

例如,利用生物工程手段开发胆固醇结合蛋白。(5)扩大生物方法所适用的范围。除蛋黄胆固醇外,还要扩展到动物油脂如猪油、牛油等方面。

总之,利用生物方法脱除食品中胆固醇的研究正面临新的挑战。尽管脱除食品胆固醇的各种物理方法和化学方法进展十分迅速,但是我们认为随着该领域研究的逐步深入,生物方法将会成为一种最有效最简便的降低食品中胆固醇的方法。

参考文献

- 1 Bringe, N. A. and Cheng, J. Low - fat, low - cholesterol egg yolk in food application. Food Technol. 1995, (5): 94 ~ 106.
- 2 Kumar, N. and Singhal, O. P. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. J. Sci. Food Agric. 1991, 55: 497 ~ 510.
- 3 Watanabe, k., Shimizu, H., and Aihara, H., et al, Isolation and identification of cholesterol degrading Rhodococcus strains from food of animal origin, and their cholesterol oxidase. J. General Appl. Microbiol. 1986, 32: 1317 ~ 1417.
- 4 Aihara, H., Watanabe, K. and Nakamura, R. Degradation of cholesterol in egg yolk by Rhodococcus equi No. 23. J. Food Sci. 1988, 53: 659 ~ 660.
- 5 Przybylski, R., Eskin, N. A. M. and Cullimore, D. R. Transformation of egg cholesterol during bacterial fermentation. Food Chem. 1993, 48: 195 ~ 199.
- 6 Johnson, T. L. and Somkuti, G. A. Properties of cholesterol dissimilation by Rhodococcus equi. J. Food Protection, 1990, 53: 332 ~ 335.
- 7 Christodoulou, s., Hung, T. V. and Trehwell, M. A. et al. J. Food Protection, 1994, 57: 908 ~ 912.
- 8 Xiangsheng, w., Hung, T. V., and Drew, P. G. et al. Enzymatic degradation of cholesterol in milk Australian J. Dairy Technol. 1990, (11): 50 ~ 52.
- 9 Randolph, T. W., Clark, D. s., and Blanch, H. et al. Enzymatic oxidation of cholesterol aggregates in supercritical carbon dioxide. Science, 1988, 238: 387 ~ 390.

出口肉类及其制品中四环素残留量的高效液相色谱测定法

蔡宝亮 徐素荣 钱成 陆成良 沈山江 颜斌

盐城进出口商品检验局 224002

摘要 针对我国出口肉类和肉类制品中四环素类残留量检测法周期长、灵敏度低的状况,探索了对它的检测方法,并与现行的 SN0179—92 方法进行比较,研制出四环素族高效液相色谱测定法的最佳工作条件,其最低检测限和回收率与 SN01 79—92 法结果一致,且可节省时间 4~5 天,缩短了周期,比较适用于进出口肉类及其制品的四环素残留量的快速测定。

关键词 肉和肉制品 四环素族抗生素 液谱法 测定

出口食品中四环素族残留量一直是国内外食品界所关注的,日本、美国、俄罗斯先后对我出口食品提出了具体要求。国内外专家作了

大量的努力,对检测方法进行了研究,但多限于生物学方法,由于周期长、灵敏度低而影响推广应用。液相色谱检测法也因回收率低、灵敏度差

不能满足。为此,我们在总结分析了国内外的有关资料的基础上,探索用高效液相色谱的检测办法,并与现行的 SN0179—92 方法比较,找出出口肉类及其制品中四环素残留量高效液相色谱测定方法的最佳工作条件。

1 实验部分

1.1 试剂和材料(除说明外,其它试剂均为分析纯)

1.1.1 乙腈:色谱级

1.1.2 5% 高氯酸

1.1.3 0.1mol/L 盐酸溶液

1.1.4 磷酸

1.1.5 0.01mol/L 磷酸二氢钠溶液:称取 15.6g 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶于蒸馏水,定容至 100ml,经微孔滤膜(0.45 μm)过滤备用。

1.1.6 抗生素标准品:四环素(TC)、土霉素(OTC)、金霉素(CTC)。由国家卫生部药品生物制品检定所规定之标准品。

1.1.7 抗生素标准贮备液

土霉素(OTC):称取土霉素 0.0500g(精确至 0.0001g),用 0.1mol/L 盐酸溶液溶解后并定容至 50ml,标准液浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (先用少量乙腈溶解后再用盐酸溶解);

