

图学基础及计算机绘图实验指导书

编者：陈香维 史亚歌

西北农林科技大学食品学院工程教研室

二〇〇七年八月

目录

前 言.....	65
训练一 工程制图基本训练.....	66
训练二 组合体绘图训练.....	70
训练三 机件的常用表达方法训练.....	78
AutoCAD2004 上机指导.....	84
上机指导一：AutoCAD2004 操作基础.....	84
上机指导二：二维图形绘制.....	86
上机指导三：文本标注与图块应用.....	87
上机指导四：零件图绘制.....	89
上机指导五：图形布局与输出.....	91

前 言

本指导书根据高等院校工科非机械类制图教学的基本要求及多年教学实践，并结合我院“产学研相结合”的人才培养模式编写而成的。

本指导书由两大部分内容组成，第一部分有3个仪器绘图训练，即工程基本训练、组合体训练、机件的常用表达方法训练，重在培养学生看图和绘图的动手能力，理论知识相对较少，需要与《工程制图》教材配套使用。第二部分为AutoCAD2004上机指导，旨在培养学生的计算机绘图能力。

本指导书具有以下特点：

1. 每个训练内容中有3-5个选题，能够实现非机械类各专业的学生分题进行课程大作业训练；

2. 每一个训练内容均包括：训练内容、目的、基本要求、相关内容指导、大作业选题、绘图步骤等几个内容；上机指导部分内容包括：上机目的和要求、上机内容、上机步骤和课后思考题。

3. 基本训练指导部分包括详细的介绍了本次训练内容的重难点，并以局部图解的形式给出了正误判别提示，帮助学生自主检查错误；

4. 工程制图基本训练全书贯彻最新《技术制图》与《机械制图》国家标准；

5. 本书所有插图都是DWG的格式，清晰度高，字迹清楚；

由于编者水平有限，书中难免存在不足之处，恳请使用本指导书的广大师生和读者批评指正。

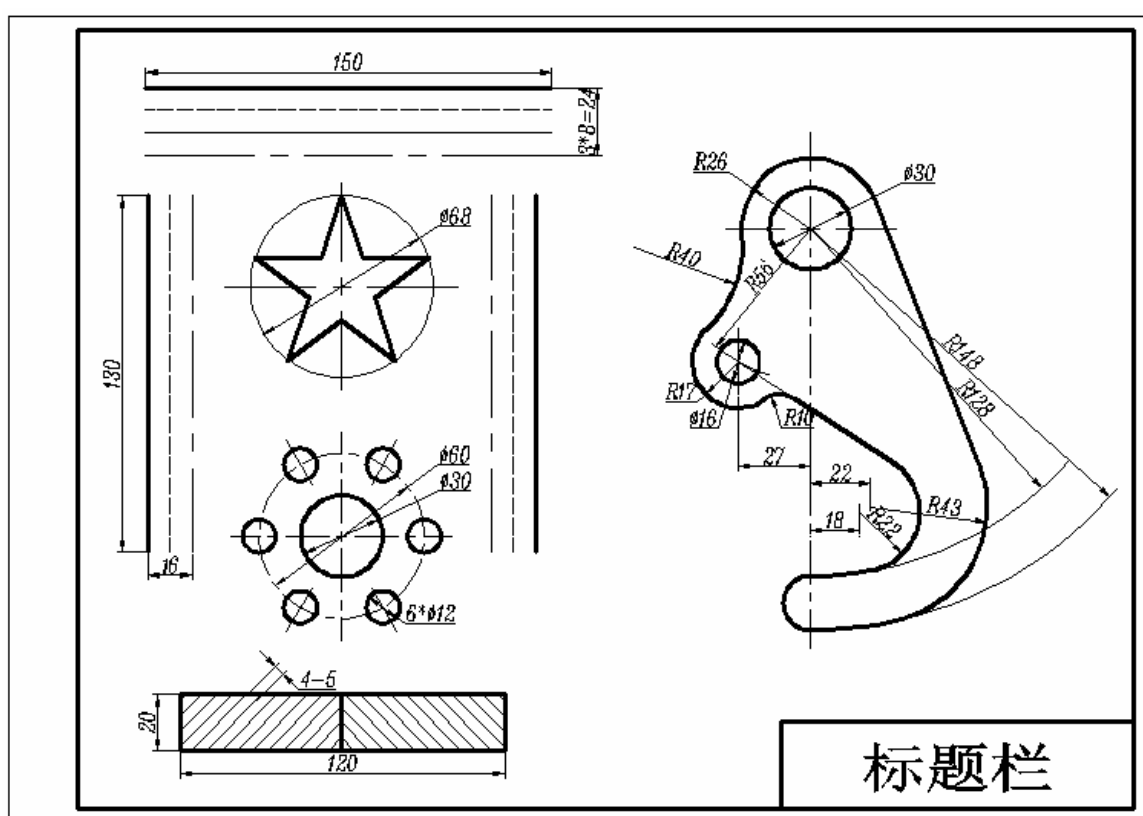
编者

2007年8月

训练一 工程制图基本训练

一、训练内容

1. 按照图示要求抄画基本线型，不需要标注尺寸；
2. 按照尺寸要求抄画圆弧连接零件轮廓，并标注尺寸；
3. 绘图比例为1:1，使用A3幅面图纸；
4. 图名：基本练习。



二、目的

1. 了解国家标准《机械制图》中关于字体、图线、尺寸标注等基本内容的要求；

2. 学会使用丁字尺、三角板、圆规、H铅笔、2B铅笔等绘图仪器和工具；
3. 掌握粗实线、细实线、点画线、虚线等各种常见图线的画法；
4. 掌握圆弧连接的画法；
5. 掌握用“短粗线”法来表示箭头，粗线长约4mm；
6. 掌握简化标题栏的画法；

三、基本要求

1. 合理布图：依据零件轮廓的大小、形状和尺寸标注的位置等因素合理确定图形的位置，使图形处于图纸的中心部分；
2. 符合国标：按照 GB/T 17450-1998绘制图线，按照 GB/T 146910-1993书写数字和汉字，按照 GB/T 4458.4-1984和 GB/T 16675.2-1996标注尺寸；
3. 光滑连接：两个圆弧连接的连接处要光滑，线条粗细要一致
4. 图面整洁，没有明显的污点；

四、相关内容指导

1. 绘图工具的清洁

图板、丁字尺、三角板等绘图工具使用一段时间后，经常会残留污渍，为了保证大作业的干净整洁，需要对绘图工具进行清洁。

图板：先撕掉残留在表面的透明胶带，再用柔软卫生纸擦拭表面；

尺子：先用自来水清洗，再用柔软的卫生纸擦拭干净即可，注意不要折断丁字尺；

2. A3图纸的修正

国标GB/T14689—1993规定A3图纸标准尺寸为420mm×297mm，但从A0图纸裁切而成的A3图纸尺寸往往比标准尺寸稍大，画图之前需要对其修正。

A3修正办法是用细实线在图纸上画出420mm×297mm的**边界线**，如右图所示；

裁切后的边界

修正后的边界线

图框线 粗实线

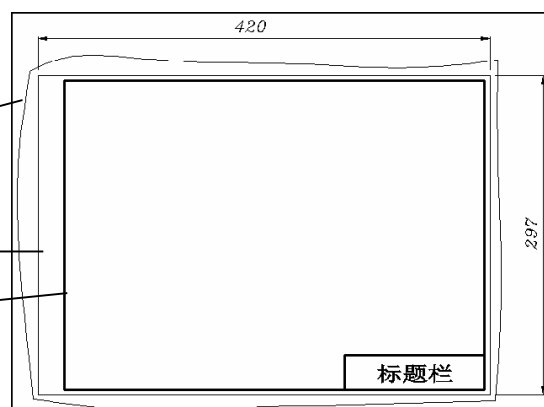


图1-1 A3图纸的修正

3. 固定图纸的位置要求

(1)上下方向的位置要求

与图板下边缘的距离大于丁字尺的宽度，保证图纸边界线可以用丁字尺绘制出来；

(2)左右方向的位置要求：尽可能靠近丁字尺的头部，即靠近图板的左边缘，因为丁字尺的末端绘图误差较大；

(3)考虑丁字尺的长度：丁字尺末端应超出图纸的右边缘，确保右边界线和图框线可以绘制出来；

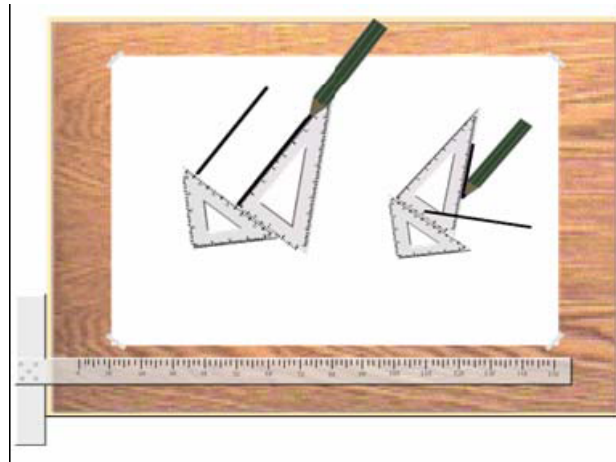


图1-2图纸的正确固定

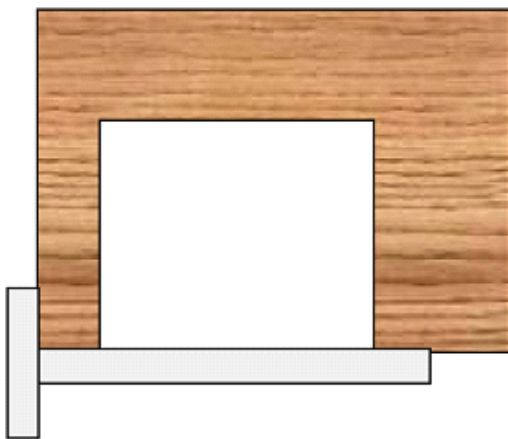


图1-3 图纸上下位置固定不正确

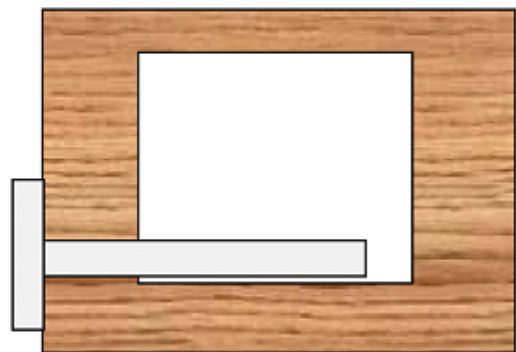


图1-4 图纸左右位置固定不正确

4. 丁字尺的使用

(1)丁字尺是绘图的常用工具，它是将尺头和尺身通过铆接或粘结而成，使用时要轻拿轻放，不要损坏丁字尺。

(2)将尺头靠紧图板的左边,上下垂直移动画水平线,不能用丁字尺画垂直线;

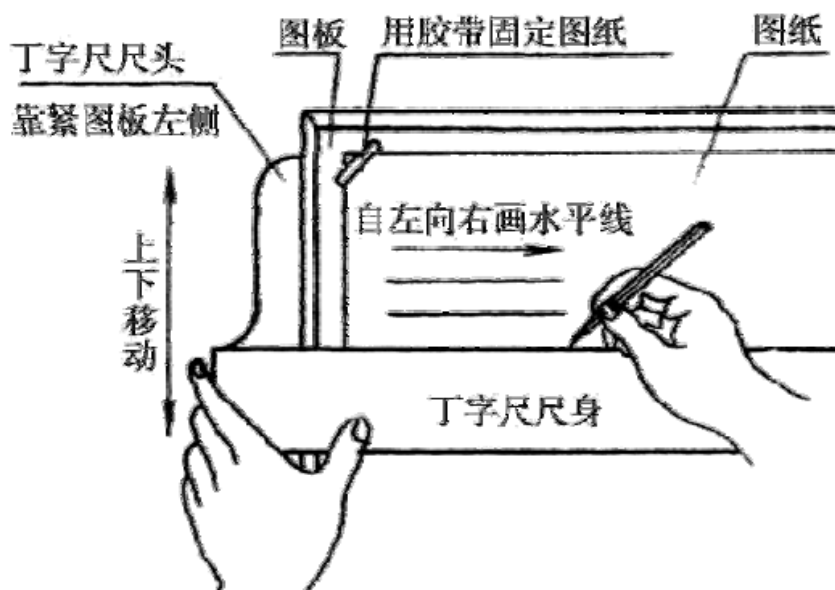


图1-5丁字尺的正确使用

5. 标题栏格式采用教材中所推荐的简化标题栏。

6. 图线

图线宽度分粗细两种,粗线优先选用 $d=0.7\text{mm}$,细线为 $d/2$ 。




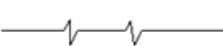
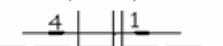

粗实线		可见轮廓线
细实线		尺寸线、剖面线
波浪线		断裂边界线
双折线		断裂边界线
虚线		不可见轮廓线
细点画线		轴线、对称中心线

图1-6 常见图线样式

7. 字体 (GB/T14691-1993)

(1)基本要求:字体端正、笔画清楚、间隔均匀、排列整齐。

(2)汉字:汉字为长仿宋体,并采用国家正式公布的简化字,字宽约为字高的 $2/3$ 。字高不小于3.5号,以免字迹不清。

8. 尺寸标注参照 (GB/T 4458.4-1984)

9. 中间弧圆心的确定办法

中间弧是已知一个圆心坐标和半径的圆弧,通过“外切半径相加”和内切半

径相减“的办法来确定圆弧的圆心。

五、绘图步骤

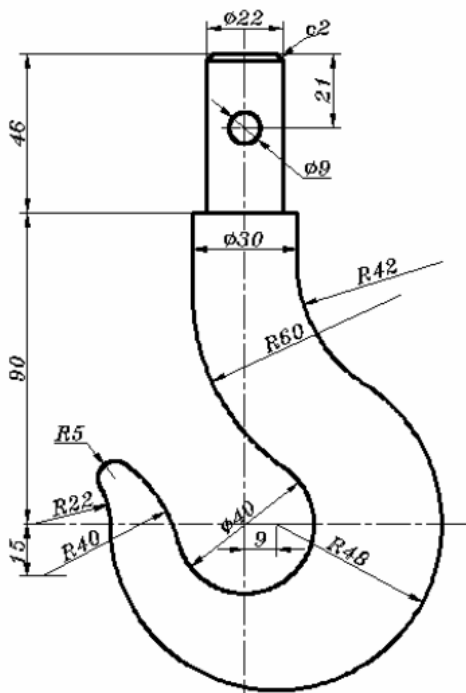
(1)合理布图：依据零件轮廓大小和尺寸标注的位置确定中心线的位置。

(2)依次从上往下、从左往右用H铅笔绘制图形底线；

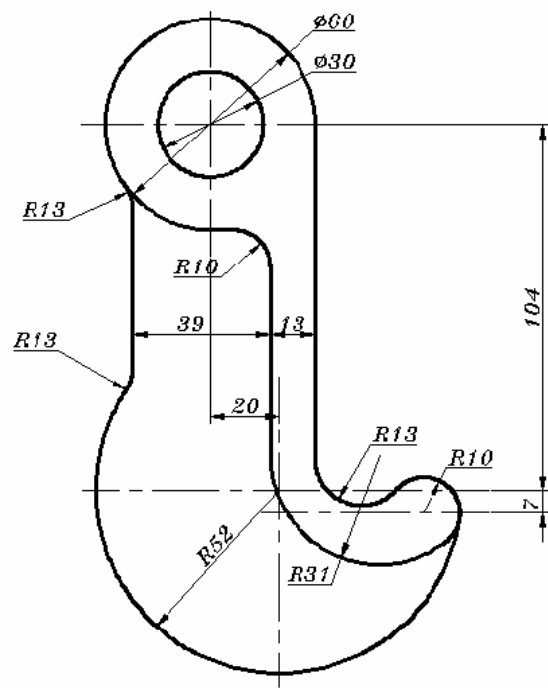
(3)合理标注尺寸。

(4)检查加深：依据原图检查是否有遗漏和画图错误，使用2B铅笔加深粗实线，注意加深的顺序为：水平线从上往下，垂直线从左往右。

六、圆弧连接大作业选题内容



承重吊钩



右吊钩

训练二 组合体绘图训练

一、训练内容

1. 依据轴测图或模型，绘制组合体的三视图；
2. 分析零件的结构形状，找出基准面，合理的标注尺寸；
3. 依据零件的大小确定绘图比例，使用A3幅面的图纸；
4. 图名：组合体；

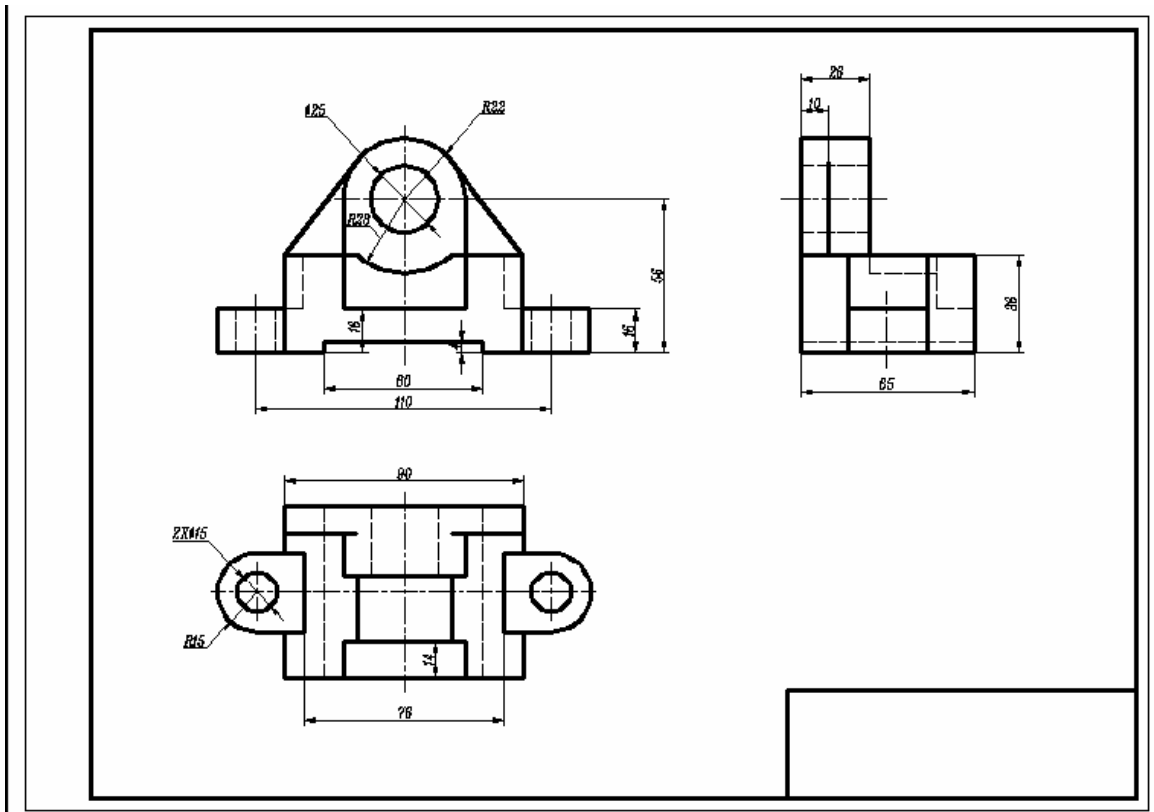


图2-1 组合体大作业内容布图

二、目的

1. 掌握运用形体分析法和线面分析法分析组合体；
2. 进一步巩固轴测图和三视图之间的对应关系；
3. 进一步熟练掌握用“短粗线”法来表示尺寸标注的箭头；
4. 掌握尺寸标注的顺序和方法；

三、基本要求

1. 所标注的尺寸要能够完整表达零件的内外形体；
2. 按照 GB/T 4458.4-1984和 GB/T 16675.2-1996 标注尺寸，力求达到正确、完整和清晰；

3. 图面整洁，不能有明显的污点；

四、相关内容指导

1. 两表面相切的画法：相切处无线！

2. 两表面相贯的画法：相贯线向两圆柱中半径较大的圆柱弯曲！

3. 尺寸分类与尺寸基准

定形尺寸：确定组合体各组成部分的长、宽、高三个方向的尺寸；

定位尺寸：确定各组成部分的位置的尺寸；

总体尺寸：组合体外形的总长、总宽、总高的尺寸；

尺寸基准：标注尺寸的起点。

4. 标注尺寸要注意的问题

(1) 尺寸应尽量标注在形状特征明显的视图上；

(2) 圆弧形底板不标注总长；

(3) 尺寸标注要排列整齐。

五、大作业选题和重难点提示

1. 组合体一内容及提示：

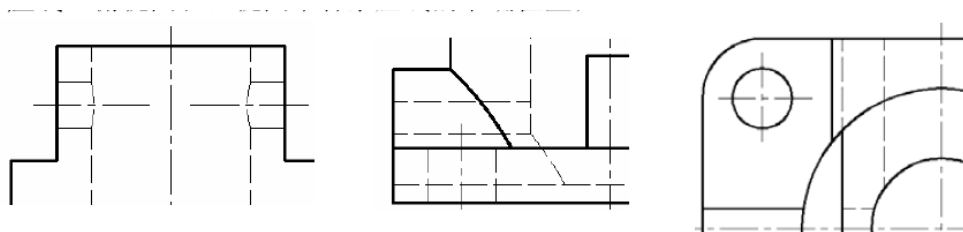
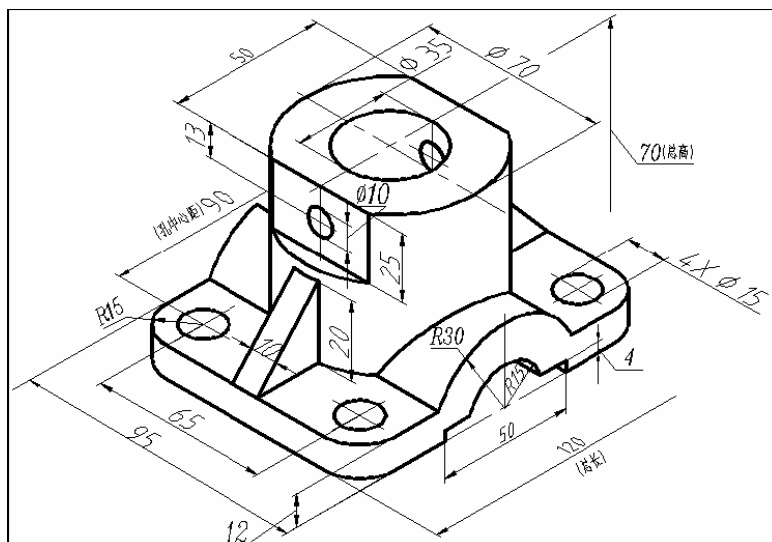


图2-2 组合体1轴测图

相贯线：主视图中 $\phi 35$ 与 $\phi 10$ 的内相贯线，左视图中R30与 $\phi 70$ 的外相贯线的内相贯线，相贯线弯向半径较大的圆柱一侧，见图2-3；

图2-3 组合体1绘图提示

图2-3 组合体1绘图提示



截交线: 主视图中, $\phi 70$ 圆柱与宽度10的肋板截交后, $\phi 70$ 圆柱的正面转向线有何变化, 提示可以简化, 不画截交线, 见图2-3;

虚线: 俯视图和左视图中各条虚线的准确位置, 见图2-3;

尺寸标注: 半径尺寸不能表示数量, 截交线上不能标尺寸, 虚线上尽量不要标尺寸, 见图2-4;

