

基于流动注射光度法的吸光度/留存时间比 自动测定过氧化物酶活性方法

李永生*¹ 郑巍¹ 高秀峰*²

(四川大学化学工程学院¹, 基础医学与法医学院², 成都 610065)

摘 要 本研究给出了流动注射分光光度系统(FI-SP)测定酶活性浓度(E_c)的通用公式 $E_c = k\Delta A/\Delta t$; Δt 是在酶促反应线性响应区域内试样塞的平均留存时间; ΔA 为平均留存时间处对应的吸光度; $k = nV/(\varepsilon vL)$, V 为样品注入点到流通池入口之间的管路总容积, n 为酶底物与产物的反应摩尔比, ε 为产物的摩尔吸收系数, v 为注入的酶液体积, L 为流通池光程; FI-SP 系统确定后 k 为常数。在此基础上,将 H_2O_2 /过氧化物酶(POD)/愈创木酚(GA)反应体系导入 FI-SP 系统,建立了一种无需标准曲线的 POD 活性快速准确测定的新方法。此方法优化后的条件:载流磷酸盐缓冲液浓度为 0.05 mol/L (pH 5.5),进样体积为 40 μ L,反应盘管长度 200 cm, 1.5 mmol/L H_2O_2 , 3.5 mmol/L GA, 0.4 mol/L HCl(清洗液),检测波长 470 nm,产物的摩尔吸光系数为 0.0125 L/(μ mol \cdot cm)。本方法的重现性 RSD < 0.38% ($n = 11$),分析速度为 40 样/h,测定范围为 450 ~ 7260 U/L,检出限为 89 U/L。在优化条件及 60 $^{\circ}$ C 下,用本方法测定了多种白萝卜中 POD 活性,结果与动力学曲线法完全相同。

关键词 流动注射分析; 过氧化物酶; 萝卜提取液; 愈创木酚; 过氧化氢

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 活性的快速准确定量尤为重要。POD 能催化酚类或胺类显色试剂与 H_2O_2 的反应;常用的显色试剂有邻苯二胺^[5]、季胺^[6]、2-联氮二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)^[7]、邻苯三酚^[8]、愈创木酚(GA)^[9]、以及胺和酚类的耦合物^[1,10]。这些显色剂在 POD 催化下与 H_2O_2 反应生成的产物都可通过比色法进行定量,但最常用的显色剂是低毒性、廉价的 GA。早先认为 H_2O_2 /POD/GA 体系的产物是愈创木酚四聚体(4-GA)^[9],但新的研究发现产物是愈创木酚二聚体(2-GA)^[11-13]。我们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褪色^[14],这导致采用手工比色法定量 POD 活性时得到的结果重现性很差。此外,由于该产物不稳定,难以提纯,所以只能通过反应物 GA 的浓度间接地求得反应体系中产物 2-GA 的摩尔吸光系数(ε)^[15],并用此 ε 值去计算 POD 活性;但这又会由于 ε 差异导致得到的 POD 活性值产生较大的误差。

测定 POD 活性方法除比色法外^[16],还有荧光光度法^[17,18]和化学发光法^[19-21]等。测定 POD 活性的手工荧光法和化学发光法灵敏度高、线性范围宽;但是,由于 POD 催化反应的产物激发波长在紫外区,所以被测样品中存在的杂蛋白会对荧光法产生干扰;手工化学发光法的灵敏度虽高但测定结果的重现性较差。流动注射分析(Flow injection analysis, FIA)作为一种自动化分析技术,具有操作简便、分析速度快、精度高等优点^[22],它能与各种检测器组合用于酶活性的自动快速测定^[23-25]。Holm^[7]用 ABTS 作为供氢体,利用流动注射光度法对发酵样品中微生物 POD 活性进行了测定;但此方法的不足之处是 ABTS 试剂的价格昂贵且稳定性也较差。本研究选择价廉、稳定、且被广泛应用的 GA 作为供氢体,基于 FIA 光度法建立了一种新的测定 POD 活性的分析流路(Flow-injection spectrophotometry for POD, FIA-SP-POD),并对萝卜提取液中的 POD 含量及活性进行了测定。

2015-04-29 收稿; 2015-07-14 接受

* E-mail: lysgx2005@qq.com; xiufengg@163.com

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

安装 10 mm 光程流通池的 UV-1800PC 型紫外/可见分光光度计(上海美谱达); 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 型原汁机(九阳股份有限公司); FIA-3100 流动注射处理仪(北京吉天仪器有限公司); ASB-200 恒温控制器(日本分光株式会社); CP224S 分析天平(德国赛多利斯集团); pXJ-1C⁺ 离子活度计(成都世纪方舟科技有限公司); SHZ-D(III)循环水式真空泵(郑州金育科贸有限公司); 800B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

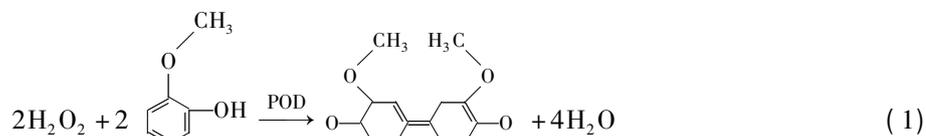
GA(国药集团化学试剂有限公司)、HRP(≥ 250 U/mg, Sigma 公司); 实验用水为超纯水(电导率 0.065 $\mu\text{S}/\text{cm}$); 其余试剂均为分析纯。新鲜白萝卜购于本地超市。

2.2 萝卜粗酶液制备

称取 50 g 新鲜白萝卜, 切成小块(约 1 cm^3), 置于榨汁机中榨汁, 用真空泵将滤渣进行抽滤, 合并两次收集的滤液, 然后在 4000 r/min 下离心 10 min; 最后用针式过滤器(13 mm/0.45 μm) 将离心上清液进行过滤; 滤液即为粗酶液, 置于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

