

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Веселова Ирина Анатольевна**

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

02.00.02 – Аналитическая химия

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
доктора химических наук

Москва — 2018

## Содержание

	стр.
<b>Общая характеристика работы</b>	5
<b>Глава 1</b> Пероксидаза в комплексе с хитозаном как основа биораспознающего слоя оптической сенсорной системы	12
1.1 Обоснование выбора природы полисахарида для иммобилизации пероксидазы в целях создания оптических сенсорных систем	15
1.2 Влияние хитозанов с различными молекулярными массами на каталитическую активность и стабильность пероксидазы	19
1.3 Влияние рН, ионной силы и природы буферного раствора на каталитическую активность комплекса пероксидаза – хитозан	22
1.4 Подтверждение существования комплекса пероксидазы с хитозаном, причины повышения каталитической активности фермента в его составе	26
1.5 Влияние диметилсульфоксида на каталитическую активность комплекса пероксидаза-хитозан	40
<b>Глава 2</b> Создание оптических сенсорных устройств, схем регистрации аналитического сигнала для определения биологически активных соединений – субстратов пероксидазы	42
2.1 Выбор конструкции и способов получения спектрофотометрических и флуориметрических сенсорных устройств	44
2.2 Создание оптических сенсорных систем на основе комплекса пероксидазы с хитозаном, схем регистрации спектрофотометрического и флуориметрического сигналов в водных и водно-органических средах	49
<b>Глава 3</b> Спектрофотометрические сенсорные системы для определения фенольных соединений и пероксидов различного строения	58
3.1 Спектрофотометрические твердофазные сенсорные системы для определения фенольных соединений различного строения	59
3.1.1 Обоснование выбора ферментов и индикаторной реакции	63
3.1.2 Выбор условий определения водорастворимых фенольных соединений	77
3.1.3 Аналитические характеристики методик определения водорастворимых фенольных соединений	89
3.1.4 Выбор условий определения нерастворимых в воде фе-	94

	нольных соединений	
3.1.5	Аналитические характеристики методик определения нерастворимых в воде фенольных соединений	102
3.2	Спектрофотометрические твердофазные сенсорные системы для определения пероксидов различного строения	105
3.2.1	Определение пероксидов различного строения в мицеллярных средах	111
3.2.2	Расчет кинетических параметров реакции пероксидазного окисления пирокатехина в мицеллярных средах	115
3.2.3	Определение пероксидов различного строения в водно-органических средах	118
3.2.4	Расчет кинетических параметров реакции пероксидазного окисления пирокатехина в водно-органических средах	120
3.3	Спектрофотометрические твердофазные сенсорные системы для определения фенольных соединений и пероксидов в анализе реальных объектов	124
3.3.1	Спектрофотометрические твердофазные сенсорные системы для определения фенольных соединений в анализе реальных объектов	126
3.3.2	Определение пероксидов различного строения в реальных объектах	128
<b>Глава 4</b>	<b>Спектрофотометрические сенсорные системы для определения фенотиазинов</b>	<b>133</b>
4.1	Спектрофотометрическое определение фенотиазинов по их пероксидазному окислению в водных и водно-органических средах	138
4.2	Спектрофотометрическая сенсорная система на основе комплекса пероксидаза-хитозан для определения фенотиазинов по их влиянию на скорость окисления о-дианизидина пероксидом водорода	149
4.3	Определение промазина в плазме крови человека с использованием спектрофотометрической сенсорной системы и эффекта субстрат-субстратной активации	156
<b>Глава 5</b>	<b>Флуоресцентные сенсорные системы для определения фенольных соединений и пероксидов на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой</b>	<b>161</b>
5.1	Оптическая сенсорная система для определения фенольных соединений на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой	162
5.1.1	Выбор условий проведения индикаторной реакции на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой	165

5.1.2	Изучение сорбции фенольных соединений и продуктов их окисления биочувствительным слоем на основе хитозана	171
5.1.3	Аналитические характеристики определения фенольных соединений с использованием флуоресцентной биосенсорной системы на основе меченого хитозана	178
5.2	Оптическая сенсорная система для определения пероксидов различного строения на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой	183
<b>Глава 6</b>	<b>Флуоресцентные сенсорные системы для определения катехоламинов и пероксидов на основе реакции дериватизации аналитов</b>	<b>188</b>
6.1	Флуоресцентная сенсорная система для определения катехоламинов на основе реакции их дериватизации с различными аминами	191
6.1.1	Выбор условий получения флуоресцирующих производных катехоламинов с различными аминами по реакции ферментативной дериватизации	193
6.1.2	Выбор условий получения флуоресцирующих производных катехоламинов в биочувствительном слое на основе хитозана	220
6.1.3	Флуоресцирующие производные фенольных соединений с <i>o</i> -ФДА и ЭДА в чувствительном слое пероксидаза-хитозан: выбор условий формирования аналитического сигнала в твердой фазе	203
6.1.4	Аналитические характеристики методик определения фенольных соединений по реакции их ферментативной дериватизации с <i>o</i> -ФДА и ЭДА	218
6.2.	Определение пероксидов различного строения с использованием флуоресцентной биосенсорной системы на основе <i>o</i> -ФДА	224
6.3	Применение разработанных флуоресцентных биосенсорных систем для определения фенольных соединений и пероксидов в анализе реальных объектов	226
	<b>Заключение</b>	<b>231</b>
	<b>Выводы</b>	<b>233</b>
	<b>Список литературы</b>	<b>235</b>

## 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 обладают достаточно широкой групповой специфичностью к разным по свойствам и строению соединениям. Таким ферментом является пероксидаза из корней хрена. Этот хорошо изученный коммерческий препарат занимает особую нишу в биоаналитической химии. 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

фильтрации 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, неизвестного 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, рН, 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 большая 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 фенотиазинового 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 *o*-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 *o*-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 фенотиазинового 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 *o*-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 *o*-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 присутствии *o*-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:**

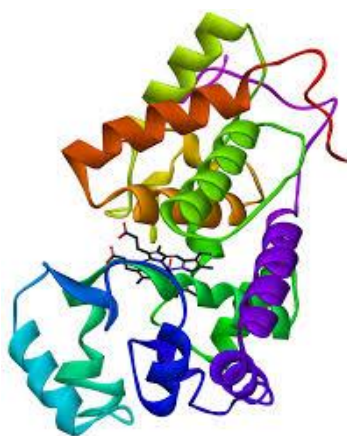
- Подходы к созданию высокоактивных, однородных по структуре и размерам комплексов пероксидазы с полиэлектролитами, стабильных при хранении и в процессе эксплуатации в водных, водно-органических и мицеллярных средах как основы оптических сенсорных систем для определения биологически активных соединений – 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.

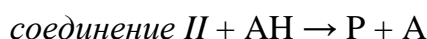
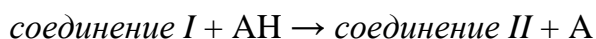
## ГЛАВА 1. ПЕРОКСИДАЗА В САМОСОБИРАЮЩЕМСЯ КОМПЛЕКСЕ С ХИТОЗАНОМ КАК ОСНОВА БИОРАСПОЗНАЮЩЕГО СЛОЯ ОПТИЧЕСКОЙ СЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ

На настоящий момент времени *пероксидаза из корней хрена* один из самых активно используемых ферментов в практическом химическом анализе, она катализирует окисление широкого спектра органических соединений пероксидом водорода. Пероксидазы (КФ 1.11.1.X) относятся к ферментам класса оксидоредуктаз и катализируют окисление широкого спектра субстратов в присутствии пероксида водорода и других пероксидов. Молекулярная масса ферментов этого типа колеблется от 17 до 84 кДа, а длина полипептидной цепи – от 153 до 753 аминокислотных остатков. Пероксидаза хрена имеет молекулярную массу около 44173.9 Да и включает от 203 до 308 аминокислотных остатков в зависимости от природы изофермента, которые образуют третичную структуру с двумя доменами (большим и малым). Фермент имеет размер белковой глобулы равный 50 А [1]. Белковая глобула обычно образована 10–11  $\alpha$ -спиралями,  $\beta$ -складки либо отсутствуют, либо представлены слабо. В большинстве случаев в молекуле различают два структурных домена, между которыми в гидрофобном кармане расположена простетическая группа – гем (комплекс железа с протопорфирином IX) (рис. 1).



**Рис 1.** Схематичное изображение структуры пероксидазы  
из корней хрена *C1*.

Пероксидазный цикл включает связывание фермента и молекулы пероксида с образованием комплекса {железо-пероксид} и его последующим переходом в так называемое *соединение I*. Восстановление *соединения I* фенольным соединением приводит к образованию *соединения II*. А восстановление *соединения II* к образованию исходной формы фермента. Образовавшийся феноксильный радикал переходит в хинон или полимеризуется.



где P ( $E-Fe^{III}$ ) – пероксидаза хрена, *соединение I* ( $^+E-Fe^{IV}=O$ ) и *соединение II* ( $^+EH-Fe^{IV}=O$ ) – два спектроскопически и кинетически различных интермедиата, AH и A – второй субстрат и соответствующий ему радикал [1, 2].

Однако ее еще более широкое применение ограничено недостаточной специфичностью и чувствительностью к ряду субстратов на фоне матриц сложного состава, влиянием последних на каталитическую активность биокатализатора, что приводит к искажениям результатов анализа, 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 [2].

В течение трех последних десятилетий интерес исследователей к поиску подходов к осуществлению ферментативного катализа в средах органических растворителей неуклонно растет [2–5]. Следует отметить, что в системах неполярных (гидрофобных) растворителей, практически не влияющих на структуру белков, ферменты, как правило, сохраняют каталитически активную конформацию [6, 7] и стабильны [8, 9]. В присутствии полярных органических растворителей вследствие денатурации белковой глобулы биокатализаторы частично или полностью теряют каталитическую активность [10, 11]. Среди приемов, рекомендуемых для повышения устойчивости биокатализаторов к этому типу инактивации, можно отметить следующие: иммобилизация ферментов на твердых носителях [12], замена аминокислотных остатков белка [13, 14], его ковалентная модификация низкомолекуляр-

ными реагентами [15, 16] и полимерами [17,18]. Однако ни один из этих способов стабилизации биокатализаторов не позволяет сохранить их высокую каталитическую активность в широком диапазоне содержаний полярных органических растворителей.

Перспективным подходом ранее (до работ авторов) не использованным в химическом анализе к преодолению указанных проблем является включение биокатализаторов в самособирающиеся структуры полиэлектролитов. 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, изменяя их соотношение в смеси для иммобилизации, условия формирования комплекса (природу буферных растворов, рН, ионную силу и т.д.) [19, 20].

Следует отметить, что способ включения фермента в самособирающиеся комплексы отличается универсальностью, простотой применяемых методик, обеспечивает равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя, что позволяет получить стабильные иммобилизованные препараты с хорошо воспроизводимыми характеристиками [18, 19]. Такие системы легко формируются, оптически прозрачны и удобны для дальнейшего применения в химическом анализе, в том числе в составе сенсорных структур. Образование нековалентных комплексов между полиионами является на сегодняшний день наиболее простым путем формирования структур как нано- (водорастворимые конъюгаты, наночастицы), так и микроскопических (физические гели, пленки) размеров [20]. Последующее их закрепление на твердых носителях (оптических стеклах, тест-полосках, пластинках и т.д.) приводит к значительному улучшению механических свойств ферментных препаратов, и служит основой для конструирования биосенсоров [21].

*Природные полисахариды* являются одними из наиболее распространенных полимеров, которые используются для формирования нековалентных комплексов с ферментами. Повышенное внимание к этому типу полиэлектролитов обусловлено не только их способностью образовывать комплексы с белками, но универсальной биосовместимостью с биологическими катализаторами различной природы [22, 23]. Варьируя химическую природу, молекулярную массу полисахаридов, используя их различные производные, меняя соотношение полимеров–фермент, можно

получать препараты с оптимальными для каждого белка характеристиками в целях их дальнейшего применения в аналитической практике и биотехнологических процессах.

Таким образом, появляются возможности создания высокоактивных и стабильных ферментативных систем с заданными свойствами (чувствительностью и селективностью) для решения конкретных аналитических задач.

На основании вышесказанного целью этой главы работы являлось создание как основы оптических сенсорных систем для определения биологически активных соединений – субстратов пероксидазы высокоактивных, однородных по структуре и размерам комплексов пероксидазы с полиэлектролитами, стабильных при хранении и в процессе эксплуатации в водных и водно-органических средах.

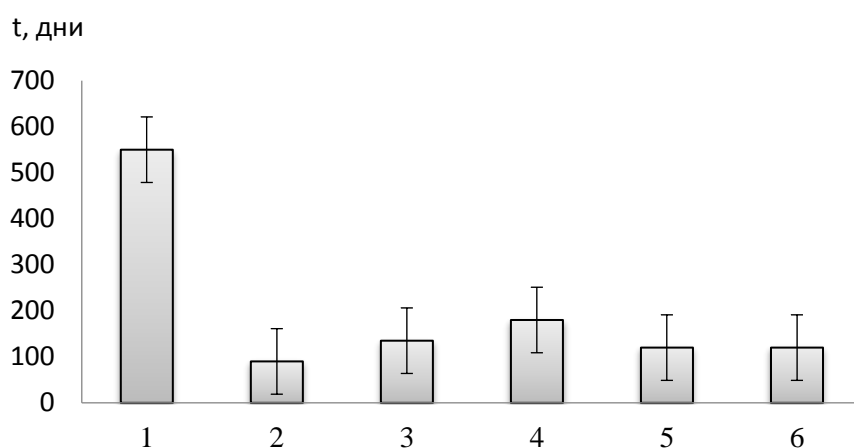
### **1.1 Обоснование выбора природы полисахарида для иммобилизации пероксидазы в целях создания оптических сенсорных систем**

Как известно, комплексы катионной пероксидазы с анионными, неионогенными и катионными полиэлектролитами могут образовываться в результате различных типов взаимодействий: электростатических, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных соответственно. Кроме того, в случае катионных полимеров ассоциация последних с ферментами может происходить за счет солевых ионных связей [24].

При выяснении влияния природы полиэлектролитов на физико-химические свойства пероксидазы нами были изучены природные и полуприродные полисахариды трех различных типов: анионные – карбоксиметилцеллюлоза и альгинат кальция, неионогенные – агароза,  $\beta$ -циклодекстрин и крахмал, а также катионный – хитозан [2, 25].

Активность и стабильность пероксидазы в их присутствии контролировали по скорости индикаторной реакции окисления пероксидом водорода *o*-дианизидина [25, 26]. Несмотря на различную природу и тип полисахаридов, все они оказывали активирующее действие ( $22 \pm 4$  %) на скорость пероксидазного превращения органического субстрата [27]. Этот факт может быть объяснен стабилизацией низких концентраций ферментов в водных растворах в результате их сорбции на полимерах, в следствие которой наблюдается кажущееся увеличение активности биокатализатора [22, 25].

При этом стабильность препаратов пероксидазы значительно зависела от типа полимера. Комплексы фермента с анионными и неионогенными полисахаридами, которые формируются за счет электростатических и Ван-дер-ваальсовых взаимодействий, теряли более чем 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 дальнейшего аналитического применения ферментных препаратов в химическом анализе, в том числе в составе сенсорных устройств (рис. 2) [25, 27].



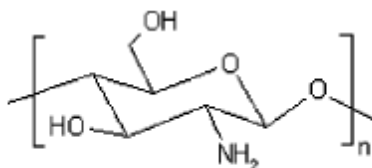
**Рис. 2.** Продолжительность (t, дни) сохранения не менее 50% активности (от начальной) препаратами пероксидазы в присутствии различных полисахаридов (**1** – хитозан, **2** – карбоксиметилцеллюлоза, **3** – крахмал, **4** – циклодекстрин, **5** – агароза, **6** – альгинат кальция).

*Хитозан* - природный полисахарид обладает высоким сродством к белкам, особенно 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. 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 [28]. Хитозан является перспективной матрицей для создания оптических сенсоров, поскольку не поглощает в ближней УФ и видимой областях спектра [29, 30]. Наличие реакционно-способных аминогрупп в составе полимера,



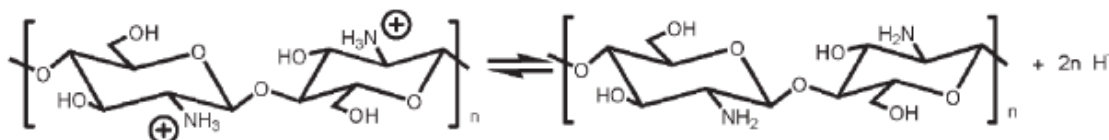
как это будет показано ниже, позволяет регулировать чувствительность и селективность пероксидазы к ряду органических субстратов, например фенолам различного строения [25].

С химической точки зрения, хитозан представляет собой полимер с большим числом свободных аминогрупп (рис. 3). Его получают в результате деацелирования природного полисахарида хитина [31, 32].



**Рис. 3.** Структурная формула хитозана.

Хитозан хорошо растворяется в слабокислых средах, в частности, в разбавленных растворах органических (муравьиной, уксусной) и некоторых минеральных (например, соляной) кислот, в которых аминогруппы полимера переходят в ионизованное и гидратированное состояние (схема 1) [31]:



**Схема 1.** Реакция протонирования-депротонирования хитозана.

Неорганические кислоты используют для растворения хитозана только при определенном значении pH при длительном нагревании и встряхивании [31]. Так, азотная кислота растворяет хитозан, но со временем при стоянии раствора из него выпадает белый осадок соли. Соляная кислота растворяет полимер после часового нагревания и встряхивания. В органических кислотах хитозан растворяется в более мягких условиях. Процесс растворения хитозана в растворах многоосновных кислот (серной, фосфорной, щавелевой) сопровождается межмолекулярной или внут-

римолекулярной сшивкой хитозановых цепей за счет связывания протонированных аминогрупп хитозана многозарядными анионами кислот [32].

Причем по мере увеличения концентрации кислоты степень сшивки хитозана возрастает; он претерпевает различные физические изменения, такие, например, как переход от наночастиц к макроагломератам. В классических растворителях, таких как вода, органические растворители, щелочи, хитозан нерастворим. Константа ( $pK_a$ ) кислотной диссоциации хитозана составляет примерно 6,5 [32], таким образом, хитозан является слабым полимерным основанием.

Однако сочетание высокой стабильности и каталитической активности фермента в составе комплекса с полиэлектролитами достигается только в результате детального изучения и оптимизации условий его образования, а именно содержания полисахарида в смеси для иммобилизации фермента, его молекулярной массы (ММ), рН, ионной силы и природы буферного раствора.

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 *o*-дианизидина пероксидом водорода, катализируемой нативной пероксидазой и в составе комплекса с хитозаном. Следует отметить, что столь детального изучения условий формирования самособирающихся структур на основе хитозана с ферментами не проводились, все полученные результаты являются новыми и оригинальными.

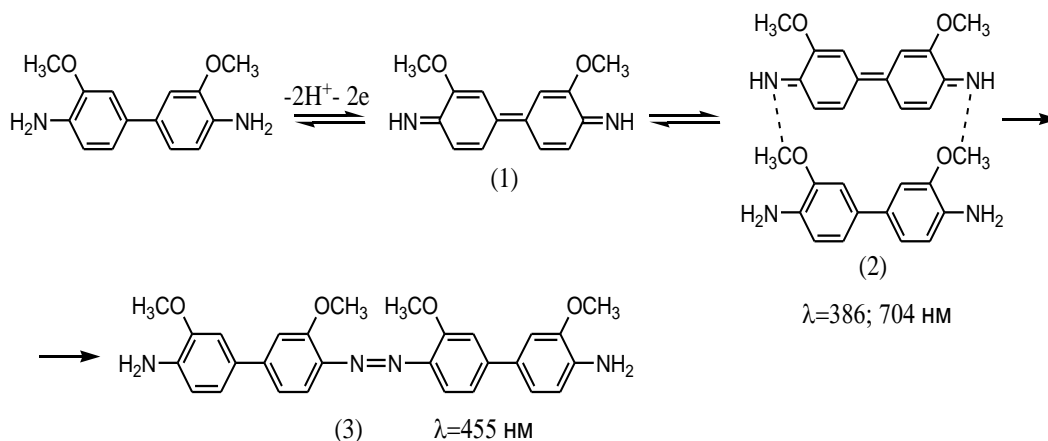
## **1.2. Влияние хитозанов с различными молекулярными массами на каталитическую активность и стабильность пероксидазы**

В исследовании был использован коммерческий препарат хитозана марки (Sigma-50494, США) со средней молекулярной массой (ММ) 150 кДа и степенью деацелирования 85 мас. %. Более низкомолекулярные полимеры (со средними ММ 5, 10, 25 кДа) были предоставлены Центром «Биоинженерия» РАН.

Для контроля активности фермента в качестве индикаторной была использована реакция окисления пероксидом водорода *o*-дианизидина в водных растворах и в средах полярных органических растворителей (этанола, ацетонитрила, в том чис-

ле диметилсульфоксида (ДМСО) - наиболее эффективного ингибитора каталитической активности пероксидазы). Кинетика и механизм этой реакции хорошо изучены [33 – 35]. Кроме того, в реакциях пероксидазного окисления ароматических диаминов каталитическая активность фермента наиболее чувствительна к действию ДМСО [36, 37], что представляет особый интерес при изучении устойчивости пероксидазы хрена в присутствии хитозана в водно-органических средах.

