

# L-色氨酸- $\text{Hg}^{2+}$ -青霉胺体系的 荧光光谱及分析应用

闫晶晶<sup>1</sup>, 张甜<sup>1</sup>, 胡咏梅<sup>2</sup>, 李政<sup>2</sup>, 刘剑雄<sup>2</sup>, 胡小莉<sup>1</sup>

1. 西南大学 化学化工学院, 重庆 400715; 2. 成都市第二人民医院, 成都 610017

**摘要:** 基于 L-色氨酸(L-Trp)荧光猝灭与恢复, 建立了一种高灵敏度、高选择性检测 D-青霉胺(D-PA)的荧光分析方法. 实验发现在 pH=4.8 的缓冲溶液中,  $\text{Hg}^{2+}$  与 L-Trp 中的羧基结合, 猝灭 L-Trp 的荧光. 随着 D-PA 的加入, 由于  $\text{Hg}^{2+}$  与 D-PA 的巯基产生更强的螯合作用, 导致  $\text{Hg}^{2+}$  脱离 L-Trp, 后者荧光恢复. 据此设计了 IMPLICATION 逻辑门, 并用于 D-PA 的检测. 在优化条件下, 荧光恢复程度与 D-PA 浓度在 0.44~50.0  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈良好的线性关系, 检出限为 0.13  $\mu\text{mol/L}$ . 该方法用于青霉胺药片含量的测定, 结果满意.

**关键词:** L-色氨酸; D-青霉胺; 荧光光谱; 逻辑门

**中图分类号:** O657.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2022)05-0119-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Fluorescence Spectra and Analytical Applications of L-tryptophan- $\text{Hg}^{2+}$ -penicillamine System

YAN Jingjing<sup>1</sup>, ZHANG Tian<sup>1</sup>, HU Yongmei<sup>2</sup>,  
LI Zheng<sup>2</sup>, LIU Jianxiong<sup>2</sup>, HU Xiaoli<sup>1</sup>

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chengdu Second People's Hospital, Chengdu 610017, China

**Abstract:** A highly sensitive and selective fluorescence method for detection of D-penicillamine (D-PA) was designed based on the “OFF-ON” fluorescence switch mode of L-tryptophan (L-Trp). The fluorescence of L-Trp turned OFF due to the effective reaction between carboxyl group of L-Trp and  $\text{Hg}^{2+}$  in pH 4.8 BR buffer. The thiol group in D-PA could compete with L-Trp for chelating  $\text{Hg}^{2+}$ , which turned ON the fluorescence of L-Trp. An IMPLICATION logic gate was designed and used for D-PA detection. Under optimized conditions, a good linear relationship was shown between fluorescence recovery and D-PA concentration in range of 0.44~50.0  $\mu\text{mol/L}$  with the detection limit of 0.13  $\mu\text{mol/L}$ . The method was used for the determination of D-PA in medicine with satisfactory results.

**Key words:** L-tryptophan; D-penicillamine; fluorescence; logic gate

青霉胺(3,3-二甲基半胱氨酸, PA)是青霉素的代谢产物,也是一种含巯基氨基酸<sup>[1]</sup>. 同时青霉胺也是一种具有药理作用的手性化合物,用于治疗多种疾病,如威尔逊氏病、类风湿性关节炎、硬皮病及重金属中毒等<sup>[2]</sup>. 青霉胺作为手性化合物,存在 D-青霉胺(D-PA)和 L-青霉胺两种对映异构体,它们的药效及毒理作用差别很大,其中 L-PA 有一定毒副作用,只有 D-PA 有治疗疾病的作用. 世界卫生组织已经将 D-PA 列为基础医疗中的必备药品. 因此,建立简单、快速、高灵敏、高选择检测 D-PA 的方法具有重要意义. 目前报道的检测 D-PA 的主要方法有电化学发光<sup>[3]</sup>、电化学法<sup>[4]</sup>、分光光度法<sup>[5]</sup>、HPLC 法<sup>[6]</sup>、圆二色性法<sup>[7]</sup>和离子色谱法<sup>[8]</sup>. 此外,荧光光谱法相比于其他方法更简单、高效,且灵敏度更高. 近年来,已有较多测定 D-PA 的荧光法报道<sup>[9-11]</sup>,但是有的荧光探针合成步骤复杂繁琐,限制了方法的使用. 本研究利用一种简单易得的荧光探针来检测 D-PA. 研究发现, L-色氨酸(L-Trp)在 352 nm 处有很强的荧光发射峰,随着  $\text{Hg}^{2+}$  的加入, L-Trp 荧光被猝灭. 接着加入 D-PA, L-Trp 的荧光得到恢复,据此建立了一种“开-关”模型来检测 D-PA,其反应机理见图 1.