四环素(TC):准确称取四环素 0.0500g(精确至 0.0001g),用 0.1mol/L 盐酸溶液溶解后并定容至 50ml,标准液浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$;

金霉素(CTC):称取金霉素 0.0500g(精确至 0.0001g),用 0.1mol/L 盐酸溶液或水溶解后并定容至 50ml,标准液浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$;配置后在冰箱中保存,在 1 周内使用。如抗生素标准品的效价低于 1000 单位/mg(1 单位 = 1 μg),配制时,换算为 1000 单位/mg。

1.1.8 抗生素标准工作液

在工作时,分别吸取 TC、OTC 各 50 μl 和 CTC 200 μl 于 3 个洁净的 10ml 棕色容量瓶中,用 0.1mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,配成 TC 和 OTC 为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、CTC 为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准

工作液。

1.1.9 混合抗生素标准工作液

根据需要各吸取适量的 TC、OTC 和 CTC 标准工作液于 10ml 棕色容量瓶中,用 0.1mol/L 盐酸稀释定容至刻度。现配现用。

1.1.10 除蛋白提取液 5% 偏磷酸:甲醇(80:20V/V)和(75:25V/V)

1.1.11 甲醇、偏磷酸、甲醇(色谱纯)、乙醇、5% EDTA-2Na 水溶液。

1.2 仪器和设备

1.2.1 离心机,超声波混合器,旋涡混合器,微孔滤器,天平(精度为 0.001g、0.0001g),微量注射器:10 μl 或 50 μl ,

1.2.2 液相色谱仪

SP8800 型配有 SC100 型紫外检测器;

Waters208 型配有 490 型紫外检测器;

1.2.3 Sep-Pak C18 预处理小柱,旋转蒸发器,沙芯漏斗,均质器,pH 计或精密 pH 试纸。

1.3 测定步骤

1.3.1 提取经绞肉机绞碎的肉样(<5mm)10g ($\pm 0.1\text{g}$)加入 5% 高氯酸溶液 30ml 在混合旋涡器上混合后在超声波上振荡脱气 10min,移入离心管中以 3000r/min 离心 5min,取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后供检。

1.3.2 测定 a、色谱柱:Symmetry TM C18, 150mm \times 3.9mm(内径) 粒度 5 μm ; b、UV 370nm; c、流动相 0.01mol/L NaH_2PO_4 : 乙腈(75:25V/V)(用磷酸溶液调节至 pH2.5)。使用前用超声波脱气 10min; d 流速:0.6ml/min; e 进样量:10 μl 或 50 μl ; f、柱温:常温。

1.3.2 色谱测定

根据样液中四环素族含量情况,选定峰面积相近的标准工作混合溶液。标准工作混合溶液和样液中四环素族的响应值均应在仪器的检测范围内。对标准工作混合溶液和样品溶液等体积参插进样测定,在上述色谱条件下,四环素(TC)保留时间约为 3.9min、土霉素(OTC)保留时间约为 4.2min,金霉素(CTC)约为 6.69min。

1.3.3 标准曲线的制备

分别注射 TC、OTC 和 CTC 标准工作液 10 μ l、20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l, 或相适应的浓度以制作 OTC、TC、CTC 标准曲线, 绘峰面积对注射浓度图。

1.3.4 空白试验

除不加样品外, 按上述方法步骤进行。

1.3.5 结果计算与表达

用色谱数据处理机或按下式计算残留量

$$X = \frac{h \times C_s}{h_s \times C}$$

式中:

X——试样中四环素族残留量, mg/kg。

h——样液中四环素族的峰面积, mm²。

h_s——标准工作溶液中四环素族峰面积, mm²。

C_s——标准工作溶液中四环素族浓度, μ g/ml。

C——最终样液所代表的试样浓度, g/L。

注: 计算结果扣除空白值。

2 小结与讨论

2.1 样品处理

样品处理主要目的在于将被测试样中四环素族全部分离出来, 这就要根据抗生素的理化性质选择溶解度大的溶剂并且应注意光、热等的影响。开始我们选择硝酸高温、除蛋白提取液, 效果并不理想, 最后选择了 5% 高氯酸, 效果较好。

2.2 测定条件的选择

2.2.1 流动相的选择: 采用 0.01mol/L NaH₂O₄; 乙腈 75: 25 和 80: 20 两种配比进行试验, 结果两种配比出峰基本一致, 最后选定前者。

