

## 硫酸耐而蓝探针共振瑞利散射法测定糖精钠<sup>\*</sup>

蔡雪语<sup>1\*\*</sup>, 田淳仁<sup>1\*\*</sup>, 刘嘉慧<sup>1\*\*</sup>, 陈芝菊<sup>1\*\*</sup>, 冯广卫<sup>2\*\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 医学检验学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025)

**[摘要]** 目的: 探讨硫酸耐而蓝(NBS)探针共振瑞利散射法(RRS)测定糖精钠(SC)含量。方法: 先在弱酸性介质中加入SC, 与硫酸耐而蓝形成离子缔合物, 采用NBS探针RRS法测定SC含量, 记录产生新的RRS光谱, RRS光谱的最大散射峰, RRS强度变化有良好的线性关系的波长、SC浓度范围、该法检出限及回收率范围。结果: 最大散射峰位于802 nm, 另在507、400 nm有两个较弱的散射峰; 802 nm处SC浓度在0.5~25 mg/L范围内RRS强度变化有良好的线性关系, 该法检出限为0.17 mg/L, 回收率范围为90.2%~102.8%。结论: 硫酸耐而蓝-SC体系的RRS方法可用于果汁中SC的测定。

**[关键词]** 糖精钠; 硫酸耐而蓝; 共振瑞利散射; 离子缔合微粒; 光谱分析

**[中图分类号]** O657.3; TS255.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)11-1283-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.11.009

## Determination of Saccharin by Resonance Rayleigh Scattering Method with Nile Blue Sulphate

CAI Xueyu<sup>1</sup>, TIAN Chunren<sup>1</sup>, LIU Jiahui<sup>1</sup>, CHEN Zhiju<sup>1</sup>, FEN Guangwei<sup>2</sup>

(1. School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate resonance Rayleigh scattering (RRS) method for the determination of Saccharin with Nile blue sulphate. **Methods:** Adding Saccharin in weak acid medium, reacted with Nile blue sulphate to form a ion-associated complex and determining the content of SC; which led to a distinctly enhanced RRS and recording new RRS spectrum and the scattering; RRS strength variation showed fine linear relationship wavelength, SC concentration scale, and limit of detection of this method and recovery rate scale. **Results:** There is a new strong RRS peak located at 802 nm and there were two smaller scattering peaks at 507 nm and 400 nm. The intensities of RRS are proportional to the concentration of Saccharin in the range of 0.5~25 mg/L. The detection limit is 0.17 mg/L. The recovery rate scale was 90.2% to 102.8%. **Conclusion:** The method can be applied to the determination of saccharin in juice.

**[Key words]** Saccharin; nile blue sulphate; resonance rayleigh scattering; ion-associated complex; spectrum analysis

糖精钠(saccharin, SC)俗称糖精, 属于食品添加剂而非食品, 其甜度比蔗糖甜300~500倍, 但对人体无任何营养价值, 并且食用较多时, 会影响肠

胃消化酶的正常分泌, 降低小肠的吸收能力。有研究表明, 摄入大量的SC可能导致雄性大鼠患膀胱癌<sup>[1]</sup>。我国规定SC在蜜饯、冷饮类最大使用量为

\*[基金项目] 贵州医科大学大学生创新创业项目(201610660002); 贵阳市科技计划项目[筑科合同(2016001)001号]

\*\* 贵州医科大学医学检验学院2015级本科生

\*\*\* 通信作者 E-mail: 461503441@qq.com

网络出版时间: 2017-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20171115.2215.012.html>

0.15 g/kg<sup>[2]</sup>。尽管允许使用于食品的甜味剂已有近 20 种,如 SC、安赛蜜、阿巴斯甜、甘草、三氯蔗糖等,但由于 SC 成本低廉,在食品加工中作为甜味剂使用较为广泛。为了满足各类饮料、食品中 SC 含量控制的需求,国内外采用分光光度法<sup>[3-4]</sup>、荧光光度法<sup>[5]</sup>、液相色谱法<sup>[6-8]</sup>、层析法<sup>[9]</sup>、或电化学法<sup>[10]</sup>等测量 SC 含量。但是利用硫酸耐而蓝(nile blue sulphate, NBS)作探针,采用共振瑞利散射(resonance rayleigh scattering, RRS)技术定量测定 SC 尚未见报道。本实验研究了 NBS 与 SC 反应的 RRS 光谱特征、反应条件、方法的线性关系等,以期 RRS 法应用于 SC 的定量分析测定提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

