

УДК 543.062.088.8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОКОЛИЧЕСТВ РТУТИ(II) И МЕТИЛРТУТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е.В. Жмаева, П.В. Бычков, Т.Н. Шеховцова

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии; e-mail: shekhov@analyt.chem.msu.ru)

Показано, что ртуть(II) и метилртуть являются эффективными ингибиторами (смешанного и бесконкурентного типа соответственно) алкогольдегидрогеназ, выделенных из пекарских дрожжей и печени лошади. При этом первый фермент значительно более чувствителен к действию указанных токсикантов. С использованием реакции окисления этанола никотинамидадениндинуклеотидом, катализируемой алкогольдегидрогеназами из пекарских дрожжей и печени лошади, разработаны методики определения ртути(II) и метилртути с разными нижними границами определяемой концентрации: 0,25; 10 нМ и 10 нМ, 1 мкМ соответственно. Методики апробированы при анализе природных вод на содержание Hg(II) и метилртути.

Ртуть является одним из основных и наиболее токсичных загрязнителей окружающей среды. Ртутные пары активно абсорбируются и аккумулируются в мозге, почках, яичках, вызывают разрушение легких; Hg^0 и CH_3Hg^+ нарушают деятельность периферийной и центральной нервной системы, что приводит к возникновению нейропсихического комплекса, проявляется в патологически повышенной возбудимости [1]. Среди соединений ртути, участвующих в глобальном круговороте, органические производные, в частности метилртуть, занимают особое место в силу своей токсичности, обусловленной их способностью аккумулироваться в цепочках питания человека. В связи с этим актуальной является задача разработки чувствительных, селективных, экспрессных и простых в использовании методов определения ртути в любых ее химических формах. К методам анализа, сочетающим в себе все перечисленные выше требования, относятся ферментативные методы. Для определения ионов тяжелых металлов, в частности ртути(II), а также метилртути, имеющих большое сродство к сульфгидрильным группам белка (SH-), перспективно использовать алкогольдегидрогеназы, выделенные из клеток пекарских дрожжей и печени лошади, субъединица которых, как известно [2], содержит до 28 сульфгидрильных групп.

Цель настоящего исследования – разработка методик определения ртути(II) и метилртути с использованием алкогольдегидрогеназ, выделенных из клеток пекарских дрожжей (АДГ-I) и печени лошади (АДГ-II).

Экспериментальная часть

Использовали препараты алкогольдегидрогеназ (ЕС 1.1.1.1) из клеток пекарских дрожжей (“*Reanal*”, Венгрия) и печени лошади (“*Sigma*”, США) с удельной активностью 25 и 0,21 ед./мг соответственно. Образцы

ферментов готовили ежедневно растворением навесок препаратов в фосфатном буферном растворе (рН 7,6). Твердые препараты хранили в морозильной камере при температуре -18° . Образцы β -никотинамидадениндинуклеотида (“*Sigma*”, США) готовили ежедневно растворением его точной навески в воде. Твердый препарат хранили в холодильнике при температуре 4° . Образцы этанола готовили разбавлением водой точного объема 96%-го этанола-ректификата.

Исходный образец ртути(II) (~1 мг/мл) готовили в кварцевом бюксе растворением точной навески очищенного металла в минимальном количестве азотной кислоты “ос.ч.” с последующим разбавлением до требуемого объема водой, подкисленной азотной кислотой до рН 2,5–3,0. Образцы с меньшим содержанием ртути(II) готовили непосредственно перед работой разбавлением исходного раствора подкисленной водой.

Образец цинка(II) концентрацией 1 мг/мл готовили растворением точной навески спектрально чистого цинка в минимальном количестве 0,1 М HCl “ос.ч.” и последующим его разбавлением до нужного объема водой, подкисленной до рН 2,5–3,0. Исходные образцы (1 мг/мл) ионов висмута(III), железа(III), кадмия(II), кобальта(II), никеля(II), меди(II), свинца(II), серебра(I) готовили растворением точных навесок их солей “ос.ч.” ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в воде, подкисленной азотной кислотой “ос.ч.” до значения рН 2,5–3,0.

