

基于指示剂置换法利用紫外-可见光谱和 比色检测水溶液中的半胱氨酸

李咏玲^{1,2}, 张建刚^{2,3}, 卫艳丽³, 程芳琴¹

(1. 山西大学资源与环境工程研究所, 太原 030006; 2. 山西农业大学文理学院, 太谷 030801; 3. 山西大学化学化工学院, 太原 030006)

摘要 基于半胱氨酸(Cys)与二价铜离子的配位作用, 发展了一种在纯水溶液中以 4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚(PAR)为指示剂, 通过紫外-可见光谱定性定量检测半胱氨酸的方法. 研究发现, 在 pH=7.0 的含有 PAR 和二价铜离子(摩尔比为 1:1)的缓冲溶液中, 当加入半胱氨酸后, 由于配位竞争使 PAR 释放出来, 实现了对半胱氨酸的识别, 选择性研究结果表明, 其它氨基酸不干扰体系对半胱氨酸的测定. 通过紫外-可见光谱(UV-Vis)对识别过程进行了研究, 确定了 Cu^{2+} 与 PAR 的配位比为 1:1, Cu^{2+} 与 Cys 的配位比为 1:3; 半胱氨酸的线性关系变化范围为 0 ~ 240 $\mu\text{mol/L}$, $\varepsilon=7519 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, 线性相关系数为 0.9982. 在检测过程中可观察到溶液颜色由桃红色变成了黄色.

关键词 指示剂置换法; 二价铜离子; 4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚; 半胱氨酸; 紫外-可见光谱

中图分类号 O657.32

文献标识码 A

DOI: 10.3969/j.issn.0251-0790.2012.06.007

半胱氨酸(Cys)是一种重要的硫代化合物氨基酸, 参与包括蛋白质的合成、解毒和代谢等多种重要的生理功能; 许多疾病的发生都和半胱氨酸有关, 如肾功能衰竭、艾滋病、老年痴呆症、帕金森病、动脉血管硬化、神经管缺陷及冠心病等^[1~4]. 因此, 建立一种快速、准确、灵敏的检测半胱氨酸的方法具有重要意义, 也是预防和监测由半胱氨酸所引发疾病的重要途径. 在过去的数十年中, 光学检测法的研究较为活跃, 如电化学法^[5,6]、流动注射分析法^[7]、高效液相色谱法^[8]、质谱分辨仪^[9,10]、酶法及荧光方法^[11,12]等, 但大多数半胱氨酸的光学检测方法需利用巯基高亲核反应或过渡金属对巯基的亲合力构建, 其中涉及探针和半胱氨酸之间的特异反应, 如 Michael 加成^[13,14]、醛的环化^[15,16]、磺酸酯的硫解^[17,18]、磺胺类药物和二硝基苯甲醚^[19,20]、硒氮键的裂解^[21,22]等. 但是, 上述方法要么需要昂贵的仪器、复杂的有机合成操作技术, 要么需在有机或半水溶性相态进行测定, 易造成环境污染和健康危害. 因此, 亟待开发一种选择性和灵敏度高, 快速且环保的检测方法. 最近, 基于指示剂和分析物间竞争机制的指示剂置换法得到了较多的关注^[23~26]. 鉴于半胱氨酸与二价铜离子的配位作用强于 4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚(PAR), 可夺取与 PAR 配位的二价铜离子, 使 PAR 得以释放回到游离状态, 恢复其颜色及光谱特性. 我们利用半胱氨酸和 PAR 对二价铜离子的配位竞争机理, 建立了一种在水溶液中检测半胱氨酸的方法, 该方法快速、准确, 且肉眼可见.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)和所有氨基酸均为 Sigma-Aldrich 产品; 4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚(PAR)购于上海试剂三厂; CuCl_2 和其它阳离子试剂均为分析纯(天津市天大化工实验厂); 所用溶液均用去离子水配制.

HP-8453 型紫外分光光度计(美国惠普公司); 贝克曼酸度计(美国 Sorex 公司); 微量进样枪

收稿日期: 2012-01-13.

