



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.5—2003
代替 GB/T 5009.5—1985

食品中蛋白质的测定

Determination of protein in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准代替 GB/T 5009.5—1985《食品中蛋白质的测定方法》。

本标准与 GB/T 5009.5—1985 相比主要修改如下：

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《食品中蛋白质的测定》；

——按照 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

——增加了比色法作为第二法。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准第一法由卫生部食品卫生监督检验所负责起草；第二法由河北省唐山市卫生防疫站负责起草。

本标准第二法主要起草人：张文德、李信荣、尹璐、郭忠、胡志芬。

本标准于 1985 年首次发布，本次为第一次修订。

食品中蛋白质的测定

1 范围

本标准规定了食品中蛋白质的测定方法。

本标准适用于食品中蛋白质的测定。

本标准不适用于添加无机含氮物质、有机非蛋白质含氮物质的食品测定。

本标准第二法检出限为 0.070 $\mu\text{g/mL}$ ；线性范围为 0~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

第一法

2 原理

蛋白质是含氮的有机化合物。食品与硫酸和硫酸铜、硫酸钾一同加热消化，使蛋白质分解，分解的氮与硫酸结合生成硫酸铵。然后碱化蒸馏使氮游离，用硼酸吸收后以硫酸或盐酸标准滴定溶液滴定，根据酸的消耗量乘以换算系数，即为蛋白质的含量。

3 试剂

3.1 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)。

3.2 硫酸钾。

3.3 硫酸(密度为 1.841 9 g/L)。

3.4 硼酸溶液(20 g/L)。

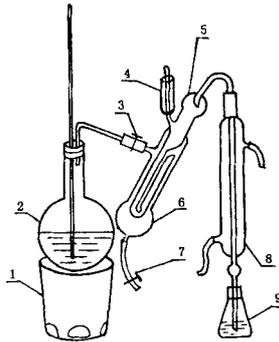
3.5 氢氧化钠溶液(400 g/L)。

3.6 硫酸标准滴定溶液 [$c(1/2\text{H}_2\text{SO}_4) = 0.050 0 \text{ mol/L}$] 或盐酸标准滴定溶液 [$c(\text{HCl}) = 0.050 0 \text{ mol/L}$]。

3.7 混合指示液：1 份甲基红乙醇溶液(1 g/L)与 5 份溴甲酚绿乙醇溶液(1 g/L)临时混合。也可用 2 份甲基红乙醇溶液(1 g/L)与 1 份亚甲基蓝乙醇溶液(1 g/L)临时混合。

4 仪器

定氮蒸馏装置：如图 1 所示。



- 1—电炉；
- 2—水蒸气发生器(2 L平底烧瓶)；
- 3—螺旋夹；
- 4—小漏斗及棒状玻塞；
- 5—反应室；
- 6—反应室外层；
- 7—橡皮管及螺旋夹；
- 8—冷凝管；
- 9—蒸馏液接收瓶。

图 1 定氮蒸馏装置

5 分析步骤

5.1 试样处理: 称取 0.20 g~2.00 g 固体试样或 2.00 g~5.00 g 半固体试样或吸取 10.00 mL~25.00 mL 液体试样(约相当氮 30 mg~40 mg), 移入干燥的 100 mL 或 500 mL 定氮瓶中, 加入 0.2 g 硫酸铜, 6 g 硫酸钾及 20 mL 硫酸, 稍摇匀后于瓶口放一小漏斗, 将瓶以 45°角斜支于有小孔的石棉网上。小心加热, 待内容物全部炭化, 泡沫完全停止后, 加强火力, 并保持瓶内液体微沸, 至液体呈蓝绿色澄清透明后, 再继续加热 0.5 h~1 h。取下放冷, 小心加 20 mL 水。放冷后, 移入 100 mL 容量瓶中, 并用少量水洗定氮瓶, 洗液并入容量瓶中, 再加水至刻度, 混匀备用。同时做试剂空白试验。

5.2 测定: 按图 1 装好定氮装置, 于水蒸气发生瓶内装水至三分之二处, 加入数粒玻璃珠, 加甲基红指示液数滴及数毫升硫酸, 以保持水呈酸性, 用调压器控制, 加热煮沸水蒸气发生瓶内的水。

