

## 阳离子铝酞菁-血卟啉单甲醚缔合物荧光探 针对黄连素的特异性响应及其应用

郑 霄<sup>1,2</sup>, 周 涛<sup>1</sup>, 张 艳<sup>1</sup>, 邓雅斌<sup>1</sup>, 黄 萍<sup>1</sup>, 薛茂强<sup>2</sup>, 李东辉<sup>1\*</sup>

1. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361102

2. 厦门大学医学院基础医学部, 福建 厦门 361102

**摘 要** 黄连素(BBR)在医学领域有广泛的应用,其定量分析对指导临床治疗具有重要价值。常见的黄连素检测方法的灵敏度、响应范围、检测成本等方面尚存在不足。本研究发现,带有负电基团的血卟啉单甲醚(HMME)对红区发射的强荧光化合物阳离子铝酞菁(TTMAAlPc)具有高效荧光猝灭作用,形成几乎无荧光的离子缔合物,而在盐酸小檗碱的存在下,体系重新发出酞菁特有的红色荧光,且荧光恢复程度与盐酸小檗碱的浓度呈正相关。这一现象的发生是由于血卟啉单甲醚与阳离子铝酞菁分子通过平面疏水作用、静电作用和水分子介导的氢键作用等超分子作用力而形成缔合物(HMME-TTMAAlPc),而盐酸小檗碱则通过强竞争结合作用,使阳离子铝酞菁从缔合物中被释放出来,导致体系荧光显著恢复。据此发现,建立了盐酸小檗碱荧光增强定量分析新方法。考察了各种因素对方法的影响,在最优条件下,标准工作曲线的方程为  $\Delta I_f = 12.85c + 66.30$ , 线性区间为  $0.3 \sim 69.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 检测限为  $15.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 相关系数  $r = 0.9972$ 。研究表明,该方法特异性强、操作简便、成本低廉。该方法已用于实际样品的测定,取得了满意的结果。该研究开拓了酞菁红色荧光探针在药物分析领域中的应用。

**关键词** 酞菁; 卟啉; 荧光; 黄连素

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)03-0817-07

### 引 言

黄连素(Berberine, BBR)又名小檗碱,是一种可从黄连、黄柏等植物中提取的活性生物碱。其药理作用广泛,不仅可抑制多种革兰阳性菌和革兰阴性菌治疗感染性腹泻<sup>[1]</sup>、调节糖代谢和脂质代谢治疗II型糖尿病<sup>[2]</sup>、改善胆固醇代谢治疗高血脂<sup>[3]</sup>,还对炎症<sup>[4-5]</sup>、心律失常<sup>[6-7]</sup>、阿尔兹海默病<sup>[8]</sup>和肿瘤<sup>[9-11]</sup>等均具有治疗作用。为更好地评价黄连素从而改善其临床应用,建立一种特异性强、灵敏度高、操作简便的定量分析方法具有很重要的实际意义。

目前黄连素检测方法有高效液相色谱法<sup>[12-14]</sup>、紫外分光光度法<sup>[15-16]</sup>、电极法<sup>[17]</sup>、荧光量子点分析方法<sup>[18]</sup>,但这些方法需要较复杂的样品前处理,操作繁琐,对检测结果影响较大。

四-三甲基氨基铝酞菁是一种新型的红区发射荧光化合

物,具有荧光量子产率高、检测灵敏度高、稳定性好等特点。特别是与传统荧光探针相比,阳离子铝酞菁[Tetra(trimethylammonio) aluminum phthalocyanine, TTMAAlPc]的发射波长在长波区域(其发射峰在670 nm左右),因此可有效避开散射光和背景荧光的干扰。而且,该化合物可在长波段进行激发,具有很强的抗光漂白能力。上述特点使TTMAAlPc具有巨大的实际应用潜力,近年来,TTMAAlPc在分析科学特别是生物分析化学中的应用已引起了人们的兴趣和关注<sup>[19-20]</sup>。

本研究发现,血卟啉单甲醚(hematoporphyrin monomethyl ether, HMME)对TTMAAlPc具有高效荧光猝灭作用,形成近乎无荧光的缔合物,而该缔合体系体系中存在黄连素时,TTMAAlPc的荧光显著恢复。据此,以TTMAAlPc和HMME构建了离子缔合物红区荧光探针(TTMAAlPc-HMME),应用于盐酸小檗碱的测定,取得了满意的结果,开拓了元素酞菁荧光化合物的新应用。