基金项目: 中国博士后科学基金(批准号: 201104611)和山西省青年科技基金(批准号: 2010021010-2)资助.

联系人简介: 程芳琴, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事化学与环境工程研究. E-mail: cfangqin@sxu.edu.cn

(上海求精生化试剂仪器有限公司); PO-120 石英比色皿(宜兴市晶科光学仪器有限公司).

1.2 实验过程

向含有 20 $\mu\text{mol/L}$ PAR, 20 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 和 10 mmol/L HEPES 缓冲溶液(桃红色溶液, $\text{pH}=7.0$) 的比色皿中逐渐滴加半胱氨酸溶液, 同时采用紫外-可见分光光度计检测, 当体系的吸收峰值不再发生变化时, 溶液由桃红色变为黄色, 停止加样. 重复 3 次, 计算水溶液中 Cys 的准确含量, 取平均值.

2 结果与讨论

2.1 紫外-可见光谱分析

向 20 μL 含有 20 $\mu\text{mol/L}$ PAR 的 10 mmol/L HEPES 缓冲溶液($\text{pH}=7.0$) 中逐渐加入 CuCl_2 溶液时, 体系在 414 nm 处的吸收逐渐减弱, 在 508 nm 处的吸收逐渐增强[图 1(A)], 溶液颜色由黄色变为桃红色. 再向桃红色溶液中滴加半胱氨酸, 发现在 508 nm 处的吸收逐渐减弱, 在 414 nm 处的吸收逐渐增强[图 1(B)], 当这种变化不再发生时, 溶液又变回黄色.

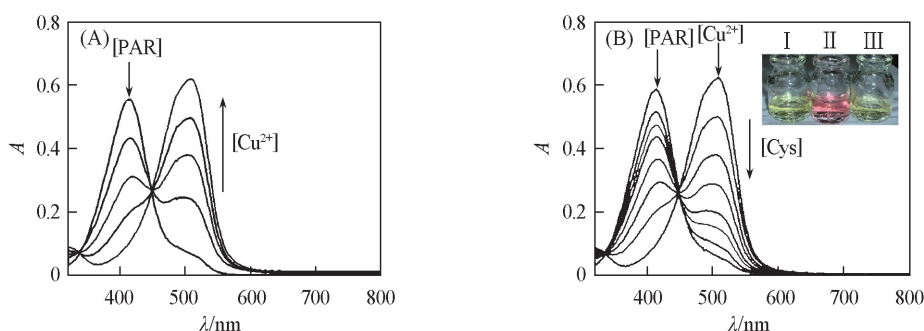


Fig. 1 UV-Vis spectra of PAR with the addition of CuCl_2 (A) and PAR-Cu^{2+} with the addition of Cys (B) in 10 mmol/L HEPES buffer

[PAR] = [PAR- Cu^{2+}] = 20 $\mu\text{mol/L}$; inset of (B): colour change from left to right: I. PAR; II. PAR- Cu^{2+} ; III. PAR- Cu^{2+} -Cys.

2.2 pH 值的影响

分别配制 pH 值为 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 和 9.0 的缓冲溶液, 考察了检测体系的 pH 效应, 发现有效的 pH 范围为 6.5 ~ 7.5, 故实验选择生理 pH(7.0).

2.3 计量关系和线性范围

通过等温的分光光度滴定实验确定了体系的计量关系. 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $[\text{Cu}^{2+}]$ 对 ΔA (体系加入 Cu^{2+} 与未加入 Cu^{2+} 的吸收值之差) 作图(图 2). 可见, 随着 $[\text{Cu}^{2+}]$ 的增大, 体系在 508 nm 处的吸收值也增大, 直到 Cu^{2+} 与 PAR 的摩尔比为 1:1 时, ΔA 不再发生变化, 由此确定 Cu^{2+} 与 PAR 的配位比为 1:1. 在含有 Cu^{2+} -PAR 的缓冲体系中加入 Cys, 体系在 414 nm 处的吸收值增大(图 3), 直到 Cu^{2+} 与 Cys 的摩尔比为 1:3 时, ΔA 不再变化, 由此确定 Cu^{2+} 与 Cys 的配位比为 1:3. 实验还测定了半胱氨酸的浓度在 0 ~ 240 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 体系在 414 nm 处的最大吸光度(图 4), 发现在此浓度范围内, 该方法遵循朗

