



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110763815 A

(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201911233579.5

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2019.12.05

G01N 33/12(2006.01)

(66)本国优先权数据

G01N 33/535(2006.01)

201811583081.7 2018.12.24 CN

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/72(2006.01)

(71)申请人 河北省动物疫病预防控制中心

G01N 21/78(2006.01)

地址 050035 河北省石家庄市阿里山大街
219号

(72)发明人 王增利 韩庆安 张若曦 马贵达

艾连峰 顾文源 李翀 仇国明

马宏伟 董维亚 吴秀楼 康志勇

赵彦岭 林建涵 张建虹 张哲

吴萌 霍惠玲 王建昌

(74)专利代理机构 武汉松涛知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42266

代理人 戴宝松

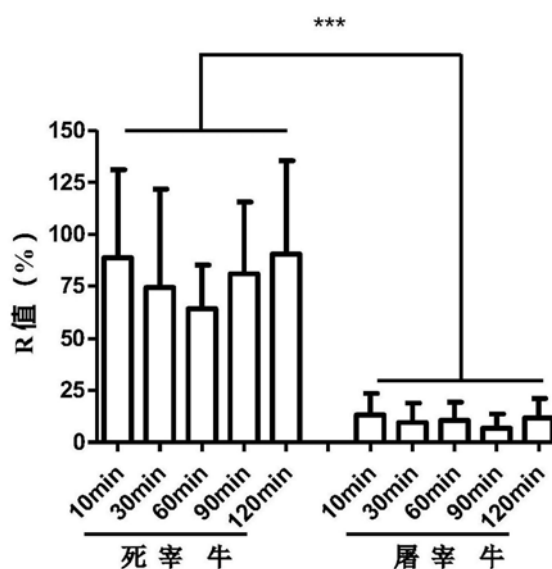
权利要求书1页 说明书15页 附图6页

(54)发明名称

一种死宰牛肉的鉴定方法

(57)摘要

本发明通过对血红蛋白残留和过氧化物酶活性进行双标检测,同时测定待测样本中过氧化物酶的浓度 C_1 以及血红蛋白的浓度 C_2 ,通过公式 $R=C_2/C_1*100\%$,获得R值,并通过收集大量的因不同病因、不同部位的死宰牛肉的数据,确立了R值的标准阈值,从而完成了对死宰牛肉的判定的绝对标准。采用本发明的检测方法,仅对待测样品进行单次实验,不受检测样本部位的限制,就可以确定待测样本是死宰牛肉还是屠宰牛肉。



1. 一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备样本处理液:取待测牛肉为检测样本,加入缓冲溶液后进行搅拌粉碎,浸渍后得到浸渍液,将所述浸渍液离心取上清,即得所述样本处理液;

(2) 检测所述步骤(1)中样本处理液的过氧化物酶的浓度,所述过氧化物酶的浓度为 C_1 ;

(3) 检测所述步骤(1)中样本处理液的血红蛋白浓度,所述血红蛋白的浓度为 C_2 ;

(4) 根据公式 $R=C_2/C_1*100\%$ 计算R值;

(5) 根据R值进行死宰牛肉的鉴定:

若 $R \leq 25\%$,则判定所述检测样本为屠宰牛肉;

若 $R \geq 35\%$,则判定所述检测样本为死宰牛肉。

2. 根据权利要求1所述的一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,所述步骤(1)中检测样本为待测牛肉的肌肉组织,待测牛肉为新鲜牛肉或冻存牛肉。

3. 根据权利要求1所述的一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,所述步骤(1)中加入缓冲溶液的质量为检测样本的9~12倍。

4. 根据权利要求1所述的一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,所述步骤(1)中浸渍8~15分钟得到浸渍液。

5. 根据权利要求1所述的一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,所述步骤(3)中血红蛋白浓度的检测方法为酶联免疫吸附法。

6. 根据权利要求1所述的一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,在步骤(1)中,搅拌粉碎的条件为:转速为16000r/min,时间为30秒。

7. 根据权利要求1所述的一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,在步骤(1)中,离心的条件为:转速为3000~4000r/min,时间为2~4分钟。

8. 根据权利要求1所述的一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,在步骤(2)中,选用四甲基联苯胺和过氧化脲作为底物,采用比色法测定所述过氧化物酶的浓度。

9. 根据权利要求8所述的一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,过氧化物酶浓度的具体的测定方法为:按顺序入磷酸二氢钠缓冲液、过氧化脲溶液、样本处理液、四甲基联苯胺溶液,室温下反应1~2min,加入硫酸溶液终止反应,在450nm波长下测定样品吸光度OD值,通过标准曲线获得所述样本处理液中过氧化物酶的浓度;其中,标准曲线通过将浓度为10mg/L辣根过氧化物酶溶液1000倍稀释后,再进行倍比稀释,制作而成。

10. 根据权利要求1所述的一种死宰牛肉的鉴定方法,其特征在于,在步骤(3)中血红蛋白浓度的检测方法为酶联免疫吸附法,所述酶联免疫吸附法包括以下步骤:实验前准备标准品、试剂及待检样本;向微孔中分别加入标准品和样本37℃孵育2小时,然后加入血红蛋白抗体37℃孵育1小时,洗涤微孔板3次,甩干后加入HRP标记37℃孵育1小时,再将微孔板彻底洗涤5次后加入TMB底物显色15-25min,加入终止液;在酶标仪450nm波长下测定吸光度OD值,计算样品浓度。

一种死宰牛肉的鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肉类检测领域,具体地,涉及一种死宰牛肉的鉴定方法。

背景技术

[0002] 随着现代物质文化水平的提高,人们对于肉类消费的品质要求也越来越高。但不少商家以死宰牛肉冒充优质牛肉进行销售,严重威胁人的身体健康。目前,对于牛肉的检测仍然是一个难题。

[0003] 死宰牛肉是指法律法规规定的,患有对人体有害的传染性疾病、寄生虫病和中毒性疾病的生牛,非经屠宰死亡的生牛以及经检疫检验不合格、不能食用的牛肉及其肉类产品。对于市场上来源复杂的死宰牛肉及其产品,我国现行的死宰牛肉的检测和鉴别还相当缺乏。肉品的卫生检验是一个比较复杂的过程,主要包括肉品新鲜度检验和肉品健康度检验。目前市场检疫中心对于死宰牛肉的检验方法主要包括感官检验、理化检验和细菌学检验。感官检验主要包括视检、嗅检和触检,主要检查肉品的杀口状态、放血程度、血液坠积情况、组织和淋巴结病理变化以及肉品异常气味等。检验方法虽然简单,但多凭经验判断且主观性较强,对一些隐性感染和无临床症状的染疫肉品很难检出,肉品检出合格率低。细菌学检验主要检查肉品所含有的致病细菌的种类和数量,细菌学检验方法实验条件要求严格,对实验人员的技术有一定要求,难以达到快速或现场检验病死畜禽肉的目的。理化检验方法主要有pH值测定法、过氧化物酶法、硫酸铜蛋白沉淀法、细菌内毒素氧化呈色法等。

