

УДК 543.426: 546.65: 547.831.9.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ ТЕРБИЯ (III)

Скрипинец Ю.В.*, Егорова А.В.***, Антонович В.П.***, Украинец И.В.***

*Одесский национальный университет им. И.И.Мечникова, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2,

**Физико-химический институт им. А.В.Богатского НАН, 65080, Одесса, Люстдорфская
дорога, 86,

***Национальный фармацевтический университет, 61002, Харьков, ул. Блюхера, 4

Изменение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) служит ценным диагностическим признаком при ряде заболеваний. Щелочная фосфатаза (фосфомоноэстераза) проявляет максимальную активность при pH 8,0-9,0 и катализирует гидролиз фосфомоноэфиров с образованием неорганического фосфата и соответствующего спирта или фенола [1]. Существует метод определения ЩФ, основанный на фотометрическом измерении количества неорганического фосфата с помощью восстановленной фосфорномолибденовой гетерополикислоты. Известны стандартные методы определения активности ЩФ, которые предусматривают использование в качестве субстратов β -глицерофосфата натрия (метод Боданского), фенилфосфата натрия (метод Кинга-Армстронга), п-нитрофенилфосфата натрия (метод Бессея-Лоури-Брока) [2, 3], фенолфталеинфосфата натрия [4], с последующим спектрофотометрическим определением образовавшихся свободных фенолов.

Для высокочувствительного определения ЩФ широко используют электрохимические методы [5-7], хемилюминесценцию [8,9], флуоресценцию [10,11]. В последние годы начали применять ферментноусиленную лантанидную люминесценцию, при которой определение фермента осуществляют косвенно по продукту расщепления субстрата, способного передавать энергию возбуждения на ион лантанида. Для определения эстеразы используют ионы тербия ($\lambda_{эмис} = 545$ нм; предел обнаружения 1×10^{-9} М) [12], а для

определения каталазы - комплексное соединение европия с тетрациклином ($\lambda_{эмис} = 616$ нм; предел обнаружения 46 мУ/мл) [13]. Лантанидная люминесценция с разрешением во времени так же используется для определения щелочной фосфатазы [14-16] (табл. 1). Так как для лантанидных комплексов характерно наличие узких полос в спектрах люминесценции, большое стоксовское смещение, длительное время жизни, что обуславливает незначительное влияние биоматрицы, они используются для высокочувствительного определения широкого круга биологически активных веществ.

Целью данного исследования является разработка методики высокочувствительного определения ЩФ с использованием в качестве люминесцентного зонда комплекса тербия с производным амида-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты. В качестве субстрата применяли фенилфосфат натрия. Косвенное определение ЩФ основано на детектировании выделяющегося неорганического фосфата по тушению люминесценции данного зонда.

Экспериментальная часть

В работе использовали стандартный раствор хлорида тербия (0,01 М), который готовили из соответствующего оксида высокой чистоты. Концентрацию металла стандартизовали комплексометрически. Рабочий раствор хлорида тербия (1×10^{-5} М) готовили разбавлением стандартного раствора. Реагент - (5-этил-[1,3,4]-тиадиазолил-2)-амид 1-метил-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой

кислоты (L) был синтезирован, идентифицирован и очищен в соответствии с данными [17]. Стандартный раствор (1×10^{-3} М) реагента получали растворением точной навески в диметилформамиде (ДМФА). Рабочий раствор L (1×10^{-5} М) готовили разбавлением стандартного раствора. Стандартные растворы (1U/мл) щелочной фосфатазы, выделенной из слизистой оболочки кишечника быка (Sigma), (1×10^{-3}

М) фенолфосфата натрия (ФФ) и (1×10^{-2}) М хлорида магния готовили растворением точных навесок в воде. Рабочие растворы щелочной фосфатазы (0,1U/мл и 0,01U/мл) готовили разбавлением стандартного раствора. Все использованные реактивы были квалификации ч. д. а. и х. ч., вода - бидистиллированная.

