

基于荧光素汞荧光法结合光纤传感-微顺序 注射-阀上实验室测定肠灌流液中 H_2S

侯俊峰¹ 关明¹ 李新霞^{* 2}

¹(新疆师范大学化学化工学院, 污染监测与控制实验室, 乌鲁木齐 830054)

²(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830000)

摘 要 建立基于光纤传感技术结合微顺序注射-阀上实验室荧光猝灭测定肠灌流液中 H_2S 含量方法。本研究进行单因素考察, 确定以 100 μL 0.1 mol/L NaOH 溶液为载液, 荧光素汞浓度为 5.0×10^{-5} mol/L、体积 50 μL 、进样体积 50 μL 、流通池检测流速 25 $\mu\text{L/s}$ 根据 H_2S 猝灭荧光素汞 521 nm 处荧光, 对样品中 H_2S 浓度进行测定。本方法检测 H_2S 的浓度范围为 $5.0 \times 10^{-6} \sim 8.0 \times 10^{-5}$ mol/L, 检出限为 5.4×10^{-7} mol/L。测定肠灌流液中 H_2S 含量为 3.8×10^{-5} mol/L, $\text{RSD} = 3.1\%$ ($n = 3$)。本方法能有效在线测定样品中 H_2S 含量, 为实时在线测定生物样品中的 H_2S 含量奠定基础。

关键词 光纤传感 硫化氢 微顺序注射-阀上实验室 荧光素汞 荧光猝灭

1 引 言

硫化氢(H_2S)是一种具有臭鸡蛋气味的有毒气体,是空气和水源的污染物之一。近研究发现, H_2S 是继 NO 和 CO 之后又一种新型信号分子,作为一种活性神经调节物质广泛存在于动物体内,参与并调节动物体诸多的生理病理活动^[1]。目前, H_2S 的测定方法大多局限于传统方法,如亚甲基蓝法^[2]、硝酸银比色法^[3]、气相色谱法^[4]等。这些传统的方法检出限和灵敏度无法满足生物样品中极微量甚至痕量 H_2S 测定要求。而荧光法的灵敏度更高,测定 H_2S 数量级达到 10^{-6} mol/L。荧光素汞具有很强荧光, H_2S 中 S^{2-} 与荧光素汞结合,使荧光素汞荧光猝灭, H_2S 含量与荧光素汞的荧光强度具有良好的相关性。

微顺序注射-阀上实验室(MicroSIA Lab-on-valve, $\mu\text{SIA-LOV}$)是第三代流动注射分析技术^[5],在 $\mu\text{SIA-LOV}$ 分析系统中,所有的单元操作,如样品稀释、试剂试样的加入、混合以及多种连用技术的结合,使得整个实验测定过程能够可控、高效地进行。该系统能将试剂及样品消耗降低至微升水平,减少了试剂的使用量,适用于长时间监测和试剂比较昂贵、样品来源受限的分析。LOV 系统不仅可以与光纤传感结合,也可以灵活与电化学^[6]、色谱^[7]、化学发光^[8]、固相萃取^[9]、原子荧光^[10]等方法联用。

本研究将光纤传感技术与微量顺序注射-阀上实验室($\mu\text{SIA-LOV}$)结合,以光纤作为传导介质,将光纤光谱仪、微顺序注射分析仪八通阀和氙灯光源连接,用计算机控制,利用该系统自动介观流控特征与光纤传感的实时监测相连,可以实现样品的在线监测。本研究以 Na_2S 为供体,建立光纤传感-微量顺序注射-阀上实验室检测肠灌流液中 H_2S 的分析方法,为进一步进行动物在体肠灌流 H_2S 或 H_2S 供体药物的肠吸收特性研究奠定分析基础。

