

# 微波消解-分光光度法测定乳清蛋白 营养强化粉中磷的含量

伍丽珍\*, 刘慧堂, 邱桃妍, 陈均洪

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要: 目的** 建立微波消解-分光光度法测定乳清蛋白营养强化粉中磷含量的测定方法。**方法** 乳清蛋白营养强化粉中加入硝酸于石墨消解仪中预消解, 待冷却后加入 30%过氧化氢使用微波消解仪消解, 样品经过赶酸, 转移至容量瓶中并定容至刻度, 在稀释液中加入钒钼酸铵试剂后使用紫外可见分光光度计进行检测。

**结果** 磷在浓度 2~15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间呈现良好的线性关系,  $r^2=0.9997$ , 回收率为 95.00%~101.20%, 相对标准偏差为 2.0%。**结论** 该方法操作简便、准确、安全、重现性好, 能准确测定乳清蛋白营养强化粉中磷含量。

**关键词:** 磷; 乳清蛋白; 营养强化粉; 微波消解法; 分光光度法

## Determination of phosphorus in whey protein fortified powder by microwave digestion-spectrophotometry

WU Li-Zhen\*, LIU Hui-Tang, QIU Tao-Yan, CHEN Jun-Hong

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of phosphorus in whey protein fortified powder by microwave digestion spectrophotometry. **Methods** The whey protein nutrition fortified powder with nitric acid was added in graphite digestion apparatus for pre digestion, and 30% hydrogen peroxide was added after cooling, and then digested by microwave digestion instrument. After removing acid, the sample was transferred to a volumetric flask and the volume was fixed to the scale. After adding ammonium vanadomolybdate reagent into the diluent, the sample was detected by ultraviolet-visible spectrophotometry. **Results** Phosphorus showed a good linear relationship between 2–15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $r^2=0.9997$ , and the average recovery rates were 95.00%–101.20%, with relative standard deviation 2.0%. **Conclusion** This method is simple, accurate, safe and reproducible, and can be used in laboratory for the determination of phosphorus content in whey protein fortified powder.

**KEY WORDS:** phosphorus; whey protein; nutritionally fortified powder; microwave digestion; spectrophotometry

## 1 引言

磷存在于人体所有细胞中, 是维持骨骼和牙齿的必要物, 几乎参与所有生理上的化学反应。磷还是使心脏有规律地跳动、维持肾脏正常机能和传达神经刺激的重要物质<sup>[1,2]</sup>。

GB 5009.87-2016《食品安全国家标准 食品中磷的测定》<sup>[1]</sup>规定, 样品前处理的方法为湿法消解法<sup>[4]</sup>, 湿法消解是在加热的条件下用强氧化剂如硝酸、硫酸、高氯酸等分解有机物, 其缺点是操作步骤繁琐、耗时、试剂消耗大, 前处理周期长, 容易造成样品污染, 在消解过程中产生大量的酸雾危害工作人员的身体健康且在高温下作

\*通讯作者: 伍丽珍, 工程师, 主要研究方向为保健食品质量检测。E-mail: 804038881@qq.com

\*Corresponding author: WU Li-Zhen, Engineer, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 804038881@qq.com

业具有一定的危险性,且该方法在样品测定之前需要使用氢氧化钠溶液(6 mol/L)调至黄色,再用硝酸溶液调至无色,最后用氢氧化钠溶液(0.1 mol/L)调至微黄色才能进行测定。微波消解法<sup>[5-10]</sup>具有快速分解样品,元素无挥发损耗,试剂用量少等优点。与湿法消解的区别在于它能直接穿透样品的内部,缩短样品消解的时间,且酸的用量少,消解过程中不需要人员时刻观察样品的消解状况,降低了人员吸入酸雾的风险,并且减少了样品被污染的风险,使试剂空白值低<sup>[11-14]</sup>。

