

## 四磺基铁酞菁做为过氧化物模拟酶 在过氧化氢及葡萄糖测定中的应用

陈秋影 李东辉 郑 洪 杨黄浩 许金钧\*  
(厦门大学化学系, 厦门 361005)

**摘 要** 以四磺基铁酞菁(FeTSPc)作为过氧化物模拟酶催化  $H_2O_2$  与 *L*-酪氨酸的荧光反应, 建立了测定宽含量范围的  $H_2O_2$  及葡萄糖的方法。该法的线性范围为  $0.0 \sim 8.0 \times 10^{-5}$  mol/L  $H_2O_2$  及  $0.0 \sim 2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 葡萄糖, 检测限分别为  $5.0 \times 10^{-8}$  mol/L 及  $6.0 \times 10^{-8}$  mol/L。将该反应与氧化酶催化反应偶联, 测定人血清中葡萄糖的含量, 取得了满意的结果。

**关键词** 催化荧光反应, *L*-酪氨酸, 四磺基铁酞菁, 过氧化氢

### 1 引 言

痕量过氧化氢的测定在临床和环境化学都有重要意义。临床分析多用过氧化物酶催化反应, 但生物酶价格昂贵, 易变性失活, 反应条件较苛刻, 因此, 模拟酶的研究是一个很重要的课题。目前已见报道的过氧化物模拟酶主要是金属卟啉类化合物, 包括以铁卟啉为催化活性中心的天然小分子, 如氯化血红素<sup>[1]</sup>, 羟高铁血红素<sup>[2]</sup>; 另一类是合成的金属卟啉络合物, 如锰(II)、铁(III)、钴(III)等的卟啉络合物<sup>[3]</sup>。酞菁类化合物母体具有与卟啉类似的结构, 也具有过氧化物模拟酶的性质。本文以经典底物之一的酪氨酸为荧光底物, 研究了 FeTSPc 催化  $H_2O_2$  氧化酪氨酸的荧光反应, 并将此用于血清中葡萄糖含量的测定。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

日立 650-10s 荧光分光光度计(1 cm 石英液槽)。L-酪氨酸(*L*-tyr, 生化药品) 0.01 mol/L 水溶液;  $H_2O_2$  由 30% 溶液稀释成 0.3% 水溶液, 并用  $KMnO_4$  标定其准确浓度; 缓冲液: 0.2 mol/L  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  (pH 10.5); 葡萄糖氧化酶(GOD, Sigma 公司产品) 稀释成 1 U/mL; FeTSPc 按文献<sup>[4]</sup>合成配成 0.001 mol/L 水溶液为储备液; 磷酸盐缓冲液(0.02 mol/L, pH = 6.0) 由 12.3 mL 0.2 mol/L 的  $Na_2HPO_4$  及 87.7 mL 0.2 mol/L 的  $NaH_2PO_4$  溶液混合而成。所用试剂除标注外均为分析试剂, 所用水为二次去离子水。

#### 2.2 实验方法

**2.2.1 水溶液中过氧化氢的测定** 在 10 mL 具塞刻度管中依次加入 pH 10.5  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  缓冲液 1.0 mL, 0.01 mol/L *L*-tyr 1.0 mL, 0.001 mol/L FeTSPc 0.10 mL, 最后加入系列  $H_2O_2$  溶液, 用去离子水定容到 10 mL, 混合均匀后, 在室温下放置 30 min, 测定产物在于激发波长 325 nm、发射波长 410 nm 处的荧光强度。

**2.2.2 水溶液中葡萄糖的测定** 在 10 mL 具塞刻度管中加入一定量的葡萄糖溶液, 再加入 1.0 mL 1.0 U/mL 的 GOD 溶液, 1.0 mL 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0)。混合溶液在 30℃ 温育

1998-11-11 收稿; 1999-04-27 接受。

5 min, 立即用冰水冷却以终止酶反应。再按  $H_2O_2$  测定方法测定。

**2.2.3 血清样品中葡萄糖的测定** 取 100  $\mu$ L 原始血清样品, 加入 1.0 mL 三氯乙酸(0.6 mol/L)使血清中的蛋白质沉淀, 经离心分离, 取上清液稀释至 100 mL, 再取稀释后的溶液 1.0 mL 按上述方法进行样品测定。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 反应产物的光谱特性

