

[研究简报]

四氨基铝酞菁作为过氧化物酶模拟酶 新型红区荧光底物的研究

陈小兰¹ 李东辉² 杨黄浩¹ 朱庆枝¹ 郑洪¹ 许金钩¹

(1. 厦门大学化学系, 现代分析科学教育部重点实验室; 2. 厦门大学抗癌研究中心, 厦门 361005)

关键词 氯化血红素; 四氨基铝酞菁; 荧光法; 过氧化物

中图分类号 O657.32

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2001)07-1120-02

本文按照文献[1]合成了一种优良的红区荧光探针-四氨基铝酞菁(TAAIPc, 在强酸性介质中, 它的最大激发与最大发射波长分别在610 nm和678 nm处), 并将它作为过氧化物酶模拟酶的红区荧光底物用于痕量过氧化氢的测定. 由于在长波区具有荧光的天然物质很少, 且溶液体系的散射光强度与 $1/\lambda^4$ 成正比, 因而在长波处进行样品测定时可以很好地避开背景荧光和散射光的干扰, 检测限可得到较大的改善.

1 实验部分

1.1 试剂 氯化血红素(分析纯, 上海东风生化试剂公司); 四氨基铝酞菁(参照文献[1]方法合成). 过氧化氢(分析纯, 上海桃浦化工厂, 用高锰酸钾标定其浓度). 所用水均为三次重蒸去离子水.

1.2 实验方法 在10 mL容量瓶中依次加入1.0 mL Tris-HCl(pH=8.5)缓冲液、0.2 mL氯化血红素溶液(1.0×10^{-4} mol/L)、0.05 mL四氨基铝酞菁溶液(1.0×10^{-4} mol/L), 再加入一系列不同浓度的过氧化氢标准溶液或样品溶液, 稀释至5 mL, 室温下放置8 min, 然后加入0.5 mL HCl(3.0 mol/L), 稀释至刻度. 以610 nm为激发波长, 在678 nm处测量体系的相对荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 光谱特性 在以前的工作中^[2], 我们课题组对四氨基铝酞菁的分子结构及其能够作为强酸测定的红区荧光探针做了报道. 实验中观察到, 在酸性介质中, 四氨基铝酞菁的荧光峰位于678 nm, 而激发峰有两个, 一个在短波处(Soret带), 一个在长波处(Q带).

若以Soret带激发, 虽有很大的Stokes位移, 但二级散射可引起干扰; 如以长波长光激发, 则可很好地避开背景荧光和散射光的干扰. 图1是以Q带激发时, 氯化血红素-四氨基铝酞菁和氯化血红素-四氨基铝酞菁-过氧化氢体系的激发与发射光谱. 这两个体系的光谱形状类似, 过氧化氢的存在并没有使荧光峰的位置发生移动, 但它严重地猝灭四氨基铝酞菁的荧光. 同时还测定了体系的吸收光谱, 发现Q带随过氧化氢的加入吸收强度明显下降, 但最大吸收峰的位置和形状并未改变.

比较过氧化氢对四氨基铝酞菁、四羧基铝酞菁的猝灭情况后, 发现在氯化血红素存在下, 只有四氨基

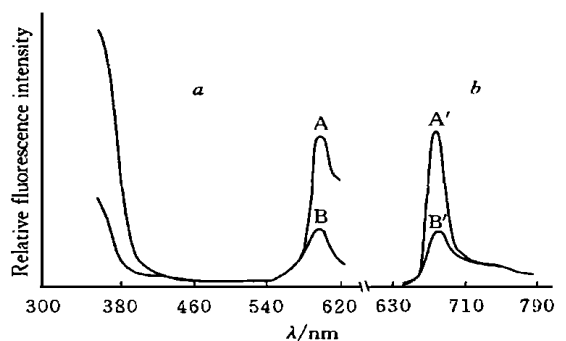


Fig. 1 Excitation spectra (a) and emission spectra (b) of hemin-TAAIPc (A, A') and hemin-TAAIPc-H₂O₂ (B, B')

Hemin: 2.0×10^{-6} mol/L; TAAIPc: 5.0×10^{-7} mol/L; H₂O₂: 1.0×10^{-7} mol/L.

收稿日期: 2000-08-10.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 29775021)资助.

联系人简介: 许金钩(1937年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事分子发光分析和生化分析的研究.