乳清蛋白是采用先进工艺从牛奶分离提取出来的蛋白质,是公认的人体优质蛋白质补充剂之一,有益于人体的多种保健功能,应用前景十分广泛<sup>[15,16]</sup>。目前,针对乳清蛋白营养强化配方粉磷含量测定的研究还比较少。本研究对 GB 5009.87-2016《食品安全国家标准 食品中磷的测定》进行优化,采用微波消解技术对乳清蛋白营养强化粉进行前处理,以钼蓝分光光度法对乳清蛋白营养强化粉中的磷含量进行测定,以期对相关产品磷含量的测定工作提供参考。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 仪器与试剂

UV-2450 紫外可见分光光度计(日本岛津仪器有限公司); Ethos one 微波消解仪(郑州迈斯通公司); DS-360 石墨消解仪(广州格丹纳仪器有限公司); BS224S 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

磷酸二氢钾(纯度 $\geq 99.0\%$ ,广东广试试剂科技有限公司); 硝酸、30%过氧化氢、硫酸(优级纯)、钼酸铵、偏钒酸铵、二硝基酚指示剂(分析纯)(广州化学试剂厂); 实验室用水为二级水。

样品来源: 汤臣倍健股份有限公司。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 溶液配制

磷的标准贮备液磷的标准贮备液(50  $\mu\text{g/mL}$ ): 称取在(105 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重的磷酸二氢钾标准品 0.2197 g,溶于 400 mL 水中,加 8 mL 硫酸,定容至 1 L。

标准曲线的制作: 分别吸取磷的标准储备液(50  $\mu\text{g/mL}$ )0、2.5、5、7.5、10、15 mL,分别放入 50 mL 容量瓶中,加入 10.00 mL 钼钒酸铵试剂,用水定容至刻度。该系列标准溶液中磷的浓度分别为 0、2.5、5、7.5、10、15  $\mu\text{g/mL}$ 。参照 GB 5009.87-2016<sup>[3]</sup>绘制标准曲线。

钼钒酸铵试剂、二硝基酚指示剂(2 g/L): 参照 GB 5009.87-2016<sup>[3]</sup>配制。

#### 2.2.2 样品前处理

##### ①试样制备

微波消解: 称取试样 0.5 g 于微波消解管中,加入

8.00 mL 硝酸,110  $^{\circ}\text{C}$ 预消解 30 min,放冷后加入 2.00 mL 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,于微波消化仪中消化,其消化条件见表 1。

表 1 微波消解温度设定参数

Table 1 Setting parameters of microwave digestion temperature

阶段 /STAGE	功率/W	爬坡时间 /min	温度 / $^{\circ}\text{C}$	保持时间 /min
1	1500	10	120	5
2	1500	3	150	5
3	1500	3	180	10

消解完成后样品呈淡黄色。待消解管自然冷却至室温,用洗瓶将消化液转移至 100 mL 烧杯中,用水少量多次洗涤消解管,洗液合并于烧杯中,于电热板上加热赶酸至烧杯消化液剩余 1.0~3.0 mL,再将消化液用水转移定容至 25 mL 容量瓶中,混匀备用,同时平行做试剂空白。

##### ②样品溶液的测定

吸取试液 1 mL 于 50 mL 容量瓶中,加少量水后,加 2 滴二硝基酚指示剂(2 g/L),加入 10.00 mL 钼钒酸铵试剂,用水定容至刻度。在 25~30  $^{\circ}\text{C}$ 下显色 15 min。用 1 cm 比色皿,于波长 660 nm 处测定吸光值。以空白溶液调零。从标准曲线上查得样品溶液中磷的浓度。

#### 2.2.3 准确度实验

随机抽取 3 批乳清蛋白营养强化粉,分别使用微波消解法和 GB 5009.87-2016<sup>[3]</sup>方法中样品消解方法处理样品,测定乳清蛋白营养强化粉磷的含量,计算其相对偏差。

#### 2.2.4 精密度实验

精密称取乳清蛋白营养强化粉 6 份,按 2.2.2 试样制备方法处理样品,检测样品磷含量,计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

