三、多酚类含量测定（酒石酸铁比色法）

（一）方法原理

根据酒石酸铁能与茶多酚生成紫褐色络合物。络合物溶液颜色的深浅与茶多酚的含量成正比，因此可以用比色方法测定。该法可避免高锰酸钾滴定法所产生的人为视觉误差。在一定的操作条件下，光密度为 1.00 时，供试液中茶多酚浓度为 7.826mg/mL。

（二）设备和试剂

1. 设备。水浴，分光光度计，三角烧瓶，容量瓶，吸管，滴瓶等。

2. 试剂。①酒石酸铁溶液：称取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g，含 4 个结晶水的酒石酸钾钠 5g，加蒸馏水溶解后，用蒸馏水稀释至 1000mL。②pH7.5 的磷酸缓冲液：60.2g Na_2HPO_4 ·

12H₂O, 5.00g NaH₂PO₄·2H₂O, 加蒸馏水溶解后, 用蒸馏水稀释至 1000mL。

(三) 实验步骤

1. 供试液的制备方法。准确称取茶叶磨碎样品 1g, 放在 200mL 三角烧瓶中, 加入沸水 80mL, 在沸水浴中浸提 30min, 然后过滤、洗涤, 滤液倒入 100mL 容量瓶中, 冷至室温, 最后用蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 即为供试液。

2. 测定。吸取供试液 1mL 放在 25mL 容量瓶中, 加蒸馏水 4mL, 加酒石酸铁溶液 5mL, 摇匀, 再加入 pH7.5 磷酸缓冲液稀释至刻度, 以蒸馏水代替供试液加入同样的试剂作空白。选择 540nm 波长和 0.5cm 的比色杯测定光密度。

(四) 结果计算

按下式计算茶多酚含量。

$$\text{茶多酚含量 (\%)} = \frac{A \times 7.826}{1000} \times \frac{T}{V \times m} \times 100$$

式中 A: 样液的光密度值; T: 供试液总量 (mL); V: 吸取的试液量 (mL); m: 样品质量 (g)。

注意事项: ①磷酸缓冲液在常温下容易生长霉菌, 以冷藏为宜。②酒石酸铁与茶多酚反应时, 因连苯酚比邻苯酚显色强, 所以没食子酸酯类儿茶素显色深, 凡是此类儿茶素含量比例大的, 显色就较深。因此酒石酸铁比色法与高锰酸钾滴定法两者测定的结果有时会有所出入。

二十四、儿茶素含量测定 (香荚兰素比色法)

(一) 方法原理

儿茶素和香荚兰素在强酸性条件下生成橘红到紫红色的产物, 红色的深浅和儿茶素的量呈一定的比例关系。该反应不受花青甙和黄酮甙的干扰, 在某种程度上可以说, 香荚兰素是儿茶素的特异显色剂, 而且显色灵敏度高, 最低检出量可达 0.5μg。

(二) 主要设备和试剂

1. 设备。10μL 或 50μL 的微量注射器, 10~15mL 具塞刻度试管, 分光光度计。

2. 试剂。95%乙醇 (A.R.), 盐酸 (G.R.), 1%香荚兰素盐酸溶液: 1g 香荚兰素溶于 100mL 浓盐酸 (G.R.) 中, 配制好的溶液呈淡黄色, 如发现变红、变蓝绿色者均属变质不宜采用。该试剂配好后置冰箱中可用 1 天, 不耐贮存, 宜随配随用。

(三) 测定步骤

称取 1.00g~5.00g 磨碎干样 (一般绿茶用 1.00g, 红茶用 2.00g) 加 95%乙醇 20mL, 在水浴上提取 30min, 提取过程中要保持乙醇的微沸, 提取完毕进行过滤。滤液冷后加 95%乙醇定容至 25mL 为供试液。

吸取 10μL 或 20μL 供试液, 加入装有 1mL 95%乙醇的刻度试管中, 摇匀, 再加入 1%香荚兰素盐酸溶液 5mL, 加塞后摇匀显出红色, 放置 40min 后, 立即进行比色测定消光度 (E), 另以 1mL 95%乙醇加香荚兰素盐酸溶液作为空白对照。比色测定时, 选用 500nm 波长, 0.5cm 比色杯 (如用 1cm 比色杯进行测定, 必须将测得的消光度除以 2, 折算成相

当于 0.5cm 比色杯的测定值, 才能进行计算含量)。

(四) 结果计算

当测定消光值等于 1.00 时, 被测液的儿茶素含量为 145.68 μ g, 因此测得的任一消光度只要乘以 145.68, 即得被测液中儿茶素的微克数。按下式计算儿茶素总含量。

$$\text{儿茶素总量 (mg/g)} = \frac{E \times 145.68}{1000} \times \frac{V_{\text{总}}}{V \times m}$$

式中 E : 样品光密度; $V_{\text{总}}$: 样品总溶液量 (mL); V : 吸取的样液量 (mL); m : 样品质量 (g)。

二十五、茶儿茶素的分离与测定 (纸层析法)

(一) 方法原理

儿茶素是茶多酚的主体物质, 茶叶中常见的有六种, 即: l -表没食子儿茶素 (l -EGC), d,l -没食子儿茶素 (d,l -GC), l -表儿茶素 (l -EC), d,l -儿茶素 (d,l -C), l -表儿茶素没食子酸酯 (l -ECG), l -表没食子儿茶素没食子酸酯 (l -EGCG)。儿茶素经纸层析法分离, 纸谱上的各种儿茶素可以通过纯品对照、显色反应以及 R_F 值的测定等方法加以鉴定。纸上层析分离出的茶儿茶素, 可用热水洗脱与特定的试剂显色进行比色定量。

(二) 设备和试剂

1. 设备。回流提取器, 层析滤纸 (中速), 20 μ L 微量点样器, 电吹风, 电风扇, 干燥箱, 水浴, 直径 24cm 的真空干燥器, 玻璃喷雾器, 254 紫外分析仪, 10~15mL 具塞刻度离心试管, 分光光度计等。

2. 试剂。①95%乙醇, 冰醋酸, 正丁醇, ②1.75%盐酸: 39.8mL 相对密度为 1.19 的浓盐酸加蒸馏水稀释至 1000mL, ③0.5%磺胺酸的稀盐酸溶液: 5.00g 磺胺酸 (磺胺酸又名对氨基苯磺酸) 溶于 1000mL 1.75% 盐酸中, ④0.5%亚硝酸钠: 5.00g 亚硝酸钠加蒸馏水溶解后定容至 1000mL, ⑤重氮化磺胺酸溶液: 0.5%磺胺酸的稀盐酸溶液与等量的 0.5%亚硝酸钠溶液混合, 该试剂混合后不耐贮存, 宜随配随用, ⑥稀释的重氮化磺胺酸溶液: 将 1 份重氮化磺胺酸溶液加 5 份蒸馏水稀释 (宜随配随用), ⑦0.2%醋酸钠: 20g 无水醋酸钠, 加蒸馏水溶解后, 定容至 1000mL, ⑧重氮化磺胺酸的醋酸钠溶液 (定量显色剂): 1 份重氮化磺胺酸溶液加 2.5 份 2%醋酸钠溶液混和均匀, 该试剂不耐存放, 宜随配随用, ⑨层析溶剂: 400mL 正丁醇, 加 100mL 冰醋酸, 加 500mL 蒸馏水, 混匀。

(三) 测定步骤

1. 供试液制备。称取磨碎干样 1.0g, 置 100mL 三角烧瓶中, 加入 95%乙醇 20mL, 连装冷凝管, 于水浴上 (使乙醇达微沸程度) 提取 30min, 然后过滤, 滤液放在 25mL 容量瓶中, 冷后用 95%乙醇定容至 25mL。

2. 滤纸的准备与点样。大张层析滤纸, 裁成直径 23cm 的圆形, 在滤纸中央用铅笔画直径 5cm 的圆圈, 在圆圈上等分为八、九个分格, 每个分格上点一个样点。用微量吸管吸取供试液 20 μ L, 点样时不断用冷风吹干后再点, 要求点得圆而小, 一般要求样点大小的直径达 0.5cm 左右为好, 在纸圆心处用刀片划破一狭窄缝, 缝长 1cm 左右, 然后插入

7cm×0.6cm 左右的双层滤纸条作“灯芯”。

除圆形纸谱外,也可采用长条形纸谱。用长 25cm 左右的层析滤纸,在离纸边 2.5cm 左右处点上样品试液,多个样品比较时,可每隔 3~4cm 左右点一个样点,平行排列,纸宽随样品多少而定,点样完毕进行垂直下行或上行层析。

3. 层析。进行圆形水平层析,用 24cm 的真空干燥器作为层析缸。干燥器内装入一些饱和层析溶剂的水溶液,另放入 1 只烧杯,杯内加入层析剂。将点样过的纸谱搁于干燥器的横隔上,让“灯芯”悬浸于层析剂中,盖好干燥器盖,层析 6h 左右,溶剂前沿达离纸边 0.5~1cm 时,取出纸谱挂在晾干架上,室温下晾干或吹干。

4. 纸谱上儿茶素斑点的检出和鉴定。作为定性试验的纸谱,可用下列方法显色定性。
①香荚兰素显色法:干燥的纸谱上,喷 1% 香荚兰素浓盐酸溶液,儿茶素斑点立即显出红色,没食子酸酯类儿茶素显示紫红色,其他儿茶素显出橘红色,随着盐酸的挥发,红色渐渐退去。
②苦味酸显色法:干燥的纸谱上先喷 1% 的 2,4,6-三硝基苯酚(即苦味酸)95% 乙醇溶液,等晾干后,再喷 5% 的氢氧化钾 80% 乙醇溶液,KOH 喷上 30s 后,有稳定的红色斑点出现。
③硝酸银显色法:干燥纸谱上喷 1% AgNO₃ 氨溶液,各个儿茶素斑点立即显出黑褐色,充分显色后挂在 80℃ 干燥箱中干燥。干燥后浸入 25% 硫代硫酸钠溶液中处理 1~2min,以除去多余的 AgNO₃,后用自来水和蒸馏水冲洗干净,再入烘箱干燥后,即可永久保存。一般的茶叶每个样点能分离出 5 个斑点,每个斑点的鉴定是通过 RF 值的测定来确定的。在上述层析条件下,各种儿茶素的 RF 值如下:

儿茶素	<i>l</i> -EGC	<i>d,l</i> -GC	<i>l</i> -EC+D, <i>l</i> -C	<i>l</i> -EGCG	<i>l</i> -ECG
Rf	0.43	0.51	0.61	0.73	0.85

5. 剪洗与定量。层析后未经显色的干燥纸谱,在暗室中置于紫外线分析灯下显出色层,各儿茶素斑点的荧光呈蓝紫色,可用铅笔描下各斑点的轮廓,(或喷以少量稀释的重氮化磺胺酸溶液做初步显色,儿茶素斑点显淡黄色)。然后剪下各儿茶素斑点,并剪成小碎片,分别放在刻度试管中,加入 10mL 热水洗脱儿茶素,稍微放冷后(使水温大约冷至 35~40℃),加入 0.35mL 定量显色剂(即重氮化磺胺酸的醋酸钠溶液),放在 35℃ 恒温箱中,保温 30min,显现稳定的黄色。选用 420nm 1cm 比色杯,以蒸馏水加同样的显色剂作空白对照,比色测定光密度。各种儿茶素测得的光密度数值乘以实验求得的换算常数(由实验制订的定量标准曲线查得),光密度等于 1.00 时各种儿茶素的微克数(即换算常数)如下:*l*-EGC 55.5μg;*d,l*-GC 60.0μg;*l*-EC+D,*l*-C 58.5μg;*l*-EGCG 86.0μg;*l*-ECG 72.0μg。实际测定样品计算含量时,还需乘以 1.30(补足 30%的损失率)。

(四) 结果计算

按下式计算含量。

$$\text{儿茶素含量 (mg/g)} = \frac{E \times K \times R}{1000} \times \frac{V_{\text{总}}}{V \times m}$$

式中 E : 光密度值; K : 换算常数; R : 损失率 (1.30); $V_{\text{总}}$: 供试液总量 (mL); V : 点样量 (mL); m : 样品质量 (g)。

注意事项：①纸层析是一项微量分离技术，层析滤纸必须始终保持清洁，防止污染，以保证分析的准确性。②提取制备好的供试液，如不及时点样，必须放在冰箱中低温保存。但从冰箱中取出后往往发现有絮状沉淀产生，这时必须用温水使其温热，等沉淀物消失摇匀后才能吸取试液进行点样，否则测定结果将会偏低。

二十六、儿茶素的分离与测定 (HPLC 法)

(一) 分析原理

采用固定相为 μ Bondapak C-18，流动相为乙酸-甲醇-*N,N*-二甲基甲酰胺-水的反相色谱系统，进行梯度洗脱，儿茶素组分能得到很好分离和定量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪，减压蒸馏装置等。
2. 试剂。(1) 丙酮、正戊烷、三氯甲烷、95% 乙醇、甲醇、乙酸、*N,N*-二甲基甲酰胺等，所有试剂均为分析纯。(2) 标准溶液的配制：准确称取 5 种儿茶素组分标样（由日本三井农林株式会社食品综合研究所提供）各 0.010g 于同一 10mL 棕色容量瓶中，用 95% 的乙醇定容至刻度，此溶液用纯水经不同程度稀释后制作标准曲线。

(三) 操作步骤

1. 样品处理过程。准确称取 1.000g 茶样于烧杯中，加 80% 的丙酮水溶液 90mL 浸泡 24h，过滤，滤液用 80% 的丙酮水溶液定容至 100mL。取该溶液 50mL 于 250mL 分液漏斗中，加入 50mL 正戊烷，振摇萃取，弃去上层正戊烷，下层液加 50mL 氯仿，振摇萃取后弃去下层氯仿。上层溶液减压蒸发除去丙酮后用水定容至 25mL，离心后取上清液 30 μ L 注入 HPLC 仪，用外标法测定儿茶素组分的含量。

2. 色谱条件。色谱柱： μ Bondapak C-18 3.9mm i. d. \times 300mm，流动相：乙酸-甲醇-*N,N*-二甲基甲酰胺-水 = 2 : 3 : 35 : 160，流量梯度洗脱：0~16min 为 1.5mL/min，16min 以后逐渐增至 2mL/min，检测波长：280nm。

(四) 结果计算

色谱分析时间为 46min。5 种儿茶素按 *l*-EGC (*l*-(-)-表没食子儿茶素)、*d*-C (*d*-(+)-儿茶素)、*l*-EC (*l*-(-)-表儿茶素)、*l*-EGCG (*l*-(-)-表没食子基儿茶素没食子酸酯)、*l*-ECG [*l*-(-)-表儿茶表没食子酸酯] 的顺序出峰。见图 6-2。

注意事项：茶样经 80% 的丙酮水溶液浸泡 24h 后，除儿茶素外，叶绿素、咖啡碱等皆被提取。这些物质的存在对儿茶素的检出会有干扰。加正戊烷萃取时，可除去叶绿素的干扰；加氯仿萃取时，可除去咖啡碱的干扰。

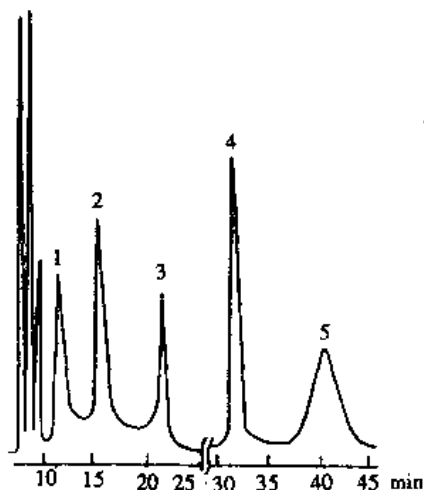


图 6-2 茶样分析色谱图

1—*l*-EGC 2—*d*-C 3—*l*-EC
4—*l*-EGCG 5—*l*-ECG

二十七、黄酮类化合物总量的测定（氯化铝比色法）

（一）方法原理

黄酮类化合物包括黄酮甙和黄酮醇甙两大部分。三氯化铝与黄酮类化合物作用后，生成黄酮的铝络合物，为黄色。黄色的深浅与黄酮含量呈一定比例关系，可作定量。

（二）主要设备和试剂

1. 设备。分光光度计，水浴等。

2. 试剂。1%三氯化铝：称取 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.7567g，加蒸馏水溶解后，定容至 100mL。

（三）测定步骤

1. 0.0g 茶叶磨碎干样，加沸蒸馏水 40mL，置沸水浴中提取 30min，过滤，滤液加蒸馏水定容至 50mL，摇匀为供试液。吸取供试液 0.5mL，加 1% AlCl_3 蒸馏水溶液至 10mL，摇匀，10min 后比色。用 721 型分光光度计，以 1cm 比色杯 420nm 波长，1% AlCl_3 溶液为空白，测定消光值 (E)。

（四）计算

根据消光值等于 1.00 时，相当于 $320\mu\text{g}$ 黄酮甙计算含量。

$$\text{黄酮甙 (mg/g)} = \frac{E \times 320}{1000} \times \frac{V_{\text{总}}}{V \times m}$$

式中 E：样品光密度； $V_{\text{总}}$ ：样品总溶液量 (mL)；V：吸取的样液量 (mL)；m：样品质量 (g)。

二十八、芦丁含量测定（HPLC 法）

（一）方法原理

样品液经反相液相色谱分离，紫外检测器测定峰面积，用芦丁进行定量测定。

（二）仪器和试剂

1. 仪器。LC-3A 高效液相色谱仪 (Shimadzu, 日本岛津), C-R1B 色谱处理仪, UVD-2 紫外检测器。

2. 试剂。甲醇，乙酸钠，磷酸，芦丁 (Rutin, 美国 Sigma 公司)。

（三）操作步骤

1. 样品提取液的制备。样品粉碎，过 40 目筛，称取 0.2~2g 碎样（对脂肪含量高的样品先用乙醚脱脂）置于 50mL 容量瓶中，加入 40mL 甲醇，在 50℃ 的水浴锅中提取 5h，提取过程中每隔 30min 振摇一次，然后定容至 100mL。

2. 色谱分离条件。固定相：Lichrosorp RP18 填料 ($7\mu\text{m}$)；柱规格：直径 250mm × 4.6mm；柱温：50℃；流动相：0.2mol/L 乙酸钠-甲醇 (MeOH : H_2O = 35 : 65) 溶液，用磷酸调 pH2.80；流速：0.8mL/min；检测条件：检测波长 UV254nm，灵敏度 0.016 AUFS，衰减 0；进样量 10 μL 。

3. 标准曲线的制作。取干燥的芦丁标准品 20mg 溶于 100mL 甲醇中, 稀释成 1、2、4、8、12、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的醇溶液, 以峰面积对芦丁浓度做标准曲线。

(四) 结果计算

$$\text{芦丁含量 (mg/100g)} = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \times 100$$

式中 ρ : 由标准曲线查出的供试液浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); V : 供试液体积 (mL); m : 样品质量 (g)。

二十九、银杏黄酮醇甙含量测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

银杏叶中黄酮醇糖甙经酸水解后生成黄酮醇类化合物, 主要成分是槲皮素、异鼠李素和山萘素三种物质, 用 HPLC 分离, 用槲皮素作为标准样品定量测定其含量。

(二) 仪器和试剂

1. 试剂。槲皮素贮备液 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甲醇溶液; 槲皮素标准工作液 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甲醇溶液; 浓盐酸(A. R.); 甲醇(A. R.); 洗脱液: 450mL 甲醇加入蒸馏水 550mL, 再加入磷酸 4mL, 混匀; 水解液: 甲醇 70mL 加入蒸馏水 20mL, 再加入盐酸 10mL, 混匀。

2. 主要仪器。高效液相色谱仪(日本岛津制作所, LC-3A 型), 其中包括: 恒温箱、紫外检测器、数据处理机各一台; 水热锅。

(三) 测定步骤

1. 样品制备。准确称取银杏叶提取物 20mg, 加入水解密封管内, 加入 10mL 水解液, 拧紧带聚四氟胶垫的管盖, 振摇水解管, 使提取物分散在水解管内。放入 65 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅内, 水解 10~12h, 水解过程中应避免光, 水解后的溶液移入 100mL 的容量瓶中, 用 60% 甲醇洗水解管并定容至 100mL, 待 HPLC 分析。

2. HPLC 测定条件。色谱柱: C_{18} 柱 (直径 25cm \times 4mm ID); 主泵压力: 90kg/cm²; 洗脱液流速: 1mL/min; 检测器: 紫外检测仪, 波长 254nm; 柱温: 50 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 10 μL 。见图 6-3。

3. 标准曲线的制作。以系列不同浓度 (0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mg/100mL) 的槲皮素溶液进行测定, 槲皮素浓度与峰面积进行线性回归分析。

(四) 结果计算

1. 以槲皮素作为外标分别计算出槲皮素、山萘素、异鼠李素的含量;

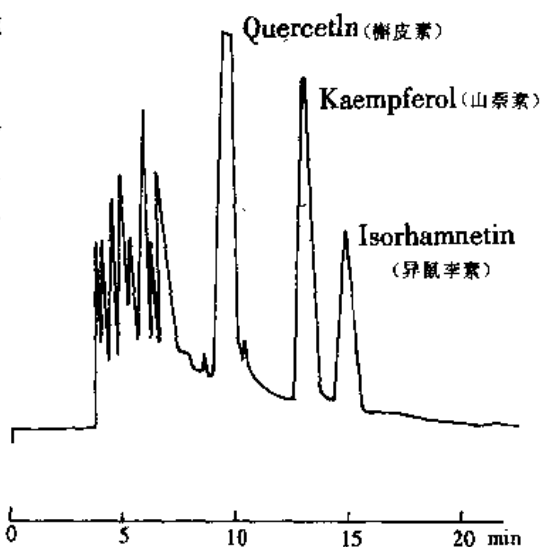


图 6-3 银杏黄酮醇甙色谱图

$$\text{黄酮醇含量 (g/100g)} = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \times 100$$

式中 ρ : 由标准曲线查出的供试液浓度 (mg/mL); V : 供试液体积 (mL); m : 样品质量 (g)。

2. 银杏总黄酮醇甙的含量:

$$\text{总黄酮醇甙含量 (g/100g)} = 2.39 \times c_1 + 2.64 \times c_2 + 2.51 \times c_3$$

式中 c_1 : 槲皮素含量 (g/100g); c_2 : 山萜素含量 (g/100g); c_3 : 异鼠李素含量 (g/100g)。

三十、银杏内酯 A、B、C 及白果内酯 HPLC 法测定

(一) 分析原理

银杏叶含有多种二萜内酯和倍半内酯, 总称为银杏萜内酯, 主要的二萜内酯有银杏内酯 A、B、C 等, 倍半萜内酯有白果内酯。本法采用反相色谱分离萜内酯, 用示差检测器测定其含量, 此法干扰物少, 操作较简便, 准确度高。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪 (日本岛津制作所 LC-3A 型), 其中包括: 恒温箱、RI 检测器、数据处理机各一台; 15mL 螺塞试管; 带聚四氟乙烯密封垫; 恒温水热锅。

2. 试剂。①银杏内酯 A (Sigma 公司), 1mg/mL。②银杏内酯 B (Sigma 公司), 1mg/mL。③白果内酯 (Sigma 公司), 1mg/mL。④浓盐酸 AR, ⑤甲醇 AR, ⑥洗脱液: 300mL 甲醇加入蒸馏水 700mL, 混匀, ⑦酸性氧化铝预处理柱。

(三) 测定步骤

1. 样品制备。准确取称取待测样品 0.5000g 置入 15mL 的螺塞试管中, 加入甲醇 5mL, 用螺塞密封, 放入 55~60℃ 恒温水浴中, 保温 4h。取出冷却至室温, 加入 10mL 蒸馏水, 充分混匀后, 过酸性氧化铝预处理柱, 待上机分析测定。

2. HPLC 测定条件。色谱柱: C_{18} 柱 (直径 25cm×4mm), 7 μ m; 主泵压力: 150kg/cm²; 洗脱液流速: 0.8mL/min; RI 检测器: 灵敏度 0.5; 柱温: 室温; 进样阀体积: 10 μ L。

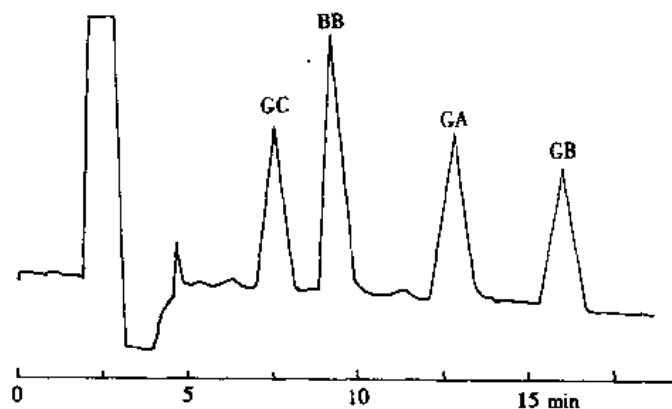


图 6-4 银杏萜内酯色谱图

3. 标准曲线制作。分别取 1mg/mL 的标准液 2、4、6、10、15、20 μ L, 上机分析, 以标准物量和峰面积 (或峰高) 做标准曲线。见图 6-4。

(四) 结果计算

数据处理由色谱处理机完成, 输入标准外标液浓度、保留时间、样品质量等参数, 自动计算出样品萜内酯总含量 (具体操作方法参考色谱数据处理机说明书)。

三十一、差式分光光度法测定辅酶 Q₁₀ 含量

(一) 分析原理

利用辅酶 Q₁₀ 在 275nm 处具有最大紫外吸收的特性, 一般均采用其氧化型和还原型吸收度差值进行测定, 以消除杂质干扰。氧化型辅酶 Q₁₀ 经硼氢化钠 (钾) 还原完全后, 在 4h 内吸收度基本无变化。本法操作简便, 有较好的测定精度。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。UV-260 自动扫描紫外分光光度计, 玻璃仪器设备等。
2. 试剂。硼氢化钠溶液: 称取硼氢化钠 20.0mg 溶于 3mL 蒸馏水中, 临用时配制; 无水乙醇。

(三) 测定步骤

样品液制备。取样品 (原料或制剂) 约 16.0mg, 置 100mL 容量瓶中, 加无水乙醇使之溶解并稀释至刻度, 混匀吸取此溶液各 10mL, 分别置两个 20mL 具塞试管中, 一管中加无水乙醇至刻度, 混匀 (为氧化型); 另一瓶加无水乙醇适量, 再加 0.2mL 新配制的硼氢化钠, 摇匀, 待气泡完全消失, 加无水乙醇至刻度, 混匀 (为还原型), 以还原型辅酶 Q₁₀ 溶液做空白校正, 在 275nm 处测定氧化型辅酶 Q₁₀ 的吸收度 (即 ΔA 值), 辅酶 Q₁₀ 在 275nm 处的 $\Delta E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 为 142。若有标准辅酶 Q₁₀ 时, 亦可用标样法进行测定。

(四) 结果计算

原料或制剂中辅酶 Q₁₀ 含量由所测吸光度, 根据 $\Delta E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 吸光度即可计算出。

三十二、植酸含量测定 (分光光度法)

(一) 方法原理

利用肌醇六磷酸酶 (植酸酶) 在 pH5.1 的缓冲体系中, 在温和的条件下, 水解植酸中的磷。磷采用钼蓝比色测定, 根据磷的含量, 即可计算出植酸量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。工业天平 (感量 0.01g), 振荡器, 有塞三角瓶 (100mL), 有塞试管 (25mL), 刻度吸管 (2mL, 10mL), 分光光度计。
2. 试剂。① 2.8mol/L 醋酸钠缓冲液 (含 0.1mol/L 硫酸镁): 称 230g CH₃-COONa 及 24.7g MgSO₄ · 7H₂O 溶于蒸馏水中, 并稀释至 1000mL, ② 60% 过氯酸溶液, ③ 0.051mol/L 盐酸-二氨基酚 [(NH₂)₂C₆H₃OH · 2HCl] 溶液 (含 1.92mol/L 亚硫酸氢钠): 称 10.1g 盐酸-2,4 二氨基苯酚, 197.1g 无水亚硫酸氢钠, 溶于蒸馏水中, 并稀释至

1000mL, ④8.3%钼酸铵溶液: 称 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 83g 溶于蒸馏水中, 并稀释至 1000mL, ⑤150g/L 三氯醋酸溶液 (质量浓度), ⑥磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 标准溶液: 称 0.4388g KH_2PO_4 溶于蒸馏水中, 稀释至 500mL, 即为 0.2mg 磷/mL, ⑦肌醇六磷酸酶 (植酸酶) 液: 以小麦粉制备, 酶液在冰箱中至少稳定两周。

(三) 测定步骤

1. 磷酸标准曲线制备。取磷酸标准溶液 (0.2mg/mL) 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0mL 放入 25mL 具塞试管中, 各管以蒸馏水稀释至 1mL, 加 2mL 60% 过氯酸、2mL 氨基苯酚试剂、1mL 8.3% 钼酸铵溶液, 以蒸馏水定容至刻度, 混匀。5~10min 后, 在光电比色计上, 于 780nm 下测定各管光密度。以光密度为纵坐标, 相应磷含量为横坐标制备标准曲线。

2. 样品中植酸提取及测定。称取脱脂油菜粉样品 1g, 加 25mL 15% 三氯醋酸 (TCA), 在室温下振荡 1h, 过滤。取滤液 6mL 放入 25mL 有塞试管中, 加 4mL 醋酸缓冲液, 3mL 肌醇六磷酸酶液, 混匀, 以蒸馏水稀释至刻度。此时 pH 为 5.1。取上液 1mL 做底物中磷酸盐测定。剩余溶液在室温下放置 16h 后, 吸取 1mL 酶解液放入 25mL 有塞试管中, 同标准曲线操作加入过氯酸、二氨基苯酚、钼酸铵试剂显色, 测定溶液的光密度值。由样品液光密度查标准曲线, 得出酶解前与酶解后磷的差数、即为植酸磷含量。

(四) 结果计算

$$\text{植酸 (mg/100g)} = \frac{\rho}{V_1} \times V_2 \times \frac{V_4}{V_3} \times \frac{100}{m} \times \frac{3.55}{1000}$$

式中 ρ : 待测样品液植酸中磷含量 ($\mu\text{g/mL}$); V_1 : 待测样品液体积 (mL); V_2 : 样品酶解液总体积 (mL); V_3 : 用于酶解的样品液体积 (mL); V_4 : 样品提取液体积 (mL); m : 脱脂样品质量 (g); 3.55: 由植酸中磷换算为植酸的系数。

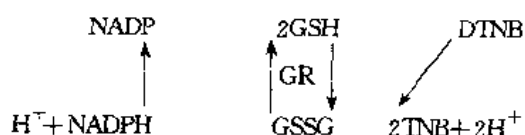
注意事项: 肌醇六磷酸酶 (植酸酶) 液可用下述方法制备: 称取 30g 小麦粉, 加 175mL 蒸馏水, 在 0~4℃ 下提取 6h, 离心, 去掉固体物。将 150mL 上清液在强烈搅拌下倾入冰冷却的 600mL 丙酮中, 放置 10min。轻轻倒去上面清液部分, 沉淀物通过布氏漏斗过滤, 用丙酮洗涤沉淀, 再用丙酮-乙醚 (1:1) 洗涤, 最后用乙醚洗涤。得到约 1.4g 粉状物, 加 75mL 蒸馏水, 在 0~4℃ 下提取 2h, 过滤。滤液加硫酸铵饱和, 于 0~4℃ 下保持 2h, 沉淀物收集在布氏漏斗上, 放入盛有无水氯化钙的真空干燥器中干燥。干物质 (0.4g) 溶解到 20mL 蒸馏水中, 在 0~4℃ 下用 2L 蒸馏水透析 48h, 去掉盐分。此酶液保存在冰箱中供植酸测定用。

第七章 活性肽及活性蛋白质

一、总谷胱甘肽 (GSH) 含量的测定 (循环法)

(一) 分析原理

在还原性辅酶 I (NADPH) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 维持谷胱甘肽总量不变的条件下, GSH 和 DTNB 反应, 在此反应中, NADPH 量逐渐减少, TNB 量逐步增加, TNB 在 412nm 吸收增加的速率 A_{412}/min 与样品中总谷胱甘肽量呈正比。由于采用了 γ -GT (γ -谷氨酸转肽酶) 抑制剂 (SBE 抗凝剂) 和快速测定, 克服了血浆中谷胱甘肽含量极低, 离体后消退极快, 不易准确测定的困难。本法灵敏度可达 0.1nmol/L 左右, 加收率 $93\% \sim 106\%$ 。由于 GSH 和 GSSG 循环交替, 周而复始总量不变, 故称此为循环法 (Recirculating Assay), 是目前较灵敏的测定总 GSH (即 GSH+GSSG) 方法。



NADP: 氧化型辅酶 I; NADPH: 还原型辅酶 I; GR: 谷胱甘肽还原酶; DTNB (Ellman 试剂): 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid); TNB: 5-thio-2-nitrobenzoate.

(二) 仪器及试剂

1. 仪器设备。带动力学功能的分光光度计 (或普通分光光度计); 高速离心机及常规的玻璃设备等。

2. 试剂。① $0.125\text{mol/L Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 。② 6.3mol/L EDTA 缓冲液, pH7.5 ($0 \sim 4^\circ\text{C}$ 保存)。③ 6.0mmol/L DTNB ; 23.8mg DTNB (FW 396.4) 溶于 10mL 上述缓冲液中 (0°C 以下冰冻保存)。④ 2.1mmol/L NADPH ; 17.5mg NADPH (FW 833.4) 溶于 10mL 上述缓冲液中 (使用当天配制)。⑤ 50u/mL GR ; 以上述缓冲液稀释商品 GR 至要求浓度。例如取 0.260mL GR (Sigma, $500\text{u}/2.6\text{mL}$) 加上述缓冲液 0.74mL (使用当天配制)。⑥ SBE 抗凝剂 (pH7.4): 内含 0.8mol/L L -丝氨酸。⑦ $0.8\text{mol/L H}_3\text{BO}_3$ 。⑧ 0.05mol/L EDTA , 以浓 NaOH 调 pH 至 7.4 (室温存放)。⑨ $10\% \text{TCA}$ (三氯醋酸), 室温存放。⑩ $0.3\text{mol/L Na}_2\text{HPO}_4$ (室温存放)。

(三) 测定步骤

1. GSH 标准系列。称取 15.3mg GSH , 用双蒸馏水准确稀释至 100mL , 得 0.5mmol/L GSH 。取此液 0.08mL , 加双蒸馏水 1.92mL , 得 20nmol/L 标准液, 再顺序 1:1 稀释制做标准曲线时, 各取 0.2mL , 则得 4、2、1、0.5、0.25nmol/L 标准系列。

2. 样品液制备。血浆: 取 1.5mL 静脉全血迅速放入含 0.09mL SBE 的小离心管中,

混匀，即刻高速（约 10000r/min）离心 1.5min，取出上层血浆 0.6mL，移入含 0.24mL 6.0mmol/L DTNB 的小管中，混匀，迅速取出 0.35mL（内含 0.1mL DTNB 和 0.25mL 血浆）移入 1mL 比色杯中测总 GSH。从取入血开始测定应控制在 3min 之内，大鼠、猪血 1.5h 内。全血：取 0.1mL SBE 抗凝全血，移入含 0.5mL 10% TCA 小离心管中，混匀，高速离心 2min，取上清液 0.1mL，加入 0.4mL 0.3mol/L Na_2HPO_4 ，0.5mL 上述缓冲液，混匀。取此全血制备液 0.1mL 移入比色杯中测总 GSH。速冻组织（心、肝、肾等）：约 1g 组织块，加 5mL 10% TCA 匀浆，10000r/min 离心 5min，取上清液 0.1mL，加入 0.4mL 0.3mol/L Na_2HPO_4 ，0.5mL 上述缓冲液，混匀。取此组织制备液 0.1mL 移入比色杯中测总 GSH。

3. GSH 测定。若采用有动力学功能的分光光度计，则令条件为：波长 412nm，吸收范围 0~3.0，延后时间 20min，反应时间 2min；若为普通分光光度计，则人工定时读 A_{412} nm，计算出 A_{412}/min 。总 GSH 测定步骤操作（见表 7-1）。

表 7-1 总 GSH 测定步骤

试剂或样品	GSH 标准管	样品管		
		血浆	全血	组织
2.1mmol/L NADPH/mL	0.10	0.10	0.10	0.10
6.0mmol/L DTNB/mL	0.10		0.10	0.10
GSH 标准系列/mL	0.20			
DTNB 血浆/mL		0.35		
全血制备液/mL			0.10	
组织制备液/mL				0.10
缓冲液 (pH7.5) /mL	0.60	0.55	0.70	0.70
直接加在 1mL 比色杯 (1cm 光径) 中				
50u/mL GR/mL	0.01	0.01	0.01	0.01
加在比色杯壁上，比色前混匀，即刻开始读 A_{412}/min				

(四) 结果计算

制作 A_{412}/min -nmol GSH 标准曲线，从样品的 A_{412}/min 计算出反应管中 GSH 的 nmol 量 G 。

$$\text{血浆: } \frac{G}{0.25\text{mL}} = \text{nmol GSH/mL 血浆; 红细胞: } \frac{G \times 90}{0.1\text{mL} \times \text{血球容积比}} = \text{nmol GSH/mL 红细胞; 组织: } \frac{G \times 50}{0.1\text{mL} \times \text{匀浆组织块质量 (g)}} = \text{nmol GSH/g 组织}$$

二、血清 γ -球蛋白盐析测定法

(一) 方法原理

在血清中加入适量的硫酸铵及氯化钠溶液，使混合后两种盐的浓度分别为 1.4mol/L 及 0.5mol/L，溶液的 pH 调节到 γ -球蛋白的等电点 (pH6.4)，此时 γ -球蛋白沉淀析出而其他蛋白质则留于溶液中。沉淀过程在低温下完成，离心除去上清液，将沉淀物溶于氯化钠溶液中，用双缩脲法测定蛋白质含量。或用其他方法测定沉淀物中蛋白质质量，再换

算成样品中 γ -球蛋白含量。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。分光光度计, 实验用离心机, pH 酸度计等。

2. 试剂。硫酸铵-氯化钠溶液: 称取硫酸铵 (A. R.) 185g 及氯化钠 (A. R.) 29.3g, 溶于蒸馏水约 900mL 中, 用氨水或硫酸调溶液 pH 至 6.4, 将溶液全部转移入 1L 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度。0.9% 氯化钠溶液。双缩脲试剂: 称取硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, A. R.) 1.50g, 酒石酸钾钠 ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, A. R.) 6.0g, 分别用蒸馏水约 250mL 溶解后, 全部移入 1L 容量瓶中, 混合, 再加入 10% NaOH 溶液 300mL, 随加随摇匀, 以蒸馏水定容至刻度, 混匀, 保存在内壁涂有石蜡的试剂瓶中; 标准血清: 由专门单位供应或自己制备。

(三) 测定步骤

吸取硫酸铵-氯化钠溶液 5.7mL, 置于 15mL 尖底离心管中, 加入血清样品 0.30mL, 加塞轻轻混匀数次, 再置冰水浴中 15min。离心 (3000r/min) 10min, 吸去上清液, 再离心 5min, 用滤纸条将残留的液体尽量吸干。加入 0.9% 氯化钠溶液 2.0mL 轻轻摇动使沉淀溶解, 此管即为测定管。另取同样的离心管 2 只, 分别加入 0.9% 氯化钠 2.0mL 及 1/20 稀释标准血清 (标准血清 0.5mL 加 0.9% 氯化钠溶液 9.5mL, 混和) 2.0mL 作为空白管及标准管。在 3 管中各加入双缩脲试剂 8.0mL, 混匀, 在室温下放置 30min, 在 540nm 处, 以空白管作对照, 测定样品管及标准管光密度值。

(四) 结果计算

$$\frac{\text{样品管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times \frac{0.1}{0.3} \times \text{标准血清蛋白含量 (g/100mL)} = \text{血清 } \gamma \text{ 球蛋白 g/100mL}$$

注意事项: ①若 γ 球蛋白含量较高, 样品管光密度值过大, 可用双缩脲试剂稀释液 (双缩脲试剂 8 份加 0.9% 氯化钠溶液 2 份) 进行稀释后再做测定, 将测得结果乘以稀释倍数。②本法不适用于测定血浆 γ -球蛋白, 因血浆中纤维蛋白原将与 γ 球蛋白一并沉淀出。

三、琼脂扩散法测定血清中 IgG、IgA、IgM 含量

(一) 分析原理

在含有抗体的琼脂板的小孔中加入抗原溶液, 经过扩散后, 在小孔周围形成抗原抗体沉淀环, 此沉淀环面积与小孔中的抗原量成正比。测定 IgG 时, 琼脂板中可加入适量的抗 IgG 血清, 琼脂板上各小孔中分别加入一系列稀释的已知 IgG 含量的标准血清及适量稀释的待测 IgG 血清样本。经过一定时间扩散后, 测量各小孔周围形成沉淀环的直径。将系列 IgG 标准血清形成的沉淀环直径与其对应的 IgG 含量做图, 绘制标准曲线。待测 IgG 血清样本形成的沉淀环直径查标准曲线得到对应的 IgG 含量, 即可计算出待测血清中 IgG 含量。测定 IgA, IgM 的原理同上。

(二) 设备及试剂

1. 设备。琼脂模板: 为了使琼脂板的厚度一致, 由二块 8cm × 15.5cm 的普通玻璃板

中间隔放一块有机玻璃 U 形板构成, 厚 0.15cm, 各边宽 1cm, 底边长 15.5cm, 两边长 8cm; 打孔器: 孔径 3mm 的金属管筒; 湿盒; 有盖搪瓷盘, 盘底铺垫纱布 3~4 层, 用 0.5% 石炭酸溶液浸湿纱布; 微量注射器; 刻度吸管等。

2. 试剂。pH8.6 巴比妥缓冲液 (离子强度 0.1): 称取巴比妥钠 20.6g, 加入巴比妥 3.68g, 并加入叠氮钠 0.25g 作为防腐剂 (也可用硫柳汞 0.1g 代替), 加蒸馏水溶解并稀释至 1L, 混匀。1.5% 琼脂: 取 pH8.6 巴比妥缓冲液 100mL, 加入琼脂 1.5g, 放在沸水浴中, 搅拌使琼脂溶解, 立即分装在小试管中 (每管 15mL), 用橡皮塞紧, 放在 4℃ 冰箱中等用。抗 IgG 血清: 由专门单位供应; IgG 对照标准血清: 由专门单位供应。

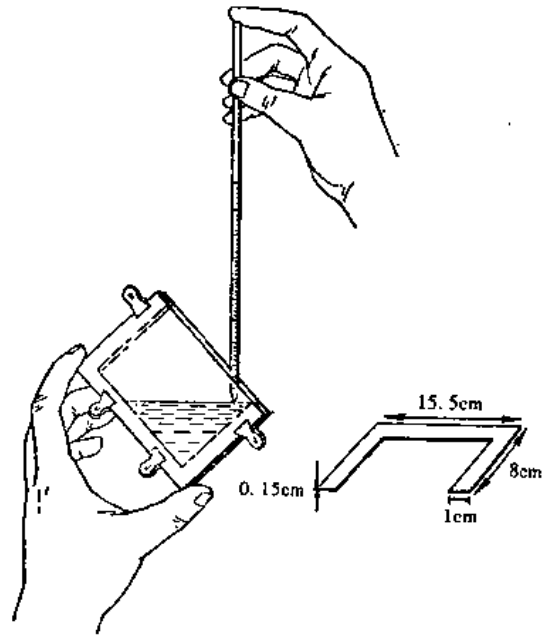


图 7-1 抗体琼脂板的制备

(三) 测定步骤

1. 抗体琼脂板制备。按图 7-1, 按 U 形有机玻璃板放置在二块玻璃板之间, 并用弹簧夹紧。将装有 15mL 1.5% 琼脂的试管放入沸水浴中, 待全部融化, 移入 60℃ 水浴中。待管内温度降至 60℃ 后, 在管中加入根据效价预先计算好体积的抗 IgG 血清 (例如效价为 1:16, 则加入抗 IgG 血清 1.0mL), 迅速混合均匀, 立即用大口 10mL 吸管吸取加入到琼脂板内。待琼脂凝固后 (需 10~15min), 将上面的玻璃板小心取去 (可预先在此板与琼脂接触的一面涂上一层硅油有利玻璃板与琼脂的分离), 再取去 U 形板, 底层的玻璃板则作为琼脂板的支持物。用打孔器相隔 1.5cm 打孔一个 (孔径 3mm), 并挑出孔内琼脂块。

2. 血清的稀释。血清样本, 根据实验的灵敏度, 一般以 pH8.6 巴比妥缓冲液稀释 10 倍。对照标准血清, 根据实验的灵敏度, 可做如下一系列稀释, 使其标准血清中 IgG 含量为 400、200、100、50、25mg/100mL。

3. 加样。将稀释好的对照标准血清及血清样本分别加入抗体琼脂板的小孔中, 每小孔 10 μ L (双样)。加样后将琼脂板放入湿盒中, 在 37℃ 放置 46h 后取出观察结果。

4. 结果观察。每批结果必须在固定时间进行观察, 可采用简单易行的直接测量法。于暗室内, 以台式日光灯斜照琼脂板, 背后用黑纸作背景, 琼脂板玻璃面朝向观察者。将透明厘米尺紧贴玻璃板, 测量沉淀环的直径。

(四) 结果计算

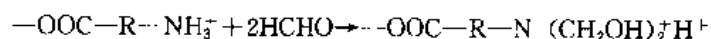
以每块琼脂板上的不同稀释度的对照标准血清的沉淀环的直径 (mm), 与其对应的 IgG 含量做标准曲线。一般沉淀环直径在 7~14mm 范围内, 与相应的 IgG 含量的对数呈直线关系。由血清样本沉淀环直径查标准曲线得相应的 IgG 含量, 计算出待测血清中 IgG 的含量。

注意事项：①在测定血清 IgA、IgM 时，只需将试剂中的抗 IgG 血清改为抗 IgA 或 IgM 血清，IgG 对照标准血清改为 IgA 或 IgM 对照标准血清，其余操作方法，结果计算均相同。②测定 IgA 时加入琼脂板的血清样本和 IgG 相同，但在测定 IgM 时，一般做 4 倍稀释；加入琼脂板的 IgA 的标准血清的浓度宜为：200、100、50、25、12.5mg/100mL；测 IgM 为 100、50、25、12.5、6.25mg/100mL。③结果观察时间：IgA 与 IgG 相同；IgM 测定宜在加样后 96h。

四、免疫电泳法测定免疫球蛋白含量

(一) 分析原理

取一定量的单价抗血清，与一定量的琼脂糖凝胶混匀，然后铺板，板上挖几个小孔，每孔中加入不同浓度的相应抗原，将此板放在 pH8.6 的电泳槽中进行电泳，于是电场引起抗原向正极泳动，在泳动途中与凝胶中的抗体反应，逐渐形成类似火箭的沉淀峰（简称火箭峰），其高度与抗原的浓度成正比，故可定量抗原。若被测抗原的等电点较低，则以琼脂代替琼脂糖也可，但此时形成的火箭峰较短。如被测抗原等电点较高，则以琼脂糖为宜。如被测抗原的等电点与单价血清中抗体（IgG）的等电点相同，则不仅需用琼脂糖。并用甲醛预处理标准抗原和待测血清样品，HCHO 处理时按下式进行反应：



(二) 仪器设备与试剂

1. 仪器设备。电泳槽（最好装有水冷却器）及电泳仪，玻璃板 7.5cm×8cm，凝胶打孔器（口径 0.2cm）；微量吸管（10μL）。

2. 试剂。①pH8.6 0.04mol/L 巴比妥酸钠-HCl 缓冲液：称取化学纯巴比妥酸钠 8.25g，加水到 1000mL，于其中再加入 0.2mol/L HCl 38.2mL，混匀。调 pH 至 8.6。② pH8.6 0.02mol/L 巴比妥酸钠-HCl 缓冲液：将上述缓冲液稀释 1 倍即成。③甲醛 A 液：100mL pH8.6 0.04mol/L 巴比妥酸钠-HCl 缓冲液内含 0.36mL 甲醛（36%）。④甲醛 B 液：100mL pH8.6 0.02mol/L 巴比妥酸钠-HCl 缓冲液内含 0.36mL 甲醛（36%）。⑤3% 琼脂糖凝胶。⑥抗血清：免抗 IgG 血清（专门生化试剂店提供）。⑦标准抗原（专门生化试剂店提供）。⑧0.1% 氨基黑染液：称 0.1g 氨基黑 10B，溶于 100mL 甲醇-冰醋酸-水（7:1:2）中，待完全溶解后，过滤。⑨脱色液：7% 醋酸。

(三) 测定步骤

1. 标准抗原血清预处理。取冷冻干燥的标准抗原血清（一安瓿），打开后加 0.5mL 双蒸水使血清溶解，然后用小滴管将其移到 5mL 容量瓶中，并用甲醛 A 液少量多次洗涤安瓿，洗液并入容量瓶中，以甲醛 A 液定容至 5mL，并分装小瓶每瓶 0.2mL（约含 IgG 15U/mL），冷冻保存备用。临用时将已甲醛化的标准抗原血清 0.2mL，用甲醛 B 液稀释成 4.0U/mL，2.0U/mL，1.0U/mL，0.5U/mL。

2. 待测 IgG 血清样品预处理。取 10μL 样液，加甲醛 A 液 0.1mL；室温处理 30min，然后用甲醛 B 液稀释至 100 倍（视血样中 IgG 浓度而异）。

3. 于 5.0mL pH8.6 0.04mol/L 巴比妥酸钠-HCl 缓冲液中，加入 0.1mL 抗 IgG 免

血清，充分混匀，即为溶液A。称取3%琼脂糖胶5.0g，加热（水浴）使之溶解。置56℃水浴保温，即为溶液B。将溶液A也保温到56℃，再倒到溶液B（56℃）中，充分混匀，但要避免气泡发生。然后将混合液倾注于水平台上的玻璃板（8cm×7.5cm）上，力求薄均匀，室温放置30min后，即凝成琼脂糖凝胶板（厚度以1mm为宜）。见图7-2。

4. 用打孔器在琼脂糖凝胶板上打孔（共12孔）。

5. 将上述琼脂糖凝胶板移入电泳仪中，两端覆盖双层纱布作为凝胶板与电泳槽中缓冲液间之联系桥。

6. 启开电源，调节电压至2V/cm，通电5min开始点样，如此可防止抗原扩散。

7. 先分别在4个孔中点上一组（4个不同稀释度）标准抗原，每孔点10 μ L。

8. 然后点待测样品液，每样品可点两孔，每孔10 μ L。

9. 点样完毕，调节电压至6V/cm，开始记时，电泳4h。此时常可观察到白色的火箭峰（最好在低温4℃左右进行）。

10. 电泳完毕，关闭电源，取下凝胶板，于凝胶面上铺上八层干燥滤纸（注意防止气泡），加压（3g/cm）吸干，以除去凝胶中多余的游离抗体。

11. 将凝胶板置氨基黑染液中染色15min。

12. 用7%醛酸脱色，至本底清晰为止，此时可看到清晰的蓝色火箭峰。

13. 用火箭峰高度（或高度的平方）为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。

（四）结果计算

从标准曲线上，查出待测血清中IgG的浓度，并换算出每100mL血清中IgG的单位数。

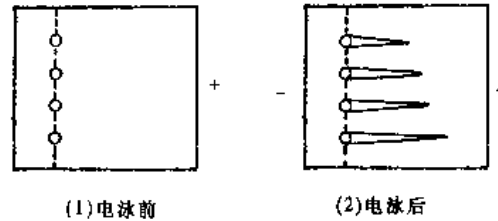


图7-2 火箭电泳示意图

第八章 其他活性成分

一、大蒜辣素含量的测定（重量法）

（一）分析原理

大蒜中蒜氨酸的亚砷基 ($\overset{\text{O}}{\uparrow}\text{—S—}$)、大蒜辣素硫代亚砷基 ($\text{—S—}\overset{\text{O}}{\uparrow}\text{—S—}$) 及其转化产物的硫醚基 (—S— , —S—S— , —S—S—S— 等) 被浓 HNO_3 氧化成硫酸根离子, 与氯化钡反应生成硫酸钡沉淀, 用重量法测定, 根据测得的硫酸钡重量换算成大蒜辣素含量。

（二）仪器设备及试剂

1. 仪器设备。高温电炉（马福炉），组织捣碎机等。
2. 试剂。浓硝酸，1:1 盐酸溶液；5% 氯化钡溶液，0.1% 甲基橙溶液，2% 硝酸银溶液（贮于棕色瓶内），10% 氢氧化钠溶液等（试剂均为 A. R.）。

（三）测定步骤

1. 样品液制备。取有代表性的新鲜蒜剥去皮，用组织捣碎机捣成糊状，准确称取 5g，加浓硝酸 2mL，用玻璃棒压磨至呈黄色，放置 5min，用蒸馏水移至 100mL 容量瓶内，定容混匀干过滤，弃去最初数毫升滤液，取滤液 80mL 放入烧杯中，加甲基橙指示剂 2 滴，滴加 10% 氢氧化钠溶液至黄色，再滴加 1:1 盐酸至红色，并多加 1mL，在砂浴上浓缩至约 50mL。

2. 沉淀。将浓缩液放电炉上热至微沸，取下加入 10mL 5% 氯化钡溶液，搅拌均匀，在 90℃ 水浴中保温 2h，用致密无灰滤纸过滤，以热蒸馏水洗至无氯离子（滤液加硝酸银溶液不混浊）。

3. 烘干及灰化。将沉淀连同滤纸放入已知质量的坩锅中，在低温电炉上烘干并使滤液炭化，再放入高温电炉中于 600℃ 下灼烧 30min 至灰分变白，取出冷却称重。

（四）结果计算

根据硫酸钡质量按下式计算：

$$\text{大蒜辣素含量 (\%)} = \frac{32.06 \times m_1 \times 162.264 \times V_0}{233.39 \times m_2 \times V \times 32.06 \times 2} \times 100$$

式中 32.06：硫的相对分子质量；233.39：硫酸钡相对分子质量；162.264：大蒜辣素相对分子质量； m_1 ：硫酸钡质量 (g)； m_2 ：样品质量 (g)； V_0 ：样品提取液总体积 (mL)； V ：吸取提取液体积 (mL)。

二、齐墩果酸、熊果酸含量测定 (HPLC 法)

(一) 分析原理

齐墩果酸、熊果酸是植物中两种重要的活性物质, 现代科学研究表明, 从女贞子中分离得到的齐墩果酸具有促进淋巴细胞增殖, 动物巨噬细胞吞噬功能及抗衰老等作用。熊果酸在与齐墩果酸相同剂量下, 对正常小鼠巨噬细胞的吞噬功能同样有非常明显的增强作用。采用高效液相色谱法测定齐墩果酸、熊果酸含量。样品经无水乙醇提取, 滤膜过滤, 与标准品对照进行分析。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。美国 Beckman 344 系统, 421 控制器, 114 泵, 165 全自动可变波长检测器, 427 积分仪。

2. 试剂。甲醇 (HPLC 级), 双蒸水, 无水乙醇 (优级纯), 齐墩果酸及熊果酸对照品 (中国药品生物制品检定所)。

3. 色谱条件。流动相: 甲醇: 蒸馏水 (91: 9), 色谱柱: C18-ODS 柱 (Beckman) 直径 4.6mm × 25cm (5μm), 检测波长: $\lambda=220\text{nm}$, 灵敏度: 0.05AUFs, 流速: 0.5mL/min, 温度: 室温, 纸速: 0.5cm/min。外标法定量分析程序由 Beckman427 积分仪提供。

(三) 测定步骤

1. 样品液提取。取样品适量, 置 60~70℃ 烤箱中干燥 8h, 粉碎, 精密称取 1g, 置 50mL 三角瓶中, 用无水乙醇回流提取 3 次, 每次 3min, 提取溶剂依次为 20、15 和 10mL, 过滤, 将 3 次滤液并入 50mL 容量瓶中, 稀释至刻度。进柱前, 用 millipore 过滤。

2. 工作曲线制备。取齐墩果酸、熊果酸标准液 (2mg/10mL 甲酸液) 分别以 2、4、6、10μL 进样分析, 以峰面积为纵坐标, 标准品进样的 μL 数为横坐标做图, 齐墩果酸和熊果酸在 400~2000μg/mL 之间呈线性关系。齐墩果酸回归方程: $Y=1426+29724.7X$

($r=0.9948$), 熊果酸回归方程: $Y=-1013.1+26248.95X$ ($r=0.9998$)。见图 8-1。

(四) 结果计算

根据待测样品液微升数的峰面积, 由回归方程式中分别计算得两种物质的微克含量, 再换算成样品中的含量。

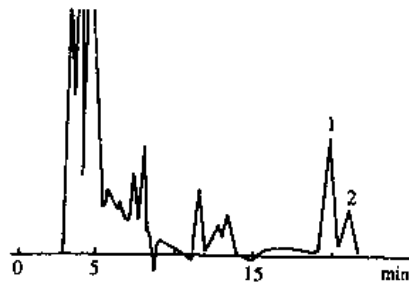


图 8-1 女贞子提取液液相色谱图
1—齐墩果酸 19.93 2—熊果酸 21.07

三、薄层扫描法测定绿原酸含量

(一) 分析原理

绿原酸经乙醇提取后, 在聚酰胺-6 薄膜上, 以 36% 醋酸为展开剂上行展开, 采用薄层扫描仪 (测定波长 345nm) 进行测定。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备及扫描条件。CS-930 薄层扫描仪, 测定波长 345nm, 反射法锯齿扫描, 狭缝 1.2mm×0.4mm, 线性化器 FF, 背景校正 ON, 灵敏度适中, 聚酰胺-6 薄膜。

2. 试剂。绿原酸标准品 (生化试剂), 60%乙醇, 36%醋酸, 乙酸乙酯等。

(三) 测定步骤

1. 样品液的制备。精密称取粉碎之样品 2.00g, 用 60%乙醇 40mL 于沸水浴中回流 2h, 过滤, 将滤液稀释至 100mL, 摇匀。准确吸取 25mL 于烧杯中, 浓缩至干加 30mL 蒸馏水溶解, 过滤。滤液置分液漏斗中, 用醋酸乙酯萃取 6 次, 每次 10mL, 合并萃取液, 挥发去醋酸乙酯, 用乙醇溶解, 定容于 10mL 容量瓶中。

