

全自动凯氏定氮仪测定大米蛋白质

Study on determination of rice protein by automatic kjeldahl apparatus

郭应时¹ 曹小彦¹ 邹杭君¹ 郭明义² 张 威¹

GUO Ying-shi¹ CAO Xiao-yan¹ ZOU Hang-jun¹ GUO Ming-yi² ZHANG Wei¹

(1. 广电计量检测〔湖南〕有限公司, 湖南 长沙 410007; 2. 长春市食品药品监督管理局, 吉林 长春 130000)

(1. Hunan GRG Metrology & TEST Co., Ltd., Changsha, Hunan 410007, China;

2. Changchun Food and Drug Administration, Changchun, Jilin 130000, China)

摘要:研究全自动凯氏定氮仪测定大米蛋白质的方法,通过考查样品质量、硫酸添加量、消化温度、消化时间等关键因素,确定最佳试验条件。结果表明:当样品质量为 0.40 g,硫酸添加量为 12 mL,消化温度为 420 ℃,消化时间为 50 min 时,5 种大米蛋白质测定值($n=6$)的标准偏差为 0.050 2~0.101 1,尿素的氮回收率为 99.9%~100.5%,该法与微量蒸馏法测定蛋白质结果的比值为 1.023 4~1.079 4,测定时间缩短到 1 h。说明该方法稳定、准确、快速。

关键词:蛋白质;全自动凯氏定氮仪;样品质量;硫酸添加量;消化温度;消化时间

Abstract: The method of measuring rice protein with fully automatic Kjeldahl azotometer by single-factor experiment and orthogonal experiment was investigated. It defines the best experiment conditions through examining such key factors as sample weight, additive amount of sulfuric acid, digesting temperature and digesting time. The results showed that when the sample weight is 0.40 g, the added amount of sulfuric acid was 12 mL, digested at is 420 ℃ and for 50 min, the experimental effect was the best. The standard deviations of 6 determinations of 5 kinds of rice were 0.050 2~0.101 1, and the recoveries of nitrogen of urea were 99.9%~100.5%. The ratios of protein obtained by semi-micro distillation method were between 1.023 4~1.079 4, and the time of determination could be shortened to 1 hours. The method was found stable and accurate.

Keywords: protein; automatic kjeldahl apparatus; sample weight; concentrated sulfuric acid; digestion temperature; digestion time

目前已报道的蛋白质测定方法可分为两类:间接法和直接法。间接法根据定氮后的氮含量,利用蛋白质系数计算出蛋白质含量,杜马斯燃烧法和凯氏定氮法是使用最广泛的间

接方法;直接法利用蛋白质的物理或化学性质,采用仪器通过建立工作曲线得出蛋白质含量^[1-3],直接方法有近红外光谱法^[4]、紫外分光光度法^[5]、电泳法^[6]、紫外吸收光谱法^[7]和 Bradford 法^[8]。

凯氏定氮法凭借着灵敏度高、稳定性好、成本低廉等优点,成为了目前分析含氮化合物最常用的方法,被国内外作为法定的标准检验方法^[9]。由于传统的半微量定氮法检测时间需要 4~6 h,效率低下,全自动凯氏定氮法得到了较快发展。目前对凯氏定氮法测定食品蛋白质进行的研究已有不少^[10-11],但是利用全自动凯氏定氮仪测定特定食品蛋白质的研究报道仅见于大豆、小麦、乳制品。尽管供应商都会根据各自仪器的特性提供一个基本方法以满足大部分样品的分析,但是由于食品基质复杂,普适性再强的方法具体到特定的样品时不一定是最佳方法,希望用同一处理方法来处理所有类型的样品是不切实际的,需要根据实际情况进行适当的调整和改进。有针对性地优化建立最优的大米处理方法,在最短的时间内得出更精准的结果十分必要。本试验拟采用全自动凯氏定氮仪测定大米中蛋白质的含量,通过考查样品质量、浓硫酸添加量、消化温度、消化时间等关键因素对蛋白质测定结果的影响,确定最佳试验条件,得出最佳分析程序,以提高分析效率,节约试验试剂,实现实验室对大批量样品的快速、准确检测。

