

文章编号:1673-1689(2009)04-0451-05

溴甲酚绿增色分光光度法测定 γ -环糊精

刘虹¹, 顾正彪^{*1,2}, 洪雁¹, 李兆丰²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了溴甲酚绿分光光度法定量测定 γ -环糊精的条件。在 pH 为 4.1 的酸性环境中, γ -环糊精使溴甲酚绿发生增色反应, 最大增色波长为 640 nm, 其增色程度(ΔA)与 γ -环糊精质量浓度在 0~0.3 g/L 的范围内成线性关系。回归方程为: $\Delta A = 1.0327C_{\gamma\text{-CD}}$ (g/L), 线性相关系数 R^2 为 0.9957。该方法具有很高的灵敏性, 表现摩尔吸光系数 $\xi_{640} = 1.7 \times 10^6 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, 对 γ -环糊精的检出限为 $7.3 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ 。样品平均实测回收率为 96%~101.3%, RSD 为 0.071%, 可用于 γ -环糊精的定量测定。

关键词: γ -环糊精; 溴甲酚绿; 分光光度法

中图分类号: TS 236.9

文献标识码: A

Hyperchromic Spectrophotometric Determination of γ -Cyclodextrin with Bromocresol Green

LIU Hong¹, GU Zheng-biao^{*1,2}, HONG Yan¹, LI Zhao-feng²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, a easy, economic and efficient determination method of γ -cyclodextrin (γ -CD) was developed based on the principle that γ -cyclodextrin (γ -CD) reacted with bromocresol green (BCG) to form BCG-(γ -CD) complexation at pH 4.1, which causes the hyperchromic of the BCG solution. The maximum hyperchromic wavelength is located at 640 nm. The optimum conditions of the reaction, the influencing factors and relationship between the hyperchromic intensity and the concentration of γ -CD has been investigated. The optimum conditions for measuring the γ -CD are as follows: pH 4.1, BCG concentration 5 mmol/L, room temperature and 20 min reaction time. The concentration of γ -CD is linear proportional to the degree of hyperchromic (ΔA) at the range of 0~0.3 g/L. The regression equation is $\Delta A = 1.0327C_{\gamma\text{-CD}}$ (g/L), the correlation coefficient is 0.9957. The method has high sensitivity and the maximum molar absorption coefficient (ξ_{640}) is $1.7 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, and the detection limit is $7.3 \times 10^{-4} \text{ g/L}$. The recovery is 96%~101.3%, RSD is 0.071%. The method with simplicity, stability system and good accuracy can be applied to the determination of γ -CD.

Key words: γ -cyclodextrin, bromocresol green, spectrophotometry

收稿日期: 2008-06-25

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10Z335)。

* 通讯作者: 顾正彪(1965-), 男, 江苏阜宁人, 工学博士, 教授, 博士生导师。主要从事食品资源的开发与利用。

Email: foodstarch@yahoo.cn

环糊精(cyclodextrin, 简称 CD)是由环糊精葡萄糖基转移酶催化淀粉或其相关的物质所得到的环状化合物,最常见的有 α -CD、 β -CD、 γ -CD 3种,分别由6、7、8个葡萄糖残基通过 α -1,4糖苷键连接而成^[1]。CD环外亲水、环内疏水的性质使其能与各种有机物作用形成稳定的复合物,改变有机物的某些性质,从而在食品、医药、农业、化工等领域都具有广泛的用途^[2-5]。

目前 β -CD的生产和应用量最大,其测定方法也比较完善^[6-13]。而 γ -CD由于制备过程存在产率低、成本高的问题,一直限制其商业化生产。但在这3种CD中, γ -CD内腔最大,具有更广泛的包埋客体分子的能力,并且其较高的水溶性、突出的乳化特性和安全性,使其在食品、制药和化妆品等领域具有很大的应用空间^[14-16]。

有关 γ -CD的测定方法仅Takashi^[17]有过研究,确定了以溴甲酚绿(简称BCG)为指示剂的分光光度法,但其对温度、反应时间等可能影响测定的因素以及测定范围未作研究,影响了测定结果的可靠性和准确性。国内对其测定方法的研究仍为空白。为了促进 γ -CD的发展,完善现有的测定方法显得非常必要。作者系统地研究了分光光度法定量测定 γ -CD的各操作参数及可能的干扰因素对测定的影响,并就测定的重复性、准确性作了深入的分析。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