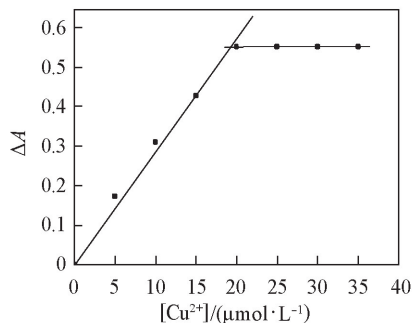


Fig. 2 UV-Vis absorbance value change at 508 nm of HEPES containing 20 $\mu\text{mol/L}$ PAR with the addition of Cu^{2+}

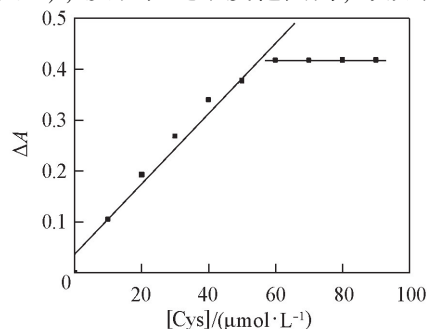


Fig. 3 UV-Vis absorbance value change at 414 nm of PAR- Cu^{2+} with the addition of Cys

伯比尔定律, $\varepsilon = 7519 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, 线性相关系数为 0.9982(图 4 插图). 由此得出计算半胱氨酸含量的公式: $[\text{Cys}] = 3[\text{Cu}^{2+}] V_{\text{Cu}^{2+}}/V_{\text{Cys}}$.

2.4 方法的选择性

在 20 μL 含 20 $\mu\text{mol/L}$ PAR, 20 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 和 $\text{pH}=7.0$ 的 HEPES 缓冲溶液的比色皿中, 分别加入其它氨基酸和阴离子, 用紫外-可见分光光度计检测. 结果表明, 其它氨基酸和阴离子的加入对 PAR 在 508 nm 处的最大吸收峰无影响, 体系的颜色也未改变(图 5 和图 6). 上述结果表明, 该体系对 Cys 具有特异识别性, 且肉眼可见.



Fig. 5 Color changes of the sensing ensemble in HEPES buffer($\text{pH}=7.0$) in the presence of other amino acids and Cys

From left to right: alanine, arginine, aspartic usions ammonia, aspartic acid, glutamine, glutamic acid, glycine, lhistidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine, cysteine.

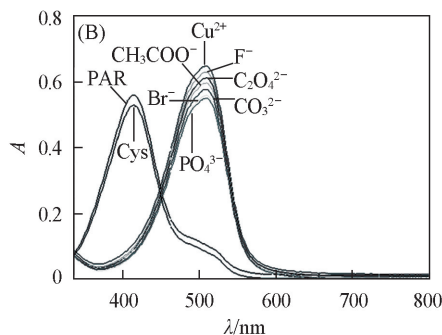
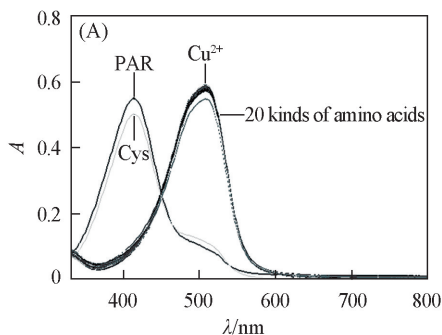


Fig. 6 UV-Vis absorption spectra of the sensing ensemble in HEPES buffer($\text{pH}=7.0$) in the presence of other amino acids(A) and anions(B)

