

协同增敏同步荧光法测定自来水 与人尿中的 1-羟基芘

林 晨, 耿安朝, 张 勇

(厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 使用正丙醇这一小分子脂肪醇, 进一步促进 β -环糊精有序介质对 1-羟基芘的荧光增强作用, 基于此, 利用同步荧光法测定水样中的 1-羟基芘, 检测限达到 2.5×10^{-11} mol/L, 相对标准偏差为 3.8% ($n=5$), 运用该方法测定了自来水与人尿样品中的 1-羟基芘, 结果满意。

关键词: 同步荧光法; 正丙醇; 环糊精; 1-羟基芘; 自来水; 人尿

中图分类号: X132

文献标识码: A

文章编号: 1672-0687(2006)03-0047-04

1-羟基芘 (1-hydroxy pyrene, 1-HP) 是四环或多环 PAHs 的主要代谢产物之一^[1], 因此 1-羟基芘常常被当作考察生物对多环芳烃暴露水平的标记性化合物。例如对人尿中的 1-HP 浓度水平进行测量, 已经成为评估人体暴露在 PAHs 下危险性的重要手段^[2]。目前, 使用得最广泛的检测 1-HP 的手段是 HPLC 与荧光检测器联用技术。

荧光检测法具有灵敏、快速、简单、操作方便等优点, 1-HP 具有较强的天然荧光, 因此研究人员一直试图直接用荧光法检测 1-HP, 但是荧光法对于复杂样品的选择性不够, 这是最大的制约因素。同步荧光技术能够减少光谱重叠, 窄化光谱, 减少杂散光的干扰, 进而提高荧光分析方法的选择性。近年来, 一些使用同步荧光法 (SFS) 检测 1-HP 的方法也逐步建立了起来^[3-5]。

环糊精 (Cyclodextrin, CD) 是由淀粉经酶促水解而生成的一类环状低聚糖, 最常见的有 α -、 β -、 γ -环糊精, 分别由 6、7、8 个葡萄糖单元组成, 其中又以 β -CD 产量最高, 应用最广泛。该类化合物的特点是分子结构中存在一个亲水的外缘和一个疏水的空腔。大多数空间尺寸与 CD 空腔大小匹配的有机荧光体进入 CD 的疏水空腔后, 就会被屏蔽于荧光猝灭因素 (如溶解氧) 之外, 荧光寿命增长, 荧光强度提高, 因此 β -CD 作为一种增强荧光强度的有序介质应用于荧光分析^[6]。江元宝等^[7]以芘为荧光探针, 用荧光光谱和吸收光谱研究了脂肪醇与 β -CD 的相互作用, 发现由于脂肪醇的烷基链在 β -CD 空腔端口的覆盖作用, 使得空腔极性进一步减小。该研究表明 β -CD 对芘的荧光有增强作用, 在添加小分子脂肪醇后, 荧光强度进一步增加。

1-羟基芘与芘的结构非常相似, β -CD 和小分子脂肪醇应该对其同样具有荧光增强作用。所以在上述的研究工作基础上, 本实验考察了: (1) 多种小分子脂肪醇加入到 1-HP+环糊精体系中后, 1-HP 同步荧光的变化情况, 从中选择出作用效果最好的正丙醇; (2) 1-HP+环糊精体系中, 正丙醇加入的最佳体积; (3) 环糊精+正丙醇增敏同步荧光法应用于实际水样中 1-HP 检测的可行性。以期建立一种能够灵敏、快速、简单地测定水样中 1-HP 的分析方法。

1 实验部分

1.1 试剂

1-羟基芘 (98%, 美国 Aldrich 公司); β -环糊精 (A.R., 中国医药上海化学试剂公司); 甲醇、乙醇 (A.R., 上

[收稿日期] 2006-03-15

[作者简介] 林 晨 (1980-), 男, 安徽明光人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋化学。

