

头发纤维表面半胱氨酸的荧光光谱分析

苏 静 冉国侠^① 袁建昌 张栋栋

(江南大学化学与材料工程学院 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号 214122)

摘 要 环境中许多物理或化学因素可破坏头发角蛋白主要构成成分胱氨酸, 使其结构中二硫键发生断裂转为带巯基的半胱氨酸, 半胱氨酸的含量可作为头发受损程度的评价依据。本文采用可与半胱氨酸反应的荧光探针试剂 7-氯-4-硝基苯-2-噻唑-1, 3-二唑(NBD-Cl), 与头发纤维表面半胱氨酸反应并进行荧光光谱分析, 探讨了反应的影响因素。结果显示, NBD-Cl 可与头发表面的半胱氨酸残基反应, 反应产物具有荧光性。对实验条件进行了优化, 发现 pH 4.5 为较适宜的反应酸度, 此时 NBD-Cl 与半胱氨酸的巯基和氨基均可反应, 表现为头发表面荧光强度较高。

关键词 头发纤维, 半胱氨酸, 7-氯-4-硝基苯-2-噻唑-1, 3-二唑, 荧光光谱法。

中图分类号: O636.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2008)05-0966-04

1 引言

环境中许多物理或化学因素可破坏头发角蛋白主要构成成分胱氨酸, 使其结构中二硫键发生断裂转为带巯基的半胱氨酸^[1]。例如, 长时间的日光曝晒, 基于化学药品处理的染发或烫发等。角蛋白化学性质的改变, 反映在头发纤维即机械强度下降, 梳理性变差。因此头发角蛋白二硫键断裂的情况一直被作为头发受损程度的评价依据。汞溴红着色法、铜吸附法通过测定巯基表征头发的损伤, 然而灵敏度较低。本文应用对蛋白质巯基敏感的荧光探针试剂 NBD-Cl^[2] 直接标定头发表面巯基, 以期获得损伤情况下头发纤维表面化学性质改变的信息。

NBD-Cl 是稳定的无荧光淡黄色固体, 易溶于有机溶剂。NBD-Cl 可作为氨基化合物的荧光衍生试剂, 它与其他亲核试剂特别是与巯基反应产生弱的荧光^[3]。文献报道 NBD-Cl 与蛋白质中巯基、氨基、酪氨酸羟基反应并在一定区域内产生弱的荧光。通过改变介质的 pH 值, 使其与不同的基团反应, 因而具有较大的应用范围^[4, 5]。

本文拟采用市售冷烫精处理头发纤维, 研究 NBD-Cl 与胱氨酸二硫键断裂后产生的含巯基半胱氨酸的反应条件。

2 实验部分

2.1 药品及试剂

NBD-Cl (Alfa Aesar(r), Johnson Matthey 公司产品, 99%)。柠檬酸, 氢氧化钠, 乙二醇四乙酸二钠, 醋酸钠等试剂均为分析纯。实验用水为去离子水。市售 R 型冷烫精。

^① 联系人, 电话: (0515) 88406293; 传真: (0510) 85917763; E-mail: gxran@jiangnan.edu.cn

作者简介: 冉国侠(1964—), 女, 陕西省渭南市人, 副教授, 主要从事天然产物与香妆品化学方向的研究。

收稿日期: 2008-04-23; 接受日期: 2008-05-12

2.2 主要仪器设备

ShimadzuRF-5301PC 型荧光分光光度计(日本岛津公司);
BX51 型荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);
Y172 型纤维切片机(国营常州纺织仪器厂)。

2.3 头发样本制备

头发的清洗^[6]。将无任何美发史黑色发样先用足量去离子水冲洗去除头发表面灰尘等污物,再以无水乙醚萃取 4h 去除头发表面油污,少量水润洗后空气中自然干燥备用。

冷烫头发:按商品说明书冷烫头发,即取适量头发水完全润湿后,加入适量的冷烫精,在 35℃ 下反应 15—20min。此时头发纤维角蛋白的胱氨酸残基转为半胱氨酸。

头发的染色处理。取适量发样,浸没入 NBD-Cl 溶液,于一定温度下使两者反应。将反应后的发样置于通风处自然阴干,待测。

2.4 头发纤维荧光光谱测定

将一束头发纤维(约 40—50 根)置于自制的固体支架,斜 45 度置固体支架于荧光分光光度仪的检测池内,确保激发光直接照射在头发纤维上,并且尽量使照射面积固定。选择 420nm 为激发光波长,在 450—700nm 波长范围扫描发射光谱。

2.5 头发纤维横断面荧光显微镜观察^[7]

