

灿烂绿共振瑞利散射法测定 功能饮料中的牛磺酸

庞向东, 江虹*, 刘微, 秦艾

(长江师范学院化学化工学院, 重庆市无机特种功能材料重点实验室, 重庆 408100)

摘要:建立了快速、准确、灵敏地测定功能饮料中牛磺酸的共振瑞利散射法。在弱碱性 Tris-盐酸缓冲介质中, 灿烂绿能与牛磺酸结合使体系的共振瑞利散射(RRS)显著增强, 并产生新的 RRS 光谱。最大共振瑞利散射峰位于 367 nm, 牛磺酸的质量浓度在 0.005 ~ 0.13 mg/L 范围内与 RRS 增强强度 ($|\Delta I_{RRS}|$) 呈线性关系, 定量限为 3.12 mg/100 mL。该方法简便、快速、灵敏, 有较高的准确度和选择性, 可用于市售功能饮料中牛磺酸的测定, 加标回收率为 98.39% ~ 102.1%, 测定值的相对标准偏差为 2.0% ~ 2.5%。

关键词:灿烂绿; 牛磺酸; 功能饮料; 共振瑞利散射

中图分类号: 0657.39

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2017)04-0194-03

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2017.04.048

Determination of taurine in functional drink by resonance Rayleigh scattering method

PANG Xiang-dong, JIANG Hong*, LIU Wei, QIN Ai

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University,

Chongqing Key Laboratory of Inorganic Special Functional Materials, Chongqing 408100, China)

Abstract: A rapid, accurate and sensitive resonance Rayleigh scattering method for quantifying taurine in functional drink is developed. In a weak alkaline Tris-hydrochloric acid buffer medium, brilliant green can be bound with taurine to form a new product, which leads to a distinctly enhanced resonance Rayleigh scattering (RRS) and the appearance of a new RRS spectrum. The maximum resonance Rayleigh scattering peak is located at 367 nm. The mass concentration of taurine in the range of 0.005 to 0.13 mg/L is linearly correlated with the RRS enhanced intensity ($|\Delta I_{RRS}|$). The limit of quantitation is 3.12 mg/100 mL. This method is simple, rapid and sensitive, and also has higher accuracy and selectivity, which can be used for the determination of taurine in commercially available functional drinks. The added recovery of the sample and relative standard deviation (RSD) ($n=6$) of measured value are in the ranges of 98.39% - 102.1% and 2.0% - 2.3% respectively.

Key words: brilliant green; taurine; functional drink; resonance Rayleigh scattering

牛磺酸(taurine)是一种非蛋白质氨基酸,是人及动物的重要营养物质,在生理和药理方面有着重要作用。他能促进大脑细胞发育,调节神经传导,提高免疫力,保肝利胆,抗心律失常,预防心脑血管疾病,还具有消炎、解热、镇痛及抗病毒之功效。人体缺乏牛磺酸会导致多种疾病的发生,若牛磺酸过量,则会抑制体内其他营养元素的吸收,造成人体内营养失衡^[1]。我国于1993年批准在乳制品、婴幼儿食品、谷类制品及饮料中添加牛磺酸作为功能营养剂使用。因此,功能性饮品中常加有牛磺酸,以达到强

化补给及保健的功效。鉴于此,严格控制牛磺酸的摄入量及准确检测功能性饮品中牛磺酸的含量具有重要意义。目前,牛磺酸含量的测定方法主要有高效液相色谱法^[2-8]、氨基酸自动分析法^[9-10]、液-质联用法^[11-12]、紫外-可见分光光度法^[13-15]等。高效液相色谱法应用较多,但需利用柱前或柱后衍生进行检测,而衍生反应条件要求苛刻,操作繁琐,费时,重复性差,且仪器价格偏贵,不易普及。氨基酸自动分析法仪器价格较贵难以普及,且反应试剂不稳定。紫外-可见分光光度法具有仪器价廉,操

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 重庆市教委科技基金资助项目(KJ1401226); 长江师范学院科技基金资助项目(2015CXX080)

作者简介: 庞向东(1962-),男,理学学士,副教授,研究方向为分子光谱分析,cspxdfxschl23456@163.com; 江虹(1956-),女,理学学士,教授,研究方向为分子光谱分析,通讯联系人,jianghongch@163.com。