收稿日期: 2019-01-21, 修订日期: 2019-04-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(90206016),福建省属公益类科研院所基本科研专项项目(2017R1036-2)资助

作者简介: 郑 霄,女,1991年生,厦门大学医学院抗癌研究中心硕士研究生 e-mail: zhengxiao883430@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: Lidh@xmu.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

LS-55 型荧光分光光度计(PerkinElmer, 美国), 检测器为 R928 红敏光电倍增管, 带恒温附件; Evolution 220 分光光度计(Thermo, 美国); Orion Star A211 pH Meter(Thermo scientific, 美国); DC-3006 低温恒温槽(宁波新芝生物科技股份有限公司); 精密天平(Sartorius 公司, 德国); OMNI 实验室超纯水系统(锐思捷科学仪器有限公司); 1 cm 石英荧光比色皿。

### 1.2 试剂

阳离子铝酞菁(TTMAAlPc), 据文献[21]合成并纯化。TTMAAlPc 储备液浓度为  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  避光保存, 工作液浓度为  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 血卟啉单甲醚注射液(第二军医大学药物化学研究所),  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  避光保存; 盐酸小檗碱(美国 Sigma 公司); 复方黄连素片(远大医药黄石飞云制药有限公司)。

磷酸广范缓冲液(由  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸、 $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾、 $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸氢二钠、 $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸钠配制而成), Britton-Robinson 缓冲液(将  $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸、乙酸和硼酸三酸混合液与  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 溶液按一定比例混合配制), 硼砂缓冲液(以硼砂  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  和 NaOH 混合配制), Tris-盐酸缓冲液, 巴比妥-盐酸缓冲液, 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, 硼酸-氯化钾-氢氧化钠缓冲液, 乙二醇胺-盐酸缓冲液, 氨-氯化铵缓冲液。

所用试剂均为分析纯, 实验用水为高纯水。

### 1.3 方法

于  $4.0 \text{ mL}$  塑料离心管中依次加入高纯水、 $12 \mu\text{L}$  TTMAAlPc( $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、 $300 \mu\text{L}$  pH 9.00 的磷酸广范缓冲液和  $24 \mu\text{L}$  HMME( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 混匀静置  $10 \text{ min}$  后, 加入一定浓度的盐酸小檗碱, 反应体系的总体积为  $3.0 \text{ mL}$ , 涡旋震荡混匀, 反应  $40 \text{ min}$  后检测体系的荧光强度, 激发与发射波长分别设为  $610$  和  $670 \text{ nm}$ , 狭缝均为  $5.0 \text{ nm}$ 。未加盐酸小檗碱的溶液荧光强度记为  $I_0$ , 加盐酸小檗碱的荧光强度记为  $I_1$ , 前后体系荧光强度的变化记为  $\Delta I_1$  ( $\Delta I_1 = I_1 - I_0$ ), 体系荧光猝灭倍数记为  $n$  ( $n = I_0 / I_1$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 TTMAALPc 的分子结构与光谱特性

阳离子铝酞菁(TTMAAlPc, 图 1)是一种具有类似卟啉结构、中心配位原子为三价铝离子的红区荧光化合物。母体结构的四个苯环上各连接一个三甲基取代的季铵基团, 故其结构富含正电荷, 因而易溶于水, 十分有利于水相中的应用。TTMAAlPc 的量子产率高且在较大 pH 范围中保持稳定; 而且, TTMAAlPc 是一种红色荧光探针, 匹配以合适的检测器(红敏光电倍增管), 可显著提高检测灵敏度; 另外, 由于其长波发射的特点, 能有效避开背景荧光和散射光的干扰, 在实际应用中具有优势。

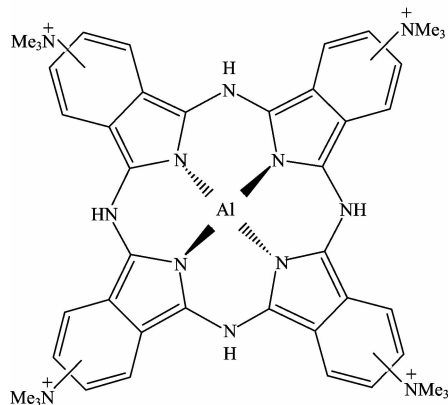


图 1 阳离子铝酞菁的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of Tetra(trimethylammonio)aluminum phthalocyanine (TTMAAlPc)