[0004] 在传统检测鉴别死宰牛肉和屠宰牛肉的方法中,pH检测和过氧化物酶(peroxidase,POD)活性检测具有一定客观性,已成为当前鉴别死宰牛肉的常用辅助手段。现有技术中,中国专利申请CN201511001061采用的过氧化物酶的检测来鉴别死宰猪肉,但是其在鉴别诊断中需要同时采用健康猪肉样品作为对照,通过比较来进行鉴别诊断。如果对照组样品出现问题,则整个鉴别的参考标准也就错了。CN201710320285则是采用基于MALDI-TOF-MS的死宰肉鉴别方法,应用MALDI-TOF-MS对样本集进行测定,得到对应质谱图;基于训练样本集和检验样本集的质谱图建立神经网络分类器;应用神经网络分类器对待测样本集中的样本进行分类,得出鉴定结果。该方法所需要的设备昂贵,操作复杂,技术难度高,并非普通技术人员可以准确的实施的。并且,上述两个专利都是以猪肉为样品进行的鉴别诊断,其能够准确地应用于牛肉的鉴别还不得而知。

[0005] 另外,在临床屠宰中,死宰牛常出现放血不完全,导致血红蛋白残留的现象。因此,血红蛋白也可以作为评价肉的病健情况的指标。

[0006] 然而在实际工作中,存在肉样处理方法和检测条件不一致,检测结果难以标准化衡量的现象。此外,pH检测和POD检测均存在死宰牛肉与屠宰牛肉检测离散区间重叠,导致重叠区间无法区分的现象。

发明内容

[0007] 针对现有检测技术的不足,本发明通过研究,建立一种新型的鉴别死宰牛肉的方

法,通过对血红蛋白残留和过氧化物酶活性进行双标检测,同时测定待测样本中过氧化物酶的浓度 C_1 以及血红蛋白的浓度 C_2 ,通过 $C_2/C_1*100\%$,获得R值,并通过收集大量的因不同病因、不同部位的死宰牛肉的数据,确立了R值的标准阈值,从而完成了对死宰牛肉的判定的绝对标准。

[0008] 本发明提出一种死宰牛肉的鉴定方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 制备样本处理液:取待测牛肉为检测样本,加入缓冲溶液后进行搅拌粉碎,浸渍后得到浸渍液,将所述浸渍液离心取上清,即得所述样本处理液;

[0010] (2) 检测所述步骤(1)中样本处理液的过氧化物酶的浓度,所述过氧化物酶的浓度为 C_1 ;

[0011] (3) 检测所述步骤(1)中样本处理液的血红蛋白浓度,所述血红蛋白的浓度为 C_2 ;

[0012] (4) 根据公式 $R=C_2/C_1*100\%$ 计算R值;

[0013] (5) 根据R值进行死宰牛肉的鉴定:

[0014] 若 $R\leq 25\%$,则判定所述检测样本为屠宰牛肉;

[0015] 若 $R\geq 35\%$,则判定所述检测样本为死宰牛肉。

[0016] 进一步地,所述步骤(1)中检测样本为待测牛肉的肌肉组织;待测牛肉为新鲜牛肉或冻存牛肉。

[0017] 进一步地,所述步骤(1)中加入缓冲溶液的质量为检测样本的9~12倍;

[0018] 进一步地,所述步骤(1)中浸渍8~15分钟得到浸渍液;

[0019] 进一步地,所述步骤(3)中血红蛋白浓度的检测方法为酶联免疫吸附法;

[0020] 进一步地,在步骤(1)中,搅拌粉碎的条件为:转速为16000r/min,时间为30秒。本发明通过研究发现,采用机搅涡旋法在对肌肉处理完全程度、检测结果精度和稳定性上均优于研磨器震荡法。

[0021] 进一步地,在步骤(1)中,浸渍的时间为8~10分钟。本发明通过检测不同浸泡时间的样本后发现,延长浸渍液的浸泡时间并不显著影响过氧化物酶活性、血红蛋白浓度和R值检测结果。因此,为了缩短检测时间,将浸渍的时间确定为8~10分钟,即可满足本发明的检测要求。

[0022] 进一步地,在步骤(1)中,离心的条件为:转速为3000~4000r/min,时间为2~4分钟。

[0023] 进一步地,在步骤(2)中,选用四甲基联苯胺和过氧化脲作为底物,采用比色法测定所述过氧化物酶的浓度。

[0024] 具体的测定方法为:按顺序入磷酸二氢钠缓冲液、过氧化脲溶液、样本处理液、四甲基联苯胺溶液,室温下反应1~2min,加入硫酸溶液终止反应,在450nm波长下测定样品吸光度OD值,通过标准曲线获得所述样本处理液中过氧化物酶的浓度。

[0025] 其中,标准曲线通过将辣根过氧化物酶溶液(10mg/L)1000倍稀释后,再进行倍比稀释,制作而成。

[0026] 进一步地,在步骤(3)中,酶联免疫吸附法至少包括以下步骤:实验前准备标准品、试剂及待检样本;向微孔中分别加入标准品和样本37℃孵育2小时,然后加入血红蛋白抗体37℃孵育1小时,洗涤微孔板3次,甩干后加入HRP标记37℃孵育1小时,再将微孔板彻底洗涤5次后加入TMB底物显色15-25min,加入终止液。在酶标仪450nm波长下测定吸光度(O.D.

值), 计算样品浓度。

[0027] 进一步地, 在步骤(4)中, 浓度 C_1 与浓度 C_2 的单位相同, 均为ng/mL。

[0028] 有益效果

[0029] 健康畜禽肉中含有过氧化物酶, 当畜禽处于病理状态或濒死状态时肉中的过氧化物酶将显著减少甚至完全消失。过氧化物酶具有从过氧化物中裂解出氧的特性, 裂解出的氧可使胺类物质氧化形成有色化合物, 其颜色变化程度与肉内过氧化物酶的含量成正比。在临床屠宰中, 死宰牛常出现放血不完全, 导致血红蛋白残留的现象。因此, 肉样血红蛋白残留是潜在的死宰牛肉鉴别靶标。但两个参数单独应用均存在死宰牛肉与屠宰牛肉检测离散区间重叠, 导致重叠区间无法区分的现象。以上方法的单一检测均不能建立死宰牛肉鉴别的绝对标准。

[0030] 本发明通过锐意研究, 通过对血红蛋白残留和过氧化物酶活性进行双标检测, 同时测定待测样本中过氧化物酶的浓度 C_1 以及血红蛋白的浓度 C_2 , 通过 $C_2/C_1 \times 100\%$, 获得R值, 并通过收集大量的因不同病因、不同部位的死宰牛肉的数据, 确立了R值的标准阈值, 从而完成了对死宰牛肉的判定的绝对标准。采用本发明的检测方法, 仅对待测样品进行单次实验, 不受检测样本部位的限制, 就可以确定待测样本是死宰牛肉还是屠宰牛肉。

[0031] 本发明通过酶联免疫吸附法检测样本处理液的血红蛋白浓度, 克服了采用比色法收到肌红蛋白干扰、测定不准确的缺陷。

[0032] 本发明的检测方法简化了判定的步骤, 缩短了检测时间, 无需设立阴性和阳性检测对照组, 提高了检测的效率, 减小了实验人员的工作负担, 并且提高了检测结果的准确度, 保障了检测结果的权威性。