2 实验部分

2.1 实验装置

微量顺序注射仪(美国 FIALab Instruments 公司);光纤光谱仪(QE65000-FL, CCD)、连续氙灯光源(HPX-2000)、200 $\mu\text{m} \times 1\text{ m}$ 光纤两根均为美国 Ocean optics 公司产品。PB-40 型 pH 计(德国 Sartorius 公司);实验流路所用连接管道采用 PTFE 管(0.75 mm I. D.)。分别采用安装有 FIALab for Windows 和 SpectraSuite 软件的 Windows XP 系统台式电脑对微量顺序注射分析仪和光纤光谱仪进行控制。光纤传

2014-05-29 收稿; 2014-09-05 接受

本文系国家自然科学基金(No. 8126048)、新疆师范大学研究生科技创新项目基金资助

* E-mail: lxx6668@163.com

感-微顺序注射-阀上实验室仪器装置: 包含一个 1000 μL 高精度注射泵、一个棕色滤光 8 通道的多位阀模块(LOV) 在该模块上集成了一个中心控制通道、多个工作通道及一个多功能流通池等操作单元; 通过软件调节控制中心通道一端与 8 位阀上联通位置, 使中心通道与工作通道准确连接, 另一端与高精度注射泵相连而构成流动分析系统。一根光纤与光谱仪相连, 另一根光纤与氙灯光源相连, 两根光纤探头插入 LOV 流通池接口, 光路垂直组成荧光测定模式。

2.2 试剂及溶液配制

荧光素汞(优级纯, 美国化学服务公司); $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 其余试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

准确称取 0.0159 g 荧光素汞, 用 0.1 mol/L NaOH 定容到 100 mL 棕色容量瓶中, 浓度为 1.874×10^{-4} mol/L, 冷藏备用, 使用时稀释到所需浓度。准确称取 0.240 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 用水溶解并定容到 100 mL, 浓度为 0.01 mol/L, 4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存备用, 使用时用水稀释到所需浓度。

Kreb-Ringer's(KR) 营养液: 准确称取 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl_2 0.37 g, NaHCO_3 1.37 g, NaH_2PO_4 0.32 g, MgCl_2 0.02 g, 葡萄糖 1.4 g 于 1000 mL 容量瓶中, 用水定容, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

系列浓度 H_2S 肠灌流液的配制: 将 0.01 mol/L Na_2S 溶液用 KR 营养液稀释 10 倍(1.0 mmol/L), 再分别取稀释液 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 和 0.25 mL 于 5 mL 容量瓶中, 用 KR 营养液定容。

供试品溶液: 由 KR 营养液配制的 Na_2S 溶液(5.0×10^{-5} mol/L), 健康大鼠麻醉后, 将 KR 营养液由活体空肠灌流(蠕动泵流速 0.2 mL/min) 30 min, 接取供试品溶液于 5 mL EP 管中, 封口 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 待测。

2.3 操作流程

实验流路如图 1 所示, 在注射泵的驱动下, 首先由多位阀的 6 号口吸入适量载液(0.1 mol/L NaOH), 7 号口以 50 $\mu\text{L/s}$ 的速度先后从中心通道吸入 50 μL 荧光素汞溶液, 再以 50 $\mu\text{L/s}$ 由 5 号口吸入适量样品溶液, 再通过 6 号口以 50 $\mu\text{L/s}$ 吸入 100 μL 载液。在注射泵的驱动下, 被吸入储液线圈中的载液推动试剂和样品迅速混合, 形成混合区带, 并充分反应, 然后再反向以 25 $\mu\text{L/s}$ 的流速将混合区带从连接有光纤的多功能流通池(Flow cell)流出, 通过光纤光谱仪读取反应后溶液的荧光强度。每次测定结束后, 用水以 300 $\mu\text{L/s}$ 流速冲洗整个流路。所有实验操作均由 FIALab 软件自动完成, 上述程序操作分 6 步, 见表 1。