### 2.2 反应体系的光谱行为和机理探讨

血卟啉单甲醚(HMME, 图 2)是一种母体具有大平面结构的卟啉衍生物, 通过甲氧基取代血卟啉侧链上的一个羟基而得。研究发现在碱性介质中, 于 TTMAAlPc 溶液中加入适量 HMME 后, TTMAAlPc 荧光被高效猝灭(图 3), 反应体系只发出微弱的荧光乃至不发光。分析认为, 这一现象的发生首先是因为血卟啉单甲醚与阳离子铝酞菁分子都具有大平面、大  $\pi$  键的刚性结构, 这种结构使二者易于通过平面疏水作用、 $\pi$  键重叠效应而发生缔合作用; 其次, 在反应的介质酸度下, TTMAAlPc 带正电而 HMME 带负电, 二者发生静电相互作用; 另外由于二者均富含强电负性的氧原子或氮原子, 易于通过水分子介导的氢键作用进一步发生缔合。上述三种作用独立观之分别为弱相互作用, 但多种作用力的叠加则可形成较强的超分子作用, 促使 TTMAAlPc 与 HMME 之间形成稳定的缔合物 TTMAAlPc-HMME。缔合物中的 TTMAAlPc 受激发后发生非辐射跃迁, 故不发射荧光或只发射很弱的荧光。

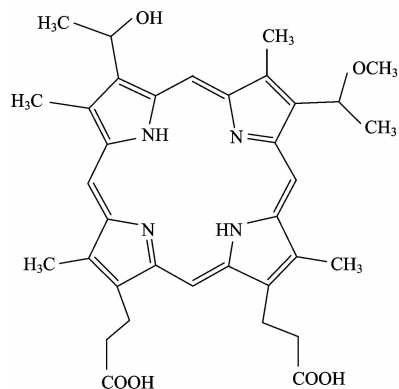


图 2 血卟啉单甲醚的分子结构

Fig. 2 Molecular structure of Hematoporphyrin monomethyl ether (HMME)

将黄连素(BBR, 图 4)加入到上述猝灭体系中, 发现 TTMAAlPc 的荧光显著恢复。分析认为, 由于 BBR 具有较

大平面共轭结构且带有正电荷及多个具有较大电负性的氧原子,因而可与 TTMAAlPc 分子竞争结合 HMME,从而使缔合物中的 TTMAAlPc 被释放成为游离态,导致体系的

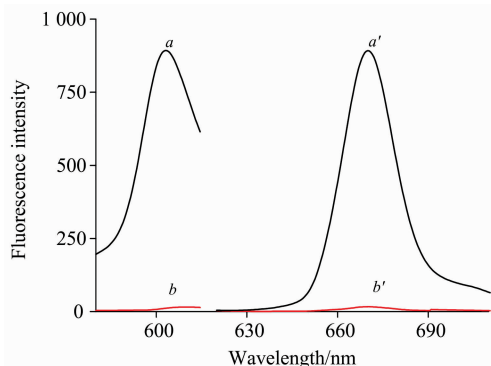


图 3 HMME 对 TTMAAlPc 激发光谱(a, a')和发射光谱(b, b')的高效猝灭作用

Fig. 3 High-efficiency quenching effect on the excitation and emission of fluorescence of TTMAAlPc in the absence (a, a') and presence (b, b') of HMME

$x$ : Excitation spectra;  $x'$ : Emission spectra

$[TTMAAlPc]=2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $[HMME]=6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

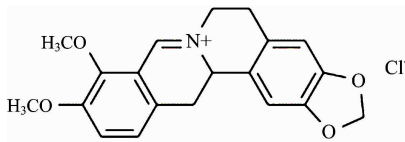


图 4 黄连素的分子结构

Fig. 4 Molecular structure of Berberine(BBR)

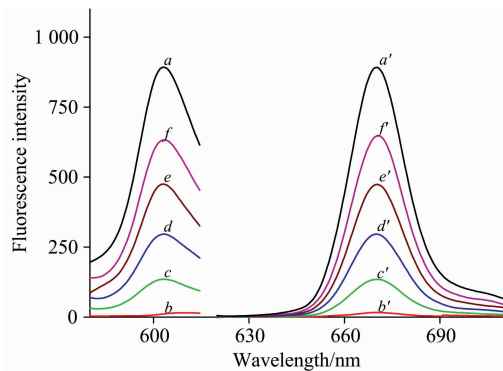


图 5 不同浓度黄连素对 TTMAAlPc-HMME 的荧光响应行为

Fig. 5 Fluorescence behavior of TTMAAlPc-HMME in the presence of various concentrations of Berberine

