

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 20520071150980

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

硫醇的 HPLC-UV/HCOOH-AFS 定量分析

Determination of Thiols by HPLC-UV/HCOOH-AFS

汤 璐

指导教师姓名: 王秋泉 教授

专业名称: 分析化学

论文提交日期: 2010 年 7 月

论文答辩时间: 2010 年 7 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 7 月

Determination of Thiols by HPLC-UV/HCOOH-AFS

A Thesis Presented

By

Lu Tang

Supervisor: Professor Qiuquan Wang

Submitted to the Graduated School of Xiamen University for the Degree

of

Master of Science

July, 2010

Department of Chemistry, Xiamen University

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言	1
1.1 硫醇	1
1.2 生命体系中硫醇的存在形式	1
1.3 小分子硫醇	2
1.3.1 还原型谷胱甘肽.....	2
1.3.2 半胱氨酸.....	3
1.3.3 同型半胱氨酸.....	3
1.3.4 其他非蛋白硫醇.....	4
1.4 蛋白硫醇	5
1.5 巯基的定量分析方法	6
1.5.1 UV.....	6
1.5.2 FL.....	8
1.5.2.1 马来酰亚胺类.....	8
1.5.2.2 碘乙酰胺类 (-NHCOCH ₂ I)	9
1.5.2.3 活性卤素类.....	10
1.5.2.4 氮杂双环类.....	11
1.5.2.5 邻苯二甲醛类 (OPA)	12
1.5.3 ECD.....	13
1.5.4 分子质谱.....	13
1.5.5 ICP-MS	14
1.5.6 AFS	15
1.6 选题依据和研究内容	16
参考文献:	17
第二章 小分子硫醇的 HPLC-UV/ HCOOH- AFS 定量方法及其在尿	

液中小分子硫醇分析中的应用	30
2.1 前言	30
2.2 实验部分	31
2.2.1 仪器.....	31
2.2.2 试剂及溶液的配置.....	32
2.2.3 PHMB 标记小分子硫醇	33
2.2.4 分析步骤.....	33
2.2.5 尿液样品前处理步骤.....	34
2.2.6 肌氨酸酐.....	34
2.3 结果与讨论	34
2.3.1 色谱条件的优化.....	34
2.3.2 检测条件的优化.....	36
2.3.2.1 光电倍增管负高压的选择.....	37
2.3.2.2 空心阴极灯电流的选择.....	38
2.3.2.3 载气流速的优化.....	38
2.3.2.4 光催化还原试剂的选择.....	39
2.3.2.5 甲酸浓度的优化.....	40
2.3.2.6 甲酸流速的优化.....	41
2.3.3 PHMB 衍生 Thiols 的条件的优化.....	43
2.3.3.1 ESI-MS 检测 Thiols 标记后 PHMB 与巯基的化学计量比.....	43
2.3.3.2 PHMB 与 GSH 摩尔比对衍生反应的影响	44
2.3.3.3 pH 对衍生反应的影响.....	45
2.3.3.4 反应时间对衍生反应的影响.....	45
2.3.4 方法的评价.....	46
2.3.5 HPLC-UV/HCOOH-AFS 应用于尿液样品中小分子硫醇的分析测定.....	47
2.3.5.1 肌氨酸酐的测定.....	47
2.3.5.2 二硫化物的还原.....	47
2.3.5.3 尿液中小分子硫醇的测定.....	49
2.4 结论	52
参考文献:	53

第三章 HPLC-UV/HCOOH-AFS 在 beta-乳球蛋白定量分析中的应用	59
.....	59
3.1 前言	59
3.2 实验部分	60
3.2.1 仪器.....	60
3.2.2 试剂及溶液的配置.....	60
3.2.3 THI 标记 BLG	61
3.2.4 分析步骤.....	61
3.3 结果与讨论	61
3.3.1 衍生条件的优化.....	61
3.3.1.1 THI 和 BLG 摩尔比对衍生反应的影响.....	61
3.3.1.2 pH 对衍生反应的影响.....	62
3.3.1.3 反应时间对衍生反应的影响.....	64
3.3.1.4 MALDI-MS 检测标记后 THI 与巯基的化学计量比.....	64
3.3.2 检测系统的优化.....	66
3.3.2.1 还原体系的选择.....	66
3.3.2.2 甲酸浓度的选择.....	67
3.3.2.3 甲酸流速的选择.....	69
3.3.2.4 Ar 流速的选择.....	69
3.3.3 方法的评价.....	70
3.4 结论	71
参考文献:	71
第四章 总结与展望	74
4.1 总结	74
4.2 展望	75
在校期间发表的论文	76
致 谢	77