作简便等优点,但灵敏度一般不高。因此,笔者以三苯甲烷染料灿烂绿作探针,采用近年新发展起来的具有高灵敏度的共振瑞利散射法来分析功能饮料中牛磺酸含量尚未见文献报道。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

pHS-3C 精密酸度计,上海虹益仪器仪表有限公司生产;F-2500 型荧光分光光度计,日本日立公司生产。

1.00×10^{-4} mol/L 灿烂绿(brilliant green, BRG)溶液,成都科龙化工试剂厂生产;125.2 mg/L 牛磺酸(taurine, TAU)标准溶液,重庆药检所提供,冰箱4℃保存,用时用水稀释100倍;pH为3.0~9.5的Tris(三羟甲基氨基甲烷)-盐酸缓冲溶液,0.10 mol/L盐酸与0.20 mol/L Tris溶液混合,用酸度计测定,配成系列缓冲溶液。以上试剂均为分析纯,试验用水为二次蒸馏水。

样品:力保健牛磺酸维生素B功能饮料(1[#])、力克保健液(2[#])、达利园乐虎氨基酸维生素功能饮料(3[#])、红牛维生素功能饮料(原味型)(4[#])及红牛维生素功能饮料(强化型)(5[#]),市售。

1.2 样品处理

准确移取摇匀后的1[#]~5[#]功能饮料各4.0 mL,分别置于离心管中,以4 000 r/min离心分离5 min,上清液分别置于5 000 mL容量瓶中,用水定容,摇匀,3[#]和4[#]的定容液即是其待测液。取1[#]、2[#]和5[#]定容液各10.0 mL,分别置于100 mL容量瓶中,用水定容,摇匀,即得1[#]、2[#]和5[#]待测液。

1.3 实验方法

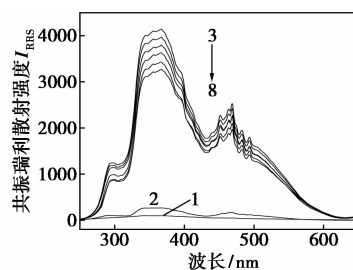
准确移取0.50 mL pH 7.68 Tris-盐酸缓冲溶液于10 mL具塞比色管中,依次加入适量的1.252 mg/L牛磺酸标准溶液或样液、2.50 mL 1.00×10^{-4} mol/L灿烂绿溶液,用水定容,摇匀,20 min后,在荧光光度计上设置 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} = 220$ nm,测定狭缝为5.0 nm,同步扫描共振瑞利散射(RRS)光谱,求得最大RRS波长处体系的RRS强度 I_{RRS} 及试剂空白的RRS强度 I_0 ,计算 $|\Delta I_{\text{RRS}}|$ 。

2 结果与讨论

2.1 TAU-BRG的RRS光谱特征

体系的RRS光谱如图1所示。由图1中谱线1、2可知,牛磺酸和灿烂绿自身的RRS均很微弱。而从图1中谱线3可知,灿烂绿溶液在弱碱性溶液

中的RRS则显著增强,最大共振瑞利散射峰位于367 nm。当在BRG的弱碱性溶液中加入不同浓度的牛磺酸溶液时,体系的RRS强度随着牛磺酸质量浓度的增加而呈线性下降(如图1中曲线3~8所示),即在牛磺酸一定质量浓度范围内,牛磺酸的质量浓度与体系的共振瑞利散射增强程度的绝对值($|\Delta I_{\text{RRS}}|$)呈线性关系。故可用于牛磺酸的定量分析。其反应机理:灿烂绿是一种三苯甲烷类的碱性染料,可与牛磺酸分子结构中的磺酸根离子以静电引力作用生成二元离子缔合物。



1—0.125 mg/L TAU; 2— 2.50×10^{-5} mol/L BRG;
3~8—0.000, 0.0250, 0.0501, 0.0751, 0.100, 0.125 mg/L TAU +
 2.50×10^{-5} mol/L BRG, pH 7.68

