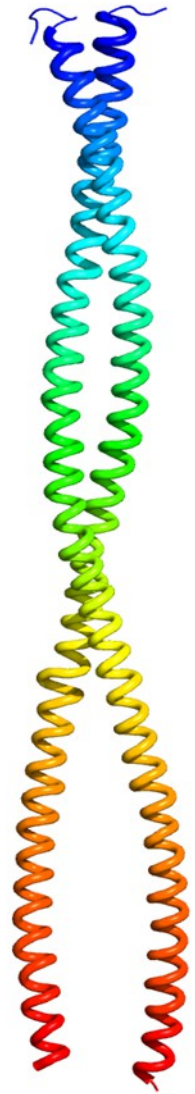

食品中蛋白质含量测定



思考：


- 蛋白质有哪些生理功能？
- 为什么要检测食品中的蛋白质含量？
- 你了解的近几年与食品中蛋白质有关的事件有哪些？



概述

- ▣ 蛋白质的生理功能：是生命的物资基础，维持人体的酸碱平衡和水平衡，传递遗传信息，物质代谢及运转都蛋白质有关。
- ▣ 测定意义：人体重要的营养物质，食品的营养指标；合理开发利用食品资源、优化食品配方、控制食品生产过程、提高和监督产品质量。

-
- 2004 年的阜阳劣质奶粉事件
 - 2008 年中国奶粉污染事件（毒奶制品、毒奶粉）



**都和蛋白质有
关！**



2004/4安徽阜阳劣质奶粉致大头娃娃171,13人死
头脸胖大，四肢细短，体重比出生时还轻

205个奶粉品46个不合格生产厂家的55种奶粉。分布8
个省，其中蛋白质含量低于**5%**的有**31种**，最少的仅为
0.37%

-
- 蛋白质的组成及性质？
 - 蛋白质区别于其他有机化合物的主要标志是什么？



蛋白质的组成及性质

- 蛋白质是复杂的含氮有机化合物，分子量大。
- 组成：20种氨基酸通过酰胺键以一定方式结合。
- 化学元素：C、H、O、N (P、S、Cu、Fe、I)；
- 官能团：肽键、氨基酸残基、酸碱基团、芳香基团。
- ✓ 结论：含氮则是蛋白质区别其他有机化合物的主要标志。

蛋白质的测定方法

- 一类是利用蛋白质的共性，如含氮、肽键、折射率
- 另一类是利用蛋白质中特定氨基酸残基、酸碱集团以及芳香基团等测定蛋白质含量。
- ✓ 目前最常用的方法是凯氏定氮法，通过测总氮量乘以蛋白质系数来确定蛋白质含量。

凯氏定氮法（GB 5009.5-2010 第一法）

- 凯氏定氮法：微量法、常量法、自动定氮仪法等。
- 是用过测出样品中总氮含量才乘以相应的蛋白质系数而求出蛋白质的含量的方法。

粗蛋白！??

- 粗蛋白：新鲜食品中含氮化合物大都以蛋白质为主体，由于样品中含有少量非蛋白质含氮化合物，和核酸、生物碱、含氮类脂、卟啉以及含氮色素等非蛋白质的含氮化合物，所以结果为粗蛋白含量。

蛋白质系数

- 蛋白质系数：每份氮素相当于蛋白质的份数。

一般蛋白质含氮为 16%，所以 1 份氮素相当于 6.25 份蛋白质。此数值（6.25）称为蛋白质系数，用 F 表示。

元素	C	H	O	N	S	P
百分比	50	7	23	16	0~3	0~3

- 不同的蛋白质由于氨基酸的构成比例及方式不同，含氮量不同。

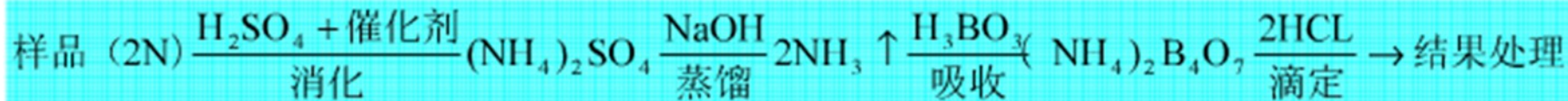
食品	鸡蛋	花生	大米	大豆及制品	小麦	牛乳及制品
F	6.25	5.46	5.95	5.71	5.70	6.38

