

应用生物化学与食品化学实验技术

周学权 郑彩霞 李 竞 编写

森林资源与环境学院植物生理教研室

2001. 10



应用生物化学与食品化学实验技术

目 录

实验一	还原糖的测定(菲林试剂法).....
实验二	糖的测定(蒽酮法).....
实验三	淀粉含量的测定(碘量法).....
实验四	粗纤维的测定.....
实验五	粗脂肪的测定(索氏提取法).....
实验六	食品中游离脂肪酸含量的测定.....
实验七	粗蛋白的测定(微量凯氏定氮法).....
实验八	可溶性蛋白质的测定(考马斯亮蓝 G-250 法)
实验九	可溶性蛋白质的测定(紫外吸收法)
实验十	色氨酸含量的测定
实验十一	赖氨酸含量的测定
实验十二	维生素 C 含量的测定(2,6-二氯酚靛酚法)
实验十三	维生素 C 含量的测定(Vc 速测片法)
实验十四	维生素 P(黄酮类)含量的测定
实验十五	维生素 E 含量的测定
实验十六	淀粉酶的测定
实验十七	果胶酶的测定
实验十八	蛋白酶的测定
实验十九	植物组织中核酸含量的测定
实验二十	醋酸纤维素薄膜电泳分离核苷酸
实验二十一	固形物的测定(折光仪法)
实验二十二	食品中微量元素的测定—DDTC 比色法
实验二十三	食品中微量锌的测定
实验二十四	食品中铁量的测定(比色法)
实验二十五	食品中钙含量的测定
实验二十六	食品铁、钙元素的原子吸收光谱法测定.....
实验二十七	食品碘量的测定
实验二十八	果蔬类多种农药快速测定—薄层层析法
实验二十九	有机磷农药残留量的快速测定
实验三十	蔬菜类食品中亚硝胺类化合物的测定(比色法)
实验三十一	植物毒素的检验
实验三十二	棉酚的测定—紫外分光光度法

实验三十三	苯甲酸及其盐类的测定	44
实验三十四	山梨酸及其盐类的测定	45
实验三十五	过氧乙酸的测定	47
实验三十六	叔丁基对羟基茴香醚(BHA)的测定	48
实验三十七	没食子酸丙酯(PG)的测定	49
实验三十八	硝酸盐和亚硝酸盐的测定	50
实验三十九	过氧化氢的测定	55
实验四十	二氧化硫的测定	56
实验四十一	糖精的测定	58
实验四十二	水溶性天然及合成色素的分离测定	59
实验四十三	总胡萝卜素含量的测定	61
实验四十四	辣椒素含量的测定	62
实验四十五	单宁含量的测定	63

附:实验 1—5,7—21,43—45 由周学权编写

实验 6,22—32,由郑彩霞编写

实验 33—43 由李竞编写

实验一 还原糖的测定

(菲林试剂法)

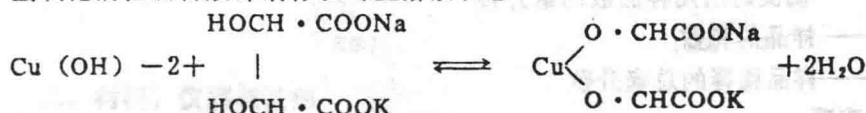
一、原理

测定果蔬及其加工品中糖分含量的基本原理，是根据还原糖可以还原菲林试剂而生成氧化亚铜这一特性而决定的。

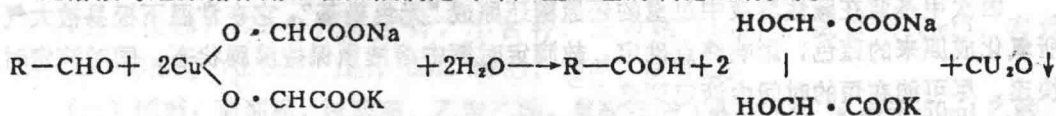
菲林试剂由甲乙两种溶液混合而成，试剂甲为硫酸铜溶液，试剂乙为氢氧化钠与酒石酸钾钠的混合液，甲乙二液混合后，硫酸铜与氢氧化钠生成氢氧化铜沉淀



氢氧化铜在酒石酸钾钠存在时呈溶液状态



此溶液与还原糖作用，在加热滴定时即产生红色的氧化亚铜沉淀



滴定终点可以借次甲基蓝作指示剂决定，次甲基蓝在碱性溶液中可被还原成无色，但必须在沸腾的情况下进行。

二、材料、仪器与试剂

(一) 材料：苹果、梨、葡萄、果脯、番茄、马铃薯。

(二) 仪器：滴定管、移液管(5ml)、三角瓶(250ml)、容量瓶(100ml)、烧杯、漏斗、研钵、水浴锅、分析天平等。

(三) 试剂：硫酸铜、酒石酸钾钠、蔗糖、氢氧化钠、盐酸、1%次甲基蓝(均为分析纯)。

1. 菲林试剂甲：称取硫酸铜 34.63%g，加蒸馏水溶解后，置于 500ml 容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。