2. 标准曲线绘制。取绿原酸标准液 (乙醇配制) 适量, 用乙醇制成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的系列溶液, 在聚酰胺-6 薄膜上分别点样 1 μL , 以 36%醋酸为展开剂上行展开, 展距 8.5cm。取出晾干, 在薄层扫描仪上扫描测定。以积分值为纵坐标, 绿原酸的微克数为横坐标, 绘制标准曲线, 或得出回归直线方程式 $Y=a+bX$ 。

3. 样品测定。取制备好的样液 1 μL , 按标准曲线绘制以下操作。

(四) 结果计算

根据待测样品液的积分值查标准曲线得样品液绿原酸的微克量, 再换算成样品中绿原酸含量。

四、绞股蓝总皂甙含量测定 (比色法)

(一) 分析原理

绞股蓝全草含多种皂甙, 皂甙元均具有四环三萜的达玛烷型结构, 糖基为低聚糖。其中 4 种皂甙与人参皂甙-Rb1、-Rb3、Rd、Rf2 完全相同。能与香草醛冰醋酸溶液和高氯酸于 60℃水浴中加温产生紫红色, 在 550nm 处有最大吸收, 可进行定量比色测定。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。分光光度计, 回流提取器等。

2. 试剂。5%香草醛冰醋酸溶液, 甲醇, 正丁醇, 高氯酸 (A. R.), 氧化铝 (柱层析用)。

(三) 测定步骤

1. 样品中皂甙的提取。精确称取粉碎试样 1.5g, 置回流提取器内, 以甲醇为溶剂回流提取皂甙 (一般为 4h 即可), 提取液回收甲醇, 残渣加蒸馏水 30mL 溶解, 以水饱和的正丁醇提取 4 次, 每次 20mL。合并提取液, 回收正丁醇, 残留物以 50%甲醇溶解后, 上氧化铝柱 (氧化铝 10g, 柱内径 1.5cm), 以 50%甲醇 150mL 洗脱, 洗脱液浓缩至干, 残留物加甲醇溶解, 转移至 5mL 容量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 作为供测样品液。

2. 标准曲线制备。精密称取人参皂甙 RB1 标准品 10mg, 加甲醇 5mL 溶解, 分别吸取此溶液 25、50、75、100、125 μL 置具塞试管内, 用热风吹干溶剂 (勿使过热) 各加 5%香草醛冰醋酸 0.2mL, 高氯酸 0.8mL, 混匀, 盖塞, 置 60℃水浴中加热 15min 后, 取出冷却至室温。各加冰醋酸 5mL, 摇匀, 于 550nm 处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓

度为横坐标绘制标准曲线,或建立回归直线方程式 $Y=a+bX$ 。

3. 样品中皂甙测定。精确吸取 $10\mu\text{L}$ 样品液,置具塞试管中,以下同标准曲线项下操作,测定吸光度。

(四) 结果计算

由样品液吸光度,从标准曲线上或回归直线方程式中计算出样品液中皂甙含量,再换算成样品中皂甙含量。

五、薄层色谱法测定甜菊糖甙含量

(一) 分析原理

甜菊糖甙经乙醇提取后,采用硅胶 F_{254} 薄层分离,展开剂为氯仿-甲醇-蒸馏水(30:20:4),以50% H_2SO_4 溶液显色于薄层扫描仪上测定。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备及扫描条件。索氏抽提取器;薄层扫描仪:CS-930型,扫描条件:光源:钨灯,测定波长: $\lambda_{S450\text{nm}}$, $\lambda_{R750\text{nm}}$,狭缝: $1.25\text{mm}\times 1.25\text{mm}$,线性参数: $\text{SX}=3$,扫描方式:双波长反射法锯齿形扫描,薄层板:取E. Merck,硅胶,(Type 60) F_{254} 加蒸馏水适量搅匀涂板。

2. 试剂。展层溶剂:氯仿-甲醇-蒸馏水=30:20:4;显色剂:50%硫酸溶液;95%乙醇;石油醚;标准溶液:精确称取甜菊糖甙标准品60mg,用95%乙醇溶解,并定容至100mL,浓度为 $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(三) 测定步骤

1. 样品中糖甙的提取。称取甜菊叶2.5g,加100mL石油醚(60~90℃)在索氏抽提器中加热回流提取4h,脱去部分色素及脂类,去掉(或回收)提取液,再用100mL 95%乙醇热回流提取至糖甙完全溶出(约需8h)提取液浓缩后移入25mL容量瓶中,以95%乙醇稀释至刻度,作为薄层层析用。

2. 标准曲线制备。用微量注射器吸取甜菊糖甙标准液1、2、3、4、 $5\mu\text{L}$,点在同一块薄板下端2cm处,点距为1.5cm,展开剂:氯仿-甲醇-蒸馏水(30:20:4),用50%硫酸溶液喷于展层后取出晾干的薄板上,放在110℃烘箱内15min显色后取出,放置1h进行薄层扫描。以斑点的积分面积为纵坐标,点样浓度为横坐标做图或计算出回归直线方程式 $Y=a+bX$ 。结果表明在 $30\mu\text{g}$ 以内积分面积与点样浓度成线性关系。

3. 用微量注射器取样品液 $2\mu\text{L}$,点在制备标准曲线的同一块薄板上,按上述条件展层,显色后扫描测定,用外标法进行浓度计算。

(四) 结果计算

根据样品液的斑点积分面积,由标准曲线或回归直线方程式计算出样品液中糖甙量,再换算为样品中糖甙的百分含量。

六、STS 改良法测定核酸含量

(一) 分析原理

用冷高氯酸 (PCA) 处理样品除去酸可溶部分 (核酸、核苷酸等), 残渣脱脂, 用稀碱处理分离 RNA 及 DNA, 再用紫外吸收法 (波长 260nm) 测定核酸含量。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。UV-260 紫外可见分光光度计, 冰冻离心机; 水浴加热器等。
2. 试剂。PCA, 乙醇, 乙醚, 盐酸, 氢氧化钠等 (A. R.)。

(三) 测定步骤

1. 样品中酸可溶部分的抽提。取 50~100mg 样品, 加入 10mL 冰冷的 5%PCA, 于冰水浴中匀质。用少量的 5%冷 PCA 将其移入到 20mL 离心管中, 于冰水浴中放置 20~30min (注意勿使冻结), 再于冷冻离心机中离心 10min (3000r/min), 用吸管将上部溶液吸出 (重复操作 2 次), 合并 2 次上清液, 即为酸可溶部分。

2. 脱脂。向残渣中加入 15mL 乙醇-乙醚液 (1:1), 用玻璃棒混悬置 50℃ 恒温水浴脱脂 15min, 冷却后离心 (3000r/min) 除去上清液 (重复操作 2 次)。若样品中脂肪含量低时可省去这一步。

3. RNA 的提取。向沉淀中加入 10mL 0.3mol/L 氢氧化钠溶液, 用玻璃棒充分搅拌放在 37℃ 水浴中 18h 分解出 RNA, 分解液冰冷后, 用 0.5mL 6mol/L 盐酸中和, 然后加 1mL 60%PCA 冷液, 混匀离心, 取上清液。残渣再用 10mL 冷 5%PCA 溶液混悬, 冰冷后同样离心取上清液, 合并 2 次上清液, 即为 RNA 提取液。

4. DNA 提取。向沉淀中再加入 10mL 5%PCA 溶液, 置 90℃ 水浴中加热 15min, 分解得到 DNA, 冰冷后离心取上清液, 沉淀物加 5%PCA 溶液再重复一次, 合并 2 次上清液, 即为 DNA 提取液。

5. 样品中核酸测定。分取的各部分上清液全部移入 50mL 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度。以紫外吸收比法定量, 以蒸馏水作对照直接测定样液在波长 260nm 处吸光度。

(四) 结果计算

$$\text{核酸的 } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 286; \text{ 样液 } 1\text{mL} \text{ 中 } \mu\text{g} \text{ 数为 } (A) = \frac{\text{吸光度}}{0.0286}; \text{ 样品核酸含量 } (\%) = \frac{(A) \times 50}{\text{样品质量 (g)} \times 10^6} \times 100$$

七、食品中核苷酸含量测定 (HPLC 法)

(一) 分析原理

食品中核苷酸经冷的 HClO_4 提取, HPLC 色谱阴离子柱分离, 检测波长为 260nm, 与标准峰面积比较, 进行定量测定。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。岛津高效液相色谱仪 LC-4A, SPD-2AS 紫外-可见分光光度检测器。

2. 试剂。标准品：5'-肌苷酸钠 (5'-IMP)，5'-鸟苷酸钠 (5'-GMP)，5'-尿苷酸钠 (5'-UMP)，5'-胞苷酸钠 (5'-CMP)，5'-腺苷酸钠 (5'-AMP)，次黄嘌呤均系日本生产， KH_2PO_4 ， HClO_4 ， KOH 均为分析纯。

(三) 测定步骤

1. 样品液制备。市售新鲜食品绞碎，混匀。称取适量放入 100mL 烧杯中，加入冷的 5% HClO_4 溶液 30mL，混匀，4℃ 冰箱内放置 1h。取出后，均质，将匀浆液移入 50mL 容量瓶中，用 5% HClO_4 溶液定容至 50mL，通过滤纸过滤，取滤液 5.0mL，移入 10mL 量瓶中，用 3mol/L KOH 溶液调 pH 至中性，以蒸馏水稀释至 10mL，混匀。离心，上清液用 0.45 μm 的水系滤膜过滤，滤液上 HPLC 仪分析。

2. 标准曲线。5'-AMP, GMP, UMP, IMP 均以 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 μg 不同浓度的混合液分别进样，计算峰面积和含量的回归方程。

3. 色谱条件。色谱柱：岛津 LC 用 ISA-07/S2504 离子交换柱，直径 4.0mm × 25cm；柱温：60℃；流动相：0.2mol/L KH_2PO_4 溶液，pH4.5；流速：1.5mL/min；检测波长：260nm。

(四) 结果计算

根据样品液峰面积，由回归方程式计算出样液中各核苷酸含量，再换算成样品 5'-AMP 等核苷酸含量 (mg/100g)。

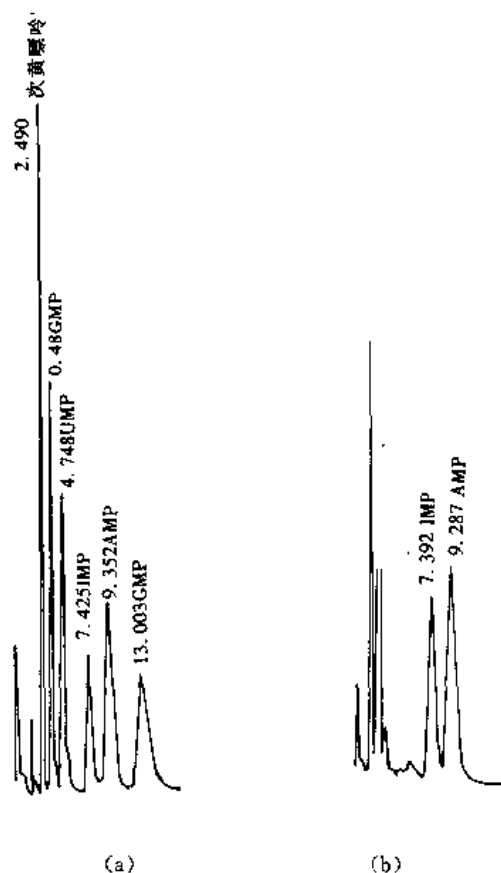


图 8-2

(a) 标准品色谱图 (b) 海虾肉样品色谱图

八、甜味素含量测定 (RP-HPLC 法)

(一) 方法原理

甜味素是近年来发展的新型高质低热型甜味剂中的一种，化学名为天门冬酰苯丙氨酸甲酯。利用高效液相色谱法快速测定各种复合甜味剂中甜味素，用 ODS 短柱 (XL-ODS 3 μm 4.6mm × 7.0cm)，以 $\text{CH}_3\text{OH}-\text{NH}_4\text{AC}$ 为流动相进行分离，根据色谱保留时间结合对的组分不同进行不停泵紫外光谱扫描定性，外标法峰高定量。最低检出浓度 0.005mg/L。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器。美国贝克曼 344M 高效液相色谱仪 (165 可变波长扫描检测器)；M-50 型过滤器及注射式滤器，滤膜 (HA 0.45 μm)。

2. 试剂。甲醇 (HPLC 级); 0.02mol/L 醋酸铵溶液: 称取 1.26g 醋酸铵于 1000mL 容量瓶中, 加重蒸馏水至近刻度, 用 1:1 HAC 调节 pH 至 5.0, 定容。经 HA 0.45 μ m 滤膜抽滤; 甜味素标准液: 准确称取 0.1000g 干燥的甜味素溶于蒸馏水, 移入 100mL 容量瓶中并用重蒸馏水定容。该溶液 1mL 相当于标准 1.0mg, 临用时稀释。

(三) 测定步骤

1. 样品处理。精确称取样品 0.1000~0.2000g 于 100mL 容量瓶中, 以重蒸馏水溶解并定容至刻度。取 1.0mL 经 HA 0.45 μ m 滤膜过滤, 滤液备用。

2. 标准曲线。取标准溶液 (1mg/mL) 稀释至 1mL 含甜味素 0.04、0.08、0.12、0.16、0.20mg, 均取 20 μ L 进液相色谱分离测定。由色谱保留时间峰面积与对应的浓度建立回归方程式 $Y=a+bX$, 甜味素浓度 0~200mg/L 有线性关系。

3. 色谱条件。色谱柱: ULRASPHERE XL-ODS 3 μ m 4.6mm \times 7.0cm 快速短柱, 流动相 CH₃OH-0.02mol/L NH₄AC (30:70, 体积比, pH5.0), 流速: 0.8mL/min; 测定波长 220nm, 扫描波长范围 200~350nm, 扫描方式: 手控选择扫描。

4. 样品测定。取样品滤液 20 μ L 进液相色谱分离测定, 根据色谱保留时间及对紫外光谱扫描定性, 外标法峰高定量。

(四) 结果计算

根据待测样液色谱峰面积, 由标准回归方程式中得样液中甜味素含量, 计算出样品中含量 (mg/100g)。

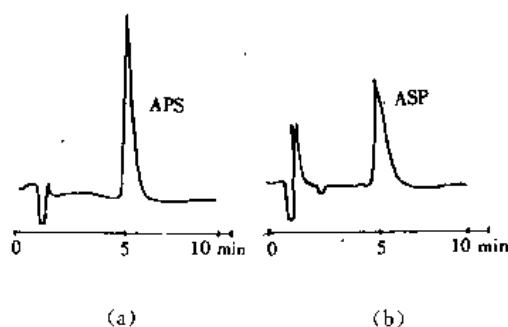


图 8-3 色谱分离图
(a) 标准色谱图 (b) 30 倍郎氏复合蛋白糖色谱分离图

九、糖精含量测定 (比色法)

(一) 原理

糖精学名邻磺酰苯酰亚胺, 为白色结晶或粉末, 无臭或微有酸性芳香气, 味极甜。糖精与硫代二苯胺和醋酸铜作用生成很稳定的红色化合物, 所呈现的色泽与糖精的含量成正比, 可与标准比色定量。本法的特点: 简便、快速、反应专一、颜色稳定。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。分光光度计, 分液漏斗 (250mL)。

2. 试剂。①硫代二苯胺溶液: 称取 1.0g 硫代二苯胺, 加少量无水乙醇溶解后, 移入 100mL 容量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度。临用时配制 (只能用 1 天)。②0.5% 醋酸溶液。③0.5% 醋酸铜溶液: 称取醋酸铜 0.5g, 加入 0.5% 醋酸溶液 100mL。④糖精钠标准贮备液: 称取糖精钠 100mg, 加入 50% 乙醇溶解后, 移入 100mL 容量瓶中, 加入 50% 乙醇至刻度, 摇匀。1mL 含糖精钠 1mg。

(三) 操作步骤

1. 样品处理。

(1) 不含蛋白质、脂肪的液体样品：如果汁、果露、汽水、酸梅汤、麦精露、格瓦斯、各种可口可乐、矿泉水等。首先将样品倒入烧杯中，用玻璃棒不断地搅拌除去 CO_2 ，称取 25g（或 25mL 样品，置于 125mL 分液漏斗中，加入 5mL 10% H_2SO_4 摇匀，用乙醚（30, 10, 10mL）萃取三次，每次摇 3min，弃去水层，合并乙醚层。再用 1% 碳酸氢钠（ NaHCO_3 ）溶液萃取乙醚中的糖精，萃取二次，每次 25mL，弃去乙醚层，向水层加入 10mL 10% 盐酸溶液酸化，然后用乙醚提取三次（30, 10, 10mL）。将乙醚提取液用 100mL 酸性水（ $\text{pH}4\sim6$ ）洗涤一次，弃去水层，将乙醚层移入 100mL 烧杯中，于 40°C 左右水浴上蒸发至 1mL 以下，用 5mL 50% 乙醇洗入 15mm×180mm 试管中，加入醋酸铜溶液和硫代二苯胺溶液各 1mL，再加乙醇 3mL，将试管置 $65\sim70^\circ\text{C}$ 水浴中 50min，并不断地摇动。然后移入 50mL 分液漏斗中，用 2mL 无水乙醇洗涤试管后合并于分液漏斗中。加入 5mL 苯或二甲苯，再加 15mL 水，振摇 5~10min，弃去水层。加入 1g 无水硫酸钠脱水。以空白液为参比，用 1cm 比色杯，于 510nm 处测定消光值，从标准曲线上查出相应的浓度。按下式计算含量。

(2) 含酒精的液体样品：准确吸取样品 10mL，加入 10mL 水，加 4% 氢氧化钠使成碱性，于沸水浴上蒸去酒精，然后移入 125mL 分液漏斗中，以下按 (1) 不含蛋白质、脂肪的液体样品操作。

2. 标准曲线的绘制。准确吸取糖精钠标准贮备液 1mL，置于 100mL 容量瓶中，加入 50% 乙醇稀释至刻度，摇匀。1mL 含 $10\mu\text{g}$ 糖精钠。取 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL（相当于糖精钠 0、5、10、20、30、40、50 μg ），分别置于 15mm×180mm 试管中，加入醋酸铜溶液和硫代二苯胺溶液各 1mL，以下按 (1) 不含蛋白质、脂肪的液体样品操作。

(四) 计算

$$\text{糖精钠 (mg/kg 或 L)} = \frac{V}{m} \times \frac{1000}{1000}$$

式中 V ：相当于糖精钠标准浓度（ μg ）； m ：样品质量（g）。

注意事项：①颜色反应达到最大强度时各试剂的用量为：硫代二苯胺 10mg；醋酸铜 5mg；0.5% 醋酸 1mL。②当溶液为中性或碱性，以及醋酸铜过量时，将产生沉淀。③反应时间（当 70°C 时）以 45~50min 为宜。④提取剂以二甲苯为最好，氯仿最差。⑤山梨酸、苯甲酸、对-羟基苯甲酸、脱氢醋酸等食品添加剂均无干扰。

十、糖精钠含量测定（HPLC 法）

(一) 分析原理

糖精钠能直接溶于水中，因此样本溶于水后可经微孔滤膜过滤后直接进样，反相色谱法分离，紫外检测器检测，外标法进行定性、定量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪，积分仪或记录仪，离心机（2000r/min），分析天平，容

量瓶 (100mL, 1000mL), 小烧杯, 离心管, 微孔滤膜 (HF 0.45 μ m)。

2. 试剂。①甲醇、醋酸铵、糖精钠标准 (均为分析纯)。②0.02mol/L 醋酸铵溶液: 称取醋酸铵 1.54g, 加水 950mL 溶解后, 以醋酸调节 pH 至 4 后, 定容至 1000mL, 微孔滤膜 (HF 0.45 μ m) 过滤。③糖精钠标准溶液: 准确称取 0.851g 经 120 $^{\circ}$ C 干燥 4h 的糖精钠, 溶于蒸馏水中, 并移入 100mL 容量瓶中, 加水至刻度, 混匀。此溶液每 1mL 相当于糖精钠 ($C_7H_4NNaSO_3 \cdot 2H_2O$) 1mg。取上述溶液 5.0mL, 置 50mL 容量瓶中, 水稀至刻度, 摇匀。此溶液 1mL 相当于糖精钠 0.1mg。

(三) 操作步骤

1. 样品处理。汽水、可乐型饮料: 取均匀试样置于小烧杯中, 微温除去二氧化碳, 经微孔滤膜 (0.45 μ m) 过滤后供进样用。

2. 果汁类。取均匀试样置于离心管中, 离心沉淀 20min, 上清液经双层滤膜过滤后供进样用。

3. 色谱条件。色谱柱: Zorbax-ODS, 直径 4.6mm \times 250mm, 流动相: 甲醇-0.02mol/L 醋酸铵 (pH4) 为 25:75, 检测器: 紫外 220nm, 流速: 1.0mL/min, 柱温: 40 $^{\circ}$ C, 灵敏度: 0.08AUFS, 纸速: 0.5cm/min, 进样量: 10 μ L。

(四) 计算

根据保留时间定性, 根据标样及样品的峰面积积分值定量。

注意事项: 若配以苯甲酸和咖啡因标准样, 用此方法也可检测样品中的苯甲酸和咖啡因。

十一、牛磺酸含量测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

牛磺酸又称牛胆碱 (Taurine), 其化学名为 2-氨基乙磺酸, 普遍存在于动物体内, 特别是海洋生物体内, 据文献报道, 牛磺酸以游离形式存在, 不掺入蛋白质, 并具有多种生理、药理作用, 常用的含量测定方法有: 酸碱滴定法、荧光法、液体闪烁法、氨基酸自动分析仪法和薄层扫描法等。采用高效液相色谱 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 柱前衍生化法测定海洋生物和有关制剂中牛磺酸的含量, 该方法具有操作简便、快速、准确、重现性好等特点。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。TWINCLE 高效液相色谱仪, UVIDEK-100 紫外分光光度检测器, C-R4A 专用微处理机。

2. 试剂。牛磺酸 (Sigma 公司); 乙腈, 碳酸氢钠, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠均为分析纯; 2,4-二硝基氟苯为生化试剂 (Merck 公司)。

(三) 测定方法

1. 测试条件。色谱柱: 4.6mm i. d. \times 250mm, Spherisorb C-18 5 μ m (国家色谱研究分析中心产, 大连), 流动相——A: CH_3CN-H_2O (1:1), B: pH7 磷酸缓冲液, 浓度为 30%A, 检测波长: 360nm, 流速: 1mL/min, 纸速: 0.5cm/min, 吸收度范围 0.08AUFS。

2. 标准曲线制作。精确称取牛磺酸对照品 10mg, 置 50mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 即得牛磺酸对照液。

精密吸取对照液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mL, 分别置 10mL 容量瓶中, 加蒸馏水使总体积均为 0.5mL, 然后依次各加入 0.5mol/L NaHCO₃ (pH9) 溶液 1mL, 1%2,4-二硝基氟苯乙腈溶液 1mL。摇匀, 置 60℃水浴中避光加热 60min 后取出, 加 pH7 磷酸盐缓冲液至刻度, 摇匀, 分别取 4μL 进样测定, 以浓度为横座标, 以峰面积为纵座标, 进行线性回归。

3. 样品测定。精密称取样品 2g, 置 25mL 容量瓶中加蒸馏水稀释至刻度, 精密吸取 0.5mL, 按上述同样条件反应后取 4μL 进行测定。

(四) 计算结果

根据待测样液色谱峰面积, 由标准回归方程式中得样液中牛磺酸含量, 计算出样品中含量 (mg/100g)。

十二、甘草苷含量测定 (HPLC 法)

(一) 分析原理

甘草苷系天然甜味剂, 是由甘草之根中提取出来。溶于水、乙醇中, 不溶于乙醚、氯仿。采用反相离子对分配型高效液相色谱法同时测定食品中甘草苷和糖精钠甜味剂。样品溶液经预柱 (Sep-pak C-18) 处理后, 用高效液相色谱法测定。操作简易、迅速。酱油、豆酱中甘草苷和糖精钠的添加回收率分别为 99.5% 和 97.8%, 定量限界均为 0.005g/kg。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪, 离心机等。
2. 试剂。①离子对试剂: 0.1mol/L 十六烷基三甲基铵氯化物 (CTA)。②洗脱溶液: 乙醇-0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (1:1) 用磷酸调 pH 为 3。③5%氨水。

(三) 操作方法

1. 酱油。取试样 5g, 加 0.1mol/L 十六烷基三基铵氯化物 (CTA) 溶液 5mL, 加蒸馏水至 100mL, 取此溶液 20mL, 通过预柱 (Sep-pak C-18) 2mL/min, 用 10mL 蒸馏水洗涤, 然后用 8mL 洗脱溶液洗脱, 洗脱液中加 0.1mol/L CTA 溶液至 10mL, 取其 50μL 进高效液相色谱仪。

2. 豆酱、腌鱼。取试样 5g, 加 5%氨水 20mL, 用组织捣碎机捣碎, 加蒸馏水至 50mL。时时振摇, 放置 1h, 离心分离 (3000r/min) 10min, 取上清液 25mL 于烧杯中, 加 0.1mol/L CTA 溶液 2.5mL, 用 1mol/L 磷酸调 pH 至酸性 (pH 3~6)。加蒸馏水至 50mL, 离心分离, 除去不溶物, 取此溶液 20mL。和酱油同样用预柱处理, 制成试验溶液进高效液相色谱仪。

3. 高效液相色谱条件。柱: Li Chrosorb RP-18 (5μm) 直径 4mm×250mm, 保护柱: Li Chrosorb RP-18 直径 4mm×4mm, 流动相: 乙醇-0.05mol/L 磷酸二氢钠 (2:3) 溶液中含 0.02mol/L CTA。用磷酸调 pH 为 3.0, 流动相流量: 1.0mL/min, 柱温: 40℃,

测定波长：254nm，样液注入量：50 μ L。

(四) 结果计算

根据待测样液色谱峰面积，由标准回归方程式中得样液中甘草苷含量，计算出样品中含量 (mg/100g)。

第三部分 营养成分检测技术

第九章 蛋白质及氨基酸

一、凯氏定氮法测定蛋白质含量

(一) 方法原理

样品与硫酸一同加热消化, 分解有机质, 释放出的 NH_3 与硫酸结合成硫酸铵留在溶液中。在定氮消化瓶中, 用氢氧化钠中和硫酸铵生成氢氧化铵, 加热又分解 NH_3 , 用硼酸吸收, 用标定过的盐酸或硫酸滴定, 从而计算出总氮量, 换算为蛋白质量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平: 感量 0.0001g, 实验用粉碎机, 半微量凯氏蒸馏装置, 半微量滴定管, 容积 10mL; 硬质凯氏烧瓶: 容积 25mL, 50mL, 锥形瓶: 容积 150mL, 电炉: 600W。

2. 试剂。①盐酸: 分析纯, 0.02mol/L, 0.05mol/L 标准溶液 (邻苯二甲酸氢钾法标定)。②氢氧化钠: 工业用或化学纯, 400g/L 溶液。③硼酸: 分析纯, 200g/L 溶液。④硼酸-混合指示剂: 溴甲酚绿 0.1g, 甲基红 0.1g 分别溶于 95%乙醇中, 混合后稀至 100mL, 将混合指示剂与 2%硼酸溶液按 1:100 比例混合; 用稀酸或稀碱调节 pH 值为 4.5, 使呈灰紫色, 此溶液放置时间不宜过长, 需在 1 个月之内使用。⑤加速剂: 五水合硫酸铜 (分析纯) 10g, 硫酸钾 (分析纯) 100g 在研钵中研磨, 仔细混匀, 过 40 目筛。⑥浓硫酸: 相对密度 1.84, 无氮; 双氧水: 分析纯, 30%; 蔗糖: 分析纯。⑦双氧水-硫酸混合液 (简称混液): 双氧水、硫酸、水的比例为 3:2:1, 即在 100mL 蒸馏水中, 慢慢加入 200mL 浓硫酸, 待冷却后, 将其加入 300mL 30%双氧水, 混匀, 此混液可一次配制 500~1000mL 贮藏于试剂瓶中备用。夏天最好放入冰箱或阴凉处贮藏, 室温 (20℃) 上下时不必冷藏, 贮藏时间不超过 1 个月。

(三) 操作步骤

1. 样品的选取和制备。选取有代表性的种子 (带壳种子需脱壳) 挑拣干净, 按四分法缩减取样, 取样量不得少于 20g。将种子放于 60~65℃烘箱中干燥 8h 以上, 用粉碎机磨碎, 95%通过 40 目筛, 装入磨口瓶备用。

2. 称样。称取 0.1g 试样两份 (含氮 1~7mg), 精确至 0.0001g, 同时测定试样的水分含量。

3. 消煮 1。将试样置于 25mL 凯氏瓶中，加入加速剂粉末。除水稻为 1g 外，其他均为 2g。然后加 3mL 硫酸，轻轻摇动凯氏瓶，使试样被硫酸湿润，将凯氏瓶倾斜置于电炉上加热，开始小火，待泡沫停止后加大火力，保持凯氏瓶中的液体连续沸腾，沸酸在瓶颈中部冷凝回流。待溶液消煮到无微小的碳粒并呈透明的蓝绿色时，谷类继续消煮 30min，豆类继续消煮 60min。

4. 消煮 2。将试样置于 50mL 凯氏瓶中，加入 0.5g 加速剂和 3mL 混液，在凯氏瓶上放一曲颈小漏斗，倾斜在电炉上加热，开始小火（用调压器将电压控制在 175V 左右），保持凯氏瓶中液体呈微沸状态。5min 后加大火力（将电压控制在 200V 左右）。保持凯氏瓶中液体连续沸腾，消煮总时间，水稻、高粱为 30min，其他均为 45min。

注：消煮中列入两种消煮条件，经与国际谷物化学协会标准法（ICC）比较，t 值测验均不显著，准确度与精密度也基本一致，在具体工作中可根据实际情况取其一种。

5. 蒸馏。消煮液稍冷却后加少量蒸馏水，轻轻摇匀。移入半微量蒸馏装置的反应室中，用适量蒸馏水冲洗凯氏瓶 4~5 次。蒸馏时将冷凝管末端插到盛有 10mL 硼酸-指示剂混合液的锥形瓶中，向反应室中加入 40% 氢氧化钠溶液 15mL（如采用消煮 2 的条件，加 10mL 即可）。然后通气蒸馏，当馏出液体积约达 50mL 时，降下锥形瓶。使冷凝管末端离开液面，继续蒸馏 1~2min，用蒸馏水冲洗冷凝管末端，洗液均需流入锥形瓶中。

6. 滴定。谷类以 0.02mol/L，豆类以 0.05mol/L 标准盐酸或硫酸滴定至锥形瓶中的溶液由蓝绿色变成灰紫色为终点。空白用 0.1g 蔗糖代替样品做空白测定。消耗标准酸溶液的体积不得超过 0.3mL。

（四）结果计算

$$\text{粗蛋白质}\% (\text{干基}) = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 0.0140 \times K \times 100}{m_1 \times (100 - m_2)}$$

式中 V_2 ：滴定试样时消耗标准酸的体积（mL）； V_1 ：滴定空白时消耗标准酸的体积（mL）； c ：标准酸溶液的浓度（mol/L）； K ：氮换算成粗蛋白质的系数； m_1 ：试样质量（g）； m_2 ：试样水分含量（g）；0.0140：每毫摩尔氮的克数。

平行测定的结果用算术平均值表示，保留小数后二位。两份试样粗蛋白质的平行测定结果为 15% 以下时，其相对相差不得大于 3%；15%~30% 进为 2%；30% 以上为 1%。结果必须注明氮换算成粗蛋白质的系数，换算系数见表（9-1）。

表 9-1 不同作物种子含氮量换算成粗蛋白之系数 K

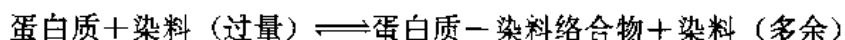
种 子	换算系数/K
麦类、豆类	5.70
水 稻	5.95
高 粱	5.83
大 豆	6.25
其他谷物	6.25

二、染料结合法测定蛋白质含量

（一）方法原理

在酸性条件下，样品蛋白质中的组氨酸、精氨酸和赖氨酸残基与偶氮磺酸染料如酸

性橙(AO-12,一种单磷酸盐)发生静电结合,形成不溶性的复合物,加入过量的偶氮磺酸染料,反应按下式进行:



蛋白质含量与染料结合量之间存在正相关关系,先对20个左右蛋白质含量不等的样品用凯氏法测得蛋白质百分含量,再由染料结合法测定相应样品未结合的染料溶液透光率,对二者进行数理统计,求出回归方程。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。GXD-201型蛋白质分析仪(或72型光电比色计),离心机(4000r/min),分析天平(感量0.0001g,或0.0001g),振荡器,有塞试管,离心管,刻度吸管。

2. 试剂。①磷酸缓冲液:3.4g磷酸二氢钾、20g草酸加蒸馏水溶解后,再加1.7mL85%磷酸(H_3PO_4),60mL冰醋酸,1mL丙酸,稀释至1000mL。②酸性橙-12染料溶液:用磷酸盐缓冲液加热溶解酸性橙-12(acid orange-12相对分子质量为350.37),配制成3.89mmol/L浓度溶液。③半饱和醋酸钠溶液:先配成饱和醋酸钠溶液,称取75g无水醋酸钠于100mL蒸馏水中,加热溶解、冷却并静置过夜,过滤得醋酸钠饱和溶液,再以蒸馏水稀释1倍即为半饱和醋酸钠溶液。

(三) 测定步骤

1. 回归方程式的求得。选取蛋白质含量高低不等的样品,粉碎过40目筛,按凯氏定氮法测定蛋白质含量。再称取相应的样品,均为0.5000g,放入有塞试管中,加2mL半饱和醋酸钠溶液及20mL酸性橙-12染料溶液,盖上塞子,置于振荡器上,在室温下振荡1h。反应液以4000r/min离心10min然后在蛋白分析仪上测定上清液(即剩余染料溶液)的透光率。或者将上清液再稀释50倍,在72型光电比色计上,于482nm下测定溶液的透光率(或光密度)。根据20个左右样品凯氏法测得的蛋白质百分含量及同一批样品染料结合法剩余染料溶液的透光率进行数理统计,算出回归方程。

2. 样品中蛋白质含量测定。取粉碎过40目筛的样品0.5000g,按上述操作加半饱和醋酸钠溶液,染料溶液,振荡、离心,在同样的蛋白分析仪上测定剩余染料溶液透光率或将上清液稀释50倍后,在同一72型光电比色计上测定透光率(或光密度)。

(四) 结果计算

将待测样品的透光率代入回归方程式中,即可算出样品中蛋白质含量。

三、改良的双缩脲法快速测定蛋白质含量

(一) 方法原理

蛋白质有两个以上的肽键,因此有双缩脲反应。在碱性溶液中蛋白质与 Cu^{2+} 形成紫红色络合物,其颜色深浅与蛋白质的浓度成正比,而与蛋白质的分子量及基酸成分无关。显色反应受温度影响颇大,在常温(20~25℃)下需1h,40℃需15min,60℃需5min。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。光电比色计,离心机(4000r/min),分析天平(感量0.0001g或0.001g),恒温振荡器或恒温水浴锅,离心管、刻度吸管。

2. 试剂。4%硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶液; 2.5%酒石酸钾钠溶液; 双缩脲试剂配制: 在 500mL 容量瓶中, 依次加入 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 30mL 和 2.5%酒石酸钾钠 100mL, 再慢慢加入 5mol/L KOH 30mL, 最后用蒸馏水稀释至刻度。使用时, 再将上述溶液与透明度良好的异丙醇混合。

(三) 测定步骤

1. 酪蛋白标准曲线制备。称取国产酪蛋白质 2 克(磨细至 80 目)于 0.15mol/L KOH 溶液中, 加热溶解并定容至 100mL, 分别取此溶液 0.2~0.9mL 8 份, 加入 10mL 双缩脲试剂, 在 60℃ 的恒温水浴振荡器中振荡 5min 显色完全, 随后以 4000r/min 离心 10min, 取离心液在波长 550nm 下, 以 1cm 比色杯进行比色测定, 空白为不加酪蛋白的试剂。同时取此溶液 5mL (双样) 进行凯氏定氮, 乘以换算系数 6.41 即为酪蛋白含量。根据测得的光密度值与相应酪蛋白含量进行回归, 算出回归方程式 $Y=a+bX$ (X 为酪蛋白光密度, Y 为相应酪蛋白含量 g)。

2. 样品处理与测定。样品粉碎磨细通过 40 目筛孔, 以风干重样品或烘干重样品测定蛋白质含量。在分析天平上准确称取待测样品 0.1000g, 放入干燥的 25mL 凯氏消化瓶或大试管中, 内放几粒玻璃珠, 加入 10mL 双缩脲试剂, 在 60℃ 的恒温水浴振荡器上振荡 5min, 随后以 4000r/min 离心 10min, 取离心液在波长 550nm 下, 以 1cm 比色杯进行比色测定, 空白为不加样品的试剂溶液。

(四) 结果计算

将样品测得的光密度值代入酪蛋白回归方程 $Y=a+bX$ (其中 X 表示样品光密度值, Y 代表样品蛋白质含量克数)。再乘以稀释倍数 1000, 即为 100g 样品中蛋白质含量 (g)。

注意事项: ①对含脂肪高的样品溶液与双缩脲试剂混合后, 若有雾状沉淀, 需让其静置 2h 以上, 再离心, 取其清液比色。②异丙醇可降低淀粉的溶解性, 有利于蛋白质提取及显色。

四、蛋白质组分的分离与含量的测定

(一) 方法原理

蛋白质的提取, 按照顺序先用蒸馏水, 再用 10% 的氯化钠, 进一步用 70%~80% 的酒精, 最后用 0.2% 的碱溶液。提取液分别收集到一定容器中, 用醋酸沉淀蛋白质。将蛋白质的沉淀离心, 然后用凯氏定氮法测定蛋白质含量。或者将提取液定容到一定体积, 取其中适量用凯氏定氮法测定蛋白质含量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。离心机 (4000r/min), 离心管 (15mL), 干燥箱, 其余同凯氏定氮法所述。
2. 试剂。10%氯化钠溶液, 1%醋酸溶液, 75%乙醇, 0.2%氢氧化钠溶液; 冰醋酸, 其余同凯氏定氮法所述。

(三) 测定步骤

1. 清蛋白的分离。样品经粉碎过 60 目筛, 谷类取 1g, 豆类 0.5g, 置于瓷研钵中, 加少量蒸馏水, 研磨至匀浆。将研磨好的材料转移到离心管中。用蒸馏水冲洗研钵, 冲洗

时用水量不得超过 15mL。用玻璃棒搅拌 5min 离心,并将上清液合并到同一烧杯中(重复操作三次)。从收集的溶液中用醋酸沉淀纯蛋白质。为此,加 10 滴冰醋酸,在水浴上加热 5~10min,直至分离出沉淀。通过滤纸过滤,集中全部沉淀于滤纸上,用 1%的醋酸冲洗 4 次,将沉淀和滤纸一起放在温箱中烘干。或者将收集的离心液加水定容至 50mL。

2. 球蛋白的分离。向离心管中残渣加入 10mL 10%的氯化钠溶液,用玻璃棒搅拌 5min 同上离心,然后以盐溶液冲洗玻璃棒,离心,将溶液倒入烧杯中(重复三次),向溶液中加入 10 滴冰醋酸,在水浴上加热至分离出沉淀。通过滤纸过滤,用 1%的醋酸将全部残渣转移到滤纸上,以同样的醋酸溶液冲洗二次;烘干。或者将提取液以 10%的氯化钠溶液定容至 50mL。

3. 醇溶蛋白分离。醇溶蛋白存在于粮食子粒中,而豆科作物缺少这种蛋白质,因此研究豆类作物也可以不作醇溶蛋白质分离。向上述盐溶液提取后的残留物中加 10mL 75%的乙醇,用玻璃棒搅拌,将混合物放在 80℃的热水中 5min,在此期间都要随时搅拌。其后取出试管,继续搅拌 5min,离心,上清液入烧杯中。向试管再加入 75%酒精,同上重复操作三次。为了沉淀酒精溶液中的蛋白质,加水稀释 2 倍,再加 10 滴冰醋酸,加热至沸。然后将沉淀用 1%的冰醋酸全部转移到滤纸上,烘干。或者将提取液以 75%乙醇定容至 50mL。

4. 谷蛋白的分离。向上述醇提取后的残渣中,加入 10mL 0.2%氢氧化钠溶液,用玻璃棒搅拌 15min,离心,将离心液倒入烧杯中(重复三次,后面两次搅拌 5min),为了沉淀蛋白质,加入 5mL 10%的三氯醋酸、摇匀。在强烈搅拌下,再一滴滴地加入三氯醋酸溶液,直至出现沉淀为止。加热后过滤,用 1%的醋酸溶液将沉淀转移至滤纸上,烘干。或者将提取液以 0.2%的 NaOH 溶液定容至 50mL。

5. 各组分中蛋白质含量的测定。将分离出的四种蛋白质组分(沉淀或溶液)放入消化瓶中,按凯氏法进行各组分蛋白质含量测定。

五、蛋白氮和非蛋白氮含量的测定

(一) 方法原理

样品经粉碎加水磨至均匀后,转入离心管中,以氢氧化铜沉淀蛋白质,离心分离,并用蒸馏水洗涤。将含非蛋白氮的溶液装入消化瓶中,加硫酸消化,用凯氏定法测定氮的含量。然后将含有蛋白氮的沉淀转入消化瓶中,也按凯氏定氮法测定氮的含量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。离心机(4000r/min),离心管,刻度吸管(5mL、10mL),水浴锅,电炉,其余仪器同凯氏定氮法。

2. 试剂。3%硫酸铜溶液,0.2mol/L 氢氧化钠溶液,其余试剂同凯氏定氮法。

(三) 测定步骤

1. 分离非蛋白氮和蛋白氮程序。精确称取 0.2~0.3g 样品(总含氮量在 10mg 左右),放入瓷研钵中,加 2mL 蒸馏水,研磨至匀浆后,再加 2mL 3%硫酸铜溶液。搅匀,

转移到离心管内，同时用 8mL 蒸馏水冲净残渣。离心管放入沸水中，用玻璃棒搅拌，保持 3min 然后取出离心管，加 3mL 0.2mol/L 的氢氧化钠溶液，搅匀，放置 10min 然后取出离心。将离心液倒入消化瓶中，用热水冲洗沉淀两次，每次 10mL（两次热水中均加一滴 3% 硫酸铜溶液），同样离心，合并到消化瓶中（非蛋白氮溶液）。将离心管中沉淀物加蒸馏水全部移入另一消化瓶中（蛋白氮溶液）。

2. 非蛋白氮和蛋白氮的测定。测定凯氏定氮法进行。

六、蛋白质效力比值的测定

蛋白质效力比是评价蛋白质质量的一项重要指标，它以消耗每克蛋白质获得的体重增加量来表示。谷物蛋白质是由廿种氨基酸构成的，其中有八种是人体必需的，它们是：异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸和缬氨酸，近年来发现组氨酸也是人体必需的氨基酸。人体对这些必需氨基酸要求不仅品种要齐全，而数量也要一定。如果缺少某种必需氨基酸或其量不足都会影响到人体的新陈代谢和生长发育，因此当一种蛋白质其构成的氨基酸缺少属于人体必需的氨基酸成分，那么这种蛋白质的质量就比八种必需氨基酸齐全的蛋白质差。而后者质量又随着必需氨基酸含量的增加而提高。可见，决定一种食物营养价时，不能单凭其蛋白质含量高低，而还必需考虑到蛋白质效力比。

测定蛋白质效力比，长期以来采用喂养小白鼠的生物法，所需时间长，手续烦琐，费用较高。近年来，一些研究者通过深入的研究，发现蛋白质中的蛋氨酸、亮氨酸、组氨酸、酪氨酸四种氨基酸与蛋白质效力比具有显著的数学关系。因而建立了以数理统计为基础的回归分析法测定蛋白质效力比。本法具有迅速、简便、经济等特点，而准确性不亚于生物测定法。其误差不大于 2%。

（一）测定步骤

样品粉碎，过 40 目筛。称取一定量样品于 6mol/L 的盐酸中，水解 24h（色氨酸用甲磺酸水解），用氨基酸自动分析仪或液相色谱仪测定各种氨基酸含量。或由其他化学或微生物法测定出蛋白质中蛋氨酸、亮氨酸、组氨酸和酪氨酸含量。

（二）结果计算

根据回归方程式

$$PER = -1.816 + 0.435 (MET) + 0.780 (LEU) + 0.211 (His) - 0.944 (TDR)$$

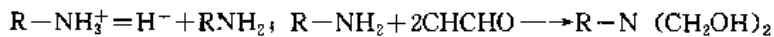
式中 -1.816：截距；0.435, 0.780, 0.211, 0.94：相应氨基酸系数；PER：蛋白质效力比；MET：蛋氨酸%；LEU：亮氨酸%；His：组氨酸%；TDR：酪氨酸%。

注意事项：回归方程式只能用来计算所使用变量值涉及的范围都是线性的。上面回归方程式的各变量值范围：组氨酸 0.8%~3.8%，亮氨酸 3.8%~9.3%，蛋氨酸 0.7%~2.7%，酪氨酸 0.9%~4.8%。

七、游离氨基氮甲醛快速滴定法

(一) 方法原理

氨基酸中的 $-\text{NH}_3^+$ 基的 pK 值常在9.0以上,不能用一般的酸碱指示剂(包括酚酞),以氢氧化钠溶液做滴定测量。但可以用甲醛滴定法测量。在 pH 中性和常温条件下,甲醛迅速与氨基酸中氨基相互作用,使滴定终点移至 $\text{pH}9.0$ 左右,在该过程中指示剂酚酞不与甲醛作用。 $\text{pH}9.0$ 正是酚酞的变色范围,因此,可以用酚酞作指示剂,以氢氧化钠溶液来滴定 $-\text{NH}_3^+$ 基上的 H^+ ,每释放一个氢离子,就相当于有一个氨基氮。反应如下:



滴定的结果表示 α -氨基的含量,其精确度可达氨基酸理论量的90%。如果样品中只含有某一种已知的氨基酸,从甲醛滴定结果可算出该氨基酸的含量。如果样品多种氨基酸的混合物(如蛋白水解液),则测定结果不能作为氨基酸定量依据。但一般常用此法测定蛋白质水解程度,随水解程度的增加滴定值增加,当水解作用完成后,测定值不再增加。甲醛测定法,一般所采用的甲醛浓度是 $2.0\sim 3.0\text{mol/L}$,即滴定后最终浓度为 $6\%\sim 9\%$ 。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平(感量 0.0001g),漏斗,玻璃研钵,三角瓶(50mL),移液管(2mL、5mL),微量滴定管(5mL或10mL),容量瓶(50mL)。

2. 试剂。①中性甲醛溶液:将试剂级甲醛(36%~37%)调到 $\text{pH}7$ (用 pH 计检查)。或是在50mL 36%~37%甲醛中加入1mL 0.1%酚酞乙醇水溶液,然后用 0.2mol/L 氢氧化钠溶液滴定到微红(需临用前配制若放置一些时间后,在使用前要重新中和)。②酚酞指示剂:0.5%酚酞的50%乙醇溶液。③标准碱溶液:0.01mol/L氢氧化钠溶液,使用前应标定。④10%醋酸溶液。

(三) 测定步骤

1. 样品中游离氨基氮的提取。谷物、植株体烘干,粉碎,称取一定量的样品(谷物 0.2g ,植株体 0.1g 左右,精确至 1mg)或取相应的新鲜材料。放在玻璃研钵中,加5mL 10%醋酸溶液研磨至均匀,以水转移到50mL容量瓶中并定容至刻度,混匀、过滤(弃去最初部分溶液)。

2. 测定。在三角瓶中加入2mL样品滤液,加蒸馏水4mL,3滴酚酞指示剂,摇匀后用氢氧化钠溶液滴定到微红色。然后加入2mL中性甲醛溶液,摇匀,放置片刻,再用微量滴定管以标定过的 0.01mol/L 氢氧化钠溶液滴定到微红色终点,记下甲醛加入后所消耗的碱量(V_1)。同样,做空白测定耗碱量(V_2)。

(四) 结果计算

$$\text{氨基氮含量}\% = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 50 \times 0.04}{2 \times m} \times 100$$

式中 V_1 : 样品加甲醛后消耗的氢氧化钠体积(mL); V_2 : 空白加甲醛后消耗的氢氧化钠体积(mL); c : 氢氧化钠的浓度(mol/L); m : 样品质量(g); 0.04: 氮的毫

摩尔质量 (mg/mmol)。

八、游离氨基酸总量的测定 (茚三酮法)

(一) 方法原理

茚三酮与氨基酸作用形成蓝色化合物。反应的灵敏性在很大程度上依赖于氢离子浓度。强酸、强碱均可阻碍反应的进行。最适酸碱度约为 pH4.5。除 α -氨基酸可与茚三酮发生反应显色外, 蛋白质、肽及多肽也能与茚三酮起颜色反应。反应分两阶段进行。最初发生氨基酸的氧化脱羧基反应并形成还原型的水合茚满三酮——茚满酮。空气中的氧如同氧化剂一样, 有阻止茚酮形成的作用。因此在一般条件下, 甚至加热的情况下反应进行很慢, 并且灵敏性很差。当茚三酮与氨基酸反应时, 加入还原剂 SnCl_2 、 KCN 、抗坏血酸等就可以在反应的混合液中获得足够的茚酮。当丙醇存在时, 显著加快反应速度和提高此方法灵敏度。抗坏血酸作为还原剂, 在加热情况下能促进较快的显色和保持颜色的稳定。

改良的茚三酮试剂—乙二醇并补加正丁醇和丙醇的茚三酮溶液。这种试剂灵敏性高, 稳定。在 pH4.54 的条件下氨基酸与该试剂反应的显色值 (除半胱氨酸和 β -丙氨酸外) 基本一致 (表 9-2)。因此可以定量测定出粮油籽粒及植株中游离氨基酸量。

表 9-2 在 pH4.54 下, 氨基酸与改良茚三酮试剂显色值 (占亮氨酸显色的 % 值)

氨基酸	显色值/%	氨基酸	显色值/%
缬氨酸	105	组氨酸	99
正缬氨酸	105	苯丙氨酸	99
谷氨酸	104	胱氨酸	99
甘氨酸	102	γ -酪氨酸	99
异亮氨酸	102	天冬氨酸	99
正亮氨酸	102	谷氨酰胺	96
赖氨酸	102	色氨酸	95
蛋氨酸	102	苏氨酸	92
丝氨酸	101	酪氨酸	91
α -丙氨酸	100	天冬酰胺	84
精氨酸	100	半胱氨酸	33
α -酮氨酸	100	β -丙氨酸	27
亮氨酸	100	氨	98

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g), 比色计 (72 型或其他型号), 水浴锅; 刻度吸管 (0.5mL, 5mL)。

2. 试剂。①茚三酮试剂: 称取 1.2g 的重结晶的茚三酮, 加 15mL 正丙醇, 摇动使其溶解。然后加入 30mL 正丁醇, 60mL 乙二醇, 混匀。再加入 9mL pH4.54 的醋酸缓冲液, 仔细混匀。保存于棕色瓶中, 置于冷凉处。试剂适用期限为 10 天。②4mol/L 醋酸缓冲液 (pH4.5): 称取 54.4g 醋酸钠 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 于烧杯中, 加 100mL 蒸馏水溶解。将烧杯置于电炉上, 加热至沸, 使溶液蒸发至原体积一半。冷至室温, 加 30mL 冰醋酸,

用无氨水稀释至 100mL。③氨基酸标准液：在分析天平上称取在 80~90℃ 下烘干的亮氨酸 46.8mg 或 α-丙氨酸 31.8mg，加 10% 异丙醇溶解，以同一溶液定容至 100mL，混匀。为了制备工作曲线，取此溶液 5mL，用蒸馏水稀释至 50mL，该工作液 1mL 含氮 5μg。④ 10% 醋酸溶液；1% 抗坏血酸溶液（制备液仅用一天）；60% 乙醇。

（三）测定步骤

1. 标准曲线的绘制。在一系列干试管中，加入氨基酸工作液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、1.6、1.8、2.0mL，各管均加水至 2mL，再加 3mL 茚三酮试剂，0.1mL 1% 抗坏血酸溶液，混匀，盖上玻璃塞，置沸水浴中加热 15min。取出，在间歇摇动下于空气中冷却 15min。加热时形成的红色茚酮在冷却和搅拌时被空气中氧氧化而退色，而茚三酮与氨基酸形成的蓝紫色化合物变得更加鲜明。以 60% 乙醇补充溶液体积至 5mL，混匀。在 580nm 下用 1cm 比色杯测定光密度。并在直角坐标纸上绘制标准曲线。

2. 样品中游离氨基酸含量的测定。称取新鲜样品 0.5g 左右（或干样品 0.1g），放在研钵中加 5mL 10% 醋酸溶液研磨至匀浆，然后以蒸馏水转移到容量瓶中，并定容至 100mL，仔细摇匀，过滤。吸取 2mL 滤液加 3mL 茚三酮，0.1mL 1% 抗坏血酸溶液，混匀，盖上玻璃塞，置沸水浴中加热 15min 取出，在间歇摇动下冷却 15min。以 60% 乙醇补充溶液体积至 5mL，混匀。在 580nm 下，用 1cm 比色杯测定光密度。

（四）结果计算

$$A = \frac{0.1 \times 100 \times 5 \times \rho}{2 \times m} = \frac{25\rho}{m}$$

式中 A：100g 分析材料中含氨态氮量（mg）；ρ：比色液中氨态氮的浓度（μg/mL）；m：分析材料的质量（g）；5：比色液体积（mL）；100：分析液总体积（mL）；2：与茚三酮反应所取样品液体积（mL）；0.1：将 μg 换算为 mg，乘上 100 的换算系数。

注意事项：茚三酮再结晶净化：取 10g 市售的茚三酮，加 40mL 蒸馏水在加热条件下溶解。再加 0.1g 抗坏血酸加热至沸后继续煮 5min。趁热过滤，向滤液中加 10mL 1:1 的盐酸溶液（体积分数），1g 活性炭，煮沸 3min，趁热过滤（滤纸应先用 0.1mol/L 盐酸冲洗）。滤液静置一夜使其结晶，通过玻璃漏斗过滤，用冷水冲洗结晶物，并置纸上在室温下干燥，保持在棕色瓶中。

九、茚三酮法快速测定赖氨酸含量

（一）方法原理

蛋白质分子中的赖氨酸残基 ε-NH₂ 基与茚三酮试剂反应，生成紫红色物质，在 515~525nm 下比色，可做赖氨酸的定量测定。该法用碳原子数与赖氨酸相同的亮氨酸溶液为标准溶液。由于亮氨酸有一个 NH₂ 基相当于蛋白质上赖氨酸的 ε-NH₂ 基，故用亮氨酸标准液制备标准曲线来测定蛋白质中赖氨酸的含量。

（二）仪器与试剂

1. 仪器。721 型分光光度计，恒温水浴锅，温度计（0~100℃），试管（20mm ×

180mm)。

2. 试剂。①缓冲液：称取 30g 甲酸钠，溶于约 60mL 蒸馏水中，加入 10mL 88% 的甲酸，最后用蒸馏水定容至 100mL。②茚三酮试剂：称取 1g 茚三酮和 2g 氯化镉放入棕色瓶中，加 25mL 上述缓冲液和 75mL 乙二醇，室温下放置一天后才能使用，若出现沉淀则须过滤，该试剂在常温下至多使用两天。③4% 和 2% 碳酸钠溶液各 100mL。④标准亮氨酸溶液：准确称取 25mg 亮氨酸，加数滴稀盐酸待溶解后，用蒸馏水定容至 50mL，浓度为 500 μ g/mL；再分别吸取 2、4、6、8、10、12mL 上述母液，于 25mL 容量瓶中，加蒸馏水至刻度。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线的制备。准确吸取已配好的标准亮氨酸溶液各 0.5mL，分别放入 6 支试管中，另取 1 支试管加入 0.5mL 蒸馏水作为空白。每支试管各加入 0.5mL 4% Na_2CO_3 及 2mL 茚三酮试剂，混匀，在 80 $^\circ\text{C}$ 水浴中保温 30min。取出，放冷水中冷却 3min，然后，每支试管各加 10mL 1:1 的 95% 乙醇，摇匀。在 515nm 下进行比色。以空白作对照，读取光密度值，绘制标准曲线。

2. 样品的测定。准确称取风干、磨细、通过 60 目筛的样品（油料种子须经脱脂）25mg 放入 250mg 石英沙及 1mL 2% 的碳酸钠中，用圆头玻璃棒充分搅拌，研磨 2min，移至试管，然后放 80 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴中提取 10min。取出试管，各管依次加入 2mL 茚三酮试剂，摇匀，在 80 $^\circ\text{C}$ 水浴中保温 30min。显色后取出，放入冷水中冷却 3min 每管各加 10mL 1:1 的 95% 乙醇，过滤，在 515nm 下进行比色，读取光密度，在相同条件下以不加样品的空白作对照。

(四) 结果计算

由亮氨酸标准曲线查得的值代入下式，求出赖氨酸占样品的百分含量。

$$\text{赖氨酸}(\%) = \frac{L \times 100}{m \times 10^6} \times 1.11 - A$$

式中 L ：由曲线查得亮氨酸的量 (μg)； m ：样品质量 (g)；1.11：由赖氨酸与亮氨酸分子量之比求出的换算系数； A ：样品中的游离氨基态氮的量。

十、2-氯-3,5-二硝基吡啶法测定赖氨酸含量

(一) 方法原理

赖氨酸和铜盐定量反应，生成可溶性铜络合物，此络合物在碱性缓冲溶液中，再与 2-氯-3,5-二硝基吡啶试剂反应生成黄色化合物，在一定浓度范围内，赖氨酸含量与溶液黄色深浅成正比例关系。此法准确、稳定性能好，重现性强，但试剂有毒，价格贵，而且操作较烦琐。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平（感量 0.0001g），离心机（4000r/min），721 分光光度计，保温箱，具塞刻度试管（10mL），刻度吸管（1mL、5mL）。

2. 试剂。①磷酸铜悬浮液：称 1.4g 分析纯氯化铜 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，用蒸馏水溶解

