

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей и неорганической химии

**РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ ТРИФЕНИЛАМИН-4-СУЛЬФОКИСЛОТЫ
ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ
ХРЕНА, АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 251 группы

направления 04.04.01 «Химия»

Институт химии

Москвичёвой Инны Сергеевны

Научный руководитель
профессор, д.х.н., доцент

Н.А. Бурмистрова

Зав. кафедрой:
д.х.н., доцент

Д.Г. Черкасов

Саратов 2018

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы: Химия ароматических аминов является хорошо изученной областью органической химии, что связано как с их широким практическим применением, так научной значимостью при изучении зависимостей строение-свойство. Ароматические амины играют существенную роль в развитии современных подходов химического анализа. Систематическое изучение реакционной способности, механизмов реакций ароматических аминов позволило разработать теоретические подходы к объяснению и предсказанию свойств этой группы соединений и реакций с их участием [1].

Среди реакций ароматических аминов интерес представляет их ферментативное окисление в присутствии оксидоредуктаз (пероксидазы, алкогольоксидазы), традиционно применяемые в различных форматах биохимического анализа [2-6]. В тоже время круг применяемых субстратов как правило ограничен о-дианизидином, о-фенилендиамином, о-толуидином и 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМБ), а их основным недостатком является неспецифическое окисление в присутствии различных окислителей [7].

Использование ди- и три-фениламинов для этих целей ранее не проводилось. В тоже время особенности электронного и пространственного строения молекул этой группы являются причиной высокой специфичности реакций окисления и устойчивости продуктов окисления [1]. Это открывает возможность улучшения аналитических характеристик методик иммуноферментного анализа [8]. Предварительные исследования показали, что наиболее перспективными реагентами для этих целей являются N-метилдифениламина и трифениламина [1].

Цель работы: изучение кинетических закономерностей протекания реакции окисления трифениламин-4-сульфоуксусной кислоты (ТФАСК) пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена (ПХ) в слабокислых растворах и оценка возможностей ее аналитического применения.

Для достижения поставленной цели в работе необходимо было решить следующие **задачи:**

- Проанализировать литературу в области реакций ферментативного окисления вторичных и третичных ароматических аминов;
- Изучить механизм реакции окисления трифениламин-4-сульфо кислоты пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена в слабокислых растворах и при включении реагента в полимерную матрицу;
- Исследовать влияние различных факторов: концентраций ПХ, H_2O_2 , ТФАСК, Ir(IV)/Rh(III) на скорость процесса окисления;
- Определить кинетические закономерности (v_{max} , $k_{\text{кат}}$ и K_m) реакций ферментативного окисления ТФАСК в присутствии Ir(IV) и Rh(III);
- Оценить возможность применения изученной реакции в создании методик для анализа ПХ в биосистемах;
- Провести оценку эффективности реакции окисления ТФАСК пероксидом водорода в определении ПХ в сопоставлении с другими субстратами.

Методы исследования. Для решения поставленных задач использовались методы электронной и ИК-спектроскопии.

Описание структуры работы. Представленная работа состоит из введения, двух частей (обзор литературы и экспериментальной части), выводов, инструктажа по технике безопасности и списка использованных источников. В тексте работы присутствуют рисунки и таблицы. Общий объем работы 60 страниц, включая 34 рисунка и 9 таблиц. Проанализировано 54 литературных источника.

