

纤维素酶降解-离子色谱法测定魔芋中的亚硝酸盐

陈 浩, 徐 娟, 薛爱芳, 李胜清, 康勤书

(华中农业大学理学院化学系, 湖北 武汉 430070)

摘要 :建立了以纤维素酶降解魔芋葡甘聚糖释放阴离子,然后采用离子色谱测定亚硝酸盐含量的方法。考察了纤维素酶降解葡甘聚糖的最佳条件,结果表明:在 50 ℃、pH 5.5 条件下酶解 24 h,可以释放出被包埋的亚硝酸盐。 NO_2^- 的检出限为 0.039 mg/L,回收率为 96.7%~97.8%。运用本法对施用稀土微肥后魔芋中亚硝酸盐的含量进行测定,发现施用稀土微肥能够在一定程度上降低魔芋中亚硝酸盐的含量。

关键词 :纤维素酶(cellulase);离子色谱法(ion chromatography, IC);亚硝酸盐(nitrite);魔芋(konjac)

中图分类号 :O658 文献标识码 :B 文章编号 :1000-8713(2007)04-0598-02 栏目类别 :技术与应用

魔芋的主要成分为魔芋葡甘聚糖(konjac glucomannan, KGM), KGM 是由 D-葡萄糖和 D-甘露糖通过 β -1,4 糖苷键聚合而成的高分子多糖,它是一种优质的膳食纤维,具有降血糖、降血脂、降血压、逆转脂肪肝、通便减肥、抗癌、增强免疫功能及抗衰老等医疗保健功效。随着我国各种魔芋功能食品的开发,魔芋已作为绿色食品摆上人们的餐桌。因此检测和控制魔芋中有害重金属及亚硝酸盐的含量意义重大。

我们曾报道了稀土微肥施用于魔芋具有不同程度的抗病和增产效果^[1];同时,喷施稀土微肥后能够降低镉、铅和铬重金属在魔芋中的积累^[2]。由于魔芋的主要成分 KGM 遇水溶胀,形成凝胶,并将阴离子包埋其中,因此直接用水提取的效率较低。本文通过纤维素酶水解 KGM,使其降解为低聚糖,同时释放出被 KGM 包埋的阴离子,然后采用离子色谱法直接测定亚硝酸盐含量。建立了纤维素酶降解-离子色谱法测定魔芋中亚硝酸盐含量的新方法,并考察了施用稀土微肥对魔芋中亚硝酸盐含量的影响。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

Dionex-1000 离子色谱仪(美国 Dionex 公司);超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);离心机(北京医用离心机厂);0.45 μm 微孔滤膜(北京格润得科技有限公司)。纤维素酶(1200 U/mg,北京拜尔迪生物公司)。供试魔芋样品(湖北省某县魔芋研究所)。

亚硝酸盐标准溶液(1000 mg/L):准确称取经 110 ℃烘干 2 h 的亚硝酸钠 0.1500 g,用去离子水

溶解,定容至 100 mL,置于冰箱中于 4 ℃保存,使用前稀释。所用试剂为分析纯,去离子水。

魔芋样品粉末制备:清洗→去皮→切碎→烘干→研磨→筛分。

1.2 色谱条件

Dionex Ionpac AS9-HC 分析柱;淋洗液:9.0 mmol/L Na_2CO_3 ;抑制柱电流 54 mA;电导池温度:35 ℃;流速:1.2 mL/min;进样量 25 μL 。

1.3 样品制备

称取 1.000 g 魔芋样品粉末,加入 0.300 g 纤维素酶,用去离子水定容至 25 mL 的比色管中。将比色管置于 50 ℃的恒温水浴锅中酶解 24 h 后,取出,自然冷却,所得溶液经 4000 r/min 离心 10 min 后,上层清液通过 0.45 μm 微孔滤膜后进行离子色谱分析。

1.4 酶水解率的测定

配制一定浓度的魔芋样品粉末溶液,加入不同量的纤维素酶,在 50 ℃水浴酶解,反应结束后在沸水浴中灭酶活 10 min。将酶解液经适当稀释后,用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[3]测定其中的还原糖量,以还原糖量与葡甘聚糖总糖量的比值计算得酶水解率。

2 结果与讨论

2.1 pH 值的选择

称取 8 份 1.000 g 魔芋样品粉末和 0.300 g 纤维素酶于 25 mL 比色管中,充分摇匀,分别用不同 pH 值的缓冲液定容至刻度,于 50 ℃水浴 2 h 后,测定酶解 KGM 产生的还原糖的浓度,并计算水解率(见图 1)。结果显示:在 pH 5.5 时,水解率最高,纤维素酶的活力最强。

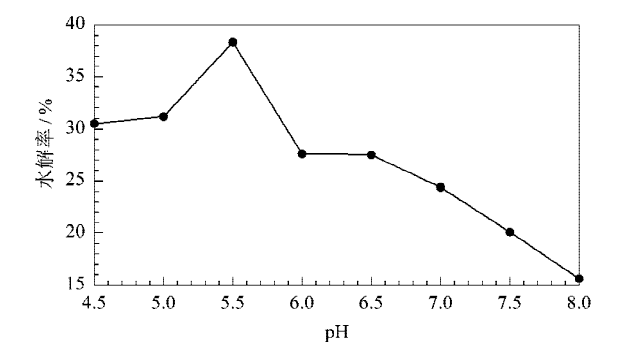


图 1 pH 对酶解的影响

2.2 纤维素酶用量的选择

称取 7 份 1.000 g 魔芋样品粉末置于 25 mL 比色管中,依次加入纤维素酶 0.100 ,0.200 ,0.300 ,0.400 ,0.500 ,0.600 和 1.000 g ,摇匀 ,分别加入 2 mL 100 mg/L 的亚硝酸盐标准溶液 ,定容至刻度。将比色管于 50 ℃ 水浴中酶解 24 h 后 ,自然冷却至室温 ,测定并计算酶水解率和亚硝酸根的回收率。由图 2 可知 ,随着纤维素酶用量的增加 ,还原糖量不断增加 ,但回收率在加入酶量为 0.300 g 时就基本稳定了。故选取纤维素酶用量为 0.300 g。

