

番红花红 T 分光光度法测定啤酒酵母中铬含量

Spectrophotometric determination of chromium content in beer yeast with safranin T

李人宇¹

黄金状¹

李咏梅²

周家宏³

LI Ren-yu¹ HUANG Jin-zhuang¹ LI Yong-mei² ZHOU Jia-hong³

(1. 连云港师范高等专科学校, 江苏 连云港 222006; 2. 淮海工学院化学工程学院, 江苏 连云港 222005;

3. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

(1. Lianyungang Teachers College, Lianyungang, Jiangsu 222006, China;

2. School of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China;

3. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

摘要:采用微波消解样品,在碱性条件下用高锰酸钾将铬(Ⅲ)转化为铬(Ⅵ),并利用在聚乙烯醇与磷酸介质中,铬(Ⅵ)与碘化钾、番红花红 T 室温下会发生显色反应的原理,建立了一种测定啤酒酵母中铬含量的新方法。研究结果表明:在最佳测定条件下,该方法的检测限为 14.55 $\mu\text{g/L}$,相对标准偏差为 1.3%~2.1% ($n=5$),样品加标回收率为 97.9%~101.7%,且常见共存离子不影响测定结果。

关键词:分光光度法;铬;番红花红 T;啤酒酵母

Abstract: A new spectrophotometric method for determination of chromium content was developed. In both polyvinyl alcohol and phosphoric acid medium, chromium (VI) could react with potassium iodide and safranin T at room temperature, leading to coloration after microwave digestion sample and oxidation of chromium (III) to chromium (VI) with potassium permanganate under alkaline conditions. The effects of the factors such as absorption spectra, reaction conditions and coexisting ions on the reaction were discussed. The results showed that under the optimum determination conditions, Beer-Lambert law was obeyed in the mass concentration range of 0.0~0.5 $\mu\text{g/mL}$ for chromium with the maximum absorption peak at 460 nm. The detection limit was 14.55 $\mu\text{g/L}$. The apparent molar absorption coefficient was $6.90 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$. This method had been applied to the determination of chromium content in beer yeast.

The results obtained by this method agreed well with those obtained by atomic absorption spectrometry. RSD was in the range of 1.3%~2.1% ($n=5$), and recovery was in the range of 97.9%~101.7%. Moreover, a large number of common coexisting ions did not affect the determination.

Keywords: spectrophotometry; chromium; safranin T; beer yeast

铬(Ⅲ)是人体必需微量元素,参与糖、脂类和蛋白质的代谢,具有维持耐糖量于正常水平、促进生长发育的功能。人体缺铬(Ⅲ)会引发糖尿病、冠心病、儿童发育不良等疾病,但铬(Ⅲ)过量又会危害人体健康^[1-2]。啤酒酵母中富含三价有机铬,人体吸收利用率高,是天然铬(Ⅲ)的良好来源^[3],因其具有品质优、产量大、经济环保等优势,被广泛应用于食品工业中^[4]。

目前铬(Ⅲ)的测定方法主要有原子吸收光谱法^[5-7]、分光光度法^[8-10]、化学发光法^[11]、电化学法^[12]、红外光谱法^[13]、色谱法^[14]、质谱法^[15]等。原子吸收光谱法、化学发光法和电化学法操作复杂、干扰较多;红外光谱法、色谱法和质谱法灵敏、准确、干扰少,但仪器昂贵、运行成本较高、对操作要求高。分光光度法仪器廉价,操作简便,灵敏度较高,准确可靠。传统的分光光度法采用显色剂二苯碳酰二肼,但需使用有毒溶剂丙酮,危害健康,显色完全需 30 min,且必须在 1 h 内完成测定^[7, 9-10]。水溶性显色剂番红花红 T 价廉易得,且在铬含量测定方面未见报道。笔者前期研究发现,铬(Ⅵ)能氧化碘化钾生成 I_3^- , I_3^- 与番红花红 T 反应生成稳定的离子缔合物,本试验拟在此基础上详细研究显色反应条件,并结合微波消解、高锰酸钾氧化样品处理技术,以期建立一种快速、准确、灵敏的测定啤酒酵母中铬含量的新方法。