Научная значимость работы:

- Изучен механизм реакции окисления трифениламин-4-сульфо кислоты пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена в слабокислых растворах и при включении реагента в полимерную матрицу;
- Исследовано влияние различных факторов: концентраций ПХ, H_2O_2 , ТФАСК, Ir(IV)/Rh(III) на скорость процесса окисления. Установлено стабилизирующее действие каталитически активной формы Ir(IV) и Rh(III) на окрашенный продукт ферментативного окисления ТФАСК;

- Определены кинетические закономерности (v_{\max} , $k_{\text{кат}}$ и K_m) реакций ферментативного окисления ТФАСК в присутствии Ir(IV) и Rh(III);
- Показана возможность применения изученной реакции в создании методик для анализа ПХ в биосистемах. Определены оптимальные условия ферментативной реакции окисления ТФАСК для определения ПХ в диапазоне до 0.1 нМ (раствор) и до 1 нМ/лунку (полимерная пленка);
- Проведена оценка эффективности реакции окисления ТФАСК пероксидом водорода в определении ПХ в сопоставлении с другими субстратами. Показана сопоставимость предлагаемой методики по ПО с ТМБ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой части (обзор литературы) представлены основные области применения реакций ферментативного окисления; рассмотрены ферменты, наиболее широко применяемые в ферментативных методах анализа [10,11]. Показаны основные достижения в изучении пероксидаз, выделенных из различных растительных источников [10], и создании новых методик с улучшенными аналитическими характеристиками по сравнению с методиками на основе ПХ [11-15].

Приведены примеры использования субстратов ПХ (фенол и его производные; 2,2-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6)-сульфоновая кислота (ABTS) и ароматические амины (о-дианизидин, N,N',N,N'-тетраметилбензидин (ТМБ), о-фенилендиамин, о-толуидин) в различных аналитических целях: определение ПХ, H₂O₂, фенолов, спиртов и др., создание тест-методик для анализа биологических жидкостей человека и т.д. [16-18].

Представлены данные исследований механизмов окисления ТМБ, о-дианизида, о-фенилендиамина [19], возможности активации/ингибирования процесса пероксидазного окисления данных субстратов [20-24], в результате чего становится возможным повысить чувствительность разрабатываемых методик.

Использование в качестве субстратов вторичных и третичных ароматических аминов предполагает возможность улучшения аналитических характеристик разрабатываемых методик в следствие электронного и пространственного строения молекул. Возможность улучшения аналитических характеристик изучаемых систем за счет введения каталитически активных форм переходных металлов (Pt(II), Pd(II), Rh(III), Ir (IV), и др) изучена на примере пероксидазного окисления МДФАСК [1].

Таким образом, анализ литературных данных показал, что реакция пероксидазного окисления трифениламин-4-сульфоокислоты ранее не изучалась.

Во **второй части** отражена информация о используемых реагентах, инструментах и методах исследования, представлены методики определения ПХ в слабокислых растворах и в полистирольных планшетах, рассмотрены результаты работы.

Реакция окисления ТФАСК пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена в слабокислых растворах

Установлено, что ТФАСК не окисляется пероксидом водорода в широком диапазоне кислотности среды. Однако одновременное присутствие пероксидазы хрена и перекиси водорода в слабокислых растворах ($1.0 \cdot 10^{-3}$ - $5.0 \cdot 10^{-5}$ М по H_2SO_4) приводит к окислению ТФАСК, о чем свидетельствует появление окрашенного продукта (рисунок 1).

