

壳聚糖对氨基酸-茚三酮体系的荧光增强作用

李晓花,魏永锋,阎宏涛,韩 肃

(西北大学 化学系,陕西 西安 710069)

摘要:为提高氨基酸分析的灵敏度,应用荧光光度法研究了在锌离子的存在下壳聚糖对氨基酸-茚三酮体系的荧光增强作用,探讨了荧光增强作用中金属离子和壳聚糖浓度的影响及其生成配合物的荧光增强作用的机理及条件,获得了满意的结果。

关键词:壳聚糖;荧光增强作用;ruhemann's purple;锌离子

中图分类号:0657.39 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274X(2002)01-0026-03

氨基酸与茚三酮反应的产物 ruhemann's purple (RP)产生荧光,据此可进行氨基酸的测定^[1]。由于RP荧光不强,应用时有一定的局限性。为此,人们致力于RP的荧光增强作用研究,已有IIB族过渡金属离子及稀土离子对RP的荧光增强作用的报道^[2~5]。本文研究了在金属离子存在下,壳聚糖对RP的荧光增强作用,探讨了壳聚糖与金属离子及RP作用生成配合物的荧光增强作用的机理及条件。实验表明,在锌离子存在下壳聚糖对RP的荧光有较大的增强作用。这不仅对于氨基酸的测定和痕迹学研究方面(指纹检测)有一定的实际意义,而且也丰富了壳聚糖在分析化学中的应用范围。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

RF-1501型荧光分光光度计(日本岛津公司,1cm石英比色皿),测定条件为单色带宽(激发和发射)均为10.0nm,光电倍增管增益为普通,响应时间为自动,扫描速度为慢速,约为100nm/min;Legend586计算机(装有Origin软件);TU-1221型紫外可见分光光度计(北京通用仪器制造公司);ZD-2型pH/mV计(江西西江电化学仪器厂)。

壳聚糖(浙江省玉环县海洋生物化学有限公司,脱乙酰度80%),茚三酮(A.R.,上海试剂三厂),L-甘氨酸(生化试剂,上海化学试剂采购供应站分装),

锌、铜和镉离子标准溶液:按文献[6]配制成0.1mol/L的标准溶液,镉离子标准溶液按文献[7]配制成1mg/mL的标准溶液,其余试剂均为分析纯,水为去离子双蒸水。

1.2 实验方法

于10mL容量瓶中,加入1.0mL 10mmol/L的甘氨酸溶液、0.4mL 50mmol/L的茚三酮溶液、0.1mL 0.1mol/L的金属离子标准溶液及0.5mL 0.5%的壳聚糖溶液,调节溶液pH至4.6,稀释至10mL。置于70℃恒温水浴中,反应180min后取出,冷却至室温。于401nm波长处激发,在400~700nm处测定荧光光谱及强度。

2 结果与讨论

2.1 氨基酸-茚三酮体系的荧光形成条件

为了探讨壳聚糖对氨基酸-茚三酮体系的荧光增强作用,首先对该体系及其和锌离子荧光体系的形成条件进行了实验。

2.1.1 pH的影响 在其他条件不变的条件下,测定了不同pH时体系的荧光光谱及荧光强度。结果表明,在pH 1~4时,荧光强度递增,在pH 4.5~6.5时,荧光强度较强且较稳定。考虑到pH大于4.7时,壳聚糖会出现絮状沉淀,不但对荧光强度测定产生影响,而且会阻碍配合物的形成,因此实验中选择pH为4.6。这样,既保证了壳聚糖不生成絮状沉淀,

收稿日期:1999-11-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(292393600);陕西省自然科学基金资助项目(2001H10)

作者简介:李晓花(1976-),女,陕西长安人,西北大学硕士生,从事分析化学研究。

又使配合物荧光较强。

2.1.2 波长选择 在 pH 4.6 的缓冲介质中,测定了该化合物的吸收光谱及激发和发射光谱(见图 1, 2)。实验表明,在 401 nm 的激发波长下,荧光发射强度在 490 nm 处最大,当有壳聚糖存在时发射波长紫移至 471 nm。这可能由于加入壳聚糖与 RP 及 Zn^{2+} 形成了三元络合物,使能级跃迁增大,荧光发射能量增大,发射波长变短。实验中选择 401 nm 为激发波长,在 400~700 nm 测定其荧光发射光谱。