2. 菲林试剂乙：称取酒石酸钾钠 173g 及氢氧化钠 50g，加蒸馏水溶解后置于 500ml 容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀，过滤后待用。

3. 标准转化糖的配制：称取纯蔗糖 9.5g，溶于 50ml 水中，加 6mol/L 盐酸 5ml，在 20~25℃ 室温下静置 5d (或煮沸 15min)，使蔗糖转化，冷却后移入 1000ml 容量瓶中，加水稀释到刻度，再由稀释了的糖液中吸取 100ml 放入 500ml 容量瓶中，加 1% 酚酞 2~3 滴，以 6mol/L 氢氧化钠溶液中和加水稀释至刻度，即为转化糖溶液。此液 1ml 含转化糖 2mg。

三、操作步骤

(一) 菲林试剂标定：吸取配好的菲林试剂甲、乙各 5ml，混于三角瓶中，加次甲基蓝指示剂 2 滴，在酒精灯上加热至沸，由滴定管中滴入糖液，至蓝色完全褪色，溶液呈清亮

为止，根据滴定所用转化糖毫升数，校正菲林试剂 10ml 相当的转化糖克数。

(二) 称样品 10g 于研钵中研磨，小心转移到 100ml 容量瓶中，蒸馏水定容，吸 10ml 样品液放入 100ml 容量瓶中，加水约 50ml，加 2.5ml (12mol/L) 浓盐酸在沸水中煮 40min，取出冷却，此时样品中的蔗糖水解成还原性糖，然后加 1 滴 1% 酚酞，加 6mol/L 氢氧化钠中和至微红，定容至 100ml。取菲林试剂甲、乙各 5ml，放入三角瓶中，加 1~2 滴次甲基蓝，于酒精灯上加热至沸，用竹制试管夹夹住三角瓶，边摇边滴定，直至样品转化液将菲林试剂滴定至用样品液的毫升数，再重复一次。

四、计算

$$W = \frac{A}{B} \times \frac{b}{a} \times 100$$

其中：W —— 100g 样品中含还原糖的克数

A —— 菲林试剂 10ml 相当的还原糖克数

B —— 滴定时所用样品液的毫升数

a —— 样品的克数

b —— 样品稀释的总毫升数

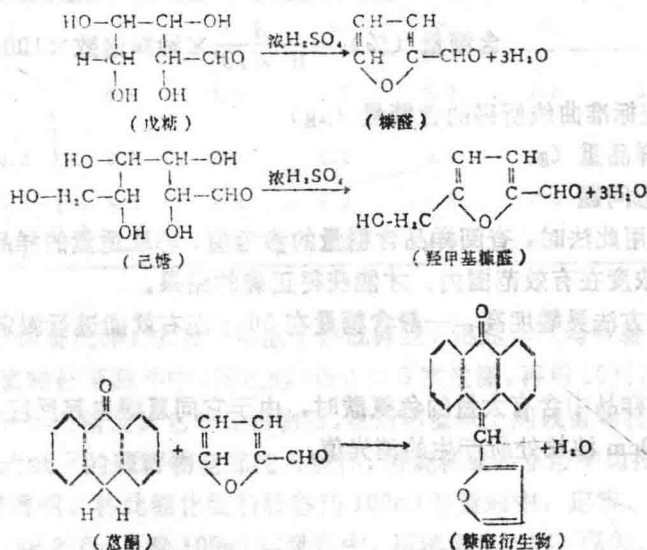
五、注意事项

因次甲基蓝在碱性溶液中过量的还原糖还原成“无色染基”，它在常温下极易被大气氧所氧化成原来的蓝色，影响终点确定，故滴定时瓶中溶液须保持沸腾状态，同时滴定时要快速，尽可能在短的时间内滴定到终点。

实验二 糖的定量测定 (蒽酮法)

一、原理

强酸可使糖类脱水生成糠醛(或羟甲基糠醛)。生成的糠醛与蒽酮脱水缩合，形成的衍生物呈蓝绿色，在 620nm 波长处有最大吸收。颜色的深浅可作为定量的标准，这就是蒽酮比色法的原理。能与蒽酮发生颜色反应的糖类包括五碳糖(如木糖、核糖和阿拉伯糖)；六碳糖(如葡萄糖、果糖、山梨糖、半乳糖)；蔗糖、糖元、多缩葡萄糖和苷等。不同性质的糖与蒽酮反应，其颜色的强度是不同的，并且各种糖的有效浓度范围也不相同。一般情况下，不同糖的混合液与蒽酮作用时，所产生的颜色强度和混合液中个别糖的颜色强度的总和是符合的。因此，在应用时，由于其它糖的存在而发生的干扰并不很大。蒽酮反应的颜色深浅，随温度条件和加温时间而变化，因此应用此法时，必须注意反应条件的一致，以求测定结果的准确性。



