005003055

Поляков Алексей Евгеньевич

ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА И СОИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ И ЭНДОПЕРОКСИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ВОДНЫХ, ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СРЕДАХ И ГИДРОФИЛЬНЫХ ИОННЫХ ЖИДКОСТЯХ

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

1 ДЕК 2011

Москва – 2011

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:	кандидат химических наук, доцент **Мугинова Светлана Валентиновна**
Официальные оппоненты:	доктор химических наук, профессор **Евтюгин Геннадий Артурович,** Казанский государственный университет, кафедра аналитической химии
	доктор химических наук, профессор **Сахаров Иван Юрьевич,** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра химической энзимологии
Ведущая организация:	Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, г. Москва

Защита состоится 21 декабря 2011 г. в 15 ч. 00 мин. в ауд. 446 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат диссертации размещен на сайте Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: www.chem.msu.ru и на сайте ВАК http://vak.ed.gov.ru.

Автореферат разослан "21" ноября 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук Торочешникова И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одним из актуальных направлений ферментативных методов анализа является разработка подходов к чувствительному, селективному и экспрессному определению ограниченно растворимых или нерастворимых в воде субстратов оксидоредуктаз в водно-органическом и неводном растворах пробы. Эта проблема сегодня стоит наиболее остро для растительных пероксидаз, которые инактивируются в присутствии органических растворителей, особенно полярных. В настоящее время для сохранения нативной структуры пероксидаз и, следовательно, обеспечения эффективного катализа в неблагоприятных для анализа ферментативными методами условиях предложен ряд подходов: иммобилизация биокатализатора на различных носителях, лиофилизация, заключение фермента в полиэлектролитные комплексы и др. Альтернативным является подход, основанный на использовании в качестве среды для проведения ферментативных реакций вместо полярных молекулярных органических растворителей гидрофильных ионных жидкостей (**ИЖ**) – высокополярных растворителей ионного типа. ИЖ выгодно отличаются от органических растворителей возможностью регулирования их физико-химических свойств варьированием природы катиона и аниона, негорючестью, пренебрежимо малым давлением паров, термической устойчивостью, уникальной растворяющей способностью и др. Изучение пероксидазного катализа в ИЖ началось с конца 90-х гг., однако имеющиеся в литературе сведения отрывочны и порой противоречивы. Для решения вопроса о целесообразности применения гидрофильных ИЖ вместо полярных органических растворителей в реакциях с участием растительных пероксидаз, а также для оценки аналитических перспектив ИЖ в пероксидазном катализе *актуальными* представляются систематические исследования кинетики превращения одних и тех же субстратов в присутствии растительных пероксидаз и растворителей двух типов (ионного и молекулярного).

Практическая значимость таких исследований возрастет, если при их проведении будут сопоставлены каталитическая активность и субстратная специфичность двух коммерческих растительных пероксидаз: пероксидазы хрена, **ПХ** (высокоактивного и стабильного фермента, давно и успешно зарекомендовавшего себя в практике биохимического анализа), и пероксидазы сои, **ПС** (аналитические возможности которой пока изучены недостаточно; до конца не выявлен круг практических задач, для решения которых целесообразна замена ПХ на её более дешевый соевый аналог). Эти пероксидазы отличаются степенью гликозилирования и значениями изоэлектрической точки белка: ПХ – катионный фермент, а ПС – анионный.

Указанные различия могут оказаться существенными при решении ещё одного круга задач, к числу которых относятся проблемы ферментативного определения в водных средах некоторых медленно окисляемых субстратов пероксидаз (например, катехоламинов) и эндопероксидных соединений (**ЭПС**) — пространственно затрудненных аналогов основного субстрата-окислителя, пероксида водорода. *Актуальность* таких задач обусловлена потребностью в чувствительных, селективных и одновременно экспрессных и простых методиках определения

катехоламинов (производных пирокатехина) и антималярийных ЭПС в различных объектах, в частности в фармацевтических.

Цели работы заключались в:

• выработке подходов к определению с использованием ПХ и ПС медленно окисляемых и ограниченно растворимых в воде фенольных соединений, а также антималярийных ЭПС в водных и водно-органических средах;

• выборе препарата пероксидазы, наиболее перспективного для определения катехоламинов, антималярийных ЭПС (природных и синтетических) и производных фенола в водных и водно-органических растворах;

• оценке перспектив использования гидрофильных ИЖ вместо полярных молекулярных органических растворителей в составе реакционной среды для пероксидазного превращения и ферментативного определения фенольных соединений;

• разработке с использованием ПХ и ПС методик определения фенольных соединений и антималярийных ЭПС в фармацевтических препаратах.

Для достижения поставленных целей необходимо было решить следующие задачи:

о оптимизировать условия проведения реакций пероксидазного окисления катехоламинов в водной среде в отсутствие и присутствии активаторов;

о выяснить оптимальные условия проявления влияния антималярийных ЭПС на скорость различных индикаторных реакций, катализируемых пероксидазами;

о изучить кинетику реакций окисления катехоламинов и производных фенола (гваякола и *о*-хлорфенола) в присутствии каждой пероксидазы в водной и смешанных средах (вода – полярный органический растворитель, вода – гидрофильная ИЖ) соответственно;

о оптимизировать составы реакционных сред для проведения катализируемых ПХ и ПС реакций окисления гваякола и *о*-хлорфенола *трет*-бутилгидропероксидом в присутствии молекулярных растворителей и гидрофильных ИЖ;

о разработать ферментативные методики определения ряда фенольных соединений и ЭПС в водных и водно-органических средах;

о апробировать разработанные ферментативные методики в анализе фармацевтических препаратов.

Научная новизна. В результате проведенных систематических исследований кинетики катализируемых ПХ и ПС реакций окисления катехоламинов (допамина, α-метилдопы, адреналина и добутамина) и производных фенола (гваякола и *о*-хлорфенола) выявлены аналитические перспективы использования этих пероксидаз для определения перечисленных соединений в водных и смешанных средах различного состава (вода – полярный молекулярный растворитель; вода – гидрофильная ИЖ). Установлена зависимость скорости реакций превращения катехоламинов от источника выделения пероксидазы и природы субстрата-восстановителя, а реакций окисления гваякола и *о*-хлорфенола *трет*-бутилгидропероксидом ещё и от природы катиона ИЖ и буферного раствора как сорастворителя. Показаны преимущества использования гидрофильных ИЖ

(тетрафторборатов 1-бутил-3-метилимидазолия, **[BMIm][BF_4]**, и N-бутил-4-метилпиридиния, **[BMPy][BF_4]**) перед полярными молекулярными растворителями (диметилсульфоксидом, ацетонитрилом, N,N-диметилформамидом, 1,4-диоксаном) при проведении реакций пероксидазного окисления гваякола и *о*-хлорфенола *трет*-бутилгидропероксидом в реакционных средах с содержанием воды не более 40 об.%.

С использованием ПХ предложены новые индикаторные системы для чувствительного, экспрессного и простого ферментативного определения допамина, α-метилдопы, адреналина и добутамина в фармацевтических препаратах, а также для определения 1,2,4,5-тетраоксана. Показана целесообразность использования неферментативной индикаторной системы HCl – H_2O_2 – I^- для определения артемизинина на уровне его концентраций в растительном сырье и фармацевтических препаратах.

Практическая значимость работы. Показано, что в гидрофильных ИЖ ([BMIm][BF_4] и [BMPy][BF_4]) даже при их содержаниях ≥ 60 об.% (в отличие от полярных молекулярных растворителей) в сочетании с оптимальными буферными растворами (сорастворителями ИЖ) и выбранным препаратом фермента сохраняется не менее 20% каталитической активности пероксидаз в реакциях превращения их фенольных субстратов.

Установленные в работе закономерности пероксидазного катализа в присутствии изученных полярных апротонных растворителей и гидрофильных ИЖ позволяют на этапе планирования эксперимента целенаправленно выбирать подходящий растворитель для превращения и определения субстрата фенольной природы.

Практическую значимость имеют разработанные чувствительные, экспрессные и простые ферментативные методики определения в водных растворах добутамина, адреналина, допамина и α-метилдопы, основанные на реакциях их окисления в отсутствие и присутствии активаторов (*о*-фенилендиамина, гормона T_4 и 4-аминоантипирина), а также предложенные индикаторные системы (*о*-дианизидин – ПХ – H_2O_2 и HCl – H_2O_2 – I^-) для ферментативного определения 1,2,4,5-тетраоксана и неферментативного определения артемизинина соответственно.

Автор выносит на защиту:

- результаты изучения кинетики реакций катализируемого ПХ и ПС окисления катехоламинов (допамина, α-метилдопы, адреналина и добутамина) и пирокатехина пероксидом водорода в отсутствие и присутствии активаторов в водной среде;
- результаты изучения влияния артемизинина и 1,2,4,5-тетраоксана на скорость катализируемых ПХ реакций;
- данные по изучению каталитических свойств ПХ и ПС в реакциях окисления гваякола и *о*-хлорфенола пероксидом водорода и *трет*-бутилгидропероксидом в водной, водно-органической средах и в присутствии гидрофильных ИЖ;
- установленные условия и закономерности протекания пероксидазного окисления фенольных соединений в водной и водно-органических средах;

- ферментативные методики определения ряда катехоламинов, 1,2,4,5-тетраоксана в водных, а гваякола и *о*-хлорфенола – водно-органических средах и в присутствии ИЖ, в том числе и в фармацевтических препаратах.