P86

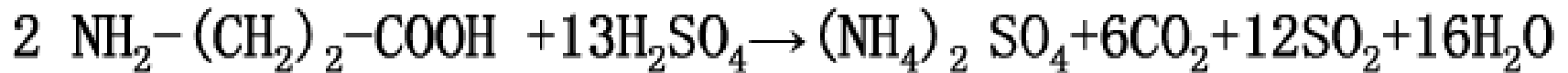
- ▣ 原理：样品与浓硫酸和催化剂一同加热消化，使蛋白质分解，其中碳和氢被氧化物二氧化碳和水逸出，而样品中的有机氮转化为氮与硫酸结合成硫酸铵。然后加碱蒸馏，使氨蒸出，用硼酸吸收后在以标准盐酸或硫酸溶液滴定，根据标准酸消耗量可计算出蛋白质的含量。
- ▣ 适用范围：各类食品中蛋白质含量的测定。

步骤

凯氏定氮法



(1) 样品消化



▣ 浓硫酸的作用：

脱水作用——使有机物脱水并炭化为 C、H、N

氧化作用——将有机物炭化后的 C 氧化为二氧化碳，硫酸则被还原成二氧化硫。
$$2\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{C} = 2\text{SO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$$

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消化液中。

□ 硫酸钾的作用：

提高溶液沸点而加快有机物的分解



- ◆ 硫酸钾加入量不能太大，否则消化体系温度过高，引起已生成的铵盐发生热分解而造成损失。
- ◆ 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。

□ 硫酸铜的作用：

1 催化作用。加速有机物的氧化分解



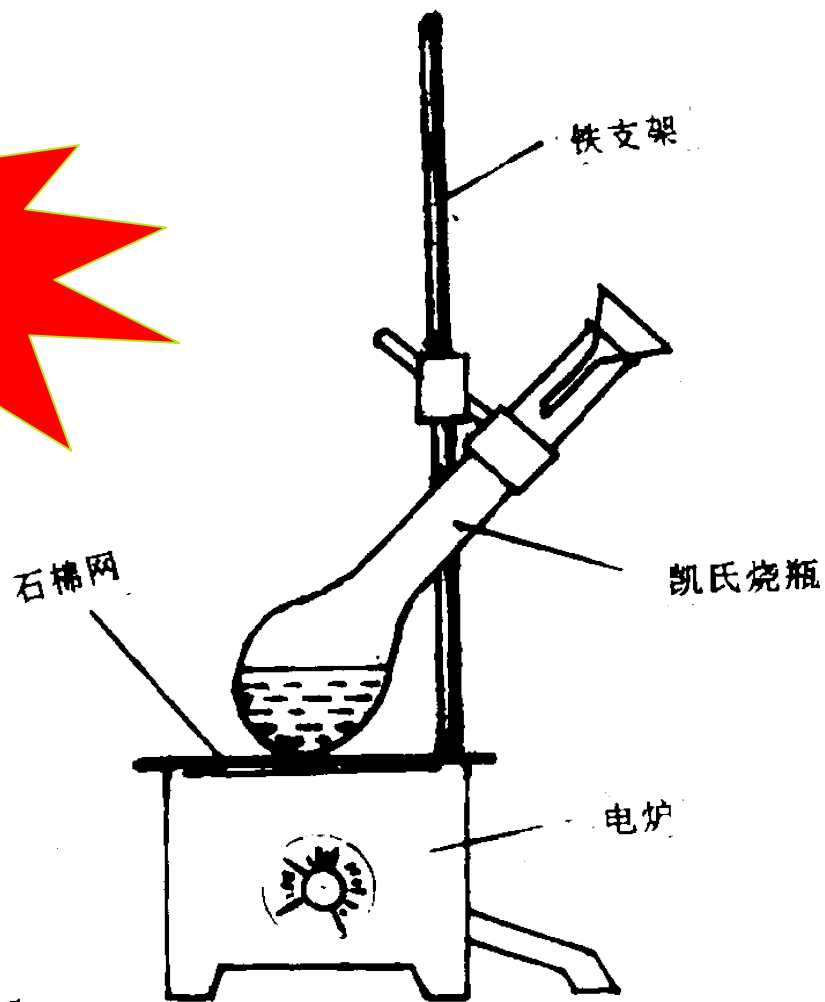
随反应不断进行，待有机物消化完后，不再有硫酸亚铜（褐色）生成，溶液呈现清澈的蓝绿色。

