

# 人为添加非蛋白质氮乳与乳制品中 蛋白质含量测定方法的研究

陈育红, 李 宁

(内蒙古自治区产品质量监督检验所、国家乳制品及肉类产品质量监督检验中心 呼和浩特 010070)

**摘 要:** 本研究分别用 GB/T 5009.5《食品中蛋白质的测定》和 NY/T 1678《乳与乳制品中蛋白质的测定——双缩脲比色法》,测定了添加非蛋白氮物质的乳及乳制品中的蛋白质含量。结果表明 GB/T 5009.5 方法不能区分样品中的蛋白氮与非蛋白氮;采用 NY/T 1678-2008 方法可以较好的实现蛋白氮和非蛋白氮物质的分离,有效地排除三聚氰胺、尿素、甘氨酸和水解蛋白等多种非蛋白氮对乳及乳制品中蛋白质含量检测的影响,该方法前处理方法快速、简单,检测结果准确。

**关键词:** 乳及乳制品;蛋白质;双缩脲比色法;非蛋白氮

**中图分类号:** TS252.7    **文献标识码:** A    **国家标准学科分类代码:** 150.2510

## Research on the methods of protein determination after added non-protein in milk and dairy products

Chen Yuhong, Li Ning

(Institute of Products Quality Inspection Inner Mongolia P. R. China, The National Center of Dairy and Meat Products Supervision and Inspection, Hohhot 010070, China)

**Abstract:** The contents of protein were determined using both “GB/T 5009.5 determination of protein in foods” method and “NY/T 1678 determination of protein in milk and dairy products with Biuret spectrophotometry” method, after adding non-protein nitrogen in milk and dairy products. It is shown from the results that GB/T 5009.5 method can not distinguish between protein nitrogen and non-protein nitrogen. Compared with the GB/T 5009.5 method, the NY/T 1678 method can determined the contents of protein accurately after adding melamine and Urea or Proteinum hydrolysatum in milk and dairy products. The method is accurate, simple and rapid.

**Key words:** milk and dairy products; protein; Biuret spectrophotometry method; non-protein nitrogen

### 1 引 言

乳蛋白含有大量的人体必需氨基酸,是人体细胞不可缺少的,是牛乳中最重要的特征营养成分,乳及乳制品中蛋白质含量是必测指标<sup>[1]</sup>。

GB/T 5009.5《食品中蛋白质的测定》采用的是凯氏定氮法。凯氏定氮法是在 1883 年由丹麦科学家凯耶达尔提出,沿用至今已百余年。此

测定蛋白质方法的原理是,在消化过程中,样品中的氮与浓硫酸作用,转化成硫酸铵,通过滴定分析计算样品中的氮含量,再乘以转化系数,折合成蛋白质的含量<sup>[2]</sup>。所测的蛋白质的含量为蛋白氮与非蛋白氮合成的粗蛋白含量,并不能区分蛋白质氮和非蛋白质氮。

由于凯氏定氮法不能区分蛋白质氮和非蛋白质氮,一些不法生产和经营者为获取高额利润,在乳及乳制品加工中添加三聚氰胺、尿素、化

肥、水解蛋白等非蛋白质氮,以提高检测结果中蛋白质的含量<sup>[3]</sup>,从而使劣质产品通过食品检验机构的检测,致使食品安全事件频频发生。

双缩脲比色法是测定乳蛋白的另一种方法<sup>[4]</sup>。此方法基于碱性条件下,含有肽键的化合物与 $\text{Cu}^{2+}$ 形成紫红色络合物,在540 nm下测定其吸光度值而得出蛋白质的含量<sup>[5]</sup>。采用NY/T 1678《乳与乳制品中蛋白质的测定——双缩脲比色法》,可以较好的实现蛋白氮和非蛋白氮物质的分离,有效地排除三聚氰胺、尿素和水解蛋白等多种非蛋白氮对乳及乳制品中蛋白质含量检测的影响,得到较好的结果。

## 2 材料和方法

### 2.1 仪器

分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司,感量为1 mg);消煮炉(金坛市盛蓝仪器制造有限公司);自动凯氏定氮仪(金坛市盛蓝仪器制造有限公司);离心机(上海安亭科学仪器厂);超声波清洗器(昆山舒美仪器制造有限公司);分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)

### 2.2 试剂

2.2.1 酪蛋白标准品(纯度 $\geq 99\%$ ),三氯乙酸,四氯化碳,氢氧化钾,氢氧化钠,酒石酸钾钠,硫酸铜,硫酸钾,浓硫酸,硼酸,95%乙醇,甲基红,溴甲酚绿,盐酸。除非另有规定,本方法中所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6682规定的三级水。

