

过氧化氢-茛三酮体系荧光光度法检测食品中的焦磷酸盐

熊海涛^{1,2}, 徐艺凤², 徐承娥²

(¹ 陕西理工大学 陕西省催化基础与应用重点实验室 陕西汉中 723001

² 陕西理工大学化学与环境科学学院 陕西汉中 723001)

摘要 摄入过多的焦磷酸盐会对人体健康产生严重影响,因此控制食品中焦磷酸盐的含量十分重要。在酸性介质中,Cu²⁺能催化过氧化氢-茛三酮体系间的氧化-还原反应而产生较强的荧光。当在该体系中加入少量焦磷酸盐后,Cu²⁺-H₂O₂-茛三酮体系的荧光强度显著减弱。基于此,建立一种荧光光度法检测焦磷酸盐含量。考察过氧化氢浓度、茛三酮浓度、Cu²⁺浓度、反应时间及反应温度等条件对荧光强度的影响。结果表明,最优条件为过氧化氢浓度 3.0×10⁻⁵ mol/L,茛三酮浓度 2.0×10⁻³ mol/L,Cu²⁺浓度 6.0×10⁻⁵ mol/L,反应时间 40 min,反应温度 30 ℃,在此条件下,减弱的荧光强度与焦磷酸盐浓度在 3.0×10⁻⁷~8.0×10⁻⁶ mol/L 范围内的对数值呈良好的线性相关。方法的检出限与相对标准偏差(RSD)分别为 3.2×10⁻⁸ mol/L,4.9%(C=1.0×10⁻⁶ mol/L,n=11)。采用该方法测定虾仁与带鱼样品中焦磷酸盐含量并做加标回收试验,平均回收率在 93.00%~97.80%范围,表明该方法可用于实际食品样品中焦磷酸盐含量的准确检测。

关键词 茛三酮; 过氧化氢; Cu(II); 焦磷酸盐; 荧光光度法

文章编号 1009-7848(2023)07-0374-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.038

作为一种生物功能组分,焦磷酸盐(Pyrophosphate,PPi)是三磷酸腺苷(ATP)及其它核苷酸的水解产物,在 DNA 和 RNA 的聚合反应与复制、部分酶促反应、能量传递、多种代谢等生命活动中扮演着重要角色,也可以作为临床诊断与治疗关节炎的一种潜在生物标志物^[1-3]。PPi 是一种食品添加剂,可以提高蛋白质成膜的几率,改善肉制品的品质和口味,增加肉制品的渗透能力,在一定程度上抑制肉制品褪色和变质,并能增加肉制品的弹性^[4]。而如果摄入过量的 PPi 可使钙磷聚合物大量产生,进而导致血管发生钙化^[5],甚至致癌^[6]。建立一种准确且灵敏的 PPi 检测方法,对保证食品安全及临床诊断十分重要。

目前,检测 PPi 的方法主要有比色法^[7-9]、色谱分析法^[10-11]、荧光光度法^[12-15]、生物发光法^[16]、化学发光法^[17-18]及电化学分析法^[19-21]等。其中,荧光光度分析法具有操作简单,灵敏度与准确度较高等优点,受到较多关注。近些年,利用荧光光度法测定实际样品中 PPi 含量的方法主要有两种^[22]:1)设计

并合成有机荧光探针,以选择性识别与检测 PPi^[23-24];2)利用金属离子与合成的荧光探针及 PPi 之间的竞争反应,以实现少量 PPi 的高灵敏检测^[25]。然而,荧光探针大多需要特殊设计,而且合成过程较为复杂,分离繁琐、费时,成本较高,因此其应用受到一定的限制。

本研究采用具有微弱荧光的茛三酮-过氧化氢混合体系为基底反应物,通过在基底液中加入具有催化活性的 Cu²⁺,使体系的荧光强度增强。当体系中加入少量的 PPi 后,基于 Cu²⁺能与 PPi 形成稳定的配离子,使催化体系的荧光强度降低,从而建立一种新型荧光光度法,以检测食品中焦磷酸盐含量。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

虾仁与带鱼样品均购自汉中市水产品市场。

冰乙酸(99.5%),天津市登峰化学试剂厂;无水乙酸钠,天津市化学试剂六厂;过氧化氢(30%),成都市科龙化学品有限公司;焦磷酸钠,天津市同鑫化工厂;茛三酮,天津市大貌学试剂厂;硫酸铜,天津市天力化工有限公司。试验用水如无特别说明,均为超纯水,固体试剂均为分析纯级。