CATOLOG

Abstract (Chinese)	I
Abstract (English)	III
Chapter 1 Preface	1
1.1 Thiols	1
1.2 Status of Thiols in Organism	1
1.3 Low-Molecular-Mass Thiols	2
1.3.1 Glutathione.....	2
1.3.2 Cysteine.....	3
1.3.3 Homocysteine	3
1.3.4 Other Low-Molecular-Mass Thiols	4
1.4 Protein Thiols	5
1.5 Quantification Analysis of Sulfhydryl	6
1.5.1 UV	6
1.5.2 FL	8
1.5.2.1 Maleimide	8
1.5.2.2 Iodoacetamide (-NHCOCH ₂ I)	9
1.5.2.3 Halides	10
1.5.2.4 Monobromobimane.....	11
1.5.2.5 OPA	12
1.5.3 ECD.....	13
1.5.4 ESI-MS	13
1.5.5 ICP-MS	14
1.5.6 AFS	15
1.6 The Basis and Content of this Study	16
References	17
Chapter 2 Determination of Low-Molecular-Mass Thiols in urine using HPLC-UV/HCOOH-AFS	30
2.1 Introduction	30
2.2 Experimental	31

2.2.1 Instruments.....	31
2.2.2 Reagents and Solutions Preparation.....	32
2.2.3 PHMB Labeling with Thiols.....	33
2.2.4 Analysis Procedures.....	33
2.2.5 Pretreatment of Urine Samples.....	34
2.2.6 Creatinine.....	34
2.3 Results and Discusstion	34
2.3.1 Seperation of PHMB labeled Thiols.....	34
2.3.2 Detection of PHMB labeled Thiols.....	36
2.3.2.1 Voltage of PMT.....	37
2.3.2.2 Current of Hollow cathode Lamp.....	38
2.3.2.3 Flow Rate of Ar.....	38
2.3.2.4 Hg Vapor Generation Reagents.....	39
2.3.2.5 Concentration of HCOOH.....	40
2.3.2.6 Flow Rate of HCOOH.....	41
2.3.3 Conditions of PHMB Labeling with Thiols.....	43
2.3.3.1 Determination of Stoichiometric between Thiols and PHMB by ESI-MS.....	43
2.3.3.2 Molar Ratio of PHMB/Thiols.....	44
2.3.3.3 pH.....	45
2.3.3.4 Reation Time.....	45
2.3.4 Method Validation.....	46
2.3.5 Urine Sample Analysis.....	47
2.3.5.1 Determination of Creatinine.....	47
2.3.5.2 Reduction of Disulfide.....	47
2.3.5.3 Determination of Urinary Thiols.....	49
2.4 Conclusion	52
References.....	53
Chapter 3 Determination of β-Lactoglobulin using HPLC-UV/ HCOOH- AFS	59
3.1 Introduction.....	59
3.2 Experimental	60
3.2.1 Instruments.....	60

3.2.2 Reagents and Solutions Preparation.....	60
3.2.3 THI labeling with BLG	61
3.2.4 Analysis Procedures	61
3.3 Results and Discusstion	61
3.3.1 Derivatiation Conditions.....	61
3.3.1.1 Molar Ratio of THI/BLG	61
3.3.1.2 pH.....	62
3.3.1.3 Reaction Time	64
3.3.1.4 Detemination of Stoichiometric between THI and BLG by MALDI-MS	64
3.3.2 Detection of THI labeled BLG	66
3.3.2.1 Hg Vapor Generation Systems	66
3.3.2.2 Concentration of HCOOH	67
3.3.2.3 Flow Rate of HCOOH	69
3.3.2.4 Flow Rate of Ar.....	69
3.3.3 Method Validation.....	70
3.4 Conclusion	71
References	71
Chapter 4 Summary and Prospects	74
4.1 Summary.....	74
4.2 Prospects.....	75
Publication during Study	76
Acknowledgement.....	77

