

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 蔬菜硝酸盐含量测定方法的改进

李帮秀\*, 张贺翠, 王三根, 万华方, 杨昆, 刘文清

西南大学农学与生物科技学院, 重庆北碚400716

**摘要:** 针对水杨酸消化比色法测定植物体内硝酸盐含量中存在的问题, 经过优化筛选, 将此测定方法的提取条件优化为: 温度90 °C、时间30 min; 每10 g绿色蔬菜加入0.2 g活性炭能消除颜色的影响, 回收率达到96%。

**关键词:** 蔬菜; 硝酸盐; 消化比色法

## An Improved Testing Method for Determining Nitrate Contents in Fresh Vegetable

LI Bang-Xiu\*, ZHANG He-Cui, WANG San-Gen, WAN Hua-Fang, YANG Kun, LIU Wen-Qing

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Beibei, Chongqing 400716, China

**Abstract:** In order to solve the problems of nitrate contents in fresh vegetables, the contents of nitrite in the different vegetables in storage were studied by visible spectrophotometry method in this paper. The results showed that the stability was good and the absorbance fluctuates was at 90 °C, the time of chromogenic reaction was 30 min, and the recovery was up to 96% when we added 0.2 g activated carbon if the darker material was 10 g.

**Key words:** fresh vegetable; nitrate nitrogen; visible spectrophotometry method

人类从蔬菜中摄入硝酸盐占摄入总量的72%~94% (吴大付等2010)。研究表明, 食物中的硝酸盐在体内还原成亚硝酸盐后, 可在胃酸的作用下与仲胺等胺类化合物反应生成N-亚硝基化合物, 引起核酸代谢紊乱或突变, 从而诱发动物消化器官癌变(陈君石和闻芝梅1999; 皇甫超申等2009), 并有造成胎儿畸形的危险(任敬红2002)。人体中的硝酸盐在细菌作用下被还原成亚硝酸盐进入血液后, 与血红蛋白强有力结合, 使其失去携氧能力, 导致高铁血红蛋白症, 严重者可致死亡(王利群等2003); 联合国世界卫生组织和粮农组织早在1973年就制定了食品中硝酸盐的限量标准: 人体硝酸盐允许日摄入量(ADI)为0~0.37 mg·kg<sup>-1</sup> (体重) (都韶婷等2007), 确切指出蔬菜中硝酸盐含量的高低已成为衡量蔬菜安全与否的一项重要指标(徐霞等2005)。因此, 准确地测定蔬菜中硝酸盐含量极为重要。

在植物生理学和植物生理生化等课程的本科实验教学中蔬菜硝酸盐的测定方法通常采用水杨酸消化比色法(宗学凤和王三根2011)。原方法通常使用花菜等白色或浅色蔬菜做为实验材料, 提取条件为温度45 °C、时间60 min, 在此提取条件

下, 因实验材料含硝酸盐量极少, 测定中不易显色, 导致吸光值过小而不易进行准确测定; 如果使用绿色等深色蔬菜, 则因提取液颜色较深会严重影响显色而不能准确测出材料中硝酸盐的含量。为了扩大实验蔬菜种类和提高有色蔬菜中硝酸盐含量测定的准确性, 我们对绿色蔬菜的硝酸盐提取条件和脱色方法进行了探索, 使本项实验合理优化, 硝酸盐含量测定更准确。

## 材料与方法

## 1 材料

实验材料分浅色蔬菜和深色蔬菜。白色或浅色蔬菜为绿豆芽 [*Vigna radiate* (L.) Wilczak] 和甘蓝‘莲花白’ (*Brassica oleracea* var. *capitata*), 绿色蔬菜为空心菜 (*Ipomoea aquatica* Forsk.) 和小白菜 (*Brassica chinensis* L.)。

收稿 2014-07-02 修定 2014-10-16

资助 西南大学实验教改项目、农业部中华农业科教基金(NKJ-201203022)和重庆市精品资源共享课(29号: 植物生理学)。

\* 通讯作者(E-mail: libangxiu@126.com; Tel: 023-68250794)。

## 2 仪器和试剂

实验所用仪器: 721分光光度计等。

实验试剂:  $\text{NO}_3^-$ -N标准液、5%水杨酸-硫酸溶液(显色剂)、 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH溶液和活性炭(宗学凤和王三根2011)。

## 3 设计及方法

原实验方法: 标准曲线(回归方程)只有一条,  $\text{NO}_3^-$ 浓度为 $50\sim 300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准溶液;

