

工作任务六 食品中蛋白质和氨基酸含量的检验

工作过程:以凯氏定氮法测定食品中的蛋白质含量为例。

一、准备工作

(一)知识准备

蛋白质是生命的物质基础,是构成生物体细胞的重要成分。蛋白质是食品中的重要营养物质,分析和测定食品中的蛋白质对于食品品质、生产加工过程、贮藏保鲜等都具有十分重要的意义。

食品种类不同,其蛋白质种类与含量亦不同,一般食品中蛋白质的含量在 13.4%~19.1%之间。组成蛋白质的主要化学元素为 C、H、O、N,氮是存在于蛋白质中的特征元素,可以通过测定食品中的氮的含量来折算出食品中蛋白质的含量。一般来讲,蛋白质中氮的含量为 16%,即 1 份氮相当于 6.25 份蛋白质,此数值(6.25)称为蛋白质换算系数。蛋白质是复杂的含氮有机物,不同种类食品的蛋白质组成成分不同,其换算系数也有所不同,如玉米、荞麦、青豆、鸡蛋等为 6.25,花生为 5.46,大米为 5.95,大豆及其制品为 5.71,小麦粉为 5.70,牛乳及其制品为 6.38。氨基酸含量丰富的食品含有更多的氮。食品中的氮,除了有来源于蛋白质的蛋白氮外,还有非蛋白氮,如来自于游离氨基酸、小肽核酸、磷脂、氨基糖、嘌呤以及某些维生素、生物碱、尿酸、脲、氨基离子等。三聚氰胺就是一种非蛋白氮。

测定蛋白质的方法可分为两大类:一类是利用蛋白质的共性,即含氮量、肽键和折射率来测定蛋白质;另一类是利用蛋白质中特定氨基酸残基、酸性和碱性基团以及芳香基团等来测定蛋白质。在具体检验工作中,选择哪种测定方法还必须考虑该方法的灵敏度、准确度、精确度、测定速度和成本等其他因素。目前我国食品安全国家标准 GB 5009.5—2010 中规定的食品中蛋白质含量测定方法有三种,即凯氏定氮法、分光光度法和燃烧法。前两者适用于各种食品中蛋白质的测定,后者用于蛋白质含量在 10 g/100 g 以上的粮食、豆类、奶粉、米粉、蛋白质粉等固体试样的筛选测定。但这三种方法都不适用于添加无机含氮物质及有机非蛋白质含氮物质的食品测定。凯氏定氮法是目前蛋白质含量测定最常见的方法,其原理是:将样品与浓硫酸和催化剂一同加热消化,使蛋白质分解,其中的碳和氢被氧化为二氧化碳和水逸出,而样品中的有机氮转化为氨,并与硫酸结合生成硫酸铵,此过程称为消化。加碱将消化液碱化,使硫酸铵与碱反应,释放出氨,通过蒸馏,使氨逸出,用硼酸吸收,形成硼酸铵,再用标准盐酸或标准硫酸溶液滴定,根据标准酸溶液消耗的量计算出蛋白质的含量。

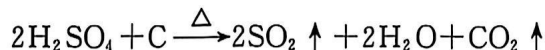
(1)样品消化

其反应方程式如下:



浓硫酸具有脱水性,使有机物脱水后炭化为碳、氢、氮。

浓硫酸又有氧化性,将有机物炭化后的碳氧化为二氧化碳,硫酸则被还原成二氧化硫:

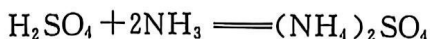


二氧化硫使氮还原为氨,本身则被氧化为三氧化硫,氨随之与硫酸作用生成硫酸铵留在





酸性溶液中:



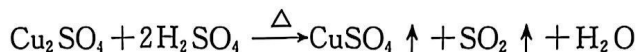
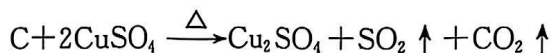
在消化反应中,为了加速蛋白质的分解,缩短消化时间,常加入下列物质:

①硫酸钾(K_2SO_4)。加入硫酸钾可以提高溶液的沸点而加快有机物分解。纯硫酸的沸点为 290°C ,纯硫酸钾的沸点为 1689°C ,添加硫酸钾后,可使反应温度提高至 400°C 以上。随着消化过程中硫酸不断被分解,水分不断逸出,硫酸钾浓度不断增大,消化液沸点不断升高。

但硫酸钾加入量不能太大,否则消化体系温度过高,又会引起已生成的铵盐发生热分解放出氨而造成损失。

除硫酸钾外,也可以加入硫酸钠、氯化钾等盐类来提高沸点,但效果不如硫酸钾。

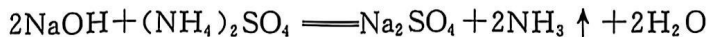
②硫酸铜(CuSO_4)。硫酸铜起催化剂的作用。在凯氏定氮法中可用的催化剂种类很多,除硫酸铜外,还有氧化汞、汞、硒粉、二氧化钛等,但考虑到效果、价格及环境污染等多种因素,应用最广泛的是硫酸铜。使用时常加入少量过氧化氢、次氯酸钾等作为氧化剂以加速有机物氧化。硫酸铜的作用机理如下:



此反应不断进行,待有机物全部被消化完后,不再有硫酸亚铜(Cu_2SO_4 ,褐色)生成,溶液呈现清澈的 Cu^{2+} 离子的蓝绿色,故硫酸铜除起催化剂作用外,还可指示消化终点,还可以在下一步蒸馏时作为碱性反应的指示剂。

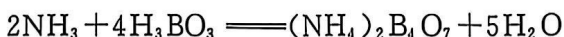
(2) 蒸馏

在消化完全的样品溶液中加入浓氢氧化钠使氨游离出来,加热蒸馏,即可释放出氨气,反应方程式如下:



(3) 吸收与滴定

加热蒸馏所放出的氨,可用硼酸溶液进行吸收,生成强酸弱碱盐 $(\text{NH}_4)_2\text{B}_4\text{O}_7$,吸收完全后,再用盐酸(或硫酸)标准溶液滴定。反应方程式如下:



(二) 器材准备

(1)天平:感量为 1 mg 。

(2)定氮蒸馏装置:如图 3-7 所示。

(3)自动凯氏定氮仪。

(三) 试剂的配制

(1)硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。

(2)硫酸钾(K_2SO_4)。

(3)硫酸(H_2SO_4)。

(4)硼酸(H_3BO_3)。

(5)甲基红指示剂($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$)。

(6)溴甲酚绿指示剂($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$)。





- (7) 亚甲基蓝指示剂($C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$)。
- (8) 氢氧化钠(NaOH)。
- (9) 95%乙醇(C_2H_5OH)。
- (10) 硼酸溶液(20 g/L):称取 20 g 硼酸,加水溶解并稀释至 1000 mL。
- (11) 氢氧化钠溶液(400 g/L):称取 40 g 氢氧化钠加水溶解后,放冷,并稀释至 100 mL。
- (12) 硫酸标准滴定溶液(0.0500 mol/L)或盐酸标准滴定溶液(0.0500 mol/L)。
- (13) 甲基红乙醇溶液(1 g/L):称取 0.1 g 甲基红,溶于 95%乙醇,用 95%乙醇稀释至 100 mL。
- (14) 亚甲基蓝乙醇溶液(1 g/L):称取 0.1 g 亚甲基蓝,溶于 95%乙醇,用 95%乙醇稀释至 100 mL。
- (15) 溴甲酚绿乙醇溶液(1 g/L):称取 0.1 g 溴甲酚绿,溶于 95%乙醇,用 95%乙醇稀释至 100 mL。
- (16) A 混合指示液:2 份甲基红乙醇溶液与 1 份亚甲基蓝乙醇溶液临用时混合。
- (17) B 混合指示液:1 份甲基红乙醇溶液与 5 份溴甲酚绿乙醇溶液临用时混合。
- 上述试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682—2008 规定的三级水。

