



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104422688 B

(45)授权公告日 2017.06.06

(21)申请号 201310367104.1

(22)申请日 2013.08.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104422688 A

(43)申请公布日 2015.03.18

(73)专利权人 中国科学院宁波材料技术与工程
研究所

地址 315201 浙江省宁波市镇海区庄市大
道519号

(72)发明人 吴爱国 李永龙 沈折玉 高月霞
汪竹青

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266

代理人 崔佳佳 祝莲君

(51)Int.Cl.

G01N 21/77(2006.01)

(56)对比文件

JP 特開2007-57334 A,2007.03.08,

CN 101413897 A,2009.04.22,

CN 101881734 A,2010.11.10,

CN 101947655 A,2011.01.19,

吴同.《特定形态贵金属纳米粒子的制备及
其在生物小分子与环境无机粒子分析中的应
用研究》.《中国博士学位论文全文数据库》.2011,
正文第5-6章.

审查员 翁永超

权利要求书1页 说明书13页 附图3页

(54)发明名称

一种半胱氨酸的检测试剂及检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种半胱氨酸的检测试剂及检测方法。具体地,所述的试剂组合包含银纳米片溶液;其中,所述的银纳米片溶液中含有保护剂。以及用所述的试剂组合检测样品中半胱氨酸的检测方法。本发明的试剂盒具有检测快速,实验条件简易,结果准确等特征。

1. 一种用于检测半胱氨酸的试剂,其特征在于,所述的试剂包含银纳米片溶液;其中,所述的银纳米片溶液中含有保护剂;和含有碘离子的溶液。

2. 如权利要求1所述的试剂,其特征在于,所述的保护剂选自下组:柠檬酸、柠檬酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、可溶性的(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合。

3. 一种用于检测半胱氨酸的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括如权利要求1所述的试剂;或

所述的试剂盒包括组分:

(i) 银纳米粒子前驱体;

(ii) 还原性试剂;

(iii) 保护剂,所述的保护剂选自下组:柠檬酸、柠檬酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、可溶性的(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合;和

(iv) 含有碘离子的溶液。

4. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述的还原性试剂为可溶性硼酸盐,或其水溶液。

5. 一种检测待测样品中的半胱氨酸的方法,其特征在于,包括:用如权利要求1所述的试剂,或如权利要求3所述的试剂盒对样品进行检测。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,包括步骤:

提供一如权利要求1所述的试剂;

提供一样品水溶液;

将所述的试剂加入样品中使其反应,再加入含碘离子的溶液,形成检测混合液;

通过所述检测混合液光谱学特征,判断所述样品中是否存在半胱氨酸,和/或判断样品中半胱氨酸的含量。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:提供一对照混合液,通过比较所述检测混合液和所述对照混合液的光谱学特征差异,判断所述样品中是否存在半胱氨酸,和/或判断样品中半胱氨酸的含量。

8. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,如权利要求1所述的试剂通过包括以下步骤的方法制备:

提供一溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液;

往上述水溶液中加入还原性试剂,得到银纳米片。

9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述的溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液通过以下步骤制备:

将银纳米粒子前驱体和保护剂加入去离子水中,形成溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液。

10. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,包括步骤:

用所述检测混合液与已知浓度的标准样品进行比较,判断待测样品中是否存在半胱氨酸和/或判断待测样品中半胱氨酸的浓度;

或所述方法包括:

检测所述检测混合液的光谱学特征,并将所得结果代入标准曲线,得到待测样品中半胱氨酸的浓度。

一种半胱氨酸的检测试剂及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物小分子的检测领域,具体涉及一种能够快速、简便、灵敏的识别出水溶液中半胱氨酸的检测方法。

背景技术

[0002] 在天然氨基酸中,半胱氨酸是唯一一种含有巯基的氨基酸,在生物体及某些植物体中起着重要的作用。例如,在生物体中半胱氨酸缺乏时,将会导致生长缓慢,头发无光泽,发生水肿,肝脏,皮肤损伤及身体虚弱等症状。因此对于半胱氨酸的检测具有重要的意义。而目前传统的半胱氨酸检测方法主要有高效液相层析、电化学、化学发光法、分光光度法等,这些方法都依赖于氧化还原法,或者得到发光基团,或者荧光基团,并且借助相关的大型精密仪器设备进行检测,而这些方法操作繁琐,成本花费高且耗时长。

[0003] 文献“Selectively colorimetric detection of cysteine with triangular silver nanoprisms”中,采用的是半胱氨酸的巯基直接和银片作用,形成银硫键,长时间的反应使银原子从银片上剥落下来,其形貌发生改变,达到检测半胱氨酸的目的。但是该反应常温下反应时间长,需要水浴加热,促使反应的进行,并且其比色灵敏度为160nM高于本发明的方法(如图1所示,比色灵敏度为25nM)。

[0004] 因此,本领域尚缺乏一种能够快速、及时、简便、准确地检测出水溶液中低浓度的半胱氨酸方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种能够快速、及时、简便、准确地检测出水溶液中低浓度的半胱氨酸的试剂盒及检测方法。

[0006] 本发明的第一方面,提供了一种用于检测半胱氨酸的试剂,所述的试剂包含银纳米片溶液;其中,所述的银纳米片溶液中含有保护剂。

[0007] 在另一优选例中,所述溶液中,银纳米片的浓度为3nM-100nM。

[0008] 在另一优选例中,所述溶液中,银纳米片的浓度为15nM-25nM。

[0009] 在另一优选例中,所述的保护剂选自下组:柠檬酸、柠檬酸盐聚乙烯吡咯烷酮、可溶性的(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合。

[0010] 在另一优选例中,所述的保护剂包括选自下组(a)和选自下组(b)的保护剂:

[0011] (a) 柠檬酸、柠檬酸盐,或其组合;

[0012] (b) 聚乙烯吡咯烷酮、可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合。

[0013] 在另一优选例中,所述的柠檬酸盐是柠檬酸碱金属盐,较佳地,所述的柠檬酸盐选自下组:柠檬酸钾、柠檬酸钠,或其组合。

[0014] 在另一优选例中,所述的可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐选自下组:碱金属盐、碱土金属盐,或其组合。