1 材料与方法

1.1 材料

大米:产地分别为东北、江苏、新疆、湖南、海南,均为当地知名品牌的大米。

1.2 试剂

盐酸、氢氧化钠、浓硫酸、硼酸、甲基红:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

溴甲酚绿:指示剂,国药集团化学试剂有限公司;

尿素:99.9%,GBW09201,中国计量科学研究院;

全麦粉粗蛋白质标准物质:GBW(E)100126,国家粮食

作者简介:郭应时,男,广电计量检测(湖南)有限公司助理工程师,本科。

通信作者:曹小彦(1973—),女,广电计量检测(湖南)有限公司研究员级高级工程师,博士。E-mail:caoxxy@grgtest.com

收稿日期:2017-07-26

局科学研究院；

铜催化剂:4.5 g $\text{K}_2\text{SO}_4 + 0.5 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /片,福斯华(北京)科贸有限公司。

1.3 试剂配置

1.3.1 盐酸标准滴定溶液(0.1 mol/L) 按 GB/T 601—2016 配置及标定。

1.3.2 氢氧化钠溶液(400 g/L) 称取 4 000 g 氢氧化钠溶于水,冷却后稀释至 10 L。

1.3.3 硼酸吸收溶液(含溴甲酚绿和甲基红指示剂)

- (1) 1% 硼酸:将 100 g 硼酸溶于 10 L 纯水中。
- (2) 0.1% 溴甲酚绿溶液:0.1 g 溴甲酚绿溶于 100 mL 95% 乙醇中。
- (3) 0.1% 甲基红溶液:0.11 g 甲基红溶于 100 mL 95% 乙醇中。
- (4) 在 10 L 1% 的硼酸溶液中加入 100 mL 1% 溴甲酚绿和 70 mL 1% 甲基红溶液混匀。

1.4 主要仪器设备

凯氏定氮仪:8400 型,福斯华(北京)科贸有限公司；
消化炉:DT220 型,福斯华(北京)科贸有限公司；
中药粉碎机:FW177 型,天津市泰斯特仪器有限公司；
电子天平:ME204E 型,梅特勒-托利多仪器(中国)有限公司。

1.5 试验方法

1.5.1 样品制备 用中药粉碎机粉碎大米,并过 100 目筛。

1.5.2 单因素试验 参考 GB 5009.5—2016 及定氮仪简报,用消化炉消化样品,全自动凯氏定氮仪测定蛋白质。以蛋白质含量为指标,分别考察样品质量(0.25,0.50,0.75,1.00,1.25,1.75 g,固定浓硫酸添加量 12 mL,消化温度 420 ℃、消化时间 60 min,添加 1 片催化剂)、浓硫酸添加量(6.00,8.00,10.00,12.00,14.00,16.00,18.00 mL,固定样品质量 0.50 g,消化温度 420 ℃,消化时间 60 min,添加 1 片催化剂)、消化温度(320,340,360,380,400,420,440 ℃,固定样品质量 0.50 g,浓硫酸添加量 12 mL,消化时间 60 min,添加 1 片催化剂)、消化时间(30,40,50,60,70,80,90 min,固定样品质量 0.50 g,浓硫酸添加量 12 mL,消化温度 420 ℃,添加 1 片催化剂)4 个因素对大米蛋白质测定值的影响。

1.5.3 正交试验 根据单因素试验结果选取合理水平设计正交试验。

1.5.4 精密度及准确度试验 称取 6 个平行样品进行精密度试验,称取 3 个平行样品,加入尿素纯度标准物质进行加标回收试验,同时利用全麦粉粗蛋白标准物质考察准确度。

1.5.5 数据处理 试验数据用 SPSS 数据分析软件进行单因素方差分析并进行 Duncan 多重比较。

2 结果与分析

2.1 样品量对测定结果的影响

分析过程中,样品称取量一般依照样品含氮量和均匀度而定^[12]。一般来说,减少样品质量可以减少消化时间;同时,在保证试样均匀的情况下,增加样品质量能够减少系统误差,提高试验准确性。但是随着样品量的增加,消化过程

需要消耗更多的硫酸、消化时间也会相应延长,因此,试验过程中确定合理的称样量十分必要。

由图 1 可知,当其他影响因素固定不变时,样品质量在 0.25~0.75 g 时,消化效果最好,蛋白质测定值相对较高。当样品质量超过 0.75 g 以后,随着样品质量的增加,蛋白质测定值有下降趋势。在测定大米蛋白质时,为保证分析结果的准确性,称样量可控制在 0.25~0.75 g。

