

·技术与方法·

基于钙黄绿素 - 铜(II)荧光体系测定乙酰半胱氨酸

杨晓红 景蓓蓓 张胜海 答敏 张萍 朱依娜

(陕西师范大学化学与材料科学学院 陕西 西安 710062)

摘要 目的 基于钙黄绿素 - 铜(II)荧光体系测定乙酰半胱氨酸。方法 在 pH=8.0 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - KH_2PO_4 缓冲液中,以 492 nm 为激发波长,520 nm 为发射波长测定乙酰半胱氨酸溶液的荧光强度。结果 在 pH=8.0 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - KH_2PO_4 缓冲液中,二价铜离子与钙黄绿素配位引起荧光猝灭。由于乙酰半胱氨酸中巯基上的硫离子与 Cu^{2+} 的亲合力很强,可从钙黄绿素 - 铜(II)的络合物中夺取铜离子而使钙黄绿素游离出来,从而使体系的荧光得以恢复,并且荧光恢复的程度与加入乙酰半胱氨酸的量在一定范围内成线性。结论 建立了一种测定乙酰半胱氨酸的荧光分析新方法,该方法的线性范围为 $6.0 \times 10^{-6} \sim 1.4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$,检出限为 $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。

关键词 钙黄绿素 荧光 乙酰半胱氨酸

中图分类号 Q503 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 07-1355-04

Fluorimetric Determination of Acetylcysteine Based on Calcein-Copper(II) System

YANG Xiao-hong, JING Bei-bei, ZHANG Sheng-hai, DA min, ZHANG Ping, ZHU Yi-na

(School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

ABSTRACT Objective: Fluorimetric Determination of Acetylcysteine in Calcein-Copper (II) System. **Methods:** In pH=8.0 of KH_2PO_4 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ buffer solution, determining the fluorescence intensity of acetylcysteine solutions with 492nm as excitation wavelength and 520nm as emission wavelength. **Results:** In pH=8.0 of KH_2PO_4 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ buffer solution, copper (II) can coordinate with calcein, and cause the fluorescence intensity of calcein solution decreased. Because the appetency between copper (II) and acetylcysteine was very strong, it can seize copper ions from calcein-copper (II) complex and make calcein free, thus make the fluorescence recovered, and the recovery degree of its fluorescence was linear related to the concentration of acetylcysteine added to the solution. **Conclusions:** Hereby we establish a new method of measuring acetylcysteine in the range of $6.0 \times 10^{-6} \sim 1.4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. The detection limit was $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$. The relative standard deviation was 0.91 % for the 11 replicate determinations of $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ acetylcysteine solution. This method was applied to the determination of acetylcysteine in pharmaceutical preparations.

Key words: Calcein; Fluorescence; Determination; Acetylcysteine

Chinese Library Classification: Q503 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1355-04

前言

乙酰半胱氨酸^[1]是一种含有巯基的重要化合物^[2],具有抗氧化、抗炎、保护肝脏、肺、心脏和神经细胞等作用,用于治疗急性、慢性支气管炎以及其他原因引起的粘痰合并发生的肺部疾病。测定乙酰半胱氨酸的方法一般有我国 2000 版的中华人民共和国药典中推荐的碘量滴定法^[3],其它文献报道的方法主要包括紫外 - 可见分光光度法^[4-6]、电化学法^[7-8]、高效液相色谱法^[9-11]、流动注射化学发光法^[12-14]、荧光法^[15]等。本文发现在中性介质中,二价铜离子能与生物小分子钙黄绿素配位,使体系的荧光强度降低,乙酰半胱氨酸能从钙黄绿素 - 铜离子络合物中夺取铜离子而使钙黄绿素游离出来使荧光强度得以恢复,并且荧光恢复的程度与加入乙酰半胱氨酸的浓度在一定范围内成线性,据此建立了一种测定乙酰半胱氨酸的新方法。

1 材料与方法

作者简介 杨晓红(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向 光分析。

电话 15891393560, **E-mail:** yangxiaohong86319@163.com

(收稿日期 2010-12-20 **接受日期** 2011-01-15

1.1 主要仪器与试剂

970-CRT 荧光分光光度计(上海分析仪器总厂) PHS-3D 数字酸度计(上海雷磁仪器厂);恒温水浴锅(上海市实验仪器厂) 钙黄绿素(天津市福晨化学试剂厂) 乙酰半胱氨酸(上海); CuSO_4 (西安化学试剂厂) 四硼酸钠标准缓冲试剂(pH=9.18)。所用试剂均为分析纯,实验用水为二次水。

