

抑制动力学荧光法测定食品中草酸的含量

宋少飞, 张 庆, 周福林

(运城学院 应用化学系, 山西 运城 044000)

摘 要:在硫酸介质中,草酸能抑制溴酸钾氧化罗丹明 B,使体系降低的荧光恢复并增强,且荧光增强程度与草酸浓度成正比,据此建立了抑制动力学荧光法测定草酸的新方法.以 265 nm 为激发波长,595 nm 为荧光发射波长,研究了反应的适宜条件.在最优化条件下,草酸浓度在 0.5 ~ 30 mg/L 范围内与荧光度呈良好的线性关系,方法的检出限为 2×10^{-2} mg/L.对浓度为 0.5 mg/L 的草酸标准溶液进行 11 次平行测定,得相对标准偏差 (RSD) 为 2.0%.该方法简单、快速,已用于菠菜和啤酒中草酸的含量测定,回收率为 96.2% ~ 102%,结果令人满意.

关键词:抑制动力学荧光法;草酸;罗丹明 B;食品

中图分类号:O657.32

文献标识码:A

文章编号:1673 - 1670(2022)02 - 0032 - 04

0 引言

荧光分析法由于具有设备简单、选择性强、分析灵敏度高等优点^[1-2],已在临床诊断、环境监测、食品工业等众多领域得到了广泛的应用^[3-5].荧光法的种类比较多,主要包括直接荧光法^[6]、光诱导电子转移法^[7]、荧光共振能量转移分析法^[8]、荧光偏振分析法^[9]和时间分辨荧光分析法^[10]等.其中,直接荧光法体系最为简单,它是根据不同物质的特征激发或发射波长的位置不同,以及荧光强度的大小与该物质的含量呈正比关系,从而对目标物进行定性或定量分析的方法.

草酸广泛存在于食品、植物和动物中,很容易与钙、镁结合而形成难溶盐^[11].高含量的草酸会导致结石的形成,对人体的健康造成很大的危害^[12].因此,准确检测草酸对健康危害、合理饮食与管理研究,以及结石的诊断与预防有很重要的意义^[13].

目前,测定草酸的方法主要有气相色谱法^[14]、液相色谱法^[15]、光谱法^[16]、毛细管电泳法^[17]和电化学法^[18]等.但是,这些方法存在一些不足之处,比如高的成本、低的灵敏度等.而荧光分析法用于草酸的检测,目前报道较少^[19-20].在酸性条件下,草酸对溴酸钾氧化罗丹明 B 有较强的抑制作用,据此,建立了抑制动力学荧光法测定食品中草酸的

新方法.该方法操作简便,灵敏度高,选择性好,可用于实际样品中草酸的测定.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4600 型荧光分光光度计(日本日立公司);HHS 型电热恒温水浴锅(天津市华北实验仪器有限公司);FA1104 型分析天平(上海恒平科技仪器有限公司);80-2 型离心机(成都市苏净科学器材有限公司).

草酸标准溶液:100.0 mg/L,用时逐级稀释;罗丹明 B 溶液: 1.0×10^{-2} mol/L; H_2SO_4 溶液:0.5 mol/L; $KBrO_3$ 溶液:0.1 mol/L;过氧化氢:30%;活性炭;实验所用试剂均为分析纯,所用水均为二次蒸馏水.

1.2 实验方法

取两支 25 mL 比色管,其中一支加入一定量的草酸标准溶液,另一支不加作为空白,然后分别依次加入 1.20 mL 硫酸溶液、0.70 mL 罗丹明 B 溶液和 0.60 mL 溴酸钾溶液,用二次蒸馏水稀释到刻度,摇匀.于 65 °C 的恒温水浴中加热 10 min.流水冷却 5 min 至室温后,以 265 nm 为激发波长,595 nm 为发射波长,测定溶液的荧光强度为 I ,同时空白溶液荧光强度为 I_0 ,计算 $\Delta I = I - I_0$.

收稿日期:2021 - 12 - 13

基金项目:山西省高等学校科技创新项目(2019L0870);运城学院博士项目(YQ - 2017030);运城学院特色农产品发展学科群科研项目(XK - 2019019)

作者简介:宋少飞(1979—),男,山西省长治市人,理学博士,运城学院应用化学系副教授,主要从事检测技术的应用与研究.

