

图8 活化甲基对硫磷对酶促反应的影响

促反应的抑制能力迅速下降,至浓度为 0.0166mg/kg 时,其对酶促反应已无抑制能力。对浓度在 $100 \sim 0.333\text{mg/kg}$ 范围内的数据进行回归分析,可得到甲基对硫磷的酶抑制反应方程。

回归方程

$$y = -0.0342 \times \lg C + 0.0814 \quad F = 1.0576E + 0.3$$

实验中对DDVP溶液进行活化处理,研究其对酶促反应的影响,可发现活化处理后DDVP溶液与未处理对酶促反应无显著变化。

甲基对硫磷属于硫代磷酸酯类。溴水是强氧化剂,溴水活化甲基对硫磷的机理,可能是将其结构中的 $\text{P}=\text{S}$ 双键,氧化成 $\text{P}=\text{O}$ 双键,其抑制酯酶的能力增强,毒性增强^[6]。而DDVP分子结构中是 $\text{P}=\text{O}$ 双键,因此溴水处理后,毒性未有显著变化。

2.1.5 DDVP和甲基对硫磷最低检出限的确定

从图7(DDVP溶液对酶活性的抑制实验)可知,DDVP溶液浓度低于 1.192×10^{-1} 后,对酶促反应抑制能力明显下降,其曲线已不成线性关系,但在

1.192×10^{-2} 时酶活性为0.134,仍较空白时下降约10.1%,表明该浓度时DDVP溶液对酶促反应仍有一定的抑制能力,用比色分析可以检出。所以该浓度可作为DDVP溶液的最低检出限。同理从图8中可知甲基对硫磷溶液的最低检出限为 0.166mg/kg 。

3 结论

3.1 本实验研究了酶抑制方法测定DDVP和甲基对硫磷两种有机磷农药,方法简单、快速。

3.2 在测定中以反应速率表示酶活性,减少了系统误差造成的影响,降低了实验误差。

3.3 有机磷农药的毒性与其酶法检测灵敏度之间有一定的对应关系。一些低毒有机磷农药的检测灵敏度低如甲基对硫磷,直接测定其检测灵敏度一般达不到要求。在实验中用溴水活化处理,甲基对硫磷的检测灵敏度提高近50~100倍。

3.4 建立DDVP和甲基对硫磷酶抑制方程,其线性范围为2~3个数量级。

参考文献

- 李治祥等. 应用植物酯酶抑制技术测定蔬菜水果中农药残留量. 环境科学学报, 1987, 7, (4), 472~478.
- 韩承辉等. 用植物酯酶片快速测定蔬菜上有机磷农药. 环境保护, 1998, 12, 31~32.
- 杜廷发等. 用酶分析法直接测定含氯水中痕量有机磷化合物. 分析化学, 1987, 15, (2), 109~112.
- 分析化学, 南京药学院主编.
- 食品物理与化学分析法. 轻工业出版社, 1987.
- 黄雁等. 简易、快速检测有机磷农药的酶片和生色基质片. 环境科学, 1995, 16, (3), 52~54.

血红素在聚吡咯-十二烷基苯磺酸修饰电极上的直接电化学

程发良 宁满霞 东莞理工学院应用化学系 东莞 523106 TR15 A
莫金垣 中山大学化学系 广州 510275
戴晓云 香港科技大学生化系

摘要 用循环伏安法研究了血红素(Heme)在聚吡咯(PPy)-十二烷基苯磺酸(DDSB)修饰电极上的直接电化学行为。探讨了影响血红素电化学反应速率的诸因素,并提出了用聚吡咯-十二烷基苯磺酸修饰电极测定的方法。结果表明:聚吡咯是血红素电子转移反应的稳定媒价体,血红素在聚吡咯-十二烷基苯磺酸修饰电极表面起准可逆氧化还原反应, -206.1mV 处还原峰电流的1.5次微分与血红素浓度在 $5.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 范围成线性关系。

关键词 血红素 化学修饰电极 聚吡咯 直接电化学

Abstract Electrochemical behavior of heme on polypyrrole - dodecylbenzene sulfonic acid modified electrode was investigated. Factors affecting electrochemical reaction speed were researched by cyclic voltammetry. A novel direct electroanalytical method for determination of heme was developed. Polypyrrole was a stable media for electron transfer of heme. Heme was quasi-reversible oxidation-reduced on surface of Ppy-DDSB modified glass-carbon electrode. The 1.5th differential of the sensitive reduction peak electric current occurred at -206. mv could be used to determine the trace heme. A linear relationship between the concentration and the 1.5th differential of the peak electric current of heme in the range of $5.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ was obtained.

