

Triton X-100 微乳液中铈与 L-色氨酸荧光反应的研究与应用

龚爱琴^{1,2}, 朱霞石^{1*}, 郭 荣¹, 马晓芹¹

1. 扬州大学化学化工学院, 江苏 扬州 225002

2. 扬州工业职业技术学院, 江苏 扬州 225002

摘 要 研究了 Triton X-100 微乳液 (Triton X-100 M) 对荧光法测定 L-色氨酸的增敏作用。在酸性条件中 Ce^{4+} 可将色氨酸氧化为强荧光性物质, 以此为基础建立了分析色氨酸的新方法。与 Triton X-100 胶束相比, Triton X-100 微乳液对荧光法测定 L-色氨酸具有更好的增敏作用, 在该介质中测定灵敏度提高了 225 倍。实验中对影响荧光测定的各种因素进行了优化, 同时考察了共存离子的干扰并做了回收试验, 对荧光增敏机理也进行了初步探讨。试验结果表明: 在优化条件下, 色氨酸浓度在 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与荧光强度成线性关系, 其线性方程为 $F = 342.37 + 30.45c$, $r = 0.9984$, 检出限为 $0.09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在优化参数条件下, 对实际样品进行分析, 结果令人满意。

关键词 L-色氨酸; 荧光分析; 微乳液; 增敏作用

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)04-0900-04

引 言

L-色氨酸是重要的氨基酸, 是人体和动物生命活动中必需的氨基酸之一, 广泛应用于医药、食品和饲料等方面。近年来发现, L-色氨酸不只是用于静脉营养输液, 对于抑郁症、失眠症、高血压及止痛等亦有良效, 在欧美一些国家已广泛应用于临床^[1]。色氨酸长期缺乏, 临床上会引发粗糙病, 严重者甚至会造成死亡。与生命科学紧密相关的手性氨基酸同人类某些疾病的发展有着密切的关系, 近年来已成为研究的热点^[2]。测定色氨酸的方法主要有荧光法^[3], 色谱法^[4], 电化学法^[5], 毛细管电泳法^[6, 7], 分光光度法^[8], 流动注射化学发光法^[11]等。

微乳液一般是由表面活性剂、助表面活性剂、油、水等组分在适当比例下组成的无色、透明(或半透明)、低粘度的热力学稳定体系。我们先前的研究工作表明: 由于其具有超低界面张力和很高的增溶能力, 作为胶体缔合结构之一的微乳液对分光光度分析具有增敏作用。与表面活性剂胶束体系相比, 微乳液具有更好的增溶、增敏及增稳作用, 能改善反应条件, 拓宽光谱分析的应用范围^[9-12]。我们曾将非离子型微乳液用荧光猝灭法测定痕量镍^[13], 阳离子微乳液 8-羟基喹啉体系荧光法测定铝^[14], 非离子型微乳液 ICP-AES 测定铂族元素^[15], 但微乳液增敏荧光法测定氨基酸尚未见报

道。本文研究了 Triton X-100 微乳液介质对荧光法测定 L-色氨酸的增敏作用, 酸性条件中 Ce^{4+} 可将色氨酸氧化为强荧光性物质, 以此为基础建立了分析色氨酸的新方法。本法操作简便, 稳定性和选择性好, 用于样品中 L-色氨酸的直接测定, 取得了令人满意的结果。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

Ce^{4+} 标准贮存液 ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 准确称取硫酸铈 0.0404 g 于烧杯中, 加少量水, 浓硫酸 $1 \sim 2 \text{ mL}$, 转移入 100 mL 的容量瓶中, 摇匀, 冷却, 定容至刻度; L-色氨酸贮存液 ($5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$): 称取 0.0275 g L-色氨酸固体, 将其溶解于 50 mL 蒸馏水中。用时稀释 100 倍; $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液: 取 98% 浓硫酸 2.2 mL , 用蒸馏水稀释至 400 mL ; Triton X-100 微乳液 (Triton X-100 M) 为, Triton X-100: 正丁醇: 正庚烷: 水 = $10: 4: 1: 85$ (质量比); Triton X-100 胶束 (Triton X-100 M-m) 为, Triton X-100: 水 = $10: 90$ (质量比); RF-4500 荧光光度计 (日本岛津)。

仪器参数选择: $E_x = 5.0 \text{ nm}$, $E_m = 5.0 \text{ nm}$, 扫描速度: $60 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 液池: 1 cm , $\lambda_{ex} = 303 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$, 扫描间隙: 0.2 nm , $E_m \text{ start WL: } 300 \text{ nm}$, $E_m \text{ End WL: } 400 \text{ nm}$, Delay: 1 s , PMT Voltage: 400 , Response: 2 。

收稿日期: 2006-10-29, 修订日期: 2007-02-02

基金项目: 物理化学江苏省国家重点培育点开放基金项目资助

作者简介: 龚爱琴, 女, 1974 年生, 扬州工业职业技术学院硕士研究生 * 通讯联系人, e-mail: xszhu@yzu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 实验方法

1.2.1 荧光强度的测定

在 10 mL 容量瓶中依次加入 0.8 mL Ce^{4+} 标准液, 适量 L-色氨酸贮存液, 0.6 mL 硫酸溶液, 5.0 mL 表面活性剂溶液, 用蒸馏水稀释至 10 mL, 放置 15 min, 测定其荧光强度, 同时做试剂空白。

1.2.2 样品测试

取一定量的粮食样品放入厚壁玻璃管中, 加入 5.0 mL 氢氧化钠溶液 ($4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 后充氮密封。在 110°C 条件下水解 24 h 后用硫酸溶液中和至 pH 6.0。过滤, 滤液稀释至一定体积后, 取适量溶液按上述实验方法进行测定。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

分别测定了水、Triton X-100 胶束、Triton X-100 微乳液介质体系中络合物的荧光光谱图。由图 1 可见, 络合物在不同介质体系中荧光强度 F 大小为 $F_{\text{Triton X-100-M}} > F_{\text{Triton X-100-m}} > F_{\text{H}_2\text{O}}$ 。Triton X-100-M 增敏作用最显著, 比水介质中提高 225 倍。因此, 本试验选用 Triton X-100 微乳液介质作为介质体系。

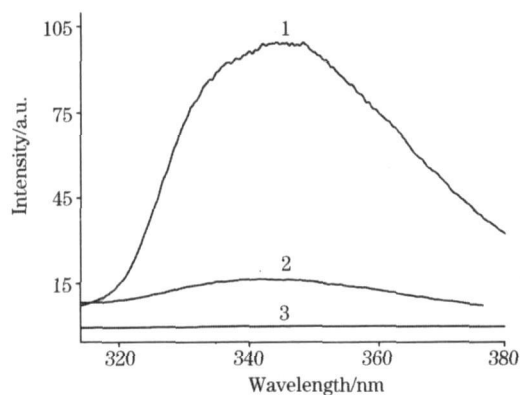


Fig 1 Fluorescence spectroscopy of L-tryptophan in different medium

1: Triton X-100-M; 2: Triton X-100-m; 3: H_2O

2.2 硫酸用量的影响

改变加入溶液中硫酸的量, 体系的最大荧光值随硫酸量变化见图 2。当 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸的加入量为 0.6 mL 时荧光强度最大。

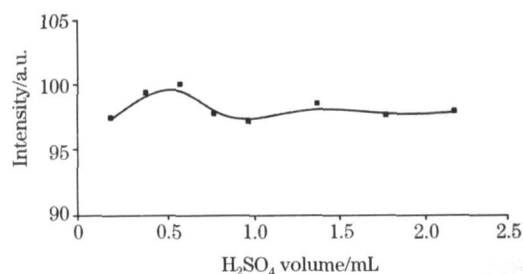


Fig 2 Effect of H_2SO_4 content on F

2.3 Ce^{4+} 溶液用量的影响

试验了不同 Ce^{4+} 溶液用量对荧光强度的影响。由图 3 可见, Ce^{4+} 溶液用量为 0.8 mL 时荧光强度最强, 因此本实验 Ce^{4+} 溶液加入量选用 0.8 mL。

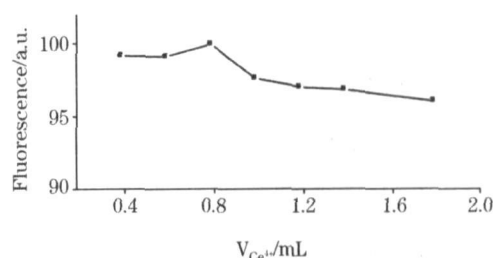


Fig 3 Effect of Ce^{4+} content on F

2.4 Triton X-100 微乳液用量的影响

试验了不同 Triton X-100 微乳液溶液用量对荧光强度的影响。由图 4 可见, 开始时随着 Triton X-100 微乳液用量的增加荧光值迅速增加, 当 Triton X-100 微乳液用量达到 5 mL 时体系的荧光值基本达到最大值, 加入量继续增加时, 荧光强度基本不变。

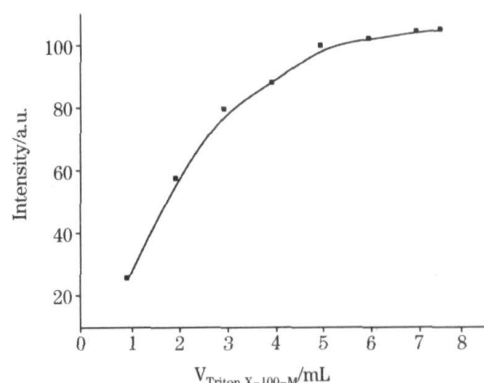


Fig 4 Effect of Triton X-100-M content on F

2.5 温度的影响

通常, 荧光分析中温度是重要影响因素之一。本试验测定了温度对体系荧光强度的影响(图 5)。结果表明, 微乳液介质中, 在试验的温度范围内, 体系荧光值基本不变, 说明温度对荧光值的影响不大。本实验在 20°C 时荧光强度有一最大值。因此本实验在此温度条件下进行。

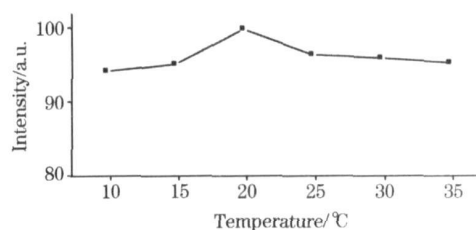


Fig 5 Effect of temperature on F

2.6 时间的影响

本试验测定了时间对荧光强度的影响(图 6)。实验体系静置 1 h 后, 其荧光值基本保持不变, 本实验控制反应时间

为 1 h。

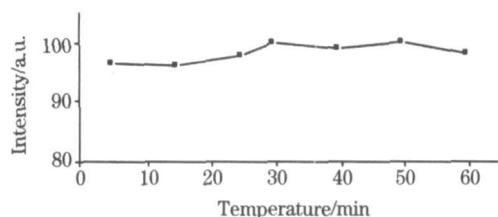


Fig 6 Effect of time on F

2.7 干扰离子的影响

在 L-色氨酸浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 考察了一些离子和氨基酸的影响, 发现 3 倍的 Fe^{3+} ; 150 倍的 Mg^{2+} 无干扰; 300 倍的 K^{+} 和 Ca^{2+} 无干扰; 400 倍的 Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , 亮氨酸, L-丝氨酸, L-半胱氨酸无干扰; 900 倍的 Cl^{-} 无干扰; 1 200 倍的 Al^{3+} 无干扰。

2.8 工作曲线

在最佳条件下测定荧光强度, 发现色氨酸浓度在 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与荧光强度成线性关系。 $F = 342.37 + 30.45c$, $r = 0.9984$, 检出限为 $0.09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.9 样品分析

样品测量结果列于表 1 中, 样品测定回收率在 96.8%~101.3% 之间。

Table 1 Analytical results of the samples

样品	加入量 $/(\text{mg} \cdot (100 \text{ g})^{-1})$	平均值($n=6$) $/(\text{mg} \cdot (100 \text{ g})^{-1})$	RSD /%	平均回收率/%
小麦面	0	62.2	1.5	
	10.0	71.9		97.0
玉米面		435.4	6.3	
	100.0	532.2		96.8
小米面		112.9	2.3	
	50.0	162.2		98.5
蜂乳		1 239.4	5.1	
	500.0	1 745.9		101.3

2.10 增敏作用机理探讨

表面活性剂对荧光是否具有增敏作用主要取决于两个方

面的因素, 一是增溶能力, 二是其介质的微环境是否有利于荧光的产生^[14]。

微乳液体系比相应的胶束介质对测定体系有更好的增敏效果, 这主要与微乳液与胶束在组成上的差别有关。与胶束体系相比, 微乳液体系增加了合适的助表面活性剂(中等碳链的直链醇)和油相。可能有以下四种情况: (1) 直链醇在栅栏层中与 Triton X-100 交替排列形成膜相。(2) 助表面活性剂的加入使得胶束体积变大, 胶束内核增加, 从而有利于络合物在胶束内核的增溶。(3) 油相在 O/W 微乳液液滴中的存在使胶束体积变大, 胶束栅栏层空间增大, 有利于络合物在胶束界面上的吸附和插入胶束栅栏层内。(4) 同时由于液滴核内油相共存减少了络合物在液滴内的增溶量。影响因素(2)和(3)大于(1)和(4), 使得络合物在 Triton X-100 微乳液体系中总的增溶量和富集程度增加, 使体系的荧光强度增加, 从而提高了体系的灵敏度。即与胶束液相比, O/W 微乳液具有更好的增敏效果。

体系中微环境的变化会导致荧光强度的改变。表面活性剂的存在改变了“溶剂”的微观性质, 提供了对激发单重态的一种保护性环境。荧光质被分散和联结于微乳液液滴或胶束中, 使它们的流动性更小了, 从而得到了很有效的屏蔽。这种保护性的环境降低了荧光质点自身的浓度猝灭及外部猝灭剂的猝灭作用, 从而大大降低了激发单重态非辐射去活化的速率常数。与相应的胶束液和其他微乳液相比, Triton X-100 微乳液的荧光强度更大, 这可能是由于 Triton X-100 微乳液液滴能将荧光物质更大限度的组织在液滴中, 改变了荧光体的微环境, 降低了非辐射过程的速率, 提高了荧光量子产率, 从而增强了荧光强度。

3 结 论

本实验探讨了 Triton X-100 微乳液增敏作用, 将 Triton X-100 微乳液介质体系用于 L-色氨酸的测定, 建立了一种用荧光分光光度法测定色氨酸的新方法。实验结果表明, 色氨酸浓度在 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与荧光强度呈线性关系。此实验方便快捷, 灵敏度高, 测定结果准确令人满意。

参 考 文 献

- [1] Jason W Costin, Paul S Francis, Simon W Lewis. *Anal. Chim. Acta*, 2003, 480: 67.
- [2] WANG Jun, SUN Guang-ming, WANG Li, et al(汪 俊, 孙光明, 王 利, 等). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 2006, 34(2): 267.
- [3] WANG Li-sheng, PENG Zhong-li, JIANG Zhi-liang(王力生, 彭忠利, 蒋治良, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2002, 22(4): 641.
- [4] DING Ya-yun, XIE Meng-xia, KANG Juan(丁雅韵, 谢孟峡, 康 娟). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 2002, 30(4): 418.
- [5] WU Jia-rui, SHI Qing-zhao, WANG Guo-shun, et al(邬建敏, 施清照, 王国顺, 等). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 1994, 22(6): 599.
- [6] YANG Li-li, YUAN Zhuo-bin(杨莉丽, 袁卓斌). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 1999, 27(9): 1065.
- [7] Qu Qishu, Tang Xiaoqin, Hu Xiaoya. *Anal. Chim. Acta*, 2006, 572: 212.
- [8] SUN Yan-hua, YANG Jing-zhi, ZHOU Jie, et al(孙衍华, 杨景芝, 周 杰, 等). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 2004, 32(8): 1067.
- [9] ZHU Xia-shi, GUO Rong, QI Wen-bin(朱霞石, 郭 荣, 戚文彬). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 1995, 23(9): 989.
- [10] ZHU Xia-shi, GUO Rong(朱霞石, 郭 荣). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 1999, 19(3): 456.
- [11] ZHU Xia-shi, GUO Rong, KANG Chun(朱霞石, 郭 荣, 康 纯, 等). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 1995, 53: 716.
- [12] ZHU Xia-shi, GUO Rong, LIU Xiu-mei(朱霞石, 郭 荣, 刘秀梅). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 1994, 22(8): 860.
- [13] ZHU Xia-shi, GUO Rong, ZHANG Xia-hong(朱霞石, 郭 荣, 张晓红). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2001, 21(4): 515.
- [14] Zhu X S, Bao L, Guo R et al. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 523: 43.
- [15] ZHU Xia-shi, GUO Rong(朱霞石, 郭 荣). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2002, 22(2): 314.

Investigation and Application of Fluorescence Reaction of Cerium-L-Tryptophan in Triton X-100 Microemulsion

GONG Ai-qin^{1,2}, ZHU Xia-shi^{*}, GUO Rong¹, MA Xiao-qin¹

1. Department of Chemistry, Yangzhou University, Yangzhou 225002, China

2. Yangzhou Polytechnic Institute, Yangzhou 225002, China

Abstract In the present article, the sensitizing effect of Triton X-100 microemulsion media (Triton X-100 M) on the determination of L-tryptophan by fluorescence spectrophotometry was studied, which was based on a strong fluorescence substance produced when L-tryptophan was oxidized by Ce^{4+} in acid medium. Compared with Triton X-100 micelle (Triton X-100 m), it was found that in the medium of Triton X-100 M the intensity of fluorescence was enhanced by 225 times. Various factors that influence fluorescence determination and interfering ions were examined. The mechanism of sensitizing effect of Triton X-100 microemulsion was also discussed. Under the optimum conditions, the linear range and detection limit are $0.11 \sim 0.10 \mu g \cdot mL^{-1}$ and $0.09 \mu g \cdot mL^{-1}$ (correlation coefficient $r = 0.9984$), respectively. The linear equation was $F = 342.37 + 30.45c$. The proposed method has been successfully applied to determine food samples.

Keywords L-tryptophan; Fluorescence; Microemulsion; Sensitizing effect

(Received Oct. 29, 2006; accepted Feb. 2, 2007)

* Corresponding author