

纯牛奶中蛋白氮测定与外源非蛋白氮风险监测*

徐 伟, 聂四平, 李 军, 胡 勇

(贵州医科大学 公共卫生学院 环境污染与疾病监控省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 建立纯牛奶中蛋白氮测定与外源非蛋白氮风险监测方法。方法: 纯牛奶经甲醛和三氯乙酸溶液沉淀分离蛋白质后, 用自动凯氏定氮仪分别测定沉淀和滤液中氮含量, 根据3倍标准偏差原则抽检确定纯牛奶中内源非蛋白氮标准范围, 后监测纯牛奶中非蛋白氮与该范围的差异。结果: 本文方法蛋白氮和非蛋白氮加标回收率分别为97.2%和101.7% ($n=6$), 相对标准偏差RSD均小于5%, 与国家标准方法比较, 经配对 t 检验分析, 纯牛奶中总氮的测定结果无显著性差异 ($P>0.05$); 样本中内源非蛋白氮服从正态分布 ($n=54$), $\bar{x} \pm 3s = (0.306 \pm 0.120) \text{g/L}$, 能监测0.28 g/L外源非蛋白氮风险。结论: 本文方法能有效排除外源非蛋白氮对蛋白氮测定的干扰, 并可同时监测外源非蛋白氮风险, 可用于纯牛奶中蛋白氮测定与外源非蛋白氮风险监测。

[关键词] 食品检查; 蛋白质; 非蛋白氮

[中图分类号] R151.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)12-1334-04

Determination of Protein Nitrogen and Risk Monitoring of Exogenous Non-protein Nitrogen in Pure Milk

XU Wei, NIE Siping, LI Jun, HU Yong

(Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of protein nitrogen and monitoring risk of exogenous non-protein nitrogen in pure milk. **Methods:** After the proteins in pure milk were precipitated and separated by formaldehyde and trichloroacetic acid solution, nitrogen in the filtrate and precipitate were respectively measured by Automatic Kjeldahl nitrogen analyzer. According to the principle of three times sigma, the standard range of endogenous non-protein nitrogen in pure milk were determined by sampling, then monitored differences between non-protein nitrogen in pure milk and the standard range. **Results:** The recovery rate of this method for protein nitrogen and non-protein nitrogen were 97.2% and 101.7% ($n=6$), the RSD were less than 5%. The data was analyzed using paired t -test and showed that no significant difference between total nitrogen in pure milk determined by this method and the GB method ($P>0.05$). Endogenous non-protein nitrogen in pure milk obey normal distribution ($n=54$), $\bar{x} \pm 3s = (0.306 \pm 0.120) \text{g/L}$. This method can monitor 0.28 g/L of exogenous non-protein nitrogen. **Conclusion:** This method can effectively eliminate the interference of exogenous non-protein nitrogen on the determination of protein nitrogen, and can simultaneously monitor the risk of exogenous non-protein nitrogen, which can be used for the determination of protein nitrogen and the risk monitoring of exogenous non protein nitrogen in pure milk.

[Key words] food inspection; protein; non-protein nitrogen

*[基金项目] 贵州省卫生厅科学技术基金项目(gzwbj2012-1-116)

网络出版时间:2015-11-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20151116.2301.032.html>

蛋白质含量是评价食品营养价值的重要指标,现行国家标准对食品中蛋白质含量的检测方法以凯氏定氮法为主。近年来,向食品中添加非蛋白氮以提高蛋白质含量的手段多种多样,随着新型非蛋白氮化合物不断被合成,食品中外源非蛋白氮风险随之增加,而我国食品安全标准中尚缺有效监测食品中外源非蛋白氮存在的方法,这对食品安全构成严重威胁,故急需建立食品中蛋白氮测定与外源非蛋白氮风险监测方法。目前非蛋白氮检测方法主要有凯氏定氮法^[1-6]和其他仪器分析法(如高效液相色谱法、气相色谱法、离子色谱法和近红外光谱法等)^[7-17],但文献报道的凯氏定氮法无法准确测定含三聚氰胺样品中的非蛋白氮,而其他仪器分析法对外源非蛋白氮风险仅能逐一进行排查。因此,本文以市购纯牛奶为实验对象,对凯氏定氮法的样品前处理过程加以改进,分离检测纯牛奶中蛋白氮和非蛋白氮含量,并抽样检测确定纯牛奶中内源非蛋白氮正常含量范围,以建立在测定蛋白氮的同时监测外源非蛋白氮风险的方法,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

