

三种 TBA 方法用于测定腌腊肉制品 脂肪氧化程度适用性的研究

张松山 刘 海 马长伟

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘 要: 本文研究了亚硝酸钠和蔗糖对 TBA 试验的影响, 比较了这两种物质对三种不同的 TBA 方法(蒸馏法、酸萃取法和样品直接反应法)用于腌腊肉制品脂肪氧化程度测定的适用性。研究发现, 亚硝酸钠在酸性或加热条件下与丙二醛反应, 导致吸光值降低; 此外, TBA 在常温下就可以和亚硝酸钠反应生成不可逆产物, 利用此反应能够消除亚硝酸钠对吸光值的影响。蔗糖对 TBA 反应的影响与溶液 pH 值有关, 当反应液的 pH 值小于 2 时, 蔗糖与 TBA 反应生成的黄色物质(吸收峰 450nm)就会叠加到 532nm 的吸收峰上, 导致吸光值偏高; 当反应液的 pH 值大于 2 时, 蔗糖不会对吸光值产生影响。在三种不同的 TBA 试验方法中, 样品直接反应法受亚硝酸钠和蔗糖的影响不显著 ($P > 0.05$)。蒸馏法和酸萃取法试验中 TBA 值都会随亚硝酸钠含量的增加而降低, 随蔗糖含量的增加而升高。

关键词: 腌腊肉制品; TBA 试验; 亚硝酸钠; 蔗糖
丙二醛

Abstract: The effects of cured meats residual nitrite and sucrose on TBA reaction have been researched. We also have tested their influences on TBA value by three TBA methods used for evaluation of cured meats lipid oxidation. We found that nitrite could react with MDA quickly after acidification and heat treatment, which made lower results. However, it also could react with TBA to produce

a steady compound, which could eliminate the effect of nitrite on absorbance. The reaction of sucrose with TBA depends on pH. Sucrose couldn't produce yellow substances to disturb the absorbance at 532nm if pH value was beyond 2. Compared with distillation method and acid extraction, directly testing with the whole sample had no insignificant difference ($P > 0.05$) when the samples were added with nitrite and sucrose.

Keywords: cured meat products; TBA test; nitrite; sucrose; malonaldehyde

前言

自从 1944 年 Kohn 和 Liversedge 发现动物组织能够与硫代巴比妥酸 (TBA) 反应生成粉红色物质后, 此反应就逐渐广泛用于脂肪氧化酸败程度的测定。其反应原理是脂肪氧化产物 1 分子丙二醛 (MDA) 与 2 分子 TBA 反应生成 MDA-TBA 复合物, 此复合物在 532nm 有最大吸收峰。吸收强度和丙二醛的浓度在一定范围内呈线性关系, 由此确定脂肪氧化程度。但是由于动物组织成分复杂, 许多物质都会对 TBA 反应产生干扰, 影响 TBA 法测定脂肪氧化程度的准确性。对于腌腊肉制品来说, 残留的亚硝酸盐可以和丙二醛反应导致 TBA 值降低。为了避免这种现象的发生, 有人在试验过程中加入一定量的磺胺 (Sulphanilamide), 因为磺胺可以使亚硝酸盐重氮化, 这样可以减少亚硝酸盐对 TBA 值的影响。但是如果加入的磺胺过量, 同样也会减小 TBA 值, 因为磺胺不但能与亚

硝酸盐反应而且还能与丙二醛反应 (Hasret, 2004)。另外,我国传统的腌腊肉制品中经常添加大量的糖类物质,这些糖在加热及酸性条件下能够与TBA发生反应,产生黄色物质,当反应生成的黄色物质(450nm~460nm)浓度达到一定范围时,就会叠加到粉红色的吸收峰上,从而导致结果偏高(赵世杰1991)。

本试验旨在研究亚硝酸钠和蔗糖在TBA试验中的反应情况,同时比较这两种物质对三种TBA方法(蒸馏法、酸萃取法和样品直接反应法)用于腌腊肉制品脂肪氧化程度测定时的影响,从而确定较佳的测定腌腊肉制品脂肪氧化程度的方法,为评价产品品质提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 原料

不含亚硝酸盐和糖类物质的香肠,由湖南省湘西自治州榜爷食品有限责任公司提供。

1.2 仪器与试剂

万分之一电子天平;紫外一可见分光光度计(752型);酸度计;电热恒温水浴锅;高速组织捣拌机;离心机;1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TEP, 97%, Sigma);分析纯试剂:硫代巴比妥酸(TBA)、三氯乙酸、吡啶、正丁醇、亚硝酸钠、蔗糖、氢氧化钠。