后定容至 50mL。另又称取 6.8g 分析纯磷酸钠 ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)，用蒸馏水溶解后定容至 100mL。将上述两种溶液混合均匀后，以 3000r/min 离心 15min，倾去上清液，沉淀物以 0.05mol/L 硼酸钠缓冲液洗涤再离心，重复三次将沉淀悬浮于 40mL 的硼酸钠缓冲液中。贮存在冰箱中，最多能用二周。②0.03mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH=7.4)。③木瓜酶 A 液 (标准曲线用)：称取 500mg 木瓜酶，用 0.03mol/L 磷酸钠溶解后定容至 100mL，摇匀，过滤备用。④木瓜酶 B 液 (样品测定用)：称取 400mg 木瓜酶，用 0.03mol/L 磷酸钠溶解后定容至 100mL，摇匀，过滤备用。⑤0.05mol/L 硼酸钠缓冲液 (pH=9)。⑥0.05mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH=9)。⑦显色液：称取 300mg 2-氯-3,5-二硝基吡啶，以甲醇溶解并定容至 10mL 备用 (用时新配)。⑧1.2mol/L 盐酸溶液，99.5% 醋酸乙酯，正己烷。⑨混合氨基酸溶液：胱氨酸 20mg，甲硫氨酸 20mg，组氨酸 30mg，丙氨酸 30mg，异亮氨酸 30mg，苏氨酸 30mg，酪氨酸 30mg，甘氨酸 40mg，苯丙氨酸 40mg，缬氨酸 40mg，精氨酸 50mg，丝氨酸 50mg，天门冬氨酸 60mg，谷氨酸 300mg，亮氨酸 80mg，脯氨酸 80mg。把上述十六种氨基酸混匀后，称取 100mg 氨基酸混合物，溶解在 10mL 碳酸盐缓冲液中。⑩赖氨酸标准原液：2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线绘制。取赖氨酸标准原液 0、2、4、6、8、10mL，分别放入 6 个 10mL 容量瓶中，以碳酸盐缓冲液定容至刻度，摇匀。即分别为每毫升含有 0、500、1000、1500、2000、2500 μg 赖氨酸标准液。分别取上述标准液各 1mL，放入 6 个 10mL 刻度试管中，加入 4mL 木瓜酶 A 液，加塞摇匀。再分别取各管中酶解液 1mL 放入另外六个 10mL 刻度试管中，加入 0.5mL 氨基酸混合液及 0.5mL 磷酸铜悬浮液，加塞振荡 5min，然后以 3000r/min 离心 10min。分别取离心后上清液 1mL，放入 10mL 试管中，加入 0.1mL 2-氯-3,5-二硝基吡啶溶液，充分振荡。室温下放置 2h，每 30min 振摇一次。向各管加入 5mL 1.2mol/L 盐酸，充分振摇进行酸化，再加入 5mL 醋酸乙酯，加盖颠倒 15 次，进行提纯去杂 (以头上带有聚乙烯管的注射器去掉上层醋酸乙酯有机相，用分液漏斗也可，重复三次)。最后取水相以波长 390nm 进行比色。此显色液浓度各为 1mL 含有 0、10、20、30、40、50 μg ，然后以光密度为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。

2. 样本测定。称取用正己烷脱脂的样本 0.1~0.4g (视赖氨酸含量多少而定)，放入 10mL 刻度试管中，加 5mL 木瓜酶 B 液，使样本湿润，加塞振摇 3min。放入 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温箱中转化 1h，每隔 20min 振摇一次。再将离心管连同样本放在 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温箱中过夜，次日取出冷却至室温，离心。再取离心后上清液 1mL 放入 10mL 刻度试管中，加 0.5mL 碳酸盐缓冲液及 0.5mL 磷酸铜悬浮液，振荡 5min，离心。取离心后上清液 1mL 放入 10mL 试管中，加 0.1mL 2-氯-3,5-二硝基吡啶，充分振摇，室温下放置 2h，每 30min 振摇一次。加入 5mL 1.2mol/L 盐酸充分振摇，以下步骤同标准曲线，比色后从曲线上查得赖氨酸微克数，减去空白，然后计算出样品赖氨酸之含量。

(四) 结果计算

$$\text{赖氨酸含量 (\%)} = \frac{A \times 5 \times 2 \times 5 \times 100}{m \times 10^6} = \frac{A}{m \times 200}$$

式中 A：查标准曲线得 1mL 样品液赖氨酸的量 (μg)；m：样品质量 (g)。

十一、氨基酸及赖氨酸含量的测定（三硝基苯磺酸比色法）

（一）方法原理

三硝基苯磺酸 (TNBS) 在偏碱性条件下与氨基酸反应, 先形成中间络合物。中间络合物在光谱上有两个吸收值相近的高峰, 分别位于 355nm 和 420nm 附近。然而溶液一旦酸化, 中间络合物成三硝基苯-氨基酸 (TNP-氨基酸), 420nm 处 (偏碱性溶液中) 或在 340nm (偏酸性溶液中) 对氨基酸进行定量测定。下表列出各氨基酸与 TNBS 反应后在不同条件下测定的光密度值。在 340nm 外, 各氨基酸吸收值大致相近, 而在 420nm 处吸收值因氨基酸种类而异, 在加入适量 SO_3^- 时, 吸收值升高。TNBS 与氨基酸中氨基的反应取决于溶液的 pH, 温度及氨基酸的性质。当 pH 低于 6.2 时几乎不起反应, 随 pH 值升高, 反应速度加快。pH 大于 11 时, 反应迅速, 在 2~3min 内即完全, 但 TNBS 本身的破坏也加强, 空白提高, 因而一般取 pH9~10 为宜, 通常用 NaHCO_3 溶液, 最终浓度为 1% 较理想。TNBS 与不同性质氨基酸反应速度不同, 与碱性氨基酸的反应较快, 在 40°C 30min 内反应即完成, 保温 2h 各种氨基酸反应均可完成。见表 9-3。

表 9-3 各种氨基酸与 TNBS 反应后在不同条件下测定的光密度值

氨基酸种类	碱溶液 ⁽¹⁾	碱性溶液加 SO_3^- ⁽²⁾	酸性溶液 ⁽³⁾
甘氨酸	0.30	0.54	0.31
丙氨酸	0.31	0.59	0.30
蛋氨酸	0.30	0.53	0.30
缬氨酸	0.31	0.57	0.31
亮氨酸	0.30	0.60	0.30
异亮氨酸	0.30	0.56	0.31
苏氨酸	0.30	0.59	0.30
丝氨酸	0.30	0.60	0.30
天冬氨酸	0.19	0.43	0.30
谷氨酸	0.23	0.53	0.30
天冬酰胺	0.30	0.46	0.30
谷氨酰胺	0.31	0.53	0.30
酪氨酸	0.30	0.48	0.30
苯丙氨酸	0.30	0.60	0.30
色氨酸	0.16	0.31	沉淀
组氨酸	0.30	0.50	0.30
赖氨酸	0.60	0.90	沉淀
精氨酸	0.40	0.58	0.30
α -N-苄氧羰酰-赖氨酸	0.32	0.45	沉淀
脯氨酸	0	0	
α -N-苄氧羰酰-精氨酸	0	0	

注: (1) 取不同含量氨基酸液 1mL, 加 4% NaHCO_3 1mL, 0.1% TNBS 1mL, 于 40°C 反应 2h, 用蒸馏水补充至 4mL, 在 420nm 处测定。制作氨基酸浓度— OD_{420} 标准曲线, 从曲线中求得各氨基酸于 1 μg 分子时的光密度。

(2) 条件同 (1), 但在与 TNBS 反应时加 0.01mol/L Na_2SO_3 1mL, 最后总体积也是 4mL, 同样在 420nm 处测定。(3) 条件同 (1), 但与 TNBS 反应后加 1mol/L HCl 1mL 酸化, 在 340nm 处测定。

测定蛋白质中赖氨酸, 是基于 TNBS 只与蛋白质中 N 末端的 α -氨基及赖氨酸残基的

ϵ -氨基起反应,反应后生成的 TNP-蛋白质经盐酸水解后分别产生含有 α -TNP-氨基的小肽碎片。在酸性溶液中前者可用有机溶剂抽提除去,而酸性液中留下的 ϵ -TNP-氨基含量即可在 340nm 处定量测定,此含量即相当于蛋白质中赖氨酸的含量。

在酸解时,为了避免 TNBS 本身的破坏,水解时间不宜过长,一般 110℃ 下 2h 即可。—SH 基的干扰作用可将蛋白质在碱性条件下保温数小时使其变形。即可使蛋白质全部氨基暴露,同时在此条件下一SH 基氧化成二硫键。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平(感量 0.0001g),紫外分光光度计,试管(10mL),移液管(1mL),容量瓶(50mL)。

2. 试剂。①0.1%三硝基苯磺酸溶液:称取 0.1g 三硝基苯磺酸加蒸馏水至 100mL。②4%碳酸氢钠溶液(以稀酸或稀碱调至 pH8.5)。③0.25%氢氧化钠溶液。④0.01mol/L 亚硫酸钠溶液:称 0.252g $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,加蒸馏水至 100mL。⑤标准氨基酸溶液:配制 5mmol/L 的水溶液。⑥ ϵ -TNP-赖氨酸标准溶液(或丙氨酸):配成 0.5mmol/L 的水溶液。

(三) 测定步骤

1. 氨基酸含量的测定方法 1。①偏碱性溶液-420nm 系统:待测氨基酸样品液(含氨基酸 0.5~4 μg 分子) 1mL,加 4% NaHCO_3 1mL,0.1% TNBS 1mL,0.01mol/L Na_2SO_3 1mL,混合后于 40℃ 反应 2h,在 420nm 处测定(空白为蒸馏水代替待测液)。②标准曲线制备。取标准氨基酸溶液(5mmol/L)0.1~0.8mL,补充蒸馏水至 1mL,加 4% NaHCO_3 1mL,0.1% TNBS 1mL,0.01mol/L Na_2SO_3 1mL,混合后于 40℃ 反应 2h,在 420nm 处测定(空白为蒸馏水代替待测液)。

2. 氨基酸含量的测定方法 2。①偏酸性溶液-340nm 系统。待测氨基酸样品液(含氨基酸 0.5~4 μg 分子) 1mL,加 4% NaHCO_3 1mL,0.1% TNBS 1mL,混合后于 40℃ 反应 2h,加 1mol/L 盐酸溶液 1mL,混合后在 340nm 测定(空白以蒸馏水代替待测液)。②标准曲线制备。取标准氨基酸溶液(5mmol/L)0.1~0.8mL,补充蒸馏水至 1mL,与上述操作同。某些氨基酸如赖氨酸,色氨酸产生沉淀,干扰测定。

3. 谷物蛋白质赖氨酸含量测定。①标准曲线制备:如没有 ϵ -TNP-赖氨酸,可用丙氨酸或其他氨基酸。取 5mmol/L 丙氨酸标准溶液 0.1~1mL,补充加蒸馏水至 1mL,再加 4% NaHCO_3 1mL,0.1% TNBS 溶液 1mL,于 40℃ 下保温 2h,加 1mL 1mol/L 盐酸,以蒸馏水稀释至 10mL,混匀,于 340nm 测定光密度。以光密度值为纵坐标,相应丙氨酸微克分子为横坐标制备工作曲线。②样品中蛋白质的提取。称取粉碎脱脂样品 0.2g 左右(精确至 1mg),加几滴无水乙醇,混匀,再加 10mL 0.25%氢氧化钠溶液,于 40℃ 下振荡 30min。或室温下放置过夜,再摇动混匀 1min,离心(2000~2500r/min) 5min。③TNP-蛋白质生成及水解。取离心液 0.2mL,放在有塞试管中,加 4% NaHCO_3 1mL 及 0.1% 的 TNBS 1mL,在 40℃ 下保温 2h,此后加入浓 HCl 2mL,塞上玻璃塞,于 110℃ 下水解 2h,加蒸馏水 4mL。④乙醚萃取。将水解液通过滤纸全部滤到装有 10mL 乙醚的分液漏斗中,以少量蒸馏水(约 2mL)洗涤沉淀,振荡混匀 1min。等分层后,将水层倒入试管中(如此重复乙醚萃取 2~3 次),在 340nm 下测定溶液光密度值。查标准曲线即可求出脱脂样品中赖氨酸含量。

(四) 结果计算

$$\text{脱脂样品中赖氨酸 (\%)} = \frac{A \times V_2 \times 146.2 \times 100}{V_1 \times m \times 10^6}$$

式中 A : 测定液中赖氨酸的浓度; m : 样品质量 (g); 146.2: 赖氨酸相对分子质量; V_1 : 样品测定液体积 (mL); V_2 : 样品液体积 (mL)。

注意事项: ①若蛋白质中 N 末端也是赖氨酸, 在用有机溶剂抽提时也将被除去, 因而实际测得赖氨酸含量将偏低, 但由于蛋白质分子较大, 总的 ϵ -氨基远多于此 α -氨基, 因此影响不大。②TMP-蛋白质在 6mol/L 盐酸溶液中水解不宜过长, 一般 2h 即可, 因为 ϵ -TNP 小肽在 340nm 外光吸收值与游离 ϵ -TNP-赖氨酸的值大致相同, 酸水解可不必彻底。③为了使大分子蛋白质中的 ϵ -氨基充分暴露, 需尽可能将蛋白质变性 (在碱性条件下保温数小时); 同时, 在此条件下, 巯基也将氧化成二硫键, 可以避免巯基的干扰。

十二、不水解蛋白质直接测定蛋白质中赖氨酸含量

(一) 方法原理

由于三硝基苯磺酸 (TNBS) 只能与蛋白质中 N 末端 α -氨基及赖氨酸残基 ϵ -氨基起反应 (最适 pH9~10), 生成黄色络合物。水稻蛋白质中, 谷蛋白的分子量大约是 6×10^5 , 其中赖氨酸含量为 4% 左右, 可见赖氨酸残基 ϵ -氨基在蛋白质分子中所占的比例远比 N 末端 α -氨基多, 以致于 α -氨基对显色的影响可以忽略不计。因此 TNP-蛋白质黄色络合物的深浅主要取决于 ϵ -氨基的量。在 350nm 和 430nm 处有两个明显的吸收峰, 与文献报道的 TNP- ϵ -赖氨酸吸收峰基本一致, 说明蛋白质大分子中的赖氨酸残基 ϵ -氨基与游离赖氨酸分子上的 ϵ -氨基都能与 TNBS 试剂发生等当量反应, 有着相同的光谱特性。赖氨酸分子中有一个 α -氨基和一个 ϵ -氨基, 这两个氨基在偏碱性溶液中同样能与 TNBS 起等当量反应, 如果以 $-\text{NH}_2$ 基为单位, 即 ϵ -赖氨酸恰好等于 1/2 赖氨酸, 因此可以直接用赖氨酸作标准曲线进行测定。

TNBS 与不同性质的氨基酸反应速度不同。与碱性氨基酸反应较快, 受显色液酸度和温度影响较大, 当 pH<6 时, TNBS 与氨基酸中的氨基几乎不起反应, 随着 pH 值升高, 反应速度加快, 当 pH>11 时, 2~3min 即完成, 但 TNBS 本身水解加快。提高温度可以加速反应, 随着温度升高, 同样加快 TNBS 试剂的破坏, 空白提高。因此一般以 pH9~10; 温度 40℃ 下显色 30min 为宜。此时碱性氨基酸上的氨基可显色完全。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。72 型分光光度计, 离心机 (4000r/min), 分析天平 (感量 0.0001g), 恒温振荡器 (或恒温水浴锅)。
2. 试剂。4% 碳酸氢钠溶液, 0.25% 氢氧化钠溶液, 无水乙醇, 1% 三硝基苯磺酸溶液。

(三) 操作步骤

1. 样品液的制备。稻米先脱壳、粉碎 (过 60 目), 脱脂。称取 60mg 左右脱脂样品 (精确至 1mg), 放入 50mL 容量瓶中, 加几滴无水乙醇, 使样品润湿, 加 10mL 0.25%

氢氧化钠,在40℃温度下振荡提取30min,或者在室温下放置6~15h之后摇动30~60s,再加10mL4%碳酸氢钠(pH8.5),摇匀,即为样品液。

2. 制备赖氨酸标准曲线。取L-赖氨酸盐酸盐(经氨基酸自动分析仪测定纯度为99.3%),在105℃温度下烘干3h,精确称取46mg,加0.25%氢氧化钠,待溶解后定容至100mL,即为2.5mmol/L赖氨酸标准溶液。吸取上述标准液0.1~0.7mL,均用0.25%氢氧化钠加至10mL,加入10mL4%碳酸氢钠,摇匀。再加入1%TNBS1mL,混匀,置于40℃的恒温箱内35min,取出,以蒸馏水定容至50mL,于430nm波长下用1cm比色皿测定光密度E,以E为纵坐标,赖氨酸的NH₂微克分子数为横坐标,制作标准曲线。

3. 测定。同一样品制备三份样品液,取其中两份,加1mL1%TNBS,摇匀,另一份不加TNBS(样品空白液),置于40℃恒温箱中保温35min,取出以蒸馏水定容至50mL(若有泡沫可加几滴乙醇消除),混匀。以4000r/min离心10min,离心液在430nm下用1cm比色杯(以试剂空白为对照)测定样液光密度E,样品空白液(以蒸馏水为对照)测定光密度E₀,查标准曲线,计算出稻米脱脂样品中赖氨酸含量。

(四) 结果计算

$$\text{脱脂样品中赖氨酸}(\%) = \frac{14.62A}{m_1} - \frac{14.62B}{m_2}$$

式中 A: 标准曲线查得光密度E的NH₂基浓度; B: E₀的NH₂基浓度; m₁: 样品液的样品质量(mg); m₂: 样品液空白的样品质量(mg)。

十三、DBL法测定谷物蛋白赖氨酸含量

(一) 方法原理

在酸性条件下,样品蛋白质中三种碱性基团(赖氨酸的ε-氨基;组氨酸的咪唑基与精氨酸的胍基)均呈正离子状态,能与偶氮磺本酸染料如酸性橙-12的磺酸基负离子结合形成不溶性复合物,所结合染料的克分子数(即染料结合量)相当于蛋白质分子中赖氨酸、组氨酸、精氨酸克分子数总和。而赖氨酸的ε-氨基与另外两个碱性基团不同,能与丙酸酐形成较稳定的酰胺类化合物,再与染料反应时便失去结合染料的能力,此时染料结合量为组氨酸、精氨酸克分子数之和。因此可以不必水解样品蛋白质,利用两次染料结合量之差,便可求得样品中赖氨酸含量。

由于染料结合是可逆平衡反应,平衡时染料结合量随剩余染料溶液浓度提高递增,因此应力求使酰化与不酰化样品与染料平衡时的剩余染料浓度接近相等。所以酰化样品质量必须要大于未酰化样品。见表9-4。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。实验用粉碎机,离心机(4000r/min),分析天平(感量0.0001g),实验用振荡器;G×D-201蛋白质分析仪(带有短光径流动比色池的比色计)或72型分光光度计,有塞试管及刻度吸管。

2. 试剂。①pH2.2磷酸盐缓冲液:3.4g磷酸二氢钾(KH₂PO₄),20g草酸溶于蒸馏水中,再加1.7mL85%磷酸(H₃PO₄),60mL冰醋酸,1mL丙酸,定容至1000mL。②

酸性橙 (acid orange 12, 相对分子质量 350.37) 染料溶液: 用磷酸盐缓冲液加热溶解染料, 配制成 3.89mmol/L 浓度溶液 (1.363mg/mL)。③16% 醋酸钠溶液: 称取 160g 无水醋酸钠于 1000mL 蒸馏水中。④丙酸酐 (C. P.)。

表 9-4 谷物和大豆种子的估计称样质量 单位: mg

样品名称	酰化样品质量 A、B	不酰化样品质量 C、D
籼稻糙米	800	600
粳、糯稻糙米	700 或 800	500 或 600
麦类大麦、小黑麦	500	400
普通玉米	800	600
奥帕克-2 玉米	700 或 500	500 或 400
高粱	1000	700
大豆	180	100

(三) 测定步骤

1. 样品制备。所有样品均磨细过 40 目筛, 贮存于密闭的样品瓶中备用。水分含量按常规烘干法测定。

2. 标准曲线制作。以 3.89mmol/L 浓度染料溶液配制成 1.00、1.10、1.20、1.30、1.40、1.50、1.60、1.70、1.80、1.90mmol/L 溶液, 在蛋白质分析仪上测定各溶液的透光率。以透光率为纵坐标, 染料浓度 mmol/L 为横坐标绘制标准曲线。或者将透光率换算为光密度, 再用最小二乘法计算出光密度与染料浓度之间的回归方程式。如果没有蛋白质分析仪, 可将上述溶液稀释 50 倍, 在 72 型光电比色计上, 于 482nm 下测定。同上绘制标准曲线或求出回归方程式。

3. 样品测定。参照表: 在分析天平上称取酰化与不酰化的样品两份, 分别放入 A、B 管 (酰化) 与 C、D 管 (不酰化), 向管中各加入 2mL 醋酸钠溶液。加 0.2mL 丙酸酐于 A、B 管中, C、D 管中加 0.2mL 缓冲液, 放置在振荡器上振荡 10min, 此时 A、B 管样品进行丙酰化反应。向各管分别加入 20mL 3.89mmol/L 染料溶液, 在振荡器上振荡 1h (水稻、大豆 2h), 使染料结合反应基本上达到平衡。反应液在 4000r/min 离心 10min, 然后在蛋白质分析仪上测定上清液 (即剩余染料溶液) 的透光率。或将反应液稀释 50 倍, 在 72 型光电比色计上比色测定。

(四) 结果计算

假设测定样品 A、B 管及 C、D 管在反应平衡时剩余染料溶液的透光率平均值分别为 T_{AB} (A、B 管平均) 和 T_{CD} (C、D 管平均), 从标准曲线上查出或据回归方程得到剩余染料溶液的浓度 (mmol/L) 分别为 c_{AB} 和 c_{CD} , 由下列公式即可求出赖氨酸含量。

$$\text{赖氨酸}\% = \left(\frac{3.89 - 1.11c_{CD}}{m_{CD}} - \frac{3.89 - 1.11c_{AB}}{m_{AB}} \right) \times 20 \times 10^{-3} \times 146.2 \times 10^{-3} \times 100$$

式中 3.89: 染料溶液原始浓度 (mmol/L); 20: 加入染料体积 (mL); 1.11: (20+2+0.2) 与 20 之体积比。若将标准系列各取 20mL 染料溶液, 分别加 2mL 醋酸钠及 0.2 缓冲液, 此值为 1; m_{AB} 、 m_{CD} : 分别为酰化样品与不酰化样品质量 (g); 146.2: 赖氨酸相对分子质量。

注意事项：①温度对丙酰化反应有明显影响。室温在 25℃ 以上，丙酰化反应速度非常迅速，只要样品与丙酸酐接触，反应很快就能完成，但在 15℃ 以下，完成丙酰化反应的时间需增加到 30min 以上。因此在 20~25℃ 之间，一般以 10min 为宜。②16% 的乙酸钠浓度 (pH8.5 左右) 对一般谷物、大豆均合适，10%~16% 对玉米、高粱也适用，而籼稻宜用 8% 乙酸钠。③随着温度升高，染料结合速度加快。但本方法是基于两份样品酰化与否的染料结合量之差来计算赖氨酸含量，所以在一般情况下不必采用高温振荡。室温 (20~25℃) 下，谷物一般采用 1h 振荡，水稻、大豆用 2h 振荡为宜。

十四、酶解法比色测定色氨酸含量

(一) 方法原理

色氨酸中吲哚基在浓硫酸及微量的 Fe^{3+} 存在下与乙醛酸缩合形成红紫色化合物，所产生的红紫色深浅与色氨酸含量成直线关系，可进行比色测定。紫红色化合物的最大吸收值在 550nm，试样通常用木瓜蛋白酶水解，经改进采用廉价的酸性蛋白酶在 pH5.0 和 40℃ 下使试样水解，并在发色剂中添加微量 Cu^{2+} ，明显降低了空白值，而且发色的灵敏性和稳定性均显著提高。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。恒温箱，分析天平 (感量 0.0001g)，索氏脂肪抽提器，72 型光电比色计，恒温水浴锅。

2. 试剂。①醋酸-醋酸钠缓冲剂：称取 3.4g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶于蒸馏水，加 125mL 0.1mol/L 醋酸，用蒸馏水稀释至 500mL，pH 为 5.0。②酸酶溶液：称取 1.6g 酸性蛋白酶制剂溶于 200mL 醋酸-醋酸钠缓冲剂中，过滤，保存在 4℃ 冰箱内。③ KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲剂：称取 3.27g KH_2PO_4 和 6.0g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于蒸馏水，稀释至 500mL，pH 为 7.4。④木瓜酶溶液：0.8g 木瓜酶溶于 200mL 的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲剂中，过滤，保存在 4℃ 冰箱内。⑤ FeCl_3 - CuCl_2 -冰醋酸试剂：称 135mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 85mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 0.5mL 蒸馏水中，用冰醋酸稀释至 500mL。⑥ 15mol/L 硫酸溶液：取 83mL 蒸馏水置于烧杯中，用量筒取 417mL 浓硫酸 (相对密度 1.84)，慢慢注入蒸馏水中，并不断搅动。⑦ 发色剂：在使用前 2h~1d，将 15mol/L H_2SO_4 在搅动下慢慢加入等体积的 FeCl_3 - CuCl_2 -冰醋酸试剂中，搅拌均匀。⑧ 色氨酸标准液：称取 20mg 色氨酸，用 5mL 0.1mol/L NaOH 溶解，移入 100mL 容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度，1mL 含色氨酸 200 μg 。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线制作。在 7 个 50mL 容量瓶中，分别加入色氨酸标准液 0、1.25、2.50、5.00、7.50、10.00、12.50mL 和酸酶溶液 5mL，摇匀后盖好，与试样消化液一起在 40℃ 恒温箱内放置 16~24h，取出用蒸馏水稀释至刻度，摇匀。各取 1mL 置带磨口塞玻璃管中，从滴定管注入 4.0mL 发色剂，摇匀后置于 65℃ 水浴中加热 15min 发色。取出玻璃管冷却，在 550nm 对照空白溶液读取光密度，并制作标准曲线。用相同步骤得出木瓜酶标准曲线。

2. 样品脱脂。谷物样品磨碎，过 40 目筛，取 1~2g 放入索氏抽提器中，按常规法用

乙醚边连续脱脂 6~8h, 烘干备用。

3. 水解。称取脱脂谷物样品 200mg 左右, 加 5mL 酸酶溶液, 摇匀, 放在 40℃ 恒温箱中水解 16~24h, 将水解后溶液移入 50mL 容量瓶, 用蒸馏水稀释至刻度。用木瓜酶水解在 65℃ 下进行 16~24h, 其余步骤同前。两种酶液均通过干滤纸过滤。

4. 比色。取 1.0mL 滤液置带塞玻璃管中, 加 4.0mL 发色液, 摇匀后在 65℃ 水浴中加热 15min 冷却, 对照空白溶液读取光密度。

(四) 结果计算

从相应的标准曲线查出色氨酸浓度, 计算试样中色氨酸百分含量

$$\text{色氨酸}(\%) = \frac{25\rho}{m}$$

式中 ρ : 比色液中色氨酸浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); m : 试样质量 (mg)。

十五、酸水解法测定色氨酸含量

(一) 方法原理

在 PDAB 试剂存在下, 蛋白质于 9.5mol/L 的硫酸中温和水解成游离色氨酸后立即与 PDAB 缩合, 经亚硝酸钠氧化而加速蓝色化合物的形成。在一定范围内, 蓝色深浅与色氨酸含量成正比。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g), 721 型分光光度计, 恒温箱, 具塞试管 (15mL)。

2. 试剂。10% 硫酸溶液; 6% 对二甲氨基苯甲醛 (PDAB); 6g PDAB 溶于 100mL 10% 硫酸溶液中; 9.5mol/L 硫酸溶液; 0.045% 亚硝酸钠溶液; L-色氨酸 (L-Trp)。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线绘制。准确称取 25mg 标准色氨酸样品放入 250mL 容量瓶中, 加入 200mL 蒸馏水及 10mL 0.1mol/L NaOH 溶液, 溶解后定容至刻度, 此溶液 1mL 含色氨酸 100 μg 。分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 标准色氨酸溶液于 6 支 15mL 试管中, 分别加入 6% 的 PDAB 溶液 0.5mL, 摇匀, 再加入 3mL 9.5mol/L 的硫酸溶液, 塞上管塞, 摇匀, 置于 25℃ 的恒温箱中水解缩合 2h 左右, 结束后再加入新近配制的 0.045% 的亚硝酸钠溶液 0.1mL, 摇匀, 待氧化 30min 后, 用蒸馏水定容至刻度, 在 721 型分光光度计上用 590nm 波长, 2cm 直径比色杯比色, 记下光密度值。

2. 样品测定。样品经磨机磨碎, 通过 40 目筛孔, 脱脂烘干。准确称取 20mg 的脱脂样品于 15mL 具塞试管中, 加入 6% 的 PDAB 溶液 0.5mL, 摇匀, 再加入 3mL 9.5mol/L 的硫酸溶液, 塞上管塞, 摇匀, 置于 25℃ 恒温箱中水解缩合 12h 左右, 结束后再加入新近配制的 0.045% 的亚硝酸钠溶液 0.1mL, 摇匀, 待氧化 30min 后, 用蒸馏水定容至刻度, 过滤, 在 721 型分光光度计上用 590nm 波长、2cm 直径比色杯比色 (每一样品均做平行试验)。

(四) 结果计算

由标准曲线对应查得色氨酸浓度，计算样品中色氨酸含量。

$$\text{色氨酸}(\%) = \frac{A \times 10^{-3}}{m} \times 100$$

式中 m ：样品质量 (mg)； A ：查标准曲线得的样品液色氨酸含量 (μg)。

注意事项：①本法用酸量少，若样品质量过大可能水解不完全，使结果偏低，一般称样 20mg 左右为好。②用 9.5mol/L 硫酸溶液水解样品中蛋白质，PDAB 对色氨酸有保护作用，其水解缩合时间 (25℃下) 需 12h 以上。③色氨酸与 PDAB 的缩合产物通常需用 NaNO_2 或 NaNO_3 氧化加速显色，本实验中加入 NaNO_2 溶液浓度在 0.045%~0.10% 之间对测定结果无影响。采用 0.1mL 0.045% 新配制的 NaNO_2 溶液氧化 30min 达到显色高峰，此后稍有下降。

十六、不水解蛋白质直接测定色氨酸含量

(一) 方法原理

蛋白质分子中色氨酸在浓硫酸溶液中能与对二甲基氨基苯甲醛试剂反应生成蓝色产物，其蓝色的深浅与色氨酸的量成线性关系，因此可以利用这一特性，蛋白质不必水解而直接色氨酸含量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g)，721 型分光光度计，刻度试管 (10mL)，刻度吸管 (1mL，5mL)。

2. 试剂。①10.7mol/L 硫酸：148mL 浓硫酸加蒸馏水稀释至 250mL。②0.25% 氢氧化钠溶液。③对二甲基苯甲醛溶液：600mg 对二甲基氨基苯甲醛溶于 180mL 10.7mol/L 硫酸中，溶液浓度达到 15mg/4.5mL。④1% NaNO_2 溶液：500mg NaNO_2 加蒸馏水至 50mL。⑤0.04% NaNO_2 溶液：取 1% NaNO_2 4mL，加蒸馏水至 100mL。⑥色氨酸标准液：10mg 色氨酸加少量蒸馏水，再加 1~2 滴硫酸，使其完全溶解，稀释至 100mL，浓度达 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线的制备。取色氨酸标准溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0~0.5mL，放入刻度试管中，均加入蒸馏水到 0.5mL，加入对二甲基氨基苯甲醛溶液 4.5mL，混匀，在室温下蔽光放置 1.5h，再各加入 0.05mL 0.04% NaNO_2 溶液，摇匀，放置 30min。以第一管作为空白对照，于 721 型分光光度计中以 600nm 波长处测定光密度值 (OD_{600})。制作标准曲线。

2. 蛋白质样品液制备：称 0.5g 脱脂谷物样品 (豆类为 0.25g)，加入 0.25% 氢氧化钠溶液 10mL，在 40℃ 水浴中振荡 30min，或在室温下放置 6~15h，再摇动 0.5min，静置。

3. 色氨酸测定：取 0.25mL 蛋白质样品液，加蒸馏水 0.25mL 及 4.5mL 对二甲基氨基苯甲醛溶液，按制备标准曲线操作，测定其光密度值。

(四) 结果计算

$$\text{色氨酸}(\%) = \frac{A}{0.25} \times 10 \times \frac{100}{m \times 10^6} = \frac{A}{250m}$$

式中 m : 样品质量 (g); A : 查标准曲线得样品液中色氨酸含量 (μg)。

十七、紫外吸收法测定色氨酸含量

(一) 方法原理

色氨酸和酪氨酸的吸收光谱, 在 pH6 的磷酸盐缓冲溶液中, 它们的吸收峰分别在 280nm 和 275nm。在此条件下, 色氨酸和酪氨酸的吸收曲线在 288nm 处几乎不重叠, 因此, 可在 288nm 波长下单独测定色氨酸。为补偿试样中酪氨酸在此波长所产生的少量吸收, 在绘制标准曲线时于色氨酸标准液中加入适量酪氨酸。粮食中可溶性碳水化合物, 非共轭型不饱和脂肪酸、饱和脂肪酸及多数维生素, 吸收峰都在 270nm 以下, 含有三个共轭键时, 吸收峰约在 270nm。为了消除干扰, 试样先用乙醚脱脂, 还需用氯仿萃取试样的水解液以除去残存的共轭型不饱和脂肪酸。维生素 C 与色氨酸的吸收曲线在 288nm 外有一小部分重叠, 但维生素 C 易被空气氧化成脱氢型, 其吸收在 210nm 以下, 而且粮食中维生素 C 含量很少, 故可不加考虑。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g), 751 型分光光度计, 索氏脂肪抽提器, 容量瓶 (50mL), 刻度试管 (10mL), 刻度吸管 (1mL, 5mL, 10mL), 分液漏斗 (25mL 或 50mL)。

2. 试剂。①磷酸盐缓冲剂: 将 3.465g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 1.0g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于蒸馏水, 稀释至 500 毫升, pH 为 6。②色氨酸标准液: 准确称取 20mg 色氨酸, 溶于 5mL 0.1mol/L NaOH 溶液中, 用盐酸调 pH 至 6, 稀释至 100mL, 1mL 含色氨酸 200 μg , 保存于冰箱内。③酸性蛋白酶溶液: 取 800mg 酸性蛋白酶溶于 50mL 0.2mol/L 醋酸, 加 50mL 0.1mol/L 醋酸钠溶液, 过滤, pH 约为 5。保存于冰箱内。④酪氨酸溶液: 称 20mg 酪氨酸溶于 5mL 0.1mol/L NaOH 溶液, 用盐酸调 pH 至 6, 稀释至 100mL, 1mL 含酪氨酸 200 μg 。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线绘制。在 8 个 50mL 容量瓶中, 加入 0.00、1.25、2.50、5.00、7.50、10.0、12.5、15.0mL 色氨酸标准液, 各加入 10mL 酸性蛋白酶溶液和 6.0mL 酪氨酸溶液 (谷物酪氨酸按试样 0.3% 加入, 豆类按试样 0.7% 加入), 用蒸馏水稀释至刻度。取上述标准液 1.0mL 注入刻度管, 加 3.0mL 磷酸盐缓冲液, 用蒸馏水稀释至 10mL, 摇匀, 用石英吸收并在 288nm 读取吸收值并绘制标准曲线。

2. 脱脂。取 1~2g 磨粉试样, 用滤纸包好, 置脂肪抽取器中, 用乙醚在水浴上回流浸提 4h, 取出蒸干乙醚。

3. 水解。称取 200mg 谷物脱脂试样 (豆类称 100mg) 置试管中, 一支试管作空白, 加 5.0mL 酸性蛋白酶溶液, 摇匀, 盖上软木塞, 在 45℃ 恒温箱中水解 16~24h, 移入 50mL 容量瓶, 用水稀至刻度, 干滤器过滤。

4. 萃取。取滤液 6mL 置 25mL 分液漏斗中, 加 4mL 氯仿, 振摇 1min, 分层后, 弃去氯仿层, 如此重复萃取四次。

5. 测定。取萃取后试液 2.0mL 置刻度管中，加 3mL 磷酸盐缓冲液，用蒸馏水稀释至 10mL，摇匀，用石英杯在 288nm 测量吸收值。从标准曲线查出试液浓度，计算色氨酸百分含量。

(四) 结果计算

$$\text{色氨酸}(\%) = \frac{\rho \times V}{m \times U} \%$$

式中 ρ : 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); V : 试液总体积 (mL); U : 取用的试液体积 (mL); m : 试样质量 (脱脂试样需换算成原样质量) (mg)。

十八、分光光度法测定蛋氨酸含量

(一) 方法原理

当蛋氨酸加入到一定量的乳酸中，在浓硫酸和羟基-联苯 (PHD) 存在下，蛋氨酸抑制乳酸与 PHD 的颜色反应，随蛋氨酸量增加，有色化合物吸收值成比例下降。在乳酸量为 $20\mu\text{g}$ ，蛋氨酸在 $5\sim 45\mu\text{g}$ 范围内符合比尔定律，可在 560nm 下进行比色测定。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g)，721 型分光光度计，恒温水浴锅，试管 (10mL)。

2. 试剂。① $40\text{g}/\text{L}$ 硫酸铜水溶液。② 1.5% P-羟基-联苯的 $0.2\text{mol}/\text{L}$ KOH 溶液 (PHD)。③ $0.1\text{mg}/\text{mL}$ 乳酸水溶液。④ *dl*-蛋氨酸标准溶液 ($0.1\text{mg}/\text{mL}$)，以 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 盐酸配制。⑤ 硫酸 (A. R.，相对密度 1.84)。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线绘制。取蛋氨酸标准溶液 0、0.05、0.15、0.20、0.25、0.35、0.45mL 放入试管中，除 0 管外，均加 0.2mL 乳酸 ($20\mu\text{g}$) 溶液，加蒸馏水稀释至 1mL，均加入 0.05mL 4% 硫酸铜、6mL 浓硫酸后，混合物置沸水浴中加热 5min，然后冷却至室温，再加入 0.1mL PHD 试剂，混匀溶液，于 30°C 温度下保温 30min (间歇摇动一次)。如果 PHD 不能完全溶解，需在沸水浴中再加热 1.5min。以试剂空白为对照，于 560nm 下测定冷却之溶液吸收值。以溶液吸收值为纵坐标，蛋氨酸含量 (μg) 为横坐标绘制标准曲线。

2. 样品中蛋氨酸测定。称取脱脂谷物样品 100mg 左右，加 $6\text{mol}/\text{L}$ 盐酸溶液 2mL，在 105°C 水解 24h，加蒸馏水稀释后，用 50mg 活性炭脱色，过滤，以 $1\text{mol}/\text{L}$ 盐酸溶液洗涤炭粉，先用 5mL 热的，然后用 2mL 冷的，滤液与洗液合并，用氢氧化钠溶液调 pH 至 3 左右，加 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 盐酸溶液稀释成 50mL。取 0.8mL 样品液，加入 0.2mL 乳酸 ($20\mu\text{g}$) 液，0.05mL 4% 硫酸铜溶液及 6mL 浓硫酸，在自来水中冷却。混合物置沸水浴中加热 5min，然后冷却至室温，再加 0.1mL PHD 试剂，混匀，于 30°C 下保温 30min (间歇摇动一次)。若 PHD 不能完全溶解，需在沸水浴中再加热 1.5min，以试剂空白为对照 (不加乳酸)，于 560nm 下同上进行比色测定。

(四) 结果计算

由样品测定的光密度值查蛋氨酸标准曲线得 $\Lambda\mu\text{g}$ 蛋氨酸则：

$$\text{样品中蛋氨酸 (\%)} = \frac{A}{0.8} \times 50 \times \frac{100}{m \times 1000} = \frac{5A}{0.8m}$$

式中 A : 样品测定液中蛋氨酸含量 (μg); m : 样品质量 (mg)。

注意事项: ①在用盐酸水解蛋白质样品时, 蛋氨酸会有不同程度的破坏。对含淀粉多的样品预先采用 100 倍 5% 三氯醋酸煮沸, 溶解淀粉, 在水解过程中, 加一些保护剂, 如巯基乙酸、巯基乙醇、苯酚、草酸等, 可提高蛋氨酸回收率。②硫酸浓度、 Cu^{2+} 含量对显色强度有明显影响, 溶液中硫酸浓度在 14mol/L 以下不显色, 而且混浊, 15mol/L 以上才能形成紫红色透明溶液。 Cu^{2+} 催化乙醛与 PHD 反应, 随其含量增加, 显色强度增大。③显色时随着温度升高, 颜色强度减弱。一般在 30°C 显色 30min 较为适宜, 显色后的溶液在室温下放置, 2h 内基本上是稳定的 (每 10min 增加光密度值 $0.004 \sim 0.006$)。④在乳酸溶液中, 吸收值降低的蛋氨酸含量范围为 $5 \sim 45\mu\text{g}$ 。下列氨基酸: Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Gys, leu, Phe, Lys, His, Arg) 在 $0.25\mu\text{g}$ 分子以上不妨碍蛋氨酸测定。

十九、蛋氨酸的比色测定 (硝普盐法)

(一) 方法原理

蛋氨酸与硝普盐, 即一亚硝基五氰络铁酸盐 $[\text{Fe}(\text{NO})(\text{CN})_5]$ 反应呈有色化合物。并且此显色试剂对胱氨酸、半胱氨酸、高胱氨酸及除色氨酸以外的其他氨基酸均不呈色, 而色氨酸在本试验的水解过程中已被破坏。蛋氨酸测定范围为 $25 \sim 200\mu\text{g}$ 。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。恒温水浴锅, 恒温烘箱, 72 型分光光度计。
2. 试剂。① 14.3mol/L 氢氧化钠溶液: 溶解 57.2g 氢氧化钠于蒸馏水中并稀释至 100mL 。② 盐酸-磷酸混合溶液: 9mL 浓盐酸与 1mL 85% 磷酸混合而成。③ 1% 甘氨酸溶液。④ 10% 硝普盐溶液。⑤ 1mol/L 盐酸溶液。⑥ 20% 盐酸溶液。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线制备。称 50mg (精确至 1mg) 蛋氨酸, 加入 0.1mol/L 盐酸液溶解, 并稀释至 50mL 。取此液 5mL , 加 0.1mol/L 盐酸液至 50mL , 混匀。即 1mL 含 $100\mu\text{g}$ 蛋氨酸。取 8 支干净有塞试管, 分别加入 $0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.7, 1.9\text{mL}$ 蛋氨酸标准液 ($100\mu\text{g}/\text{mL}$), 均以 0.1mol/L 盐酸稀释至 5mL , 按顺序加入下述试剂并混匀: 1mL 14.3mol/L 氢氧化钠, 1mL 1% 的甘氨酸溶液及 0.3mL 10% 的新配制的硝普盐溶液, 在 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 水浴中加热 $5 \sim 10\text{min}$, 然后用冰水冷却 2min , 并加入 5mL 盐酸-磷酸混合液, 摇匀, 再于室温水浴中冷却 $5 \sim 10\text{min}$, 于波长 540nm 下比色测定, 以光密度值为纵坐标, 蛋氨酸含量为横坐标做标准曲线。

2. 样品中蛋氨酸含量的测定。称 50mg 谷物样品放入安培瓶中, 加入 2mL 20% 盐酸并放入 105°C 恒温箱中水解 24h 。稀释后用 50mg 活性炭脱色, 过滤, 炭粉用 1mol/L 盐酸洗涤, 先用 5mL 热的, 然后用 2mL 冷的。滤液与洗液合并, 并用 5mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 3.5 , 然后用 0.1mol/L 盐酸稀释至 100mL 。吸取样本液 5mL 并按顺序加

入下述试剂, 摇匀: 1mL 14.3mol/L 的氢氧化钠, 1mL 1%甘氨酸溶液及 0.3mL 10%的新配硝普酸钠溶液, 在 30~40℃水浴中加热 5~10min, 然后用冰水冷却 2min 并加入 5mL 盐酸-磷酸混合溶液, 摇匀, 再于室温下的水浴中冷却 5~10min, 在 540nm 波长下比色测定其光密度。

(四) 结果计算

$$X = \frac{A}{5} \times V \times \frac{100}{m \times 10^6} = \frac{A}{500m}$$

式中 X: 样品中蛋氨酸百分含量; A: 待测样品液中蛋氨酸含量 (μg); m: 样品质量 (g); V: 样品稀释液的总体积 (mL)。

二十、苯丙氨酸含量的测定

(一) 方法原理

苯丙氨酸与茚三酮及铜盐反应生成荧光复合物, *l*-亮氨酸-*l*-丙氨酸二肽能增强这一反应。荧光复合物的最高激发波长为 385nm, 最高发射波长为 490nm。苯丙氨酸含量在 0~12 μg 的范围内和相对荧光值符合直线关系。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g), 荧光比色计, 恒温干燥箱, 容量瓶 (50mL), 试管 (10mL), 刻度吸管 (1mL, 5mL)。

2. 试剂。

(1) 二肽-茚三酮试剂。试剂 A: 5mmol/L 亮丙二肽溶液: 称取 *l*-亮氨酸-*l*-丙氨酸 (相对分子质量 202.25) 1mg 溶于 1mL 蒸馏水 (临用时配制)。试剂 B: 30mmol/L 茚三酮溶液: 称取茚三酮 (相对分子质量 178.15) 534mg 溶于 100mL 蒸馏水 (冰箱内贮存)。试剂 C: 0.6mol/L 琥珀酸盐缓冲液: 称取琥珀酸 7.086g, 加蒸馏水约 25mL, 加入 4.8mol/L 氢氧化钠 (称取 9.6g 溶于 50mL 蒸馏水) 约 22mL, 调节至 pH5.88, 加蒸馏水至 100mL, 冰箱内贮存。临用前将试剂 A、B、C 三种溶液按 1:2:5 容积比混合。

(2) 铜试剂。试剂 C: 25mmol/L 碳酸钠-0.4mmol/L 酒石酸钾钠溶液: 称取无水碳酸钠 2.66g、酒石酸钾钠 (含 4 份结晶水) 113mg 加蒸馏水至 1000mL。试剂 D: 0.8mol/L 硫酸铜溶液: 称取 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 100g, 溶于 500mL 蒸馏水。临用前将试剂 C、D 两液按 3:2 容积比混合。

(3) 标准苯丙氨酸溶液。精确称取 *l*-苯丙氨酸 (相对分子质量 165.19) 15.0mg, 溶于 100mL 蒸馏水中, 冰箱内贮存, 在制备工作液时, 吸取上液 2.5mL, 加蒸馏水至 50mL, 即为 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(三) 测定步骤

精确称取脱脂种子样品 50~150mg, 加 6mol/L 盐酸 2mL, 于 105℃烘箱中水解 24h, 取出以蒸馏水转移到 100mL 容量瓶中, 加 2mol/L 氢氧化钠溶液调至中性, 定容至刻度, 过滤。取三支试管, 分别为测定管 (A)、标准管 (B)、空白管 (C)、在 A 管中加 0.2mL 样品液, B 管中加 0.2mL 标准苯丙氨酸 (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C 管中加 0.2mL 蒸馏水。于各管

中加 0.3mL 二肽-茚三酮试剂, 混匀。放在 75℃ 水浴中保温 80min (或在 65~70℃ 下保温 140min 左右), 取出试管, 浸入自来水中冷却, 加入 2.5mL 铜试剂, 摇匀后在 90min 内测定荧光强度 (测定时激发光波为 385nm, 发射光波长 472nm)。

(四) 结果计算

根据下式计算苯丙氨酸含量。

$$\text{苯丙氨酸 (mg/100g)} = \frac{A-C}{B-C} \times \rho \times V_3 \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{100}{m \times 1000} = \frac{A-C}{B-C} \times \frac{75}{m}$$

式中 A: 测定管荧光强度; C: 空白管荧光强度; B: 标准管荧光强度; ρ : 苯丙氨酸浓度 ($\mu\text{g/mL}$); V_1 : 标准液体积 (mL); V_2 : 样品液总体积 (mL); V_3 : 样品待测液体积 (mL); m : 样品质量 (g)。

注意事项: ①反应温度、时间对荧光强度有显著影响。在 60~80℃ 中保温, 随温度升高, 荧光值也增高, 而且荧光物质生成的时间加快, 超过 80℃ 荧光值又显著降低。从保温完毕加入铜试剂算起, 相对荧光值约稳定 90min。②苯丙氨酸和茚三酮、铜盐作用只有二肽存在下才有荧光产生。在 pH5.8 时, 除苯丙氨酸外, 亮氨酸、精氨酸也产生荧光, 相当于等当量苯丙氨酸的 4%, 其余氨基酸均小于 0.5%, 因而对苯丙氨酸有较好的专一性。

二十一、多种氨基酸含量的测定 (HPLC 法)

(一) 分析原理

蛋白质经盐酸水解或游离氨基酸, 再用高效液相色谱进行测定。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高压液相色谱仪, 荧光检测仪, 积分仪, 分析天平, 真空泵, 酒精喷灯, 恒温烘箱, 硬质厚壁玻璃试管 (180mm×18mm), 容量瓶 (50mL), 平底小烧瓶 (5mL), 小玻璃瓶等。

2. 试剂。①浓盐酸, 硼酸 (均为分析纯)。②丙酮, 氢氧化钠, 醋酸钠, 醋酸 (均为分析纯)。③乙腈 (光谱纯), 正戊醇 (HPLC 级纯)。④6mol/L 盐酸: 浓盐酸 496mL, 加蒸馏水稀释至 1000mL 即可。⑤去沫剂: 正辛醇或十氢萘。⑥冷却剂: 液氮或干冰。⑦干燥剂: 硅胶、无水氯化钙或氧化钙。⑧酸吸收剂: 固体氢氧化钠或氧化钙; Fmoc (9-氟甲基氯甲酸盐)。⑨氨基酸内标溶液: 准确称取 40mg 缬氨酸溶于 10mL 0.1mol/L 盐酸中, 并用重蒸馏水定容到 100mL。⑩Fmoc 溶液: 准确称取 155mg Fmoc 溶于 40mL 丙酮中。在黑暗下 4℃ 保存, 并在 100 天内有效。⑪0.5mol/L 硼酸溶液: 称取 61.83g 硼酸定容到 2000mL, 并用氢氧化钠调节 pH 至 7.7。⑫醋酸钠缓冲液: 取 3.0mL 醋酸 (96%) 置 1000mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 并用 30% 的氢氧化钠调节 pH 至 4.2。

(三) 操作步骤

1. 样品水解。精确称取 30mg 左右的样品, 置 180mm×18mm 试管底部, 加 10mL 6mol/L 盐酸, 2 滴去沫剂。将试管在距离口 1~2cm 处用喷灯加热并拉成细至直径 2mm 的玻璃管, 将试管放入干冰中冷冻 2min。将试管与真空泵相连, 抽至基本无气泡为

止, 并立即用酒精灯封管。将封好口的试管置于恒温烘箱内, 于 $110\text{C} \pm 1\text{C}$ 水解 24h。冷却后打开试管, 将水解液过滤至 50mL 容量瓶中, 用蒸馏水反复冲洗试管和滤纸, 然后定容至刻度, 混匀。取清液 1.0mL 置 5mL 平底小烧瓶中, 于减压加热下蒸干 (酸蒸气用干燥剂或酸吸收剂吸收), 残留物用 1.0mL 重蒸馏水溶解并蒸干, 此操作反复 2~3 次, 最后一次蒸干后置 4C 冰糖中保存。

2. 衍生。于上述小烧瓶中加 2.0mL 稀释液 (含内标缬氨酸 0.2mg/mL), 并摇动至完全溶解。从小烧瓶中取 0.1mL 试样于小试管中, 加 0.4mL 硼酸, 稍许摇动。加 0.6mL FMOC 于试管中, 稍许摇动并等 1min。加 2mL 正戊醇于试管中用力摇动, 静置一会儿后抽掉界面上的液体, 该过程反复 2~3 次 (目的在于除去多余的 FMOC)。从试管中取 100 μ L 样液置于一平底小玻璃瓶中, 并加 1.0mL 洗脱液 A (见色谱条件), 摇匀后 4C 冰箱中, 待上机分析。

3. 色谱条件。色谱柱: Lichro CART Super—spher CH-8 250mm \times 4mm; 流动相: A 液乙腈-醋酸钠 (20:80), B 液乙腈-醋酸钠 (70:30); 检测器: 荧光 EX = 260nm EM = 310nm; 进样量: 20 μ L; 梯度洗脱程序: 见表 9-5。

表 9-5

时间/min	流速/mL \cdot min ⁻¹	A 液 (体积分数) /%	B 液 (体积分数) /%
0.0	1.0	90	10
10.0	1.0	78	22
20.0	1.0	70	30
26.0	1.0	60	40
52.0	1.0	10	90
52.5	1.0	0	100
56.0	1.0	100	0
56.5	1.0	90	10

(四) 计算

$$\text{氨基酸含量}\% = S \times \frac{C_0}{S_0} \times \frac{S_n \times S_q}{C_p \times C_q} \times \frac{D}{m}$$

式中 S : 样品某氨基酸峰面积; C_0 : 标准某氨基酸含量; S_0 : 标准某氨基酸峰面积; S_p : 标准缬氨酸峰面积; S_q : 样品缬氨酸峰面积; C_p : 标准缬氨酸含量; C_q : 样品缬氨酸含量; D : 稀释倍数 \times 100%; m : 样品质量 (mg)。

注意事项: ①本实验只详细介绍了高压液相色谱分析氨基酸的一种水解方法—封管水解法, 另外还有一些其他的方法, 如消化瓶水解法、回流水解法、封管氧化水解法、碱水解法等。②色谱条件中的梯度程序可根据柱的填料及长短而改变。

二十二、多种氨基酸含量的测定 (苯基异硫氰酸酯柱前衍生 HPLC 法)

(一) 分析原理

高效液相色谱 (HPLC) Pico-Tag 法因采用柱前衍生, 反相色谱分离, 具有分析时间

短、灵敏度高、重现性好等优点，广泛地用于各种类型样品的氨基酸成分分析。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。美国 Millipore 公司 Waters 色谱业务部生产的 HPLC 产品，包括 Pico-Tag 工作台，510 型泵两台，U6k 型手动进样器，TCM 型柱温控制器，484 型紫外检测器，810 色谱工作站。

2. 试剂。①乙腈（色谱级），三乙胺（色谱级），异硫氰酸苯（PITC，Waters 公司提供），水解氨基酸（HAA，Waters 公司提供），6mol/L HCl（优级纯），乙醇（分析纯），三水醋酸钠（分析纯），磷酸氢二钠（分析纯）。②A 液：19.0g 三水醋酸钠，0.5mL 三乙胺溶解于 1L 超纯水中。用冰醋酸调 pH 为 6.4，用 0.45 μ m 滤膜过滤，取此液 940mL，加入 60mL 乙腈，混匀，超声波脱气 20s（或冲氮保存）。③B 液：分别量取 600mL 乙腈，400mL 水，混匀，超声波脱气 20s 备用。④样品水解液：1g 苯酚溶解于 6mol/L HCl 100mL 中。⑤再干燥液：乙醇-水-三乙胺=2:2:1。⑥衍生液：异硫氰酸苯（PITC）-乙醇-三乙胺-水=1:7:1:1。⑦样品稀释液：取 710mg Na₂HPO₄ 加超纯水至 1000mL，用 10%磷酸-乙腈（95:5）调 pH 为 7.4 备用。

(三) 实验步骤

1. 样品处理及分析。样品于 105℃ 烘至恒重，用研钵磨细，精确称取 100mg 左右样品放入 180mm×18mm 试管中，加 6mol/L HCl 10mL，巯基乙醇 20 μ L，正辛醇二滴，混匀，冲氮，封管。于 110℃ 水解 24h，定容至 50mL，混匀，用 0.45 μ m 滤膜过滤。取滤液 20 μ L，放入 6mm×50mm 小管，装入水解台，在 60~100mT 下干燥 20~30min，加 15 μ L 再干燥液，混匀，干燥 20~30min。加 20 μ L 衍生液，混匀，室温下放置 10min。干燥之后，加入 100 μ L 样品稀释液，混匀，即可进样分析。

2. 色谱条件。柱温：38℃，波长：254nm，0.1AUFS；柱：Pico-Tag HAA-Column 3.9mm i. d. ×150mm，流动相梯度程序见表 9-6；

表 9-6

时间/min	流速/mL·min ⁻¹	A 液 (体积分数) /%	B 液 (体积分数) /%	曲线号
开始	1.0	100	0	+5
10.0	1.0	54	46	0
10.5	1.0	0	100	0
11.5	1.0	0	100	0
12.0	1.5	0	100	0
12.5	1.5	100	0	0
20.0	1.5	100	0	0
20.5	1.0	100	0	0

(四) 结果计算

氨基酸组分定性用保留时间，定量用外标法，数据计算由色谱工作站完成。

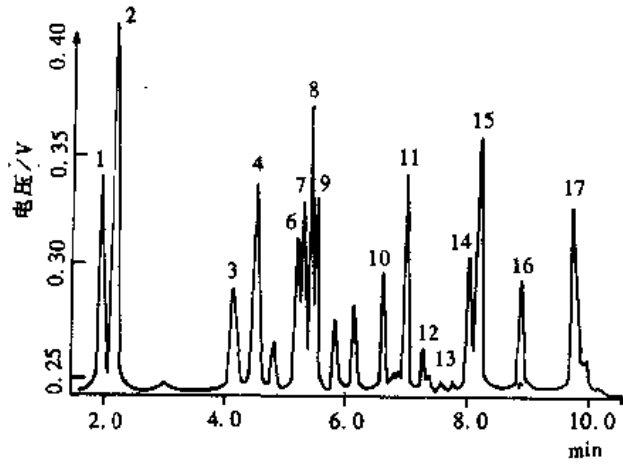


图 9-1 野蕨菜氨基酸组分图 (括号内为保留时间, 单位为 min)

- 1—Asp (1.83) 2—Glu (2.06) 3—Ser (3.82) 4—Gly (4.08) 5—His (4.36) 6—Arg (4.73)
 7—Thr (4.88) 8—Ala (4.95) 9—Pro (5.14) 10—Tyr (6.35) 11—Val (6.74) 12—Met (7.04)
 13—Cys (7.48) 14—Ile (7.78) 15—Leu (8.04) 16—Phe (8.59) 17—Lys (9.43)

第十章 碳水化合物

一、旋光法测定谷物种子粗淀粉含量（氯化钙-醋酸法）

（一）分析原理

在加热及氯化钙-醋酸的作用下，淀粉水解并转入溶液中，以硫酸锌沉淀蛋白质。在特定条件下，淀粉的比旋度为 203，从而测出谷物种子中粗淀粉含量。

（二）仪器、设备

1. 仪器。分析天平：(感量 0.001g)，实验室用粉碎机，电热恒温甘油浴锅：恒温 $119\text{C} \pm 1\text{C}$ ，旋光仪：灵敏度 0.01，三角瓶：规格 150mL、250mL，容量瓶：100mL，中速定性滤纸：15~18cm。