海振兴化工一厂);正丙醇、正丁醇(A.R.,中国医药上海化学试剂公司);异丙醇(A.R.,上海申鹤化学品有限公司);实验用水为反渗透水。

1.2 仪器

Cary Eclipse 型荧光分光光度计(美国 Varian 公司);RO-130JB 型反渗透制水器(中国安吉尔公司);Bran-son 型超声波清洗器(美国 Smithkline 公司);激发、发射狭缝宽度分别为 10 nm 和 5 nm, $\Delta\lambda=37$ nm,扫描速度 ≤ 600 nm/min;1 cm 石英比色皿。

1.3 实验方法

1-HP 配制成浓度为 10^{-3} mol/L 的乙醇储备溶液,移取 100 μ L 储备液至 10 mL 棕色容量瓶中,高纯氮气吹干乙醇,用反渗透水定容,得 1-HP 浓度为 10^{-5} mol/L 的工作溶液; β -CD 配制成浓度为 10^{-2} mol/L 的水溶液,放入冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

移取适量体积的工作液、 β -CD 水溶液、正丙醇,加入到 10 mL 棕色容量瓶中,用通氮除氧过的反渗透水定容。摇匀,超声振荡 10 min,使各种溶质以分子状态混合均匀,然后放入冰箱 4 $^{\circ}$ C 下静置 1 h,使 1-HP 充分进入 β -CD 的空腔,然后测量同步荧光。取 $\lambda_{\text{ex}}=350$ nm 处荧光值。测量时温度控制在 20 ± 1 $^{\circ}$ C。

2 结果与讨论

2.1 各种醇的影响

首先选取了甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇 5 种小分子脂肪醇,考察了它们加入到 1-HP 和 CD 混合体系中后,1-HP 同步荧光的变化情况,结果见表 1。

表 1 环糊精存在下各种醇对 1-HP 同步荧光增敏效果

1-HP 浓度 /nmol \cdot L $^{-1}$	不同溶液中的荧光强度						
	水	β -CD+水	β -CD+甲醇+水	β -CD+乙醇+水	β -CD+正丙醇+水	β -CD+异丙醇+水	β -CD+正丁醇+水
5	16.234	18.650	19.211	25.039	27.428	28.343	25.018
10	22.116	37.549	28.009	50.001	58.236	58.903	53.628
50	121.334	198.631	182.695	249.917	281.050	282.359	248.351

注:溶液中 β -CD 浓度为 5×10^{-3} mol/L,醇填充量为 4%(v/v)。

由表 1 可见, β -CD 对水溶液中的 1-HP 具有荧光增敏作用,在进一步加入小分子脂肪醇(除甲醇外)之后,其荧光增敏作用又得到了进一步增强。其中,正丙醇和异丙醇的加入增强效果相似且最强,相对于纯水溶液,荧光强度增加 70%~180%,相对于加入 β -CD 的水溶液,增加 50%~60%。异丙醇相对于正丙醇有更强的荧光性质,同样条件下它会产生更高的背景荧光峰,对准确测定目标物浓度有影响。所以,本实验选择正丙醇与 β -CD 来协同增敏 1-HP 的同步荧光。

2.2 同步荧光光谱

图 1 表明,在 1-HP 水溶液中同时加入适当量的 β -CD 和正丙醇后,相比于同浓度的 1-HP 纯水溶液以及只加入 β -CD 的 1-HP 水溶液,其同步荧光峰的峰形和峰位没有发生变化,但荧光强度得到了大大提高,信号、噪声比大大加强,表明测量的灵敏度有了明显提高。需要指出的是,只加入 β -CD 时,1-HP 的同步荧光峰存在略微的红移,而在有 β -CD 和正丙醇共同存在时,并不存在这一现象。

2.3 适宜条件的选择

2.3.1 酸碱度的影响

基于对文献[3]的分析,本实验采用 HCl-NaOH 体系调节酸度,考察正丙醇与 β -CD 存在下 pH 值对 1-HP 荧光强度的影响。结果表明,在 pH=4~6.5 之间时,荧光值达到最大,如图 2 所示。

