

基于2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸的紫外法检测辣根过氧化物酶浓度

蔡燕*, 严鑫, 王泽东, 姚勇#

南通大学化学化工学院, 江苏 南通

收稿日期: 2021年10月7日; 录用日期: 2021年10月22日; 发布日期: 2021年11月12日

摘要

本文首次提出采用2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸(配体L)-H₂O₂-HRP测定HRP酶浓度的新体系。利用紫外考查HRP催化H₂O₂氧化配体L体系的光谱变化。在pH = 7.2, 25℃下, 配体L浓度为 6×10^{-6} mol/L, H₂O₂浓度为 1×10^{-4} mol/L时, 回归方程为 $A = -0.0034x + 1.072$, 线性相关系数为0.9909, 该体系的检测范围可达 10^{-8} ~ 10^{-9} mol/L, 灵敏度较高, 操作简便, 抗干扰能力强, 稳定性好, 可用作检测游离HRP酶的新方法, 具有实际的应用前景。

关键词

辣根过氧化物酶, 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸, 紫外, 浓度, 水相

Determination of Horseradish Peroxidase Concentration Based on 2,6-Di-(2-pyridyl)-4-pyridyl Carboxylic Acid by UV Method

Yan Cai*, Xin Yan, Zedong Wang, Yong Yao#

School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

Received: Oct. 7th, 2021; accepted: Oct. 22nd, 2021; published: Nov. 12th, 2021

Abstract

A new system for the determination of horseradish peroxidase concentration by 2,6-di-(2-py-

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 蔡燕, 严鑫, 王泽东, 姚勇. 基于 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸的紫外法检测辣根过氧化物酶浓度[J]. 分析化学进展, 2021, 11(4): 261-267. DOI: 10.12677/aac.2021.114028

ridyl)-4-picolinic acid (ligand L)-H₂O₂-HRP was proposed for the first time. The spectral changes of ligand L system catalyzed by HRP for H₂O₂ oxidation were investigated by UV method. At pH = 7.2 and 25°C, the ligand L concentration is 6×10^{-6} mol/L, H₂O₂ concentration is 1×10^{-4} mol/L, the regression equation is $A = -0.0034x + 1.072$ and the linear correlation coefficient is 0.9909. The detection range of the system can reach $10^{-8} \sim 10^{-9}$ mol/L. This method has high sensitivity, simple operation, strong anti-interference ability and good stability. It can be used as a new method for the detection of free HRP enzyme and has practical application prospects.

Keywords

Horseradish Peroxidase, 2,6-Di-(2-pyridyl)-4-picolinic Acid, Ultraviolet, Concentration, Aqueous Phase

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

辣根过氧化物酶(Horse Radish Peroxidase, 简称 HRP)是一种含有血红素辅基的糖蛋白复合酶, 比活性高、耐热酸碱, 能够在相对宽泛的条件下催化氧化许多芳香类化合物, 被普遍用于食品工业、污水处理、分析检测和合成等领域。关于 HRP 的测定, 目前的化学发光法稳定性和灵敏度不够理想, 且很多试剂国内尚无供应, 不利于推广。HPLC 法样品量要求偏多且灵敏度偏低, 操作也相对繁琐[1] [2]。

三联吡啶衍生物对大多数过渡金属离子都具有很强的成键能力, 其配位形式主要为三齿螯合或双齿螯合[3] [4]。近年来, 三联吡啶衍生物因其构造和功能多样化亦受关注, 在分子识别、分子催化剂、抗肿瘤药物和自组装等领域都有广泛的应用前景[5] [6] [7] [8] [9]。在三 4' 位置引入羧基可以与各种金属 Mⁿ⁺ 构成丰富的配位, 进而形成多种新结构的配合物, 而且羧基配体能溶于弱碱性水溶液, 易与生物大分子发生相互作用[10] [11]。本文首次提出 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸(配体 L, 结构见图 1)-H₂O₂-HRP 体系测定 HRP 酶浓度的新体系。在 pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液中, 以辣根过氧化物酶催化过氧化氢氧化配体 L 形成水溶性产物, 通过测定体系紫外吸光度变化以确定辣根过氧化物酶浓度。配体 L 易于合成, 且在接近中性的条件下能溶于水和 HRP 作用, 与 HRP 的最适作用 pH 范围十分匹配。

