

文章编号: 1004-1656 (2008) 03-0272-04

氨基酸的光辅助氧化化学发光及其分析应用

高英¹, 苏颖颖², 陈贺¹, 吕弋¹, 侯贤灯^{1,2*}

(1. 四川大学化学学院, 四川 成都 610064; 2. 四川大学分析测试中心, 四川 成都 610064)

摘要: 氨基酸与溴酸钾混合液经紫外光照射后与鲁米诺反应产生较强的发光信号, 且在一定条件下氨基酸浓度与发光强度成线性关系, 据此建立了一种氨基酸测定方法。在优化的条件下, 该方法对五种氨基酸的检出限在 $0.004 \mu\text{g/mL} \sim 0.06 \mu\text{g/mL}$ 范围内; 分别对 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的五种氨基酸平行测定 7 次, 其相对标准偏差在 2.3% ~ 4.2% 范围内。初步考察了该方法与液相色谱联用测定氨基酸的可行性。

关键词: 氨基酸; 化学发光; 光辅助氧化; 液相色谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A

目前测定氨基酸的主要分析方法有: 荧光法^[1-3]、质谱法^[4]、电化学法^[5,6]、蒸发光散射法^[7]、示差折光法^[8]等。在这些检测方法中, 利用荧光法进行检测时, 反应体系中需要加入衍生试剂, 且实验耗时, 操作繁琐; 质谱仪器昂贵, 运行成本高; 蒸发光散射在低浓度时线性不好, 且容易受到溶液中难挥发介质影响; 示差折光检测则因灵敏度低、操作条件苛刻等因素使其应用受到限制。

本文建立了一种光辅助氧化化学发光直接测定氨基酸的方法。该方法是基于氨基酸与溴酸钾混合液经紫外光照射后与鲁米诺反应产生较强的发光信号, 从而对待测氨基酸进行定量分析。该方法具有操作简单, 测定快速, 灵敏度高优点, 并可用作液相色谱的检测手段。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

微弱化学发光分析仪 (BPCL, 中国科学院生物物理研究所, 北京); 低压汞灯 (15 W, 44 cm, TUV-15, 飞利浦, 荷兰); 蠕动泵 (HL-2, 青浦沪西仪器厂, 上海); 液相色谱仪 (LC 213, 天美科学仪器有限公司, 上海); 阴离子交换柱 (Hamilton PRP X-100, 美国); 聚四氟乙烯 (PTFE) 管 (内径 0.3 mm)。

氨基酸储备液 (1 g/L): 称取 0.1000 g 氨基酸, 用二次水溶解后, 稀释定容至 100 mL, 4 °C 下保存, 工作溶液由储备液用载流 (流动相) 逐级稀释至所需浓度; 鲁米诺储备液 (1×10^{-2} mol/L): 溶解

0.4454 g 的鲁米诺于 0.1 mol/L NaOH 溶液中, 转移至 250 mL 的容量瓶后用 0.1 mol/L NaOH 溶液定容, 避光保存; 载流 (流动相): 4×10^{-2} mol/L CH_3COONa 溶液; 1×10^{-3} mol/L 溴酸钾溶液; 0.1 mol/L 碳酸钠溶液; 以及 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液。除氨基酸为生化试剂外, 其它试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

如图 1 所示, 将载流、溴酸钾溶液、鲁米诺溶液分别从相应的管道输入分析系统, 打开紫外灯电源, 待基线稳定之后, 再进样 100 μL , (经色谱分离后) 样品与溴酸钾混合后, 经紫外光照射, 再与鲁米诺反应产生发光信号, 发光信号用微弱化学发光分析仪检测记录。测定时以相对峰高定量。

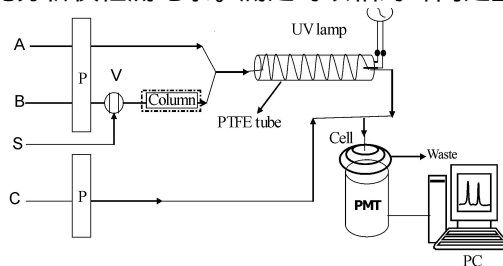


图 1 仪器结构示意图

Fig. 1 Instrumental arrangement

A: 溴酸钾; B: 载流 (流动相); C: 鲁米诺; P: 泵; Column: 阴离子交换柱; V: 进样阀; PTFE tube: 聚四氟乙烯管; UV lamp: 低压汞灯; S: 样品; Cell: 流通池; PMT: 光电倍增管; Waste: 废液; PC: 计算机