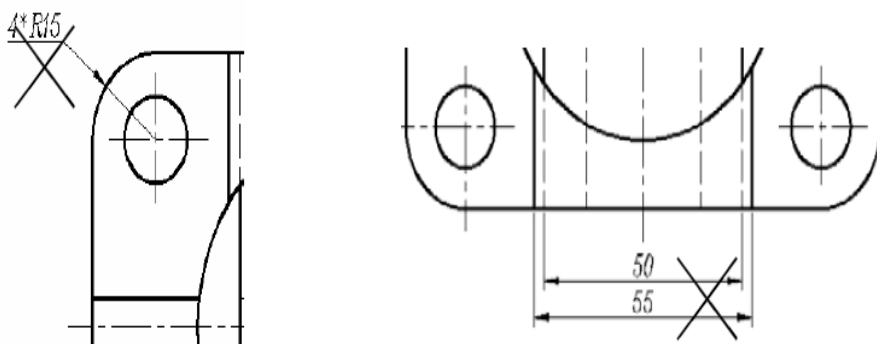


图2-4 组合体1尺寸标注提示

2. 组合体二内容及提示

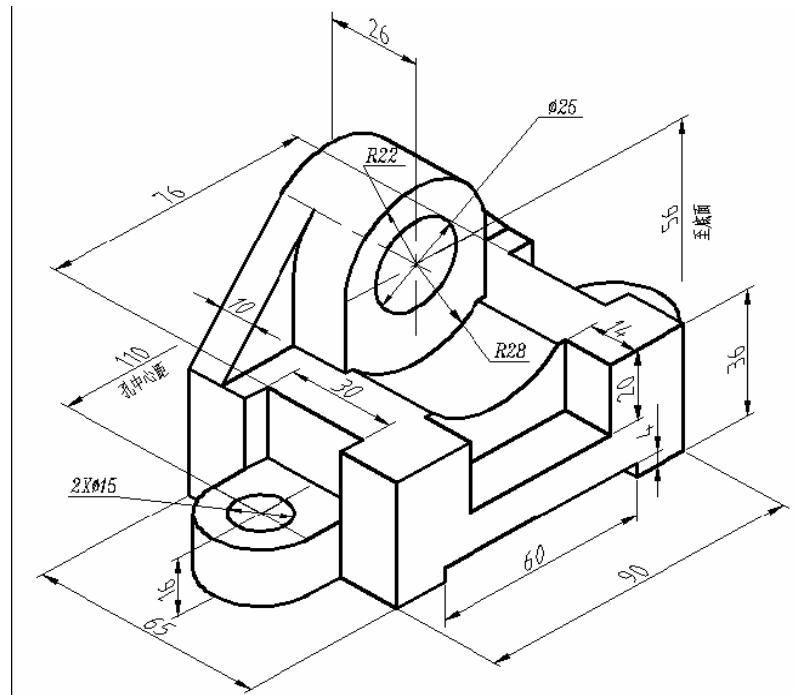


图2-5组合体1尺寸标注提示

相切：宽度为10的两块肋板与R22的圆柱相切，注意切线的起始位置和终止位置；

截交线：注意R28的圆弧与高度为36的水平面的截交线的水平投影的画法；

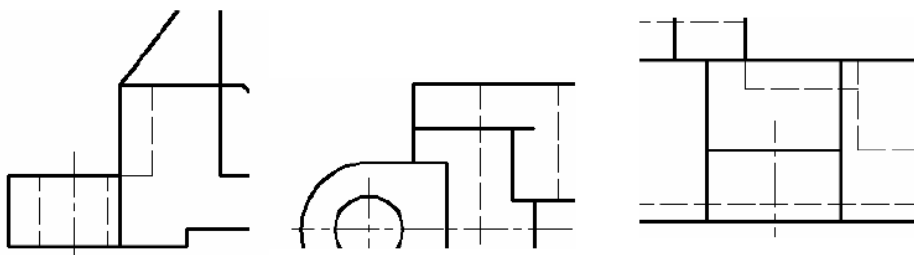


图2-6 组合体2绘图提示

总高度尺寸：因为R22的半圆柱的存在，不能直接标注总高度尺寸，总高度尺寸计算得到，同理也不标注总长尺寸；

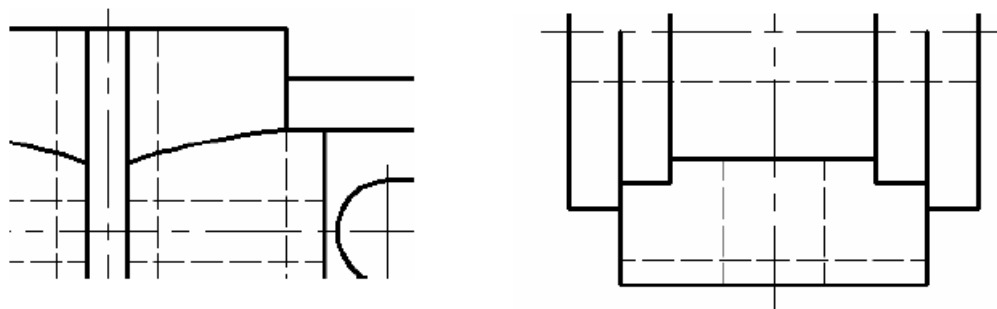


图2-9 组合体3绘图提示

尺寸标注：因为R20的存在，不能直接标注总高度尺寸，由 $70+R20$ 计算得到；

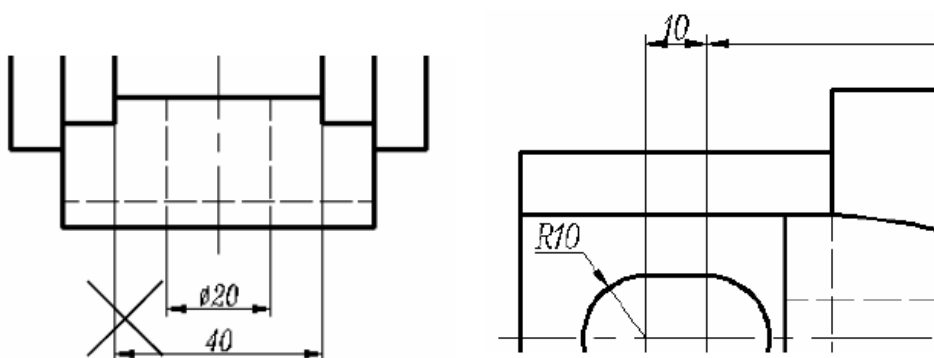


图2-10 组合体3的尺寸标注提示

4. 组合体四内容及提示

相贯线：左视图中 $\phi 52$ 与 $\phi 140$ 的外相贯线；

截交线：主视图中，宽度为24的肋板与 $\phi 140$ 圆柱相交，只有截交线，注意圆的正面转向线的变化；

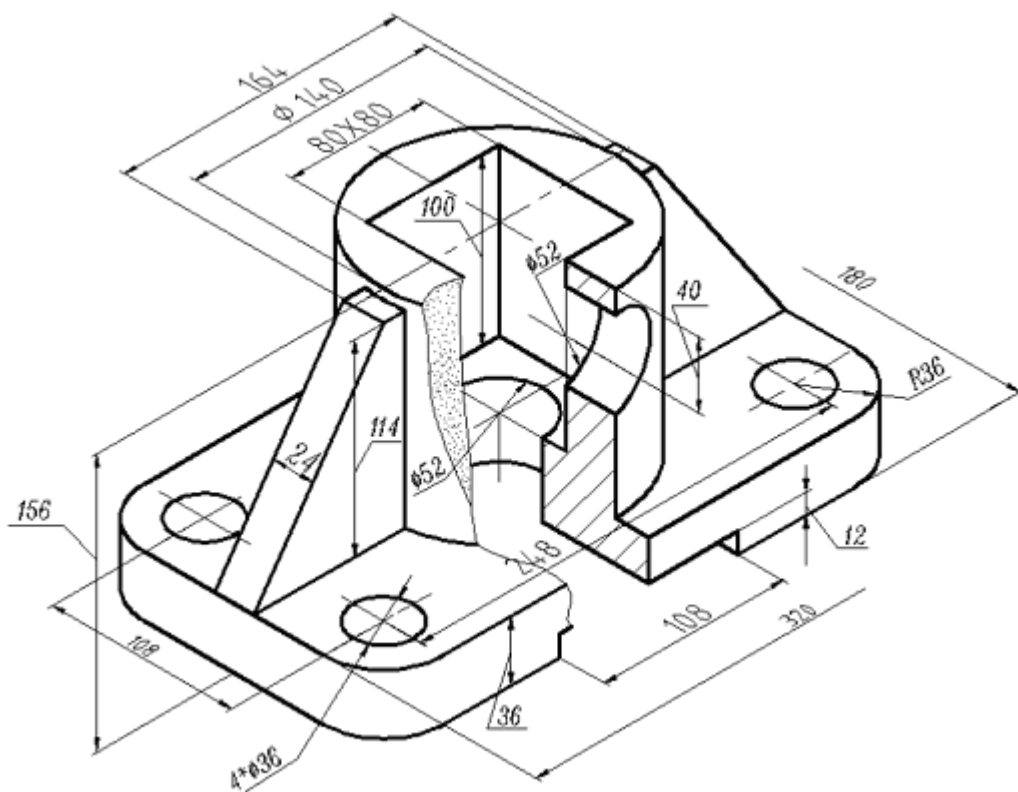


图2-11组合体4轴测图

六 绘图步骤

1. 对所给的组合体进行形体分析，选择合适的主视图；
2. 依据轴测的大小，合理的布置三个视图位置，并预留出尺寸标注的位置，画视图的中心线和底面的位置线；
3. 逐步画出组合体各部分的三视图；
4. 分析标注尺寸的基准，合理标注尺寸（不要照搬轴测图上的尺寸）；
5. 完成底稿后，仔细检查，并用2B铅笔加深粗实线；

训练三 机件的常用表达方法训练

一、训练内容

1. 依据所给定的零件的三视图，合理运用剖视图、断面图和局部放大图等表达方法重新表达形体；
2. 读懂三视图原有尺寸，并依据新的表达方法重新合理标注尺寸；
3. 依据零件的大小确定绘图比例为 1:1 或 1:2，使用 A3 幅面图纸；
4. 图名：剖视图；

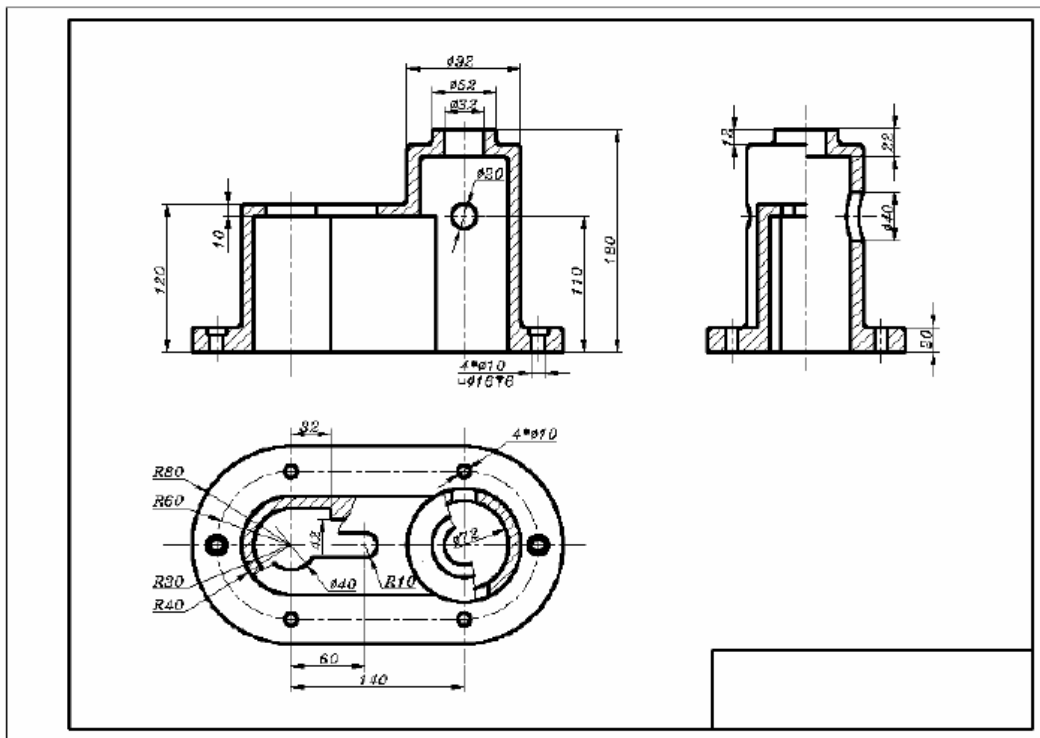


图3-1 表达方法训练内容

二、目的

1. 熟悉剖视图、断面图、局部视图和局部放大图等常用表达方法的概念；
2. 掌握合理运用常用表达方法重新表达零件；
3. 依据重新表达的零件，调整的原有尺寸的位置，做到更为清晰合理；
4. 掌握常用表达方法在图纸上的标记方法；

三、基本要求

1. 重新表达的机件要能够完整、正确和清晰的表达原有机件的内外形状和结构，要便于看图、绘图和标注尺寸；
2. 所有表达方法要符合《技术制图》国家标准 GB/T 17451-1998、GB/T

17452-1998 和 GB/T 17453-1998 的要求;

3. 合理布图, 图面整洁, 不能有明显的污点;

四、相关内容指导

1. 剖视图的适用范围和剖切标记;

a. 全剖视图——适合于表达内形, 条件是外形相对简单;

b. 半剖视图——内形外形都需要表达, 条件是形体结构要对称;

c. 用两个平行的平面剖切(俗称阶梯剖);

d. 用两个相交的平面剖切(俗称旋转剖);

2. 断面图: 只看到剖面区域, 鼠目寸光; 剖视图: 一直往后看, 目光长远;

五、大作业选题及重难点提示

1. 表达方法——内容及提示

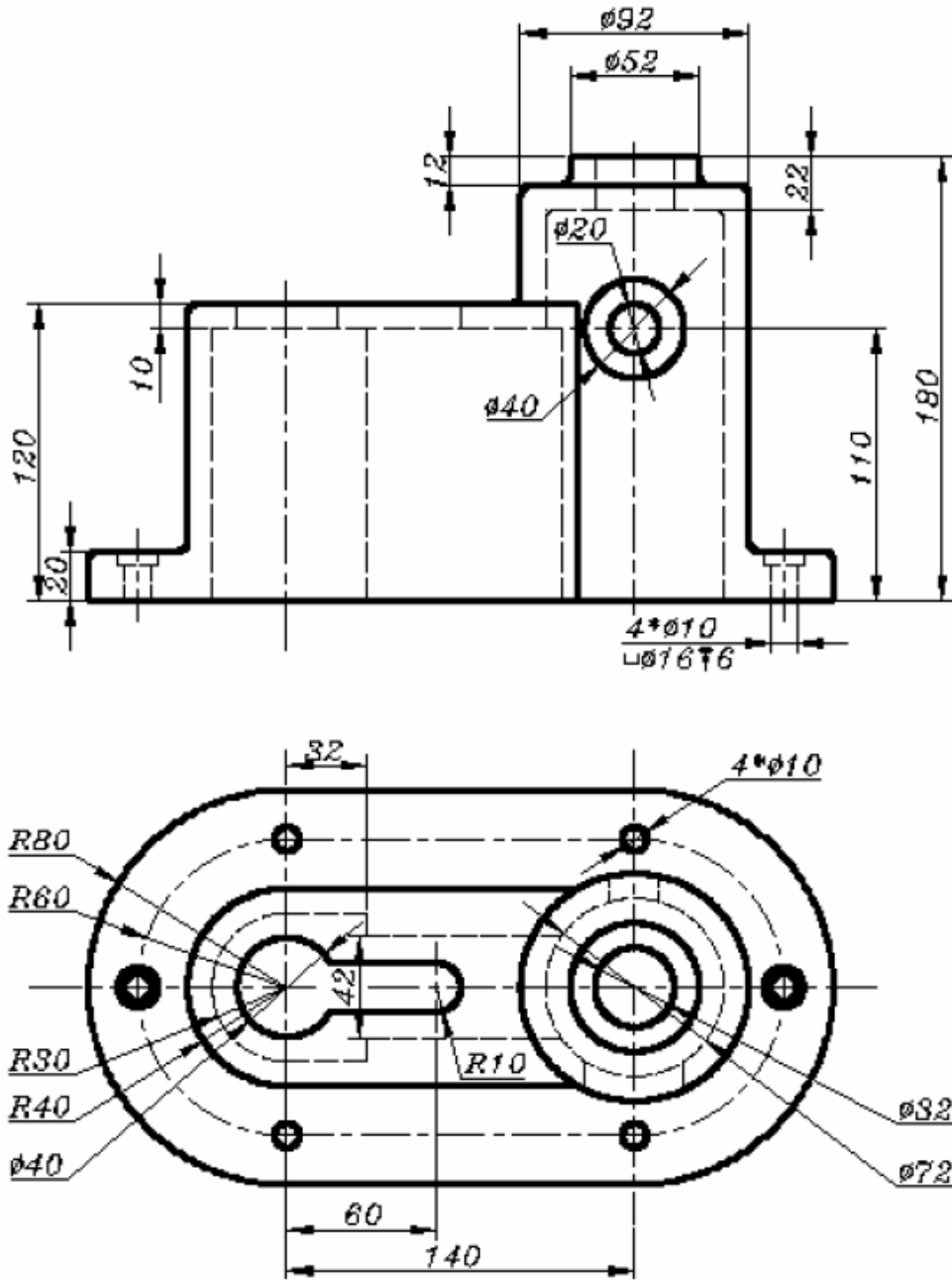


图3-2 表达方法选题1

主视图：采用单一剖切面的全剖视图，因为形体前后对称，主视方向外形相对简单，参考图3-3；

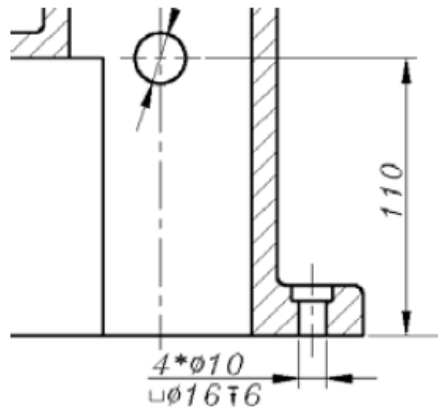


图3-3 主视图表达方法提示

俯视图：局部剖视图，将虚线部位剖开表达清楚，参考图3-4；

左视图：采用全剖，采用经过 $\Phi 40$ 和 $\Phi 32$ 的阶梯剖面，目的是更清楚的表达形体，并调整尺寸标注位置；

少量调整尺寸标注：重新调整尺寸标注的位置，避免在虚线上标注尺寸，并且要标注在显著的位置特征上，总体上看上去美观大方；

绘图比例：通过计算可知，A3图纸无法1:1绘图，故采用1:2，足以每个尺寸都缩小1/2；

2. 表达方法二内容及提示

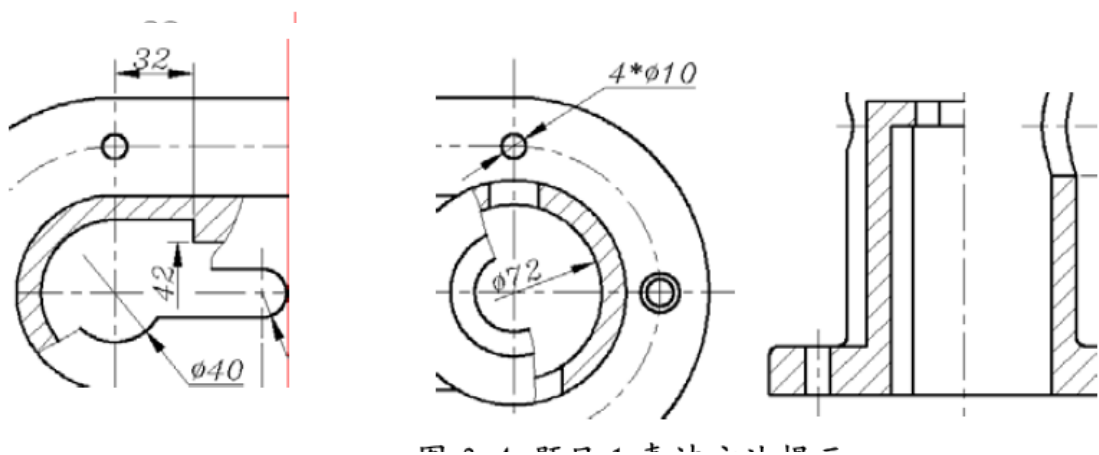


图3-4 题目1表达方法提示

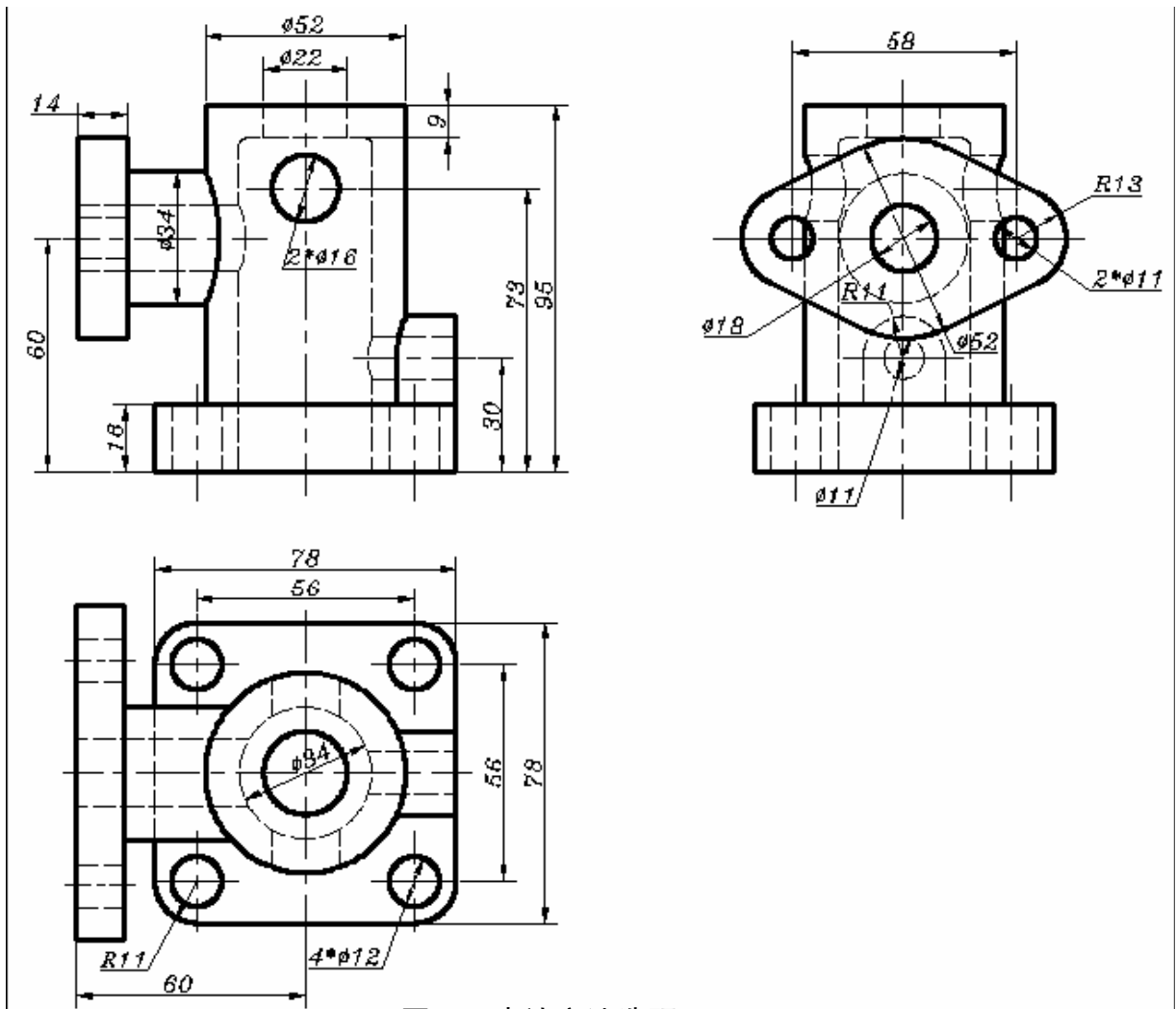


图3-5 表达方法选题2

主视图：单一剖切面全剖，重点是表达内部空腔的结构；

俯视图：画半剖视图，采用两剖切平面A-A剖切，注意在主视图的相应位置作剖切标记，参考图3-6。

左视图：画出外形即可，并对底板上的4*φ12的孔作局部剖；

局部视图：为了表达形体右部的U形凸台，增加一个B向局部视图予以充分表达；

少量调整尺寸标注：因为对形体进行了重新表达，一些尺寸标注可以调整到显著位置特征上，如U形凸台的2个定形尺寸等；

绘图比例：通过计算可知，A3图纸可以1:1绘图，注意合理布图；

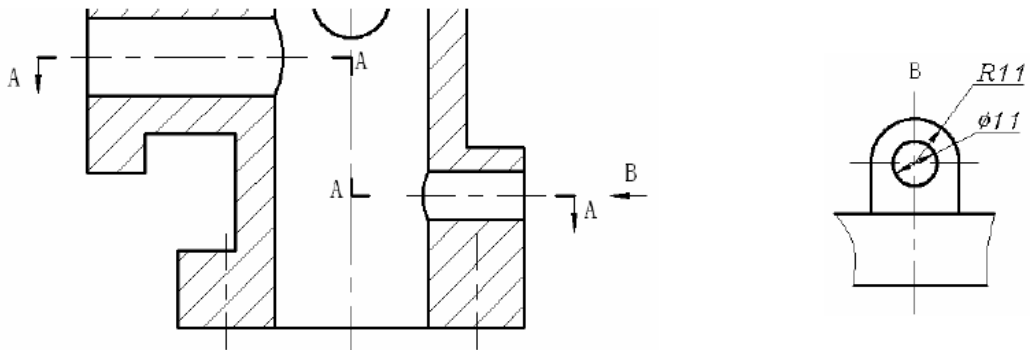


图3-6 表达方法选题2

3. 表达方法三内容及提示:

