

凯氏定氮法测定牙鲆肌肉粗蛋白含量方法的改进*

IMPROVEMENT IN KJADEHL'S METHOD DETERMINING PROTEIN CONTENT OF FLOUNDER MUSCLE

刘宗柱^{1,2} 朱凤华² 徐永立¹ 张培军¹⁽¹⁾ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)⁽²⁾ 莱阳农学院动物科学系 265200)

鱼肌肉样本中粗蛋白含量的测定是鱼类养殖及营养学研究中经常用到的实验手段,凯氏定氮法是一般样品中粗蛋白含量测定的经典方法(它是1883年由凯达尔(Kjadel)道创的),但这一方法过程繁琐,样品消化后需经蒸馏、滴定等操作步骤,实验人员往往需要相当的实验经验,才能取得较好的实验结果。本文对这一经典方法进行了改进并做了对比实验。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验样品 牙鲆鱼肌肉,按常规方法制备成半干样品。

1.1.2 实验器材 分析天平,凯式烧瓶(100 ml)及电热凯氏消化架,半微量凯氏蒸馏器及滴定装置,722-型光栅分光光度计等。

1.2 方 法

1.2.1 消化 精确称取半干样品0.5 g左右,小心无损地移入凯式烧瓶,加入浓H₂SO₄ 6 ml及混合催化剂2.0 g,置电热凯式烧瓶架上加热消化至烧瓶内溶液澄清(通风橱中进行)。消化结束后将消化液移入容量瓶并定容至100 ml,此消化稀释液部分用作蒸馏、滴定实验,部分用作比色测定。

1.2.2 蒸馏及滴定^[1] 将凯式半微量蒸馏器准备妥当后,先用蒸汽洗涤3次,用移液管量取10 ml消化稀释液或硫酸铵标准液注入蒸馏器的反应室,加入5 ml饱和氢氧化钠溶液,通入蒸汽开始蒸馏,蒸出的氨经冷凝后以加有甲基红-溴甲酚绿混合指示剂的硼酸吸收,硼酸溶液吸收氨后由灰色变为蓝色,之后以0.01 mol/L HCl滴定至溶液由蓝色变成灰色为止。

结果计算:

样本中粗蛋白含量(%) = $V_3 \times N \times 0.014 \times 6.25 \times$

$(V_1/V_2) \times (100/W)$,

式中:W为样本重(g),V₁为消化液稀释容量(ml),V₂为稀释液蒸馏用量(ml),V₃为滴定样本馏出液的HCl消耗量(ml),N为HCl浓度。

1.2.3 比色法测定^[2] (1) Nessler试剂(原液):KI 5 g溶于5 ml重蒸水中,加入饱和氯化汞溶液(5.7%,约需50 ml),不断搅拌,直至产生的朱红色沉淀不再溶解,加入40 ml NaOH,定容至100 ml,棕色瓶保存,临用时稀释10倍(应用液)。(2) 标准(NH₄)₂SO₄溶液:1 mg/ml硫酸铵溶液倍比稀释为6个浓度梯度(3)标准曲线的绘制及样品测定:取数支洁净的试管,编号,每管加100 μl梯度浓度的硫酸铵标准液或样品消化稀释液,然后加4 ml Nessler应用液,混匀后,测定各管反应液在440 nm处的光密度(OD₄₄₀)。依据各标准管硫酸铵的标准浓度与其OD₄₄₀的对应关系,绘出标准曲线,求出回归方程,计算样品管中的氨氮浓度,继而换算出样品粗蛋白含量。

2 实验结果

2.1 比色法测定标准曲线的绘制及回归方程

比色反应液的最大光吸收波长为425 nm,但在440 nm处的光吸收线性较强,当氨氮浓度较低时,有较好的稳定性,氨氮浓度高时,比色液的光吸收随着时间的延长而有较明显的升高,但25 min后亦趋于稳定(图1)。硫酸铵标准工作曲线如图2所示,其回归

* 国家科委“九五”攻关项目96-C01-05-04号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第3508号;中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室调查研究报告第197号。

收稿日期:1998-08-25;修回日期:1998-10-26

方程为: $Y = 6.291X$, $r = 0.9862$, $P < 0.01$, 表现出很好的线性关系。

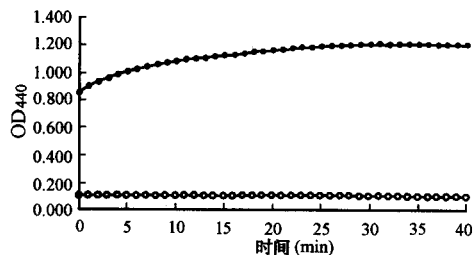


图1 反应液光吸收的稳定性

1. 0.5 mg/ml; 2. 0.0625 mg/ml

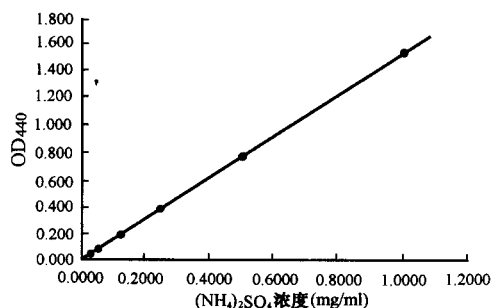


图2 硫酸铵标准工作曲线

2.2 标准硫酸铵回收实验两种方法的比较

分析纯硫酸铵配制成 0.5 mg/ml 的标准溶液, 分别用蒸馏、滴定和比色法测定, 其回收实验结果如表 1 所示。与蒸馏、滴定测定法相比, 比色法测定的回收率稍高, 但更接近理论值, 其标准差也远小于蒸馏、滴定的测定结果。

