МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Веселова Ирина Анатольевна

Оптические сенсорные системы на основе пероксидазы для определения органических биологически активных веществ

Специальность:

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва — 2018

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Официальные оппоненты:

Евтюгин Геннадий Артурович,
доктор химических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института имени А.М.Бутлерова

Дзантиев Борис Борисович,
доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунобиохимии Института биохимии имени А.Н. Баха ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Штыков Сергей Николаевич,
доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Защита диссертации состоится 14 ноября 2018 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.02.05 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.3, МГУ имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/136697573/.

Автореферат разослан «12» сентября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук Ананьева И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Создание сенсорных систем для определения биологически активных веществ в объектах окружающей среды, растительном сырье, продуктах питания, косметических и медицинских препаратах, биологических жидкостях является на сегодняшний день одной из самых динамично развивающихся областей биоаналитической химии.

По сравнению с традиционными аналитическими методами перспективность применения сенсорных устройств в практике химического анализа обусловлена такими их преимуществами, как экспрессность, экономичность, методическая простота, отсутствие необходимости привлечения высококвалифицированного персонала.

В научной литературе существующие сенсоры разделяют на две группы: физические (реагирующие на физические параметры измеряемой среды: давление, температуру, и т.д.) и химические (реагирующие на изменение качественного и количественного состава образца). В номенклатуре Международного союза по теоретической и прикладной химии (ИЮПАК) дано следующее определение биосенсора: «Биосенсор – это устройство, которое основано на биохимических реакциях с участием ферментов, антител, ДНК, органоидов или целых клеток, для определения химических соединений».

Наличие в устройстве специфических биологических компонентов перечисленных выше и некоторых других позволяет селективно определять актуальные аналиты в сложной по составу смеси, не прибегая к использованию вспомогательных реагентов, предварительному концентрированию и т. д.

Существующие ферментативные сенсоры как правило основаны на электрохимической регистрации аналитического сигнала и позволяют успешно определять органические соединения многих классов, в то время как созданию и развитию биосенсорных систем с оптическим (спектрофотометрическим и флуориметрическим) детектированием уделяется меньшее внимание.

При создании сенсорных устройств используют ферменты, которые катализируют превращение либо только одного какого-то соединения (примеры таких узко специфических ферментов крайне малочисленны), либо ряда близких по свойствам веществ.

На сегодняшний день наибольший практический интерес представляют ферменты, которые обдают достаточно широкой групповой специфичностью к разным по свойствам и строению соединениям. Таким ферментов является пероксидаза из корней хрена. Этот хорошо изученный коммерческий препарат занимает особую нишу в биоаналитической хи-

мии. К субстратам-восстановителям пероксидазы относятся амины, фенольные соединения и некоторые другие вещества, а в роли субстратов-окислителей могут выступать пероксиды различного строения.

К первым относятся многие важнейшие экотоксиканты, антиоксиданты природного и промышленного назначения, витамины, основные действующие вещества лекарственных препаратов; вторые могут исполнять роль маркеров качества пищевых, медицинских и косметических продуктов, являются фармацевтическим сырьем. Кроме того, как субстраты-восстановители, так и субстраты-окислители пероксидазы относятся к важнейшим маркерам различных социально-значимых заболеваний. Определение всех перечисленных классов соединений - важная задача химического анализа.

Основное требование, предъявляемое к любым химическим сенсорным системам, заключается в том, что отклик их чувствительного слоя должен быть пропорционален концентрации определяемого соединения (или нескольких соединений при их групповом определении). При этом компоненты матрицы анализируемого образца не должны оказывать влияние на результаты измерения аналитического сигнала. Однако, реальные объекты, которые, как правило, представляют наибольший аналитический интерес, имеют матрицы сложного, порой изменяющегося состава (например, растительное сырье, биологические жидкости), в том числе нерастворимые в воде (в частности, многие лекарственные вещества, косметические и медицинские препараты, пищевые продукты и т.д.). Компоненты этих матриц могут не только влиять на точность результатов измерения, но и значительно затруднять процедуру анализа. В связи с этим при анализе реальных объектов возникает потребность дополнительной подготовки проб к анализу с использованием токсичных или агрессивных органических растворителей, трудоемких стадий фильтрования и/или разделения, что существенно увеличивает время анализа, а также погрешность результатов измерений.

Перспективный подход к решению поставленных проблем заключается в создании сенсорных систем, основанных на формировании и измерении оптического (спектрофотометрического или флуоресцентного) сигнала не в анализируемом растворе, а непосредственно в чувствительном (распознающем) слое сенсорного устройства. В этой области автором настоящей работы в течение последних 15 лет получены оригинальные результаты, и есть все основания полагать, что внедрение оптических сенсорных систем нового типа в аналитическую практику позволит расширить возможности ферментативных методов и химического анализа в целом.

Цель работы состоит в создании новых универсальных оптических сенсорных устройств, схем анализа, индикаторных систем на основе пероксидазы для определения органических биологически активных веществ в объектах различного происхождения со сложными состава матрицами без предварительной или минимальной подготовки проб к анализу.

Для достижения поставленной цели требовалось решить **следующие задачи**:

- создать высокоактивный, оптически прозрачный, однородный по структуре и размерам биочувствительный (распознающий) слой на основе комплексов пероксидазы из корней хрена с полиэлектролитами, стабильный как при хранении, так и в процессе эксплуатации в водных и водно-органических средах – основу спектрофотометрических и флуоресцентных сенсорных систем для определения биологически активных соединений (фенольных соединений, пероксидов различного строения, фенотиазинов);
- в целях создания сенсорных систем для определения биологически активных веществ – субстратов пероксидазы, разработать оптическое сенсорное устройство на основе биочувствительного слоя пероксидаза – хитозан; предложить схемы проведения анализа и регистрации аналитического сигнала (спектрофотометрического и/или флуоресцентного) непосредственно в распознающем слое, адаптированные под серийные спектрофотометры и флуориметры;
- предложить оригинальные твердофазные спектрофотометрические и флуоресцентные индикаторные реакции для определения фенольных соединений, пероксидов и фенотиазинов в водных, водно-органических и мицеллярных средах в целях проведения анализа в объектах с матрицей сложного состава (в том числе нерастворимой в воде) без предварительной (или минимальной) пробоподготовки;
- на основе созданных спектрофотометрического и флуоресцентного сенсорных устройств и предложенных индикаторных реакций разработать методики определения фенольных соединений, пероксидов и фенотиазинов и продемонстрировать их аналитические возможности в анализе разных по природе и составу объектов.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- В результате целенаправленного подбора природы полимеров – различных полисахаридов, pH, ионной силы и природы буферного раствора, детального изучения их многофакторного влияния на свойства пероксидазы из корней хрена нами создан однородный по своей структуре и размерам комплекс этого фермента с хитозаном. Отличительными особенностями комплекса являются чрезвычайно высокая каталитическая

активность (в два раза б**о**льшая по сравнению с нативным биокатализатором), а также стабильность как при хранении, так и в процессе эксплуатации в водных и водно-органических средах.

- Предложено сенсорное устройство на основе оптически прозрачного биочувствительного слоя пероксидаза – хитозан, закрепленного на кварцевой стеклянной пластинке, способное функционировать в водных, водно-органических и мицеллярных средах.
- Разработаны оригинальные схемы проведения анализа и твердофазной регистрации аналитического сигнала непосредственно в биораспознающем слое, адаптированные под серийные спектрофотометры и флуориметры в целях создания оптических сенсорных систем для определения актуальных аналитов – субстратов пероксидазы.
- Предложена твердофазная спектрофотометрическая индикаторная реакция, основанная на взаимодействии хитозана с продуктом ферментативного окисления фенольного соединения – хиноном по механизму присоединения Михаэля, позволяющая определять фенольные соединения и пероксиды различного строения (на уровне их микромолярных содержаний) в водных, водно-органических и мицеллярных средах, в том числе в непрозрачных и неоднородных растворах.
- Разработана спектрофотометрическая индикаторная реакция для высокочувствительного и селективного определения некоторых соединений фенотиазиного ряда в водно-органических экстрактах и плазме крови без предварительной дополнительной подготовки проб к анализу по их специфическому активирующему действию (эффекту субстрат-субстратной активации) на скорость реакции окисления *о*-дианизидина пероксидом водорода в присутствии пероксидазы.
- Предложены твердофазные флуоресцентные индикаторные реакции, основанные на взаимодействии продуктов пероксидазного окисления фенольных соединений с хитозаном, меченным флуоресцентной меткой изотиоцианатом родамина Б по уменьшению интенсивности флуоресценции – косвенное определение; дериватизации продуктов ферментативного окисления фенольных соединений *о*-фенилендиамином, этилендиамином для прямого определения фенольных соединений и пероксидов в водных, водно-органических и мицеллярных средах, в том числе в непрозрачных и неоднородных растворах, объектах со сложной изменяющейся матрицей (биологических жидкостях).

Практическая значимость работы состоит в следующем:

- Создано оптическое сенсорное устройство, основанное на формировании и измерении спектрофотометрического или флуоресцентного сигнала не в анализируемом растворе, а в чувствительном слое пероксидаза-хитозан, способное функционировать в водных, водно-органических

и мицеллярных средах; а также анализировать непрозрачные и неоднородные растворы, объекты со сложной изменяющейся матрицей (биологические жидкости) без предварительной (или минимальной) пробоподготовки.

- Разработаны методики определения водорастворимых (фенола, гидрохинона, пирокатехина, пирогаллола, резорцина) и ограниченно растворимых в воде фенольных соединений (кверцетина, рутина, эскулетина); а также пероксида водорода, мочевины, бензоилпероксида, *2*-бутанонпероксида и *трет*-бутилгидропероксида на уровне их концентраций 10-1000 мкМ с использованием твердофазной спектрофотометрической индикаторной реакции, основанной на взаимодействии хитозана с продуктом ферментативного окисления фенольного соединения – хиноном по механизму присоединения Михаэля.
- Предложены методики высокочувствительного и селективного определения некоторых соединений фенотиазиного ряда (промазина, хлорпромазина и трифторперазина) в диапазонах их концентраций 0,02 – 0,1; 0,05 – 0,4; 0,09 – 0,7 мкМ в водно-органических экстрактах и плазме крови без предварительной дополнительной подготовки проб к анализу по их специфическому активирующему действию (эффекту субстрат-субстратной активации) на реакцию окисления *о*-дианизидина пероксидом водорода в присутствии пероксидазы.
- Разработаны методики определения дигидроксифенолов (пирокатехина, резорцина, гидрохинона) и катехоламинов (допамина, адреналина) в диапазоне их концентраций 0,5 – 25 мкМ и 5 – 150 мкМ, соответственно, с использованием флуоресцентной сенсорной системы на основе пероксидазы, иммобилизованной в пленке хитозана, меченного флуоресцентной меткой (косвенное определение).
- Разработаны методики определения замещенных *о*-дигидроксифенольных соединений – катехоламинов (допамина, адреналина) и их метаболитов (гомованилиновой и ванилилминдальной кислот) в диапазонах их концентраций 0,1 – 5 мкМ и 5 – 250 нМ, соответственно, на основе прямой флуоресцентной сенсорной системы в присутсвии *о*-фенилендиамина, иммобилизованного в пленке хитозана.
- Предложены методики определения пероксида мочевины, *2*-бутанонпероксида, бензоилпероксида и *трет*-бутилгидропероксида на уровне их концентраций 10 – 2500 мкМ с использованием косвенной и прямой флуоресцентных сенсорных систем на основе биочувствительного слоя пероксидаза-хитозан.

Положения, выносимые на защиту:

- Подходы к созданию высокоактивных, однородных по структуре и размерам комплексов пероксидазы с полиэлектролитами, стабильных при хранении и в процессе эксплуатации в водных, водно-органических и мицеллярных средах как основы оптических сенсорных систем для определения биологически активных соединений – субстратов пероксидазы.
- Принципы создания универсальных сенсорных устройств на примере комплекса пероксидаза-хитозан, адаптированных под различное серийное оборудование – спектрофотометры и флуориметры, основанных на формировании и измерении аналитического сигнала оптическими методами не в анализируемом растворе, а в биочувствительном (распознающем) слое.
- Твердофазные спектрофотометрические и флуоресцентные индикаторные реакции для определения субстратов пероксидазы - фенольных соединений, пероксидов различного строения, фенотиазинов в водных, водно-органических и мицеллярных средах, в том числе в непрозрачных и неоднородных растворах, со сложной изменяющейся матрицей (биологических жидкостях); подходы к их разработке.
- Способы повышения чувствительности, расширения круга определяемых веществ и анализируемых объектов в результате детального подбора состава водно-органического или мицеллярного раствора реакционной смеси – создания дизайна среды.
- Методики определения фенольных соединений различного строения, неорганических и органических пероксидов, фенотиазинов и результаты их апробации в анализе косметических, фармацевтических, пищевых объектов с матрицами сложного состава (мутными, окрашенными, нерастворимыми в водных растворах), биологических жидкостях без предварительной (или минимальной) подготовки проб к анализу.

Степень достоверности. Достоверность результатов обеспечена использованием комплекса современных инструментальных методов анализа, статистической оценкой погрешностей измерений, а также высокой воспроизводимостью полученных результатов и их согласованностью для различных методов.

Апробация работы. Результаты работы доложены на XVI, XVII, XVIII и XIX европейских конференциях по аналитической химии «Euroanalysis» (Белград, 2011; Варшава, 2013; Бордо, 2015 и Стокгольм, 2017), форуме по химическим сенсорам «BioTech 2014» (Вандесвиль, 2014), симпозиуме Европейского общества исследования материалов «E-MRS – 2014: spring meeting» (Лилль, 2014), X Международной конференции Biocatalysis (Ис-

тра, 2015), II и III Всероссийских конференциях по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2015; Московский, 2017), XXVI Ежегодном всемирном конгрессе по биосенсорам «Biosensors» (Гетеборг, 2016), XXI Международном симпозиуме по полиэлектролитам «ISP-2016» (Москва, 2016), Научной конференции грантодержателей РНФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века» (Москва, 2016), VI Всероссийской конференции по наноматериалам «НАНО-2016» (Москва, 2016), III, VI и V Международных конференциях по биосенсорным технологиям «Bio-Sensing Technology» (Лозанна, 2013; Лиссабон, 201; Рива дель Гарда, 2017), симпозиуме Европейского общества исследования материалов «E-MRS – 2017: spring meeting» (Страсбург, 2017), II и III съездах аналитиков России (Москва, 2013 и 2017).

