

吡啶橙-PAR-钒(V)能量转移荧光猝灭法的研究及分析应用

侯明¹, 冯丽娥¹, 蒋治良^{1,2}

1. 桂林工学院材料与化学工程系, 广西 桂林 541004
2. 广西师范大学资源与环境学系, 广西 桂林 541004

摘要 在 pH 5.5 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液中, 吡啶橙(AO)与 PAR-钒(V)络合物之间发生有效的能量转移, 使吡啶橙 526 nm 处的荧光猝灭, 据此建立了能量转移荧光测定痕量钒的新方法。实验表明, 在 pH 5.5 的 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AO- $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PAR 体系中, 钒的含量 c 在 $0.12 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与荧光猝灭强度 ΔF 呈良好线性关系, 线性回归方程为 $\Delta F = 165.4c + 2.5$, 方法检出限为 $0.0045 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相对标准偏差为 0.6%。该荧光猝灭反应 15 min 内完全, 其相对荧光强度在 2.5 h 内基本保持不变。用该方法测定生物样品中钒的含量, 相对误差小于 5%, 结果满足痕量分析要求。

关键词 吡啶橙; PAR; 能量转移; 荧光猝灭; 钒

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)02-0476-03

引言

钒是人体所必需的微量元素之一, 但人体内的钒过量会引起急性或慢性中毒, 损害皮肤、心脏及肾脏^[1]。因此, 检测环境样品中钒的含量具有重要意义。分光光度法测定钒的灵敏度低, 难于满足生物样品中微量钒的测定要求。荧光法^[2-8], 特别是能量转移荧光分析法, 具有较高的灵敏度, 已用于痕量铁、铜、磷、砷、维生素 B_{12} 、蛋白质^[9-15]等的分析, 但能量转移荧光法测定生物样品中微量钒的研究却少见。本研究发现, 在 pH 5.5 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液中, 吡啶橙(AO)与 PAR-钒(V)络合物间能发生有效的能量转移, 使吡啶橙的荧光猝灭, 据此建立了能量转移荧光猝灭测定生物样品中痕量钒的新方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器及试剂

LS-55 荧光/磷光/发光分光光度计(PE 公司, 美国); UV-1901 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), pH S-3C 型精密 pH 计(上海精密仪器有限公司), MDS-2003F 压力自控式密闭微波消解仪(上海新仪微波化学科技有限公司)。

钒标准贮备液, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 钒标准工作溶液, $1 \mu\text{g} \cdot$

mL^{-1} ; 4-(2-吡啶偶氮)-间苯二酚(PAR)溶液, $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇溶液; 吡啶橙(AO)溶液, $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液; Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液, 分别量取一定体积的浓度均为 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸溶液和 Na_2HPO_4 溶液, 充分混合, 并调节至所需酸度。

以上试剂均为分析纯, 水为石英亚沸蒸馏水。

1.2 实验方法

于 10 mL 比色管中, 依次加入 1.2 mL pH 5.5 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液, 0.4 mL $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PAR 溶液, 1.5 mL $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的吡啶橙溶液, 一定量的钒(V)标准溶液, 用水稀释至刻度, 摇匀, 静置 15 min, 在荧光光度计上于缝宽 0.3 nm, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 495.5/526$ 处, 测定试剂空白荧光强度 F_0 和配合物荧光强度 F_1 , 计算荧光猝灭强度 $\Delta F = F_0 - F_1$ 。

2 结果与讨论

2.1 激发光谱、发射光谱和吸收光谱

图 1 表明, 吡啶橙的最大激发波长和最大发射波长分别为 495.5 和 526 nm; 图 2 表明, PAR 的最大吸收波长为 403.9 nm, PAR-V(V)络合物的最大吸收波长为 530 nm。由于 PAR 的吸收光谱与吡啶橙的荧光光谱重叠度小, 不能发生能量转移, 荧光强度不变; 从图 1 中谱线可以看出, V(V)

收稿日期: 2007-09-28, 修订日期: 2007-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20365001), 广西自然科学基金资助项目(桂科自 0728218, 0679005), 桂林工学院科研启动基金项目 and 广西壮族自治区教育创新人才基地项目资助

作者简介: 侯明, 女, 1957 年生, 桂林工学院材料与化学工程系教授 e-mail: glhou@glite.edu.cn

也不能使吡啶橙荧光猝灭,只有当加入 PAR 后, V(V) 同 PAR 形成络合物,其吸收光谱红移,并与吡啶橙的荧光光谱重叠,发生荧光能量转移,并导致吡啶橙荧光猝灭。

