

文章编号:1673-1689(2008)04-0030-04

荧光法研究头发光损伤

曹蕊, 曹玉华*

(江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:建立了头发中色氨酸的荧光分析方法,用该法研究了 UVB 辐射下头发中色氨酸的变化规律。头发样品以 5.5 mol/L 氢氧化钠溶液在 110 °C 下水解 20 h,在 pH 10.5 的磷酸二氢钠-氢氧化钠缓冲液中,激发波长为 280 nm、发射波长为 360 nm 处测定色氨酸的荧光强度。方法线性范围为 $8.00 \times 10^{-8} \sim 1.75 \times 10^{-6}$ g/mL,检测限为 1.6×10^{-8} g/mL,回收率在 96.3%~100.3%。头发样品中色氨酸的量随 UVB 辐射时间增加呈减少趋势,光照 28 d 后,色氨酸的损失率达到 18.8%。该法快速、简便、灵敏度高,可作为衡量头发光损伤的定量指标。

关键词: 荧光法;色氨酸;头发;光损伤

中图分类号:O 657.3

文献标识码:A

Study on Ultraviolet Damnification of Hair with Fluorescence Spectrometry

CAO Rui, CAO Yu-hua*

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A fluorescence spectrometry method has been developed to determine tryptophan in hair, and applied to evaluate hair damnification under UVB ultraviolet. 5.5 mol/L⁻¹ NaOH solution containing 0.5% soluble starch was used for hydrolysis of hair samples. In buffer of NaH₂PO₄-NaOH(p H 10.5), the fluorescent intensity of tryptophan was determined at 280nm as excitation wavelength and 360nm at emission wavelength. The linear range of tryptophan was from 8.0×10^{-6} g/mL to 1.75×10^{-6} g/mL. The detection limit of 1.6×10^{-8} g/mL and the recoveries ranged from 96.3% to 100.3%, these results showed that the method was sensitive and accurate. With increase of the irradiation time with UVB ultraviolet, tryptophan in hair was decreased. During 28days irradiation, tryptophan in hair was lost by 18.8%. Therefore this novel method could be used to measure ultraviolet damnification of hair.

Key words: fluorescence spectrometry; tryptophan; hair; ultraviolet damnification

头发受到日光中的紫外线的连续辐射,发表面角质消失,露出皮质层纤维,头发分叉和断裂,发结

构发生明显退化,因此头发的光防护不容忽视。Nacht^[1]等认为,头发中有二硫键的断裂,就属光损

收稿日期:2007-07-03.

基金项目:国家自然科学基金项目(20775028).

作者简介:曹蕊(1981-),女,河北石家庄人,分析化学硕士研究生.

* 通讯作者:曹玉华(1964-),女,江苏通州人,理学博士,教授,博士生导师,主要从事分析技术研究. Email: yu-huacao@yahoo. com. cn

伤;胡国胜^[2]采用头发张力仪测定模拟日光紫外灯照射头发的梳理功,记录梳理功曲线来评价光损伤。色氨酸在296~315 nm的紫外光下不稳定,容易产生光分解^[3],色氨酸可以推荐作为头发光损伤的灵敏标志物^[4],通常采用荧光技术,通过监测紫外光照射后头发中色氨酸的变化来定量评价头发光损伤的程度。

氨基酸分析最常用的方法是样品水解后,进行衍生化,用高效液相色谱法测定,可同时测定多种氨基酸。该方法准确、重现性好,但步骤繁琐,此外,水解中和后,不经脱盐直接上柱,易对树脂造成污染^[5]。头发中的色氨酸质量为头发角蛋白的0.7%,含量相对较少。荧光分析法具有灵敏度高、选择性好、操作方便等优点^[6],金静芳等采用荧光技术测定羽毛中的色氨酸含量^[7]。ISP公司采用荧光法测量了头发中的色氨酸含量^[8]。但受紫外线的辐射,头发中色氨酸含量变化的定量测定,目前尚无报道。作者通过头发在UVB波段的紫外光下照射不同时间,采用荧光法测定头发中色氨酸含量的变化,定量评价头发的光损伤。

