

在线透析-流动注射光度法测定奶及奶制品中尿素含量

赵立晶¹ 闫杰¹ 马东升¹ 范志影² 肖靖泽¹ 赵萍^{*1}

¹(北京吉天仪器有限公司,北京 100015) ²(中国农业科学研究院饲料研究所,北京 100081)

摘 要 建立了在线透析-流动注射光度法测定奶及奶制品中尿素的方法。加入三氯乙酸使样品中蛋白质沉淀,离心过滤去除沉淀的蛋白质,在线透析去除剩余的脂肪及大分子,避免干扰光度分析。在 Fe^{3+} 存在时,尿素与二乙酰-肼在酸性溶液中水解生成的二乙酰反应生成红色化合物,在 534 nm 处测量吸光度,加入硫代氨基脲提高显色强度。实验对试剂的浓度、在线透析模块的结构、混合环的长度均进行了优化。在最佳的分析条件下,尿素浓度在 0 ~ 500 mg/kg 的范围内,可获得良好的线性($r \geq 0.999$)。方法的检出限为 1.3 mg/kg;相对标准偏差为 0.91% ~ 1.95%;样品测定频率分别为 22 样/h;牛奶及奶制品的加标回收率为 94.1% ~ 109.8%。

关键词 流动注射;在线透析;尿素;奶制品

1 引 言

哺乳动物体内的尿素很容易进入乳腺细胞,并随乳液排出,因此尿素是乳液的常规组分并构成非蛋白氮的一部分。通常,牛奶中尿素含量在 200 ~ 300 mg/kg 为正常含量范围。目前,由于国家尚未限定尿素的允许添加量,存在市售牛奶中尿素含量超高的现象,且多源于不法商贩在鲜奶中添加尿素,以提高总氮含量。此种牛奶直接危害人体健康,同时给乳品加工企业造成巨大的经济损失。

尿素的检测方法根据机理不同可分为:直接测定法^[1,2],通常基于尿素和试剂所生成的络合物结构及数量的比色测定法,如 AOAC(2000 版)法定方法 967.07“动物饲料中的尿素”和 ISO 6654-1991“动物饲料中尿素含量的测定”;间接测定法^[3],主要为测定尿素降解产物的酶法,如 ISO 14637-2004“牛奶中尿素含量的测定”中采用的 pH 值差异测定法,由于该方法对试剂和仪器有特殊要求,一般实验室难以实现。

采用流动注射分析法测定奶中的尿素,近年来也多见报道,多为间接测定法:基于酶法水解生成氨,利用气体扩散法测定氨引起的接收液 pH 值的变化^[4],或利用水杨酸光度法于 660 nm 处测定氨^[5,6],或利用选择电极测定 NH_4^+ ^[7,8],但脲酶溶液的制备较繁琐,不适于现场快速测定。使用电化学微分析系统测定尿素也有报道^[9],但还无法实际应用。在线透析-流动注射法近年来也有报道^[10-12],但未见用于尿素的分析。

本实验采用自行研制的小型全自动乳品分析仪对乳品中的尿素进行了测定,方法简单快捷,可现场快速测定,对市售的奶及奶制品等样品进行了测定,结果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

FIA-MILK 全自动牛奶分析仪(北京吉天仪器有限公司);ARUS 艾科浦超纯水器(重庆颐洋企业发展有限公司);BS124S 分析天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司);USB4000 光纤光谱仪(美国海洋光学公司);RJ-TDL-40B 低速台式离心机(无锡市瑞江分析仪器有限公司);DZKW-C 电子恒温水浴锅(北京市光明医疗仪器厂)。

尿素(H_2NCONH_2)、三氯乙酸($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$)、硫代氨基脲($\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}$)、二乙酰-肼($\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2$)等均为

2010-05-31 收稿;2010-09-07 接受

本文系科技部“十五”科技攻关项目(No. 2004BA210A05)资助

*E-mail: zhaoping@mail.ccit.com.cn

©1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

国产分析纯或优级纯试剂。实验用水为二次去离子水。

酸试剂: 200 mL H_2SO_4 (优级纯) 溶于 650 mL 水, 冷却, 再加入 100 mL H_3PO_4 (85%, 优级纯), 冷却至室温, 加入 0.0333 g FeCl_3 , 用水稀释至 1 L。**显色剂:** 400 mL 17.22% (m/V) 二乙酰一肟溶液与 100 mL 0.86% (m/V) 硫代氨基脲溶液混合配制。载流为去离子水。12% 和 24% (V/V) 三氯乙酸溶液。1.0 g/L 尿素标溶液, 将其以 12% 三氯乙酸溶液逐级稀释得到标准使用液。所有的奶制品均购于本地超市。