2.3 测定原理

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, 生成 3,3'-二甲氧基-4,4'-联苯二醌产物(2-GA) [11~13]; 此产物在 470nm 处有最大吸收。本方法利用此 H_2O_2 /POD/GA 反应体系定量检测 POD 活性。其具体的反应如下:



本研究基于酶活性(E)定义 [26], 将酶活性浓度(E_c)定义为单位体积内的酶活性(U/L), 可导出以下的酶活性浓度计算式:

$$E_c(\text{U/L}) = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{nV}{\varepsilon vL} \quad (2)$$

式中: ΔA 为酶催化反应线性区域内产物吸光度变化值; Δt 为反应时间, 在本 FIA 系统中 Δt 是试样从注入到产物出现最大吸收峰之间的平均留存时间(0.53 min); ε 为 2-GA 的摩尔吸收系数(0.0125 $\text{L} \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$); n 为底物与产物的反应摩尔比, 在 GA/POD/ H_2O_2 反应体系中 $n=2$; L 为流通池的光程(1.0 cm); V 为样品注入点到流通池入口之间的管路总容积(1.65 mL); v 为注入 FIA 系统中的酶液体积, 在本研究中为采样环的体积(0.040 mL)。将数据代入公式 2, 简化后得:

$$E_c(\text{U/L}) = 6560 \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3)$$

可见, 当 FIA 系统参数确定后, E_c 仅与 FIA 系统平均留存时间(Δt) 处的吸光度变化值(ΔA) 相关; 一般情况下, E_c 仅与所测的酶促反应速率($\Delta A/\Delta t$) 相关。

2.4 FIA 系统及测定过程

FIA-SP-POD 系统见图 1。测定过程为: 当双通道注入阀(V) 转至“采样”位置时, 酶试样在 P_1 的抽吸作用下充满样品定量环(S_L), 多余的样品从 W_2 排出, 采用 P_1 抽吸采样, 可缩短试样流经途径, 达到节省试样目的; 当此阀转至“注入”位置时, PBS 缓冲液载流(C) 推动 S_L 中“酶样品塞”进入反应盘管, 与反应试剂(R_1) 汇合, 样品塞中的 POD 催化 H_2O_2 /GA 反应生成 2-GA, 流经流通式检测器, 给出吸光度信号(A); 试样从注入到产物出现最大吸收峰之间的留存时间为 Δt ; 与此同时, HCl 清洗液被 P_2 吸入清洗液定量环(R_L), 多余的清洗液从 W_1 排出。当此阀再转至“采样”位置时, PBS 缓冲液载流(C) 推动 R_L 中的 HCl 清洗液塞, 依次进入反应盘管和流通池进行自动清洗, 检测器给出基线信号(A^0), 两者之差为 $\Delta A(A - A^0)$ 。将此 $\Delta A/\Delta t$ 代入公式(3) 可求得 E_c 。

3 结果与讨论

3.1 FIA 系统参数的优化

基于前期手工法^[27]将 FIA-SP-POD 系统的初始条件设定如下: 1.5 mmol/L GA, 0.5 mmol/L H₂O₂, 两者等体积混合作为 R₁; POD 样品的注入体积 60 μL; 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 5.5) 作为载流; 0.4 mol/L HCl 作为清洗液; P₁ 转速 20 r/min (1.73 mL/min), P₂ 转速 20 r/min; 反应盘管(Φ 0.8 mm) 长度为 200 cm; 背压管(Φ 0.3 mm) 长度为 50 cm。采用单因素优选法考察了 FIA 法测定 POD 活性时的影响因素。

3.1.1 反应盘管最适长度的考察 在 FIA-SP-POD 系统中, 反应盘管长度影响反应进程和分析速度。因此, 用白萝卜提取液作为测试样品, 考察了 RC 长度(150, 200, 250, 300 和 350 cm) 对反应产物吸光度的影响。得到的结果表明, RC 长度增加, 产物吸光度先增大后逐渐减小, RC 长度在 200 cm 时 ΔA 最大。其原因是: RC 长度较短时反应时间短, 导致反应不充分; RC 太长时, 反应产物的生成速率小于其在管路中被稀释的速率, 导致吸光度值缓慢下降。所以本系统的 RC 选定为 200 cm。

3.1.2 试样环最适体积的考察 FIA-SP-POD 系统中采样环(S_L) 的体积即为 POD 溶液的体积, 系统中加入的 POD 量不同导致酶催化速率不同, 进而影响 FIA 系统的灵敏度, 因此, 在 RC 为 200 cm 的前体下, 考察了 S_L(30, 40, 50, 60 和 70 μL) 对反应产物吸光度的影响。结果表明, S_L 增加基本上不影响产物吸光度值; 其原因可能是 H₂O₂ 与 GA 反应已达到平衡, 再增加 S_L 仅仅是酶过量而没有增加反应产物的生成量。考虑到方法灵敏度及节省试样的因素, 选定 S_L 为 40 μL。

3.1.3 FIA 系统基线漂移的消除 研究发现, 在 FIA-SP-POD 系统中 H₂O₂ 与 GA 反应所生成的褐色 2-GA 容易吸附在流通池中, 导致 FIA 系统的基线漂移。所以, 为了减小由于 2-GA 导致的基线漂移, 在 FIA 系统导入清洗液。即在 FIA 流路中设计了一个异步注入阀, 利用此阀将清洗液在“酶试样塞”之后注入 FIA 系统(60 μL), 以达到对 FIA 系统自动清洗, 减小基线漂移的效果。为了考察此效果, 在 FIA 系统中分别用 HCl 和 NaOH 作为清洗液, 萝卜提取液作为测试样品, 得到了图 2 中的两条实测曲线。随着清洗液浓度(HCl 和 NaOH) 增加, 基线漂移值减小; 在相同浓度下, HCl 的清洗效果(基线漂移值) 优于 NaOH。所以, 最后选取 0.4 mol/L HCl 溶液作为清洗剂。