$\text{NO}_3^-$ -N测定: 称取 $5\sim 10 \text{ g}$ 新鲜植物材料研磨成匀浆后装入 $50 \text{ mL}$ 容量瓶中, 加去离子水 $30 \text{ mL}$ 于 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中浸提 $60 \text{ min}$  (浸提过程中不时摇动), 冷却后定容至刻度, 然后过滤(如含色素需脱色), 取 $0.2 \text{ mL}$ 滤液于 $50 \text{ mL}$ 三角瓶中, 加 $0.8 \text{ mL}$ 显色剂混匀后静置 $20\sim 30 \text{ min}$ 使其充分反应显色后加入 $19 \text{ mL}$ 的 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH溶液, 冷却后于 $410 \text{ nm}$ 下测定吸光值(宗学凤和王三根2011)。

改进后方法: 设3条回归方程, 即回归方程1 ( $\text{NO}_3^-$ 浓度为 $10\sim 60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准溶液)、回归方程2 ( $\text{NO}_3^-$ 浓度为 $10\sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准溶液)和回归方程3 ( $\text{NO}_3^-$ 浓度为 $10\sim 250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准溶液)。 $\text{NO}_3^-$ -N测定时操作相同, 但提取过程中使用大试管加热(非容量瓶), 加热一定时间后, 待其冷却后定容至 $50 \text{ mL}$ ; 确定提取最适条件时, 为了避免色素干扰, 选择白色或浅色蔬菜, 硝酸盐提取温度设置为 $45$ 、 $70$ 、 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 和沸水浴(简称FSY, 下同), 时间设置为 $30$ 和 $60 \text{ min}$ , 共8个组合, 实验过程中每一种蔬菜每一组合重复3次, 每一重复进行3次平行测定, 从上述设计中筛选出最适条件; 为了消除绿色或深色蔬菜中色素的影响, 在提取过程中, 每 $10 \text{ g}$ 绿色蔬菜分别加入 $0$  (对照)、 $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.3 \text{ g}$ 活性炭搅拌均匀后提取 $\text{NO}_3^-$ , 筛选出活性炭的最适量。实验过程每一种蔬菜不同的活性炭加入量重复3次, 每一重复进行3次平行测定和一次加标测定。

本文用DPS数据处理系统的新复极差法统计。表中小写字母表示1%差异, 大写字母表示5%差异。

## 实验结果

### 1 标准曲线的制作

从表1可知, 3条不同浓度 $\text{NO}_3^-$ 溶液与吸光值的回归方程的相关系数( $R^2$ )均达极显著水平, 3条

表1  $\text{NO}_3^-$ 标准溶液浓度对吸光值的影响

Table 1 The effects of different  $\text{NO}_3^-$  standard solutions on light absorption value

$\text{NO}_3^-$ 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	吸光值	回归方程	相关系数
10	0.067	$Y=0.0072x-0.0033$	$R^2=0.9983$
20	0.139		
30	0.213		
40	0.290		
50	0.345		
60	0.429		
10	0.067	$Y=0.0072x-0.0032$	$R^2=0.9995$
20	0.139		
40	0.290		
60	0.429		
80	0.596		
100	0.742		
10	0.067	$Y=0.0075x-0.0114$	$R^2=0.9997$
50	0.345		
100	0.742		
150	1.097		
200	1.481		
250	1.877		

回归方程及其相关系数间差异不显著。学生在实验中根据材料的吸光值选择不同浓度所得的回归方程计算 $\text{NO}_3^-$ 的含量。

### 2 提取白色或浅色蔬菜中 $\text{NO}_3^-$ 含量的最适条件筛选

从表2可知, 无论是绿豆芽还是‘莲花白’, 在 $90 \text{ }^\circ\text{C}-60 \text{ min}$ 和 $90 \text{ }^\circ\text{C}-30 \text{ min}$ 条件下, 其 $\text{NO}_3^-$ 含量无显著差异, 都是所有组合中最高的, 与其他条件下测定的 $\text{NO}_3^-$ 含量有显著差异。对照及原方法的提取条件 $45 \text{ }^\circ\text{C}-60 \text{ min}$ 和 $45 \text{ }^\circ\text{C}-30 \text{ min}$ 下,  $\text{NO}_3^-$ 含量极显著低于其他组合。当温度恒定时, 随着时间的增加,  $\text{NO}_3^-$ 含量也增加; 当时间恒定时, 随着温度(沸水浴除外)的增加,  $\text{NO}_3^-$ 含量也增加, 但增加幅度不同。 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 时 $\text{NO}_3^-$ 含量与 $45$ 、 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 $\text{NO}_3^-$ 含量均达到极显著水平, 与FSY的 $\text{NO}_3^-$ 含量无显著差异。 $90 \text{ }^\circ\text{C}-60 \text{ min}$ 条件下 $\text{NO}_3^-$ 含量与 $90 \text{ }^\circ\text{C}-30 \text{ min}$   $\text{NO}_3^-$ 含量无显著差异。为了节约时间和成本, 确定温度 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 、时间 $30 \text{ min}$ 为蔬菜 $\text{NO}_3^-$ 的含量测定的最适条件。

