

基于荧光探针对食物中半胱氨酸的检测方法建立

韩蕊, 吴琼, 赵昕, 毛淑红

Establishment of Cysteine Detection Method in Food Based on Fluorescent Probe

HAN Rui, WU Qiong, ZHAO Xin, and MAO Shuhong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021060066>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

粘菌素功能化的 Fe_3O_4 -GQDs作为荧光探针用于快速检测大肠杆菌

Colistin-functionalized Fe_3O_4 -GQDs as a Fluorescent Probe for Rapid Detection of *Escherichia coli*

食品工业科技. 2021, 42(11): 9-14

半胱氨酸处理对采后金针菇品质和抗氧化活性的影响

Effects of Cysteine Treatment on the Quality and Antioxidant Activity in Postharvest *Flammulina velutipes*

食品工业科技. 2021, 42(16): 303-310

色氨酸在Nafion-聚半胱氨酸修饰电极上的电化学行为及分析测定

Electrochemical behavior and determination of tryptophan at the nafion and L-cysteine modified electrode

食品工业科技. 2018, 39(12): 267-270,283

基于适配体的荧光纳米探针在食品安全检测中的研究进展

Research progress of fluorescent nano probe based on aptamer in food safety detection

食品工业科技. 2017(10): 395-399

分子印迹荧光纳米探针在食品安全检测中的研究进展

Research progress of fluorescent molecularly imprinted nano probe in food safety and detection

食品工业科技. 2017(01): 369-374

功能化纳米金修饰电极检测食品中 H_2O_2 的残留量

Determination of H_2O_2 Residue in Food by Functionalized Gold Nanommodified Electrode

食品工业科技. 2020, 41(20): 212-217



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

韩蕊, 吴琼, 赵昕, 等. 基于荧光探针对食物中半胱氨酸的检测方法建立 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 305-311. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060066

HAN Rui, WU Qiong, ZHAO Xin, et al. Establishment of Cysteine Detection Method in Food Based on Fluorescent Probe[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 305-311. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060066

· 分析检测 ·

基于荧光探针对食物中半胱氨酸的检测方法建立

韩蕊, 吴琼, 赵昕, 毛淑红*

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要:为建立食品中半胱氨酸简便、灵敏的测定方法, 利用荧光光度法建立了基于 Rosamine 荧光探针的半胱氨酸检测体系。该探针以 Rosamine 为信号报告单元、以苯乙炔基为反应位点, 可通过迈克尔 (Michael) 加成反应和分子内环化反应实现对半胱氨酸选择性检测。结果表明, 在磷酸缓冲液浓度为 10 mmol/L, pH9.5, 甲醇/水体积比为 1:9, 室温反应 35 min 条件下, 探针选择性识别半胱氨酸, 其相对荧光强度随半胱氨酸浓度增大而增强。半胱氨酸在 18.0~70.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内与该探针响应呈现较好的线性关系 ($R^2=0.992$), 检出限为 0.18 $\mu\text{mol/L}$ ($S/N=3$)。将该方法用于水、牛奶、奶粉、白菜、苹果、梨及萝卜中检测半胱氨酸, 加标回收率为 96.4%~102.97%, 相对标准偏差为 0.1%~2%。该方法简便、灵敏度高、选择性好, 可用于实际样品中半胱氨酸的测定, 具有较好应用前景。

关键词: Rosamine, 半胱氨酸, 苯乙炔, 荧光探针, Michael 加成

中图分类号: O652.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)04-0305-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060066



本文网刊:

Establishment of Cysteine Detection Method in Food Based on Fluorescent Probe

HAN Rui, WU Qiong, ZHAO Xin, MAO Shuhong*

(School of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A novel, simple and sensitive fluorescence method for determination of cysteine in water, milk, milk powder, cabbage, apple, pear and radish was established based on rosamine fluorescent probe. The probe was constructed by rosamine as the signal reporter and phenylalkynyl as the reaction site. Through Michael addition and intramolecular reaction, the probe could detect cysteine with high selectivity and sensitivity. Results indicated that under the optimized conditions of phosphoric acid buffer concentration of 10 mmol/L, pH9.5, methanol/water volume ratio of 1:9 and room temperature reaction for 35 min, the probe selectively recognized cysteine, and its relative fluorescence intensity increased with the increasing of cysteine concentration. Furthermore, the fluorescence signal of the probe had a good linear relationship with cysteine in the concentration range from 18.0 to 70.0 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2=0.992$) with detection limit of 0.18 $\mu\text{mol/L}$. Furthermore, the method was used to determine cysteine in water, milk, milk powder, cabbage, apple, pear and radish with good recoveries (96.4%~102.97%) and RSD (0.1%~2%). This suggested that the approach would have high selectivity, sensitivity and the feasibility of cysteine detection in practical sample, as well as a good application prospect.

