

光谱检测新技术应用研究—I. 吸光标记染料的测定

王冬媛, 赵一兵, 孙旭峰, 郭祥群, 许金钧

(厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 将所提出的光谱检测新技术应用于染料标记蛋白质的分析测定, 所得光谱图形与吸收光谱相似, 检测限比相应的分光光度法测定降低 1 个数量级, 并利用等摩尔连续变化法和摩尔比法测定了染料与蛋白质的配位比。

关键词: 光谱检测新技术; 吸光染料

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

吸光染料, 如甲基橙、孔雀石绿、偶氮胂 III、二甲酚橙等常用于标记生物大分子, 并定量测定生物大分子和获取相关的结构信息, 广泛应用于生化和临床分析中^[1-5]。但是, 上述分析采用紫外-可见吸收光谱法进行检测, 灵敏度还远不能满足现代生命科学的要求。基于此, 我们把在前期工作^[6]中建立的光谱检测新技术应用于标记染料的分析, 建立了相应的分析检测新方法。

1 实验方法

在 10 mL 比色管中加入 pH 缓冲溶液、染料溶液, 以水定容, 放置一定时间, 以缓冲液为参比, 在荧光分光光度计上放置相应的测定附件, 测定信号 S 。根据理论推导式:

$$S'(\lambda) = kS(\lambda) = 2.303kI_0\epsilon(\lambda)bc$$

即可得到相应的光谱图, 并进行定量测定。式中, S' 为归一化后的信号值, S 为未经归一化的信号值, ϵ 为摩尔吸光系数, k 为归一化系数, b 为光程, C 为浓度。其中 S' 、 S 、 ϵ 为波长的函数。

2 染料分子的测定

考察了本法测定常见的吸光染料如甲基橙、孔雀石绿、偶氮胂 III、二甲酚橙、溴甲酚绿等的介质条件、pH 范围和峰值波长, 获得测定的最佳条件。在最佳实验条件下利用该方法绘制不同染料的光谱图, 并与其紫外-可见吸收光谱图进行比较。结果表明, 二者光谱形状基本一致, 只是信号值相差 1000 倍左右。

实验在最佳条件下进行染料的定量测定, 并与分光光度法测定同浓度染料的结果进行比

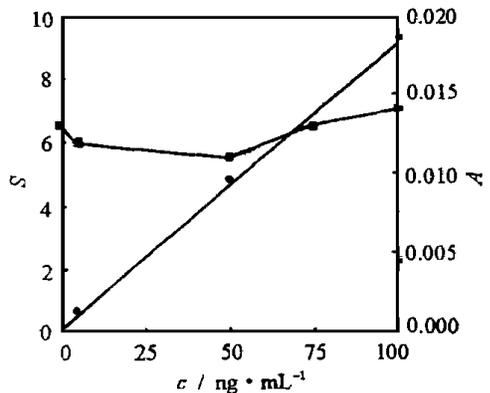


图 1 信号 (S 或 A) 和浓度相互关系
(● 本法; ■ 分光光度法)

收稿日期: 1999-06-15

作者简介: 王冬媛 (1973-), 女, 博士。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29745002)

较。图 1 给出了利用本法测定孔雀石绿的 $S \sim C$ 关系曲线和利用分光光度法测定孔雀石绿的吸光度 $A \sim C$ 关系曲线。可以看出, 对低浓度染料溶液, 分光光度法已无法测定, 而利用本技术能准确测定相同浓度的染料溶液且具有较好的线性关系。对甲基橙、偶氮肿 III、二甲酚橙、溴甲酚绿等的测定得到同样的结果。表 1 给出了甲基橙、孔雀石绿、偶氮肿 III、二甲酚橙、溴甲酚绿的分析结果, 结果表明, 本法测定染料溶液较分光光度法具有较大的线性范围, 且检测限比相应的分光光度法测定降低 1 个数量级左右。

表 1 本法和分光光度法测定燃料的结果比较

染料	测定方法	线性范围 / $g \cdot L^{-1}$	相对偏差	检测限 / $g \cdot L^{-1}$
甲基橙	分光光度法	$2.0 \times 10^{-4} \sim 2.0 \times 10^{-2}$	0.997	2.0×10^{-4}
	本法	$2.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	0.998	9×10^{-6}
孔雀石绿	分光光度法	$2.0 \times 10^{-4} \sim 2.0 \times 10^{-2}$	0.993	2.0×10^{-4}
	本法	$2.0 \times 10^{-5} \sim 2.0 \times 10^{-2}$	0.993	1.2×10^{-5}
偶氮肿 III	分光光度法	$5.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	0.998	5.0×10^{-4}
	本法	$2.5 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	0.997	1.6×10^{-5}
二甲酚橙	分光光度法	$2.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \times 10^{-2}$	0.998	2.0×10^{-3}
	本法	$2.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	0.997	8×10^{-5}
溴甲酚绿	分光光度法	$4.0 \times 10^{-4} \sim 8.0 \times 10^{-3}$	0.997	4.0×10^{-4}
	本法	$2.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-3}$	0.995	9×10^{-6}

参考文献:

- [1] Ma C Q, Li K A, Tong S Y. Anal Lett, 1997, 30 (4): 739
- [2] Congdon R W, Muth G W, Splitterber A G. Anal Biochem, 1993, 213: 407.
- [3] Peasavento M, Profumo A. Talanta, 1991, 38: 1099
- [4] Wei Y J, Li K A, Tong S Y. Talanta, 1996, 43 (1): 1
- [5] 魏永巨, 李克安, 童沈阳. 高等学校化学学报, 1996, 17 (11): 1687.
- [6] ZHAO Yi-bing, WANG Dong-yuan, GUO Xiang-qun, et al. Science in China (Series B), 1998, 41 (3): 239 ~ 246

Study on the Application of Novel Spectrometric Technique— I . Determination of Labeling Dyes

WANG Dong-yuan, ZHAO Yi-bing, SUN Xu-feng, GUO Xiang-qun, XU Jin-gou

(Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

Abstract: The novel spectrometric technique proposed applied to study labeling dyes. The spectral profiles gained by this technique were all similar to the corresponding UV-Vis absorption spectra, and the detection limits of dyes by this method were 10 times lower than those by spectrophotometry.

Keywords: spectrometric technique; dyes