

酶催化显色法测定小麦粉中的过氧化钙

张玉荣¹, 张德伟^{1,2}, 周显青¹

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001)(2. 中储粮北京分公司质检监督管理中心, 河北承德 067101)

摘要: 基于过氧化钙(CaO₂)在酸性介质中可生成过氧化氢, 过氧化氢在辣根过氧化物酶(HPR)的催化作用下, 以KI为增敏剂, 可快速氧化季胺[4,4'-(二甲氨基)-二苯基甲烷]显色的原理, 建立了小麦粉中CaO₂定性测定的目视比色法和定量测定的分光光度法。研究了HPR用量、KI用量、季胺用量、pH值、反应温度和反应时间对显色的影响, 并对测定条件进行了优化。结果表明: 在最佳实验条件下, 显色体系的颜色随CaO₂标准使用液浓度的升高而加深, 根据颜色的渐变与CaO₂浓度的关系制作了目视比色测定的标准比色带; 且显色体系吸光度在CaO₂浓度0 mg/L~9 mg/L范围内符合比尔定律, 线性回归方程为 $\Delta A = 0.107C + 0.0052$, $R^2 = 0.9994$ 。该法用于实际样品的分析, 目视比色法可快速确定CaO₂的含量范围, 分光光度法检出限为 1.64×10^{-2} mg/L, 加标回收率为96.3%~101.7%, RSD为1.74%~3.15%。

关键词: 小麦粉; 过氧化钙; 测定; 目视比色法; 分光光度法

文章编号: 1673-9078(2015)5-262-266

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.041

Enzyme Catalytic Chromogenic Method for Determination of Calcium Peroxide in Wheat Flour

ZHANG Yu-rong¹, ZHANG De-wei², ZHOU Xian-qing¹

(1. College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

(2. Quality Determination Center of Beijing Company of China State Grain, Chengde 067101, China)

Abstract: As calcium peroxide can generate hydrogen peroxide in an acidic medium, visual colorimetry for rapid qualitative analysis and spectrophotometry for quantitative analysis of calcium peroxide in wheat flour were established based on the principle that hydrogen peroxide can cause rapid oxidation and chromogenesis in quaternary amine [4,4'-(dimethyl amine)diphenyl methane] by using horseradish peroxidase (HPR) as the catalyst with KI as the sensitization agent. In this study, the experimental conditions for detecting calcium peroxide were optimized, and the experimental factors influencing chromogenesis, including the HPR content, KI content, quaternary amine content, pH, reaction temperature, and reaction time, were investigated. The results showed that under the optimum conditions, the color of the complex gradually deepened with increasing calcium peroxide content. Based on the relationship between the color gradients and concentration of calcium peroxide, a standard color card was created for visual colorimetric determination. Beer's law was obeyed when the concentration range of calcium peroxide was within 0~9 mg/L. The linear regression equation was as follows: $\Delta A = 0.0052 + 0.107C$, with a correlation coefficient of 0.9994. The recovery rate for spiked standards was within 96.3%~101.7%, and the relative standard deviation was 1.74%~3.15%. The range of calcium peroxide content was rapidly determined by visual colorimetry and its detection limit was 1.64×10^{-2} mg/L.

Key words: wheat flour; calcium peroxide; determination; visual colorimetry; spectrophotometry

过氧化钙(CaO₂)为白色晶体状固体, 不溶于水, 易溶于甲醇、乙醚等有机溶剂, 一般用作防腐剂、杀菌剂、漂白剂、增白剂等^[1-2]。CaO₂添加到小麦粉中, 可较高程度地漂白小麦粉的同时提高面筋筋力和面团韧性, 我国在过去曾广泛使用CaO₂作为小麦粉处理剂并规定其最大添加量为0.5 g/kg^[3]。但最近研究表

明, 食用含有过量CaO₂的小麦粉会刺激胃肠道, 引发胃部不适, 长期食用则可加重人体的肝脏代谢负担, 导致慢性疾病。随着我国小麦粉加工工艺的提高和对人们身体健康的考虑, 于2011年禁用了CaO₂作为小麦粉处理剂^[4]。目前, 已报道的CaO₂含量的分析方法有: 热分解法、高锰酸钾法、间接碘量法, EDTA法等^[5-6], 而这些方法只适用于CaO₂纯品的分析, 并不能用于小麦粉中CaO₂的检测。孙兴权等^[7]提出组合分析法分析小麦粉中CaO₂、雕白粉、大白粉、滑石粉等四种违禁添加物的含量, 该法依次通过酸碱度测试、