Образцы с меньшим содержанием ионов металлов готовили непосредственно перед работой последовательным разбавлением исходных растворов подкисленной водой. Препарат иодида метилртути был синтезирован и очищен в институте Геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН.

Образцы метилртути готовили растворением их твердых препаратов в этаноле-ректификате и хранили в темноте без доступа воздуха при температуре 4°.

Фосфатный буферный раствор готовили смешением 0,1 М растворов дигидрофосфата калия “ч.” и гидрофосфата натрия “х.ч.”, дважды перекристаллизованных из воды, доводя рН до нужного значения 0,1 М NaOH “ос.ч.”. Трис-НСl-буферный раствор (0,05 М) готовили растворением точной навески его препарата (“Serva”, США) в воде, доводя рН до требуемого значения 0,1 М HCl “ос.ч.”.

Для приготовления всех водных растворов и перекристаллизации реагентов использовали воду, очищенную с помощью системы очистки воды “Simplicity” фирмы “Millipore” (Франция), с удельной электропроводностью не более 1,5 мОм.

Оптическую плотность растворов во времени измеряли на фотозлектроколориметре КФК-2, спектрофотометрах СФ-46 (“ЛОМО”, Россия) и “Shimadzu UV-2201” (“Shimadzu”, Япония). рН буферных растворов измеряли с помощью потенциометра рН-121 и рН-милливольтметра (“Эконикс-эксперт”, Россия) с точностью ±0,04 и ±0,005 соответственно. Для отбора малых количеств растворов (1 мл) использовали микродозаторы фирмы “Biohit” (Финляндия).

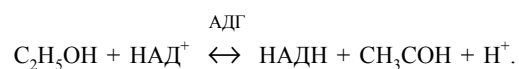
Определение ртути(II) с использованием АДГ-I и АДГ-II. В стеклянную пробирку с притертой пробкой вводили последовательно 1,1 мл трис-НСl-буферного раствора (рН 9,0 (АДГ-I) или 9,5 (АДГ-II)), по 0,1 мл 90 мМ раствора НАД⁺, этанол (6 М (АДГ-I) или 0,45 М (АДГ-II)), раствор ртути(II), по 0,1 мл 3 мкМ

АДГ-I или 60 мкМ АДГ-II. Общий объем смеси составлял 1,5 мл. В момент смешения растворов включали секундомер и измеряли оптическую плотность растворов через каждые 15 с в течение 2 мин. Скорость ферментативной реакции характеризуют тангенсом угла наклона (tg α) начального участка кинетических кривых в координатах оптическая плотность – время. Градуировочные графики строят в координатах tg – концентрация ингибитора.

Определение метилртути с использованием АДГ-I и АДГ-II. В стеклянную пробирку с притертой пробкой вводили последовательно 1,75 мл трис-НСl-буферного раствора (рН 9,0 (АДГ-I) или 9,5 (АДГ-II)), по 0,1 мл 90 мМ раствора НАД⁺, этанол (6 М (АДГ-I) или 0,45 М (АДГ-II)), 0,025 мл раствора метилртути, по 0,1 мл растворов 3 мкМ АДГ-I или 60 мкМ АДГ-II. Далее определение метилртути выполняют по методике, приведенной выше.

Результаты и их обсуждение

В качестве индикаторной выбрали катализируемую АДГ-I и АДГ-II реакцию окисления этанола β-никотинамидадениндинуклеотидом (НАД⁺), кинетика и механизм которой достаточно хорошо изучены [3, 4].