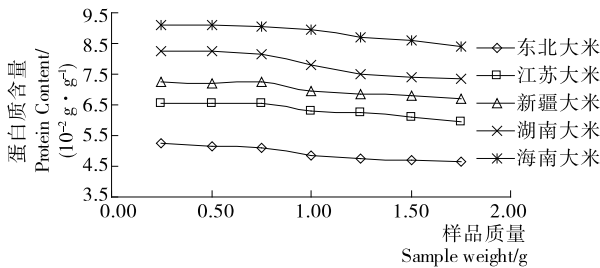


图 1 样品质量对蛋白质测定值的影响

Figure 1 Effect of Sample weight on the protein content

2.2 硫酸量对测定结果的影响

大米中有机氮与浓硫酸共热,在催化条件下被分解为无机氮,产生的氮与硫酸结合^[13],因此,浓硫酸在消化过程中起直接消化作用,浓硫酸用量直接影响消化结果。硫酸量过少会导致样品消化不完全,试验结果偏低;浓硫酸用量过多,又会浪费试剂。因此,确定合适的硫酸用量十分必要。由图 2 可知,当浓硫酸量为 10~12 mL 时消化效果最好,蛋白质测定值最高。当硫酸量<10 mL 时,随着浓硫酸使用量的增加,蛋白质测定值增大,硫酸量>10 mL 后,随着硫酸量的增加,蛋白质测定值有下降趋势。因此样品量为 0.5 g 时,浓硫酸添加量宜控制在 10 mL 左右。

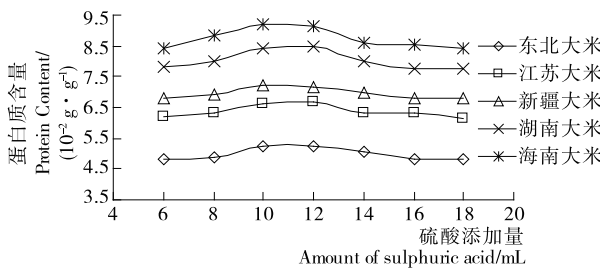


图 2 硫酸量对蛋白质测定值的影响

Figure 2 Effect of concentrated sulfuric acid on the protein content

2.3 消化时间对测定结果的影响

消化时间关系到样品中蛋白质能否完全被分解,对测定结果有重要影响。由图 3 可知,消化时间<50 min 时,随着消化时间的延长,蛋白质含量测定值增加,消化时间为 50~90 min 时,蛋白质测定结果差异不大。有研究^[14]表明,消化时间过长,氮元素会随蒸气逸出,造成结果偏低。为节约时间,测定大米蛋白质时可将时间控制在 50 min。

2.4 消化温度对测定结果的影响

消化过程本质上是使大米中有机氮转换成铵离子,氮的临界分解温度为 373 ℃,理论上温度越高,消化速度越快,但

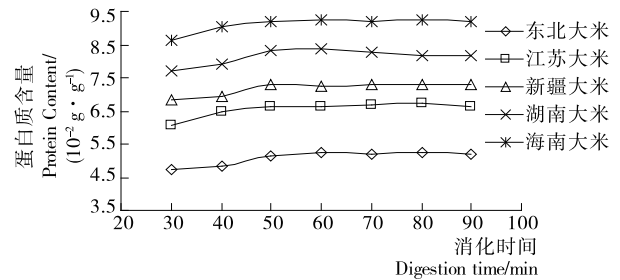


图 3 消化时间对蛋白质测定值的影响

Figure 3 Effect of digestion time on the protein content

是过高的温度势必会引起氮元素的损失。由图 4 可知,在温度<400 ℃时,随着消化温度的升高,蛋白质测定值也随之增加,380~440 ℃时蛋白质测定结果最高,且无显著差异。可见消化温度是影响消化效果的另一个重要因素,并且消化温度过低会造成消化不完全,导致试验结果偏低;消化温度过高也对消化过程无益,有研究^[15]表明,消化温度过高容易造成氮元素损失,导致测定结果偏低。因此,进行大米样品处理时,宜将消化温度控制在 400 ℃左右。