[0033] 在本发明中, 待测牛肉不仅可为新鲜牛肉, 也可为冻存时间在20天内的冻存牛肉。

附图说明

[0034] 图1是死宰牛肉和屠宰牛肉样品经过不同的浸渍时间后所检测到的过氧化物酶总浓度分布。

[0035] 图2是死宰牛肉和屠宰牛肉样品经过不同的浸渍时间后所检测到的血红蛋白浓度分布。

[0036] 图3是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍10分钟后所检测到的血红蛋白浓度分布。

[0037] 图4是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍30分钟后所检测到的血红蛋白浓度分布。

[0038] 图5是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍60分钟后所检测到的血红蛋白浓度分布。

[0039] 图6是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍90分钟后所检测到的血红蛋白浓度分布。

[0040] 图7是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍120分钟后所检测到的血红蛋白浓度分布。

[0041] 图8是死宰牛肉和屠宰牛肉样品经过不同的浸渍时间后所检测到的R值分布。

[0042] 图9是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍10分钟后所检测到的R值分布。

[0043] 图10是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍30分钟后所检测到的R值分布。

[0044] 图11是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍60分钟后所检测到的R值分布。

[0045] 图12是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍90分钟后所检测到的R值分布。

[0046] 图13是死宰牛肉和屠宰牛肉样品浸渍120分钟后所检测到的R值分布。

[0047] 图14是死宰牛肉和屠宰牛肉样品经过不同的浸渍时间后所检测到的R值的差异显

著性分析。

具体实施方式

[0048] 以下将结合附图对本发明各实施例的技术方案进行清楚、完整的描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例;基于本发明的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所得到的所有其它实施例,都属于本发明所保护的范围。

[0049] 实施例一

[0050] 1、样品采集

[0051] 分别采集4头屠宰牛取6个不同部位(A.通脊肉;B.五花肉C.前臀尖;D.前腿肉;E.后臀尖;F.后腿肉),得到屠宰牛肉共24份,来自保定市某屠宰场。分别采集5头死宰牛取6个不同部位(A.通脊肉;B.五花肉C.前臀尖;D.前腿肉;E.后臀尖;F.后腿肉),得到死宰牛肉共30份,来自承德市某无害化处理厂。每份肉样采集约50g,于-20℃冻存备用。

[0052] 2、制备样本处理液

[0053] 将冷冻待测样品,取10g肌肉组织加100mL PBS至搅拌机以最大转速机搅30秒至机搅完全,随后转移至200mL烧杯中,用玻璃棒搅拌均匀,浸渍10分钟时间,取4mL浸润液以3000r/min离心3分钟后取上清液2mL以备检测。

[0054] 3、过氧化物酶检测

[0055] 比色皿内按顺序入磷酸二氢钠缓冲液(1.56g/100mL,pH4.5)2mL、过氧化脲溶液(0.94g/100mL)(上海安耐吉化学有限公司)0.2mL、样品肉浸液0.2mL、3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液(TMB)(0.065g/100mL)(BIOTOPPED)0.2mL,室温下反应1min,加入硫酸溶液终止反应,在450nm波长下测定样品吸光度(OD)值。将辣根过氧化物酶(SIGMA)溶液(10mg/L)1000倍稀释后,再进行倍比稀释,制作标准曲线。通过计算获得各牛肉样品的POD值(记为C1),实验数据及比较结果如图1所示。

[0056] 由图1可知,屠宰牛肉POD值与死宰牛肉A、C、D、F部位的分布于同一区间而无法区分。由此可见,单独采用过氧化物进行检测,无法对屠宰牛肉和死宰牛肉进行区分。

[0057] 4、牛血红蛋白ELISA检测

[0058] 取步骤2中的样本处理液,检测牛血红蛋白的含量(记为C2)。牛血红蛋白ELISA检测方法参照试剂盒(货号:DL-HB-b,DEVELOP公司)说明书。具体如下:

[0059] 所述酶联免疫吸附法包括以下步骤:实验前准备标准品、试剂及待检样本;向微孔中分别加入标准品和样本37℃孵育2小时,然后加入血红蛋白抗体37℃孵育1小时,洗涤微孔板3次,甩干后加入HRP标记37℃孵育1小时,再将微孔板彻底洗涤5次后加入TMB底物显色15-25min,加入终止液。在酶标仪450nm波长下测定吸光度O.D.值,计算样品浓度。

[0060] 各样品检测牛血红蛋白的含量的实验数据及比较结果图2所示。

[0061] 由图2可知,死宰牛肉A、B部位的血红蛋白值与屠宰牛肉A、B、D部位分布区间相同无法区分。由此可见,单独采用血红蛋白进行检测,无法对屠宰牛肉和死宰牛肉进行区分。

[0062] 将各时间条件下血红蛋白检测结果进行详细比对的示意图如图3~7所示。

[0063] 由图3~7可知,不同牛肉样本中血红蛋白含量变化明显,存在严重的交叉现象,难以区分。

[0064] 5、将各样品中所检测到的过氧化物酶浓度C1与其血红蛋白浓度C2带入如下公式中进行计算R值：

[0065] 根据式I计算R值；

[0066] $R = C2 / C1 * 100\%$ (式I)；

[0067] 获得的实验数据及比较结果图9所示。

[0068] 如图9所示，屠宰牛肉和死宰牛肉样本的R值区间有明显区分，死宰牛肉R值明显高于屠宰牛。

[0069] 屠宰牛和死宰牛的不同部位在浸渍10分钟下所检测到的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值如表一所示。

[0070] 表一 各样品在浸渍10分钟下的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值

样品类别	牛只编号	部位	浸渍 10 分钟		
			过氧化物酶浓度	血红蛋白浓度	R 值 (%)
[0071] 屠宰牛	1	A.通脊肉	383.154	10.904084	2.845875027
		B.五花肉	332.905	15.870038	4.767137171
		C.前臀尖	312.522	70.225276	22.4705064
		D.前腿肉	207.773	72.31976	34.80710198
		E.后臀尖	313.176	15.160616	4.840925231
		F.后腿肉	284.4	25.19387	8.858604079

[0072]

死宰牛	2	A.通脊肉	229.682	2.952699	1.2855596
		B.五花肉	134.852	5.539587	4.107901255
		C.前臀尖	189.025	27.420348	14.50620183
		D.前腿肉	157.197	44.558481	28.34563064
		E.后臀尖	160.031	34.282787	21.42259125
		F.后腿肉	159.268	21.132773	13.26868737
	3	A.通脊肉	241.236	59.972022	24.86031189
		B.五花肉	337.701	8.054617	2.385132706
		C.前臀尖	310.778	14.557766	4.684297473
		D.前腿肉	292.902	64.391289	21.98390212
		E.后臀尖	186.3	23.971164	12.8669694
		F.后腿肉	153.491	20.845341	13.58082298
	4	A.通脊肉	253.88	79.912617	31.47653104
		B.五花肉	306.418		
		C.前臀尖	319.498	15.958997	4.995022504
		D.前腿肉	378.14	20.378264	5.389079177
		E.后臀尖	188.698	34.929509	18.5107998
		F.后腿肉	367.567	7.120463	1.937187778
	1	A.通脊肉	286.544	157.2109526	54.86450689
		B.五花肉	128.669	148.823528	115.6638569
		C.前臀尖	350.536	150.3692771	42.89695698
		D.前腿肉	244.444	149.9743843	61.35326876
		E.后臀尖	250.759	147.7234051	58.91050972
		F.后腿肉	352.641	148.2671249	42.0447778
	2	A.通脊肉	112.25	55.78106287	49.69359721
		B.五花肉	99.62	47.19236863	47.37238369
		C.前臀尖	130.353	116.4140565	89.30677198
		D.前腿肉	169.927	139.219111	81.9287759
		E.后臀尖	104.672	124.195572	118.6521438
		F.后腿肉	154.771	129.754639	83.83653206
	3	A.通脊肉	114.776	139.219111	121.2963608
		B.五花肉	188.649	62.34365943	33.047437
		C.前臀尖	220.868	153.0734834	69.30541474
		D.前腿肉	130.774	102.7961043	78.60591882
		E.后臀尖	138.352	134.4298	97.16505725