$[TTMAAlPc]=3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (a, a');  $[TTMAAlPc]=3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $[HMME]=6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (b, b');  $[TTMAAlPc]=3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $[HMME]=6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , The concentrations of BBR were  $1.26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (c, c'),  $13.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (d, d'),  $23.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (e, e') and  $43.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (f, f'), respectively;  $\lambda_{\text{ex}}=610 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=670 \text{ nm}$ ; Slit-width for excitation and emission were both set at  $5.0 \text{ nm}$

荧光恢复,且恢复程度与加入黄连素的量呈线性正相关(图 5)。据此,本研究建立了灵敏度高、操作性强的黄连素荧光定量分析新方法。

### 2.3 实验条件的优化

#### 2.3.1 pH 的影响与缓冲介质的筛选

先以 P-B 广范缓冲液为反应介质,考察了不同 pH 值的 HMME 对 TTMAAlPc 的荧光猝灭行为。可以看出,在 pH 8.0~10.0 的介质中, HMME 对 TTMAAlPc 的猝灭效果最好(图 6),故选择在 pH 9.0 的介质中进行猝灭反应。随后考察了黄连素存在下 9 种 pH 9.0 的不同缓冲液对体系荧光恢复的影响,所用的缓冲液包括 P-B、二乙醇胺-盐酸、Tris-盐酸、氨-氯化铵、硼砂、B-R、巴比妥-盐酸、甘氨酸-氢氧化钠和硼酸-盐酸-氢氧化钠缓冲液。可以看出, pH 9.0 P-B 缓冲液的荧光强度改变量  $\Delta I_f$  最好(图 7),故选用其作为反应介质。

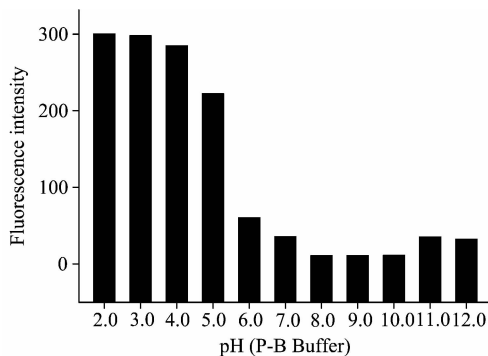


图 6 pH 对 TTMAAlPc-HMME 体系荧光猝灭的影响

Fig. 6 Effect of pH on fluorescence quenching of the TTMAAlPc-HMME reaction system

$[TTMAAlPc]=3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $[HMME]=6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

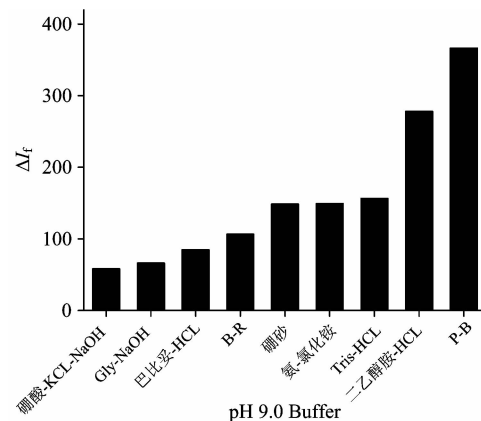


图 7 不同的 pH 9.0 缓冲液对体系荧光恢复的影响

Fig. 7 Effect of fluorescence recovery of TTMAAlPc-HMME in the presence of BBR in different kinds of buffers (pH 9.0)

$[TTMAAlPc]=3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $[HMME]=6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $[BBR]=1.26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

#### 2.3.2 HMME 用量的优化

考查了 HMME 用量对 TTMAAlPc 的荧光猝灭效果,

随着 HMME 浓度的增加, 体系荧光显著猝灭并且趋于稳定(图 8)。HMME 达到  $6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 体系的荧光可猝灭到最低值, 表示在该浓度下 TTMAAlPc 已与 HMME 缔合完全, 因此选择 HMME 的浓度为  $6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