二、分析步骤

(一) 凯氏定氮法

1. 试样处理

称取充分混匀的固体试样 0.2~2 g、半固体试样 2~5 g 或液体试样 10~25 g(相当于 30~40 mg 氮)(精确至 0.001 g),移入干燥的 100 mL、250 mL 或 500 mL 定氮瓶中,加入 0.4 g 硫酸铜(1)、6 g 硫酸钾(2)及 20 mL 硫酸(3),轻摇后于瓶口放一小漏斗,将瓶以 45°角斜支于有小孔的石棉网上。小心加热,待内容物全部炭化,泡沫完全停止后,加强火力,并保持瓶内液体微沸,至液体呈蓝绿色并澄清透明后,再继续加热 0.5~1 h。取下放冷,小心加入 20 mL 水。放冷后,移入 100 mL 容量瓶中,并用少量水洗净定氮瓶,洗液并入容量瓶中,再加水至刻度,混匀备用。同时做试剂空白试验。

2. 测定

按图 3-7 装好定氮蒸馏装置,向水蒸气发生器内装水至 2/3 处,加入数粒玻璃珠,加甲基红乙醇溶液(13)数滴及数毫升硫酸(3),以保持水呈酸性,加热煮沸水蒸气发生器内的水并保持沸腾。

向接收瓶内加入 10.0 mL 硼酸溶液(10)及 1~2 滴 A 混合指示液(16),并使冷凝管的下端插入液面下,根据试样中的氮含量,准确吸取 2.0~10.0 mL 试样处理液由小玻璃杯注入反应室,以 10 mL 水洗涤小玻璃杯并使之流入反应室内,随后塞紧棒状玻塞。将 10.0 mL 氢氧化钠溶液(11)倒入小玻璃杯,提起玻塞使其缓缓流入反应室,立即将玻塞盖紧,并加水于小玻璃杯以防漏气。夹紧螺旋夹,开始蒸馏。

蒸馏 10 min 后移动蒸馏液接收瓶,液面离开冷凝管下端,再蒸馏 1 min。然后用少量水冲洗冷凝管下端外部,取下蒸馏液接收瓶。尽快以硫酸或盐酸标准滴定溶液(12)滴定至终点,如用 A 混合指示液,终点颜色为灰蓝色;如用 B 混合指示液,终点颜色为浅灰红色。同



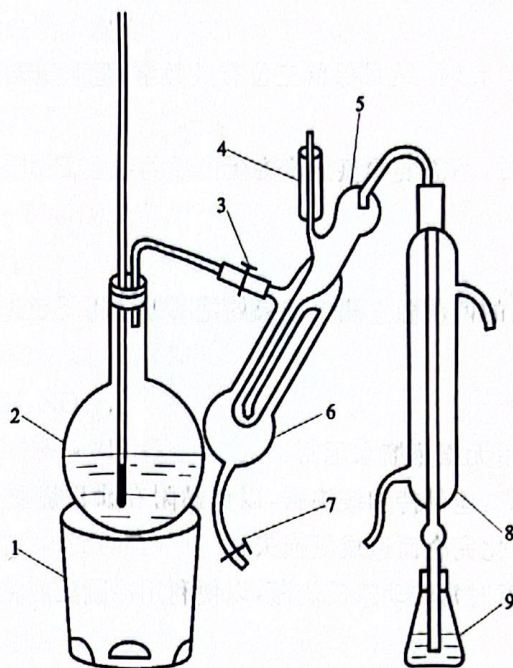


图 3-7 定氮蒸馏装置图

1—电炉;2—水蒸气发生器(2L 烧瓶);3—螺旋夹;4—小玻璃杯及棒状玻塞;
5—反应室;6—反应室外层;7—橡皮管及螺旋夹;8—冷凝管;9—蒸馏液接收瓶

时做试剂空白试验。

(二)自动凯氏定氮仪法

称取充分混匀的固体试样 0.2~2 g、半固体试样 2~5 g 或液体试样 10~25 g(相当于 30~40 mg 氮),精确至 0.001 g,置于消化瓶内,加入 0.4g 硫酸铜、6g 硫酸钾及 20mL 硫酸于消化炉进行消化。当消化炉温度达到 420℃之后,继续消化 1h,此时消化管中的液体呈绿色透明状,取出冷却后加入 50mL 水,于自动凯氏定氮仪(使用前加入氢氧化钠溶液、盐酸或硫酸标准溶液以及含有混合指示剂 A 或 B 的硼酸溶液)上实现自动加液、蒸馏、滴定和记录滴定数据的过程。

