

一种乳中钙含量的快速检测方法

梁春梅, 常建军, 喻东威*, 宋晓东, 解 鑫, 李 照, 许 璐, 吴玉秋

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司中心实验室, 呼和浩特 011500)

摘 要: 目的 建立血液中钙离子临床快速检测方法检测乳中钙含量的方法。**方法** 样品采用盐酸+TX-100 稀释, 依据碱性(酸性)条件下钙与偶氮胂III作用生成的蓝色复合物颜色与钙浓度正比的正比关系, 在 650 nm 波长处测定吸光度变化, 经与钙校准液比较, 计算出样品中钙含量。方法的准确度、精密度、稳定性等用乳中钙含量检测国标方法进行验证。**结果** 建立的乳中钙含量快速测定方法与国标方法比较, 准确度(偏差 $\leq 10\%$ 的符合率达到 100%)和精密度(相对标准偏差为 10%)方面均符合要求, 且操作简单、成本低、安全性高, 单个样品检测时间由原来国标方法的 24 h 缩短至 8 min。**结论** 该方法可应用于乳中钙含量快速检测, 对生乳采购和液态奶市场筛查检测具有重要的应用价值。

关键词: 乳钙快检方法; 偶氮胂III; 国标方法

A rapid method for determination of calcium content in milk

LIANG Chun-Mei, CHANG Jian-Jun, YU Dong-Wei*, SONG Xiao-Dong, XIE Xin,
LI Zhao, XU Lu, WU Yu-Qiu

(Central Laboratory, Inner Mongolia Mengniu Dairy Products Co., Ltd., Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of calcium content in milk by rapid clinical detection of calcium ion in blood. **Methods** The sample was diluted with hydrochloric acid and TX-100. According to calcium and azo arsine III color of blue complex and calcium concentration was directly proportional relationship under alkaline (acid) condition, the absorbance change was measured at the wavelength of 650 nm, and the calcium content in the sample was calculated by comparing with the calcium calibration solution. The accuracy, precision and stability of the method were verified by the national standard method for determination of calcium content in milk. **Results** Compared with the national standard method, the established method for the rapid determination of calcium content in milk met the requirements in terms of accuracy (the coincidence rate of deviation $\leq 10\%$ reached 100%) and precision (the relative standard deviation was 10%). In addition, this method was simple to operate, low in cost and high in safety. The detection time of a single sample was shortened from 24 h in the original national standard method to 8 min. **Conclusion** This method can be applied to the rapid detection of calcium content in milk, which has important application value for raw milk purchase and liquid milk market screening.

KEY WORDS: milk calcium rapid detection method; ArsenazoIII; national standard method

基金项目: 十三五国家课题(2018YFC1604202)

Fund: Supported by National Project of the 13th Five-Year Plan (2018YFC1604202)

*通讯作者: 喻东威, 副高级工程师, 主要研究方向为食品安全风险评估。E-mail: yudongwei@mengniu.cn

*Corresponding author: YU Dong-Wei, Assistant Senior Engineer, Inner Mongolia Mengniu Dairy Co., Ltd., Hohhot 011500, China. E-mail: yudongwei@mengniu.cn

1 引言

钙是食品中重要的矿物元素,对维持机体骨骼、牙齿和心血管的健康非常有利^[1]。牛奶中含有丰富的钙,一般为 100~130 mg/100 mL^[2,3]左右,且牛奶中的钙磷比例比较好,有利于人体吸收^[4,5],是人体钙的最佳来源。随着人们对生活质量的提高,对于产品中的营养成分越来越关注,钙含量测定已成为乳品中常规营养分析必须检测的主要项目和质量指标。目前国内外钙的检测方法有很多种,有火焰原子吸收光谱法、EDTA 滴定法、电感耦合等离子体质谱法、电感耦合等离子体发射光谱法、离子选择性电极法(钙离子计法)等^[6],但这些方法存在检测时间过长、精密度不稳定、准确度不高等缺点^[7-10]。对于牛奶生产企业而言,除了要求准确度高以外,在生乳收购过程中需要快速筛选出高钙含量的生乳。本研究开发的快速检测方法是利用样品中的钙与偶氮胂Ⅲ作用生成蓝色复合物,通过在 650 nm 波长处测定吸光度的变化值,计算出样品中钙含量的方法。本方法操作简便,只需要简易的试剂即可完成测定,对人员操作要求不高且相对安全,并且该方法检测速度快,准确性高,稳定性好,可满足企业的快速检测钙含量的要求,为快速筛选获得钙含量较高的生乳提供技术保障,有效解决了生乳收购时间过长、产品滞留时间长等问题。

