

氯化锆-氯化铵荧光光谱法测定葡萄糖共存下的果糖

童蕾¹, 王焰新¹, 赵中^{1,2}, 金继红², 郭小慧²

1. 中国地质大学环境学院与生物地质与环境地质教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074
2. 中国地质大学材料科学与化学工程学院, 湖北 武汉 430074

摘要 文章根据 $ZrOCl_2$ 水解产生的 $[ZrO(OH)]^+$ 能与果糖作用产生荧光的原理, 建立了果糖的定量测定方法。在 NH_4Cl 介质中, 体系的荧光强度有所增强, 产物在 408 nm 处发荧光, 在 $0.5 \sim 25 \mu g \cdot mL^{-1}$ 范围内荧光强度与果糖浓度成正比, 当反应温度为 $70^\circ C$ 、反应时间 15 min 时, 葡萄糖不干扰测定。该法成功用于水果中果糖的测定, 灵敏度高, 检出限达 $0.071 \mu g \cdot mL^{-1}$, 方法稳定性好, 结果满意。

关键词 果糖; 葡萄糖; 氯化锆-氯化铵; 荧光光谱法

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)11-2313-04

引言

果糖与葡萄糖是组成相同, 结构不同的两种天然单糖, 常共存一体。在共存的情况下分别进行测定, 对食品和营养分析很重要。由于葡萄糖和果糖都没有发色团和荧光团, 这就使直接光度法或荧光法的检测受到限制。

目前, 用于测定果糖的方法主要有滴定法、色谱法^[1]、毛细管电泳法^[2]、分光光度法^[3,4]等。用荧光光谱法测定果糖的报道还不多见, 将荧光分析法的高灵敏度、低检出限的优势应用于果糖的测定是十分有意义的。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

荧光光谱仪: LS-55 型, 美国 Perkin Elmer 公司; 石英比色皿: 1 cm; (美国 Perkin Elmer 公司); 水浴锅: ($0 \sim 100^\circ C$); (上海跃进医疗器械厂); 电子天平: (1601M P8-1); 酸度计: pH211C 型, (HANNA 公司)(Portual)。D-果糖标准储备液($0.5 g \cdot L^{-1}$); D-果糖标准工作液($50 \mu g \cdot mL^{-1}$); 葡萄糖标准工作液($50 \mu g \cdot mL^{-1}$); 蔗糖标准工作液($50 \mu g \cdot mL^{-1}$)。0.1% $ZrOCl_2$ 水溶液; $0.1 mol \cdot L^{-1} NH_4Cl$ 溶液; 试剂为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

取果糖标准工作液 $\leq 50 \mu g$ 于 25 mL 比色管中, 加入一定量 $0.1 mol \cdot L^{-1} NH_4Cl$ 和 0.1% $ZrOCl_2$ 水溶液, 定容。

水浴加热 15 min, 温度控制在 $70^\circ C$, 冰水冷却至室温, 于荧光光度计上检测。仪器参数: $\lambda_{ex} = 354 nm$, $\lambda_{em} = 408 nm$, 激发狭缝: $8.0 nm$, 发射狭缝: $15.0 nm$, 扫描速度: $500 nm \cdot min^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 $ZrOCl_2$ -果糖体系荧光形成条件

2.1.1 荧光发射光谱图

如图 1 所示: 果糖和 $ZrOCl_2$ 本身不发荧光, 而 $ZrOCl_2$ 与果糖的络合物则有较强荧光, 加入 NH_4Cl 可明显增强体系的荧光强度。络合物的最大荧光发射波长在 408 nm 处,

