

第十章 蛋白质和氨基酸的测定

第一节 概述

蛋白质是生命的物质基础，是构成生物体细胞组织的重要成分，是生物体发育及修补组织的原料。一切有生命的活体都含有不同类型的蛋白质。人体内的酸、碱及水分平衡，遗传信息的传递，物质代谢及转运都与蛋白质有关。人及动物只能从食物中得到蛋白质及其分解产物，来构成自身的蛋白质，故蛋白质是人体重要的营养物质，也是食品中重要的营养成分。

蛋白质在食品中含量的变化范围很宽。动物来源和豆类食品是优良的蛋白质资源。部分种类食品的蛋白质含量见表 10-1

表 10-1 部分食品的蛋白质含量

食品种类	蛋白质的质量分数（以湿基计）/%	食品种类	蛋白质的质量分数（以湿基计）/%
谷类和面食		土豆（整粒、肉和皮）	2.1
大米（糙米、长粒、生）	7.9	豆类	
大米（白米、长粒、生、强化）	7.1	大豆（成熟的种子、生）	36.5
小麦粉（整粒）	13.7	豆（腰子状、所有品种、成熟的种子、生）	23.6
玉米粉（整粒、黄色）	6.9	豆腐（生、坚硬）	15.6
意大利面条（干、强化）	12.8	豆腐（生、普通）	8.1
玉米淀粉	0.3	肉、家禽、鱼	
乳制品		牛肉（颈肉、烤前腿）	18.5
牛乳（全脂、液体）	3.3	牛肉（腌制、干牛肉）	29.1
牛乳（脱脂、干）	36.2	鸡（可供煎炸的鸡胸肉、生）	23.1
切达干酪	24.9	火腿（切片、普通的）	17.6
酸奶（普通的、低脂）	5.3	鸡蛋（生、全蛋）	12.5
水果和蔬菜		鱼（太平洋鳕鱼、生）	17.9
苹果（生、带皮）	0.2	鱼（金枪鱼、白色、罐装、油浸、滴干的固体）	26.5
芦笋（生）	2.3		
草莓（生）	0.6		
莴苣（冰、生）	1.0		

蛋白质是复杂的含氮有机化合物，摩尔质量大，大部分高达数万~数百万，分子的长轴则长达 1nm~100nm，它们由 20 种氨基酸通过酰胺键以一定的方式结合起来，并具有一定的空间结构，所含的主要化学元素为 C、H、O、N，在某些蛋白质中还含有微量的 P、Cu、Fe、I 等元素，但含氮则是蛋白质区别于其它有机化合物的主要标志。

不同的蛋白质其氨基酸构成比例及方式不同，故各种不同的蛋白质其含氮量也不同。一般蛋白质含氮量为 16%，即 1 份氮相当于 6.25 份蛋白质，此数值（6.25）称为蛋白质系

数。不同种类食品的蛋白质系数有所不同，如玉米、荞麦、青豆、鸡蛋等为 6.25，花生为 5.46，大米为 5.95，大豆及其制品为 5.71，小麦粉为 5.70、牛乳及其制品为 6.38。

蛋白质可以被酶、酸或碱水解，其水解的中间产物为胨、胬、肽等，最终产物为氨基酸。氨基酸是构成蛋白质的最基本物质，虽然从各种天然物中分离得到的氨基酸已达 175 种以上，但是构成蛋白质的氨基酸主要是其中的 20 种，而在构成蛋白质的氨基酸中，亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、色氨酸和缬氨酸等 8 种氨基酸在人体中不能合成，必须依靠食物供给，故被称为必需氨基酸，它们对人体有着极其重要的生理功能，常会因其在体内缺乏而导致患病或通过补充而增强了新陈代谢作用。随着食品科学的发展和营养知识的普及，食物蛋白质中必需氨基酸含量的高低及氨基酸的构成，愈来愈得到人们的重视。为提高蛋白质的生理效价而进行食品的开发及合理配膳等工作都具有极其重要的意义。

测定蛋白质的方法可分为两大类：一类是利用蛋白质的共性，即含氮量、肽键和折射率等测定蛋白质含量；另一类是利用蛋白质中特定氨基酸残基、酸性和碱性基团以及芳香基团等测定蛋白质含量。但因食品种类繁多，食品中蛋白质含量各异，特别是其它成分，如碳水化合物、脂肪和维生素等干扰成分很多，因此蛋白质含量测定最常用的方法是凯氏定氮法，它是测定总有机氮的最准确和操作较简便的方法之一，在国内外应用普遍。该法是通过测出样品中的总含氮量再乘以相应的蛋白质系数而求出蛋白质含量的，由于样品中常含有少量非蛋白质含氮化合物，故此法的结果称为粗蛋白质含量。此外，双缩脲法、染料结合法、酚试剂法等也常用于蛋白质含量测定，由于方法简便快速，故多用于生产单位质量控制分析。

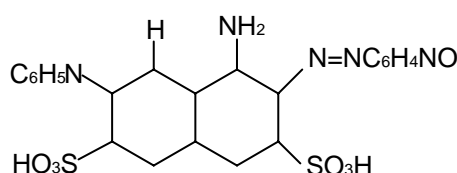
近年来，凯氏定氮法经不断的研究改进，使其在应用范围、分析结果的准确度、仪器装置及分析操作速度等方面均取得了新的进步。另外，国外采用红外分析仪，利用波长在 $0.75\sim 3\mu\text{m}$ 范围内的近红外线具有被食品中蛋白质组分吸收及反射的特性，依据红外线的反射强度与食品中蛋白质含量之间存在的函数关系而建立了近红外光谱快速定量方法。

鉴于食品中氨基酸成分的复杂性，在一般的常规检验中多测定样品中的氨基酸总量，通常采用酸碱滴定法来完成。色谱技术的发展为各种氨基酸的分离、鉴定及定量提供了有力的工具，近年来世界上已出现了多种氨基酸分析仪，这使得快速鉴定和定量氨基酸的理想成为现实。另外利用近红外反射分析仪，输入各类氨基酸的软件，通过电脑控制进行自动检测和计算，也可以快速、准确地测出各类氨基酸含量。下面分别介绍常用的蛋白质和氨基酸测定方法。

第二节 蛋白质的定性测定

一、蛋白质的一般显色反应

1. 氨基黑法



氨基黑 10B 是酸性染料，其磺基与蛋白质反应构成复合盐，是最常用的蛋白质染料。

(1) 经点样后的层析纸经电泳或层析后，浸入氨基黑 10B 醋酸甲醇溶液（13g 氨基黑 10B 溶解于 100mL 冰醋酸和 900mL 甲醇中，充分摇匀，放置过夜，过滤后可反复使用几次）中，染色 10min，染色后，用 10% 醋酸甲醇溶液洗涤约 5~7 次，待背景变成浅蓝色后干燥。若欲进行洗脱，用 0.1mol/L 氢氧化钠浸泡 30min，于 595nm 比色测定。

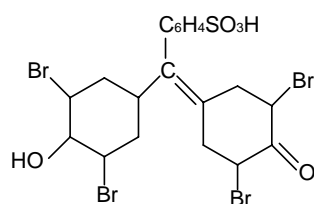
(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳后染色：用甲醇固定后，在含 1% 氨基黑 10B 0.1mol/L 氢氧化钠溶液中染色 5min(室温)，用 5% 乙醇洗脱背景底色。或用 7% 醋酸固定后，于 96°C 水浴中用 7% 醋酸（含 0.5%~1% 氨基黑 10B）染色 10min, 7% 醋酸洗脱背景底色。用氨基黑 10B 染 SDS-蛋白质时效果不好。如果凝胶中含有两性离子载体，先用 10% 三氯醋酸浸泡，每隔 2h 换液一次，约 10 次，再进行染色。

(3) 凝胶薄层的直接染色：将凝胶薄层放在一定湿度的烘箱内逐步干燥（50°C），没有调温调湿箱时用一张滤纸放于烘箱内，以保持一定的湿度。将干燥的薄层板于漂洗液（750 mL 甲醇，200mL 水，50mL 冰醋酸）中预处理 10min，然后在染色液（750mL 甲醇，200mL 水，50mL 冰醋酸，在此溶液中加入氨基黑 10B 饱和）中染色 5h, 再在漂洗液内洗涤。

本法优点是灵敏度较高，缺点是花费时间长，不同蛋白质染色强度不同。

2. 溴酚蓝法

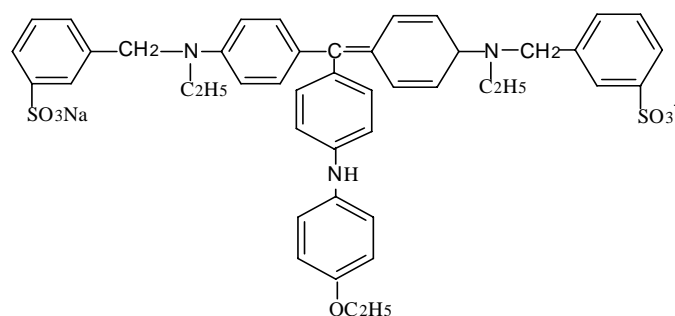
经电泳或层析后滤纸或凝胶于 0.1% 溴酚蓝固定染色液（1g 溴酚蓝，100g 氯化汞溶于 50% 乙醇水溶液中，用 50% 乙醇稀释至 1000mL）中浸泡 15~20min，在 30% 乙醇：5% 醋酸水溶液中漂洗过夜。如欲洗脱，可用 0.1mol/L NaOH。



此法缺点是灵敏度低，某些摩尔质量低的蛋白质可能染不上颜色。

3. 考马斯亮蓝法

考马斯亮蓝 R250



该染料和蛋白质是通过范德华力结合的。考马斯亮蓝含有较多疏水基团，和蛋白质的疏水区有较大的亲和力，而和凝胶基质的亲和力不如氨基黑，所以用考马斯亮蓝染色时漂洗要容易得多。

(1) 经电泳后滤纸或醋酸纤维膜在 200g/L 磺基水杨酸溶液中浸 1min，取出后放入 2.5g/L 考马斯亮蓝 R250 染色液（配制用的蒸馏水内不含有重金属离子）浸 5min，在蒸馏水

或 7%醋酸中洗四次，每次 5min，于 90℃放置 15min。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶也可同上处理。在酸性醇溶液中，考马斯亮蓝-兼性离子载体络合物溶解度显著增大，因此能免去清除兼性离子载体的步骤。可运用下列方法之一：

凝胶用 10% 三氯醋酸固定，在 10% 三氯醋酸-1% 考马斯亮蓝 R250 (19+1) 中室温染色 0.5h，用 10% 三氯醋酸脱底色。

凝胶浸入预热至 60℃ 的 0.1% 考马斯亮蓝固定染色液 (150g 三氯醋酸，45g 磺基水杨酸溶于 375mL 甲醇和 930mL 蒸馏水的混合液。每 1g 考马斯亮蓝 R250 溶于此混合液 1000mL 中) 中约 30min，用酸性乙醇漂洗液 (乙醇+水+冰醋酸=25+25+8) 洗尽背景颜色。染色后凝胶保存于酸性乙醇漂洗液中。本法灵敏度：卵清蛋白 0.03 μg，血清清蛋白 0.02 μg，血红蛋白 0.01 μg。

凝胶浸入考马斯亮蓝固定染色液 (2g 考马斯亮蓝 R250，溶于 100mL 蒸馏水中，加 2mol/L 硫酸 100mL，过滤除去沉淀，向清液中滴加 10mol/L KOH 至颜色从绿变蓝为止。量体积，每 100mL 加入三氯醋酸 12g) 中 1h，然后用蒸馏水洗净背景颜色或在 0.2% H₂SO₄ 溶液中浸泡片刻脱除背景颜色。染色后的凝胶保存于蒸馏水中。本法机制未明，起染色作用的可能不是考马斯亮蓝本身，灵敏度不如上法。

考马斯亮蓝法灵敏度比氨基黑高五倍，尤其适用于 SDS 电泳的微量蛋白质的染色。在 549nm 有最大吸收值，蛋白质在 1~10 μg 呈线性关系。

4. 酸性品红法

经电泳后滤纸置于 0.2% 酸性品红溶液中 (2g 酸性品红溶解于 500mL 甲醇，400mL 蒸馏水和 100mL 冰醋酸中) 加热染色 15min；取出后浸入醋酸甲醇溶液 (500mL 甲醇，加 400mL 蒸馏水和 100mL 冰醋酸) 15min；然后浸入 10% 醋酸溶液，每次 20min，至背景无色为止。若欲进行比色，可用 0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡 2h，在波长为 570nm 处比色。

5. 氨基萘酚磺酸法

聚丙烯酰胺凝胶电泳后，把凝胶暴露于空气中几分钟，或在 2mol/L HCl 中浸一下使表层蛋白变性，再在 0.003% 氨基萘酚磺酸的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.8) 中染 3min，在紫外光下可显黄绿色荧光。这样的染色可保留凝胶内部的酶和抗体的活性。如不需保留活性时，可先在 3mol/L HCl 中浸 2min 以上使蛋白质充分变性，再染色。

二、复合蛋白质的显色反应

1. 糖蛋白的显色

(1) 过碘酸-Schiff 氏试剂显色法：

试剂

过碘酸液：1.2g 过碘酸溶解于 30mL 蒸馏水中，加 15mL 0.2mol/L 醋酸钠溶液及 100mL 乙醇。临用前配制，或保存在棕色瓶中，可用数日。

还原液：5g 碘化钾，5g 硫代硫酸钠溶于 100mL 蒸馏水中，加 150mL 95% 乙醇及 2.5mL 2mol/L HCl。现配现用。

亚硫酸品红液：2g 碱性品红溶解于 400mL 沸水中，冷却至 50℃ 过滤。在滤液中加入 10mL 2mol/L 盐酸和 4g 偏亚硫酸钾 (K₂S₂O₅)，将瓶塞紧放在冰箱中过夜，加 1g 活性炭，过滤，再逐渐加入 2mol/L 盐酸，直至此溶液在玻片上干后不变红色为止，保存在棕色瓶中，冰箱贮存，当溶液变红时不可以再用。

亚硫酸盐冲洗液： 1mL 浓硫酸， 0.4g 偏亚硫酸钾加入到 100mL 水中。

显色步骤

将含有样品的滤纸浸在 70% 乙醇中，片刻后吹干，在高碘酸液中浸 5min，用 70% 乙醇洗一次，在还原液中浸 5~8min，再用 70% 乙醇洗一次，在亚硫酸品红液中浸 24~25min，用亚硫酸盐冲洗液洗三次，并用乙醇脱水后，放在玻璃板上吹干。显色结果：在黑灰色的底板上呈现紫红色。

(2) 甲苯胺蓝 (Toluidine blue) 显色法：

试剂

试剂甲：1.2g 过碘酸溶解在 30mL 蒸馏水中，加 15mL 0.5mol/L 醋酸钠和 100mL 96% 乙醇。现配现用。试剂乙：100mL 甲醇加 20mL 冰醋酸及 80mL 蒸馏水。试剂丙：溴水。试剂丁：10g/L 甲苯胺蓝水溶液。试剂戊：40g/L 钼酸铵溶液。

显色步骤

将点有样品的滤纸依次在试剂甲中浸 15min，试剂丙中浸 15min，用自来水漂洗，再在试剂丁中浸 30min，自来水中漂洗至没有蓝色染料渗出（约 30~40min）后，再依次在试剂戊中浸 3min，试剂乙中浸 15min，丙酮中浸 2min 后在空气中干燥。显色结果：糖蛋白部分染成蓝色，背景带有红紫色。

(3) 阿尔新蓝 (Alcian blue) 显色法：

聚丙烯酰胺凝胶在 12.5% 三氯醋酸中固定 30min 后，再用蒸馏水轻轻漂洗。放入 1% 过碘酸液（在 3% 醋酸中）中氧化 50min。用蒸馏水反复洗涤去除多余的过碘酸盐。再放入 0.5% 偏重亚硫酸钾中还原剩余的过碘酸盐 30min，再用蒸馏水洗涤。浸在 0.5% 阿尔新蓝（在 3% 醋酸中）溶液中染 4h。

2. 脂蛋白的显色

(1) 苏丹黑 (Sudan black) 显色法：

将 0.1g 苏丹黑 B 溶解于煮沸的 100mL 60% 的乙醇溶液中，制备成饱和溶液，冷却后过滤两次，备用。

显色时将点有样品的滤纸浸于上述溶液中，3h 后取出，用 50% 乙醇溶液洗涤两次，每次 15min，空气中干燥。

聚丙烯酰胺凝胶电泳中预染法：加苏丹黑 B 到无水乙醇中成饱和液，并震荡使乙酰化。用前过滤。按样品液的 1/10 量加入样品液中染色 1h 或 4℃ 过夜。染色后的样品再进行电泳。

(2) 油红-O (Oil red O) 显色法：

0.04g 油红溶解于 100mL 60% 的乙醇中，30℃ 放置过夜（16h）使充分饱和后，在 30℃ 下滤去多余的染料，澄清液即可用于染色。

将滤纸浸入染料液中，在 30℃ 下染色 18h 后，用水冲洗，使背景变浅，在空气中干燥。脂蛋白为红色，背景为桃红色。本法在 30℃ 以下显色时，会引起染料沉淀。

第三节 蛋白质的定量测定

一、凯氏定氮法

新鲜食品中含氮化合物大都以蛋白质为主体，所以检验食品中蛋白质时，往往只限于测定总氮量，然后乘以蛋白质换算系数，即可得到蛋白质含量。凯氏定氮法可用于所有动、

植物食品的蛋白质含量测定，但因样品中常含有核酸、生物碱、含氮类脂、卟啉以及含氮色素等非蛋白质的含氮化合物，故结果称为粗蛋白质含量。

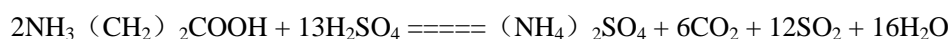
凯氏定氮法由 Kieldahl 于 1833 年首先提出，经过长期改进，迄今已演变成常量法、微量法、自动定氮仪法、半微量法及改良凯氏法等多种，至今仍被作为标准检验方法。下面仅对前三种方法予以介绍。

