

半微量定氮法中三氯乙酸提取挥发性 盐基氮的改进

黄忠意^{1,2*}, 周兴旺^{1,2}, 马东兴³, 徐文泐^{1,2}

(1. 湖南省食品质量监督检验研究院, 长沙 410007; 2. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 长沙 410007;
3. 临沂市检验检测中心, 临沂 276000)

摘要: **目的** 改进半微量定氮法中三氯乙酸提取挥发性盐基氮的条件。**方法** 比较了提取剂三氯乙酸和水的提取效果, 并优化了三氯乙酸作提取剂时氧化镁的添加量, 同时添加氯化铵做回收率实验。**结果** 按照标准方法用三氯乙酸浸泡的样品检测结果明显偏低, 其样品溶液碱度未能达到方法要求, 经调整氧化镁添加量后, 加标回收率为94.0%~95.6%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为0.57%; 用水作提取剂的样品结果偏高, 浸泡30 min过程中, pH值中性环境样品持续腐败。**结论** 优化后的检验方法满足实验要求, 且三氯乙酸给样品提供足够的酸性环境, 抑制样品进一步腐败。

关键词: 三氯乙酸; 氧化镁; 挥发性盐基氮; 半微量定氮法

Improvement on extraction of volatile basic nitrogen by trichloroacetic acid in semimicro-kjeldahl determination method

HUANG Zhong-Yi^{1,2*}, ZHOU Xing-Wang^{1,2}, MA Dong-Xing³, XU Wen-Yang^{1,2}

(1. Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Changsha 410007, China; 2. Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning of Hunan Province, Changsha 410007, China; 3. Linyi Inspection and Testing Center, Linyi 276000, China)

ABSTRACT: Objective To improve the extraction conditions of volatile basic nitrogen by trichloroacetic acid in semimicro-kjeldahl determination method. **Methods** The extraction effect of trichloroacetic acid and water was compared. The addition amount of magnesium oxide when trichloroacetic acid was used as extraction agent were optimized. At the same time, ammonium chloride was added for recovery experiment. **Results** The test result of samples soaked with trichloroacetic acid according to the standard method was obviously low. The alkalinity of sample solution failed to meet the method requirements. After adjusting the supplemental amount of magnesium oxide, the recoveries rate of spiked sample by the optimized method were 94.0%~95.6%, and the relative standard deviations (RSDs) were 0.57%. The result of the sample with water as the extractant was high, and the sample in the pH-neutral environment continued to rot after being immersed for 30 min. **Conclusion** The optimized test method meets the experimental requirements, and trichloroacetic acid provides sufficient acidic environment for the samples to inhibit further spoilage changes.

KEY WORDS: trichloroacetic acid; MgO; volatile basic nitrogen; semimicro-kjeldahl determination method

*通信作者: 黄忠意, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与分析。E-mail: 670743882@qq.com

*Corresponding author: HUANG Zhong-Yi, Master, Senior Engineer, Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, No.238, Sunshine Dadao, Yuhua District, Changsha City, Hunan Province 410007, China. E-mail: 670743882@qq.com

0 引言

挥发性盐基氮是动物性食品在酶和细菌的作用下,腐败过程中蛋白质分解产生的氨以及胺类等碱性含氮物质的总称,是判断动物性食品新鲜程度的一个非常重要的指标^[1-3],目前分析方法主要有定氮法(半微量和全自动凯氏定氮法)^[4-8]、光谱法等^[9-14]。GB 2707—2016《食品安全国家标准 鲜(冻)畜、禽产品》对鲜(冻)畜、禽产品的挥发性盐基氮限量值作出了规定(<15 mg/100 g),并制定检验方法为 GB 5009.228—2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》。而此检验方法中第一法半微量定氮法 5.2 试样处理中,提取试剂有 2 种,水和三氯乙酸溶液。本研究组在实验中发现,处理相同的样品,当采用三氯乙酸溶液浸泡提取时,检测结果远低于用水浸泡的值,且按照标准方法添加氧化镁混悬液蒸馏后,试液 pH 值呈中性,不符合此方法 2 原理中提出“在碱性溶液中蒸出”的条件。在实际工作中,多采用水提取而舍弃三氯乙酸溶液浸泡提取的方法^[15-19]。

本研究就提取剂三氯乙酸和水的提取效果、结果稳定性进行了比较与分析,并通过对氧化镁的添加量进行考察和判别指示剂的筛选优化三氯乙酸作为提取剂的方法,同时对优化后的方法进行方法学考察,以确保方法的有效性和准确性,从而使检测结果更真实地反映动物性食品的新鲜程度。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料与试剂