SC 标准溶液(国家标准物质局):1 g/L 备用,试验时稀释为 50 mg/L;NBS(上海化学试剂厂)0.2 g/L 水溶液。Britton-Robinson(B-R)缓冲溶液:混和酸溶液( $H_3PO_4$  2.71 mL、乙酸 2.36 mL、 $H_3BO_3$  2.47 g 溶解后,定容为 1 L)和 0.2 mol/L NaOH 溶液按一定的体积比配制。Cary eclipse 荧光分光光度计(美国瓦里安),TU-1800pc 紫外-可见分光光度计(北京普析)。

### 1.2 方法

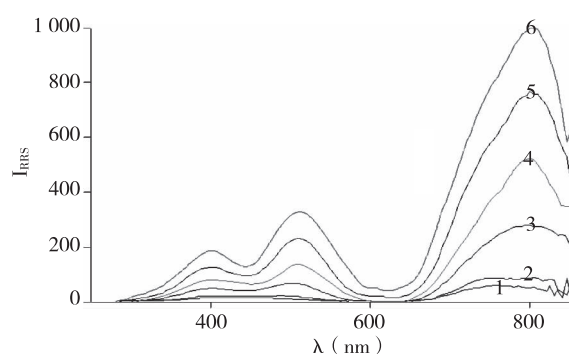
取 6 根 10 mL 具塞比色管,均加入 B-R 缓冲溶液(pH 3.78)1.00 mL,并在第 1 支比色管中加入 50 mg/L 的 SC 4.00 mL;其余 5 支比色管中均加入 0.2 g/L NBS 溶液 1.00 mL,再分别加入 50 mg/L SC 0、1.00、2.00、3.00 及 4.00 mL,双蒸水稀释至刻度,摇匀,25 °C 的恒温水浴中静置 20 min。在 Cary eclipse 荧光分光光度计上,以  $\lambda_{em} = \lambda_{ex}$  同步扫描,分别得到 SC 空白液、NBS 空白液、SC-NBS 离子缔合物的 RRS 光谱。记录 RRS 峰  $\lambda_{max}$  处各溶液的散射光强度,其中 NBS 空白液的散射光强度记为  $I_{RRS}^0$ 、SC-NBS 离子缔合物的散射光强度记为  $I_{RRS}$ ,则  $\Delta I_{RRS} = I_{RRS} - I_{RRS}^0$ 。

## 2 结果

### 2.1 体系的共振散射光谱

利用 Cary eclipse 荧光光度计,在 250 ~ 850 nm 区间对配制的溶液同步扫描,结果如图 1: pH 3.78

的 B-R 缓冲溶液中,SC、NBS 空白溶液的 RRS 强度均较弱(曲线 1、2),当把 SC 加入 NBS 溶液中,两者发生缔合反应后,体系的共振光瑞利散射增强,并在 400、507、802 nm 出现散射峰,其中以 802 nm 的散射峰强度最大,此处的  $\Delta I_{RRS}$  最显著。由图 1 还可以观察到:随着 SC 的加入量的逐渐增加,各散射峰的强度逐渐增强,散射峰强度的变化( $\Delta I$ )与 SC 的浓度(c)成线性关系,故试验选择 802 nm 作为测定波长。



