

食品中蛋白质两种测定方法比较

方亚敏, 冯蓓健, 杨滨 (上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

蛋白质是由多肽键组成的生物大分子,是生命的物质基础,人体体重的16.5%是蛋白质。人体蛋白质种类很多,性质、功能各异,由20多种氨基酸按不同比例组成,并在体内不断代谢、更新。人体蛋白质主要来源于消化分解的氨基酸或多肽。因此,食品蛋白质与人体生长发育、健康都有着密切联系。当蛋白质缺乏时,成人会肌肉萎缩、免疫力下降、贫血,严重者将产生水肿;儿童时期将影响身体发育和智力发育;而蛋白质过量,也会产生蛋白中毒。食品中蛋白质含量多少,不仅关系食品的质量,而且与人体健康有密切关系。所以,食品中蛋白质含量应有一定规定。目前,我们常用检测蛋白质方法有经典凯氏定氮法(国标法)(GB/T 5009.5—2003)^[1]、双缩脲法(Biuret法)、folin-酚试剂法(lowry法)、杜马斯燃烧法(直接测定法)等多种。本文主要对国标法、直接测定法进行比较研究。

1 材料与方法

1.1 凯氏定氮法

1.1.1 试剂与仪器 试剂:硫酸铜,硫酸钾,硫酸,40%氢氧化钠,4%硼酸溶液,0.10mol/L盐酸,95%乙醇,甲基红-次甲基蓝混合指示剂液。仪器:天平(1/万,精度0.1mg),凯氏烧瓶,蒸气蒸馏瓶。

1.1.2 样品前处理(消化) 称取固体0.50~5.00g试样或液体10.0~20.0mL(试样含氮30~40mg)移入凯氏烧瓶,加入0.4g硫酸铜、10g硫酸钾、20mL硫酸及数粒玻璃珠,将凯氏烧瓶缓慢加热,逐渐升温消化,直至液体呈蓝绿色透明后,继续加热0.5h,冷却至室温,加水,摇匀。移入100mL容量瓶中,用蒸馏水定容^[2]。

1.1.3 测定(蒸馏,滴定) 向100mL接收瓶中加10mL 4%硼酸和1滴混合指示剂,并放在蒸气蒸馏瓶冷凝管下,将冷凝管下口插入硼酸内。取消化液5.0mL,放在蒸馏瓶中,加入10.0mL氢氧化钠溶液立刻塞紧盖子加热蒸馏,至接收瓶内液体达到75.0mL左右时取下接收瓶,用0.1000mol/L盐酸标准溶液滴定接收液至出现紫红色为止。

1.1.4 计算 计算公式:

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times 0.014 \times C}{m \times \frac{5.0}{100} \times F \times 100}$$

X - 食品中蛋白质含量(%); V₁ - 滴定时试样所消耗0.1000mol/L盐酸标准溶液的体积(mL); V₀ - 滴定时空白所消耗0.1000mol/L盐酸标准溶液的体积(mL); C - 盐酸标准溶液的摩尔浓度(mol/L); m - 试样质量(g); F - 氮换算为蛋白质系数。

1.2 杜马斯燃烧法

1.2.1 试剂与仪器 试剂:五氧化二磷(Fluka公司产品),氧化铜(德国elementar公司产品),钨(德国elementar公司产品),天冬氨酸或谷氨酸(Merc K产品)。仪器:元素分析仪(Vario Max CN产品),P121天平(1/万,精度0.1mg)。

1.2.2 标准校正 正确称取250mg(精确到1.0mg)天冬氨酸或谷氨酸(Merc K公司产品,其标准值9.50±5%)3个,上机测定,并计算出平均值 \bar{x} ,采用仪器测定值计算出校正因子($DF = \frac{9.50}{\bar{x}}$)。

1.2.3 样品测定 取200~2000mg(精确到0.1mg)于不锈钢坩埚内,进入自动进样测定。

1.2.4 计算 计算公式:

$$X = N \times F \times DF$$

X - 蛋白质测定含量(%); N - 氮的测定含量(%); F - 氮换算为蛋白质系数; DF - 校正因子。

2 结果

2.1 精密度试验

用凯氏定氮法和燃烧法分别对样品进行高、中、低3个浓度平行重复7次测定,结果见表1。

表1 凯氏定氮法和燃烧法精密度比较

编号	低浓度(%)		中浓度(%)		高浓度(%)	
	凯氏定氮法	燃烧法	凯氏定氮法	燃烧法	凯氏定氮法	燃烧法
1	5.28	5.35	24.56	25.52	51.74	51.83
2	5.34	5.29	24.10	25.22	52.90	52.50
3	5.13	5.31	23.87	26.30	51.98	52.05
4	5.13	5.42	24.78	26.20	52.21	53.13
5	5.42	5.56	23.98	25.85	52.30	52.60
6	5.33	5.53	24.27	25.98	52.48	52.79
7	5.48	5.76	24.72	24.89	52.56	52.42
平均值	5.30	5.46	24.31	25.85	52.31	52.47
标准差	0.1338	0.1683	0.3845	0.3762	0.3837	0.4367
相对标准偏差	2.52	3.08	1.58	1.46	0.73	0.83