Таблица 1. Методы определения ЩФ

Субстрат	Метод	Предел обнаружения	Литература
<i>n</i> -нитрофенилфосфат	спектрофотометрия	$6,0 \times 10^{-12}$ М	[2, 3]
фенилфосфат	амперометрия	$6,7 \times 10^{-14}$ М	[5]
фенилфосфат	циклическая вольтамперометрия	$7,0 \times 10^{-12}$ М	[6]
[[[(4-оксифенил)амино] карбонил] кобальтоциениум гексафторфосфат]-4 фосфат]	циклическая вольтамперометрия	$4,0 \times 10^{-16}$ М	[7]
кортизол-21-фосфат	хемилюминесценция	$1,0 \times 10^{-12}$ М	[8]
1-(2-метилпропенил) фосфат	хемилюминесценция	$1,0 \times 10^{-15}$ М	[9]
5-фторсалицилфосфат	флуоресценция	0,5 мU/мл	[10]
6,8-дифтор-4- метилумбеллиферилфосфат	флуоресценция	0,4 мU/мл	[11]
5-фторсалицилфосфат + Tb-ЭДТА	люминесценция с разрешением во времени	1,0 пг/мл	[14]
5-фторсалицилфосфат + Tb-ЭДТА	люминесценция с разрешением во времени	$1,2 \times 10^{-14}$ М	[15]
фенилфосфат + Eu-тетрациклин	люминесценция с разрешением во времени	0,8 мU/мл	[16]
фенилфосфат + Tb-L	люминесценция	0,05 мU/мл	данная работа

Спектры люминесценции и возбуждения регистрировали с помощью люминесцентных спектрометров СДЛ-2 (ЛОМО) и Aminco-Bowman Series 2 (SLM – Aminco, Rochester, NY) с ксеноновой лампой 150 W. Все измерения проводили при комнатной температуре (21-23°C). Кислотность среды создавали с помощью 0,1 М Трис-НСl буферного раствора, который готовили растворением Трис-основания (1,211 г) в 90 мл воды, с последующим

добавлением 0,1 М НСl до рН 8,0 и разбавлением раствора до 100 мл водой. Измеряли рН растворов стеклянным электродом на рН-метре – милливольтметре ОР-211/1 (Radelkis, Венгрия). Спектры поглощения записывали на регистрирующем спектрофотометре Lambda-9 (Perkin Elmer). Триплетный уровень лиганда, рассчитанный нами из спектра фосфоресценции его комплекса с гадолинием, измеряли при 77°К.

Результаты и их обсуждение

В качестве реагента в комплексном соединении с тербием использовали:

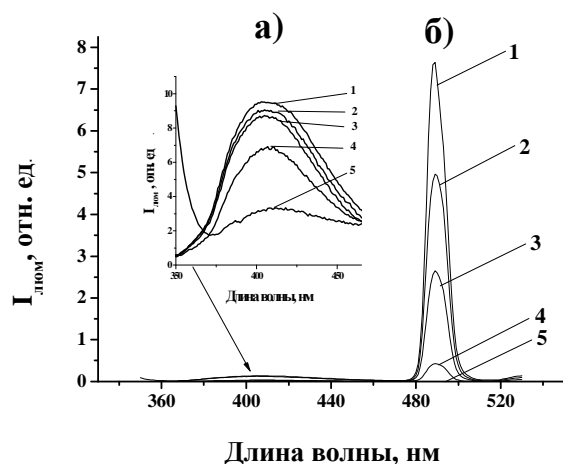
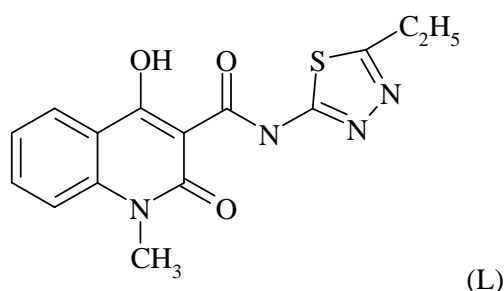


Рис. 1. Изменение спектров люминесценции L (а) и Tb(III) в комплексе с L (б) в присутствии различных концентраций ионов Tb(III): 1-0; 2- 1×10^{-7} ; 3 - 1×10^{-6} ; 4 - 1×10^{-5} ; 5 - 1×10^{-4} М ($C_L = 1 \times 10^{-4}$ М; $\lambda_{\text{возб}} = 320$ нм; pH 8.0)