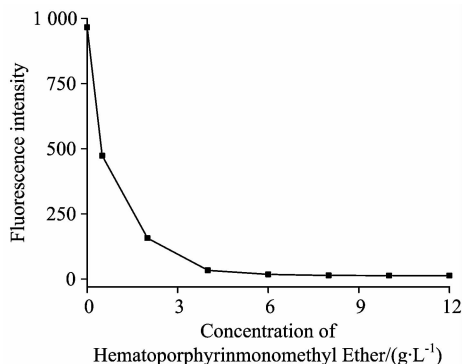


图 8 HMME 用量对 TTMAAlPc 荧光猝灭的影响

Fig. 8 Fluorescence quenching effect of different concentrations of HMME on TTMAAlPc

$$[\text{TTMAAlPc}] = 3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

### 2.3.3 反应时间的影响

加入猝灭剂(HMME)反应 10 min 后, 猝灭体系(TTMAAlPc-HMME)即达到稳定(图 9)。然后加入 BBR, 涡旋震荡进行竞争结合反应, 静置 20 min 后体系荧光恢复并达到平衡, 且至少在 3 h 内保持稳定(图 10)。因此, 实际操作中采用荧光猝灭 10 min 后加入 BBR, 进一步反应 20 min 后进行荧光检测。

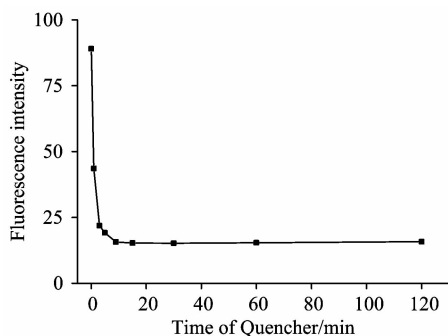


图 9 反应时间对体系荧光猝灭程度的影响

Fig. 9 Influence of reaction time on the fluorescence quenching of the reaction system

$$[\text{TTMAAlPc}] = 3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, [\text{HMME}] = 6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

### 2.3.4 反应温度的影响

考察了不同反应温度下(0, 25, 50 °C)对 BBR 工作曲线的影响(图 11)。可以看出, 反应温度对工作区间的线性和响应区间有明显的影 响, 25 °C 时线性关系最好。因此, 实际操作采用常温下进行反应、测定, 既有利于获得较好的线性关系和响应区间又具有操作的简便性。

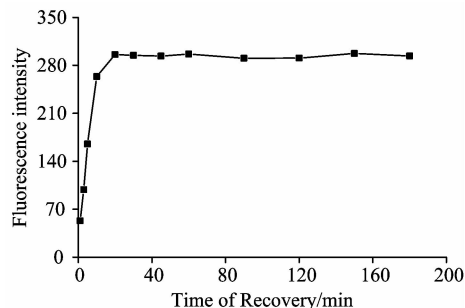


图 10 反应时间对体系荧光恢复程度的影响

Fig. 10 Effect of reaction time on the fluorescence recovery of TTMAAlPc-HMME in the presence of BBR

$$[\text{TTMAAlPc}] = 3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; [\text{HMME}] = 6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1};$$

$$[\text{BBR}] = 13.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

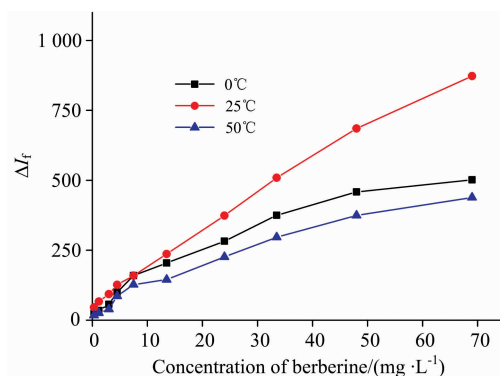


图 11 温度对 TTMAAlPc-HMME-BBR 体系的影响

Fig. 11 Effect of reaction temperature on the determination of BBR using TTMAAlPc-HMME as a fluorescent probe

$$[\text{TTMAAlPc}] = 3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, [\text{HMME}] = 6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

### 2.3.5 TTMAAlPc 用量的考察

考察了 TTMAAlPc 的用量对黄连素测定工作曲线的影响。可以看出, 体系的荧光强度与黄连素的浓度在一定区间内有良好的线性关系, 结果表明 TTMAAlPc 浓度为  $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时线性范围最宽, 检测限最低(表 1), 故最终选用 TTMAAlPc 浓度为  $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 TTMAAlPc 用量的优化

