

实验技术与方法

离子色谱法测定原料乳中蛋白质含量

房宁李倩巩俐彤

(北京市大兴区疾病预防控制中心,北京 102600)

摘要:目的 建立测定原料乳中蛋白质的离子色谱法。方法 用 15% 三氯乙酸沉淀原料乳中蛋白并抽滤得滤液,用硫酸-双氧水体系分别消解原料乳及滤液,用 20 mmol/L 的甲烷磺酸作淋洗液, Ionpac CS12A 色谱柱, DS-6 电导检测器测定原料乳及滤液中的 NH_4^+ -N 含量,两者之差乘以转换系数即为蛋白质含量。结果 蛋白质(以 NH_4^+ -N 计)在 0.2 ~ 10 mg/L 范围内线性良好,该方法的定量限为 0.038 g/100 g,加标回收率为 90.0% ~ 105.0%,相对标准偏差(RSD)为 1.06% ~ 5.38%。结论 本法简便、快速、准确,灵敏度及精密度高,适用于原料乳中蛋白质含量的测定。

关键词:色谱法;离子交换;蛋白质类;原料乳;氮

Determination of Proteins in Crude Milk by Ion Chromatography

FANG Ning, LI Qian, GONGLI-tong

(Daxing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102600, China)

Abstract: **Objective** To develop an ion chromatography method for the determination of protein in raw milk. **Method** The proteins in raw milk were precipitated by 15% trichloroacetic acid and then filtered. The raw milk and the filtrate were digested separately by a H_2SO_4 - H_2O_2 system. The eluent was 20 mmol/L methanesulfonic acid. The analytical column was Ionpac CS12A and the NH_4^+ -N content was detected by DS-6 conductivity detector. The protein content in raw milk was calculated by the difference between the NH_4^+ -N content of raw milk and that of the filtrate, and multiplied by a conversion factor. **Results** The content of protein calculated by NH_4^+ -N showed a good linearity in the range between 0.2 and 10 mg/L, the limit of quantification was 0.038 g/100 g and the recovery of standard addition was 90.0%~105.0% with relative standard deviation (RSD) of 1.06%~5.38%. **Conclusion** The method was simple, rapid and accurate, and proved to be satisfactory for the determination of protein content in raw milk.

Key words: Chromatography, Ion Exchange; Proteins; Crude Milk; Nitrogen

目前,普遍采用凯氏定氮法测定原料乳中总氮含量来推算其蛋白含量^[1,2],该法有消解时间长、辅助试剂多、重现性差及操作繁杂等缺点,且不能去除非蛋白氮对测定结果的影响。本法在参考标准方法^[3]的基础上,试验了离子色谱法测定原料乳总氮与非蛋白氮含量,再由两者之差计算蛋白质含量的方法;对原料乳中非蛋白氮成分的溶解条件、蛋白沉淀条件、样品消化处理方法和仪器条件进行了优化,建立了离子色谱仪测定原料乳蛋白质的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

美国戴安公司 ICS-1500 离子色谱仪(附 CGI2A 保护柱;CSRS-ULTRA 4mm 自身再生型抑制柱;DS-6 电导检测器;Chromleon 软件),赛多利斯 BP 211D 电子天平,上海和泰公司 MASTER-SPWSUV 纯水机,

0.45 μm 水系滤膜。

1.2 试剂

NH_4^+ -N 标准溶液,编号 CBW(E)081619,浓度为 1 000 mg/L;尿素氮标准溶液,编号 BW3453,浓度为 1 000 mg/L;三聚氰胺标准物质,编号 BW3831,其特性量为 99.9%,使用前配制成含氮为 1 000 mg/L 的标准溶液。以上标准物质均购于国家标准物质研究中心。甲烷磺酸、三氯乙酸、硫酸、双氧水(30%),均为保证试剂,购于迪马公司。试验用水为 18.2 M $\Omega\cdot\text{cm}$ 超纯水。

1.3 试验方法

1.3.1 仪器工作条件 淋洗液:20 mmol/L 甲烷磺酸水溶液,流速 1.0 ml/min;抑制器电流:65 mA;进样量:25 μl ;高纯氮气压力:20 KP;采样时间:16 min。

1.3.2 标准曲线的绘制 以超纯水作溶剂,配制含 NH_4^+ -N (0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00) mg/L 的标准系列,在上述色谱条件下进样测定,每个浓度测定 3 次。仪器软件以浓度为横坐标,峰面积均值为

