

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410092788. X

G01N 21/79 (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01)
G01N 21/33 (2006.01)
G01N 21/29 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 12 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100445731C

[22] 申请日 2004. 11. 12

[21] 申请号 200410092788. X

[73] 专利权人 中国科学院兰州化学物理研究所
地址 730000 甘肃省兰州市城关区天水路
342 号

[72] 发明人 郭勇 邵士俊 蒋生祥 师彦平
徐健

[56] 参考文献

SU1191791A 1985. 11. 15

GB1247449A 1971. 9. 22

CN1435692A 2003. 8. 13

JP2004113138A 2004. 4. 15

审查员 支辛辛

[74] 专利代理机构 兰州中科华西专利代理有限公司

代理人 方晓佳

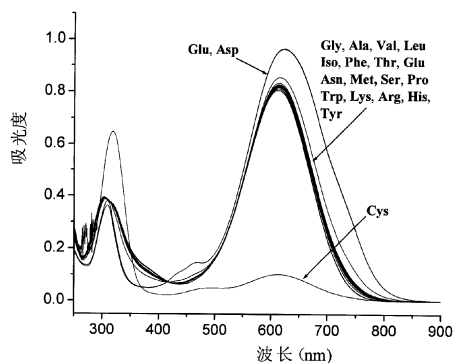
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

半胱氨酸的比色检测分析方法

[57] 摘要

本发明公开了一种半胱氨酸的比色检测分析方法。具体就是在一种有色的电荷转移配合物溶液中，加入待测物溶液后，通过溶液的颜色变化检测待测物。该方法使用二吡咯甲烷作为电子给予体，醌类化合物作为电子受体在极性溶剂中发生电子转移，形成有色的电荷转移配合物检测液。将含有巯基的待测物配制成一定浓度的水溶液，取一定体积的此水溶液与相同体积的检测液混合，溶液的颜色发生明显变化，其它氨基酸对此不能对半胱氨酸的检测产生干扰。本发明对含有巯基官能团的氨基酸分子具有非常专一的比色识别能力，本方明溶液配制方便，比色检测操作简便，比色反应的变色速度快，在极短的时间内就可完成对待测物的比色检测。



1、一种半胱氨酸的比色检测分析方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

A 使用二吡咯甲烷和醌类化合物，以无水乙醇或者乙腈作为溶剂，制成蓝色的有色电荷转移配合物作为半胱氨酸检测试剂；其中二吡咯甲烷选自二羟基二吡咯甲烷、二甲基二吡咯甲烷中的一种，醌类化合物选自 2, 3, 5, 6-四氯苯醌、7,7,8,8-四氰基醌二甲烷中的一种；二吡咯甲烷的浓度为 0.001-0.0025M，醌类化合物的浓度为 $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ - $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ ；

B 用 2-羟乙基-1-哌嗪基乙磺酸配制浓度为 0.005-0.015M 的缓冲水溶液，在缓冲溶液中加入半胱氨酸制成检测液，半胱氨酸的浓度为 1.0×10^{-3} - $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ ；

C 将半胱氨酸检测试剂与体积相同的检测液混合，混合液变为无色。

半胱氨酸的比色检测分析方法

技术领域

本发明涉及一种半胱氨酸的比色检测分析方法。

技术背景

构成人体的最基本的物质,有蛋白质、脂类、碳水化物、无机盐、维生素、水等。作为构成蛋白质分子基本单位的氨基酸,无疑是构成人体内各器官的最基本物质之一。可以说氨基酸分子是构成生命大厦的最基本元素,与生物体生命活动有着密不可分的关系。它在机体内具有特殊的生理功能,是生物体内不可缺少的营养成分之一。

构成生命体的基本氨基酸有 20 多种,如果人体缺乏任何一种氨基酸,就可导致生理功能异常,影响机体代谢的正常进行,最终导致疾病的发生。如精氨酸和瓜氨酸对形成尿素十分重要;胱氨酸摄入不足就会引起胰岛素减少,血糖升高等。现代医学研究表明,体液中某种氨基酸浓度的异常变化也是导致众多疾病产生的根源,如血液中同型半胱氨酸(Hcy,分子中比半胱氨酸多一个次甲基)升高会促进动脉粥样硬化,进而与缺血性心、脑血管疾病密切相关,目前侦测同型半胱氨酸在血液中浓度的变化是诊断此类疾病危险性的一个独立参考因子,因此准确地检测体液中同型半胱氨酸的含量已成为控制疾病发展的重要因素之一。目前使用的检测方法繁琐且检测速度较慢,发展一种方便、灵敏、快速的检测手段是非常必要的。