[0073]

	4	F.后腿肉	149.298	117.3670163	78.61258442
		A.通脊肉	322.75	189.4239169	58.69060166
		B.五花肉	117.277	58.94327868	50.25987933
		C.前臀尖	100.041		
		D.前腿肉	121.933	118.3256131	97.04150076
		E.后臀尖	112.671	179.7294809	159.5170726
		F.后腿肉	179.189	148.0152938	82.60289066
	5	A.通脊肉	104.672	119.289847	113.9653842
		B.五花肉	170.967	57.018175	33.35039803
		C.前臀尖	119.407	190.7404658	159.7397688
		D.前腿肉	194.345	324.1504643	166.7912549
		E.后臀尖	120.249	217.5398723	180.9078431
		F.后腿肉	164.033	235.846387	143.7798413

[0074] 6、死宰牛肉的鉴定标准的确定

[0075] 通过对图9中的结果进行进一步分析,R值在20%---40%之间为区分死宰牛肉与屠宰牛肉的有效隔离区间。更加精确的,死宰牛肉的R值在35%以上,屠宰牛肉的R值都在25%以下。因此,根据以上数据,可以获得死宰牛肉的鉴定标准。即:

[0076] 根据计算所获得的R值进行死宰牛肉的鉴定:

[0077] $R \leq 25\%$,判定所述检测样本为屠宰牛肉;[0078] $R \geq 35\%$,判定所述检测样本为死宰牛肉。

[0079] 实施例二

[0080] 本实施例中,在制备样本处理液时,浸渍的时间为30分钟,其他步骤与实施一相同。

[0081] 屠宰牛和死宰牛的不同部位在浸渍30分钟下所检测到的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值如表二所示。对其进行统计学分析,如图10所示,屠宰牛肉和死宰牛肉样本的R值区间有明显区分,死宰牛肉R值明显高于屠宰牛。

[0082] 表二 各样品在浸渍30分钟下的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值

[0083]

样品类别	牛只编号	部位	浸渍 30 分钟		
			过氧化物酶浓度	血红蛋白浓度	R 值 (%)

[0084]

屠宰牛	1	A.通脊肉	241.018	26.308676	10.9156478
		B.五花肉	218.237	16.57946	7.59699776
		C.前臀尖	287.016	6.309732	2.19839033
		D.前腿肉	242.544	14.924142	6.15316891
		E.后臀尖	363.97	22.558874	6.19800368
		F.后腿肉	358.847	12.795876	3.56583056
	2	A.通脊肉	262.927	29.468301	11.2077881
		B.五花肉	349.037	1.47961	0.42391208
		C.前臀尖	330.289	8.413907	2.54743785
		D.前腿肉	266.415	9.635493	3.61672316
		E.后臀尖	369.529	7.264179	1.96579402
		F.后腿肉	180.196	39.348776	21.8366534
	3	A.通脊肉	204.721	66.475171	32.4711051
		B.五花肉	293.338	7.264179	2.47638526
		C.前臀尖	362.226	22.965152	6.34000652
		D.前腿肉	326.147	47.217227	14.4772839
		E.后臀尖	198.617	29.719804	14.9633737
		F.后腿肉	230.336	14.41405	6.25783638
	4	A.通脊肉	347.838	15.994926	4.59838373
		B.五花肉	359.065	2.19819	0.61219835
		C.前臀尖	315.683	4.138356	1.3109214
		D.前腿肉	241.018	71.505231	29.6680045
		E.后臀尖	183.248	49.588541	27.0608907
		F.后腿肉	223.469	21.384276	9.569236
死宰牛	1	A.通脊肉	348.852	151.7957938	43.5129493
		B.五花肉	164.454	143.1213438	87.0281925
		C.前臀尖	445.682	159.4509123	35.7768347
		D.前腿肉	194.766	146.0026077	74.9630878
		E.后臀尖	253.285	144.1236731	56.9017799
		F.后腿肉	379.164	153.0734834	40.3713125
	2	A.通脊肉	115.197	64.27328188	55.7942324
		B.五花肉	114.355	43.12134375	37.7083151
		C.前臀尖	145.93	78.67154592	53.910468
		D.前腿肉	159.823	114.056319	71.364146
		E.后臀尖	99.62	77.64163143	77.9377951

[0085]

	3	F.后腿肉	169.927	106.7483149	62.8201021
		A.通脊肉	142.141	89.66827452	63.0840324
		B.五花肉	132.854	48.45118332	36.4694953
		C.前臀尖	248.233	143.6856478	57.8833789
		D.前腿肉	142.141	63.99339375	45.0210662
		E.后臀尖	113.934	61.53781728	54.0118115
		F.后腿肉	163.191	78.67154592	48.2082627
	4	A.通脊肉	343.8	158.9293397	46.2272658
		B.五花肉	149.273	61.80502207	41.4040195
		C.前臀尖	102.988	192.0626517	186.490321
		D.前腿肉	133.721	96.875112	72.4456981
		E.后臀尖	126.564	74.30018503	58.7056233
		F.后腿肉	195.608	73.32523168	37.4858041
	5	A.通脊肉	109.303	114.9951862	105.207713
		B.五花肉	196.227	55.78106287	28.4268031
		C.前臀尖	142.141	183.5692053	129.145852
		D.前腿肉	193.503	279.2210915	144.298068
		E.后臀尖	124.038	196.7346941	158.608406
		F.后腿肉	175.4	384.679327	219.315466

[0086] 实施例三

[0087] 本实施例中,在制备样本处理液时,浸渍的时间为60分钟,其他步骤与实施一相同。

[0088] 屠宰牛和死宰牛的不同部位在浸渍60分钟下所检测到的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值如表三所示。对其进行统计学分析,如图11所示,屠宰牛肉和死宰牛肉样本的R值区间有明显区分,死宰牛肉R值明显高于屠宰牛。

[0089] 表三 各样品在浸渍60分钟下的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值

[0090]

样品类别	牛只编号	部位	浸渍 60 分钟		
			过氧化物酶浓度	血红蛋白浓度	R 值 (%)
屠宰牛	1	A.通脊肉	199.271	33.842062	16.9829338
		B.五花肉	264.017	16.545678	6.26689872
		C.前臀尖	267.941	25.464126	9.50363177
		D.前腿肉	269.903	15.22818	5.64209364

[0091]

