

异硫氰酸酯(ITC)的硫脲紫外法和银量法测定对比研究

潘雷^{1,2}, 李爱科^{*}, 程茂基, 郝斌¹, 张晓林, 栾霞, 周乃继²

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036; 2. 国家粮食局科学研究院, 北京 100037)

摘要 利用硫脲紫外法对菜籽饼粕中硫甙、OZT 含量进行了测定, 根据硫甙降解原理, 推导出用硫脲紫外法测定 ITC 含量公式, 并与银量法测定 ITC 结果对比分析, t 检验表明两者差异不显著 ($P > 0.05$); 线性分析, 两者相关系数 $R = 0.9995$ 。由此建立了一个适用于饲料行业中的快速和大批量同时测定硫甙、ITC 和 OZT 的方法, 该方法操作简单、快速, 使用普及面更广。

关键词 硫脲紫外法; 银量法; ITC

中图分类号 O652 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)17-07823-03

Study on the Determination of Isothiocyanate Content with Thiourea Ultraviolet Method and Argentimetry

PAN Lei et al (College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract The content of glucosinolate and oxazolidine in rapeseed cake was determined by using thiourea ultraviolet method. According to the degradation principles of glucosinolate, the formula for determination of isothiocyanate in rapeseed meal was derived. There was no difference on the determination of isothiocyanate by t test ($P > 0.05$) and the correlation coefficient R was 0.9995 by contrasting analysis. Thus, a method for fast simultaneous determination of glucosinolate, isothiocyanate and oxazolidine in feed industry was established, which was operated easily and used widely.

Key words Argentimetry; Thiourea ultraviolet method; Isothiocyanate

菜籽饼粕营养丰富, 是潜力很大的优质蛋白饲料资源。但菜籽饼粕含有硫甙, 硫甙本身无毒, 而在芥子酶的作用下会转化成异硫氰酸酯、噻唑烷硫酮、硫氰酸酯或腈类等毒素, 对动物机体有很大的毒害作用。OZT 和 ITC 更是菜籽饼粕主要的质量指标, 因此快速测定硫甙及其水解产物 OZT、ITC 具有十分重要的意义。若单独测定各毒素, 必将耗时、耗财、耗力, 不利于大批量的测定。这就需要寻求一种快速、准确、能够同时测定各毒素的方法。

ITC 国标测定方法气相色谱法^[1]灵敏度较高、操作简单、测定快速, 可定量到所有的单体 ITC, 检测限达 1~5 ng/kg, 在准确度和重现性上都有较好的结果, 可作为测定 ITC 的仲裁方法(一法)。但由于气相色谱法需要昂贵的气相色谱仪、精酶及各种 ITC 标准品, 一般的饲料厂或油厂没有能力购买和维护仪器, 分析费用也大; 而国标银量法^[1]能较简单直观地判定菜粕中 ITC 含量大小, 可用粗酶且无需标准品, 成本也较低, 检测限可达到 20~50 ng/kg, 但操作比较繁琐、耗时, 需要复杂的蒸馏装置, 每人每天仅能测 5~6 个样。

硫脲紫外法^[2-14]的原理是菜籽粕中硫甙在 pH=7 的条件下, 可被芥子酶水解生成异硫氰酸酯, -OHITC 在极性溶剂中可自动环化成噻唑烷硫酮, ITC 与氨作用生成的硫脲和 OZT 在紫外区 245 nm 处有最大吸收, 可通过测定二者在紫外区的吸收峰, 计算出它们的含量。硫脲紫外法最早由加拿大大学者 Wetter 和 Youngs(1976) 建立用于测定硫甙的加拿大国标, 它测定的是 ITC 与 OZT 混合物, 以 ITC+OZT 表示硫甙含量, 并可同时测定 OZT 含量, 但无法用于测定 ITC 的含量。笔者在前人研究硫脲紫外法的基础上, 利用粗芥子酶, 根据硫甙降解原理, 推导出 ITC 的计算公式, 可同时测定菜籽饼粕中硫甙、ITC 和 OZT 含量, 建立了一个适合于饲料工业上的较为简便、快速和经济有效的毒素测定方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料。菜籽、脱皮菜仁、脱皮冷榨饼、脱皮冷榨膨化饼、脱皮冷榨浸出粕、脱皮热榨饼等均采自武汉中排油厂; 市售印度进口菜粕。