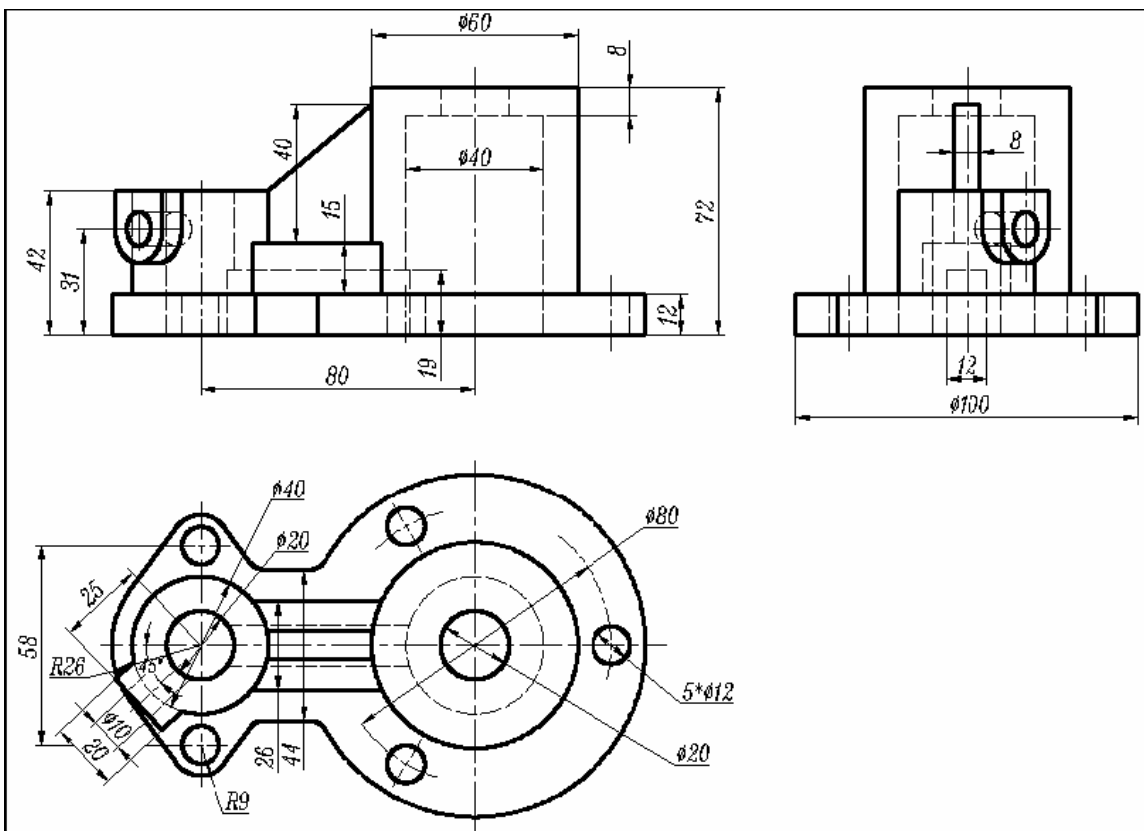


图3-7表达方法选题3

主视图: 两相交剖切面全剖（旋转剖），重点是表达内部空腔的结构和45°方向的凸台，注意在俯视图的相应位置作剖切标记；

俯视图: 画外型，重点是表达底板及外形；

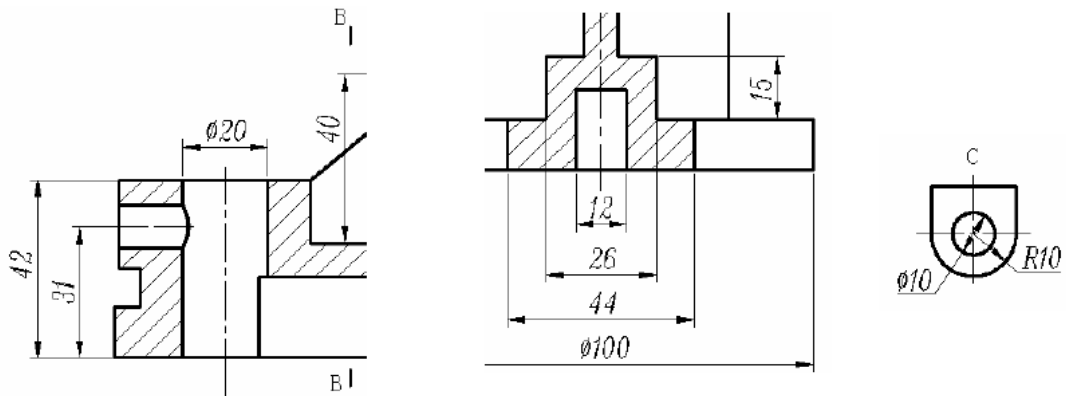
左视图: 在肋板处作全剖视图，是表达内部空腔，也可以用断面图代替左视图；

局部视图: 为了表达形体左部的U型凸台，增加一个C向局部视图予以表达，

并为尺寸标注提供方便；

少量调整尺寸标注：原俯视图中45°方向的凸台的尺寸与其它尺寸形成交叉，因此需要调整，同时12、26和44等宽度尺寸也需要调整，使俯视图看上去更为简洁；

绘图比例：通过计算可知，A3图纸可以1:1绘图，注意合理布图；



五、绘图步骤

1. 读懂所给三视图，选择合理的表达方案和绘图比例；
2. 依据三视图的大小，重新布置各视图位置，并预留出尺寸标注的位置，画出视图的中心线和地面的位置线，逐步画出各视图，并作相应的剖且标记；
3. 重新调整尺寸标注的位置，在三个视图中合理分配，不要照搬原图上的尺寸；
4. 完成底稿后，仔细检查，并用2B铅笔加深粗实线。

大作业评分标准

- 一、图面质量：布局合理；图线符合国家标准要求，图面整洁，30%；
- 二、尺寸标注：标注合理；符合国家标准要求，20%；
- 三、表达方案：方案合理；表达形式简明扼要，20%；
- 四、图样画法：图样画法正确；符合国家标准要求，30%。

AutoCAD2004 上机指导

上机指导一：AutoCAD2004 操作基础

一、上机目的和要求

1. 熟悉 AutoCAD 2004 的工作界面；
2. 熟悉图形显示控制的基本命令；
3. 掌握绘图界限、绘图单位、图层等绘图环境设置的基本方法；
4. 掌握图层操作的基本方法；
5. 完成 A3 图幅的样板图设置，并保存到模板文件夹（即以“A3.dwt”为文件名存盘），供今后绘图时选用；
6. 在 A3 样板图中完成粗实线图层、中心线图层、虚线图层、细实线图层、剖面线图层、文本标注图层、尺寸标注图层的设置。

二、上机内容

1. 设置一个图形单位，要求长度单位为小数点后一位，角度单位为十进制度数后两位小数。

2. 按下表要求设置图层名、颜色、线型、线宽。

图层名	颜色	线型	线宽
0 层	黑色	Continuous	默认
粗实线	黑色	Continuous	0.5
细实线	蓝色	Continuous	0.25
中心线	红色	Center	0.25
虚线	黄色	Dashed	0.25
汉字	青色	Continuous	默认
尺寸标注	品红	Continuous	默认

3. 绘制 A3 图幅及标题栏（标题栏尺寸见下图，文字暂不标注）。



4. 将上述设置内容创建为样板文件。

三、上机基本步骤

1. 在实验室指定的盘符下创建一个上机专用文件夹，并将今后所有的上机结果保存到此文件夹，以便教师修改。

例如：C:\机制 031\学号姓名

2. 仔细观察 AutoCAD 的工作界面，了解组成部分的主要特点，学习各部分用途。


3. 建立新图名，设置绘图单位、图层名、颜色、线型、线宽和 A4 图幅的绘图界限等。

4. 绘制 A3 图幅界线（297×420）。

5. 将上述设置内容创建为样板文件 A3.dwt。

思考题

一、选择题

1. 在 AutoCAD 的菜单中，如果菜单命令后跟有  符号，表示（ ）。

- A: 在命令下还有子命令 B: 该命令具有快捷键
C: 单击该命令可打开一个对话框 D: 该命令在当前状态下不可使用

2. 使用“选项”对话框中的（ ）选项卡，可以设置中文版 AutoCAD2006 的窗口元素、布局元素。

- A: “系统 ” B: “显示” C: “打开和保存” D: “草图”

3. 如果一张图纸的左下角点为（10，10），右上角点为（100，80），那么该图纸的图限范围为（ ）。

- A: 100*80 B: 70*90 C: 90*70 D: 10*10

二、问答题

1. 在中文版 AutoCAD2004 中打开一个图形文件的方式有几种？
2. 简述如何在“选项”对话框中设置绘图窗口的背景颜色。

上机指导二：二维图形绘制

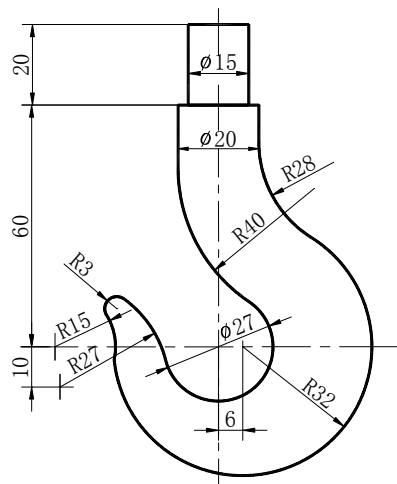
一、上机目的和要求

1. 掌握常用二维绘图命令的使用方法；

2. 掌握常用二维编辑命令的使用方法；
3. 运用常用二维绘图命令和二维编辑命令绘制二维图。

二、上机内容

综合利用各种绘图工具，绘制右示图形。



上机指导三：文本标注与图块应用

一、上机目的和要求

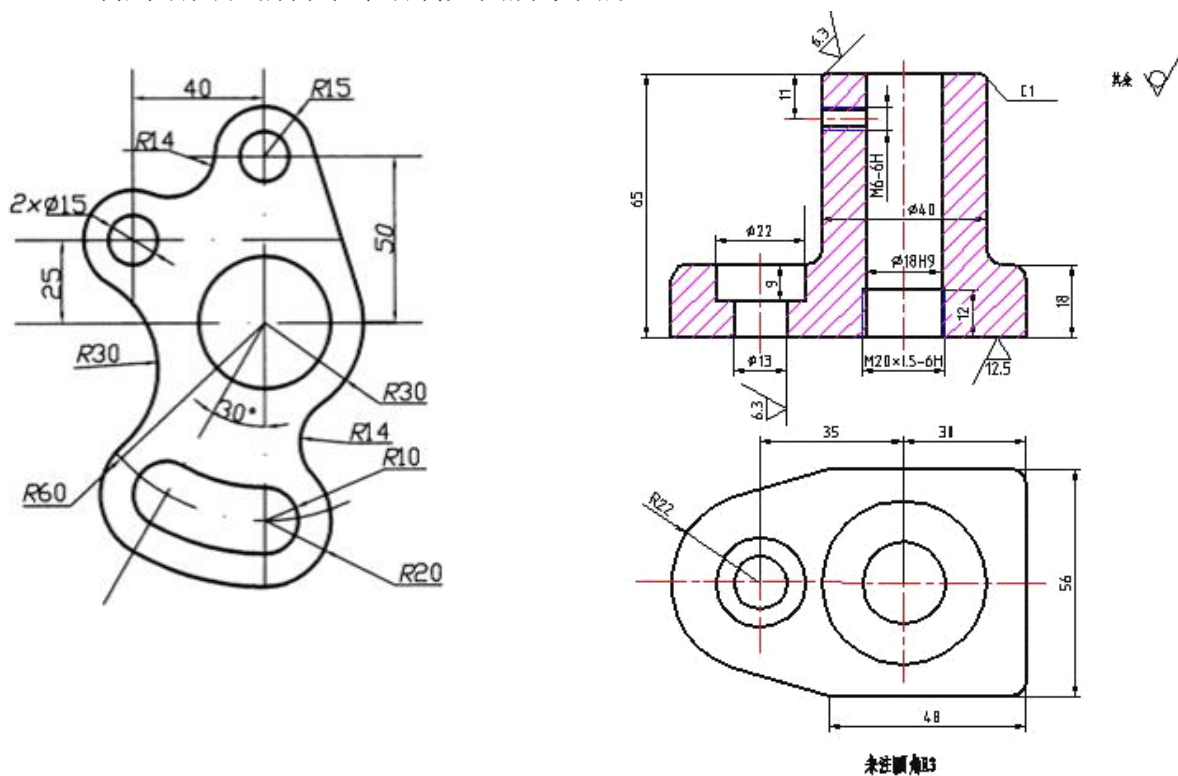
1. 掌握高级绘图命令；
2. 掌握设置文本样式的方法；
3. 掌握文本标注与编辑的基本方法；
4. 掌握定义图块的方法；
5. 掌握定义图块属性的方法；
6. 掌握插入图块的方法和技巧；
7. 掌握图块的编辑方法。

二、上机内容

1. 填写如图所示标题栏中的文字。

(图名)		比例		(图号)
		件数		
班级		材料		
制图		(校名)		
审核				

2. 利用绘图和编辑命令绘制如图所示图形。



三、上机基本步骤

1. 创建符合国家标准的文本样式：将字体设为“仿宋”体，宽度比例为 0.67，为能随时修改文本的高度，建议将字高设为“0”；
2. 填写如图所示标题栏中的文字。

3. 绘制粗糙度符号；完成粗糙度的属性定义；用写块命令 (WBlock) 定义粗糙度图块；

4. 显示图形编辑命令工具条,必要时关闭不用的工具条,以保证适当大小的绘图区域;参照内容 2 中的各个图形完成图形的绘制与编辑(不注尺寸)。

5. 用插入命令完成粗糙度图块在各零件图中的定位;

6. 应用属性编辑命令,对部分粗糙度的属性位置、属性旋转角度等进行修改,使粗糙度标注符合国家标准的规定。

思考题

一、选择题

1. 中文版 AutoCAD2004 中,“孤岛检测样式”有()。

A: 普通、外部和忽略 B: 普通、内部和忽略

C: 内部、外部和忽略 D: 普通、内部和外部

2. 填充边界的编辑方式有哪些?()

A: 使用夹点编辑 B: 使用基本图案编辑

C: 使用特性窗口编辑 D: 直接在边界区域画出填充图案

3. 在 AutoCAD 中创建文字时,圆的直径的表示方法是()。

A: %%D B: %%P C: %%C D: %%R

4. 要在 AutoCAD 的绘图窗口中创建字符串“ $\Phi 200 \pm 0.05$ ”,下列正确的命令是()。

A: %%U200%%U0.05 B: %%C200%%D0.05

C: %%O200%%D0.05 D: %%C200%%P0.05

5. 图块作为 AutoCAD 中的一类特殊对象,具有那些特性()。

A: 建立常用符号、部件的标准库 B: 节省磁盘存储空间

C: 便于图形的修改 D: 便于携带属性

二、问答题

1. 如何启动绘制多段线的命令?

2. 图案填充有哪几种基本形式?

3. 在中文版 AutoCAD2004 中,如何创建文字样式?

4. 在中文版 AutoCAD2004 中,如何创建多行文字?

三、上机基本步骤

1. 完成上机内容中各零件图的绘制与编辑修改；
2. 创建符合国家标准文本样式：将字体设为“仿宋”体，宽度比例为0.67，为能随时修改文本的高度，建议将字高设为“0”；
3. 建立尺寸标注所需的文本样式：将字体设为“italic”（斜体），宽度比例为0.67，字高为“0”；
4. 完成符合国家标准尺寸标注样式的设置；
5. 在零件图中标注文本、尺寸、尺寸公差和形位公差。

思考题

一、填空题

1. 一个完整的尺寸标注对象_____、_____、_____、_____等4部分组成。
2. 标注样式管理器有_____、_____、_____等3种启动方式。

二、问答题

1. 尺寸标注与被标注对象有几种关联方式，它们之间有何区别？
2. 如何创建一个与当前标注样式不同的尺寸标注对象，但又不重新创建一个标注样式？

上机指导五：图形布局与输出

一、上机目的和要求

1. 了解“Plot”对话框的操作方法；
2. 掌握图纸空间的图形布局；
3. 掌握常用命令的使用技巧；

二、上机内容

1. 练习在打印前进行完全预览和局部预览。

2. 将绘制的零件图任选一个，按 A4 图幅、纵向打印的要求进行布局页面设置，并打印输出。

三、上机基本步骤

1. 调入图形文件。

2. 在布局 1 插入图框。如预先画好的 A4 图框块文件 A4base1.dwg，插入点“0,0”，比例均为“1”，旋转角度为“0”。


3. 调入“视口工具栏”。

4. 建立单个视口，图形布置方式为布满图纸图框内的整个区域。

5. 切换到“浮动视口”空间——双击“浮动视口”区，选择“视口工具栏”右侧的比例为 1:2。

6. 因为“浮动视口”的缩放比例不是 1:1，而是缩小一倍比例，尺寸和箭头也比正常大小缩小一倍很小，所以必须进行标注更新，让“浮动视口”的尺寸文字和箭头自动将缩放比例调整成标注管理器的默认值。

1) 先检查标注样式管理器

2) 执行标注更新命令 ，在“浮动视口”中直接框选所有图形即可。尺寸立即自动调整为默认的大小。


7. 锁定“浮动视口”，以防不小心滚轮改变了原有缩放比例。碰选“浮动视口”框线，单击鼠标右键出现快捷菜单，选择“显示锁定”→“是”

8. 隐藏“浮动视口”框线。新建一个图层“VPORIS”，并将“浮动视口”矩形框线更换到此图层。将此图层“关闭”或“冻结”。

9. 从菜单栏，单击“文件”→“页面设置”，调出“页面设置管理器”

10. 单击页面设置管理器右侧的“新建”，出现新建页面设置对话框。输入名后按“确定”，出现“页面设置”对话框

11. 在“页面设置”对话框，选择打印机、A4 图纸、范围、比例 1:1 和 monochrome.ctb，按“确定”，并关闭页面管理器。

12. 以 PLOT 命令，或单击工具条中的打印按钮 ，调出打印对话框，选择页面设置名称为“moban1-1”，再按“确定”，即开始打印。

思考题

1. 如何在布局上排列 4 个等大、布满整个布局的视口？（提示：视图→视口→四个视口。）

2. 现根据需要，欲使图形中所有红色图形的打印线宽为 0.75，如何实现这一要求？

食品安全检测与评价教学实习 2 指导书

编者：于修焯 张建新 席美丽 欧阳韶晖

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

第一部分 近红外光谱

现代近红外光谱（NIR）分析技术是近年来分析化学领域迅猛发展的高新分析技术，越来越引起国内外分析专家的注目，在分析化学领域被誉为分析“巨人”，它的出现可以说带来了又一次分析技术的革命。近红外区域是人们最早发现的非可见光区域。但由于物质在该谱区的倍频和合频吸收信号弱，谱带重叠，解析复杂，受当时的技术水平限制，近红外光谱“沉睡”了近一个半世纪。直到 20 世纪 60 年代，随着商品化仪器的出现及 Norris 等人所做的大量工作，提出物质的含量与近红外区内多个不同的波长点吸收峰呈线性关系的理论，并利用 NIR 漫反射技术测定了农产品中的水分、蛋白、脂肪等成分，才使得近红外光谱技术曾经在农副产品分析中得到广泛应用。到 60 年代中后期，随着各种新的分析技术的出现，加之经典近红外光谱分析技术暴露出的灵敏度低、抗干扰性差的弱点，使人们淡漠了该技术在分析测试中的应用，此后，近红外光谱进入了一个沉默的时期。70 年代产生的化学计量学(Chemometrics)学科的重要组成部分——多元校正技术在光谱分析中的成功应用，促进了近红外光谱技术的推广。到 80 年代后期，随着计算机技术的迅速发展，带动了分析仪器的数字化和化学计量学的发展，通过化学计量学方法在解决光谱信息提取和背景干扰方面取得的良好效果，加之近红外光谱在测样技术上所独有的特点，使人们重新认识了近红外光谱的价值，近红外光谱在各领域中的应用研究陆续展开。进入 90 年代，近红外光谱在工业领域中的应用全面展开，有关近红外光谱的研究及应用文献几乎呈指数增长，成为发展最快、最引人注目的一门独立的分析技术。由于近红外光在常规光纤中具有良好的传输特性，使近红外光谱在在线分析领域也得到了很好的应用，

并取得良好的社会效益和经济效益，从此近红外光谱技术进入一个快速发展的新时期。

一、近红外光谱分析原理

近红外光（Near Infrared, NIR）是介于可见光（VIS）和中红外光（MIR）之间的电磁波，按 ASTM（美国试验和材料检测协会）定义是指波长在 780~2526nm 范围内的电磁波，习惯上又将近红外区划分为近红外短波（780~1100nm）和近红外长波（1100~2526nm）两个区域。近红外光谱属于分子振动光谱的倍频和主频吸收光谱，主要是由于分子振动的非谐振性使分子振动从基态向高能级跃迁时产生的，具有较强的穿透能力。近红外光主要是对含氢基团 X-H（X=C、N、O）振动的倍频和合频吸收，其中包含了大多数类型有机化合物的组成和分子结构的信息。由于不同的有机物含有不同的基团，不同的基团有不同的能级，不同的基团和同一基团在不同物理化学环境中对近红外光的吸收波长都有明显差别，且吸收系数小，发热少，因此近红外光谱可作为获取信息的一种有效的载体。近红外光照射时，频率相同的光线和基团将发生共振现象，光的能量通过分子偶极矩的变化传递给分子；而近红外光的频率和样品的振动频率不相同，该频率的红外光就不会被吸收。因此，选用连续改变频率的近红外光照射某样品时，由于试样对不同频率近红外光的选择性吸收，通过试样后的近红外光线在某些波长范围内会变弱，透射出来的红外光线就携带有机物组分和结构的信息。通过检测器分析透射或反射光线的光密度，就可以确定该组分的含量。