Kjeltec 8200 型自动凯氏定氮仪(附带 Tecator Digestor 型消化炉, FOSS 公司), Mettler Toledo AB265-S 型电子天平(Mettler Toledo 公司), VDR-TEX-5 型漩涡混匀器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司), GM-0.33 II 型隔膜真空泵(天津市腾达过滤器件厂), HH-8 型数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司)。牛血清白蛋白(优级纯, 98%), 其他试剂均为分析纯, 实验用水为 Milli-Q 超纯水($>18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), 混合指示剂: 称取甲基红和溴甲酚绿各 0.1 g, 分别用 95% 乙醇溶液溶解并稀释至 100 mL, 临用时将 1 份甲基红-乙醇溶液与 5 份溴甲酚绿-乙醇溶液混合。

1.2 方法

移取纯牛奶 5.00 mL, 加入甲醛 3 mL, 漩涡混

匀后于 70 °C 水浴加热 10 min, 加入 70 °C 150 g/L 三氯乙酸溶液 5 mL, 漩涡混匀 1 min, 抽滤分离, 用 70 °C 150 g/L 三氯乙酸溶液 5 mL 分多次洗涤器皿和沉淀, 收集沉淀和滤液于 2 支消化管中, 各加入硫酸铜 0.2 g、硫酸钾 2.0 g 和浓硫酸 15 mL, 于 420 °C 消化约 2.5 h, 直至消化液变为澄清的蓝绿色溶液, 冷却; 将消化管放入自动凯氏定氮仪中进行测定, 设置稀释用水 30 mL, 400 g/L 氢氧化钠溶液 70 mL, 20 g/L 硼酸溶液 30 mL, 蒸馏时间 5 min, 蒸汽量 90%; 吸收液滴加混合指示剂 0.5 mL, 用 0.050 0 mol/L 盐酸标准溶液滴定至溶液呈淡红色, 0.5 min 未褪色即为终点。同时做空白试验。

1.3 统计学方法

纯牛奶中总氮、沉淀氮、滤液氮、蛋白氮、内源非蛋白氮含量等为计量资料, 以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS 17 统计软件进行数据分析, 国家标准方法测定的总氮含量与本文方法测定的沉淀和滤液中氮含量之和比较、纯牛奶中蛋白氮测定与对照组比较均采用配对样本 *t* 检验, $P > 0.05$ 表明差异无统计学意义; 纯牛奶中内源非蛋白氮含量分布, 采用 *K-S* 检验, $P > 0.05$ 表明差异无统计学意义。

2 结果

2.1 方法准确度与精密度试验

移取 5.00 mL 同袋牛奶 18 份, 均分为 3 组, 其中 1 组作为对照组, 1 组加入 1 mL 20 g/L 牛血清白蛋白标准溶液(国家标准方法测得氮含量为 3.231 g/L), 另 1 组加入三聚氰胺 5.0 mg(相当于非蛋白氮 3.330 mg), 分别按照 1.2 项下操作测定每份样品沉淀中蛋白氮含量和滤液中非蛋白氮含量, 并计算蛋白氮和非蛋白氮加标回收率及各组内测量值的相对标准偏差, 以考察本文方法的准确度和精密度; 另移取 5.00 mL 上述同袋牛奶 18 份, 按上述分组方法分组, 采用现行国家标准方法测定每份样品中总氮含量, 与本文方法同组测得的沉淀和滤液中氮含量之和进行比较。结果见表 1。