2 材料与方法

2.1 试剂与材料

乳钙测定试剂(包括钙测定试剂、校准品、稀释液)、盐酸稀释液(2%盐酸+0.5%Triton X-100)(上海溯源公司提供);钙测定试剂是偶氮胂Ⅲ(>95.0%,分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);氢氧化钠稀释液(0.5%,分析纯,天津市福晨化学试剂厂)。

生乳、牛奶半成品、牛奶成品,市售。

2.2 仪器与设备

SS-330 乳钙快速检测仪(上海溯源公司);Z2000 火焰原子吸收分光光度计(日本日立公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 实验原理

在酸性性(或碱性)条件下,样品中钙与偶氮胂Ⅲ作用生成蓝色复合物,其颜色深浅与钙浓度成正比,通过在 650 nm 波长处测定吸光度的变化值,与经过同样处理的钙校准液进行比较,计算出样品中钙含量。

2.3.2 样品前处理

将待测样品充分摇匀,取 100 μ L 待测奶样加入到 900 μ L 乳钙稀释液的离心管中,并吸打 3~5 次。将离心管上下颠

倒充分混匀后立即取 10 μ L 用于检测。

2.3.3 操作步骤

(1) 取 10 μ L 样品(校准品、超纯水)加入到装有 1000 μ L 钙测定试剂的离心管中并润洗枪头 3~5 次。

(2) 将离心管上下颠倒充分混匀,于(37 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min;

(3) 水浴完成后,将离心管上下颠倒充分混匀;

(4) 取 4 联杯孔置于 SS-330 仪器卡槽中,运行微孔杯校准程序,校准后请勿更换微孔杯或调整微孔杯顺序;

(5) 分别吸取 200 μ L 空白管、校准管和样品管中的反应液按顺序加入到对应的微孔杯中,并将微孔杯放置于 SS-330 仪器卡槽中,进行检测并读数。

2.3.4 不同方法间比对

随机选取不同批次生乳样品、牛奶半成品样品、牛奶成品样品,同时用 SS-330 检测仪法和国家标准 GB 5009.92-2016 《食品安全国家标准食品中钙的测定》^[1]中第一法火焰原子吸收光谱法进行钙含量检测。

2.3.5 精密度实验

选取 1 个批次样品,用快速检测方法进行精密度检测,检测 20 次。

2.3.6 稳定性实验

选取成品牛奶样品在不同日期,分别用国标方法和乳钙快检方法进行测定。

2.3.7 定量限实验

参照国标方法[方法检出限为 0.5 mg/kg(或 0.5 mg/L),定量限为 1.5 mg/kg(或 1.5 mg/L)],对钙的快检方法进行定量限实验。钙标准物质用水配制并稀释至浓度分别为 0.01、0.05、1、5、10、20、30 mg/100 mL 的钙标准溶液,用钙快速检测方法进行检测,计算回收率和相对标准偏差。

2.3.8 数据分析^[11]