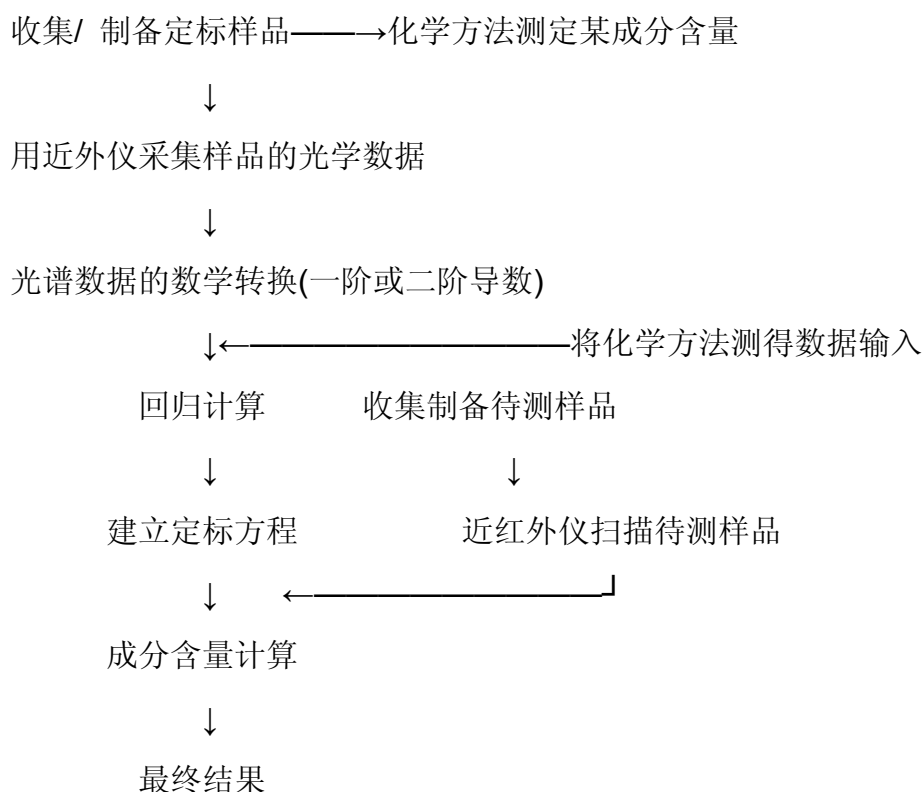
近红外光谱分析技术包括定性分析和定量分析，定性分析的目的是确定物质的组成与结构，而定量分析则是为了确定物质中某些组分的含量或是物质的品质属性的值。与常用的化学分析方法不同，近红外光谱分析法是一种间接分析技术，是用统计的方法在样品待测属性值与近红外光谱数据之间建立一个关联模型(或称校正模型，**Calibration Model**)。因此在对未知样品进行分析之前需要搜集一批用于建立关联模型的训练样品(或称校正样品，**Calibration Samples**)，获得用近红外光谱仪器测得的样品光谱数据和用化学分析方法(或称参考方法，**Reference method**)测得的真实数据。其工作原理是，如果样品的组成相同，则其光谱也相同，反之亦然。如果我们建立了光谱与待测参数之间的对应关系(称

为分析模型），那么，只要测得样品的光谱，通过光谱和上述对应关系，就能很快得到所需要的质量参数数据。分析方法包括校正和预测两个过程：

（1）在校正过程中，收集一定量有代表性的样品（一般需要 80 个样品以上），在测量其光谱图的同时，根据需要使用有关标准分析方法进行测量，得到样品的各种质量参数，称之为参考数据。通过化学计量学对光谱进行处理，并将其与参考数据关联，这样在光谱图和其参考数据之间建立起一一对应映射关系，通常称之为模型。虽然建立模型所使用的样本数目很有限，但通过化学计量学处理得到的模型应具有较强的代表性。对于建立模型所使用的校正方法视样品光谱与待分析的性质关系不同而异，常用的有多元线性回归，主成分回归，偏最小二乘，人工神经网络和拓扑方法等。显然，模型所适用的范围越宽越好，但是模型的范围大小与建立模型所使用的校正方法有关，与待测的性质数据有关，还与测量所要求达到的分析精度范围有关。

（2）在预测过程中，首先使用近红外光谱仪测定待测样品的光谱图，通过软件自动对模型库进行检索，选择正确模型计算待测质量参数。

近红外仪定标及样品分析的流程如下：



从上述流程图可以看出,近红外光谱分析技术,其实就是一种间接的相对分析,

通过收集大量具有代表性的标准样本,通过严格细致的化学分析测出必要的数据,再通过计算机建立数学模型,即定标,以最大限度反应被测样本群体常态分布规律,然后再通过该数学模型或定标方程,预测未知样品的所需数据。

二、实习目的。

- 1、了解近红外光谱仪的工作原理。
- 2、掌握近红外光谱仪操作规程及软件的使用。
- 3、掌握红外光谱仪定量分析的全过程。

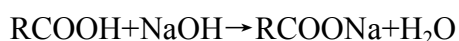
(酱油各理化指标检测可参照有关国标进行)

酱油中总酸的测定及氨基氮的测定

一、酱油总酸的测定

1. 原理

用标准氢氧化钠溶液滴定酱油中多种有机酸,从其消耗量计算出酸度,以乳酸来表示其含量反应如下:



用酚酞作指示剂,滴定至溶液呈现浅红色,30s不褪色为终点。根据所消耗标准碱溶液的浓度和体积,计算样品中酸的质量分数(%)。

2. 试剂

- (1) 1%酚酞乙醇溶液
- (2) 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液

3. 操作方法

准确称取酱油样品 10ml,置于 100ml 烧杯中,加入 50ml 水和活性碳约 5 克(2 药勺)加热煮沸,过滤,用 30ml 热水洗涤活性碳,滤液于 100ml 容量瓶中定容。

准确吸取稀释溶液 10ml 于三角瓶中,加入 50ml 水及酚酞指示剂 3 滴,用 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定至呈微红色为终点,记录所消耗氢氧化钠的毫升数。另取水 50ml 做空白滴定。

$$\text{酱油总酸}(\text{g}/100\text{mL}) = \frac{C \cdot V \cdot K}{V_{\text{样}}} \times 100$$

式中 C —氢氧化钠标准溶液浓度 (mol/L)

V —滴定样品耗用氢氧化钠的量 - 滴定空白耗用氢氧化钠的量 (mL)
 V 样—样品测定时的+取用量 (ml)
 K —换算为适当酸的系数。乳酸 0.090

二、甲醛滴定法测定氨基氮含量

1. 原理

氨基酸含有酸性的 COOH 基, 也含有碱性的 NH₂ 基, 它们相互作用使氨基酸成为中性的内盐, 不能直接用碱液滴定它的羧基。当加入甲醛时, NH₃ 基与甲醛结合, 其碱性消失, 使 COOH 基显示出酸性, 可用氢氧化钠标准溶液滴定—NH₃⁺ 基上的 H⁺, 从而求出氨基氮含量。

2. 试剂

- (1) 1%酚酞乙醇溶液
- (2) 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液
- (3) 40%中性甲醛

3. 操作方法

准确称取酱油样品 10ml, 置于 100ml 烧杯中, 加入 50ml 水和活性碳约 5 克 (2 药勺) 加热煮沸, 过滤, 用 30ml 热水洗涤活性碳, 滤液于 100ml 容量瓶中定容。

准确吸取稀释溶液 10ml 于三角瓶中, 加入 50ml 水及酚酞指示剂 3 滴, 用 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定至初现微红色, 不记录所消耗氢氧化钠的毫升数。加入 40%中性甲醛 10ml, 摇匀, 放置 1min, 再用 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定至呈微红色, 记录所消耗氢氧化钠的毫升数 V_2 。

用同一条件以水代替酱油样品做空白对照滴定, 记录所消耗氢氧化钠的毫升数 V_1 。

4. 计算

$$X = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times \frac{14}{1000}}{V} \times 100$$

式中 X —样品中氨基氮含量 (g/100mL)

V_2 —加入甲醛后消耗氢氧化钠标准液的体积 (mL)

V_1 —空白滴定消耗氢氧化钠标准液的体积 (mL)

c —氢氧化钠标准液的浓度 (mol/L)

V —滴定用样品液取用量 (mL)

0.014—1mol/L 氢氧化钠溶液 1ml 相当的氮量

酱油中铵盐的测定

1. 原理

铵盐在弱碱性溶液中加热蒸馏，使氨游离蒸出，被硼酸溶液吸收，然后用盐酸标准溶液滴定，计算出铵盐的含量。

2. 试剂

(1) 氧化镁

(2) 2%硼酸

(3) 混合指示剂 0.2%甲基红乙醇溶液 1 份与 0.2%溴甲酚绿乙醇溶液 5 份混合

(4) 0.05M 盐酸标准溶液

3. 仪器

250ml 蒸馏装置

4. 操作方法

准确称取酱油 2.0 克，置于 250ml 蒸馏瓶中，加水约 150ml，氧化镁约 1 克。接好蒸馏装置，并使冷凝管尖端插入接受瓶内的液面以下，瓶内预先放有 2%硼酸溶液 10ml 及混合指示剂 3 滴，加热蒸馏。

收集馏出溶液约 150ml，用少量水洗涤冷凝管尖端，停止蒸馏，用 0.05M 盐酸标准溶液滴定至灰红色为止。记录 0.05M 盐酸液的毫升数。

5. 计算

6.

$$\text{铵盐 (以氨计)\%} = \frac{V \times N \times 0.017}{W} \times 100$$

式中 V —滴定样液消耗盐酸标准液的量 (mL)

N —盐酸标准液的浓度 (mol/L)

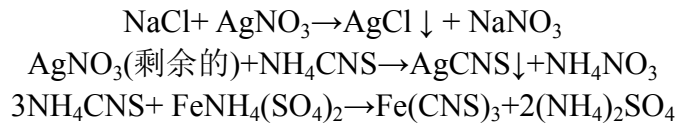
W —样品重量 (克)

0.017—1mol/L 盐酸标准溶液 1ml 相当的氮量

酱油中氯化钠的测定(I)

1. 原理

加入过量的硝酸银溶液使之与氯化钠作用,生成白色的氯化银沉淀,剩余的硝酸银用硫氰酸铵回滴,用硫酸铁铵做指示剂。反应式如下:



2. 试剂

(1) 硝酸

(2) 6N 硝酸: 取 190ml 硝酸(相对密度 1.42)加水稀释至 500ml

(3) 硝基苯

(4) 0.1mol/L 硝酸银标准溶液

称取 17g 硝酸银溶于水中,转移到 1000mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,置于暗处。

(5) 0.1mol/L 硫氰酸铵标准溶液

称取 7.6g 硫氰酸铵溶于水中,转移到 1000mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。

(6) 10%硫酸铁铵(100ml 内含 6mol/L 硝酸 25ml)。

3. 操作方法

移取酱油 5.0ml,置于 100 容量瓶中,加水至刻度,摇匀。吸取酱油稀释液 10ml 于具塞三角瓶中,加水 50ml,混匀。加硝酸 5ml、0.1mol/L 硝酸银溶液 25ml 和硝基苯 5ml,摇匀。加入硫酸铁铵 5ml,用 0.1mol/L 硫氰酸铵标准溶液滴定至血红色。

4. 计算

$$\text{氯化钠}(\%) = \frac{(N_1 \times V_1 - N_2 \times V_2) \times 0.05845}{W} \times 100$$

式中 W—样品液实际用量(mL)

N_1 —硝酸银标准溶液的浓度 (mol/L)
 V_1 —硝酸银标准溶液加入量 (ml)
 N_2 —硫氰酸铵标准溶液的浓度 (mol/L)
 V_2 —硫氰酸铵标准溶液加入量 (ml)
0.05845—NaCl 的毫克当量

5. 注意

计算结果精确至小数点后第二位。

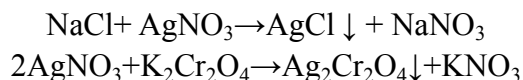
允许差：同一样品的两次测定值之差,每 100g 试样不得超过 0.2g。

酱油中氯化钠的测定(II)

——莫尔滴定法

1. 原理

硝酸银与氯化物作用生成氯化物白色沉淀，与铬酸钾则生成砖红色铬酸银沉淀。氯化银的溶解度比铬酸银溶解度低，所以氯化银先析出沉淀。当硝酸银与氯化物作用完毕后，过量的硝酸银才与铬酸钾作用而显红色，即为反应终点。



2. 试剂

(1) 5%铬酸钾指示剂

(2) 0.1mol/L 硝酸银标准溶液

3. 操作方法

准确称取均匀样品 10—20ml，置于烧杯中，加入 25ml 水溶解，加入铬酸钾指示剂 5 滴，用 0.1mol/L 硝酸银溶液进行滴定至呈砖红色为止。

$$\text{氯化钠}(\%) = \frac{N \times V \times 0.05845}{W} \times 100$$

式中 W —样品液实际用量 (mL)

N —硝酸银标准溶液的浓度 (mol/L)

V —硝酸银标准溶液滴定所耗毫升数 (ml)

0.05845—1mol/L 硝酸银标准溶液 1ml 相当于氯化钠的质量

第二部分 物性测定仪

物性测定仪（质构仪）具有专门的分析软件包，它可以对仪器进行控制，选择各种检测分析模式，并实时传输数据绘制检测过程曲线。内部计算功能，对有效数据进行分析计算，并可将多组实验数据进行分析比较，获得有效的物性分析结果。

一、仪器介绍

仪器名称: 物性测定仪（质构仪）

仪器型号: TA-XT plus

由英国 Stable Micro System 公司设计并生产，可对样品的物性概念作出数据化的表述。仪器设计有 300 多种探头可供选择，是业内公认的物性（质构）标准检测仪器，也是食品公司进行品控管理的首选品牌。

准确度保证 第三方标准砝码进行精度自检，确保仪器准确度，测试数值满足国家计量。

标准认可体系 用户可以在相应的测试范围内进行有针对性的校准，确保用户用于不同力量范围时均可保证仪器精度。

应用领域 粮油食品、面制品、米制品、谷物、糖果、肉制品、凝胶、休闲食品、宠物食品、果蔬。

检测数据 硬度、脆度、胶粘性、粘聚性、回复性、弹性、凝胶强度、咀嚼性等。

测试方法 测试力用拉力或压力进行标准方法的测试，包括 TPA, 粘性, 衰减度，压力松弛等。

国际标准 拥有 AACC, AOAC, AIB, ASTM, FINAT, PSTC, AFERA, AEN/ISO, GMIA 等多家机构认证的食品。

力量感应元 5Kg、30Kg、50Kg 的，并且更换只需要几分钟。

测试参数 力量、时间、距离、温度、湿度。

二、实习目的。

- 1、了解物性测定仪的结构及应用领域。
- 2、掌握物性测定仪的操作规程及软件的使用。

第三部分 大气质量检测

总悬浮颗粒物 悬浮在大气中的液体或固体微粒的总称。一般用浓度表示,单位为毫克(或微克)每立方米。总悬浮颗粒物的测定采用重量浓度法。测定时用抽气泵使空气以一定流速通过滤膜,空气中的颗粒物就被阻留在滤膜上。根据抽气的流速和时间,计算被采集空气的体积,根据采样前后滤膜的重量差,计算悬浮颗粒物的总重量,从而求出大气中颗粒物的浓度。

在国际上,重量浓度法有大流量和小流量两种采样法。中国以小流量法作为测定大气中颗粒物的试行标准法。悬浮颗粒物中,粒径小于 10 μm 的颗粒物称为飘尘,它能在大气中长期悬浮而不沉降,并能随呼吸进入人体。测定飘尘需用特殊的仪器,如分级采样仪器、压电晶体法飘尘测定仪等。

(总悬浮颗粒物的测定 参照 *GB/T15432-1995*)

氮氧化物 大气中主要的氮氧化物是一氧化氮(NO)和二氧化氮(NO₂)。测定大气中的氮氧化物是先将一氧化氮用氧化剂(如三氧化铬)氧化成二氧化氮,然后进行测定,并以二氧化氮浓度计量空气中的氮氧化物浓度。

中国规定用盐酸萘乙二胺比色法作为测定大气中氮氧化物的标准方法。其原理是用冰醋酸、对氨基苯磺酸和盐酸萘乙二胺配制成的溶液吸收二氧化氮,二氧化氮在溶液中形成亚硝酸根离子,与对氨基苯磺酸起重氮化反应,再与盐酸萘乙二胺偶合成玫瑰红色的偶氮染料,进行比色定量。测定时吸收液为 5 毫升,采样速度为每分钟 300 毫升。在吸收液呈微红色时,记录采样时间,计算采样体积。用标准亚硝酸钠配制各种浓度的等价标准溶液,也可用二氧化氮渗透管利用动态配气方法,稀释成各种浓度的标准气,然后定量地吸收至吸收液中,进行显色。同时测定试剂空白校正值,绘制经试剂空白校正后的标准比色曲线,计算每单位吸光度相当于二氧化氮的微克数 BS。空气样品的测定方法与标准气的测定方法相同。两者分别测定后按氮氧化物浓度(以 NO₂ 计,毫克/米³)等于 $BS(A-A_0) / (V \cdot 0.76)$ 式计算空气样品中的氮氧化物量。式中 A 为样品溶液的吸光度;A₀ 为试剂空白溶液的吸光度;V 为在标准状态下空气样品的体积(升);0.76 为 NO₂ 气体转换成溶液中 NO₂ 的转换系数;BS 为计算因子。氮氧化物的连续自动监测仪器有动态库仑仪、化学发光测定仪等。

(氮氧化物的测定 参照 **GB/T 15436-1995**)

第四部分 食源微生物危害分析

主要仪器检测原理简介

一、 实时定量 PCR

PCR 技术类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性——退火——延伸三个基本反应步骤构成：①模板 DNA 的变性：模板 DNA 经加热至 93℃ 左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应做准备；②模板 DNA 与引物的退火（复性）：模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至 55℃ 左右，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合；③引物的延伸：DNA 模板-引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶序列为模板，按碱基配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链。重复循环变性——退火——延伸三过程，就可获得更多的“半保留复制链”。

所谓实时荧光定量 PCR 技术，是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

用于荧光定量 PCR 仪的化学染料有多种，包括 SYBR Green I、分子 Beacons、水解探针(TaqMan 探针)、ScorpionsTM 探针和 AmplifluorTM 系统。也可完成实时量化和 DNA 解链曲线。

SYBR Green I 是一种结合于小沟中的双链 DNA 结合染料。与双链 DNA 结合后，其荧光大大增强。这一性质使其用于扩增产物的检测非常理想。SYBR Green I 的最大吸收波长约为 497nm，发射波长最大约为 520nm。

SYBR Green I 在核酸的实时检测方面有很多优点，由于它与所有的双链 DNA 相结合，不必因为模板不同而特别定制，因此设计的程序通用性好，且价格相对较低。此外，由于一个 PCR 产物可以与多分子的染料结合，因此 SYBR Green I 的灵敏度很高。但是，由于 SYBR Green I 与所有的双链 DNA 相结合，因此由引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性。

二、脉冲场电泳原理

脉冲场凝胶电泳与常规电泳的不同之处在于，常规的电泳采用的是单一的均匀电场，DNA 分子经凝胶的分子筛作用由负极移向正极。而脉冲场凝胶电泳采用了两个交变电场，即两个电场交替地开启和关闭，使 DNA 分子的电泳方向交替改变，使得 DNA 分子在“爬行”过程中，因为电场方向的变化，DNA 分子以一种扭曲的状态运动，达到分离的目的。

三、凝胶成像系统

该系统包括了密封暗箱，摄像头，白光和 UV 光源，带琥珀型滤片的滤片环，UV 保护档板。它还包括了从图象采集到分析打印一体的 Quantity One® 1-D 分析软件，以及无安装数量限制的 QuantityOne® Basic 软件。

四、电穿孔仪

原理：电穿孔技术是一种有效地将外源分子导入多种细胞的方法。通过一个高强度的电场作用，瞬时提高细胞膜的通透性，周围介质中的外源分子可被吸收。这种技术可以用来向原核和真核细胞内导入核苷酸、DNA、RNA、蛋白质、糖类、染料和病毒颗粒。与其他的物理学、化学和病毒方法比较，电穿孔是一种更为有效的方法。

五、酶标仪和核酸蛋白测定仪

紫外分光光度计原理。

第五部分 果蔬农药残留分析

随着栽培技术的不断进步，蔬菜的生长期已越来越短，而随着环境污染的加剧，蔬菜的病虫害也越来越重，绝大部分蔬菜需要连续多次放药后才能成熟上市。农药污染较重的有叶类蔬菜，其中韭菜、油菜受到的污染比例最大。茄果类蔬菜如青椒、番茄等，嫩荚类蔬菜如豆角等，鳞茎类蔬菜如葱、蒜、洋葱等，农药的污染相对较小。

目前在蔬菜生产中使用的农药主要有以下几种：

一是有机磷农药。

该农药是广谱杀虫剂，应用广泛，主要有乐果、敌百虫、敌敌畏、内吸磷、对硫磷、马拉硫磷等 60 余种。有机磷不稳定，挥发性强，在自然环境容易分解，进入生物体内易被酶分解，故不污染环境，在食物中残留时间也短，因此慢性中毒少，急性中毒多。有机磷是神经毒物，人们吃了施用有机磷农药的果蔬或茶叶、薯类、谷物等，可能发生肌肉震颤、痉挛、血压升高、心跳加快等症状，甚至昏迷死亡。

二是有机氯农药。

该农药是高残毒农药，其中六六六、DDT 等我国早已禁用，但至今仍有违规使用的情况，尤其林丹、七〇五四、毒杀芬、氯丹等仍继续使用。有机氯脂溶性强，不易水解和降解，非常稳定，聚集于人体脂肪，在自然和食物中能长期残留，停用后自然环境要经 25~110 年才能复原。

食物受有机氯污染常是从水体中经浮游生物吸食开始，鱼虾吃浮游生物，最终进入水鸟、人体，其富集可提高到 800 万倍。果蔬及粮、谷、薯、茶、烟草都可残留有机氯，禽、鱼、蛋、奶等动物性食物污染率高于植物性食物，而且不会因其贮藏、加工、烹调而减少，很容易进入人体积蓄。

有机氯农药可致急性或慢性中毒。急性中毒引发中毒者中枢神经症状。因其积蓄在人体脂肪，故急性中毒性低、症状轻，一般为乏力、恶心、眩晕、失眠；慢性中毒可造成人的肝、肾和神经系统损伤，DDT 还有致癌性。

三是氨基甲酸酯类农药。

该类农药是应用很广的新型杀虫剂与除草剂，如抗蚜威、克百威、西维因、残杀威、杀螟丹等，其毒性跟有机磷相似，但毒性较轻，恢复也快。食用了

残留这类农药较多的果蔬及谷、薯、茶等，中毒者会产生和有机磷中毒大致相同的症状，但因其毒性较轻，一般几小时就能自行恢复。

四是拟除虫菊酯类农药。

拟除虫菊酯类农药主要有氯氰菊脂(灭百可)、溴氰菊脂(敌杀死)、杀灭菌脂(速灭杀丁)等，对人类低毒，但有蓄积性，中毒表现症状为神经系统症状和皮肤刺激症状。

(具体项目检测参照有关国标)

-

第六部分 离子色谱法测定水中的硝酸和亚硝酸根含量

实习目的

了解离子色谱的工作原理和使用方法。

了解离子色谱分析后的数据处理方法。

掌握离子色谱分析样品的处理方法。

实验原理

离子色谱分析的基本原理是借助离子交换色谱层析的原理进行样品的分离，然后借助不同物质的电化学特性，用化学检测器检测样品的响应，通过物质的响应大小根据标准曲线加以定量。

实验仪器

2550Dionex 离子色谱分析系统，Ionpac AS11-HC 阴离子交换分析柱(4×250mm)。

Millipore 超纯水机，超声波清洗机，针头过滤器，超滤器，分析天平，干燥器。

500ml 容量瓶、25ml 容量瓶。

试剂

贮存液：250mmol/lNaOH 溶液。

标准使用液：准确称取 250.0mg 硝酸钠和亚硝酸钠于硅胶干燥器中干燥 24h，用超纯水溶解移入 500ml 容量瓶中，稀释至刻度，混均，在 4℃ 避光保存。此溶液每毫升相当于 500ug 的亚硝酸钠和硝酸钠，所用试剂均为 A.R 级。

标准样品：准确吸取硝酸钠和亚硝酸钠标准使用液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0ml，分别置于 25ml 容量瓶中，用超纯水稀释至刻度，配成浓度分别为 2.5、5、10、15、20ug/ml 标准混合溶液。