基金项目:2015 年度国家自然科学基金面上项目(编号:21571105);2014 年江苏省高校“青蓝工程”资助项目;2015 年度连云港市第五期“521 工程”科研项目(编号:201529);2015 年江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(编号:201511585003Y)

作者简介:李人宇(1972—),男,连云港师范高等专科学校教授,博士。E-mail: lirenys18@163.com

收稿日期:2017-05-27

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

紫外—可见分光光度计:UV-2550 型,日本岛津公司;
超级恒温水浴:SYC-15C 型,南京桑力电子设备厂;
酸度计:pHS-3C 型,上海精密科学仪器有限公司;
微波消解仪:ETHOS E 型,意大利 Milestone 公司;
石英亚沸高纯水蒸馏器:SYZ-B 型,宜兴新建石英玻璃
器厂;

重铬酸钾、磷酸、碘化钾、聚乙烯醇:分析纯,国药集团化
学试剂有限公司;

番红花红 T:生物染色剂,上海灵锦精细化工有限公司;
啤酒酵母粉:食品级,亳州市保华药业有限公司;
试验用水:二次蒸馏水。

1.2 试验方法

1.2.1 铬(VI)标准储备液的配制 称取 0.282 9 g 经 105 ℃
烘干 2 h 的基准试剂重铬酸钾,用水溶解并定容至 1 L,即得
100.0 μg/mL 的铬(VI)标准储备液,置于冰箱 4 ℃ 保存备
用。使用时稀释成 5.0 μg/mL 的标准溶液。

1.2.2 样品处理 称取 0.5 g(精确到 0.000 1 g)啤酒酵母粉
于消解罐,加入 6 mL 硝酸和 2 mL 双氧水,置于微波消解仪
中,在 5 min 内由室温升至 120 ℃ 并恒温 5 min,再在 5 min
内升温至 160 ℃ 并恒温 10 min,然后在 5 min 内升温至
180 ℃ 并恒温 10 min,消解完毕得透明溶液。冷却后取出消
解罐,在 140~160 ℃ 电热板上赶酸至 0.5~1.0 mL。冷却后
将消化液转移至三角瓶中,加入 40 mL 水,用 2 mol/L 氢氧
化钠调节 pH 至 12,滴加 20 g/L 高锰酸钾溶液至溶液呈紫
红色,在电炉上加热煮沸 20 min,期间若紫红色褪去,应及时
滴加高锰酸钾溶液。加热完毕后立即滴加 95%乙醇使紫红
色褪去,摇匀,用 1 mol/L 硝酸溶液调节 pH 至 7.0,趁热过
滤,滤液置于 50 mL 容量瓶中,并用少量热水洗涤 3 次,洗涤
液并入容量瓶中,加水定容至刻度,即得待测样液。

1.2.3 测定方法 取 2 支 25 mL 具塞比色管,其中一支依次
加入 4 mol/L 磷酸溶液、一定量铬(VI)标准溶液或待测样
液、0.1 mol/L 碘化钾溶液、10 g/L 聚乙烯醇溶液、 5.0×10^{-4} mol/L 番红花红 T 溶液,用水定容至 25 mL,摇匀;另
一支为试剂空白同时配制,仅不加铬(VI)。避光反应完全
后,以试剂空白为参比,用 1 cm 比色皿,用分光光度计在波
长 460 nm 下测量离子缔合物体系的吸光度。

1.2.4 测定波长的选择 按 1.2.3 的方法分别扫描试剂空白
(以水为参比)和离子缔合物体系(以试剂空白为参比)的吸
收光谱,根据光谱图的最大吸收峰确定测定波长。

1.2.5 测定条件的选择 以影响反应的主要因素反应介质
的选择及用量、碘化钾用量、番红花红 T 用量、表面活性剂
的选择及用量、反应温度和反应时间为考察因素,以吸光度
值为考察指标,分别进行单因素试验,按 1.2.3 的方法在 1.2.4
中的测定波长下测量吸光度,优化出适宜的测定条件。其中
对于反应介质、表面活性剂的选择按以下步骤操作:分别考
察盐酸、硫酸和磷酸 3 种介质,根据吸光度值选择反应介质,