收稿日期: 2014-08-14

作者简介: 张玉荣(1967-), 女, 教授, 主要从事农产品储藏与品质分析
通讯作者: 周显青(1964-), 男, 博士, 教授, 主要从事谷物科学及产后加工利用

下是否符合比尔定律。

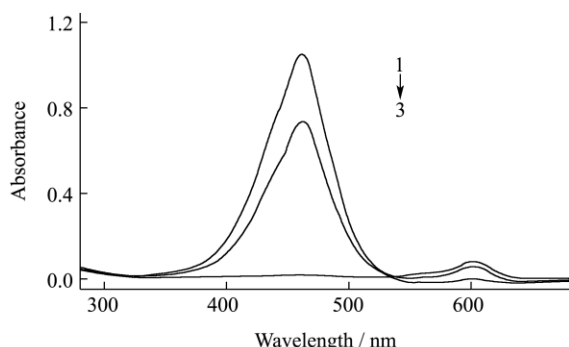


图1 光谱吸收曲线

Fig.1 Absorption spectra of the color system

注: 1. 1.0 mL CaO_2 标准使用液+PBS+HRP+KI+季胺; 2. 0.6 mL CaO_2 标准使用液+PBS+HRP+KI+季胺; 3. 0 mL CaO_2 标准使用液+PBS+HRP+KI+季胺。

2.3 测定条件的选择及优化

2.3.1 pH 值对显色的影响

酶催化反应需在适宜的pH值下进行, 研究了柠檬酸-柠檬酸盐、HAc-NaAc和PBS缓冲溶液作为pH值调节剂对显色的影响, 结果表明: 选择柠檬酸-柠檬酸盐、HAc-NaAc作为缓冲液时体系出现浑浊现象, 故选择PBS作为缓冲液。在 CaO_2 浓度为10 mg/L时, HRP、KI和季胺溶液均为50 μL 的情况下, 分别加入不同量的PBS缓冲液调节pH, 考察pH值对显色的影响, 结果如图2所示。

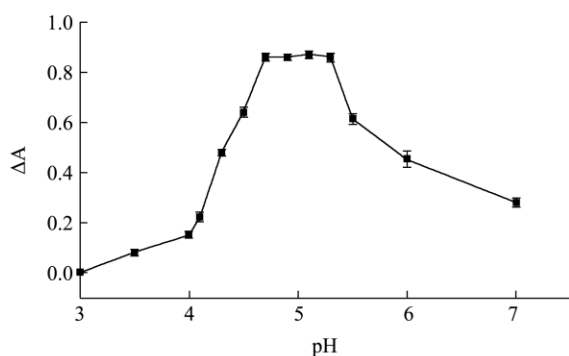


图2 pH 对显色的影响

Fig.2 Influence of pH on the absorbancy of the system

根据图2, 当显色体系的吸光度在pH值4.7时达到最大, 并在4.7~5.3之间趋于稳定, 实验选择5.0作为测定的pH值。

2.3.2 反应介质用量对显色的影响

采用单因素轮换法, 在 CaO_2 浓度为10 mg/L时, 按照1.2.3中方法考察HRP、KI、季胺等反应介质用量对显色的影响, 结果如图3、图4、图5所示。

HRP作为反应的催化剂, 其用量可影响催化反应

的速度和进行的程度, 根据图3: 当HRP用量在0 μL ~40 μL 之间时体系的 ΔA 逐渐上升, 在40 μL 时达到最大并在40 μL ~70 μL 之间趋于稳定, 实验选择HRP加入量50 μL 。