2.2.2 流速的选择: 采用 0.5 ~ 1.5ml/min 进行试验, 结果 0.6ml/min 出峰效果最佳。

2.2.3 吸收波长的选择

通过试验发现 268nm 波长噪音大、干扰

多, 以波长 370nm 出峰效果较好。

2.2.4 柱温的选择 如果柱温太低, 流动相粘度大, 色谱峰拖尾; 柱温太高, 特别是超过 45 $^{\circ}$ C, 将导致四环素异构, 使回收率大大下降, 所以选择常温。

根据以上条件, 我们取混合 TC、OTC 和 CTC 标液及样品中添加混合标液所得混合标液色谱图(图 1)和样品色谱图(图 2)

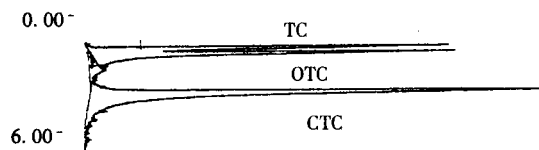


图 1 混合标液色谱图

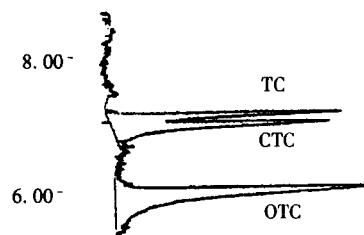


图 2 样品色谱图

2.3 标准曲线的制作和线性试验

制作标准曲线要特别注意标准贮备液和工作液的保存, 通常置于低温即 0 ~ 4 $^{\circ}$ C 保存, 在常温下 24h 效价会大大下降。另外, 在标准配制中我们发现在标样峰前出现一异峰, 经多次试验, 证明为甲醇吸收峰, 改用盐酸溶液定容后异峰消失。同时用 OTC、TC、CTC 进行了线性试验, 注射 OTC 0.4 ~ 3.6 μ g/ml 可以绘出标准曲线, 进行线性关系试验, 基于 $Y = mX + b$ (式中 X 为峰面积, Y 为浓度), $r = 0.986$, 查表得 $r_{0.01} = 0.959$, $r > r_{0.01}$, 所以线性相关关系特别显著; 同样, 注射 TC 0.4 ~ 3.6 μ g/ml 和注射 CTC 1.6 ~ 14.4 μ g/ml 可以绘出标准曲线, 进行线性关系试验。经查证线性相关关系都特别显著。

2.4 最低检测限和回收率

2.4.1 最低检测限

取 TC、OTC 标准工作液 2~0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 CTC~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 进行试验得出本法最低检测限 TC、OTC 为 0.05 mg/kg , CTC 为 0.2 mg/kg 。

2.4.2 回收率

本法回收率的实验数据 TC、OTC 浓度在 0.05~0.2 mg/kg 范围内,其回收率为 72%~82%,CTC 浓度在 0.5~8 mg/kg 范围内回收率为 76%~86.6% (见表 1)。

2.5 与 SN0179—92 方法比较

表 1 HPIC 法回收率试验结果

样号	添加标准量 mg/kg			测定结果 (mg/kg)			回收率 (%)		
	TC	OTC	CTC	TC	OTC	CTC	TC	OTC	CTC
1	0	0	0	0	0	0	/	/	/
2	0.05	0.05	0.5	0.036	0.041	0.038	72	82	76
3	0.5	0.5	2	0.41	0.39	1.62	82	78	81
4	2	2	8	1.58	1.60	6.93	79	80	86.6
5	1	0.5	0.4	0.89	0.37	0.32	89	74	80
6	1	0.5	0.4	0.88	0.44	0.31	88	88	78
7	1	0.5	0.4	0.91	0.42	0.33	91	84	83

用本法与 SN0179—92 法对比检测,两种方法的检验结果和回收率基本一致,由表 2 数

据采用 t 值检两方法的显著性

2.5.1 OTC

表 2 HPLC 法与 SN0179—92 法试验结果对照表

样品号	添加标准量 mg/kg			HPLC 法测定结果 (mg/kg)			HPLC 回收率 (%)			SN0179—92 测定结果 (mg/kg)			SN0179—92 测定回收率 (%)		
	TC	OTC	CTC	TC	OTC	CTC	TC	OTC	CTC	TC	OTC	CTC	TC	OTC	CTC
1	0	0	0	0	0	0	/	/	/	0	0	0	/	/	/
2	0.05	0.05	0.50	0.036	0.041	0.38	72	82	76	0.035	0.038	0.40	70	76	80
3	0.5	0.5	2	0.41	0.39	1.62	82	78	81	0.41	0.38	1.60	82	76	80
4	2	2	8	1.58	1.60	6.93	79	80	86.6	1.38	1.60	6.61	69	80	82.6
5	1	0.5	0.4	0.89	0.37	0.32	89	74	78	0.90	0.38	0.33	90	76	83
6	1	0.5	0.4	0.88	0.44	0.31	88	88	78	0.87	0.41	0.34	87	82	85
7	1	0.5	0.4	0.91	0.42	0.33	84	84	83	0.89	0.42	0.32	91	84	80