用 FeTSPc 催化 *L*-酪氨酸与  $H_2O_2$  的反应得到强荧光的二聚产物——二-酪氨酸。其荧光的激发与发射光谱如图 1。最大激发和发射波长为  $\lambda_{ex}$  325nm、 $\lambda_{em}$  410 nm, 与 HRP 催化的结果几乎相同( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 324 \text{ nm}/410 \text{ nm}$ )。

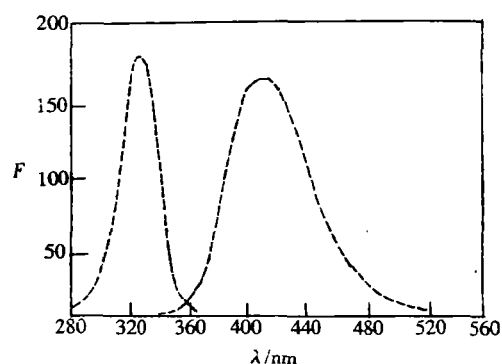


图 1 *L*-tyr- $H_2O_2$ -FeTSPc 体系的激发和发射光谱  
Fig. 1 The excitation and emission spectra of *L*-tyrosine (*L*-tyr)- $H_2O$ -iron-tetrasulfonatophthalocyanine (FeTSPc) system

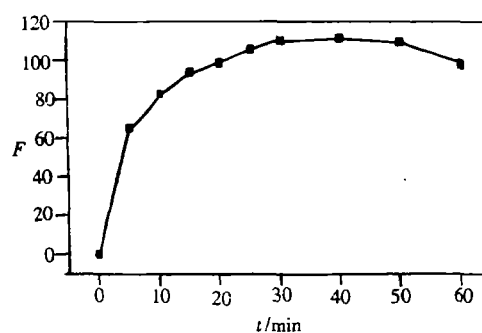


图 2 FeTSPc- $H_2O_2$ -*L*-tyr 反应体系的动力学曲线  
Fig. 2 Kinetic curve of the FeTSPc- $H_2O_2$ -*L*-tyr reaction system

#### 3.2 最佳反应条件

**3.2.1 酸度对模拟酶催化反应的影响** 模拟酶的催化反应性能不但与酸度有关, 还因所用的特定缓冲体系不同而异。本实验考察了硼砂-NaOH、 $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$ 、甘氨酸-NaOH 和  $NH_4$ - $NH_4Cl$  等 4 个缓冲体系, 发现产物在 pH 10.0~10.8 的  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  缓冲体系中有最大的荧光。本文选择 pH 10.5 的  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  缓冲液为缓冲介质。

**3.2.2 温度及对反应时间的影响** 反应温度对该催化反应的影响不大, 在 20~35 $^{\circ}C$  范围内, 体系的荧光强度恒定。从图 2 可以看出, 该催化荧光反应在室温下反应在 30~50 min 内已达到平衡且荧光强度基本不变, 但随着放置时间的增长, 相对荧光强度有所下降。本实验选择室温下 30 min 后测定。

**3.2.3 最佳试剂浓度** 结果表明, 当 *L*-Tyr 及 FeTSPc 的最终浓度分别为  $8.0 \times 10^{-4} \sim 1.2 \times 10^{-3}$  mol/L 及  $1.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-5}$  mol/L 时, 体系的荧光强度最大且恒定, 本实验采用 0.10 mL 0.001 mol/L 的 FeTSPc 及 1.0 mL 0.01 mol/L 的 *L*-tyr 为最佳试剂用量。

#### 3.3 工作曲线

在最佳测定条件下,  $H_2O_2$  测定的线性方程为:  $F = 78.33 + 1.908[L\text{-tyr}]$ , 其中 *L*-tyr 的浓度单位为  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L, 相关系数是 0.9991, 线性范围为 0.0 ~  $8.0 \times 10^{-5}$  mol/L, 9 次空白测定

