

# 全自动凯氏定氮仪测定大豆蛋白质方法的研究

徐新娟, 黄中文, 王伟, 贺亚飞

(河南科技学院 生命科技学院/现代生物育种河南省协同创新中心, 河南 新乡 453003)

**摘要:**利用全自动凯氏定氮仪测定大豆蛋白质含量,采用单因素试验及正交设计试验,研究称样量、催化剂比例、浓硫酸量及消化时间对蛋白质含量测定结果的影响。结果表明:称样量对蛋白质含量测定结果的影响差异不显著,催化剂比例、浓硫酸量和消化时间则显著影响测定结果。正交设计结果表明,最佳的样品处理条件为  $A_2B_2C_2$ ,即当称样量在 0.5 g 时,最佳催化剂比例选择  $K_2SO_4/CuSO_4=6:0.2$ ,加 9 mL 浓硫酸,消化时间控制在 70 min 时可获得最佳的测定效果,在此条件下蛋白质测定含量最高可达 43.11%。

**关键词:**全自动凯氏定氮仪;蛋白质含量;样品处理条件

中图分类号:S565.102 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2016)02-0108-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.02.0108

凯氏定氮法是经典的蛋白质定量方法,也是蛋白质测定的国标规定方法,通过测定样品中总氮量来计算样品蛋白质含量,适用于各类样品中蛋白质含量的测定。传统的凯氏定氮装置需要人工进行仪器洗涤、安装、试剂添加、滴定等步骤,过程复杂,操作繁琐,耗时耗力且误差来源较多,尤其不利于大批量样品的检测。与传统装置相比,全自动凯氏定氮仪实现了测定的自动化程度,可通过快速编程一键式操作,不仅提高了测定效率及测定结果的准确度和精密度,而且节省了人力物力,因而得到广泛的应用<sup>[1-3]</sup>。由于测定时仪器采用程序化控制,对测定结果而言,样品前处理即消化时的人为操作则成为关键的影响因素。目前,采用全自动凯氏定氮仪测定蛋白质含量时不同处理条件对测定结果的影响鲜有报道。

大豆种子富含蛋白质,含量在 40% 左右,蛋白质含量是反映大豆品质的重要指标。因此,本试验以大豆为材料,研究不同称样量、催化剂比例、浓硫酸量及消化时间对蛋白质含量测定结果的影响,探讨最佳样品处理条件,以期为全自动凯氏定氮仪测定大豆蛋白质的方法提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验选用蛋白质含量差异较大的 2 个大豆品种:郑 97196 和中黄 13,由河南科技学院大豆

遗传育种实验室提供。配制 40% 氢氧化钠、1% 硼酸、0.1% 溴甲酚绿、0.1% 甲基红,盐酸用碳酸钠标定后浓度为  $0.1080 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所用试剂均为分析纯,蒸馏水为超纯水。

### 1.2 方法

1.2.1 试验设计 用 FOSS 旋风磨把大豆种子处理成粉末状后,先用 FOSS 消化仪进行消化处理(消化温度  $420^\circ\text{C}$ ),然后采用 FOSS Kjelttec8400 型全自动凯氏定氮仪进行蛋白质含量测定<sup>[4]</sup>。参考蛋白质含量测定的国标方法及仪器要求的工作条件<sup>[5-6]</sup>,样品处理时,选择称样量、催化剂比例、浓硫酸量及消化时间作为变量,研究每种因素对仪器测定结果的影响。称样量设置 0.3、0.5、0.7、1.0、1.2、1.5 和 2.0 g;催化剂比例  $K_2SO_4/CuSO_4$  设置 3/0.2、3/0.5、4/0.8、6/0.2、6/0.5 和 6/1.0(3/0.2 即 3 g  $K_2SO_4$  与 0.2 g  $CuSO_4$  混匀,使用时随机称取 5 g,其余同);浓硫酸量设置 4、6、8、10、12 和 15 mL;消化时间设置 50、60、70、80、90 和 120 min。每个处理均设 3 次重复。

1.2.2 数据分析 所有数据均为测定平均值,采用 SAS10.0 进行数据分析,LSD 法多重比较,EXCEL 进行图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 称样量对蛋白质测定结果的影响

样品的均匀性和代表性影响检测结果的准确性。称样量过少会降低样品的代表性,在样品量充足的情况下可适当增大称样量,并利于降低称量误差。在浓硫酸量 12 mL、催化剂比例  $K_2SO_4/CuSO_4$  为 6/1 和消化时间 90 min 时,研究不同称

收稿日期:2015-12-12

基金项目:河南省高校青年骨干教师助项目(2011GGJS-133);河南省重点科技攻关资助项目(142102110042)

