

基于愈创木酚荧光减量准确测定过氧化物酶活性的新方法

赵 炆¹ 李永生^{* 1} 高秀峰²

¹(四川大学化学工程学院, 成都 610065) ²(四川大学基础医学与法医学院, 成都 610041)

摘 要 利用 H_2O_2 /过氧化物酶(POD)/愈创木酚(GA)反应体系的产物(470 nm)吸光度去定量 POD 活性是目前常用方法之一,但产物不稳定且对比色皿有吸附现象是该反应的主要缺点之一。为了解决此问题,本研究利用 GA 的荧光特性建立了一种能准确测定 POD 活性的方法。用辣根过氧化物酶(HRP)作为测试样品得到了以下优化条件: 0.5 mmol/L GA, 0.5 mmol/L H_2O_2 , 0.05 mol/L PBS 缓冲液(pH 6.0), 反应温度 20℃, 样品耗量 20 μL ; 本方法的线性范围为 500 ~ 60000 U/L ($r = 0.9993$), $\text{RSD} \leq 2.4\%$ ($n = 11$), 检出限为 385 U/L。在优化条件下,用白萝卜提取液作为测试样品,用本方法(9714 ± 132) U/L)与比色法(9926 ± 352) U/L)和循环催化流动分析法(9608 ± 456) U/L)进行了对比,结果表明,3 种方法相互一致性很好。

关键词 过氧化物酶; 愈创木酚; 荧光; 白萝卜提取液

1 引 言

过氧化物酶(POD, EC 1.11.1.7)是一种广泛存在于植物和动物体内的酶,被应用在临床检验^[1]、环境监测^[2]、有机合成^[3]和食品分析^[4]等领域,大多数生化试剂盒都含有 POD,其最重要的指标就是酶活性。因此,POD 活性的准确定量尤为重要。

POD 能催化酚类或胺类化合物与 H_2O_2 的反应,常见的显色试剂有邻苯二胺^[5]、季胺^[6]、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐^[7]、邻苯三酚^[8]、愈创木酚(GA)^[9]以及胺和酚类的耦合物^[10,11]; 这些反应的产物通过比色法进行检测,但最常用的是低毒性、廉价的 GA。

研究认为, H_2O_2 /POD/GA 体系的反应产物是愈创木酚四聚体(4-GA)^[12],但新的研究发现是愈创木酚二聚体(2-GA)^[11~13]。文献[4]也验证了此结果,并发现该产物不稳定,会很快分解成其它物质,而且通过它的吸收去定量 POD 活性,重现性也较差。此外,由于该产物不稳定、难提纯,所以只能间接地^[14]通过 GA 浓度求得反应体系中 2-GA 的摩尔吸光系数,但这又会由于表观摩尔吸光系数差异导致测定的 POD 活性结果产生较大的误差。由于发现 H_2O_2 /POD/GA 体系中的 GA 还具有稳定的荧光特性^[14],所以为了解决上述问题,基于 GA 荧光减量,提出了一种准确测定 POD 活性的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UV-1800PC 型紫外/可见分光光度计(上海美谱达公司); RF-5301PC 型荧光光度计、AUW120D 型电子天平(日本岛津公司); 800-1 型离心机(常州普天仪器制造有限公司); JYZ-E6 型榨汁机(九阳股份有限公司)。

愈创木酚(国药集团化学试剂有限公司); 过氧化氢(30%, w/V)、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (成都市科龙化工试剂厂); HRP (≥ 250 U/mg, Sigma 公司); 实验用水为超纯水(电导率 0.065 $\mu\text{S}/\text{cm}$); 所用试剂均为分析纯。

2.2 POD 测定原理及活性计算

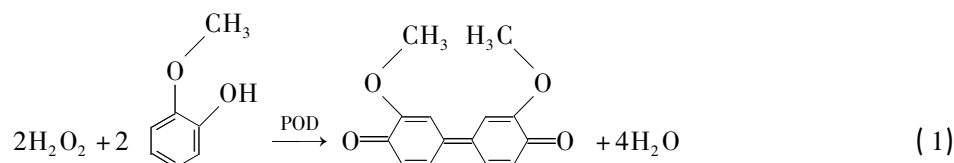
在 POD 的催化作用下,有荧光的 GA 与无荧光的 H_2O_2 发生反应,并生成了 3,3'-二甲氧基-4,4'-联苯二酮(2-GA)^[11~13],与此同时,导致了反应体系中 GA 浓度降低,使其对应的荧光强度等比例降低。

