

以利多卡因为探针共振光散射法测定血清白蛋白的含量

王珺瑶¹, 宋双居², 吴秋华², 王春², 王志^{2*}

1. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001

2. 河北农业大学理学院, 河北保定 071001

摘要 实验发现在十二烷基苯磺酸钠(SDBS)存在下, 利多卡因能增强血清白蛋白的共振光散射强度, 据此, 建立了以利多卡因为探针, 利用共振光散射法测定牛血清白蛋白(BSA)和血清白蛋白(HSA)含量的新方法。考察了反应时间、试剂的加入顺序、pH值、SDBS和利多卡因的浓度以及共存干扰物等因素对共振光散射强度的影响。在优化的条件下, 测定BSA和HSA的线性范围分别为1.0~45.0和0.5~30.0 mg·L⁻¹。该方法用于人血清样品中蛋白含量的分析, 获得了较高的精密度和准确度, 五次平行测定的相对标准偏差在4.9%~5.7%之间, 加标回收率在90%~103%之间。该方法使用常规荧光仪和常用化学试剂即可测定, 操作简便、具有较高的灵敏度(检出限为0.14 mg·L⁻¹)。对新鲜的人血清样品可以直接进行分析, 无需进行样品前处理。本方法为人血清样品中蛋白含量的测定提供了一个可供选择的新途径。

关键词 BSA; HSA; 共振光散射; 利多卡因; 测定

中图分类号: O641.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)09-2517-04

引言

蛋白质作为生命活动的基本物质在生命现象和生命过程中起着决定性的作用^[1], 其定量测定是生物化学、药学、食品及临床分析中常涉及的内容, 也是临床诊断疾病的重要指标, 因此定量分析蛋白质的含量具有重要意义。

目前蛋白质的定量分析方法有很多种, 常用的有分光光度法^[2]、荧光分析法^[3]、化学发光法^[4]等。但分光光度法灵敏度低、选择性差, 荧光分析法和化学发光法需使用昂贵的甚至有毒的荧光试剂和发光试剂, 且分析时间较长。共振光散射技术只需要普通荧光分光光度计, 且方法灵敏、简便、快速, 自从Pasternack等^[5]首次用共振光散射技术研究卟啉类化合物在核酸上的聚集, 并将该技术应用于生物大分子的定量分析以来, 共振光散射技术得到了迅速发展, 已广泛应用于核酸^[6,7]、蛋白质^[8-12]以及其他无机物的含量测定^[13-15]。共振光散射法测定蛋白质最常用的探针包括染料^[8,9,13]、卟啉衍生物^[16]、表面活性剂^[14,17]和纳米材料^[10,11]等, 使用药物小分子作为共振光散射探针的报道还很少^[18]。

利多卡因是目前临床常用的麻醉剂, 以利多卡因为探针采用共振光散射技术测定蛋白质含量还未见文献报道。试验

发现, 在十二烷基苯磺酸钠存在下, 利多卡因能提高蛋白质的共振光散射强度, 且共振光强度与蛋白质的浓度成正比。基于上述现象, 本文利用共振光散射技术, 建立了以利多卡因为探针的测定血清蛋白质含量的新方法, 该方法适于血清和牛血清样品的测定, 方法简便、具有较高的灵敏度和准确度。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

使用日本日立公司生产的F-4500型荧光分光光度计, 日本岛津公司的TB-85恒温水浴装置; 利多卡因(Lidocaine)由中国药品生物制品检定所提供, 牛血清白蛋白(BSA)由Fraction V, Roche提供, 人血清白蛋白(HSA)由Sigma公司提供。用蒸馏水配制浓度分别为1.0 g·L⁻¹的HSA和BSA标准储备液, 浓度为2.0×10⁻² mol·L⁻¹的利多卡因标准储备液和1.0×10⁻² mol·L⁻¹的SDBS储备液, 人血清样品由河北农业大学附属医院提供, 蛋白和血清样品放在0~4℃的冰箱中保存。Britton-Robinson(B-R)缓冲溶液用于调节溶液的酸度。其他试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 方法

收稿日期: 2010-11-01, 修订日期: 2011-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071580)资助