Публикации. Основные результаты по материалам диссертации опубликованы в 19 статьях, 4 главах в сборниках и монографии, 3 патентах.

Личное участие автора заключалось в постановке задач, активном участии на всех этапах исследования, обсуждении, интерпретации и систематизации полученных результатов. Диссертационная работа представляет собой обобщение результатов исследований, полученных автором лично и совместно с аспирантами А.В. Кирейко, К.В. Яблоцким, Л.И. Малининой, Борзенковой Н.В., П.В. Родионовым и студентами химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова при ее непосредственном участии, руководстве и соруководстве.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав (каждая из которых содержит литературную и постановочную части, а также обсуждение результатов и промежуточные вывод), заключения, выводов и списка цитируемых источников из 347 наименований. Диссертационная работа изложена на 272 страницах, включает 40 таблиц, 106 рисунков и 10 схем.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Пероксидаза в комплексе с хитозаном как основа биораспознающего слоя оптической сенсорной системы

В первой главе работы описаны подходы к созданию высокоактивного, однородного по структуре и размерам комплекса пероксидазы с хитозаном, стабильного при хранении и в процессе эксплуатации в водных и водно-органических средах, как основы оптических сенсорных систем для определения органических биологически активных соединений - субстратов пероксидазы из корней хрена.

Пероксидаза из корней хрена - наиболее часто используемый в химическом анализе фермент, относится к классу оксидоредуктаз и катализируют окисление широкого круга субстратов, прежде всего органических соединений, в присутствии пероксида водорода и других пероксидов. Однако ее еще более широкое аналитическое применение ограничено недостаточной специфичностью к ряду субстратов и, как следствие, чувствительностью их определения, а также малой стабильностью нативного фермента и низкой эффективностью биокатализа в органических средах при определении биологически активных соединений в мало- или нерастворимых в воде объектах.

Следует отметить, что в системах неполярных (гидрофобных) растворителей, практически не влияющих на структуру белков, ферменты, как правило, сохраняют каталитически активную конформацию и стабильны; при этом резко снижается эффективность контакта участников ферментативной реакции и, соответственно, скорость биокаталитического процесса. В присутствии полярных органических растворителей вследствие денатурации белковой глобулы биокатализаторы частично или полностью теряют каталитическую активность. Среди приемов, рекомендуемых для повышения устойчивости биокатализаторов к этому типу инактивации, можно отметить следующие: иммобилизация ферментов на твердых носителях, замена аминокислотных остатков белка, его ковалентная модификация низкомолекулярными реагентами, полимерами и т.д. Однако ни один из этих способов стабилизации биокатализаторов не позволяет сохранить их высокую каталитическую активность в широком диапазоне содержаний полярных органических растворителей.

Перспективным подходом к преодолению указанных проблем является включение биокатализаторов в структуры самособирающихся комплексов. Достоинством комплексов фермент−полиэлектролит, образованных за счет неспецифических электростатических взаимодействий, является то, что физико-химические свойства комплекса и кинетические параметры катализируемых им реакций можно моделировать, варьируя природу и молекулярную массу полимеров, изменяя их соотношение в смеси для иммобилизации, условия формирования комплекса (природу буферных растворов, pH, ионную силу и т.д.). Таким образом, появляются возможности создания высокоактивных и стабильных ферментативных систем с заданными свойствами (чувствительностью, селективностью, стабильностью) для решения конкретных аналитических задач.

Следует отметить, что способ включения фермента в комплекс с полиэлектролитами отличается простотой применяемых методик, обеспечивает равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя, что позволяет получить стабильные иммобилизованные препараты с хорошо воспроизводимыми характеристиками. Образование таких комплексов яв-

ляется на сегодняшний день наиболее простым путем формирования структур как нано- (различные коньюгаты, наночастицы), так и микроскопических (гели, пленки) размеров. Кроме того, такие системы легко формируются, в ряде случаев оптически прозрачны и удобны для дальнейшего применения в химическом анализе.

Выбор природы полисахарида для образования комплекса с пероксидазой. Для формирования нековалентных ферментных комплексов перспективно применение природных и синтетических производных полисахаридов вследствие их биосовместимости, способности образовывать комплексы с белками. При выяснении влияния природы полиэлектролитов на свойства пероксидазы нами были изучены полисахариды трех различных типов: анионные – карбоксиметилцеллюлоза и альгинат кальция, неионные – агароза, *β*-циклодекстрин и крахмал, а также катионный – хитозан. Активность и стабильность пероксидазы в их присутствии контролировали по скорости индикаторной реакции окисления пероксидом водорода *о*-дианизидина. Несмотря на различную природу и тип полисахаридов, все они оказывали активирующее действие (22 ± 4 %) на скорость пероксидазного превращения органического субстрата.

При этом стабильность препаратов пероксидазы значительно зависела от типа полимера. Комплексы фермента с анионными и неионогенными полисахаридами, которые формируются за счет многоточечных электростатических и Ван-дер-ваальсовых взаимодействий, теряли более 50 % от их первоначальной активности в среднем за 3 и 6 месяцев соответственно. Наибольшую стабильность пероксидаза проявляла в присутствии катионного полимера - хитозана (в течение полутора лет), что чрезвычайно важно для аналитического применения ферментных препаратов в химическом анализе, в том числе в составе сенсорных устройств (рис. 1).

В связи с этим одной из целей исследования являлось выяснение влияния на каталитическую активность и стабильность пероксидазы хитозанов с различными молекулярными массами; оптимизация условий образования комплекса пероксидаза-хитозан; а также сравнение кинетических параметров индикаторной реакции окисления *о*-дианизидина пероксидом водорода, катализируемой нативной пероксидазой и в комплексе с хитозаном. Следует отметить, что столь детальное изучение условий формирования самособирающихся структур на основе хитозана с пероксидазой не проводилось, все полученные результаты являются новыми и оригинальными.

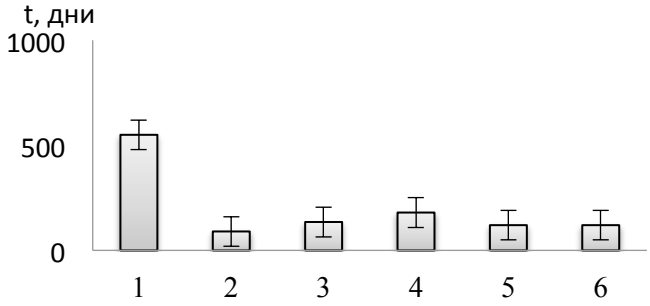

Рис. 1. Продолжительность (t, дни) сохранения 50% активности (от начальной) препаратами пероксидазы в присутствии различных полисахаридов (***1*** - хитозан, ***2*** – карбоксиметилцеллюлоза, ***3*** – крахмал, ***4*** – циклодекстрин, ***5*** – агароза, ***6*** – альгинат кальция).

Хитозан - природный полисахарид обладает высоким сродством к белкам, в том числе к ферментам, хорошей сорбционной способностью. Его часто применяют в качестве носителя для иммобилизации биомолекул разными способами: ковалентным и нековалентным связыванием, капсулированием, включением в гели и т.д. (рис. 2).

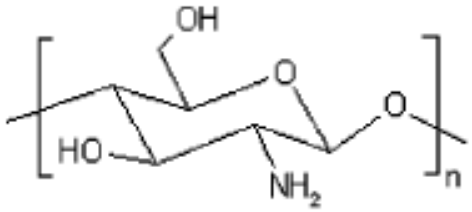

Рис. 2. Структурная формула хитозана.

Этому способствуют такие его свойства, как биосовместимость, низкая токсичность, химическая инертность, способность образовывать пленки, гели, мембраны; механическая прочность, высокая проницаемость по отношению к воде, гидрофильность. Хитозан является перспективной матрицей для создания оптических сенсорных систем, поскольку не поглощает в ближней УФ и видимой областях спектра.

Влияние на каталитическую активность пероксидазы хитозанов с различными молекулярными массами (ММ) (со степенью деацилирования 85 %) было изучено с использованием той же индикаторной реакции окисления пероксидом водорода *о*-дианизидина. Установлено, что все хитозаны – низкомолекулярные (со средними ММ 5, 10, 25 кДа) и высокомолекулярный (со средней ММ 150 кДа) при их различных содержаниях в реакционной смеси (0,01-10 мас. % и 0,001-0,05 мас. % соответствен-

но) оказывают на пероксидазу (0,1 нМ) активирующее действие, степень которого зависит как от молекулярной массы полимера, так и от его концентрации.

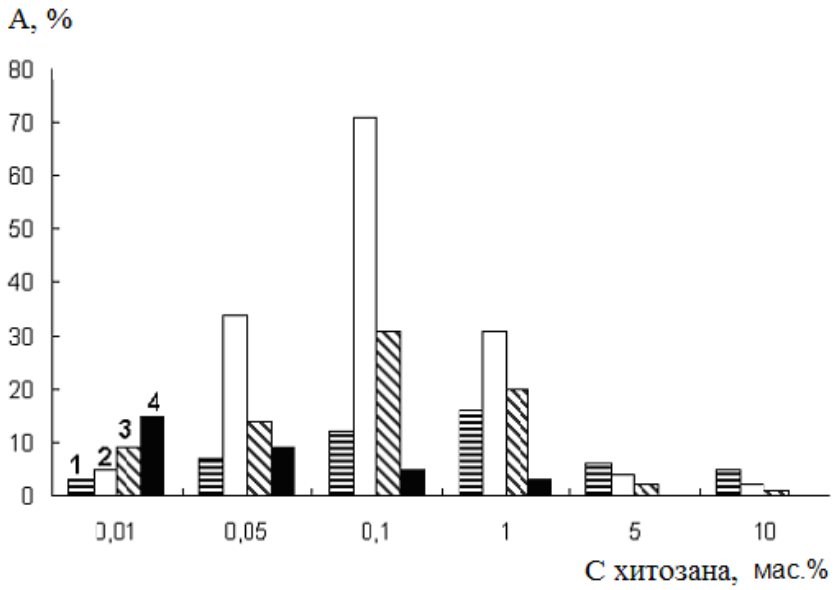

Рис. 3. Зависимость степени активирования (*A*, %) пероксидазы от молекулярной массы (ММ, кДа) и содержания ($C_{хитозана}$, мас.%) хитозана в реакционной смеси (0,05 М фталатный буферный раствор, pH 5,0; со средними ММ хитозана, кДа: ***1*** – 5; ***2*** – 10; ***3*** – 25; ***4*** – 150).

В наибольшей степени активирует пероксидазу 0,1 мас. % раствор хитозана со средней ММ 10 кДа (рис. 3).

Влияние хитозанов с различными молекулярными массами на стабильность пероксидазы. Стабильность комплексов пероксидазы с хитозанами со средними ММ 5, 10, 25 и 150 кДа возрастала с увеличением средней ММ полисахарида; наиболее стабильным (50% от первоначальной активности сохранялись в течение 120 дней) оказался комплекс в присутствии 10 мас. % хитозана со средней ММ 25 кДа. Однако максимальную стабильность проявлял комплекс, образованный высокомолекулярным (ММ 150 кДа) хитозаном с содержанием 0,001 мас. %, который в течение 550 дней сохранял не менее 50% от первоначальной активности (рис. 1 и 4). Препараты иммобилизованного фермента до исследования хранили в герметичной упаковке при температуре 4 ^{0}C.

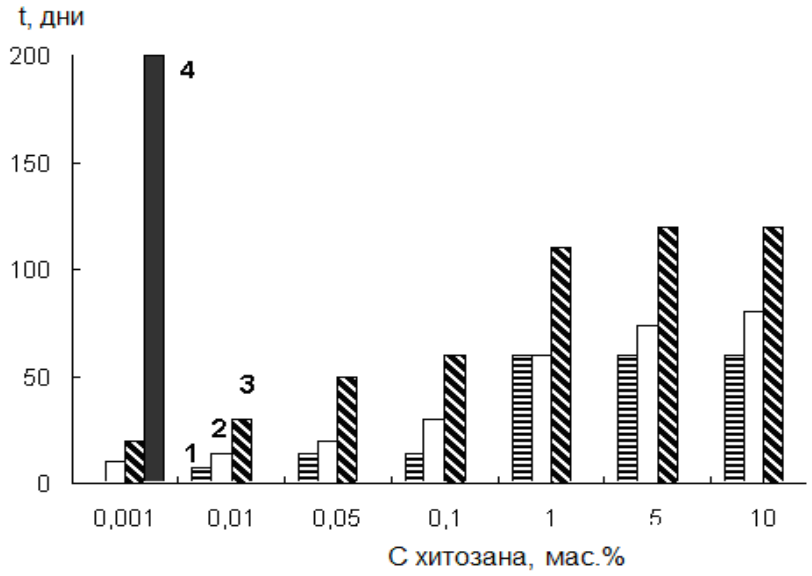

Рис. 4. Продолжительность (t, дни) сохранения не менее 50 % активности (от начальной) препаратами пероксидазы в присутствии хитозанов с различными средними ММ (кДа) и содержаниями (мас. %) в смеси для иммобилизации; ММ хитозана, кДа: ***1*** – 5; ***2*** – 10; ***3*** – 25; ***4*** – 150.

В связи с тем, что стабильность биокатализатора является одной из наиболее важных аналитических характеристик сенсорных систем, то в целях получения комплекса на основе пероксидазы был выбран хитозан со средней ММ 150 кДа.

Влияние на каталитическую активность комплекса пероксидаза-хитозан pH, ионной силы и природы буферного раствора. Такое исследование необходимо прежде всего в тех случаях, когда значения pKa полимера (pKa хитозана - 6,3-6,5; он растворим только в протонированной форме) и изоэлектрической точки фермента (pI пероксидазы - 7,2) различаются незначительно.

