doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2014.01.012　　文章编号:2095-6002(2014)01-0065-04
引用格式:王建清,徐丽红,张玉,等. 鲁米诺化学发光法测定食品中的亚硫酸盐. 食品科学技术学报,2013,32(1):65 - 68.
WANG Jian-qing, XU Li-hong, ZHANG Yu, et al. Determination of sulfite in foods based on luminol chemiluminescence. Journal of Food Science and Technology, 2014,32(1):65 - 68.

鲁米诺化学发光法测定食品中的亚硫酸盐

王建清, 徐丽红*, 张 玉, 王 伟, 胡 祺
(浙江省农业科学院 农产品质量标准研究所, 浙江 杭州 310021)

摘 要: 提出了运用化学发光法测定食品中亚硫酸盐的新方法,对影响化学发光的诸因素进行了实验和探讨,得出较佳检测条件:方法的定量限为 4.6 mg/kg,亚硫酸盐质量浓度在 1.0 ~ 10.0 mg/L 与发光强度增强值(ΔI)呈良好的线性关系,R^2 为 0.993 4. 对 6 类样品进行了测定并做加标回收试验,平均 RSD 3.05%,平均回收率 93.0%,可用于食品中亚硫酸盐的定量与定性检测.

关键词: 鲁米诺试剂; 亚硫酸盐; 化学发光
中图分类号: TS207.5; O657.3　　**文献标志码**: A

食品中亚硫酸盐残留指标是国家质检部门的严控指标之一. 在食品加工过程中,人为或非人为的因素都会导致诸多食品中亚硫酸盐的含量超出国家标准,如何控制亚硫酸盐含量是各食品生产加工企业和质检机构面临的一大难题. 为了解决食品中亚硫酸盐残留超标问题,各食品生产企业和质量监督部门都必需对食品中的亚硫酸盐进行检测. 目前对食品中亚硫酸盐的检测主要有国标 GB/T 5009.34—2003[1]中规定的盐酸副玫瑰苯胺比色法,其主要原理是利用亚硫酸盐与四氯汞钠的反应生成稳定的络合物,再与甲醛及盐酸副玫瑰苯胺作用生成紫红色络合物,在波长 550 nm 处测定溶液吸光度,与标准系列比较定量,方法十分完善可靠,灵敏度符合要求,其不足之处是操作繁杂,耗时. 测定亚硫酸盐的其他方法有电导滴定法[2]、离子色谱法[3]、流动注射化学发光法[4]、气相色谱法[5]、近红外光谱法[6]等,这些方法在某些领域已经得到广泛应用[7-18]. 鲁米诺(Luminol,3-氨基苯二甲酰肼)是人们公认的最有效的化学发光物质之一,在碱性介质中,亚硫酸盐能够有效增强鲁米诺 - 过氧化氢体系的化学发光,且在一定的浓度范围内,与化学发光强度呈良好的线性关系,可应用于亚硫酸盐的检测. 鲁米诺化学发光法作为测定食品中亚硫酸盐的方法具有快速简便、无需复杂精密仪器、灵敏度较高等特点,具有一定的应用价值.

本文研究了鲁米诺-过氧化氢体系与亚硫酸盐的各种反应条件, 建立了一种快速、简便测定亚硫酸盐残留量的检测方法.

1 实验部分

1.1 仪器与材料

BHP-9504 型系列微孔板化学发光分析仪,北京滨松光子技术股份有限公司;96 孔微孔板(黑板),美国康宁公司生产;分析天平(感量 0.000 1 g, 0.1 g);超声波仪;200 μL 移液枪.

1.2 标准溶液及试剂的配制

Na_2SO_3 标准溶液(100 mg/L,以二氧化硫计):称取 0.019 7 g Na_2SO_3 用水溶解定容至 100 mL,冷藏保存. 用时稀释至需要浓度.

