

牛乳中有机氯农药残留物的测定

牛乳样品很少只被一种农药污染,同一样品中通常存在三到五种残留物。从已知的残留物中最引起注意的是烃的氯代化合物,如DDT、DDE、DDD(TDE)、BHC、狄氏剂、七氯环氧化合物、甲氧滴滴涕、异一狄氏剂等类似的化合物。定性和定量测定法是根据色谱原理,它可同时测定同一样品中存在多种残留物。萃取和清理是利用溶剂分配和柱层析,把农药残留物与样品分离。这些操作步骤是很重要的,必须在色谱法测定前进行。

一、农药残留物和脂肪萃取

a) 牛奶: 取鲜奶100毫升(浓缩奶用一倍水稀释后,再取用100毫升),入于500毫升离心瓶中,加100毫升乙醇或甲醇和1克草酸钠或草酸钾,摇匀,混合。加50毫升乙醚,盖上瓶塞,剧烈摇动1分钟,再加50毫升石油醚,盖上瓶塞,继续剧烈摇动1分钟,再加50毫升石油醚,盖上瓶塞,继续剧烈摇动1分钟。然后置离心瓶于转速为1500转的离心机上,离心约5分钟。吸出上层醚萃取液,入于已盛有500—600毫升水,30毫升氢氧化钠饱和溶液的一升分离漏斗中。离心瓶中的水层,再加1:1乙醚、石油醚每次用50毫升,萃取二次(每次都经过剧烈摇动、离心),吸出上层醚萃取液,一起合并于一升分移漏斗中。摇匀,混合分移漏斗中内容物。静置,待分层清晰后,弃去水层上层醚萃取液,再用蒸馏水每次100毫升洗涤二次(如果加入蒸馏水形成乳浊液则可5毫升饱和氯化钠液)。静置,分层后,弃去水层,将上层醚萃取液,通过装有无水硫酸钠的色谱柱,收集于400毫升烧杯中。加少量石油醚洗涤无水硫酸钠柱,洗出液一起合并于烧杯

中。然后置烧杯于蒸汽浴上,以除去溶剂,杯内剩余物即为牛乳中农药残留物和脂肪。

b) 奶油: 取奶油样品加热至约50℃,完全溶化。倒入干燥过滤器中过滤。

c) 乳酪: 取乳酪样品25~100克(取样品量经萃取所得脂肪量应不少于3克),入于高速混合器中,加入约2克草酸钠或草酸钾,100毫升乙醇或甲醇,进行高速搅拌混合约2~3分钟(如果估计到离心时,会形成乳浊液,则应先加入一定量的水,1克样品加2毫升蒸馏水)。然后,移混合液于500毫升离心瓶中,加50毫升乙醚,盖上瓶塞,剧烈摇动1分钟,再加50毫升石油醚继续剧烈摇动一分钟(也可改用250毫升离心瓶,则样品量和所用试剂各减半)。其余处理步骤可参照牛乳项。

二、乙晴分离

称重由萃取所得的脂肪约3克,入于125毫升分移漏斗中,加石油醚约12毫升(使脂肪和石油醚总体积为15毫升),加入30毫升石油醚乙晴饱和溶液,剧烈摇动一分钟,静置,候其分层,放出石油醚、乙晴萃取液层,入于已盛有650毫升蒸馏水,40毫升氢氧化钠饱和溶液及100毫升石油醚的1升分移漏斗中。原分移漏斗,再用石油醚乙晴饱和溶液,每次加30毫升,重复萃取三次,萃取液一起合并于1升分移漏斗中,握住1升分移漏斗,上下摇动30~45秒钟,充分混合内容物,静置,候其分层。放出水层,入于另一个1升分移漏斗中,并加100毫升石油醚,盖上瓶塞,剧烈摇动15秒钟,候其分层。弃去水层,醚萃取液合并于第二个1升分移漏斗中,并加蒸馏水100毫升,洗涤一次,弃去水洗涤液。放出醚萃取液入于内径