2.2 样品的前处理

2.2.1 固体奶制品(如奶酪、奶粉)的前处理 称取 2.5 g 样品于 50 mL 离心管中, 用 50 ~ 55 °C 的水将样品溶解, 定量到 20 g, 加入等体积的 24% 三氯乙酸溶液, 摇匀。以 3500 r/min 离心 20 min。将离心好的样品通过针头过滤器过滤, 收集到的滤液用全自动牛奶分析仪测定。

2.2.2 液体奶制品的前处理 称取 20 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入等体积的 24% 三氯乙酸溶液, 摇匀。其余步骤同上。

2.3 测定原理

乙酸锌和 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 与蛋白质共沉淀可去除提取液中的蛋白质^[13]。对于牛奶样品, 残存的脂肪需采用正己烷去脂处理, 且 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的色度对后续的测定有干扰。本研究参照文献[14], 用 24% 三氯乙酸与样品等体积混合沉淀蛋白质, 离心去除蛋白质沉淀, 再采用在线透析的方法去除剩余的蛋白质和脂肪, 消除蛋白质、脂肪等大分子对显色反应的干扰。将生鲜乳中的蛋白质和脂肪等干扰物质去除后, 用流动注射光度分析法测定尿素含量。在线透析模块可避免残余的脂肪等大分子造成的干扰, 反应基于二乙酰一肟在酸性溶液中被水解为二乙酰, 在 Fe^{3+} 的催化下, 二乙酰直接与尿素发生反应, 形成红色的化合物。加入硫代氨基脲增加显色强度。经过光纤光谱仪在 200 ~ 850 nm 进行光谱扫描, 此红色化合物在 534 nm 处具有最大的吸收峰, 故选择 534 nm 作为检测波长。

2.4 实验方法与仪器条件

乳品中尿素的检测流路如图 1 所示, 使用蠕动泵和 Tygon[®] PVC 泵管驱动样品及试剂溶液, 其中样品溶液通过自动进样器采集。毛细管采用 FEP 管 (0.8 mm i. d.), 使用无需翻边的快速接头和三通连接。电动的低压六位阀上连接有采样环。在线透析模块、在线冷凝模块为自行设计制造; 534 nm 的窄带滤光片分光, 流通池 80 μL , 光程为 10 mm; 检测器为 UV-Vis 6000 双光束光度计 (北京吉天仪器有限公司), 光源 (360 ~ 900 nm); 软件为 Viscal C⁺⁺ (Microsoft) 语言编制, 完成对仪器的控制、数据的采集及处理。

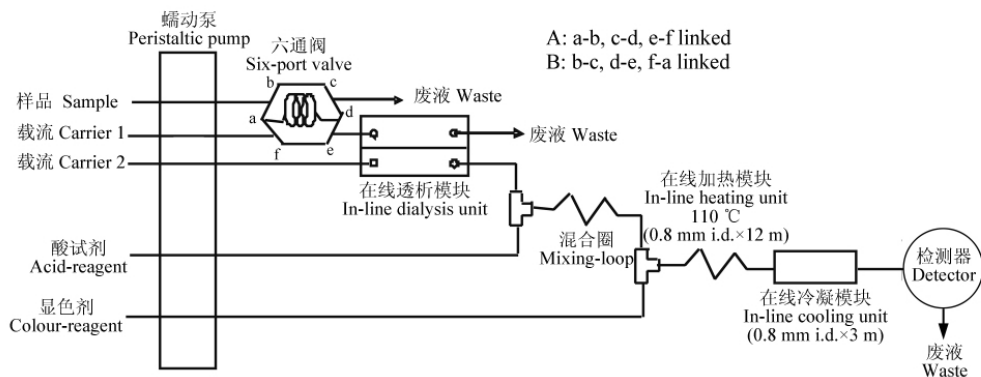


图 1 奶及奶制品中尿素分析单元流程图

Fig. 1 FI manifold for determination of urea in milk and milk products

样品通过自动进样器及蠕动泵的驱动进入六位阀 (A 位) 上连接的采样环, 将采样环充满后, 六位阀切换到 B 位, 载流 1 将采样环中的样品推出, 进入在线透析模块, 大分子化合物通过废液排出, 包含小分子的化合物通过透析膜进入接收载流 2, 与酸试剂混合后, 进入在线加热模块 (110 °C) 与显色剂混合, 混合后的气液混合物经过在线冷凝模块冷却到 40 ~ 50 °C 后, 进入插在检测器中的流通池, 在 534 nm 处测定得吸光度的峰面积 (峰高) 值, 采用工作曲线计算出样品中尿素的含量。尿素的分析条件: 泵

