

谷物化学与品质分析

比色法测定粮食脂肪酸值的研究*

严梅荣

(南京财经大学食品科学与工程学院 210003)

摘 要 脂肪酸值是粮食储存品质的重要指标,本研究采用比色法来测定粮食脂肪酸值。本方法使用石油醚提取粮食脂肪酸,利用异辛烷,双-(2-基己基)磺基丁二酸钠和 pH=9.0 的酚红 Tris/HCl 溶液形成的透明反胶团体系进行比色分析。通过比色法和国标法相比较测定了玉米粉、糙米和小麦三种样品的脂肪酸值;结果表明:比色法和国标法两者之间相对误差分别为 18.65%,11.24% 和 6.61%。比色法的精密度较高,标准偏差相对值在 2.0% 和 5.3% 之间。比色法具有快速灵敏、样品和试剂用量少、测定结果客观、便于大批量样品测定等优点。

关键词 比色法 粮食 脂肪酸值 反胶团

粮食在储藏过程中受到温度、水分和酶的影响,其脂类物质易发生水解和氧化反应。水解造成粮食游离脂肪酸含量的增加,会对粮食的种用品质和食用品质产生不良影响。粮食发生霉变时,霉菌产生的脂解酶可促使粮食水解。由于脂肪酸值与储粮品质有很好的相关性,因此该值已作为粮食储存品质的重要指标,是粮食陈化判定的一个重要参数。鉴于脂肪酸值对于粮食品质的意义,对其测定方法已引起了广泛研究。

为了测定粮食脂肪酸值,通常先用有机溶剂将粉碎试样中的游离脂肪酸提取出来,并经过滤等方法将其与固体物质分离后再进行含量测定,所以对于粮食脂肪酸值测定方法的研究主要集中在溶剂提取分离及提取后的测定两方面。现行国标法 GB/T15684-1995 采用无水乙醇提取粮食脂肪酸,克服了过去使用苯带来的毒性及对环境的严重污染。此外,乙醇极性明显大于苯,增加溶剂极性可加速破坏脂肪酸与细胞膜和脂蛋白等物质之间的结合^[1],提高提取速度,适合快速测定法的需要,所以在 GB/T15684-1995 中提取脂肪酸的时间可减少至 10 min。但是溶剂极性的增大也增加了提取粮食非游离脂肪酸的酸性物质的可能性,同时乙醇可溶解醇溶性酶蛋白也会干扰测定。国标法采用滴定法测定游离脂肪酸含量,使用氢氧化钾乙醇溶液滴定中和提取液中的游离脂肪酸,以酚酞变色显示终点,该法简单易行,不需要特殊仪器和试剂。但是由于粮食游离脂肪酸是有机弱酸的混合物,其滴定终点突变不明显。同时在粮食游离脂肪酸提取过程中,一些色素进入提取液以及提取液变混浊等更增加了终点判断的难度,使得个体间判断终点差异增大。氢氧

化钾乙醇标准溶液较易吸收空气中的 CO₂,因为生成的碳酸盐在醇中溶解度比水中小^[2]。乙醇较易挥发也会影响标准溶液的浓度。此外滴定法难以实现自动化操作,不便于大批样品的测定。虽然为解决滴定终点判断困难,已有报道使用返滴定法^[3],活性炭脱色消除提取液色素干扰^[4],和使用电位滴定等方法^[5,6,7],但增加了操作的复杂性。

比色法是一种能够快速测定游离脂肪酸含量的有效方法。Walde 等人于 1990 年首次提出生成反胶团(Reverse Micelles)进行比色分析,用于测定脂解酶水解活性^[8],同时也将其作为一种新型、简单经济的方法测定植物油游离脂肪酸含量^[9]。本文研究对该法进行了一定改进,并将其应用于粮食脂肪酸值的测定。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

小麦、糙米、玉米粉:购于市场

1.2 试剂及仪器

1.2.1 试剂 三羟甲基氨基甲烷(tris),酚红,双-(2-乙基己基)磺基丁二酸钠,油酸,十六酸,石油醚等。

1.2.2 仪器 SHA-C 恒温振荡器,PHS-3C 精密 pH 计,752 紫外可见分光光度计,粮食粉碎机,离心机,电子天平等。

1.3 实验方法

1.3.1 已知脂肪酸的标准曲线

1.3.1.1 试剂的配制 配制 0.1 mol/L tris/HCl pH=9.0 的溶液。该溶液称 A 溶液。

* 通讯地址:南京市铁路北街 128 号(福建路校区)

配制 3 mmol/L 酚红 - 0.1 mol/L Tris/HCl 溶液,调 pH=9.0。该溶液称 B 溶液。

配制 0.1 mol/L 双 - (2 - 乙基己基)磺基丁二酸钠的异辛烷溶液。该溶液称 C 溶液。

将 0.375 mL A 溶液和 0.125 mL B 溶液加入到 50 mL C 溶液中,混合直至生成红色澄清透明液止。该透明液称为 D 液。

1.3.1.2 测定方法 将 C 溶液作为参比溶液,取 3 mL D 液加入到 1 cm 比色皿中,加入 0.1 mL 不同浓度油酸石油醚溶液,搅拌 1 分钟后于 560 nm 处测定吸光度,作出标准曲线。

按上述相同方法以十六酸代替油酸做出相应标准曲线。

1.3.2 比色法测定粮食脂肪酸值

1.3.2.1 粮食脂肪酸的提取 将 2 g 经粉碎过 40 目筛的粮食样品加入到 100 mL 具塞锥形瓶内,再加入 5 mL 60~90℃ 石油醚,摇匀后置于恒温振荡器内于 25℃ 时振荡不同时间,将锥形瓶倾斜静止数分钟,倾析上清液于离心管内,以 2500 r/min 离心 5 min,上层为澄清透明含有粮食脂肪酸的石油醚溶液。