图1 RRS光谱

2.2 反应条件

2.2.1 pH对 ΔI_{RRS} 的影响

考察了Tris-盐酸缓冲溶液pH对体系 $|\Delta I_{\text{RRS}}|$ 的影响,结果如图2所示。由图2可知,pH在6.5~8.4范围内,体系 $|\Delta I_{\text{RRS}}|$ 相对较大,此时灵敏度也较高。因此,选用pH为7.68的Tris-盐酸缓冲溶液,最佳用量为0.50 mL。

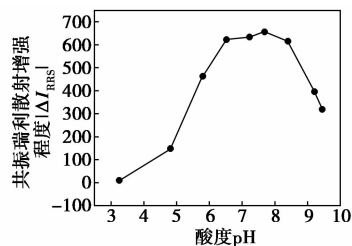


图2 pH对 ΔI_{RRS} 的影响

2.2.2 灿烂绿溶液的浓度对 ΔI_{RRS} 的影响

考察了灿烂绿溶液浓度对体系 $|\Delta I_{\text{RRS}}|$ 的影响,结果如图3所示。由图3可知,灿烂绿溶液适宜浓度范围为 $2.2 \times 10^{-5} \sim 2.8 \times 10^{-5}$ mol/L。在此范围外,体系的 $|\Delta I_{\text{RRS}}|$ 均较小,灵敏度也较低。原因是灿烂绿浓度较小时,与牛磺酸反应不完全,而灿烂绿浓度过大时,其自身发生聚合作用,故 $|\Delta I_{\text{RRS}}|$ 均减弱。因此,选用 1.00×10^{-4} mol/L灿烂绿溶液

2.50 mL。

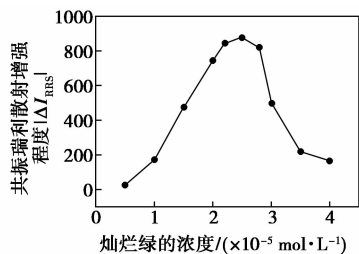


图 3 灿烂绿溶液浓度对 ΔI_{RRS} 的影响

2.2.3 试剂加入顺序对 ΔI_{RRS} 的影响

考察了各试剂不同加入顺序对体系 $|\Delta I_{RRS}|$ 的影响。结果表明:按 1.3 节实验方法的加入顺序为最佳,此时体系 $|\Delta I_{RRS}|$ 值最大,灵敏度最高。

2.2.4 反应时间对 ΔI_{RRS} 的影响

考察了反应时间对体系 $|\Delta I_{RRS}|$ 的影响,结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,开始时,随着反应时间的增加, $|\Delta I_{RRS}|$ 逐渐增大,表明此时的反应并未完全;当反应时间增至 20 min 后,体系的 $|\Delta I_{RRS}|$ 基本处于一个平台上,表明反应需 20 min 才能进行完全,之后至少稳定 1 h。因此,选在 20 min 后测定。

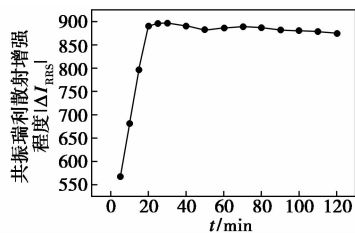


图 4 时间对 ΔI_{RRS} 的影响

2.3 标准曲线

按最佳实验条件配制标准系列溶液并扫描

RRS 光谱。以 ΔI_{RRS} 为纵坐标,牛磺酸的质量浓度 ρ (mg/L) 为横坐标作标准曲线,结果如图 5 所示。该方法的一元线性回归方程为 $\Delta I_{RRS} = -5.726 - 7144\rho$ (ρ : mg/L), 相关系数 $r = -0.9998$, 线性范围为 0.005 ~ 0.13 mg/L, 定量限为 3.12 mg/100 mL。

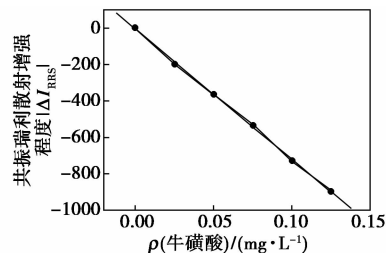


图 5 牛磺酸的标准曲线

2.4 共存物质的影响

考察了某些常见物质对 0.125 mg/L 牛磺酸测定的影响。结果表明,当相对误差不大于 $\pm 5\%$ 时,下列物质不干扰测定:500 倍的 Na^+ 、 K^+ 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、L-白氨酸、L-色氨酸、L-亮氨酸、L-丙氨酸、L-谷氨酸、L-异亮氨酸;100 倍的 Sn^{2+} 、 I^- 、L-组氨酸、L-赖氨酸、甘氨酸、尿素;50 倍的 Ba^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 、 SO_3^{2-} 、 CO_3^{2-} 、 SO_4^{2-} 、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₁₂。可见,该方法具有良好的选择性。

