

β -环糊精包合中性红荧光光度法测定食品中的亚硝酸根

覃世杰¹, 金文英², 海洪²

(1.中国有色桂林矿产地质研究院有限公司, 广西桂林 541004) (2.桂林理工大学化生学院, 广西桂林 541004)

摘要: 合成 β -CD-中性红包合物, 研究其在盐酸介质中与 NO_2^- 的亚硝化反应。结果表明, 在盐酸介质中, NO_2^- 在0~120 $\mu\text{g/L}$ 范围之内与荧光猝灭程度成正比, 常见的共存离子不干扰其测定。所拟方法用于食品中 NO_2^- 的测定, 结果满意。

关键词: β -环糊精; 亚硝酸根; 中性红; 荧光光度法

文章编号: 1673-9078(2013)6-1400-1402

Determination of Nitrite by Fluorescence Spectrometry with

Neutral Red included in β -Cyclodextrin

TAN Shi-jie¹, JIN Wen-ying², HAI Hong²

(1.China Nonferrous Metal Guilin Research Institute of Geology for Mineral Resources, Guilin 541004, China)

(2.College of Chemistry and Bioengineering, Guilin Institute of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract: An inclusion complex was prepared via synthesis of β -CD and neutral red envelope and the reaction of this complex with nitrite in hydrochloric acid was investigated. The results showed that, in hydrochloric acid, the inclusion complex can directly react with nitrite. The detection limit and relative standard deviation were within the rage of 0~120 $\mu\text{g/L}$, the NO_2^- content showed a linear relation with the fluorescence quenching spectrum. Common coexisting ions did not interfere with its determination. The proposed method can be used for water samples in the determination of nitrite with satisfactory results.

Key words: β -Cyclodextrin; nitrite; neutral red; fluorescence spectrometry

β -环糊精(cyclodextrin, CD)是通过葡萄糖转糖基酶作用于淀粉,得到的由7个葡萄糖单元组成的环状低聚糖化合物,具有外亲水内疏水的特殊结构^[1],这种特殊结构能够增强多类物质的荧光强度,大大提高检测灵敏度。目前,利用 β -CD及其衍生物形成超分子体系过程荧光强度发生变化的特性,将其作为荧光增敏试剂的研究和应用越来越多,为环境监测等领域高灵敏度检测技术的开发提供了新的思路和方向^[2~4]。

亚硝酸根广泛存在于土壤、天然水和食品等物质中,其易与仲胺、酰胺反应生成致癌的亚硝胺化合物,因此亚硝酸盐的含量是环境监测和食品分析的重要指标,对其测定有实际意义。亚硝酸根的测定通常采用 Griess 比色法及其改进方法,近年来又报道了催化光度法和计算光度法及荧光光度法^[5~6]。中性红是一种常

收稿日期: 2013-01-19

基金项目: 广西教育厅科研项目(200911LX120), 珍稀濒危动植物生态与环境保护部共建教育部重点实验室研究基金(桂科能1102K003)资助

作者简介: 覃世杰

通讯作者: 金文英(1973-), 女, 讲师

用的指示剂,在酸性溶液中具有一定的荧光强度。本文在 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中,合成荧光增敏的 β -CD-中性红包合物,研究了在盐酸介质中, NO_2^- 与 β -CD-中性红包合物的亚硝化反应,并用于食品中亚硝酸盐含量的测定。

1 实验部分

1.1 主要试剂及仪器

$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液; 1.0×10^{-3} mol/L 中性红溶液; 3.0 mol/L HCl 溶液; β -环糊精; NaNO_2 储备液: 1.0 g/L, 使用前稀释成 10 mg/L 的工作液。

实验所用试剂均为分析纯,实验用水均为超纯水。

美国 VARIAN CARY50 紫外-可见分光光度计,日本岛津 RF-5301PC 荧光分光光度计。

1.2 实验方法

1.2.1 包合物的制备

准确移取 2.0 mL $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液(pH 7.6)、1.0 mL 中性红溶液(1.0×10^{-3} mol/L)、取适量的 β -CD 溶液(5.0×10^{-3} mol/L)于 10 mL 比色管中,定容,

混匀, 超声5 min, 再室温静置15 min, 测定溶液的荧光强度。

1.2.2 NO₂⁻的测定

于25 mL的比色管中加入1.0 mL的NO₂⁻工作液, 再加入0.50 mL的β-CD-中性红包合物溶液, 稀释至10.0 mL, 再加入0.50 mL的3 mol/L的HCl溶液, 摇匀, 反应10 min后, 用水稀释至刻度, 在λ_{ex}为470 nm的激发下, 于λ_{em}为590 nm处测定试剂的荧光强度F和试剂空白的荧光强度F₀。计算ΔF=F₀-F。