1.2 实验方法

1.2.1 储备溶液配制 钙黄绿素储备溶液($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 准确称取 0.3333 g 钙黄绿素固体,加 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液 25 mL 使固体溶解后,转入 500 mL 的容量瓶,用二次水定容到刻度,4 °C 保存,使用时用水逐级稀释至所需浓度。

Cu^{2+} 标准储备溶液 ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$): 准确称取 0.1596 g CuSO_4 ,溶于少量水后转入 1000 mL 的容量瓶,用二次水定容到刻度。使用时再用水逐级稀释到所需浓度,得分析用 Cu^{2+} 标准溶液。

乙酰半胱氨酸标准储备溶液($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 准确称取乙酰半胱氨酸 0.01632 g 用二次水溶解后定容到 100 mL。使用时用二次水逐级稀释到所需浓度。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 标准缓冲溶液：准确称取 0.2269 g KH_2PO_4 溶于少量水后转入 25 ml 的容量瓶，用二次水定容至刻度，配成 1/15 mol/L KH_2PO_4 溶液；准确称取 11.935 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于少量水后转入 500 ml 的容量瓶，用二次水定容至刻度，配成 1/15 mol/L Na_2HPO_4 溶液；分别取上述 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液 475 ml 和 KH_2PO_4 溶液 25 ml 配成 pH=8.04 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 标准缓冲溶液。

1.2.2 实验操作 移取 5.0 mL pH =8.0 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液于一系列 50 mL 容量瓶中，分别依次加入 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mL 1.0×10^{-5} mol/L 的乙酰半胱氨酸标准溶液，再加入 2.5 mL 1.0×10^{-5} mol/L 钙黄绿素标准溶液，最后加入 2.5 mL 1.0×10^{-5} mol/L Cu^{2+} 标准溶液后，用二次水定容，摇匀，在 40 °C 水浴中加热 5min 后于室温下放置，以 492 nm 为激发波长，520 nm 为发射波长，测定溶液的荧光强度，以荧光强度对浓度绘制标准曲线。

2 结果

2.1 标准曲线的绘制

在优化的实验条件下，按 1.2.2 实验操作绘制标准曲线(图 1)。乙酰半胱氨酸浓度在 $6.0 \times 10^{-6} \sim 1.4 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内与荧光强度呈良好的线性关系，标准曲线方程为 $F=187.3+4.935 \times 10^7 C$ (F 为荧光强度， C 为乙酰半胱氨酸的浓度)，相关系数为 0.9949。

对浓度为 1.0×10^{-5} mol/L 的乙酰半胱氨酸溶液进行 11 次平行测定的相对标准偏差为 0.91 %。按照 IUPAC 建议，计算得该方法的检出限为 4.0×10^{-6} mol/L。

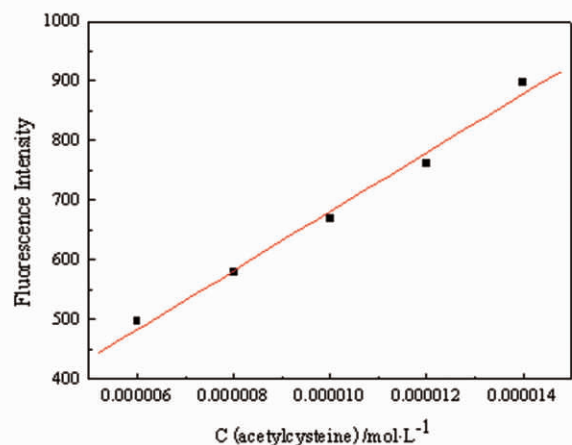


图 1 标准曲线

Fig.1 Standard Curve

2.2 样品分析

准确称取市售的乙酰半胱氨酸颗粒制剂(标示量: 0.1 g/3 g) 0.4898 g 加二次水溶解后，定容至 100 mL，摇匀，准确移取一定量该样品溶液稀释至线性范围内，然后按上述实验方法测定，根据其荧光强度计算乙酰半胱氨酸含量，结果见表 1。

表 1 样品分析结果

Table1 Sample analysis

sample	labeled	amount	this method RSD
granule(C1310G04)	0.1 g/3 g	0.107 g/3 g	1.4 %

3 讨论

3.1 钙黄绿素及钙黄绿素铜配合物的激发光谱与发射光谱

实验显示，在中性介质中，钙黄绿素溶液呈现很强的荧光，最大激发波长为 492 nm，最大发射波长为 520 nm。向钙黄绿素溶液中加入一定量二价铜离子溶液后，溶液的荧光猝灭，激发光谱和发射光谱峰位置无明显变化。如图 2 所示。