注:1 为 SC,2 为 NBS,3 ~ 6 分别为 5 及 15 mg/L 的 SC-NBS  
图 1 糖精钠-NBS 体系的共振瑞利散射光谱

Fig. 1 RRS spectrum of SC-NBS system

### 2.2 酸度选择

固定 0.2 g/L NBS 溶液 1.00 mL、50 mg/L SC 4.00 mL,分别检测 B-R 缓冲溶液、Tris-HCl 缓冲溶液、HAc-NaAc 缓冲溶液在不同 pH 时对体系  $\Delta I_{RRS}$  的影响,发现 B-R 缓冲溶液在 pH 3.29 ~ 4.56 时体系的  $\Delta I_{RRS}$  最稳定并且较大,以 pH 3.78 的 B-R 缓冲溶液 1.00 mL 为实验的酸度条件。

### 2.3 NBS 用量

固定 B-R 缓冲溶液(pH = 3.78)1.00 mL、50 g/mL SC 4.00 mL,改变 NBS 溶液的用量。实验表明,0.2 g/L NBS 溶液在 0.80 ~ 1.20 mL 范围内  $\Delta I_{RRS}$  最大。NBS 溶液的用量较小,与 SC 的缔合反应不完全;NBS 溶液的用量较大时,可能存在自吸作用,均导致  $\Delta I_{RRS}$  减小,故实验选择 0.2 g/L NBS 溶液的用量为 1.00 mL。

### 2.4 稳定性实验

在 10 mL 具塞比色管中,加入 B-R 缓冲溶液(pH 3.78)1.00 mL、50 kg/L SC 4.00 mL、0.2 g/L NBS 溶液 1.00 mL,双蒸水稀释至刻度,摇匀。分别置于 0、5、10、15、20、25、30、35 及 40 °C 的恒温水浴中,每隔 5 min 分别测定 1 次  $\Delta I_{RRS}$ 。结果表明,体系温度在 15 ~ 30 °C 范围内得到的  $\Delta I_{RRS}$  较大,15

~50 min 反应体系  $\Delta I_{RRS}$  最大并且稳定。实验中将配制好的溶液于 25 ℃ 的恒温水浴中静置 20 min。

2.5 线性关系及方法的灵敏度

以  $\Delta I_{RRS}$  对 SC 浓度作图绘制标准曲线,分别得到波长在 802、507 及 400 nm 的线性回归方程、相

关系系数( $r$ )、线性范围以及检出限,结果显示,802、507 及 400 nm 处  $\Delta I_{RRS}$  都有良好的线性关系;以 802 nm 的灵敏度较高,检出限为 0.17 mg/L,见表 1。对含有 20 mg/L SC 的 11 份溶液进行精密密度检验,相对标准偏差为 2.82%。

表 1 标准曲线的线性范围、相关系数及方法的检出限

Tab. 1 Linear range of standard curve and the detection limits for correlation coefficient and method

波长 (nm)	线性回归方程 (mg/L)	$r$	线性范围 (mg/L)	检出限 (mg/L)
802	$\Delta I_{RRS} = 7.45 + 48.96C$	0.998 8	0.5 ~ 25	0.17
507	$\Delta I_{RRS} = -6.21 + 19.12C$	0.998 2	1.0 ~ 25	—
400	$\Delta I_{RRS} = -2.69 + 13.90C$	0.998 0	1.0 ~ 25	—

2.6 干扰实验

当 SC 浓度为 20 mg/L,允许误差为  $\pm 5\%$  时,一些物质可以允许共存的倍数,分别为 NaCl 100 倍,葡萄糖 50 倍,尿素、淀粉、 $HCO_3^-$  20 倍,NaH- $SO_3$ 、蔗糖 10 倍, $Ca^{2+}$ 、柠檬酸、甘氨酸钠、 $H_2PO_4^-$  5 倍,酒石酸钠、 $NH_4^+$  2 倍, $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  1 倍,维生素 C、 $Fe^{3+}$  0.2 倍,牛血清白蛋白 0.05 倍。可见,有蛋白质共存时,对测定的干扰严重。

2.7 样品分析

2.7.1 样品前处理 购买贵阳市饮品店自制果汁

饮料,将样品搅拌均匀后,取 10.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,加入 50% 乙醇 10 mL、10% 硫酸铜溶液 4 mL,摇匀后再加 4% 氢氧化钠溶液 0.88 mL,50% 乙醇定容,摇匀,得到样品备用液<sup>[6]</sup>。取一定量的样品备用液于离心管中,高速离心机离心 10 min,吸取上清液 1 mL 作为样品测试液(相当于原果汁液 0.1 mL)。

