

酱油中氨基酸态氮的比色法测定可行性验证

胡明友

中图分类号: O656.3 文献标识码: B 文章编号: 1007-0931 (2005) 07-0081-02

酱油中氨基酸态氮的测定通常采用甲醛值法即酸度计滴定法, 新的标准 GB/T 5009 - 2003 中增加了比色法。大批量样品采用比色法较为方便、快速。本文通过多种酱油的测定, 对比色法中酱油颜色干扰等进行了探讨, 同时用甲醛值法比较, 经统计学处理, 二者无显著差异, 结果令人满意。

材料与方法

1 原理 在 PH 4.8 的乙酸钠—乙酸缓冲液中, 氨基酸态氮与乙酰丙酮和甲醛反应生成黄色的 3, 5—二乙酰—2, 6—二甲基—4, 二氢吡啶氨基酸衍生物。在波长 400nm 处测定吸光度, 与标准比较定量。

2 试剂 乙酸溶液 (1mol/L); 乙酸钠溶液 (1mol/L): 乙酸钠—乙酸缓冲液: 量取 60ml 乙酸钠溶液 (1mol/L) 与 40ml 乙酸溶液 (1mol/L) 混合, 该溶液 PH 4.8; 显色剂: 15ml 37% 甲醛与 7.8ml 乙酰丙酮混合, 加水稀释至 100ml, 剧烈振荡混匀。(室温下可放置稳定三日); 氮氮标准储备溶液 (1.0mg/ml): 精密称取 105 干燥 2h 的硫酸铵 0.4720g, 加水溶解后移入 100ml 容量瓶中, 并稀释至刻度, 混匀, 此溶液含 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 1.0mg/ml (10 下冰箱稳定 1 年以上); 氮氮标准使用溶液 (100 μg /mL): 用移液管精密移取 10ml 氮氮标准储备溶液 (1.0mg/ml) 于 100ml 容量瓶内, 加水至刻度, 混匀, 此溶液含氮氮 100 μg /ml。

3 检测方法

3.1 标准工作曲线 精密吸取氮氮标准使用溶液 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0ml。(相当于 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0 μg) 分别于 10ml 比色管中。各加入 4ml 乙酸钠—乙酸缓冲液及 4ml 显色剂。置于 10 水浴中加热 15min, 取出, 冷却至室温后, 移入 1cm 比色皿内, 以零管为参比, 于波长 400nm 处测量吸光度, 绘制标准工作曲线。

3.2 试样测定 精密移取 1.0ml 试样于 50ml 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。精密移取 1.0ml 试样稀释溶液于 10ml 比色管中, 以下按标准工作曲线中“向各比色管中加入 4ml 乙酸钠—乙酸缓冲液及 4ml 显色剂。

3.3 结果计算 氨基酸态氮, g/100ml。

$$= \frac{C \times 50 \times 100}{V_1 \times V_2 \times 1000 \times 1000}$$

C: 试样中氮的质量, μg V_1 : 试样体积, ml V_2 : 试样稀释液体积, ml

结果与讨论

1 标准曲线 依法测定标准曲线吸光度, 结果见表 1。

表 1 标准曲线

μg	0	5.0	10.0	20.0	40.0	60.0	80.0	100.0
A	0.000	0.060	0.102	0.224	0.440	0.660	0.835	1.100
直线回归	$r = 0.9993$			$a = 0.00196$		$b = 0.0108$		

2 酱油颜色干扰消除的探讨

2.1 活性炭脱色处理 多数酱油含有颜色, 本试验开始采用活性炭脱色, 即在取样 1.0ml, 作 50ml 稀释后的溶液中, 加入不同量的活性炭 (0.1g, 0.3g, 0.5g), 11 种酱油的结果及与甲醛值法结果比较见表 2:

表 2 活性炭脱色后氨基酸态氮含量 (g/100ml)

编号	活性炭脱色法			
	0.1g	0.3g	0.5g	
1	0.30	0.27	0.27	0.41
2	0.36	0.34	0.33	0.46
3	0.29	0.29	0.28	0.43
4	0.30	0.29	0.28	0.42
5	0.46	0.45	0.41	0.54
6	0.43	0.40	0.36	0.48
7	0.36	0.34	0.32	0.46
8	0.34	0.32	0.31	0.41
9	0.35	0.34	0.32	0.45
10	0.34	0.32	0.32	0.47
11	0.46	0.40	0.42	0.56

2.2 不脱色处理 通过以上分析发现加活性炭虽然脱去了酱油的颜色, 但氨基酸态氮下降, 且减少量与加入量成正比。可见加活性炭脱色不合适, 本实验继而采用不脱色,

作者单位: 湖州市疾病预防控制中心, 浙江 湖州 313000

直接扣除酱油空白（取样 1.0ml，作 50ml 稀释后的溶液，加缓冲液后，不加显色剂，以后同法处理），结果见表 3，显示直接取 50 倍稀释样液所测得的吸光度扣除此稀释液本底吸光度后，所得结果与甲醛值法（酸度计滴定法）无显著差异（经 t^2 分析， $P < 0.05$ ）