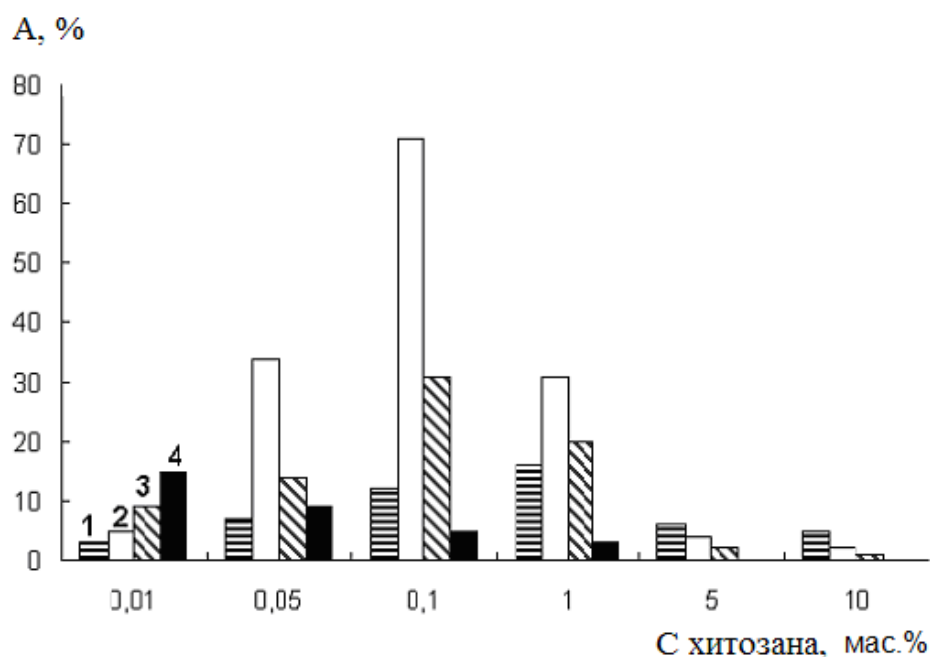
В спектре поглощения продуктов пероксидазного окисления *o*-дианизида наблюдаются три максимума, которые соответствуют 386, 455 и 704 нм. Согласно литературным данным как ферментативное, так и неферментативное окисление *o*-дианизида при значениях рН, близких к нейтральным, протекает по схеме 2:



**Схема 2.** Механизм окисления *o*-дианизида [33].

Стабильным продуктом пероксидазного окисления *o*-дианизида является *бис*-азобифенил, образующийся в результате конденсации двух молекул хинондиимина и имеющий коричневую окраску (соединение 3;  $\lambda_{\text{max}}$  453 – 475 нм) (схема 2). Установлено также [34], что окисление *o*-дианизида протекает через образование промежуточного соединения зеленого цвета, которому приписана мерихиноидная структура ( $\lambda_{\text{max}}$  386 и 704 нм) [35]. Согласно литературным данным хинондиимин обратимо взаимодействует с *o*-дианизином с образованием комплекса с переносом заряда, который довольно чувствителен к изменению рН реакционной среды и концентраций компонентов [34].

В результате изучения влияния хитозанов с различными молекулярными массами (ММ) на каталитическую активность пероксидазы из корней хрена было показано, что все хитозаны со средними ММ 5, 10, 25 и 150 кДа при их различных содержаниях в реакционной смеси (0,01 – 10 и 0,001 – 0,05 мас. % соответственно) оказывают активирующее действие на пероксидазу, которое зависит как от молекулярной массы полимера, так и от его содержания в реакционной смеси [25].



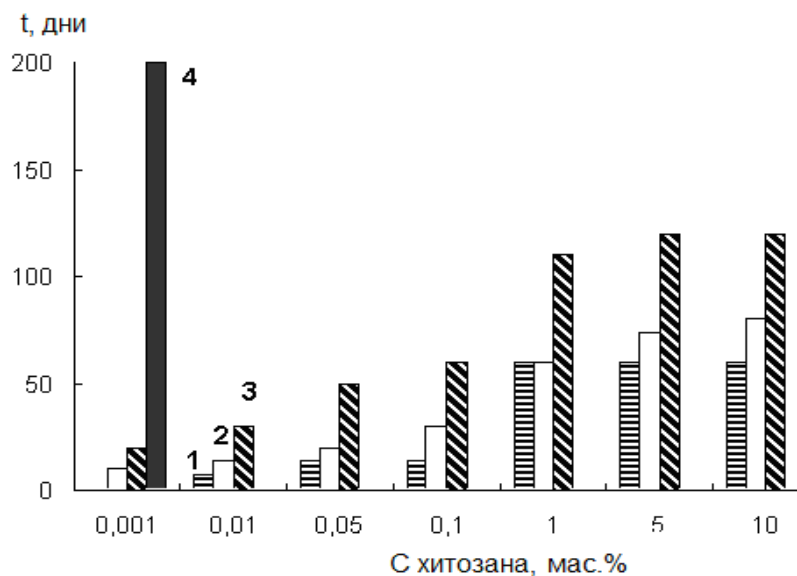
**Рис. 4.** Зависимость степени активации ( $A, \%$ ) пероксидазы от средней молекулярной массы (ММ, кДа) и содержания ( $C_{\text{хитозана}}$ , мас. %) хитозана в реакционной смеси (0,05 М фталатный буферный раствор, pH 5,0; концентрации (на этом и последующих рисунках): пероксидазы – 0,1 нМ, *o*-Д – 10 мкМ, пероксида водорода – 80 мкМ); ММ хитозана, кДа: **1** – 5; **2** – 10; **3** – 25; **4** – 150.

Было установлено, что наибольшим активирующим действием на пероксидазу обладает 0,1 мас. % раствор хитозана со средней ММ 10 кДа (рис. 4). Степень активирования пероксидазы рассчитывали по формуле [27]:

$$A, \% = \{ (tg_{\text{хитозан}} - tg_0) / tg_0 \} \cdot 100,$$

где  $tg_0$  и  $tg_{\text{хитозан}}$  – тангенсы углов наклона начальных прямолинейных участков кинетических кривых ферментативной реакции в отсутствие и в присутствии полисахарида соответственно.

Полученные препараты пероксидазы с хитозанами со средними ММ 5, 10, 25 и 150 кДа хранили при 4<sup>0</sup>С и контролировали их активность до тех пор, пока она сохранялась на уровне не менее 50 % от первоначальной (рис. 5) [2].



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

Как видно из приведенных данных, стабильность ферментных препаратов в присутствии низкомолекулярных хитозанов (со средними ММ 5, 10 и 25 кДа) повышалась с возрастанием ММ полисахарида и его процентного содержания в смеси для иммобилизации; наибольшей стабильностью (50 % первоначальной активности сохранялись в течение 120 дней) характеризовался образец, полученный при использовании 10 мас. % хитозана с ММ 25 кДа [2]. Однако максимальной стабильностью отличался препарат пероксидазы, связанной с высокомолекулярным (ММ 150 кДа) 0,001 мас. % хитозаном: фермент сохранял не менее 50% первоначальной активности в течение 550 дней.

Следующим этапом работы являлось выяснение природы взаимодействия пероксидазы с хитозаном; изучение зависимости активности пероксидазы от содержания хитозана, рН, ионной силы и природы буферного раствора; выяснение оптимальных условия формирования высокоактивного и стабильного самособирающегося комплекса в водных и водно-органических средах, исследование причин его активирующего действия на фермент; а также оценка перспективности и целесообразность его использования в химическом анализе. Ранее такие исследования не проводились.

В качестве модельного полисахарида был выбран хитозан с ММ 150 кДа, поскольку именно этот препарат коммерчески доступен, а его строение и свойства хорошо охарактеризованы различными физико-химическими методами [38]; кроме того, при иммобилизации в присутствии именно этого полисахарида пероксидаза из корней хрена стабильна в течение наиболее длительного времени. Все вышеперечисленные факторы указывают на перспективность применения указанного полисахарида в дальнейшем в аналитической практике при разработке методик и создании биосенсорных систем для определения биологически активных субстратов пероксидазы в различных средах.

### **1.3 Влияние рН, ионной силы и природы буферного раствора на каталитическую активность комплекса пероксидаза-хитозан**

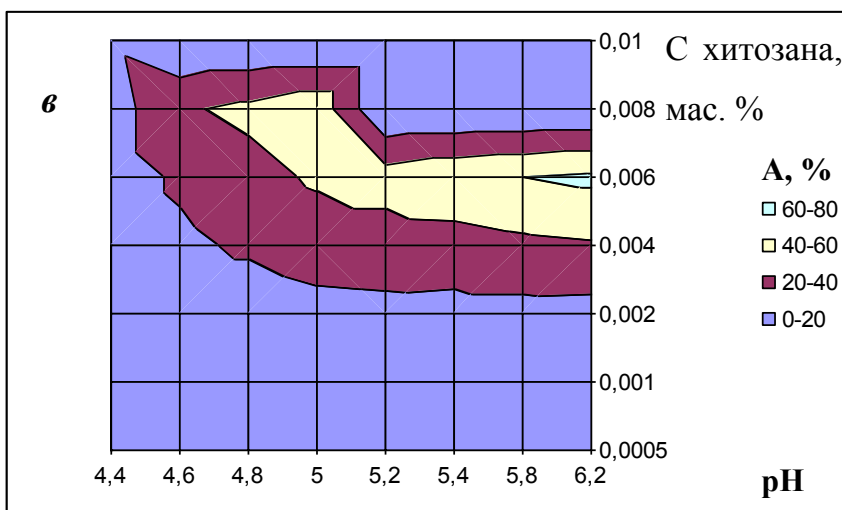
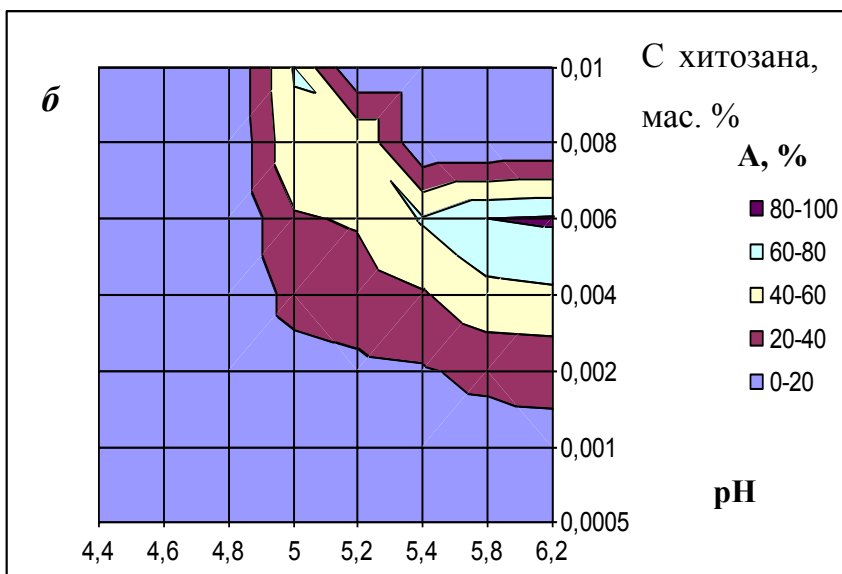
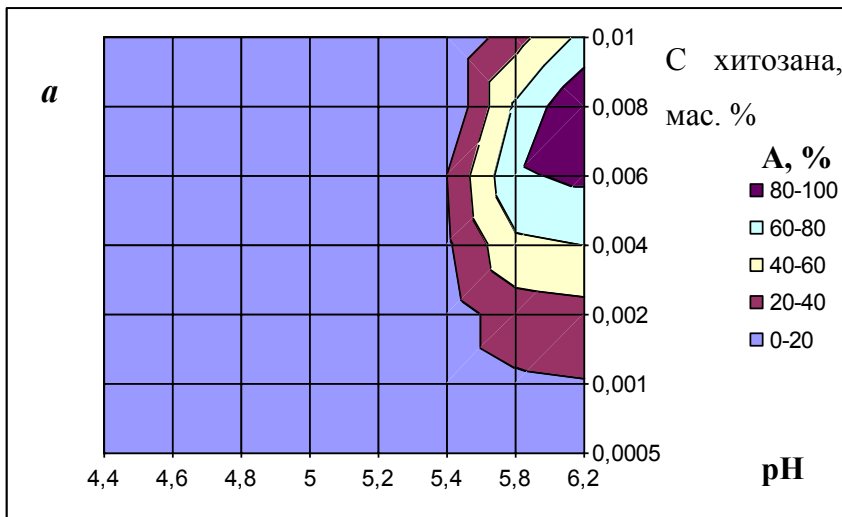
Было предположено, что активирующее действие хитозанов на пероксидазу обусловлено, очевидно, образованием самособирающегося комплекса ферментом и полисахаридом, более каталитически активного, чем нативный биокатализатор. Формирование комплексов пероксидазы хрена с синтетическим полимером поли(5-аминодисульфидом) салициловой кислоты [39], панкреатической рибонуклеазы с декстран-сульфатами разных молекулярных масс [40, 41], химотрипсина с анионными синтетическими полиэлектролитами (полиглутамином или сополимером этилена и малеиновой кислоты) [41] и др. также приводило к повышению каталитической активности ферментов. Аналогичное повышение активности таких ферментов, как ксантиноксидаза и хитиназа, за счет образования ими комплексов с хитозаном отмечено в работе [30].

Влияние рН, ионной силы и природы буферного раствора на каталитическую активность комплекса пероксидаза-хитозан было детально изучено в оптимальных условиях формирования нековалентных комплексов, образующихся в результате электростатических взаимодействий между полиионами. Такое исследование необходимо прежде всего в тех случаях, когда значения рКа полимера (рКа хитозана - 6,3-6,5; он растворим только в протонированной форме [30, 31]) и изоэлектрической точки фермента (рI пероксидазы - 7,2 [32]) близки по значениям.

Нами была изучена зависимость каталитической активности пероксидазы в реакции окисления *o*-дианизидина в присутствии 0,0005 – 0,01 мас. % хитозана от рН (4,4 – 6,2) и концентрации фталатного буферного раствора (0,05 – 0,2 М) (рис. 6 а – в).

В указанном диапазоне концентраций фталатного буферного раствора сочетаются высокая каталитическая активность пероксидазы с хорошей воспроизводимостью скорости ферментативного процесса. Выбор диапазона рН обусловлен, во-первых, буферной емкостью фталатного буферного раствора [43], а, во-вторых, при значениях рН буферного раствора меньших 4,0 каталитическая активность пероксидазы резко снижается, а при рН больших 6,5 хитозан выпадает в осадок вследствие его перехода в депротонированную форму.

Каталитическая активность пероксидазы в реакции окисления *o*-дианизидина в присутствии 0,0005-0,01 мас. % хитозана с ММ 150 кДа оказалась максимальной в 0,05 М фталатном буферном растворе при рН 5,8-6,2 [2, 25]. Таким образом, активность комплекса максимальна в той области рН, в которой, судя по значениям рКа хитозана и точки электронейтральности пероксидазы, можно предполагать наличие наибольшего количества противоположно заряженных групп пероксидазы и хитозана, необходимых для формирования упорядоченного самосборочного комплекса фермент-полисахарид.



**Рис. 6.** Степень активирования пероксидазы при различных содержаниях хитозана, рН и концентрациях фталатного буферного раствора – 0,05 ( *а* ), 0,1 ( *б* ) и 0,2 М ( *в* ).



При изучении влияния природы буферного раствора на свойства и условия формирования комплекса использовали помимо фталатного, 0,05 М фосфатный и цитратный буферные растворы с рН 5,8-6,2.

В цитратном буферном растворе каталитическую активность пероксидазы не зависела от присутствия хитозана при различных его содержаниях (0,0005-0,01 мас. %) в реакционной смеси. В фосфатном буферном растворе хитозан активировал пероксидазу, но в меньшей степени, чем во фталатном буферном растворе. Было предположено, что различия в действии полисахарида на каталитическую активность фермента в зависимости от природы, рН и концентрации буферного раствора может быть обусловлено либо изменением ионной силы реакционной смеси, заряда аниона, либо совместным действием этих двух факторов [30].

В целях установления причин влияния состава буферных растворов на активность пероксидазы и выбора оптимальных условий формирования комплекса фермент-хитозан были изучены диаграммы распределения форм фталевой, фосфорной и лимонной кислот, а также рассчитаны значения ионной силы соответствующих буферных растворов при рН 5,8. Последняя возрастает в ряду 0,05 М буферных растворов: фосфатный ( $I = 0,03$  М), фталатный ( $I = 0,09$  М), цитратный ( $I = 0,18$  М). Причем ионная сила в 0,05 М цитратном буферном растворе всего в 1,5 раза ниже, чем в 0,2 М фталатном буферном растворе с  $I = 0,27$  М, при которой степень активирования пероксидазы хитозаном составляла более 60 %. Таким образом, в выбранных составе среды и условиях формирования комплекса фермент-полисахарид ионная сила не оказывает значительного влияния на каталитические свойства пероксидазы.

Следует отметить, что согласно распределительным диаграммам, при рН 5,8 около 7 % фосфорной и 80 % лимонной кислот находятся в виде двухзарядных ионов; при указанном значении рН такие ионы отсутствуют в случае фталевой кислоты. По литературным данным [44] 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

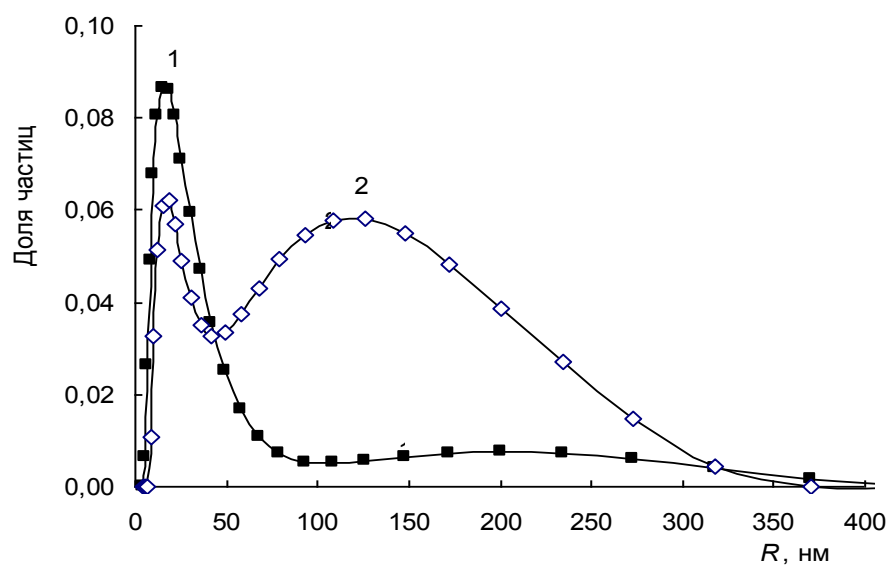
взаимодействие хитозан-хитозан, что приводит к кажущемуся снижению каталитической активности фермента в присутствии полисахарида по сравнению с фталатным буферным раствором.

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 рН 5,8-6,2. Таким образом, активность комплекса максимальна в той области рН, которая близка к значениям рКа хитозана и точки электронейтральности пероксидазы.

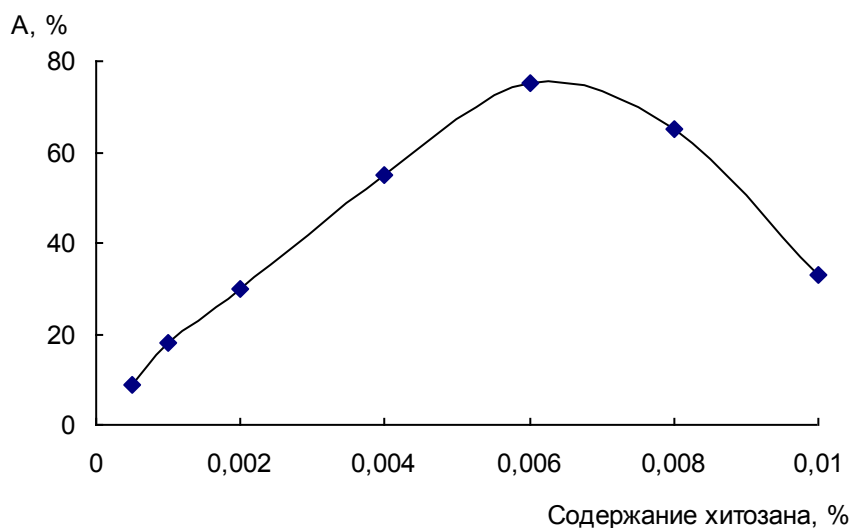
Не меньшее значение имело и содержание хитозана в системе. Наибольшую каталитическую активность (практически в два раза выше, чем у нативного фермента) комплекс фермента с полисахаридом проявлял в 0,05 М фталатном буферном растворе при содержании высокомолекулярного хитозана в реакции 0,006-0,009 мас. %.

#### **1.4. Подтверждение существования комплекса пероксидазы с хитозаном, причины повышения каталитической активности фермента в его составе**

Образование комплекса пероксидазы с хитозаном было подтверждено методом светодинамического рассеяния, который является на сегодняшний день одним из самых информативных методов для изучения распределения частиц по размерам. Установлено, что при содержании хитозана 0,006 мас. %, при котором в условиях 0,05 М фталатный буферный раствор с рН 5,8 скорость каталитического процесса максимальна, преобладает фракция частиц хитозана с гидродинамическим радиусом ( $R$ , нм) 15 – 20 нм (рис. 7, кривая 1). При увеличении содержания хитозана появляются более крупные его агрегаты, значимой становится фракция с размером частиц 120 – 140 нм (рис. 7, кривая 2), при этом активирующий эффект полисахарида на пероксидазу снижался (рис. 8).



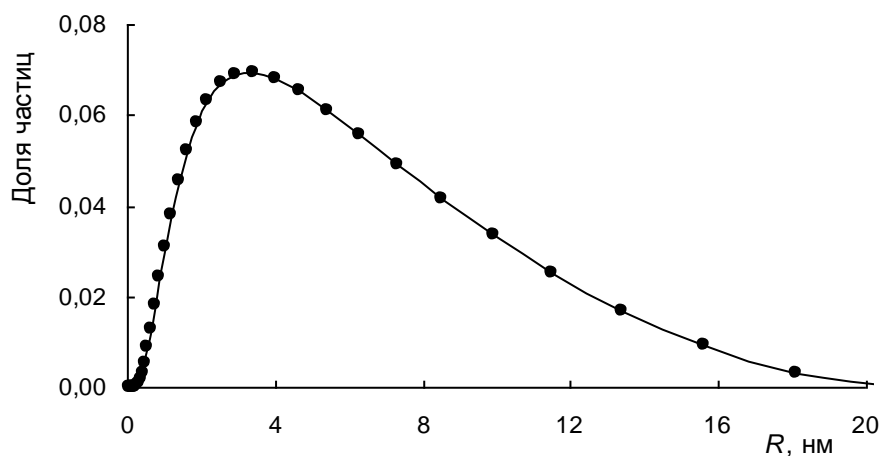
**Рис. 7.** Распределение частиц хитозана (0,006 (1) и 0,02 мас.% (2)) по размерам в 0,05 М фталатном буферном растворе, pH 5,8.