1.3.2.2 测定脂肪酸值 将 C 溶液作为参比溶液,取 3 mL D 溶液加入到 1 cm 比色皿中,于 560 nm 处测定吸光度。再加入 0.1 mL 上述脂肪酸提取液,搅拌 1 min 后于 560 nm 处测定吸光度,按下式计算粮食脂肪酸值:

$$\text{粮食脂肪酸值} = \frac{|\Delta OD|}{K} \times \frac{3+0.1}{0.1} \times 5 \times \frac{10}{m \times (100-M)} \times 56.1$$

式中:ΔOD—两次测定的吸光度差值;

K—标准曲线的斜率;

m—试样质量,g;

M—试样水分百分率,%。

1.3.3 比色法 D 溶液的稳定性实验 配制 D 液,以 C 溶液作为参比溶液,每隔 1 h 于 560 nm 处测定 D 液吸光度。

1.3.4 国标法测定粮食脂肪酸值 见 GB/T 15684 - 95。

2 结果与讨论

2.1 两种脂肪酸的标准曲线

油酸和十六酸的标准曲线见图 1。图 1 显示:随着两种脂肪酸在比色皿中浓度的增加,吸光度不断减小。本比色分析法系利用生成反胶团原理,即将异辛烷,表面活性剂[双 - (2 - 乙基己基)磺基丁二酸钠]和少量水以一定比例混合形成光学透明的稳定反胶团体系。半径以纳米计的细小水滴在该体系中被有机溶剂包围,而表面活性剂的薄层则分布于两者之间。将酚红溶于反胶团 pH=9.0 的水相

中,酚红的 PK₁ 等于 7.8,在碱性介质中显红色,其水溶液于 560 nm 处有最大吸收。当介质 pH 下降时,酚红的分子结构发生变化,分子共轭体系减小,颜色也相应转变成黄色(弱酸或中性溶液),最大吸收出现在 430 nm 处。当将油酸、十六酸或粮食脂肪酸提取试样加入到上述反胶团体系,脂肪酸发生酸碱中和反应,使反胶团体系 pH 下降,颜色产生变化,其在 560 nm 处的吸光度相应减少。

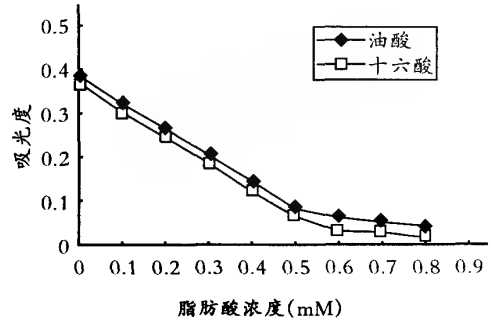


图 1 油酸和十六酸的标准曲线

从图 1 可知,当比色皿中脂肪酸浓度范围为 0~0.5 mmol/L 时,脂肪酸浓度与吸光度呈线性关系,可用于比色分析。油酸是一些粮食油脂品种中的主要脂肪酸,常用它来计算游离脂肪酸的含量。图 1 中油酸和十六酸的曲线未能重叠,但它们的直线部分基本平行,斜率基本相同,不能重叠是由于两者测定时 D 液的起始吸光度不同(见 2.2);当使用标准曲线斜率计算粮食脂肪酸值时,使用油酸或十六酸曲线不会影响测定结果。

2.2 比色法 D 液的稳定性

由于酚红的颜色及在 560 nm 处的吸光度均与 pH 值密切相关,处于 D 液反胶团体系中的酚红分子虽然被异辛烷包围,但仍有可能与空气中的 CO₂ 接触,从而使 D 液的 pH 值随时间下降,造成 560 nm 处的吸光度下降,图 2 清楚地表明了这一点。虽然吸光度下降影响到 D 液的起始吸光度值,但并不影响吸光度曲线的斜率,因而不会影响粮食脂肪酸值的测定结果。同时 5 h 以后的吸光度下降速度有所减慢。

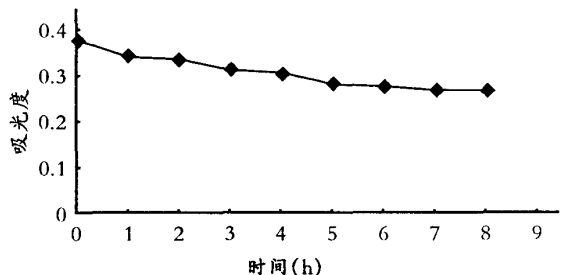


图 2 D 液吸光度随时间的变化

2.3 粮食脂肪酸提取时间对比色法测定结果的影响

图 3 为石油醚提取糙米时间对脂肪酸值测定结

果的影响。由图 3 可见,在 15 min 至 1 h 时间内,石油醚提取时间对糙米脂肪酸值测定结果影响较小,因而本实验在玉米粉、糙米和小麦的脂肪酸值比色测定中均采用 15 min 提取时间。石油醚极性小,能与 D 液很好互溶,且不影响 pH 值。

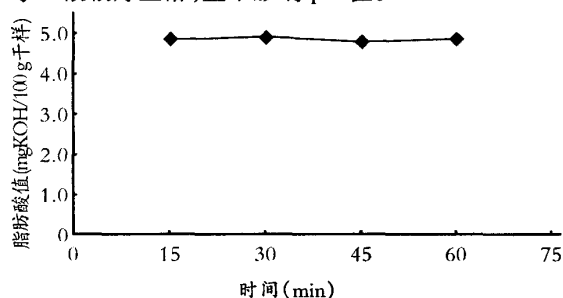


图 3 粮食脂肪酸提取时间的影响

2.4 国标法和比色法测定粮食脂肪酸值的结果比较

使用国标法和比色法来分别测定玉米粉、糙米和小麦中的脂肪酸值,测定结果见表 1。

表 1 两种方法测定脂肪酸值比较

(单位:mgKOH/100 g)