2. 试剂。(1) 氯化钙-醋酸溶液：500g 氯化钙 ($\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 二级) 溶于 600mL 蒸馏水中，过滤至澄清为止，用波美比重表 (或比重瓶) 在 20C 条件下调相对密度至 1.3，滴加醋酸并用精密 pH 试纸调 pH 为 2.3 左右，再用酸度计准确调 pH 至 2.3 (每 1000mL 溶液约加冰醋酸 2mL)。(2) 30% 硫酸锌溶液：取 30g 硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 二级) 用蒸馏水溶解并稀释至 100mL。(3) 15% 亚铁氰化钾溶液：取 15g 亚铁氰化钾 [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，二级]，用蒸馏水溶解并稀释至 100mL。

（三）测定步骤

1. 样品准备。选取有代表性的谷物种子，挑选干净，按四分法缩减取样约 20g，充分风干后，粉碎，95% 过 60 目筛，装入磨口瓶备用 (水稻、谷子、高粱等需先脱壳再粉碎)。

2. 称样。称取过 60 目筛的样品 2.5g，精确至 0.001g。同时称样测定水分。

3. 水解。将称好的样品放入 250mL 三角瓶中，先加 10mL 氯化钙-醋酸溶液，充分摇匀 (可溶性淀粉为 $117\text{C} \pm 1\text{C}$) 甘油浴中，使之在 5min 内达到恒温，再继续加热 25min，立即放入冰水槽中。

4. 提取。用 30mL 蒸馏水，少量多次地将三角瓶内水解溶液全部转入 100mL 容量瓶中，加 1mL 30% 硫酸锌溶液沉淀蛋白质，摇匀，再加 1mL 15% 亚铁氰化钾溶液，消除剩余硫酸锌的干扰，摇匀。若有气泡，可加几滴无水乙醇消除，用蒸馏水定容至刻度，用中速滤纸过滤，并弃掉初滤液 (10~15mL)。

5. 测定。将滤液装满 2dm 旋光管。测定前先用空白液调整旋光仪零点，在 20C 条件下，测定前先用空白液调整旋光仪零点进行旋光测定，取两次读数平均值。

（四）结果计算

$$\text{粗淀粉}(\%) = \frac{a \times 10^5}{L \times m \times 203 \times (100 - K)}$$

式中 a ：旋光仪上读出的旋转角度； L ：旋光管长度 (dm)； m ：取样质量 (g)； K ：样

品水分含量；203；淀粉的比旋度。

两个平行相对误差不得大于1%，即两个平行旋光读值约不大于0.07度。

二、旋光法测定粗淀粉含量（盐酸水解法）

（一）方法原理

在加热及稀盐酸的作用下，淀粉水解并转入盐酸溶液中，在一定的水解条件下，不同作物淀粉的比旋光 $[\alpha]_D^{20}$ 是不同的，其值在171~195之间。

（二）仪器、设备

1. 仪器。自动旋光仪（或一般旋光仪）；分析天平（感量0.01g），水浴锅，实验室用粉碎机，100mL容量瓶。

2. 试剂。①0.32mol/L盐酸（需要标定，准确配制）溶液。②30%硫酸锌溶液。③15%亚铁氰化钾溶液。

（三）测定步骤

将分析用种子粉碎过40目筛，用分析天平称取混合后的细粉2.5g（精确至0.01g），将试样移入50mL容量瓶中，向其中加入25mL 0.32mol/L盐酸溶液，开始先加入少量振荡内容物至试样全部湿润，然后用此溶液将瓶壁径上的颗粒洗下。将容量瓶置于沸水浴中，使容量瓶的大部分浸入水中，且保持水一直沸腾15min后取出，迅速冷却至室温。

加1mL 30%硫酸锌，用力混和后加入1mL亚铁氰化钾，重新混合，沉淀蛋白质得澄清溶液，如有泡沫形成可用1~2滴乙醇予以消除，用蒸馏水加至刻度，摇匀。并以滤纸过滤，滤液收集在干燥的三角瓶中。将滤液装入旋光管，并立即在旋光仪上进行测定，迅速读出旋光角度数，每个样品读三次。计算出平均值。

（四）结果计算

淀粉含量百分数按下式计算：

$$X = \frac{100 \times \alpha}{[\alpha]_D^{20} \times L} \times \frac{V}{m}$$

式中 X：淀粉含量百分数； α ：在旋光仪上所读出的旋转角度； $[\alpha]_D^{20}$ ：淀粉的因素；L：旋管的管长（dm）；m：样品质量（g）；V：样品液总体积。

表 10-1 淀粉的因素

品种	淀粉因素	品种	淀粉因素
小麦	182.7	玉米	184.6
黑麦	184.0	马铃薯	195.4
大麦	181.5	小米	171.4
水稻	185.9	荞麦	179.5

三、比色法快速测定淀粉含量

(一) 方法原理

淀粉在浓硫酸中加热条件下,迅速水解生成糠醛,糠醛与茴酮($C_6H_4COC_6H_4CH_2$)作用能产生一种蓝绿色化合物,淀粉在 $10\sim 140\mu g$ 范围内其颜色深浅与淀粉量成正比关系。淀粉的结构(直链、支链淀粉)及两种组分含量变化对显色没有影响。样品液中蛋白质含量在 $150\mu g$ 以下不影响测定结果。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平(感量 $0.0001g$),分光光度计,水浴锅,有塞试管($10mL$),刻度吸管($10mL$),容量瓶($50mL$)。

2. 试剂。①茴酮-硫酸溶液:称 $0.4g$ 茴酮溶于 $100mL$ 88%硫酸(约84份体积97%浓硫酸与16份体积水混合)中。密封在磨口瓶中。冷却至室温备用。此液当天配制。② $0.5mol/L$ 氢氧化钠溶液。③标准淀粉溶液:称取淀粉纯品(也可用直链淀粉或支链淀粉纯品) $50mg$,加 $0.5mol/L$ 氢氧化钠溶液 $10mL$,在水浴中加热至完全分散,冷却,以蒸馏水稀至 $50mL$ ($1mg/mL$)。在制备标准曲线时,取 $1mg/mL$ 淀粉溶液 $5mL$,加蒸馏水稀释至 $50mL$,即为 $100\mu g/mL$ 淀粉液。

(三) 测定步骤

1. 淀粉标准曲线制备。取 $100\mu g/mL$ 淀粉标准液 $0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4mL$,均加蒸馏水至 $2mL$,再加茴酮硫酸溶液 $6.0mL$,放在沸水浴中准确加热 $7min$,取出冷却至室温,于 $640nm$ 下测定各管溶液光密度,以光密度为坐标,相应各管淀粉 μg 量为横坐标,制备淀粉标准曲线。

2. 样品中淀粉提取及测定。准确称取 $40mg$ 左右粉碎过 60 目筛的谷物样品放入 $50mL$ 容量瓶中,加少量无水乙醇湿润样品及 $0.5mol/L$ 氢氧化钠溶液 $5mL$,在热水浴中加热 $10min$,并间歇轻摇几次,取出。冷至室温,以蒸馏水定容至 $50mL$,混匀。取样品稀释液 $1\sim 2mL$,同上制备淀粉标准曲线操作测定样品液光密度,查标准曲线得样品测定液中淀粉含量。

(四) 结果计算

$$\text{淀粉}(\%) = \frac{A}{V} \times \frac{V_1 \times 50}{V_2} \times \frac{100}{m \times 10^3}$$

式中 A : 查淀粉标准曲线得样品测定液淀粉量(μg); V : 样品测定液体积(mL); V_1 : 样品稀释液总体积(mL); V_2 : 样品稀释液所取样品液体积(mL); m : 样品质量(mg)。

注意事项:①谷物样品中,含可溶性糖较低,而且葡萄糖、果糖在稀碱溶液中加热煮沸 $15min$ 已被破坏,与茴酮试剂不显色,仅残留少量的蔗糖,对测定结果影响不大。②硫酸含水量对淀粉显色有影响,因此需要配制一批供较长时间使用。③反应温度、显色时间均影响显色强度,应尽量控制一致。④有文献报道,当含有较多色氨酸的蛋白质时,糖的显色反应不稳定,呈现红色。本实验中,蛋白质含量在 $150\mu g$ 以下,不影响测定结

果,因而测定谷物子粒淀粉含量,不需要沉淀蛋白质。

四、还原糖、非还原糖及淀粉含量系统分析

(一) 方法原理

还原糖具有醛基和酮基,在碱性溶液中能还原铜试剂中的二价铜成一价氧化亚铜,砷钼酸试剂可与氧化亚铜生成蓝色溶液,砷酸盐可使蓝色加深,生成的钼蓝溶液于 560nm 下的光密度与还原糖浓度呈正比例的关系。基于样品中还原糖的测定,按不同程序水解,从而可测定出非还原糖,淀粉含量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。离心机 (4000r/min), 水浴锅, 分析天平 (感量 0.0001g), 光电比色计, 25mL 及 10mL 有塞刻度试管。

2. 试剂。

(1) 铜试剂。称取酒石酸钾钠 12g, 无水碳酸钠 24g, 研成细粉, 再称取碳酸氢钠 16g, 三者分别溶于 3 份 200mL 蒸馏水中, 然后将 3 份溶液混匀。另称取硫酸铜 4g, 溶于 200mL 蒸馏水中, 在搅拌下倒入上述混合液中, 再加入 180g 无水硫酸钠。于沸水浴中加热 20min, 冷却, 若有沉淀需过滤, 稀释至 1000mL。保存在 20℃ 以上处。

(2) 砷钼酸试剂。称取 25g 钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, 溶于 450mL 蒸馏水中, 再加 22mL 浓硫酸, 混匀。另取 3g 砷酸氢钠 $(\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, 溶于 25mL 蒸馏水中, 将此溶液与上述酸性钼酸铵溶液混合均匀。放在 37℃ 下保温 24~48h 后贮藏于棕色瓶中。

(3) 标准葡萄糖溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。准确称取干燥的葡萄糖 100mg 溶于 100mL 蒸馏水中, 即为贮备液, 可加几滴甲苯或几粒苯甲酸钠防腐。取贮备液 5mL 加蒸馏水稀释至 50mL 为葡萄糖工作液。

(4) 3mol/L 盐酸溶液。

(5) 3mol/L 氢氧化钠溶液。

(三) 测定步骤

1. 葡萄糖标准曲线制备。取 6 支干燥试管分别加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 葡萄糖工作液, 均加蒸馏水至 2mL, 再加入铜试剂 1mL, 并分别塞上玻璃塞。放在沸水浴中煮沸 15min, 取出冷却至室温, 加 1mL 砷钼酸试剂, 以蒸馏水稀释至 10mL, 混匀, 于 560nm 下以 1cm 比色杯测定光密度, 以各管光密度为纵坐标, 葡萄糖浓度为横坐标, 绘制标准葡萄糖工作曲线。

2. 样品液制备。对于大批植株, 谷物样品先在 105℃ 烘箱中烘 20min, 再置于 70~80℃ 温度下烘干, 研成粉末, 贮藏在有塞玻璃瓶中。若用新鲜样品分析, 将新鲜样品放在水蒸气中处理 15min, 以纯化酶活性。取干样品粉末 0.1~0.2g 或新鲜样品 0.2g 左右 (精确至 1mg), 放在研钵中加入 5mL 蒸馏水研磨至匀浆状物。以 5mL 蒸馏水将浆状物移到离心管中, 以 3000r/min 离心 5min, 离心液倒入干净试管中, 再向盛有沉淀物的离心管加 5mL 蒸馏水并搅拌沉淀物, 离心 (重复两次), 合并离心液, 以蒸馏水定容至 25mL

(A液), 此液做还原糖和非还原糖测定。

3. 水解。以 10mL 3mol/L 盐酸将离心管中沉淀物全部转移到容量瓶中, 盖上玻璃盖, 放在沸水浴中煮沸 40~45min, 取出冷却至室温, 以 3mol/L 的氢氧化钠溶液 10mL 中和其酸性, 加蒸馏水定容至 50mL 混匀, 静置。取上面清液 2mL 加蒸馏水稀释至 50mL, 混匀。此稀释液作淀粉测定用 (B液)。

4. 样品测定。还原糖测定, 取 A 液 2mL 放入有塞试管中, 加铜试剂 1mL 塞上试管塞, 放在沸水浴煮沸 15min, 取出冷却至室温。加 1mL 砷钼酸试剂, 以蒸馏水稀释至 10mL 混匀, 在 560nm 下以 1cm 比色杯测定样品液光密度 ($E_{\text{还}}$)。

5. 非还原糖测定。取 A 液 1mL 放入有塞试管中, 加 0.5mol/L 盐酸 0.5mL 放在沸水浴中 15min, 取出冷却至室温。加 0.5mol/L 氢氧化钠溶液 0.5mL, 加铜试剂 1mL 塞上试管塞, 放入沸水浴中煮沸 15min, 取出冷却至室温。加 1mL 砷钼酸试剂, 以蒸馏水稀释至 10mL 混匀, 同上比色测定样品液光密度 ($E_{\text{还+非还}}$)。

6. 淀粉测定。取 B 液 2mL 加铜试剂及砷酸试剂同上述还原糖测定步骤得光密度 ($E_{\text{淀粉}}$)。

(四) 结果计算

由 $E_{\text{还}}$, $E_{\text{(非还+还)}}$, $E_{\text{(淀粉)}}$ 查标准葡萄糖工作曲线得相应的单糖量 X、Y、Z (μg)。

$$\text{样品中还原糖}(\%) = \frac{25X}{2m} \times 100 \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{1000} = \frac{0.125X}{100m}$$

$$\begin{aligned} \text{样品中非还原糖}(\%) &= \frac{25(2Y - X)}{2m} \times 100 \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{1000} \times 0.05 \\ &= \frac{0.95(2Y - X)}{800m} \end{aligned}$$

$$\text{样品中淀粉}(\%) = \frac{50Z}{m \times 2} \times \frac{50}{2} \times \frac{100}{1000} \times \frac{1}{1000} \times 0.90 = \frac{0.9Z}{16m}$$

式中 m : 样品质量 (g); X: 查标准曲线得 2mLA 液中还原糖量 (μg); Y: 查标准曲线得 1mLA 液中还原糖加非还原的糖量 (μg); Z: 查标准曲线得 2mL 液中还原糖量 (μg)。

五、蒽酮比色法快速测定葡萄糖、果糖、蔗糖及淀粉含量

(一) 分析原理

蒽酮试剂与碳水化合物生成一种蓝绿色物质, 是糖类特有的反应。不经分离面进行系统测定葡萄糖、果糖、蔗糖及淀粉含量基于以下三点: 第一在室温下葡萄糖与蒽酮试剂不显色, 此温度下果糖显色 5min 的吸收值与果糖在 100℃ 显色 5min 吸收值几乎相等。第二稀碱与糖溶液共热时, 可破坏葡萄糖、果糖, 而蔗糖不被破坏。第三淀粉经酸水解后与蒽酮试剂显色。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g), 分光光度计, 水浴锅, 离心机 (4000r/min), 离心管 (15mL), 有塞试管 (10mL), 刻度吸管 (1mL、10mL)。

2. 试剂。①蒽酮试剂。称 0.4g 蒽酮溶于 100mL 88% 硫酸中 (约 84 份体积 97% 浓硫酸与 16 份体积水混合, 密封在磨口瓶中)。溶解后置水中冷却备用。此液当天配制。② 2mol/L 氢氧化钾溶液。③ 3mol/L 盐酸溶液。④ 3mol/L 氢氧化钠溶液。⑤ 标准糖贮备液: 精确称取 250mg 干燥的分析纯的糖 (葡萄糖、果糖、蔗糖), 分别移至 250mL 容量瓶中, 配成 1mg/mL 浓度溶液。溶剂用蒸馏水和 75% 乙醇均可。⑥ 标准糖工作液: 用移液管吸取 10mL 标准糖贮备液于 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度、摇匀。此液含糖为 100 μ g/mL。

(三) 测定步骤

1. 工作曲线绘制。用 2mL 吸量管按表 10-2 取标准糖工作液 (葡萄糖不多于 160 μ g, 果糖不多于 80 μ g, 蔗糖不多于 100 μ g) 于干净的试管 (16mm \times 180mm) 中, 用蒸馏水分别调整其体积为 2.0mL。从滴定管中加入蒽酮试剂 6.0mL。摇匀并立即置于沸水浴中加热 5min, 取出立即在冷水中迅速冷却 (不断摇动)。用 2.0mL 蒸馏水重复上述操作, 作为空白溶液。在分光光度计中, 以 640nm 波长测定它们的消光度。以消光度为纵坐标, 糖含量为横坐标, 绘制标准工作曲线。见表 10-2, 表 10-3。

表 10-2 葡萄糖、果糖和蔗糖标准曲线绘制溶液配制

糖名称	空白	葡萄糖 (G)				果糖 (F)				蔗糖 (S)				
		0.4	0.8	1.2	1.6	0.2	0.4	0.6	0.8	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标准糖体积/mL	0.0	0.4	0.8	1.2	1.6	0.2	0.4	0.6	0.8	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水体积/mL	2.0	1.6	1.2	0.8	0.4	1.8	1.6	1.4	1.2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
糖含量/ μ g	0	40	80	120	160	20	40	60	80	20	40	60	80	100

表 10-3

蔗糖水解换算表

单位: μ g

S	G 或 F	S	G 或 F	S	G 或 F
10	5.3	1.0	0.5	0.1	0.05
20	10.5	2.0	1.1	0.2	0.11
30	15.8	3.0	1.6	0.3	0.16
40	21.1	4.0	2.1	0.4	0.21
50	26.3	5.0	2.6	0.5	0.26
60	31.6	6.0	3.2	0.6	0.32
70	36.9	7.0	3.7	0.7	0.37
80	42.1	8.0	4.2	0.8	0.42
90	47.4	9.0	4.7	0.9	0.47

2. 样品中糖的提取。谷物或植株体烘干、粉碎。精确称取烘干样品 (谷物 0.2g、植

株体 0.1g 左右) 放入研钵中, 加入 5mL 蒸馏水磨至均匀, 以 5mL 蒸馏水将均匀物全部移入离心管中, 离心 (3000r/min) 5min。离心液倒入干净试管中。再向盛有沉淀的离心管加 5mL 蒸馏水并搅拌沉淀物, 离心 (重复 2 次), 合并离心液于 50mL 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度。此液用于葡萄糖、果糖及蔗糖的测定 (A 液)。

以 10mL 3mol/L 盐酸将离心管中沉淀物全部转移到容量瓶中, 盖上玻璃塞, 放在沸水浴中煮沸 40~45min, 取出冷却至室温, 加 3mol/L 氢氧化钠溶液 10mL 中和其酸性, 以蒸馏水定容至 50mL, 从中取 2mL 溶液, 加蒸馏水至 50mL, 混匀。此液用于淀粉的测定 (B 液)。

3. 蔗糖的测定。精确吸取样品液 (A) 10mL, 加入 2mol/L 氢氧化钾溶液 2mL, 置沸水浴中煮沸 10min。取出迅速冷至室温, 加蒸馏水稀释至 50mL, 摇匀。精确吸取稀释液 2mL 至一干净试管中, 按标准曲线绘制步骤加蒽酮试剂显色测定, 得光密度值 $E_{蔗}$ 。

4. 蔗糖的结果计算。从蔗糖工作曲线求得蔗糖量为 S (μg), 按下式计算样品中蔗糖百分含量。

$$\text{蔗糖}(\%) = \frac{S \times V_2 \times V_3 \times 100}{V_1 \times V_4 \times m \times 10^6}$$

式中 S : 待测样品液中蔗糖量 (μg); m : 样品质量 (g); V_1 : 用于测定的样品稀释液的体积 (mL); V_2 : 用于分析的样品稀释液总体积 (mL); V_3 : 样品液总体积 (mL); V_4 : 用于氢氧化钾水解的样品液体积 (mL)。

5. 葡萄糖、果糖的测定。取样品液 (A) 10mL 加蒸馏水至 50mL, 往两支干净试管中分别加入 2mL 样品稀释液, 其中一支加蒽酮试剂 6mL, 摇匀, 在沸水浴中煮沸 5min, 取出立即浸入自来水冷却至室温, 在 640nm 下测定光密度 E_{100} 。另一支试管, 加蒽酮试剂 6mL, 摇匀, 在常温下显色 5min, 同上述操作测定光密度 $E_{常温}$ 。由 $E_{常温}$ 查果糖工作曲线求得样品液果糖量为 F (μg), 按下式计算样品中果糖、葡萄糖含量。

6. 果糖、葡萄糖的结果计算。

$$\text{果糖}(\%) = \left(F - \frac{S}{2 \times 0.95} \right) \times \frac{50 \times 50 \times 100}{2 \times 10 \times m \times 10^6}$$

由 $E_{100} - E_{常温}$ 查葡萄糖工作曲线求得样品液中葡萄糖量为 G (μg), 按下式算葡萄糖百分含量。

$$\text{葡萄糖}(\%) = \left(m_1 - \frac{S}{2 \times 0.95} \right) \times \frac{50 \times 50 \times 100}{2 \times 10 \times m \times 10^6}$$

式中 m_1 : 由 $E_{100} - E_{常温}$ 所得葡萄糖量 (μg); $\frac{S}{2 \times 0.95}$: 可查蔗糖水解换算表 (S 为待测样品液蔗糖量 (μg); F : 由 $E_{常}$ 得到的果糖量 (μg); m : 样品质量 (g); 50: 样品稀释液体积 (mL); 50: 样品液总体积 (mL); 10: 用于稀释的样品液体积 (mL); 2: 用于比色时样品稀释液体积 (mL)。

7. 淀粉测定。取样品液 (B 液) 2mL, 再加 6mL 蒽酮试剂, 摇匀, 放在沸水浴中煮沸 5min, 取出, 放入在冷水中冷却至室温。在 640nm 下测定光密度 $E_{淀粉}$, 以 $E_{淀粉}$ 查葡萄糖式计算淀粉百分含量:

$$\text{淀粉}(\%) = \frac{V_0 \times Y}{V_2} \times \frac{V_1}{V_3} \times \frac{100}{m \times 10^6} \times 0.9$$

式中 Y: 查标准曲线得淀粉水解稀释测定液糖量 (μg); V_0 : 水解液总体积 (mL); m : 样品质量 (g); V_1 : 水解稀释液体积 (mL); 0.9: 换算糖为淀粉量; V_2 : 用于稀释的样品液体积 (mL); V_3 : 用于比色时样品稀释液体积 (mL)。

六、还原糖的快速测定法

(一) 方法原理

3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热后被还原成棕红色的氨基化合物, 在一定范围内 (400~1600 μg), 还原糖的量和反应液的颜色强度呈比例关系, 利用比色法可测知样品的含糖量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。具塞试管 (15mL), 移液管 (1mL 和 2mL), 电热恒温浴, 分析天平 (感量 0.0001g), 容量瓶 (50mL), 分光光度计。

2. 试剂。①3,5-二硝基水杨酸试剂 (DNS)。甲液: 溶解 6.9g 结晶酚于 15.2mL 10% 氢氧化钠溶液中, 并稀释至 69mL, 在此溶液中加入 6.9g 亚硫酸钠。乙液: 称取 255g 酒石酸钾钠, 加到 300mL 10% 氢氧化钠中, 再加入 880mL 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液。将甲液与乙液相混合即得黄色试剂, 贮于棕色试剂瓶中。在室温下放置 7~10 天以后使用。②1mg/mL 葡萄糖标准液: 准确称取 100mg 分析纯的葡萄糖 (预先在 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重)。用少量蒸馏水溶解后定容至 100mL, 冰箱保存备用。

(三) 测定步骤

1. 葡萄糖标准曲线制备。取葡萄糖标准液 (1mg/mL) 0~0.8mL 分别放入试管中, 均用蒸馏水稀释至 1mL, 加入 1mL DNS 试剂, 在沸水浴中加热 5min, 取出以自来水冷却, 再加入蒸馏水 8mL, 混匀, 在波长 520nm 下, 以 1cm 比色杯测定各管光密度 (空白管溶液调零), 以葡萄糖含量 (mg) 为横坐标, 相应各管光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

2. 样品中还原糖含量测定。谷物子粒或植株烘干, 粉碎过 40 目筛, 精确称取样品 0.5~1g (还原糖含量 5~50mg), 放入 50mL 容量瓶中, 加水 20mL, 置沸水浴中加热 20min 取出冷却至室温, 以蒸馏水定容至刻度, 混匀。通过干滤纸过滤, 取滤液 1mL, 加入 1mL DNS 试剂, 在沸水浴中加热 5min, 取出以自来水冷却, 再加入蒸馏水 8mL, 混匀, 在波长 520nm 下, 用 1cm 比色杯测定样品液光密度值。查标准曲线即可计算出还原糖含量。

(四) 结果计算

$$\text{还原糖}(\%) = \frac{A \times V}{V_1 \times m \times 1000} \times 100$$

式中 A: 查标准曲线所得待测样品液中还原糖量 (mg); m : 样品质量 (g); V : 样品液总体积 (mL); V_1 : 待测样品液的体积 (mL)。

七、粗纤维素含量的测定

(一) 方法原理

分析材料在加热情况下用醋酸和硝酸混合液处理，在这种情况下细胞间的物质被溶解，而纤维素也分解成单个的纤维。木质素、半纤维素和其他物质也被除去。淀粉、多缩戊糖和其他物质受到了水解。用蒸馏水洗涤排除杂质以后，纤维素在硫酸存在下被重铬酸钾氧化成 CO_2 和水。过剩的重铬酸盐用碘量法测定。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。离心机 (4000r/min)，恒温水浴，酸滴定管，移液管 (10mL)，离心管，三角瓶 (500mL)，分析天平 (感量 0.0001g)。

2. 试剂。①硝酸和醋酸混合液：取 10mL 相对密度为 1.4 的硝酸加到 100mL 80% 的醋酸中，充分混合，保存于磨口玻璃瓶中。②5/60mol/L 重铬酸钾-硫酸溶液：称 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 25g (精确度达 0.01g) 溶于 250mL 蒸馏水中，装入容积不小于 2L 的烧瓶中，在冷凉条件下逐渐加入 800mL 相对密度为 1.84 的浓硫酸，仔细混匀。冷凉后装入磨口玻璃瓶中，保存于暗处。③1/60 mol/L 重铬酸钾：精确称取 4.9000g 干燥至恒重的重铬酸钾，先加少许蒸馏水在烧杯中溶解，而后转移到 1000mL 容量瓶，并以蒸馏水定容至刻度。④0.1mol/L 硫代硫酸钠溶液：称取 25g 的硫代硫酸钠于烧杯中，加少许蒸馏水溶解，并转移到 1000mL 容量瓶中，以蒸馏水定容至刻度。测定时需进行标定。⑤20% 碘化钾：称取 20g 碘化钾于烧杯中，加蒸馏水，加热溶解，并定容至 100mL。⑥0.5% 淀粉指示剂：称取 0.5g 可溶性淀粉于烧杯中，加蒸馏水，加热溶解，并定容至 100mL。

(三) 测定步骤

1. 硫代硫酸钠溶液的标定。吸取上述配制的 1/60 mol/L 重铬酸钾溶液 20mL 于 500mL 三角瓶中，用量筒加入浓硫酸 5mL 及 20% 的碘化钾 10mL，盖塞在暗处放置 5min，加蒸馏水约 200mL，用待标定的硫代硫酸钠溶液滴定，当溶液由橙色转变为黄色时，加入 0.5% 淀粉溶液 5 滴，继续缓慢滴定至溶液由蓝色变成亮绿色为止。从硫代硫酸钠的用量计算其浓度。

$$\text{硫代硫酸钠的浓度 (mol/L)} = \frac{\text{重铬酸钾溶液的体积 (mL)}}{\text{硫代硫酸钠溶液的体积 (mL)}} \times 0.1$$

2. 样品的处理及测定。将植株或谷物材料烘干，磨碎，取一定量粉末，使样品中含纯纤维素 3~25mg (叶子和茎 0.05g，种子 0.4g)。将样品粉末装入离心管中，并加入醋酸和硝酸混合液；当样品少于 0.1g 时，加 5mL 混合液，当样品多于 0.1g 时，加 10mL 混合液。在离心管上盖上带有玻璃棒的球形玻璃盖，置沸水中煮沸 25min，同时定期进行搅拌。而后离心，小心将上清液沿玻璃棒弃去，再向沉淀中加 10mL 蒸馏水，混匀、离心，倒掉溶液，用 10mL 蒸馏水冲洗 (共洗 3 次)。用移液管再向冲洗过的纤维素沉淀中加 10mL 5/60mol/L 重铬酸钾-硫酸溶液，用玻璃棒搅匀。将离心管浸入开水中 10min，并定期用玻璃棒搅拌，然后冷却，将溶液倒入作为滴定的 250mL 三角瓶中，同时用 10~15mL 蒸馏水冲洗沉淀。待溶液冷却后，加入 5mL 20% 的碘化钾溶液，并盖上玻璃盖在

暗处放置 5min, 加入蒸馏水约 30mL, 用标定好的硫代硫酸钠溶液滴定, 当溶液由橙色变为黄色时, 加入 0.5% 淀粉溶液 5 滴, 继续缓慢滴定至溶液由蓝色变成亮绿色为止。记下硫代硫酸钠消耗的体积 (mL)。单独滴定 10mL 5/60 重铬酸钾-硫酸溶液, 记下硫代硫酸钠消耗之体积 (mL)。

(四) 结果计算

根据上述测定所得结果, 按下式求出纤维素含量:

$$X = \frac{0.675 \times K(A - B)}{m}$$

式中 X : 纤维素含量 (%); K : 硫代硫酸钠的浓度 (mol/L); A : 滴定 10mL 硫酸-重铬酸钾对照液所用去的硫代硫酸钠的体积 (mL); B : 测定样品液所用去的硫代硫酸钠的体积 (mL); m : 分析材料样品质量 (g); 0.675: 纤维素摩尔乘 100。

八、重量法测定粗纤维的含量

(一) 方法原理

在食物分析中, 脱脂样品经用煮沸的酸及碱溶液处理后, 除去其可被酸或碱消化的糖及蛋白质, 所遗留的残渣称为“粗纤维”, 其中主要成分为纤维素。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。回流冷凝管, 三角烧瓶 (500mL), 抽滤瓶 (500mL), 古氏坩埚 (25mL), 布氏漏斗, 高温炉, 滤布。

2. 试剂。①硫酸溶液: 每 100mL 含 1.25g 纯硫酸 (0.1276mol/L 的硫酸)。②氢氧化钠溶液: 每 100mL 含 1.25g 氢氧化钠 (0.3125mol/L 氢氧化钠), 须不含碳酸钠, 但微量无妨碍。③石棉: 先用上面配制的 0.1276mol/L 硫酸将 100g 石棉浸没, 放在水浴中煮 2h。然后把煮过的石棉浆倒在纱布上, 用纱布包好石棉浆, 用力把硫酸挤净。再用蒸馏水洗净酸。再以 0.3125mol/L 的氢氧化钠再处理该石棉一次后, 用蒸馏水洗到无碱性为止。烘干, 放在灰化炉中在 700℃ 烧灼 2h, 烧去有机物质。

(三) 测定步骤

1. 取 2g 样品用乙醚提取脂肪, 然后移入 500mL 三角烧瓶中, 加入 200mL 煮沸的硫酸溶液, 连接回流冷凝管, 立即加至沸腾。继续煮沸 30min, 每隔约 5min 旋动三角瓶一次, 以充分混合瓶内物质, 唯须避免试料附着于液面以上的瓶壁上。为防止消化时起泡沫, 可加石蜡油数滴。30min 后移开三角瓶, 立即以布氏漏斗用滤布过滤。用甲基红为指示剂, 以沸水洗涤至洗液不呈酸性为止。

2. 用 200mL 煮沸氢氧化钠溶液冲洗滤布上的残存物至原三角瓶内。连接回流冷凝管, 加热煮沸 30min, 然后移去三角瓶, 立即以滤布过滤。以沸水洗涤 2~3 次, 至用酚酞试验洗液不呈碱性反应为止。用蒸馏水把滤布上的残存物洗入 100mL 小烧杯内, 然后再倒入已铺好石棉的古氏坩埚内。用抽滤瓶抽去古氏坩埚中的水, 继以 15mL 酒精倒入坩埚洗之。

3. 将坩埚及内容物在 110℃ 烘至恒重 (约 4h)。置于干燥器内至室温, 称重。然后放

入高温炉中，在 700℃ 下烧灼之，使含碳物质全部灰化（自温度达到 700℃ 时计约 30min）。待炉温低到 200℃ 以下时，将坩埚移入干燥器内，待至室温，称其质量。所损失的质量即为粗纤维质量。

注意事项：①样品须尽可能地磨细，颗粒过粗影响消化，常产生较高的结果。②制备古氏坩埚时，系将石棉放入蒸馏水内，使成稀薄的悬液。混匀后将约 30mL 倒入坩埚内，并抽干，石棉应均匀，不可太厚，以免不易过滤。③此法测得的纤维素，尚有部分半纤维素、戊聚糖及含氮物质。

第十一章 脂肪及脂肪酸

一、粗脂肪含量的测定（残余法）

（一）方法原理

用乙醚抽提含脂肪的样品，除各种甘油三酸脂外，尚有许多杂质如游离脂肪酸、有机酸、磷脂、色素等溶解到乙醚抽提物中。此法测得的脂肪，常称为“粗脂肪”。

（二）仪器与试剂

1. 仪器。分析天平（感量 0.0001g），实验室用粉碎机，研钵，电热恒温水浴锅，电热恒温箱，滤纸筒：直径 22mm×100mm，备有变色硅胶的干燥器，索氏脂肪抽提器：60mL 或 150mL，铜丝筛：孔径 0.42mm（40 目）。

2. 试剂。无水乙醚：分析纯。

（三）测定步骤

样品烘干，粉碎，过 40 目筛备用。将滤纸（7cm×7cm），并叠成一边不封口的滤纸包，用铅笔编上序号，顺序排列在培养器中，每器不得多于 20 包。将培养器连同滤纸包移入 105℃±2℃烘箱中干燥 2h。取出放入干燥器中冷却至室温（大约 45~60min），分别将各包放入同一个称量瓶中称重（a）（称样时的室内相对湿度不宜高于 70%）。而后用角匙将已制备好的样品小心地装入纸包中，称样量为 1~5g 两份，精确至 0.0001g。封上包口，并按原序号排列在培养器中，放入 105℃±2℃烘箱中，干燥 3h，然后放入干燥器中冷却至室温。分别将各包在原称量瓶中称量（b），这次称重与第一次称重之差即为样重。接着将样包装入脂肪抽提器的抽提筒中，倒入无水乙醚，使之刚好超过样包高度，连接好抽提器的各部分，浸泡一夜。次日将浸泡后的无水乙醚放入抽提瓶，在抽提瓶中加入几粒浮石，然后，在抽提筒中重新倒入无水乙醚，使其完全浸泡样包，连接好抽提器的各部分，接通冷凝水流，在水浴锅中进行抽提，并调节水温，使其冷凝下滴之乙醚呈连珠状（乙醚回流量为 20mL/min 以上）。这时水浴温度大约在 70~80℃，一般须抽提 6~8h。抽提时的室温以 12~25℃为宜。抽提完毕，取出样包，在通风处使乙醚挥发。另将抽提器中剩余乙醚回收。将样包仍按原序号排列在培养器中，放入 105℃±2℃烘箱中干燥 2h，取出放入干燥器，冷却至室温，再将各包在原称量瓶中称重（c），这次称重与第二次称重之差即为粗脂肪重。

（四）结果计算

$$\text{粗脂肪含量(g/100g, 干基)} = \frac{b - c}{b - a} \times 100$$

式中 a：称量瓶加纸重的质量（g）；b：称量瓶加纸重加抽提前烘干样品的质量（g）；c：称量瓶加纸重加抽提后烘干样品的质量（g）。

二、折光法测定脂肪含量

(一) 方法原理

本法基于脂肪与溶剂在折光率上具有显著的差异来测定脂肪含量的。用 α -溴代萘作为溶剂，此溶剂在常温下极易溶解油，并具有高沸点 (280℃) 和高折光率。在溶解油后， α -溴代萘的折光率下降，降低值与溶解的油量成正比。若取用重量相同的种子样品和体积相同的溶剂，在种子中油较多时，混合液的折光率较低。根据混合液的折光率即可用公式求得种子中油的含量。此法分析速度快，但不如索氏抽提法准确。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。分析天平 (感量 0.001g)，折光仪，玻璃研钵，刻度吸管 (2mL)，移液管：由橡皮球，弯形玻璃管，脱脂棉，过滤器三部分组成，移液管小球直径 10~14mm，小球一侧管长 80~100mm，另一侧管子 15~20mm，并弯成 60°~70°角，移液管口内径为 3mm。在使用前取一小束脱脂棉顺着纤维拉直并对折塞进移液管口纤维末梢朝外，用剪刀在距管口 2~3mm 处剪去。移液管上端连有橡皮球，用手压缩橡皮器，将脱脂棉过滤器浸透液体，放开手压缩橡皮球，造成真空，待慢慢吸取所需量液体后，取下橡皮球及脱脂棉过滤器。

2. 试剂。 α -溴代萘；石油醚或乙醚 (为洗涤折光仪棱镜用)。

(三) 测定步骤

将样品干燥粉碎并在 105℃ 下烘干 2~3h，去掉水分。按下述量称取烘干粉碎的样品和加入 α -溴代萘溶剂。使样品质量与溶剂体积的比例保持一定 (0.75)，如表 11-1：

表 11-1 样品与溶剂的比例关系

样品量/g	0.30	0.60	0.90	1.20	1.80
α -溴代萘量/mL	0.4	0.80	1.20	1.60	2.00

用玻璃棒小心研磨 (不让样品溶剂粘在研钵壁上)，研磨至均匀 (有些样品如大豆等难以研磨可加少量石英砂)，放置 3~5min，再研磨一次。然后用带脱脂棉过滤器的吸液管吸取数滴溶液，在 20℃ 左右温度下测定折光率。当较 20℃ 高或低一度即引入 ± 0.0004 的校正值。

(四) 结果计算

根据测得的折光率代入下式即可计算种子中油含量。

$$X = \frac{Vd_1}{m} \times \frac{n - n_2}{n_2 - n_1} \times 100$$

式中 X：油的百分数； d_1 ：油的相对密度；V： α -溴代萘体积 (mL)；m：样品质量 (g)；n： α -溴代萘折光率； n_1 ：油的折光率； n_2 ：样品混合液折光率。

三、反相纸层析快速法测定油脂脂肪酸含量

(一) 方法原理

在纸层析中，通常支持相是含水的，移动相是有机溶剂，但是脂肪酸等一些化合物却用有机的支持相和含水的移动相能得到更好的分离，即所谓反相纸层析法。

由于脂肪酸在乙酸-水中的溶解度不一样，当混和脂肪酸的溶液在涂有液体石蜡的纸上向上层开时，得到层析点谱，然后生成脂肪酸的铜盐，在红氨酸溶液中，菜籽油的混合脂肪酸显出蓝灰色的斑点谱带。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。层析纸：杭州新华1号层析纸（或3号）；层析架：铁或木质的脚架，固定有上下两层并列玻璃，可固定层析纸30~40张，每张层析纸上滴15个样品，全架一次可测450~600个样品；层析缸：依层析架大小选用；显色盘：普通搪瓷盘；烘箱：通用烘箱或恒温箱。

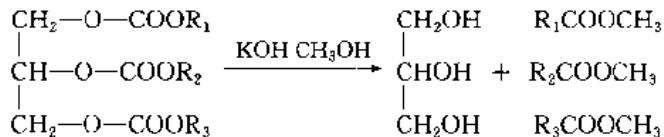
2. 试剂。①5%氢氧化钾-甲醇溶液：称取5g氢氧化钾溶于100mL的甲醇中。②10%的液体石蜡-石油醚溶液：量取10mL液体石蜡，用石油醚稀释至100mL。③95%醋酸溶液。④0.3%~0.5%醋酸铜溶液：称取0.3~0.5g醋酸铜，加蒸馏水溶解并稀释至100mL。⑤0.015%红氨酸溶液：称取75mg红氨酸，溶于500mL95%的乙醇中。

(三) 测定步骤

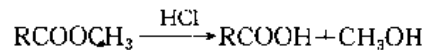
1. 准备层析纸。将1号（或3号）层析纸裁成宽14.8cm，长23.5cm，然后在长的一边距1.5cm处画一横线，距宽边处1.2~1.3cm处在横线上每隔1.5cm距离打点编号，每张纸共15个点，将编好号的层析纸放入10%石蜡-石油醚溶液中浸透，取出晾干（使编号朝上）。

2. 制样。将油菜籽单粒沿脐切1/2~1/3，五粒用微型粉碎机粉碎后，放入小试管内，编上号。

3. 酯化。向盛有样品的小试管中加入氢氧化钾-甲醇溶液（半粒种子加0.1mL，5粒种子加0.2mL）。并用小玻璃棒将样品尽量研碎，然后放置6~8h（或过夜），酯化实际上是醇解作用，使脂肪酸变成各种脂肪酸甲基酯，氢氧化钾是起催化作用。



4. 点样。将过夜提取液加入1mol/L（1:5浓度）盐酸（半粒加0.1mL，5粒加0.2mL）及石油醚0.1mL和0.2mL，然后振荡，取样品上清液5~10 μ L按编号顺序点样（点样时针要垂直，边点样边吹，使每个点之间的样不相连）。酯化后的样品溶液加盐酸的作用是将脂肪酸甲基酯还原成各种脂肪酸，石油醚作萃取液。



5. 展开溶剂系统与条件。将点好样的层析纸，固定在层析架上（使编号朝下），放入

盛有醋酸溶液(95%150mL)的层析缸中(或长方形瓷盘),醋酸溶液以能浸泡层析纸,液面低于点样处为宜。展开(2~4h,根据室温而定)完毕,取出层析纸,晾干(30min)。展开时醋酸是饱和状态,一般为3h,涂有石蜡的滤纸是固定相(也即是载体),醋酸为流动相,各种脂肪酸由于极性不同自上移动的速度不一样,极性大的走得快,极性小的走得慢,不饱和键和分子量小的移动快,反之则慢。

6. 显色。将层析纸浸入0.3%~0.5%醋酸铜溶液中,40min后取出,使脂肪酸铜盐生成,用清水(流水)冲洗1.5h(冲洗时将层析架直接放入塑料盆中)。小心取出稍晾干(或滤纸吸干大部分水分),置于40℃烘干。将层析纸在红氨酸溶液中一带而过,并立即放入1mol/L的盐酸溶液中做短时间处理,立即用清水冲洗层析纸(注意不要弄破层析纸),晾干后观察显出的蓝灰色谱带斑点,并记录其结果。

R_f 值大小次序为:亚麻酸(18:3) > 亚油酸(18:2) > 油酸(18:1) > 花生油酸(20:1) > 芥酸(22:1)。

四、薄层色谱法分离主要不饱和脂肪酸

(一) 方法原理

根据不饱和脂肪酸碳原子数、极性、双键数目等的不同使反相色谱的 R_f 值相差较大,在适宜的薄层上和展开剂中将主要的几种不饱和脂肪酸分离开,在薄层板上喷荧光素溶液后与溴作用转变成不显荧光的曙红斑点。若薄层上的斑点中有含乙烯基的化合物时,则溴与它作用,而不与荧光素作用,在长波长下显示荧光。不饱和脂肪酸是含乙烯基的化合物,所以当薄层上的斑点中有不饱和脂肪酸时可在粉红色背景上出现黄绿色荧光斑点,而饱和脂肪酸没有相当于乙烯基的双键,就没有这种反应。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。涂布台,涂布器,10cm×20cm玻璃板,玻璃研钵(直径为7~8cm),量筒,点样台,微量进样器,吹风机,有盖玻璃层析缸,玻璃喷雾器,玻璃干燥器(直径为22cm)。

2. 试剂。苯-石油醚(沸程30~60℃或60~90℃均可使用)1:1体积比溶液,0.4mol/L KOH-甲醇溶液,硅藻土G,10%液体石蜡-石油醚(沸程30~60℃)溶液,展开剂:液体石蜡饱和的乙腈溶剂,显色剂(荧光素乙醇溶液);取0.06g荧光素溶于3.6mL 0.1mol/L KOH溶液和180mL乙醇中;15%溴的四氯化碳溶液或者溴水均可。

(三) 测定步骤

1. 硅藻土G薄层板制备。取硅藻土G加适量水搅匀,再均匀涂在10cm×20cm的玻璃板上(0.2mm左右),风干2d,经10%液体石蜡-石油醚溶液中浸渍,再风干。

2. 样品中脂肪酸提取与甲酯化。称取粉碎的样品0.5~1.0g,加入2mL苯-石油醚溶液浸泡6h以上或者放置过夜提取脂肪酸,并加入2mL 0.4mol/L KOH-甲醇溶液,混匀,放置20min,再加入少量蒸馏水,待分层。

3. 点样、层析、显色。用微量进样器吸取甲酯化的样品液5~20 μ L,在制备好的玻璃薄板上点样,放在液体石蜡饱和的乙腈溶剂中上行法展开10cm后(一般为17~

22min),取出并将薄层板放在通风橱中约4min即可将溶剂挥去。用荧光素乙醇溶液喷雾,在溴蒸气上熏片刻,斑点清晰可见。放置10min左右就可以达到最大的显色强度。与标准的不饱和脂肪酸相比,可确定出亚麻酸、亚油酸、油酸、花生烯酸(花生油酸)、芥酸的位置和大致含量。

五、游离脂肪酸含量的快速测定

(一) 方法原理

用苯提取种子中脂肪酸,以一定浓度的氢氧化钠溶液滴定即可计算出样品中游离脂肪酸含量。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。实验室用研磨机,工业天平(感量0.01g),振荡器,有塞三角瓶(100mL),碱滴定管(50mL或25mL)。

2. 试剂。0.04%乙醇-酚酞溶液:于100mL 95%乙醇中加入0.04g酚酞而成,0.02mol/L氢氧化钾溶液(需用苯二甲酸氢钾或碳酸钠标定,酚酞作指示剂),苯。

(三) 测定步骤

样品烘干,粉碎。称取粉碎的样品5~10g,放入有塞三角瓶中,加25mL苯,盖上塞子,置于振荡器振荡40min,取下静置2~3min,尽量迅速将液体倾注到放有折叠滤纸的玻璃漏斗上,过滤,用表皿盖上漏斗,使之蒸发减少到最小限度。用吸液管吸取10mL滤液,加10mL乙醇-酚酞溶液,混匀,以标定过的氢氧化钠溶液滴定至粉红色。如果滴定过程中发生混浊,可用加入等体积的苯与乙醇混合液稀释。另取1mL苯和10mL乙醇-酚酞溶液进行空白滴定。

(四) 结果计算

$$\text{游离脂肪酸}(\%) = \frac{(V - V_1) \times c \times F \times V_3 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

式中 V : 滴定样品液耗去的氢氧化钠体积(mL); V_1 : 滴定空白液耗去的氢氧化钠体积(mL); c : 氢氧化钠的浓度(mol/L); F : 游离脂肪酸的摩尔,游离脂肪酸一般以油酸的分数表示,它的摩尔为282/1,即282; m : 样品质量(g); V_2 : 滴定液体积(mL); V_3 : 样品提取液总体积(mL)。

六、油折光率的测定

(一) 方法原理

折光率是液体特征常数之一,即光在空气中的速度与光在某种液体中速度之比,通常用 n_D^t 表示, D 表示钠光源, t 是测定时的温度, n 为仪器实测折光率。折光仪的校正可用一系列标准样品比较,常用:甲苯(n_D^{20} 1.49693),甲基环己烷(n_D^{20} 1.42312),氯苯(n_D^{20} 1.52460), α -溴萘(n_D^{20} 1.5602)。温度对折光率影响较大,比20℃高一度或低一度所引入的校正值为油 ± 0.00035 , α -溴萘为 ± 0.00046 ,水为 ± 0.00006 。

(二) 仪器

阿贝折光仪 (可以准确读出 ± 0.0001 误差范围), 微量吸液管。

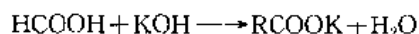
(三) 测定步骤 (详细操作见有关折光仪说明书)

取油 0.05~0.1mL, 滴入阿贝式折光仪下面直角棱镜上, 关闭棱镜, 转动反射镜使光线射入棱镜, 聚焦于“十”字线中央, 由于平常用阳光或电灯光, 出现彩色光带, 可转动补偿棱镜调节器, 使之观察到一明晰黑白界线, 再调整直角棱镜调节器, 使界限刚好通过十字的交点, 从标尺上读得数字, 一般重复读数 3 次, 求得平均值, 并记下温度, 根据实测温度与 20℃ 的差值引入校正值, 即为油的折光率。

七、油脂酸值的测定

(一) 方法原理

脂肪中游离脂肪酸含量的情况, 常用“酸值”表示。所谓酸值或酸价就是中和 1g 样品游离脂肪酸所需要的氢氧化钾的毫克数。



油脂的游离脂肪酸含量的多少, 是油脂品质好坏、精炼程度的重要标准之一。一般以游离脂肪酸含量低为佳。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g), 三角瓶 (100mL), 碱滴定管 (50mL)。

2. 试剂。① 0.1mol/L 氢氧化钾溶液: 称取 6g 氢氧化钾 (A.R.), 溶于蒸馏水中, 定容至 1000mL。② 95% 乙醇 (用碱液滴定至中性)。③ 酚酞指示剂: 称取 1g 酚酞溶于 100mL 95% 的乙醇溶液中。④ 0.1mol/L 氢氧化钾溶液标定方法: 称取 0.5g (精确至 0.0002g) 恒重的邻苯二甲酸氢钾于 100mL 三角瓶中, 加 30mL 水, 酚酞 2~3 滴, 用所配制的氢氧化钾溶液滴定至微红色。

$$c = \frac{B}{A \times 204.1 \times 1000}$$

式中 A : 标定中所耗用的氢氧化钾溶液体积 (mL); B : 为邻苯二甲酸氢钾的质量 (g)。

(三) 测定步骤

精确称取油样 3~5g (精确至 0.001g) 置于 100mL 三角瓶中, 加入 50mL 热的 95% 乙醇溶液, 摇匀, 使油样充分溶解后, 加入 2~3 滴酚酞指示剂, 然后以 0.1mol/L 氢氧化钾溶液进行滴定, 至微红色 30s 不消失为止。

(四) 结果计算

$$\text{酸值} = \frac{V \times c \times 56.11}{m}$$

式中 V : 滴定时所耗氢氧化钾溶液的体积 (mL); c : 氢氧化钾溶液的浓度 (mol/L); m : 油样的质量 (g)。

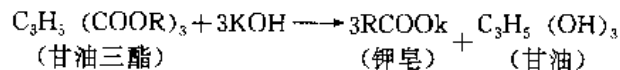
注意事项: ① 颜色深的试样, 用酚酞作指示剂, 确定终点有困难, 可改用百里酚等

其他指示剂。②所用的溶剂可采用乙醚：乙醇混合液(2：1体积分数)，乙醇：苯混合液(1：1体积分数)。不论用哪种溶剂都要中和到中性才能使用。

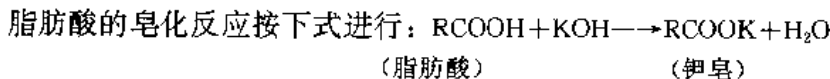
八、油脂皂化值的测定

(一) 方法原理

皂化值就是水解 1g 脂肪所需要氢氧化钾的毫克数。用碱水解脂肪时，分解出来的脂肪酸即与碱中和生成脂肪酸的盐。这种作用称为皂化作用。



由此反应式可见，每皂化 1g 分子的脂肪，需要 3g 分子的氢氧化钾。因此由皂化值大小可以估计试样的平均分子量。试样组分(甘油三酯或脂肪酸)的平均分子量愈大，皂化值愈小；反之，平均分子量小，则皂化值愈大。脂肪的分子量决定于构成它的脂肪酸的碳链的长短。所以，由长碳链脂肪酸构成的脂肪，皂化值小；短碳链脂肪酸构成的脂肪，皂化值大。



所以，1g 分子氢氧化钾可以皂化 1g 分子脂肪酸，从而也可以求得脂肪酸的平均分子量。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。分析天平(感量 0.0001g)，酸滴定管(50mL)，水浴锅，带冷凝管装置的烧瓶。

2. 试剂。①70%中性乙醇溶液：在温热的 70%乙醇中加酚酞指示剂数滴，以 0.1mol/L 氢氧化钾中和。②1%酚酞指示剂：称取 0.5g 酚酞溶于 95%乙醇 50mL 中。③0.5mol/L 盐酸标准溶液：取相对密度 1.19 盐酸 45mL，加蒸馏水至 1000mL。标定方法：称取恒重的无水碳酸钠 0.5~0.8g(精确至 0.0002g)于 250mL 三角瓶中，加 50mL 蒸馏水溶解，滴加 2 滴 0.1%甲基橙指示剂，用盐酸标准溶液滴至橙色。

$$M = \frac{m}{V \times 0.053}$$

式中 m ：称取的碳酸钠的质量(g)； V ：滴定所耗用的盐酸标准溶液的体积(mL)；0.053：1/2 碳酸钠的量(mmol)； M ：所配的盐酸溶液实际浓度 mol/L。

④0.5mol/L 氢氧化钾乙醇溶液：分析纯氢氧化钾 30g，溶于 1L 精馏乙醇(95%)中，振荡均匀，静置 24h，用虹吸法或倾出上层澄清液，以移去不溶性碳酸盐。溶液贮存于玻璃瓶中，接以装有苏打石灰的球管(球形干燥管)，以防止吸收空气中的二氧化碳。

⑤精馏乙醇的方法：硝酸银 2g，加 3mL 蒸馏水溶解，注入 1L 乙醇中强烈振荡，另取氢氧化钠 3g，溶于 15mL 热乙醇中，冷却后加入上述液体中，静置 1~2 周，待澄清后吸取清液蒸馏。

(三) 测定步骤

称取油样 2g(精确至 0.001g)于 250mL 三角瓶中，由滴定管放入 0.5mol/L 氢氧化

钾乙醇液 25mL。连接回流冷凝器，在水浴或电热板上煮沸 30min，并随时摇动，至样品完全皂化为止。取下回流冷凝器，加 10mL 中性乙醇和 3~4 滴酚酞指示剂，趁热立即以 0.5mol/L 盐酸标准液滴定至终点。记录其耗量。同时做空白试验。

(四) 结果计算

$$\text{皂化价} = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 56.11}{m}$$

式中 V_1 : 滴定样品消耗盐酸标准液体积 (mL); V_2 : 滴定空白消耗盐酸标准液体积 (mL); c : 盐酸溶液的浓度 (mol/L); m : 样品质量 (g); 56.11: 氢氧化钾分子量 (g)。

九、油脂碘值的测定

(一) 方法原理

利用脂肪与卤素的加成反应可以测定油脂的不饱和程度。每 100g 脂肪，在一定条件下，所吸收的碘的克数，称为该脂肪的碘值。碘值愈大，表示脂肪的不饱和程度愈大。测定碘值的方法很多，多数方法应用以下原理：把含脂肪样品溶入惰性溶剂，加入过量卤素或卤素本身的化合物（例如氯化碘等）标准溶液，使卤素起加成反应，但不使卤素取代脂肪酸中的氢原子。通常再加碘化钾，使与未起反应的卤素作用，以硫代硫酸钠滴定释放出的碘而定量之。为了定量地进行加成反应，并避免产生取代反应，反应应该在较低的温度下进行，还需用适当的溶剂例如冰醋酸、三氯甲烷等稀释，使适当降低反应物的浓度。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。分析天平（感量 0.0001g），酸滴定管（50mL），碘价瓶（或具塞三角瓶）。
2. 试剂。①氯仿或四氯化碳（A. R）。②Hanus 试剂：溶 13.20g 升华碘于 1000mL 冰醋酸（99.5%）内，溶时可将冰醋酸分次加入，并置水浴中微热助溶，冷后加适当量溴（约 3mL），此溶液贮于棕色瓶中。上述配制用的冰醋酸不得含有还原性物质。醋酸精制方法：每 800mL 冰醋酸加 8~10g 高锰酸钾，移入圆底烧瓶，装上回流冷凝管，加热回流。静置至氧化完全，移入蒸馏瓶进行蒸馏，接取 118~119℃ 的馏出液。③冰醋酸的还原性检查试验：取 2mL 冰醋酸，加 10mL 0.02mol/L 高锰酸钾溶液，所产生的粉红色不得在 2h 内完全退去。另一方法为取 10mL 冰醋酸，加入含有 0.05mL 重铬酸钾饱和溶液的浓硫酸（相对密度 1.84）10mL，混匀后应不立即产生绿色。④15% 碘化钾溶液：称取 15g 碘化钾溶于蒸馏水中，稀释至 100mL。⑤1% 淀粉溶液：称取可溶性淀粉 1g，加入少量蒸馏水调成薄浆，把它倾入 100mL 沸水中，迅速搅拌放冷。可加入少量苯甲酸钠或水杨酸（每 mL 1.25mg）防腐。⑥0.1mol/L 硫代硫酸钠溶液：称取 26g 硫代硫酸钠（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）及 0.2g 无水碳酸钠，用煮沸的蒸馏水溶解并定容至 1000mL，必要时可用基准重铬酸钾物质标定。

(三) 测定步骤

称取油样 0.15~1.2g（精确至 0.0002g，具体称量示样品碘值而定）置于 250mL 干

燥而清洁的碘价瓶中(同时做空白试验),加10mL四氯化碳(或氯仿),立即振荡使油样充分溶解,混匀,然后由滴定管精确加入25mL Hanus 试剂(放入速度掌握在2min左右,不宜太快,每次速度要一致)。盖紧瓶塞,摇匀后,置暗处(20℃左右)放置30min(碘值在130以上应放置60min),促使加成反应完全。加入15%碘化钾溶液20mL和100mL蒸馏水。在不断振荡下,用0.1mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液滴定,当溶液棕红色变成淡黄色时,加入1mL 1%淀粉溶液,再继续滴定蓝色消失为止。记录样品和空白试验所消耗的0.1mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的毫升数。

(四) 结果计算

$$\text{碘值} = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 0.01296}{m} \times 100$$

式中 V_1 : 滴定样品所耗用0.1mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液体积(mL); V_2 : 滴定空白所耗用0.1mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液体积(mL); m : 样品质量(g); 0.01296: 消耗每毫摩尔 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 换算成碘的克数; c : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的浓度(mol/L)。

十、脂肪酸含量的测定(HPLC法)

(一) 方法原理

根据脂肪酸含有不同的碳原子数和双键数目,及所在位置在色谱柱上有不同的保留时间来调节流动相的极性,使各种脂肪酸能得到有效的分离。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪(LKB-2150型,瑞典),检测器:紫外检测器(LKB-2151型,瑞典)。