2015-02-03 收稿; 2015-03-15 接受

* E-mail: lysgxf2005@qq.com

本方法利用 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{POD}/\text{GA}$ 反应体系中 GA 的荧光减量原理定量 POD 活性。

本研究基于公认的酶活性(E)定义^[4],将酶活性浓度(E_c)定义为单位体积内的酶活性(U/L)。



根据上述荧光反应,利用 GA 的荧光减量定量 POD 活性时,可导出以下的酶活性浓度(E_c)计算式:

$$E_c(\text{U/L}) = \frac{\Delta F}{\Delta t} \times \frac{nV}{KvL} \quad (2)$$

式中, ΔF 为 POD 催化反应的动力学线性响应区域内荧光强度的减量; Δt 为该线性区域的时间间隔(min); K 为 GA 的摩尔荧光系数($\text{L}/\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$); L 为荧光石英池的光程(cm); V 为反应体系总体积(mL); v 为加入的含酶样品体积(mL)。为了进行对照实验,在此给出了比色法测定 POD 的计算公式:

$$\Delta E_c(\text{U/L}) = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{nV}{\varepsilon vL} \quad (3)$$

$\text{H}_2\text{O}_2/\text{POD}/\text{GA}$ 反应体系的产物为有色物质,在 470 nm 处有最大吸收。公式(3)与公式(2)不同的地方是, ΔA 是 POD 催化反应的动力学线性区域内吸光度的增值; ε 为 2-GA 的摩尔吸收系数($\text{L}/(\mu\text{mol cm})$), n 为底物与产物的反应摩尔比。

3 结果与讨论

3.1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{POD}/\text{GA}$ 反应体系荧光性考察

对 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{POD}/\text{GA}$ 反应体系中的 GA, GA + HRP, GA + H_2O_2 及 GA + HRP + H_2O_2 溶液分别进行了荧光光谱扫描,考察了这些物质的荧光特性。实验条件: pH 6.0, 0.5 mmol/L 的 GA 和 H_2O_2 , 3000 U/L HRP, 室温(20°C)、光谱通带 $3 \times 20 \text{ nm}$, 发射波长(λ_{em}) 612 nm , 激发波长(λ_{ex}) 288 nm ^[4]。得到的 GA 激发光谱和发射光谱曲线见图 1a; $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{POD} + \text{GA}$ 混合液在不同时间下的荧光光谱见图 1b。由图 1a 可知,GA 与 GA + HRP 和 GA + H_2O_2 溶液在 612 nm 处都有很强的荧光,且荧光光谱曲线重叠,这说明产生的荧光由 GA 引起。另外,在 612 nm 处,GA + HRP + H_2O_2 的荧光值略低于 GA 的荧光值,这是因为 HRP 催化 GA 与 H_2O_2 反应使体系中的 GA 浓度降低,导致了其荧光强度减少。由图 1b 可知,该混合液在 580 nm 处的荧光强度逐渐增大,而在 612 nm 处荧光强度逐渐减小,推测在 580 nm 处应该为产物 2-GA 的荧光强度。研究发现 2-GA 不稳定,会很快分解成其他物质,所以本研究没有利用此产物的荧光特性。而 612 nm 处是 GA 产生的荧光,比较稳定,因此选择 GA 的荧光减量去定量 POD 活性。

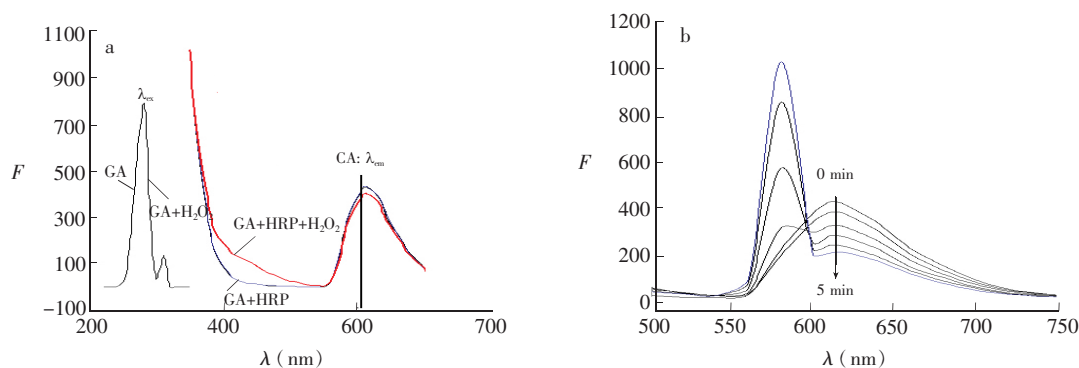


图1 GA 的荧光特性考察

Fig. 1 Investigation of guaiacol (GA) fluorescence feature

(a) GA 的激发光谱和荧光光谱; (b) 在不同时间下 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HRP}/\text{GA}$ 反应体系的荧光光谱。