Luminol (Fluka 公司) 储备液(1.0×10^{-2} mol/L):称取 0.442 9 g 鲁米诺,用 0.1 mol/L NaOH 溶解定容至 250 mL,避光保存;用时稀释至需要浓度.

收稿日期: 2013 - 07 - 16
基金项目: 浙江省科技厅重大科技专项(2009C12052);浙江省农业科学院重点实验室前瞻性项目(2009C32093).
作者简介: 王建清,男,实验师,主要从事农产品品质测试研究工作;
* 徐丽红,女,研究员,主要从事农产品质量安全及检测方面的研究. 通讯作者.

H_2O_2储备液(1.0×10^{-3} mol/L)：由 13.0 mol/L 的 H_2O_2直接稀释而成，当天配制.

Cu^{2+}储备液(1.0×10^{-2} mol/L)：称取 0.249 7 g $CuSO_4\cdot5H_2O$，用二次水溶解定容至 100 mL，用时稀释成所需浓度.

0.1 mol/L NaOH 溶液：称取氢氧化钠 4.0 g，用水溶解并定容到 1 L.

所用试剂均为分析纯，水为二次蒸馏水.

1.3 样品前处理

称取 1.0 g 干燥粉碎后的样品于 100 mL 容量瓶中，加 30 mL 水，1.0 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液，超声 15 min，然后用水定容，过滤后备用.

1.4 样品检测步骤

用 200 μL 移液枪分别吸取 40 μL 亚硫盐酸标准系列溶液(1.0 ~ 10.0 mg/L)、1.0×10^{-3} mol/L H_2O_2溶液和 1.0×10^{-3} mol/L Luminol 试剂于 96 孔微孔板中(不要颠倒加样顺序)，立即置入化学发光仪中，1 min 后读取发光值. 同时读取空白值(用水代替亚硫盐酸标准溶液)，计算化学发光值差值 ΔI. 以亚硫盐酸标准溶液与 ΔI 制作标准工作曲线，同时读取样品 ΔI，用标准工作曲线计算样品中亚硫盐酸含量(以二氧化硫计).

2 实验方法

2.1 化学发光读取时间曲线

亚硫酸盐对 Luminol-H_2O_2-Cu^{2+}反应体系的化学发光有很强增敏作用，Cu^{2+}作为催化剂使 Luminol 试剂迅速从基态激发到激发态，并发出光能，发光从混合后开始为最大值随即迅速衰减至基线，可见该体系为快速发光体系. 用 200 μL 移液枪分别吸取 40 μL 100 mg/L 亚硫盐酸标准溶液、1.0×10^{-3} mol/L H_2O_2溶液、1.0×10^{-2} mol/L Cu^{2+}储备液和 1.0×10^{-2} mol/L Luminol 试剂于 96 孔微孔板中，立即置入化学发光仪中，每间隔 10 秒测定一次化学发光值，绘出图 1 (Luminol-H_2O_2-Cu^{2+}反应体系的发光时间曲线). 从图 1 可见，发光值随测定时间不断变化，无法实现定量测定. 可见 Cu^{2+}作为催化剂，具有较强的化学发光体系增敏作用，且该体系极不稳定.

2.2 化学发光反应体系及读取时间的选择

按实验方法 **2.1**，不加 Cu^{2+}，可降低反应速度，有利于读取稳定的化学发光值，并每隔 10 秒测定一次发光值绘制图 2. 从图 2 得出，化学发光值从加样始为最大，随即迅速降低，至 60 秒后基本趋于稳定. 故选择不加 Cu^{2+}且加样后 60 秒为读取化学发光值时间.