5.3 向接收瓶内加入 10 mL 硼酸溶液(20 g/L)及 1 滴~2 滴混合指示液, 并使冷凝管的下端插入液面下, 准确吸取 10 mL 试样处理液由小漏斗流入反应室, 并以 10 mL 水洗涤小烧杯使流入反应室内, 棒状玻塞塞紧。将 10 mL 氢氧化钠溶液(400 g/L)倒入小玻杯, 提起玻塞使其缓缓流入反应室, 立即将玻塞盖紧, 并加水于小玻杯以防漏气。夹紧螺旋夹, 开始蒸馏。蒸馏 5 min。移动接收瓶, 液面离开冷凝管下端, 再蒸馏 1 min。然后用少量水冲洗冷凝管下端外部。取下接收瓶。以硫酸或盐酸标准滴定溶液(0.05 mol/L)滴定至灰色或蓝紫色为终点。同时准确吸取 10 mL 试剂空白消化液按 5.3 操作。

6 结果计算

试样中蛋白质的含量按式(1)进行计算。

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.0140}{m \times 10/100} \times F \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中蛋白质的含量,单位为克每百克或克每百毫升(g/100 g 或 g/100 mL);

V_1 ——试样消耗硫酸或盐酸标准滴定液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——试剂空白消耗硫酸或盐酸标准滴定液的体积,单位为毫升(mL);

c ——硫酸或盐酸标准滴定溶液浓度,单位为摩尔每升(mol/L);

0.014 0——1.0 mL 硫酸[$c(1/2\text{H}_2\text{SO}_4)=1.000$ mol/L]或盐酸[$c(\text{HCl})=1.000$ mol/L]标准滴定溶液相当的氮的质量,单位为克(g);

m ——试样的质量或体积,单位为克或毫升(g 或 mL);

F ——氮换算为蛋白质的系数。一般食物为 6.25;乳制品为 6.38;面粉为 5.70;玉米、高粱为 6.24;花生为 5.46;米为 5.95;大豆及其制品为 5.71;肉与肉制品为 6.25;大麦、小米、燕麦、裸麦为 5.83;芝麻、向日葵为 5.30。

计算结果保留三位有效数字。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

第二法

8 原理

蛋白质是含氮的有机化合物。食品与硫酸和催化剂一同加热消化,使蛋白质分解,分解的氮与硫酸结合生成硫酸铵。然后在 pH4.8 的乙酸钠-乙酸缓冲溶液中,铵与乙酰丙酮和甲醛反应生成黄色的 3,5-二乙酰-2,6-二甲基-1,4-二氢吡啶化合物。在波长 400 nm 处测定吸光度,与标准系列比较定量,结果乘以换算系数,即为蛋白质含量。

9 试剂

9.1 硫酸铜。

9.2 硫酸钾。

9.3 硫酸。

9.4 氢氧化钠溶液(300 g/L);称取 30 g 氢氧化钠加水溶解后,放冷,并稀释至 100 mL。

9.5 对硝基苯酚指示剂溶液(1 g/L);称取 0.1 g 对硝基苯酚指示剂溶于 20 mL 95% 乙醇中,加水稀释至 100 mL。

9.6 乙酸溶液(1 mol/L);量取 5.8 mL 冰乙酸,加水稀释至 100 mL。

9.7 乙酸钠溶液(1 mol/L);称取 41 g 无水乙酸钠或 68 g 乙酸钠($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$),加水溶解后并稀释至 500 mL。

9.8 乙酸钠-乙酸缓冲溶液;量取 60 mL 乙酸钠溶液(1 mol/L)与 40 mL 乙酸溶液(1 mol/L)混合,该溶液为 pH4.8。

9.9 显示剂;15 mL 37% 甲醛与 7.8 mL 乙酰丙酮混合,加水稀释至 100 mL,剧烈振荡,混匀(室温下放置稳定三日)。

9.10 氮氮标准储备溶液(1.0 g/L);精密称取 105℃ 干燥 2 h 的硫酸铵 0.472 0 g,加水溶解后移入 100 mL 容量瓶中,并稀释至刻度,混匀,此溶液每毫升相当于 1.0 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ (10℃ 下冰箱内储存稳定 1 年以上)。

