

# 牛奶尿素氮含量不同测定方法比较研究

王东卫<sup>1,2</sup>, 曹志军<sup>1</sup>, 王之盛<sup>2</sup>, 黄文明<sup>1</sup>, 李胜利<sup>1</sup>, 王瑜<sup>3</sup>, 温万<sup>3</sup>, 邵怀峰<sup>3</sup>

(1. 中国农业大学动物科学技术学院, 北京 100193; 2. 四川农业大学动物营养研究所, 雅安 625014;  
3. 宁夏回族自治区畜牧工作站, 银川 750004)

中图分类号: TS252.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4264(2010)09-0055-03

**摘要:** 本研究的目的是比较不同测定方法对牛奶尿素氮含量的影响。分别采用红外法(Foss 4000)、二乙酰-胍法及不同去蛋白处理的尿素氮试剂盒法测定奶样中尿素氮含量(n=50)。结果表明, 红外法、二乙酰-胍法、尿素氮试剂盒水溶法的测定结果之间差异不显著(P>0.05)。试剂盒法中, 三氯乙酸水溶液测定的牛奶尿素氮值显著高于乙醚溶解法的测定结果值(P<0.01)。因此, 实验室中可以采用二乙酰-胍法和尿素氮试剂盒水溶法测定牛奶尿素氮含量。

**关键词:** 牛奶尿素氮; 红外法; 二乙酰-胍法; 尿素氮试剂盒法

牛奶尿素氮(MUN)不仅可以监测奶牛日粮能氮平衡、蛋白需要量和氮利用率, 还可以作为提高奶牛繁殖性能的指标, 加快奶牛育种进展<sup>[1]</sup>。不同的MUN测定方法可能对结果有较大影响。目前MUN的测定方法主要有红外法、酶法和化学法。酶法的测定原理是采用酶处理奶样后产生氨, 通过测定氨的变化来计算MUN值, 操作步骤繁琐, 不利于快速分析; 红外法利用红外光谱分析尿素在某一区域出现官能团的特征吸收峰测定MUN, 操作简单, 但使用的仪器价格较高, 广泛推广有一定的难度, 该方法的准确性和精确性有待于进一步研究; 化学法则通过加入特定化学试剂(如二乙酰-胍法)与尿素反应生成有色物质, 一定范围内有色物质的色泽深浅与尿素浓度呈正比, 通过比色法测定。

由于奶样中脂肪和蛋白质会影响尿素氮试剂盒法测定MUN的准确性, 一般采用三氯乙酸溶液沉淀蛋白质。配制三氯乙酸溶液时, 既可以采用蒸馏水溶解, 也可以采用乙醚溶解, 这两种不同去蛋白处理方法对测定结果是否有差异尚不清楚。本研究应用红外法(FOSS 4000)、二乙酰-胍法和不同去蛋白处理的尿素氮试剂盒法测定MUN含量, 比较不同方法测定结果的差异。

## 1 样本来源和处理方法

在宁夏某牛场用流量计按早、中、晚4:3:3的比例共取样50份(每份80mL), 加入0.06%的重铬酸钾2滴,

再将每份原料奶分成2等份。一份送上海光明检测中心采用红外法测定; 另一份带回本实验室同时采用尿素氮试剂盒法和二乙酰-胍法测定。

## 2 测定方法

### 2.1 红外分析法

上海光明检测中心(FOSS 4000, 丹麦福斯公司)进行测定。

### 2.2 尿素氮试剂盒水溶法

#### 2.2.1 试剂与仪器

25%三氯乙酸水溶液(25g三氯乙酸溶于100mL蒸馏水), 尿素氮试剂盒(南京建成生物技术公司), 紫外可见分光光度计(752S), 离心机(LD5-2A), 移液管(5mL), 移液枪(50 $\mu$ L), 三用恒温水浴锅(DK-600S)。

