

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG PHỨC PHÁT QUANG Eu(III)-OTC ĐỂ XÁC ĐỊNH ATP

Đến tòa soạn 10-11-2019

Trần Thượng Quảng, Vũ Thị Hậu, Trần Thu Quỳnh, Vũ Anh Tuấn,
Lương Xuân Điền, Nguyễn Xuân Trường
Viện Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

SUMMARY

STUDY ON APPLICATION OF LUMINESCENT COMPLEX Eu(III)-OTC FOR IDENTIFICATION OF ATP

In this paper, we have investigated the application of luminescent complex Eu(III)-OTC for identification of ATP (adenosine disodium triphosphate) in water. The Eu(III)-OTC complex is prepared by the mixing of Eu^{3+} ion and OTC ligand (oxytetracycline) with a 1:1 molar ratio. The luminescent intensity of the complex is at $\lambda_{em} = 616 \text{ nm}$, which is used for quantification of ATP. The luminescent intensity decreases with ATP concentration according to the Stern-Volmer equation with the linearity over range of $5,0 \times 10^{-7} \div 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ (coefficient correlation $R^2 = 0.9925$) and LOD of $9,6 \times 10^{-8} \text{ M}$. The Eu(III)-OTC complex is potential for ATP determination.

Keywords. Luminescent complex, Eu(III), oxytetracycline, adenosine disodium triphosphate.

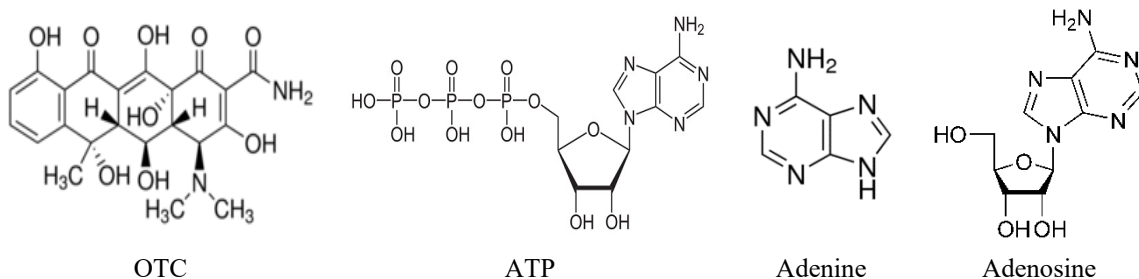
1. MỞ ĐẦU

Adenosine-disodium-triphosphate (ATP) có mặt trong mọi tế bào sống có chức năng dự trữ năng lượng. Việc xác định ATP sẽ cho biết thông tin về số lượng vi sinh vật trong mẫu kiểm tra.

Phương pháp ATP quang sinh học đang được áp dụng để kiểm tra vệ sinh an toàn thực phẩm cho các cơ sở sản xuất chế biến thực phẩm; đây là phương pháp mới, tiên tiến. Nguyên tắc của phương pháp ATP quang sinh học, ATP trong tế bào được giải phóng nhờ các tác nhân cation, dưới tác dụng của enzym luciferin và sự có mặt của Mg^{2+} sẽ tạo ra phản ứng phát quang. Cường độ phát quang tỷ lệ thuận với lượng ATP có trong mẫu [1,2].

Ngoài phương pháp quang sinh học, hiện nay đã có nhiều công trình nghiên cứu xác định ATP bằng phương pháp phát quang hóa học. Phương pháp này có độ chọn lọc cao, độ nhạy tốt và có ưu điểm là sử dụng những hóa chất

sẵn có, bảo quản thuốc thử dễ dàng. Đã có nhiều công trình nghiên cứu xác định ATP bằng phương pháp phát quang hóa học sử dụng phức chất phát quang của nguyên tố đất hiếm Eu/Tb hay kim loại chuyển tiếp Cu/Zn [3-14]. Phức chất phát quang của Eu, Tb, Cu, Zn,... với phối tử hữu cơ (imidazole, β -diketonate, pyridine,...) có những đặc tính quang lý nổi trội như: độ dịch chuyển Stokes lớn, thời gian phát quang tương đối “dài” (cỡ μs) và có các dải phát xạ hẹp. Độ dịch chuyển Stokes lớn nên sự phát quang không bị hấp thụ bởi chính khung phối tử hữu cơ của nó (hiện tượng nội hấp thụ) do đó giảm nhiễu nền. Thời gian phát quang “dài” nên loại bỏ hoàn toàn những tín hiệu nền nhiễu gây ra bởi các hiện tượng phát quang ngắn hơn. Hơn nữa, do dải phát quang hẹp nên làm tăng độ nhạy của phép đo. Do đó, phức chất phát quang cho đáp ứng tín hiệu/nền lớn và nhạy với đối tượng phân tích.