1. 常量凯氏定氮法

(1) 原理

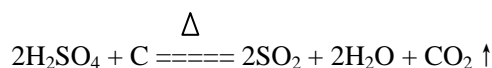
样品与浓硫酸和催化剂一同加热消化，使蛋白质分解，其中碳和氢被氧化成二氧化碳和水逸出，而样品中的有机氮转化为氨与硫酸结合成硫酸铵。然后加碱蒸馏，使氨蒸出，用硼酸吸收后再以标准盐酸或硫酸溶液滴定。根据标准酸消耗量可计算出蛋白质的含量。

①样品消化：消化反应方程式如下

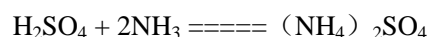


浓硫酸具有脱水性，使有机物脱水后被炭化为碳、氢、氮。

浓硫酸又有氧化性，将有机物炭化后的碳成为二氧化碳，硫酸则被还原成二氧化硫：

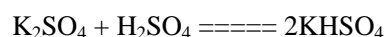


二氧化硫使氮还原为氨，本身则被氧化为三氧化硫，氨随之与硫酸作用生成硫酸铵留在酸性溶液中：

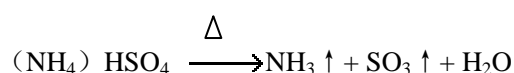
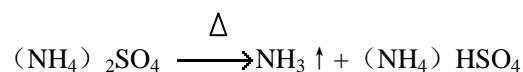


在消化反应中，为了加速蛋白质的分解，缩短消化时间，常加入下列物质：

1) 硫酸钾 加入硫酸钾可以提高溶液的沸点而加快有机物分解。它与硫酸作用生成硫酸氢钾可提高反应温度，一般纯硫酸的沸点在 340℃ 左右，而添加硫酸钾后，可使温度提高至 400℃ 以上，原因主要在于随着消化过程中硫酸不断地被分解，水分不断逸出而使硫酸钾浓度增大，故沸点升高，其反应式如下：



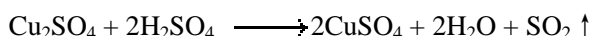
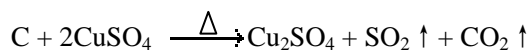
但硫酸钾加入量不能太大，否则消化体系温度过高，又会引起已生成的铵盐发生热分解放出氨而造成损失：



除硫酸钾外，也可以加入硫酸钠、氯化钾等盐类来提高沸点，但效果不如硫酸钾。

2) 硫酸铜 CuSO_4 硫酸铜起催化剂的作用。凯氏定氮法中可用的催化剂种类很多，除硫酸铜外，还有氧化汞、汞、硒粉、二氧化钛等，但考虑到效果、价格及环境污染等多种因素，应用最广泛的是硫酸铜、使用时常加入少量过氧化氢、次氯酸钾等作为氧化剂以加速有机物氧化，硫酸铜的作用机理如下所示：



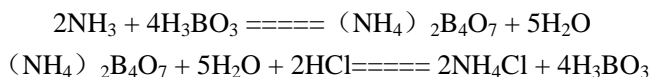


此反应不断进行，待有机物全部被消化完后，不再有硫酸亚铜（ Cu_2SO_4 ）生成，溶液呈现清澈的蓝绿色。故硫酸铜除起催化剂的作用外，还可指示消化终点的到达，以及下一步蒸馏时作为碱性反应的指示剂。

②蒸馏：在消化完全的样品溶液中加入浓氢氧化钠使呈碱性，加热蒸馏，即可释放出氨气，反应方程式如下：



③吸收与滴定：加热蒸馏所放出的氨，可用硼酸溶液进行吸收，待吸收完全后，再用盐酸标准溶液滴定，因硼酸呈微弱酸性（ $K_{a1}=5.8 \times 10^{-10}$ ），用酸滴定不影响指示剂的变色反应，但它有吸收氨的作用，吸收及滴定反应方程如下：



(2) 适用范围

此法可应用于各类食品中蛋白质含量测定，是国家标准分析方法，详见 GB/T5009.5-1985。

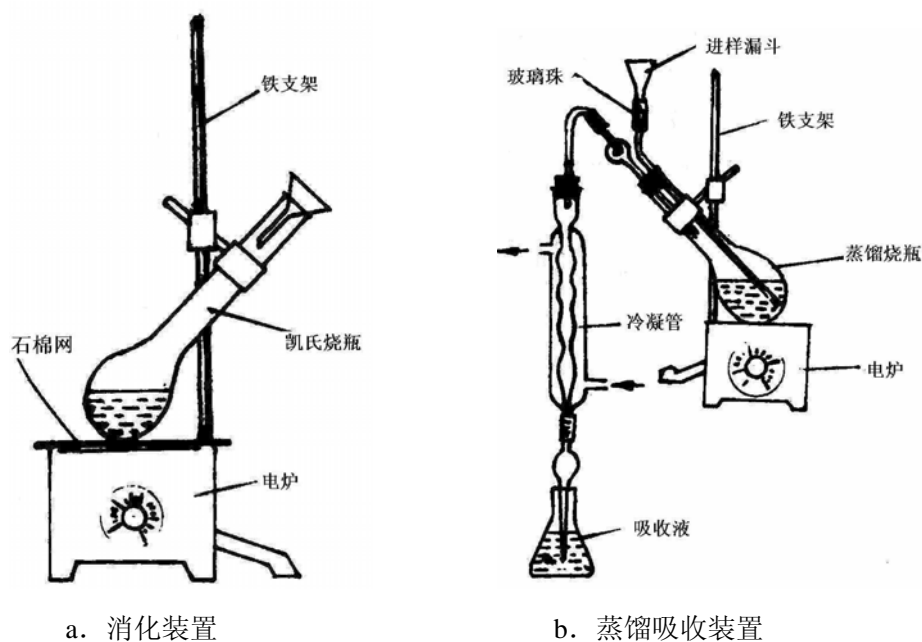


图 10-1 常量凯氏定氮消化、蒸馏装置

(3) 操作方法

准确称取固体样品 0.2~2g（半固体样品 2~5g，液体样品 10~20mL），小心移入干燥洁净的 500mL 凯氏烧瓶中，然后加入研细的硫酸铜 0.5g、硫酸钾 10g 和浓硫酸 20mL，轻轻摇匀后，按图 10-1 中 a 安装消化装置，于凯氏瓶口放一漏斗，并将其以 45°角斜支于有小孔

的石棉网上。用电炉以小火加热，待内容物全部炭化，泡沫停止产生后，加大火力，保持瓶内液体微沸，至液体变蓝绿色透明后，再继续加热微沸 30min。冷却，小心加入 200mL 蒸馏水，再放冷，加入玻璃珠数粒以防蒸馏时暴沸。

将凯氏烧瓶按图 10-1 蒸馏装置方式连好，塞紧瓶口，冷凝管下端插入吸收瓶液面下（瓶内预先装入 50mL 40g/L 硼酸溶液及混合指示剂 2~3 滴）。放松夹子，通过漏斗加入 70~80mL 400g/L 氢氧化钠溶液，并摇动凯氏瓶，至瓶内溶液变为深蓝色，或产生黑色沉淀，再加入 100mL 蒸馏水（从漏斗中加入），夹紧夹子，加热蒸馏，至氨全部蒸出（馏液约 250mL 即可），将冷凝管下端提离液面，用蒸馏水冲洗管口，继续蒸馏 1min，用表面皿接几滴馏出液，以奈氏试剂检查，如无红棕色物生成，表示蒸馏完毕，即可停止加热。

将上述吸收液用 0.1000mol/L 盐酸标准溶液直接滴定至由蓝色变为微红色即为终点，记录盐酸溶液用量，同时作一试剂空白（除不加样品外，从消化开始操作完全相同），记录空白试验消耗盐酸标准溶液的体积。

(4) 结果计算

$$\text{蛋白质 (g/100g)} = \frac{c \times (V_1 - V_2) \times \frac{M_{\text{氮}}}{1000}}{m} \times F \times 100$$

式中：c——盐酸标准溶液的浓度，mol/L；

V_1 ——滴定样品吸收液时消耗盐酸标准溶液体积，mL；

V_2 ——滴定空白吸收液时消耗盐酸标准溶液体积，mL；

m——样品质量，g；

$M_{\text{氮}}$ ——氮的摩尔质量，14.01g/mol；

F——氮换算为蛋白质的系数。

(5) 说明及注意事项

①所用试剂溶液应用无氨蒸馏水配制。

②消化时不要用强火，应保持和缓沸腾，以免粘附在凯氏瓶内壁上的含氮化合物在无硫酸存在的情况下未消化完全而造成氮损失。

③消化过程中应注意不时转动凯氏烧瓶，以便利用冷凝酸液将附在瓶壁上的固体残渣洗下并促进其消化完全。

④样品中若含脂肪或糖较多时，消化过程中易产生大量泡沫，为防止泡沫溢出瓶外，在开始消化时应用小火加热，并不停地摇动；或者加入少量辛醇或液体石蜡或硅油消泡剂，并同时注意控制热源强度。

⑤当样品消化液不易澄清透明时，可将凯氏烧瓶冷却，加入 30%过氧化氢 2~3mL 后再继续加热消化。

⑥若取样量较大，如干试样超过 5g，可按每克试样 5mL 的比例增加硫酸用量。

⑦一般消化至呈透明后，继续消化 30min 即可，但对于含有特别难以氮化的氮化合物的样品，如含赖氨酸、组氨酸、色氨酸、酪氨酸或脯氨酸等时，需适当延长消化时间。有机物如分解完全，消化液呈蓝色或浅绿色，但含铁量多时，呈较深绿色。

⑧蒸馏装置不能漏气。

⑨蒸馏前若加碱量不足，消化液呈蓝色不生成氢氧化铜沉淀，此时需再增加氢氧化钠用量。

⑩硼酸吸收液的温度不应超过 40℃，否则对氨的吸收作用减弱而造成损失，此时可置于冷水浴中使用。

⑪蒸馏完毕后，应先将冷凝管下端提离液面清洗管口，再蒸 1min 后关掉热源，否则可

能造成吸收液倒吸。

(12)混合指示剂在碱性溶液中呈绿色，在中性溶液中呈灰色，在酸性溶液中呈红色。

2. 微量凯氏定氮法

(1) 原理

同常量凯氏定氮法。

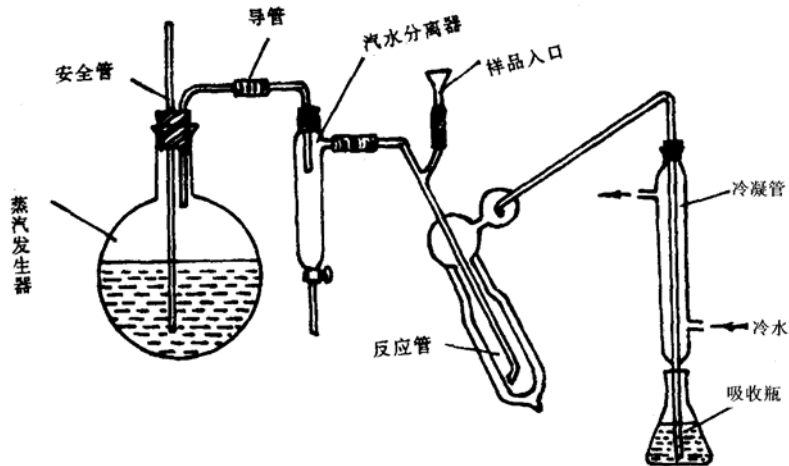


图 10-2 微量凯氏定氮装置

(2) 操作方法

样品消化步骤同常量法。

将消化完全的消化液冷却后，完全转入 100mL 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀。按图 10-2 装好微量定氮装置，准确移取消化稀释液 10mL 于反应管内，经漏斗再加入 10mL 400g/L 氢氧化钠溶液使呈强碱性，用少量蒸馏水洗漏斗数次，夹好漏斗夹，进行水蒸气蒸馏。冷凝管下端预先插入盛有 10mL 40g/L (或 20g/L) 硼酸吸收液的液面下。蒸馏至吸收液中所加的混合指示剂变为绿色开始计时，继续蒸馏 10min 后，将冷凝管尖端提离液面再蒸馏 1min，用蒸馏水冲洗冷凝管尖端后停止蒸馏。

馏出液用 0.01000mol/L 盐酸标准溶液滴定至微红色为终点。同时作一空白试验。

(3) 说明

①蒸馏前给水蒸汽发生器内装水至 2/3 容积处，加甲基橙指示数滴及硫酸数毫升以使其始终保持酸性，这样可以避免水中的氨被蒸出而影响测定结果。

②20g/L 硼酸吸收液每次用量为 25mL，用前加入甲基红-溴甲酚绿混合指示剂 2 滴。

③在蒸馏时，蒸汽发生要均匀充足，蒸馏过程中不得停火断气，否则将发生倒吸。加碱要足量，操作要迅速；漏斗应采用水封措施，以免氨由此逸出损失。

3. 自动凯氏定氮法

所谓自动凯氏定氮法，是将常量凯氏定氮装置组装成具有自动操作功能的一套装置，其原理与试剂与常量法相同，操作方法简述如下。

(1) 称取 0.50~1.00g 样品，置于消化瓶内，加入硫酸铜与硫酸钾制成的片剂两片，加入浓硫酸 10mL，将消化瓶置于红外线消化炉中。消化炉分成两组，每行一组共 4 个消化炉。消化瓶放入消化炉后，用连接管连接密封住消化瓶，开启抽气装置，开启消化炉的电源，30min 后 8 个样品消化完毕，消化液完全澄清并呈绿色。

(2) 取出消化瓶，移装于自动凯氏定氮仪中，接连开启加水的电钮、加碱电钮、自动

蒸馏滴定电钮，开启电源，大约经 12min 后由数显装置即可给出样品总氮百分含量，并记录样品总氮百分比。根据样品的种类选择相应的蛋白质换算系数 F，即可得出样品中蛋白质含量。

(3) 开启排废液电钮及加水电钮，排出废液并对消化瓶清洗一次。

大约在 2h 左右时间内可完成 8 个样品的蛋白质含量测定工作。该法具有灵敏、准确、快速及样品用量少等优点。

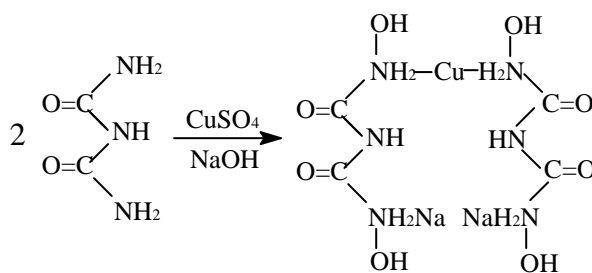
二、双缩脲法

1. 原理

当脲被小心地加热至 150~160℃ 时，可由两个分子间脱去一个氨分子而生成二缩脲(也叫双缩脲)，反应如下：



双缩脲与碱及少量硫酸铜溶液作用生成紫红色的配合物，此反应称为双缩脲反应：



(双缩脲)

(紫红色配合物)

由于蛋白质分子中含有肽键 (-CO-NH-)，与双缩脲结构相似，故也能呈现此反应而生成紫红色配合物，在一定条件下其颜色深浅与蛋白质含量成正比，据此可用吸收光度法来测定蛋白质含量，该配合物的最大吸收波长为 560nm。

2. 方法特点及应用范围

本法灵敏度较低，但操作简单快速，故在生物化学领域中测定蛋白质含量时常用此法。本法亦适用于豆类、油料、米谷等作物种子及肉类等样品测定。

3. 操作方法

①标准曲线的绘制：以采用凯氏定氮法测出蛋白质含量的样品作为标准蛋白质样。按蛋白质含量 40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、110mg 分别称取混合均匀的标准蛋白质样于 8 支 50mL 纳氏比色管中，然后各加入 1mL 四氯化碳，再用碱性硫酸铜溶液准确稀释至 50mL，振摇 10min，静置 1h，取上层清液离心 5min，取离心分离后的透明液于比色皿中，在 560nm 波长下以蒸馏水作参比液调节仪器零点并测定各溶液的吸光度 A，以蛋白质的含量为横坐标，吸光度 A 为纵坐标绘制标准曲线。

②样品的测定。准确称取样品适量(即使得蛋白质含量在 40~110mg 之间)于 50mL 纳氏比色管中，加 1mL 四氯化碳，按上述步骤显色后，在相同条件下测其吸光度 A。用测得的 A 值在标准曲线上即可查得蛋白质毫克数，进而由此求得样品中的蛋白质含量。

4. 结果计算

$$\text{蛋白质 (mg/100g)} = \frac{A \times 100}{A_{\text{标准}}}$$

式中 c ——由标准曲线上查得的蛋白质质量, mg ;
 m ——样品质量, g 。

5. 说明及注意事项

①蛋白质的种类不同,对发色程度影响不大。②标准曲线制作完整后,无需每次再作标准曲线。③含脂肪高的样品应预先用醚抽出弃去。④样品中有不溶性成分存在时,会给比色测定带来困难,此时可预先将蛋白质抽出后再进行测定。⑤当肽链中含有脯氨酸时,若有多量糖类共存,则显色不好,会使测定值偏低。⑥碱性硫酸铜溶液由 0.1mol 氢氧化钾、 5g 酒石酸钾钠、 1.6g 硫酸铜溶于水后加水至 1000mL 配成。