**Рис. 8.** Зависимость степени активирования (A,%) пероксидазы от содержания хитозана с ММ 150 кДа (мас.%) в 0,05 М фталатном буферном растворе с pH 5,8.

Последнее может быть обусловлено двумя факторами: меньшей эффективностью электростатического взаимодействия с ферментом более крупных частиц хитозана, образованных в результате его самопроизвольной межмолекулярной сшивки; а также образованием более плотной полимерной оболочки вокруг пероксидазы, лимитирующей доступ субстратов к активному центру биокатализатора.

В отсутствие хитозана средний размер частиц пероксидазы при ее концентрации 0,1 – 100 нМ в 0,05 М фталатном буферном растворе с рН 5,8 составляет 4 – 6 нм (рис. 9). Варьирование концентрации фермента в растворе не приводило к изменению среднего размера частиц пероксидазы.



**Рис. 9.** Распределение частиц пероксидазы (0,1 нМ) по размерам в 0,05 М фталатном буферном растворе с рН 5,8.

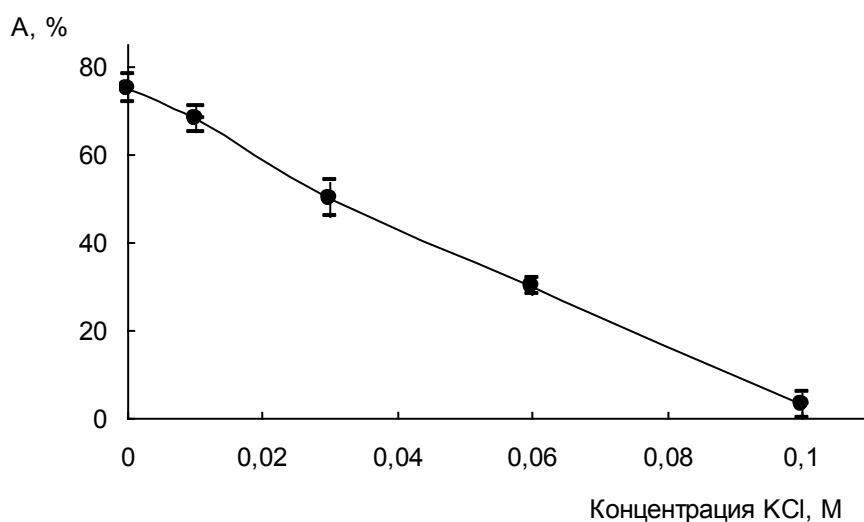
При исследовании воспроизводимости однородности получаемых частиц по их среднему гидродинамическому радиусу было установлено, что в оптимальных условиях формирования комплекс пероксидазы с хитозаном представляют собой упорядоченную структуру со средним размером частиц  $22 \pm 3$  нм [30].

Столь высокая однородность получаемых частиц на наноуровне свидетельствует о перспективности их использования в дальнейшем для получения гомоген-

ных и воспроизводимых биочувствительных поверхностей (пленок) как основы оптических сенсорных систем.

Как уже было отмечено выше, комплекс пероксидазы с хитозаном проявляет максимальную каталитическую активность в области рН близкой к изоэлектрической точке белка и полимера [30-32].

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 [25, 45]. 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 [46, 47]. Предварительно было показано, что в отсутствие полисахарида хлорид калия в изученном интервале концентраций не оказывал влияния на скорость ферментативного процесса.



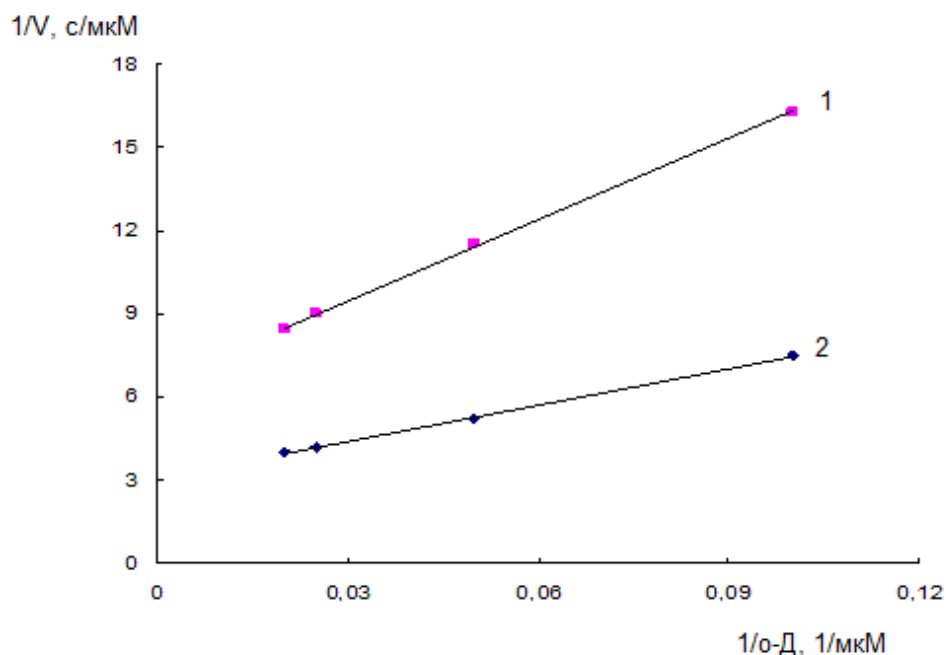
**Рис. 10.** Зависимость степени активирования пероксидазы хитозаном (0,006 мас.%) от концентрации хлорида калия в 0,05 М фталатном буферном растворе с рН 5,8.

При этом было выявлено, что степень активирующего действия хитозана на пероксидазу понижается по мере увеличения концентрации КСl в реакционной

смеси (рис. 10), что свидетельствуют о том, что активирующее действие хитозана обусловлено формированием комплекса полисахарида с пероксидазой посредством электростатических и/или Ван-дер-ваальсовых взаимодействий между полиионами.

В ряде работ было показано, что полиэлектролиты могут значительно изменять такие кинетические характеристики ферментативных реакций, как каталитическая константа  $k_{cat}$  и наблюдаемая константа Михаэлиса  $K_M$ . Эти эффекты связаны со сдвигом рН-зависимости активности ферментов,  $pK_a$  их ионогенных групп, изменением локальной концентрации субстратов при взаимодействии с заряженной матрицей, стерическим блокированием фермента в результате образования им комплекса с полиэлектролитом и другими факторами [48].

В связи с вышесказанным была детально изучена кинетика реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода в отсутствие и присутствии хитозана. Кинетические параметры  $V_{max}$  и  $K_M$  определяли методом линейаризации уравнения Михаэлиса-Ментен в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка [49]. Для обеспечения подчинения процесса пероксидазного окисления *o*-дианизидина механизму Михаэлиса данные по стационарной кинетике получали при избытке одного из субстратов, то есть в условиях, когда ферментативную реакцию можно рассматривать как односубстратную [50]. Все исследования проводили в оптимальных условиях формирования высокоактивного комплекса - 0,05 М фталатном буферном растворе в диапазоне рН 4,5–6,0 при концентрации пероксидазы 0,1 нМ и содержании хитозана в реакционной смеси 0,002 – 0,008 мас.%. Удовлетворительная линейаризация полученных экспериментальных данных в координатах Лайнуивера-Берка (рис. 11) является дополнительным свидетельством того, что в выбранных нами условиях механизм реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина подчиняется схеме Михаэлиса.



**Рис. 11.** Линеаризация в координатах Лайнуивера-Берка зависимости скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина в отсутствие (1) и присутствии (2) 0,006 мас. % хитозана в 0,05 М фталатном буферном растворе с рН 5,8.

Кинетические параметры, рассчитанные из данных стационарной кинетики и полученные относительно пероксида водорода в интервале его концентраций 25 – 200 мкМ в отсутствие и в присутствии хитозана, практически совпадают (табл. 1). Этот факт указывает на то, что электростатическое взаимодействие между ферментом и полисахаридом не влияет на превращение основного субстрата пероксидазы.

Сравнительное изучение кинетических параметров по отношению к *o*-дианизидину показало, что кажущиеся  $V_{max}$  и  $k_{cat}$  индикаторной реакции, катализируемой комплексом, почти в 1,5 раза выше, чем в случае катализа нативным ферментом. Кроме того, кажущаяся константа Михаэлиса в присутствии хитозана незначительно понижается, а специфичность пероксидазы к *o*-дианизидину, характеризуемая отношением  $k_{cat}/K_M$ , повышается в 2 раза (табл. 2). Следовательно, активирующее действие хитозана на пероксидазу в изученной индикаторной реакции обусловлено влиянием полисахарида на присоединение и превращение второго субстрата пероксидазы *o*-дианизидина.

**Таблица 1.** Кинетические параметры по отношению к пероксиду водорода реакции окисления *o*-дианизидина, катализируемой нативной пероксидазой и комплексом пероксидаза–хитозан (концентрация пероксидазы 0,1 нМ, 0,05 М фталатный буферный раствор, рН 5,8) ( $n = 5, P = 0,95$ )

Кинетические параметры	С <sub>хитозана</sub> в реакционной смеси, мас. %	
	0	0,006
$K_M$ , мкМ	$52 \pm 4$	$60 \pm 6$
$V_{max}$ , нМ/с	$91 \pm 9$	$106 \pm 12$
$k_{cat} \cdot 10^{-3}$ , 1/с	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
$k_{cat}/K_M$ , 1/с·мкМ	18	18

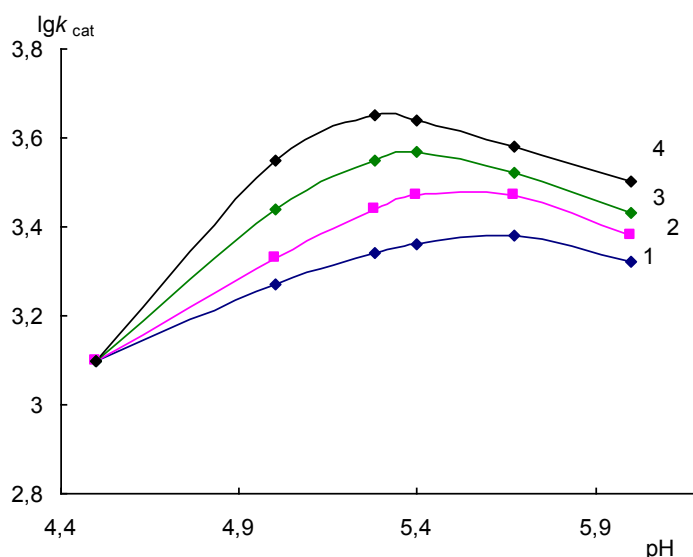
**Таблица 2.** Кинетические параметры по отношению к субстрату-восстановителю *o*-дианизидину в реакции его окисления пероксидом водорода, катализируемой нативной пероксидазой и комплексом пероксидаза–хитозан (концентрация пероксидазы 0,1 нМ, 0,05 М фталатный буферный раствор, рН 5,8) ( $n = 5, P = 0,95$ )

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

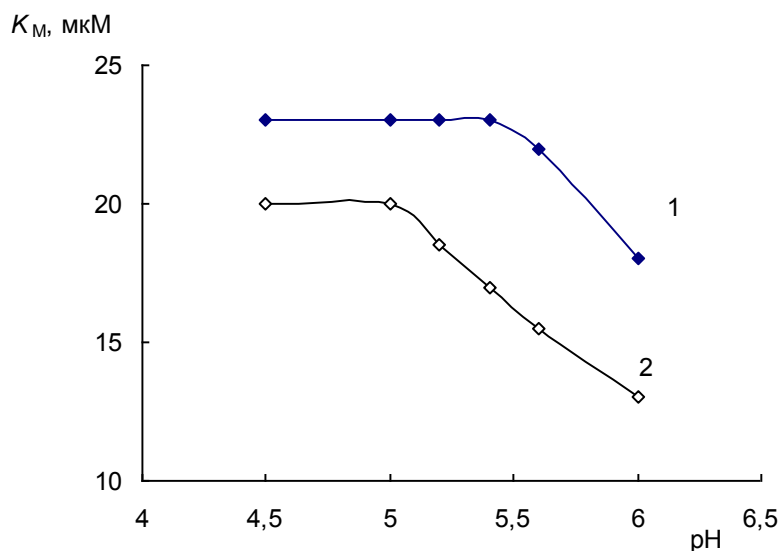


Известно, что включение белков в комплексы с полиэлектролитами может приводить к изменению  $pK_a$  ионогенных групп биокатализатора вследствие локального изменения  $pH$  на его поверхности и субстрата, что приводит к изменению специфичности связывания биокатализатора с субстратом и, как следствие, изменению кинетических параметров ферментативной системы [42, 51-52].

Для выяснения причин влияния хитозана на активность нативной пероксидазы и фермент-субстратного комплекса нами были рассчитаны кинетические параметры ( $k_{cat}$ ,  $K_M$  и  $k_{cat}/K_M$ ) индикаторной реакции в отсутствие и в присутствии хитозана в диапазоне  $pH$  4,5 – 6,0. Полученные данные представлены на рис. 12–14.

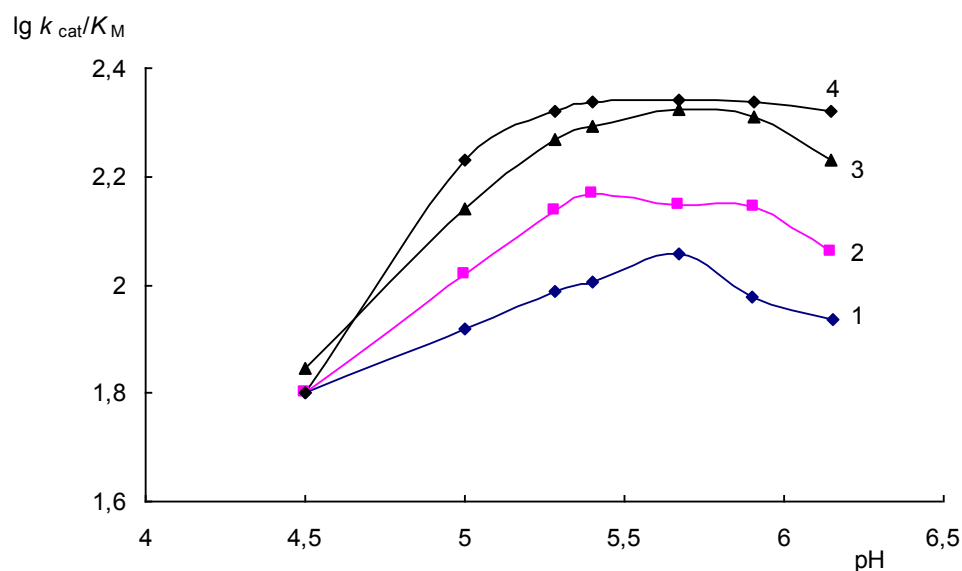


**Рис. 12.** Зависимость логарифма каталитической константы реакции окисления *o*-дианизида пероксидом водорода от  $pH$  0,05 М фталатного буферного раствора в отсутствие (1) и в присутствии 0,002 (2); 0,004 (3) и 0,006 мас.% (4) хитозана.

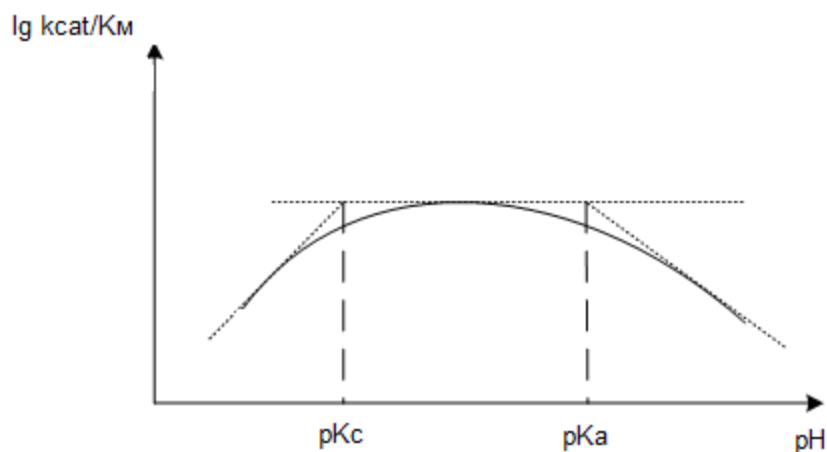


**Рис. 13.** Зависимость константы Михаэлиса реакции окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода от pH 0,05 М фталатного буферного раствора в отсутствие (1) и в присутствии 0,006 мас. % (2) хитозана.

Значения рК ионогенных групп фермента (или субстрата), определяющих скорость реакции, по профилям зависимостей кинетических параметров ферментативной реакции от pH находят по тем же правилам, что и при обработке pH-зависимостей неферментативных реакций. Графики зависимостей логарифмов кинетических параметров ферментативной реакции от pH должны иметь вид четких прямолинейных отрезков, соединенных плавными переходами. Экстраполяция линейных участков до их пересечения друг с другом дает величины рК ионогенных групп, контролирующих изменения кинетических параметров ферментативной системы (рис. 15) [42]. Определение параметров pH-зависимостей сильно осложняется в тех случаях, когда ионогенные группы содержит не только фермент, но и субстрат. Для анализа таких кинетических схем обычно используют метод графов. Наиболее просто анализировать pH-зависимости ферментативных реакций, если каталитической активностью в изучаемом диапазоне pH обладает лишь одна из форм фермента (или субстрата). В этом случае для расчета рК ионогенных групп можно использовать классическую схему, описанную выше [53].



**Рис. 14.** Зависимость специфичности пероксидазы к *o*-дианизидину от pH 0,05 М фталатного буферного раствора в отсутствие (1) и присутствии 0,002 (2); 0,004 (3) и 0,006 мас.% (4) хитозана.

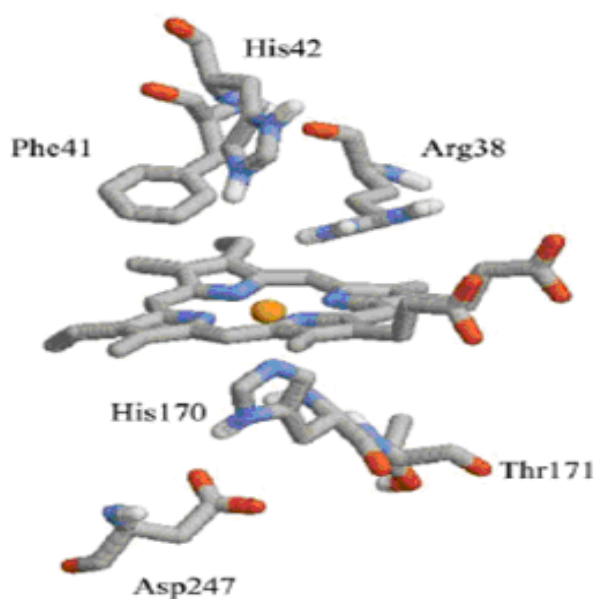


**Рис. 15.** Графический способ нахождения ионогенных групп фермента ( $pK_a$ ) или субстрата ( $pK_c$ ).

В рассматриваемой нами системе можно применять классическую схему графической оценки  $pK$  ионогенных групп, поскольку согласно литературным данным [54], в диапазоне pH 4,5 – 6,0 катализ окисления *o*-дианизидина пероксидазой наиболее эффективен в том случае, когда активный центр фермента протонирован,

а субстрат находится в депротонированном состоянии. Кроме того, следует отметить, что величина  $k_{cat}$  отражает влияние рН на активность фермент-субстратного комплекса, а величина  $k_{cat}/K_M$  – на активность свободной формы фермента; и поскольку значения рК ионогенных групп пероксидазы и *o*-дианизида в свободном и связанном состояниях могут изменяться, для выяснения причин влияния хитозана при его различных содержаниях на скорость индикаторной реакции мы определили рК ионогенных групп субстрата и фермента для двух вышеуказанных состояний.

По литературным данным [55], в диапазоне рН 4,5 – 6,0 в процессе пероксидазного катализа участвуют одна ионогенная группа субстрата (амино-группа *o*-дианизида с  $pK_c \sim 5,0$ ) и одна группа фермента (имидазольная группа гистидина His 42 в активном центре пероксидазы с  $pK_a \sim 5,7$ ) (рис. 16). Константа диссоциации ионогенной группы субстрата обозначена как  $K_c$ .



**Рис. 16.** Кристаллографическая структура окружения гема пероксидазы.

Рассчитанные нами значения  $pK$  ионогенных групп пероксидазы и субстрата в свободном состоянии и в фермент-субстратном комплексе при различных содержаниях хитозана в реакционной смеси представлены в табл. 3.

