

碱水解法测定乳及乳制品中脂肪的含量

晏凯^{1*}, 刘晓彤², 刘悦¹, 李凤娟¹, 于磊¹, 马英伟¹, 李培丹¹

(1. 天津市南开区疾病预防控制中心, 天津 300112; 2. 南开大学化学学院, 天津 300071)

摘要: 目的 建立简单、快速的碱水解法测定乳及乳制品中脂肪的含量。**方法** 取0.5 g样品于离心管中, 用10 mL纯水复溶后加入2 mL氨水(25%)水解并65 °C水浴20 min。加入乙醇沉淀蛋白质并使用乙醚、石油醚提取样品中脂肪。将上清液提取至收集瓶中, 蒸干提取液, 称量收集瓶前后质量, 计算样品中脂肪含量。

结果 此法测得样品脂肪含量为26.53 g/100 g, 结果相对偏差为0.37%。测定值在质控样品值满意区间内, 且符合国标规定的两次独立测定结果之差 ≤ 0.3 g/100 g的要求。**结论** 本法测定乳及乳制品中脂肪的含量具有简便、快速、重现性好的优点, 适合实验室日常样品测定及考核使用。

关键词: 乳及乳制品; 脂肪; 碱水解法; 罗紫-哥特里法

Determination of fat content in milk and dairy products by alkaline hydrolysis

YAN Kai^{1*}, LIU Xiao-Tong², LIU Yue¹, LI Feng-Juan¹, YU Lei¹, MA Ying-Wei¹, LI Pei-Dan¹

(1. Disease Prevention and Control Center of Nankai District, Tianjin 300112, China; 2. College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

ABSTRACT: Objective To establish a simple and rapid alkaline hydrolysis method for the determination of fat content in milk and dairy products. **Methods** 0.5 g sample was taken in a centrifuge tube, redissolved with 10 mL pure water, then 2 mL ammonia water (25%) was added for hydrolysis and water bath at 65 °C for 20 min. Ethanol was added to precipitate the protein and ether and petroleum ether were used to extract the fat in the sample. Extract the supernatant into a collecting bottle, evaporate the extractive solution, weigh the mass before and after the collecting bottle, and calculate the fat content in the sample. **Results** The fat content of the sample measured by this method was 26.53 g/100 g, and the relative deviation was 0.37%. The measured value was within the satisfactory range of the quality control sample value, and meets the requirement specified by the national standard that the difference between the two independent measurement results was less than or equal to 0.3 g/100 g. **Conclusion** This method is simple, rapid and reproducible for the determination of fat in milk and dairy products. It is suitable for routine laboratory sample determination and examination.

KEY WORDS: milk and dairy products; fat; alkaline hydrolysis; Rose-Gottlieb method

1 引言

乳及乳制品是人们日常饮食中不可或缺的一部分,

是身体钙元素和优质蛋白的重要来源。中国营养学会在《中国居民膳食指南》中对其摄入量作出了每日300 g的饮食建议^[1]。脂肪作为七大营养素之一, 日益引起人们的重视,

*通讯作者: 晏凯, 主要研究方向为食品安全检验及职业卫生检验。E-mail: 782829127@qq.com

*Corresponding author: YAN Kai, Disease prevention and control center of Nankai District, No. 18, Yaan Street, Nankai District, Tianjin 300112, China. E-mail: 782829127@qq.com

更被国家强制要求标注在“营养成分表”中^[2]。食品中的脂肪有诸多益处, 改善食品风味的同时为人体提供能量, 而随着经济社会的不断发展, 人们过量摄入脂肪导致的肥胖率逐年上升, 使国家在慢性病预防及诊治方面面临越来越大的压力, 同时也增加了居民的生活负担。脂肪对人体产生的不利影响越加引起居民的重视, 更催生了低脂、脱脂食品的产生。

食品中的脂肪以游离态和结合态 2 种形式存在, 其中以游离态存在的脂肪居多^[3]。食品中脂肪的检测方法目前有索氏提取法、酸水解法、碱水解法(罗紫-哥特里法)、盖勃法、三氯甲烷冷浸法、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)络合反滴定法和气相色谱法等。目前常用且被纳入 GB 5009.6-2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》的有索氏提取法、酸水解法、碱水解法、盖勃法 4 种方法^[4,5]。而美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)提出的气相色谱法由于其实验成本和难度远超其他方法, 未被广泛使用^[6]。对于乳和乳制品来讲, 其中的脂肪由于被酪蛋白钙盐包裹而难以被溶剂萃取, 而氨水可以将不溶的酪蛋白钙盐溶解, 进而游离出脂肪^[7]。因此碱水解法最适合于乳及乳制品中脂肪的测定。但是国标中碱水解法消耗试剂多、耗时较长。本研究以离心管代替抽脂瓶, 通过离心技术减少静置分层时间并提高分层效果, 并进一步探讨取样量、水解浓度以及提取液对实验结果的影响。以期符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的相关要求^[8], 加快批样品处理时间, 提高检测效率, 为实验室日常样品处理提供参考。