1 材料与方 法

1.1 材料

头发:健康黑发,25岁女性提供。

1.2 仪器与试剂

分光光度仪:岛津RF-5301,配1 cm的吸收池,岛津公司产品;UVB紫外灯:40 W,南京华强电子有限公司产品;L-色氨酸:AR,中国医药集团上海化学试剂公司产品,用pH 10.5缓冲液配成 1×10^{-4} g/mL的标准储备液;水解液:含质量分数0.5%可溶性淀粉的5.5 mol/L的氢氧化钠溶液;pH缓冲溶液:0.5 mol/L磷酸二氢钠与0.5 mol/L氢氧化钠溶液以体积比为8.5:10混合,pH值为10.5。

1.3 标准溶液及样品溶液的制备

1.3.1 标准系列溶液配置 分别移取0.0、0.08、0.15、0.40、0.60、0.80、1.00、1.25、1.50、1.75 mL的 1×10^{-4} g/mL色氨酸储备液于100 mL容量瓶中,用pH 10.5的缓冲溶液定容,得到一系列色氨酸标准溶液。

1.3.2 样品及样品溶液制备 取一束健康干净头发均匀铺展开,置于UVB紫外灯下照射,照射距离25 cm,定时取样。实验样品为照射5,10,15,19,28 d的头发样品,未经UVB照射的头发作对照样^[6,7]。

将上述头发样品剪成1 cm左右的碎发,用石

油醚超声脱脂,在50 ℃烘箱内烘20 min。在避光处冷却至室温。

准确称取0.0150 g的头发样品于水解管内,加入新鲜配置的内含0.5%淀粉的5.5 mol/L的氢氧化钠溶液3 mL,将水解管抽真空2~3 min,封口,在烘箱中110 ℃水解20 h,放置暗处冷却至室温。

将水解物转移至已加有2.6 mL 6 mol/L盐酸的25 mL容量瓶中,用蒸馏水冲洗水解管5~6次,直至完全转移。用0.1 mol/L盐酸溶液调pH到5~6,然后再用0.5 mol/L的氢氧化钠溶液调pH到7~8,用蒸馏水定容,得到供试液。

1.4 荧光测定

选择280 nm作为激发波长,激发光谱狭缝宽度为3 nm,发射光谱狭缝宽度为5 nm,在270~700 nm波长范围快速扫描,得到色氨酸的荧光发射光谱。在最大发射波长360 nm测定荧光强度值,对色氨酸进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 条件优化

2.1.1 水解条件优化 酸碱水解提取法是较常用的氨基酸生产方法。但是采用酸水解法,头发中的色氨酸几乎全被破坏。因此,作者采用碱水解法。

考察氢氧化钠浓度对头发样品水解的影响,各称取0.0150 g未光照的头发样品,分别加入不同浓度的氢氧化钠水解液3 mL进行水解,测定色氨酸的荧光强度。从图1可知,5.5 mol/L氢氧化钠水解效果最好。

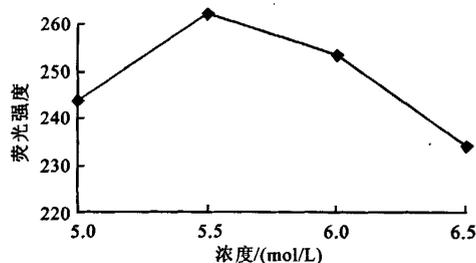


图1 水解液浓度对色氨酸荧光强度的影响

Fig. 1 Effect of concentration of hydrolysis solution on fluorescent intensity

2.1.2 缓冲液pH值的影响 色氨酸的荧光信号强弱与缓冲液pH值有很大的关系。作者考察了不同pH值缓冲液的荧光信号强度,如图2所示,色氨酸在pH 9.5~10.5缓冲液中,荧光信号较强。因此选择了pH 10.5的缓冲液。