含巯基氨基酸及生物小分子在生物生命的代谢活动中扮演着非常重要的角色,通过小分子间的氧化还原反应能够使蛋白质的构象发生改变。

目前,半胱氨酸的分析测定一般是利用其还原性及其与某些有机试剂发生反应后,用电化学、分光光度法、化学发光法、催化动力学方法及荧光方法进行分析测定,这些方法操作复杂、灵敏度不高并且选择性较差。

设计一种体系或合成一个具有特殊结构的化合物作为受体,利用它识别某种重要的生物小分子或官能团。在此技术领域一个最具吸引力的方法就是构建和

使用比色传感器。在我们已知的比色传感器中，作为传感器的主体分子通过共价键连有一个受点和一个增色基团，当受点与客体分子发生作用时，主体分子上的增色基团就会产生颜色变化，但是这种检测基本都是发生在非极性溶剂中。我们发现醌和二吡咯甲烷构成的电荷转移配合物也能够用于比色检测，这种电荷转移体系能够稳定地存在于体积比为 1:1 的水 / 乙醇、水 / 乙腈混合溶液中，这为检测水溶性物质提供了有利的环境。应用电荷转移配合物作为高选择性的检测探针，通过肉眼可视的颜色变化选择性地检测半胱氨酸。利用电荷转移配合物比色检测半胱氨酸目前无相关文献报道。

发明内容

本发明的目的就是为了解决氨基酸检测中存在的不足之处，提供一种半胱氨酸检测的高选择性、方便简单的分析方法。

本发明的思路是要求分析方法操作简便，选择性高，不需要对样品进行特殊处理，在短时间内不借助仪器通过肉眼可见的颜色变化完成样品的定性分析。

本发明通过以下措施来实现：

我们使用二吡咯甲烷与醌在乙醇或者乙腈中形成的半胱氨酸检测液，通过肉眼可见的颜色变化检测含巯基的氨基酸分子。在一定浓度的二吡咯甲烷-醌的乙醇或者乙腈溶液中加入半胱氨酸的水溶液，半胱氨酸检测液的蓝色退去变成无色。

一种半胱氨酸的比色检测分析方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

A 使用二吡咯甲烷和醌类化合物，以无水乙醇或者乙腈作为溶剂，制成蓝色的有色电荷转移配合物作为半胱氨酸检测试剂；其中二吡咯甲烷选自二羟基二吡咯甲烷、二甲基二吡咯甲烷中的一种，醌类化合物选自 2, 3, 5, 6-四氯苯醌 (TCBQ)、7,7,8,8-四氰基醌二甲烷 (TCNQ) 中的一种；

B 用 2-羟乙基-1-哌嗪基乙磺酸 (HEPES) 配制浓度为 0.005-0.015M 的缓冲水溶液，在缓冲溶液中加入半胱氨酸制成检测液，半胱氨酸的浓度为 1.0×10^{-3} - 1.0×10^{-4} M；

C 将半胱氨酸检测试剂与体积相同的检测液混合，混合液变为无色。

半胱氨酸检测试剂中，二吡咯甲烷的浓度为 0.001-0.0025M，醌类化合物的浓度为 2.5×10^{-4} M- 1.0×10^{-4} M。

当检测液中含有其它氨基酸溶液时，不发生颜色变化。

我们用分析仪器作了对比试验：

在同样的条件下，以相应浓度的氨基酸溶液作参比，用紫外—可见分光光度仪测定在缓冲体系下 628nm 波长处的吸光度变化。在检测液中加入半胱氨酸缓冲水溶液，配合物在 628nm 处的吸收峰消失。

本发明与现有技术相比，具有如下实质性特点：

1. 本发明无需对氨基酸进行衍生化处理，氨基酸的水溶液就能满足检测的要求。
2. 本发明所使用的检测液，能与水以任意比例相混合，溶液混合后无沉淀等不稳定现象产生。
3. 本发明所使用的氨基酸检测试剂，其配制过程简单，配制完毕后可放置于冰箱中备用。
4. 本发明其特征在于此检测方法不借助任何仪器，通过肉眼可见的颜色变化检测被测物质。
5. 本发明简便快速，数秒钟内就可通过颜色变化检测出被测物。