三、紫外吸收法

1. $A_{280\text{nm}}$ 光吸收法

(1) 原理

蛋白质及其降解产物(“月示”、脲、肽和氨基酸)的芳香环残基 $[-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-\text{CO}-]$ 在紫外区内对一定波长的光具有选择吸收作用。在此波长(280nm)下,光吸收程度与蛋白质浓度($3\sim 8\text{mg}/\text{mL}$)成直线关系,因此,通过测定蛋白质溶液的吸光度,并参照事先用凯氏定氮法测定蛋白质含量的标准样所作的标准曲线,即可求出样品蛋白质含量。

(2) 适用范围

本法操作简便迅速,常用于生物化学研究工作;但由于许多非蛋白质成分在紫外光区也有吸收作用,加之光散射作用的干扰,故在食品分析领域中的应用并不广泛,最早用于测定牛乳的蛋白质含量,也可用于测定小麦面粉、糕点、豆类、蛋黄及肉制品中的蛋白质含量。

(3) 操作方法

①标准曲线绘制:准确称取样品 2.00g ,置于 50mL 烧杯中,加入 0.1mol/L 柠檬酸溶液 30mL ,不断搅拌 10min 使其充分溶解,用四层纱布过滤于玻璃离心管中,以 $3000\sim 5000\text{r/min}$ 的速度离心 $5\sim 10\text{min}$,倾出上清液。分别吸取 0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0 、 2.5 、 3.0mL 于 10mL 容量瓶中,各加入 8mol/L 尿素的氢氧化钠溶液定容至标线,充分振摇 2min ,若浑浊,再次离心直至透明为止。将透明液置于比色皿中,以 8mol/L 尿素的氢氧化钠溶液作参比液,在 280nm 波长处测定各溶液的吸光度 A 。

以事先用凯氏定氮法测得的样品中蛋白质的质量为横坐标,上述吸光度 A 为纵坐标,绘制标准曲线。

②样品的测定:准确称取试样 1.00g ,如前处理,吸取的每毫升样品溶液中含有大约 $3\sim 8\text{mg}$ 的蛋白质。按标准曲线绘制的操作条件测定其吸光度,从标准曲线中查出蛋白质的含量。

(4) 结果计算

$$\text{蛋白质质量分数 (\%)} = \frac{c}{m} \times 100$$

式中: c ——从标准曲线上查得的蛋白质质量, mg ;

m ——测定样品溶液所相当于样品的质量, mg 。

(7) 说明及注意事项

①测定牛乳样品时的操作手续:准确吸取混合均匀的样品 0.2mL 于 25mL 纳氏比色管中,用 $95\%\sim 97\%$ 的冰醋酸稀释至标线,摇匀,以 $95\%\sim 97\%$ 冰醋酸为参比液,用 1cm 比色皿于 280nm 处测定吸光度,并用标准曲线法确定样品蛋白质含量(标准曲线以采用凯氏定氮法已测出蛋白质含量的牛乳标准样绘制)。

②测定糕点时,应将表皮的颜色去掉。

③温度对蛋白质水解有影响,操作温度应控制在 $20\sim 30^\circ\text{C}$ 。

2. $A_{260\text{nm}}$ 和 $A_{280\text{nm}}$ 比值法

(1) 原理

凡是有共轭双键的物质，均具有紫外吸收值。因此，若样品中含核酸，则嘌呤、嘧啶两类碱基对蛋白质的测定产生干扰，应加以校正。核酸在 260nm 处的紫外吸收值大于 280nm 处的紫外吸收值，但蛋白质恰恰相反。利用这些性质，通过计算可以适当校正核酸对测定蛋白质浓度的干扰。但是，由于不同的蛋白质和核酸对紫外吸收不同，校正后的测定结果还存在一定的误差。

(2) 测定

取一定量的样品稀释液，分别测出样品的 $A_{280\text{nm}}$ 和 $A_{260\text{nm}}$ ，计算出 $A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ 的比值后，从下表中查出校正因子“F”值，同时可查出该样品内混杂的核酸百分含量。将 F 值代入，由下述公式可直接算出该样品的蛋白质含量：

$$\text{蛋白质含量 (mg/mL)} = F \times 1/d \times A_{280\text{nm}} \times n$$

式中 $A_{280\text{nm}}$ ——该样品液在 280nm 波长下的吸收值；

d——石英杯的厚度 (cm)；

n——样品的稀释倍数。

3. $A_{215\text{nm}}$ 和 $A_{225\text{nm}}$ 的吸收差法

对于蛋白质的稀溶液，由于蛋白质含量低而不能使用 280nm 的光吸收测定，可用 215nm 和 225nm 吸收值之差求算蛋白质浓度。

样品测定：取一定量的样品液，以蒸馏水调零，分别测定 $A_{215\text{nm}}$ 和 $A_{225\text{nm}}$ ，并求出差值 $A_{215\text{nm}} - A_{225\text{nm}}$ ，与蛋白质标准溶液吸收差值作对照，求出样品的蛋白质含量。

本法在 20~100mg/L 蛋白质范围内呈良好线性关系。氯化钠、硫酸铵及 0.1mol/L 磷酸、硼酸和三羟甲基氨基甲烷等缓冲液都无显著干扰作用，但 0.1mol/L 氢氧化钠、0.1mol/L 乙酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、巴比妥等缓冲液，在 215nm 下的吸收较大，必须将其浓度降到 0.005mol/L 才无显著影响。

4. 肽键紫外光测定法

蛋白质溶液在 238nm 下均有光吸收，其吸收强弱与肽键多少成正比，根据这一性质，可测定样品在 238nm 下的吸收值，与蛋白质标准液作对照，求出蛋白质含量。

本法比 280nm 吸收法灵敏。由于醇、酮、醛、有机酸、酰胺类和过氧化物等都具有干扰作用，因此最好用无机酸、无机碱和水作为介质溶液。若含有机溶剂，则可先将样品蒸干，或用其他方法除去干扰物质，然后用水、稀酸或稀碱溶解后再作测定。在 50~500mg/L 蛋白质范围内呈良好线性关系。表 10-2 为紫外分光光度法测定蛋白质含量校正数据表。

表 10-2 紫外分光光度法测定蛋白质含量校正数据表。

280/260	核酸质	因子	280/260	核酸质	因子	280/260	核酸质	因子
	量分数	(F)		量分数	(F)		量分数	(F)
	/%			/%			/%	
1.75	0.00	1.116	1.03	3.00	0.814	0.753	8.00	0.545
1.63	0.25	1.081	0.979	3.50	0.776	0.730	9.00	0.508
1.52	0.50	1.054	0.939	4.00	0.743	0.705	10.00	0.478
1.40	0.75	1.023	0.874	5.00	0.682	0.671	12.00	0.422
1.36	1.00	0.994	0.846	5.50	0.656	0.644	14.00	0.377
1.30	1.25	0.970	0.822	6.00	0.632	0.615	17.00	0.322

1.25	1.50	0.944	0.804	6.50	0.607	0.595	20.00	0.278
1.16	2.00	0.899	0.784	7.00	0.585			
1.00	2.50	0.852	0.767	7.50	0.565			

注：表中的数值是由结晶的酵母烯醇化酶和纯的酵母核酸的吸光度计算得来的。一般，纯蛋白质的吸光度比值（280/260）约为 1.8，而核酸的比值大约为 0.5。

四、福林-酚比色法

1. 原理

蛋白质与福林（Folin）-酚试剂反应，产生蓝色复合物。作用机理主要是蛋白质中的肽键与碱性铜盐产生双缩脲反应，同时也由于蛋白质中存在的酪氨酸与色氨酸同磷钼酸-磷钨酸试剂反应产生颜色。呈色强度与蛋白质含量成正比，是检测可溶性蛋白质含量最灵敏的经典方法之一。

2. 试剂

①福林酚试剂甲：将溶液 A 50mL 和溶液 B 1mL 混合即成。现用现配，过期失效。

溶液 A：1g Na_2CO_3 溶于 50mL 0.1mol/L NaOH 溶液中。

溶液 B：将 1% 硫酸溶液和 20g/L 酒石酸钠（钾）溶液等体积混合而成。

②福林酚试剂乙：在 1.5L 体积的磨口回流瓶中，加入 100g 钨酸钠（ $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）、25g 钼酸钠（ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）以及 700mL 蒸馏水，再加入 50mL 85% 磷酸溶液及 100mL 浓盐酸，充分混合，接上回流冷凝管，以小火回流 10h。回流完毕，加入 150g 硫酸锂、50mL 蒸馏水及数滴液体溴，开口继续沸腾 15min，以便除去过量的溴，冷却后加水定容至 1000mL，过滤，滤液呈微绿色，置于棕色瓶中保存。使用时用氢氧化钠标准溶液滴定，以酚酞作指示剂，最后用蒸馏水稀释（约 1 倍左右），使最终浓度为 1.0mol/L。

① 牛血清蛋白标准溶液：精确称取牛血清蛋白或酪蛋白，配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 溶液。

3. 测定

吸取一定量的样品稀释液，加入试剂甲 3.0mL，置于 25℃ 中水浴保温 10min，再加入试剂乙 0.3mL，立即混匀，保温 30min，以介质溶液调零，测定 $A_{750\text{nm}}$ 值，与蛋白质标准液作对照，求出样品的蛋白质的含量。

本法在 0~60mg/L 蛋白质范围呈良好线性关系。

4. 说明

福林-酚法灵敏度高，实测下限较双缩脲法约小 2 个数量级。但对双缩脲法有干扰的物质对福林酚法的影响更大。酚类及柠檬酸均对本法有干扰。

五、考马斯亮蓝染料比色法

1. 原理

考马斯亮蓝 G-250 是一种蛋白质染料，与蛋白质通过范德华引力结合，使蛋白质染色，在 620nm 处有最大吸收值，可用于蛋白质的定量测定。此法简单而快速，适合大量样品的测定，灵敏度与福林酚法相似，但不受酚类、游离氨基酸和小分子的影响。

2. 试剂

①牛血清蛋白标准液：精确称取牛血清蛋白 10mg，用蒸馏水配成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶

液。

②染料试剂：称取考马斯亮蓝 G-250 (Coomassie brilliant blue G-250) 60mg,溶于100mL3%过氯酸溶液中，滤去未溶解的染料，贮于棕色瓶中。

3.测定

吸取样品稀释液 2mL，加染料试剂 2mL，混匀，以介质溶液调零，测定 A_{620nm} ，与蛋白质标准溶液对照，求出样品蛋白质含量。

本法在 0~100mg/L 蛋白质范围内呈良好的线性关系。

六、染料结合法

1. 原理

在特定条件下，蛋白质可与某些染料（如胺黑 10B 或酸性橙 12 等）定量结合而生成沉淀，用分光光度计测定沉淀反应完成后剩余的染料量可计算出反应消耗的染料量，进而可求得样品中蛋白质含量。

2. 适用范围

本法适用于牛乳、冰淇淋、酪乳、巧克力饮料、脱脂乳粉等食品。

3. 试剂

①柠檬酸溶液：称取柠檬酸（含 1 分子结晶水）20.14g，用水稀释至 1000mL，加入 1.0mL 丙酸（防腐），摇匀后 pH 应为 2.2。

②胺黑 10B 染料溶液：准确称取胺黑 10B 染料 1.066g，用 pH2.2 的柠檬酸溶液定容至 1000mL，摇匀，取出 1mL，用水稀释至 250mL，以水为参比液，用 1cm 比色皿于 615nm 波长处测定吸光度应为 0.320；否则用染料柠檬酸溶液或水进行调节。

4. 操作方法

①样品处理：用组织捣碎机将样品粉碎，准确称取一定量（蛋白质含量在 370~430mg），作标样用时称四份（两份凯氏法、两份染料结合法）。如样品脂肪含量高，用乙醚提取脂肪弃去，然后再作试验。

②染料结合：将脱脂肪后样品全部放入组织捣碎机中，准确加入吸光度为 0.320 的染料溶液 200mL，缓慢搅拌 4min。

③过滤离心：将结合后的样品溶液用铺有玻璃棉的布氏漏斗自然过滤，或用 G₂ 熔结玻璃漏斗抽滤，静置 20min，取上清液 4mL，用水定容至 100mL，摇匀，取出部分溶液离心 5min（2000r/min）。

④比色：取离心后的澄清透明溶液，用 1cm 比色皿，以蒸馏水为参比液于 615nm 波长处测定吸光度。

⑤标准曲线的绘制：用凯氏定氮法测出上述两份平行样品的总氮量，进而计算出用于染料结合法测定的每份平行样的蛋白质含量，以比色测定得到的吸光度（实质是由沉淀反应后剩余的染料所产生的吸光度）为纵坐标（注意数值最好按从上到下吸光度增大的顺序标出），以相应蛋白质含量为横坐标绘图，即得标准曲线。

该标准曲线供分析同类样品蛋白质含量使用。

⑥测样：完全按照上述（1）~（4）步骤进行，根据测出的吸光度在标准曲线上查得蛋白质含量即可。

6. 说明及注意事项

①取样要均匀。②绘制完整的标准曲线可供同类样品长期使用，而不需要每次测样时都作标准曲线。③脂肪含量高的样品，应先用乙醚脱脂，然后再测定。④在样品溶解性能不好

时,也可用此法测定。⑤本法具有较高的经验性,故操作方法必须标准化。⑥本法所用染料还包括橙黄 G 和溴酚蓝等。

七、水杨酸比色法

1. 原理

样品中的蛋白质经硫酸消化而转化成铵盐溶液后,在一定的酸度和温度条件下可与水杨酸钠和次氯酸钠作用生成蓝色化合物,可以在波长 660nm 处比色测定,求出样品含氮量,进而计算出蛋白质含量。

2. 操作方法

①标准曲线的绘制:准确吸取每毫升相当于氮含量 2.5 μg 的标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL,分别置于 25mL 容量瓶或比色管中,分别加入 2mL 空白酸工作液、5mL 磷酸缓冲溶液,并分别加水至 15mL,再加入 5mL 水杨酸钠溶液,移入 36~37℃ 的恒温水浴中加热 15min 后,逐瓶加入 2.5mL 次氯酸钠溶液,摇匀后再在恒温水浴中加热 15min,取出加水至标线,在分光光度计上于 660nm 波长处进行比色测定,测得各标准液的吸光度后绘制标准曲线。

②样品处理:准确称取 0.20~1.00g 样品(视含氮量而定,小麦及饲料称取样品 0.50g 左右),置于凯氏定氮瓶中,加入 15mL 浓硫酸、0.5g 硫酸铜及 4.5g 无水硫酸钠,小火加热至沸腾后,加大火力进行消化。待瓶内溶液澄清呈暗绿色时,不断地摇动瓶子,使瓶壁黏附的残渣溶下消化。待瓶内溶液澄清后取出冷却,移至 25mL 容量瓶中并用水稀释至标线。

③样品测定:准确吸取上述消化好的样液 10mL(如取 5mL 则补加 5mL 空白酸原液),置于 100mL 容量瓶中,并用水稀释至标线。准确吸取 2mL 于 25mL 容量瓶中(或比色管中),加入 5mL 磷酸盐缓冲溶液,以下操作手续按标准曲线绘制的步骤进行,并以试剂空白为参比液测定样液的吸光度,从标准曲线上查出其含氮量。

3. 结果计算

$$\text{总氮质量分数 (\%)} = \frac{c \times K}{m \times 1000 \times 1000} \times 100$$

式中: c——从标准曲线查得的样液的含氮量, μg;

K——样品溶液的稀释倍数;

m——样品的质量, g。

蛋白质 (%) = 总氮 (%) × F (蛋白质系数, 同凯氏定氮法)

4. 说明

①样品消化完全后当天进行测定结果的重现性好,但样液放至第二天比色即有变化。②温度对显色影响极大,故应严格控制反应温度。③对谷物及饲料等样品的测定证明,此法结果与凯氏法基本一致。④试剂配制请参考黄伟坤等编著《食品检验与分析》书。

八、红外光谱法

1. 原理

红外光谱法测定由食品或其他物质中分子引起的辐射吸收(近红外、中红外、远红外区)。食品中不同的功能基团吸收不同频率的辐射。对于蛋白质和多肽,多肽键在中红外波段(6.47 μm)和近红外(NIR)波段(如 3300~3500nm, 2080~2220nm, 1560~1670nm)的特征吸收可用于测定食品中的蛋白质含量。针对所要测的成分,用红外波长光辐射样品,通过测

定样品反射或透射光的能量（反比于能量的吸收）可以预测其成分的浓度。

2. 应用

红外牛乳分析仪采用中红外光谱法测定牛乳蛋白质含量，同时近红外光谱仪也广泛应用于食品蛋白质的分析中（如谷物、谷类制品、肉类和乳制品中）。这些仪器非常昂贵，且多须经适当的调试。但分析人员只需经最低程度的培训就可以快速分析样品（30s~2min）。

九、4,4'-二羧基-2,2-联喹啉，BCA(Bicimchonic Acid)法

1. 原理

Smith 等人提出，在碱性条件下蛋白质将铜离子，亚铜离子-蛋白质复合物和苹果绿的 BCA 试剂反应形成浅紫色。反应形成颜色的深浅与一定范围内蛋白质浓度成正比。

2. 方法

(1) 蛋白质溶液和含有 BCA 钠盐、 Na_2CO_3 、 NaOH 、 CuSO_4 、pH 11.25 的 BCA 试剂一步混合；

(2) 在 37°C 保温 30min 或室温下放置 2h，或 60°C 保温 30 min。温度的选择取决于灵敏度的要求。较高的温度导致较深的颜色反应；

(3) 在 562nm 处比色读数，并做空白比较；

(4) 用 BSA（牛血清白蛋白）作标准曲线。

3. 应用

BCA 法已经应用于蛋白质的分离和纯化中。此法对测定复杂食品体系中蛋白质的适用性还未见报道。

优点：①灵敏度与福林酚法相似。微量 BCA 法的灵敏度（ $0.5\sim 10\mu\text{g}$ ）稍高于福林酚法；②一步混合的操作比福林酚法更简单；③所用试剂比福林酚法简单；④非离子型表面活性剂和缓冲液不对反应产生干扰；⑤中等浓度的变性剂（ 4mol/L 盐酸胍或 3mol/L 尿素）不对反应产生干扰。