#### 2.2.2 测定步骤

取3mL奶样加入等体积的三氯乙酸水溶液(25%), 静置5min后于5 000 $\times$ g离心15min去蛋白。吸取离心沉淀后的上清液, 按照表1所示加样。

加入物	空白管	标准管	测定管	单位: mL
蒸馏水	0.05	-	-	
尿素氮标准液	-	0.05	-	
样本	-	-	0.05	
胍溶液	2.5	2.5	2.5	
酸溶液	2.5	2.5	2.5	

混合均匀后置沸水浴中水浴15min, 立即用自来水冷却, 测定OD值, 波长为525nm。

MUN的浓度按照以下公式计算:

$$\text{样本尿素氮浓度(mg/dL)} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准管尿素氮浓度(mg/dL)}$$

收稿日期: 2010-04-14

基金项目: 公益性行业(奶业)科研专项经费(nyhyzx07-036)和中国农业大学-南京农业大学青年教师开放基金(CN2007008)。

作者简介: 王东卫(1985-), 男, 河南巩义人, 主要从事反刍动物营养与饲料的研究。

通讯作者: 曹志军, 王之盛。

标准液浓度为 28mg/dL。

### 2.3 尿素氮试剂盒醚溶法

25%三氯乙酸乙醚溶液(25g 三氯乙酸溶于 100mL 乙醚),其他测定步骤均同方法 2.2。

### 2.4 二乙酰-胍法

#### 2.4.1 试剂

试剂 I:在三角瓶中加入蒸馏水约 200mL,然后加入浓硫酸 300mL 及 85%的浓磷酸 100mL,冷却至室温,再加入 FeCl<sub>3</sub> 0.1g,加蒸馏水至 1L,置于棕色瓶中,放入冰箱储藏室。

试剂 II:称取二乙酰-胍 5.0g 及硫胺脲 1.0g,溶于 1L 蒸馏水中。尿素氮标准液 20mg/dL(南京建成生物有限公司生产)。

试剂 III:25%的三氯乙酸水溶液。

#### 2.4.2 仪器

紫外可见分光光度计(752S),离心机(LD5-2A),移液管(5mL),移液枪(50μL),三用恒温水浴锅(DK-600S)。

#### 2.4.3 测定步骤

分别取 3mL 奶样加入等体积的三氯乙酸水溶液,静置 5min 后于 5 000×g 离心 15min,去蛋白。用 50μL 的移液枪吸取离心沉淀后的上清液待测。将试剂 I 和试剂 II 按照 2:1 的比例均匀混合,作为显色剂。样本和试剂的添加量见表 2。

表 2 样品和试剂的添加量情况

加入物	测定管		标准管		单位:mL
	测定管	标准管	空白管	空白管	
混合试剂	5	5	5		
样本	0.01	-	-		
尿素氮标准液	-	0.01	-		
蒸馏水	-	-	0.01		

混合均匀后置沸水浴中水浴 15min,立即用自来水冷却,测定 OD 值,波长为 525nm。MUN 含量的测定参照方法 2.2。

## 3 数据处理

试验数据经 Excel 2007 处理后用 SPSS 13.0 做配对统计分析,结果表示为平均数±标准差。

## 4 结果

### 4.1 不同测定方法的比较

表 3 不同测定方法的比较

测定方法	平均值(mg/dL)	n	SD	95%置信区间	P
红外法	14.25±2.11	50			
二乙酰-胍法	14.20±2.06	50	0.42	-0.62-0.18	0.342
红外法	14.25±2.11	50			
试剂盒水溶法	14.35±2.10	50	0.37	-0.01-0.20	0.73

注:P>0.05 表示差异不显著;P<0.01 表示差异极显著。

由表 3 可知,不同测定方法得到的 MUN 值都有一

定的差异。二乙酰-胍法测得的 MUN 值比红外法略低,但无显著差异(P>0.05)。试剂盒水溶法得到的 MUN 值比红外法高,也无显著差异(P>0.05)。表明红外法与二乙酰-胍法和尿素氮试剂盒水溶法测定的结果比较接近。

