

文章编号: 1000-2243(1999)S0-0075-02

# 光替代酶荧光法测定苯丙氨酸的研究

王细生, 蔡维平, 朱庆枝, 王志红, 许金钧

(厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 在碱性介质中, 光子可以取代苯丙氨酸氧化酶使苯丙氨酸分解并生成  $H_2O_2$ , 然后用氯化血红素作为模拟酶检测  $H_2O_2$ , 从而建立间接测定苯丙氨酸的新方法.

关键词: 苯丙氨酸; 光子; 氯化血红素; 模拟酶

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

苯丙氨酸是人体中重要的氨基酸, 它的检测在蛋白质化学、生物化学及临床医学中具有重要的意义, 测定苯丙氨酸的方法颇多, 但大多数或灵敏度不够高, 或测定时间较长. 而酶法分析<sup>[1]</sup>, 灵敏、快速, 但由于酶不稳定, 价格昂贵, 限制了方法的广泛应用. 我们的研究发现, 光子可以替代苯丙氨酸氧化酶使苯丙氨酸氧化并生成  $H_2O_2$ , 并以模拟过氧化酶氯化血红素 (hemin) 催化  $H_2O_2$  氧化而使对羟基苯乙酸 (HPA) 偶合的荧光反应作为指示反应<sup>[2]</sup>, 建立苯丙氨酸测定新方法.

## 1 实验步骤

移取一定量苯丙氨酸溶液于 10mL 容量瓶加入 2.0mL pH 10.0 的广泛缓冲溶液, 用水稀释至刻度, 摇匀. 将上述溶液用 LZ-1010-1010 型蠕动泵至缠在 15W 紫外杀菌灯管上的 PTFE 管中, 停流光照 15 min. 泵出, 移取适量光照后溶液于 10mL 容量瓶, 加入 1.5mL 0.1mmol/L hemin 溶液, 2.5mL 1.0 $\mu$ mol/L HPA 溶液, 2.5mL pH 10.5 氨性缓冲溶液, 稀释至刻度, 摇匀, 室温反应 25min. 在 Hitachi F-4500 荧光分光光度计上, 于激发波长 320 nm、发射波长 410nm 处, 测量体系的荧光强度.

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应体系荧光光谱

按上述实验步骤, 绘制整个反应体系光照前后的荧光激发和发射光谱, 结果表明, 苯丙氨酸溶液未经光照时, 指示反应没有进行, 荧光值几乎为 0, 而光照后的光谱最大激发波长为 320nm、最大发射波长为 410nm, 与文献 [2] 的  $H_2O_2$ -HPA-Hemin 反应体系的光谱完全一致, 说明苯丙氨酸光照后, 产生  $H_2O_2$ . 同时用奈斯勒试剂检测体系的  $NH_3$ , 其吸收曲线也与文献一致, 说明光化学反应还生成  $NH_3$ , 这表明光照成功地替代了苯丙氨酸氧化酶.

收稿日期: 1999-06-07

作者简介: 王细生 (1973-), 男, 硕士.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (B96003)

## 2.2 反应条件的选择

采用一系列不同 pH 值的广泛缓冲溶液控制光照前体系的酸度, 从而比较不同酸度的影响. 结果当  $\text{pH}=8.0\sim 10.8$  时, 荧光强度最大且基本稳定, 实验采用  $\text{pH}10.0$  的缓冲溶液; 光照时间是影响反应的一个重要因素, 绘制光化学反应的动力学曲线, 在  $10\sim 20\text{min}$  区间内, 荧光强度达到最大且变化较小. 为此, 实验选用光照时间  $15\text{min}$ ; 考察指示反应氯化血红素催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  与对羟基苯乙酸反应的动力学曲线, 表明当反应  $25\text{min}$  时基本达到平衡; 文献 [3] 指出, 对于辣根过氧化酶或羟高铁血红素催化氧化对羟基苯乙酸的反应,  $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_4\text{Cl}$  是最佳的缓冲体系, 氨对该体系的催化活性有增强作用. 本实验发现, 氨对作为模拟过氧化物酶的 hemin 的催化活性也有增敏作用, 同时考察  $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_4\text{Cl}$  缓冲体系的 pH 及用量对产物荧光强度的影响, 当体系中加入  $2.50\text{mL}$  pH 为  $10.5$  的  $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_4\text{Cl}$  缓冲溶液荧光强度最大; HPA 及 hemin 的浓度是影响反应的重要因素, 试验表明 HPA 浓度在  $0.2\sim 0.3\text{mmol/L}$ 、hemin 浓度在  $1.0\sim 3.0\mu\text{mol/L}$  范围内时体系的荧光强度最大且基本稳定, 本实验 HPA 的浓度为  $0.25\text{mmol/L}$ , hemin 的浓度为  $1.5\mu\text{mol/L}$ .

## 2.3 工作曲线与方法的检出限、精密度

按上述条件绘制工作曲线, 结果表明, 在  $0.01\sim 2.0\mu\text{mol/L}$  浓度范围内, 苯丙氨酸浓度与相对荧光强度呈良好的线性关系, 回归方程为:  $\Delta F=3.29C+2.35$  ( $C$  的单位是  $1.0\times 10^{-8}\text{mol/L}$ ), 相关系数为  $0.9987$ . 经测定, 方法的检测限 ( $\text{LOD}=3\sigma/K$ ,  $n=11$ )  $1.6\text{nmol/L}$ , 相对标准偏差 ( $n=8$ ) 为  $1.1\%$ .

## 参考文献:

- [1] 吉尔鲍特. 酶法分析 [M]. 北京: 科学出版社, 1977. 115~118
- [2] Zhu Q Z, Li Q G, et al. Application of thiamine as a fluorogenic substrate in the determination of hydrogen peroxide based on the catalytic effect of hemin [J]. Anat Lett, 1996, 29: 1729
- [3] Zhang G, Purnendu K D, William S Edgemond et al. Determination of hydrogen peroxide by photoinduced fluorogenic reactions [J]. Anal Chim Acta 1991, (243): 207~216

# Study on Fluorimetry for Determination of Phenylalanine Using Enzyme Substituted by the UV—Light

WANG Xi—sheng, CAI Wei—ping, ZHU Qing—zhi, WANG Zhi—hong, XU  
Jing—gou

(Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

**Abstract:** In alkaline medium, the photon can substitute phenylalanine oxydase, and cause phenylalanine to decompose and produce  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which are detected by using HPA to be coupled and produce strong fluorescent substance in present of mimetic peroxydase—hemin. Thus, a new fluorimetry for the determination of phenylalanine was developed.

**Keywords:** phenylalanine; photon; hemin; mimetic enzyme