2.5 其它金属离子的影响

实验结果表明, 在该体系中, 其它金属离子的干扰可分为 3 种情况: (1) Zr^{2+} , Ru^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Bi^{3+} , Al^{3+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , Sn^{4+} 和 Mg^{2+} 加入后 PAR 的紫外吸收光谱无明显变化, 加入 Cys 后也无颜色变化, 说明以上离子既不能与 PAR 配位, 也不能与 Cys 配位; (2) Zn^{2+} , Sm^{3+} , Ho^{3+} , Co^{2+} , Ni^{4+} , Er^{3+} , Gd^{3+} , Nd^{3+} 和 Yb^{3+} 虽能引起 PAR 紫外吸收光谱的变化和颜色的改变, 但加入 Cys 后紫外光谱和体系颜色均未发生明显变化, 说明这些金属离子能与 PAR 配位, 但不能与 Cys 作用; (3) Tb^{3+} , Eu^{3+} , Hg^{2+} 和 La^{3+} 能引起 PAR 紫外吸收光谱的改变, 加入 Cys 后紫外光谱略有变化, 且颜色变化不明显, 说明这些金属离子虽然能与 PAR 结合, 也能与 Cys 进行配位, 但与 Cys 的作用不强, 不能完全释放 PAR.

参 考 文 献

- [1] Huo F. J., Sun Y. Q., Su J., Chao J. B., Zhi H. J., Yin C. X.. Org. Lett. [J], 2009, **11**: 4918—4921
- [2] Deng L., Wu W. T., Guo H. M., Zhao J. Z., Ji S. M., Zhang X., Yuan X. L., Zhang C. L.. J. Org. Chem. [J], 2011, **76**: 9294—9304
- [3] Zhou Y., Yong J.. Chem. Soc. Rev. [J]. 2012, **41**: 52—67
- [4] Yang X. F., Guo Y. X., Strongin R. M.. Angew. Chem. Int. Ed. [J]. 2011, **50**: 10690—10693
- [5] Wen M., Liu H. Q., Zhang F., Zhu Y. Z., Liu D., Yang T., Wu Q. S.. Chem. Commun. [J], 2009, (30): 4530—4532
- [6] ZHONG Yuan-Wen(钟苑雯), LIN Mou-Hong(林谋宏), ZHOU Jie-Dan(周洁丹), LIU Ying-Ju(刘英菊). Chin. J. Anal. Chem.

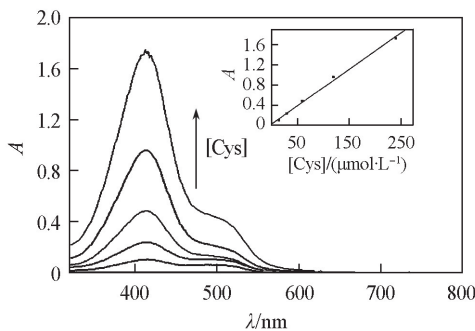


Fig. 4 UV-Vis absorbance at 414 nm of PAR-Cu^{2+} with the addition of Cys

Inset: working curve plot for the determination of $[\text{Cys}]$.