表 3 不脱色的结果

样品	A ₀	A	A = A - A ₀	氨基酸态氮， (g/100ml)	氨基酸态氮， (甲醛值法) (g/100ml)
1	0.065	0.975	0.910	0.42	0.41
2	0.118	0.607	0.489	0.45	0.46
3	0.154	1.064	0.910	0.42	0.43
4	0.190	0.631	0.441	0.41	0.42
5	0.073	0.678	0.605	0.56	0.54
6	0.086	0.628	0.542	0.50	0.48
7	0.123	1.076	0.953	0.44	0.46
8	0.153	1.019	0.866	0.40	0.41
9	0.084	0.562	0.478	0.44	0.45
10	0.159	1.147	0.888	0.46	0.47
11	0.107	0.687	0.580	0.54	0.56

*样品 2、4、5、6、9、11 因超出线性范围取 50 倍样品稀释液 0.50ml 测定。

3 加标回收 对 1~4 号样品作加标回收（因超出线性范围，取 50 倍样品稀释液 0.50ml 测定，结果见表 4。

表 4 回收率试验

样品	测定值(μg)	加标量(μg)	加标样测得值	回收率 (%)
1	42.0	40	81.8	99.5
2	45.0	30	75.8	102.7
3	42.0	50	91.4	98.8
4	40.9	40	82.0	102.8

4 精密度试验 对 1~4 号样品作精密度实验（取 50 倍样品稀释液 1.0ml n=6），结果见表 5。

表 5 精密度试验

样品	测定值 (μg)	X (μg)	S	RSD (%)
1	83.8、84.0、84.2、83.6、84.1、84.3	84.0	0.26	0.31
2	89.6、90.1、90.3、89.7、90.0、90.3	90.0	0.30	0.33
3	83.7、83.9、84.4、83.8、84.0、84.2	84.0	0.26	0.31
4	81.2、81.4、82.8、81.1、81.6、82.7	81.8	0.64	0.78

国家标准方法未提及酱油脱色处理，本文经实验发现：样品经活性炭脱色处理，不适合比色法而采用直接取 50 倍稀释样液所测得的吸光度，扣除此稀释液本底吸光度后，所得的结果与甲醛值法（酸度计滴定法）无显著差异。样品经 50 倍稀释后，取 1.0ml，国家标准方法取 2.0ml，超出标准线性范围测定，满足食品卫生标准关于氨基酸态氮的要求（>0.40g/100ml），较高或酱色较深者取 0.50ml 测定。比色法与甲醛值法相比，可同时快速测定大批样品，且准确度和精密度较高，符合分析要求。

(收稿日期：2004-08-09)

(上接第 80 页)

问题。随着国家生物制品检定所更新抗 HCV 血清盘，HCV 试剂的灵敏度不断提高，使得 HCV 假阳性反应可能性不断增加，特别是在 HCV 低流行的人群中，假阳性反应更加明显。近年来由于无偿献血和反复多次献血的人群不断增加，献血人员 HCV 的流行感染率已相当低，因此在实际检测工作中应关注 HCV 检测假阳性的问题。本次所收集的样本是从无偿献血中筛查出的特定样本，每种试剂均存在较高的假阳性率，试剂 A、B、D 无明显的区别，而试剂 C、E 假阳性率更高，因此选择试剂时应综合考虑。

HCV 假阳性是指检测出的阳性样本并不一定是“真阳性”，常需要进行确认，国外一般采用免疫重组印迹（RIBA）的方法进行抗体确认，由于抗体确认实验的价格昂贵，国内很少采用其进行 HCV 确认，因此在无偿献血人群中检测抗 HCV 出现的阳性反应结果应综合考虑，不宜作为诊断的依据。美国采用强生傲拓试剂检测 S/CO 3.8 作为

实验室判断的依据，本次实验中的 21 例强生傲拓 S/CO 3.8 的样本，HCV RNA 均为阳性，也表明其比值可能在实验诊断中具有一定的作用；但是有关国产试剂的比值诊断价值尚待进一步研究。

参考文献

[1] 于洋，祁自柏，周诚，等. 国产抗 HCV EIA 试剂漏检原因分析 [J]. 中国药事，2003，17（5）：300~302.
[2] 雷晓秋. 国产 ELISA 抗-HCV 试剂的应用评价 [J]. 临床输血与检验，2003，5（3）：189~191.
[3] 穆士杰，张献清，孙文利，等. 三种抗-HCV 检测试剂盒对无偿献血者筛检价值评价 [J]. 第四军医大学学报，2004，25（12）：1123~1125.
[4] 胡继征，余妙嫦. 9 种抗-HCV ELISA 试剂质量比较 [J]. 中国输血杂志，2003，16（4）：262~263.

(收稿日期：2004-12-16)