猪肉(样 1)、牛肉(样 2)、鸡肉(样 3)、鸭肉(样 4)、草鱼肉(样 5)、鲫鱼(样 6)(市售)。

氧化镁、三氯乙酸、氯化铵、溴甲酚绿、无水乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);硼酸(分析纯,天津市北联精细化学品有限公司);酚酞(分析纯,天津市光复精细化工研究所);亚甲基蓝(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.1.2 仪器与设备

XH-BWL 半微量定氮装置(上海昕沪实验设备有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

鲜(冻)肉去除皮、脂肪、骨、筋腱,取瘦肉部分搅碎搅匀。

1.2.2 水和三氯乙酸提取剂方法比较

分别称取多份已处理试样 20 g 置于具塞锥形瓶中,各准确加入 100 mL 水或三氯乙酸溶液(20 g/L),不时振摇,

试样在样液中分散均匀,浸渍 30 min。向接收瓶内加入 10.0 mL 硼酸溶液(20 g/L),5 滴混合指示剂(溴甲酚绿乙醇溶液、亚甲基蓝乙醇溶液),水浸泡样品准确吸入 10.0 mL 滤液,三氯乙酸溶液浸泡样品摇匀后取 10 mL 上清液,分别注入反应室,加水洗后,再注入 5 mL 氧化镁混悬液(10 g/L)和三滴酚酞乙醇溶液(5 g/L),按照操作规程进行实验。并同时测定水和三氯乙酸浸渍样品蒸馏前、后的 pH 值。结果按式(1)进行计算。

$$X_i(\text{mg}/100\text{ g}) = \frac{(V_i - V_0)C \times 14}{m_i \times V_{\text{测}}/V_{\text{总}}} \times 10 \quad (1)$$

式中:

X_i —试样中挥发性盐基氮的含量, mg/100 g;

C —标准溶液浓度, mol/L;

m_i —样品质量, g;

V_i —标准溶液滴定体积, mL;

V_0 —空白消耗标准溶液体积, mL;

$V_{\text{总}}$ —样液总体积, mL;

$V_{\text{测}}$ —准确吸取的滤液体积, mL;

14—滴定 1.0 mL 盐酸[$c(\text{HCl})=1.000\text{ mol/L}$]标准滴定溶液相当的氮的质量, g/mol。

1.2.3 三氯乙酸提取方法的优化

分别称取 10 份已处理试样(样 3) 20 g 置于具塞锥形瓶中,各准确加入 100 mL 三氯乙酸溶液(20 g/L),不时振摇,试样在样液中分散均匀,浸渍 30 min 后摇匀。向接收瓶内加入 10.0 mL 硼酸溶液(20 g/L),5 滴混合指示剂(溴甲酚绿乙醇溶液、亚甲基蓝乙醇溶液),准确吸入 10.0 mL 上清液注入反应室,加水洗后,再注入不同质量氧化镁粉末(0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、1.0 g)和三滴酚酞乙醇溶液(5 g/L),按照操作规程进行实验并按式(1)计算挥发性盐基氮,结果记为 X ,同时做空白实验。

1.2.4 改进方法的方法学考察

加标物质(10%氯化铵)挥发性盐基氮含量测定:取 2 个锥形瓶加入 100 mL 水,分别准确加入 10%氯化铵溶液 0.5 mL 摇匀,同时做空白实验。向接收瓶内加入 10.0 mL 硼酸溶液(20 g/L),5 滴混合指示剂(溴甲酚绿乙醇溶液、亚甲基蓝乙醇溶液),准确吸入 10.0 mL 上清液注入反应室,加水洗后,再注入 1.2.3 中最佳量氧化镁粉末和三滴酚酞乙醇溶液(5 g/L),按照操作规程进行实验,并按照式(2)计算添加物挥发性盐基氮含量 T 。

$$T(\text{mg}) = (V - V_0) \times C \times 14 \quad (2)$$

式中:

T —试样中添加挥发性盐基氮的含量, mg;

C —标准溶液浓度, mol/L;

V —标准溶液滴定体积, mL;

V_0 —空白消耗标准溶液体积, mL;

