

辣根过氧化物酶催化动力学光度法测定汞

李 囡 姜子涛 李 荣

(天津商学院食品科学与工程系 天津市 300134)

摘 要 基于辣根过氧化物酶催化 H_2O_2 -4-氨基安替比林-2, 4-二氯苯酚的反应中, 汞离子对于酶催化的抑制作用, 建立了用动力学分光光度法测定 Hg^{2+} 新方法。测定范围为 $1.0—5.0 \mu g/mL$, 检出限为 $5.78 \times 10^{-7} g/mL$, 优化了测定 Hg^{2+} 的实验条件并讨论了共存离子对测定的影响。本法简单、快速。

关键词 汞, 辣根过氧化物酶, 动力学光度法。

中图分类号: O 657. 32

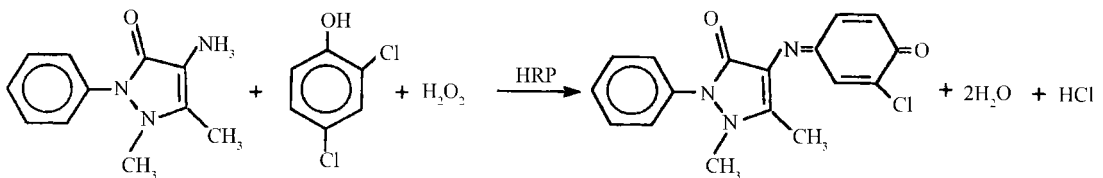
文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2006)06-1311-03

1 前言

汞俗称“水银”, 是典型的有害元素。常用的汞化合物检测方法有双硫脲光度法^[1]、原子吸收光谱法^[2]和原子荧光光谱法^[3]。双硫脲光度法操作步骤较复杂, 且受许多因素的影响; 而原子吸收光谱法和荧光光谱法所用的仪器又比较昂贵。近年来酶法在分析测定方面得到了广泛的应用, 例如 Shekhovtsova 等人利用无机离子对辣根过氧化物酶(HRP)的抑制作用测定了 Hg^{2+} ^[4]; 但其底物邻联茴香胺是致癌物, 制约了方法的发展。现已有报道, 无致癌作用的 2, 4-二氯苯酚(2, 4-DCP)可作为邻联茴香胺的代用品, 并利用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶-2, 4-二氯苯酚反应体系测定 A_{g^+} ^[5]。

本文基于 HRP 催化 H_2O_2 氧化 2, 4-DCP, 与 4-氨基安替比林(4-AAP)偶联形成喹啉酮染料。反应式如下:



Hg^{2+} 的存在使 HRP 的活性降低, 喹啉酮染料吸光度的变化与抑制剂汞离子的浓度有关, 因此可制得 Hg^{2+} 校准曲线, 从而测出样品中 Hg^{2+} 的含量。由于酶促反应的专属性, 可以避免试样中众多共存组分的干扰。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

HSS-1(B)型恒温浴槽(成都仪器厂); pH S-25 数显酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司); UV-

基金项目: 天津市自然科学基金(043604511)

联系人, 电话: (022)26675771; 传真: (022)26669611; E-mail: ztjiang@yahoo.com

作者简介: 李囡(1981—), 女, 新疆乌鲁木齐人, 硕士研究生, 研究方向为食品添加剂。

姜子涛(1956—), 男, 吉林省吉林市人, 教授, 博士, 研究方向为食品添加剂、微量成分分析。

收稿日期: 2006-08-31; 接受日期: 2006-09-19

2102PC (U nico 上海仪器有限公司)。

所用试剂除特殊注明外均为分析纯, 实验用水为二次去离子水。

汞标准储备液(1.0mg/mL): 准确称取 0.1760g 硝酸汞(优级纯), 溶解于 5% (V/V) 硝酸溶液中, 用二次去离子水定容至 100mL, 不同浓度的 Hg^{2+} 标准溶液均用此溶液经适当稀释制得; 辣根过氧化物酶(HRP, R. Z= 3.0, 美国Bio sharp 公司): 配制成 3.0mg/mL 的储备液(4℃保存), 用时稀释成 3.0×10^{-2} mg/mL 的工作液; H_2O_2 : 用 $KMnO_4$ 标定 30% 的 H_2O_2 , 所需浓度的 H_2O_2 工作液用储备液稀释; 30mmol/L 2,4-DCP 溶液(化学纯); 2.5mmol/L 4-AAP 溶液; $NaH_2PO_4-Na_2HPO_4$ 缓冲溶液: pH4.7—7.5。