(a) Excitation and emission spectra of GA; (b) Fluorescent spectra created by the system at different time.

3.2 GA 荧光稳定性考察

在室温(20℃)、光谱通带为 3×20 nm 条件下,分别用 0.1, 0.3 和 0.6 mmol/L 的 GA 考察了其在 3 h 内的荧光稳定性。结果表明,3 种浓度的 GA 荧光强度值分别为 162.2 ± 3.3 (RSD = 2.0%)、 443.3 ± 7.2 (RSD = 1.6%)、 864.8 ± 8.7 (RSD = 1.0%),说明其荧光稳定性良好。而且对 0.5 mmol/L GA 连续检测 5 min,其荧光强度值为 724.3 ± 10.0 (RSD = 1.4%),这表明 GA 可在长时间激发光照射下保持稳定,故可用于 POD 酶的动力学测定。

3.3 GA 浓度与荧光强度的相关性

实验条件: 20℃, 0.05 ~ 2.0 mmol/L GA, 1.5×20 nm, 3×15 nm, 3×20 nm, 5×10 nm 和 5×15 nm 通带宽度; 得到的结果见图 2。由图 2a 可知,当 GA 浓度大于 500 $\mu\text{mol/L}$ 时,其荧光强度曲线开始向下弯曲; 在 0 ~ 500 $\mu\text{mol/L}$ 范围内(图 2b),GA 与荧光强度呈线性相关,通带宽度不影响线性,只影响线性响应的斜率(灵敏度)。综合考虑,选择在 3×20 nm, 0.5 mmol/L GA 下,研究 POD 活性的测定方法。

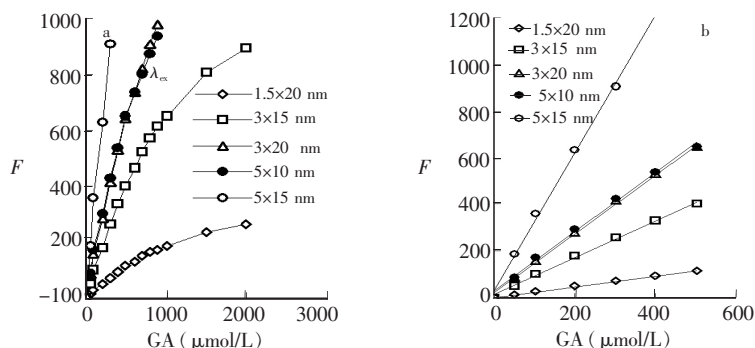


图 2 不同通带宽度下,GA 浓度与荧光强度之间的线性相关考察

Fig. 2 Investigation of the linearity between GA concentration and fluorescent intensity in different spectral bandwidth

为了考察 pH 值、温度、PBS 和 H_2O_2 浓度对 POD 活性测定的影响,用 HRP、萝卜 POD 作为测试样品,按 4 因素 5 水平的正交试验方法进行了测定。因素(水平)分别为: H_2O_2 浓度(200, 300, 400, 500 和 600 $\mu\text{mol/L}$)、pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)、温度(20, 30, 40, 50 和 60℃)、PBS 浓度(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 和 0.3 mol/L)。

3.4 正交实验结果

正交试验结果见图 3,对于 HRP 和白萝卜 POD,4 种因素的影响趋势类似。另外,从图 3a 可知,POD 的活性随 H_2O_2 浓度增加而增大,当 H_2O_2 浓度处于 0.4 ~ 0.6 mmol/L 范围时,POD 活性达到最大;图 3b 表明,反应体系 pH = 6.0 时,POD 活性最大,当 pH > 6.0 时,pH 增加,活性逐渐减小;图 3c 表明,POD 活性随温度升高而降低,这是由于温度升高导致 GA 荧光猝灭;图 3d 的曲线显示了 PBS 浓度对

