

## 毛细管区带电泳法快速测定食品中的金属硫蛋白

郝守进<sup>1</sup>, 李 铨<sup>1</sup>, 康君行<sup>2</sup>, 赵 蓉<sup>2</sup>,  
赵 珊<sup>2</sup>, 唐庆平<sup>1</sup>, 茹炳根<sup>1</sup>

(1. 北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871;  
2. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013)

**摘要** 采用毛细管区带电泳法(CZE),以 50 cm × 75 μm i.d. 毛细管柱作为分析柱,0.02 mol/L 磷酸二氢钠-0.02 mol/L 磷酸氢二钠混合体系(pH 7.0)作为背景电解质,以紫外检测器在波长 200 nm 的条件下检测,对具有生物活性的金属硫蛋白(MT)的两种异构体(MT1,MT2)进行了分离。样品经过预处理后,采用外标法可对食品中的金属硫蛋白进行定量测定。该方法的最低检测质量浓度为 1 mg/L,相对标准偏差低于 10%,加标回收率为 82.0% ~ 93.4%。

**关键词** 毛细管区带电泳,金属硫蛋白,食品

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2002)02-0163-04

## Rapid Determination of Metallothioneins in Foods by Capillary Zone Electrophoresis

HAO Shou-jin<sup>1</sup>, LI Xuan<sup>1</sup>, KANG Jun-xing<sup>2</sup>, ZHAO Rong<sup>2</sup>,  
ZHAO Shan<sup>2</sup>, TANG Qing-ping<sup>1</sup>, RU Bing-gen<sup>1</sup>

(1. National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China;  
2. Beijing Center for Disease Prevention and Control, 100013, China)

**Abstract:** A rapid method for the analysis of metallothioneins(MT) in foods by capillary zone electrophoresis(CZE) was developed. Two isomers of MT(MT1,MT2) in foods were separated and determined. After a series of optimization, the separation and determination of MT1 and MT2 were obtained within 10 min by using the phosphate buffer system consisting of 0.02 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.02 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.0), and UV detection at 200 nm. Under the optimal experimental conditions, the minimum detectable limit was 1 mg/L, and the added standard recoveries of MT1, MT2 in foods were found to be in the range of 82.0% - 93.4%. The relative standard deviations(RSD) were found to be lower than 10%. Therefore, with this simple and rapid method, the contents of two isomers in foods can be determined by external standard method after sample pretreatment.

**Key words:** capillary zone electrophoresis; metallothionein; food

金属硫蛋白(metallothionein,简称 MT)是一类广泛存在的可诱导性的低相对分子质量(6 000 ~ 7 000)金属结合蛋白。MT 富含半胱氨酸而不含芳香族氨基酸,在动、植物体内表现出重要的生物学功能,例如,MT 具有拮抗电离辐射和清除自由基的功能,并参与细胞 DNA 的复制、蛋白质的合成和分解、能量代谢及微量元素的储存、运输和代谢等过程。尤其是在生命科学领域,从基因工程水平构建

表达 MT 成功之后,利用它的这些活性,研究其作为食品营养强化剂的应用已成为当今的前沿课题之一。目前测定 MT 的方法较多,主要有高效液相色谱法和极谱法等<sup>[1,2]</sup>,但这些方法的重复性较差,在实际样品中没有得到广泛的应用。采用毛细管区带电泳技术(CZE)成功地分析蛋白质已有了大量报道<sup>[3~5]</sup>,但由于食品成分比较复杂,能成功地测定食品中 MT 的方法还未见报道。据文献报道,采用

收稿日期 2001-10-17

作者简介 郝守进 男,1964 年生,讲师,博士后,电话(010)62751842(010)62768282,E-mail haoshouj@hotmail.com.

通讯联系人 茹炳根 男,教授,电话(010)62751842,E-mail Ru@public.east.cn.net.