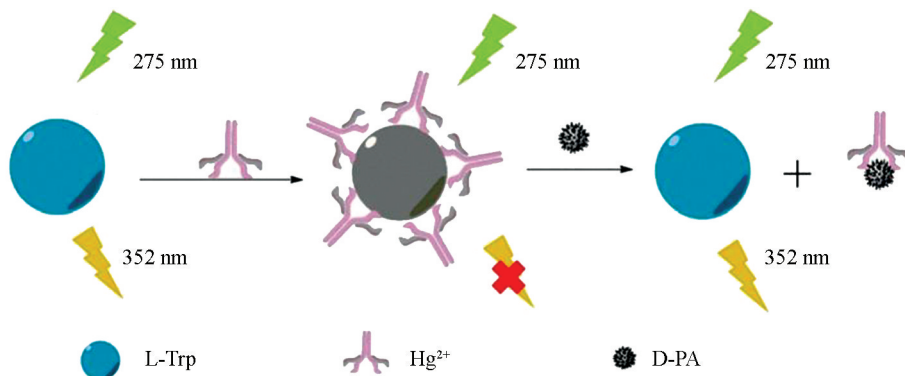


图 1 L-Trp 测定 D-PA 的反应机理

## 1 实验部分

### 1.1 实验仪器与材料

Hitachi F-2500 型荧光分光光度计(日立科学仪器有限公司, 日本); UV-2450 型紫外-可见分光光度计(岛津公司, 日本); pHSJ-4F 酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司, 上海).

L-Trp、D-PA(阿拉丁试剂有限公司, 上海);  $\text{HgCl}_2$ (四川科伦医药贸易有限公司, 成都); Britton-Robinson 缓冲溶液: 2.71 mL 85% 磷酸(重庆北碚化学试剂厂, 重庆), 2.36 mL 冰醋酸(重庆川东化工有限公司, 重庆)和 2.47 g 硼酸(重庆北碚化学试剂厂, 重庆)溶于 1.0 L 蒸馏水中, 用 0.2 mol/L NaOH 调节不同 pH 值. 实验过程中所用水均为超纯水.

### 1.2 实验方法

在 10.0 mL 的比色管中依次加入 pH=4.8 的 BR 缓冲溶液 1.0 mL, 0.5 mL  $4.0 \times 10^{-4}$  mol/L L-色氨酸, 0.5 mL  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{Hg}^{2+}$  和一系列不同浓度的 D-PA, 用蒸馏水定容至刻度后摇匀, 在室温下静置 15 min. 在荧光分光光度计上以  $\lambda_{\text{ex}}=275$  nm 激发, 进行波长扫描, 记录体系的荧光光谱, 并在波长 352 nm 处测定样品和试剂空白的荧光强度,  $\Delta F = F - F_0$ . 狭缝宽度为 10 nm.

