



Eu - TTA 体系测定条件的优化及其在小麦代谢研究中的应用

曾福礼* 吴 翠 安 宜 邓汝温 王怀公

(兰州大学生命科学学院 化学化工学院 兰州 730000)

摘要 研究了铕(Ⅲ) - TTA(邻 - 噻吩甲酰三氟丙酮)体系在有机溶剂和邻菲罗啉衍生物存在下的荧光性质,发现醇类有机溶剂能使 Eu(Ⅲ) - TTA 体系荧光强度大幅度提高;三种邻菲罗啉衍生物中,4,7 - 二苯基 - 2,9 - 二甲基 - 1,10 - 邻菲罗啉的加入也能提高体系灵敏度.优化了反应条件,并用此法研究了小麦根施 Eu^{3+} 数天后, Eu^{3+} 在根和叶片细胞膜和细胞内的分布定位,为稀土元素的植物代谢研究提供了一种重要的辅助研究手段.

关键词 铕(Ⅲ), TTA(邻 - 噻吩甲酰三氟丙酮), 荧光性质

Study of Eu(Ⅲ) Metabolism in Wheat Cells by Eu(Ⅲ) - TTA - 4,7 - Diphenyl - 2,9 - dimethyl - 1,10 - phenanthroline System

ZENG Fu - Li^{a*} WU Hui^b AN Yi^b DENG Ru - Wen^b WANG Huai - Gong^b

(^a School of Life Science, ^b College of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, 730000)

Abstract Study on the fluorescence properties, the application in plant metabolism and distribution and localization of Eu(Ⅲ) - TTA system has been undertaken. The presence of alcohol solvent and 4,7 - diphenyl - 2,9 - dimethyl - 1,10 - phenanthroline can yield high sensitivity. The measuring conditions have been improved and used satisfactorily in analyzing the content of Eu(Ⅲ) which was absorbed by wheat (triticum aestivum L) root and leave cells. An optimal method has been developed for the study of plant metabolism.

Keywords Eu(Ⅲ), TTA(2 - thenoyltrifluoroacetone), fluorescence property

铕是一种十分重要的稀土生命元素,在一定条件下具有内源荧光,其多种生理活性在医药研究中早已引起人们的广泛关注.近年来,铕在植物生理学上的生理活性也得到广泛的研究^[1~3].随着稀土资源的开发利用(稀土农肥、农药)^[2],Eu 也不可避免地越来越多进入生态环境,所以,铕的分析在研究稀土对农作物的增产机理、稀土在植物体甚至人体内的分布和生物大分子降解过程时占有越来越重要的地位.近年来, Eu - TTA 荧光体系由于适用范围广,

操作简便而日益受到科研工作者的关注^[4~9].但该体系检测限高,灵敏度低,不能满足某些特定体系中铕的测定,且多数需要萃取,受第三组分影响较大,使其应用受到一定限制.本文在以往应用 Eu - TTA 荧光体系检测铕在小麦细胞内分布定位研究的基础上,在原体系中加入有机溶剂优化测试条件,并用此法研究了小麦在根施 Eu^{3+} 数天后, Eu^{3+} 在根和叶片细胞膜和细胞内的定位,初步探讨了有机溶剂化效应和三元配合物的生成对 Eu - TTA 体系荧光性质的

* E - mail: swxzsl@lzu.edu.cn

收稿日期: 1999 - 10 - 25, 修回日期: 2000 - 01 - 24, 定稿日期: 2000 - 03 - 26, 国家自然科学基金(9770183)资助项目

(Received October 25, 1999. Revised January 24, 2000. Accepted March 26, 2000)

影响,结果表明优化后的 Eu-TTA 荧光体系使荧光强度增大,检测限变低,灵敏度提高,排除了第三组分干扰测试结果的影响,扩展了适用范围.铕在细胞内与蛋白质的结合不具有随机性,而主要是富集和积累在细胞膜上和线粒体内.