Table 1 Optimization of the TTMAAlPc usage

Concentration of TTMAAlPc / (mol · L <sup>-1</sup> )	Linear range / (mg · L <sup>-1</sup> )	Correlation coefficient	LOD / (mg · L <sup>-1</sup> )	Calibration curve
$1.0 \times 10^{-6}$	3~48	0.991 0	0.50	$\Delta I_f = 8.10c + 26.51$
$2.0 \times 10^{-6}$	1.2~33	0.975 9	0.24	$\Delta I_f = 8.51c + 80.33$
$3.0 \times 10^{-6}$	0.3~69	0.993 1	0.015	$\Delta I_f = 12.71c + 66.05$
$4.0 \times 10^{-6}$	0.3~48	0.992 5	0.09	$\Delta I_f = 15.09c + 66.26$

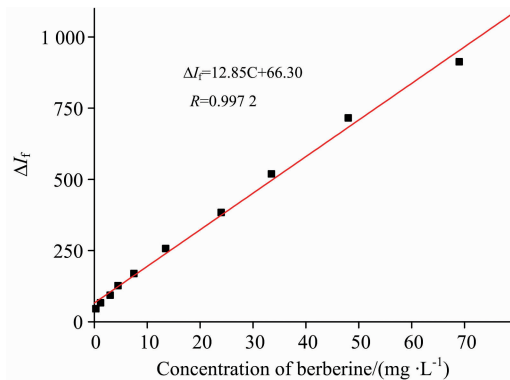


图 12 黄连素的标准工作曲线

Fig. 12 The calibration curve of Berberine achieved by this method

### 3 标准工作曲线

在最优条件下,测定并制作黄连素的标准工作曲线(图 12)。以黄连素的浓度( $c$ ,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )为横坐标,体系恢复前后的荧光变化量( $\Delta I_f$ )为纵坐标绘制工作曲线,得到的线性回归方程为:  $\Delta I_f = 12.85c + 66.30$ ,  $r = 0.9972$ ,线性区间为  $0.3 \sim 69.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,检测限为  $15.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 4 干扰物质的考察

对黄连素检测常见共存或干扰物质的影响进行了考察(表 2),结果表明在允许误差((5%)内,常见的金属离子、无机酸根离子、氨基酸、糖类对本法的测定基本无影响,某些表面活性剂和蛋白对本方法测定稍有影响,但都在允许的误差范围内。

表 2 干扰物的考察

Table 2 Tolerance of foreign substance

共存物质	浓度/( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	相对误差/%	共存物质	浓度/( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	相对误差/%
$\text{Na}^+$	$4.3 \times 10^{-3}$	-4.5	$\text{NO}_3^-$	$1.0 \times 10^{-3}$	-2.2
$\text{K}^+$	$5.3 \times 10^{-3}$	4.6	$\text{Cl}^-$	$3.8 \times 10^{-3}$	1.8
$\text{Ca}^{2+}$	$2.5 \times 10^{-4}$	-4.8	EDTA	$2.2 \times 10^{-5}$	-4.9
$\text{Cu}^{2+}$	$3.2 \times 10^{-4}$	-5.0	SDS	$1.1 \times 10^{-6}$	-4.7
$\text{Ba}^{2+}$	$4.8 \times 10^{-4}$	-5.6	SDBS	$4.8 \times 10^{-6}$	4.9
$\text{Mn}^{2+}$	$2.7 \times 10^{-4}$	-4.6	Tween-80	$2.3 \times 10^{-6}$	-4.6
$\text{Ag}^+$	$9.6 \times 10^{-3}$	3.7	Sucrose	$2.2 \times 10^{-4}$	4.1
$\text{Zn}^{2+}$	$4.3 \times 10^{-4}$	-3.8	Glucose	$4.2 \times 10^{-4}$	1.5
$\text{Cd}^+$	$6.4 \times 10^{-3}$	3.2	D-Lactose	$4.1 \times 10^{-4}$	-3.1
$\text{Pb}^{2+}$	$4.8 \times 10^{-4}$	4.9	Glycerin	$2.2 \times 10^{-4}$	2.8
$\text{Al}^{3+}$	$4.8 \times 10^{-4}$	-2.7	Threonine	$3.2 \times 10^{-4}$	1.6
$\text{Fe}^{3+}$	$5.8 \times 10^{-3}$	3.1	Methionine	$5.1 \times 10^{-5}$	-1.1
$\text{Hg}^{2+}$	$8.9 \times 10^{-4}$	4.1	Histidine	$4.8 \times 10^{-5}$	4.2
$\text{F}^-$	$2.3 \times 10^{-3}$	-3.9	Leucine	$2.3 \times 10^{-4}$	4.5
$\text{SO}_4^{2-}$	$5.3 \times 10^{-4}$	-2.0	Proline	$2.8 \times 10^{-5}$	-2.7
$\text{PO}_4^{3-}$	$1.8 \times 10^{-4}$	3.6	Human serum albumin	$6.6 \times 10^{-6}$	4.1
$\text{I}^-$	$3.5 \times 10^{-3}$	4.7	$\gamma$ -globulin	$7.3 \times 10^{-6}$	-3.9
$\text{Br}^-$	$2.8 \times 10^{-3}$	-4.1	BSA*	$2.4 \times 10^{-6}$	-2.0