### 3 最适条件(温度 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 、时间 $30 \text{ min}$ )提取绿色蔬菜中 $\text{NO}_3^-$ 含量时活性炭加入量筛选

根据吸光值的不同选择不同的回归方程计算含量。用 $Y=0.0075x-0.0114$ 计算小白菜 $\text{NO}_3^-$ 含量; 用 $Y=0.0072x-0.0032$ 计算空心菜 $\text{NO}_3^-$ 含量; 加标回

表2 不同温度和时间组合下绿豆芽及‘莲花白’的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量Table 2 The content of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> under different combinations of temperatures and periods in *V. radiate* and *B. oleracea*

温度与时间组合	绿豆芽		‘莲花白’	
	平均吸光值	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	平均吸光值	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
45 °C-30 min	0.0746	54.10 <sup>C,d</sup>	0.275	193.26 <sup>E,e</sup>
45 °C-60 min	0.0811	58.61 <sup>BC,cd</sup>	0.281	197.43 <sup>DE,de</sup>
70 °C-30 min	0.0841	60.69 <sup>ABC,bcd</sup>	0.289	202.99 <sup>CD,cd</sup>
70 °C-60 min	0.0907	65.28 <sup>AB,abc</sup>	0.295	207.15 <sup>BC,bc</sup>
90 °C-30 min	0.0968	69.51 <sup>A,a</sup>	0.311	218.26 <sup>A,a</sup>
90 °C-60 min	0.0980	70.35 <sup>A,a</sup>	0.310	217.57 <sup>A,a</sup>
FSY-30 min	0.0923	66.39 <sup>AB,ab</sup>	0.301	211.32 <sup>AB,b</sup>
FSY-60 min	0.0947	68.05 <sup>AB,ab</sup>	0.303	212.71 <sup>Ab,ab</sup>

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量采用 $Y=0.0072x-0.0033$ 计算。表中小写字母表示1%差异,大写字母表示5%差异。

收率(%)=(加标试样测定值-试样测定值)/加标量×100%(赵嵩林2013)。

从表3可知,小白菜加入0.1或0.2 g活性炭时,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量低于对照;加入0.3 g活性炭时,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量略高于对照,但四者间差异不显著。空心菜加入0.1或0.2 g活性炭时,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量与对照相近;加入

0.3 g活性炭时,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量略高于对照,四者没有显著差异。

从表3也可看出,二种材料加入不同活性炭后的回收率不同。其中以加入0.2 g活性炭样品的回收率最高,加入0.3 g活性炭样品的回收率最低,极显著低于前三者。

表3 不同量的活性炭对小白菜和空心菜NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量的影响Table 3 The effects of different amounts of activated carbon on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content in *B. chinensis* and *I. aquatica*

活性炭/g	小白菜			空心菜		
	吸光值	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	回收率/%	吸光值	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	回收率/%
0(对照)	1.074	723.6 <sup>a</sup>	86.56	0.650	453.61 <sup>a</sup>	106.48
0.1	1.017	685.6 <sup>a</sup>	86.21	0.653	455.69 <sup>a</sup>	89.34
0.2	1.020	687.6 <sup>a</sup>	95.99	0.650	453.61 <sup>a</sup>	96.40
0.3	1.082	728.93 <sup>a</sup>	79.52	0.675	470.69 <sup>a</sup>	76.57

小白菜NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量采用 $Y=0.0075x-0.0114$ 计算,空心菜NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量采用 $Y=0.0072x-0.0032$ 计算。表中小写字母表示1%差异。

## 讨 论

各种蔬菜NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量相差很大,实验时或研究时根据实验材料的吸光值选择不同浓度的回归方程计算NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的含量,可避免原方法由于实验材料吸光值太小,甚至比回归方程中最小浓度的吸光值还小的情况下,仍使用唯一的回归方程计算NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量。

