

УДК 543.062.088.8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РТУТИ (II) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДАЗЫ, КОВАЛЕНТНО ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СИЛИКАГЕЛЯХ

Д.Л. Григорьева, И.А. Веселова, Т.Н. Шеховцова

(кафедра аналитической химии; e-mail: VIA@analyt.chem.msu.ru)

Проведено сравнительное изучение активности и стабильности пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на силикагелях, модифицированных амино- и эпокси-группами. На основе ингибирующего действия ртути (II) на каталитическую активность иммобилизованного на указанных носителях фермента разработаны методики определения ртути при минимальной концентрации ($C_{\text{мин}}$) 0,05 нг/мл и 5 нг/мл соответственно.

Ранее для разработки высокочувствительных тест-методик определения ртути (II) использовали ее ингибирующее действие на каталитическую активность пероксидазы из корней хрена, модифицированной хитозаном и физически (сорбционно) иммобилизованной в полистирольном планшете [1], на бумагах различного типа [2], микрокристаллической целлюлозе и пенополиуретане [3]. Полученные иммобилизованные препараты фермента отличаются высокой активностью и стабильностью в течение длительного времени (от 5 до 24 мес в зависимости от природы носителя) [1–3], однако их можно использовать только однократно и в статических условиях из-за недостаточной прочности связывания фермента с носителем. Представляется целесообразным получение и применение в аналитических целях ковалентно иммобилизованного препарата пероксидазы, так как химическая связь обеспечивает более высокую прочность связывания фермента с носителем.

Цель данной работы состояла в сравнительном изучении свойств пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на силикагелях, модифицированных амино- и эпокси-группами, а также в разработке методик определения ртути(II) с использованием полученных ферментных препаратов.

Экспериментальная часть

Реагенты. В работе использовали твердые препараты пероксидазы из корней хрена (К.Ф. 1.11.1.7) (“Sigma”, США) ($RZ = A_{430}/A_{270} = 2,2$). Растворы фермента готовили растворением навесок их твердых препаратов в боратном буферном растворе (рН 7,0). Твердый препарат и растворы фермента хранили в холодильнике при 4° С, точную концентрацию раствора пероксидазы устанавливали спектрофотометрически ($\epsilon = 9,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, $l = 1 \text{ см}$).

Использовали препараты тетрабората натрия (“х.ч.”), борной кислоты (“ос.ч.”), бифталата калия

(“х.ч.”), гидроксида калия (“ос.ч.”), гидрофосфата натрия (“х.ч.”), дигидрофосфата натрия (“х.ч.”), ацетата натрия (“х.ч.”) и уксусной кислоты (“ос.ч.”) (“Реахим”, Россия). Боратный, фталатный, фосфатный, ацетатный буферные растворы готовили, как описано в [4]. Точную концентрацию раствора пероксида водорода (“ос.ч.”, “Реахим”, Россия) устанавливали перманганатометрически. Раствор *o*-дианизидина (ОД) (“ос.ч.”, “Sigma”, США) готовили растворением его точной навески в этаноле-ректификате. Тиомочевину (“х.ч.”) (“Реахим”, Россия) дважды перекристаллизовывали из воды; растворы готовили растворением точной навески в воде. Растворы ртути(II) с концентрацией 0,1 нг/мл–1 мкг/мл готовили разбавлением исходного стандартного раствора (1 мг/мл) водой, подкисленной азотной кислотой до ~ рН 3,0.

Для приготовления всех водных растворов использовали деионизованную воду, очищенную на установке “Millipore” (Франция).

Использовали образцы силикагелей (“Биохиммак”, Россия) с привитыми амино- и эпокси-группами (диаметр пор 250 Å, размер частиц 100–200 мкм, обменная емкость 250 и 1,45 мМ/г, удельная поверхность 120 и 305 м²/г соответственно).

Аппаратура. Оптическую плотность растворов измеряли на приборах КФК-2 (Россия, $\lambda_{\text{эф}} = 440 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$) или спектрофотометре UV-2201 (Shimadzu, Япония). Величину рН водных растворов измеряли с точностью $\pm 0,1$ при помощи рН-метра-иономера “Эконикс-Эксперт-001”.