2.2 方法学研究

2.2.1 回归方程及检出限 在最佳实验条件下,

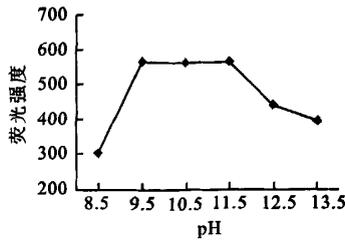


图2 缓冲液 pH 值对荧光强度的影响

Fig. 2 Effect of pH value of buffer on fluorescent intensity

对一系列标准溶液进行荧光测定,工作曲线见图3。得到色氨酸的线性范围为 $8.0 \times 10^{-8} \sim 1.75 \times 10^{-6}$ g/mL, 回归方程 $y = 4 \times 10^8 x + 6.4405$, 相关系数 0.9992。对未光照样品水解液连续取样测试7次, RSD=2.2%。由荧光信号强度相对标准偏差的3倍与工作曲线斜率之比, 得色氨酸的检出限为: 1.6×10^{-8} g/mL。

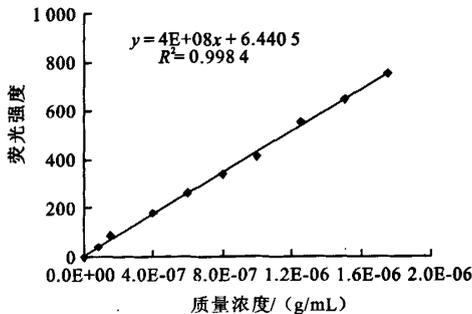


图3 色氨酸标准工作曲线

Fig. 3 The standard curve of tryptophan

2.2.2 重现性试验 对光照4d的头发样品连续取样测定7次, 荧光强度分别为: 217.419、217.611、214.834、213.495、214.284、214.285、214.2857 a. u., 其相对标准偏差(RSD)为: 0.91%。表明重现性良好。

2.2.3 稳定性研究 为了考察供试液的稳定性, 在1.5 h内每隔10 min取样测定一次, 荧光强度分别为: 214.085、212.092、213.202、208.633、212.153、209.71、211.047、209.498、208.922 a. u., 结果发现, 9次测定结果的相对标准偏差(RSD)为1.5%, 表明供试液稳定性良好。

2.2.4 干扰实验 在氨基酸分析中, 可以直接通过荧光技术检测的有色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。

未处理过的头发中, 色氨酸的质量为角蛋白的0.7%, 酪氨酸的质量为角蛋白的3.1%, 苯丙氨酸的量为角蛋白的2.7%。采用碱水解, 虽然含有酚羟基的酪氨酸会部分被破坏掉, 但仍有少部分存在; 色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸的最大激发波长和发

射波长为:

L-Trp: $\lambda_{ex} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 360$ nm; L-Tyr: $\lambda_{ex} = 276$ nm, $\lambda_{em} = 305$ nm; L-Phe: $\lambda_{ex} = 210$ nm, $\lambda_{em} = 303$ nm。可见在实验条件下, 苯丙氨酸对该实验无影响; 虽然在pH为10.5时, 色氨酸荧光强度最大, 是同等浓度下酪氨酸溶液的100倍^[9], 但由于色氨酸与酪氨酸的激发波长相近, 最大发射波长相差55 nm, 因此对酪氨酸的干扰进行了考察。

考虑到头发中酪氨酸的质量分数是色氨酸的4.4倍, 实验中先对 4×10^{-7} g/mL 的色氨酸标准样品测定了3次, 平均荧光强度为162.478 a. u., 然后对 4×10^{-7} g/mL 的色氨酸和 1.76×10^{-6} g/mL 的酪氨酸混合标准样品进行测定, 平均荧光强度为164.288 a. u., 实验结果发现: 加酪氨酸后, 色氨酸的平均荧光强度增高1.08%, 说明至少4.4倍色氨酸量的酪氨酸供试液的测定不产生影响, 所以头发中的色氨酸可直接用荧光法进行测定。

2.3 样品测定及回收率实验

UVB照射不同天数的头发样品及未经照射的对照样, 按1.3.2方法操作, 取2 mL供试液加入10 mL的pH 10.5的缓冲液, 混匀, 进行测定。结果见表1。发现随着紫外光辐射时间的增长, 头发样品中色氨酸的量呈下降趋势, 光照28 d后色氨酸的量下降了18.8%。通过测量头发中色氨酸的含量, 可以表征头发光损伤的严重程度。