	比色法	国标法
玉米粉	73.78 ± 1.51	90.7
糙米	44.94 ± 1.10	40.4
小麦	31.13 ± 1.65	29.2

注:表中数据为三次测定平均值

从表 1 可知比色法测定玉米粉、糙米和小麦三个样品的标准偏差为 1.51、1.10 和 1.65,相对值为 2.0%、2.4% 和 5.3%,测定的精密度较高。其中小麦的脂肪酸值较低,使得测定的误差稍大。三个样品的比色法和国标法的测定结果之间的相对误差分别为 18.65%、11.24% 和 6.61%。其中玉米粉的两方法结果误差较大,这可能与玉米粉带色、滴定终点难以判断有关。

3 结论

比色法使用石油醚振荡提取粮食脂肪酸,在由异辛烷,双-(2-乙基己基)磺基丁二酸钠和 pH = 9.0 的酚红 Tris/HCl 溶液以一定比例混合形成的光学透明的反胶团体系中,粮食脂肪酸通过改变体系 pH 值影响酚红的吸光度,从而实现比色测定粮食脂肪酸值。通过使用国标法和比色法两种方法分别测定玉米粉、糙米和小麦样品中的脂肪酸值,两者测定结果的相对误差分别为 18.65%、11.24% 和 6.61%。比色法的精密度较高,标准偏差相对值分别为 2.0%、2.4% 和 5.3%。比色法具有样品和试剂用量少、操作简单方便、便于大批样品的测定以及避免用滴定法判断终点的主观性等优点。

参 考 文 献

- Christie W. W. Lipid Analysis, 2nd ed., Pergamon Press, Oxford, 1982, 17~19
- Tur' Yan Ya. I., Berezin O. Yu. Kuselman I. and Shenhar A. PH - Metric determination of acid values in vegetable oils without titration. JAOCS, 1996, 73(3): 295~301
- 肖学彬, 杨军. 改进粮食脂肪酸值测定方法的探讨. 粮食储藏, 2002(2): 34~36
- 史玮, 李蛟红, 赵群. 脂肪酸值测定方法的研究. 吉林粮食高等专科学校学报, 2001, 16(4): 12~14
- 杨慧萍, 宋伟, 曹玉华等. 电位滴定法测定粮食脂肪酸值的研究. 中国粮油学报, 2003, 18(6): 78~82
- 窦玉平. 电位滴定法测定玉米脂肪酸值. 粮油仓储科技通讯, 2004(3): 47~49
- 严永忠. 运用酸度计测定谷物脂肪酸值的探讨. 粮食与饲料工业, 2004(4): 45~46
- Walde P. A Colorimetric determination of fatty acids as a new assay of lipases in reverse micelles. JAOCS, 1990, 67(2): 110~115
- Walde P., Nastrozzi, C. Application of a new, simple and economic colorimetric method for the determination of non-esterified fatty acids in vegetable oils. Food Chemistry, 1991, 39: 249~256

(收稿日期: 2007 03 26)

STUDY ON COLORIMETRIC DETERMINATION OF FATTY ACID VALUE IN GRAIN

Yan Meirong

(College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210003)

Fatty acid value is an important quality index of stored grain. The determination of fatty acid value in grain by colorimetric method was proposed in this study. Fatty acid in grain was extracted with petroleum ether. The transparent reverse micellar solutions made of isooctane, bis (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate and phenol red - tris/HCl solution were used for colorimetric analysis of free fatty acids. Fatty acid values of samples of corn flour, coarse rice and wheat were determined by the colorimetric method and the national standard method. Results showed that the relative error between two methods were 18.65%, 11.24% and 6.61% respectively. The colorimetric method was precise with standard deviation varied between 2.0% and 5.3%.

There are some advantages of the colorimetric method. It is fast, sensitive. It needs small amount of sample and consumes less organic solvent. It is ideal for analysis of large number of samples.

Keywords: colorimetric method, grain, fatty acid value, reverse micelle

比色法测定粮食脂肪酸值的研究

作者: [严梅荣](#), [Yan Meirong](#)
 作者单位: [南京财经大学食品科学与工程学院, 210003](#)
 刊名: [粮食储藏](#) **ISTIC**
 英文刊名: [GRAIN STORAGE](#)
 年, 卷(期): 2007, 36(3)
 被引用次数: 2次

参考文献(9条)

1. Christie W W [Lipid Analysis](#) 1982
2. Tur' Yan Ya I. Berezin O Yu. Kuselman I. Shenhar A [PH-Metric determination of acid values in vegetable oils without titration](#) 1996(03)
3. 肖学彬, 杨军 [改进粮食脂肪酸值测定方法的探讨](#) [期刊论文]-[粮食储藏](#) 2002(02)
4. 史玮, 李蛟红, 赵群 [脂肪酸值测定方法的研究](#) [期刊论文]-[吉林粮食高等专科学校学报](#) 2001(04)
5. 杨慧萍, 宋伟, 曹玉华 [电位滴定法测定粮食脂肪酸值的研究](#) [期刊论文]-[中国粮油学报](#) 2003(06)
6. 窦玉平 [电位滴定法测定玉米脂肪酸值](#) [期刊论文]-[粮油仓储科技通讯](#) 2004(03)
7. 严永忠 [运用酸度计测定谷物脂肪酸值的探讨](#) [期刊论文]-[粮食与饲料工业](#) 2004(04)
8. Walde P A [Colorimetric determination of fatty acids as a new assay of lipases in reverse micelles](#) 1990(02)
9. Walde P. [Nastruzzi C Application of a new, simple and economic colorimetric method for the determination of non-esterified fatty acids in vegetable oils](#) 1991

相似文献(10条)