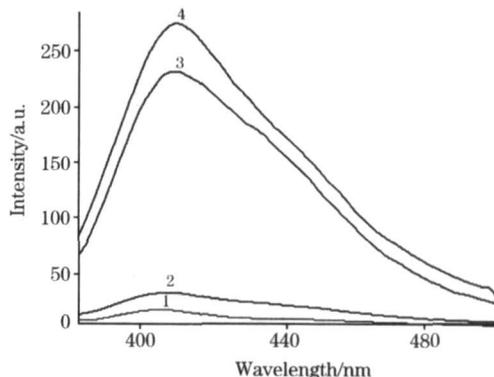


Fig 1 Fluorescence emission spectra

1: Fructose; 2: $ZrOCl_2$; 3: $ZrOCl_2$ -Fructose;
4: $ZrOCl_2$ -Fructose- NH_4Cl

收稿日期: 2006-05-10, 修订日期: 2006-08-20

基金项目: 科技部“863”计划项目(2004AA601050)资助

作者简介: 童蕾, 女, 1982年生, 中国地质大学材料科学与化学工程学院博士研究生 e-mail: tonglei0710@163.com

试剂空白的发射波长在 402 nm 处, 与试剂空白相比, 络合物的荧光波长发生了红移, 说明有新物质产生, 证明了络合物形成的可能。

2.1.2 Cl^- 对荧光强度的影响

由于 ZrOCl_2 水解会产生 H^+ 和 Cl^- , 具体反应式如下,



分别试验了几种氯化物 (NaCl , KCl , NH_4Cl) 对络合物的影响, 结果发现, Cl^- 能增强络合物的荧光强度, 且不改变荧光峰的位置和峰形。实验表明, NH_4Cl 对络合物荧光强度的贡献最大, 因此, 选择 NH_4Cl 作为荧光增强液。随 NH_4Cl 的加入量不断增多, 体系荧光强度逐渐增强, 当 NH_4Cl 的加入量超过 0.8 mL 后, 由于 Cl^- 浓度过大, 抑制了 ZrOCl_2 的水解, 荧光强度反而减小。因此, 选择 0.8 mL NH_4Cl 的加入量最合适。

2.1.3 酸度对荧光强度的影响

同时考查了 Cl^- 和酸度的综合影响, 分别试验了 HCl 和 HClO_4 以及不含 Cl^- 的缓冲液对络合物的影响。比较了不同酸度 (pH 1, 2, 3, 4, 5) 下络合物的荧光强度, 试验结果表明, 当 Zr 的浓度从 $0.001 \sim 0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 变化时, 溶液的 pH 值降低 2 个单位^[5], 当 pH 值降为 3 时, 荧光强度达到最大。如果继续加酸, 络合物的峰形则发生很大变化。因果糖为己酮糖, 在强酸性条件下被破坏, 失水变成 5-羟甲基呋喃甲醛。因此, 溶液酸性越强, 峰形就越不明显, 用缓冲溶液调节也得到同样的结果。

2.1.4 试剂用量的影响

保持其他试剂用量不变, 改变 ZrOCl_2 的用量如图 2 所示, 理论上 ZrOCl_2 的水解产物 $[\text{ZrO}(\text{OH})]^+$ 与果糖 1:1 发生络合反应^[6], ZrOCl_2 的浓度与果糖浓度应一致。但事实上 ZrOCl_2 的浓度远远高于果糖, 这可能由于 ZrOCl_2 在水中发生水解的水化作用较强, 与果糖作用时, 由于 $[\text{ZrO}(\text{OH})]^+$ 与大量水分子结合成 $[\text{ZrO}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_n]^+$, 使反应物浓度降低, 适当增加 ZrOCl_2 的浓度能增强荧光。当加入 4.0 mL ZrOCl_2 时, 体系荧光强度达到最大, 且此时溶液 pH 值为 3, 继续增大 ZrOCl_2 的浓度, 荧光强度基本不变, 故选择实际 ZrOCl_2 的用量为 4.0 mL。

