

可见光谱法测定 GA-HRP-H₂O₂ 体系的活化能

王恒 李永生^① 高秀峰^a

(四川大学化学工程学院 成都市一环路南一段 24 号 610065)

^a(四川大学华西基础医学与法医学学院 成都市人民南路三段 17 号 610041)

摘要 活化能 (E_a) 是反应中一个重要的物理量, 与反应速度直接相关, 因此本实验计划利用一个新的循环催化流动分析方法 (RCFA), 测定愈创木酚 (GA)-HRP-H₂O₂ 反应体系的活化能。RCFA 系统为循环回路, 人为干扰因素小, 能够对酶催化过程实现连续检测, 得到的测定结果准确度高。使用 RCFA 系统在可见光谱下测定得到 GA-HRP-H₂O₂ 体系完整动力学曲线, 由此求解得到酶催化反应表观速率常数 (k), 最后利用阿仑尼乌斯公式求得该催化反应体系的活化能 (E_a) = 53.46 ± 0.097 kJ · mol⁻¹, 指前因子 (A_E) = 2.5 × 10³ ± 0.099 min⁻¹; E_a 与 A_E 的相对标准偏差分别为 0.18% 和 3.81%, 结果表明在一级反应阶段的不同区段中 HRP 催化反应的活化能和指前因子均为常数。

关键词 可见光谱; 过氧化物酶; 循环催化流动分析; 活化能; 指前因子; 阿仑尼乌斯公式

中图分类号: O 657.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8138(2011)02-0489-05

1 引言

活化能表示化学反应中自由分子变成活化分子所需的最低能量^[1], 是各种化学反应的重要参数指标^[2,3]。酶催化反应中活化能则表示酶与底物在自由状态下的势能与二者形成的活化分子的势能之差, 是影响酶催化反应速率的一个重要的物理量^[4,5]。但是在酶学性质的研究中, 前人主要对酶的活性^[6] 及米氏常数^[7-9] 进行了测定, 而对酶分子催化下反应体系的活化能研究较少^[10]。在活化能的测定中, 主要应用手工法, 操作过程繁琐, 并且难免带入人为误差而使测定结果不准确, 因此需要开发一种能够准确测定酶活性, 并可用于酶学性质研究的方法。

循环催化流动分析方法 (Recirculating Catalysis Flow Analysis, RCFA) 是将流经检测器的反应液再回流到反应池中而实现反应液循环使用及检测的方法。RCFA 法能对酶催化反应进行全程监测, 得到详细的酶催化反应数据; RCFA 法测定体系为循环回路, 测定中人为干扰因素少, 测定结果准确度高; 反应液的循环使用, 节省了大量的昂贵酶试剂; 因此, RCFA 法非常适用于酶的性质研究。基于 RCFA 法, 李永生研究团队^[11] 利用邻苯二胺-辣根过氧化物酶 (HRP) -H₂O₂ 反应体系已初步研究了 HRP 的活性。

本文基于 RCFA 法, 研究了 HRP 催化下愈创木酚 (GA)-H₂O₂ 反应体系的活化能。在用 RCFA 法得到 HRP 分子催化 GA-H₂O₂ 反应体系在不同反应温度下的动力学曲线后, 依据反应速率与活化能的关系对 HRP 催化下 GA-H₂O₂ 反应体系的活化能进行了计算。

① 联系人, 手机: (0) 13689091550; E-mail: li-yongsheng@scu.edu.cn

作者简介: 王恒 (1985—), 男, 西安市人, 硕士研究生, 主要从事可见光谱研究工作。

收稿日期: 2010-04-29; 接受日期: 2010-06-15

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

721 型可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);蠕动泵(东北电力学院仪器仪表厂);AUW 型电子天平(德国 Shimadzu 公司);pH 计(日本东亚电波工业株式会社);XWT-S 小型台式记录仪(上海自动化仪表三厂);GL-150 微量恒温器(海门市麒麟医用仪器厂)。

