

文章编号:1008-1542(2009)02-0166-05

重金属离子对葡萄糖氧化酶电极抑制作用的研究

李彤, 伊丽丽, 魏福祥, 张亚楠, 赵纯, 田彩欢

(河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

摘要:采用二氧化硅溶胶-凝胶固定化酶技术制备了葡萄糖氧化酶电极,优化了酶电极的工作条件。考察了酶电极的响应性能以及 Hg^{2+} , Fe^{3+} 等重金属离子对酶电极响应的抑制影响。实验结果表明在 $E=0.8\text{ V}$, $\text{pH}=5.0$, $T=25\text{ }^\circ\text{C}$ 时, Hg^{2+} , Fe^{3+} 的存在抑制了酶电极对葡萄糖的电流响应,且抑制电流的大小和重金属离子浓度在一定范围呈线性关系,线性范围分别是 $0\sim 1.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 和 $0\sim 60\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。将被抑制的酶电极浸入 EDTA 溶液中 10 min 后,酶电极可以恢复部分响应性能。

关键词:葡萄糖氧化酶;酶电极;重金属离子;抑制

中图分类号: X132 文献标识码: A

Study on inhibition of heavy metal ions on glucose oxidase electrode

LI Tong, YI Li-li, WEI Fu-xiang, ZHANG Ya-nan, ZHAO Chun, TIAN Cai-huan

(College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

Abstract: A glucose oxidase electrode with SiO_2 sol-gel immobilization was prepared. The optimum experimental conditions of enzyme electrode were investigated. The response characteristics of enzyme electrode and inhibition of heavy metal ions on the enzyme electrode were also discussed. The experimental results show the amperometric response to glucose of enzyme electrode is inhibited due to the existence of Hg^{2+} and Fe^{3+} when the working potential is 0.8 V , pH is 5.0 and the temperature is $25\text{ }^\circ\text{C}$. There is a linear relationship between the inhibited amperometric response and certain concentration of heavy metal ions. The linear range of Hg^{2+} and Fe^{3+} are $0\sim 1.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ and $0\sim 60\text{ }\mu\text{mol/L}$. The recovery of response on the inhibited enzyme electrode is possible by immersing in EDTA solution after 10 min.

Key words: glucose oxidase; enzyme electrode; heavy metal ions; inhibition

重金属是重要的环境荷尔蒙物质之一,因其污染造成生态环境破坏和农产品品质的下降;由于食用含有高毒重金属食品而中毒的事件时有发生,严重影响人体健康。目前检测重金属使用的国标方法多为原子吸收法、电化学法等^[1],这些技术灵敏度高、特异性强,但存在仪器成本和费用高等缺陷。采用酶抑制比色法是近年来迅速发展起来的食品中重金属残留检测的方法之一。与传统的方法相比,酶抑制法具有快速、简便、对所分析的样品需要量少等优点。

酶是维持生物体新陈代谢的重要催化剂,进入生物体内的重金属离子与体内某些酶的活性中心具有特别强的亲和力,使酶失去活性,此即重金属的致害作用。因此酶抑制法可用于对污染环境重金属的风险评价^[2-5]。利用金属离子对葡萄糖氧化酶(GOD)-辣根过氧化物酶(POD)催化体系酶活的抑制作用检测重金

收稿日期:2008-12-17;修回日期:2009-03-09;责任编辑:王海云

作者简介:李彤(1964-),女,河北石家庄人,教授,博士,主要从事电化学生物传感器方面的研究。

属已见报道^[6]。本研究是应用二氧化硅溶胶-凝胶固定化酶技术制备葡萄糖氧化酶电极,考察在重金属离子存在时的酶电极的电化学响应,初步研究重金属离子对酶电极上酶活的抑制及复活机制。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:微机电化学分析系统(天津兰力科化学电子高技术有限公司提供);研究电极采用 3 mm 的铂盘电极,对电极为铂丝电极,参比电极为 Ag/AgCl(饱和 KCl 溶液)电极;SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器(江苏宏华仪器厂提供);pHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司提供)。