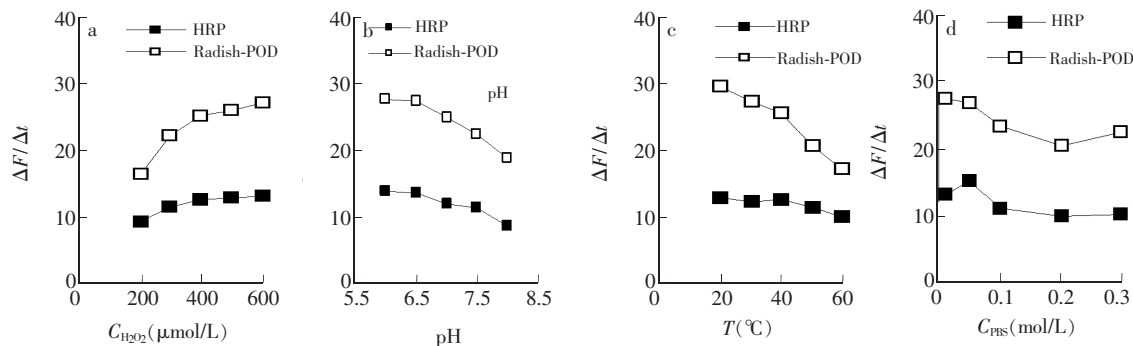


图 3 影响 POD 活性测定的因素考察

Fig. 3 Investigation for factors affecting peroxidase (POD) activity assay

POD 活性的影响规律,当 PBS 浓度为 0.05 mol/L 时,POD 活性最大。根据正交试验极差结果,各因素影响水平为 pH(极差: 5.31) > PBS 浓度(4.97) > H_2O_2 浓度(3.82) > 温度(2.81)。初步选择 POD 活性的测定条件为:0.5 mmol/L GA, 0.5 mmol/L H_2O_2 , 0.05 mol/L PBS 缓冲液、pH 6.0、温度 20℃。

基于上述结果,对在 5.0 ~ 7.0 范围内的 pH 值进行了单因素考察。结果表明,当 pH < 6.0 时,pH 增加,POD 活性增加;而当 pH > 6.0 时,pH 增加,POD 活性减小。所以最终选择测定 POD 活性时 pH = 6.0。

3.5 POD 活性测定

3.5.1 GA 的摩尔荧光系数 由公式(2)可知,用荧光法测定 POD 活性时,要先在给定条件下得到 GA 的摩尔荧光系数(K),此值是 GA 浓度与荧光强度的线性相关曲线的斜率。所以,在选定条件(20℃, 3×20 nm)下,测定一系列 GA 浓度(0, 50, 100, 200, 300, 400 和 500 μ mol/L)的荧光强度,得到线性相关曲线,并对此曲线进行数学回归($F = 1.4052c + 21.689$, $r = 0.998$),得到了 K 值为 $1.4052 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;在计算 POD 活性时,将其带入公式(2)。

3.5.2 线性范围及检出限的考察 为了考察本方法的线性范围,将商品化的 HRP 母液稀释成一系列酶标准溶液,将其作为样品,在优选条件下测定它们的活性。结果表明,当样品用量为 20 μ L 时,HRP 活性浓度在 500 ~ 60000 U/L 范围内呈良好的线性相关($\Delta F/\Delta t = 0.0094E_c + 0.131$, $r = 0.9993$)。分别用 15000 和 3400 U/L HRP 标液作为测试样品,考察了本方法的重现性($n = 11$)。得到的两组 E_c 平均值分别为(14625 ± 540) U/L(RSD < 3.7%)和(3377 ± 81) U/L(RSD < 2.4%),此结果表明,本方法重现性良好;11 次测定的平均值与校正值的差值分别为 375 U/L(RSD < 2.5%)和 23 U/L(RSD < 0.7%),表明本方法准确度高。此外,用 0.5 mmol/L GA + 0.5 mmol/L H_2O_2 混合液作为空白试样,连续测定 11 次,得到的荧光强度平均值为 706.00 ± 1.18 。经计算,得到本方法的检出限为 385 U/L($K = 0.0094$, $S = 1.18$, $c_L = 3S/K$)。方法的线性范围和检出限与基于 H_2O_2 /POD/GA 反应体系的比色法(线性范围 1000 ~ 20000 U/L,检出限 675 U/L)相比,线性范围宽(500 ~ 60000 U/L),检出限低(385 U/L)。