Была изучена зависимость каталитической активности пероксидазы в реакции окисления *о*-дианизидина в присутствии 0,0005 − 0,01 мас. % хитозана от в интервале значений pH 4,4 − 6,2 и концентрации буферных растворов в диапазоне 0,05 − 0,2 М. Выбор диапазона pH обусловлен как буферной емкостью фталатного буферного раствора, так и тем, что при значениях pH буферного раствора меньших 4,0 каталитическая активность фермента резко снижается, а при pH выше 6,5 вследствие перехода в депротонированную форму хитозан выпадает в осадок.

Исследование влияния природы буферного раствора на условия образования и свойства комплекса проводили во фталатном, фосфатном, цитратном буферных растворах.

Установили, что в цитратном буферном растворе хитозан при различных его содержаниях в реакционной смеси не оказывал влияния на

каталитическую активность пероксидазы. В фосфатном буферном растворе полисахарид активировал пероксидазу, но в несколько меньшей степени, чем во фталатном буферном растворе. Следует отметить, что согласно распределительным диаграммам, при pH 5,9 около 7 % фосфорной и 80 % лимонной кислот находятся в виде двухзарядных ионов; при указанном значении pH такие ионы отсутствуют в случае фталевой кислоты. По литературным данным присутствие двухзарядных анионов кислот способствует сшивке молекул хитозана между собой, что, по-видимому, происходит в цитратном буферном растворе, в результате комплекс между молекулами фермента и полисахарида не образуется. В фосфатном буферном растворе протекают два конкурирующих процесса: взаимодействие пероксидазы с хитозаном и взаимодействие хитозан-хитозан, что приводит к кажущемуся снижению каталитической активности фермента в присутствии полисахарида по сравнению с фталатным буферным раствором. Ионная сила раствора на каталитическую активность комплекса пероксидаза-хитозан согласно расчетам и сопоставлениям в 0,05-0,2 М буферных растворах влияла незначительно.

Каталитическая активность пероксидазы в реакции окисления *о*-дианизидина в присутствии 0,0005-0,01 мас. % хитозана со средней ММ 150 кДа оказалась максимальной в 0,05 М фталатном буферном растворе при pH 5,8-6,2. Таким образом, активность комплекса максимальна в той области pH, которая близка к значениям pK_a хитозана и точки электронейтральности пероксидазы.

Установлено, что даже полностью протонированный хитозан способен образовывать агрегаты с белком в результате образования водородных связей через аминогруппы и гидрофобных взаимодействий. Последние реализуются за счет присутствия в структуре хитозана *N*-ацетилгруппы в позиции С2. Для выявления природы связей между пероксидазой и полисахаридом изучили влияние на скорость пероксидазного окисления *о*-дианизидина в присутствии хитозана хлорида калия (в диапазоне его концентраций 0,01 − 0,1 М), поскольку известно, что сильные электролиты разрушают электростатические взаимодействия между полиионами и не влияют на гидрофобные. Предварительно было показано, что в отсутствие полисахарида хлорид калия в изученном интервале концентраций не оказывал влияния на скорость ферментативного процесса. При этом было выявлено, что степень активирующего действия хитозана на пероксидазу понижается по мере увеличения концентрации KCl в реакционной смеси, что свидетельствуют о том, что активирующее действие хитозана обусловлено формированием комплекса полисахарида с пероксидазой посредством электростатических и/или Ван-дер-ваальсовых взаимодействий между полиионами.

Сравнительное изучение кинетических параметров в оптимальных условиях формирования высокоактивного комплекса пероксидаза-хитозан по отношению к *о*-дианизидину показало, что кажущаяся k_{cat} индикаторной реакции, катализируемой комплексом, почти в 1,5 раза выше, чем в случае катализа нативным ферментом. Кажущаяся константа Михаэлиса в присутствии хитозана незначительно понижается, а специфичность пероксидазы к *о*-дианизидину, характеризуемая отношением k_{cat}/K_M, повышается в 2 раза (табл. 1).

Таблица 1. Кинетические параметры по отношению к субстрату-восстановителю *о*-дианизидину в реакции его окисления пероксидом водорода, катализируемой нативной пероксидазой и комплексом пероксидаза−хитозан (0,05 М фталатный буферный раствор, pH 5,8; концентрация пероксидазы − 0,1 нМ) ($n = 5$, $P = 0,95$)

Кинетические параметры	$C_{хитозана}$, масс.%	
	0	0,006
K_M, мкМ	22 ± 2	16 ± 3
V_{max}, нМ/с	235 ± 7	347 ± 19
$k_{cat} \cdot 10^{-3}$, 1/с	2,4 ± 0,1	3,5 ± 0,2
k_{cat}/K_M, 1/с·мкМ	107	217

Эти данные свидетельствуют о том, активирующее действие хитозана на пероксидазу в изученной индикаторной реакции обусловлено влиянием полисахарида на присоединение и превращение второго субстрата пероксидазы − *о*-дианизидина.

Распределение по размерам частиц комплекса пероксидаза-хитозан. При изучении методом динамического светорассеяния однородности получаемых частиц полисахаридного комплекса и их среднего гидродинамического радиуса было установлено, что в оптимальных условиях формирования частицы комплекса пероксидазы с хитозаном представляют собой упорядочную структуру со средним размером частиц 22±3 нм. Столь высокая однородность получаемых частиц на наноуровне свидетельствует о перспективности их использования в дальнейшем для получения гомогенных и воспроизводимых биочувствительных пленок как основы оптических сенсорных систем.

Влияние на каталитическую активность комплекса пероксидаза-хитозан диметилсульфоксида. Нами была изучена активность и стабильность комплекса пероксидаза–хитозан в среде полярного органического растворителя − диметилсульфоксида (ДМСО). Выбор последнего

обусловлен тем, что он входит в состав многих фармацевтических препаратов. В медицинской практике этот растворитель активно применяют для обеспечения транспорта лекарственных веществ через кожный покров, клеточные мембраны, подготовки проб к анализу в качестве экстрагента биологически активных веществ из биологических жидкостей и других объектов, растворителя лекарственных средств и т.д. Кроме того, ДМСО смешивается с водой в любых соотношениях, что позволяет исследовать его влияние на активность пероксидазы в широком интервале содержаний в реакционной смеси.

Нами установлено, что при 30 об. %-ном содержании ДМСО в реакции окисления *о*-дианизидина комплекс пероксидаза-хитозан в два раза активнее, чем нативный фермент; при 60 об. %-ном содержании органического растворителя комплекс так же активен как и нативный фермент в отсутствие органической среды, в присутствии 70 об. % ДМСО каталитические свойства проявляет только комплекс (рис. 5).

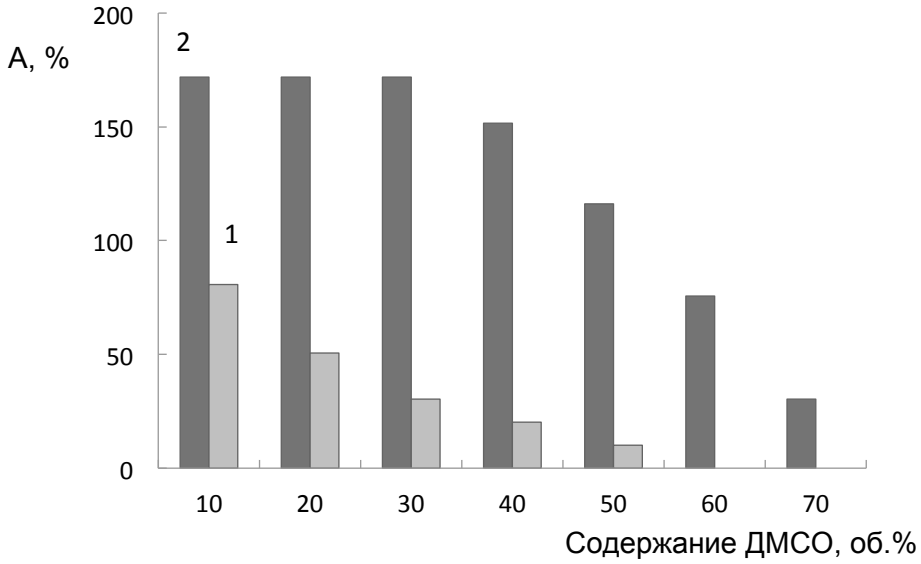

Рис. 5. Зависимость активности пероксидазы от содержания ДМСО в в 0,05 М фталатном буферном растворе с pH 5,8 *(*1- нативный фермент, 2-комплекс пероксидаза-хитозан).

Сравнение операционной стабильности (в процессе эксплуатации) нативной пероксидазы и в комплексе с хитозаном в присутствии 30 об.% ДМСО показало, что фермент сохраняет половину первоначальной активности в среде органического растворителя в течение 7 и 28 ч соответственно.

Таким образом, в результате тщательного выбора природы полимеров – различных полисахаридов, pH, ионной силы и природы буферного раствора, детального изучения их многофакторного влияния на свойства пероксидазы нами был создан однородный по своей структуре и размерам

самособирающийся комплекс этого фермента с хитозаном. Отличительными особенностями комплекса являются высокая каталитическая активность (в два раза больше по сравнению с нативным биокатализатором), а также стабильность как при хранении, так и в процессе эксплуатации в водных и водно-органических средах. Все вышеперечисленные факты указывают на перспективность применения комплекса пероксидаза-хитозан в аналитической практике при разработке методик и создании сенсорных систем для определения биологически активных субстратов пероксидазы в различных средах.

Создание оптических сенсорных устройств, схем анализа и регистрации аналитического сигнала для определения биологически активных соединений – субстратов пероксидазы

В главе 2 обсужден следующий этап создания сенсорных систем на основе комплекса пероксидазы с хитозаном со спектрофотометрической и флуориметрической регистрацией аналитического сигнала - разработка простой технологии формирования оптически прозрачных биораспознающих пленок на оптических стеклах. В качестве подложки для оптических сенсорных устройств использовали кварцевые стекла фирмы *Menzel* (Германия), не имеющие собственного поглощения в области от 230 до 900 нм.

Размеры пластинки (13×38 мм) выбрали, исходя из конструкции кюветных отделений серийных спектрофотометров и флуориметров. Чувствительный слой сенсора получали путем капельного нанесения смеси, состоящей из раствора полимера, пероксидазы и дополнительных компонентов индикаторных реакций в случае необходимости. Для растворения коммерческого препарата хитозана использовали 0,5 мас. % раствор уксусной кислоты. Смесь равномерно распределяли по поверхности подложки и высушивали при комнатной температуре на воздухе (рис. 6).

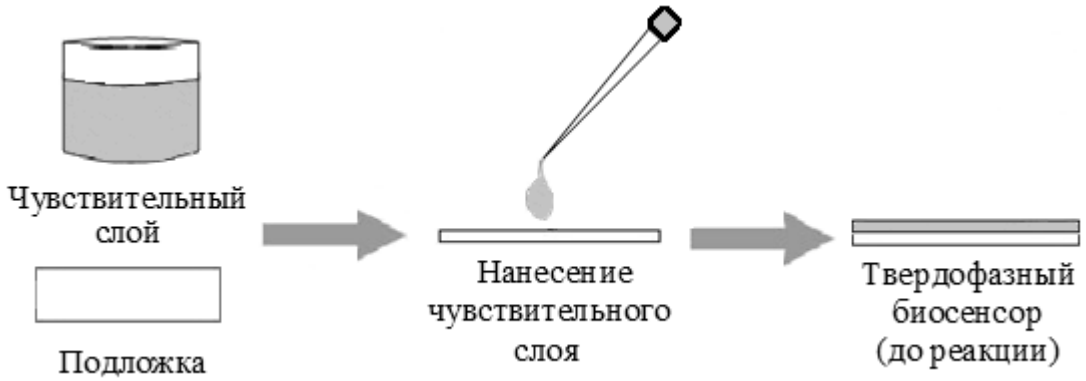

Рис. 6. Схема формирования чувствительного слоя оптического биосенсорного устройства.

При сравнительном изучении пропускания пленок после их выдерживания в течение часа в водном растворе (0,05 М фосфатный буферный раствор, pH 6,5) и в водно-органической среде (в присутствии 30 об. % ДМСО) установили, что пленки после их выдерживания в присутствии органического растворителя более прозрачны (T=96±2 %, n=5), чем пленки, выдержанные в водном растворе (T=81±4 %, n=5). Следует отметить, что аналогичный эффект наблюдался не только в присутствии ДМСО, но и этанола, ацетонитрила.

Для изучения морфологии и топографии пленок, полученных из различных сред, использовали метод атомно-силовой микроскопии. Рис. 7 свидетельствует о том, что пленки после их выдерживания в 30 об. % растворе ДМСО более однородные по поверхности, чем аналогичные, но полученные из водного раствора (флуктуации по высоте на 1 мкм^2 полимерного слоя составили 30-35 и 140-150 нм соответственно).