2.1.5 加热温度及时间的影响

考察了不同温度和时间下, ZrOCl_2 分别与果糖、葡萄糖、蔗糖体系的反应情况。如图 3 所示, 分别选取 20 °C (室温), 60, 70, 80, 90, 100 °C 几个温度下络合物的荧光强度变化, 发现当温度达到 60 °C 时, 果糖荧光强度明显增强, 蔗糖次之, 葡萄糖则无荧光, 当温度达 80 °C 时, 葡萄糖才产生微弱荧光, 因此可以得出三者的反应速率为: 果糖 > 蔗糖 > 葡萄糖。因蔗糖在酸性条件下, 水浴加热, 能水解生成葡萄糖和果糖, 因此蔗糖与 ZrOCl_2 反应产生的荧光强度介于果糖和葡萄糖之间, 这与实验结果相一致。

为了提高果糖的选择性, 测定时要避免葡萄糖的干扰。因此, 选择加热温度为 70 °C, 此时, 葡萄糖不产生荧光, 不干扰果糖的测定。

如图 4 所示, 试验了果糖、葡萄糖、蔗糖在不同反应时间下的荧光强度变化, 反应温度为 70 °C, 选择 0, 10, 20,

30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 min 为不同的加热时间。结果表明, 葡萄糖需反应 20 min 后才开始出现荧光, 三种糖的荧光强度均随加热时间的延长而增强, 当加热时间达到 60 min 后荧光强度渐趋平缓。通过实验得知, 当加热温度 90 °C, 反应 60 min 时, 果糖的检出限 $< 0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 当加热温度为 70 °C, 反应时间 15 min, 果糖的检出限为 $0.071 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 也能达到测定要求, 且此时葡萄糖不干扰测定。因此

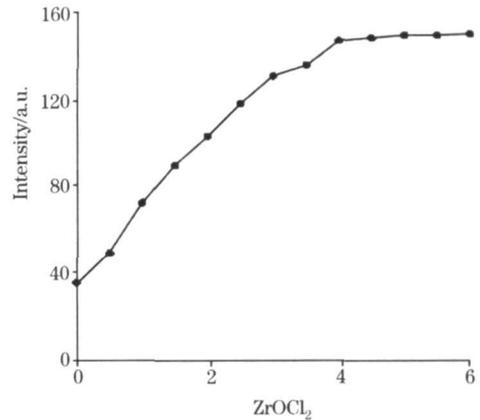


Fig 2 The influence of dosage of ZrOCl_2 on fluorescence

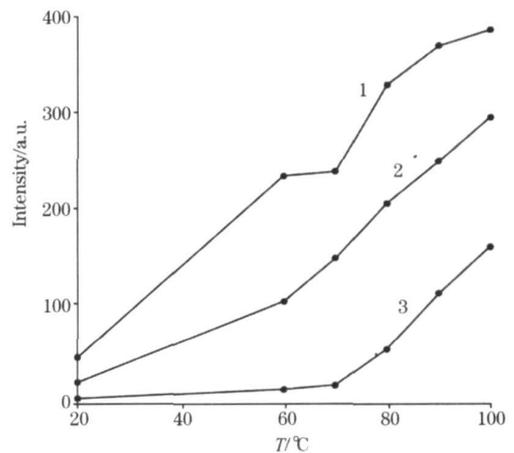


Fig 3 The influence of temperature on fluorescence

1: Fructose; 2: Sucrose; 3: Glucose

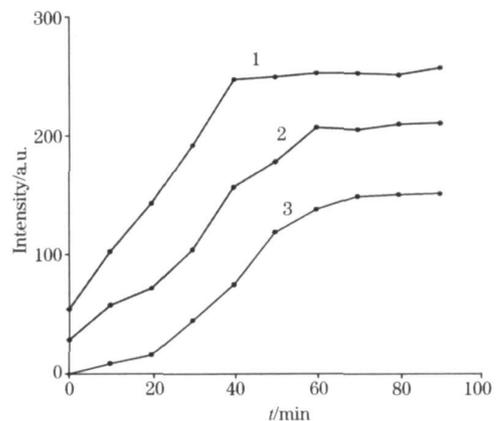


Fig 4 The influence of reaction time on fluorescence

1: Fructose; 2: Sucrose; 3: Glucose

选择 15 min 作为反应时间。

2.2 ZrOCl₂ 与果糖体系荧光产生的机理探讨

果糖为己酮糖，而葡萄糖为己醛糖，都具有烯醇式结构，如图 5。前者属于具有五元环的呋喃糖，后者属于含有六元环结构的吡喃糖，果糖和葡萄糖的开链式和氧环式处在互变的平衡状态^[7]。

