

充氮蒸馏-邻苯二甲醛荧光法测定绿豆芽中的亚硫酸盐含量

马占玲, 张静, 励建荣, 汪莹, 李宁宁, 陈思

(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: 建立了一种检测绿豆芽中亚硫酸盐的含量新方法。绿豆芽在充氮条件下进行蒸馏, 挥发出来的 SO₂ 用氢氧化钠溶液进行吸收, 吸收后的亚硫酸盐在室温下, pH 值为 6.6 的介质中与铵盐、邻苯二甲醛反应生成强荧光物质, 荧光强度与亚硫酸盐浓度 (以 SO₂ 计) 在 0~9.60 mg/L 范围内呈现良好的线性, 线性方程为 $y=403.1x-147.41$, 相关系数为 0.9996。该方法测定豆芽中的亚硫酸盐操作简单, 选择性好, 灵敏度高, 所测结果与国标法 (蒸馏滴定法) 无显著性差别。同时对豆芽中亚硫酸盐的去除方法进行了研究, 考察了水、醋酸水溶液、氯化钠溶液、碳酸钠溶液、洗米水对豆芽中亚硫酸盐的去除效果。结果表明洗米水和碳酸钠水溶液可以很好地去除豆芽中的亚硫酸盐。在 65 °C, 绿豆芽在 150.00 g/L 洗米水和 2.00 g/L 的碳酸钠溶液中浸泡 1.5 h, 亚硫酸的去除率可分别达到 66.41%~72.83% 和 67.07%~80.12%。

关键词: 亚硫酸盐; 去除; 豆芽; 邻苯二甲醛; 荧光法

文章编号: 1673-9078(2016)07-243-248

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.037

Analysis of Sulfite Content in Mung Bean Sprouts using the Distillation (with a Nitrogen Flow)-*Ortho*-phthalaldehyde Fluorescence Method

MA Zhan-ling, ZHANG Jing, LI Jian-rong, WANG Ying, LI Ning-ning, CHEN Si

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

Abstract: A new method was established for the determination of sulfite (SO₂) content in mung bean sprouts. Mung bean sprouts were distilled with a nitrogen flow, and the volatilized SO₂ was absorbed by sodium hydroxide solution. At room temperature, the absorbed sulfite, ammonium salt and *ortho*-phthalaldehyde (OPA) could react to generate compounds with strong fluorescence in a medium with a pH of 6.6. The fluorescence intensity and concentration of SO₂ showed good linearity in the range of 0 to 9.60 mg/L, and the regression equation was $y = 403.1x - 147.41$, with a correlation coefficient of 0.9996. This method for determination of SO₂ content in mung bean sprouts was simple, sensitive, and selective, and the results obtained showed no significant differences from those using the national standard method (the distillation-distillation method). Furthermore, appropriate methods for removal of sulfite in mung bean sprouts were studied. Additionally, the effects of water, acetic acid solution, salt solution, sodium carbonate solution, and rice washing water on removal of SO₂ from mung bean sprouts were investigated. The results showed that the sulfite in mung bean sprouts could be effectively removed with rice washing water and sodium carbonate solution. At 65 °C, mung bean sprouts were soaked in 150.00 g/L rice washing water and 2.00 g/L sodium carbonate solution for 1.5 h, and the removal rates of SO₂ reached 66.41~72.83% and 67.07~80.12%, respectively.

Key words: sulfite; removal; bean sprouts; *ortho*-phthalaldehyde; fluorescence method

收稿日期: 2015-01-05

项目资助: “十二五”国家科技支撑计划 (2012BAD29B06); 辽宁省食品安全重点实验室暨辽宁省高校重大科技平台“食品贮藏加工及质量安全控制工程技术研究中心”开放课题 (LNSAKF2011024)。

