

抑制氧化甲基橙光度法测定贝类中牛磺酸

李咏梅^{1,2,3}, 祝龙生², 李人宇⁴

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005) (2. 淮海工学院化学工程学院, 江苏连云港 222005) (3. 江苏省海洋资源开发研究院, 江苏连云港 222005) (4. 连云港师范高等专科学校, 江苏连云港 222006)

摘要: 本研究建立了分光光度法测定贝类中牛磺酸的新方法。痕量牛磺酸在pH 11.0氨-氯化铵缓冲液中对高锰酸钾氧化甲基橙的反应具有显著抑制作用, 使体系褪色, 吸光度明显减小。试验了酸度、高锰酸钾用量、甲基橙用量、温度和时间的影响, 确定了最佳反应条件。在最佳反应条件下, 最大褪色波长位于690 nm, 吸光度减小值与牛磺酸质量浓度在0~75 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 表观摩尔吸光系数为 $2.22 \times 10^6 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, 检出限为1.19 $\mu\text{g/L}$ 。采用热水浸提和离子交换法处理样品, 将该方法用于测定文蛤、缢蛏、栉孔扇贝和四角蛤蜊中牛磺酸, 结果与高效液相色谱法一致, 相对标准偏差为0.82~1.24% ($n=6$), 回收率为98.31~101.76%。该方法灵敏、准确、简便、快速、精密度高, 选择性好, 反应条件温和, 对环境友好, 适用于贝类中牛磺酸的测定。

关键词: 牛磺酸; 分光光度法; 抑制氧化; 甲基橙; 热水浸提; 离子交换; 贝类

文章编号: 1673-9078(2014)4-291-295

Spectrophotometric Determination of Taurine in Shellfish by Inhibiting Methyl Orange Oxidation

LI Yong-mei^{1,2,3}, ZHU Long-sheng², LI Ren-yu⁴

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

(2. School of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

(3. Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Lianyungang 222005, China)

(4. Lianyungang Normal College, Lianyungang 222006, China)

Abstract: Trace taurine has obvious inhibitory effect on the reaction of potassium permanganate oxidizing methyl orange in ammonium chloride-ammonia buffer solution at pH 11.0, resulting in fading of the system and great decrease of absorbance. The acidity, potassium permanganate and methyl orange dosage, temperature and time were optimized. Under the optimum reaction conditions, good linear relationship was obtained between the decreased value of absorbance and taurine concentration in the range of 0~75 $\mu\text{g/L}$ with the maximum fading wavelength of 690 nm. The apparent molar absorption coefficient was $2.22 \times 10^6 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, with detection limit of 1.19 $\mu\text{g/L}$. Samples were pretreated using hot water extraction and ion exchange, the proposed method was applied to the determination of taurine in *Meretrix meretrix*, *Sinonovacula constricta*, *Chlamys farreri* and *Macra veneriformis*. The results agreed well with those obtained by high performance liquid chromatography. The relative standard deviation was 0.82~1.24% ($n=6$), and recovery was 98.31~101.76%. This method was sensitive, accurate, simple, rapid and environmentally friendly under, which was suitable for determination of taurine in shellfish.

Key words: taurine; spectrophotometry; inhibiting oxidation; methyl orange; hot water extraction; ion exchange; shellfish

收稿日期: 2013-10-26

基金项目: 国家自然科学基金 (21101069); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; “十二五”期间江苏省重点专业(淮海工学院化工与制药类)资助项目(343); 江苏省高校“青蓝工程”资助项目; 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室研究基金项目(2012HS007); 江苏省海洋资源开发研究院科技开放基金项目(JSIMR201308); 2013年淮海工学院大学生实践创新训练项目

作者简介: 李咏梅(1973-), 女, 高级实验师, 研究方向为食品分析

通信作者: 李人宇(1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品分析

牛磺酸是人体内一种条件性必需氨基酸, 具有独特的生理功能, 对人体的神经系统、生殖系统、免疫系统、消化系统、运动系统等起着重要的调节作用^[1-4]。人体主要从食物中摄取牛磺酸。海洋贝类牛磺酸含量丰富, 价格低廉, 是人体补充牛磺酸的有效来源。因此, 建立贝类中牛磺酸含量灵敏、准确的测定方法具有重要意义。