2. 试剂。脂肪酸标准品, α -溴苯乙酮、乙腈、己烷、石油醚(色谱纯)、重蒸馏水。

(三) 操作步骤

1. 色谱条件。色谱柱: μ -Boudapak C-18 (3.9mm×250mm) (Water Co.), 流动相: $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}=85:15$ (体积比), 流速: 0.8mL/min, 检测: UV242nm, 进样量: 20 μ L。

2. 标准液配制。取标准脂肪酸10 μ g于配有聚四氟乙烯瓶塞的10mL试管中,加入10mg/mL三乙胺丙酮溶液1mL和10mg/mL α -溴苯乙酮-丙酮溶液1mL,置于沸水浴中反应10min中后,加入2mg/mL乙酸丙酮溶液1.75mL,反应5min,在充氮条件下40℃挥发溶液,加入5mL乙腈定容,0.45 μ m滤膜过滤后待测。

3. 样品处理。0.1g样品(如鱼油)置于25mL烧瓶中,加入1mol/L氢氧化钾甲醇溶液5.0mL,水浴上回流1h,冷却后加入10mL蒸馏水,用石油醚提取3次。用蒸馏水冲洗2次石油醚相,合并水相,用6mol/L盐酸调节水相溶液至酸性(pH<4),用己烷提取3次,合并己烷相后,用蒸馏水将己烷相洗至中性,加入适量的无水硫酸钠脱水,过滤,用己烷定容至50mL,待用。

取上述己烷溶液0.1mL于配有聚四氟乙烯瓶塞的10mL试管中,加入10mg/mL三乙胺丙酮溶液1mL和10mg/mL α -溴苯乙酮-丙酮溶液1mL,置水浴上反应10min后加入

2mg/mL 乙酸、丙酮溶液 1.75mL, 反应 5min, 在充氮条件下 40℃挥发溶剂, 加入 5mL 乙腈定容, 0.45μm 滤膜过滤后待测。

4. 测定。取 20μL 混合标准样进行色谱分析, 求各脂肪酸峰面积; 在同一色谱条件下, 取 20μL 样品溶液进行分析, 以相应峰面积计算含量。

(四) 计算

$$c = \frac{\rho_1 \times A_2 \times V_2}{m \times A_1 \times V_2 \times 1000} \times 0.5$$

式中 c : 每克鱼油中各种脂肪酸的含量 (mg/g); ρ : 标准样脂肪酸的浓度 (μg/mL); m_2 : 样本质量 (g); V_1 : 样品进样体积 (mL); V_2 : 样品定容体积 (mL)。

十一、脂肪酸含量的测定 (GC 法)

(一) 方法原理

样品中脂肪酸一般以甘油三酯形式存在, 经氢氧化钾甲醇液甲酯化, 生成相应的脂肪酸甲酯, 经气相色谱分离并定量测定。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。Sigma 300 气相色谱仪, I.CI-100 积分仪, SQF-200B 型氢气发生器。

2. 试剂。AOCS 混合油对照品 RM₃ Supelcs 50mg、RM₆ Supelcs 50mg (MATREYA 公司提供); 棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸均为气相色谱标准; 乙醚、正己烷、甲醇、氢氧化钾均为分析纯。

(三) 测定方法

1. 色谱条件。色谱柱: 2.1m×2mmID 不锈钢柱, 填充 15%CP-SIL 84 白色高效担体 100~120 目。载气: N₂。空气: 30kPa。氢气: 20kPa。检测器: FID。进样口温度: 240℃。检测器温度: 220℃。程序升温: 175℃、180℃、210℃ 保持时间分别为 7.0、8.0、5.0min。升温速度: 30℃/min。

2. 回归曲线制作。精密吸取 AOCS 混合油对照品 RM₃ Supelcs、RM₆ Supelcs, 用乙醚-正己烷 (2:1) 溶解并稀释至适当浓度, 定体积进样, 制作标准曲线。

3. 样品制备。取油样 100mg (其他样品称样适当增加), 置 10mL 容量瓶中, 加入乙醚-正己烷 (2:1) 1mL、甲醇 1mL 及 0.8mol/L 氢氧化钾甲醇溶液 1mL, 摇匀, 静置 5min, 加水至刻度, 取上层液进样。

(四) 结果计算

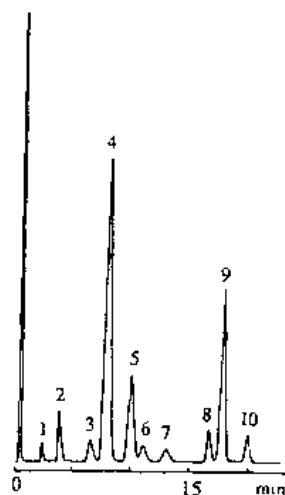


图 11-1 脂肪酸的分离色谱图

1—C _{14:0} (2.329min)	2—C _{16:0} (3.896min)
3—C _{18:0} (6.62min)	4—C _{18:1} (8.10min)
5—C _{18:2} (10.14min)	6—C _{20:0} (11.25min)
7—C _{18:3} (13.24min)	8—C _{22:0} (16.88min)
9—C _{22:1} (18.06min)	10—C _{24:0} (20.14min)

以保留时间定性鉴定各种脂肪酸,以峰面积查标准曲线并计算出各种脂肪酸的含量。以上数据由积分仪处理。

第十二章 维生素

一、维生素 A 含量的测定 (见第六章五、六)

二、维生素 D 含量的测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

本法是用高效液相色谱法测定样品维生素 D, 样品经碱性皂化、乙醚抽提、蒸发。用甲醇溶解残渣注入半制备柱 (C-18 柱), 收集含有维生素 D 的部分, 然后将这部分洗脱液再蒸发干燥, 溶于异辛烷, 用 C-18 分析柱进行定量测定。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱, 旋转蒸发器, μ -Bondapak C-18 (300mm \times 3.9mm), 分液漏斗。

2. 试剂。①乙醚, 无水乙醇, 氢氧化钾, 正己烷, 异辛烷, 甲醇, 氯化钠。②维生素 D 标准贮存液 (Fluka, Co.): 精确称量 20mg 维生素 D₃ 溶于 20mL 正己烷中 (1mg/mL)。应用时再用正己烷按 1:100 稀释至含量为 400I. U./mL。③BHT (二丁基羟基甲苯) (Fluka, Co.)。

(三) 操作步骤

1. 准确称取一定量的测试样品置三角回流瓶内 (含量高的样品取 0.1g, 含量低的饲料预混物取 5~20g), 加无水乙醇 70mL, 50% 的氢氧化钾 20mL, 然后在带有电热罩的磁力搅拌器上回流 30min, 冷却到室温, 倒入 500mL 分液漏斗中, 用 100mL 重蒸馏水冲洗回流管和三角烧瓶, 液体再倒入分液漏斗中加乙醚 120mL, 振荡 30s, 待明显分层后, 转移下层溶液到另一 500mL 分液漏斗中, 再加入 120mL 乙醚, 重复上述操作过程, 弃去下层水相, 合并两次醚层。再通过以下四个步骤将液体洗至中性: ①用 100mL 10% 氯化钠洗; ②用 100mL 重蒸馏水洗; ③用 100mL 10% 乙醇洗; ④用 100mL 重蒸馏水洗。最后在醚层中加入 100mg 二丁基羟基甲苯 (BHT), 用旋转蒸发器 40℃ 蒸干, 残渣再加入 20mL 无水乙醇重复两次, 加 5mL 甲醇溶解残渣, 注入 HPLC 中的 C-18 半制备柱。

2. 色谱条件。色谱柱: 直径 8mm \times 250mm YWG C-18 10 μ m; 流动相: 制备柱用甲醇-蒸馏水 (95:5) 分析柱用己烷: 二氧六环 (93:7); 流速: 1.2mL/min; 检测器: UV264nm; 柱温: 室温; 纸速: 5mm/min; 进样量: 100 μ L。

3. 将 20 μ L 标准维生素 D₃ (含 80I. U.) 注入 HPLC C-18 半制备柱, 在 264nm 处观察洗脱时为 30~40min 的组分, 收集此组分。然后注入处理好的样品 300~500 μ L, 同样收集 30~40min 之间的组分。此两部分液体分别用旋转蒸发器蒸干, 残渣用 15mL 无水乙醇溶解, 再重蒸一次, 用 1mL 异辛烷溶解。取 100 μ L 注入 C-18 分析柱定量。

(四) 结果计算

从半制备柱上所收集的标准维生素 D 的保留时间, 可用来确定样品中维生素 D 的保留时间, 用样品的峰高与标准维生素 D 的峰高进行比较, 即可计算出样品维生素 D 的含量。

三、胡萝卜素含量的测定 (见第六章七~十)

四、维生素 E 含量的测定 (见第六章十二~十四)

五、维生素 K₁ 含量的测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

维生素 K₁ 又称叶绿醌, 广泛存在于绿色蔬菜中。利用非极性有机溶剂提取脂溶性维生素 K₁, 并经高效液相色谱分离测定。这种具有快速、准确、简便等优点的测定方法, 是近年来发展迅速的一种现代化分析手段。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪, 积分仪或记录仪, 分析天平, 分液漏斗 (250mL)。
2. 试剂。①异辛烷; 正辛醇; 正戊醇, 甲醇, 氢氧化钾, 无水硫酸钠 (以上均为分析纯试剂)。②20%氢氧化钾的甲醇溶液: 称 20g 氢氧化钾, 溶于 100mL 甲醇溶液中。③维生素 K₁ 标准溶液: 精确称取 5.0mg 维生素 K₁ 标准液, 溶于 50mL 异辛烷中, 取一定量稀释, 使最终浓度为 10 μ g/mL。

(三) 操作步骤

1. 样品处理。称取样品 5.00g 放入研钵中, 加少量异辛烷和甲醇研磨成匀浆后抽滤, 并不断用少量甲醇、异辛烷冲洗残渣至白色。将滤液倒入分液漏斗中, 加 20%氢氧化钾的甲醇溶液 10mL, 振荡后静置待分层, 以除去下层提取液中的叶绿素。再用甲醇 10mL 按上述方法处理一次, 使得上层的异辛烷提取液部分为黄色, 然后用重蒸馏水洗涤数次, 用 pH 试纸测试洗涤水的 pH 值为 6 左右。无水硫酸钠脱水后, 提取液移入容量瓶中, 弃去的溶液加少量异辛烷, 按上述步骤再提取 1~2 次, 最后异辛烷定容到 50mL, 摇匀后待测。

2. 色谱条件。色谱柱: Lichrosorb Si-60 250mm \times 4mm; 流动相: 0.08mL 正辛醇, 0.08mL 正戊醇, 0.04mL 甲醇在 100mL 异辛烷中; 检测器: 紫外 265nm; 流速: 0.8mL/min; 灵敏度: 0.05AUFs; 纸速: 0.5cm/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μ L。

(四) 计算

上机测定后记录标准维生素 K₁ 及样品维生素 K₁ 的峰面积积分值, 从而求出样品中 K₁ 的含量 (mg/100g 样品)。

注意事项: ①维生素 K₁ 遇光易分解, 整个操作过程应避免强光直射或半暗室中进行。②维生素 K₁ 遇碱会破坏, 所以用碱除去叶绿素时, 时间不易过久。

六、维生素 K₃ 含量的测定 (HPLC 法)

(一) 分析原理

维生素 K₃ 又称亚硫酸氢钠甲基萘醌, 为人工合成的维生素, 它可通过三氯甲烷或己烷提取后, 用 C-18 柱或硅胶柱进行分离测定。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪, 天平, 摇床或磁力搅拌器, 离心机, 旋转蒸发仪。
2. 试剂。①三氯甲烷或己烷; 25% 氢氧化铵, 硅藻土, 硫酸钠, 甲醇。②维生素 K₃ 标准液。称标准 5mg (精确到 0.0001mg) 甲醇溶解并定容至 50mL, 取 1.0mL 稀释至 50mL 上机。

(三) 操作步骤

1. 样品液制备。取样品 1~5g, 加 35mL 三氯甲烷 (或己烷) 于摇床或磁力搅拌器上振摇 2min, 加 3mL 25% 氢氧化铵继续振摇 3min, 加 5g 硅藻土-硫酸钠粉末 (按 3:20 比例) 振摇 30min, 然后于 2000r/min 离心 10min (或滤纸过滤), 用三氯甲烷定容至 50mL。取 10mL 或 5mL 样品液于旋转蒸发仪上蒸干, 用 1.0mL 甲醇溶解后上机。必要时用甲醇稀释。

2. 色谱条件。色谱柱: YWG C-18 (4.6mm × 250mm); 流动相: 甲醇-蒸馏水 = 96:4; 检测器: 紫外 254nm, 流速: 1.0mL/min, 进样量: 20μL。

(四) 计算

$$\text{维生素 K}_3 \text{ 含量 (mg/kg)} = \frac{\rho \times H_1}{H_2} \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{1000}{m}$$

式中 ρ : 标准液浓度 (mg/mL); H_1 : 样品峰高 (mm); H_2 : 标准峰高 (mm); V_1 : 样品定容体积 (mL); V_2 : 用于蒸干的样品液 (mL); m : 样品质量 (g)。

注意事项: 此方法适用于维生素 K₃ 含量高于 0.5mg/mL 的样品。

七、维生素 C 含量的测定 (见第六章十五~十九)

八、维生素 B₁ (硫胺素) 含量的测定 (荧光法)

(一) 方法原理

测定硫胺素的化学方法是根据硫胺素在碱性高铁氰化钾溶液中能被氧化成一种蓝色的荧光化合物——硫色素。在没有其他荧光物质存在时, 溶液的荧光强度与硫色素的浓度成正比例。进行硫胺素的化学测定时, 必须先将食物或生物材料用稀酸做定量的抽提, 随后用磷酸酶或其他酶制剂将硫胺素从它的自然复合物中释出, 抽提液通过人造沸石柱, 硫胺素被吸附, 而重金属、还原剂等影响颜色反应的杂质被除去。柱上的硫胺素可先用酸性氯化钾洗脱, 再用碱性高铁氰化钾氧化成硫色素, 后者在用丁醇提取后, 可用荧光

比色计测定其浓度。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。工业天平(感量0.01g), 实验用粉碎机, 25mL反应瓶, 离子交换管, 荧光比色计, 三角瓶(250mL, 100mL), 移液管, 恒温培养箱。

2. 试剂。①0.05mol/L硫酸溶液: 208mL浓硫酸(相对密度1.84)加蒸馏水稀释至1000mL。②2.5mol/L醋酸钠: 340g含有3个水分子的醋酸钠, 溶于蒸馏水中, 稀释至1000mL。③0.1%溴甲酚绿溶液。④2%淀粉酶溶液: 取酶2g溶于100mL 2.5mol/L的醋酸钠溶液中, 贮藏于冰箱中备用。⑤3%醋酸: 30mL冰醋酸加蒸馏水稀释成1000mL。⑥25%酸性氯化钾溶液: 8.5mL浓盐酸以25%氯化钾溶液稀释成1000mL。⑦15%氢氧化钠溶液: 溶解15g氢氧化钠于蒸馏水中, 稀释至100mL。⑧碱性铁氰化钾溶液: 吸取1mL 1%的高铁氰化钾溶液, 用15%氢氧化钠溶液稀释至15mL, 用时现配, 贮于暗处。⑨硫胺素贮备液: 将硫胺素盐酸盐放在盛有五氧化二磷的干燥器至少干燥24h, 然后取100mg溶于25%乙醇, 稀释至1L。如维持冷藏, 可保存几个月。⑩硫胺素标准溶液: 将1mL硫胺素贮备液用蒸馏水稀释至100mL, 再用0.05mol/L硫酸稀释1mL此溶液至10mL(即为0.1 μ g/mL硫胺素标准液)。每天临时现配。⑪硫酸奎宁溶液: 溶解100mg硫酸奎宁于0.05mol/L硫酸中, 用0.05mol/L硫酸溶液稀释至1000mL, 再用0.05mol/L硫酸溶液稀释1.5mL此溶液至1L, 贮于棕色瓶内(0.15 μ g/mL硫酸奎宁溶液)。⑫人造沸石(50~80目)。

(三) 测定步骤

1. 样品液提取。准确称取4~8g经磨细的谷物样品(内含硫胺素5~30 μ g)于锥形瓶内, 加0.05mol/L硫酸50mL, 在沸水浴中加热10min。取出冷却至室温后, 用2.5mol/L的醋酸钠调节至pH4.5(以溴甲酚绿作指示剂)。加入2%淀粉酶混悬液2mL, 在37~40 $^{\circ}$ C下至少保温4h。保温后取出再用蒸馏水稀释至100mL, 混匀后过滤。

2. 柱纯化。准确吸取滤液25mL, 加入已装好的人造沸石柱中, 弃去流出液, 并用热蒸馏水洗涤3次, 每次约5mL, 流出液亦弃去。用热的25%的酸性氯化钾20mL洗脱, 收集流出液于25mL有刻度的试管中, 最后以酸性氯化钾液稀释至刻度。另备一人造沸石柱, 以硫胺素标准应用液(0.1 μ g/mL)25mL通过, 重复上述步骤。

3. 氧化。取反应瓶四支(1、2、3、4号), 1、2号瓶中各加3mL 15%氢氧化钠溶液, 3、4号瓶中各加3mL碱性铁氰化钾溶液。将样品硫胺素洗脱液5mL(两份)分别放入2、4号瓶中, 另取标准硫胺素洗脱液5mL(两份)分别放入1、3号瓶中。

4. 萃取。摇匀各瓶后, 均加入正丁醇15mL, 塞好瓶塞, 并用力摇荡90s。将上述各管离心或静置, 使正丁醇与碱溶液分层清楚。将各管下层的水除去, 并各加无水硫酸钠1~2g, 摇匀, 离心(2000r/min)1~2min或静置分层。

5. 测定。用橡皮头吸管吸取各管中脱水后的丁醇溶液, 置于荧光比色计上(激发波长385nm, 发射波长435nm)分别测定各管丁醇提出液的荧光度(用硫酸奎宁应用液校正荧光计)。

(四) 结果计算

$$V_{\text{Rl}} \text{ 含量 (mg/100g)} = \frac{T_4 - T_2}{T_3 - T_1} \times \rho \times V_1 \times \frac{V}{V_2} \times \frac{100}{1000 \times m}$$

式中 T_4 : 样品液的荧光度; T_2 : 样品空白液的荧光度; T_3 : 标准液的荧光度; T_1 : 标准空白液的荧光度; m : 样品质量 (g); ρ : 标准硫胺素浓度 ($\mu\text{g/mL}$); V : 样品液总体积 (mL); V_1 : 通过柱的样品液总体积 (mL); V_2 : 通过柱的标准液总体积 (mL)。

注意事项: ①人造沸石柱的制备: 以少许玻璃或棉花塞在交换柱下管端连一乳胶管, 夹一止水夹。以 3% 醋酸液 10mL 倾入 1g 活性人造沸石到交换柱上, 再用少量 3% 醋酸液冲洗管壁上的沸石, 待全部沉下时就打开止水夹, 让酸液流出, 用蒸馏水 10mL 冲洗管中沸石, 水流尽后即可用于交换吸附。②新买回来的人造沸石用下法处理使其活化: 把 100g 人造沸石置于烧杯中, 以 10 倍体积的 3% 热醋酸液处理二次, 每次搅 10min, 倾去醋酸后, 再用 5 倍体积热的 25% 氯化钾液搅拌 15min, 倾去氯化钾液, 然后用 3% 热醋酸液搅拌 10min, 沸石下沉后倾去醋酸, 再用热蒸馏水洗至没有氯离子存在为止。最后在抽气瓶内抽干, 并保存于广口玻璃瓶中。用过的人造沸石, 可以再生, 方法按处理新的完全相同。若处理后活性仍不高时, 可按上述步骤反复处理一遍或增加 25% 氯化钾溶液的处理次数。

九、维生素 B₂ (核黄素) 含量的测定 (荧光法)

(一) 方法原理

核黄素在波光 430~440nm 下发荧光, 荧光峰为 536nm 在稀溶液中荧光的强度与核黄素的浓度成正比。样品中存在的其他色素和荧光杂质可在酸性条件下以高锰酸钾将色素氧化脱色, 使某些荧光杂质失去荧光活性, 以过氧化氢消除过多的高锰酸钾, 然后测定溶液的荧光强度, 再加低亚硫酸钠还原核黄素, 测残余荧光杂质的荧光强度。由还原前后的荧光差数与内标核黄素溶液荧光强度比较即可测定样品中核黄素的含量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。工业天平 (感量 0.01g), 实验用粉碎机, 离心机 (4000r/min), 荧光比色计, 三角瓶 (100mL), 容量瓶 (50mL), 试管 (15mL), 刻度吸管 (1mL, 10mL)。

2. 试剂。①3% 高锰酸钾溶液: 称 3g 高锰酸钾溶于蒸馏水中, 稀释至 100mL, 砂心漏斗过滤, 每周配一次。②核黄素标准溶液: 将核黄素溶于蒸馏水, 配成浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。③荧光红钠贮备液: 溶解 50mg 荧光红钠于 1000mL 蒸馏水中。④荧光红钠操作液: 吸取贮备液 1mL, 用蒸馏水稀释至 1000mL, 浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。⑤2.5mol/L 醋酸钠溶液: 将 340g 醋酸钠三水合物溶解于蒸馏水稀释至 1000mL。⑥3% 过氧化氢溶液: 用蒸馏水将 30% 过氧化氢稀释 10 倍。⑦低亚硫酸钠。⑧0.05mol/L 硫酸溶液。

(三) 测定步骤

1. 样品提取。称含有核黄素约 5~10 μg 经粉碎的样品 (4~8g) 置 100mL 三角瓶中, 加入 30mL 0.05mol/L 的硫酸于沸水浴中 30min, 每 4~5min 摆动一次, 冷却, 用 2.5mol/L 的醋酸钠调 pH 至 4.5, 静置至少 1h, 用蒸馏水稀释至 50mL (稀释度可按标

准液浓度确定), 过滤。

2. 滤液酸化。取两支试管, 一支加 10mL 滤液和 1mL 蒸馏水, 另一支加 10mL 滤液和 1mL 核黄素标准液 (0.5 μ g/mL), 均加 1mL 冰醋酸。

3. 纯化。每支试管各加 0.5mL 3% 高锰酸钾溶液, 摇动样品, 以氧化样品内的杂质, 混匀后放置 2min, 再加入 0.5mL 3% 的过氧化氢液, 混匀, 10s 内退色。

4. 荧光测定。用荧光红钠溶液调整荧光计, 测得滤液加蒸馏水的荧光读数为 A, 滤液加 20mg 低亚硫酸钠混合后的荧光读数为 C, 滤液加标准液的荧光读数为 B。即可通过计算求得核黄素量。

(四) 结果计算

$$\text{核黄素含量 (mg/100g)} = \frac{A-C}{B-C} \times \frac{\rho}{V_1} \times V \times \frac{100}{m \times 1000}$$

式中 m : 样品质量 (g); $A-C$: 待测样品核黄素发出荧光强度; $B-C$: 标准核黄素发出荧光强度; V : 样品液总体积 (mL); ρ : 标准核黄素溶液浓度 (μ g/mL); V_1 : 待测样品液体积 (mL)。

注意事项: ①核黄素标准液及荧光红钠浓度应根据不同型号荧光计来确定。②脱色时所用的高锰酸钾不宜太多, 否则会破坏核黄素。③过氧化氢应尽量少加, 只要能消除多余的高锰酸钾就够了。因过多加入过氧化氢将多消耗低亚硫酸钠, 且因产生气泡过多, 影响荧光测定。④核黄素容易受光线破坏, 因此所有操作步骤都是在暗室红光下进行的。

十、维生素 B₁、B₂ 含量的测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

维生素 B₁、B₂ 大量存在于谷物类食品中, 蔬菜、水果中含量也较丰富。维生素 B₂、B₂ 遇碱易被破坏, B₂ 见光易分解。因此应在避光或暗光条件下测定。样品测定前用稀盐酸或稀硫酸在高压灭菌锅中水解、提取, 然后再用高效液相色谱进行分离、测定。这种方法快速、简便、准确、灵敏度高。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪, 记录仪, C-18 柱, 高压灭菌锅, 微孔滤膜 (0.45 μ m), 超声波清洗仪。

2. 试剂。①甲醇 (分析纯); ②0.1mol/L 盐酸; ③庚烷磺酸 (PIC-B₇); ④维生素 B₁ 标准液: 称取在五氧化二磷干燥器中干燥的盐酸硫胺素 10mg, 溶于含 25% 乙醇的 0.1mol/L 盐酸中, 并用 0.1mol/L 盐酸定容至 100mL, 最终浓度为 100 μ g/mL; ⑤维生素 B₂ 标准液: 称取在五氧化二磷干燥器中干燥的核黄素 10mg, 加入 0.12mL 的冰醋酸溶解, 然后用重蒸馏水定容至 100mL。最终浓度为 100 μ g/mL; ⑥维生素 B₁、维生素 B₂ 混合液: 吸取 B₁、B₂ 标准液各 2mL, 混合在一起, 用重蒸馏水定容至 100mL, 最终浓度各为 2 μ g/mL。

(三) 操作步骤

1. 样品处理。准确称取新鲜果蔬样品 5.0~10.0g, 谷物类样品 1.0~2.0g。磨碎放

入 150mL 三角瓶中, 加入 50mL 0.1mol/L 盐酸, 放入高压灭菌锅中水解 30min, 取出冷却, 用重蒸馏水定容到 100mL, 过滤, 滤液待用, 上机前取 5mL 滤液用微孔滤膜过滤。

2. 流动相配制。40% 甲醇 + 10mL 庚烷磺酸, 用重蒸水定容到 500mL, 这时庚烷磺酸的最终浓度为 0.005mol/L。然后放入超声波清洗仪中脱气 30min。

3. 色谱条件。色谱柱: Bondapak C-18 3.9mm × 300mm; 流动相: 40% 甲醇 + 60% 蒸馏水 (含庚烷磺酸 10mL, pH 为 4); 检测器: 紫外波长 354nm; 流速: 1.0mL/min; 进样量: 20μL; 纸速: 4mm/min。

(四) 结果计算

根据维生素 B₁、B₂ 保留时间定性, 根据标准及样品的峰高定量。

$$\text{样品中维生素含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{H}{H_0} \times \rho_0 \times \frac{100}{m} \times 100$$

式中 H : 样品峰高 (mm); H_0 : 标准品峰高 (mm); ρ_0 : 标准上机浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); m : 样品质量 (g)。

注意事项: 配好的标准维生素液应放在冰箱中保存, 每次上机前再配稀释液。

十一、维生素 B₆ 含量的测定 (比色法)

(一) 方法原理

维生素 B₆ 与 2,6-二氯醌氯亚胺在氯化铵-氢氧化铵缓冲溶液中生成蓝色靛酚, 于 650nm 处具有最大吸收。维生素 B₆ 含量在 3~8μg/mL 时符合比尔定律。

(二) 仪器及试剂

1. 仪器。工业天平 (感量 0.01g), 721 型分光光度计, 容量瓶 (200mL), 刻度吸管 (1mL, 5mL), 有塞试管 (25mL)。

2. 试剂。① 2,6-二氯醌氯亚胺溶液: 取 2,6-二氯醌氯亚胺 40mg 溶于 100mL 异丙醇中, 贮存于冰箱处 1 个月内是稳定的。若产生粉红色即应弃去。试剂重结晶方法: 取 1g 2,6-二氯醌氯亚胺溶于 50mL 丙酮中, 随即连续搅拌, 逐渐加入 200mL 蒸馏水, 使 2,6-二氯醌氯亚胺沉淀。经抽滤, 迅速干燥, 装入密闭瓶中, 保存于冰箱中, 在此条件下, 所得结晶体 6 个月内是稳定的。② 氯化铵-氢氧化铵溶液: 将 160g 氯化铵溶于 700mL 蒸馏水中, 并加 160mL 浓氢氧化铵 (27%), 加蒸馏水稀释至 1000mL。③ 标准维生素 B₆ 贮备液 (0.1mg/mL): 将 50mg 维生素 B₆ 盐酸盐溶于 500mL 0.1mol/L 盐酸中, 放入冰箱中保存, 在 3 个月内是稳定的。在应用当天吸取上液 5.0mL, 加蒸馏水至 100mL (5μg/mL)。④ 4mol/L 盐酸溶液。⑤ 2mol/L 氢氧化钠溶液。⑥ 2.5% 硼酸溶液。⑦ 异丙醇 (A. R.)。⑧ pH3 缓冲液: 将 73g 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄ · 2H₂O) 和 167g 柠檬酸溶于蒸馏水中, 稀释至 1000mL。⑨ 吸附剂: Lloyd'S 试剂 (水合硅酸铝) 漂白土。⑩ 酸化水: 含 0.001mol/L 盐酸。⑪ 调 pH 用液: 18mol/L 和 1mol/L 氢氧化钠, 12mol/L 和 1mol/L 盐酸。

(三) 测定步骤

样品粉碎过 40 目筛, 称取含维生素 B₆ 30~200μg 的样品, 放入 20mL 离心管中, 加

10mL 4mol/L 盐酸, 插入玻璃搅棒, 将管浸入沸水浴中 1h, 间歇搅拌。冷却后调 pH 至 3, 加入 3mL pH3 的缓冲液, 随后加入 2.5g Lloyd's 试剂, 塞住离心管, 振荡 5min。离心并弃去上清液, 用 15mL 酸化水洗涤沉淀物一次, 离心弃去洗涤水。加入 5mL 2mol/L 氢氧化钠溶液, 并加蒸馏水至 20mL。多次颠倒离心管约 3min, 使吸附剂分散而保持在悬浮状态, 离心, 取出 5mL 离心液, 加入 25mL 异丙醇混合, 并对溶液进行离心分离, 倾出上清液, 用几滴 12mol/L 盐酸调 pH 至 5~7。

取四支有塞试管, 每管加入 5mL 上清液, 2mL 氯化铵-氢氧化铵缓冲液。再加 2mL 2.5% 硼酸溶液到第 1 管, 2mL 蒸馏水到第 2 管和第 3 管中, 2mL 维生素 B₆ 盐酸盐标准液到第 4 管中。用快速移液管加 1mL 2,6-二氯醌氯亚胺溶液到第 1 管中, 混匀, 使其显色。加入显色试剂后, 准确 1min 立即在 650nm 下, 用 1cm 比色杯调光密度为零, 随后对其他三管加 1mL 2,6-二氯醌氯亚胺溶液, 同样准确 1min 后测定各管光密度值。

(四) 结果计算

$$\text{维生素 B}_6 \text{ 盐酸盐 (mg/100g)} = \frac{A}{B-A} \times C \times \frac{V}{V_1} \times \frac{V_3}{V_2} \times \frac{100}{m \times 1000}$$

式中 A: 样品液 (2 和 3 管) 光密度平均值; B: 标准维生素 B₆ 盐酸盐及样品液 (4 管) 光密度值; m: 样品质量 (g); C: 标准维生素 B₆ 盐酸盐含量 (μg); V₁: 样品测定液的体积 (mL); V: 样品稀释液体积 (mL); V₂: 用于稀释的样品液体积 (mL); V₃: 样品液体积 (mL)。

十二、维生素 B₆ 含量的测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

样品采用含达卡淀粉酶、木瓜蛋白酶的醋酸缓冲溶液酶解提取, 过阳离子交换柱 ISC-07/S1504 进行维生素 B₆ 的分离测定, 以标样定量。最小检出量为 3~9×10⁻⁴ μmol/L。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。液相色谱仪 LC-3A, 梯度装置 SGR-1A, 柱恒温箱 CTO-2A, 荧光分光光度计 RF-510LC, 色谱数据处理机 C-R1B, 液相色谱柱 ISC-07/S1504 (日本岛津)。

2. 试剂。①盐酸吡哆醛, 盐酸吡哆醇, 二盐酸吡哆胺。②达卡淀粉酶, α-Amylase 活性: 40U/mg, β-Amylase 活性: 25U/mg。③木瓜蛋白酶: 酶活性: 1.5U/mg。④流动相 A: 0.4mol/L Na⁺, pH4.9 的甲酸盐缓冲液。⑤流动相 B: 0.6mol/L Na⁺, pH5.6 的甲酸盐缓冲液。⑥流动相 C: 1.0mol/L Na⁺, pH6.5 的甲酸盐缓冲液。⑦流动相 D: 0.2mol/L 氢氧化钠 (为再生液)。

HPLC 用试剂为优级纯, 水为无离子水。

(三) 测定方法

1. 样品制备。(1) 鲜样。称取有代表性的样品 100g, 加入 200g pH4.8 的 0.4mol/L 乙酸钠缓冲液 (内含 1% EDTA) 后匀浆; 称取双份 60g 匀浆液于 250mL 锥形瓶中, 每只瓶中加入均匀悬浮于乙酸钠缓冲液中的 160mg 达卡淀粉酶和 160mg 木瓜蛋白酶; 混

匀后置 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中酶解 16h。酶解结束后冷却,转移内容物至 100mL 容量瓶中用蒸馏水定容,摇匀后用致密滤纸过滤,滤液待测。

(2) 干样。称取 5g 粉碎干样于 250mL 锥形瓶中,加入悬浮有 160mg 达卡淀粉酶和 160mg 木瓜蛋白酶的乙酸钠缓冲液 60mL 混匀后置 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中酶解 16h,酶解结束后冷却,转移内容物至 100mL 容量瓶中用蒸馏水定容,摇匀后用致密滤纸过滤,滤液待测。

2. 柱纯化。①装柱:732 型阳离子交换树脂,氢型,80~120 目,层析柱直径 10mm \times 300mm,湿法装柱,树脂床高 100mm。②纯化:吸取 50mL 样液上柱,待样液全部流过树脂床后用 30~40mL 蒸馏水分多次洗涤,直至流出液无色。然后用 0.4mol/L 氢氧化钠洗脱维生素 B_6 ,洗脱前沿至柱出口处约 5mm 时开始收集洗脱液,共收集 48mL,然后在洗脱液中加入 2mL 80% 甲酸,摇匀,上机测定。

3. 测定

(1) 色谱条件。色谱柱:ISC-07/S1504;流速:0.5mL/min;柱温: 60°C ;荧光检测器:Ex320nm,Em400nm;进样体积:50 μL

(2) 梯度程序:进样 \rightarrow 流动相 A (20min) \rightarrow 流动相 B (10min) \rightarrow 流动相 C

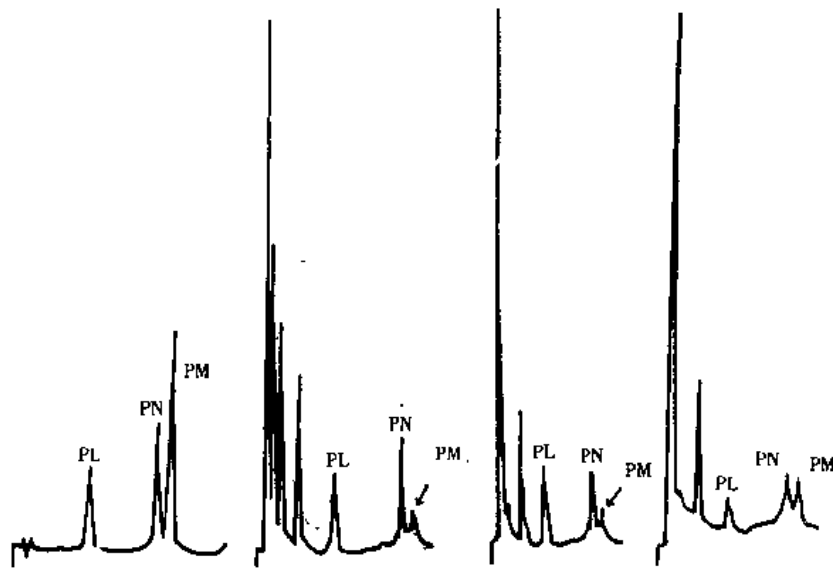


图 12-1 维生素 B_6 标准和样品色谱图

(13min) \rightarrow 流动相 D (5min) \rightarrow 流动相 A (10min) \rightarrow 下次进样……

(四) 结果计算

由色谱数据处理机分别制作 PL、PN、PM 的标准曲线。输入标准液浓度、保留时间及样品质量等参数,计算出样品中 B_6 含量。

十三、烟酸和烟酰胺的测定 (AACC 法)

(一) 方法原理

本方法适用于谷物产品。以 1.5% 氢氧化钙提取, 并以溴化氰在 2°C 时与烟酸起反应为方法的依据。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。光电比色计, 离心机, 冰浴或冰箱。

2. 试剂。①烟酸贮备液: 将 50mg 供作标准参考用的 U. S. P 烟酸 (预先经干燥并于暗处贮存在装有五氯化二磷的干燥器内) 溶解于 25% 的乙醇中, 并稀释到 500mL, 贮藏处所约 10°C (1mL 含 100 μ g 烟酸)。②烟酸标准液: 取 10mL 贮备液, 用蒸馏水稀释至 100mL (1mL 含 10 μ g 烟酸)。③磷酸缓冲液: 将 60g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 10g KH_2PO_4 溶解于温水中, 并稀释至 200mL。④10% 溴化氰溶液: 在大的烧瓶中将 370mL 蒸馏水预热至 40°C, 然后加 40g CNBr , 振荡直至溶解, 冷却并稀释至 400mL (剧毒, 勿接触皮肤)。⑤55% 对氨基苯磺酸: 加入 27mL 蒸馏水和 27mL NH_4OH 于 55g 对氨基苯磺酸中, 并振荡至溶解, 必要时可加热。用几滴 NH_4OH 或 5mol/L 盐酸调节 pH 到 7, 稀释至 100mL, 贮存于暗处。

(三) 测定步骤

1. 样品制备。充分地混合样品 (样品预先粉碎) 并称量一份大约含 100 μ g 烟酸的样品供用。

2. 测定。用一支试剂空白和 5 支不同浓度烟酸标准液, 随待测样品一起同样地进行。

3. 水解。向 6 个 250mL 三角烧瓶内每个加入大约 1.5g 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 然后用移液管分别注入 0、5、10、15、20 和 25mL 的烟酸标准液。将称好的样品移入另外一支 250mL 的锥形烧瓶内, 并加入 1.5g 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 。向每个烧瓶中加入 90mL 蒸馏水, 振荡混合, 然后在 103.4kPa 压力下高压蒸煮 2h, 冷却至大约 40°C, 转移到 100mL 的容量瓶中, 并稀释至刻度。

4. 澄清。从每支 100mL 的容量瓶中, 吸取大约 50mL 上层清液至各自的离心管中, 并坐入冰浴内 15min, 或在冰箱内放置至少 2h。离心 15min。然后从每支离心管中吸取 20mL 上清液分别移入含有 8g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 2mL 磷酸缓冲液的离心管内, 振摇至溶解并加温至 55~60°C, 离心 5min。然后通过华特曼 12 号滤纸或与之相当的滤纸进行过滤。如果必须获得澄清液, 可再过滤一次。

5. 显色。添用另外一支试管正如标准系列中的空白一样, 作为样品空白。其中不加 CNBr 。在每支装有 5mL 标准液或样品的试管中, 向标准及样品与空白管中各加 10mL 蒸馏水。并让所有的管子在碎冰浴静置 30min。依序向样品、系列标准液, 以及试剂空白中各加入 10mL 冷的 CNBr , 随后在 30s 内加入 1mL 55% 的对氨基苯磺酸溶液。加入每一种试剂后, 立即混合, 务必使含有 CNBr 的管子塞紧。将所有试管放回冰浴中。向样品空白中加入 1.0mL 55% 的对氨基苯磺酸溶液。用空白标准液调置比色计在 470nm 波长的透光度为 100%。当加入对氨基苯磺酸后 12~15min, 读取其他各试管的透光度。试管必须均

匀冷却而且每一个试管在放进比色计之前必须擦干。如果试管外层起雾，在温水中浸一下，并于测取读数之前擦干。

(四) 结果计算

以标准液扣除试剂空白后的吸收值对烟酸的浓度(微g/mL)做图，划出一条最适合的直线。从这条线中读取与样品吸收值相应的含量 c ，而此样品的吸收值已经样品空白和试剂空白校正。

$$\text{烟酸含量 (mg/100g)} = \frac{c}{\text{样品质量 (g)}} \times 10^4$$

十四、烟酸含量测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

样品内的烟酸经 121℃ 的酸性环境中提取 30min，再经过阳离子交换柱纯化去除杂质，HPLC 法分离，254nm 检测定量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。液相色谱仪 LC-3A，梯度洗脱仪 SGR-1A，柱恒温箱 CTO-2A，紫外检测器 UVD-2 (254nm)，数据处理仪 C-R1B，高速组织匀浆机，高压灭菌锅，玻璃层析柱(直径 8mm×250mm) 等。

2. 试剂。0.1mol/L 硫酸，0.2mol/L 氢氧化钠，80%甲酸，三氯乙酸。以上试剂均为分析纯，10μg/mL 烟酸溶液。

(三) 测定方法

1. H⁺型 732 阳离子交换树脂的处理和层析柱的装填。80℃ 下烘干市售 732 树脂，机械粉碎，筛分出 80~120 目的树脂，用常法使其成为 H⁺型后，用蒸馏水浸泡于广口瓶中备用。装填层析柱时用玻璃棒搅动树脂使其悬浮，然后倒入层析柱内，使树脂自然沉降后的高度为 100mm。装有树脂的层析柱使用时需先注满蒸馏水，颠倒几次后垂直安放，使树脂沉降为很均匀的床层。

2. 样品制备过程。用样品 100g 与 100mL 0.1mol/L 硫酸在匀浆机中匀浆后称取 50g 浆液，倒入 250mL 锥形瓶中，在高压灭菌锅内 0.1MPa 压力下加热提取 30min。锥形瓶取出冷却后定容至 100mL，过滤(滤不清应在过滤前加入 10g 三氯乙酸)，吸取 50mL 滤液，上准备好的层析柱净化。待样液全部通过树脂床层后再进行随后的冲洗。然后加入 45mL 左右的蒸馏水洗除杂质。也可用 pH 试纸检查柱流出液，当 pH 值为 6~7 时即可。然后用 0.2mol/L 氢氧化钠洗脱烟酸。仔细观察洗脱前沿，待前沿距层析柱出口端的树脂层约 5mm 时开始收集洗脱液，收集 48~49mL，在收集液中加入 1mL 80%甲酸后定容至 50mL，待测。如当天不能完成色谱测定，可将待测液保存在冰箱中。上述净化须小心进行，尽量不要冲动树脂床层，这样洗脱前沿才平直，回收率才能得到保证。

3. 色谱条件。色谱柱：ISC07/S1504；洗脱液：Na⁺浓度 0.2mol/L，pH 值 3.1 的甲酸盐缓冲液(使用优级纯氢氧化钠，重蒸 80%甲酸，无离子水配制)；再生液：0.2mol/L 氢氧化钠，用优级纯氢氧化钠和无离子水配制；流速：0.5mL/min；柱温：55℃；检测

波长：254nm；检测器灵敏度： 2×10^{-2} AUF；定量方式：外标法；进样量：50 μ L。

色谱程序：进样→洗脱液（25min）→再生液（5min）→洗脱液（30min）→下一次进样。

4. 标准曲线制作。分别将1、2、3、4、5、6、8、10 μ g/mL的系列标准液50 μ L，上机分析，以浓度、峰面积制作标准曲线。

（四）结果计算

$$\text{烟酸含量 (mg/100g)} = \frac{c \times V}{m \times 1000} \times 100$$

式中 c ：由标准曲线查出上机样液浓度（ μ g/g）； V ：样液体积（mL）； m ：样品质量（g）。

十五、维生素 B₆（叶酸）含量的测定

（一）方法原理

叶酸定名为蝶酰单谷氨酸，其结构式中含有一个吡嗪-嘧啶环，因而有其特殊吸收光谱，并且在紫外光中产生强烈的蓝色荧光能力。由于叶酸难溶于水中，不溶于醇、乙醚及其他有机溶剂。可采用偏磷酸热提取法从样品中提取叶酸，在提取液中加入活性炭，吸附叶酸并去除其他的荧光性杂质，再以适当溶剂洗脱被活性炭吸附的叶酸，根据溶液中荧光强度即可定量出叶酸含量。

（二）仪器、设备

1. 仪器。工业天平（感量1/100），荧光比色计，玻璃研钵，pH酸度计，抽气机或水泵，水浴锅，布式漏斗，容量瓶（50mL）。

2. 试剂。①40%偏磷酸溶液（在冰箱中能保存2~3周）。②4%高锰酸钾溶液。③3% H₂O₂溶液。④叶酸标准液：取10mg叶酸溶于100mL蒸馏水中，加几滴甲苯，移入棕色试剂瓶内，保存在冰箱中。在测定时，取上述溶液1mL，加蒸馏水稀释至50mL（以醋酸调溶液pH为4.5），即1mL标准液含2 μ g叶酸。⑤含氨3%的乙醇溶液：722mL 95%乙醇和117mL 25%氨溶液（相对密度0.910），以蒸馏水稀至1000mL，贮存于有塞玻璃瓶中。⑥吸附活性炭：取活性炭数克，加入10倍新配制10%苯胺溶液（不含荧光物质），在沸水浴中煮沸，并不断搅拌处理1h，通过布式漏斗过滤，以蒸馏水洗涤5~6次，铺成薄层，在30~40℃下干燥，贮于有塞瓶中。

（三）测定步骤

1. 样品中叶酸的提取。称取磨碎的谷物等样品1~5g，加少量石英沙及10mL 40%偏磷酸，研磨至匀浆，以20mL 40%偏磷酸溶液将匀浆物全部转入50mL容量瓶中，置沸水浴中保持45min，冷却，加蒸馏水至50mL，过滤。

2. 叶酸吸附及洗脱。取上面提取滤液20~30mL，加入50mg处理过的活性炭，煮沸5min，以吸附叶酸。通过布式漏斗抽气过滤，弃去滤液，再以含NH₃ 3%的乙醇溶液洗涤漏斗上面的活性炭4~5次（每次加10mL），收集各次洗涤液于烧杯中，在水浴中蒸发至10mL左右，以25%醋酸调pH至3.0。

3. 杂质的氧化。向上述洗涤液中途滴加入 4% 高锰酸钾溶液至浅红色不退为止，静置 10min，再逐滴加入 3% H_2O_2 溶液至浅红色退去，将溶液 pH 调为 4~4.5，定容至一定体积，过滤。

4. 荧光强度测定。取滤液在荧光计上测定荧光强度（激发光波长为 365nm，发射波长为 450nm），另测定 $2\mu\text{g/mL}$ 标准叶酸荧光强度（对照为不加样品的所有试剂溶液）。

（四）结果计算

根据上述测定的荧光强度，按下式计算待测物质中叶酸含量。

$$X = \frac{(A-B) \times V \times V_2 \times V_3 \times 100}{c \times m \times V_1}$$

式中 X：每 100g 样品中叶酸含量 (μg)；A：待测物溶液荧光强度；B：对照实验溶液荧光强度；c： $2\mu\text{g/mL}$ 叶酸标准溶液荧光强度；m：样品质量 (g)；V：用于测定荧光强度的提取液体积 (mL)； V_1 ：用于吸附叶酸所取提取液体积 (mL)； V_2 ：叶酸提取液总体积 (mL)； V_3 ：叶酸标准液浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。

十六、胆碱含量的测定（雷氏盐法）

（一）方法原理

植物样品及食品中胆碱，以 1:5 硝酸水溶液提取，5% 雷氏盐-甲醇溶液沉淀，正丙醇洗涤，丙酮溶解，在 526nm 下比色测定，用标准氯化胆碱作对照计算样品中胆碱含量。

（二）仪器与试剂

1. 仪器。721 型分光光度计，水泵，25mL 具塞试管，100mL 烧杯等。
2. 试剂。雷氏盐，氯化胆碱，丙酮，正丙醇均为 A. R.，1:5 硝酸水溶液。

（三）测定步骤

1. 待测液的制备。称取 5g 烘干粉碎的刺梨干粉于 200mL 三角瓶中，加入 1:5 硝酸水溶液 40mL，置电热板上加热提取 5h（随时补充蒸发掉的水分），冷却，转入 50mL 容量瓶中，定容过滤。

2. 雷氏盐沉淀比色。准确吸取滤液 30mL 于 10mL 烧杯中，用浓碱液调 pH8~9，加入 30mL 甲醇，摇匀，置冰箱过夜。次日取出过滤，用 100mL 小烧杯收集滤液，在水浴上浓缩至 20~25mL，冷却。加入 5mL 5% 的雷氏盐-甲醇溶液，置冰箱中放置 2h 以上，生成胆碱雷氏盐结晶，将结晶抽吸过滤，再用 5mL 正丙醇洗涤沉淀多次（以洗至滤液无色为止），用丙酮溶解沉淀，定容至 25mL，在 526nm 测定吸光度。

3. 标准曲线制作。称取标准氯化胆碱（置真空干燥器中五氧化二磷干燥）1.0000g，用蒸馏水溶解后定容成 100mL，准确吸出 10mL 定容成 100mL，即为 1mg/mL 的标准胆碱溶液。吸取此标准液 1、3、5、7、9mL 于 25mL 具塞试管中，用蒸馏水定容至 20mL，加入 5% 雷氏盐溶液 5mL，摇匀，置冰箱中 2h 以上，其余操作同上。

（四）结果计算

由标准曲线求出试样中氯化胆碱的浓度，再乘以系数 0.869，即求得胆碱浓度 A，100g 试样中的胆碱量按下式求得：

$$\text{样品中胆碱含量 (mg/100g)} = \frac{A}{m} \times 100$$

式中 A: 由标准曲线求得胆碱浓度; m: 样品质量 (g)。

十七、维生素 B₁₂ 含量的测定 (微生物法)

(一) 方法原理

可作维生素 B₁₂ 测定用的菌株有 *Lactobacillus Leichmannii* (*Lact. leichmannii*)、*Escherichia Coli* (大肠埃希杆菌) 变异株, *Euglena gracilis*, *Ochromonas malhamensis* 等。但一般情况下均使用 *Lact. leichmannii*。

(二) 仪器、菌株与试剂

1. 仪器。721 型分光光度计, 培养箱, 压力灭菌锅等。

2. 菌株与试剂。

(1) 使用菌株: *lactobacillus leichmannii* ATCC 7830。

(2) 保存培养基: *Lact. leichmannii* 保存培养基。

表 12-1

酵母提取物	8.5g	番茄汁	3.7g
豚	8.5g	Tween 80	1.0g
葡萄糖	11.0g	粉末琼脂	15.0g
磷酸钾	2.0g		
	pH6.8±0.1		

(3) 接种用培养基: 从保存用培养基中除去琼脂一项, 其他相同。

(4) 菌株的保存: 每周需进行 2 次细菌培育, 再经 37℃ 培养 21~24h 后保存于冰箱中。

(5) 定量用基础培养基:

表 12-2

成分组成 (2 倍浓度 1L/份)			
酪蛋白氨基酸	10g	烟酸	2mg
L-胱氨酸	400mg	黄嘌呤	20mg
D,L 色氨酸	400mg	磷酸钾	1g
硫酸腺嘌呤	20mg	磷酸氢钾	1g
盐酸鸟嘌呤	20mg	硫酸镁	400mg
尿嘧啶	20mg	硫酸锰	20mg
维生素 B ₁	1mg	无水醋酸钠	20g
维生素 B ₂	1mg	葡萄糖	40g

续表

成分组成 (2 倍浓度 1L/份)			
生物素	8 μ g	对氨基苯甲酸	2mg
泛酸钙	1mg	硫酸亚铁	20mg
盐酸吡哆醇	1mg	<i>d</i> -天门冬酰胺	200mg
抗酸吡哆醇	4mg	维生素 C	4g
盐酸吡哆胺	800 μ g	聚山梨醇酯 80	2g
叶酸	200 μ g		

pH6.0

(6) 接种菌液：将菌种从保存培养基接种至接种培养基上，经 37℃、18~21h 培养后用灭菌生理食盐水洗涤 3 次，用生理食盐水稀释至 660nm 的透过率为 80%~85%，作为接种菌液。

(7) 维生素 B₁₂ 标准液的配制：精确称量维生素 B₁₂ 结晶 100mg 溶解在 25% 乙醇中并定容至 1L，作为维生素 B₁₂ 原液（浓度 100 μ g/mL）。放入棕色瓶中保存于冰箱中。使用时用水配制成 0.1ng/mL 的溶液。定量范围：用 5mL 培养，0~0.1ng。

(8) 维生素 B₁₂ 标准液的系列 (ng/5mL)：0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.09, 0.1。

(三) 操作步骤

1. 试样的配制。由于天然物中的维生素 B₁₂ 以羟钴胺素 (Hydroxo-Cobalamin)，辅酶型 (辅酶 B₁₂)，与肽或蛋白质结合的结合型等存在，所以定量时有必要转化为游离型进行提取。向经过充分粉碎后的 1g 试样（约含维生素 B₁₂ 0.25~5mg）里加入 5mL pH4.5 的 0.2mol/L 乙酸缓冲液（将 3.96mL 乙酸，7.71g 乙酸钠溶解于水，定容 100mL），0.2mL KCN (500 μ g/mL)，20mL 水，在 100℃ 条件下加热 30min。冷却后加入 0.3mL 10% 的偏磷酸，用水定容 25mL。定容后过滤或离心取 10mL 上清液调至 pH7.0，用水稀释至维生素 B₁₂ 含量为 0.05ng/mL 左右，作为检液。

由于 *Lact. Leichmannii* 除对维生素 B₁₂ 以外，还会对脱氧胸腺嘧啶核苷等脱氧核糖苷也显示活性，所以有必要根据不同试样对 *Lact. Leichmannii* 的非维生素 B₁₂ 活性物质进行测定并扣除之。

取上述提取液 10mL 用 NaOH 调 pH11~12，经 0.1MPa 压力，加热 30min 后调节 pH7.0，用水定容作为维生素 B₁₂ 量求出数值，从检液的维生素 B₁₂ 测定值中扣除。

细菌的接种和培养，向灭菌试管里分别加入 2.5mL 基础培养基及检液（或标准液），用水加至总量达 5mL，经 0.1MPa 5min 加压灭菌，加入 1 滴接种菌液，在 37℃ 条件下培养 21~24h。

2. 测定及计算。培养后的试液，在 0.1MPa 5min 加压灭菌，在分光光度计上波长 550nm 处测百分透光度，用水调仪器 100%T，测未接种的空白。用未接种空白调仪器的 100%T，测接种的空白。将 9 个接种的空白管混合，用混合液调仪器的 100%T，测定系列标准物、样品管的光密度，计算出样品维生素 B₁₂ 含量。

十八、泛酸含量的测定（微生物法）

（一）仪器、菌株与试剂

1. 仪器。721 型分光光度计，培养箱，压力灭菌锅等。
2. 菌株与试剂。（1）使用菌株：乳酸杆菌 (*Lactobacillus arabinosus* 17-5 ATCC 8014)。
- （2）保存培养基：保存培养基 (1L/份)。见表 12-3。

表 12-3

酵母提取物	5.5g	无水醋酸钠	10.0g
胨	12.5g	硫酸镁	0.1g
葡萄糖	11.0g	硫酸锰	5.0mg
磷酸二氢钾	0.25g	硫酸亚铁	5.0mg
磷酸氢二钾	0.25g	粉末琼脂	20.0g
pH6.8±0.1			

- （3）接种用培养基：将保存用培养基中琼脂除去即可。
- （4）菌株保存：细菌接种培养每周进行一次，在 37℃ 培养 21~24h 后，冰箱保存。
- （5）定量用基础培养基。见表 12-4。

表 12-4

定量用基础培养基

成分组成 (2 倍浓度 1L/份)

酪蛋白氨基酸	10g	烟酸	400μg
L-胱氨酸	400mg	维生素 B ₆	800μg
D-色氨酸	200mg	磷酸二氢钾	1g
硫酸腺嘌呤	20mg	磷酸氢二钾	1g
盐酸鸟嘌呤	20mg	硫酸镁	400mg
尿嘧啶	20mg	硫酸锰	20mg
维生素 B ₁	200μg	无水醋酸钠	20g
维生素 B ₂	400μg	葡萄糖	40g
生物素	0.8μg	对氨基苯甲酸	200μg
pH6.8			

（6）接种菌液：将菌种以保存培养基接种到接种用培养基上，37℃ 培养 18~21h 后，用灭菌生理食盐水洗涤 3 次，并用生理食盐水稀释。在 660nm 波长处测透过率为 80%~85%，作为接种菌液。

（7）泛酸标准液的调制：精确称量 100mg 泛酸钙结晶溶解于 500mL 水中。加入 10mL 0.2mol/L 乙酸及 10mL 0.2mol/L 乙酸钠，再用水定容 1L，即得泛酸钙原液（泛酸

钙的浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$), 冰箱低温保存, 使用时用水稀释至 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 。定量范围: 按泛酸钙计用 5mL 培养, 定量范围为 $0\sim 0.1\mu\text{g}$ 。

(8) 标准系列: $0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 泛酸溶液。

(二) 操作步骤

1. 试样的制备。为将天然物中的结合型泛酸及泛酸共轭物等转化为游离型, 必须采用酶解法。酶解法采用鸟肝(鸡肝)淀粉酶及肠碱性磷酸酯酶并用, 也有用高淀粉酶 B 及鸽肝提取液合并使用。向经充分粉碎后的试样(含泛酸 $5\sim 15\mu\text{g}$)里加入 0.1mL 的肠磷酸酯酶 ($50\sim 100$ 单位/ mL), 0.2mL 经离子交换树脂处理后的肝酶液, 0.1mL $1\text{mol}/\text{L}$ 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 ($\text{pH}8.3$), 再加水至总量为 1mL 在 37°C 条件下进行酶解反应 $3\sim 4\text{h}$ 后, 煮沸使其反应停止, 冷却后, 调 pH 至 6.8 , 定容。如有沉淀物可进行离心或过滤并稀释至泛酸含量为 $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为检液。如只对游离型进行定量, 可加入 10mL $1\text{mol}/\text{L}$ 羟甲基氨基甲烷缓冲液及水, 在 $9.8\times 10^4\text{Pa}$ 下加压 15min 进行抽提, 冷却后调 pH 至 8 , 定容后作为检液。

2. 细菌的接种与培养。向灭过菌的试管里分别加入 2.5mL 基础培养基及检液(或标准液)加水至总量为 5mL , 经 1.03×10^5 6min 加压灭菌, 加入 1 滴接种菌液, 在 37°C 条件下培养 $21\sim 24\text{h}$ 。

3. 测定及计算。培养后在 100°C 沸腾水浴中加热 10min , 将各试管的内容物充分晃动混合, 于 1cm 比色皿内在 660nm 波长处测定透过率。制作标准曲线, 由标准曲线上求得检液的泛酸含量, 乘以稀释倍数后即可算出试样中的泛酸量。