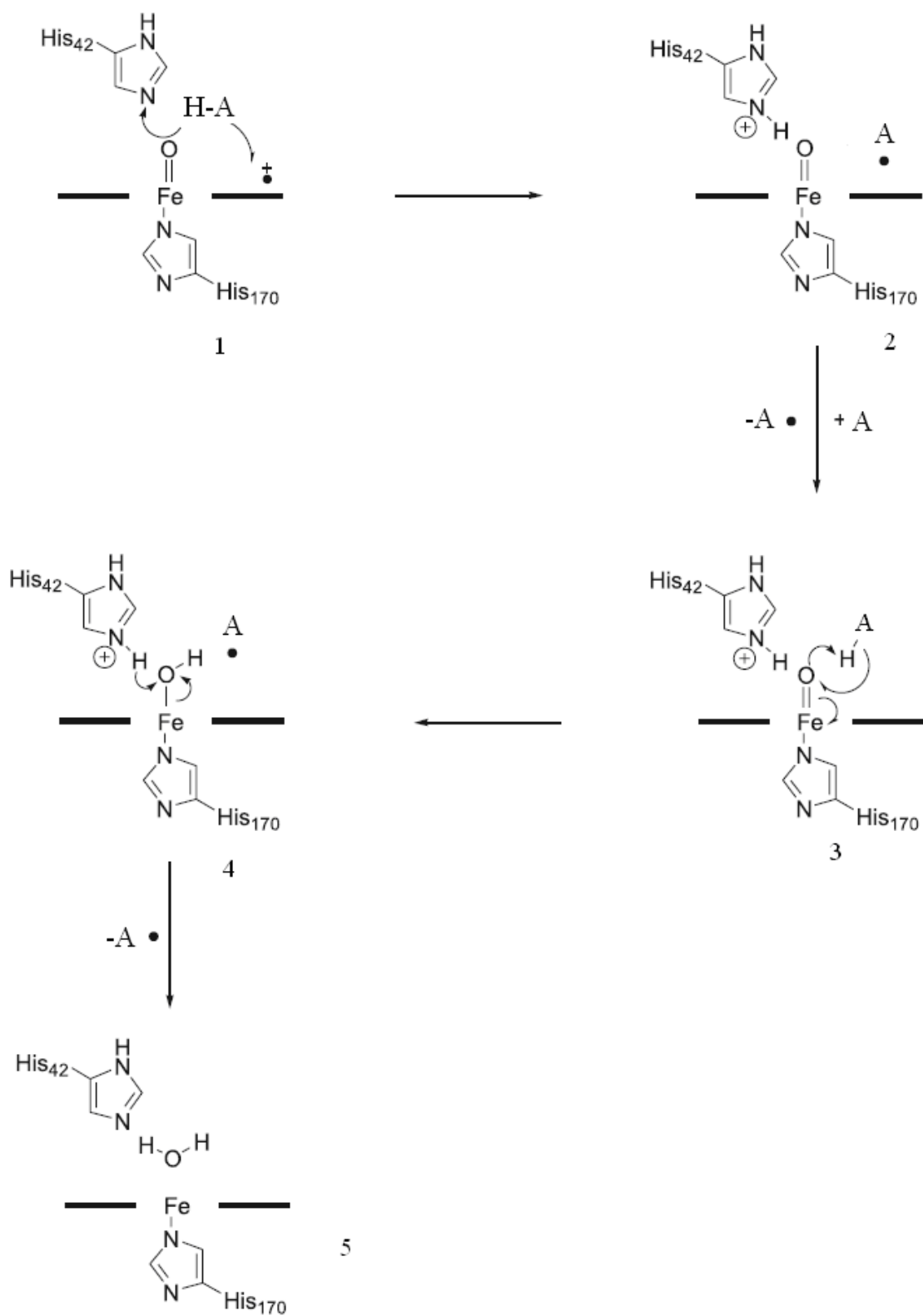
**Таблица 3.** Значения ионогенных групп *o*-дианизидина ( $pK_c$ ) и пероксидазы ( $pK_a$ ) в свободном состоянии (I) и в составе фермент-субстратного комплекса (II) при различных содержаниях хитозана

Содержание хитозана, мас. %	$pK_c$		$pK_a$	
	I	II	I	II
0	$5,6 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,2$
0,002	$5,4 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,1$
0,004	$5,2 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$
0,006	$5,0 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,2$

Установлено, что по мере увеличения содержания хитозана в составе комплекса  $pK_a$  ионогенной группы свободного (не связанного в фермент-субстратный комплекс) фермента возрастает, а  $pK_c$  субстрата уменьшается. Аналогичный характер зависимости  $pK_c$  ионогенной группы *o*-дианизидина от концентрации полисахарида наблюдается и в случае фермент-субстратного комплекса, а  $pK_a$  ионогенной группы биокатализатора в связанном состоянии несколько понижается.

На основании зависимостей значений  $pK$  ионогенных групп фермента и субстрата от содержания хитозана в реакционной смеси и механизма превращения ароматических аминов под действием пероксидазы (схема 3) можно предложить следующую схему активирующего действия хитозана на пероксидазу в составе комплекса. Повышение  $pK_a$  имидазольной группы гистидина *His42* в активном центре пероксидазы в свободном состоянии по мере увеличения содержания хитозана приводит к повышению ее способности принять протона от донора - *o*-дианизидина в изученном диапазоне pH. В свою очередь понижение  $pK_c$  ионогенной группы субстрата-восстановителя повышает ее кислотные свойства, и она бо-

лее эффективно отдает протон ионогенной группе фермента (схема 3, 1). Некоторое понижение  $pK_a$  имидазольной группы гистидина *His42* в активном центре пероксидазы в фермент-субстратном комплексе способствует повышению ее донорных свойств при передаче протона на кислород, связанный с железом (IV) в геме пероксидазы (схема 3, 4). В результате последнего железо в геме восстанавливается до основного трехвалентного состояния, и молекула воды покидает активный центр фермента (схема 3, 5). При этом образующееся сопряженное основание – имидазол становится более слабым и в меньшей степени передает электронную плотность на гем, что также способствует повышению эффективности катализа пероксидазой реакции окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода в присутствии хитозана (схема 3, 5).



где H-A - ароматический донор протонов (O - дианизидин)

**Схема 3.** Окисление ароматических диаминов в активном центре пероксидазы.

Таким образом, методом динамического светорассеяния было подтверждено образование однородных и воспроизводимых по среднему размеру частиц ( $22 \pm 3$  нм) на основе комплекса пероксидазы с хитозаном. Показано, что формирование последнего в растворе происходит прежде всего за счет электростатических и/или Ван-дер-ваальсовых взаимодействий между макромолекулами. Установлено, что повышение каталитической активности фермента в составе комплекса обусловлено изменением  $pK_a$  ионогенной группы *His42* в активном центре пероксидазы в фермент-субстратном комплексе, что способствует повышению эффективности катализа реакции окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода в присутствии хитозана.

### **1.5. Влияние диметилсульфоксида на каталитическую активность комплекса пероксидаза-хитозан**

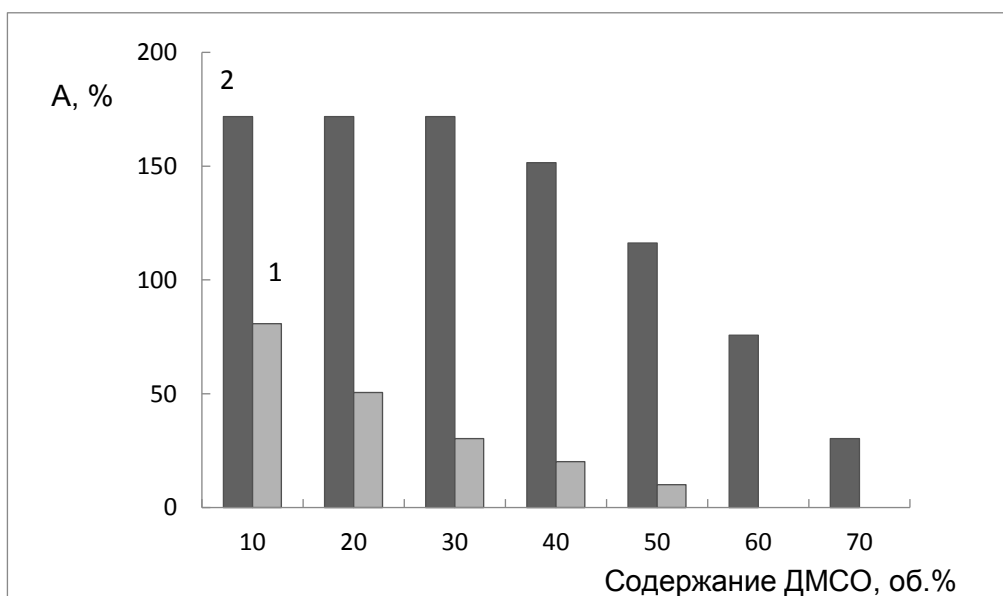
В смесях полярных органических растворителей ферменты теряют каталитическую активность вследствие денатурации биомолекулы, степень которой зависит как от полярности растворителя, так и от его содержания в реакционной среде [56, 57]. При этом, как следует из литературы [58–61], комплексы белков с полиэлектролитами устойчивы в присутствии органических растворителей, но этот эффект не применялся ранее для повышения стабильности и сохранения активности пероксидазы в водно-органических средах, в том числе диметилсульфоксида (ДМСО).

Выбор ДМСО для проведения исследований обусловлен рядом причин. 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. [62]. Кроме того, ДМСО смешивается с водой в любых соотношениях, что позволяет исследовать его влияние на активность пероксидазы в широком интервале содержаний в реакционной смеси.



В проведенных ранее исследованиях по влиянию ДМСО на нативную пероксидазу из корней хрена было показано, что даже 0,5 об. % этого растворителя уменьшают активность коммерческого препарата фермента в реакциях окисления ряда ароматических субстратов, а в 20 об. %-ом ДМСО остаточная активность пероксидазы не превышает 20% от ее активности в водном растворе [63]. Исследования А.М. Клибанова с соавторами показали, что ДМСО существенно изменяет вторичную структуру белковой молекулы фермента [63, 64].

Нами установлено, что при 30 об. %-ном содержании ДМСО в реакции окисления *o*-дианизидина комплекс пероксидаза-хитозан в два раза активнее, чем нативный фермент; при 60 об. %-ном содержании органического растворителя они характеризуются одинаковой каталитической активностью, а в присутствии 70 об. % ДМСО каталитические свойства проявляет только комплекс (рис. 17).



**Рис. 17.** Зависимость активности пероксидазы от содержания ДМСО (0,05 М фталатный буферный раствор, рН 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, рН, 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.

## **ГЛАВА 2. СОЗДАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СЕНСОРНЫХ УСТРОЙСТВ, СХЕМ РЕГИСТРАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ – СУБСТРАТОВ ПЕРОКСИДАЗЫ**

Определение биологически активных соединений – субстратов пероксидазы из корней хрена, прежде всего таких как фенольные соединения, пероксиды различного строения, остается актуальной задачей современного химического анализа. К фенолам относятся многие загрязнители окружающей среды (промышленные отходы), лекарственные препараты (витамины, антибиотики), биологически активные добавки (флавоноиды), маркеры различных заболеваний (катехоламины и их метаболиты). Поступая в организм человека через кожу и слизистые оболочки, продукты распада некоторых фенольных соединений (хлор-, нитро-, алкилзамещенных) чрезвычайно токсичны и вызывают заболевания нервной, дыхательной и мочеполовой систем [65, 66]. Другие производные фенола (физиологически активные вещества – катехоламины), напротив служат маркерами нейродегенеративных и нейроэндокринных заболеваний и применяются при их лечении [67]. Неорганические и органические пероксиды часто используют в качестве дезинфицирующих и отбеливающих агентов в составе косметических и лекарственных препаратов [68-70]. Качество и безопасность продуктов питания (овощей, фруктов, алкогольных напитков, жиросодержащей продукции) также оценивают по содержанию полифенольных соединений (флавоноидов) и фенолов, соответственно, а также различных гидропероксидов [71-75]. Анализ таких объектов, как правило, требует дополнительной подготовки пробы: растворения с использованием токсичных или агрессивных органических растворителей, фильтрования и/или разделения, что существенно усложняет методики, увеличивает время анализа, а также погрешность результатов измерений. Перспективным подходом к решению перечисленных проблем является создание сенсорных систем и индикаторных реакций, основанных на формировании и измерении аналитического сигнала не в анализируемом растворе, а непосредственно в чувствительном слое сенсорного устройства от определяемого вещества.

На сегодняшний момент времени большинство подобных твердофазных сен-

соров для определения фенольных соединений и пероксидов различного строения основано на электрохимической регистрации аналитического сигнала [76, 77]. Существующие же оптические (спектрофотометрические, хемилюминесцентные, флуоресцентные) сенсорные устройства предполагают измерение аналитического сигнала в растворе (часто в проточном режиме), а их чувствительность позволяют определять перечисленные соединения на уровне микро- и миллимолярных концентраций. При этом чувствительность и селективность определения возрастает при замене «косвенных» индикаторных систем, основанных на *уменьшении* аналитического сигнала по мере увеличения содержания определяемого соединения, прямыми, в которых сигнал *возрастает* прямо пропорционально концентрации аналита, а также при использовании флуоресцентного детектирования вместо спектрофотометрического. Следует отметить, что флуоресцентные сенсоры являются преимущественно косвенными [65]. Селективность отклика чувствительного слоя оптических сенсоров значительно возрастает при введении в их состав в качестве распознающих элементов материалов биологической природы – ферментов [65, 78-86].

Большинство потенциальных объектов анализа, содержащие перечисленные соединения, нерастворимы или ограниченно растворимы в воде, а отдельные компоненты этих матриц могут не только вносить ошибку в результаты измерения, но и в ряде случаев делают анализ невозможным. В связи с этим при определении фенольных соединений и органических пероксидов в объектах на основе матриц сложного состава необходима дополнительная пробоподготовка анализируемого образца, существенно повышающая трудоемкость методики и погрешность результатов измерения. В связи с этим измерение аналитического сигнала в растворе не позволяет анализировать непрозрачные и мутные среды [81-86].

В связи с этим актуальной задачей современного химического анализа является создание новых твердофазных универсальных сенсорных элементов/устройств, адаптированных под различное серийное оборудование – спектрофотометры и флуориметры, основанных на формировании и измерении аналитического сигнала оптическими методами не в анализируемом растворе, а непосредственно в биочувствительном (распознающем) слое без предварительной или ми-

нимальной подготовки пробы к анализу. Такие сенсорные системы станут дополнением к уже существующим методикам определения актуальных аналитов, но при этом позволят, как это будет показано в дальнейшем в настоящей работе, а также расширить круг определяемых веществ и анализируемых объектов.

## **2.1. Выбор конструкции и способов получения твердофазных спектрофотометрических и флуориметрических сенсорных устройств**

К современным сенсорным системам на сегодняшний день предъявляют требования к их аналитическим характеристикам, сравнимые с современными инструментальными методами [87-88], а именно высокие чувствительность, правильность, воспроизводимость, экспрессность, низкое значение фонового сигнала, длительный срок эксплуатации, устойчивость к внешней среде, безотказность в работе и технологичность (малые габариты и масса, простота конструкции, низкая себестоимость, экологичность) [65].

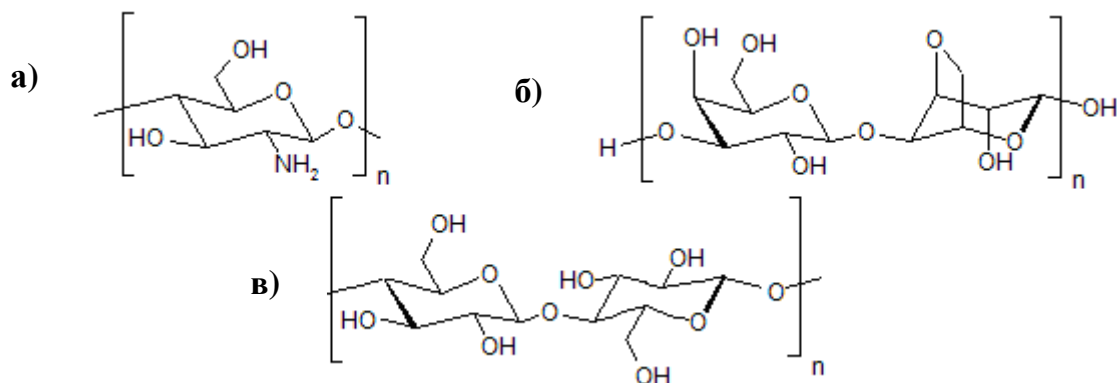
Оптический сенсор самой простой конструкции представляет собой подложку с чувствительной к определяемым веществам полимерной матрицей, содержащей компоненты индикаторной реакции. Все вместе это представляет собой распознающий (чувствительный) слой – рабочую основу сенсорной системы. Из большого разнообразия оптических сенсорных систем, представленных в литературе [65, 87-129], мы выбрали именно этот конструкционно простейший вариант, поскольку он легко мог быть адаптирован по форме и размерам под стандартные кюветные отделения современных серийных приборов. При условии прозрачности пластины (в настоящей работе - кварцевых стекол) и чувствительного слоя становится возможным измерение аналитического сигнала в режиме пропускания, что потенциально обеспечивает бóльшую воспроизводимость результатов и чувствительность определения спектрофотометрическим методом. Таким образом, работа оптических сенсоров может быть основана как на поглощении света (абсорбции), или возникновении люминесценции (в частности флуоресценции). Сенсорные устройства, основанные на измерении отражения падающего светового потока, как правило, обладают худшими метрологическими характеристиками.

Следует отметить, что к полимерной матрице для иммобилизации и материалу подложки помимо прозрачности и отсутствия фоновых сигналов в ближнем УФ и видимой областях спектрального диапазона предъявляют такие требования, как нерастворимость в реакционной среде, химическая инертность по отношению ко всем компонентам раствора и определяемым веществам (за исключением тех случаев, когда сама матрица выступает в роли индикаторного вещества) [89–93]. Малая растворимость в водных растворах ряда субстратов пероксидазы - фенольных соединений и органических гидропероксидов, а также некоторых других приводит к необходимости проведения анализа в водно-органических или органических средах и предъявляет еще ряд требований к конструкции и используемой индикаторной реакции в составе оптической биосенсорной системы: прочное закрепление чувствительного слоя на поверхности прозрачной подложки – стекла; механическая стабильность покрытия в водных растворах различной кислотности и в присутствии по крайней мере некоторых органических растворителей; прозрачность чувствительного слоя до и после воздействия водно-органических, мицеллярных и окрашенных сред; надежное удерживание компонентов индикаторной реакции в чувствительном слое; стабильность продукта индикаторной реакции во времени; сохранение каталитической активности фермента при хранении и в процессе эксплуатации, в том числе в присутствии органических растворителей.

Чувствительный слой оптических сенсорных систем формируют чаще всего двумя способами: капельным нанесением [95–98, 100–103, 108, 109] и послойной сборкой [94, 110]. При послойной сборке поверхность подложки сначала протравливают, затем отмывают от остатков кислоты водой, выдерживают в растворе (или в разных растворах в случае формирования многослойных пленок), формирующем чувствительный слой, высушивают. Современные технологические возможности позволяют легко, быстро получать таким способом пленки строго необходимой толщины (от десятых долей нанометра до нескольких нанометров). При этом в сенсорных технологиях в целях химического анализа капельное нанесение используют гораздо чаще, поскольку даже при наличии высокотехнологичного оборудования послойная сборка представляет собой трудоемкий процесс, а получаемые таким образом сенсорные устройства нередко отличаются по воспроизводимости от партии к партии [65].

При капельном нанесении на горизонтально расположенную подложку помещают требуемое количество раствора или геля, основой которых является формирующая чувствительный слой полимерная матрица, а затем высушивают на воздухе [65].

В качестве таких полимерных матриц перспективно применение полисахаридов. Это объясняется их доступностью, наличием в них реакционноспособных функциональных групп, способностью к формированию механически устойчивых, воспроизводимых, однородных (благодаря линейной структуре большинства полисахаридов), а в ряде случаев оптически прозрачных пленок. Примерами таких линейных полимеров, покрытия на основе которых могут удовлетворять выше перечисленным требованиям, могут служить хитозан, агароза, целлюлоза, построенные из строго чередующихся остатков глюкозамина, галактопиранозы и глюкозы, соответственно (рис. 18) [130].



**Рис. 18.** Структурные формулы хитозана (а), агарозы (б) и целлюлозы (в).

Агароза нерастворима в холодной воде и этаноле, при этом хорошо растворяется в горячей воде при температуре выше 80°C [131]. Высокая пористость агарозы и отсутствие в ее структуре заряженных групп обеспечивает высокую степень связывания фермента и матрицы и предотвращает неспецифическую сорбцию субстратов и продуктов их окисления на ней. Однако существенный недостаток использования агарозы при масштабировании сенсорных элементов заключается в ее высокой стоимости [132].

Целлюлоза нерастворима в воде и многих органических растворителях, хорошо растворима в щелочи, причем растворимость увеличивается при переосажде-

нии, а также предварительном набухании полимера в холодной воде. Однако способность целлюлозы связывать фермент значительно ниже, чем у агарозы и хитозана [133].

Хитозан с молекулярной массой выше 30 кДа не растворяется в воде и органических растворителях, при этом он легко растворим в слабых органических кислотах, включая пищевые (лимонную, уксусную, молочную, салициловую, пировиноградную), переходя при  $pH < 6,5$  в протонированную форму [134, 135].

Будучи положительно заряженным поликатионом, хитозан служит матрицей для иммобилизации противоположно заряженных молекул (в частности ферментов с  $pI < 6,5$ ) при создании прежде всего электрохимических сенсоров для определения фенольных соединений. Так, в работах [136–138] описаны амперометрические биосенсоры для определения фенола и ряда его *o*-дизамещенных производных на нМ – мкМ уровне концентраций. Биосенсоры представляют собой графитовые электроды, покрытые пленками на основе хитозана [136], а также сополимеров хитозана с лапонитом (отрицательно заряженным композитом) [137] или слоистыми двойными гидроксидами (композитами, состоящими из положительно заряженных слоев ионов металлов и подвижных анионов в межслоевом пространстве) [138], содержащей иммобилизованный фермент – полифенолоксидазу ( $pI = 4.1$ ). Авторы указанных работ отмечали, что высокая степень связывания фермента в таких пленках обусловлена возникновением электростатических взаимодействий между их компонентами.

Важное достоинство хитозана, как матрицы для иммобилизации ферментов, заключается в его высокой биосовместимости. Как было показано в главе 1, включение пероксидазы из корней хрена в самособирающийся комплекс с этим полимером позволяет значительно повысить каталитическую активность и стабильность фермента, в том числе в средах с высоким содержанием органического растворителя. Перечисленные достоинства в сочетании с низкой токсичностью, коммерческой доступностью и низкой стоимостью свидетельствуют о перспективности применения хитозана в качестве оптически прозрачной полимерной основы биочувствительного (распознающего) слоя сенсорного элемента по сравнению с полимерами,



обладающими схожими характеристиками, при создании оптических биосенсорных систем. Дополнительным аргументом в пользу выбора хитозана было то, что, согласно литературным данным [139-142], он может взаимодействовать с продуктами ферментативного окисления фенолов с образованием поглощающего свет соединения, то есть потенциально может одновременно служить и матрицей, и твердофазным реагентом – компонентом индикаторной системы.

## **2.2. Создание оптических сенсорных систем на основе комплекса пероксидазы с хитозаном, схем регистрации спектрофотометрического и флуориметрического сигналов в водных и водно-органических средах**

Для создания сенсорных систем на основе комплекса пероксидазы с хитозаном со спектрофотометрической и флуориметрической регистрацией аналитического сигнала нами была разработана простая технология формирования оптически прозрачных биораспознающих пленок на оптических стеклах. В качестве подложки при создании оптических сенсоров использовали кварцевые стекла фирмы *Menzel* (Германия), не имеющие собственного поглощения в области от 230 до 900 нм.