目前, 牛磺酸的测定方法主要有高效液相色谱法^[5]、氨基酸分析仪法^[6]、薄层扫描法^[5]、荧光法^[7]和分

光光度法^[8]等。高效液相色谱法应用较多,灵敏度较高,但衍生反应条件需严格控制,否则难以保证测定的准确度和精密度。氨基酸分析仪法灵敏度较高,选择性好,但仪器价格昂贵,分析条件严格,分析时间长。薄层扫描法灵敏度较低,薄层板制备、点样、展开及显色等操作要求严格。荧光法灵敏度较低,精密度较差。

分光光度法仪器价廉、操作简便、易于推广普及,但很少应用于牛磺酸测定。已报道的络合显色分光光度法^[8-10]存在灵敏度较低、试剂毒性大、反应需高温或长时间加热等不足。笔者曾建立抑制氧化褪色光度法^[11-12]测定牛磺酸,方法灵敏、准确、快速,反应条件温和,对环境友好,克服了上述光度法的不足。笔者深入研究发现,痕量牛磺酸在氨-氯化铵缓冲液中能显著抑制高锰酸钾氧化甲基橙的反应,使体系吸光度明显减小,国内外未见文献报道。通过试验优化反应条件,采用热水浸提和离子交换法处理样品,建立了分光光度法测定贝类中牛磺酸含量,为贝类中牛磺酸资源的合理利用提供实验依据。该方法灵敏度进一步提高。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

文蛤(新鲜)、缢蛏(新鲜)、栉孔扇贝(新鲜)和四角蛤蜊(新鲜)购于连云港市。

牛磺酸标准储备液:1.0 mg/mL,于冰箱4℃保存;牛磺酸标准工作液:0.5 μg/mL,临用时由牛磺酸标准储备液稀释;氨-氯化铵缓冲液:pH 11.0;高锰酸钾溶液:1.0×10⁻² mol/L;甲基橙(MO)溶液:5.0×10⁻⁴ mol/L。牛磺酸纯度为99.8%,其他试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 仪器与设备

WFJ7200型可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器公司;CS-501超级恒温槽,重庆银河试验仪器有限公司;SYZ-550石英亚沸高纯水蒸馏器,江苏金坛市白塔石英玻仪厂。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

用清水洗净贝类样品,去壳,取出贝肉,沥干,制备匀浆。准确称取匀浆25.0 g,加适量水煮沸1 h,二层纱布过滤。残渣再按上述方法提取1次,合并2次提取液,用水定容至500 mL,混匀。吸取2.0 mL于离心

管中,加入2.0 mL 60 g/L磺基水杨酸,混匀,静置10 min,4000 r/min离心15 min,弃去蛋白质沉淀,上清液经滤纸、0.45 μm滤膜过滤,滴加1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH为4~5。将其通过001×7强酸性阳离子交换柱,控制流速为1.5 mL/min,用50 mL水洗脱,弃去最初流出液,用1 L容量瓶收集后面流出液,用水定容,备用。

1.3.2 实验方法

在两支10 mL比色管中,依次加入2.0 mL pH 11.0氨-氯化铵缓冲液,2.5 mL 1.0×10⁻² mol/L高锰酸钾溶液和0.7 mL 5.0×10⁻⁴ mol/L甲基橙溶液,再向其中一支比色管中加入一定量牛磺酸标准工作液或样品溶液,另一支不加牛磺酸作试剂空白,用水定容并摇匀,室温下反应8 min。用1 cm比色皿,以水为参比,在波长690 nm处分别测量试样溶液的吸光度A和试剂空白的吸光度A₀,并计算吸光度差值ΔA=A₀-A。

2 结果与分析

2.1 反应条件的优化

2.1.1 吸收光谱

以水为参比,体系的吸收光谱如图1所示。由图1可知,甲基橙溶液的最大吸收峰位于610 nm(曲线1),高锰酸钾溶液的最大吸收峰位于620 nm(曲线2),当两者混合后,最大吸收峰红移至590 nm,体系吸光度显著增大(曲线3);当牛磺酸加入其中后最大吸收峰仍位于590 nm,体系吸光度明显减小(曲线4)。以试剂空白为参比,最大吸收波长位于690 nm处(曲线5),故选择690 nm为测定波长。

