

许 晔, 宋 亮. 1 种快速检测乳及乳制品中皮革水解蛋白的方法[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 264–265.

1 种快速检测乳及乳制品中皮革水解蛋白的方法

许 晔¹, 宋 亮²

(1. 江苏教育学院生命科学与化学学院, 江苏南京 210013; 2. 扬州大学化学化工学院, 江苏扬州 225002)

摘要:在乳及乳制品中添加皮革水解蛋白对乳及乳制品的生产和消费产生很大负面影响, 引起社会各方关注, 为保证乳及乳制品的质量安全, 急需快速、简便的民用检测乳及乳制品中是否含有皮革水解蛋白。本研究建立了乳及乳制品中皮革水解蛋白检测方法, 该方法中样品无需进行前处理, 2 mL 乳及乳制品中加入 2 mL 硫酸, 100 ℃ 水浴 6.5 min 进行显色反应。结果表明, 该方法对乳及乳制品中皮革水解蛋白最低检测限为 0.25 mg/mL, 满足简便、快速的定性分析要求。

关键词:乳; 乳制品; 皮革水解蛋白; 快速检测

中图分类号: R155.5⁺7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)02–0264–02

蛋白质是乳及乳制品中的主要营养成分, 但是一些不法企业为谋取暴利, 在乳及乳制品中添加有机化工原料、不合法的动植物蛋白等, 以提高蛋白质含量。近年来, 媒体频繁报道的“皮革奶”事件让乳品产业受到一次次重创^[1]。掺假乳会直接引起食品安全问题, 影响奶农、生产厂家和消费者的利益^[2–3]。在常规检测牛奶中蛋白含量时, 结果是乳制品中总蛋白质含量, 而不是乳制品中乳蛋白的实际含量^[2–3], 而皮革水解蛋白与三聚氰胺不同的是, 它由皮革经过化学、生物技术处理, 水解出原有的蛋白(胶原蛋白), 是真正的蛋白质。所以, 皮革水解蛋白添加在乳及乳制品中更为隐蔽, 检测难度更大。

若是较为纯净的皮革水解蛋白被人服用后伤害不大, 而不法商贩是将生产皮衣、皮沙发、皮包等皮革下角料进行化学、生物水解后制得的皮革水解产物添加到兑了水的牛奶中以提高蛋白含量, 而鞣质皮革下角废料中含有重金属铬(VI), 含有铬离子的牛奶被人服用后, 可造成人体重金属中毒, 导致关节疏松、关节肿大。近期国家卫生部已将皮革水解蛋白公布为食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种(第二批)^[4–5]。

目前, 检测乳制品中是否添加皮革水解蛋白的常规方法有显色环法^[6]、超声乳成分分析法^[7]、石墨炉原子法^[8]、比色法^[9]、高效液相色谱法^[10]、离子交换色谱—积分脉冲安培法^[11]、高效液相色谱—质谱联法^[12]、高效液相色谱—蒸发光散射法^[13]和氨基酸自动分析仪法^[14]。常见的检测方法大都为定量分析, 操作复杂、耗时长, 不利于普通百姓用于快速简便定性检测。目前皮革奶定性分析方法仅有显色环法^[6], 但该方法需要水浴浓缩, 耗时较长。本研究试图建立乳及乳制品中皮革水解蛋白简便快速的定性检测方法, 利于普通百姓在日常生活中对乳及乳制品中是否添加皮革水解蛋白进行简便定性检测, 为乳与乳制品监管提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

皮革水解蛋白粉(蛋白质含量 78%), 特仑苏纯牛奶(经过 GB/T 9695.23—2008《肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定》^[9]的方法未测出水解蛋白, 为合格乳, 蛋白含量 3.1%)。以上材料的蛋白质含量均由凯氏定氮法^[15–16]测得。