[0015] 在另一优选例中,所述的试剂的pH值为3-10。

- [0016] 在另一优选例中,所述试剂的pH值为4-9,较佳地为5-8。
- [0017] 本发明的第二方面,提供了一种用于检测半胱氨酸的试剂盒,所述的试剂盒包括如本发明第一方面所述的试剂;或
- [0018] 所述的试剂盒包括组分:
- [0019] (i) 银纳米粒子前驱体;
- [0020] (ii) 还原性试剂;和
- [0021] (iii) 保护剂。
- [0022] 在另一优选例中,所述的银纳米粒子前驱体是可溶性银盐。
- [0023] 在另一优选例中,所述的还原性试剂为可溶性硼酸盐,或其水溶液,其中,所述的可溶性硼酸盐优选硼氢化钠、硼氢化钾,或其组合。
- [0024] 在另一优选例中,所述的保护剂选自下组:柠檬酸、柠檬酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、可溶性的(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合。
- [0025] 在另一优选例中,所述的保护剂包括选自下组(a)和选自下组(b)的保护剂:
- [0026] (a) 柠檬酸、柠檬酸盐,或其组合;
- [0027] (b) 聚乙烯吡咯烷酮、可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合。
- [0028] 在另一优选例中,所述的柠檬酸盐是柠檬酸碱金属盐,较佳地,所述的柠檬酸盐选自下组:柠檬酸钾、柠檬酸钠,或其组合。
- [0029] 在另一优选例中,所述的可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐选自下组:(对-磺酰苯基)苯基膦化碱金属盐、(对-磺酰苯基)苯基膦化碱土金属盐,或其组合。
- [0030] 在另一优选例中,所述的试剂盒还包括:含有碘离子的溶液。
- [0031] 在另一优选例中,所述的含有碘离子的溶液为碘化钾溶液。
- [0032] 在另一优选例中,所述的试剂盒还包括pH调节试剂。
- [0033] 在另一优选例中,所述的pH调节试剂是强酸和/或强碱,较佳地,所述的pH调节试剂选自下组:氢氧化钠、氢氧化钾、硫酸、硝酸。
- [0034] 本发明的第三方面,提供了一种检测待测样品中的半胱氨酸的方法,所述方法包括:用如本发明第一方面所述的试剂,或如本发明第二方面所述的试剂盒对样品进行检测。
- [0035] 在另一优选例中,所述方法包括步骤:
- [0036] 提供一如本发明第一方面所述的试剂;
- [0037] 提供一样品水溶液;
- [0038] 将所述的试剂加入样品中使其反应,再加入含碘离子的溶液,形成检测混合液;
- [0039] 通过所述检测混合液光谱学特征,判断所述样品中是否存在半胱氨酸,和/或判断样品中半胱氨酸的含量。
- [0040] 在另一优选例中,所述的光谱学特征选自下组:颜色、光吸收强度、吸收光谱峰,或其组合。
- [0041] 在另一优选例中,所述方法还包括:用肉眼观察所述检测混合液的颜色。
- [0042] 在另一优选例中,所述方法还包括:用仪器分析方法检测所述检测混合液的颜色。
- [0043] 在另一优选例中,所述的仪器分析方法选自下组:分光光度检测法、紫外-可见吸收光谱法。
- [0044] 在另一优选例中,所述方法还包括:提供一对照混合液,通过比较所述检测混合液

和所述对照混合液的光谱学特征,判断所述样品中是否存在半胱氨酸,和/或判断样品中半胱氨酸的含量。

[0045] 在另一优选例中,所述的对照混合液通过以下步骤制备:

[0046] 提供一不含有半胱氨酸的空白溶液;

[0047] 将所述的试剂加入空白溶液中,并加入含碘离子的溶液,形成对照混合液;

[0048] 通过所述对照混合液和所述检测混合液的光谱学特征差异,判断所述样品中是否存在半胱氨酸。

[0049] 在另一优选例中,所述的光谱学特征选自下组:颜色、光吸收强度、吸收光谱峰,或其组合。

[0050] 在另一优选例中,所述方法还包括:用肉眼分别观察所述检测混合液和所述对照混合液的颜色。

[0051] 在另一优选例中,所述方法还包括:用仪器分析方法分别检测所述检测混合液和所述对照混合液的颜色。

[0052] 在另一优选例中,所述的仪器分析方法选自下组:分光光度检测法、紫外-可见吸收光谱法。

[0053] 在另一优选例中,所述的如本发明第一方面所述的试剂通过包括以下步骤的方法制备:

[0054] 提供一溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液;

[0055] 往上述水溶液中加入还原性试剂,得到银纳米片。

[0056] 在另一优选例中,所述的银纳米粒子前驱体是可溶性银盐。

[0057] 在另一优选例中,所述的还原性试剂为可溶性硼酸盐,或其水溶液,其中,所述的可溶性硼酸盐优选硼氢化钠、硼氢化钾,或其组合。

[0058] 在另一优选例中,所述溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液中还含有保护剂。

[0059] 在另一优选例中,所述的溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液通过以下步骤制备:

[0060] 将银纳米粒子前驱体和保护剂加入去离子水中,形成溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液。

[0061] 在另一优选例中,所述的保护剂选自下组:柠檬酸、柠檬酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、可溶性的(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合。

[0062] 在另一优选例中,所述的保护剂包括选自下组(a)和选自下组(b)的保护剂:

[0063] (a) 柠檬酸、柠檬酸盐,或其组合;

[0064] (b) 聚乙烯吡咯烷酮、可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐溶液,或其组合。

[0065] 在另一优选例中,所述的柠檬酸盐是柠檬酸碱金属盐,较佳地,所述的柠檬酸盐选自下组:柠檬酸钾、柠檬酸钠,或其组合。

[0066] 在另一优选例中,所述的可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐选自下组:碱金属盐、碱土金属盐,或其组合。

[0067] 在另一优选例中,所述的方法还包括:用pH调节试剂调节样品溶液pH至3-10。

[0068] 在另一优选例中,用pH调节试剂调节样品溶液至pH值为4-9,较佳地为5-8。

[0069] 在另一优选例中,包括步骤:

[0070] 用所述检测混合液与已知浓度的标准样品进行比较,判断待测样品中是否存在半

胱氨酸和/或判断待测样品中半胱氨酸的浓度；

[0071] 或所述方法包括：

[0072] 检测所述检测混合液的光谱学特征，并将所得结果代入标准曲线，得到待测样品中半胱氨酸的浓度。

[0073] 在另一优选例中，所述的标准曲线是通过如下方法制得：

[0074] 配制一系列含有不同浓度的半胱氨酸的检测混合液，并加入如本发明第一方面所述的试剂，从而制得含有不同浓度的半胱氨酸的检测混合液；

[0075] 测量各检测混合液的光谱学特征；

[0076] 绘制“检测混合液的光谱学特征-半胱氨酸浓度”曲线，或绘制“相对光谱学特征-半胱氨酸浓度”曲线，作为标准曲线。

[0077] 在另一优选例中，所述的检测混合液的光谱学特征是各检测混合液的紫外-可见吸光度或紫外-可见透光度。

[0078] 在另一优选例中，所述的相对光谱学特征是各检测混合液相对对照混合液的紫外-可见吸收峰值对应的波长之差。

[0079] 在另一优选例中，所述方法包括：用所述检测混合液与标准比色卡进行对比。

[0080] 在另一优选例中，所述的样品水溶液是选自下组的样品经过或未经过预处理制成的溶液：环境水样、生物样品、固态环境样品、食品、化妆品、人体尿液、血样，或其组合。

[0081] 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文（如实施例）中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