继而考察其浓度,加入 1,4,10 mol/L 的介质溶液各 5 mL,再
根据吸光度值确定介质适宜浓度,然后按以下单因素试验方
法确定最佳用量。分别考察 8 种常用表面活性剂,其浓度为
10 g/L(或 10 mL/L),用量为 2 mL,根据吸光度值选择表面
活性剂,再按以下单因素试验方法确定最佳用量。单因素试
验步骤为:对于反应条件适宜浓度介质溶液 3.0 mL、
0.1 mol/L 碘化钾溶液 3.0 mL、10 g/L(或 10 mL/L)适宜表
面活性剂溶液 2.0 mL、 5.0×10^{-4} mol/L 番红花红 T 溶液
4.0 mL,反应温度 20 ℃,避光反应时间 15 min,逐一改变反
应条件,固定其他反应条件不变进行试验,根据吸光度值确
定最佳反应条件。

1.2.6 标准曲线的绘制 向 6 个 25 mL 比色管中,分别准确
加入 0.00,0.50,1.00,1.50,2.00,2.50 mL 铬(VI)标准溶液,
使铬(VI)质量浓度各为 0.0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 μg/mL,按
1.2.3 的方法在 1.2.5 的条件下测定。以吸光度为纵坐标,铬
(VI)质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.7 共存离子的影响 在 25 mL 比色管中加入 2.0 mL
铬(VI)标准溶液,按 1.2.3 的方法在 1.2.5 的条件下测定吸光
度;另取若干支 25 mL 比色管,除了加入 2.0 mL 铬(VI)标准
溶液外,分别加入一定量待考察的共存离子,再同前述步骤
测定吸光度,并计算两次吸光度测定值的相对误差,判断共
存离子是否干扰铬(VI)的测定^[16]。

1.2.8 样品中铬含量的测定 取 2.0 mL 1.2.2 待测样液于
25 mL 比色管中,按 1.2.3 的方法在 1.2.5 的条件下测定。根
据样品的吸光度及标准曲线线性回归方程,求得样品中铬含
量。测定结果与 GB 5009.123—2014 中的原子吸收光谱法
(AAS)对照。同时做加标回收试验。

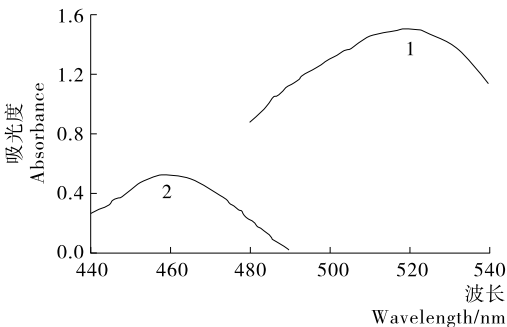
2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

扫描 440~540 nm 吸收光谱见图 1。试剂空白的最大吸
收峰位于 521 nm;铬(VI)、碘化钾和番红花红 T 反应生成离
子缔合物的最大吸收峰位于 460 nm。故选择测定波长
460 nm 定量检测铬(VI)的含量。

2.2 测定条件的选择

2.2.1 反应介质 分别考察了盐酸、硫酸和磷酸介质对吸光
度的影响。结果表明,磷酸介质的灵敏度最高。故选用磷酸



1. 试剂空白 2. 离子缔合物

图 1 吸收光谱

Figure 1 Absorption spectra

介质,改变其浓度进一步试验,发现 4 mol/L 磷酸效果最佳。若使用 1 mol/L 磷酸,基本不反应,吸光度几乎为 0;若使用 10 mol/L 磷酸,反应过快体系不稳定,吸光度数值变化大,造成测定不准确。当 4 mol/L 磷酸溶液用量为 3.0 mL,吸光度最大(见图 2)。因此,后续试验加入 4 mol/L 的磷酸溶液 3.0 mL。

