

盐酸苯海索-Ce(IV)荧光法检测虾中亚硫酸盐含量

张静,马占玲*,汪莹,李宁宁,陈思,励建荣*

(渤海大学 化学化工与食品安全学院,辽宁省食品安全重点实验室,辽宁 锦州,121013)

摘 要 基于盐酸苯海索-Ce(IV)-亚硫酸盐在弱酸或中性条件下反应生成强烈的荧光物质,建立了检测食品中亚硫酸盐含量的新方法。确定了测定亚硫酸盐的最佳条件。在最佳条件下,亚硫酸盐含量在 0.02~1 mg/mL 呈现良好的线性,线性方程为: $y = 8\,031.7x - 203.31$,相关系数为 0.996 8,方法的检出限为 0.001 $\mu\text{g/mL}$,远低于国家标准方法——盐酸副玫瑰苯胺法。方法的相对标准偏差为 6.08%,回收率在 82.4%~92.8% 之间。该方法操作简单、灵敏度高、污染小;用于测定虾中亚硫酸盐含量,与国标法无显著性差异。

关键词 盐酸苯海索;Ce(IV);亚硫酸盐;荧光法;虾

亚硫酸盐是一种常用的食品添加剂,具有漂白、防腐、抗氧化、防止褐变等作用^[1-2]。虾类制品(海捕鲜虾,冻虾仁,速冻小虾,冻对虾,烤虾等)是亚硫酸盐的一大应用领域。此类制品中,亚硫酸盐能有效防止虾体在冷冻(藏)贮存和加工过程中的褐变,防腐保鲜,保护制品的品质和色泽,延长制品的保质期^[1]。但是,亚硫酸盐具有一定的毒性,WHO 规定每人每日摄入亚硫酸盐的量应低于 0.7 mg^[3]。摄入过量亚硫酸盐将会导致呼吸困难、荨麻疹、哮喘、胃肠不适等问题,尤其是对哮喘患者尤为严重^[4-5],过量的亚硫酸盐还会对人体的神经系统、生殖系统、循环系统、免疫系统等带来一定的危害^[6-8]。基于对亚硫酸盐毒性的认识,各国均对食品中 SO_2 残留量做出了严格的限定,国际食品法典委员会(CAC)明确规定了冷冻虾中 SO_2 残留量,在生品可食性部分 $\leq 100 \text{ mg/kg}$,熟食可食性部分 $\leq 30 \text{ mg/kg}$ ^[9]。目前我国检测食品中亚硫酸含量的方法主要有国标法中采用的盐酸副玫瑰苯胺比色法和蒸馏滴定法^[10],其他方法如色谱法^[11]、化学发光法^[12]、电化学法^[13]、传感器法^[14]等,但均有各自的不足。如盐酸副玫瑰苯胺比色法使用大量剧毒试剂四氯汞钠,对环境和人体造成损害,同时食品中含量较高的离子如 Cl^- 对方法的干扰较大,蒸馏滴定法操作复杂,不适合大批量样品的检测。

基于盐酸苯海索能显著增强 Ce(IV)与亚硫酸盐之间化学发光反应^[15],本文建立了一种检测水产品中亚硫酸盐含量的新的荧光法,与盐酸副玫瑰苯胺比色法相比,该方法污染性小,干扰低,检测限低,与蒸馏滴定法相比,操作简单、检测速度快、适合大批量样品检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

KQ-250DB 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;PL303 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;970CRT 荧光分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;电热恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司;RRHP-100 型万能高速粉碎机,欧凯莱芙实业公司;UV-1801 紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器有限公司。

硫酸铈、盐酸苯海索、NaOH、 Na_2SO_3 均为分析纯,购自国药集团。

1.2 样品处理与检测

1.2.1 样品处理

样品经粉碎机粉碎均匀后,准确称取 2.5 g 样品粉末,置于 50 mL 容量瓶中,加入 2.5 mL NaOH 溶液,再加入适量蒸馏水,超声 1.5 h 后定容,取滤液备用。

1.2.2 样品检测

向比色管中加入 2 mL $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (0.01 mol/L), 2 mL 盐酸苯海索 (0.020 mg/mL)、1 mL 样液,去离子水定容到 20 mL。摇匀,35℃ 条件下反应 15 min,在激发波长为 265 nm,发射波长为 350 nm,狭缝为