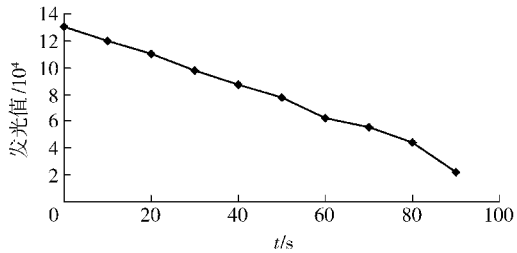

图 1 加 Cu^{2+}发光值读取时间曲线

Fig. 1 Illumination values at different time points

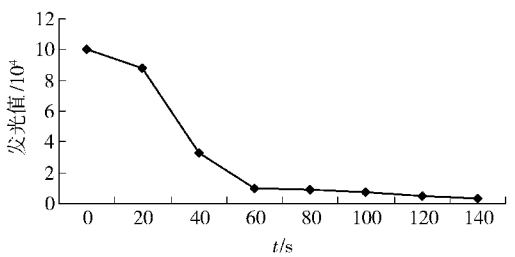

图 2 不加 Cu^{2+}发光读取时间曲线

Fig. 2 Light emitting values at different time points

2.3 鲁米诺浓度的选择

按实验方法 **2.1**，不加 Cu^{2+}，研究了不同浓度的鲁米诺(1.0×10^{-4} ~ 1.5×10^{-3} mol/L) 对发光值的影响(见图 3). 实验结果表明当鲁米诺浓度增大，发光值逐步增加，到 1.0×10^{-3} mol/L 时，达到最大值；浓度继续增加，发光强度还会增加，但其重现会变差，因此实验选择鲁米诺浓度为 1.0×10^{-3} mol/L.

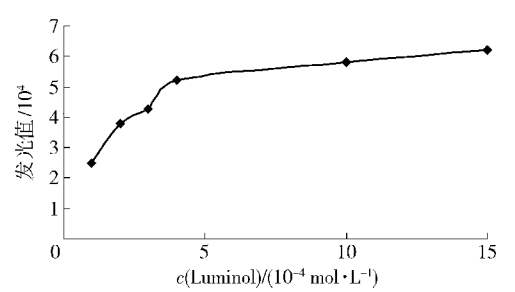

图 3 Luminol 试剂浓度对发光值的影响

Fig. 3 Illumination values under different luminol reagent concentrations

2.4 过氧化氢浓度的选择

按实验方法 **2.1**，仅改变 H_2O_2的浓度进行实验，当 H_2O_2的浓度在 1.0×10^{-4} ~ 2.0×10^{-3} mol/L

内变化时，发光强度逐步增加，到 1.0×10^{-3} mol/L 时基本达到最大值（见图 4），故选择 H_2O_2 的浓度为 1.0×10^{-3} mol/L.

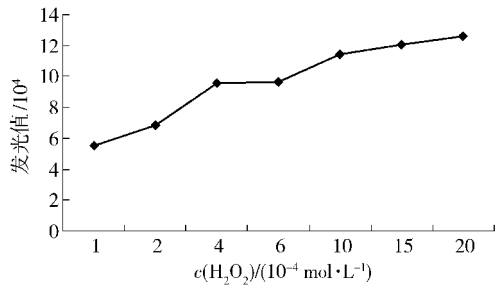

图 4　H_2O_2 试剂浓度对化学发光值的影响

Fig. 4　Chemiluminescence values under different H_2O_2 reagent concentrations

2.5　提取超声时间的选择

按 **1.3** 实验前处理条件，选择超声时间为 15，30，45，60，75，90 min，再按 **1.4** 实验方法并读取化学发光值，制作提取时间与化学发光值曲线如图 5. 从图 5 可知，超声时间对化学发光值变化不大，超声 15 min 已能提取样品中的亚硫酸盐，故选择最短超声时间为 15 min.