表 1 本实验所用蛋白氮和非蛋白氮检测方法的准确度与精密度

Tab. 1 The accuracy and precision of this method

组别	蛋白氮加 入量(mg)	非蛋白氮加 入量(mg)	国家标准方法		本文方法					
			总氮含量 (g/L)	RSD (%)	沉淀中氮 含量(g/L)	RSD (%)	蛋白氮回 收率(%)	滤液中氮 含量(g/L)	RSD (%)	非蛋白氮回 收率(%)
1	0	0	4.957	0.8	4.620	0.5	—	0.345	4.3	—
2	3.231	0	5.591	0.8	5.248	0.3	97.2	0.349	4.0	—
3	0	3.330	5.630	0.9	4.629	0.9	—	1.022	1.2	101.7

结果经配对 *t* 检验分析,国家标准方法测定的总氮含量与本文方法测定的沉淀和滤液中氮含量之和无统计学意义 ($P > 0.05$);在无外源非蛋白氮时,因样品中存在微量内源非蛋白氮,故本文方法测定的蛋白氮相对国家标准方法测定的总氮略显偏低;本文方法测定牛奶中蛋白氮和非蛋白氮均具有较高的准确度和精密度,蛋白氮和非蛋白氮加标回收率分别为 97.2% 和 101.7%, $RSD < 5.0\%$ 。

2.2 纯牛奶中内源非蛋白氮正常范围

移取 5.00 mL 3 个品牌各 3 个批次的纯牛奶各 6 份,分别按 1.2 项下操作测定滤液中的非蛋白氮,并以样本均值加减 3 倍标准偏差确定纯牛奶中

内源非蛋白氮正常范围。结果见表 2。结果经正态分布单样本 *K-S* 检验表明,具有相同生产工艺的 3 个品牌不同批次纯牛奶中内源非蛋白氮含量服从正态分布,根据 3 倍标准偏差原则,纯牛奶中内源非蛋白氮正常范围为(0.186 ~ 0.426) g/L。

2.3 纯牛奶中蛋白氮测定与外源非蛋白氮风险监测

移取 5.00 mL 同袋纯牛奶 24 份,均分为 4 组,其中 1 组作为对照组,另 3 组分别加入约相当于 1.4 mg 氮的三聚氰胺、尿素和硫酸铵非蛋白氮化合物,分别按 1.2 项下操作,测定沉淀和滤液中氮含量,并分析滤液氮含量与 2.2 项下内源非蛋白氮范围的偏离程度。结果见表 3。

表 2 纯牛奶中内源非蛋白氮测定

Tab. 2 Determination of endogenous non protein nitrogen in pure milk

品牌	批	内源非蛋白氮含量(g/L)					组内均值	组间均值	定值范围
		$\bar{x}_1 \pm s_1$ (g/L)	$\bar{x}_2 \pm s_2$ (g/L)	$\bar{x}_2 \pm 3s_2$ (g/L)					
品牌 1	1	0.352	0.367	0.348	0.372	0.326	0.358	0.354 ± 0.017	
	2	0.323	0.315	0.357	0.336	0.340	0.328	0.333 ± 0.015	
	3	0.345	0.366	0.329	0.317	0.334	0.341	0.339 ± 0.017	
品牌 2	1	0.243	0.261	0.256	0.278	0.248	0.267	0.259 ± 0.013	
	2	0.282	0.263	0.256	0.279	0.254	0.242	0.263 ± 0.016	0.306 ± 0.040
	3	0.235	0.232	0.263	0.258	0.266	0.247	0.250 ± 0.015	
品牌 3	1	0.325	0.334	0.327	0.338	0.317	0.294	0.323 ± 0.016	
	2	0.295	0.315	0.332	0.314	0.298	0.324	0.313 ± 0.015	
	3	0.341	0.309	0.334	0.338	0.324	0.307	0.326 ± 0.015	