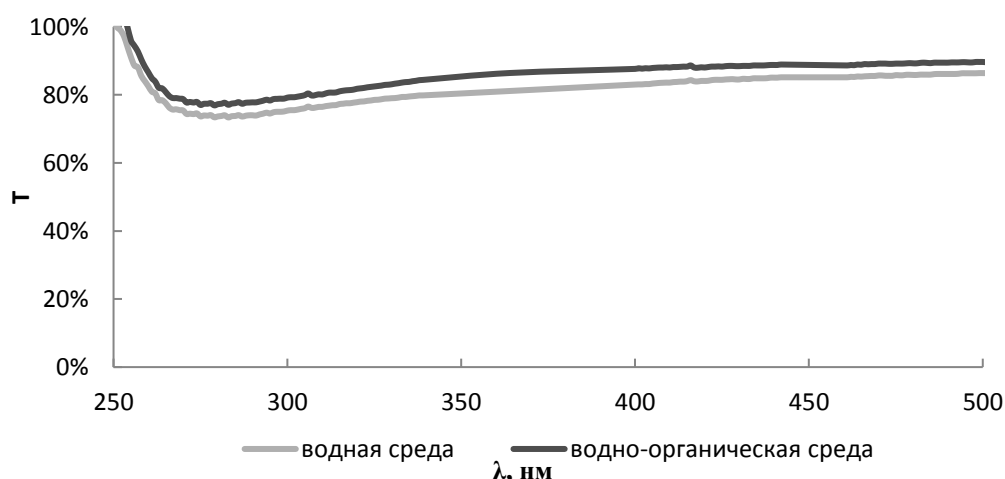
Размеры пластинки (13×38 мм) выбрали, исходя из конструкции кюветных отделений серийных спектрофотометров и флуориметров. Для обеспечения хорошего растекания раствора биополимера по поверхности пластинок их перед использованием выдерживали в азотной кислоте, после чего тщательно очищали механически в присутствии ПАВ, многократно промывали водой и ~~этиловым~~ этанолом [143].

Чувствительный слой сенсора формировали капельным нанесением смеси, состоящей из полимерной матрицы для иммобилизации фермента, биокатализатора – пероксидазы и компонентов индикаторной системы в случае необходимости. Для растворения коммерческого препарата хитозана использовали 0,5 мас. % раствор уксусной кислоты. Смесь равномерно распределяли по поверхности подложки, расположенной на строго горизонтальной поверхности, и высушивали на воздухе при комнатной температуре (рис. 19).



**Рис. 19.** Схема формирования чувствительного слоя оптического биосенсора.

Далее исследовали изменение прозрачности чувствительного слоя на основе хитозана при выдерживании его в водном и водно-органическом растворах. 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 % ДМСО – выбор этого растворителя детально обсужден в главе 1) установили, что пленки после их выдерживания в присутствии органического растворителя более прозрачны ( $T=96\pm 2\%$ ,  $n=5$ ), чем пленки, выдержанные в водном растворе ( $T=81\pm 4\%$ ,  $n=5$ ) (рис. 20).



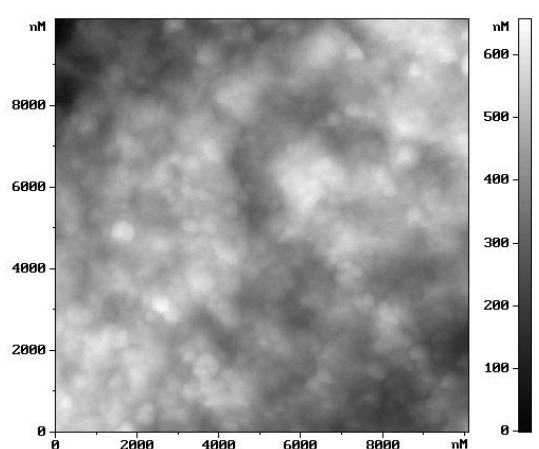
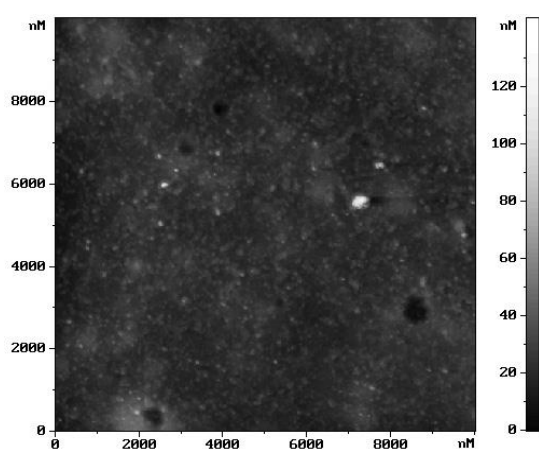
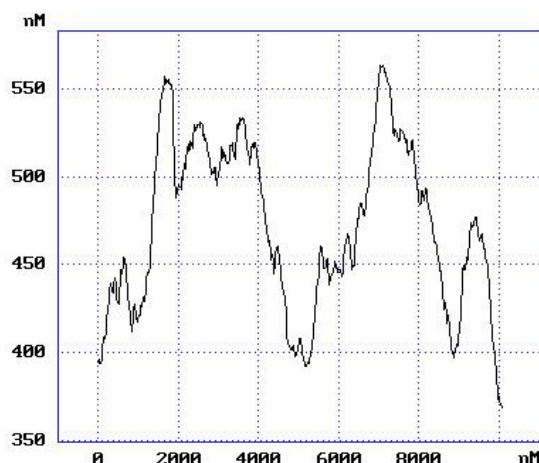
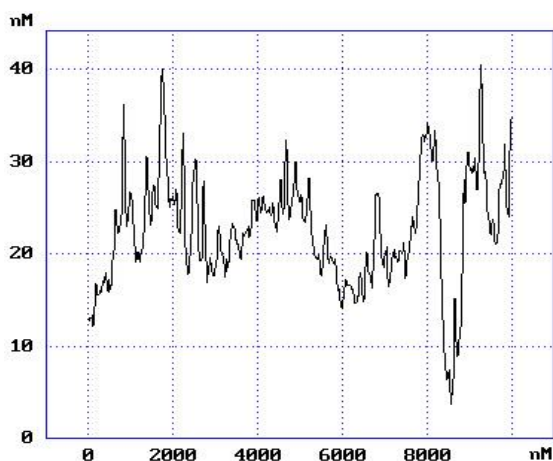
**Рис. 20.** Спектры пропускания биочувствительного слоя (пероксидаза – 50 пмоль, хитозан  $0,4 \text{ мг/см}^2$ ) на поверхности оптического стекла после выдерживания в водной (фосфатном буферном растворе, pH 6,5) и водно-органической среде (30 об. % ДМСО – фосфатный буферный раствор, pH 6,5).

Кроме того, пропускание возрастало, и как следствие снижался фоновый сигнал вследствие собственного поглощения чувствительного слоя на основе хитозана при увеличении содержания (до 40-50 об. %) полярного органического растворителя. Следует отметить, что аналогичный эффект наблюдался не только в присутствии ДМСО, но и этанола, ацетонитрила. Более высокая прозрачность пленок и большая их однородность после выдерживания в водно-органической среде, а не в фосфатном буферном растворе, возможно, связана с тем, что при введении органического растворителя в систему понижается диэлектрическая проницаемость среды. Вследствие этого уменьшаются силы отталкивания одноименно заряженных групп полиэлектролита; пленка меньше набухает и, соответственно, в меньшей степени захватывает компоненты буферного раствора.

Для изучения морфологии и топографии пленок, полученных из различных сред, использовали метод атомно-силовой микроскопии. Рис. 21 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  $1 \text{ мкм}^2$  полимерного слоя составили 30-35 и 140-150 нм соответственно).

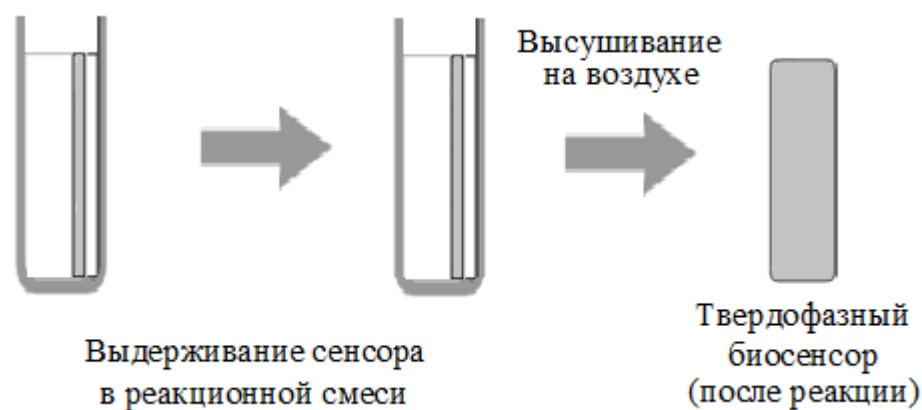
Толщина биораспознающего слоя при содержании хитозана  $0,4 \text{ мг/см}^2$  на поверхности стеклянной пластинки была определена методом оптической микроскопии и составила 5 мкм.

В дальнейших исследованиях схема проведения анализа и использованием различных индикаторных реакций для определения субстратов пероксидазы была следующей: биочувствительную стеклянную пластинку погружали в раствор, выдерживали в нем необходимое время (непроточный вариант проведения индикаторной реакции), извлекали и высушивали на воздухе при комнатной температуре (рис. 22).



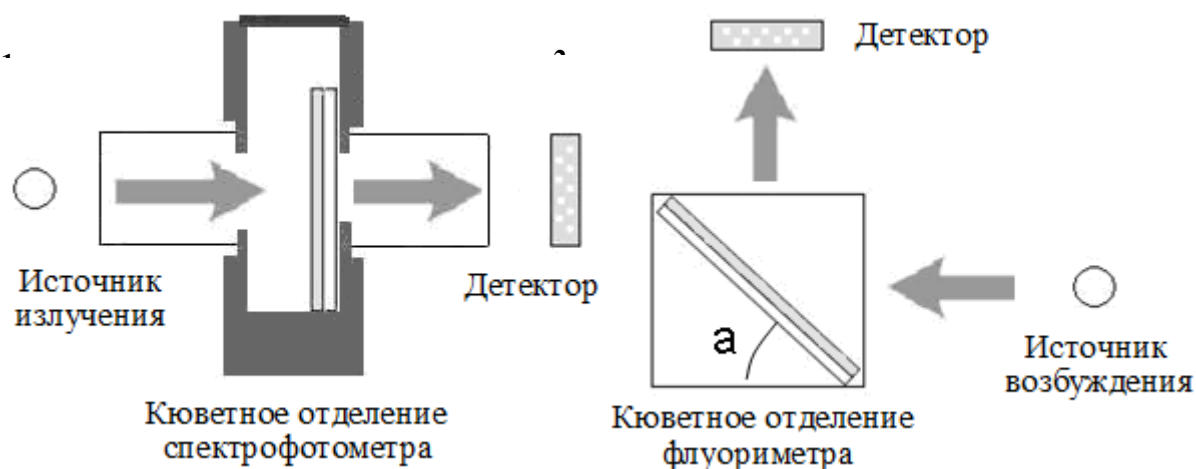
**Рис. 21.** Профили и изображения поверхности чувствительного слоя (пероксидаза – 50 пмоль, хитозан 0,4 мг/см<sup>2</sup>) после выдерживания в фосфатном буферном растворе, рН 6,5 (рисунки справа) и среде вода (фосфатный буферный раствор, рН 6,5) – ДМСО (30 об. %) (рисунки слева). Цветовая шкала справа соответствует глубине изображения (в нм).

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



**Рис. 22.** Схема проведения индикаторной реакции с использованием твердофазного оптического биосенсора.

Сенсорный элемент устанавливали, соответственно, на фронтальной поверхности кюветного отделения спектрофотометра или в кюветном отделении флуориметра перед отражающей поверхностью – зеркалом (рис. 23).



**Рис. 23.** Схема измерения поглощения (1) и флуоресценции (2) чувствительного слоя твердофазного оптического биосенсора.

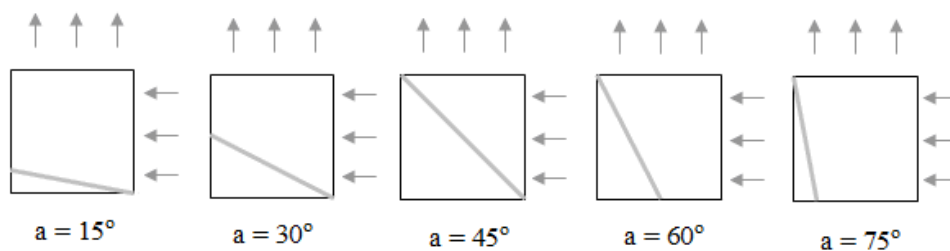
Таким образом, описанная конструкция позволяла при необходимости сочетать два способа измерения аналитического сигнала. При использовании отражающей поверхности в случае флуориметрического детектирования значительно по-

вышалась чувствительность определения, поскольку при этом в детектор попадало больше возбужденного излучения.

Однако, серьезной проблемой при регистрации флуоресцентного сигнала с использованием твердофазных сенсорных устройств предложенной конструкции явилось высокое значение фонового сигнала в области 300 – 500 нм ( $\lambda_{ex} = 300 - 400$  нм и  $\lambda_{em} = 400 - 500$  нм). Наличие высокого фонового сигнала делало фактически невозможным измерение полезного аналитического сигнала в широком спектральном диапазоне.

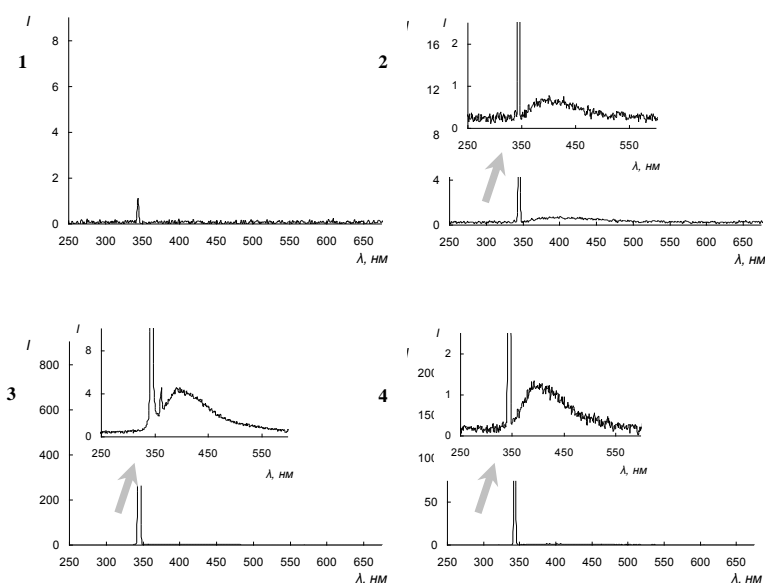
Значимой проблемой при регистрации флуоресцентного сигнала с использованием твердофазных сенсорного устройства предложенной конструкции оказалось высокое значение фонового сигнала в области 300–500 нм ( $\lambda_{ex}=300-400$  нм и  $\lambda_{em} = 400-500$  нм). Для выявления природы фонового сигнала, уменьшения его величины, установления рабочей области спектра (а также выбора индикаторных систем) использовали подход, заключающийся в изменении угла отражения возбуждающего излучения.

В кюветное отделение флуориметра устанавливали зеркальные пластинки разного размера (отражающие поверхности) под определенными углами относительно источника возбуждения (рис. 24).



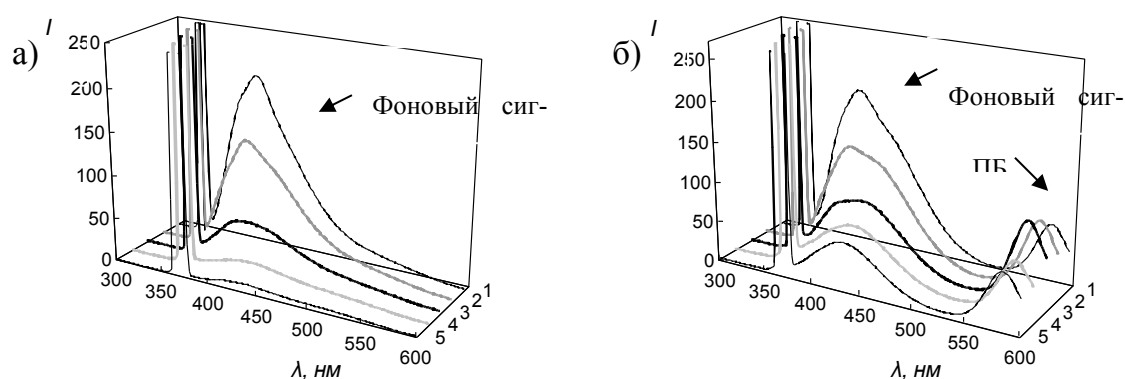
**Рис. 24.** Схема расположения зеркал в кюветном отделении флуориметра, где  $a$  – угол отражения возбуждающего излучения.

Как свидетельствуют спектры, приведенные на рис. 25, изменение угла позволило существенно уменьшить величину фонового сигнала (до 1 – 4 у.е.), однако не позволило полностью от него избавиться.



**Рис. 25.** Спектры флуоресценции, полученные при отражении возбуждающего излучения от зеркала, расположенного под разными углами относительно источника возбуждения: (1)  $15^\circ$ ; (2)  $30^\circ$ ; (3)  $60^\circ$ ; (4)  $75^\circ$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  нм, ширина входной и выходной щелей 1,5 нм.

Величина фонового сигнала была максимальной при  $\lambda_{\text{ex}} = 330$  нм, а интенсивность, форма и положение полосы флуоресценции фона зависели от длины волны возбуждения (рис. 26а).



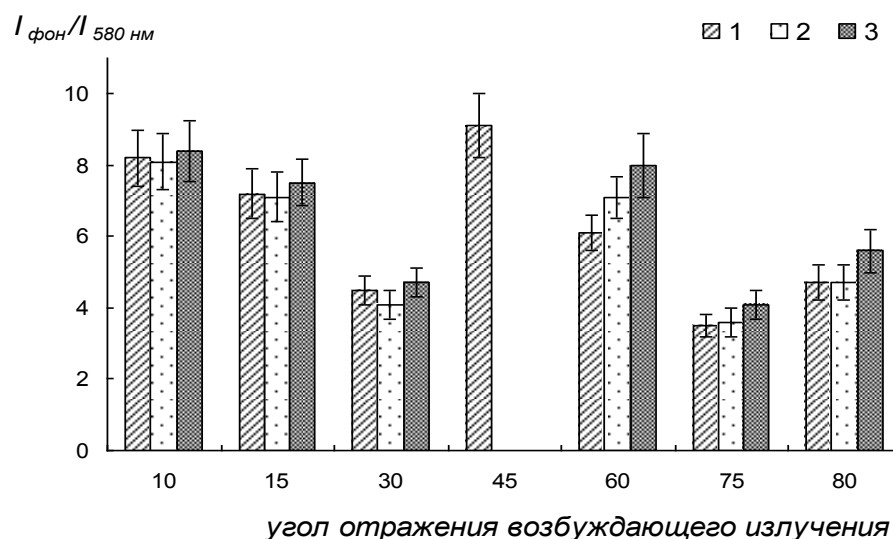
**Рис. 26.** Спектры флуоресценции хитозановых пленок (а) и пленок хитозан-пиронин Б (ПБ) (б), нанесенных на поверхность зеркала: (1)  $\lambda_{\text{ex}} = 330$ ; (2)  $\lambda_{\text{ex}} = 340$ ; (3)  $\lambda_{\text{ex}} = 350$ , (4)  $\lambda_{\text{ex}} = 360$ ; (5)  $\lambda_{\text{ex}} = 370$  нм; угол отражения возбуждающего излучения  $75^\circ$ , ширина щелей 5,0 нм.

Это позволило сделать предположение, что возникновение фонового сигнала обусловлено собственным излучением источника возбуждения (ксеноновой лампой).

В целях уменьшения фонового сигнала путем подбора оптимального угла отражения на поверхность зеркальных пластинок равномерно наносили чувствительный слой, состоящий из хитозана и органического соединения, интенсивно флуоресцирующего в области 300 – 600 нм, высушивали, а затем регистрировали спектры флуоресценции полученных пленок структур. Пиронин Б был выбран в качестве флуорофора, спектры поглощения которого имеют несколько максимумов в диапазонах 340 – 360 и 540 – 560 нм. При  $\lambda_{ex} = 350$  нм спектр флуоресценции пленок {полимер – пиронин Б} лежал в широком диапазоне длин волн, включая область фоновой флуоресценции (400 – 500 нм) и флуоресценции пиронина Б (полезного аналитического сигнала,  $\lambda_{em} = 580$  нм). В отличие от фонового сигнала форма и положение максимума флуоресценции пиронина Б (но не интенсивность) не зависели от длины волны возбуждения (рис. 26б). Таким образом, явления, наблюдаемые при измерении полезного аналитического сигнала в предложенном твердофазном варианте, подчинялись основным законам флуоресценции.

Диаграмма, представленная на рис. 27, иллюстрирует изменение отношения интенсивности флуоресценции фона к интенсивности флуоресценции пиронина Б при разных ширинах входной и выходной щелей флуориметра.





**Рис. 27.** Соотношения интенсивностей флуоресценции фона и молекулы-флуорофора в пленке {хитозан-пиронин Б} при разных углах отражения возбуждающего излучения;  $V(\text{хитозан-пиронин Б}) = 200$  мкл,  $c(\text{пиронин Б}) = 5$  мкМ,  $V(\text{хитозан})/V(\text{пиронин Б}) = 1/1$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  нм, ширина входной и выходной щелей: (1) 1,5; (2) 3,0; (3) 5,0 нм.

Установили, что отношение интенсивности флуоресценции фона к интенсивности флуоресценции индикатора - пиронина Б минимально при угле  $75^\circ$ . 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.