14—滴定 1.0 mL 盐酸 $[c(\text{HCl})=1.000\text{ mol/L}]$ 标准滴定溶液相当的氮的质量, g/mol。

加标回收率实验设计: 按照 GB/T 57404—2008 精密度实验要求, 称取 6 份已处理试样(样 3) 20.0 g 置于具塞锥形瓶中, 各准确加入 100 mL 三氯乙酸溶液(20 g/L)、0.10 mL 10%氯化铵溶液, 不时振摇, 试样在样液中分散均匀, 浸渍 30 min 后摇匀。向接收瓶内加入 10.0 mL 硼酸溶液(20 g/L), 5 滴混合指示剂(溴甲酚绿乙醇溶液、亚甲基蓝乙醇溶液), 准确吸入 10.0 mL 上清液注入反应室, 加水洗后, 再注入 1.2.3 中最佳量氧化镁粉末和三滴酚酞乙醇溶液(5 g/L), 按照操作规程进行实验并做空白实验。按式(1)计算挥发性盐基氮, 结果记为 X , 按式(3)计算加标回收率结果, 结果记为 A 。

$$A(\%) = \frac{X \times m - X_0 \times m}{T} \quad (3)$$

式中:

- A —试样中挥发性盐基氮的加标回收率, %;
- X_0 —B 组中样品基质挥发性盐基氮含量, mg/100 g;
- X —A 组中样品挥发性盐基氮含量, mg/100 g;
- m —A 组中样品质量, g;
- T —试样中添加挥发性盐基氮的含量, mg。

1.2.5 改进后方法与水提取法比较

分别称取已处理试样 12 份(样品 3) 20 g 置于具塞锥形瓶中, 分为 2 组每组 6 份各按照三氯乙酸提取改进后的方法和水提取法进行测定, 并同时做空白实验。结果按式(1)

进行计算。

2 结果与分析

2.1 标准方法中水提取和三氯乙酸提取的差异性

水提取法浸泡液 pH 值在 6.05~6.53 之间, 呈中性至弱酸性; 蒸馏过程中酚酞显紫红色, 提示在碱性条件下蒸馏, 蒸馏后样品溶液 pH 值为 11.28~11.74, 挥发性盐基氮结果为 3.91~8.50 mg/100 g。而三氯乙酸溶液浸泡的样品, 浸泡液 pH 值在 1.82~1.89 之间, 呈酸性; 蒸馏过程中酚酞未显色, 提示未在碱性条件下蒸馏, 挥发性盐基氮结果除一个为 0.465 mg/100 g 外, 其他均为未检出(低于检出限 0.18 mg/100 g), 蒸馏后样品溶液 pH 值 7.15~7.30。研究结果表明, 按照标准方法的氧化镁加入量, 水提取法满足在碱性条件下蒸馏的条件, 而三氯乙酸提取未达到要求(结果见表 1)。

2.2 三氯乙酸提取法氧化镁添加量确定

因氧化镁悬浮液并不稳定, 在使用过程中易沉淀, 从而导致加入量很难控制, 因此在实验中直接加入氧化镁粉末。标准方法中规定的 10 g/L 氧化镁悬浮液 5 mL 即 0.05 g 氧化镁粉末作为添加下限, 往上逐渐增加至 1.00 g。结果表明, 氧化镁粉末添加量在 0.09 g 以上时, 结果趋于稳定, 酚酞显色为紫红色, 氧化镁添加量宜在 0.09 g 以上, 结果见表 2。为方便操作, 本研究选用 0.10 g 氧化镁作为最佳添加量。

表 1 标准方法中水提取和三氯乙酸提取的差异性
Table 1 Difference between water extraction and trichloroacetic acid extraction in standard methods

提取剂	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	
水	浸泡液 pH 值	6.21	6.15	6.05	6.19	6.53	6.14
	蒸馏过程中酚酞显色	紫红色	紫红色	紫红色	紫红色	紫红色	紫红色
	蒸馏后样品溶液 pH 值	11.43	11.58	11.62	11.28	11.74	11.38
	挥发性盐基氮含量/(mg/100 g)	4.15	6.83	5.84	3.91	6.89	8.50
三氯乙酸溶液	浸泡液 pH 值	1.87	1.82	1.83	1.88	1.89	1.84
	蒸馏后酚酞显色	未变色	未变色	未变色	未变色	未变色	未变色
	蒸馏后样品溶液 pH 值	7.15	7.28	7.26	7.30	7.22	7.28
	挥发性盐基氮含量/(mg/100 g)	未检出	未检出	未检出	0.465	未检出	未检出

表 2 氧化镁不同添加量结果汇总
Table 2 Summary of results of different supplemental levels of magnesium oxide