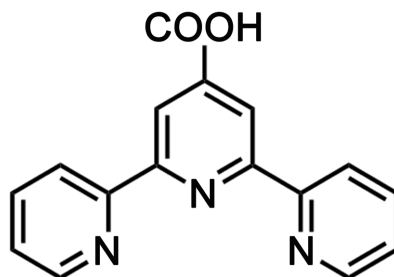


Figure 1. The structure of 2,6-di-(2-pyridyl)-4-picolinic acid
图 1. 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸结构

目前未见 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸用于检测 HRP 酶浓度的研究。本文以 UV-Vis 技术测定 HRP 催化 H₂O₂ 氧化配体 L 的体系。结果表明该体系中的 HRP 酶促反应灵敏度高, 反应迅速, 重现性高且稳

定。本方法可用于游离 HRP 的检测, 操作简便, 有望用于医药工业、食品检测、环境监测以及探究生命体信息规律等诸多领域, 可为 HRP 检测的发展和完善提供有用信息和多样性选择。

2. 实验部分

2.1. 实验试剂与仪器

2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸, 辣根过氧化物酶(HRP), 阿拉丁; 30% H_2O_2 , NaOH, KOH, NaHSO_3 , 无水乙醇, 分析纯, 西陇化工股份有限公司。TU-1901 紫外-可见光谱仪, 北京普析通用仪器有限责任公司。

1) 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸溶液: 准确称取一定量配体 L, 加 pH 7.2 磷酸缓冲液, 后移入 250 mL 容量瓶中, 定容成浓度为 5×10^{-4} mol/L 的溶液, 常温保存, 稀释为不同浓度为后续使用。2) 辣根过氧化物酶溶液: 准确称取一定量 HRP 溶于水, 移入 250 mL 容量瓶中, 配制成 1×10^{-6} mol/L 的溶液, 放入 4°C 冰箱中保存, 稀释为不同浓度供后续使用。

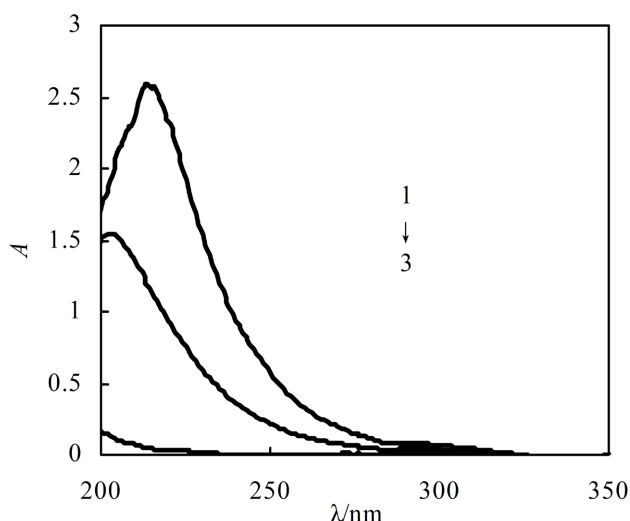
2.2. 实验方法

分别以 pH 7.2 磷酸缓冲液和水为参比, 扫描 200~400 nm 范围内配体 L 和 HRP 酶的紫外光谱。固定配体 L 的浓度为 1×10^{-5} mol/L, H_2O_2 和配体保持过量, 配制系列浓度的 HRP, 测试其紫外吸收强度, 绘制工作曲线, 并寻找检测限。

3. 实验结果

3.1. 配体与 HRP 酶体系的紫外吸收图谱

图 2 是配体、HRP 以及配体 L-HRP- H_2O_2 体系的紫外吸收光谱。HRP 酶在紫外区无明显的吸收。配体 L 在紫外区有较强的吸收, 参照文献[12]可以推断 210~260 nm 处的吸收峰来自配体 L 的激发态(II-II^*), 与之对应的在 366 nm 处有强荧光发射峰。在配体 L 与 HRP 浓度比小于 100:1 时, 配体的紫外吸收被酶所覆盖, 210~260 nm 范围内的紫外吸收峰消失。由此可知, 对于配体 L-HRP- H_2O_2 体系, 当配体过量时(大于 100:1), 可尝试利用其紫外光谱检测 HRP 酶的浓度。