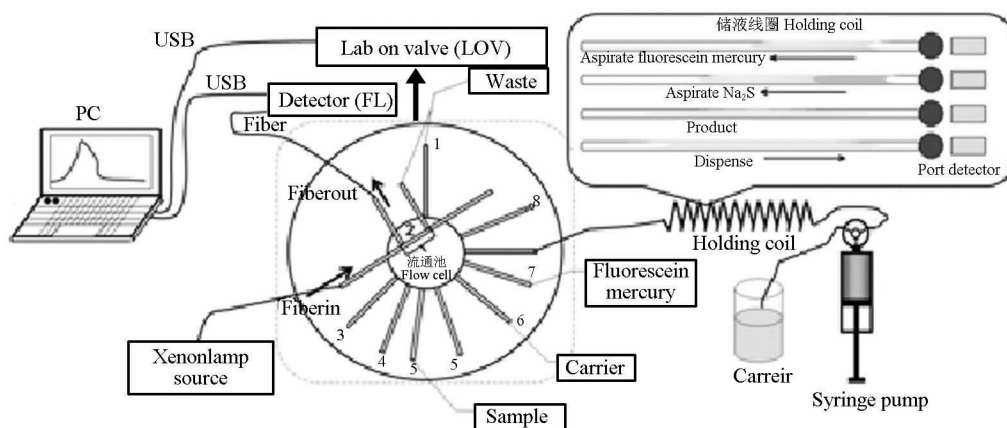


图1 实验装置示原理意图

Fig. 1 Diagram of experiment device and principle

软件模块: 由 FIALab for Windows 软件进行 8 通阀控制及程序的编译和自动完成; SpectraSuite 软件通过光纤光谱仪进行控制并采集光谱图。

3 结果与讨论

3.1 荧光素汞荧光光谱

由通道 5 吸入 200 μL 荧光素汞(1.0×10^{-5} mol/L), 得到光谱图(图 2), 结果表明, 荧光素汞最大发

射波长位于 521 nm。

表 1 微量顺序注射-阀上实验室(μ SIA-LOV) H_2S 测定程序

Table 1 Program of determination H_2S by Micro sequential injection (SIA) lab-on-valve(μ SIA-LOV)

Step	Operate	Valve	Port	A/D	流速 Flowrate ($\mu\text{L/s}$)	体积 Volume (μL)
1	去除死体积 Remove the dead volume	Out	5#(Sample)	Aspirate	50	200
		Out	1#(Waste)	Dispense	50	Empty
2	吸载液 Aspirate carrier	Out	6#(Carrier)	Aspirate	50	100
3	吸荧光素汞 Aspirate Fluorescein mercury	Out	7#(Port7)	Aspirate	50	50
4	吸入样品 Aspirate sample	Out	5#(Sample)	Aspirate	50	50
5	打入流通池 Dispense to flowcell	Out	2#(Flowcell)	Dispense	25	Empty
6	冲洗流通池 Flush flowcell	In	2#(Flowcell)	Aspirate	300	500
		Out		Dispense	300	Empty

3.2 荧光素汞浓度的选择及体积

考察荧光素汞浓度($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 的影响,由于 LOV 为封闭的管道系统,管径很小,荧光素汞浓度过大,会粘附在管道内,清洗使用试剂多、时间长,影响测定效率;荧光素汞浓度过低,会影响测定灵敏度,故本实验选择荧光素汞的浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。溶液体积越大,混合程度越低,为了确保充分混合、反应完全,本实验选择荧光素汞溶液体积为 $50 \mu\text{L}$ 。

3.3 载流 NaOH 溶液浓度及体积

根据文献 [11],荧光素汞在碱性条件下荧光较强增加实验的灵敏度,本研究考察不同浓度的 NaOH 溶液(0.01 , 0.05 , 0.1 , 0.2 和 0.5 mol/L) 以及水作为载液对荧光素汞($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 与 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L Na}_2\text{S}$ 荧光强度的影响(图 3)。综合考虑,本实验选择 0.1 mol/L NaOH 作为载液。NaOH 溶液为整个体系提供碱性环境,冲洗管路并推动反应后,溶液全部流过流通池,本实验采用 $100 \mu\text{L}$ 的 0.1 mol/L NaOH 作为载液,即达到上述目的。