二、材料、仪器与试剂

(一) 材料：苹、梨、黄瓜、番茄等。

(二) 仪器：721 分光光度计，小台秤、三角瓶 (50ml)、试管 (15ml)、容量瓶 (50ml)、移液管 (0.5ml, 1ml, 2ml, 5ml)、漏斗，试管架。

(三) 试剂：葡萄糖、浓硫酸、乙酸乙酯、葱酮试剂 (称取葱酮 1g 溶于 50ml 乙酸乙酯中，贮于棕色瓶，暗中保存备用。)

三、操作步骤

(一) 葡萄糖标准曲线的制作：按下表数据配置一系列不同浓度的葡萄糖溶液。准确称取葡萄糖 200mg，用蒸馏水溶解后置 1000ml 容量瓶中定容。取 6 支编号的试管，

管 号	1	2	3	4	5	6
葡萄糖原液 (200 μ g/ml 量 (ml))	0	0.2	0.4	0.5	0.8	1.0
蒸馏水量 (ml)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
量终浓度 (μ g/ml)	0	20	40	60	80	100

在每支试管中按表用移液管加入葡萄糖原液和蒸馏水，再在各试管管中立即分别加入葱酮试剂 0.5ml 和浓硫酸 5ml，摇匀，于沸水浴中加热 5min，用自来水冲冷至室温，在 620nm 波长依次测消光值。以标准葡萄糖浓度作横坐标，以消光值作纵坐标，画制标准曲线。

(二) 样品处理：切取苹果食用部用捣碎机捣成匀浆，准确称取 1~5g，置于三角瓶中，加蒸馏水 10ml，在水浴中加盖煮沸 15min，冷却后用漏斗斗争过滤到 50ml 容量瓶中，并用蒸馏水将三角瓶冲洗数次。然后在容量瓶中加入 2.5ml 10% 醋酸铅，混匀，以沉淀样品中的蛋白质，待反应完全后，再加入 0.5g 草酸钾结晶，以除去过量的醋酸铅。定容并混匀，过滤得上清液备用，(若溶液中蛋白质含量很低，可省去加醋酸铅此步)。

(三) 测定：取上清液 2ml 放入 20ml 大试管中，加入 0.5ml 葱酮试剂，并小心加入 5ml 浓硫酸，摇匀，试管置于沸水浴中加热 5min，取出用自来水冲冷，静置 10min，于 721 分光光度计 620 波长处测消光值，从标准曲线查出含糖量，即可计算求得样品的含糖量。

四、计算

$$\text{含糖量}(\%) = \frac{A}{W \times 10^6} \times \text{稀释倍数} \times 100$$

A 查标准曲线所得的含糖量 (μg)

W 样品重 (g)

五、注意问题

(一) 应用此法时, 查阅样品含糖量的参考值, 称取适量的样品, 选择适当的含糖量浓度使含糖量浓度在有效范围内, 才能获得正确的结果。

(二) 此方法灵敏度高, 一般含糖量在 $30\mu\text{g}$ 左右就能进行测定, 可作为微量测糖的方法。

(三) 当样品中含有大量的色氨酸时, 由于它同葱酮也起反应, 与糖醛发生竞争作用, 因此减少 620nm 波长处所产生的消光值。

实验三 淀粉含量的测定 (碘量法)

一、原理

淀粉是食品中主要的组成成分, 也是植物种子中重要的贮藏性多糖。由于淀粉颗粒可与碘生成深蓝色的络合物, 故可根据生成络合物颜色的深浅, 用分光光度计测定消光度而计算出淀粉的含量。

二、材料、仪器与试剂

(一) 材料: 马铃薯、栗子、山药等。

(二) 仪器: 721 分光光度计、小台秤、分析天平、烧杯 (100ml)、研钵、容量瓶 (100ml)、洗瓶、漏斗, 滤纸、具塞刻度试管 (15ml)、恒温水浴、移液管 (1ml, 2ml)、蔬菜用擦丝擦子。

(三) 试剂

1. I-KI 溶液: 称取 20.00g 碘化钾, 加 50ml 蒸馏水溶解, 再用小台秤迅速取碘 2.0g, 置烧杯中, 将溶解的 KI 溶液倒入其中, 用玻璃棒搅拌, 直到碘完全溶解, 若碘不能完全溶解时, 可再加少许固体碘化钾即能溶解, 贮存在棕色小滴瓶中待用, 用时稀释 50 倍。