[0082] 图1是本发明中含不同浓度半胱氨酸溶液的检测混合液的比色检测结果图。

[0083] 图2是本发明得到的检测混合液的紫外可见光光谱吸收波长-半胱氨酸浓度曲线图。

[0084] 图3是本发明检测混合液（包括半胱氨酸样品与其他20种氨基酸样品）与对照混合液的肉眼比色图。

[0085] 图4是本发明检测混合液得到的相对紫外可见光吸收波长位移-半胱氨酸浓度标准曲线。

[0086] 图5是本发明方法检测混合液得到的紫外波长位移的特异性结果。

具体实施方式

[0087] 本发明人经过长期而深入的研究，意外地发现，当银纳米片溶液中存在半胱氨酸溶液，加入碘离子溶液时，半胱氨酸会阻挡碘离子与银原子形成碘化银复合物，从而使银纳米片表面等离子体的共振吸收保持不变，呈现原来溶液的颜色，且上述的显色反应非常明显，用肉眼即可判断。基于上述发现，发明人完成了本发明。

[0088] 术语

[0089] 如本文所用，术语“样品”指任何含有半胱氨酸的物质，如泥土样品、环境样品、生物样品等。优选地，若样品为非水溶液状态，可通过本领域的常规技术手段预处理，转化为

水溶液状态。所述的样品水溶液中可以含有任何杂质,如金属离子、有机可溶性杂质、微生物、尘土等。本发明所述的样品中半胱氨酸的含量没有特别限制,可低至 10^{-9} M。

[0090] 如本文所用,术语“紫外可见光的波长位移”指待测样品半胱氨酸检测混合液的最高吸收峰对应的波长(W)与对照混合液的最高吸收峰对应的波长(W0)的差值(W-W0)。

[0091] 术语“检测混合液”指待测样品与本发明的试剂以及含碘离子的溶液形成的混合液。

[0092] 术语“标准样品”是指已知溶液中半胱氨酸浓度的样品,或空白样品。

[0093] 术语“空白样品”是指已知不含半胱氨酸的样品。

[0094] 术语“对照混合液”指标准样品与本发明的试剂以及含碘离子的溶液形成的混合液。所述的标准样品可以是已知半胱氨酸浓度的样品,或不含半胱氨酸的空白样品。

[0095] 半胱氨酸检测试剂(试剂盒)

[0096] 本发明提供一种能够快速、实时、准确和简便地检测出水溶液体系中半胱氨酸含量的试剂。

[0097] 当初始的银纳米片溶液中加入一定浓度的半胱氨酸溶液时,半胱氨酸与银纳米片结合,阻挡碘离子与银原子形成碘化银复合物,使得银纳米片表面等离子体的共振吸收保持不变,呈现原来溶液的颜色。通过这种抗形貌改变的方法,实现对水溶液中半胱氨酸的实时、快速、简便的检测。

[0098] 本发明的半胱氨酸检测试剂包含银纳米片溶液,其中,所述的银纳米片溶液中含有保护剂。

[0099] 所述的保护剂选自下组:柠檬酸、柠檬酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、可溶性的(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合。

[0100] 在另一优选例中,所述的保护剂包括选自下组(a)和选自下组(b)的保护剂:

[0101] (a) 柠檬酸、柠檬酸盐,或其组合;

[0102] (b) 聚乙烯吡咯烷酮、可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐溶液,或其组合。

[0103] 在另一优选例中,所述的柠檬酸盐是柠檬酸碱金属盐,较佳地,所述的柠檬酸盐选自下组:柠檬酸钾、柠檬酸钠,或其组合。

[0104] 在另一优选例中,所述的可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐选自下组:碱金属盐、碱土金属盐,或其组合。

[0105] 较佳地,所述的试剂的pH值为3-10,更佳地为4-9,最佳地为5-8。

[0106] 本发明的检测试剂还可以制备成试剂盒形式,所述的试剂盒包括如本发明所述的试剂。

[0107] 在另一优选例中,本发明的检测试剂还可以制备成如下的试剂盒形式:

[0108] 所述的试剂盒包括组分:

[0109] (i) 银纳米粒子前驱体;

[0110] (ii) 还原性试剂;和

[0111] (iii) 保护剂。

[0112] 使用时,将银纳米粒子前驱体与还原性试剂、保护剂混合,从而形成银纳米片溶液,用于检测半胱氨酸。

[0113] 在另一优选例中,所述的银纳米粒子前驱体是可溶性银盐。

[0114] 在另一优选例中,所述的还原性试剂为可溶性硼酸盐,或其水溶液。所述的可溶性硼酸盐优选为硼氢化钠、硼氢化钾,或其组合。

[0115] 在另一优选例中,所述的保护剂选自下组:柠檬酸、柠檬酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、可溶性的(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合。

[0116] 在另一优选例中,所述的保护剂包括选自下组(a)和选自下组(b)的保护剂:

[0117] (a) 柠檬酸、柠檬酸盐,或其组合;

[0118] (b) 聚乙烯吡咯烷酮、可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐溶液,或其组合。

[0119] 在另一优选例中,所述的柠檬酸盐是柠檬酸碱金属盐,较佳地,所述的柠檬酸盐选自下组:柠檬酸钾、柠檬酸钠,或其组合。

[0120] 在另一优选例中,所述的可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐选自下组:碱金属盐、碱土金属盐,或其组合。

[0121] 所述的试剂盒还可以包括含有碘离子的溶液,如碘化钾溶液。

[0122] 优选地,所述的试剂盒还包括pH调节试剂,用于调节银纳米片溶液的pH至适合检测的范围。

[0123] 在另一优选例中,所述的pH调节试剂是强酸和/或强碱,较佳地,所述的pH调节试剂选自下组:氢氧化钠、氢氧化钾、硫酸、硝酸。

[0124] 半胱氨酸检测方法

[0125] 本发明人探索出了一种新的方法,能够快速、及时、简便、准确地检测出水溶液中低浓度的半胱氨酸,对应用于环境分析及生物学分析等领域,具有重要的应用价值。

[0126] 具体地,本发明提供了一种半胱氨酸的检测方法,所述的检测方法包括:用如本发明所述的试剂或试剂盒对待测样品进行检测。

[0127] 在本发明的一个优选例中,所述的方法包括步骤:

[0128] 提供一本发明的检测试剂;

[0129] 提供一样品水溶液;

[0130] 将所述的试剂加入样品中使其反应,再加入含碘离子的溶液,形成检测混合液;

[0131] 通过所述检测混合液光谱学特征,判断所述样品中是否存在半胱氨酸,和/或判断样品中半胱氨酸的含量。

[0132] 所述的光谱学特征可以是(但并不限于)选自下组的特征:颜色、光吸收强度、吸收光谱峰,或其组合。

[0133] 所述的光谱学特征可以通过肉眼观察,如用肉眼观察所述检测混合液的颜色;或通过仪器分析方法检测所述检测混合液的颜色,如通过以下的仪器分析方法:分光光度检测法、紫外-可见吸收光谱法等。

[0134] 在另一优选例中,还可以制备一对照混合液,通过比较检测组和对照组的光谱学特征差异,从而定性或定量地检测待测样品中的半胱氨酸。

[0135] 在另一优选例中,所述的对照混合液可以通过以下方法制备:

[0136] 提供一空白对比溶液;