试剂:葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD, E. Cl. 1. 3. 4, 234, 900 units/g, 美国 Sigma 公司提供);-D(+)-葡萄糖(天津市大茂化学试剂厂提供);四甲氧基硅烷(质量分数 > 98%, TMOS, 武汉大学有机硅新材料股份有限公司提供);溴代十六烷基三甲胺(CTAB, 北京化工厂提供);其他试剂 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 等均为分析纯,溶液均用二次水配制。

1.2 酶电极的制备

制备二氧化硅溶胶-凝胶,将 1 mL 甲醇,0.1 mL TMOS,0.05 mL 的 5×10^{-3} mol/L NaOH,0.05 mL 的 3%(体积分数)CTAB 甲醇溶液,及 0.2 mL 二次水混合。使用前现配制。

将 2 mg 葡萄糖氧化酶溶于 100 μL 水中,取 4 μL 滴于铂电极上,晾干。再将新配制的二氧化硅溶胶-凝胶 6 μL 滴于修饰电极上,放置 10 min,然后置于潮湿气氛下 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中密闭保存,24 h 后使用。

1.3 实验方法

将制备的酶电极及 Ag/AgCl 参比电极、铂对电极置于含 10 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS)的电解池中,采用三电极体系,在恒温、恒电位下,用磁力搅拌器搅拌,待背景电流稳定后注入被分析底物溶液,记录其安培响应。加入重金属离子溶液记录其安培响应的变化。

2 结果与讨论

2.1 酶电极工作条件的优化

2.1.1 最佳工作电位的确定

室温下,在 pH 值为 6.0 的磷酸缓冲溶液中,于 0.65 ~ 0.90 V 的范围内比较了酶电极对葡萄糖响应及 Hg^{2+} 的抑制响应情况,如图 1 所示。由图 1 可知,酶电极对葡萄糖响应的灵敏度在 0.85 V 达到最大,而对 Hg^{2+} 响应的灵敏度在 0.80 V 达到最大。综合考虑酶电极的灵敏度及选择性,故选择 0.80 V 作为本实验的最佳工作电位。

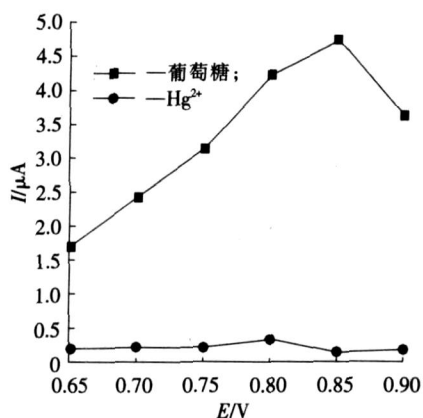


图 1 应用电位对酶电极响应的影响

Fig. 1 Effect of applied potential in the enzyme electrode

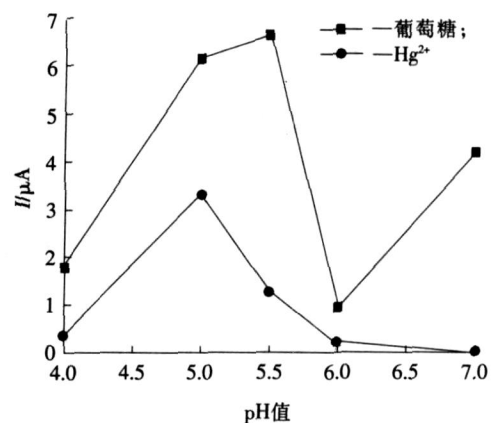


图 2 pH 值对酶电极响应的影响

Fig. 2 Effect of solution pH on the enzyme electrode

2.1.2 适宜缓冲溶液 pH 值的确定

在室温,0.80 V 工作电位下,于磷酸缓冲溶液 pH 值在 4.0 ~ 7.0 的范围内考察了酶电极对葡萄糖及

Hg^{2+} 的抑制响应情况,如图 2 所示。由图 2 可知,在 pH 值为 5.0 时酶电极对葡萄糖响应的灵敏度达到最大,而酶电极对 Hg^{2+} 响应的灵敏度在 pH 值为 5.5 时达到最大。综合考虑酶电极的灵敏度及稳定性,本实验选择 pH 值为 5.0 作为最适宜的 pH 值。