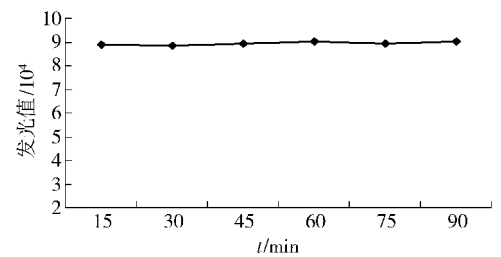

图 5　提取时间与化学发光值曲线

Fig. 5　Chemiluminescence values at different the extraction times

2.6　实验结果

样品提取选取碱性条件（加氢氧化钠），用水超声提取时间 15 min，鲁米诺浓度确定为 1.0×10^{-3} mol/L，过氧化氢浓度确定为 1.0×10^{-3} mol/L，所有试剂及样品加入后 60 s 为仪器读取发光值时间.

2.7　线性关系与方法检出限、精密度

按实验条件 **2.6**，以亚硫酸盐的浓度与发光值 ΔI 绘工作曲线，见图 6. 亚硫酸盐浓度在 1.0 ~ 10.0 mg/L 时，化学发光值与亚硫酸盐浓度呈良好的线性关系. 其线性回归方程为 $y=435.82x-37.647$，相关系数 R^2 为 0.993 4. 对香菇样品平行测定 10 次，相对标准偏差 RSD 3.59%. 以标准曲线截距 3 倍计算最低检出浓度，最低检出质量比为 2.3 mg/kg，定量限则为 4.6 mg/kg.

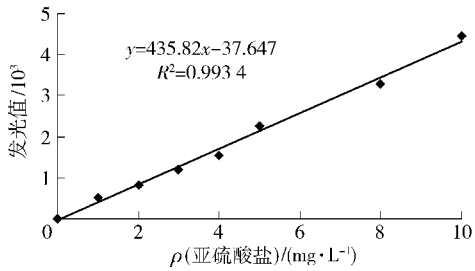

图 6　标准工作曲线

Fig. 6　Standard curve of sulfite concentration and luminous intensity

2.8　实际样品测定及回收率

取市售香菇、银耳、腐竹、腰果仁、新竹米粉、开心果样品若干，制样后按方法 **2.6** 检测（6 次重复测定），测得样品中亚硫盐残留量（平均值），并计算相对标准偏差 RSD，做加标试验，测定加标后测出量（2 次重复测定），计算回收率，结果见表 1.

表 1　样品亚硫酸盐测定结果及回收率

Tab. 1　Results of samples determination and sulfite recoveries

样品	残留量/（mg·kg⁻¹）	加入量/（mg·kg⁻¹）	测出量/（mg·kg⁻¹）	回收率/%	RSD/%
香菇 1	118.2	100.0	208.4	90.2	2.21
香菇 2	228.7	100.0	321.6	92.9	2.73
银耳 1	440.2	200.0	620.3	90.1	1.23
银耳 2	207.8	200.0	395.4	93.8	2.58
腐竹 1	105.2	100.0	199.5	94.3	3.05
腐竹 2	100.3	100.0	197.8	97.5	4.02
腰果仁	33.9	50.0	81.2	94.6	3.98
新竹米粉	55.4	50.0	99.5	88.2	4.05
开心果	28.7	50.0	76.5	95.6	3.58

3　结果与讨论

本文运用近年来广泛应用于医疗、药物、食检、环境和材料科学等领域的化学发光技术，建立了测定食品中亚硫酸盐的一种简便方法. 方法是对原有的流动注射化学发光法的改进，取消了原先需要的流动注射装置，简化了仪器设备及操作程序，使其更加快速简便. 方法的定量限为 4.6 mg/kg，回收率 93.0%，实际样品测定结果相对相差 10% 以下，线性关系良好，R^2 为 0.993 4，满足检测要求，样品浓度更低的还可定性测定，整个检测过程在半小时以内.

由于化学发光反应体系较不稳定,化学发光值会随着时间迅速变化,检测过程需注意的是化学发光值 ΔI 仪器读取时间的一致性,以确保结果重现. 本法建议在基层实验室和农贸市场化验室推广应用.

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.34—2003 食品中亚硫酸盐的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2003: 269 - 273.

