

杜马斯燃烧法快速测定粮油中粗蛋白质含量研究

汪红^{1,2,3}, 魏亮亮¹, 李通^{1,2}, 王铁良^{1,2}, 许超¹, 刘冰杰¹, 郭洁^{1,2}

(1. 河南省农业科学院 农业质量标准与检测技术研究所, 河南 郑州 450002;

2. 农业部农产品质量安全风险评估实验室, 河南 郑州 450002;

3. 河南省粮食质量安全与检测重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要:为了提高粮油中粗蛋白质含量的测定效率,减少试剂使用对生态环境的污染。以小麦、玉米、芝麻、花生4种粮油作物为样品,通过优化进样量、氧气通量、氧气因子等检测条件,确定了杜马斯燃烧法测定粮油种子的最佳实验条件:燃烧管温度990℃,还原管温度650℃,进样量100~180 mg,氧气通量300 mL/min,氧气因子1.3~1.6 mL/mg。回收实验表明,当添加EDTA 80 mg时,小麦、玉米、芝麻和花生的添加回收率分别为99.21%、100.54%、99.49%和99.10%。与凯氏定氮法比对,两者结果没有显著性差异。添加实验和对比实验证明优化后的杜马斯燃烧法准确可靠,完全可以替代凯氏定氮法作为粮油作物粗蛋白质的检测手段。

关键词:粮油种子;粗蛋白质含量;杜马斯燃烧法;凯氏定氮法

中图分类号:TS 210.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2018)02-0049-05

Determination of crude protein content in grain and oil seeds by dumas combustion method

WANG Hong^{1,2,3}, WEI Liang-liang¹, LI Tong^{1,2}, WANG Tie-liang^{1,2}, XU Chao¹,
LIU Bing-jie¹, GUO Jie^{1,2}

(1. Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou Henan 450002; 2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-Products, Ministry of Agriculture, Zhengzhou Henan 450002; 3. Key Laboratory of Cereal Quality Safety and Testing of Henan Province, Zhengzhou Henan 450002)

Abstract: To improve the efficiency of the determination of the crude protein in grain and oil seeds, and reduce pollution of the ecological environment caused by reagent consumption, taking wheat, corn, sesame, and peanut as samples, the optimal condition by Dumas combustion method was determined after optimizing the testing parameters, such as sample volume, oxygen flux and oxygen factor. The optimal testing condition was: the temperature of combustion tube 990℃, the temperature of reduction tube 650℃, sample volume 100~180 mg, oxygen flux 300 mL/min and oxygen factor 1.3~1.6 mL/mg. The recovery experiment showed that when EDTA was 80 mg, the recovery ratios of the four samples were 99.21%, 100.54%, 99.49% and 99.10% respectively. Compared with Kjeldahl determination, there was no significant difference between the results of the two methods. Dumas combustion method is accurate and reliable attested by both addition test and contrast test, which can replace Kjeldahl determination for the determination of crude protein content in grain and oil seeds.

Key words: grain and oil seeds; crude protein content; Dumas combustion method; Kjeldahl

我国人口众多,对粮油的需求量很大,粮油质

量直接影响到人们的身体健康,与我国社会经济发展息息相关,不容忽视^[1]。目前我国粮油市场已形成多元化格局,竞争日趋激烈,粮油食品以次充好、以假乱真的现象时有发生。这就对粮油质量检验

收稿日期:2017-08-08

基金项目:国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP2016001)

