

## 基于异氟尔酮的 L-精氨酸探针光谱性能研究

张 玉<sup>1</sup>, 顾峰焯<sup>2</sup>, 徐洪耀<sup>2\*</sup>, 光善仪<sup>1\*</sup>

1. 东华大学化学化工与生物工程学院和生态纺织教育部重点实验室, 上海 201620
2. 东华大学分析测试中心与材料学院和纤维改性国家重点实验室, 上海 201620

**摘 要** L-精氨酸(L-Arginine, L-Arg)是蛋白质的重要组成部分,也是人类某些疾病的重要诊断标准之一, L-Arg 的浓度变化可能会导致许多疾病的问题,因此如何高效且灵敏地检测 L-Arg 极其重要。目前,对 L-Arg 的研究大多数是利用其作为 NO(一氧化氮)的前体,来预防或缓解某些疾病的产生,对于 L-Arg 的定性检测并不多,而利用质子转移形成络合物/加成物的方式检测 L-Arg 更是少之又少。基于异氟尔酮设计并合成了一种含有丙二腈以及 2,4-二羟基苯甲醛的比色探针(ISO-CN-OH),该探针可以用于快速检测 L-Arg。通过紫外吸收光谱研究发现,当向探针 ISO-CN-OH 溶液中加入 L-Arg 后,其紫外吸收光谱在 669 nm 处的吸收峰急剧增强,且溶液的颜色由橙黄色变为墨绿色,而其他氨基酸的加入不产生吸收峰以及溶液颜色的变化。通过对探针 ISO-CN-OH 进行抗干扰性实验,表明探针 ISO-CN-OH 对 L-Arg 具有专一选择性及良好的抗干扰能力。通过对 L-Arg 进行光谱滴定研究,实验结果表明在  $1.0 \sim 10.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度范围内,具有良好的线性关系( $R^2=0.997$ ),线性归方程式为  $y=0.020x+0.073$ ,根据  $DL=3\sigma/K$  可计算出 ISO-CN-OH 的检出限为  $8.5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,这表明探针 ISO-CN-OH 具有高灵敏性。通过固定探针 ISO-CN-OH 与 L-Arg 的总浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,改变 L-Arg 占总浓度的比例,根据其吸收光谱的 Job's plot 滴定曲线分析可知,当 L-Arg 占总浓度比例为 0.67 时,探针 ISO-CN-OH 在 669 nm 处紫外吸收强度达到最大值,这表明探针 ISO-CN-OH 与 L-Arg 以 1:2 的络合比进行配位络合。为了更进一步了解探针 ISO-CN-OH 与 L-Arg 的配位机理,进行了  $^1\text{H-NMR}$  滴定实验,在探针 ISO-CN-OH 的  $\text{DMSO-d}_6$  溶液中分别加入 0, 0.5, 1.0 及 2.0 当量的 L-Arg( $\text{d}_2\text{O}$ ),研究发现加入 L-Arg 后 ISO-CN-OH 的羟基峰消失,且其羟基周围氢质子共振峰的位置明显发生了偏移。该研究结果表明探针 ISO-CN-OH 通过将酸性的酚羟基质子转移到 L-Arg 碱性的胍基 NH 基团上,导致—OH 基团附近形成负电荷,该负电荷与精氨酸的胍基部分络合,从而形成络合物/加成物,使得紫外可见光谱图在 669 nm 处出现新峰,且溶液颜色由橙黄色变为墨绿色。该研究为今后设计检测 L-Arg 探针分子奠定了基础。

**关键词** 异氟尔酮;光谱分析;L-精氨酸;比色探针

**中图分类号:** O643.12 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)11-3607-05

## 引 言

氨基酸是一种含有碱性氨基和酸性羧基的有机化合物,它既是生命体中蛋白质的基本组成部分,同时也是参与生命体的修复和再生的必须物质<sup>[1]</sup>。在 20 种天然氨基酸中,精氨酸(L-Arg)有不可替代的优势,在一端的旁链处存在着高碱性的胍基,其 pKa 高达 12.48,使得其在酸性、中性及碱性条件下均带正电荷<sup>[2-3]</sup>。L-Arg 作为 NO(一氧化氮)的前体,