正常牛奶每 100 mL 约含有蛋白质 3.4 g、脂肪 1.3 g(考虑到直接添加脂肪与水不容且脱脂奶中无脂肪, 以下的模拟皮革奶中未加入脂肪), 碳水化合物(主要是乳糖)5.0 g, 根据以上配比取 0.43 g 的皮革水解蛋白(蛋白含量约为 0.34 g), 加入 10 mL 蒸馏水, 0.5 g 的乳糖, 混合均匀再与 15 mL 的合格乳样混匀(提高合格乳添加量可保证皮革水解蛋白充分溶解)。最终制得的添加皮革水解蛋白粉的自制皮革奶 25 mL。用皮革水解蛋白制得的皮革奶自制样外观与正常牛奶一样, 乳白色, 无异味, 且经凯氏定氮操作测得蛋白含量与合格乳相近(蛋白含量大于 2.95% 为合格乳)。

1.2 方法

1.2.1 试剂配置 硫酸溶液的浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mol/L。

1.2.2 温度对显色反应的影响 在 3 支试管中分别加入 4 mL 皮革奶和 2 mL 3 mol/L 硫酸, 分别放入 80、90、100 ℃ 温度的水浴中, 记录不同水浴温度下开始显色的时间。

1.2.3 硫酸浓度对显色反应的影响 在 7 支试管中各加入皮革奶 4 mL 和 2 mL 不同浓度硫酸溶液, 另取 1 支试管加入 2 mL 正常奶及 2 mL 蒸馏水, 混匀后再加入 2 mL 3.0 mol/L 的硫酸溶液, 该试管作为空白管。将 8 支试管放置于 100 ℃ 水浴, 记录不同试管显粉红色的时间。

1.2.4 皮革奶显色检出限 在 7 支试管中各加入 2 mL 不同浓度(皮革奶中皮革水解蛋白粉含量分别为 30、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05 mg/mL)的皮革奶和 2 mL 3.0 mol/L 硫酸溶液, 另取 1 支试管加入 2 mL 正常奶与 2 mL 3 mol/L 硫酸, 分别放入 100 ℃ 水浴中, 记录皮革水解蛋白不同浓度皮革奶在 10 min 内显粉红色的程度。

收稿日期: 2013–06–18

作者简介: 许 晔(1980—), 男, 江苏常州人, 博士, 讲师, 研究方向为食品安全。E-mail: cukexu@gmail.com。

2 结果与分析

2.1 温度对显色反应的影响

由表 1 可见,水浴温度越高,显色越明显;水浴温度越高,显色时间越短。100 ℃ 水浴条件下显色时间比 80 ℃ 水浴条件下显色时间短 356 min。

表 1 皮革奶在不同温度下显色出现时间及显色程度

温度(℃)	显色出现时间(s)	显色程度
80	562 ± 10	一般
90	381 ± 8	较明显
100	206 ± 6	很明显

2.2 硫酸浓度对显色反应的影响

由表 2 可知,皮革奶显色所需时间随硫酸浓度提高而缩短,使用 3.0 mol/L 硫酸的显色时间只需要 209 s,仅为使用 0.5 mol/L 硫酸所需时间的 38.63%。

表 2 皮革奶在不同硫酸浓度下显色出现时间

硫酸浓度(mol/L)	显色时间(s)
0	—
0.5	792 ± 3
1.0	541 ± 5
1.5	438 ± 9
2.0	382 ± 7
2.5	267 ± 3
3.0	209 ± 1

2.3 皮革奶显色检出限

由表 3 可见,当皮革奶中皮革水解蛋白粉添加量为 0.25 mg/mL 时,显色开始不明显,此时皮革奶中皮革粉浓度为 0.25 mg/mL。

表 3 皮革奶显色检出限

皮革奶中皮革水解蛋白粉含量(mg/mL)	显色是否明显
7.5	明显
5.0	明显
2.5	明显
1.25	明显
0.25	一般
0.125	不明显
0.025	不明显
0.012 5	不明显

3 讨论

用酸法单独水解制皮革水解蛋白粉及牛奶中添加皮革水解蛋白粉制皮革奶时可以观察到,皮革水解蛋白粉在酸性条件下自身会水解为淡粉红色混合物,而混有皮革水解蛋白粉的乳样加酸后,经过一段时间的高温水浴,会呈现更深的粉红色,而正常奶加酸水浴,则不会呈现粉红色。该显色方法无需对样品进行前处理,试剂简单,操作方便,可以初步判断乳样中是否添加了皮革粉。