缺点：①反应产生的颜色不稳定，需要仔细地控制比色时间；②还原糖会对此反应产生的干扰比对福林酚法更大；③不同蛋白质反应引起的颜色变化与福林酚法相似；④比色的吸光度与蛋白质浓度不成线性关系。

十、比浊法

1. 原理

低浓度（3%~10%）的三氯乙酸、磺基水杨酸和乙酸中的铁氰化钾能使提取的蛋白质沉淀形成蛋白质颗粒的悬浊液。其浊度可由辐射光传送过程中的衰减而确定，辐射光传送过程中的衰减是由于蛋白质颗粒的散射造成的，辐射光衰减的程度与溶液中的蛋白质浓度成正比。

2. 方法

测定小麦蛋白质的常规方法为磺基水杨酸法，具体方法如下所述：①小麦面粉用 0.05mol/L 氢氧化钠溶液萃取；②溶碱液的蛋白质从不溶性原料中离心分离；③磺基水杨酸和蛋白质溶液混合；④在 540nm 处测定其浊度，并扣去空白；⑤蛋白质的含量可根据凯氏定氮法校正过的标准曲线来计算。

3. 应用

比浊法已经用于测定小麦面粉和玉米的蛋白质含量。

优点：①快速，可在 15min 内完成；②测定结果不包括除了核酸外的非蛋白质含量。

缺点：①不同的蛋白质沉淀的速率不同；②浊度随酸试剂浓度的不同而变化；③核酸也能被酸试剂沉淀。

十一、杜马斯法（燃烧法）

1. 原理

样品在高温下（700~800℃）燃烧，释放的氮气由带热导检测器（TCD）的气相色谱仪测定。测得的氮含量转换成样品中的蛋白质含量。

2. 方法

样品（100~500mg）称量后置于样品盒中，放入具有自动装置的燃烧反应器中，释放的氮气由内置的气相色谱仪测定。

3. 应用

燃烧法适用于所种类的食品，AOAC 方法 992.15 和 992.23 分别用于肉类和谷物食品。

优点：①燃烧法是凯氏定氮法的一个替代方法；②不需要任何有害化合物；③可在 3min 内完成；④最先进的自动化仪器可在无人看管状态下分析多达 150 个样品。

缺点：①需要的仪器价格昂贵；②非蛋白氮也包括在内。

第四节 蛋白质的末端测定

一、N-末端测定—丹磺酰化法

1. 原理

蛋白质的 α -氨基与丹磺酰氯（DNS-Cl）反应，生成 DNS-蛋白质，经水解可生成 DNS-氨基酸。通过分析 DNS-氨基酸，可确定蛋白质的 N-末端氨基酸。

2. 操作步骤

(1)氨基酸的丹磺酰化

分别称取 2.3 μ mol 层析纯的各种氨基酸，溶于 0.5mL 0.2mol/L 磺酸氢钠溶液中。取 0.1mL 于具塞玻璃试管中，加入 0.1mL DNS-Cl 丙酮溶液，检查 pH，必要时用三乙胺调 pH 9.0~9.5，于室温（25℃左右）下放置 2~4h。再用去离子水稀释 10 倍，贮存于暗处。经层析，得 DNS-氨基酸的标准图谱。

(2)蛋白质 N-末端氨基酸的 DNS 化

取 0.5mg 蛋白质（胰岛素 B 链或其他纯蛋白质）样品，置于具塞玻璃试管中。用少量水溶解后，加入 0.5mL 0.2mol/L 碳酸氢钠溶液。再加入 0.5mL DNS-Cl 丙酮溶液（称取丹磺酰氯 250mg 溶于 100mL 丙酮之中，贮于棕色瓶，置冰箱保存，一个月内稳定。），用三乙胺（重蒸后）调至 pH 9.0~9.5，塞好塞子，于 40℃烘箱中反应 2h，或室温（25℃左右）放置 2~4h，生成 DNS-蛋白质。

(3)DNS-蛋白质的水解

DNS 化反应结束后，真空蒸去丙酮，加入 0.5mL 6mol/L 盐酸溶解 DNS-蛋白质。全部移入水解管，抽真空封管，于 110℃烘箱中水解 18~24h。开管后蒸去盐酸，加少量水，再蒸干。重复 2~3 次以除尽盐酸。

(4)DNS-氨基酸的抽提

将上述水解产物，加 0.5mL 水，用 1mol/L 盐酸调至 pH2~3。加入 0.5mL 乙酸乙酯抽提，分层可在细长滴管中进行。重复抽提 2~3 次，将上层抽提液合并于小试管中，抽去乙酸乙酯，置于干燥器中备用。

(5)DNS-氨基酸的层析与检测

样品生成的 DNS-氨基酸和标准 DNS-氨基酸分别进行聚酰胺薄膜层析。

将图谱用 360nm 或 280nm 波长的紫外灯检测。比较样品 DNS-氨基酸和 DNS-氨基酸的层析图谱，从而确定蛋白质样品的 N-末端氨基酸。（若用胰岛素 B 链，其 N-末端氨基酸为苯丙氨酸。）

二、蛋白质及多肽 C-末端测定及顺序分析（羧肽酶法）

1. 原理

蛋白质或多肽及其裂解片段，一般均先进行末端基测定，然后再进行顺序分析，C-末端的测定方法很多，如化学法中的胍解法、还原法、乙内酰硫脲法、同位素标记法以及羧肽酶法等。通常 C-末端基的测定要比 N-末端基的测定困难，特别是 C-末端基的化学测定法效果较差。目前普遍采用羧肽酶法进行 C-末端基的测定及 C 端氨基酸顺序分析，故羧肽酶法至今仍是测定肽链 C 端比较有效的手段。羧肽酶是一类外肽酶，这些酶与蛋白质或多肽作用时，能从 C-末端氨基酸残基开始顺序降解，并逐个释放出游离 C 端氨基酸。

目前常用的羧肽酶有羧肽酶-A、羧肽酶-B、羧肽酶-C 和羧肽酶-Y（分别简称 CPA、CPB、CPC 和 CPY），其中 CPA 使用最广泛。也有将 CPA 与 CPB 混合作用，以此扩大酶解作用的范围，效果较好。CPY 则具有更广的作用范围，包括释放 C-末端 Pro 的特殊功能，因此，它适用于降解所有的氨基酸，在多肽或蛋白质的结构研究中是一种非常重要的工具酶。

蛋白质或多肽在羧肽酶的作用下，被逐步降解及释放的氨基酸种类和数目随时间而发生变化，将经过一定间隔时间反应的样品分别取出，进行酸化失活处理后可用自动分析仪或 HPLC 仪进行快速测定，根据不同时间取样的分析结果便能初步确定 C-末端基为何种氨基酸。若以酶作用时间为横坐标，对所释放的各氨基酸量（mol/L）为纵坐标作图，然后根据氨基酸释放的动力学曲线即可进一步判断和确定肽链 C 端的氨基酸顺序。

在用羧肽酶测定 C-末端基时，关键在于测出第一个释放的为何种氨基酸，如果 C 端第一个氨基酸残基降解的速率很慢，而第二个残基降解的速率则非常快时，这样就很容易得出错误的结论。一般最好采用两种以上 C-末端测定方法，进行比较和验证才稳妥可靠。由于酶解反应是连续进行的，很难加以控制。如果几个氨基酸以相近的速率降解时，以及几个相同的氨基酸顺序毗邻排列时，结果就难以确定。这些都是 C-末端分析的缺点，有待改进和完善。

2. 试剂

①羧肽酶 Y（-20℃保存）

②牛胰核糖核酸酶 A（RNase A）

③降解缓冲液（又称消化液）称取 1g 纯 SDS 和 1.312g 亮氨酸，定容于 100mL 0.1mol/L 吡啶-醋酸缓冲液中（pH 5.6）

3. 操作步骤

(1)酶液和样品溶液的制备

①酶液的配制

将 1mgCPY 溶于 0.5mL 0.1mol/L 吡啶-醋酸缓冲液中（pH5.6），每次均必须临用前配制。

②样品溶液的准备

称取适量 RNaseA 或其他蛋白质，加降解缓冲液溶解，配制成 0.1~0.2 μmol/L 蛋白质样品溶液。然后置于 60℃ 恒温水浴箱中保温 20min，使蛋白质变性（小肽或肽片段无须进行变性处理），冷却至室温备用。

(2) 样品的酶解

取上述蛋白质样品溶液 200 μL 放入干净的具塞试管中，留下 25 μL 样品于另一干净小试管中作空白对照用。然后向样品液中加入 5 μL CPY 酶液，迅速混匀并开始计算反应时间，盖上塞子后室温放置或于 25℃ 恒温水浴中进行酶解反应。按一定时间间隔（如 1min, 2min, 5min, 10min, 20min, 30min 及 1h 等）分别快速取出 25 μL 酶解液放入小离心管中，为了终止酶解反应，立即加入 5 μL 冰醋酸到取出的样品液中，混匀。或用 1mol/L HCl 溶液酸化至 pH 2.0，再加热 5min（60℃ 以上），使 CPY 彻底失活。低温离心除去沉淀，上清液留待进行氨基酸分析。

(3) 氨基酸分析

取上清液用自动氨基酸分析仪进行氨基酸定性或定量测定。若不能立即分析，必须将上清液样品冷却干燥后，置 1~20℃ 低温冰箱中保存。如果再取出无需另作处理，可按氨基酸分析仪灵敏度配制溶液上样直接进行测定。样品中含有少量 SDS 既不影响洗脱曲线的图形也不损害氨基酸分析仪。

在进行蛋白质或多肽 C-末端氨基酸顺序分析时，鉴于操作上或其他原因，往往会出现被分析的各个氨基酸的实际释放量与测定值有偏差。为了比较准确测定在规定酶解时间内所释放的每个氨基酸摩尔数，通常在酶解液中加入一种已知量（mol/L）的非蛋白质氨基酸类似物作为内标，即用亮氨酸来进行校正，可按下列公式进行计算：

$$\text{释放的氨基酸实际值} = \frac{\text{亮氨酸实际值}}{\text{释放的氨基酸测定值} \times \text{亮氨酸测定值}}$$

4. 实验结果

① 动力曲线的绘制

依据自动氨基酸分析仪测定所提供的数据，以酶解时间为横坐标，对不同时间所释放的各种氨基酸相应的量（mol/L）为纵坐标作图，绘制出氨基酸释放的动力学曲线图。

② C-末端分析结果

根据上述氨基酸释放的动力学曲线分析，判断和确定被测蛋白质的 C-末端为何种氨基酸，并写出其 C-端氨基酸排列顺序。

第五节 氨基酸的定性测定

一、氨基酸的一般显色反应

本节介绍三种显色反应：茚三酮法、吲哚醌法和邻苯二甲醛法。前二种是经典的常用显色法，后一种是近年来发展起来的荧光显色法，具有灵敏度高的特点。

1. 茚三酮法

显色方法有下列数种：

① 常用法：将点有样品的层析或电泳完毕的滤纸充分除尽溶剂，用 5g/L 茚三酮无水丙酮溶液喷雾，充分吹干，置 65℃ 烘箱中约 30min（温度不宜过高，避免空气中氨，以免背

景泛红色), 氨基酸斑点呈紫红色。

为了使各种氨基酸呈现不同颜色, 可用下列方法:

②用 0.4g 茚三酮, 10g 酚和 90g 正丁醇的混合液显色。

③用 1g/L 茚三酮无水丙酮溶液显色完毕后, 再用盐酸蒸汽熏 1min。

④用 1g 茚三酮, 600mL 无水乙醇, 200mL 冰醋酸及 80mL 2,4,6-三甲基吡啶混合液 80℃染色 5~10min。

为了使显色稳定, 可用下列方法:

⑤配制含醋酸镉 2g 加蒸馏水 200mL 及冰醋酸 40mL 的贮存液。将上述贮存液加 200mL 丙酮及 2g 茚三酮, 即为显色液。点有样品的滤纸上浸有此显色液后, 放置于盛有一小杯浓硫酸的密闭玻璃容器中, 25℃, 18h, 或较高温度下适当缩短时间。背景色浅, 氨基酸斑点也比较稳定。

⑥用含 2g/L CoCl_2 (或 CuSO_4) 的 4g/L 茚三酮异丙酮溶液显色时, 氨基酸斑点呈红色, 也可在茚三酮显色后喷以含钴、镉或铜等无机离子的异丙醇溶液, 斑点自蓝紫色变成红色。

2. 吡啶醌法

(1) 原理

各种氨基酸与吡啶醌试剂能显示不同颜色, 因此可借此辨认氨基酸。氨对吡啶醌显色没有妨碍, 但其灵敏度较茚三酮法稍差, 显色不稳定, 颜色只有在绝对干燥的环境中才能保存。

(2) 试剂

①显色剂: 1g 吡啶醌溶于 100mL 乙醇及 10mL 冰醋酸中 (若冰醋酸用量减少则灵敏度稍差)。

②底色褪色剂: 在 100mL 200g/L 碳酸钠溶液中加入 60g 硅酸钠 ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 在水浴 (60~70℃) 中加热搅拌直至完全溶解, 待溶液比较清澈为止。在溶解过程中, 有时硅酸钠会结成凝胶, 此时只需继续搅拌即可溶解。配制时若硅酸钠用量多则褪色较快, 但背景容易变黄, 硅酸钠用得少 (40g), 虽褪色较慢, 但背景较为洁白。

显色步骤

层析或电泳后滤纸烘干后, 仔细喷上或涂上显色剂, 用电吹风迅速吹干, 待醋酸气味不太刺鼻时移置 100℃烘箱烘 5~15min, 直至显色为止 (温度不要太高, 以免引起减色) 注意观察所显出的颜色, 然后均匀地涂上底色褪色剂, 纸的背景即由黄色变为绛红而后逐渐变浅, 待黄色背景几乎褪尽时, 迅速用电吹风吹干, 并随时观察颜色的变化。例如苏氨酸在褪色前为浅红带褐色, 褪色后则呈橙黄色或黄色; 脯氨酸在褪色前为蓝色, 吹干时很快褪成无色。室温较低时, 底色褪色很慢, 此时可将褪色剂加温到 30~40℃。温度过高也不宜, 因氨基酸斑点的褪色速度也同时加快, 应该避免。

其他显色步骤: 显色剂为 1g 吡啶醌, 1.3g 醋酸锌溶解于 70~80mL 热异丙醇中, 冷却后加 1mL 吡啶。或者 1g 吡啶醌, 1.5g 醋酸锌溶解于 95mL 热异丙醇中, 加 3mL 水, 冷却后加 1mL 冰醋酸。点有样品的滤纸仔细喷以显色剂后, 80~85℃放置 10min, 背景可用水迅速浸洗去而不使氨基酸斑点退去

由于吡啶醌试剂配制方法不同, 对同一种氨基酸所显颜色往往也有差异。

3. 邻苯二甲醛法

邻苯二甲醛法是目前纸上层析、硅胶薄层层析荧光显色氨基酸最灵敏的方法之一, 也可用于氨基酸溶液定量, 并推广应用于乙内酰苯硫脲氨基酸、多肽和蛋白质的检出和定量。根据文献报道, 氨基酸纸上层析灵敏度达 $0.5 \mu\text{mol}$, 在硅胶薄层层析上为 $0.05 \sim 0.2 \mu\text{mol}$ 。这里介绍在纸上层析显现氨基酸方法。(荧光胺是另一种常用的荧光试剂, 由于荧光胺来源

比较困难，这里未作介绍)

(1) 原理

邻苯二甲醛在 2-巯基乙醇存在下，在碱性溶液中与氨基酸作用产生荧光化合物，最适的激发光和发射光波长分别为 340nm 和 455nm。

各种氨基酸显现的荧光强度不同，其相对荧光强度由大到小大致顺序如下：天门冬氨酸，异亮氨酸，甲硫氨酸，精氨酸，组氨酸，亮氨酸，丝氨酸，缬氨酸，谷氨酸，苏氨酸，甘氨酸，色氨酸，丙氨酸，苯丙氨酸，赖氨酸，酪氨酸， NH_3 ，脯氨酸和半胱氨酸。

(2) 试剂

邻苯二甲醛显色液：取 0.1g 邻苯二甲醛，0.1mg 巯基乙醇，1mL 三乙胺，加丙酮+石油醚（60℃~90℃）(1+1) 的混合溶剂至 100mL。放置 0.5h 后使用。

显色步骤

将含有氨基酸样品的滤纸浸入邻苯二甲醛显色液中 1min，冷风吹干，在温度 18℃ 以下，湿度 50%~90% 之间显色 0.5h，于紫外灯下观察荧光点。

说明

在滤纸上显现氨基酸时，邻苯二甲醛浓度以 0.1% 为宜。显色时必须有一定的湿度，以便氨基酸溶解，提高分子碰撞机率，并使极性基团解离，促进反应趋于完全。湿度太低，显不出荧光。温度对显现的荧光延时有显著影响，温度高荧光延时短，温度低荧光延时长。