Апробация работы. Основные результаты исследований доложены на 10 международных и всероссийских конференциях (съездах, симпозиумах): International Conference «Chimia 2009» (Констанца, Румыния, 2009), Всероссийской конференции по аналитической химии «Аналитика России – 2009» (Краснодар, 2009), International conference «Biocatalysis-2009: Fundamentals and Applications» (Архангельск, 2009), 15 European Conference on Analytical Chemistry «EUROanalysis XV» (Инсбрук, Австрия, 2009), I-ой Всероссийской конференции «Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции» (Москва, 2009), 13 Annual Meeting of the Israel Analytical Chemistry Society «Isranalytica 2010» (Тель-Авив, Израиль, 2010), Съезде аналитиков России «Аналитическая химия – новые методы и возможности» (Клязьма, 2010), 2 Russian-Hellenic Symposium with International Participation «Biomaterials and bionanomaterials: Recent advances and safety – toxicology issues» (Ираклион, Крит, Греция, 2011), 16 European Conference on Analytical Chemistry, Challenges in Modern Analytical Chemistry «EUROanalysis XVI» (Белград, Сербия, 2011), а также на семинаре «Химический анализ медицинских объектов» в рамках выставки «Аналитика ЭКСПО-2011» (Москва, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 5 статей в международных и российских журналах и 11 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях, съездах и симпозиумах.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 230 стр. машинописного текста, содержит 90 рисунков и 43 таблицы, и состоит из введения, 3 глав обзора литературы, 5 глав экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы, включающего 313 источников, и 7 приложений.

Во **Введении** обоснована актуальность работы, сформулированы ее цели и задачи, научная новизна и практическая значимость.

Обзор литературы включает 3 главы. В *первой главе* изложены общие сведения о катехоламинах и лекарственных средствах на их основе, обсуждены методики определения катехоламинов в фармацевтических препаратах спектроскопическими, кинетическими и биохимическими методами. Во *второй главе* приведены сведения о структуре и механизме действия антималярийных ЭПС, систематизированы и обсуждены литературные данные о методиках их определения инструментальными методами в различных объектах. *Третья глава* посвящена применению ИЖ в биотехнологии, ферментативном катализе и биохимических методах анализа. Кратко описаны основные физико-химические свойства ИЖ, использованных в указанных целях.

Экспериментальная часть работы представлена главами 4 – 8. В *четвертой главе* перечислены исходные вещества, их характеристики, оборудование; приведены методики приготовления растворов и проведения спектрофотометрических, хроматографических, масс-спектрометрических и других измерений. В *пятой главе* обоснован выбор для исследования пероксидаз из двух растительных источников (ПХ

и ПС), а также определяемых соединений. В *шестой главе* представлены результаты изучения кинетики реакций пероксидазного окисления катехоламинов и пирокатехина в водной среде в отсутствие и присутствии *о*-фенилендиамина (**ФДА**); гормонов T_3 и T_4; 4-аминоантипирина; оптимальные условия ферментативного определения катехоламинов. Рассчитаны и сопоставлены константы скоростей ферментативного (пероксидом водорода в присутствии ПХ и T_4) и неферментативного (KIO_4) окисления допамина. На основе полученных данных подтверждена целесообразность использования в индикаторной системе для определения допамина *био*катализатора. Обсужден механизм ускорения гормоном T_4 катализируемого ПХ окисления допамина и адреналина. Приведены аналитические характеристики ферментативных методик определения в водном растворе катехоламинов и пирокатехина, а также результаты определения катехоламинов в фармацевтических препаратах. В *седьмой главе* описаны результаты изучения влияния эндопероксидов, артемизинина и 1,2,4,5-тетраоксана, на скорость катализируемых пероксидазами 6 индикаторных реакций, скорость которых контролировали спектрофотометрическим и люминесцентным методами; данные по оптимизации условий катализируемой ПХ реакции окисления *о*-дианизидина в присутствии 1,2,4,5-тетраоксана и неферментативной реакции окисления иодид-ионов пероксидом водорода, выделяющимся из артемизинина в кислой среде; представлены аналитические характеристики разработанных ферментативной и неферментативной методик определения 1,2,4,5-тетраоксана и артемизинина. В *восьмой* главе обсуждены результаты сравнительного изучения кинетики катализируемых ПХ и ПС реакций окисления гваякола и *о*-хлорфенола в водной и водно-органической средах, а также в присутствии гидрофильных ИЖ. Обоснован выбор для исследования конкретных полярных органических растворителей и ИЖ. Приведены оптимальные условия проведения индикаторных реакций в изученных средах; сопоставлены рассчитанные кинетические параметры ферментативных реакций; представлены аналитические характеристики ферментативных методик определения гваякола и *о*-хлорфенола в воде и смешанных средах. Представлены результаты ферментативного определения гваякола в стоматологическом препарате «Гваяфен№3» в средах вода – диметилсульфоксид (75:25 об.%) и вода – $[BMIm][BF_4]$ (20:80 об.%).

В **Заключении** к гл. 8 обобщены результаты спектрофотометрических, рефрактометрических, вязкозиметрических измерений в средах вода – полярный апротонный органический растворитель и вода – гидрофильная ИЖ. Сделана попытка выявить взаимосвязь относительной каталитической активности ПХ и ПС в реакциях окисления гваякола (**ГК**) и *о*-хлорфенола (*о*-**ХФ**) в средах разного состава и разных содержаний органических растворителей, при которых достигается 50% ингибирование обоих ферментов, с параметрами полярности (E_{30}^{N}) изученных молекулярных органических растворителей и ИЖ, а также с параметрами их гидрофобности ($\log P$).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Реагенты и аппаратура, использованные в работе

Использовали лиофилизованные препараты («Sigma», США) ПХ и ПС (ЕС 1.11.1.7) с RZ = 2.7 и 0.5 и каталитическими активностями 266 и 90 ед.×мг$^{-1}$ по пирогаллолу соответственно. Растворы пероксидаз (1 – 30 мкМ) готовили растворением их препаратов в 0.1 М фосфатном буферном растворе, pH 7.0. Точные концентрации ПХ и ПС устанавливали спектрофотометрическим методом (ε_{403}= 10.2 и 9.4×10^4 М$^{-1}$×см$^{-1}$ для ПХ и ПС соответственно). Твердые препараты и растворы ферментов хранили в холодильнике при -18 и +4°С соответственно. Использовали субстраты ферментов, а также артемизинин, гормоны T_4 и T_3, 4-аминоантипирин производства «Sigma», США.

Буферные растворы готовили, используя растворы дигидро- и гидрофосфата калия, бифталата калия, малеиновой кислоты, лимонной кислоты и КОН, имидазола, 2,4,6-коллидина, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой (**ГЭПЭС**), морфолинэтансульфоновой (**МЭС**) кислот и трис(гидроксиэтил)амино-метана (**Трис**). Применяли этанол, диметилсульфоксид (**ДМСО**), ацетонитрил, 1,4-диоксан и N,N-диметилформамид (**ДМФА**); коммерческие и синтезированные препараты гидрофильных ИЖ ([BMIm][BF_4] и [BMPy][BF_4]). Квалификация используемых реагентов была не ниже ч.д.а. Для приготовления всех водных растворов использовали деионизованную воду, очищенную на установке «Millipore» (Франция) с удельной электропроводностью не более 18.2 МΩ×см$^{-1}$.

Спектры поглощения или кинетику реакций регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu UV mini-1240A» (Япония, точность ±0.0003 опт. ед; l = 1 см). При проведении индикаторных реакций в ячейках полистирольного планшета оптическую плотность реакционных растворов измеряли на микропланшетном фотометре «Multiskan EX» («Thermo Labsystems», Финляндия; точность измерения оптической плотности ±0.007 опт. ед.; l = 1 см). Спектры флуоресценции и хемилюминесценции (при выключенной ксеноновой лампе) регистрировали на спектрофлуориметре «Shimadzu RF 5301», Япония.

Измеряли pH буферных растворов на pH-метре «Mettler Toledo» (Швейцария) с точностью ±0.01 ед. pH. Спектрофотометрическое титрование водно-органических растворов *о*-ХФ 1 М раствором гидроксида тетраэтиламмония («Fluka», Венгрия) проводили в стеклянной термостатированной при 25.0±0.1°С ячейке объёмом 50 или 100 мл в атмосфере Ar при непрерывном перемешивании, регистрируя УФ-спектры поглощения титруемых растворов на спектрофотометре «Specord 200PC» («Analytik Jena AG», Германия). Измеряли pH водно-органических растворов в различные моменты титрования на pH-метре «Эксперт-001.1.101» («Эконикс-эксперт», Россия) с комбинированным стеклянным электродом «ЭСК-10601/7» (Россия), откалиброванным по водным стандартным буферным растворам. Показатели преломления водно-органических растворов (n_D^{25}) измеряли на рефрактометре «ИРФ-454 Б2М» (Россия) (точность измерений ± 1×10^{-4}, диапазон измерений 1.2 – 1.7). Вязкость водно-органических растворов (η) измеряли на капиллярном стеклянном вязкозиметре ВПЖ-1 (диаметр капилляра 0.73 мм, Россия), погруженном в

вязкозиметрический термостат LOIP LT-910 (Россия, точность ± 0.1°C). Препараты ИЖ высушивали на роторном испарителе «Buchi», Швейцария.

