

分光光度法测定食品中的蛋白质

宜昌市卫生防疫站 王正建 陈艳林

摘要 应用分光光度法测定食品中的蛋白质,操作简单,适合于大批样品的同时测定,检验所得结果与凯氏蒸馏法相比无显著性差异。

关键词 分光光度法 蛋白质

根据蛋白质的性质和成份,测定蛋白质的方法分为两大类:一类是利用蛋白质的共性即含氮、肽键和折射率测定蛋白质含量;另一类是利用蛋白质中特定氨基酸残基、酸、碱性基团和芳香基团测定蛋白质含量。经典的蛋白质测定为凯氏定氮蒸馏法,由于本法需要碱化、蒸馏、滴定,操作步骤较为繁琐,为了简化操作步骤,本文在凯氏定氮硝化^[1]的基础上,参照有关资料^[2],进行了条件试验:对醋酸钠溶液的浓度、温度、时间等影响因素做了进一步的试验研究。改进后的方法,反应混合物的浓度在 $0.5\sim 6.0\mu\text{g}/\text{ml}$,符合朗格-比尔定律。标准曲线的斜率、截距、相关系数分别是 0.069 、 0.043 、 0.9999 。本法简便、快速、精确。用本法测定了饼干和粉中的蛋白质,结果与凯氏蒸馏法测得结果经 t 检验无显著性差异。

方法原理

标准及样品液在 $\text{pH}5.0\sim 6.0$ 醋酸钠存在的情况下,氨与乙酰丙酮-甲醛反应生成的黄色化合物3,5-二乙酰-1,4-二水合甲基吡啶,在波长 412nm 处有一最大吸收。

主要试剂和仪器

所有试剂均用分析纯级。用重蒸馏水配制。

硫酸铵标准贮备液($1\text{mg}/\text{ml}$)预先在 105°C 干燥 2h ,称取恒温半 h 的硫酸铵

0.472g ,用水溶解于 100ml 容量瓶中,定容于 4°C 贮存。

显色溶液:量取 15ml 甲醛($37\%\text{w}/\text{v}$)与 7.8ml 乙酰丙酮混匀,用水稀释到 200ml 。

4.1% ($\text{g}/100\text{ml}$)醋酸钠溶液 称取 41.0g 无水醋酸钠溶解后用水稀至 IC 。

硝化剂 硒粉 硫酸铜 浓硫酸。

721 分光光度计。

测定方法

样品制备 称取 $0.2\sim 2.0\text{g}$ 固体样品(视含氮而定)于 500ml 凯氏定氮瓶中,加入 10ml 浓硫酸和 0.1g 硒粉,将混合物在直火上慢慢加热至无色后,再加热 10min ,取出冷至室温,加入 $10\sim 15\text{ml}$ 水于电炉上沸腾 $2\sim 5\text{min}$,取出冷至室温将硝化液转移到 100ml 容量瓶中,定容至刻度。吸取一定量的样品液(每毫升不超过 $6\mu\text{g}$,含量高时适当稀释)下同标准操作。

标准曲线的绘制 吸取硫酸铵标准溶液($0.1\text{mg}/\text{ml}$) 0.0 、 0.125 、 0.25 、 0.50 、 0.75 、 1.00 、 1.25 、 1.50ml 分别于 25ml 带塞比色管中,分别加入 4.1% 醋酸钠溶液 3.0ml 和显色液 4.0ml ,混匀,放入沸水浴中 15min (97.5°C),取出冷却至室温,用水稀至 25ml ,以试剂空白调零,用 1cm 比色杯, 412nm 波长处测定吸光度值,绘制曲线。见图1。