Методика иммобилизации пероксидазы на модифицированных силикагелях. Порошок силикагеля, модифицированного амино-группами (0,3 г) помещали в 2,5%-й раствор глутарового альдегида, полученную смесь перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. После этого активированный носитель промывали водой и 0,1 М боратным буферным раствором (рН 7,0) до исчезновения запаха глутарового

альдегида. Затем активированный амино-силикагель и эпокси-силикагель (без предварительной подготовки) помещали в раствор пероксидазы определенной концентрации и перемешивали в течение 3,5 или 12 ч соответственно. Полученные препараты иммобилизованного фермента отмывали 0,05 М боратным буферным раствором (рН 7,0) от неспецифически связанного с носителем фермента и хранили в 0,1 М буферном растворе с рН 7,0 при температуре 4°C.

Методика проведения индикаторной реакции, катализируемой иммобилизованной пероксидазой. В стеклянную пробирку объемом 5 мл последовательно вводили 2,8 мл 0,1 М фталатного буферного раствора (рН 5,0), 100 мкл суспензии, содержащей силикагель с иммобилизованным ферментом, 100 или 50 мкл 5 мМ ОД и 175 или 300 мкл 10 мМ пероксида водорода в случаях использования амино- и эпокси-силикагелей соответственно, а также воду до общего объема смеси 4 мл. В момент введения пероксида водорода включали секундомер, реакционный раствор перемешивали и переносили в кювету. Скорость пероксидазного окисления ОД контролировали спектрофотометрически, регистрируя нарастание оптической плотности реакционной смеси во времени при $\lambda_{\text{эф}} = 440$ нм ($l = 1$ см). Абсолютное значение начальной скорости ферментативной реакции (v_0 , М/мин) рассчитывали по формуле: $v_0 = \Delta C / \Delta t = (\Delta A / \Delta t) (1 / \epsilon) = \text{tg} \alpha / l \epsilon$, где C – концентрация конечного продукта ферментативной реакции (М), ϵ – молярный коэффициент поглощения последнего при 440 нм ($3,0 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$), l – толщина кюветы, $\text{tg} \alpha$ – среднее значение тангенса угла наклона кинетических кривых, построенных в координатах оптическая плотность (A_{440}) – время (t , с) ($n = 5$).

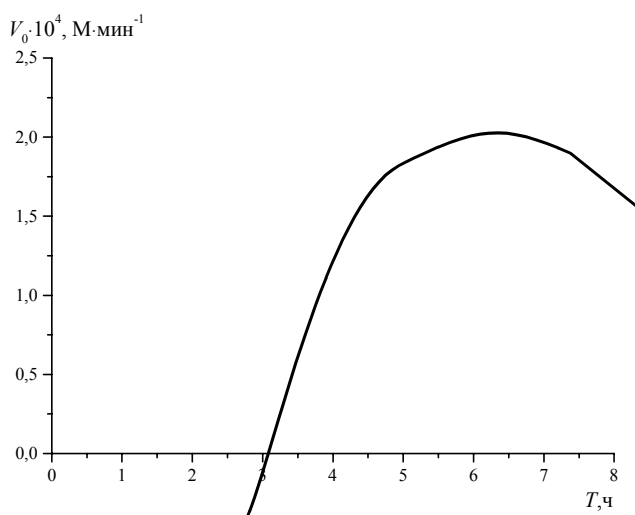


Рис. 1. Зависимость начальной скорости индикаторной реакции от времени выдерживания амино-силикагеля в растворе пероксидазы (0,1 М фталатный буферный раствор с рН 5,0; концентрации растворов: ОД – 0,05 М; H_2O_2 – 0,01 М)

Степень ингибирования пероксидазы ионами ртути (II) (I , %) рассчитывали по формуле: $I = (v_0 - v_1) / v_0 \cdot 100\%$, где v_0 и v_1 – начальные скорости индикаторной реакции в отсутствие и в присутствии иона металла соответственно.

Результаты и их обсуждение

Выяснение оптимальных условий ковалентной иммобилизации пероксидазы на модифицированных силикагелях. Силикагели, модифицированные амино- и эпокси-группами, наиболее часто используют для химического связывания фермента [5]. В случае силикагеля, модифицированного эпокси-группами, прочная химическая связь образуется при непосредственном взаимодействии фермента с активными группами носителя, а аминогруппы амино-силикагеля необходимо предварительно активировать дополнительным сшивающим агентом – глутаровым альдегидом.