Спектр поглощения лиганда в водном растворе характеризуется интенсивным светопоглощением в ультрафиолетовой области спектра с высоким молярным коэффициентом поглощения ($\epsilon = 2,3 \times 10^4$ л·моль $^{-1}$ см $^{-1}$). Триплетный уровень лиганда ($T = 21050$ см $^{-1}$) превышает энергию уровня первого возбужденного состояния иона Tb $^{3+}$ (5D_4 ; 20500 см $^{-1}$), что определяет возможность внутримолекулярной передачи поглощенной энергии лиганда на энергетический уровень лантанида. Собственная люминесценция лиганда понижается с увеличением концентрации добавляемых ионов тербия (рис.1 а), что так же подтверждает эффективную передачу энергии от лиганда на ион тербия и приводит к значительному

увеличению интенсивности последнего (рис. 1 б).

Спектры возбуждения (а) и люминесценции (б) комплекса Tb - L представлены на рисунке 2. Спектр люминесценции данного комплекса характеризуется наличием трех полос: при 490 нм (переход ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$), 545 нм (переход ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$), 585 нм (переход ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_4$), из которых наиболее интенсивна (и представляет интерес в плане аналитического применения) полоса с максимумом 545 нм. Взаимодействие в системе Tb - L наблюдается в широком интервале кислотности (pH 3,0 - 10,5), максимальное увеличение интенсивности люминесценции ($I_{\text{люм}}$) наблюдается при pH 8,0-9,5.

Изучено влияние концентраций тербия (III) и реагента на $I_{\text{люм}}$. Установлено, что оптимальными являются равные концентрации тербия и реагента (1×10^{-6} М). Наиболее вероятно, что в таких концентрационных условиях образуется комплекс 1:1, в отличие от Tb:L=1:2 при избытке реагента. Определены основные флуоресцентные характеристики комплекса Tb (III):L = 1:2 (время жизни возбужденного состояния $\tau = 1850$ мкс, квантовый выход $\Phi = 0,35$) и комплекса Tb (III):L = 1:1 (время жизни возбужденного состояния $\tau = 1500$ мкс, квантовый выход $\Phi = 0,27$). Кривые затухания флуоресценции комплексов Tb (III) представлены на рис. 3.

Было установлено, что при увеличении концентрации фосфатов наблюдается тушение интенсивности в спектрах люминесценции комплекса Tb (III):L (рис. 4 а), а также увеличивается собственная люминесценция лиганда (рис. 4 б), что подтверждает тушение люминесценции, связанное с вытеснением фосфат-ионами связанного лиганда из его комплекса с тербием. Установлено, что при добавлении фосфат-ионов к данному комплексу не происходит изменения его времени жизни ($\tau_0/\tau \approx 1$). Согласно существующим представлениям о типах тушения люминесценции [18], это явление можно отнести к статическому типу. Для статического тушения известна зависимость интенсивности люминесценции комплекса от концентрации тушителя [18]:

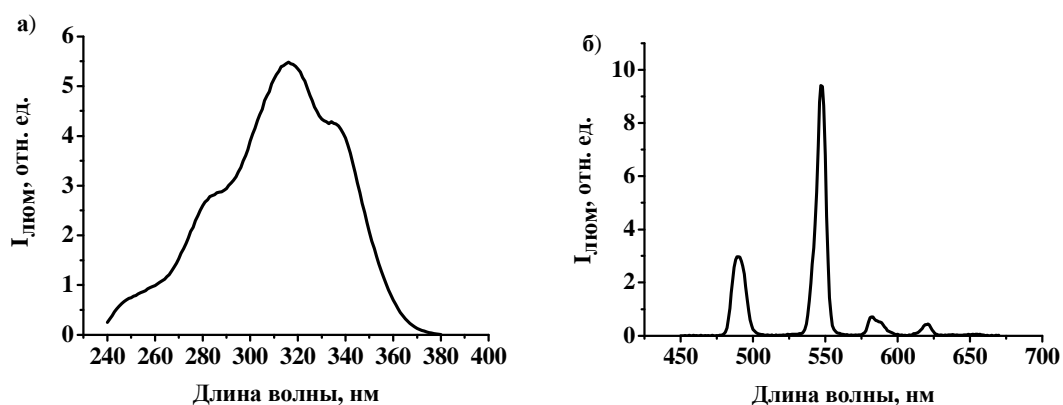


Рис. 2. Спектры возбуждения (а) и люминесценции (б) Tb (III) в комплексе с L ($C_{Tb^{3+}} = C_L = 1 \times 10^{-6}$ M)