作者简介: 王珺瑶, 女, 1987年生, 河北农业大学生命科学学院硕士研究生 e-mail: 11398868@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: zhiwang1963@yahoo.com.cn

在 10 mL 比色管中, 按下列顺序依次加入适量缓冲溶液、SDBS、利多卡因和血清白蛋白标准溶液或样品工作溶液, 用水稀释至刻度, 混匀, 室温放置 20 min, 然后在荧光分光光度计上选择激发和发射狭缝为 5 nm, 在 200~750 nm 波长范围内进行同步荧光扫描得到共振光散射光谱, 设定 $\lambda = 310$ nm 测定 SDBS-lidocaine-血清白蛋白体系的共振光散射强度 I_{RLS} 。溶液中不加血清白蛋白测定空白 SDBS-lidocaine 体系的共振光散射强度 I_{RLS}^0 , 其差值 $\Delta I_{\text{RLS}} = I_{\text{RLS}} - I_{\text{RLS}}^0$ 。

2 结果与讨论

2.1 共振光散射光谱特征

图 1 是同步扫描激发与发射波长所得到的 SDBS, SDBS-lidocaine, lidocaine-BSA, SDBS-BSA 和 SDBS-lidocaine-BSA 体系的共振光散射光谱图。在 pH 2.2 的 B-R 缓冲溶液中, SDBS, SDBS-lidocaine 和 lidocaine-BSA 体系的共振光散射强度都很弱, 但 SDBS-lidocaine-BSA 体系的共振光散射强度很强并强于 SDBS-BSA 体系。在酸性条件下, 表面活性剂 SDBS 能与 BSA 相互作用, 并使 BSA 的共振光散射增强, 在 SDBS-BSA 体系中加入利多卡因后, 有强烈的共振光散射增强现象, 表明生成了 BSA-SDBS-lidocaine 三元复合物。在酸性条件下, 阴离子表面活性剂 SDBS 能与带正电蛋白质结合形成二元复合物, 加入利多卡因后, 阳离子形式的利多卡因可以继续与 SDBS-BSA 二元复合物中的阴离子表面活性剂 SDBS 结合, 从而形成 BSA-SDBS-lidocaine 三元复合物, 该复合物导致强烈的共振光散射增强现象, 最大散射强度位于 310 nm 处。

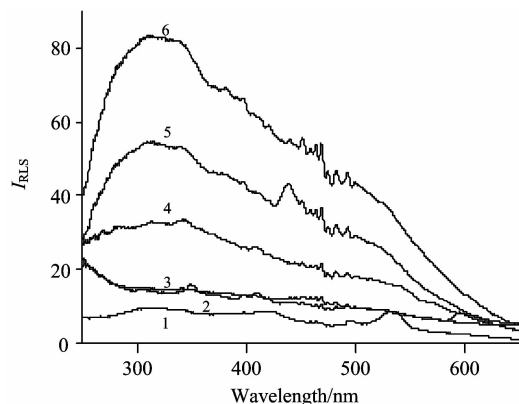


Fig. 1 The resonance light scattering spectra

1: SDBS; 2: SDBS-lidocaine; 3: lidocaine-BSA; 4: SDBS-BSA; 5, 6: SDBS-lidocaine-BSA
Concentrations: SDBS 1.5×10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$, Lidocaine 2.0×10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$, BSA 5.0 mg \cdot L $^{-1}$ for curves 3, 4 and 5, 7.5 mg \cdot L $^{-1}$ for curve 6, pH 2.2

2.2 pH 值的影响

试验考察了体系的 pH 值对共振光散射强度的影响, 结果见图 2。空白 (SDBS-lidocaine) 的光散射强度受 pH 值的影响不大, 而 SDBS-lidocaine-BSA 体系的共振光散射强度随

pH 值变化明显, 体系的共振光散射强度在 pH 2.2 时达到最大, 之后开始迅速减弱, 当 pH > 4.7 时, 体系的共振光散射强度保持恒定。可能的原因是利多卡因有较强的疏水性, 可进入表面活性剂 SDBS 胶束内部的疏水空腔, 由于 BSA 的等电点是 4.7, 当 pH > 4.7 时, BSA 带负电, 不能与阴离子胶束及其中的利多卡因形成复合物。当溶液 pH < 4.7 时 BSA 带正电, 易与阴离子表面活性剂胶束表面的阴离子静电相吸形成复合物; 随着 pH 的降低, 蛋白质带正电荷的数量增加, 使蛋白质与 SDBS 之间的结合能力增强, 使共振光散射强度在 pH 2.2 的时候达到最大。当 pH < 2.2 时, 由于 SDBS 的解离能力下降, 所带负电荷减少, 导致蛋白质与 SDBS 之间的结合能力下降, 所以体系的 pH 过高或过低都会使体系的共振光散射强度降低。

