第14卷 无锡轻工大学学报 Vol.14
第4期 JOURNAL OF WUXI UNIVERSITY OF LIGHT INDUSTRY 1995 No.4

紫外吸收光谱法测定猪肉中蛋白质的含量

张墨英 程瑞庆

（无锡轻工大学） （江苏泰兴黄桥肉联厂）

摘要 用紫外吸收光谱测定法测定了猪肉中蛋白质的含量，与凯氏定氮法对照，二者无显著性差异，前者准确度较高，重现性好，简单方便。

主题词 蛋白；猪肉；吸收光谱法

中图分类号 TS201.21

0 前 言

蛋白质的测定方法可按蛋白质的性质和成分分为两大类：一类是利用蛋白质的共性，即含氮量、肽键和折射率测定；另一类是利用蛋白质中特定氨基酸残基、酸、碱基团和芳香基团测定，如凯氏定氮法、水杨酸比色法、染料比色法等。其中凯氏定氮法是食品蛋白质含量测定法的标准检测方法。但该法操作极繁，耗时甚多，劳动强度大，测定中的影响因素也较多，其测定的总氮 量也包括了核酸、生物碱、含氮类脂和含氮色素等非蛋白质氮化合物，而当待测样品中蛋白质的实际含量与凯氏定氮法中常采用的平均含氮量16%相差较大时，采用6.25这一换算因子也会引起显著偏差。

作者依据蛋白质完全水解后产生的所有氨基酸中，仅酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸在紫外区具有明显吸收，以及典型的猪瘦肉中蛋白质含量及氨基酸组成具有一定比值，用紫外吸收光谱法快速准确地测定出猪肉中蛋白质的含量。

1 测定原理

1.1 各种氨基酸在紫外区域的吸收情况

蛋白质中含有21种天然氨基酸，其中，同时具有特征性苯环等芳香族共轭双键结构以及能使吸收峰波长向长波方向移动的助色团、能使化合物最大吸收峰移至紫外区的生色团结构的氨基酸只有酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸，故只有它们在紫外区域具有光吸收。因此可以利用这些芳香族氨基酸的紫外吸收光谱来定量测定蛋白质含量。此法首先被应用于牛乳

收稿日期：1994-11-04

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中蛋白质含量的测定[1]。

对于有机物来说，紫外吸收光谱法主要是在溶液中进行测定的，相当多的溶剂对紫外光都是透明的。假如样品能在水中溶解，则蒸馏水是最好的溶剂。本测定方法中，样品蛋白质需经碱水解处理，因而待测样品溶液呈碱性。由于离解的阴、阳离子的光谱与母体不同，出现混合光谱，故碱性样品溶液应适当稀释，在 0.1mol/L KOH 溶液中进行测定。

在碱性溶液中酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的摩尔吸光系数 ε 与波长 λ 的关系[2]可见图 1. 酪氨酸的最大吸收波长，λ_{max} = 240nm. 在波长 240nm 处，上述三种氨基酸的 ε_{240} 酪氨酸 11300±20，色氨酸 1959±30，苯丙氨酸 68.9±3.2，均有吸收，出现混合光谱。但此紫外吸收光谱大部分是由酪氨酸的吸收造成的；与之相比，色氨酸的吸收很小；而苯丙氨酸的吸收极小，可以忽略不计。因此，蛋白质对紫外光的最大吸收峰是它所含有的酪氨酸和色氨酸决定的，可以利用这一性质测定样品中蛋白质的含量。