十九、泛酸含量的测定 (HPLC 法)

(一) 原理方法

本法(简称 HPLC 荧光法)原理是, 样品去杂提纯后, 用 Zorbax C_8 色谱柱分离, 再用 NaOH 水解泛酸成 β -丙氨酸, 然后, β -丙氨酸与邻苯二甲醛及巯基乙醇在碱性缓冲液中反应生成荧光物质, 荧光分析检测其含量。此法灵敏度高、快速、标准偏差、变异系数、回收率均达满意要求, 对供试的几种食品样来看, 其分离效果均比较理想。

(二) 仪器与试剂

1. 主要仪器。高效液相色谱(日本岛津制作所 LC-3A 型), 其中包括: 两台副泵、恒温箱、化学反应恒温器、荧光检测器、数据处理机各一台, 高速组织捣碎机, 精密酸度计 PHS-73A 型。

2. 试剂。①泛酸贮备液 $1\text{mg}/\text{mL}$ 。②泛酸标准中间液 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 。③泛酸标准工作液 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。④ $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{AR}$ 。⑤洗脱液: $0.1\text{mol}/\text{L}$ H_2PO_4 , 调 $\text{pH}4.5$ 。⑥水解液: $1\text{mol}/\text{L}$ NaOH 。⑦荧光衍生液: $0.5\text{mol}/\text{L}$ 碳酸缓冲液; 其中含邻苯二甲醛 0.1% , 巯基乙醇 0.4% , Brij35 0.1% , 乙醇 1% 。⑧732 阳离子交换树脂(过 $80\sim 120$ 目筛), 处理成 H^+ 型, 60°C 烘干备用。

3. HPLC 分析装置

(三) 测定步骤

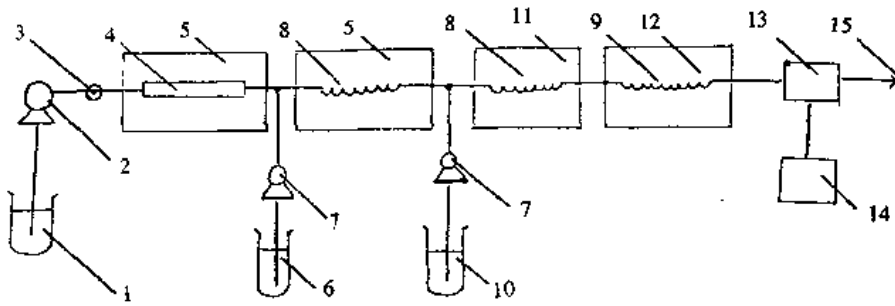


图 12.2 HPLC 分析装置示意图

1—洗脱液 2—主泵 3—进样阀 4—色谱柱 5—恒温箱 6—水解液
7—副泵 8—反应圈 9—冷却圈 10—荧光衍生液 11—化学反应恒温器
12—冷却水 13—荧光检测器 14—数据处理器 15—废液

1. 样品抽提。称取鲜样品 100g, 加入蒸馏水 100mL, 用高速组织捣碎机捣成糊状, 用二层纱布过滤, 取滤液 90mL, 用 6mol/L NaOH 调 pH5.3, 然后加入 2gCa(OH)₂ 迅速搅拌均匀, 定容至 100mL, 过滤, 取滤液 90mL 用 3mol/L 磷酸调至中性, 定容至 100mL, 过滤, 滤液过 H⁺ 型 732 柱, 供 HPLC 测定。

2. HPLC 测定条件: 色谱柱: Zorbax C₈ 柱 (25cm×4.6mmID); 主泵压力: 9.8×10⁶Pa; 洗脱液流速: 1mL/min; 检测器: 荧光检测仪, 激发波长 360nm, 发射波长 430~800nm; 水解温度: 99℃; 水解液流速: 0.2mL/min; 荧光衍生温度: 55℃; 荧光衍生液流速: 0.3mL/min; 进样阀体积: 50μL。

3. 标准曲线制作。分别将 0.1、0.2、0.4、0.6、0.9、1.2μg/mL 泛酸液 50μL, 上机分析, 以浓度-峰面积制作标准曲线。

(四) 结果计算

$$\text{泛酸含量 (mg/100g)} = \frac{c \times V \times N}{m \times 1000} \times 100$$

式中 c : 样品液泛酸浓度 (μg/g); V : 样液体积 (mL); N : 样液稀释倍数; m : 样品质量 (g)。

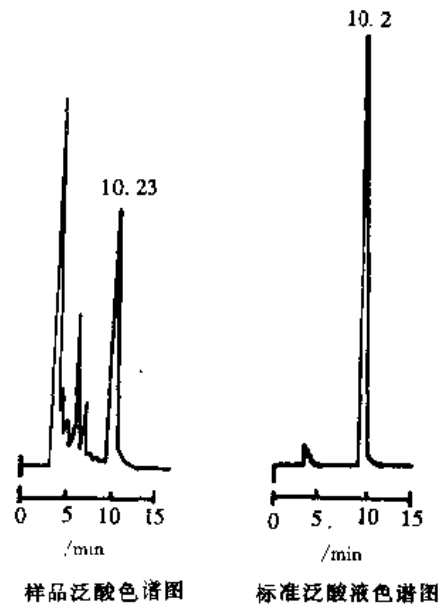


图 12.3 标准泛酸和样品色谱图

注意事项: 本法采用荧光检测, 比紫外检测灵敏度提高 10~100 倍, 而干扰物大大减少。分析快速, 泛酸峰保留时间为 15min 左右, 而且泛酸峰后, 无其他明显的干扰峰, 可连续进样分析。

二十、生物素含量的测定（微生物法）

（一）仪器、菌株与试剂

1. 仪器。721 型分光光度计，培养箱，压力灭菌锅等。

2. 菌株与试剂。

(1) 使用菌株：乳酸杆菌 (*Lactobacillus arabinosus* 17-5 ATCC 8014)。

(2) 保存培养基：保存培养基 (1000mL/份)。

酵母提取物	5.5g	无水醋酸钠	10.0g
胨	12.5g	硫酸镁	0.1g
葡萄糖	11.0g	硫酸锰	5.0mg
磷酸二氢钾	0.25g	硫酸亚铁	5.0mg
磷酸氢二钾	0.25g	粉末琼脂	20.0g
pH6.8±0.1			

(3) 接种用培养基：将保存用培养基中琼脂除去即可。

(4) 菌株保存：细菌接种培养每周进行一次，在 37℃ 培养 21~24h 后，冰箱保存。

(5) 定量用基础培养基。见表 12-5。

表 12-5 定量用基础培养基

成分组成 (2 倍浓度 1L/份)			
酪蛋白氨基酸	10g	烟酸	400μg
<i>l</i> -胱氨酸	400mg	维生素 B ₆	800μg
<i>d,l</i> -色氨酸	200mg	磷酸二氢钾	1g
硫酸腺嘌呤	20mg	磷酸氢二钾	1g
盐酸鸟嘌呤	20mg	硫酸镁	400mg
尿嘧啶	20mg	硫酸亚铁	200mg
维生素 B ₁	200μg	无水醋酸钠	20g
维生素 B ₂	400μg	葡萄糖	40g
对氨基苯甲酸	200μg		

(6) 标准液的制备：精确称量生物素 10mg，溶解于 50% 乙醇，定容 1000mL (含生物素浓度为 1μg/mL)。使用时用水稀释为 1ng/mL。

(7) 定量范围：用 5mL 培养 0~0.5ng。

(8) 标准液系列：0, 0.02, 0.06, 0.1, 0.14, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5ng/mL 生物素液。

（二）测定步骤

1. 试样的制备。为从试样中提取生物素，通常采用在 H₂SO₄ 作用下的加压分解法。即

将试料(约含 200ng 生物素)充分粉碎后,加入 25mL 3mol/L H_2SO_4 ,在 $9.8 \times 10^4 Pa$ 下加压分解 1h。冷却后用 5mol/L NaOH 调至 pH6.8,定容。如有必要,可离心分离或过滤后,再稀释至约含生物素 0.2ng/mL。对含脂肪酸高的试样,可调 pH4.5 后进行过滤或乙醚处理,以除去脂肪酸。

2. 细菌的接种与培养。向灭过菌的试管里加入 2.5mL 基础培养基及待检液(或标准液),加水至总量为 5mL,经 0.1MPa 5min 加压灭菌,加入 1 滴接种菌液,在 37℃ 条件下培养 21~24h。

3. 测定及计算。培养后在 100℃ 沸水浴中加热 10min 后,将各试管的内容物充分晃动混合,于 1cm 比色皿内测定波长 660nm 的透过率。由标准液系列制作标准曲线。由标准曲线上求出检液中生物素的含量,乘以稀释倍数即可算出试样中生物素含量。

第十三章 水分及矿物元素的测定方法

一、水分测定法

(一) 方法原理

105℃烘箱法适用于谷物、油料作物种子水分的测定。130℃烘箱法适用于谷类作物种子水分的测定。

(二) 仪器、设备

分样器，样品磨碎机：粗细可调的，密闭的；铜丝筛：孔径 0.5，1.0mm 的各一个，小型电热式恒温烘箱，分析天平：感量为 0.001g，铝盒：高 2cm，直径 4.6cm，干燥器及变色硅胶。

(三) 操作步骤

1. 试样的选取和制备。取具有代表性样品，装于密封容器中。将样品通过分样器，充分混匀，从中取出 30~40g，除去杂质，进行磨碎或切片。制备好的试样，立即装入磨口的样品瓶中，混匀备用。

2. 测定。105℃烘箱法：称取平行试样两份，每份 4.5~5g。精确至 0.001g，放入预先在 105℃下烘至恒重的铝盒内，摊平，盖好。把烘箱预热至 115℃左右，将盒盖揭开放在盒底下，打开烘箱门，将试样放入烘箱内距温度计 2~2.5cm 的第一层筛板上，关好箱门，尽快使温度回升至 105℃，开始计时，于 105℃±2℃烘干 8h。然后，打开烘箱，立即盖好盒盖，取出，放入盛有变色硅胶的干燥器中，冷却至室温（30~40min），迅速称重。

130℃烘箱法：测定前，先将烘箱预热至 140~145℃，将试样放入烘箱内，关好箱门，使温度尽快在 10min 内回升至 130℃，开始计时。在 130℃±2℃烘 60min。其他操作均与上述 105℃烘箱法相同。

(四) 结果计算

由试样的烘干失重计算种子的水分百分率。

$$\text{水分}(\%) = \frac{m_1 - m_2}{A} \times 100$$

式中 m_1 ：烘干前试样质量 (g)； m_2 ：烘干后试样质量 (g)；100：换算成百分含量。

二、胶体束缚水及自由水含量的测定

(一) 方法原理

在现用测定束缚水的方法中，折光法是最方便的。胶体束缚水具有整齐的结构，与蔗糖溶液混合时不能作为溶剂，在蔗糖溶液中，只有未被胶体束缚的水分。若向一定体

积浓度的蔗糖溶液中加入一定量的含有束缚水的样品，则溶液的浓度由于非束缚水的进入而减少，束缚水的量可从水的总量减去进入溶液中自由水的量求得。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。工业天平 (感量 0.01g)，离心机，折光仪，称量秤，烘箱，瓷研钵。
2. 试剂。40%蔗糖溶液，氯仿。

(三) 测定步骤

取 2g 磨碎的新鲜材料放入已称重的称瓶中，在分析天平上称重，再放入烘箱中于 100℃ 下烘至恒重。称取同一样品 2g (精确到 0.01g)，放入已称重的称瓶中称重。加 5mL 40% 蔗糖溶液，盖上盖子，再称重。此后以一长度不超过称瓶高度的短玻璃棒搅匀称瓶内含物，盖上盖子 (连同玻璃棒一同盖上)，放置 20~24h 并定期搅拌，使其达到平衡。转入离心管中，以 2000~3000r/min 离心，利用折光仪测定溶液蔗糖浓度。

其余样品在瓷研钵中仔细研磨，称取 2g (精确到 0.01g)，装入已称重的称瓶中，加 5mL 蒸馏水，加盖，放置 2h 并定期用短玻璃棒搅拌。此后转入离心管中，一起离心，利用折光仪测定溶液蔗糖浓度。

(四) 结果计算

按公式计算胶体束缚水含量：

$$X = A - \frac{m_1 \times S (w_0 - w_2) \times (100 - w_1) + m_2 \times H \times w_1 \times (100 - w_2)}{m_1 \times m_2 \times (w_2 - w_1)}$$

式中 X ：胶体束缚水量 (占分析物%)； H ：给样品中加的水量 (g)； S ：给样品中加的蔗糖量 (g)； m_1 ：加水处理的样品质量 (g)； m_2 ：加蔗糖处理的样品质量 (g)； w_0 ：蔗糖溶液原始浓度 (%)，根据折光仪测定)； w_1 ：用水处理样品 m_1 后所得溶液糖的浓度 (%)，折光仪测定)； w_2 ：用蔗糖溶液处理样品 m_2 后所得溶液糖的浓度 (%)，折光仪测定)。

$$A = \frac{100 (B - m)}{B}$$

式中 A ：样品中总含水量 (%)； B ：鲜样质量 (g)； m ：样品烘干质量 (g)。

自由水 (游离水) 含量由下式计算：

$$Y = A - X$$

式中 Y ：自由水 (%)； A ：总含水量 (%)； X ：胶体束缚水量 (%)。

注意事项：若离心液呈绿色浑浊状，难于进行折光仪测定，故须加入 0.3mL 氯仿，摇动，盖上塞子。放置一夜，以便沉淀胶体，第二天再离心，取清液 1~2 滴，用折光仪测其浓度。

三、灰分含量的测定

(一) 方法原理

灰分为测定物中的矿物质，或称无机盐，主要为钾、钠、钙、镁、硫、硅、磷、铁及其他微量元素。测定方法是在适当的温度下使测定物中的有机物质烧灼氧化后，把残

余的白色物质用分析天平称重，即得灰分的质量。

(二) 仪器、设备

分析天平(感量 0.0001g)，灰化炉，瓷坩埚(30mL)，坩埚钳，电炉，干燥器，水浴锅。

(三) 测定步骤

将用 1:4 的盐酸煮过的瓷坩埚洗净，在灰化炉内以 550~600℃灼烧 0.5h。待炉温降到 200℃以下时，将坩埚移入干燥器内，待至室温，称坩埚重量。将样品 2~5g 称入坩埚内，先用电炉将样品炭化到无烟，再移入灰化炉中在 550~600℃下初步灼烧 3h，待冷后将坩埚取出，加蒸馏水少许将灰分溶解，并在水浴锅上将水分蒸干；或加少量 10%硝酸、过氧化氢等氧化剂，然亦须于水浴锅上蒸干，然后将坩埚置灰化炉内灼烧 3h。待温度降低到 200℃以下时，将坩埚置于干燥器内，待至室温，用天平称重。如坩埚内仍有黑色炭质或一对相同样品的灰分重量不一致时，可再灼烧 2h，再称重。

(四) 结果计算

$$\text{灰分}(\%) = \frac{A-B}{m} \times 100$$

式中 A: 灰分+坩埚质量(g); B: 空坩埚质量(g); m: 样品质量(g)。

注意事项: 灼烧的温度不得超过 600℃如超过则磷酸盐熔化，凝结为固形物，其中所含的碳粒不易氧化。温度过高，钾、钠、氯等也能挥发，致使测得结果产生误差。

在第一次烧灼后稍加蒸馏水的目的，是把已灰化的物质溶解到坩埚底，使中间未灰化的物质露出表面，易于灰化。在用电炉炭化样品前，可在样品酌加无灰植物油数滴，以防样品膨胀流溢坩埚。

四、络合滴定法测定钙含量

(一) 方法原理

EDTA(乙二胺四乙酸二钠盐)滴定法测定钙的含量，基于 EDTA 与样品消化液中的钙能形成比钙红指示剂与钙所形成的络合物更加稳定的 EDTA-Ca 络合物。在 pH13~14 的含钙溶液中，同时有氰化钾及柠檬酸等掩蔽剂消除干扰离子影响的情况下，首先是钙红指示剂与溶液中钙络合成酒红色，随着滴入 EDTA，由于形成更稳定的 EDTA-Ca 络合物，钙红指示剂变成蓝色的游离状态，终点时溶液呈纯蓝色。根据滴入的 EDTA 量和它的滴定度即可算出消化液中钙的含量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平(感量 0.0001g)，微量滴定管，容量瓶(100mL)，凯氏消化瓶(50mL)，移液管(2mL)，三角瓶(100mL)，滴管。

2. 试剂。①标准钙溶液: 称取 GR 级碳酸钙 124.8mg，加蒸馏水 20mL，0.5mol/L 盐酸 3mL，加热溶解，冷后加蒸馏水稀释至 500mL，浓度为 10mg 钙/100mL，贮于涂蜡的玻璃瓶中，用时取出部分稀释 10 倍，浓度为 1.0μg/mL。②4mol/L 氢氧化钠溶液。③钙红指示剂: 取 0.1g 钙红溶于 100mL 蒸馏水中，在冰箱内保存 1.5 月。钙红即 2-羟基

-1-(2-羟-4-磺酸-1-重氮萘)-3-萘酸。④EDTA 溶液：称取 450mg 乙二胺四乙酸二钠溶于蒸馏水中，稀释至 1000mL，贮存于涂蜡的玻璃瓶中。⑤1% 氰化钾溶液。⑥柠檬酸钠溶液：称 14.7g 三水柠檬酸钠，配成 1000mL 蒸馏水溶液。⑦0.1% 孔雀绿指示剂：称 0.1g 孔雀绿溶于 100mL 蒸馏水。

(三) 测定步骤

1. EDTA 溶液滴定度的测定。吸取标准钙溶液四份于四个三角瓶中，每份 2mL，均加入空白消化液 2mL，加 10 滴柠檬酸钠溶液和 2 滴氰化钾溶液，孔雀绿指示剂 2 滴，用 4mol/L 氢氧化钠溶液滴定酸性溶液至无色时，表示溶液达 pH13 左右。再加钙红指示剂 3 滴，以 EDTA 溶液滴定至溶液呈纯蓝色，记录各管消耗的 EDTA 溶液的量 (mL)，算出平均值 X mL。同法单独测定空白消化液 2mL，所消耗的 EDTA 溶液平均值为 Y mL。1mL EDTA 溶液相当于钙的微克数 (T)，即称 EDTA 的滴定度。计算：

$$T = \frac{2\text{mL} \times 10\mu\text{g/mL}}{X - Y}$$

2. 样品消化。称 2g 经粉碎过筛的均匀样品 1~3g 放入凯氏烧瓶中，加 10mL 分析纯浓硫酸轻轻摇动，使与样品混匀，将凯氏烧瓶放于电炉上加热。待瓶内所发浓烟近于完毕时，停止加热，小心缓慢用滴管分两次滴入 1mL 过氯酸，继续加热至溶液无色。冷却，小心加入少量水，将瓶内消化液移入 100mL 容量瓶中，用蒸馏水冲洗烧瓶数次，合并于容量瓶中，稀释至 100mL，混匀。同时制备空白消化液。

3. 滴定。样品消化液各 4 份，每份 2mL。均加入 10 滴柠檬酸钠溶液，2 滴 1% 氰化钾溶液，2 滴孔雀绿指示剂，以 4mol/L 氢氧化钠溶液滴定至溶液呈无色，再加 3 滴钙红指示剂，用 EDTA 滴定至终点，算出 4 份样品液消耗的 EDTA 溶液平均用量。

(四) 结果计算

$$\text{钙的含量 (mg/100g)} = (S - Y) \times T \times \frac{100}{2} \times \frac{1}{Z} \times \frac{100}{1000}$$

式中 S ：2mL 样品消化液所消耗的 EDTA 溶液用量 (mL)； Y ：2mL 空白消化液所消耗的 EDTA 溶液用量 (mL)； T ：EDTA 溶液的滴定度 (μg 钙/mL)； Z ：用于消化的粉状干样品质量 (g)。

注意事项：①滴定用的样品量随钙含量而定，最适合的范围为 5~50 μg 。②加钙红指示剂后不能放得太久，否则终点发灰，不明显。③氰化钾是消除锌、铜、镍和钴等金属离子的干扰，而柠檬酸钠是防止钙和磷的结合形成磷酸钙沉淀。④滴定时的 pH 应为 12~14，过高过低指示剂变红，滴不出终点。

五、硫氰酸钾比色法测定铁含量

(一) 方法原理

用硫酸和过氯酸或过氧化氢将样品中的有机物氧化，并使铁成为三价铁的硫酸盐，三价铁与硫氰酸钾形成红色的硫氰酸盐。用 485nm 波长进行比色测定。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。容量瓶 (100mL), 刻度试管 (20mL), 刻度吸管 (10mL、5mL、1mL), 光电比色计。

2. 试剂。①20%硫氰酸钾: 取 20g 硫氰酸钾 (分析纯) 溶于 100mL 蒸馏水里。②贮备标准铁溶液: 溶解 0.702g 亚铁硫酸铵于 100mL 蒸馏水中, 加浓硫酸 5mL, 稍稍加温, 随即滴入 20%KMnO₄ 溶液, 至最后一滴不退色为止, 然后加蒸馏水稀释至 1000mL, 混匀。1mL 含有 0.1mg 铁。③2%过二硫酸钾 (K₂S₂O₈): 2g 过二硫酸钾溶于 100mL 蒸馏水中。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线制备。将 1mL 含铁 0.1mg 的贮备标准液稀释成为含铁 5μg/mL 标准液。向试管中分别加入 0、0.5、1、2、3、4mL 的标准铁溶液 (5μg/mL), 加 0.5mL 浓硫酸, 以少量蒸馏水稀释, 使其最终体积为 5mL (体积少的先加水, 后加硫酸)。于每管加入 0.2mL 2%过二硫酸钾, 2mL 20%硫氰酸钾, 混匀。进行比色, 将透光度记录下, 并制作标准曲线。

2. 样品消化。称 2g 经粉碎过筛的均匀样品 1~3g 放入凯氏烧瓶中, 加 10mL 分析纯浓硫酸轻轻摇动, 使与样品混匀, 将凯氏烧瓶放于电炉上加热。待瓶内所发浓烟近于完毕时, 停止加热, 小心缓慢用滴管分两次滴入 1mL 过氯酸, 继续加热至溶液无色。冷却, 小心加入少量水, 将瓶内消化液移入 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水冲洗烧瓶数次, 合并于容量瓶中, 稀释至 100mL, 混匀。同时制备空白消化液。

3. 比色。取 5mL 消化后的稀释液, 放入 15mm×150mm 试管中, 加 0.2mL 2%过二硫酸钾, 再加入 2mL 20%硫氰酸钾, 混匀后进行比色。查标准曲线得样品中铁的含量。

(四) 结果计算

$$\text{铁含量 (mg/100g)} = A \times \frac{V}{m} \times \frac{100}{1000}$$

式中 A: 标准曲线查得的 1mL 样品液含铁量 (μg); m: 样品质量 (g); V: 样品消化液总体积 (mL)。

六、磷含量比色测定法

(一) 方法原理

样品中的有机质迅速为过氯酸、硫酸氧化, 使磷在酸性溶液中 (加硫酸或硝酸) 与钼酸铵结合为钼酸磷铵。钼酸磷铵为黄色结晶, 遇还原剂即变成蓝色物质, 称为“钼蓝”, 钼蓝为 MoO₃ 及 Mo₂O₅ 的混合物。利用此种蓝色, 用比色计可以测定出样品中含磷的多少。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。刻度试管 (20mL), 刻度吸管 (2mL, 1mL), 光电比色计。

2. 试剂。①钼酸溶液: 溶 25g 纯钼酸铵于 300mL 蒸馏水内。另将 75mL 浓硫酸徐徐加入 100mL 蒸馏水内。冷却后, 稀释为 200mL。将此 200mL 稀释硫酸加入 300mL 钼酸铵溶液中, 混匀。②对苯二酚溶液: 溶 0.5g 对苯二酚于 100mL 蒸馏水内, 加入一滴浓硫

酸,可使氧化作用减慢。③20%亚硫酸钠溶液(当天配制)。④标准磷酸溶液:精确称出纯净、干燥的酸性磷酸钾(KH_2PO_4) 0.0439g,溶于1000mL蒸馏水内(可加氯仿少许以增加保存时间)。此溶液1mL相当于0.01mg磷。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线绘制。取有20mL刻度试管7个,分别记上号码:0、1、2、3、4、5、6。在0管中放入蒸馏水少许。在1至6号试管中依次放入0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3mL标准磷酸溶液,再于每试管中依次加入下列试剂:钼酸溶液2mL,亚硫酸钠溶液1mL,对苯二酚溶液1mL,加蒸馏水稀释至20mL,摇匀。静置0.5h后,以0号试管内的溶液为空白,在光电比色计上以650nm波长进行比色,记下光密度值,制作标准曲线。

2. 样品溶液中磷的测定:取500mg样品,消化后稀释为100mL,或将测钙的样品消化液稀释5~10倍测磷。取清液1~5mL置于有20mL刻度的试管内。另取一试管,放入蒸馏水少许。同制备标准曲线操作,加钼酸溶液,亚硫酸钠溶液,对苯二酚溶液显色,测定样品液光密度。在标准曲线上查出未知液中磷的含量。

(四) 结果计算

$$\text{磷含量 (mg/100g)} = \frac{A}{m} \times \frac{100}{V} \times 100$$

式中 A:查标准曲线所得测定液铁含量(mg); m:样品质量(g); V:测定液的体积(mL)。

七、铜、锌、钴含量的系统分析法

(一) 方法原理

将分析材料放在高温炉中灰化后,加稀酸溶解。在盐酸约为0.05mol/L时,用对苯硫脲四氯化碳溶液从所得溶液中浸提铜。浸提液浓缩后,以 HNO_3 或 H_2O_2 分解对苯硫脲及其盐,用二乙氨基二硫代甲酸盐(铜锌灵)比色法测铜。浸提铜以后的水相中余下锌和钴,用氨液碱化以后以对苯硫脲浸提。加0.01mol/L盐酸溶液处理对苯硫脲盐溶液时,锌转入水相,此时,在pH4.75条件下,用对苯硫脲重复浸提,进行比色测定。钴在用 HNO_3 和 H_2O_2 分解对苯硫脲钴盐之后,用亚硝基-R盐进行比色测定。

氢离子浓度对苯硫脲盐的形成有影响,铜(对苯硫脲铜盐的不稳定常数为 1.1×10^{-27})与对苯硫脲的反应是在强酸条件下产生的,在pH1时铜可由有机溶剂完全浸提出来。对苯硫脲锌盐(不稳定常数为 0.8×10^{-26})在pH2时,完全不能形成。但它可从pH4.75的醋酸缓冲液中完全浸提出来。钴仅在pH5.5条件下开始浸提出来。在柠檬酸溶液中,锌和钴仅在pH8~9条件下才能完全被浸提出来。对苯硫脲盐几乎不溶于一定pH水溶液,而在有机溶剂中溶解度却高出 $10^4 \sim 10^7$ 倍。

对苯硫脲四氯化碳溶液在可见光谱中有两个吸收高峰:450nm和620nm,吸收低谷在510nm。对苯硫脲锌最大吸收峰为535nm,而对苯硫脲铜为545nm,对苯硫脲钴为542nm。铜离子在弱酸或氨液环境中与二乙氨基二硫代甲酸钠盐形成褐色的二乙氨基二硫代甲酸铜胶体悬浮液。可溶于四氯化碳或氯仿中。其吸收峰为435nm。亚硝酸-R盐

(1-亚硝基-2-萘酚-3,6-二磺酸钠)与钴在近中性环境中形成稳定的红色络合物,在pH6时,络合物在5min内即可形成,在光照下1h还是稳定的。吸收峰为490~500nm。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平(感量0.0001g),高温炉,电炉,瓷坩埚,水浴锅,分液漏斗,72型光电比色计。

2. 试剂。

(1) 铜盐标准液。在分析天平上称取0.3930g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于由对苯硫脲净化过的蒸馏水中,倒入500mL容量瓶中,加1mL盐酸(1:1),用对苯硫脲净化过的蒸馏水加至刻度,混匀,该溶液1mL含0.2mg铜。将这种溶液稀释100倍以配制工作液:用移液管吸取5mL注入500mL容量瓶中,用对苯硫脲净化过的水加至刻度,仔细混匀。该溶液1mL含2 μg 铜。

(2) 锌盐标准液。在分析天平上称取0.1g金属锌或纯净的锌粉,放入烧杯中,加5mL硫酸(1:4),加5mL蒸馏水,盖上表面玻璃,加热到完全溶解。溶液全部转入500mL容量瓶中,用对苯硫脲净化过的蒸馏水加至刻度,混匀。金属锌亦可用0.4398g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (化学纯)来代替,溶于500mL蒸馏水。该溶液1mL含0.2mg锌。用所得溶液稀释100倍来配制工作液:用移液管吸取5mL,注入500mL容量瓶中,用对苯硫脲净化过的水加至刻度,混匀。该溶液1mL含2 μg 锌。

(3) 钴盐标准液。在分析天平上称0.2630g无水硫酸钴盐(CoSO_4),放入烧杯中,溶于被1mL盐酸溶液(1:4)酸化的水中,转入500mL容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,混匀。所得溶液1mL含0.2mg钴。将这种溶液稀释100倍以配制工作液:用移液管吸取5mL溶液,放入500mL容量瓶中,用被对苯硫脲净化过的水加至刻度,混匀。该溶液1mL含2 μg 的钴。

(4) 无水 CoSO_4 盐。用化学纯的 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水合结晶放入马福炉中,于500℃下烧到恒重来制备。无水盐要保存于带盖的优质玻璃瓶中。

(5) 去微量金属的蒸馏水。应特别注意蒸馏水的纯度。用对苯硫脲来净化普通蒸馏水。为此,向分液漏斗中的蒸馏水里加0.01%对苯硫脲四氯化碳(按1L水加5mL计算),猛烈振荡3min,使其静置,倒出有机相,水经预先用0.1mol/L盐酸洗涤过的无灰的滤纸过滤。把开始滤下的一部分滤液弃去,而其余部分水保存在有磨口塞的玻璃瓶中。

(6) 醋酸缓冲液(pH4.75)。7.5g醋酸钠 $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 和2.7mL冰醋酸溶于蒸馏水中,然后稀释到500mL,混匀。溶液用对苯硫脲净化。为此,溶液转入分液漏斗中,加5mL0.01%对苯硫脲四氯化碳溶液,猛烈振荡2~3min。倒出有机相,如果需要,用对苯硫脲溶液再处理一次。然后水相经过预先用0.1mol/L盐酸和净化了的水洗涤过的无灰滤纸过滤。溶液保存在有磨口塞的玻璃瓶中。

(7) 10%柠檬酸钠溶液。称取10g柠檬酸三钠 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和0.5g柠檬酸,溶于水,稀释至100mL。清液转入分液漏斗,加入少量0.01%对苯硫脲四氯化碳溶液,振荡到绿色不再变化,排除重金属离子,溶液由预先以0.1mol/L盐酸和净化水洗涤的滤纸过滤,以便排除四氯化碳液滴。

(8) 10%硫代硫酸钠溶液。10g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于烧沸后冷却了的蒸馏水中,并用

这种蒸馏水加到 100mL, 再用对苯硫脲净化: 在分液漏斗中加少量的 (按 2mL) 0.01% 对苯硫脲四氯化碳溶液, 振荡到有机相不再变成鲜红色。一部分对苯硫脲转入水相, 变为黄色。水相刚一变黄, 而有机相只是浅红色, 对苯硫脲的净化作用即告停止。水相中的对苯硫脲由氯仿浸提, 每次加氯仿 2~3mL, 猛烈振荡 2min。反复浸提, 直到氯仿浸提液不再变为绿色。此后, 溶液经过预先用 0.1mol/L 盐酸和净化水洗涤过的无灰滤纸过滤。保存在暗色玻璃瓶中。

(9) 0.1% 二乙氨基二硫代甲酸钠。0.1g $C_5H_{10}NS_2Na \cdot 3H_2O$ 试剂溶于 100mL 蒸馏水。保存在暗色瓶中。溶液在 1 个月内是稳定的。

(10) 0.1% 亚硝基-R 盐溶液。亚硝基-R 盐是溶于水解乙醇的金黄色的结晶粉末。中性或酸性溶液是浅黄色的, 而碱性溶液是橙黄色的。0.1g 的 $C_5H_{10}NS_2Na$ 试剂溶于 100mL 水中。保存在暗色瓶中的溶液几个月内不变化。

(11) 0.1% 甲酚红溶液。甲酚红是一种指示剂, pH 值由 7.2~8.8, 颜色由黄变红。称 0.1g 指示剂放入研钵, 加 3mL 0.1mol/L NaOH 研磨, 转入 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释到刻度, 混匀。

(12) 氯仿。有出售的分析纯的氯仿可以不作任何净化处理而直接利用。为了回收利用过的氯仿, 从水相分离出氯仿, 在分液漏斗中用浓硫酸洗涤, 每次加 5~10mL, 直到退去颜色。然后, 加石灰振荡, 放入蒸馏烧瓶中, 于水浴上蒸馏, 并收集在 61~61.5°C 下蒸馏出的部分。在馏出物中加 1% 乙醇 (按体积), 以防止氯仿分解。

(13) 四氯化碳。将市售的纯四氯化碳, 加几滴溴水浸泡之后, 再在分液漏斗中每次加 5mL 20% 含有盐酸羟胺的 NaOH (100mL 20% NaOH 0.8g 盐酸羟胺) 猛烈振荡。一直振到碱转变为黄色。用水洗涤一次之后, 转入蒸馏瓶中, 加入粒状的 $CaCl_2$, 在水浴上蒸馏, 收集 76.5~77°C 温度下蒸馏出的部分。有出售的分析纯的四氯化碳无需净化即可利用。为了回收已用过的四氯化碳, 要以水相中分离出四氯化碳, 如果溶液浑浊, 经滤纸过滤。为了解对苯硫脲, 在分液漏斗中每次加浓硫酸 5~10mL 振荡, 直到再次添加的硫酸呈无色。然后用蒸馏水洗涤, 以便排除硫酸, 加 1% NaOH 溶液振荡, 再用水洗涤, 然后移至水浴上加 CaO 蒸馏。

(14) 0.02% 对苯硫脲四氯化碳溶液。在分析天平上称取 20mg 净化过的试剂, 放入 100mL 容量瓶内, 溶于四氯化碳中, 用同样溶剂加至刻度, 混匀。溶液装于暗色瓶中, 于 5°C 室温下保存之。在利用溶液的当天用这种溶液加四氯化碳稀释 2 倍和 20 倍, 配成 0.01% 或 0.001% 溶液。

对苯硫脲方法纯化: 对苯硫脲 ($C_6H_5N=N-CS-NH-NH-C_6H_5$), 是不溶于水的黑褐色结晶粉末。微溶于乙醇和醚中。室温条件下 100g 氯仿溶解 2g 左右的试剂, 而 100g 四氯化碳则溶解 0.05g 左右。纯化方法如下: 1) 1g 对苯硫脲溶于 50mL 氯仿中经滤纸过滤到烧杯中, 边搅边加 150mL 石油醚。这时对苯硫脲成深蓝黑色结晶沉下。过滤后于空气中或真空干燥箱中干燥。2) 1g 对苯硫脲溶于 50mL 氯仿中, 经滤纸过滤到烧杯中, 敞口放于黑暗处, 直到 2/3 氯仿挥发掉, 或放于真空干燥箱中减压挥发到 10~15mL, 用这样浓缩的溶液以结晶形式沉淀对苯硫脲。含有沉淀的溶液经过 2 号或 3 号多孔的玻璃滤器过滤。结晶于空气中或真空干燥箱中干燥, 并保存在暗色瓶中。

(15) 氨。市售的氨几乎都含有相当数量的可与对苯硫脲相反应的金属。特别是锌、铅、铜。因此必须清除杂质。很纯的氨是用等温扩散方法获得。为此，在空干燥器中放两个烧杯，一个杯中装着市售的 25% 氨，另一个烧杯装上重蒸馏水到 2/3 处，放置 2~3 天。干燥器盖磨口要好。氨气被水吸收，直到均衡状态。在双重蒸馏水中所吸收的氨溶液转入有磨口塞的玻璃瓶中保存之。

(16) 硝酸。把相对密度为 1.40 的浓 HNO_3 放入索氏提取器的烧瓶中，于电炉上蒸馏，当馏入萃取器中的液体表面距虹吸管上端 10~15mm 时停止蒸馏。然后冷却，取下萃取器，把 HNO_3 转入有磨口塞的玻璃瓶中。

含水的 HNO_3 常是含有沸点为 121.9℃，68.4% HNO_3 的沸腾混合物。

(17) 盐酸。在盐酸中常含有相当数量的锌、汞、铅及其他金属，因此需要净化。含水的盐酸常是含有沸点 110℃ (20.2% 盐酸) 的沸腾混合物。为了用蒸馏方法净化，取相对密度为 1.19 的盐酸用蒸馏水稀释 2 倍，在索氏提取器中按蒸馏 HNO_3 相同方法蒸馏，保存在带磨口塞的玻璃瓶中。在索氏提取器中蒸馏出的盐酸，其浓度为 6mol/L 左右，用这种溶液加净化蒸馏水稀释配制低浓度溶液——1、0.1、0.01mol/L。也可以用类似于氨净化的等温扩散方法获得很纯的盐酸。

(三) 测定步骤

1. 样液处理。用分析天平先将瓷皿（直径为 6cm）称重，再称取 2g 精细粉碎了的风干材料。如果不知含水量，放入恒温箱中，于 100℃ 下烘 1~2h。置于干燥器中冷却，在分析天平上称重。此后把瓷皿放在电炉上，加热到物质炭化，然后套上石棉罩，烧到完全灰化。最好几个瓷皿同时进行灼烧和灰化。瓷皿冷却之后，向残余物中加 2mL 蒸馏水，2mL HNO_3 (1:1)，在水浴上蒸干，再在电炉上烧到 NO_2 褐烟排除。残余物冷却之后，加 1mL 盐酸 (1:1)，在水浴上蒸干，再加 2mL 1mol/L 盐酸，5mL 蒸馏水，混匀，加热接近沸腾。热溶液用直径 6~7cm 的无灰滤纸（预先用 0.1mol/L 盐酸洗涤好的）过滤。瓷皿和滤纸用 25mL 蒸馏水洗涤。滤液注入分液漏斗，并用 10mL 水洗涤残留液。必须准确依照所指明的水的体积加水，以便在稀释终了时酸的浓度近似于 0.05mol/L。

2. 铜的测定。(1) 铜标准曲线制备。在一系列分液漏斗中按次吸取 1、2、4、6、8、10mL 铜盐标准液（含 2 μg /mL 铜），用蒸馏水加至 20mL。向溶液中各加 2mL 10% 柠檬酸钠溶液，2mL 0.1% 二乙氨基二硫代甲酸钠盐溶液，5mL 四氯化碳溶液，振荡 2min，静置。把有机相注入有色比色皿中，在 440nm 下，以 10mm 比色杯测定溶液的光密度值，并制作标准曲线。

(2) 样品液中铜的提取及测定。向分液漏斗中已获得的盐酸分析液中加入 2mL 0.01% 对苯硫脲四氯化碳溶液，强烈振荡 2min。使其分层后，将下层的有机相注入另一个分液漏斗中。用对苯硫脲重复处理，直到颜色不再改变。此后加入 2mL 四氯化碳（化学纯）浸提剩余的对苯硫脲，并把它并入浸提液中。漂浮在水相表面的对苯硫脲四氯化碳液滴，通过轻敲或轻摇分液漏斗的方法分出。所收集的对苯硫脲铜盐浸提液，用 10mL 0.05mol/L 盐酸溶液洗涤，并振荡 1h 左右。把四氯化碳相注入瓷皿内，而水相并入上述的分液漏斗中。为了分解对苯硫脲和对苯硫脲铜盐，在瓷皿中加 2mL HNO_3 (1:1)，在水浴上蒸发排除四氯化碳。向残余的 HNO_3 中加 5 滴 30% H_2O_2 ，再蒸干。用 5 滴盐酸稀释液 (1

: 1) 润湿残余物, 再于水浴上蒸干。在瓷皿中加 2mL 10% 柠檬酸钠溶液, 溶解干的残留物, 把溶液移注入分液漏斗中, 用蒸馏水洗涤瓷皿 2 次 (每次 5mL), 把洗涤液注入同一分液漏斗中。向溶液中加入 1mL 0.1% 二乙氨基二硫代甲酸钠盐, 混匀, 加 5mL 四氯化碳, 振荡 2min。静置有机溶剂层, 以免其中出现水滴, 用滤纸小块擦干分液漏斗末端, 把浸提液注入有塞比色皿中。在 440nm 下, 用 10mm 厚比色杯测定溶液的光密度。以蒸馏水作对照溶液。用所得数据在标准曲线上查出铜的浓度。

(3) 结果计算:

$$X = \frac{5 \times \rho}{m}$$

式中 X : 铜的含量 (mg/1000g 分析材料); ρ : 比色液中铜的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); m : 样品的绝对干质量 (g); 5: 比色液的体积 (mL)。

3. 锌的测定。(1) 锌标准曲线制备: 在 100mL 的分液漏斗中, 注入 15mL 醋酸缓冲液 (pH4.75), 加 5mL 0.001% 对苯硫脲四氯化碳溶液, 振荡 2min, 以便排除与对苯硫脲反应的微量金属, 使其分层, 弃去有机相。然后用刻度移液管按次吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0mL 锌盐标准液 (含 $2\mu\text{g}$ 锌/mL)。每份标准液均以下列过程处理, 即在分液漏斗中先装上净化了的缓冲液, 再注入一份标准液, 加 10mL 0.001% 对苯硫脲四氯化碳, 振荡 2min, 静置一定时间, 以便分层。用滤纸擦干漏斗口, 把透明浸提液注入干燥试管中, 并塞上软木塞。然后向漏斗残留的缓冲液中再加另一个标准液, 加 10mL 0.001% 对苯硫脲溶液, 振荡, 静置, 把有机相注入另一个试管内。如此处理绘制标准曲线所必需的全部锌标准液。此后在 490~510nm 下, 用 5mm 厚比色杯测定对苯硫脲锌盐有色溶液光密度值, 以 0.001% 对苯硫脲四氯化碳溶液作为对照溶液。用所获得的数据绘制标准曲线。

(2) 样品液中锌的提取及测定。向浸提了铜以后留在分析漏斗中的溶液里, 加 5mL 10% 柠檬酸钠溶液, 2 滴 0.1% 甲酚红指示剂, 并逐滴滴加浓氨溶液, 直到显示红褐色 (pH9)。然后加 5mL 0.02% 对苯硫脲四氯化碳溶液, 强烈振荡, 使其分层, 把有机相注入另一个分液漏斗中。进一步的浸提, 每次用少量对苯硫脲溶液 (每次 1mL), 直到对苯硫脲不再转变为褐色并开始有绿色阴影出现。此后再加 2mL 四氯化碳, 振荡 1~2min, 静置, 放出有机相, 倒进开始浸提的浸提液中。所收集的浸提液放置 1h 后, 用 10mL 蒸馏水洗涤, 此后转移到干净的分液漏斗中。向其中再加 10mL 0.01mol/L 盐酸溶液, 振荡 2min, 以便全部锌转入水相。分层之后, 把四氯化碳相注入另一个分液漏斗中, 其中加 5mL 新配的 0.01mol/L 盐酸振荡。把酸浸提液收集到一块, 注入 50mL 容量瓶中, 用蒸馏水洗涤残留液, 并加至刻度, 仔细混匀。这种溶液含有全部的锌 (四氯化碳相含有对苯硫脲钴, 倒入瓷皿中以便进一步测钴)。

从 50mL 容量瓶溶液中取出 5mL, 注入分液漏斗中, 加 5mL 醋酸缓冲液 (pH 为 4.75), 1mL 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液, 5mL 0.001% 对苯硫脲四氯化碳溶液, 振荡 2min。用滤纸擦干分液漏斗口, 以便排去水滴, 把下层透明液注入干燥试管中, 塞上软木塞。向分液漏斗溶液中再加 5mL 0.001% 对苯硫脲溶液, 振荡, 并分出有机相, 并入最先的浸提液中。浸提到最后应该有一些剩余的对苯硫脲呈浅绿色。如果没有对苯硫脲剩余 (为红褐

色), 那么再用一部分对苯硫脲重复浸提, 完成浸提之后, 混匀所收集浸提液, 量其体积, 并在 490~510nm 下, 用 5mm 厚比色杯测定溶液的光密度。以 0.001% 对苯硫脲四氯化碳溶液作为对照溶液。应该避免太阳直射对苯硫脲溶液和浸提液。

(3) 结果计算。用上述所得数据在标准曲线上查出锌的浓度, 并算出分析材料中锌的含量。

$$X = \frac{0.1 \times 50 \times B}{5 \times m} \times \rho$$

式中 X : 锌的含量 (mg/100g 分析材料); 50: 锌分析液的总体积 (mL); 5: 用对苯硫脲浸提锌时所取的锌分析液的体积 (mL); B : 四氯化碳对苯硫脲锌盐比色液的体积 (mL); ρ : 比色液中锌的浓度 ($\mu\text{g/mL}$); m : 样品的绝对质量 (g); 0.1: 把 μg 变为 mg 乘 100, 换算为 mg/100g 分析材料含量的系数。

4. 钴的测定。(1) 钴标准曲线制备。按次吸取 1、2、4、6、8、10mL 钴盐标准液 (含 $2\mu\text{gCo/mL}$), 注入不同的分液漏斗中, 用蒸馏水把体积加至 10mL, 再各加 5mL 10% 柠檬酸钠溶液, 1 滴甲酚红溶液, 逐滴地加氨液, 直到出现红色。然后各加 5mL 0.01% 对苯硫脲四氯化碳溶液, 振荡 2min, 静置, 把有机相放到瓷皿中。在分液漏斗中再加 2mL 氯仿, 振荡 1min, 静置, 把有机相注入瓷皿中。向所收集的浸提液中各加 2mL HNO_3 溶液 (1:1), 1 滴 1mol/L 硫酸, 在水浴上蒸干, 再在电炉上煅烧。冷却之后, 向残留物中各加 0.5mL 硝酸 (1:1), 5 滴 H_2O_2 , 再在水浴上蒸干。向残留物 (应该是无色的) 各加 1mL 10% 柠檬酸钠溶液, 溶解残留物, 各加 1mL 0.1% 亚硝基-R-盐溶液。混匀, 静置 10~15min。然后各加 1mL HNO_3 (1:1), 以蒸馏水稀释至 5mL, 混匀, 在 490~500nm 下以 10mm 比色杯测定光密度, 用 1mL 0.1% 亚硝基-R-盐和 1mL HNO_3 (1:1), 加蒸馏水稀释至 5mL 的溶液作为对照液, 有色溶液要避免。用所获得数据绘制标准曲线。

(2) 样品液中钴的提取及测定。将经 0.01mol/L 盐酸溶液处理后置于瓷皿中的对苯硫脲浸提液, 加 2mL 硝酸 (1:1), 1 滴 1mol/L 硫酸溶液, 在水浴上蒸干, 再在电炉上煅烧。冷却之后向残留物中加 5mL 硝酸溶液 (1:1), 5 滴 30% H_2O_2 , 在水浴上蒸干。用硝酸和 H_2O_2 反复处理。向干的残余物 (应当是无色的) 中加 1mL 10% 柠檬酸钠溶解之。再加 1mL 0.1% 亚硝基-R-盐溶液, 混匀, 放置 10~15min (或加热 1~2min)。然后加 1mL 硝酸 (1:1), 把瓷皿内含物转入 5mL 或 10mL 的刻度试管中 (或量筒中), 用少量蒸馏水洗涤瓷皿, 把体积加至 5mL, 混匀, 在 490~500nm 下, 用 10mm 比色杯测定光密度。吸取同样数量的亚硝基-R-盐溶液和硝酸溶液, 用蒸馏水稀释至 5mL 作为对照液。有色溶液要避免阳光直射。

(3) 结果计算。用上述所获得数据在标准曲线上查出比色溶液中钴的浓度, 按下式计算。

$$X = \frac{0.1 \times 5 \times \rho}{m}$$

式中 X : 钴的含量 (mg/100g 分析材料); 5: 比色溶液的体积 (mL); ρ : 比色溶液的浓度 ($\mu\text{g/mL}$); m : 样品的绝对干质量 (g); 0.1: μg 变为 mg 再乘 100, 换算为

mg/100g 分析材料的系数。

注意事项:①在用亚硝基-R 盐测定钴时,其他金属离子也可与该试剂形成组合物,可添加无机酸加以消除。在 1mol/L 热 HNO_3 溶液中,甚至铜和镍的络合物也会被分解,铁、锰、锌、镉、铅和锡均不干扰钴的测定。②三价铁在含有柠檬酸盐和酒石酸盐的碱溶液中氧化对苯硫脲,可以在浸提之前加盐酸羟胺来防止氧化。③铜、锌、钴形成的有色络合物在强光照射下不稳定,因此操作尽量在弱光下进行。④用对苯硫脲四氯化碳萃取锌时,振荡之后常常形成四氯化碳液滴,漂浮在水相表面。为了从表面上排除此种液滴,必须轻轻振荡液体表面部分。以破坏表面张力使液滴进入下层。

八、催化和分光光度法测定痕量碘和锰含量

(一) 方法原理

Mn^{2+} 对高碘酸钾氧化孔雀绿退色反应 (KIO_3 -孔雀绿反应) 有极佳的催化效应,痕量碘对此反应也有很高的催化效应,碘在 10~200ng/mL, 锰在 0.2~10ng/mL 范围内,孔雀绿吸光度的减少符合朗伯—比尔定律。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (1/1000), 72 型分光光度计, 恒温水浴, 高温灰化炉, 容量瓶 (50mL), 刻度试管 (25mL)。

2. 试剂。①高碘酸溶液: 称取 4.00g KIO_4 溶于蒸馏水, 定容 1000mL, 浓度为 17.4mmol/L。②醋酸-醋酸铵缓冲剂: 10mol/L 醋酸与 2.6mol/L 醋酸铵按 1.6:1 混合, pH 值为 3.8。③孔雀绿溶液: 称取 0.1572g 孔雀绿溶于蒸馏水, 定容 1L, 浓度为 0.4314mmol/L。④NaF 溶液: 称取 0.913g NaF 溶于蒸馏水, 定容 1000mL, F-浓度为 0.5mg/mL。⑤EDTA 溶液: 称取 3.723g EDTA 二钠盐溶于蒸馏水, 稀释至 500mL, 浓度为 0.02mol/L。⑥标准碘液: 0.1308g 纯 KI 溶于蒸馏水, 稀释至 100mL, 1mL 含碘 1mg。取此液再稀释 100 倍, 得 10 μg /mL 碘工作液。⑦标准锰液: 1.4364g 纯 KMnO_4 溶于蒸馏水, 稀释至 500mL, 1mL 含锰 1mg。取此溶液 1mL 用 H_2SO_4 酸化, 再用等当量的草酸滴至红色刚好退去, 稀释至 1L, 得 1 μg /mL 锰工作液。

(三) 测定步骤

1. 碘标准曲线。在 8 支 25mL 刻度的比色管中加入 0.000、0.025、0.050、0.100、0.200、0.300、0.400、0.500mL 10 μg /mL 的标准碘液。各管加 2.5mL 醋酸-醋酸铵缓冲剂和 2mL 0.02mol/L EDTA 溶液, 加蒸馏水至 24.2mL, 摇匀, 在 40 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴内放置 15min, 取出。在 1~8 号管中依次加入孔雀绿溶液 0.4mL, 接着以同样顺序和相同的时间间隔加入 0.4mL KIO_4 溶液, 摇匀。在 40 $^\circ\text{C}$ 水浴上放置 30min, 在 615nm 的波长处测各管碘液的吸光度。以吸光度对碘浓度制作得碘的标准曲线。

2. 锰的标准曲线。在 8 支 25mL 刻度试管中, 分别加入 0.000、0.025、0.050、0.075、0.100、0.125、0.150、0.175mL (1 μg /mL) 锰标准液, 各管加 2.5mL 醋酸-醋酸铵缓冲液, 加蒸馏水至 24.2mL, 摇匀, 在 35 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴内放置 15min, 取出。均加入孔雀绿溶液 0.4mL, 再依次加入 0.4mL KIO_4 溶液, 摇匀, 在 35 $^\circ\text{C}$ 水浴上放置 30min, 于 615nm

波长下测定各管锰液的吸光度,以吸光度对锰浓度做标准曲线,即得锰的标准曲线。

3. 试样溶液的制备。称取粉碎过的样品 2g,加 20mL 10%KOH-乙醇溶液浸泡 24h,在水浴中蒸干,500℃灰化 4h,用少量 1:1 盐酸溶解,加蒸馏水 5mL,蒸去过量盐酸。以蒸馏水定容至 50mL。

4. 试样中碘和锰的测定。测碘时,取上液 5mL (碘量在 0.25~5μg)。同制备碘标准曲线操作加入试剂及保温处理,测定溶液之吸光度(以试剂空白为对照)。测锰时,取上液 0.25mL 同制备锰标准曲线操作,加试剂及保温处理,测定溶液之吸光度(以试剂空白为对照)。

(四) 结果计算

从碘和锰的标准曲线查出试液中碘或锰的浓度,按下式计算试样中碘和锰的含量。

$$\text{碘或锰的含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{25 \times \rho \times 50 \times 100}{1000 \times m \times V}$$

式中 ρ : 样品比色液碘或锰的浓度 (ng/mL); m : 试样质量 (g); 50: 试液总体积 (mL); 25: 催化反应液体积 (mL); V : 取用试液的体积 (碘为 5mL, 锰为 0.25mL); 1000: 换算 ng 为 μg ; 100: 换算为百分含量。

注意事项: ①测锰的适宜 pH 值为 3.8~4.5; 碘的适宜 pH 值为 3.5~4.5。pH 值大于 5 时反应速度迅速增大,碘对该反应的催化效应明显减弱。测碘的适宜温度在 40~50℃ 之间,而锰在 25~35℃ 之间,此时,温度变化对反应速度影响很小。②在规定的实验条件和催化剂浓度范围内,KIO₃ 浓度固定在 0.278mmol/L,孔雀绿适宜浓度为 6.90×10⁻⁶mol/L,此时反应线性关系最好。③测定 40ng/mL 碘时,阴离子 PO₄³⁻、SO₄²⁻、NO₃⁻、F⁻、Br⁻、硅氟酸根等不干扰; 75μgMoO₄²⁻ 和 5μgVO₃⁻ 也不干扰; Fe³⁺、Al³⁺、Mn²⁺ 严重干扰,但可用 EDTA 掩蔽。在测定生物材料时,EDTA 浓度达 1.6mmol/L 时,可完全掩蔽可能存在的所有干扰金属离子。锰的干扰成分: 铁可用 20 倍,铝可用 100 倍的 NaF 掩蔽; 铁少于 5μg/mL,铝少于 0.05μg/mL 时不干扰; 10ng/mL 碘不干扰; 较高浓度的碘可用 10 倍的 Hg²⁺ 掩蔽。由于本法对锰的灵敏度极高,各种试剂可大量稀释,故测定锰时不必加任何掩蔽剂和任何事前处理。

九、利用氟离子选择性电极测定氟的含量

(一) 方法原理

在 20℃ 下用 0.1mol/L 高氯酸浸提植物样品,将样品氟化物转入溶液,用氟离子选择性电极,以标准加入法测定。电极工作条件为 pH1,测得结果为包括络合态和离子态的总氟量,样品中含硅 2.0%,铁 0.06%,镁 0.7%和钙 1.2%均不干扰测定。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。酸度计或电极电位仪或其他型号离子计,CSB-F-1 型氟离子选择性电极,饱和甘汞电极,100μL 微量注射器。

2. 试剂。①氟标准液 (2mg 氟/mL): 将氟化钠(分析纯)在 110℃ 干燥 2h,精确称取 4.4210g,溶于去离子水中,定容至 1000mL。②0.1mol/L 高氯酸: 在 2L 去离子水中

加入高氯酸(优级纯,含量70%~72%)22~26mL(在pH计上边搅拌边加入高氯酸,控制pH1.0)。

(三) 测定步骤

1. 样品制备。植物样品根据需要进行清洗或不预清洗(如测定植物地上部时,要求包括样品表面吸附的氟化物可不清洗,仅测定吸入体内的氟化物则必须清洗;植物地下部则均须清洗),在80℃烘干,粉碎,过60目筛,混匀,置清洁、干燥的聚乙烯瓶中备用。

2. 测定。准确称取0.25~1.0g样品置50mL烧杯中,加入25mL0.1mol/L高氯酸,于电磁搅拌器上搅拌20min,再加入25mL0.1mol/L高氯酸,在继续搅拌下插入氟电极和甘汞电极进行测定,待电位稳定后(1min变化不超过1mV,一般需数min),读取电压值为 E_1 ,用微量注射器加入氟标准液100 μ L或200 μ L,电位稳定后读取电压值为 E_2 。

(四) 结果计算

$$c_F = \frac{m_F}{m_2 \times [\log_{-1} (\Delta E/S) - 1]}$$

式中 c_F : 样品氟浓度(μ g/g); m_F : 加入的标准溶液中的氟量(μ g); m : 样品质量(g); $\Delta E = E_2 - E_1$; S : 电极斜率。

注意事项:①氟离子选择性电极在测定前应浸入稀氟溶液中(1 μ g/1mL左右)0.5h,再用去离子水洗至260mV以上,以保证工作正常。②电极斜率对测定结果影响颇大,实际斜率常与理论值有一定偏离,为此可在估计的测量体系范围内,用标准溶液配制一个数量级差异的0.1mol/L高氯酸溶液(1.0与10.0 μ g/mL),重复测量数对电位值,二者差值的平均值即为实测斜率。③加入的标准液体积,以不超过总体积的1%为限, ΔE 在20~40mV为宜。本方法对于含氟高于10 μ g/1mL的样品可不做空白校正。对于含氟较低的样品或高氯酸含氟较高时,必须扣除试剂空白值。

十、硫氰酸比色法测定钼含量

(一) 方法原理

在酸性溶液中,六价钼被 SnCl_2 还原成五价钼,再与酸氰根离子形成黄色或橙黄色化合物。有色化合物采用异戊醇-四氯化碳(1:1)混合液提取。三价铁离子提高钼的有色化合物生成率并增加它的稳定性。有铁离子时,只形成五价钼,使颜色强度大大增加。加入铜能促进三价铁还原为两价铁,使硫氰酸铁所显现的颜色完全退去。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平(感量0.0001g),分光光度计,瓷皿(或铂皿),马福炉,分液漏斗(50mL),试管(10mL)。