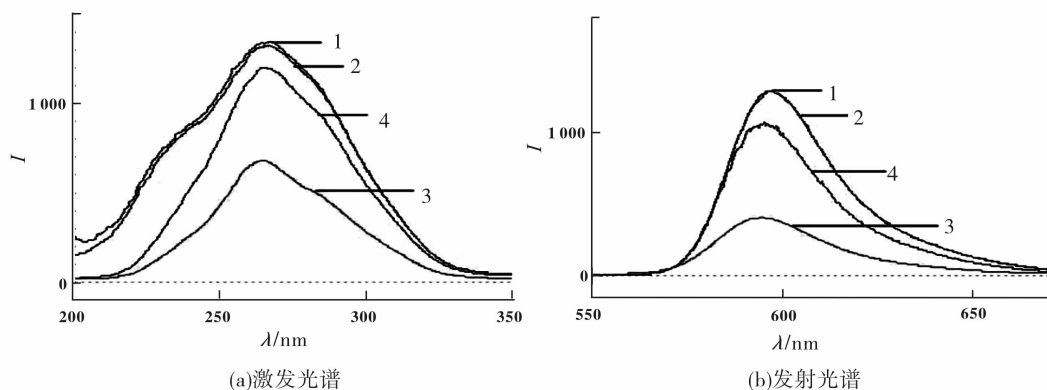
通信作者:周福林(1980—),女,山西省朔州市人,理学博士,运城学院应用化学系教授,主要从事荧光生物传感应用研究.



2 结果与讨论

2.1 激发和发射光谱

以图1所示条件配制不同组分溶液, 并按实验方法在激发、发射波长下分别测定荧光强度 I , 以荧光强度为纵坐标, 波长为横坐标绘制荧光光谱图. 可见4条曲线的最大激发和最大发射波长, 都没有产生位移, 但峰高有所降低. 曲线1表明罗丹



1— H_2SO_4 + 罗丹明 B; 2— H_2SO_4 + 罗丹明 B + 草酸; 3— H_2SO_4 + 罗丹明 B + $KBrO_3$; 4— H_2SO_4 + 罗丹明 B + $KBrO_3$ + 草酸.

图1 荧光激发与发射光谱

2.2 反应条件的选择

2.2.1 波长的选择

由图1, 几种体系溶液的最大激发波长和最大发射波长均在 265 nm 和 595 nm 处. 因此, 选择最大激发波长和最大发射波长分别为 265 nm 和 595 nm.

2.2.2 硫酸浓度的影响

笔者比较了体系在硫酸、盐酸及磷酸介质中的反应情况. 结果表明, 硫酸介质中的灵敏度高于盐酸和磷酸介质, 且荧光强度稳定. 并且考查了 12 ~ 32 mmol/L 范围内不同浓度硫酸对荧光强度的影响(图2), 当其浓度为 24 mmol/L 时, 体系的 ΔI 最大. 故实验选择硫酸的最佳浓度为 24 mmol/L.

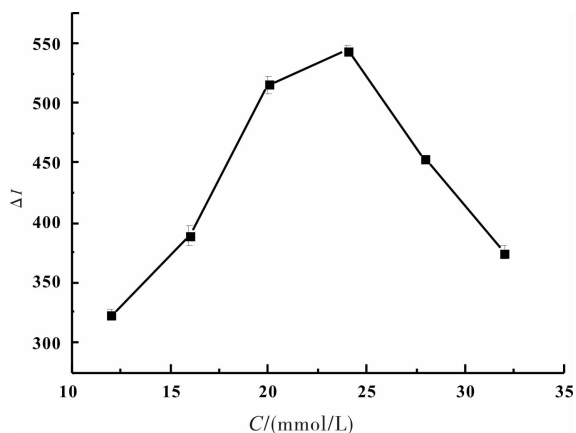


图2 硫酸浓度的影响

明 B 有一定的荧光强度, 曲线 2 表明草酸本身对罗丹明 B 没有作用, 曲线 3 表明 $KBrO_3$ 对罗丹明 B 有氧化褪色作用. 当在反应体系中加入草酸时(曲线 4), 曲线荧光强度反而增大, 说明草酸对溴酸钾氧化罗丹明 B 的褪色反应有抑制作用, 说明建立的抑制动力学荧光法测定草酸的方法是可行的. 体系的最大激发波长和发射波长分别是 265 nm 和 595 nm.

2.2.3 罗丹明 B 浓度的影响

考查了 8 ~ 36 $\mu\text{mol/L}$ 范围内不同浓度罗丹明 B 对荧光强度的影响. 结果如图 3 所示, ΔI 随着浓度的增加而增大, 但当浓度超过 28 $\mu\text{mol/L}$ 时, ΔI 基本不变. 因此, 选择罗丹明 B 的最佳浓度为 28 $\mu\text{mol/L}$.