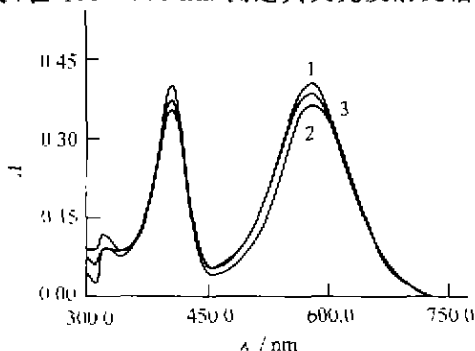


图 1 吸收光谱

Fig.1 Adsorption spectra

1 RP 2 RP+ Zn^{2+} 3 RP+ Zn^{2+} +壳聚糖

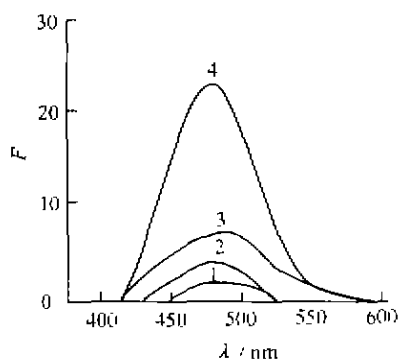


图 2 荧光光谱

Fig.2 Fluorescence emission spectra

1 RP 2 RP+ Zn^{2+} 3 RP+壳聚糖 4 RP+ Zn^{2+} +壳聚糖

2.1.3 温度及加热时间对配合物形成及稳定性的影响 温度及加热时间对配合物荧光强度的影响,是随着反应温度升高,荧光强度增强。当温度在 70~80℃ 时荧光最强;超过 80℃ 配合物不稳定,且发生副反应,荧光减弱;在 70℃ 时壳聚糖及 Zn^{2+} 存在下 RP 显色反应速度明显加快,且荧光稳定性有所提高。这是由于壳聚糖与 RP 及 Zn^{2+} 形成大分子三元配合物,有利于氨基酸与茚三酮的显色反应进行及增加产物的稳定性。当加热反应时间 < 180 min 时,配合物反应不完全, > 180 min 时荧光达到最大且基本保持不变。因此,实验选择反应温度为 70℃,反应时间为 180 min。

2.1.4 锌离子浓度的影响 在其他条件不变的情况下,试验了锌离子浓度对该体系荧光强度的影响(见图 3)。实验发现,当锌离子浓度与 RP 浓度的摩尔浓度比接近 1:1 时荧光强度最大,小于 1:1 时配合物形成不完全,由于过量游离 Zn^{2+} 与配体壳聚糖络合,不利于三元配合物 RP- Zn^{2+} -壳聚糖(见图 4, b)的形成,所以荧光强度减小。

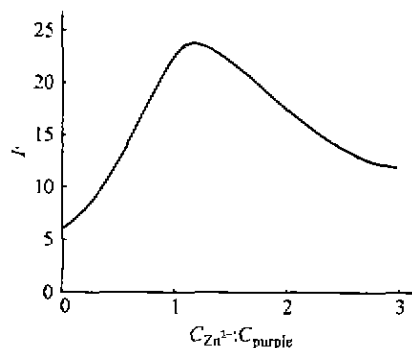
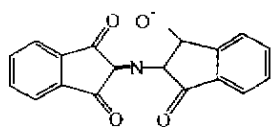
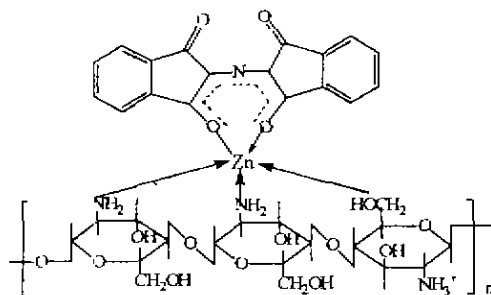


图 3 锌离子浓度的影响

Fig.3 The effect of the concentration of Zn^{2+}



(a)



(b)

图 4 RP(a)及 RP- Zn^{2+} -壳聚糖配合物(b)结构示意图

Fig.4 The structure of RP(a) and RP- Zn^{2+} -chitosan complex (b)

2.1.5 壳聚糖浓度的影响 由于壳聚糖参与荧光配合物的形成,实验中研究了壳聚糖浓度对配合物

荧光强度的影响(见图 5)。实验表明,随着壳聚糖质量分数的增加,配合物的荧光强度亦呈增加趋势。当壳聚糖浓度大于 0.02% 时,配合物荧光强度增加趋势变缓。这是由于壳聚糖开始参与荧光配合物的形成,对荧光强度影响较大,主要表现为粘度的影响。考虑到在 pH 4.6 的缓冲溶液中壳聚糖的溶解度及背景荧光随其浓度而加大,实验中采用壳聚糖浓度为 0.025%。