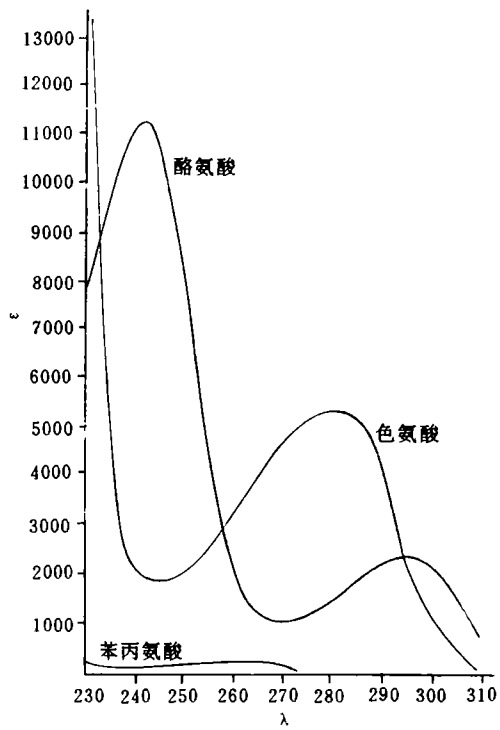


图 1 酪氨酸、色氨酸和苯丙酸的摩尔吸光系数

1.2 酪氨酸、色氨酸的紫外吸收比

典型猪瘦肉中含水分 74.4%，粗蛋白 20.8%，其也为脂类和灰分。粗蛋白经水解后，其氨基酸含量为：亮氨酸 1.629%，赖氨酸 1.627%，缬氨酸 1.134%，苏氨酸 1.019%，异亮氨酸 0.857%，苯丙氨酸 0.805%，酪氨酸 0.701%，蛋氨酸 0.557%，组氨酸 0.552%，色氨酸 0.268%，胱氨酸 0.248%. 其他组分为核酸、糖、脂类、磷酸色素和金属离子等。

猪肉蛋白质完全水解成氨基酸后，在碱性溶液中的吸收主要是由酪氨酸和色氨酸产生的。由猪瘦肉中酪氨酸含量 0.701%，色氨酸含量 0.268%，可以推出在 λ = 240nm 时，典型猪瘦肉中酪氨酸、色氨酸各自产生紫外吸收的百分比，采用本实验中在 751 紫外分光光度计上测得 λ = 240nm 时的 ε_{240}：酪氨酸 11310，色氨酸 1974 进行计算。

$$\text{酪氨酸产生的紫外吸收百分比} = \frac{11310 \times 0.701 \div 181.19}{11310 \times 0.701 \div 181.19 + 1974 \times 0.268 \div 204.23} = 94.4\%$$

$$\text{色氨酸产生的紫外吸收百分比} = \frac{1974 \times 0.268 \div 204.23}{11310 \times 0.701 \div 181.19 + 1974 \times 0.268 \div 204.23} = 5.6\%$$

式中 181.19 和 204.23 分别为酪氨酸和色氨酸的摩尔质量。由于典型猪瘦肉中粗蛋白占 20.8%，酪氨酸占 0.701%，故典型猪瘦肉中酪氨酸的百分含量可推知为：

$$\frac{0.701\%}{20.8\%} \times 100\% = 3.37\%$$

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 实验部分

2.1 实验原料

猪瘦肉 黄桥肉联厂提供的十四类猪肉食品小包装产品混合瘦肉样

2.2 实验药品及仪器

标准酪氨酸,标准色氨酸 日本味之素株式会社生产

2mol/L KOH 溶液,0.1mol/L KOH 溶液

混合指示剂(1 份 1%甲基红乙醇溶液与 5 份 0.1%甲酚绿乙醇溶液临用前混合而成)

751 紫外分光光度计 上海分析仪器厂

凯氏定氮装置

其它常规化学药品和仪器

2.3 紫外吸收法测定蛋白质含量

准确称取已捣碎的猪瘦肉样品 10g,加入 2mol/L KOH 溶液 10ml,于水浴上煮沸,经一定时间使之完全水解后,冷却,稀释定容至 200ml,以双层滤纸过滤,弃去初滤液,吸取滤液 1ml,以 0.1mol/L KOH 溶液定容至 50ml,以 0.1mol/L KOH 溶液作空白,调零,以 1cm 吸收池在波长 240nm 处测定吸光度 A,计算样品中蛋白质的百分含量:

$$\text{蛋白质百分含量}(\%)=\frac{A\times 94.4\%\times 181.19\div 1000}{11310\times W\div(200\times 50)\times 3.37\%}\times 100=\frac{A}{W}\times 449$$