## 2 结果与讨论

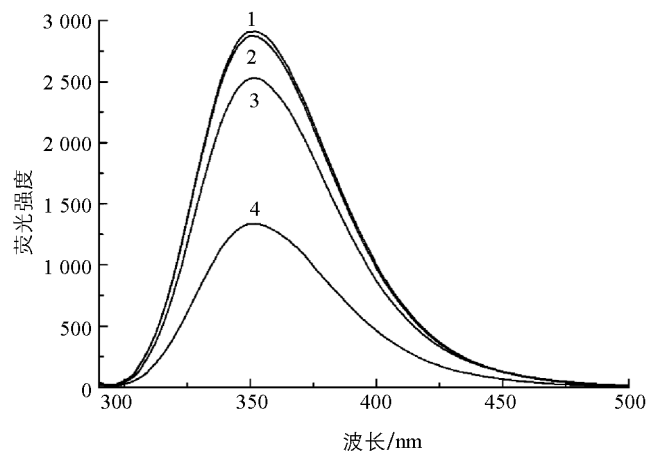
### 2.1 荧光光谱

以最大激发波长 275 nm 对 L-Trp 溶液进行荧光光谱扫描, 发现其最大荧光峰位于 352 nm 处(图 2 中曲线 1), 而  $\text{Hg}^{2+}$  和 D-PA 均无荧光. L-Trp 与 D-PA 溶液混合, L-Trp 的荧光强度几乎没有变化(图 2 中曲线 2). 然而, 在一定浓度的 L-Trp 中加入适量  $\text{Hg}^{2+}$  后, 由于  $\text{Hg}^{2+}$  与 L-Trp 结构中的羧基结合, 使得 L-Trp 在 352 nm 的荧光猝灭<sup>[12]</sup>(图 2 中曲线 4), 接着向溶液中加入与  $\text{Hg}^{2+}$  结合能力更强的 D-PA, L-Trp 被释放出来, 溶液荧光逐渐得到恢复(图 2 中曲线 3).

## 2.2 反应条件优化

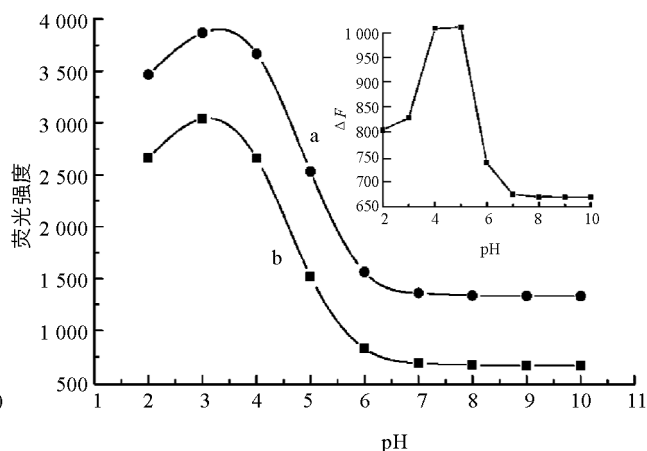
### 2.2.1 pH 值的影响

实验探究了不同 pH 值的 BR 缓冲溶液对反应体系的影响. 由图 3 可知, L-Trp-Hg<sup>2+</sup> 和 L-Trp-Hg<sup>2+</sup>-D-PA 两个反应体系的荧光强度在 pH=2.0~3.1 范围逐渐增强, pH=3.1~7.2 之间荧光逐渐减弱, 但荧光恢复值( $\Delta F$ )在 pH=4.0~5.0 时最大(图 3 插图). 因此本实验选用 pH=4.8 的 BR 溶液为反应介质.



1. L-Trp; 2. L-Trp+D-PA; 3. L-Trp+Hg<sup>2+</sup>+D-PA; 4. L-Trp+Hg<sup>2+</sup>;  $c_{\text{L-Trp}}=2.0\times 10^{-5}$  mol/L;  $c_{\text{Hg}^{2+}}=5.0\times 10^{-4}$  mol/L;  $c_{\text{D-PA}}=5.0\times 10^{-5}$  mol/L; pH=4.8.

图 2 L-Trp-Hg<sup>2+</sup>-D-PA 体系的荧光光谱



a.  $c_{\text{D-PA}}=2.0\times 10^{-5}$  mol/L; b.  $c_{\text{D-PA}}=0$ .