3.4 流通池检测流速

0.1 mol/L NaOH 溶液中荧光素汞与 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L Na}_2\text{S}$ 反应后,考察通过流通池流速分别为 10 , 15 , 20 , 25 , 30 , 35 和 $40 \mu\text{L/s}$ 时的信号强度。结果表明,流速过慢,会加大对供试品的稀释效应;流速过快,信号稳定,重现性降低。在流速为 $25 \mu\text{L/s}$ 时,检测信号最强且稳定(图 4)。

3.5 干扰物质测定

据文献 [12]报道,含巯基氨基酸可能是内源性 H_2S 的供体,故本实验在最佳实验条件下,以 5% 的最大允许误差进行干扰测定,考察了 L-半胱氨酸、蒜氨酸、高半胱氨酸、胱氨酸、蛋氨酸及大蒜辣素对 H_2S 测定造成的干扰,结果如表 2 所示。

3.6 性能分析

荧光素汞浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 0.1 mol/L NaOH 溶液为载液,检测流速为 $25 \mu\text{L/s}$,检测波长为 521 nm ,供试品进样量 $50 \mu\text{L}$,测定系列浓度硫化氢肠灌液,获得在 521 nm 处的荧光强度,将荧光强度与浓度进行线性回归,在 $5.0 \times 10^{-6} \sim 8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内,线性方程为 $y = -262.13x + 26182$ (图 5),相关系数 $r = 0.997$ 。

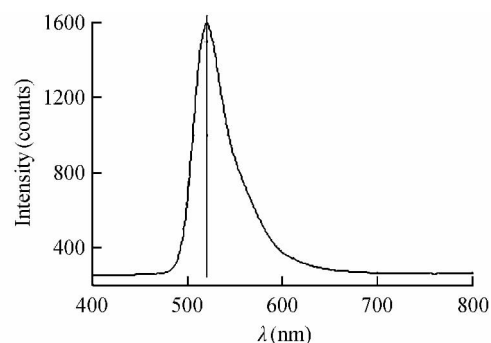


图 2 荧光素汞荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectrum of mercury fluorescein

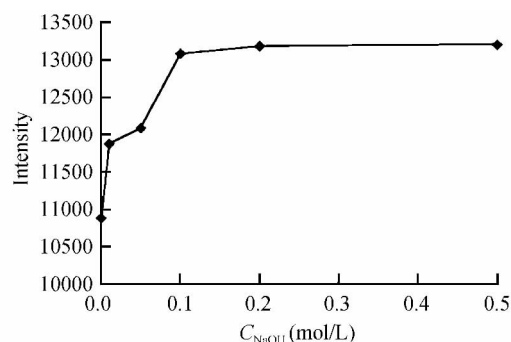


图 3 载液 NaOH 浓度对荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of carrier NaOH concentration on fluorescence intensity

根据 IUPAC 建议,空白连续进样 20 次,计算得出限为 5.4×10^{-7} mol/L,分析频率为 40 样/h。

表 2 各种干扰组分的最大允许浓度
Table 2 Tolerance concentrations of coexisting species

共存组分 Coexisting species	允许浓度 Tolerance concentration (g/L)	共存组分 Coexisting species	允许浓度 Tolerance concentration (g/L)
L-半胱氨酸 L-cysteine	0.05	蛋氨酸 Methionine	0.02
蒜氨酸 Alliin	0.02	胱氨酸 Cystine	0.03
高半胱氨酸 Homocysteine	0.05	大蒜辣素 Allicin	0.02