HRP($\geq 250\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, R. Z= 3, 中科院上海生化所东风生物技术公司);过氧化氢(30% w/V, 高锰酸钾法标定其浓度为 $9.88\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 成都金山化工试剂厂);愈创木酚(GA, 中国余山化工厂);磷酸氢二钠(成都市科龙化工厂);磷酸二氢钠(成都市科龙化工厂)。实验试剂均为分析试剂。实验用水均为超纯水。

2.2 反应原理及测定过程

在过氧化物酶(POD)的催化作用下, H_2O_2 氧化 GA 反应生成四愈创木酚(4-GA), 4-GA 在 472nm 处有最大吸收, 反应方程式如图 1 所示。

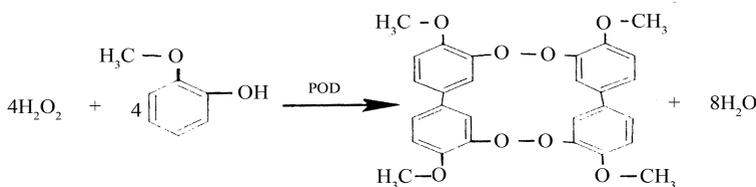


图 1 在 POD 催化下 H_2O_2 与 GA 之间的反应

实验使用的 RCFA 系统如图 2 所示, 其中管路总体积 1mL, 反应池中溶液体积 1mL。测定过程中, 在管路长度、管径及反应液流速固定的情况下, 反应液在系统中完成一次循环的时间固定。

RCFA 系统中 GA-HRP- H_2O_2 反应体系的测定过程为: 首先用磷酸盐缓冲液(PBS, pH= 7.5)冲洗管路至吸光度(A)零值, 系统中存留 PBS 1.0mL。在反应池中分别加入 0.50mL 的 H_2O_2 与 0.50mL 的 GA 溶液, 混合均匀后预热至设定温度, 将流路的入口端与出口端同时插入反应池中, 在泵的抽吸下试剂混合液进入检测器并沿管路回流至反应池中完成循环, 在 A 达到稳定后, 将此 A 定义为试剂空白值(A_0), 随后在反应池中加入 HRP 溶液 $20\mu\text{L}$ (由于 $V_{\text{酶液}}/V_{\text{混合液}} \leq 1\%$, 酶溶液加入所导致的溶液稀释可忽略)进行酶催化反应, 含酶的反应液被泵抽入检测器得到某时刻的 A 值, 由于进入检测器的反应液中产物所对应的 A 随时间而变化, 于是得到一条 A 随时间变化的反应动力学曲线, 直至 A 达到平衡。使用 Δt 表示酶催化反应时间的变化, ΔA 表示在此段时间中 A 的变化, 则 $\Delta A/\Delta t$ 表示在酶催化反应中单位时间内 A 的变化。

2.3 GA-HRP- H_2O_2 体系活化能计算公式推导

GA-HRP- H_2O_2 催化反应体系中, 反应产物为 4-GA, 因此催化反应体系的活化能定义为 GA 与 HRP 两者结合形成活化分子所需的势能。

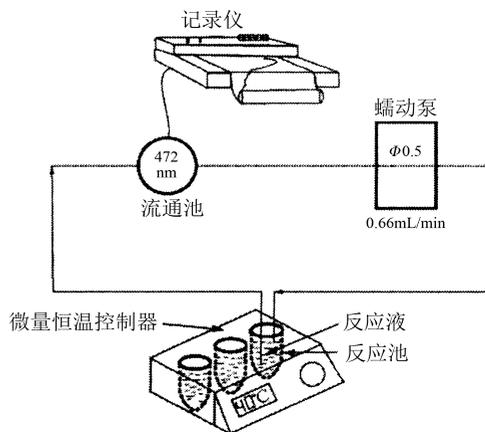


图 2 测定用 RCFA 系统

催化体系中活化能与反应速率常数的关系通过阿仑尼乌斯公式描述为:

$$-\ln k = \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} - \ln A_E \quad (1)$$