Обоснование выбора изучаемых ферментов и определяемых соединений

Пероксидазу хрена широко применяют в химическом анализе; ее структура и свойства хорошо известны. Напротив, свойства и аналитические возможности *пероксидазы сои* еще активно изучаются. Несмотря на близкие молекулярные массы, высокий процент (57%) гомологии структур и одинаковое количество дисульфидных мостиков, ПХ и ПС отличаются степенью гликозилирования биомолекул (9 и 4 центров гликозилирования соответственно) и значением изоэлектрической точки белка (pI составляют 8.8 и 4.1). К началу наших исследований в литературе отмечена бóльшая стабильность ПС по сравнению с ПХ при pH ~ 3 и в фосфатном буферном растворе (pH 6.0, 7.0 и 8.0) при повышенной температуре вплоть до 80°C. Установлено, что ПС обладает меньшей субстратной специфичностью к ФДА, *о*-дианизидину, ГК и пирокатехину в водной среде по сравнению с ПХ.

Систематические исследования каталитических свойств нативных ПХ и ПС в реакциях окисления различных фенольных соединений и ЭПС в водных, водно-органических средах и гидрофильных ИЖ и сопоставление полученных данных ранее никто в мире не проводил.

Выбор в качестве определяемых веществ ***катехоламинов:*** допамина (**ДА**), адреналина (**АД**), α-метилдопы (**МД**), добутамина (**ДБ**), обусловлен потребностью в простых и экспрессных методиках их определения в фармацевтических препаратах в диапазоне концентраций $n\times10^{-6} - 10^{-3}$ М, альтернативных существующим фармакопейным методикам. Самостоятельный научный интерес представляло изучение эффективности катализа ПХ и ПС реакций окисления пероксидом водорода природных и синтетических катехоламинов, а также пирокатехина, производными которого они являются.

Интерес к изучению катализируемых пероксидазами реакций превращения ***эндопероксидов*** – природного антималярийного лекарственного вещества артемизинина (**АМ**), и его синтетического аналога 1,2,4,5-тетраоксана (**ТО**) (рис. 1), объясняется актуальностью разработки простых и экспрессных методик их определения в растительном сырье и лекарственных субстанциях соответственно. ЭПС содержат в структуре своих молекул пероксидные мостики, что позволяет рассматривать их в качестве возможных кандидатов на роль субстратов-окислителей пероксидаз. Концентрации ЭПС в растительном сырье и фармацевтических препаратах варьируют в диапазоне $10^{-5} - 10^{-2}$ М.

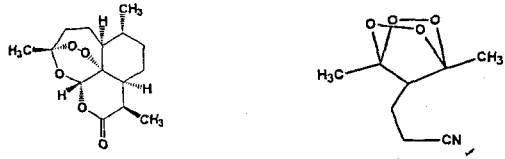


Рис. 1. Структуры исследуемых в работе ЭПС: АМ (слева) и ТО (справа).

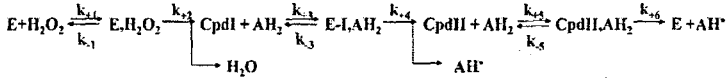
Выбор ГК и *о*-ХФ в качестве модельных ***фенольных соединений*** обусловлен рядом причин. Во-первых, они входят в круг тех фенолов, которые загрязняют поверхностные воды и почвы, поступая туда со стоками предприятий целлюлозно-бумажной, нефте- и коксохимической, сланцеперерабатывающей промышленности; во-вторых, ГК и *о*-ХФ являются субстратами пероксидаз. Достоинством ГК и *о*-ХФ как модельных субстратов является также образование окрашенных продуктов в результате их окисления в водных и водно-органических растворах, что позволяет контролировать скорость этих процессов простым и удобным спектрофотометрическим методом.

Субстратами-окислителями перечисленных выше соединений служили хорошо растворимый в воде H_2O_2 или ограниченно растворимый в воде *t*-BuOOH. Благодаря высокой растворимости последнего в большинстве полярных органических растворителей, он, в отличие от H_2O_2, способен окислять ГК и *о*-ХФ как в водной, так и в водно-органических средах в присутствии пероксидаз.

Пероксидазы хрена и сои в реакциях превращения катехоламинов

Для разработки чувствительных и селективных ферментативных методик определения катехоламинов и пирокатехина в фармацевтических препаратах изучили кинетику их индивидуального окисления пероксидом водорода в присутствии ПХ и ПС. Установили, что скорости ферментативного окисления катехоламинов и пирокатехина возрастали в ряду: ДА ≈ МД < АД < ДБ < пирокатехин, а их величины зависели от природы фермента (в присутствии ПХ скорости были в 1.5 – 2 раза выше, чем в случае ПС) и природы буферного раствора. На примере ДА показали, что константы скоростей отдельных стадий, k_{+1}, k_{+5}, k_{+6}, индикаторной реакции (*схема 1*) с участием ПХ в 4.7, 2.3 и 1.4 раза соответственно превышали таковые для реакций в присутствии ПС.

Схема 1 ферментативного окисления фенольных субстратов пероксидазы в рамках «пинг-понг» механизма



где *E*, *CpdI* и *CpdII* — исходный фермент и его промежуточные окисленные формы соответственно, AH_2 и *AH*· — исходный субстрат (донор электронов или протонов) и его окисленная форма (радикал) соответственно.

Таким образом, для превращения катехоламинов предпочтительнее использовать в качестве биокатализатора ПХ, а не ПС. Скорость ферментативного окисления катехоламинов максимальна в фосфатном буферном растворе. Отмечено возрастание скорости окисления ДБ с уменьшением pK_a основного компонента буферного раствора (рис. 2). Установленные оптимальные условия проведения пероксидазного окисления катехоламинов и пирокатехина приведены в табл. 1.

Сопоставление кинетических параметров реакции пероксидазного окисления ДА, АД (*схема 1*, k_{+5}) с таковыми для некаталитической реакции их окисления периодатом калия показало, что по сравнению с ферментативным, неферментативное окисление ДА, АД протекает менее эффективно (константы скорости (k_{+6}) ниже в 5 и 20 раз в случаях ДА и АД соответственно), что обосновывает целесообразность применения ***био***катализатора (ПХ) для разработки методик определения катехоламинов в фармацевтических препаратах.

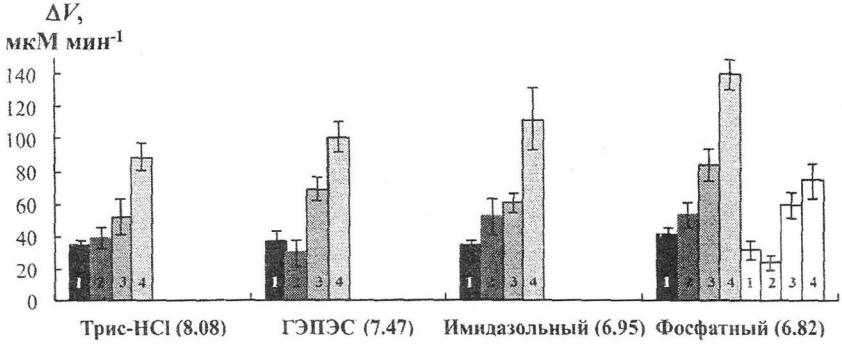


Рис. 2. Зависимость скоростей пероксидазного окисления катехоламинов (ДА (*1*), МД (*2*), АД (*3*), ДБ (*4*)) от природы буферного раствора (в скобках – pK_a основного компонента буферной смеси, pH 7.0; концентрации: катехоламин – 0.1 мМ, ПХ (заливка), ПС (без заливки) – 700 нм, H_2O_2 – 0.4 мМ; $n = 3$, $P = 0.95$). ΔV – разность скоростей ферментативной и неферментативной реакций.

Таблица 1. Оптимальные условия проведения реакций индивидуального окисления ДА, МД, АД, ДБ и пирокатехина пероксидом водорода, катализируемых ПХ (0.1 М фосфатный буферный раствор)

Индикаторная система	λ_{max}, нм	pH	Концентрации	
			ПХ, нМ	H_2O_2, мкМ
ДА - H_2O_2	465	7.0	900	400
МД - H_2O_2	481	7.0	700	200
АД - H_2O_2	480	8.6	350	200
ДБ - H_2O_2	481	9.2	40	100
Пирокатехин - H_2O_2	400	7.5	30	100

Расчет кинетических параметров индикаторных реакций показал, что в выбранных условиях (табл. 1) ДБ и пирокатехин являются быстро окисляемыми субстратами ПХ (константа скоростьлимитирующей стадии $k_{+5} > 10^6$ $M^{-1}\times c^{-1}$), в то время как ДА, АД и МД – средне окисляемые субстраты (k_{+5} в диапазоне 10^4 - 10^6 $M^{-1}\times c^{-1}$). Для повышения скорости ферментативного окисления последних целесообразно использовать активаторы.

На основании литературных данных выбрали в качестве ***активаторов*** ФДА, гормоны T_4 и T_3, а также 4-аминоантипирин, применение которых позволяет

повысить скорость окисления катехоламинов. В результате изучения кинетики реакций окисления ДА, АД и МД в присутствии ФДА, T_4, T_3 и 4-аминоантипирина выявили, что оптимальным активатором пероксидазного окисления ДА и АД является T_4, а для индикаторной реакции с участием МД – 4-аминоантипирин. На рис. 3 приведены кинетические кривые обсуждаемых ферментативных реакций в отсутствие и присутствии соответствующих активаторов.