1.1.2 试剂。磷酸、柠檬酸、磷酸氢二钠、二氯甲烷、95%乙醇、氨水。粗芥子酶: 取白芥子(72 h 发芽率 > 75%, 存储时间 < 2 年) 约 200 g, 粉碎过 60 目筛, 取筛下物于烧杯内, 加石油醚(沸点 60~90 °C) 200 ml, 搅拌 5 min, 静止到澄清, 过滤, 用石油醚冲洗多次, 直至脂肪除净。然后吹干石油醚, 再过 60 目筛, 取筛下物于干燥玻璃瓶内, 4 °C 保存, 有效期 50 d。

1.1.3 仪器。分析天平; 具塞离心管; UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计; LDZ5-2 型离心机; 控温水浴锅; 微量注射器; VORTEX-2 型振荡器; 空气浴振荡器; 移液枪。

1.2 试验方法

1.2.1 硫脲紫外法。四分法将样品缩分至 200 g 左右, 取一定量样品置 105 °C 烘箱中 30 min(注意: 温度达到 105 °C 时再放样品, 样品容器应密闭), 使样品本身芥子酶失活。然后碾碎装入滤纸包, 置索氏脂肪抽提器中, 加无水乙醚至滤包淹没, 浸泡 12 h, 在 50~60 °C 水浴锅回流抽提 6~8 h。风干, 40 °C 恒温箱干燥 2 h, 碾磨过 60 目, 自封袋保存(除尽脂肪)。称取上述样品 0.1 g(精确到 0.0001 g), 放入 10 ml 具塞离心管中(加 1 粒玻璃珠), 加 50 ng 粗芥子酶, 1 ml pH 值 7.0 缓冲液, 2.5 ml 二氯甲烷, 盖紧塞子, 漩涡混合器充分混合, 再于电动振荡器上振荡 2 h(30 °C, 200 r/min)。将反应后的样品离心(3500 r/min, 15 min), 离心后分为 3 层, 上层为水层, 中间为饼粕, 下层为含酶解产物的二氯甲烷。吸取下层 50 μl 二氯甲烷 2 份, 一份加 20% 氨-乙醇 3 ml, 一份加 95% 乙醇 3 ml, 漩涡混合器充分混合, 50 °C 水浴 2 h, 冷却。用紫外分光光度计在 235 nm、245 nm、255 nm 波长处测定吸光度。空白除不加试样外, 其他处理均与样品处理一致。

加 20% 氨-乙醇是测定 ITC, 即是总的硫甙含量, 计算公式为:

$$ITC = OD_{245} \text{校正} \times 28.55 (\text{ng/g})$$

基金项目 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAD12B04)。

作者简介 潘雷(1984-), 男, 安徽旌德人, 硕士研究生, 研究方向: 动物营养与饲料科学。* 通讯作者, E-mail: Lak@chinagrain.org。

收稿日期 2009-03-09

$OD_{245} \text{校正} = OD_{245} - (OD_{235} + OD_{245}) / 2$ (注: ITC = ITC + OZT)。

加95%乙醇是测定OZT, 计算公式为:

$$OZT = OD_{245} \text{校正} \times 22.1 (\text{ng/g})$$

$$OD_{245} \text{校正} = OD_{245} - (OD_{235} + OD_{245}) / 2$$

1.2.2 硫脲紫外法测定ITC 推导换算公式。以丁烯基硫脲(A, 分子量412)表示硫脲, 3-丁烯基异硫氰酸酯(B, 分子量113)表示硫脲法测得异硫氰酸酯, 5-乙基-2-噁唑烷硫酮(C, 分子量129)表示噁唑烷硫酮。根据一分子硫脲可降解为一分子异硫氰酸酯, 可推导出 $A = 3.646B$; 同理, 一分子OZT由一分子-OHITC 极性条件下环化而来, 故可用硫脲法测得ITC 总量, 扣除OZT 换算成的ITC 量, 即可推导出银量法所测ITC 量(D, 丁基异硫氰酸酯表示, 分子量115) (图1)。由图1

