

入 500ml 圆底烧瓶中,加入水 100g,放在电热套中加热,溶剂瓶中放入 40ml 正戊烷,在 40℃ 下,用同时蒸馏提取器上提取 4h.

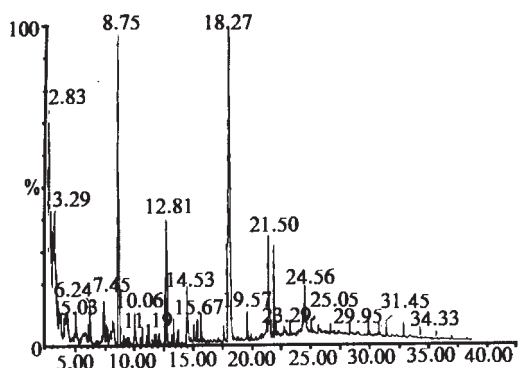
(4) 提取液用无水 Na_2SO_4 干燥,然后用 Vigreux 柱 (30cm × 2cm) 浓缩至约 1ml,浓缩液用清华大学所购的 PERKIN ELMER 公司的 TurboMass 气-质联用仪 (GC/MS) 进行分析.

(5) 气-质联机分析的条件^[12]:

气相色谱实验条件:色谱柱 SE-54 石英毛细管柱 (30m/0.25mm). 柱温:80℃ (2min) → 10℃/min → 150℃ (10min) → 20℃/min → 260℃ (10min). 气化口温度 280℃, 色谱-质谱接口处温度 260℃, 柱前压力 1.70KPa, 载气为氦气, 气流量 0.5ml/min, 分辨率 10:1.

质谱实验条件:质量扫描范围 20.00~400.00, 扫描时间 2.20~40.00min, 增益 1.2kV, 溶剂切割 1.5min.

2 结果与讨论



从表中可以看出:

(1) 从本 Maillard 反应模型系统中分离鉴定出了 2-甲基-3-呋喃硫醇、2-乙酰基呋喃、2-甲基-四氢噻吩酮、苯乙醛、3-甲基-2-噻吩醛、3-乙基-2-噻吩醛、反式茴香醚、二(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚、二(2-甲基-4,5-二氢-3-呋喃基)二硫醚、十六醛、

十八醛等重要肉香味或鸡肉味化合物,与文献报道相吻合.说明本 Maillard 反应模型系统组成的正确性,这是除感官评定外的又一有力的佐证,提供了科学根据.

(2) 炖鸡中的主要香味物质反,反-2,4-癸二烯醛、 γ -十二内酯(根据 U. Gasser & W. Grosch)并未从本 Maillard 反应模型系统中分离鉴定出,说明本体系的风味是以烤肉味为主的.

参考文献

- 1 A. E. Wasserman, Thermally produced flavor components in the aroma of meat and poultry[J], "J. of Agric. & Food Chem.", 20 (4): 737 ~ 747, 1972.
- 2 H. Shi & C. T. Ho, The flavor of poultry meat[A], Flavor of Meat & Meat Products[M], pp52 ~ 70, London: Blakie Academic & Professional, 1994.
- 3 Farmer, Poultry meat flavor[A], Poultry Meat Science[M], pp127 ~ 158, New York: GAB International, 1999.
- 4 U. Gasser & W. Grosch, Primary odourants of chicken broth[J], "Z. Lebensm. Unters. Forsch.", 1990: 3 ~ 8, 1990.
- 5 I. D. Morton[P], G. B. Patent 836, 694(1960).
- 6 G. Mealeod & M. Seyyedain - Ardebili, Natural & simulated meat flavors (with particular reference to beef)[J], "CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition", 308 ~ 437, 1991.
- 7 G. Macleod, The Scientific & Technological Basis of Meat Flavors[A], Development in Food Flavors[M], pp191 ~ 227, London: Elsevier, 1986, 192 ~ 223.
- 8 D. Mottram, Some factors in influencing meat-like Maillard reaction[J], Thermally Generated Flavors[M], pp105 ~ 126, Washington DC: American Chemical Society, 1995.
- 9 L. Chhuy et al[P], U. S. Patent 4, 081, 565(1978).
- 10 B. Lieske, Protein Hydrolysis - The Key to Meat Flavoring Systems[J], Food Reviews International, 1994, 10(3): 287 ~ 312.
- 11 J. Adler - Nissen, Mechanism of Enzymic Hydrolysis[A], Enzymic Hydrolysis of Food Proteins[M], London: Elsevier, 1986, 46 ~ 84.

固定化酶流动注射化学发光法测定淀粉的含量

袁道强 郑州轻工业学院食品与生物工程系 450002

舒友琴 郑州牧业工程高等专科学校 450008

摘要 用溶液凝胶法固定 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖氧化酶,将其用于流动注射化学发光分析体系,可实现对淀粉的快速检测,测定的线性范围为 10 ~ 200mg/L,检出限为 0.2mg/L,10 次测定的相对标准偏差为 1.8%。

关键词 溶液凝胶技术 固定化酶 化学发光 淀粉

Abstract In this paper, α -amylase, glucoamylase and glucose oxidase were Immobilized by sol-gel. With its application to flowing injection chemiluminescence system, starch could be rapidly determined with the linear range of its concentration in 10-200mg/L and detection limit at 0.2mg/L. The relative standard deviation (RSD) is 1.8% with 10 continuous assays.