3.6 实际样品 POD 活性测定

选择富含 POD 的白萝卜、青萝卜、红心柚子表皮、红薯、大白菜和土豆的提取液作为酶样品,用本方法测定了它们的 POD 活性并进行了比较。为了考察本方法可靠性,进行加标回收实验。将酶样品与 HRP 以 1:1 比例混合,在优选条件下测定加标后样品的活性。为消除 HRP 失活的影响,每次加标实验前对其活性进行校正,得到的结果见表 1。本方法的回收率介于 95% ~ 105%,测定结果令人满意。本实验所选样品中 POD 质量活性比的顺序为:白萝卜 > 红心柚子皮 > 青萝卜 > 大白菜 > 红薯 > 土豆。

利用标准加入法(Standard addition method, SAM)进一步考察了本方法的准确性。表 1 的结果表明,两方法结果一致。

3.7 对比实验

3.7.1 POD 的手工比色法 常规比色法测定 POD 活性时,是利用 H_2O_2 /POD/GA 体系反应产物(470 nm)的吸光度差值,带入公式(3)计算得到。但本研究发现,所用仪器(波长分辨率、灵敏度)及方法的测试条件(温度、pH)不同, ε 不同,所以计算 POD 活性时不能直接采用文献或商家给出的 ε 值。因此,本实验先用比色法测定产物的 ε_{2-GA} 。由于 2-GA 不稳定、无法提纯,不能靠直接测定吸光度值得到 ε_{2-GA} ,只能利用 GA 浓度间接求出 2-GA 的浓度($2H_2O_2 + 2GA \xrightarrow{\text{POD}} 2-GA + 4H_2O$)。理论上讲,当 H_2O_2 /POD/GA 体系中 POD 过量,且 H_2O_2 浓度远大于 GA 时,可认为 GA 完全转化为 2-GA,所以对 POD 活性浓度与 H_2O_2 /GA 浓度比进行了考察。

在考察酶的活性浓度时,在分别取 20 μ L 的 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 U/L HRP,加入 0.5 mmol/L H_2O_2 + 1.5 mmol/L GA 混合液中^[17]测定 2-GA 的吸光度,得到的结果如图 4a。很明显:当 HRP 浓度小于 1000 U/L 时,2-GA 的吸光度随 HRP 浓度增加而增大,当 HRP 浓度大于 1000 U/L 时,2-GA 的吸光度不再变化。

选定 3000 U/L HRP, 0.2 mmol/L GA,使其与不同浓度的 H_2O_2 溶液(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 和 2.0 mmol/L)按体积比 1:1 混合,测定其产物 2-GA 的吸光度,得到结果见图 4b。2-GA 的吸光度随

H_2O_2 浓度增加呈线性增加趋势,当 H_2O_2 浓度大于 5 倍 GA 浓度时,2-GA 的吸光度不再随 H_2O_2 浓度而变化。由此得出结论: 当 HRP 为 3000 U/L、 H_2O_2 /GA 浓度比大于 5 时,GA 能完全转化为 2-GA。因此,根据已知的 GA 浓度先求得反应系统中的 2-GA 浓度,再将其带入朗伯-比尔定律,求得 $\varepsilon_{2\text{-GA}}$ 。

表 1 试样中 POD 活性测定及回收率结果($n=3$)

Table 1 Determination of POD in real samples and recovery test ($n=3$)

