

利用荧光增敏效应测定半胱氨酸的新体系研究

Study on a New Complex System of Determination of Cysteine by Spectrofluorimetry

黄志标¹ 王维生²HUANG Zhi-biao¹ WANG Wei-sheng²

(1.广西壮族自治区分析测试研究中心,广西南宁 530022; 2.上海烟草公司,上海 200082)

(1. The Center for Analysis & Test Research of Guangxi, Nanning, Guangxi, 530022, China;

2. Shanghai Tobacco Company, Shanghai, 200082, China)

摘要:在硼酸缓冲液和 In(III)-HQs 荧光络合体系中加入一定浓度的半胱氨酸,体系的荧光强度与半胱氨酸的加入量成正比,从而提出一种新的荧光光度法测定半胱氨酸。该方法测定半胱氨酸的检出限为 $15\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($SNR = 3$),大多数的氨基酸即使浓度较高时也无干扰。用该方法测定胱氨酸电解液中的半胱氨酸回收率为 $95.7\% \sim 101.3\%$ 。

关键词:半胱氨酸 荧光光度法 In(III)-8-羟基喹啉-5-磺酸荧光络合体系

中图分类号:O652.7 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2008)01-0060-04

Abstract The addition of cysteine (Cys) to the fluorescence system of In(III)-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid complex (In(III)-HQs) in $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer (pH 8.50) solution led to immediate fluorescence inhibition, which was proportional to their amounts. Based on this finding, a new spectrofluorimetric method for the determination of Cys has been developed. The detection limits was $15\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($SNR = 3$). Most amino acids had no interference at high concentrations. The proposed method has been applied to the determination of Cys in cysteine electrolyte, with recoveries of $95.7\% \sim 101.3\%$.

Key words cysteine, spectrofluorimetry, In(III)-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid complex

半胱氨酸 (Cys) 是组成蛋白质的主要氨基酸之一,有重要的生物学功能。对于 Cys 的测定,分光光度法^[1~3]和荧光法^[4~6]利用了 Cys 分子中巯基的反应活性和络合能力。Cys 与 5,5'-双硫双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 反应产生一种有较强吸收的物质,测定其吸光度可确定 Cys 的含量^[1,2]。利用 Cys 与马来酰亚胺类试剂^[4,5],可用荧光法测定 Cys。Cys 与 $\text{Ag(I)}\text{-}2\text{-TPPS}$ 络合物中 Ag(I) 络合后,体系荧光增强,可用于测定 $0 \sim 5 \times 10^{-7}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cys,检出限为 $1 \times 10^{-10}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($SNR = 3$)^[6]。

我们研究了 Cys 与 In(III)-8-羟基喹啉-5-磺酸 (HQs) 荧光络合体系的作用,发现 Cys 对 In(III)-HQs 体系荧光有增敏作用。Cys 浓度为 $0 \sim 0.4\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,体系荧光增强与其浓度成正比,可基于此测定 Cys。该方法体系简单,操作简便,灵敏度高, Cys 检出限 $15\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($SNR = 3$),选择性好,氨基酸允许量较大。该方法用于胱氨酸电解液中半胱氨酸的测定,回收率 $95.7\% \sim 101.3\%$, $RSD < 2.6\%$,结果令人满意。

1 实验部分

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-5000 型荧光分光光度计 (日本岛津出品), DF-80 酸度计 (中山大学出品)

8-羟基喹啉-5-磺酸 (自合成, A. R.): 用水配制成 $4.44 \times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液,操作液浓度为 $4.44\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; In(III) 标准溶液; 用 1: 盐酸溶解金属铟 (A. R.), 用水定容配制成 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,操作液浓度为 $10\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; L-半胱氨酸盐酸盐 (99.9%): 用水配制成 $8.25 \times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液 (使用时新鲜配

收稿日期: 2007-07-13

修回日期: 2007-10-23

作者简介: 黄志标 (1966-), 男, 硕士, 工程师, 主要从事分析检测管理研究工作。

制);缓冲溶液:在酸度计上将 $0.05\text{mol L}^{-1}\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液和 $0.2\text{mol L}^{-1}\text{H}_3\text{BO}_3$ 溶液(含 $0.05\text{mol L}^{-1}\text{NaCl}$)混合调至 pH 值为 8.50 水为二次蒸馏水,其余试剂为分析纯。

1.2 实验方法

在 10ml 比色管中依次加入一定量 In(III) 溶液, HQS 溶液, 5ml 缓冲溶液, 摇匀, 加入一定量 Cys 溶液及干扰或样品溶液。用水定容至刻度后摇匀, 用 1cm 石英荧光池, 在荧光激发波长 $\lambda_{\text{ex}}364\text{nm}$ 处激发, 在荧光发射波长 $\lambda_{\text{em}}507\text{nm}$ 处测量荧光强度。