为 $22 \times 50 \text{ mm}$ 填装有无水硫酸钠层析柱中, 进行干燥过滤、滤液收集于500毫升K、D浓缩器中。分移漏斗和无水硫酸钠层析柱每次用石油醚约10毫升, 洗涤三次, (先洗分移漏斗, 再将洗出液入于层析柱), 醚洗涤液一起合并于K、D浓缩器中。蒸发, 浓缩醚萃取液至约10毫升, 然后移浓缩液于弗罗里土柱, 进行清理纯化。

三、弗罗里硅土柱清理

在内径为22mm层析柱中, 填装入4英寸高活化过的弗罗里硅土(或者根据吸附月桂酸值, 调整其装入量), 上面再复盖一层1/2吋无水硫酸钠, 加40~50毫升石油醚湿润。层析柱下接具有校正收集管的K、D浓缩器, 用来收集淋洗液, 装毕, 将已浓缩的约10毫升石油醚萃取液倒入层析柱中, 盛器用石油醚每次约5毫升洗涤二次, 洗液一起合并于层析柱中。取6%淋洗剂200毫升, 以每分钟5毫升速度淋洗, 加入于层析柱中, 洗毕, 移去层析柱下K、D浓缩器, 换上一个新的K、D浓缩器。另取15%淋洗剂200毫升, 以同样速度进行淋洗, 洗毕, 将两个K、D浓缩器中淋洗液各自浓缩至一定体积。

注: 1、如要求浓缩液体积小于5毫升, 则可用双球微量K、D浓缩器或微量维格罗分馏柱。

2、6%淋洗液中可含有: BHC, DDE, DDD(TDE)、OP'-DDT'P、P'-DDT, 七氯环氧化合物, 林丹, 甲氧滴滴涕, 可直接用来色谱测定。如还需要进一步清理纯化, 可换用新弗罗里硅土, 再重复一次。

3、15%淋洗液中可含有: 狄氏剂, 异狄氏剂。如还需要进一步清理纯化, 则应用氧化镁-硅藻土柱或皂化法, 进行再次处理, 这对用薄层色谱和纸上色谱定性和定量时, 都是必要的, 方法如下:

氧化镁-硅藻土柱清理: 置10克氧化镁

一硅藻土混合物于无塞的层析柱中, 抽气压紧。加40毫升柱石油醚湿润, 弃去下端流出多余石油醚、层析柱下接上K、D浓缩器, 然后从柱上端加入已浓缩成5毫升的15%淋洗液, 用少量石油醚洗涤容器, 洗液也合并于柱中, 同时一面抽气吸滤一面用100毫升石油醚进行分次淋洗。洗毕, 置K、D浓缩器于蒸汽浴上, 浓缩淋洗液至一定体积, 作色谱测定用。

皂化法清理: 移已浓缩的15%淋洗液于125毫升有塞烧瓶中, 用少量石油醚洗涤器, 洗液也合并于烧瓶中, 置烧瓶于蒸汽浴上, 蒸发淋洗液至刚刚干。加20毫升氢氧化钠或氢氧化钾乙醇液于烧瓶中, 盖上瓶塞, 装上空气冷凝管, 置烧瓶于水浴上、加热回流30分钟。然后将烧瓶内容物移入125毫升分移漏斗中, 烧瓶用每次10毫升石油醚洗涤三次、洗液也一起合并于分移漏斗中, 并加蒸馏水20毫升, 摇匀、混合。分层后, 放出水层于另一个已盛有20毫升石油醚的125毫升分移漏斗中, 并剧烈摇动。静置分层后、弃去水层, 合并二分移漏斗中石油醚萃取液。另用1:1乙醇水溶液每次20毫升, 洗涤分移漏斗中石油醚萃取液三次(如果开始洗涤时, 形成很混乳浊液, 则其余二次洗涤时, 不要加乙醇, 只用蒸馏水即可)。分层后, 弃去水层, 放出石油醚萃取液, 通过内径为 $22 \times 50 \text{ mm}$ 填装无水硫酸钠层析柱进行干燥、过滤、并用少量石油醚洗涤原容器、洗液也入于无水硫酸钠层析柱中, 浓缩石油醚萃取液至一定体积, 作色谱测定用。