推导换算公式: $A = \frac{412}{113}B = 3.646B$; $D = \frac{115}{113}(B - \frac{113}{129}C) = 1.018B - 0.891C$ 。

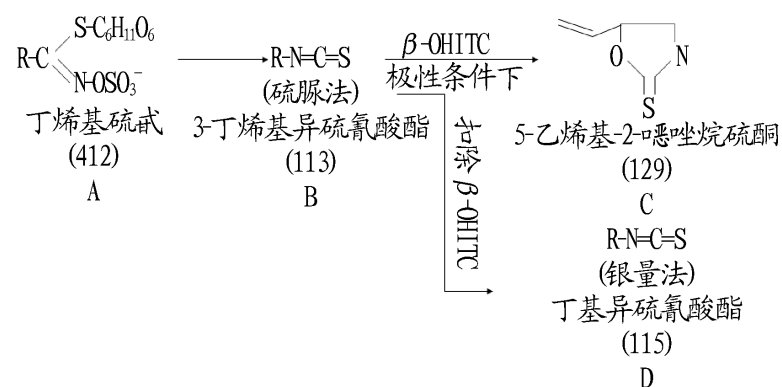


图1 硫脲紫外法与银量法换算关系

Fig.1 The conversion relation between thiourea ultraviolet method and argentometry

1.2.3 项目测定及数据处理。银量法: 采用 GB/T 13087-1991 的测定方法; 粗脂肪: 采用 GB/T 6433-1994 方法测定; 水分: 采用 GB/T 6435-1986 方法测定; 毒素含量: 各样品毒素含量均以其绝干脱脂粕测定值根据样品含油量和水分换算成原样绝干物中的含量。

数据处理: 试验数据经 Microsoft Excel 初步整理, 再利用 OriginLab 数据处理软件进行分析, 数据均用平均数 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 硫脲紫外法测定结果

2.1.1 粗酶用量考察。硫脲含量不同, 所需粗酶用量也不一样, 为保证酶解效果彻底, 需对粗酶添加量进行测定。参考蒋玉琴等的方法^[8], 设定酶添加量梯度, 每100 ng 样品分别添加30、50、70、90及110 ng 粗芥子酶(图2)。经测定, 30 ng 粗酶最高能酶解约8 ng/g ITC, 50、70、90 ng 及110 ng 组能使所有样品完全酶解。故所有结果均以50 ng 粗酶添加量组数据计算。