Hình 1: Công thức cấu tạo của phân tử OTC, ATP, adenine và adenosine

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu ứng dụng phức chất phát quang của Eu(III) với oxytetracycline (OTC), một phối tử loại β -diketonate (Hình 1), để xác định anion ATP (adenosine disodium triphosphate).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

2.1.1. Hóa chất

Eu₂O₃ (99,8%), adenosine disodium triphosphate (ATP, 99,8%), adenosine (99,8%) và adenine (99,8%) được mua từ Sigma Aldrich.

Các hóa chất và dung môi khác gồm đệm Tris-HCl 0,01M pH = 7,5, NaNO₃, Na₂CO₃, Na₂SO₄, Na₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ (Trung Quốc); nước cất 2 lần được sử dụng để pha chế dung dịch trong các thí nghiệm.

2.1.2. Thiết bị

Phổ hấp thụ phân tử của các chất nghiên cứu được ghi trên máy quang phổ UV-Vis 8453 Agilent. Phổ huỳnh quang của phức chất được ghi trên máy đo Brolight 6102 ($\lambda_{ex} = 405$ nm). Tất cả thí nghiệm đều được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ phòng.

Một số thiết bị khác trong phòng thí nghiệm như máy cô quay chân không, máy khuấy từ và máy đo pH Hanna 2215.

2.2. Tổng hợp phức phát quang Eu(III)-OTC

Phức chất phát quang Eu(III)-OTC được tổng hợp dựa theo các tài liệu tham khảo [3,7], gồm các bước như sau:

Muối EuCl₃ được tạo thành bằng cách cho Eu₂O₃ tác dụng với một lượng HCl 0,1M tối thiểu đủ để hòa tan hết, sau đó cô cạn dung dịch. Tiếp theo, thêm một lượng ethanol gấp

hai lần lượng axit HCl đã dùng. Khuấy 5 phút, cho tiếp 1-2 giọt NaOH 2N. Rồi tiếp tục thêm OTC vào hỗn hợp trên, khuấy trộn trong 30 phút. Tỷ lệ số mol giữa phức Eu³⁺ và OTC được lấy theo tỷ lệ là 1:1. Quá trình tổng hợp phức phát quang được thực hiện ở 60°C.

2.3. Quan hệ giữa cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC và nồng độ ATP – Phương trình Stern-Volmer

Trong dung dịch với nồng độ ATP tăng dần, cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC giảm dần. Sự phụ thuộc của cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC vào nồng độ ATP được biểu diễn theo phương trình Stern-Volmer [15]:

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K_{SV} [ATP] \quad (1)$$

Trong đó:

I_0 và I tương ứng là cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC trong dung dịch nghiên cứu không có và có ATP;

[ATP]: nồng độ ATP trong dung dịch;

K_{SV} : hằng số Stern-Volmer.

Phương trình Stern-Volmer, phương trình tuyến tính bậc nhất biểu diễn mối quan hệ giữa

đại lượng $\frac{I_0}{I}$ và [ATP], là cơ sở để xác định

ATP theo phương pháp quang phổ phát quang.

2.4. Xác định giới phát hiện ATP sử dụng phức Eu(III)-OTC

Giới hạn phát hiện (LOD) ATP bằng phương pháp quang phổ phát quang sử dụng phức Eu(III)-OTC được tính toán theo phương trình 2 [16]:

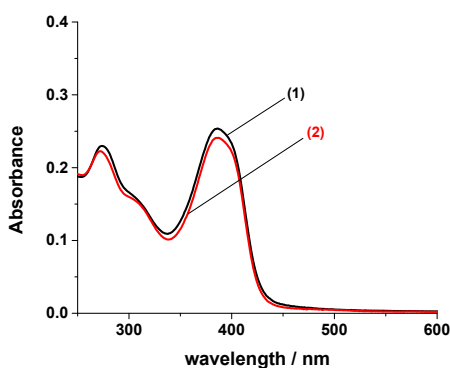
$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{a} \quad (2)$$

Trong đó, SD là độ lệch chuẩn của mẫu trắng thêm chuẩn. a là độ dốc của đường chuẩn (phương trình Stern-Volmer).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