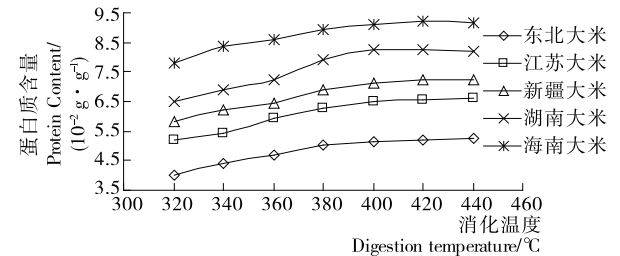


图 4 消化温度对蛋白质测定值的影响

Figure 4 Effect of digestion temperature on the protein content

2.5 正交试验

根据单因素试验结果,选取样品量、浓硫酸量、消化时间、消化温度 4 个因素各取 4 个水平采用湖南大米作为试验材料进行正交试验,试验结果见表 1。方差分析见表 2。

由表 2~6 可知:消化温度和消化时间的显著值分别为 0.000 1(P<0.05)和 0.045 1(P<0.05),可见消化温度和消化

表 1 正交试验结果

Table 1 The orthogonal test results

试验号	样品质量/ g	浓硫酸量/ mL	消化时间/ min	消化温度/ ℃	蛋白质含 量/%
1	0.30	6.00	40	380	7.79
2	0.30	8.00	50	400	8.31
3	0.30	10.00	60	420	8.38
4	0.30	12.00	70	440	8.31
5	0.40	6.00	50	420	8.37
6	0.40	8.00	40	440	8.25
7	0.40	10.00	70	380	7.85
8	0.40	12.00	60	400	8.35
9	0.50	6.00	60	440	8.30
10	0.50	8.00	70	420	8.28
11	0.50	10.00	40	400	8.25
12	0.50	12.00	50	380	7.86
13	0.60	6.00	70	400	8.20
14	0.60	8.00	60	380	7.82
15	0.60	10.00	50	440	8.32
16	0.60	12.00	40	420	8.33

表 2 方差分析表

Table 2 Variance analysis

来源	第 III 类平方	自由度	平均值平方	F 值	显著性
修正的模型	0.707 0	12	0.058 9	139.256 2	0.000 9
截距	1 072.071 3	1	1 072.071 3	2 534 946.931 0	0.000 0
样品量	0.004 1	3	0.001 4	3.206 9	0.182 1
浓硫酸量	0.007 1	3	0.002 4	5.610 8	0.095 2
消化时间	0.012 7	3	0.004 2	10.024 6	0.045 1
消化温度	0.682 8	3	0.227 6	538.182 3	0.000 1
错误	0.001 3	3	0.000 4		
总计	1 072.779 3	16			
校正后总数	0.708 0	15			

表 3 样品量的统计量

Table 3 Statistic of Sample quantity

样品量/ g	平均值/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	标准 偏差	95%置信区间	
			下限/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	上限/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)
0.30	8.198	0.010	8.165	8.230
0.40	8.205	0.010	8.172	8.238
0.50	8.173	0.010	8.140	8.205
0.60	8.168	0.010	8.135	8.200

表 4 浓硫酸量的统计量

Table 4 Statistic of sample quantity

浓硫酸 量/mL	平均值/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	标准 偏差	95%置信区间	
			下限/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	上限/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)
6	8.165	0.010	8.132	8.198
8	8.165	0.010	8.132	8.198
10	8.200	0.010	8.167	8.233
12	8.213	0.010	8.180	8.245

表 5 消化时间的统计量
Table 5 Statistic of Digestion time

消化时 间/min	平均值/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	标准 偏差	95%置信区间	
			下限/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	上限/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)
40	8.155	0.010	8.122	8.188
50	8.215	0.010	8.182	8.248
60	8.213	0.010	8.180	8.245
70	8.160	0.010	8.127	8.193

时间对测定结果影响十分显著;浓硫酸量的显著值为0.095 2 (0.05<P<0.10),说明浓硫酸量也对测定结果有一定影响;样品质量的显著值为 0.182 1(P>0.10),对测定结果无十分显著影响。各因素影响次序分别为消化温度>消化时间>浓硫酸量>样品质量。