第一作者:硕士研究生(马占玲教授,励建荣教授为通讯作者,E-mail 分别为:13898355801@sina.com 和 lij6491@163.com)。

基金项目:“十二五”国家支撑计划项目课题“水产品加工过程质量安全控制关键技术集成与示范”(No. 2012BAD29B06)

收稿日期:2015-12-30,改回日期:2016-02-22

10 nm 条件下进行荧光测定。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验条件的选择

2.1.1 最大发射波长的确定

在最佳条件下,盐酸苯海索-亚硫酸根-硫酸铈进行反应,在 200 ~ 800 nm 内进行发射光谱扫描,结果见图 1,从而确定该反应体系的荧光发射波长为 350 nm。

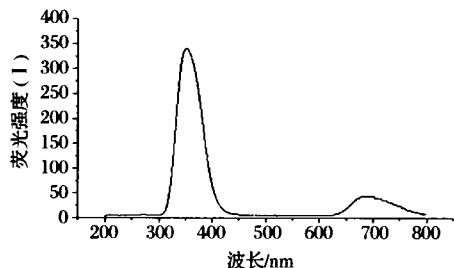


图 1 EM 扫描荧光光谱

Fig. 1 Chart of EM scanning fluorescence spectra

2.1.2 盐酸苯海索用量的影响

当其他条件一定时,考察了 20 mg/L 盐酸苯海索的用量对实验结果的影响,结果见图 2。由图 2 可见,荧光强度随着盐酸苯海索用量的增加先变小后变大,盐酸苯海索用量为 2.0 mL 时,荧光强度较大且比较稳定。本实验选择盐酸苯海索用量为 2.0 mL。

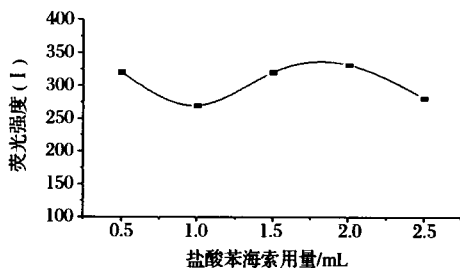


图 2 盐酸苯海索用量对反应体系的影响

Fig. 2 Effect of trihexyphenidyl hydrochloride dosage on chemical reaction system

2.1.3 硫酸铈用量的影响

探讨了 0.01 mol/L 硫酸铈的用量对实验结果的影响,结果如图 3 所示。当其他条件一定时,随着硫酸铈用量的增加,荧光强度不断变大。可见在该反应体系中,荧光强度与硫酸铈和亚硫酸盐均有关,但在硫酸铈用量一定的条件下反应体系的荧光强度与亚硫酸盐成正比,考虑到实验条件,本实验确定 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 用量为 2.0 mL。

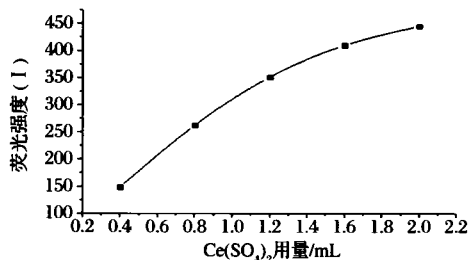


图 3 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 用量对反应体系的影响

Fig. 3 Effect of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ dosage on chemical reaction system

2.1.4 反应温度的影响

当其他条件一定时,考察了温度对实验结果的影响,结果如图 4 所示。由图可见,荧光强度随着温度的升高先变小后变大,当反应温度为 35 °C 时,荧光强度达到最大值。本文确定反应最佳温度为 35 °C。