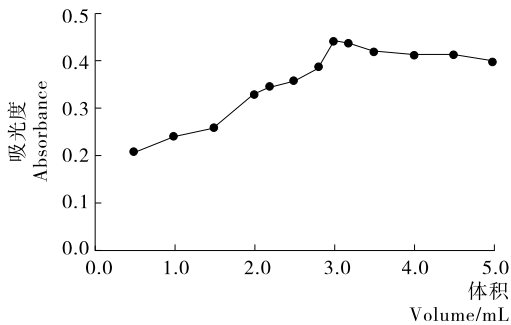


图 2 磷酸用量对吸光度的影响

Figure 2 Effect of phosphoric acid volume on absorbance

2.2.2 碘化钾溶液(0.1 mol/L)用量 由图 3 可知,当碘化钾溶液加入量为 3.0 mL 时,吸光度最大。因此碘化钾溶液用量选用 3.0 mL。

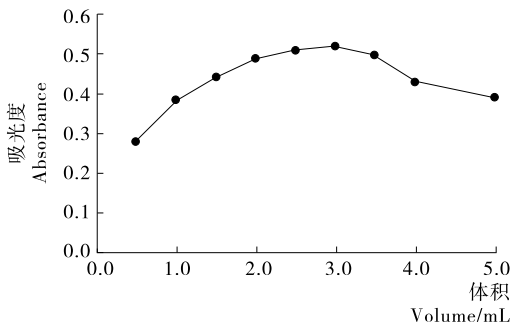


图 3 碘化钾用量对吸光度的影响

Figure 3 Effect of potassium iodide volume on absorbance

2.2.3 番红花红 T 溶液(5×10^{-4} mol/L)用量 由图 4 可知,当加入 4.0 mL 番红花红 T 溶液时,吸光度最大。因此番红花红 T 溶液用量选用 4.0 mL。

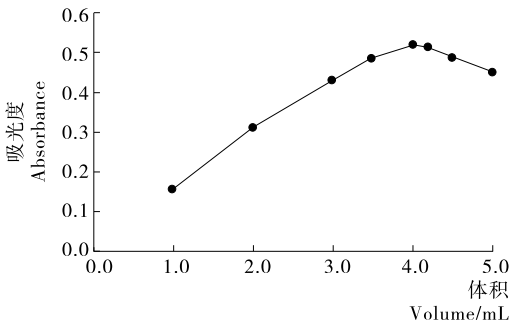


图 4 番红花红 T 用量对吸光度的影响

Figure 4 Effect of safranin T volume on absorbance

2.2.4 表面活性剂 由表 1 可知,与未加表面活性剂相比,加入聚乙烯醇,吸光度显著增大,增敏效果明显优于其他表面活性剂,此外其增稳效果也好,吸光度数据更稳定,有利于

准确测定。加入 β -环糊精或阿拉伯树胶,吸光度增幅较小,灵敏度略有提高。加入其他表面活性剂,吸光度均减小,灵敏度不同程度降低。故选用 10 g/L 聚乙烯醇作增敏增稳剂。由图 5 可知,聚乙烯醇适宜用量为 2.0 mL。

表 1 表面活性剂对吸光度的影响		
Table 1 Effect of surfactant on absorbance		
表面活性剂	最大吸收波长/nm	吸光度
不加表面活性剂	456	0.368
聚乙烯醇	460	0.519
β -环糊精	497	—0.449
阿拉伯树胶	461	0.439
吐温 20	463	0.320
吐温 80	364	0.293
十二烷基硫酸钠	345	0.293
曲拉通 X-100	363	0.282
十二烷基苯磺酸钠	468	0.256