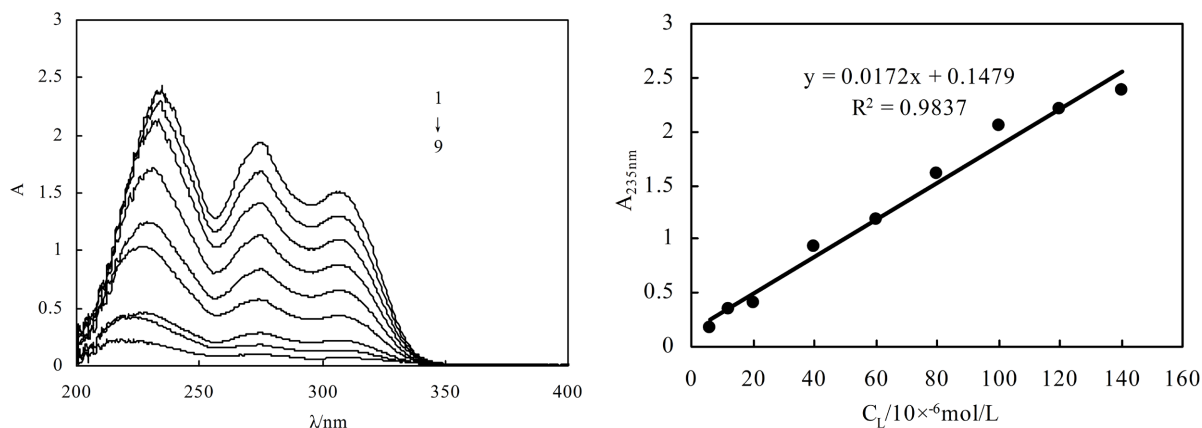


C (配体 L) = 6×10^{-6} mol/L, C (HRP) = 1.76×10^{-7} mol/L, C (H_2O_2) = 1×10^{-4} mol/L, 反应时间 0.5 h
1) 配体; 2) 配体 L-HRP- H_2O_2 ; 3) HRP

Figure 2. UV absorption spectra of ligand L, HRP and ligand L-HRP- H_2O_2 system
图 2. 配体 L、HRP 以及配体 L-HRP- H_2O_2 体系的紫外吸收光谱

3.2. 配体浓度对体系吸光度的影响

图3是加入梯度浓度的配体L溶液所测得的紫外吸收图谱。随着配体L加入浓度的增加,体系的紫外吸收依次增加。在210~250 nm出现最高峰,在250~300 nm以及300~350 nm处也分别出现了两个明显的吸收峰。在此浓度范围内配体L与吸光度呈较好的正相关。



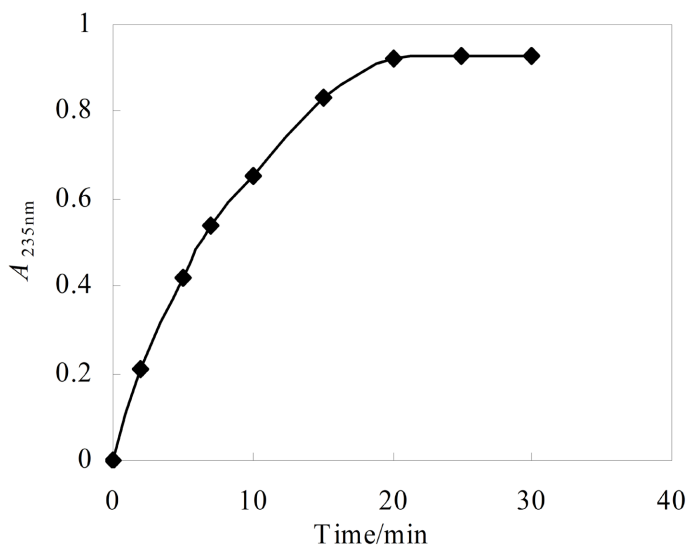
1-9: $C(\text{配体 L}) = 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.12, 0.06 (\times 10^{-4} \text{ mol/L})$
 $C(\text{HRP}) = 1.056 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 反应时间 0.5 h

Figure 3. Effect of ligand L concentration on ligand L-HRP-H₂O₂ system

图3. 配体L浓度对配体L-HRP-H₂O₂体系的影响

3.3. 体系反应时间

影响体系吸光度的因素很多,如时间、浓度、pH、反应,温度等。反应随催化时间的增加,体系的吸光度亦增加,在前10 min几乎呈线性。但20 min之后,则速度增加缓慢,渐趋于平衡,见图4。达到平衡后的体系非常稳定,24 h内吸光度保持基本恒定,见表1。



$C(\text{配体 L}) = 0.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $C(\text{HRP}) = 1.056 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$