Key words: rosamine; cysteine; phenylacetylene; fluorescent probe; Michael addition

收稿日期: 2021-06-08

基金项目: 国家自然科学基金 (21878233); 天津市大学生创新训练计划项目 (202010057090)。

作者简介: 韩蕊 (1997-), 女, 本科, 研究方向: 食品分析与检测, E-mail: 415520866@qq.com。

* 通信作者: 毛淑红 (1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物与生化药学, E-mail: shuhongmao@126.com。

半胱氨酸(Cysteine, Cys)是一种天然存在于水果、蔬菜及谷物中的半必需氨基酸^[1],具有较强还原亲和能力、抗氧化性和对重金属离子解毒等优良性能,广泛应用于食品、医药等多种领域^[2]。此外,Cys在生物体清除自由基、保护酶和蛋白质等重要生命活性物质以及在生命体生化防御体系中起着至关重要的作用^[3]。因此,Cys的专一性检测引起了人们广泛关注。目前,Cys检测方法主要包括高效液相色谱法、毛细管电泳法、质谱法、红外光谱法等,大多需要繁琐样品预处理、昂贵仪器,甚至不能区分检测Cys。荧光探针检测技术具有高选择性和高灵敏度,且操作简单,是检测Cys的有效方法。基于特定反应构建的用于Cys检测荧光探针已有报道^[4-8]。高胱氨酸(Hcy)和谷胱甘肽(GSH)具有与Cys类似结构和反应活性,往往会干扰荧光探针对于Cys特异性识别^[5,9-16]。此外,当前已报道Cys荧光探针多用于生物成像分析^[6,11,17-19],用于食品中Cys检测研究鲜见报道。

Rosamine是一类光化学性能优良荧光染料,已用于生理活动中具有重要意义的生命活性物质(如 H_2O_2 、 H_2S 及 Cu^{2+} 等)识别与传感研究及生物成像分析^[20-22]。但Rosamine类化合物用于Cys荧光探针构建及识别与传感性能研究鲜见报道。本研究基于Rosamine结构特征,在其9位引入能与Cys作用的苯炔基反应位点,构建了具有高选择性、高灵敏性的Rosamine新型荧光探针,揭示其识别与传感机理,并将其应用于水、牛奶、奶粉、白菜、苹果、梨及萝卜中Cys检测。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苯乙炔、双三苯基膦氯化钨、4-溴苯甲醛、3-二乙氨基酚、碘化亚铜 分析纯,北京百灵威科技有限公司;L-丙氨酸(L-Alanine, Ala)、L-丝氨酸(L-Serine, Ser)、L-天冬氨酸(L-Aspartate, Asp)、L-缬氨酸(L-Valine, Val)、L-半胱氨酸(L-Cysteine, Cys)、L-赖氨酸(L-Lysine, Lys)、L-甘氨酸(L-Glycine, Gly)、L-组氨酸(L-Histidine, His)、L-色氨酸(L-Tryptophane, Try)、L-亮氨酸(L-Leucine, Leu)、L-酪氨酸(L-Tyrosine, Tyr)、L-苏氨酸(L-Threonine, Thr)、L-苯丙氨酸(L-Phenylalanine, Phe)、L-甲硫氨酸(L-Methionine, Met)、L-精氨酸(L-Arginine, Arg)、L-异亮氨酸(L-isoleucine, Ile)、D,L-谷胱甘肽(D,L-Glutathione, Glu)、D,L-高半胱氨酸(D,L-Homocysteine, Hcy)、L-脯氨酸(L-Proline, Pro)、L-谷氨酸(L-Glutamate, Glu) 分析纯,上海源叶生物科技有限公司;氯化钠、醋酸钠、硫化钠、乙酸乙酯、石油醚、二氯甲烷、四氯苯醌 分析纯,天津化学试剂六厂;甲醇 光谱纯,天津基准化学试剂有限公司;光谱表征中所用水均为去离子水,经实验室纯化制备;

自来水 取自本地供水管网;矿泉水(瓶装,500 mL) 购自本地超市。

FS5 荧光分光光度计 Edinbrough 公司;Tu-1810 PC 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;Bruker AV 400 核磁共振波谱仪 Bruker 公司;PHS-3C pH 酸度计 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 探针制备及表征 氩气保护下,将4-溴苯甲醛(6.3 mmol, 0.9 g)、 $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (0.32 mmol, 0.224 g)、CuI(0.63 mmol, 0.95 g)和三乙胺(12 mL)置于三口瓶中,用适量无水DMF溶解,冰水浴搅拌30 min。将含有苯乙炔(6.3 mmol, 1.3 g)无水DMF滴加入反应体系,室温搅拌过夜。将反应体系倾入水中,乙酸乙酯萃取,用饱和 NH_4Cl 及NaCl洗涤有机相,无水硫酸钠干燥。经减压除去乙酸乙酯后,用硅胶色谱柱进行纯化,洗脱剂为乙酸乙酯:石油醚(v/v, 1:60),得白色固体粉末,为中间体1^[23-24],产率为72.5%。