作者简介: 马占玲 (1969-), 女, 教授, 主要从事食品及精细化学品检验方面的研究工作

通讯作者: 励建荣 (1964-), 男, 博士, 教授, 博导, 主要从事果蔬、水产品贮藏加工与质量安全控制方面的研究

亚硫酸及其盐类是广泛使用的食品添加剂, 它们可以抑制微生物的繁殖, 抑制果蔬中氧化酶的活力, 防止氧化酶对营养成分的破坏和颜色的改变, 具有防腐、保鲜、抗氧化、漂白等作用^[1-2]。因此, 一些非法商贩常用亚硫酸盐浸泡豆芽, 对其进行漂白、防腐, 延长货架期。

然而, 亚硫酸盐有一定的毒性, 人体如果摄入过多, 会造成红细胞减少, 肝脏受损, 甚至会损伤生殖

细胞,具有生殖毒性^[4]。近几年来,毒豆芽事件搞得人心惶惶,很多人“敢爱不敢吃”。因此建立快速检测豆芽中亚硫酸盐的含量,并寻找有效的去除方法,具有重要的现实意义。

亚硫酸的检验方法较多,分光光度法^[5]、离子色谱法^[6]、电化学法^[7-8]、化学发光法^[9]、流动注射法^[10]、传感器法^[11]等等。这些方法有的操作复杂,仪器昂贵;有的不适用新鲜果蔬中亚硫酸盐含量的测定,因为新鲜果蔬中含有维生素C等物质,会产生干扰。果蔬中亚硫酸盐含量的测定方法有充氮蒸馏-碘滴定法^[12],充氮蒸馏-盐酸副玫瑰苯胺法。充氮蒸馏-碘滴定法,不能用于低浓度物质的检测,选择性较差,样品用量大,而充氮蒸馏-盐酸副玫瑰苯胺法,其缺陷主要表现在①操作过程中大量使用有毒的四氯汞钠溶液,对环境造成汞污染;②检测时间长;③对于某些种类的样品可能存在干扰物质,干扰络合反应而产生假阳性;④盐酸副玫瑰苯胺在使用时对HCl的加入量十分苛刻,加入量不同,所得产物的吸光度不同,对结果的准确度影响较大^[13]。本文采用充氮蒸馏-氢氧化钠吸收-邻苯二甲醛荧光法测定豆芽中亚硫酸盐的含量,该方法灵敏,准确,无污染。同时,对豆芽中亚硫酸盐的去除方法进行了研究,为人们安全食用豆芽提供保障。

1 材料与方法

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。

邻苯二甲醛,乙酸铵,亚硫酸钠,均为分析纯,购自国药集团有限公司;氢氧化钠,碘,硫代硫酸钠,均为分析纯,购自天津永晟精细化工有限公司。

豆芽,实验室自制,在测定前用1.00 g/L亚硫酸钠溶液浸泡12 h。

1.2 测定原理

亚硫酸盐-邻苯二甲醛-铵盐在中性或弱酸性条件下反应,生成化合物1-磺酸基-异吲哚,该化合物可以产生强烈的荧光^[4]。荧光强度与亚硫酸盐浓度成正比。反应机理见图1。

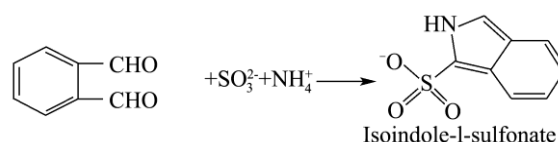


图1 反应机理

Fig.1 Reaction mechanism

1.3 最佳测定条件的确定

采用控制变量法,对邻苯二甲醛-铵盐-亚硫酸根荧光法测定亚硫酸盐的实验条件:荧光发射波长,邻苯二甲醛的用量,乙酸铵的用量,介质pH,反应时间和反应温度进行探索,以确定最佳测定条件。

1.4 样品处理与测定

称取一定质量自制豆芽,用一定量1.00 g/L亚硫酸钠溶液浸泡后,取出,控干水分后,分成若干等份,一份不作处理,剩下的分别用自来水、食盐水、白醋水、洗米水、纯碱水浸泡一定时间后,各称取10 g,采用下列方法进行蒸馏。