附图说明

图 1 为用半胱氨酸检测试剂检测半胱氨酸的紫外光谱图。

图 2 为用半胱氨酸检测试剂检测半胱氨酸的比色可视图。

图中英文缩写分别为：甘氨酸 Gly；丙氨酸 Ala；缬氨酸 Val；亮氨酸 Leu；异亮氨酸 Ile；天冬氨酸 Asp；谷氨酸 Glu；精氨酸 Arg；赖氨酸 Lys；组氨酸 His；丝氨酸 Ser；苏氨酸 Thr；半胱氨酸 Cys；蛋氨酸 Met；苯丙氨酸 Phe；色氨酸 Try；脯氨酸 Pro；天冬酰胺 Asn；谷氨酰胺 Gln。

具体实施方式

实施例 1

进行检测试剂的配制：在容量瓶中准确称取一定量的 2, 3, 5, 6-四氯苯醌（浓度 $2 \times 10^{-4} \text{M}$ ）和一定量的二甲基二吡咯甲烷（浓度 $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ），加入无水乙醇溶解定容，溶液变为深蓝色后待用。此深蓝色溶液为检测半胱氨酸的检测试剂。

进行氨基酸检测液的配制：分别称取下列二十种氨基酸（甘氨酸 Gly；丙氨酸 Ala；缬氨酸 Val；亮氨酸 Leu；异亮氨酸 Ile；天冬氨酸 Asp；谷氨酸 Glu；精氨酸 Arg；赖氨酸 Lys；组氨酸 His；丝氨酸 Ser；苏氨酸 Thr；半胱氨酸 Cys；

蛋氨酸 Met; 苯丙氨酸 Phe; 色氨酸 Try; 脯氨酸 Pro; 天冬酰胺 Asn; 谷氨酰胺 Gln) 于不同的试管中, 用移液管移取 10ml 的浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 的 HEPES 缓冲水溶液于分别装有氨基酸的试管中, 溶解后为 $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 的溶液。

进行半胱氨酸的检测: 将 2ml 的氨基酸缓冲水溶液分别与 2ml 的 TCBQ-二甲基二吡咯甲烷 (TCBQ= $2.0 \times 10^{-4} \text{M}$, 二甲基二吡咯甲烷= $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$) 检测剂混合, 观察不同氨基酸溶液的颜色变化, 所得结果如图 2 所示。

实施例 2

进行检测试剂的配制: 在容量瓶中准确称取一定量的 2, 3, 5, 6-四氯苯醌 (浓度 $2 \times 10^{-4} \text{M}$) 和一定量的二羟甲基二吡咯甲烷 (浓度 $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$), 加入无水乙醇溶解定容, 溶液变为深蓝色后待用。此深蓝色溶液为检测半胱氨酸的检测试剂。

进行氨基酸检测液的配制: 分别称取下列二十种氨基酸 (甘氨酸 Gly; 丙氨酸 Ala; 缬氨酸 Val; 亮氨酸 Leu; 异亮氨酸 Ile; 天冬氨酸 Asp; 谷氨酸 Glu; 精氨酸 Arg; 赖氨酸 Lys; 组氨酸 His; 丝氨酸 Ser; 苏氨酸 Thr; 半胱氨酸 Cys; 蛋氨酸 Met; 苯丙氨酸 Phe; 色氨酸 Try; 脯氨酸 Pro; 天冬酰胺 Asn; 谷氨酰胺 Gln) 于不同的试管中, 用移液管移取 10ml 的浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 的 HEPES 缓冲水溶液于分别装有氨基酸的试管中, 溶解后为 $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 的溶液。

进行半胱氨酸的检测: 将 2ml 的氨基酸缓冲水溶液分别与 2ml 的 TCBQ-二羟甲基二吡咯甲烷 (TCBQ= $2.0 \times 10^{-4} \text{M}$, 二羟甲基二吡咯甲烷= $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$) 检测剂混合, 观察不同氨基酸溶液的颜色变化, 所得结果如图 2 所示。

实施例 3

进行检测试剂的配制: 在容量瓶中准确称取一定量的 7,7,8,8-四氰基醌二甲烷 (浓度 $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$) 和一定量的二羟甲基二吡咯甲烷 (浓度 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$), 加入乙腈溶解定容, 溶液变为深蓝色后待用。此深蓝色溶液为检测半胱氨酸的检测溶液。