四、测定

a、电子捕获气相色谱法; b、微库仑气相色谱法; c、薄层色谱法; d、纸上色谱法。

利用电子捕获气相色谱法作为测定的主要方法。它反应灵敏, 对七氯环氧化合物的检出灵敏度达 10^{-9} 克。

在林丹, 七氯, 艾氏剂, 七氯环氧化物, 狄氏剂、异—狄氏剂和PP'—DDT的混合物产生分离的情况下, 利用柱呈液相的如DC—200或QF—1作固定液。

1.8m×4mm内径柱的操作条件, 以80~100目 Chromosorb WHP计的10% DC—200或15% QF—1和10% DC—200用1:1混合; 柱温200℃; 流速每分钟125毫升; 注入温度225℃。

从清理萃取的3克脂肪样品而已被浓缩成5毫升的样液中, 吸取5微升, 注入电子捕获气相色谱仪。

根据出峰时间确定残留物。计算农药残留物峰的面积, 并把它与已知相当的一定量农药标准比较。用最精确的计算、样品与标准样峰面积大小应该相似, 为了正确起见, 除了用电子捕获气相色谱法外, 还可用薄层色谱法, 元素分析专用气相色谱检出器, 以及其它适当的方法来进行对照试验。

五、器具

a、色谱管: 具有活磨砂多孔板或玻璃棉栓; 内径22mm×300mm; b、色谱管: 无塞、内径22mm×300mm或400mm; c、滤管: 内径22mm×100mm; 具有移液管和磨砂多孔板, 或玻璃棉栓; d、K、D浓缩器: 容量500毫升, 具有5~1毫升接受瓶或刻度管; e、分移漏斗: 1000毫升, 125毫升; f、微量斯奈德柱: 双球型; g、微量维格罗分馏柱。

六、试剂

乙晴: 使用前应用气相色谱仪检查试剂纯度, 否则得用下法进行纯化处理: 取乙晴4升加1毫升磷酸, 30克五氧化二磷, 防爆沸玻片数粒, 用全玻璃装置, 保持81~82℃, 加热蒸馏, 不要超过82℃。检查乙晴纯度, 可用石蕊试纸试验, 置试纸于盛装乙晴容器口, 如潮湿试纸由红色变成兰色, 表明胺存在。

乙晴石油醚饱和液: 溶乙晴于重蒸馏石

油醚中至饱和。

2%碱乙醇液: 溶价2克氢氧化钠或氢氧化钾于乙醇中, 然后稀释至100毫升。

乙醇或甲醇: 试剂级

硅藻土545: 不得存在电子捕获物。

6%涤洗剂: 取乙醚60毫升, 用重蒸馏石油醚稀释至1升。

15%涤洗剂: 取乙醚150毫升, 用重蒸馏石油醚稀释至1升。

乙醚: 保持34~35℃重蒸馏, 并在氮气中贮藏、加入2%(体积比)乙醇, 无过氧化物存在。

弗罗里硅土: 试剂级, 需在650℃下加热活化, 贮藏在密闭的容器中, 暗处保存。使用前再在130℃下加热5小时, 贮藏于有塞玻璃瓶或干燥器中, 放置2天后, 需重新在130℃下加热。

乙烷: 用气相色谱仪检查试剂纯度, 否则得用全玻璃装置重新蒸馏。

氧化镁: 取氧化镁500克, 加蒸馏水调制成浆状, 在蒸气浴上加热约半小时, 减压过滤。然后在105~130℃烘箱中干燥过应, 碾成粉状、过筛、贮藏密闭容器中。

氧化镁—硅藻土混合物: 按重量计算混合等量的氧化镁和硅藻土。

石油醚: 用气相色谱仪检查试剂纯度, 否则得用全玻璃装置, 在30~60℃下重新蒸馏。

硫酸钠: 无水, 粒状。

试剂纯度试验: 使用电子捕获气相色谱仪, 所用试剂不应含有引起检出器偏转物质存在, 这可用下列试验查明: 取300毫升试剂于K、D浓缩器中, 加热蒸发浓缩至5毫升, 用10微升注射器吸取浓缩液5微升, 注入分析样品所用同一气相色谱仪中, 进样2~60分钟后, 记录器指针偏斜不大于1mm。