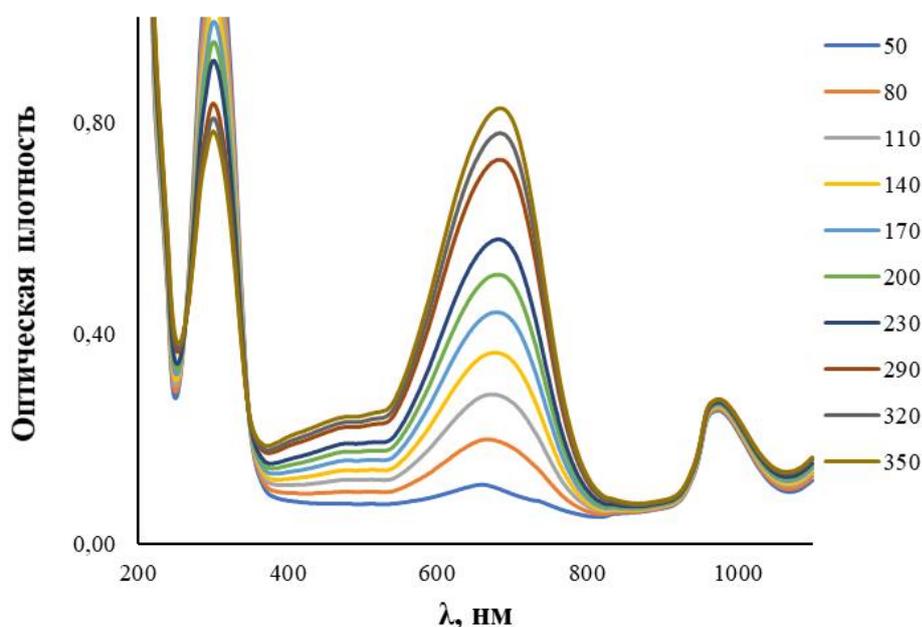


Рисунок 1 - Спектр поглощения ТФАСК, окисленного пероксидом водорода в присутствии ПХ, во времени: рН=5.0, $C_{\text{ТФАСК}} = 0.06$ мМ, $C_{\text{ПХ}} = 1.2$ нМ, $C_{H_2O_2} = 0.01$ М.

В результате окисления ТФАСК образуются сульфопроизводные катион-радикала $\text{ТФБ}^{\bullet+}$ или дикатиона ТФБ^{2+} (рисунок 2), что согласуется с известными закономерностями окисления ТФА (рисунок 3). Изучение трансформации спектра окисления ТФАСК позволяет предположить совместное существование

в растворе ТФАСК^{•+} (647 нм) и ТФБ²⁺ (λ=680 нм). Уменьшение концентрации катион-радикалов ТФАСК^{•+}, который участвует в процессах димеризации, приводит к смещению равновесия в сторону образования бесцветного катион-радикала тетрафенилбензидина ТФБ^{•+} (λ=480 нм) (рисунок 4).

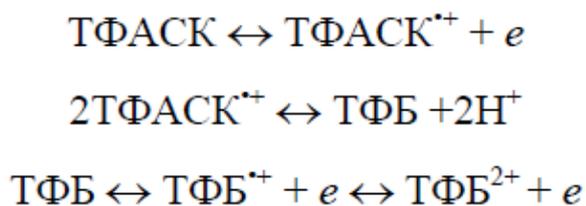


Рисунок 2 – Схематичное изображение пероксидазного окисления ТФАСК в присутствии пероксида водорода [1].