铝酞菁的荧光能被过氧化氢严重猝灭, 表明该体系中所发生的反应, 可能是氯化血红素催化过氧化氢和四氨基铝酞菁的氨基的相互作用, 从而影响到整个分子吸收结构. 详细机理正在探讨之中.

2.2 最佳反应条件 实验结果表明, 催化反应最佳 pH 值为 8.3~8.9, 故实验中选用 0.05 mol/L Tris-HCl (pH=8.5) 缓冲液. 催化反应达到平衡后, 在盐酸介质中测定荧光. 当氯化血红素和盐酸的用量分别在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-6}$ mol/L 和 0.06~0.18 mol/L 之间时, 体系的荧光猝灭程度最大且恒定, 本实验分别选用 2.0×10^{-6} mol/L 氯化血红素及 0.15 mol/L HCl. 四氨基铝酞菁的用量愈少愈灵敏, 但为了兼顾方法的灵敏度和线性区间, 最终选定 5.0×10^{-7} mol/L. 该反应达平衡的时间为 8 min.

2.3 模拟酶的性能 利用酶反应动力学初速度法^[3], 求出模拟酶催化反应的米氏常数 $K_m = 0.79 \times 10^{-6}$ mol/L, 最大速度 $v_{max} = 1.27 \times 10^{-8}$ mol/(L·s), 转换率 $K_{cat} = 0.254 \text{ s}^{-1}$ ($v_{max} = K_{cat}[E_0]$), 其中 $[E]_0 = 0.5 \times 10^{-7}$ mol/L^[4].

2.4 工作曲线及样品测定 在最佳反应条件下, 过氧化氢的浓度在 $0.0 \sim 3.0 \times 10^{-7}$ mol/L 范围内与体系的相对荧光强度呈线性关系, 回归方程为 $\Delta F = 3.16 + 7.914X$ ($n=7$), X 的单位是 (1.0×10^{-8} mol/L), 相关系数 $r = 0.992$, 检测限为 3.7×10^{-9} mol/L. 同时考察了共存离子的影响, 当测定 2.0×10^{-7} mol/L H_2O_2 时, 在体系中加入不同的共存离子, 在相对误差不大于 $\pm 5\%$ 条件下, 外加离子的允许量(物质的量比)为: Na^+ , NO_3^- , S^{2-} , Cl^- (10 000); PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , K^+ , NH_4^+ (5 000); SO_3^{2-} , Ca^{2+} (2 000); Cd^{2+} (1 000); Co^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} (250); EDTA, Al^{3+} (100); Hg^{2+} (50); Mn^{2+} , Ni^{2+} , NO_2^- (10); Fe^{3+} (2.5).

利用上述方法测定了雨水样品中的过氧化氢含量, 加标回收实验结果(见表 1)令人满意.

参 考 文 献

- 1 Nakano N., Yake H., Nagashima K. *et al.*. *Bunseki Kagaku*[J], 1995, **44**: 151—155
- 2 Li D. H., Chen Q. Y., Zhu Q. Z. *et al.*. *Talanta*[J], 1999, **49**: 745—750
- 3 Briggs G. E., Haldane J. B. S. *Biochem. J.*[J], 1925, **19**: 338—339
- 4 Lineweaver H., Burk D. *J. Am. Chem. Soc.*[J], 1934, **56**: 658—666

Studies on Tetra-substituted Amino Aluminum Phthalocyanine as a New Red-region Substrate for Mimetic Peroxidase

CHEN Xiao-Lan¹, LI Dong-Hui², YANG Huang-Hao¹, ZHU Qing-Zhi¹
ZHENG Hong¹, XU Jin-Gou^{1*}

(1. *The Key Laboratory of Analytical Sciences of MOE and Department of Chemistry;*

2. *Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)*

Abstract Tetra-substituted amino aluminum phthalocyanine (TAAIPc) has been synthesized and used for the first time as a new red-region fluorescent substrate for the determination of hydrogen peroxide catalyzed by peroxidase or mimetic peroxidase. Under optimum conditions, the calibration graph has a linear range of $0.0 \sim 3.0 \times 10^{-7}$ mol/L H_2O_2 with a detection limit of 3.7×10^{-9} mol/L. The feasibility of TAAIPc as a new promising red-region substrate in practical application has been proven in the determination of H_2O_2 in rainwater. The proposed method can largely minimize the interference that results from background fluorescence or scattering light and has a high analytical sensitivity.

Keywords Hemin; Tetra-substituted amino aluminum phthalocyanine; Fluorimetry; Hydrogen peroxide