Key words Heme Chemical modified electrode Polypyrrole Direct electrochemistry

由于活性中心被多肽链所包围而无法接触到反应界面和在固体电极表面上强烈吸附而引起分子变形等原因,蛋白质分子在固体电极上氧化还原反应速度慢、可逆性差,因而很难直接测定其电化学信号。目前普遍采用的研究手段有:利用蛋白质的光谱特性间接研究其电化学信号。目前普遍采用的研究手段有:利用蛋白质的光谱特性间接研究其电化学行为^[1]、在电极表面修饰或在溶液中加入适当的促进剂以提高蛋白质电化学反应的速度^[2]或选择特殊的电极材料^[3]等,以期使蛋白质分子在电极上进行可逆的氧化还原反应^[4]。血红素是由原卟啉和一个铁原子构成的,其中铁原子可以两种价态存在。血红素和珠蛋白构成的血红蛋白(Hb)含有两条 α -链和两条 β -链的4个血红素基团。研究表明:聚吡咯中的吡咯单元可以与血红素中的铁相互作用而使 Fe^{2+} 落入卟啉环中,因而聚吡咯修饰电极可以促进血红蛋白的异相电子传递反应^[5],但由于电化学反应速率过慢导致其电化学信号难以直接观察。有理由认为:分子量小、结构较为简单、分子中含有吡咯环基本结构的血红素在导电聚吡咯修饰电极上应有良好的电化学响应。实验表明,血红素在聚吡咯-十二烷基苯磺酸修饰电极上发生准可逆氧化还原反应,可以直接观察到明显的氧化-还原电流信号,并且无明显的变性作用。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

XJP-821(b)型新极谱仪(江苏电分仪器厂),3086型X-Y记录仪(四川仪表四厂),三电极系统:玻碳电极(GCE)为工作电极,使用之前经金相砂纸和 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 抛光成镜面,双蒸水充分洗涤后,在0.1mol/L H_2SO_4 空白溶液中循环扫描数周待用;饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,对电极为铂柱。

吡咯(Py),在氮气保护下减压蒸馏成无色液体,

氯化血红素(Heme Chloride, Sigma公司), $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (300目,层析用),其余试剂均为分析纯,实验用水为二次石英蒸馏水。

1.2 血红素储备液的配制

氯化血红素用适量乙酸溶解后,配置成含0.1mol/L乙酸的 1.0×10^{-5} mol/L血红素溶液。充分通氮除氧后,于氮气气氛下,4℃避光保存。鉴于血红素在空气和水中的稳定性较差,所有实验均经充分通 N_2 除 O_2 后,在氮气气氛下进行。

2 结果与讨论

2.1 DDSB-Ppy 修饰电极的制备

三电极系统浸入0.1mol/LPy+0.1mol/L乙酸

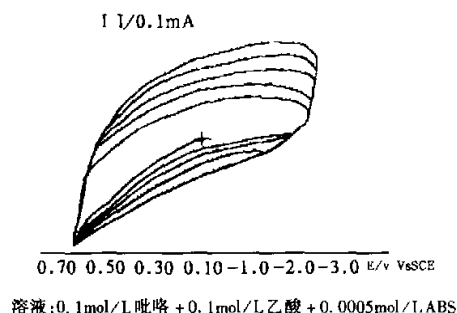


图1 吡咯循环伏安图

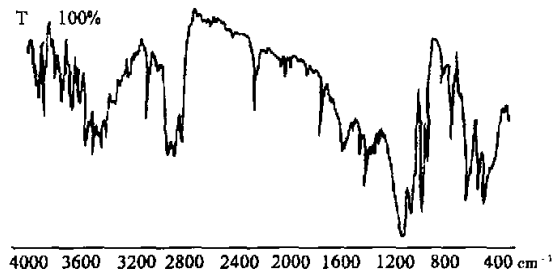


图2 DDSB-聚吡咯膜红外光谱图

+0.0005mol/L DDSB 的电解质溶液中, 于 -0.35 ~ 0.65V 之间循环伏安法制备。Ppy 膜的厚度和掺杂 DDSB 的量可通过恒定扫描速度, 必变循环扫描次数控制。循环伏安图上出现典型的阴离子掺杂 = 释放峰 (图 1), 同时, DDSB - 聚吡咯膜的红外光谱图上出现吡咯和 DDSB 分子的特征吸收峰 (图 2)。表明 DDSB 阴离子已随 py 的聚合而逐渐掺杂进入 Ppy 膜中。