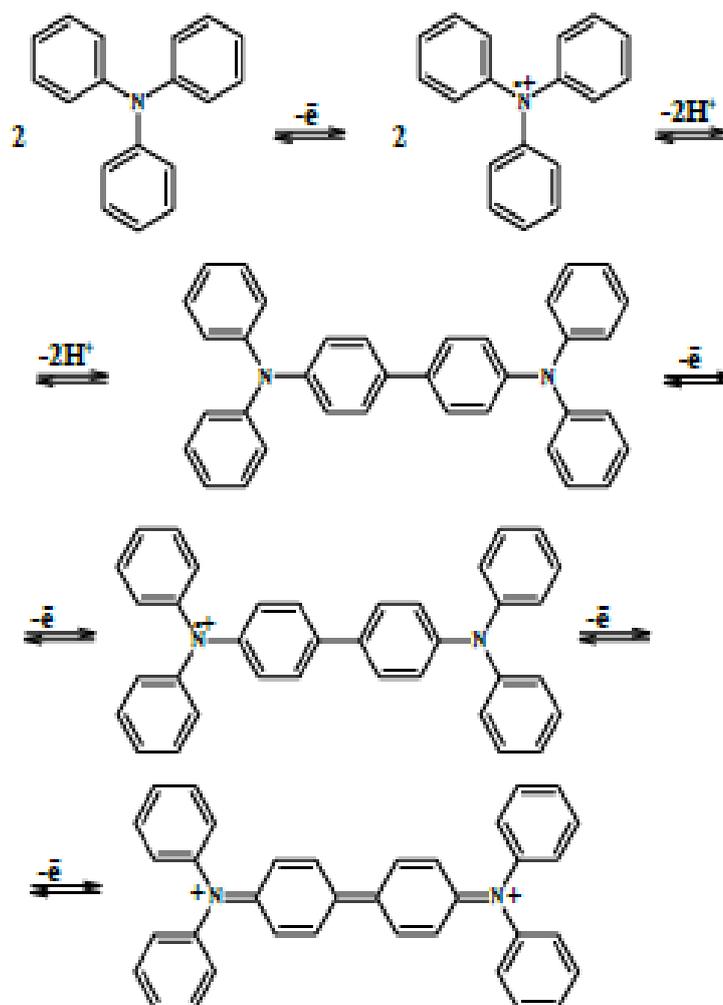


Рисунок 3 – Схема окисления ТФА [1].

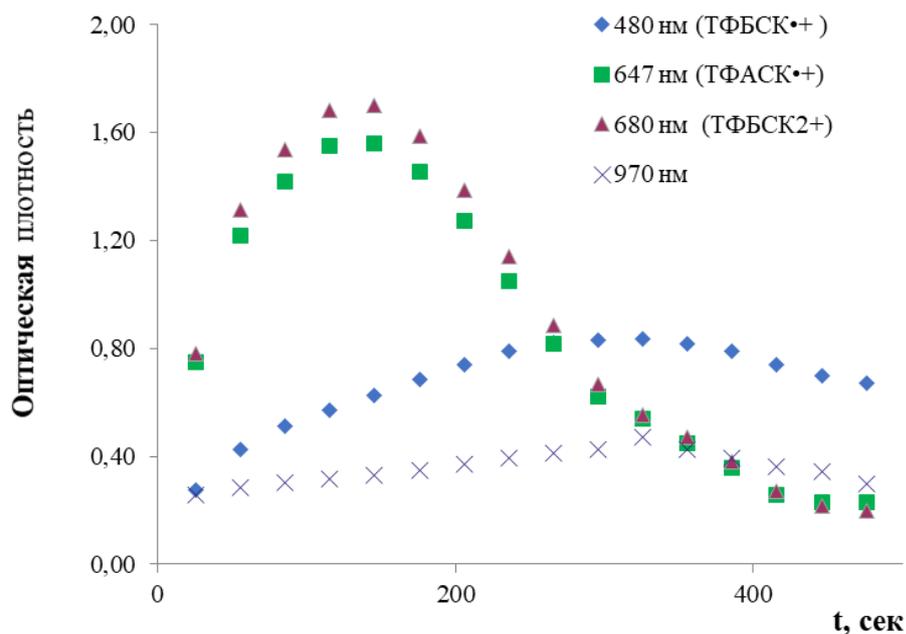


Рисунок 4 - Изменение оптической плотности при длинах волн, соответствующих окисленным формам: (1) ТФБСК²⁺ (680 нм), (2) ТФАСК^{•+} (647 нм), (3) ТФБСК^{•+} (480 нм): рН=5.0, С_{ТФАСК} = 0.18 мМ, С_{ПХ}=1.2 нМ, С_{Н₂О₂}=0.01 М.

Установлено, что скорость ферментативного окисления зависит от кислотности среды и концентраций реагирующих веществ (Н₂О₂, ПХ). Ярко окрашенные и устойчивые в течение 10 мин продукты окисления ТФАСК пероксидом водорода в присутствии ПХ удалось получить при концентрациях: 1.0·10⁻⁴ М Н₂SO₄, 1.0·10⁻² М Н₂О₂, 1.2 нМ ПХ.