1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$): δ 10.02 (s, 1H), 7.86 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.56 (m, 2H), 7.37 (m, 3H)。

氩气保护下,取化合物1(3.4 mmol, 0.72 g)、3-二乙氨基酚(8 mmol, 1.322 g)和对甲苯磺酸(1 mmol, 0.2 g)于三口瓶中,用70 mL丙酸溶解后,加热至65 $^{\circ}C$,反应过夜。降至室温,向反应体系加入3 mol/L醋酸钠溶液,用二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥。减压蒸除溶剂后,加入100 mL二氯甲烷/甲醇(v/v=1:1)的混合液,加入四氯苯醌(3.4 mmol, 0.836 g),室温搅拌3 h。经硅胶色谱柱进行纯化得紫红色固体粉末,经表征为探针R^[25],产率为32.8%。在避光条件下,该探针可稳定存在于空气中。

1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.77 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.59 (m, 2H), 7.39 (m, 6H), 7.28 (s, 1H), 6.95 (d, $J=12.0$ Hz, 2H), 6.86 (s, 1H), 3.67 (q, $J=8.0$ Hz, 8H), 1.34 (t, $J=8.0$ Hz, 12H)。ESI-MS: 499.2756 ($[M-Cl]^-$)。

1.2.2 荧光探针R检测Cys条件优化

1.2.2.1 溶液制备 探针R标准溶液:准确称取0.01070 g探针R用去离子水溶于50 mL容量瓶中,定容,配成 4×10^{-4} mol/L母液,操作液为 1×10^{-5} mol/L。氨基酸及硫化钠标准溶液:准确称取适量相关试剂(精确至 ± 0.0001 g),用水定容,配成 4×10^{-3} mol/L储备液。PBS溶液:100 mmol/L。磷酸缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS):pH3~12(pH计测定)。

1.2.2.2 pH对探针R与Cys相互作用的影响 向含有0.4 mL甲醇样品管中加入0.4 mL不同pH的PBS缓冲溶液、0.1 mL 4×10^{-4} mol/L探针R、0.1 mL 4×10^{-3} mol/L Cys及3.0 mL去离子水,平衡35 min,进行光谱测试。考察pH变化引发的测试体系相对荧光强度变化。本文中荧光光谱测试条件均为:激发

波长为 565 nm, 入射狭缝 10 nm, 出射狭缝 10 nm。

1.2.2.3 响应时间对探针 R 与 Cys 相互作用的影响

向含有 0.4 mL 甲醇样品管中加入 0.4 mL PBS 缓冲溶液(pH9.5)、0.1 mL 4×10^{-4} mol/L 探针 R、0.1 mL 4×10^{-3} mol/L Cys 及 3.0 mL 去离子水, 每隔 5 min, 测试样品相对荧光强度。考察响应时间对测试体系相对荧光强度影响。

1.2.2.4 荧光滴定

向含有 0.4 mL 甲醇样品管中加入 0.4 mL PBS 缓冲溶液(pH9.5)、0.1 mL 4×10^{-4} mol/L 探针 R, 不同体积的 4×10^{-3} mol/L Cys 和适量去离子水, 得 4.0 mL 样品, 平衡 35 min, 进行光谱测试。绘制 Cys 浓度引起探针 R 荧光相对强度 (F/F_0) 与 Cys 浓度关系曲线。据此, 得到 Cys 检测线性关系方程式。根据检出限计算公式: $DL=3\sigma/slop$ [25], 计算 Cys 检出限。

1.2.2.5 选择性实验和抗干扰实验

向含有 0.4 mL 甲醇、0.4 mL PBS 缓冲溶液 (pH9.5) 及 0.1 mL 4×10^{-4} mol/L 探针 R 试管中, 分别加入 0.1 mL 4×10^{-3} mol/L 不同氨基酸及 3.0 mL 去离子水, 检测体系荧光强度变化, 探讨不同氨基酸对探针 R 相对荧光强度变化影响。

向含 0.4 mL 甲醇、0.4 mL PBS 缓冲溶液(pH9.5)、0.1 mL 4×10^{-4} mol/L 探针 R 及 0.1 mL 4×10^{-3} mol/L Cys 和 2.0 mL 去离子水的试管中, 分别加入 1.0 mL 其它氨基酸(4×10^{-3} mol/L), 测试其荧光强度, 评价探针抗干扰性能。

1.2.2.6 重复性、稳定性及重现性实验

配制探针 R 甲醇/水体系(1×10^{-5} mol/L, v/v, 1:9; pH9.5), 用荧光分光光度计连续检测其荧光强度; 平行配制 10 个含相同浓度 Cys (5×10^{-5} mol/L) 和探针 R (1×10^{-5} mol/L) 甲醇/水体系 (v/v, 1:9; pH9.5), 分别测试其荧光强度, 据此确定方法的精密度、稳定性和重现性。