Key words Sol-gel technique Immobilized Enzyme Chemiluminescence Starch

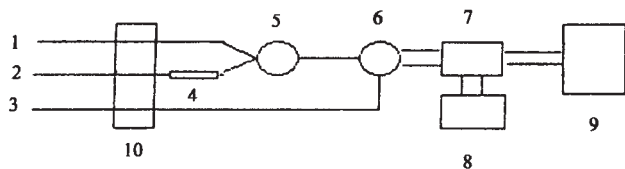
淀粉测定的方法之一是酶水解法,即在淀粉酶的作用下,使淀粉水解为麦芽糖和低分子糊精,再用酸进一步水解,使淀粉全部转化为葡萄糖,然后按测还原糖的方法测定生成的葡萄糖,并折算成淀粉的含量。方法繁琐费时,且在此酶法分析中,溶液酶是一次性消耗的,不能重复使用,造成酶试剂的浪费。

溶胶凝胶过程具有纯度高、均匀性强、处理温度低、反应易于控制等优点^[1],另外,近期的研究^[2-5]表明,采用溶胶凝胶技术将酶固定于无机陶瓷或玻璃材料内,酶的活性保持能有明显改善,并具有更好的坚固性、抗磨性、化学惰性以及高的光稳定性和透过性。使之比传统的固定方法具有更多的优势。本文采用硅酸乙酯(TEOS)的溶胶凝胶过程固定了 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖氧化酶,制备了固定化的 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖氧化酶柱,并结合流动注射化学发光系统测定了淀粉的含量。方法具有多种优点:节省酶试剂,操作简便,专一性高,测定速度快。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

IFIS-C型智能流动注射进样器及GD-1型微量光测量仪(西安瑞科电子设备有限公司),Rikadenki记录仪。发光分析的流路系统如图1所示。

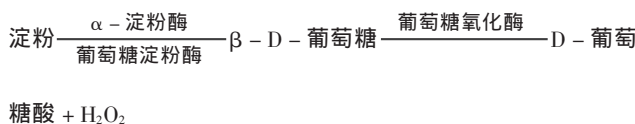


1. Luminol 2. $K_3Fe(CN)_6$ 3. 待测液 4. 固定化酶柱 5. 混合管 6. 六通阀 7. 光电倍增管 8. 负高压 9. 记录仪 10. 蠕动泵

图1 流动注射化学发光分析流路图

α -淀粉酶(EC3.2.1.1)(美国Sigma公司),葡萄糖淀粉酶(EC3.2.1.3)(美国Sigma公司),葡萄糖氧化酶(EC1.2.3.4)(美国Sigma公司),可溶性淀粉标准品(北京红星化工厂)、Luminol(北京化学试剂厂)、 $K_3Fe(CN)_6$ 及其他有关试剂均为分析纯,供试样品由市场购得。

1.2 酶柱反应及发光测定原理



反应生成的 H_2O_2 与Luminol在 $K_3Fe(CN)_6$ 的催化下产生化学发光,发光强度与生成的 H_2O_2 的量成正比,即与样液中淀粉的含量成正比,从而求出样品的淀粉含量。

1.3 酶的固定化及酶柱的制备

在三只小烧杯中,分别加入硅酸乙酯溶液2ml、乙醇1ml、水0.5ml和1:20的盐酸25 μ l,搅拌混合1h后溶液变清,形成溶胶。在此溶胶中,分别加入pH5.0的含4.0mg/ml α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖氧化酶的磷酸盐缓冲溶液0.5ml,混合均匀后制成分别掺杂 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖氧化酶的溶胶液。再在此胶液中分别加入1.5g粒径为100目左右的分子筛,超声混匀后,将其放入冰箱的(4 $^{\circ}\text{C}$)静置若干小时,溶胶液即变为干溶胶,用水洗涤几次后继续贮存于冰箱中备用。

分别取一定量的掺有 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖氧化酶的干溶胶压碎混匀,依此装入8 \times 100mm塑料管内(每种溶胶约占三分之一),两端用玻璃棉封住。即制成固定化的酶柱,不用时保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中。

1.4 固定化酶的活性

固定化后 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的活性采用消色法测定^[6],葡萄糖氧化酶的活性采用4-氨基安替吡啉、苯酚和辣根过氧化物酶(HRP)体系测定^[7]。

温度、酸度对酶的活性有影响,多次测定的结果表明,在30-40 $^{\circ}\text{C}$ 、pH=4.5-6.5的条件下,被溶胶凝胶体系所固化后的 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖氧化酶可保持其游离酶活性的85%、83%和81%左右。

