

“九二〇”工作进展 (十)

猪肉中“九二〇”残留量的测定方法

中国科学院上海生物化学研究所



农业技术资料 第 66 号

上海人民出版社

猪肉中“九二〇”残留量的 测定方法

目前有些单位正在进行“九二〇”（即赤霉素）催肥生猪的科学实验。生猪经注射“九二〇”后，是否会引起肉中“九二〇”的积累呢？是否会因“九二〇”残留量太多，而影响猪肉的质量呢？“九二〇”催肥生猪猪肉中的“九二〇”残留量测定，是需要解决的一个实际问题。

测定“九二〇”含量的方法一般采用荧光比色法、溴酸钾滴定法、高锰酸钾比色法等。但在注射“九二〇”催肥生猪时，“九二〇”注射量小，一般不超过二万单位（1单位即1微克，相当于1毫克的千分之一，或1公斤的10亿分之一），而且“九二〇”在猪体内广泛分布于各部位，又经代谢、排泄，猪肉中“九二

〇”残留量极微，用这些方法难以测出；同时，猪肉组织中成分复杂，应用这些方法测定时有较大干扰。因此，测定猪肉中“九二〇”残留量，要选用其他特异性较强的微量测定方法。经过试验，确定了“大麦胚乳法”和“羊蹄叶片法”测定猪肉中“九二〇”的残留量。这两种方法的优点是灵敏度较高，可以测出每克猪肉中万分之一单位（ 10^{-4} 微克）的“九二〇”含量，特异性较强，而且操作简便，试验材料（羊蹄叶片、大麦胚乳）容易得到，对于测定猪肉中“九二〇”的残留量是适用的，而且，也可用于其他“九二〇”样品的测定。

由于含有“九二〇”的植物相当普遍，猪的多种饲料中都有“九二〇”，因此，在猪肉中常可测出微量“九二〇”的存在。要知道生猪经注射“九二〇”后猪肉中“九二〇”的残留量，需将注射“九二〇”的试验猪的测定值与未注射“九二〇”的对照猪的测定值相比，它们的差值就是因注射“九二〇”引起的残留量。

结合催肥生猪实验，我们曾经用这两个方法作了一定数量的测定，没有发现因注射“九二〇”而引起猪肉中“九二〇”残留量增加的情况。但我们测定的样品较少，而随着猪的品种、生长情况、饲养条件、注射“九二〇”的情况等等变化，猪肉中“九二〇”的残留量亦有所变化。因此，关于注射“九二〇”后猪肉中“九二〇”的残留量，还需在“九二〇”催肥生猪实验中进一步测定和研究。

事物都是一分为二的。“羊蹄叶片法”和“大麦胚乳法”虽能基本达到测定要求，但还有一些不完善的地方，例如精确度较差，每次测定时间较长，需要二至四天等。下面介绍“羊蹄叶片法”和“大麦胚乳法”供有关单位进行测定时参考。

羊蹄叶片法

一、原 理

羊蹄叶片摘下后，放置暗处，一般约经2~4天，叶片就衰老发黄，叶细胞衰老程度，可用叶片中存留下来的叶绿素含量表示出来。当叶片接触“九二〇”溶液后，叶细胞的衰老能延缓，使叶绿素存留。在一定的浓度范围内（每毫升含“九二〇” $10^{-4} \sim 10^{-1}$ 微克），叶绿素存留量与“九二〇”浓度成正比关系。利用这一特性，测定未知样品作用过的叶片中叶绿素含量，对照标准浓度“九二〇”溶液引起的叶绿素存留含量曲线，就可算出未知样品中的“九二〇”含量。

二、材料、仪器和试剂

1. 材料：羊蹄（见图1）

羊蹄别名土大黄，属蓼科，酸模属。有关羊蹄的植物形态、特征、生长环境等详细介

绍，请参阅《常用中草药图谱》(中国医学科学院药物研究所革命委员会、浙江中医学院革命委员会编，人民卫生出版社出版，1970年)。

2. 仪器：

组织捣碎器（或组织匀浆器）

72型分光光度计
(或光电比色计)