[0137] 将所述的试剂加入空白对比溶液中,并加入含碘离子的溶液,形成对照混合液。

[0138] 通过所述对照混合液和所述检测混合液的光谱学特征差异,可以判断所述样品中是否存在半胱氨酸。

[0139] 所述的对照混合液可以是用不含半胱氨酸的空白溶液制备的检测混合液,或用已知浓度的标准样品制备的检测混合液。在本发明中,也可以根据行业标准或国家标准,配制具有特定浓度半胱氨酸的标准样品并制备对照混合液,并与待测样品制备的检测混合液对比,从而得出待测样品中半胱氨酸的浓度是否符合标准。

[0140] 在另一优选例中,所述方法还包括:用肉眼分别观察所述检测混合液和所述对照混合液的颜色。

[0141] 在另一优选例中,所述方法还包括:用仪器分析方法分别检测所述检测混合液和所述对照混合液的光谱学特征。

[0142] 在另一优选例中,所述的仪器分析方法选自下组:分光光度检测法、紫外-可见吸收光谱法,或其组合。

[0143] 在所述的检测方法中,本发明所述的试剂可以是市售的已配好的试剂,也可以是现制的。如在本发明的另一优选例中,所述的试剂可以通过包括以下步骤的方法制备:

[0144] 提供一溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液;

[0145] 往上述水溶液中加入还原性试剂,得到银纳米片。

[0146] 在另一优选例中,所述的银纳米粒子前驱体是可溶性银盐。

[0147] 在另一优选例中,所述的还原性试剂为可溶性硼酸盐,优选硼氢化钠、硼氢化钾水溶液,或其组合。

[0148] 在另一优选例中,所述的试剂是用本发明的试剂盒制备的。

[0149] 在另一优选例中,所述的溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液也可以是现制的,如通过以下步骤制备:

[0150] 将银纳米粒子前驱体和保护剂加入去离子水中,形成溶解有银纳米粒子前驱体的水溶液。

[0151] 其中,所述的保护剂选自下组:柠檬酸、柠檬酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、可溶性的(对-磺酰苯基)苯基膦化盐,或其组合。

[0152] 在另一优选例中,所述的保护剂包括选自下组(a)和选自下组(b)的保护剂:

[0153] (a) 柠檬酸、柠檬酸盐,或其组合;

[0154] (b) 聚乙烯吡咯烷酮、可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐溶液,或其组合。

[0155] 在另一优选例中,所述的柠檬酸盐是柠檬酸碱金属盐,较佳地,所述的柠檬酸盐选自下组:柠檬酸钾、柠檬酸钠,或其组合。

[0156] 在另一优选例中,所述的可溶性(对-磺酰苯基)苯基膦化盐选自下组:碱金属盐、碱土金属盐,或其组合。

[0157] 在另一优选例中,所述的柠檬酸盐是柠檬酸碱金属盐,较佳地,所述的柠檬酸盐选自下组:柠檬酸钾、柠檬酸钠,或其组合。

[0158] 在另一优选例中,所述的检测方法还包括:用pH调节试剂调节样品溶液pH至3-10。

[0159] 在另一优选例中,用pH调节试剂调节样品溶液至pH值为4-9,较佳地为5-8。

[0160] 在另一优选例中,所述的方法还包括步骤:

[0161] 用所述检测混合液与标准样品进行比较,判断待测样品中是否存在半胱氨酸和/或判断待测样品中半胱氨酸的浓度。

[0162] 其中,所述的标准样品是预制的标准样品,可以是用含有某一特定浓度(如含有某

种质量标准中临界点的半胱氨酸浓度)的半胱氨酸的水溶液与本发明的检测试剂及含有碘离子的溶液混合制得的标准样品,或用一系列含有特定浓度的半胱氨酸的水溶液与本发明的检测试剂及含有碘离子的溶液混合制得的标准样品组合。

[0163] 在另一优选例中,还可以预制标准曲线,并对所述检测混合液作光谱分析,将分析所得的光谱学特征代入标准曲线,从而定量测定所述检测混合液中的半胱氨酸。标准曲线的制备可以参考本领域的通用方法,或按照以下的步骤:

[0164] 在另一优选例中,所述的标准曲线是通过如下方法制得:

[0165] 配制一系列含有不同浓度的半胱氨酸的检测混合液,并加入如本发明第一方面所述的试剂;

[0166] 测量各检测混合液的光谱学特征;

[0167] 以标准样品中半胱氨酸的浓度作为横坐标(X),以各个样品的光谱学特征(如吸收峰值的波长W),与空白混合液的相应光谱学特征(如吸收峰值的波长W₀)的差值(W-W₀)即,波长位移作为纵坐标(Y),得出其散点图,并计算出二者的线性关系。

[0168] 一个典型实施例的结果如图4。在测定未知浓度的检测液时,以含有各个浓度的半胱氨酸混合液的吸收峰值的波长(W)与空白混合液的吸收峰值的波长(W₀)的差值(W-W₀)代入图4的公式Y中,即可获得半胱氨酸的浓度数值。

[0169] 在另一优选例中,还可以制备标准比色卡,用于与本发明的检测混合液进行对比,从而定性或定量地检测样品中的半胱氨酸。

[0170] 本发明中,所述的样品没有特别的限制,可以是选自下组的样品经过或未经过预处理制成的溶液:环境水样、生物样品、固态环境样品、食品、化妆品、人体尿液、人体血样,或其组合。

[0171] 本发明中,一种优选的快速检测溶液中的半胱氨酸的方法具体步骤如下:

[0172] (1)在水溶液中加入柠檬酸化合物,边搅拌的条件下,加入聚乙烯吡咯烷酮化合物作为保护剂,再加入适量的可溶性银盐以及适量的双氧水,上述混合物加完后搅拌五分钟,再快速加入现制的硼氢化钠溶液,继续搅拌1min取下,在周围环境下放置30min即可得到蓝宝石色的银纳米片检测液;并配置一定浓度的碘化钾溶液。

[0173] (2)配制不含半胱氨酸的水溶液作为空白对比溶液,将对比溶液以及与对比溶液等体积的被检测水溶液,并将溶液调节成弱酸/弱碱性。从步骤(1)中制得的检测液,量取两份体积相同的检测液样品,加入到等量的空白对比溶液和被检测溶液中,形成第一混合液和第二混合液;

[0174] (3)往步骤(2)中的第一混合液和第二混合液加入相同量的(1)中配好的碘化钾溶液。对比第二混合液与第一混合液的颜色或紫外可见吸收强度、峰值的变化,判断被检测溶液中是否存在半胱氨酸。

[0175] 上述检测过程中,第一检测混合液(无半胱氨酸)时的颜色为浅红色,当第二检测混合液的颜色相对于第一检测混合液的颜色变为深红色或变为蓝色时,则判定待测样本中含有半胱氨酸,并且半胱氨酸的浓度大于或等于 $2.5 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 。没有发生颜色变化,则待测样品中不一定含有半胱氨酸。若含有半胱氨酸其浓度低于 $2.5 \times 10^{-8} \text{mol/L}$,并对未变色的检测混合液进行紫外可见分光光度计测量进一步确定待测样品中是否存在半胱氨酸。

[0176] 作为优选,提供能够反映水溶液中半胱氨酸浓度与紫外可见吸收波长关系的标准

曲线图,从而通过本发明得到的第二混合液的紫外可见吸收波长与该标准曲线图进行对比,获得第二混合液中半胱氨酸的浓度。该标准曲线图的具体绘制方法如下:

[0177] 按照所述的第二混合液的配制方法配制一系列不同浓度的半胱氨酸溶液,在波长250~900nm区间内扫描其紫外可见吸收波长,以混合液的紫外可见吸收峰值所对应的波长与空白样品形成的对照混合液的吸收峰值所对应的波长的差值为纵坐标(波长位移),混合液中含有的半胱氨酸浓度为横坐标绘制曲线,即获得标准曲线图,如图4;

[0178] 通过实验发现,标准曲线图绘制时,随着半胱氨酸浓度的增加,紫外可见吸收峰值所对应的波长范围优选为500~720nm。得到相对紫外可见光波长位移与半胱氨酸浓度的关系图,如图4。

[0179] 所述的可溶性银盐包括硝酸银、亚硝酸银和高氯酸银等,但不限于中的一种或多种;选用两种以上时,各化合物之间的比例没有严格的限制,可为任意比例。

[0180] 所述的聚乙烯吡咯烷酮包括不同分子量,但不限于及其衍生物的一种或多种;选用两种以上时,各化合物之间的比例没有严格的限制,可为任意比例。

[0181] 所述的柠檬酸化合物包括但不限于指及其类似物,优选为柠檬酸、柠檬酸钠、柠檬酸钾;选用两种以上时,各化合物之间的比例没有严格的限制,可为任意比例。

[0182] 所述的反应时间为5-20分钟;

[0183] 所述的被检测水溶液可以是环境中的水样,例如,河水、湖水以及海水等;可以是液态样品经过处理后获得的样品,如血液制品、尿液制品等;可以是固态的环境样品(如食品与蔬菜制品等)经过处理后获得的水溶液。

[0184] 作为优选,在步骤(2)中的被检测液进行的pH的调节,使其pH值为5到8之间,然后进行步骤(3)的操作,不仅可以节省检测时间,而且还可以提高检测限和灵敏度。对于强碱性待测样品溶液,优选强酸,优先选用硝酸调节pH值;对于强酸性待测样品溶液,优选强碱,特别优选利用氢氧化钠/氢氧化钾溶液调节pH值。

[0185] 本发明的主要优点

[0186] (1) 本发明提供了一种用于检测水溶液中半胱氨酸的方法,所述的方法可以直接通过肉眼判别溶液颜色的变化实现对溶液中半胱氨酸的裸眼比色检测,也可以通过简单的仪器设备快速检测溶液体系中的半胱氨酸的含量,从而实现对被检测液中半胱氨酸的定性和定量检测。

[0187] (2) 本发明的检测方法操作简单方便、快速、成本低廉、灵敏度高,并且可以在普通的实验室,乃至在采样现场进行快速检测,适用于生活用水的监测以及生物医学分析等领域,具有广泛的应用价值。

[0188] (3) 使用银纳米片浓度为 $\geq 3\text{nM}$ 的检测试剂,本发明的方法仅通过肉眼比色,即可达到最低 $2.5 \times 10^{-8}\text{mol/L}$ 的检测下限;通过本发明方法结合仪器分析手段,还能够检测出更低浓度的半胱氨酸水溶液样品,具有非常高的灵敏度。

[0189] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0190] <材料来源>

[0191] 1. 柠檬酸钠:购自国药化学试剂有限公司;型号:分析纯(AR)。

- [0192] 2. 硝酸银:购自国药化学试剂有限公司;型号:分析纯(AR)。
- [0193] 3. 聚乙烯吡咯烷酮:购自阿拉丁试剂有限公司;型号:分析纯(AR)。
- [0194] 4. 双氧水:购自国药化学试剂有限公司;型号:分析纯(AR)。
- [0195] 5. 半胱氨酸:购自国药化学试剂有限公司;型号:分析纯(AR)。
- [0196] 6. 碘化钾:购自阿拉丁试剂有限公司;型号:分析纯(AR)。

[0197] 通用方法:标准曲线的制备

[0198] (1) 制备本发明的检测液:所述的检测液可以通过以下方法制备:

[0199] 往99.5mL的水中依次加入6mL30mM的柠檬酸钠、6mL0.7mM的聚乙烯吡咯烷酮、500 μ L20mM硝酸银、240 μ L30wt%的双氧水(以上试剂边搅拌边加入),加完后混匀搅拌5min,再迅速加入1mL0.1M硼氢化钠溶液,反应1min后,取下放置30min,即可得到由柠檬酸根、聚乙烯吡咯烷酮作为保护剂的蓝色的银纳米片溶液,作为检测样品液;并配置 10^{-4} M的碘化钾溶液。

[0200] (2) 制备标准样品:用去离子水和半胱氨酸配制一系列半胱氨酸浓度依次为0.050 μ M、0.075 μ M、0.10 μ M、0.25 μ M、0.50 μ M和1.0 μ M的标准溶液,分别取不同浓度的标准溶液各0.1mL,并各自加入0.85mL步骤1所制备的检测样品液,并加入(1)中制备的碘化钾溶液(50 μ L)。静置15分钟。

[0201] (3) 绘制标准曲线:对上述制备得到的标准样品进行紫外可见分光光度计测量,在250~900nm区间内测得的紫外可见吸收波长的变化,并记录500nm与720nm处之间的吸收峰值波长,并计算各个样品在500~720nm处的吸收峰值波长的差值,以标准样品的浓度作为横坐标,峰值波长的差值作为纵坐标(波长位移),绘制标准曲线。绘制的标准曲线如图4所示。

[0202] 样品的紫外可见光谱检测

[0203] 等量的银纳米片溶液(850 μ L)中加入不同浓度的半胱氨酸(100 μ L),再加入50 μ L 10^{-4} M KI,反应15min后,进行紫外测试。在250~900nm区间内测得的紫外可见吸收波长的变化,得到检测混合液的紫外可见光谱吸收波长-半胱氨酸浓度曲线图(图2)。

[0204] 不同种类氨基酸的吸收度检测

[0205] 分别配制20种天然氨基酸的水溶液,其中半胱氨酸的浓度为5 μ M,其他氨基酸的浓度为500 μ M,各取0.1mL加入到等量等浓度的银纳米片溶液中,再加入等量等浓度的KI溶液,反应15min,得到检测混合液的紫外峰值对应的波长与空白对照混合液的峰值对应的波长的差值,作为纵坐标作柱状图,如图5所示。结果显示,本发明的试剂能够特异性地检测半胱氨酸。

[0206] 实施例1:河水、湖水、海水水样中半胱氨酸的检测

[0207] (1) 制备检测液:往99.5mL的水中依次加入6mL30mM的柠檬酸钠、6mL0.7mM的聚乙烯吡咯烷酮、500 μ L20mM硝酸银、240 μ L30wt%的双氧水(以上试剂边搅拌边加入),加完后混匀搅拌5min,再迅速加入1mL0.1M硼氢化钠溶液,反应1min后,取下放置30min,即可得到由柠檬酸根、聚乙烯吡咯烷酮作为保护剂的蓝色的银纳米片溶液,作为检测样品液;并配置 10^{-4} M的碘化钾溶液。