2.1.2 不同样品毒素含量。见表1。

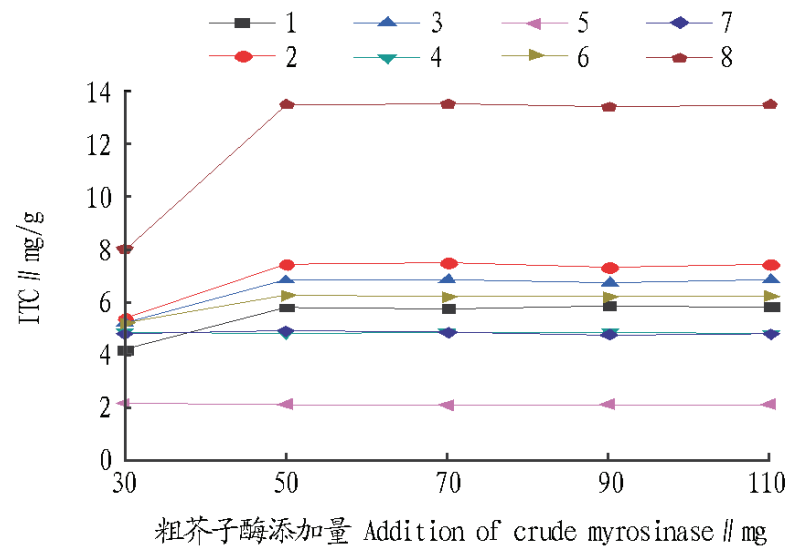
2.1.3 推导换算公式计算结果。见表2。

2.2 硫脲紫外法与银量法对比

2.2.1 银量法测定结果。为验证硫脲紫外法推导换算公式, 用银量法做对比测定, 结果见表2。

2.2.2 t 检验。t 检验表明, 推导公式计算值与银量法测定值差异不显著 ($P > 0.05$)。表明推导公式适用于菜籽饼粕中

ITC 的定量。银量法测定值大多比推导公式计算值低, 分析原因可能是由于少量的不易汽化的异硫氰酸酯难以随水蒸汽蒸馏出来, 故值偏低。



注: 1. 菜籽; 2. 脱皮菜仁; 3. 脱皮冷榨饼; 4. 脱皮冷榨膨化饼; 5. 脱皮冷榨浸出粕; 6. 脱皮热榨饼; 7. 预榨浸出粕; 8. 印度菜粕。

Note: 1, Rapeseed; 2, Dehulled rapeseed; 3, Dehulled cold pressed rapeseed cake; 4, Dehulled cold pressed expansion rapeseed cake; 5, Dehulled cold pressed extraction rapeseed meal; 6, Dehulled hot press rapeseed cake; 7, Prepressed extraction rapeseed meal; 8, India rapeseed meal.

图2 粗芥子酶添加量与ITC 测定值关系

Fig.2 The relationship between the addition of crude myrosinase and measured ITC content

表1 不同样品的ITC 和 OZT 含量

Table 1 ITC and OZT contents in different samples ng/g

样品 Sample	ITC	OZT
菜籽 Rapeseed	5.82 \pm 0.29	3.26 \pm 0.21
脱皮菜仁 Dehulled rapeseed	7.43 \pm 0.34	4.68 \pm 0.28
脱皮冷榨饼 Dehulled cold pressed rapeseed cake	6.83 \pm 0.40	4.05 \pm 0.25
脱皮冷榨膨化饼 Dehulled cold pressed expansion rapeseed cake	4.87 \pm 0.55	2.76 \pm 0.06
脱皮冷榨浸出粕 Dehulled cold pressed extraction rapeseed meal	2.16 \pm 0.01	1.08 \pm 0.06
脱皮热榨饼 Dehulled hot press rapeseed cake	6.26 \pm 0.50	2.96 \pm 0.17
预榨浸出粕 Prepressed extraction rapeseed meal	4.80 \pm 0.41	2.46 \pm 0.10
印度菜粕 India rapeseed meal	13.53 \pm 0.21	0.47 \pm 0.11

表2 ITC 硫脲紫外法与银量法测定ITC 结果

Table 2 The determined results of ITC content by thiourea ultraviolet method and argentometry method ng/g

样品 Samples	硫脲紫外法 Thiourea ultraviolet method		银量法 ITC ² Argentometry method
	硫脲 ¹	ITC ¹	
菜籽 Rapeseed	21.21	3.02	2.91 \pm 0.04
脱皮菜仁 Dehulled rapeseed	27.08	3.39	3.22 \pm 0.11
脱皮冷榨饼 Dehulled cold pressed rapeseed cake	24.90	3.34	3.48 \pm 0.10
脱皮冷榨膨化饼 Dehulled cold pressed expansion rapeseed cake	17.74	2.50	2.40 \pm 0.06
脱皮冷榨浸出粕 Dehulled cold pressed extraction rapeseed meal	7.89	1.24	1.20 \pm 0.13
脱皮热榨饼 Dehulled hot press rapeseed cake	22.82	3.74	3.60 \pm 0.09
预榨浸出粕 Prepressed extraction rapeseed meal	17.51	2.69	2.45 \pm 0.05
印度菜粕 India rapeseed meal	49.33	13.35	13.00 \pm 0.02