的标准偏差为 0.33;检测限( $3\sigma/K, K=3$ )为  $5.0 \times 10^{-8}$  mol/L。对  $5.0 \times 10^{-7}$  mol/L  $H_2O_2$  做了 7 次平行测定,相对标准偏差为 2.1%。将葡萄糖氧化酶催化反应与模拟酶催化荧光反应偶联,用上述测定方法得到了葡萄糖的校正曲线,其拟合方程为:  $F = 16.06 + 298.5[\text{Glu}]$ , Glu 的浓度单位为  $1.0 \times 10^{-7}$  mol/L,线性范围为  $0.0 \sim 2.0 \times 10^{-4}$  mol/L,检测限为  $C_L = 6.0 \times 10^{-8}$  mol/L。

### 3.4 干扰实验

以  $5.0 \times 10^{-7}$  mol/L  $H_2O_2$  的测定考察了不同干扰离子的影响,当要求相对误差  $\leq 5\%$ ,外加离子的允许量(摩尔比)为:  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $NH_4^+$ 、 $Cl^-$ 、 $NO_3^-$  (10000);  $Al^{3+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  (200);  $Mg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  (20);  $Ba^{2+}$  (10);  $Ag^+$  (2);  $Sn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  (1);  $Fe^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$  (0.1);胆红素(0.25)。

### 3.5 血清中葡萄糖的测定

取 100  $\mu\text{L}$  经过稀释的血清样品按上述方法进行测定。结果表明,血清中的无机离子不干扰测定,其它物质由于其含量比葡萄糖低得多也不干扰测定。测定结果列于表 1。利用标准加入法检验了该方法的可靠性,从表 1 可以看出,标准加入的回收率为  $100\% \pm 5\%$ 。对两份血清样品的测定,平行六次测定的日内 RSD 分别为 4.7%、5.0%。

表 1 人血清中葡萄糖含量的测定

Table 1 Determination of glucose in human sera

样品 Sample	葡萄糖含量* Glucose content (mg/L)	葡萄糖加入量 Glucose added ( $\mu\text{g}$ )	葡萄糖测得量 Glucose found ( $\mu\text{g}$ )	回收率 Recovery (%)
1	0.070	0.1 0.2 0.5	0.094 0.190 0.514	94.0 95.1 102.8
2	0.099	0.1 0.2 0.5	0.097 0.206 0.521	97 102.9 104.2

原始血清经 10000 倍稀释后的葡萄糖含量(after the 10000-fold dilution of original serum)。

### References

- Zhu Q Z, Li Q G, Lu J Z, Xu J G. *Anal. Lett.*, 1996, 29:1729
- Genfa Z, Pasgapth P K. *Anal. Chem.*, 1992, 64: 517
- Tie Jianke(帖建科), Chang Wenbao(常文保), Ci Yunxiang(慈云祥). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 1994, 22:516
- Weber J, Busch D H. *Inorg. Chem.*, 1965, 4:469

## Application of Iron-Tetrasulfonatophthalocyanine as a Mimetic Peroxidase to the Determination of Hydrogen Peroxide and Glucose

Chen Qiuying, Li Donghui, Zheng Hong, Yang Huanghao, Xu Jingou\*  
(Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract** Iron(III)-tetrasulfonatophthalocyanine (FeTSPc) has been synthesized and used as a mimetic peroxidase to the determination of hydrogen peroxide and glucose based on its catalytic effect on the oxidation reaction of *L*-tyrosine by hydrogen peroxide. Under optimum conditions, the calibration graphs for the determination of hydrogen peroxide and glucose were linear over the ranges of  $0.0 \sim 8.0 \times 10^{-5}$  mol/L  $H_2O_2$  and  $0.0 \sim 2.0 \times 10^{-4}$  mol/L glucose, with detection limit of  $5.0 \times 10^{-8}$  mol/L  $H_2O_2$  and  $6.0 \times 10^{-8}$  mol/L glucose, respectively. Satisfactory results were obtained when the proposed method coupled with the catalysis of glucose oxidase was adopted in the determination of glucose in human sera.

**Keywords** Catalytic fluorescent reaction, *L*-tyrosine, tetrasulfonatophthalocyanine, hydrogen peroxide

(Received 11 November 1998; accepted 27 April 1999)