2.2 血红素在 DDSB - Ppy 修饰电极上的直接电化学

DDSB - Ppy 修饰电极在 1.0×10^{-7} mol/L 的血红素溶液中 (支持电解质: 0.1mol/L 醋酸溶液), 于 -0.35 ~ 0.65V 之间循环伏安 (CV) 扫描, 明显可见血红素的氧化还原峰 (图 3b), 其氧化电位为 14.9mV, 还原峰电位为 -206.1mV; 氧化峰电流小于还原峰电流、且峰形也较还原峰宽。而血红素在裸玻碳电极上只在 -470mV 处有一微弱的不可逆还原峰 (图 3a)。这表明 DDSB 血红素氧化为高铁血红素容易, 这类似于血红蛋白 - Ppy 修饰电极对血红素的电子转移反应有促进作用; 高铁血红素被还原成亚铁血红素较亚铁血红素氧化为高血红素容易, 这类似于血红蛋白 (Hb) 在亚甲基蓝修饰电极上的情况^[6]; 随扫描速度的加快, 氧化峰电位正移、还原峰电位负移 (图 4), 符合准可逆电极反应的特征; 峰电流与扫描速度的一次方成正比, 将在血红素溶液中扫描过的修饰电极冲洗后在空白溶液中循环伏安扫描, 血红素的氧化信号是吸附在修饰电极表面的血红素的氧化还原行为。

修饰电极在血红素溶液中连续扫描, 循环十次后电流开始有所下降, 阴、阳极峰电位分别负移和正移, 但峰未改变, 说明血红素在修饰电极上的吸附是弱吸附, 血红素的变性不明显。

2.3 DDSB 浓度对血红素电化学响应的影响

实验证实: 制备修饰电极时, DDSB 的适宜浓度为 $3.5 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-4}$ mol/L, DDSB 浓度过低, 血红素电

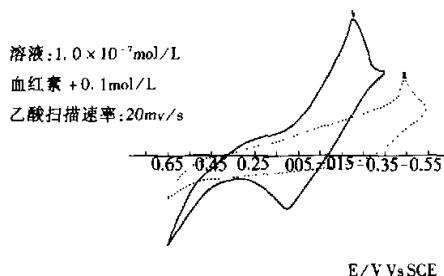
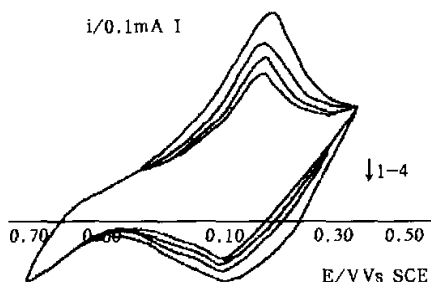


图3 血红素在玻碳电极和 DDSB - 聚吡咯修饰电极伏安图



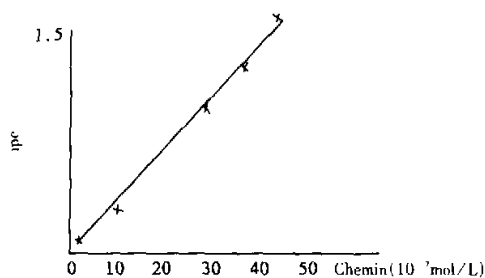
溶液: 1.0×10^{-7} mol/L 血红素 + 0.1mol/L 乙酸
扫描速率: 1:20, 2:40, 3:80, 4:100 (mV/s)

图4 峰电流与扫描速率关系

化学反应电流不明显: DDSB 浓度高于 5.0×10^{-4} mol/L 时, 血红素氧化还原电亦下降; 当 DDSB 浓度高于 1.0×10^{-3} mol/L 时, Py 很难在玻碳电极表面聚合。这里 DDSB 的作用是多方面的, 首先只有作为对阴离子的 DDSB 掺杂入 Ppy 膜中, 才可能使带正电荷的高铁血红素离子在修饰电极表面富集。我们曾设法用 DDSB - Ppy 修饰电极研究 Hb 的电化学行为, 但 Hb 在 DDSB - Ppy 修饰电极上没有任何电化学响应信号。这是由于 Hb 是负电性的, 无法在 DDSB - Ppy 修饰表面富集, 而和反应界面接触是物质发生电化学反应的先决条件^[7]。同样我们无法在 Ppy 修饰电极上得到 Heme 的电化学信号, 而 Ppy 的电化学信号, 而 Ppy 修饰电极可促进 Hb 的氧化还原反应^[5]; 其次, DDSB 可能是血红素电化学反应的良好促进剂; 再者, 表面活性剂有助于蛋白质的溶解; 这些有利于 Heme 的电化学反应。但另一方面, DDSB 为非导体, DDSB 的掺杂使修饰电极的导电性能有所减弱, 这样就不利于修饰电极与 Heme 之间的电子转移; 与此同时, DDSB 作为表面活性剂, 不利于 Heroin 在电极表面的吸附。因此, 只有在适宜的 DDSB 浓度范围内, 才能得到最佳的电化学响应信号。当然, 修饰电极中的吡咯单元与 Heme 中铁的相互作用^[5] 也对 Heroin 的电化学反应有一定的促进作用。