1 实验

1.1 试剂与仪器

铕标准溶液: Eu_2O_3 (99.99%) 用少量 HCl 溶解,配制成 $1\mu\text{g/mL}$ EuCl_3 溶液, EDTA 标定. TTA: 0.01 mol/L 的乙醇溶液. 邻菲罗啉衍生物均为 φ (乙醇) = 1% 溶液. 缓冲溶液: pH 4.7 HAc-NaAc 溶液, 纤维素酶 ONOZUK'R-10 (日本 Yakult 公司产品), 果胶酶 (澳大利亚 Serva 公司产品) 其余试剂均为国产分析纯, 水为二次蒸馏水.

岛津 RF 540 荧光光度计; PHS2 型酸度计.

1.2 方法

小麦 (*triticum. aestivum* L) 种子经 φ (HgCl_2) = 0.1% 消毒 20min 后, 浸泡 12h, 吸胀, (23 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 暗箱萌发, 用缺钙的 Hoagland 完全培养液 (每升溶液含 KNO_3 0.5mmol, KH_2PO_4 2mmol, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mmol, 5% 酒石酸铁溶液 1mL, A-Z 溶液 1mL, 其中 A-Z 溶液中含 2.86mg H_3BO_3 , 0.08mg $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.22mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.09mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.09mg $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 进行饥饿培养, 待苗长至 3~4cm (4d), 换用 5mmol/L EuCl_3 溶液 [对照除不含 Eu^{3+} 外其余条件与处理相同, 培养温度 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 70%~80%], 幼苗长至 6~7cm 时, 剪取根与叶片用 EDTA 及二次蒸馏水冲洗 5 次, 吸干水分, 分离原生质体备用.

清除铕及其它金属离子在小麦实验材料部位的残留: 利用二次蒸馏水和 10mmol/L EDTA 各 50mL 洗涤 (浸泡 0.8h) 对照样与处理实验材料样后, 取清洗液 2mL 测定荧光强度的变化. 结果显示: 用 EDTA 溶液和二次蒸馏水间隔清洗 3 次后, 溶液的荧光强度已降低到对照 (无 Eu^{3+} 离子) 水平, 从而排除了样品分析过程中, 附着的 Eu^{3+} 及其它金属离子干扰测定的可能性.

原生质体制备: 酶液组成为 2% Cellulose R-10, 5% Pectinase, 0.5mol/L 甘露醇, 3mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分离所得原生质体悬浮分为两组, 一组用以测定原生质体相对荧光强度, 另一组按方法^[10]进行. 所有操作均需在 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, 取原生质体悬浮

液, 破碎细胞, 10,000g 20min 沉降线粒体粗制品并纯化^[11], 80,000g 1h 沉淀细胞质膜, 不连续密度梯度离心纯化, 悬浮, 上清液为胞质可溶性部分, 含细胞内大部分蛋白.

荧光强度测定: 移取 0.25 μg Eu (III) 标准溶液于 25mL 比色管中, 依次加入 TTA 标液, 1mL HAc-NaAc 缓冲液 (pH4.7) 后, 加入 2mL 1% 4,7-二苯基-2,9-二甲基-1,10-邻菲罗啉溶液, 95% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 于 (60 ± 3) $^{\circ}\text{C}$ 水浴上加热 30min 室温放置 20min. 在 RF540 荧光分光光度计上于 $\lambda_{\text{ex}} = 365\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 616\text{nm}$ 处以试剂空白为参数测定相对荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 有机溶剂对体系荧光性质的影响