基金项目 国家“九五”重点攻关项目(96-C03-01-06)(1996~2000),已通过国家教育部科学技术成果鉴定。

毛细管区带电泳法测定 MT 简单、快速,而且能够分离 MT 的各种异构体<sup>[6~8]</sup>,为此,作者认为 CZE 可能成为未来测定食品中 MT 最有前途的方法。本文根据实验室现有的实验条件,参照了前人的经验<sup>[6,9,10]</sup>,研究了从食品中提取 MT 的方法,探讨了该方法的分离条件,建立了用毛细管电泳快速测定食品中金属硫蛋白的分析方法,取得了比较满意的结果。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器和试剂

P/ACE 5000 毛细管电泳仪,紫外检测器和二极管矩阵检测器,Beckman 黄金系统工作站(Beckman 公司,美国),KQ-100E 医用超声波清洗器(昆山市超声仪器公司),Eppendorf 移液器(德国 Eppendorf 公司),LXJ-II 型离心机(上海安亭科学仪器厂),电动振荡器(北京北德科学器材公司),食品粉碎机(带 20 目筛),食品匀浆机(上海标本模型厂),恒温干燥箱(广东医疗器械厂)等。

无水乙醇和磷酸盐的缓冲溶液(pH 7.0),金属硫蛋白标准品(白色片状固体,纯度为 99.5%,由北京大学生命科学学院提供),高纯氮气(纯度 99.99%)。以上试剂除注明外均为分析纯,实验用水为去离子水。

### 1.2 测定条件

50 cm × 75 μm i.d. 毛细管柱,紫外检测器,分离电压 15 kV,积分时间 0.7 s,设定最佳灵敏度,检测波长 200 nm。高纯氮气的压力为 0.49 MPa,最佳操作温度 15 °C ~ 30 °C,分离时间 20 min,采用气体高压进样,正极设定为与气体压力相同的方向,进样时间为 5 s。

### 1.3 试剂的处理和配制

**1.3.1 磷酸盐的缓冲溶液** 准确称取磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 3.561 g,用去离子水稀释至 1 L,配成 0.02 mol/L 磷酸氢二钠溶液。同样,称取磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 3.121 g,用去离子水稀释至 1 L,配成 0.02 mol/L 磷酸二氢钠的溶液。分别取 61 mL 磷酸氢二钠和 39 mL 磷酸二氢钠混合,配成 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液。

**1.3.2 MT 标准溶液的配制** 称取一定量的 MT 标准品 50 mg,用去离子水溶解,定容于 50 mL 容量瓶中,于 4 °C 冰箱中保存备用。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 样品处理** 取含有金属硫蛋白的食品 40 g,用食品粉碎机粉碎,过 20 目筛。然后称粉碎过的样

品 5 g,用水将食品溶解,食品与水的质量比例为 1:2,用匀浆机将混合物匀浆(含水多的食品直接用匀浆机将混合物匀浆)。然后将匀浆后的混合物以 3 000 r/min 离心,收集上清液。沉淀物(剩余物)置于 5 mL 去离子水于 60 °C 保持 5 min,于振荡器上振荡 10 min,使样品充分溶解,然后将溶解液以 3 000 r/min 离心,收集上清液。该沉淀物的提取过程再重复两次。最后,合并其上清液。

**1.4.2 样品中 MT 的沉淀分离** 在所合并的上清液中,加入 4 倍于上清液的水,将其中的金属硫蛋白进行沉淀,收集沉淀部分,并以 10 000 r/min 离心,将沉淀部分收集待测。

**1.4.3 工作曲线的绘制** 分别配制质量浓度为 0.01 g/L,0.03 g/L,0.05 g/L,0.10 g/L,0.50 g/L 和 1.00 g/L 的金属硫蛋白标准溶液置于样品瓶中。以硅胶样品瓶盖(内有一 O 型封垫)密封样品瓶中的气压,同时,隔离电解质溶液,维持电压恒定。在每个硅胶样品瓶盖的顶部有一个冲压的十字形切口,从而产生 4 个三角形的活塞。在最适条件下进行电泳分析,于波长 200 nm 处测定其峰面积,以金属硫蛋白标准溶液的浓度为横坐标,以相应金属硫蛋白异构体 I (MT1) 和金属硫蛋白异构体 2 (MT2) 的峰面积之和为纵坐标,绘制标准工作曲线。