3.2 反应体系影响因素的考察

3.2.1 POD 最适温度 温度是影响 POD 活性的因素之一。低温使酶活性不能完全显现, 高温又会使酶蛋白变性, 丧失活性。将 FIA-SP-POD 系统的 RC 置于恒温控制器内, 先用热电偶对 RC 出口液的温度进行校正, 然后用白萝卜提取液作为测试样品, 在不同温度下(25℃ ~ 70℃) 考察了温度与白萝卜 POD

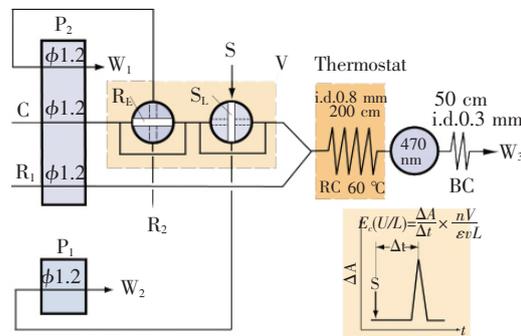


图 1 用于测定 POD 活性的流动注射分光光度系统
Fig. 1 Flow-injection spectrophotometric system for determination of peroxidase (POD) activity

C: 载流; R₁: GA + H₂O₂; R₂: 清洗液; S: 样品; S_L: 样品定量环; R_L: HCl 定量环; RC: 反应盘管; BC: 背压管; V: 进样阀; P₁, P₂: 蠕动泵; W₁, W₂, W₃: 排废。
C: carrier; R₁: guaiacol (GA) and hydrogen peroxide; R₂: washing liquid; S: sample; S_L: sample loop; R_L: HCl loop; RC: reaction coil; BC: back-pressure coil; V: injection valve; P₁, P₂: pump; W₁, W₂, W₃: waste.

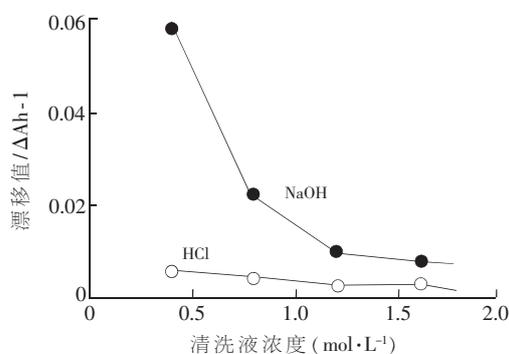


图 2 清洗液对基线漂移值的影响
Fig. 2 Effect of washing solution on baseline drift in FIA system

在不同温度下(25℃ ~ 70℃) 考察了温度与白萝卜 POD

活性的相关性。结果见图 3a。在 60℃ 时, 酶催化反应产物的 ΔA 最大(此时 FIA 系统的平均留存时间 Δt 都相同, 所以 ΔA 与反应速率 $\Delta A/\Delta t$ 及 E_c 成正比关系), 当温度大于 60℃ 时, ΔA 开始降低, 即高温导致 POD 失活, POD 的催化活力下降。由此可知白萝卜 POD 最适温度为 60℃, 此结果与文献 [28] 一致。

3.2.2 POD 最适 pH 值 酸度对酶活性的影响, 不是酸、碱对酶分子解离状态的影响, 而是对酶活性中心或相关基团解离状态的影响。因此本实验用白萝卜提取液作为测试样品, 考察了磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L) 的酸度 (pH 3.0 ~ 9.0) 对反应体系中 POD 活性的影响。除温度控制在 60℃ 外, 其它条件同上。由图 3b 所示的结果可知, 当 pH 在 3 ~ 5.5 范围时, pH 增加, ΔA 增大, 即 POD 催化生成的产物增多; 在 pH 5.5 ~ 9.0 范围时, pH 增加, ΔA 反而降低, 即 POD 催化生成的产物减少; 在 pH 5.5 时产物最多, 即 POD 活性最强。由此可知萝卜中所含的 POD 的最适 pH 为 5.5。

3.2.3 H₂O₂ 浓度的考察 在上述优选条件下, 考察反应体系中 H₂O₂ 浓度 (0 ~ 2.0 mmol/L) 对 POD 催化反应的影响。得到的结果见图 3c。可以看出: 在给定的 Δt 值下, H₂O₂ 浓度增加, 产物 ΔA 逐渐增大, 当此浓度大于 1.5 mmol/L 时, 产物 ΔA 不再变化, 即 POD 催化产物的生成速率趋于稳定。因此, 将 H₂O₂ 浓度设定为 1.5 mmol/L。在此基础上, 以 H₂O₂ 为底物作 Lineweaver-Burk 双倒数图, 根据双倒数图的截距, 计算得到以 H₂O₂ 为底物的米氏常数 (K_m) 为 0.21 mmol/L, 酶促反应最大速度 (V_{max}) 为 1.155 mmol/(L · min)。