样品 Sample	活性浓度 (稀释前) Activity (before diluting) (U/L)	质量活性比* Mass activity ratio (U/L)	添加活性 浓度 Added (U/L)	测得总活性 Total found (U/L)	回收活性 Recovery activity (U/L)	回收率 Recovery (%)	SAM (U/L)
白萝卜 White radish	5478 ± 111 (10342 ± 686)	10.34	0	5478 ± 111	—	—	5425 ± 53 ($\Delta F/\Delta t = 0.0094c + 50.995$, $r = 0.9992$)
			653	6143 ± 333	665	101.8	
			1034	6461 ± 15	1088	95.1	
			2394	7798 ± 715	2320	96.9	
			3339	8717 ± 523	3239	97.0	
			4770	10332 ± 529	4854	101.8	
红心柚子表皮 Red heartpomelo peels	479 ± 37 (805 ± 21)	2.56	0	479 ± 37	—	—	444 ± 35 ($\Delta F/\Delta t = 0.0095c + 4.2139$, $r = 0.9991$)
			376	869 ± 34	390	103.6	
			685	1140 ± 53	661	96.6	
			1802	2193 ± 205	1714	95.1	
			2599	3047 ± 37	2568	98.8	
			3607	4192 ± 327	3713	102.9	
青萝卜 Green turnip	1781 ± 85 (3653 ± 239)	2.13	0	1781 ± 85	—	—	1720 ± 52 ($\Delta F/\Delta t = 0.0096c + 16.597$, $r = 0.9997$)
			320	2097 ± 111	316	98.6	
			601	2407 ± 29	626	104.1	
			1604	3355 ± 59	1574	98.1	
			2329	4181 ± 187	2400	103.0	
			3058	4919 ± 383	3133	102.5	
红薯 Sweet potato	4451 ± 15 (6332 ± 126)	1.19	0	4451 ± 15	—	—	4081 ± 242 ($\Delta F/\Delta t = 0.0097c + 40.825$, $r = 0.998$)
			2019	6566 ± 248	2115	104.8	
			4115	8393 ± 270	3942	95.8	
			5473	9910 ± 263	5459	99.7	
			7358	11962 ± 99	7511	102.1	
			9292	14158 ± 234	9928	104.5	
大白菜 Cabbage	1706 ± 96 (3465 ± 243)	1.98	0	1848 ± 165	—	—	1790 ± 84 ($\Delta F/\Delta t = 0.0094c + 16.824$, $r = 0.997$)
			2019	3841 ± 304	2051	101.6	
			4115	5944 ± 25	4238	103.0	
			5473	7286 ± 342	5580	102.0	
			7358	8692 ± 131	6986	95.0	
			9292	11428 ± 802	9722	104.6	
土豆 Potato	694 ± 44 (1651 ± 120)	0.51	0	694 ± 44	—	—	598 ± 96 ($\Delta F/\Delta t = 0.0095c + 5.7424$, $r = 0.9996$)
			1890	2512 ± 113	1818	96.2	
			4115	4804 ± 199	4110	99.9	
			5214	5775 ± 388	5081	97.5	
			7092	7755 ± 480	7061	99.6	
			9107	9985 ± 434	9291	102.0	

*: 单位质量样品中所含的酶活性(POD activity of the sample in unit mass)。

为了得到更准确的 $\varepsilon_{2\text{-GA}}$,可根据 H_2O_2 /POD/GA 体系中产物浓度与其吸光度的线性相关曲线的斜率求得 $\varepsilon_{2\text{-GA}}$ 的平均值。具体操作时,使 H_2O_2 /GA 浓度比大于 5 (H_2O_2 /GA: 3.0/0.04, 3.0/0.08, 3.0/0.2, 3.0/0.4, 3.0/0.6 mmol/L),测定产物的吸光度,绘制 2-GA 浓度与其吸光度的线性相关曲线,得到其斜率。

在 20℃ 下(为便于比较,此温度与荧光法相同),用手工比色法测得的 $\varepsilon_{2\text{-GA}}$ 为 0.0102 L $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($A = 0.0102c + 0.00224$, $r = 0.9991$)。用 5 点平均法得到的 $\varepsilon_{2\text{-GA}}$ 值为 (0.0122 ± 0.0031) L $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; 两者之间差别仅为 0.0020 L $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,故可用斜率代表 $\varepsilon_{2\text{-GA}}$ 平均值。

在上述优化条件下,测定了白萝卜提取液中的 POD 活性。操作时先测定预热 5.0 min 后的 0.75 mL

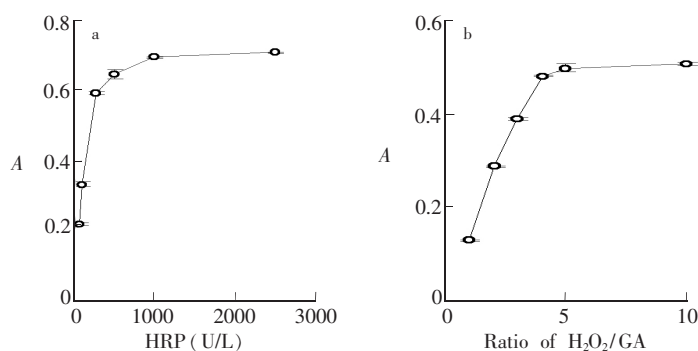


图4 HRP 活性浓度 (a) 及 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{GA}$ 浓度比 (b) 对产物 2-GA 的平衡吸光度 (A) 的影响

