

萃取法测定猪油中丙二醛的研讨

浙江东阳市卫生防疫站 许龙福

提 要

本文对丙二醛萃取法进行研究结果表明,原法操作烦琐,灵敏度和萃取率低,经改进后,操作快速、简便,灵敏度提高。平均回收率93.2%,精密度CV2.97%,最低检出量0.06 μ g,斜率 $b=0.192$ 。同时提出丙二醛测定改进方向及性质应用等值得探讨性问题。

1976年作者对Tartadyis等丙二醛的蒸馏法作了改进,首先在肉品卫生标准协作会议上发表;而后又发表了再论与三论[1]。现在对猪油中丙二醛萃取法[2]进行改进;原萃取法操作过于繁琐,须双层滤纸二次过滤,离心沉淀及氯仿处理等,以及酸度和波长选择存在问题,为此进行研究改进。经改进后只要用慢速滤纸一次过滤即可达上述目的,操作简便,灵敏度提高;回收率93.2%,精密度CV2.97%。现将萃取法试验结果报告如下。

一、实验方法

1. 原理

油脂酸败产生丙二醛,经三氯乙酸除蛋白质同时萃取丙二醛;丙二醛与2-硫代巴比妥酸(TBA)在酸性介质中加热,形成在532nm波长具有最大吸收的红色复合物(摩尔消光系数 $\epsilon=1.56 \times 10^5 \text{cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$)。

2. 试剂仪器

(2) 0.02M TBA溶液:称取硫代巴比妥酸,2.883g溶于水并稀释至1000ml,加温助溶。

(2) 三氯乙酸混合液:三氯乙酸7.5g及乙二胺四乙酸二钠0.1g,用水溶解,稀释至100ml。

(3) 丙二醛标准液:精确称取1.1.3.3-四乙氧基丙烷(TEP)0.315g加水稀释至

100ml;吸取1ml加三氯乙酸混合液稀释至100ml(1ml=1 μ g丙二醛)。

(4) 53W型紫外可见分光光度计。

3. 操作方法

(1) 称取融化猪油10g,于100ml具塞三角烧瓶中,加50ml氯乙酸液振荡30min,慢速滤纸过滤。

(2) 吸取滤液5ml于具塞试管中,加5ml TBA水溶液,加塞于90 $^{\circ}$ C水浴40min,取出冷却至室温,在532nm波长,1cm比色杯比色测定。

同时制标准曲线:0.0,0.5,1.0,1.5,2.0,3.0ml加三氯乙酸混合液补足至5ml,以下与试料管同步操作。

(3) 计算

$$\text{丙二醛 (mg \%)} = \frac{A \times 100}{10 \times \frac{5}{50} \times 1000}$$

式中: A——丙二醛相应含量(μ g)。

二、结果与讨论

1. 最佳波长的选择

原法中波长选择在538nm,灵敏度低,而实际测得结果,以532nm吸光度最高(表1),这与有关文献报导一致[3]。

2. 三氯乙酸对显色影响:原法中标准管与

表1. 波长选择

波长	538	535	533	532	531	530
光密度	0.451	0.501	0.516	0.516	0.513	0.503

试料管条件不一致,前者用水配制,后者含三氯乙酸。经试验证实,二者显色不一致,前者显色慢,后者快,如:同样浓度标准(5 μ g),在室温(14 $^{\circ}$ C)放1h后,前者不显色,后者因含有三氯乙酸显红色,经90 $^{\circ}$ C40分水浴后测得A值为0.735与0.893之别。所以标准管与试料

管三氯乙酸浓度必须一致。

3. 澄清度试验:原法中提出为了使溶液澄清透明,选用双层滤纸二次过滤,离心沉淀及氯仿处理手续,由于方法中只提到定性滤纸,没有说明何种规格(快、中、慢速),这就导致是否要上述麻烦操作处理问题,作者试验结果认为,只要用单层慢速定量滤纸过滤一次即可达澄清透明,也用不到离心和氯仿处理,其结果没有什么差异(表2)。

经氯仿处理后吸光度有稍微下降(表2.3),

表2. 单层慢速定量滤纸和氯仿处理结果比较(光密度)

过滤数	处理	1	2	3	4	5	6	7
1次	直接	0.210	0.455	0.795	0.202	0.434	0.715	0.763
	氯仿	0.209	0.452	0.777	0.219	0.442	0.716	0.755
2次	直接	0.208	0.458	0.793	0.197	0.438	0.715	0.765
	氯仿	0.203	0.447	0.773	0.206	0.427	0.705	0.745

相互之间t检验结果: $P>0.05$

这可能是丙二醛和TEP有部分溶解在氯仿中,为此氯仿处理更无必要。

脂溶性又是水溶性的,与乙二醛,丁二醛相似[4]。

表3. 标准曲线氯仿处理与不处理比较(光密度)