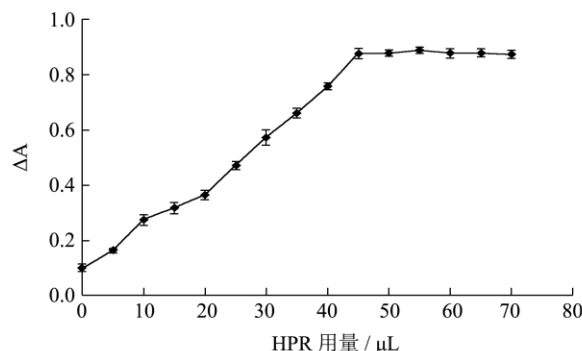


图3 HRP 用量对显色的影响

Fig.3 Influence of the HRP dosage on the absorbancy of the system

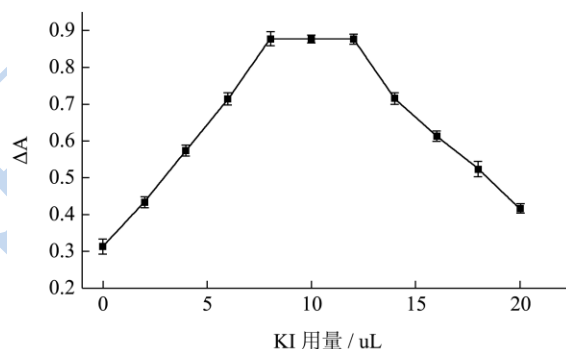


图4 KI 用量对显色的影响

Fig.4 Influence of the KI dosage on the absorbancy of the system

KI在体系反应中充当增敏剂的作用, 图4表明: 在KI用量为8 μL ~12 μL 时增敏效果最好, 体系的吸光度达到最大, 实验选取10 μL 加入量。

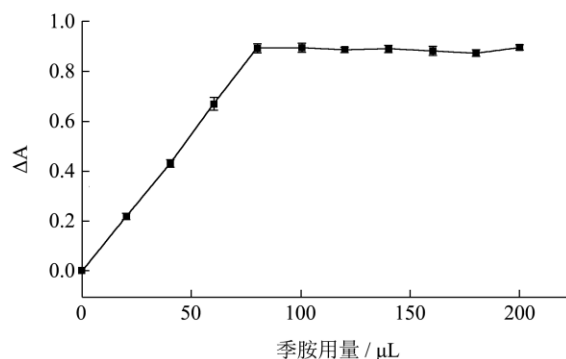


图5 季胺用量对显色的影响

Fig.5 Influence of the quaternary ammonium dosage on the absorbancy of the system

季胺作为被氧化的底物, 其用量可影响显色进行的程度, 根据图5: 当季胺用量为80 μL 时, 显色体系

的吸光度达到最大,实验选择100 μL作为季胺加入量。

经过上述实验,得到的反应介质最佳用量分别为: HPR 50 μL、KI 10μL、季胺100μL。

2.3.3 环境条件对显色的影响

酶催化反应需要在适宜的温度下进行,在反应时间为 30 min,反应介质为最佳用量的条件下,考察反应温度对显色的影响,结果(图6)表明:40℃时具有最高的吸光度,所以,实验选择40℃作为反应温度。

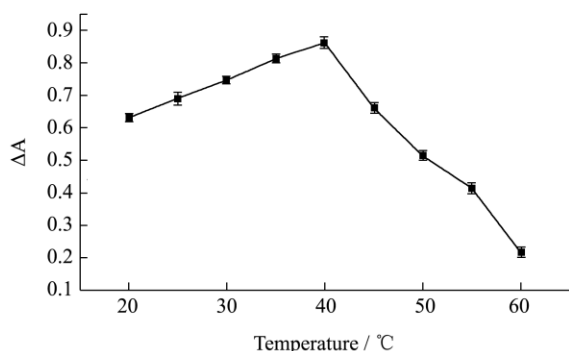


图6 反应温度对显色的影响

Fig.6 Influence of reaction temperature on the absorbancy of the system

在最佳介质用量和最佳反应温度下,研究反应时间对显色的影响,结果(图7)表明:显色体系的吸光度在反应8 min时已达到最大,实验选取10 min作为反应时间。

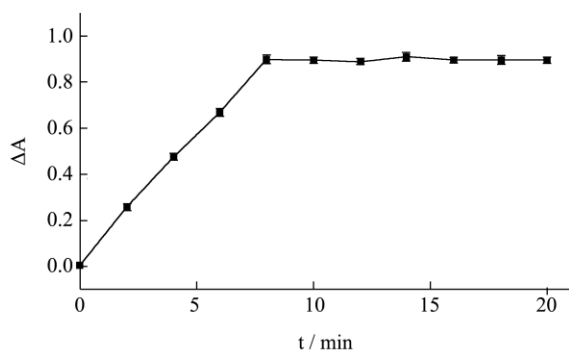


图7 反应时间对显色的影响

Fig.7 Influence of water bath time on the absorbancy of the system

经过上述实验,得到的最优化实验方法为:取一定量的标准液或待检液于10 mL比色管中,分别加入50 μL HPR、10 μL KI、100 μL季胺,然后加入PBS缓冲液调节pH为5.0,于40℃水浴反应10 min后,定容,观察溶液颜色并在460 nm波长下测其吸光度。