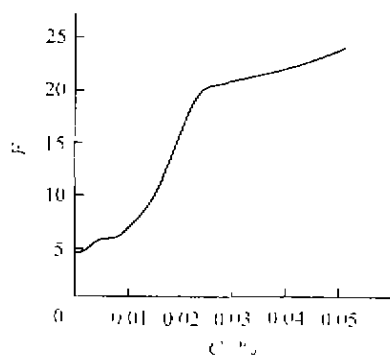


图 5 壳聚糖浓度的影响

Fig. 5 The effect of the concentration of chitosan

2.1.6 不同金属离子对壳聚糖-茚三酮体系荧光的影响 RP 除与 Zn^{2+} 形成络合物外,还可与 IIB 族其他元素及稀土元素离子形成配合物,使 RP 荧光

强度有所增加,荧光稳定性亦有所改善^[5]。实验中其他条件不变,进行了 Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} 及 Eu^{3+} 等金属离子存在时,壳聚糖对 RP 的荧光增强作用的研究。结果表明,这些金属离子存在时,壳聚糖对 RP 的荧光均有一定的增强作用,其顺序为 $Cd^{2+} > Ni^{2+} > Eu^{3+} > Cu^{2+}$ 。

2.2 壳聚糖荧光增强作用的机理探讨

茚三酮与氨基酸的反应产物 RP 产生弱的荧光,加入金属离子后,由于与 RP 形成了配合物,其荧光有所增强^[2-5]。当加入壳聚糖时,该配合物的荧光强度更为增强(见图 2)。当金属离子不存在时,单纯地加入壳聚糖其荧光增强作用不明显。这表明壳聚糖对 RP 的荧光增强作用,是由于金属离子与 RP 形成的配合物中有五元环平面结构,配合物形成后金属离子上仍有空轨道,在加入壳聚糖后,壳聚糖上的 $-NH_2$, $-NHCOCH_3$ 及 $-OH$ 等与金属离子的空轨道配位^[7],形成了 RP-金属离子-壳聚糖配合物。该配合物的形成,使 RP 上 π 电子的共轭程度和分子平面度增加,加之大分子壳聚糖的存在,导致配合物的自由度减小,分子刚性增加,荧光量子效率亦有一定程度的增加。这通过测定加入壳聚糖前后吸光度值的增加和荧光强度的增强也可证明。

参考文献:

- [1] 王成荣. 痕迹学[M]. 成都:四川科学技术出版社,1988:81.
- [2] LENNARD C J, MARGOT P A, STOILOVIC M, *et al.* Synthesis and evaluation of ninhydrin analogs as reagents for the development of latent fingerprints on paper surface[J]. J Forensic Sci Soc, 1988, 28(1): 3-23.
- [3] STOILORIC M, KOEUS J, MARGOT P A, *et al.* Improved enhancement of ninhydrin developed fingerprints by cadmium complexation using low temperature[J]. J Forensic Sci, 1986, 31(2): 432-445.
- [4] MENZEL E R. Detection of latent fingerprints by laser-excited luminescence[J]. Anal Chem, 1989, 61(8): 557-561.
- [5] 张 伟, 阎宏涛. 稀土离子对氨基酸-茚三酮体系的荧光增强作用[J]. 光谱学与光谱分析, 1995, 15(3): 117-121.
- [6] 阎宏涛, 黑玉芬. 化学试剂配制与标定[M]. 西安:西北工业大学出版社, 1995. 76, 81, 84.
- [7] 严 俊. 甲壳素的化学和应用[J]. 化学通报, 1984, (11): 26-31.

(编辑 张银玲)

Fluorescence enhancement of ninhydrin-amino acid in the presence of Zn^{2+} and chitosan

LI Xiao-hua, WEI Yong-feng, YAN Hong-tao, HAN Su

(Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Studies have been carried out on the fluorescence enhancement of ninhydrin-amino acid in the presence of Zn^{2+} and chitosan. Experimental results show that in the presence of Zn^{2+} , chitosan can react with the Zn^{2+} -ruhemann's purple and form a complex, which can enhance the fluorescence of ninhydrin-amino acid system. The mechanism of enhancement and the experimental condition are discussed also.

Key words: chitosan; fluorescence enhancement; ruhemann's purple; Zn^{2+}