1.2.2.7 加标回收实验

矿泉水与自来水均未处理, 直接检测。巴氏杀菌的全脂牛奶(240 mL, 纸盒包装)和高钙奶粉(一袋 400 g, 内装 16 小袋, 25 g/袋), 购自本地超市, 检测前未过保质期。奶粉: 准确称取 1.0000 g 奶粉, 用 59.0000 g 去离子水溶解, 摇匀, 备用。牛奶: 准确称取 1.0000 g 牛奶, 加入 59.0000 g 去离子水, 摇匀, 备用。称取 5.0000 g 白菜、苹果、梨、白萝卜后, 榨取汁液后, 直接用于检测。

向含有 1.00 mL 甲醇、1.00 mL PBS 缓冲溶液 (100 mmol/L, pH9.5)、0.2500 g 样品(矿泉水、自来水、牛奶或奶粉)的 10.00 mL 容量瓶中, 分别加入适量 Cys 标准储备液, 使其折合成容量瓶中 Cys 浓度分别为 0、20.0、40.0、60.0 $\mu\text{mol/L}$, 加入 1.00 mL 4×10^{-4} mol/L 探针 R, 最后用去离子水定容至刻度, 平衡 35 min 后进行荧光测试。每个加标浓度平行配制 5 个样, 根据 Cys 检测线性方程式, 确定 Cys 浓度, 计算相对标准偏差及回收率。

向含有 1.00 mL 甲醇、1.00 mL PBS 缓冲溶液 (100 mmol/L, pH9.5)、2.5000 g 样品(白菜、苹果、梨或白萝卜)的 10.00 mL 容量瓶中, 分别加入适量 Cys 标准储备液, 加入 1.00 mL 4×10^{-4} mol/L 探针 R, 最后用去离子水定容至刻度, 平衡 35 min 后进行荧光测试。每个加标浓度平行配制 5 个样, 根据 Cys 检测线性方程式, 确定 Cys 浓度, 计算相对标准偏差及回收率。

1.3 数据处理

通过 Origin2015 对实验数据进行分析并作图, 每个实验至少重复测量 3 次, 取平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 探针 R 对 Cys 选择性识别

对特定底物高选择性识别是探针优良性能之一[2,9], 因此, 首先考察了探针 R(其结构如图 1 所示)对 Cys 的选择性识别。如图 2 所示, 在甲醇/水体系中 (v/v, 1:9; pH9.5, PBS 10 mmol/L), 探针 R ($10 \mu\text{mol/L}$) 最大发射峰为 589 nm, 当向其体系中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ Cys 时, 探针 R 荧光光谱明显增强, 同时, 其最大发射峰蓝移至 583 nm; 100 $\mu\text{mol/L}$ GSH 和 Hcy 引起探针荧光增强, 但变化较小; 而其它氨基酸和 H_2S 加入几乎不能引起探针 R 明显的荧光变化。为进一步证实探针 R 对 Cys 选择性识别, 研究了 Cys 和其它氨基酸及 H_2S 共存时, R-Cys 荧光变化。如图 3 所示, 当其它底物与 Cys 共存时, 对测试体系相对荧光强度无显著影响 ($P>0.05$)。实验结果表明, 探针 R 可特异性识别 Cys。

2.2 探针 R 与 Cys 相互作用最佳 pH 及响应时间

pH 对主客体相互作用起到至关重要作用[10], 如图 4 所示, 酸性条件下, 随 pH 增大, F/F_0 缓慢增强; 碱性条件下, 荧光强度明显增强, pH9.5 时达到最大