表1 头发样品中色氨酸质量分数测定(n=3)

样品	照射天数/d	色氨酸质量分数/(mg/g)	RSD/%	相对降低值/%
1#	0	5.74	1.54	0.00
2#	5	5.33	0.69	7.14
3#	10	5.07	1.19	11.67
4#	15	4.97	1.43	13.41
5#	19	4.82	0.46	16.03
6#	28	4.66	0.84	18.80

用未经照射的对照发样, 进行了回收率测定。结果见表2, 回收率在96.3%~100.3%, 表明方法准确可靠。

表2 回收率试验(n=3)

样品质量浓度/(g/mL)	加标质量浓度/(g/mL)	加标后质量浓度/(g/mL)	回收质量浓度/(g/mL)	回收率/%
2.98×10^{-7}	3.3×10^{-7}	6.29×10^{-7}	2.99×10^{-7}	100.3
2.98×10^{-7}	3.3×10^{-7}	6.25×10^{-7}	2.95×10^{-7}	99.0
2.98×10^{-7}	3.3×10^{-7}	6.17×10^{-7}	2.87×10^{-7}	96.3

3 结 语

作者建立了头发中色氨酸荧光分析方法,并用该法研究了 UVB 辐射下头发中色氨酸的变化规

律。头发样品在光照条件下,头发中色氨酸的量呈减少趋势,在实验条件下光照 28 d 后,色氨酸的损失率达到 18.8%。该法快速,简便,灵敏度高,可作为衡量头发光损伤的定量指标。

参考文献(References):

- [1] Natcht S. Sunscreens and Hair, in Sunscreen, Development, Evaluation, and Regulatory Aspects[M]. New York: Marcel Dekker, Inc, 1990.
- [2] 胡国胜. 植物提取的防晒成分用于头发防晒作用的研究[J]. 日用化学工业, 2000(6): 60-61.
HU Guo-sheng. Study on the effect of solarizing-prevention by using the distilling from plant[J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2000(6): 60-61. (in Chinese)
- [3] 孙晓蓉. 理化因素对头发影响作用的研究方法与现状[J]. 日用化学工业, 1998(4): 41-44.
SUN Xiao-rong. The research methods and present status for effects of physicochemical factor on human hair[J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 1998(4): 41-44. (in Chinese)
- [4] 何学民. 头发的损伤与头发结构和组分的相互关系[J]. 日用化学工业, 2000, 30(4): 34-36.
HE Xue-min. Relationship between the damage of hair and the structure and composition of hair[J]. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2000, 30(4): 34-36. (in Chinese)
- [5] 李予霞, 王少珩. 色氨酸分析方法的筛选研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2001, 5(1): 41-44.
LI Yu-xia, WANG Shao-heng. A study on the determination method of tryptophan[J]. *Journal of Shihezi University: Natural Science*, 2001, 5(1): 41-44. (in Chinese)
- [6] 吴芳, 郭卫东, 张润, 等. 荧光法测定微藻中色氨酸的含量[J]. 实验与技术, 2005, 29(10): 1-4.
WU Fang, GUO Wei-dong, ZHANG Run, et al. Fluorescence measurement of tryptophan content in microalgae[J]. *Experiment & Tachnology*, 2005, 29(10): 1-4. (in Chinese)
- [7] 金静芳, 沈明泉. 荧光法测定羽毛中的色氨酸含量[J]. 氨基酸和生物资源, 1995, 17(4): 27-30.
JIN Jing-fang, SHEN Ming-quan. Measurement of the content of tryptophan in feather with fluorescence method[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 1995, 17(4): 27-30. (in Chinese)
- [8] Jachowicz J. photodegradation of hair and its photoprotection by a substantive photofilter[J]. *DCI*, 1995(12): 163-175.
- [9] 侯东岩, 回瑞华. 色氨酸和酪氨酸的双波长荧光光谱研究[J]. 分析实验室, 2001, 20(6): 88-89.
HOU Dong-yan, HUI Rui-hua. Study on double-wavelength fluorescence spectra of tryptophan and tyrosine[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2001, 20(6): 88-89. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)