由温度对显色的影响试验可以看出,水浴温度越高,显色越明显,显色时间越短,考虑操作的方便与简便,建议水浴温度为 100 ℃。通过酸浓度对显色的影响试验可以看出,硫酸浓度越高,显色越明显,显色所需时间越短,为考虑到安全性及显色时效性,建议硫酸浓度取 2 mol/L。同时试验结果表

明,皮革奶中皮革水解蛋白的最低检出限为 0.25 mg/mL。

当水浴温度为 100 ℃,酸的浓度取 2 mol/L,经过 382 s,皮革奶直接显色,达到快速简便检测的效果。而传统的比色法判断乳样中是否添加了皮革水解蛋白必须先将乳样进行水解使其游离出特征氨基酸 L- 羟脯氨酸,然后进行氧化再与显色剂反应显色,该方法对于定性定量判断乳样是否为皮革奶虽然可靠稳定,但涉及到水解步骤,适于实验室检测,而其他检测皮革水解蛋白的方法如色谱法及其他仪器检测法都涉及昂贵的仪器,对样品的前期及后期处理较为繁琐,且操作要求高,不适于民用,而本研究建立的直接显色法操作简便,对仪器要求很低,所用试剂和仪器为 2 mol/L 的硫酸和试管,适于民用检测。当然,该方法只能对于添加皮革水解蛋白的皮革奶进行检测,若乳样中添加猪皮粉或者动物水解蛋白,那么该方法的灵敏性较差,但考虑到猪皮粉较贵不适于作为动物蛋白添加剂,而动物水解蛋白大多是有盐酸水解中和而来,颜色为棕黄色且其中的氯离子也容易检测不适于作为蛋白添加剂,所以本研究建立的直接显色法有一定的应用价值。

参考文献:

[1]李叶双,陆有飞,李理论. 思考中国动物性食品安全保障[J]. 广西畜牧兽医,2011,27(3):178-179.

[2]赵洋,吴颖,路勇,等. 解析乳及乳制品中添加皮革水解蛋白问题[J]. 食品工业科技,2010,31(8):377-380.

[3]许晔,宋亮,凌靖. 检测方法研究进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):251-254.

[4]刘学琴,徐栓朝,高建龙,等. 生鲜乳中添加皮革水解蛋白的测定方法研究[J]. 乳业科学与技术,2010,33(4):188-192.

[5]金苏英,林笑容,赵志红,等. 高效液相色谱法测定奶粉及其他乳制品中的 L- 羟脯氨酸[J]. 饮料工业,2009,12(7):28-30.

[6]蒋儒林,张金丽. 关于原奶掺假提高脂肪和蛋白质含量的检验方法[J]. 中国乳业,2005,4(3):37-39.

[7]王衍彬,刘东红,叶兴乾,等. 超声乳成分分析仪对牛乳掺水解动物蛋白粉和豚的检测效果研究[J]. 中国食品学报,2005,5(2):98-102.

[8]乌尼尔,胡桂林,高娃,等. 石墨炉原子吸收法测定乳和乳制品中的铬[J]. 中国乳品工业,2009,37(6):51-53.

[9]GB/T 9695.23—2008 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定[S]. 北京:中国标准出版社,2008:1-5.

[10]邹晓莉,黎源倩,曾红燕,等. 反相高效液相色谱法测定人肌腱中的胶原蛋白[J]. 色谱,2006,24(3):263-266.

[11]丁永胜,牟世芬. 氨基酸直接分析法原理及应用[J]. 现代仪器,2002,38(1):11-14.

[12]夏金根,陈波,姚守拙. 高效液相色谱-质谱联用测定胶原蛋白中的羟脯氨酸[J]. 色谱,2008,26(5):595-598.

[13]赵燕燕,刘丽艳,杜光玲,等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定奶制品中动物水解蛋白[J]. 食品科学,2010,31(20):282-285.

[14]刘智广,马海燕. 胶原特异性氨基酸快速测定方法的研究及应用[J]. 氨基酸杂志,1994(3):8-12.

[15]陈智慧,史梅,王秋香,等. 用凯氏定氮法测定食品中的蛋白含量[J]. 新疆畜牧业,2008(5):22-24.

[16]郭颖娜,孙卫. 蛋白质含量测定方法的比较[J]. 河北化工,2008,31(4):36-37.