表 3 纯牛奶中蛋白氮测定与外源非蛋白氮风险监测

Tab. 3 Determination of protein nitrogen and risk monitoring of exogenous non protein nitrogen in pure milk

组别	外源非蛋白氮		蛋白氮含量 (g/L)	非蛋白氮含量(g/L)						外源氮平均		
	化合物	加入量(mg)		1	2	3	4	5	6	\bar{x}	RSD(%)	回收率(%)
1	—	—	4.640 ± 0.017	0.326	0.348	0.338	0.362	0.358	0.328	0.343	4.7	—
2	三聚氰胺	2.0	4.638 ± 0.026	0.622	0.605	0.596	0.598	0.603	0.619	0.607	1.9	99.2
3	尿素	3.0	4.644 ± 0.036	0.619	0.637	0.625	0.621	0.631	0.628	0.627	1.2	101.3
4	硫酸铵	6.5	4.642 ± 0.022	0.608	0.606	0.632	0.615	0.605	0.624	0.615	1.8	98.7

结果表明,样品中添加约 1.4 mg 非蛋白氮(即样品中外源非蛋白氮含量为 0.28 g/L,仅相当于增加 0.18% 的蛋白质),经与对照组配对 *t* 检验,蛋白氮的测定结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$),三聚氰胺、尿素和硫酸铵在滤液中的回收率分别为 99.2%、101.3% 和 98.7%,对蛋白氮的测定无干扰;非蛋白氮含量明显高于 2.2 中纯牛奶内源非蛋白氮上限值,约为该值的 140%。故本文方法在测定蛋白氮时能有效排除外源非蛋白氮干扰,并可同时监测 0.28 g/L 的外源非蛋白氮风险。

3 讨论

目前食品中外源非蛋白氮风险主要有三聚氰胺、尿素及其衍生物和铵盐等,除三聚氰胺外,其他非蛋白氮化合物通常均具有良好的水溶性。三聚氰胺水中溶解度较小,利用常用的蛋白质沉淀分离方法难以使之与沉淀完全分离,对蛋白氮和非蛋白氮测定均存在干扰^[3-4]。本文在前人研究基础上,对凯氏定氮法的样品前处理过程加以改进,利用三

聚氰胺与甲醛反应生成可溶性产物的特性,在沉淀蛋白质前加入适量甲醛以溶解样品中可能存存的三聚氰胺,后加入三氯乙酸溶液沉淀蛋白质,经沉淀分离后检测滤液含氮量,若结果大于样品中内源非蛋白氮范围上限值,即可认为该样品中可能存在外源非蛋白氮风险。实验表明,本文方法对纯牛奶中蛋白氮和非蛋白氮测定的准确度和精密度较高,蛋白质分离效果较好,能有效排除三聚氰胺、尿素和硫酸铵等外源非蛋白氮对蛋白氮测定的干扰,并可同时监测 0.28 g/L 外源非蛋白氮风险。但因抽样多因素影响,本文纯牛奶中内源非蛋白氮含量范围仅作参考。

本文以纯牛奶作为实验对象,建立了一种测定蛋白氮的同时监测外源非蛋白氮风险的方法,为其他类型的奶制品和食品中外源非蛋白氮风险监测奠定了研究基础。如在食品审批过程明确该类食品内源非蛋白氮正常范围,即可在食品生产和流通环节借鉴本文方法进行食品外源非蛋白氮风险监测,从而促进食品安全生产和有效监管。