1.3 试验方法

1.3.1 样品处理

处理一:将香肠绞碎均匀,分别添加30、60、90、120mg/kg的亚硝酸钠,4℃冰箱保存。

处理二:将香肠绞碎均匀,分别添加5%、10%、15%、20%的蔗糖,4℃冰箱保存。

1.3.2 蒸馏法TBA试验

参照Tarladgis et al.(1960)。

1.3.3 酸萃取法TBA试验

参照Pikul et al.(1983),具体操作如下:准确称取研磨均匀的样品10g,加入40mL5%三氯乙酸溶液后于14000rpm均质10min,用中性滤纸过滤,再用5%三氯乙酸将滤液定容至50mL,取上述滤液5mL置于25mL具塞管内,加入5mLTBA溶液,混匀,加塞,置于90℃水浴锅内保温40min,取出冷却10min,在532nm处测吸光值。

1.3.4 样品直接反应法

参照Ohkawa et al.(1979),具体操作如下:取0.2mL10%(w/v)样品溶液加入0.2mL8.1%的SDS溶液和1.5mL pH3.5的20%醋酸缓冲液于具塞试管内,再加入0.8%的TBA溶液1.5mL,定容到4mL,恒温95℃加热60min,然后流水冷却10min后,加入1mL蒸馏水和4mL吡啶与正丁醇混合物(1:15)剧烈摇晃后于4000rpm离心10min,取上层液于532nm测吸光值。

1.4 统计分析

运用SASV8统计分析软件对数据进行统计分析

2 结果与分析

2.1 亚硝酸钠与丙二醛反应的影响因素

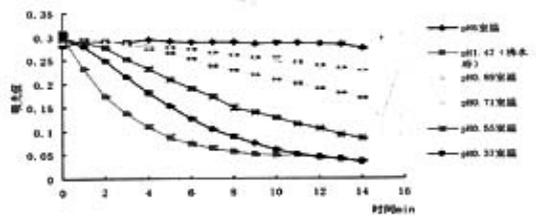


图1 亚硝酸钠和MDA在不同条件下反应后对TBA吸光值的影响

注:本试验的反应条件是模拟不同TBA方法中的反应条件,目的是初步观察利用不同的TBA方法时亚硝酸钠对TBA反应的影响。

试验中,MDA溶液由1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TEP)或1,1,3,3-四甲氧基丙烷(TMP)来代替,因为1molTEP或TMP经水解形成1molMDA。本试验先将TEP和亚硝酸钠在不同的酸性条件和温度下反应,然后再取混合液与TBA反应测其吸光值,目的是通过观察丙二醛含量的变化来判断亚硝酸钠与丙二醛的反应情况。

从图1中可以看出,亚硝酸钠和丙二醛的反应在室温下进行, pH值越低,测得的丙二醛含量越低,说明越有利于亚硝酸钠与丙二醛的反应。而当反应的pH值接近中性的时候,吸光值无显著变化($P>0.05$)。值得注意的是,在混合液pH值为1.47时,试验中采用沸水浴加热而不是在常温下反应,目的是为了通过模拟蒸馏法提取丙二醛的温度和pH值来初步观察亚硝酸钠对蒸馏法测定TBA值的影响。从图中看出,它与pH值为0.37室温下反应时MDA含量变化的曲线相比,MDA

含量减少的速率明显更高。这说明加热更有利于亚硝酸钠与MDA的反应。从图中我们还可以看出随着反应时间的延长,MDA的含量降低(除反应条件为pH6常温下反应的曲线外),这说明亚硝酸钠和丙二醛的反应随着时间的延长一直都会进行。在反应的开始阶段,即MDA与亚硝酸钠混合后立即加入TBA溶液时,我们发现即使在不同的酸性环境和温度下得到的吸光值变化都很小,由此可以推测是由于TBA的加入破坏了亚硝酸钠和丙二醛的反应。