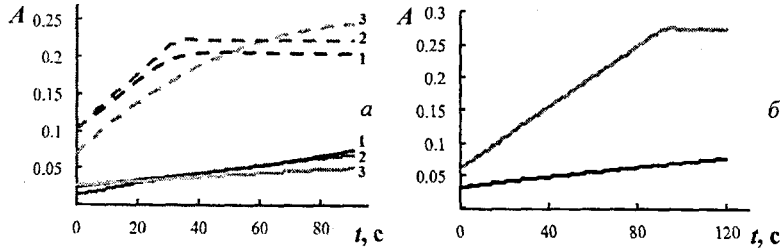
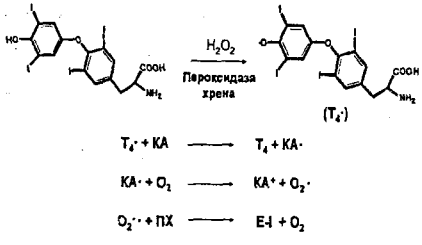


Рис. 3. Кинетические кривые катализируемого ПХ окисления ДА (*1*), МД (*2*) и АД (*3*) в отсутствие (сплошные линии) и присутствии (пунктирные линии) T_4 (*а*) и МД в отсутствие и присутствии 0.1 мМ 4-аминоантипирина (*б*) (0.1 М фосфатный буферный раствор, pH 7.0; концентрации: *а* – ДА (АД, МД) – 0.1 мМ, ПХ – 600 нМ, T_4 – 40 мкМ, H_2O_2 – 0.4 мМ; *б* – МД – 0.1 мМ, ПХ – 250 нМ, H_2O_2 – 0.2 мМ).

Активирующее действие 4-аминоантипирина на реакцию пероксидазного окисления МД – следствие эффекта «субстрат-субстратной» активации, который проявляется в том, что в рассматриваемой паре восстановителей 4-аминоантипирин ускоряет окисление «медленного» субстрата – МД.



В результате изучения кинетики катализируемых ПХ реакций окисления ДА, АД и МД и масс-спектрометрического анализа реакционной смеси до и после проведения реакций предложена кинетическая схема, объясняющая ускоряющее действие гормона T_4 на их скорость. Тироидный гормон является донором образующихся на начальной стадии свободных радикалов ($T_4^{\bullet}$), необходимых для дальнейшего окисления катехоламинов (КА). Тот факт, что фосфат-ионы в отличие от компонентов изученных органических буферных смесей не могут перехватывать свободные радикалы $T_4^{\bullet}$, участвующие в окислении катехоламинов, свидетельствует в пользу применения фосфатного буферного раствора для проведения этих индикаторных реакций.

Выбранные оптимальные условия проведения реакций окисления ДА, АД и МД в присутствии ПХ и активаторов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Оптимальные условия проведения катализируемых ПХ реакций окисления катехоламинов и пирокатехина пероксидом водорода в присутствии активаторов

Аналит	λ_{max}, нм	Буферный раствор (pH)	Концентрации		
			ПХ, нМ	Активатор, мкМ	H_2O_2, мМ
ДА	435	0.1 М Фталатный (5.5)	15	100 (ФДА)	400
	465	0.1 М Фосфатный (5.4)	670	50 (T_4)	250
МД	481	0.1 М Фосфатный (6.2)	600	30 (4-Аминоантипирин)	200
АД	480	0.1 М Фосфатный (8.6)	150	15 (T_4)	100

На основе выявленных активирующих эффектов разработаны ферментативные методики определения катехоламинов и пирокатехина (табл. 3). Чувствительность ферментативной методики определения ДБ на основе его индивидуального окисления пероксидом водорода (в отсутствие активаторов) вполне достаточна для анализа фармацевтических препаратов. Применение активаторов для определения ДА, АД и МД позволило в 10, 5 и 10 раз соответственно понизить их $c_н$ по сравнению с методиками, основанными на ферментативных реакциях их индивидуального окисления. При замене ФДА на T_4 $c_н$ ДА понизилась в 2 раза; при использовании 4-аминоантипирина вместо T_4 коэффициент чувствительности при определении МД повысился более чем в 25 раз (табл. 3).

Таблица 3. Аналитические характеристики разработанных ферментативных методик определения катехоламинов и пирокатехина ($n = 5$; $P = 0.95$)

Аналит	Активатор	Уравнение градуировочной зависимости	ДОК[а], мкМ	s_r при $c_н$
ДБ	–	$y^б = (0.8\pm0.1)\,x + (3.1\pm0.8)$	5 – 20	0.09
Пирокатехин	–	$y = (1.2\pm0.1)\,x + (11\pm6)$	20 – 200	0.13
ДА	–	$y = (2.3\pm0.1)\,x + (0.4\pm0.1)$	5 – 300	0.06
	ФДА	$y = (1.4\pm0.1)\,x + (128\pm1)$	1 – 200	0.08
	T_4	**$y = (0.9\pm0.1)\,x - (1.5\pm0.2)$**	**0.5 – 300**	**0.08**
АД	–	$y = (3.1\pm0.3)\,x + (4\pm1)$	20 – 300	0.18
	T_4	**$y = (1.4\pm0.1)\,x + (1.4\pm0.3)$**	**4 – 300**	**0.09**
МД	–	$y = (2.7\pm0.8)\,x + (1.1\pm0.8)$	100 – 400	0.25
	T_4	$y = (4\pm1)\times10^{-2}\,x + (25\pm2)$	100 – 400	0.23
	4-Аминоантипирин	**$y = (1.1\pm0.1)\,x + (5\pm2)$**	**10 – 100**	**0.18**

[а] ДОК – диапазон определяемых концентраций.
[б] $y - V_0$, мкМ×мин$^{-1}$, $x - c$, мкМ.

Ферментативные методики определения ДА, АД, МД и ДБ апробированы при анализе фармацевтических препаратов (табл. 4 и 5), в состав которых помимо катехоламинов входили указанные в табл. 4 компоненты.

Чувствительность и селективность предложенных ферментативных методик позволяет определять катехоламины в различных по составу лекарственных формах (табл. 5: инъекциях[1], таблетках[2], лиофилизатах[3]) в широком диапазоне содержаний

действующего вещества (от 2 до 50 масс. %). Разработанные ферментативные методики более экспрессны (время анализа 15-20 мин), просты и менее трудоемки, чем известные из литературы спектрофотометрические, электрохимические методики определения катехоламинов в фармацевтических препаратах, а также фармакопейные потенциометрические методики.

Таблица 4. Селективность разработанных ферментативных методик определения катехоламинов

Аналит (тестируемая концентрация)	Информация о мешающем влиянии компонентов, входящих в состав фармацевтических препаратов
ДА (10 мкМ)	L-Цистеин мешает выше 4-кратных избыточных количеств; $Na_2S_2O_5$ в 2-кратных, лактоза, сахароза, фруктоза при более, чем 10-кратных избыточных количествах мешают; NaCl не мешает вплоть до 100-кратных избыточных количеств
АД (10 мкМ)	Лидокаин и NaCl не мешают вплоть до 50 и 200 мМ концентраций соответственно в фармацевтических препаратах; $Na_2S_2O_5$ мешает при более, чем 2-кратных избыточных количествах
МД (20 мкМ)	Тальк, крахмал, этилцеллюлоза, стеарат магния, стеариновая кислота не мешают определению после фильтрования анализируемого раствора
ДБ (10 мкМ)	Маннитол не мешает на уровне его концентраций (10-100 мкМ) в фармацевтических препаратах

Таблица 5. Результаты определения ДА, АД, МД и ДБ в фармацевтических препаратах с использованием разработанных ферментативных методик (I) и методом ВЭЖХ-МС (II) ($n = 3$, $P = 0.95$)

Фармацевтический препарат	Ед. сод.	Найдено		Паспорт.
		I	II	содерж.
«Дофамин-Ферейн» «Ферейн», Россия[1]	мг×мл$^{-1}$	4.6 ± 0.2	5.2 ± 0.5	5
«Допамин-Солвей» «Solvay Pharma», Россия[1]	мг	62 ± 10	59 ± 6	60
«Ксилокаин-Адреналина» «Astra Zeneca», Германия[1]	мкг×мл$^{-1}$	5.1 ± 0.3	4.8 ± 0.4	5.0
«Допегит» «Egis», Венгрия[2]	мг	230 ± 20	245 ± 16	250
«Добутамин-ГЕКСАЛ» «Hexal», Германия[3]	мг	244 ± 16	–	250

Артемизинин и 1,2,4,5-тетраоксан в индикаторных реакциях с участием пероксидаз

Для оценки перспективности использования растительных пероксидаз для определения антималярийных ЭПС изучили ферментативные системы, приведенные в табл. 6. Выбранные индикаторные системы различались не только методом контроля скорости реакций (спектрофотометрический или люминесцентный), но и тем, что в некоторых индикаторных реакциях (в табл. 6 они выделены *курсивом*) ЭПС предварительно дериватизировали растворами минеральных кислот.

Проведенные исследования показали, что из всех изученных индикаторных систем для ферментативного определения ТО возможно применять лишь систему I, в которой ЭПС выступает в роли соокислителя основного субстрата биокатализатора. К сожалению, ни в одной из исследованных ферментативных систем аналитический сигнал не был пропорционален концентрации АМ. Установлено, что для определения АМ целесообразно применять кинетический метод, измеряя скорость накопления иода в реакции окисления иодид-иона пероксидом водорода, выделяющегося из АМ после его обработки раствором HCl.