在动物的生存,繁殖,生长,抗衰老和免疫方面起着重要的作用。越来越多的临床试验表明,在饮食中适当添加 L-Arg 可以减轻体重,降低动脉血压,抵抗氧化并使内皮功能正常化,从而缓解高血压<sup>[4]</sup>,同时也可以促进孕妇在孕期胎盘和胚胎的生长<sup>[5]</sup>。精氨酸在细胞分裂,伤口愈合,免疫系统,激素的释放,尤其是基因调节,糖蛋白靶向和囊泡运输中起着重要作用<sup>[6-7]</sup>。因此,对精氨酸的选择性识别研究是生物化学和医学科学领域的关键课题之一<sup>[8-9]</sup>。

目前,报道检测 L-Arg 的方法有很多但均存在一些缺

收稿日期: 2020-09-15, 修订日期: 2021-01-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(21671037 和 21771036)资助

作者简介: 张 玉,女,1995 年生,东华大学化学化工与生物工程学院硕士研究生 e-mail: 1150119229@qq.com

\* 通讯作者 e-mail: syg@dhu.edu.cn; hongyaouxu@dhu.edu.cn

点,如使用高效液相色谱法(HPLC)<sup>[10]</sup>检测时对 L-Arg 的选择性差,采用电化学<sup>[11]</sup>方法检测时对于精氨酸甲基化蛋白的修饰过程比较复杂,选择离子交换色谱法<sup>[12]</sup>检测时方法条件及仪器均具有较高的要求,利用毛细管电泳<sup>[13]</sup>检测时样品处理过程较为复杂,从而限制了它们在实际生活中的应用。因此,操作简单迅速,高灵敏度以及价格低廉的探针就成了有效检测氨基酸的方法之一。

比色探针作为一种可以通过检测分析物的颜色及吸收光谱变化的检测方法,可以实现对氨基酸定性以及定量的检测分析。因此,基于异氰基设计并合成了可以用于精氨酸(L-Arg)检测的一种新型比色探针 ISO-CN-OH。通过对 ISO-CN-OH 进行光谱性能研究,发现 ISO-CN-OH 对 L-Arg 具有高选择性以及高灵敏性,并通过紫外可见吸收的 Job's plot 曲线及 <sup>1</sup>H-NMR 核磁滴定波谱,详细研究了探针 ISO-

CN-OH 与 L-Arg 的配位机理,并利用配位模型图模拟出 ISO-CN-OH 与 L-Arg 的配位过程。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

上海豫华仪器有限公司 DF-101S 集热式恒温式加热磁力搅拌器;瑞士 Bruker 公司 Bruker AVANCE/DMX600 型核磁共振仪器;美国热电集团 Nicolet 8700 型傅里叶变换红外光谱仪;PerkinElmer UV/Vis Spectrometer Lambda 35。所用药品试剂和溶剂均为市售分析纯。