二、个别氨基酸的显色反应

利用个别氨基酸与某些试剂具有特殊的显色反应定性氨基酸。可应用于纸层析和纸电泳显色，也可单独应用。方法很多，仅将常用的方法介绍如下：

1. 精氨酸的显色——坂口 (Sakaguchi) 反应

(1) 第一种方法

试剂：①5g 尿素溶解于 100mL 0.1g/L α -萘酚乙醇中。使用前，每 100mL 加约 5g KOH。
②0.7mL 溴水溶解于 100mL 5%NaOH 中。

显色步骤：在点有样品的滤纸上喷试剂①后，在空气中吹几分钟，再喷试剂②。精氨酸或含精氨酸的多肽显红色。此试剂对含精氨酸的蛋白质也适用。

(2) 第二种方法：

试剂：①1g/L 8-羟基喹啉的丙酮溶液。②0.02mL 溴水溶解于 100mL 0.5mol/L NaOH 溶液中。

显色步骤：将点有样品的滤纸烘干后，喷上试剂①，吹干后，再喷试剂②。精氨酸或其他胍类物质显桔红色。

2. 胱氨酸和半胱氨酸的显色

试剂：①1.5g 亚硝基铁氰化钠 ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶于 5mL 2mol/L H_2SO_4 溶液中，加 95mL 甲醇。此时会有沉淀产生，可保存一个月以上。使用时在每 100mL 上述溶液中加入 10mL 28% 氨水，过滤除去沉淀，清液仅能保持一天左右。②2g 氰化钠溶于 5mL 水中，然后加 95mL 甲醇。此时有沉淀产生，使用时只需摇匀即可。

显色步骤：半胱氨酸的显色：在滤纸上喷以试剂①的清液，5min 后半胱氨酸显红色。
胱氨酸的显色：先将滤纸浸入试剂②，迅速取出，稍等片刻再喷试剂甲的清液，5min 后胱氨酸显红色。也可以把试剂②配制的浓度增加一倍，在显色前混和，再喷到滤纸上。

3. 甘氨酸的显色

试剂：0.1g 邻苯二甲醛溶于 100mL 77% 乙醇中。

显色步骤：点有样品的滤纸喷上试剂，甘氨酸显墨绿色，在汞灯（365nm）下显巧克力棕色。吡啶醌显色后，再用此试剂仍有效。以甘氨酸为 N 端的小肽也能显色，但其 N 端被保护后，以及其他氨基酸均不显色。

4. 脯氨酸的显色

试剂：1g 吡啶醌和 1.5g 醋酸锌，1mL 醋酸，5mL 蒸馏水混和，再加入 95mL 异丙醇。新鲜配制。

显色步骤：层析滤纸除尽溶剂，喷上以上试剂，80℃~85℃烘箱内放置 30min，脯氨酸显蓝色，再以 30℃温水漂洗除去多余的试剂后，背景为白色或浅黄色。

也可剪下脯氨酸斑点，在试管中加入 5mL 水饱和酚，在黑暗中洗脱 15min，间歇振摇，于 610nm 测定其吸光度。从已知标准曲线即可求得样品内脯氨酸含量，测定范围 5~20 μg。

5. 丝氨酸和羟赖氨酸的显色

试剂：①0.035mol/L 过碘酸钠（748mgNaIO₄溶于数毫升甲醇中，加 2 滴 6mol/L 盐酸，再用甲醇稀释至 100mL）。②15g 醋酸铵加 0.3mL 冰醋酸，加 1mL 乙酰丙酮，用甲醇稀释到 100mL。

显色步骤：点有样品的滤纸吹干，先喷试剂①，近干后再喷试剂②，室温放置 2h，紫外灯下照射 0.5h，丝氨酸和羟赖氨酸呈黄色斑点，在紫外线下都有荧光。

6. 羟脯氨酸的显色

试剂：①1g 吡啶醌溶于 100mL 乙醇及 10mL 冰醋酸。②1g 对二甲胺苯甲醛溶于 100mL 的丙酮浓盐酸（9+1）混合液中。（此试剂不稳定，隔数日后溶液颜色加深发黑，灵敏度降低，故用时新鲜少量配制。

显色步骤：将待鉴定的溶液点于小方块纸上，干后先点上试剂①，热风吹干。这时纯羟脯氨酸呈墨绿色，纯脯氨酸呈深蓝色（极灵敏），对其他氨基酸呈程度不同的紫红色（不太灵敏）；然后再点上试剂②吹干，如溶液中含有羟脯氨酸即转变为玫瑰红色，而其他氨基酸与吡啶醌所生成的颜色则褪去。

7. 色氨酸的显色

(1)第一种方法

试剂：1g 对二甲氨基苯甲醛加 90mL 丙酮，10mL 浓盐酸。新鲜配制。

显色步骤：点有样品的滤纸干燥后，喷上以上试剂，在室温下放置几分钟后，色氨酸显蓝色或紫红色。茚三酮显色后，仍可使用本法。

(2)第二种方法：

试剂：10mL 35% 甲醛加 10mL 25% 盐酸，20mL 无水乙醇。

显色步骤：点有样品的滤纸喷上以上试剂后，100℃烘 5min，色氨酸在长波长紫外光下呈现荧光（黄-橙-带绿色）。

8. 酪氨酸的显色

试剂：①0.1% α-亚硝基 β-萘酚的 95% 乙醇溶液。②10% 硝酸水溶液。

显色步骤：点有样品的滤纸喷上试剂①后，吹干，再喷试剂②，然后在 100℃烘 3min，酪氨酸或含酪氨酸的多肽在浅灰绿色的背景上显红色，0.5h 后转变为桔红色，其后渐退去。

灵敏度 1~2 μg 酪氨酸。茚三酮显色后，再用此试剂处理，仍能显色，茚三酮所显出的紫红色斑点变成红色。

9. 酪氨酸和组氨酸的显色——pauly 反应

试剂：①4.5g 对氨基苯磺酸与 45mL 12mol/L 盐酸共热溶解，以蒸馏水稀释至 500mL。用时取出 30mL，在 0°C 与等体积的 5% 亚硝酸钠水溶液相混合。（室温放置太长会失效）
②10% 碳酸钠水溶液。

显色步骤：点有样品的滤纸上喷试剂①，片刻后再喷试剂②。组氨酸及含组氨酸的多肽显桔红色；酪氨酸及含酪氨酸的多肽显浅红色。

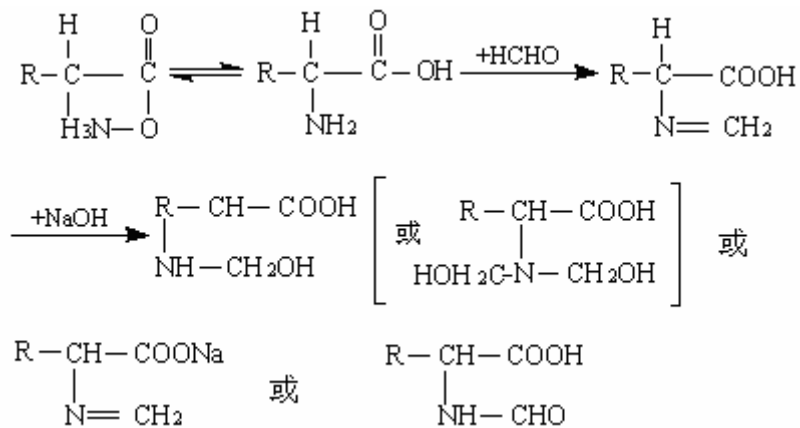
第六节 氨基酸定量测定

一、氨基酸的一般定量测定

(一) 甲醛滴定法

1. 原理

氨基酸具有酸性的-COOH 基和碱性的-NH₂ 基。它们相互作用而使氨基酸成为中性的内盐。当加入甲醛溶液时，-NH₂ 基与甲醛结合，从而使其碱性消失。这样就可以用标准强碱溶液来滴定-COOH 基，并用间接的方法测定氨基酸总量。反应式（有三种不同的推论）如下：



2. 方法特点及应用

此法简单易行、快速方便，与亚硝酸氮容量法分析结果相近。在发酵工业中常用此法测定发酵液中氨基氮含量的变化，来了解可被微生物利用的氮源的量及利用情况，并以此作为控制发酵生产的指标之一。脯氨酸与甲醛作用时产生不稳定的化合物，使结果偏低；酪氨酸含有酚羧基，滴定时也会消耗一些碱而致使结果偏高；溶液中若有铵存在也可与甲醛反应，往往使结果偏高。

3. 操作方法

吸取含氨基酸约 20mg 的样品溶液于 100mL 容量瓶中，加水至标线，混匀后吸取 20.0mL 置于 200mL 烧杯中，加水 60mL，开动磁力搅拌器，用 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定至酸度计指示 pH8.2，记录消耗氢氧化钠标准溶液 mL 数，供计算总酸含量。

加入 10.0mL 甲醛溶液，混匀。再用上述氢氧化钠标准溶液继续滴定至 pH9.2，记录消耗氢氧化钠标准溶液毫升数。

同时取 80mL 蒸馏水置于另一 200mL 洁净烧瓶中，先用氢氧化钠标准溶液调至 pH8.2，（此时不计碱消耗量），再加入 10.0mL 中性甲醛溶液，用 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定至 pH9.2，作为试剂空白试验。

4. 结果计算

$$\text{氨基酸态氮质量分数 (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.014}{m \times 20 / 100} \times 100$$

式中：V₁——样品稀释液在加入甲醛后滴定至终点（pH9.2）所消耗氢氧化钠标准溶液的体积，mL；

V₂——空白试验加入甲醛后滴定至终点所消耗的氢氧化钠标准溶液的体积，mL；

c——氢氧化钠标准溶液的浓度，mol/L；

m——测定用样品溶液相当于样品的质量，g；

0.014——氮的毫摩尔质量，g/mmol。

5. 说明

①本法准确快速，可用于各类样品游离氨基酸含量测定。②浑浊和色深样液可不经处理而直接测定。

(二)茚三酮比色法

1. 原理

氨基酸在碱性溶液中能与茚三酮作用，生成蓝紫色化合物（除脯氨酸外均有此反应），可用吸光光度法测定。

该蓝紫色化合物的颜色深浅与氨基酸含量成正比，其最大吸收波长为 570nm，故据此可以测定样品中氨基酸含量。

2. 操作方法

(1)标准曲线绘制

准确吸取 200 μg/mL 的氨基酸标准溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mL（相当于 0、100、200、300、400、500、600 μg 氨基酸），分别置于 25mL 容量瓶或比色管中，各加水补充至容积为 4.0mL，然后加入茚三酮溶液（20g/L）和磷酸盐缓冲溶液（pH 为 8.04）各 1mL，混合均匀，于水浴上加热 15min，取出迅速冷至室温，加水至标线，摇匀。静置 15min 后，在 570nm 波长下，以试剂空白为参比液测定其余各溶液的吸光度 A。以氨基酸的微克数为横坐标，吸光度 A 为纵坐标，绘制标准曲线。

(2)样品测定

吸取澄清的样品溶液 1~4mL，按标准曲线制作步骤，在相同条件下测定吸光度 A 值，用测得的 A 值在标准曲线上可查得对应的氨基酸微克数。

3. 结果计算

$$\text{氨基酸含量 (mg/100g)} = \frac{c}{m \times 100} \times 100$$

式中：c——从标准曲线上查得的氨基酸的质量数，μg；

m——测定的样品溶液相当于样品的质量，g。

4. 说明及注意事项

①通常采用的样品处理方法为：准确称取粉碎样品 5~10g 或吸取样液样品 5~10mL，置于烧杯中，加入 50mL 蒸馏水和 5g 左右活性炭，加热煮沸，过滤，用 30~40mL 热水洗

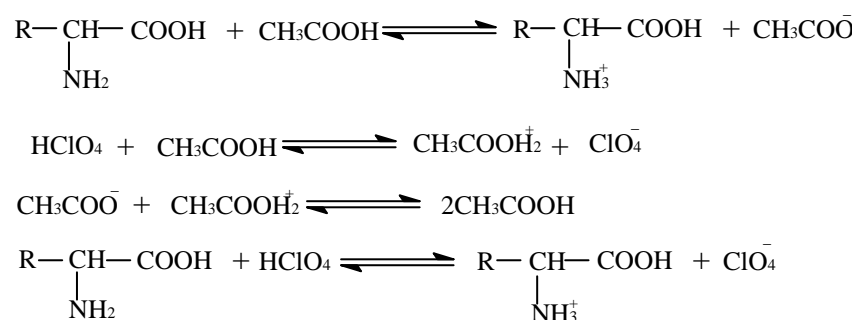
涤活性炭，收集滤液于 100mL 容量瓶中，加水至标线，摇匀备测。

②茚三酮受阳光、空气、温度、湿度等影响而被氧化呈淡红色或深红色，使用前须进行纯化，具体操作可参阅黄伟坤等编著《食品检验与分析》。

(三)非水溶液滴定法

1. 原理

氨基酸的非水溶液滴定法是氨基酸在冰醋酸中用高氯酸的标准溶液滴定其含量。根据酸碱的质子学说：一切能给出质子的物质为酸，能接受质子的物质为碱；弱碱在酸性溶剂中碱性显得更强，而弱酸在碱性溶剂中酸性显得更强，因此本来在水溶液中不能滴定的弱碱或弱酸，如果选择适当的溶剂使其强度增加，则可以顺利地滴定。氨基酸有氨基和羧基，在水中呈现中性，而在冰醋酸中就能接受质子显示出碱性，因此可以用高氯酸等强酸进行滴定。



本法适合于氨基酸成品的含量测定。允许测定的范围是几十毫克的氨基酸

2. 测定

(1)直接法（适用于能溶解于冰醋酸的氨基酸）：精确称取氨基酸样品 50mg 左右，溶解于 20mL 冰醋酸中，加 2 滴甲基紫指示剂，用 0.100mol/L 高氯酸标准液滴定（用 10mL 体积的微量滴定管），终点为紫色刚消失，呈现蓝色。空白管为不含氨基酸的冰醋酸液，滴定至同样终点颜色。

(2)回滴法（适用于不易溶解于冰醋酸而能溶解于高氯酸的氨基酸）：精确称取氨基酸样品 30~40mg 左右，溶解于 5mL 0.1mol/L 高氯酸标准溶液中，加 2 滴甲基紫指示剂，剩余的酸以醋酸钠溶液滴定，颜色变化由黄，经过绿、蓝至初次出现不褪的紫色为终点。

3. 说明

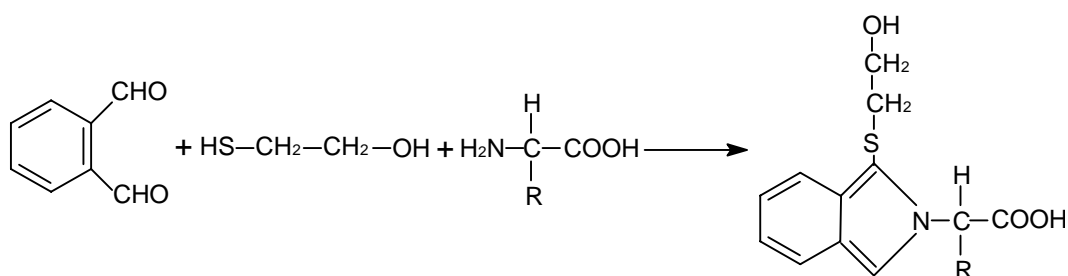
(1)能溶解于冰醋酸的氨基酸，可以用直接法测定的有：丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和苏氨酸。不易溶解于冰醋酸，但能溶解于高氯酸可以回滴法测定的有：赖氨酸、丝氨酸、胱氨酸和半胱氨酸。

(2)谷氨酸和天冬氨酸在高氯酸溶液中也不能溶解，可以将样品溶解于 2mL 甲酸中，再加 20mL 冰醋酸，直接用标准的高氯酸溶液滴定。

(四)邻苯二甲醛法(OPT 法)

1. 原理

邻苯二甲醛在 2-巯基乙醇存在下，于碱性溶液中与氨基酸作用产生荧光化合物，最适的激发光和发射光波长分别为 340 和 455nm。可能产物为：

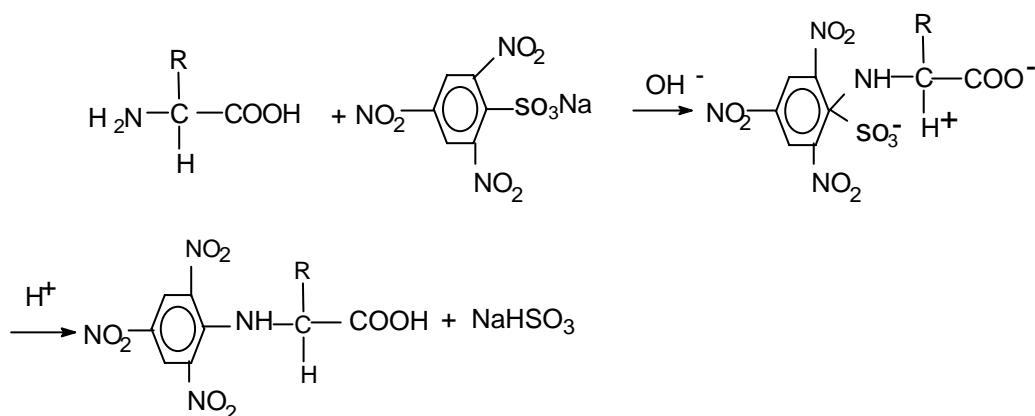


各种氨基酸显现的荧光强度不同,其相对荧光强度由大到小大致顺序如下:天门冬氨酸,异亮氨酸,甲硫氨酸,精氨酸,组氨酸,亮氨酸,丝氨酸,缬氨酸,谷氨酸,苏氨酸,甘氨酸,色氨酸,丙氨酸,苯丙氨酸,赖氨酸,酪氨酸, NH_3 , 脯氨酸, 和半胱氨酸。