2. 乙醚。

3. 10%乙醇。

三、操作步骤

(一) 标准曲线的制作: 用分析天平准确称取 1.000g 精制马铃薯淀粉, 加入 5.0ml 蒸馏水制成匀浆, 逐渐倒入 90ml 左右沸腾的蒸馏水中, 边倒边搅拌, 即得澄清透明的糊化淀粉溶液, 置 100ml 容量瓶中, 用少量蒸馏水冲洗烧杯, 定容, 此淀粉溶液浓度为 10mg/ml (A 液)。吸取 A 液 2.0ml 置 100ml 容量瓶, 定容, 此时淀粉浓度为 $200\mu\text{g/ml}$ (B 液)。取具塞刻度试管 8 支, 按下表加入淀粉及 I-KI 溶液, 再加蒸馏水使每支试管溶液补足到 10ml, 摇匀, 使蓝色溶液稳定 10min 后, 在 721 分光光度 660nm 波长处测其消光值。以消

光值为纵坐标，已知淀粉溶液的浓度为横坐标绘制标准曲线。

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8
标准淀粉溶液 [(200 μ g/ml) ml]	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
I-KI (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
蒸馏水 (ml)	9.8	9.3	8.8	8.3	7.8	7.3	6.8	5.8
淀粉含量 (μ g/ml)	0	100	200	300	400	500	600	800

(二) 样品处理：马铃薯洗净，去皮，用擦子擦成碎丝，迅速称取马铃薯碎丝 300g，置研钵中磨成匀浆。将匀浆转移至漏斗中，用乙醚 50ml 分 5 次洗涤，再用 10% 乙醇洗涤 3 次，以除去样品中的色素，可溶性糖及其它非淀粉物质，然后将滤纸上的残留物转移到 100ml 烧杯中，用蒸馏水分次将滤纸上的残留物全部洗入烧杯，将烧杯置沸水浴中边搅拌边加热，直到淀粉全部糊化成澄清透明。将此糊化淀粉转移到 100ml 容量瓶中，定容、混匀 (C 液)。

(三) 测定：吸取 C 液 2.0ml，置 100ml 容量瓶中，用蒸馏水定容，混匀。准确吸取 2ml 样品溶液 (吸取量依样品中淀粉浓度而变)，置 15ml 具塞刻度试管，加入 I-KI 溶液 0.2ml，直至溶液呈现透明蓝色，用蒸馏水补充足到 10ml，混匀，静置 10min，于 660nm 波长处测定消光值。由标准曲线查出样品中淀粉含量 (g/100g 鲜重)。

四、计算

$$G \text{ (g/100g 鲜重)} = \frac{A}{W \times 10^4} \times \text{稀释倍数} \times 100$$

G 样品淀粉含量 (g/100g 鲜重)

A 从标准曲线查得的样品淀粉含量 (μ g/ml)

W 样品重 (g)

五、注意事项

(一) 若样品含淀粉浓度高时，加 I-KI 后会出现极深的蓝色而无法比色时，就须将溶液重新稀释后再进行测定。

(二) 若样品含淀粉量太少时，加 I-KI 溶液后不呈现蓝色，可适当加大样品用量。

实验四 粗纤维的测定

(重量法)

一、原理

食品先脱去脂肪，然后经煮沸的酸及碱溶液处理后除去其中可被酸或碱消化的碳水化合物及蛋白质，剩下的残渣即称为粗纤维。因其成分中不纯属于纤维素，尚含有部分半纤维素，戊聚糖及含氮物质。

二、材料、仪器与试剂

(一) 材料：各种蔬菜等。

(二) 仪器：回流冷凝管、三角瓶 (50ml)、洗瓶、抽滤瓶、水抽滤器、古氏坩埚、布氏漏斗，电炉。

(三) 试剂

1. 硫酸溶液：0.1275mol/L 硫酸。

2. 0.312mol/L 的氢氧化钠 (须不含碳酸钠)。

上述溶液须标定。

3. 石棉：用 5% 的氢氧化钠在蒸气锅中加热 8h，然后用水充分洗涤，再用同样方法在盐酸中 (1+3) 处理 8h，用热水充分洗涤，烘干，并在灰化炉中燃烧之。

三、操作步骤

用乙醚抽提 2.0g 干样或用测定脂肪后的脱脂样品，置 500ml 三角瓶中，并加入 0.5g 石棉 (作用是加速以后的过滤，通常情况下不加也可以)。然后加入 200ml 煮沸的硫酸溶液。加热煮沸，并立即连接回流冷凝管，将三角瓶置电磁搅拌器上徐徐振荡，使瓶内物质充分混合，并避免样品附着于液面以上的瓶壁处，并继续加热使微微沸腾 30min，移开三角瓶，立即用垫有双层尼龙纱的布氏漏斗过滤之，并用沸水洗涤至滤液不呈酸性反应为止。用 200ml 煮沸的氢氧化钠溶液冲洗滤布上的存留物，回到原来三角瓶中，连接回流冷凝管，处理如上并微煮 30min，然后移去三角瓶，立即用布氏漏斗过滤，并以沸水洗涤 2~3 次，然后将存留物移入具有致密薄层石棉的古氏坩埚中，用水抽滤器抽滤，再用沸水充分洗涤，最后用 15ml 95% 酒精洗涤。