Таблица 6. Изученные индикаторные реакции с участием ЭПС и ПХ

№	Индикаторная система	Аналит	pH	Индикаторное вещество (λ, нм)
	Спектрофотометрический метод контроля скорости реакции			
I.	*o*-Дианизидин – ЭПС (H_2O_2)	АМ/ТО	5.5	Продукт окисления *o*-дианизидина (455)
II.	ТМБ[a] – ЭПС (H_2O_2)	АМ/ТО	5.3	Продукт окисления ТМБ (375)
III.	$AM + HCl \rightarrow PP + H_2O_2$ *(1) Индигокармин* – H_2O_2 *(2) ТМБ* – H_2O_2	АМ	4.8	 Индигокармин (613) Продукт окисления ТМБ (655)
	Люминесцентный метод контроля скорости реакции			
IV.	Люминол – ЭПС	АМ/ТО	11	Аминофталат (425)
IVa.	*Люминол* – H_2O_2	АМ	11	Аминофталат (425)
V.	Пиронин Б – ПХ	ТО	7.5	Пиронин Б ($\lambda_{возб}$ 345, $\lambda_{фл}$ 547)

[a] 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

В оптимальных условиях проведения индикаторных реакций с участием АМ (концентрации: HCl – 2.5 М; KI – 30 мМ; время накопления H_2O_2 – 5 мин; 350 нм) и ТО (концентрации: ПХ – 0.45 нМ, *o*-дианизидин – 0.1 мМ, H_2O_2 – 0.2 мМ, ацетатный буферный раствор, pH 4.2; 460 нм) разработали неферментативную (АМ) и ферментативную (ТО) методики их определения с аналитическими характеристиками, представленными в табл. 7.

Таблица 7. Аналитические характеристики методик определения АМ после его кислотного разложения по реакции с KI и ТО по катализируемой ПХ реакции окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода ($n = 6$, $P = 0.95$)

ЭПС	Уравнение градуировочной зависимости[a]				ДОК, мМ	s_r при $c_н$
	a	Δa	b	Δb		
АМ	0.7	0.1	0.08	0.01	0.15 – 1	0.01
ТО	3.5	0.3	2.3	0.2	0.2 – 0.6	0.07

[a] $y = (a \pm \Delta a)\,x + (b \pm \Delta b)$, где y – V, мкМ×мин$^{-1}$; x – концентрация ЭПС, мМ.

Чувствительность разработанной ферментативной методики определения ТО невысока ($c_н = 0.2$ мМ) и в полной мере не удовлетворяет требованиям фармацевтического анализа. К сожалению, ни в одной из изученных индикаторных

систем в присутствии ПХ не проявил свое действие АМ, однако для оценки качества растительного сырья при производстве АМ разработанная методика его определения кинетическим методом ($c_и$ = 0.15 мМ) вполне пригодна.

Пероксидазное окисление гваякола и *о*-хлорфенола в водных и водно-органических средах

Для сравнительного изучения пероксидазного катализа в водных и водно-органических средах разного состава в качестве модельных индикаторных реакций использовали реакции окисления ГК и *о*-ХФ растворами H_2O_2 или *t*-BuOOH. Из широкого круга коммерческих гидрофильных ИЖ выбрали две ИЖ, содержащие один и тот же анион – [BF_4^-], но разные катионы – [$BMIm^+$] и [$BMPy^+$]. Согласно литературным данным, имидазолиевые ИЖ используют в ферментативном катализе наиболее часто; второе место по распространенности занимают ИЖ на основе катиона пиридиния. В качестве полярных молекулярных органических растворителей для проведения реакций пероксидазного окисления ГК и *о*-ХФ выбрали ДМСО, ДМФА, ацетонитрил, 1,4-диоксан и этанол.

Пероксидазное окисление фенольных соединений в водной среде проводили в оптимальных условиях, приведенных в табл. 8. Из изученных буферных растворов (фосфатный, цитратно-фосфатный, МЭС, Трис-малеиновый, малеиновый и фталатный) эффективность превращения обоих фенольных субстратов максимальна в 0.1 М фосфатной буферной смеси. Для достижения одной и той же скорости окисления ГК требовалось ПХ в 3 раза больше, чем ПС, а для окисления *о*-ХФ наоборот необходимо в 3.5 раза большее количество ПС (табл. 8).

Таблица 8. Оптимальные условия проведения пероксидазного окисления ГК и *о*-ХФ в 0.1 М фосфатном буферном растворе

Источник пероксидазы			λ_{max}, нм	pH	Концентрации			
					Е, нМ	Субстрат, мкМ	Окислитель, мМ	
Субстрат	ГК	ПХ	470	6.0	10	1000	*t*-BuOOH	120
		ПС			3	3500		220
	о-ХФ	ПХ	415	5.5	15	60	H_2O_2	0.25
		ПС			50	120		0.35

Пероксидазное окисление ГК и о-ХФ в среде вода – полярный органический растворитель. На рис. 4 и 5 в виде диаграмм для наглядности представлены зависимости относительной активности (a/a_0, соотношение каталитической активности пероксидаз в присутствии и отсутствие органического растворителя соответственно) ПХ и ПС в реакциях окисления ГК и *о*-ХФ *трет*-бутилгидропероксидом от содержания (10 – 40 об.%.) органических растворителей в реакционном растворе. Концентрации компонентов индикаторных реакций соответствуют оптимальным для водной среды (табл. 8). Из рис. 4 и 5 видно, что при увеличении содержания органического растворителя относительная активность пероксидаз в обеих индикаторных реакциях в присутствии большинства

растворителей резко уменьшается. Исключение составляет реакция окисления *о*-ХФ в среде вода – ДМСО в присутствии ПХ. Скорость окисления ГК при содержании органического растворителя < 5 об.% практически не отличается от таковой в водном растворе в присутствии обоих ферментов. Уже при концентрации органического растворителя 15 об.% ПХ инактивирована более чем на 50%, в то время как ПС в реакции окисления ГК более активна в среде ДМСО и ацетонитрила. Для дальнейшей работы выбрали максимальные содержания органических растворителей, при которых скорость реакции ещё достаточна для регистрации, а степень ингибирования пероксидаз не превышает 75%.

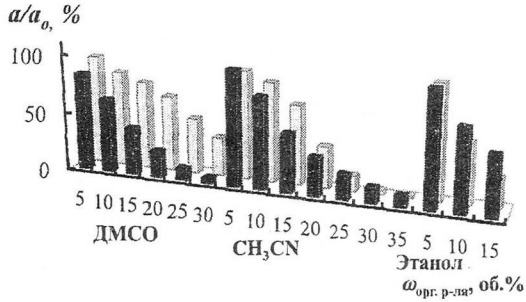
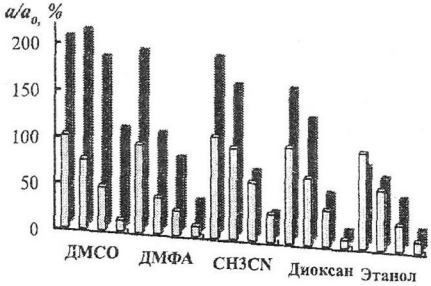


Рис. 4. Зависимость относительной активности **ПХ** и **ПС** в реакции окисления ГК от содержания ДМСО, ацетонитрила и этанола (концентрации: ПХ – 9 нМ; ГК – 0.9 мМ; *t*-BuOOH – 120 мМ; ПС – 2.7 нМ, ГК – 3.6 мМ, *t*-BuOOH – 220 мМ; 0.1 М фосфатный буферный раствор, pH 6.0; 470 нм).

Скорость окисления *о*-ХФ при содержании органического растворителя 10 об.% в присутствии ПС практически не отличается от таковой в водном растворе, в то время как скорость катализируемой ПХ реакции возрастает почти в 2 раза (рис. 5). Лишь этанол понижает скорость реакции с участием ПХ. Аналогичную картину наблюдали в системе ГК – *t*-BuOOH, в которой при увеличении содержания этанола от 3 до 10 об.% степень ингибирования пероксидаз (главным образом, ПС) повышалась от 5 до 50% соответственно.

Рис. 5. Зависимость относительной активности **ПХ** и **ПС** от объемного содержания органического растворителя* в индикаторной системе с *о*-ХФ (концентрации: ПХ – 170 нМ, ПС – 50 нМ, *о*-ХФ – 0.1 мМ, *t*-BuOOH – 50 мМ; 415 нм) (**растворители расположены в порядке возрастания* log*P*; *содержания органических растворителей составляют 10, 20, 30, 40 об.%).*



При содержаниях любого органического растворителя более 10 об.%, в реакции окисления *о*-ХФ каталитическая активность пероксидаз понижается. Наименьшее инактивирующее действие на ПХ при окислении *о*-ХФ оказывает ДМСО, в присутствии 40 об.% которого активность фермента сохраняется на «водном» уровне. Для соевого фермента самой «благоприятной» средой оказался ацетонитрил, при 40 об.% которого

каталитическая активность ПС уменьшается до 25%, однако в других изученных растворителях она падает до 15%.

Из данных табл. 9 видно, что концентрации обеих пероксидаз увеличиваются в 1.5 – 1.8 раз при переходе от водной к водно-органической среде. Исключение составляет концентрация ПХ в среде вода-ацетонитрил, в которой она такая же, как и в водной среде. Во всех случаях концентрация ПС в 2 – 4 раза ниже концентрации ПХ. В водно-органических средах при использовании ПХ и ПС в 10 – 17 раз и 2.5 раза соответственно возрастают оптимальные концентрации ГК. Оптимальная концентрация *t*-BuOOH при переходе в водно-органическую среду в случае ПС не меняется, в то время как в присутствии ПХ повышается в 1.2 – 2.4 раза. Для проведения реакций, катализируемых ПХ и ПС, в водно-органической среде требуется ~ 20-кратное избыточное количество *t*-BuOOH по отношению к ГК, в водной – 130- и 60-кратные избыточные количества соответственно.