将样品置于500 mL蒸馏烧瓶中,加入250 mL水,装上冷凝装置,冷凝管下端插入碘量瓶中的25 mL吸收液(国标法:20.00 g/L乙酸铅 荧光法:0.10 mol/L NaOH)中。然后在蒸馏烧瓶中加入10 mL盐酸(1+1),立即盖塞,调节N₂流量约为0.50 L/min,加热蒸馏,当蒸馏液约200 mL时,使冷凝管下端离开液面,再蒸馏1 min。(蒸馏液沸腾后,蒸馏20 min)。获得的吸收液分别用荧光法或国标法进行检测。

国标法检测:向碘量瓶中依次加入10 mL浓盐酸,1 mL淀粉指示液(10.00 g/L),摇匀后用碘标准滴定液(0.01 mol/L)滴定至变蓝且在30 s内不褪色为止。通过公式计算二氧化硫含量。

荧光法检测:向比色管中加入1.50 mL pH=6.6的缓冲液,0.15 mL邻苯二甲醛(100.00 mmol/L)、0.80 mL乙酸铵(1.00 mmol/L)、1 mL样液,去离子水定容到10 mL。摇匀,20 min后检测。

1.5 数据分析

采用SPSS11.0统计软件进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 为差异显著,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 荧光法最佳测定条件的确定

首先将不同浓度的荧光体系在300 nm~800 nm波长范围内分别对激发峰和发射峰进行扫描,结果见图

1. 由图确定最大激发波长为 320 nm, 荧光最大发射波长(即测量波长)为 390 nm。在此波长下采用单因素控制变量法对邻苯二甲醛-铵盐-亚硫酸根测定亚硫酸盐的实验条件进行了探究, 确定最佳测定条件, 结果见表 1。反应体系在此条件下反应后, 荧光强度较强且稳定。

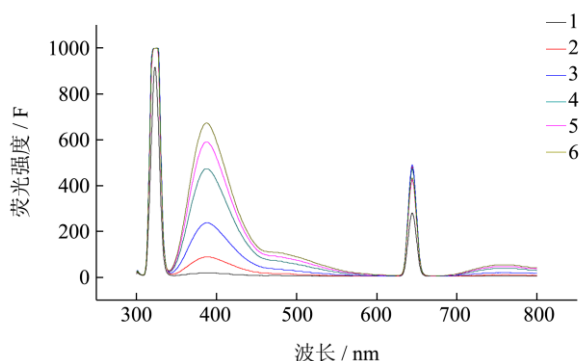


图2 荧光谱图

Fig.2 Fluorescence spectra

注: 1~6 为不同浓度荧光谱图。

表 1 荧光测定最佳条件

吸收波长 (EX)	发射波长 (EM)	邻苯二甲醛最佳用量 (n 邻苯二甲醛:n 二氧化硫)
320nm	390 nm	12:1
pH	反应时间	乙酸铵的最佳用量 (n 乙酸铵:n 二氧化硫)
6.6	20min	6.40: 1

表 2 荧光法与国标法显著性差异比较

测定平均值/(mg/kg)	方差(s)	F 值	t 值	结果
国标法	73.40	4.86	0.66	二者无显著性差异
荧光法	84.20			

用 F 检验法和 t 检验法对国标法和荧光法测得的豆芽中亚硫酸盐含量的平均值显著差异进行检验。通过计算 F 为 4.86, 小于 $F_{0.95,3}$ (9.28), 说明二者的方差不存在显著性差异 ($p < 0.05$); t 值为 0.66, 小于 $t_{0.95,5}$ (2.57), 说明两种方法测得的平均值, 即两种方法无显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.5 加标回收实验

取六份 10 g 左右豆芽, 放入蒸馏瓶中, 分别加入

表 3 国标法与荧光法检测的加标回收率

样品中 SO ₂ 含量平均值/(mg/kg)	加标浓度/mg	测量值/(mg/kg)	平均回收率/%	方差/%	
国标法	73.40	2.00	227.50	77.10	0.78
荧光法	84.20	2.00	234.20	75.00	2.72