800型离心沉淀器
保温箱

3. 药品：

“九二〇”结晶（工业产品，作标准用）

95%乙醇(化学纯)

硫酸庆大霉素粉剂(作防止染菌用，亦可改用其它抗菌素)

4. 玻璃器材和其他：

试 管：直径 15 毫米，长 150 毫米

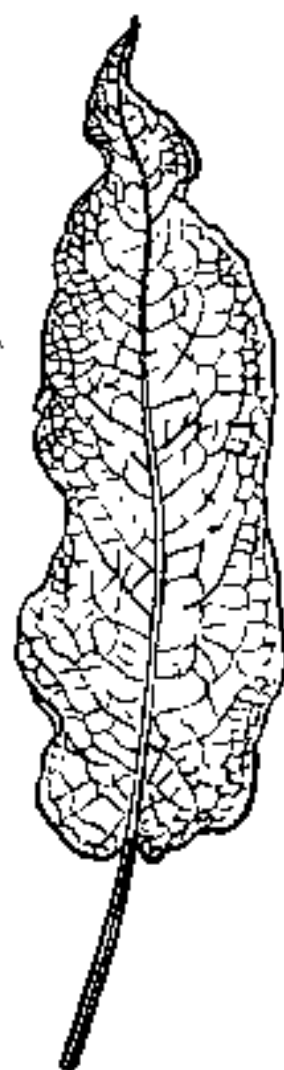


图 1 羊蹄叶片

容量瓶: 10 毫升, 100 毫升
刻度吸管: 0.2 毫升, 0.5 毫升, 1.0 毫升, 5.0 毫升, 10.0 毫升
玻璃滤器: 5 号滤板(滤板平均洞孔 2~5 微米)或 6 号滤板(滤板平均洞孔小于 2 微米)的玻璃滤器
离心管: 有 5 毫升刻度的和没有刻度的
培养皿: 直径 15 厘米
量筒: 100 毫升
三角瓶: 100 毫升
玻璃漏斗: 直径 3~4 厘米
水浴锅(铜锅、铝锅、搪瓷杯皆可)
普通滤纸
剪刀、镊子、打洞器

三、测定方法

1. 猪肉样品处理:

①取待测猪肉(瘦肉即肌肉组织, 或肥肉即

皮下脂肪) 1.5 克, 剪碎, 加入 6.0 毫升 10% 乙醇, 用高速组织捣碎器处理二分钟制成匀浆(在冰浴中进行)。将制得的匀浆, 在沸水浴中边搅拌边加热一分钟后, 趁热过滤, 滤液在 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩, 以去除乙醇。在浓缩液内加入 0.5 毫升浓度为 200 微克/毫升的硫酸庆大霉素(亦可以采用链霉素、氯霉素等其他抗菌素), 用蒸馏水调整至最后体积为 5.0 毫升, 离心, 取上清液, 即为待测样品。

如有染菌现象发生, 则需采用无菌操作。将上述待测样品在无菌室内, 经 5 号或 6 号砂芯漏斗过滤, 取滤液作为测定用。

2. 样品测定:

采取较老而且色泽均匀的羊蹄叶片, 洗净, 用滤纸吸干叶面水分, 用打洞器切取直径 6 毫米的圆形片, 切取时尽量避开大叶脉。将叶片的轴外面(即叶背面)向下, 安放在含有 0.2 毫升待测样品及不同浓度的“九二〇”标准溶液、蒸馏水的圆形滤纸片上, 滤纸片的直径为 2.5 厘米, 每一张滤纸片上放六块

从不同叶子上取下的圆形叶片。再将滤纸片放在大培养皿中，培养皿盖内衬湿滤纸以保持湿度（如图2）。然后将培养皿放在暗处，于 $25\sim 30^{\circ}\text{C}$ 保温。