2 材料与方 法

2.1 实验仪器

SY-1230 恒温水浴锅(美国 Crysta 公司); Allegra 64R 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海飞跃实验仪器有限公司); BP211D 万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); SMART RO-30 纯水机(香港力康公司)。

2.2 实验试剂

25%氨水(优级纯)、无水乙醇(优级纯)、石油醚(分析纯)(天津市风船化学试剂科技有限公司); 乙醚(优级纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2.3 质控样品

奶粉质控样品, 编号 CFAPA-QC163A-3, 大连中食国实检测技术有限公司。

2.4 实验方法

2.4.1 前处理

取接收瓶若干于 100 °C 烘箱中, 待恒重后记录相应质

量 m_1 , 精确到 0.0001 g, 放于干燥器中备用。

2.4.2 样品制备

取 0.5000 g(m)乳粉于 50 mL 离心管中, 用 10 mL 65 °C 的纯水溶解; 若样品为乳状, 则直接称取 10.0000 g 乳液于 50 mL 离心管。

2.4.3 样品水解

取样后, 每离心管中加入氨水 2.0 mL 并置于(65±5) °C 水浴中水解 20 min, 取出后冷却至室温。

2.4.4 提取脂肪

离心管中加入 10 mL 乙醇, 轻摇 30 s; 加入 15 mL 乙醚, 振摇 1 min; 加入 15 mL 石油醚, 振摇 30 s。以 10000 r/min 速度离心 5 min, 取上清液于接收瓶中完成第一轮提取。再向离心管中加入 5 mL 乙醇, 轻摇 30 s; 加入 12 mL 乙醚, 振摇 1 min; 加入 12 mL 石油醚, 振摇 30 s。以 10000 r/min 速度离心 5 min, 取上清液于接收瓶中完成第二轮提取。再向离心管中加入 5 mL 乙醇, 轻摇 30 s; 加入 10 mL 乙醚, 振摇 1 min; 加入 10 mL 石油醚, 振摇 30 s。以 10000 r/min 速度离心 5 min, 取上清液于接收瓶中完成第三轮提取。

2.4.5 验证提取

滴提取液 1 滴于毛玻璃片上, 挥干后无油斑表明提取完全。若油斑存在则需继续进行提取, 实验经验表明, 3-4 轮提取过程可将样品中脂肪提取完全。

2.4.6 蒸干与称量

水浴锅放置在通风橱内, 用沸水浴蒸干接收瓶中的溶剂; 后将接收瓶外壁用纯水洗净并置于 100 °C 烘箱中干燥 2 h, 烘干后放入干燥器冷却至室温。称取接收瓶质量(m_2)。

2.4.7 空白实验

以 10 mL 纯水代替样品进行相同步骤空白实验。空白组接收瓶前后质量分别为 m_3 和 m_4 。

2.4.8 计算公式:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) - (m_4 - m_3)}{m} \times 100$$

m —取样量, g

m_1 —恒重后接收瓶质量, g

m_2 —恒重后接收瓶和提取物总质量, g

m_3 —空白组接收瓶质量, g

m_4 —空白组接收瓶和提取物总质量, g

X —样品中脂肪含量, g/100 g

3 结果与分析

3.1 混合醚提取脂肪与石油醚单独提取脂肪结果对比

表 1 为采用上述方法对质控样品进行的 6 次平行实验数据。结果显示混合醚组实验测定结果为 26.53 g/100 g, 此值与质控样品指定值相符, 且结果相对标准偏差 RSD 为 0.37%, 表明此法测定乳及乳制品中脂肪的结果准确度、精密度均较高。此外, 石油醚组脂肪含量明显低于混合醚组,

表明石油醚提取效率低于乙醚,前文方法中石油醚的作用更多在于降低乙醚极性,促使溶液分层。

3.2 石油醚单独提取脂肪

表 2 结果显示,0.5 g 质控样品用石油醚单独提取 3 次,测得脂肪含量低于其标称值,降低取样量后,石油醚提取脂肪含量升高,说明在相同提取次数情况下,样品量越大,石油醚提取效率越低。若实验条件需单独使用石油醚提取,则应显著增加提取次数以使测定数值贴近混合醚测定数值。且相关文献表明,对于高碳水样品进行脂肪测定,石油醚提取结果会优于乙醚提取结果。这是因为部分水溶性非脂化合物被乙醚提取至醚层,使测定结果产生正偏差,而石油醚极性低,此类物质不会被提取^[9,10]。