#### 2.2.5 加标回收实验

精密称取 9 份样品,置于微波消解管中,分成 3 组,每组 3 份,于每一组分中分别精密加入浓度为 5000  $\mu\text{g/mL}$  的磷的标准储备液 1.00、1.50、2.00 mL,加标量分别为 5.00、7.50、10.00 mg,再按照步骤 2.2.2 的处理方法平行操作

## 3 结果与分析

### 3.1 线性关系

磷线性方程为  $Y=0.03382X-0.00107$ ,在浓度 2~15  $\mu\text{g/mL}$  之间呈现良好的线性关系, $r^2$  为 0.9997,说明用该方法测定乳清蛋白营养强化粉磷的含量。

### 3.2 检出限和定量限

按照  $S/N=3$  计算方法的检出限(limit of detection, LOD), $S/N=10$  计算定量限(limit of quantitation, LOQ)由信噪比( $S/N$ ),得到本方法检出限为 16.6 mg/kg,定量限为 55.3 mg/kg,方法灵敏度高。

### 3.3 准确度实验

准确度结果见表 2。结果显示,使用微波消解法与 GB 5009.87-2016 样品消解方法测定乳清蛋白营养强化粉中磷含量的相对偏差在 1.3%~2.4%之间,说明该方法准确度高,科学有效。

### 3.4 精密度实验

精密度结果见表 3。结果显示,连续测量 6 个乳清蛋白营养强化粉磷的相对标准偏差(relative standard deviation,

RSD)为 2.0%,说明该方法具有较好的精密度。

### 3.5 加标回收率

加标回收结果见表 4。由上述数据可知样品中称样量为 0.5 g 时,测定的浓度值为 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右,在 80%、100%、120% 3 个添加水平上加入磷标准物质,测得乳清蛋白营养强化粉中磷方法的回收率范围为 95.00%~101.20%,RSD 为 2.0%。说明该方法对乳清蛋白营养强化粉磷的含量测定科学有效。

表 2 磷准确度实验结果  
Table 2 Accuracy experimental results of phosphorus

序号	消解方法	称样量/g	浓度/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	消化后体积 /mL	吸取样体积 /mL	显色后体积 /mL	测定结果/ (mg/100 g)	平均含量 /(mg/100 g)	相对偏差 /%
1	微波消解	0.5053	6.0736	25	2.5	50	600.989	600.34	2.4
		0.5053	6.0605	25	2.5	50	599.693		
	湿法消解	0.5125	6.3700	25	2.5	50	621.463	614.35	
		0.5247	6.3723	25	2.5	50	607.232		
2	微波消解	0.5145	6.4404	2.5	2.5	50	625.889	626.71	1.8
		0.5132	6.4409	25	2.5	50	627.523		
	湿法消解	0.5002	6.1485	25	2.5	50	614.604	615.69	
		0.5006	6.1751	25	2.5	50	616.769		
3	微波消解	0.5189	6.4914	25	2.5	50	625.496	640.20	1.3
		0.5169	6.4842	25	2.5	50	627.219		
	湿法消解	0.5001	6.0736	25	2.5	50	618.336	618.71	
		0.5003	6.0605	25	2.5	50	619.078		

表 3 磷精密度实验结果( $n=6$ )  
Table 3 Precision experimental results of phosphorus ( $n=6$ )

序号	称样量/g	浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	消化后体积/mL	吸取样体积/mL	显色后体积/mL	测定结果/ (mg/100 g)	平均含量 /(mg/100 g)	RSD/%
1	0.5869	7.7150	25	2.5	50	657.267	644.20	2.0
2	0.5679	7.4122	25	2.5	50	652.597		
3	0.5636	7.0748	25	2.5	50	627.644		
4	0.5425	6.8266	25	2.5	50	629.180		
5	0.5653	7.3220	25	2.5	50	647.621		
6	0.5739	7.4709	25	2.5	50	650.889		