Для выяснения оптимального времени связывания фермента с носителем из тщательно перемешанной смеси, содержащей эпокси-силикагель (либо амино-силикагель, активированный глутаровым альдегидом), и раствор пероксидазы, каждые 30 мин отбирали суспензию объемом 300 мкл. После центрифугирования и слива надосадочной жидкости иммобилизованный препарат пероксидазы несколько раз отмывали от неспецифически связанного фермента небольшими порциями боратного буферного раствора (рН 7,0). Затем измеряли каталитическую активность иммобилизованного фермента, вводя определенное количество суспензии силикагеля, промытого в боратном буферном растворе, в индикаторную реакцию окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода [6]. Для ковалентной иммобилизации пероксидазы на амино-силикагеле в качестве оптимального времени, при котором достигается максимальная активность препарата, т.е. наибольшее количество фермента связывается с носителем, были выбраны 3,0–4,5 ч (рис. 1), а на эпокси-носителе – 12 ч.

Наибольшая каталитическая активность препаратов пероксидазы, ковалентно иммобилизованных на силикагеле, модифицированном эпокси-группами, достигалась при концентрации нативного фермента в 5 раз большей, чем в случае получения препарата фермента, связанного с амино-силикагелем.

Для характеристики модифицированных силикагелей при использовании их для иммобилизации пероксидазы были рассчитаны: степени связывания ими фермента (R , % = $(A_{\text{исх}} - A_{\text{ост}} / A_{\text{исх}}) \cdot 100\%$), где $A_{\text{исх}}$ и $A_{\text{ост}}$ – активности нативной пероксидазы до внесения в нее навески силикагеля и после извлечения из нее носителя); емкость носителя (количество молей фермента, связанного с 1 г носителя $C_{\text{исх}} \cdot V \cdot R / m \cdot 100\%$, где $C_{\text{исх}}$ – концентрация пероксидазы, необходимая для получения высокоактивного препарата фермента

Т а б л и ц а 1

Характеристики препаратов пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на модифицированных силикагелях, и оптимальные концентрации субстратов в индикаторной реакции

Характеристика	Носитель	
	Амино-силикагель	Эпокси-силикагель
Степень связываения, %	35	87
$A_{им}/A_{исх}$, %	21	<10
Емкость, моль г ⁻¹	$4,2 \cdot 10^{-8}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$
Стабильность*, мес	6	6
$C_{од}$, мМ	1	0,5
$C_{H_2O_2}$, мМ	0,4	0,7

* Время хранения препарата иммобилизованного фермента, в течение которого он не теряет активность

(М); V – объем раствора, взятого для иммобилизации (л); R – степень связываения (%); m – масса навески силикагеля (г); отношение активности иммобилизованных и нативных препаратов пероксидазы (A , % = $A_{им}/A_{исх} \cdot 100\%$) (табл. 1). Как видно из табл. 1, степень связываения пероксидазы с амино-силикагелем ниже, а активность полученного препарата выше, чем у препарата, иммобилизованного на эпокси-силикагеле.

Была изучена прочность связываения пероксидазы с модифицированными силикагелями в динамических условиях в различных буферных растворах (фталатном, фосфатном и ацетатном) при рН 5,0, когда активность пероксидазы в индикаторной реакции максимальна [7]. Прочность связываения характеризовали отношением разности значений активности иммобилизованного препарата фермента в начальный момент и через определенное время к активности препарата в начальный момент ($A_{дин}^t$, % = $(A_{им}^0 - A_{им}^t)/A_{им}^0 \cdot 100\%$). Для этого препараты иммобилизованного фермента помещали в разные буферные растворы и перемешивали в течение 8 ч, соответствующих продолжительности рабочего дня (рис. 2). Активность пероксидазы, иммобилизованной на амино-силикагеле, во всех буферных растворах резко уменьшается в течение 1–2 ч; наибольшую активность (68 %) пероксидаза, иммобилизованная на амино-силикагеле, сохраняет в фосфатном буферном растворе. В том же растворе фермент, иммобилизованный на эпокси-силикагеле, сохраняет 100% первоначальной активности в течение всего времени наблюдения.