2.2 实验方法

于 10mL 比色管中加入 3.0mL pH 5.0 $NaH_2PO_4-Na_2HPO_4$ 缓冲溶液, 一定量的 Hg^{2+} 标准溶液, 0.2mL 2.5mmol/L 4-AAP 溶液, 0.2mL 30mmol/L 2,4-DCP 溶液, 0.2mL 15mmol/L H_2O_2 溶液, 以二次去离子水定容, 30℃ 预热 5min; 加入 $5\mu L$ 3.0×10^{-2} mg/mL HRP 溶液, 迅速振荡混匀, 在 505nm 波长下每隔 30s 测一次吸光度, 绘制反应时间曲线。

3 结果与讨论

3.1 吸收光谱

按实验方法在波长 430—600nm 测定了 HRP 催化反应所生成的喹啉酮染料的吸收曲线(图 1)。由图可见, 在 505nm 波长处有最大吸收, 本试验选择 505nm 作为测定波长。

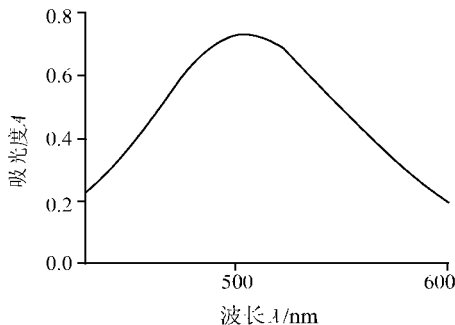


图 1 吸收光谱

(pH= 5.0, C_{4-AAP} = 2.5mmol/L, $C_{2,4-DCP}$ = 30mmol/L, $C_{H_2O_2}$ = 15mmol/L, V_{HRP} = 5 μ L)

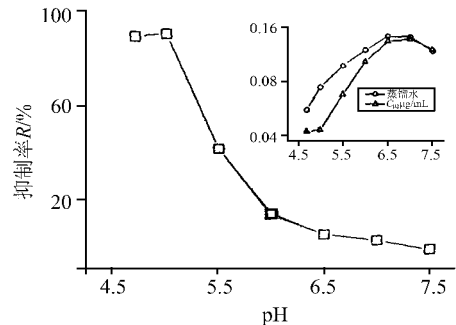


图 2 pH 值的影响

(pH= 5.0, C_{4-AAP} = 2.5mmol/L, $C_{2,4-DCP}$ = 30mmol/L, $C_{H_2O_2}$ = 15mmol/L, V_{HRP} = 5 μ L)

3.2 pH 值的影响

按实验方法在 pH4.7—7.5 范围内研究了 pH 值对反应的影响, 实验结果表明, 在 pH 4.7—5.0 范围内抑制率最大且吸光度值稳定(图 2)。本文选用 0.10mmol/L 的 $NaH_2PO_4-Na_2HPO_4$ 缓冲溶液(pH5.0) 3.0mL。

3.3 试剂用量的选择

选择 3.0 μ g/mL Hg^{2+} 对试剂用量进行优化, 实验表明加入 0.2mL 2.5mmol/L 4-AAP, 0.2mL 30mmol/L 的 2,4-DCP, 0.2mL 15mmol/L 的 H_2O_2 及 $5\mu L$ 3.0×10^{-2} mg/mL HRP 时体系抑制率最大且吸光度值稳定。

3.4 校准曲线

按 2.2 方法, 对不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液进行测定, 绘制反应时间曲线(图 3)。对该曲线进行线性回归, 求得斜率 k , 即在该段时间内的平均反应速率。计算抑制率($R\%$):

$$R(\%) = \frac{k_0 - k_i}{k_0} \times 100$$

式中: k_0 ——空白溶液的平均反应速率; k_i ——不同浓度 Hg^{2+} 溶液的平均反应速率。

结果表明: 在 $1.0\text{--}5.0\ \mu\text{g/mL}$ 范围内, $R\%$ 与 $\ln[\text{Hg}^{2+}]$ 存在良好的线性关系, 可做校准曲线。回归方程为 $R\% = 30.58 + 40.55 \ln[\text{Hg}^{2+}]$, $r = 0.9972$ 。测定 6 份含 $2.0\ \mu\text{g/mL}$ Hg^{2+} 溶液, RSD 为 2.63% 。测定 15 份空白溶液计算标准偏差为 2.79% , 检出限为 $5.78 \times 10^{-7}\ \text{g/mL}$ 。