在实验器材的配置中,我们根据实验所需配置器材,原方法中使用容量瓶加热液体(王三根和宗学风2011),但容量瓶不能进行加热,因为容量瓶的容量定义为:在20 °C时,充满至标线所容纳水的体积。因此容量瓶在加热过程中,温度升高会引

起瓶体膨胀,造成所量溶液的体积误差较大(北京大学化学系分析化学教研组1998),因此改进后选用大试管加热液体,然后将冷却液定容刻度,从而减小了实验误差。

在筛选最适条件时,对于浅色材料来说,无论是绿豆芽还是‘莲花白’,在45、70和90 °C条件下,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量都随着温度升高而升高,但沸水浴的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量却低于90 °C时NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量,可能是在沸水浴提取过程中,试管中的样品加热到沸腾后溅到高于水浴锅液面的试管壁上并附着其上而无法提取,造成结果偏低;在90 °C-60 min和90 °C-30 min条件下,所有组合中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量均最高,相互间没有显著

差异,由此可知,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量提取的最佳条件为:水浴温度90℃,时间为30 min。在优化后的最佳提取条件下,绿豆芽中硝酸盐含量是原提取方法的1.19倍;‘莲花白’中硝酸盐含量是原方法的1.11倍,且时间减少30 min。优化后的方法更有利于实验教学和科学研究中对不同蔬菜中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的含量进行准确测量。

在提取NO<sub>3</sub><sup>-</sup>最适条件(温度90℃,时间30 min)下,对于深色的两种绿色蔬菜,没有加入活性炭时,过滤后溶液显黄色,是因为材料中的叶绿素被破坏呈现出类胡萝卜素的颜色(黄色),与秋天或不良环境下叶片中较易降解的叶绿素数量减少、而类胡萝卜素比较稳定时呈现的黄色(王忠2008)一致。加入活性炭后(贾翠英等2010),因色素被吸附而黄色递减;但随着活性炭的增加提取液颜色加深呈灰黑色,是因为蔬菜中的色素被完全吸附而呈现出活性炭的颜色。实验的两种绿色蔬菜,加入不同量的活性炭后NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量均无差异,但回收率存在差异,且以加入0.2 g活性炭回收率最适宜,因此,每10 g绿色蔬菜加入0.2 g活性炭为最适量。加入活性炭后可准确地测定绿色蔬菜中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量,拓展了实验材料的取材范围。

综上所述,适用水杨酸消化比色法测定绿色

蔬菜硝酸盐的硝酸盐提取条件为:10 g样品加入0.2 g活性炭,水浴温度90℃,时间为30 min。

### 参考文献

- 北京大学化学系分析化学教研组(1998). 基础分析化学实验. 第二版. 北京:北京大学出版社, 55~57
- 陈君石, 闻芝梅(1999). 食物营养与癌症预防译. 上海:上海医科大学出版社, 183~184
- 都韶婷, 章永松, 林咸永, 王月, 李刚, 张英鹏(2007). 蔬菜积累的硝酸盐及其对人体健康的影响. 中国农业科学, 40 (9): 2007~2014
- 皇甫超申, 许靖华, 秦明周, 马同森(2009). 亚硝酸盐与癌的关系. 河南大学学报, 39 (1): 35~41
- 贾翠英, 张明霞, 张玉辉(2010). 乳链菌肽发酵液活性炭脱色. 食品工业科技, 31 (3): 300~303
- 任敬红(2002). 孕妇食入硝酸盐造成胎儿神经管畸形的危险. 国外医学(护理学分册), 2 (4): 187~188
- 王利群, 王文兵, 吴守一(2003). 蔬菜硝酸盐含量与硝酸还原酶活性的研究. 食品科学, 24 (12): 37~40
- 王忠(2008). 植物生理学. 第二版. 北京:中国农业出版社, 126~133
- 吴大付, 任秀娟, 李东方(2010). 蔬菜硝酸盐含量测定方法研究. 河南科技学院学报, 38 (3): 36~38
- 徐霞, 应兴华, 段彬伍, 陈能(2005). 蔬菜中硝酸盐和亚硝酸盐测定方法的研究进展. 中国农学通报, 21 (5): 149~152
- 赵嵩林(2013). 分光光度法中加标回收率计算方法的探讨. 治淮, 1: 60~61
- 宗学风, 王三根(2011). 植物生理研究技术. 重庆:西南师范大学出版社, 102~104