2.2 共存离子的影响

在亚硫酸盐浓度为 0.80 mg/L, 相对偏差小于 $\pm 5.00\%$ 时, 干扰离子所允许的共存倍数为: Na⁺ (200 倍)、Cl⁻ (200 倍)、K⁺ (200 倍)、CO₃²⁻ (200 倍)、Zn²⁺ (100 倍)、蛋白质 (100 倍)、Vc (100 倍), 由此可见, 该体系对亚硫酸盐的选择性较好。

2.3 工作曲线

系列亚硫酸盐标准溶液, 在最佳条件下反应 20 min 后, 于激发波长为 320 nm, 发射波长 390 nm 下测定其荧光强度, 绘制工作曲线。得到线性回归方程为 $y = 403.1x - 147.41$, 相关系数为 0.9996, 亚硫酸盐浓度(以 SO₂ 计)在 0~9.60 mg/L 范围内呈现良好的线性关系, 且直线斜率较大, 灵敏度较高。

2.4 荧光法与国标法测定豆芽中亚硫酸盐差

异性检验

将自制豆芽用浓度为 1.00 g/L 亚硫酸钠溶液浸泡 12 h 后用清水冲洗(以下同), 分成 6 份, 每份 10g 左右, 放入蒸馏瓶中, 通氮气蒸馏, 其中三份用 0.10 mol/L NaOH 溶液吸收, 用荧光法测定; 另外三份用 20.00 g/L 乙酸铅溶液吸收, 碘量法滴定(国标法), 结果见表 2。

2 mL 浓度为 1.00 g/L 的亚硫酸钠标准溶液, 充氮加热蒸馏后, 分别用国标法和荧光法进行检测。计算方差和回收率, 结果见表 3。

由实验结果可见, 国标法和荧光法的平均回收率分别为 77.10% 和 75.00%, 精密度分别为 0.78% 和 2.72%, 荧光法与国标法比较, 其精密度和回收率均无显著性差异 ($p < 0.05$)。而且荧光法具有样品用量少, 灵敏度高等优点。

2.6 豆芽中亚硫酸盐去除

2.6.1 去除方法比较

取6份10g左右的豆芽，一份不作处理，剩下的分别用自来水、食盐水、白醋水、洗米水、纯碱水（碳酸钠溶液）在室温下浸泡30min后，充氮蒸馏，荧光法进行测定，比较豆芽菜在不同溶质的水溶液中浸泡后的去除效果。结果见图3。

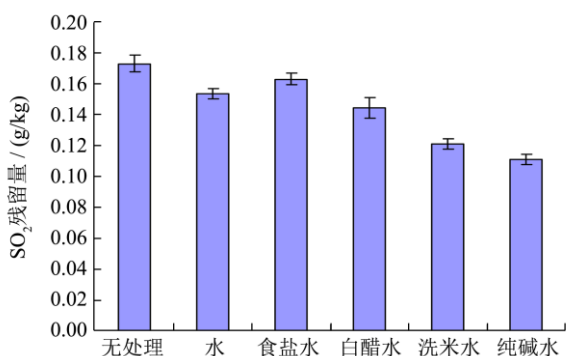


图3 不同方法处理豆芽的检测结果

Fig.3 Measurement results of mung bean sprouts after different treatments

由图可见，豆芽用不同溶质的水溶液浸泡，亚硫酸盐的去除效果不同。采用食盐水浸泡，亚硫酸盐的残留量高于纯水浸泡；用白醋的水溶液浸泡，效果与纯水相当；而采用洗米水和纯碱水浸泡，亚硫酸盐的残留量明显低于纯水。可见用无毒、无害的洗米水和纯碱水溶液能有效地去除豆芽菜中的亚硫酸盐，是人们日常生活简单可行的方法。