作者简介:汪红,1963年出生,女,研究员。

通讯作者:郭洁,1982年出生,女,博士。

工作提出了更高的要求^[2]。蛋白质是构成人体组织器官的支架和主要物质,在人体生命活动中起着重要作用^[3]。作为人们蛋白质的主要食物来源,蛋白质含量就成为粮油质量标准中的重要指标,是粮油质量检验工作中的重要内容。蛋白质含量的检测方法主要包括凯氏定氮法和杜马斯燃烧法^[4]。在国内,凯氏定氮法因其良好的精密度、重复性和较低的设备成本成为测定粮油作物中蛋白质含量的主要方法。但凯氏定氮法包括了消化、蒸馏、吸收和滴定多个环节,测定过程需要用到浓硫酸、硫酸铜、氢氧化钠等多种试剂,步骤多,耗时长,需要较多冷却水并产生大量废液,对操作人员要求较高,且对人体和生态环境危害较大^[5-7]。相比之下,杜马斯燃烧法称取样品后可直接进样检测,无需冗杂的前处理过程及各种试剂,整个检测过程仅需要3~5 min即可完成,而且不会产生对人和环境有害的废液及废气,同时杜马斯燃烧定氮仪在测试过程中不需要冷却水,减少了大量水资源的浪费。虽然存在设备和检测成本较高的问题,但在大批样品的检测中,杜马斯燃烧法可以大大缩短检测时间,降低工作强度,显示出巨大优势。因此,研究优化杜马斯燃烧法的测定条件,促进其推广使用是目前研究热点之一。杜马斯燃烧法测定牛奶中蛋白质含量的最佳条件为燃烧管960℃,二级燃烧管800℃,还原管815℃,进样量100 mg,通氧量80 mL/min,通氧时间80 s^[8]。郭望山等^[9]对比了杜马斯燃烧法和凯氏定氮法测定饲料中的含氮量,发现杜马斯燃烧法测定反刍动物饲料含氮量结果与凯氏法高度相关,测定青储饲料时结果高于凯氏法。虽然研究工作较多,但目前的研究范围仍然不能满足科研和检测工作的需要,尤其是粮油作物中的粗蛋白测定,目前大量的科研检测工作中仍然会选择凯氏定氮法^[10-11],主要原因还是杜马斯应用于粮油作物的测定条件研究不够,无法满足科研及检验工作中对数据准确性和稳定性方面的要求。在本研究中,选择小麦、玉米、芝麻、花生4种主要粮油作物为研究对象,用杜马斯燃烧法测定其蛋白质含量,对测试条件进行优化,最终将测定结果与凯氏定氮法进行

比对,以促进杜马斯燃烧法在测定粮油作物粗蛋白含量的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小麦、玉米、芝麻、花生:由河南省农业科学院经济作物研究所提供。EDTA(乙二胺四乙酸,氮含量 $9.59\% \pm 0.05\%$):德国 Gerhardt 公司;全麦粉标准物质(GBW 100126,粗蛋白质含量 $15.8\% \pm 0.3\%$):国家粮食局科学研究院;硫酸(UPS级,浓度98%):苏州晶瑞化学有限公司;氢氧化钠(优级纯):北京化学试剂厂;混合催化剂(每片含3.5 g K_2SO_4 及0.4 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$):丹麦 FOSS 公司;甲基红指示剂(分析纯):国药集团化学试剂有限公司;溴甲酚绿指示剂(分析纯):上海化学试剂厂;氮气($\geq 99.99\%$)、氧气($\geq 99.999\%$)、氩气($\geq 99.999\%$):北京普莱克斯实用气体有限公司。

DT-Dumatherm 燃烧定氮仪:德国 Gerhardt 公司;2300 全自动凯氏定氮仪:丹麦 FOSS 公司;Mettler-Toledo 万分之一电子天平:瑞士 Mettler Toledo 公司;1093 Cyclitec 旋风磨:丹麦 FOSS 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 杜马斯燃烧法