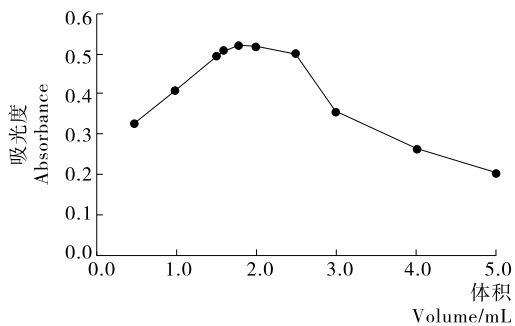


图 5 聚乙烯醇用量对吸光度的影响

Figure 5 Effect of polyvinyl alcohol volume on absorbance

2.2.5 反应温度 由图 6 可知,温度为 5 $^{\circ}\text{C}$ 时反应较容易发生,吸光度较大;温度为 10 $^{\circ}\text{C}$ 时能反应完全,吸光度达到最大,温度升至 40 $^{\circ}\text{C}$,吸光度基本不变;温度升至 50~100 $^{\circ}\text{C}$ 时,吸光度明显减小,这是由离子缔合物的稳定性降低造成的。考虑测定的灵敏度和操作的简便性,选择室温下反应。

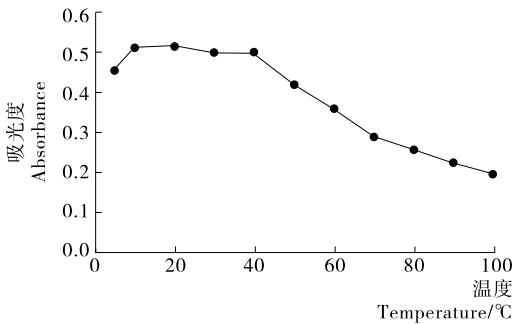


图 6 反应温度对吸光度的影响

Figure 6 Effect of reaction temperature on absorbance

2.2.6 反应时间与稳定性 由图 7 可知,反应初期,吸光度逐渐增大;反应 15 min 时,吸光度达到最大,在聚乙烯醇增稳作用下能保持 175 min 基本不变(相对误差 $<-5\%$)。说

明铬(VI)、碘化钾和番红花红 T 的显色反应在 15 min 内即可完成,生成的离子缔合物能稳定维持 175 min。故选择反应时间为 15 min。本法的反应时间和稳定性均优于传统的二苯碳酰二肼分光光度法^[7, 9-10],反应时间缩短一半,稳定时间延长 1.9 倍。

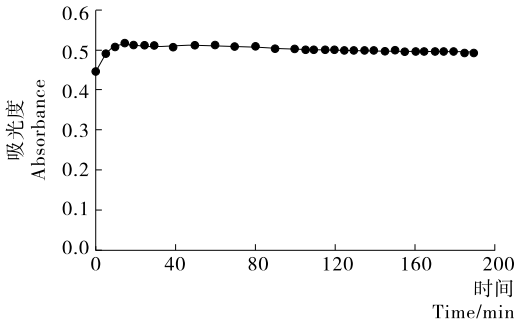


图 7 反应时间对吸光度的影响

Figure 7 Effect of reaction time on absorbance

2.3 标准曲线

由图 8 可知,铬(VI)质量浓度在 0.0~0.5 μg/mL 时,符合朗伯—比尔定律,线性回归方程为 $A=1.326\rho-0.008\ 4$, $r=0.999\ 5$,表观摩尔吸光系数 $\epsilon_{460}=6.90\times10^4\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 。平行测定 11 次试剂空白 A_0 ,得标准偏差为 6.43×10^{-3} ,该计算方法的检出限($3s/k$)为 14.55 μg/L。

2.4 干扰试验

相对误差为±5%,28 种常见共存离子的允许质量浓度

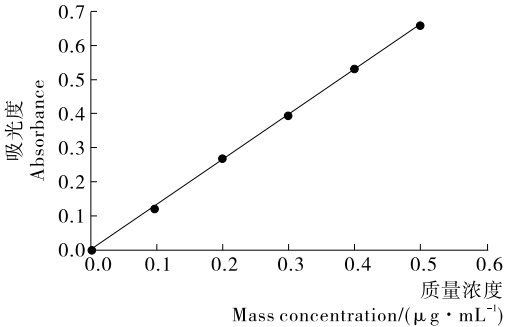


图 8 标准曲线

Figure 8 Standard curve

(未做上限): Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 HCO_3^- 、 NO_3^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 SO_4^{2-} 为 40 μg/mL; Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Sn^{4+} 、 F^- 为 20 μg/mL; $\text{I}(\text{V})$ 、 $\text{V}(\text{V})$ 、 $\text{Se}(\text{IV})$ 为 4 μg/mL。结果表明,方法选择性良好,啤酒酵母中常见离子 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 等有较高允许量,样品可直接测定。