1. 学位论文 [魏静](#) [大豆皂甙提取纯化与快速检测技术的研究](#) 2007

大豆皂甙因具有消炎、抗肿瘤、增强机体免疫力、抗衰老、减肥等生理作用, 已成为近年来食品与营养学研究的热点。目前国内外研究多以大豆或大豆胚芽为原料采用溶剂法提取大豆皂甙, 存在成本高、溶剂用量大、原料利用率低等问题。豆粕是大豆浸出法制油的副产物, 富含皂甙等多种有效成分, 具有较高的研究和应用价值, 越来越受到人们的重视。为寻求简便、准确的皂甙含量检测方法、高效的提取工艺和易操作的纯化方法, 本文对大豆皂甙的快速检测方法和、提取与纯化条件进行系统的研究, 为大豆皂甙的提取和应用提供依据。

本文应用比色法测定大豆皂甙的含量, 确定了比色法测定的最佳条件; 以低变性脱脂豆粕为原料, 采用超声波结合溶剂法提取大豆皂甙, 通过单因素及正交试验确定了最佳工艺参数; 考察了大豆皂甙纯化条件对纯化效果的影响。主要研究结论如下:

1. 比色法测定大豆皂甙含量的最佳条件为: 以齐墩果酸为标准品, 确定吸收波长为560nm, 以5%香草醛冰乙酸溶液和0.8mL高氯酸溶液为显色剂, 60℃下显色15min, 测定吸光度, 该比色体系稳定, 所得回归方程线性可靠, 曲线高度显著, 相对标准差RSD为2.21%, 失拟性小, 测得数据可靠, 适于快速检测大豆皂甙含量。
2. 以脱脂豆粕为原料, 超声波结合乙醇法提取大豆皂甙。通过单因素试验及正交试验, 确定该法提取大豆皂甙的最佳工艺参数为: 料液比为1: 15, 乙醇浓度为70%, 超声波功率为250W, 在60℃下提取1h, 重复提取2次, 提取物中大豆皂甙的含量为70.6%。
3. AB-8大孔树脂作为吸附剂对大豆皂甙的吸附率为93.8%, 每20g干重AB-8大孔树脂可吸附洗脱出大豆皂甙0.2543g, 吸附平衡时间为12h。在洗脱条件为乙醇浓度为95%、溶剂样品比为200: 1、洗脱时间为6h时, 得到皂甙含量为80.7%。所得大豆皂甙产品具有特殊滋气味的淡黄色粉末, 可通过80目筛。产品中水分含量为2.43%、灰分为3.17%、皂甙含量为80.7%; 产品中菌落总数为80cfu/g、大肠杆菌不超过30(MPN/100g)、酵母菌、霉菌不超过100(cfu/g); 重金属砷和铅的含量分别为0.27mg/kg和0.16mg/kg。

2. 期刊论文 [胡漠彪](#), [胡烈宇](#), [罗玲](#) [测定粮食、水果、蔬菜稀土总量的一分析测试学报](#)2001, 20(1)

以一定比例的镧、铈、镨、钕、钐的氧化物配制的混合标准溶液在酸性条件下与二溴羟基偶氮胂反应, 632nm处的吸光度在0~1.5mg/L范围内符合比耳定律, 检出限为1.5μg/L, 相关系数为0.9995。方法不需加掩蔽剂。试样实测结果的相对标准偏差<7%(n=5), 加标回收率在84%~108%之间。

3. 期刊论文 [宋宏哲](#), [赵勇](#), [白志明](#) [比色法测定大豆皂甙的解析](#) -[黑龙江粮食](#)2007, ""(5)

采用香草醛-高氯酸比色法对大豆皂甙的含量进行检测, 通过分析几种显色反应方法, 确立了最佳显色条件: 向挥干的样品中分别加入0.2ml 5%香草醛溶液和0.8ml高氯酸, 于70℃水浴反应15min, 流水冷却, 加入5ml冰乙酸。此方法测定样品含量准确, 线性范围良好, 显色剂用量和稀释剂的选用可使成色溶液具有较强的吸收, 采用该方法做为大豆皂甙的检测方法最佳。

4. 期刊论文 [王咏梅](#), [刘建保](#) [粮食中磷化物定量测定的探讨](#) -[粮食与食品工业](#)2008, 15(4)

介绍了我国主要的仓库杀虫剂磷化物的危害、允许量及测定方法, 阐述了钼蓝比色法的测定原理以及各分析步骤, 总结了各步骤产生误差的原因及注意事项。

5. 学位论文 [中海涛](#) [黄曲霉毒素G₁>诱发小鼠肺腺癌的组织发生及其对肺泡II型上皮细胞影响的研究](#) 2007

黄曲霉毒素(Anatoxins, AF)是黄曲霉菌(Aspergillus flavus)等真菌产生的具有致癌作用真菌毒素, 包括AFB₁>、B₁>、B₂>、G₁>、G₂>和M₁>等。黄曲霉毒素G₁>(Aflatoxin G₁>, AFG₁>)在我国胃癌、食管癌高发区居民饮食中的检出率很高, 是当地粮食主要的污染真菌毒素。

II型肺泡上皮细胞(alveolar type II cell, AT-II)是肺泡上皮损伤修复的干细胞。外源性致癌因素如吸烟、粉尘、石英等作用于肺组织可引起AT-II损伤、修复和增生, 在外源性致癌因素刺激长期反复作用下, AT-II细胞可发生癌变而导致肺癌发生。

本研究室前期动物诱癌实验结果表明, AFG<1>具有致肺毒性, 经口给予AFG<1>可诱发实验小鼠肺腺癌发生。目前有关AFG<1>诱发肺腺癌研究局限于长期动物诱癌实验及AFG<1>诱发不同动物肺腺癌的验证方面, 对AFG<1>诱发实验动物肺腺癌的组织来源高缺乏研究, AFG<1>对实验动物肺组织及AT- II的短期影响也未见文献报道。

为进一步探讨AFG<1>诱癌机制, 研究AFG<1>诱发实验动物肺腺癌的组织学来源细胞类型, 探讨AFG<1>对肺组织和AT- II的影响及其可能机制。本研究在前期动物诱癌实验研究的基础上, 分析了AFG<1>诱发肺腺癌组织AT- II特异分化标志物SP-C和支气管无纤毛上皮细胞—C1ara细胞特异分化标志物CC-10表达情况; 观察了在整体水平上和细胞水平上AFG<1>急性作用对大鼠肺组织和AT- II结构和功能的影响及其致损伤生物学效应, 同时探讨了JNK信号转导通路在AFG<1>介导AT- II损伤中的作用。