五、实验材料

不同水样：包括自来水、饮用水、井水、灌溉水、河水、工业排污水、雨水等。

六、方法步骤

标准样品处理：标准样品经 0.25um 针头过滤器过滤放入样品瓶中。

样品预处理：水样经 0.25um 针头过滤器过滤放入样品瓶中。

色谱条件

色谱柱：Ionpac AS11-HC 阴离子交换分析柱(4×250mm)

流动相：30mMNaOH

流 速：1.5ml/min

温 度：30℃

检测器：Suppressed conductivity

ASRS®-ULTRA

Autosuppression® Recycle Mode

Injection volume:10ul

Storage solution:Eluent

七、结果计算

待色谱工作站稳定并使参数最佳化后，连续进标准样品和待测样品，采集样品数据，样品数据采集后，进行数据处理，打印测定试验结果。

八. 注意事项

- 1.流动相使用前必须严格过滤和脱气。
- 2.待仪器稳定，基线平直后再进样分析。
- 3.应等每一样品中所有组分都出完，基线平直后再进下一个样品。
- 4.微量进样器用所要分析的样品清洗三次后进样，以排除交叉污染造成的误差。
- 5.分析工作完成后先用流动相冲洗色谱柱 40min，最后关机。

《食品环境学》实验指导书

编者：席美丽

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

实验一、水污染调查与水样的采集、保存与预处理

一、实验目的

对于食品工业而言,受环境影响最大的因素就是水,同时食品加工又对水环境产生污染,要防止并控制水污染就必须了解其污染物种类与含量特性等,这一切都是需要对水样进行分析检测,水样的采集、保存与预处理的恰当与否对检测结果起着非常大的作用。本实验主要就是让学生学习地区水污染调查状况,并了解水体污染的途径与危害,掌握水样采集和保存的方法和步骤。

二、实验仪器、用具

磨口瓶;塑料瓶;

三、实验方法

(一) 调查点的选择确定

根据地区水资源、水体污染状况确定调查点,分析根据水有关理化指标测定结果和咨询调查结果分析污染主要原因。

(二) 采样点的选择

样品的代表性和可靠性,首先取决于采样断面和采样点的代表性。为合理选择采样断面和采样点,应认真做好调查研究工作,收集水体的水文、气候、地质、地貌、本单位在城市的具体位置、整个工业布局、污染源、交通情况、生物和沉积物等有关材料。

本实验拟采集生活用水与废水样进行部分指标测试,以让学生初步了解水样采集、保存与预处理的基本原则与方法。

(三) 采样方法

1. 采样瓶的准备

盛水样的容器用无色硬质瓶或聚乙烯塑料瓶。采样前,先用10%的盐酸、热肥皂水、漂白粉溶液或合成洗涤剂等任何一种洗液洗涤玻璃瓶,并用蒸馏水洗净。瓶塞最好用磨口玻璃塞、橡皮塞或软木塞,绝对禁止使用木料、纸团和金属作塞子。当用橡皮塞时,分别用10%的碳酸钠溶液、(1+5)盐酸溶液煮沸,再在水中煮沸,并用蒸馏水洗净。用软木塞时先用蒸馏水煮,后用蒸馏水洗净。

在采样前还必须用将被采集的水样洗涤容器2~3次。无论采集哪种水样,都应在采水装置的进水管口配备滤网,防止水中的浮游物堵塞水泵与传感器。

2. 表层水的采集

可用桶、瓶和袋等作采水器,轻轻放入水面下20~50 cm或距水底30 cm以上各处直接采集水样。采样后立即塞紧瓶塞,防止水样接触空气或表层水所含漂浮物的进入。此法不适用于溶解气体及还原性物质的采集。

3. 深层水的采集

深层水样的采集,可用样品容器采水器、单层采水器、多层采水器、海洛特采水器、倒转式采水器、班吨采水器和抽吸泵等专用设备,分别从不同深度采集水样。

4. 废水的采集

由于生产的产品及工艺过程的不同,食品工业废水的成分差别很大。废水的排放时间也各有差异因而

需根据废水产生情况，在一昼夜或几昼夜中采集废水的平均水样或平均比例水样以及高峰浓度的水样。因为有些工厂并不是有规律地每天排放污水，所以为采集水的平均比例水样，即流量大时多取，流量小时少取；相反，废水流量较恒定时，就只采集平均水样。不论平均水样或平均比例水样，一般都应采集一昼夜的，把每次水样倒入清洁瓶中混合，以备分析测定使用。在混合水样时，应防止水样中的物质发生变化。如果废水是间断性的排放，那么应采集代表生产、生活过程的废水。

5. 天然水的采集

采集井水时，可用筒、瓶等采水器直接采集。采集自来水时，应先将水龙头打开，放流 3~5 min 管内积水，再盛装水样。采集泉水时，如若是自喷泉水，可在冒出水口直接采样，或者用抽水阀采样。采集雨水时，采用一般降雨器（简易集尘器、大型采水盘）直接收集一定时间的降雨量或雪量。

（四）采样体积

采样体积的大小由分析测定的项目多少而定。因为分析项目往往对水样的用量和保存条件有不同的要求，所以采样体积应按照各个监测的项目实际需要量计算，再适当增加 20%~30% 水样量，作为检测项目的实际采样量。

（五）水样的保存

每种水样允许存放的时间是各不相同的，清洁水为 72 h，轻度污染的水为 48 h，严重污染的水为 12 h。如果水样放置过久，会由于物理、化学、生物作用而常常造成降低被测组分的浓度、改变水样的性质、进而影响分析结果。因此，从采样到测定相间隔的时间愈短，分析结果愈可靠。但是，水样在运输途中或不能立即进行分析测定的情况下，必须采取一定的措施来对水样进行妥善的保存，以确保分析结果的准确性。

水样的保存方法较多，不过，理想的保存方法较少。常见的保存方法有冷冻法和化学法等。

1. 冷冻保存法

利用冷冻机或冰箱，将水样保存在 4℃ 暗处。这样，可以防止微生物繁殖，减慢物理作用和化学变化的速度，减少组分的挥发。这种保存方法，可把有机物毫无变化的保存下来，不影响分析的结果。所以利用干冰等低温保存被认为是最好的保存方法，但成本较高。

2. 化学保存法

在水样中，加入一定量的化学试剂作抑制剂、杀菌剂或防腐剂，抑制微生物的作用，或调节水样的酸度，防止沉淀、水解、氧化还原、络合反应的产生，使水样的成分、状态和价态保持相对的稳定。

3 水样的管理

样品是从各种水体及各类型水中取得的实物证据和资料，水样妥善而严格的管理是获得可靠监测数据的必要手段，本标准规定了水样管理方法和程序。

3.1 水样的标签设计

水样采集后，往往根据不同的分析要求，分装成数份，并分别加入保存剂。对每一份样品都应附一张完整的水样标签。水样标签的设计可以根据实际情况，一般包括：采样目的，课题代号，监测点数目、位置，监测日期，时间，采样人员等。标签应用不退色的墨水填写，并牢固地贴于盛装水样的容器外壁上。

对需要现场测试的项目，如 pH 值、电导、温度、流量等应按表 2 进行记录，并妥善保管现场记录(见表 2)。

3.2 水样的运送

装有水样的容器必须加以妥善的保护和密封，并装在包装箱内固定，以防在运输途中破损，包括材料和运输水样的条件都应严格要求。除了防震、避免日光照射和低温运输外，还要防止新的污染物进入容器和沾污瓶口使水样变质。

在水样转运过程中，每个水样都要附有一张管理程序登记卡(见表 3)。在转交水样时，转交人和接收人都必须清点和检查水样并在登记卡上签字，注明日期和时间。

管理程序登记卡是水样在运输过程中的文件，必须妥为保管，防止差错和备查。尤其是通过第三者把水样从采样地点转移到实验室分析人员手中时，这张管理程序登记卡就显得更为重要了(见表 3)。

3.3 实验室对水样的接收

水样送至实验室时，首先要核对水样，验明标签，确切无误时签字验收。
如果不能立即进行分析时，则应尽快采取保存措施，并防止水样被污染。

表 2 采样现场数据记录

采样人员 _____ _____ 现场数据记录 _____ _____									
采样地点	样品编号	采样日期	时间, h		pH	温度	其他参量		
			采样开始	采样结束					

表 3 管理程序记录卡片

课题编号			课题名称			样品 容器 编号	备注					
采样人员(签字)												
采样点 缠号	日期	时刻	混合 样	定时 样	采样点 位置							
转交人签字:		日期 时刻		接收人签字:		转交人签字:		日期 时刻		接收人签字:		
转交人签字:		日期 时刻		接收人签字:		转交人签字:		日期 时刻		接收人签字:		
转交人签字:		日期 时刻		接收人签字:		转交人签字:		备注				

实验二、水及废水的理化指标检测

一、实验目的

对于食品工业而言，受环境影响最大的因素就是水，同时食品加工又对水环境产生污染，要防止并控制水污染就必须了解其污染物种类与含量及理化特性等，就需要对水样进行分析检测。本实验主要就是让学生了解水污染测定指标，掌握水部分常见理化指标的测定方法和步骤。

二、实验仪器、用具

比色管；离心机；电热炉；三角瓶；容量瓶；酸度计；砂芯漏斗；抽滤泵；分析天平；真空干燥器等。

三、实验方法

（一）色度的测定（铂-钴标准比色法）

1、原理

用氯铂酸钾和氯化钴配成铂-钴标准溶液，同时规定每升水中含 1mg 铂[以 $(PtCl_6)^{2-}$ 形式存在]时所具有颜色作为一个色度单位，称为 1 度。用目视法比色测定水样的色度。

2、仪器

（1）50ml 成套高型具塞比色管（2）离心机

3、试剂

铂-钴标准溶液 称取 1.246g 氯铂酸钾 (K_2PtCl_6)，再用具盖称量瓶称取 1.000g 干燥的氯化钴 ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)，共溶于 100ml 纯水中，加入 100ml 浓盐酸，然后用纯水定容至 1000ml，此标准溶液的色度为 500 度。

4、步骤

（1）取 50ml 透明的水样于比色管中，如水样色度过高，可少取水样，加纯水稀释后比色，将结果乘以稀释倍数。

（2）另取比色管 11 支，分别加入铂-钴标准溶液 0、0.50ml、1.00ml、1.50ml、2.00ml、2.50ml、3.00ml、3.50ml、4.00ml、4.50ml、5.00ml，加纯水至刻度，摇匀，即配制成色度为 0、5 度、10 度、15 度、20 度、25 度、30 度、35 度、40 度、45 度及 50 度的标准比列，可长期使用。

（3）将水样与铂-钴标准色列比较。如水样与标准色列的色调不一致，即为异色，可用文字描述。

5、计算

$$C=M/V \times 500$$

式中 C——水样的色度； M——相当于铂-钴标准溶液用量 ml； V——水样体积 ml。

注：此法适用于测定生活饮用水及其水源水的色度。浑浊水样需先离心，然后取上清液测定。水样不可用滤纸过滤，因滤纸能吸附部分颜色而测定结果偏低。本法最低检测色度为5度。

（二）臭和味的检查

1、原水样的臭和味

取100ml水样，置于250ml三角瓶中，振摇后从瓶口嗅水的气味，用适当词句描述，可按六级记录其强度。与此同时，取少量水放入口中，不要咽下去，尝尝水的味道，加以描述，并按六级记录强度。

2、原水煮沸后的臭和味

将上述三角瓶中水样加热至开始沸腾，立即取下三角瓶，稍冷后按上法嗅味和尝味，用适当词句描述，并按六级记录其强度，见表3。

表3. 臭和味的强度等级

等级	强度	说明	等级	强度	说明
0	无	无任何臭和味	3	明显	已能明显察觉
1	微弱	一般饮用者甚难察觉，但嗅、味敏感者可以发觉。	4	强	已有明显的臭味
2	弱	一般饮用者刚能察觉。	5	很强	有强烈的恶臭或异味

注：1、原水的水味鉴定只适用于对人体健康无害的水样。

2、可用活性炭处理过的蒸馏水作为无臭对照水。

（三）悬浮物的测定

1、原理

将水样过滤，截留在滤纸上的固体于103-105℃干燥至恒量，得到悬浮物固体的质量。

2、仪器

（1）全玻璃微孔滤膜过滤器：本书用CNCA滤膜，孔径0.45um、60mm或用2号玻璃砂芯漏斗，或中心理学定量滤纸。

（2）吸滤设备：吸滤瓶，真空泵或射水器。

3、操作步骤

（1）水样的采集和贮存

用洗净的聚乙烯瓶或硬质玻璃瓶，采集具有代表性的水样500-1000ml，盖紧瓶塞。漂浮或浸没的不均匀固体物质不属于悬浮物，应从水样中除去。采样后应尽快测定，如无条件，应贮存在4℃冷藏箱中，但最长不得超过7d，不能加入任何保护剂，以防破坏物质在固、液间的分配平衡。

2、滤器准备

将一张滤膜（或蒸馏水洗过的滤纸）放在称量瓶中，打开瓶盖，在103-105℃烘干30min后取出。在干燥器内冷却至室温，盖好瓶塞称量，反复烘干、冷却、称量，直到两次称量的质量差小于0.2mg。

3、测定

取振荡均匀的水样100ml（必要时可减少或增加量取水样的体积，使含悬浮物10-100mg），通过滤膜（或滤纸）过滤，再以每次10ml蒸馏水洗涤3次。

仔细取出载有悬浮物的滤膜，放入原称量瓶中，移入烘箱于103-105℃下烘于1h后移

入干燥器中，使冷却到室温，称量，反复烘干、冷却、称量，直到两次称量的质量差不大于 0.4mg 为止。

4、结果计算

$$\rho(\text{悬浮物}) = \frac{(m - m_1) \times 10^6}{V}$$

式中：m—悬浮物+滤膜+称量瓶质量，g

m₁：滤膜+称量瓶质量，g

V：水样体积，ml。

5、用玻璃砂芯漏斗过滤的测定方法

如滤器用玻璃漏斗代替滤膜，方法同上，但不使用称量瓶，过滤前及过滤后直接将下班砂芯漏斗烘干、冷却、称量、直到恒重。

(四) pH 的测定

食品工厂要求所排放的废水的 pH 值在 6.5-8.5 之间，在果蔬汁饮料厂、碳酸饮料厂、乳制品厂、啤酒厂等的生产过程中，常用大苏打进行清洗容器、设备。此外，还会用到盐酸、硝酸等酸性清洗剂。所以，不仅要原料水进行 pH 值测定，对于所打废水也要测定 pH 值，以确定是否需要中和处理。

1、PH 试纸法

为了粗略知道水样的 pH，可采用 PH 试纸法。测定时将水样点在试纸上使其呈色，与标准色板比较，即可得 pH 值，此方法简便，但测定误差大，不适用于色度很高和有缓冲作用的水样。

2、pH 电位计法

(1) 原理

PH 电位计常称酸度计，它以饱和甘汞电极为参比电极，以下班电极为指示电极组成电池，在 25℃、101.3kpa(=1atm)时，溶液中每变化一个 pH 单位，电位差改变为 59.1mV。用酸度计可直接读出溶液的 pH 值，酸度计的使用方法可参看仪器说明书。

(2) 仪器

酸度计或离子活度计均可

(3) 试剂：标准 PH 缓冲液

(4) 实验步骤

- 根据酸度计的使用要求，打开电源开关，预热一定时间。
- 用 pH 标准溶液校正仪器刻度，下班电极应预先用水浸泡一昼夜以上，校正前，用水冲洗两支电极，用滤纸吸干，把下班电极的下班泡浸入与被测溶液挖的 PH 标准溶液中（注意饱和甘汞电极内要有结晶的氯化钾，同时必须去掉甘汞电极下面的橡皮套和上部的橡皮塞），小心摇动溶液 1min，调整仪器指针使其位于该校正溶液的 pH 值处，注意标准溶液和被测水样温度必须与室温相同。
- 水样 pH 值的测定：测定时，先用水样淋洗电极 3-5 次，然后将电极插入预先在室内放置半小时以上的 50ml 水样中，轻轻摇动水样使其均匀，反复读取 pH 值，直到计数稳定为止。

(5) 注意事项

- 废水水样必须尽快分析，最好在现场测定，测定 pH 值之前，不可打开废水水样瓶。
- 不可在含油或脂的溶液中使用下班电极，可用分液漏斗分层除去样品中的油或脂，电极上若沾有油膜，可先用乙醇或丙酮清洗，再用水彻底洗净。

- 测定之后，要将下班电极浸在水中存放，饱和甘汞电极用后套上橡皮帽或橡皮塞，注意及时补充饱和氯化钾溶液。

（五）溶解性总固体的测定

1、原理

水样经过滤后，在一定温度下烘干，所得的固体残渣称为溶解性总固体，包括不挥发的可溶性盐类、有机物及能通过滤器的不溶解微粒等。烘干温度一般采用 105℃，但 105℃的烘干温度不能彻底除去高矿化度水样中盐类所含的结晶水，采用 180℃烘干温度，可得到较为准确的结果。当水样的溶解性总固体中含有多量氯化钙、硝酸钙、氯化镁、硝酸镁时，由于这些化合物具有强烈的吸潮性使称量不能达到恒重，此时可在水样中加入适量碳酸钠溶液而得到改进。

2、仪器

- (1) 分析天平，感量万分之一克
- (2) 水浴锅
- (3) 电热恒温干燥箱
- (4) 瓷蒸发皿，100ml
- (5) 干燥器，用硅胶作干燥剂
- (6) 中速定量滤纸或滤腊及相应滤器。

3、试剂

1%碳酸钠溶液，称取 10g 无水碳酸，溶于纯水中，稀释至 1000ml，

4、操作步骤

- (1) 溶解性总固体在 105℃烘干
- (2) 将蒸发皿洗净，放在 105℃烘箱内 30min，取出，放在干燥器内冷却。
- (3) 在分析天平上称其质量，再次烘烤，称量直到恒重，2 次称量相差不超过 0.0004g。
- (4) 将蒸发皿置于水浴锅上蒸干，将蒸发皿移入 105℃烘箱内，1 小时后取出，放入干燥器内，30min，称量。
- (5) 将称过质量的蒸发皿再放入(105℃)烘箱内 30min，再放入干燥器内 30min，称量直到恒重。

5、计算

$$c=(W_2-W_1) \times 1000 \times 1000/V$$

式中：c——水样中溶解性总固体，mg/L；

W_2 ——空蒸发皿质量，g；

W_1 ——蒸发皿和溶解性总固体质量，g；

V——水样体积。

6、讨论

- (1) 本法适用于测定生活饮用水及其水源水的溶解性总固体
- (2) 测定前先将水样上清液用过滤器过滤。用吸管吸取振荡均匀的过滤水样 100ml 于蒸发皿内，如果水样的溶解性总固体过少时，可增加水样体积。
- (3) 如采用 180℃的烘干温度烘干，则按上法步骤将蒸发皿在 180℃烘干并称量至恒重。用吸管吸取 100ml 水样于蒸发皿中，精确加入 1%碳酸钠溶液 25.0ml 于蒸发皿内，混匀，同时做一对只加 1%碳酸钠溶液 25.0ml 的空白试验，计算水样结果时应减去碳酸钠空白的质量。

（六）化学需氧量（COD）的测定（高锰酸钾法）

1、原理

在酸性条件下，高锰酸钾将水样中的有机物及还原性无机物氧化。反应后剩余的高锰酸钾，用过量的草酸钠还原，再以高锰酸钾标准溶液回滴过量的草酸钠，通过计算求得水样中

含有的有机物及无机还原性物质所消耗高锰酸钾的量，此法适用于一般轻度污染的水样。

2、仪器

双列六孔恒温水浴。

3、试剂

(1) 0.2 mol/L 高锰酸钾溶液 溶解 3.2 g 高锰酸钾于约 1.2 L 水中，煮沸半小时至 1h，使体积减少至 1 000 ml 左右，放置过夜，用 G3 号熔结玻璃漏斗过滤后，滤液贮于棕色试剂瓶中。

(2) 0.02 mol/L 高锰酸钾溶液 用移液管吸取溶液① 100ml，放入 1 000 ml 容量瓶中，用水稀释至标线，混匀。

(3) (1+3) 硫酸溶液 取 1 体积相对密度为 1.84 的浓硫酸慢慢加入到盛有 3 体积水的烧杯中，搅匀中，滴加 0.02 mol/L 高锰酸钾溶液至硫酸溶液呈浅红，若红色褪去应再补加至浅红色不褪为止。

(4) 0.0500 mol/L 草酸钠标准溶液 称取 0.6705 g 在 105~110℃ 下烘 1 h 并经干燥器冷却的草酸钠，放入烧杯中，加水 25 ml (1+3) 硫酸至草酸钠全部溶解，移入 100 ml 容量瓶中，用水稀释至标线，混匀。

(5) 0.0050 mol/L 草酸钠标准溶液 用直吸管吸取 0.0500 mol/L 草酸钠标准溶液 10.00 ml，放至 100 ml 容量瓶中，用水稀释至标线，混匀。

4、操作步骤

(1) 用移液管吸取 100 ml 充分摇匀的水样于 250 ml 锥形瓶中（污染较重的水样，则用移液管吸取适量水样，用水稀释至 100 ml）。

(2) 用直吸管加入 5 ml (1+3) 硫酸，混匀。

(3) 用滴定管加入 0.02 mol/L 高锰酸钾溶液 10.00 ml 摇匀，立即放入沸水浴中加热 30min，沸水浴液面要高于反应溶液液面。

(4) 从沸水浴中取下锥形瓶，趁热用滴定管加入 0.00500 mol/L 草酸钠标准溶液 10.00 ml，摇匀，并立刻用 0.02 mol/L 高锰酸钾溶液滴定至溶液呈微红色，记下滴入体积 V_1 (ml)。

(5) 标定高锰酸钾溶液浓度 取步骤④中滴定完毕的水样，用滴定管加入 10.00 ml 草酸钠标准溶液，再用 0.02 mol/L 高锰酸钾溶液回滴至溶液呈微红色，记录相当于 10.00 ml 0.0050 mol/L 草酸钠溶液的高锰酸钾溶液体积 V_1 (ml)，则高锰酸钾的校正系数为 $K=10/V_1$ 。

(6) 若水样用蒸馏水稀释时，需再取 100 ml 蒸馏水，按步骤 1~4 测定空白值，记录 0.02 mol/L 高锰酸钾溶液用量 V_0 (ml)。

(7) 计算

当取 100 ml 水样时，高锰酸钾法需氧量 (O_2 , mg/L) 为

$$\frac{[(10 + V_1)K - 10] \times M \times 8 \times 1000}{100}$$

若水样用蒸水和稀释时，高锰酸钾法需氧量 (O_2 , mg/L) 为

$$\frac{\{[(10 + V_1)K - 10] - [(10 + V_0)K - 10] \times C\} \times M \times 8 \times 1000}{V_2}$$

式中 M——草酸钠标准溶液的摩尔浓度；

V_2 ——水样体积，ml；

C——稀释水样中所含蒸馏水的比例。如取 10 ml 水样，加入 90 ml 蒸馏水稀释，则 $C=0.90$ 。

讨论：

1 水样需稀释时所取水样体积的确定 要求在测定中高锰酸钾溶液反滴定草酸钠时，所消耗的高锰酸钾溶液的量为 4~6 ml，若消耗量过大或过小，都需要再取适量水样重新测

定。

2 在水浴加热完毕后，溶液仍应保持淡红色，如红色很浅或全部退去，说明高锰酸钾用量不够，应将水样稀释倍数加大后再测定。

3 在酸性条件下，草酸钠和高锰酸钾溶液的反应温度应保持在 60~80℃，所以滴定操作必须趁热进行，若溶液温度过低，需适当加热。

（七）水温的测定

1、原理：用温度计或半导体温度计直接可以测出水温。

2、仪器：（1）温度计或半导体温度计，分度 0.1—0.2℃，用标准温度计校正后使用。

（2）深水温度计，供测量较深水体水温。

3、步骤：将温度计直接进入水体中至读数恒定后，记录水温。如不能直接测量，可在采样器中进行测量，水样体积不少于 100ml。测定水温时应同时测量气温。

实验三、土壤中铬的测定——二苯碳酰二肼比色法

一、实验目的

对于食品原料而言，土壤污染是影响原料产量、质量甚至食品安全性的重要因素，特别是食品中的重金属含量。本实验主要是让学生了解地区土壤污染状况和水污染与土壤污染的相关性，并掌握重金属铬的基本测定步骤与方法，进一步了解重金属污染途径和对食品安全性的危害。