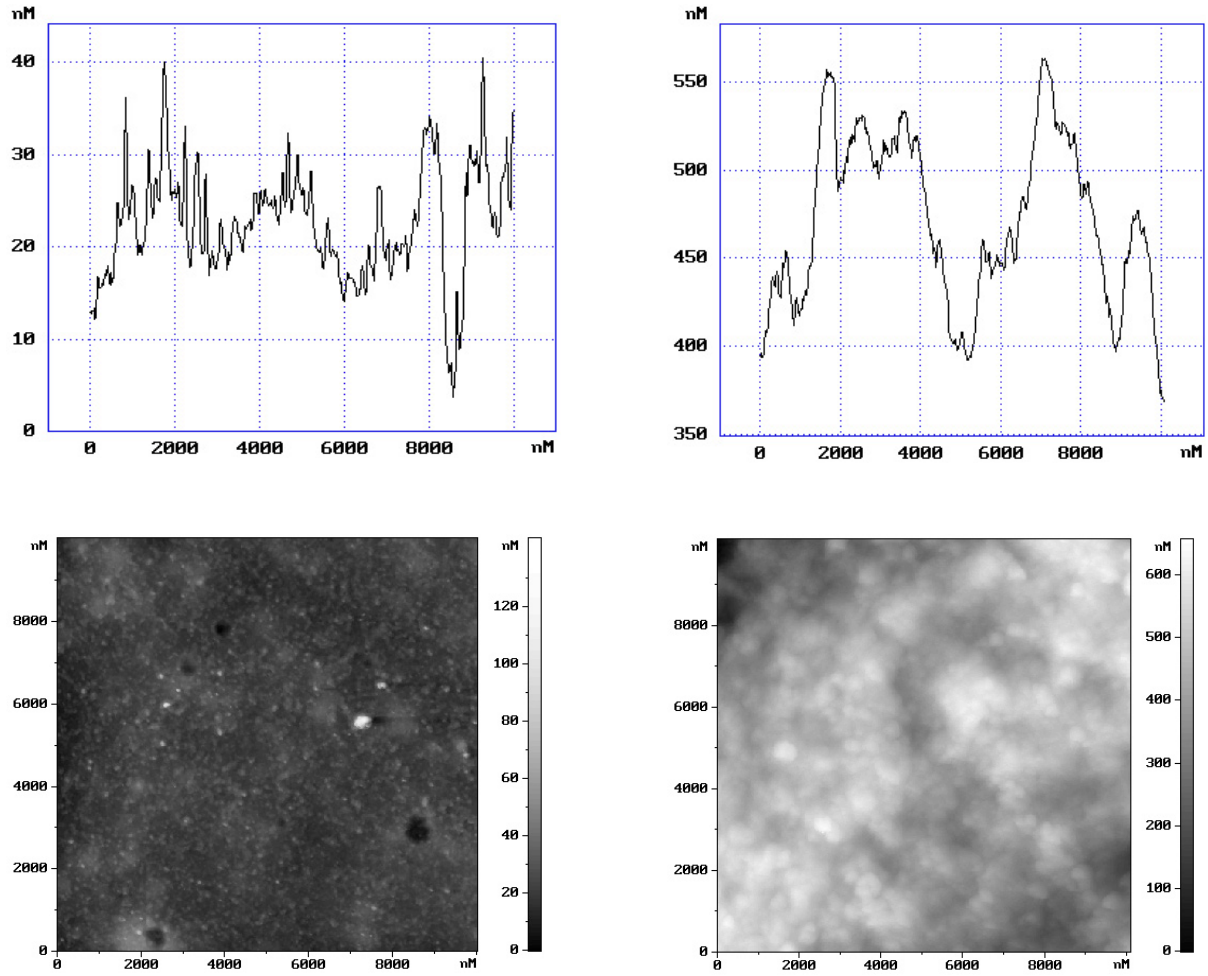

Рис. 7. Профили и изображения поверхности чувствительного слоя (пероксидаза – 50 пмоль, хитозан 0,4 мг/см^2) после выдерживания в фосфатном буферном растворе, pH 6,5 (рисунки справа) и среде вода (фосфатный буферный раствор, pH 6,5) – ДМСО (30 об. %) (рисунки слева). Цветовая шкала справа – глубина изображения в нм.

Толщина биораспознающего слоя при содержании хитозана 0,4 мг/см^2 на поверхности стеклянной пластинки была определена методом оптической микроскопии и составила 5 мкм.

Схема проведения анализа с использованием различных индикаторных реакций для определения субстратов пероксидазы была следующей: кварцевую пластинку, модифицированную биочувствительным слоем пероксидаза-хитозан погружали в раствор, выдерживали необходимое время, затем извлекали и высушивали на воздухе (рис. 8). Все последовательные операции проводили при комнатной температуре.

Аналитический сигнал регистрировали в режиме поглощения в случае спектрофотометрического детектирования или отражения при флуориметрическом детектировании в чувствительном слое на поверхности кварцевого стекла.

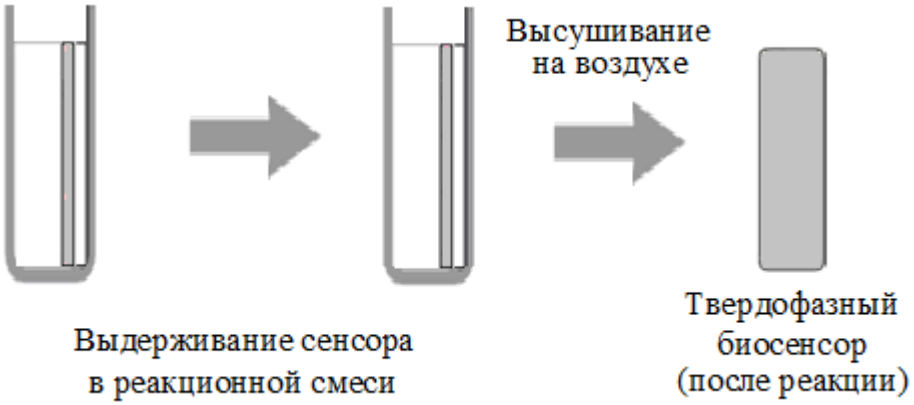

Рис. 8. Схема проведения индикаторной реакции с использованием оптического биосенсорного устройства.

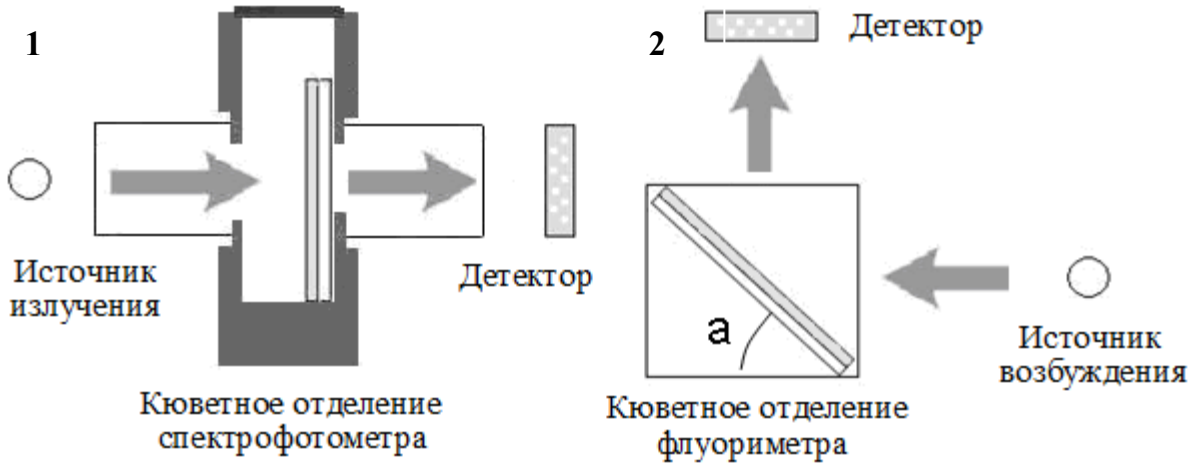

Рис. 9. Схема измерения поглощения (1) и флуоресценции (2) чувствительного слоя оптического сенсорного устройства.

Сенсорный элемент (устройство) устанавливали на фронтальной поверхности кюветного отделения спектрофотометра или в кюветном отделении флуориметра перед отражающей поверхностью – зеркалом (рис. 9).

Предложенная конструкция сенсорного устройства была универсальной и позволяла сочетать два способа измерения аналитического сигнала. При использовании отражающей поверхности в случае флуориметрического детектирования значительно повышается чувствительность определения за счет многократного (суммарного) усиления сигнала.

Значимой проблемой при регистрации флуоресцентного сигнала с использованием твердофазных сенсорного устройства предложенной конструкции оказалось высокое значение фонового сигнала в области 300–500 нм (λ_{ex}=300–400 нм и λ_{em} = 400–500 нм). Для выявления природы фонового сигнала, уменьшения его величины, установления рабочей области спектра (а также выбора индикаторных систем) использовали подход, заключающийся в изменении угла отражения возбуждающего излучения. Установили, что отношение интенсивности флуоресценции фона к интенсивности флуоресценции индикатора - пиронина Б минимально при угле 75^{o}. Рекомендуемая ширина входной и выходной щелей составила 5,0 нм.

Таким образом, нами предложено новое сенсорное устройство на основе оптически прозрачного биочувствительного слоя комплекса пероксидаза – хитозан, закрепленного на пластинке из кварцевого стекла, способное функционировать как в водных, так и водно-органических средах. Разработаны оригинальные схемы проведения анализа и регистрации аналитического сигнала непосредственно в распознающем слое, адаптированные под серийные спектрофотометры и флуориметры в целях создания оптических сенсорных систем для определения актуальных аналитов – субстратов пероксидазы.

Спектрофотометрические сенсорные системы для определения фенольных соединений, неорганических и органических пероксидов, фенотиазинов

Возможность определения растворимых и ограниченно растворимых в воде биологически активных веществ в объектах со сложной, а в ряде случаев изменяющейся матрицей без предварительной пробоподготовки оптическими методами обеспечивается не только конструкцией сенсорных устройств, стабильностью и активностью биочувствительного слоя в водных растворах различной кислотности, в присутствии органических растворителей. Чрезвычайно важной и актуальной задачей является создание твердофазных индикаторных реакций, в которых одновременно сочетаются надежное удержание и стабильность дериватизирующего агента, а впоследствии индикаторного соединения, в биочувствительном (распознающем) слое сенсорного устройства с требуемыми аналитиче-

скими характеристиками определения конкретного аналита, объекта анализа и не зависящими от физико-химических свойств и состава последнего. Вследствие вышесказанного *в главах 3 и 4* обсуждаются результаты разработки новых спектрофотометрических индикаторных реакций для определения субстратов пероксидазы (фенольных соединений различного строения, неорганического и органических пероксидов, фенотиазинов) без предварительной пробоподготовки, а также апробации разработанных на их основе сенсорных систем в анализе различных объектов. В целях повышения чувствительности и воспроизводимости спектрофотометрического определения перечисленных выше соединений аналитический сигнал регистрировали в режиме пропускания. До работ автора подобный подход к созданию оптических сенсорных систем для определения фенольных соединений различного строения, пероксидов, фенотиазинов не был реализован.

Спектрофотометрическая твердофазная индикаторная реакция для определения фенольных соединений различного строения. Ферментативное определение оптическими методами фенолов различного строения в водных растворах основано, как правило, на окислении этих соединений с образованием в большинстве случаев соответствующих хинонов. В реакциях со специально введенными реагентами последние образуют окрашенные соединения, что определять их спектрофотометрически.

Наличие реакционноспособных аминогрупп в составе хитозана обусловливает его способность вступать в некоторые реакции, характерные для аминов, в том числе известно, что он реагирует с хинонами. Этот тип взаимодействий нашел несколько практических применений, а именно для удаления фенольных соединений из сточных вод после их ферментативного окисления, получения модифицированных полимеров на основе хитозана; однако, этот процесс не был использован в химическом анализе.

Работа предложенной нами сенсорной системы для определения фенольных соединений основана на последовательности двух процессов: пероксидазного окисления аналита с образованием хинонного продукта и его последующего взаимодействия с аминогруппами хитозана (в составе биораспознающего слоя) с образованием сильно поглощающего свет аддукта. Последний процесс описан в работах Г. Пейна с соавторами, которые предположили, что реакция образования аддукта хитозан-хинон протекает по механизму присоединения Михаэля.

При разработке спектрофотометрической индикаторной реакции в качестве модельного водорастворимого фенольного соединения был выбран гидрохинон, который является субстратом пероксидазы, а также его применяют как антиоксидант при производстве полимеров и в качестве отбеливающего кожу компонента в некоторых фармацевтических препа-

ратах наружного применения. Аналитический сигнал регистрировали в режиме поглощения непосредственно в чувствительном слое на поверхности подложки. Обнаружили, что через несколько часов после начала реакции пленка хитозана окрашивалась в коричневый цвет, а в спектре поглощения, зарегистрированном относительно чистой пластинки, появлялись два максимума при 265 и 345 нм. В отсутствие фенольных соединений в системе этих максимумов не наблюдалось. В целях минимизации влияния фоновых компонентов реакционной смеси, а в дальнейшем и анализируемых объектов, а также самого полимерного слоя в качестве аналитической выбрали длину волны 345 нм (ε_{345}= (4,2±0,2)×10^3 $М^{-1}см^{-1}$).

В оптимальных условиях формирования биораспознающего слоя на поверхности оптического стекла и регистрации аналитического сигнала (0,05 М фосфатный буферный раствор, pH 6,5-7,5, концентрация пероксида водорода – 5 мМ, чувствительный слой: хитозан – 0,4 мг/$см^2$, пероксидаза – 50 пмоль) возможно определение гидрохинона со следующими характеристиками: диапазон определяемых концентраций 20 – 200 мкМ, s_r (при концентрации гидрохинона 20 мкМ, n=5) составил 0,02, предел обнаружения 3 мкМ (табл. 2).

Следует отметить высокую стабильность индикаторного соединения – аддукта хинона с хитозаном, образованного по механизму присоединения Михаэля: его поглощение в полимерном слое сенсорного устройства остается постоянным не менее 8 недель при хранении на воздухе при комнатной температуре.

Нами была изучена стабильность сенсорной системы на основе пероксидазы при хранении: отклик после 5 дней хранения при комнатной температуре (25°С) составил (69±7) % (n=5, P=0,95), а после 90 дней хранения этого же сенсора при 4°С – (98±8) % (n=5, P=0,95). Следовательно, перед использованием сенсорное устройство можно хранить не менее трех месяцев в холодильнике.

Аналитические возможности спектрофотометрической сенсорной системы были апробированы для определения фенольных соединений различного строения - растворимых (фенола, гидрохинона, пирокатехина) и малорастворимых (кверцетина, рутина, эскулетина) в водных растворах, В случае последних реакцию проводили в присутствии 10 об. % ДМСО (табл. 2).

Отклик сенсорной системы понижался в ряду кверцетин, гидрохинон, катехол, рутин, эскулетин, фенол, а в случае резорцина, пирогаллола и флуороглюцина аналитический сигнал отсутствовал. По-видимому, это обусловлено тем, что продукты окисления этих фенольных соединений не взаимодействуют с хитозаном с образованием аддукта Михаэля, поскольку, как известно, все изученные фенолы окисляются пероксидом водорода в присутствии пероксидазы. Использование в качестве аналитической си-

стемы двух последовательных реакций позволяет устранить мешающее влияние многих мешающих компонентов нефенольной структуры (за исключением хинонов), которые могут присутствовать в реальных объектах.