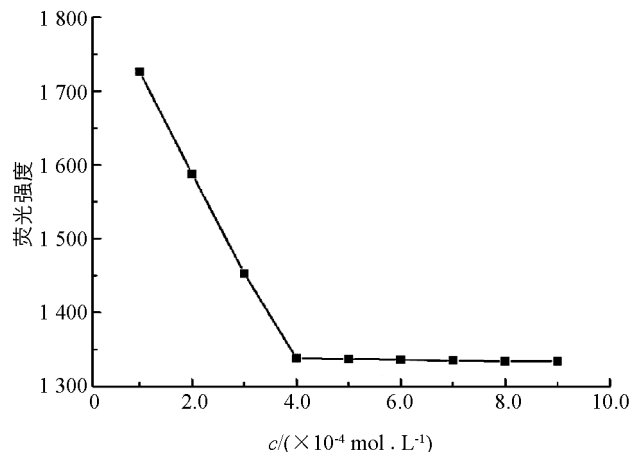
图 3 pH 值对反应体系荧光强度的影响

### 2.2.2 Hg<sup>2+</sup> 浓度的影响

L-Trp 作为一种常见天然氨基酸, 已有文献报道 Hg<sup>2+</sup> 可以与羧基螯合从而猝灭 L-Trp 的荧光<sup>[13]</sup>. 如图 4 所示, 在 Hg<sup>2+</sup> 浓度为  $4.0\times 10^{-4}$  mol/L 时, L-Trp 荧光猝灭程度最大, 且随着 Hg<sup>2+</sup> 继续加入, 荧光强度保持不变. 故本实验选择  $5.0\times 10^{-4}$  mol/L 为 Hg<sup>2+</sup> 后续实验浓度.

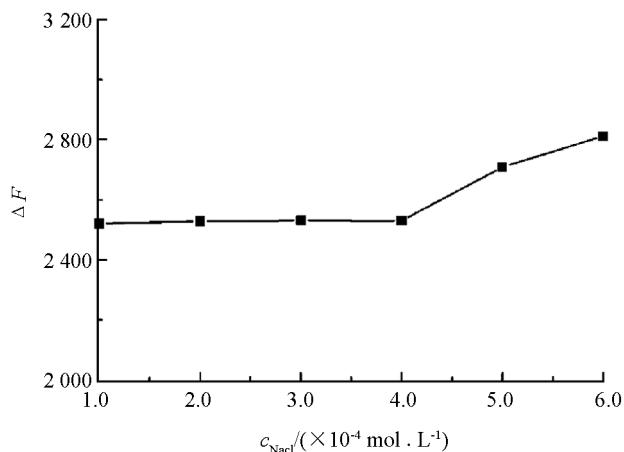
### 2.2.3 离子强度和反应时间的影响

研究了离子强度对三元反应体系的影响(图 5), 当 NaCl 浓度低于  $4.0\times 10^{-4}$  mol/L 时, 反应体系荧光强度较稳定; 当 NaCl 浓度高于  $4.0\times 10^{-4}$  mol/L 时, 荧光强度有所增加, 因此, 在实际样品检测过程中要注意控制离子强度, 避免高浓度盐类的引入. 此外, 实验发现 L-Trp 的荧光在 15 min 恢复到最大值并且在 1 h 内保持稳定, 因此选择 15 min 为反应时间.



$c_{\text{L-Trp}}=2.0\times 10^{-5}$  mol/L; pH=4.8.

图 4 Hg<sup>2+</sup> 浓度对 L-Trp 荧光强度的影响



$c_{\text{L-Trp}}=2.0\times 10^{-5}$  mol/L,  $c_{\text{Hg}^{2+}}=5.0\times 10^{-4}$  mol/L,  $c_{\text{D-PA}}=5.0\times 10^{-5}$  mol/L, pH=4.8.

图 5 离子强度的影响

2.3 方法的选择性

为了考察该方法的选择性,在优化的实验条件下,探究了 20 种常见物质对测定 D-PA 的影响.当共存物质引起的荧光强度改变在相对误差±5%之内,通常认为不会对检测造成影响.由表 1 可知,常见的金属离子、氨基酸、糖类对 D-PA 的检测几乎没有影响,表明本法具有较好的选择性,可以应用于实际样品的检测.