### **ГЛАВА 3. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ПЕРОКСИДОВ РАЗЛИЧНОГО СТРОЕНИЯ**

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 систем, стабильностью и активностью биочувствительного слоя в водных растворах различной кислотности, в присутствии органических растворителей. Чрезвычайно важным и актуальным направлением является создание твердофазных индикаторных реакций, в которых одновременно сочетаются надежное удержание и стабильность дериватирующего агента, а впоследствии индикаторного соединения, в биочувствительном (распознающем) слое сенсорной системы с требуемыми аналитическими характеристиками для конкретного аналита, объекта анализа и не зависящими от физико-химических свойств и состава последнего. Вследствие вышесказанного эта глава работы будет посвящена обсуждению результатов создания новых универсальных спектрофотометрических твердофазных индикаторных систем для определения биологических активных веществ – субстратов пероксидазы (фенольных соединений различного строения, неорганических и органических пероксидов) без предварительной или минимальной 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, неорганических и органических пероксидов не был реализован.

### **3.1. Спектрофотометрические твердофазные сенсорные системы для определения фенольных соединений различного строения**

Выбор фенольных соединений в качестве модельных аналитов для разработки твердофазных спектрофотометрических индикаторных реакций обусловлен рядом причин. Во-первых, создание новых способов определения фенолов различного строения является интенсивно развивающимся направлением аналитической химии, так как многочисленные соединения, относящиеся к этому классу, являются маркерами различных заболеваний, качества растительного сырья, пищевых, фармацевтических и лекарственных препаратов, косметических средств, экотоксикантами, и с каждым годом расширяется как круг определяемых веществ, так и анализируемых объектов. При этом ужесточаются требования к простоте, экспрессности и метрологическим характеристикам разрабатываемых методик [65-70].

Кроме того, многие фенольные соединения ограничено растворимы в водных растворах, содержатся в малорастворимых в воде объектах, в связи с чем отдельной интересной и актуальной практической задачей является их определение в органических (гексане, хлороформе), водно-органических средах (в присутствии полярных растворителей, например, этанола, ацетонитрила, диметилсульфоксида), в мутных и окрашенных растворах [144]. При этом биосенсорные системы, разработанные для анализа водных растворов, не всегда применимы в органических средах ввиду инактивации фермента и/или из-за повреждения/растворения полимерной матрицы чувствительного слоя. Верно и обратное – в ряде случаев сенсорные системы, предназначенные для анализа органических сред, имеют матрицу, которая растворяется в водной среде. Следует отметить, что при работе в присутствии органических растворителей по сравнению с водной средой за счет изменения гидрофильно-гидрофобного баланса может также меняться распределение субстрата между реакционным раствором и полимерной матрицей чувствительного слоя; специфичность фермента и кинетические параметры, катализируемой им индикаторной системы; и, как следствие, чувствительность и селективность сенсорной системы в целом. Таким образом, все эти факторы необходимо учитывать при проведении анализа в разных по составу и полярности растворах.

В случае электрохимических сенсоров эта проблема изучена весьма подробно; существует специальный термин – *organic phase enzyme electrodes* (ОПЕЕ), обобщающий ферментные электроды для работы в органических средах [145]. В целом, следует отметить важные моменты: для функционирования ферментного электрода (превращения субстрата с участием биокатализатора) в органических средах необходимо присутствие некоторого количества воды. Последнее обеспечивается простым добавлением воды в гидрофильные (полярные) растворители или насыщением ею органической фазы в случае работы в гидрофобных растворах. Другим решением этой проблемы является включение фермента во влагоудерживающую (набухающую) матрицу (обычно, полимерный гель), то есть благоприятная для катализа среда создается непосредственно внутри биочувствительного слоя сенсорной системы. Взаимосвязи между природой и свойствами растворителей, такими как гидрофобностью ( $\log P$ ), вязкостью и диэлектрической проницаемостью, с аналитическими характеристиками сенсорных систем посвящено много работ [144-154]. Считается, что более гидрофобные растворители отнимают из микроокружения меньше воды, поэтому с ростом гидрофобности должен наблюдаться рост чувствительности (то есть предпочтительны растворители типа бензола и хлороформа, в то время как гидрофильные растворители (этанол, ацетонитрил или ДМСО) оказывают сильное инактивирующее действие на фермент); вязкость и диэлектрическая проницаемость влияют на диффузию субстрата к ферменту, а также отведение продуктов реакции от фермента [146]. Однако практические результаты различаются, однозначные закономерности отсутствуют, и почти в каждой работе из выявленных закономерностей находятся исключения [144-154]. Довольно подробно вопросы создания ферментативных электродов для работы в органических средах обсуждены в обзоре [147], где представлено множество корреляционных диаграмм для различных систем.

Число работ, посвященных определению именно фенолов различного строения в водно-органических и органических средах с помощью электрохимических сенсоров, не столь велико, как можно было бы ожидать. Следует упомянуть работы [148, 149], посвященные определению фенольных соединений (фенола, пирокатехина, *n*-крезола) на уровне их микромолярных содержаний в хлороформе с использованием амперометрического биосенсора на основе тирозиназы, включенной в ти-

тановый золь-гель. Правильный выбор способа иммобилизации фермента: биочувствительный слой был получен методом парового формирования титанового золь-геля, и за счет мягких условий и достаточного содержания воды сенсор позволял проводить анализ в чистом растворителе (без добавления воды). Электрод оставался стабильным как при хранении (по истечении 70 дней давал 95 % от первоначального отклика), так и в процессе эксплуатации (при проведении около 100 последовательных измерений в течение 5 дней биосенсор сохранял 92 % от первоначальной активности тирозиназы).

В работе [150] представлен тирозиназный биосенсор, способный работать как в водной, так и в органической среде. В водной среде сенсор имел очень высокую чувствительность к фенолу, позволяя определять от 1 нмоль/л фенола в статическом варианте и 10 нмоль/л в проточном (биосенсор давал отклик также и на пирокатехин, *n*-хлорофенол, *n*-крезол, и, в меньшей степени, допамин, *n*-метоксифенол, и *n*-бензохинон). Для иммобилизации тирозиназы использовали водную дисперсию полуретанполиэтиленоксида, которую в смеси с ферментом наносили на поверхность электрода и сверху дополнительно защищали гидрофильной мембраной для диализа. В качестве органических реакционных сред изучили гептан, гексан, хлоробензол, толуол и хлороформ. Отмечается, что, хотя в более гидрофобных растворителях чувствительность была традиционно выше, существенно увеличивалось время отклика в проточном режиме в результате ухудшения диффузии гидрофильных фенольных соединений и продуктов их окисления. Интересно, что в органической фазе наблюдали обратные тенденции изменения чувствительности по сравнению с водной фазой – более гидрофобные субстраты определяли с меньшей чувствительностью. Авторы это связывают с тем, что более гидрофильные субстраты в большей степени стремились перейти из гидрофобного раствора в полярную мембрану. При работе в различных растворителях (указанных в скобках) в режиме проточного анализа диапазоны определяемых концентраций фенола составили: 0,1-40 (гептан), 0,1-50 (гексан), 1-200 (хлоробензол), 1-400 (толуол), 5-500 мкМ (хлороформ); пирокатехина – 0,05-50 (хлоробензол), 0,1-60 (толуол), 0,1-100 мкМ (хлороформ).

Число работ по оптическим ферментативным сенсорным системам, способным функционировать в органических средах, относительно невелико [144], а сведения о таких биосенсорах для определения фенольных соединений, единичны. Фактически можно привести единственный пример - тирозиназный сенсор, представленный в работе [155], с флуоресцентным детектированием аналитического сигнала в органических растворителях. Додецилсульфат трис(4,7-дифенил-1,10-фенантролин) рутения(II), растворимый в водно-органических и органических средах, применяли в качестве индикаторного вещества, флуоресценция которого гасится в присутствии кислорода, то есть авторами предложена оптическая альтернатива электроду Кларка [156]. В качестве реакционной среды использовали хлороформ, *n*-гексан и смесь хлороформ-гексан. Фермент тирозиназа был нанесен на частицы октадецилсиликагеля и иммобилизован в гидрофильную полимерную мембрану из сополимера винилового спирта и гидроэтилкарбоксиметилцеллюлозы; мембрана хорошо удерживала воду, что способствовало сохранению каталитической активности фермента. Перед началом использования биосенсор предварительно замачивали в водной среде на несколько секунд или же проводили реакцию в растворителе, насыщенном водой. Насыщенная водой матрица, содержащая фермент, обеспечивала постоянство сигнала в образцах с разным содержанием воды, то есть являлась «водным» буферным раствором. Авторы выявили, что в хлороформе сигнал сенсора был выше, чем в гексане, объяснив это более высокой растворимостью *o*-хинона в этом растворителе и, соответственно, лучшим переносом этого вещества от фермента в систему. В то же время наблюдали существенное уменьшение сигнала и увеличение времени отклика при переходе к растворителям, смешивающимся с водой – ацетонитрилу, тетрагидрофурану или 2-пропанолу, в ацетоне сигнал отсутствовал. Этот эффект авторы связали с тем, что перечисленные растворители разрушали гидратную оболочку фермента, приводя к потере активности последнего. В отличие от представленных выше электрохимических твердофазных сенсорных систем флуоресцентный сигнал генерировался в растворе, а не в биочувствительном слое, то есть возможность его регистрации и величина могли быть ограничены как составом, так и физико-химическими свойствами матриц анализируемых объектов. Кроме того, чувствительность предложенной оптической сенсорной системы была невысока и позволяла определять фенольные

соединения на уровне их миллимолярных содержаний. Прототипы биосенсорных систем со спектрофотометрической регистрацией аналитического сигнала для определения указанных аналитов в водно-органических и органических средах в литературе отсутствуют, что обуславливает дополнительный интерес для проведения исследований и разработок в указанном направлении.

### **3.1.1. Обоснование выбора ферментов и индикаторной реакции**

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 качестве биокатализаторов применяют ферменты-оксидоредуктазы – лакказы, тирозиназу, пероксидазу [94-103]. В этих работах используют различные препараты ферментов, прежде всего коммерческие, выделенные промышленно из различных источников: тирозиназа – из мякоти грибов, пероксидаза – из корней хрена и несколько разновидностей лакказы, чаще других, – из грибов *Trametes versicolor*, *Rigidoporus*; их выпускают такие фирмы как Sigma Aldrich, Fluka и др. Они могут быть получены также из растительных экстрактов в лабораторных условиях; кроме того, в ряде работ используют биомассу из растительного сырья, из которой ферменты предварительно не выделяют. Следует отметить, что последний прием позволяет повысить стабильность и каталитическую активность фермента в составе сенсора, упростить и удешевить процесс его изготовления, однако ухудшается воспроизводимость сигнала сенсоров, полученных на основе различных партий сырья; по этой причине более широко в практике химического анализа используют коммерческие препараты ферментов.

Выбор между тремя указанными выше биокатализаторами обусловлен прежде всего двумя факторами: субстратной специфичностью определяемого индивидуального фенольного соединения к ферменту, а также задачами анализа, например, необходимостью определения индивидуального вещества или же общего содержания фенольных соединений. Кроме того, для перечисленных ферментов характерны различные субстраты-окислители – для пероксидазы хрена это перок-

сиды (в первую очередь, пероксид водорода), в случае тирозиназы и лакказы – растворенный в воде кислород. При использовании последних ферментов нет необходимости вводить дополнительный реагент (пероксид), однако при этом трудно варьировать содержание кислорода, что может приводить к ухудшению воспроизводимости результатов измерений и, в некоторых случаях, невозможности простыми средствами обеспечить оптимальную концентрацию окислителя. В то же время, поскольку снижение концентрации кислорода в растворе нетрудно контролировать с помощью электрода Кларка, в биосенсорах на основе тирозиназы и лакказы сигнал можно регистрировать по потреблению кислорода в реакции окисления фенольных соединений [157].

Пероксидаза, которая проявляет каталитическую активность в реакциях окисления более узкого круга фенолов, может быть использована в комбинации с глюкозооксидазой (как это продемонстрировано в [158]). Это исключает, во-первых, необходимость дополнительного введения пероксида водорода (растворы которого не очень стабильны и требуют частого контроля концентрации); во-вторых, решает проблему ингибирования пероксидазы избытком пероксида, поскольку пероксид, образующийся в результате ферментативного окисления глюкозы, тут же вступает в реакцию пероксидазного окисления фенолов. Кроме того, в отдельных работах используют сочетание тирозиназы и пероксидазы или тирозиназы и лакказы для повышения эффективности окисления фенольных соединений (в целях улучшения аналитических характеристик посредством увеличения выхода конечного продукта и, как следствие, аналитического сигнала) или расширения круга определяемых соединений. Это имеет смысл при необходимости определения общей концентрации фенольных соединений в образце, так как в этом случае требуется обеспечить окисление как можно большего числа соединений схожей структуры (например, [159-160]). Кроме того, интересным примером комбинации всех трех перечисленных оксидоредуктаз является работа [161], в которой эти ферменты включены в состав печатного электрода, используемого в системе для проточного определения пирокатехина. Среди прочего в этой работе можно найти сравнение чувствительностей электродов на основе тирозиназы, пероксидазы и лакказы по отношению к различным фенольным соединениям при прочих равных условиях. Показано, что чувствительность лакказного электрода максимальна по отношению к *n*-



замещенным веществам, в особенности к *n*-аминофенолу и *n*-замещенным *o*-дифенолам; пероксидазный электрод имел аналогичные свойства, причем наибольший отклик наблюдался по отношению к кверцетину и допамину; в то же время электрод на основе тирозиназы был наиболее чувствителен к *n*-аминофенолу, *n*-крезолу, гваяколу и допамину (табл. 4).

Подробное исследование селективности на примере лакказного электрода и тридцати фенольных соединений можно найти также в работе [162].

Следует отметить, что хиноны, образующиеся при ферментативном окислении фенольных соединений, способны вступать в реакцию со специально введенными реагентами. При этом образуются окрашенные соединения, что открывает широкие возможности для спектрофотометрического определения актуальных аналитов [94-103]. Так, на принципе формирования окрашенного соединения в результате дериватизации хинонов разработаны сенсорные системы, представленные в работах [95-98]. Серия этих работ посвящена определению простейших фенольных соединений с помощью сенсоров на основе оксидоредуктаз (пероксидазы, тирозиназы или лакказы) и 3-метил-2-бензотиазолина гидразона (МБТГ), образующего с продуктами ферментативного окисления фенолов соединение красного цвета. Согласно предполагаемому механизму, реагент присоединяется по *n*-положению хинона или радикала (схема 4), поглощение которого в области 500 нм служит аналитическим сигналом.

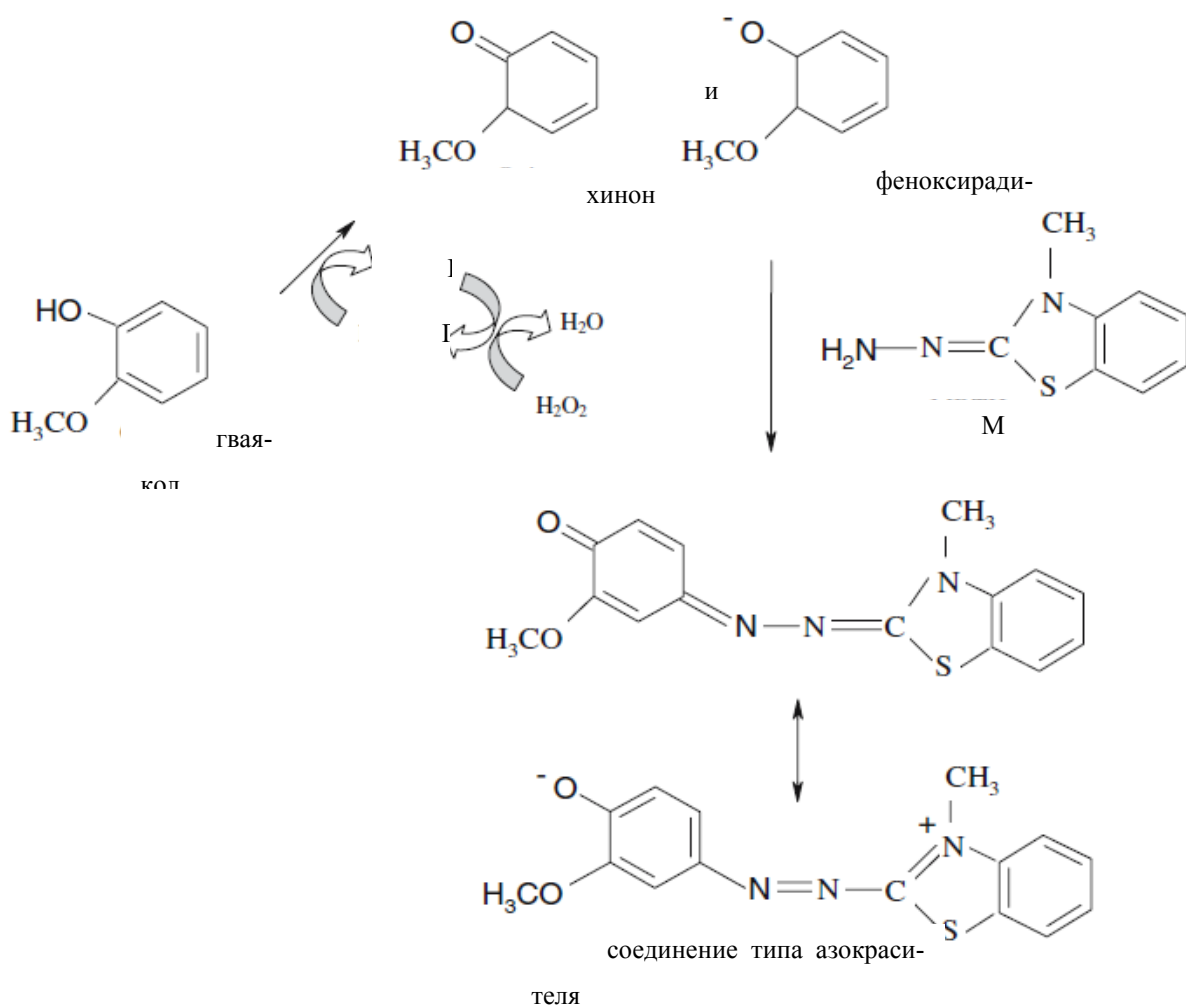
Сигнал измеряли спектрофотометрически, в работах [96-98] - по поглощению кюветы с анализируемым раствором и пластинкой, на которую иммобилизованы компоненты системы, а в работе [95] - аналогично, но при этом на пластинке иммобилизован только фермент, в то время как все остальные компоненты находятся в растворе. Однако, продолжая эту работу, авторы [96-98] упростили методику анализа, иммобилизовав дериватирующий агент МБТГ в пленку золь-геля поверх пленки хитозана с ферментом.

**Таблица 4.** Относительный отклик электродов (%) на основе различных ферментов на фенольные соединения (отклик на пирокатехин принят за 100 %) [161]

Фенольное Соединение	Фермент		
	<i>Лакказы</i>	<i>Пероксидаза</i>	<i>Тирозиназа</i>
Фенол	18	11	318
<i>m</i> -Аминофенол	27	19	-
<i>n</i> -Аминофенол	212	128	38
5-Аминосалициловая кислота	8,1	432	6,5
<i>m</i> -Крезол	18	24	18
<i>n</i> -Крезол	32	36	40
3,5-Диметилфенол	-	15	-
4-Хлоро-3-метилфенол	63	30	24
2,6-Дихлорофенол	-	4,4	-
Гваякол	20	52	16
Ванилин	3,7	53	22
Ванилиновая кислота	2,9	5,1	-
<i>n</i> -Метоксифенол	23	52	8,2
Пирокатехин	100	100	100
Допамин	38	154	-
Резорцин	-	30	0,8
Гидрохинон	89	31	3,1
Кверцетин	23	142	3,9

Эта серия работ интересна еще тем, что при одинаковых конструкции оптического сенсора и способа иммобилизации фермента и дериватирующего агента, но при использовании разных ферментов получены различающиеся ряды по чувствительности и селективности к фенолам различного строения. Так, сенсор на основе пероксидазы оказался чувствителен по отношению к резорцину, гваяколу, *o*-

крезолу и не чувствителен по отношению к пирокатехину, фенолу и гидрохинону. Сенсор на основе тирозины давал отклик на фенол, пирокатехин и *m*-крезол, но не реагировал на *o*-, *n*-крезолы, гидрохинон и 4-хлорофенол (аналогичный сенсор с иммобилизованным реагентом давал отклик на фенол, *m*-, *n*-крезол и 4-хлорофенол). Сенсор на основе лакказы был чувствителен только к пирокатехину и не реагировал на присутствие гваякола, *o*-крезола и *m*-крезола.



**Схема 4.** Образование окрашенного соединения фенолов (на примере гваякола) с МБТГ в присутствии фермента-оксидоредуктазы (на примере пероксидазы хрена) [97].

В связи с вышесказанным для сравнительной оценки аналитических перспектив использования различных ферментов для определения фенолов разного строения были изучены возможности не только пероксидазы, но и двух упомянутых выше оксидаз – тирозиназы и лакказы. В работе использовали твердые препараты пероксидазы из корней хрена (Е.С. 1.11.1.7) (Sigma, США), лакказы *Trametes Versicolor* (Е.С. 1.10.3.2) (Sigma, США) и грибной тирозиназы (Е.С. 1.14.18.1) (Sigma, США).

В качестве возможных твердофазных индикаторных систем для разработки спектрофотометрической сенсорной системы на основе оптически прозрачного биочувствительного слоя пероксидаза – хитозан, закрепленного на стеклянной пластинке, мы выбрали две классические реакции для определения фенольных соединений по их окислению и последующей дериватизации с участием 4-аминоантипирина (4-ААП) (примеры использования этого реагента для определения фенольных соединений можно найти в работах [163-165]) и 3-метил-2-бензотиазолингидразона (МБТГ, например [166-167]).

Наличие реакционноспособных аминогрупп в составе хитозана обуславливает его способность вступать в некоторые реакции, характерные для аминов, в том числе известно [139-142], 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.