Исследование процесса ферментативного окисления ТФАСК показало, что система характеризуется нестабильным сигналом во времени, что в свою очередь снижает ценность ее практического применения. В связи с этим изучена возможность стабилизации аналитического сигнала при введении в систему переходных металлов Ir(IV) и Rh(III), полученных термообработкой с хлорной кислотой.

Установлено (рисунок 5), что присутствие каталитически активных форм Ir(IV) и Rh(III) приводит к увеличению (~60%) интенсивности окраски продукта ферментативного окисления ТФАСК и его стабилизации.

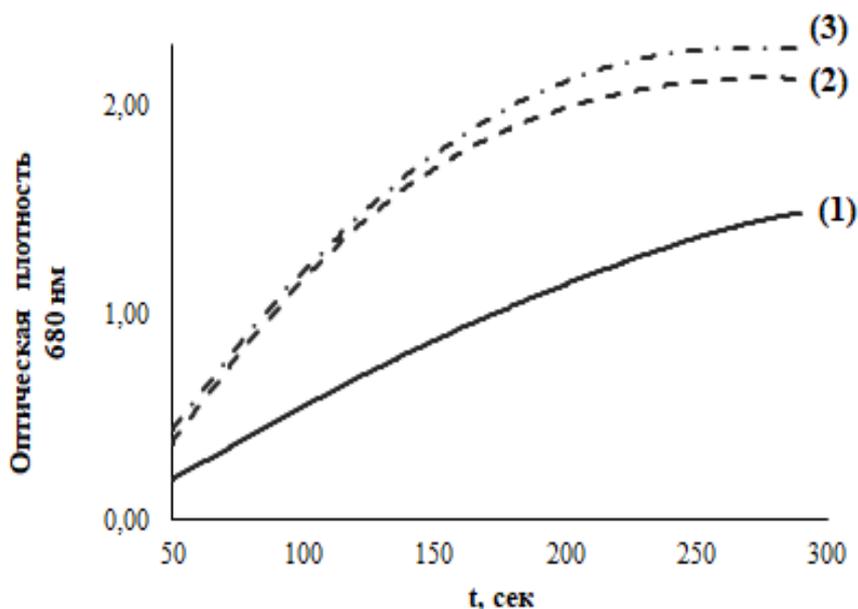


Рисунок 5 - Изменение оптической плотности, соответствующей окисленной форме ТФАСК в отсутствии и присутствии катализаторов: рН=5.0, $C_{\text{ТФАСК}} = 0.18$ мМ, $C_{\text{ПХ}} = 1.2$ нМ, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0.01$ М (1) катализатор отсутствует, (2) Ir(IV) = 0.20 мкМоль, (3) Rh(III) = 0.50 мкМ.

Для расчета кинетических характеристик реакции пероксидазного окисления ТФАСК при различных условиях проведения использовали модель Михаэлиса-Ментен.

В таблице 1 отражены значения v_{max} , $k_{\text{кат}}$ и K_m , определенные при разных концентрациях Ir(IV) и Rh(III). Полученные значения хорошо согласуются с литературными данными [23].

Таблица 1 - Кинетические характеристики пероксидазного окисления ТФАСК при 20°C в различной концентрации каталитически активной формы Ir(IV) и Rh(III)

C [Ir]/C[Rh]*, мМоль	V ₁ , x10 ⁵ М·с ⁻¹	K _m , x10 ⁴ М	k cat x10 ⁻⁴ с ⁻¹	α (k cat) x10 ⁴ М ⁻¹	α (K _m) x10 ⁴ М ⁻¹
0	0.005	0.1	0.4		
5.0·10 ⁻⁵	0.008	0.2	0.7	1.2	1.1
1.0·10 ⁻⁴	0.070	0.8	5.7	12.3	12.7
2.0·10 ⁻⁴	0.157	1.8	13.3	15.0	15.0
0	0.012	0.1	1.0		
5.0·10 ⁻⁴	0.100	0.9	8.5	15.0	13.0
5.0·10 ⁻³	0.187	1.0	15.8	3.0	3.0

Таким образом, установленная зависимость $k_{\text{кат}}$ и K_m от содержания каталитически активных форм Ir(IV) и Rh(III) показывает возможность улучшения аналитических характеристик реакции пероксидазного окисления ТФАСК (понижить ПО) и может быть использована при разработке методик определению ПХ в биосистемах.