2.7.2 样品测定 按照实验方法,测定果汁样品中 SC 的含量,对所分析样品进行标准加入回收试验,结果显示回收率范围为 90.2% ~ 102.8%。见表 2。

表 2 样品中 SC 的测定结果

Tab. 2 Results of the determination of Saccharin in the samples

样品	测定值 (mg/L)	RSD	加入量 (mg/L)	测定总量 (mg/L)	回收率 (%)
1	156.2	4.98	50	201.3	90.2
2	137.6	3.76	50	183.6	92.0
3	167.4	5.02	50	218.8	102.8

3 讨论

SC 是一种有机化工合成产品,作为可以用于食品的甜味剂,由于其较高的甜度应用比较广泛。在生产经营活动中少数企业为了片面追求产品的甜度、延长产品保质期,擅自违法过量使用 SC 等食品添加剂,对人体健康构成了潜在的威胁。因而建立简便、快速测定 SC 的方法对食品安全具有重要的意义。目前定量测定 SC 的各种方法中,光度法、层析法操作简单,但方法的灵敏度较低;液相色谱法研究较多,但检测成本较高,并且和电化学法一样操作繁琐。RRS 技术是一种高灵敏的分析技术,利用普通的荧光光度计即得到完整的 RRS 光谱特征图,近年来在生物大分子及药物的分析测

定中得到迅速发展,但 RRS 法测定食品中 SC 的报道不多<sup>[11-16]</sup>。

本研究结果显示,在 pH 3.78 的溶液中,NBS 和 SC 作用,形成的离子缔合物能产生 RRS 明显增强效应,原因可能是:(1)根据简化的瑞利散射公式: $I_{RRS} = kcMI_0$ (式中  $I_{RRS}$  为 RRS 强度, $I_0$  为入射光强度, $c$  为溶液浓度, $K$  为比例系数, $M$  为相对分子质量),当其他因素不变时, $I_{RRS}$  与散射物质的相对分子质量成正比;NBS 与 SC 缔合,缔合物的分子量必然增大,有利于体系 RRS 强度的提高。(2)在 pH 3.78 的溶液中,NBS 为带正电荷的大阳离子( $NBS^+$ ),SC 离解为阴离子形式存在,两者借静电引力和疏水作用形成离子缔合物,分子体积大大增强,有利于 RRS 强度的提高;由于  $NBS^+$  和  $SC^-$  均具有较强的亲水性,能很好地溶于水,而离子缔合

物的形成使两者的电荷被中和,整个离子缔合物以疏水性的状态存在,可能与水之间形成疏水界面而有利于产生一种表面增强的散射效应。

综上,本研究利用 NBS 作探针,采用 RRS 技术定量测定 SC,操作简便、快速。在选定的实验条件下,体系相对稳定,线性范围宽,测定检出限为 0.17 mg/L,该法可用于果汁样品中 SC 的测定,并且有较好的回收率。同时,该法对于果汁样品中可能存在的 NaCl、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸的共存允许量较大;但如果果汁样品中有蛋白质共存,则对测定干扰严重,测定时可以考虑在样品前处理时除去蛋白质。

## 4 参考文献

- [1] Suzanne DT, Helen T, Walter P, et al. The male rat carcinogens limonene and sodium saccharin are not mutagenic to male Big Blue rats[J]. *Mutagenesis*, 2001(4):329 - 332.
- [2] 王茂起,王竹天,陈君石,等. GB2760-2007. 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社, 2007: 70-71.
- [3] 段鹏,庞伟毅,黄元新,等. 亚甲蓝分光光度法快速测定食品中的糖精钠[J]. *公共卫生与预防医学*, 2010(1):46-49.
- [4] 焦嫚,董学芝,胡卫平,等. 结晶紫紫外分光光度法测定食品中糖精钠的含量[J]. *光谱实验室*, 2010(1): 287-290.
- [5] 王守兰,谢杨. 荧光光度法测定饮料中糖精钠含量[J]. *光谱实验室*, 2001(5):601-603.