不同方法对比结果偏差小于 10%,重复性实验用相对标准偏差(小于 10%)进行分析,方法定量限实验回收率范围应为 95%~105%。

3 结果与分析

3.1 稀释液的选择

随机选取 20 个不同批次生乳样品,同时采用 2 种稀释液与国标检测方法结果进行比对,结果如表 1。

从表 1 结果可知,选择氢氧化钠为稀释液与国标方法检测结果进行比较,偏差 $\leq$ 5%的符合率为 40%,偏差 $<$ 10%的符合率达到 95%;选择盐酸+TX-100 稀释液与国标方法进行比较,偏差 $\leq$ 5%的符合率达到 70%,偏差 $<$ 10%的符合率达到 100%。

综合上述结果可知盐酸+TX-100 作为稀释液偏差均小于 10%,因此选择盐酸+TX-100 作为稀释液检测样品中钙含量相对于氢氧化钠稀释液较好。

表 1 不同稀释液与国标方法比对结果
Table 1 Results of comparison between different diluents and national standard method

编号	国标法	乳钙快速检测方法/(mg/100 mL)						与国标法对比结果	
		方法 1-0.5%氢氧化钠			方法 2-盐酸+TX-100				
		平行 1	平行 2	平均值	平行 1	平行 2	平均值	方法 1	方法 2
1	137	130	131	131	130	130	130	-4.6%	-5.0%
2	121	120	121	121	120	122	121	-0.7%	-0.2%
3	114	121	124	123	119	119	119	7.5%	4.4%
4	114	121	121	121	118	116	117	5.9%	2.4%
5	117	119	119	119	120	122	121	2.0%	3.7%
6	111	119	117	118	113	114	114	6.3%	2.3%
7	117	120	123	122	119	121	120	4.1%	2.8%
8	115	117	118	118	120	120	120	2.0%	4.2%
9	115	118	120	119	117	116	117	3.2%	1.0%
10	119	123	123	123	119	121	120	3.2%	0.7%
11	124	124	124	124	118	119	119	0.0%	-4.4%
12	110	115	118	117	115	116	116	6.4%	5.5%
13	112	122	124	123	122	123	123	9.6%	9.2%
14	111	117	120	119	118	122	120	7.0%	8.4%
15	113	119	121	120	121	120	121	6.4%	6.8%
16	111	121	123	122	120	123	122	10.1%	9.7%
17	113	119	122	121	121	123	122	6.7%	8.1%
18	113	122	122	122	120	119	120	7.9%	5.7%
19	115	123	124	124	117	118	118	7.1%	1.9%
20	128	117	121	119	120	124	122	-6.9%	-4.5%

3.2 方法的准确性验证

随机选取 30 个不同批次生乳样品、半成品牛奶样品和成品牛奶样品，分别采用乳钙快速检测方法、国标法进行检测比对。结果见表 2。

从表 2 可知，采用 2 种方法对不同批次的生乳样品进行检测，乳钙快速检测方法结果与国标方法比较，偏差≤5%的符合率为 60%，<10%的符合率为 100%。计算不同方法平行样的变异系数(coefficient of variation, CV)值可知，国标方法 CV 值在 0.6%~3.9%之间，乳钙快速检测法 CV 值在 0%~2.8%之间。