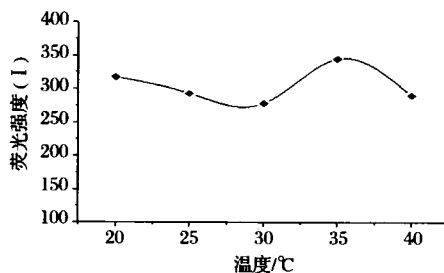


图 4 反应温度对反应体系的影响

Fig. 4 Effect of reaction temperature on chemical reaction system

2.1.5 反应时间的影响

考察了时间对实验结果的影响,结果如图 5 所示。当其他条件一定时,反应时间对实验结果的影响不大。综合考虑,本文选择反应时间为 15 min。

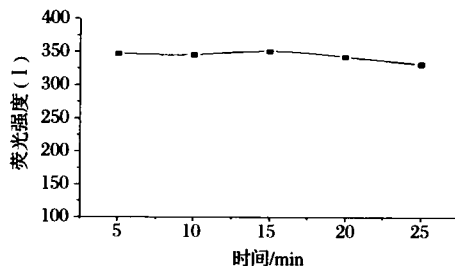


图 5 反应时间对反应体系的影响

Fig. 5 Effect of reaction time on chemical reaction system

2.2 反应条件的正交实验

在单因素的基础上,对盐酸苯海索用量、 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 用量、反应温度、反应时间进行 4 因素 4 水平正交实验 $L_{16}(4^4)$ 。表 1 为正交实验因素水平表。表 2 和表 3 为正交实验结果表。

表 1 正交实验因素水平表 $L_{16}(4^5)$

Table 1 Factors and levels of orthogonal test $L_{16}(4^5)$

水平	A(盐酸苯海索 用量)/mL	B($Ce(SO_4)_2$ 用量)/mL	C(反应 温度)/ $^{\circ}C$	D(反应 时间)/min
1	0.5	0.5	20	5
2	1.0	1.0	25	10
3	1.5	1.5	30	15
4	2.0	2.0	35	20

表 2 正交实验结果及计算表 $L_{16}(4^5)$

Table 2 Schemes and results of orthogonal design of $L_{16}(4^5)$

试验号	因素					荧光 值 I
	A	B	C	D	空	
1	1	1	1	1	1	102.108
2	1	2	2	2	2	180.088
3	1	3	3	3	3	326.38
4	1	4	4	4	4	420.631
5	2	1	2	3	4	126.221
6	2	2	1	4	3	187.016
7	2	3	4	1	2	315.08
8	2	4	3	2	1	396.98
9	3	1	3	4	2	156.029
10	3	2	4	3	1	285.936
11	3	3	1	2	4	295.723
12	3	4	2	1	3	370.213
13	4	1	4	2	3	166.925
14	4	2	3	1	4	240.891
15	4	3	2	4	1	354.081
16	4	4	1	3	2	430.935
K1	1 029.208	551.284	1 015.78	1 028.292	1 139.104	
K2	1 025.296	893.932	1 030.604	1 039.716	1 082.132	
K3	1 107.9	1 291.264	1 120.28	1 169.472	1 050.532	
K4	1 192.832	1 618.76	1 188.572	1 117.756	1 083.468	
k1	257.302	137.821	253.945	257.073	284.776	
k2	256.324	223.483	257.651	259.929	270.533	
k3	276.975	322.816	280.07	292.368	262.633	
k4	298.208	404.69	297.143	279.439	270.867	
R	41.884	266.869	43.198	35.295	22.143	

通过极差分析可知,各因素对荧光强度(I)的影响顺序为: $Ce(SO_4)_2$ 用量 $B >$ 反应温度 $C >$ 盐酸苯海索用量 $A >$ 反应时间 D 。荧光法检测食品中亚硫酸盐含量的最佳条件为: $A_4B_4C_4D_3$,即盐酸苯海索用量为 2.0 mL, $Ce(SO_4)_2$ 用量为 2.0 mL,反应温度为 35 $^{\circ}C$,反应时间为 15 min。

方差分析结果表明, $Ce(SO_4)_2$ (B)达到极显著水平,对荧光强度影响较大。其他因素对盐酸苯海索用量、反应温度、反应时间均未达到显著水平,对实验结果影响不大。

2.3 共存离子的影响

在亚硫酸盐浓度为 0.8 g/L,相对偏差小于 \pm

5.0%时,干扰离子所允许的共存倍数为 Na^+ (200 倍)、 Cl^- (200 倍)、 K^+ (200 倍)、 NO_2^{2-} (100 倍)、 Zn^{2+} (100 倍)、蛋白质(100 倍)、Vc(5 倍)、 PO_4^{3-} (100 倍),由此可见,该体系对亚硫酸盐的选择性较好。