实验结果表明: 醇类有机试剂的加入, 使 Eu-TTA 体系荧光强度增大, 其中乙醇提高荧光强度的幅度最大, 但最大 λ_{ex} , λ_{em} 变化小, 说明溶剂没有参加配位反应. 而且, 醇类对体系荧光强度有不同程度增强, 常用的非醇类溶剂丙酮和 1,4-二氧六环则没有增敏作用, 有机溶剂增敏次序为: 乙醇 > 正丁醇 > 正丙醇 > 叔丁醇 > 异丙醇 > 异丁醇 > 甲醇 > 乙二醇, 本实验选用乙醇作溶剂. 荧光强度的增强与有机溶剂的物理性质如粘度^[11]、表面张力等没有明显的依赖关系, 这表明有机溶剂对配合物荧光性能的影响是复杂的和多方面的^[12]. 可能的情况是醇类有机溶剂的加入使 Eu-TTA 配合反应的微环境发生了变化, 它可能在没有破坏 Eu-TTA 二元配合物的荧光中心的前提下保护了配合物的激发单线态, 此外, 有机溶剂能排斥水分子进入配位内界, 增大了络合物溶解度提高了荧光强度. 不同醇类, 其最佳 pH 范围不同, 这与不同结构的溶剂具有不同溶剂化效应有关, 而且, 只有当有机醇类溶剂在体系中的含量超过 80% 时, 才有较大增敏作用.

2.2 二元配合物的组成及 K_s , 溶剂化数和溶剂化常数的测定

分别用摩尔比法及平衡移动法测定配合物组成, 二者一致结果为 Eu (III): TTA = 1:3 (摩尔比), $K_s = 2.03 \times 10^{16}$, 由平衡移动法所测得溶剂化数及溶剂化常数说明溶剂化常数与荧光强度没有定量关系.

2.3 三元配合物的形成对 Eu-TTA 体系荧光性质的影响

从表 1 可知, 邻菲罗啉衍生物的加入, 不仅改变

了体系荧光强度,激发波长也有改变.第三组分取代基不同,分子激发所吸收能量发生改变,导致激发波长发生变化^[12],体系 V 的灵敏度高,线性范围宽.这是由于基团的增敏效应顺序为:苯基 + 甲基 > 甲基 > H > 硝基,供电子能力强的基团可对体系提供更多的配位体微扰 $m \rightarrow m^*$ 跃迁^[13],本实验选用体系

V 进行测定.

2.4 放置时间与反应温度的影响

实验表明,温度对体系荧光强度影响较大,随温度升至 50 ~ 70℃,体系荧光强度达稳定,本文选用 60℃ 加热 30min,室温放置 20min.

表 1 邻菲罗啉及其衍生物对 Eu(0.01μg/mL) - TTA 荧光性质的影响

体系	I	II	III	IV	V
第三组分	—	邻菲罗啉	5-硝基-1,10-邻菲罗啉	2,9-二甲基-1,10-邻菲罗啉	4,7-二苯基-2,9-二甲基-1,10-邻菲罗啉
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	347/617	374/613	373/617	350/617	365/616
荧光强度	30.0	108	100	137	195.3
最佳 pH 范围	4.4 ~ 5.0	4.5 ~ 6.3	5.0 ~ 5.9	4.5 ~ 5.0	4.5 ~ 5.0
TTA 用量(mL)	1.0	1.0	2.0	0.7	2.0
第三组分用量(mL)	0.5 ~ 1.1	0.5 ~ 1.5	1.5 ~ 2.5	< 1.0 ^b	1.3 ~ 2.7
检测限(μg)	0.005	0.004	0.004	0.003	0.002
线性范围(μg/mL)	0 ~ 0.012	0 ~ 0.015	0 ~ 0.014	0 ~ 0.020	0 ~ 0.030

a. 当 2,9-二甲基-1,10-邻菲罗啉用量大于 1mL 时,荧光强度低于 Eu-TTA 体系荧光强度, $\Delta F < 0$; b. 各体系内均含 φ (乙醇) = 0.80.

2.5 共存离子的影响

按实验方法测定了 17 种金属离子的干扰,结果表明,对在允许误差 3% 范围内,10 倍的 La(III), Y(III), Ho(III), Sm(III), Er(III), Mg(II), 100 倍的 Ba(II), Cr(III), Ni(II), Al(III), 200 倍的 Co(II); 50 倍的 Mn(II), Ca(II), Ge(II) 对反应不产生干扰; Fe(III), Cd(II), Ce(III) 对体系有干扰,这些物质可在样品处理过程中被除去.