4 参考文献

- [1] 赵琴. 乳粉中非蛋白氮含量测定的不确定度评价[J]. 农产品加工·学刊, 2012(9):125-128.
- [2] 王静,端礼钦,冯群科,等. 生鲜牛乳中非蛋白氮含量测定方法改进研究[J]. 现代农业科, 2011(9):366-367
- [3] 任国谱,孟宪娇,余兵,等. 生鲜乳及工业奶粉中酸溶性非蛋白氮质量分数的测定[J]. 中国乳品工业, 2010(5):42-45.
- [4] 刘莹,傅泽田,侯彩云,等. 人为添加三聚氰胺液态乳中蛋白质含量测定方法的研究[J]. 中国农业大学学报, 2009(2):22-26.
- [5] GB/T 21704-2008. 乳与乳制品中非蛋白氮含量的测定[S]. 中华人民共和国国家标准.
- [6] SN/T 3382-2012. 出口乳与乳制品中非蛋白氮含量的测定[S]. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准.
- [7] 宋薇,张姝,陈晓旭,等. 高效液相色谱-荧光检测器法测定乳和乳粉中尿素含量[J]. 乳业科学与技术, 2014(1):23-26.
- [8] 李美桃,王波,葛冬梅,等. 鲜牛乳中掺杂非蛋白氮及非乳蛋白的检测研究[J]. 中国乳品工业, 2014(6):44-47.
- [9] 曾凯,刘峙嵘,宁雅君,等. 气相色谱-质谱联用法同时测定乳及乳制品中的三聚氰胺及肌酐[J]. 色谱, 2013(5):477-480.
- [10] 王祖翔,蒋俊,孙莉,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的尿素、缩二脲与双氰胺[J]. 分析测试学报, 2012(5):593-599.
- [11] 李永生,梁琴琴,侯艳秋,等. 用于高效液相色谱测定乳制品中三聚氰胺的流动注射在线固相萃取富集系统[J]. 分析化学, 2012(2):298-303.
- [12] 王祖翔,余杨,孙莉,等. 离子色谱法测定食品中的无机铵[J]. 食品与机械, 2012(4):96-99.
- [13] 黄晖,向东山,李丽,等. 巴比妥酸衍生物荧光增强法快速测定牛奶中的三聚氰胺[J]. 高等学校化学学报, 2011(11):2504-2508.
- [14] 王炼,庞晶晶,余辉菊. 超高效液相色谱法测定乳及乳制品中的三聚氰胺[J]. 分析试验室, 2010(4):53-55.
- [15] 张辰凌,田婧,秦卫东. 毛细管电泳-电容耦合非接触电导法检测牛奶中金属离子和三聚氰胺[J]. 分析化学, 2010(10):1497-1500.
- [16] 徐云,王一鸣,吴静珠,等. 用近红外光谱检测牛奶中的三聚氰胺[J]. 红外与毫米波学报, 2010(1):53-56.

(2015-06-16 收稿,2015-09-18 修回)

中文编辑:刘平;英文编辑:赵毅

(上接第 1333 页)

- [6] 祁慧萌,白小涓,周红瑜,等. 血管弹性随年龄进行性减低 310 例的自身对照分析[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2013(9):701-704.
- [7] Asmar R, Benetos A, London G, et al. Aortic distensibility in normotensive, untreated and treated hypertensive patients[J]. Blood Press, 1995(1):48-54.
- [8] 王显,赵建功,胡大一. 中国脉搏波传导速度评价动脉硬化参数的参数及流行病学研究[J]. 中国康复理论与实践, 2008(4):305-308.
- [9] 周红瑜,白小涓,吴兵,等. 增龄是影响健康人臂踝脉搏波速度的主要因素[J]. 中国老年学杂志, 2009(24):3172-3176.
- [10] 曹霞,陈志恒,朱小玲,等. 围绝经期女性颈动脉内膜中层厚度、斑块与臂踝脉搏波传导速度的关系[J]. 中国老年学杂志, 2010(30):3152-3153.
- [11] 樊广渊,郑延松,陈志来,等. 20 748 例健康体检对象肱踝脉搏波传导速度的分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014(8):803-807.

(2015-08-20 收稿,2015-10-25 修回)

中文编辑:戚璐;英文编辑:赵毅