本法可用于测定游离氨基酸的含量。灵敏度较茚三酮法约高 100 倍以上,可测到 $0.1 \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol}$ 氨基酸。如用于血清中 α -氨基氮的测定,每次血清用量只需 $5 \sim 10 \mu\text{L}$ 。与另一种荧光试剂(荧光胺)一样,空白无荧光,只有与氨基酸结合才产生荧光。缺点是与脯氨酸不产生荧光,邻苯二甲醛与半胱氨酸荧光值太低。荧光胺已有用于氨基酸自动分析定量分析,但由于试剂昂贵及个别氨基酸反应不满意,目前还未普遍应用。

(五)三硝基苯磺酸法

三硝基苯磺酸(TNBS)是定量测定氨基酸的重要试剂之一。TNBS 在偏碱性的条件下与氨基酸反应,先形成中间络合物,如下式所示:



中间络合物在光谱上有二个吸收值相近的高峰,分别位于 355nm 和 420nm 附近。然而溶液一旦酸化,中间络合物转化成三硝基苯-氨基酸(TNP-氨基酸),420nm 处的吸收值显著下降,而 350nm 附近的吸收峰则移至 340nm 处。

利用 TNBS 与氨基酸反应的这一特性,可在 420nm 处(偏碱性溶液中)或在 340nm (偏酸性溶液中)对氨基酸进行定量测定。下表列出各种氨基酸与 TNBS 反应后在不同条件下测定的吸光度。在 340nm 处,各氨基酸的吸收度大致相近,而在 420nm 处的吸光度因氨基酸种类而异;在加入适量 SO_3^{2-} 时,吸收值升高。

本法允许的测定范围是 $0.05 \sim 0.4 \mu\text{mol}$ 氨基酸。

表 10-3 各种氨基酸与 TNBS 反应后在不同条件下测定的吸光度

氨基酸种类	碱性溶液 ^①	酸性溶液加 SO_3^{2-} ^②	酸性溶液 ^③
甘氨酸	0.30	0.54	0.31
丙氨酸	0.31	0.59	0.30
甲硫氨酸	0.30	0.53	0.30

缬氨酸	0.31	0.57	0.31
亮氨酸	0.30	0.60	0.30
异亮氨酸	0.30	0.56	0.31
苏氨酸	0.30	0.59	0.30
丝氨酸	0.30	0.60	0.30
天冬氨酸	0.19	0.43	0.30
谷氨酸	0.23	0.53	0.30
天冬酰胺	0.30	0.46	0.30
谷氨酰胺	0.31	0.53	0.30
酪氨酸	0.30	0.48	0.30
苯丙氨酸	0.30	0.60	0.30
色氨酸	0.16	0.31	沉淀
组氨酸	0.30	0.50	0.30
赖氨酸	0.60	0.90	沉淀
精氨酸	0.40	0.58	0.30
α-N-苄氧羰酰-赖氨酸	0.32	0.45	沉淀
脯氨酸	0	0	
α-N-苄氧羰酰-赖氨酸	0	0	

①取不同含量氨基酸液 1mL, 加 4%NaHCO₃ 1mL, 0.1%TNBS 1mL, 于 40℃反应 2h, 用水补充至 4mL, 在 420nm 处测定。制作氨基酸浓度—吸光度坐标图, 从曲线中求得各氨基酸于 1 μ mol 时的吸光度。

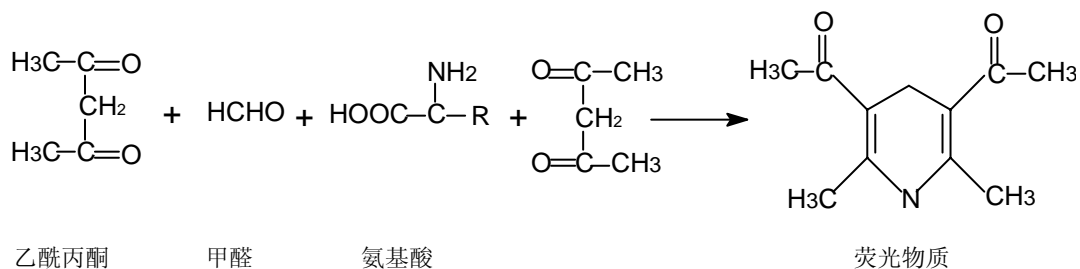
②条件同上, 但在与 TNBS 反应时加 0.01mol/L Na₂SO₃ 1mL, 最后总体积也是 4mL, 同样在 420nm 处测定。

③条件同①, 但与 TNBS 反应后加 1mol/L HCl 1mL 酸化, 在 340nm 处测定。

(六)乙酰丙酮和甲醛荧光法

1. 原理

氨基酸与乙酰丙酮和甲醛反应, 生成 N-取代基 2,6-二甲基-3,5-二乙酰基 1,4-二氢吡啶, 产生黄-绿色荧光, 可用荧光分析法检测。主要反应如下:



2. 试剂

混合试剂: 取 1mol/L 乙酸钠溶液 10mL, 加入乙酰丙酮溶液 0.4mL 和 30% 甲醛溶液 1mL, 用水稀释至 30mL。

3. 测定

取氨基酸液 1mL, 加入混合试剂 1mL, 用棉花塞满试管口, 避光于 100℃下加热 10min, 冷却, 加水 2mL, 然后测定荧光值。

表 10-4 各种氨基酸的发射波长和检测范围

化合物（激发波长 405nm）	发射波长（nm）	检测范围（mg/L）
甘氨酸	485	2~10
苯丙氨酸	490	8~40
丝氨酸	485	5~25
半胱氨酸（盐酸盐）	500	20~100
谷氨酸	485	20~100

与标准相比较求出样品中的氨基酸含量。

二、个别氨基酸的定量测定

（一）赖氨酸的测定

1. 原理

用铜离子阻碍游离氨基酸的 α -氨基,使赖氨酸的 ϵ -氨基可以自由地与 1-氟-2,4 二硝基苯(FDNB)反应,生成 ϵ -DNP-赖氨酸。经酸化和用二乙基醚提取,在波长 390nm 处有吸收峰,从而求出样品中游离赖氨酸的含量。

2. 试剂

(1)氯化铜液: 称 28.0g 无水氯化铜,用水稀释至 1000mL。

(2)磷酸三钠溶液: 称 68.5g 无水磷酸钠,用水稀释至 1000mL。

(3)硼酸盐缓冲液 (pH9.1~9.2): 称 54.64g 带有 10 结晶水的四硼酸钠,用水稀释至 1000mL。

(4)磷酸铜悬浮液: 搅拌情况下,把氯化铜液 200mL,缓慢倒入 400 mL 的磷酸三钠溶液中,把悬浮液以 2000r/min 速度离心 5min,用硼酸盐缓冲液再悬浮沉淀物,洗涤离心 3 次,把最后的沉淀物悬浮在硼酸盐缓冲液中,并用缓冲液稀释至 1L。

(5)1-氟-2, 4 二硝基苯(FDNB)溶液: 吸取 FDNB10mL 用甲醇稀释至 100mL。

(6)赖氨酸-HCl 标准溶液: 称取一定量赖氨酸-HCl,用水配成 200mg/L 的工作标准液。

(7)100g/L 丙氨酸溶液。

3. 测定

(1)称取通过 40 目筛的均匀试样 1.00g,置于 100mL 烧瓶中。另吸取赖氨酸-HCl 标准工作液 5mL (相当 1mg 赖氨酸-HCl),连同试剂空白同时进行试验。

(2)向各烧瓶中加入 25mL 磷酸铜悬浮液,然后再加 10%丙氨酸 1.0mL,振摇 15min。吸取 10%FDNB 溶液 0.5mL。置于各处理烧瓶中,将烧瓶置沸水中加热 15min。

(3)取出烧瓶,立即加入 1mol/LHCl 溶液 25mL,并不断摇动使之酸化和分散均匀。

(4)烧瓶中的溶液冷却至室温,用水稀释至 100mL。取约 40mL 悬浮液进行离心。

(5)用 25mL 二乙基醚提取上清液 3 次,除去醚。并将溶液收集于有刻度试管中,于 65℃ 水浴中加热 15min,以除去残留的醚。并记录溶液的毫升数。

(6)吸取上述各处理液 10mL,分别与 95%乙醇溶液 10mL 混合,用滤纸过滤。

(7)用试剂空白液调零,测定样液 A_{390nm} ,与赖氨酸-HCl 标准液对照,求出样品中赖氨酸-HCl 的含量。

本法在 0~40mg/L 赖氨酸溶液范围内呈良好线性关系。

4. 说明

(1)添加一定量的中性氨基酸如丙氨酸,增加总氨基酸的浓度,有助于赖氨酸-HCl 浓度具有良好的线性关系。

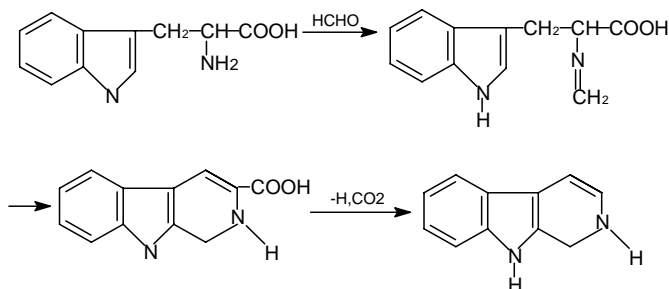
(2)用醚提取酸性溶液,可将所有中性或酸性的 DNP-氨基酸衍生物除去,并把 FDWB

的产物破坏，否则这些产物在 390nm 处存在干扰。

(二) 色氨酸的测定

1. 原理

样品中的蛋白质经碱水解后，游离的色氨酸与甲醛和含铁离子的三氯乙酸溶液作用，生成哈尔满化合物 (norharman)，具有特征荧光值，可以进行定量测定。反应式如下：



2. 试剂

(1) 0.3mmol/L 三氯化铁-三氯乙酸溶液：称取三氯化铁(FeCl₃·6H₂O)41mg，加入 10%三氯乙酸溶液溶解并定容至 500mL。

(2) 2% 甲醛：量取甲醛溶液(36%~38%)5.5mL，加水至 100mL。

(3) 色氨酸标准溶液：称取 10mg 色氨酸，用 0.1mol/LNaOH 溶液溶解并定容至 100mL，置棕色瓶中备用，使用时用水稀释成 1mg/L 的标准溶液。

3. 测定

称取样品粉末 100~200mg 于离心管中，加入 4mL 乙醚，摇匀后过夜，以 3000r/min 速度离心。将乙醚提取液移入试管内，并用乙醚洗涤残渣 3 次，收集乙醚液于试管中，于 40℃ 水浴除去醚。残留物中加入 6.25mol/L NaOH 4mL，火焰封口，于 110℃ 水解 16~24h。水解液用 4mol/L HCl 溶液调节至 pH6~8 后，用水定容至 50mL，过滤备用。

吸取滤液 0.2mL，加入 2% 甲醛 0.2mL 和 0.3mmol/L 三氯化铁-三氯乙酸混合液 2mL，摇匀后于 100℃ 水浴中加热 1h，取出，冷却后用水定容至 10mL。在激发波长为 365nm，发射波长 449nm 条件下，测定样品的荧光强度，与色氨酸标样作对照，求出样品中色氨酸含量。

本法在 0~10mg/L 色氨酸溶液范围内呈良好线性关系。

(三) 苯丙氨酸的测定

1. 原理

苯丙氨酸与茚三酮及铜盐反应生成荧光复合物，其荧光复合物在激发波长 365nm，发射波长 490nm 处可以产生最大荧光强度，与标准氨基酸对照，可求出样品中苯丙氨酸的含量，检测时加入 L-亮氨酸-L-丙氨酸二肽能增强这一反应。

2. 试剂

试剂均用分析纯试剂和玻璃器重蒸水配制。

(1) 二肽-茚三酮试剂

① 5mmol/L 亮丙二肽溶液：称取 L-亮氨酸-L-丙氨酸 1mg，溶于 1mL 水中，临时配制。

② 30mmol/L 茚三酮溶液：称取茚三酮 534mg，溶于 100mL 水中，冰箱贮存。

③ 0.6mol/L 琥珀酸盐缓冲液：称取琥珀酸 7.086g，加水约 25mL，用 4.8mol/L NaOH 溶液调至 pH5.88，加水至 100mL，冰箱贮存。

临用前 3 种溶液按顺序以 1+2+5（体积比）混合。

(2)铜试剂

①25mmol/LNa₂CO₃-0.4mmol/L 酒石酸钾钠溶液，称取无水碳酸钠 2.66g，酒石酸钾钠（含 4 份结晶水）113mg，加水至 1000mL。

②0.8mol/L CuSO₄ 溶液

临用前将①、②两溶液按 3+2（体积比）混匀。

(3)0.6mol/L 三氯醋酸溶液：称取三氯醋酸 98g 溶于 1L 水。临用前取 0.6mol/L 三氯醋酸稀释 10 倍，得 0.06mol/L 的溶液。

(4)标准苯丙氨酸溶液：称取苯丙氨酸配制成 6.6mg/L 的氨基酸标准液。

3. 测定

(1) 血清的去蛋白处理：吸取新鲜血清 50~100 μL 和等体积 0.6mol/L 三氯乙酸溶液混匀，静置 10min 后，以 4000r/min 速度离心 10min，吸取上清液用水精确稀释 5 倍。

(2) 样品测定：吸取血清稀释液 100 μL，置于样品管中，另吸取苯丙氨酸标准液 25 μL，加 0.06mol/L 三氯乙酸溶液 100 μL，然后两管均加水至 200 μL，同时作试剂空折。再向各管加入二肽-茚三酮 0.3mL。放在 75℃ 水浴中保温 80min（或 65~70℃，保温约 140min）。取出冷却，加入 2.5mL 铜试剂，振摇均匀，90min 内在激发波长为 385nm，发射波长 472nm 条件下，测定样品的荧光值，与苯丙氨酸标样作对照，求出样品游离苯丙氨酸的含量。

4. 计算

$$\text{苯丙氨酸含量 (mg/L)} = \frac{f_1 - f_0}{f_2 - f_0} \times \frac{m'}{m}$$

式中： f_1 为检样荧光值； f_2 为标样荧光值； f_0 为试剂空白荧光值； m' 为标样氨基酸质量（mg）； m 为样品质量，mg。

5. 说明

(1)反应的温度、时间对荧光物质的生成有显著影响。60℃ 保温 120min 所得相对荧光值较低，苯丙氨酸含量略高时，测定值容易参差不齐，低于 60℃ 相对荧光值更低，实验更加不稳定。将温度提高至 65-70℃ 相对荧光值增高，保温约 140min 以后荧光值不再显著增高，此时的测定值约为 60℃ 保温 120min 时的两倍。将温度提高至 75℃，相对荧光最高值提前在 80min 左右出现，维持半小时左右后逐渐减退。80℃ 以上相对荧光值显著降低，最高值更早出现。

(2)荧光物质的稳定性：从保温完毕加入铜试剂后算起，相对荧光值约稳定 90min，以后逐渐下降。

(3)苯丙氨酸和茚三酮、铜盐作用的产物如果没有二肽存在几乎没有荧光产生。能促使产生荧光的二肽甚多，以 L-亮-L-丙二肽的荧光值为 100%，则甘-L-丙为 95%，甘-dL-苯丙为 75%，L-丙-L-丙为 70%，L-丙-甘为 30%，甘-L-色为 28%。这些二肽单独和茚三酮作用都不显荧光，在 pH 5.8 时，除苯丙氨酸外，只有亮氨酸和精氨酸产生荧光，相当于等当量苯丙氨酸的 4%，除此以外其他氨基酸均小于 0.5%，可以认为对苯丙氨酸有较好的专一性。

(4)反应溶液的 pH 低于 5.8，产生的荧光较低，pH 大于 5.8 荧光增加，在 pH 6.8 时达到最高值，但专一性下降。由于蛋白质沉淀三氯醋酸对 pH 有较大影响，应该严格限制用量，在实际操作中血清用量应限于 10 μL，用量过大会使三氯醋酸用量也相应增多，除非用适量氢氧化钠中和，否则使荧光值降低甚至消失。

(四)酪氨酸的测定

1. 原理

酪氨酸和 1-亚硝酸-2-萘酚反应,生成有色化合物,此化合物在硝酸和亚硝酸钠存在的条件下加热,产生稳定的荧光物质,可用荧光法定量测定。

2. 试剂

试剂均用分析纯和玻璃器重蒸馏水制备。

(1)亚硝酸萘酚试剂

①1-亚硝酸-2-萘酚乙醇溶液:称取 1-亚硝酸-2-萘酚 20mg,溶于 100mL 无水乙醇,于 4℃下保存。

②3mol/L HNO₂ 溶液。

③0.1mol/L NaNO₂ 溶液,于 4℃下保存。

临用前将①、②、③三种溶液按(2+3+3)体积混合。

(2) 0.6mol/L 三氯醋酸溶液:称取三氯醋酸 98g 溶于 1L 水中。稀释 10 倍即得 0.06mol/L。

(3) 1,2 二氯乙烷 (ClCH₂CH₂Cl)

(4)标准酪氨酸溶液 (7.2mg/L):称取 L-酪氨酸 18.0mg,先加入数滴浓盐酸,微热完全溶解后,加水至 10mL,用氢氧化钠溶液中和到近中性,定容至 100mL,置冰箱保存。临用时吸取贮存液 2mL,定容至 50mL。

3. 测定

(1)样品去蛋白处理:吸取新鲜血清 50~100 μL 和等体积 0.6mol/L 三氯醋酸溶液混匀,4000r/min 离心 10min,吸取上清液用水精确稀释 5 倍,即得稀释 10 倍的样品溶液。