式中 W 为样品质量 (g);94.4%为典型猪瘦肉中酪氨酸的紫外吸收比;181.19 为酪氨酸的摩尔质量;11310 为酪氨酸在波长 240nm 处的摩尔吸光系数;3.37%为典型猪瘦肉中酪氨酸的百分含量。

2.4 凯氏定氮法测定蛋白质含量

按 GB5009.5-85 规定的食品中蛋白质含量的测定方法进行。

2.5 紫外吸收法回收率试验

按酪氨酸:色氨酸=701:268=2.62:1 的质量比,分别称取酪氨酸标准样 W (g),色氨酸标准样 $W/2.62$(g),以 0.1mol/L KOH 溶液稀释定容至 100ml,吸取稀释液 10ml 至烧杯中,加入 2mol/L KOH 溶液 10ml,混合均匀。

以下测定步骤同 2.3.

按下式计算测得的酪氨酸含量:

$$\text{酪氨酸含量}(\%)=\frac{A\times 0.944\times 0.18119}{11310\times W\div 100\times 10\div 200\div 50}\times 100=\frac{A}{W}\times 151$$

3 结果与讨论

3.1 样品完全水解时间的确定

蛋白质水解有酸水解、碱水解和酶法水解三种。酸水解虽水解彻底,但水解过程中能全部或部分破坏一些氨基酸。酶法水解虽然条件温和,但水解不够彻底,时间又过于冗长。故本实验采用 2mol/L KOH 溶液于水浴煮沸进行水解。对同类样品经不同指定时间水解后,按 2.3 进行测定结果如下:

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

水解时间(min)	50	70	90	180	300
吸光度(A)	0.420	0.428	0.440	0.438	0.433
蛋白质含量(%)	18.9	19.2	19.8	19.7	19.4

由此可见,完全水解所需的最佳时间为90min. 时间过短,则蛋白质水解不够完全,时间过长,则部分氨基酸被破坏,结果偏低。

3.2 紫外吸收法和凯氏定氮法的对照实验

以同一批样进行紫外吸收法和凯氏定氮法的对照实验。平行2次,结果如下:

凯氏定氮法测得蛋白质含量(%)	X_1	19.6	19.9	19.6	20.0	20.1	19.3	20.1
紫外吸收法测得蛋白质含量(%)	X_2	19.3	19.9	19.2	19.5	20.0	19.8	20.2

$\overline{X}_1 = 19.8(\%)$,$\overline{X}_2 = 19.7(\%)$. 采用两个正态总体的 t 检验得总体标准差

$$S = \left[\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2}\right]^{1/2} = 0.3416\%$$

得 $$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{S \times (1/n_1 - 1/n_2)^{1/2}} = 0.5477$$

按自由度 $f = n_1 + n_2 - 2 = 12$,取置信度95%,查表得 $t_{0.95} = 2.18$,$t = 0.5477 \ll t_{0.95} = 2.18$. 证明紫外吸收法总体的评分(数学期望)与凯氏定氮法并无显著性差异。

3.3 紫外吸收法的精密度试验

用紫外吸收法对样品进行7次试验,测定结果如下:

吸光度(A)		0.430	0.443	0.428	0.435	0.445	0.440	0.450
蛋白质含量(%)	X_2	19.3	19.9	19.2	19.5	20.0	19.8	20.2

统计处理得:平均值 $\overline{X}_2 = 19.7\%$,标准差 $S_2 = 0.3742\%$,标准误差 $\overline{S}_{X_2} = 0.1414\%$,变异系数 $C_{V_2} = 1.90\%$. 总体数学期望蛋白质含量的一个置信区间:由给出置信度95%,自由度 $f = 6$,查 t 分布表得 $t_{0.95} = 2.45$. 紫外吸收法的测定结果为:

$$\text{蛋白质含量} = \overline{X}_2 \pm t\frac{S_2}{n_2^{1/2}} = 19.7\% \pm 2.45 \times 0.1414\% = 19.7\% \pm 0.3\%$$