收稿日期: 2022-07-12

基金项目: 陕西省科技厅自然科学基金项目(2018JQ2057);
国家级大学生创新创业训练计划项目(202110720022)

第一作者: 熊海涛,男,博士,副教授

E-mail: xhtao2008@126.com

乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH 5.5);硫酸铜溶液(1.0×10^{-3} mol/L); H_2O_2 (1.0 mol/L); 茛三酮溶液(1.0×10^{-2} mol/L)。焦磷酸钠储备液(1.0×10^{-2} mol/L): 在电子天平上准确称量 0.2660 g 焦磷酸钠固体,用超纯水溶解,并定容于 100 mL 容量瓶中,摇匀。

1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅(KQ-700VDE 型),北京科伟水兴仪器有限公司;粉碎机(FW-80 型),郑州科丰仪器设备有限公司;电子天平(AR124CN 型),奥豪斯仪器(上海)有限公司;荧光分光光度计(F-4600 型),日立高新技术公司;烘箱(MH-1000 型),北京科伟永兴仪器有限公司;马弗炉(KRD-16CMA 型),山东科瑞达电炉有限公司。

1.3 样品预处理

首先,将适量虾仁与带鱼用水洗净,虾仁置于 60 °C 烘箱中烘干,切碎并研磨成粉末,备用。将带鱼低温冷冻 24 h,取可食用部分,剪成小块状用粉碎机彻底搅碎,充分搅拌混匀,备用。取上述两种样品各 2.5000 g,分别置于 2 个瓷坩埚中,通过电炉加热使其碳化,再将二者于马弗炉(600 °C)内灰化 6 h。冷却至室温,将其分别转移至 2 只烧杯中,并加入少量 NaOH 与超纯水使其全部溶解,加入活性炭并搅拌 8 min,静置 30 min。最后,依次使用滤纸、0.45 μ m 及 0.22 μ m 滤膜各过滤 1 次,将获得的透明样品溶液用醋酸-醋酸钠缓冲溶液稀释至 10 mL。以同样的方法,虾仁与带鱼各平行处理 2 份。

1.4 试验方法

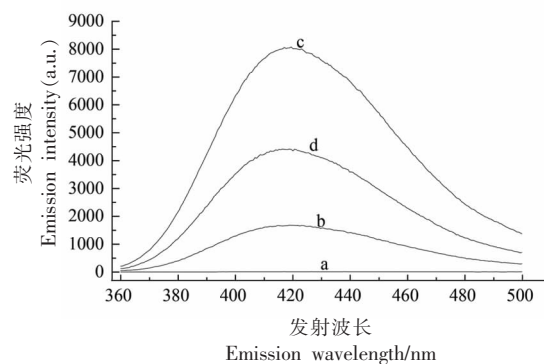
取两支 25 mL 的比色管依次编号 1、2,各加入 5.0 mL 茛三酮(1.0×10^{-2} mol/L)溶液,1 号比色管中加入 0.5 mL 过氧化氢及 0.5 mL 的硫酸铜溶液储备液,然后用 pH 为 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液定容至刻度线,2 号比色管加入 0.5 mL 过氧化氢,0.5 mL 的硫酸铜溶液储备液及一定浓度的焦磷酸钠溶液,然后用相同的缓冲溶液定容至刻度线,每支比色管摇匀,再静置 30 min 后,用 F-4600 荧光光度计以 310 nm 为激发波长测定茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} (F_1)、茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -PPi(F_2)两个不同反应体系的荧光发射光谱。然后,在 421 nm 的发射波长处,以降低的荧光强度($\Delta F = F_1 - F_2$)

对标准系列 PPi 浓度的对数值作图,以对食品样品中的焦磷酸盐含量进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 不同体系荧光光谱的研究

按照 1.4 节的试验方法,分别测定茛三酮-缓冲液、茛三酮- H_2O_2 -缓冲液、茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -缓冲液、茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -PPi-缓冲液 4 个反应体系的荧光发射光谱(固定其激发波长均为 310 nm)。如图 1 所示,4 种体系的荧光发射波长均为 421 nm,茛三酮-缓冲溶液体系(曲线 a)无明显的荧光产生,茛三酮- H_2O_2 -缓冲溶液体系(曲线 b)荧光强度为 1 685,这可能是由于茛三酮与 H_2O_2 之间的氧化产物具有微弱的荧光特性;而茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -缓冲溶液体系(曲线 c)的荧光强度为 8 077,说明 Cu^{2+} 在酸性介质下能显著催化茛三酮- H_2O_2 之间的氧化还原反应而获得较高的荧光强度,这与文献[26]报道相一致。而当茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -缓冲溶液加入少量的 PPi 后(曲线 d),体系的荧光强度变为 4 415,这可能是由于加入的 PPi 与反应体系中的 Cu^{2+} 稳定结合,而生成焦磷酸合铜(II)配离子,使茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} 体系的荧光强度显著减弱。结合已报道的文献[26]~[28],推测 PPi 的检测原理如图 2 所示,当体系中没有 PPi 存