本研究论文共分为五个部分:

1 黄曲霉毒素G<1>诱发大鼠肺腺癌组织发生的研究

目的: 探讨长期经口给予AFG<1>诱发NIH小鼠肺腺癌的组织学来源以及AFG<1>长期作用对小鼠肺泡上皮细胞SP-C和PCNA 蛋白表达的影响。

方法: 采用本实验室存档的AFG<1>长期灌胃NIH小鼠58周后存活小鼠肺组织取材石蜡包埋组织块标本24例作为研究对象, 其中 AFG<1>诱发的肺腺癌9例。以同期实验中灌灌生理盐水的12例NIH小鼠正常肺组织作为对照。采用免疫组化方法检测9例肺腺癌组织中SP-C、CC-10、P53和RasP<21>的表达情况。同时, 采用免疫组化方法检测不同剂量AFG<1>长期灌胃组和对照组肺组织肺泡上皮细胞SP-C和PCNA蛋白的表达情况。

2 支气管内给予黄曲霉毒素G<1>对大鼠肺组织的作用的研究

目的: 探讨一次性支气管内给予 AFG<1>对大鼠肺组织的影响。

方法: 按30 μg/kg body weight剂量经支气管一次性给予雄性SD大鼠AFG<1>处理。AFG<1>处理1、3、7和14d后, 分别处死实验动物。部分大鼠支气管插管收集支气管。肺泡灌洗液(BALF), 离心10min收集上清, 采用生化法检测乳酸脱氢酶(LDH)和碱性磷酸酶(AKP)活力。分别切取实验大鼠肺组织进行如下研究工作: 取1mm<3>大小的肺组织标本经2.5%戊二醛固定标本24h后, 以扫描电镜方法观察大鼠肺组织超微结构变化; 取部分肺组织4%多聚甲醛固定4h后, 常规石蜡切片制备, 采用原位杂交方法检测肺组织肿瘤坏死因子-α(TNF-α)mRNA的表达情况; 取部分肺组织10%多聚甲醛固定, 常规石蜡切片制备, 按S-P 法进行免疫组化方法检测核因子-κB(NF-κB)蛋白的表达; 取部分肺组织用生理盐水制成10%的肺匀浆, 采用活性氧(ROS)测定法按相应试剂盒操作程序检测肺组织中ROS(以H<2>O<2>、O<2>为)含量。

3 支气管内给予黄曲霉毒素G<1>对大鼠肺组织II型上皮细胞影响的研究

目的: 探讨一次性支气管给予AFG<1>对大鼠肺组织II型肺泡上皮细胞(AT- II)结构和功能的影响

方法: 实验动物模型同前一部分。AFG<1>处理1、3、7和14d后, 分别处死实验动物, 切取部分新鲜肺组织, 分别进行如下研究, 取1mm<3>大小的新鲜肺组织固定于4%戊二醛中, 待制备透射电镜电镜标本, 观察AT- II超微结构变化; 取部分肺组织10%多聚甲醛固定, 常规石蜡切片制备, 参照试剂盒说明书按S-P法进行免疫组化方法检测SP-C蛋白的表达; 部分肺组织固定于70%酒精, 采用FCM检测SP-C蛋白的表达; 取100mg肺组织加入 500 μL蛋白裂解液, 提取肺组织总蛋白, Western blot方法检测SP-C蛋白的表达; 部分肺组织液氮冻存, 提取组织RNA, RT-PCR方法检测SP-C和SP-A mRNA的表达情况。

4 黄曲霉毒素G<1>对体外培养的大鼠肺泡II型上皮细胞影响的研究

目的: 进一步探讨AFG<1>对体外培养的大鼠AT- II致损伤作用。

方法: 以酶消化法原代分离、培养大鼠 AT- II, 将10~15mL 细胞悬液接种于0.1 g · L<1>大鼠IggG处理后的平皿中纯化3h, 纯化后AT- II用20%DMEM 调整细胞浓度为(1~2) × 10<4> 9L<1>, 接种于96孔板、24孔板和细胞培养瓶中培养24h。用10%DMEM换液后继续培养12h, 实验组分别给予不同浓度(0.5、1.0和2.0mg · L<1>)的 AFG<1>处理, 溶剂对照组和对照组给予DMSO(0.4mL · L<1>)和生理盐水处理。AFG<1>作用24h后, 收集96孔板细胞采用噻唑蓝比色法(MTT)检测细胞存活率; 收集24孔板培养基上清液, 采用生化学方法检测上清液乳酸脱氢酶(LDH)和碱性磷酸酶(AKP)活力; 离心收集细胞于2.5%戊二醛中前固定24h, 超薄切片(厚度50nm), 醋酸铀、柠檬酸铅染色, 日立H-7500透射电镜观察 AT- II超微结构的改变; 收集24孔板细胞, Fluor-3/AM负载40min, 采用激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)检测细胞内[Ca<2+>]; 收集24孔板细胞, 采用免疫细胞化学、CLSM方法检测AT- II SP-C的表达; 离心收集细胞于70%酒精固定, 采用FCM方法检测AT- II SP-C蛋白表达。

5 JNK 信号转导通路在黄曲霉毒素G<1>诱导A549细胞损伤中的意义

目的: 探讨JNK信号转导通路在AFG<1>诱导A549细胞损伤中的作用及其机制。

方法:

5.1 AFG<1>处理24h对A549细胞毒性作用、JNK激酶活性、SP-C 表达及细胞内[Ca<2+>]影响的检测

A549细胞复苏培养后, 取对数生长期A549细胞, 用10%DMEM调整细胞浓度为(1~2) × 10<4> 8L<1>, 接种于96孔板。实验按AFG<1>处理8、16、24和48h不同时间分为4个时间点, 每个时间点按0.1、0.5、1.0 和2.0mg · L<1>AFG<1>依次给予AFG<1>处理、溶剂对照组和对照组分别给予DMSO(0.4mL · L<1>)和生理盐水处理。以MTT比色法检测 AT- II存活率。