摘要

硫醇是生物体中许多蛋白质和小分子的重要组成部分,在生命体系中起着重要的作用。大量的生物现象被认为依赖于这些包含巯基的硫醇类物质,如氧化还原反应、甲基转移反应、二氧化碳固定反应以及辅酶A参与的反应等。由于硫醇是生物体内的重要活性物种,体液(血液和尿液等)和组织中硫醇的浓度变化与许多疾病有着直接的联系,因而实时准确地检测体液中硫醇的含量在生物学、医学和药理学上都有重大意义。因此,目前已经发展了一系列基于巯基衍生的方法检测硫醇,如液相色谱/电泳与紫外、荧光、电化学和质谱等联用的分析方法。在诸多的衍生试剂中,有机汞与巯基有很强的亲和性,且反应按照化学计量比1:1进行,因此可以通过高灵敏度的原子光谱检测技术(如原子荧光光谱(AFS)和电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)等)检测汞以实现对小分子硫醇和含硫醇蛋白质的定量。

在本论文中,我们选择有机汞离子衍生试剂来标记小分子硫醇和含硫醇蛋白质,利用分子质谱进行标记效率的确认,通过AFS对标记在小分子硫醇和含硫醇蛋白质中的汞进行定量,以期对有机汞标记的小分子硫醇和含硫醇蛋白质进行定量。全文包含以下几个部分:

第一章主要对硫醇的种类及其在生命体内的作用进行综述,阐述硫醇定量信息的重要性,对应用于硫醇检测的各种分析技术进行详细的介绍,提出了基于有机汞作为衍生试剂对小分子硫醇和含硫醇蛋白质进行定量的分析策略,并提出将新发展的光催化还原装置用于标记在小分子硫醇和含硫醇蛋白质分子中汞的原子化。

第二章发展了对羟基汞苯甲酸衍生巯基、反相液相色谱分离、UV/HCOOH光催化在线还原原子化、AFS检测六种小分子硫醇(半胱氨酸(Cys),半胱氨酰胱氨酸(Cys-Gly),同型半胱氨酸(HCys), γ -谷氨酰半胱氨酸(γ -Glu-Cys),谷胱甘肽(GSH),N-乙酰半胱氨酸(NAC))的定量分析方法。这六种小分子硫醇的检测限(3σ)分别为4.6(Cys)、5.9(Cys-Gly)、5.9(HCys)、8.1(γ -Glu-Cys)、7.3(GSH)、5.9(NAC) nmol L^{-1} 。在不使用TCEP和使用TCEP还原氧化型(以

二硫键相连接的)小分子硫醇的情况下,分别测定了10个尿液样品中还原型硫醇和总硫醇(还原型和氧化型硫醇的总和)。

第三章主要利用毒性较小的硫柳汞动态标记蛋白质,验证了基于汞标记策略的蛋白质定量的可行性。硫柳汞(乙基汞硫水杨酸钠)能在溶液中离解出乙基汞离子,其能严格按照化学计量比(1:1)对蛋白质中的自由巯基进行标记。我们选择 β -乳球蛋白作为模型蛋白质,通过硫柳汞动态标记巯基、尺寸排阻色谱分离、UV/HCOOH光催化在线还原实现汞的原子化、AFS检测汞实现对 β -乳球蛋白的定量。该方法对 β -乳球蛋白的检测限为 66 nmol L^{-1} 。

第四章总结了本硕士论文的研究工作,对其不足进行了检讨,并对将来进一步研究工作进行了展望。

关键词: 硫醇; 有机汞; 生物分子的标记策略; UV/HCOOH; 原子荧光光谱

Abstract

Thiols are an important family consisting of many proteins and small molecules playing essential role in organisms. A large number of biological functions, such as antioxidation, methyl-transformation reaction, CO₂-storage reaction and etc, rely on thiols. The variation of thiols' concentrations in blood and urine link to many kinds of disease, simultaneous and exact quantification of them is thus crucial. Up till now, many methods have been developed for such a purpose using the hyphenated techniques such as HPLC and/or CE coupled with molecular absorption spectrometry, molecular fluoremetry, electrochemical detection, mass spectrometry and atomic spectrometry. Among various derivatization-reagents, organic mercury demonstrates unique properties of strong interaction with sulfhydryl and forming a simple complex of $\text{RHg}^+ : -\text{SH} = 1:1$. Subsequently, quantification of thiols can be fulfilled via the accurate determination of mercury using atomic fluorescence spectrometry (AFS) and/or inductively coupled plasma mass spectrometry. In this thesis, organic mercury ion RHg^+ was chosen as a derivatization-reagent for labeling low-molecular-mass thiols and sulfhydryl-containing protein to achieve their quantification by integrating AFS together with molecular mass spectrometry. The thesis consists of four chapters.