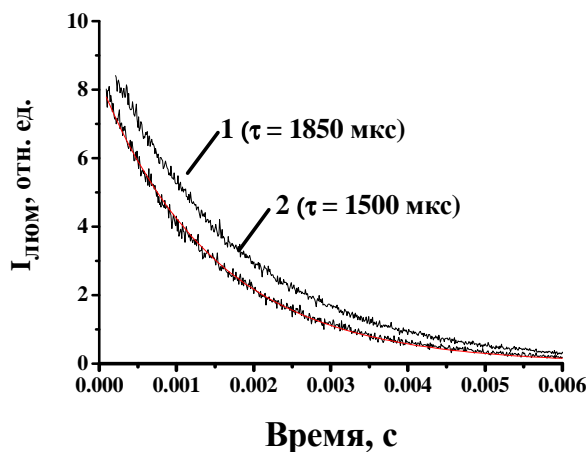


Рис. 3. Кривые затухания флуоресценции комплексов Tb(III) – L ($C_{Tb^{3+}} = 1 \times 10^{-6}$ M; 1 - $C_L = 5 \times 10^{-6}$ M; 2 - $C_L = 1 \times 10^{-6}$ M)

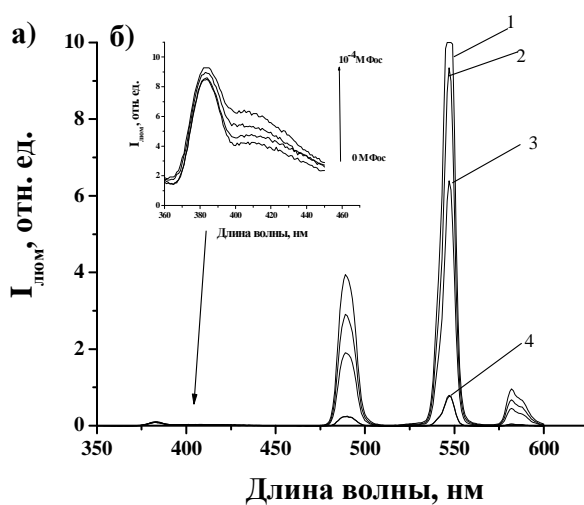


Рис. 4. Спектры люминесценции комплекса Tb(III) – L (а) и L (б) в присутствии различных концентраций фосфат – ионов: 1-0; 2- 1×10^{-6} ; 3 - 1×10^{-5} ; 4 - 1×10^{-4} M ($\lambda_{возб} = 320$ nm; pH 8.0)

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K[Q]$$

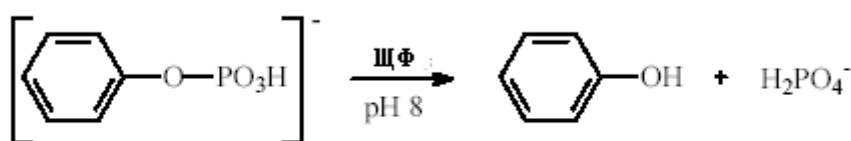
где:

Q – концентрация тушителя;

K – константа тушения;

I_0 – интенсивность флуоресценции контрольной пробы;

I – интенсивность флуоресценции люминесцентного зонда в присутствии тушителя.



Достоверность определения ферментативной активности зависит от глубины гидролиза субстрата, его длительности и количества внесенного фермента. Как было установлено ранее [1,16], ферментативный гидролиз ФФ (1×10^{-4} М) под действием ЩФ осуществляется при термостатировании реакционной смеси на водяной бане (25°C ; $\text{pH} = 8,0$) в течение 20 мин, а так же в присутствии ионов $\text{Mg}(\text{II})$, которые необходимы для проявления каталитической активности ЩФ.