3.5 共存离子的影响

在 $\text{pH} 5.0$ 的条件下, 向含 $2.0\ \mu\text{g/mL}$ Hg^{2+} 的体系中加入常见无机离子, 发现在允许误差不大于 $\pm 5\%$ 时, 干扰离子的最大允许量以 $\mu\text{g/mL}$ 计为: Na^+ (800)、 K^+ (400); Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ag^+ 、 Mg^{2+} (100); Cd^{2+} 、 Co^{2+} (60); Zn^{2+} (40); Cu^{2+} (16), Fe^{3+} (8)。

3.6 方法应用

为了检验所提出的方法的准确度, 利用此方法对合成标准水样中 Hg^{2+} 的含量进行了测定。该合成标准水样 ($50\ \text{mL}$) 中含 Hg^{2+} $0.25\ \text{mg}$; Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 各 $2.00\ \text{mg}$; Cu^{2+} $1.00\ \text{mg}$; K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 各 $4.00\ \text{mg}$; Na^+ $40.00\ \text{mg}$ 。每次取 $5.0\ \text{mL}$, 测定 5 次, 回收率在 $94.1\% \text{--} 106.0\%$ 之间, RSD 为 4.92% 。

参考文献

- [1] 郑礼胜, 王士龙, 安红. 双硫脲水相分光光度法测定废水中汞[J]. 环境监测管理与技术, 1996, 8(3): 32—33
- [2] 马亚民, 曹林林, 曹爱兰. 原子吸收光谱法测定甘草中汞的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(2): 23
- [3] 臧素娟, 申义珍, 魏林阳等. 鱼中铅、镉、汞和砷的测定[J]. 光谱实验室, 2005, 22(5): 973—975
- [4] Vesebva IA, Shekhovtsova T N. Visual Determination of Mercury (II) Using Horseradish Peroxidase Immobilized on Polyurethane Foam[J]. Anal. Chim. Acta, 1999, 392(2—3): 151—158
- [5] 翟彤宇, 马清河, 王洁等. 利用葡萄糖氧化酶反应体系动力学光度法测定痕量银[J]. 分析化学, 1998, 26(4): 404—406

Kinetic Spectrophotometric Determination of Mercury with Horseradish Peroxidase

LI Nan JIANG Zi-Tao LI Rong

(Department of Food Engineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, P. R. China)

Abstract A kinetic spectrophotometric method for the determination of Hg^{2+} was developed based on the inhibition of Hg^{2+} in the catalytic reaction of H_2O_2 -4-aminoantipyrine-2,4-dichlorophenol systems by horseradish peroxidase. The detection ranges were $1.0\text{--}5.0\ \mu\text{g/mL}$ with the detection limit of $5.78 \times 10^{-7}\ \text{g/mL}$. The conditions for the determination of Hg^{2+} were optimized, and the effect of the coexisted ions were discussed. The developed method is simple and fast.

Key words Mercury, Horseradish Peroxidase, Kinetic Spectrophotometry.

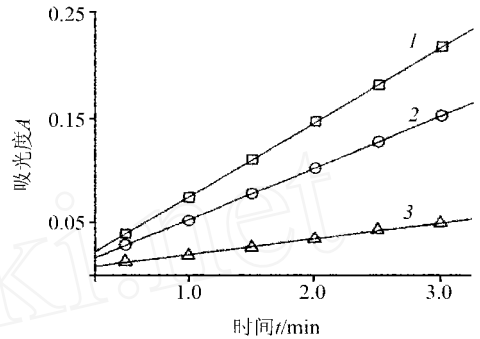


图 3 反应时间曲线

(汞离子浓度: 1—0; 2—1.0; 3—3.0 $\mu\text{g/mL}$;
 $\text{pH} = 5.0$, $C_{4\text{-AAP}} = 2.5\ \text{mmol/L}$, $C_{2,4\text{-DCP}} = 30\ \text{mmol/L}$,
 $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 15\ \text{mmol/L}$, $V_{\text{HRP}} = 5\ \mu\text{L}$)