2 消化完全的指示：蓝绿色，澄清，透明；

3 蒸馏时碱性反应的指示。亦深蓝色或产生黑色沉淀

样品消化

要注意防
止爆沸



a. 消化装置

(2) 蒸馏

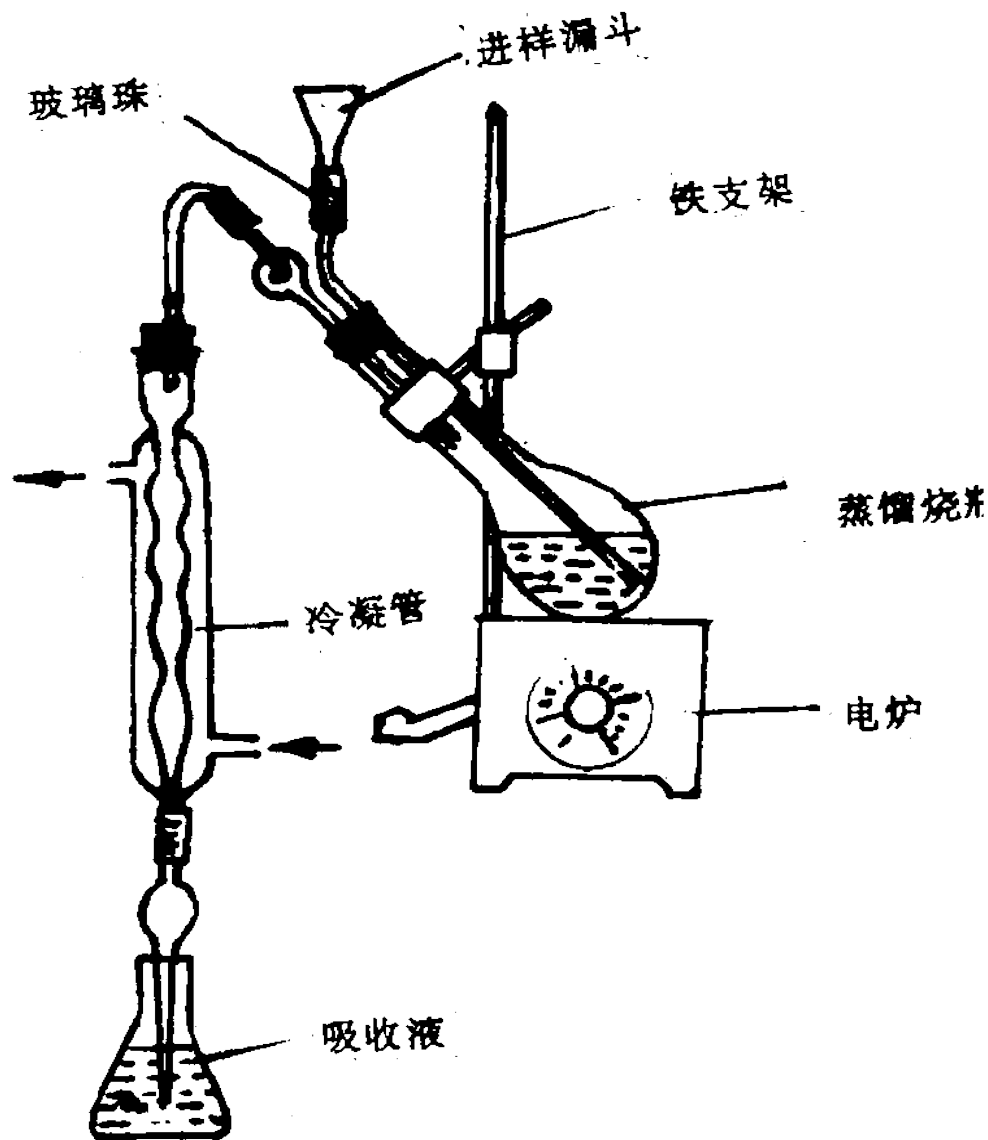
- 氢氧化钠的作用：使消化液呈碱性，加热蒸馏，即可释放出氨气。



装置如下：

蒸馏：

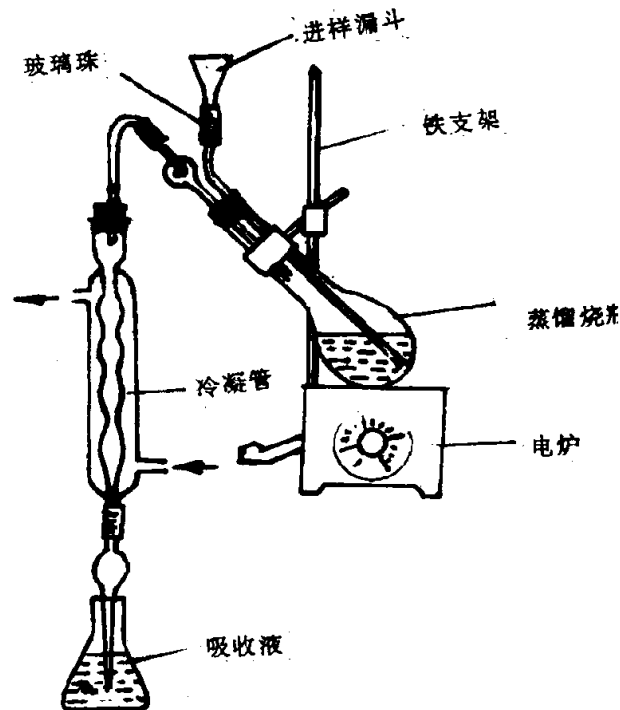
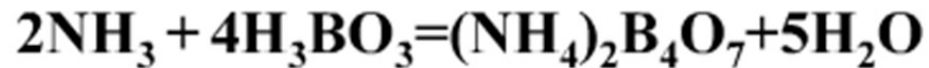
- 一：加入氢氧化钠溶液要过量；
- 二：要防止样液中氨气逸出。



b. 蒸馏吸收装置

(3) 吸收

- 硼酸溶液：吸收氨气，形成硼酸铵



b. 蒸馏吸收装置

(4) 滴定

- 待吸收完全后，再用盐酸标准溶液滴定，溶液由蓝绿色变成灰红色



仪器和试剂

500mL 凯氏烧瓶、凯氏定氮装置