称取一定量样品于无氮锡箔纸中,挤出空气,置于自动进样器中。样品在氧化管中充分燃烧,生成的气体经过高温铜粉还原、多孔陶瓷吸附及干燥除水后,通过 TCD 检测器检测,由标准曲线计算、定量。反应条件为:燃烧管温度为990℃,还原管温度为650℃。以全麦标准物质为研究对象研究最佳进样量,最佳氧气流量,以及最佳氧气因子的范围,以选择最佳实验条件。称取 EDTA 约10.0、20.0、40.0、80.0、120.0、160.0、180.0 mg 上机检测,绘制标准曲线。粗蛋白质含量/% = 总氮百分含量 × 蛋白质因子^[12]。

进样量条件优化。称取不同质量的全麦粉标准物质在相同条件下(氧气流量为300 mL/min,氧气因子为1.4 mL/mg)进行测定,以进样量为横坐标,相应的变异系数为纵坐标作图。

燃烧条件优化。将全麦粉标准物质进样量固

定在 140 mg,在不同的氧气流量和氧气因子条件下进行测定,每个样品平行测定 4 次。以氧气流量与氧气因子的组合为横坐标,变异系数为纵坐标作图。

回收率实验。称取小麦、玉米、芝麻和花生各 100.0 mg,每个样品平行测定 5 次,取平均值作为本底值。再分别向 4 种样品中准确添加 80.0 mg EDTA 标准物质,每个样品平行测定 5 次,取平均值计算回收率。

1.2.2 凯氏定氮法

根据预估含氮量称取一定量的样品(0.2 ~ 2 g,使试样含氮量处在 0.02 ~ 0.2 g 之间)置于消化管内,加入 1 片混合催化剂和 12 mL 浓硫酸,在 420 ℃ 下消化 1 ~ 1.5 h,直至消化液澄清透亮。待消化液冷却至室温后,在消化管内加入 30 mL 蒸馏水,用凯氏定氮仪自动蒸馏滴定,仪器根据消耗的硫酸标准溶液体积自动计算样品的含氮量,乘以蛋白质因子即为蛋白质含量^[13]。

1.2.3 杜马斯燃烧法和凯氏法的对比实验

采用优化后的条件,用杜马斯燃烧法和凯氏定氮法分别测定小麦、玉米、芝麻、花生 4 种作物共 40 个样品中粗蛋白质的含量,每个样品平行测定 3 次,并对测定结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 杜马斯条件选择

2.1.1 进样量选择

从表 1 和图 1 中均可看出,进样量对结果有较大影响。当进样量 ≤ 70 mg 时,结果变异系数 > 0.9 ,测定值略微偏低;当进样量 ≥ 230 mg 时,变异系数 > 2.5 ,测定值严重偏高,进样量在 100 ~ 180 mg 之间时,测定结果的变异系数较小并且比较稳定。原因可能是进样量较小时,样品不具代表性,仪器的误差对结果的影响较大。理论上讲,进样量过大时,样品燃烧不充分,此时测定结果应该相应偏低,但实际上发现,由于样品燃烧不充分产生的一氧化碳和氮气的热导系数非常接近,燃烧过程中产生的一氧化碳也会被当做氮气计入结果,从而结果偏高。这一结论从峰型图中可以得到佐证,图 2 所示为正常样品量的峰型图,图 3 为样品量过大

的峰型图,对比发现,图 2 峰形拖尾严重,从而造成积分面积过大,自然导致结果偏高。因此粮油作物检测时,进样量范围控制在 100 ~ 180 mg 之间最为合适。

表 1 试样质量对全麦粉粗蛋白质测定结果的影响

试样质量/mg	粗蛋白质含量/%	变异系数($n=4$)/%
40.0	15.59	1.4
70.0	15.76	0.93
100	15.84	0.51
140	15.93	0.32
180	15.86	0.47
230	16.79	2.5
270	21.36	9.8