3.3 氨水浓度控制

氨水起到破坏乳及乳制品中酪蛋白钙盐的作用,氨水浓度亦是影响脂肪提取效率的重要因素,本组人员使用前述方法对比 2 种浓度水解液测定脂肪含量,结果如表 3 所示。发现 10 mL 纯水复溶乳粉后加 2 mL 氨水已可使酪

蛋白钙盐溶解完全。但应注意的是,检测乳粉时需用 10 mL 纯水进行复溶,避免氨水浓度过高使脂肪水解。

3.4 空白值的影响

空白值是影响实验结果的重要指标,经实验验证,空白组提取液蒸干质量范围为 0.0004~0.0007 g,结果如表 4 所示,在 0.5 g 取样量情况下,忽略空白实验将导致测定结果偏高 0.1 g/100 g,因此在 0.5 g 取样量条件下,本组人员建议每批样品带空白样同时测定。增加取样量可以减少空白值对测定结果的影响,当取样量 ≥ 1.0 g 时,空白值一般可以省略不计。

3.5 天平精度的选择

以取样 0.5 g 为例,0.0001 g 的偏差将产生 0.02 g/100 g 的偏离,而实验结果通常保留 3 位有效数字。常见乳粉脂肪含量一般为 10.0~30.0 g/100 g,即 0.0005 g 偏差将影响计算结果产生 0.1 g/100 g 偏差,此偏差对脱脂奶粉的影响将会更大。因此脂肪的测定天平精度至少应达到 0.0001 g 以上。

表 1 不同提取液测定 0.5 g 样品脂肪含量(g/100 g)
Table 1 Determination of fat content (g/100 g) of 0.5 g samples by different extracts

提取液	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	均值	RSD
混合醚	26.43	26.44	26.67	26.57	26.59	26.45	26.53	0.37%
石油醚	23.51	23.37	23.62	23.46	23.44	23.59	23.50	0.40%

表 2 石油醚单独提取不同质量样品测定脂肪含量(g/100 g)
Table 2 Determination of fat content (g/100 g) by separate extraction of different quality samples with petroleum ether

取样量	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	均值	RSD
0.1 g	24.87	24.96	24.90	24.69	24.73	24.81	24.83	0.42%
0.5 g	23.51	23.37	23.62	23.46	23.44	23.59	23.50	0.40%

表 3 不同氨水浓度水解 0.5 g 样品测定脂肪含量(g/100 g)
Table 3 Determination of fat content (g/100 g) by hydrolysis of 0.5 g samples with different ammonia concentrations

氨水比例	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	均值	RSD
10 mL 纯水+2 mL 氨水	26.43	26.44	26.67	26.57	26.59	26.45	26.53	0.37%
10 mL 纯水+4 mL 氨水	26.49	26.52	26.57	26.52	26.51	26.48	26.52	0.12%

表 4 混合醚提取组样品空白值(g)
Table 4 Sample blank value of mixed ether extraction group (g)

样品号	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号
样品空白值	0.0004	0.0006	0.0004	0.0005	0.0007	0.0005

3.6 乳化现象的应对

此法选用 10000 r/min 的转速对样品进行离心分层, 改善了静置分层时间过长的缺点, 同时对于乳化现象也有很好的改善。此外, 实验试剂纯度虽然高, 但装瓶过程中仍有机会进入毛状不溶杂质, 高速离心可有效将不溶杂质沉至下层, 提取上清液时减少误差。同时, 相关文献提出超声提取代替手动振摇, 提高实验重复性的同时节约人力, 结果准确^[11,12]。

3.7 提高乙醇加入量的原因

乙醇在此反应中起到了 2 个作用。其一, 沉淀溶解的酪蛋白, 使其不影响醚层的提取。其二, 使能溶于乙醇的物质进入水相, 减少非脂成分进入醚层。本组人员由于使用 50 mL 离心管进行提取操作, 试剂加入量被限制, 因此降低了取样量, 使乙醇加入量变相提高, 并得到满意结果^[13,14]。

3.8 样品不进行干燥的原因

此次 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定》的修订删除了样品需干燥这一前处理步骤。水是各类营养成分良好的溶剂, 国家食品安全标准允许奶粉中存在不超过 5% 的水分, 在测定前进行样品干燥完全除去水分将会导致测定结果偏高^[15]。