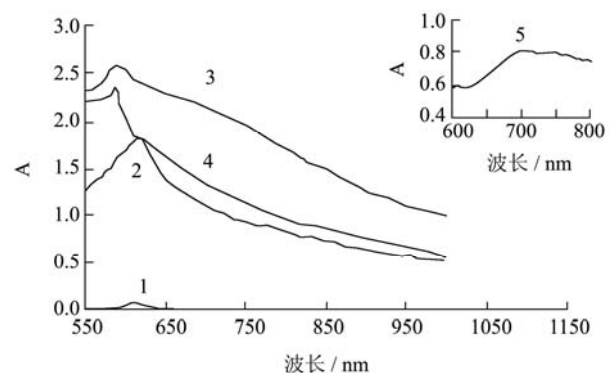


图1 吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra

注:1.甲基橙(以水为参比);2.高锰酸钾(以水为参比);3.高锰酸钾-甲基橙(以水为参比);4.高锰酸钾-甲基橙-牛磺酸(以水为参比),ρ(牛磺酸)=45 μg/L;5.高锰酸钾-甲基橙-牛磺酸(以试剂空白为参比),ρ(牛磺酸)=45 μg/L。

2.1.2 酸度的影响

分别考察了盐酸-乙酸钠(pH 1.99~4.19)、乙酸-

乙酸钠 (pH 3.6~5.7)、乙酸铵 (pH 7.0)、氨-氯化铵 (pH 7.5~11.0) 缓冲液、氢氧化钠 (pH 11、12) 和氢氧化钾 (pH 13.7) 溶液对反应体系的影响。实验结果表明, 酸度直接影响反应的进程以及体系的稳定性。由图 2 可知, 以 pH 11.0 氨-氯化铵缓冲液控制体系酸度, 痕量牛磺酸对高锰酸钾氧化甲基橙反应的抑制作用最明显, ΔA 值最大。当缓冲液用量在 2.0 mL 时, ΔA 值最大, 如图 3 所示。实验选用 2.0 mL pH 11.0 氨-氯化铵缓冲液。

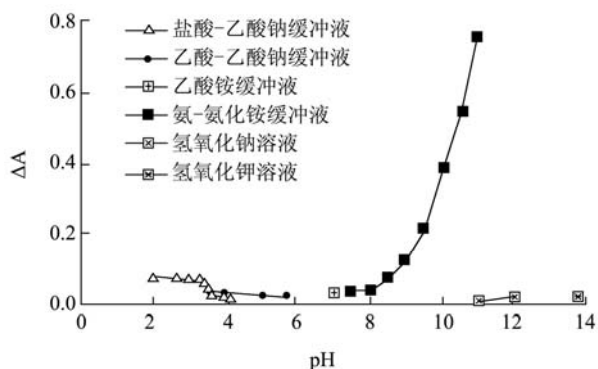


图 2 pH 值的影响

Fig.2 Effect of pH value

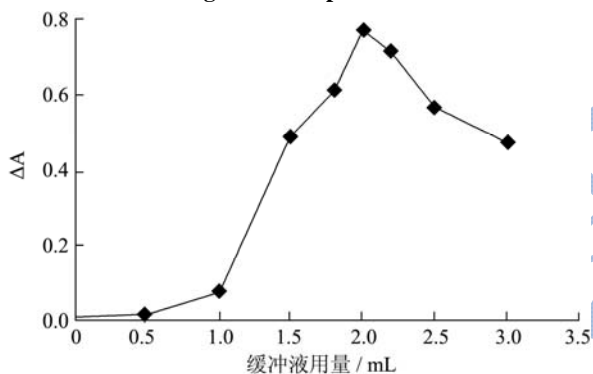


图 3 缓冲液用量的影响

Fig.3 Effect of buffer solution dosage

2.1.3 高锰酸钾用量的影响

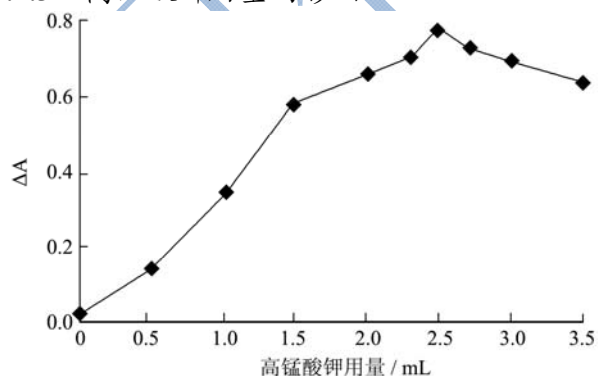


图 4 高锰酸钾用量的影响

Fig.4 Effect of KMnO4 dosage

实验发现, 高锰酸钾浓度的大小直接影响反应速率及体系的稳定性。若高锰酸钾溶液浓度过大, 反应

体系不稳定, ΔA 值变化太快, 难以准确测定。若高锰酸钾溶液浓度过小, 氧化甲基橙反应不充分, 痕量牛磺酸对此氧化反应的抑制作用不明显, 导致 ΔA 值过小。实验结果表明选用 1.0×10^{-2} mol/L 高锰酸钾为宜, 且用量在 2.5 mL 时, ΔA 值最大且恒定, 如图 4 所示。故选择加入 2.5 mL 1.0×10^{-2} mol/L 高锰酸钾。