死宰牛		E.后臀尖	402.338	7.559666	1.87893413
		F.后腿肉	373.671	14.012028	3.7498302
	2	A.通脊肉	279.386	5.324013	1.90561195
		B.五花肉	257.15	25.120892	9.76896442
		C.前臀尖	294.973	72.798675	24.6797758
		D.前腿肉	273.064	6.15038	2.25235842
		E.后臀尖	402.338	9.994783	2.48417574
		F.后腿肉	241.345	26.198762	10.8553158
	3	A.通脊肉	239.165	50.414908	21.0795509
		B.五花肉	369.529	3.563492	0.96433352
		C.前臀尖	357.43	17.072796	4.77654254
		D.前腿肉	297.916	14.234405	4.77799279
		E.后臀尖	227.175	50.019689	22.018131
		F.后腿肉	410.949	8.449836	2.05617631
	4	A.通脊肉	236.331	65.311015	27.6353991
		B.五花肉	275.353	7.600999	2.76045621
		C.前臀尖	241.672	25.06763	10.3725835
		D.前腿肉	188.698	41.031396	21.7444785
		E.后臀尖	160.031	32.715543	20.4432535
		F.后腿肉	360.7	69.385449	19.2363319
	1	A.通脊肉	324.855	159.964183	49.241718
		B.五花肉	151.403	148.4511833	98.0503579
		C.前臀尖	400.635	171.413375	42.7854219
		D.前腿肉	259.179	163.4378453	63.0598333
		E.后臀尖	257.495	155.085143	60.2284095
		F.后腿肉	357.693	158.6915758	44.3653009
	2	A.通脊肉	126.564	99.37885788	78.5206361
		B.五花肉	126.985	53.07348343	41.7950809
		C.前臀尖	153.087	111.2735397	72.6864722
		D.前腿肉	115.618	102.7961043	88.9101215
		E.后臀尖	121.933	104.5385497	85.7344195
		F.后腿肉	193.082	221.853108	114.900979
	3	A.通脊肉	125.722	67.14967248	53.4112347
		B.五花肉	110.541	49.77905175	45.0322068
		C.前臀尖	260.442	157.2109526	60.3631337

[0092]

		D.前腿肉	134.563	74.627988	55.4595156
		E.后臀尖	98.778	87.36746208	88.4483003
		F.后腿肉	151.403	71.413375	47.1677411
	4	A.通脊肉	300.016	126.7012818	42.2315082
		B.五花肉	132.433	56.01585468	42.2975049
		C.前臀尖	81.938	75.61985247	92.2891119
		D.前腿肉	134.142	70.78736352	52.7704697
		E.后臀尖	129.511	71.72849463	55.3840945
		F.后腿肉	195.608	79.71414375	40.7519855
	5	A.通脊肉	97.094	66.27195807	68.2554618
		B.五花肉	176.44	76.84539063	43.5532706
		C.前臀尖	124.88	115.4667337	92.4621506
		D.前腿肉	203.186	107.1944957	52.7568315
		E.后臀尖	116.881	91.62437287	78.391161
		F.后腿肉	154.771	127.7134305	82.5176748

[0093] 实施例四

[0094] 本实施例中,在制备样本处理液时,浸渍的时间为90分钟,其他步骤与实施一相同。

[0095] 屠宰牛和死宰牛的不同部位在浸渍90分钟下所检测到的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值如表四所示。对其进行统计学分析,如图12所示,屠宰牛肉和死宰牛肉样本的R值区间有明显区分,死宰牛肉R值明显高于屠宰牛。

[0096] 表四 各样品在浸渍90分钟下的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值

[0097]

样品类别	牛只编号	部位	浸渍 90 分钟		
			过氧化物酶浓度	血红蛋白浓度	R 值 (%)
屠宰牛	1	A.通脊肉	290.613	7.695327	2.647963787
		B.五花肉	180.196	7.58754	4.210714999
		C.前臀尖	282.765	6.114451	2.162379007
		D.前腿肉	286.362	8.413907	2.938206536
		E.后臀尖	263.363	63.27749	24.02671977
		F.后腿肉	153.709	25.695756	16.71714473
	2	A.通脊肉	250.61	19.623755	7.830395834
		B.五花肉	311.323	7.695327	2.471814482

[0098]

死宰牛		C.前臀尖	231.971	2.629338	1.133477029
		D.前腿肉	240.037	9.563635	3.984233681
		E.后臀尖	216.057	35.899592	16.61579676
		F.后腿肉	210.28	32.198905	15.31239538
	3	A.通脊肉	344.132	11.791233	3.426369242
		B.五花肉	272.301	3.347918	1.229491629
		C.前臀尖	326.147	6.617457	2.028979877
		D.前腿肉	353.07	12.653529	3.583858442
		E.后臀尖	162.756	36.941533	22.69749379
		F.后腿肉	227.72	21.995069	9.658821799
	4	A.通脊肉	300.641	19.189758	6.382947768
		B.五花肉	333.014	1.155378	0.346945774
		C.前臀尖	307.072	14.280399	4.650505093
		D.前腿肉	272.192	10.873905	3.994939234
		E.后臀尖	380.647	7.400617	1.944220498
		F.后腿肉	360.7	9.437834	2.616532853
	1	A.通脊肉	328.644	152.4282969	46.38097666
		B.五花肉	152.245	145.6753593	95.68482336
		C.前臀尖	412.423	162.615092	39.4292006
		D.前腿肉	249.075	153.5106541	61.63230114
		E.后臀尖	268.441	153.9534618	57.35094928
		F.后腿肉	372.428	168.9431513	45.36263421
	2	A.通脊肉	132.879	104.5385497	78.67198709
		B.五花肉	127.827	43.26030588	33.8428547
		C.前臀尖	153.508	121.2352259	78.97648714
		D.前腿肉	111.829	143.0230493	127.8944185
		E.后臀尖	110.566	114.056319	103.1567743
		F.后腿肉	172.032	169.7382457	98.66666999
	3	A.通脊肉	124.88	112.1954958	89.84264554
		B.五花肉	199.595	68.339688	34.23917834
		C.前臀尖	236.024	168.0400702	71.1961793
		D.前腿肉	135.405	125.6947701	92.82875084
		E.后臀尖	110.566	114.9951862	104.0059207
		F.后腿肉	157.297	164.2767177	104.4372859
	4	A.通脊肉	334.959	165.4805258	49.40321823

[0099]		B.五花肉	105.068	66.27195807	63.07530178
		C.前臀尖	100.041	158.3422329	158.2773392
		D.前腿肉	142.141	128.7312162	90.56585801
		E.后臀尖	129.09	87.74740767	67.97382266
		F.后腿肉	198.555	82.55641207	41.5786115
	5	A.通脊肉	103.409	99.37885788	96.10271628
		B.五花肉	195.385	60.56883743	30.99973766
		C.前臀尖	126.985	185.5080925	146.0866185
		D.前腿肉	208.238	172.8217521	82.99241832
		E.后臀尖	131.616	121.7250938	92.48502747
		F.后腿肉	132.458	193.3904746	146.0013549

[0100] 实施例五

[0101] 本实施例中,在制备样本处理液时,浸渍的时间为120分钟,其他步骤与实施一相同。

[0102] 屠宰牛和死宰牛的不同部位在浸渍120分钟下所检测到的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值如表五所示。对其进行统计学分析,如图13所示,屠宰牛肉和死宰牛肉样本的R值区间有明显区分,死宰牛肉R值明显高于屠宰牛。