2.6.2 洗米水、纯碱水去除豆芽中亚硫酸盐的最佳条件的确定

2.6.2.1 洗米水、纯碱水浓度对亚硫酸盐去除效果的影响

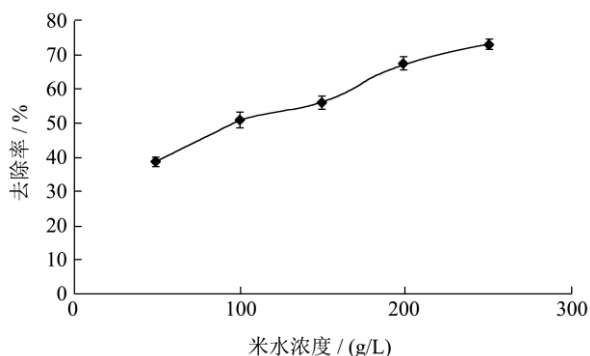


图4 洗米水浓度对去除率的影响

Fig.4 Effects of the concentration of rice washing water on the removal rate

称取质量相等的12份豆芽。两份不处理，5份分别用浓度为50.00g/L（将50g大米放入1L水中，以

下同）、100.00g/L、150.00g/L、200.00g/L、250.00g/L洗米水浸泡豆芽1.5h，5份分别用浓度为1.00g/L、1.50g/L、2.00g/L、2.50g/L、3.00g/L纯碱水浸泡豆芽1.5h后，充氮蒸馏，荧光法检测样液，结果见图4、图5。

实验结果表明，米水和碱水的浓度越大，豆芽中亚硫酸盐的去除率越大。由图4可知，洗米水浓度为150.00g/L时，亚硫酸盐的去除率达到58.03%，250g/L时达到73.15%。所以日常生活中尽量用浓度大的洗米水来处理豆芽中的亚硫酸盐，考虑到实际情况，本实验选择150.00g/L的洗米水处理样品。由图5可知，纯碱水（碳酸钠水溶液）浓度越大，处理效果越好。纯碱水浓度为2.00g/L时，去除率达到70.18%，当碱水的浓度超过2.00g/L后，去除率升高缓慢。为了不影响豆芽菜的口感，选择纯碱水浓度为2.00g/L。

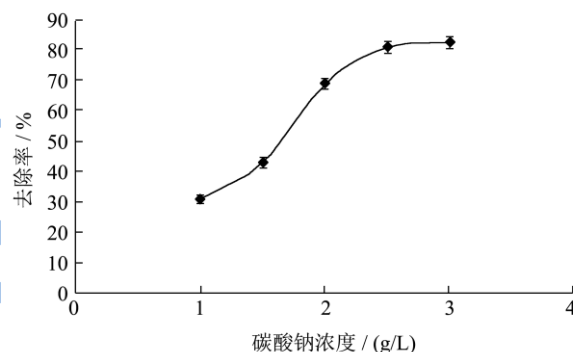


图5 纯碱水浓度对去除率的影响

Fig.5 Effects of the concentration of carbonate solution on the removal rate

2.6.2.2 洗米水、纯碱水处理时间的影响

称取13份豆芽，一份不处理，另外12份分别用150.00g/L洗米水和2.00g/L纯碱水常温下浸泡，考察不同的浸泡时间对亚硫酸盐去除率的影响，结果见图6。

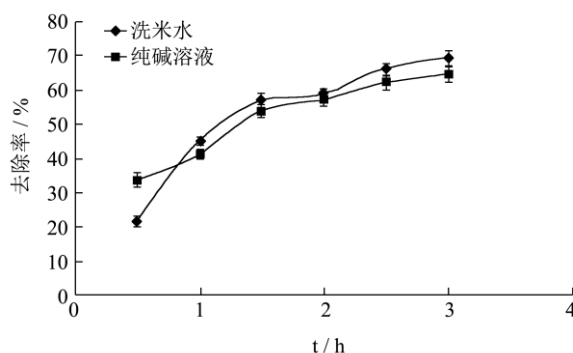


图6 洗米水、碱水处理豆芽的时间对亚硫酸盐去除率的影响

Fig.6 Effects of the duration of rice water and sodium carbonate solution treatments on the removal rate