将头发纤维的横截面切片固定在载玻片上,选择绿色滤光片激发荧光,观察头发横截面切片的荧光光斑并拍照。

3 结果与讨论

3.1 头发纤维横断切片荧光显微镜观察

将冷烫头发进行 NBD-Cl 染色处理,未冷烫处理的对照发样作同样处理。制头发纤维横断方向切片,激发波长下观察头发横断面,显微图像见图 1。从图 1a 可见,对照发样染色较浅,主要染色区域在头发纤维外表层。与图 1a 相比较,图 1b 显示纤维外表层染色较深,同时内层皮质荧光也明显强于前者。

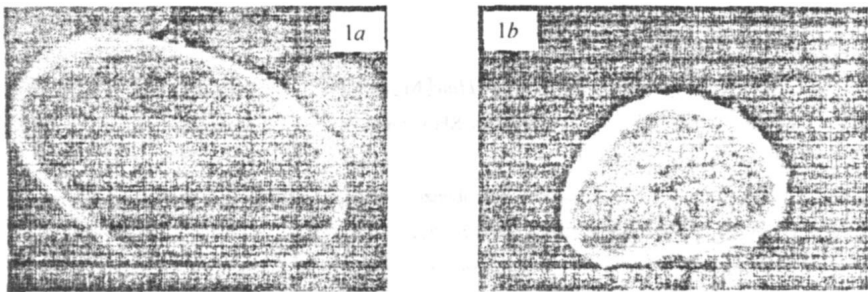


图 1 NBD-Cl 染色后头发纤维横断切片的荧光显微镜观察

1a——对照发样;1b——冷烫发样。

头发主要成分为角质蛋白,其氨基酸残基组成与所处头发解剖学位置有关,如胱氨酸在头发表面含量最高。化学物质、光照等因素可破坏胱氨酸二硫键,使其转化为带有巯基的半胱氨酸。与半胱氨酸巯基反应后形成的 NBD-SR 具有荧光性,由荧光显微图像可知,NBD-Cl 可标记头发表面巯基。

3.2 头发纤维的荧光光谱

以 pH 4.5 的 NBD-Cl 溶液浸染冷烫处理头发纤维, 同样方法浸染未冷烫头发纤维。扫描发束荧光发射光谱, 并设置冷烫头发作为空白对照。由图 2 可见, 对照发束没有出现荧光发射峰, 表明冷烫后头发表面自身也不具有荧光性; 未冷烫的头发与 NBD-Cl 反应后没有出现荧光发射峰, 冷烫的与 NBD-Cl 反应的头发样本在波数 515nm 处出现了明显的荧光峰。用冷烫精冷烫头发会使头发表皮胱氨酸的二硫键断裂, 转化为半胱氨酸, 半胱氨酸上的巯基与 NBD-Cl 可以特异性结合, 其产物具荧光性。因此可以认为, NBD-Cl 与冷烫头发表面的半胱氨酸在头发原位发生反应。

3.3 pH 对头发半胱氨酸与 NBD-Cl 反应的影响

用不同酸性的 NBD-Cl 溶液浸染冷烫剂处理的头发纤维, 扫描头发束的荧光发射光谱, 图 3 结果表明, 最大发射峰随 pH 值的改变发生位移。与文献溶液体系类似, pH 4.5 时最大发射峰波长为 515nm^[2,4], pH 4.5 时反应产生的荧光强度高于 pH 6.0 时。考虑到酸度过高对头发纤维本身影响, 因此选择 pH 4.5 为 NBD-Cl 与半胱氨酸反应的适宜酸度。

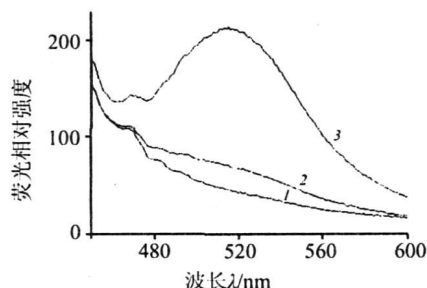


图 2 头发纤维的荧光光谱

1——对照发束; 2——未冷烫发束; 3——冷烫发束。

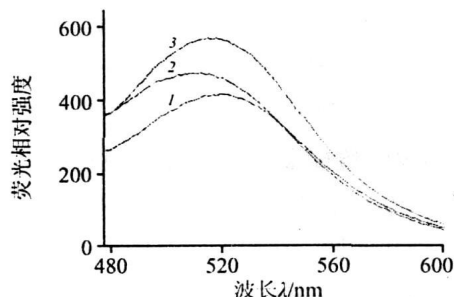


图 3 pH 对头发半胱氨酸与 NBD-Cl 反应的影响

1——pH 6.0; 2——pH 2.0; 3——pH 4.5。

4 结论

荧光探针试剂 7-氯-4-硝基苯-2-噁唑-1, 3-二唑 (NBD-Cl) 可与头发表面的半胱氨酸残基反应, 反应产物具荧光性。通过对反应体系 pH 的优化, 可获得最佳的反应条件。