[0103] 表五 各样品在浸渍120分钟下的氧化物酶浓度、血红蛋白浓度及R值

样品类别	牛只编号	部位	浸渍 120 分钟		
			过氧化物酶浓度	血红蛋白浓度	R 值 (%)
[0104] 屠宰牛	1	A.通脊肉	216.602	24.366383	11.2493804
		B.五花肉	332.905	3.671279	1.1028008
		C.前臀尖	287.452	14.234405	4.95192415
		D.前腿肉	360.591	36.402598	10.0952597
		E.后臀尖	167.225	43.768043	26.1731458
		F.后腿肉	185.537	24.797531	13.3652754
	2	A.通脊肉	285.054	17.899163	6.27921832
		B.五花肉	127.985	15.85121	12.3852092
		C.前臀尖	286.035	71.038154	24.8354761
		D.前腿肉	203.304	32.773769	16.1205726
		E.后臀尖	410.949	4.461717	1.08571064
		F.后腿肉	355.904	5.4318	1.52619808

[0105]

	3	A.通脊肉	251.046	29.540159	11.7668312
		B.五花肉	277.969	24.366383	8.76586346
		C.前臀尖	226.085	42.762031	18.9141389
		D.前腿肉	249.193	42.510528	17.0592786
		E.后臀尖	373.671	15.168559	4.05933535
		F.后腿肉	234.805	22.534004	9.59690126
	4	A.通脊肉	186.954	67.582011	36.1490051
		B.五花肉	194.802	12.510358	6.4220891
		C.前臀尖	340.971	3.225992	0.94611917
		D.前腿肉	207.991	55.4589	26.6640864
		E.后臀尖	286.02	35.053333	12.2555531
		F.后腿肉	350.454	5.663973	1.61618158
死宰牛	1	A.通脊肉	344.642	158.69158	46.0453386
		B.五花肉	165.296	150.97219	91.334446
		C.前臀尖	455.786	164.55458	36.1034738
		D.前腿肉	254.969	160.48309	62.9421972
		E.后臀尖	225.078	121.23523	53.8636499
		F.后腿肉	340.853	182.55641	53.5586931
	2	A.通脊肉	129.511	67.445062	52.0767058
		B.五花肉	126.143	51.795794	41.0611716
		C.前臀尖	153.508	136.54429	88.9492991
		D.前腿肉	183.399	131.30034	71.5927255
		E.后臀尖	111.408	157.75654	141.60252
		F.后腿肉	195.608	203.52883	104.049337
	3	A.通脊肉	134.984	179.09446	132.678287
		B.五花肉	121.487	57.698857	47.4938525
		C.前臀尖	254.127	156.72869	61.6733703
		D.前腿肉	118.144	108.09109	91.4909645
		E.后臀尖	110.566	115.93969	104.860165
		F.后腿肉	144.667	113.12309	78.1955034
	4	A.通脊肉	355.167	168.51471	47.4466119
		B.五花肉	118.961	65.982205	55.4654089
		C.前臀尖	102.988	169.12577	164.218911
		D.前腿肉	131.616	132.33786	100.548458
		E.后臀尖	141.299	93.615703	66.2536201

[0106]	5	F.后腿肉	202.344	102.36402	50.5891037
		A.通脊肉	107.198	132.33786	123.451798
		B.五花肉	104.647	91.230335	87.1791209
		C.前臀尖	137.51	303.80787	220.935109
		D.前腿肉	223.394	276.74528	123.882144
		E.后臀尖	130.774	212.57189	162.549043
		F.后腿肉	184.241	275.10178	149.316265

[0107] 图8是死宰牛肉和屠宰牛肉样品经过不同的浸渍时间后所检测到的R值分布,即对实施例一至五中结果进行汇总。通过对图8中的结果进行进一步分析,R值在20%--40%之间为区分死宰牛肉与屠宰牛肉的有效隔离区间。

[0108] 更加精确的,死宰牛肉的R值在35%以上,屠宰牛肉的R值都在25%以下。因此,根据以上数据,可以获得死宰牛肉的鉴定标准。即:

[0109] $R \leq 25\%$,判定所述检测样本为屠宰牛肉;

[0110] $R \geq 35\%$,判定所述检测样本为死宰牛肉。

[0111] 将各时间条件下R值检测结果进行详细比对的示意图如图9~13所示,将所有死宰牛肉与屠宰牛肉的数据进行处理分析,得到图14。

[0112] 由图9~13可知:相较于单一血红蛋白靶标区分,死宰牛肉和屠宰牛肉R值在各浸泡时间下均有明显区分,且差异极显著。

[0113] 在各时间条件下,鉴别正确率均在90%以上,而在60分钟时,死宰牛肉与健康牛肉的区分区域最为显著。

[0114] 由图14可知,死宰牛肉和屠宰牛肉样品经过不同的浸渍时间后所检测到的R值的差异显著性分析结果是差异极显著,因此,以R值作为死宰牛肉与健康牛肉的区分指标是可靠的。