表 4 加标回收实验结果  
Table 4 Results of adding standard recovery tests

序号	称样量/g	浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	测得对照品量/mg	实际加标的量/mg	回收率/%	RSD/%
1	0.5236	10.5326	1.90	2	95.00	
2	0.5211	10.5912	1.95	2	97.50	
3	0.5136	10.5821	1.99	2	99.50	
4	0.5412	12.0121	2.53	2.5	101.20	
5	0.5302	11.6954	2.44	2.5	97.60	2.0
6	0.5214	11.5879	2.44	2.5	97.60	
7	0.5412	13.0058	3.03	3	101.00	
8	0.5469	13.0041	2.99	3	99.67	
9	0.5463	12.9663	2.97	3	99.00	

## 4 结 论

常规测试中, 需要使用硝酸、高氯酸、硫酸等试剂, 且消解时间需要 5 h 以上<sup>[3]</sup>。与常规样品消解方法相比, 本方法具有耗时短(1.5 h)、试剂品种少(硝酸、30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ )、用量少(硝酸 8 mL、30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mL)、样品损耗少、操作简单、较为安全且测定样品的准确度和精密度高等优点, 减少了实验操作步骤, 大大提升检测效率, 适合应用于乳清蛋白营养强化粉中磷的含量。同时, 本方法还可以推广到其他同类型样品的磷含量测定, 可以磷含量的检测工作提供参考。

## 参考文献

- [1] 赵珈. 鸡钙、磷失衡或缺乏症的诊治措施[J]. 畜牧兽医科技信息, 2019, (12): 159  
Zhao J. Diagnosis and treatment of calcium and phosphorus imbalance or deficiency in chicken [J]. Inform Anim Husband Veter Sci Technol, 2019, (12): 159.
- [2] 黄麟杰, 陈洁, 黄炜, 等. 水王消解 ICP-AES 测定土壤中的磷[J]. 环境与发展, 2018, 30(12): 168-169  
Huang LJ, Chen J, Huang W, *et al.* nitrohydrochloric acid digestion ICP-AES determination of phosphorus in soil [J]. Environ Dev, 2008, 30(12): 168-169
- [3] GB 5009.87-2016 食品安全国家标准 食品中磷的测定 S].  
GB 5009.87-2016 National food safety standard-Determination of phosphorus in food [S]
- [4] 林建奇, 刘海涛, 甄长伟, 等. 湿法消解/干灰化-氢化物发生-原子荧光光谱法测定基围虾中总砷[J]. 中国无机分析化学, 2019, 9(6): 23-28.  
Lin JQ, Liu HT, Zhen CW, *et al.* Determination of total arsenic in shrimp [J]. Chin J Inorg Anal Chem, 2019, (6): 23-28.
- [5] 母元波, 高宝丽. 微波消解-ICP-MS 法测定底泥中的 12 种金属元素[J]. 世界有色金属, 2019, (22): 173-174.  
Mu YB, Gao BL. Microwave digestion-ICP-MS method for determination of 12 metal elements in sediment [J]. World Nonferr Metal, 2019 (22): 173-174.
- [6] 杨财平, 马蓓蓓, 万思丽. 微波消解-电感耦合等离子体质谱法同时测定莲藕中 15 种元素[J]. 公共卫生与预防医学, 2019, 30(6): 115-117.  
Yang CP, Ma PP, Wan SL. Microwave digestion-simultaneous determination of 15 elements in lotus root by inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Publ Health Prev Med, 2019, 30(6): 115-117.
- [7] 张莹, 顾锡龙, 王燕, 等. 微波消解-ICP-MS 法测定青藏高原富硒藜麦中 10 种金属元素[J]. 中国金属通报, 2019, (12): 125, 127.  
Zhang Y, Gu XL, Wang Y, *et al.* Microwave digestion-ICP-MS method for the determination of 10 metal elements in selenium-rich quinoa on the Qinghai-Tibet plateau [J]. China Metal Bull, 2019, (12): 125, 127.
- [8] 段玲敏, 施白妮, 程常磊. 微波消解-氢化物发生原子荧光法测定土壤中硒[J]. 世界有色金属, 2019, (24): 270-271.  
Duan LM, Shi BN, Cheng CL. Determination of selenium in soil by microwave digestion hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. World Nonferrous Metals, 2019, (24): 270-271.
- [9] 朱有涛, 张遐, 邵梅, 等. 微波消解-ICP-MS 法监测大豆素火腿中的 7 种金属残留[J]. 食品工业, 2019, 40(12): 326-329.  
Zhu YT, Zhang X, Shao M, *et al.* Microwave digestion-ICP-MS method for the determination of 7 metal residues in soybean-based ham [J]. Food Ind, 2019, 40(12): 326-329.
- [10] 梅婵, 董耀, 彭雪琦. 微波消解-原子荧光光谱法测定龙虾中的汞[J]. 现代食品, 2019, (23): 158-159, 163.  
Mei C, Dong Y, Peng XQ. Determination of mercury in lobsters by microwave digestion-atomic fluorescence spectrometry [J]. Mod Food, 2019, (23): 158-159, 163.
- [11] Juliana PS, Camila C, Tatiane M. *et al.* Evaluation of sample preparation methods for cereal digestion for subsequent As, Cd, Hg and Pb determination by AAS-based techniques [J]. Food Chem, 2020, (321): 126715.
- [12] Duygu A, Gulsu S, Nuriye NU. Dataset of the analyzing trace elements and minerals via ICP-MS: Method validation for the mammalian tissue and serum samples [J]. Data Brief, 2020, (29): 105218.
- [13] 惠越, 林梦佳, 王晨茜, 等. 分光光度法测定种衣剂包衣脱落率[J]. 浙江化工, 2019, 50(8): 52-54.  
Hui Y, Lin MJ, Wang CX, *et al.* Spectrophotometric method for

