

共振光散射法检测辣椒及其制品中苏丹红 I

黄明元¹, 彭晓君², 李延志³

摘要: [目的] 建立一种测定苏丹红 I 的新方法。[方法] 人血清白蛋白 (HSA) 与苏丹红 I 结合, 用共振瑞利散射光法进行苏丹红 I 的检测。[结果] 在 360 nm 处共振光散射增强强度与苏丹红 I 的浓度呈线性关系。以 K_2HPO_4 - NaH_2PO_4 为缓冲体系维持苏丹红 I 测定溶液的 pH=5.80, 当温度为 305.16K (28 °C) 和静置时间为 30 min 时, 方法的检出限为 0.10 μg/ml, 线性范围为 0.10 ~2.80 μg/ml, 线性相关系数 $r=0.995$, 方法精密度 (RSD) 和准确度 (P), 分别为 2.98%~5.19% 和 92.50%~108.00%。[结论] 方法可靠、简便, 快速, 可直接测定水样中的苏丹红 I。

关键词: 血清白蛋白; 共振瑞利散射; 苏丹红 I

DETECTION OF SUDAN I IN HOT CHILLI AND RELATED PRODUCTS BY RESONANCE LIGHT SCATTERING METHOD HUANG Ming-yuan, PENG Xiao-jun, LI Yan-zhi. (Zhuhai District Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510288, China)

Abstract: [Objective] To set up a new method for determination of sudan I in hot chilli and related products. [Methods] The sudan I was determined by resonance light scattering (RLS) method after it had combined with human serum albumin (HSA). [Results] The enhanced intensity of RLS at the wavelength of 360 nm was proportional to the concentration of sudan I. The buffer solution K_2HPO_4 - NaH_2PO_4 was used to maintain the solution pH5.80. When the temperature and place time were 305.16K (28 °C) and 30 minutes, respectively, the linear range of the calibration curve was 0.10-2.80 μg/ml with the detection limit of 0.10 μg/ml and the correlation coefficient was 0.995. The RSD and the rates of recoveries were 2.98%-5.19% and 92.50%-108.00% respectively. [Conclusions] This method is reliable and accurate and can be used to detect sudan I directly in hot chilli and related products.

Key word: HAS; Resonance light scattering; Sudan I

目前检测苏丹红 I 的国标方法是用反相高效液相色谱—紫外可见光检测器进行色谱分析, 样品经溶剂提取、固相萃取净化后, 采用外标法定量。欧盟采用高效液相色谱与质谱联用的方法进行测定, 该方法灵敏度与准确度较高, 但所用仪器价格昂贵, 操作繁琐, 难以在发展中国家普及。共振瑞利散射光作为测定方法已有广泛的应用^[1-3]。人血清白蛋白 (Human Serum Albumin, HSA) 作为一种重要的转运蛋白质, 进入体内的各种物质均要与 HSA 结合, 才能在肝脏转化。本文应用 HSA 与苏丹红 I 结合后共振瑞利散射 (RLS) 的变化, 建立了一种基于生物蛋白 RLS 增强测定环境中苏丹红 I 的新型检测方法。

1 实验内容

1.1 仪器与试剂

荧光分光光度计 (RF-540 型分光光度计, 日本岛津公司); 酸度计 (Orion 868, 美国奥立龙公司); 超级恒温箱 (501 型, 上海市实验仪器厂)。旋转蒸发器 (SB-1000 型, 日本东京理化器械株式会社)。

苏丹红标准溶液: 准确称取标准品 50.0 mg 置于 50 ml 容

量瓶中, 用甲醇溶解稀释至刻度, 配成 1.0 mg/ml 的标准溶液, 摇匀后备用。

三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 生化试剂) 缓冲溶液 (0.01 mol/L, pH=7.43); HSA (电泳纯, >98%, Sigma 公司原装, 购自北京华美生物工程公司); HSA 应用液 (用 Tris 缓冲溶液配制所需浓度的溶液); pH 标准溶液 (25 °C 时 pH=4.03、6.86 和 9.18)。