[0115] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

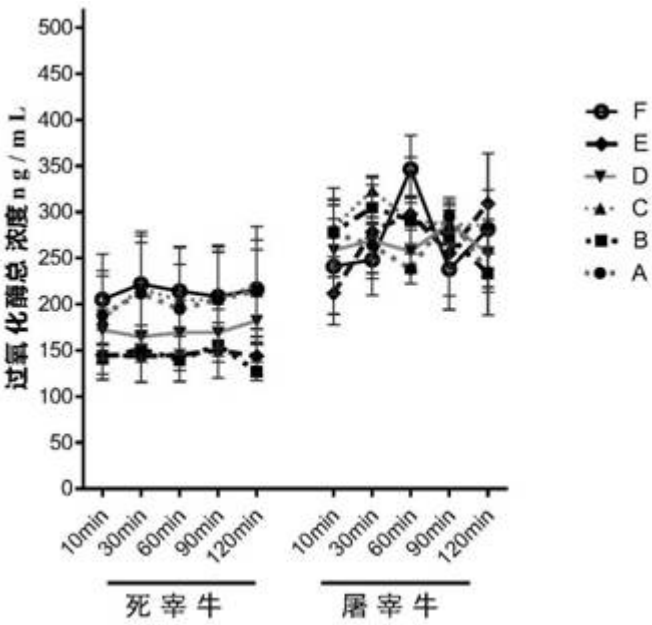


图1

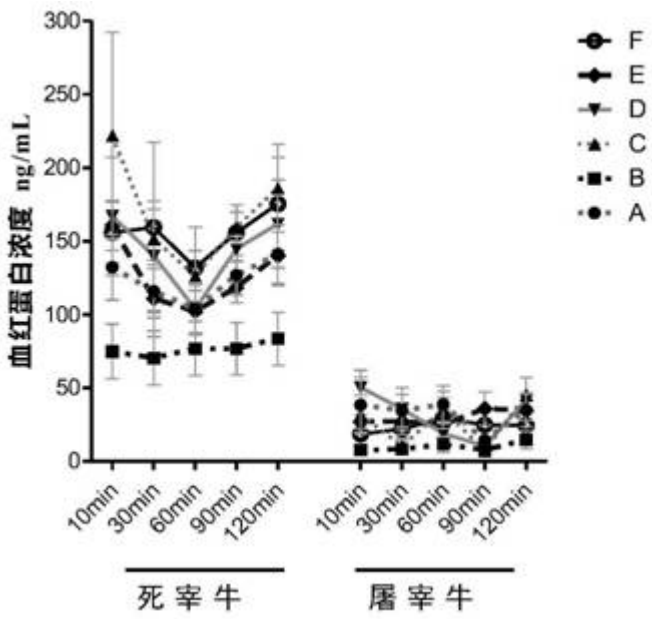


图2

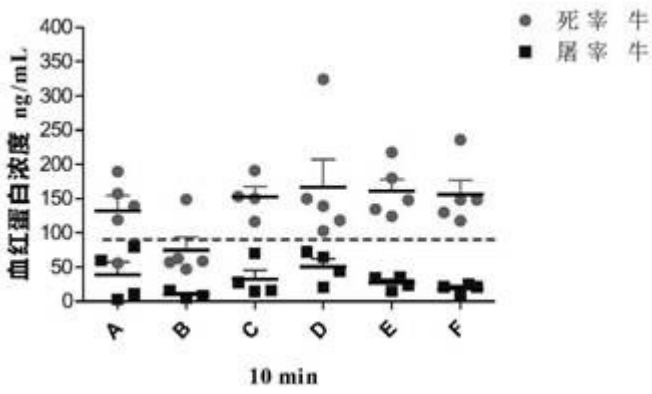


图3

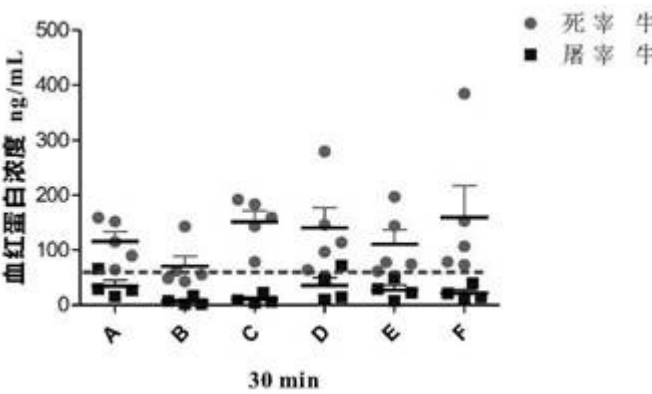


图4

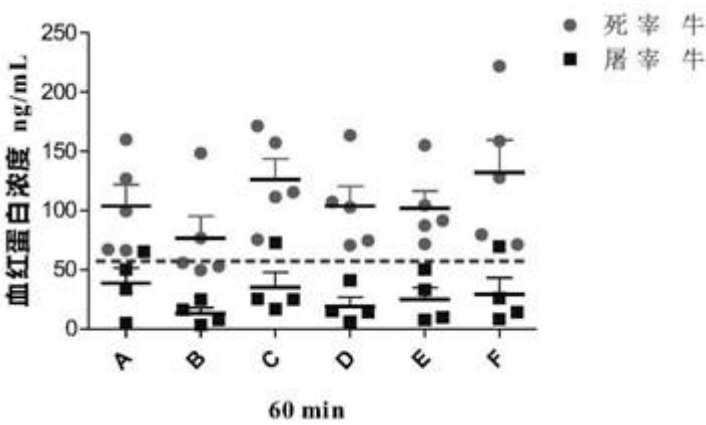


图5

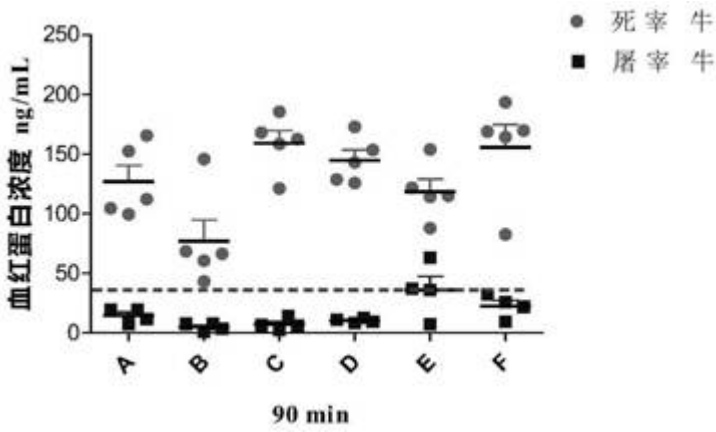


图6

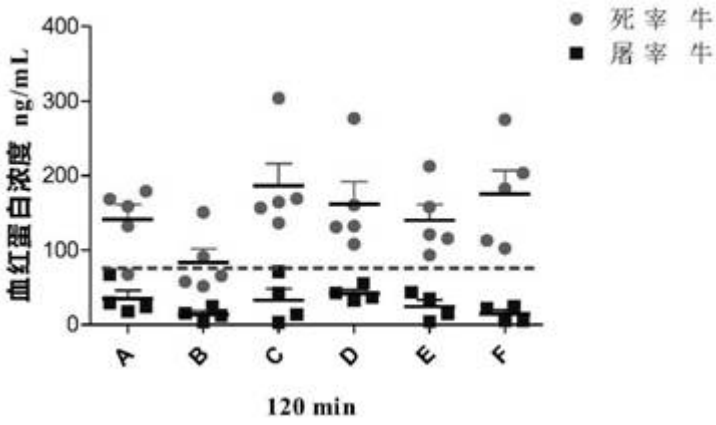


图7

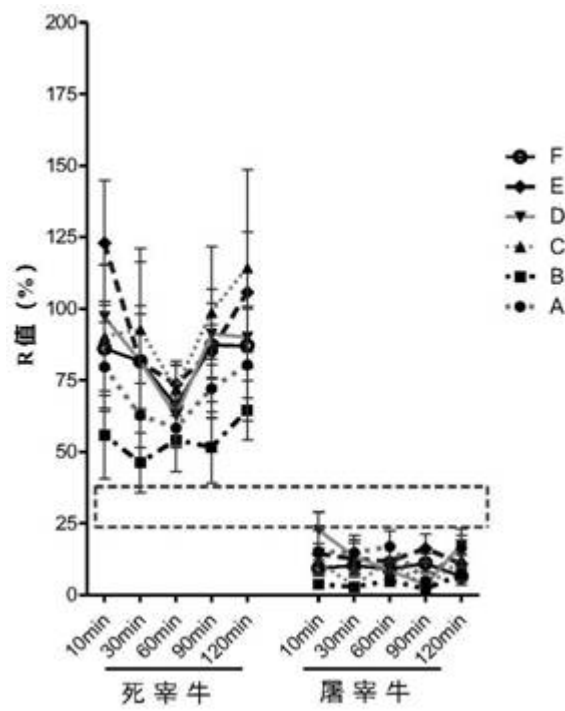


图8

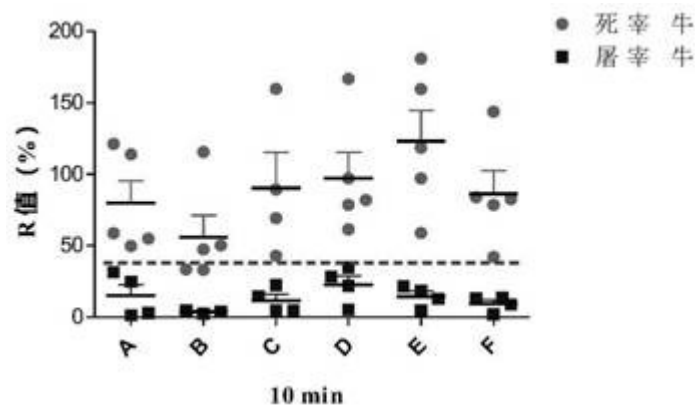


图9

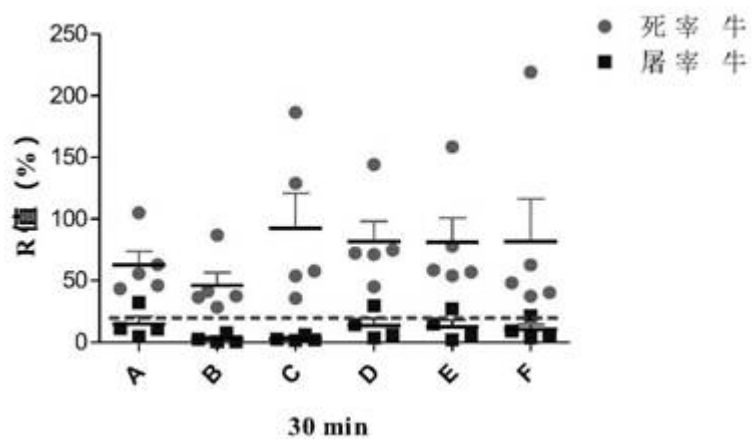


图10

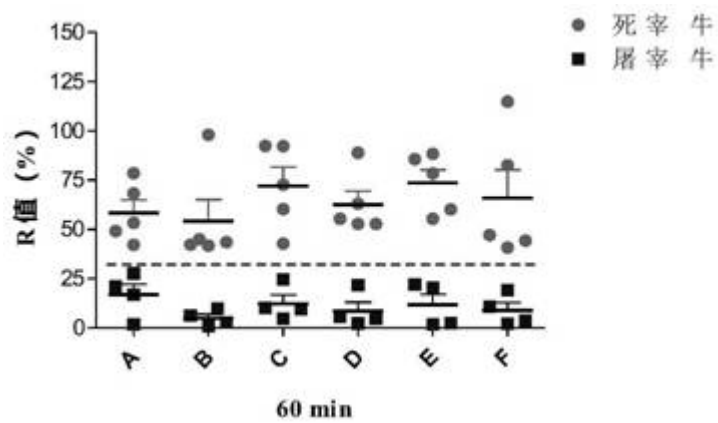


图11

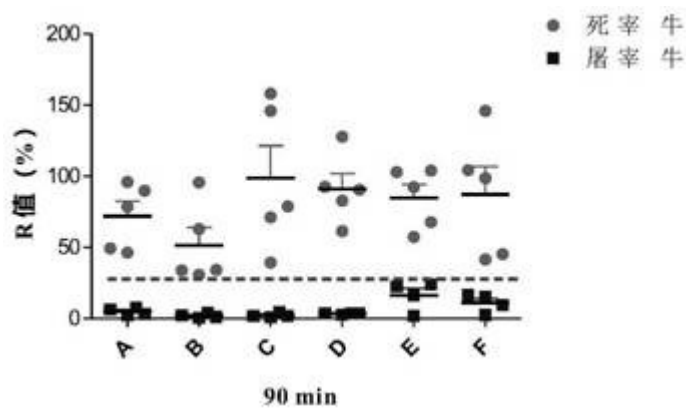


图12

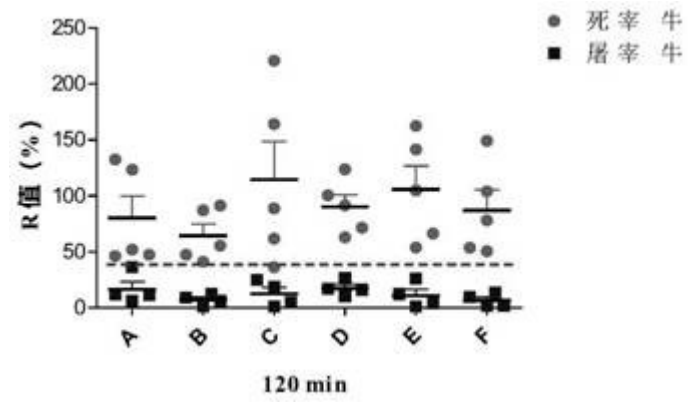


图13

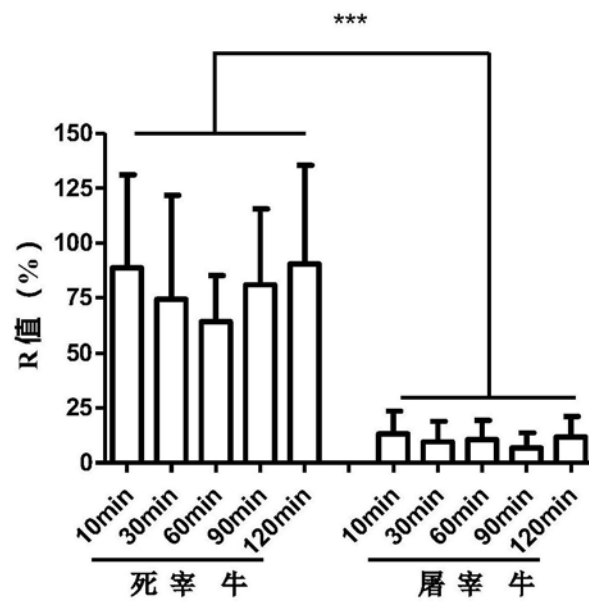