2.5 样品分析

取待测样液 1[#] 1.0 mL, 2[#] 1.2 mL, 3[#] 2.0 mL, 4[#] 1.5 mL, 5[#] 1.8 mL, 分别按实验所述方法加入其他试剂溶液并扫描 RRS 光谱,从谱图及回归方程求得各待测样液及原始饮料中牛磺酸的质量浓度,各样液平行测定 6 次。同时进行加标回收试验 ($n = 6$), 评价该方法的准确度。结果如表 1 所示。

表 1 样品分析结果及回收试验 ($n = 6$)

样品	测得值/ [mg·(100 mL) ⁻¹]	标示量/ [mg·(100 mL) ⁻¹]	本底值/ (10 ⁻⁴ mg)	加标量/(10 ⁻⁴ mg)	测得值/(10 ⁻⁴ mg)	平均回收率/%	RSD/%
1 [#]	988.60	1000	7.909	1.252, 2.504, 3.756	9.172, 10.45, 11.71	101.20	2.1
2 [#]	507.50	500	4.872	2.504, 5.008, 7.512	7.395, 9.949, 12.53	101.40	2.3
3 [#]	43.04	42	6.886	1.252, 3.756, 5.008	8.120, 10.57, 11.82	98.39	2.0
4 [#]	48.78	50	5.854	2.504, 3.756, 6.260	8.408, 9.715, 12.21	102.10	2.5
5 [#]	367.70	370	5.295	1.252, 3.756, 6.260	6.530, 9.020, 11.46	98.98	2.0

从表 1 可知,该方法的测定结果与标示量接近,样品的加标回收率为 98.39% ~ 102.1%, 相对标准偏差为 2.0% ~ 2.5%, 说明该方法具有较高的准确度和精密度。

3 结论

利用灿烂绿共振瑞利散射技术测定牛磺酸, (下转第 198 页)

的病症,如阿尔茨海默症、威尔逊氏症^[12]。近年来,铜离子荧光探针的研究一直是热门问题,并已经制备和开发出许多高效的铜离子荧光探针。

罗丹明类铜离子荧光探针一般是通过适当的桥联剂将罗丹明荧光母体与高选择性的含有 N、O 等杂原子识别基团相连接。Li 等^[2]利用罗丹明 B 和吡喃合成了探针 1,如图 1 所示。该化合物与 Cu^{2+} 的络合常数 (K_a) 是 $5.01 \times 10^4 \text{ mol}$ 。在 HEPES/乙腈体积比为 1/1 的缓冲溶液中,探针 1 对 Cu^{2+} 浓度在 $0.1 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 范围内具有良好的线性响应,检出限为 $1.2 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。同时,该化合物是“裸眼” Cu^{2+} 化学传感器,加入铜离子后,溶液由无色变为明显的粉红色。在离子竞争实验中,其他离子 (Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 等) 不会干扰 Cu^{2+} 的测定。此荧光探针对 Cu^{2+} 有高灵敏度和选择性,并成功用于检测 Hela 细胞内 Cu^{2+} 浓度。

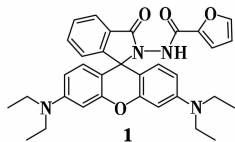


图 1 探针 1

Wang 等^[12]利用罗丹明 6G 和水杨醛的衍生物

(上接第 196 页)

仪器价廉,操作简便,条件要求不苛刻,试剂价廉易得,样品处理简单、安全,有很高的灵敏度,较宽的线性范围,较高的准确度、精密度和良好的选择性,能满足微量分析要求。该法适于功能饮料中牛磺酸的快速测定。