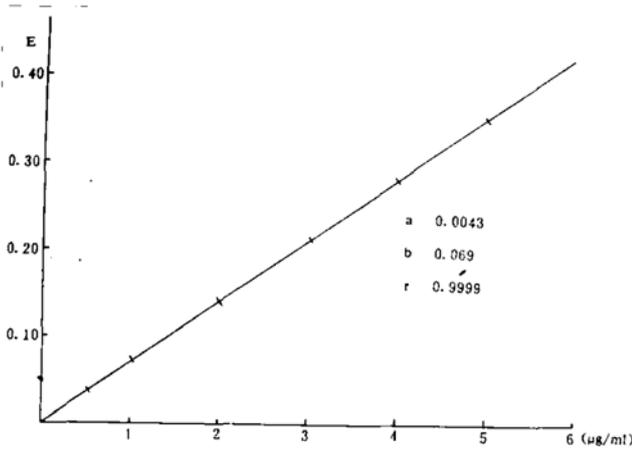


图1 蛋白质标准曲线

图1 蛋白质标准曲线

计算

$$\text{蛋白质}(\%) = \frac{C \times F \times K}{W \times 1000 \times 10000} \times 1000$$

C—相当于标准含量(mg)

F—样品溶液的稀释倍数

W—样品质量(g)

K—换算系数(同凯氏蒸馏法)

结果和讨论

醋酸钠浓度的影响 醋酸钠浓度为8.2%时,加入1.0、2.0、3.0ml,反应混合物的PH值在PH6.0以上,增大醋酸钠浓度,PH值逐步增高,所得曲线不佳,与文献^[3]报导有所不同。固定其它试验条件,分别加入4.1%醋酸钠液1.0、2.0、3.0、4.0ml,加入4.1%醋酸钠液3.0ml时可生成最大的吸光度(PH5.0~6.0),增加醋酸钠液的体积,吸光度保持稳定。

显色剂浓度的影响 固定其它试验条件,分别加入1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml显色液,加入4.0ml显色液时,颜色最深,增大显色液的体积,则保持恒定。

温度的影响 取0.50ml(0.1mg/ml)硫酸铵标准液,其它试验条件不变,分别于60、70、80、90、95、97.5、100℃反应15min,吸光值随着温度的增加而增加,当温度为97.5—100℃时,可获最深的颜色,吸光值保持稳定。

时间对吸光值的影响 其它试验条件不

变取0.5ml(0.1mg/ml)硫酸铵标准,分别反应5、10、14、15、20、25min,吸光值随着温度的延长而增加,反应15~25min吸光值保持恒定,本文选择15min。

方法的稳定性 标准与样品定容后比色和放置30、60、90、120min比色,吸光度值基本稳定。标准、试剂连续使用15天,曲线的斜率、截距、相关系数基本不变。因此,方法可靠,试剂稳定。

消化用催化剂的影响 使用国标方法^[4]与本文所用方法硝化样品,两法所得结果无显著性差异。选用亚硒酸钠与硫酸作为氧化混合液^[5],不仅加快了硝化时间,而且氨化效果也比较理想。

方法比较 见附表。在样本自由度等于9时,t_{0.05(9)}=1.833,t_{0.01(9)}=2.821,饼干和奶粉样品用两种方法测定比较所得t值分别为1.515,0.755,即ρ>0.05。由此说明两种方法所得结果无显著性差异。

附表 两种方法测定饼干和奶粉中的蛋白质结果比较

方法	饼 干				奶 粉			
	\bar{x}	n	s	CV	\bar{x}	n	s	cv
			%	%			%	%
分光光度法	9.235	10	0.0587	0.64	25.746	10	0.058	0.23
凯氏蒸馏法	9.295	10	0.1107	1.19	25.783	10	0.1448	0.56

总 结

本方法简便、快速,结果准确,由于不需碱化、蒸馏和滴定,适合大批样品的连续测定。

参 考 文 献

[1]中华人民共和国国家标准 食品卫生检验方法理化部分 第一版 中国标准出版社出版,1986:21。
 [2]北京市卫生防疫站译,分光光度法测微量氮—凯氏消化法,国外预防医学,1990;4(1)6:61—63。
 [3]北京市卫生防疫站译,分光光度法测微量氮—凯氏消化法 国外预防医学 1990;4(1)6:61—62。
 [4]中华人民共和国国家标准 食品卫生检验方法理化部分 第一版 中国标准出版社出版,1986:21。
 [5]周淑兰等,依据凯氏定氮方法测定食品中蛋白质时消化方法的比较评价,中国食品卫生杂志 1990;2(1):46。