(分析化学)[J], 2010, **38**(2): 229—232

- [7] Waseem A. , Yaqoob M. , Nabi A. . Chem. Res. Chinese Universities[J], 2010, **26**(6): 893—898
- [8] Chen W. , Zhao Y. , Seefeldt T. , Guan X. . J. Pharm. Biomed. Anal. [J], 2008, **48**(5): 1375—1380
- [9] Burford N. , Eelman M. D. , Mahony D. E. , Morash M. . Chem. Commun. [J], 2003, (1): 146—147
- [10] Fafii M. , Elango R. , Courtney-Martin G. , House J. D. , Fisher L. , Pencharz P. B. . Anal. Biochem. [J], 2007, **371**: 71—81
- [11] Matsumoto T. , Urano Y. , Shoda T. , Kojima H. , Nagano T. . Org. Lett. [J], 2007, **9**: 3375—3377
- [12] Tanaka F. J. , Mase N. , Barbas III C. F. . Chem. Commun. [J], 2004, (15): 1762—1763
- [13] Girouard S. , Houle M. , Grandbois A. , Keillor J. W. , Michnick S. W. . J. Am. Chem. Soc. [J], 2005, **127**(2): 559—566
- [14] Guy J. , Caron K. , Dufresne S. , Michnick S. W. , Skene W. G. , Keillor J. W. . J. Am. Chem. Soc. [J], 2007, **129**(39): 11969—11977
- [15] Hu M. M. , Fan J. L. , Li H. L. , Song K. , Wang S. , Chen G. , Peng X. . Org. Biomol. Chem. [J], 2011, **9**(4): 980—983
- [16] Yao Z. Y. , Feng X. L. , Li C. , Shi G. . Chem. Commun. [J], 2009, (39): 5886—5888
- [17] Maeda H. , Matsuno H. , Ushida M. , Katayama K. , Saeiki K. , Itoh N. . Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2005, **44**: 2922—2925
- [18] Wang S. P. , Deng W. J. , Sun D. , Yan M. , Zheng H. , Xu J. G. . Org. Biomol. Chem. [J], 2009, **7**: 4017—4020
- [19] Bffard J. , Kim Y. , Swager T. M. , Weissleder R. , Hilderbrand S. A. . Org. Lett. [J], 2008, **10**: 37—40
- [20] Yang X. F. , Su Z. , Liu C. H. , Qi H. P. , Zhao L. . Anal. Bioanal. Chem. [J], 2010, **396**: 2667—2674
- [21] Tang B. , Xing Y. L. , Li P. , Zhang N. , Yu F. B. , Yang G. W. . J. Am. Chem. Soc. [J], 2007, **129**(38): 11666—11667
- [22] Zhu B. C. , Zhang X. L. , Jia H. Y. , Li Y. M. , Chen S. T. , Zhang S. C. . Dyes Pigm. [J], 2010, **86**: 87—92
- [23] Yin C. X. , Gao F. , Huo F. J. , Yang P. . Chem. Commun. [J], 2004, (8): 934—935
- [24] Huo F. J. , Sun Y. Q. , Su J. , Chao J. B. , Zhi H. J. , Yin C. X. . Org. Lett. [J], 2009, **11**(21): 4918—4921
- [25] YIN Cai-Xia(阴彩霞), HUO Fang-Jun(霍方俊), YANG Pin(杨频). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(10): 1849—1852
- [26] Lou X. , Zhang L. , Qin J. , Li Z. . Langmuir[J], 2010, **26**: 1566—1569

Detection of Cysteine in Aqueous Solution Based on Indicator Displacement by Ultraviolet-Visible and Colorimetric Methods

LI Yong-Ling^{1,2}, ZHANG Jian-Gang^{2,3}, WEI Yan-Li³, CHENG Fang-Qin^{1*}

(1. *Institute of Resource and Environment Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;*

2. *College of Arts and Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;*

3. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)*

Abstract Through ultraviolet-visible (UV-Vis) spectra, a strategy for the determination of cysteine (Cys) was established by simply assembling copper(II) and 4-(2-pyridylazo)-resorcinol (PAR) in a molar ratio of 1 : 1 in aqueous solution. Cys could be detected in 10 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer (pH=7.0) system containing copper(II)-PAR due to coordination competition. The Cu²⁺-PAR ensemble was highly selective for Cys without interference from other amino acids. From the UV-Vis absorbance value changes of Cu²⁺-PAR and Cu²⁺-PAR-Cys, the optimal coordinated ratio of PAR : Cu²⁺ was found to be 1 : 1 and Cu²⁺ : Cys was 1 : 3. It is worthy mentioned that within the concentration range of 0—240 μmol/L in aqueous solution, the measurement of Cys conformed well with linear law, with an average coefficient of light extinction of 7519 L/(mol · cm) and a correlation coefficient of 0.9982. The whole recognition process for Cys gave rise to a rapid visual color change from pink to yellow which can be observed simultaneously with naked eye.

Keywords Indicator displacement method; Copper(II); 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol; Cysteine; UV-Vis spectrum