进行氨基酸检测液的配制: 分别称取下列二十种氨基酸 (甘氨酸 Gly; 丙氨酸 Ala; 缬氨酸 Val; 亮氨酸 Leu; 异亮氨酸 Ile; 天冬氨酸 Asp; 谷氨酸 Glu; 精氨酸 Arg; 赖氨酸 Lys; 组氨酸 His; 丝氨酸 Ser; 苏氨酸 Thr; 半胱氨酸 Cys; 蛋氨酸 Met; 苯丙氨酸 Phe; 色氨酸 Try; 脯氨酸 Pro; 天冬酰胺 Asn; 谷氨酰胺 Gln) 于不同的试管中, 用移液管移取 10ml 的浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 的 HEPES 缓冲

水溶液于试管中，溶解后为 $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 的溶液。

进行半胱氨酸的检测：将 2ml 的氨基酸缓冲水溶液分别与 2ml 的 TCNQ-二羟甲基二吡咯甲烷（TCNQ= $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ ，二羟甲基二吡咯甲烷= $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ）检测液混合，观察不同氨基酸溶液的颜色变化，所得结果如图 2 所示。在同样的条件下，以相应浓度的氨基酸乙腈-水溶液为参比，用紫外-可见分光光度仪测定在缓冲体系下 628nm 波长处的吸光度变化。所测结果如图 1 所示，在检测溶液中加入半胱氨酸水溶液，检测液在 628nm 的吸收峰消失。

实施例 4

进行检测试剂的配制：在容量瓶中准确称取一定量的 7,7,8,8-四氰基醌二甲烷（浓度 $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ ）和一定量的二甲基二吡咯甲烷（浓度 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ），加入乙腈溶解定容，溶液变为深蓝色后待用。此深蓝色溶液为检测半胱氨酸的检测溶液。

进行氨基酸检测液的配制：分别称取下列二十种氨基酸（甘氨酸 Gly；丙氨酸 Ala；缬氨酸 Val；亮氨酸 Leu；异亮氨酸 Ile；天冬氨酸 Asp；谷氨酸 Glu；精氨酸 Arg；赖氨酸 Lys；组氨酸 His；丝氨酸 Ser；苏氨酸 Thr；半胱氨酸 Cys；蛋氨酸 Met；苯丙氨酸 Phe；色氨酸 Try；脯氨酸 Pro；天冬酰胺 Asn；谷氨酰胺 Gln）于不同的试管中，用移液管移取 10ml 的浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 的 HEPES 缓冲水溶液于试管中，溶解后为 $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 的溶液。

进行半胱氨酸的检测：将 2ml 的氨基酸缓冲水溶液分别与 2ml 的 TCNQ-二甲基二吡咯甲烷（TCNQ= $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ ，二甲基二吡咯甲烷= $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ）检测液混合，观察不同氨基酸溶液的颜色变化，所得结果如图 2 所示。在同样的条件下，以相应浓度的氨基酸乙腈-水溶液为参比，用紫外-可见分光光度仪测定在缓冲体系下 628nm 波长处的吸光度变化。所测结果如图 1 所示，在检测溶液中加入半胱氨酸水溶液，检测液在 628nm 的吸收峰消失。

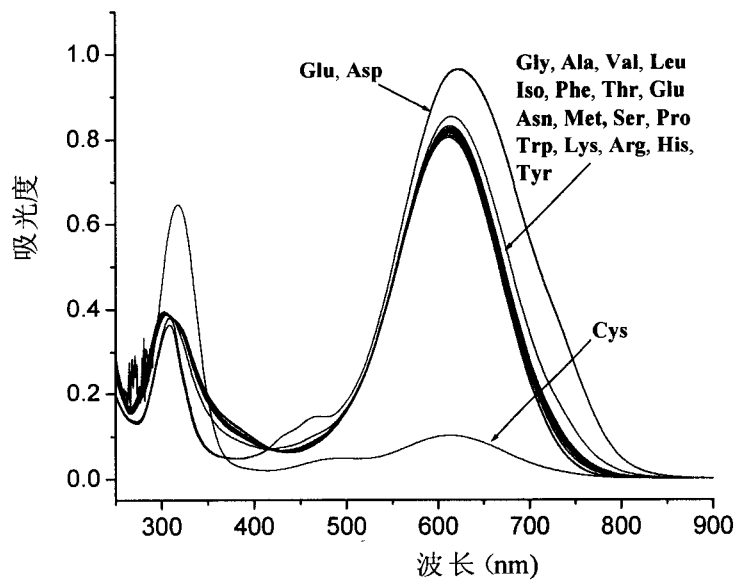


图 1



图 2