Таблица 2. Аналитические характеристики методик определения различных фенольных соединений и пероксидов в различных средах с использованием спектрофотометрической сенсорной системы на основе комплекса пероксидаза-хитозан

Аналит	Диапазон определяемых концентраций, мкМ*	Предел обнаружения, мкМ	Чувствительность, $М^{-1}$	Среда
Фенольные соединения				
Фенол	20 – 100	3	2×10^3	Вода
Гидрохинон	20 – 200	3	7×10^3	Вода
Пирокатехин	20 – 250	7	3×10^3	Вода
Кверцетин	10 – 150	3	12×10^3	ДМСО
Рутин	10 – 150	3	4×10^3	ДМСО
Эскулетин	10 – 200	3	4×10^3	ДМСО
Пероксиды				
Пероксид водорода	10 – 100	7	25×10^2	ДДС
Пероксид мочевины	10 – 100	5	28×10^2	ДДС
2-Бутанол-пероксид	50 – 1000	32	13×10^2	ДМСО
Бензоил Пероксид	50 – 250	35	8×10^2	ДМСО
трет-Бутилгидро-пероксид	150-1000	60	10×10^2	Ацетон

*Во всех случаях s_r не превышало 0,08.

Отличительной особенностью разработанной биосенсорной системы является то, что аналитическим сигналом является поглощение биочувствительного слоя на поверхности кварцевого стекла, а не анализируемого раствора. Последнее обеспечивает возможность анализа непрозрачных и окрашенных растворов, эмульсий без предварительного отделения матрицы; этому также способствует длительная операционная стабильность сенсорной системы в среде вода–ДМСО. Существенным недостатком и ограничением применения в химическом анализе предложенной спектро-

фотометрической сенсорной системы является длительность получения аналитического сигнала (24 ч), однако этот недостаток компенсируется простотой выполнения определения, небольшими непосредственными затратами времени аналитика и длительной стабильностью индикаторного вещества в биочувствительном слое при хранении.

Спектрофотометрическая твердофазная индикаторная реакция для определения пероксидов различного строения. Разработанная твердофазная индикаторная реакция, основанная на взаимодействии хитозана с продуктом ферментативного окисления фенольного соединения с образованием вещества, поглощающего в видимой области спектра; наличие прямо пропорциональной зависимости поглощения биочувствительного слоя сенсорного устройства от концентрации пероксида водорода в реакционной смеси открывает перспективу ее использования для определения не только фенольных соединений, но и субстратов-окислителей пероксидазы - пероксидов различного строения.

В качестве субстрата-восстановителя использовали пирокатехин. Условия эксперимента были те же, что и при определении фенольных соединений (концентрация пирокатехина 1 мМ, 0,05 М фосфатный буферный раствор, pH 6,5-7,5, время выдерживания - 24 ч; состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см^2).

В работе использовали следующие субстраты-окислители - пероксиды водорода, мочевины, бензоилпероксид, *2*-бутанонпероксид и *трет*-бутилгидропероксид. Выбор такого ряда пероксидов был обусловлен благодаря их широкому применению в производстве косметических и фармацевтических средств, а также в связи с тем, что они являются маркерами качества пищевых продуктов. Аналитические характеристики методик определения всех перечисленных соединений на основе твердофазной спектрофотометрической индикаторной реакции представлены в табл. 2.

Предложенные нами твердофазные методики определения органических пероксидов с использованием спектрофотометрической сенсорной системы на основе биочувствительного слоя пероксидаза–хитозан обладают метрологическими характеристиками, сравнимыми с характеристиками сенсоров, представленных в литературе.

Было показано, что в результате детального подбора состава раствора – дизайна среды можно улучшить кинетические параметры ферментативного процесса и, как следствие, метрологические характеристики разрабатываемых методик путем повышения растворимости аналитов в "правильно выбранном" растворителе или в результате эффекта солюбилизации в растворах поверхностно-активных веществ (ПАВ).

При проведении индикаторной реакции в среде прямых мицелл ПАВ субстратная специфичность пероксидазы по отношению к выбранным пе-

роксидам (за исключением *трет*-бутилгидропероксида) возрастала в ряду: ЦТАБ < немицеллярная среда < ТВИН 80 < ДДС, что, вероятно, обусловлено наличием электростатических взаимодействий между молекулами фермента и ПАВ.

Таблица 3. Аналитические характеристики методик определения различных пероксидов в среде прямых мицелл ПАВ с использованием спектрофотометрической сенсорной системы на основе комплекса пероксидаза-хитозан

ПАВ	Диапазон определяемых концентраций, мкМ	c_{min}, мкМ	Коэффициент корреляции, r	s_r (при $c_н$, n = 5, P = 0,95)
Пероксид водорода				
–	100–1000	45	0,996	0,08
ЦТАБ	50 – 500	35	0,986	0,09
ТВИН 80	25 – 250	10	0,992	0,12
ДДС	10 – 100	7	0,995	0,09
2-Бутанонпероксид				
–	100–1000	40	0,996	0,08
ЦТАБ	250 – 1000	150	0,993	0,11
ТВИН 80	25 – 500	15	0,999	0,13
ДДС	10 – 100	7	0,998	0,09
Пероксид мочевины				
–	25–250	10	0,996	0,08
ЦТАБ	50 – 500	35	0,995	0,09
ТВИН 80	25 – 250	10	0,996	0,11
ДДС	10 – 100	5	0,996	0,13
Бензоилпероксид				
–	50–500	45	0,998	0,07
ЦТАБ	100 – 1000	40	0,977	0,08
ТВИН 80	100 – 500	35	0,998	0,07
ДДС	25 – 250	20	0,998	0,06
трет-Бутилгидропероксид				
–	750 – 2500	360	0,990	0,07
ЦТАБ	2500 – 5000	2100	0,993	0,11
ТВИН 80	5000 – 10000	3500	0,996	0,07
ДДС	2500 – 10000	2250	0,988	0,08

Использование ПАВ в ряде случаев позволило понизить пределы обнаружения пероксидов, чувствительность определения изменялась в ря-

ду *трет*-бутилгидропероксид < 2-бутанонпероксид < пероксид водорода < пероксид мочевины (табл. 3). Следует отметить, что полученный ряд полностью совпадает с изменением полярности этих соединений. Чувствительность определения всех пероксидов, кроме *трет*-бутилгидропероксида, возрастала в ряду сред: ЦТАБ < немицеллярная среда < ТВИН 80 < ДДС, а в случае *трет*-бутилгидропероксида была наибольшей при проведении реакции в немицеллярной среде. По-видимому, это связано с тем, что гидрофобная якорная группа *трет*-бутилгидропероксида прочно удерживается гидрофобными участками ПАВ, что препятствует его взаимодействию с другими участниками индикаторной системы.

При этом на примере наименее полярного из всех изученных пероксидов, *трет*-бутилгидропероксиде, было продемонстрировано влияние органических растворителей (ДМСО, ацетонитрила, этанола, ацетона) на чувствительность их определения.

Использование ДМСО и ацетонитрила не позволило существенно улучшить метрологические характеристики соответствующих методик, а в присутствии менее полярных этанола и ацетона чувствительность определения *трет*-бутилгидропероксида возрастала, в присутствии 50 об.% ацетона предел его обнаружения снизился более, чем в 5 раз по сравнению с водной средой (табл. 4).

Таблица 4. Аналитические характеристики методик определения *трет*-бутилгидропероксида в водно-органических средах с использованием спектрофотометрической сенсорной системы на основе комплекса пероксидаза-хитозан

Среда	Диапазон определяемых концентраций, мкМ	c_{min}, мкМ	S, мкМ$^{-1}$	s_r, (n=5, P = 0,95)
Водная среда	750-2500	360	6×10^2	0,11
Этанол				
30 об. %	450-2500	300	6×10^2	0,06
50 об. %	350-2500	250	7×10^2	0,13
Ацетон				
30 об. %	350-2500	250	6×10^2	0,06
50 об. %	150-1000	60	10×10^2	0,12

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало целесообразность направленного управления свойствами среды, в которой протекает индикаторный процесс. Экспериментально доказано и под-

тверждено расчетами кинетических параметров ферментативной реакции, что использование мицеллярных и водно-органических сред для ее проведения позволяет регулировать, прежде всего, улучшать метрологические характеристики методик определения пероксидов различного строения и полярности, а также демонстрирует возможность расширения круга анализируемых объектов.

Спектрофотометрическая индикаторная реакция для определения фенотиазинов по их активирующему действию на скорость окисления о-дианизидина пероксидом водорода. Фенотиазины представляют собой класс искусственно синтезированных гетероциклических соединений, используемых в медицине в качестве транквилизаторов, антидепрессантов, нейролептиков, антиаллергенов и т.п. Среди антипсихотических препаратов фенотиазинового ряда наиболее широко в медицинской практике применяют хлорпромазин (торговое название «аминазин»), промазин (торговое название «промазин») и трифторперазин (торговое название «трифтазин»). Определение указанных соединений в биологических объектах - весьма сложная и трудоемкая задача. Достоверность результатов анализа во многом определяется стадией подготовки пробы. В связи с этим поиск новых подходов к экспрессному определению фенотиазинов в различных объектах без предварительной (или минимальной) пробоподготовки весьма актуален.

В биологических системах могут протекать реакции совместного окисления субстратов пероксидазы. Экспериментами *in vitro* показано, что при совместном окислении различных субстратов пероксидазы наблюдается эффект субстрат-субстратной активации, который выражается в ускорении окисления одного субстрата-восстановителя в присутствии другого. Аналогичный эффект субстрат-субстратной активации был отмечен при совместном присутствии *о*-дианизидина и промазина в системе. Мы решили использовать этот эффект для разработки новой индикаторной реакции в целях определения соединений фенотиазинового ряда с использованием спектрофотометрического сенсорного устройства на основе биочувствительного слоя пероксидаза-хитозан. Однако, в отличии от аналогичных сенсорных систем для определения фенольных соединений и пероксидов различного строения (*Глава 3*) при применении эффекта субстрат-субстратной активации аналитическим сигналом служило не поглощение индикаторного вещества, а скорость накопления продукта во времени. Для обеспечения экспрессности контроля накопления продукта во времени регистрировали поглощение каждые 15 сек в течение не менее 2-3 мин и не в пленке биочувствительного слоя, а непосредственно в реакционной смеси. Кроме того, неустойчивость *о*-дианизидина при хранении из-за его неферментативного окисления кислородом воздуха, также определила изменение схемы регистрации сигнала. В связи с этим биочувствительный

слой на поверхности кварцевой подложки выполнял роль только катализатора в представленной системе.

Все исследования проводили в условиях, при которых пероксидаза в составе комплекса с хитозаном, проявляет максимальную каталитическую активность в средах разной полярности (0,05 М фталатный буферный раствор pH 5,8, концентрации реагентов: пероксидаза − 0,1 нМ, *о*-дианизидин − 10 мкМ, пероксид водорода − 100 мкМ) (*Глава 1*).

Для выяснения влияния фенотиазинов на скорость окисления *о*-дианизидина мы рассчитали кинетические параметры трехсубстратной реакции, катализируемой нативной пероксидазой и в присутствии хитозана. Кинетические параметры были получены графически путем линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнуивера-Берка (табл. 5).

Следует отметить, что в присутствии промазина возрастают максимальная скорость индикаторной реакции, значения k_{cat} и специфичность фермента по отношению к *о*-дианизидину, характеризуемая величиной k_{cat}/K_M, что свидетельствует о субстрат-субстратной активации индикаторного процесса в присутствии фенотиазина. При этом в присутствии второго субстрата-восстановителя специфичность пероксидазы в составе комплекса с хитозаном по отношению к *о*-дианизидину приблизительно в 2 раза выше, чем в случае нативного фермента. Кроме того, установлено, что кинетические параметры зависят от природы фенотиазинов. Например, одни и те же значения V_{max}, k_{cat} и k_{cat}/K_M в реакциях пероксидазного окисления достигаются при концентрациях промазина, хлорпромазина и трифторперазина 50, 150 и 250 мкМ соответственно.

Таблица 5. Кинетические параметры реакции окисления *о*-дианизидина (*ОД*) в присутствии 50 мкМ промазина (*Фен*), катализируемой пероксидазой нативной (*I*) и включенной в комплекс с хитозаном (*II*) (n = 5, P = 0,95)

Параметр	Состав реакционной смеси			
	ОД (I)	*ОД (II)*	*ОД + Фен (I)*	*ОД + Фен (II)*
K_M, мкМ	17 ± 2	14 ± 2	16 ± 1	14 ± 3
V_{max}, нМ/с	167 ± 8	316 ± 21	233 ± 19	382 ± 23
k_{cat}, $с^{-1}$	1666 ± 78	3162 ± 212	2330 ± 193	3821 ± 234
k_{cat}/K_M, $с^{-1}$ $мкМ^{-1}$	98	225	145	282

Эффект увеличения скорости окисления *о*-дианизидина в присутствии фенотиазинов пропорционально их содержанию в реакционной смеси был положен в основу ферментативных методик определения промазина, хлорпромазина и трифторперазина в водных растворах и в присутствии 30 об. %

ДМСО (табл. 6). Следует отметить, что разработать методику определения самого трудноокисляемого из изученных субстратов пероксидазы – трифторперазина в отсутствие хитозана в водно-органической среде вообще не удалось.

Таблица 6. Метрологические характеристики методик определения фенотиазинов по их активирующему действию на окисление *о*-дианизидина, катализируемого нативным ферментом (I) и комплексом пероксида−хитозан (II) в водных растворах и в присутствии 30 об. % содержании ДМСО

Определяемое соединение		Диапазон определяемых концентраций, мкМ	s_r при $c_н$ (n = 5, P=0,95)
0,05 М Фталатный буферный раствор pH 5,8			
Промазин	(I)	0,03 – 0,2	0,03
	(II)	0,02 – 0,1	0,05
Хлорпромазин	(I)	0,07 – 0,5	0,07
	(II)	0,05 – 0,4	0,04
Трифторперазин	(I)	0,1 – 1	0,05
	(II)	0,09 – 0,7	0,08
0,05 М Фталатный буферный раствор pH 5,8 + ДМСО (30 об.%)			
Промазин	(I)	0,1 – 0,8	0,07
	(II)	0,02 – 0,1	0,05
Хлорпромазин	(I)	0,5 – 2	0,06
	(II)	0,05 – 0,4	0,04
Трифторперазин	(I)	─	-
	(II)	0,09 – 0,7	0,03

Полученные результаты показывают перспективность применения новой индикаторной системы для осуществления ферментативного катализа в водно-органических средах, а высокая специфичность активирующего действия фенотиазинов на пероксидазное окисление *о*-дианизидина расширяет возможности применения разработанной сенсорной системы в биоаналитической практике. Для подтверждения последнего вывода эта системы была апробирована для определения промазина в плазме крови человека.