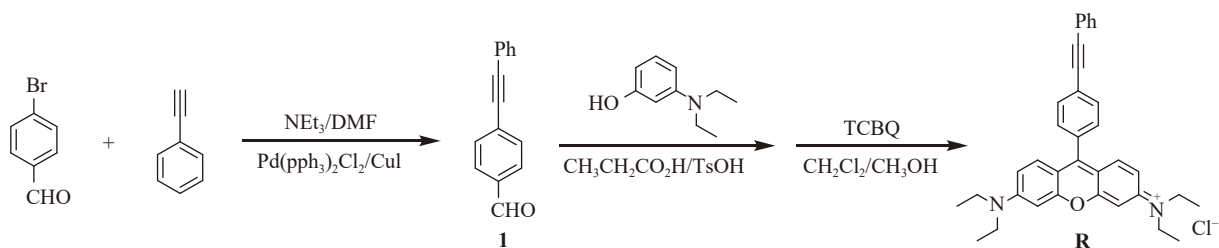


图 1 探针 R 的合成

Fig.1 Synthesis route of probe R

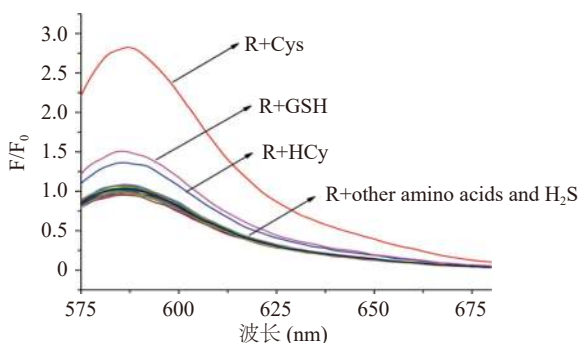


图2 探针 R 对氨基酸及 H₂S 在甲醇/水体系中的响应
Fig.2 Response of probe R to amino acids and H₂S in the MeOH/H₂O

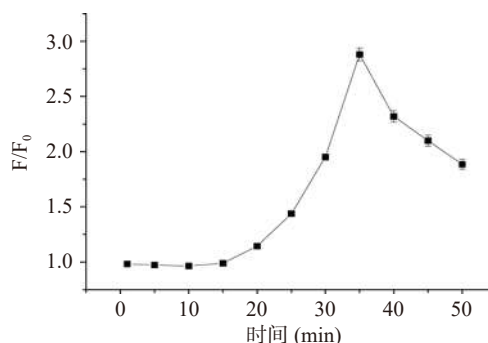


图5 响应时间对探针 R 与 Cys 相互作用影响
Fig.5 Effect of response time on the interaction between R and Cys

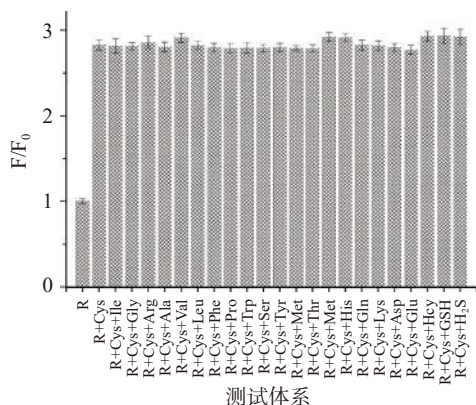


图3 氨基酸与 H₂S 对探针 R-Cys 体系荧光的影响
Fig.3 Influence of amino acids and H₂S on the R-Cys system

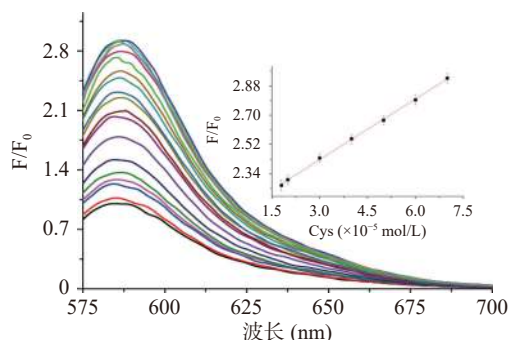


图6 不同浓度 Cys 引起的探针 R 荧光光谱变化及荧光强度比值与 [Cys] 关系

Fig.6 Spectral changes of probe R induced by different [Cys] and the relationship between F/F_0 and [Cys]

注:浓度为 0、16、18、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μmol/L。

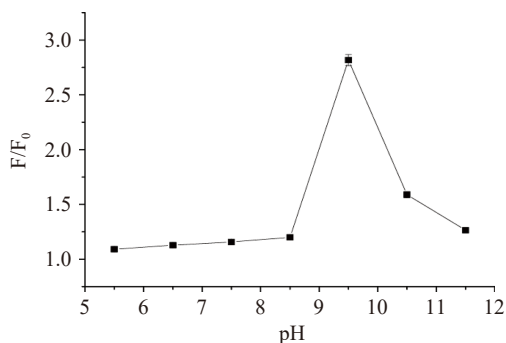


图4 pH 对探针 R 与 Cys 相互作用影响

Fig.4 Effect of pH on the interaction between R and Cys

值。Cys 的 pKa=8.0, 碱性条件有利于 Cys 巯基氢的解离, 便于 Cys 与探针 R 相互作用^[24]。此外, 亦考察了响应时间对主客体相互作用影响。如图 5 所示, 随相互作用时间延长, F/F_0 逐渐增强, 当作用体系达 35 min 时, F/F_0 达到最大值, 之后迅速降低, 可能由于碱性较强破坏了发色团共轭体系所致。

2.3 Cys 检测线性范围及检出限

利用荧光滴定技术研究探针 R 与 Cys 相互作用, 结果如图 6 所示。随着 Cys 浓度增大, 体系荧光强度比值增大, 最大发射峰由 589 nm 蓝移至 583 nm, 表明探针与底物发生 Michael 加成及消除反应。当 Cys 浓度为 70 μmol/L 时, F/F_0 达到最大值, 之后, 继续增大 Cys 浓度, F/F_0 变化不明显, 体系达到平衡。