其它试剂均为分析纯, 实验用水为 2 次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的制备 向 10 ml 比色管中依次加入 pH=7.43 Tris 缓冲液 3.0 ml, 1.0 mg/ml HSA 溶液 5.00 ml, 混匀, 加入 0.1 mol/L NaCl 溶液 1.00 ml 和适量苏丹红 I 标准溶液, 用 pH=7.43 Tris 缓冲液定容, 混匀。30 min 后, 在激发光狭缝和发射光狭缝宽度均为 10 nm, 灵敏度=2, $\lambda_{ex}=\lambda_{em}=360$ nm 的条件下, 分别测定 HSA 空白溶液和加苏丹红 I 的 HSA 溶液的散射光强度 (I_0 和 I), 依次计算每一加苏丹红 I-HSA 溶液的 I ($=I-I_0$) 值, $I-C$ Sudan I 标准曲线法定量检测痕量苏丹红 I。

1.2.2 样品溶液制备 称取粉碎均匀的辣椒产品约 5 g, 置于具塞三角瓶中, 用甲醇超声波萃取 3 次 (每次用 30 ml 甲醇, 超声波萃取 20 min), 合并萃取液, 旋转蒸发器浓缩至干, 用甲醇溶解并定容至 5 ml。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线、检出限

基金项目: 广州市海珠区科技局立项项目 (2006-D-11)

作者简介: 黄明元 (1971-), 男, 硕士, 主管技师, 研究方向: 理化实验

作者单位: 1.广州市海珠区疾病预防控制中心, 广州, 510288; 2.广东轻工职业技术学院 07 级实习生; 3.广东省药品检验所

取 11 只 10 ml 比色管, 分别加入 0、50、100、150、……1000 μl 1.0 mg/ml 苏丹红 I 溶液按方法 1.2 进行实验, 结果表明, 溶液苏丹红 I 含量大于 2.80 $\mu\text{g/ml}$ 时, 线性关系较差; 而苏丹红 I 含量在 0.10 ~2.80 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, I 与 CNH 呈良好的线性关系, 其回归方程为 $Y=0.079+15.33X$, 相关系数 $r=0.995$ 。

重复测定试剂空白溶液 I 值 ($m=6, n=11$), 计算出其标准偏差 (S_b), 按式 $CL=3S_b/K$ (K 表示斜率) 计算, 方法检出限为 0.10 $\mu\text{g/ml}$ 。按式测定下限= $10S_b/K$ 计算, 测定下限为 0.32 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2 精密度实验

取 33 支 10 ml 比色管分成 3 组, 每组 11 支, 按组依次加入不同含量的苏丹红 I 溶液, 按方法 1.2 做精密度实验, 实验结果见表 1。可见采用共振瑞利散射光方法测定水苏丹红 I, 对高、中、低浓度含苏丹红 I 样品的测定都具有较好的精密度。

表 1 不同浓度精密度比较 ($n=11$)

组别	含量 ($\mu\text{g/ml}$)	结果范围 ($\mu\text{g/ml}$)	平均值 ($\mu\text{g/ml}$)	S ($\mu\text{g/ml}$)	RSD ($\times 10^{-2}$)
1	0.80	0.77~0.82	0.79	0.041	5.19
2	1.60	1.52~1.67	1.59	0.048	3.02
3	2.40	2.28~2.49	2.42	0.072	2.98

2.3 准确度实验

按实验方法取 6 份含苏丹红 I 量不同的样品, 分别加入含苏丹红 10.2 μg 的溶液, 混匀, 进行回收实验, 结果见表 2。由表 2 可见, 样本加标回收率为 92.50%~108.00%, 结果可靠。

表 2 样本加标回收率结果 ($\times 10^{-2}$)