表 3 方差分析表

Table 3 Data analysis by ANOVA procedure (SAS software)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F_{α}	显著水平
A	4 692.87	3	1 564.29	4.61	$F_{0.05}=9.280$	
B	162 186.666	3	54 062.22	159.48	$F_{0.01}=29.500$	**
C	4 915.990	3	1 638.66	4.83		
D	3 354.234	3	1 118.08	3.30		
模型误差 e	175 149.72	12	14 595.81	43.06		*
误差 e	1 016.95	3	338.98			
总变异	176 166.64	15				

2.4 方法评价

2.4.1 工作曲线

取系列亚硫酸盐标准溶液,在最佳条件下反应 15 min 后,在激发波长为 265 nm,发射波长为 350 nm 下测定荧光强度,绘制工作曲线。实验结果表明,亚硫酸盐含量在 0.02 ~ 1 mg/mL 荧光强度与浓度成正比,其线性回归方程为 $y = 8031.7x - 203.31$,相关系数 R 为 0.996 8,呈很好的线性关系。

2.4.2 方法的检出限

使用空白溶液连续测量 15 次,利用公式(1)计算出本方法的最低检出限:

$DL = 3\sigma/k$ (1)

式中: σ ,标准偏差; k ,工作曲线斜率。

经 15 次测量空白溶液,其标准偏差为 3.48,工作曲线的斜率为 8 031.7,计算方法检出限为 0.001 $\mu g/mL$,低于国标法盐酸副玫瑰苯胺的检测限 0.1 $\mu g/mL$ (即 1 mg/kg,按 10g 样品定容 100 mL 计)。可见该方法的检出限低,灵敏度高,能较好地适应虾中亚硫酸盐的检测。

2.4.3 方法的精密度和回收率

取冻虾用粉碎机搅碎,准确称取 5.00 g,移入容量瓶中,加入 2.5 mL NaOH 溶液,再加入少量水将样品浸没,超声 90 min 之后,测定其中亚硝酸盐含量,平行测定 5 次,计算其相对标准偏差。然后分别加入不同量的亚硫酸盐,测定回收率。结果如表 4 所示,由实验结果可见,相对标准偏差为 6.08%,平均回收率在 82.4% ~ 92.8% 之间。精密度和准确度均能达到实验要求。

表 4 方法精密度和回收率

Table 4 Relative standard deviation (RSD) and recovery rate

样品	本底值/ (mg · kg ⁻¹)	相对标准 偏差/%	加标量/ (mg · kg ⁻¹)	测定值/ (mg · kg ⁻¹)	回收率/ %
冻虾	92.62	6.08	40	126.91	85.6
			90	166.81	82.4
			180	255.90	90.7
			200	273.82	90.6
			250	324.70	92.8

2.4.4 与国标法差异性检验

分别用本法与国标法检测冻虾中亚硫酸盐的含量,平行测定 5 次,结果如表 5 所示。

用 F 检验法和 t 检验法对国标法和荧光法测得的冻虾中亚硫酸盐含量的平均值显著性差异进行检验。通过计算 F 为 1.05,小于 $F_{0.95,4}$ (6.39),说明二者的方差不存在显著性差异 ($P < 0.05$); t 值为 1.27,小于 $t_{0.95,8}$ (2.31),说明 2 种方法测得的平均值,即 2

种方法无显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 5 荧光法与国标法显著性差异比较

Table 5 Comparison of the significant difference by the proposed method and the national standard method

方法	平均值/ (mg · kg ⁻¹)	相对标准 偏差/%	F 值	t 值	结果
荧光法	92.62	6.08	1.05	1.27	二者无显著性差异
国标法	97.62	6.41			

2.5 样品检测

在市场买取 5 份不同的冻虾进行测量,测得结果见表 6。结果表明 5 种冻虾中亚硫酸盐的含量在 82.33 ~ 121.35 mg/kg。其中有一种样品中亚硫酸盐含量超过中华人民共和国水产行业标准 SC/T 3113—2002 规定的冷冻虾中 SO_2 残留量 ≤ 100 mg/kg 的限量,其他 4 种样品合格。

表 6 样品测定

Table 6 Sulfite of the samples

样品	本底值(活虾)	冻虾 1	冻虾 2	冻虾 3	冻虾 4	冻虾 5
亚硫酸盐含量/(mg · kg ⁻¹)	2.80 ± 0.02	92.62 ± 0.02	85.31 ± 0.02	121.35 ± 0.04	78.25 ± 0.04	82.33 ± 0.03