2.5 样品分析

由表 2 可知,番红花红 T 分光光度法测定结果与原子吸收光谱法^[5]一致,且相对标准偏差为 1.3%~2.1%,表明该方法准确可靠,重现性好。

由表 3 可知,平均回收率为 97.9%~101.7%,表明该方法测定结果准确。

表 2 啤酒酵母中铬含量测定结果

Table 2 Results for the determination of chromium in beer yeast (n=5)

样品	AAS 法测定值/ (mg · kg ⁻¹)	番红花 T 分光光度法						RSD/%
		测定值/(mg · kg ⁻¹)				平均值/ (mg · kg ⁻¹)		
1	165.9	166.3	163.5	171.9	170.1	165.3	167.4	2.1
2	241.9	239.8	244.5	240.8	249.2	243.6	243.6	1.5
3	269.7	273.8	270.9	274.7	267.2	275.6	272.4	1.3

表 3 回收试验结果

Table 3 Results of test for recovery (n=5)

样品	加标量/(mg·kg ⁻¹)	测定总量/(mg·kg ⁻¹)						平均回收率/%
1	150	319.0	322.8	319.9	315.2	320.9		101.4
2	150	400.1	397.2	396.3	392.5	394.4		101.7
3	150	416.1	420.8	417.0	422.7	419.9		97.9

3 结论

本试验建立了一种适用于啤酒酵母中铬含量测定的番红花红 T 分光光度法,该方法快速,有较高的准确度、灵敏度和精密度,符合常规检测要求。与传统的二苯碳酰二肼分光光度法相比,该方法避免使用有毒溶剂,反应时间缩短、提高样品分析速度,稳定可持续测定时间明显延长、能保证测定准确度。

参考文献

[1] 杨克敌, 张天宝, 王爱国, 等. 微量元素与健康[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 139-148.
[2] 吴茂江. 铬与人体健康[J]. 微量元素与健康研究, 2014, 31(4): 72-73.
[3] 傅永怀. 微量元素与临床[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997: 64-67.

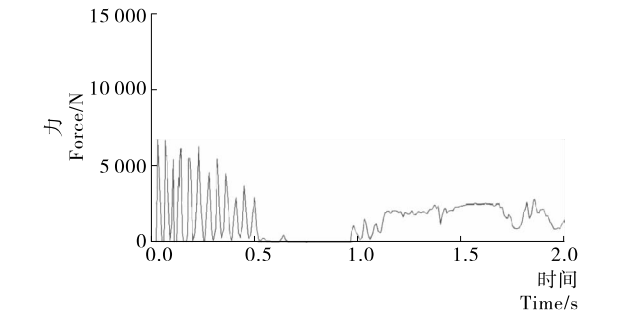


图 9 接触受力图

Figure 9 Contact force curve

面条自动化生产中的关键装置——碱面条松散装置进行了研究,在其功能特性需求分析的基础上进行了总体方案设计,详述了滚筒、滚轮、传动带等关键零部件的设计过程。利用 Adams 软件对碱面条松散装置进行建模,通过运动学仿真从滚筒转速和角加速度 2 个方面验证了设计的合理性;通过动力学仿真测试了传动带的接触力及滚轮接触力,为后续碱面条松散装置优化设计及构建碱面条自动化生产线提供了参考依据。

参考文献

[1] FU B X, ASSEFAW E G, SARKAR A K, et al. Evaluation of durum wheat fine flour for alkaline noodle processing[J]. Cereal Foods World, 2006, 51(4): 178-183.

[2] MONISHA Chakraborty, GARY A Hareland, FRANK A Manthey, et al. Evaluating quality of yellow alkaline noodles made from mechanically abraded sprouted wheat[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2003, 83(5): 487-495.