2 结果与分析

HQS 是一种本身荧光很弱的络合剂, 它与 In(III) 络合后荧光大大增强。在一定条件下, Cys 对 In(III)-HQS 体系荧光有增敏作用, 加入少量 Cys 体系荧光强度迅速增加。在一定浓度范围内, 体系荧光强度增强与 Cys 的浓度成正比, 可以基于荧光增敏效应测定 Cys。

2.1 HQS 及 In(III)-HQS 络合物的荧光激发光谱和发射光谱

pH 值为 8.50 时, HQS 荧光激发波长 $\lambda_{\text{ex}}362\text{nm}$, 发射波长 $\lambda_{\text{em}}499\text{nm}$, 荧光强度低。 In(III)-HQS 络合物荧光激发波长 $\lambda_{\text{ex}}364\text{nm}$, 发射波长 $\lambda_{\text{em}}507\text{nm}$, 荧光强烈。HQS 及 In(III)-HQS 络合物荧光激发光谱和发射光谱见图 1。

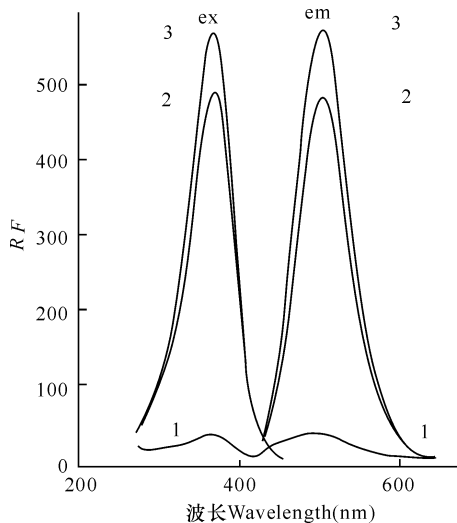


图 1 HQS 和 In(III)-HQS 络合物的荧光激发光谱和发射光谱及 Cys 对 In(III)-HQS 络合物荧光强度的影响

Fig. 1 Fluorescence spectra of In(III)-HQS complex system and the effect of cysteine on the fluorescence intensity of the system

1 HQS $6.67 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, In(III) 0; 2 HQS $6.67 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, In(III) $8.7 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$; 3 HQS $6.67 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, In(III) $8.7 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, Cys $8.26 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 。

2.2 Cys 对 In(III)-HQS 络合物荧光增敏现象

在 In(III)-HQS 荧光络合体系中加入少量 Cys, 体系荧光强度迅速增加, 表明 Cys 对此体系的荧光有增敏作用(图 1)。当 Cys 含量继续增加时, 荧光增加不明显, 甚至开始下降。这可能是由于 Cys 含量少时, 形成了 In(III)-Cys-HQS 三元强荧光络合物, 使体系荧光增强。Cys 含量增加, 逐渐形成 In(III)-Cys 二元无荧光络合物, 体系荧光不再增加甚至开始下降。Cys 与 In(III)-HQS 络合物作用机理需进一步的研究。

2.3 最佳酸度确定

酸度对 In(III)-HQS 络合物荧光强度有影响。在 pH 值为 7.00~9.00 时, 络合物荧光较强, 且荧光强度变化较为平稳。为了灵敏地检测 Cys, 在一定酸度下, 加入一定量 Cys 时, 体系荧光增强明显。酸度对体系 ($\text{HQS } 4.44 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, $\text{In(III)}: 8.7 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$) 加入 $2.48 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ Cys 后荧光强度的影响结果(图 2)显示, 在 pH 值为 8.00~9.00 时, 体系荧光增加值大且保持平稳变化, 因此本实验中选最佳酸度 pH 值为 8.50。

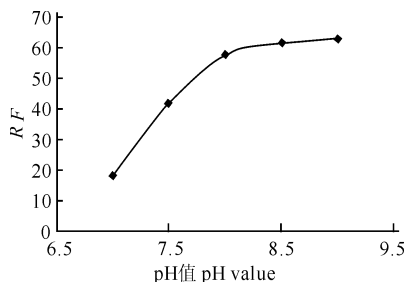


图 2 酸度对 In(III)-HQS 体系加入 Cys 后荧光强度的影响

Fig. 2 Effect of pH on the fluorescence intensity of the system after adding cysteine