通过对表 2 数据进行正态性检验分析可知(如图 1)AD=0.259，小于临界值 0.725(95%置信区间)，系统服从正态分布，数据处于统计受控状态。

3.3 精密度实验

分别选取 1 个生乳样品、1 个半成品牛奶样品、1 个

成品牛奶样品，采用乳钙快速检测方法进行精密度检测，每种样品均做 20 个平行实验，检测结果见表 3。

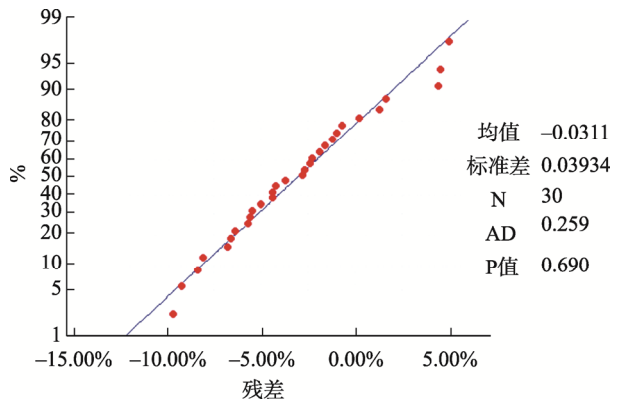


图 1 生乳样检测正态性检验图
Fig.1 Normal test diagram of raw milk sample detection

表 2 生乳样品不同检测方法比对结果
Table 2 Comparison results of different detection methods for raw milk samples

	原吸法/(mg/100 mL)				乳钙快速检测方法/(mg/100 mL)				2 种方法偏差/%
	平行 1	平行 2	CV/%	平均值	平行 1	平行 2	CV/%	平均值	
1	132	134	1.4	133	131	131	0.0	131	1.3
2	116	117	0.8	116	119	117	1.7	118	-1.6
3	111	117	4.8	114	117	117	0.0	117	-2.7
4	113	116	2.8	115	119	122	2.5	121	-5.0
5	112	114	1.1	113	114	115	0.9	115	-1.2
6	110	113	2.4	112	118	120	1.7	119	-6.6
7	123	118	4.1	120	118	119	0.8	119	1.6
8	115	116	1.5	116	120	124	3.3	122	-5.6
9	110	115	4.8	112	118	121	2.5	120	-6.4
10	116	114	2.0	115	119	121	1.7	120	-4.4
11	136	138	1.8	137	130	130	0.0	130	5.0
12	121	122	0.8	121	120	122	1.7	121	0.2
13	115	114	0.9	114	119	119	0.0	119	-4.4
14	115	114	0.7	114	118	116	1.7	117	-2.4
15	117	116	0.5	117	120	122	1.7	121	-3.7
16	112	111	0.9	111	113	114	0.9	114	-2.3
17	116	118	1.7	117	119	121	1.7	120	-2.8
18	116	114	1.9	115	120	120	0.0	120	-4.2
19	115	116	1.2	115	117	116	0.9	117	-1.0
20	120	119	1.2	119	119	121	1.7	120	-0.7
21	124	124	0.5	124	118	119	0.8	119	4.4
22	110	109	0.9	110	115	116	0.9	116	-5.5
23	113	111	1.4	112	122	123	0.8	123	-9.2
24	111	110	1.1	111	118	122	3.3	120	-8.4
25	111	115	3.5	113	121	120	0.8	121	-6.8
26	112	110	1.4	111	120	123	2.5	122	-9.7
27	111	115	3.0	113	121	123	1.6	122	-8.1
28	113	114	1.1	113	120	119	0.8	120	-5.7
29	116	115	1.2	115	117	118	0.9	118	-1.9
30	126	130	2.8	128	120	124	3.3	122	4.5

精密度实验结果表明: 乳钙快速检测方法检测生乳相对标准偏差为 2.0%、检测本成品样品相对标准偏差为 1.4%、检测成品样品相对标准偏差为 1.4%, 偏差均小于 2.0%。乳钙快速检测方法检测生乳、牛奶半成品和牛奶成品的精密度均满足要求。

3.4 稳定性实验

选取同一批次成品牛奶样品在不同日期, 用乳钙快速检测方法进行测定结果见表 4。

对前期已测定钙含量的纯牛奶样品进行连续 7 d 的测定, 其中快速乳钙检测方法得到的检测结果相对标准偏差 1.7%, 国标法检测结果相对标准偏差为 2.4%, 稳定性均符合国标中规定的精密度要求(相对标准偏差小于 10%), 且 SS-330 仪器法检测钙稳定性优于国标检测法。