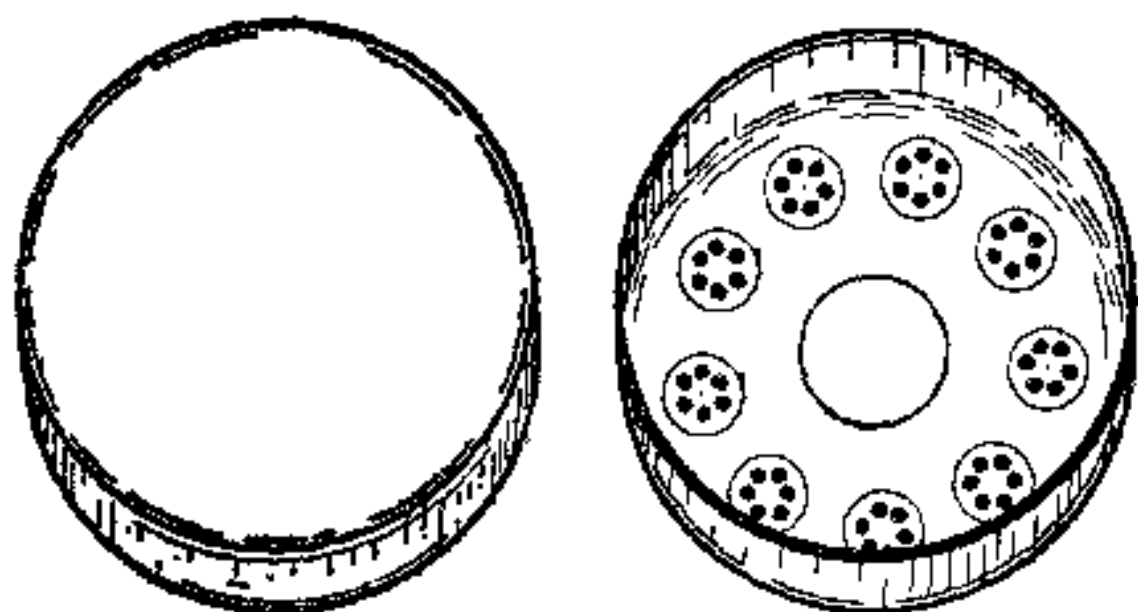


图2 羊蹄叶片法实验装置

右为培养皿底部，中间一张滤纸片用蒸馏水润湿，以保持湿度周围圆形滤纸片分别含有蒸馏水、不同浓度的“九二〇”标准溶液和待测样品溶液，每张滤纸片上安放六块圆形小叶片。

左为培养皿盖，内衬有湿滤纸。

当对照叶片（就是放在含有蒸馏水滤纸片上的叶片）的叶绿素几乎完全消退时（一般

约2~4天), 将各滤纸片上的圆形叶片分别放入各试管中, 加入4.0毫升95%乙醇。试管加塞后, 放于70~75°C水浴中抽提至叶片无绿色为止(约需半小时至一小时), 或在上述水浴中放置几分钟后, 取出试管用玻璃棒将圆形叶片贴在管壁上挤压, 至叶片无绿色为止, 另外也可以在加入95%乙醇后抽提过夜。以上各种用95%乙醇抽提叶绿素的方法, 可按具体情况选用。

用72型分光光度计(在665毫微米)或用光电比色计(660毫微米滤波片)测定抽提液的光密度, 如果抽提液混浊, 可将抽提液过滤, 然后再进行比色测定。将待测样品叶片抽提液的光密度值, 减去对照叶片抽提液的光密度值, 再由同时制作的“九二〇”标准曲线, 推算出待测样品中“九二〇”的含量。

注射“九二〇”的试验猪猪肉中“九二〇”含量减去未注射“九二〇”的对照猪猪肉中“九二〇”含量, 就是因注射“九二〇”引起的猪肉中“九二〇”残留量。

由于不同叶片间个体差异极大，为了避免因叶片个体差异引起的误差，除每次需同时制作“九二〇”标准曲线外，在测定时，每组滤纸片（即包括“九二〇”标准溶液，待测溶液，对照的蒸馏水溶液）上面安放的6块圆形叶片，必须具有等量的从不同羊蹄叶片上切下的圆形叶片。例如：测定时有“九二〇”标准溶液5个，待测样品溶液2个，对照的蒸馏水溶液1个，可用8张滤纸片构成一组。假定选取的一张羊蹄叶片，共切下6毫米圆形叶片26块，那末在这8张含有不同溶液的滤纸片上各放3块圆形叶片，而多余的2块圆形叶片弃去。另外，再选取羊蹄叶片，继续按此程序在每张滤纸片上共放6块圆形叶片。

