

文章编号: 1006-6144(2007)05-0515-04

以四硝基铝酞菁为荧光探针测定葡萄糖的荧光分析新方法

陈贞茂^{1,2}, 杨春丽^{1,2}, 石立杰^{1,2}, 黄萍², 李东辉^{*2}

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005; 2. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建厦门 361005)

摘要: 建立以四硝基铝酞菁为荧光探针测定葡萄糖的荧光分析新方法。方法基于四硝基铝酞菁苯环上的硝基与葡萄糖发生还原反应, 形成铝酞菁的氨基化产物; 氨基化铝酞菁具有红区激发和发射的特性, 在强酸性介质中可发射较强荧光; 体系的荧光强度和葡萄糖的含量呈良好的线性关系, 并具有较好的准确性和稳定性。方法用于测定发酵样品中的还原糖, 结果满意。

关键词: 四硝基铝酞菁; 四氨基铝酞菁; 葡萄糖

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A

葡萄糖等单糖物质, 在植物、动物和微生物等的机体构成上除了提供维持生命过程所需的能量外, 在控制、调节细胞的增殖、分裂和生长, 增强人体免疫功能, 以及抗癌、抗菌、抗病毒等方面都起着重要作用。葡萄糖测定的常用方法主要有光化学法^[1]、电化学法^[2]、酶比色法^[3]、离子色谱法^[4]和高效液相色谱法^[4]等。

本文提出一种测定葡萄糖的新方法。该方法基于葡萄糖等还原性糖含有的醛基, 在碱性条件下能将四硝基铝酞菁苯环上的硝基还原成氨基, 形成了氨基化合物^[5-7] (图 1)。而氨基铝酞菁具有红区激发和

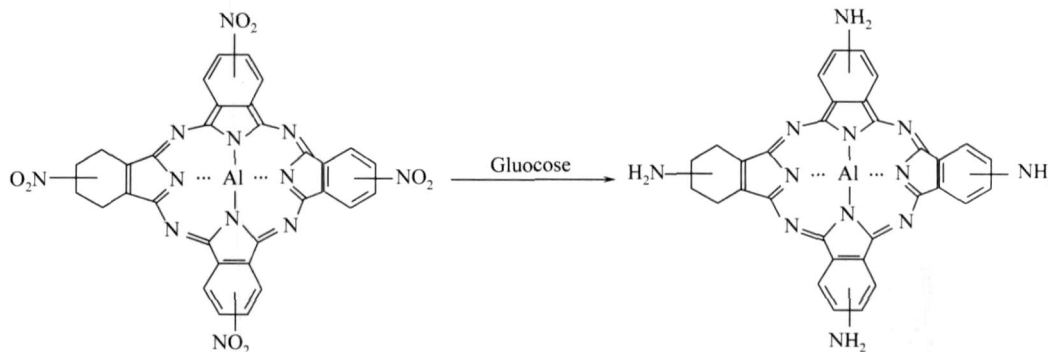


Fig. 1 Possible route of reduction for TNAIPc by glucose

发射的特性, 在强酸性介质中氨基质子化成为 $-NH_3^+$, 变为吸电子基团, 使氨基铝酞菁荧光增强^[8], 且体系的荧光强度与葡萄糖的含量有良好的定量关系, 据此建立的葡萄糖的荧光分析法具有方便快捷, 探针用量少, 灵敏度高的特点。用此法直接分析生物样品中的还原糖含量, 获得较满意的结果。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

LS-55 荧光分光光度计 (Perkin-Elmer); Spectronic Genesys-5 紫外可见分光光度计 (Thermo)。

四硝基铝酞菁 (Tetra-Substituted Nitro Aluminum Phthalocyanine, TNAIPc) 参照文献^[9]方法合成,

收稿日期: 2007-02-06 修回日期: 2007-04-28

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 20105005); 福建省自然科学基金 (F0210012); 厦门大学新世纪优秀人才支持计划资助
通讯联系人: 李东辉, 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物医学分子光谱学。

配成浓度为 1.0×10^{-3} mol/L 的工作液。四氨基铝酞菁 (Tetra-Substituted Amino Aluminum Phthalocyanine, TAAIPc) 浓度为 1.0×10^{-3} mol/L。10 g/L 葡萄糖母液, 6.0 mol/L 盐酸, 0.1 mol/L 碳酸钠, 0.1 mol/L 碳酸氢钠, 1.0 mol/L 硝酸钠, 1.0 mol/L 氯化钠, 1.0 mol/L 乙酸钠, 0.1 mol/L 乙二醇四乙酸二钠, 0.1 mol/L 硫化钠, 5.0×10^{-3} mol/L 抗坏血酸, 0.1 mol/L 亚硝酸钠, 0.1 mol/L 柠檬酸三钠。所用的试剂均为分析纯, 水为二次水(一次去离子, 一次蒸馏)。