**1.4.4 样品中 MT 的测定** 将“1.4.2”节所收集沉淀用去离子水溶解,并定容至一定体积。在最适条件下,将样品溶液进行电泳分析,于波长 200 nm 处分别测定其相应的峰面积,根据标准曲线计算相应的金属硫蛋白的质量浓度。

## 2 结果和讨论

### 2.1 检测波长的选择

本实验采用了 3 种缓冲溶液作为背景缓冲液,对 MT 的标准溶液用二极管矩阵检测器在 190 nm ~ 300 nm 波长范围内进行了扫描,其扫描结果如图 1 所示。图 1-a, b, c 分别是以 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 9.2), 0.2 mol/L 硼酸缓冲溶液(pH 6.0) 和 0.2 mol/L 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液(pH 2.2) 为背景缓冲液的扫描图。

从图 1 可看出,在此 3 种背景缓冲液中,MT 的最大吸收峰均在 200 nm 附近,且在 200 nm 时的紫外吸收值为在 230 nm 时的紫外吸收值的 4 倍。实验结果还表明,Tris-HCl 缓冲溶液的背景吸收最大,0.2 mol/L 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液背景吸收最小,硼酸的分离效果不理想。因此本实验选择磷酸溶液作为背景缓冲液,检测波长选择为 200 nm。

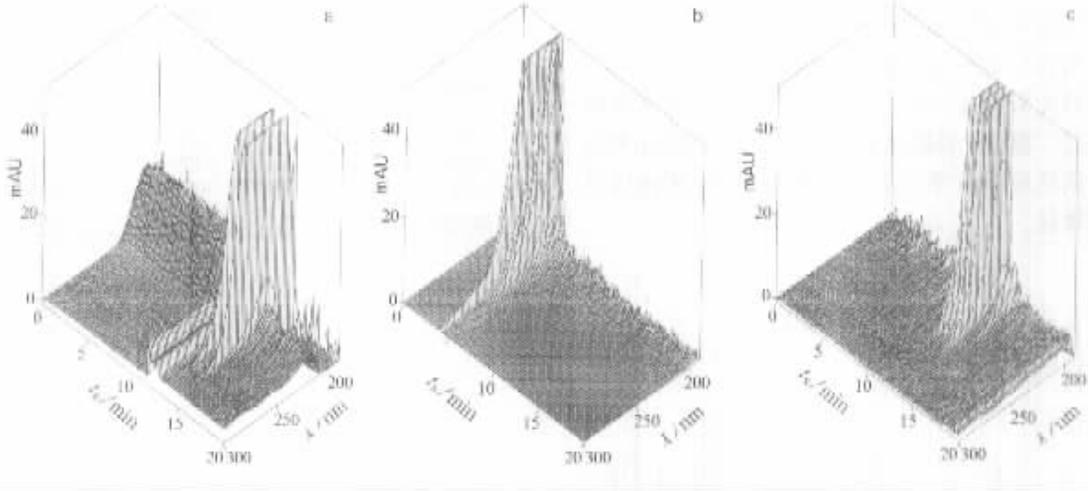


图 1 二极管矩阵检测器在波长 190 nm~300 nm 对 MT 的扫描图

Fig. 1 The scan diagrams of diode array detection for characteristic components separated by capillary electrophoresis  
a. 0.2 mol/L Tris-HCl buffer ; b. 0.2 mol/L boric acid buffer ; c. 0.2 mol/L phosphate citric acid buffer.