	氧化镁添加量/g									
	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.13	1.00
酚酞显色情况	未变色	未变色	粉红	红色	紫红	紫红	紫红	紫红	紫红	紫红
挥发性盐基氮结果/(mg/100 g)	未检出	0.56	1.26	3.27	4.86	4.87	4.87	4.87	4.88	4.85

2.3 加标回收和精密度实验

称取 6 份已处理试样 3 各 20.0 g, 分别添加氧化镁 0.10 g, 10%氯化铵溶液 0.10 mL, 测得挥发性盐基氮结果计算加标回收率。经实验测得, 10%氯化铵溶液挥发性盐基氮含量为 2575 mg/100 mL。2.2 试样 3 中氧化镁 0.10 g 时, 测得挥发性盐基氮结果 4.87 mg/100 g(即为本底值)。2.58 mg 标准样品加标到 20.0 g 样品中, 即加标量为 12.90 mg/100 g。最终结果测得加标回收率为 94.0%~95.6%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.57%, 符合方法学要求。详见表 3。

表 3 改进后方法精密度实验
Table 3 Precision test of the improved method

	序号					
	1	2	3	4	5	6
加标量/(mg/100 g)	12.90					
本底值/(mg/100 g)	4.87					
测得浓度/(mg/100 g)	17.2	17.1	17.2	17.2	17.0	17.2
计算得加标回收率/%	95.6	94.8	95.6	95.6	94.0	95.6
RSD/%	0.57					

表 4 改进后方法与水提取法结果比较
Table 4 Results of improved method compared with that of water extraction method

	序号						平均值
	1	2	3	4	5	6	
改进后方法/(mg/100 g)	2.91	2.89	2.91	2.73	2.14	2.63	2.70
水提取法/(mg/100 g)	5.86	5.81	5.89	5.93	5.75	5.86	5.85

3 结 论

经过提高氧化镁添加量, 以酚酞乙醇溶液作为指示剂, 能完全蒸馏出样品中的挥发性盐基氮, 且相对于水提取法, 三氯乙酸酸性环境抑制了微生物的进一步分解。因此, 经优化后的三氯乙酸提取法不仅能准确测定挥发性盐基氮, 且结果更接近真实值。

参考文献

[1] BEKHIT E, HOLMAN B, GITERU SQ, *et al.* Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review [J]. Trends Food Scie Technol, 2021, 109: 280–302.

[2] 张越, 宫田娇. 食品中挥发性盐基氮检测技术研究[J]. 现代食品, 2019, 58(24): 188–189.

ZHANG Y, GONG TJ. Study on the determination technology of volatile base nitrogen in food [J]. Mod Food, 2019, 58(24): 188–189.

[3] 王天佑, 王玉娟, 秦文. 猪肉挥发性盐基氮值指标与其感官指标的差异研究[J]. 食品工业科技, 2007, (12): 124–126.

2.4 改进后方法与水提取法结果比较

经比对实验得出, 水提取法结果明显高于改进后三氯乙酸提取法, 比值为 2.17:1(测定时室温 22 ℃)。又因为测得水提取法浸泡液 pH 值在 6.05~6.53 之间, 呈中性至弱酸性, 三氯乙酸溶液浸泡的样品, 浸泡液 pH 值在 1.82~1.89 之间, 呈酸性。因霉菌和酵母菌生长最适 pH 在 5~6 之间, 而细菌的生长最适 pH 值在 7 左右^[20], 三氯乙酸溶液低 pH 值不利于微生物的繁殖, 从而抑制了样品进一步的腐败, 因而其测定结果应该更接近于样品真值, 具体结果见表 4。

WANG TY, WANG YJ, QIN W. Study on the difference of volatile base nitrogen value index and sensory index of pork [J]. Sci Technol Food Ind, 2007, (12): 124–126.

[4] 封晴霞, 王利强. 4 ℃冷藏牛肉的新鲜度检测及指标分析[J]. 包装与食品机械, 2020, 38(6): 1–4.

FENG QX, WANG LQ. Freshness detection and index analysis of beef in 4 ℃ refrigeration [J]. Pack Food Mach, 2020, 38(6): 1–4.

[5] 王想, 高乾钟, 肖新清, 等. 保活运输河蟹品质感知生物信号检测与建模[J]. 农业机械学报, 2020, 51(10): 268–277.

WANG X, GAO GZ, XIAO XQ, *et al.* Detection and modeling of quality sensing biological signal of river crab in alive transportation [J]. Trans Chin Socr Agric Mach, 2020, 51(10): 268–277.

[6] 郭有辉, 胡露, 王利娜, 等. 罐装鱼挥发性盐基氮定量测定能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(8): 2524–2528.