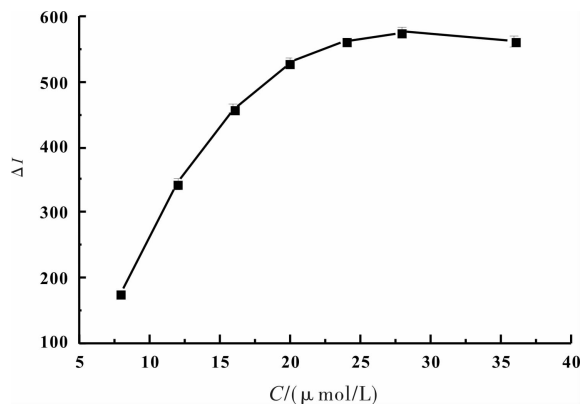


图3 罗丹明 B 浓度的影响

2.2.4 溴酸钾浓度的影响

笔者对 $KBrO_3$ 浓度进行了选择, 结果如图 4 所示. 当 $KBrO_3$ 溶液的浓度为 2.4 mmol/L 时, ΔI 最大. 因此, 选择 $KBrO_3$ 溶液的最佳浓度为 2.4 mmol/L.

2.2.5 反应温度的影响

笔者对反应温度进行了考查. 结果表明, 当温度为 65 $^{\circ}\text{C}$ 时, ΔI 达到最大值(图 5). 所以, 选择工

作条件为 65 ℃.

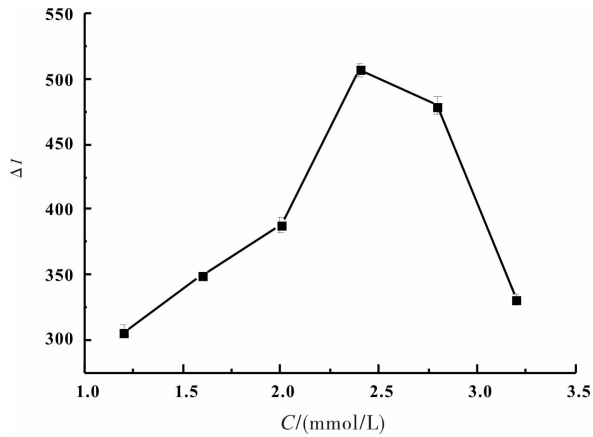


图4 溴酸钾浓度的影响

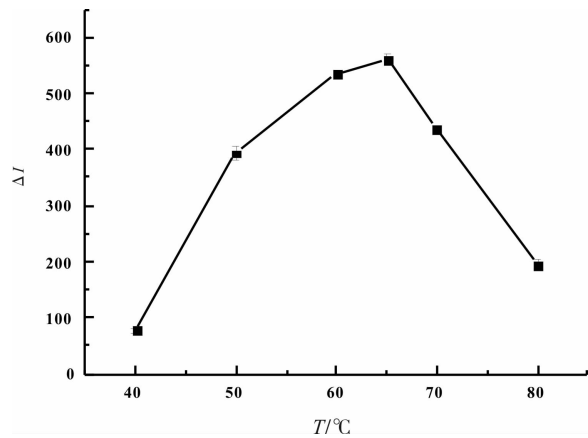


图5 反应温度的影响

2.2.6 反应时间的影响

最后,对反应时间进行了选择.如图6所示,ΔI随着反应时间的增加而增大,但20 min后,ΔI基本保持不变.所以,本实验的最佳反应时间为20 min.

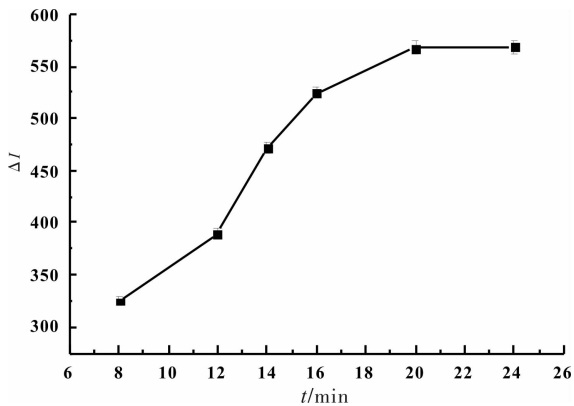


图6 反应时间的影响

2.3 标准曲线

按1.2节的实验方法,在最优化实验条件下,对不同浓度的草酸标准溶液进行测定.草酸浓度在0.5~30 mg/L范围内与ΔI呈良好的线性关系(图7),回归方程为: $\Delta I = 6.598 C + 499.0$ (C : mg/L), $r = 0.994 0$.