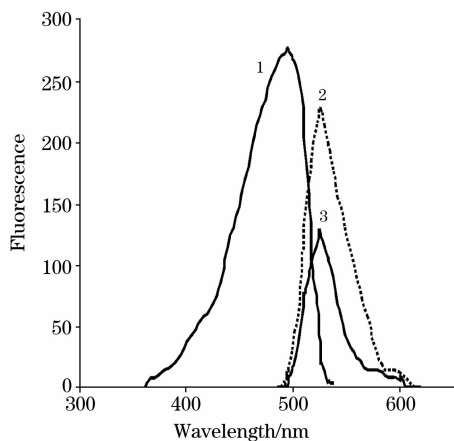


Fig. 1 Excitation spectra and emission spectra

- 1: AO excitation spectra
- 2: AO emission spectra
- 3: AO-PAR-V(V) emission spectra

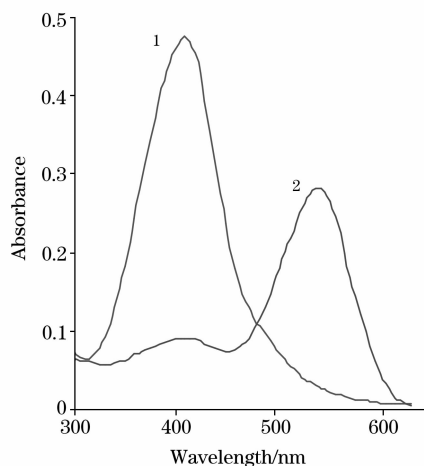


Fig. 2 Absorption spectra

- 1: PAR; 2: PAR-V(V)

2.2 酸度的选择及用量的影响

试验了不同缓冲体系对能量转移荧光体系的影响。结果发现,在 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲介质中,荧光猝灭程度显著大于 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲介质,故选择 Na_2HPO_4 -柠檬酸溶液。实验表明,在 pH 5.0~6.5 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸溶液中,荧光猝灭程度较大,故本文选择 pH 5.5 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液,其最佳用量为 1.2 mL。

2.4 PAR 溶液浓度对荧光强度的影响

PAR-V(V) 紫色络合物在能量转移荧光体系中作为能

量受体。此络合物是否完全生成对荧光猝灭反应影响较大,而 PAR 的浓度直接关系到 PAR-V(V) 络合物生成的完全程度,进而影响体系的荧光猝灭反应进行的程度。结果表明,随着 PAR 浓度的增大,荧光猝灭值增大,当 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAR 溶液的用量达 0.4 mL 时,体系的荧光猝灭程度最大,随后,再增大其浓度,体系的荧光猝灭值缓慢下降。所以,本文选择 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PAR 溶液的最佳用量为 0.4 mL。

2.5 AO 溶液浓度对荧光强度的影响

AO 作为能量给体,当 AO 浓度为 $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,体系的荧光猝灭程度最大。

2.6 工作曲线、检出限和精密度

按实验方法,测得不同量钒相应的荧光强度 ΔF , 绘制工作曲线。其线性范围为 $0.012 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性回归方程为 $\Delta F = 165.4c + 2.5$, 相关系数为 0.998 5。按 $3S/k$ 计算得方法的检出限 DL 为 $4.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按照实验方法,对 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ V(V) 进行 11 次重复试验,测定其相对荧光猝灭强度 ΔF 。计算得出 $\text{RSD} = 0.6\%$, 可以看出本方法的精密度很好。

2.7 荧光体系的稳定性

结果表明, AO-PAR-V(V) 能量转移荧光反应在 15 min 内反应完全,其荧光猝灭值 ΔF 在 2.5 h 内基本保持恒定。

2.8 共存离子的影响

考察了共存离子对测定 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ V 的影响。在相对误差 5% 的范围内,可允许存在各种离子的量(倍数)分别为: Al^{3+} (60), Cd^{2+} (90), Zn^{2+} (30), W(V) (10), Ti(IV) (2), Fe(III) (30), Cr(VI) (50), Mn(II) (120), Mn(VII) (30), 酒石酸 (2 000)。而 Ni^{2+} (200), Pb^{2+} (200), Mo(VI) (200), Cl^- (200), 硫脲 (1 000), F^- (2 000), 柠檬酸钠 (2 000), NO_3^- (104) 等均未达到允许量上限。实验表明, 10 mg 酒石酸和 50 mg 硫脲可以掩蔽 Cu^{2+} (10 倍) 和 Co^{2+} (2 倍); 10 mg 酒石酸和 10 mg F^- 可以掩蔽 Fe^{3+} (40 倍)。

3 样品分析

分别称取 0.500 0~1.000 0 g 植物样品于聚四氟乙烯溶样杯中,用移液管加入 5 mL 浓 HNO_3 , 浸泡 30 min, 再逐滴加入 1 mL H_2O_2 , 浸泡 10 min 后, 装入消解外罐体, 置于自控式密闭微波消解仪中, 按操作步骤, 选取微波消解仪最佳工作条件进行消解, 同时进行空白试验。消解后的溶液转移至 10 mL 比色管中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 静置澄清。