## 2.2 背景缓冲液的选择

实验比较了分别以 0.2 mol/L 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液(pH 2.2)和 0.02 mol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH 7.0)为背景缓冲液时对灵敏度产生的影响。结果表明,以后者为背景缓冲液测定质量浓度为 0.01 g/L 的 MT 标准溶液时,其背景吸收有较大的改善,其值是以前者为背景缓冲液背景吸收值的 1/10。因此,本实验选择 0.02 mol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH 7.0)作为背景缓冲液。

## 2.3 电压的选择

升高电压,会使分离效率和分离度增加,分离时间缩短。但过高的电压会产生过量的焦耳热,这些热量不能及时散失,导致径向温度梯度加大,反而使分离效率和分离度下降。因此需要选择一个最佳的分离电压。通过比较电压分别为 5 kV, 10 kV, 15 kV 和 20 kV 时的分离效果,发现当电压为 15 kV 时,分离效果最好。

## 2.4 上样时间的选择

由于毛细管柱容量较小,高浓度和大的进样体积造成的超载将使峰形变坏,分离效率降低。体系的最大分离效率受毛细管总体积与进样体积之比的限制,因此进样量也是影响分离效果的一个重要因素。在其他条件相同时(电压为 15 kV,采用气体高压上样),对上样时间分别为 1 s, 3 s, 5 s, 7 s 和 10 s 进行了试验,结果表明,上样时间为 5 s 时效果最佳。因此本实验选择上样时间为 5 s。

## 2.5 方法的精密度

将 10.0 mg/L 的 MT 标准液,于 24 h 内连续测

定 7 次,测得平均质量浓度为 10.4 mg/L,日内相对标准偏差为 6.7%;又采用 1 d 测定 1 次,连续测定 12 d 的方法,考察日间精密度,测得平均质量浓度为 10.7 mg/L,日间的相对标准偏差为 8.4%。日内及日间的 RSD 均在 10% 以内,符合食品中微量 MT 分析的要求。

## 2.6 方法的最低检出限

在上述最佳条件下,MT 产生 3 倍噪音信号所需要的物质浓度为该物质的最低检出浓度(LOD),产生 10 倍噪音信号所需要的物质浓度为 MT 的最低定量浓度(LOQ),再根据进样量 50 nL,计算出最低检出量。所测得本方法的 LOD 和 LOQ 分别为 0.3 mg/L 和 1.0 mg/L,最低检出量为 50 pg。

## 2.7 MT 的工作曲线和线性范围

MT 在 10 mg/L~1 000 mg/L 时峰面积(A)与质量浓度(C,mg/L)呈线性关系,回归方程为  $A = 9.6 \times 10^4 C + 1 649$  相关系数 r 为 0.994。

## 2.8 方法的准确度

取 5 g 亮美特(某保健食品的商品名)样品,加入一定量的 MT 标准液,按食物样品的预处理方法进行处理,用毛细管区带电泳法分析,计算加标回收率。实验结果见表 1。可看出用本法测定保健品中的 MT,其加标回收率为 80.0%~93.4%。

表 1 MT 添加回收率的测定结果(n=6)

Table 1 The determination results of MT recovery(n=6)

Original (mg)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
0.50	5.00	5.170	93.4
0.50	0.50	0.966	93.2
0.50	0.05	0.541	82.0

### 2.9 食物的测定

本实验采用所建立的方法对亮美特及金属硫蛋白标准品进行了测定,电泳图见图 2。

我们又采用此方法对一些食物样品中的金属硫蛋白进行了测定,结果见表 2。其中所采用的大白兔和大鼠是用锌诱导 2 周后进行分析的,其他样品为实际样品。

表 2 食物样品中 MT 的测定结果( n = 6 )

Table 2 The determination results of MT in food( n = 6 )

Sample	Concentration	Sample	Concentration
Milk	0.09 ± 0.03	Rat liver	2.9 ± 0.6
Food	11.0 ± 0.80	Rabbit liver	3.4 ± 0.7
Fish	0.17 ± 0.20	Rat kidney	1.10 ± 0.17
Vegetable	0.076 ± 0.012	Rabbit kidney	0.94 ± 0.06