Изучено влияние различных концентраций ЩФ на $I_{\text{люм}}$ предлагаемого зонда в присутствии ФФ (рис. 6). При увеличении концентрации ЩФ наблюдается тушение интенсивности в спектрах люминесценции (рис. 6 а) и возбуждения (рис. 6 б), что связано с увеличением концентрации фосфат - ионов в результате ферментативного гидролиза.

Аналитическое применение. На основании вышеизложенного разработана методика люминесцентного определения ЩФ в модельных растворах. Для построения градуировочного графика в мерные пробирки вместимостью 10 мл вносят по 0,1; 0,3; 1,0 мл рабочего раствора ЩФ (0,01U/мл), 0,3; 0,5;

Зависимость $I_{\text{люм}}$ от концентрации фосфатов (а), а так же градуировочный график Штерна-Фольмера (б), линейный в интервале концентраций фосфатов 0,5-100 мкМ, представлены на рис. 5. Предел обнаружения составляет 0,25 мкМ.

Косвенное определение ЩФ основано на измерении количества выделяющегося неорганического фосфата по тушению люминесценции данного зонда. В качестве субстрата применяли фенолфосфат натрия:

0,7; 1,0 мл рабочего раствора ЩФ (0,1U/мл), 0,1; 0,5; 0,7 мл стандартного раствора ЩФ (1U/мл), в каждую пробирку добавляют по 1 мл рабочих растворов хлорида тербия(III) и L, 1 мл стандартного раствора хлорида магния, 1 мл стандартного раствора ФФ, 2 мл Трис-НСl буфера ($\text{pH} = 8,0$) и доводят дистиллированной водой до метки. Для проведения гидролиза растворы термостатируют при 25°C в течение 20 мин. Далее измеряют интенсивность флуоресценции при 545 нм. На основании полученных данных строят градуировочный график с использованием программы Origin 6.0. Зависимость $I_{\text{люм}}$ от концентрации ЩФ (а), а так же градуировочный график Штерна-Фольмера (б), линейный в интервале концентраций ЩФ 0,1-70 мU/мл представлены на рис. 7.

При определении ЩФ в модельных растворах поступают, как описано выше. Концентрацию ЩФ в модельных растворах определяют по градуировочному графику. Проверка правильности предлагаемой методики была проведена методом “введено-найденно”. Результаты проверки и их статистическая обработка приведены в таблице 2.

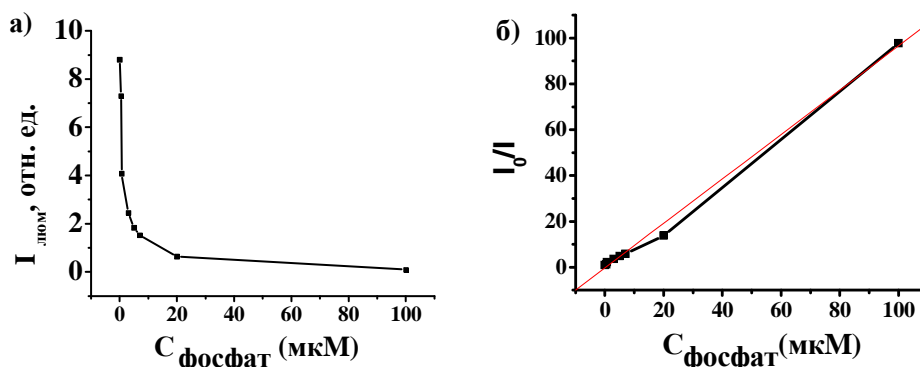


Рис. 5 Зависимость интенсивности люминесценции комплекса Tb – L от концентрации фосфатов ионов (а) и градуировочный график Штерна – Фольмера для их определения (б) ($C_{Tb^{3+}} = C_L = 1 \times 10^{-6}$ M)