参考文献

- [1] Motoki M, Yasuhisa A. A simple assay of taurine concentrations in food and biological samples using taurine dioxygenase[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 427: 121 - 123.
- [2] 王丽雅,陶宁萍,张恒劼. 柱前衍生-高效液相色谱法测定暗纹东方鲀肉中牛磺酸含量[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(10): 159 - 164.
- [3] 邵金良,杨东顺,王丽,等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中 13 种磺胺残留[J]. *分析实验室*, 2014, 33(11): 1322 - 1325.
- [4] 孙变娜,沈和定,吴洪喜,等. 高效液相色谱法测定 4 种石磺中牛磺酸的含量[J]. *海洋渔业*, 2015, 37(1): 93 - 98.
- [5] 陈申如,胡阳,倪辉,等. 高效液相色谱法测定牡蛎中牛磺酸含量[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(2): 193 - 198.
- [6] 刘成模,王华朗,杨曦,等. 液相色谱法检测乌贼膏中牛磺酸含量[J]. *粮食与饲料工业*, 2015, (3): 60 - 62.

通过两步反应合成了探针 2,如图 2 所示。在乙腈-水体积比为 3:7 的体系中,随着铜离子的加入,在 527 nm 出现了 1 个新的吸收峰,而 512 nm 处的发射峰锐减并伴随着蓝移至 500 nm,同时在 548 nm 处出现 1 个新的发射峰。2 个发射峰的强度都随着 Cu^{2+} 浓度的增加而降低。当 Cu^{2+} 浓度是化合物浓度的 5 倍时,荧光完全猝灭。用 386 nm 的光激发时,水杨醛席夫碱部分被激发得到 512 nm 处的绿色荧光,这与新形成的开环罗丹明荧光团的吸收峰重叠,从而开环罗丹明被激发,得到相应的新的发射峰 (548 nm)。然而, Cu^{2+} 可作为水杨醛席夫碱绿色荧光的猝灭剂。因此, 2 个发射峰 (512 nm 和 548 nm) 强度都会随着 Cu^{2+} 的加入而降低。这与大多数罗丹明衍生物由螺内酰胺变成开环酰胺同时伴随荧光增强相反。

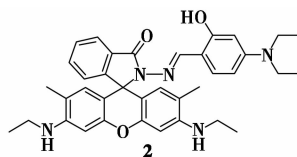


图 2 探针 2

另外,同样是水杨醛衍生物与罗丹明合成的荧光探针还有 Tang 等^[13]开发的探针 3、4 和 Huo 等^[14]

- [7] Wang X F, Che D F, Su G M, *et al.* Determination of taurine in biological samples by high performance liquid chromatography using 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan as a derivatizing agent[J]. *Biomedical and Environmental Science*, 2011, 24(5): 537 - 542.
- [8] Mohammadreza G S, Siminozar M, Mahboub N, *et al.* A Rapid determination of taurine in human plasma by LC[J]. *Chromatographia*, 2009, 69(11): 1427 - 1430.
- [9] 王洪健,周兴起,冯志强,等. 氨基酸自动分析仪测定食品中牛磺酸的方法建立[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(3): 348 - 350.
- [10] 蔡梅,吉文亮,刘华良,等. 氨基酸自动分析仪对食品中牛磺酸快速测定方法研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(1): 41 - 45.
- [11] 陈晓峰,周围,解迎双. 超高效液相色谱串联质谱法直接测定婴幼儿乳粉中牛磺酸[J]. *食品科学*, 2015, 36(24): 280 - 285.
- [12] Massimo R, Giovanni C, Manuela C, *et al.* Simultaneous determination of taurine, glucuronolactone and glucuronic acid in energy drinks by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (triple quadrupole)[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1364: 303 - 307.
- [13] 李秀娟,鲁曾,黄贤刚. 牡蛎中牛磺酸含量测定方法的建立[J]. *食品与机械*, 2010, 26(5): 81 - 83.
- [14] 李咏梅,李人宇. 高灵敏分光光度法测定贝类中牛磺酸含量[J]. *现代化工*, 2013, 33(10): 137 - 140.
- [15] 李人宇,彭松,李咏梅,等. 促进氧化溴酚蓝光度法测定饲料中牛磺酸含量[J]. *中国饲料*, 2015, (2): 31 - 33, 37. ■