据此, 绘制了 F/F_0 与 C_{Cys} 关系曲线, Cys 浓度在 18~70 μmol/L 范围内与 F/F_0 呈线性关系, 其线性方程为 $F/F_0=0.01244[Cys]+2.052$ ($R^2=0.992$)。根据检测限计算公式: $DL=3\sigma/slop$ ^[25], 可得出探针 R 对 Cys 检测限为 0.18 μmol/L, 与当前已报道的 Cys 荧光探针检测限^[26-29] 相比, 本研究检测限略低(表 1)。

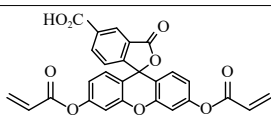
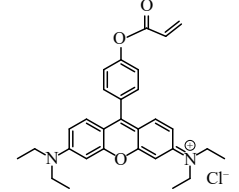
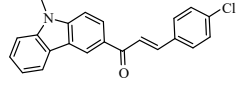
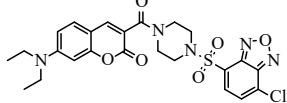
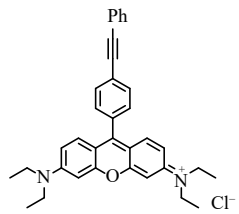
2.4 重复性、重现性和稳定性

用荧光光谱研究了探针重复性、重现性和稳定性。对探针 R(10 μmol/L) 的甲醇/水体系 (v/v, 1: 9; pH9.5) 进行了 10 次重复实验, 荧光强度相对标准偏差为 2.49%, 表明探针重复性良好。通过 1 h 内测定探针 R 对 Cys 荧光响应, 确定探针稳定性探针荧光响应约为探针初始响应的 55%。对 10 个平行配制溶液进行检测, 荧光强度标准偏差为 2.61%, 证实探针具有重现性。

2.5 探针 R 对 Cys 响应机理研究

探针 R 与 Cys 可能作用模式如图 7 所示, Rosamine 骨架具有较强的吸电子能力, 其 9 位上苯炔基具有类似于 α、β 不饱和醛(酮)的较高反应活性^[24], 此类化合物可能和巯基发生 Michael 加成反应。事实上, 基于苯乙炔基^[24] 和苯乙烯基^[30] 为识别位点荧光探针不仅可与 Cys 经 Michael 加成形成硫醇加合物, 还可进一步发生分子内 retro-aza-aldol 反应脱去

表 1 探针 R 半胱氨酸识别性能与其他半胱氨酸荧光探针性能比较
Table 1 Comparison of the designed probe with other published Cys probes

探针结构	线性范围($\mu\text{mol/L}$)	检测限($\mu\text{mol/L}$)	参考文献
	—	0.58	[26]
	6~20	0.29	[27]
	—	1.77	[28]
	30~200	1.4	[29]
	18~70	0.18	本研究

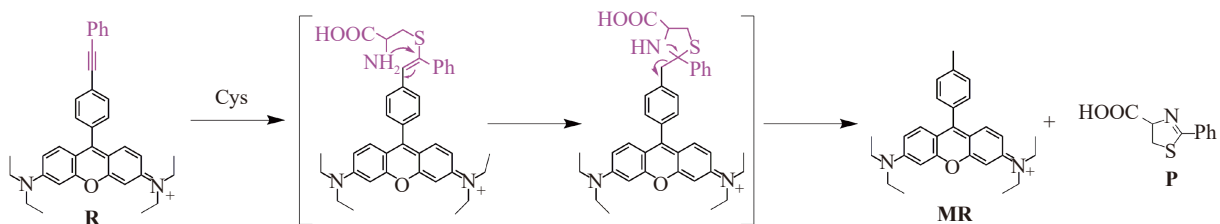


图 7 探针 R 与 Cys 可能作用模式

Fig.7 Possible interaction mode of probe R with Cys

五元环^[24]。探针 R 与 Cys 作用体系经 ESI-MS 研究亦证实了上述反应路径。R-Cys 体系的 ESI-MS 质谱图上存在对应参照物 MR ($[M^+]$) 分子离子峰, 进一步比对 R-Cys 体系与参照物 MR 的荧光光谱, 发现二者一致, 这表明探针 R 与 Cys 反应后生成了 MR 及 P, MR 生成使得荧光增强。具有与 Cys 类似结构的 Hcy 和 GSH 虽可与探针 R 发生 Michael 加成反应, 但因动力学抑制, 之后分子内环化反应非常缓慢^[6,18,24], 不能形成 MR 发射荧光, 不干扰探针 R 对 Cys 选择性识别。

