

美洛昔康示差脉冲伏安法测定蛋白质的研究^①

谢勇平^② 陈敬华^a 吴琼洁

(福建农林大学生命科学学院 福州市金山 350002)

^a(福建医科大学药学院 福州市 350004)

摘要 在 pH 4.8 的 NaAc-HAc 缓冲液中, 美洛昔康与蛋白质能够相互作用形成超分子复合物, 使美洛昔康在 0.584V 处的氧化峰电流下降, 在最佳条件下, 峰电流的下降值同牛血清白蛋白(BSA) 的浓度在 2.0×10^{-8} — 6.0×10^{-7} mol/L 范围内呈线性关系, 相关系数为 0.9980, 检出限为 1.2×10^{-8} mol/L, 可应用于血清样品的测定。

关键词 牛血清白蛋白, 美洛昔康, 伏安法。

中图分类号: O657.14

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2006)03-0590-04

1 前言

蛋白质的定量测定在临床医学和生命科学的研究中起着重要作用, 目前蛋白质定量分析的方法很多, 常见的有基于染料-蛋白质结合及金属离子-染料-蛋白质结合的光谱分析法, 荧光分析法和共振光散射法^[1-6]等。电分析化学法具有高灵敏度和高选择性, 为探讨蛋白质的亚层结构和生理作用等生物电化学研究提供了重要的方法, 利用电化学方法研究有机分子与蛋白质相互作用及其分析应用也有报道^[7,8]。美洛昔康(MLX, $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$), 是新型昔康类非甾体抗炎药, 化学名为 4-羟基-2-甲基-N-(5-甲基-2-噻唑基)-2H-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1-二氧化物(图 1)。它是选择性环氧化酶 II (COX2) 抑制剂, 对白三烯、血小板活化因子、氧自由基的产生具有抑制作用, 有很强的抗炎镇痛作用, 主要用于治疗类风湿性关节炎和骨关节炎。尚未见有用电化学方法研究美洛昔康与蛋白相互作用的报道, 经研究发现美洛昔康具有电化学活性, 并且在弱酸性条件下能与蛋白质结合形成一种超分子复合物, 使美洛昔康的氧化峰电流降低, 因此建立了一种新的测定蛋白质的方法。

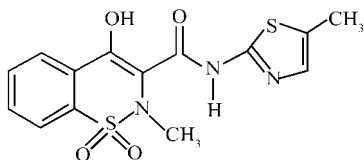


图 1 美洛昔康结构式

① 福建省教育厅基金资助项目: No. 2005K051, 福建省卫生厅青年科研基金资助项目: No. 2005123

② 联系人, 电话: (0591) 83769155; E-mail: xiaoa811225@163.com

作者简介: 谢勇平(1978—), 福建省泰宁县人, 硕士, 助教, 从事药物分析和生物大分子分析工作。

收稿日期: 2006-01-16; 接受日期: 2006-02-22

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI660B 电化学分析仪(上海辰华仪器公司), 采用三电极体系, 工作电极为玻碳电极, 对电极为铂丝电极, Ag-AgCl 电极为参比电极; pHS-3B 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂); KQ-250DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); JB-1 型搅拌器(上海雷磁新泾仪器有限公司); BS110S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司); 5.0×10^{-4} mol/L 美洛昔康(MLX, 化学对照品, 中国药品生物制品检定所)标准溶液; 牛血清白蛋白溶液(BSA)(美国 Sigma 公司): 相对分子质量以 65000 计, 1.0×10^{-5} mol/L, 4℃冰箱保存; 高纯 N_2 (99.99%); 所用试剂均为分析纯; 实验用水为石英亚沸二次蒸馏水。

2.2 实验方法

电极预处理: 将玻碳电极依次用金相砂纸和 $0.05 \mu\text{m}$ 氧化铝和水的混合物抛光, 然后用蒸馏水超声清洗, 备用。将电极先在 pH4.8 的醋酸缓冲溶液中经过循环伏安扫描至伏安曲线稳定。以 $0.2 \text{ mol/L NaAc-HAc}$ 缓冲液为支持电解质, 加入适量的美洛昔康与牛血清白蛋白, 与未加 BSA 的美洛昔康溶液比较, 用循环伏安法和示差脉冲伏安法对该体系进行研究和测定, 实验时须向溶液中通入高纯 N_2 除氧, 测定过程中溶液上方保持 N_2 气氛。