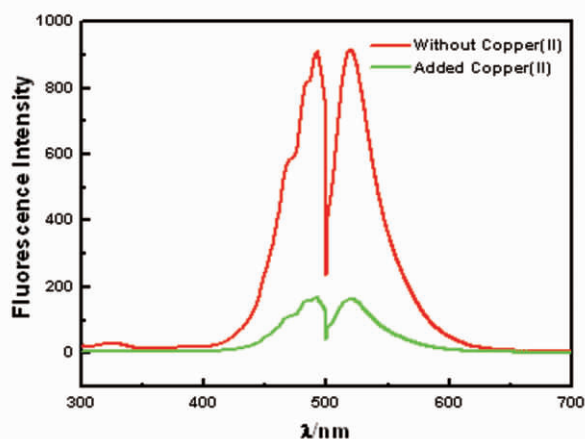


图 2 钙黄绿素及钙黄绿素铜配合物的激发光谱与发射光谱

Fig. 2 Excitation Spectrum and Emission Spectrum of Calcein and Calcein-Copper(II) Complex

3.2 pH 值及缓冲液体系的选择

在上述实验条件下，考察了不同 pH 值对荧光强度的影响，由图 3 可见当 pH=8.0 时，钙黄绿素与钙黄绿素铜配合物的荧光强度变化最大。在此基础上又考察了 pH=8.0 时不同缓冲液体系 $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{KH}_2\text{PO}_4$, $\text{NaCl} - \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaOH} - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 对钙黄绿素与钙黄绿素铜配合物的荧光强度的影响，由图 4 可见在 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲介质中钙黄绿素与钙黄绿素铜配合物的荧光强度变化最大。所以本文中乙酰半胱氨酸的测定在 pH=8.0 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液中进行。

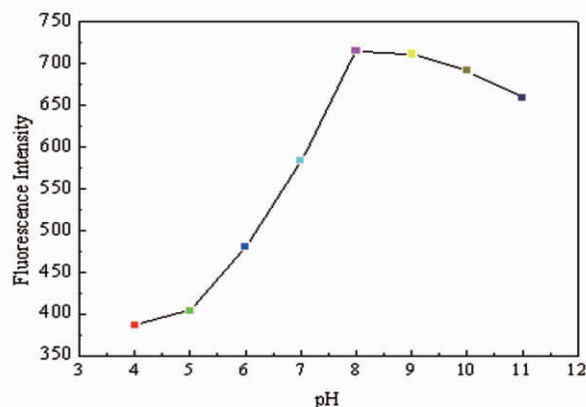


图 3 pH 对荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of pH on Fluorescence Intensity

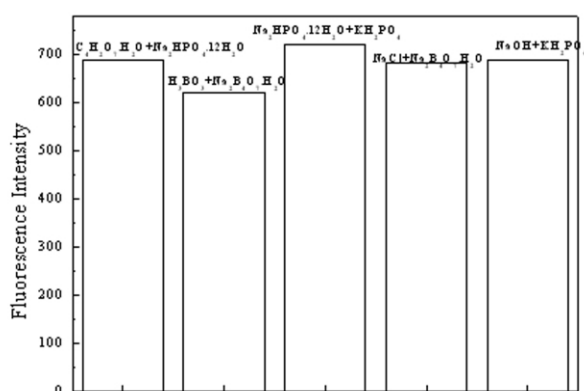


图4 缓冲体系对荧光强度的影响

Fig. 4 Effect of Buffer Systems on Fluorescence

3.3 钙黄绿素与铜(II)标准溶液浓度比的选择

分别取 pH=9.18 的标准缓冲溶液 2.5 mL 于一系列 25 mL 容量瓶中,再加入 1.25 mL 1.0×10^{-4} mol/L 钙黄绿素标准溶液,然后分别加入 0.25 mL, 0.5 mL, 0.75 mL, 1.0 mL, 1.25 mL, 1.5 mL, 1.75 mL, 2.0 mL, 2.25 mL, 2.5 mL 1.0×10^{-4} mol/L 铜(II)标准溶液,均放置 20 min 后测定其荧光强度,考察钙黄绿素与铜(II)标准溶液的浓度比与荧光猝灭程度的关系。实验结果显示钙黄绿素与铜(II)标准溶液的浓度比为 1:1 时,铜(II)对钙黄绿素的荧光猝灭效果最好且趋于平稳,如图 5 所示,所以本实验选择钙黄绿素与铜(II)标准溶液的浓度比为 1:1。