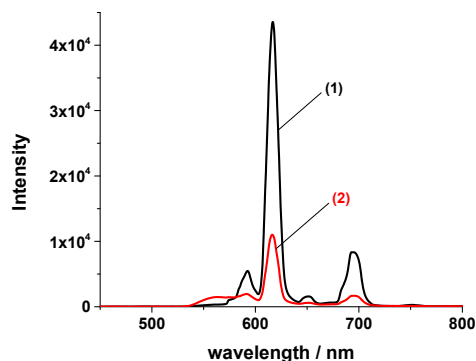
3.1. Phổ hấp thụ phân tử và phổ phát quang của phức Eu(III)-OTC

Phổ hấp thụ UV-Vis của phức Eu(III)-OTC được chỉ ra ở Hình 2. Phức Eu(III)-OTC hấp thụ ở bước sóng $\lambda \sim 200 \div 500$ nm, với cực đại hấp thụ tại $\lambda_{\max} \approx 385$ nm, ứng với bước chuyển dời điện tử $\pi-\pi^*$ của OTC. Nhận thấy, trong môi trường đệm Tris-HCl pH = 7,5 và trong nước phổ hấp thụ phân tử UV-Vis của phức gần như tương đương. Tuy nhiên, độ hấp thụ của phức Eu(III)-OTC trong đệm Tris-HCl có lớn hơn trong nước.



Hình 2: Phổ hấp thụ UV-Vis của phức Eu(III)-OTC 6,20 mg/L (1) trong đệm Tris-HCl pH = 7,5 và (2) trong nước

Hình 3 chỉ ra phổ phát quang của phức Eu(III)-OTC trong môi trường đệm Tris-HCl pH = 7,5 và trong nước. Phổ phát quang của phức Eu(III)-OTC cho thấy đã có sự chuyển electron từ OTC sang ion Eu(III) tạo nên những bước sóng phát xạ đặc trưng của ion Eu(III): $\lambda_{em} = 590; 616$ và 695 nm. Cường độ phát xạ của phức trong môi trường đệm mạnh hơn trong nước $\sim 4,5$ lần nên dung dịch đệm Tris-HCl được dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

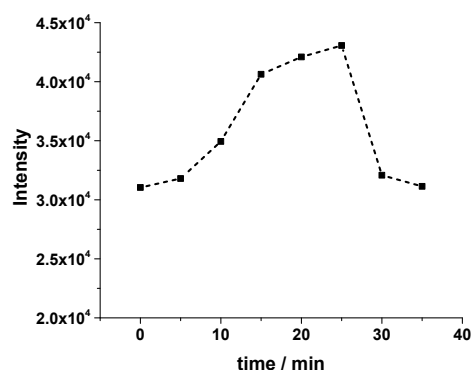


Hình 3: Phổ phát quang của phức Eu(III)-OTC 6,20 mg/L (1) trong đệm Tris-HCl pH = 7,5 và (2) trong nước

3.2. Nghiên cứu ứng dụng phức phát quang Eu(III)-OTC để xác định ATP

3.2.1. Thời gian phản ứng

Kết quả khảo sát thời gian phản ứng (Hình 4) cho thấy, khi thêm ATP cường độ phát quang (I) của phức Eu(III)-OTC là mạnh nhất sau 25 phút ổn định mẫu. Do đó, trong các nghiên cứu tiếp theo mẫu được để ổn định trong vòng 25 phút trước khi đo.

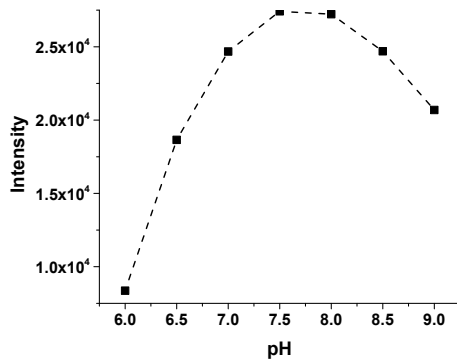


Hình 4: Ảnh hưởng của thời gian đến cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC ($[ATP] = 5,0 \times 10^{-7} M$).

3.2.2. Ảnh hưởng của pH

Cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC khi thêm ATP với pH = 6 - 9 được chỉ ra ở Hình 5. Kết quả khảo sát cho thấy, trong môi

trường kiềm pH >8 cường độ phát quang của phức giảm dần, điều này được giải thích do sự tạo thành các phức cạnh tranh – phức hydroxo của ion Eu^{3+} . Trong môi trường kiềm yếu đến axit yếu ($8 > \text{pH} > 6$), cường độ phát quang của phức giảm dần, tại giá trị pH = 7,5 phức Eu(III)-OTC cho cường độ phát xạ huỳnh quang mạnh nhất. Do đó, môi trường đệm Tris-HCl pH = 7,5 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo vì khi đó phép phân tích sẽ có độ nhạy cao nhất.