Реакция окисления ТФАСК пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена при включении реагента в полимерные пленки

Структурные особенности ТФАСК позволили предположить возможность включения реагента в полимерные пленки, которая была изучена на примере оптически прозрачных и устойчивых в водных растворах пленок гидрогеля полиуретана.

Характеристики спектра поглощения окисленной формы ТФАСК в сенсорных пленках совпадают с характеристиками в растворе, что

свидетельствует об однотипности механизма окисления ТФАСК в растворе и при включении реагента в полимер.

Отмечено, что кислотность среды существенно влияет на стабильность окраски окисленной формы ТФАСК после реакции с H_2O_2 . Оптимальной концентрацией является $2.0 \cdot 10^{-5}$ М серной кислоты. Изменение концентрации H_2O_2 в диапазоне $2.5 \cdot 10^{-3}$ - $2.5 \cdot 10^{-4}$ М/лунку практически не влияет на аналитический сигнал и чувствительность определения ПХ.

Зависимость скорости ферментативного окисления ТФАСК от концентраций ПХ в диапазоне $1.0 \cdot 10^{-3}$ – $3.0 \cdot 10^{-1}$ нМ/лунку описывается уравнением прямой в диапазоне до $3 \cdot 10^{-2}$ нМ ПХ.

Таким образом, изучена реакция окисления трифениламин-4-сульфо кислоты пероксидом водорода при включении реагента в полимерную матрицу полиуретана. Оценено влияние концентраций ПХ, H_2O_2 на скорость процесса окисления. Определены оптимальные условия ферментативной реакции окисления ТФАСК для определения ПХ в диапазоне до $3.0 \cdot 10^{-2}$ нМ/лунку.

Аналитическое приложение реакции пероксидазного окисления ТФАСК пероксидом водорода

Наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации ПХ (коэффициент регрессии более 0.99) в оптимальных условиях и низкий ПО сопоставимый с другими известными методиками предполагает возможность применения изучаемой реакции окисления для определения ПХ в биосистемах.

Другим направлением применения данной реакции может быть возможность определения H_2O_2 при включении ТФАСК в сенсорную мембрану.

В таблице 2 суммированы аналитические характеристики разработанных методик.

Таблица 2 - Характеристики определения ПХ по реакции окисления ТФАСК пероксидом водорода

	Диапазон определения (ПО)				R ²
	ПХ, нМ/лунку*	H ₂ O ₂ , М	Ir(IV), М	Rh(III), М	
Раствор	1.0·10 ⁻¹ –5.0 (5.0·10 ⁻²)	1.0·10 ⁻³ -3.0·10 ⁻³ (6.0·10 ⁻⁴)	2.0·10 ⁻⁸ – 6.0·10 ⁻⁸ (5.0·10 ⁻⁹)	2.5·10 ⁻⁷ – 2.5·10 ⁻⁶ (6.0·10 ⁻⁸)	0.99
Микро- планшет*	1.0·10 ⁻³ – 3.0·10 ⁻¹ (4.0·10 ⁻⁴)	1.0·10 ⁻⁴ – 2.5·10 ⁻³ (3.0·10 ⁻⁵)	-	-	0.99

Проведена оценка эффективности применения реакции окисления ТФАСК для определения ПХ при ее сопоставлении с другими субстратами – АВТС и ТМБ. Данные показывают, что ПО ПХ с использованием разработанной методики уступает АВТС и сопоставим с ТМБ (таблица 3). В тоже время одним из недостатков использования АВТС является его высокая стоимость, кроме того, использование третичного амина предполагает большую селективность ТФАСК по сравнению с ТМБ.