第一作者简介:徐新娟(1979-),女,河南省漯河市人,硕士,实验师,从事植物营养生理及光合生理研究。E-mail: xinxuan\_xu@163.com。

样量对蛋白质测定结果的影响。国标方法中规定固体称样量最大为 2.0 g, 但本试验中称样量为 2.0 g 的样品经消化处理后呈黑褐色, 表明在加入 12 mL 浓硫酸时不足以完全消化, 因此该处理未进行含量测定。对其余几个设置测定结果进行分析(见图 1)。方差分析结果表明不同处理之间并无显著差异。为保证分析结果的准确性, 在分析过程中应根据试样蛋白质含量的高低来决定所称试样的重量。大豆属于高蛋白样品, 在测定时称样量可控制在 0.5 g 左右。

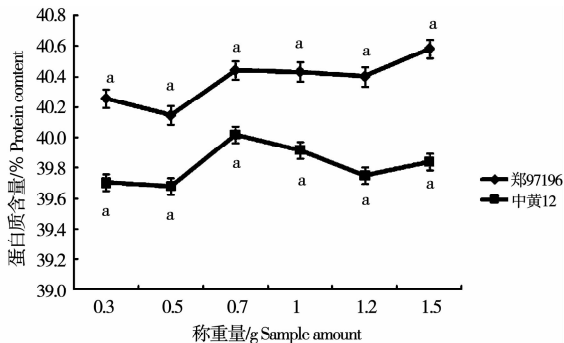


图1 不同称样量对蛋白质测定结果的影响

Fig. 1 Effect of different sample amount on the protein content

## 2.2 催化剂比例对蛋白质测定结果的影响

消化过程中加入催化剂是为了提高消化沸点, 加速试样消化, 并保证全部有机氮转换为无机铵盐。常用硫酸钾以提高浓硫酸的沸点, 促进有机物分解, 硫酸铜作为催化剂可加速反应过程并作为碱性指示剂。使用催化剂时要注意把握使用量, 控制好各成分之间的比例, 以达到最好的消化效果。若添加量过大, 消化液易结块不易转移, 添加量减少, 消化时间加长或者消化不完全。实践中可参考国标方法, 根据自己的经验以及试样的多少、消化的难易程度、蛋白质含量的多少自行调整。当称样量为 0.5 g、加入 12 mL 浓硫酸并控制消化时间在 90 min 时, 催化剂比例改变显著影响了蛋白质含量(见图 2)。K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> 为 6/0.2 时测定结果最大, 除与 6/0.5 和 6/1.0 处理无显著差异外, 均显著高于其它处理。因此, 加入催化剂时 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> 比例控制在 6/0.2 较为理想。

## 2.3 浓硫酸量对蛋白质测定结果的影响

蛋白质样品处理中加入浓硫酸起消化作用, 通过加热使硫酸将样品中的有机氮转变为无机氮。浓硫酸的用量应根据试样的重量、含水量及

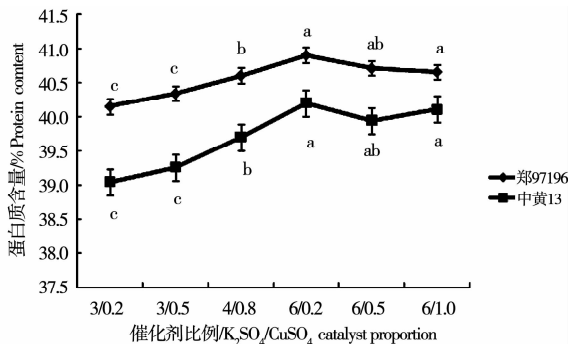


图2 不同催化剂比例对蛋白质测定结果的影响

Fig. 2 Effect of different catalyst proportion on the protein content

其所含蛋白质高低而适当调整, 过少会使消化不完全而导致测定结果偏低, 过多则浪费试剂并产生污染。因此, 适当的浓硫酸量对测定结果有着重要的影响。当称样量为 0.5 g、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> 为 6/1、消化时间为 90 min 时, 改变浓硫酸量使蛋白质含量呈现如图 3 所示的变化。随着浓硫酸体积的增加, 蛋白质含量增加, 在 8 mL 处理时达最大值, 随后下降。10 mL 处理与 8 mL 处理无显著差异, 但都显著高于其余 4 个处理。因此, 称样量为 0.5 g 左右时浓硫酸量可控制在 8~10 mL, 既达到消化完全的目的, 又避免浪费及污染。

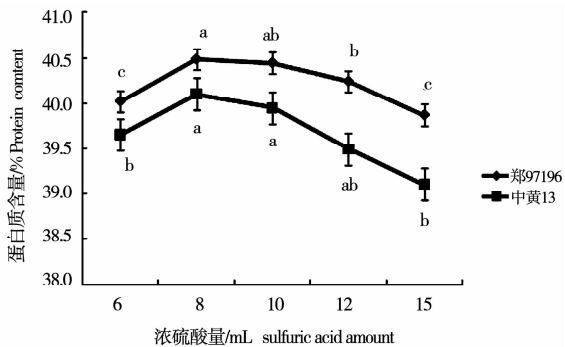


图3 不同浓硫酸量对蛋白质测定结果的影响

Fig. 3 Effect of different sulfuric acid amount on the protein content

## 2.4 消化时间对蛋白测定结果的影响

消化时间也是许多文献一直在探讨的问题, 消化时间过长会引起氮的损失, 消化时间太短则会使消化不完全, 进而导致测定结果偏低。称样量为 0.5 g、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> 为 6/1.0、浓硫酸量为 12 mL 时, 消化时间对蛋白质含量测定结果产生了显著的影响。从图 4 看出, 随着消化时间增加, 蛋白质含量也不断升高, 当消化时间为 70 min 时