Методом «введено-найдено» проанализировали пробы плазмы крови двумя способами: с предварительным выделением промазина методом жидкостной экстракции и без предварительной подготовки (непосред-

ственно плазму крови добавляли в реакционную смесь). Концентрация промазина в реакционной смеси (добавки) была 1 мкмоль/л.

Результаты определения промазина с использованием спектрофотометрической сенсорной системы, основанной на эффекте активирования окисления *о*-дианизидина, в органическом экстракте из плазмы крови человека и в плазме крови без предварительного извлечения аналита составили (n=5, P=0,95) составили 1,2 ± 0,4 и 0,9 ± 0,4 мкмоль/л соответственно; то есть разработанная сенсорная система позволяет анализировать непосредственно плазму крови человека без предварительного извлечения или предварительного концентрирования фенотиазинов.

Таким образом, в результате проведенного исследования нами была предложена новая спектрофотометрическая сенсорная система для высокочувствительного и селективного определения фенотиазинов по их специфическому активирующему действию на ферментативное окисление *о*-дианизидина пероксидом водорода. По чувствительности предложенная нами система превосходит спектрофотометрические методики определения указанных аналитов и сравнима с хроматографическими методиками их определения. Специфичность эффекта субстрат-субстратной активации позволяет определять фенотиазины (как было показано на примере промазина) в водно-органических экстрактах и плазме крови человека без предварительной дополнительной подготовки проб к анализу.

Флуоресцентные сенсорные системы для определения фенольных соединений и пероксидов различного строения

В главах 5 и 6 представлены результаты работы по созданию твердофазных флуоресцентных сенсорных систем на основе комплекса пероксидаза-хитозан для определения фенольных соединений и пероксидов различного строения. Подход, основанный на формировании и измерении аналитического сигнала непосредственно в биочувствительном слое, не был ранее использован при создании флуоресцентных сенсорных систем для определения указанных аналитов.

В качестве определяемых веществ в работе использовали простейшие изомерные дигидроксифенолы (пирокатехин, резорцин, гидрохинон), катехоламины (допамин, адреналин) и их метаболиты (гомованилиновую и ванилилминдальную кислоты), а также пероксиды различного строения (пероксид водорода, пероксид мочевины, *2*-бутанонпероксид, бензоилпероксид, *трет*-бутилгидропероксид).

Предложены два типа новых индикаторных реакций для определения фенольных соединений и пероксидов различного строения: 1) взаимодействие продуктов ферментативного окисления фенолов с хитозаном, меченным флуоресцентной меткой, сопровождающееся уменьшением ин-

тенсивности флуоресценции; 2) пероксидазная дериватизация катехоламинов и их метаболитов с ароматическими диаминами - *о*-фенилендиамином или этилендиамином с образованием флуоресцирующих производных.

Флуоресцентная индикаторная реакция для определения фенольных соединений и пероксидов на основе хитозана, меченного изотиоцианатом родамина Б. Хиноны и феноксильные радикалы (акцепторы электронов), образующиеся в ходе ферментативного окисления фенолов, уменьшают собственную флуоресценцию молекул-флуорофоров (доноров электронов), что может быть использовано для косвенного определения фенольных соединений. В свою очередь, изотиоцианатные производные флуоресцентных красителей взаимодействуют в мягких условиях с первичными аминами с образованием флуоресцирующих соединений. Описанную реакцию широко применяют для введения флуоресцентных меток в состав молекул полимеров, в частности хитозана. Наиболее часто в качестве флуоресцентных меток используют изотиоцианат флуоресцеина (λ_{ex} ~ 500 нм, λ_{em} ~ 525 нм) и изотиоцианат родамина Б (РБИТЦ) (λ_{ex} ~ 550 нм, λ_{em} ~ 575 нм). Нами был выбран РБИТЦ, поскольку он характеризуется максимумами возбуждения и испускания в более длинноволновой области спектра. Последнее позволяет улучшить соотношение сигнал/шум при регистрации флуоресцентного сигнала с поверхности кварцевого стекла, а также повысить селективность индикаторной реакции (поскольку большинство компонентов реальных объектов имеет собственные максимумы возбуждения в более коротковолновой области спектра).

Схема введения флуоресцентной метки в молекулу хитозана приведена на рис. 10.

Меченый хитозан (как и в случае спектрофотометрической системы) одновременно выступал в качестве индикаторного вещества и матрицы для иммобилизации фермента. Интенсивность флуоресценции чувствительного слоя сенсорного устройства значительно уменьшалась при ферментативном окислении фенольных соединений пропорционально содержанию аналита.

Следует отметить, что тушение интенсивности флуоресцентного сигнала происходит только в специфичном двухстадийном процессе: ферментативного окисления фенольного соединения и взаимодействия продукта окисления с полимерным слоем сенсорной системы – хитозаном, меченным флуоресцентной меткой.

Для получения максимального отклика чувствительного слоя флуоресцентного сенсорного устройства в присутствии определяемых соединений выбрали условия и концентрации всех компонентов в реакционной системе: концентрации хитозана - 1 мас. % (соответствовало 0,4 мг·см$^{-2}$),

флуоресцентной метки РБИТЦ - 25 нг·см$^{-2}$, пероксидазы - 50 нМ, пероксида водорода – 100 мкМ, 0,05 М фосфатный буферный раствор pH 7,5.

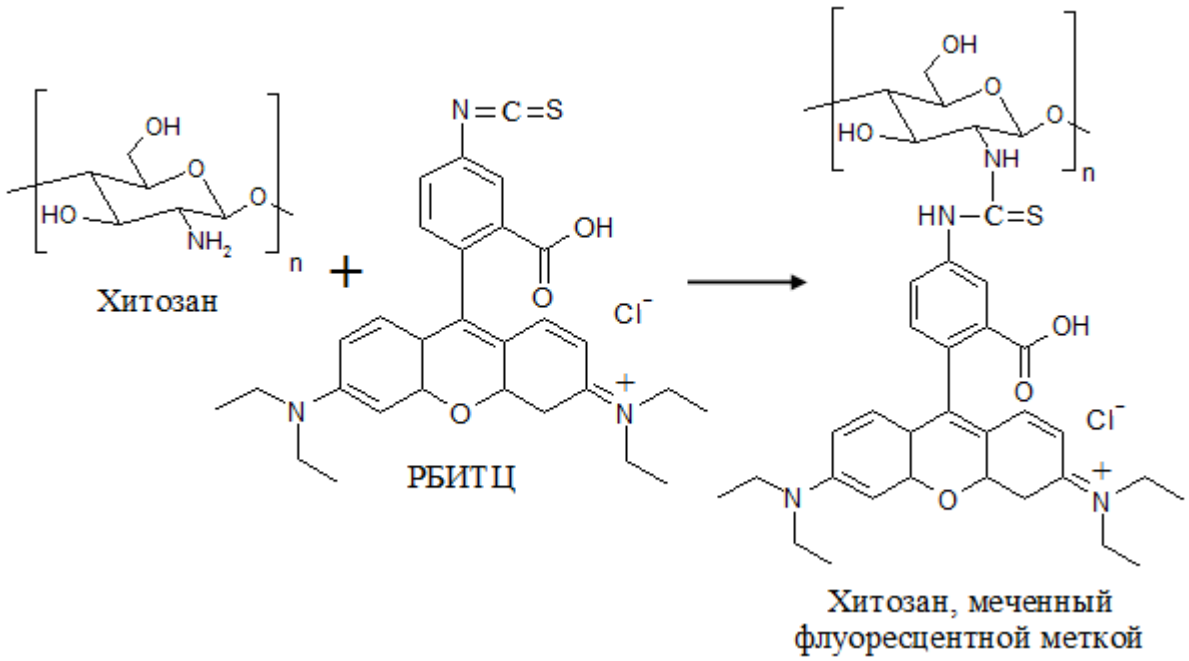

Рис. 10. Схема введения флуоресцентной метки родамина *Б* изотиоцианата (РБИТЦ) в молекулу хитозана.

В выбранных условиях формирования аналитического сигнала флуоресцентной биосенсорной системы для определения фенольных соединений на основе хитозана, меченного РБИТЦ, построили градуировочные зависимости и рассчитали метрологические характеристики методик определения пирокатехина, резорцина, гидрохинона, допамина и адреналина (табл. 8). Установили, что предложенная косвенная флуоресцентная система позволяет определять дигидроксифенолы и катехолы на уровне их концентраций 0,1 – 10 и 1 – 100 мкМ соответственно. Время реакции (достижение 90 % величины аналитического сигнала) не превышало 15 мин.

Флуоресцентный отклик биочувствительного слоя на основе пероксидазы в комплексе с хитозаном, меченным изотиоцианатом родамина Б, пропорционален концентрации не только восстановителя - фенольного соединения, но и окислителя - пероксида. Вследствие этого перспективно его применение для определения пероксидов различного строения, в том числе органических.

В качестве субстрата-восстановителя использовали пирокатехин (фенольное соединение с наибольшим коэффициентом чувствительности определения) с концентрацией 2,5 мкМ, соответствующей середине диапазона линейности его определения. Метрологические характеристики методик определения ряда пероксидов приведены в табл. 7.

Таблица 7 . Метрологические характеристики определения фенольных соединений и гидропероксидов в водной среде с использованием биосенсорной системы на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой изоцианата родамина Б

Определяемое соединение	Диапазон линейности, мкМ	c_{min}, мкМ	s_r (при $c_н$, n = 4, P = 0.95)
Фенольные соединения			
Пирокатехин	0,5 – 5,0	0,10	0,04
Резорцин	0,5 – 7,5	0,15	0,03
Гидрохинон		0,20	0,03
Допамин	5,0 – 50,0	2,0	0,05
Адреналин		1,5	0,06
Пероксиды			
Пероксид водорода	100 – 1000	45	0,08
Пероксид мочевины	25 – 250	10	0,08
2-Бутанонпероксид	100 – 1000	40	0,08
Бензоилпероксид	50 – 750	15	0,07
трет-Бутилгидропероксид	250 – 25000	130	0,07

Биосенсорная система на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой, позволяет определять пероксид водорода, пероксид мочевины, *2*-бутанонпероксид, а также бензоилпероксид на уровне от микро до миллимолярных концентраций, при этом отклик чувствительного слоя на присутствие нескольких пероксидов аддитивен. Методики определения *трет*-бутилгидропероксида характеризуются более низкой чувствительностью и значительно худшей воспроизводимостью результатов измерения.

По чувствительности и воспроизводимости предложенная флуоресцентная сенсорная система сопоставима с аналогами, основанными на измерении аналитического сигнала в растворе, и несколько превосходит спектрофотометрическую на основе хитозана при использовании последнего в водных и водно-органических растворах (последнее будет продемонстрировано в анализе реальных объектов). Однако в мицеллярных растворах воспроизводимость отклика сенсорной системы на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой, резко снижалась. При этом спектрофотометрическая сенсорная система для определения пероксидов различного строения может быть использована для анализа более широкого

круга сложных объектов, в том числе мицеллярных сред. Значимым преимуществом применения флуоресцентной системы по сравнению со спектрофотометрической, как и в случае определения фенольных соединений, является значительное сокращение времени анализа – с 24 ч до 10-15 мин.

Разработанные спектрофотометрическое и флуоресцентное сенсорные устройства в сочетании с твердофазными реакциями на основе хитозаном могут быть использованы либо для анализа объектов, содержащих только одно фенольное соединение (например, фармацевтических и косметических препаратов), либо для оценки суммарного содержания фенольных соединений в анализируемом образце (например, в промышленных и сточных водах).

Таким образом, сравнение характеристик обеих – спектрофотометрической и флуоресцентной сенсорных систем на основе биочувствительного слоя пероксидаза-хитозан свидетельствует о том, что они обе обладают как недостатками, так и достоинствами.

В то же время достигаемая с их помощью чувствительность и селективность определения изученных аналитов по-прежнему остаются недостаточными для решения некоторых важных аналитических задач, например, определения ряда таких фенольных соединений как катехоламины и их метаболиты – важнейших маркеров нейромедиаторного баланса в биологических жидкостях и тканях. При определении таких соединений должны сочетаться низкие пределы обнаружения с высокой воспроизводимостью и экспрессностью анализа.

Перспективным подходом к решению обозначенной проблемы, по нашему мнению, является переход от косвенных флуоресцентных индикаторных реакций к прямым, в которых величина аналитического сигнала в твердофазном варианте измерений прямопропорционально зависит от концентрации аналитов в пробе.

Флуоресцентные индикаторные реакции для определения фенольных соединений и пероксидов на основе дериватизации аналитов. Согласно литературным данным для повышения не только чувствительности (до уровня наномолярных концентраций и ниже), но и селективности флуоресцентного определения катехоламинов перспективен прием, заключающийся в дериватизации этих соединений различными органическими молекулами. Процесс дериватизации катехоламинов с участием ароматических и алифатических аминов, таких как бензиламин (БА), *1,2*-дифенилэтилендиамин (ДЭД), этилендиамин (ЭДА) и *о*-фенилендиамин (*о*-ФДА), включает последовательное протекание нескольких реакций: окисление определяемого соединения и взаимодействие продукта окисления с дериватизирующим агентом (рис. 11). Катехоламины окисляют обычно в присутствии ферроцианида калия. Конечным продуктом дерива-

тизации продуктов окисления катехоламинов этилендиамином и *о*-ФДА являются производные [*7-f*]-хиноксалина и 2,3-бензо-[*7-f*]-хиноксалина (*f* – название соответствующего радикала по номенклатуре ИЮПАК), характеризующиеся максимумами возбуждения и испускания при 400 – 450 нм и 450 – 550 нм соответственно. Конечные продукты дериватизации продуктов окисления катехоламинов с БА и ДЭД - *2*-фенил-(*4,5*-дигидропирроло)-[*2,3-f*]-бензоксазольные производные (λ_{ex} = 340 – 360 нм, λ_{em} = 480 – 490 нм).