3.5 定量限实验

选择不同浓度的钙标准物质, 用钙快速检测方法进行检测, 结果见表 5。

表 3 检测不同样品精密度实验结果
Table 3 Precision test results of different samples

编号	生乳 /(mg/100 mL)	半成品牛奶 /(mg/100 mL)	成品牛奶 /(mg/100 mL)
1	121	126	117
2	122	125	120
3	119	127	117
4	122	125	119
5	117	128	120
6	119	130	119
7	121	127	119
8	121	126	121
9	117	125	119
10	120	128	121
11	116	125	120
12	120	125	122
13	117	126	118
14	119	127	119
15	117	127	120
16	117	129	121
17	116	127	117
18	119	127	120
19	117	126	118
20	117	128	120
相对标准偏差	2.0%	1.4%	1.4%

表 4 不同时间不同方法检测结果
Table 4 Test results of different methods at different times

样品	测定时间/d	乳钙快速检测方法 /(mg/100 mL)	国标法 /(mg/100 mL)
同一批次 纯牛奶样品	1	111	108
		112	115
	2	111	117
		112	115
	3	110	114
		110	112
	4	114	116
		115	111
	5	111	112
		112	117
	6	109	112
		111	114
	7	114	110
		111	116
相对标准偏差		1.7%	2.4%

表 5 不同浓度钙标准溶液测定结果
Table 5 Determination results of calcium standard solution with different concentration

编号	加标浓度 /(mg/100 g)	检测结果 /(mg/100 g)	回收率/%
1	0.01	0.0101	101.0
2	0.05	0.049	98.0
3	1	1.01	101.0
4	5	4.85	97.0
5	10	10.1	101.0
6	20	20.4	102.0
7	30	30.9	103.0

从表 5 可知该方法在钙标准溶液浓度为 0.01 mg/100 mL 时检测结果回收率为 101.0%，在该浓度条件下进行重复性实验，回收率均在 95%~105%之间(表 6)，且相对标准偏差为 2.64%，符合国标中规定的精密度要求。因此方法定量限为 0.01 mg/100 mL。

表 6 钙标准溶液精密度实验结果
Table 6 Results of precision test of calcium standard solution

编号	加标浓度 /(mg/100 g)	检测结果 /(mg/100 g)	回收率/%
1	0.01	0.01	100.0
2	0.01	0.0101	99.0
3	0.01	0.0095	105.3
4	0.01	0.0102	98.0
5	0.01	0.0098	102.0
6	0.01	0.0098	102.0
7	0.01	0.0096	104.2

4 结论与讨论

乳钙的测定方法有滴定法、比色法、火焰原子吸收法、离子选择电极法等，其中以火焰原子吸收法应用较广泛^[12](国标方法)，虽然稳定性好、灵敏度高、特异性好，但对仪器的使用以及操作要求也较高，且检测时间长^[13,14]。乳钙快速检测方法是血液将钙离子临床快速检测方法应用于乳中钙含量检测的方法^[15,16]，通过测定钙与偶氮胂Ⅲ作用生成蓝色复合物的吸光度，而后计算出样品中钙含量的方法。该方法是只需要简单的样品前处理后通过仪器直接读取值的快速方法。通过实验结果可知乳钙快速检测方法重复性和稳定性好，准确性高，且方法稳定性优于国标方法，操作简单，只需要简易的试剂即可完成测定，检测时间 8 min，对批量样品检测，每个样检测时间可缩短