二、实验原理

土壤样品经过硫酸、磷酸消解，铬化合物变成可溶性。经过离心或过滤分离后，加入稍微过量的高锰酸钾将三价铬氧化成六价铬，过剩的高锰酸钾用叠氮化钠分解除去。在酸性条件下铬与二苯碳酰二肼反应生成紫红色化合物，于波长 540 纳米处测定吸光度。

三、实验仪器、试剂

（一）所用主要仪器：

- | | |
|--------------|-------------|
| 1、电热板或电炉； | 2、离心机 |
| 3、水浴锅； | 4、分光光度计； |
| 5、50 毫升三角瓶； | 6、50 毫升烧杯； |
| 7、100 毫升容量瓶； | 8、25 毫升比色管。 |

（二）所用试剂：

- 1、浓硫酸、浓磷酸和浓硝酸；
- 2、0.5%高锰酸钾溶液；
- 3、0.5%叠氮化钠溶液；
- 4、0.25%二苯碳酰二肼丙酮溶液；称取 0.25 克二苯百炼成钢酰二肼，溶于丙酮中，并稀释至 100 毫升。

5、1：1 磷酸溶液：加热至沸，并滴加稀高锰酸钾至微红色。

6、5%硫酸—磷酸混合液：取硫酸、磷酸各 5 毫升慢慢倒入水中，稀释至 100 毫升，加热至沸，并加稀高锰酸钾溶液至微红色。

7、铬标准贮备液：准确称取 0.2829 克铬酸钾（优级纯，于 105-110℃烘 2 小时），溶于水中，转移入 1 升容量瓶中并稀释至标线，此溶液每毫升含铬 100 微克。

8、铬标准使用液：准确吸取上述贮备液 10.00 毫升于 1 升容量瓶中，以二次蒸馏水稀释至标线，此溶液每毫升含铬 1.0 微克。

四、实验步骤：

1、标准曲线绘制

(1) 准确吸取铬标准溶液 0.00、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 毫升比色管中。加 5% 硫酸-磷酸混合液 2.5 毫升。用水稀释至标线。配成的标准采到含铬分别为 0.00、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 微克。

(2) 加 1: 1 磷酸 1 毫升，摇匀，加 1 毫升二苯碳酸二胍丙酮液，迅速摇匀，10 分钟后用 3 厘米比色皿于波长 540nm 处测定吸光值。

(3) 以吸光度对铬含量绘制标准曲线。

2、样品分析：

(1) 预处理

- 准确称取 0.500 克土样于 50 毫升三角瓶中，加少许水湿润，再加浓磷酸、浓硫酸各 1.5 毫升，毫上小漏斗，置于电炉上加热至冒白烟，取下稍冷却，重复滴加 2-3 浓硝酸，再置于电炉上加热至冒大量的白烟，至土样变白，消解液呈浅绿色为止。
- 取下三角瓶冷却，用蒸馏水冲洗小漏斗和瓶壁，将消解液（约 50 毫升）连同残渣称入 50 毫升离心管内，离心。将上层清液移入 100 毫升容量瓶中，用蒸馏水冲洗离心管壁，并用玻璃棒搅动离心管下部残渣，再离心，将上层清液合并入 100 毫升容量瓶中，稀释至标线。

(2) 测定

- 准确吸取 10.00 毫升（试样溶液取量可视含量不同而改变）经过离心分离的清液于 50 毫升烧杯中，滴加 0.5% 高锰酸钾至呈紫红色，置于水浴上煮沸 15 分钟，（若煮沸过程中紫红色褪去，应再滴加高锰酸钾至紫红色不褪）趁热滴加叠氮化钠，并不断振摇，到红色刚好褪去。迅速放入冷水中冷却。然后转移到 25 毫克比色管中，用冷蒸馏水稀释至标线。
- 向上述比色管里加入 1: 1 磷酸 1 毫升，摇匀，再加显色剂 1 毫升，迅速摇匀，10 分钟后以 3 厘米比色皿于波长 540nm 处比色测定。

(3) 计算

$$\text{铬 (毫克/千克)} = \frac{M \times V_{\text{总}}}{V \times W_{\text{总}}}$$

式中：M——从标准曲线上查得铬的微克数

$V_{\text{总}}$ ——试样定容体积（毫升）

V——测定取试样溶液的毫升数。

$W_{\text{总}}$ ——试样重量（克）

注意事项：

1、土壤样品常用的预处理方法有碱溶法、氢氟酸溶解法、硫酸-硝酸消化法，王水消化法，高氯酸消化法，硫酸-磷酸消化法等。用本法消化土壤，时间不可过长，温度不可过高，不可蒸干，以防焦磷酸盐产生，影响结果，且残渣结块粘结在玻璃不易洗下，易损坏三角瓶。

2、本法用磷酸掩蔽铁，使之形成无色铬合物，同时还可以和其它金属离子络合，避免一些盐类的析出而产生浑浊。在磷酸存在下可以排除 NO_3^- 、 Cl^- 的影响。如果在氧化时或显色时出现浑浊可考虑加大磷酸的用量。

3、可用 10% 尿素质% 亚硝酸钠代替叠氮化钠，使用时应注意防止亚硝酸钠还原有六价铬。为止应在溶液中预先加入尿素，使亚硝酸钠还原高锰酸钾后，即与尿素反应。亚硝酸钠的量必须控制，且加入后必须充分摇动。

4、加入二苯百炼成钢酰二胍丙酮溶液后，应立即摇动，防止局部有机溶剂过量而使六价铬部分被还原为三价，使测定结果偏低。

5、用高锰酸钾来氧化低价铬，在氧化过程中，七价锰可能被还原为棕色的二氧化锰，干扰观察紫红色而影响低价铬的氧化完全。因此要控制好溶液的酸度及高锰酸钾的用量。

实验四 农产品中氟化物的测定

(氟离子选择电极法)

一、实验目的

氟是人体必需的营养元素，又是有毒性的污染元素，自然界中的氟主要存在于萤石和磷灰石等天然矿物中。氟主要工业排放含氟气体、液体和废渣，以及磷肥的施用和含氟农药如氟化钠、氟硅酸钠等的施用而进入土壤—植物系统，再通过食物链进入动物及人体内。人体长期摄入过量的氟化物会引起氟中毒，轻则造成釉牙，重则造成氟骨病。

本实验主要让学生掌握干灰化消解生物样品的方法、掌握离子选择性电极法测定氟化物的方法与原理，了解我国农产品中氟含量的基本情况。

二、实验原理

氟化镧单晶对氟离子有选择性对数响应，将氟离子选择电极和外参比电极浸入灰化后的含氟浸提液中，构成原电池。该原电池的电动势与氟离子活度的对数呈线性关系，故通过测量电极与已知氟离子浓度溶液组成的原电池电动势和电极与待测氟离子浓度溶液组成的原电池电动势，即可计算出待测溶液中氟离子浓度。

三、实验仪器、设备、试剂

1、仪器、设备

- (1) 氟电极：CSB—F—1 型或其他型号
- (2) 酸度计：pHS—2 型或电位计
- (3) 磁力搅拌器
- (4) 232 型甘汞电极或银—氯化银电极
- (5) 聚乙烯烧杯 100ml
- (6) 马福炉

(7) 瓷坩埚

2. 试剂

本方法所用水均为去离子水，全部试剂贮于聚乙烯塑料瓶中。

(1)3mol / L 乙酸钠溶液：称取 204g 乙酸钠($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)，溶于 300mL 水中，加 1mol / L 乙酸调节 pH 至 7.0，加水稀释至 500mL。

(2)0.75mol / L 柠檬酸钠溶液：称取 110g 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，溶于 300mL 水中，加 14mL 高氯酸，再加水稀释至 500mL。

(3)总离子强度调节缓冲液：3mol / l 乙酸钠溶液与 0.75mol / L 柠檬酸钠溶液等量混合，临用时配制。

(4)1mol / L 盐酸 (1+11)：量取 10ml 盐酸，小心倒入 110ml 水，混匀。

(5)氟标准溶液：称取 0.2210g 经 100℃干燥 4h 冷却后的氟化钠，溶于水，移入 100ml 容量瓶中，加水至刻度，混匀，置冰箱中保存。此溶液每毫升相当于 1.0mg 氟。

(6)氟标准使用液：吸取 10.0mL 氟标准溶液，在 100ml 容量瓶中稀释，定容至刻度，摇匀，此溶液每毫升含氟离子 10ug。如此反复稀释至此溶液每毫升相当于 1ug 氟。

四、实验方法与步骤

(1)称取 1.00g 粉碎过 40 目筛的样品，置于 50mL 容量瓶中，加 10mL 1mol / L 盐酸，密闭浸泡提取 1h(不时轻轻摇动)，应尽量避免样品黏于瓶壁上。提取后加 25mL 总离子强度调节缓冲液，加水至刻度，混匀，备用。

(2)吸取 0.0、1.0、2.0、5.0、10.0mL 氟标准使用液(相当于 0、1、2、5、10ug 氟)，分别置于 50mL 容量瓶中，于各容量瓶中分别加入 25mL 总离子强度调节缓冲液，10mL 1mol / L 盐酸，加水至刻度，混匀，备用。

(3)将氟电极和甘汞电极与测量仪器的负端与正端相联接。电极插入盛有水的 25mL 塑料杯中，杯中放有套着聚乙烯管的铁棒，在电磁搅拌中，读取平衡电位值，更换 2~3 次水后，待电位值平衡后，即可进行样液与标准液的电位测定。

(4)以电极电位为纵坐标，氟离子浓度为横坐标，在半对数坐标纸上绘制标准曲线。

五、结果计算

$$W = P \cdot V \cdot 1000 / (M \cdot 1000)$$

式中：W——样品氟的含量，mg/kg

P——测定用样液氟的浓度，ug/ml

M——样品质量，g

V——样液总体积，ml

注意：

[1]当氟电极的响应极限为 0.025ug / mL 时，取样量为 1g 时，最低检出值为 1.25mg / kg。回收率：95%~120%。

[2]氟电极在使用前，应在水中浸泡(活化)数小时，不要在含氟量较高的溶液中浸泡，以免损坏电极。一支电极长时间使用后，会发生迟钝现象，可用金相纸擦拭以将表面活化。

每支电极都有一定的响应极限，电极的性能越好，最低检出浓度越低。初次使用新电极应先测试其响应极限，可准确估计样品的最低检出量，因小于响应极限的浓度不成对数响应，测定很微量的氟会产生误差。

[3]如果电极长期不使用，不要在水中浸泡保存，应冲洗干净后于干燥处放置。

[4]为了保持电位计的稳定性，最好用电子交流稳压作电源。如在夏季或室温波动很大时测量电位，会受一定影响，应在恒温室或者有空调的室内测量，工作曲线与样品应在同样温度下测定，不得相差±2℃。

说明：我国土壤的氟(F)含量平均 453mg · kg⁻¹，范围值为 191—1012mg · kg⁻¹，农产品

中一般有微量的氟，粮食中含氟量一般低于 $1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，蔬菜、水果中的氟含量一般低于 $0.5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，鱼贝类 $5 - 10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。茶叶的氟含量比一般植物高，叶菜含氟量一般在 $10 - 200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。土壤含氟量高或被氟污染的农田、水稻、玉米、小麦等籽实的含氟量高达 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上我国农产品氟允许限量为粮、豆及蔬菜 $\leq 1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，水果 $\leq 0.5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，鱼肉类 $\leq 2.0\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

六、(灰化法)

(一) 仪器同上，试剂：

1. 硝酸镁溶液：取 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 950g 溶解于水并稀释至 1000 毫升。
2. 氟化物标准储备液：称取 0.2210g 基准氟化钠(预先在 $105 - 110^\circ\text{C}$ 烘干 2 小时)用水溶解后转入 1000 毫升容量瓶，稀释至刻度，摇匀、储存在聚乙烯瓶中，此溶液每毫升含氟离子 $100\mu\text{g}$ 。
3. 氟化物标准溶液：吸取氟化物标准储备液 10ml 稀释在 100ml 容量瓶中，定容至刻度，摇匀，此溶液每毫升含氟离子 $10\mu\text{g}$ 。
4. $0.5\text{mol} / \text{L}$ 氢氧化钠溶液
5. 离子强度调节缓冲溶液(TISAB)：称取 58.8g 二合水柠檬酸钠和 85g 硝酸钠于烧杯中，加水溶解，用盐酸调节 pH 至 5—6 转入 1000ml 容量瓶，稀释至刻度。

(二) 测定步骤

1. 称取样品 1—2g 置于瓷坩埚中，加入 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 溶液 1ml，置于沸水浴上，数分钟后，小心加入数滴浓盐酸，注意避免样品溢出坩埚，继续添加浓盐酸 2—3 次，每次数滴，至样品接近干燥。内容物粘稠的话，须先用电热板干燥然后进行炭化。加上坩埚盖，放入冷的马福炉，加热在 $500 - 550^\circ\text{C}$ 灼烧 6 小时，灼烧至灰分呈浅灰色，取出放冷。将坩埚内容物一盐酸(1: 4)移入 100ml 烧杯中，加入浓盐酸 5ml，置于水浴锅上蒸干。

以 2ml 浓盐酸湿润烧杯，再加入 50ml 水、于水浴锅上加热数分钟，取下冷却，移入 100ml 容量瓶，定容。过滤，弃去开始滤液备用。

2. 标准曲线的绘制：用吸管吸取 $10\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}\text{F}^-$ 标准溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0ml 分别放入 7 只 50ml 容量瓶中，加入 10ml 总离子强度调节缓冲溶液，用水稀释至刻度，摇匀。即含 F^- 0.2、0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的标准系列，分别移入 150ml 烧杯中放入转子，按浓度由低到高的顺序依次插入电极，再搅拌下测定 mv 数记录。并做 $\text{mv} - \log C_{\text{F}^-}$ 曲线。

3. 待测液测定：吸取待测液 20—50ml 于 50ml 容量瓶中，用 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 调节近中性，加入 10ml 总离子强度调节缓冲液，用水稀释至刻度，摇匀。将其转入 150ml 烧杯，放入转子，插入电极，在搅拌下待电位稳定后读 mv 值

4. 空白：用蒸馏水代替，按测定样品进行测定。

5. 结果计算：

$$C_{\text{F}^-}(\mu\text{g}/\text{g}) = C \cdot V_1 \cdot (V/V_1) / W$$

式中：C——根据待测液中测定的电位值在标准曲线上查得的氟离子浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

V_1 ——测定电位值时所取得的浸提液的体积(ml)

V——样品制备时所得的浸提液的体积(ml)

W——称取农产品的总量(g)

实验五 农产品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定

一、实验目的

食品中硝酸盐、亚硝酸盐含量是影响食品品质、危害人体健康的重要污染物质之一。其在食品原料中的含量主要受环境中氮含量的影响。本实验的目的主要是通过实验让学生了解不同农产品中硝酸盐和亚硝酸盐含量状况，掌握其测定方法和步骤。

二、实验原理

(一)亚硝酸盐测定：样品经沉淀蛋白质、除去脂肪后，在弱酸条件下亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后，再与 N-1-萘基乙二胺偶合形成紫红色染料，与标准比较定量。

(二)硝酸盐测定：样品经沉淀蛋白质、除去脂肪后，溶液通过镉柱，或加入镉粉，使其中的硝酸根离子还原成亚硝酸根离子，在弱酸性条件下，亚硝酸根与对氨基苯磺酸重氮化后，再与 N-1-萘基乙二胺偶合形成红色染料，测得亚硝酸盐总量，由总量减去亚硝酸盐含量即得硝酸盐含量。

三、实验仪器、试剂（亚硝酸盐测定）

(一) 仪器：小型粉碎机；分光光度计；分析天平

(二) 试剂：实验用水为蒸馏水，试剂不加说明者，均为分析纯试剂。

1 氯化铵缓冲液：1L 容量瓶中加入 500mL 水，准确加入 20.0mL 盐酸，振荡混匀，准确加入 50mL 氢氧化铵，用水稀释至刻度。必要时用稀盐酸和稀氢氧化铵调试至 pH9.6~9.7。

2 硫酸锌溶液(0.42mol/L)：称取 120g 硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)，用水溶解，并稀释至 1000mL。

3 氢氧化钠溶液(20g/L)：称取 20g 氢氧化钠用水溶解，稀释至 1L。

4 对氨基苯磺酸溶液：称取 10g 对氨基苯磺酸，溶于 700mL 水和 300mL 冰乙酸中，置棕色瓶中混匀，室温保存。

5 N-1-萘基乙二胺溶液(1g/L)：称取 0.1gN-1-萘基乙二胺，加 60%乙酸溶解并稀释至 100mL，混匀后，置棕色瓶中，在冰箱中保存，一周内稳定。

6 显色剂：临用前将 N-1-萘基乙二胺溶液(1g/L)和对氨基苯磺酸溶液等体积混合。

7 亚硝酸钠标准溶液：准确称取 250.0mg 于硅胶干燥器中干燥 24h 的亚硝酸钠，加水溶解移入 500mL 容量瓶中，加 100mL 氯化铵缓冲液，加水稀释至刻度，混匀，在 4℃避光保存。此溶液每毫升相当于 500μg 的亚硝酸钠。

8 亚硝酸钠标准使用液：临用前，吸取亚硝酸钠标准溶液 1.00mL，置于 100mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，此溶液每毫升相当于 5.0μg 亚硝酸钠。

四、实验方法与步骤

1 样品处理

称取约 10.00g(粮食取 5g)经绞碎混匀样品，置于打碎机中，加 70mL 水和 12mL 氢氧化钠溶液(20g/L)，混匀，用氢氧化钠溶液(20g/L)调样品 pH=8，定量转移至 200mL 容量瓶中加 10mL 硫酸锌溶液，混匀，如不产生白色沉淀，再补加 2~5mL 氢氧化钠，混匀。置 60℃水浴中加热 10min，取出后冷至室温，加水至刻度，混匀。放置 0.5h，用滤纸过滤，弃去初滤液 20mL，收集滤液备用。

2 测定

2.1 亚硝酸盐标准曲线的制备：吸取 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mL 亚硝酸钠标准使用液(相当于 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25μg 亚硝酸钠)，分别置于 25mL 带塞比色管中。于标准管中分别加入 4.5mL 氯化铵缓冲液，加 2.5mL60%乙酸后立即加入 5.0mL 显色剂，加水至刻度，混匀，在暗处静置 25min，用 1cm 比色杯(灵敏度低时可换 2cm 比色杯)，以零管调节零点，于波长 550nm 处测吸光度，绘制标准曲线。

低含量样品以制备低含量标准曲线计算，标准系列为：吸取 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0mL 亚硝酸钠标准使用液(相当于 0, 2, 4, 6, 8, 10μg 亚硝酸钠)。

2.2 样品测定：吸取 10.0mL 上述滤液(1.1)于 25mL 带塞比色管中，自 2.1“于标准管中分别加入 4.5mL 氯化铵缓冲液”起依法操作。同时做试剂空白。

五 结果计算

$$X_1 = \frac{m_2 \times 1\,000}{m_1 \times \frac{V_2}{V_1} \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：X₁——样品中亚硝酸盐的含量，mg/kg；

m₁——样品质量，g；

m₂——测定用样液中亚硝酸盐的质量，μg；

V₁——样品处理液总体积，mL；

V₂——测定用样液体积，mL。

结果的表述：报告算术均值的二位有效数，相对相差≤10%。

六、硝酸盐测定

(一) 试剂

1 氯化铵缓冲溶液(pH9.6~9.7)：同 3.1。

2 硫酸镉溶液(0.14mol/L)：称取 37g 硫酸镉(CdSO₄·8H₂O)，用水溶解，定容至 1L。

3 盐酸溶液(0.1mol/L)：吸取 8.4mL 盐酸，用水稀释至 1L。

4 硝酸钠标准溶液：准确称取 500.0mg 于 110~120℃干燥恒重的硝酸钠，加水溶解，移于 500mL 容量瓶中，加 50mL 氯化铵缓冲液，用水稀释至刻度，混匀，在 4℃冰箱中避光保存。此溶液每毫升相当于 1mg 硝酸钠。

5 硝酸钠标准使用液：临用时吸取硝酸钠标准溶液 1.0mL，置于 100mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀，临用时现配。此溶液每毫升相当于 10μg 硝酸钠。

6 亚硝酸钠标准使用液同 3.8。

7 镉柱(镉粉)。

7.1 海绵状镉粉的制备：于 500mL 硫酸镉溶液中，投入足够的锌棒经 3~4h，当其中的镉全部被锌置换后，用玻璃棒轻轻刮下，取出残余锌棒，使镉沉底，倾去上层清液，以水用倾斜法多次洗涤，然后移入粉碎机中，加 500mL 水，捣碎约 2s，用水将金属细粒洗至标准筛上，取 20~40 目之间的部分，置试剂瓶中，用水封盖保存，备用。

7.2 镉柱还原效率的测定：取 25mL 酸式滴定管数支，向柱底压入 1cm 高的玻璃棉作垫，上置一小漏斗，将新配制的镉粉带水加入柱内，边装边轻轻敲击柱，排除柱内空气，加镉粉至 8~10cm 高，上面用 1cm 高的玻璃棉覆盖，上置一贮液漏斗。

当镉柱填装好后，先用 25mL 盐酸(0.1mol/L)洗涤，再以水洗两次，每次 25mL，调节柱流速至 3~5mL/min。镉柱不用时用水封盖，随时都要保持水平面在镉层之上，不得使镉层夹有气泡。

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

柱先加 25mL 氯化铵缓冲液，至液面接近海绵镉时，吸取 2.0mL 硝酸钠标准使用液(10μg/mL)，经柱还原，控制流速 3~5mL/min，用 50mL 容量瓶接收。加入 5mL 氯化铵缓冲液，液面接近海绵镉时，加入 15mL 水洗柱，还原液和洗液一并流入 50mL 容量瓶中。加 5mL 60%乙酸，10mL 显色剂，加水稀释至刻度，混匀，暗处放置 25min。用 1cm 比色杯，以标准零管调节零点，于波长 550nm 处测吸光度，根据亚硝酸盐标准曲线计算还原效率(如镉柱还原率小于 95%，应经盐酸浸泡活化处理)。

7.3 镉粉还原效率的测定：镉粉使用前，经盐酸浸泡活化处理，再以水洗两次，用水浸没待用。用牛角勺将镉粉加入 25mL 带塞刻度试管中，至 5mL 刻度；用少量水封住。吸取 2.0mL 硝酸钠标准使用液，加入 5mL 氯化铵缓冲液。盖上试管塞，振摇 2min，静止 5min，用漏斗颈部塞有少量脱脂棉的小漏斗过滤，滤液定量收集于 50mL 容量瓶中，用 15mL 水少量多次地洗涤镉粉，洗液与滤液合并。加 5mL 乙酸(60%)后，立即加 10mL 显色剂，加水稀释至刻度，混匀，暗处置 25min。用 1cm 比色杯，以标准零管调节零点，于 550nm 波长处测吸光度，根据亚硝酸盐标准曲线计算还原效率。

7.4 计算

$$X_2 = \frac{m_3 \times 1.232}{20} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：X₂——还原效率，%；

20——硝酸盐的质量，μg；

m₃——20μg 硝酸盐还原后测得亚硝酸盐的质量，μg；

1.232——亚硝酸盐换算成硝酸盐的系数。

(二) 实验方法与步骤

1 样品处理： 同 5.1。

2 测定(用镉柱法或镉粉法还原硝酸盐为亚硝酸盐)

2.1 甲法(镉柱法)：经活化的镉柱先加 25mL 氯化铵缓冲液，至液面接近海绵镉时，准确吸取 5.1 的样品滤液 10.0mL，加入镉柱还原。以下按 9.7.2 自“控制流速 3~5mL/min”起依法操作。