В то же время аддукт хитозана и хинона сильно поглощает свет в УФ и видимой областях спектра и, таким образом, эта реакция может быть использована для определения фенольных соединений после их предварительного окисления, то есть возможно создание оптической биосенсорной системы для определения фенольных соединений, которая не требует использования дополнительных хромогенных агентов. Работа предложенного сенсорного устройства основана на последовательности двух процессов: ферментативного окисления фенольного соединения с образованием хинонного продукта и его последующего взаимодействия с

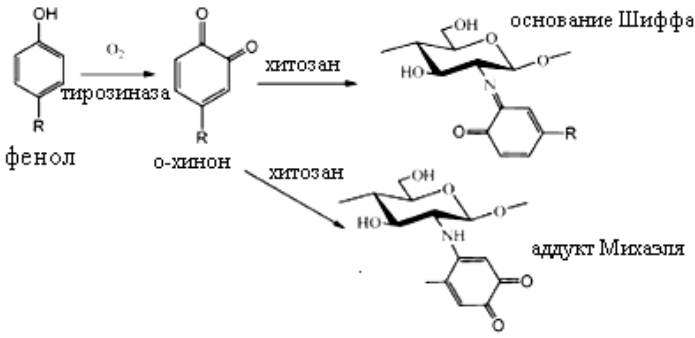
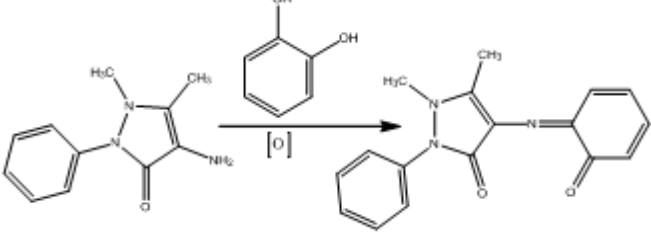
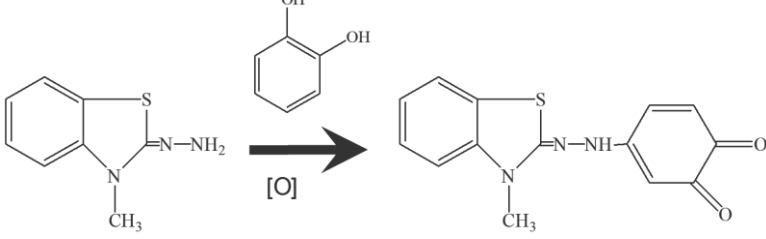
аминогруппами хитозана с образованием сильно поглощающего свет аддукта [139]. Последний процесс описан в работах Г. Пейна с соавторами [141, 142], которые предположили, что реакция образования аддукта хитозан-хинон протекает по механизму присоединения Михаэля [142].

В табл. 5 приведены схемы всех трех вышеупомянутых реакций, которые в дальнейшем были апробированы в разработке спектрофотометрических твердофазных сенсорных систем для определения фенольных соединений различного строения.

Продукты взаимодействия 4-ААП [163] и МБТГ [167] с фенолами в присутствии окислителей в щелочной среде поглощают в диапазоне длин волн 420–510 нм. Кроме того, известно, что эта реакция проходит и в водно-органических средах, что можно использовать как для определения малорастворимых субстратов пероксидазы, так и в анализе ограниченно растворимых в воде объектов. Например, продукт взаимодействия МБТГ и фенола в водно-спиртовом растворе имеет максимум поглощения при 510 нм и высокое значение молярного коэффициента поглощения  $4,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [167].

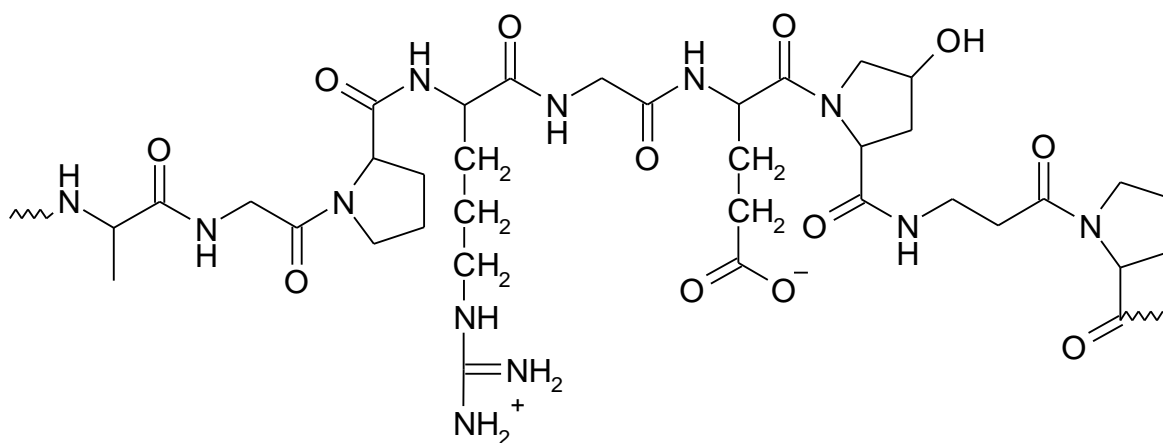
Из литературы [165, 166] известно, что МБТГ и 4-ААП вступают во взаимодействие только с теми фенолами, у которых имеется свободное пара-положение относительно гидроксильной группы. Тем не менее, в работе [168] отмечено, что наряду с *n*-замещенным образуется *o*-замещенный продукт, но его концентрация существенно ниже (3% против 97% в щелочной среде), в то время как в кислой среде доля *o*-замещенного продукта возрастает до 30%. В частности, продукты совместного окисления *o*- и *m*-крезола с МБТГ окрашивались в красный цвет, *n*-крезола – в фиолетовый, а фенол и его алкилпроизводные со свободными *n*- и *o*-положениями имеют на хроматограмме два окрашенных пятна: красное и фиолетовое. Оптимальным для формирования *n*-замещенного соединения являлся рН 7,5 – 9,5; при рН выше 10 оба продукта неустойчивы, поэтому эту систему изучали при рН 9 (это значение рН являлось оптимальным по выходу и стабильности окрашенного аддукта по данным [167]).

**Таблица 5.** Выбранные индикаторные реакции для разработки спектрофотометрических твердофазных сенсорных систем для определения фенольных соединений

Название (сокращение)	Реакция взаимодействие реагента с продуктами окисления фенольных соединений
Хитозан	 <p>Схема реакции: Фенол (с заместителем R) окисляется тирозиназой (с участием O<sub>2</sub>) до о-хинона. О-хинон взаимодействует с хитозаном, образуя основание Шиффа (Schiff base) и аддукт Михаэля (Michael adduct).</p>
4-Аминоантипирин (4-ААП)	 <p>Схема реакции: 4-Аминоантипирин (4-ААП) окисляется ([O]) до 4-оксипиридина.</p>
3-Метил-2-бензотиазолин гидразон (МБТГ)	 <p>Схема реакции: 3-Метил-2-бензотиазолин гидразон (МБТГ) окисляется ([O]) до соответствующего оксо-производного.</p>

Следует отметить, что на этой стадии эксперимента для иммобилизации МБТГ и 4-ААП в качестве матрицы выбрали желатин, так как в литературе отмечена плохая удерживаемость МБТГ в матрицах на основе хитозана [95].

Желатин – природный полимер, получаемый из продуктов, насыщенных коллагеном – сухожилий, костей, который представляют собой сеть полипептидных цепей, пространственно связанных участками тройных спиралей (рис. 28).



**Рис. 28.** Структурная формула молекулы желатина.

Полимер набухает, но не растворяется в холодной воде и разбавленных кислотах. Растворение желатина возможно лишь при нагревании выше  $40^{\circ}\text{C}$ , при этом образуется вязкий раствор, который при охлаждении превращается в гель. Его хорошая адгезивная (клеящая) способность обеспечивает прочное скрепление пленки с подложкой. Вблизи изоэлектрической точки ( $\text{pH } 4,8 - 5,1$ ) все основные группы желатина заряжены положительно, а большинство карбоксильных групп диссоциированы и отрицательно заряжены. Полимер фактически содержит объемную сетку зарядов и некоторое количество свободных ионов, связанных с этой сеткой [169], которая при  $\text{pH} < 5$  имеет положительный заряд, а при  $\text{pH} > 5$  – отрицательный (что используется для иммобилизации противоположно заряженных молекул).

На основе полимерного массива с подобной структурой можно получать матричные системы с достаточно однородным распределением иммобилизованного вещества, причем молекулы последнего остаются стерически доступными [170]. Кроме того, желатиновый гель играет исключительно роль матрицы и индифферентен ко всем участникам реакций, протекающих в тонком слое. Это создает благоприятные условия для осуществления различных химических процессов с участием иммобилизованного реагента.

Предложенная нами методика нанесения прозрачного чувствительного слоя на основе желатина на поверхность оптического стекла приведена в работе [143].

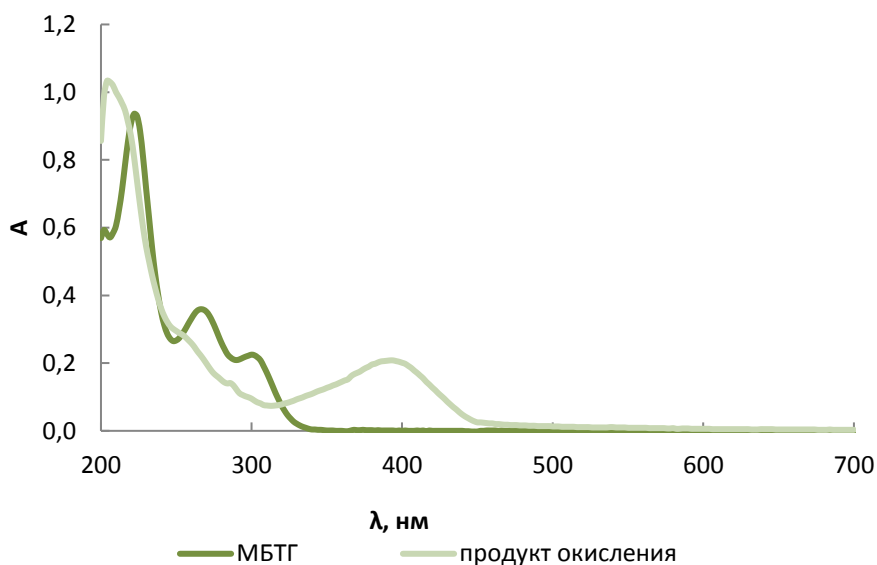
Как отмечено в литературе [168, 171], использование МБТГ может быть предпочтительнее использования 4-ААП, поскольку МБТГ имеет более компакт-

ную структуру и легче вступает в реакцию с хинонами с образованием окрашенного продукта из-за меньших стерических затруднений. Кроме того, 4-ААП весьма чувствителен к рН и требует более строгого контроля кислотности. По этой причине именно МБТГ использовали для выявления оптимального состава биочувствительного слоя на поверхности сенсорного устройства. Поскольку МБТГ находился в катионной форме 3-метилбензотиазолин-гидразон гидрохлорида, для его лучшего удерживания в желатиновой пленке иммобилизацию проводили при рН выше 5, используя растворы желатина, приготовленные растворением его сухого порошка в воде, 0,05 М пиррофосфате калия (рН ~ 10.4) или щелочи различной концентрации для выбора оптимального значения рН взаимодействия желатиновой пленки с МБТГ. Кроме того, рН раствора оказывал влияние на свойства желатиновой пленки, в том числе механические свойства – прочность и надежность закрепления на поверхности стекла (эти характеристики оценивали визуально, результат считали положительным, если при вынимании из раствора пленка не отслаивалась от стекла, а при высыхании не трескалась). Дальнейшую перспективность того или иного состава чувствительного слоя сенсорной системы оценивали по двум критериям: эффективности удерживания дериватизирующего агента в биочувствительном слое и прозрачности последнего.

Для количественной оценки эффективности удерживания МБТГ в пленках на основе желатина регистрировали спектр поглощения этого реагента в растворе, в котором наблюдалось два максимума поглощения: при 265 и 300 нм (рис. 29). Однако максимум при 265 нм не является характеристическим, поскольку в этой области спектра помимо МБТГ может поглощать большое число соединений, в том числе компоненты буферного раствора, желатиновая матрица биочувствительного слоя. По этой причине степень вымывания МБТГ из полимерной пленки в раствор контролировали при 300 нм следующим образом: чувствительный слой с иммобилизованным реагентом помещали в буферный раствор на 15 мин, после чего вынимали пластинку с пленкой и регистрировали поглощение раствора при 300 нм, считывая из этой величины концентрацию МБТГ в растворе ( $\epsilon_{300} = 4,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), и, как следствие, долю МБТГ, высвободившегося в раствор по отношению к его количеству, первоначально иммобилизованному в пленке. Плотность нанесения желатина на этом этапе выбирали из соображений экспериментального удобства,



степень вымывания регистрировали через 15 мин после погружения пленки в раствор.



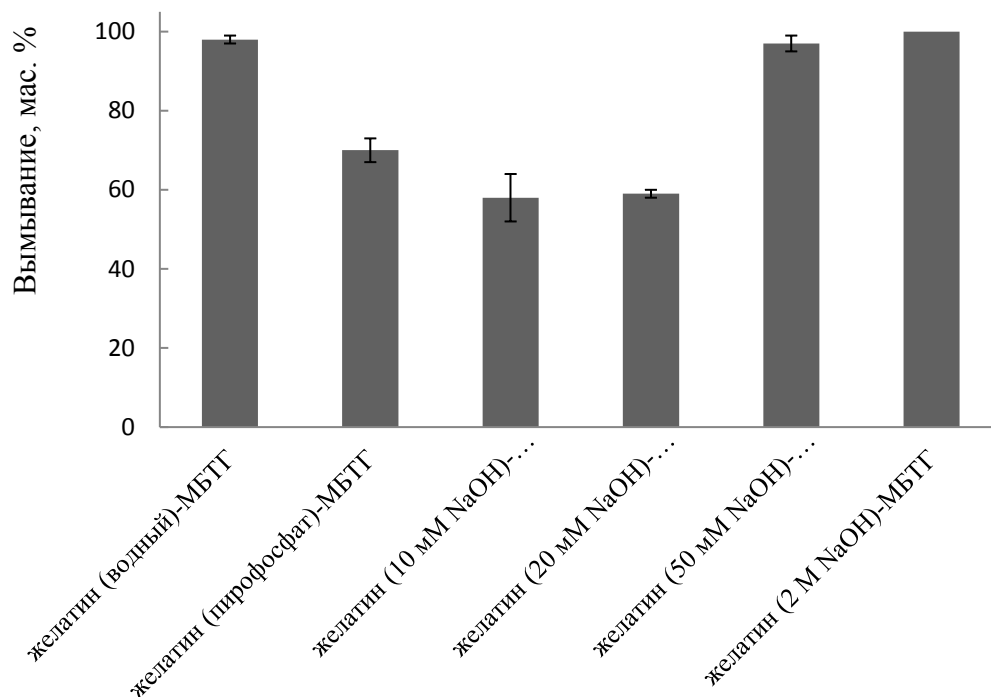
**Рис. 29.** Спектр поглощения МБТГ и продукта его пероксидазного окисления в растворе. Концентрации в растворе: МБТГ – 50 мкМ,  $H_2O_2$  – 1 мМ, пероксидаза – 30 нМ, пирофосфатный буферный раствор, рН 9,0.

Диаграммы на рис. 30 иллюстрируют степень вымывания хромогенного вещества из пленок на основе желатина различного состава.

Следует отметить, что эффективность удерживания МБТГ в биочувствительном слое на основе желатина была низкой, через 15 мин после выдерживания пленки в растворе вымывалось в лучшем случае не менее 50 мас. % дериватирующего агента (рис. 28), что являлось неприемлемым для дальнейшего аналитического использования сенсорной системы в твердофазном варианте. Дальнейшее увеличение щелочности раствора (до 20 мМ NaOH) при формировании биочувствительного слоя на основе желатина несколько повышало эффективность удерживания МБТГ в биочувствительном слое, однако при этом пленки теряли прозрачность.

При использовании сильнощелочных растворов (при концентрации NaOH > 2 М) полимерный слой становился механически настолько непрочным, что полностью смывался с поверхности стекла после выдерживания в буферном растворе, а в более концентрированных растворах желатина образовывались визуально неодно-

родные пленки. Фактически аналогичный результат нами был получен и при использовании 4-ААП [143].



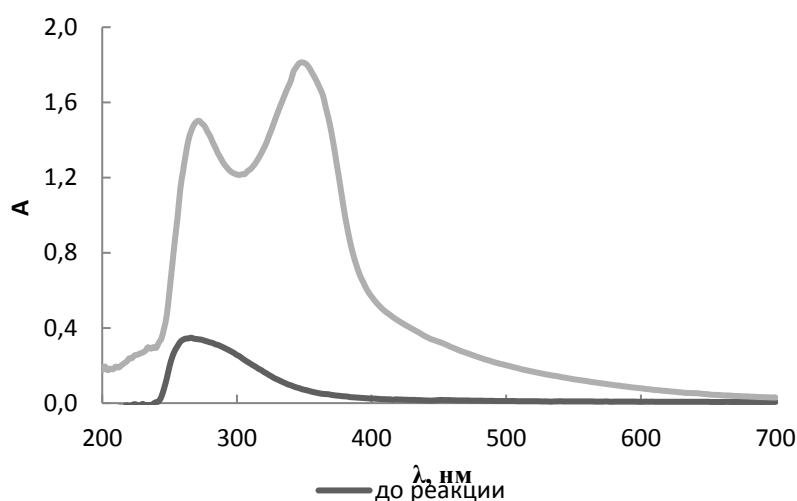
**Рис. 30.** Степень вымывания МБТГ из пленок на основе желатина, полученных из растворов различной кислотности. Состав пленки: желатин – 0,8 мг/см<sup>2</sup>, МБТГ – 0,25 мкмоль (соответствует концентрации в растворе 50 мкМ). Раствор: 0,05 М пирофосфатный буферный раствор, рН 9,0, объем раствора 5 мл, время выдерживания пленки - 15 мин.

Для оценки возможности применения в качестве индикаторной реакции образования аддукта между хитозаном и хинонами в отсутствие других дополнительных хромогенных агентов для спектрофотометрического определения фенольных соединений провели следующий эксперимент: чувствительный слой сенсора формировали капельным нанесением смеси, состоящей только из полимерной матрицы для иммобилизации фермента и биокатализатора [25]. Аналитический сигнал регистрировали в режиме поглощения непосредственно в чувствительном слое на поверхности подложки по схеме, предложенной в гл. 2.



**Рис. 31.** Вид биочувствительного слоя на основе комплекса пероксидазы с хитозаном на поверхности оптического стекла после выдерживания в реакционном растворе.

Состав пленки: хитозан –  $0,4 \text{ мг/см}^2$ , пероксидаза –  $50 \text{ пмоль}$ .  
Концентрации в растворе: гидрохинон –  $0,5 \text{ мМ}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  –  $5 \text{ мМ}$   
( $\text{pH } 7,0$ ,  $0,05 \text{ М}$  фосфатный буферный раствор, время выдерживания  $6 \text{ ч}$ ).

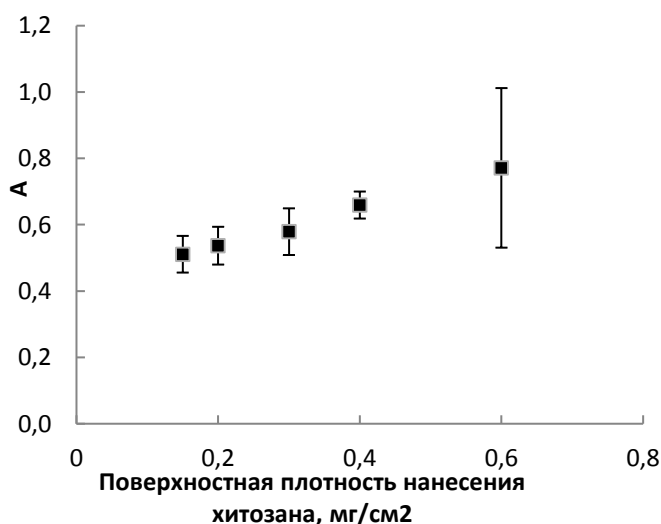


**Рис. 32.** Спектр поглощения чувствительной пленки (хитозан –  $0,4 \text{ мг/см}^2$ , пероксидаза –  $50 \text{ пмоль}$ ) до и после взаимодействия с реакционным раствором (концентрации в растворе: гидрохинон –  $500 \text{ мкМ}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  –  $5 \text{ мМ}$ ,  $\text{pH } 7,0$ ,  $0,05 \text{ М}$  фосфатный буферный раствор, время выдерживания  $24 \text{ ч}$ ).

На этом этапе экспериментов концентрации компонентов были выбраны произвольно, на основе того их диапазона и  $\text{pH}$ , с которыми обычно работают при проведении этой ферментативной реакции в растворе, а именно  $0,5 \text{ мМ}$  гидрохинона,  $5 \text{ мМ}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{pH } 7,0$ ,  $0,05 \text{ М}$  фосфатный буферный раствор). Обнаружили, что через несколько часов после начала реакции пленка хитозана окрашивалась в коричневый цвет (рис. 31), а на спектре поглощения, зарегистрированном относительно чистой пластинки, появлялись два максимума при  $265$  и  $345 \text{ нм}$  (рис. 32). В отсутствие фенольных соединений в системе соответствующие максимумы не появлялись. В целях минимизации влияния фоновых компонентов реакционной смеси, а в

дальнейшем и анализируемых объектов, а также самого полимерного слоя в качестве аналитической была выбрана длины волны – 345 нм ( $\epsilon_{345} = (4,2 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Для определения оптимального содержания хитозана в чувствительном слое варьировали плотность его нанесения на стеклянную подложку. Выяснили, что при увеличении содержания хитозана на поверхности кварцевого стекла от 0,75 до 3 мг (что соответствует плотности нанесения пленки хитозана с  $0,15 \text{ мг/см}^2$  до  $0,6 \text{ мг/см}^2$ ) величина поглощения от сенсорного устройства после выдерживания в реакционном растворе возрастает (рис. 33). Последнее можно связать как с увеличением длины оптического пути вследствие возрастания толщины поглощающего биочувствительного слоя, так и с увеличением концентрации количества аминогрупп, вступающих в реакцию с хинона, и, как следствие, количеством поглощающего аддукта в составе сенсорного устройства. При содержании хитозана 3 мг (что соответствует плотности нанесения  $0,6 \text{ мг/см}^2$ ) значительно ухудшается воспроизводимость измерений, пленка становится механически непрочной и начинает скалываться с поверхности стекла; поэтому для дальнейшей работы выбрали содержание хитозана 2 мг (плотность нанесения  $0,4 \text{ мг/см}^2$ ).