将坩埚及内容物在 110℃ 烘箱中烘干至恒重 (约 4h)，置干燥器中冷却，称其重量，然后放入马福炉中灼烧之，使含碳物质全部灰化，再置干燥器中冷却后，称其重量。所损失的重量即为粗纤维量。

四、注意事项

样品应尽可能地磨细，若颗粒过粗影响消化，会产生较高的结果，普通样品须磨碎通过 40 孔筛目。

实验五 粗脂肪的测定

一、原理

脂肪的测定可用有机溶剂提取样品中的脂肪，蒸发溶剂后得到的剩余物称为脂肪，除脂肪外，还尚含有色素、蜡质、挥发油、树脂等，所以又称粗脂肪，在多数食品中，这些杂质极少，可以忽略。

二、材料、仪器与试剂

(一) 材料：谷物、豆类等。

(二) 仪器：索氏提取器 (如图)、烧瓶 (150ml)。

(三) 试剂：1. 无水乙醚，2. 海砂。

三、操作步骤

精确称取充分研体的干燥样品 2.00~5.00g, 置于已称重的滤纸筒内(半固体或液体品取 5.0~10.0g 于蒸发皿中, 加入海砂 20g, 于水浴上蒸干, 在 100~105℃ 烘干, 研细, 全部移入滤纸筒内, 蒸发皿及附有样品的玻璃棒用蘸有乙醚的棉花擦净, 棉花也放进滤纸筒内)。将滤纸筒封好后小心放入索氏提取器的提取筒内, 应使滤纸筒高度低于虹吸管上端弯曲部位。连接已恒重的蒸发烧瓶。由冷凝管上端加入无水乙醚, 至烧瓶中乙醚量为瓶的 2/3 体积, 于水浴上加热, 乙醚开始回流后, 仔细调整水浴温度, 使虹吸回流速度控制在 8~12 次/h, 一般抽提 6~12h。(如乙醚挥发过多, 可从冷凝管上端补充)。取下接收瓶。回收乙醚至瓶内剩 1~2ml 时, 在水浴上蒸干, 再于 100~105℃ 干燥 1~2h, 取出于干燥器中冷却 30min 称重。

四、计算

$$\text{粗脂肪}\% = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

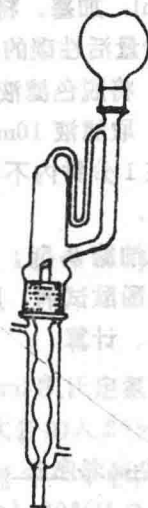
W —— 样品重 (g)

W_0 —— 接收瓶重 (g)

W_1 —— 接收瓶和脂肪重 (g)

五、注意事项

1. 向滤纸筒内填装样品及回流提取过程中都不应外漏, 否则重作。
2. 应用无水乙醚, 并在通风柜中进行蒸干, 切忌明火。



索氏提取器

实验六 食品中游离脂肪酸含量的测定

一、原理

由于食品中水分和其他杂质存在, 加上酶或热能的作用, 油脂能逐渐水解产生游离脂肪酸, 因此可根据油脂中游离脂肪酸的含量来判定油脂质量。游离脂肪酸可用碱进行滴定

二、材料、仪器与试剂

1. 材料: 花生、瓜籽、油菜籽、豆类, 也可直接食用油, (以不同贮藏期的进行比较)
2. 仪器: 台秤、水浴锅、研钵、三角烧瓶、大试管和橡皮塞、碱式滴定管等, 25ml 容量瓶。

3. 试剂

- (1) 95% 乙醇
- (2) 1% 酚酞试剂
- (3) 0.05ml/L NaOH

三、操作步骤

I.

1. 于台秤上称取 1g 油料种子仁，于研钵中研成粉末，将粉末置于试管中，加 95% 乙醇 25ml，加塞。将试管在 70℃ 水浴锅中保温 30 分钟。取出后静止数分钟，将上层清液在放有少量活性炭的滤纸中过滤脱色 1~2 次。
2. 将脱色滤液收集并定容重 25ml。
3. 取滤液 10ml 于三角烧瓶中，加酚酞试剂 2 滴，用 0.05mol/L 的 NaOH 滴定至微红色，在 1 分钟内不褪色即为终点。记录用去 NaOH 的 ml 数。

II.