Figure 4. Reaction process of ligand L-HRP-H₂O₂ system

图4. 配体L-HRP-H₂O₂体系的反应进程

Table 1. Time stability of ligand L-HRP-H₂O₂**表 1.** 配体 L-HRP-H₂O₂ 体系的时间稳定性

时间/h	1	3	5	8	18	20	24
A235 nm	0.931	0.932	0.930	0.933	0.932	0.931	0.930

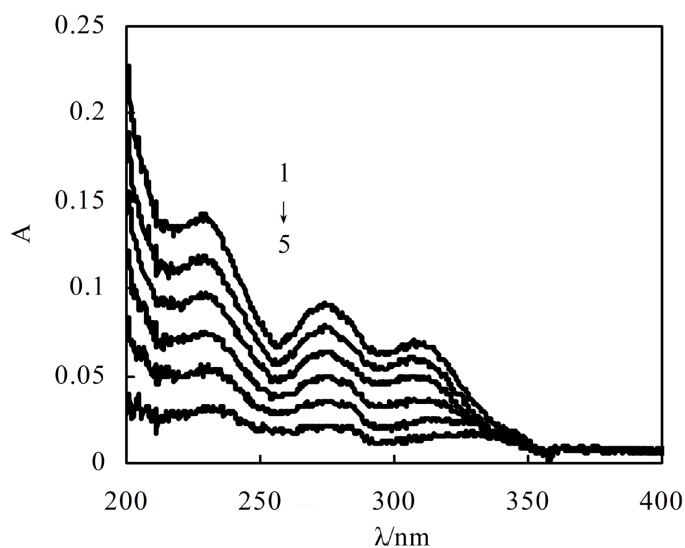
3.4. 温度和 pH 对体系的影响

温度不仅影响酶反应速率,而且影响酶的稳定性。HRP 酶反应在 40℃ 左右为比较适宜,较高温度时反应速率有所提升,但不利于酶的稳定。本体系在室温下即可得到满意的反应速率,且室温操作较为节能方便,故本实验在室温下进行。

HRP 催化作用的最佳 pH 是中性或弱酸性。配体 L 在中性条件下溶解性较差,在酸性时易溶于有机溶剂。经实验测试配体 L 在 pH = 7.2 的弱碱性体系中溶解良好,该 pH 也在 HRP 催化反应的最适 pH 范围,因此该体系的 pH 定为 7.2。

3.5. 检测限

图 5 是梯度浓度的配体 L 的紫外吸收光谱,旨在寻找适宜的最低配体浓度。结果显示,配体 L 浓度为 6×10^{-6} mol/L 时峰值低于 0.15,浓度进一步降低导致紫外吸光度低于 0.1,误差将放大,失去测量准确度。因此体系配体 L 浓度最好应高于 6×10^{-6} mol/L。

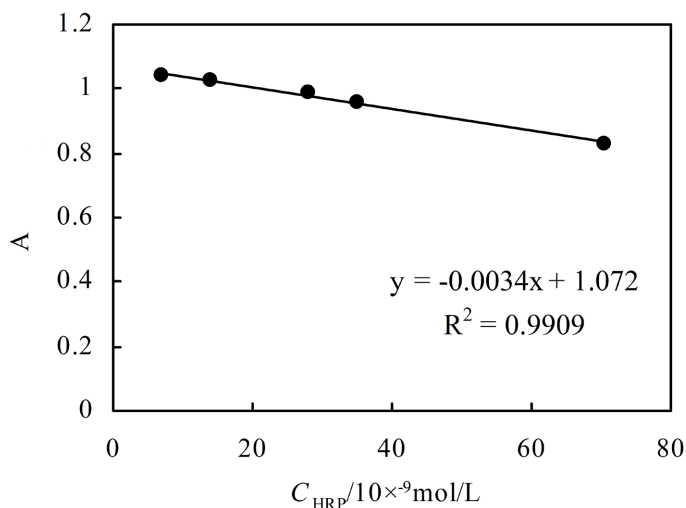


C (配体 L): 1-6: 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.0×10^{-6} mol/L

Figure 5. UV absorption spectra of ligand L**图 5.** 配体 L 的紫外吸收光谱

3.6. 工作曲线

图 6 是配体 L-HRP-H₂O₂ 体系在 235 nm 波长下的 HRP 酶工作曲线。从工作曲线上看,吸光度变化范围 0.8~1.2,回归方程为 $A = -0.0034x + 1.072$,其线性相关系数为 0.9909。配体 L-HRP-H₂O₂ 体系对于 HRP 的检测范围可达 10^{-8} ~ 10^{-9} mol/L,灵敏度高,操作简便,具备一定的应用价值。按照上述实验方法,重复十次实验,计算其相对标准偏差为 4.05%,表明方法精密度良好。