式中: k ——反应速率常数, min^{-1} ; A_E ——指前因子, min^{-1} ; E_a ——活化能, $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; R ——摩尔气体常数, $R = 8.314 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; T ——反应的热力学温度, K。在反应条件固定时, 式(1)中的 T 与 R 为已知量, 因此在活化能及指前因子求解中, 首先应求得催化反应体系的 k 。

反应过程中 H₂O₂ 过量, 在不同的 GA 浓度下得到反应速度 v_E 与 C_{GA} 浓度的关系为:

$$v_E = k C_{GA} \quad (2)$$

假设在线性区的 t_1 、 t_2 时, 产物 4-GA 的 A 分别为 A_{4-GA}^1 、 A_{4-GA}^2 , 则在 t_1 、 t_2 时刻, 溶液中 GA 浓度分别用 C_{GA}^1 和 C_{GA}^2 表示, 即 $C_{GA}^1 = \frac{nA_{4-GA}^1}{\epsilon b}$ 和 $C_{GA}^2 = \frac{nA_{4-GA}^2}{\epsilon b}$, 因此 t_1 、 t_2 时刻内底物浓度的改变为:

$$\frac{nA_{GA}^1}{\epsilon b} - \frac{nA_{GA}^2}{\epsilon b} = \frac{n\Delta A}{\epsilon b} \quad (3)$$

式中: n ——底物与生成物之间的摩尔比, 反应中 $n = 4$; ϵ ——反应产物的摩尔吸光系数, 取值为 $2.88 \times 10^4 \text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; b ——比色皿光程, 1cm。

公式(3)表示单位体积内底物浓度的变化, 因此反应速度 v_E 可以表示为:

$$v_E = \frac{\Delta C_{GA}}{\Delta t} = \frac{n\Delta A}{\epsilon b} / \Delta t = \frac{n\Delta A}{\epsilon b \Delta t} = \frac{n}{\epsilon b} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (4)$$

综合公式(2)与公式(4)可以得到:

$$v_E = \frac{n}{\epsilon b} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} = k C_{GA} \quad (5)$$

所以 k 的计算公式可以表示为:

$$k = \frac{n}{\epsilon b C_{GA}} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (6)$$

在实验条件固定的情况下, 公式(6)可以写为:

$$k = \frac{4}{2.88 \times 10^4 \times 1 \times 1.56} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} = (0.89 \times 10^{-4}) \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (7)$$

在求得反应速率常数的基础上, 通过反应速率常数与热力学温度的关系, 计算得到反应体系的活化能与指前因子。

3 结果与讨论

3.1 一级反应阶段活化能及指前因子求解

实验条件: GA 浓度 $1.56 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; H₂O₂ 浓度 $0.375 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 反应体系中 HRP 浓度为 $3 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。反应液温度分别为 20、25、30、35、37、39、41、46℃, 反应液流速为 $0.66 \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。不同反应温度下的酶催化反应动力学曲线, 在 1—15min 内 A 与反应时间呈线性关系。

酶催化反应中线性区为一级反应阶段^[11], 在不同的反应温度下, 通过线性区的回归方程求解得到 k 及 $-\ln k$ 。如表 1 所示, 在反应温度 293K 到 314K 之间, k 与反应热力学温度间呈线性关系, $\ln k$ 与反应热力学温度间服从公式 1, 以 $-\ln k$ 对 $1/T$ 作图, 得到图 3。