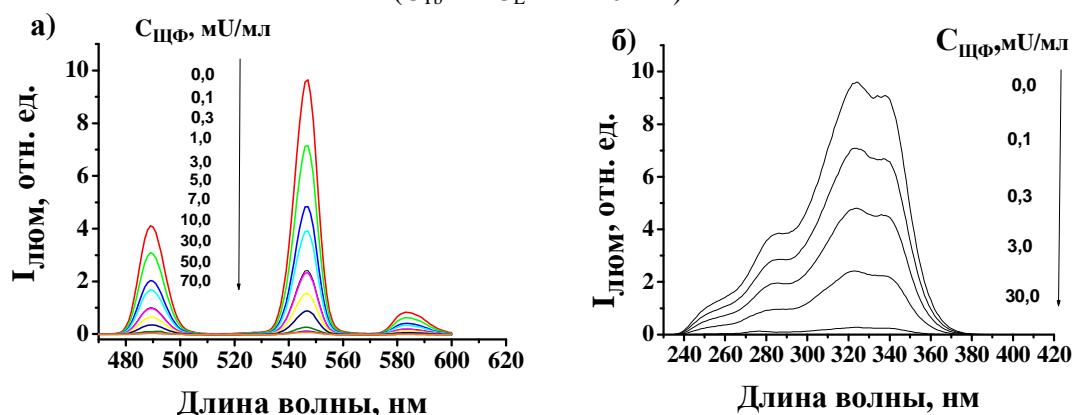


Рис. 6. Спектры люминесценции (а) и возбуждения (б) комплекса Tb(III) – L в присутствии различных концентраций ЩФ ($C_{Tb^{3+}} = C_L = 1 \times 10^{-6}$ M; $C_{ЩФ} = 1 \times 10^{-4}$ M)

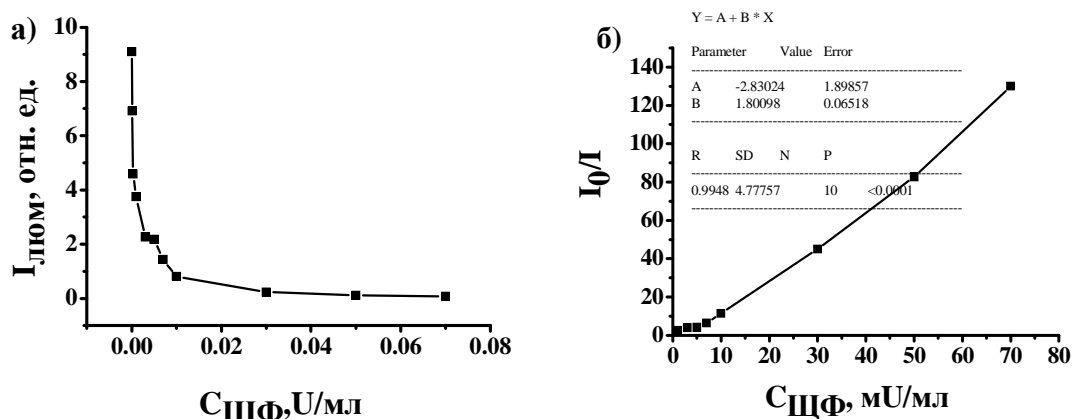


Рис. 7. Зависимость интенсивности люминесценции комплекса Tb(III) – L от концентрации ЩФ (а) и градуировочный график Штерна – Фольмера для ее определения (б) ($C_{Tb^{3+}} = C_L = 1 \times 10^{-6}$ M; $C_{ЩФ} = 1 \times 10^{-4}$ M; $C_{Mg^{2+}} = 1 \times 10^{-3}$ M)

Таблица 2. Результаты определения ЩФ в модельных растворах методом «введено-найдено» (n=5, P=0.95)

Введено, мU/мл	Найдено, мU/мл	s_r
0,5	$0,52 \pm 0,03$	0,049
5,0	$5,09 \pm 0,21$	0,033
50,0	$50,27 \pm 1,44$	0,023

Таким образом, разработана высокочувствительная люминесцентная методика косвенного определения ЩФ, основанная на измерении концентрации выделяющегося неорганического фосфата по тушению люминесценции нового комплекса Tb (III)-L с пределом обнаружения 0,05 мУ/мл. Предлагаемая методика характеризуется высокой чувствительностью, удовлетворительными метрологическими характеристиками, простотой выполнения и может быть использована для целей иммуноферментного анализа.