七、弗罗里硅土评价和标准化: 弗罗里硅土随批次不同, 性能也会发生许多变化, 因而用它来清理纯化, 溶介于6%和15%涤洗剂中的各种农药数量也会产生差异。如狄氏

剂与异一狄氏剂在15%淋洗液中应该完全复原,然而有时会存在于6%淋洗液中。另外,七氯环氧化合物可能会被15%淋洗剂淋洗下。也有可能狄氏剂和异狄氏剂不全部被15%淋洗剂淋洗下。为了保证有效地分离农药、以及复原完全,应该经常检查佛罗里硅土。检查佛罗里硅土分离和复原农药性能,方法如下:

a)一配制每毫升己烷分别含有1, 1, 1和2微克艾氏剂,七氯环氧化合物,狄氏剂和异一狄氏剂。

b)一取1毫升混合农药己烷标准液于已制备活化过的佛罗里硅藻土柱中,然后按照处理样品项中操作方法,用6%及15%淋洗剂分别进行淋洗。

c)一浓缩淋洗液至10毫升。

d)一用微量注射器吸取一定量已浓缩的淋洗液,注入气相色谱仪中,测定每种农药复原量,艾氏剂和七氯环氧化合物应该全部被6%淋洗剂淋洗下,而狄氏剂和异狄氏剂在15%淋洗液中也应得到满意结果。

为了获得有效分离,可以用下列指出标准方法来调整佛罗里硅土用量。

器具和试剂:

25毫升滴定管。10毫升、20毫升移液管。25毫升、125毫升三角烧瓶。500毫升容量瓶。氢氧化钠液,溶解20克氢氧化钠于蒸馏水中、稀释至500毫升(1N)。取1N氢氧化钠25毫升,用蒸馏水稀释至500毫升(0.05N)。月桂酸液:称取月桂酸10.000克(化学纯)于500毫升容量瓶中,加己烷溶解,然后稀释至500毫升(1ml=20mg)。酚酞指示液,溶解1克酚酞于乙醇中,稀释至100毫升。乙醇(分析纯):对酚酞呈中性。己烷:(分析纯),用全玻璃装置,重蒸馏过。

0.05N氢氧化钠液标定

a)称取100~200毫克月桂酸于125毫升三角烧瓶中。

b)加50毫升中性乙醇和3滴酚酞指示液,用0.05N氢氧化钠滴定终点。

c)计算每毫升0.05N氢氧化钠液相当于月桂酸毫克数(每毫升约10mg月桂酸)。

佛罗里硅土标定

称取2.000克佛罗里硅土于25毫升三角烧瓶中,盖上铝箔,在130℃下加热过应。取下冷至室温,加20毫升月桂酸液(相当于400毫克),盖上瓶塞,不时摇动15分钟。静置,候佛罗里硅土沉淀,吸取上层清液10毫升于125毫升三角烧瓶中,防止把佛罗里硅土吸上来。加50毫升中性乙醇,3滴酚酞指示液,用0.05N氢氧化钠滴定至终点。

计算:吸附值($\text{mg/g}=200-\text{)}$ 滴定10毫升上层清液所消耗0.05N氢氧化钠毫升数 \times 每毫升0.05N氢氧化钠相当于月桂酸毫克数)。

佛罗里硅土调整:规定20克佛罗里硅土吸附月桂酸值为110,如果它的密度(60~100目)是每立方呎约30磅,填装入内径为22mm层析柱至4吋高,那末使用这种佛罗里硅土柱进行清理已能达到纯化分离目的。