4 结 论

本研究测定乳及乳制品中脂肪的含量具有简便、快速、重现性好的优点, 且实验结果与质控样品指定值相符, 适合实验室日常样品处理和参加考核认证。但乙醚饱和的水分会使测定结果产生正偏差, 因此对于样品所含脂肪的真实值, 国际通用的气相色谱法测定更为准确^[16]。

参考文献

- [1] 中国营养学会. 中国居民膳食指南(2016)[M]. 人民卫生出版社: 北京, 2016: 107-139.
Chinese society of nutrition. Dietary guidelines for Chinese residents (2016) [M]. People's Health Press: Beijing, 2016: 107-139.
- [2] GB 28050-2011 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则[S].
GB 28050-2011 National food safety standard, general principles for nutrition labeling of prepackaged food [S].
- [3] 陆翠珍, 李英. 测定食品脂类的几种常用方法[J]. 食品安全导刊, 2013, (4): 74-75.
Lu CZ, Li Y. Several common methods for determination of food lipids [J]. Chin Food Saf Magz, 2013, (4): 74-75.
- [4] 张晓婷, 潘建君, 王知, 等. 食品中脂肪测定国家标准的分析与探讨[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 348-351.
Zhang XT, Pan JJ, Wang Z, et al. Analysis and discussion on national standards for fat determination in food [J]. Food Ind Sci Technol, 2018, 39(20): 348-351.
- [5] GB 5009.6-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定[S].
GB 5009.6-2016 National Food Safety Standard-Determination of fat in national standard food [S].
- [6] AOAC Official method 996.06 fat (total, saturated and unsaturated) in foods [S]. 2001.
- [7] 覃涛. 脂肪酸水解法与哥特里-罗紫法对植物蛋白饮料中脂肪测定的比较[J]. 计量与测试技术, 2007, (9): 4-7.
Qin T. Comparison of fatty acid hydrolysis method and Gothic Rhodes method in the determination of fat in vegetable protein drinks [J]. Meas Test Technol, 2007, (9): 4-7.
- [8] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Specification for laboratory quality control-Chemical testing of food [S].
- [9] 邱清莲, 蔡伟江, 房家祥. 石油醚与乙醚测定含糖类样品中脂肪含量的准确率比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(8): 3393-3397.
Qiu QL, Cai WJ, Fang JX. Comparison of the accuracy of petroleum ether and ether in the determination of fat content in sugar samples [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(8): 3393-3397.
- [10] 郑丽卿, 崔锦良, 方志成, 等. 植脂末中脂肪测定方法研究[J]. 食品安全导刊, 2015, (33): 103-104.
Zheng LQ, Cui JL, Fang ZC, et al. Study on the determination method of fat in the end of fat planting [J]. Chin Food Saf Magz, 2015, (33): 103-104.
- [11] 高岐. 食品中脂肪的超声提取快速测定法研究[J]. 食品工业科技, 2008, (4): 292-293.
Gao Q. Rapid determination of fat in food by ultrasonic extraction [J]. Food Ind Sci Technol, 2008, (4): 292-293.
- [12] 彭爱红. 超声波提取法测定午餐肉中脂肪含量[J]. 食品工业科技, 2003, (9): 82-85.
Peng AH. Determination of fat content in luncheon meat by ultrasonic extraction [J]. Food Ind Sci Technol, 2003, (9): 82-85.
- [13] 邓斯丽. 食品中脂肪测定标准的选择及操作经验[J]. 现代食品, 2016, (23): 56-58.
Deng SL. Selection and operation experience of fat determination standard in food [J]. Mod Food, 2016, (23): 56-58.
- [14] 吴晓静. 碱水解法测定奶粉中脂肪含量[J]. 食品安全导刊, 2018, (15): 63-64.
Wu XJ. Determination of fat content in milk powder by alkali hydrolysis [J]. Chin Food Saf Magz, 2018, (15): 63-64.
- [15] 王春玲. 浅谈糕点水分含量对脂肪测定的影响[J]. 科技资讯, 2009, (21): 238.
Wang CL. Effect of moisture content of pastry on fat determination [J]. Sci Technol Inform, 2009, (21): 238.
- [16] 胡明燕, 王骏, 车明秀, 等. DHA 固体饮料脂肪测定方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(4): 144-146.
Hu MY, Wang J, Che MX, et al. DHA solid beverage fat determination method research [J]. Food Res Dev, 2017, 38(4): 144-146.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



晏 凯, 主要研究方向为食品安全检验及职业卫生检验。

E-mail: 782829127@qq.com