Hình 5: Ảnh hưởng của pH đến cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC ($[\text{ATP}] = 7,5 \times 10^{-7} \text{ M}$).

3.2.3. Độ chọn lọc

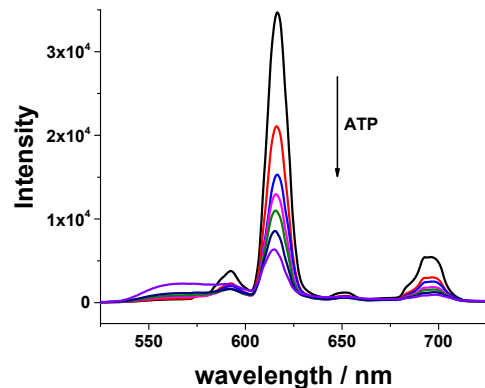
Ion Eu^{3+} có khả năng tương tác hoặc tạo liên kết với một số anion trong dung dịch, đồng thời những phân tử có một phần cấu trúc giống ATP (adenosine và adenine – Hình 1) cũng có thể có tương tác làm thay đổi cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC. Do vậy, độ chọn lọc của phức Eu(III)-OTC được khảo sát với một số anion và phân tử sau: NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , adenosine và adenine. Kết quả khảo sát (Bảng 1) cho thấy, sự có mặt của các anion NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} và phân tử adenosine, adenine trong dung dịch với nồng độ $< 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ không làm ảnh hưởng đến cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC. Tuy nhiên, sự có mặt của các anion khác với nồng độ nhỏ PO_4^{3-} ($> 5 \times 10^{-6} \text{ M}$), HPO_4^{2-} ($> 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$), H_2PO_4^- ($> 5 \times 10^{-6} \text{ M}$) gây ảnh hưởng đến tín hiệu phát quang của phức. Do đó, không sử dụng phức Eu(III)-OTC để xác định ATP trong dung dịch có chứa phosphate anion.

Bảng 1: Ảnh hưởng của một số anion và phân tử khác đến cường độ phát quang của phức Eu(III)-OTC

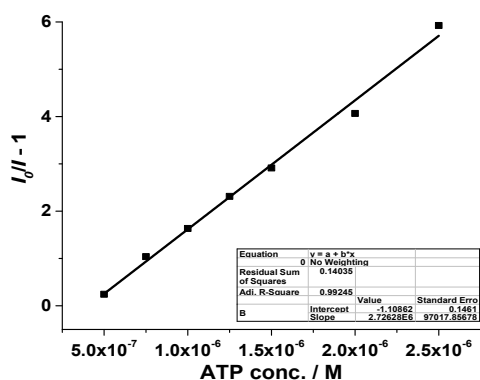
Anion	Nồng độ (mol L ⁻¹)	$\Delta I/I_0$ (%)
NO_3^-	$1,0 \times 10^{-4}$	+ 2,60
SO_4^{2-}	$1,0 \times 10^{-4}$	+ 1,69
CO_3^{2-}	$1,0 \times 10^{-4}$	+ 2,23
PO_4^{3-}	$5,0 \times 10^{-6}$	+ 0,92
HPO_4^{2-}	$2,5 \times 10^{-5}$	+ 0,17
H_2PO_4^-	$5,0 \times 10^{-6}$	- 8,94
Adenine	$1,0 \times 10^{-4}$	-1,67
Adenosine	$1,0 \times 10^{-4}$	- 2,96

3.2.4. Giới hạn phát hiện ATP

Phổ phát quang của phức Eu(III)-OTC khi tăng dần nồng độ ATP được biểu diễn ở Hình 6a; tương quan giữa cường độ phát quang (I) và nồng độ ATP tương ứng theo phương trình Stern-Volmer được biểu diễn ở Hình 6b. Kết quả cho thấy, I giảm khi nồng độ ATP tăng; khoảng tuyến tính xác định ATP được lựa chọn từ $5,0 \times 10^{-7} \div 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9925$. Kết quả phân tích mẫu trắng thêm chuẩn ATP $5,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ cho giá trị độ lệch chuẩn SD = 0,07914 (n = 6). Từ đó tính toán được giá trị LOD = $9,6 \times 10^{-8} \text{ M}$.