### 4.2 二乙酰-胍法和尿素氮试剂盒法的比较

由表 4 可知,水溶法得到的 MUN 值比二乙酰-胍法高约 1.05%,差异不显著(P>0.05);醚溶法得到的 MUN 值比二乙酰-胍法低 3.35%,差异极显著(P<0.01);试剂盒法中,水溶法得到的 MUN 值比醚溶法高约 4.25%,差异极显著(P<0.01)(表 5)。

表 4 二乙酰-胍法和尿素氮试剂盒法的比较

测定方法	平均值(mg/dL)	n	SD	95%置信区间	P
二乙酰-胍法	14.20±2.06	50			
试剂盒水溶法	14.35±2.10	50	0.54	-0.002-0.30	0.053
二乙酰-胍法	14.20±2.06	50			
试剂盒醚溶法	13.74±2.22	50	0.93	0.20-0.73	0.001

注:P>0.05 表示差异不显著;P<0.01 表示差异极显著。

表 5 不同去蛋白处理的试剂盒法的比较

测定方法	平均值(mg/dL)	n	SD	95%置信区间	P
试剂盒水溶法	14.35±2.10	50			
试剂盒醚溶法	13.74±2.22	50	0.89	0.36-0.87	<0.01

注:P>0.05 表示差异不显著;P<0.01 表示差异极显著。

## 5 讨论

MUN 的测定方法需要较高的准确性、精确性和价格相对较低的仪器以及简便的测定程序。红外法是国内进行奶牛生产性能测定(DHI)的主要方法。然而关于红外法是否适于测定 MUN,国外的报道不一。Peterson 等<sup>[2]</sup>研究发现 Foss 4000 的回收率仅为 47.1%(SE=9.9%),显著低于其他方法(P<0.05)。Broderick<sup>[3]</sup>采用红外法、化学法和酶法等 3 种方法测定 MUN 浓度,结果发现红外法测定的 MUN 值=0.709×酶法测定值+4.845,R<sup>2</sup>=0.198;比色法测定的 MUN 值=1.085×酶法+1.39,R<sup>2</sup>=0.724,红外法和化学法的结果存在显著差异,红外法和酶法测定的结果相关性很低,而化学法和酶法测定结果的相关性较高,说明红外法(Foss 4000)不适用于 MUN 的测定。然而,Arunvipas 等<sup>[4]</sup>认为 Foss 4000 的准确性和重复性优于酶法,两种方法的测定结果在统计学上有一定差异,但是绝对差异较小不会影响应用。本试验表明 Foss 4000 测得的 MUN 值与二乙酰-胍法和尿素氮试剂盒水溶法没有显著差异(P>0.05)。由于试验条件的限制,本试验没有对红外法的回收率和变异系数进行测定。

翟少伟<sup>[5]</sup>采用二乙酰-胍法测定 MUN 值,结果表明,批间的平均变异系数为 3.40%,批内的平均变异系数为 2.32%,平均回收率为 98%,说明该方法有很高的精确

度和准确度。黄文明等<sup>[6]</sup>将奶样经 5 000×g 离心 15min, 采用尿素氮试剂盒测定 MUN 含量, 平均变异系数为 4.68%, 平均回收率为 94.91%。本试验对以上两种方法的测定值进行比较, 结果发现试剂盒法的测定值略高于二乙酰-脲法, 但差异不显著( $P < 0.05$ )。说明这两种方法都可以用于实验室测定 MUN 含量。虽然这两种方法都比较简便、快速, 但因测定过程需煮沸显色, 煮沸时间的不同会导致同一样品测定结果平行间相差较大, 可能是导致以上两种方法存在一定差异的原因。由于国内目前没有测定 MUN 的标准奶样, 本试验未进行线性范围的测定。