3 结论

建立了盐酸苯海索荧光光度法检测食品中亚硫酸盐含量的新方法。与国标法中的盐酸副玫瑰苯胺比色法相比较,该方法未使用剧毒试剂,环境污染小,海产品中含量较大的离子如 Cl^- 对方法的干扰较小,检测更快速;检出限低,适合大批量样品的检测。该方法用于冻虾中亚硫酸盐含量的检测,效果较好。

参 考 文 献

[1] 张双灵,赵奎浩,周德庆,等. 水产品中亚硫酸盐的安全性及残留状况检测[J]. 现代食品科技, 2007, 23 (3):60-62.

[2] AMATATONGCHAI M, SROYSEE W, CHAIRAM S, et al. Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes-PDDA-gold nanoparticles. [J]. Talanta, 2015, 133:134-141.

[3] KOCH M, KOPPEN R, SIEGEL D. Determination of total sulfite in wine by ion chromatography after in-sample oxidation[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(17):9 463-9 467.

[4] RANGUELOVA K, RICE A B, LARDINOIS O M, et al.

Sulfite-mediated oxidation of myeloperoxidase to a free radical: immuno-spin trapping detection in human neutrophils [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 60(10):98-106.

[5] WU M Y, HE T, LI K, et al. A real-time colorimetric and ratiometric fluorescent probe for sulfite [J]. Analyst, 2013, 138(10):3 018-3 025.

[6] SANG N, YUN Y, LI H, et al. SO_2 inhalation contributes to the development and progression of ischemic stroke in the brain[J]. Toxicological Sciences, 2010, 114(2):226-236(11).

[7] 刘东奇,陈华成,杨雪丽. 二氧化硫对机体各组织器官毒性作用的研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2008, 27 (1):37-39.

[8] 李雪莲,杨丽,陈鸿平,等. 食品中亚硫酸盐研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(3):34-37.

[9] 高平,黄国方,胡琼予,等. 浅议虾类产品标准中亚硫酸盐限量问题[J]. 当代水产, 2009(11):31-32.

[10] GB/T5009.34-2003. 食品中亚硫酸盐的测定[S].

[11] ABERL A, COELHAN M. Determination of sulfur dioxide in wine using headspace gas chromatography and electron capture detection. [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013, 30(2):226-233.

[12] NAVARRRO M V, MARÍA RAMOS PAYÁN, MIGUEL

- ANGEL BELLO LÓPEZ, et al. Rapid flow injection method for the determination of sulfite in wine using the permanganate-luminol luminescence system. [J]. Talanta, 2010, 82(5):2 003 – 2 006.
- [13] FU L M, JU W J, LIU C C, et al. Integrated microfluidic array chip and LED photometer system for sulfur dioxide and methanol concentration detection[J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 243(5):421 – 427.
- [14] SARTORI E R, VICENTINI F C, FATIBELLO-FILHO O. Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film[J]. Talanta, 2011, 87(2):235 – 242.
- [15] 张泾凯,李建国,屠一锋. 铈(IV)-亚硫酸盐体系流动注射化学发光法测定苯海索新方法研究[J]. 苏州大学学报:自然科学版, 2009, 25(3):68 – 71.

Fluorescence determination of sulfite in shrimp with trihexyphenidyl hydrochloride-Ce (IV) systym

ZHANG Jing, MA Zhan-ling*, WANG Ying, LI Ningning, CHEN Si, LI Jian-rong*

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety, Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China)

ABSTRACT Strong fluorescent substances were generated based on trihexyphenidyl hydrochloride - Ce (IV) - sulfite under the conditions of weak acid or neutral. A new determination method of sulfites in shrimp was established. The fluorescence intensity and the concentration of sulfite (SO_2) showed good linearity in the range of 0.02 ~ 1 mg/mL, the regression equation is $y = 8\,031.7x - 203.31$. The correlation coefficient is 0.999 6. The method detection limit is 0.001 $\mu\text{g/mL}$. It is far lower than that of the national standard. The relative deviation of the sample is 6.08% and the recovery rate is between 96% and 107%. The method is simple, sensitive, and environmentally friendly and the result was satisfying. The result comparing with the standard method is basically the same.

Key words trihexyphenidyl hydrochloride; Ce (IV); sulfite; fluorescence spectrometry; shrimp