In Chapter One, species of thiols and their physiological functions in organisms as well as the analytical techniques for determining low molecular-mass thiols and proteins were briefly reviewed. Research proposal was thus made for this thesis, aiming to develop an RHg^+ -based labeling strategy toward low-molecular-mass thiols and sulfhydryl-containing proteins and their AFS quantification. New photocatalytical reduction system for mercury cold vapor generation was proposed instead of conventional $\text{K}_2\text{SO}_8\text{-KBH}_4/\text{NaOH-HCl}$ and/or $\text{KBrO}_3/\text{KBr-KBH}_4/\text{NaOH-HCl}$ systems.

In Chapter Two, a novel analytical method was established for simultaneous determination of main urinary low-molecular-mass (LMM) thiols including cysteine (Cys), cysteinylglycine (Cys-Gly), homocysteine (HCys), γ -glutamyl cysteine

(γ -Glu-Cys) and glutathione (GSH) as well as *N*-acetylcysteine (NAC) using RP-HPLC coupled on line with UV/HCOOH-induced cold vapor generation (CVG) atomic fluorescence spectrometry (UV/HCOOH-AFS) with 4- (hydroxymercuric) benzoic acid (PHMB) as a tag. The limits of detection (3σ) of RPLC-UV/HCOOH-AFS with PHMB labeling for Cys, HCys, Cys-Gly, γ -Glu-Cys and GSH as well as NAC were 4.6, 5.9, 5.9, 8.1, 7.3 and 5.9 nmol L⁻¹, respectively. This developed method was applied successfully to determine the urinary LMM reduced-form thiols and Total thiols before and after tris-(2-carboxyethyl)-phosphine reduction in 10-urine samples contributed by 10 healthy volunteers.

In Chapter Three, we demonstrated a proof of concept for the quantitative analysis of proteins via thiomersol (THI) labeling integrated molecular mass spectrometry and AFS. C₂H₅Hg⁺ released from THI has a specific and covalent interaction with -SH in proteins resulting in forming a simple complex of C₂H₅Hg⁺: -SH = 1:1 when all -SH are exposed. β -lactoglobulin (BLG) was chosen as a model protein to demonstrate the feasibility of protein quantification using UV/ HCOOH-AFS coupled with size-exclusion chromatography when THI was used as a dynamic labeling tag. The limit of detection of 66 nmol L⁻¹ was obtained for BLG.

In Chapter Four, achievements obtained in this thesis were summarized, and the perspective was discussed.

Key words: Thiols; Organic mercury; Biomolecular labeling strategy; Photocatalytical reduction; AFS

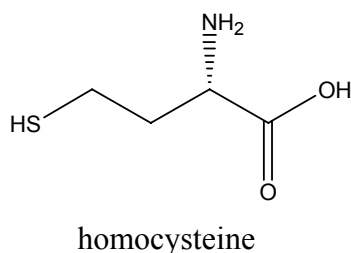
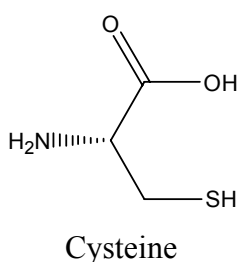
第一章 前言

1.1 硫醇

硫醇是生物体中许多蛋白质和小分子的重要组成部分，在生命体系中起着重要的作用。大量的生物现象被认为依赖于这些包含巯基的硫醇类物质，如氧化还原反应、甲基转移反应、二氧化碳固定反应以及辅酶A参与的反应等^[1]。由于硫醇是生物体内的重要活性物种，体液（血液和尿液等）和组织中硫醇的浓度变化与许多疾病有着直接的联系，因而实时准确地检测细胞中硫醇的含量，在生物学、医学和药理学上都有重大意义。