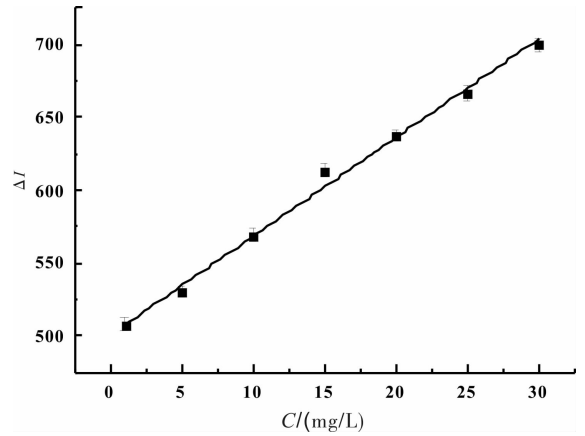


图7 标准曲线

2.4 精密度与检出限

按实验方法对浓度为0.5 mg/L的草酸标准溶液进行11次平行测定,得ΔI的相对标准偏差(RSD)为2.0%.根据IUPAC建议($S/N = 3$),计算出该方法的检出限: 2×10^{-2} mg/L.

2.5 共存离子的影响

在最佳实验条件下,考查了常见干扰离子对草酸的干扰.对相同浓度的草酸(1.0 mg/L)进行测定,相对误差 $\leq \pm 5\%$ 时,对1 000倍的 K^+ 、 Br^- 、 NO_3^- ,500倍的 ClO_3^- 、 NH_4^+ ,200倍的 SO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} 、 Zn^{2+} ,100倍的 Na^+ 、 Cl^- ,50倍的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} ,30倍的苹果酸进行不干扰测定.

2.6 样品分析

笔者分别对菠菜和啤酒中的草酸进行了测定.

准确称取新鲜菠菜200 g,洗净并晾干,用研钵破碎后过滤取汁,得到新鲜原汁65 mL,在其中加入活性炭15 g,常温下脱色30 min,然后用80-2型离心机在转速3 000 r/min下分离活性炭(时间为15 min).随后,用同样方法进行二次脱色,待其溶液呈无色或略呈乳白色为止,制备的样品溶液冷藏备用.测定时,准确移取3 mL样品溶液按实验方法进行操作,同时做加标回收实验.

啤酒呈淡黄色且其中草酸浓度较低,不利于草酸的测定,因此要进行脱色与浓缩.在300 mL啤酒中加入20 g活性炭,于60 ℃恒温水浴中加热30 min并充分搅拌,抽滤得脱色后的清液.将清液在70 ℃恒温下减压蒸发,将300 mL清液啤酒蒸发浓缩至100 mL,冷藏备用.测定时,取浓缩后的啤酒3 mL,按实验方法进行操作,同时做加标回收实验.结果如表1所示,该法测定草酸的加标回收率为96.2%~102.0%,6次测定的相对标准偏差为1.8%~4.5%,方法可用于实际样

品的测定.

表1 食品中草酸的测定结果($n=6$)

样品	编号	ΔI	测得值/ (mg/L)	RSD/ %	加入量/ (mg/L)	测得总量/ (mg/L)	回收 率/%
菠菜	1	520.8	3.3		5.0	8.1	96.2
	2	522.1	3.5	4.5	6.0	9.3	96.7
	3	520.1	3.2		7.0	10.0	97.1
啤酒	1	536.7	5.7		1.0	6.7	100.0
	2	535.9	5.6	1.8	3.0	8.5	96.7
	3	535.3	5.5		5.0	10.6	102.0

3 结论

笔者根据草酸对溴酸钾氧化罗丹明 B 的抑制作用,建立了抑制动力学荧光法测定草酸的新方法.该方法的检出限为 2×10^{-2} mg/L,有灵敏度高、选择性好、操作简便等优点,常见离子在一定范围内不干扰测定,适用于菠菜和啤酒中痕量草酸的测定.

参考文献:

- [1] WEBSTER J R, BURNS M A, BURKE D T, et al. Monolithic capillary electrophoresis device with integrated fluorescence detector[J]. *Anal Chem*, 2001, 73(7):1622 - 1626.
- [2] LIN Y H, TSENG W L. Fluorescence detection of coralyne and polyadenylation reaction using an oligonucleotide-based fluorogenic probe [J]. *Chem Commun*, 2011, 47(39):11134 - 11136.
- [3] 高霞,周凌云,席景砖. 荧光分析法在环境有机污染物检测中的应用[J]. *光谱实验室*, 2011(4):2008 - 2016.
- [4] 邱清莲,黄成安,梁嘉敏,等. 紫外串联荧光检测法测定奶昔中维生素 B6 和烟酰胺[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019(9):2795 - 2800.
- [5] KIM S, GANG J. Label-free simple fluorescence assay of DNA polymerase using the G-Quadruplex structure[J]. *Anal Methods*, 2016, 8(2):275 - 279.
- [6] 王丽,叶华,桑宏庆,等. 基于核酸适配体的荧光法检测水胺硫磷和丙溴磷[J]. *分析化学*, 2016(5):799 - 803.
- [7] 刘萍,王书民,任有良,等. 基于光诱导电子转移荧光传感器检测土壤中的 Hg^{2+} [J]. *分析科学学报*, 2018(1):85 - 89.
- [8] 王培培,梁涛,左苗苗,等. 基于发光共振能量转移的比率型上转换荧光纳米探针检测次硝酸[J]. *化学学报*, 2020(8):797 - 804.
- [9] 刘洋,刘艳,刘宸辛,等. 荧光偏振免疫分析法在小分子药物小鼠血药浓度检测中的应用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2018(4):833 - 838.
- [10] LI M, WANG H M, SUN J D, et al. Rapid, on-site, and sensitive detection of aflatoxin M1 in milk products by using time-resolved fluorescence microsphere test strip[J]. *Food Control*, 2021, 121:107616.
- [11] 江晶洁,刘涛,林双君. 基于莽草酸途径微生物合成芳香族化合物及其衍生物的研究进展[J]. *生命科学*, 2019(5):430 - 448.
- [12] KIM D S, KIM H K, KIM M K. Analysis of oxalic acid of various vegetables consumed in Korea[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2007, 16(4):650 - 654.
- [13] LIU Y, HUANG J S, WANG D W, et al. Electrochemical determination of oxalic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofiber modified electrode [J]. *Anal Methods*, 2010, 2(7):855 - 859.
- [14] JELLUM E. Profiling of human body fluids in healthy and diseased states using gas chromatography and mass spectrometry, with special reference to organic acids [J]. *J Chromatogr*, 1977, 143(5):427 - 462.
- [15] WU F W, HE Z K, LUO Q Y, et al. HPLC determination of oxalic acid using tris(1, 10-phenanthroline) ruthenium (II) chemiluminescence-application to the analysis of spinach[J]. *Food Chem*, 1999, 65(4):543 - 546.
- [16] ENSAFI A, KAZEMZADEH A. Flow injection spectrophotometric determination of ultra trace amounts of oxalic acid [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2000, 367:590 - 592.
- [17] FU C G, WANG L X, FANG Y Z. Determination of oxalic acid in urine by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection [J]. *Talanta*, 1999, 50(5):953 - 958.
- [18] RAOOF J, CHEKIN F, EHSANI V. Palladium-doped mesoporous silica SBA-15 modified in carbon-paste electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of oxalic acid[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 207:291 - 296.
- [19] 李岚,郝洪庆. 恒波长同步荧光猝灭法测定啤酒中草酸[J]. *理化检验(化学分册)*, 2017(3):330 - 332.
- [20] 高艳丽,王宗花,张菲菲,等. CdSe 量子点荧光增敏法测定甘草酸[J]. *分析测试学报*, 2011(11):1241 - 1245.

(责任编辑:王彦江)

(下转第 60 页)

(上接第 35 页)

Determination of Oxalic Acid in Food by Inhibitory Kinetic Spectrofluorimetry

SONG Shaofei, ZHANG Qing, ZHOU Fulin

(Department of Applied Chemistry, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi 044000, China)

Abstract: In this paper, an inhibitory kinetic spectrofluorimetric method for the determination of oxalic acid is reported based on the inhibitory effect of oxalic acid on the oxidation reaction between potassium bromate and Rhodamine B in sulfuric acid medium. The reduced fluorescence of the system is restored and enhanced, and the degree of fluorescence enhancement is directly proportional to the concentration of oxalic acid. The effecting factors have been investigated with the excitation wavelength of 265 nm and the fluorescence emission wavelength of 595 nm. There is a good linear relationship between fluorescence and concentration of oxalic acid in the range of 0.5 ~ 30 mg/L under the optimal conditions. The detection limit is 2×10^{-2} mg/L. The relative standard deviation (RSD) is 2.0% for 0.5 mg/L oxalic acid solution ($n = 11$). The method is simple and fast, and has been applied to the detection of trace oxalic acid in spinach and beer. The rate of recovery between 96.2% ~ 102.0% is satisfactory.

Key words: inhibitory kinetic spectrofluorimetry; oxalic acid; Rhodamine B; food