При хранении иммобилизованных препаратов пероксидазы в 0,05 М фосфатном буферном растворе с

рН 7,0 (при этом значении рН обычно хранят растворы этого фермента), их активность полностью сохраняется в течение 6 мес при 4°C; в то же время лиофилизированный препарат иммобилизованного фермента полностью теряет каталитическую активность через три дня хранения.

Выяснение оптимальных условий проведения индикаторной реакции окисления *o*-дианизида в присутствии пероксидазы, иммобилизованной на силикагелях. При изучении индикаторной реакции во фталатном, фосфатном и ацетатном буферных растворах установлено, что природа буферного раствора не влияет на активность иммобилизованных препаратов фермента. Пероксидаза, иммобилизованная на амино- и эпокси-силикагелях, наиболее активна при рН 5,0–5,5 и 4,8–5,2 соответственно (рис. 3).

Для дальнейших исследований был выбран фталатный буферный раствор, поскольку в нем наиболее хорошо исследованы свойства пероксидазы.

В результате изучения зависимости скорости индикаторной реакции, катализируемой иммобилизованной пероксидазой, от концентрации субстратов в качестве оптимальных были выбраны концентрации ОД и пероксида водорода, при которых иммобилизованная пероксидаза проявляла наибольшую каталитическую активность (рис. 4, 5; табл. 1).

Были рассчитаны кинетические параметры (константа Михаэлиса, максимальная скорость реакции) реакции окисления ОД пероксидом водорода в оптимальных условиях ее проведения в присутствии обоих препаратов фермента. Сродство к субстрату-восстановителю пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на амино-силикагеле, в 10 раз ниже ($K_m = 0,35$ мМ), а

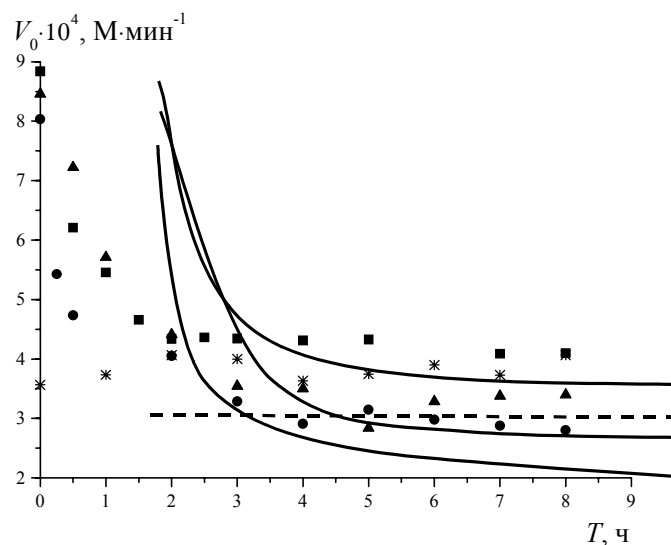


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции окисления *o*-дианизида от времени выдерживания препаратов пероксидазы, ковалентно иммобилизованных на амино- (1, 3, 4) и эпокси- (2) силикагелях, в фосфатном (1, 2), фталатном (3) и ацетатном (4) буферных растворах (рН 5,0)

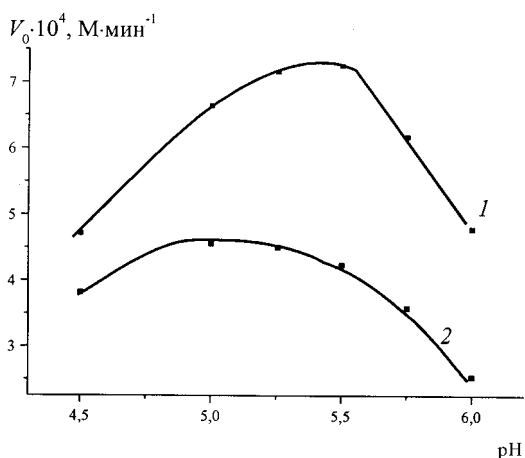


Рис. 3. Зависимость начальной скорости индикаторной реакции, катализируемой пероксидазой, ковалентно иммобилизованной на amino- (1) и эпокси- (2) силикагелях, от pH 0,1 М фталатного буферного раствора; концентрации (М): ОД – 0,05; H₂O₂ – 0,01