异氰基-丙二腈(ISO-CN)按照文献[14]的方法合成。

### 1.2 ISO-CN-OH 合成方法

探针 ISO-CN-OH 的合成路线如图 1 所示。

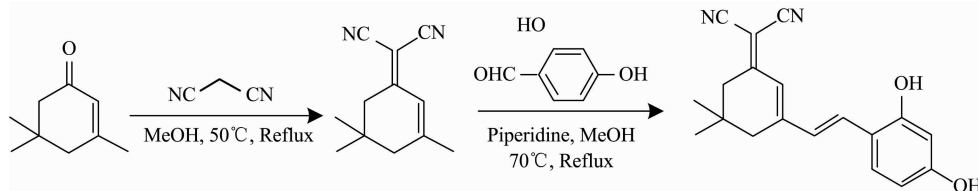


图 1 ISO-CN-OH 合成路线

Fig. 1 Synthetic route of the ISO-CN-OH

将 ISO-CN(372.5 mg, 2 mmol)与 2,4-二羟基苯甲醛(276.2 mg, 2 mmol)溶解在 20 mL 的无水乙醇中,加入 2~3 滴吡啶,将混合物在氮气保护下,70 °C 搅拌回流过夜直至产物点出现(用 TLC 跟踪,展开剂为石油醚/乙酸乙酯, V/V=2:1)。将混合物冷却至室温,旋蒸除去溶剂,将残留物溶于二氯甲烷,多次萃取,经无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥后,旋转蒸发溶剂,通过色谱柱进行收集(石油醚/乙酸乙酯, V/V=20:1),得到红棕色固体粉末 ISO-CN-OH,45 °C 真空烘箱烘干至恒重(产率 71.8%)。结构表征如下:<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.10 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 7.54 (d, J=8.7 Hz, 1H), 7.42 (d, J=16.1 Hz, 1H), 7.14 (d, J=16.1 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.35 (d, J=2.3 Hz, 1H), 6.28 (dd, J=8.6, 2.3 Hz, 1H), 1.23 (s, 6H), 1.01 (s, 4H); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ 170.64, 161.27, 158.59, 157.98, 134.12, 129.46, 125.50, 120.96, 115.00, 114.02, 108.64, 102.91, 74.03, 42.83, 40.52, 40.40, 40.26, 40.12, 39.99, 39.85, 39.71, 39.57, 38.66, 32.15, 27.89, 26.81; IR (KBr), ν (cm<sup>-1</sup>): 3 431.74 (—OH), 2 220.83 (—C≡N), 2 953.34 (—CH<sub>3</sub>), 1 615.47 (C=C)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 探针 ISO-CN-OH 对氨基酸的光学吸收性能研究

选择 21 种常见的氨基酸作为研究对象,探究了探针 ISO-CN-OH 与不同氨基酸之间的紫外可见光谱性能,实验结果如图 2(a)所示。发现在 DMSO/H<sub>2</sub>O (95/5, V/V, PBS

=7.0)溶液中,探针 ISO-CN-OH 本身在 471 nm 处呈现吸收峰,当分别向探针中加入 10 当量的 L-His, L-Ala, L-Gly, Cys, L-Val, L-Pro, L-Leu, L-Phe, L-Ser, L-Met, L-Glu, L-Asp, L-Lys, L-Thr, L-Tyr, GSH, L-Asn, L-Trp, L-Ile 和 L-Gln 时,在 471 nm 处的吸收峰并没有发生明显的改变,但是在 669 nm 处出现了新的微弱的吸收峰,且溶液的颜色并无明显的改变。仅向溶液中加入 10 当量的 L-Arg 时,光谱在 669 nm 处出现强吸收峰且溶液颜色由原本的橙黄色变为了墨绿色。该吸收光谱实验结果表明,探针 ISO-CN-OH 是对 L-Arg 具有高度选择性的比色探针,且响应灵敏,检测结果肉眼可视。

为了排除共存的氨基酸对 L-Arg 的识别产生干扰,进行了对 L-Arg 的竞争性实验测试。在其余 20 种氨基酸的 ISO-CN-OH 溶液中分别加入等当量的 L-Arg,由图 2(b)可知,其余 20 种氨基酸的存在并不会影响探针 ISO-CN-OH 对 L-Arg 的紫外识别。因此,探针 ISO-CN-OH 对 L-Arg 的紫外识别具有较强的抗干扰能力。

### 2.2 光谱吸收滴定曲线分析

在 DMSO/PBS(95/5, V/V, PBS=7.0)体系中,进行紫外-可见光谱滴定实验研究。如图 3(a)所示,随着 L-Arg 浓度的增加,探针 ISO-CN-OH 在 669 nm 处的吸收峰强度逐渐上升,441 nm 处的吸收峰逐渐下降,这表明 ISO-CN-OH 与 L-Arg 形成了稳定的复合物。除了在 669 nm 处产生新的吸收,在 550 nm 处还出现了等吸收点,这也为 ISO-CN-OH+L-Arg 络合物的形成提供了进一步的证据。当 L-Arg 的浓度在 1.0~10.0×10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> 范围时,根据 ISO-CN-OH+L-Arg 在 669 nm 处的吸收强度与不同浓度做线性回归曲线,