Для выяснения оптимальных условий протекания индикаторной реакции в присутствии алкогольдегидрогеназ разного происхождения изучили зависимости ее скорости от рН среды в трис-НСl-буферном растворе, концентраций этанола, НАД⁺, ферментов (рис. 1, а–з). Выбор трис-НСl-буферного раствора связан с тем, что именно в нем в интервале значений рН 9,0–11,0 [3] каталитическая активность АДГ-I и АДГ-II максимальна. На рис. 1, а показано, что в случае АДГ из дрожжей и печени лошади скорость реакции максимальна при рН 9,5 и 9,0 соответственно. В качестве оптимальных концентраций кофермента (НАД⁺) и этанола выбрали их наименьшие концентрации, при которых достигается максимальная и постоянная скорость реакции (рис. 1 б, в).

Таким образом, оптимальными являются следующие условия проведения индикаторной реакции: [НАД⁺] = 6 мМ, [АДГ-I] = 0,2 мкМ, [АДГ-II] = 4,0 мкМ, концентрация этанола – 0,4 (АДГ-I) и 0,03 (АДГ-II) М; трис-НСl-буферный раствор с рН 9,0 (АДГ-I) и 9,5 (АДГ-II).

Влияние ионов металлов изучали в указанных оптимальных условиях, варьируя рН в интервале 7,6–9,5, так как при более высоких значениях рН (>9,5) фермент денатурируется, а при более низких (<7,6) реакция протекает с малой скоростью, недостаточной для ее точного фиксирования. Установлено, что Ni(II) и Fe(III) не оказывают никакого действия на оба фермента даже при концентрации 100 мкг/мл; Hg(II), Cd(II), Cu(II) и Zn(II) ингибируют обе АДГ; Co(II) является ингибитором АДГ-II и не влияет на активность АДГ-I (табл. 1).

Таблица 1

Характеристики ингибирующего действия ионов металлов на каталитическую активность АДГ-I и АДГ-II и рK_s сульфидов металлов

Ион металла	Диапазон концентраций, в котором проявляется ингибирующее действие ионов (мкг/мл)		рK _s
	I	II	
Hg(II)	1·10 ⁻⁶ –1·10 ⁻²	0,01–1,0	52
Cd(II)	1·10 ⁻⁶ –1·10 ⁻²	1–100	28
Ag(I)	1·10 ⁻³ –1·10 ⁻²	–*	49
Pb(II)	5·10 ⁻³ –1·10 ⁻²	–	27
Cu(II)	0,0–1,0	0,1–100	35
Zn(II)	0,1–1,0	0,1–1,0	24
Bi(III)	0,1–1,0	–	97
Co(II)	не влияет	10–100	20

* Не изучено.