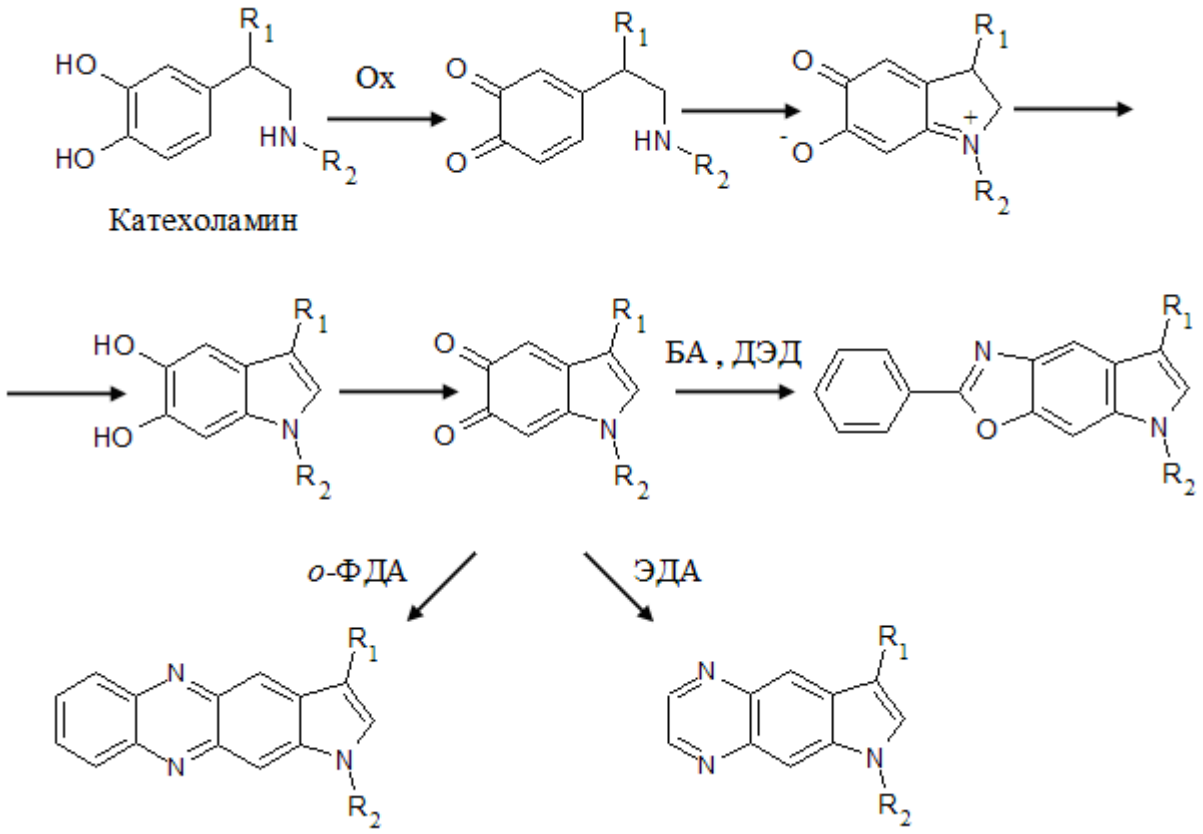

Рис. 11. Схема реакций образования флуоресцирующих производных по реакциям продуктов окисления катехоламинов с БА, ДЭД, ЭДА и *о*-ФДА.

Однако, следует отметить, несмотря на высокую чувствительность к катехоламинам и метаболитам (на уровне пико-, наномолярных содержаний), реакции дериватизации с использованием неорганического окислителя проводят в весьма жестких условиях: в присутствии токсичных органических растворителей (метанола) и при повышенных температурах (50-90^{0}С), время анализа занимает около часа.

Нами предложен новый прием для преодоления вышеуказанных недостатков, заключающийся в замене неорганического окислителя - гексацианоферрата калия на более эффективную биокаталитическую систему на основе пероксидазы. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что использование этой системы для окисления катехо-

ламинов позволяет повысить эффективность процесса образования их флуоресцирующих производных. В присутствии пероксидазы реакция дериватизации протекает при комнатной температуре, в водной среде, время реакции сокращается с 30-45 мин до 5 мин. Идентичность состава продуктов дериватизации катехоламинов с ДЭД и БА на примере адреналина в присутствии пероксидазы и ферроцианида калия доказали методами спектрофотометрии и ВЭЖХ-МС.

Продукты дериватизации катехоламинов и их метаболитов с БА и ДЭД характеризуются максимумами флуоресценции в области 450 – 500 нм (при λ_{ex} ~ 350 нм). Следует отметить, что использование сенсорного устройства предложенной нами конструкции по инструментальным причинам невозможно при λ_{em} < 500 нм. В связи с этим для разработки флуоресцентных методик определения фенольных соединений в сенсорном варианте в качестве дериватизирующих агентов использовали *о*-фенилендиамин (*о*-ФДА) и этилендиамин (ЭДА), дериватизаты которых флуоресцируют в области 500 – 600 нм.

Нами была предложена новая твердофазная флуоресцентная индикаторная реакция для определения фенольных соединений, основанная на дериватизации с алифатическим ЭДА (0,1 М буферный раствор CAPS-KOH, pH 10,5; концентрации пероксидазы – 2,5 мкМ, пероксида водорода -100 мкМ, ЭДА - 1 мМ, λ_{ex} = 400 нм) и ароматическим *о*-ФДА (условия реакции: 0,05 М пирофосфатный буферный раствор, pH 9,5; концентрации пероксидазы – 0,1 мкМ, пероксида водорода – 100 мкМ, *о*-ФДА – 100 мкМ, λ_{ex} = 450 нм) продукта их пероксидазного окисления. Показано, что использование двухслойных пленок на основе хитозан-дериватизирующий агент в качестве внутреннего слоя, а хитозан-фермент в качестве внешнего позволяет создавать системы для регистрации аналитического сигнала непосредственно в чувствительном слое биосенсорного устройства с использованием легкоокисляемых на воздухе реагентов. Преимуществом предложенной флуоресцентного сенсорной системы по сравнению с косвенной системой на основе меченого хитозана, является, помимо наличия прямопропорциональной зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого вещества, является ее экспрессность – время отклика (достижение 90 % величины аналитического сигнала) не превышает 30 с.

При разработке методик определения фенольных соединений с использованием *о*-ФДА, иммобилизованного в чувствительном слое пероксидаза-хитозан, в качестве модельных аналитов выбрали простейший изомерный дигидроксифенол – пирокатехин, катехоламины (допамин и адреналин) и их метаболиты (гомованилиновую и ванилилминдальную кислоты). При применении ЭДА ограничились разработкой методик определения только пирокатехина, допамина и адреналина (табл.8).

Таблица 8. Метрологические характеристики определения фенольных соединений с использованием флуоресцентной биосенсорной системы на основе реакции дериватизации с *о*-ФДА и ЭДА

Определяемое соединение	Диапазон линейности, нМ	c_{min}, нМ	s_r (при $c_н$, n = 5, P = 0,95)
Дериватизирующий агент – о-ФДА			
Пирокатехин	50 – 1000	20	0,03
Допамин	50 – 500	18	0,03
Адреналин	10 – 2500	5	0,04
Гомованилиновая кислота	10 – 250	5	0,03
Ванилилминдальная кислота	5 – 100	3	0,03
Дериватизирующий агент – ЭДА			
Пирокатехин	500 – 5000	180	0,04
Допамин	250 – 5000	75	0,06
Адреналин	250 – 1000	150	0,08

Сенсорные системы с использованием *о*-ФДА позволяет определять катехоламины и их метаболиты на наномолярном уровне концентраций, что достаточно для определения этих соединений в биологических жидкостях человека; а основе на основе ЭДА - на уровне микромолярных концентраций, время реакции в случае этого дериватизирующего агента составляет от 2 до 15 мин. Отклик чувствительного слоя биосенсорных систем на основе *о*-ФДА и ЭДА на уровне 90 – 95% от первоначального сохраняется не менее 1 и 4 недель при 25^{o}C и -20 ^{o}C соответственно.

На примере анализа смесей, содержащих одновременно (попарно) допамин и адреналин; гомованилиновую кислоту и адреналин; ванилилминдальную кислоту и адреналин, установили, что как в растворе, так и при использовании биосенсорного устройства, скорость образования флуоресцентных производных адреналина с *о*-ФДА значительно превосходит скорость дериватизации остальных изученных в работе фенольных соединений, вследствие этого величина аналитического сигнала в перечисленных системах не аддитивна. Определение допамина, гомованилиновой и ванилилминдальной кислот в присутствии адреналина возможно только при их многократном (в 100 – 1000 раз) избытке. При одновременном введении в реакционную систему дофамина и гомованилиновой кислоты, до-

памина и ванинлилминдальной кислоты, а также гомованилиновой и ванилилминдальной кислот сенсорная система давала аддитивный отклик. При этом при pH 10 (оптимальном для определения гомованилиновой кислоты) скорость реакции ферментативной дериватизации ванилилминдальной кислоты с *о*-ФДА уже настолько низка, что позволяет определять гомованилиновую кислоту на фоне двухкратного избытка другого метаболита. В норме содержание гомованилиновой кислоты в биологических жидкостях превышает содержание ванилилминдальной кислоты. Следовательно, биосенсорная система на основе *о*-ФДА может быть использована для суммарного определения гомованилиновой и ванилилминдальной кислот в моче при проведении реакции при pH 9,5, а при pH 10 для определения гомованилиновой кислоты в биообъектах на фоне родственных соединений.

Разработанная нами флуоресцентная биосенсорная система для определения фенольных соединений на основе реакции пероксидазной дериватизации катехоламинов с *о*-ФДА превосходит описанные в литературе аналоги по чувствительности и сопоставима по селективности и воспроизводимости результатов измерения. Метрологические характеристики предложенной сенсорной системы, а также стабильность не только при хранении, но и в процессе эксплуатации позволяет ее использовать для определения катехоламинов и их метаболитов в фармацевтических препаратах, а в отдельных случаях в анализе биологических жидкостей.

Эта же флуоресцентная сенсорная система (в присутствии *о*-ФДА) была также использована для разработки методик определения пероксидов различного строения в интервале концентраций 10-1000 мкМ, при этом чувствительность определения *трет*-бутилгидропероксида была выше, чем при использовании косвенной флуоресцентной и спектрофотометрической биосенсорных систем на основе хитозана. Однако по воспроизводимости результатов измерений и чувствительности определения остальных пероксидов система существенно уступала как спектрофотометрической, так и косвенной флуоресцентной сенсорным системам.

Следует отметить, что спектрофотометрические и флуоресцентные сенсорные системы на основе комплекса пероксидаза-хитозан сопоставимы по чувствительности (лишь в отдельных случаях уступают) с существующими оптическими сенсорами для определения пероксидов различного строения. Значимым преимуществом регистрации аналитического сигнала непосредственно в биораспознающем слое сенсорных систем при определении указанных аналитов является возможность проведения анализа окрашенных, нерастворимых в воде, мицеллярных средах (растворах, суспензиях разной плотности и полярности) без подготовки проб к анализу.

Таким образом, разработанная нами прямая флуоресцентная сенсор-

ная система на основе реакции ферментативной дериватизации фенольных соединений с ароматическим амином – *о*-фенилендиамином позволяет в мягких условиях (при комнатной температуре, в отсутствие токсичных органических растворителей) определять фенольные соединения, в том числе катехоламины и их метаболиты, на уровне нано- и микромолярных концентраций. Достигаемые чувствительность, а в некоторых случаях и селективность анализа позволяют определять указанные соединения не только в фармацевтических и косметических препаратах, но и в биологических жидкостях человека. Последнему также способствует высокая экспрессность предложенной индикаторной реакции – время отклика сенсорного устройства составляет всего 30 с. Кроме того, эта флуоресцентная сенсорная система может быть применена для определения пероксидов различного строения на уровне их микро- и миллимолярных концентраций в объектах со сложной матрицей без предварительной пробоподготовки.

Применение разработанных оптических сенсорных систем для определения фенольных соединений и пероксидов в анализе реальных объектов

Предложенные нами оптические биосенсорные системы были апробированы для определения фенольных соединений (гидрохинона, допамина, адреналина) и органических пероксидов (бензоилпероксида, пероксида мочевины) в косметических и фармацевтических препаратах различной природы (растворимых и нерастворимых в воде). Определение проводили способами градуировочного графика или стандартных добавок без предварительной или минимальной проподготовки. Последняя заключалась в гомогенизации (в случае нерастворимых в воде препаратов) или разбавлением анализируемого образца.

Установили, что результаты определения фенольных соединений в выбранных фармацевтических препаратах хорошо согласуются с содержаниями, указанными производителем (табл. 9).

Флуоресцентную биосенсорную систему с использованием *о*-ФДА применили для гомованилиновой кислоты в моче здорового человека. Анализ проводили способом стандартных добавок в условиях оптимальных для селективного определения гомованилиновой кислоты в анализируемом объекте. Определение проводили без предварительной пробоподготовки анализируемого образца.