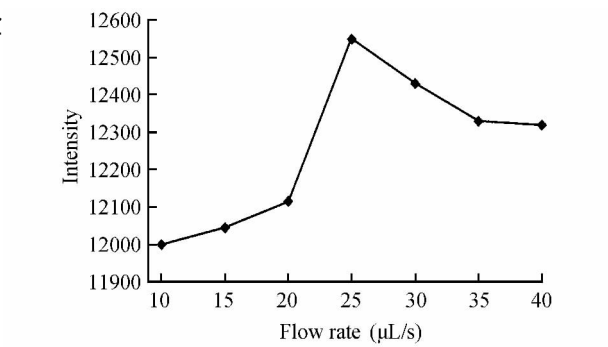


图 4 检测流速对荧光强度的影响
Fig. 4 Effect of flow rate on fluorescence intensity

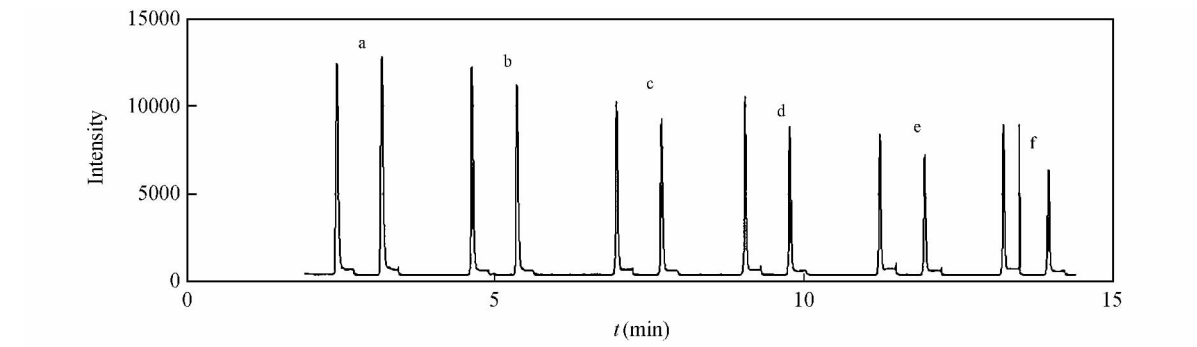


图 5 不同浓度硫化钠溶液对荧光素汞的猝灭作用
Fig. 5 Quenching effect of sodium sulphide solution with different concentration on mercury fluorescein
硫化钠溶液(Concentrations of sodium sulfide): a. 0; b. 1.0×10^{-5} mol/L; c. 2.0×10^{-5} mol/L; d. 3.0×10^{-5} mol/L; e. 4.0×10^{-5} mol/L; f. 5.0×10^{-5} mol/L.
 8.0×10^{-5} mol/L, 3.0×10^{-5} mol/L 和 5.0×10^{-6} mol/L 的硫化氢肠灌流液,每个浓度平行测定 10 次,精密度分别为 1.7%, 2.1% 和 4.2%。

3.7 回收率测定和样品分析

分别取供试品溶液 1 mL,加入到 12 个 5 mL 容量瓶中,分别加入 2.0×10^{-4} mol/L Na₂S 溶液 0.2, 0.6 和 1.0 mL,定容,每个浓度平行测定 3 次(表 3),平均回收率分别为 87.5%, 100.0% 和 90.0%, RSD 分别为 5.4%, 4.5% 和 1.6%。

取健康大鼠 Na₂S 肠灌流液于 2mL 离心管中,以 10000 r/min 离心 10 min,取上清液平行测定 3 次,荧光强度平均值为 12551, RSD = 3.1% 根据工作曲线计算 H₂S 含量为 3.8×10^{-5} mol/L。

表 3 回收率测定
Table 3 Determination of the recovery

加入值 Added (mol/L)	F	测定值 Found (mol/L)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, n = 3)
0	23033	1.1×10^{-5}	—	2.2
	22987			
	23890			
0.8×10^{-5}	20030	1.8×10^{-5}	87.5	5.4
	21886			
	22139			
2.4×10^{-5}	17827	3.5×10^{-5}	100.0	4.5
	15909			
	17743			
4.0×10^{-5}	13623	4.7×10^{-5}	90.9	1.6
	13770			
	14045			