2.2.2 蛋白质标准溶液:准确称取1.000 0 g(0.000 2 g)酪蛋白标准品,溶于水并定容至100 mL,配制成10 mg/mL标准液备用。

2.2.3 氢氧化钾溶液(10 mol/L):准确称取560 g氢氧化钾。加水溶解并定容至1 L。

2.2.4 酒石酸钾钠溶液(250 g/L):准确称取250 g酒石酸钾钠,加水溶解并定容至1 L。

2.2.5 硫酸铜溶液(40 g/L):准确称取40 g硫酸铜,加水溶解并定容至1 L。

2.2.6 双缩脲试剂:将10 mol/L氢氧化钾10 mL(如2.2.3所示方法配制)和250 g/L酒石酸钾钠溶液(如2.2.4所示方法配制)20 mL加到约800 mL蒸馏水中,剧烈搅拌,同时缓慢加入

40 g/L硫酸铜溶液(如2.2.5所示方法配制)30 mL,定容至1 000 mL。

2.2.7 三氯乙酸溶液(150 g/L):准确称取150 g三氯乙酸。加水溶解,并定容至1 L。

2.2.8 硼酸溶液(20 g/L):称取20 g硼酸,加水溶解,并稀释至1 000 mL。

2.2.9 氢氧化钠溶液(400 g/L):称取40 g氢氧化钠加水溶解后,放冷,并稀释至100 mL。

2.2.10 盐酸标准滴定溶液:浓度为0.050 0 mol/L。

2.2.11 甲基红乙醇溶液(1 g/L):称取0.1 g甲基红,溶于95%乙醇,用95%乙醇稀释至100 mL。

2.2.12 溴甲酚绿乙醇溶液(1 g/L):称取0.1 g溴甲酚绿,溶于95%乙醇,用95%乙醇稀释至100 mL。

2.2.13 混合指示液:1份甲基红乙醇溶液(2.2.11)与5份溴甲酚绿乙醇溶液(2.2.12)临时混合。

### 2.3 材料

某品牌市购液态奶、尿素、甘氨酸、三聚氰胺、水解蛋白。

### 2.4 实验方法

2.4.1 GB/T 5009.5 测定液体乳中蛋白质含量

样品处理:精密称取2.0 g液体乳5份,分别添加三聚氰胺、尿素、甘氨酸、水解蛋白4种非蛋白氮各10 mg于消化管中,加入0.2 g硫酸铜,3 g硫酸钾及20 mL浓硫酸<sup>[6]</sup>,摇匀后于消煮炉上消化完全,放冷。取与样品等量的硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸按同一方法做试剂空白试验<sup>[6]</sup>。

测定:将以上消化管安置在自动凯氏定氮仪上,向接收瓶内加入10 mL2%硼酸溶液(2.2.8)及混合指示液1滴(2.2.13),并使冷凝管的下端插入液面下,将10 mL40%氢氧化钠溶液(2.2.9)缓缓流入消化管,开始蒸馏,接收瓶吸收蒸馏液200 mL,移动接受瓶,使冷凝管下端离开液面,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0.05 N盐酸标准溶液(2.2.10)滴定至蓝紫色为终点。同时吸取10.0 mL试剂空白消化液,按同一方法做试剂空白试验。

分析结果的表述:

试样中蛋白质的含量按式(1)进行计算。

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

式中:

$X$ ——试样中蛋白质的含量,单位为克每百克(g/100 g);

$V_1$ ——盐酸标准滴定液的体积,单位为毫升(mL);

$V_2$ ——试剂空白消耗盐酸标准滴定液的体积,单位为毫升(mL);

$c$ ——盐酸标准滴定溶液浓度,单位为摩尔每升(mol/L);

0.0140——盐酸[ $c(\text{HCl}) = 1.000 \text{ mol/L}$ ]标准滴定溶液相当的氮的质量,单位为克(g);

$m$ ——试样的质量,单位为克(g);

$F$ ——氮换算为蛋白质的系数。

#### 2.4.2 双缩脲法测定液体乳中蛋白质含量

准确称取液体乳,分别添加三聚氰胺、尿素、甘氨酸、水解蛋白4种非蛋白氮各10 mg,至于50 mL离心管中,加入10 mL三氯乙酸溶液(2.2.7)混匀,静置10 min,10 000 r/min离心10 min。弃取上清液加入2 mL四氯化碳20 mL双缩脲试剂(2.2.6),用超声波清洗器震荡使其溶解,放置显色10 min,10 000 r/min离心20 min,取上清液在540 nm下测定其吸光度值。根据标准曲线,计算出试样中蛋白质含量<sup>[7]</sup>。