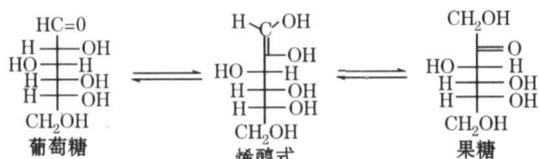


Fig 5

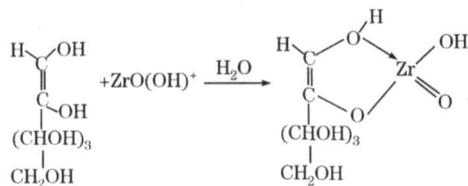


Fig 6

当 ZrOCl₂ 水解后产生的 [ZrO(OH)]⁺ 与烯醇式结构发生反应时，平衡状态被破坏，氧环式向开链式转化，与 Zr 形成具有五元环的络合物，如图 6 所示，满足荧光产生的平面共轭结构要求。由于 Zr 是过渡金属元素，外层电子排布为 4d²5s²，具有抗磁性，因此与有机配体能形成强荧光的络合物，属于 L* → L 发光。

糖分子羟基水化致使溶质的有效溶剂水减少，导致糖的加入使溶液中 ZrOCl₂ 的活度升高，而果糖与烯醇式转化效率要高于葡萄糖，因此，果糖与 [ZrO(OH)]⁺ 反应易于葡萄糖。又由于糖在水溶液中的性质与其水化特性有关。糖的水化受糖分子中平伏羟基数影响，平伏羟基与水的配伍性优

于直立羟基，糖分子中的平伏羟基数越多，水化效应越强。计算表明，葡萄糖、果糖的平伏羟基数顺序为：葡萄糖 > 果糖^[8,9]，因此，果糖反应速率明显快于葡萄糖。而蔗糖由葡萄糖和果糖缩合而成^[10]，性质介于二者之间，因此与 [ZrO(OH)]⁺ 反应的速率快于葡萄糖，而低于果糖。

2.3 样品分析

2.3.1 样品前处理

将水果去皮，从萼凹到果顶方向、对角线取两个楔形小块、粗粗切碎，快速称取 10 g 转入碾钵中，磨成浆状物，用水全部无损的洗入 250 mL 容量瓶中，加入过量的 Ba(OH)₂ 5 mL，形成蛋白质沉淀。再加入过量的 ZnSO₄ 除去剩余的 Ba(OH)₂，定容摇匀，过滤取滤液 1 至 100 mL 容量瓶中，定容即为样品待测液。

2.3.2 工作曲线和检测限的测定

按实验方法绘制标准曲线，果糖含量在 0.5~25 μg·mL⁻¹ 范围内荧光强度与浓度成正比，线性回归方程为：F = 11.273c + 7.057，相关系数 r = 0.9993。对 11 份试剂空白进行平行测定，根据 3S₀/K (S₀ 为空白测定值的标准偏差，K 为工作曲线的斜率) 进行计算，得到检测限为 0.071 μg·mL⁻¹。

2.3.3 共存离子的影响

在含有 5 μg·mL⁻¹ 的果糖溶液中，加入干扰物质进行试验，结果表明：500 倍的葡萄糖、Vc、100 倍的蔗糖、亮氨酸、80 倍的甘氨酸、苯丙氨酸、50 倍的苯甲酸、20 倍的山梨醇、柠檬酸、10 倍的 Ca、色氨酸、5 倍的 Fe 和 V_B 对果糖的测定无干扰。