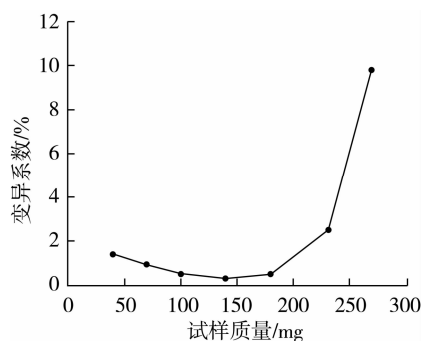


图 1 试样质量与变异系数的关系

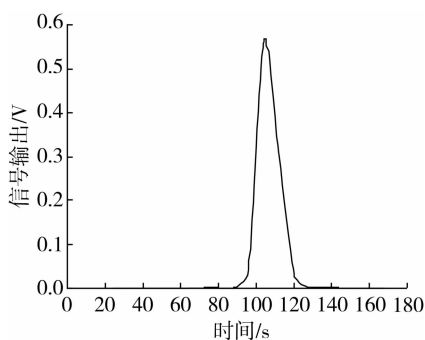


图 2 正常峰形图

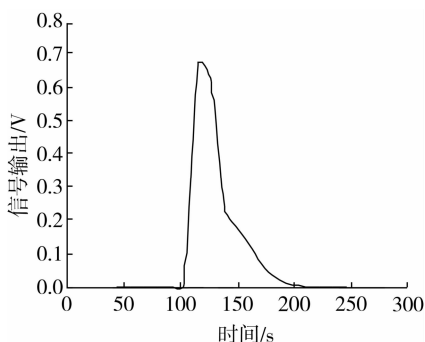


图 3 拖尾峰形图

2.1.2 燃烧条件选择

从表 2 可知,进样量相同时,不同的氧气流量和氧气因子对结果有很大影响。氧气流量为 200 mL/min 时,所测粗蛋白含量与标准物质标称值相比严重偏高,且变异系数 $CV \geq 4.3$,这可能是由于进氧速度过慢,导致样品不能充分燃烧,使得检测结果偏高;氧气流量为 400 mL/min 时,所测结果与标准物质标称值相比偏高,且变异系数 $CV \geq 1.1$,这是由于进氧速度过快,燃烧过程短,造成不能完全燃烧,而且没有参与燃烧过程的过剩氧气会过快地消耗还原铜粉,因此也造成结果偏高;氧气流量选用 300 mL/min,所测粗蛋白含量在标准物质标称值范围内,且变异系数最小,其中,氧气因子为 1.0 mL/mg 时,所测结果为 16.08%,接近标称值上限 16.1%。这是由于氧气因子过小造成的氧气量略微不足。从图 4 中同样可以看出,氧气流量与氧气因子组合数为 4 ~ 6 时,所对应的变异系数最小。从以上分析可以明显发现,对于测定结果影响最大的条件是氧气流量选择,一旦氧气流量选择出现偏差,无论选择何种氧气因子,均不能得到令人满意的结果,同时氧气因子对结果也有一定的影响,如果偏差太大也会

表 2 氧气流量和氧气因子对全麦粉粗蛋白质测定结果的影响

组合	氧气流量 /(mL/min)	氧气因子 /(mL/mg)	粗蛋白质含量 /%	变异系数 (n=4)/%
1	400	1.0	15.98	1.3
2	400	1.3	16.26	1.1
3	400	1.6	17.29	2.7
4	300	1.0	16.08	0.68
5	300	1.3	15.81	0.27
6	300	1.6	15.90	0.38
7	200	1.0	21.16	11.4
8	200	1.3	19.56	8.6
9	200	1.6	17.13	4.3

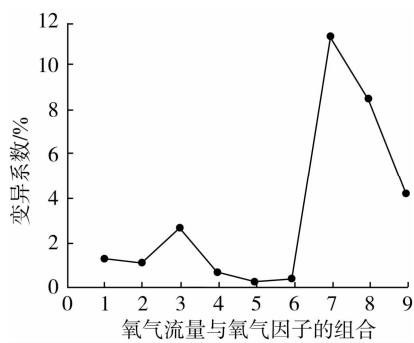


图 4 氧气流量与氧气因子与变异系数的关系

造成结果的不准确。根据测定值的范围和测定结果的变异系数,检测粮油作物时的氧气流量选用 300 mL/min、氧气因子选用 1.3 ~ 1.6 mL/mg 为最佳测试条件。