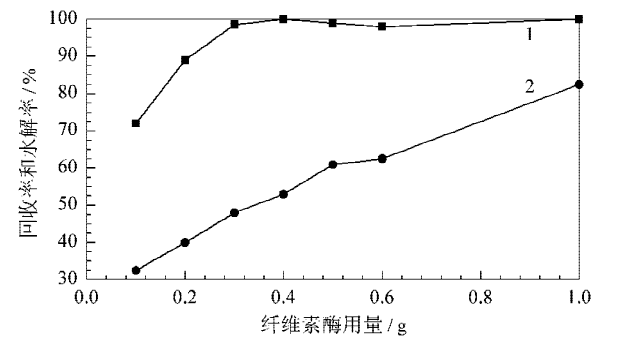


图 2 酶量对酶解的影响
1. 亚硝酸根的回收率 ;2. 酶水解率。

2.3 方法的线性范围和检出限

配制质量浓度为 0.05 ,0.1 ,0.2 ,1 ,5 ,10 ,20 mg/L 的一系列 NO_2^- 标准溶液 ,在选定的色谱条件下测定。以 NO_2^- 的质量浓度为横坐标(x ,mg/L) ,

以峰面积(y)对相应的质量浓度进行回归处理 ,其回归方程为 $y = 0.0841x - 0.0036$,相关系数 $r = 0.9999$, NO_2^- 在 0.05 ~ 20 mg/L 范围内呈良好的线性关系。以 $S/N = 3$ 计算 , NO_2^- 的检出限为 0.039 mg/L。

2.4 精密度和回收率

配制浓度为 1 mg/L 的 NO_2^- 标准溶液 ,在“ 1.2 ”节色谱条件下 ,连续进样 7 次 ,测得峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.22%。

称取魔芋样品粉末 1.000 g ,加入 0.300 g 纤维素酶 ,按“ 1.3 ”节样品制备方法处理 ,同时作加标回收实验 ,结果见表 1。 NO_2^- 的回收率在 96.7% ~ 97.8% 之间 ,表明该法有较好的准确度。

表 1 NO_2^- 的回收率			
本底值/ (mg/L)	添加值/ (mg/L)	测定值/ (mg/L)	回收率/ %
4.29	8.00	12.03	96.7
4.53		12.35	97.8
4.03		11.82	97.4

2.5 分析应用

将上述方法用于魔芋样品分析 ,以考察喷施稀土微肥对魔芋中亚硝酸盐含量的影响。准确称取施用稀土微肥的魔芋样品和对照样品各 1.000 g ,按“ 1.3 ”节所述步骤处理后 ,在“ 1.2 ”节色谱条件下测定(魔芋样品的色谱图见图 3) ,分析结果见表 2。

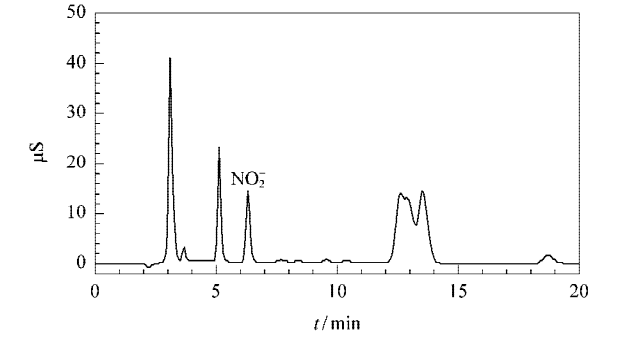


图 3 魔芋样品的色谱图

表 2 样品中 NO_2^- 的测定结果($n = 3$)								
魔芋样品	E_1	E_2	$\bar{E}$	A	B	C	D	$\bar{S}$
亚硝酸盐含量/(mg/g)	0.141	0.127	0.134	0.077	0.098	0.064	0.057	0.074

注 : E_1 和 E_2 为未施用稀土微肥的魔芋对照品 , $\bar{E}$ 为其对照平均值 ;A、B、C、D 均为施用稀土微肥的魔芋样品 ,其中 A、B 的喷施稀土微肥浓度为 0.2% ,C、D 的喷施浓度为 0.3% ;A、C 喷施稀土微肥的次数为 2 次 ,B、D 的喷施次数 4 次 ; $\bar{S}$ 为样品 A ~ D 的平均值。

结果表明 :施用稀土微肥 ,可以在一定程度降低魔芋中亚硝酸盐的含量。这可能由于稀土可使植株硝酸还原酶的活性明显提高 ,有利于植物体内无机硝态氮转化为有机氮化物(氨基酸 ,蛋白质) ,从而使植物体内硝态氮的含量减少 ,氨基和总氮含量增加。

参考文献 :

[1] 薛爱芳 ,徐娟 ,陈浩 ,李庆 ,刘汉兰 ,李胜清 ,徐兴全 ,夏良荣. 湖北农业科学 ,2005(5) :89
[2] 徐娟 ,王敏 ,薛爱芳 ,李庆 ,康勤书 ,陈浩. 中国稀土学报 ,2006 ,24(专辑) :122
[3] 胡敏 ,李波 ,龙萌 ,尹志荣. 湖北农业科学 ,1998(5) :56