表 1 共存物质的影响( $c_{\text{D-PA}}=5.0\times10^{-5}\text{ mol/L}$ )

| 共存物                                             | 浓度/ $(\times10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})$ | 相对误差/% | 共存物                | 浓度/ $(\times10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})$ | 相对误差/% |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------|--------------------|----------------------------------------------------|--------|
| KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>              | 500.0                                              | −3.2   | NH <sub>4</sub> Cl | 750.0                                              | −2.6   |
| Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | 380.0                                              | 3.9    | NaF                | 600.0                                              | 3.2    |
| CoSO <sub>4</sub>                               | 460.0                                              | −4.4   | 淀粉                 | 710                                                | 3.7    |
| CuSO <sub>4</sub>                               | 50.0                                               | −4.0   | 果糖                 | 500.0                                              | 4.5    |
| ZnSO <sub>4</sub>                               | 530.0                                              | 4.8    | 葡萄糖                | 450.0                                              | 5.0    |
| NiSO <sub>4</sub>                               | 500.0                                              | 3.5    | 精氨酸                | 30.0                                               | −4.8   |
| PdCl <sub>2</sub>                               | 70.0                                               | 4.1    | 甘氨酸                | 100.0                                              | −3.6   |
| MnSO <sub>4</sub>                               | 450.0                                              | −3.5   | L-酪氨酸              | 160.0                                              | −4.5   |
| NaNO <sub>3</sub>                               | 100.0                                              | 3.6    | L-丝氨酸              | 500.0                                              | −4.9   |
| MgCl <sub>2</sub>                               | 660.0                                              | −3.8   | L-天门冬氨酸            | 30.0                                               | −4.8   |

2.4 标准曲线

按照前述实验方法,测定不同 D-PA 浓度下反应体系的荧光强度.如图 6 所示,随着 D-PA 的加入,L-Trp 的荧光逐渐恢复,荧光恢复程度( $\Delta F$ )与 D-PA 浓度在 0.44~50.0  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈现良好的线性关系(图 6 插图),线性回归方程为  $\Delta F=226.6 C+51.8$ ,相关系数为 0.999 3,检出限( $3\sigma/K$ )达 0.13  $\mu\text{mol/L}$ .表 2 列出了本法与其他方法测定 D-PA 的比较,由此可以看出,本法灵敏度高,操作简单,更具有实用价值.

2.5 逻辑门的模拟应用

分子传感器与目标分析物协同作用,对反应条件进行信息处理,将一个或多个反应条件作为输入信号,荧光信号的改变作为输出信号<sup>[14]</sup>.基于荧光响应可以通过  $\text{Hg}^{2+}$  和 D-PA 的加入来回切换,体系荧光强度进入“on-off-on”模式,为此构建了 IMPLICATION 逻辑门<sup>[15]</sup>.以 L-Trp 作为一种逻辑门装置,设定  $\text{Hg}^{2+}$ (输入 1)和 D-PA(输入 2)为输入信号,352 nm 处荧光强度为输出信号,0 和 1 分别代表荧光猝灭和未猝灭.无信号输入(0,0)或只有 D-PA 输入(0,1),352 nm 处荧光吸收很强,输出为 1;单独  $\text{Hg}^{2+}$  输入(0,1)时,荧光猝灭,输出为 0.当两者同时输入(1,1)时,L-Trp 荧光恢复,输出为 1.表 3 为逻辑门对应的真值表,图 7 为荧光输出 IMPLICATION 逻辑图.

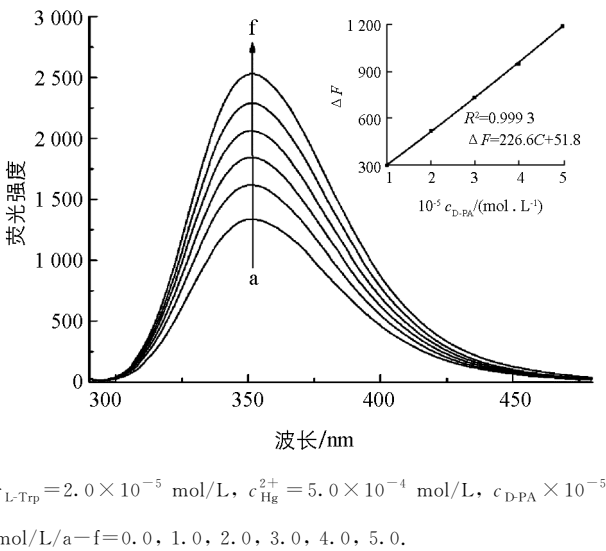


图 6 探针对不同浓度 D-PA 的荧光响应

$c_{\text{L-Trp}}=2.0\times10^{-5}\text{ mol/L}$ ,  $c_{\text{Hg}^{2+}}=5.0\times10^{-4}\text{ mol/L}$ ,  $c_{\text{D-PA}}\times10^{-5}$   
 $\text{mol/L/a-f}=0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0$ .