线性回归方程式为  $y=0.020x+0.073$ ,  $R^2=0.997$ , 如图 3 (b)所示, 根据  $DL=3\sigma/K$ , 其中  $\sigma$  为探针 ISO-CN-OH 溶液平行测试 20 次的标准偏差,  $K$  为线性回归方程的斜率, 可计算出检出限为  $8.5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

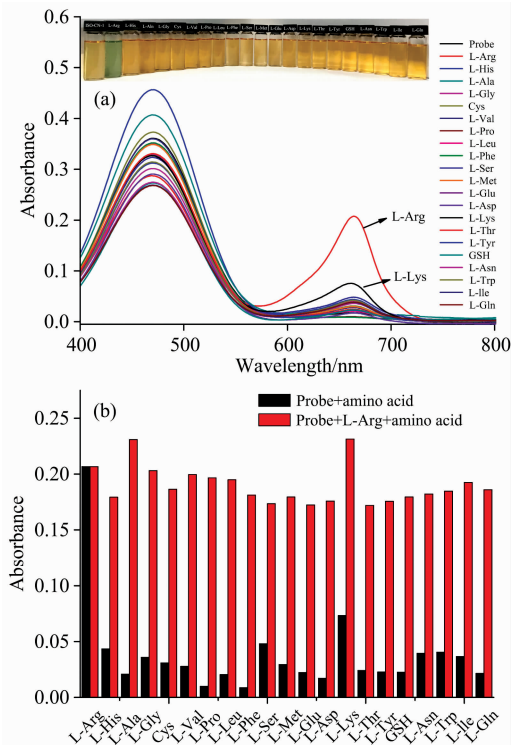


图 2 (a) 探针 ISO-CN-OH ( $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对氨基酸 ( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的选择性识别; (b) ISO-CN-OH ( $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 L-Arg 及共存氨基酸 ( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的竞争性实验

Fig. 2 (a) Selective recognition of amino acids by ISO-CN-OH ( $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); (b) Competitive experiment of ISO-CN-OH ( $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on L-Arg ( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and coexisting amino acids

2.3 吸收光谱的 Job's plot 滴定曲线分析

通过固定探针 ISO-CN-OH 与 L-Arg 的总浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 改变 L-Arg 占总浓度的比例, 测其在 669 nm 处的吸收强度。由此获得探针 ISO-CN-OH 对 L-Arg 的 Job's plot 滴定光谱吸收曲线, 如图 4 所示。当 L-Arg 占总浓度比例为 0.67 时, 发现探针 ISO-CN-OH 在 669 nm 处紫外吸收强度达到最大值, 根据计算公式  $n = X_{\text{max}} / (1 - X_{\text{max}})$  可得  $n=2$ , 表明探针 ISO-CN-OH 与 L-Arg 以 1 : 2 的络合比进行配位络合。

2.4 核磁共振光谱滴定曲线分析与探针机理研究

在确定了配位比的基础上, 通过核磁滴定实验来进一步确定配位机理。在探针 ISO-CN-OH 的  $d_6$ -DMSO 溶液中分别加入 0, 0.5, 1.0 及 2.0 当量的 L-Arg( $d_2$ O), 结果如图 5(a) 所示。当加入 L-Arg 后, 探针上的羟基氢  $H_2$  (9.83 ppm) 和  $H_1$  (8.76 ppm) 峰逐渐消失, 如图 5(b) 放大图所示。此外, 羟基周围的氢信号峰发生了向高场的偏移,  $H_1$  峰从 7.08