[0208] (2) 待检测水样采集:用水样采集瓶在河、湖中三个不同地点的一定深度(20~50cm)处采集水样,得到的混合液用硝酸或氢氧化钠(取决于检测液样品的酸碱度)调节其水样的pH呈弱酸性,以免杂质影响检测效果,并用滤纸过滤水样,获得的滤液为待检测水

样。

[0209] (3) 准备两个同样规格的试管A和试管B,分别向试管A和试管B中加入相同体积(0.85mL)的检测液样品。

[0210] (4) 分别向试管A和试管B中加入等体积(0.1mL)的超纯水和待检测水样,混匀后,再加入(1)中制备的碘化钾溶液(50 μ L)。观察试管A和试管B中水溶液颜色变化的情况。

[0211] 检测结果:15分钟内,如果试管B中水溶液相对于试管A中水溶液的颜色发生变化(变深红或变蓝),则判定待检测水样中含有半胱氨酸,且浓度大于或等于 2.5×10^{-8} mol/L;若试管B中水溶液相对于试管A中水溶液的颜色没有发生变化,则判定待检测水样中半胱氨酸浓度低于 2.5×10^{-8} mol/L。

[0212] 对检测混合液进行紫外可见分光光度计测量,在250~900nm区间内测得的紫外可见吸收波长的变化,并将500nm及720nm处的吸光度差值代入图4进行比对计算,得到待检测液中半胱氨酸的浓度。

[0213] 测定结果:

[0214]	样本名称	测量结果	
		是否变色	浓度(μ mol/L)
	S1.1(自来水)	否	未测
	S1.2(河水)	否	0.014
[0215]	S1.3(湖水)	是	0.027
	S1.4(海水)	是	0.24

[0216] 实施例2:人体尿液、血液制品中半胱氨酸的检测

[0217] (1) 制备检测液:往99.5mL的水中依次加入6mL30mM的柠檬酸钠、6mL0.7mM的聚乙烯吡咯烷酮、500 μ L20mM硝酸银、240 μ L30wt%的双氧水(以上试剂边搅拌边加入),加完后混匀搅拌5min,再迅速加入1mL0.1M硼氢化钠溶液,反应1min后,取下放置30min,即可得到由柠檬酸根、聚乙烯吡咯烷酮作为保护剂的蓝色的银纳米片溶液,作为检测样品液;并配置 10^{-4} M的碘化钾溶液。

[0218] (2) 待检测水样采集:从医院获得人体尿液及血液制品,利用强酸加热消解,使尿液试样、血样中的有机组分被完全氧化,以免杂质影响检测效果,然后用氢氧化钠调节pH至弱碱性,并用滤纸过滤水样,获得待检测水样。

[0219] (3) 准备两个同样规格的试管A和试管B,分别向试管A和试管B中加入相同体积(0.85mL)的检测液样品。

[0220] (4) 分别向试管A和试管B中加入等体积(0.1mL)的超纯水和待检测水样,混匀后,再加入(1)中制备的碘化钾溶液(50 μ L)。观察试管A和试管B中水溶液颜色变化的情况。

[0221] 检测结果:15分钟内,如果试管B中水溶液相对于试管A中水溶液的颜色发生变化(变蓝),则判定待检测水样中含有半胱氨酸,且浓度大于或等于 2.5×10^{-8} mol/L;若试管B中水溶液相对于试管A中水溶液的颜色没有发生变化,则判定待检测水样中半胱氨酸浓度低于 2.5×10^{-8} mol/L。

[0222] 对检测混合液进行紫外可见分光光度计测量,在250~900nm区间内测得的紫外可见吸收波长的变化,并将500nm及720nm处的吸光度差值代入图4进行比对计算,得到待检测液中半胱氨酸的浓度。

[0223] 测定结果:

[0224]	样本名称	测量结果	
		是否变色	浓度($\mu\text{mol/L}$)
	S2.1(血液)	是	未测
	S2.2(血液)	是	0.047
[0225]	S2.3(尿液)	否	0.021
	S2.4(尿液)	否	未测

[0226] 实施例3:食品、化妆品中半胱氨酸的检测

[0227] (1) 制备检测液:往99.5mL的水中依次加入6mL30mM的柠檬酸钠、6mL0.7mM的聚乙烯吡咯烷酮、500 μL 20mM硝酸银、240 μL 30wt%的双氧水(以上试剂边搅拌边加入),加完后混匀搅拌5min,再迅速加入1mL0.1M硼氢化钠溶液,反应1min后,取下放置30min,即可得到由柠檬酸根、聚乙烯吡咯烷酮作为保护剂的蓝色的银纳米片溶液,作为检测样品液;并配置 10^{-4}M 的碘化钾溶液。

[0228] (2) 待检测水样采集:从待测食品、化妆品样品中称取约2g溶于水中,并加入浓度为98%的浓硝酸消解,浓硝酸与样品溶液的体积比为1:1,待样品中的有机组分被完全氧化后,再用0.1mol/L氢氧化钠滴至弱酸性,并用滤纸过滤水样,获得待检测水样。

[0229] (3) 准备两个同样规格的试管A和试管B,分别向试管A和试管B中加入相同体积(0.85mL)的检测液样品。

[0230] (4) 分别向试管A和试管B中加入等体积(0.1mL)的超纯水和待检测水样,混匀后,再加入(1)中制备的碘化钾溶液(50 μL)。观察试管A和试管B中水溶液颜色变化的情况。

[0231] 检测结果:15分钟内,如果试管B中水溶液相对于试管A中水溶液的颜色发生变化(变蓝),则判定待检测水样中含有半胱氨酸,且浓度大于或等于 $2.5 \times 10^{-8}\text{mol/L}$;若试管B中水溶液相对于试管A中水溶液的颜色没有发生变化,则判定待检测水样中半胱氨酸浓度低于 $2.5 \times 10^{-8}\text{mol/L}$ 。

[0232] 对检测混合液进行紫外可见分光光度计测量,在250~900nm区间内测得的紫外可见吸收波长的变化,并将500nm及720nm处的吸光度差值代入图4进行比对计算,得到待检测液中半胱氨酸的浓度。

[0233] 测定结果:

[0234]	样本名称	测量结果	
		是否变色	浓度($\mu\text{mol/L}$)
	S3.1(食品)	否	0.008

[0235]	S3.2(化妆品)	是	0.074
	S3.3(化妆品)	是	未测
	S3.4(化妆品)	是	未测

[0236] 结果显示,各实施例中,未变色的样品的浓度均小于 $2.5 \times 10^{-8} \text{mol/L}$,说明本发明的半定量方法检测结果可靠。而通过标准曲线计算法,可以进一步准确地测定出样品中半胱氨酸的浓度,实现定量检测。

[0237] 使用银纳米片浓度为 $\geq 3 \text{nM}$ 的检测试剂,当样品水样的最低可接受浓度为 $\geq 2.5 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 时,通过肉眼比色,即可方便地判断样品水样中半胱氨酸是否符合标准。当样品水样的最低可接受浓度为 $< 2.5 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 时,也可以用本发明的试剂结合光谱学仪器分析,判断样品水样中半胱氨酸是否符合标准得出样品的浓度。当需要进行定量分析时,也可以结合光谱学仪器分析,得出样品的浓度。