为了求得任意批次佛罗里硅土当量值,可用110除以该批佛罗里硅土标定值(即每一克佛罗里硅土吸附月桂酸毫克数),再乘上20。

根据操作经验表明,调整佛罗里硅土用量达吸附月桂值酸80~120,一般已能淋洗好七氯环氧化合物、狄氏剂和异狄氏剂。

八、蒸馏浓缩事项

a)浓缩萃取液至5毫升或大于5毫升,用具有3球斯奈德柱和容量瓶或刻度承受管的K、D浓缩器,蒸发浓缩时必须加入20目的防爆沸玻片数粒。

b)浓缩萃取液至不到5毫升:蒸发浓缩萃取液至约5毫升,然后改有一个双球微量斯奈德柱或维格罗分馏柱。再加热蒸发至比所要求体积略为少一些,后可用溶剂补足

(下转第68页)

或维生素D₃含量(国际单位/克)

$$= \frac{H_1 \times D_2}{H_2 \times 1.5 \times W} \times 40$$

注:

1、本方法对含维生素量低的其他食品不适用。例如人造黄油或奶粉(0.01—0.10微克/公斤),因为含有较高量干扰物质。为除去这些干扰物,需要在(e)11步骤时用制备薄层色谱法提纯,并且气相色谱仪要和质谱仪结合以便在测定阶段有足够的灵敏度和专一性。

2、发现氧化铝的活性有变化,因此每批在制备中或制备后都需要校正,校正方法如下

2.1使100微克维生素D异构化(见3)

2.2转移到氧化铝柱上,用50%二乙醚—石油醚洗脱(见4),收集以下组分:80毫升,5毫升,5毫升,120毫升,10毫升,10毫升,10毫升,10毫升。

2.3用不同组分中异速甾醇在278,288和301毫微米处的特性吸收以得到异构化维生素D的正确洗脱型式。

另外,也可用少量的维生素D的起始重量(10毫微克),在微生物作用后用气液色谱法测定洗脱型式。(收稿日期79.10)

陈祖荫译自英文《The Analysis of Nutrients in Food》1978

(上接第72页)

不到体积部分,移去分馏柱。这样最小可达到0.2~0.4毫升。

c)蒸发由分离样品时获得脂肪和农药残留物溶剂:在清洁干燥气流下,盛至有萃取液的烧杯于35~40℃水浴上,进行加热蒸发,等溶剂蒸发完毕,就立即除去热和停止通入气流,让残余水份自然地蒸发掉。(收稿日期80.1)

邵伟章 译自英文《乳制品标准检验方法》资料 陈祖荫校

失色水化松软肉(PSE) 和深色坚实干燥肉(DFD) 的快速检定法

对猪肉和牛肉的大量研究表明在死后几分钟内可以将失色水化松软肉(PSE)和深色坚实干燥肉(DFD)同正常的肉区分开,这是因为它们缺乏象糖原和三磷酸腺苷那样能量丰富的物质。PSE和DFD肉只含有少量的三磷酸腺苷,有高浓度的肌苷酸和肌苷,这是由于腺苷嘌呤核苷酸的脱氨作用形成的。相反,正常的肉含有高水平的三磷酸腺苷和低浓度的肌苷酸和肌苷。

三磷酸腺苷和其他的腺嘌呤核苷酸在260毫微米处呈现最大的吸光率,而肌苷酸、肌苷和次黄嘌呤则在248.5毫微米处呈现最大的吸光率。通常把在250和260毫微米处的吸光率之比(R)作为商品腺嘌呤和肌苷核苷酸制剂纯度的指标。对肌苷核苷酸来说,这一比值为0.78—0.80,而肌苷酸和肌苷则其比值分别为1.68和1.70。所以,正常的肉在刚屠宰后的R值应该低,而PSE和DFD肉则有高的R值。对不同的猪肉和牛肉进行了大量研究后证实了这些设想。所以从R值基础可以将PSE肉DFD肉和正常的肉区分开。

PSE的PH值低于6.1,而DFD肉的PH值则高于6.1。用这些标准测定R值和PH值可以区分PSE肉、DFD肉和正常肉。用这样一种快速方法可以在3—4分钟内区分正常肉,PSE肉和DFD肉。(收稿日期80.3)

陈祖荫 译自英文《22nd meat Research congress Sweden》1976