处理	1	2	3	4	5
直接	0.194	0.361	0.519	0.691	0.80
氯仿	0.184	0.352	0.507	0.681	0.798

表4. 萃取法与蒸馏法测定丙二醛比较(ppm)

样品	蒸馏法	萃取法
1	6.82	1.31
2	34.2	5.50

4. 萃取法与蒸馏法对丙二醛提取率不同,蒸馏法高于萃取法数倍(表4)。这两个原因,一是丙二醛部分存在于磷脂及细胞类脂质、线类体中,不易被水溶解;二是可能丙二醛既是

5. 标准曲线:二法标准曲线(表5);本法丙二醛0~4 μ g线性良好, $r=0.9999$,斜率 $b=0.192$, $a=0.0145$,最低检出量为0.06 μ g,原法 $r=0.9999$,斜 $b=0.169$, $a=0.0142$,本法比原法灵敏度高。

表5. 二法标准曲线比较(吸光度)

标准(μ g)	0.5	1	1.5	2	3	4	5
本法	0.109	0.207	0.303	0.395	0.589	0.784	—
原法	0.098	0.184	0.272	0.349	0.525	0.688	0.863

注:原法538nm波长。

6. 精密度:低浓度和中浓度分别测5次,本法变异系数5.5%和2.97%。

7. 回收率:猪油加标准低、中、高三个浓度作回收率,其结果本法93.23%;原法为

91%, 两法相接近 (表6)。

表6. 二法加标回收率

本 法			原 法	
加标量(μg)	n	回收率 %	n	回收率 %
1.0	3	93	5	88
2.5	6	93.1	6	93.2
4.5	3	93.6	5	91.8

8. 值得提出的加标回收率高, 并不等于从脂肪中萃取丙二醛高, 因为 TEP 与 丙二醛是二种不同物质, 如分子量不同(220:72); 反应性质有差异, 又如 TBA 与 TEP 反应在酸下也可显色, 而脂肪中丙二醛与 TBA 反应必须在酸性下显色。再 TEP 易溶于水相中, 加标后等于直接溶于水, 很少溶于脂肪试料中, 故回收率必定高。前面提到的蒸馏法比萃取法提取率高几倍, 这就说明加标回收率与实际提取率不相应之原因。

9. 干扰试验

在 7.5% 三氯乙酸条件下作干扰试验, 其结果: 甲酸白色沉淀干扰, $<0.1\text{mg}$ 不干扰; 乙醛橙色干扰, $<0.2\text{mg}/10\text{ml}$ 不干扰; 戊二醛桔色干扰, $<0.1\text{mg}/10\text{ml}$ 不干扰; 糖醛红色干扰, $<0.01\text{mg}$ 不干扰; 蔗糖黄色干扰,

$<1\text{mg}$ 不干扰。文献报导乙二醛等有干扰。

10. 目前国内外都未有丙二醛试剂生产出来, 所以目前丙二醛标准都用代用品。但在理论上应有丙二醛存在, 并从质谱分析中证实, 有待进一步探讨。另一些存在问题已在另一文中提到[2], 在此略。

三、小 结

本文对猪油中丙二醛检验方法——萃取法作了改进, 以单一慢速定量滤纸一次过滤, 即能达到原法中双层定性滤纸重复过滤, 离心沉淀及氯仿处理等烦琐手续; 对波长和酸度作了选择改进。改进法灵敏度提高; 精密度 $\text{cv} 2.97\% \sim 5.56\%$; 回收率 93.2% ; 斜率 $b=0.192$, 最低检出量 $0.06\mu\text{g}$ 。

参 考 文 献

- [1] 许龙福: 肉品中丙二醛测定方法研讨, 中国食品卫生杂志, 35, 1985。
- [2] 中华人民共和国国家标准——猪油卫生标准 GB 10146—88; 检验方法 5.1。
- [3] 袁厚积、赵邦锦译: 现代生物化学方法, 人民教育出版社, 北京, 58, 1980。
- [4] 甘肃师范大学: 简明化学手册, 甘肃人民出版社, 兰州, P.378, 426, 1980。

蘑菇罐头中肠毒素的检测

南京商检局 李 献 重庆商学院 李效静

金黄色葡萄球菌肠毒素 (简称肠毒素) 的检测, 以前多以猫、猴等动物实验为主。由于动物的来源有限, 个体差异较大而不能定量等原因, 使得动物实验的局限性很大。血清学试验方法具有灵敏度高、特异性强、简便快速等优点, 在毒素检测方面发展很快。为了检测出

口蘑菇罐头中的肠毒素, 我们特地引进了在美国反应良好的试剂盒, 进行酶联免疫吸附 (ELISA) 试验。该方法操作简便, 灵敏快速, 但由于是采用多价抗体而不能分血清型检出。据此, 我们采用反向间接血球凝集 (RPHA) 试验, 对阳性样品进行了肠毒素血