达到最大值,显著高于 50 min 和 80 min 处理。延长消化时间并没有提高蛋白质含量,表明过长的消化时间并无益处。因此,在进行大批量样品处理时,从节约时间上考虑可将消化时间控制在 70~90 min 为宜。

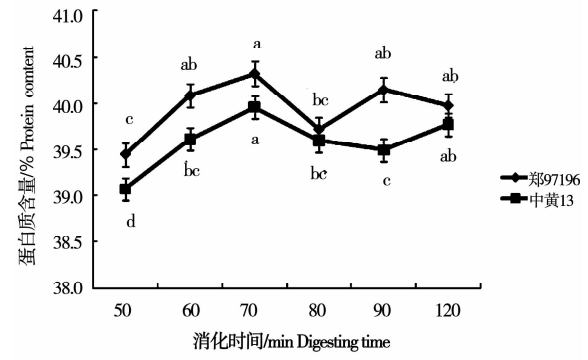


图 4 不同消化时间对蛋白质测定结果的影响  
Fig. 4 Effect of different digestion time on the protein content

2.5 正交设计

在单因素水平的基础上,选择对蛋白质含量影响较大的催化剂比例、浓硫酸量和消化时间进行三因素三水平正交试验,对全自动凯氏定氮仪测定大豆蛋白质的方法进行进一步优化,因素水平见表 1,在称样量为 0.5 g 时,以蛋白质含量为考察指标,测定结果见表 2。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 The orthogonal factor level table			
水平 Levels	因素 Factors		
	A	B	C
	催化剂比例 Catalyst ratio	浓硫酸量/mL Concentrated sulphuric acid	消化时间/min Digesting time
1	4:0.8	8	60
2	6:0.2	9	70
3	6:0.5	10	80

对正交试验结果进行极差分析,可知全自动凯氏定氮仪测定大豆蛋白质方法中各个因素对提取率的影响大小为:消化时间(C)>催化剂比例(A)>浓硫酸量(B)。经验证试验得出,各因素最好组合方案为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即催化剂比例 6:0.2、浓硫酸量 9 mL、消化时间 70 min。在此条件下进行测定蛋白质含量为 43.11%,与正交试验各组提取率相比为最高值,表明正交结果可靠。

表 2 正交试验结果

Table 2 The orthogonal experiment results				
试验号 No.	因素 Factors			蛋白质含量/% Protein content
	A	B	C	
1	1	1	1	39.44
2	1	2	2	40.82
3	1	3	3	40.13
4	2	1	2	41.79
5	2	2	3	41.81
6	2	3	1	39.57
7	3	1	3	41.04
8	3	2	1	39.65
9	3	3	2	42.42
K <sub>1</sub>	120.39	122.27	118.66	
K <sub>2</sub>	123.17	122.28	125.03	
K <sub>3</sub>	123.11	122.12	122.98	
K <sub>1</sub>	40.13	40.76	39.55	
K <sub>2</sub>	41.06	40.76	41.68	
K <sub>3</sub>	41.04	40.71	40.99	
极差 R	2.78	0.16	6.37	
因素主次	C A B			
优方案	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>			

3 结论与讨论

大豆样品称样量对蛋白质含量测定结果影响不显著;实际测定中应根据样品中蛋白质含量作适当调整,大豆样品以 0.5 g 左右为宜。

当称样量为 0.5 g 左右时,催化剂比例 K<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub>为 6/0.2、浓硫酸量为 9 mL、消化时间控制在 70 min 是较为理想的样品处理条件,此时可获得最大的蛋白质含量。

本试验中探讨的只是一部分因素,还有很多因素未做研究,如样品处理时加入的硫酸钾决定了浓硫酸的沸点,即硫酸钾与浓硫酸的比例也是试验中的关键,另外,样品颗粒的大小、消化温度及消化过程中的其它因素都影响最后的测定结果,因此,有必要在今后的研究中加大研究范围,获得更加完整的试验数据。

参考文献:

[1] 史玮,孙莹,徐振斌. 凯氏定氮法测定粮食蛋白质含量方法研究[J]. 粮食科技与经济,2013,38(5): 31-32.  
[2] 张艳,陈中赫,刘敬娟. 利用自动凯氏定氮系统测定大豆籽实粗蛋白的初步探讨[J]. 土壤通报,2004,35(6): 815-816.

(下转第 121 页)