UV-2000型紫外-可见分光光度计,尤尼柯上海仪器有限公司制。甘氨酸-氢氧化钠缓冲液,pH=8.5,浓度为0.2 mol/L; γ -CD标准溶液,sigma公司提供。柠檬酸缓冲液,pH=4.2,浓度为0.2 mol/L;溴甲酚绿(BCG)溶液用乙醇配制,浓度为5 mmol/L;盐酸,1 mol/L;所有试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

准确移取4 mL柠檬酸缓冲液、0.1 mL盐酸、0.2 mL BCG溶液和适量的 γ -CD标准溶液于试管中,立即混匀,静置20 min后,在640 nm处测定其吸光度(以缓冲液为参比)。其中,空白溶液不含 γ -CD,其余操作均相同。吸光度差值(ΔA)=样品吸光度(A)-空白溶液吸光度(A')。

2 结果与讨论

2.1 测定波长的选择

在紫外-可见分光光度计上分别对 γ -CD、BCG

及BCG-(γ -CD)复合物溶液在200~780 nm的波长范围内进行波长扫描,得吸收光谱(图1),并测得不同质量浓度的 γ -CD与BCG的反应产物的吸收光谱(图2),以及其在最适波长下的关系(图3)。由图1、图2可知,BCG溶液在酸性条件下呈现多个不同的吸收峰。当 γ -CD加入BCG溶液后,BCG溶液呈现增色效应,最大增色波长为640 nm。由图3可知,在640 nm下BCG的增色程度随 γ -CD质量浓度的增大而增大,且成线性关系。因此,选择640 nm作为测定波长。

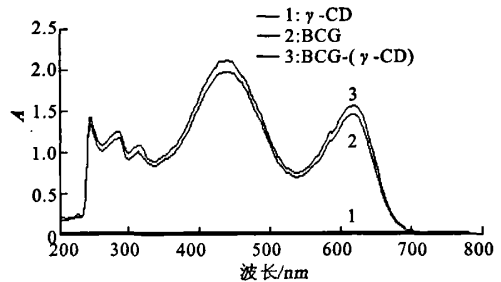


图1 γ -CD、BCG及BCG-(γ -CD)的吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of γ -CD, BCG and BCG-(γ -CD)

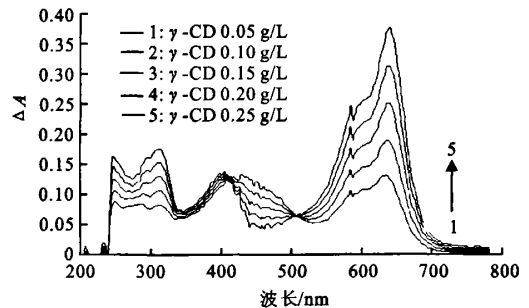


图2 γ -CD不同质量浓度时溴甲酚绿的吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra of BCG in different γ -CD concentrations

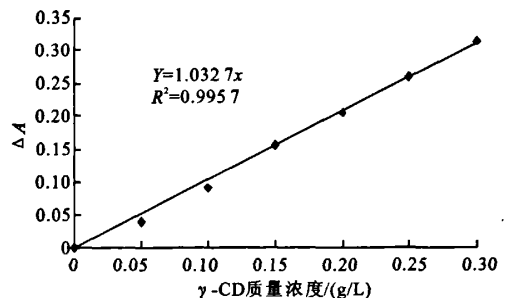


图3 γ -CD质量浓度与 ΔA 的关系

Fig.3 Relationship between the γ -CD concentration and ΔA

2.2 显色时间的确定

BCG-(γ -CD)体系达到稳定状态需要一段时间,期间样品的吸光度会随显色时间的增加而增加。以一定时间为间隔测定其吸光度,并以吸光度对显色时间作图,结果如图 4 所示。可知,在前 5 min BCG-(γ -CD)形成速度较快,吸光度增加较大,其后形成速率变得缓慢,吸光度增加程度也随之减小。显色 15 min,吸光度达到稳定,并在其后 15 min 内基本保持不变。实验选择 γ -CD 与 BCG 混合静置 20 min 后,再测定其吸光度。