2.2.3 线性相关性。经 OriginLab 数据处理软件分析, 硫脲紫外法与银量法相关性 $R = 0.9995$ (图3)。

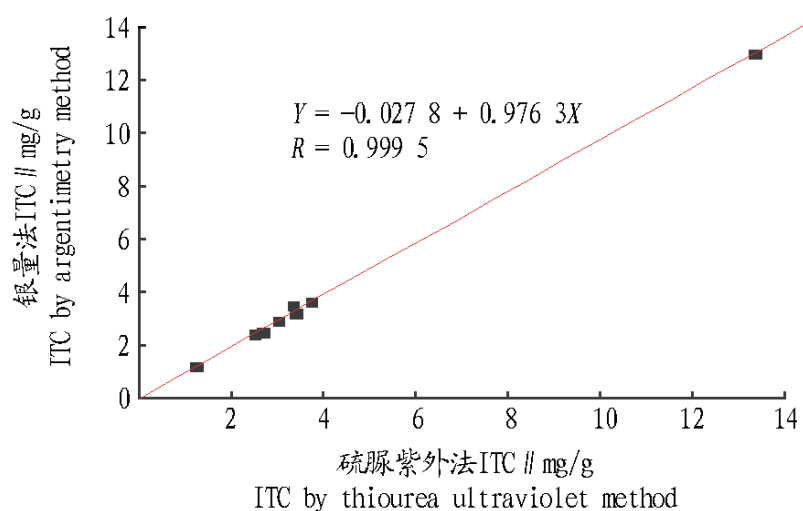


图3 硫脲紫外法与银量法测定ITC 结果关系

Fig 3 The relationship of ITC determined by thiourea ultraviolet method and argentimetry method

3 结论

(1) 利用硫脲紫外法同时测定菜籽饼粕中硫脲 ITC 与 OZT 含量, 仪器、设备简单, 操作简便快速, 每人每天能测 40 份左右样品, 适合于油厂和饲料企业中的快速和大批量测定。

(2) 由表 1、2 可见, 硫脲紫外法标准差普遍比银量法大, 为得到较精确的测定值最好多次测定取平均值, 同时为保证有较好的重复性, 应严格操作条件。

(上接第 7811 页)

是 1 种聚间苯三酚的复合物, 不过其结构还有待于鉴定。

表5 马尾藻多酚的体外抑菌结果

Table 5 The results of antimicrobial experiment in vitro with Sargassum polyphenol

				mm
大肠杆菌 Escherichia coli	枯草芽孢杆菌 Bacillus subtilis	沙门氏杆菌 Salmonella enterica	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	对照组 Control group
10	9	13	-	0
10	9	14	-	0
10	7	14	-	0
11	7	16	-	0
9	12	11	-	0
10	7	12	-	0

注:“-”表示无抑菌圈。

Note: - stands for no bacteriostatic circle.

(3) 采用体外抑菌试验的纸片法来鉴定褐藻多酚的抗菌活性, 结果发现褐藻多酚对沙门氏杆菌抑菌效果好, 其次是大肠杆菌, 对枯草杆菌也有抑菌圈, 但对葡萄球菌则无抑菌圈。