待测样品为有高效的几丁质降解能力的基因工程菌株 CB101 的发酵液上清。

1.2 实验方法

取 1.0×10^{-5} mol/L 四硝基铝酞菁溶液 100 μ L 于 5 mL 塑料离心管中, 加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液 (0.1 mol/L) 300 μ L, 再加入一系列浓度的葡萄糖标准溶液 300 μ L (或者是含有葡萄糖的待测样品), 沸水浴 10~15 min。冷却后加水至终体积 3 mL, 加入 200 μ L 的 6.0 mol/L 盐酸, 充分混匀后, 以激发波长 610 nm, 发射波长 680 nm 进行荧光强度的测定。激发狭缝和发射狭缝分别设为 5 nm 和 10 nm。

2 结果与讨论

2.1 光谱特征

同其它酞菁化合物类似, 四硝基铝酞菁也具有两个吸收带, 一个在短波处, 一个在长波 640 nm 处(图 2 曲线 a)。四氨基铝酞菁也有两个吸收带, 一个在短波, 一个在长波 725 nm 处(图 2 曲线 c)。反应产物吸收光谱在长波处显示如图 2 曲线 b 所示的吸收特性。反应前后, 反应体系的吸收光谱发生了明显的改变, 640 nm 处的吸收逐渐下降, 725 nm 处的吸收则逐渐增强。

图 3 是反应产物的激发和发射光谱。四硝基铝酞菁在酸性条件下不发荧光, 而反应产物在酸性条件下具有荧光, 荧光峰在 680 nm 处(图 3 曲线 b)。与文献^[8]中关于四氨基铝酞菁的荧光特性相符。因此, 我们认为四硝基铝酞菁经葡萄糖还原后, 形成了铝酞菁的氨基化产物。反应产物在 610 nm 处有一激发峰。以此峰激发, 可有效避开散射光的干扰, 获得较好的信噪比, 故实验选择 610 nm 进行激发。

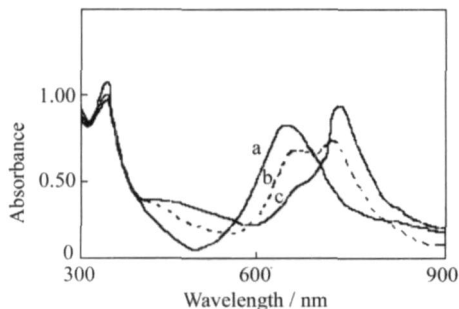


Fig. 2 Absorption spectra of TNALPc (a), reaction product of TNALPc reduced by glucose in the sodium carbonate medium (b) and TAAIPc (c)
 TNALPc = 3.33×10^{-6} mol/L, TAAIPc = 3.33×10^{-6} mol/L.

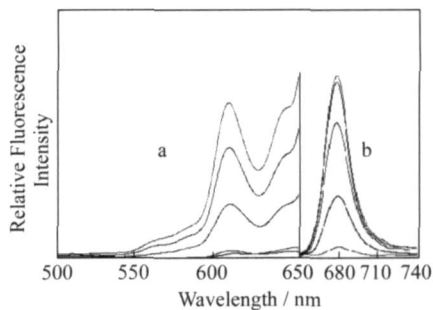


Fig. 3 Excitation spectra (a) and Emission spectra (b) of reaction product of TNALPc reduced by increasingly gradient concentration of glucose from bottom to top were 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 and 0.50 (g/L), respectively.

2.2 实验条件优化

2.2.1 反应体系酸度的选择 反应需在弱碱性条件下进行, 实验选择 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液 (0.1 mol/L) 维持反应体系稳定的碱性环境。考察了不同 pH 值的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲体系, 实验结果如表 1 所示, 在 pH 10.53 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲体系中, 工作曲线的线性区间最宽。因此, 实验中采用此缓冲体系维持稳定碱性环境。

Table 1 Effect of buffer system on linear range of calibration curve

pH of buffer (0.1 mol/L)	Linear range (g/L)
9.40	0.05 ~ 0.20
9.78	0.05 ~ 0.50
10.14	0.03 ~ 0.50
10.53	0.02 ~ 0.50

2.2.2 四硝基铝酞菁浓度的选择 考察了四硝基铝酞菁的用量对工作曲线线性区间的影响。浓度较低时工作曲线动态区间较窄,浓度较高时灵敏度较低。实验结果如表 2 所示,四硝基铝酞菁的浓度为 3.3×10^{-7} mol/L 时,工作曲线的动态区间宽,灵敏度也较高。因此,将此浓度定为四硝基铝酞菁的最佳使用浓度。

Table 2 Effect of TNAlPc concentration on linear range of calibration curve

Concentration of TNAlPc ($\times 10^{-7}$ mol/L)	Linear range (g/L)
2.0	0.02 ~ 0.20
3.3	0.02 ~ 0.50
5.0	0.03 ~ 0.50
10.0	0.03 ~ 0.50