3. “九二〇”标准曲线的制作：

取不同浓度的“九二〇”标准溶液（包括 10^{-4} 微克“九二〇”/毫升， 10^{-3} 微克“九二〇”/毫升， 10^{-2} 微克“九二〇”/毫升和 10^{-1} 微克“九二〇”/毫升）和蒸馏水各0.2毫升，分别滴加在各滤纸片上。按羊蹄叶片法的“样品

测定”所讲的步骤进行测定。将比色测定的不同浓度“九二〇”标准溶液光密度值减去对照的蒸馏水溶液光密度值。以这些光密度值作纵座标，“九二〇”标准溶液浓度的对数值作横座标，制作出“九二〇”标准曲线(图3)。

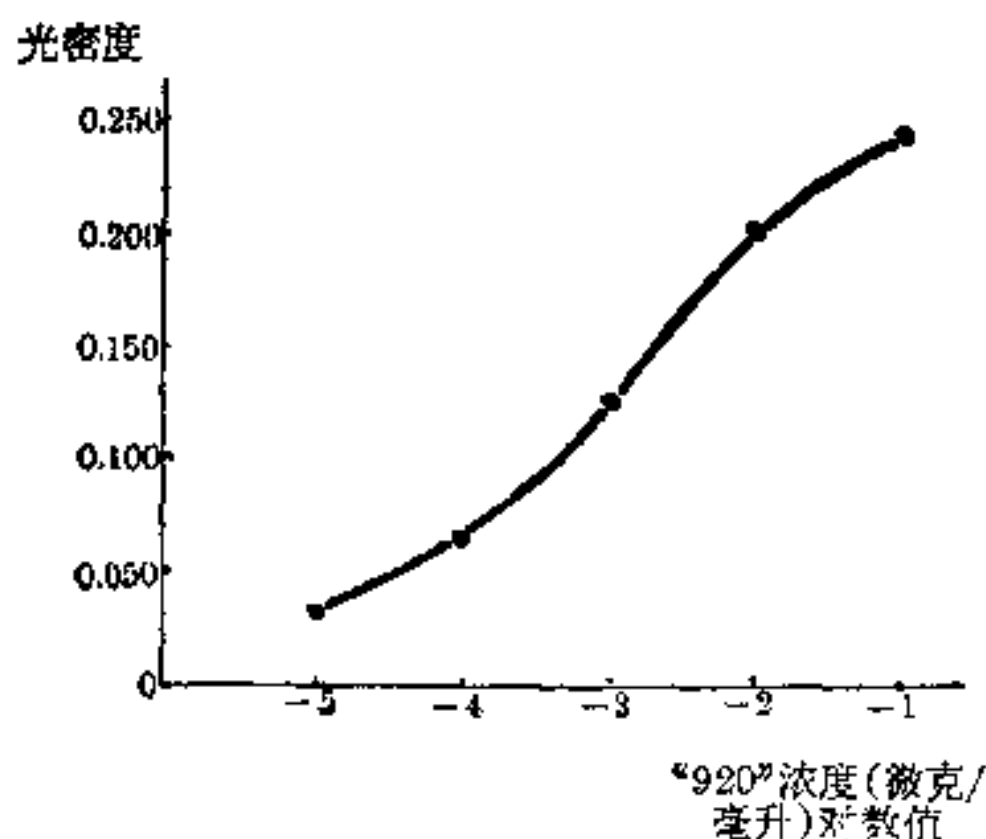


图3 羊蹄叶片法“九二〇”溶液标准曲线

注： 10^{-5} 微克“九二〇”/毫升因光密度值较低，误差大，所以在制作“九二〇”溶液标准曲线时，这个浓度亦可不用。

以上述不同浓度“九二〇”标准溶液制作的标准曲线和不同浓度“九二〇”的猪肉抽提液（即在猪肉中加入不同浓度“九二〇”标准溶液，制成匀浆，再抽提而得到）制作的标准曲线基本一致。因此，用不同浓度的“九二〇”标准溶液制作“九二〇”标准曲线即可。