2.3.4 标准比色带与标准曲线

在最优化实验条件下,准确吸取一系列的不同浓度的CaO₂标准使用液于10 mL比色管中,按照建立的操

作方法显色后,利用扫描仪采集显色后的图像,并利用photoshop根据颜色的渐变规律进行拟合,得到CaO₂测定的标准比色带(图8);在460 nm处测测定体系和空白的吸光度A与A₀,并计算ΔA = A - A₀值,得到测定的标准曲线(图9)。

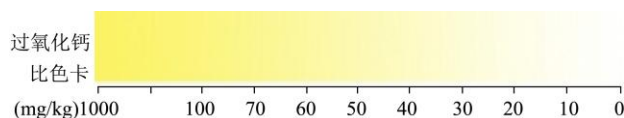


图8 过氧化钙测定的标准比色带

Fig.8 Standard color chart of the calcium peroxide content

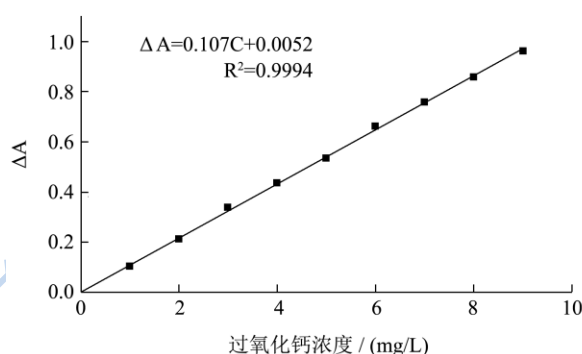


图9 过氧化钙测定的标准曲线

Fig.9 Standard curve obtained during the determination of calcium peroxide

根据图8,标准比色带的颜色按照刻度上CaO₂含量的增加而加深,当被测样品按照最优化显色条件显色后,可与标准比色带进行对比,得出大致含量范围。根据图9:该显色体系在CaO₂浓度0 mg/L~9 mg/L范围内呈线性相关,相关系数为R²=0.9994。

2.3.5 检出限与干扰试验

对一份空白小麦粉样品,进行11次空白检测试验,得到标准差S_b=5.86×10⁻⁴,由3倍标准偏差除以工作曲线斜率,得出本法检出限为1.64×10⁻² mg/L。

在最优化实验条件下,按试验方法测定0.1 mg/L的CaO₂,在相对误差±5%内,10倍K⁺、Fe³⁺、Na⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Pb²⁺、S²⁻、NO³⁻、SO₄²⁻、Cl⁻、等离子均不干扰测定。过氧化苯甲酰也为过氧化物,可干扰显色,本法前处理中加入20 mL丙酮,震荡5 min后,离心,弃去上清液正是为了排除过氧化苯甲酰的干扰,可见本法抗干扰能力较强。

2.4 验证试验与分析

在最优化实验条件下,进行样品测定和加标回收率分析,结果(表1)表明:根据显色后溶液的颜色与标准比色带进行对比,可得出CaO₂大致含量范围,分光光度法测定样品的回收率为96.3%~101.7%,RSD

为 1.74%~3.15%。

表 1 实际样品中过氧化钙含量测定结果 (n=6)

Table 1 Recovery rates of BPO in spiked samples(n=6)

样品 编号	分光光度法 测定本底 值/(mg/kg)	加标量 /(mg/kg)	显色体 系颜色 显示	分光光度法 测定总量 /(mg/kg)	回收 率/%	RSD /%
1	0	30	■	28.89	96.3	2.26
2	0	50	■	49.46	98.92	3.11
3	0	80	■	81.36	101.7	1.96
4	28.43	30	■	57.26	97.8	3.15
5	55.13	50	■	104.87	99.75	2.28
6	80.74	80	■	161.58	100.52	1.74