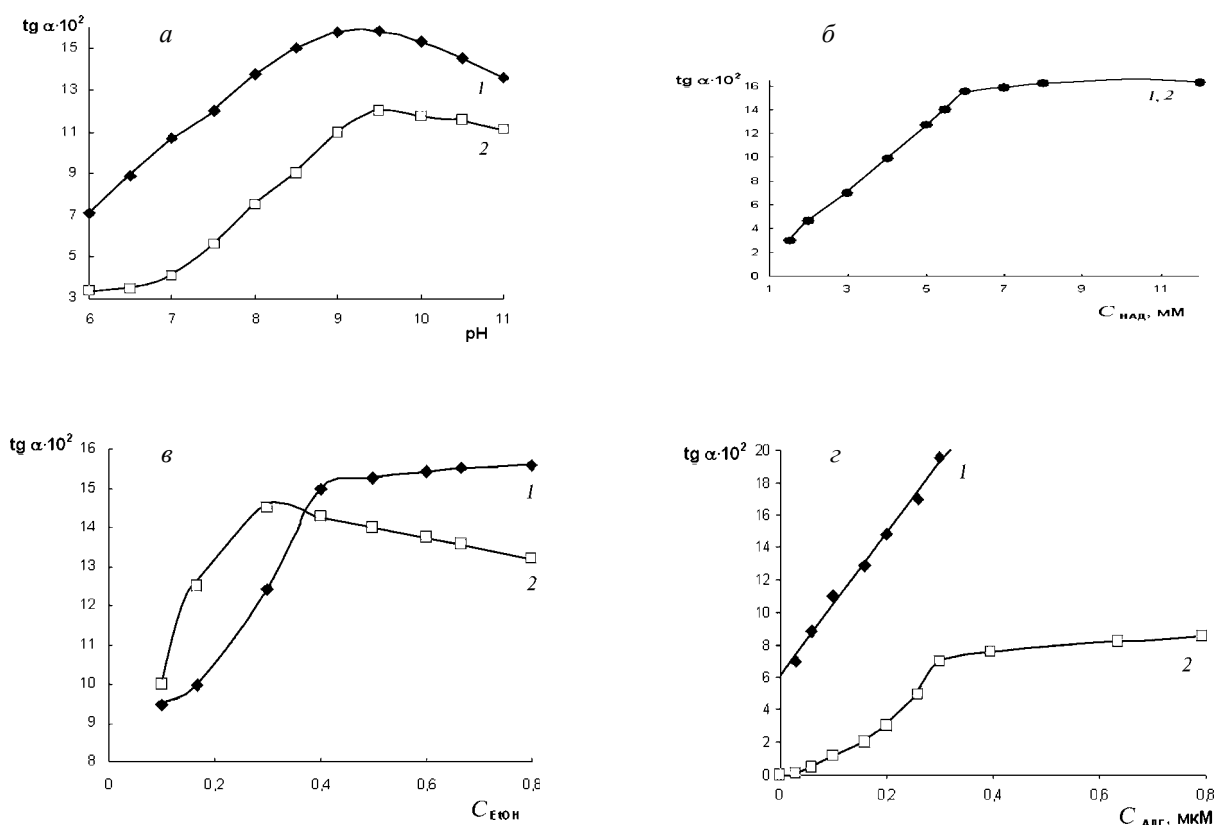


Рис. 1. Зависимость скорости ферментативного окисления этанола НАД^+ от pH трис-НСI-буферного раствора (а), концентраций НАД^+ (б), этанола (в) и АДГ (г) (концентрации: АДГ- I (1) 0,2 мкМ, АДГ- II (2) – 4,0 мкМ (а–в), этанола – 0,4 М (3) и 0,03 М (4) (а, б, г), НАД^+ – 6 мМ (а, в, г), трис-НСI-буферный раствор, pH 9,0 (1) и 9,5 (2) (б–г))

Полученные данные свидетельствуют о том, что степень ингибирующего действия ионов металлов на каталитическую активность АДГ определяется их природой, а также сродством катионов к сульфгидрильным группам в молекуле фермента.

Таким образом, Hg(II) является наиболее эффективным ингибитором обеих алкогольдегидрогеназ. Предварительное инкубирование ртути(II) с ферментами не приводит к усилению ее ингибирующего действия, что указывает на обратимость процесса ингибирования.

Известно [5], что метилртуть – (органическое соединение ртути(II)) оказывает наибольший токсический эффект на человеческий организм по сравнению с остальными химическими формами ртути(II), и при этом является специфическим реагентом на SH-группы белков [6]. В связи с этим нами было изучено влияние метилртути на скорость катализируемой АДГ-I и АДГ-II реакции окисления этанола НАД^+ . Обнаружено, что CH_3Hg^+ ингибирует АДГ из дрожжей и печени лошади в широких интервалах их концентраций: (0,001–1000) мкМ и (0,1–1000) мкМ соответственно. Максимальное ингибирующее действие метилртути проявляется так же, как и в случае Hg(II) , в оптимальных условиях проведения индикаторной реакции и не зависит от времени инкубирования ферментов с ингибитором.