(4) 马尾藻中多酚的提取率随样品采集时间、地点不同

(3) 硫脲紫外法最小检测限一般在 300 ~ 500 mg/kg, 一些低毒或脱毒菜籽饼粕不建议用硫脲紫外法, 仍需用银量法。

参考文献

- [1] 国家技术监督局. 饲料中异硫氰酸酯的测定方法. GB/ 13087- 1991 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1991.
- [2] WETTER L R, YOUNG C G. Athiourea UV assay for total glucosinolate content in rapeseed [J]. J of Amer Oil Chemist's Soc, 1976, 53: 162- 164.
- [3] LEMING R, LEMBER A, KUKK T. The content of individual glucosinolates in rapeseed and rapeseed cake produced in Estonia [J]. Agrarstudia, 2004, 15: 21- 27.
- [4] 戈兰英, 王晓军, 陈家良, 等. 油菜籽中硫代葡萄糖苷测定技术—硫脲紫外吸收改良法的研究 [J]. 上海农业学报, 1985, 1(3): 53- 58.
- [5] 彭良才, 吴新镛, 徐润芳, 等. 油菜硫代葡萄糖苷分析方法的改进和应用 [J]. 中国油料, 1989(1): 38- 41.
- [6] 胡之杰. 菜籽粕中芥子甙的水解产物—异硫氰酸酯和噻唑烷硫酮的测定 [J]. 中国油料, 1991(5): 22- 24.
- [7] 张菊珍, 徐世前, 史美仁. 硫脲法测菜籽饼粕中的硫代葡萄糖苷 [J]. 南京化工学院学报, 1992, 14(2): 63- 68.
- [8] 蒋玉琴, 邵明诚, 黄玲, 等. 菜籽粕中硫脲的紫外分光光度分析 [J]. 江苏农业学报, 1993, 9(1): 57- 59.
- [9] 余英, 安廷士, 罗朝忠, 等. 菜籽粕中硫代葡萄糖苷测定方法的改进 [J]. 中国油料, 1994, 16(2): 52- 55.
- [10] 华欲飞. 硫脲法测定芥子甙—Witter- Youngs 系数可靠性的影响因素 [J]. 中国油脂, 1994, 19(2): 38- 40.
- [11] 王润莲, 李新社, 贾汝敏. 甘肃省菜籽饼异硫氰酸盐及噻唑烷硫酮的含量 [J]. 甘肃农业大学学报, 1996(4): 368- 370.
- [12] 鲍英慧. 比色法测定菜籽饼粕中异硫氰酸酯 [J]. 中国饲料, 1999(24): 13.
- [13] 余珠花, 兰燕丽, 吴幼青, 等. 用硫脲紫外法测定菜籽饼粕中硫代葡萄糖苷的检测分析及讨论 [J]. 中国油脂, 2003, 28(10): 40- 41.
- [14] 张清峰, 姜子涛, 张久春, 等. 紫外分光光度法测定辣根及芥末制品中异硫氰酸酯含量的研究 [J]. 中国调味品, 2005(6): 15- 20.

而变化, 植物原料的贮存, 干燥, 粉碎, 提取溶剂, 温度都可能改变多酚的化学结构和提取效率, 从而改变了多酚的化学、物化和生物活性, 使测得值与真实值情况有很大出入。据一些资料报道在藻体的不同部位其活性成分含量是不一样的。

(5) 马尾藻多酚的结构分析有待于进一步研究, 利用其具有特异性生物活性成分的化学结构作为模式, 进一步合成或半合成有特殊疗效的新药, 以开创中国“蓝色药业”发展的新局面。

参考文献

- [1] 师然新, 徐祖洪. 青岛沿海九种海藻的类脂及酚类抗菌活性的研究 [J]. 中国海洋药物, 1997(4): 16- 19.
- [2] 西北农业大学. 基础生物化学实验指导 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1985: 23- 25.
- [3] 严小军, 姜清香, 吴真真, 等. 褐藻多酚连三羟基的测定 [J]. 海洋科学, 2000, 24(12): 3- 5.
- [4] 范晓, 严小军, 韩丽军. 海藻化学分析方法 [M]. 北京: 学苑出版社, 1996: 53- 56.
- [5] 冒寿平. 生化技术 (广西大学内部资料) [I]. 2 版. 2001: 38- 40.
- [6] 曹治权. 层析显色试剂手册 [M]. 北京: 中国商业出版社, 1986: 22- 26.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 56- 58.
- [8] 石碧, 狄莹. 植物多酚 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 32- 34.