分别吸取上述试液 2 mL, 加入 1 mL $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒石酸-50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲混合掩蔽剂和 1 mL 的 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaF 溶液, 按照实验步骤测定试剂空白荧光强度 F_0 和样品溶液的荧光强度 F_1 , 计算荧光猝灭值 ΔF 和样品中钒的含量(表 1), 其相对误差小于 5%, 结果满足痕量分析要求。

Table 1 Analysis results of vanadium in samples

样品	测定值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	平均值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/%	推荐值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
杨树叶 GSV-3	0.62, 0.60, 0.65, 0.64, 0.62, 0.63	0.63 ± 0.023	3.56	0.64
茶叶 GSV-4	0.87, 0.86, 0.84, 0.79, 0.80, 0.76	0.82 ± 0.043	5.28	0.86
菠菜 GSB-6	0.83, 0.82, 0.85, 0.83, 0.86, 0.83	0.84 ± 0.016	1.82	0.85

参 考 文 献

- [1] WANG Ping-li, ZHANG Cheng-jiang(王平利, 张成江). Computing Techniques for Geophysical and Geochemical Exploration(物探化探计算技术), 2004, 26(3): 247.
- [2] CHEN Lan-hua, GE Hai-yan(陈兰化, 葛海燕). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(6): 1154.
- [3] BAO Suo-yan, LI Shu-cun, SHI Sheng-xun(鲍所言, 李书存, 石生勋). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2001, 29(10): 1170.
- [4] BAO Suo-yan, LI Shu-cun, MENG Fan-hui, et al(鲍所言, 李书存, 孟凡辉, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(2): 284.
- [5] LIN Shao-yu, GAO Wen-hua, LIU Xiao-xuan, et al(林韶玉, 高文华, 刘小暄, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(1): 113.
- [6] WANG Jin-zhong, LIU Bo, ZHANG Dong-di, et al(王金中, 刘波, 张东娣, 等). Chemical Research(化学研究), 2002, 13(4): 21.
- [7] NI Yong-nian, CAI Ying-jun(倪永年, 蔡英俊). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(10): 1641.
- [8] HOU Ming, ZHAO Qing-hua(侯明, 赵清华). Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析实验室), 2001, 20(3): 56.
- [9] BAO Suo-yan, WANG Gui-hua, LIU Bao-sheng, et al(鲍所言, 王桂华, 刘保生, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(1): 87.
- [10] HOU Ming, ZHANG Jing(侯明, 张静). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2004, 20(6): 619.
- [11] LIU Bao-sheng, WANG Gui-hua, SUN Han-wen, et al(刘保生, 王桂华, 孙汉文, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2001, 29(1): 42.
- [12] LIU Bao-sheng, GAO Jing, LIU Zhi-chao, et al(刘保生, 高静, 刘智超, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(2): 306.
- [13] LIU Bao-sheng, GAO Jing, YANG Geng-liang(刘保生, 高静, 杨更亮). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(7): 1080.
- [14] LIU Bao-sheng, GAO Jing, YANG Geng-liang(刘保生, 高静, 杨更亮). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2005, 33(4): 546.
- [15] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorimetry(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 112.

Study on the Energy Transfer Fluorescence Quenching Reaction of Acridine Orange-4-(2-Pyridylazo) Resorcinol-V(V) System and Analytical Application

HOU Ming¹, FENG Li-e¹, JIANG Zhi-liang^{1, 2}

1. Material and Chemistry Department, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China

2. Department of Resource and Environmental Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

Abstract An energy transfer technique for 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR)-vanadium(V) and acridine orange(AO) was studied, and the optimum conditions of energy transfer system were also experimented. It was found that in citrate- Na_2HPO_4 buffer solution at pH=5.5, energy transfers from AO to vanadium(V)-PAR complexes. A new method based on energy transfer fluorescence quenching for the determination of trace vanadium(V) with AO-PAR-V(V) was established. The equation of linear regression is $\Delta F = 165.4c + 2.5$, and the determination range of vanadium is 0.012-0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, with detection limit of 0.0045 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The correlation coefficient is $R = 0.9985$, and relative standard deviation is 0.6%. The fluorescence reaction is completed within 15 minutes, and relative fluorescence intensity remains unchanged for 2.5 hours. The influence of foreign ions on the determination of V (0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) was examined, with a related error of 5%. The method has been used in the determination of trace vanadium in biological samples with the relative error of 6.98%, which meets the requirements of trace analysis.

Keywords Acridine orange; 4-(2-Pyridylazo) resorcinol(PAR); Energy transfers; Fluorescence quenching; Vanadium

(Received Sep. 28, 2007; accepted Dec. 28, 2007)