作者简介:房宁男 主管技师

纵坐标自动绘制标准曲线。

1.3.3 样品前处理 准确称取0.5 g混匀原料乳于三角烧瓶中,加入0.5 ml浓硫酸混匀,盖上表面皿置电炉低温加热至黑色黏稠状,放冷后沿瓶壁加入10 ml 30%过氧化氢,盖上表面皿150 加热至瓶内无色透明后,取下表面皿继续加热至液体少于1 ml。放冷后用超纯水多次洗涤,洗液并入50 ml容量瓶,加水定容后放冷,此为样品液A,用于测定样品中总氮。同条件做试剂空白。

准确称取5 g混匀试样于50 ml具塞比色管中,加入20 ml 55~60 热水混匀,置于55~60 水浴中超声振荡10 min;加入5 ml 15%的三氯乙酸溶液并加热水至刻度后混匀,再继续超声振荡10 min;于55~60 水浴中静置30 min后,取上清液经0.45 μm水系滤膜抽滤;移取10.00 ml澄清滤液于三角瓶,加入0.5 ml浓硫酸与其充分混匀。以下操作同上。定容至50 ml容量瓶,为样品液B,用于测定样品非蛋白氮。同条件做试剂空白。

1.3.4 样品测定 分别移取样品液A、样品液B各10.00 ml至100 ml容量瓶,以纯水定容混匀,即为总氮与非蛋白氮测定液,上机测定其浓度, NH_4^+ -N峰面积标准曲线法定量。

1.3.5 结果计算公式

$$X = \frac{C_1 m_2 - 5 C_2 m_1}{20 \times m_1 \times m_2} \times 6.38$$

注: X—样品蛋白质含量, g/100 g; m_1 —测定总氮样品用量, g; m_2 —测定非蛋白氮样品用量, g; C_1 —总氮测定液中氮浓度, mg/L; C_2 —非蛋白氮测定液中氮浓度, mg/L; 6.38—乳中氮与蛋白质转换系数^[1,2]。

2 结果

2.1 方法性能指标

2.1.1 方法线性范围及检出限 在本试验条件下, NH_4^+ -N标准曲线线性范围0.2~10 mg/L, 回归方程 $y = 0.95x - 0.19$, $r = 0.999$ 。按基线噪声的10倍推算本方法定量限为0.038 g/100 g。

2.1.2 方法精密度及添加回收率试验 按本方法对某样品进行6批×6次测定, 计算批内及批间RSD, 表示精密度; 在样品中分别加入相应标准液使加标氮含量为0.20、2.00、4.00 mg/L并分析6次, 计算回收率, 表示其准确度。其中总氮加标物为铵氮标准; 根据近年发现的非法添加物, 非蛋白氮加标物选择尿素氮及三聚氰胺标准分别进行加标回收试验, 具体数据见表1。

表1 方法精密度及回收率试验结果 (n=6)

测定项目	本底均值 (mg/L)	加标物质	加标水平 (mg/L)	加标后测定值 (mg/L)	回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
总氮	4.86	氨氮标准液	0.20	5.07	105.0	1.06~1.92	2.13
			2.00	6.80	97.0		
			4.00	8.79	98.2		
非蛋白氮	0.54	尿素氮标准液	0.20	0.75	105.0	3.22~5.38	4.72
			2.00	2.45	95.5		
			4.00	4.41	96.7		
		三聚氰胺氮标准液	0.20	0.72	90.0		
			2.00	2.47	96.5		
			4.00	4.48	98.5		

2.2 方法比较 用本法与凯氏定氮法分别测定12份样品蛋白质含量, 本法测定结果依次为(2.97、3.04、2.75、2.83、2.87、2.92、2.80、2.67、2.69、2.84、3.08、2.81) g/100 g, 标准方法测定结果依次为(2.84、3.11、2.83、2.72、2.69、2.79、2.91、2.74、2.82、2.73、2.92、2.86) g/100 g。将两种方法测定数据进行配对t检验, 检验假设 $H_0: \mu_d = 0$, $H_1: \mu_d \neq 0$, $\alpha = 0.05$, $n = 12$, $\bar{d} = 0.31$, $s_d^2 = 0.164$, $S_d = 0.119$, 得 $t = 0.75$, 临界值 $t_{0.20/2, 11} = 1.36$, 知 $P > 0.20$, 因此在 $\alpha = 0.05$ 水平上两种方法测定结果差异无统计学意义, 故可认为两方法测定结果一致。

2.3 实际样品的测定 用本法测定采自不同饲养场的6份原料乳中蛋白质含量, 结果见表2。

3 讨论

3.1 非蛋白氮成分的溶解度分析试验

使非蛋白氮成分充分溶于水准确测定其含量的关键。原料乳本身含有多种非蛋白氮成分, 如部分含氮维生素、有机及无机含氮物等, 其在原料乳中含量很低, 对蛋白氮的测定影响甚微, 大多在水中具有较好的溶解度^[4]。根据近年发现的伪蛋白添加物, 选择尿素及三聚氰胺进行溶解试验, 发现在55~60 热水中三聚氰胺溶解度大于10 g/L, 而尿素的溶解度更大, 加入10%的三氯乙酸后观察并无固体析出。因此按本法处理非蛋白成分能有效溶解。

