

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 3. С. 178-183.

УДК 543.94

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ В ТЕСТ-СИСТЕМАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛОВ

Вяткина О.В.

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия
E-mail: oksana_yatkina@list.ru*

Разработана методика количественного определения гидрохинона, основанная на образовании окрашенных продуктов пероксидазного окисления гидрохинона в системе, где в качестве катализатора используется пероксидаза редьки черной иммобилизованная на силикагеле, синтезированном в кислой среде, с регистрацией сигнала фотоколориметрическим методом.

Ключевые слова: пероксидаза, иммобилизация, гидрохинон, погрешность.

ВВЕДЕНИЕ

Различные отрасли промышленности используют фенолы в качестве сырья, что обуславливает присутствие фенольных веществ в природных водоемах, куда они попадают с промышленными стоками. Для фенолов характерна высокая химическая активность в природных средах, что значительно увеличивает количество химических соединений и токсичных продуктов их превращений, поэтому мониторинг содержания фенолов в водных объектах – актуальная задача. Для решения задач экологического мониторинга наиболее приемлемыми являются on-site методы анализа при помощи тест-систем [1]. Известно, что фенолы являются одними из наиболее легкоокисляемых субстратов пероксидаз. Учитывая тот факт, что ферментативный катализ отличается высокой специфичностью, а продукты окисления фенолов, как правило, окрашены, особый практический интерес представляют ферментные тест-системы определения фенолов. В данной работе представлены результаты разработки новой тест-системы на основе пероксидазы редьки черной иммобилизованной на силикагеле для определения фенольных веществ в водных объектах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза, выделенная из корнеплодов редьки черной. Экстракцию фермента фосфатным буфером (рН=6,8) из очищенного и измельченного растительного сырья проводили в течении 15 мин. по стандартной

методике, описанной Селибером [2]. В качестве подложки для иммобилизации фермента был использован силикагель, полученный из силикатного клея при взаимодействии с 6M соляной кислотой при $pH < 2$. Иммобилизацию фермента на силикагель проводили методом физической сорбции из раствора, содержащего 20 объемных процентов фосфатно-буферного экстракта пероксидазы (массовое соотношение твердой и жидкой фаз $\approx 1:40$) в течение 2 часов. По истечении времени сорбент отфильтровывали и оставляли высушиваться на воздухе при комнатной температуре. В результате нами был получен материал, содержание фермента в 1 г которого соответствует его содержанию в 5 мл нативного ферментного препарата. Данный препарат использовали в качестве компонента аналитических систем для количественного определения фенольного субстрата в водных растворах. Состав исследуемых систем представлен в таблице 1.

Таблица 1

Состав исследуемых систем

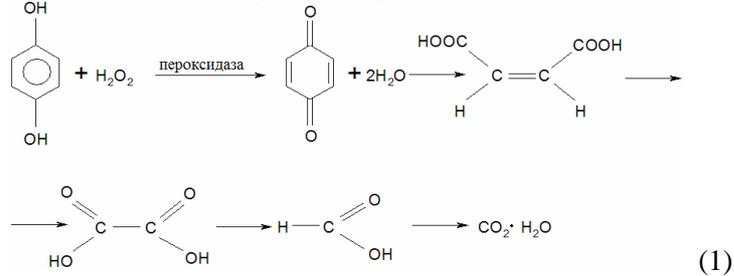
	Система			
	I	II	III	IV
Количество проб в серии, n	10		13	
Концентрация гидрохинона ($C_{min} - C_{max}$, моль/л)	$8 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$		$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	
Объем раствора гидрохинона (V, мл)	20			
Концентрация пероксида водорода (C, моль/л)	0,09			
Объем раствора пероксида водорода (V, мл)	2		3	
Масса ферментного препарата (m, г)	1	0,5	1	0,5
Время экспозиции (t, мин)	40		10	

В каждую пробу к 20 мл водного раствора гидрохинона вносили определенную массу ферментного препарата и приливали пероксид водорода H_2O_2 . Выдерживали фиксированное время. Далее растворы фильтровали и измеряли оптическую плотность на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 440 нм, 490 нм и толщине кюветы $l=1$ см. Экспериментальные данные обрабатывали методами математической статистики [3]. Полученные результаты сравнивали со стандартным фотоколориметрическим методом количественного определения гидрохинона в системах с Fe^{3+} и *o*-фенантролином [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдения показали, что достаточно интенсивное красное окрашивание в системах с анолитом I и II, появляется уже в течение первых 20 мин., но после 40 мин. экспозиции интенсивность окраски остается неизменной. Поэтому аналитический сигнал для построения калибровочных кривых в этих системах измеряли через 40 мин.

экспозиции. Общее время проведения анализа составило 50 мин. Системы III и IV отличались от систем I и II большим содержанием субстрата окислителя – пероксида водорода, что привело к сокращению времени появления окраски в них до 10 минут. Но в отличие от систем I и II, достигнув максимального значения, окраска системы не оставалась стабильной, а начинала изменяться в сторону осветления, что, по всей видимости, связано с реализацией дальнейшего окисления окрашенных хиноидных структур с образованием бесцветных продуктов реакции в соответствии со схемой (1).