附：“九二〇”标准溶液的配制

(1) 配制“九二〇”标准母液：准确称取纯“九二〇”结晶（市售的“九二〇”结晶一般含量为80~90%左右，应折算成100%）10毫克，放于100毫升的容量瓶中，加蒸馏水至刻度，即成每毫升含有100微克的标准母液。

(2) 配制“九二〇”标准溶液：取每毫升含100微克的母液1毫升放于100毫升容量瓶中，加蒸馏水至刻度，即配制成每毫升含有1微克的标准溶液。然后再取每毫升含1微克的标准溶液10毫升于100毫升容量瓶中，加

蒸馏水至刻度，即配制成每毫升含有0.1微克 (10^{-1} 微克) 的标准溶液，用同样方法逐步配制每毫升含有 0.01 微克 (10^{-2} 微克)，0.001 微克 (10^{-3} 微克)，0.0001 微克 (10^{-4} 微克) 的“九二〇”标准溶液。

标准溶液配成后，最好能在冰箱内保存，每次用时倒一些出来，以免污染。不宜长期存放使用。

大 麦 胚 乳 法

一、原 理

“九二〇”能够促进大麦胚乳（即切去胚芽的无胚大麦）糖化酶类的活动，产生还原糖，还原糖的含量可以用定糖方法测定。在一定的浓度范围内（每毫升含“九二〇” $10^{-4} \sim 10^{-1}$ 微克），“九二〇”的浓度和还原糖量的增加成正比。利用这一特性，测定未知样品作用过的大麦胚乳保温液中还原糖含量，对照不同浓度“九二〇”标准溶液引起的还原

糖增加曲线，就可算出未知样品中的“九二〇”含量。

二、材料、仪器和试剂

1. 材料：大麦

2. 仪器：

组织捣碎器(或组织匀浆器)

72 型分光光度计(或光电比色计)

800 型离心沉淀器

保温箱

3. 药品：

“九二〇”结晶(工业产品，作标准用)

95% 乙醇(化学纯)

硫酸庆大霉素粉剂(作防止染菌用，亦可改用其它抗菌素)

硫酸(化学纯)

无水碳酸钠(化学纯)

酒石酸钾钠(化学纯)

硫酸铜(化学纯)

碳酸氢钠(化学纯)

硫酸钠(化学纯)

钼酸铵(化学纯)

砷酸钠(化学纯)

4. 玻璃器材和其它:

三角瓶: 250 毫升, 100 毫升

烧杯: 600 毫升, 400 毫升, 100 毫升

量筒: 1000 毫升, 100 毫升

容量瓶: 100 毫升, 10 毫升

刻度吸管: 10.0 毫升, 5.0 毫升, 2.0 毫升, 1.0 毫升, 0.5 毫升, 0.2 毫升

玻璃滤器: 5 号滤板(滤板平均洞孔 2~5 微米)或 6 号滤板(滤板平均洞孔小于 2 微米)的玻璃滤器

离心管: 有 5 毫升刻度的和没有刻度的

平底小瓶: 直径 3 厘米, 高 6 厘米(或底部直径为 3 厘米的其他

小瓶)

试 管: 直径 15 毫米, 长 150 毫米

玻璃漏斗: 直径 3~4 厘米

水浴锅(铜锅、铝锅、搪瓷杯皆可)

普通滤纸

剪刀、镊子、刀片

磺酸型阳离子交换树脂

三、测 定 方 法

1. 大麦胚乳的处理:

将有壳大麦浸于新鲜配制的 50% 硫酸(体积比)内, 于室温 20~30°C 保温 3 小时, 至麦壳呈深棕色, 而麦粒本身未被烧坏, 用无菌蒸馏水洗大麦至少 10 次, 在洗涤时, 必须剧烈振荡, 以去除麦壳和酸液。经去壳消毒处理之大麦泡于无菌蒸馏水内, 于冰箱存放 20~24 小时, 取出, 横向切除胚芽(见图 4), 就是可用作测定的大麦胚乳。

2. 定糖试剂的配制: