

# 《食品营养与卫生学》实验指导书

编者：王敏

西北农林科技大学食品科学与工程学院

食品化学与营养教研室

**2009年6月12日**

## 实验一：果蔬中黄酮类物质含量的测定

### 一、原理和目的：

#### （一）原理：

维生素 P 是一组与保持血管壁正常渗透压有关的黄酮类物质，包括芸香苷、橙皮苷、圣草苷，其中以芸香苷为主。维生素 P 常与维生素 C 共存，在柑橘、芹菜中含量丰富。维生素 P 能与铝离子生成有色络合物，其吸光度与浓度成正比。

#### （二）目的：

维生素 P 是一组与保持血管壁正常渗透压有关的黄酮类物质，实验通过索氏提取器提取维生素 P，进一步熟悉提取，测定等技术。

### 二、材料、仪器与试剂

材料：柑橘、芹菜皮

仪器：分光光度计；索氏提取器；千分之一天平；真空干燥箱；恒温水浴

试剂：V<sub>p</sub>（分析纯）；甲醇；5%亚硝酸钠；10%硝酸铝；4%氢氧化钠；乙醚

### 一、操作步骤

（一）标准曲线的制作：准确称取 120° C 下减压干燥至恒重的维生素 P 与 100ml 容量瓶中，加少许甲醇在通风柜中微微加热使其溶解，冷却后用甲醇定容，混匀，吸取 10ml 于 100ml 容量瓶中，加蒸馏水定容，混匀，此液最终浓度为 0.2mg/ml 维生素 P。取上述标准液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 于 7 个 25ml 的容量瓶中，各加入 5%亚硝酸钠 1 ml 放置 6min，再加入 10%硝酸铝 1ml，混匀，放置 6min。然后加入 4%氢氧化钠 10ml 用蒸馏水定容，静置 15min。以第一管作空白在 500nm 处测吸光值为纵坐标，做标准曲线。

（二）样品中维生素 P 的提取与测定：准确称取干燥样品 1.0g，置索氏提取器中，加入 60ml 乙醚，回流到样品无色，冷却后，弃去乙醚液。再加甲醇 60ml 回流提取到无色，冷却后，把提取液转移到 100ml 容量瓶中，用蒸馏水定容，摇匀，取 3.0ml 于 25ml 容量瓶中，按标准曲线的操作步骤测定，通过标准曲线算出维生素 P 的含量。

### 二、计算

$$\text{维生素 P (mg/100g)} = \frac{X \times 100 \times 100 / 10 \times 25 / 3 \times 10^{-3}}{W(\text{g})} \times 100$$

式中：X——从标准曲线计算出的维生素 P 含量（mg/ml）

100——定容体积

100/10×25/3——稀释倍数

10<sup>-3</sup>——毫克换算为克

W——样品重（g）

## 实验二：几种果蔬抗氧化活性的比较

### 一、原理与目的

#### （一）原理：

在较低的 pH 下，Fe<sup>3+</sup>—TPTZ（三吡啶三吡嗪）可被还原剂还原为二价铁，并明显的显出蓝色，并于 593nm 具有最大光吸收。故可用其来反映样品的还原能力。

#### （二）目的：

蔬菜、水果不仅提供人体所需的一些维生素、矿物质和纤维素等，还含有许多植物抗氧化物质。这些物质载体外具有较强的抗氧化活性，因此对蔬菜、水果的抗氧化活性比较在防治人类一些与自由基损伤有关的疾病以及抗衰老过程中可能起着重要的作用。使同学了解一些抗氧化活性的指示。

## 二、材料、仪器与试剂

材料：新鲜果蔬

仪器：分光光度计；10000r/min 离心机；常量天平；恒温水浴

试剂：TPTZ 工作液（由 0.3mol/L 醋酸盐缓冲液 25ml、10m mol/L TPTZ 溶液 2.5ml、20m mol/L  $\text{FeCl}_3$  2.5ml 组成）；冰醋酸

## 三、操作步骤

（一）样品处理：所有样品用自来水、蒸馏水反复冲洗干净后，称取日常食用部分 1~5g 在研钵中按 1：9 比例加入蒸馏水，研磨制备匀浆液，10000r/min 离心 10min。

（二）样品测定：取适量上述样品上清液，加入 1.8 ml TPTZ 工作液，混匀后 37℃ 反应 10min，测定 593nm 处吸光度，以 1.0m mol/L  $\text{FeSO}_4$  为标准，样品抗氧化活性 (FRAP value) 以达到同样吸光度所需的  $\text{FeSO}_4$  的毫摩尔数表示。

## 实验三：食品中有机磷、氨基甲酸酯类农残的检测（比色法）

### 一、原理和目的：

#### （一）原理：

在一定条件下，有机磷、氨基甲酸酯类农药对胆碱脂酶正常功能有抑制作用，其抑制率与农药的浓度成正相关。正常情况下，酶催化乙酰胆碱水解，水解产物与显色剂反应，产生黄色物质，用分光光度计在 412nm 处测定吸光度随时间的变化值，计算抑制率，从抑制率判断样品中是否含有有机磷、氨基甲酸酯类农药的存在。

#### （二）目的

农药的残留直接影响到人体健康，特别是食用农产品的农药残留。近年来蔬菜中有机磷、氨基甲酸酯类农药残留尤为突出，因此加强对蔬菜种农药残留的检测力度是控制蔬菜种

农药残留对人体危害最有效的方法。此实验应用化学方法利用分光光度计进行检测，使学生对其中的原理有一定的了解。

## 二、材料、仪器与试剂

材料：蔬菜样品

仪器：分光光度计，水浴锅，常量天平

试剂：pH8.0 缓冲溶液（用磷酸氢二钠，磷酸二氢钠配制）

显色剂：分别取 160mg 二硫代二硝基苯甲酸和 15.6g 碳酸氢钠，用 20ml 缓冲溶液溶解，4℃冰箱保存；

底物：取 25.0mg 硫代乙酰胆碱，加 3.0ml 蒸馏水溶解后，摇匀，4℃冰箱保存，保存期不超过两周；

乙酰胆碱脂酶

## 三、操作步骤

（一）样品处理：选取有代表性的蔬菜样品，擦去表面泥土，剪成 1cm 左右见方的碎片，取样品 1g，放入烧杯或提取瓶中，加入 5ml 缓冲溶液，振荡 1-2min，倒出提取液，静置 3-5min，待用。

（二）测定：对照溶液测试：先于试管中加入 2.5ml 缓冲溶液，再加入 0.1ml 酶液、0.1ml 显色剂，摇匀后于 37℃ 放置 15min 以上（每批样品的控制时间应一致）。加入 0.1ml 底物摇匀，此时碱液开始显色反应，应立即放入仪器比色池中，记录反应 3min 的吸光度变化值  $\Delta A_0$ 。样品测试：先于试管中加入 2.5ml 样品提取液，其他操作与对照溶液测试相同，记录反应 3min 的吸光度变化值  $\Delta A_t$ 。

## 四、实验结果

1、结果计算：检验结果按下列公式计算

$$\text{抑制率}(\%) = [(\Delta A_0 - \Delta A_t) / \Delta A_0] \times 100\%$$

式中： $\Delta A_0$ —对照溶液反应 3min 的吸光度变化值

$\Delta A_t$ —样品溶液反应 3min 的吸光度变化值

2、结果判定：结果以酶被抑制的程度（抑制率）表示。

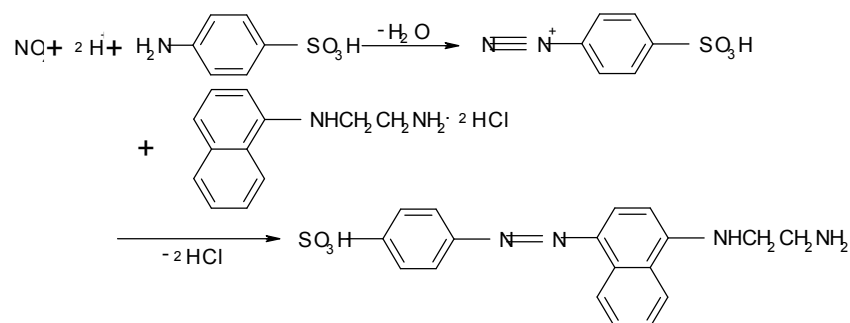
当蔬菜样品提取液对酶的抑制率  $\geq 50\%$  时，表示蔬菜中含有有机磷或氨基甲酸酯类农药存在。抑制率  $\geq 50\%$  的样品需要重复检验两次以上。对抑制率  $\geq 50\%$  的样品，可用其他方法进一步确定具体农药品种和含量。

## 实验四：食品中硝酸盐含量的测定（比色法）

### 一、原理和目的

（一）原理：

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，再与盐酸萘乙二胺偶合形成紫红色染料，其最大吸收波长为 538nm，可测定吸光度并与标准比较定量。反应式如下



## (二) 目的:

我国是农业大国, 化肥的大量使用主要造成了食品中硝酸盐的污染。硝酸盐进入人体, 产生直接毒害和慢性毒害, 因此硝酸盐的检测具有特别重要的意义。此试验是应用比色法来进行硝酸盐的检测。

## 二、试剂

- (1) 氯化铵缓冲溶液, pH9.6~9.7: 1L 容量瓶中加入 500ml 水, 准确加入 20.0ml 盐酸溶液, 摇匀。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 pH 至所需范围。
- (2) 0.42mol/l 硫酸锌溶液: 称取 120g 硫酸锌 ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 用水溶解, 稀释至 1L。
- (3) 20g/l 氢氧化钠溶液: 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, 置棕色试剂瓶中混匀, 室温贮存。
- (5) 1g/l 盐酸萘乙二胺溶液: 称取 0.1g 盐酸萘乙二胺, 加 100ml 60% 乙酸溶解混匀后, 置棕色试剂瓶中, 在冰箱贮存, 一周内稳定。
- (6) 显色剂: 临用前将 1g/l 盐酸萘乙二胺和对氨基苯磺酸溶液等体积混合, 临用现配, 仅供一次使用。
- (7) 亚硝酸钠标准贮备液: 精密称取 250.0mg 于硅胶干燥器干燥 24h 的亚硝酸钠, 加水溶解移入 500ml 容量瓶中, 加 100ml 氯化铵缓冲溶液, 加水稀释至刻度, 混匀, 在 4℃ 避光贮存。此溶液每毫升相当于 500  $\mu$ g 的亚硝酸钠。
- (8) 亚硝酸钠标准使用液: 准确吸取亚硝酸钠标准贮备液, 稀释 100 倍, 临用现配, 此溶液每毫升相当于 5  $\mu$ g 的亚硝酸钠。

三、仪器: 小型绞肉机, 分光光度计, 组织捣碎机, 恒温水浴

## 四、操作步骤

(1) 样品处理: 准确称取 10.0g 经绞碎混匀的样品, 置于组织捣碎机中, 加 70ml 水和 12ml 20g/l 氢氧化钠溶液, 打碎, 混匀, 测试样品溶液的 pH, 如样品溶液呈酸性, 用 20g/l 氢氧化钠溶液调至 pH8 呈碱性, 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 20g/l 氢氧化钠溶液, 混匀, 在 60℃ 水浴中加热 10min。取出, 冷至室温, 稀释至刻度, 混匀, 过滤, 弃去初滤液 20ml, 收集滤液待测。

### (2) 亚硝酸盐含量的测定

①亚硝酸盐标准曲线制备: 吸取亚硝酸钠标准使用液 5  $\mu$ g/ml 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml, 分别置于 25ml 带塞试管中, 分别加入 4.5ml 氯化铵缓冲溶液, 加 2.5ml 冰乙酸后立即加入 5.0ml 显色剂, 用水稀释至刻度, 混匀, 在暗处放置 25min, 用 1cm 比色杯, 一零管调节零点, 于波长 550nm 处测定吸光度, 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: 吸取亚硝酸钠标准使用液 5  $\mu$ g/ml 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0ml。

②样品测定: 吸取 10.0ml 样品滤液于 25ml 带塞比色管中, 按亚硝酸盐标准曲线制备中“分别加入 4.5ml 氯化铵缓冲溶液”开始依法操作。

### (3) 计算

$$X = \frac{m \times 1000}{W \times (10/200) \times 1000}$$

式中：X—样品中亚硝酸盐的含量（mg/kg）

W 为样品的质量（g）

m 为测定用样液中亚硝酸盐的质量（ $\mu$ g）