

译者按:

天然食品均含有蛋白质,对蛋白质含量的测定是食品理化检测的重要指标。随着营养卫生工作的深入开展,选择一种快速而准确的方法更为必要。国内目前沿用的凯氏定氮法需用专用玻璃仪器,操作繁琐。本篇译文为美国公职分析化学家协会(简称 AOAC)新近发表的微量蛋白测定法,不需成型设备,耗费样品及试剂量少,具有先进、准确、简易、快速等特点,尤其适于对大批量样品的普查工作。我们认为有实用价值,特向广大食品工作者们推荐。

微量分光光度凯氏定氮法

天津市食品卫生监督检验所 陈森译 曹成锐审

方法摘要

本文论述了一种新的凯氏消化分光光度计微量测定氮含量的方法。本方法原理是氨与乙酰丙酮—甲醛溶液起作用生成黄色的 3,5-二酮-1,4-二氢-2-甲基吡啶,它在 412nm 处有特征的吸收。文中对几种实验变量均进行了研究。该法适用在酸性介质中对消化液直接测定,加入的几种催化剂均无干扰。在反应体系中,氮含量为 0.5—6.0 微克/毫升时能遵循朗伯—比尔定律。氮的克分子吸光系数为 1.4×10^3 升/克分子·厘米,本方法的标准差与相对标准差分别是 ± 0.0447 和 $\pm 0.896\%$ ($n=10$)。本法简单、快速、准确。文中对不同碳环和杂环含氮化合物中氮含量的测定进行了分析和探讨,结果与 AOAC47.021 法有可比性。

1. 引言

凯氏法^[1]测氮时样品首先用硫酸消化,然后消化液被碱化并蒸馏出氨。在选定的程序中,硫酸与盐或金属(作为催化剂)协同作用将样品中的氮转化为铵盐。大家一致认为铵的蒸馏使此法的应用受到了限制。

对方法的进一步改进是在消化后用比色法定氮,其效果明显优于蒸馏法^[2-8],但这些显色反应均发生在碱性介质中,催化剂对有机物消化时会产生沉淀,^[9-13]从而对测定有干扰。因此,我们迫切希望能建立一种在酸性凯氏消化液中直接测定氮含量的简单的分光光度法。

众所周知氨与 β 酮酯(乙酰丙酮)和醛能生成 1,4-二氢-2-甲基吡啶(HANTZSEH 反应),此反应发展成为新的凯氏消化测氮法。

在本法介绍的实验条件下,消化液与乙酰丙酮—甲醛试剂在醋酸钠存在下生成能在 412nm 处有最大吸收的黄色反应物。

本方法可用于测定多种含氮有机化合物包括杂环含氮化合物中的氮含量,结果与 AOAC47.021 法测定计算出的氮含量结果相同。

2. 实验部分**2.1 仪器:**

2.1.1 微量定氮瓶:30 毫升或 50 毫升凯氏消化瓶。

2.1.2 分光光度计。

双光束 25 型贝克曼分光光度计,并配有二个成对的 1 厘米石英比色皿。

2.2 试剂

全部试剂选用分析纯,并用重蒸馏水配

制。

2.2.1 硫酸铵标准工作液

称取 0.472 克已恒重的硫酸铵(事先可于 105℃ 干燥 2 小时)用水稀释定容为 100 毫升。此溶液每毫升相当 1 毫克氮。此标准液应于 4℃ 冰箱贮存。

2.2.2 显色液

分别吸取 15 毫升甲醛(37%, W/V)及 7.8 毫升乙酰丙酮,混匀,并用水稀释至 100 毫升。

2.2.3 1M 醋酸钠液:

称取 82.0 克无水醋酸钠溶于水并稀释至 1 升。

2.2.4 催化剂

二氧化硒;氧化汞;硫酸铜。

2.3 样液的制备

精密称取适量固体样品或吸取适量体积待测样液使其含氮量约为 5.0 毫克(mg),移入干燥的定氮瓶中,添加 1.0 克硫酸钾,50.0 毫克黄色的氧化汞及 2.0 毫升浓硫酸。小心加热待内容物微沸后加大火力直至消化液呈无色透明状再加热 10 分钟,然后放冷使之冷却于室温。用 10 毫升水稀释消化液并进一步冷却。小心转移消化液至 100 毫升容量瓶内,以水冲洗定氮瓶数次后定容,则消化液每毫升含氮 50 微克。

2.4 氮的测定

吸取部分混均后的消化液至 50 毫升锥形瓶内,使其氮含量为 25—100 微克,依次添加 3 毫升醋酸钠液、4 毫升显色液并充分混匀。将锥形瓶置于沸水浴中(约为 97.5℃)15 分钟冷却至室温。同时作试剂空白。

适量地吸取反应液及同量的试剂空白液至 25 毫升容量瓶内并以水稀释定容后,以试剂空白调零于 412nm 处分光光度计测定其吸光值。

2.5 标准曲线:

吸取适量的硫酸铵标准溶液,使含氮由

0.5—6 微克/毫升,按 2.4 步骤测定并绘制出吸光值(A)—氮含量(mg/ml)的标准曲线图。

注 1:样品应在通风橱内消化。

2:显色液应避免与皮肤接触,否则会使皮肤变黄。

3. 结果与讨论

3.1 显色反应

消化液中的氨与乙酰丙酮——甲醛当有醋酸钠存在时能在 PH5.5—6.0 介质中生成黄色的 3,5 丁二酮 1,4 二氢二甲基吡啶,其最大吸收峰是 412nm。

图 1:反应混合物(A)3,5 丁二酮 1,4 二氢二甲基吡啶标准吸收光谱的比较:

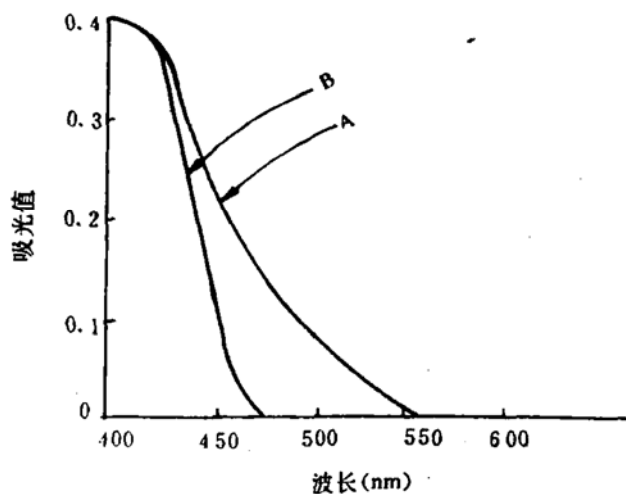


图 1 A. 反应物的吸收光谱

B. 3,5 丁二酮 1,4 二氢二甲基吡啶的吸收光谱

此显色反应是分光光度比色法测消化液中氮含量的基础。

3.2 mol/l 醋酸钠用量的影响:

在显色过程中,加入 3 毫升 1.0mol 醋酸钠溶液是必要的。测定氮含量加入 1—3ml 醋酸钠时,呈色逐步加深,再增加醋酸钠用量则对呈色无影响。

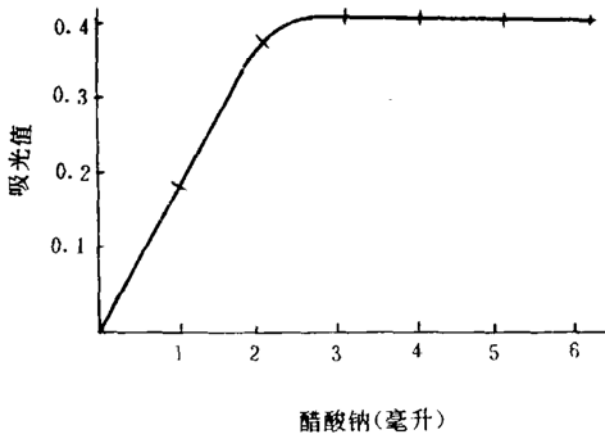


图2 1m 醋酸钠加入量对硫酸铵与显色剂作用的影响:

3.3 显色剂用量的影响

加入 4.0ml 显色剂时呈色最深且稳定, 再增加显色剂效果与前者相同。

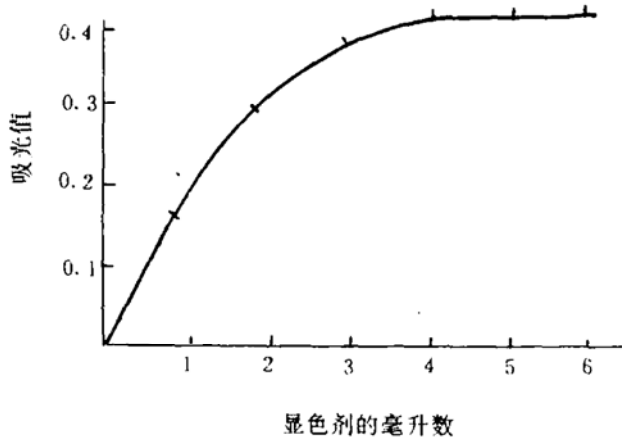


图 3 显色剂加入量对显色强度影响曲线

3.4 温度的影响

温度升高可提高发色的速率, 将反应混合物浸在沸水浴中 97.5℃ 15' 时呈色最深。

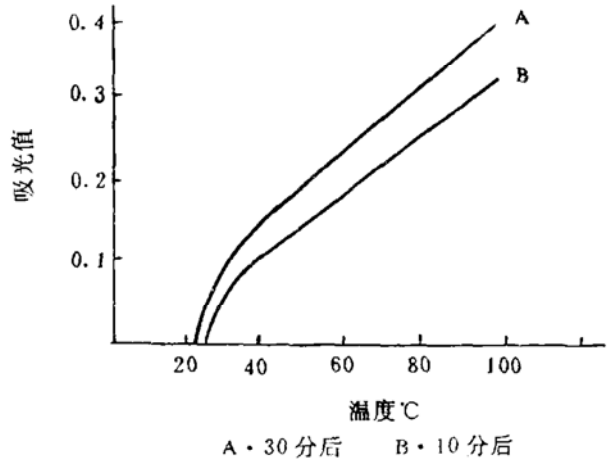


图4 硫酸铵与显色剂作用在 30'(A);10'(B)吸光值的比较:

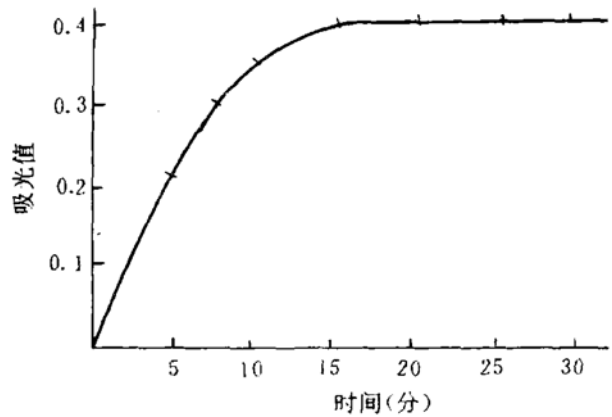


图5 加热时间对呈色深度的影响曲线:

3.5 催化剂的影响

单独使用 1.0 克硫酸钾及 1.0 克硫酸钾与 50.0mg 黄色氧化汞混合使用或与 50.0mg 硫酸铜或与 50.0mg 二氧化硒混合使用, 对显色均无干扰。

表1 凯氏测氮法消化使用不同催化剂对测定结果的影响:

催化剂种类	%N	回收率(均值±SD)*
H ₂ SO ₄		100±0.89
H ₂ SO ₄ +K ₂ SO ₄		100±0.90
H ₂ SO ₄ +K ₂ SO ₄ +HgO(黄)		100±0.90
H ₂ SO ₄ +K ₂ SO ₄ +CuSO ₄		100±0.92
H ₂ SO ₄ +K ₂ SO ₄ +SeO ₂		100±0.91

为九次测定均值

3.6 线性关系、最佳的浓度范围、灵敏度及克分子吸光系数:

按上述实验方法测得的朗伯——比尔曲线呈线性且通过原点。斜率、截距及相关系数经最小二乘方法处理后分别为0.0975、0.0042和0.9999。反应体系中氮含量浓度范围为0.5~6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时显色符合比尔定律。氮的最佳浓度测试范围为1——5ppm⁽¹⁵⁾。氮的克分子吸光系数为每克分子、厘米 1.4×10^3 升(1.4×10^3 升/克分子·厘米)。颜色的光学敏感度⁽¹⁶⁾在412nm是0.01微克氮/厘米²。

精密度:方法的重现性可通过十份含氮5毫克的标准硫酸铵液来测定。将推荐的方法与按AOAC法⁽¹⁴⁾所测的结果比较,并作统计学分析。如表2。

结果表明经t检验·F检验比较,此法与准确、精密的AOAC法无显著差异。

3.7 3,5丁二酮1,4二氢二甲基吡啶是乙酰丙酮、甲醛和氨发生hentsch反应的产物。

最初此反应用于测定甲醛,我们希望在推荐的方法中有个相同的发色团存在。为了证实3,5丁二酮1,4二氢二甲基吡啶的结构,可在一定的实验条件下合成。合成物能溶于乙醇并由乙醇液中重结晶析出得到(测

表2 统计学分析结果

	氮含量	
	推荐法	AOAC法
均值	4.99	4.98
标准差	0.0447	0.0461
样本测定次数	10	10
相对标准差	0.896	0.926
方差	1.998×10^{-8}	2.215×10^{-8}
均值的标准差	0.0141	0.0146
t检验	0.493(2.101)*	
F检验	1.064(3.18)*	

*为95%可信限

得其熔点为196——199 $^{\circ}\text{C}$,纯品⁽¹⁹⁾熔点为198 $^{\circ}\text{C}$)。所得合成物乙醇液的吸收光谱与反应得到的发色团的吸收光谱相同,最大吸收峰均为412nm。见图1。

因反应体系PH为5.5——6.0,在硝化液中各种金属离子均不会出现沉淀。在此介质条件下且可防止氨挥发带来的损失。本法不需碱化消化液蒸馏测氨,选用的试剂稳定、价廉、易购,故该法简易、快速、准确、精密有可比性,可行。

参考文献略。

摘译自AOAC(1989, VOL72, NO6, P953—956)

【上接56页】别的因素便有可能起着主要作用,诸如总膳食中的脂肪、旦白质、盐类、总热能都影响着肿瘤的发生。但是,在定量的化学物质危害度评定中,这些因素还尚未加以考虑。而且某些人类疾病,如慢性炎症、尿道结石、寄生虫等都证实是促进肿瘤发生因素。正是因为除了致癌性化学物质以外,其它因素都可能促进肿瘤的发生,所以对食品中致癌性化学物质的危害度评定和管理都应在考虑这些因素的前提下进行。

〔张志强 节译自 Regulatory toxicology and pharmacology 11,149—157(1990)〕