2.1.4 甲基橙用量的影响

考察甲基橙用量对体系吸光度的影响, 结果如图 5 所示。当用量在 0.7 mL 时, ΔA 值最大且稳定。故选择加入 0.7 mL 5.0×10^{-4} mol/L 甲基橙。

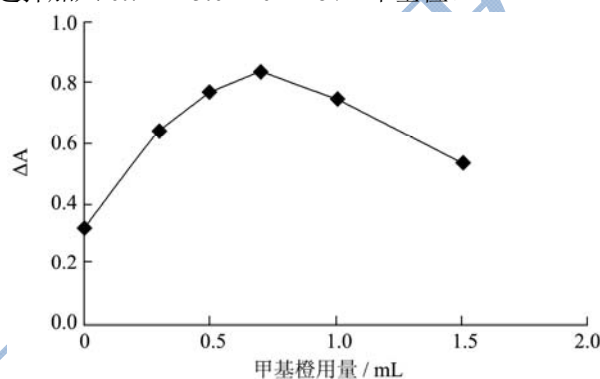


图 5 甲基橙用量的影响

Fig.5 Effect of Methyl Orange dosage

2.1.5 反应温度的影响

反应温度对体系吸光度的影响如图 6 所示。温度在 5~15 °C 时, 牛磺酸的抑制作用增强, ΔA 值增大; 温度在 15~30 °C 时, 牛磺酸的抑制作用最强, ΔA 值随之达到最大; 温度在 30~40 °C 时, 牛磺酸阻抑作用减弱, ΔA 值减小。当温度 ≥ 50 °C 时, 空白溶液中容易产生沉淀。为了确保体系稳定和测定的灵敏度, 选择室温 (15~30 °C) 为反应温度。

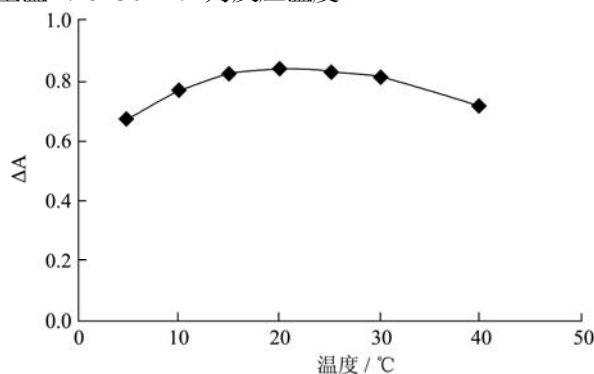


图 6 反应温度的影响

Fig.6 Effect of reaction temperature

2.1.6 反应时间的影响

反应时间对体系吸光度的影响情况如图 7 所示。反应一开始, ΔA 值随着反应时间的增大而增大, 当反应 8 min 时, 吸光度达到最大, 并保持 50 min 基本不变。选择反应时间为 8 min。

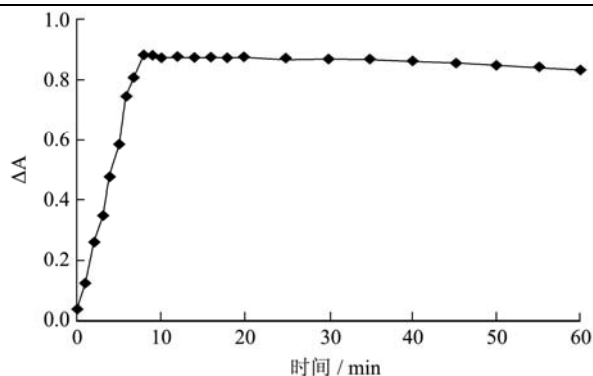


图7 反应时间的影响

Fig.7 Effect of reaction time

2.2 工作曲线与检出限

在一组 10 mL 比色管中,分别准确加入 0.5 μg/mL 牛磺酸标准工作液 0.15、0.30、0.60、0.90、1.20、1.50 mL。按实验方法测量体系吸光度,绘制工作曲线,如图 8 所示。吸光度与牛磺酸浓度在 0~75 μg/L 范围内呈良好的线性关系,线性回归方程为 $\Delta A=0.0177\rho(\mu\text{g/L})-0.0093$, 相关系数 $r=0.9995$ 。表观摩尔吸光系数为 $\epsilon_{690}=2.22\times 10^6 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$, 而文献报道值仅达到 $10^3\sim 10^4$ 数量级^[8], 本法灵敏度提高 2~3 个数量级。