2.4 最佳 In(III) 浓度和 HQS 浓度确定

In(III)-HQS 体系荧光强度不仅受到酸度及 Cys 浓度的影响, 而且受到 In(III) 、HQS 浓度的影响。为了达到灵敏检测 Cys 的目的, 必须对 In(III) 、HQS 浓度进行优化。 In(III) 或 HQS 浓度过高或过低, 加入 Cys 后体系荧光强度改变不明显, 灵敏度不高。如图 3, 在 HQS 浓度为 $6.67 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, In(III) 浓度为 $4.36 \sim 13.07 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 时, 体系荧光增加较大, 线性关系较好, 因此选 In(III) 最佳浓度为 $8.7 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 。同理根据图 4, 在 In(III) 浓度为 $8.7 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 时, 选出 HQS 最佳浓度为 $6.67 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 。

2.5 体系稳定性及试剂加入顺序的影响

In(III)-HQS-Cys 体系在常温下可稳定 40min, 荧光强度变化 $< 5\%$ 。改变 In(III) 、HQS 及 Cys 加入次序对体系荧光强度无影响。

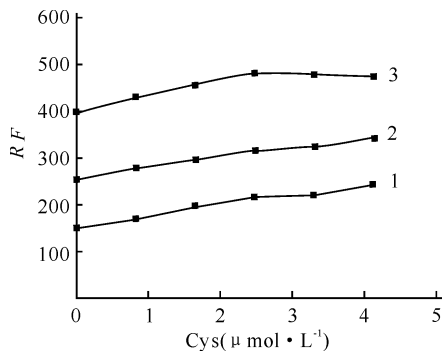


图3 最佳 In(III)浓度

Fig. 3 Optimization of In(III) concentration

1: $4.35 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2: $8.7 \mu\text{mol L}^{-1}$, 3: $13.07 \mu\text{mol L}^{-1}$.

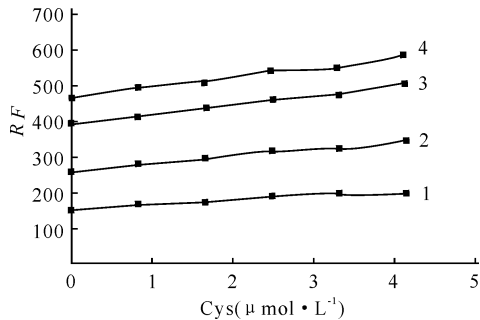


图4 HQS最佳浓度

Fig. 4 Optimization of HQS concentration

1: $2.2 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2: $4.4 \mu\text{mol L}^{-1}$, 3: $6.6 \mu\text{mol L}^{-1}$, 4: $8.8 \mu\text{mol L}^{-1}$.

2.6 线性范围及检出限

Cys 浓度为 $0 \sim 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时, 体系荧光强度增加与 Cys 浓度成正比, 测定 Cys 线性回归方程为 $\Delta F = 256.61X - 0.234$ ($\Delta F = F - F_0$, X : Cys 浓度, $n = 9$, $r = 0.9989$), 检出限为 15ng mL^{-1} ($SNR = 3$)

2.7 金属离子及其它氨基酸干扰

由于 HQS 的络合能力比较强, 能与多种重金属离子络合, 没有专一性, 因此, 重金属离子对 $\text{In(III)} - \text{HQS}$ 荧光络合体系有很强的干扰。我们对一些重金属离子的干扰进行过一些试验, 结果和预期的一致, 干扰比较严重, 因此没有进一步做重金属离子的允许量。因为没有具体的重金属离子允许量的实验数据, 因此只在本文简单提及, 这也是今后该课题需要改进的地方。

氨基酸允许量如表所示。色氨酸、酪氨酸本身有强荧光, 对测定 Cys 有干扰, 其它氨基酸无干扰, 允许量大。

2.8 样品测定

本实验所用样品为胱氨酸电解液样品。测定电解液样品时, 先加入允许量胱氨酸, 按实验方法绘制工作曲线, 用加入回收法测定样品中的 Cys 含量。样品分析数据结果 (表 2) 令人满意。

表 1 氨基酸干扰结果 ($\text{Cys } 1.65 \mu\text{mol L}^{-1}$)

Table 1 The interference of amino acids ($\text{Cys } 1.65 \mu\text{mol L}^{-1}$)

氨基酸 Amino acid	氨基酸: 半胱氨酸* Amino acid: cysteine*	偏差 error(%)
谷氨酸 Glu	300	0.1
苯丙氨酸 Phe	60	-0.7
甲硫氨酸 Met	60	1.1
羟脯氨酸 Hydroxyproline	60	2.0
精氨酸 Arg	60	-1.2
异亮氨酸 Ile	60	-3.2
亮氨酸 Leu	60	-0.9
天冬氨酸 Asp	60	0.3
苏氨酸 Thr	60	1.4
缬氨酸 Val	60	1.3
脯氨酸 Pro	60	-0.3
丝氨酸 Ser	60	0.5
组氨酸 His	12	4.4
天冬酰胺 Asn	15	-4.6
胱氨酸 Cystine	12	4.4
色氨酸, 酪氨酸 Try, Tyr	有干扰 Interference	