determination of shedding rate of seed coat coating agent [J]. Zhejiang Chem Ind, 2019, 50(8): 52-54.

- [14] 孙茜, 王艳洁, 于涛, 等. 海水中油类紫外分光光度法测定结果的有效位数推算[J]. 环境影响评价, 2017, 39(6): 87-89.

Sun Q, Wang YJ, Yu T. *et al.* Calculation of the effective number of the determination results of oil in seawater by ultraviolet spectrophotometry [J]. Environ Impact Assess, 2017, 39(6): 87-89.

- [15] 韩婷, 蔡东联. 乳清蛋白的营养特点和作用[J]. 肠外与肠内营养, 2005, 8(20): 243-246.

Han T, Cai DL. Nutritional characteristics and functions of whey protein [J]. Parenter Enter Nutr, 2005, 8(20): 243-246.

- [16] 马玉琴, 崔广智, 苏德亮, 等. 乳清蛋白粉营养成分分析研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4687-4691.

Ma YQ, Cui GZ, Su DL, *et al.* Analysis and research on nutritional components of whey protein powder [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(14): 4687-4691.

(责任编辑: 李磅礴)

### 作者简介



伍丽珍, 工程师, 主要研究方向为保健食品质量检测。

E-mail: 804038881@qq.com

## “茶学研究”专题征稿函

茶叶源于中国, 与咖啡、可可并称为世界三大饮料。茶叶可鲜食, 也可以加工精制备用, 具有降压、提神等多种保健功能, 且含有多种有机化学成分和无机矿物元素。国内外对茶叶市场需求稳定增长, 我国的茶产业增长潜力巨大, 茶已成为社会生活中不可缺少的健康饮品和精神饮品。

鉴于此, 本刊特别策划了“茶学研究”专题, 主要围绕茶叶的贮藏保鲜、精深加工、品质评价、生物化学和功能性成分、香气成分分析、污染物分析检测、茶树生长代谢、茶叶资源的质量标准化等方面展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编吴永宁研究员特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 2021 年 3 月出版, 请在 2021 年 1 月 30 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您能够通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)(注明茶学研究专题)

E-mail: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)(注明茶学研究专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部