2.1.3 最佳操作温度的确定

在 0.80 V 的工作电位下,酶电极在 pH 值为 5.0 的磷酸缓冲溶液中,于 25 ~ 45 °C 温度范围内考察了酶电极对葡萄糖和 Hg^{2+} 的响应情况,如图 3 所示。由图 3 可知,从 25 ~ 45 °C 时,酶电极对葡萄糖和 Hg^{2+} 响应的灵敏度都是逐渐上升,到 45 °C 达到最大,高于 45 °C 后,灵敏度开始下降。45 °C 是酶电极的最佳操作温度。但考虑到将来酶电极应用于在线检测环境的便利性,故选择接近室温 25 °C 作为本实验酶电极的操作温度。

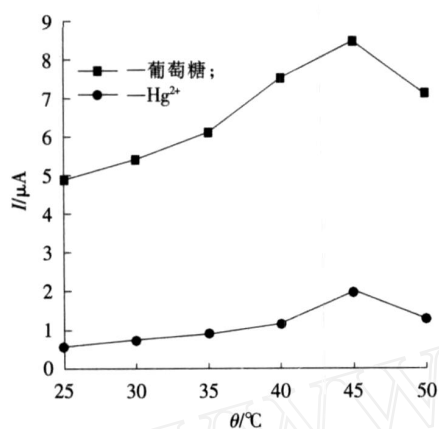


图 3 温度对酶电极响应的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the enzyme electrode

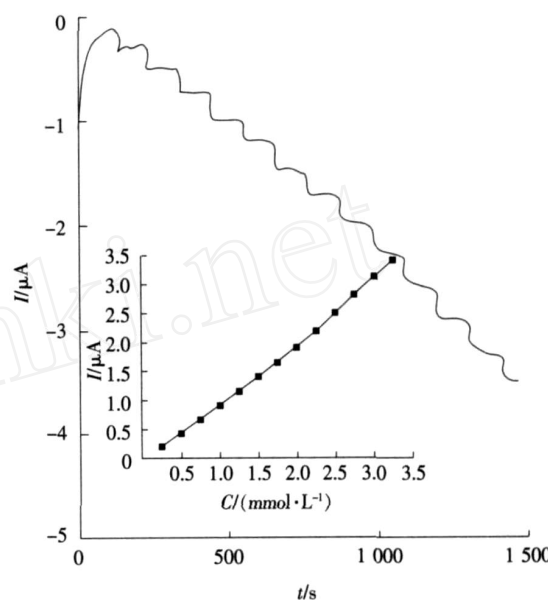


图 4 酶电极对连续加入 0.5 mol/L 葡萄糖溶液的计时电流响应(插图校正曲线)

Fig. 4 Typical steady-state response of the enzyme electrode to successive addition of 0.5 mol/L glucose solution (the insert illustrate is calibration curve)

2.2 葡萄糖氧化酶电极对葡萄糖的响应性能的考察

图 4 为在室温 25 °C, 0.80 V 的工作电位下,将含有 10 mL, pH = 6.5 的磷酸缓冲溶液的电解池中分次加入等量的 0.5 mol/L 葡萄糖溶液的一个典型的计时电流图。该葡萄糖氧化酶电极对葡萄糖的响应很快,在 15 s 内可达稳定响应电流的 95%。葡萄糖氧化酶电极对葡萄糖响应的校正曲线见图 4 插图。

由图 4 可计算得:酶电极对葡萄糖响应的线性范围为 0 ~ 2.25 mmol/L, 线性回归方程为 $I = 1.079 2 C - 0.166 8$, $R = 0.999 8$ 。信噪比为 3 时检出限为 0.10 mmol/L, 灵敏度为 1.079 2 $\mu\text{A} \cdot \text{L} / \text{mmol}$ 。