2 结果与讨论

2.1 激发波长的确定

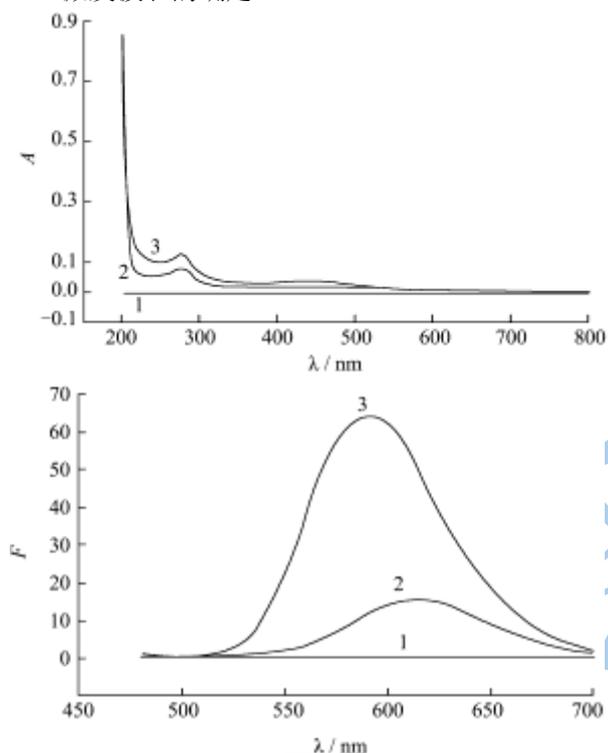


图1 激发光谱(a)和发射光谱(b)

Fig.1 Excitation spectra (a) and emission spectra (b)

注: 1: β-CD; 2: 中性红; 3: β-CD-中性红。

紫外-可见分光光度法测得中性红在波长456 nm处有最大吸收峰。选择456 nm为荧光激发波长, 激发和发射光谱通带分别为5 nm时, 扫描分别得到中性红、β-CD、β-CD-中性红包合物的荧光强度与发射波长的关系曲线, 即发射光谱(如图1)。图1可知β-CD溶液不产生荧光, 中性红的荧光发射波长为610 nm, β-CD-中性红包合物的荧光发射波长为590 nm, 其荧光强度比中性红的大而且发射波长蓝移, 表明合成了包合物且β-CD有荧光增敏作用。

2.2 包合条件的选择

2.2.1 酸度的影响

分别配制pH 6.8~8.0按2.2.1实验方法测定溶液的

荧光强度。由表1可知荧光强度随着缓冲液pH值的增大, 体系的ΔF增大; 当pH值增大到7.6时, ΔF的值最大; 之后随着缓冲液pH值的增大, 体系的ΔF逐渐减小。所以选pH值为7.6作为反应环境。

表1 缓冲液 pH 值的影响

pH值	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0
ΔF	11.957	18.138	23.923	38.044	40.846	38.573	34.437

2.2.2 包合反应稳定时间

按2.2.1实验方法操作, 室温静置不同的时间后测定溶液的荧光强度, 结果见表2。随着室温放置时间的越长, 体系的荧光越强, 当放置15 min后荧光强度高且趋于稳定, 因此选择包合反应的稳定时间为15 min。

表2 反应稳定时间的影响

t/min	5	10	15	30	60	90	120
ΔF	34.785	36.506	36.478	36.451	36.486	34.802	34.766

2.2.3 试剂加入顺序的影响

分别改变缓冲溶液、β-CD和中性红等试剂的加入顺序, 研究其对β-CD包合中性红的影响。由表3可知随着试剂加入顺序的不同, 其产生的荧光强度也不同, 按缓冲液+中性红+β-CD的顺序合成包合物所产生的荧光强度最大。

表3 试剂加入顺序的影响

试剂加入顺序	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
ΔF	46.968	40.159	46.391	39.353	39.546	39.233

注: (1): 缓冲液+中性红+β-CD; (2): 缓冲液+β-CD+中性红; (3): 中性红+缓冲液+β-CD; (4): 中性红+β-CD+缓冲液; (5): β-CD+缓冲液+中性红; (6): β-CD+中性红+缓冲液。

2.3 NO₂⁻的测定

2.3.1 盐酸用量的影响

表4 盐酸用量的影响

V _{HCl} /mL	0.10	0.30	0.50	0.70	0.90	1.00
ΔF	7.542	8.140	8.366	4.886	4.696	4.007

改变盐酸的加入体积, 实验表明, NO₂⁻的用量在0.5 mL时, ΔF值较大。

2.3.2 反应时间的影响

表5 反应时间的影响

t/min	5	10	15	30	60	90
ΔF	7.815	8.366	8.360	8.220	7.340	7.312

按2.2.2实验方法操作, 室温静置不同的时间后测定溶液的荧光强度。由表5可知, 随着反应时间的增长, 体系的 ΔF 值增大; 当反应时间为10~30 min时, ΔF 值趋于稳定, 所以选择10 min为反应时间。

2.3.3 试剂加入顺序的影响

本实验分别改变 NO_2^- 、中性红包合物, HCl的加入顺序, 随着试剂加入顺序的不同而 ΔF 值不同。由表6可知, 采用 NO_2^- +中性红包合物+HCl所测 ΔF 值最大。所以实验选择先加入中性红包合物再加入HCl的方法。