注: a. 茛三酮-缓冲液; b. 茛三酮- H_2O_2 -缓冲液; c. 茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -缓冲液; d. 茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -PPi-缓冲液; C (茛三酮) = 2.0×10^{-3} mol/L; C (Cu^{2+}) = 4.0×10^{-5} mol/L; C (PPi) = 4.0×10^{-5} mol/L; C (H_2O_2) = 3.0×10^{-5} mol/L; pH = 5.5; 温度: 25 °C; 时间: 30 min。

图 1 不同体系荧光发射光谱图

Fig.1 Fluorescence emission spectrums of different systems

在时, Cu^{2+} 能催化过氧化氢氧化茛三酮而产生大量的氧化产物, 该氧化产物在 310 nm 的激发波长下, 具有非常强的荧光发射波长($\lambda_{\text{EM}}=421 \text{ nm}$)。而当在 Cu^{2+} -过氧化氢-茛三酮体系中加入少量 PPI 后, 基于 PPI 能与 Cu^{2+} 形成稳定的 $[\text{Cu}(\text{PPI})_2]^{6-}$ 而使体系中游离态的 Cu^{2+} 数目大量减少, 从而减弱了

体系中的催化-氧化反应程度, 致使茛三酮的氧化产物量减少, 此时仅能在 421 nm 的发射波长($\lambda_{\text{EX}}=310 \text{ nm}$)处检测到 1 个较弱的荧光发射。根据 PPI 存在前、后, Cu^{2+} -过氧化氢-茛三酮体系荧光发射的显著差异, 可研发一种新的阻抑荧光光度法对实际样品的 PPI 进行准确检测。

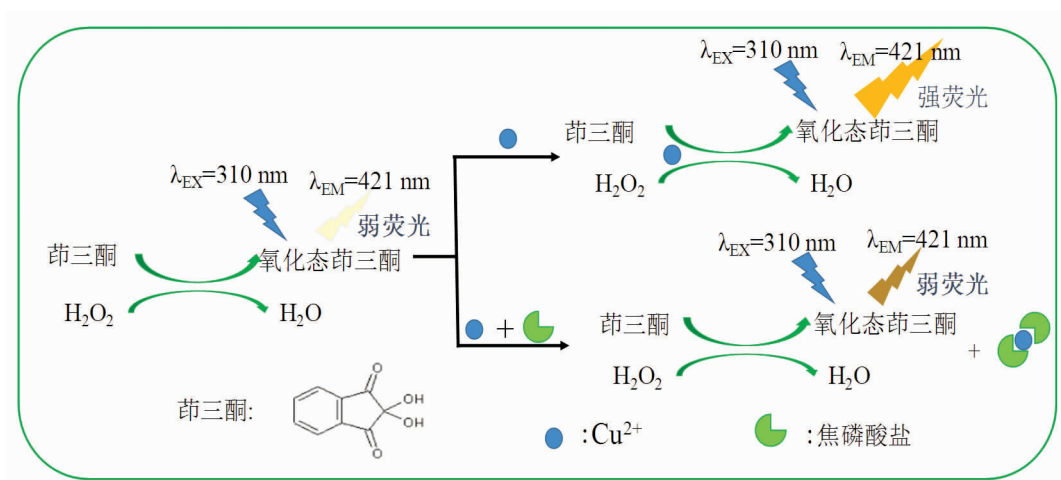


图2 检测 PPI 的原理说明图

Fig.2 Schematic illustration of the mechanism for the determination of PPI

2.2 试验条件优化

2.2.1 过氧化氢浓度的选择 考察过氧化氢浓度 (4.0×10^{-6} , 6.0×10^{-6} , 8.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} , 2.0×10^{-5} , 3.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} , $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 对选定体系荧光强度的影响。由图 3 可知, 随着过氧化氢浓度的增加, 相对荧光强度先增强后减弱; 当过氧化氢浓度为 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, 体系的荧光降低幅度最大; 当过氧化氢的浓度小于 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, 随着过氧化氢浓度的增加, 体系的相对荧光强度逐渐增大。可能是由于较低浓度的过氧化氢导致体系间的氧化还原反应较弱, 随着过氧化氢浓度的增加, 体系的相对荧光强度增强。而当过氧化氢的浓度大于 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, 体系的相对荧光强度有所减弱, 这可能是由于随着过氧化氢浓度的持续增大, 体系的荧光空白信号与标准溶液荧光信号均增加, 而少量的 Cu^{2+} 与 PPI 对体系的荧光特性影响较小。因此, 确定过氧化氢的最佳浓度为 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