2.3 Hg^{2+} 对葡萄糖氧化酶电极的抑制影响

图 5 为在室温 25 °C, 0.80 V 的工作电位下,将电解液中先加入 20 μL , 0.5 mol/L 葡萄糖溶液后,再分次加入 5 μL , 1 mmol/L 的 Hg^{2+} 溶液的一个典型的计时电流图。 Hg^{2+} 对酶电极抑制的响应很快,在 15 s 内可达稳定抑制响应电流的 95%。

图 6 为抑制率与 Hg^{2+} 浓度曲线图。

酶电极对 Hg^{2+} 响应的线性范围为 0 ~ 1.5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 。在浓度更高的范围内响应灵敏度虽然很好,但是不成线性。

应用米氏方程中的 Lineweaver-Burk 双倒数做图法对酶电极进行动力学考察,图 7 为在室温 25 °C, 0.80 V 的工作电位下,将 10 mL, pH 值为 5.0 磷酸缓冲液中分别:不加入 1 mmol/L 的 Hg^{2+} 溶液(图中 B 曲线);加入 10 μL , 1 mmol/L 的 Hg^{2+} 溶液(图中 C 曲线);加入 15 μL , 1 mmol/L 的 Hg^{2+} 溶液(图中 D 曲线)后,再分别加入 10 μL , 0.5 mol/L 葡萄糖溶液的电流响应的校正曲线图。

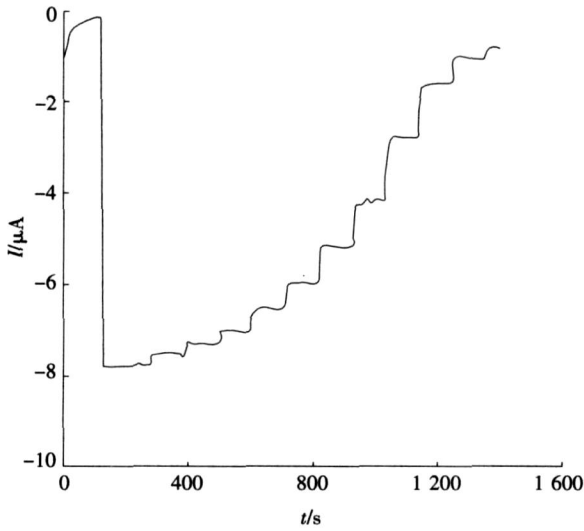


图 5 酶电极对连续加入 1 mmol/L Hg^{2+} 溶液的计时电流响应

Fig. 5 Typical steady-state response of the enzyme electrode to successive addition of 1 mmol/L Hg^{2+} solution

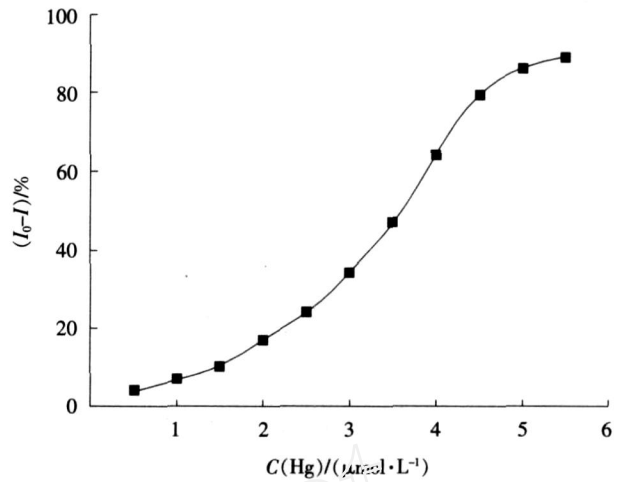


图 6 抑制率与 Hg^{2+} 浓度

Fig. 6 Inhibition percentage vs. Hg^{2+} concentration

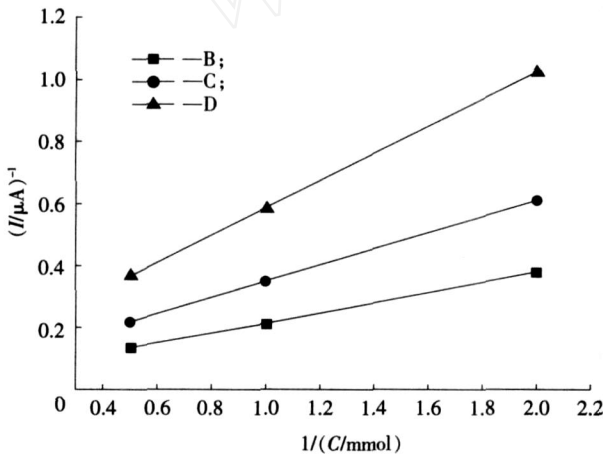


图 7 酶电极的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 7 Lineweaver-Burk plot of the enzyme electrode