Для подтверждения обратимости процесса ингибирования ферментов ионами Hg(II) и CH_3Hg^+ использовали метод разбавления [7]. Согласно этому методу в случае обратимости процесса при разбавлении смеси фермента с ингибитором в 10 раз должно выполняться соотношение: активность (разб.) $\geq 1/10$ активности (неразб.). Нами установлено, что характер взаимодействия АДГ (I и II) с ионами Hg(II) ($A_{(\text{неразб.})}/A_{(\text{разб.})} = 6,6$ и $9,4$) и CH_3Hg^+ ($A_{(\text{неразб.})}/A_{(\text{разб.})} = 7,0$ и $10,0$ соответственно) является обратимым. Методом линеаризации кинетических кривых в координатах Лайнуивера–Берка ($1/W - 1/[S]_0$) и Диксона ($1/W - [I]_0$) показано, что ингибирование обеих АДГ ртутью(II) происходит по смешанному типу (рис. 2, а, б), а метилртутью – по бесконкурентному (рис. 3, а, б). Бесконкурентный тип ингибирования предполагает, что ингибитор не способен присоединяться к ферменту, но присоединяется к комплексу фермент–субстрат. При смешанном ингибировании ингибитор действует как на участок связывания, так и на каталитический центр фермента, независимо от того, перекрываются они или нет; образуются как двойной комплекс фермент–ингибитор, так и тройной комплекс ингибитор–фермент–субстрат (оба комплекса каталитически неактивны).

Рассчитанные нами константы ингибирования и Михаэлиса (табл. 2) наглядно иллюстрируют тот факт, что

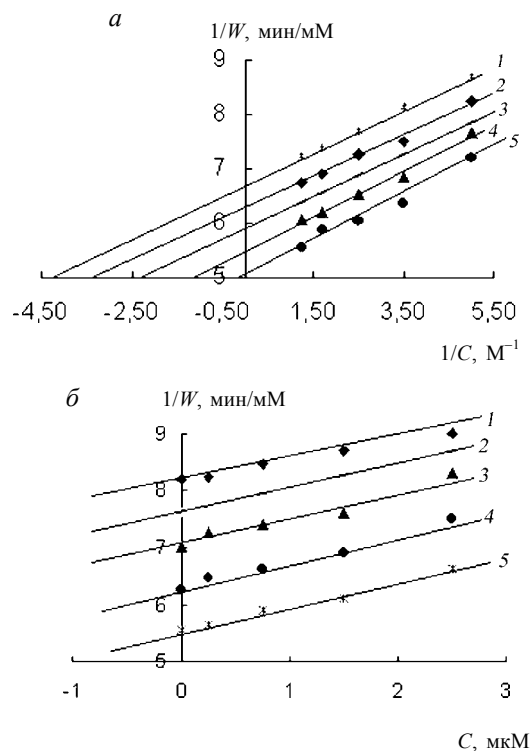
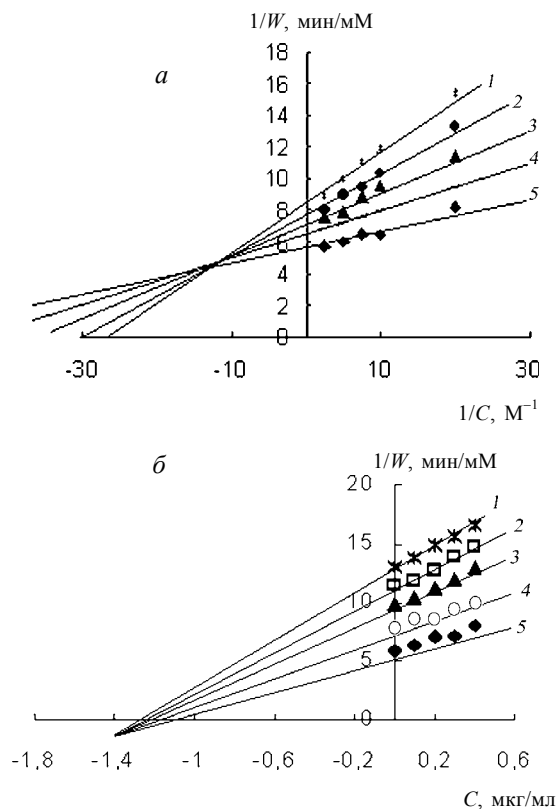