3.2.4 GA 浓度的考察 在上述优选条件下, 也考察了 GA 浓度 (0 ~ 4.0 mmol/L) 对 POD 酶催化反应的影响。得到的结果见图 3d。在给定的 Δt 值下, 曲线的变化趋势与 H₂O₂ 底物相似, 即随着 GA/POD/H₂O₂ 反应体系中 GA 浓度增大, ΔA 先迅速增大后不再变化; 当浓度大于 3.5 mmol/L 时, 反应速率 ($\Delta A/\Delta t$) 趋于稳定。故本系统选定 GA 浓度为 3.5 mmol/L。同样以 GA 为底物作 Lineweaver-Burk 双倒数图, 再根据此图计算出以 GA 为底物的 K_m 和 V_{max} 值分别为 0.20 mmol/L 和 0.539 mmol L⁻¹ · min⁻¹。结果表明: 白萝卜 POD 与 GA 之间的亲和力与 H₂O₂ 相差不大。

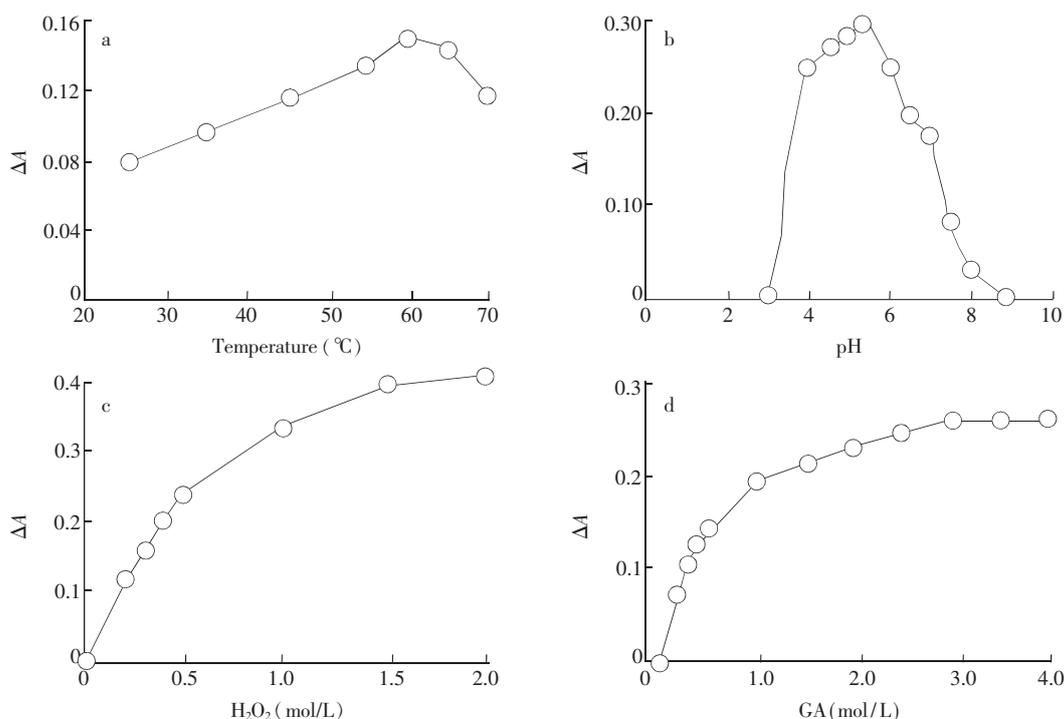


图 3 GA/POD/H₂O₂ 反应体系中影响因素的考察 (a. 温度; b. pH; c. H₂O₂ 浓度; d. GA 浓度)

Fig. 3 Effects of different factors on the GA/POD/H₂O₂ system. a. temperature; b. pH; c. H₂O₂ concentration; d. GA concentration.

3.3 干扰离子对 POD 活性测定影响

金属离子可能与 POD 形成络合物进而影响 POD 活性,本实验考察了 4 种盐溶液(FeCl_3 , CuSO_4 , ZnSO_4 , CoSO_4) 对 POD 活性测定的影响。实验时,白萝卜 POD 作为测试样品,在 0 ~ 0.8 mmol/L 范围内改变 FIA-SP-POD 系统载流中的金属离子浓度,得到的结果见图 4。从图 4a 可知,随着 Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} 浓度的增加,在给定的 Δt 值下,相关的 ΔA 都有增大的趋势,即 Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} 对 POD 均有一定程度的激活作用;POD 激活顺序为 $\text{Fe}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ 。所以,在提取白萝卜 POD 时,要避免接触这些金属离子,防止发生酶促褐变。