表1 硫酸铵回收实验两种方法的比较

方法	样本数	理论值 (mg/ml)	测定平 均值 (mg/ml)	标准差	回收率 (%)
蒸馏、滴定	16	0.500 0	0.471 2	0.062 8	95.19
比色	16	0.500 0	0.501 4	0.009 3	100.28

2.3 两种方法测定牙鲆鱼肌肉粗蛋白含量结果比较

牙鲆鱼肌肉样品经消化、稀释定容后, 一部分用蒸

馏、滴定法测定其粗蛋白含量, 一部分用比色法测定其粗蛋白含量, 结果如表 2 所示, 用比色法测定的结果略高于蒸馏、滴定法的测定结果, 反映数据精密度的变异系数比色法小于蒸馏、滴定法, 与硫酸铵回收实验的结果基本一致。

表2 牙鲆鱼肌肉粗蛋白含量(%)两种方法测定结果的比较

方法	样本数	平均值($X \pm SE$)	变异系数(%)
蒸馏、滴定	12	84.380 1 \pm 5.361 8	6.4
比色	12	89.788 2 \pm 1.794 0	2.0

3 讨论

虽然现在已有自动定氮仪可以较方便地测定样本中的粗蛋白含量, 但由于该仪器造价昂贵, 维持费用较高, 故目前一般中、小型实验室仍广泛采用传统的手工凯氏定氮法测定样品粗蛋白含量。由于此法有较高的准确度和精密度, 很早就被美国分析化学家协会(AOAC)、国际谷物化学家协会(ICC)等组织确定为法定标准分析法。凯氏法的基本原理是首先将样品在催化剂存在下, 以浓硫酸消化分解, 蛋白质中的氮转化为铵态(硫酸铵), 再经强碱蒸馏, 蒸出的氨用硼酸溶液吸收, 最后用酸标准溶液滴定, 根据酸标准溶液的浓度和消耗的体积, 可计算氮的含量。含氮量乘以相应的蛋白质换算系数, 即为蛋白质含量^[1]。

凯氏定氮法由于存有前文述及的缺点, 而且滴定终点须根据溶液颜色的变化依靠视觉来判定, 容易造成比较大的偶然性误差。

本文根据凯氏定氮法的部分基本原理, 参考氨氮测定的比色法, 将样品用浓硫酸消化后, 直接用 Nessler 试剂测定消化稀释液中的氨氮浓度。基本原理是, 氨与碘化汞钾在碱性溶液中生成黄色络合物, 其色度与氨氮含量成正比, 用分光光度计测定反应液的光密度值, 对照标准曲线即可计算出样品中的氨氮含量^[2]。该方法省略了传统凯氏定氮法中蒸馏和滴定的操作步骤, 排除了滴定终点判定时可能存在的人为性误差, 精密度高, 客观性强。该方法的另一个特点是操作简便、快速。用传统的凯氏定氮法测定样品时, 从蒸馏到滴定结束, 一个样品平均约需时间 5 min 左右, 而用改进的凯氏定氮法, 5 min 可以测定十几个样品, 尤其在测定大批量样品时, 应用改进的凯氏定氮法可以大大提高实验的工作效率。

改进的凯氏定氮法可用于常量、半微量及微量定氮等实验操作, 除用于牙鲆鱼肌肉粗蛋白含量测定

外,亦可广泛应用于其他生物样品及食品、饵料(饲料)的粗蛋白测定以及土壤、肥料中含氮量的测定,具体应根据样品含氮量的大致范围对消化样品量及消化液稀释倍数做适当调整。

注意事项:(1) 如果样品中 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} 含量较多,可能会导致反应液混浊而干扰测定,此时可加入酒石酸钾钠(反应液终浓度 0.5%)掩蔽,可取得较好的实验结果。(2) Nessler 试剂配制好后应静置 24 h,取上层澄清液储于棕色试剂瓶内(用橡皮塞盖紧),

Nessler 试剂久置可能又有沉淀生成,使用时只要不扰动沉淀,不影响实验结果。

参考文献

- 1 宁开桂(编著)。实用饲料分析手册。北京:中国农业科技出版社,1993。45~48
- 2 李建武、余瑞元、袁明秀等(合编)。生物化学实验原理和方法。北京:北京大学出版社,1994。403~406