三、结果计算

试样中蛋白质的含量按式(3-24)进行计算:

$$X = \frac{(V_1 - V_2)c \times 0.0140}{m \times V_3/100} \times F \times 100 \quad (3-24)$$

式中 X——试样中蛋白质的含量, g/100 g;

V_1 ——试液消耗硫酸或盐酸标准滴定液的体积, mL;

V_2 ——试剂空白消耗硫酸或盐酸标准滴定液的体积, mL;

V_3 ——吸取消化液的体积, mL;

c ——硫酸或盐酸标准滴定溶液的浓度, mol/L;

0.0140——1.0 mL 硫酸 [$c(1/2\text{H}_2\text{SO}_4) = 1.000 \text{ mol/L}$] 或盐酸 [$c(\text{HCl}) = 1.000 \text{ mol/L}$] 标准滴定溶液相当的氮的质量, g;

m ——试样的质量, g;

F ——氮换算为蛋白质的系数, 各种食品中的氮转换系数见附录三;





100——换算系数。

蛋白质含量 ≥ 1 g/100 g 时,结果保留三位有效数字;蛋白质含量 < 1 g/100 g 时,结果保留两位有效数字。

注:当只检测氮含量时,不需要乘氮换算为蛋白质的系数 F 。

四、精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

五、注意事项

- (1) 所用试剂溶液应用无氨蒸馏水配制。
- (2) 消化时不要用强火,应保持和缓沸腾,以免黏附在凯氏烧瓶内壁上的含氮化合物在无硫酸存在的情况下未消化完全而造成氮损失。
- (3) 消化过程中应注意时常转动凯氏烧瓶,以便利用冷凝酸液将附在瓶壁上的固体残渣洗下并促进其消化完全。
- (4) 样品中若含脂肪或糖较多时,消化过程中易产生大量泡沫,为防止泡沫溢出瓶外,在开始消化时应用小火加热,并不停地摇动。或者加入少量辛醇或液体石蜡或硅油消泡剂,并同时注意控制热源强度。
- (5) 当样品消化液不易澄清透明时,可将凯氏烧瓶冷却,加入 30% 过氧化氢 1~3 mL 后再继续加热消化。
- (6) 若取样量较大,如干试样超过 5 g,可按每克试样 5 mL 的比例增加硫酸用量。
- (7) 一般消化至透明后,继续消化 30 min 即可,但对于含有特别难以氮化的含氮化合物的样品,如含赖氨酸、组氨酸、色氨酸、酪氨酸或脯氨酸等时,需适当延长消化时间。有机物如分解完全,消化液呈蓝色或浅绿色,但含铁量多时,呈较深绿色。
- (8) 蒸馏装置不能漏气。
- (9) 蒸馏前若加碱量不足,消化液呈蓝色,而不生成氢氧化铜沉淀,此时需再增加氢氧化钠用量。
- (10) 硼酸吸收液的温度不应超过 40 °C,否则对氨的吸收作用减弱而造成损失,此时可置于冷水浴中使用。
- (11) 蒸馏完毕后,应先将冷凝管下端提离液面清洗管口,再蒸 1 min 后关掉热源,否则可能造成吸收液倒吸。
- (12) 混合指示剂在碱性溶液中呈绿色,在中性溶液中呈灰色,在酸性溶液中呈红色。

能力拓展

一、分光光度法测定食品中的蛋白质含量

(一) 原理

食品中的蛋白质在催化加热条件下被分解,分解产生的氨与硫酸结合生成硫酸铵,在 pH=4.8 的乙酸钠-乙酸缓冲溶液中与乙酰丙酮和甲醛反应生成黄色的 3,5-二乙酰-2,6-二