Таблица 9. Определение фенольных соединений и пероксидов различного строения в фармацевтических и лекарственных препаратах с использованием оптических сенсорных систем на основе чувствительного слоя пероксидаза – хитозан (n=5, P=0,95)

Сенсорная система	Определяемое соединение / фармацевтический препарат	Найдено, %	Паспортное содержание, %
Спектрофотометрическая сенсорная система	*Гидрохинон* / «Ахромин»	1,9±0,2	1,9
	Бензоилпероксид / «Базирон»	4,8±0,7	5,0
	Бензоилпероксид / «Пероксидерм»	2,8±0,4	2,5
	Пероксид мочевины /«Splat Exreem White»	0,09±0,01	0,1
Флуоресцентная сенсорная система на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой	Гидрохинон / «Ахромин»	2,1 ± 0,2	1,9
	Допамин / «Допамин – Ферейн»	0,53±0,04	0,5
	Адреналин / «Адреналина гидрохлорид»	0,11±0,01	0,1
	Адреналин / «Ксилокаин – Адреналин»	$(5,4\pm0,6)\cdot10^{-4}$	$5\cdot10^{-4}$
	Бензоилпероксид / «Базирон»	4,7±0,6	5,0
	Бензоилпероксид / «Пероксидерм»	2,5±0,4	2,5
	Пероксид мочевины / «Splat Exreem White»	0,11±0,02	0,1
Флуоресцентная сенсорная система на основе дериватизации с *о*-ФДА	*Допамин* / «Допамин – Ферейн»	0,54±0,07	0,1
	Адреналин / «Адреналина гидрохлорид»	0,11±0,02	0,5
	Адреналин / «Ксилокаин – Адреналин»	$(4,9\pm0,6)\cdot10^{-4}$	$5\cdot10^{-4}$
	Бензоилпероксид / «Базирон»	4,7±0,4	5,0
	Бензоилпероксид / «Пероксидерм»	2,4±0,4	2,5
	Пероксид мочевины / «Splat Exreem White»	0,11±0,01	0,1

Таким образом, нами продемонстрирована перспектива применения разработанных спектрофотометрической и флуоресцентных биосенсорных систем на основе твердофазных индикаторных реакций для определения фенольных соединений и пероксидов различного строения в многочисленных объектах с матрицей сложного состава, в том числе нерастворимой в воде, биологических жидкостях без предварительной (или минимальной) пробоподготовки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных в работе результатов позволяет говорить о развитии нового направления в ферментативных методах, и биохимических методах анализа в целом, которое заключается в создании методологии разработки оптических сенсорных систем, основанных на формировании аналитического сигнала не в анализируемом растворе, а непосредственно в чувствительном слое сенсорного устройства и его измерении спектроскопическими методами – спектрофотометрией и флуоресценцией. Основным достоинством предложенного подхода является возможность анализа без предварительной пробоподготовки широкого круга сложных объектов, к которым относятся среды разной полярности, нерастворимые в воде, мицеллярные растворы, непрозрачные мутные и окрашенные среды. При этом следует отметить, что именно для спектрофотометрии и флуоресценции стадия подготовки пробы к анализу является наиболее важной, и именно она характеризуется наибольшими как случайными, так и систематическими погрешностями. Отсутствие стадии пробоподготовки позволяет не только минимизировать погрешности, но также в значительной степени повысить экспрессность определения актуальных аналитов, что особенно важно при работе с объектами с изменяющейся во времени матрицей, например, биологическими жидкостями.

Кроме того, предложенный подход, с использованием которого в настоящей работе созданы сенсорные устройства, схемы анализа, новые индикаторные системы на основе биораспознающих слоев комплексов биокатализаторов с полиэлектролитами, прежде всего, пероксидазы из корней хрена, позволили расширить возможности применения этого фермента в практике химического анализа, а именно расширить круг определяемых соединений за счет средне- и плохо окисляемых субстратов, в частности, фенотиазинов, а также улучшить метрологические характеристики уже известных методик определения ряда биологически активных веществ (фенольных соединений, пероксидов различного строения) – субстратов этого фермента.

Апробация созданных спектрофотометрических и флуоресцентных сенсорных систем в анализе реальных объектов продемонстрировала достоинства и перспективность предложенной методологии.

Следует отметить, что исследование представляется в значительной степени завершенным, но, несомненно, решены не все проблемы (прежде всего, проблемы повышения селективности определения многих актуальных аналитов, в ряде случаев экспрессности анализа), и исчерпаны не все возможности предложенного подхода, поэтому направление продолжает активно развиваться. На основе методологии, разработанной в этой работе, предложены новые селективные мультиплексные сенсорные системы для определения катехоламинов и их метаболитов в биологических жидкостях, широкого круга флавоноидов в фармацевтических препаратах и растительном сырье, схемы анализа и способы регистрации аналитического сигнала методом усиленной рамановской спектроскопии в целях контроля качества нефтепродуктов.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методология создания оптических сенсорных систем, основанных на формировании аналитического сигнала в твердой фазе, непосредственно в чувствительном (распознающем) слое сенсорного устройства, а не в анализируемом растворе, и его измерении спектроскопическими методами – спектрофотометрией и флуоресценцией в сложных по составу объектах без предварительной (или при минимальной) пробоподготовки.
2. Предложены подходы к получению высокоактивного, однородного по структуре и размерам комплекса пероксидазы из корней хрена с хитозаном как основы оптических сенсорных систем для определения биологически активных соединений – субстратов пероксидазы. Отличительными особенностями комплекса пероксидазы с хитозаном являются чрезвычайно высокая каталитическая активность (в два раза большая, чем у нативного биокатализатора), а также стабильность при хранении и в процессе эксплуатации в водных и водно-органических средах.
3. Создано универсальное сенсорное устройство на основе оптически прозрачного биочувствительного слоя пероксидаза – хитозан, способное функционировать как в водных, так и водно-органических средах; разработаны оригинальные схемы проведения анализа и регистрации аналитического сигнала твердой фазы, адаптированные под серийные спектрофотометры и флуориметры.
4. Предложена твердофазная спектрофотометрическая индикаторная реакция, основанная на взаимодействии хитозана с продуктом фер-

ментативного окисления фенольного соединения – хиноном (по механизму присоединения Михаэля), позволяющая определять микромолярные концентрации фенольных соединений и пероксидов различного строения в водных, водно-органических и мицеллярных средах, в том числе в непрозрачных и неоднородных растворах.

5. Разработана спектрофотометрическая сенсорная система для высокочувствительного и селективного определения соединений фенотиазиного ряда в водно-органических экстрактах и плазме крови без предварительной дополнительной подготовки проб к анализу по их специфическому активирующему действию (эффекту субстрат-субстратной активации) в реакции окисления *о*-дианизидина пероксидом водорода в присутствии пероксидазы.
6. Предложены твердофазные флуоресцентные индикаторные реакции, основанные на взаимодействии продуктов пероксидазного окисления фенольных соединений а) с хитозаном, меченным флуоресцентной меткой изотиоцианатом родамина Б (по уменьшению интенсивности флуоресценции – *косвенно*е определение); б) с дериватизирующими агентами: *о*-фенилендиамином и этилендиамином с образованием флуоресцирующих производных (*прямое* определение) для определения нано- - микромолярных концентраций фенольных соединений и пероксидов различного строения в водных, водно-органических и мицеллярных средах, в том числе в непрозрачных и неоднородных растворах, объектах со сложной матрицей (биологических жидкостях).
7. На основе предложенных сенсорных систем разработаны методики определения фенольных соединений, пероксидов различного строения, фенотиазинов и продемонстрированы возможности их применения в анализе косметических, фармацевтических, пищевых объектов с матрицами сложного состава, биологических жидкостях без предварительной (или при минимальной) пробоподготовки.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ ИЗЛОЖЕНЫ В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в Web of Science™, Scopus®:

1. ***Veselova I.A.**, Shekhovtsova T.N.* Visual determination of mercury (II) using horseradish peroxidase immobilized on polyurethane foam. // Anal. Chim. Acta. 1999. V. 413. P. 95 – 101. WOS: 4.950
2. *Шеховцова Т.Н., **Веселова И.А.**, Мугинова С.В.* Ферментативные методы анализа: новые подходы и области применения. // Известия РАН. Серия химическая. 2007. № 4. С. 583-597. РИНЦ: 0.947
3. *Поляков А.Е., Яблоцкий К.В., Мугинова С.В., **Веселова И.А.**, Шеховцова Т.Н.* Ферментативное определение допамина в фармацевтических препаратах. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2009. Т. 75. № 12. С. 18-23. РИНЦ: 0.333
4. Кирейко А.В., **Веселова И.А.**, Шеховцова Т.Н. Ферментативное определение ряда лекарственных веществ в прямых и обращенных мицеллах додецилсульфата натрия. // Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия. 2007. Т. 62. № 4. С. 216 – 220. РИНЦ: 0.525
5. **Веселова И.А.**, Кирейко А.В., Шеховцова Т.Н. Повышение каталитической активности и стабильности пероксидазы хрена за счет включения ее в полиэлектролитный комплекс с хитозаном. // Прикл. биохим. микроб. 2009. Т. 45. № 2. С. 1 – 6. WOS: 0.659
6. *Олейник Л.И., **Веселова И.А.**, Родионов П.В., Будашов И.А., Шеховцова Т.Н.* Оптический биосенсор на основе комплекса {пероксидаза-хитозан} для определения гидрохинона. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2011. Т. 77. № 4. С. 23-28. РИНЦ: 0.333
7. *Malinina L.I., Rodionov P.V., **Veselova I.A.**, Shekhovtsova T.N.* Novel application of chitosan. // Advances in Chitin Sciences. 2011. V. 9. P. 309 – 312. WOS: 3.386
8. ***Veselova I.A.**, Malinina L.I., Rodionov P.V., Shekhovtsova T.N.* Properties and analytical applications of the self-assembled complex {peroxidase–chitosan}. // Talanta. 2012. V. 102. P. 101-109. WOS: 4.162
9. *Родионов П.В., **Веселова И.А.**, Павлова М.Е., Алиева Е.А., Шеховцова Т.Н.* Подходы к повышению чувствительности определения фенольных соединений с использованием твердофазных оптических биосенсоров на основе хитозана. // Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия. 2013. Т. 54. № 3. С. 154 – 163. РИНЦ: 0.525
10. *Родионов П.В., **Веселова И.А.**, Шеховцова Т.Н.* Оптические сенсоры для определения фенольных соединений различного строения. // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 11. С. 1044 – 1055. РИНЦ: 0.626

11. *Борзенкова Н.В.,* ***Веселова И.А.****, Шеховцова Т.Н.* Применение гемсодержащих биокатализаторов для окисления и определения серосодержащих соединений. //Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2013. Т.54. №2. С. 92-101. РИНЦ: 0.525
12. *Rodionov P.V.,* ***Veselova I.A.****, Shekhovtsova T.N.* A solid phase fluorescent biosensor for the determination of phenolic compounds and peroxides in samples with complex matrices. // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. № 5. P. 1531 – 1540. WOS: 3.431
13. ***Веселова И.А.****, Сергеева Е.А., Македонская М.И., Еремина О.Е., Калмыков С.Н., Шеховцова Т.Н.* Методы определения маркеров нейромедиаторного обмена в целях клинической диагностики. // Журн. аналит. химии. 2016. Т.71. № 12. С. 1-15. РИНЦ: 0.626
14. *Родионов П.В., Алиева Е.А., Сергеева Е.А., Павлова М.Е.,* ***Веселова И.А.****, Шеховцова Т.Н.* Определение пероксида водорода и органических пероксидов в мицеллярных и водно-органических средах с использованием спектрофотометрического биосенсора на основе пероксидазы из корней хрена. // Журн. аналит. химии. 2016. Т.71. N 9. С. 971-982. WOS: 0.626
15. ***Veselova I.****, Malinina L., Barsukova M., Tokareva A., Buslova T., Sokolova L., Pirogov A., Shekhovtsova T.* A novel multi-purpose enzymatic system and procedures for the rapid fluorescent determination of flavonoids in herbal pharmaceuticals and plant materials. // Talanta. 2017. T. 171. C. 108-114. WOS: 4.162
16. *Барсукова М.Е., Токарева А.И., Буслова Т.С., Малинина Л.И.,* ***Веселова И.А.****, Шеховцова Т.Н.* Кинетика окисления флавоноидов в водной и водно-органических средах в присутствии пероксидазы, тирозиназы и лакказы. // Прикл. биохим. микробиол. 2017. Т. 53. № 2. С. 146-154. WOS: 0.659
17. *Eremina O.E., Sidorov A.V., Shekhovtsova T.N., Goodilin E.A.,* ***Veselova I.A.*** Novel multilayer nanostructured materials for recognition of polycyclic aromatic sulfur pollutants and express analysis of fuel quality and environmental health by surface enhanced Raman spectroscopy. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2017. V. 9. P. 15058 – 15067. WOS: 7.504
18. *Барсукова М.Е.,* ***Веселова И.А.****, Шеховцова Т.Н.* Основные методы и подходы к определению маркеров окислительного стресса - органических перекисных соединений и пероксида водорода. // Журн. аналит. хим. 2019. Т. 92. № 5. Принята в печать. WOS: 0.626
19. *Makedonskaya M.I.,* ***Veselova I.A.****, Kalmykov S.N., Shekhovtsova T.N.* Novel biosensing system for the simultaneous multiplex fluorescent determination of catecholamines and their metabolites in biological liquids. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2018. V. 156. P. 133-141. WOS: 3.255

Иные публикации:
Главы в сборниках и монографии:

20. *Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В.,* ***Веселова И.А.*** Новые подходы в ферментативных методах определения субстратов оксидоредуктаз. Глава в кн. Биохимические методы анализа. Под ред. Дзантиева Б.Б. Москва: Наука, 2010. С. 12-49.
21. *Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В.,* ***Веселова И.А.*** Развитие ферментативных методов. Химический анализ: на пути к совершенству. Кафедра аналитической химии Московского университета, место издания ЛЕНАНД УРСС Москва. 2015. С. 245-257.
22. ***Веселова И.А.****, Шеховцова Т.Н., Бадун Г.А.* Использование хитозана и его производных для иммобилизации ферментов. // Сборник статей 5 конф. "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.:ВНИРО, 1999. С.265-267.
23. *Родионов П.В.* ***Веселова И.А.****, Шеховцова Т.Н.* Влияние состава матрицы на отклик чувствительного слоя твердофазных оптических биосенсоров на основе хитозана. "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана". Изд-во ВНИРО. Москва. 2014. Р. 81-86.

Патенты:

24. ***Веселова И.А.***, Родионов П.В., Шеховцова Т.Н. Способ получения флуоресцирующих производных катехоламинов и их метаболитов методом дериватизации. Патент РФ № 2554499 от 20 декабря 2012.
25. ***Веселова И.А****., Родионов П.В., Шеховцова Т.Н.* Способ определения катехоламинов и их метаболитов с использованием твердофазного флуоресцентного биосенсора. Патент РФ № 034835 от 23 мая 2013.
26. *Македонская М.И., Еремина О.Е.,* ***Веселова И.А.****, Шеховцова Т.Н.* Тест-система для определения низкомолекулярных маркеров нейромедиаторного обмена в образцах биологических жидкостей, способ ее получения и способ определения катехоламинов и их метаболитов с ее использованием. Заявка на патент РФ № 2017133992 от 29 сентября 2017.