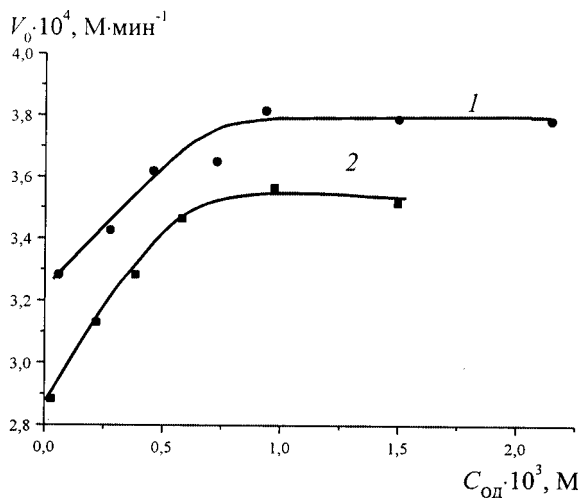


Рис. 4. Зависимость скорости индикаторной реакции, катализируемой пероксидазой, ковалентно иммобилизованной на amino- (1) и эпокси- (2) силикагелях, от концентрации *o*-дианизидина (0,1 М фталатный буферный раствор с pH 5,0; концентрация H₂O₂ 0,01 М)

препарата, иммобилизованного на эпокси-носителе, примерно в 10 раз выше ($K_m = 4,74 \text{ мкМ}$), чем у нативного фермента ($K_m = 0,033 \text{ мМ}$). Максимальные скорости окисления ОД, катализируемого пероксидазой, иммобилизованной на amino- и эпокси-носителях, составили 0,27 и 0,11 мМ·мин⁻¹ соответственно, что ниже, чем в случае нативного фермента ($V_{\text{макс}} = 1,35 \text{ мМ} \cdot \text{мин}^{-1}$).

Определение ртути (II). Изучение влияния ртути (II) на активность пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на amino- и эпокси-силикагелях, показало, что ртуть (II) в интервале концентраций 0,1 нг/мл – 0,1 мкг/мл (без инкубирования и при инкубировании) не меняет активность обоих препаратов фермента.

При введении в индикаторную реакцию 0,1–2,5 мМ тиомочевины, присутствие которой в индикаторной системе усиливает, как известно [8], ингибирующее действие ртути(II), скорость ферментативного процесса на обоих носителях понижается на 12–45 %. При этом тиомочевина ингибирует фермент, иммобилизованный на эпокси-силикагеле, сразу после их смешения, а фермент на amino-силикагеле – только после 5 мин инкубирования. В качестве оптимальных концентраций тиомочевины выбрали – 2,5 и 1,25 мМ для индикаторных реакций, катализируемых пероксидазой, иммобилизованной на amino- и эпокси-силикагелях соответственно. При таком ее содержании достигается 40–45 % ингибирование активности иммобилизованной пероксидазы и максимально различаются скорости ферментативных реакций в отсутствие и в присутствии ртути (II).

Ртуть (II) эффективно ингибирует активность пероксидазы, иммобилизованной на amino-силикагеле, после 30-минутного предварительного выдерживания фермента с тиомочевинной и последующего добавления иона металла. В случае пероксидазы, иммобилизованной на эпокси-силикагеле, ртуть (II) ингибирует фермент в присутствии тиомочевины без инкубирования. Степень ингибирующего действия возрастает прямо пропорционально логарифму ее концентрации в интервале 0,1–10 и 0,01 – 0,1 нг/мл, соответственно. Определение ртути(II) проводили по методике, приведенной в экспериментальной части. После введения в пробирку фталатного буферного раствора и суспензии эпокси-силикагеля с иммобилизованным ферментом (в случае amino-силикагеля смесь выдерживали 30 мин) добавляли 100 или 50 мкл 1М раствора тиомочевины