2.2.2 最佳时间的选择 设置茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} 及茛三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -PPI 两种体系溶液均反应 5,

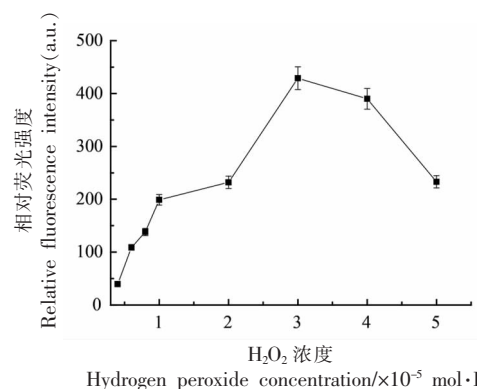


图3 不同过氧化氢浓度对体系荧光强度的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of hydrogen peroxide on the relative fluorescence intensity

10, 15, 20, 30, 40, 50 min 后进行荧光光谱扫描。由图 4 可知, 在两种体系各自反应 40 min 时, 相对荧光强度达到最大值, 再延长反应时间, 荧光信号减小的程度基本保持不变。这说明 PPI 与 Cu^{2+} 在 40 min 时反应完全。因此, 确定最佳反应时间为 40 min。

2.2.3 茚三酮浓度的选择 加入不同浓度 (2.0×10^{-4} , 4.0×10^{-4} , 6.0×10^{-4} , 8.0×10^{-4} , 1.0×10^{-3} , 2×10^{-3} , 3×10^{-3} , 4.0×10^{-3} mol/L) 的茚三酮, 其它反应条件不变, 对茚三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} 及茚三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -PPi 两种体系荧光光谱扫描。由图 5 可知, 随着茚三酮浓度的增加, 相对荧光强度先增强后减弱, 这可能

是由于过低浓度的茚三酮会得到较弱的荧光发射峰值, 而过高浓度的茚三酮会使少量焦磷酸根存在, 恢复的体系荧光发射不明显, 而当茚三酮浓度为 2.0×10^{-3} mol/L 时荧光强度减弱程度最大。因此, 确定茚三酮的最佳浓度为 2.0×10^{-3} mol/L。

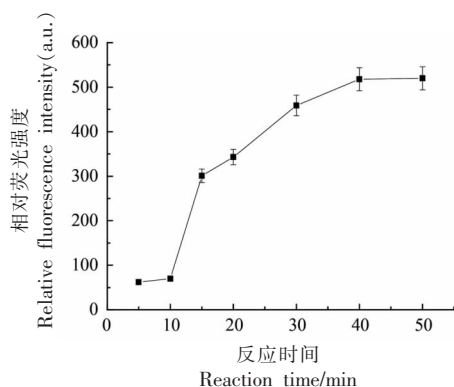


图 4 不同反应时间对体系相对荧光强度的影响

Fig.4 Effect of reaction time on the relative fluorescence intensity

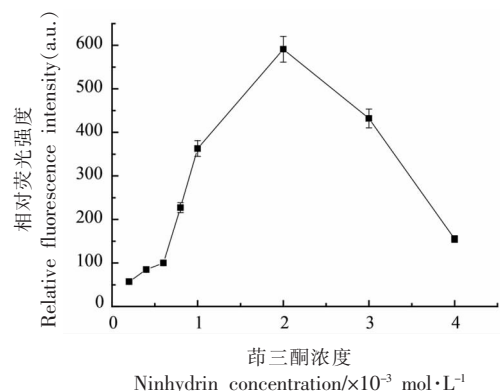


图 5 不同茚三酮浓度对荧光减弱程度的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of ninhydrin on the decreasing fluorescence intensity