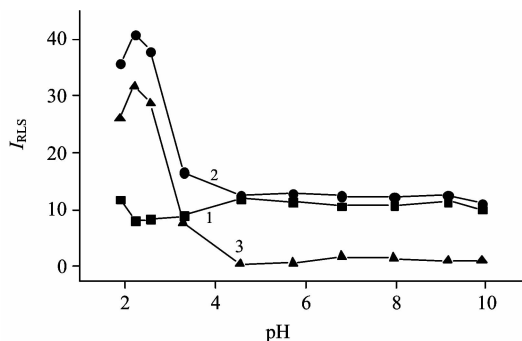


Fig. 2 Effect of pH on the RLS intensity

1: I_{RLS} ; 2: I_{RLS} ; 3: ΔI_{RLS}

Concentrations: SDBS 1.5×10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$, Lidocaine 2.0×10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$, BSA 5.0 mg \cdot L $^{-1}$

2.3 十二烷基苯磺酸钠浓度的影响

十二烷基苯磺酸钠浓度的大小也会影响体系的共振光散射强度的大小, 本实验考察了其浓度在 $0.75 \times 10^{-4} \sim 2.5 \times 10^{-4}$ mol \cdot L $^{-1}$ 内变化时对体系共振光散射强度的影响, 结果如图 3 所示。随着阴离子表面活性剂 SDBS 浓度的增加, ΔI_{RLS} 逐渐增加, 当 SDBS 的浓度在 $1.5 \sim 2.0 \times 10^{-4}$ mol \cdot L $^{-1}$ 范围内时体系的 ΔI_{RLS} 较大, 且基本不变。当浓度超过了 2.0×10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$ 时, 体系的 ΔI_{RLS} 开始降低。本实验选择

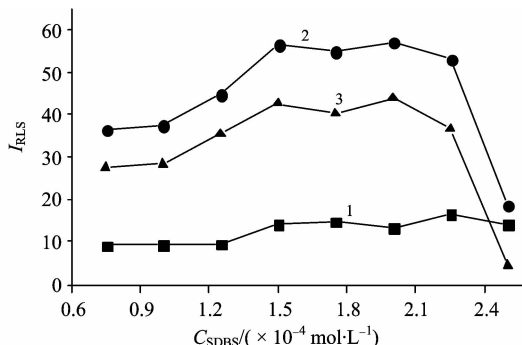


Fig. 3 Effect of the concentration of SDBS on the RLS intensity

1: I_{RLS} ; 2: I_{RLS} ; 3: ΔI_{RLS}

Concentrations: Lidocaine 2.0×10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$, BSA 5.0 mg \cdot L $^{-1}$, pH 2.2

SDBS 的浓度为 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 利多卡因浓度的影响

实验考察了利多卡因浓度对体系共振光强度的影响, 结果见图 4。当利多卡因浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的共振光强度达最大, 所以本实验选择利多卡因的浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

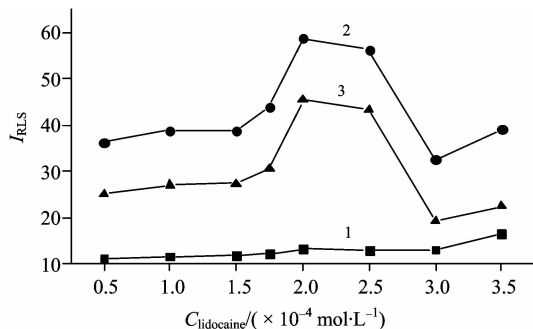


Fig. 4 Effect of the concentration of lidocaine on the RLS intensity

1: I_{RLS} ; 2: I_{RLS} ; 3: ΔI_{RLS}

Concentrations: SDBS $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, BSA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 2.2