稀土元素程度量的重物质指标之一.

表 2 EuCl₃ 处理后根和叶片细胞不同部分 Eu(III) 含量的变化 [10^{-4} μg/mg(Pr)]

	原生质体	质膜	线粒体	胞质可溶性部分
根	26.849 ± 1.172	40.267 ± 1.584	86.562 ± 1.012	0
叶	34.233 ± 1.511	19.812 ± 2.331	27.056 ± 0.297	0

3 样品分析

3.1 分析结果

分离所得的原生质体、质膜、线粒体与胞质部分, 80℃ 强酸消化 $V(HClO_4): V(HNO_3) = 1:3$, 所得白色粉末用去离子水溶解, 置于 10mL 比色管中加一滴 0.1% 甲基红指示剂, 用 $\varphi(NH_4OH) = 0.05$ 和 $\varphi(HCl) = 0.03$ 调节溶液使其变红后, 依实验方法测定, 结果见表 2.

表 2 显示, Eu^{3+} 进入植物细胞后, 与胞内蛋白质的结合并不是随机的, 根和叶片中线粒体均比质膜有更高的亲合性, 积累的 Eu^{3+} 多, 植物一旦受到稀土元素毒害时, 首先受伤害的部位可能是线粒体. 因此, 检测其积累稀土离子的量可以作为检测土壤中

3.2 回收实验

表 3 回收实验 [$Eu 10^{-4}$ μg/mg(Pr)]

样品	测得值	加入量	回收量	回收率(%)
质膜(根)	40.267 ± 1.584	20	19	98
线粒体(根)	86.562 ± 1.012	20	18	96

表 3 表明, 体系回收率较好, 结果令人满意.

以上分析表明: Eu-TTA-4,7-二苯基-2,9-二甲基-1,10-邻菲罗啉体系具有检测限低, 操作简便, 精确度高, 操作时间短, 测定过程中不需要萃取等优点. 因此, 用该法进行痕量 Eu 的荧光分析不仅在植物代谢研究中具有广泛的应用前景, 而且可应用于不同学科领域的类似研究, 是一种可信的、重要的辅助研究方法.

References

- 1 LU Kuan - Ke, *Journal of Benjing Medical University*, **1997**, 29(4), 289 (in Chinese).
- 2 SHI Gang - Lin, *Plants*, **1996**, 1, 33 (in Chinese).
- 3 WU Zhao - Min, *Chin. J. Rare Earths*, **1988**, 6(1), 67 (in Chinese).
- 4 ZHOU Ji - Xin, PING Xi - Kang, *Rock and Mineral Analysis*, **1988**, 7(4), 295 (in Chinese).
- 5 SHI Hui - Ming, CUI Wan - Cang, *Chin. J. Anal. Chem.*, **1982**, 10, 561 (in Chinese).
- 6 T. Taketatsu, A. Sato, *Anal. Chim. Acta.*, **1979**, 108, 429.
- 7 E. V. Mdenteva., N. S. Poluektov, L. I. Kononenko, *Zh. Anal. Khim.*, **1967**, 22, 187.
- 8 L. I. Knonenko, N. S. Poluektov, M. P. Nikonova, *Zavod. Lab.*, **1964**, 30, 779.
- 9 ZHANG Kun, *Chinese Science Bulletin*, **1988**, 14, 10 (in Chinese).
- 10 B. S. Serlin, S. K. Sopory, S. L. Roux, *Plant Physiol*, **1984**, 74, 827.
- 11 WANG Huai - Gong, LI Lan - Yun, *Chem. J. Chin. Univ.*, **1987**, 8(7), 601 (in Chinese).
- 12 CHEN Neng - Lin, HU Sheng - Wen, "Solvents Handbooks", Beijing, Chemical Industry Publishing House, **1987**, p. 2, 30 (in Chinese).
- 13 CHEN Guo - Zhen, *Fluorescence Technology*, Beijing, Science Press, **1990**, 33 (in Chinese).

(Ed. SHEN Hong)

(DONG Hua - Zhen)