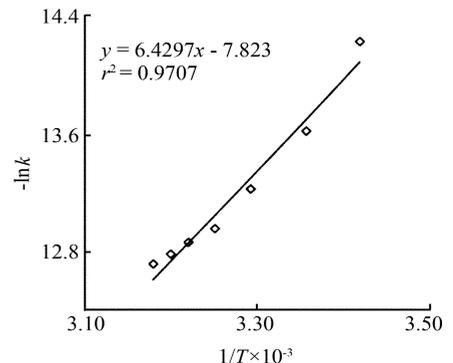


图 3 活化能求解中 $-\ln k$ 与 $1/T$ 的关系

表 1 表观速率常数求解

t (°C)	$1/T \times 10^{-3}$	酶反应线性回归方程 ($t = \text{min}$)	公式 7 计算 k	$k (\times 10^{-6} \text{min}^{-1})$	$-\ln k$
20	3.41	$\Delta A = 0.0074t + 0.0163$	$0.89 \times 10^{-4} \times 0.0074$	0.66	21.14
25	3.35	$\Delta A = 0.0133t + 0.0257$	$0.89 \times 10^{-4} \times 0.0133$	1.18	20.56
30	3.29	$\Delta A = 0.0198t + 0.0353$	$0.89 \times 10^{-4} \times 0.0198$	1.76	20.16
35	3.25	$\Delta A = 0.0260t + 0.0472$	$0.89 \times 10^{-4} \times 0.0260$	2.31	19.89
37	3.22	$\Delta A = 0.0287t + 0.0506$	$0.89 \times 10^{-4} \times 0.0287$	2.55	19.79
39	3.20	$\Delta A = 0.0309t + 0.0547$	$0.89 \times 10^{-4} \times 0.0309$	2.75	19.71
41	3.18	$\Delta A = 0.0336t + 0.0580$	$0.89 \times 10^{-4} \times 0.0336$	2.99	19.63
46	3.13	$\Delta A = 0.0320t + 0.0578$	$0.89 \times 10^{-4} \times 0.0320$	2.85	19.68

依据图 3 中的线性回归方程并与公式(1)比较,可以得到 $E_a/R = 6.4297$, $\ln A_E = 7.823$, 因此,最终求得 GA-HRP-H₂O₂ 催化反应体系的活化能 $E_a = 53.46 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 指前因子 $A_E = 2.5 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ 。

3.2 不同反应区段中活化能及指前因子求解

为充分了解酶催化反应体系中不同反应时间区段中 E_a 与 A_E 的变化规律,在一级反应阶段,以相同的时间间隔,对不同区段中的 E_a 与 A_E 进行考察。

选取的时间段分别为 1—3、3—5、5—7、7—9、9—11、11—13、13—15 min, 计算得到不同时间区段中的 E_a 及 A_E , 结果见表 2。

表 2 不同反应时间区段中 E_a 与 A_E 的计算

反应时间 (min)	1—3	3—5	5—7	7—9	9—11	11—13	13—15	SD	RSD (%)
$E_a (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	53.04	53.62	53.47	53.60	53.65	53.41	53.62	0.097	0.18
$A_E \times 10^3 (\text{min}^{-1})$	2.45	2.67	2.52	2.65	2.67	2.44	2.67	0.099	3.81

通过表 2 可知,在不同的时间区段中,GA-HRP-H₂O₂ 催化反应体系的 E_a 和 A_E 值基本不变;通过计算,在不同的时段中活化能与指前因子的 RSD 分别为 0.18% 和 3.81%, 这表明在同一个反应中 E_a 与 A_E 为一个常量。

4 结论

RCFA 法测定体系为循环回路,测定中人为干扰因素少,结果准确度高,并且测定过程中能节省大量的贵重酶试剂,因此适用于紫外-可见光谱下酶性质的研究。本文以可见光谱检测为基础,首次将 RCFA 法用于 GA-HRP-H₂O₂ 催化反应体系 E_a 和 A_E 的测定,在相同的时间间隔下分别计算不同反应区段的 E_a 和 A_E , 得到了 GA-HRP-H₂O₂ 酶催化反应体系的 $E_a = 53.46 \pm 0.097 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $A_E = 2.5 \times 10^3 \pm 0.099 \text{ min}^{-1}$ (线性区: 1—15 min), E_a 与 A_E 的 RSD 分别为 0.18% 和 3.81%。