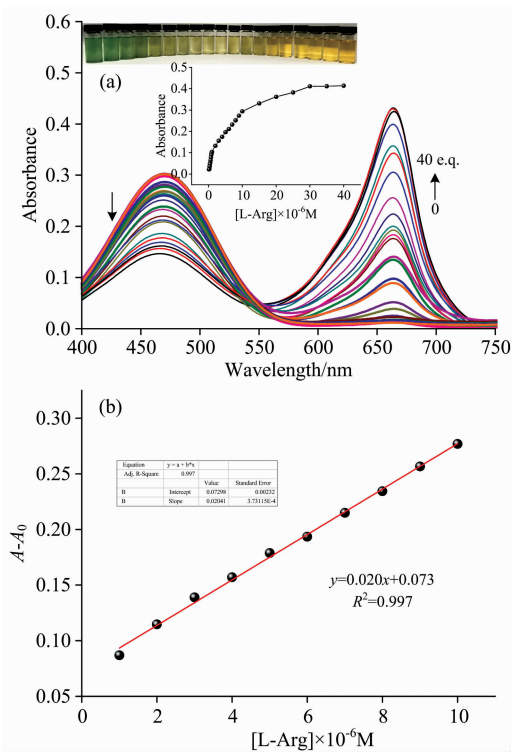


图 3 (a) 探针 ISO-CN-OH ( $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 随 L-Arg ( $10^{-6} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 浓度变化的紫外可见光谱图; (b) 相对吸收强度  $A-A_0$  与 L-Arg 浓度变化的线性曲线

Fig. 3 (a) UV/Vis spectra of probe ISO-CN-OH ( $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) with L-Arg ( $10^{-6} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) concentration; (b) Linear curve of relative absorption intensity  $A-A_0$  and L-Arg concentration

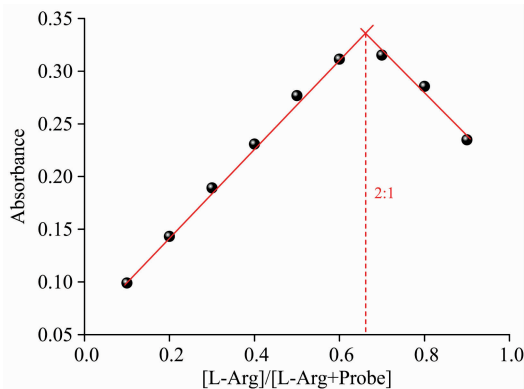


图 4 探针 ISO-CN-OH 与 L-Arg 的 Job's plot 滴定曲线  
Fig. 4 Job's plot titration curves of ISO-CN-OH and L-Arg

nm 逐渐偏移到 6.96 nm,  $H_3$  峰从 6.67 nm 逐渐偏移到 6.54 nm,  $H_5$  峰从 6.32 nm 逐渐偏移到 6.10 nm, 且在高场区出现了 L-Arg 的特征峰  $H_6$  (3.15 ppm) 和  $H_6$  (1.54 ppm), 如图 5(a) 所示。上述结果表明探针 ISO-CN-OH 上的羟基与 L-Arg 结合形成了络合物, 从而引起了羟基以及周围氢化学环境的变化。出现上述结果的原因是探针 ISO-CN-OH 具有两个酸性酚羟基, 且 L-Arg 属于强碱, 其  $pK_a=12.48$ , 有足够的去除羟基中的质子, 因此探针 ISO-CN-OH 通过将酸

性的酚羟基质子转移到 L-Arg 碱性的胍基 NH 基团上, 导致羟基基团附近形成负电荷, 该负电荷与精氨酸的胍基部分络合, 从而形成了络合物, 即 ISO-CN-OH 与 L-Arg 通过质子