取油脂 0.5g，加入 25ml 醇醚混合液，在 40℃ 水浴中不断摇动溶化至透明，稍冷后加入 2 滴酚酞试剂，用 0.1N 氢氧化钾标准溶液滴定至微红色 1 分钟不褪色。

四、计算

$$\text{游离脂肪酸含量 (\%)} = \frac{V \times N \times 0.282}{G} \times 100$$

式中：V —— 滴定时消耗碱液的量 ml；

N —— 滴定时所用碱液的当量浓度；

G —— 样品的重量 (g)

0.282 —— 油酸的毫克当量数。

平行试验结果允许误差为 0.30%。

五、思考题

比较和讨论不同贮藏期或不同贮藏条件对食品中油脂质量的影响。

实验七 粗蛋白质的测定 (微量凯氏定氮法)

一、原理

食品及其原料中蛋白质含量的高低往往为检查其质量的一个重要指标。蛋白质测定常采用微量凯氏定氮法，其原理是将样品与硫酸共同加热煮沸，使蛋白质分解，其中的氮氧化成氨，氨与硫酸化合成硫酸铵，然后碱化蒸馏使氮游离，用硼酸吸收，生成四硼酸铵盐，以标准盐酸滴定。凯氏定氮法所测得的为试样中的总氮量，它除蛋白质的氮外，还包括氨基酸、酰胺、核酸中的氮，换算成的蛋白质称为粗蛋白质。

二、材料、仪器与试剂

(一) 材料：各种食品。

(二) 仪器：凯氏定氮瓶 (100ml)、消化用电炉、容量瓶 (100ml)、微量凯氏蒸馏器、三角瓶 (125ml) 滴定管 (25ml)、移液管。

(三) 试剂：1. 浓硫酸 2. 硫酸铜 3. 硫酸钾 4. 40% 氢氧化钠 5. 4% 硼酸溶液 6. 0.1mol/L 盐酸溶液。

0.02mol/L 盐酸溶液：准确称取 0.1g 无水碳酸钠（烘干 2h）三份，各放入 250ml 三角瓶中，加 50ml 蒸馏水溶解，并加入 2 滴甲基橙指示剂，用 0.02mol/L 盐酸滴定至橙色。

$$N_{HCl} = \frac{W}{\frac{M}{2} \times V} \times 1000$$

V ——无水碳酸钠重 (g)

M ——无水碳酸钠摩尔数

V ——消耗盐酸溶液的体积 (ml)

7. 溴甲酚绿—甲基红混合指示剂：取 0.2% 甲基红乙醇 (95%) 溶液 1 份和 0.2% 溴甲酚绿乙醇 (95%) 溶液 5 份临用时混合。

三、操作步骤

(一) 样品消化：准确称取样 1.0~5.0g (干样 0.1~0.3g)，置 100ml 凯氏定氮瓶中，干样先加 1ml 蒸馏水使之湿润，加 5ml 浓硫酸 (比重 1.84)，摇匀，分两次各加入 30% H_2O_2 2ml，摇匀，待剧烈反应结束后，在消化电炉上加热消煮，先用小火加热，待泡沫减少后再将火力加强，至其中固体物消失，成为基本透明溶液，冷却后，再每次加入 30% H_2O_2 2ml，共三次，消煮至溶液完全清亮，再煮 10min 以完全赶走 H_2O_2 ，冷却后无损地转移至 100ml 容量瓶中，定容，备用。

(二) 蒸馏：于 100ml 三角瓶中加入 5.0ml 2% 硼酸溶液，并置于蒸馏设备的冷凝管上。吸取适量稀释的消化液，转移到蒸馏装置的圆底烧瓶中。加入 100ml 蒸馏水和 20ml 40% 氢氧化钠溶液，立即盖严并加热蒸馏。待流出液为 250ml 时，此时氨已全部进入硼酸溶液。停止加热前应先使流出液液面离开冷凝管口，并用少许蒸馏水冲洗管口下端。将三角瓶移开蒸馏设备，准备滴定。

(三) 滴定：于上述硼酸溶液中加入 2 滴溴甲酚绿—甲基红指示剂，用 0.02mol/L 盐酸标准溶液滴定至灰色后，再加 1~2 滴盐酸溶液使呈红色为止。然后按下列公式，根据消耗的酸量即可计算出样品中蛋白质含量。

四、计算

$$\text{粗蛋白质}\% = (V_1 - V_2) \times N \times 0.014 \times \frac{1}{W} \times 100 \times 6.25$$

其中： V_1 ——样品滴定时消耗 0.02mol/L 盐酸量 (ml)

V_2 ——试剂空白滴定时消耗 0.02mol/L 盐酸量 (ml)

N ——盐酸溶液的摩尔浓度

W ——样品重 (g)

0.014 ——氮的毫摩尔

6.25 ——氮与蛋白质的换算系数

实验八 可溶性蛋白质的测定

(考马斯亮蓝 G-250 法)

一、原理

考马斯亮蓝 G-250 以两种不同颜色存在, 红色与蓝色, 当染色剂与蛋白质结合时, 红色的就转变为蓝色。这种蛋白质染色剂复合物有较高的消光系数。因此, 用这种方法测定蛋白质含量灵敏度比较高, 这种染色剂和蛋白质的结合过程迅速, 大约 2min, 而且在 1h 内这种蛋白质——染色剂复合物能在溶液中保持稳定。