2.5 反应时间的影响

实验考察了反应时间在 5~180 min 范围内对体系共振光强度的影响。结果表明在 20 min 前, 体系的共振光散射强度随着时间的增加而急剧增强, 20 min 时体系的共振光散射强度达到最大, 并且在 180 min 内保持稳定, 因此选择反应时间 20 min。另外, 结果还表明, 该方法 RLS 的信号很稳定, 适于蛋白含量的测定。

2.6 试剂加入顺序对体系共振光散射强度的影响

考察了试剂的加入顺序对体系的散射光强度的影响, 实验的结果表明: 试剂加入顺序为缓冲溶液-SDBS-利多卡因-BSA 时, 体系的 ΔI_{RLS} 最大。

2.7 共存物质的影响

在上述选定的实验条件下, 考察了多种常见的金属离

子、氨基酸、糖等对 BSA 测定的影响。实验结果见表 1。几种常见的金属离子中 Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} 可以允许其浓度在 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, 对于氨基酸和糖类来说, D-半乳糖醛酸、葡萄糖、甘氨酸、L(+)-谷氨酸也都可以允许其浓度在 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右而不会引起太大的干扰。由此可知, 该法的选择性较好。

Table 1 The influence of foreign substances*

Foreign substances	Concentration / ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Change of IRLS / %
L-Ala	0.1	-4.2
Gly	1.0	-4.7
L(+)-Glu	1.0	-2.8
Sorbose	10.0	-1.4
Glucose	1.0	-3.2
D-Galacturonic acid	1.0	-5.7
D-Ribose	10.0	-0.6
Fs-DNA	0.1	-10.0
Fe^{3+} , Cl^{-}	0.1	0.6
Cu^{2+} , Cl^{-}	1.0	-1.6
Zn^{2+} , Cl^{-}	1.0	2.4
Mg^{2+} , Cl^{-}	1.0	-10.0
Ca^{2+} , Cl^{-}	1.0	-0.7
Fe^{2+} , SO_4^{2-}	0.1	6.0
K^{+} , Cl^{-}	10.0	-5.9
Hg^{2+} , Cl^{-}	0.1	4.4
Pb^{2+} , Cl^{-}	0.1	-2.3
Mn^{2+} , SO_4^{2-}	1.0	8.8

* Concentration: SDBS $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Lidocaine $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, BSA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 2.2

2.8 标准曲线和实际样品分析

在确定的最佳条件下, 按照实验方法测定了牛血清蛋白 (BSA) 与人血清白蛋白 (HSA) 浓度与 RLS 强度之间的关系, 并绘制了标准曲线。线性范围、相关系数 (r) 及检出限等实验参数列于表 2 中。

Table 2 Analytical parameters for serum albumins detection

Serum albumin	Linear range/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Regression equation c /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	r	LOD/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
BSA	1.0~45.0	$\Delta I_{\text{RLS}} = 0.31 + 2.52c$	0.994	0.14
HSA	0.5~30.0	$\Delta I_{\text{RLS}} = -0.52 + 2.43c$	0.998	0.14

为考察方法的可行性, 将所建立的方法用于人血清样品的测定, 将人血清样品稀释 1 000 倍得到血清样品工作溶液, 按实验方法每个样品平行测定 5 次, 并与 Bradford 方法^[19] 进行对比; 在人血清样品中加入浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA 标样, 平行测定 5 次, 计算回收率, 结果见表 3。结果表明用两种分析方法的测定结果基本一致, HSA 的加标回收率在 90%~103% 之间, 相对标准偏差 RSDs 在 4.9%~5.7% 之间, 说明本文所建立的分析方法准确可靠, 可用于实际样品的直接测定。

Table 3 Determination of serum albumin in human serum

Samples	Content of protein / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) ($n=5$)		Recovery/% ($n=5$)	RSD/% ($n=5$)
	Bradford method	This method		
1	61.0	60.3	90~95	4.9
2	69.6	67.4	92~103	5.5
3	70.5	71.5	93~102	5.7