2.2.4 Cu^{2+} 浓度的选择 在其它反应条件不变的情况下, 考察不同 Cu^{2+} 浓度 (1.0×10^{-5} , 2.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} , 6.0×10^{-5} , 8.0×10^{-5} mol/L) 对茚三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} 及茚三酮- H_2O_2 - Cu^{2+} -PPi 两种反应体系荧光强度的影响。如图 6 所示, 随着 Cu^{2+} 浓度的增大, 体系的相对荧光强度呈先增大后减小的趋势; 当 Cu^{2+} 浓度为 6.0×10^{-5} mol/L 时, 体系的荧光强度下降最大; 当 Cu^{2+} 浓度超过 6.0×10^{-5} mol/L 时, 体系的荧光强度变化有所减弱。这可能是由于 Cu^{2+} 浓

度过高会导致体系的空白荧光信号较强, 而少量的 PPi 加入反应体系后, 形成稳定的 $[\text{Cu}(\text{P}_2\text{O}_7)_2]^{4-}$ 较少而不足以影响的催化体系的荧光强度。故确定 Cu^{2+} 浓度为 6.0×10^{-5} mol/L。

2.2.5 反应温度的选择 在固定上述条件的情况下, 考察不同温度 (10, 20, 30, 40, 50, 60 $^{\circ}\text{C}$) 对反应体系荧光强度的影响。由图 7 可知, 随着温度的升高, 荧光的降低强度呈先增加后减弱的趋势, 在 10~30 $^{\circ}\text{C}$ 时, 随着温度的升高, 反应体系的荧光强

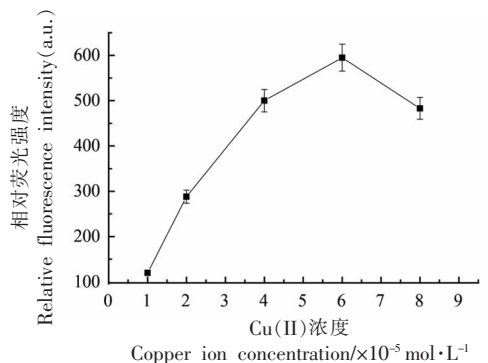


图 6 Cu^{2+} 浓度对体系相对荧光信号的影响

Fig.6 Effect of Cu^{2+} concentration on the relative fluorescence signal

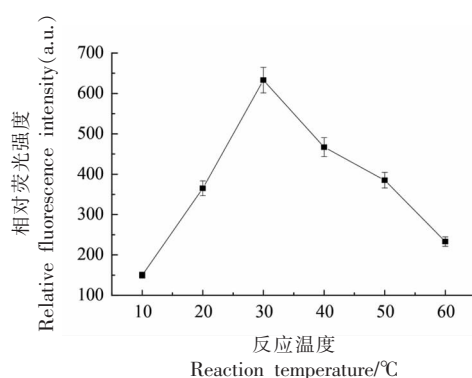


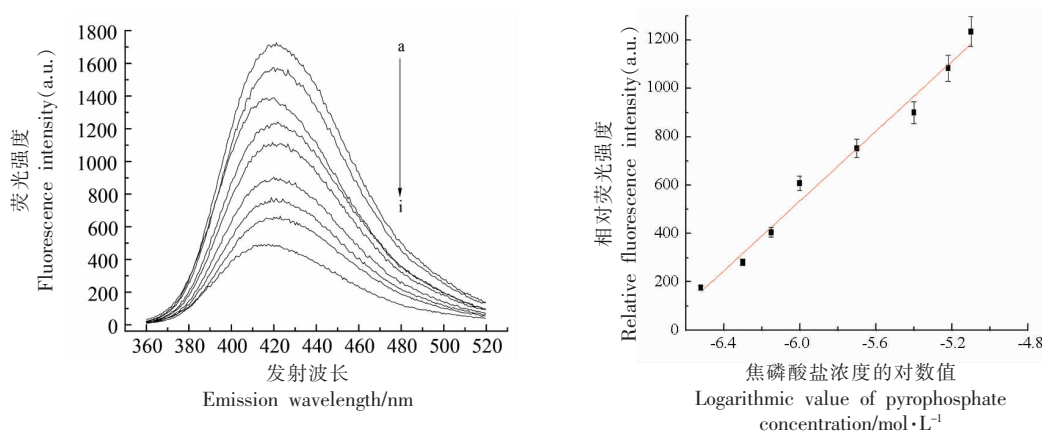
图 7 反应温度对体系相对荧光强度的影响

Fig.7 Effect of reaction temperature on the relative fluorescence intensity

度降低程度增强,这可能是由于反应温度升高促进了该反应体系的反应效率;在30~60℃时,随着温度的升高,体系的相对荧光强度呈下降趋势,这可能是由于反应温度过高会使 Cu^{2+} 与PPi之间的配位效应减弱。因此,确定30℃时对体系进行荧光光谱扫描。