经计算 $t=0.0177$ 。查 t 值表,当 $f=n_1+n_2-2=10$, $\alpha=0.05$, $t(10)_{0.05}=2.228>0.0177=t$

所以,两方法没有显著差异。

2.5.2 同法,经计算 t 值查 t 值表,进行显著性检验,证明两方法对 CTC、TC 没有显著差异。

2.6 人工模拟试验与验证

为进一步证实本法的准确性,我们分别向 3 只白兔静脉注射 TC、OTC、CTC 标准系列各 50 mg/kg ,另 1 只作为空白对照,24h 后扑杀,取肌肉用 HPLC 法与 SN0179—92 法同时测定四环素族残留量,结果基本一致。

经有关大专院校验证,结果普遍反映本法与 SN0179—92 检测结果一致,可节省时间 4~5 天,成本基本相同,大大提高工作效率,减轻了劳动强度,应用前景十分广阔。

2.7 4 年多的试验证明,本法可以检测肉类和肉类制品中四环素族残留量;而且最低检测限在美国、日本规定的范围内。与 SN0179—92 法检测回收率一致。

参考文献

- 1 AOAC 分析方法。1990 年,第 15 版。
- 2 吴文华译。商检科技通讯,食品译文辑,第 8 期。
- 3 天津商检局。出口食品中四环素族抗生素残留量检验方法。
- 4 秦皇岛商检局。肉类和罐头中四环素族抗生素残留检测方法的改进实验。
- 5 国家商检局。现代商检科技,1991,1(2) 28~31。
- 6 王秉栋编著。动物性食品卫生理化检验手册。上海科学技术出版社,1989。
- 7 第十一次全国色谱报告会(文集),1995,4。
- 8 美国《化学文摘资料来源索引》
- 9 Mc Donald D D. Anal, 1975, 49, 2023。
- 10 Hirm D R. J Chromatogr Sci, 1985, 23, 454。
- 11 Haky JE. Anal Letters, 1989, 22(11, 12): 2637。
- 12 Snyder L R, Kirkland J J, Introduction to modern liquid chromatography, John Wiley Sons, Inc。
- 13 Ralph M Riggan. Anal Chem. 1983, 55, 1862。
- 14 松枝隆彦等,分析化学(日文)1982,31(2):59。
- 15 卢佩章等。高效液相色谱法及其及家系统。沈阳:辽宁科学技术出版社,1993。
- 16 Mc Clung Get al. J Liq Chrom atogr, 1988, 11: 613

黄瓜生食菜肴卫生研究

蒋云升 扬州大学商业学院烹饪系 225002

摘 要 对不同味型的黄瓜生食菜肴制作过程中的细菌数变化检测表明:有一种或多种调味品起着杀菌作用。通过调味品用量的调整,可以使菜肴成品中的细菌数低于 10^3 cfu/g。调味品杀菌效果的观察为改进菜肴配方提供了可能性。

关键词 黄瓜 调味品 菌落总数 配方

九十年代开始欧美各国倡导“回归自然”,风行吃生菜。我国的宾馆、饭店也纷纷推出各种生食菜肴。96 年夏季,日本、韩国先后发生了食生菜引起的大肠埃希氏菌 O157: H7 出血性结肠炎^[1]。至此人们对生食菜肴还能否生食产生了怀疑。

我国的生食菜肴多数不经加热处理,唯有依靠调味的手段来控制其卫生质量。其配方往往建立在口感和经验基础上。鉴于国内对生食菜肴的卫生研究资料甚少,笔者以黄瓜生食菜

肴为例,分析了各种调味品在菜肴制作过程中的杀菌效果,并在此基础上建立了一些新的工艺配方,现报道如下。

1 材料与方法

黄瓜、大蒜及各种调味品,市售。培养基和试剂按文献^[2]配制。菜肴制作步骤同文献^[3]。试验时用 100g 黄瓜。每次称量均更换灭菌平皿。菜肴基础配方见表 1。

菌落总数、大肠菌群、致病性大肠埃希氏菌检验按文献^[2]进行。减菌率(%)计算:(基础配