2.6 样品分析

为验证探针 R 对实际样品中 Cys 检测的可行性, 借助线性回归方程, 测定了牛奶、奶粉、矿泉水、自来水样品中 Cys 含量。为判断测定准确度, 向牛奶、奶粉、矿泉水和自来水样中添加适量的 Cys 标准储备液, 测定回收率。如表 2 所示, 矿泉水、自来水、牛奶和奶粉中均未检测到 Cys, 白菜、苹果、梨及

萝卜中 Cys 浓度分别为 4.37、6.56、4.87 和 4.58 $\mu\text{g/kg}$, 此外, 不同样品中 Cys 回收率介于 96.4% 和 102.8% 之间, 相对标准偏差在 0.1%~2% 之间, 表明该检测方法测定水、牛奶、奶粉、白菜、苹果、梨及萝卜中 Cys 具有较好重现性, 可用于实际样品分析。

3 结论

Cys 是重要抗氧化物质, 其在食品中含量受到了人们关注。本研究通过在 Rosamine 荧光团分子骨架引入苯炔基反应位点, 构建新型高灵敏、高选择性 Cys 荧光探针。在 pH9.5 含水体系中, 该探针可通过 Michael 加成及分子内环化反应实现对 Cys 选择性检测。实际样品分析表明, 该探针可用于天然食品中 Cys 选择性测定, 但其结构有待改进, 水溶性有待提高。目前, 基于荧光探针检测天然食品中 Cys 研究甚少, 该结果为构建用于 Cys 检测的高灵敏、高选择的基于 Rosamine 新型荧光探针提供新思路、新素材。

表2 实际样品中 Cys 测定结果
Table 2 Determination of Cys in real samples

样品	Cys标准加入量	Cys测定量	回收率(%)	相对标准偏差(%)
矿泉水 ^a	0	ND		
	20.0	19.5±0.3	97.5	0.8
	40.0	39.3±0.1	98.3	0.2
	60.0	60.7±0.2	101.2	0.1
自来水 ^a	0	ND		
	20.0	19.6±0.2	98.0	0.6
	40.0	38.9±0.3	97.3	0.2
	60.0	58.9±0.3	98.1	0.1
牛奶 ^a	0	ND		
	20.0	20.3±0.2	101.5	0.9
	40.0	38.6±0.1	96.4	0.1
	60.0	61.5±0.4	102.5	0.1
奶粉 ^a	0	ND		
	20.0	20.5±0.4	102.5	0.7
	40.0	40.5±0.3	101.3	0.2
	60.0	61.7±0.1	102.8	0.5
白菜 ^b	0	4.37±0.3		
	2.91	7.48±0.4	102.7	0.6
	13.8	18.3±0.3	100.5	1.0
	19.7	24.3±0.5	100.9	0.8
梨 ^b	0	4.87±0.4		
	2.56	7.47±0.3	100.5	0.9
	12.2	17.3±0.5	101.2	1
	17.3	22.5±0.4	101.5	0.7
苹果 ^b	0	6.56±0.3		
	0.51	7.16±0.3	100.7	1
	6.43	13.2±0.3	101.5	0.8
	11.6	17.9±0.4	98.9	0.5
萝卜 ^b	0	4.58±0.3		
	2.01	6.63±0.3	100.6	1
	8.60	12.9±0.4	97.7	0.8
	18.5	22.6±0.5	97.9	2

注: ^a代表Cys浓度单位为 $\mu\text{mol/L}$; ^b代表Cys浓度为 $\mu\text{g/kg}$; ND代表未在样品中检测出Cys。

参考文献

- [1] ANTON R, BARLOW S, BOSKOU D, et al. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) to review the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU[J]. *The EFSA Journal*, 2005, 263: 1–71.
- [2] CHEN X, ZHOU Y, PENG X, et al. Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(6): 2120–2135.
- [3] WU B, XUE T, HE Y. Design of activatable red-emissive assay for cysteine detection in aqueous medium with aggregation induced emission characteristics[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2021, 32(2): 932–937.
- [4] CHANG Y, QIN H, WANG X, et al. Visible and reversible restrict of molecular configuration by copper ion and pyrophosphate[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(8): 2438–2447.
- [5] YANG M, FAN J, DU J, et al. Small-molecule fluorescent probes for imaging gaseous signaling molecules: Current progress and future implications[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(20): 5127–5141.
- [6] REN H, HUO F, ZHANG Y, et al. An NIR ESPT-based fluorescent probe with large Stokes shift for specific detection of Cys and its bioimaging in cells and mice[J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2020, 319: 128248.
- [7] QIAN M, XIA J, ZHANG L, et al. Rationally modifying the dicyanoisophorone fluorophore for sensing cysteine in living cells and mice[J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2020, 321: 128441.
- [8] LI Y, HE X, HUANG Y, et al. Development of a water-soluble near-infrared fluorescent probe for endogenous cysteine imaging[J]. *Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 226: 117544.
- [9] JUNG H S, CHEN X, KIM J S, et al. Recent progress in luminescent and colorimetric chemosensors for detection of thiols[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(14): 6019–6031.
- [10] YIN C X, XIONG K M, HUO F J, et al. Fluorescent probes with multiple binding sites for the discrimination of Cys, Hcy, and GSH[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(43): 13188–13198.
- [11] GUO B, PAN X, LIU Y, et al. A reversible water-soluble