收稿日期: 2007-9-12; 修回日期: 2007-10-30

联系人简介: 侯贤灯 (1962-), 男, 教授, 博导, 主要从事光谱分析研究。Email: houxd@scu.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 化学发光实验条件的优化

2.2.1 鲁米诺浓度及其 pH 值的影响 鲁米诺在本实验中作为发光试剂,其浓度直接影响化学发光强度。实验研究了其在 1×10^{-6} mol/L ~ 1×10^{-4} mol/L 浓度范围内对反应体系发光信号的影响。如图 2 所示,当鲁米诺浓度为 1×10^{-5} mol/L,信噪比最佳。

鲁米诺溶液在碱性条件下发光强度较大,因此以碳酸钠 碳酸氢钠为缓冲液,考察了 pH 在 9.0 ~ 11.0 范围内不同 pH 值的鲁米诺溶液对发光信号的影响。从图 3 可以看出,除赖氨酸外,其它氨基酸在 pH 9.3 时,信噪比均最大,而赖氨酸在 pH 10.0 时信噪比最大,这可能由于赖氨酸是碱性氨基酸的原因。综合考虑鲁米诺溶液 pH 值对几种氨基酸发光信号的影响,本实验选择 pH 9.3 的鲁米诺溶液。

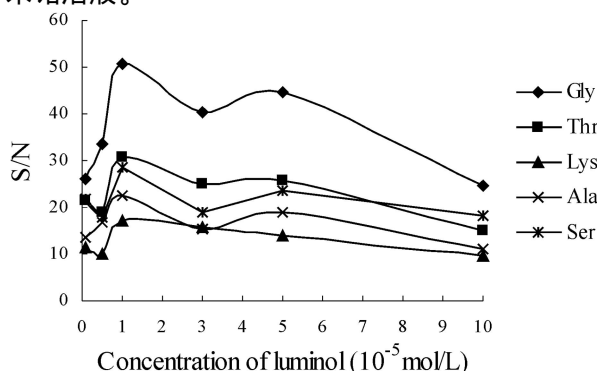


图 2 鲁米诺浓度对化学发光信噪比的影响
Fig.2 Effect of the concentration of luminol on the signal-to-noise ratio

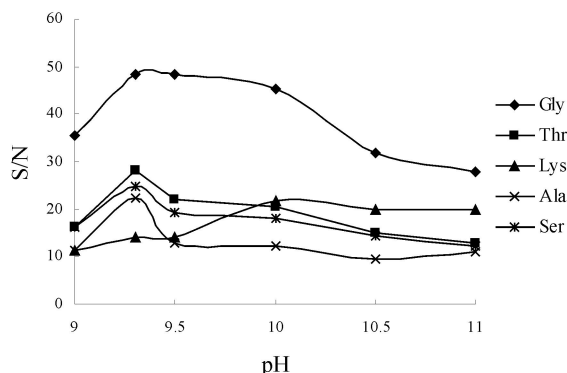


图 3 鲁米诺溶液 pH 值对化学发光信噪比的影响
Fig.3 Effect of pH of luminol on the signal-to-noise ratio

2.2.2 溴酸钾浓度的影响 溴酸钾在本实验中

作为氧化剂,其浓度是该发光体系的重要影响因素。实验研究了溴酸钾在 2.5×10^{-4} mol/L ~ 4×10^{-3} mol/L 浓度范围内对化学发光的影响,其结果如 4 所示。结果表明,随着溴酸钾浓度的增加,发光信号也增强,但基线也随之增高。当溴酸钾浓度为 1×10^{-3} mol/L 时,除苏氨酸外其它四种氨基酸信噪比最大,而溴酸钾浓度为 5×10^{-4} mol/L 时苏氨酸信噪比最大。实验选择溴酸钾浓度为 1×10^{-3} mol/L。

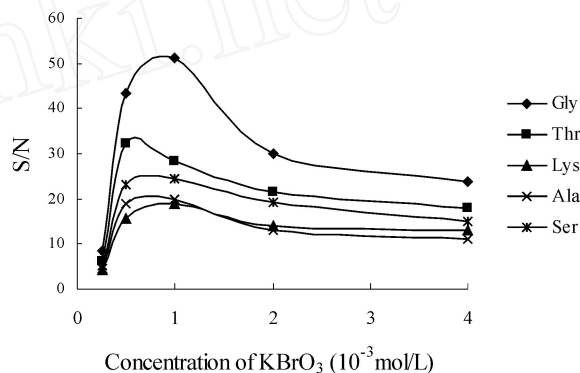


图 4 溴酸钾浓度对化学发光信噪比的影响
Fig.4 Effect of the concentration of $KBrO_3$ on the signal-to-noise ratio