表6 试剂加入顺序的影响

Table 6 Effect of reagent join order on ΔF value

试剂顺序	NO_2^- +中性红包合物+HCl	NO_2^- +HCl+中性红包合物
ΔF	9.108	8.015

2.3.4 标准曲线

取不同量的 NO_2^- , 按2.2.2实验方法测定其荧光强度, NO_2^- 在0~120 $\mu\text{g/L}$ 范围内与 ΔF 成线性关系, 回归方程为 $\Delta F=1.3891x+2.1469$, $R^2=0.9993$ 。

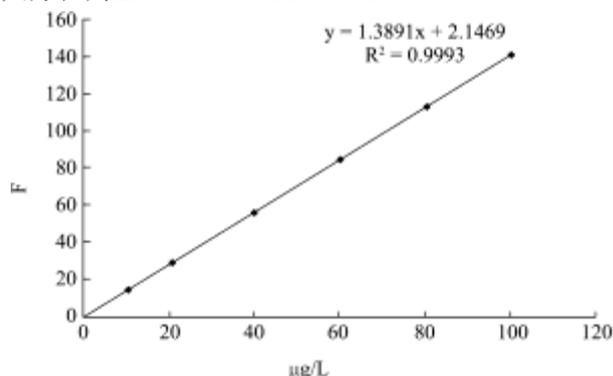


图9 标准曲线

Fig.9 Standard curve

2.3.5 方法的检测限

平行测定12次空白, 计算出标准偏差为 9.76×10^{-3} , 以3倍的标准偏差S除以工作曲线的斜率K(即是 $3S/K$),

得到本方法的检测限为 $2.11 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$ 。

2.3.6 共存离子的影响

共存离子的影响按2.2.2实验方法考察了常见共存组分对在含 NO_2^- 20 $\mu\text{g/L}$ 的溶液中, 分别加入各种干扰离子。结果表明, K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 CO_3^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 NO_3^- 、 Br^- 、 I^- 、 SO_4^{2-} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 等不干扰 NO_2^- 的测定。

表7 方法的检出限

Table 7 Detection limit of the method

次数	空白 F_0	S	检出限 ($3S/K$)
1	14.863		
2	14.842		
3	14.856		
4	14.848		
5	14.830		
6	14.852		
7	14.832	9.76×10^{-3}	$2.11 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$
8	14.844		
9	14.839		
10	14.838		
11	14.847		
12	14.837		

2.4 样品分析

分别称取火腿肠样品, 置于研钵中捣碎为肉浆, 然后加入20 mL饱和硼砂溶液和100 mL 70 °C左右的水, 一起转入250 mL的锥形瓶中, 放置沸水浴中15 min, 取出, 一边转动一边加入5 mL亚铁氰化钾溶液, 摇匀, 再加入5 mL乙酸锌溶液以沉淀蛋白质, 冷却, 静置30 min, 除去上层脂肪后真空抽滤, 得到的滤液于150 mL容量瓶中稀释定容至刻度, 摇匀待测。按照实验测定方法, 对火腿肠样品中亚硝酸盐含量进行测定。同时, 也对样品做加标回收实验, 测定其回收率, 测定结果见表8。

表8 样品分析表 (n=3)

Table 8 Analytical of samples

样品	样液测得浓度/ $\mu\text{g/mL}$	NaNO_2 含量/ $\mu\text{g/g}$	NaNO_2 平均含量/ $\mu\text{g/g}$	NO_2^- 加标量/ μg	加标后测得浓度/ $\mu\text{g/mL}$	回收率/%	平均回收率/%
1 (25g)	0.00820	2.46		3.114	0.13002	97.8	
	0.00819	2.46	2.46	3.114	0.12930	97.2	97.4
	0.00817	2.45		3.114	0.12907	97.1	
2 (25g)	0.00966	2.90		3.114	0.12907	95.9	
	0.01009	3.02	2.99	3.114	0.13002	96.3	95.9
	0.01012	3.04		3.114	0.12930	95.7	

3 结论

本实验用中性红为荧光剂, β -环糊精包合中性红

荧光增敏的作用,再采用荧光猝灭法测定了火腿肠中亚硝酸盐的含量,常见的共存离子几乎不影响实验结果的测定。本实验方法操作简便,灵敏度高,选择性好,用于肉制品中亚硝酸盐含量的测定,具有较好的现实意义。

参考文献

- [1] 宋乐新,孟庆金,游效曾.环糊精和环糊精包合物[J].无机化学学报,1997,13(4):368-374
- [2] 张元超,黄立新,徐正康.环糊精的改性和应用研究进展[J].

现代食品科技,2008,24(9):947-951

- [3] 张敏,张宇昊,马良. β -环糊精及其衍生物的荧光增敏作用研究进展[J].食品科学,2011,32,(1):297-302
- [4] 戚文彬.环糊精衍生物在荧光分析中的应用进展[J].分析科学学报,1997,13(3):334-340
- [5] 郝桂霞,杨晓斌.潮州酱腌菜中硝酸盐及亚硝酸盐含量的测定[J].现代食品科技,2007,23(7):86-88
- [6] 孙彩兰,蹇瑞红,姜维民.新体系催化动力学光度法测定痕量亚硝酸根[J].分析实验室,2001,20(2):34-36