По этой причине, аналитический сигнал измеряли в данных системах после экспозиции в течение 10 минут, но из-за нестабильности окраски возникли проблемы с воспроизводимостью методики, что отразилось в статистическом анализе её результатов. Общее время выполнения анализа 20 мин. Параллельно было проведено определение концентрации гидрохинона по стандартной методике с раствором железа(III) и *o*-фенантролином [4]. Данный анализ требует большого количества реактивов. Общее время выполнения анализа 90 мин. Калибровочные кривые были аппроксимированы уравнениями типа $y = bx + a$. Значения параметров градуировочного графика a и b и их доверительные интервалы указаны в табл. 2.

Таблица 2
Результаты статистической обработки данных в исследуемых системах

$$y = (b \pm \epsilon_b)x + (a \pm \epsilon_a)$$

Системы	Параметры калибровочной прямой				Стандартный раствор		
	a	ϵ_a	b	ϵ_b	\bar{Y}_a	\bar{X}	ϵ_x
$\lambda = 440$ нм							
I	0,04	0,02	39	4	0,320	0,007	0,0005
II	0,06	0,03	16	6	0,167	0,007	0,002
III	0,05	0,05	15	1	0,160	0,007	0,004
IV	0,1	0,01	14	2	0,113	0,0007	0,0008
$\lambda = 490$ нм							
I	0,07	0,02	38	3	0,340	0,007	0,0003
II	0,06	0,04	17	6	0,173	0,007	0,002
III	0,05	0,01	13	2	0,157	0,008	0,0008
IV	0,09	0,007	16	1	0,097	0,0003	0,0005
Стандартная методика $\lambda = 580$ нм							
	0,02	0,04	336	38	0,30	0,0008	0,00007

Анализ полученных данных показал, что при избранных длинах волн вид калибровочных зависимостей и их численные параметры практически идентичны для всех исследованных систем (табл. 2). Установили, что чувствительность предложенной нами методики количественного определения гидрохинона максимальна в системе I (m ферментного препарата=1г, $V(H_2O_2)=2$ мл), но это в среднем в 9 раз ниже, чем у стандартной методики. На примере систем I и II видно, что увеличение количества ферментного препарата в системе ведёт к повышению чувствительности методики. Однако эта зависимость не выполняется в системах III и IV, где при увеличении концентрации пероксида водорода меняется механизм индикаторной реакции.

Расчетные значения пределов обнаружения (C_{min}) представлены в табл. 3. откуда видно, что в системах I и II предел обнаружения практически не зависит от количества внесённого ферментного препарата, минимальным он является в системе I, при $\lambda=490$ нм, при этом он превышает значение предела в стандартной системе в 5 раз.

Таблица 3

Значения пределов обнаружения C_{min} гидрохинона в исследуемых системах

Система								
I		II		III		IV		стандарт
$\lambda=440$ нм	$\lambda=490$ нм	$\lambda=440$ нм	$\lambda=490$ нм	$\lambda=440$ нм	$\lambda=490$ нм	$\lambda=440$ нм	$\lambda=490$ нм	$\lambda=580$ нм
$C_{(min)} \cdot 10^{-4}$, моль/л								
$6 \pm 0,2$	$5 \pm 0,2$	$6 \pm 0,2$	$6 \pm 0,3$	—	—	$10 \pm 1,2$	$9 \pm 1,0$	$1 \pm 0,3$

В системах III и IV в области низких концентраций наблюдаются значительные отклонения калибровочных зависимостей от линейности и крайне низкая воспроизводимость. Относительная ошибка параметра b в системе III при $\lambda=440$ нм $\Delta b_{440}=100\%$, при $\lambda=490$ нм $\Delta b_{490}=20\%$; в системе IV при $\lambda=440$ нм $\Delta b_{440}=10\%$, при $\lambda=490$ нм $\Delta b_{490}=8\%$. Относительная ошибка параметра a в системе III при $\lambda=440$ нм $\Delta a_{440}=7\%$, при $\lambda=490$ нм $\Delta a_{490}=15\%$; в системе IV при $\lambda=440$ нм $\Delta a_{440}=14\%$, при $\lambda=490$ нм $\Delta a_{490}=6\%$. Поэтому предел обнаружения в системе III выше на порядок по сравнению с другими системами. А в системе IV данный параметр вовсе определить достоверно невозможно.