3 结论

本文根据 CaO₂在酸性介质中可生成 H₂O₂, H₂O₂在 HPR 的催化作用下,以 KI 为增敏剂,可快速氧化季胺显色的原理,建立了小麦粉中 CaO₂定性测定的目视比色法和定量测定的分光光度法,并对测定条件进行了选择和优化。在最佳测定条件下,显色体系的颜色随 CaO₂浓度的升高而加深,且在 CaO₂浓度 0 mg/L~9 mg/L 范围内符合比尔定律。用于实际样品的分析,目视比色法可快速确定 CaO₂的含量范围,分光光度法检出限为 1.64×10⁻² mg/L,加标回收率为 96.3%~101.7%,RSD 为 1.74%~3.15%。

参考文献

[1] 葛飞,李权,刘海宁,等.过氧化钙的制备与应用研究进展[J].无机盐工业,2010,2:1-4
GE Fei, LI Quan, LIU Hai-ning, et al. Progress in preparation and applications of calcium peroxide [J]. Inorganic Chemicals Industry, 2010, 2: 1-4

[2] Qian Y, Zhou X, Zhang Y, et al. Performance and properties of nanoscale calcium peroxide for toluene removal [J]. Chemosphere, 2013, 91(5): 717-723

[3] 岳青.面粉中违禁的添加物[J].粮食加工,2012,37(2):19-21
YUE Qing. Illegal additives in wheat flour [J]. Grain Processing, 2012, 37(2): 19-21

[4] 梁讯.卫生部等 7 部门关于撤销食品添加剂过氧化苯甲酰、过氧化钙的公告[J].粮食与食品工业,2011,18(2):30-30
LIANG Xun. The ministry of health and other 7 departments on the revocation of food additives, benzoyl peroxide, calcium peroxide announcement [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 18(2): 30-30

[5] 高誉,马兵,潘易,等.过氧化钙含量分析方法的比较研究[J].

湖北农业科学,2011,17(50):3625-3627
GAO Yu, MA Bing, PAN Yi, et al. Analysis and comparison of the methods of calcium oxide content [J]. Journal of Hubei Agricultural Sciences, 2011, 17 (50): 3625-3627

[6] 吴莉莉,李群芳.过氧化钙的碘量分析法[J].西南民族学院学报:自然科学版,2000,26(1):105-107
WU Li-li, LI Qun-fang. Analysis of calcium peroxide by iodine quantity method [J]. Journal of Southwest Nationalities College(Natural Science Edition), 2000, 26(1): 105-107

[7] 孙兴权,曾泽,赵景红,等.组合分析法检测小麦粉中 4 种非法添加物[J].食品工业科技,2013,34(21):305-309
SUN Xing-quan, ZENG Ze, ZHAO Jing-hong, et al. Combined analysis of 4 kinds of illegal additives were detected in wheat flour [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(21): 305-309

[8] CHEN Wei, SHI Wen, LI Zhao, et al. Simple and fast fluorescence detection of benzoyl peroxide in wheat flour by N-methoxy rhodamine-6G spiroactam based on consecutive chemical reactions [J]. Anal. Chim. Acta., 2011, 708(1/2): 84-88

[9] Mu G, Liu H, Gao Y, et al. Determination of benzoyl peroxide as benzoic acid in wheat flour by capillary electrophoresis compared with HPLC [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(4): 960-964.

[10] Yukiko A O, Chikako Y, Naoki S, et al. Determination of benzoyl peroxide and benzoic acid in wheat flour by high-performance liquid chromatography and its identification by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1040: 209-214

[11] 张玉荣,张德伟,周显青,等.小麦粉中过氧化苯甲酰的定性和定量检测方法研究[J].现代食品科技,2014,30(1):170-174
ZHANG Yu-rong, ZHANG De-wei, ZHOU Xian-qing, et al. Qualitative and quantitative detection methods of benzoyl peroxide in wheat flour [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(1): 170-174

[12] 刘林,彭蜀晋.小麦粉添加剂过氧化苯甲酰的作用机理及安全性研究[J].安徽农业科学,2011,39(6):3669-3671
LIU Lin, PENG Shu-jin. Research on function mechanism and safety of benzoyl peroxide in wheat flour additives [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(6): 3669-3671