3 结 论

基于共振光散射技术,以利多卡因为探针建立了测定血清白蛋白含量的新方法,在 pH 2.2 缓冲溶液中,利多卡因与蛋白质和 SDBS 相互作用形成三元复合物而使蛋白体系的

共振光强度增强,并且共振光强度与血清白蛋白的浓度成正比。实验考察了各种实验参数的影响,并将所建立的方法成功地用于人血清样品中蛋白含量的测定,结果表明该方法有较高的灵敏度和较好的重现性,对新鲜的人血清样品可以直接进行分析,不需要进行样品前处理。

References

- [1] Krang-hansen U. *Pharmacol. Rev.*, 1981, 33: 17.
- [2] Wei Y J, Li K A, Tong S Y. *Talanta*, 1996, 43: 1.
- [3] Jiang C Q, Luo L. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 506: 171.
- [4] Li Z P, Fan S S, Zhang L N, et al. *Anal. Sci.*, 2004, 20: 1327.
- [5] Pasternack R F, Bustamante C, Collings P J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115: 5393.
- [6] Li X M, Gao J Q, Liu D J. *Anal. Methods*, 2010, 2: 1008.
- [7] Chen H, Yu H, Zhang J Z, et al. *Sensors and Actuators B, Chem.*, 2010, B145: 378.
- [8] Cai C Q, Chen X M. *Spectrochim. Acta Part A*, 2010, 75: 1057.
- [9] Chen Z G, Peng Y R, Chen J H. *Anal. Sci.*, 2009, 25: 891.
- [10] Guo X Y, He B L, Sun C T, et al. *Spectroscopy Lett.*, 2009, 42: 28.
- [11] Zhang S H, Fan Y S, Feng S, et al. *Spectrochim. Acta Part A*, 2009, 72: 748.
- [12] Guo X Y, He B L, Sun C T, et al. *Spectroscopy Lett.*, 2009, 42: 28.
- [13] Zhong H, Li N, Zhao F L, et al. *Talanta*, 2004, 62: 37.
- [14] Dong L J, Chen X G, Hu Z D. *Talanta*, 2007, 71: 555.
- [15] ZHU Jin(朱 进). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2009, 37: 320.
- [16] Huang C Z, Li Y F, Mao J G, et al. *Analyst*, 1998, 123: 1401.
- [17] Chen Z G, Liu G L, Chen M H, et al. *Anal. Biochem.*, 2009, 384: 337.
- [18] Liu Y, Yang J H, Liu S F, et al. *Spectrochim. Acta Part A*, 2005, 61: 641.
- [19] Li Y X, Zhao D H, Zhu C Q, et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 374: 395.

Determination of Serum Proteins by Resonance Light Scattering Method with Lidocaine as a Probe

WANG Jun-tao¹, SONG Shuang-ju², WU Qiu-hua², WANG Chun², WANG Zhi^{2*}

1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

2. College of Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

Abstract A new method for the determination of bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA) was developed by using resonance light scattering (RLS) technique via an interaction of serum albumin with lidocaine and sodium dodecylbenzene sulphonate (SDBS). The RLS intensity of serum albumin was enhanced in the presence of lidocaine and SDBS. The influences of some experimental factors, including incubation time, addition sequence of reagents, pH values, foreign substances and the concentrations of lidocaine and SDBS, on the enhancement of the RLS intensity were investigated. Under the optimal conditions, the enhanced RLS intensities were proportional to the concentrations of serum albumin in the range of 1.0~45.0 mg · L⁻¹ for BSA and 0.5~30.0 mg · L⁻¹ for HSA. The method was successfully applied to the determination of real human serum samples, with the relative standard deviations of 4.9%~5.7% (n=5) and standard addition recoveries of 90%~103%. The method only involves the use of conventional fluorescence spectrometer and chemical reagents. It is simple, easy to operate and sensitive with the limit of detection of 0.14 mg · L⁻¹. The fresh human serum samples can be directly analyzed without the need of any prior pretreatment. The method can be a good alternative of choice for the determination of BSA and HSA.

Keywords Bovine serum albumin; Human serum albumin; Resonance light scattering; Lidocaine; Determination

* Corresponding author

(Received Nov. 1, 2010; accepted Mar. 15, 2011)