奶样经三氯乙酸水溶液处理离心后, 蛋白质分布于离心管的管壁上, 中间为澄清的液体。由于奶样被稀释, 测定结果需要乘以稀释倍数才能得到 MUN 的含量。采用三氯乙酸乙醚溶液处理奶样时, 由于乙醚不溶于水, 离心后, 乙醚位于离心管的最上层, 其次为薄乳脂层, 底层管壁上为蛋白质, 中间为澄清液体, 其高度明显低于水溶法的液体高度。枪头需要穿过乙醚和乳脂层才能吸取到中间的澄清液体, 此过程可能会吸入少量乳脂和乙醚, 这可能是尿素氮试剂盒醚溶法的测定结果低于水溶法的主要原因, Carlssen 等<sup>[7]</sup>报道乳脂会增加

MUN 的测定误差。提示测定 MUN 时, 应该尽量减少乳脂引起的误差。

## 6 结论

红外法(Foss 4000)、二乙酰-脲法和尿素氮试剂盒水溶法测得的牛奶尿素氮值比较接近; 采用尿素氮试剂盒法测定 MUN 时, 三氯乙酸乙醚溶液的测定结果与水溶液测定的结果之间差异较大。因此, 实验室中可以采用二乙酰-脲法或尿素氮试剂盒水溶法测定牛奶尿素氮含量。

### 参考文献

- [1] 杭楠. 两种测定乳尿素氮浓度方法的比较[D]. 厦门: 集美大学, 2008.
- [2] Peterson, A B, K R French, E Russek-Cohen, et al. Comparison of analytical methods and the influence of milk components on milk urea nitrogen[J]. J.Dairy Sci, 2004, 87: 1747-1750.
- [3] Broderick, G.A. Effect of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows[J]. J.Dairy Sci, 2003, 86: 1370-1381.
- [4] Arunvipas P, I R Dohoo, J A Vanleeuwen, et al. Factors on milk urea nitrogen levels in dairy cows in Prince Edward Island, Canad[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2003, 59: 83-93.
- [5] 翟少伟. 中国荷斯坦牛乳尿素氮与蛋白质营养关系的研究[D]. 杭州, 浙江大学, 2006.
- [6] 黄文明, 李胜利, 曹志军, 等. 牛奶尿素氮的测定方法[J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(9): 54-56.
- [7] Carlssen. J and J Bergstrom. The diurnal variation of urea in cow's milk and cow milk fat content, storage and preservation affects analysis by a flow injection technique[J]. Acla Vet.Scand. 1994, 34: 67-77.

## Comparison of Determination Methods for Milk Urea Nitrogen

WANG Dong-wei<sup>1,2</sup>, CAO Zhi-jun<sup>1</sup>, WANG Zhi-sheng<sup>1</sup>, HUANG Wen-ming<sup>1</sup>, LI Sheng-li<sup>1</sup>,

WANG Yu<sup>3</sup>, WEN Wan<sup>3</sup>, SHAO Huai-feng<sup>3</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193;

2. Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University Yaan 625014;

3. Animal Husbandry Station, Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750004)

**Abstract:** This objective of this study was to compare the difference of milk urea nitrogen (MUN) concentration determined by different measurement methods. Milk samples ( $n=50$ ) were determined by infrared method, diacetyl monoxime method and urea nitrogen kit, respectively. The results showed that there was no significant difference in MUN concentration by the Fossomatic 4000 Milk Analyzer, diacetyl monoxime method and urea nitrogen kit ( $P > 0.05$ ). Compared with the distilled water solution with urea nitrogen kit, diethyl ether solution with urea nitrogen kit gave lower MUN concentration ( $P < 0.01$ ). The results indicated that the MUN concentration were similar between Fossomatic 4000 Milk Analyzer, diacetyl monoxime method and urea nitrogen kit. When MUN concentration was determined by urea nitrogen kit, there was extremely significant difference between distilled water solution and diethyl ether solution.

**Key words:** MUN; Diacetyl monoxime method; Infrared method; Urea nitrogen kit

欢迎投稿 惠登广告