因此,当样品质量为 0.40 g,浓硫酸量为 12 mL,消化温度为 420 ℃,消化时间为 50 min 时,消化效果最为理想,大米蛋白质测定值最高。

2.6 精密度试验和准确度试验

按照优化后的样品处理方法进行精密度试验,5 种大米

表 6 消化温度的统计量
Table 6 Statistic of Digestion temperature

消化温 度/℃	平均值/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	标准 偏差	95%置信区间	
			下限/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	上限/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)
380	7.830	0.010	7.797	7.863
400	8.278	0.010	8.245	8.310
420	8.340	0.010	8.307	8.373
440	8.295	0.010	8.262	8.328

样品各测定 6 次,计算均值和相对标准偏差。各称取 3 个平行样品,加入一定量的尿素纯度标准物质进行加标试验,同时称取 3 份全麦粉粗蛋白质标准物质进行试验,检验该处理方法的准确性。

由表 7 可知:当样品质量为 0.40 g,浓硫酸量为 12 mL,消化温度为 420 ℃,消化时间为 50 min 时,5 种大米蛋白质测定结果的相对标准偏差最大值为 0.101 1,说明该方法精密度高、稳定性好。由表 8 可知:该处理条件下,试验回收率结果理想,平均回收率达到了 100.1%。由表 9 可知,标准物质的回收率也达到了 98.5%,说明试验结果准确可靠。

表 7 精密度试验结果
Table 7 The results of Precision experiment

样品	蛋白质测定值/(10 ⁻² g·g ⁻¹)						平均值/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5	6		
东北大米	5.28	5.15	5.31	5.26	5.28	5.18	5.24	0.063 5
江苏大米	6.62	6.52	6.58	6.45	6.51	6.48	6.53	0.063 1
新疆大米	7.13	7.25	7.08	7.22	7.16	7.35	7.20	0.096 2
湖南大米	8.42	8.30	8.40	8.39	8.45	8.37	8.39	0.051 2
海南大米	9.21	9.25	9.08	9.11	9.18	9.36	9.20	0.101 1

表 8 样品加标结果[†]
Table 8 The results of recovery experiment

样品	样品测定值 (以 N 计)/mg	加标量 (以 N 计)/mg	加标样品测定值 (以 N 计)/mg	回收率/%	
				结果	平均值
东北大米	3.52	7.00	10.50	99.71	99.9
	3.45	7.00	10.44	99.86	
	3.45	7.00	10.45	100.00	
江苏大米	4.39	8.50	12.92	100.35	100.1
	4.51	8.50	12.98	99.65	
	4.46	8.50	12.99	100.35	
新疆大米	4.85	10.00	14.92	100.70	100.5
	4.82	10.00	14.85	100.30	
	4.76	10.00	14.82	100.60	
湖南大米	5.64	12.00	17.63	99.92	99.8
	5.55	12.00	17.48	99.42	
	5.68	12.00	17.68	100.00	
海南大米	6.22	12.00	18.25	100.25	100.3
	6.28	12.00	18.21	99.42	
	6.20	12.00	18.35	101.25	

[†] 样品测定值和加标样品测定值均以 0.40 g 样品中氮含量计。

表 9 标准物质分析结果
Table 9 The results of Standard Substances

序号	测定值/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	标准值/ (10 ⁻² g·g ⁻¹)	回收率/%	
			结果	平均值
1	15.6	15.8±0.3	98.73	98.5
2	15.7		99.37	
3	15.4		97.47	

2.7 全自动凯氏定氮法与半微量蒸馏法的比较

采用优化后的全自动凯氏定氮法和国标方法中半微量蒸馏法(GB 5009.5—2016 第一法 5.1 部分)分别测定 5 种大米的蛋白质含量,并对测定结果进行分析,结果见表 10。

由表 10 可知,全自动凯氏定氮法和半微量蒸馏法测定蛋白质结果的差值均为正值,在 0.213 2~0.381 8;测定结果

表 10 全自动凯氏定氮法和半微量蒸馏法测定大米蛋白质结果比较

Table 10 Comparison of protein content in rice by Automatic Kjeldahl Apparatus and Semi-micro Distillation