2. 试剂。(1)钼盐标准液:称0.1500g MoO_3 放入烧杯,加热溶于20mL0.1mol/L NaOH溶液中,用蒸馏水稀释到接近50mL,加10mL1mol/L HCl溶液,把溶液移注500mL量瓶中,用蒸馏水加至刻度,仔细混匀。1mL溶液含0.2mgMo,用这种溶液稀释100倍配成1mL含2 μ g的工作液。

把钼酸铵(分析纯)放在马福炉中于450~500℃下燃烧45~60min,即制得 MoO_3 。制剂加奈斯试剂检查,看铵是否排完,即将0.1g MoO_3 溶于10mL0.2mol/L NaOH溶液中,加1滴奈斯试剂。这时不应该出现黄色,否则应重复煅烧。

(2) 20%硫氰酸钾溶液:称KCNs(分析纯)20g,溶于蒸馏水中,加至100mL,如有需要,再进行过滤。然后保存在暗色瓶中。

(3) 氯化铁溶液:称取2.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 放入500mL量瓶中,加蒸馏水溶解,再加10mL HCl(1:1),用蒸馏水稀释到刻度,混匀。1mL溶液大约含1mgFe。

(4) 10%氯化亚锡溶液:10g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加热溶于10mL浓HCl中,用蒸馏水稀释到100mL。在装着溶液的玻璃瓶中放几块金属锡。

(5) 异戊醇和四氯化碳(1:1)混合液:100mL四氯化碳(分析纯)加到100mL异戊醇(分析纯)中。混合液倒入带磨口塞的暗色瓶中,保存在冷处。

(6) 1%硫酸铜溶液。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线制备。在一系列分液漏斗中,依次加入钼标准液(1mL含 $2\mu\text{g}$ 钼)0、1、2、4、6、8、10mL,用蒸馏水稀释到18mL,各加5mL HCl(1:1),2mL氯化铁(1mgFe/mL溶液),1滴1%硫酸铜,2mL20%硫氰酸钾,5mL异戊醇和四氯化碳混合液(1:1),混匀。然后在分液漏斗中各加2mL10% SnCl_2 ,摇动到红色消失,显出橙黄色,停1~2min,再摇0.5min,再停2~3min,把有机相注入干燥试管中,如果溶液浑浊,各加10滴异戊醇,混匀。在440nm下测其光密度(以试剂空白作为对照),用所得数据绘制标准曲线。

2. 样品中钼的提取及测定。称取3~5g分析样品,放入瓷皿或铂皿中,在马福炉中煅烧到有机物质灰化后,冷却,加2mL蒸馏水及2mL HNO_3 (1:1),在水浴上蒸干,再置电炉上煅烧到排除氮的氧化物褐烟。冷却后加入1~2mL HCl(1:1),在水浴上蒸干。在瓷皿中再加5mL HCl(1:1),加热,并趁热经预先用0.1mol/L HCl洗涤的滤纸过滤。用15mL蒸馏水洗涤瓷皿和滤纸。滤液转入分液漏斗中,并用5mL蒸馏水洗涤残留液。给分液漏斗溶液加1滴1%硫酸铜溶液,1mL0.5%氯化铁溶液,2mL20%硫氰酸钾溶液,5mL异戊醇和四氯化碳的混合液(1:1),然后混匀。加2mL10% SnCl_2 溶液,摇动到红色消失,显示橙黄色,暂停1~2min,然后再摇0.5min,停2~3min。分出的有机相位于干燥试管中。如果有浑浊加10滴异戊醇排除之,然后在440nm下,以试剂空白为对照,测定样品分析液的光密度。用所得数据在标准曲线上查出比色溶液中钼的浓度,计算样品中钼的含量。

(四) 结果计算

$$Y = \frac{V \times \rho}{m}$$

式中 Y:钼的含量(mg/1000g分析材料); ρ :比色液中钼的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$);m:样品质量(g);V:比色溶液的体积(mL)。

注意事项:① SnCl_2 还原时最适宜的HCl浓度是1mol/L,在反应中硫氰酸钾的浓度应不低于1%,而 SnCl_2 不低于0.5%。在溶液中的三价铁应为1~2mg,较高铁含量(到10mg)并不改变颜色强度。②当钛的含量达30mg时,它的干扰作用可采用加入NaF消

除。在测铝时，所分析溶液中含有铁或铜，能提高钼酸组合物的颜色强度，因而标准液也必须加入这些离子。

十一、利用靛茜素试剂比色测定硼

(一) 方法原理

硼在浓 H_2SO_4 中为阳离子 B^{3+} ，而在低浓度 H_2SO_4 溶液中则成 B^{3+} 离子。在反应产物中，硼离子对试剂分子有相当强的极化作用，使试剂分子吸收光的特性随之发生很大改变。其吸收最大值在 590~610nm 范围。硼与靛茜素络合物的 H_2SO_4 溶液的颜色强度取决于 H_2SO_4 浓度：由浅蓝色 (99%~80% H_2SO_4) 变为红色 (73%~60%)；由红色变为橙黄色 (60%~44%)。靛茜素本身颜色也受 H_2SO_4 浓度影响有类似的变化，在 H_2SO_4 浓度为 87%~97% 时，硼与靛茜素反应最为灵敏。在靛茜素 H_2SO_4 溶液中加入冰醋酸，靛茜素乙酰化，使蓝紫色溶液变为玫瑰红色，而乙酰化的靛茜素-硼络合物为浅蓝色，因而可消除二者吸收光谱的重叠。在一定范围内，络合物溶液颜色深浅与硼的含量成比例关系。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (感量 0.0001g)，分光光度计，高温灰化炉，水浴锅，瓷坩埚及瓷皿，刻度试管 (10mL)，刻度吸管 (1mL、5mL)，容量瓶 (25mL)。

2. 试剂。①0.003%靛茜素溶液：称取 30mg 靛茜素 (1,2,5,8-四羟基蒽醌)，放入 1000mL 容量瓶中，注入约 1/2 量瓶浓 H_2SO_4 (相对密度 1.84)，摇至溶解，用浓 H_2SO_4 加至刻度，混匀，保存在有磨口的棕色试剂瓶中。②硼标准液：先配制 100 μg 硼/mL 溶液。为此，称 0.4407g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ，放入 500mL 容量瓶中，加蒸馏水溶解，并定容至刻度，混匀。在制备工作曲线时，用蒸馏水稀释 50 倍，即为 2 μg /mL。③乙醇-醋酸混合液 (1:1)：50mL 95% 酒精与 50mL 冰醋酸混合保存在磨口塞玻璃瓶中。④1mol/L 盐酸溶液。⑤1g/L 碳酸钠溶液。⑥饱和氢氧化钙溶液：称 3g CaO ，放入容量瓶中，注入 1000mL 蒸馏水，加塞振荡 10min，然后过滤到试剂瓶中，密封保存，以防止 CO_2 进入。

(三) 测定步骤

1. 硼标准曲线制备。在一系列瓷皿中，依次加入 0、0.6、1.2、2.4、3.6、4.8、6.0mL 硼标准溶液 (2 μg 硼/mL)，各加 1mL 1% Na_2CO_3 溶液，在水浴中蒸干，冷却。均加入 1mL 乙醇-醋酸混合液，用玻璃棒搅匀，及时加入 5mL 0.003% 靛茜素硫酸溶液，仔细混匀，各溶液注入 10mL 刻度试管里，放置 30min，于 610nm 下以 1cm 比色杯测定各管有色溶液的光密度，并制作标准曲线。

2. 样品液的制备及硼的测定。称取 0.5~1.0g 样品，放入铂坩埚 (或瓷坩埚) 中，加 2mL 1% Na_2CO_3 溶液，用玻璃棒搅拌，以蒸馏水漂洗玻璃棒 1~2 次，把坩埚放到烘箱中，在 105℃ 下烘干，再移入高温灰化炉中灼烧。坩埚内残存物用 1mL 蒸馏水润湿，烘干，再煅烧至灰化完全。待冷却后，取出坩埚，加 5mL 蒸馏水，5 滴乙醇，混匀，再加热至沸。这时锰由六价变为四价，即成 MnO_2 沉淀出来。然后加入 1mL 1mol/L HCl ，混匀，用无灰滤纸过滤到 25mL 容量瓶中 (以蒸馏水洗涤坩埚数次)，加蒸馏水至刻度，混匀。吸取

10~20mL 滤液放入瓷皿中, 加 2mL 1% Na_2CO_3 溶液, 在水浴上蒸干, 加入 1mL 乙醇-醋酸混合液, 用玻璃棒搅匀, 立即加入 5mL 0.003% 靛茜素硫酸溶液, 用制备标准曲线处理, 测定样品液的光密度, 查工作曲线即可计算出样品中硼含量。

(四) 结果计算

查标准曲线得样品测定液中硼的浓度, 按下列公式计算分析物质中硼的含量。

$$X = \frac{A \times V_1}{V \times m} \times 100$$

式中 X : 硼的含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$ 分析样品); A : 查标准曲线得样品比色液中硼量 (μg); V : 用于比色时所取样品液体积 (mL); V_1 : 样品液总体积 (mL); m : 样品质量 (g)。

注意事项: ①在成分中, 存在的铁、铝、镁、磷、氯元素不产生干扰反应。硝酸盐、亚硝酸盐、高锰酸盐和其他氧化剂则干扰反应。因为在强酸介质中它们氧化靛茜素, 当氧化剂量过多时, 试剂完全被分解, 溶液退色。氟与硼形成络合物也干扰测定, 它使硼不再与靛茜素反应。但是由于硝酸盐在煅烧条件下被分解, 氟在植物中含量很少, 锰在煅烧处理中, 以 MnO_2 沉淀析出, 实际上这些干扰物的影响也被消除。②靛茜素试剂对硼的呈色极为迅速, 且经 20~25min 最深, 长时间不退色。颜色的发展速度及其强度取决于 H_2SO_4 浓度。随 H_2SO_4 浓度增加 (由 88%~98%), 络合物形成速度降低, 而反应灵敏性却增加。因此测定中始终要用相同的 H_2SO_4 浓度。

十二、锌含量的测定 (双硫脲比色法)

(一) 分析原理

锌可与双硫脲形成有色配合物, 根据这个性质, 可用于定量检测痕量锌。样品经干法灰化后, 在碱性溶液中 (最适 pH 为 8.3), 用双硫脲四氯化碳溶液提取, 此时, 全部的锌进入有机相, 与双硫脲配合。铁、铝等为柠檬酸铵所掩蔽。 Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , 则与双硫脲作用进入四氯化碳层。当以盐酸处理时, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} 等金属移入水层, 在 pH 为 4~5.5 时, 硫代硫酸钠掩蔽了 Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} 等离子, 故再以双硫脲提取时, 仅锌与双硫脲作用而生成红色配合物, 于波长 520nm, 用 1cm 比色皿测其消光度, 根据样品试液测得的消光度, 从标准曲线查出锌的含量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。分光光度计, 分液漏斗 (100mL) 等。
2. 试剂。①四氯化碳 (分析纯)。②10% 柠檬酸钠溶液: 溶解 10g 柠檬酸钠 (分析纯) 于重蒸馏水中, 并稀释到 100mL, 以百里香酚蓝为指示剂, 加氢氧化铵至淡蓝色, 以 0.01% 双硫脲的四氯化碳溶液抽提, 直到双硫脲层的绿色不变, 再以四氯化碳摇到无色为止, 以除去残存的双硫脲。③醋酸缓冲溶液: 混合等量的 2mol/L 醋酸钠溶液和 2mol/L 醋酸溶液, 同上用双硫脲处理。④双硫脲溶液: 0.01g/L, 0.001% 的四氯化碳溶液。⑤ 25% 硫代硫酸钠溶液: 溶解 25g 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 分析纯) 于重蒸馏水中, 并稀释到 100mL, 同上用双硫脲处理。⑥ 50% 柠檬酸铵溶液: 溶解 50g 柠檬酸铵 (分析

纯)于重蒸馏水中,并稀释到100mL,同上用双硫脲处理。⑦0.1%百里香酚蓝指示剂。⑧氨水(1:1):将浓氨水和等体积的重蒸馏水开口放置于干燥器内平衡一周。取平衡后的重蒸馏水备用(或用市售氨水重蒸馏后备用)。⑨锌标准溶液(1 μ g/mL):精确称取锌粒(分析纯)0.1g(精确到0.0001g),溶解于10mL 2mol/L盐酸中,加重蒸馏水稀释到1000mL,配成100 μ g/mL的贮备液(贮存瓶事先用浓硝酸处理后备用)。吸取贮备液1mL,用重蒸馏水稀释到100mL。

(三) 操作步骤

1. 标准曲线的制作。①于7个100mL分液漏斗中,分别加0.00,1.00,2.00,3.00,4.00,5.00,6.00mL的锌标准溶液,然后加重蒸馏水,使其总体积为10mL,配成的标准系列为含锌0.0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 μ g。②各加入柠檬酸溶液5mL,滴入百里香酚蓝指示剂2滴,以柠檬酸铵溶液[或用经处理过的氨水(1:1)]调节到试液呈蓝色(pH8.3),过量数滴,加入0.01%双硫脲溶液5mL,剧烈振摇2min,静置澄清后将下层分入另一100mL分液漏斗中,再用少量双硫脲溶液进行提取,每次2~3mL,直到双硫脲溶液不变色为止。合并上述所得双硫脲液,加入0.02mol/L盐酸20mL,剧烈振摇2min,静置分层后,弃去双硫脲的四氯化碳层,并用少量四氯化碳洗涤提取过的盐酸溶液,以除去残存于酸液中的双硫脲。加入醋酸缓冲溶液5mL,并准确加入硫代硫酸钠溶液1mL(pH4.5~5.0),0.001%双硫脲溶液30mL,剧烈振摇3min,待分层澄清后,将下层分入一小三角瓶中,加少量无水硫酸钠以除去少量悬浮水珠。③用分光光度计在520nm波长下,1cm比色皿,以试剂空白为零,测定消光值。以消光值为纵坐标,锌含量(μ g)为横坐标,绘制标准曲线。

2. 样品处理。称取搅拌均匀并经充分捣碎的样品40g于一光滑的瓷蒸发皿内,置电炉上小火蒸干,升温炭化,待烟冒尽后移入500 $^{\circ}$ C马福炉内灼烧到全部变成白色灰烬。如不易烧白,则待冷却后,加入少量硝酸润湿之,蒸干后再行灼烧。溶解灰分于5mL 6mol/L盐酸中,在水浴上稍蒸干,移入100mL容量瓶中,以重蒸馏水定容至刻度。

3. 样品测定。精确吸取上述已制备好的试样溶液5mL(含锌量少于5 μ g),置于100mL分液漏斗中,加重蒸馏水5mL,按标准曲线同样操作进行萃取,比色测定。

(四) 计算

$$\text{锌含量 (mg/kg)} = \frac{M \times V_T}{V \times m}$$

式中 M : 从标准曲线上查得锌的微克数; V_T : 试样定容体积(mL); V : 测定时取试样溶液的体积(mL); m : 试样质量(g)。

注意事项:①本法配制试剂和洗涤剂器皿用水均为去离子水。②含有氧化锌的玻璃、表面污染的玻璃容器、橡胶制品、活塞上的油脂、试剂和水,都能使结果偏高,并造成错误的空白。所以,所有玻璃器皿,每次使用前均需用(1:1)硝酸浸泡2h以上,再用去离子水洗净。③测定消光度应在萃取后60min内完成。避免阳光直射萃取液和双硫脲溶液。④硫代硫酸钠络合锌,故其用量不能任意增加,否则会使结果偏低。

十三、铜含量的测定（二乙硫代氨基甲酸钠比色法）

（一）分析原理

在碱性溶液中（pH9.0~9.2）， Cu^{2+} 与二乙基二硫代氨基甲酸钠作用，生成黄棕色配合物，溶于四氯化碳中，可于440nm波长处作比色测定。铁、锰、镍、钴和铋等也与二乙基二硫代氨基甲酸钠生成有色配合物，干扰铜的测定，可用EDTA及柠檬酸铵掩蔽。本方法的最低检出浓度为0.05mg/L铜，测定上限为2.0mg/L铜。

（二）仪器与试剂

1. 仪器。分液漏斗（125mL），分光光度计。

2. 试剂。所用试剂均用不含铜的重蒸馏水或去离子水配制。①盐酸，浓硝酸，高氯酸，浓氨水均用优级纯。②1%硝酸溶液：取浓硝酸10mL，用水稀释至1L。③铜标准贮备液：称取1.000g金属铜（99.99%），放于小烧杯中，加入20mL（1:1）硝酸溶液，加热溶解后，再加入10mL（1:1）硫酸溶液，并蒸发到冒白烟。冷却后，加水溶解，定容1000mL。此溶液1mL约含1.00mg铜。根据金属铜的实际称取量计算溶液的准确浓度。④铜标准使用液：吸取5.00mL铜标准贮备溶液，置于1000mL容量瓶中，用水稀释至刻度。此溶液1mL含5.0 μg 铜。⑤1%二乙基二硫代氨基甲酸钠溶液：称取1g二乙基二硫代氨基甲酸钠，用水溶解，并稀释至100mL。用棕色玻璃瓶贮存，放在暗处。⑥氢氧化铵-氯化铵缓冲溶液：称取70g氯化铵，加入570mL浓氨水，用水稀释至1L。⑦EDTA-柠檬酸铵-氢氧化铵溶液：称取125g乙二胺四乙酸二钠盐（ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ），250g柠檬酸铵 $[(\text{NH}_4)_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]$ ，加入100mL水和200mL浓氨水溶解，最后稀释至1L。加入少量1%二乙基二硫代氨基甲酸钠溶液，并用四氯化碳萃取提纯，以除去试剂中可能存在的铜，直至四氯化碳层无色。

（三）操作步骤

1. 标准曲线的制作。在一组编号的分液漏斗中，各加入约10mL重蒸馏水，然后分别加入铜标准溶液0.00, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 5.00, 7.00mL，并加重蒸馏水至体积为50mL。配成的标准系列为0.00, 1.00, 2.50, 5.00, 10.0, 15.0, 25.0, 35.0 μg 铜。

加入10mL EDTA-柠檬酸铵-氢氧化铵溶液，摇匀后再加入5.0mL氢氧化铵-氯化铵缓冲溶液（此时pH约为10）。冷却后，各加入5mL1%的二乙基二硫代氨基甲酸钠溶液，摇匀，静置约5min。向分液漏斗中各加入10.0mL四氯化碳，剧烈振摇2min，静置分层后，用滤纸吸去漏斗颈部的水分，填充一小团脱脂棉，先放少量四氯化碳洗净颈部，然后将萃取液放入1cm比色皿中，在440nm波长处测定消光值，以消光值相对铜含量（ μg ）绘制标准曲线。

2. 样品处理。准确称取制备好的植物样品10g，于200mL硬质三角瓶中，加50mL浓硝酸，不时摇动，盖上漏斗，放置过夜，让其充分浸泡成糊状，同时作试剂空白。将样品及试剂空白的三角瓶，放在相变压器控制温度的电热板或电沙浴上加热消解。开始低温，逐步提高温度，但温度不宜过高，以防样品液冒出。液面始终维持在微沸状态

(温度 140~160℃), 让其充分分解。当剧烈反应过后, 有机物充分分解, 取下三角瓶, 冷却后, 沿着瓶壁的四周分别加入 10mL 高氯酸, 继续加热分解, 直至瓶内有高氯酸的白烟发生, 样液接近透明无色。继续加热, 赶走残留的高氯酸。当样液很少时, 适当降低温度, 加热至高氯酸白烟几乎冒尽, 但不要使样液蒸干。此时样品完全发白。取下三角瓶, 冷却至室温。加入约 20mL 1% 的硝酸溶液, 加热让样品盐类充分溶解。此时大米、小麦、玉米等粮食样品溶液一般无不溶物, 可直接转移定容。无需过滤, 如个别不溶性物质较多的样品溶液, 用中速滤纸过滤于 100mL 容量瓶中, 三角瓶和滤纸用 1% 硝酸溶液洗净。冷却, 用重蒸馏水稀释至标线。

对于较难消解的粮食等作物, 如大豆等, 在消解的过程中为了保证消解完全, 可酌情补加硝酸或高氯酸。蔬菜等可参照上述消解粮食作物的方法进行消解。

3. 样品测定。吸取适量的样品溶液(含铜量在 30mg 以内)及试剂空白溶液, 分别置于 125mL 分液漏斗中, 并加重蒸馏水到 50mL, 以下萃取比色测定步骤按标准曲线同样操作进行。

(四) 计算

$$\text{铜 (mg/kg)} = \frac{m \times V_T}{V \times m}$$

式中 m : 从标准曲线上查得铜的微克数 (μg); V_T : 定容体积 (mL); V : 测定时取样品溶液体积 (mL); m : 样品质量 (g)。

注意事项: ①所用玻璃器皿, 必须用 (1:1) 硝酸浸泡清洗, 最后用二次蒸馏水洗。②用王水分解样品中的硫化铜最为完全, 当有机物基本分解后, 取下锥形瓶, 待样液冷却后方能加高氯酸, 否则会引起有机物与高氯酸的强烈反应而爆炸! ③消解样品时, 必须在通风橱内进行。样品不宜蒸干, 以免引起所要分析的金属元素损失。④萃取与比色操作应在避光的条件下迅速进行以免二乙基二硫代氨基甲酸钠分解退色。⑤为了保证测定溶液 pH 值稳定, 所用 EDTA-柠檬酸铵-氢氧化铵溶液和氢氧化锌-氯化铵缓冲溶液均放在低温的地方, 以防氨的挥发。⑥操作过程中必须加入过量的二乙基二硫代氨基甲酸钠溶液, 使之与可能共存多量的与试剂反应的铜以外的元素反应, 而使试剂与铜反应趋于完全。过量试剂在萃取时并不进入有机层中。⑦萃取铜时, 强烈振荡应不少于 2min, 因溶液中加入 EDTA, 会降低其萃取率。

十四、铜、锌含量的测定 (原子吸收分光光度法)

(一) 方法原理

铜、锌的试样, 经处理后用原子吸收法测定, 方法简便、灵敏、准确。试样经消解处理并制成溶液后, 将消解液直接喷入火焰测定铜、锌。试样消解方法可分为湿消解和干灰化法。实验证明, 一般粮食样品中磷酸根含量较高, 灰化不会造成被测元素的损失。蔬菜水果类样品, 灰化前加适量的磷酸也可以避免被测元素的损失。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。原子吸收分光光度计。

2. 试剂。①硝酸：特级纯。②盐酸：特级纯。③铜标准贮备液：称取 1.0000g 金属铜 (99.99%)，溶解于 15mL (1:1) 硝酸，移入 1L 容量瓶中，并用去离子水稀释至标线，此溶液为 1mL 含 1.00mg 铜。④锌标准贮备液：称取 1.0000g 金属锌 (99.99%)，用 20mL (1:1) 盐酸溶解，移入 1L 容量瓶中，并用去离子水稀释至标线，移入聚乙烯塑料瓶中，此溶液为 1mL 含 1.00mg 锌。

(三) 操作步骤

1. 标准曲线的制作。①配制 1mL 含有铜 (锌) 为 50 μ g 的标准液。分别向 6 个已编号的 50mL 容量瓶中按顺序加入 0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50mL 标准液，用 0.1mol/L 盐酸或 0.1mol/L 硝酸稀释至标线，摇匀。此系列为含铜 (锌) 为 0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 μ g/mL 的标准系列。②将铜 (锌) 标准液直接喷入空气-乙炔 (C_2H_2) 气火焰测定铜 (锌)。以消光值为纵坐标，以浓度为横坐标绘制标准曲线。仪器测定条件如下：

表 13-1

条件	铜	锌
测定波长/nm	324.7	213.8
燃气	乙炔	乙炔
助燃气	空气	空气
测定相	水相	水相
火焰类型	氧化型	氧化型
曲线范围/ μ g \cdot mL ⁻¹	0.5~10	0.5~10

2. 样品预处理。(1) 湿法消解。称取 1.00~5.00g 试样 (根据待测元素含量而定) 于 150mL 高型硬质烧杯中，加入 5~20mL 浓硝酸，盖上表面皿浸泡过夜，置电热板上微火加热，至颗粒溶化，再加 5~10mL 浓硝酸，3~5mL 高氯酸，摇匀，逐渐升温继续加热，此溶液逐渐变稠，颜色变棕红，注意防止炭化。继续加入 5~10mL 浓硝酸 (共 30~50mL)，如溶液仍有变棕红色炭化趋势，再滴加浓硝酸。加热消解直至溶液变透明无色。继续蒸发至溶液冒浓厚白烟，并出现粉红色或黄白色残渣为止。取下冷却，用水转入 25mL 容量瓶中，并稀释至标线备做测定，同时做二份试剂空白。

(2) 干灰化。准确称取 20~50g 样品于 100mL 石英烧杯或瓷坩埚中，在电炉上加热炭化要不冒烟，再放进马福炉内，逐渐升高温度灰化。先在 200 $^{\circ}$ C 灰化 1h，最后在 480~490 $^{\circ}$ C 温度下灰化，总时间为 12~18h，待灰分与烧杯脱离并为白色或灰白色时，取出冷却，加入 10mL 硝酸-高氯酸 (1:1) 消解，消解完毕，放冷后打开表面皿蒸干，加入 1mol/L 盐酸溶解，将溶液和沉淀全部移入 50mL 容量瓶中，并用 1mol/L 盐酸冲洗烧杯，转入容量瓶至标线，放置澄清，备做原子吸收测定。同时做二个试剂空白。

3. 测定。将消解液直接喷入火焰，测定铜 (锌) 的消光值，在相应的标准曲线上，查得待测元素含量。

(四) 计算

$$\text{铜 (锌) (mg/kg)} = \frac{\rho \times V_T}{m}$$

式中 ρ : 从曲线查得浓度 ($\mu\text{g/mL}$); V_T : 试样定容总体积 (mL); m : 称样质量 (g)。

注意事项: ①消解时温度控制要适宜, 温度太高, 溶液溅出或炭化, 使结果偏低, 酸量消耗大; 温度太低, 消解速度慢, 容易形成胶状物, 消解不完全, 影响结果。②高氯酸的用量必须严格控制, 尽量少加 (5mL 以下), 加入量要一致, 因此应选用可靠的优级纯试剂, 否则试剂空白值高, 直接影响结果准确度。③在酸量较少的情况下, 高氯酸遇到大量有机物易爆炸, 必须在足够量的硝酸存在和常温下, 才能将高氯酸加入样品中。消解时必须在通风良好的通风橱中进行。④在消解中, 如果加入少量五氧化二钒或钒酸铵可明显地提高消解速度。⑤大米、小麦、玉米等粮食样品消解后, 用水溶解, 一般无不溶物, 可不必过滤。而植物根、茎、叶 (包括蔬菜) 消解后, 加水溶解时, 不溶性物质较多, 必须过滤除去不溶性物质, 然后再进行测定。

十五、钙、镁、铁、锰、铜、锌含量的测定 (原子吸收法)

(一) 分析原理

食物样品经消化后, 将含金属元素残留物溶解在稀酸中, 将溶液喷入原子吸收仪器的火焰中, 使金属元素原子化, 在各元素的特征波长下测量吸收值。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。原子吸收分光光度计, 高型硬质烧杯 (150mL), 表面皿, 电热板, 容量瓶, 小漏斗, 滤纸等。

2. 试剂。①硝酸, 高氯酸, 1mol/L 盐酸 (均为优级纯)。②标准贮备液: 称取相应数量的纯金属或金属盐, 溶于 10mL (1:1) 的盐酸或硝酸中, 用优质去离子水稀释, 定容于 500mL 容量瓶中, 配成 1.00mg/mL 的标准贮备液。

(三) 操作步骤

1. 样品湿消化。根据样品中待测元素的大致含量及含水量, 准确称取样品 1.00~5.00g, 于 100mL 高型硬质烧杯中, 加入 5~20mL 浓硝酸, 盖上表面皿浸泡过夜。置电热板上微火加热至颗粒熔化, 再加 5~10mL 浓硝酸, 3~5mL 高氯酸, 混匀, 逐渐升温加热, 溶液变成棕红色。此时应注意防止炭化。继续加 5~10mL 浓硝酸, 如溶液仍有变棕红色炭化趋势, 再滴加浓硝酸, 加热消解至溶液变成透明无色, 继续加热至溶液冒浓厚白烟, 并出现粉红色或黄白色残渣为止。冷却后用蒸馏水稀释, 再转移至 25mL 容量瓶中, 定容。同时做二份空白。

2. 分析的仪器条件。见表 13-2 仪器的工作条件视仪器而定, 具体参看仪器的使用说明。

3. 标准曲线。根据上面的工作范围, 确定标准序列, 然后将金属贮备液适当稀释, 配好后上机测定吸收值, 绘制标准曲线。

4. 样品测定。消化后的稀释液可直接上机测定吸收值。若吸收值超过标准曲线范围, 则需适当稀释后再测。根据吸收值查出待测液中的金属浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。

表 13-2

元素	波长/nm	检出限/ $\mu\text{g 金属} \cdot \text{mL}^{-1}$	测定范围/ $\mu\text{g 金属} \cdot \text{mL}^{-1}$
Ca	422.7	0.01	0.05~5
Cu	324.8	0.005	0.05~5
Fe	248.3	0.03	0.05~5
Mg	285.2	0.001	0.02~2
Mn	279.5	0.005	0.2~5
Zn	213.9	0.004	0.1~2

(四) 结果计算

$$\text{金属含量 (mg/100g)} = \frac{(a-b) \times V}{10 \times m}$$

式中 a : 样品溶液的浓度; b : 空白溶液的浓度; V : 萃取液的体积; m : 样品质量 (g)。

注意事项: ①使用的所有器皿需在稀释液中浸泡过夜, 充分洗涤后, 才可使用。②选择适当容积的容量瓶, 以便样品消化后的最后萃取液中的金属浓度在工作范围内。③消化时温度控制要适宜, 太高, 溶液溅出或炭化; 太低, 消化速度慢, 容易形成胶状物, 消化不完全。④高氯酸的用量需严格控制, 尽量少加, 加入量要一致, 否则影响准确性。高氯酸遇大量有机物时易爆炸, 必须在有足够量的硝酸存在和常温下才能加入。消化必须在通风橱内进行。

十六、钾和钠含量的测定 (火焰光度法)

(一) 分析原理

样品经硝酸、高氯酸的混合酸处理而制备的溶液, 可用原子吸收分光光度计 (火焰光度法), 同时测定钠、钾的含量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。火焰光度计, 高温电炉, 凯氏烧瓶 (250mL), 容量瓶, 漏斗, 滤纸等。
2. 试剂。①浓硝酸, 高氯酸 (均为优级纯), 优质去离子水。②钠贮备标准液 (100mg/L): 在 105℃ 下将氯化钠干燥 2h 后, 称取 254.2mg, 溶解于水中, 定容至 1000mL, 保存在聚乙烯瓶中。③钾标准贮备液 (100mg/L): 在 105℃ 下将氯化钾干燥 2h 后, 称取 190.7mg, 溶解于水中, 定容至 1000mL, 保存在聚乙烯瓶中。④钾稀溶液: 称取 3.8g 氯化钾溶解于水中并稀释至 1L。

(三) 操作步骤

1. 标准曲线的制备。①钠工作标准液: 分别吸取 0, 5, 10, 15, 20mL 钠贮备液至 100mL 容量瓶中, 在每个容量瓶中各加入 5mL 钾稀溶液, 用水稀释, 定容。这些溶液分别含钠 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mg/100mL。②钾工作标准液: 分别吸取 0, 5, 10, 15, 20mL 钾贮备液至 100mL 容量瓶中, 加水定容。这些溶液分别含钾 0.05, 1.0, 2.0mg/

100mL。

2. 样品制备。①消化：称取 2.000g 样品，用滤纸包好，放入 250mL 凯氏瓶中，加入 20mL (1:1) 硝酸，徐徐加热 10min，冷却至室温。消化液过滤到 100mL 容量瓶中，用水洗涤凯氏瓶和滤纸数次，定容、摇匀。同样制空白液。②钠标准液的稀释：吸取 50mL 消化液，定容至 100mL 容量瓶中。吸取 50mL 空白液，加入 5mL 钾稀溶液，定容至 100mL 容量瓶中。③钾用溶液的稀释：分别吸取 50mL 消化液和空白液，在 100mL 容量瓶中定容。

3. 测定。①测定标准溶液的钠和钾，波长分别为 589nm 和 766.5nm。②以零浓度标准校正所得数值，绘制标准曲线。③分别测定钠稀释液和钾稀释液及样品空白稀释液，从标准曲线上查得相应的浓度 (mg/100mL)。

(四) 结果计算

1. 钠含量计算：

$$\text{钠含量 (mg/100g 样品)} = \frac{(A_1 - A_0) \times 2}{m} \times 100$$

式中 A_1 ：钠稀释液读数； A_0 ：空白液读数； m ：样品质量 (g)。

2. 钾含量计算：

$$\text{钾含量 (mg/100g 样品)} = \frac{(B_1 - B_0) \times 2}{m} \times 100$$

式中 B_1 ：钾稀释液读数； B_0 ：空白液读数； m ：样品质量 (g)。

注意事项：钠标准中不加钾、钠结果会太高，这是由于样品中的钠对钾有共存元素影响所致。

第四部分 有害成分检测技术

第十四章 有害成分

一、简易鉴定油菜籽芥酸含量的测定

(一) 方法原理

根据不同芥酸含量菜油在无水乙醇中可溶性差异, 来用标样法简易鉴定油菜籽芥酸含量。所需设备简单, 具有易于掌握、简便、快速, 分析费用低及准确性高。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。台秤(感量0.1g), 电热恒温干燥箱, 恒温水浴锅, 四管手工液压榨油机, 有机玻璃水箱, 10窗孔铝制观察架, 玻璃试管(直径13~15mm, 长150mm), 微量加液器。

2. 试剂。无水乙醇(分析纯), 标准芥酸含量菜油。

(三) 测定步骤

1. 将样品(如油菜籽)约20g置于120℃烘箱中烘干4h, 从中取出约12g, 用手工液压榨油机榨取油样约2~2.5mL。

2. 用微量定量加液器吸取油样0.2mL, 匀速地将油注入试管内, 再加入3.5mL无水乙醇(与标样管一样数量), 并用橡皮塞塞紧。

3. 把样品试管与标样管一起插入10窗孔铝制观察架(其中有两个标样管, 8个样品管, 每个样品设两个重复, 即4个样品)上, 同时置于70℃水浴中加热约5~7min, 加热过程须振荡样品三次, 让油样完全溶解。

4. 把样品连同观察架一起移入约30℃有机玻璃冷却水箱冷却, 观察待测样品沉淀形成快慢, 并与标样管比较, 即可鉴定菜籽芥酸含量高低。沉淀形成速度比标样管快的则表明其芥酸含量高于标准芥酸含量, 反之则低于标准芥酸含量。对于芥酸含量与标准芥酸含量相近而不易鉴定的样品, 可将其与标准管再同时置入70℃水浴中加热数秒后迅速取出, 并置于空气中观察沉淀溶解过程, 若样品溶解速度快于标样管, 则表明其芥酸含量较标准芥酸含量低, 反之则相反。

5. 标样管的配制。将本品系或脂肪酸成分相似(主要以亚麻酸为指标)品系的菜籽置于120℃烘箱中烘干4h后, 用手工液压榨油机榨取获得该品系的低芥酸菜油配成标准芥酸含量可按要求来定, 商品收购时, 定为芥酸含量5%, 良种收购则定为2%(这些标

准油的芥酸含量经气相色谱仪测定校正)。

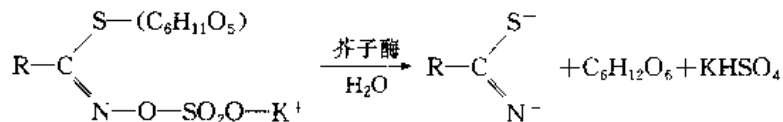
配制标样管：以 0.2mL 标准芥酸含量菜油加 3.5mL 无水乙醇，如前所述，经 70℃ 加热、振荡，至油样完全溶解后，移入 30℃ 水中冷却，记载溶液至完全不透明所需时间。无水乙醇加入量将直接影响可溶性时间及测试灵敏度，一般无水乙醇所需加入量以 5% 芥酸含量可溶性为 90s，2% 芥酸含量可溶性为 130s 为宜，且这时测试灵敏度较高。标样管应预先配制 20~30 支，经加热、溶解、冷却，观察沉淀形成一致性，去掉个别差异较大的管，其余均用胶布封紧供鉴定时反复轮换使用。

注意事项：使用回收无水乙醇时，标样管也应用回收无水乙醇配制。

二、油菜籽硫代葡萄糖甙快速测定技术 (3,5-二硝基水杨酸法)

(一) 方法原理

本法是在葡萄糖试纸 (Tas-Ta-Pc) 法及试棍 (Tes-Stick) 法基础上进一步研究提出来的。



样品不需要脱脂处理，方法简便、准确、灵敏度高，试剂简单。根据 3,5-二硝基水杨酸法测定所产生的葡萄糖量，即可计算出硫葡萄糖甙的量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平 (1/1000)，721 型分光光度计 (或其他型的光电比色计)，刻度试管 (10mL, 25mL)，恒温箱 (或恒温水浴, 37℃)。

2. 试剂。①氯化钠 (粉状)。②3,5-二硝基水杨酸溶液：称酒石酸钾钠 182g 及 3,5-二硝基水杨酸 7g，加热溶解于 500mL 蒸馏水中，加入粒状氢氧化钠 15g，边加边搅拌，再加苯酚 4g 及无水亚硫酸钠 1g，溶解及冷却后加蒸馏水定容至 1000mL，放置一星期后使用。③饱和硫酸钠溶液：称硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 165g，溶解于 100mL 蒸馏水中。④中性醋酸铅溶液：称 300g 醋酸铅及 50g 氧化铝，加蒸馏水 50mL，沸水浴上加热至呈白色或紫白色，然后在搅拌下加入 950mL 蒸馏水，倒入瓶内，加盖后于室温下澄清、过滤，贮棕色瓶中密封备用。⑤葡萄糖标准溶液：称 0.100g 葡萄糖于 100mL 量瓶中，加蒸馏水溶解，稀释到刻度，混匀。宜用前配制。因系用一分子结晶水的葡萄糖，故此溶液葡萄糖含量 1mL 实为 0.9mg。

(三) 测定步骤

1. 葡萄糖标准曲线制备。取 6 支 10mL 刻度试管，依次加入葡萄糖标准液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mL，均加蒸馏水至 1.0mL，再加入 3,5-二硝基水杨酸 3mL，混匀，置沸水浴中准确保温显色 10min 后取出。冷却后，加蒸馏水定容至 10.0mL，混匀。于 530nm 下，以第一管光密度值为零，分别测定各管溶液的光密度值，以葡萄糖量为横坐标，对应各管之光密度值为纵坐标制备工作曲线。

2. 样品酶解及硫葡萄糖甙测定。准确称取研磨样品 0.500g 两份, 分别置于两支 25mL 刻度试管中, 各加粉状氟化钠 0.100g, 对于经过热处理的菜籽及菜籽饼等样品, 则尚需加少量新鲜菜籽粉作为酶料。在一试管中, 加沸蒸馏水约 20mL 后立即加热至沸腾, 并继续保持微沸 10min。在另一试管中则加入 35~38℃ 温蒸馏水约 20mL, 置 37℃ 温水浴中或恒温箱中, 保温酶解 1h (不时振荡), 使硫葡萄糖甙在芥子酶作用下加速水解, 完成酶解后加热至沸亦保持微沸 10min。

在两支试管中, 均滴加中性醋酸铅, 以沉淀其中蛋白质及色类物质。每次加 1 滴, 摇动后静置, 观察上部溶液是否澄清, 否则继续滴加至上层溶液由混浊变为澄清为止 (一般加 6 滴)。过量的醋酸铅应沿管壁加入 1 滴饱和硫酸钠溶液消除之。如不出现白色沉淀, 示醋酸铅未过量, 可不必再加入, 否则需继续加至无白色沉淀产生为止 (一般加 1 滴)。最后均加蒸馏水定容至 25mL, 混匀, 经干滤纸过滤到干试管中 (若滤液混浊, 应重新过滤)。

取上面两支试管的滤液各 0.50mL, 放入 10mL 刻度试管中, 均加蒸馏水 0.50mL 及 3,5-二硝基水杨酸溶液 3.0mL, 混匀, 置沸水浴中准确保温显色 10min 后取出。冷却后, 加蒸馏水至 10mL, 混匀, 以样品空白液光密度值为零, 分别测定两管溶液的光密度值 (样品空白液是取上面任何一试管的滤液 0.50mL, 加 3,5-二硝基水杨酸 3.0mL, 但不经过加热处理, 并稀释至 10mL, 混匀)。

(四) 结果计算

$$\text{葡萄糖} (\%) = m_1 \times 10^{-3} \times \frac{25}{0.5} \times \frac{100}{0.5} \times 0.9 = 9m_1$$

$$\text{葡萄糖与硫葡萄糖甙葡萄糖} (\%) = m_2 \times 10^{-3} \times \frac{25}{0.5} \times \frac{100}{0.5} \times 0.9 = 9m_2$$

$$\text{硫葡萄糖甙葡萄糖} (\%) = \text{葡萄糖与硫葡萄糖甙葡萄糖} - \text{葡萄糖} = 9(m_2 - m_1)$$

m_1 及 m_2 分别为测定第一管溶液 (葡萄糖) 及第二管溶液 (葡萄糖与硫葡萄糖甙葡萄糖) 所得比色溶液的光密度自比色标准线上读得的相应葡萄糖质量 (mg), 0.9 系用于配制葡萄糖标准溶液的另 1 分子结晶水葡萄糖, 实际含葡萄糖仅 90%。

根据硫葡萄糖甙葡萄糖再进行硫葡萄糖甙的计算:

$$\text{硫葡萄糖甙} (\%) = 2.207 \times \text{硫葡萄糖甙葡萄糖} (\%)$$

2.207 为硫葡萄糖甙葡萄糖转换为硫葡萄糖甙的系数, 在硫葡萄糖甙的酶解反应中, 硫葡萄糖甙中的 R 基可以是丙烯基、丁烯基、戊烯基等, 计算转换系数时均假定为丙烯基, 则因 397.4g 硫葡萄糖甙可以酶解产生 180.0g 葡萄糖, 故得以上系数。

亦可用异硫氰酸盐及噁唑烷硫酮含量表示结果:

$$\text{异硫氰酸盐} (\%) + \text{噁唑烷硫酮} (\%) = 0.5499 \times \text{硫葡萄糖甙葡萄糖} (\%)$$

0.5499 为硫葡萄糖甙葡萄糖转换为异硫氰酸盐及噁唑烷硫酮含量的系数。因假定酶解产生腈及硫的反应可以忽略不计, 则 397.4g 硫葡萄糖甙可以产生 99g 异硫氰丙烯酯等, 故得以上系数。

注意事项: ①硫葡萄糖甙一般在 20~25℃ 下酶解需 24h。在 37℃ 下酶解, 由于芥子酶活性提高, 则酶解反应加快, 1h 即可酶解完全。②制备的样品液 (灭活滤液及酶解滤

液)放置时间不宜过久,否则由于在有水条件下,可使芥子酶恢复部分活性,从而能催化水解。其结果,使灭活溶液的葡萄糖含量有所增加。相应地降低了葡萄糖和硫葡萄糖甙葡萄糖之间的差数,影响测定结果。③一般没有经过加热等灭活处理的新鲜菜籽,其中的芥子苷酶含量甚多,不存在缺酶问题。而经过加热等处理的菜籽或菜籽饼,由于酶的活性部分或全部丧失,对于这些样品,一般每0.500g需加入0.050g已准确测知其硫葡萄糖甙葡萄糖含量的新鲜菜籽粉即够(计算时扣除外加部分)。

三、油菜籽(饼)中硫葡萄糖甙总量的快速测定

(一) 方法原理

硫葡萄糖甙在酸性条件下与氯化钯生成有色复合体沉淀。当加入一定量的分散剂羧甲基纤维素钠溶液时,沉淀亦消失,溶液变为清亮,适宜比色测定。在540nm和420nm处,具有较大的消光值。在前一波长下,氯化钯用量及菜籽色素影响可以忽略不计,因而选择540nm下测定,可以提高方法的准确度。在测定液中,含有1/3(体积分数)以上的0.1%羧甲基纤维素钠溶液时,放置10天后观察未发现沉淀,放置两天后测定,消光值不变。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平(感量0.0001g),721型(或其他型号分光光度计),粉碎机,水浴锅,有塞刻度试管(10mL),刻度吸管(1mL、2mL)。

2. 试剂。①氯化钯(PdCl_2)显色液:称取177mg氯化钯于200mL烧杯中,加入2mol/L的盐酸溶液2mL和蒸馏水20mL,加热溶解后以蒸馏水稀释至250mL。②0.1%羧甲基纤维素钠溶液:1g羧甲基纤维素钠于少量水中加热至完全溶解后,以蒸馏水稀释至1000mL,放置过夜取清液备用。

(三) 测定步骤

1. 样品中硫甙的提取。准确称取经粉碎的油菜籽或菜饼100mg装入10mL试管中,在沸水浴中干蒸10min,加入约90℃的热蒸馏水8~10mL,再置沸水浴中20min以上,取出静置冷却后,用蒸馏水稀释至刻度,混匀。

2. 样品测定。分取上层清液(样液若混浊需过滤或离心)0.5mL于10mL有塞试管中,加0.1%羧甲基纤维素钠溶液2mL,充分摇匀,再加入1mL氯化钯显色溶液,盖上玻璃塞,充分摇匀并放置1h,在540nm下,以1cm比色皿(试剂空白溶液作对照)测定有色络合物的光密度,与标准曲线对照,求出硫甙的总量。

3. 标准曲线的绘制。称取100mg含量分别为0.10%、0.50%、1.0%、1.5%、1.8%左右硫甙的油菜籽(粉碎),装入10mL试管中(以下手续同上),将测得的各管光密度值与对应的硫甙含量做出一条标准曲线。

注意事项:①硫甙钯显色反应的酸度,可在0.01mol/L盐酸或接近中性溶液中显色,在0.0028~0.5mol/L盐酸溶液中显色,光密度无差异。酸度对显色完全的时间有明显影响,在0.003~0.05mol/L盐酸溶液中显色,放置1h,显色完全。但当酸度增大时,需放置较长时间(12h以上)才显色完全,为加快显色完全,选取低酸度是适宜的,一般取

0.003~0.05mol/L的盐酸溶液,1h以后即可做比色测定。②钼的用量在2.5~10倍于硫甙时是稳定的,低于2.5倍显色完全的时间拖长,重现性不好,大于10倍颜色太深,影响测定,且浪费试剂。③芥子酶的灭活可在100℃下干蒸3min或在90℃灭活5min即可。经实验在90℃或100℃的水浴中干蒸10min,然后再加入沸蒸馏水提取硫甙,提取液放置两天未发现硫甙酶解。④油脂及蛋白质对测定没有明显影响,因此分析样品无需预处理。

四、比色法测定单宁的含量

(一) 方法原理

单宁类化合物在碱性溶液中将磷钨钼酸还原,产生深蓝色,其深度与含量成正比,可用分光光度法测定。本方法简单快速,准确性较高,适合于大批样品的分析测定,是目前应用最广的一种化学法测定单宁含量。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。工业天平(感量0.01g),恒温箱,具塞三角瓶(250mL),振荡器,容量瓶(50mL),刻度吸管(2mL、5mL),721型光电比色计。

2. 试剂。①F-D(Folir-Denis)试剂:750mL蒸馏水中加入 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100g,磷钼酸20g及磷酸50mL,回流2h,冷却,并稀释为1L。②碳酸钠饱和溶液:每100mL蒸馏水中加入无水 Na_2CO_3 35g,在70~80℃时溶解,并放置过夜。用 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 结晶种入晶种于过饱和溶液中,待其结晶后过滤。③单宁酸标准溶液:溶解单宁酸50mg于50mL容量瓶中,加蒸馏水溶解并定容至刻度,混匀。再用蒸馏水稀释10倍即为0.1mg/mL标准溶液。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线的绘制。吸取单宁标准液0、0.5、1、1.5、2.0、2.5、3、3.5mL,分别置于盛有30mL蒸馏水的50mL容量瓶中,加F-D试剂2.5mL和饱和 Na_2CO_3 溶液5mL,加蒸馏水稀释至50mL。充分混合,并于30min后在650nm处测定光密度值。以吸光度对单宁酸毫克数作标准曲线。

2. 单宁的提取。高粱样品粉碎,过40目筛,称取2~4g(视单宁含量而定)放入具塞三角瓶中,加蒸馏水50mL于60℃左右的保温箱中过夜,取出,在振荡器上摇动30min,通过滤纸过滤到三角瓶中,弃去前面少部分滤液,其余滤液供测定用。

3. 样品液的测定。吸取上述滤液1~2mL(视单宁含量而定)置于盛30mL蒸馏水的50mL容量瓶中,加入2.5mL F-D试剂与5mL饱和碳酸钠溶液,加蒸馏水至50mL充分混合,并于30min后比色测定光密度值。

(四) 结果计算

$$\text{单宁}(\%) = \frac{P}{V} \times \frac{50}{m} \times 100$$

式中 m : 提取单宁时所称样品质量(mg); V : 比色时所吸提取液体积(mL); P : 从标准曲线查得的提取液所含单宁量(mg)。

注意事项: ①单宁含量在1mg以下,其光密度与单宁含量成线性关系。②室温下显

色 25min, 颜色达最大深度, 且于 3h 内稳定。

五、快速络合滴定法测定单宁的含量

(一) 方法原理

锌对单宁的沉淀作用, 符合一般沉淀理论, 往往处于动态平衡, 在一定温度下, 单宁的沉淀与金属锌浓度有关。本实验条件下, 锌浓度为 0.500mg/mL 以上, 单宁酸立即形成沉淀, 若锌浓度在 0.100mg/mL 以下时, 仅形成胶体混浊状。在形成单宁酸沉淀的锌浓度范围内, 单宁酸结合锌量有着明显差异, 随着锌浓度降低, 结合的锌也减少。显然在不同锌浓度下, 沉淀单宁酸以一个常数表示单宁酸对锌固有结合量是不恰当的。采取一系列含有不同量的单宁酸标准液与固定锌量组成的沉淀动态平衡体系, 在一定范围内, 溶液中剩余的锌量与单宁酸量成一定比例关系, 即单宁酸含量愈多, 剩余的锌量愈少。如果用一定浓度乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA) 滴定剩余的锌量。以 EDTA 滴定体积数作横坐标, 单宁酸毫克数作纵坐标, 便可得一条特定的单宁酸-EDTA 滴定曲线, 从实验数据做回归统计分析, 得到一回归直线方程 $y=a+bx$ 。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。工业天平 (感量 0.01g), 微量滴定管 (5mL 或 10mL), 移液管 (2mL、5mL), 容量瓶 (50mL), 具塞三角瓶 (250mL)。

2. 试剂。①0.08mol/L 醋酸锌溶液: 17.5600g 醋酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ 加蒸馏水溶解, 再加数滴冰醋酸, 以蒸馏水定容至 1000mL, 摇匀。②0.005mol/L EDTA 溶液: 1.85g 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA) 加蒸馏水溶解, 定容至 1000mL 摇匀。③pH10 $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ 缓冲液: 67.5g NH_4Cl 溶于 200mL 蒸馏水中, 加 570mL 浓氨蒸馏水, 再加蒸馏水至 1000mL。④铬黑 T 指示剂: 0.5g 铬黑 T 加 4.5g 盐酸羟胺 (以少量蒸馏水溶解) 加 95% 乙醇 100mL 溶解。

(三) 测定步骤

1. 单宁酸标准曲线制备或回归方程式计算: 称取在 105℃ 烘干 3h 的单宁酸 0.1000g 加蒸馏水溶解, 定容于 100mL 容量瓶, 混匀, 即 1mg/mL 的单宁酸标准液。另取 7 个 50mL 容量瓶, 均加入 5mL 0.08mol/L 醋酸锌及 1.4mL 浓氨水, 摇动至沉淀完全溶解。分别加入上述单宁酸标准液 0~20mL, 摇匀, 室温下放置片刻, 加蒸馏水至 50mL, 混匀, 过滤。取滤液 5mL, 加 20mL 左右蒸馏水, 2.5mL pH10 $\text{NH}_4\text{OH}-\text{NH}_4\text{Cl}$ 缓冲液, 3 滴含 5% 盐酸羟胺的 0.1% 铬黑 T 溶液 (95% 乙醇), 以 0.005mol/L EDTA 溶液滴定, 终点由酒红色变为天蓝色, 记下 EDTA 滴定体积数。用 EDTA 滴定的毫升数作纵坐标, 单宁毫克量作横坐标, 绘制单宁酸标准滴定曲线。以单宁毫克量为 y , 相应的 EDTA 滴定毫升数为 x , 计算回归直线方程式。

2. 样品中单宁含量的测定: 样品粉碎, 过 60 目筛, 称取粉碎样品 1~3g, 放入 250mL 具塞三角瓶中, 加 50mL 蒸馏水, 在 80℃ 水浴中提取 1h (并间歇摇动), 取出, 冷却至温, 过滤, 弃去前面数毫升滤液。取滤液 10~20mL, 按制备单宁标准曲线的方法进行测定, 另取同量滤液做空白滴定。

(四) 结果计算

由样品滴定消耗的 EDTA 体积 (mL 数) 减去样品空白滴定消耗的 EDTA 毫升数, 查单宁酸标准滴定曲线或代入回归直线方程式 $y=a+bx$ 中, 即可算得待滴定样品液中单宁毫克数。

$$\text{单宁含量 (mg/100g)} = \frac{A}{V} \times \frac{50 \times 100}{m}$$

式中 A : 查标准滴定曲线所得测定液中单宁含量 (mg); V : 测定液总体积 (mL); m : 样品质量 (g)。

六、自由棉酚含量的测定 (比色法)

(一) 分析原理

自由棉籽酚是指在棉籽产品中可溶于丙酮水溶液中的棉籽酚及棉籽酚的衍生物等。本测定方法适用于棉籽、棉籽肉、棉籽饼、棉籽糊等产品。

(二) 仪器、设备

1. 仪器。摇动机, 工业天平 (感量 0.01g), 分光光度计, 具塞三角瓶 (250mL), 刻度吸管 (10mL, 25mL 胖肚吸管), 容量瓶 (100, 250mL), 恒温箱, 具塞试管 (25mL)。

2. 试剂。①丙酮; 异丙醇 (A. R.)。②环己烷 (光谱纯)。③丙酮水溶液: 将 700mL 丙酮与 300mL 蒸馏水混合。④异丙醇水溶液: 将 800mL 异丙醇与 200mL 蒸馏水混合。⑤硫脲溶液: 溶 10g 硫脲 (A. R.) 于蒸馏水中, 并稀释至 100mL。⑥1.2mol/L 盐酸溶液: 将 106mL 浓盐酸 (35%~37% 盐酸) 于 1000mL 蒸馏水中。⑦苯胺: 将苯胺加入少量锌粉后, 进行蒸馏, 弃去最初和最后少量馏出物, 贮藏于棕色试剂瓶中, 放在冰箱中保存。当空白试剂光密度超过 0.022 时再行蒸馏。⑧棉籽酚: 采用一级标准的棉籽酚或乙酸棉籽酚 (重量计含 89.62% 棉籽酚) 用作标准。为了测定纯度, 用分析天平准确称取 2mg 棉籽酚或乙酸棉籽酚, 移入 100mL 容量瓶中, 加入 40mL 环己烷, 并于水浴上加热, 摇动至内容物溶解, 冷至室温, 以环己烷稀释至刻度。在分光光度计上于 358nm 下, 以环己烷为空白, 测定棉籽酚溶液的光密度, 计算吸收系数如下:

$$\alpha = A / (C \times L)$$

式中 α : 吸光系数; A : 光密度; C : 浓度 (g/L); L : 比色皿厚度 (cm)。

一级标准棉籽酚最高纯度的吸光系数应是 39.9 ± 0.2 ; 而乙酸棉籽酚为 35.8 ± 0.2 。
⑨棉籽酚标准溶液: 准确称取 25mg 一级标准棉籽酚或 27.9mg 一级标准乙酸棉籽酚, 移入 250mL 容量瓶中, 加入 100mL 丙酮, 1.0mL 冰醋酸, 75mL 蒸馏水, 以丙酮稀释至刻度, 混匀。吸取 25mL 上述溶液放入 100mL 容量瓶中, 加入 50mL 丙酮, 以蒸馏水稀释至刻度, 即为 0.025mg 棉籽酚/mL, 避光保存, 可稳定 24h。

(三) 测定步骤

1. 标准曲线制备。吸取 0、1、2、3、4、5、7、10mL 标准棉酚溶液, 分别移入 8 个 25mL 具塞试管中, 标记以 A 系。各加入 2 滴 10% 硫脲水溶液, 1 滴 1.2mol/L 盐酸, 并

用异丙醇水溶液稀释至刻度,混匀,在分光光度计上于440nm处测定各管光密度(以异丙醇水溶液为空白)。

将第二组载有标准棉酚溶液的25mL具塞试管标记以B系,加入2滴10%硫脲水溶液,1滴1.2mol/L盐酸及2mL重蒸馏的苯胺。空白为含10mL丙酮水溶液,2滴10%硫脲水溶液及2mL苯胺(不加1.2mol/L盐酸)。标准试管B系及空白试管放入沸水浴中加热30min,取出,冷却至室温,用异丙醇水溶液稀释至刻度,在分光光度比色计上于440nm处测定光密度(以空白试管溶液调仪器光密度为零)。每一标准棉籽酚的校正光密度值:[溶液B系光密度-溶液A系光密度],以校正光密度为纵坐标,相应棉籽酚mg数为横坐标,绘制标准曲线。

2. 样品制备及测定。在工业天平上称取磨碎的棉籽或棉籽饼0.5~2g,放入250mL具塞三角瓶中,加50mL丙酮水溶液,盖上玻璃塞,在电动摇动机上充分摇动1h,过滤,弃去最初少量滤液,在过滤时用表玻璃皿盖在漏斗上以减少蒸发。吸取2~10mL滤液(双份)移入2个25mL具塞试管中,其中一个管(A)加2滴10%硫脲水溶液,1滴1.2mol/L盐酸溶液,并用异丙醇水溶液稀释至刻度。另一管(B),加2滴10%硫脲水溶液,1滴1.2mol/L盐酸溶液及2mL重蒸馏的苯胺。对照液(C),向25mL具塞试管中加入与样品液等量的丙酮水溶液,2滴10%硫脲溶液(不加1.2mol/L盐酸)及2mL苯胺。将B、C二管放入沸水浴中加热30min,取出,各管均加入10mL异丙醇水溶液,并在冷水中冷却至室温,用异丙醇水溶液稀释至刻度。A管(异丙醇水溶液为对照),B管(C管为对照)按制备工作曲线操作测定A、B两管光密度值。