4 结 论

本实验将微量顺序注射-阀上实验室(μSIA-LOV)系统与光纤传感技术结合,建立了荧光素汞二元体系荧光猝灭法测定生物样品中 H₂S 含量的方法。H₂S 作为一种信号分子,本身是内源性物质,参与和调节动物体多种生理及病理活动,目前对 H₂S 的测定方法大多采用需取样分析,需要经过多步样品前

处理。本实验则是在 LOV 模块上以荧光测定模式进行样品测定,简化了操作步骤,每一步操作采用程序化控制,提高了实验可重复性和规范性;整个系统微升级的进样量大大降低了试剂和样品的消耗,显著提高分析速度。本方法与光纤传感相连可实现生物体内 H_2S 的在线监测。

References

- 1 Kimura H. *Amino Acids*, **2011**, 41(1): 113–121
- 2 ZHAO Jing, FANG Li-Ping, XU Ge-Yang, TANG Chao-Shu, GENG Bin. *Journal of Peking University: Medical Sciences*, **2008**, 39(5): 449–452
赵晶, 房立平, 许戈阳, 唐朝枢, 耿彬. 北京大学学报(医学版), **2008**, 39(5): 449–452
- 3 XIA Wei-Wen, DUAN Ni. *Chinese Journal of Health Inspection*, **2010**, 20(10): 2618–2618
夏卫文, 段妮. 中国卫生检验杂志, **2010**, 20(10): 2618–2618
- 4 Zheivot V I, Krivoruchko V N, Medvedev A S, Voroshina O V. *Anal. Chem.*, **2006**, 61(4): 334–337
- 5 Wang J H, Hansen E H. *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22(4): 225–231
- 6 Wang Y, Wang L, Tian T, Yao G, Hu X, Yang C, Xu Q. *Talanta*, **2012**, 99(15): 840–845
- 7 Vichapong J, Burakham R, Srijaranai S, Grudpan K. *Journal of Separation Science*, **2011**, 34(13): 1574–1581
- 8 WANG Yang, FAN Shi-Hua. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **2005**, 25(2): 184–187
王洋, 范世华. 光谱学与光谱分析, **2005**, 25(2): 184–187
- 9 Vidigal S S M P, Tóth I V, Rangel A O S S. *Analytical Methods*, **2013**, 5(3): 585–597
- 10 Rodríguez R, Avivar J, Ferrer L, Leal L O, Cerda V. *Talanta*, **2012**, 96: 96–101
- 11 Hunt A L, Alder J F. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 387(2): 207–215
- 12 Li L, Rose P, Moore P K. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **2011**, 51: 169–187

Fluorescein Mercury Combined with Optical Sensing Micro Sequential Injection Lab-on-Valve for Determination of H_2S in Intestinal Perfusate

HOU Jun-Feng¹, GUAN-Ming¹, LI Xin-Xia^{* 2}

¹(Laboratory on Pollution Monitoring and Control, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China)

²(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

Abstract A fluorescence quenching method was established for the determination of H_2S in intestinal perfusate by optical fiber sensing technology combined with micro sequential injection lab-on-valve ($\mu\text{SIA-lov}$). In the experiment, 100 μL of 0.1 mol/L NaOH was used as the carrier, and 50 μL of 5.0×10^{-5} mol/L fluorescein mercury and 50 μL of sample were selected for the determination. The detection flow rate at the flowcell was 25 $\mu\text{L/s}$. According to H_2S quenching fluorescence at 521 nm, the concentration of H_2S in the sample was determined. The detected concentration range of H_2S was 5.0×10^{-6} – 8.0×10^{-5} mol/L, and the detection limit was 5.4×10^{-7} mol/L. Detection result of H_2S in intestinal perfusion was 3.8×10^{-5} mol/L with 3.1% RSD ($n=3$). This method can be used for the determination of H_2S effectively in the samples, which lay the foundation for real-time online measurement of H_2S in biological samples.

Keywords Fiber sensing; Hydrogen sulfide; Micro sequential injection lab-on-valve; Fluorescein mercury; Fluorescence quenching

(Received 29 May 2014; accepted 5 September 2014)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 8126048)