由本实验可知,pH值、反应温度和反应时间均是影响亚硝酸钠和丙二醛反应的重要因素,可以通过调节这3个反应参数来消除亚硝酸钠对TBA试验的影响。

2.2 pH值对蔗糖与TBA反应的影响

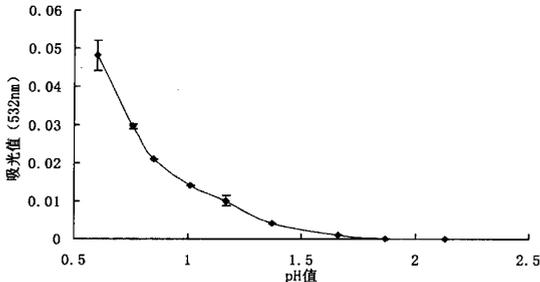


图2 pH值对蔗糖与TBA反应的影响

从图2中可以观察到蔗糖与TBA反应时,pH值越低,在532nm处得到的吸光值就越大,说明对TBA和丙二醛反应的干扰就会越严重。由此可以利用pH值对蔗糖与TBA反应的影响来控制试验过程中蔗糖的干扰作用,即控制反应液的pH值 ≥ 2 ,这样蔗糖就不会对TBA反应产生影响。

2.3 亚硝酸钠对TBA试验的影响

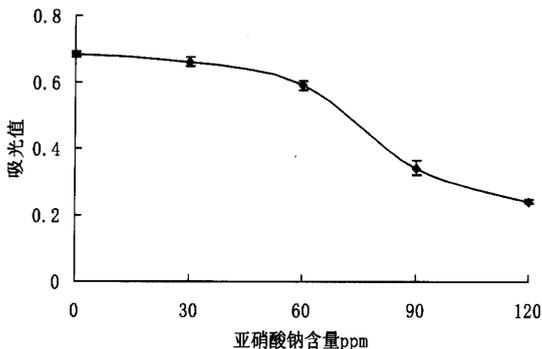


图3 亚硝酸钠对TBA试验的影响(蒸馏法)

从图3中可以看到,利用蒸馏法测定样品中丙二醛含量时,随着样品中亚硝酸钠含量的增加,

吸光值呈现下降的趋势。当含量在0到60mg/kg时,吸光值下降不明显($P>0.05$),而当亚硝酸钠的含量超过60mg/kg时,吸光值开始明显降低。

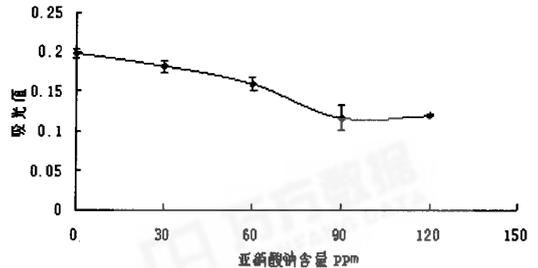


图4 亚硝酸钠对TBA试验的影响(酸萃取法)

从图4中可以看到,采用酸萃取法进行TBA值的测定时,吸光值随着样品中亚硝酸钠含量的增加而降低。但是亚硝酸钠含量的变化对吸光值的影响并不像图1那么明显,原因可能是样品组织成分复杂,亚硝酸钠由于其在酸性条件下具有较强的氧化还原性,可以和其它物质反应,导致吸光值变化不显著($P>0.05$)。

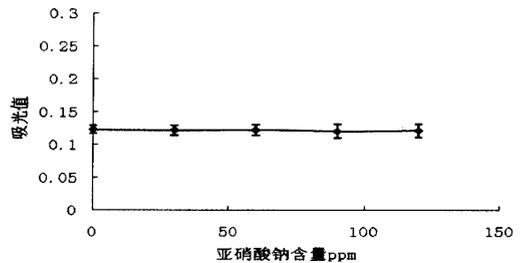


图5 亚硝酸钠对TBA试验的影响(样品直接反应法)

从图5中可以看出,用样品直接反应法测定TBA时,样品中亚硝酸钠含量的变化对吸光值无显著影响($P>0.05$),吸光值并没有呈现下降的趋势。根据图1的分析,我们推测此方法操作时,由于样品经弱酸酸化后立即加入TBA溶液,这有利于消除亚硝酸钠的影响。

2.4 蔗糖对TBA试验的影响

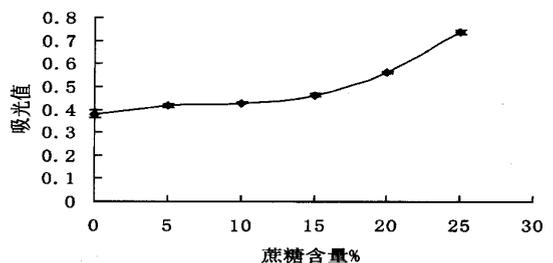


图6 蔗糖对TBA试验的影响(蒸馏法)