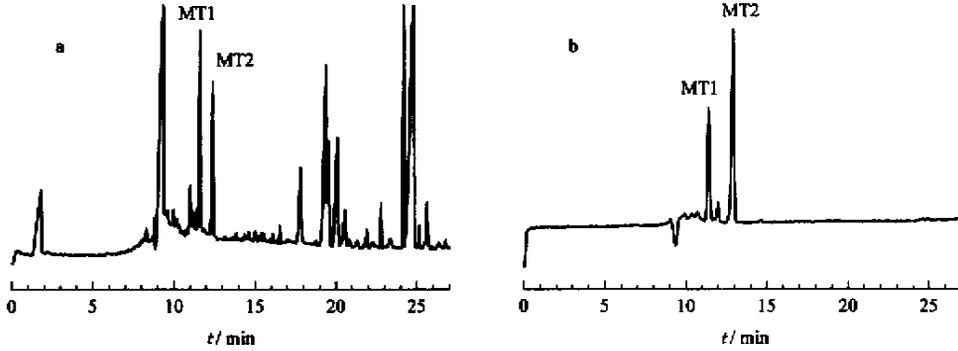


图 2 标准品 MT 及样品的毛细管电泳图

Fig.2 The electropherograms of sample and MT standard

a. nutritional food( Liang Mei Te ); b. metallothionein standard.

### 3 小结

毛细管电泳法测定金属硫蛋白虽已有一些报道,但大多数停留在分离条件的探讨和研究方面,未见应用于实际样品的定量分析。Liu 等人<sup>[8]</sup>认为其他杂蛋白可能影响 MT 的测定。但由本文的实际样品测定结果可知,该方法可将其他干扰杂蛋白与 MT 进行完全分离,不影响测定结果,且重现性较好,方法简单实用,适于实际样品的分析。此外,本文所建立的方法与国外 Beattie<sup>[6]</sup>所报道的相关文献相比,其灵敏度提高 3 ~ 5 倍。因此,本文建立的毛细管电泳法,具有一定的先进性和实际意义,可为测定食品中的金属硫蛋白提供可靠的手段,能更好地满足实际样品的分析。

### 参考文献:

[ 1 ] Pan A H , Wang Z X , Ru B G . Biomedical Chromatography , 1991 , 5 ( 5 ) : 509  
 [ 2 ] TIE Feng , PAN Ai-hua , RU Bing-gen , et al . Journal of

Instrumental Analysis , 1993 , 12 ( 5 ) : 18

铁 锋 , 潘爱华 , 茹炳根 , 等 . 分析测试学报 , 1993 , 12 ( 5 ) : 18

[ 3 ] WANG Qing-gang , LUO Guo-an . Chemical Journal of Chinese Universities , 1999 , 20 ( 10 ) : 1551  
 王清刚 , 罗国安 . 高等学校化学学报 , 1999 , 20 ( 10 ) : 1551

[ 4 ] DING Yong-sheng , LIN Bing-cheng . Chinese Journal of Chromatography , 1999 , 17 ( 2 ) : 134  
 丁永生 , 林炳承 . 色谱 , 1999 , 17 ( 2 ) : 134

[ 5 ] Ding Y S , Zhu X F , Lin B C . Chromatographia , 1999 , 49 : 343

[ 6 ] Beattie J H . Talanta , 1998 , 46 ( 2 ) : 255

[ 7 ] Hermosa A , Arato T , Tominaga I , et al . J Pharm Biomed Anal , 1997 , 15 ( 9 - 10 ) : 257

[ 8 ] Liu G Q , Wang W , Shan X Q . J Chromatogr B , 1994 , 653 ( 1 ) : 41

[ 9 ] Chen Z , Ren L , Ru B G , et al . Marine Pollution Bulletin , 1999 , 39 : 155

[ 10 ] Lauer H H , McManigill D . J Capillary Electrophor , 1996 , 3 ( 4 ) : 191