消化用： 硫酸、硫酸钾、硫酸铜

蒸馏用： 40% 氢氧化钠溶液

吸收用： 4% 硼酸

滴定用： 盐酸标准溶液

指示剂： 0.1% 甲基红、溴甲酚绿混合指示剂

操作步骤

(一) 样品消化

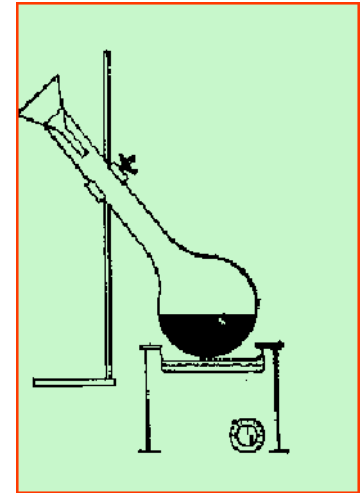
1、称样 (约相当氮 30 ~ 40 mg)

(1) 固体试样: 0.20 ~ 2.00 g

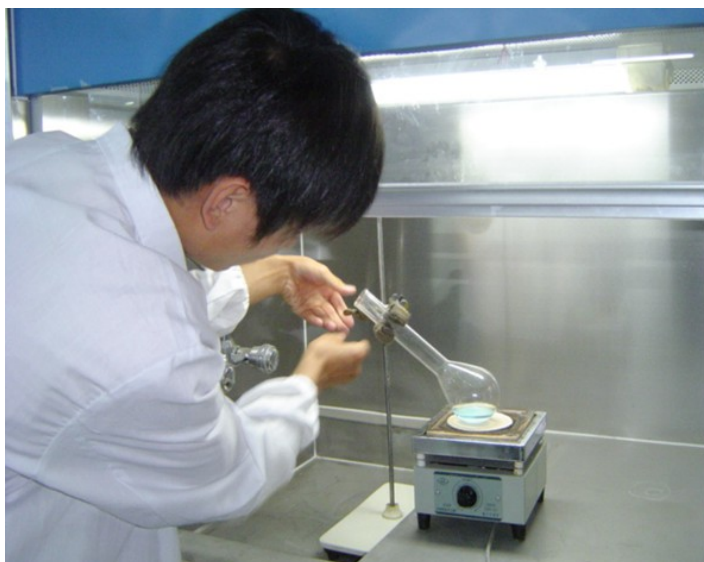
(2) 半固体试样: 2.00 ~ 5.00 g

(3) 液体试样: 10.00 ~ 25.00 mL

2、**消化准备** 将试样移入洗净、烘干、编号的凯氏烧瓶内，加入 0.2 g 硫酸铜，6 g 硫酸钾及 20 mL 硫酸，加入 2 粒~ 3 粒玻璃珠，稍摇匀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。