3 结果与讨论

3.1 循环伏安图的变化

在 pH4.8 的 NaAc-HAc 缓冲液中, 美洛昔康有一灵敏的氧化峰($E_{pa} = -0.594 \text{ V}$) (图 2 曲线 a), 当体系中引入 BSA 后, 在电位扫描范围内未出现新峰, 氧化还原峰电流均降低, 而峰电位基本不变(图 2 曲线 b, c), BSA 加入量越多, 峰电流下降越大, 这说明 MLX-BSA 复合物不具有电化学活性, 结合反应后游离的 MLX 浓度下降, 对应的氧化峰电流下降。

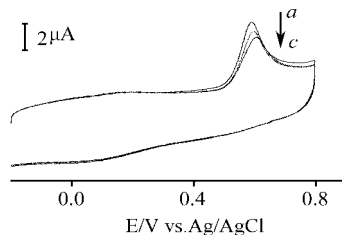


图 2 5.0×10^{-4} mol/L 美洛昔康
与 BSA 作用的循环伏安图

a—0; b— 4.0×10^{-8} mol/L BSA;
c— 8.0×10^{-8} mol/L BSA
scan rate, 100 mV/s 。

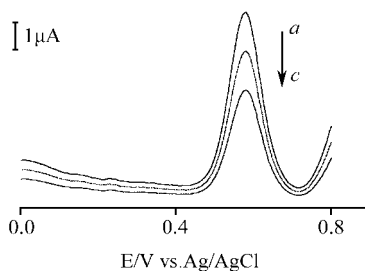


图 3 美洛昔康与不同浓度 BSA
作用的示差脉冲伏安图

a—MLX, $C = 5.0 \times 10^{-4}$ mol/L;
b—MLX + 4.0×10^{-8} mol/L BSA;
c—MLX + 8.0×10^{-8} mol/L BSA。

3.2 示差脉冲伏安法

示差脉冲伏安法(Differential pulse voltammetry, DPV)可提高灵敏度和选择性, 试验采用 DPV 法研究美洛昔康与 BSA 相互作用的电化学行为, 如图 3 所示, 美洛昔康在 pH4.8 的 NaAc-HAc 缓冲液中, 产生一个灵敏的氧化峰, 峰电位为 0.584 V ; 在溶液中加入一定量的 BSA 后氧化峰电位几乎不变, 而峰电流大大降低, 峰电流的降低值同加入的 BSA 量在一定范围内呈线性关系, 因而可以

用于 BSA 的电化学测定。

3.3 实验条件的选择

3.3.1 缓冲介质和酸度的选择

试验了 NaAc-HAc; B-R 缓冲液; 六次甲基四胺等缓冲液对 Δip 的影响, 结果表明, 美洛昔康在 NaAc-HAc 缓冲液中峰形稳定, 且引入 BSA 后峰下降明显, 故选之为缓冲体系。在 10 mL 测定溶液中, 0.2 mol/L NaAc-HAc 缓冲液用量为 3.0 mL 时, Δip 最大, 所以选用 NaAc-HAc 缓冲液加入量为 3.0 mL。还实验了 pH 值对峰电流差值 Δip 的影响, 结果表明 pH 在 4.5—5.5 之间峰电流差值 Δip 最大, 本实验选择溶液 pH 4.8。

3.3.2 美洛昔康用量对反应体系的影响

在 pH 4.8 的 NaAc-HAc 的缓冲液中, 固定 BSA 浓度为 8.0×10^{-8} mol/L, 考察美洛昔康浓度变化对测定的影响, 结果表明, 当美洛昔康在 5.0×10^{-4} — 5.5×10^{-4} mol/L 浓度范围内变化时, 峰电流稳定, 且峰电流差值 Δip 最大, 考虑到美洛昔康量太大, 对低浓度蛋白质不敏感, 所以本实验选择美洛昔康浓度为 5.0×10^{-4} mol/L。