Рис. 2. Зависимость обратной скорости индикаторной реакции от обратной концентрации этанола при различных концентрациях Hg(II) (координаты Лайнуивера–Берка) (а) и от концентрации Hg(II) при различных концентрациях этанола (координаты Диксона) (б) (оптимальные условия определения Hg(II)); (а) концентрации Hg(II), мкМ: 1 – 2,5; 2 – 1,5; 3 – 1; 4 – 0,5; 5 – 0; (б) концентрации этанола, М: 1 – 0,05; 2 – 0,1; 3 – 0,2; 4 – 0,4; 5 – 0,6)

Рис. 3. Зависимость обратной скорости индикаторной реакции от обратной концентрации этанола при различных концентрациях метилртути (координаты Лайнуивера–Берка) (а) и от концентрации метилртути при различных концентрациях этанола (координаты Диксона) (б) (оптимальные условия определения метилртути); (а) концентрации метилртути, мкМ: 1 – 1,5; 2 – 0,75; 3 – 0,25; 4 – 0,025; 5 – 0; (б) концентрации этанола, М: 1 – 0,2; 2 – 0,3; 3 – 0,4; 4 – 0,6; 5 – 0,8)

Hg(II) – более сильный ингибитор алкогольдегидрогеназ, чем CH_3Hg^+ . Следует отметить, что степень ингибирования (I,%) этими эффекторами активности для АДГ-I существенно выше, чем для АДГ-II: 85 и 10% в случае ртути(II) ($C_{\text{Hg(II)}} = 0,1$ мкМ) и 68 и 7% – метилртути ($C_{\text{CH}_3\text{Hg}^+} = 1$ мкМ) соответственно.

Наличие обратной пропорциональной зависимости скорости индикаторной реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназами I и II, от концентрации Hg(II) и метилртути позволило разработать методики их определения с метрологическими характеристиками, представленными в табл. 3.

Методики определения указанных эффекторов с применением АДГ-I, отличающиеся более высокой чувствительностью (рис. 4), были использованы для определения Hg(II) и метилртути в природных водах. Занижение (по сравнению с ожидаемыми) результатов определения Hg(II) и метилртути в воде Красного моря, имеющей высокую соленость, обусловлено, по-видимому, влиянием большой ионной силы, а также связыванием Hg(II) и метилртути в комплекс с различными лигандами, присутствующими в морской воде, например, Cl^- , Br^- , I^- , HS^- , S^{2-} , лимонной кислотой, аминокислотами, гуминовыми и фульвокислотами и т.д. Полученные

данные об ингибировании алкогольдегидрогеназ, выделенных из разных источников, ртутью(II) и метилртутью, свидетельствуют о сопоставимости структур активных центров ферментов. В то же время существенные различия в степенях ингибирующего действия на ферменты специфических реагентов на сульфгидрильные группы белков указывают на то, что доступность этих групп в молекулах АДГ различного происхождения определяется природой ее продуцента и выше в случае фермента из клеток пекарских дрожжей.