Полученные градуировочные прямые использовали для определения количества гидрохинона в стандартных растворах. Каждая серия состояла из трёх определений. Статистическая обработка полученных результатов показана в табл. 2, откуда видно, что минимальной относительной погрешностью, причем допустимой в фотоколориметрии, характеризуется результат, полученный в системе I при длине волны $\lambda=490$ нм ($\Delta x_{490}=4,3\%$), что ниже погрешности определения в стандартной методике ($\Delta x_{станд}=8,8\%$). Таким образом, система I может быть нами рекомендована как тест-система для полуколичественного колориметрического и количественного фотоколориметрического определения гидрохинона в водных растворах в диапазоне концентраций $6 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, что ниже уровня ПДК в природной воде. Тем

более, что время выполнения анализа в этом случае почти в 2 раза меньше, чем в стандартной методике и нет необходимости использования большого количества растворов реагентов, что облегчает задачу анализа on-site.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана методика количественного определения гидрохинона, основанная на образовании окрашенных продуктов пероксидазного окисления гидрохинона в системе, где в качестве катализатора используется пероксидаза редьки черной иммобилизованная на силикагеле, синтезированном в кислой среде, с регистрацией сигнала фотоколориметрическим методом.
2. Установлено, что при длинах волн $\lambda=440$ нм и $\lambda=490$ нм вид калибровочных зависимостей и их численные параметры практически идентичны.
3. Определено, что чувствительность предложенной нами методики количественного определения гидрохинона при использовании 1 г порошка ферментного препарата 2 мл 3% раствора пероксида водорода в среднем в 9 раз ниже, а предел обнаружения в среднем в 5 раз выше, чем в стандартной методике. Предложенный способ определения гидрохинона в 1,5 раза более экспрессен, чем стандартный и имеет в 2 раза меньшую относительную погрешность определения.

Список литературы

1. Золотов Ю.А. Химические тест-методы анализа / Ю.А. Золотов, В.М. Иванов, В.Г. Амелин. – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 302с.
2. Селибер Г.Л. Большой практикум по микробиологии / Г.Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
3. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа. Методы обнаружения и оценки ошибок / А.К. Чарыков. – Л.: Химия, 1984. – 168 с.
4. Лурье Ю.Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю.Ю. Лурье, А.И. Рыбников. – М.: Химия, 1974. – 395 с

USING BLACK RADISH PEROXIDASE IN TEST-METHODS OF PHENOLS` DETERMINATION

Vyatkina O.

*Taurida V.I. Vernadskiy National University, Simferopol, Russia
E-mail: oksana_vyatkina@list.ru*

Phenols are raw material for different branches of industry. It has been found to present in natural water bodies, where it comes upon with domestic and industrial wastewater. Phenols characterized by high chemical activity in the natural environment, which significantly increases the amount of toxic chemical compounds and their reaction products therefore monitoring of phenols in water bodies is a problem of current importance. On-site analysis methods by means of test systems are the most appropriate for solving the problems of environmental monitoring. Phenols are known to be among

the most easily oxidized substrates of peroxidase. Enzymatic test systems to determine phenols are considered of particular interest, while enzymatic catalysis characterized by high specificity and the oxidation products of phenols are usually colored.

We have developed a method of quantitative determination of hydroquinone. It is based on the formation of colored products obtained by peroxidase oxidation of hydroquinone in the system, where black radish peroxidase immobilized on silica gel was used as the catalyst and indicator dust. The black radish peroxidase immobilized on silica gel was synthesized in an acid medium, with a photo colorimetric method recording of the signal. Substrate oxidizer is hydrogen peroxide. To each 20 ml sample of an aqueous solution of hydroquinone were added a certain weight of the enzyme preparation and hydrogen peroxide H_2O_2 . After a certain time the solution was filtered. By means of photo electro colorimeter CPC-2 the optical density of solutions was measured at a wavelength of 440 nm, 490 nm, and a 1 cm thick cuvette was used. The experimental data were processed by methods of mathematical statistics. The obtained results were compared to a standard photo colorimetric method of quantitative determination hydroquinone in the systems with Fe^{3+} and *o*-phenanthroline.

It has been found, at wavelengths $\lambda=440$ nm and $\lambda=490$ nm the form of calibration functions and their numerical parameters are almost identical. The suggested method of quantitative determination of hydroquinone is based on using 1 g of an enzyme preparation powder and 2 ml of 3% hydrogen peroxide. It's sensitivity is 9 times lower on average, but the detection limit is 5 times higher than in the standard technique. The proposed method for determining hydroquinone 1.5 times more expressive than standard one, and it has 2 times lower relative observational error.

Keywords: peroxidase, immobilization, hydroquinone, observational error

References

1. Zolotov Y.A. Chemical Test Methods of Analysis, 302 p. (Editorial URSS, Moscow, 2002) (in Russ.).
2. Seliber G.L., A large workshop in microbiology, 492 p. (Mir, Moscow, 1962). (in Russ)
3. Tcharykov A.K. Mathematical processing of the results of chemical analysis. Methods for detection and assessment of errors, 168 p. (Chemistry, Leningrad, 1984). (in Russ.).
4. Lurie Y.Y, Rybnikov A.I., Chemical analysis of industrial waste water, 395 p. (Khimiya, Moscow, 1974). (in Russ.).

Поступила в редакцию 15.10.2014 г