(2)样品测定:分别吸取样液 100 μL 于具塞试管 1;标准酪氨酸溶液 25 μL 和 0.06mol/L 三氯醋酸溶液 100 μL 于具塞试管 2;0.06mol/L 三氯醋酸溶液 100 μL 于具塞试管 3;各管用水补充容积至 200 μL。

将各管置于 55℃水浴数分钟,加入新配制的亚硝酸萘酚试剂 0.3mL,摇匀,55℃保温 20min,保温后加水 2.5mL,摇匀后再加三氯乙酸溶液 3mL。充分振摇以便将多余的试剂抽提入二氯乙烷溶液中,4000r/min 离心 10min,将上层水溶液移至另一试管内,在 180min 内,于激发波长为 468nm,发射波长为 555nm 处,测定样品的荧光强度,与氨基酸标样对照(消除试剂空白荧光值),求出样品氨基酸含量。

本法在 0~0.2mol/L 酪氨酸范围内呈良好的线性关系。

4. 说明

(1)荧光物质的稳定性:从保温完毕算起,相对荧光值在 180min 内平均减少 2%左右。

(2)酪胺的存在对荧光光度测定存在干扰,色氨酸、色胺、苯丙氨酸、5-羟色氨酸,5-羟吲哚乙酸均有轻微的荧光值。

(五)脯氨酸的测定

1. 原理

在丙酮溶剂中,脯氨酸与吲哚醌反应形成蓝色化合物,能用以测定蛋白质水解液中的脯氨酸含量,在一定条件下(包括 pH、缓冲液浓度和吲哚醌浓度),可以在其他氨基酸存在下直接进行测定,不受羟脯氨酸的干扰。

2. 试剂

(1)pH3.9 的柠檬酸盐缓冲液:柠檬酸 2.1g,用 1mol/L NaOH 溶液调 pH3.9,并加水至 100ml。pH 计检测(可用 0.1mol/L HCl 溶液调节)。

(2)0.75g/L 吲哚醌丙酮溶液:37.5mg 吲哚醌溶解于 50mL 丙酮,置棕色瓶中贮存于冰箱中。褪色失效。

(3)水饱和酚溶液:于分液漏斗内加入酚及水,剧烈摇动后,放置过夜分层,取下层酚溶液。

3. 测定

称取蛋白质样品 5mg (视样品含量而定), 加 6mol/L HCl 溶液 2mL, 封管后于 140℃ 水解 4h。启封, 加蒸馏水稀释至盐酸浓度达 0.25mol/L。

吸取一定量蛋白质酸水解液 0.1~0.5mL (含脯氨酸 0.5~5 μg) 于小烧杯内, 75℃ 干燥至恒重。残留物加 pH3.9 柠檬酸缓冲液 0.2mL, 使残留物完全溶解后, 加 0.75g/L 吡啶醌丙酮溶液 0.25mL, 混匀, 于 100℃ 烘箱内使溶剂蒸发 0.5h 左右。以下各步骤在避光条件下操作。先加 0.5mL 水饱和酚溶液, 剧摇后, 加 1mL 蒸馏水和 2mL 丙酮, 混匀成均相溶液, 立即于波长 598nm 的条件下, 以试剂空白调零, 测定样品的 A_{598nm} , 与氨基酸标准对照, 求出样品中脯氨酸的含量。

本法在 0~10mg/L 氨基酸溶液范围内呈良好线性关系。

4. 说明

(1) 要获得最佳的灵敏度及专一性, 必须严格控制本法所规定的条件, 即控制缓冲液 0.1mol/L, pH3.9, 吡啶醌浓度 0.75g/L。

(2) 脯氨酸与吡啶醌形成的蓝色化合物见光不稳定, 在一般实验室光照下, 1h 后吸光值下降 26%, 必须避光操作。

(六) 羟脯氨酸的测定

1. 原理

羟脯氨酸在有过量丙氨酸 (其作用是减少其他氨基酸的干扰) 的条件下, 用氯胺 T 氧化生成 Δ^2 -吡咯啉-4-羧酸和吡咯-2-羧酸, 它们不溶于甲苯, 但将溶液加热处理后可溶于甲苯中。所以在加热前先用甲苯除去其他物质, 加热后再用甲苯把这些氧化产物抽提, 最后用对-二甲基苯甲醛试剂显色。在波长 560nm 处有最大的吸收值, 可进行定量测定。

2. 试剂

(1) 0.2mol/L 氯胺 T 试剂: 称取氯胺 T 1.41g, 溶于不含过氧化物的甲基溶纤剂 (methyl cellosolve) 25mL 中。新鲜配制。如有大量泡沫表示溶剂不纯。

(2) 3.6mol/L 硫代硫酸钠溶液: 称取硫代硫酸钠 (含五份结晶水) 89.3g, 用水 100mL 溶解。加甲苯一层保存。

(3) 对-二甲基氨基苯甲醛试剂: 量取浓硫酸 27.4mL, 慢慢加入 200mL 无水乙醇中, 冷却, 即为溶液 A。另称取对-二甲基氨基苯甲醛 120g, 溶于无水乙醇中, 用 37℃ 水浴加热使溶解, 冷却, 为溶液 B。在冰浴中, 将溶液 A 慢慢加入溶液 B 中, 并混匀。

(4) 6mol/L 盐酸

(5) 100g/L 丙氨酸溶液: 称取丙氨酸 10g, 溶于蒸馏水 90mL 中, 调节至 pH8.7, 再稀释至 100mL。

(6) pH8.7 硼酸钾缓冲液: 称取硼酸 61.8g 及氯化钾 225g, 溶于蒸馏水 800mL 中, 用 10mol/L 氢氧化钾及 1mol/L 氢氧化钾调节 pH 至 8.7, 用蒸馏水稀释至 1L。

(7) 10g/L 酚酞乙醇溶液

(8) 羟脯氨酸标准液: 精确称取羟脯氨酸 18mg, 加浓盐酸 0.2mL 使溶解, 移入 50mL 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度。浓度为 0.36mg/mL。新鲜配制。用时再用蒸馏水稀释 10 倍, 浓度为 0.036mg/mL。

3. 测定

(1) 酸水解: 当样品中的羟脯氨酸大多数以结合形式, 甚至大分子的结合形式存在时, 要测定其总量则应先进行水解。分别吸取:

① 测定管: 样品液 1.0mL;

② 标准管: 0.036mg/mL 羟脯氨酸 1.0mL;

③ 空白管：蒸馏水 1.0mL；

置于刻有 15mL 刻度的具塞试管中。然后各加入浓盐酸 1.0mL，用硅橡胶塞塞后混匀，置 100℃烘箱中过夜（16-18h）。取出冷却后各加 1%酚酞乙醇液 1 滴，12mol/L 氢氧化钾 0.95mL，1mol/L 氢氧化钾 0.5mL，并用 0.1mol/L 氢氧化钾滴至粉红色。各管加蒸馏水至 15mL 刻度。（测定管如有沉淀物，离心除去。）

(2) 氧化和抽提：上述三管各吸取 3.0mL，分别加入三支具塞试管中，各加蒸馏水 1.0mL，10g/L 酚酞乙醇液 1 滴，用 0.05mol/L 氢氧化钾或 0.05mol/L 盐酸调节至粉红色。各管加固体氯化钾 3g 使溶液饱和，再加 100g/L 丙氨酸 0.5mL 及 pH8.7 硼酸钾缓冲液 1.0mL，混匀，室温放置 20~30min，振摇数次。各加 0.2mol/L 氯胺 T 试剂 1.0mL，混匀，室温放置 25min（振摇数次）。各加入 3.6mol/L 硫代硫酸钠溶液 3.0mL（中止氧化）及甲苯 5.0mL，塞紧，用力振摇 5min，离心，吸出上层甲苯，弃去。再塞紧，置 100℃沸水浴中 30min，冷却。各加甲苯 5.0mL，塞紧，用力振摇 5min，离心。

(3) 样品测定：吸取上述三管的上层甲苯抽提液 2.5mL，各加对-二甲基氨基苯甲醛试剂 1.0mL，充分混和，放置 30min。以甲苯作空白调零，在 560nm 读取各管吸光值。

4.说明

(1) 本法对羟脯氨酸有特异性，其他氨基酸即使同时存在 10000 倍也无干扰。

(2) 如测定游离羟脯氨酸可省去第一步酸水解操作。

（七）胱氨酸的测定

1. 原理

用亚硫酸盐使胱氨酸还原为半胱氨酸和 S-半胱氨酸磺酸，其他含二硫键的物质也被还原。通过巯基被磷钨酸还原成钨蓝的反应测定半胱氨酸，从而定量出胱氨酸。非胱氨酸的巯基可在加磷钨酸前先加氯化汞与巯基结合。因反应 pH 为 5，其他还原性物质如尿酸、抗坏血酸也使磷钨酸还原，通过空白对照加以去除。

2.试剂

(1) 亚硫酸钠试剂：称取亚硫酸氢钠 12.6g 及氢氧化钠 0.2g，溶于蒸馏水至 100mL。冰箱保存。

(2) 乙酸盐缓冲液：2mol/L 乙酸钠溶液 100mL 和 2mol/L 乙酸液 20mL 混合。

(3) 磷钨酸试剂：称取不含钼的钨酸钠 40g，溶于蒸馏水约 300mL。加 85%磷酸溶液 32mL，回流煮沸 2h，冷却至室温，加蒸馏水至 1L，加入硫酸锂（含 1 份结晶水）32g，冰箱保存。

(4) 胱氨酸标准溶液（400mg/L）：称取胱氨酸 40mg，溶于 0.1mol/L HCl 溶液 100mL 中，冰箱保存。

3. 测定

(1) 取 4 支试管中分别吸取

① 测定管：样品液 1.0mL（胱氨酸含量在 0.2mg/mL）。

② 样品空白管：样品液 1.0mL。

③ 标准管：胱氨酸标准液 0.5mL、蒸馏水 0.5mL。

④ 试剂空白管：蒸馏水 1.0mL。

(2) 胱氨酸的还原反应：上述各管分别加入醋酸盐缓冲液 1.0mL，亚硫酸钠试剂 0.3 mL。测定管和标准管各加入蒸馏水落石出 1.7mL；样品空白管和试剂空白管各加蒸馏水 1.5mL、0.1mol/L HgCl₂ 溶液 0.2mL，混合后放置 2min。

(3) 巯基的还原反应和比色：上述各管分别加磷钨酸试剂 1.0mL，混合后于 15min 内，在 600nm 波长下，以试剂空白管校正零点，测定标准管吸光度；以样品空白管校正零点，测定样品测定管吸光度，与氨基酸标样作对照，求出样品氨基酸含量。

本法在 0~200mg/L 氨基酸范围内呈良好的线性关系。

4. 说明

如果测定的样品中有胱氨酸结晶时，可用离心方法把沉淀物分离。然后向沉淀物加 1mol/LHCl 溶液 1.0mL，放在 60℃恒温水浴中保温 15min，使胱氨酸溶解。再离心后，取此上清液与初次离心上清液合并进行分析。

(八) 谷氨酸的测定

1. 原理

L-谷氨酸在大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶作用下脱羧释放出二氧化碳，用华勃士呼吸仪由测压法测得二氧化碳放出量，计算出谷氨酸含量。

2. 试剂

(1) 大肠杆菌丙酮粉的制备：大肠杆菌 37℃液体培养 18h(培养基成分：豆饼水解液 3%、蛋白胨 1%、酵母膏 1%、牛肉膏 1%、玉米浆 0.5%、K₂PO₄ 0.25%、pH 7.0)，离心 (3500r/min) 20min,收集菌体。菌体用冷蒸馏水或生理盐水洗涤，离心后，将菌体用冷丙酮 (0℃以下) 搅匀，抽滤，所得粉白色的大肠杆菌丙酮粉，具有专一性强的谷氨酸脱羧酶的活性。置冰箱贮存，保持数月酶活性不变。

(2) 0.5mol/LpH4.8 乙酸盐缓冲液：称取 68.04g 乙酸钠，用蒸馏水溶解后，加乙酸调至 pH4.8，最后定容至 1000mL。

(3) 20g/L 大肠杆菌丙酮粉悬浮液 (含谷氨酸脱羧酶)：称取丙酮粉 2g，溶于 100mLpH4.8 的 0.5mol/L 乙酸盐缓冲液中。

3. 测定

(1) 取样品稀释液 1mL(谷氨酸含量 0.5~1.0mg)于反应瓶主室 (F) 中，其中再加 0.2mLpH4.8 醋酸盐缓冲液，1mL 蒸馏水；在反应瓶侧室 (G) 内加入 0.3mL 大肠杆菌丙酮粉悬浮液。

(2) 装瓶密封，固定在振荡板上放入 37℃恒温水浴。旋调检压液达 260mm 左右，振荡，与外界平衡 5min，关闭上端三向阀门与外界隔闭，旋检压液至 150mm 处，再振摇 5min，调准检压液闭口端至 150mm 处，记下开口端检压液高度，此为初读。

(3) 记下初值后，迅速将侧室中酶液倒入反应液中，振摇 10~15min (使二氧化碳完全放出)。旋调检压液闭口端至 150mm 处，记下开口端检压液高度，此读数减去初读再加上或减去空白瓶差额即为压差 ΔH 。

根据下式计算 L-谷氨酸含量：

$$\text{谷氨酸含量 (mg)} = K \times \Delta H \times \frac{147.130}{22,400,000}$$

式中， ΔH ——表示在检压管上读出的压差毫升数，

147.130——为谷氨酸的摩尔质量

22, 400, 000——表示 1mol L-谷氨酸脱羧标准状态下放出二氧化碳的微升数

K——表示反应瓶常数

4. 说明

本法专一性强，不受其他氨基酸及 D-谷氨酸的干扰，适用于谷氨酸生产中发酵液的测定，测定量以不超过 1.0mg/mL 为宜。

第七节 氨基酸的分离及测定

一、薄层色谱法

1. 原理

取一定量经水解的样品溶液，滴在制好的薄层板上，在溶剂系统中进行双向上行法展开，样品各组分在薄层板上经过多次的被吸附、解吸、交换等作用，同一物质具有相同的 R_f 值，不同成分则有不同的 R_f 值，因而各种氨基酸可达到彼此分离的目的。然后用茚三酮显色，与标准氨基酸进行对比，即可鉴别样品中所含氨基酸的种类，从显色斑点颜色的深浅可大致确定其含量。

2. 试剂

- ① 展开剂 I：叔丁醇-甲乙酮-氢氧化铵-水（5+3+1+1），须临时配制。
- ② 展开剂 II：异丙醇-甲酸-水（20+1+5），须临时配制。
- ③ 5g/L 茚三酮的无水丙酮溶液
- ④ 羧甲基纤维素或微晶纤维素
- ⑤ 标准氨基酸溶液：浓度 0~2mg/mL。

3. 操作方法

① 薄层板制备：称取 10g 微晶纤维素，加入 20mL 水和 2.5mL 丙酮，研磨 1min 后调成匀浆后，用薄层涂布器于洁净干燥的玻璃板上（玻璃板 200×200mm，厚度 3mm），使涂层厚度以 300~500 μm 为宜（比一般的薄板厚一些），置水平架上晾干后即可使用。

② 样品液制备：称取样品 5mg，放入小试管内，加入 0.6mL 5.7mol/L 盐酸溶液（恒沸点盐酸）。在火焰上熔融封口后，置于 110℃ 烘箱中水解 24h。取出，打开封口，置真空干燥器中减压抽干，以去掉多余的盐酸。以稀氨水调节 pH7 左右，再加入 10% 异丙醇至最后体积达 0.5mL，置冰箱中保存备用。

③ 点样：用微量注射器吸取样液 5 μL （每种氨基酸约 1 至 10 μg ），分次滴加在距薄板下边缘约 2cm 处，边点边用电风吹干，使点样直径在 2~3mm 内。

④ 展开：采用双向上行法展开。将已点样的两个薄板的薄层面朝外合在一起，放入层析缸（250×100×250mm）中的玻璃船内，将两板的上端分开靠在缸壁上。先进行碱向展层，将展开剂 I 从两块板中间加入，薄层浸入展开剂中的深度约 0.5cm，盖好缸盖，进行展开。当溶剂前沿达到距原点约 11cm 时（时间约 1~1.5h），即可将薄板取出，冷风吹干，放平，刮去前沿上端的黄色杂质部分。再进行酸向展层，将薄板重新放入另一个缸中的船槽内，与碱向体系成垂直方向，加入展开剂 II，进行展层。展开至距原点约 11cm 时，取出，吹干。

⑤ 显色：每块板喷以 7~10mL 0.5% 茚三酮丙酮液，喷雾时应控制使薄层板恰好湿润而无液滴流下。喷雾后的薄板用电风吹干。有氨基酸存在的地方逐渐显出蓝紫色斑点，仅脯氨酸为黄色斑点。用铅笔将斑点圈出，并用描图纸绘制、复印或摄影保存。

⑥ 标准氨基酸按上述步骤进行点样、展层和显色。为了定量还可以点上不同浓度的氨基酸标准液，所得图谱供比较和确定样品中的氨基酸含量。

4. 结果计算

$$\text{氨基酸含量 (mg/kg)} = \frac{V_0 \times m_2}{V \times m_1}$$

式中： V_0 ——样品溶液的总容积，mL；

V ——点样用样品溶液的体积，mL；

m_1 ——样品的质量, g;

m_2 ——样品色斑相当于标准氨基酸的量, μg 。

5. 说明

① 薄层色谱法操作简便快速, 灵敏度高, 成本低廉, 故应用广泛。

② 薄层扫描仪是一种定量测定薄层斑点的现代仪器, 它的问世更发挥了薄层色谱法的优势, 使之可与 GC 和 HPLC 法相媲美。

二、氨基酸自动分析仪法

1. 原理

氨基酸的组分分析, 现在广泛地采用离子交换法, 并由自动化的仪器来完成。其原理是利用各种氨基酸的酸碱性、极性和分子量大小不同等性质, 使用阳离子交换树脂在色谱柱上进行分离。当样液加入色谱柱顶端后, 采用不同的 pH 值和离子浓度的缓冲溶液即可将它们依次洗脱下来, 即先是酸性氨基酸和极性较大的氨基酸, 其次是非极性的芳香性氨基酸, 最后是碱性氨基酸; 摩尔质量小的比摩尔质量大的先被洗脱下来, 洗脱下来的氨基酸可用茚三酮显色, 从而定量各种氨基酸。