2.2 乙法(镉粉法)：准确吸取 5.1 的样品滤液 10.0mL，置于盛有高度 5mL 镉粉的 25mL 带塞刻度试管中。自“加入 5mL 氯化铵缓冲液...”按 9.7.3 依法操作。

注：蔬菜、腌菜类食品中硝酸盐含量较高，可根据样品中硝酸盐的实际含量，将样品溶液稀释至适当浓度。

(三) 结果计算

$$X_3 = \frac{(m_5 - m_4) \times 1.232 \times 1\,000}{m_4 \times (V_4/V_3) \times 1\,000} \dots\dots\dots(3)$$

式中：X₃——样品中硝酸盐的含量，mg/kg；

m₄——样品的质量，g；

m₅——经镉粉还原后测得亚硝酸钠的质量，μg；

m₆——直接测得亚硝酸盐的质量，μg；

1.232——亚硝酸钠换算成硝酸钠的系数。

V₃——样品处理液总体积，mL；

V₄——测定用样液体积，mL。

结果的表述：报告算术平均值的两位有效数，相对相差≤10%。

《食品毒理学》实验指导书

编者：王新

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

实验一 实验动物分组、标记与染毒

一、目的和意义

实验动物的分组、标记和合理染毒，是取得良好实验结果和结论的前提，也是每一个毒理学试验首先做的工作。通过本实验学习试验动物的科学分组、标记和常用基本染毒方法。

二、材料和试剂

- 1、实验动物：成年健康小白鼠
- 2、染料 结晶紫、苦味酸、品红。
- 3、毛笔或棉签
- 4、动物称或天平。

三、实验方法和步骤

（一）健康动物的选择

无论选择哪种种属品系的动物进行实验，均要求选择健康的实验动物。健康动物检查时要求达到：外观体形丰满，被毛浓密有光泽、紧贴体表，眼睛明亮，行动迅速，反应灵活，食欲及营养状况良好。

（二）实验动物性别的鉴定

动物性别不同对毒物的敏感性也不同，这可能与性激素、肝微粒体羟基化反应有关，也随受试物而异。因此，要根据实验要求选择性别，一般实验如对性别无特殊要求者，以选用雌雄动物各半。

1. 大鼠、小鼠主要以肛门与生殖空间的距离区分，间距大者为雄性，小者为雌性。
2. 豚鼠 用一只手抓住豚鼠颈部，另一只手扒开靠生殖器孔的皮肤，雄性动物在圆孔中露出性器官的突出，雌性动物则现出三角形间隙，成年雌性胸部有二个乳头。

3. 家兔

(三) 实验动物的抓取方法

1. 小鼠 先用右手抓取鼠尾提起，置于鼠笼或实验台上向后拉，在其向前爬行时，用左手拇指和食指抓住小鼠的两耳和颈部皮肤，将鼠体置于左手心中，把后肢拉直，以无名指按住鼠尾，小指按住后腿即可。

2. 大鼠的抓取方法 基本同小鼠，但因大鼠凶猛，不宜采取袭击方法抓取。为避免咬伤，可带上帆布或棉纱手套。采用左手固定法，用拇指和食指捏住鼠耳，余下三指紧捏鼠背皮肤，置于左掌心中，这样右手可进行各种实验操作。

3. 豚鼠的抓取方法 豚鼠胆小易惊，在抓取时要稳、准、迅速。用手掌迅速扣住鼠背，抓住其肩胛上方，以拇指和食指环握颈部，另一只手托住臀部即可。

4. 兔的抓取方法 用右手抓住兔颈部的毛皮提起，然后左手托住其臀部或腹部，让其体重的大部分重量集中在左手上。

(四) 实验动物的随机分组法

1. 随机数字分组法

2. 随机区组分组法

(五) 实验动物的编号、标记方法

1. 称重 大、小鼠秤的感应量需在 0.1g 以下。根据实验的不同要求，选择一定数量的大小鼠，体重要求在同一组内、同性别动物体重差异应小于平均体重的 10%，不同组间同性别动物体重均值差异应小于 5%。

2. 编号

(1) 染色法：一般用苦味酸。一般头部为 1，右前腿为 2，右腰为 3，尾基部为 5，左后腿为 6，左腰为 7，左前腿为 8，背部为 9。

(2) 剪耳法

(3) 烙印法

(4) 号牌法

(六) 实验动物染毒途径和方法

1. 皮下注射

2. 皮内注射

3. 肌肉注射

4. 腹腔注射

5. 静脉注射

(1) 兔：常用耳外缘静脉；

(2) 小白鼠：一般为静脉注射（左右二侧的）；

6. 经口染毒：灌胃，胶囊，自由采食。

7. 其他途径给药：

(1) 呼吸道染毒

(2) 皮肤染毒：a. 斑贴法；b. 浸尾法

实验二 实验动物生物材料采集和制备

一、目的与意义

研究外来化合物的毒性效应。常需测定动物接触外来化合物后，血液、尿液和组织中的化合物或其代谢产物的浓度，以及分析测定化合物所致的生物化学的变化。为此，采集和制备生物材料就成为食品毒理学的重要基础技术之一。

本实验主要学习食品毒理学试验中常用生物材料的采集和制备方法。

二、内容

- 1、实验动物大鼠、小鼠和家兔的采血方法。
- 2、实验动物血清与细胞分离技术。
- 3、大鼠尿液收集方法。
- 4、脑或肝组织匀浆制备技术。

三、试剂和材料

(一) 实验动物：成年小鼠、大鼠和家兔。

(二) 器材

- 1、家兔盒，兔固定架，大小鼠固定板。
- 2、解剖器材 大剪刀，镊子，儿科小骨钳。
- 3、其他器材 离心管(2-10ml)，玻璃毛细管(内径1-1.5ml)，注射器(1, 2, 5和10ml)及相应针头，吸管(5-10ml)，滴管，匀浆机，培养皿(直径5-10ml)。
- 4、仪器设备 离心机(4000r/min)，搅拌机(2000r/min)，大小鼠代谢笼。动物称，电子天平。

(三) 试剂

- 1、抗凝剂 0.5%肝素生理盐水溶液。
- 2、生理盐水或PBS缓冲液。

(四) 其他

碘酒、酒精棉球、滤纸。

四、操作步骤

(一) 血液的采集

1、大鼠与小鼠的采血方法：

① 鼠尾采血：当所需血量很少时采用本法。固定动物并露出鼠尾，将尾部浸入45~50℃温水中数分钟，使尾静脉充血，擦干，再用酒精棉球擦试消毒。剪掉尾尖(约0.2~0.3cm)，拭去第一滴血。然后用血色素吸管定量吸取尾血，或将尾血直接滴入容器内。采血完毕用干棉球压迫止血。亦可不剪尾，用7~8号注射针头连上注射器直接刺破尾静脉采血。

② 眼眶静脉丛采血：当需用中等量的血液，而又避免动物死亡时采用本法。左手拇指及食指紧紧握住大鼠或小鼠颈部，压迫颈部两侧使眶后静脉丛充血，但用力要恰当，防止动物窒息死亡。右手持玻璃毛细管从右眼或左眼内眦部以45°角刺入，刺入深度小鼠约2~3mm，大鼠4~5mm。若遇阻力稍后退调整角度后再刺入，如穿刺适当，血液能自然流入毛细管内。得到所需的血量后，即除去加于颈部的压力，拔出毛细管，用干棉球压迫止血。

③断头采血：当需用较大的血液，而又不需继续保存动物生命时采用本法。左手握住动物，右手持剪刀，快速剪掉头颈部，倒立动物让血液滴入容器。需注意防止断毛落入容器中。

2、家兔采血方法：

①耳缘静脉采血：本法为最常用的取血方法之一，可多次反复取血。将家兔固定于兔箱中，拔掉拟采血耳缘部细毛，用手指轻轻弹耳或电灯照射兔耳，使耳部血管扩张，然后消毒。左手压迫耳根，用针头刺破静脉或以刀片在血管上切一小口，让血液自然流出。也可直接用注射器进针耳缘静脉抽取血液。采血完毕用干棉球压迫止血，如一时不易止血，可用木夹夹住耳壳10~20分钟。

②心脏穿刺采血：将家兔仰卧位固定在兔台上或由助手捉持，在左胸第2~4肋部剪毛，常规消毒。于第3~4肋胸骨左缘心跳最明显处穿刺，针头刺入心脏后即见血液涌入注射器。采血完毕迅速将针头拔出，这样心肌上的穿刺孔较易闭合，针眼处用酒精棉球压迫止血。体重2公斤的家兔每隔2~3周可重复采血10~20ml。

③股动脉采血：将家兔仰卧固定在兔台上，左手拉直动物后肢，右手持注射器，以血管搏动为指标，将针头刺入股动脉。若已刺入动脉，即有鲜红色血液流入注射器。抽血完毕迅速拔出针头，用干棉球压迫止血。

3、狗的采血方法：

①后肢外侧小隐静脉和前肢皮下头静脉采血：本法最常用，且方便。后肢外侧小隐静脉位于后肢胫部下1/3的外侧浅表的皮下，由前侧走向后上侧，前肢皮下头静脉位于前肢脚爪上方背侧的正前方。抽血前，将狗固定在狗台上或使狗侧卧，由助手固定好。剪去抽血部位的毛，常规消毒。一人用力压迫静脉近心端或用止血带绑紧，使静脉充盈，另一人持注射器进行静脉穿刺。取得所需血量后拔出针头，以干棉球压迫止血。

②耳缘静脉采血：当需少量血液或作血常规检查时，可用狗的耳缘静脉采血法。剪毛后先将狗的耳壳加热，或用二甲苯棉球擦耳壳，然后以刀片切割已扩张的血管，使血液滴入容器。采血完毕，以干棉球压迫切割口以止血。

4、采集血液的注意点：

①实验动物一次采血量过多或采血过于频繁，都可影响动物健康，造成贫血甚至死亡，其最大安全采血量见表1。

②采血方法的选择，主要取决于实验的目的和所需血量的多少，所需血量较少时可刺破组织取毛细血管的血，当需血量较多时可作静脉采血，若需反复多次静脉采血时，应自远心端开始。

③若需抗凝全血，在注射器或试管内需预先加入抗凝剂，常用的抗凝剂有：

A、草酸钾：常用于供检验用血液样品的抗凝。在试管内加饱和草酸钾溶液2滴，均匀浸湿管壁后，放入烘箱（80℃）烤干，包好备用。每管能使3~5ml血液不凝固，供钾、钙含量测定的血样不能用草酸钾抗凝。

B、肝素：取1%肝素溶液0.1ml于试管内，均匀浸湿试管内壁，放入烘箱（80~100℃）中烤干。每管能使5~10ml血液不凝固。市售的肝素注射液每ml含肝素12.500U，相当于肝素钠125mg。

C、枸橼酸钠：3.8%的枸橼酸钠溶液1份可使9份血液不凝固，用于红细胞沉降速率测定。因其抗凝作用较弱而碱性较强，不适用于供化验用的血液样品。

（二）血清与细胞分离

1、制备血清 将全血置于4℃冰箱中保存3—4h，以1500—2000r/min离心15min。上清液呈淡黄色即为血清，吸出备用；如上清液呈淡红色（甚至红色），表明有溶血，一般应废弃。

2、细胞分离 分离血细胞时，采血所有器皿均先行抗凝剂处理。即先将抗凝剂吸入所有器具中，使在器壁上均匀涂布。采血时使抗凝剂溶于血中，并混匀。2000r/min离心20min，吸出上清血浆。血浆与红细胞之间白细胞，需要时，把白细胞转入到另外离心管，不需要则废弃。离心管所留的红细胞，加入等体积的生理盐水，轻轻混匀红细胞，再次离心，弃去上清液。如此洗涤3次，直至上清液为无色透明为此，即获得红细胞。白细胞可依相同洗涤处理。

（三）尿液的收集

1、一次尿收集法：在实验研究中，有时为了某种实验目的，要求每间隔一定的时间收集一次尿液，如每4小时收集一次，以观察药物的排泄情况。此种情况下，常用以下方法收集尿

液。

①逼尿法：本法适用于兔、猫。助手把动物抱住，操作者右手由腹腔向下逐渐用力压迫膀胱，逼出尿液。

②导尿法：本法适用于兔、猫、猴和狗等动物，是较常用的方法之一。动物取仰卧位固定于手术台上，尿道口常规消毒。以左手充分暴露尿道口且固定之，右手持导尿管（尖端涂有消毒凡士林或液体石蜡）顺尿道轻而慢地插入，家兔插入约8~12cm，一旦进入膀胱腔，即见尿液流出。若无尿流出，可将导尿管适当上下左右移动，到尿液流出为止，然后用胶布将导尿管与动物体固定。

③输尿管插管法：本法适用于兔、猫、猴和狗。以兔为例：将兔麻醉后仰卧位固定在手术台上，于耻骨联合上缘沿正中腹白线作一4~6cm的切口，打开腹腔，在膀胱底两侧找出左右两根输尿管，分离后于两根输尿管下各穿两根线，一根结扎近膀胱端，在结扎线上方向肾脏方向剪一小口插入导管，用另一线结扎。将两根导管的游离端一并放入量筒内收集尿液。实验过程中，应用温生理盐水纱布覆盖手术野，以保持腹腔温度。

2、连续收集尿液的方法

大鼠和小鼠的留尿法：在小动物的毒理实验中，常常收集24小时或某特定时间内的尿液。为此常用代谢笼配上粪尿分离漏斗收集尿液，此装置除支架外均用玻璃或有机玻璃制成，便于清洗。该装置主要包括圆形有机玻璃笼罩，带孔的圆玻璃底盘，供饮水和食料的装置，锥形集尿漏斗和粪尿分离器等。动物置于代谢笼内，粪尿分离漏斗的侧口接一只150~200ml的集尿容器收集尿液。

一般5~6小时内，平均每只小鼠可收集到0.4~0.5ml的尿液。如留尿前给予灌胃，每克体重灌液0.02ml，则可增至0.7~0.8ml。未经水负荷的正常大鼠，排尿量约为0.5ml/100g体重/小时。

猫和兔连续集尿装置的组成部分与大鼠的基本相同。但代谢笼常用铁丝和搪瓷制成。集尿的容器要大一些。

3、收集尿液的注意点

①尿液收集器必须保证粪尿分开，防止粪便污染尿液。标本容器务须洁净，其容量视动物而定。

②标本收集后，须在新鲜时进行检验，若需放置时间较久，则须贮放在冰箱或加入适当的防腐剂。

③分析尿中金属离子时，代谢笼等应避免用金属材料制成，集尿容器最好用聚乙烯材料的。

④为了满足实验所需尿量，在收集尿液前，可灌喂适量的水及青菜。

（四）实验动物组织匀浆的制备

动物处死后，立即取出所需组织，置于干冰内备用。或置于冰块上，轻轻除去表面的凝血及结蒂组织等附属物，再经冰冷生理盐水洗涤几次，用滤纸吸干水份，称取一定重量的组织备用。如有特殊需要或短期保存，应放入液氮中或冰箱冻结。

将已剥离处理好的脏器定量置于匀浆器中，按设计要求加入一定比例的溶液。以肝组织匀浆为例，称取1克重的肝组织，在表面皿内剪碎后，以1:9（1份肝组织加9份0.155M KCl溶液）在匀浆器中稀释，用电动搅拌器以3,000转/分的转速研磨2~3分钟。再经3,000转/分的转速，在4℃中离心10~15分钟。取上清液即可测定肝组织匀浆的酶活力（GPT或GOT）。

当制备组织药物萃取的组织匀浆时，基本方法同上，但匀浆的操作不一定在冷冻条件下进行。组织块与适宜比例的无离子水研磨成匀浆后，匀浆不必离心。但有时需水解，使结合的药物变成游离状态，再加入萃取用的有机溶剂，振荡、抽提，使药物或代谢产物萃取入有机溶剂内，从而达到与组织分离的目的。

实验三 急性毒性试验（改进寇氏法）

一、目的与要求

1、学习化学物急性毒性试验设计，掌握LD₅₀的测定方法。

2、观察辛硫磷的毒性反应。

二、实验原理

急性毒性试验是指受试动物在一次大剂量给药后所产生的毒性反应和死亡情况。药物毒性的大小，常用动物的致死量来表示，因为动物生与死的生理指标较其他指标明显、客观、容易掌握。致死量的测定也较准确。在测定致死量的同时，还应仔细观察动物是否出现耸毛、倦卧、耳壳苍白或充血、突眼、步履蹒跚、肌肉瘫痪、呼吸困难、昏迷、惊厥、大小便失禁等不良反应。

致死量的测定常以半数致死量为标准。半数致死量是指能够引起试验动物一半死亡的剂量，用符号 LD_{50} 表示。由于 LD_{50} 的测定较简便、可靠，而且稳定，现已成为标志动物急性中毒程度的重要常数。 LD_{50} 测定的方法有多种，如 Bliss 法、改进寇氏法、简化机率单位法、累积插值法、机率单位-加权直线加归法等等。以上方法虽各有特点，但都有共同的要求：

(1) 动物：均选用体重 17~22 克健康小鼠（同次试验体重相差不得超过 4 克），或选用体重 120~150 克（同次试验体重相差不得超过 10 克）健康大鼠作实验动物。性别相同或雌雄各半。

(2) 给药途径：尽量使受试动物与人对受试物的实际接触途径相一致。食品毒理学一般选用经口途径。主要采用灌胃。

(3) 试验周期和观察指标：给药后至少观察 7 天。观察期间应逐日记录动物的毒性反应情况和死亡动物的分布。

(4) 正式试验前，均须先用少量动物进行预试试验，大致测出受试药物引起 0% 和 100% 死亡率的致死量范围，然后安排正式试验。正式试验组数不得少于三个剂量组，一般选用 4~5 个剂量组，每组动物数为 10~20 只。

(5) 报告 LD_{50} 时需注明实验动物的种属及品系、性别、体重范围、给药途径及每个剂量组动物数等，还需注明受试药物的配制方法、给药剂量、各组剂量间的比值（一般以 0.65~0.85 为宜）、给药容积、观察时间及计算方法。还须标出 LD_{50} 的 95% 可信限。

三、实验材料和试剂

动物：小鼠

药品：辛硫磷

器材：注射器、灌胃针头、鼠笼

四、操作方法

1、预试实验：预试实验目的是为了找出引起动物 0% (D_n) 和 100% (D_m) 死亡的剂量，以便安排正式实验。预试实验一般采用少量动物（6~9 只小鼠）进行，将动物随机分为 3 组，组间剂量比值一般以 1: 0.5 或 1: 0.7 为宜。灌服或腹腔注射量以 0.2ml/10g 体重为度。预试实验应进行到找出 D_n 和 D_m 后方可安排正式实验。

2、正式实验：在预试实验测得 D_n 和 D_m 的剂量范围内设 4~6 个剂量组，最多 10 组。最理想的结果是使 LD_{50} 的上下各有 2~3 组。组数愈少，准确性愈差。各剂量组的动物要求相等，至少 10 只动物（分组时应注意分层随机均匀化的原则）。本实验要求最大反应率为 100%，最小反应率为 0%，或至少反应率接近 100% 或 0%。组间剂量比值（1: K），常用 1: 0.8 或 1: 0.75。如实验中出现相邻剂量有重复的 100% 和 0% 反应率时，应将靠边的组弃去不计，使大剂量组只有一个 100% 的反应率，小剂量组也只有一个 0% 的反应率。

分组完毕和各组剂量算出后，分组灌服或注射不同剂量的受试药物。为能得到理想的结果，实验最好从中间剂量开始，以便从最初几个剂量组动物接受药物后的反应来判断两端剂量是否合适，便于调整剂量和组数。为了提高实验的精确度和节省药物，受试药物可按“低比稀释法”配置。即使每只动物的用药体积相等（0.2ml/10g），而溶质不等。给药后逐日观察并记录中毒反应、死亡率和死亡情况。

五、实验结果记录与计算辛硫磷对小鼠死亡率的影响

辛硫磷对小鼠死亡率的影响

组别	剂量 g/kg (d)	Logd (X)	死亡数	死亡率 (P)	p ²	P-p ²
1						
2						
3						
4						

公式 1: LD₅₀ 值计算 $\lg LD_{50} = X_m - i(\sum P - 0.5)$

公式 2: lgLD₅₀ 标准误 $S_{\lg LD_{50}}$

$$S_{\lg LD_{50}} = ix \sqrt{\frac{\sum Pq}{n}}$$

公式 3: LD₅₀ 的 95%可信限 = $\lg^{-1} (\lg LD_{50} \pm 1.96 \times S_{\lg LD_{50}})$

LD₅₀ 的平均可信限 = $LD_{50} \pm (LD_{50} \text{ 高限} - LD_{50} \text{ 低限}) / 2$

X_m: 最大剂量组剂量的对数值

i: 相邻两组剂量 (d) 对数值之差, 或相邻两组高剂量与低剂量之比的对数。

P: 各组动物的死亡率, 用小数表示。

$\sum P$: 为各组动物死亡率的总和。

n: 每组动物数。

S_{lgLD₅₀}: logLD₅₀ 的标准误。

《食品免疫学》实验指导书

编者：王新

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

实验一免疫相关的细胞形态的观察

目的要求:

观察与免疫相关的几种细胞的形态,了解它们在机体免疫反应中的作用。

实验原理:将血液样品制成单层细胞的图片标本,经瑞氏(Wright)染色后,不同免疫细胞中的颗粒可以呈现不同的颜色。根据细胞中颗粒的颜色、大小及多少,再结合细胞大小及细胞核的形态,就可以将免疫细胞进行分类计数。

实验器材:显微镜、血液涂片(瑞氏染色)、酒精棉球、镊子、经脱脂洗净的载玻片等。

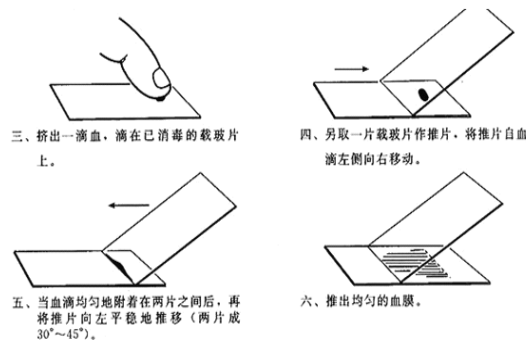
实验试剂:瑞氏(Wright)染液。

方法:油镜观察

实验步骤:

1、采血 动物采血时先将耳部剪毛,酒精消毒后,刺破动物耳部皮肤,挤去第一滴不要(因含单核细胞较多)。

2、涂片 挤出第二滴血置于载玻片上的一端,再取另外一张边缘光滑的载玻片,斜置于血涂片的前缘,先向后稍移动轻轻触及血液,使血液沿载玻片端展开成线状,两玻片的角度以30—40度为宜(角度过大血膜较厚,角度小则血膜薄),轻轻将载玻片向前推进,即涂成血液薄膜(如下图),推进时速度要一致,否则血膜成波浪形,厚薄不均。



3、染色 待涂片在空气中完全干燥后,滴加数滴瑞氏染液盖满血膜为止,染色1—3min。然后滴加等量的缓冲液(PH6.4)或蒸馏水冲去染液,吸水纸吸干,镜检。

4、封片 经染色的涂片完全干燥后,用中性树脂封片。(我们不作)

5 观察 分别用低倍、高倍和油镜观测血涂片,分辨不同的血细胞类型。

(A) 红细胞:淡红色,无核的圆形细胞,因红血球为双凹形,故边缘部分染色较深,中心较浅,直径7—8微米。

(B) 颗粒白血球

嗜中性颗粒白血球:体积略大于红细胞,细胞核被染成紫色分叶状,可分1—5叶,核

叶之间联以染色质细丝，染色质染成粉色，其中充满细小的大小均匀的颗粒被染成紫红色。直径 10—12 微米。

嗜酸性颗粒白血球：略大于嗜中白血球，细胞核染成紫色，通常为 2 叶，胞质充满嗜酸性大圆颗粒，被染成鲜红色。直径 10—15 微米。

嗜碱性颗粒白血球：体积略小于嗜酸性白血球，细胞质中有大小不等被染成紫色颗粒，颗粒数目较嗜酸性白血球的颗粒少，核为 1—2 叶染成淡兰色。直径 10—11 微米。

(C) 无颗粒白血球

淋巴细胞：涂片中可观察到中、小型两种。小淋巴细胞与红血球大小相似，圆形。其中含致密的核，染成深紫色。周围仅有一薄层嗜硷性染成淡蓝的细胞质。中淋巴细胞较大，有较宽层的细胞，核圆形。6-8 微米。