(四) 结果计算

样品液校正光密度:(样B光密度-样A光密度)查标准曲线得样品待测液中棉酚含量(mg)。

$$\text{棉酚 (mg\%)} = \frac{A}{V} \times \frac{V_1 \times 100}{m}$$

式中 A:待测样品液中棉酚含量(mg); V:供比色所取滤液体积(mL); V_1 :样品液总体积(mL); m:样品质量(g)。

七、棉籽蛋白中游离和总棉酚含量测定(HPLC法)

(一) 方法原理

游离棉酚(FGP),采用混合溶剂(95%乙醇-水-乙醚-冰醋酸)室温萃取,过滤以C-18色谱柱分离。总棉酚(TGP)在0.1mol/L草酸溶液中,以丁酮-水为溶剂,在加温下水解,过滤,再与FGP同样方法分离。用外标法定量。棉酚在2~10 μ g范围内呈良好的线性关系,其最低检出量为10ng。此法专属性强,灵敏度高,重现性好,结果可靠。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器。Waters 244 高效液相色谱仪, Waters UV-254 检测器, SP-4290 自动积分仪。

2. 试剂。①标准棉酚(99.45%)。②乙腈, 甲醇(色谱纯), 水(重蒸馏, HPLC

级),乙醇,磷酸,醋酸钡等试剂均为分析纯。③0.1mol/L 草酸溶液:准确称取草酸 9.04g,以丁酮-水(55.3:5)混合溶剂溶解,定容至 1L。④0.5mol/L 醋酸钡溶液:准确称取醋酸钡 63.9g,以蒸馏水溶解,定容至 500mL。⑤标准品溶液:准确称取 1.0mg 棉酚标准品,用混合溶剂(95%乙醇-水-乙醚-冰乙酸=71.5:28.5:20:0.2,体积分数)溶解,定量转移至 10mL 容量瓶中,并稀释至刻度。

(三) 测定步骤

1. FGP 样品溶液。准确称取 5.0g 棉籽蛋白粉于 100mL 具塞瓶中,加入 60mL 配制棉酚标准液所用的混合溶剂,室温振摇萃取 30min。将提取液过滤到 100mL 容量瓶中,反复用混合溶剂洗涤数次,并稀释至刻度。

2. TGP 样品溶液。准确称取 3.0g 棉籽蛋白粉于 100mL 具塞瓶中,加 60mL 0.1mol/L 草酸溶液(丁酮-水=55.3:5),水浴 78℃ 加热水解 6h,冷却;加 30mL 70% 丙酮水溶液,再加 5mL 0.5mol/L 醋酸钡溶液,振摇萃取 15min,静置过夜。过滤,反复用 70% 丙酮水溶液洗涤数次,定容至 100mL。

3. 测定。取 FGP 和 TGP 样品液适量用微孔滤膜过滤,以微量进样器进样 10 μ L 进行分析测定,并取 10 μ L 标准液同样进行分析测定。

4. 色谱条件。Bondapak C-18 不锈钢柱;流动相系统:甲醇-水-乙腈-磷酸(80:15:5:0.2,体积分数);流速:1.0mL/min;柱温:25℃;进样量:10 μ L;检测系统:UV-254nm;灵敏度范围:0.2AUFS。

(四) 结果计算

根据样液色谱图定性,用外标法定量。

八、大豆胰蛋白酶抑制物活性的测定(AACC法)

(一) 仪器、设备

1. 仪器。分析天平(感量 0.0001g), 37℃ \pm 0.5℃ 恒温水浴箱,分光光度计,搅拌器。

2. 试剂。①0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液(Tris 缓冲溶液, pH8.2):溶解 6.05g 三羟甲基氨基甲烷及 2.94g CaCl₂·H₂O 于约 900mL 蒸馏水中,调节至 pH8.2,并用蒸馏水稀成 1L。②底物溶液:称取 40mg 苯甲酰-*dl*-精氨酸-*p*-硝基酰替苯胺盐酸盐[Benzoyl-*dl*-Arginine-*p*-Nitro Nilid (BAPA) Hydro Chloride]溶于 1mL 二甲基亚砜中,并将三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液预热至 37℃,然后用作溶剂,将上述试剂稀释成 100mL。③胰蛋白酶溶液:称取 4mg 胰蛋白酶(不含盐)溶于 200mL 0.001mol/L 的盐酸中。④乙酸溶液:30mL 冰醋酸溶于 70mL 蒸馏水中。⑤0.01mol/L 氢氧化钠溶液。

(二) 测定步骤

将样品粉碎并通过 100 目筛,每 1g 样品用 50mL 0.01mol/L 的氢氧化钠溶液提取 3h(搅拌),样品的最大用量约为 1g。分别吸取 0、0.6、1.0、1.4 及 1.8mL 澄清的上层提取液注入 2 组试管中,并各加蒸馏水至 2mL。加入 2mL 预热至 37℃ 的胰蛋白酶溶液于每支试管中,混匀。再加入 5mL 预热至 37℃ 的 BAPA 溶液,并严格地于 10min 后加入

1mL 醋酸溶液并混匀,以停止反应。将内容物过滤,并于 410nm 处测定光密度值。对于空白对照管,是取 2mL 样本提取液加入 5mL BAPA 试剂并保温于 37℃ 10min,然后加入 1mL 醋酸溶液及 2mL 胰蛋白酶溶液。

活力的表示方法:1 个胰蛋白酶单位(TU),是 10mL 反应溶液在本文叙述的条件下,于 410nm 处测得反应前后所增加 0.01 光密度为 1 单位(Absorbance Unit)。胰蛋白酶抑制物活力:用胰蛋白酶抑制单位(TLU)表示。

(三) 结果计算

用 TLU/mL 对分析所用提取液体积(mL)做标准曲线,并外推到零。每克样本的 TLU 值=延伸值×稀释倍数。当用于分析的提取液的 TLU/mL 对分析液体积做图并不是直线关系时,则计算出每单位体积提取液中 TLU 平均值,则 TLU/g 样品=平均值×稀释倍数。

注意事项:①悬浮液的 pH 应在 8.4~10.0 之间。②溶液应稀释到能使 1mL 产生出 40%~60%胰蛋白酶抑制剂为止,这样就可以减少相对标准偏差。③当应用时,每天配制 BAPA 溶液,并保存于 37℃。④TLU 值即为 1mL 提取液读数减去空白读数之后与 0mL 浸出液读数之间表观差值。TLU/mL 是指 TLU 除以浸出液的毫升数。

九、HPLC 法测定黄曲霉毒素 B₁ 的含量

(一) 方法原理

使用国产硅镁型吸附剂制备层析柱,对天然污染的黄曲霉毒素 B₁(AFTB₁)进行分离纯化,再用反相 HPLC 配荧光检测器测其含量。最低检出量为 0.08ng,黄曲霉毒素 B₁ 含量在 0.5~60ng 范围内线性关系良好。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。Water 高效液相色谱仪,510 型输液泵,U6K 进样器,420 荧光检测器(Ex=340nm Em=425nm),746 数据处理机。

2. 试剂。甲醇(色谱纯),氯仿,正己烷,丙酮,三氟醋酸,磷酸二氢钾(A.R.),硅镁型吸附剂(100~200 目),上海化学试剂供应站,AFTB₁,AFTB₂,AFTG₁,AFTG₂,AFTM₁(Sigma)。

(三) 测定步骤

1. 硅镁净化柱的制备。将硅镁型吸附剂置烘箱中 250℃ 烘 2h,冷却后放入干燥器中。使用前二日取出,称 4.0g 放在烧杯中,加 0.6mL 蒸馏水混匀。在烧杯口蒙上塑料薄膜,平衡 48h 使其活化符合使用要求。

取长 25cm,内径 1cm 的层析柱一只,加入过 40 目筛孔,经 130℃ 烘 2h 的无水硫酸钠至 2cm,加氯仿 8mL,用玻璃棒轻轻搅动排出硫酸钠层内的空气。在上述装有硅镁吸附剂的烧杯中加入 15mL 氯仿,轻轻搅动使硅镁吸附剂悬浮。打开层析柱下口活塞,使柱内氯仿缓慢流出,同时将悬浮的硅镁吸附剂倒入柱中。硅镁吸附剂自然下沉,当氯仿液面下降至硅镁吸附剂层上 3cm 时,关闭活塞,加入无水硫酸钠 2cm。

2. 样品萃取。准确称取经粉碎过 20 目筛的样品(如玉米粉)10.0g,放入 200mL 具

塞锥形瓶内。用滴管将 5mL 重蒸馏水均匀滴在样品上使其湿润。加入 50mL 氯仿，振荡器上振摇 30min。加入无水硫酸钠 10g，振摇后静置 10min，经快速滤纸滤入具塞量瓶中。

3. 上柱纯化。将硅镁吸附柱中氯仿放出，使液面至无水硫酸钠表面。加入样品提取液 5mL，打开层析柱下口活塞，使样品提取液进入柱内，直到液面与上层无水硫酸钠表面对齐。依次加入氯仿-己烷 (1:1) 混合液 6mL，氯仿-甲醇 (9:1) 混合液 10mL，以 2mL/min 淋洗除去杂质。吸附在硅镁型吸附剂上的黄曲霉毒素用丙酮-水 (99:1) 混合液 15mL 洗脱。收集洗脱液，用旋转蒸发器 40℃ 下浓缩挥发干。用氯仿转入到 2mL 具塞小瓶内，氮气吹干。加入 200 μ L 正己烷，50 μ L 三氟醋酸，加塞，在振荡器上摇匀。放置 30min 后用氮气吹干，残渣用 100 μ L 流动相溶解后供进样用。

4. 色谱条件。用 0.01mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (1:1) 混合液为流动相；Ultrasphere ODS 柱 (4.6mm \times 150mm)，流动相流速：1.5mL/min；进样量：20 μ L。

5. AFTB₁ 标准曲线制备。吸取 AFTB₁ 标准液 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0ng 依次进样做色谱测定，用峰面积与相应的浓度得回归方程式 $Y=0.62+4.52X$ 。

(四) 结果计算

根据样液色谱峰面积，由 AFTB₁ 标准回归方程式得样液 AFTB₁ ng 量，再换算为每 kg 样品中 AFTB₁ ng 量。

注意事项：在本实验条件下，黄曲霉毒素标准混合样 (AFTB₁ 0.5ng, AFTB₂ 1ng, AFTG₁ 1ng, AFTG₂ 1ng, AFTM₁ 1ng) 进样时行色谱分析，20min 内，五种黄曲霉毒素能得到很好地分离。

十、比色法测定亚硝胺类化合物

(一) 方法原理

本法是挥发性 *N*-亚硝胺总量的测定，食品中挥发性亚硝胺采用夹层保温水蒸气蒸馏纯化挥发性亚硝胺，经紫外光照射下分解释放为亚硝酸根。通过强碱性离子交换树脂浓缩，在酸性条件下与对氨基苯磺酸形成重氮盐进而与 *N*-萘乙烯二胺二盐酸盐形成红色偶氮染料，其颜色深浅与亚硝胺的含量成正比例，可比色定量。

由于二甲胺与亚硝酸盐在酸性条件下能结合产生亚硝胺。同样采用亚硝胺测定中使用离子交换树脂浓缩，再洗脱进行重氮化偶合反应，比色测定亚硝酸根含量。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。分光光度计，紫外灯 (10W)，夹层保温蒸馏装置。

2. 试剂。①磷酸缓冲液 (0.1mol/L pH7.0)：吸取 0.1mol/L 磷酸氢二钾 61.0mL 和 0.1mol/L 磷酸二氢钠 39.0mL 混合而成。②30%醋酸溶液。③0.5mol/L 氢氧化钠溶液。④显色剂 A：1g 对氨基苯磺酸，加入 100mL 30%醋酸溶液。⑤显色剂 B：0.2g *N*-1-萘乙烯二胺二盐酸盐，加入 100mL 30%醋酸溶液。⑥显色剂 C：1g 对氨基苯磺酸，加入 100mL 1.7mol/L 盐酸溶液。⑦显色剂 D：0.1% *N*-1-萘乙烯二胺二盐酸盐溶液。⑧ 1.7mol/L 盐酸溶液。⑨二乙基亚硝胺标准溶液 (100 μ g/mL)。⑩亚硝酸钠标准溶液 (100 μ g/mL) ⑪强碱性离子交换树脂 (交联度 8，粒度 50 目) ⑫正丁醇饱和的 1mol/L 氢

氧化钠溶液。⑬10%硫酸锌溶液。

(三) 挥发性 *N*-亚硝胺总量的测定

1. 样品液的制备。液体样品视含量称取 10~20g, 移入 100mL 容量瓶中, 加入氢氧化钠溶液使其最后浓度为 1mol/L, 摇匀, 过滤, 收集滤液待测定。对于固体样品经捣碎或研磨均匀, 称取 20g, 加正丁醇饱和的 1mol/L 氢氧化钠溶液移入 100mL 容量瓶中, 并稀释至刻度, 混匀, 浸泡过夜, 离心取清液待测定。

2. 亚硝胺标准曲线制备。准确吸取 100 μ g/mL 的亚硝胺标准液 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10mL, 分别移入小玻璃皿中, 均加入 pH7 的磷酸盐缓冲液, 使各皿中反应溶液总体积为 2.0mL, 摇匀后在紫外光下照射 1min。按顺序加入 0.5mL 显色剂 A, 摇匀后再加 0.5mL 显色剂 B, 待溶液呈玫瑰红色后, 在 550nm 下测定吸光度, 绘制标准曲线。

3. 亚硝胺总量的测定。吸取待测样液 50mL, 移入蒸馏瓶内进行夹层保温水蒸气蒸馏, 收集 25mL 馏出液, 用 30% 醋酸调至 pH3~4; 再移入蒸馏瓶内进行夹层保温水蒸气蒸馏, 收集 25mL 馏出液, 用 0.5mol/L 氢氧化钠调至 pH7~8。将馏出液在紫外光下照射 15min, 通过强碱性离子(氯型)交换柱(1cm \times 0.5cm)浓缩, 经少量蒸馏水冲洗, 用 1mol/L 氯化钠溶液洗脱亚硝酸根, 分管收集洗脱液(每管 1mL)至收集洗脱液加入显示剂不显色为止。各管中加入 1.0mL pH7 的磷酸盐缓冲液 0.5mL 显色剂 A, 摇匀后再加入 0.5mL 显色剂 B, 以下操作同标准曲线的制备程序。根据测得的吸光度查标准曲线得每管亚硝胺含量, 计算各管总含量。

$$\text{挥发性 } N\text{-亚硝胺 } (\mu\text{g/kg}) = \frac{C}{m} \times 1000$$

式中 C : 相当于标准的量 (μ g); m : 测定时样品液相当于样品的质量 (g)。

(四) 亚硝酸盐的测定

1. 样品液制备。液体样品称取样品 5g, 用蒸馏水移到 100mL 容量瓶中, 以 30% 氢氧化钠溶液调节溶液呈中性。加入 10% 硫酸锌液 0.5mL, 加蒸馏水至刻度, 离心或过滤去沉淀, 溶液待测定。固体样品称取捣碎或磨细的样品 5g, 用蒸馏水移入 100mL 容量瓶中, 在 60 $^{\circ}$ C 水浴上提取 30min, 取出, 滴加 10% 硫酸锌溶液 5mL 摇匀加蒸馏水至刻度, 混匀, 离心或过滤去沉淀, 溶液待测定。

2. 亚硝酸盐标准曲线制备。准确吸取 100 μ g/mL 标准亚硝酸盐溶液 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10mL, 分别移入玻璃管中, 均加蒸馏水至 9.0mL, 加入 0.5mL 显色剂 C, 摇匀后再加入 0.5mL 显色剂 D, 摇匀。在 550nm 下测定吸光度绘制标准曲线。

3. 亚硝酸盐的测定。吸取待测液 10mL, 用氢氧化钠溶液调 pH 至 7, 通过强碱性(氯型)离子交换柱(1cm \times 2.5cm)浓缩, 经少量蒸馏水洗后, 用 1mol/L 氯化钠洗脱, 每管 9mL, 收集 2~3 管, 各管均加入 0.5mL 显色剂 C, 摇匀后再加入 0.5mL 显色剂 D, 摇匀。以下按制备标准曲线程序, 由标准曲线查样液中亚硝酸盐的含量(对照管用蒸馏水经树脂交换, 洗脱, 显色程序)。

$$\text{亚硝酸盐 } (\mu\text{g/kg}) = \frac{C}{m} \times 1000$$

式中 C : 相当于标准的量 (μg); m : 测定样液相当于样品的质量 (g)。

十一、HPLC 法测定亚硝胺类化合物的含量

(一) 分析原理

亚硝胺经二氯甲烷提取, 过中性氧化铝或碱性氧化铝柱而达到除杂净化作用, 再以二氯甲烷-乙腈 (95:5) 洗脱, 浓缩后即可用于 HPLC 分析。可以二甲基亚硝胺形式, 或以衍生物形式应用亚硝胺分解产物促胺的柱前整合反应选择性检测亚硝胺。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备。高效液相色谱仪, SEP-PAK Silica 预处理柱, K-D 浓缩器, 超声波清洗器。

2. 试剂。①氢氧化钠, 磷酸二氢钾 (A. R.), 二氯甲烷, 乙酸乙酯, 正己烷, 乙腈 (A. R. 重蒸馏)。②溴化氢饱和冰醋酸溶液。③0.02% 酚酞指示剂。④1:1 氨水 (体积分数)。⑤0.01mol/L 硝酸铜溶液。⑥0.01mol/L 二氯化汞溶液。⑦5% 二硫化碳氯仿溶液。

(三) 酒中二甲基亚硝胺的测定

1. 样液制备。取 100mL 啤酒样品置于 250mL 容量瓶中, 加入 0.3g NaOH 于样品中, 振摇溶解。加入 100mL 二氯甲烷, 振摇 2min, 在超声浴中超声 5min。用 10mL 二氯甲烷-乙腈 (95:5) 洗 SEP-PAK Silica 预处理柱, 取 20mL 二氯甲烷提取液通过预柱, 并用 10mL 二氯甲烷-乙腈 (95:5) 洗预柱, 合并滤液。在室温下蒸发至干或用 N_2 气吹干。加蒸馏水 5mL, 溶解亚硝胺成分, 即可用于 HPLC 分析, 用标准曲线法定量。

2. 液相色谱条件。进样体积 150 μL ; 流动相: 乙腈+水 (5:95), 含有 2g/L K_2HPO_4 ($\text{pH}=7.9$); 流速 1.0mL/min; 纸速: 0.5cm/min; 检测器: 紫外检测器, 波长 254nm; 色谱柱: Radial-PAK C-18 Cartridge。

(四) 以衍生物形式测定

1. 样液制备。取 1mL 二氯甲烷浓缩提取液置于具塞小试管中, 加入 0.03mL 溴化氢冰醋酸溶液, 塞紧后混匀。置红外灯加热器上, 控制温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 加热 30min。再通入高纯氮气, 挥发除去二氯甲烷。此小试管中滴入 1 滴 0.02% 酚酞指示剂, 依次加入 0.2mL 1:1 氨水, 0.10mL 0.01mol/L $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 溶液, 精确移入 0.05mL 5% (体积分数) 二硫化碳氯仿溶液, 振摇 1min, 静置分层后, 弃去水相, 水洗有机相数次, 至水相无色。加入 0.10mL 0.01mol/L HgCl_2 溶液, 振摇至有机相的棕色完全退去, 有机相用于 HPLC 分析, 用标准曲线法定量。

2. 液相色谱条件。色谱柱: Nucleosil CN 5 μg 2.6mm \times 250mm; 流动相: 15% (体积分数) 乙酸乙酯-正己烷 (0.01mol/L HgCl_2 饱和); 流速: 0.8mL/min; 检测器, 波长为 273nm; 柱温: 室温; 进样体积: 5 μL 。

十二、食品中苯并芘的简易快速测定

(一) 方法原理

样品的石油醚提取液,经甲酸、甲醇水洗去杂质,用咖啡因的甲酸溶液萃取,苯并芘以水溶性的咖啡碱复合物分离出来,再用石油醚反萃取。苯并芘在经过微柱管硅镁层时被吸附,在紫外光下呈蓝紫色荧光,荧光强度在一定范围内与苯并芘含量成正比。本法最低检出量为 0.002 μg 。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器。紫外检测器 (365nm); 微柱管: 内径 5mm, 长 20cm, 玻璃管, 依次装入脱脂棉 5mm, 60~80 目无水硫酸钠 2cm, 硅镁吸附剂 1cm, 80~100 目无水硫酸钠 2cm, 脱脂棉 5mm, 下端空间 4cm, 上端空间 8cm 左右, 0~100 酒精计, 10mL 刻度离心管; 100mL 分液漏斗, 50、100mL 烧杯及刻度吸管。

2. 试剂。①石油醚 (30~60 $^{\circ}\text{C}$, 重蒸馏); ②无水硫酸钠 (A. R.); ③2% 硫酸钠水溶液; ④甲酸 (88%~90%); ⑤15% 咖啡因-甲酸溶液; ⑥苯并芘标准品; ⑦硅镁吸附剂。

(三) 测定步骤

1. 样品提取。2g 油样在加有 4mL 石油醚的分液漏斗中混匀, 用 90% 甲酸洗两次, 每次 2mL, 振荡 2min, 静置分层, 弃去甲酸。石油醚层再加 2mL 甲醇水 (55:45) 洗一次, 振荡 2min, 静置分层, 弃去甲醇水。石油醚层以 15% 咖啡因-甲酸溶液萃取二次, 第一次 2mL, 振荡 2min, 静置分层后, 将咖啡因甲酸层转入 40mL 烧杯; 第二次 1mL, 振荡 2min, 静置分层后合并咖啡因甲酸液, 加入 2% 硫酸钠 6mL, 用石油醚反萃取二次, 每次 2mL, 合并石油醚, 使其经过约含 2g 无水硫酸钠柱状漏斗, 待液面低于硫酸钠时, 加 1mL 石油醚于柱状漏斗中。合并石油醚于 10mL 刻度离心管中, 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上挥去石油醚至近干, 然后用石油醚定容。

2. 测定。将定容后的样品液, 取 0.4mL 移入微柱管中, 待液面低于柱上部棉花层时, 加 0.2mL 石油醚, 待液体全部进入柱层后, 将微柱管置于 360nm 紫外检测器中观察硅镁层荧光强度。同样取苯并芘标准液作对照处理观察荧光柱的长度 (cm) 及强度, 当苯并芘 < 0.001 μg 时, 未见蓝紫色荧光; 0.002 μg , 约 0.1cm 蓝紫色荧光, 较淡; 0.005 μg , 约 0.5cm 蓝紫色荧光, 较淡; 0.010 μg 约 1cm 蓝紫色荧光, 色较淡; 0.020 μg , 约 1cm 蓝紫色荧光, 色深。

(四) 结果计算

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

式中 X : 样品中苯并芘含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$); S : 荧光强度表示的苯并芘量 (μg); m : 样品质量 (g); V_1 : 样品液定容体积 (μL); V_2 : 上柱样品液体积 (μL)。

十三、多环芳烃 (PHA) 类化合物含量测定 (HPLC 法)

(一) 方法原理

样品经 KOH 乙醇溶液回流, 经正己烷、二甲基亚砜等萃取及反萃取纯化, 经 HPLC 分离 PHA, 用荧光检测器测定其含量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。高效液相色谱仪，荧光分光光度计，积分仪，KD 浓缩器等。
2. 试剂。氢氧化钾，甲醇，乙醇，正己烷，乙腈，二甲基亚砜 (DMSO)；均为分析纯。

(三) 操作步骤

1. 提取方法。试样(湿重 25~100g, 干燥 5~10g)放入 300mL 三角瓶, 加 KOH 10~30g, 加 H₂O 10~20mL, 加乙醇 150mL, 加热回流 1.5~2h, 冷后加水 150mL, 用正己烷提取三次 (50mL×3), 弃去碱性乙醇液, 收集正己烷层用蒸馏水洗三次 (100mL×3) 弃去水层, 正己烷层用 DMSO 提取三次 (30mL×3), 弃去正己烷层, 收集 DMSO 层加蒸馏水 50mL, 用正己烷提三次 (30mL×3) 弃去 DMSO, 收集正己烷层, 用水洗二次 (50mL×2), Na₂SO₄ 脱水, 用 KD 浓缩器浓缩至 3mL, 加乙腈 3mL, 通 N₂ 下蒸除正己烷至 2mL 为 HPLC 的测定溶液。与标准比较峰高定量。

2. 国际癌症研究中心推荐的前处理方法为: ① 高蛋白食物样品: 在氢氧化钾甲醇溶液中消化, 用环己烷提取。② 脂肪和植物油: 在环己烷中溶解。③ 植物性食物样品: 先用丙酮提取, 然后将丙酮蒸发, 残留物溶于环己烷。④ 环己烷通过二甲基甲酰胺-蒸馏水 (9:1) 的溶液分配, 弃去环己烷, 然后再经水和环己烷萃取二甲基甲酰胺溶液, 弃去二甲基甲酰胺液。环己烷浓缩至 1mL, 经硅胶柱将提取液净化, 然后用于 HPLC 分析。

3. 液相色谱条件。分析柱: 十八烷基硅烷 (ODS) 不锈钢柱 4mm×150mm; 压力: 2000Pa; 流速: 2mL/min, 流动相: 乙腈-水 (70:30); 检测器: 荧光分光光度计 (Ex 384nm, Em 446nm); 进样量: 5~50μL。

(四) 结果计算

以苯并 (b) 荧蒽、苯并 (k) 荧蒽、苯并 (a) 芘为标准样品, 根据样液色谱峰面积计算出各种多芳烃化合物的含量。

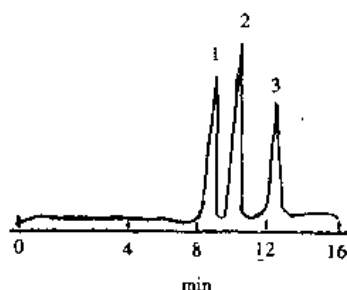


图 14-1 三种多环芳
烃化合物的分离

- 1—苯并 (b) 荧蒽 [B (b) F]
2—苯并 (k) 荧蒽 [B (k) F]
3—苯并 (a) 芘 [B (a) P]

十四、原子吸收分光光度法测定砷的含量

(一) 方法原理

将样品中的砷全部变成砷离子, 再和硼氢化钾反应生成砷化氢, 随氮气进入砷原子化炉, 在高温下砷化氢分解成原子砷和氢气, 原子砷吸收波长 193.7nm 的能量, 从而可定量测定砷的含量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。原子吸收分光光度计, 砷空心阴极灯, 氮气, 砷化氢发生装置。
2. 试剂。① 硼氢化钾溶液 (0.5% g/L): 取 1.0g 硼氢化钾溶于 0.5% 氢氧化钾溶液中成 200mL, 随用随配。② 砷标准溶液: 精确称取预先在硫酸干燥器中干燥的三氧化二砷 0.1320g, 溶于 10mL 1mol/L 氢氧化钠溶液中, 加 0.5mol/L 硫酸溶液 10mL, 将此溶

液仔细地移入 1000mL 容量瓶中,并用水稀释至刻度,此液 1mL 含量 0.1mg 砷。③砷标准使用液:取砷标准溶液 1mL,加 10mL 10%硫酸溶液、加水稀释至 1000mL,此液 1mL 含 0.1 μ g 砷。④消化液:取 80mL 硝酸,加 20mL 高氯酸混合。⑤硫酸 (GR)。⑥盐酸 (GR)。

(三) 测定方法

1. 样品液制备。称取 5.00~10.00g 粉碎样品,置于 250mL~500mL 定氮瓶中,先加少量水润湿,加 2 粒玻璃珠,10~15mL 硝酸高氯酸消化液,放置 10min,小火缓缓加热,待作用缓和后放冷。沿瓶壁加 5~10mL 硫酸,再加热至瓶内液体开始变成棕色时,再不断沿瓶壁加入硝酸高氯酸混合液至有机质分解完全。加大火力,至发生白烟,溶液应澄清无色或微黄色,放冷。

加入 20mL 蒸馏水煮沸,除去残余的硝酸至产生白烟为止。反复处理两次,放冷。移入 50mL 容量瓶中,用蒸馏水洗涤定氮瓶,洗液并入容量瓶中,加蒸馏水至刻度,混匀。定容后的溶液 10mL 相当 1g 样品,相当加入硫酸量 1mL。同法做试剂空白试验。

2. 测定。①将仪器按图联接好,仪器条件为灯电流 10mA;波长 193.7nm;狭缝 2;量程 $\times 4$;记录器量程 20mV;砷原子化炉温 850~900 $^{\circ}$ C;氮气流速 0.7L/min;砷化氢-原子吸收分光光度法测定装置示意图如下:②开动仪器,预热稳定 1h。测试前向砷化氢发生瓶中加入 10mL (1:4) 盐酸溶液和几粒元砷锌粒,用产生的氢气处理管路(同时以 0.7L/min 速度通入氮气)。③另取同样规格砷化氢发生瓶,向其中加入 5mL 待测溶液,补加 15mL 水,装好之后,先以 0.7L/min 速度通入氮气以驱逐空气,待仪器指针回到“0”点之后,用注射器加入 4.0mL 0.5%硼氢化钾溶液,反应 10s 后,将产生的砷化氢气体用氮气流载入砷原子化炉的石英管中,测定其吸收峰值,与标准曲线比较可定量。④取三价砷标准溶液 (0.1 μ g/mL) 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0mL 置于砷化氢发生瓶中,补加 0.5mol/L 硫酸溶液至刻度,再分别转移到砷化氢发生瓶中,按操作进行测定。

(四) 结果计算

$$\rho = \frac{(A-B) \times V_1 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000}$$

式中 ρ : 样品中含砷量 (mg/kg 或 mg/L); A: 根据标准曲线得出测定用样品消化液中含砷量 (μ g); B: 根据标准曲线得出空白液中含砷量 (μ g); V_1 : 样品消化液的总体积 (mL); V_2 : 测定用样品消化液的体积 (mL); m : 样品质量 g (或体积,

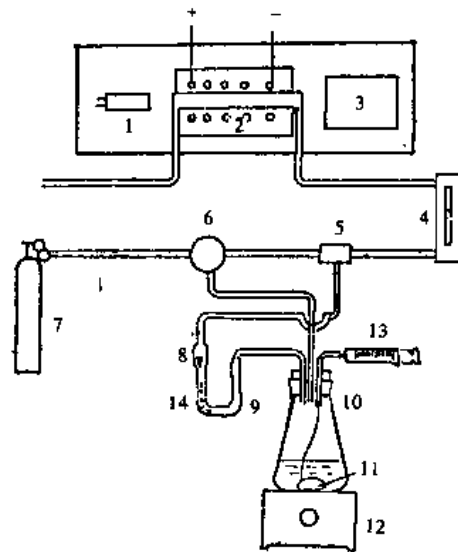


图 14-2 砷化氢-原子吸收装置图

- 1—砷空心阴极灯 2—砷原子化炉
3—记录器 4—流量计 5—三通
6—三通电磁阀 7—氮气瓶
8—止逆阀 9—干燥管
10—砷化氢发生瓶 11—搅拌棒
12—搅拌器 13—注射器 14—乙酸铅棉

mL)。

注意事项：①因盐酸中含有一定量的砷，消化采用硝酸、硫酸均可。②对含水量高的样品，应相应加大称样量；对含糖量高的样品应防止炭化。

十五、原子吸收分光光度法测定铅的含量

(一) 方法原理

样品处理后，导入原子吸收分光光度计中，经火焰高温原子化以后，吸收 283.3nm 共振线，其吸收量与铅量成正比，与标准系列比较定量。

(二) 仪器与试剂

1. 仪器。原子吸收分光光度计，火焰原子化器，所用玻璃仪器均以 10%~20% 硝酸浸泡 24h 以上，用水反复冲洗，最后用去离子冲洗晾干后，方可使用。

2. 试剂。要求使用去离子水，优级纯或高纯级试剂。①硝酸。②6mol/L 硝酸：量取 38mL 硝酸，加水稀释至 100mL。③0.5% 硝酸：量取 1mL 硝酸，加水稀释至 200mL。④10% 硝酸：量取 10.5mL 硝酸，加水稀释至 100mL。⑤过硫酸铵。⑥0.5% 硫酸钠溶液。⑦石油醚。⑧铅标准溶液：精密称取 1.0000g 金属铅 (99.99%)，分次加入 6mol/L 硝酸溶液，总量不超过 37mL，移入 1000mL 容量瓶中，加水稀释至刻度。此溶液 1mL 相当于 1mg 铅。⑨铅标准使用液：吸取 10.0mL 铅标准溶液置于 100mL 容量瓶中，加 0.5% 硝酸稀释至刻度。同样方法稀释至 1μg 铅/mL。

(三) 操作步骤

1. 样品液制备。称取 1.0g 粉碎的样品，置于石英或瓷坩埚中，加 5mL 硝酸放置 0.5h，小火蒸干，继续加热炭化，移入高温炉中，500℃ 灰化 1h，取出放冷，再加 1mL 硝酸浸湿灰分，小火蒸干。称取 2g 过硫酸铵，覆盖灰分，再移入高温炉中，800℃ 灰化 20min，冷却后取出，以 0.5% 硫酸钠溶液少量多次洗入 10mL 容量瓶并稀释至刻度，备用。

取与样品相同量的硝酸、过硫酸铵，按同一方法做试剂空白试验。

2. 测定。吸取 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0mL 铅标准使用液，分别置于 10mL 容量瓶中，加 0.5% 硝酸稀释至刻度，混匀。(容量瓶中 1mL 分别相当于 0, 50, 100, 200, 300, 400ng 的铅)。

将处理后的样液，试剂空白液和各容量瓶中铅标准稀释液分别导入火焰进行测定。测定条件：灯电流 7.5mA，波长 283.3nm，狭缝 0.2nm，空气流量 7.5L/min，乙炔流量 1L/min，灯头高度 3mm，氘灯背景校正 (可根据仪器型号，调至最佳条件)，以铅含量对吸光度做标准曲线。

(四) 计算

$$X = \frac{(\rho_1 - \rho_2) \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000}$$

式中 X：样品铅的含量 (mg/kg)； ρ_1 ：测定用样品中铅的含量 (mg/mL)； ρ_2 ：空白液中铅的含量 (mg/mL)；V：样品处理后的总体积 (mL)；m：样品质量 (g，或体

积 mL)。

十六、火焰原子吸收法测定痕量铅、镉含量

(一) 方法原理

样品经消化分解后,调 pH6.5,采用 APDC-DDTC-MIBK-环己烷体系萃取试液中的铅镉,用空气-乙炔火焰原子吸收法进行测定,铅在水相中浓度为 $0.005\mu\text{g}/\text{mL}$,镉为 $0.0004\mu\text{g}/\text{mL}$,即能准确测定出。

(二) 仪器设备及试剂

1. 仪器设备及工作条件。3300 型原子吸收分光光度计,PHS-2 型酸度计,AEG-22D 型自动天平。

最佳工作条件:

待测元素	分析线 /nm	灯电流 /mA	狭缝 /nm	燃烧器高度 /mm	乙炔气流量 /L·min ⁻¹	空气流量 /L·min ⁻¹
Pb	283.3	8	0.7	5	2.0	7
Cd	218.8	7	0.7	5	2.5	7

2. 试剂。①铅、镉标准溶液 ($1\text{mg}/\text{mL}$),分别称取铅、镉(高纯)各 0.500g,用 $6\text{mol}/\text{L}$ HNO_3 溶解,以蒸馏水定容至 500mL 贮存。 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准工作液由稀释得到。②吡咯啉二硫代甲酸钠溶液 (APDC) $0.01\text{mol}/\text{L}$ 。③二乙胺硫代甲酸钠溶液 (DDTC) $0.1\text{mol}/\text{L}$ 。④溴甲酚紫指示剂 0.1% 的 20% 乙醇溶液;甲基异丁基丙酮 (MIBK);MIBK-环己烷 (4:1)。

以上未标明试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水,实验中玻璃器皿都用 5% HNO_3 溶液浸泡过夜,用蒸馏水冲洗干净。

(三) 测定步骤

1. 试样处理。准确称取烘干的试样(如奶粉)4.000g,放入 200mL 烧杯中,加入 25mL 浓 HNO_3 ,盖上表玻璃皿,放置过夜。再置于电热板上低温加热,微沸,直至溶液变棕色透明,取下冷却。缓慢滴加 5mL H_2O_2 ,在低温下分解有机物,直至溶液呈浅黄色透明液,取下冷却,用蒸馏水定容至 200mL。

2. 标准加入法各系列的配制。移取 25mL 试样液于 6 个 100mL 容量瓶中,分别加入 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 铅、镉标准液 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5mL, 稀释至刻度。

3. 萃取。取以上溶液各 50mL 置于 100mL 分液漏斗中,各加入 2 滴溴甲酚紫指示剂,用 $2\text{mol}/\text{L}$ 氨水调至溶液颜色由黄变为紫色 (pH 为 6.5),混匀后,准确加入 5mL $0.01\text{mol}/\text{L}$ APDC 和 5mL $0.1\text{mol}/\text{L}$ DDTC 溶液,摇匀,放置 5min。再准确加入 10mL MIBK-环己烷混合萃取剂,振摇 4min,静置分层后,弃去水相,将有机相转入 10mL 具塞试管中。

4. 测定。以 MIBK-环己烷萃取剂为空白按选定的工作条件,测定各具塞试管中铅和镉的吸收值绘制工作曲线,计算样品中铅、镉含量。

附录一

推荐的每日膳食中营养素供给量
(中国营养学会 1988 年 10 月修订)

类别	体重/kg		能量/MJ	蛋白质/ g	脂肪(脂肪 能量占总 能量的百分 比,%)		钙/ mg	铁/ mg	锌/ mg	硒/ μg		
	男	女			不分性别	不分性别					不分性别	不分性别
婴儿												
初生~6个月	6.7	6.2	120/kg 体重	2~4/kg	不分性别	45	不分性别	不分性别	不分性别	不分性别		
7~12个月	9.0	8.4	100/kg 体重	体重	不分性别	30~40	不分性别	不分性别	不分性别	不分性别		
儿童												
			男	女	男	女						
1岁~	9.9	9.2	1100(4.6)	1050(4.4)	35	35	600	10	10	20		
2岁~	12.2	11.7	1200(5.0)	1150(4.8)	40	40	600	10	10	20		
3岁~	14.0	13.4	1350(5.7)	1300(5.4)	45	45	800	10	10	20		
4岁~	15.6	15.2	1450(6.1)	1400(5.9)	50	45	800	10	10	40		
5岁~	17.4	16.8	1600(6.7)	1500(6.3)	55	50	800	10	10	40		
6岁~	19.8	19.1	1700(7.1)	1600(6.7)	55	55	800	10	10	40		
7岁~	22.0	21.0	1800(7.5)	1700(7.1)	60	60	800	10	10	50		
8岁~	23.8	23.2	1900(8.0)	1800(7.5)	65	60	800	10	10	50		
9岁~	26.4	25.8	2000(8.4)	1900(8.0)	65	65	800	10	10	50		
10岁~	28.8	28.8	2100(8.8)	2000(8.4)	70	65	1000	12	15	50		
11岁~	32.1	32.7	2200(9.2)	2100(8.8)	70	75	1000	12	15	50		
12岁~	35.5	37.2	2300(9.6)	2200(9.2)	75	75	1000	12	15	50		
少年												
13岁~	42.0	42.4	2400(10.0)	2300(9.6)	80	80	1200	15	20	15	50	
16岁~	54.2	48.3	2800(11.7)	2400(10.0)	90	80	1000	15	20	15	50	
成年												
			男	女	男	女	不分性别	不分性别	男	女	不分性别	不分性别
18~	63*	53*										
极轻劳动			2400(10.0)	2100(8.8)	70	65	800	12	18	15	50	
轻			2600(10.9)	2300(9.6)	80	70	800	12	18	15	50	
中			3000(12.6)	2700(11.3)	90	80	800	12	18	15	50	
重			3400(14.2)	3000(12.6)	100	90	800	12	18	15	50	
极重			4000(16.7)	—	110	—	800	12	—	15	50	
孕妇(4~6个月)				+200(+0.8)	+15		1000	28	20	50		
孕妇(7~9个月)				+200(+0.8)	+25		1500	28	20	50		
乳母				+800(+3.3)	+25		1500	28	20	50		

* 参考值。

续表

类别	体重/kg	能量/MJ	蛋白质/g		脂肪(脂肪 能量占总 能量的百分 比,%)					
			g	g	钙/ mg	铁/ mg	锌/ mg	硒/ μg		
老年前期										
45~										
极轻劳动		2200(9.2)	1900(8.0)	70	65	} 20~25	800	12	15	50
轻		2400(10.0)	2100(8.8)	75	70		800	12	15	50
中		2700(11.3)	2400(10.0)	80	75		800	12	15	50
重		3000(12.6)	—	90	—		800	12	15	50
老年										
60岁~										
极轻劳动		2000(8.4)	1700(7.1)	70	60	800	12	15	50	
轻		2200(9.2)	1900(8.0)	75	65	800	12	15	50	
中		2500(10.5)	2100(8.8)	80	70	800	12	15	50	
70岁~										
极轻		1800(7.5)	1600(6.7)	65	55	800	12	15	50	
轻		2000(8.4)	1800(7.5)	70	60	800	12	15	50	
80岁以上		6000(6.7)	1400(5.9)	60	55	800	12	15	50	
类别	碘/μg	视黄醇当量/ μg	维生素 D/ μg	维生素 E/ mg	硫胺素/ mg	核黄素/ mg	烟酸/ mg	抗坏 血酸/ mg		
婴儿	不分性别	不分性别	不分性别	不分性别	不分性别	不分性别	不分性别	不分性别		
初生~6个月	40	200	10	3	0.4	0.4	4	30		
7~12个月	50	200	10	4	0.4	0.4	4	30		
儿童										
1岁~	70	300	10	4	0.6	0.6	6	30		
2岁~	70	400	10	4	0.7	0.7	7	35		
3岁~	70	500	10	4	0.8	0.8	8	40		
4岁~	70	500	10	6	0.8	0.8	8	40		
5岁~	70	750	10	6	0.9	0.9	9	45		
6岁~	70	750	10	6	1.0	1.0	10	45		
7岁~	120	750	10	7	1.0	1.0	10	45		
8岁~	120	750	10	7	1.1	1.1	11	45		
9岁~	120	750	10	7	1.1	1.1	11	45		
10岁~	120	750	10	7	1.2	1.2	12	50		
11岁~	120	750	10	8	1.3	1.3	13	50		
12岁~	120	750	10	8	1.3	1.3	13	50		

续表

类别	碘/ μg	视黄醇当量/ μg	维生素 D/ μg	维生素 E/ mg	硫胺素/ mg		核黄素/ mg		烟酸/ mg		抗坏血酸/ mg
					男	女	男	女	男	女	
少年											
13岁~	150	800	10	10	1.6	1.5	1.6	1.5	16	15	60
16岁~	150	800	5	10	1.8	1.6	1.8	1.6	18	16	60
成年	不分性别	不分性别	不分性别	不分性别	男	女	男	女	男	女	不分性别
18~											
极轻劳动	150	800	5	10	1.2	1.1	1.2	1.1	12	11	60
轻	150	800	5	10	1.3	1.2	1.3	1.2	13	12	60
中	150	800	5	10	1.5	1.4	1.5	1.4	15	14	60
重	150	800	5	10	1.7	1.6	1.7	1.6	17	16	60
极重	150	800	5	10	2.0	—	2.0	—	20	—	60
孕妇(4~6个月)	175	1000	10	12		1.8		1.8	18		80
孕妇(7~9个月)	175	1000	10	12		1.8		1.8	18		80
乳母	200	1200	10	12		2.1		2.1	21		100
老年前期											
45~											
极轻劳动	150	800	5	12		1.2		1.2	12		60
轻	150	800	5	12		1.2		1.2	12		60
中	150	800	5	12		1.3		1.3	13		60
重	150	800	5	12		1.5		1.5	15		60
老年											
60岁~											
极轻劳动	150	800	10	12		1.2		1.2	12		60
轻	150	800	10	12		1.2		1.2	12		60
中	150	800	10	12		1.3		1.3	13		60
70岁~											
极轻	150	800	10	12		1.0		1.0	10		60
轻	150	800	10	12		1.2		1.2	12		60
80岁以上	150	800	10	12		1.0		1.0	10		60

注:1. 推荐的每日膳食中营养素供给量是依据我国目前的膳食模式拟定的,即膳食中动物食物供给的能量约为总摄入能量的10%左右,动物食物和大豆供给的蛋白质约为总摄入蛋白质的20%左右。

2. 1~18岁儿童青少年体重,引自《中国九市儿童青少年体格发育调查研究资料汇编》1985,九市儿童体格发育调查研究协作组,首都儿科研究所。

3. 能量单位为kJ,括号内数字的单位为MJ。

附录二

每日膳食中微量元素和电解质的安全及适宜的摄入量

单位:mg

	镁	铜	锰	氟	铬	钼	钠	钾	氯
婴儿									
初生~6个月	50	0.5~0.7	0.5~0.7	0.1~0.5	0.01~0.04	0.03~0.06	115~350	350~925	275~700
7~12个月	70	0.7~1.0	0.7~1.0	0.2~1.0	0.02~0.06	0.04~0.08	250~750	425~1275	400~1200
儿童									
1岁以上	150	1.0~1.5	1.0~1.5	0.5~1.5	0.02~0.08	0.05~0.10	325~975	550~1650	500~1500
4岁以上	200	1.5~2.0	1.5~2.0	1.0~2.5	0.03~0.12	0.06~0.15	450~1350	775~2325	700~2100
7岁以上	250	2.0~2.5	2.0~3.0	1.5~2.5	0.05~0.20	0.10~0.30	600~1800	1000~3000	925~2775
青少年									
男 11岁以上	350~400	2.0~3.0	2.5~5.0	1.5~2.5	0.05~0.20	0.15~0.50	900~2700	1525~4575	1400~4200
女	300	2.0~3.0	2.5~5.0	1.5~2.5	0.05~0.20	0.15~0.50	900~2700	1525~4575	1400~4200
成年									
男	350	2.0~3.0	2.5~5.0	1.5~4.0	0.05~0.20	0.15~0.50	1100~3300	1875~5625	1700~5100
女	350	2.0~3.0	2.5~5.0	1.5~4.0	0.05~0.20	0.15~0.50	1100~3300	1875~5625	1700~5100
孕妇	+150								
乳母	+150								

附录三

平衡膳食、合理营养、促进健康

(1997年4月10日中国营养学会常务理事会通过)

1 食物多样、谷类为主

人类的食物是多种多样的。各种食物所含的营养成分不完全相同。除母乳外,任何一种天然食物都不能提供人体所需的全部营养素,平衡膳食必须由多种食物组成,才能满足人体各种营养需要,达到合理营养、促进健康的目的。因而要提倡人人广泛食用多种食物。

多种食物应包括以下五大类:

第一类为谷类及薯类:谷类包括米、面、杂粮,薯类包括马铃薯、甘薯、木薯等,主要提供碳水化合物、蛋白质、膳食纤维及B族维生素。

第二类为动物性食物:包括肉、禽、鱼、奶、蛋等,主要提供蛋白质、脂肪、矿物质、维生素A和B族维生素。

第三类为豆类及其制品:包括大豆及其他干豆类,主要提供蛋白质、脂肪、膳食纤维、矿物质和B族维生素。

第四类为蔬菜水果类:包括鲜豆、根茎、叶菜、茄果等,主要提供膳食纤维、矿物质、维生素C和胡萝卜素。

第五类为纯热能食物:包括动植物油、淀粉、食用糖和酒类,主要提供能量。植物油还可提供维生素E和必需脂肪酸。

谷类食物是中国传统膳食的主体,随着经济发展,生活改善,人们倾向于食用更多的动物性食物。根据1992年全国营养调查的结果,在一些比较富裕的家庭中动物性食物的消费量已经超过了谷类的消费量。这种“西方化”或“富裕型”的膳食提供的能量和脂肪过高,而膳食纤维过低,对一些慢性病的预防不利,提出谷类为主是为了提醒人们保持我国膳食的良好传统,防止发达国家膳食的弊端。

另外要注意粗细搭配,经常吃一些粗粮、杂粮等。稻米、小麦不要碾磨太精,否则谷粒表层所含的维生素、矿物质等营养素和膳食纤维大部分流失到糠麸之中。

2 多吃蔬菜、水果和薯类

蔬菜与水果含有丰富的维生素、矿物质和膳食纤维。蔬菜的种类繁多,包括植物的叶、茎、花苔、茄果、鲜豆、食用蕈藻等,不同品种所含营养成分不尽相同,甚至悬殊很大,红、黄、绿等深色蔬菜中维生素含量超过浅色蔬菜和一般水果,它们是胡萝卜素、维生素B₂、维生素C和叶酸、矿物质(钙、磷、钾、镁、铁)、膳食纤维和天然抗氧化物的主要或重要来源。

有些水果维生素及一些微量元素的含量不如新鲜蔬菜,但水果含有的葡萄糖、果糖、柠檬酸、苹果酸、果胶等物质又比蔬菜丰富。红黄色水果如鲜枣、柑橘、柿子和杏等是维生素C和胡萝卜素的极好来源。我国近年来开发的野果如猕猴桃、刺梨、沙棘、黑加仑等也是维生素、胡萝卜素的丰富来源。

薯类含有丰富的淀粉、膳食纤维,以及多种维生素和矿物质。我国居民近10年来吃薯类较少,应当鼓励多吃些薯类。

含丰富蔬菜、水果和薯类的膳食,对保护心血管健康、增强抗病能力、减少儿童发生干眼病的危险及预防某些癌症等方面起着十分重要的作用。

3 每天吃奶类、豆类或其制品

奶类除含有丰富的优质蛋白质和维生素外,含钙量较高,且利用率也很高,是天然钙质的极好来源。我国居民膳食提供的钙普遍偏低,平均只达到推荐供给量的一半左右,我国婴幼儿佝偻病的患者也较多,这和膳食钙不足可能有一定的联系。大量的研究工作表明,给儿童、青少年补钙可以提高其骨密度。因此,应大力发展奶类的生产和消费。豆类是我国的传统食品,含丰富的优质蛋白质、不饱和脂肪酸,钙及维生素B₁、维生素B₂、烟酸等。为提高农村人口的蛋白质摄入量及防止城市中过多消费肉类带来的不利影响,应大力提倡豆类,特别是大豆及其制品的生产和消费。

4 经常吃适量鱼、禽、蛋、瘦肉、少吃肥肉和荤油

鱼、禽、蛋、瘦肉等动物性食物是优质蛋白质,脂溶性维生素和矿物质的良好来源。动物性蛋白质的氨基酸组成更适合人体需要,且赖氨酸含量较高,有利于补充植物性蛋白质中赖氨酸的不足,肉类中铁的利用较好,鱼类特别是海产鱼所含不饱和脂肪酸有降低血脂和防止血栓形成的作用。动物肝脏含维生素A极为丰富,还富含维生素B₁₂、叶酸等。但有些脏器如脑、肾等所含胆固醇相当高,对预防心血管系统疾病不利。我国相当一部分城市和绝大多数农村居民平均吃动物性食物的量还不够,应适当增加摄入量。但部分大城市居民食用动物性食物过多,吃谷类和蔬菜不足,对健康不利。

肥肉和荤油为高能量和高脂肪食物,摄入过多往往会引起肥胖,并是某些慢性病的危险因素,应当少吃。目前猪肉仍为我国人民的主要肉食,猪肉脂肪含量高,应发展瘦肉型猪。鸡、鱼、兔、牛肉等动物性食物含蛋白质较高,脂肪较低,产生的能量远低于猪肉。应大力提倡吃这些食物,适当减少猪肉的消费比例。

5 食量与体力活动要平衡,保持适宜体重

进食量与体力活动是控制体重的两个主要因素。食物提供人体能量,体力活动消耗能量。如果进食量过大而活动量不足,多余的能量就会在体内以脂肪的形式积存即增加体重,久之发胖;相反若食量不足,劳动或运动量过大,可由于能量不足引起消瘦、造成劳动能力下降。所以人们需要保持食量与能量消耗之间的平衡。对于脑力劳动者和活动量较少的人应加强锻炼,开展适宜的运动,如快走、慢跑、游泳等。对于消瘦的儿童应增加食量和油脂的摄入,以维持正常生长发育和适宜体重。体重过高或过低都

是不健康的表现,可造成抵抗力下降,易患某些疾病,如老年人的慢性病或儿童的传染病等。经常运动会增强心血管和呼吸系统的功能,保持良好的生理状态、提高工作效率、调节食欲、强壮骨骼、预防骨质疏松。

三餐分配要合理,一般早、中、晚餐的能量分别占总能量的30%、40%、30%为宜。

6 吃清淡少盐的膳食

吃清淡膳食有利于健康,即不要太油腻,不要太咸,不要过多的动物性食物和油炸、烟熏食物。目前,城市居民油脂的摄入量越来越高,这样不利于健康。我国居民食盐摄入量过多,平均值是世界卫生组织建议值的2倍以上。流行病学调查表明,钠的摄入量与高血压发病呈正相关,因而食盐不宜过多。世界卫生组织建议每人每日食盐用量不超过6克为宜,膳食钠的来源除食盐外还包括酱油、咸菜、味精等高钠食品及含钠的加工食品等,应从幼年就养成吃少盐膳食的习惯。

7 如饮酒应限量

在节假日、喜庆和交际场合人们往往饮酒,高度酒含能量高,不含其他营养素。无节制地饮酒,会使食欲下降,食物摄入减少,以致发生多种营养素缺乏,严重时还会造成酒精性肝硬化。过量饮酒会增加患高血压、中风等危险,并可导致事故及暴力的增加,对个人健康和社会安定都是有害的。应严禁酗酒,若饮酒可少量饮用低度酒,青少年不应饮酒。

8 吃清洁卫生、不变质的食物

在选购食物时应当选择外观好,没有污泥、杂质,没有变色、变味并符合卫生标准的食物,严把病从口入关。进餐要注意卫生条件,包括进餐环境、餐具和供餐者的健康卫生状况。集体用餐要提倡分餐制,减少疾病传染的机会。

主要参考文献

- [1] 郑建仙编著. 功能性食品. 中国轻工业出版社, 1996
- [2] 周慧萍等. 生物化学杂志, 1995, 11 (1): 91
- [3] 姚文兵等. 生物化学与生物物理学报, 1991, 23 (6): 482
- [4] 汪东风等. 茶叶科学, 1996, 16 (1): 1
- [5] 何进等. 植物资源与环境, 1996, 5 (3): 61
- [6] 周静. 中草药, 1994, 25 (1): 41
- [7] 蒋世琼. 色谱, 1996, 14 (6): 487
- [8] 李玲等. 食品与发酵工业, 1995 (3): 44
- [9] 郑州粮食学院“食品分析方法”翻译组译. 食品分析方法. 四川科学技术出版社, 1985
- [10] 翟永信主编. 现代食品分析手册. 北京大学出版社, 1988
- [11] 郑荣梁主编. 自由基生物学. 高等教育出版社, 1992
- [12] 毛强等. 中草药, 1991, 22 (2): 67
- [13] 任一平等. 食品与发酵工业, 1996, (5): 31
- [14] 李好枝等. 中草药, 1994, 25 (4): 185
- [15] 何照范等. 植物淀粉及其利用. 贵州人民出版社, 1990
- [16] 吴红京等. 色谱, 1994, 12 (4): 289
- [17] 马克里等. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23 (1): 78
- [18] Mitchell K. T. et al. Anal Biochem. 1986, 158: 447
- [19] Ferrell J. E. et al. J. Cell Biol. 1992, 1984: 98
- [20] 张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术. 上海科学技术出版社, 1987
- [21] 潘颖等. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21 (4): 353
- [22] 董伟等. 色谱, 1994 12 (2): 152
- [23] 沈晓京等. 药学学报, 1996, 31 (5): 394
- [24] Bouspuet O. et al. J. Chromatogr. 1994, 39: 40
- [25] 李庆民等. 药物分析杂志, 1994, 14 (3): 35
- [26] 卫生部卫生监督司. 保健食品技术规范. 1996
- [27] 何照范编著. 粮油子粒品质及其分析技术. 农业出版社, 1985
- [28] 刘彦等. 中草药, 1995, 26 (6): 295
- [29] 胡德福等. 中国生化药物杂志, 1996, 17 (3): 123
- [30] 何照范等. 营养学报, 1991, 13 (2): 166
- [31] 熊凤麒等. 色谱, 1993, 11 (4): 251
- [32] 夏奔明. 营养学报, 1990, 12 (1): 18
- [33] 王荣民等. 食品与发酵工业, 1992 (6): 34
- [34] 上海市医学化验所主编. 临床生化检验. 上海科学技术出版社, 1979
- [35] 王世中主编. 免疫化学技术. 科学出版社, 1980
- [36] 张维勤. 山东农业科学, 1988, (5): 49
- [37] 吕曙华等. 药物分析杂志, 1993, 13 (5): 291
- [38] 王绮秋主编. 中药制剂成分现代分析法. 贵州科技出版社, 1991

- [39] 张燕婉等. 食品科学, 1994, 174 (6): 59
- [40] C. Horvath W. et al. Anal. chem. 1997, 49 (1): 142
- [41] 蒋明哲等. 食品科学, 1996, 17 (6): 67
- [42] 蔡武城、袁厚积主编. 生物物质常用化学分析法. 科学出版社, 1982
- [43] 李明元主编. 高效液相色谱法及其在食品分析中的应用. 北京大学出版社, 1988
- [44] [苏] X. H. 波钦诺克著. 荆家波等译. 植物生物化学分析方法. 科学出版社, 1981
- [45] 陈柏林等. 色谱, 1994, 12 (4): 293
- [46] 韩雅珊主编. 食品化学实验指导. 中国农业大学出版社, 1996
- [47] 李宏涛. 药物分析杂志, 1995, 15 (6): 27
- [48] 杨森等编. 食用维生素基础知识定量方法. 中国环境科学出版社, 1989
- [49] 国兴明. 营养学报, 1996, 18 (3): 347
- [50] 高鹤娟主编. 食品卫生检验方法·理化·注解. 1987
- [51] 粮食部谷物油脂化学研究所编译. 美国谷化协会审批方法. 1983, 第八版
- [52] 张延刊等. 营养学报, 1995, 17 (4): 419
- [53] 文镜. 食品科学, 1996, 17 (1): 68
- [54] 陶顺兴等. 食品科学, 1995, 16 (5): 48
- [55] 张秀香. 食品工业科技, 1997 (3): 76
- [56] 谢继红等. 色谱, 1994, 12 (4): 301