$C(\text{配体}) = 6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; 反应时间 0.5 h

Figure 6. UV working curve of ligand L-HRP-H₂O₂ system

图 6. 配体 L-HRP-H₂O₂ 体系紫外工作曲线

4. 结论

HRP 对 H₂O₂ 氧化配体 L 的反应具备灵敏的催化作用, 配体 L-HRP-H₂O₂ 体系在紫外吸收光谱 235 nm 处出现最高峰, 且吸光度与 HRP 的浓度也呈现良好的线性关系, 检测限可达 10⁻⁸~10⁻⁹ mol/L。该 2,6-二-(2-吡啶基)-4-吡啶甲酸-H₂O₂-HRP 体系的灵敏度高, 操作简便, 可作检测游离 HRP 的新方法, 具有实际的应用前景。

基金项目

国家青年自然科学基金(21801139)资助。

参考文献

- [1] Tang, B. and Zhang, L. (2006) FIA-Near-Infrared Spectrofluorimetric Trace Determination of Hydrogen Peroxide Using Tricarborocyanine Dye (Cy.7.Cl) and Horseradish Peroxidase (HRP). *Talanta*, **68**, 876-882. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.053>
- [2] Gong, T., Liu, J.F. and Wu, Y.W. (2017) Fluorescence Enhancement of CdTe Quantum Dots by HBcAb-HRP for Sensitive Detection of H₂O₂ in Human Serum. *Biosensors and Bioelectronics*, **92**, 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.048>
- [3] Hu, R.X., Yang, J., Chen, X., et al. (2018) Monomer, Chain, Layer and 3-D Framework Constructed by Linear 4'-(4-Carboxyphenyl)-2,2':6',2"-terpyridine. *Inorganica Chimica Acta*, **482**, 702-708. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.07.006>
- [4] Drath, O., Gable, R.W., Mobaraki, B., et al. (2018) Synthesis and Properties of Cobalt(II) Coordination Polymers Linked by 4'-(4-Pyridyl)-2,2':6',2"-terpyridine. *Polyhedron*, **151**, 323-329. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2018.05.052>
- [5] Ferraro, G., Marzo, T., Infrasca, T., et al. (2018) A Case of Extensive Protein Platination: The Reaction of Lysozyme with a Pt(II)-Terpyridine Complex. *Dalton Transactions*, **47**, 8716-8723. <https://doi.org/10.1039/C8DT01254G>
- [6] Biniuri, Y., Albada, B., Wolff, M., et al. (2018) Cu²⁺ or Fe³⁺ Terpyridine/Aptamer Conjugates: Nucleoapzymes Catalyzing the Oxidation of Dopamine to Aminochrome. *ACS Catalysis*, **8**, 1802-1809. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b03454>
- [7] Yan, D., Qi, Z., Sun, Y., et al. (2018) Latest Researches in Modified Anode Catalysts for Direct Methanol Fuel Cell (DMFC). *Journal of Materials Science and Engineering*, **1**, 163-168.
- [8] Qiu, C., Hua, P., Yu, H., et al. (2020) Synthesis and Properties of Octyl Glucoside. *Textile Auxiliaries*, **37**, 22-30.

-
- [9] Yao, Y., Chen, J. and Wang, C.W. (2019) Construction and Application of 3D Supramolecular Polymers Based on Pillar[n]arenes. *Journal of Nantong University*, **18**, 8-15.
- [10] Chen, L.M., Yu, S.S., Xiao, M., *et al.* (2017) Recognition of Chiral Amines by a Terpyridine-Zn-II-Complex-Based Circular-Dichroism Sensor. *European Journal of Organic Chemistry*, **16**, 2338-2343. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700066>
- [11] Lin, C.P., Florio, P., Campi, E.M., *et al.* (2014) Synthesis of Substituted Terpyridine Ligands for Use in Protein Purification. *Tetrahedron*, **70**, 8520-8531. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.09.074>
- [12] Du, J., Huang, Z., Yu, X.Q., *et al.* (2013) Highly Selective Fluorescent Recognition of Histidine by a Crown Ether-Terpyridine-Zn(II) Sensor. *Chemical Communications*, **49**, 5399-5401. <https://doi.org/10.1039/c3cc42081g>