试样中蛋白质含量按照式(2)进行计算。

$$X = 2c/m_0 \quad (2)$$

式中:

$X$ ——100 g样品中蛋白质的含量,单位为克每百克(g/100 g);

$C$ ——蛋白质质量浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

$m_0$ ——称取样品质量,单位为克(g)。

### 3 结果与分析

#### 3.1 液体乳中添加非蛋白物质的配制

#### 3.2 酪蛋白标准曲线的绘制

取7支试管,分别加入0 mL、1 mL、3 mL、5 mL、7 mL、10 mL、15 mL蛋白质标准溶液

(2.2.2), (测定溶液中酪蛋白质量浓度分别为0 mg/mL、0.2 mg/mL、0.6 mg/mL、1.0 mg/mL、1.4 mg/mL、2.0 mg/mL、3.0 mg/mL),再加入2 mL四氯化碳和20 mL双缩脲试剂(2.2.6)震荡使其溶解,放置显色10 min,10 000 r/min离心20 min,取上清液在540 nm下测定其吸光度值,绘制酪蛋白标准曲线如图1所示。

表1 液体乳中添加非蛋白物质的配制

Table 1 Milk formulation after adding non-protein

添加物	添加量/mg	液体乳/g
空白	0	2.000
三聚氰胺	10	2.000
尿素	10	2.000
甘氨酸	10	2.000
水解蛋白	10	2.000

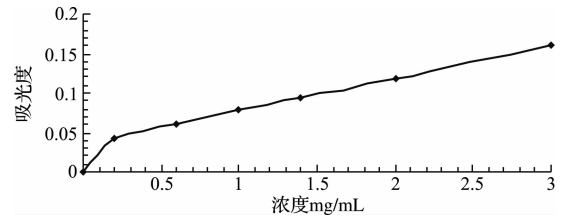


图1 双缩脲法检测蛋白质标准曲线

Fig. 1 The standard curve of protein determination

由图1可知,当酪蛋白质量浓度为0.2~3.0 mg/mL时,与溶液的吸光度值有较好的线性关系。

#### 3.3 不同方法测定添加非蛋白氮样品中的蛋白质含量

分别用凯氏定氮法和双缩脲比色法,测定添加非蛋白氮样品中的蛋白质含量,结果如表2所示。

表2 不同方法测定添加非蛋白氮样品中的蛋白质含量

Table 2 Contents of protein in milk after adding non-protein 单位:g/100 g

添加物	未添加	三聚氰胺	尿素	甘氨酸	水解蛋白
凯氏定氮法	3.18	4.56	4.18	4.37	4.43
双缩脲比色法	3.14	3.10	3.20	3.16	3.22

## 4 讨 论

从食品安全控制可靠性上考虑,解决在乳及乳制品加工中添加三聚氰胺、尿素、化肥、水解蛋白等多种非蛋白质氮的根本方法,是直接检测乳及乳制品中的蛋白质含量。这样就能阻挡市场监管上的漏洞,使伪劣产品无所遁形,使添加三聚氰胺等假蛋白质物质毫无意义。因此,区别蛋白质氮与非蛋白氮的意义,在于可以获得真实准确的蛋白质含量。

动植物总氮包括蛋白质氮和非蛋白质氮。非蛋白质氮主要以氨基酸和酰胺及少量无机氮化物的形式存在,都是可溶于三氯乙酸溶液的小分子化合物。生物体中的含氮化合物以有机氮为主,无机氮含量极少,通常只需测定总氮量即可说明问题。这也是目前国标采用凯氏定氮法检测蛋白质含量的主要原因<sup>[8]</sup>。GB/T 5009《食品中蛋白质的测定》采用的是凯氏定氮法。该法评价的是全氮量,但不能区分蛋白质氮和非蛋白质氮,致使无法识别通过添加三聚氰胺、尿素、化肥、水解蛋白等多种非蛋白质氮。