作者简介:方亚敏(1965—),女,副主任技师,学士。

凯氏定氮法从低到高的相对偏差分别为2.52%、

1.58%和0.73%,燃烧法从低到高的相对偏差分别为3.08%、1.46%和0.83%。说明精密度良好,符合要求^[3]。

2.2 准确度试验

取水稻粉[GBW(E)100010]标准值(7.41 ± 0.4)%,做7次测定,计算其相对偏差(表2)。

表2 水稻粉准确度试验

编号	凯氏定氮法	燃烧法
1	7.6	7.7
2	7.7	7.73
3	7.75	7.88
4	7.72	7.82
5	7.69	7.79
6	7.63	7.8
7	7.72	7.83
平均值(%)	7.69	7.79
相对偏差(%)	3.78	5.13
t值	4.69	
P值	<0.05	

凯氏定氮法相对偏差3.78%,燃烧法相对偏差5.13%,说明准确度良好。同时,对采用凯氏定氮法与燃烧法所获得的值,选用配对t检验方法进行比较,结果表明t值均t < t_(6,0.05),相应的P值均大于0.05,差别无统计学意义。说明凯氏定氮法与燃烧法对水稻粉(标准值7.41 ± 0.4%)蛋白质样品的使用效果是一致的。

3 讨论

燃烧法在整个测定过程中,校正因子DF会有所不同,若需进行精密分析,最好每进行5个样品需用天冬氨酸或其它标准品进行一次校正。对各类不同蛋白质含量样品凯氏定氮法和燃烧法比较见表3。

表3 不同蛋白质含量样品凯氏定氮法和燃烧法比较

方法	编号	蛋白质含量(%)				
		0~5	5~10	10~30	30~50	>50
凯氏定氮法(%)	1	0.60	7.42	18.50	38.10	52.20
	2	0.46	9.42	11.00	48.30	79.40
	3	4.35	9.00	10.90	35.50	62.80
	4	0.56	7.09	15.50	46.30	51.70
	5	2.37	9.96	18.40	37.00	68.70
	6	0.82	8.43	13.20	37.90	57.20
	7	1.32	8.56	10.70	41.00	53.10
燃烧法(%)	1	2.84	7.89	18.60	37.80	52.90
	2	0.07	9.61	11.40	47.80	77.40
	3	3.27	8.22	10.30	35.60	67.10
	4	1.32	7.45	15.00	43.20	50.70
	5	2.58	9.52	18.90	35.30	73.40
	6	2.96	8.32	13.00	38.80	54.20
	7	3.87	9.07	11.00	42.80	53.70
T		+6, -22	+12, -16	+12.5, -13.5	+17, -11	+13, -16
P值		<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

采用秩和检验方法,对含量0%~5%蛋白质样品用凯

氏定氮法与燃烧法所获得的值进行比较,T值在T_(6,0.05)外,P值均小于0.05,差别有统计学意义,说明两方法测定蛋白质含量低于5%的样品时,分析结果有差异;对含量>5%的蛋白质样品,将用凯氏定氮法与燃烧法所获得的分析结果进行比较,T值均在T_(6,0.05)内,P值均大于0.05,差别无统计学意义,说明两方法测定蛋白质含量大于5%样品时,凯氏定氮法与燃烧法使用效果是一致的。

对不同种类样品用凯氏定氮法和燃烧法进行蛋白质含量测定比较见表4。

表4 不同种类样品两种测定方法比较

种类	凯氏定氮法(%)	燃烧法(%)	
肉类	梅花肉	18.5	18.6
	牛肉	23.7	23.8
植物类	火腿肠	10.4	10.5
	挂面	12.1	12.6
	玉米面	7.09	7.45
	小麦粉	11.0	11.0
奶制品	黄豆	37.2	37.8
	酸牛奶	3.29	2.12
	牛奶	2.83	3.00
鱼类	奶粉	13.0	13.2
	小黄鱼	19.6	20.8
蛋类	鸡蛋	12.8	12.9
保健品	<5%片剂	0.46	1.54
	>5%香蒜片	11.4	10.8
	小乐康胶囊	48.1	48.9
	纽崔莱蛋白质粉	79.4	77.4
T	+40, -70.5		
P	>0.05		

注:保留3位有效数字。

采用秩和检验方法,对凯氏定氮法与燃烧法所获得的分析结果进行比较,T值均在T_(13,0.05)内,P值均大于0.05,差别无统计学意义,凯氏定氮法与燃烧法使用效果是一致的。因而,不同种类样品用凯氏定氮法和燃烧法进行蛋白质含量测定只要蛋白质含量>5%两方法皆有可比性。

将两种检测方法进行比较发现,虽然直接测定法在精密度、稳定性比国标法略低,但在可接受范围内,达到国标要求。其操作简单、快速、费用低,适合日常食品中蛋白质测定。当蛋白质含量大于5%时,直接测定法与国标法之间无统计学差异,因而,直接测定法是一种快速、简单、精密度、灵敏度均符合要求的测定蛋白质的安全方法。

4 参考文献

[1] 食品卫生检验方法 理化部分(一)[M]. 北京:中国标准出版社, 2004: 780-783.
 [2] 吕玉琼,于雯,林凯. 自动凯氏定氮仪测定食品中蛋白质[J]. 中国卫生检验杂志, 2003,13(5): 319-321.
 [3] 张文彬. SPSSII统计分析教程[M]. 北京:希望电子出版社,2002:228-230.

(收稿日期:2009-02-13)