Таблица 3 - Сравнительная характеристика субстратов в определении ПХ

Субстрат	АВТС	ТМБ	ТФАСК
ПО	1.0·10 ⁻¹²	2.0·10 ⁻¹¹	5.0·10 ⁻¹¹
Диапазон определения	5.0·10 ⁻¹² – 5.0·10 ⁻⁹	5.0·10 ⁻¹¹ – 5.0·10 ⁻⁹	1.0·10 ⁻¹⁰ – 5.0·10 ⁻⁹
Токсичность (индекс риска R)	36/37/38	36/38-36/37/38-22	36/37/38
Молярный коэффициент, М ⁻¹ см ⁻¹	3.6·10 ⁴	3.9·10 ⁴	6.7·10 ⁴
	Высокая цена	Возможность протекания неспецифических реакций	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведен анализ литературы, посвященный ферментативному окислению вторичных и третичных ароматических аминов, за последние 10 лет. Установлено, что изучение реакций ферментативного окисления производных трифениламина представляет интерес в плане аналитического применения в качестве селективных субстратов и ранее не проводилось.

2. Изучен механизм реакции окисления трифениламин-4-сульфоукислоты пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена в слабoкислых растворах и при включении реагента в полимерную матрицу.

3. Оценено влияние различных факторов: концентраций ПХ, H_2O_2 , ТФАСК, Ir(IV)/Rh(III) на скорость процесса окисления. Установлено стабилизирующее действие каталитически активной формы Ir(IV) и Rh(III) на окрашенный продукт ферментативного окисления ТФАСК.

4. Установлены кинетические закономерности (v_{max} , $k_{\text{кат}}$ и K_m) реакций ферментативного окисления ТФАСК в присутствии Ir(IV) и Rh(III).

5. Показана возможность применения предлагаемых методик для анализа ПХ в биосистемах и сопоставимость предлагаемой методики по ПО с ТМБ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бурмистрова Н.А. Ароматические амины: строение, окислительно-восстановительные свойства, новые аналитические решения. Дис. ... докт. хим. наук. - Саратов: Саратовский госуд. ун-т им. Н.Г. Чернышевского. - 2016 - 330 с.
2. Преснова Г.В., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена // Российск. хим. журн. (Журн. Российск. хим. общества им. Д.И. Менделеева). - 2008. - Т. 52, № 2. - С. 60-65.
3. Fornera S., Walde P. Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with *o*-phenylenediamine // Anal. Biochem. - 2010. - 407(2). - P. 293-295.
4. Григоренко Ю.А., Карасева Е.И., Метелица Д.И., Сорокин В.Л., Ксендзова Г.А., Шадыро О.И. Замещенные аминофенолы и флавоноиды – перспективные компоненты тест-систем общей антиоксидантной активности // Журн. Биомедицинская химия. - 2007. - 53(5). - С. 566-576.
5. Флюрик Е.А., Леонтьев В.Н., Буткевич О.Г., Чеушева М.В. Влияние тиолов на пероксидазную реакцию окисления *o*-дианизидина // Труды БГТУ. Серия IV. Химия, технология органических веществ и биотехнология. Выпуск XVIII. – 2010. – С.78-86.
6. Алпеева И.С. Анионные пероксидазы их применение в биоанализе: Дис. ... канд. хим. наук. - М: Моск. госуд. ун-т им. М.В. Ломоносова. - 2007. - 27 с.
7. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Триптофан как регулятор реакций пероксидазного окисления *o*-дианизидина и гидрохинона в присутствии пероксидазы хрена // Журн. Химия растительного сырья. - 2010. - 4. - С. 105-109.
8. Бурмистрова Н.А., Муштакова С.П. Квантовохимическое и ИК-спектрометрическое сульфопроизводных ди исследование - и трифениламинов // Изв. Саратов. ун-та. Серия Химия. Биология. Экология, вып. 1. - 2016. – 6. - С. 8-13.
9. Долманова И. Ф., Угарова Н. Н. Ферментативные методы анализа // Журнал аналитической химии. - 1980. – 35(8). - С.56-60.