从图6中可以看出,使用蒸馏法进行TBA试

验时,吸光值随着蔗糖含量的增加整体上呈上升趋势。当蔗糖浓度小于15%时,吸光值的增加缓慢,对于测定结果的影响较小;当蔗糖的含量超过15%时,吸光值开始明显增加。导致吸光值增加的原因可能是蔗糖在酸性条件下加热分解生成一些醛类物质,这些物质中有些可以和TBA反应同样生成粉红色物质。

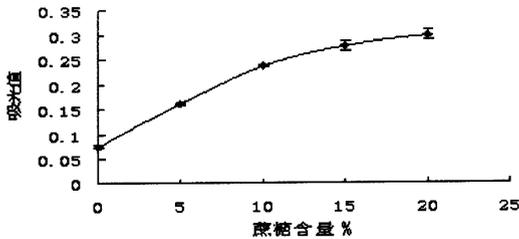


图7 蔗糖对TBA试验的影响(酸萃取法)

从图7中可以看出,在用酸萃取法进行TBA试验的时候,蔗糖对测定值产生显著影响。随着蔗糖含量的增加,吸光值呈快速上升趋势。原因是试验过程中加入了三氯乙酸进行酸化处理,蔗糖与TBA在酸性条件下反应生成大量的黄色物质,使吸光值偏高。

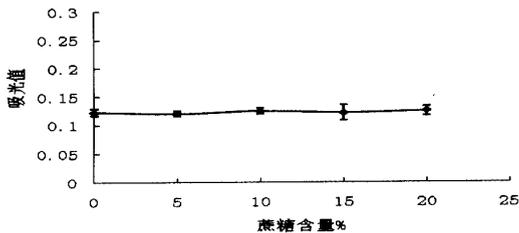


图8 蔗糖对TBA试验的影响(样品直接反应法)

从图8中可以看出,用样品直接反应法测定TBA时,样品中的蔗糖含量对测得的吸光值没有显著影响($P>0.05$),原因是反应发生在较弱的酸性环境下,不利于蔗糖与TBA反应生成黄色物质。所以在进行TBA值的测定时,为了消除样品中蔗糖的干扰,可以选取样品直接反应法进行测定。

3 讨论

蒸馏法和酸萃取法是目前测定食品脂肪氧化程度最常用的TBA方法。但是我们发现在测定腌腊肉制品脂肪氧化酸败程度的时候,产品中的亚硝酸钠和蔗糖对TBA值会产生明显的干扰作用。

蒸馏法操作复杂,而且比较费时,经验性很强。酸萃取法比蒸馏法简便,并且需要的仪器少,但缺点是萃取时其他成分如可溶性蛋白、多肽、其它醛类、色素等同样会被萃取出来,从而造成对反应的干扰。样品直接反应法在生物组织脂肪氧化程度的测定方面应用极为广泛,其要是因为这种方法可以量化,虽然此方法测定的结果相对偏高,但是与其他方法相比,更能准确地反映脂肪氧化产物丙二醛含量的变化。根据图1我们知道,样品在酸化和加热之前加入TBA可以消除亚硝酸钠的影响。根据图2我们得知,控制反应的pH值可以减少蔗糖对TBA值的影响。而样品直接反应法正符合上述两个条件,使它受这两种物质的干扰最小,能够用于定量分析,所以样品直接反应法可能是测定腌腊肉制品脂肪氧化酸败程度的较佳方法。

参考文献

- [1] 赵世杰,许长成,邹琦,孟庆伟.植物组织中丙二醛测定方法的改进.植物生理学通讯,1991,30(3):207~210.
- [2] Hasret vlu.Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products.Meat Science,2004,67:683~687.
- [3] Hiroshi,O.,Nobuko,O.& Kunio,Y.Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.Analytical biochemistry,1979,95:351~358.
- [4]Kwon,T.W.,Menzel,D.B & Cott,H.s.Reactivity of maonaldehyde with food constituents.Food science,1965,30:808~813.
- [5] Pikul,J.,Leszczynski,D.E.& Kummerow,F.A.Elimination of sample autoxidation by butylated hydroxytoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat.Journal of Agricultural and Food Chemistry,1983,31:1338~1342.
- [6] Tarladgis,B.G.,Watts,B.M.& Younathan,M.T.A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods.The Journal of the American Oil Chemists' Society,1960,37:44~48.