Fig. 4 Effect of concentration of HRP (a) and ratio of $\text{H}_2\text{O}_2/\text{GA}$ (b) on absorbance of 2-GA

$\text{H}_2\text{O}_2 + 0.75 \text{ mL GA} + 1.48 \text{ mL PBS}$ 混合液, 得到试剂空白值 (A_0), 再将 0.020 mL POD 样品液加入此反应液中, 总体积固定在 3.0 mL ; 连续检测此反应液的吸光度 (A_i), 得到酶促反应的动力学曲线。最后根据公式 (3) 计算出 POD 的活性, 得到的结果为 $9926 \pm 352 \text{ U/L}$ ($n=3$)。

3.7.2 循环催化流动分析法 图 5 所示的是本研究组开发的循环流动分析法 (Recirculating catalysis flow analysis, RCFA)^[8], 该系统的特点是测定过程自动化, 人为干扰因素小, 能获得酶动态催化过程全部信息, 测定结果准确度高、重现性好。RCFA 系统的测定过程见图 5。在反应池中加入试剂混合液 ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{GA}$), 预热 5 min 后用泵使其循环, 得到空白值 (A_0); 将 POD 样品液加入反应池, 此含酶混合液边发生酶促反应, 边循环, 检测器同时输出一条随时间变化的动态酶催化动力学曲线 (A_i); 完成一次测定后, 用缓冲液清洗流路。

测定 POD 活性时, 同样要先得到 RCFA 系统的 $\varepsilon_{2-\text{GA}}$, 因此在与 3.7.1 节相同条件下对其进行测定, 得到 $\varepsilon_{2-\text{GA}}$ 为 $0.0085 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($A = 0.0085c + 0.0185, r = 0.9993$), 此数据证明 RCFA 的 $\varepsilon_{2-\text{GA}}$ 与手工比色法不同。然后用 RCFA 系统测定相同白萝卜样品提取液的 POD 活性, 其结果为 $9608 \pm 456 \text{ U/L}$ ($n=3$)。

3.8 测定结果对比

在优选的条件下, 分别用上述 3 种方法测定了某一白萝卜提取液的 POD 活性, 得到结果分别为 (9714 ± 132) U/L (荧光法)、(9926 ± 352) U/L (比色法)、(9608 ± 456) U/L (RCFA), 其结果相互一致。另外, 将此白萝卜提取液与超纯水分别以 $0.5:9.5, 1:9, 1:4$ 和 $1:1$ 的比例稀释成 4 个样品, 再用上述 3 种方法进行了测定, 考察了方法之间的相关性。结果表明, 荧光法与比色法 ($y = 1.10x - 678.8, r = 0.9992$), 荧光法与 RCFA ($y = 1.02x - 389.8, r = 0.997$) 之间具有很好的线性相关。

4 结 论

基于 GA 荧光减量建立了一种能准确测定 POD 活性的方法。本方法的特点是选择性好、灵敏度高、酶样品用量少、重现性及线性关系较好。本方法的测定结果与常规比色法、RCFA 法的结果一致, 这证明本方法准确、可靠。

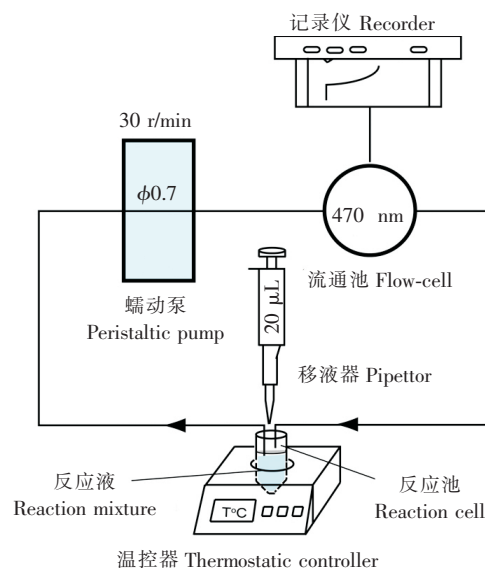


图5 RCFA 系统

Fig. 5 System of recirculating catalysis flow analysis (RCFA)