2.3 优化方法的分析特性

在上述优化的试验条件下,降低的荧光强度



注:分图(a)中的a~i分别为 $0, 3.0 \times 10^{-7}, 5.0 \times 10^{-7}, 7.0 \times 10^{-7}, 1.0 \times 10^{-6}, 2.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6}, 6.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}$ mol/L。

图8 不同PPi浓度的荧光发射光谱(a)与校准曲线(b)

Fig.8 Fluorescence emission spectrums (a) in the presence of different concentrations of PPi and calibration curve (b)

2.4 干扰组分的考察

在最优的试验条件下(过氧化氢浓度为 3.0×10^{-5} mol/L, 茚三酮浓度为 2.0×10^{-3} mol/L, Cu^{2+} 浓度为 6.0×10^{-5} mol/L, 反应时间为40 min, 反应温度为30℃), 固定加入PPi的浓度为 1.0×10^{-6} mol/L, 保证相对误差的绝对值不超过5%, 考察共存组分对本方法测定焦磷酸根离子的干扰情况。结果表明, 200倍的 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- , 100倍的淀粉、 SO_4^{2-} , 50倍的三聚磷酸盐、多聚磷酸盐, 10倍的半胱氨酸、 PO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 均对PPi的检测均无

干扰。

2.5 样品测定及回收率验证

在最优的试验条件下(过氧化氢浓度为 3.0×10^{-5} mol/L, 茚三酮浓度为 2.0×10^{-3} mol/L, Cu^{2+} 浓度为 6.0×10^{-5} mol/L, 反应时间为40 min, 反应温度为30℃), 准确移取1.3节处理的两种样品各1.0 mL, 按照1.4节的试验方法测定虾仁与带鱼样品处理液中焦磷酸盐的含量, 并分别加入适量的PPi标准液进行加标回收试验, 测定结果见表1。虾仁与带鱼样品中焦磷酸盐的含量分别为 6.23×10^{-3} ,

表1 样品分析与回收率测定结果($n=3$)

Table 1 Sample analysis and recovery results ($n=3$)

样品	样品测定值		加标量/ mol·L ⁻¹	测定总值/ mol·L ⁻¹	相对标准偏差/ %	回收率/%
	相对含量/mol·L ⁻¹	绝对含量/g·kg ⁻¹				
虾仁	3.58×10^{-7}	6.23×10^{-3}	3.00×10^{-7}	6.42×10^{-7}	4.8	94.67
			4.00×10^{-7}	7.45×10^{-7}	3.6	96.75
带鱼	4.11×10^{-7}	7.15×10^{-3}	4.00×10^{-7}	7.83×10^{-7}	4.3	93.00
			5.00×10^{-7}	9.00×10^{-7}	4.5	97.80

7.15×10^{-3} g/kg, 均低于欧美国家要求的最高限量 (<0.5 g/kg)^[10], 加标回收率在 93.00%~97.80% 之间, 其相对标准偏差均小于 4.8%。这说明本试验所述方法具有较高的准确度与精密度。

3 结论

本文利用 Cu^{2+} 与 PPI 的配位作用强于 Cu^{2+} 与茛三酮之间的相互作用, 在一定程度上减弱了 Cu^{2+} 对茛三酮- H_2O_2 体系氧化还原反应的催化作用, 使选择体系的荧光强度明显减弱。设计了一种荧光光度法检测焦磷酸盐含量的新方法, 采用此方法检测虾仁与带鱼样品中焦磷酸盐含量, 二者的平均回收率分别为 95.71% 和 95.40%。该测定方法试剂廉价, 灵敏度与准确度较高, 有望为食品样品中焦磷酸盐的含量分析提供一定的数据参考。