编号	本底 (μg)	加标值 (μg)	测定值 (μg)	回收率 (p)
1	1.125	0.2	1.341	108.00
2	1.125	0.2	1.337	106.00
3	1.671	0.2	1.664	96.50
4	1.671	0.2	1.682	105.50
5	2.373	0.2	2.558	92.50
6	2.373	0.2	2.581	104.00

2.4 样品分析

按实验方法 1.2.2 对辣椒等样品 ($n=11$) 进行样前处理并用

本方法测定, 同时对同一样品用国标法进行测定, 两种方法进行了 t 检验, 结果发现 $P < 0.05$ 。

2.5 静置时间的影响

按实验方法分成 2 组进行操作, 1 组为空白, 另 1 组加入 20 μl 1.0 mg/ml 苏丹红 I 溶液。进行静置时间实验, 测定静置 5、10、15、20、25、30、40、50、60、90、120、150 min 后溶液散射光强度, 结果发现共振 Rayleigh 散射光强度差值 I 在 30 min 时达到最大值, 且在 3 h 内基本保持稳定, 说明苏丹红 I 与 HSA 的反应需要一定的时间, 静置 30 min 后测定为较适宜。

2.6 温度的影响

在 $T=5 \sim 50$ 范围内, 取 20 只 10.0 ml 比色管分成 2 组, 按实验方法, 1 组每管加入 20 μl 1.0 mg/ml 苏丹红 I 溶液, 另 1 组为空白, 每间隔 5 进行温度试验, 计算加苏丹红 I 组、空白组及 2 组共振 Rayleigh 散射光强度差值 I 发现随着温度的升高, 空白组和加苏丹红 I 组二者的共振 Rayleigh 散射光强度增强; 25~30 时 I 值达到最大值且趋于稳定。表明反应是一个吸热反应; 温度升高, 加快该反应的速度, 缩短达到平衡的时间; 但 30 后, 继续提高温度, I 值下降。取 28 作为实验温度较为适宜。

2.7 pH 值及缓冲溶液量的影响

不同 pH 值的 $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液对体系共振散射强度有影响, 结果表明, pH 值在 5.0~6.4 之间实验结果较好, 本文选择缓冲溶液的 pH 为 5.80。

3 结论

当 $\lambda_{ex}=\lambda_{em}=360 \text{ nm}$, 激发光狭缝和发射光狭缝宽度均为 10 nm, 仪器灵敏度为 2 时, 共振 Rayleigh 散射光检测苏丹红 I 的方法的检出限为 0.10 $\mu\text{g/ml}$, 线性相关系数为 $r=0.995$, 线性范围为 0.10~2.80 $\mu\text{g/ml}$ 。该方法的精密度 ($RSD=2.98\% \sim 5.19\%$) 和准确度 ($P=92.50\% \sim 108.00\%$), 方法可靠。

参考文献:

[1] 蒋治良, 刘绍璞, 王力生, 等. 金纳米粒子-荧光素体系的光谱特征[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24 1201-1204.
 [2] Lu W., Huang C.Z., Li Y.F.. A sensitive and selective assay of nucleic acids by measuring enhanced total internal reflected resonance light scattering signals deriving from the evanescent field at the water/tetrachloromethane interfacet [J]. Analyst, 2002, 127 (10): 1392-1396.

(收稿日期: 2006-10-26)

【读者·作者·编者】

表格的常用种类及编排位置

文字叙述表: 表格以文字叙述为主, 多见于临床研究论文中各种病症的比较。采用文字表时应注意归类总结, 力求专业术语少而精, 并根据需要加用表线。统计表: 是医学论文最常用的一种, 它在表达、积累、分析、比较资料方面都有着极为重要的作用。表格的位置应紧随“见表 x”或“(表 x)”之文字的自然段落之下, 即先见文, 后见表。若作者将所有表格另纸放最后, 正文中也应以“表 x”标示其所在位置。