利用3.2中凯氏定氮法7次平行测定的数据,对凯氏定氮法测定的结果进行统计处理,得:测定结果平均值 $\overline{X}_1 = 19.8\%$,标准差 $S_1 = 0.3055\%$,标准误差 $\overline{S}_{X_1} = 0.1155\%$,变异系数 $C_{V_1} = 1.54\%$. 总体数学期望蛋白质含量的一个置信区间:由给出置信度95%,自由度 $f = 6$,查 t 分布表得 $t_{0.95} = 2.45$. 凯氏定氮法的测定结果为:

$$\text{蛋白质含量} = \overline{X}_1 \pm t\frac{S_1}{n_1^{1/2}} = 19.8\% \pm 2.45 \times 0.1155\% = 19.8\% \pm 0.3\%$$

结果表明,两种方法测定结果平均值的置信区间范围均为0.3%. 紫外吸收法的测定结果平均值比凯氏定氮法低0.1%.

3.4 紫外吸收法的回收率试验

按2.5进行的6次测定结果如下:

酪氨酸标准样重量 W (g)	0.593	0.935	0.627	0.655	0.647	0.603
吸光度(A)	0.230	0.575	0.255	0.265	0.265	0.230
测得酪氨酸含量 (g)	0.586	0.930	0.615	0.612	0.619	0.577

平均回收率为96.9%. 标准差 $S = 2.32\%$,变异系数 $C_V = 2.39\%$. 总体数学期望酪氨

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酸回收率的一个置信区间:由给出置信度95%,自由度 $f=5$,查 t 分布表得 $t_{0.95}=2.57$. 所以紫外吸收法的酪氨酸回收率为:

$$\text{回收率}=\bar{X}\pm t\frac{S}{n^{1/2}}=96.9\%\pm 2.4\%$$

4 结　论

1) 猪瘦肉蛋白质中的氨基酸有一定的组成与含量,21种天然氨基酸中,仅酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸在紫外区 $\lambda=240$nm 处具有明显吸收,且以酪氨酸的吸收为最大,占94.4%;色氨酸的吸收仅占5.6%;而苯丙氨酸的吸收小于0.7%,可以忽略不计。因为吸光光度法测定的相对误差约为2%～5%,加之苯丙氨酸的 ε_{240} 仅为63.3,灵敏度极低,对测定结果的影响极小。故这一忽略是合理的。猪瘦肉中蛋白质在碱性条件下完全水解后,于波长240nm处测定其氨基酸的紫外吸收,即可推算出猪瘦肉蛋白质的含量。

2) 紫外吸收法与经典的凯氏定氮法进行对照,表明两者无显著性差异。紫外吸收法数据稳定,重现性良好,准确度较高,测定简单方便,因此适用于对肉食品进行例行检测,其准确度可满足检测要求。

3) 本法的原理可推广至其它确定食品中蛋白质含量的测定。

4) 本法测定时可以凯氏定氮法测得的蛋白质含量为横坐标,以同一批样紫外吸收法测得的吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,作为食品中常规分析测定用的工作曲线使用,使常规检测更为方便。

参 考 文 献

1 Journal of Daily Science, 53(3)

2 周骏山. 实用氨基酸手册. 无锡市氨基酸研究所科技情报室

Determination of Protein Content in Pork by Ultraviolet Absorption Spectrophptpmetry

Zhang Moyin　Cheng Ruiqing

(Wuxi University of Light Industry)

Abstract A method for determination of protein content in pork by Ultraviolet absorption Spectrophotometry is introduced. With accuracy, reproducibility and simplicity, there is no obvious difference compared to the Kjeldahl method determination.

Subject-words Proteins; Pork; Ultraviolet spectrophotometry

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net