- [6] Dossi N, Toniolo R, Susmel S, et al. Simultaneous RP-LC determination of additives in soft drinks[J]. *Chromatographia*, 2006(11-12):557-562.
- [7] 金岚. 高效液相色谱法测定食品中苯甲酸、山梨酸、糖精钠样品前处理方法[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012(6):1445-1446.
- [8] 潘智慧. HPLC 法测定瓜子中糖精钠的样品前处理方法探讨[J]. *中国卫生检验杂志*, 2003(3):352.
- [9] 刘维华,郭银燕. 薄层层析法同时测定饮料中甜蜜素和糖精钠[J]. *中国公共卫生*, 2000(8):766.
- [10] 宋秋娟,李志岭,宁伟. 离子选择电极法测定含乳饮料糖精钠[J]. *中国公共卫生*, 2002(8):967.
- [11] 徐红,刘绍璞,罗红群. 盐酸吡啶黄-脱氧核糖核酸反应体系的 RRS 及其应用[J]. *理化检验-化学分册*, 2010(1):5-8.
- [12] 蒋治良,张玉兰,梁爱惠,等. 痕量甲胎蛋白的免疫纳米金催化-氧化亚铜微粒共振散射光谱分析[J]. *高等学校化学学报*, 2009(6):1109-1115.
- [13] 谭建红,陈杰,江虹. 橙黄(IV)探针 RRS 光谱法测定大观霉素[J]. *分析科学学报*, 2014(4):557-559.
- [14] 刘红,徐红,黄亚励,等. 硫酸卡那霉素-固绿体系的共振瑞利散射光谱及其分析应用[J]. *化学研究与应用*, 2016(5):720-723.
- [15] 张国胜,董学芝,王爱芳,等. 甲基紫-糖精钠体系共振瑞利散射光谱的研究及其应用研究[J]. *分析实验室*, 2008(5):358-361.
- [16] 张国胜,韩晓声,徐琳琳. 共振瑞利散射法快速测定果汁中糖精钠[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011(2):348-349.

(2017-08-20 收稿,2017-10-28 修回)

中文编辑:吴昌学;英文编辑:赵毅

(上接第 1282 页)

- [7] 刘万洋,魏薇,董静,等. 妊娠大鼠碘缺乏和甲状腺功能减退对仔鼠海马脑源性神经营养因子表达的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2010(6):471-473.
- [8] 王慧. L-T4 干预对甲状腺功能减退大鼠生殖、妊娠结局的影响[D]. 山西:山西医科大学, 2014.
- [9] 鄢明超,牛艳丽,王小青,等. Reelin 与小脑发育-Noth1 信号通路的调节作用[J]. *解剖学报*, 2015(2):182-189.
- [10] 梁爽. Reelin 缺失对小鼠小脑皮质和血管发育的影响[D]. 郑州:河南大学, 2015.
- [11] Tandberg E, Larsen JP, Aarsland D, et al. The occurrence of depression in Parkinson's disease. A community-based study[J]. *Arch Neurol*, 2012(53):175-179.
- [12] 梁爽,王倩,穆小云,等. Reelin 基因缺失对小鼠小脑浦

肯野纤维迁移与极化的影响[J]. *河南大学学报*, 2015(5):569-574.

- [13] 梁国强,高海鑫,时燕薇,等. Reelin 可增强海马神经元的多巴胺 D1 受体表达[J]. *解剖学研究*, 2014(1):1-6.
- [14] 刘阳. 甲状腺功能减退妊娠大鼠的仔鼠海马络丝蛋白和脑源性神经营养因子的表达及意义[J]. *职业与健康*, 2016(13):1772-1776.
- [15] 鲁丽. 妊娠早期亚临床甲减左旋甲状腺素干预对后代神经智力发育影响的动物实验研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2009.

(2017-08-22 收稿,2017-11-01 修回)

中文编辑:文箬颖;英文编辑:乐萍