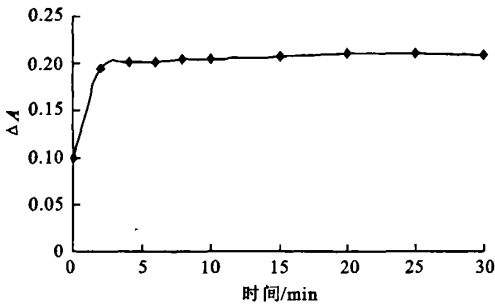


图 4 BCG-(γ -CD)形成速率及稳定性

Fig. 4 Rates of formation and stability of (γ -CD)-BCG inclusion complex

2.3 测定条件对 γ -CD 测定的影响

2.3.1 pH 对 γ -CD 测定的影响 加入 4 mL 不同 pH 值的柠檬酸缓冲液使体系呈不同的 pH 值,按试验方法测定其吸光度,并以 ΔA 对 γ -CD 质量浓度作图,结果如图 5 所示。可知,随着 pH 值的增大,测定曲线的斜率随之增大,即灵敏度升高。在 pH 值为 3.9~4.1 的环境中,曲线灵敏度接近并且较好。实验中选择控制 pH 值为 4.1,即在体系中加入 0.1 mL 1 mol/L 盐酸和 4 mL 柠檬酸缓冲液 (pH=4.2) 所得到的 pH 值。

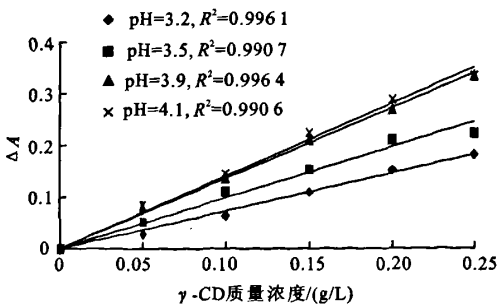


图 5 pH 对 γ -CD 测定的影响

Fig. 5 Effect of pH on determination of γ -CD

2.3.2 温度对 γ -CD 测定的影响 考察了在 0、16、25 $^{\circ}\text{C}$ 下的吸光度变化,从图 6 可知,实验中各温度下测定的标准曲线的线性关系和灵敏度都较好,因

此可在室温下进行,实验时保持标准曲线和样品的测定在同样温度下进行即可。

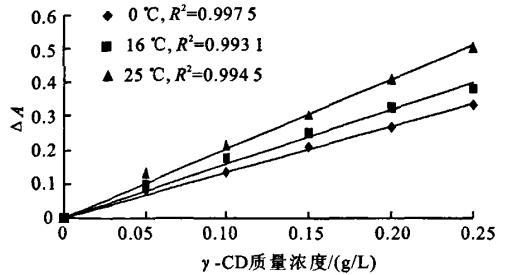


图 6 显色温度对 γ -CD 测定的影响

Fig. 6 Effect of temperature on determination of γ -CD

2.3.3 BCG 浓度对 γ -CD 测定的影响 加入不同浓度的 BCG 溶液,按实验方法测定其吸光度,并以 ΔA 对 γ -CD 质量浓度作图 7。结果表明,BCG 的浓度在 5~8 mmol/L 范围内时曲线灵敏度较好(曲线斜率都大于 1);而 BCG 的浓度在 1~4 mmol/L 范围内时则曲线灵敏度较弱(曲线斜率大都小于 1)。但是只有 BCG 浓度为 5 mmol/L 时所有样品的吸光值 A 都介于 0.2~0.8 之间,实验结果更可靠。因此,综合考虑实验选择 BCG 浓度为 5 mmol/L。

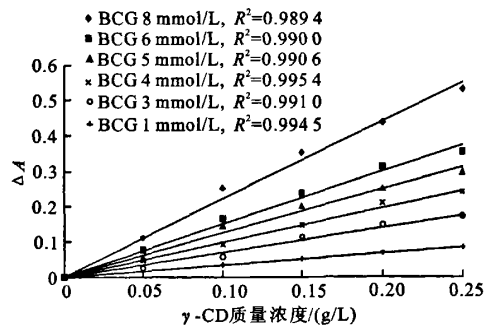


图 7 BCG 浓度对 γ -CD 测定的影响

Fig. 7 Effect of concentration of BCG on determination of γ -CD

2.4 校准曲线及检出限

在以上选定的测定条件下,按试验方法测定其吸光度,并以 ΔA 对 γ -CD 质量浓度作图 8。由图 8 可知:当测定 γ -CD 的质量浓度范围为 0~0.3 g/L 时, R^2 为 0.995 7;但当其质量浓度测定范围为 0~0.4 g/L 时, R^2 降低为 0.974 9。因此,实验确定 γ -CD 的线性测定范围为 0~0.3 g/L。校准曲线方程 $\Delta A = 1.032 7 C_{\gamma\text{-CD}} (\text{g/L})$,线性相关系数 R^2 为 0.995 7。表观摩尔吸收系数 ϵ_{640} 为 $1.7 \times 10^6 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$,检出限为 $7.3 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ 。