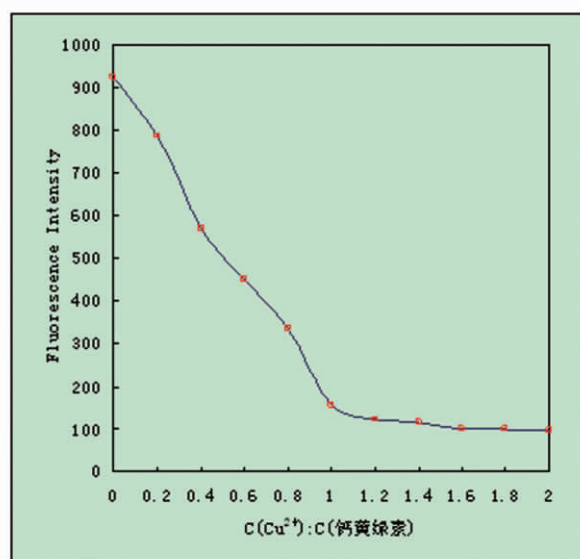


图5 铜(II)与钙黄绿素标准溶液的浓度比与荧光强度的关系

Fig. 5 Relationship between Concentration Ratio of Copper (II) with Calcein Standard Solution and Fluorescence Intensity

3.4 试剂加入顺序和反应时间及温度的选择

试剂加入顺序对测定结果的影响较大,因此考察了不同的试剂加入顺序下体系的荧光强度。实验结果显示按钙黄绿素 - 乙酰半胱氨酸 - 铜(II)加入顺序时体系的荧光强度最大。

按上述试剂加入顺序进行实验时,又考察了反应时间和温度对测定结果的影响,当温度低于 25 °C 时,乙酰半胱氨酸同钙黄绿素 - 铜(II)配合物之间竞争反应的速度比较慢,反应 1.5 h

仍不能达到平衡,所以采用 40 °C 水浴进行加热,反应 5 min 即能达到平衡。所以本实验选择钙黄绿素 - 乙酰半胱氨酸 - 铜(II)加入顺序,在 40 °C 水浴中加热 5 min 后测定溶液的荧光强度。

3.5 干扰物质的影响

考察一些常见离子对乙酰半胱氨酸测定的影响,结果表明:当测定误差控制在 $\pm 5\%$ 以内,对 1.0×10^{-5} mol/L 的乙酰半胱氨酸,500 倍量的糖精钠、F⁻、Cl⁻、Br⁻、I⁻、NO₃⁻、NO₂⁻、SO₃²⁻、HSO₃⁻、NH₄⁺、SCN⁻、PO₄³⁻;100 倍量的淀粉、葡萄糖、蔗糖不干扰测定,但 10 倍量的 Ni²⁺、Fe³⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Ag⁺ 对测定均有干扰。

4 结论

在上述优化的实验条件下,以 492 nm 为激发波长,520 nm 为发射波长测定乙酰半胱氨酸溶液的荧光强度,建立了乙酰半胱氨酸的荧光分析新方法。本方法操作简单、灵敏度高,且已经用于乙酰半胱氨酸颗粒制剂的检测。

参考文献(References)

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].北京:人民卫生出版社,2004:394-395
Chen Xin-qian, Jin You-yu, Tang Guang, New materia medica [M]. BeiJing: People Health Press, 2004: 394-395
- [2] 王正刚.含硫氨基酸衍生物的研究进展[J].氨基酸和生物资源,2001,23(1):38-41
Wang Zheng-gang. Research Progress in the Derivatives of the Anino Acids Containing Sulphur [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2001, 23 (1): 38-41
- [3] 中华人民共和国药典委员会,中华人民共和国药典(二部)[M].北京:化学工业出版社,2000:5-6
The pharmacopoeia committee of the People's Republic of China, The People's Republic of China pharmacopoeia (Two Part) [M]. BeiJing: Chemical Industry Press, 2000: 5-6
- [4] Abu Eid M, Spectrophotometric determination of cysteine and N-acetylcysteine in pharmaceutical preparations[J]. Microchim. Acta, 1998, 129(1-2): 91-95
- [5] Suarez W T, Vieira H J, Fatibello-Filho O. Generation and destruction of unstable reagent in flow injection system: determination of acetyl-cysteine in pharmaceutical formulations using bromine as reagent [J]. J. Pharm. Biomed. Anal, 2005, 37(4): 771-775
- [6] Garcia-Molina F, Penalver M J, Rodriguez-Lopez J N, et al. Tudela J. Enzymatic method with polyphenol oxidase for the determination of cysteine and N-acetylcysteine [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(16): 6183-6189
- [7] 任超超,高作宁. N-乙酰-L-半胱氨酸在多壁碳纳米管修饰玻碳电极上的电催化氧化及电分析方法[J].药物分析杂志,2009,29(7): 1183-1186
Ren Chao-chao, Gao Zuo-ning. Electrocatalytic oxidation and its electroanalytical method of N-Acetyl-L- cysteine at multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. [J]. Chin J Pharm Anal, 2009, 29 (7): 1183-1186
- [8] Suarez W T, Marcolino LH, Fatibello O. Voltammetric determination of N- acetylcysteine using a carbon paste electrode modified with cop-