单核细胞：体积最大，细胞圆形。胞质染成灰蓝色。核呈肾形或马蹄形，染色略浅于淋巴细胞的核。直径 14-20 微米。

(D) 肥大细胞的观察

胞体较大，呈卵圆形，胞质内充满粗大均等的嗜硷性颗粒。其中含肝素、组织胺等物质。常成群地分布于血管的周围。





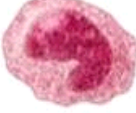


(E) 浆细胞的观察

细胞呈圆形或卵圆形，胞质丰富，呈嗜硷性。核圆形，着色深，多偏于细胞的一侧，染色质核膜呈车轮分布。正常组织浆细胞少，慢性炎症时增多。浆细胞合成和分泌抗体，对免疫有重要意义。

(F) 巨噬细胞：又称组织细胞，细胞形态不规则。常伸出短而钝突起，有很强的吞噬能力。

(G) 观察完血液后，进行免疫器官（脾脏，淋巴结等）的观察。

血细胞

红细胞	白细胞				血小板	
	粒细胞			单核细胞	淋巴细胞	
	中性细胞	嗜酸性粒细胞	嗜碱性粒细胞			
						

附：

瑞特氏染色：

1. 染色液配置

称取瑞特氏染料 0.1 克溶于 60ml 甲醇中，过滤。贮褐色瓶中备用。（配置时，要先将瑞特氏染料置研钵体内边研边滴加甲醇，使染料溶液得更好。）

2. 瑞特氏染色法：

取小鼠骨动脉血，涂制玻片。干后用玻璃笔在涂处之两侧划线（限制染液流掉）。于划线内部滴加染液 3-4 滴，经 3-5 分钟后，再滴加等量的蒸馏水，轻轻晃动混合。经 5 分钟后，用蒸馏水洗净，待干后用油镜检查

实验二 多克隆抗体的制备

【实验目的】

1. 加深对抗体基本知识的了解。

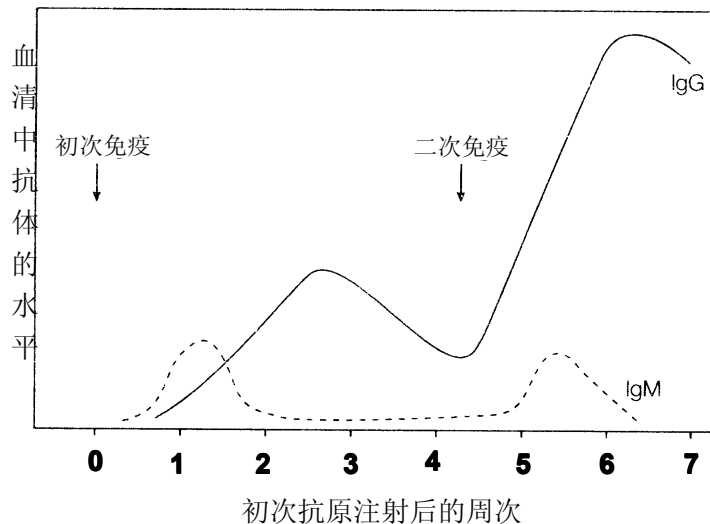
一、多克隆抗体的制备

【实验原理】

当将抗原注射入实验动物体内时，一系列抗体生成细胞会不同程度的与抗原结合，受抗原刺激后在血液中产生不同类型的抗体，这种由一种抗原刺激产生的抗体称为多克隆抗体。多克隆抗体中不同的抗体分子可以以不同的亲和能力与抗原分子表面不同的部分—抗原决定簇相结合。

将抗原导入敏感动物体内后，可刺激网状内皮细胞系统，尤其是淋巴结和脾脏中的淋巴细胞大量增殖。如图所示，实验动物对初次免疫和二次免疫的应答有明显的不同。通常初次免疫应答往往比较弱，尤其是针对于易代谢，可溶性的抗原。首次注射后大约7天，在血清中可以观察到抗体但抗体的浓度维持在一个较低的水平，在大约10天左右抗体的滴度会达到最大值。但同种抗原注射而产生的二次免疫应答的结果明显不同，和初次免疫应答相比抗体的合成速度明显增加并且保留时间也长。

免疫应答的动力学结果取决于抗原和免疫动物的种类，但初次和二次免疫应答之间的关系是免疫应答的一个重要特点。三次或以后的抗原注射所产生的应答和二次应答结果相似：抗体的滴度明显增加并且血清中抗体的种类和性质发生了改变，这种改变被称为免疫应答的成熟，具有重要的实际意义。通常在抗原注射4-6周后会产生具有高亲和力的抗体。



【实验材料】

1. 实验动物

成年兔。

2. 实验器材

特制兔盒；刀片；25G 针头；1ml 注射器；20 ml 血液收集管；药铲；离心机以及塑料离心管；加样器及加样管；烧杯。

3. 实验试剂

- (1) 抗原；乙醇；20mM 磷酸缓冲溶液 pH7.2。

(2) 福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂:

福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂的成分

成分		完全佐剂	不完全佐剂
石蜡油	6 份	+	+
无水羊毛脂	4 份	+	+
杀死的分枝杆菌	3-5 mg	+	-
磷酸缓冲溶液	10 份	+	+

(福氏完全佐剂的制备: 使用前在福氏不完全佐剂中加入适量杀死的分枝杆菌)

【实验方法】

1. 抗原的制备

抗原制备的主要目的在于在免疫动物体内产生最强、最适当的抗体。由于纯化的抗原适合产生抗体, 因此在注射前通常采用一些经典的方法, 比如柱层析、分级萃取、亚细胞分离等进行抗原的分离和纯化。如果多肽抗原在 SDS/PAGE 中为可见的单一带, 抗原从凝胶中的抽提可作为纯化的最后一个步骤。

2. 预放血

轻轻的将兔子放在特制兔盒中, 处于放松状态的兔子采血会较容易。按压兔子耳根部直至血管突出, 然后将针头插入耳部血管的中上部, 观察到进针后小心推出活塞收集血液 1ml-5ml。结束收集后, 退出针头并按压伤处以制止血流, 再用乙醇消毒。取收集的血液在 37°C 恒温箱中放置 30 分钟以防止激活补体系统, 再将试管在 4°C 放置过夜使血液凝固。用药铲将血凝块从管壁上拨落, 将血液转移至塑料离心管中, 4°C, 10,000g 离心 10 分钟, 收集上清液在 4°C 保存。

3. 注射抗原

(1) 准备两只成年兔, 将 100 μ g 抗原/兔溶于 1ml 磷酸缓冲溶液中待用。在 1ml 福氏不完全佐剂中加入分枝杆菌制成完全佐剂, 并加入 1ml 抗原溶液, 剧烈震荡使之充分乳化, 用 3ml 注射器抽取该乳化液, 接上 25G 针头, 排除注射器中的气泡。从笼中取出兔子放在平坦处, 在 4 个不同的部位进行皮下注射, 两处是在后背, 两处在大腿处。抚去注射处的兔毛并用乙醇消毒暴露的皮肤。捏出皮肤, 将针头以相对皮肤 15 度的角度进针, 进针深度为 1cm-2cm, 小心不要刺入肌肉中, 在 4 个不同部位分别各注射约 500 μ l 抗原溶液。注射结束后, 将针在注射处放置几秒钟后再轻轻拔出, 并用乙醇在注射处消毒。在 4 个部位重复上述操作。用相同方法免疫另一只家兔。

(2) 每 4-6 周注射抗原, 并在注射后的 7 天-10 天按照步骤 2 收集血液。将收集的血液与注射前收集的血液进行比较, 检查是否有抗体产生。待确定产生抗体后可大量收集血液, 但每只兔子收集血液不能多于 40ml 以防止休克。

4. 收集血液

(1) 将家兔轻轻放入固定架上, 二甲苯涂于耳部血管的上中部, 用刀片倾斜 45°在该处切出 0.23cm-0.3cm 的切口使血液能自由的流出。用消毒后的管收集滴出的血液, 若在结束之前出现凝固可用温水轻擦切口处, 再继续收集。收集适量血液后可用消毒后的纱布轻擦患处, 轻按患处 10 秒-20 秒确定血流停止后方可结束。

(2) 将血液在 37°C 恒温箱中放置 30 分钟, 再在 4°C 放置过夜。用药铲将血凝块从管壁上拨落, 将血液转移至塑料离心管中, 4°C, 10,000g 离心 10 分钟, 收集上清液即为抗血清, 可在 -20°C 保存数年。

实验三 沉淀反应

可溶性抗原与相应的抗体混合，在电解质存在的条件下，两者比例适合，即可有沉淀物出现，叫沉淀反应（Precipitation）。由于沉淀反应抗原多系胶体溶液。沉淀物主要是由抗体蛋白所组成。

为了求得抗原与抗体的适宜比例，保证有足够的抗体，而且抗原分子小，具有较大的反应面积，因此操作上通常是稀释抗原，不稀释抗体。

沉淀反应的种类有环状沉淀、絮状沉淀、荚膜膨胀、琼脂扩散及免疫电泳等。此外还有放射性同位素标记、酶标记等测定法。

（一）环状沉淀反应

当抗原与相应抗体形成一个接触面时，如二者比例适当，接触面上可形成一个乳白色的环状物即为阳性沉淀反应。

材料：

1. 免疫血清：卵清蛋白抗体
2. 抗原：卵清蛋白
3. 小沉淀管、毛细吸管、橡皮头、生理盐水。

方法：

1. 取小沉淀管 2 只，以毛细吸管吸取抗人血清约 0.2 毫升，加入第一管，加时注意不能有气泡。
2. 以毛细吸管吸取生理盐水 0.2 毫升加入第二管。
3. 用毛细吸管吸入血稀释 0.2 毫升加入各管，加时应注意使抗原溶液缓缓由管壁流下，轻浮于血清面上，使成一明显界面，切勿使之相混。
4. 置室温中 10—20 分钟，观察液面有无乳白色沉淀环，若有则为阳性。

（二）.琼脂扩散试验

琼脂扩散是抗原抗体在凝胶中所呈现的一种沉淀反应。

抗体在含有电解质的琼脂凝胶中相遇时，便出现可见的白色沉淀线。这种沉淀线是一组抗原抗体的特异性复合物。如果凝胶中有多种不同抗原抗体存在时，便依各自扩散速度的差

异，在适当部位形成独立的沉淀线，因此广泛地用于抗原成分的分析。琼脂扩散试验可根据抗原抗体反应的方式和特性分为单向免疫扩散、双向免疫扩散、免疫电泳、对流免疫电泳、单向及双向火箭电泳试验。

(1) 单向琼脂扩散试验

方法:

1. 将适当稀释（事先滴定）的诊断血清与予溶化的 2%琼脂在 60℃水浴预热数分钟后等量混合均匀制成免疫琼脂板。

2. 在免疫琼脂板上按一定距离（1.2—1.5 厘米）打孔，见图 1。



图 1 单向琼脂扩散试验抗原孔位置示意图
1-5 孔加参考血清，6-7 孔加待检血清

3. 向孔内滴加 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32 稀释的参考血清及 1: 10 稀释的待检血清，每孔 10 微升，此时加入的抗原液面应与琼脂板一平，不得外溢。

4. 已经加样的免疫琼脂板置湿盒中 37℃温箱扩散 24 小时。

5. 测定各孔形成的沉淀环直径(mm),用参考血清各稀释度测定值绘出标准曲线，再由标准曲线查出被检血清中免疫球蛋白的含量。

(2) 双向琼脂扩散试验

材料：抗体与抗原与环状沉淀反应相同。

方法:

1. 取一清洁载玻片，倾注 3.5—4.0 毫升加热熔化的 1%食盐琼脂制成琼脂板。

2. 凝固后，用直径 3 毫米打孔器，孔间距为 5 毫米。孔的排列方式如图 2 所示。

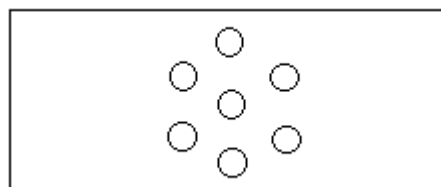


图 2 双向琼脂扩散原抗体孔位置示意图

3. 用微量进样器于中央孔加抗体，于周围孔加各种抗原。加样时勿使样品外溢或在边缘残存小气泡，以免影响扩散结果。

4. 加样后的琼脂板收入湿盒内置 37℃温箱中扩散 24—48 小时。

5. 结果观察：若凝胶中抗原抗体是特异性的，则形成抗原—抗体复合物，在两孔之间出现一清晰致密白色的沉淀线，为阳性反应。若在 72 小时仍未出现沉淀线则为阴性反应。实验时至少要做一阳性对照。出现阳性对照与被检样品的沉淀线发生融合，才能确定待检样品为真正阳性。

6. 结果分析：琼脂扩散结果受许多因素影响。

①抗原特异性与沉淀线形状的关系：在相邻两完全相同的抗原与抗体反应时，则可出现两单沉淀线的融合。反之，如相邻抗原完全不同时，则出现沉淀线之交叉；两种抗原部分相同时，则出现沉淀线的部分融合。见图 3。

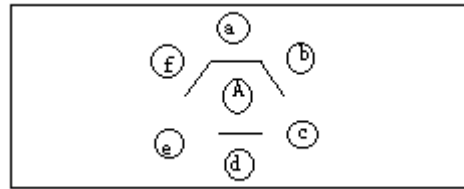


图 3 双扩散试验结果示意图

A: 已知抗体 a、b: 阳性对照

c、d、e、f: 被检材料

②抗原浓度与沉淀线形状的关系：两相邻抗原浓度相同，形成对称相融合的沉淀线；如果两抗原浓度不同，则沉淀线不对称，移向低浓度的一边。见图 4。

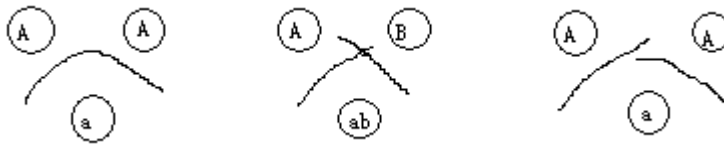


图 4 抗原浓度与沉淀线形状的关系

a、b: 抗体 A、A'、B: 抗原

A、B 完全不同 A、A'部分相同

③温度对沉淀线的影响：在一定范围内，温度扩散快。通常反应在 0-37℃下进行。在双向扩散时，为了减少沉淀线变形并保持其清晰度，可在 37℃下形成沉淀线，然后置于室温或冰箱（4℃）中为佳。

④琼脂浓度对沉淀线形成速度的影响：一般来说，琼脂浓度越大，沉淀线出现越慢。

⑤参加扩散的抗原与抗体间的距离对沉淀线形成的影响：抗原、抗体相距越远，沉淀线形成的越慢，所以在微量玻片法时，孔间距离以 0.25-0.5cm 为好，距离远影响反应速度。当

然孔距过远，沉淀线的密度过大，容易发生融合，有碍对沉淀线数目的确定。

⑥时间对沉淀线的影响：沉淀线形成一般在 1-3 天出现，14-21 天出现的数目最多。玻片法可在 1-2 小时出现，一般观察 72 小时，放量过久可出现沉淀线重合消失。

（三）对流免疫电泳试验

对流免疫电泳是在琼脂扩散基础上结合电泳技术而建立的一种简便而快速的方法。此方法能在短时间内出现结果，故可用于快速诊断，敏感性比双向扩散技术高 10-15 倍。

血清蛋白在 PH8.6 条件下带负电荷，所以在电场作用下都向 E 极移动。但由于抗体分子在这样的 PH 条件下只带微弱的负电荷，而且它的分子量又较大（为 r 球蛋白）。所以游动慢。更重要的是抗体分子受电渗作用影响较大，也就是说电渗作用大于它本身的迁移率。所谓电渗作用是指在电场中溶液对于一个固定固体的相对移动。琼脂是一种酸性物质，在碱性缓冲液中进行电泳，它带有负电荷，而与琼脂相接触的水溶液就带正电荷，这样的液体便向负极移动。抗体分子就是随着带正电荷的液体向负极移动的。而一般的蛋白质（如血清抗原）也受电渗作用的影响，使泳动速度减慢，但它的电泳迁移率远远大于电渗作用。这样抗原就达到了定向对流，在两者相遇且比例合适时便形成肉眼可见的沉淀线。

材料：

- 1 抗体与抗原与环状沉淀反应相同。
2. PH8.6,离子强度 0.05M 的巴比妥缓冲液配置

巴比妥钠	10.3 克
巴比妥	1.84 克
蒸馏水	1000 毫升

3. 缓冲琼脂板：将纯化的琼脂用 PH8.6 离子强度 0.025 的巴比妥缓冲液（用 0.05M 的巴比妥缓冲液稀释一倍即可）配成 1.5%的琼脂，加入 0.01-0.02%流柳汞防腐，保存冰箱内备用。

4. 电泳仪
5. 其他：生理盐水、打孔器、微量进样器。

方法：

1. 琼脂板的制备根据需要可选用大玻板（6 厘米×9 厘米）和（小玻片）两种。大玻板约需琼脂 10 毫升，小玻片约需 3.5 毫升，凝固后按图打孔，方法同琼脂扩散试验。

2. 加样：左侧孔内加患者血清（原血清及 10 倍稀释血清各占一孔），右侧内加抗血清，每片应有阳性对照。

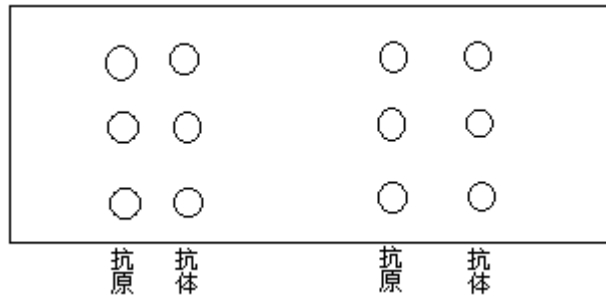


图 5 对流免疫电泳抗原孔、抗体孔位置示意图

3. 电泳

用国产普通电泳仪。其内加 0.05mPH8.6 的巴比妥缓冲液，加至电泳槽高度的三分之二处，注意两槽内液面尽量水平。将加好样品的玻板置于电泳槽上，抗原端接负极，抗体端接正极，用 2—4 层滤纸浸湿作盐桥，滤纸与琼脂板联接处为 0.5 厘米。以板宽度计算电流，以板的长度计算电压。要求电流量为 2—3 毫安/厘米，即大板为 20 毫安，小板为 10 毫安。电压为 4—6 伏/厘米。通电 45 分钟—2 小时后观察结果。

4. 结果观察：在黑色背景上方，用散射光多个角度观察，在对孔之间有白色沉淀线即为阳性对照应出现明显的白色沉淀线。如果抗原，两极微沉淀条纹不清晰，于 37℃ 保温数小时可增强沉淀条纹的清晰度。

5. 影响结果的因素

(1) 抗原抗体的比例：抗原抗体比例适应时容易出现沉淀带，反之不易发生。当抗体浓度恒定时，被检血清含甲胎蛋白浓度高时，作 10 倍、20 倍或更高倍数稀释可以提高阳性率。随稀释度的增加，抗原抗体的比例发生变化，沉淀线由靠近抗血清孔向逐步移向两孔中间，并可出现不典型的沉淀线如弧形、八字须形、斜线形，这些也是阳性，应予注意。

(2) 几组电泳缓冲液其电泳结果以巴比妥钠—盐酸缓冲液灵敏度最高。巴比妥—巴比妥钠次之。Tris 缓冲液更差。

(3) 电压与电流时电泳时间需要长些：电压电流增大时，电泳时间可更短。但电压过高则孔径变形，电流过大抗原抗体蛋白易变性，干扰实验结果。一般选择每厘米 5 毫升，电泳时间改为 1.5 小时。

(四) 免疫电泳实验

免疫电泳实验是先将抗原物质在琼脂凝胶中做电泳分离，然后于凝胶槽中加入抗体血清。使抗原抗体进行双向扩散，在比例适宜部位形成特异的抗原抗体沉淀弧线。每条沉淀弧线代表一组抗原抗体复合物，故可用抗原成分分析；且可以根据其迁移率与抗体所出现的特异反应进行鉴定。

材料：

1. 抗体与抗原与环状沉淀反应相同。

2. 1.5%离子琼脂（系用巴比妥缓冲液配制的）

3. 电泳仪

4. 巴比妥缓冲液：

巴比妥 1.84 克

巴比妥钠 10.3 克

蒸馏水 1000 毫升

pH8.6，离子强度（M）0.05

5. 其它：载物玻片，直径 3 毫米打孔器，20mm × 2mm 玻璃铸型，微量进样器。

方法：

1. 取载物玻片（7.5 × 2.5 厘米）加上 3.5 毫升 1.5%琼脂凝胶，制成 2 毫米厚的琼脂板。

2. 按图位置，在琼脂板未凝固时，放入抗血清槽铸型，注意勿使铸型全部浸入琼脂中，待凝固时再打孔。

3. 加待检标本：用微量进样器往孔中加 1—5 微升。

4. 电泳：电压 9—7 伏/厘米，泳动 15—20 小时。

5. 电泳后取出抗血清槽铸型，加入抗血清，进行双扩散，一般在 24 小时内沉淀弧出全。

6. 观察结果：或描绘、拍照或进行染色，染色后的标本便于结果分析及保存。

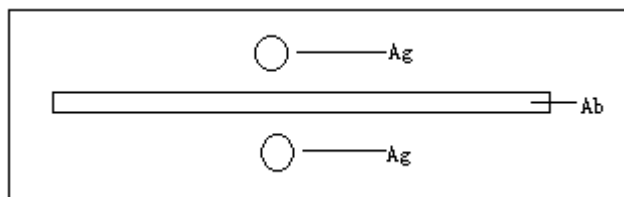


图 6 免疫电泳抗原孔和抗体槽位置示意图

（五）火箭电泳试验

火箭电泳实际是一种定量免疫电泳。其原理为：在电场作用下，抗原在含定量抗体的琼脂介质中泳动，二者比例在合适时在较短时间内形成状似火箭或锥形的沉淀线，而此沉淀线的高度常与抗原量成正比关系，因此本法可以测定样品中抗原的含量。

材料：

1. 抗体与抗原与环状沉淀反应相同。

2. pH8.6，离子强度 0.05M 巴比妥缓冲液配制（见对流免疫电泳试验）

3. 其它：琼脂粉，微量进样器，打孔器，玻璃板，电泳仪

方法：

1. 抗体琼脂板的制备

同单向扩散法，但注意稀释液应用 pH8.6 离子强度 0.05M 的巴比妥缓冲液。

2. 打孔见下图

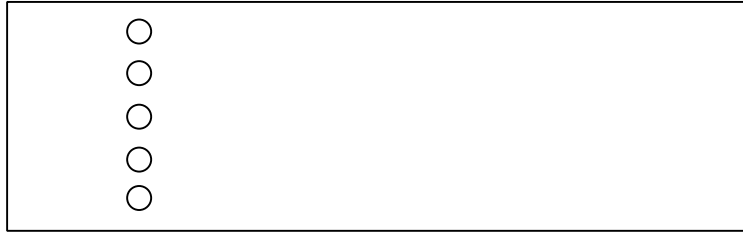


图 7 火箭电泳抗原孔位置图

3. 将用缓冲液稀释的适宜浓度的参考血清及适当稀释的抗原（人血清）分别加入各孔中，每孔 10 或 20 微升，要求加量准确而不外溢。

4. 把加完样的免疫琼脂板放入电泳槽中进行电泳，电压 4—6 伏/厘米，电泳时间 1—5 小时，直到大部分抗原孔前端出现顶端尖窄而完全闭合的火箭状沉淀线，关闭电源。

5. 取下琼脂板，以抗原孔中心为起点，量出各火箭状沉淀线的高度。同单向琼脂扩散法绘制标准曲线，查出待检血清中 Ig 含量。