参 考 文 献

- [1] LEE S Y, YUEN K K Y, JOLLIFFE K A, et al. Fluorescent and colorimetric chemosensors for pyrophosphate[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(7): 1749-1762.
- [2] MESQUITA L M, ANDRE V, ESTEVES C V, et al. Dinuclear zinc (II) macrocyclic complex as receptor for selective fluorescence sensing of pyrophosphate[J]. *Inorganic Chemistry*, 2016, 55(5): 2212-2219.
- [3] KIM S K, LEE D H, HONG J I, et al. Chemosensors for pyrophosphate[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2009, 42(1): 23-31.
- [4] 许道光, 程金妹, 戴四发. 焦磷酸盐与氯化钠腌制对牛肉色泽品质的影响[J]. *肉类工业*, 2016, 28(5): 15-21.
XU D G, CHENG J M, DAI S F. Effect of pickling by pyrophosphate and sodium chloride on quality and color of beef[J]. *Meat Industry*, 2016, 28(5): 15-21.
- [5] MOOCHHALA S H, SAYER J A, CARR G, et al. Renal calcium stones insights from the control of bone mineralization[J]. *Experimental Physiology*, 2008, 93(1): 43-49.
- [6] TIMMS A E, ZHANG Y, RUSSELL R G G, et al. Genetic studies of disorders of calcium crystal deposition[J]. *Rheumatology*, 2002, 41(7): 725-729.
- [7] XIA W Q, ZHANG P, FU W S, et al. Aggregation/dispersion-mediated peroxidase-like activity of MoS_2 quantum dots for colorimetric pyrophosphate detection[J]. *Chemistry Communication*, 2019, 55(1): 2039-2042.
- [8] CHEN C Y, TAN Y Z, HSIEH P H, et al. Metal-free colorimetric detection of pyrophosphate ions by inhibitive nanozymatic carbon dots[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(5): 1314-1324.
- [9] CUI F J, YIN G M, YANG R, et al. A colorimetric chemosensor for pyrophosphate based on monopyrenylurea in aqueous media[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 241(11): 118658.
- [10] 钟志雄, 李攻科. 离子色谱法测定海产品中磷酸盐、焦磷酸盐、偏磷酸盐和总磷[J]. *色谱*, 2009, 127(4): 499-504.
ZHONG Z X, LI G K. Determination of phosphate, pyrophosphate, metaphosphate and total phosphorus in sea foods by ion chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2009, 127(4): 499-504.
- [11] 胡波, 马航, 万邦隆, 等. 离子色谱法同时测定焦磷酸腺苷中磷酸盐和焦磷酸盐[J]. *理化检验-化学分册*, 2020, 56(2): 229-231.
HU B, MA H, WAN B L, et al. Simultaneous determination of phosphate and pyrophosphate in piperazine pyrophosphate by ion chromatography[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis*, 2020, 56(2): 229-231.
- [12] 李小琴, 袁芳, 曹根霞, 等. 基于碳量子点光活性模拟酶性能灵敏检测焦磷酸根离子[J]. *分析测试学报*, 2017, 36(6): 794-799.
LI X Q, YUAN F, CAO G X, et al. Sensitive detection of pyrophosphate using a novel colorimetric sensor based on carbon quantum dots photocatalytic mimic enzyme activity[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2017, 36(6): 794-799.
- [13] YANG S J, FENG W Y, FENG G Q, et al. Development of a near-infrared fluorescent sensor with a large Stokes shift for sensing pyrophosphate in living cells and animals[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1034(11): 119-127.
- [14] 周思慧, 李琼, 张婷, 等. 基于碳点的荧光纳米开关灵敏检测 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子和焦磷酸盐[J]. *高等学校化学学报*, 2019, 40(8): 1593-1599.
ZHOU S H, LI Q, ZHANG T, et al. Luminescent