1.2 生命体系中硫醇的存在形式

目前生物体内还原性物质研究的最多的是硫醇，其在细胞抗氧化系统中发挥着重要作用。他们在生物体内以小分子硫醇（非蛋白硫醇 NP-SH）、含硫醇蛋白质（蛋白硫醇 P-SH）和二硫化物三种形式存在^[2]。小分子硫醇包括半胱氨酸（Cys）、谷胱甘肽（GSH）、同型半胱氨酸（HCys）、半胱氨酰甘氨酸（Cys-Gly）、谷氨酰半胱氨酸（ γ -Glu-Cys）和 N-乙酰半胱氨酸（NAC）等（图 1-1）。含硫醇蛋白质是含半胱氨酸残基的蛋白质如金属硫蛋白，还氧硫蛋白等，据报道^[3]，有 96.6%的蛋白质含有半胱氨酸残基。二硫化物包括(NP-S-S-NP, P-S-S-P 和 NP-S-S-P)。



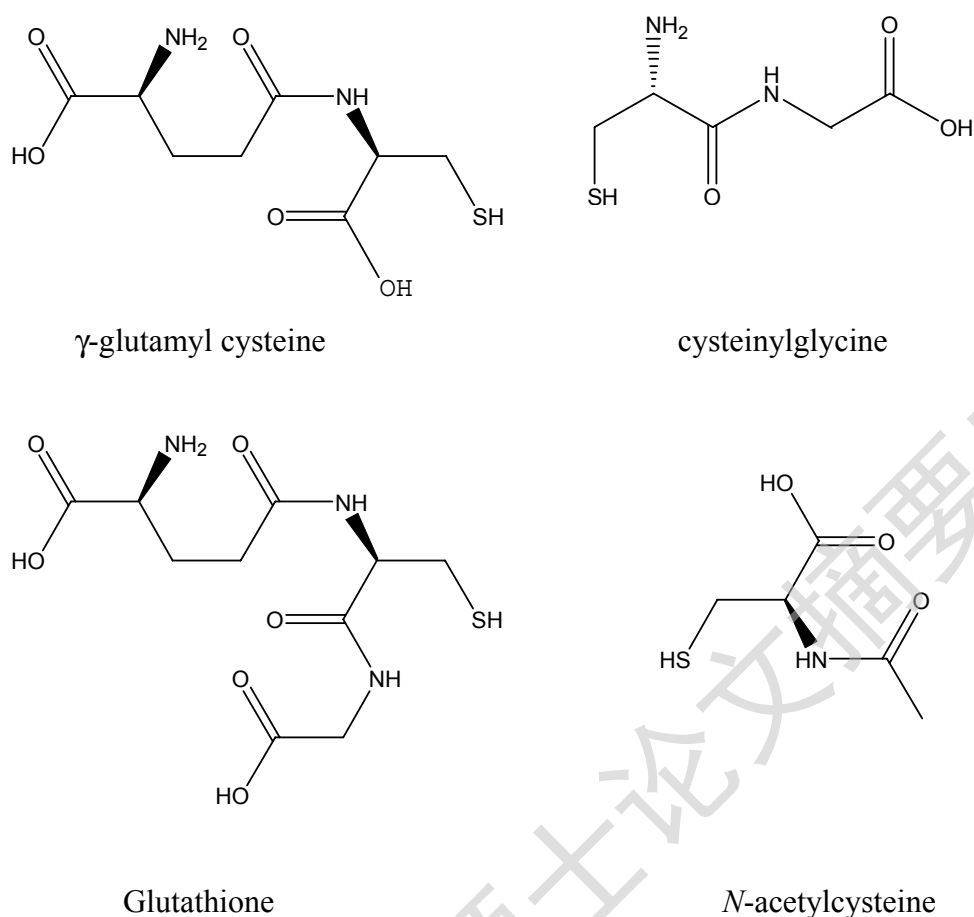


图1-1 常见小分子硫醇的化学结构示意图

Fig. 1-1 Chemical structures of non-protein thiols

1.3 小分子硫醇

细胞内小分子硫醇（包括谷胱甘肽、半胱氨酸和同型半胱氨酸等）在维持生命体系的氧化还原动态平衡方面起着重要的作用，它们是通过在还原态(RSH)和氧化态(RSSR)之间维持一个等势点而建立的动态平衡^[4]。硫醇是与酶活性有关的最具有反应性的官能团，并且在酶代谢过程中起着重要的作用。体内某些硫醇水平的高低与许多疾病密切相关，如癌症、老年痴呆症和心血管疾病等。

1.3.1 还原型谷胱甘肽

谷胱甘肽是细胞内含量最高的非蛋白硫醇，是由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶连续催化合成的一种低分子量的非蛋白巯基化合物，分为还原型

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库