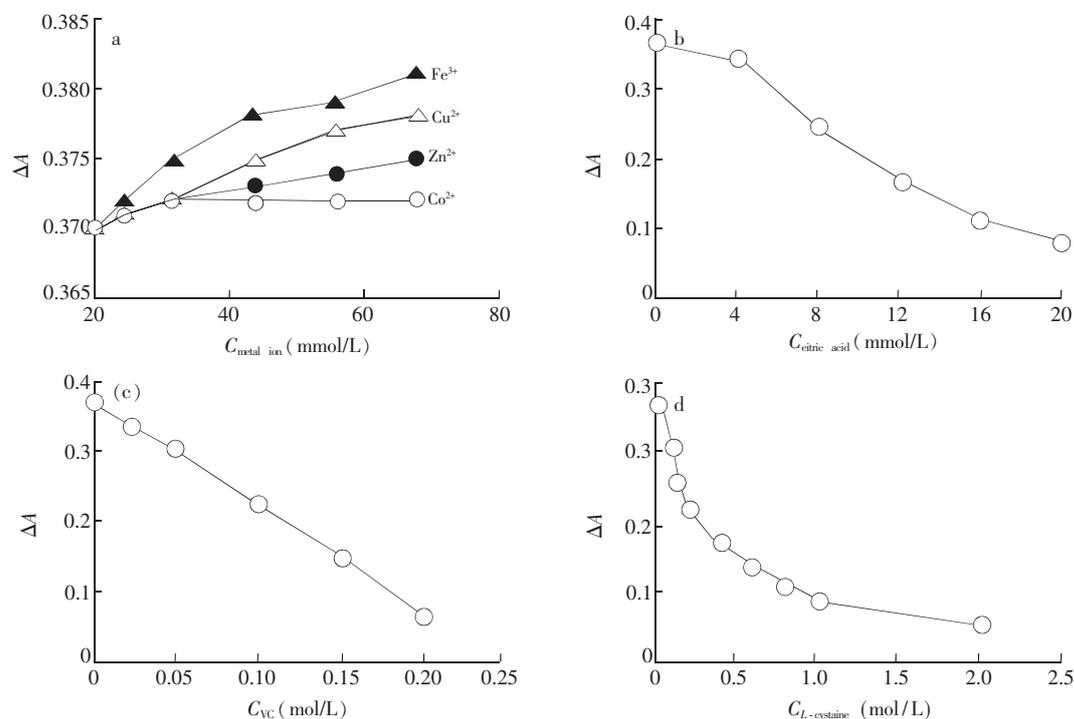


图 4 干扰物质浓度对 FIA 系统吸光度的影响(a. 金属离子, b. 柠檬酸, c. 抗坏血酸, d. L-半胱氨酸)
Fig. 4 Effects of interfering substances concentration on POD activity (a. metal ions; b. citric acid; c. vc.; d. L-cysteine)

此外,在载流中分别添加柠檬酸(0 ~ 20 mmol/L)、抗坏血酸(0 ~ 0.2 mmol/L)和 L-半胱氨酸(0 ~ 2.0 mmol/L),考察了这些有机酸类对 POD 活性的影响。从得到的图 4b ~ d 3 条曲线可以看出:添加的有机酸浓度增大,在给定的 Δt 值下吸光度都逐渐降低。这表明这 3 种有机酸对 POD 活性有明显的抑制作用,其抑制作用顺序为抗坏血酸 > L-半胱氨酸 > 柠檬酸。由于 L-半胱氨酸和柠檬酸都与 POD 活性中心的 Fe^{3+} 发生螯合反应,使酶活性中心失去催化功能,因而抑制了 POD 的活性或减弱了 POD 与底物的亲和力。

3.4 摩尔吸收系数测定

常规比色法测定 POD 活性时,是利用 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{POD}/\text{GA}$ 体系反应产物在 470 nm 处的 ΔA 值,带入公式(2)计算得到。但本研究发现: ϵ 值是准确定量 POD 酶活性的最关键因素;当所用仪器(波长分辨率、灵敏度)及方法的测试条件(温度、pH 及溶剂)不同时得到的 ϵ 不同。所以,计算 POD 活性时不能直接将文献或商家给出的 ϵ 值代入公式(2)进行计算,须在选定条件下用所选仪器进行测定。

因此,本实验对准确测定 $\epsilon_{2\text{-GA}}$ 方法进行了研究。由于 2-GA 不稳定、无法提纯,不能通过直接测定其吸光度值得到 $\epsilon_{2\text{-GA}}$ 值,只能利用 GA 浓度间接求出 2-GA 的浓度($2\text{H}_2\text{O} + 2\text{GA} \xrightarrow{(\text{POD})} 2\text{-GA} + 4\text{H}_2\text{O}$)。理论上,当 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{POD}/\text{GA}$ 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,对所需的 POD 活性浓度、 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{GA}$ 浓度比进行了考察。

3.4.1 GA 完全转化为产物所需的 HRP 活性浓度 用商品化的 HRP 作为测试样品, 分别取 20 μL 的 50, 100, 250, 500, 1000 和 2500 U/L HRP 加入 0.5 mmol/L H_2O_2 + 1.5 mmol/L GA 混合液中^[26]测定 2-GA 的吸光度, 结果见图 5a。当 HRP 浓度小于 1.0 kU/L 时 2-GA 的吸光度随 HRP 活性浓度增加而增大, 当 HRP 浓度大于 1.0 kU/L 时 2-GA 的吸光度不再变化, 即此时 HRP 活性浓度能使 GA 完全转化为产物。

3.4.2 GA 完全转化为产物所需的 H_2O_2 的浓度 选定 HRP 为 1.0 kU/L、GA 浓度为 0.2 mmol/L, 使其与不同浓度的 H_2O_2 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 和 2.0 mmol/L) 按 1 + 1 混合, 测定其产物 2-GA 的吸光度, 结果见图 5b, 产物吸光度随 H_2O_2 浓度增加呈线性增加趋势, 当 H_2O_2 浓度大于 GA 浓度的 5 倍时, 产物吸光度不再随 H_2O_2 浓度而变化。由此得出结论: 当 HRP 为 1.0 kU/L、 H_2O_2 /GA 浓度比大于 5 时, GA 能完全转化为产物 2-GA。因此, 此时可根据已知的 GA 浓度换算出反应系统中的 2-GA 浓度, 再将其带入朗伯-比尔定律, 就求得 $\epsilon_{2\text{-GA}}$ 。在室温 ($\sim 20^\circ\text{C}$) 下, 用手工比色和 5 点平均数据得到的 $\epsilon_{2\text{-GA}}$ 值为 $0.0122 \pm 0.0031 \text{ L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