[0238] 本发明的试剂可以用于测定各种来源的含半胱氨酸水样,不会受到水样中杂质的干扰,且均能准确、定量地测定出水样中半胱氨酸的浓度。可见,本发明的试剂具有极大的应用价值。

[0239] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

半胱氨酸浓度 ($10^{-7}M$)

Blank 0.25 0.5 0.75 1.0 2.5 5.0 7.5 10 17.5 25 50 100

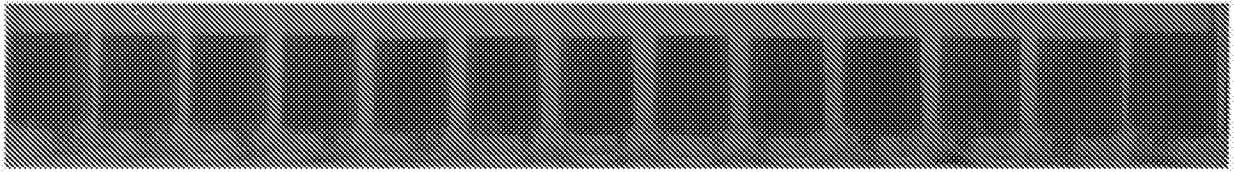


图1

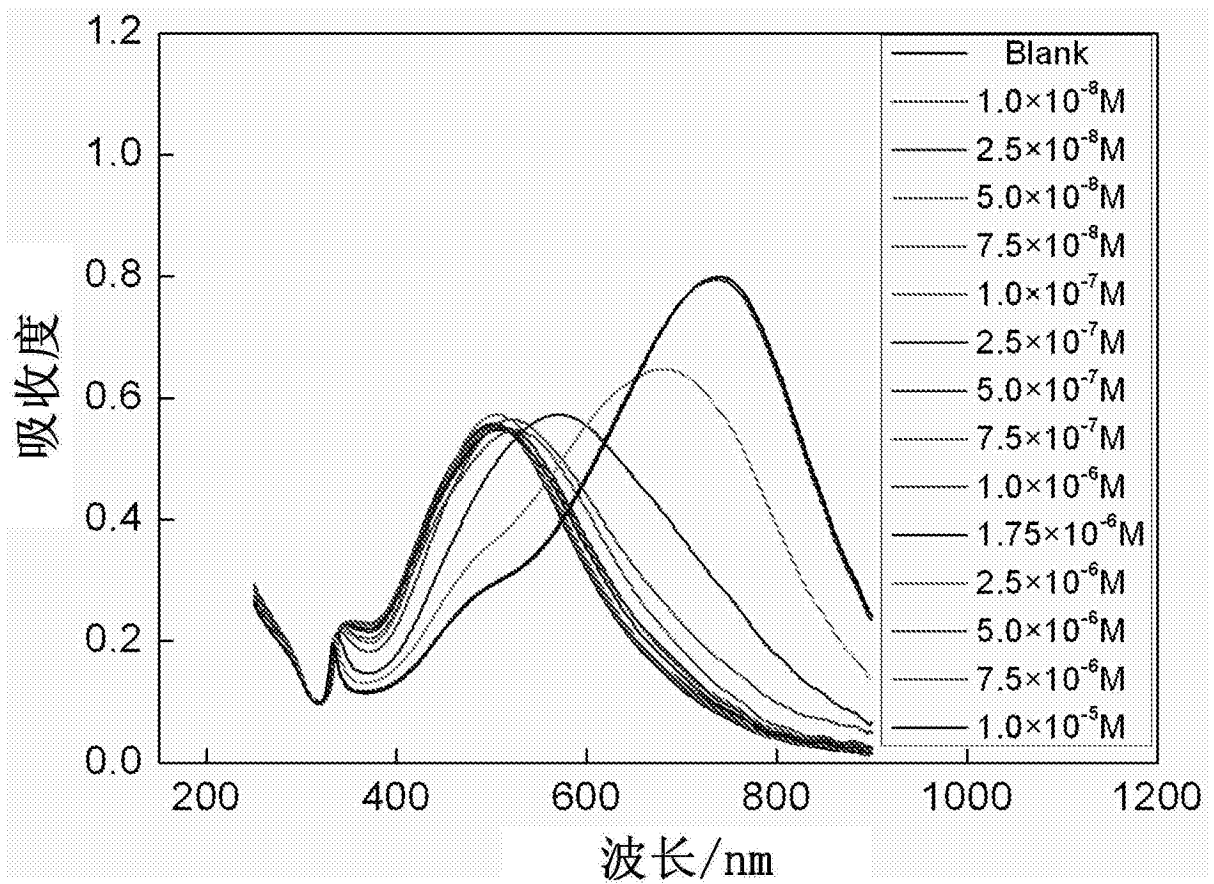


图2

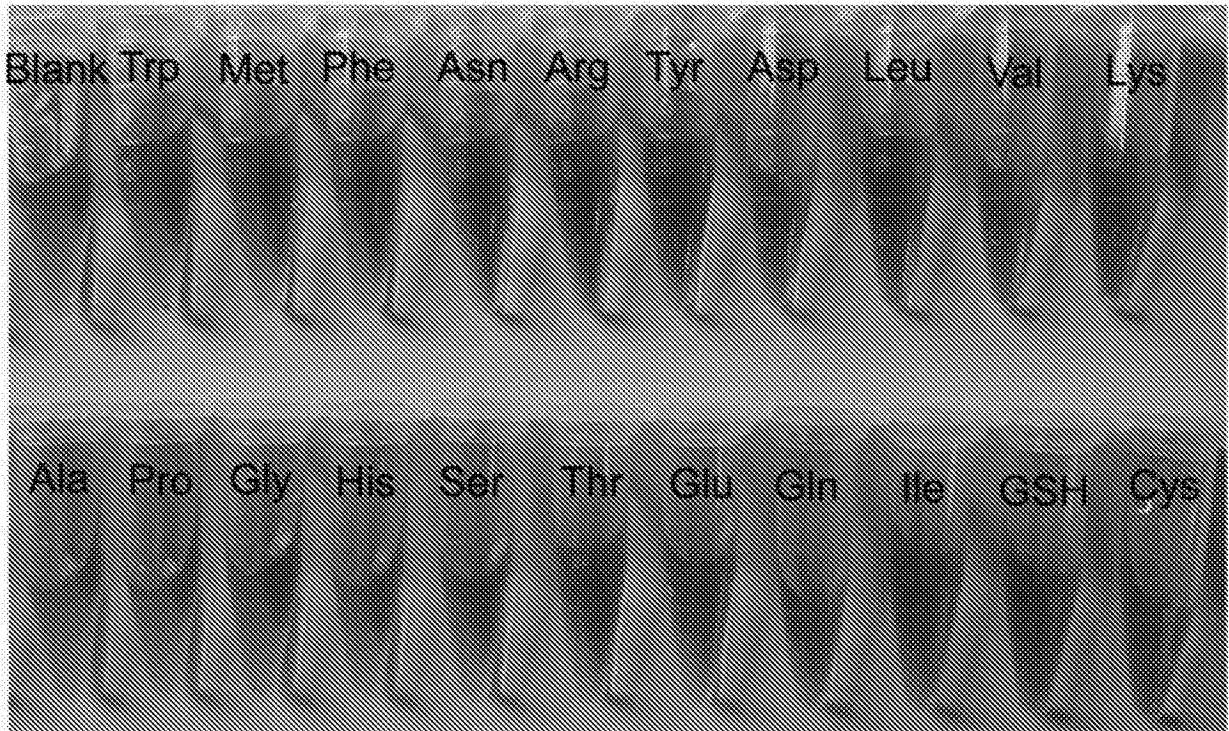


图3

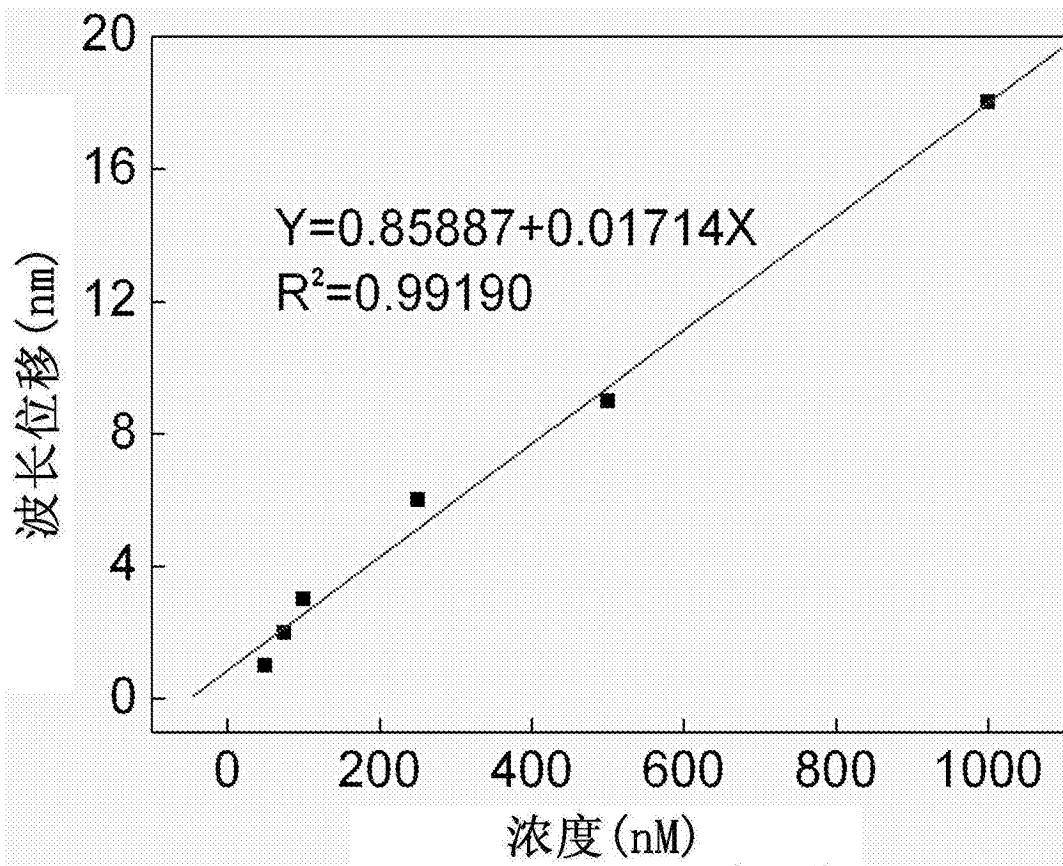


图4

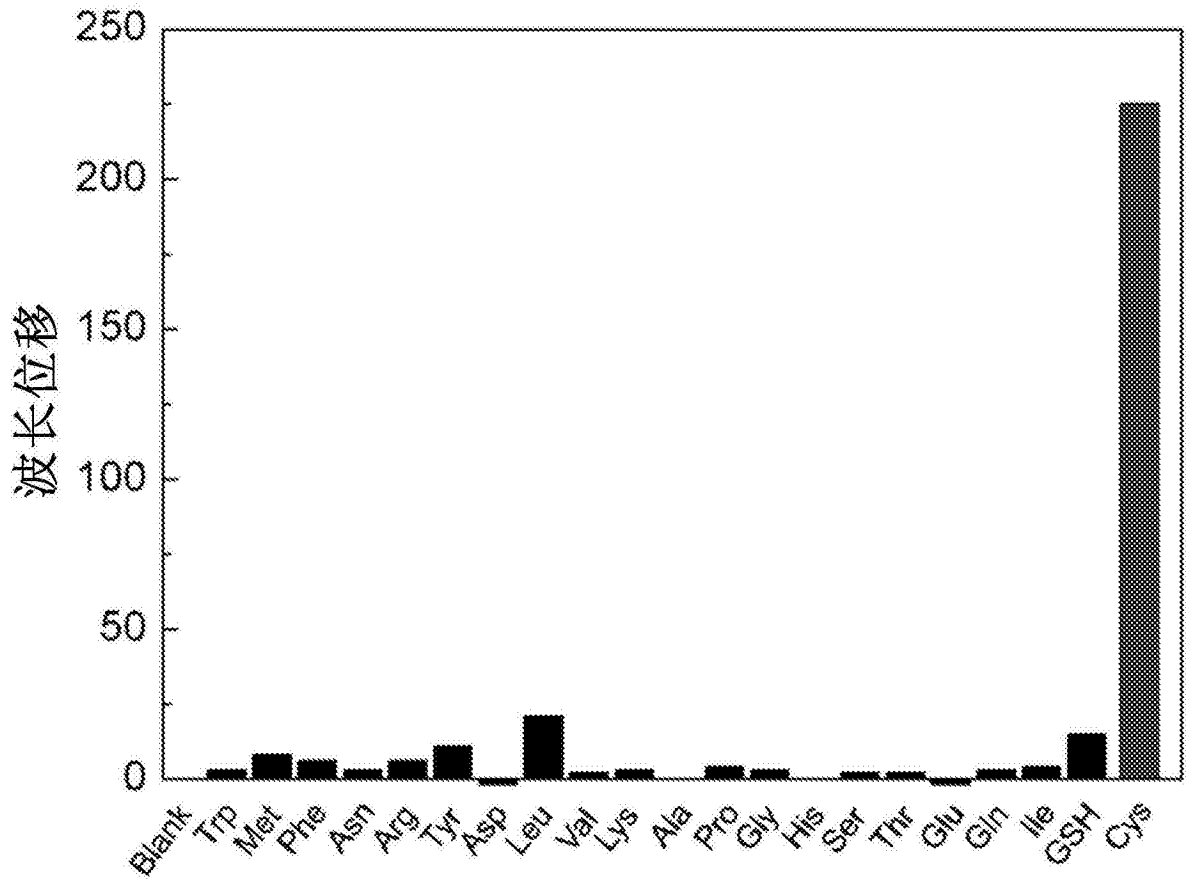


图5