2.3.4 实际样品的测定

为验证本法的精密度和回收率，对实际样品进行了测定，结果见表 1。

将本实验方法与间苯二酚分光光度法相比较，得出本方法准确度、精密度较高，适合于天然产品及加工食品中果糖含量的测定。

Table 1 Determination results for the fructose in the fruits (n = 5)

| 样品 | 测定值(μg/100g) | | | | | | 平均值(μg/100g) | RSD/% | 加入值/μg | 回收率/% |
|----|--------------|------|------|------|------|------|--------------|-------|--------|-------|
| 苹果 | 5.37 | 5.26 | 5.41 | 5.58 | 5.33 | 5.39 | 2.22 | 50.0 | 101.5 | |
| 桔子 | 4.03 | 3.94 | 3.9 | 3.88 | 4.06 | 3.96 | 2.01 | 50.0 | 99.6 | |
| 梨子 | 2.24 | 2.38 | 2.41 | 2.29 | 2.3 | 2.3 | 3.00 | 50.0 | 98.8 | |

参 考 文 献

- [1] Hirotaka Kakita, Hiroshi Kamishima, Katsuo Komiya, et al. Journal of Chromatography A, 2002, 961: 77.
- [2] GENG Yue, ZHAO Xiang-xuan, HU A Yi-shan, et al(耿越, 赵相轩, 花义山, 等). Journal of Food Science(食品科学), 2002, 23(1): 114.
- [3] HASEN Qimuge, HE Feng-ga(哈森其木格, 贺锋嘎). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(3): 446.
- [4] HU Bin, CHEN Da, SU Qing-de(胡斌, 陈达, 苏庆德). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(7): 1049.
- [5] Danielson N D, Heenan C A, Haddadian F, et al. Microchemical Journal, 1999, 63(3): 405.
- [6] WANG Xi-cheng(王希成编著). Biochemistry(生物化学). Beijing: Tsinghua University Press(北京: 清华大学出版社), 2001.
- [7] GUO Zhen-chu, HAN Liang, HU Bo, et al(郭振楚, 韩亮, 胡博, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 963.
- [8] JIANG Yue-cheng, WANG Jian-ji, ZHUO Ke-lei, et al(蒋育澄, 王键吉, 卓克垒, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2003, 24(10): 1842.
- [9] Valerie Ralsimba, Jose Manuel Garcia Fernandez, Jacque Defaye, et al. Journal of Chromatography A, 1999, 844: 283.
- [10] Eduardo A, Borges da Silva, Antonio A, et al. Chemical Engineering Journal, 2006, 118: 168.

Fluorometric Determination of Fructose in the Presence of Glucose Using Zirconyl Chloride-Ammonium Chloride

TONG Lei¹, WANG Yan-xin¹, ZHAO Zhong-yi², JIN Ji-hong², GUO Xiao-hui²

1. School of Environmental Studies and Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology of Chinese Ministry of Education, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China
2. School of Material Science and Chemistry Engineering, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

Abstract According to the principle that $Zn(OH)^+$ produced by $ZrOCl_2$ upon hydrolysis in water can react to form a fluorescent derivative with fructose, a method for the quantitative determination of fructose has been proposed. The fluorescence of the derivative enhanced at 408 nm in NH_4Cl medium has a direct ratio with fructose in the linear range of $0.5-25 \mu g \cdot mL^{-1}$. When reaction conditions such as a temperature of $70^\circ C$ and a time of 15 min are used, the detection limits is $0.071 mg \cdot mL^{-1}$. The proposed method was also applied successfully to the determination of fruit, satisfaction with high accuracy and good reproduction.

Keywords Fructose; glucose; Chloride-ammonium chloride; Fluorometric

(Received May 10, 2006; accepted Aug. 20, 2006)