参考文献

- [1] 刘彬, 卢荣. 物理化学 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2008. 262—264.
- [2] 莎仁, 张志颖. 活化剂存在下 H₂O₂ 氧化间乙酰基偶氮氯膦催化光度法测定痕量铁(III) [J]. 光谱实验室, 2006, 23(3): 446—449.
- [3] 卢嘉春, 黄萍, 张丽莉. 聚偏氯乙烯热解动力学研究 [J]. 光谱实验室, 2003, 20(6): 807—809.
- [4] Mejri M, Mathlouthi M. Effect of Small Carbohydrates on the Catalytic Activity of a Protease and Two Glycohydrolases [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1999, 45: 161—167.
- [5] Krishalik L I. Effective Activation Energy of Enzymatic and Nonenzymatic Reactions. Evolution-Imposed Requirements to Enzyme Structure [J]. *Theoretical Biology*, 1985, 112(21): 251—264.
- [6] Paschal A, Weernink O, Rijksen G. Determination of Specific Protein Kinase Activities Using Phosphorus-33 [J]. *Biochemical and*

Biophysical Methods., 1995, **31**: 49—57.

- [7] Daisuke N, Toshitaka U. Effect of High Temperature on the Apparent Activation Energy of Respiration of Fresh Produce[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, **37**: 277—285.
- [8] Amisha K J K, Digambar V B. Kinetic Stabilities of Soybean and Horseradish Peroxidases[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, **138**: 110—114.
- [9] 陈石根, 周润琦. 酶学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001. 163—167.
- [10] 张青, 许学书, 谢静莉等. 米曲霉蛋白酶动力学特性的研究[J]. *食品科学*, 2007, **28**(6): 213—217.
- [11] 魏然飞, 高秀峰, 李永生. 循环连续流动分析法测定辣椒过氧化物酶的活性[J]. *分析化学*, 2009, **37**(6): 897—901.

Determination of Activation Energy in GA-HRP-H₂O₂ System by Visible Spectrometry

WANG Heng LI Yong-Sheng GAO Xiu-Feng^a

(School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, P. R. China)

^a(West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, P. R. China)

Abstract Activation energy (E_a) is an important physical parameter, which is directly related to the reaction speed. The activation energy of GA-HRP-H₂O₂ system was determined by recirculating-catalysis flow analysis (RCFA) method. RCFA system was a circuit, which had lower man-made interference factors, can achieve continuous process of enzyme catalysis and had high accuracy. Therefore, the dynamics curve of GA-HRP-H₂O₂ system under the visible spectrum by RCFA method was obtained, then the apparent reaction rate constant (k) could be calculated. According to the Arrhenius equation, E_a and pre-exponential factor (A_E) of the reaction also could be got, which were $53.46 \pm 0.097 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $2.5 \times 10^3 \pm 0.099 \text{ min}^{-1}$, respectively. The relative standard deviations were 0.18% and 3.81%, respectively. The results demonstrated that E_a and A_E were constants in different time quantum in the first stage.

Key words Visible Spectrum; Peroxidase; Recirculating-Catalysis Flow Analysis; Activation Energy; Pre-Exponential Factor; Arrhenius Formula

这真是令人啼笑皆非
——由重大发明写成的论文被判为“没有发表价值”

欢迎作者将被他刊拒绝的佳作再投本刊

在物理学的科技成就中, 激光可算是仅次于核能的 1 项重大发明创造。第 1 台激光器是 1960 年由美国物理学家梅曼(见本刊《邮票上的科学家——佼佼者之路》一书中之 M4)发明的。然而《物理评论快报》却拒绝刊登梅曼的论文, 理由是: 这是微波激射物理方面的文章, 对快速出版物不再有价值。这真是令人啼笑皆非!

接着, 梅曼将论文寄到了英国《自然》杂志, 这篇 300 字的简短文章立即被接受。发表后引起全世界轰动。后来, 梅曼被列入了美国发明家名人堂。

为了吸取历史教训, 本刊收到的论文, 即使其观点与审稿人有尖锐的意见冲突, 只要是言之有理, 也给予发表。因为“仁者见之谓之仁, 智者见之谓之智”(《周易·系辞上》), 不同人从不同角度看问题, 难免不同。我们欢迎将被他刊判为“没有发表价值”的佳作, 再投本刊。

繁荣学术交流事业, 需要“宽容”精神!

光谱实验室编辑部