速35 r/min,进样针清洗时间10 s,到达阀时间40 s,注射时间80 s,进样时间35 s,清洗时间40 s,样品周期160 s,出峰时间140 s,峰宽120 s。

3 结果与讨论

3.1 三氯乙酸浓度和超声提取对反应的影响

对于同一个牛奶样品,样品经前处理后,最终溶液中的三氯乙酸浓度为9%时,测定样品浓度为 (325.35 ± 3.15) mg/kg,加标100 mg/kg的回收率为 $116.0\% \pm 1.2\%$;最终溶液中的三氯乙酸浓度为12%时,测定样品浓度为 (296.60 ± 0.80) mg/kg,加标100 mg/kg的回收率为 $99.4\% \pm 3.3\%$ 。本研究选择最终溶液中的三氯乙酸浓度为12%。

样品经前处理后,采用超声提取处理,测定结果为 (313.85 ± 3.37) mg/kg,RSD为1.07%;采用摇匀处理,测定结果为 (313.87 ± 3.41) mg/kg,RSD为1.09%。配对 t -检验显示,两种方法获得的结果无统计学差异性($t = 0.0085$, $P > 0.05$),说明提取液是否经过超声提取处理对测定的结果影响不大,故选取简单的摇匀处理。

3.2 显色剂的选择

采用流动注射方法,以二乙酰-肼和对二甲氨基苯甲醛(DMAB)为显色剂。结果表明,由于采用三氯乙酸对样品进行前处理,样品的pH值较小,与对二甲氨基苯甲醛(DMAB)显色剂要求在pH 7.0条件下显色的基体不匹配,在FIA测定的过程中,会产生严重的Schlieren效应,导致测定结果不准确。因此,在FIA-DMAB法中,采用乙酸锌溶液和 $K_4Fe(CN)_6$ 溶液生成 $Zn_2Fe(CN)_6$ 白色沉淀,与蛋白质共同沉淀,沉淀蛋白后的提取液用正己烷为萃取剂进行脱脂处理,采用流动注射的方法,在酸性条件下,试液中的尿素与对二甲氨基苯甲醛反应生成黄色化合物,其颜色的深浅与尿素含量成正比,在420 nm下进行比色测定。

分别使用二乙酰-肼及对二甲氨基苯甲醛对同一个样品进行测定($n = 6$),结果分别为 (349.58 ± 1.81) mg/kg(RSD = 0.52%)、 (373.26 ± 38.31) mg/kg(RSD = 10.26%)。配对 t -检验显示,两种方法获得的结果无统计学差异性($t = 1.45$, $P > 0.05$)。但采用FIA-二乙酰-肼法获得的数据比FIA-对二甲氨基苯甲醛的精密度高、稳定性好,且前处理方法简单,因此采用二乙酰-肼作为显色剂。

3.3 反应条件的优化

酸试剂中 H_2SO_4 和 H_3PO_4 的浓度对测试基线的稳定性及吸光度的响应值有较大的影响。 H_2SO_4 浓度太高时,Schlieren效应导致基线波动较大。 H_3PO_4 浓度过低或不加 H_3PO_4 时,吸光度的响应值较小; H_3PO_4 浓度较高时,基线稳定性不好,噪音高达1 mAu。 Fe^{3+} 作为催化剂,其量超过0.2 mmol后,对响应值影响不大。显色剂中二乙酰-肼的浓度为13.78%(m/V),硫代氨基脲的浓度为0.172%时,可以获得最大的吸光度值。

3.4 反应流路的优化

图1所示的反应流路比较复杂,综合了3个在线前处理模块(在线加热、在线透析及在线冷凝)和1个混合圈,其长度、温度对基线及吸光度的读数影响均较大。实验发现,当混合圈1的长度为2 m时,酸试剂与样品达到较为充分的混合,对基线稳定性有利,可避免Schlieren效应。在线加热模块的长度为12 m,温度为110℃时,可获得稳定的吸光度值。当温度低于110℃时,虽可避免大量的气泡对反应造成的干扰,但温度低对吸光度值影响极大,故在加热模块后面加入在线冷凝模块避免气泡干扰。在线冷凝模块的毛细管长度为3 m时,出水温度在40~50℃之间,可保证无气泡干扰,并且可获得较大的吸光度读数。