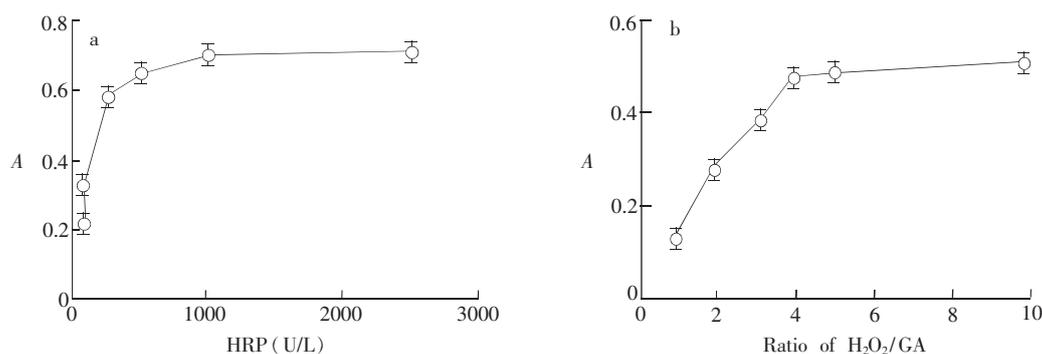


图 5 HRP 活性浓度 (a) 及 H_2O_2 /GA 浓度比 (b) 对产物 2-GA 的平衡吸光度 (A) 的影响

Fig. 5 Effect of HRP active concentration (a) and ratio of H_2O_2 /GA (b) on the absorbance

3.4.3 产物摩尔吸收系数的平均值 为了得到 FIA 法测定白萝卜 POD 的 $\epsilon_{2\text{-GA}}$, 用稀释一倍后的白萝卜粗酶液作为样品 ($E_c > 1.0 \text{ kU/L}$), FIA 系统中载流为 PBS 缓冲液 (pH 5.5), R_1 (H_2O_2 /GA) 按 1 + 1 混合, 且浓度比大于 5 (H_2O_2 /GA: 1.5/0.01, 1.5/0.04, 1.5/0.08, 1.5/0.12, 1.5/0.16, 1.5/0.20 和 1.5/0.24 mmol/L) 在 60°C 下测定了 FIA-SP-POD 系统中 H_2O_2 /POD/GA 反应体系形成的产物吸光度, 并将换算出的 2-GA 浓度 (1.25, 5, 10, 15, 20, 25 和 30 $\mu\text{mol/L}$, $\epsilon_{2\text{-GA}} = 1000 \times (c_{\text{GA}}/4)/2$) 与其吸光度值进行数学回归, 最后得到相关的线性方程: $\Delta A = 0.0125c_{2\text{-GA}} + 0.050$ ($r = 0.9995$); 此斜率值 $0.0125 \text{ L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$ 即为本系统的 $\epsilon_{2\text{-GA}}$ 平均值。

3.5 萝卜 POD 活性测定

考察了 POD 的线性响应范围和精密度以及检出限。在优选条件下, 一系列 HRP 标液作为样品, 用 FIA-SP-POD 系统检出它们在 Δt 下的 ΔA 值, 然后代入公式 3, 求出对应的 POD 活性值。结果表明: 在给定的 Δt (0.53 min) 下, 在 450 ~ 7260 U/L 范围内 HRP 活性浓度与 ΔA 值呈现良好的线性相关 ($\Delta A = 0.00013E_c + 0.0012$, $r = 0.9985$)。随后, 分别用 500 U/L、2500 U/L HRP 标液进行 11 次测定, 得到两组标液的 RSD 分别为 0.62% ($\epsilon_c = 501 \pm 3 \text{ U/L}$)、0.31% ($\epsilon_c = 2530 \pm 8 \text{ U/L}$); 此结果表明本方法测定 POD 活性浓度的精度很好; 用 500 U/L HRP 为样品, 计算得到本方法的检出限为 7.0 U/L ($c_L = 3\text{SD}/K$, $\text{SD} = 0.000326$, $K = 0.00013$)。

用 pH 5.5 磷酸盐缓冲液将萝卜提取液按 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 和 35% 比例稀释成 6 个样品 ($E_{c10} \sim E_{c35}$), 分别注入 FIA-SP-POD 系统, 在给定的 Δt 下, 检测其催化产物的 ΔA (0.067, 0.105, 0.135, 0.170, 0.193, 0.220), 得到了一条萝卜提取液与 ΔA 呈良好线性关系的相关曲线 ($\Delta A = 0.638\epsilon_c + 0.004$, $r = 0.9965$), 表明本方法基于平均留存时间 (Δt) 处的 ΔA 能快速准确地定量 POD 活性浓度。

另外 模拟手工酶动力学曲线法在本系统上采用流动注射停留法,对上述稀释的萝卜 POD 活性进行了测定。操作过程是:注入酶样品 32s 后停泵(在响应峰的最大值之后停泵),连续记录 $H_2O_2/POD/GA$ 体系在后 30s 期间的催化反应动力学曲线(ΔA vs Δt),根据此区间曲线的斜率,求得 POD 活性浓度。得到的数据表明,停留法的结果(E_{c10} : 777 ± 3 U/L, E_{c15} : 1211 ± 13 U/L, E_{c20} : 1470 ± 14 U/L, E_{c25} : 1760 ± 30 U/L, E_{c30} : 2075 ± 20 U/L, E_{c35} : 2268 ± 23 U/L)与上述 FIA-SP-POD 系统的结果(E_{c10} : 706 ± 8 U/L, E_{c15} : 1105 ± 6 U/L, E_{c20} : 1425 ± 22 U/L, E_{c25} : 1802 ± 6 U/L, E_{c30} : 2034 ± 27 U/L, E_{c35} : 2323 ± 32 U/L)是一致的。