对试剂空白进行 11 次测定,求得标准偏差 $S_b=7.05\times 10^{-3}$, 方法检出限为 $DL=3S_b/K=1.19 \mu\text{g/L}$, 显著低于国标法-高效液相色谱法和薄层色谱法的检出限^[5]。

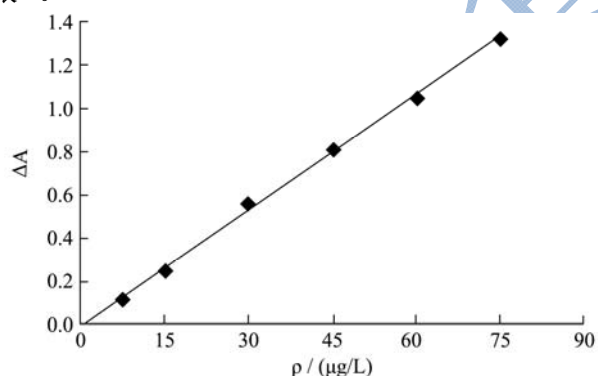


图8 工作曲线

Fig.8 working curve

2.3 共存物质的影响

在最佳反应条件下,对 50 μg/L 牛磺酸进行测定,相对误差在±5%范围内,常见物质的允许含量如下:葡萄糖、蔗糖(2000),磺基水杨酸、柠檬酸、柠檬酸三钠(1500),可溶性淀粉(1000), NH_4^+ 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、 SO_4^{2-} (600),抗坏血酸、草酸、草酸钠、 Ag^+ 、 PO_4^{3-} (500),尿素、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- (400), Hg_2^{2+} (300), β -

环糊精、 Ni^{2+} 、 F^- (200), Pb^{2+} (120), Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Al^{3+} (100), Ba^{2+} 、 Zn^{2+} (60), Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Sn^{4+} 、 I^- 、 Br^- 、 IO_3^- 、 NO_2^- 、 SO_3^{2-} 、 Se(IV) 、 V(V) 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (50), 苯丙氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸(20), 脯氨酸、谷氨酸、苏氨酸、白氨酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸(10), 酪氨酸、色氨酸(5)。结果表明,方法有良好的选择性,仅酪氨酸和色氨酸对测定有干扰,可用阳离子交换树脂分离除去。而简单样品可以不经预处理直接测定。

2.4 样品分析

分别精密吸取 1.0 mL 样品溶液于 10 mL 比色管中,按 1.3.2 方法测定,根据标准曲线求得样品中牛磺酸含量。由表 1 可知,本法与国标法-高效液相色谱法测定结果一致^[6],且相对标准偏差 RSD 为 0.82~1.24% ($n=6$),表明该方法准确、可靠,精密度高。统计学分析结果表明,经 F 检验和 t 检验,这两种方法的准确度和精密度的无显著性差异。

表 1 样品中牛磺酸含量分析结果 ($n=6$)

Table 1 Analytical results of taurine content in samples ($n=6$)

样品	国标法		本法		F 检验 ^①	t 检验 ^②
	测定值 / (mg/g)	RSD / %	测定值 / (mg/g)	RSD / %		
文蛤	3.78±0.04	1.01	3.77±0.03	0.82	1.78	0.49
缢蛭	2.66±0.03	1.09	2.67±0.02	0.90	2.25	-0.68
栉孔扇贝	1.30±0.02	1.46	1.29±0.02	1.24	1.00	0.87
四角蛤蜊	2.17±0.03	1.29	2.19±0.02	0.96	2.25	-1.36

注: ^① $f(5,5)$, 置信度 95%, $F_{\alpha}=5.05$; ^② $f=10$, 置信度 95%, $t_{\alpha}=1.81$ 。

表 2 加标回收实验结果 ($n=6$)

Table 2 Results for spiked recovery test ($n=6$)