3.5 在线透析模块的优化

流路中的在线透析模块为自行设计加工,为“三明治”式设计,上下各为一块聚四氟乙烯板块,板块上刻有流路槽,上下对称,流路槽的两端为流路接头,中间夹有透析膜,三部分用具有3个大螺钉的铝体夹持固定。

考察透析流路槽的机械参数发现,流路长度相同的条件下,流路槽的形式是曲线型、直线型、折线

型对透析无显著影响。但流路的长度对透析有显著的影响,考察流路槽的尺寸(50 mm×2 mm×0.3 mm,70 mm×2 mm×0.3 mm,100 mm×2 mm×0.3 mm和120 mm×2 mm×0.3 mm)时发现,流路过长,液流阻力大,容易导致透析膜的损坏;流路过短,透析效果较差,仪器的检出限高。而在线透析模块为70 mm×2 mm×0.3 mm时,吸光度达到稳定的最大值(图2)。

考察透析膜的截留分子量为3500、7000和14000时对反应的影响发现,截留分子量为14000的透析膜效果最好,能获得吸光度达到稳定的最大值,所以选取截留分子量为14000的透析膜。透析膜在使用前需进行清洗。

3.6 线性范围、检出限和精密度

在优化的FIA条件下,配制系列质量浓度的尿素进行测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制工作曲线。尿素浓度在0~500.0 mg/kg范围内的具有良好的线性关系 $A=0.9437c-0.7419$, $r=0.9999$ 。

根据EPA关于方法检出限的定义:对10.0 mg/kg的尿素标准溶液平行前处理7份,测定吸光度,并换算样品中的尿素浓度,由标准偏差(S)按下式计算检出限: $DL=S\times t_{(n-1,0.95)}$ (连续分析7个样品,在95%的置信区间,此时 $t_{(6,0.95)}=3.14$),其中: $t_{(n-1,0.95)}$ 为置信度95%、自由度为 $n-1$ 时的 t 值, μ 为重复分析的样品数。检出限的测定结果为1.3 mg/kg。精密度的测定:取2个原料奶样品,每个样品做6个重复,计算得相对标准偏差为0.91%~1.95%。

3.7 干扰研究

按实验方法对20 mg/L尿素标准溶液进行测定,当相对误差小于±5.0%时,2倍的 Fe^{2+} ,5倍的 Na^{+} ,20倍的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,5倍的抗坏血酸、硫脲对尿素的测定无干扰;对阴离子,如 SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, NO_2^{-} 在1倍的条件下都有明显的负干扰。样品中若有 NO_2^{-} 存在,其与尿素在酸性条件下反应生成 CO_2 ,引起负干扰。本研究小组曾用FIA-MILK全自动牛奶分析仪测定不同奶及奶制品中的 NO_2^{-} 的含量^[15],结果发现,奶及奶制品中不存在 NO_2^{-} ,故在测定牛奶时可不考虑该离子的干扰。而对于有些奶制品中添加的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,其含量在允许范围内,对本实验也不存在干扰。

3.8 实际样品的加标回收实验

对市售牛奶、酸奶、奶酪等样品中的尿素进行检测,并进行加标回收实验,结果见表1,其加标回收率均在94.1%~109.8%之间。结果表明,本方法适用于乳制品中尿素的检测。

表1 奶制品中尿素的加标回收实验 (n=5)
Table 1 Recovery of standard addition of urea in milk and milk products (n=5)

| 样品 Sample | 浓度 Determined (mg/kg) | 加入量 Added concentration (mg/kg) | 测定值 Found concentration (mg/kg) | 回收率 Recovery (%) |
|----------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| 纯牛奶 Pure milk | 311.2±4.7 | 214.3 | 535.2±8.9 | 104.8 |
| 鲜牛奶 Fresh milk | 310.4±3.9 | 214.3 | 545.6±5.7 | 109.8 |
| 酸奶 Yoghurt | 255.7±7.1 | 100.0 | 349.8±2.9 | 94.1 |
| 奶酪 Cheese | 296.3±5.8 | 100.0 | 396.2±2.1 | 99.9 |