[3] FU Bin-xiao. Asian noodles: History, classification, raw materi-

als, and processing[J]. Food Research International, 2008, 41(9): 888-902.

[4] 侯国泉. 亚洲面条加工技术概述[J]. 粮食加工, 2010, 35(4): 9-13.

[5] 宋显良, 邓学良, 周文化. 生鲜湿面防霉保鲜技术[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 159-162.

[6] 岑军健. 工艺创新: 非油炸方便面产业将突破困境[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 5-6.

[7] 刘兴信. 我国面条产业概况和趋势[J]. 粮油食品科技, 2005, 13(6): 24-25.

[8] 孟素荷. 中国方便面产业的进步与发展[J]. 食品与机械, 2004, 20(3): 1-3.

[9] 张钟, 王勇, 戴震亚, 等. 免油炸方便面的生产工艺及设备选型[J]. 包装与食品机械, 2005(6): 32-35.

[10] 赵延伟, 吕振磊, 王坤, 等. 面条的质构与感官评价的相关性研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(4): 25-28.

[11] 刘国锋, 徐雪萌, 王德东. 生湿鲜面条的规模化生产及其包装技术[J]. 包装工程, 2004, 25(4): 144-146.

[12] 崔浩然, 卢大马, 卢伟亮. 大型热干面连续生产线: 中国, 201210298315.X[P]. 2012-11-28.

[13] 刘海元, 江凤林, 何彩华. 非油炸多味方便热干面的生产方法: 中国, 201210246058.5[P]. 2012-07-17.

[14] 朱弟生. 方便面的生产工艺及其设备[J]. 农机化研究, 2003(3): 261.

[15] 赵飞宇. 碱面条(热干面)生产工艺技术研究及关键装置设计[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2016: 32-59.

[16] 夏宇. 生鲜湿面生产工艺及关键设备的设计[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2014: 23-36.

[17] 李里特. 我国面条加工技术存在的问题与前景[J]. 郑州粮食学院学报, 2000, 21(3): 12-14.

(上接第 77 页)

[4] 吴振, 江建梅, 舒媛, 等. 啤酒酵母及其衍生品的应用研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(10): 10-13.

[5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.123—2014 食品安全国家标准 食品中铬的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.

[6] BOUTORABI L, RAJABI M, BAZREGAR M, et al. Selective determination of chromium(VI) ions using in-tube electro-membrane extraction followed by flame atomic absorption spectrometry[J]. Microchemical Journal, 2017, 132(5): 378-384.

[7] 李鑫, 张东雷, 张越, 等. 多方法测定明胶中铬含量[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 100-103.

[8] 陈意光, 阮文红, 罗东辉, 等. 紫外分光光度法测定食品模拟物中六价铬和铝[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 65-67.

[9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 13088—2006 饲料中铬的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.

[10] 李晓燕, 宋樱, 欧阳泉根, 等. 二苯碳酰二肼光度法测定微量铬的改进[J]. 理化检验: 化学分册, 2016, 52(6): 729-731.

[11] 高向阳, 高迢竹, 张小燕, 等. 微波消解—流动注射化学发光法快速测定调味品中的微量铬[J]. 中国调味品, 2016, 41(10): 101-104, 108.

[12] 王征帆. 库仑分析法测定富铬酵母中铬含量研究[J]. 中国调味品, 2013, 38(8): 102-103, 120.

[13] TIWARI S, DEB M K, SEN B K. Cloud point extraction and diffuse reflectance-Fourier transform infrared spectroscopic determination of chromium(VI): A probe to adulteration in food stuffs[J]. Food Chemistry, 2017, 221(4): 47-53.

[14] 任华莉, 李琪琳, 曾文法. 离子色谱法测定六价铬的研究进展[J]. 广东化工, 2016, 43(9): 239-240.

[15] 杨晓颖, 丁春光, 闫慧芳. 电感耦合等离子体—质谱法检测全血中铬[J]. 中国职业医学, 2014, 41(2): 208-210.

[16] 庞向东, 江虹, 张琴, 等. 三波长分光光度法快速测定青苹果中的苹果酸[J]. 食品与机械, 2016, 32(12): 79-82.