实验结果表明，用洗米水和纯碱水浸泡时间越

长, 去除率越高。但在用两种方法浸泡 1.5 h 之后, 亚硫酸盐减少的趋势变缓, 为了节省时间。本实验选择二者的浸泡时间均为 1.5 h。

2.6.2.3 洗米水、纯碱水处理豆芽的温度对结果的影响

称取 13 份等质量的豆芽, 一份不处理, 另外 12 份分别用 150.00 g/L 洗米水和 2.00 g/L 碱水在温度为 25 °C、35 °C、45 °C、55 °C、65 °C、75 °C 下浸泡 1.5 h, 用荧光法进行测定。计算去除率, 结果见图 7。

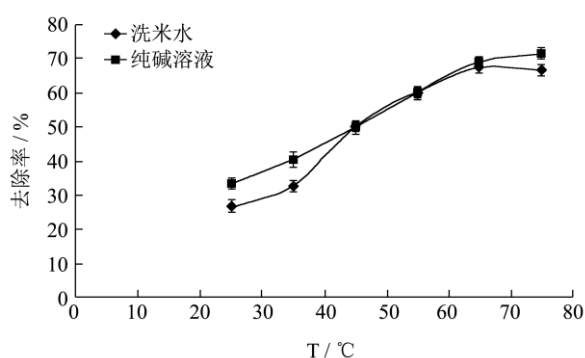


图 7 洗米水、纯碱水处理豆芽的温度对结果的影响

Fig.7 Effects of the temperature of rice water and sodium carbonate solution treatments on the removal rate

实验结果表明, 温度低于 65 °C 时, 随着处理豆芽温度的升高, 亚硫酸盐的去除率随之升高, 在 65 °C 之后, 变化不大, 所以洗米水、纯碱水处理豆芽的温度都选定为 65 °C。

2.7 样品的测定

取 6 份豆芽样品, 在最佳去除条件下, 即洗米水的浓度为 150.00 g/L, 纯碱水浓度为 2.00 g/L, 在 65 °C 水浴中浸泡 1.5 h 后亚硫酸盐含量的变化, 结果见表 4。

表 4 绿豆芽样品中亚硫酸盐的去除率

Table 4 Removal rate of sulfite from mung bean sprouts

	样品 1	样品 2	样品 3	
米水	浸泡前/(mg/kg)	170.40±1.30	193.40±2.40	164.20±3.20
	浸泡后/(mg/kg)	46.20±2.50	65.10±3.60	53.60±1.80
	去除率/%	72.83±1.20	66.41±1.40	67.30±0.40
纯碱水	浸泡前/(mg/kg)	171.40±2.10	111.10±3.20	185.90±1.50
	浸泡后/(mg/kg)	32.80±0.90	36.50±3.60	59.20±2.10
	去除率/%	80.12±0.50	67.07±2.20	68.21±0.90

由实验结果可知, 豆芽样品经洗米水浸泡后, 亚硫酸盐的去除率在 66.41%~72.83% 之间, 经 2.00 g/L 的纯碱水溶液浸泡后, 去除率在 67.07%~80.12% 之间。而且浸泡后豆芽中亚硫酸盐残留量有三个样品达到世界食品法典委员会 (CODEX) 规定的去皮、切块或切碎的新鲜蔬菜中二氧化硫的含量限量 0.05 g/kg 的标

准, 其余三个样品二氧化硫残留量与标准接近。可见洗米水与纯碱水可以有效去除豆芽中亚硫酸盐含量, 是人们日常生活中切实可行的办法。

3 结论

3.1 本文利用充氮蒸馏法将豆芽中的亚硫酸盐提取出来, 再利用邻苯二甲醛-铵盐-亚硫酸盐荧光法进行检测。该方法具有操作简单、价格低廉、无污染、灵敏度高、样品用量少等特点。方法的相对标准偏差为 2.73%, 精密性较好。F 检验和 t 检验表明荧光法和国标法检测结果无显著性差异。因此, 本方法可以用于豆芽中亚硫酸盐含量的测定。