定量测定的依据是氨基酸和茚三酮反应生成蓝紫色化合物的颜色深浅与各有关氨基酸的含量成正比。但脯氨酸和羟脯氨酸则生成黄棕色化合物, 故需在另外波长处定量测定。

阳离子交换树脂是由聚苯乙烯经交联再磺化而成, 其交联度为 8。

氨基酸分析仪有两种, 一种是低速型, 使用 300~400 目的离子交换树脂; 另一种是高速型, 使用直径 4~6 μm 的树脂。不论哪一种, 在分析组成蛋白质的各种氨基酸时, 都采用柠檬酸缓冲液作为洗脱液; 完全分离和定量 40~46 种游离氨基酸时, 则使用柠檬酸锂缓冲液。但分析后者时, 由于所用缓冲液种类多, 柱温也要变为三个梯度, 因此一般不能用低速型。

2. 仪器

氨基酸自动分析仪

3. 操作方法

① 样品处理: 测定样品中各种游离氨基酸含量, 可以除去脂肪杂质后, 直接上柱进行分析。测定蛋白质的氨基酸组成时样品必须经酸水解, 使蛋白质完全变成氨基酸后才能上柱进行分析。

酸水解的方法: 称取干燥的蛋白质样品数毫克, 加入 2mL 5.7mol/L 盐酸, 置于 110°C 烘箱内水解 24h, 然后除去过量的盐酸, 加缓冲溶液稀释到一定体积, 摇匀。取一定量的水解样品上柱进行分析。

如果样品中含有糖和淀粉、脂肪、核酸、无机盐等杂质, 必须将样品预先除去杂质后再进行酸水解处理。去杂质的方法如下:

去糖和淀粉: 把样品用淀粉酶水解, 然后用乙醇溶液洗涤, 得蛋白质沉淀物。

去脂肪: 先把干燥的样品经研碎后用丙酮或乙醚等有机溶剂离心或过滤抽提, 得蛋白质沉淀物。

去核酸: 将样品在 100g/L 氯化钠溶液中, 85°C 加热 6h, 然后用热水洗涤, 过滤后将固形物用丙酮干燥即可。

去无机盐: 样品经水解后含有大量无机盐时还必须用阳离子交换树脂进行去盐处理。其方法是用国产 732 型树脂, 先用 1mol/L 盐酸使其转成 H 型, 然后用水洗至中性, 装在一根小柱内。将去除盐酸的水解样品用水溶解之后上柱, 并不断用水洗涤, 直至洗出液中无氯离子为止 (用硝酸银溶液检查)。此时氨基酸全被交换在树脂上, 而无机盐被洗去, 最后用

2mol/L 的氨水溶液把交换的氨基酸洗脱下来。收集洗脱液进行浓缩，蒸干，然后上柱进行分析。

②样品分析：经过处理后的样品上柱进行分析。上柱的样品量根据所用自动分析仪的灵敏度来确定。一般为每种氨基酸 0.1 μ mol 左右（水解样品干重为 0.3mg 左右）。对于一些未知蛋白质含量的样品，水解后必须预先测定氨基酸的大致含量后才能分析，否则会出现过多或过少的现象。测定必须在 pH5~5.5、100℃ 下进行，反应进行时间为 10~15min，生成的紫色物质在 570nm 波长下进行比色测定。而生成的黄色化合物在 440nm 波长下进行比色测定。做一个氨基酸全分析一般只需 1h 左右，同时可将几十个样品一起装入仪器，自动按序分析，最后自动计算给出精确的数据。仪器精确度在 $\pm 1\sim 3\%$ 。用阳离子交换柱分离及测定氨基酸所得图谱如图 10-3。

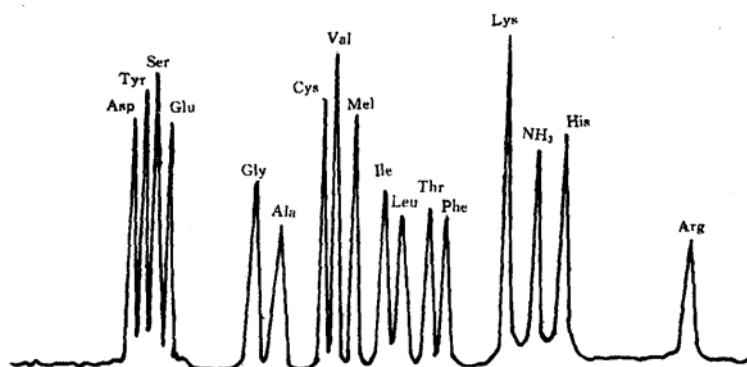


图 10-3 自动分析仪氨基酸分离图谱

4. 结果计算

带有数据处理机的仪器，各种氨基酸的定量结果能自动打印出来，否则，可用尺子测量峰高或用峰高乘以半峰宽确定峰面积进而计算出氨基酸的精确含量。另外，根据峰出现的时间可以确定氨基酸的种类。

5. 说明

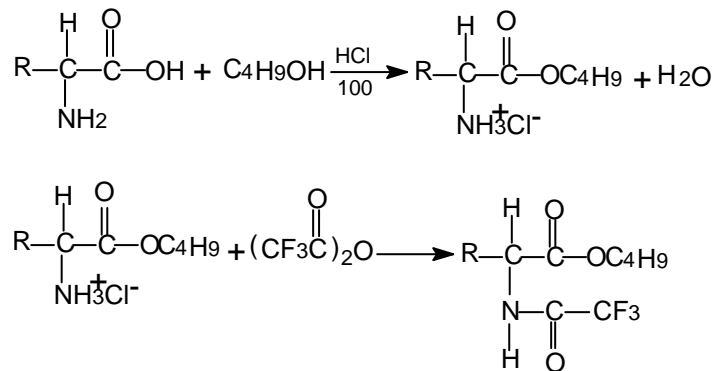
① 显色反应的茚三酮试剂，随着时间推移发色率会降低，故在较长时间测样过程中应随时采用已知浓度的氨基酸标准溶液上柱测定以检验其变化情况。

② 近年出现的采用反相色谱原理制造的氨基酸分析仪，可使蛋白质水解出的 17 种氨基酸在 12min 内完成分离，且具有灵敏度高（最小检出量可达 1pmol）、重现性好以及一机多用等优点。

三、气相色谱法

1. 原理

将本身没有挥发性的氨基酸转变为适合于气相色谱分析的衍生物——三氟乙酰基正丁酯。它包括用正丁醇的酯化和用三氟乙酸酐（TFAA）的酰化两个步骤。将酰化好的氨基酸衍生物进行气相色谱分析。其酯化、酰化反应式如下：



2. 主要仪器

① 超声波浴

② 气相色谱仪：带程序升温 and 氢火焰离子检测器。

色谱条件：分离蛋白质的 20 种氨基酸的三氟乙酰基正丁酯，一般采用双柱系统。

柱 I：己二酸乙二醇聚酯柱（PEGA）。供分离除组氨酸、精氨酸、色氨酸和胱氨酸以外的 16 种氨基酸混合物之用。固定液为 0.325%PEGA。

柱 II：供分离组氨酸、精氨酸、色氨酸和胱氨酸之用。固定液用硅酮类（如 OV₁₇、OV₁₇₊₂₁₀。

用硅藻土载体（Chromosorb W,80/100 目），用浓盐酸浸泡 24h，用蒸馏水洗至中性，然后在 140℃干燥 12h；不锈钢柱为 3mm×1.5m。老化：柱温 220℃，N₂ 作载气，流速 25mL/min，2.5h。

柱温：起始 80℃，进样 3.5min 以 4℃/min 程序升温至 215℃，至分析结束。

鉴定器温度 230℃；进样温度 200℃；进样量 1~10 μL，载气 N₂ 40mL/min；H₂ 经过分子筛柱，50mL/min；空气经硅胶柱 0.6L/min。

整个分析可在 40min 内完成。

3. 试剂

① 正丁醇、二氯甲烷：均为分析纯，先用无水氯化钙处理，然后分别用全玻璃蒸馏器重蒸馏一次。

② 无水氯化钙：分析纯

③ 三氟乙酸酐：分析纯

④ 3mol/L 盐酸浓度的正丁醇溶液：在气体发生器中，使氯化铵与硫酸混合，产生氯化氢气体。让气体通过两级浓硫酸的干燥后，再通入重蒸馏过的正丁醇溶液中。最后通过标定，直至正丁醇溶液中盐酸的浓度为 3mol/L 即可。

⑤ 氯化铵：优级纯

⑥ 硫酸：优级纯

⑦ 高纯 N₂

4. 操作方法

① 样品处理：根据需衍生样品所含氨基酸数量，可分为常量、半微量及微量衍生的方法。常量衍生时，氨基酸总量在 1~20mg；半微量衍生时，为 0.2~1mg；微量衍生时，为 1~200 μg。下面以半微量衍生的方法为例，叙述其具体操作：将总量约为 1mg 的氨基酸的稀盐酸（0.1mol/L）溶液加入 10mL 容量瓶中。将容量瓶置 100℃砂浴，吹入高纯 N₂，蒸发水分，待恰好干燥时取出，加入 0.5mL 二氯甲烷再置砂浴继续吹入高纯 N₂，使残存的水分和二氯甲烷成共沸物吹出。吹干后，加入 1.5mL 盐酸正丁醇混合液，在超声波浴中振荡约 2min 以加速氨基酸的溶解（当样品中有碱性氨基酸和胱氨酸等组分时，尤需此步骤，否则氨基酸不溶或溶不完全将影响酯化反应的顺利进行）。盖紧磨口塞，将容量瓶置 100℃砂

浴中，酯化 35min。稍冷，吹入高纯 N₂，在砂浴中蒸发正丁醇和盐酸，按前述步骤加入二氯甲烷进行共沸，进一步除去水分。最后加入 0.2mL 三氟乙酸酐和 0.6mL 二氯甲烷，在超声波浴中振荡 1~2min。将磨口塞继续盖严后，置干燥器中室温下进行酰化反应。2h 即可对所形成的衍生物进行气相色谱分析。

② 定性鉴定：根据保留时间与标样比较后加以定性，它们是：丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、正亮氨酸、别异亮氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、羟脯氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、色氨酸和胱氨酸

③ 定量测定：采用正亮氨酸为内标。以峰高乘半峰宽的方法计算出色谱峰面积之比并求出含量。

5. 说明及注意事项

① 近年使用七氟丁基 (HFB) 酰化和使用正丙基的 N-HFB-正丙酯酯化，可用一根 OV₁ 的柱子完成分离，因其操作较简便、精密度与氨基酸自动分析仪法相当而得到了重视。

② 样品处理操作应在通风橱中进行。

③ 氯化氢气体也可采用氯化钠与硫酸反应制得。

四、高效液相色谱法

高效液相色谱法适于分析沸点高、分子量大、热稳定性差的物质和生物活性物质。用于氨基酸的分析已进行了大量的研究工作，并已取得了广泛应用。由于大多数氨基酸无紫外吸收及荧光发射特性，而紫外吸收检测器 (UVD) 和荧光检测器 (FD) 又是 HPLC 仪的最常用配置。故人们需将氨基酸进行衍生化，使其可以利用紫外吸收或荧光检测器进行测定。

氨基酸的衍生可分为柱前衍生和柱后衍生。柱后衍生需额外的反应器和泵，常用于氨基酸分析仪，如前文所提的茚三酮反应。此外，如荧光胺 (Floram)、邻苯二甲醛 (OPA) 也有被人采用。在氨基酸的 HPLC 测定中，更多的还是采用柱前衍生法，这是因为比起柱后衍生法它的优点有：(1) 固定相采用 C₁₈ 或其它疏水物，可分辨分子结构细小的差异；(2) 反相洗脱，流动相为极性溶剂，如甲醇、乙二腈等，避免对荧光检测的干扰，可提高灵敏度及速度；(3) 一机多用。常用的柱前衍生化试剂见表 10-5。

下面仅以 Waters 推出的 ACCQ.tag 法为例作一介绍。

1. 原理

含蛋白质的食品，用 6mol/LHCl 水解并在 110℃ 加热 24h，用内标 α-氨基丁酸(AABA) 稀释和过滤后，取一小部分用 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯 (AQC) 衍生，用反相液相向色谱分析。

2. 主要仪器与试剂

(1) 高效液相色谱仪，带紫外检测器、梯度洗脱、温控装置。

(2) ACCQ.tag 氨基酸分析柱

(3) 脱气、溶剂过滤、混合等附件与装置。

(4) Waters 公司 ACCQ-Flour 试剂包，衍生用。

(5) 流动相试剂：由乙腈、EDTA、H₃PO₄ 等试剂配成，具体操作可参阅 Waters 公司 ACCQ.tag 法说明书。

3. 操作说明

操作步骤可分为：称取样品 → 置于水解试管 → 加盐酸溶液 → 冷冻固化后抽真空 → 烧结封口 → 110℃ 下水解 22h → 用水溶解 → 吸取溶解液 1~2mL 于蒸发试管中旋转蒸发至干 (<50℃) → 加入内标物 (AABA) 混合均匀 → 吸取一定量液加入 AQC 衍生试剂 → 密封后于 50℃ 下反应 10min → 进 HPLC 仪测定。

表 10-5 氨基酸柱前衍生化试剂^[5-11]

中文名称	英文名称及缩写	结构式
邻苯二甲醛	ortho-phthalaldehyde, OPA	
异硫氰酸苯酯	phenylisothio cyanate, PITC	
二甲胺基偶氮苯异硫氰酸酯	dimethylaminoazobenzeneisothiocyanate, DABITC	
二甲胺基萘磺酰氯 (丹酰氯)	dimethylaminophthalenesulfonyl chloride, DANSYL-Cl	
二甲胺基偶氮苯磺酰氯	dimethylaminoazobenzene-sulfonyl chloride DABSYL-Cl	
4-(N-酞基)苯磺酰氯	4-(N-phthalimidyl)benzene-sulfonyl chloride, PHISYL-Cl	
芴基甲氧基羰酰氯 (氯甲酸芴甲酯)	fluorenylmethylxycarbonyl chloride, Fmoc-Cl (fluorenylmethylchloroformate)	
6-氨基喹啉-N-羟基丁二酰亚胺氨基甲酸酯	6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate, AQC	

分析结果由计算机打印出来。分离图见图 10-4。

4. 讨论

(1) 此法由美国 waters 公司推出，随机附带所需各种专用试剂包及附件，该法具有操作简便，灵敏度高的优点（可达 pmol~fmol 级）。

(2) 本法可同时测定各种氨基酸。

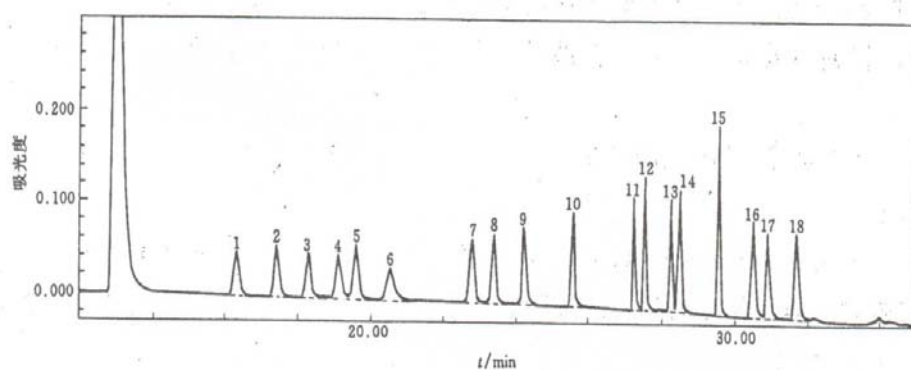


图 10-4 食品中氨基酸色谱图

- 1—天冬氨酸；2—丝氨酸；3—谷氨酸；4—甘氨酸；5—组氨酸；6—氨；7—精氨酸；
8—苏氨酸；9—丙氨酸；10—脯氨酸；11—胱氨酸；12—酪氨酸；13—缬氨酸；
14—蛋氨酸；15—赖氨酸；16—异亮氨酸；17—亮氨酸；18—苯丙氨酸。

思考题

1. 当选择蛋白质测定方法时，那些因素是必须考虑的？
2. 为什么凯氏定氮法测定出食品中的蛋白质含量为粗蛋白含量？
3. 在消化过程中加入的硫酸铜试剂有哪些作用？
4. 样品消化过程中内容物的颜色发生什么变化？为什么？
5. 样品经消化蒸馏之前为什么要加入氢氧化钠？这时溶液的颜色会发生什么变化？为什么？如果没有变化，说明了什么问题？
6. 蛋白质蒸馏装置的水蒸汽发生器中的水为何要用硫酸调成酸性？
7. 染料结合法测定食品中的蛋白质的原理？
8. 蛋白质的结果计算为什么要乘上蛋白质系数？6.25 的系数是怎么得到的？
9. 说明甲醛滴定法测定氨基酸态氮的原理及操作要点。
10. 用什么方法可对谷物中的蛋白质含量进行快速的质量分析？
11. 从离子交换色谱柱上洗脱氨基酸，采用什么定量测定方法？

(钱和)