3.4 稳定性实验

实验表明反应 20 min 后峰电流基本稳定, 并至少可稳定 2 h 以上, 本实验选取反应时间为 20 min。

3.5 离子强度对测定的影响

实验发现, 在 1.0×10^{-3} — 8.0×10^{-2} mol/L 浓度范围内, 随着 NaCl 浓度的增加, Δip 下降, 其原因是钠离子和氯离子的屏蔽作用, 而且随着 NaCl 浓度的增加, Cl⁻ 对蛋白质分子结合部位的竞争结合作用加大了, 从而减弱了美洛昔康与蛋白质分子的结合作用, 导致体系 Δip 下降。

3.6 线性关系, 精密度和检出限

在选定的最佳条件下, 测定 BSA 的线性范围为 2.0×10^{-8} — 6.0×10^{-7} mol/L, 回归方程为 $\Delta ip = -0.7202 + 0.4854C$, $r = 0.9980$ 。(Δip 为 MLX 与 MLX-BSA 复合物峰电流的差值, 单位 μA ; C 为 BSA 的浓度)。检出限为 1.2×10^{-8} mol/L。对 4.0×10^{-7} mol/L 的 BSA 溶液平行进行 7 次测定, 其相对标准偏差为 2.10%。

3.7 干扰物质的影响

实验了酪氨酸、L-胱氨酸、丝氨酸、谷氨酸、柠檬酸、苹果酸及常见离子如 Zn²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺ 等对测定的干扰, 结果表明低浓度的上述物质对测定结果影响不大。

3.8 合成样品的分析

在未知样品(含量为 1×10^{-7} mol/L)中加入一定量已知样品, 制成合成样品。按实验方法对合成样品进行测定, 结果见表 1, 方法的回收率较好。

表 1 样品分析结果

样品	加入量 (10^{-6} mol/L)	测得值 (10^{-6} mol/L)	回收率 (%)
1	0.2	0.186	93
2	0.4	0.412	103
3	1.6	1.595	99
4	2.0	2.021	101

参考文献

- [1] Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Using the Principle of Protein-Dye Binding [J]. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**(1—2): 248.
 [2] 魏永巨, 李克安, 董沈阳. 溴甲酚绿与血清白蛋白的结合反应 [J]. *分析化学*, 1996, **24**(4): 387.

- [3] Wei Y J, Li K A, Tong S Y. The Interaction of Bromophenol Blue with Proteins in Acidic Solution[J]. *Talanta*, 1996, **3**(1): 1.
- [4] 魏永巨, 李克安, 童沈阳. 血清白蛋白与偶氮肿 III 结合反应的研究[J]. *高等学校化学学报*, 1996, **17**(4): 550.
- [5] 李娜, 李克安, 童沈阳. 偶氮肿 III 与牛血清白蛋白作用的分光光度研究[J]. *分析化学*, 1996, **24**(1): 10.
- [6] 俞英, 黄发德, 高庆. 牛血清白蛋白与偶氮肿 III-锝(III) 结合反应及其应用[J]. *分析化学*, 2001, **29**(10): 1205.
- [7] 孙伟, 焦奎, 刘晓云. 电化学法研究蛋白质和茜素红 S 的相互作用[J]. *分析化学*, 2002, **30**(3): 312.
- [8] 郑石英, 周春, 罗登柏. 刚果红与血清白蛋白相互作用的极谱分析[J]. *分析测试学报*, 2003, **22**(4): 64.

Study on the Differential Pulse Voltammetric Detection of Albumin with Meloxicam

XIE Yong-Ping CHEN Jing-Hua^a WU Qiong-Jie

(College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry, Fuzhou 350002, P. R. China)

^a(Department of Pharmaceutical Analysis, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, P. R. China)

Abstract Meloxicam can react with bovine serum albumin to form an electrochemically nonactive supermolecular complex MLX-BSA in the buffer solution of NaAc-HAc (pH4.8), resulting in the decrease of oxidation peak at 0.584V without the change of peak potential. The decrease of the peak current is proportional to BSA concentration in the range of 2.0×10^{-8} — 6.0×10^{-7} mol/L. The limit of the detection is 1.2×10^{-8} mol/L with the correlation coefficient to 0.9980. This method can be applied to the determination of BSA.