选取 4 种萝卜的提取液作为酶样品,用 FIA-SP-POD 系统测定其产物的吸光度,然后代入公式 3,得到 POD 活性值。得到结果为:红皮萝卜(14673 U/L) > 青萝卜(14365 U/L) > 圆萝卜(13076 U/L) > 白萝卜(8309 U/L)。为了考察本方法的可靠性,用 HRP 标准进行了加标回收率实验(表 1)。考虑到 HRP 自然失活的影响,每次加标实验前先对 HRP 活性进行了校正。本方法的回收率在 95.2% ~ 107.1% 之间,结果满意。

表 1 实样中 POD 活性测定及回收率结果($n=3$)

Table 1 Results for determination of the real samples and the recovery test ($n=3$)

样品 Sample	样品活性浓度(稀释前) Sample con. (undilution) (U/L)	添加活性浓度 Active con. added (U/L)	测定浓度 Test con. (U/L)	回收浓度 Recovery con. (U/L)	回收率 Recovery (U/L)	SAM Standard addition method (U/L)
白萝卜 White radish	1906 ± 22 (3536 ± 51)	0	1906 ± 22	-	-	1996 ± 90 ($\Delta A = 0.00011c + 0.1996$, $r = 0.9990$)
		944	2904 ± 82	998	105.7	
		1525	3343 ± 28	1497	95.2	
		2012	3891 ± 23	1985	98.7	
		2510	4397 ± 30	2491	99.3	
青萝卜 green turnip	898 ± 38 (1605 ± 96)	0	898 ± 38	-	-	975 ± 77 ($\Delta A = 0.00012c + 0.0975$, $r = 0.9991$)
		944	1905 ± 24	1007	106.7	
		1525	2426 ± 21	1528	100.2	
		2012	2971 ± 17	2073	103.1	
		2510	3459 ± 20	2561	102.0	
圆萝卜 Round white radish	1499 ± 45 (2772 ± 22)	0	1499 ± 45	-	-	1568 ± 69 ($\Delta A = 0.00011c + 0.1568$, $r = 0.9989$)
		944	2452 ± 4	953	101.0	
		1525	2995 ± 12	1496	98.1	
		2012	3578 ± 18	2079	103.3	
		2510	3940 ± 23	2441	97.3	
红皮萝卜 red radish	2973 ± 78 (5693 ± 33)	0	2973 ± 78	-	-	3117 ± 199 ($\Delta A = 0.00012c + 0.3117$, $r = 0.9997$)
		227	3198 ± 6	225	99.3	
		1378	4398 ± 66	1425	103.5	
		1867	4973 ± 16	2000	107.1	
		2688	5767 ± 36	2794	103.9	
		2884	5933 ± 29	2960	102.6	

4 结论

本研究基于 $H_2O_2/POD/GA$ 反应体系,利用流动注射吸光度/留存时间比值法,建立了一种无需标准曲线的 POD 活性快速准确测定新方法,分析速度可达 40 样/h。用本方法测定 POD 活性,不但减少了手工操作带来的误差,而且具有准确度高、重现性好、分析速度快、自动化程度高的优点。

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. *Biotech. Annual Review*, **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: 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, 方园. *分析化学* , **2009** , 37(6) : 897 – 901
- 6 LI Jian-Guo , LIU Yin , JU Huang-Xian. *Acta Chim. Sin.* , **2007** , 65(15) : 1499 – 1503
李建国, 刘颖, 鞠焯先. *化学学报* , **2007** , 65(15) : 1499 – 1503
- 7 Holm K A. *Analyst* , **1995** , 120(8) : 2101 – 2105
- 8 Ghadiri M , Kariminia H R , Azad R R. *Ecotox. Environ. Safe.* , **2013** , 91: 117 – 121
- 9 Vieira I d 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 , Mona I. *Anal. Biochem.* , **1997** , 250(1) : 10 – 17
- 12 Tonami H , Uyama H , Nagahata R , Kobayashi S. *Chem. Letters* , **2004** , 33(7) : 796 – 797
- 13 Hwang S P , Lee C H , Ahn I S. *J. Ind. Eng. Chem.* , **2008** , 14: 487 – 492
- 14 CHENG 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 WEI Yong-Feng , YAN Hong-Tao. *Spectro. Spect. Anal.* , **2001** , 21(5) : 704 – 706
魏永锋, 闫宏涛. *光谱学与光谱分析* , **2001** , 21(5) : 704 – 706
- 17 CI Yun-Xiang , CHEN Lie , WEI Shan. *Chem. J. Chinese Universities* , **1990** , 11(1) : 81 – 83
慈云祥, 陈列, 魏珊. *高等学校化学学报* , **1990** , 11(1) : 81 – 83
- 18 WEI Yong-Feng , YAN Hong-Tao. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2000** , 28(1) : 99 – 101
魏永锋, 闫宏涛. *分析化学* , **2000** , 28(1) : 99 – 101
- 19 Sherman D H. *Trends Biotechnology* , **1984** , 2(1) : 1 – 2
- 20 YANG Xiu-Cen , WU Li-Ping , CHEN Da-Jin , ZENG Yao. *J. West China University of Medical Sci.* , **1990** , 21(3) : 293 – 297
杨秀岑, 伍莉萍, 陈达进, 曾瑶. *华西医科大学学报* , **1990** , 21(3) : 293 – 297
- 21 JI Zheng-Ping , WANG Jun , HAN Jing , HU Xiao-Ya. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2011** , 39(7) : 1100 – 1103
嵇正平, 王俊, 韩静, 胡效亚. *分析化学* , **2011** , 39(7) : 1100 – 1103
- 22 Li Y S , Gao X F. *Flow Injection Analysis and Application for Chemistry Analysis*. The Jilin People's Publisher , **2002**: 1 – 14
- 23 Recktenwald A , Kroner K H , Kula M R. *Enzyme and Microbial Technology* , **1985** , 7(12) : 607 – 612
- 24 Huang H P , Cai R X , Du Y M , Lin Z X , Zeng Y E. *Anal. Chim. Acta* , **1995** , 318: 63 – 69
- 25 Van Staden J. F. , Mulaudzi L. V. *Anal. Chim. Acta* , **2000** , 421(1) : 19 – 25
- 26 NG-ICB. *Eur. J. Biochem.* , **1979** , 97: 319 – 320
- 27 ZHANG Zhao , LI Yong-Sheng , GAO Xiu-Feng. *Sci. Tech. 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
- 28 WANG Lin , WANG Lin-Song , MA Jian-Min. *J. Henan Normal University (Natural Science)* , **2004** , 32(3) : 81 – 83
王琳, 王林嵩, 马剑敏. *河南师范大学学报(自然科学版)* , **2004** , 32(3) : 81 – 83