2.3 共存离子的干扰

考察了一些离子的干扰,其中包括常见离子和一些还原性的离子。表 3 列出了这些离子的干扰情况。强烈的干扰即是在外源离子存在的情况下,本法检测的葡萄糖含量远远超过其实际含量;弱干扰即是在外源离子存在的情况下,本法检测的葡萄糖含量超过其实际含量一倍至十倍;无干扰即是在外源离子存在的情况下,本法检测的葡萄糖含量与其实际含量接近,外源离子存在下,可以用本法进行葡萄糖含量的测定。

Table 3 Interference of various foreign substances

	Molar ratio of various ion to glucose		
	30	10	1
CH ₃ COONa	-	-	-
NaNO ₃	-	-	-
NaCl	+	-	-
EDTA	++	+	-
Na ₂ S	++	++	++
Sodium citrate	++	++	++
NaNO ₂	++	++	++

++ : serious interference; + : weak interference; - : no interference.

2.4 工作曲线和分析参数

在优化的反应条件下,体系的荧光强度随着还原性葡萄糖浓度的增加而呈现对数增长关系。表 4 列出了标准曲线相关的各项参数。

Table 4 Characteristic parameters of calibration curves

	Limit of detection (g/L)	Linear range (g/L)	Linear regression equation	r
Proposed method	0.0052	0.020 ~ 0.50	$F = 155.07 + 84.69 \log c$	0.9575
Reference method	0.0080	0.010 ~ 0.10	$A = 2.11c - 0.17$	0.9993

3 生物样品中还原糖含量的测定

几丁质是海洋中居首位的多糖物质,它是虾壳、蟹壳的主要成分,同时广泛存在于昆虫外骨骼及真菌的细胞壁中。许多微生物都能够产生几丁质酶降解几丁质,生成各种单糖和寡糖,满足生活所需碳源和氮源。从厦门海域分离到的高效几丁质降解菌 CB101 能够分泌多种几丁质酶,具有很强的几丁质降解能力,已经用作几丁质的发酵实验^[10]。

实验采用本法对发酵样品中还原糖的含量进行测定,并与常用的 3,5-二硝基水杨酸法^[11]比较,结果见表 5。

Table 5 Analytical results for real sample

Proposed method (g/L)	RSD (%)	Added (mg/mL)	Recovery (% , n = 6)	Reference method ^[11] (g/L)
0.083	2.96	0.080	75.0	0.071

参考文献:

- [1] Wang J. Anal. Chem. [J], 1991, **63**:235.
- [2] GONG Zhi-long(宫志龙), ZHANG Zhur-jun(章竹君), ZHANG Hai(张海). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学) [J], 1996, **24**(9):998.
- [3] HAN Ai-xia(韩爱霞), WU Guo-shi(吴国是), LIANG Qiang(梁强), ZHANG Fushi(张复实). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学) [J], 2003, **31**(12):1417.
- [4] WANG Jing(王静), WANG Qing(王晴), XIANG Wen-sheng(向文胜). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学) [J], 2001, **29**(2):222.
- [5] CI Yun-xiang(慈云祥), ZHOU Tian-ze(周天泽). Coordinate Compound in Analytical Chemistry (分析化学中的配位化合物) [M]. Beijing(北京): Beijing University Press(北京大学出版社), 1986:388.
- [6] Sumner J B. Laboratory Experiments in Biological Chemistry[M]. New York: Academic Press Inc, 1949:38.
- [7] Reese E T. Methods in Carbohydrate Chemistry[M]. Academic Press, 1963, **3**:141.
- [8] Li Donghui, Chen Qiuying, Xu Jingou. Talanta[J], 1999, **49**:745.
- [9] Liu J B, Zhao F Q, Zhao Y. Acta Physico-Chim. Sinica[J], 1996, **12**:491.
- [10] Xiao X, Zhou Y, Wang F P. Acta Oceanologica. Sinica[J], 2003, **25**(1):137.
- [11] WANG Ji-gui(王继贵). Clinical Biochemistry(临床生化检验) [M]. Changsha(长沙): Hunan Scientific Technology Press(湖南科学技术出版社), 1996:529.

A Novel Method for the Determination of Glucose Using Tetra-Sbstituted Nitro Phthalocyanine as a Fluorescent Probe

CHEN Zhen-mao^{1,2}, YANG Chun-li^{1,2}, SHI Li-jie^{1,2}, HUANG Ping², LI Dong-hui^{*2}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005;

2. Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract: A novel method has been developed for the fluorimetric determination of glucose using tetra-substituted nitro aluminum phthalocyanine (TNAIPc) as the fluorescence probe. Tetra-substituted nitro aluminum phthalocyanine (TNAIPc) react with glucose, resulting in obvious enhancement in fluorescence in the acidic medium, which is the base of the proposed method. Investigations were carried out on the spectral characteristics, usage of reagent, effect of acidity and the interference of foreign ions. This method has been applied to the determination of practical samples obtained from fermentation liquid.

Keywords: Tetra-substituted nitro aluminum phthalocyanine; Tetra-substituted amino aluminum phthalocyanine; Glucose; Fluorescence