表 2 测定 D-PA 的不同方法的比较

| 方法                     | 试剂与材料                                | 检出限/<br>( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |                             | 评价 |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|----|
| 电化学发光法 <sup>[3]</sup>  | 碳纳米片                                 | 33.0                                            | 灵敏度较低                       |    |
| 电化学法 <sup>[4]</sup>    | 碳糊电极                                 | 0.7                                             | 合成步骤较复杂                     |    |
| 分光光度法 <sup>[5]</sup>   | [Ru(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-</sup> | 0.25                                            | 检出限较低, 但合成步骤较繁琐, 需要使用贵金属    |    |
| 高效液相色谱法 <sup>[6]</sup> | C18 柱                                | 0.03                                            | 灵敏度高, 可同时进行多组分检测, 但需要使用有机溶剂 |    |
| 圆二色性法 <sup>[7]</sup>   | CdS 量子点                              | 0.49                                            | 步骤复杂, 不适宜常规检测               |    |
| 荧光法 <sup>[9]</sup>     | 银离子, 碳点                              | 5.62                                            | 合成步骤较繁琐                     |    |
| 荧光法 <sup>[10]</sup>    | CdTe 量子点                             | 3.3                                             | 合成步骤较繁琐                     |    |
| 荧光法 <sup>[11]</sup>    | 碳点                                   | 0.6                                             | 合成步骤较繁琐                     |    |
| 荧光法(本研究)               | L-Trp-Hg <sup>2+</sup>               | 0.13                                            | 简单、灵敏、选择性好, 适用于日常测定         |    |

表 3 逻辑门真值表

| 输入 1<br>(Hg <sup>2+</sup> ) | 输入 2<br>(D-PA) | 输出荧光 |
|-----------------------------|----------------|------|
| 0                           | 0              | 1(高) |
| 0                           | 1              | 1(高) |
| 1                           | 0              | 0(低) |
| 1                           | 1              | 1(高) |

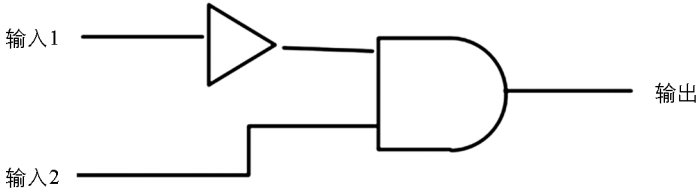


图 7 IMPLICATION 逻辑图

2.6 实际样品的测定

为了评价本方法的适用性和有效性, 将本方法用于青霉素药片中 D-PA 含量检测. 随机选 10 片药片(上海信谊药厂有限公司), 研细. 称取相当于 0.25 片质量的样品, 溶解、过滤、除去不溶物, 最后定容至 500.0 mL 容量瓶中, 备用. 吸取 0.5 mL 待测液于 10.0 mL 比色管中进行检测, 结果见表 4. 通过标准加入法测得回收率和相对标准偏差分别为 96.0%~103.8% 和 2.8%~4.0%, 表明本方法具有较高的准确度和较好的重复性, 可以用于实际样品的测定.

表 4 药片中 D-PA 的测定结果

| 样品 | 标称量/<br>( $\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$ ) | D-PA 测得值/<br>( $\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$ ) | D-PA 加入量/<br>( $\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$ ) | D-PA 测得值/<br>( $\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$ ) | 回收率/<br>% | RSD/<br>% |
|----|--------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|-----------|
| 1  |                                            |                                                 | 0.025                                           | 0.146                                           | 96.0      | 3.2       |
| 2  | 0.125                                      | 0.122                                           | 0.053                                           | 0.177                                           | 103.8     | 2.8       |
| 3  |                                            |                                                 | 0.109                                           | 0.228                                           | 97.2      | 4.0       |

注:  $n=5$ .