注:表中带“\*”的共存物质浓度单位为“ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ”

### 5 样品检测

将本法应用于药片中小檗碱含量的测定,并与文献报道的分光光度法<sup>[16]</sup>进行比较(表 3)。样品处理方法参照文

献<sup>[16]</sup>:取盐酸小檗碱片 10 片,如为糖衣片,则除去糖衣后,精密称定、研细,精密称取细粉适量(约相当于盐酸小檗碱 30 mg),置 100 mL 量瓶中,加水适量,超声溶解后加水至刻度,摇匀、滤过、弃去初滤液,精密量取续滤液 4.0 mL 于另一 100 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。两种方法的检测结果

表 3 实际样品检测结果

Table 3 Analytical results of actual samples

Berberine Hydrochloride Tablets	Content of Berberine/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )			RSD ( $n=6$ )	
	Content	Present method	literature method	Present method	Standard method
1	1	1.03	0.97	3.66	3.59
2	9	8.95	8.74	1.35	2.81
3	14	13.27	14.76	3.72	2.24

基本一致,但紫外分光光度法的线性范围小于本法。

## 6 结 论

利用血卟啉单甲醚对红区荧光化合物阳离子铝酞菁的荧光高效猝灭作用,构建以结构匹配的 TTMAAlPc 和 HMME 组成的缔合物为红区荧光探针,通过理论上对药物

的结构分析及实际的筛选实验,发现盐酸小檗碱可以使 TTMAAlPc-HMME 缔合物探针的荧光显著恢复。荧光响应具有特异性和良好的线性关系,且对药品中常见的金属离子、糖类、蛋白等分子均具有较强的抗干扰能力。据此建立了操作简便、灵敏度高、浓度范围广、具有实际应用价值的黄连素荧光增强定量分析新方法,开拓了酞菁红色荧光探针在药物分析领域的应用。

## References

- [ 1 ] Chen Chunqiu, Tao Chunhua, Liu Zhongchen, et al. *Phytotherapy Research*, 2015, 29: 1822.
- [ 2 ] Lan Jiarong, Zhao Yanyun, Dong Feixia, et al. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 161: 69.
- [ 3 ] Li Xiaoyang, Zhao Zhenxiong, Huang Min, et al. *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13: 278.
- [ 4 ] Mo Chunfen, Wang Ling, Zhang Jie, et al. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 20(4): 574.
- [ 5 ] Fan Xiaodi, Wang Jun, Hou Jincai, et al. *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13: 92.
- [ 6 ] Liao Ying, Chen Kaihong, Dong Xingmo, et al. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018, 16: 2499.
- [ 7 ] Yin Jun, Ye Jianping, Ji Weiping. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2012, 2(4): 327.
- [ 8 ] Cai Zhiyou, Wang Chuanling, Yang Wenming. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2016, 12: 2509.
- [ 9 ] Parham Jabbarzadeh Kaboli, Asmah Rahmat, Patimah Ismail, et al. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 740: 584.
- [10] Mao Liyuan, Chen Qiogyun, Gong Ke, et al. *Oncology Report*, 2018, 16: 2436.
- [11] Luis Miguel Guamán Ortiz, Paolo Lombardi, Micol Tillhon, et al. *Molecules*, 2014, 19(8): 12349.
- [12] Roopam Devaliya, Mrunal Shirsat. *Oriental Journal of Chemistry*, 2017, 33(2): 989.
- [13] Wu Xia, Li Yan, Wang Qiu, et al. *Journal of Chromatography B*, 2015, 1007: 110.
- [14] Rahayu Utami, Armon Fernando, Indah Puspita Sari, et al. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 2017, 3(2): 115.
- [15] Cao M, Liu M, Cao C, et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2010, 75: 1043.
- [16] Akowuah G A, Okechukwu P N, Chiam N C. *Acta Chromatographica*, 2014, 26(2): 243.
- [17] Dalibor M, Anchalee S, Kurt K. *Electroanalysis*, 2015, 27(12): 2753.
- [18] Lu Shuaimin, Li Guoliang, Lv Zhengxian, et al. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 85: 358.
- [19] CHEN Lin, HUANG Ping, YANG Hui-qing, et al(陈 林, 黄 萍, 杨惠卿, 等). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2014, 42(7): 962.
- [20] YIN Lu, WANG Jing, HUANG Ping, et al(尹 璐, 王 敬, 黄 萍, 等). *Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceutics(中国生化药物杂志)*, 2011, 32(4): 277.
- [21] Duan Wubiao, Wang Zhenxin, Michael J Cook. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2009, 13(12): 1255.