- naphthalimide-based chemosensor for imaging of cellular copper(II) ion and cysteine[J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2018, 256: 632–638.
- [12] ZHANG Y, YAO W, LIANG D, et al. Selective detection and quantification of tryptophan and cysteine with pyrenedione as a turn-on fluorescent probe[J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2018, 259: 768–774.
- [13] SHARMA P, KUMAR K, KAUR S, et al. Near-IR discriminative detection of H₂S and cysteine with 7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole-peryleneimide conjugate in water, live cells and solid state: mimicking IMP, INH and NOR/OR complimentary logic[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry*, 2020, 388: 112151.
- [14] DAI C G, LIU X L, DU X J, et al. Two-input fluorescent probe for thiols and hydrogen sulfide chemosensing and live cell imaging[J]. *ACS Sensors*, 2016, 1(7): 888–895.
- [15] XUE H, YU M, HE K, et al. A novel colorimetric and fluorometric probe for biothiols based on MnO₂ NFs-Rhodamine B system[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1127: 39–48.
- [16] ZHANG H, LI W, CHEN J, et al. Simultaneous detection of Cys/Hcy and H₂S through distinct fluorescence channels[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1097: 238–244.
- [17] WANG J, LI B, ZHAO W, et al. Two-photon near infrared fluorescent turn-on probe toward cysteine and its imaging applications[J]. *ACS Sensors*, 2016, 1(7): 882–887.
- [18] ZHAO X, JI H, HASRAT K, et al. A mitochondria-targeted single fluorescence probe for separately and continuously visualizing H₂S and Cys with multi-response signals[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1107: 172–182.
- [19] DAI Y, ZHENG Y, XUE T, et al. A novel fluorescent probe for rapidly detection cysteine in cystinuria urine, living cancer/normal cells and BALB/c nude mice[J]. *Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 225: 117490.
- [20] CARDOSO I C S, AMORIM A L, QUEIRÓS C, et al. Microwave-assisted synthesis and spectroscopic properties of 4'-substituted rosamine fluorophores and naphthyl analogues[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012, 2012(29): 5810–5817.
- [21] CHENG J, SONG J, NIU H, et al. A new rosamine-based fluorescent chemodosimeter for hydrogen sulfide and its bioimaging in live cells[J]. *New Journal Chemistry*, 2016, 40(7): 6384–6388.
- [22] YANG L, NIU J Y, SUN R, et al. Rosamine with pyronine-pyridinium skeleton: unique mitochondrial targetable structure for fluorescent probes[J]. *Analyst*, 2018, 143(8): 1813–1819.
- [23] LEEN V, YUAN P, WANG L, et al. Synthesis of meso-halogenated BODIPYs and access to meso-substituted analogues[J]. *Organic Letters*, 2012, 14(24): 6150–6153.
- [24] LIU Y, LV X, HOU M, et al. Selective fluorescence detection of cysteine over homocysteine and glutathione based on a cysteine-triggered dual michael addition/retro-aza-aldol cascade reaction[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(22): 11475–11483.
- [25] YANG L, NIU J Y, SUN R, et al. The pH-influenced PET processes between pyronine and different heterocycles[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2017, 15(30): 8402–8409.
- [26] CHEN T, PEI X, YUE Y, et al. An enhanced fluorescence sensor for specific detection Cys over Hcy/GSH and its bioimaging in living cells[J]. *Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 209: 223–237.
- [27] LIU K, GU H, SUN Y, et al. A novel rosamine-based fluorescent probe for the rapid and selective detection of cysteine in BSA, water, milk, cabbage, radish, apple, and pea[J]. *Food Chemistry*, 2021, 356: 129658.
- [28] SONG H, ZHANG J, WANG X, et al. A novel “turn-on” fluorescent probe with a large stokes shift for homocysteine and cysteine: Performance in living cells and zebrafish[J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2018, 259: 232–240.
- [29] HE L, YANG X, XU K, et al. Improved aromatic substitution–rearrangement-based ratiometric fluorescent cysteine-specific probe and its application of real-time imaging under oxidative stress in living zebrafish[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(17): 9567–9573.
- [30] ARROYO I J, HU R, TANG B Z, et al. 8-Alkenyl-borondipyrromethene dyes. general synthesis, optical properties, and preliminary study of their reactivity[J]. *Tetrahedron*, 2011, 67(38): 7244–7250.