2.1.3 杜马斯添加回收实验

从表 3 可以看出,4 种本底样品含氮量存在高低梯度,添加定量的 EDTA 相当于 200% ~ 600% 的本底值,测定回收率在 99.10% ~ 100.54%,均较为满意^[14]。

表 3 杜马斯燃烧法的加标回收率 (n=5)

样品	本底质量 /mg	氮含量 /mg	EDTA 加入量 /mg	加标后 样品氮含量 /mg	回收率 /%
小麦	100.0	2.370	80.0	9.981	99.21
玉米	100.0	1.623	80.0	9.336	100.54
芝麻	100.0	3.671	80.0	11.304	99.49
花生	100.0	4.590	80.0	12.193	99.10

2.2 杜马斯与凯氏定氮结果比较

从表 4 可以看出,杜马斯燃烧法与凯氏定氮法测定值的差值(D-K)范围为 -0.27% ~ 0.67%,测定值的比值(D/K)范围为 0.972 ~ 1.057,杜马斯燃烧法的测定值整体上略高于凯氏定氮法,这可能是由于粮油样品含有少量的硝态氮和方法的差异性所致^[15],但整体两种结果值差别不大。统计分析表明,小麦、玉米、芝麻、花生 4 种作物的杜马斯燃烧法测定结果和凯氏定氮法的测定结果之间无显著性差异(P 值分别为 0.76、0.83、0.91、0.85)。

表 4 杜马斯燃烧法和凯氏定氮法测定油料作物的粗蛋白质含量比较 (n=3)

样品	杜马斯燃烧法 测定结果 /% (D)	凯氏定氮法 测定结果 /% (K)	D-K /%	D/K	P 值 (t 检验)
小麦	10.37	10.27	0.10	1.010	0.76
	13.51	13.34	0.17	1.013	
	12.13	11.87	0.26	1.022	
	10.55	10.47	0.08	1.008	
	11.96	11.77	0.19	1.016	
	13.15	12.90	0.25	1.019	
	9.78	9.91	-0.13	0.987	
	11.99	11.97	0.02	1.002	
	12.84	12.80	0.04	1.003	
	12.41	11.74	0.67	1.057	

续表4

样品	杜马斯燃烧法 测定结果 /% (D)	凯氏定氮法 测定结果 /% (K)	D - K /%	D/K	P 值 (t 检验)
玉米	11.30	11.17	0.13	1.012	0.83
	8.66	8.70	-0.04	0.995	
	9.11	9.03	0.08	1.009	
	10.14	10.34	-0.20	0.981	
	9.50	9.20	0.30	1.033	
	9.85	9.66	0.19	1.020	
	9.45	9.72	-0.27	0.972	
	9.87	9.80	0.07	1.007	
	10.83	10.49	0.34	1.032	
	10.80	10.61	0.19	1.018	
芝麻	17.61	17.34	0.27	1.016	0.91
	19.51	19.46	0.05	1.003	
	21.54	21.79	-0.25	0.989	
	22.83	22.56	0.27	1.012	
	19.46	19.30	0.16	1.008	
	22.47	21.91	0.56	1.026	
	22.94	22.76	0.18	1.008	
	21.63	21.88	-0.25	0.989	
	23.20	22.95	0.25	1.011	
	23.70	23.89	-0.19	0.992	
花生	24.99	24.81	0.18	1.007	0.85
	25.00	24.61	0.39	1.016	
	28.57	28.53	0.04	1.001	
	27.43	27.57	-0.14	0.995	
	26.93	26.64	0.29	1.011	
	23.12	23.38	-0.26	0.989	
	25.87	25.33	0.54	1.021	
	24.43	24.29	0.14	1.006	
	22.63	22.44	0.19	1.008	
	23.45	23.12	0.33	1.014	