需要特别指出的是,在碱性条件下,1-HP 的荧光值大大降低,而且峰形变宽,红移, β -CD 和正丙醇对其增敏作用基本消失。为此,考察了不存在正丙醇与 β -CD 的 1-HP 纯水溶液,发现有类似的现象存在。据此,笔者推测,由于 1-HP 羟基上以及芳环的某些位置上的氢原子性质比较活泼,在有 OH $^{-}$ 存在时,这些氢原子

会失去,造成整个芳环上的电子云密度降低,共轭性下降,荧光值随之降低。有关这方面的研究,将在以后的工作中开展。

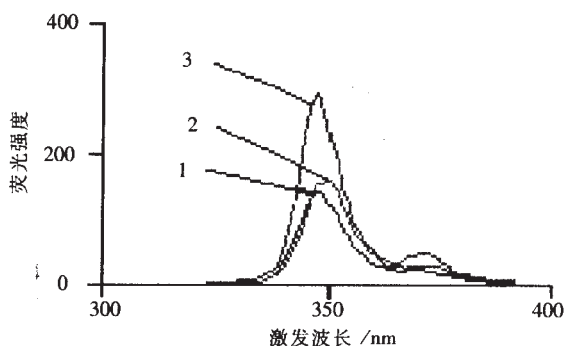


图1 不同溶液中的1-HP同步荧光峰位置

1.水溶液 2.存在0.005 mol/L β -CD 3.存在0.005 mol/L β -CD和5%体积正丙醇。1-HP浓度均为100 nmol/L。

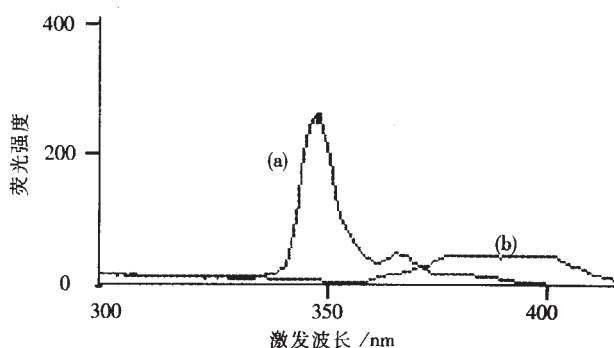


图2 pH值对1-HP的同步荧光影响

(a) pH=6.3; (b) pH=8.9。1-HP浓度为100 nmol/L。

2.3.2 温度和时间对荧光强度的影响

考察了试剂添加完成并超声完毕后,分别在室温和4℃冰箱中静置时,时间与荧光强度的关系。结果表明,静置1h后,荧光强度达到最大。在室温下,体系稳定时间为2h左右,而在4℃冰箱中,则能达到8h荧光强度不变。

2.3.3 最佳 $\Delta\lambda$ 的选择

一系列实验表明,在 $\Delta\lambda=37$ nm时,1-HP的同步荧光峰值最大,峰形最佳。

2.3.4 β -CD浓度的影响

随着 β -CD的加入,荧光强度逐渐增大,当体系中浓度达到 4×10^{-3} mol/L时,荧光强度达到最大并基本恒定。本实验采用 5×10^{-3} mol/L,以保证 β -CD对1-HP的充分包络。

2.3.5 正丙醇浓度的影响

在相同1-HP浓度、 β -CD浓度的情况下,考察了不同正丙醇浓度的影响。发现在体系中加入4%~6%体积的正丙醇时效果最好,此时,荧光增敏程度大,而且试剂造成的背景荧光峰小。

2.4 校正曲线的线性关系和方法检测限

配制一系列浓度的1-HP标准溶液,内含一定量的 β -CD和正丙醇。按1.3实验方法中所述操作,然后测定同步荧光强度,绘制校正曲线。

在 1.0×10^{-9} ~ 2.0×10^{-7} mol/L的线性范围内,校正曲线的线性回归方程为 $y=4.6243x+8.183$,线性拟合的相关系数为0.9998。空白样($n=7$)的相对标准偏差(RSD)为3.9%,以3倍空白样RSD除以校正曲线的斜率,得出检测限为 2.5×10^{-11} mol/L。