- per(II) hexacyanoferrate(III) [J]. Microchem J, 2006, 82(2): 163-167
- [9] Celma C, Allue JA, Prunonosa J, et al. Determination of N-acetylcysteine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. J. Chromatogr A, 2000, 870 (1-2): 13-22
- [10] Nozal M J, Bernal J L, Toribio L, et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) [J]. J. Chromatogr A, 1997, 778 (1-2): 347-353
- [11] 王芳侠, 徐创莉, 陈赞民, HPLC 法测定乙酰半胱氨酸颗粒中有关物质 [J]. 中国热带医学, 2007, 7(9): 1665-1667
Wang Fang-xia, Xu Chuang-li, Chen Zan-min, Detection of relevant substance from acetylcysteine granules by HPLC [J] China Tropical Medicine, 2007, 7(9): 1665-1667
- [12] 李红, 杨育民, Luminol-Cu(II)体系流动注射化学发光法测定乙酰半胱氨酸 [J]. 光谱实验室, 2010, 27 (5): 1968-1970
Li Hong, Yang Yu-min, Determination of Acetylcysteine in Luminol-Cu (II) System by Flow Injection Chemiluminescence [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2010, 27 (5): 1968-1970
- [13] 刘红萍, 流动注射化学发光法测定 N-乙酰半胱氨酸的研究 [J]. 化学研究与应用, 2007, 19 (4): 454-456
Liu Hong-ping, Flow injection chemiluminescence determination of N-acetylcysteine [J]. Chemical Research and Application, 2007, 19 (4): 454-456
- [14] 张广彬, 陈宪民, 李海燕, 等. 反相流动注射化学发光法测定含巯基药物的含量 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2010, 31(1): 125-128
Zhang Guang-bin, Chen Xian-min, Li Hai-yan, et al. Determination of sulfhydryl-containing drugs by reverse flow injection chemiluminescence analysis [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University(Medical Sciences), 2010, 31(1): 125-128
- [15] Elham A T, Nagiba Y H, Fahima A A et al. Fluorimetric Determination of some Sulfur Containing Compounds through Complex Formation with Terbium(Tb3+) and Uranium (U3+) [J]. J. Fluoresc, 2007, 17(3): 293-300

(上接第 1342 页)

- [8] Karpanen M, Egeblad MJ, Karkkainen, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumour lymphangiogenesis and intralymphatic tumour growth [J]. Cancer Res, 2001, 61:1786-1790
- [9] 祖雄兵, 叶章群, 周四维, 等. 淋巴管密度和功能形态与膀胱癌淋巴结转移关系的研究 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(4): 224-226
Zu xiong-bing, Ye Zhang-qun, Zhou Si-wei, et al. Functional morphology of lymphatic vessel density and lymph node metastasis in bladder cancer research [J]. Journal of Urology, 2006, 27 (4): 224-226
- [10] 郭永顺, 戴宇平, 夏金堂, 等. 膀胱移行细胞癌环氧化酶 2 表达与淋巴管和血管生成的关系 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2009, 30(3): 299-303
Guo Yong-shun, Dai Yu-ping, Xia Jin-tang, et al. Bladder transitional cell carcinoma of the COX-2 expression and lymph vessels and angiogenesis [J]. Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2009, 30 (3): 299-303
- [11] 陆晓哲, 卓文利, 王安喜, 等. 膀胱癌组织 VEGF-C 表达与淋巴管生成和淋巴结转移之间关系的研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13 (8): 721-723
Lu Xiao-zhe, Zhuo Wen-li, Wang An-xi, et al. Bladder cancer VEGF-C expression and lymphangiogenesis and lymph node metastasis of the relationship between [J]. Journal of Clinical Oncology, 2008, 13 (8): 721-723
- [12] Choi WW, Lewis MM, Lawson D, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression [J]. Mod Pathol, 2005, 18 (1): 143-152
- [13] Dias S, Choy M, Alitalo K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FL T-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy [J]. Blood, 2002, 99(6): 2179-2184