样品	全自动凯氏定氮法			半微量蒸馏法			$A-B$	A/B
	结果/ ($10^{-2}\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	平均值(A)/ ($10^{-2}\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%	结果/ ($10^{-2}\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	平均值(B)/ ($10^{-2}\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%		
东北大米	5.28			4.98				
	5.18	5.19	0.082 8	4.89	4.81	0.227 7	0.381 8	1.079 4
	5.12			4.55				
江苏大米	6.47			6.22				
	6.62	6.59	0.107 3	6.47	6.23	0.238 2	0.362 0	1.058 1
	6.68			5.99				
新疆大米	7.18			7.07				
	7.11	7.13	0.047 8	6.96	6.85	0.292 4	0.282 6	1.041 3
	7.10			6.52				
湖南大米	8.43			8.15				
	8.21	8.33	0.113 6	8.32	8.11	0.225 8	0.223 1	1.027 5
	8.36			7.87				
海南大米	9.39			8.88				
	9.24	9.32	0.076 3	9.49	9.11	0.332 7	0.213 2	1.023 4
	9.34			8.95				

比值均>1,在 1.023 4~1.079 4。说明 2 种方法的测定结果差异不大,且全自动凯氏定氮法的测定值均要比半微量蒸馏法高,这是由于半微量蒸馏法涉及到多次样品转移,氮元素的损失不可避免。同时,全自动凯氏定氮法测定结果的相对标准偏差均要小于半微量蒸馏法,说明该方法稳定性要要比半微量蒸馏法好;另一方面,全自动凯氏定氮法与半微量蒸馏法相比,检测时间由 4 h 缩短到 1 h,并且减少了人为操作误差,既提高了效率,又提高了结果的准确性。

3 结论

消化温度、消化时间和浓硫酸量对大米蛋白质的测定结果有显著影响,样品质量亦对测定结果有一定影响,4 个影响因素的影响次序为消化温度>消化时间>浓硫酸量>样品质量。

在测定大米蛋白质过程中,控制试样质量为 0.40 g,浓硫酸量为 12 mL,消化温度为 420 ℃,消化时间为 50 min,消化效果最佳,大米蛋白质测定结果较为理想,精密度试验和准确度试验均达到了试验要求。该方法与传统方法相比,操作更简便,减少了人为误差,保证了结果的准确性,同时耗时短,提高了工作效率。

参考文献

[1] 路苹,于同泉,王淑英,等. 蛋白质测定方法评价[J]. 北京农学院学报,2006,21(2): 65-69.

[2] 孙蓉,吴文标. 食品中蛋白质检测技术研究进展[J]. 食品科学,2012,33(23): 393-398.

[3] 刘庆,王凡余,李刚. 乳制品中蛋白质检测方法的研究进展[J]. 生命科学仪器,2014(1): 43-46.

[4] 刘建学,吴守一,方如明. 近红外光谱法快速检测大米蛋白质含

量[J]. 农业机械学报,2001,32(3): 68-70.

[5] 曹红翠. 紫外分光光度法测定蛋白质的含量[J]. 广东化工,2007,34(8): 93-94.

[6] 唐萍,田晶,余振宝,等. 奶制品中蛋白质测定的毛细管电泳法研究[J]. 分析科学学报,2006,22(1): 5-8.

[7] 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社,2002: 23-29.

[8] 张志涛,刘金生,许强,等. Bradford 法测定牛奶中蛋白质含量[J]. 食品与机械,2011,27(5): 128-130.

[9] 郭颖娜,孙卫. 蛋白质含量测定方法的比较[J]. 煤炭与化工,2008,31(4): 36-37.

[10] 罗小芬. 浅谈凯氏定氮法测定蛋白质准确度的操作技巧及关键点[J]. 现代食品,2017(19): 99-100.

[11] 张泽泉,罗翠婷,李孔寿,等. 凯氏定氮法蛋白质测定的改进探讨[J]. 海峡预防医学杂志,2017(1): 64-66.

[12] 王潍波.不同测定方法对饲料粗蛋白测定结果影响的研究[J]. 饲料与畜牧,2008(12): 41-45.

[13] 余文琴. 大米分离蛋白制备、表征及重构大豆一大米肽研究[D]. 重庆: 重庆大学,2014: 1-64.

[14] 梁芳珍. 无腺体棉仁蛋白粉 Kjeldahl 定氮法的有效消化剂[J]. 中国油脂,1997(5): 36-36.

[15] 徐新娟,黄中文,王伟,等. 全自动凯氏定氮仪测定大豆蛋白质方法的研究[J]. 黑龙江农业科学,2016(2): 108-110.