-
- 先小火加热，待内容物全部炭化、泡沫停止产生后加大火力，保持瓶内液体微沸。
 - 至液体变蓝绿色透明后，继续加热微沸 30min 。
 - 关闭电炉，取下烧瓶、冷却，转移至 100mL 容量瓶中，加水定容。



- 消化过程中应注意的问题：

- ① 加入样品不要粘附在凯氏烧瓶瓶颈。
- ② 消化开始时不要用强火，要控制好热源，并注意不时转动凯氏烧瓶。
- ③ 样品中若含脂肪较多时，消化过程中易产生大量泡沫，应加入少量辛醇或液体石蜡或硅油消泡剂。
- ④ 消化完全后要冷却至室温才能稀释定容。
- ⑤ 所用试剂溶液应用无氨蒸馏水配制；

(2) 蒸馏与吸收



按图安装好微量定氮蒸馏装置。于水蒸气发生瓶内装水至 $2/3$ 容积处，加甲基橙指示剂数滴及硫酸数毫升，以保持水呈酸性，加入数粒玻璃珠。

- 在接收瓶中加入 10mL 40g/L 硼酸及 2 滴混合指示剂，将冷凝管下端插入液面以下。
- 准确吸取消化液 2.0-10.0mL 于反应管内，用蒸馏水冲洗漏斗并迅速经漏斗加入 10mL NaOH 溶液，夹好漏斗夹并水封，加热煮沸水蒸汽发生瓶内的水进行蒸馏。
- 蒸馏 10min，将冷凝管尖端提离液面继续蒸 1min，用少量水冲洗冷凝管管口，洗液并入接收瓶中。



蒸馏与吸收过程中应注意的问题

- ①整套装置不能漏气。
- ②加碱量要足，应使消化液呈深蓝色或产生黑色沉淀。操作要迅速，漏斗要采用水封防氨逸出。
- ③冷凝管下端先插入硼酸吸收液液面以下才能蒸馏。吸收液温度不应超过 40°C ，若超过时可置于冷水浴中使用。
- ④蒸馏完毕后，将接收瓶移开后再关闭电源，避免发生吸收液倒吸。
- ⑤在每次测定前及两次测定之间，均要洗涤反应管。（倒吸法，在吸收瓶中加入蒸馏水，其余同测定时的做法，在蒸汽发生器中水剧烈沸腾后，立即移开电炉，水即从吸收瓶中倒吸入反应管，再倒吸入汽水分离管或蒸汽发生器中，打开夹子，即可放出废水。）

(3) 滴定

- 取下接收瓶，用 0.01mol/L 盐酸标准溶液滴定至终点。同时做一试剂空白（除不加样品，从消化开始操作完全相同）。

(4) 结果计算

$$W = \frac{c(V_2 - V_1) \times 0.014 \times F}{m \times \frac{10}{100}} \times 100(\%)$$

W-蛋白质含量，%

C-盐酸标准滴定溶液的浓度，mol/L

V₂—试样消耗盐酸的体积，mL

V₁—空白消耗的盐酸的体积，mL

m—试样的质量，g

F—蛋白质系数

讨论

- 1、什么是蛋白质系数？蛋白质的测定结果为什么要乘以蛋白质系数？
- 2、蛋白质的测定方法有哪些？国家标准是哪一法？
- 3、为什么说用凯氏定氮法测定出来的是粗蛋白的含量？
- 4、凯氏定氮法的操作包括哪些步骤？有哪些注意事项？
- 5、实验中用到哪些试剂？作用是什么？

操作视频

微量凯氏定氮法：

http://v.youku.com/v_show/id_XODIwODI3NDQ0.html?from=y1.2

凯氏定氮法

http://v.youku.com/v_show/id_XNzExNDIwMzI=.html?from=y1.2-1-1

(7 m 54 s)