二、材料、仪器与试剂

(一) 材料: 豆芽、马铃薯。

(二) 仪器: 分析光度计、分析天平、容量瓶、移液管、具塞刻度试管。

(三) 试剂

1. 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂: 称取 100mg 考马斯亮蓝 G-250, 溶于 50ml 90%乙醇中, 加入 85% 正磷酸 100ml, 最后加蒸馏水至 1000ml, 此溶液可在常温下放置一个月。

2. 蛋白质标准液: 称取 100mg 牛血清蛋白, 溶于 100ml 蒸馏水中, 制成 1000 μ g/ml 贮备液。再按下表比例配制成每毫升分别含 200, 400, 600, 800, 1000 μ g 蛋白标准液及每毫升分别含 20, 40, 60, 80, 100 μ g 蛋白的标准液。

表 1

蛋白浓度 (μ g/ml)	200	400	600	800	1000
加贮备液 (ml)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
加蒸馏水 (ml)	1.6	1.2	0.8	0.4	0

表 2

蛋白浓度 (μ g/ml)	20	40	60	80	100
加贮备液 (ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
加蒸馏水 (ml)	9.8	9.6	9.4	9.2	9.0

三、操作步骤

(一) 标准曲线的制作

1. 100~1000 μ g/ml 蛋白标准曲线: 准确吸取含有 200, 400, 600, 800, 100 μ g 的牛血清蛋白标准液 0.1ml, 分别放入 10ml 刻度试管中, 加入 5.0ml 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂, 将溶液混匀, 2min 后在 595nm 处测其消光值, 空白以蒸馏水代替标准液, 其它操作同上。

2. 0~100 μ g/ml 蛋白标准曲线: 准确吸取 0.5ml 含 20, 40, 60, 80, 100 μ g 牛血清蛋白标

准液，分别放入 10ml 具塞刻度试管中，加入 5.0ml 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂，其它作同上。以消光值为纵坐标，蛋白含量为横坐标，作标准曲线。

(二) 样品中蛋白质浓度的测定，样品中蛋白质浓度的测定除加入标准液致为样品液外其余操作完全相同，通过标准曲线即可查得每毫升溶液中蛋白质的含量。

实验九 可溶性蛋白质的测定 (紫外吸收法)

一、原理

由于蛋白质中含有酪氨酸和色氨酸残基，蛋白质溶液在 280nm 处的消光值与其含量成正比关系，可用来定量测定食物中的可溶性蛋白，但是这个方法测定蛋白质含量的准确性较差。其一是因为蛋白质中酪氨酸和色氨酸的含量各不相同，其二是样品提取液中若存有核酸等具紫外光吸收物质时，就会出现干扰。但可通过计算来校正核酸对蛋白质的干扰，目前紫外吸收法已成为蛋白质含量测定的常用方法之一。其方法是将样品提取液各在 280nm 和 260nm 波长时测定其消光值，求出此两值的比例，并从下表中求得合适的校正因子，按以下公式即可得到蛋白质的含量。

$$OD_{280nm} \times \text{校正因子} = \text{蛋白质含量 mg/ml}$$

表 紫外吸收法测定蛋白质含量的校正因子

OD ₂₈₀ /OD ₂₆₀	校正因子	核酸	OD ₂₈₀ /OD ₂₆₀	校正因子	核酸
1.75	1.12	0	0.85	0.66	5.50
1.63	1.08	0.25	0.82	0.63	6.00
1.52	1.05	0.50	0.80	0.61	6.50
1.40	1.02	0.75	0.78	0.59	7.00
1.36	0.99	1.00	0.77	0.57	7.50
1.30	0.97	1.25	0.75	0.55	8.00
1.25	0.94	1.50	0.73	0.51	9.00
1.16	0.90	2.00	0.71	0.48	10.00
1.09	0.85	2.50	0.67	0.42	12.00
1.03	0.81	3.00	0.64	0.38	14.00
0.98	0.78	3.50	0.62	0.32	17.00
0.94	0.74	4.00	0.60	0.29	20.00
0.87	0.68	5.00			

二、材料、仪器与试剂

(一) 材料、黄豆芽、绿豆芽及小麦种子等。

(二) 仪器：紫外分光光度计、刻度试管 (10ml)、研钵、移液管 (ml)、容量瓶、离心机。

(三) 试剂：(1) 30% 氢氧化钠 (2) 石英砂 (3) 碱性乙醇：取 2g NaOH，溶于 1000ml 60% 乙醇液中。(4) 蛋白质标准液：准确称取牛血清蛋白。配成浓度为 1mg/ml 的蛋白质贮备液，如不溶解加少许 NaCl 液。

三、操作步骤

(一) 标准曲线的制作：取 8 支 10ml 具塞刻度试管，分别加入 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 的 1mg/ml 的标准蛋白质溶液，加入蒸馏水使最终体积为 5.0ml，混匀。测其蛋白质浓度各为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8mg/ml。在 280nm 处测定其消光值，以蛋白质浓度为横坐标，消光值为纵坐标，作出标准曲线。