万方数据

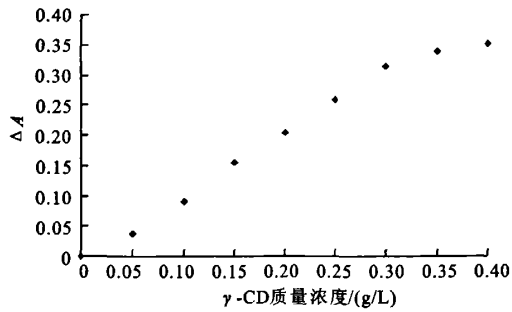


图8 γ-CD测定线性范围的确定

Fig. 8 Effect of concentration of γ-CD on linearity of its complex

2.5 干扰因素对γ-CD测定的影响

环糊精实际生产中其产物是α-CD、β-CD、γ-CD和糖类的混合物,为准确测定产物中γ-CD的含量,实验考察α-CD、β-CD和葡萄糖对γ-CD测定可能的影响。不同程度加入另外两种CD和葡萄糖等可能的干扰素,配成不同的混合溶液。按照实验方法测定其吸光度,并计算出相应的γ-CD的量,结果如表1所示。可知,测定误差均在4.5%以下(允许相对误差≤5%),各因素对γ-CD的测定干扰小,说明该方法测定γ-CD具有良好的选择性^[18]。

表1 不同干扰因素对γ-CD测定的影响

Tab. 1 Effect of various carbohydrates on the determination of γ-CD

γ-CD 质量浓度/ (mg/L)	β-CD 质量浓度/ (mg/L)	α-CD 质量浓度/ (mg/L)	葡萄糖 质量浓度/ (mg/L)	γ-CD测定值/ (mg/L)	误差/%
100	100	0	0	102.1±0.1	2.1
100	200	0	0	96.5±0.3	-3.5
100	2 000	0	0	101.2±0.3	1.2
100	0	100	0	104.1±0.1	4.1
100	0	200	0	101.3±0.3	1.3
100	0	2 000	0	96.2±0.2	-3.8
100	0	0	100	102.3±0.2	2.3
100	0	0	200	95.5±0.5	-4.5
100	0	0	2 000	96.3±0.3	-3.7
100	100	100	0	99.1±0.3	-0.9
100	200	200	0	99.2±0.1	-0.8
100	2 000	2 000	0	96.3±0.1	-3.7
100	100	100	100	98.5±0.1	-1.5
100	200	200	200	103.3±0.2	3.3
100	2 000	2 000	2 000	98.3±0.1	-1.7

注:所有实验数据均为3次平均值。

2.6 样品分析及标准加入回收实验

取10 mL实际生产中的混合环糊精母液放入100 mL的容量瓶中,定容至刻度。从中取样品溶液2 mL,按照实验方法进行γ-CD的测定,平行测定5次。再取5份2 mL的样品溶液,分别加入不同量的γ-CD标准溶液,测定样品的回收率,结果见表2。同时,采用高效液相色谱法测定样品中γ-CD的质量浓度,结果为(0.168±0.001)g/L。因此可得知本方法有较高的测量精密度、准确性,以及较好的回收率。

表2 γ-CD的测定及标准加入回收实验结果

Tab. 2 Determination results of γ-CD in tables and recovery

测定值/ (g/L)	RSD/% (n=5)	加入值/ (g/L)	测定值/ (g/L)	回收率/ %
		0.02	0.119±0.002	96.0
		0.04	0.140±0.001	100.0
0.169±0.002	0.071	0.06	0.159±0.001	98.3
		0.08	0.181±0.001	101.3
		0.1	0.199±0.002	99.0

3 结 语

在 pH 为 4.1, BCG 浓度为 5 mmol/L, γ -CD 质量浓度为 0~0.3 g/L 的条件下, γ -CD 与 BCG 混合后在室温下静置 20 min, 再在 640 nm 波长下进行