9.11 氮氮标准使用溶液(0.1 g/L);用移液管精密吸取 10 mL 氮氮标准储备液(1.0 mg/mL)于 100 mL 容量瓶内,加水稀释至刻度,混匀,此溶液每毫升相当于 100 μg $\text{NH}_3\text{-N}$ (10℃ 下冰箱内贮存稳

定1个月)。

10 仪器

- 10.1 分光光度计。
- 10.2 电热恒温水浴锅(100℃±0.5℃)。
- 10.3 10 mL具塞玻璃比色管。

11 分析步骤

11.1 试样消解

精密称取经粉碎混匀过40目筛的固体试样0.1g~0.5g或半固体试样0.2g~1.0g或吸取液体试样1mL~5mL,移入干燥的100mL或250mL定氮瓶中,加0.1g硫酸铜、1g硫酸钾及5mL硫酸,摇匀后于瓶口放一小漏斗,将瓶以45°角斜支于有小孔的石棉网上。小心加热,待内容物全部炭化,泡沫完全停止后,加强火力,并保持瓶内液体微沸,至液体呈蓝绿色澄清透明后,再继续加热0.5h。取下放冷,小心加20mL水,放冷后移入50mL或100mL容量瓶中,并用少量水洗定氮瓶,洗液并入容量瓶中,再加水至刻度,混匀备用。取与处理试样相同量的硫酸铜、硫酸钾、硫酸按同一方法做试剂空白试验。

11.2 试样溶液的制备

精密吸取2mL~5mL试样或试剂空白消化液于50mL~100mL容量瓶内,加1滴~2滴对硝基酚指示剂溶液(1g/L),摇匀后滴加氢氧化钠溶液(300g/L)中和至黄色,再滴加乙酸(1mol/L)至溶液无色,用水稀释至刻度,混匀。

11.3 标准曲线的绘制

精密吸取0,0.05,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0mL氨氮标准使用溶液(相当于NH₃-N0,5.0,10.0,20.0,40.0,60.0,80.0,100.0μg),分别置于10mL比色管中。加4mL乙酸钠-乙酸缓冲溶液(pH4.8)及4mL显色剂,加水稀释至刻度,混匀。置于100℃水浴中加热15min。取出用水冷却至室温后,移入1cm比色皿内,以零管为参比,于波长400nm处测量吸光度,根据标准各点吸光度绘制标准曲线或计算直线回归方程。

11.4 试样测定

精密吸取0.5mL~2.0mL(约相当于氮小于100μg)试样溶液和同量的试剂空白溶液,分别于10mL比色管中。以下按11.3自“加4mL乙酸钠-乙酸缓冲溶液(pH4.8)及4mL显色剂……”起依法操作。试样吸光度与标准曲线比较定量或代入标准回归方程求出含量。

12 计算结果

试样中蛋白质的含量按式(2)进行计算。

$$X = \frac{c - c_0}{m \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{V_4}{V_3} \times 1\,000 \times 1\,000} \times 100 \times F \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- X—试样中蛋白质的含量,单位为克每百克或克每百毫升(g/100g或g/100mL);
- c—试样测定液中氮的含量,单位为微克(μg);
- c₀—试剂空白测定液中氮的含量,单位为微克(μg);
- V₁—试样消化液定容体积,单位为毫升(mL);
- V₂—制备试样溶液的消化液体积,单位为毫升(mL);
- V₃—试样溶液总体积,单位为毫升(mL);

V_4 ——测定用试样溶液体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量或体积,单位为克或毫升(g或mL);

F ——氮换算为蛋白质的系数。

蛋白质中的氮含量一般为15%~17.6%,按16%计算乘以6.25即为蛋白质,乳制品为6.38,面粉为5.70,玉米、高粱为6.24,花生为5.46,米为5.95,大豆及其制品为5.71,肉与肉制品为6.25,大麦、小米、燕麦、裸麦为5.83,芝麻、向日葵为5.30。

13 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的5%。