样品	加入量 / (mg/g)	测得总量均值 / (mg/g)	回收率 / %	RSD / %
文蛤	2.00	5.74	98.96	0.79
	3.00	6.78	100.63	0.75
缢蛭	2.00	4.69	101.08	0.87
	3.00	5.62	98.37	0.82
栉孔扇贝	1.50	2.77	98.31	1.19
	2.50	3.78	99.55	0.90
四角蛤蜊	2.00	4.20	100.27	0.98
	4.00	6.26	101.76	0.81

另称取贝类匀浆 25.0 g, 加入一定量牛磺酸标准使用液,按 1.3.1 方法处理样品,分别精确吸取 1.0 mL 样品溶液于 10 mL 比色管中,按 1.3.2 方法进行测定,根据标准曲线求得牛磺酸总量,再计算回收率。由表

2 可知,回收率为 98.31~101.76%,表明该方法测定结果准确。

3 结论

本文通过试验对牛磺酸-高锰酸钾-甲基橙体系反应条件进行优化,确定了最佳条件,采用热水浸提和离子交换法处理样品,建立了高灵敏度分光光度法测定贝类中牛磺酸。表观摩尔吸光系数为 2.22×10^6 L/(mol·cm),明显高于文献报道值。方法检出限为 1.19 μ g/L,显著低于国标法检出限。本方法灵敏、准确、简便、快速、精密度高,选择性好,反应条件温和,对环境友好,适于贝类中牛磺酸含量的测定。

参考文献

- [1] Militante J D, Lombardini J B. Dietary Taurine Supplementation: Hypolipidemic and Antiatherogenic Effects [J]. Nutrition Research, 2004, 24(10): 787-801
- [2] Wójcik O P, Koenig K L, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. The Potential Protective Effects of Taurine on Coronary Heart Disease [J]. Atherosclerosis, 2010, 208(1): 19-25
- [3] Zeng K H, Xu H X, Chen K, et al. Effects of Taurine on Glutamate Uptake and Degradation in Müller Cells under Diabetic Conditions Via Antioxidant Mechanism [J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2010, 45(2): 192-199
- [4] Dragnes B T, Larsen R, Ernsten M H, et al. Impact of Processing on the Taurine Content in Processed Seafood and Their Corresponding Unprocessed Raw Materials [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2009, 60(2): 143-152
- [5] GB/T 5009.169-2003,食品中牛磺酸的测定[S]
GB/T 5009.169-2003, Determination of Taurine in Foods [S]
- [6] 王洪健,周兴起,冯志强,等.氨基酸自动分析仪测定食品中牛磺酸的方法建立[J].现代食品科技,2012,28(3):348-350
Wang H J, Zhou X Q, Feng Z Q, et al. Determination of Taurine in Food Products by Amino Acid Autoanalyzer [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(3): 348-350
- [7] 李珊,刘玉兰.荧光法测定食物中牛磺酸[J].理化检验:化学分册,2001,37(2):80-81
LI S, Liu Y L. Fluorophotometric Determination of Taurine in Foodstuff [J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2001, 37(2): 80-81
- [8] 李省云,杨毅萍,任引哲,等.牛磺酸与苯醌类试剂的荷移反应[J].分析测试学报,2005,24(6):110-112
Li S Y, Yang Y P, Ren Y Z, et al. Charge Transfer Reaction of Taurine with Benzoquinones [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2005, 24(6): 110-112
- [9] 张忠义,刘振林,陈辉.乳与乳制品中牛磺酸的吸光光度法测定[J].中国公共卫生,2005,21(12):1461
Zhang Z Y, Liu Z L, Chen H. Determination of Taurine in Milk and Dairy Products by Spectrophotometry [J]. Chinese Journal of Public Health, 2005, 21(12): 1461
- [10] Pieszko C, Baranowska I, Flores A. Determination of Energizers in Energy Drinks [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2010, 65(12): 1228-1234
- [11] 李咏梅,李人宇,施鹏飞.抑制氧化罗丹明B光度法测定贝类中牛磺酸含量[J].食品科学,2013,34(20):117-120
Li Y M, Li R Y, Shi P F. Spectrophotometric Determination of Taurine in Shellfish Using Inhibition of Rhodamine B Oxidation [J]. Food Science, 2013, 34(20): 117-120
- [12] 李咏梅,祝龙生,李人宇.抑制氧化刚果红光度法测定饲料中牛磺酸含量[J].中国饲料,2013,12:36-39
Li Y M, Zhu L S, Li R Y. Spectrophotometric Determination of Taurine Content in Feeds Using Inhibition of Congo Red Oxidation [J]. China Feed, 2013, 12: 36-39