A New Method for Rapid and Automatic Determination of Peroxidase Activity Based on Ratio of Flow-Injection Residence Time and Absorbance

LI Yong-Sheng^{*1} , ZHENG Wei¹ , GAO Xiu-Feng^{*2}

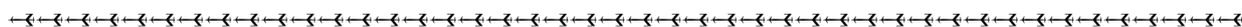
¹(School of Chemical Engineering , Sichuan University , Chengdu 610065 , China)

²(College of Basic Medicine and Forensic Medicine , Sichuan University , Chengdu 610065 , China)

Abstract A formula of $E_c = k\Delta A/\Delta t$ was proposed for determining the activity concentration (E_c) of the enzymes based on a flow-injection spectrophotometric system (FI-SP). In the formula, Δt was the mean residence time of the sample plug injected in the system and it was in a linear response region of the enzymatic reaction, ΔA was a response peak at the residence time, and $k = nV/(\Delta vL)$, in which, V was the total volume of the connecting pipeline from an injected sample point to an entrance of a flow-cell, n was the reaction molar ratio of enzyme substrate and product, ε was a molar absorption coefficient of the product, v was an injection volume of enzyme solution, L was optical path length of the flow-cell, and k became a constant when the FI-SP system was defined. On this basis, by introducing the reaction of H_2O_2 /peroxidase (POD)/guaiacol (GA) into the FI-SP system, a new method for rapid and accurate determination of the POD activity was established without the standard curve. The optimized conditions for this method were as follows: the concentration of phosphate buffer used as the carrier was 0.05 mol/L (pH 5.5), the sampling volume was 40 μ L, the reaction coil length was 200 cm, the H_2O_2 concentration was 1.5 mmol/L, the GA concentration was 3.5 mmol/L, HCl used as a cleaning fluid was 0.4 mol/L, the detection wavelength was 470 nm, and the product's molar absorption coefficient was 0.0125 L (mol cm)⁻¹. The RSD of the method was 0.38% ($n = 11$), the analytical rate was 40 samples/h, the determination range was 450 – 7260 U/L, the detection limit was 7.0 U/L. Under the optimum conditions and at 60°C, the POD activity in different radishes was determined by this method, and the results obtained here were the same as the results obtained by kinetic curve method.

Keywords Flow injection analysis; Peroxidase; Radish extracts; Guaiacol; Hydrogen peroxide

(Received 29 April 2015; accepted 14 July 2015)



《光谱学与光谱分析》2016 年征订启事

国内邮发代码: 82-68 国外发行代码: M905

《光谱学与光谱分析》1981 年创刊,国内统一刊号: CN 11-2200/O4, 国际标准刊号: ISSN 1000-0593, CODEN 码: GYGFED, 国内外公开发行, 大 16 开本, 308 页, 月刊; 是中国科协主管, 中国光学学会主办, 钢铁研究总院、中国科学院物理研究所、北京大学、清华大学共同承办的学术性刊物。北京大学出版社出版, 每期售价 55.00 元, 全年 660 元。刊登主要内容: 激光光谱测量、红外、拉曼、紫外、可见光谱、发射光谱、吸收光谱、X 射线荧光光谱、激光显微光谱、光谱化学分析、国内外光谱化学分析领域内的最新研究成果、开创性研究论文、学科发展前沿和最新进展、综合评述、研究简报、问题讨论、书刊评述。

《光谱学与光谱分析》适用于冶金、地质、机械、环境保护、国防、天文、医药、农林、化学化工、商检等各个领域的科研单位、高等院校、制造厂家、从事光谱学与光谱分析的研究人员、高校有关专业的师生、管理干部。

《光谱学与光谱分析》为我国首批自然科学核心期刊, 中国科协优秀科技期刊, 中国科协择优支持基础性、高科技学术期刊, 中国科技论文统计源刊, “中国科学引文数据库”, “中国物理文摘”, “中国学术期刊文摘”, 同时被国内外的 CSCD, SCI, AA, CA, Ei, PK, MEDLINE, Scopus 等文献机构收录。根据国家科技部信息研究所发布信息, 中国科技期刊物理类影响因子及引文量《光谱学与光谱分析》都居前几位。欢迎国内外厂商在《光谱学与光谱分析》发布广告(广告经营许可证: 京海工商广字第 8094 号)。

《光谱学与光谱分析》的主编为高松院士。

欢迎新老客户到全国各地邮局订阅, 若有漏订者可直接与《光谱学与光谱分析》期刊社联系。

联系地址: 北京市海淀区学院南路 76 号(南院), 《光谱学与光谱分析》期刊社

邮政编码: 100081

联系电话: 010-62181070, 62182998

电子信箱: chngpxygpx@vip.sina.com;

修改稿专用邮箱: gp2008@vip.sina.co

网址: <http://www.gpxygpx.com>