* : 摩尔比 molar ratio

表 2 样品分析数据

Table 2 Analytical results of samples

样品 Sample	加入量 Added (μg)	回收量 Found (μg)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, $n = 5$)
胱氨酸 Cystine	0 ^a	2.03		
	2	3.91~4.04	95.7~100.7	2.0
电解液 Electrolyte	0 ^b	1.52		
	2	3.44~3.61	96.6~101.3	2.5

a 电解 6h 样品; b 电解 12h 样品。 a Electrolysed 6h; b Electrolysed 12h.

3 结论

用 $\text{In(III)} - 8$ -羟基喹啉-5-磺酸荧光络合体系测定半胱氨酸的方法操作简单, 灵敏度高, 检出限低。

测定半胱氨酸时, 普通氨基酸的干扰较少, 重金属离子的干扰比较严重。

本文建立的方法可以测定胱氨酸电解液中半胱氨酸的含量, 回收率为 95.7% ~ 101.3%。

参考文献:

- [1] Ellman G E. Tissue sulphhydryl groups[J]. Arch Biochem Biophys, 1959, 82: 70-77.
- [2] Thomas G, Skriniska V. Determination of glutathione in human platelets[J]. Clin Chem, 1985, 31: 350-351.
- [3] Tummuru M K, Divakar T E, Sastry C S. Spectrophotometric determination of some sulphur compounds and tryptophan with brucine and sodium metaperiodate[J]. Analyst, 1984, 109: 1105-1106.
- [4] Takamitsu S, Kimiyo. Fluorescent thiol reagents V

Microfluorometry of thiol compounds with a fluorescent-labeled maleimide[J]. Anal Biochem, 1972, 48 557-568.

- [5] Machida Y K M, Ando H, Sekine T. Fluorescence and structures of proteins as measured by incorporation of fluorophore IV Synthesis and fluorescence characteristics of N-(p-(2-benzimidazolyl) phenyl) maleimide[J]. Biochim Biophys Acta, 1970, 207 269-

277.

- [6] Takahata K, Igarshi. Spectrofluorimetric determination of 10^{-7} M levels of thiol compounds using silver(I)-5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfophenyl) porphine complex [J]. Chem Pharm Bull, 1996, 44 226-230.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 59 页 Continue from page 59)

表 2 辛伐他汀样品测定结果和加标回收率

Table 2 Concentrations and recoveries of MSA in a simvastatin sample

编号 No.	溶液中 MSA浓度 Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	固体样品中 MSA含量 Found ($\mu\text{g g}^{-1}$)	加入标 样量 Added ($\mu\text{g g}^{-1}$)	测得总量 Total found ($\mu\text{g g}^{-1}$)	回收率 Recovery (%)
1	28	2.80	0.25	3.01	84
2	28	2.80	2.50	5.60	112
3	28	2.80	25.0	29.05	105

表 3 不同批次辛伐他汀样品测定结果的比较

Table 3 Comparison of analytical results of different samples

批号 Lot	本方法含量 Found ($\mu\text{g g}^{-1}$)	药厂报告值 Certified ($\mu\text{g g}^{-1}$)
0401	2.8	2.9
0402	2.0	2.2
0403	< 0.5	< 0.5
0511	3.1	3.0
0520	2.5	2.4

3 结论

实验结果表明,该离子色谱方法对于辛伐他汀样品中杂质成份的测定十分重要,样品无需复杂的样品前处理手段,使用淋洗液发生器产生的 KOH 溶液,抑制电导检测,方便地对辛伐他汀样品中的多种离子进行分离,甲烷磺酸峰形良好,并不受其它常规阴离子杂质的干扰。方法简便、快速、基体干扰小,可在辛伐他汀产品的检验中发挥重要作用,对其它药品中的甲烷磺酸测定也有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] Weeratunga G, Young S, Home S, Murthy K S K. E. P. Patent, 1284264A1, 2003
- [2] 刘京生,史亚利,蔡亚岐,等.甲磺酸帕珠沙星中甲烷磺酸的离子色谱法测定[J].环境化学,2006,25(5): 644.
- [3] 胡敏,陆昀,曾立民.离子色谱法测定大气中的甲磺酸[J].环境化学,2000,19(6): 572.

(责任编辑: 邓大玉)