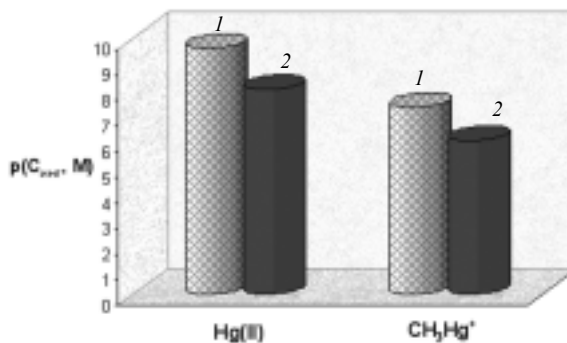


Рис. 4. Сравнение чувствительности методик определения ртути(II) и метилртути с использованием АДГ-I (1) и АДГ-II (2)

Т а б л и ц а 2

Кинетические характеристики ингибирующего действия ртути(II) и метилртути на алкогольдегидрогеназы из клеток пекарских дрожжей (I) и печени лошади (II)

Ингибитор	Концентрация, мкМ		K_i , мкМ		$K_{эф}$ М	
	I	II	I	II	I	II
Hg(II)	0	0	0,04	2,1	0,015±0,004	0,041±0,005
	0,5	0,25			0,020±0,006	0,057±0,007
	1,0	0,50			0,025±0,006	0,059±0,008
	1,5	0,75			0,030±0,005	0,072±0,007
	2,5	1,00			0,035±0,006	0,095±0,009
CH ₃ Hg ⁺	0	0	1,6	3,2	1,40±0,40	0,196±0,035
	0,025	0,25			0,60±0,08	0,092±0,020
	0,25	0,50			0,42±0,08	0,057±0,008
	0,75	0,75			0,33±0,07	0,041±0,017
	1,50	1,00			0,27±0,09	0,023±0,009

Т а б л и ц а 3

Метрологические характеристики методик определения Hg(II) и метилртути при помощи АДГ-I и АДГ-II

Ингибитор		Диапазон определяемых содержаний, нМ (I) и мкМ (II)	Уравнение градуировочного графика	$C_{мин}$, нМ (I) и мкМ (II)
I	Hg(II)	0,25–2,50	$y^* = 12,40 - 0,35x^{**}$ ($m = 10$)	0,15
	CH ₃ Hg ⁺	10–250	$y = 11,11 - 0,25x$ ($m = 8$)	3
II	Hg(II)	0,05–1	$y = 9,07 - 0,70x$ ($m = 7$)	0,02
	CH ₃ Hg ⁺	1–10	$y = 9,28 - 0,53x$ ($m = 6$)	0,7

* $y = \operatorname{tg}\alpha \cdot 10^2$; ** x = концентрация ингибитора ($C \cdot 10^m$, нМ (I) или мкМ (II)).

Т а б л и ц а 4

Метрологические характеристики методик определения Hg(II) и метилртути при помощи АДГ-I и АДГ-II

Введено	Найдено	s_f	Введено	Найдено	s_f
Колодезная вода					
Hg(II) (нг/мл)			Метилртуть (мкМ)		
0,75	0,73±0,07	0,03	0,6	0,60±0,07	0,01
3,75	3,8±0,1	0,02	4,2	4,3±0,1	0,01
Вода Красного моря					
Hg(II) (нг/мл)			Метилртуть (мкМ)		
3,75	2,83±0,09	0,01	0,75	0,60±0,09	0,03
18,75	17,9±0,2	0,02	5,25	4,25±0,1	0,01

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зигель Х., Зигель А. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. М.: Мир. 1993.
2. Aurichio F., Bruni C. Biochim. Biophys. Acta. 1969. 185. P. 461-463.
3. Boyer P., Lardy H., Myrback K. The Enzymes. New-York-London: Academic Press. 1963.
4. J. van Eys, Giotti M., Kaplan N. J. Biol. Chem. 1958. 231. P.571.
5. Winfrey M., Rudd J. Environ. Contam. Toxicol. 1990. 9. P. 853-869.
6. Торчинский Ю.М. Сера в белках. М.: Наука. 1997.
7. Попова И.М. Ферментативные методы определения физиологически активных веществ с применением пероксидазы. Дисс. к.х.н. М.: МГУ. 1981. 232 С.

Поступила в редакцию 25.10.02