图14

专利名称(译)	一种死宰牛肉的鉴定方法		
公开(公告)号	CN110763815A	公开(公告)日	2020-02-07
申请号	CN201911233579.5	申请日	2019-12-05
[标]发明人	王增利 张若曦 马贵达 艾连峰 顾文源 李肿 马宏伟 董维亚 康志勇 赵彦岭 林建涵 张建虹 张哲 吴萌 王建昌		
发明人	王增利 韩庆安 张若曦 马贵达 艾连峰 顾文源 李肿 仇国明 马宏伟 董维亚 吴秀楼 康志勇 赵彦岭 林建涵 张建虹 张哲 吴萌 霍惠玲 王建昌		
IPC分类号	G01N33/12 G01N33/535 G01N33/58 G01N33/72 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/12 G01N33/535 G01N33/581 G01N33/721		
优先权	201811583081.7 2018-12-24 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明通过对血红蛋白残留和过氧化物酶活性进行双标检测，同时测定待测样本中过氧化物酶的浓度C1以及血红蛋白的浓度C2，通过公式 $R = C2/C1 \times 100\%$ ，获得R值，并通过收集大量的因不同病因、不同部位的死宰牛肉的数据，确立了R值的标准阈值，从而完成了对死宰牛肉的判定的绝对标准。采用本发明的检测方法，仅对待测样品进行单次实验，不受检测样本部位的限制，就可以确定待测样本是死宰牛肉还是屠宰牛肉。