2.2.3 光照时间及流速的影响 实验通过改变聚四氟乙烯管子的长度,考察了光照时间对化学发光的影响,其结果如图 5 所示。当光照时间大于 20 s 时,信噪比逐渐开始出现平台,而当光照时间为 24 s 发光信号最强。考虑发光强度,实验选择了光照时间为 24 s,即 6 m 的聚四氟乙烯管。

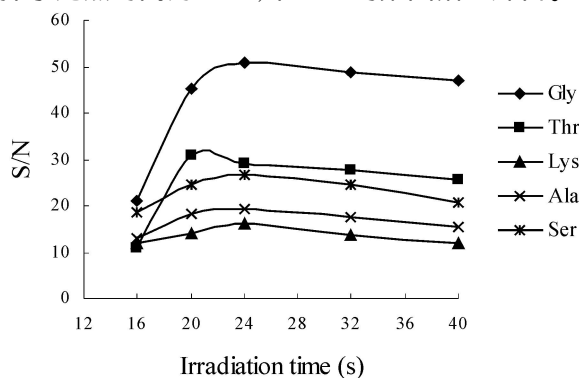


图 5 光照时间对化学发光信噪比的影响
Fig.5 Effect of irradiation time on the signal-to-noise ratio

当溴酸钾及样品混合液与鲁米诺溶液流速相等时,更有利于化学发光,所以在优化流速时保持混合液与鲁米诺流速相同,溴酸钾与载流的流速也相同。因此,下述流速为混合液的流速或鲁米诺流速,溴酸钾与载流流速为混合液流速的一半。

如图 6 所示,随流速的增加,所测氨基酸的信噪比也不断增加,当流速大于 1.34 mL/min 时,信噪比增长趋于平缓。综合考虑信噪比、试剂消耗及色谱分离条件等多方面因素,实验选择流速为 1.34 mL/min。

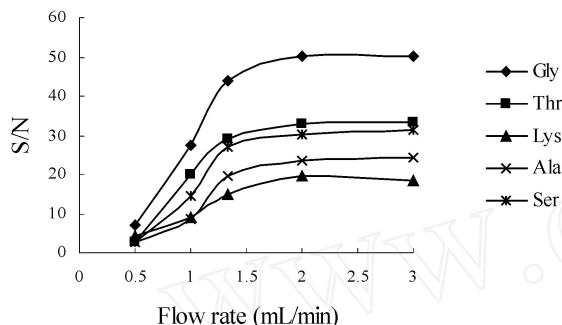


图 6 流速对化学发光信噪比的影响

Fig. 6 Effect of flow rate on the signal-to-noise ratio

2.3 线性范围、检出限及精密度

在优化的条件下,考察了各种氨基酸的线性范围、检出限及精密度,结果见表 1。检出限 (3 σ) 在 0.004 μ g/mL ~ 0.06 μ g/mL 范围内,能满足大多数样品分析要求。对 0.5 μ g/mL 的氨基酸连续平行测定 7 次,相对标准偏差在 2.3% ~ 4.2% 范围内。

表 1 线性范围、检出限及精密度

Table 1 Detection characteristics for amino acids using KB IO_3 -lumino UV CL system

化合物	线性范围 (μ g/mL)	相关系数	检出限 (μ g/mL)	RSD (%) (n=7)
甘氨酸	0.05-2.5	0.9957	0.004	4.2
苏氨酸	0.05-4.0	0.9978	0.01	3.9
赖氨酸	0.1-2.5	0.9990	0.04	4.2
丙氨酸	0.1-4.0	0.9971	0.06	4.0
丝氨酸	0.1-2.5	0.9981	0.02	2.3

参考文献:

- [1] Hsieh M M, Chen S M. Determination of amino acids in tea leaves and beverages using capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection [J]. *Talanta*, 2007, 73: 326 - 331.
- [2] Iwata T, Mitoma H, Yamaguchi M, et al. Fluorescence derivatization of amino acids with 4-(5, 6-dimethoxybenzothiazolyl)-phenylisothiocyanate in liquid chromatography [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 416: 69 - 75.
- [3] Peris-Vicente J, Gimeno Adelantado J V, Doméch Carbó