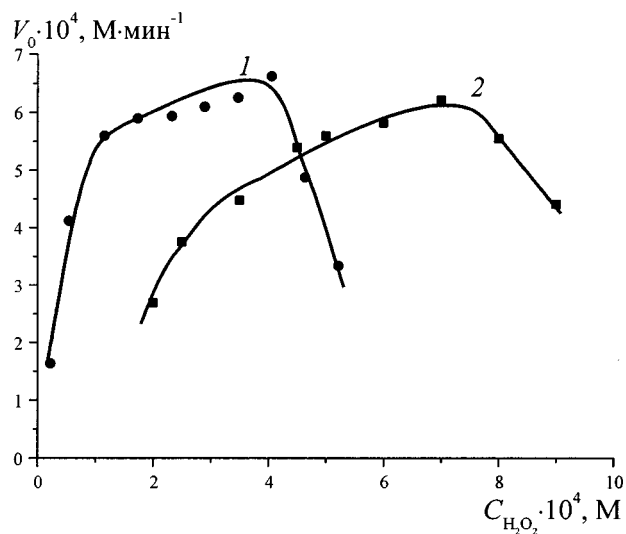


Рис. 5. Зависимость скорости индикаторной реакции, катализируемой пероксидазой, ковалентно иммобилизованной на amino- (1) и эпокси- (2) силикагелях, от концентрации пероксида водорода (0,1 М фталатный буферный раствор с pH 5,0, концентрация *o*-дианизидина 0,05 М)

Таблица 2

Метрологические характеристики методики определения Hg(II) с использованием пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на модифицированных силикагелях

Носитель	$C_{\text{мин}}$, нг/мл	Уравнение градуировочного графика	Диапазон определяемых содержаний Hg(II), нг/мл	s_r^{***} $P = 0,95,$ $n = 5$
Амино – силикагель	0,05	$y^* = 71,28 - 12,46x^{**}$	0,1 –10	0,15
Эпокси – силикагель	0,005	$y^* = 101,76 - 15,41x^{**}$	0,01 –0,1	0,09

* $I, \%$ - степень ингибирования пероксидазы ионами ртути (II); ** $Ig(C_{\text{Hg(II)}}, \text{нг/мл})$; *** относительное стандартное отклонение при определении ртути (II) на уровне нижней границы определяемых содержаний.

и раствор ртути (II) в указанных выше диапазонах концентраций для amino- и эпокси-силикагелей соответственно. Метрологические характеристики разработанных методик приведены в табл. 2.

Результаты исследований показали, что из двух препаратов пероксидазы, ковалентно иммобилизованных на модифицированных силикагелях, более перспективен для использования в целях химического анализа препарат, полученный с использованием эпокси-силикагеля: для его получения не требуется предварительного активирования носителя сшиваю-

щим агентом, что упрощает и сокращает время получения иммобилизованного препарата фермента; прочность связывания пероксидазы с эпокси-силикагелем значительно выше. Предложенная методика определения ртути (II) с использованием эпокси-силикагеля в качестве носителя пероксидазы характеризуется уникальной чувствительностью: превосходит по чувствительности все разработанные нами ранее и известные из литературы методики определения этого токсиканта, высокой воспроизводимостью, простотой и экспрессностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Никольская Е.Б., Долманова И.Ф. // ЖАХ. 1994. **49**. С. 862.
2. Мугинова С.В., Аковбян Н.А., Шеховцова Т.Н. // ЖАХ. 1999. **54**. С. 645.
3. Veselova I., Shekhovtsova T. // Analyt. Chim. Acta. 1999. **392**. P. 151.
4. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. и др. Справочник биохимика. М., 1991.
5. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В. и др. Иммобилизованные ферменты. М., 1987.
6. Багирова Н.А., Шеховцова Т.Н. // Кинетика и катализ. 1999. **40**. С. 625.
7. Долманова И.Ф., Ершова Е.В., Шеховцова Т.Н., Надь В.Ю. // ЖАХ. 1979. **34**. С. 1644.
8. Долманова И.Ф., Шеховцова Т.Н., Стародумова Н.Н. // ЖАХ. 1987. **42**. С. 1824.

Поступила в редакцию 20.03.03

DETERMINATION OF MERCURY (II) USING PEROXIDASE COVALENTLY IMMOBILIZED ON THE MODIFIED SILICA

D.L. Grigoryeva, I.A. Veselova, T.N. Shekhovtsova

(Division of Analytical Chemistry)

The activity and stability of peroxidase covalently immobilized on silica, modified with amino- and epoxy- groups were studied. On the basis of inhibiting activity of mercury (II) on the catalytic activity of the enzyme, immobilized on the indicated supports, the procedure for its determination with $C_{\text{min}} = 0,05 \text{ ng/ml}$ и 5 pg/ml , respectively was worked out.