1.5 样品的预处理

(1)含脂肪较多的样品:称取试样1~5g(视样品含淀粉量而定,实验中可用调节称样量和定容体积,把样液浓度调节在10-200mg/L的线性测定范围

内),置于铺有滤纸的漏斗内,先用 50ml 乙醚分 5 次洗涤后除去脂肪,再用 100ml 85% 乙醇分次洗去可溶性糖类。用 50ml 水将残渣移至 250ml 烧杯中。将烧杯置沸水浴中加热 15min,使淀粉糊化溶解,冷却后移入 1000ml 容量瓶中,定容。用快速滤纸过滤,得滤液备用。

(2)含脂肪较少的样品:可省去去除脂肪的操作,其余步骤同上。

(3)淀粉类样品:称样后可直接糊化,再将糊化液直接定容备用。

1.6 化学发光实验方法

按图 1 所示,将各流通管分别插入相应的试剂溶液中,打开蠕动泵,待信号稳定后,记录发光强度。以体系的发光强度和空白发光强度之差定量。

2 结果和讨论

2.1 Luminol 溶液酸度的选择

配制 pH=9,10,11,12 的 Luminol 溶液,按实验条件测定体系的发光强度。结果表明,在 Luminol 溶液的 pH=9 左右时,体系的发光强度最大,故实验选定 Luminol 溶液的 pH=9.0。

2.2 流速的选择

在流动注射化学发光测定体系中,由于淀粉溶液流经酶柱时不可能完全转化,故流速的快慢将对淀粉的转化率产生一定的影响,实验结果表明,流速越慢,体系的发光强度越大,体系的检测灵敏度就越高。考虑到蠕动泵流速的均匀性及分析速度,本实验选用淀粉溶液的流速为 4 r/min。

2.3 校正曲线、精密度及检测限

在 Luminol 浓度为 1×10^{-3} mol/L, $K_3Fe(CN)_6$ 浓度为 2.5×10^{-2} mol/L,二者流速均为 10 r/min 的条件下,测定由 10、50、100、200、250mg/L 淀粉标液所产生的发光强度,以浓度 C,发光强度 I 进行回归分析得线性回归方程为: $I = 2.312C - 1.63$, $R = 0.999$ 。测定的线性范围为 10 - 200mg/L。对 50mg/L 淀粉标液进行 10 次测定的 RSD 为 1.8%,由对 10mg/L 淀粉标液的测定结果,求得测定的检测限为 0.2mg/L (信噪比 S/N=3)。

2.4 加标回收率试验

取四种样品,经予处理后进行加标回收试验,结果见表 1。

2.5 样品测定和对比试验

为了进一步验证方法的可靠性,把本法的测定结果与传统酶法的测定结果进行比较,结果无显著性差

表 2 样品测定和对比试验结果(g/100g)

样品	固定化酶法	传统酶法
鸡蛋粉	13.13	12.91
小麦粉	73.98	74.14
玉米面	69.75	69.93
凉皮	19.71	19.64
凉粉	5.14	5.09
饼干	14.83	14.77
豆浆	1.57	1.54
牛乳	-	-

“-”表示未检出

表 1 回收率试验结果(n=5)

样品	测得量 (mg/L)	加入量 (mg/L)	测得总量 (mg/L)	回收率 (%)
鸡蛋面	25.6	50	74.7	98.2
小麦面	146.3	50	195.1	97.6
玉米面	142.8	50	192.1	98.6
凉皮	19.7	50	70.3	101.2

异。见表 2。

2.6 酶柱的使用寿命

酶柱的使用寿命取决于酶从固定柱中流出的速度,因为这种流出将导致分析信号的减弱。我们对在 1 个月内至少使用了 500 次的酶柱所产生的发光强度与新酶柱所产生的发光强度进行比较,发现发光信号没有明显的减弱。

3 结论

溶胶凝胶化过程以其纯度高、均匀性强、处理温度低、反应条件易于控制等优点在很多领域都获得了广泛的应用。本文利用 TEOS 的溶胶凝胶化过程将 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖氧化酶固定于凝胶的网状结构中,制成了固定化酶柱,将此酶柱用于流动注射化学发光分析体系,测定淀粉的线性范围为 10 - 200mg/L,检出限为 0.2mg/L,10 次测定的 RSD 为 1.8%。此法用于食品中淀粉含量的测定,操作简便,节省酶试剂,测定结果与传统酶法的测定结果相吻合。

参考文献

- 1 Keith B, Luong J H T. Appl. Biochem. Biotech., 1996, 61: 267.
- 2 Lev O, Tsionksy M. Anal. Chem., 1995, 67: 22A.
- 3 Barreau S, Miller J N. Anal. Commun., 1996, 33: 5H.
- 4 Ingersoll C, Bright F V. Chem. Tech., 1997, 27(1): 26.
- 5 Dave B, Dunn B. Anal. Chem., 1994, 66: 1120A.
- 6 庞广昌,王清连,董淑丽等. 生物化学实验技术. 郑州:河南科学技术出版社,1994,109.
- 7 熊振平,李载平,李致勤等. 酶工程. 北京:化学工业出版社,1989,43.