[2] 芦晓芳,王颖莉,杜慧玲,等. 电导滴定法测定食品中二氧化硫残留量[J]. 现代食品科技,2010,26(11): 1289 - 1292.

[3] 雒丽丽,王海波,刘汉霞,等. 离子色谱法测定食品中的二氧化硫[J]. 食品科技,2011,36(8):297 - 299.

[4] 李世凤,魏先文. 流动注射化学发光法测定空气中的二氧化硫[J]. 安徽师范大学学报:自然科学版,2005,28(3):303 - 305.

[5] 李涛,林芳,徐长根,等. 顶空气相色谱法检测中药饮片中的二氧化硫[J]. 中国药业,2010,19(24):32 - 33.

[6] 黎庆涛,王远辉,潘路路,等. 近红外光谱法在线测定白砂糖二氧化硫的研究[J]. 食品科技,2010,35(9): 324 - 327.

[7] 黎永杰. 食品中亚硫酸盐的检测方法研究进展[J]. 食品与发酵工业,2004,30(5):99 - 105.

[8] 谢艳云,张明明,邓颖妍. 凯氏定氮-电位滴定仪联合快速检测果脯中的二氧化硫[J]. 食品科学,2010,31(14):225 - 228.

[9] 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, 27(8):139 - 142.

[10] 魏丽红. 银耳中亚硫酸盐提取方法的研究[J]. 食品科技,2009,34(11),184 - 186.

[11] 李军,朱凤妹,杜彬. 鲁米诺化学发光法测定甘蓝中甲基对硫磷残留方法研究[J]. 中国食品学报,2010,10(1):186 - 189.

[12] 尹洁,朱军莉,励建荣. 食品中二氧化硫的来源与检测方法[J]. 食品科技,2009,34(11): 292 - 296.

[13] 张文德,徐贺荣,郭忠,等. 单扫示波极谱法快速测定食品中二氧化硫[J]. 理化检验:化学分册,2007,43(4):303 - 305,307.

[14] 柯洋丽,李才津,蒋家保,等. 工作场所空气中二氧化硫的测定方法研究[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(2):276 - 278.

[15] 聂骊晓,刘塔斯,舒柯,等. 商品天麻中二氧化硫残留量的研究[J]. 湖南中医药大学学报,2011,31(5): 29 - 30.

[16] 王丽丽,纪淑娟,李顺. 食品中二氧化硫及亚硫酸盐的作用与检测方法[J]. 食品与药品,2007,9(2): 64 - 66.

[17] 李利军,卢美欢,岳淑宁. 蒜制品中二氧化硫的检出、来源及食用安全性分析[J]. 中国酿造,2010(1):121 - 122.

[18] 崔韶晖,李婷婷,陈曦,等. 魔芋精粉中二氧化硫残留量的几种测定方法比较[J]. 安徽农业科学,2009, 37(2): 472 - 473, 479.

Determination of Sulfite in Foods Based on Luminol Chemiluminescence

WANG Jian-qing, XU Li-hong*, ZHANG Yu, WANG Wei, HU Qi

(*Institute of Quality and Standard for Agro-Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou* 310021, *China*)

Abstract: The chemiluminescence technology was selected to establish a new method for the determination of sulfites in foods. Various factors affecting the chemiluminescence detection were evaluated and the optimum determination conditions were obtained in this study. The detection limit of the method was 4.6 mg/kg. In the range of 1.0 - 10.0 mg/L, the sulfite concentration was positively correlated with the luminous intensity value (ΔI), and the correlation coefficient (R^2) was 0.993 4. Spike recovery tests of six different samples were evaluated. The average RSD was 3.05% and the average recovery was 93.0%. Chemiluminescence determination results indicated that the new method was a good candidate for the qualitative and quantitative analysis of sulfites in foods.

Key words: luminol reagent; sulfite; chemiluminescence (责任编辑:檀彩莲)