参考文献

- [1] Robbins C R. *Chemical and Physical Behavior of Human Hair* [M]. 4th ed., New York: Springer-Verlag, Inc., 2002.
- [2] Birkett D J, Price, N C, Radda G K *et al.* The Reactivity of SH Groups With a Fluorogenic Reagent [J]. *FEBS Letter*, 1970, **6** (4): 346—348.
- [3] Shipton M, Stuchbury T, Brocklehurst K. 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-oxa-1, 3-Diazole as a Reactivity Probe for the Investigation of the Thiol Proteinases [J]. *Biochemistry Journal*, 1976, **159** (2): 235—244.
- [4] Al-Majed A A, Belal F, Abounassif M A *et al.* Fluorimetric Determination of Gentamicin in Dosage Forms and Biological Fluids Through Derivatization with 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1, 3-Diazole [J]. *Microchimica Acta*, 2003, **141** (1—2): 1—6.
- [5] Akinyele A F, Okogun J I, Faboya O P. Use of 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole for Determining Cysteine and Cystine in Cereal and Legume Seeds [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1999, **47** (6): 2303—2307.
- [6] Dos Santos Silva A L, Joekes I. Rhodamine B Diffusion in Hair as a Probe for Structural Integrity [J]. *Colloids and Surface (B: Biointerfaces)*, 2005, **40** (1): 19—24.
- [7] Kelch A, Wessel S, Will T *et al.* Penetration Pathways of Fluorescent Dyes in Human Hair Fibres Investigated by Scanning Near-Field Optical Microscopy [J]. *Journal of Microscopy*, 2000, **200** (3): 179—186.

Analysis of Cysteine on the Surface of Hair Fibers with Spectrofluorescence

SU Jing RAN Guo-Xia YUAN Jian-Chang ZHANG Dong-Dong
(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, No. 1800 Lihudadao,
Wuxi, Jiangsu 214122, P. R. China)

Abstract Many physical or chemical factors can affect the cysteine components in the keratin of human hair, which leads to the rupture of disulfide bonds in cysteine and forms cysteine with mercapto group. Thus the amount of cysteine production can be used as an index to assess the extent of hair damage. In this paper a fluorescence probe, NBD-Cl, was selected to study the formation of cysteine in the surface of hair fibers with spectrofluorescence method. NBD-Cl interact with both the mercapto and amino groups contained in cysteine, resulting fluorescence complexes on the hair surfaces. Reaction conditions were optimized. The highest fluorescence emission was obtained at pH 4.5.

Key words Hair Fibers, Cysteine, NBD-Cl, Spectrofluorescence.

荟萃 全球信息 评介 世界仪器 欢迎订阅 《现代科学仪器》双月刊

《现代科学仪器》是在有关领导人和著名科学家的指导和大力支持下诞生的,由中国分析测试学会主办。它是国内唯一以介绍和评论国内外科学仪器为主的综合性的科技期刊,是国内权威性的科学仪器论坛,也是一份具有参考价值的指南。

本刊宗旨:荟萃全球信息,评介世界仪器,发挥导向作用,为促进中国仪器事业的发展服务。

主要内容:对国内外仪器进行综述和评论;及时介绍现代仪器国际前沿的动态和成果;报道国内仪器研制成果,分析测试技术和方法;交流仪器升级改造、选购、使用和维护保养等方面的知识和经验;各种仪器的应用论文及仪器的介绍。

读者对象:各行各业实验室、试验室、研究室应用仪器的科技人员及购置仪器设备的管理人员;从事高技术及其产品研制开发的科技人员;各级有关管理决策人员;大专院校师生等。

发行范围:国内外公开发行。

本刊是中国科技核心期刊,为双月刊,每双月出版:12元/期,72元/年。国内统一刊号:CN11-2837/TH,国际刊号:ISSN1003-8892,国外发行代号:4536BM,国内邮发代号:82-65。读者可到全国各地邮局订阅,亦可直接到编辑部订阅,按以下地址将款邮寄至编辑部或通过银行汇款均可。

编辑部地址:北京市西三环北路27号理化实验楼512室

邮编:100089

开户银行:交通银行北京万寿寺支行

户名:北京华夏大成科学仪器技术有限公司

帐号:110060871012015013955

电话:010-68410135 68410137 68422478

传真:010-68410137 <http://www.journals17.cn> E-mail: info@instrumentation.com.cn

©1994-2008 China Academic Journal Electronic Information All rights reserved. <http://www.cnki.net>