Таблица 9. Оптимальные условия проведения индикаторных реакций пероксидазного окисления ГК и *о*-ХФ в водно-органических средах

Оптимальные концентрации	Среда					
	ДМСО		Ацетонитрил		ДМФА	
	ПХ	ПС	ПХ	ПС	ПХ	ПС
Реакция окисления ГК						
Буферный раствор, pH	0.1 М Фосфатный, pH 6.0					
Фермент, нМ	16.5	4.0	10.0	4.5	20	6
ГК, мМ	15.0	9.0	8.5	9.0	12	10
t-BuOOH, мМ	290	220	145	220	210	240
Растворитель, об.%	20	25	25	20	35	20
Реакция окисления *о*-ХФ						
Оптимальные концентрации	ДМСО		Ацетонитрил		ДМФА	
Буферный раствор, pH	0.1 М Цитратно-фосфатный, 5.5					
Фермент, нМ	170	50	170	60	170	–[a]
о-ХФ, мкМ	100	100	100	100	35	–
t-BuOOH, мМ	25	25	25	25	13	–
Растворитель, об.%	40	40	25	30	30	–
Оптимальные концентрации	1,4-Диоксан		Этанол			
Буферный раствор, pH	0.1 М Цитратно-фосфатный, 5.5					
Фермент, нМ	240	–	50	40		
о-ХФ, мкМ	160	–	100	100		
t-BuOOH, мМ	13	–	25	60		
Растворитель, об.%	25	–	20	20		

[a] реакция в этой среде в изученных условиях не протекает.

Пероксидазное окисление фенольных соединений в среде вода – гидрофильная ИЖ. При окислении ГК и *о*-ХФ в присутствии 25 об.% ИЖ и более необходимо применять буферные системы органической природы (табл. 10), поскольку компоненты фосфатного и цитратно-фосфатного буферного растворов, обеспечивающих высокую каталитическую активность пероксидаз в водной среде и смесях молекулярных растворителей с водой (табл. 9), в ИЖ осаждаются. Выбор оптимального буферного раствора (его природы, pH и концентрации) как сорастворителя ИЖ позволил нам изучить кинетику пероксидазного окисления ГК и

о-ХФ при высоких объёмных содержаниях (≥ 60 об.%) гидрофильных ИЖ в реакционной смеси. Для окисления ГК *трет*-бутилгидропероксидом в присутствии $[BMPy][BF_4]$ и $[BMIm][BF_4]$ оптимальными оказались буферные системы (коллидиновая и имидазольная соответственно), компоненты которых содержали структурные элементы исследуемых ИЖ. В среде пиридиниевой ИЖ *о*-ХФ не окислялся ни в одной из изученных буферных систем, а в качестве оптимального сорастворителя для $[BMIm][BF_4]$ выбрали 0.1 М МЭС-КОН буферный раствор.

Таблица 10. Относительная активность (a/a_0, %) ПХ и ПС в реакциях окисления ГК и *о*-ХФ *трет*-бутилгидропероксидом в зависимости от природы буферного раствора – сорастворителя ИЖ (концентрации: ПС – 8.0 нМ, ПХ – 10.0 нМ; *t*-BuOOH – 120 мМ, ГК – 1 мМ, *о*-ХФ – 0.1 мМ; 0.05 М буферные растворы, pH 7.0 (ГК) и 5.5 (*о*-ХФ))

Среда (об.%)	Фермент	a/a_0, %		
		Имидазол-HCl	2,4,6-Коллидин-HCl	Трис-HCl
		Окисление ГК		
$[BMPy][BF_4]$ – буферный раствор (60:40)	ПХ	-	-	-
	ПС	39[a]	34	12
$[BMIm][BF_4]$ – буферный раствор (80:20)	ПХ	6	8	3
	ПС	**23**	9	-

		Окисление *о*-ХФ	
		МЭС-КОН	Трис-малеиновый
$[BMIm][BF_4]$ – буферный раствор (70:30)	ПХ	**110**	65

[a] В имидазольном и коллидиновом буферных растворах относительные активности ПС сопоставимы, однако воспроизводимость результатов измерений в коллидиновом буферном растворе выше ($s_r \le 0.11$, $n = 3$).

Вследствие высокой динамической вязкости ИЖ по сравнению с растворами молекулярных растворителей оптимален следующий порядок введения компонентов в реакционную систему: ИЖ – *t*-BuOOH – буферный раствор – ГК (*о*-ХФ) – фермент.

Установлено, что характер зависимостей относительной активности ПХ и ПС в реакциях окисления ГК и *о*-ХФ от содержания ИЖ в реакционном растворе различен. В системе *о*-ХФ – *t*-BuOOH каталитическая активность соевого фермента в присутствии уже 20 об.% имидазолиевой ИЖ понижалась до 20% и приближалась к нулю при 95 об.% этого ионного растворителя (рис. 6, *а*). Напротив, относительная активность ПХ в диапазоне содержаний $[BMIm][BF_4]$ от 20 до 60 об.% превышала 100% (т.е. в присутствии ИЖ скорость реакции была больше, чем в её отсутствие), а затем уменьшалась и при 95 об.% ИЖ составляла ~20% от её исходной величины.

При 80 об.% $[BMPy][BF_4]$ и выше реакция окисления ГК в присутствии ПХ, не протекала, в то время как каталитическая активность ПС в той же реакции сохранялась на уровне 7-9% при 70 об.% пиридиниевой ИЖ (рис. 6, *б*). С повышением содержания $[BMIm][BF_4]$ относительная активность ПС понижалась в меньшей степени, чем ПХ.

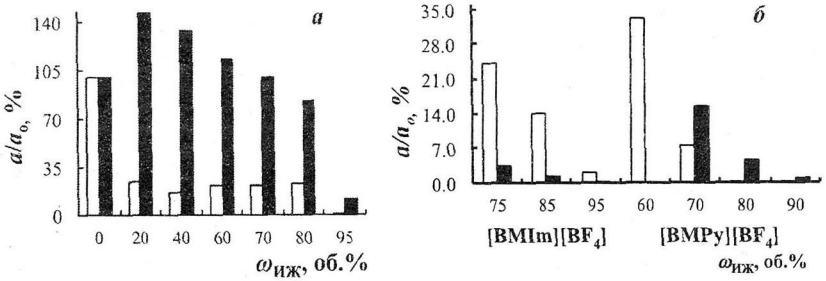


Рис. 6. Зависимость относительной активности ПХ (заливка) и ПС (без заливки) в реакциях окисления *о*-ХФ (*а*) и ГК (*б*) *трет*-бутилгидропероксидом от содержания [BMIm][BF_4] и [BMPy][BF_4] (***а*** – 0.1 М МЭС-КОН буферный раствор; концентрации: ПХ – 20 нМ, ПС – 80 нМ, *о*-ХФ – 0.1 мМ, *t*-BuOOH – 40 мМ; 415 нм; ***б*** – 0.05 М имидазольный ([BMIm][BF_4]) и коллидиновый (([BMPy][BF_4]) буферные растворы; ПС – 8 нМ, ПХ – 10 нМ; ГК – 0.9 мМ; *t*-BuOOH – 122 мМ; 470 нм).

В табл. 11 приведены оптимальные условия проведения реакций окисления ГК и *о*-ХФ в присутствии ИЖ. Благодаря использованию ИЖ вместо полярных молекулярных растворителей, стало возможным проведение изученных катализируемых пероксидазами реакций в присутствии значительно бóльших содержаний ионного органического растворителя в индикаторной системе (60 об.% и выше), при которых катализ в присутствии молекулярных растворителей отсутствовал (табл. 9).

Таблица 11. Оптимальные условия проведения реакций окисления ГК и *о*-ХФ *трет*-бутилгидропероксидом, катализируемых ПС (I) и ПХ (II), в присутствии ИЖ

Среда (об. %)	Концентрация		
	Фермент, нМ	*t*-BuOOH, мМ	Фенольный субстрат, мМ
ГК – *t*-BuOOH			
[BMPy][BF_4] – 0.05 М 2,4,6-коллидин – HCl, pH 7.0 (60:40)	60 (I)	145	1
[BMIm][BF_4] – 0.05 М имидазол – HCl, pH 7.0 (80:20)	45 (I)	170	3
***о*-ХФ – *t*-BuOOH**			
[BMIm][BF_4] – 0.1 М МЭС-КОН буферный раствор, pH 5.5 (70:30)	200 (II)	50	0.4

Сравнительный анализ кинетики пероксидазного окисления ГК и о-ХФ в водной и смешанных средах. Введение в реакционную смесь полярных апротонных органических растворителей (например, ДМСО, ацетонитрила) и ИЖ приводило к изменению эффективности катализа с участием растительных пероксидаз по сравнению с таковой в водной среде (табл. 12).

В среде 25 об.% ДМСО или 20 об.% ацетонитрила ГК эффективнее превращается ПС, чем ПХ, в то время как в водной среде ситуация противоположная.

Как и в случае ГК, в присутствии 40 об.% ДМСО или 30 об.% ацетонитрила *о*-ХФ *является наилучшим субстратом для ПС, но не для ПХ. Однако в среде 20 об.%* этанола обе пероксидазы в реакции превращения *о*-ХФ ведут себя одинаково.

Таблица 12. Эффективность катализа ($k_{эфф}$) ПХ (I) и ПС (II) в реакциях окисления ГК и *о*-ХФ в водной и смешанных средах в рамках упрощенной схемы «пинг-понг» механизма (оптимальные условия табл. 9 и 11)

Субстрат	$k_{эфф}\times10^{-4}$, $M^{-1}\times c^{-1}$							
	H_2O		ДМСО		Ацетонитрил		ДМФА	
	I	II	I	II	I	II	I	II
ГК	8.52	0.91	0.13	0.28	0.11	0.22	Не изучено	
о-ХФ	43.3	10.4	0.78	9.8	0.69	3.9	0.69	-[a]
Субстрат	1,4-Диоксан		Этанол		[BMIm][BF_4]		[BMPy][BF_4]	
ГК	Не изучено		Не изучено		-	0.26	-	0.22
о-ХФ	0.78	-	11.7	11.2	0.88	-	-	-

[a] нет возможности для расчета констант.