# Construction of a Red-Emitting Associate Fluorescent Probe Consisting of a Cationic Aluminum Phthalocyanine and Hematoporphyrin Monomethylether: Its Response to Berberine and Application

ZHENG Xiao<sup>1,2</sup>, ZHOU Tao<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, DENG Ya-bin<sup>1</sup>, HUANG Ping<sup>1</sup>, XUE Mao-qiang<sup>2</sup>, LI Dong-hui<sup>1\*</sup>

1. Cancer Research Center, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361102, China

2. Department of Basic Medicine, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361102, China

**Abstract** Berberine (BBR) is widely used and of significant importance in medical field, and its quantitative analysis is of great value in guiding clinical treatment. There still be some shortcomings remaining in the determination of berberine by traditional methods, such as less sensitivity, narrow response range, or high testing cost. In this study, we found that hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) with negative groups had a high fluorescence quenching effect on Tetra (trimethylammonia) aluminum phthalocyanine (TTMAAlPc), a cationic phthalocyanine compound emitting strong red fluorescence, due to the formation of an almost non-fluorescent ion associate. Interestingly, it was found that the fluorescence of TTMAAlPc-HMME associate re-emitted in the presence of berberine. The recovery of fluorescence of TTMAAlPc was positively correlated with the concentration of berberine. The mechanism of the above-mentioned phenomena was discussed. We believed that the high-efficiency fluo-

rescence quenching effect of HMME on TTMAAlPc can be attributed to the formation of associate consisting of hematoporphyrin monomethyl ether and the cationic aluminium phthalocyanine (HMME-TTMAAlPc) through supramolecular interactions including planar hydrophobic interaction,  $\pi$ -bond stacking, electrostatic interaction and hydrogen bonding mediated by water molecules. The fluorescence recovery was due to the strong competitive binding to release the cationic aluminum phthalocyanine from the associate by berberine with a molecular structure matches TTMAAlPc. A new fluorescence-enhanced quantitative analysis method for berberine was established based on the above-findings. The factors including pH, sorts of buffer, reaction temperature, usages of HMME and TTMAAlPc and reaction time that affected the determination were investigated. Under the optimum conditions, the equation of calibration curve was  $I_f = 12.85c + 66.30$  with a correlation coefficient ( $R$ ) of 0.997 2, the linear range was 0.3~69.0 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, and the detection limit was 0.01~5.0 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>. The study indicated that this method bears the merits of strong specificity, simple operation and low cost. The established method has been applied to the determination of practical samples with satisfactory results. This study not only presents a new strategy for the construction of phthalocyanine-based optical probes, but also opens up the application of red-emitting phthalocyanines in the field of drug analysis.

**Keywords** Phthalocyanine; Berberine; Fluorescence; Molecular probe

(Received Jan. 21, 2019; accepted Apr. 29, 2019)

\* Corresponding author

---

## 敬告读者——《光谱学与光谱分析》已全文上网

从 2008 年第 7 期开始在《光谱学与光谱分析》网站(www.gpxygpx.com)“在线期刊”栏内发布《光谱学与光谱分析》期刊全文,读者可方便地免费下载摘要和 PDF 全文,欢迎浏览、检索本刊当期的全部内容;并陆续刊出自 2004 年以后出版的各期摘要和 PDF 全文内容。2009 年起《光谱学与光谱分析》每期出版日期改为每月 1 日。

《光谱学与光谱分析》期刊社