Литература

1. Большая медицинская энциклопедия в 30-ти т. АМН СССР. Т. 26 / Под. ред. Б.В. Петровского – 3-е изд. – М.: Советская энциклопедия, 1985, С. 378-382.
2. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник/ В.В.Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П.Золотницкая; Под. ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина, 1987, - С. 205-209.
3. H.U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie Weinheim. 1974, P. 528-529.
4. Л.С. Фомина. Определение кишечной щелочной фосфатазы. Т. 1. Современные методы в биохимии. / Под. ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1964. – С. 292-298.
5. B. Serraa, M.D. Moralesb, A.J. Reviejob, E.H. Halla, J.M. Pingarryn. Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor // Anal. Biochem. - 2005. – Vol. 336. – P. 289–294.
6. S. Ito, S. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda. Highly sensitive electrochemical detection of alkaline phosphatase // Anal. Chim. Acta. – 2000. –Vol. 424. – P. 57–63.
7. O. Bagel, B.Limoges, B. Schollhorn, C.Degrad. Subfemtomolar determination of alkaline phosphatase at a disposable screen-printed electrode modified with a perfluorosulfonated ionomer film // Anal. Chem. – 1997. Vol. 69. - P. 4688-4694.
8. J. Lin, A. Tsuji, M. Maeda. Chemiluminescent flow injection determination of alkaline phosphatase and its applications to enzyme immunoassays // Anal. Chim. Acta. – 1997. – Vol. 339. - P. 139-146.
9. V. Ximenes, A.Campa, W. Baader, L. Catalani. Facile chemiluminescent method for alkaline phosphatase determination // Anal. Chim. Acta. – 1999. – Vol. 402. – P. 99–104.
10. C. Hempen, U. Karst. A dual fluorophore system for simultaneous bioassays // Anal. Chim. Acta. – 2004. – Vol. 521. – P. 117–122.
11. Molecular probes, Handbook of fluorescent probes and research products, Ninth Edition, 2000, P. 421-422.
12. T. Steinkamp, F. Schweppe, B. Krebs, U. Karst. A tripod ligand as a new sensitizer for the enzyme amplified lanthanide luminescence determination of esterase // Analyst. – 2003. – Vol. 128. – P. 29-31.
13. M. Wu, Z. Lin, O. Wolfbeis. Determination of the activity of catalase using a europium(III)-tetracycline-derived fluorescent substrate // Anal. Biochem. – 2003. – Vol. 320. – P. 129–135.
14. T. Christopoulos, E. Diamandis. Enzymatically amplified time-resolved fluorescence immunoassay with terbium chelates // Anal. Chem. 1992. –Vol. 64. – P. 342-346.
15. Evangelista R., Pollak A., Templeton E. Enzyme-Amplified Lanthanide luminescence for enzyme detection in bioanalytical assays // Anal. Biochem. - 1991. - V.197. - P 213 - 224.
16. Українець І.В., Горохова О.В., Таран С. Г., Безуглий П. А., Туров А. В., Марусенко Н. А., Ефтеєва О. А. 4-оксихинолоны-2. 22. Синтез и биологические свойства 1-алкил(арил)-2-оксо-3-карбэтокси-4-гидроксикинолинов и их производных // Химия гетероцикл. соед. - 1994. - №. 7. -с. 958 – 966
17. Lakowicz J.R. // Principles of fluorescence spectroscopy. – Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. – 1999. – P. 237-264.

THE LUMINESCENCE DETERMINATION OF ALKALINE PHOSPHATASE WITH USING OF TERBIUM (III) COMPLEX

Scripinets Y.V., Yegorova A.V., Antonovich V.P., Ukrainets I.V.

The highly sensitive luminescent indirect method of determination of alkaline phosphatase based on the measurement of concentration of allocated inorganic phosphate by quenching of the new complex Tb (III)-L luminescence was developed with a limit of detection 0,05 мУ/мл.