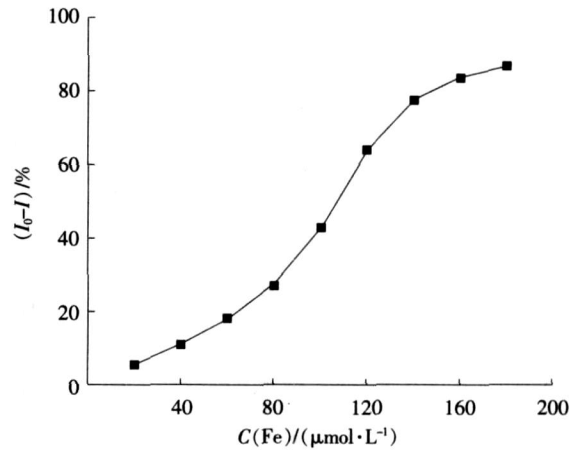


图 8 抑制率与 Fe^{3+} 浓度

Fig. 8 Inhibition percentage vs. Fe^{3+} concentration

由图 7 经计算可知 3 条曲线交于一点。米氏常数 $K_m = 3.06 \text{ mmol/L}$ 。推断 Hg^{2+} 对葡萄糖氧化酶电极的抑制为非竞争性抑制。

2.4 Fe^{3+} 对葡萄糖氧化酶电极的抑制影响

同 2.3 的实验方法可得 Fe^{3+} 对葡萄糖氧化酶电极的抑制影响的线性范围是 $0 \sim 60 \mu\text{mol/L}$ (见图 8)。

2.5 酶电极的活性恢复考察

由于 EDTA 可与重金属离子螯合,从而使酶复活。将使用过的酶电极放入 0.1 mol/L EDTA 溶液中 10 min 后再用来进行同样检测,图 9 显示酶电极在 2.3 项下实验后,在 EDTA 溶液中恢复活性后的电流响应。实验结果表明,响应电流可恢复到原来的 75%。反复多次活化后,电极的响应性能会逐渐下降。通过实验可知,每支电极通过活化可重复利用 3~5 次。

3 结 语

本实验采用二氧化硅溶胶-凝胶固定化酶技术制备了葡萄糖氧化酶电极,考察 pH 值、温度、工作电位等

操作条件对酶电极响应性能的影响。实验结果表明在 pH 值为 5.0, $T=25^{\circ}\text{C}$, $E=0.8\text{ V}$ 时,制备的酶电极对葡萄糖响应的线性范围为 $0\sim 2.25\text{ mmol/L}$,灵敏度为 $1.079\ 2\ \mu\text{A}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$,检出限为 0.10 mmol/L ($S/N=3$),响应时间为 15 s 。在此实验基础上,考察了重金属离子对酶电极响应的抑制影响。结果显示在优化工作条件下, Hg^{2+} 和 Fe^{3+} 的存在抑制了酶电极对葡萄糖的电流响应,且抑制电流响应和加入的重金属离子浓度在一定范围呈线性关系,线性范围分别是 $0\sim 1.5\ \mu\text{mol/L}$ 和 $0\sim 60\ \mu\text{mol/L}$ 。最后,将被抑制的酶电极浸入 EDTA 溶液中 10 min 后再用来检测,实验结果表明,响应电流可恢复到原来的 75% 。