3 结论

利用 Hg<sup>2+</sup> 与 D-PA 之间的强螯合作用, 使得 Hg<sup>2+</sup> 脱离 L-Trp, L-Trp 荧光得到恢复, 从而设计了分子

逻辑门,并建立了 D-PA 的荧光检测新方法。本方法相较于其他方法,简单易行、选择性好、灵敏度高,无需精密的仪器和复杂的合成步骤,适用于青霉胺药片含量的测定。

#### 参考文献:

- [1] SULIMAN F E O, AL-LAWATI Z H, AL-KINDY S M Z. A Spectrofluorimetric Sequential Injection Method for the Determination of Penicillamine Using Fluorescamine in the Presence of Beta-Cyclodextrins [J]. Journal of Fluorescence, 2008, 18(6): 1131-1138.
- [2] 陈新谦,金有豫,汤光,等. 新编药理学 [M]. 13 版. 北京:人民卫生出版社,1992.
- [3] LIN X, ZHU S, WANG Q H, et al. Chiral Recognition of Penicillamine Enantiomers Using Hemoglobin and Gold Nanoparticles Functionalized Graphite-Like Carbon Nitride Nanosheets via Electrochemiluminescence [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 148: 371-376.
- [4] ZHAI Y B, ZHUANG H Y, PEI M S, et al. The Development of a Conjugated Polyelectrolytes Derivative Based Fluorescence Switch and Its Application in Penicillamine Detection [J]. Journal of Molecular Liquids, 2015, 202: 153-157.
- [5] LI B L, LUO J H, LUO H Q, et al. A Novel Strategy for Selective Determination of D-Penicillamine Based on Molecularly Imprinted Polypyrrole Electrode via the Electrochemical Oxidation with Ferrocyanide [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, 186: 96-102.
- [6] SARACINO M A, CANNISTRACI C, BUGAMELLI F, et al. A Novel HPLC-Electrochemical Detection Approach for the Determination of D-Penicillamine in Skin Specimens [J]. Talanta, 2013, 103: 355-360.
- [7] NGAMDEE K, PUANGMALI T, TUNTULANI T, et al. Circular Dichroism Sensor Based on Cadmium Sulfide Quantum Dots for Chiral Identification and Detection of Penicillamine [J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 898: 93-100.
- [8] 李茜,宋汉敏,刘英. 离子色谱法测定青霉胺片的含量及有关物质 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(4): 698-706.
- [9] 李玲芳,王琦. 荧光碳点的制备及银离子辅助的点亮型识别青霉胺 [J]. 无机化学学报, 2020, 36(11): 2055-2062.
- [10] 周晓燕,李在均,王光丽,等. 手性 CdTe 量子点制备及在药物青霉胺对映体检测中的应用 [J]. 分析试验室, 2013, 32(9): 1-5.
- [11] YUAN Y S, ZHAO X, LIU S P, et al. A Fluorescence Switch Sensor Used for D-Penicillamine Sensing and Logic Gate Based on the Fluorescence Recovery of Carbon Dots [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 236: 565-573.
- [12] NEUPANE L N, PARK J Y, PARK J H, et al. Turn-on Fluorescent Chemosensor Based on an Amino Acid for Pb(II) and Hg(II) Ions in Aqueous Solutions and Role of Tryptophan for Sensing [J]. Organic Letters, 2013, 15(2): 254-257.
- [13] WAN X J, LI S F, ZHUANG L L, et al. L-Tryptophan-Capped Carbon Quantum Dots for the Sensitive and Selective Fluorescence Detection of Mercury Ion in Aqueous Solution [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2016, 18(7): 1-9.
- [14] NEELAM, SINGH V, SHANKAR B, et al. Molecular Logic Operations Based on Optical Detection of Sulfur Mustard Simulant Using Pyridine Appended Mg-Porphyrizine Complex [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 227: 85-91.
- [15] SINGH G, SINGH J, SINGH J, et al. Design of Selective 8-Methylquinolinol Based Ratiometric  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  Fluorescent Chemosensor Mimicking NOR and IMPLICATION Logic Gates [J]. Journal of Luminescence, 2015, 165: 123-129.

责任编辑 潘春燕