10. Дзантиев Б.Б. Биохимические методы анализа. – Т.12 - М: Наука, 2010. - 391 с.
11. Википедия [Электронный ресурс]: свободная энциклопедия / текст доступен по лицензии Creative Commons Attribution-ShareAlike; Wikimedia Foundation, Inc, некоммерческой организации. URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%B4%D0%B0%D0%B7%D0%B0_%D1%85%D1%80%D0%B5%D0%BD%D0%B0 (дата обращения 19.05.2018)
12. Sakharov I. Yu. Palm Tree Peroxidases // J. Biochemistry. - 2004. – 69. - P. 823-829.
13. Caramyshev A. V., Evtushenko E. G., Ivanov V. F. Synthesis of Conducting Polyelectrolyte Complexes of Polyaniline and Poly(2-acrylamido-3-methyl-1-propanesulfonic acid) Catalyzed by pH-Stable Palm Tree Peroxidase // J. Biomacromolecules. - 2005. - 6. - P. 1360-1366.
14. Sakharov I. Yu., Berlina A. N., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Advantages of Soybean Peroxidase over Horseradish Peroxidase as the Enzyme Label in Chemiluminescent Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Sulfamethoxypyridazine // J. Agric. Food Chem. - 2010. - 58. - P. 3284–3289.
15. Vdovenko M. M., Vorobiev A. Kh., Sakharov I. Yu. Phenothiazine Derivatives as Enhancers of Peroxidase-Dependent Chemiluminescence // J. of Bioorganic Chemistry. - 2013. – 39. - P. 176–180.
16. Давиденко Т.И. Пероксидазное окисление фенолов. Журн. Прикладная биохимия и микробиология. - 2004. - 40. - с. 625-629.
17. Bagirova N.A., Shekhovtsova T.N., Van Huystee R.B. Enzymatic determination of phenols using peanut peroxidase // Talanta. - 2001. – 55. - С. 1151-1164.
18. Shekhovtsova T.N., Muginova S.V., Luchinina J.A., Galimova A.Z. Enzymatic methods in food analysis: determination of ascorbic acid // Anal. Chim. Acta. - 2006. – 57. - P. 125–132.

19. Кирейко А.В., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Механизм реакций пероксидазного окисления о-дианизидина, 3,3',5,5'-тетраметилбензидаина и о-фенилендиаминa в присутствии додецилсульфата натрия // Журн. Биоорганическая химия. - 2006. – 32. - С. 80-86.

20. Мигунова С.В., Веселова И.А., Парова Л.М., Шеховцова Т.Н. Ферментативное определение кадмия, цинка и свинца в растительных объектах // Журн. аналит. химии. - 2008. – 63. - С.1103-1113.

21. Григорьева Д.Л., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Определение ртути (II) с использованием пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на модифицированных силикагелях // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2: Химия. - 2003. – 44(3). - С. 178-182.

22. Наумчик И.В., Карасева Е.И., Метелица Д.И., Едимечева И.П. Ингибирование пероксидазного окисления 3,3',5,5' – тетраметилбензидаина аминофенолами // Журн. Биохимия. - 2005. – 70. - С. 397-405.

23. Карасева Е.И., Гапоник П.Н., Метелица Д.И. Влияние тетразола и его аминопроизводных на кинетику пероксидазного окисления хромогенных субстратов // Журн. Биоорган. Химии. - 2004. – 30. - С.316-323.

24. Мугинова С.В., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Кинетика и химизм реакций окисления о-фенилендиаминa, о-дианизидина, 3,3',5,5'-тетраметилбензидаина пероксидом водорода, катализируемых пероксидазой хрена, иммобилизованной на различных носителях // Журн. прикладной химии. - 1999. – 72. - С. 803-810.