5.2 JNK抑制剂SP600125预处理对AFG<1>诱导细胞毒性作用、JNK 激酶活性和SP-C 表达变化影响的检测

取对数生长期A549细胞用10%DMEM调整细胞浓度(1~2) × 10<4> 8L<1>, 接种于96孔培养板, 随机分为9组: 溶剂对照组、对照组、1 μM SP600125组、0.5 μM SP600125组、0.1 μM SP600125组、1 μM SP600125+AFG<1> 1.0mg · L<1>组、0.5 μM SP600125+AFG<1> 1.0 mg · L<1>组、0.1 μM SP600125+AFG<1> 1.0 mg · L<1>组和AFG<1> 1.0 mg · L<1>组。细胞培养24h后, 更换2%低血清DMEM培养基, 溶剂对照组和对照组给予DMSO(0.4mL · L<1>)和生理盐水处理。

结论:

1. 长期经口灌胃NIH小鼠AFG<1>所诱发的肺腺癌组织来源于AT- II, 肺腺癌组织中未见突变型P53和Ras P21蛋白表达; AFG<1>长期经口灌胃NIH小鼠促进肺泡上皮细胞SP-C和PCNA的表达。
2. 急性支气管给予AFG<1>可以增加处理大鼠BALF中LDH和AKP的活力, 导致大鼠肺组织超微结构出现损伤性变化; 激活肺泡细胞 TNF-α mRNA的表达, 降低肺组织抗活性氧能力, 但对肺组织NF-κB蛋白的表达没有影响。
3. 急性支气管给予AFG<1>可时间特异性地降低大鼠肺组织SP-C在蛋白水平上的表达, 降低SP-C和SP-A在mRNA水平的表达。
4. AFG<1>对原代培养的大鼠AT- II具有明显的致损伤作用, 可以增加大鼠AT- II细胞内[Ca<2+>], 降低原代培养的大鼠 AT- II SP-C蛋白的表达。
5. AFG<1>作用于A549细胞可以增加A549细胞内[Ca<2+>]、激活JNK蛋白激酶、降低A549细胞SP-C mRNA的表达; 给予JNK特异性阻断剂-SP600125预处理可以部分抑制AFG<1>对A549细胞的细胞毒性作用, 但对AFG<1>诱导SP-C mRNA表达降低没有影响。JNK 信号转导通路可能部分参与介导AFG<1>致AT- II损伤生物学作用。

6. 期刊论文 刘兰英, 许颖, 谭晓燕, 原蕾 粮食及饲料中磷含量几种测定方法 - 黑龙江粮食2003, "" (3)

用国标法、改进的国标法和钼蓝法等6种不同的方法对磷的标样进行了对比实验, 发现改进的亚硫酸钠法显色快速, 操作简便, 颜色稳定, 且与国标法试验结果基本一致, 是一种快速、准确的试验方法。

7. 学位论文 李增宁 河北省不同地区粮食赭曲霉毒素A污染情况及OA致细胞损伤作用的研究 2007

赭曲霉毒素(Ochratoxins, OT)是由赭曲菌(Aspergillus alutaceus)和纯绿青霉(Penicillium viridicatum)产生的有毒代谢产物, 包括七种结构类似的化合物, 其中以赭曲霉毒素A(Ochratoxin A, OA)为主, 毒性也最大。OA的分子量为404, 熔点169℃, 为无色晶体, 易溶于有机溶剂(三氯甲烷和甲醇)和稀硫酸氢钠溶液, 微溶于水。在紫外线照射下OA呈绿色荧光, 最大吸收峰为333nm。该化合物相当稳定, 一般的烹调 and 加工方法只有部分破坏。动物实验表明, 赭曲霉毒素A具有肾毒性、免疫毒性和致癌、致畸、致突变性。1993年国际癌症研究中心将赭曲霉毒素A列为可能的人类致癌物。一些国家已报道了从人全血、血清及人奶中检出赭曲霉毒素A。研究表明, 粮食污染是人类赭曲霉毒素A暴露的主要途径。研究分析粮食赭曲霉毒素A 污染情况对保障食品卫生和安全具有非常重要的意义。目前, 国外文献中已有不少粮食赭曲霉毒素A 污染情况的分析检测报道, 不少国家和国际组织还根据赭曲霉毒素A 的污染情况制定了人体赭曲霉毒素A 摄入量的限制标准。迄今为止, 国内有关粮食中赭曲霉毒素A的污染情况报道较少。目前, 有关粮食中赭曲霉毒素A的检测方法主要有薄层色谱法(TCL)、酶免检测法(ELISA)、高效液相色谱法(HPLC)等。我国谷物和大豆中赭曲霉毒素A的国家标准检测方法为TCL法, 属于目测半定量法, 最低检出量为10 μg/kg, 不适用于粮食中赭曲霉毒素A的准确测定和居民赭曲霉毒素A的膳食摄入量暴露评估研究。

为准确分析我国粮食中OA的污染情况, 进一步探讨OA污染的生物学意义, 本研究对OA的检测方法进行了改进, 建立了灵敏度高、重现性好、准确可靠的OA高效液相色谱荧光定量检测方法。对河北省不同地理环境的三个地区粮食中赭曲霉毒素A污染情况进行了定量检测。同时, 以细胞培养、FCM等方法研究了OA对外周血单个核细胞增殖和凋亡的影响, 探讨了OA对人正常肾小管上皮细胞株(HKC)和人肺泡II型上皮细胞(AT- II)细胞系A549凋亡的诱导

作用。在上述工作的基础上,采用Western Blotting 和免疫组化方法等方法在蛋白水平上对JNK通路在OA诱导细胞损伤中作用及OA诱导细胞损伤的机制进行了研究。