В 30 об.% [BMIm][BF_4] *о*-ХФ в присутствии ПС не окисляется, в то время как катализ ПХ в этой среде характеризуется величинами $k_{эфф}$, сравнимыми с таковыми для сред вода-молекулярный органический растворитель. Эффективность превращения ГК в средах [BMIm][BF_4] и [BMPy][BF_4] сопоставима с таковой в смесях воды с ДМСО или ацетонитрилом, однако содержание последних в 3-4 раза ниже по сравнению с ИЖ.

Важно отметить, что если в водной среде использование пероксидазы хрена для превращения обоих субстратов предпочтительнее пероксидазы сои, то в смешанных средах целесообразнее применять соевый фермент. В ионных жидкостях выбор фермента определяется природой субстрата-восстановителя.

Строгой корреляции относительной каталитической активности растительных пероксидаз с характеристиками изученных водно-органических реакционных сред (показателями их преломления, динамической вязкостью), а также с параметрами *полярности и гидрофобности молекулярных органических растворителей* и гидрофильных ИЖ не обнаружили. Тем не менее, для выбора «дружелюбного» по отношению к пероксидазе апротонного молекулярного растворителя и гидрофильной ИЖ для превращения субстратов фенольной природы параметр гидрофобности растворителя нам представляется наиболее адекватной характеристикой.

Ферментативное определение ГК и о-ХФ в водных и водно-органических средах разного состава. В оптимизированных условиях окисления ГК и *о*-ХФ *трет*-бутилгидропероксидом (табл. 9 и 11) разработали методики их определения в среде полярных молекулярных органических растворителей и ИЖ (табл. 13).

Применение ПС в реакции превращения *о*-ХФ позволяет определять его с большей чувствительностью в присутствии ДМСО и ацетонитрила (шире ДОК и выше коэффициент чувствительности, чем в присутствии ПХ). Выбор ПС в качестве оптимального биокатализатора реакции окисления ГК оправдан только более широкими ДОК по сравнению с методикой в присутствии ПХ. Применение

[BMIm][BF_4], а в случае окисления ГК и [BMPy][BF_4], позволяет незначительно понизить $c_н$ фенольных соединений, при этом их ДОК остаются такими же (табл. 13, выделенные ряды), как и в присутствии молекулярных органических растворителей. Для определения ГК и *о*-ХФ на уровне их концентраций 10^{-6} – 10^{-5} М индикаторные реакции рекомендуется проводить в водной среде, а для бóльших концентраций (на уровне 10^{-4} – 10^{-3} М) – в водно-органической. Для определения фенольных субстратов оптимальными являются среды вода – ДМСО (фермент – ПС) и вода – [BMIm][BF_4] (фермент – ПС и ПХ для определения ГК и *о*-ХФ соответственно).

Таблица 13. Аналитические характеристики методик определения ГК и *о*-ХФ в водной и водно-органической средах с использованием ПХ (I) и ПС (II) (n=3, P= 0.95)

Среда (об.%)	Фермент	ДОК, мМ	a^a	$\pm\Delta a$	b	$\pm\Delta b$	r	s_r при $c_н$
			мин$^{-1}$		мкМ×мин$^{-1}$			
ГК								
Вода	I	0.02 – 0.15	43	5	0.1	0.5	0.998	0.04
	II	0.1 – 0.5	5.1	0.8	0.1	0.2	0.991	0.04
ДМСО (25)	I	0.1 – 1.5	4.9	0.9	0.2	0.5	0.995	0.06
	II	**0.2 – 3.6**	**1.3**	**0.3**	**0.5**	**0.4**	**0.993**	**0.05**
Ацетонитрил (20)	I	0.2 – 0.9	4.0	0.3	-0.03	0.2	0.998	0.04
	II	0.5 – 9.0	0.8	0.1	0.4	0.4	0.993	0.04
[BMIm][BF_4] (80)	**II**	**0.1 – 3**	**2.8**	**0.6**	**1**	**1**	**0.985**	**0.06**
[BMPy][BF_4] (60)	**II**	**0.05 – 1**	**8**	**4**	**0.4**	**1**	**0.967**	**0.06**
***о*-ХФ**								
Вода	I	0.003 – 0.03	34	3	1.0	0.5	0.966	0.05
	II	0.003 – 0.1	22	2	3.6	0.9	0.968	0.08
ДМСО (40)	I	0.02 – 0.5	13	1	1.5	0.9	0.988	0.04
	II	**0.003 – 0.04**	**24**	**3**	**3.2**	**0.5**	**0.961**	**0.04**
Ацетонитрил (25)	I	0.02 – 0.6	10	1	4.2	2.3	0.968	0.06
Ацетонитрил (30)	**II**	**0.003 – 0.07**	**15**	**1**	**1.1**	**0.2**	**0.993**	**0.05**
[BMIm][BF_4] (70)	**I**	**0.01 – 0.3**	**11**	**1**	**1.0**	**0.7**	**0.982**	**0.07**

$^a y = (a \pm \Delta a)\, x + (b \pm \Delta b)$, где y – V, мкМ×мин$^{-1}$; x – концентрация ГК или *о*-ХФ, мМ.

Разработанные ферментативные методики определения ГК апробированы в анализе фармацевтического препарата «Гваяфен №3», применяемого в стоматологии. Это лекарственное средство представляет собой ограниченно растворимую в воде маслянистую жидкость, содержащую помимо ГК фенол, формальдегид и дексаметазон. Показано, что фенол и формальдегид не влияют на результаты определения ГК. Результаты ферментативного определения ГК в средах вода – ДМСО и вода – [BMIm][BF_4] представлены в табл. 14.

Проведенные исследования показали возможность использования ионной жидкости [BMIm][BF_4] для ферментативного определения ГК в жидких фармацевтических препаратах, ограниченно смешивающихся с водой.

Таблица 14. Результаты ферментативного определения ГК в средах ДМСО – вода и [BMIm][BF_4] – вода, полученные методом градуировочного графика (I) и методом добавок (II) ($n = 5$, $P = 0.95$)

Среда	Метод	a	$\pm\Delta a$	b	$\pm\Delta b$	Найдено гваякола, г на 100 г	
		$10^{-3}\times$мин$^{-1}$		мкМ×мин$^{-1}$			
Вода –ДМСО (75:25 об.%)	I	2.2	0.3	0.3	0.4	49 ± 4	Паспортное содержание
	II	4.4	0.7	0.8	0.3	41 ± 3	
H_2O – [BMIm][BF_4] (20:80 об.%)	II	4.0	0.8	1.5	0.7	31 ± 2	30

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения гидрофильных ИЖ, главным образом [BMIm][BF_4], как альтернативы полярным молекулярным органическим растворителям в катализируемых ПХ и ПС реакциях превращения их фенольных субстратов. Несмотря на то, что использование ИЖ не позволило существенно улучшить аналитические характеристики ферментативных методик определения фенольных соединений по сравнению с характеристиками методик в присутствии молекулярных полярных растворителей, важным итогом исследования является выявленная «дружелюбность» ИЖ по отношению к нативным пероксидазам, возможность регулирования эффективности и селективности пероксидазного окисления фенольных субстратов путем варьирования природы катиона ИЖ. Это открывает возможности дальнейшего использования гидрофильных ИЖ (пока ещё относительно дорогих растворителей) в катализируемых пероксидазами реакциях превращения и определения их малорастворимых субстратов (например, серосодержащих органических соединений, фенилфенолов), в сенсорных технологиях при создании биочувствительных материалов как основы оптических и электрохимических биосенсоров. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования пероксидазы сои вместо пероксидазы хрена в ферментативных методах анализа водно-органических растворов.

ВЫВОДЫ

1. На основе выявленного стимулирующего действия гормона T_4 и 4-аминоантипирина на скорость реакций превращения средне окисляемых субстратов пероксидаз хрена и сои – допамина, адреналина, а также α-метилдопы, предложены индикаторные системы для их ферментативного определения ***в водной среде***: допамин (адреналин) – T_4 – H_2O_2, α-метилдопа – 4-аминоантипирин – H_2O_2. Определение добутамина возможно без применения специальных приемов повышения скорости индикаторной реакции. Показано, что для определения катехоламинов целесообразнее использовать пероксидазу хрена.

2. С применением предложенных индикаторных систем разработаны чувствительные, простые и экспрессные ферментативные методики определения ***в водной среде*** добутамина, адреналина, допамина и α-метилдопы в диапазонах их

концентраций 5 – 20, 1 – 200, 0.5 – 300 и 10 – 100 мкМ соответственно. Разработанные методики превосходят известные спектрофотометрические по чувствительности в 5 раз, а по экспрессности в 2 – 4 раза (время анализа 15 – 20 мин). Методики успешно применены в анализе твердых и жидких лекарственных форм фармацевтических препаратов.

3. В результате изучения пяти ферментативных и одной неферментативной индикаторных систем показано, что для определения ***в водной среде*** эндопероксидов артемизинина и 1,2,4,5-тетраоксана целесообразно использовать системы: HCl – H_2O_2 – I^- и *о*-дианизидин – пероксидаза хрена – H_2O_2 соответственно. Разработана неферментативная методика определения 0.15 – 1 мМ артемизинина; показана принципиальная возможность ферментативного определения 0.2 – 0.6 мМ 1,2,4,5-тетраоксана.