3 应用

将该化学发光体系作为液相色谱的检测器,分离并测定了甘氨酸、苏氨酸、赖氨酸三种氨基酸(图 7)。色谱分离时须注意:流动相配制好后,需用氮气保护,否则空气中的二氧化碳会溶于流动相中,对分离效果造成较大影响。若需分离更多种氨基酸,可用氨基柱或 C_{18} 水柱。选择适当的色谱柱,该方法应当可用于食品、生物等样品中无紫外吸收或弱紫外吸收氨基酸的检测。

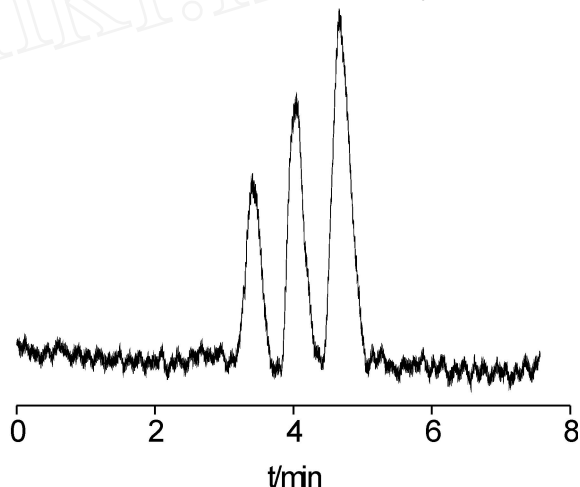


图 7 氨基酸的色谱分离图

Fig. 7 HPLC chromatogram of amino acids

溴酸钾流速: 0.67 mL/min; 流动相乙酸钠流速: 0.67 mL/min; 乙酸钠浓度: 0.04 mol/L; 鲁米诺流速: 1.34 mL/min; 进样量: 100 μ L; Lys: 0.4 μ g/mL 赖氨酸; Gly: 0.2 μ g/mL 甘氨酸; Thr: 0.4 μ g/mL 苏氨酸

4 结论

基于氨基酸与溴酸钾混合液经紫外光照射后与鲁米诺产生较强发光信号,本文建立了一种氨基酸检测方法。该分析方法具有快速、灵敏等优点。

- M T, et al. Characterization of proteinaceous glues in old paintings by separation of the o-phthalaldehyde derivatives of their amino acids by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Talanta*, 2006, 68: 1648 - 1654.
- [4] Mayboroda O A, Neus Ü C, Pelzing M, et al. Amino acid profiling in urine by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1159: 149 - 153.
- [5] Kubá P, Hauser P C. Application of gradient programs for

- the determination of underivatized amino acids and small peptides in reversed-phase high-performance liquid chromatography with contactless conductivity detection [J]. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1128: 97 – 104.
- [6] Ding Y S, Yu H, Mou S F. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection [J]. *J. Chromatogr. A*, 2002, 982: 237 – 244.
- [7] Chambault P, Petritis K, Elfakir C, et al. On-line pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids [J]. *J. Chromatogr. A*, 2000, 870: 245 – 254.
- [8] Ivanov A R, Nazimov I V, Lobazov A P, et al. Direct determination of amino acids and carbohydrates by high performance capillary electrophoresis with refractometric detection [J]. *J. Chromatogr. A*, 2000, 894: 253 – 257.

Chemiluminescence based on photo-assisted oxidation of amino acids and its analytical application

GAO Ying¹, SU Ying-ying², CHEN He¹, LV Yi¹, HOU Xian-deng^{1,2*}

(1. College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Analytical & Testing Center, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: A new chemiluminescence system for the determination of amino acids was proposed, based on UV irradiation of the mixture solution of potassium bromate and amino acids and the reaction of the irradiated products with luminol to emit light. Under the optimized conditions, the limits of detection ranged from 0.004 $\mu\text{g/mL}$ to 0.06 $\mu\text{g/mL}$, and the relative standard deviations (RSD) for the determination of the five amino acids (0.5 $\mu\text{g/mL}$) were in the range of 2.3% ~ 4.2% ($n=7$). Coupled with high performance liquid chromatography (HPLC), the method is promising in the determination of amino acids without UV absorption or with weak UV absorption.

Key words: amino acids; chemiluminescence; photo-assisted oxidation; HPLC

(责任编辑 李方)