本研究共分为五部分

第一部分赭曲霉毒素A检测方法的建立

目的:建立SPE-C₁₈柱纯化和富集-高效液相色谱法荧光检测粮谷和酒类样品中赭曲霉毒素A的系列方法。

方法:1用三氯甲烷提取玉米、小麦和大麦样品中的OA后,经C₁₈固相萃取柱净化处理,以乙腈:水:乙酸(99:99:2)作为流动相,用带有荧光检测器的反相高效液相色谱法(激发波长为333nm,发射波长为460nm)检测OA含量;2选用C₁₈固相萃取小柱(250mg/3ml),用2ml乙腈和2ml水分别活化C₁₈小柱,30ml酒样通过C18固相萃取小柱,控制流速30滴/分。再用2ml乙腈溶液洗脱,最后将C₁₈小柱抽干。45℃下氮气吹干,流动相溶液稀释至0.5ml,0.45 μm微孔滤膜过滤后取20 μL 进高效液相色谱仪进行检测。

第二部分河北省不同地区粮食中赭曲霉毒素A污染情况研究

目的:分析河北省不同地理环境地区居民食用粮食OA污染情况,了解河北省居民OA的暴露量,揭示其对健康的可能影响,为减少OA污染及其影响奠定基础。

方法:抽样检测河北省不同地理环境的三个代表性地区粮食OA污染情况,三个地区分别为河北省南部邯郸市磁县、河北省中部石家庄市赞皇县和河北省北部塞外地区张家口市赤城县。分别入户采取中南部地区居民日常食用主粮小麦和北部地区居民日常食用主粮大麦样品。采用反相-高效液相色谱法检测OA含量;用三氯甲烷提取小麦和大麦样品中的OA后,经C₁₈固相萃取柱净化处理,以乙腈:水:乙酸(99:99:2)作为流动相,用带有荧光检测器的高效液相色谱仪(激发波长为333nm,发射波长为460nm)检测OA含量。

第三部分赭曲霉毒素A对体外培养HPBMCs增殖与凋亡的研究

目的:探讨OA对体外培养HPBMCs增殖与凋亡的影响,揭示OA暴露对机体免疫功能的可能作用。

方法:健康献血员抗凝静脉血200mL,采用蔗糖梯度离心法(ficoll-hypaque density gradient centrifugation)分离人外周静脉血单个核细胞,接种于含10%胎牛血清,10⁶ U/L青霉素,100mg/L链霉素的RPMI-1640培养液中,加入PHA并使其浓度为300 μg/mL,37℃、5%CO₂培养24h,更换不含PHA的新的培养液。HPBMCs随机分为4组:空白对照组、溶剂对照组、1 μmol/L OA和5 μmol/L OA实验组。实验组分别给予乙醇溶解的OA处理,使其终浓度分别为1 μmol/L和5 μmol/L,对照组和溶剂对照组分别给予等体积生理盐水和乙醇处理。细胞继续培养24h,常规收集细胞,采用流式细胞定量检测术(FCM)检测HPBMCs细胞凋亡率和增殖指数,以及细胞凋亡相关蛋白Caspase-3的表达。

第四部分赭曲霉毒素A对A-549和HKC细胞损伤的研究

目的:探讨OA处理对A549和HKC细胞增殖与凋亡的影响及可能机制,并观察OA对体外分离的DNA损伤作用。

方法:取对数生长期A549和HKC细胞,用10%DMEM调整细胞浓度为(1~2)×10⁶ L⁻¹,接种于细胞培养板和细胞培养瓶中。细胞培养24h后,随机分为4组:空白对照组、溶剂对照组、1 μmol/L OA和5 μmol/L OA实验组。实验组分别给予OA 1 μmol/L和5 μmol/L处理,溶剂对照组和对照组分别给予乙醇和生理盐水处理,继续细胞培养24h。采用MTT法检测A549和HKC细胞存活率。采用FCM检测A549和HKC细胞凋亡率,以及细胞凋亡相关蛋白Caspase-3的表达情况;采用紫外以及荧光光谱法检测了OA与小牛胸腺和鲑鱼精DNA的相互作用形成的DNA加合物。

第五部分 JNK 信号转导通路在赭曲霉毒素A诱导HKC凋亡中的作用

目的:探讨JNK信号转导通路在赭曲霉毒素A诱导HKC凋亡中的作用,以期进一步探讨OA诱导凋亡的可能机制。

方法

5.1 OA对HKC细胞JNK激酶活性和Caspase-3蛋白表达影响的检测

实验分组与处理同论文第四部分有关OA作用HKC细胞24h的实验分组和处理。细胞处理24h后,离心收细胞用于相关指标的检测。采用免疫细胞化学方法和Western blot方法检测HKC细胞p-JNK水平, JNK和Caspase-3蛋白表达。

5.2 JNK抑制剂SP600125预处理对OA诱导HKC细胞JNK激酶活性、凋亡率、Caspase-3蛋白表达和细胞损伤影响的检测

选择对数生长期的细胞(传代24h后),随机分为空白对照组、溶剂对照组、OA处理组和JNK抑制剂组。1 μM OA处理组给予终浓度为1 μM OA; JNK抑制剂组预先加入0.5 μM SP600125孵育30min后再加入1 μM OA;空白对照组加入生理盐水;溶剂对照组加入乙醇(1:500+DMSO(1:30000))。细胞培养24h后消化离心收集细胞。采用Western blot方法检测HKC细胞p-JNK水平和Caspase-3蛋白表达;采用流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率;采用MTT比色法检测HKC细胞的存活率。

结论

1.建立了反相-高效液相色谱法检测粮谷和酒类样品中赭曲霉毒素A的系列方法,本方法具有准确度高、精密性好和灵敏度高等优点。可定量检测粮谷和酒类样品中赭曲霉毒素A,检测结果准确可靠,提取净化过程简单等优点,为食品中赭曲霉毒素A污染情况调查和居民对赭曲霉毒素A的暴露评估提供了有力的技术支持和保障。