Hình 6a: Phổ phát quang của phức Eu(III)-OTC trong dung dịch khi tăng dần nồng độ ATP



Hình 6b: Đường chuẩn xác định ATP sử dụng phức phát quang Eu(III)-OTC

Như vậy, bằng phương pháp quang phổ phát quang, phức Eu(III)-OTC có thể sử dụng để xác định nồng độ ATP trong nước.

4. KẾT LUẬN

Phức phát quang Eu(III)-OTC được sử dụng để xác định ATP trong những điều kiện tối ưu như sau: đệm Tris-HCl pH = 7,5; thời gian ổn định mẫu 25 phút và dung dịch phân tích không chứa phosphate anion với nồng độ $>5,0 \times 10^{-6} \text{M}$. Cường độ phát quang của phức được ghi tại bước sóng $\lambda_{em} = 616 \text{ nm}$, khoảng tuyến tính xác định ATP $5,0 \times 10^{-7} \div 2,5 \times 10^{-6} \text{M}$ và giới hạn phát hiện $1 \times 10^{-6} \text{M}$.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu được hoàn thành với sự tài trợ của đề tài B2019-BKA-06, Bộ Giáo dục và Đào tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Trần Thị Hào, *Đánh giá sự tương thích giữa phương pháp kiểm tra vi sinh vật truyền thống và phương pháp đo ATP quang sinh học trong quá trình kiểm tra vệ sinh của dây chuyền sản xuất bia ở Viện công nghiệp thực phẩm*, Luận văn Thạc sỹ Khoa học, 2011, Đại học Khoa học Tự Nhiên – Đại học Quốc Gia Hà Nội.

[2] Võ Minh Trí, Trần Linh Thuộc, *Khảo sát các điều kiện của phản ứng phát sáng sinh học cần ATP để định lượng nhanh vi sinh vật*, Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ ĐHQG TP. HCM, 2002, 5, 13-19.

[3] Xiaohui Wang, Hongjin Chang, Juan Xie, Baozhou Zhao, Botong Liu, Shuilin Xu, Wenbo Pei, Na Ren, Ling Huang, Wei Huang, *Recent developments in lanthanide-based*

luminescent probes, Coord. Chem. Rev., 2014, 273–274, 201-212.

[4] Xiao Liu, Jun Xu, Yinyun Lv, Wenyu Wu, Weisheng Liu and Yu Tang, *An ATP-selective, lanthanide complex luminescent probe*, Dalton Trans., 2013, 42, 9840-9846.

[5] Sneha Wankar, Aarti Saxena, Umar J. Pandit, Imran Khan, Ratnesh Das & Sudhir N. Limaye, *Synthesis and characterization of luminescent indole based Europium complex for selective sensing of ATP*, J Biomol Struct Dyn., 2017, 35, 2049-2054

[6] YingWu, Jia Wen, Hongjuan Li, Shiguo Sun, Yongqian, Xu, *Fluorescent probes for recognition of ATP*, Chinese Chemical Letters, 28, 2017, 1916-1924.

[7] Hou, F.; Miao, Y.; Jiang, C. Determination of Adenosine Disodium Triphosphate (ATP) Using Oxytetracycline-Eu³⁺ as a Fluorescence Probe by Spectrofluorimetry. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2005, 61 (13–14), 2891–2895.

[8] Hou, F.; Wang, X.; Jiang, C. Determination of ATP as a Fluorescence Probe with Europium(III)-Doxycycline. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* 2005, 21 (3), 231–234.

[9] Z.Y. Wu, J.N. Cui, X.H. Qian, T.Y. Liu, *Chin. Chem. Lett.* 24 (2013) 359-361.

[10] W. Feng, Q.L. Qiao, S. Leng, et al., *Chin. Chem. Lett.* 27 (2016) 1554-1558.

[11] A.J. Moro, P.J. Cywinski, S. Korsten, G.J. Mohr, *Chem. Commun.* 46 (2010) 1085-1087.

[12] V. Amendola, G. Bergamaschi, A. Buttafava, L. Fabbri, E. Monzani, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 147-156.

[13] A. Ojida, S. Park, Y. Mito-oka, I. Hamachi, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 6193-6195.

[14] E. Kataev, R. Arnold, T. Ruffer, H. Lang, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 7948-7950.

[15]. Joseph R. Lakowicz, *Principle of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3rd Edition, (2006).

[16]. Trần Cao Sơn, *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học & vi sinh vật*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2010.