根据表4的结果,对杜马斯燃烧法和凯氏定氮法的测定结果做相关性分析,以杜马斯燃烧法的测定值为横坐标,凯氏定氮法的测定值为纵坐标,做相关性方程,结果见图5。从图5可以看出,2种方法的

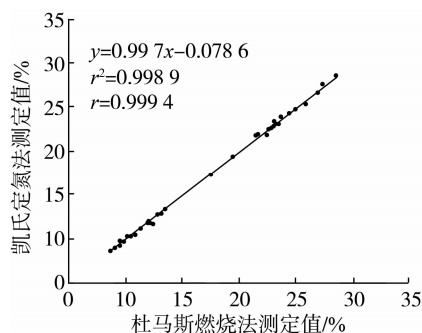


图5 杜马斯燃烧法和凯氏法测定粗蛋白质的相关性

测定值间呈线性相关,线性方程为 $Y = 0.997X - 0.0786$, 相关系数 r 为 0.9994, 表明这2种方法的测定结果显著相关。同时,计算了2种方法检测每个样品是平均耗时,包括前处理步骤在内,杜马斯燃烧法测定每个样品平均耗时不超过15 min,而凯氏定氮法平均耗时4 h以上。

3 结论

杜马斯燃烧法测定粮油中粗蛋白含量的最佳测定条件为:进样量100~180 mg,氧气流量300 mL/min,氧气因子1.3~1.6 mL/mg;添加回收率在99.10%~100.54%之间;杜马斯燃烧法测定小麦、玉米、大豆和芝麻中粗蛋白含量结果与凯氏定氮法的测定结果没有显著差异;杜马斯燃烧法操作简便、检测快速、试剂用量少,可以替代凯氏定氮法作为粮油中粗蛋白质含量的快速测定方法。

参考文献:

- [1] 林家永. 我国粮油检测方法标准体系的发展现状与对策[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(3): 225-228.
- [2] 李洪远, 陈义飞, 王代强. 基层粮油检验工作存粮油检验工作的重要性及有关问题[J]. 养殖技术顾问, 2011(9): 258.
- [3] 刘志皋. 食品营养学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991.
- [4] 孙蓉, 吴文标. 食品中蛋白质检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 393-398.
- [5] 路苹. 蛋白质测定方法评价[J]. 北京农学院学报, 2006(21): 65-69.
- [6] 王钦权, 翁佳妍, 黄诚. 凯氏定氮法和杜马斯燃烧法测定食品中蛋白质含量的比较研究[J]. 轻工科技, 2014(3): 13-14.
- [7] 田培, 马飞, 李培武, 等. 杜马斯燃烧法测定油料粗蛋白含量[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(6): 650-654.
- [8] 徐丽, 翟丽娜, 刘亚楠, 等. 杜马斯燃烧法测定牛奶中的蛋白质含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12): 3903-3905.
- [9] 郭望山, 孟庆翔. 杜马斯燃烧法与凯氏法测定饲料含氮量的比较研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(5): 464-468.
- [10] 吴建宝, 宁程茜, 胡传荣, 等. 水酶法从冷榨油茶籽饼中提取油和蛋白的工艺研究[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(6): 34-39.
- [11] 尹亚军, 张翔宇, 廖卢艳, 等. 超声波辅助酶法提取米渣中蛋白质工艺的优化[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(4): 6-9.
- [12] GB 5009.5—2010, 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S].
- [13] GB/T 5511—2008, 谷物和豆类 氮含量测定和粗蛋白质含量计算 凯氏法[S].
- [14] GB/T 27404—2008, 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
- [15] 吴广, 刘荣, 丁维岱, 等. SPSS 统计分析与应用[M]. 北京: 电子工业出版社, 2014.