3.2 同时研究了绿豆芽中亚硫酸盐含量的去除方法, 实验结果表明洗米水和纯碱水可以有效去除豆芽中亚硫酸盐。在 150.00 g/L 的洗米水和 2.00 g/L 的纯碱溶液中, 于 65 °C 下浸泡 1.5 h, 亚硫酸盐的去除效果基本上能达到安全食用标准。

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): 60-63
ZHANG Shuang-ling, ZHAO Kui-hao, ZHOU De-qing, et al. Safety research and residue determination of sulphites in aquatic products [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(3): 60-63
- [2] Chandra Shekhar Pundir, Rachna Rawal. Determination of sulfite with emphasis on biosensing methods: a review [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2013, 405: 3049-3062
- [3] Zhixiong Zhong, Gongke Li, Binghui Zhu, et al. A rapid distillation method coupled with ion chromatography for the determination of total sulphur dioxide in foods [J]. Food Chemistry, 2012, 131(3): 1044-1050
- [4] 党卫红, 任平国. 亚硫酸盐生殖毒性研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(4): 373-376
DANG Wei-hong, REN Ping-guo. Study on Reproduction Toxicity of Sulfite in Food Additive [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(4): 373-376
- [5] Hayati Filik, Gamze Cetintas. Determination of sulfite in water and dried fruit samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with UV-Vis fiber optic linear array spectrophotometry [J]. Food Anal. Methods, 2012, 5(6): 1362-1367
- [6] Benjamin S Liao, Jacqueline C Sram, Darin J Files. Determination of free sulfites (SO_3^{2-}) in dried fruits processed with sulfur dioxide by ion chromatography through anion

- exchange column and conductivity detection [J]. *J. AOAC Int.*, 2013, 96(5): 1103-1108
- [7] Hassan Karimi-Maleh, Ali A Ensafi, Hadi Beitollahi, et al. Electrocatalytic determination of sulfite using a modified carbon nanotubes paste electrode: application for determination of sulfite in real samples [J]. *Ionic*, 2012, 18(7): 687-694
- [8] Mohammad Hossein Arbab-Zavar, Gholam Hossein Rounaghi, Somayeh Rajabzadeh, et al. Development of vapor generation combined with potentiometric detection for determination of sulfite in beverages [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2013, 7(2): 75-80
- [9] Mercedes Villar Navarro, Mar ía Ramos Pay án, 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): 2003-2006
- [10] Li Qian Yin, Dong Xing Yuan, Min Zhang. Determination of sulfite in water samples by flow injection analysis with fluorescence detection [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2010, 21(12): 1457-1461
- [11] Pei-Yen Chen, Yi-Ming Chi, Hsueh-Hui Yang, et al. A sulfite sensor based on electrocatalytic oxidation at a phenothiazine drop-coated screen-printed carbon electrode [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012, 675: 1-4
- [12] GB/T5009.34-2003 食品中亚硫酸盐含量的测定[S]. GB/T5009.34-2003 Determination of sulfite in foods[S]
- [13] 陈飞东,戴志远.食品中亚硫酸盐测定方法的研究进展[J]. *食品研究与开发*,2006,2(8):139-142
CHEN Fei-dong, DAI Zhi-yuan. The progress of sulfite analysis in food products [J]. *Food Research and Development*, 2006, 2(8): 139-142
- [14] 欧阳小清,谢增鸿,郭祖奉,等.静态抑制荧光法和流动注射抑制荧光法测定微量甲醛的研究[J].*光谱学与光谱分析*,2004,24(11):1395-1399
OUYANG Xiao-qing, XIE Zeng-hong, GUO Zu-feng, et al. Study of direct fluorphotometric and flow-injection fluorphotometric method based on the inhibitory effect for the determination of trace formaldehyde [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, 24(11): 1395-1399.