- nanoswitch based on carbon dots for sensitive detection of Cu(II) ions and pyrophosphates[J]. *Chemical Journal of Chinese University*, 2019, 40(8): 1593–1599.
- [15] AL-MASHRIQI H S, ZHENG H H, QI S D, et al. Gold nanoclusters reversible switches based on aluminum ions-triggered for detection of pyrophosphate and acid phosphatase activity[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2021, 1242(10): 130755–130762.
- [16] MARQUES S M, PERALTA F, SILVA J C G E. Optimized chromatographic and bioluminescent methods for inorganic pyrophosphate based on its conversion to ATP by firefly luciferase[J]. *Talanta*, 2009, 77(4): 1497–1503.
- [17] NAKAMURA H, YAMAZAKI R, SHIRAI T, et al. Development of an enzymatic flow-injection chemiluminescence system for determining inorganic pyrophosphate ion[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 518(1): 45–49.
- [18] LI F, LIU Y T, ZHUANG M, et al. Biothiols as chelators for preparation of *N*-(aminobutyl)-*N*-(ethylisoluminol)/Cu²⁺ complexes bifunctionalized gold nanoparticles and sensitive sensing of pyrophosphate ion[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(20): 18104–18111.
- [19] LIN Y Q, HU L L, LI L B, et al. Electrochemical determination of pyrophosphate at nanomolar levels using a gold electrode covered with a cysteine nanofilm and based on competitive coordination of Cu(II) ion to cysteine and pyrophosphate[J]. *Microchimica Acta*, 2015, 182(1): 2069–2075.
- [20] XU W W, SHAO C M, PANG J J, et al. Electrochemical method of pyrophosphate determination by quinone reduction[J]. *Electrochimica Acta*, 2019, 300(3): 171–176.
- [21] XU H F, ZHU XI, DONG Y Q, et al. Highly sensitive electrochemiluminescent sensing platform based on graphite carbon nitride nanosheets for detection of pyrophosphate ion in the synovial fluid[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 236(11): 8–15.
- [22] XU X C, ZOU X B, WU S W, et al. In situ formation of fluorescent polydopamine catalyzed by peroxidase-mimicking FeCo-LDH for pyrophosphate ion and pyrophosphatase activity detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1053(4): 89–97.
- [23] MIKATA Y J, UGAI A, OHNISHI R, et al. Quantitative fluorescent detection of pyrophosphate with quinoline-ligated dinuclear zinc complexes[J]. *Inorganic Chemistry*, 2013, 52(18): 10223–10225.
- [24] WANG J F, LIU X M, PANG Y. A benzothiazole-based sensor for pyrophosphate (PPi) and ATP: mechanistic insight for anion-induced ES IPT turn-on[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(8): 6634–6638.
- [25] XUE W Z, HAN X F, ZHAO X L, et al. An AIRE-active far-red ratiometric fluorescent chemosensor for specifically sensing Zn²⁺ and resultant Zn²⁺ complex for subsequent pyrophosphate detection in almost pure aqueous media[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 263(12): 120169–120178.
- [26] 苏美红, 封满良, 章竹君. 一种测定痕量铜(II)的荧光新体系[J]. *分析化学*, 2000, 28(4): 446–448.
- SU M H, FENG M L, ZHANG Z J. A new system for the determination of trace copper (II) by fluorimetry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 28(4): 446–448.
- [27] ZHOUY, ZHANG G M, XU T, et al. Silk fibroin-confined star-shaped decahedral silver nanoparticles as fluorescent probe for detection of Cu²⁺ and pyrophosphate[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020, 6(5): 2770–2777.
- [28] CHEN C, RUAN G T, SUN Y J, et al. In situ Cu²⁺-triggered wavelength-tunable fluorescent sensor for highly sensitive sensing inorganic pyrophosphatase activity and its logic gate application[J]. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 2021, 346(11): 130439–130446.

Fluorescence Spectrophotometric Method for the Detection of Pyrophosphates in Food Samples with Hydrogen Peroxide–Ninhydrin System

Xiong Haitao^{1,2}, Xu Yifeng², Xu Cheng²

(¹Shaanxi Key Laboratory of Catalysis, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi

²School of Chemical & Environmental Sciences, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi)

Abstract Pyrophosphate can seriously affect human health. Therefore, it is necessary to control the content of pyrophosphate in food. In the acid medium, copper ion (Cu^{2+}) can effectively catalyze the redox reaction between hydrogen peroxide and ninhydrin, leading to produce a strong fluorescence. When a small amount of pyrophosphate was added into the hydrogen peroxide–ninhydrin system, the above–mentioned fluorescence was obviously reduced. Based on this observation, a fluorescence strategy for the quantitative analysis of pyrophosphate was developed. Several experiment parameters, such as hydrogen peroxide concentration, ninhydrin concentration, Cu^{2+} concentration, reaction time and reaction temperature were optimized to investigate the effect of these factors on the fluorescence intensity. The result showed that, the optimized experimental conditions was set as follows: 3.0×10^{-5} mol/L of hydrogen peroxide, 2.0×10^{-3} mol/L of ninhydrin 6.0×10^{-5} mol/L of copper ion, 40 min of reaction time and reaction temperature at 30 °C. Under the conditions, the relative fluorescence intensity displayed a good linear relationship with the logarithm value of pyrophosphate concentration in the range of 3.0×10^{-7} – 8.0×10^{-6} mol/L. And the detection limit and the relative standard deviation were 3.2×10^{-8} mol/L and 4.9% ($C=1.0 \times 10^{-6}$ mol/L, $n=11$), respectively. The content of pyrophosphate in the shelled shrimp and hairtail samples were quantified by the proposed method, and the average recoveries were between 93.00% and 97.80%. This result showed that the developed method can be applied in the accurate detection of pyrophosphate content in the practical food samples.

Keywords ninhydrin; hydrogen peroxide; copper ion; pyrophosphate; fluorescence spectrophotometric