GUO YH, HU L, WANG LN, *et al.* Verification results and analysis of quantitative determination ability of volatile base nitrogen in canned fish [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(8): 2524–2528.

[7] 胡云峰, 潘悦, 王雅迪, 等. 基于 pH 值变化的冷藏草鱼肉新鲜度预测模型研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(2): 14–17.

- HU YF, PAN Y, WANG YD, *et al.* Prediction model of frozen grass fish freshness based on pH value change [J]. *Food Res Dev*, 2021, 42(2): 14–17.
- [8] 王敬, 钱坤, 任连泉. 鲤鱼在冷冻贮藏下鱼肉品质变化研究[J]. *农产品质量与安全*, 2020, 1: 91–93.
- WANG J, QIAN K, REN LQ. Study on changes of carp fish quality during cryopreservation [J]. *Qual Saf Agro-Prod*, 2020, 1: 91–93.
- [9] 张珏, 田海清, 王珂, 等. 基于高光谱成像技术的羊肉新鲜度预测[J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25(5): 94–103.
- ZHANG J, TIAN HQ, WANG K, *et al.* Prediction of lamb freshness based on hyperspectral imaging technology [J]. *J China Agric Univ*, 2020, 25(5): 94–103.
- [10] OUYANG Q, WANG L, ZAREEF M, *et al.* A feasibility of nondestructive rapid detection of total volatile basic nitrogen content in frozen pork based on portable near-infrared spectroscopy [J]. *Microchem J*, 2020, 157: 1–7.
- [11] QIAO L, LU B, DONG J, *et al.* Total volatile basic nitrogen content in duck meat of different varieties based on calibration maintenance and transfer by use of a near-infrared spectrometric model [J]. *Spectrosc Lett*, 2020, 53(1): 44–54.
- [12] LI H, CHEN Q, ZHAO J, *et al.* Nondestructive detection of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in pork meat by integrating hyperspectral imaging and colorimetric sensor combined with a nonlinear data fusion [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, 63: 268–274.
- [13] SUN DW, ZENG XA, CHENG JH, *et al.* Non-destructive and rapid determination of TVB-N content for freshness evaluation of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by hyperspectral imaging [J]. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2014, 21: 179–187.
- [14] ZHANG Y, LUO Q, DING K, *et al.* A smartphone-integrated colorimetric sensor of total volatile basic nitrogen (TVB-N) based on Au@MnO₂ core-shell nanocomposites incorporated into hydrogel and its application in fish spoilage monitoring [J]. *Sensors Actuat B: Chem*, 2021, 335: 125–133.
- [15] 方靖, 徐清霞, 洗灿标. 半自动凯氏定氮仪法测定挥发性盐基氮含量[J]. *广州化工*, 2019, 47(7): 108–109.
- FANG J, XU QX, XIAN CB. Determination of volatile base nitrogen in pork by semi-automatic kjeldahl method [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2019, 47(7): 108–109.
- [16] 王熬, 凌育昕, 司徒茵, 等. 不同储存温度对猪肉中挥发性盐基氮本底值测定水平的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(13): 4285–4289.
- WANG A, LING YX, SHI TY, *et al.* Effect of different storage temperature on determination level of volatile basic nitrogen in pork [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(13): 4285–4289.
- [17] 彭焱辉, 梁洁怡, 李维嘉, 等. 熟牛肉中挥发性盐基氮含量的测定方法[J]. *食品工程*, 2019, 1: 62–64.
- PENG YH, LIANG JY, LI WJ, *et al.* Analysis on the determination of volatile salt nitrogen in cooked beef [J]. *Food Eng*, 2019, 1: 62–64.
- [18] 姚劲松. 猪肉中挥发性盐基氮的实验室质量考核研究[J]. *食品安全导刊*, 2020, 3: 124.
- YAO JS. Study on laboratory quality assessment of volatile base nitrogen in pork [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2020, 3: 124.
- [19] 王玉静, 柳旭伟, 毛玉梅, 等. 挥发性盐基氮对鸡肉品质的影响[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2019, 5: 28–29.
- WANG YJ, LIU XW, MAO YM, *et al.* Effects of volatile base nitrogen on chicken quality [J]. *Shanghai Anim Husb Vet Med*, 2019, 5: 28–29.
- [20] 江汉湖, 董明盛, 李平兰, 等. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- JIANG HH, DONG MS, LI PL, *et al.* Food microbiology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004.

(责任编辑: 张晓寒 王欣)

作者简介



黄忠意, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与分析。

E-mail: 670743882@qq.com