转移形成了稳定的络合物<sup>[15]</sup>。

基于以上光谱分析, 可以得到探针 ISO-CN-OH 与 L-Arg 的配位模型如图 6 所示。

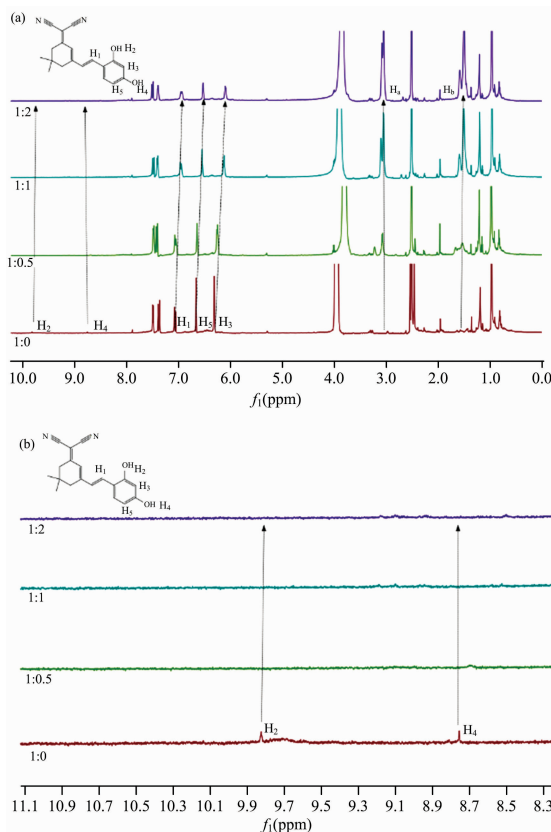


图 5 (a)在 ISO-CN-OH(DMSO-d<sub>6</sub>) 中加入 0, 0.5, 1.0 及 2.0 当量的 L-Arg(d<sub>2</sub>O)的<sup>1</sup>H-NMR 对比图; (b)局部放大图

Fig. 5 (a) <sup>1</sup>H-NMR Contrast diagram of ISO-CN-OH (DMSO-d<sub>6</sub>) after adding 0, 0.5, 1.0 and 2.0 e. q. L-Arg(d<sub>2</sub>O) in turn; (b) Partial enlarged drawing

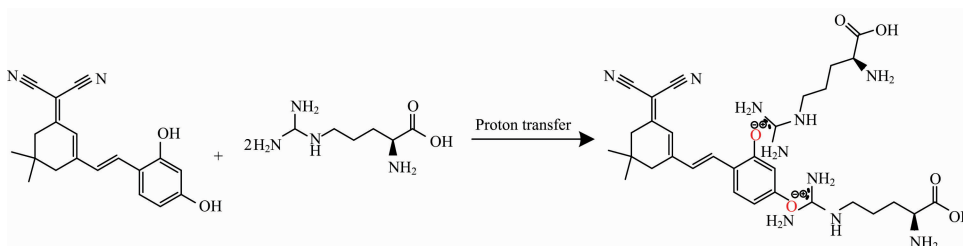


图 6 探针 ISO-CN-OH+L-Arg 配位模型

Fig. 6 Complex model of ISO-CN-OH+L-Arg

### 3 结 论

通过设计并合成了一种可以用于检测 L-Arg 的比色探针, 采用各种光谱分析方法, 研究了其光学性能及配位机理, 发现该探针可以专一性识别 L-Arg, 溶液颜色发生了从橙黄色到墨绿色的改变。滴定实验表明 L-Arg 在 1.0~10.0

$\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内具有良好的线性关系, 最低检测限为  $8.5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 表明该探针对 L-Arg 具有高灵敏度。基于核磁共振滴定的方法, 通过对 ISO-CN-OH 与 L-Arg 的配位机理的研究, 发现 ISO-CN-OH 与 L-Arg 是通过质子转移方式形成络合物。本研究为今后 L-Arg 新型探针分子的设计, 提供重要光谱研究方法与分析基础。

### References

- [ 1 ] Sruthi C K, Prakash M. PLOS ONE, 2018, 13; 1.  
 [ 2 ] Marshall S R, Stoudt M L, DiVittorio M A, et al. The Journal of Organic Chemistry, 2019, 84; 14407.

- [ 3 ] Xu B, Jacobs M I, Kostko O Ahmed M. *ChemPhysChem Communications*, 2017, 18; 1503.
- [ 4 ] Hou E, Sun N, Zhang F, et al. *Cell Reports*, 2017, 19; 1631.
- [ 5 ] Li Z, Xu Y, Fu J, et al. *ChemPhysChem Communications*, 2018, 54; 888.
- [ 6 ] Zou S, Wang X, Liu P, et al. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118; 109210.
- [ 7 ] Morris S M Jr. *The Journal of Nutrition*, 2016, 146; 2579.
- [ 8 ] Jonker R, Deutz N E, Erbland M L, et al. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2016, 103; 1458S.
- [ 9 ] Poillet-Perez L, Xie X, Zhan L, et al. *Nature*, 2018, 563; 569.
- [10] Jones C E, Darcy C J, Woodberry T, et al. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878; 8.
- [11] He M, Guo J, Yang J, et al. *Electrochemistry Communications*, 2020, 118; 106808.
- [12] Fu L, Zhou J, Wang C, et al. *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6; 305.
- [13] Forteschi M, Sotgia S, Pintus G, et al. *Journal of Separation Science*, 2014, 37; 2418.
- [14] Zhang Y, Yuan B, Ma D. *Inorganica Chimica Acta*, 2020, 508; 5004.
- [15] Mohan N, Sreejith S S, Begum P M, et al. *New Journal of Chemistry*, 2018, 42; 13114.