(二) 样品的提取：准确称取粉碎并过 40 号筛的小麦种子样品 1.0g 或鲜豆芽 5.0g，加 2.5ml 30% NaOH，研磨成匀浆，加 5ml 60% 碱性乙醇研磨后，置 50ml 容量瓶中，用 60% 碱性乙醇定容，静止 3h 后，取部分提取液在离心机中 (6000r/min) 离心 30min，取 1.0ml 上清液于 50ml 容量瓶中，用 60% 碱性乙醇定容，于 280nm, 260nm 处测其消光值，根据表及公式可计算出蛋白质浓度。

实验十 色氨酸含量的测定

一、原理

色氨酸是人体营养的必需氨基酸，测定色氨酸是判断食品营养成分的要素之一，但在目前最常用的氨基酸自动分析仪中因蛋白质经酸水解后色氨酸被破坏而漏测，故必须单独处理测定。蛋白质经酶解 (或碱水解) 产生的色氨酸，在酸性条件下，它的吲哚基可与对-二甲基氨基苯甲醛 (p-DAB) 生成蓝色的复合物，其颜色的深浅在一定范围内与色氨酸含量成线性关系，用 721 分光光度计可在 590nm 波长处测消光值，用色氨酸标准曲线求出样品中色氨酸含量的百分数。

二、材料、仪器与试剂

(一) 材料：小麦、玉米、水稻等。

(二) 仪器：721 分光光度计、恒温水浴、分析天平、漏斗、滤纸、具塞试管 (15ml)、移液管 (1ml, 5ml)、烧杯。

(三) 试剂

1. 标准色氨酸溶液 100 μ g/ml，用 pH7.0, 0.2mol/L 磷酸缓冲液配置 (0.2mol/L Na_2HPO_4 61ml, 0.2mol/L NaH_2PO_4 39ml 混匀即可)。

2. 9mol/L 硫酸：浓硫酸缓慢倒入等体积的水中。

3. DAB 液：0.85g 对-二甲基氨基甲醛溶于 25ml 9mol/L 硫酸中。

4. 0.045% 亚硝酸钠溶液；

5. 木瓜蛋白酶溶液 (3mg/ml)，用 pH 7.0 磷酸缓冲液配置，木瓜蛋白酶在 65 $^{\circ}$ C 加热，使之充分溶解后过滤再用。

三、操作步骤

(一) 标准曲线的制作: 取六个洁净干燥编号的具塞试管, 按表所列数据加入各种溶液, 摇匀置室温下反应0.5h后, 以空白为对照, 于721分光光度计590nm波长处测消光值。以色氨酸含量为横坐标, 以消光度为纵坐标绘制标准曲线(重复二次求平均值)。

管号		1	2	3	4	5	6
标准色氨酸溶液	ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
磷酸缓冲液	ml	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
色氨酸含量	μg/ml	0	20	40	60	80	100
DAB溶液	ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
9mol/L 硫酸溶液	ml	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
0.045%亚硝酸钠	ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

(二) 样品处理: 准确称取粉碎, 烘干样品100mg(如样品中含有脂肪, 还需经乙醚浸提脱脂), 放入具塞试管中, 注意勿使样品粘于管壁, 加入木瓜蛋白酶溶液5ml于65℃恒温水浴上酶解16~18h。同时做酶液空白管, 在酶解过程中摇动数次以使酶解充分。酶解后过滤或离心上清液待测。

(三) 测定: 取上述上清液1ml于具塞试管中, 加入DAB溶液1ml, 再加入9mol/L硫酸5ml, 混合后加入0.045%亚硝酸钠0.1ml摇匀后0.5h, 590nm波长处测消光值(重复二次)。

四、计算

从标准曲线上查得样品每毫升含色氨酸的微克数, 计算样品中色氨酸含量的百分数。

$$\text{色氨酸含量}\% = \frac{(A-B) \times V}{W \times 10^4} \times 100$$

A 样品每毫升含色氨酸微克重

B 空白酶液每毫升含色氨酸微克重

V 样液总体积(样液1ml, DAB1ml, 酶液5ml, 总体积为7ml)

W 样品重(mg)

五、注意事项

木瓜蛋白酶酶解样品过程中, 必须严格控制65℃及缓冲液的pH值, 以使酶解充分, 否则会影响测定结果。

实验十一 赖氨酸含量的测定

一、原理

谷蛋白中赖氨酸残基有自由的ε-NH₂, 它与茚三酮试剂可以发生颜色反应, 其颜色的深浅与赖氨酸残基的含量成正相关。因此酸解谷蛋白与茚三酮反应, 用比色法就可测得赖氨酸的含量。选用碳原子数与赖氨酸相同的亮氨酸, 配成标准溶液, 制作标准曲线, 可以测定谷蛋白内赖氨酸的含量。