4. В результате сравнительного изучения кинетики катализируемых пероксидазами хрена и сои реакций окисления *трет*-бутилгидропероксидом гваякола и *о*-хлорфенола в присутствии N,N-диметилформамида, 1,4-диоксана, ацетонитрила и ДМСО выбраны оптимальные биокатализатор (пероксидаза сои) и полярные молекулярные растворители (ацетонитрил и ДМСО), при использовании которых оба фенольных субстрата окисляются наиболее эффективно.

5. Проведение индикаторных реакций окисления гваякола и *о*-хлорфенола в присутствии гидрофильных ионных жидкостей – тетрафторборатов 1-бутил-3-метилимидазолия ([BMIm][BF_4]) и N-бутил-4-метилпиридиния ([BMPy][BF_4]) – вместо ДМСО, ацетонитрила и других полярных молекулярных растворителей обеспечивает сохранение 20 – 30 % ферментативной активности при высоких (60 – 80 об.%) содержаниях ИЖ в системе. В присутствии более 40 об.% ДМСО, ацетонитрила и других растворителей пероксидазы хрена и сои не катализируют окисление фенольных субстратов.

6. Выявлена зависимость эффективности превращения гваякола и *о*-хлорфенола пероксидазами в присутствии изученных гидрофильных ионных жидкостей от источника фермента, природы субстрата-восстановителя, а также природы катиона ионной жидкости и буферного водного раствора как её сорастворителя. Наиболее активным ферментом в реакции окисления гваякола в присутствии обеих ионных жидкостей является пероксидаза сои. При высоких (70 об.%) содержаниях [BMIm][BF_4] пероксидаза хрена окисляет *о*-хлорфенол в 4 раза эффективнее, чем пероксидаза сои. В среде [BMPy][BF_4] превращение *о*-хлорфенола не катализирует ни тот, ни другой фермент. Оптимальными буферными системами при окислении гваякола и *о*-хлорфенола в присутствии 80 и 70 об.% [BMIm][BF_4] являются соответственно 0.05 М имидазол – HCl с pH 7.0 и 0.1 М 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота – KOH с pH 5.5.

7. С использованием пероксидазы сои разработаны методики определения гваякола в средах **вода-ДМСО** (75:**25** об.%) и **вода-ацетонитрил** (80:**20** об.%) с $c_н$ 0.2 и 0.5 мМ,

а также **вода-[BMIm][BF_4]** (20:80) и **вода-[BMPy][BF_4]** (40:60) с $c_н$ 0.1 и 0.05 мМ соответственно ($s_r \leq 0.06$, $n=3$). Возможность практического использования предложенных ферментативных методик продемонстрирована на примере анализа ограниченно растворимого в воде стоматологического препарата «Гваяфен №3». С применением пероксидаз хрена и сои разработаны методики определения *о*-хлорфенола с $c_н$ 3 – 7 мкМ в **водно-органических средах** при их оптимальных составах и в присутствии 70 об.% [BMIm][BF_4].

Основные результаты диссертационной работы изложены в следующих статьях:

1. *Поляков А.Е., Яблоцкий К.В., Мугинова С.В., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н.* Ферментативное определение допамина в фармацевтических препаратах. // Зав. Лаб. Диагностика материалов. 2009. № 12. С. 18 – 23.
2. *Мугинова С.В., Галимова А.З., Поляков А.Е., Шеховцова Т.Н.* Ионные жидкости в ферментативном катализе и биохимических методах анализа: возможности и перспективы. *Обзор.* // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. № 4. С. 341–362.
3. *Muginova S.V., Galimova A.Z., Poliakov A.E., Shekhovtsova T.N.* Hydrophilic ionic liquids as novel reaction media for the determination of guaiacol using horseradish and soybean peroxidases. // Mendeleev Commun. 2011. V. 21. P. 97 – 98.
4. *Poliakov A.E., Dumshakova A.V., Muginova S.V., Shekhovtsova T.N.* A peroxidase-based method for the determination of dopamine, adrenaline, and α-methyldopa in the presence of thyroid hormones in pharmaceutical forms. // Talanta. 2011. V. 84. P. 710 – 716.
5. *Poliakov A.E., Muginova S.V., Shekhovtsova T.N.* Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations. *Review.* // Curr. Top. Anal. Chem. 2011. V. 8. P. 51 – 75.

тезисах докладов:

1. *Polyakov A.E., Muginova S.V., Shekhovtsova T.N.* Application of stimulatory effect of L-thyroxine and related compounds in the reactions of peroxidases oxidation of catecholamines for their determination. International Conference Chimia 2009. Constanta, Romania. 2009, May 13 – 16. P. 46.
2. *Мугинова С.В., Галимова А.З., Поляков А.Е., Шеховцова Т.Н.* Роль природы и состава реакционной среды — водной, водно-органической и ионных жидкостей — при определении субстратов и эффекторов щелочных фосфатаз и пероксидаз. Аналитика России-2009. Краснодар, 2009, 27 сентября – 3 октября. С. 144.
3. *Veselova I.A., Muginova S.V., Kireyko A.V., Polyakov A.E., Shekhovtsova T.N.* Determination of catecholamines and phenothiazanes using the effect of substrate-substrate activation in the reactions catalyzed by horseradish peroxidase. International conference «Biocatalysis-2009: Fundamentals and Applications». Arkhangelsk, 2009, June 12 – 24, P. 92.
4. *Muginova S.V., Polyakov A.E., Sharapova V.Yu., Shekhovtsova T.N.* Determination of phenolic substrates of plant peroxidases in water miscible ionic liquids and polar organic solvents. EUROANALYSIS-2009. Innsbruck, Austria. 2009, September 6 – 10. P127-B1.
5. *Мугинова С.В., Веселова И.А., Поляков А.Е., Олейник Л.И., Шеховцова Т.Н.* Ферментативные методы определения катехоламинов и фенольных соединений в

готовых жидких и мягких лекарственных формах. I Всероссийская конференция «Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции». Москва. 2009, 1 – 4 декабря. С. 199-200.

6. *Muginova S., Veselova I., Polyakov A., Yablotskiy K., Shekhovtsova T.* Enzymatic determination of catecholamines: various approaches to enhancing sensitivity. Isranalytica 2010. Tel-Aviv, Israel. 2010, January 19 – 20. P. 120.
7. *Поляков А.Е., Шарапова В.Ю., Мугинова С.В., Шеховцова Т.Н.* Гидрофильные ионные жидкости и полярные органические растворители в ферментативных методах определениях фенольных соединений. Конференция «Аналитическая химия – новые методы и возможности». Клязьма. 2010. 26 – 30 апреля. С. 229.
8. *Мугинова С.В., Веселова И.А., Яблоцкий К.В., Поляков А.Е., Шеховцова Т.Н.* Ферментативное определение катехоламинов в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях. Материалы семинара «Химический анализ медицинских объектов» в рамках выставки «Аналитика ЭКСПО-2011» Москва, 2011, 26 – 29 апреля. С. 30 – 34.
9. *Muginova S.V., Poliakov A.E., Myasnikova D.A., Shekhovtsova T.N.* Application of hydrophilic ionic liquids for the reactions catalyzed by plant peroxidases, native and encapsulated in a cellulose matrix. «Biomaterials and bionanomaterials: Recent advances and safety – toxicology issues». Heraklion, Crete, Greece. 2011, May 5 – 12. P. 43.
10. *Muginova S., Poliakov A., Myasnikova D., Shekhovtsova T.* Novel aspects of the application of water-miscible ionic liquids in catalysis by plant peroxidases: formation of the reaction media and supporting material for the enzyme immobilization. «EUROANALYSIS-2011». Belgrade, Serbia. 2011, September 11 – 15. BC21.
11. *Poliakov A., Petrova D., Muginova S., Shekhovtsova T.* Novel approaches to kinetic determination of antimalarial compounds. «EUROANALYSIS-2011». Belgrade, Serbia. 2011, September 11 – 15. P. 34.

Автор выражает искреннюю благодарность проф. Т.Н. Шеховцовой и сотрудникам лаборатории кинетических методов анализа за постоянное внимание и помощь в обсуждении результатов; д.х.н. А.А. Формановскому и к.х.н. Г.В. Колесникову за синтез ионных жидкостей; д.х.н., вед.н.с. А.О. Терентьеву (ИОХ РАН им. Н.Д. Зелинского) за предоставленный препарат 1,2,4,5-тетраоксана; д.х.н. С.А. Еремину за образцы гормонов T_4 и T_3; д.х.н. А.В. Пирогову и к.х.н. Е.Б. Пашковой за определение катехоламинов методом ВЭЖХ-МС; Е.А. Кочновой за проведение масс-спектрометрических исследований; к.х.н. Д.С. Косякову, к.х.н. Н.Л. Иванченко, а также стажеру М.В. Панфиловой и аспиранту А.В. Ладесову за помощь в проведении эксперимента в САФУ г. Архангельска; д.х.н. Л.Г Томиловой за предоставление роторного испарителя для высушивания ионных жидкостей; д.фарм.н. Е.И. Калениковой за организацию рефрактометрических измерений.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (госконтракты: №П868 от 25.05.2010 и №П991 от 27.05.2010) и РФФИ (гранты: №07-03-00556а, №09-03-00823а).

Подписано в печать: 18.11.2011

Заказ № 6293 Тираж - 100 экз.
Печать трафаретная.
Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(499) 788-78-56
www.autoreferat.ru