## Spectral Properties of L-Arginine Probe Based on Isoflurone

ZHANG Yu<sup>1</sup>, GU Zheng-ye<sup>2</sup>, XU Hong-yao<sup>2\*</sup>, GUANG Shan-yi<sup>1\*</sup>

1. Key Laboratory of Science & Technology of Eco-Textile, Ministry of Education, College of Chemical, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China
2. Research Center for Analysis and Measurement & College of Materials Science and Engineering, and State Key Laboratory for Modification of Chemical Fibers and Polymer Materials, Donghua University, Shanghai 201620, China

**Abstract** L-Arginine (L-Arg) is an important component of protein and one of the important diagnostic criteria for certain diseases in humans. The concentration change of L-Arg may cause many health problems. Therefore, it is very important to detect L-Arg efficiently and sensitively. At present, most research work based on L-Arg is used as the precursor of NO (Nitric Oxide) to prevent or alleviate some diseases. It are rarely reported for qualitative tests of L-Arg, and the detection of L-Arg by proton transfer to form complex/adduct is even less. In this paper, a colorimetric probe ISO-CN-OH based on isophorone, malononitrile and 2,4-dihydroxybenzaldehyde was designed and synthesized. The method based on proton transfer forming complex/adduct for detection of L-Arg rapidly were found. The UV-Vis spectra showed that absorption peak of the probe at 669 nm increased sharply when L-Arg was added into the ISO-CN-OH and the color of the solution changed from orange yellow to dark green. However, no color and absorption peak change was observed while other amino acids were added. Besides, ISO-CN-OH could detect L-Arg specifically without any interference by competition experiments. What's more, the titration experiment of L-Arg, showed There is A good linear relationship ( $R^2=0.997$ ) between the relative absorption intensity ( $A-A_0$ ) and the concentration of L-Arg within the concentration range of  $1.0\sim 10.0\times 10^{-6}$  mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>. And the linear regression model was  $y=0.020x+0.073$ . According to  $DL=3\sigma/K$ , the detection limit of ISO-CN-OH was  $8.5\times 10^{-8}$  mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, which indicated that the probe had very high detection sensitivity. Fixing the total concentration of ISO-CN-OH and L-Arg was 100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, and the ratio of L-Arg to the total concentration is changed to get the job's plot titration curve. According to the job's plot titration curve analysis, it is found that the UV absorption intensity of ISO-CN-OH reached the maximum at 669 nm when the ratio of L-Arg to the total concentration was 0.67, which indicated that ISO-CN-OH coordinated with L-Arg in the ratio of 1 : 2. In order to further understand the coordination mechanism of ISO-CN-OH and L-Arg, <sup>1</sup>H-NMR titration experiment was carried out. 0, 0.5, 1.0 and 2.0 equivalent of L-Arg (*d*<sub>2</sub>O) were added into the DMSO-*d*<sub>6</sub> solution of ISO-CN-OH respectively. It was found that the hydroxyl peak of ISO-CN-OH disappeared and the hydrogen around the hydroxyl group shifted after adding L-Arg. The results showed that ISO-CN-OH causes the formation of negative charges near the —OH group by transferring acidic phenolic hydroxyl protons to l-ArG alkaline guanidine NH group. The forming negative charge complexed with the guanidine part of arginine to form a complex/admixture, which result in a new peak at 669 nm, and the color solution change. The study based on proton transfer forming complex/adduct for detection of L-Arg will provide certain guidelines for the design of L-Arg probe molecules in the future.

**Keywords** Isophorone; Spectrum analysis; L-Arginine; Colorimetric probe

\* Corresponding authors

(Received Sep. 15, 2020; accepted Jan. 2, 2021)