2.4 Ppy 膜厚度的影响

Ppy 膜过厚, 不利于血红素在电极表面的电子转移反应; 膜过薄时, 掺杂的 DDSB 量太少, 不利于 Heme 的富集和电化学响应, 同时, DDSB 容易从 Ppy 膜中脱出而影响修饰电极响应的稳定性, 选择在 0.1mol/L py + 0.1mol/L 醋酸 + 0.0005mol/L DDSB 的电解质溶液中, 以 20mV/s 的扫速, 经过 20 次循环伏安扫描得到的修饰电极对 Heme 的电化学响应最理想。



支持电解质: 0.1 mol/L 乙酸 扫描速率: 20 mV/s

图5 峰电流的1.5次微分与血红素浓度的关系

窄, 半微分次数的增加有利于增加峰高并减小峰宽^[8]。因而选择测定阴极峰电流的1.5次微分与浓度的关系。血红素在 DDSB-Ppy 修饰电极表面 -206.1 v 处还原峰电流的1.5次微分 $i_p^{1.5}$ 与血红素浓度 C_{Heme} 的关系见图5在 $5.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内, 阴极峰电流的1.5次微分与血红素的浓度成线性关系(测定前经过2min富集), 相关系数为0.965, 检测下限为 5.0×10^{-6} mol/L。

参考文献

2.5 富集时间的影响

溶液静止条件下, 经过2min的富集后, 响应电流以达到最大。由于 DDSB 阴离子体积较大, 不容易从 Ppy 膜中脱出, 富过程实质上是 Heme 进入 Ppy 膜中以中和由于 DDSB 的掺杂而使 DDSB-Ppy 修饰电极所带负电荷的过程。实验还未发现: 较负的富集电位有利于 Heme 在修饰电极上的富集。

2.6 Heme 浓度与峰电流的关系

Heme 的阴极峰电流大于阳极峰电流, 峰形也较

- 1 DONGS. J., Chu Q., Chin. J. Chem., 1993, 11: 12 ~ 15.
- 2 Elliott C. M., Martin W. S., J. Electroanal. Chem., 1982, 137: 377 ~ 342.
- 3 Rusling J. F., Acc Chem. Res. 1998, 31: 363 ~ 369.
- 4 胡乃非. 高等学校化学学报, 2001, 22(3): 450 ~ 454.
- 5 朱毅彪等. 应用化学. 1992, 9(2): 51 ~ 54.
- 6 董绍俊等. 化学学报, 1991, 49(3): 49 ~ 53.
- 7 Frew J. E and Hill H. A. O., Eur. J. Biochem., 1988, 172: 261 ~ 267.
- 8 王耀光. 半微积分谱学, (厦门): 厦门大学出版社, 1991: 66.

发酵大豆食品中染料木素含量的 ELISA 测定

吴 定 路桂红 南京经济学院食品科学与工程系 江苏 210003

T52 A

摘 要 染料木素是大豆发酵食品中的主要异黄酮成分。制备了牛血清白蛋白-染料木素免疫抗原和卵白蛋白-染料木素包被抗原, 并对它们进行紫外和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。抗染料木素抗体的效价为 1:1600。建立竞争 ELISA 测定发酵大豆制品中染料木素含量方法, 染料木素测定浓度范围为 6.25 ~ 150 μ g/L; 回收率为 87% ~ 102%; 亲和常数为 1.62×10^8 ; 与大豆甙元、芒柄花素的交叉反应率分别为 9.8%、4.57%; 与槲皮素、儿茶素、单宁和核黄素等结构类似物无交叉反应。同时将 ELISA 法与薄层层析法进行比较。

关键词 染料木素 酶联免疫吸附测定 发酵大豆制品

Abstract Genistein was the main component of isoflavone in the fermented soybean food. The immune antigen of BSA-genistein and the coated antigen of OA-genistein were synthesized respectively, and identified with ultraviolet absorption spectrometry and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The antibody IgG of antigenistein was purified with saturated solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the column chromatography of Sephadex G-25, with 1:1600 titer of antibody IgG of antigenistein. The competitive ELISA for detecting the genistein content in the fermented soybean food was developed, with 6.25 ~ 150 μ g/L of the detecting concentration range of genistein, the recovery of 87% ~ 102%, the affinity constant of 1.62×10^8 , and the 9.8% and 4.57% cross reaction ratios of antibody for daidzin and formononetin respectively, while no cross reaction for catechin, tannin, quercetin and riboflavin was observed. The ELISA method and thin-layer chromatography method were also compared for the effect of assaying genistein.

Key words Genistein Enzyme-linked immunosorbent assay The fermented soybean food