双缩脲( $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ )在碱性溶液中能与 $\text{Cu}^{2+}$ 产生紫红色络合物,该反应称双缩脲反应。蛋白质都有两个以上的肽键( $\text{CO-NH-}$ ),因此可以发生双缩脲反应,且蛋白质的含量与紫红色络合物颜色的深浅成正比,故可用来测定蛋白质含量。三聚氰胺、尿素、甘氨酸、水解蛋白等多种非蛋白氮。在NY/T 1678-2008《乳与乳制品中蛋白质的测定——双缩脲比色法》所规定的检测方法中,蛋白质检测条件不与双缩脲试剂产生显色反应,使得NY/T 1678-2008法测定的结果,即添加了三聚氰胺、尿素、甘氨酸、水解蛋白等多种非蛋白氮物质的液体乳蛋白质含量与液体乳中真实的蛋白质含量接近。

目前,我国乳及乳制品产品标准中蛋白质项目指定的检测方法仍使用凯氏定氮法,为了保证产品质量监督检验部门在乳及乳制品监督检测中,能够测定出样品中真实的蛋白质含量,有必要对现行乳及乳制品产品标准进行修订,将真蛋白质检测尽快纳入预防性安全监控标准。

## 参考文献

- [1] 程涛,孙艳波,李健. 双缩脲法测定乳中酪蛋白含量[J]. 中国乳品工业,2000,28(3):33-35.  
CHENG T, SUN Y B, LI J. Determination of casein content in milk by Biuret's method[J]. China Dairy Industry,2000,28(3):33-35.
- [2] 盛成乐. 关于凯氏定氮测定蛋白质的几个问题[J]. 中国酿造,2002(2):43-44.  
SHENG CH L. Some problems about determination of protein by Kjeldahl[J]. China Brewing, 2002(2):43-44.
- [3] 陈靖,侯彩云,牛巍,等. 乳粉蛋白氮数字图象检测方法的研究[J]. 食品科技,2007(9):221-223.  
CHEN J, HOU C Y, NIU W, et al. Research on determination of protein nitrogen in milk powder by method of digital image[J]. Food Science and Technology, 2007(9):221-223.
- [4] 王敏. 双缩脲法快速测定大豆分离蛋白粉中的粗蛋白[J]. 大豆通报,2003(13):36.  
WANG M. Rapid determination of crude protein in Soy protein powder with Biuret method[J]. Soybean Bulletin, 2003(13):36.
- [5] 任国普,李忠海,彭纯美,等. 奶粉中低聚肽质量浓度测定方法[J]. 中国乳品工业,2007,35(10):47-50.  
REN G P, LI ZH H, PENG CH M, et al. Determination of peptide content in milk powder[J]. China Dairy Industry, 2007,35(10):47-50.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009.30-2010 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2010.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T5009.30-2010 National food safety standard determination of protein in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010.
- [7] 中华人民共和国农业部. NY/T 1678-2008 乳与乳制品中蛋白质的测定——双缩脲比色法[S]. 北京:中国标准出版社,2010.  
The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Determination of protein in milk and dairy products Biuret spectrophotometry method[J]. Beijing: Standards Press of China, 2010.
- [8] 张新国,李坤. 一种快速鉴别三聚氰胺毒奶粉蛋白质含量的检测方法[J]. 中国食品工业,2010(12):65-67.

ZHANG X G, LI K. A rapid detect method of protein content in milk powder additived with Melamine [J]. China Food Industries, 2010(12):65-67.

### 作者简介

**陈育红**(1964~),女,1987年毕业于内蒙古大学化学系化学专业。内蒙古自治区产品质量检验研究院(国家乳制品及肉类产品质量监督检验中心)工作,高级工程师,主要从事乳及乳制品和肉制品质量检验。

Email: nmgchyh@163.com

**Chen Yuhong**, female, who was graduated from Chemistry Department, Inner Mongolia University in 1987, and now she is a senior engineer of Institute of Products Quality Inspection Inner Mongolia P. R. China(The National Center of Dairy and Meat Products Supervision and Inspection),

mainly engaged in the detect work of milk, dairy product and meat product.

**李宁**(1979~),女,2006年毕业于内蒙古大学化学系化学专业。内蒙古自治区产品质量检验研究院(国家乳制品及肉类产品质量监督检验中心)工作,工程师,主要从事乳及乳制品和肉制品及食品质量检验。

Email: lnyx0923@163.com

**Li Ning**, female, who was graduated from Chemistry Department, Inner Mongolia University in 2006, and now she is an engineer of Institute of Products Quality Inspection Inner Mongolia P. R. China(The National Center of Dairy and Meat Products Supervision and Inspection), mainly engaged in the detect work of milk, dairy product and meat product.