2.5 方法精密度

平行配制5份同浓度($C=5\times 10^{-8}$ mol/L)的标准溶液,测量同步荧光值。计算该方法的RSD,结果为3.8%。

2.6 样品的测定

2.6.1 自来水样测定

取一定体积的自来水,加入一定量的1-HP标准溶液,然后移取其中1 mL,至10 mL棕色容量瓶中,加入一定量 β -CD和正丙醇,按1.3实验方法中所述操作,然后测定同步荧光强度。结果列于表2。

表2 自来水样测定结果

样品	1-HP加标量 / μ mol	测得值 / μ mol	回收率 /%
空白	0	0	/
1	+100	101	101.0
2	+500	512	102.0
3	+1000	971	97.1

2.6.2 人尿样品的测定

采集 3 份人的尿样,分别取 10 mL,加入一定量的 1-HP 标准溶液,然后移取其中 1 mL 至 10 mL 棕色容量瓶中,加入一定量 β -CD 和正丙醇,按 1.3 实验方法中所述操作,然后测定同步荧光强度。结果列于表 3。

表 3 人尿样品测定结果

样品	1-HP 加标量 / μmol	测得值 / μmol	回收率 %
空白	0	65.6	/
1	+100	131.6	79.5
2	+200	221.3	83.3
3	+300	317.4	86.8

3 结语

本实验利用 β -CD 和正丙醇协同增强水溶液中 1-HP 的同步荧光,相对于纯水溶液,荧光强度增加 70%~180%,相对于加入 β -CD 的水溶液,增加 50%~60%,该方法检测限可以达到 2.5×10^{-11} mol/L。标准溶液的校正曲线线性良好,测量精密度较高,对实际自来水样和人尿样测定后,回收率较好,证明本方法稳定、可靠,可以应用于实际检测。

参考文献:

- [1] Krahn M M, Burrows D G, Macleod W D *et al.* Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways[J]. *Xenobiotica*, 1987, 14(2): 633-646.
- [2] Jongeneelen F J, Bos R P, Henderson P Th. Metabolites of PAHs in urine of exposed workers[J]. *Toxicol Environ Chem*, 1988, 16(4): 295-307.
- [3] 赵振华, 田德海, 金文熠, 等. 尿中 1-羟基芘的同步荧光测定法[J]. *环境化学*, 1994, 13(2): 141-145.
- [4] 张勇, 王淑红, 朱亚先, 等. 同步荧光法检测鱼胆汁中的 1-羟基芘[J]. *分析化学*, 2002, 30(4): 467-469.
- [5] 睦蔚. 多环芳烃及其代谢产物的同步荧光分析新方法研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2000.
- [6] 陈国珍, 黄贤智, 郝朱梓, 等. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [7] 江云宝, 黄贤智, 陈国珍. 荧光光谱和吸收光谱研究脂肪醇与 β -环糊精的相互作用[J]. *物理化学学报*, 1991, 7(3): 289-293.

Determination of 1-Hydroxyl Pyrene in Tap Water and Human Urine by Enhanced Synchronous Fluorescence Spectrometry with β -Cyclodextrin and n-Propyl Alcohol

LIN Chen, GENG An-chao, ZHANG Yong

(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Joint use of β -Cyclodextrin and n-propyl alcohol can enhance synchronous fluorescent intensity of 1-hydroxyl pyrene (1-HP) greatly. Based on this phenomenon, experiments were carried out, a new method for the determination of 1-HP established by enhanced Synchronous Fluorescence Spectrometry. The limitation of determination of this method was 2.5×10^{-11} mol/L, RSD=3.8% ($n=5$). Tap water and human urine samples were determined by this method, and satisfying data were gained.

Key words: synchronous fluorescence spectrometry; n-propyl alcohol; cyclodextrins; 1-Hydroxyl Pyrene; tap water; human urine