3.2 蛋白沉淀剂的选择

表2 实际样品测定结果

样品编号	测定结果(g/100 g)							RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	均值	
样品1	2.84	2.76	2.87	2.81	2.91	2.79	2.83	2.03
样品2	2.73	2.90	2.86	2.98	2.77	2.82	2.84	3.21
样品3	2.69	2.73	2.79	2.75	2.82	2.77	2.76	1.68
样品4	3.02	2.96	2.84	2.92	2.88	2.90	2.92	2.16
样品5	2.58	2.81	2.67	2.73	2.76	2.70	2.71	3.01
样品6	2.78	2.66	2.74	2.82	2.71	2.85	2.76	2.64

根据国标方法^[1,3]中常用的蛋白沉淀剂与不引入阳离子的前提下,考虑到乙腈含氨基,而甲醇与硫酸生成硫酸酯类,因此它们不适用于该方法沉淀蛋白。试验证明使用15%三氯乙酸沉淀乳中蛋白效果较好^[3],能快速有效沉淀蛋白。

3.3 消化条件选择

凯氏定氮法的消化方法使样液中含大量的 K^+ 及 Cu^{2+} ^[1,2],用离子色谱测定时铵、钾分离度变差,色谱柱压增大,亦造成柱效降低及抑制器管道堵塞;本法采用少量硫酸-双氧水消化样品^[5],不引入其他阳离子,消化快速、环保,有利于离子色谱分析。

3.4 色谱柱及淋洗液的选择

文献^[5,6]报道了Inpac CS12A色谱柱分离钠、铵、钾、镁、钙及其淋洗液的条件,该柱淋洗液为流速1.0 ml/min的20 mmol/L甲烷磺酸溶液,遵照该条件进行5种组分的分离试验,得到了满意效果,其相邻两组分分离度均大于2。

3.5 抑制器电流

分别设定抑制器电流为50、55、60、65 mA进行比较,结果表明50~60 mA时虽能抑制背景电导,但测定 NH_4^+ -N灵敏度较低,而选用65 mA则可有效抑制背景电导,测定 NH_4^+ -N灵敏度较高。因此本方法抑制器电流设定为65 mA。

3.6 样液pH值

NH_4^+ 在酸性条件下稳定,结合Inpac CS12A色谱柱的pH值稳定范围^[6],分别试验了样液pH值为0.5~7几种情况下5种阳离子的分离情况,结果表

明,pH值为0.5~1.5时,离子洗脱时间快于标准系列,钠与铵、铵与钾的分离度较差;而pH值为1.5~7时,离子洗脱时间与标准系列无明显差别,相邻组分的分离度较理想。因此本方法样品溶液pH值控制在1.5~7之间。

3.7 干扰试验

在样品溶液中加入含量为20 mg/L的铁、铜、锰、锌,2 mg/L的砷、铅、镉阳离子,不干扰 NH_4^+ -N测定,但长期使用将引发柱效降低及柱压升高、抑制器污染的问题^[6];磷、碘、氯等非金属元素在样品溶液中通常以酸根阴离子形式存在,在阳离子分离柱上无保留^[6],不干扰 NH_4^+ -N测定。

参考文献

- [1] 卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.5—2003 食品卫生理化检验部分[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [2] 国家质检总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5413.1—1997 婴幼儿配方食品和乳粉蛋白质的测定[S]. 北京:中国标准出版社,1997.
- [3] 国家质检总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 21704—2008 乳与乳制品中非蛋白氮含量的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [4] 吴坤,孙秀发,张立实,等. 营养与食品卫生学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:55-84,110-113.
- [5] 夏玉宇,张完白,郭荣芬,等. 化验员实用手册[M]. 北京:化学工业出版社,2005:423-425,1055-1070.
- [6] 牟世芬,刘克纳,丁晓静,等. 离子色谱方法及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005:25-105.

[收稿日期:2009-03-31]

中图分类号:R155.57;O657.75;O629.73 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2009)06-0505-03

卫生部关于普通食品中有关原料问题的批复

卫监督函〔2009〕326号

上海市食品药品监督管理局:

你局《关于普通食品中有关原料问题的请示》(沪食药监食安〔2009〕303号)收悉。经研究,《卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知》(卫法监发〔2002〕51号)规定的可用于保健食品的物品名单中所列物品及冬虫夏草目前均不得作为普通食品原料使用。

此复。

二 九年七月二十二日