2.通过对河北省不同地区居民食用主粮调查发现:河北省中南部地区居民食用小麦中OA的检出率达39~34%,北部地区居民食用的大麦中OA的检出率达到35.48%,均明显高于国内已有的研究报道。赞皇县农村居民OA的日暴露量为1.17 μg/kg,磁县农村居民OA的日暴露量为0.31 μg/kg,张家口赤城农村居民OA的日暴露量为3.38 μg/kg,超过世界卫生组织/粮农组织联合专家委员会暂定的容许摄入量。可见河北省不同地理环境居民食用粮食中OA的污染均比较普遍,应当引起重视。

3. OA可以促进体外培养HPBMCs凋亡,上调Caspase-3蛋白表达,但对HPBMCs增殖没有明显影响。

4. OA可抑制体外培养A549和HKC细胞增殖,上调Caspase-3蛋白的表达,促进体外培养A549和HKC细胞凋亡。OA可能对体外分离的DNA没有损伤作用。

5. OA可以提高体外培养HKC细胞p-JNK水平,激活JNK途径。

6. JNK抑制剂SP600125预处理降低OA诱导的细胞凋亡、Caspase-3蛋白上调及细胞损伤作用,提示JNK信号转导通路部分参与OA介导细胞损伤和凋亡过程。

8. 期刊论文 [李莉华,刘友祥,余辉,LI Li-hua,LIU You-xiang,YU Hui 土壤粮食蔬菜中镉的催化极谱分析-预防医学情报杂志2007,23\(1\)](#)

土壤、粮食、蔬菜中微量镉的分析[1],一般使用双流脲比色法,原子吸收分光光度计法[2,3],双流脲比色法灵敏度低,样品用量大,方法受干扰因素多,使用有机溶剂及剧毒药品,对操作者及环境影响较大。原子吸收分光光度计法灵敏度高,准确,但需昂贵的仪器及严格的安装使用条件,目前难以具备此条件。

9. 学位论文 [赵书景 粮食、饲料中蛋白质含量测定方法的研究 2008](#)

蛋白质是粮食、饲料和食品中的重要营养成分,对机体的生长、发育具有不可替代的作用,但某些饲料、食品生产企业为了降低成本,向产品中添加非蛋白含氮物质冒充高蛋白产品。这种低蛋白饲料一方面影响动物生长,另一方面是危害畜禽健康并进而严重影响人类食品卫生安全。

目前,测定粮食、饲料以及食品等蛋白质含量的国家标准方法为凯氏定氮法,其最大缺点是将样品本身含有或添加的非蛋白含氮物与蛋白质中的氮一同测出并换算为蛋白质,结果使含非蛋白氮样品测定值比蛋白质实际含量明显偏高。解决该问题的途径是建立一种不受非蛋白氮等其它因素干扰、能够准确测定样品中蛋白质的方法来取代或作为凯氏定氮法的补充。

本研究通过比较目前各种测定蛋白质方法的优缺点,建立一种能够简便、灵敏、准确地测定粮食、饲料和食品中蛋白质的方法。研究主要包括以下内容:确定各种比色法稳定性和线性范围,干扰因素对测定方法的影响,样品前处理最佳消化条件,干扰物对消化样品测定的影响,并用凯氏定氮法对建立方法的验证。

确定了大米、玉米、大豆、面粉、玉米秸秆、苜蓿干草块、火腿、鲜肉等不同样品消化的最佳温度、NaOH浓度、时间、样品稀释倍数等。最佳消化条件是:称取粉碎样品0.3g;NaOH浓度为1.0 mol/L(面粉采用0.25 mol/L除外);消化温度为水浴50℃;消化时间为面粉0.5h,大米粉、玉米粉、鲜肉、火腿等1h,大豆粉2h,苜蓿干草、玉米秸秆4h;稀释倍数除大豆1000倍外,其它均为500倍。

按照上述消化条件用Lowry法进行实际样品测定,结果与凯氏定氮法测定结果比较基本吻合,符合度从95.2%(大豆)至110%(玉米)不等,其它大多数种类样品接近100%。添加干扰试验表明,非蛋白含氮物中三聚氰胺、硫酸铵、尿素、生物蛋白精添加浓度333.3g/kg仍无干扰作用。缩二脲添加浓度66.7g/kg无干扰。氯化钠、蔗糖、柠檬酸钠、维生素C、维生素B1、肌醇、多种氨基酸(酪氨酸除外)等在添加常规用量数倍不产生明显干扰。

实验结果表明,Lowry法具有灵敏度高、结果比较准确、不受大多数干扰物影响,操作简便、适合大量样品测定等优点。

本研究建立的样品碱消化、Lowry法可以作为粮食、饲料及食品中真蛋白质的测定方法，对防止添加非蛋白含氮物冒充蛋白质具有积极的作用。

10. 期刊论文 [周传欣, ZHOU Chuan-xin 测定马拉硫磷过程中乳化物的消除 - 吉林粮食高等专科学校学报](#)2001, 16(1)

主要对国家标准方法(GB5009, 36-85)—铜络合物比色法测定马拉硫磷含量过程中出现乳化现象进行研究, 对标准方法用离心法分离乳化物质进行改进, 从而减少测定时对样品的损失, 缩短测定时间, 保证国际法中严格的时间要求.

引证文献(2条)

1. [赵宁, 赵秀芳, 赵来喜, 戎郁萍 不同燕麦品种在坝上地区的适应性评价](#)[期刊论文]-[草地学报](#) 2009(1)

2. [周延智 谷物脂肪酸值变化及测定方法的研究进展](#)[期刊论文]-[粮油加工](#) 2008(6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_lssc200703011.aspx

授权使用: 沈阳大学(sydx), 授权号: 54e445ef-d6c6-42c7-ab05-9dc400b72952

下载时间: 2010年7月31日