3~5 min。该方法可应用于乳中钙含量快速检测, 对生乳采购和液态奶市场筛查检测具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] Wang L, Manson JE, Song Y, *et al.* Systematic review: Vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events [J]. *Ann Int Med*, 2010, 152(5): 315–323.
- [2] 何梅, 门建华, 赵同刚, 等. 包装食品中钙含量分析和变化范围的研究 [J]. *卫生研究*, 2008, 37(1): 37–39.
- He M, Men JH, Zhao TG, *et al.* Study on laboratory analysis and its variety for calcium in prepackaged food [J]. *J Hyg Res*, 2008, 37(1): 37–39.
- [3] 卢娜, 刘高飞, 王雅晶, 等. 不同品种奶牛产奶量、乳成分、血清生化指标与乳钙含量的相关性研究 [J]. *动物营养学报*, 2018, 30(8): 3302–3310.
- Lu N, Liu GF, Wang YJ, *et al.* Study on correlations between milk yield, milk composition and serum biochemical indices with milk calcium content of different dairy cow breeds [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2018, 30(8): 3302–3310.
- [4] 章丽华, 雷翠华. 婴幼儿骨源性碱性磷酸酶与血钙测定的评价及其意义 [J]. *江西医学检验*, 2007, 25(4): 385–386.
- Zhang LH, Lei CH. Evaluation of bone alkaline phosphatase and serum calcium in infants and young children and its significance [J]. *Jiangxi J Med Lab Sci*, 2007, 25(4): 385–386.
- [5] Martens P, Rabe A, Johnsson P, *et al.* Serum S-100 protein and neuron-specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia [J]. *Strokes*, 1998, 29(11): 2363–2366.
- [6] Canadian Food Inspection Agency. Nutrition labelling compliance Test. Nutrition labelling, nutrient content claims and Health Claims: CFIA Compliance Test to Assess the Accuracy of Nutrient Values. 2003, Canada [Z].
- [7] Barlet JP, Champredon C, Coxam V, *et al.* Parathyroid hormone-related peptide might stimulate calcium secretion into the milk of goats [J]. *J Endocrinol*, 1992, 132(3): 353–359.
- [8] Boudon A, Johan M, Narcy A, *et al.* Dietary cation-anion difference and day length have an effect on milk calcium content and bone accretion of dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(2): 1527–1538.
- [9] Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal [J]. *J Dairy Sci*, 1991, 74(10): 3583–3597.
- [10] Van Hulzen KJE, Sprong RC, Van Dermeer R, *et al.* Genetic and

nongenetic variation in concentration of selenium, calcium, potassium, zinc, magnesium, and phosphorus in milk of Dutch Holstein-Friesian cows [J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(11): 5754–5759.

- [11] Ritter D, Mayo MM. Erroneous detection of hypercalcemia in specimens stored in Greiner bio-one vacuette plasma separator tubes and analyzed by the arsenazo III methodology [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133(9): 1363–1364.
- [12] GB 5009.92-2016 食品安全国家标准食品中钙的测定[S].
GB 5009.92-2016 National food safety standard-Determination of calcium in food [S].
- [13] Bijl E, Van Valenbe RGHJ, Huppe RTZT, *et al.* Protein, casein, and micellar salts in milk: current content and historical perspectives [J]. *J Dairy Sci*, 2013, 96(9): 5455–5464.
- [14] Ward RT, Colton DM, Meade PC, *et al.* Serum levels of calcium and albumin in survivors versus nonsurvivors after critical injury [J]. *J Crit Care*, 2004, 19(1): 54–64.
- [15] 谭晓霞, 靳春雷, 吴三英. 孕妇血清 25 羟维生素 D 与血清离子钙检测结果分析 [J]. *中国卫生检验杂志*. 2018, 28(2): 186–187.
- Tan XX, Jin CL, Wu SY. Detection results of serum 25 hydroxy vitamin D and serum calcium in pregnant women [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2018, 28(2): 186–187.
- [16] 唐骞, 蒋兴亮, 唐中. 偶氮氯膦 I 显色 EDTA 褪色法测定血清钙 [J]. *川北医学院学报*, 2004, 19(3): 97–98.
- Tang Q, Jiang XG, Tang Z. Determination of calcium in serum by complexing with chlorophenazo I and dissociated by EDTA [J]. *J North Sichuan Med Coll*, 2004, 19(3): 97–98.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



梁春梅, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测及分析。
E-mail: liangchunmei@mengniu.cn



喻东威, 博士, 副高级工程师, 主要研究方向为食品安全风险评估。
E-mail: yudongwei@mengniu.cn