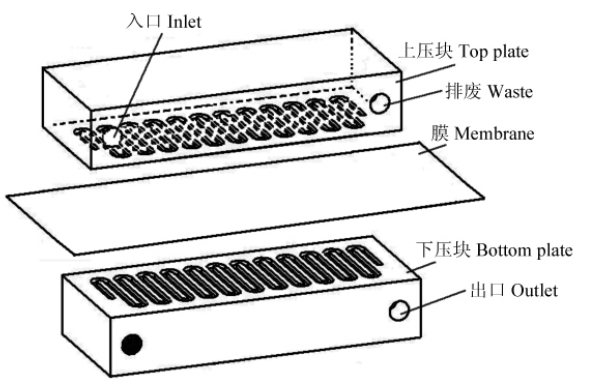


图2 在线透析模块的结构
Fig.2 In-line dialysis unit structure

References

1 AOAC 967.07 , *Determination of Urea*. AOAC International Official Methods
2 ISO 6654-1991 , *Animal Feeding Stuffs-Determination of Urea Content*. International Standard
3 ISO 14637: 2004 , *Milk-Determination of Urea Content-Enzymatic Method Using Difference in pH*. International Standard

- 4 Reis Lima M J , Fernandes S M V , Rangel A O S S. *J. Agric. Food Chem.* , **2004** , 52(23) : 6887 ~ 6890
- 5 Baumgartner M , Flöck M , Winter P , Luf W , Baumgartner W. *Acta Vet. Hung.* , **2002** , 50(3) : 263 ~ 71
- 6 González-Rodríguez J , Pérez-Juan P , Luque de Castro M D. *Anal. Chim. Acta* , **2002** , 471(1) : 105 ~ 111
- 7 Lima José L F C , Delerue-Matos C , Vaz M , Carmo V F. *J. Agric. Food Chem.* , **1998** , 46(4) : 1386 ~ 1389
- 8 Walcerz I , Glab S , Koncki R. *Anal. Chim. Acta* , **1998** , 369(1-2) : 129 ~ 137
- 9 Ohnishi N , Satoh W , Morimoto K , Fukuda J , Suzuki H. *Sensors and Actuators B* , **2009** , 144(29) : 146 ~ 152
- 10 Kritsunankul O , Pramote B , Jakmunee J. *Talanta* , **2009** , 79(4) : 1042 ~ 1049
- 11 Oliveira S M , Lopes T I M S , Toth I V , Rangel A O S S. *Talanta* , **2010** , 81(4-5) : 1735 ~ 1741
- 12 Luque de Castro M D , Capote F P , Sanchez Avila N. *Trends Anal. Chem.* , **2008** , 27(4) : 315 ~ 326
- 13 GB/T 5413.32-1997 *Milk Powder-Determination of Nitrate and Nitrite Contents*(乳粉硝酸盐、亚硝酸盐的测定) . National Standards of the People's Republic of China(中华人民共和国标准)
- 14 ISO 8968-4-2001 , *Milk-Determination of Nitrogen Content-Part 4: Determination of Non-protein-nitrogen Conten.* International Standard
- 15 ZHAO Ping , ZHAO Li-Jing , XIAO Jing-Ze(赵萍 , 赵立晶 , 肖靖泽) . *Food Sci. Tech.* (食品科技) **2010** , 35(7) : 296 ~ 299

Determination of Urea in Milk and Milk Products by In-line Dialysis-Flow Injection-Spectrophotometry

ZHAO Li-Jing¹ , YAN Jie¹ , MA Dong-Sheng¹ , FAN Zhi-Ying² , XIAO Jing-Ze¹ , ZHAO Ping^{*1}

¹(Beijing Titan Instruments Co. , Ltd. , Beijing 100016)

²(Feed Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081)

Abstract An in-line dialysis flow-injection-spectrophotometric method was developed to determine urea in milk and milk products. Protein was precipitated from a sample portion by the addition of trichloroacetic acid solution. The precipitated milk protein was removed by centrifuging and filtration. Remaining protein and fat which could interfere with the subsequent analysis was removed by in-line dialysis. The spectrophotometric method was based on the reaction of urea with diacetyl which was produced from diacetylmonoxime hydrolysis in acid solution when the Fe^{3+} co-existed in solution. The red compound obtained from the said reaction was measured at 534 nm. To enhance the intensity of the color , aminothiourea was added. Experimental parameters , including the reagent concentration , on-line dialysis unit structure , the length of the mixing coil , were optimized. Under optimized conditions , the linear calibration curves were obtained for the concentration range of 0 – 500.0 mg/kg ($r \geq 0.999$) . The proposed method had low detection limit of 1.3 mg/kg urea. The relative standard deviation was 0.9% – 2.0% with the sample throughput of 22 samples/h. The urea was determined various milk products with the standard addition recovery of 94.1% – 109.8% . The method was simple , rapid and has been used to determine the urea in milk and milk products with satisfactory results.

Keywords Flow injection; In-line dialysis; Urea; Milk

(Received 31 May 2010; accepted 7 September 2010)