测定, 根据其吸光值的变化计算出相应的 γ -CD 的含量。这种方法专一性好, 不受其他因素的干扰; 形成相应的复合物迅速而稳定, 并且测定重复性好, 准确度高。因此可作为 γ -CD 工业化生产时测定的首选方法。

参考文献(References):

- [1] 童林荟. 环糊精化学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] Martin Del Valle E M. Cyclodextrins and their uses: a review[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 1033-1046.
- [3] Lajos Szente, Jozsef Szejtli. Cyclodextrins as food ingredients[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2004, 15: 137-142.
- [4] Thompson D O. Cyclodextrins-Enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1997, 14: 1-104.
- [5] Oakes J V, Shewmaker C K, Stalker D M. Production of cyclodextrins, a novel carbohydrate, in the tubers of transgenic potato plants[J]. *Biotechnology*, 1991(9): 982-986.
- [6] Kaneko T, Kato T, Nakamura N. Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin forming cyclodextrin glucanotransferase[J]. *Jpn Soc Starch Sci*, 1987, 34: 45-48.
- [7] 陈国亮, 柴华丽, 杨琦. β -CD 测定方法的研究[J]. 化学试剂, 1990, 12(5): 308-310.
CHEN Guo-liang, CHAI Hua-li, YANG Qi. Studies on the determination of β -cyclodextrin[J]. *Chemical Reagents*, 1990, 12(5): 308-310. (in Chinese)
- [8] 刘燕华. 分光光度法测定 β -CD[J]. 日用化学工业, 1990, 35(6): 35-37.
LIU Yan-hua. The quantitative determination of β -cyclodextrin by spectrophotometry[J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 1990, 35(6): 35-37. (in Chinese)
- [9] 邱细敏, 钱锋, 李志良. 酚酞作探针用于 β -CD 的分光光度法测定[J]. 化学世界, 1992, (3): 126-129.
QIU Xi-min, QIAN Feng, LI Zhi-liang. Determination of β -cyclodextrin by phenolphthalein used as probe[J]. *Chemical World*, 1992, (3): 126-129. (in Chinese)
- [10] 胡锦煜. 分光光度法测定微量 CD[J]. 淀粉与淀粉糖, 1992(4): 51-53.
HU Jin-yu. Determination of trace cyclodextrin by spectrophotometric methods[J]. *Starch and Starch Sugar*, 1992(4): 51-53. (in Chinese)
- [11] 李文德, 周俊侠, 张力田. 改进的酚酞分光光度法测定 β -CD[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 1995, 7(23): 35-39.
LI Wen-de, ZHOU Jun-xia, ZHANG Li-tian. Determination of β -cyclodextrin by modified phenolphthalein spectrophotometric methods[J]. *Journal of south China university of technology: Natural Science*, 1995, 7(23): 35-39. (in Chinese)
- [12] 李文德, 周俊侠, 张力田. 分光光度法测定 β -环糊精时条件变化对纯度分析的影响[J]. 中国粮油学报, 1995, 10(2): 39-43.
LI Wen-de, ZHOU Jun-xia, ZHANG Li-tian. Studies on β -cyclodextrin purity by phenolphthalein spectrophotometric methods[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 1995, 10(2): 39-43. (in Chinese)
- [13] 李明时, 张帆. β -CD 的分光光度测定[J]. 分析化学, 1998, 7(26): 912-914.
LI Ming-shi, ZHANG Fan. Determination of β -cyclodextrin by spectrophotometric methods[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1998, 7(26): 912-914. (in Chinese)
- [14] WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants[Z]. WHO Food Additives Series 42. Geneva: World Health Organization, 1999: 183-202.
- [15] Albers E, Muller B W. Cyclodextrin derivatives in pharmaceuticals[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1995(12): 311-337.
- [16] Koch J. Stabilization and controlled release of perfume in detergents[C]. Proceedings of the 1st International Symposium on Cyclodextrins. Budapest: [s. n.], 1981: 487-496.
- [17] Takashi kato, koki horikoshi. Colorimetric determination of γ -cyclodextrin[J]. *Analytical Chemistry*, 1984, 56: 1738-1740.
- [18] 阳泽平, 刘忠芳, 胡小莉, 等. 甲基绿褪色分光光度法测定维生素 K₃[J]. 分析化学, 2006, 34: 269-271.
YANG Ze-ping, LIU Zhong-fang, HU Xiao-li, et al. Fading spectrophotometric determination of vitamin K₃ with methyl green[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34: 269-271. (in Chinese)

(责任编辑: 秦和平)