Key words BSA, Meloxicam, Voltammetry.

(上接 586 页)

美国化学文摘(CA)选登本刊论文摘要的最近情况

序号	作者姓名	论文题目	《光谱实验室》发表的年、卷(期)、页	CA 选登的卷(期)、编号
406	崔慧 陶绪泉 张爱梅 贾丽萍	催化动力学光度法测定芦丁	2003, 20 (5) 706-709	140 (6): 82403e
407	林钰 蒋永贵 司晚令 朱伯仲	氢化物发生-原子荧光法测定中药中痕量砷	2003, 20 (5) 703-705	140 (6): 82368x
408	黄晓东 陈美珠	以吐温-80 为增溶剂催化光度法测定痕量钒(V)	2003, 20 (4) 633-635	140 (6): 81723x
409	程祥圣 秦晓光	悬浮液进样石墨炉原子吸收法测定近海沉积物中的铜	2003, 20 (4) 586-589	140 (6): 81722w
410	魏宏伟 姜福良 李青霞	石墨炉原子吸收法测定地表水中钼	2003, 20 (4) 574-576	140 (6): 81721v
411	胡先文 叶发兵 董元彦	水中甲磺隆的气相色谱分析研究	2003, 20 (4) 547-549	140 (6): 81720u
412	王尚芝 刘月成 宋雅茹	流动注射-氢化物发生-原子吸收光谱法测定海水中铅	2003, 20 (4) 513-516	140 (6): 81719a
413	苏苓 李建国 马泓冰 陶冠红	流动注射催化动力学光度法测定痕量锰	2003, 20 (4) 501-504	140 (6): 81718z
414	康士秀 蒋作宏 沈显生 黄宇营	安徽沼虾和米虾的同步辐射 X 射线荧光分析及对水环境污染的监测作用	2003, 20 (4) 517-521	140 (6): 81649c
415	江锦花	微波消解-原子吸收光谱法测定电镀污泥中铜含量	2003, 20 (4) 544-546	140 (6): 81495z
416	任斌 黄河 刘少琼 于黄中	有机导电复合材料聚苯胺/聚乙炔醇的光谱分析	2003, 20 (2) 165-168	140 (6): 77862z
417	刘立军 姜恒 宫红 苏婷婷	高聚物红外光谱分析制样方法的改进	2003, 20 (2) 201-204	140 (6): 77607c
418	李满秀 赵二劳 任光明 张海容	钙(II) 增敏秦皮乙素-CTMAB 体系荧光特性的研究	2003, 20 (5) 787-789	140 (5): 69777k
419	徐郭文英 黄炳强 屠一锋	中性介质鲁米诺电化学发光测定过氧化氢	2003, 20 (5) 694-696	140 (5): 69776j
420	曹玮 曲波 钟惠民 袁瑾	Bi ³⁺ -Cys 配合物的 X 射线粉末衍射光谱	2003, 20 (2) 247-249	140 (5): 69570n
421	高峰 章丽 王伦	灿烂甲酚蓝-溴酸钾-硫酸体系催化荧光光度法测定痕量甲醛	2003, 20 (4) 630-632	140 (5): 63762e
422	徐增芹 郭强 高良豪	CID-ICP-AES 检测煤中不同形态的硫	2003, 20 (4) 522-524	140 (5): 62022b
423	陈文新 方奕文	ICP-AES 测定车用无铅汽油中的铅	2003, 20 (4) 495-497	140 (5): 61932m
424	杨郁 张国梅 双少敏 董振明	环糊精包合作用及其分子识别功能的研究进展	2003, 20 (2) 169-180	140 (5): 61247s
425	潘景浩 任宏波 刘昌岭 夏宁	石墨炉原子吸收法测定大气降水中的铜、铅和镉	2003, 20 (4) 568-570	140 (4): 46151n
426	王锡宁 孙玉泉	南鹤虱挥发油化学成分的分析	2003, 20 (4) 530-532	140 (4): 38804n
427	孙长勇 宋一兵 郭锡坤	Tm-SO ₃ ²⁻ /TiO ₂ 的催化酯化性能及 XRD 和 IR 表征	2003, 20 (4) 564-567	140 (3): 28747g

(下转 597 页)