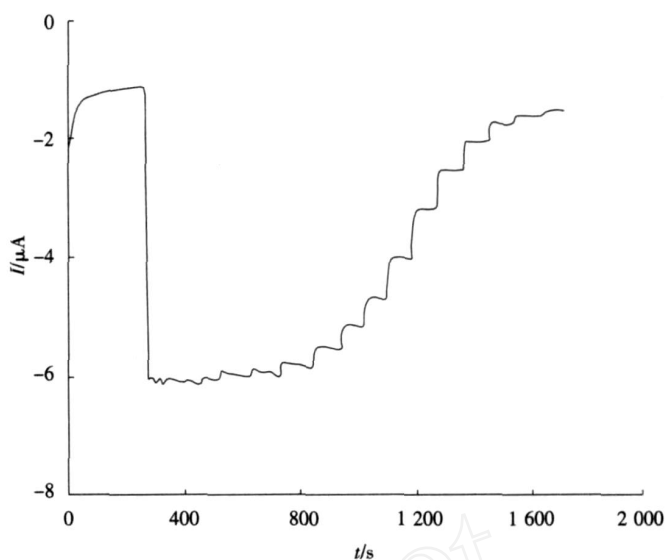


图9 恢复活性后的酶电极对 Hg^{2+} 的响应

Fig.9 Effect of Hg^{2+} on the enzyme electrode after recovery of activity

参考文献:

- [1] 毛跟年,许牡丹,黄建文. 环境中有毒有害物质与分析检测[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [2] 陆贻通,沈国清,华银锋. 污染环境重金属酶抑制法快速检测技术研究进展[J]. 安全与环境学报,2005,5(2):68-71.
- [3] 和文祥,朱铭裁,张一平. pH对汞镉与土壤脲酶活性关系的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(3):66-70.
- [4] 蒙绮芳,周锡良,奚定平. 测量痕量农药和重金属离子的光纤生物化学酶传感器[J]. 传感器世界,1996,2(11):18-21.
- [5] 华银锋,陆贻通. 脲酶抑制法检测环境样品中重金属离子研究[J]. 上海环境科学,2003,22(12):939-942.
- [6] 翟彤宁,胡常英,王洁,等. 金属离子对葡萄糖氧化酶活性测定的影响[J]. 河北省科学院学报,1997,14(4):11-14.

(上接第159页)

地方,但是从模拟的作用来说,已经起到了验证和预测的作用,模拟结果和实验结果相差不大,证明这个模型是适用这个反应体系的,可以通过模拟预测实验的基本情况,为模拟工业化奠定基础。模拟结果:当 $V(\text{O}_2)/V(\text{CH}_4)$ 为 0.50 时,出口气体组成中 $V(\text{H}_2)/V(\text{CO})$ 基本为 2.00, CH_4 反应完全,没有 CO_2 生成, O_2 完全转化,这与实验结果是吻合的。

3 结 语

将预混燃烧技术应用于甲烷的部分氧化过程取得了不错的结果:温度为 900°C ,压力约为 100 kPa , $V(\text{O}_2)/V(\text{CH}_4)$ 为 0.50 时,出口气体组成 $V(\text{H}_2)/V(\text{CO})$ 约为 2.00,适合甲醇的合成。该方法与传统的非催化部分氧化法相比,所需的反应温度低,降低了对反应材质的要求,并且反应过程中基本没有积炭。其创新点在于反应气之前的预混以及采用新型的预混燃烧器。采用化工模拟软件 CHEM KIN4.0 对反应过程进行模拟,模拟结果与实验结果基本一致,从而证明了实验结果的可靠性,也为工业化生产提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 王辅臣,李伟锋. 天然气非催化部分氧化制合成气过程的研究[J]. 石油化工,2006,35(1):47-51.
- [2] 王辅臣,龚欣. 天然气部分氧化炉的数值模拟[J]. 大氮肥,2003,26(1):65-69.
- [3] BOWMAN C T, FRENKLACH M, GARDINER W C. The "GRIMech3.0" Chemical Kinetic Mechanism[EB/OL]. <http://www.me.berkeley.edu/grim-mech/data/frames.html>,2006-10-04.
- [4] ZHU D, ZHANG K D, KING R. Reforming of CH_4 by partial oxidation: Thermodynamic and kinetic analyses[J]. Fuel,2001,80(7):899-905.