References

- 1 Padmarajaiah N, Honnur K, Anantharaman S, Ashwinee K S. *Clin. Biochem.*, **2012**, 45: 139 – 143
- 2 Azevedo A M, Martins V C, Prazeres D M F, Vojinovic V, Cabral J M S, Fonseca L P. *Biotechnol. Ann. Rev.*, **2003**, 9: 199 – 247
- 3 Lopes G R, Pinto D C G A, Silva A M S. *RSC. Adv.*, **2014**, 4(70): 37244 – 37265
- 4 Shekhovtsova T N, Muginova S V, Luchinina J A, Galimova A Z. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 573 – 574: 125 – 132
- 5 WEI Ran-Fei, GAO Xiu-Feng, LI Yong-Sheng, WANG Heng, FANG Yuan. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(6): 897 – 901
魏然飞, 高秀峰, 李永生, 王 恒, 方 圆. *分析化学*, **2009**, 37(6): 897 – 901
- 6 LI Jian-Guo, LIU Ying, JU Huang-Xian. *Acta Chimica Sinica*, **2007**, 65(15): 1499 – 1503
李建国, 刘 颖, 鞠焜先. *化学学报*, **2007**, 65(15): 1499 – 1503
- 7 Holm K A. *Analyst*, **1995**, 120: 2101 – 2105
- 8 Ghadiri M, Kariminia H R, Azad R R. *Ecotox. Environ. Safe.*, **2013**, 91: 117 – 121
- 9 Vieira I C, Fatibello-Filho O. *Analyst*, **1998**, 123: 1809 – 1812
- 10 Molaei R A, Ghourchian H, Moosavi-Movahedi A A, Hong J, Nazari K. *Anal. Biochem.*, **2007**, 362: 38 – 43
- 11 Doerge D R, Divi R L, Churchwell M I. *Anal. Biochem.*, **1997**, 250(1): 10 – 17
- 12 Tonami H, Uyama H, Nagahata R, Kobayashi S. *Chem. Lett.*, **2004**, 33(7): 796 – 797
- 13 Hwang S, Lee C H, Ahn I S. *J. Ind. Eng. Chem.*, **2008**, 14(4): 487 – 492
- 14 CHEN Ting-Mei, LI Yong-Sheng, GAO Xiu-Feng. *Chinese J. Anal. Lab.*, **2011**, 30(8): 6 – 10
陈婷梅, 李永生, 高秀峰. *分析实验室*, **2011**, 30(8): 6 – 10
- 15 Robert B M, Lawrence W B, Robert W B, Richard C K, George N B. *Clin. Chem.*, **1976**, 22(2): 141 – 150
- 16 NC-ICB. *Eur. J. Biochem.*, **1979**, 97: 319 – 320
- 17 ZHANG Zhao, LI Yong-Sheng, GAO Xiu-Feng. *Science and Technology of Food Industry*, **2013**, 34(12): 187 – 191
张 朝, 李永生, 高秀峰. *食品工业科技*, **2013**, 34(12): 187 – 191

A New Method for Accurate Determination of Peroxidase Activity Based on Fluorescence Decrease of Guaiacol

ZHAO Yang¹, LI Yong-Sheng^{*1}, GAO Xiu-Feng²

¹(School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

²(West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract At present the most common colorimetry for the activity determination of the peroxidase (POD) is based on the detection of the absorbance of product at 470 nm in a reaction system of the H₂O₂/POD/guaiacol (GA), but the shortcoming of the method is that the formed product is not stable and there is the serious adsorption phenomenon on the cell. To solve this problem, a new method was established for accurate determination of POD activity based on the fluorescent feature of GA. By using standard solutions of horseradish peroxidase as the test samples and under these optimum conditions such as 0.5 mmol/L of GA, 0.5 mmol/L of H₂O₂, pH 6, 0.05 mol/L of phosphate buffer solution and the reaction temperature of 20℃, the sample volume was only consumed 20 microlitre at a time, the linear response range was 500 – 60000 U/L ($r = 0.9993$), the detection limit was 385 U/L and relative standard deviation was $\leq 2.4\%$ ($n = 11$). The comparisons for the determination results of the POD activity in the white radish's extraction solutions were conducted among our method (9714 ± 132 U/L) and the colorimetric method (9926 ± 352 U/L) as well as the recirculating-catalytic flow analysis (9608 ± 456 U/L). The results showed that the mutual consistency is better.

Keywords Peroxidase; Guaiacol; Fluorescence decrease; White radish extraction solution

(Received 3 February 2015; accepted 15 March 2015)