**Рис. 33.** Зависимость поглощения чувствительной пленки (содержание пероксидазы – 5 пмоль) от содержания хитозана на поверхности пластины (размер  $13 \times 38 \text{ мм}^2$ ) (концентрации в растворе:  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 5 мМ, ГХ – 0,1 мМ, 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 7,0, объем реакционного раствора 5 мл, время выдерживания – 24 ч).


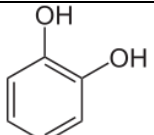
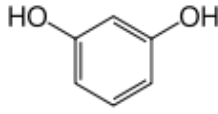
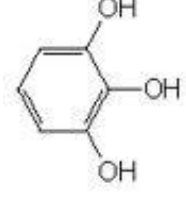
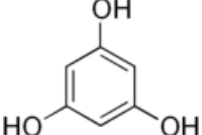
На основании полученных результатов можно сделать очевидный вывод, что среди трех рассмотренных спектрофотометрических индикаторных реакций единственно возможной для регистрации аналитического сигнала в твердофазном варианте является реакция на основе взаимодействия продуктов ферментативного окисления фенолов – хинонами непосредственно с матрицей биочувствительного слоя - хитозана. Существенным недостатком использования МБТГ и 4-ААП в качестве дериватирующих агентов являются значительное (от 50% и выше) их вымывание из чувствительного слоя на поверхности стекла. Наличие ковалентной связи между хитозаном и продуктами окисления фенольного соединения обеспечивает прочное связывание индикаторного вещества с биочувствительным слоем пероксидаза-хитозан; фактически происходит концентрирование продукта ферментативного окисления фенольных соединений из анализируемого раствора. Кроме того, чувствительный слой на основе хитозана, как было показано в предыдущих главах, обеспечивает высокую каталитическую активность и стабильность фермента – пероксидазы из корней хрена как в водных, так и водно-органических средах, что также демонстрирует перспективность применения именно этой новой, ранее не использовавшейся в химическом анализе реакции в целях создания спектрофотометрических сенсорных систем для определения биологически активных веществ.

### **3.1.2. Выбор условий определения водорастворимых фенольных соединений**

Следующим этапом работы стало изучение взаимодействия чувствительного слоя на основе хитозана с водорастворимыми фенольными соединениями, представленными в табл. 6.

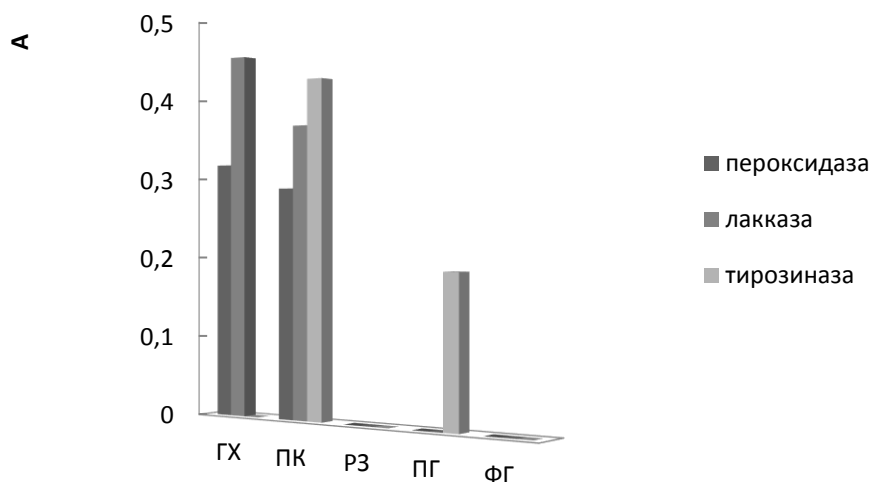
Выбор именно этих веществ объясняется тем, что, помимо того, что их определение в ряде объектов представляет практический интерес (например, гидрохинона, содержание которого регулируется во многих странах, в косметических препаратах), они являются структурными единицами ряда более сложных соединений (в частности, флавоноидов, катехоламинов) и могут моделировать их поведение в исследуемой системе.

**Таблица 6.** Изученные водорастворимые фенольные соединения и литературные сведения об их субстратной специфичности к пероксидазе, лакказе и тирозиназе (“+” – фермент катализирует окисление фенола, “-” – фермент не катализирует окисление фенола)

Формула	Название	Фермент		
		<i>Пероксидаза</i>	<i>Лакказа</i>	<i>Тирозиназа</i>
	Гидрохинон	+ [172]	+ [174]	- [175]
	Пирокатехин	+ [173]	+ [174]	+ [176]
	Резорцин	+ [174]	+ [174]	- [176]
	Пирогаллол	+ [174]	+ [174]	+ [176]
	Флуороглюцин	+ [173]	+ [177]	- [176]

Возможность определения перечисленных соединений с помощью выбранной индикаторной реакции – ферментативного окисления фенольных соединений и последующего взаимодействия продукта с биочувствительным слоем на основе хитозана; условия проведения этой реакции для создания твердофазных спектрофотометрических сенсорных систем были выявлены *в присутствии трех различных ферментов* – пероксидазы из корней хрена, лакказы из *Trametes Versicolor* и грибной тирозиназы (табл. 6).

Полученные результаты представлены на рис. 34 они позволяют выделить две представляющих аналитический интерес особенности, определяющие селективность отклика сенсорной системы. Во-первых, как и ожидалось, селективность по отношению к определенному фенольному соединению определяется специфичностью фермента (сравнение результатов с табл. 8 [172-178]).



**Рис. 34.** Селективность отклика разработанных сенсоров в присутствии ряда изомерных ди- и три-фенольных соединений. Концентрации в растворе: фенольное соединение (ГХ – гидрохинон, ПК – пирокатехин, РЗ – резорцин, ПГ – пирогаллол, ФГ – флуороглюцин) – 50 мкМ,  $H_2O_2$  – 5 мМ (в случае пероксидазы), состав чувствительной пленки: фермент (пероксидаза – 50 пмоль/тирозидаза – 8 у.е., лакказа – 1,25 у.е), хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 6.5, время выдерживания 24 ч).

Так, тирозиназная сенсорная система дает отклик только в присутствии пирокатехина и пирогаллола, то есть *o*-замещенных фенолов, поскольку только они, по литературным данным, являются субстратами этого фермента. В то же время, биочувствительные пленки, содержащие лакказу и пероксидазу, которые катализируют согласно литературным данным окисление всех изученных фенолов, реагировали исключительно на присутствие гидрохинона и пирокатехина. То есть, как и предполагалось, во взаимодействие с полимерным слоем на основе хитозана вступают только те соединения, которые в результате ферментативного окисления об-

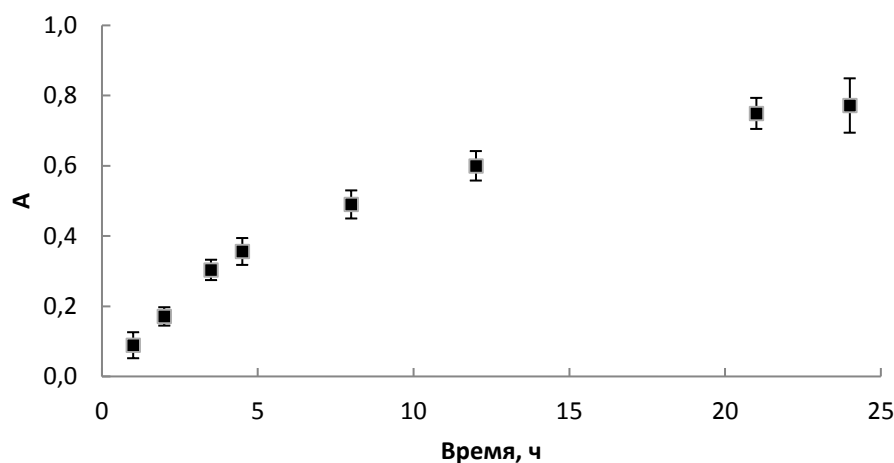
разуют хиноны, в изученном ряду - гидрохинон и пирокатехин. А в результате пероксидазного и лакказного окисления резорцина, пирогаллола и флуороглуцина образуются димеры или полимерные продукты [178], то есть отличные от хинонов продукты, они не вступали во вторую стадию индикаторного процесса, приводящую к появлению характеристического максимума в спектре поглощения.

Таким образом, знание механизмов ферментативного окисления и соответствующий выбор катализатора позволяет управлять селективностью спектрофотометрической биосенсорной системы. Включение в чувствительную пленку тирозиназы может обеспечить селективное определение *o*-фенолов в присутствии *p*-фенолов, а, например, фенольные соединения, не образующие при окислении хинонов, вообще не влияют на аналитический сигнал сенсорной системы.

Следующим этапом стало *изучение зависимости поглощения чувствительного слоя от времени* выдерживания пленки в реакционном растворе в присутствии аналита. На рис. 35 представлена полученная зависимость для чувствительного слоя, содержащего пероксидазу; для двух других ферментов наблюдалась качественно аналогичная зависимость. Таким образом, при комнатной температуре величина поглощения максимальна и, в перспективе, наиболее высока чувствительность определения фенольных субстратов при выдерживании сенсора в реакционном растворе в течение суток (24 ч).

На примере пероксидазной сенсорной системы оценили возможность уменьшения времени отклика путем повышения температуры. Для этого построили ряд градуировочных зависимостей для определения гидрохинона в диапазоне температур 20 – 40° С.



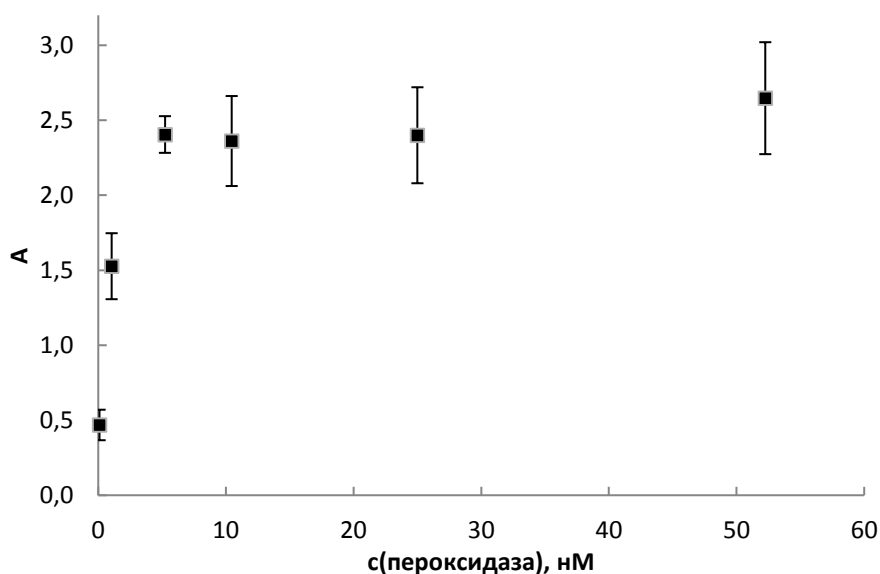


**Рис. 35.** Зависимость поглощения биочувствительного слоя на поверхности оптического стекла от времени его выдерживания в растворе (концентрации в растворе:  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 5 мМ, гидрохинон – 0,1 мМ, состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 М фосфатный буферный раствор рН 7,0, объем реакционного раствора 5 мл).

Повышение температуры до 30 – 40°C позволило повысить скорость реакции и наклон градуировочного графика для определения гидрохинона в 1,6 раза при выбранной длительности выдерживания сенсора в реакционной среде (условия: 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 7,0, концентрация пероксида водорода – 5 мМ, чувствительный слой: хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, пероксидаза – 50 пмоль). В то же время наклон градуировочного графика при комнатной температуре и 24 ч выдерживания пластинки был практически в 3 раза выше, чем при 30°C и 3 ч выдерживания. При этом более длительный вариант был проще экспериментально и может использоваться для внелабораторного определения аналитов: после погружения стеклянной пластинки с чувствительным слоем в раствор не требовалось никаких манипуляций до их извлечения на следующий день. По этой причине использование предложенного сенсора при повышенной температуре сочли нецелесообразным, и далее во всех экспериментах время выдерживания составляло около 24 ч при комнатной температуре.

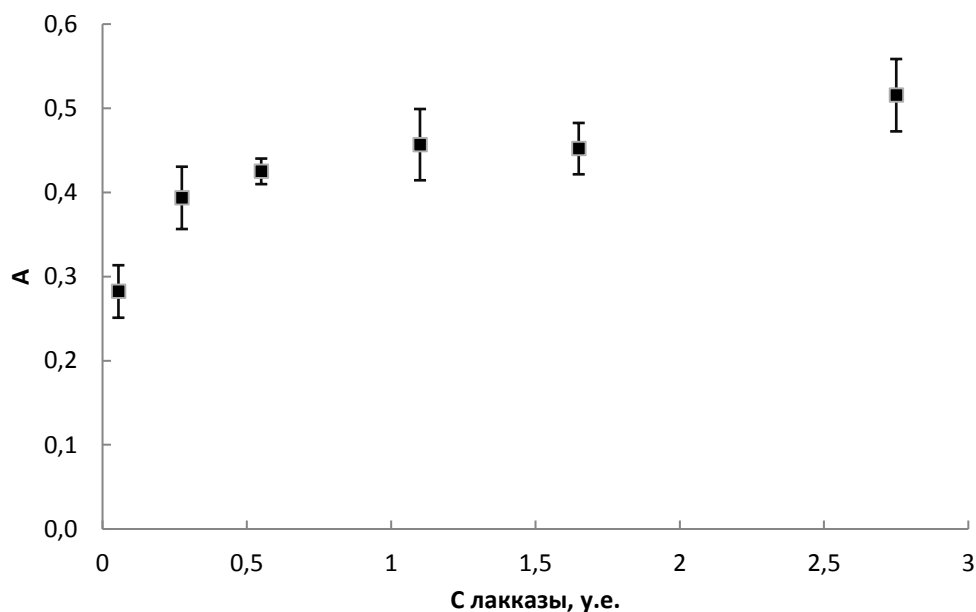
Для выбора оптимальных условий проведения индикаторной реакции присоединения продукта окисления фенольного соединения к хитозану изучили зависимость поглощения биочувствительного слоя от содержания в нем фермента (вы-

бор оптимального количества хитозана описан в главе 2), *состава реакционной среды (природы, концентрации и рН буферного раствора)*, а при использовании пероксидазы в качестве биокатализатора – и от *концентрации субстрата-окислителя – пероксида водорода*. В качестве модельного субстрата применяли гидрохинон (ГХ) (в присутствии пероксидазы и лакказы) или пирокатехин (в случае тирозиназы). Содержание фермента выражали в условных единицах (у.е.), которые рассчитывали, исходя из добавленной массы фермента и данных о его активности, указанных производителем, или, в случае пероксидазы, в виде молярной концентрации, определяя ее по молярному коэффициенту поглощения [143]. Как видно из рис. 36-38, во всех трех случаях увеличение концентрации фермента сначала приводит к накоплению продукта второй стадии индикаторного процесса и, соответственно, росту поглощения полимерного слоя на основе хитозана; при более высоких концентрациях, соответствующих большей активности фермента, продукт не накапливается. Очевидно, это связано с тем, что первая – ферментативная – стадия перестает быть скоростью-лимитирующей в работе сенсорной системы.

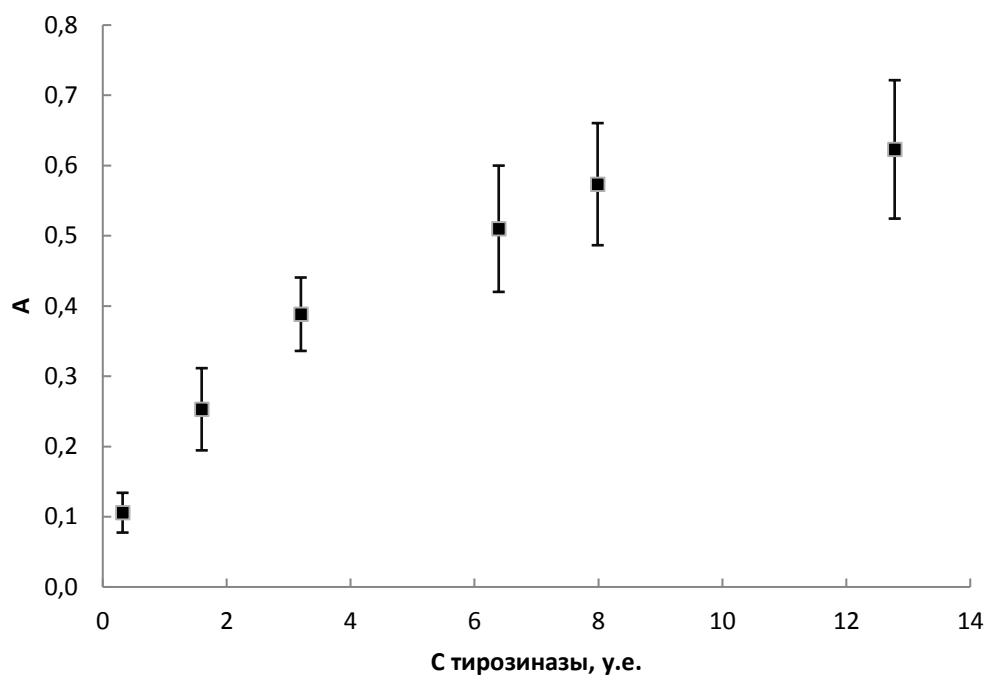


**Рис. 36.** Зависимость поглощения биочувствительного слоя сенсорной системы от содержания в нем фермента (концентрации в растворе:  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 5 мМ, гидрохинон – 0,5 мМ, состав чувствительной пленки: пероксидаза, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 М фосфатный буферный раствор рН 7,0, объем реакционного раствора 5 мл, время выдерживания – 24 ч).

На зависимостях в присутствии пероксидазы и лакказы выше их определенных концентраций/активностей (5 нМ пероксидазы и 0,5 у.е. лакказы) наблюдается практически плато, что является положительным моментом: в диапазонах содержаний 0,5-2,5 у.е. лакказы и 5-50 нМ пероксидазы поглощение чувствительной пленки оказывается достаточно устойчивым к снижению активности фермента, например, при хранении.

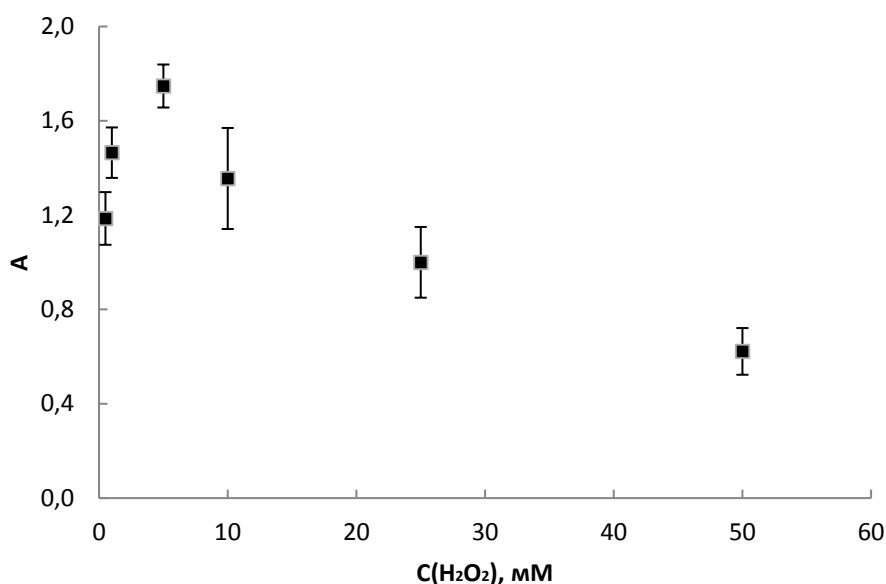


**Рис. 37.** Зависимость поглощения чувствительного слоя сенсорной системы от активности лакказы (концентрация гидрохинона в растворе – 50 мкМ, состав чувствительной пленки: лакказа, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 6,5, время выдерживания – 24 ч).



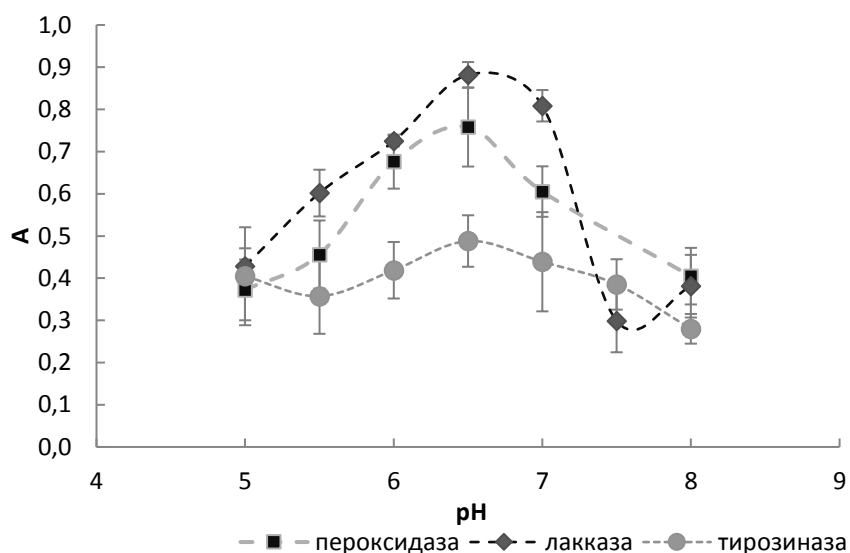
**Рис. 38.** Зависимость поглощения чувствительного слоя сенсора от активности тирозиназы (концентрация в растворе пирокатехина – 50 мкМ, состав чувствительной пленки: тирозиназа, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 6,5, время выдерживания – 24 ч).

Зависимость аналитического сигнала от концентрации субстрата-окислителя пероксидазы – *пероксида водорода* представлена на рис. 39. При малых концентрациях пероксида низкий сигнал обусловлен недостатком субстрата в системе; при больших концентрациях, очевидно, фермент ингибируется избытком субстрата. Для дальнейшей работы выбрали концентрацию пероксида водорода, при которой сигнал максимален – 5 мМ.



**Рис. 39.** Зависимость поглощения чувствительного слоя сенсора от содержания в системе пероксида водорода (концентрации в растворе: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 5 мМ, гидрохинон – 0,5 мМ, состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 7,0, объем реакционного раствора – 5 мл, время выдерживания – 24 ч).

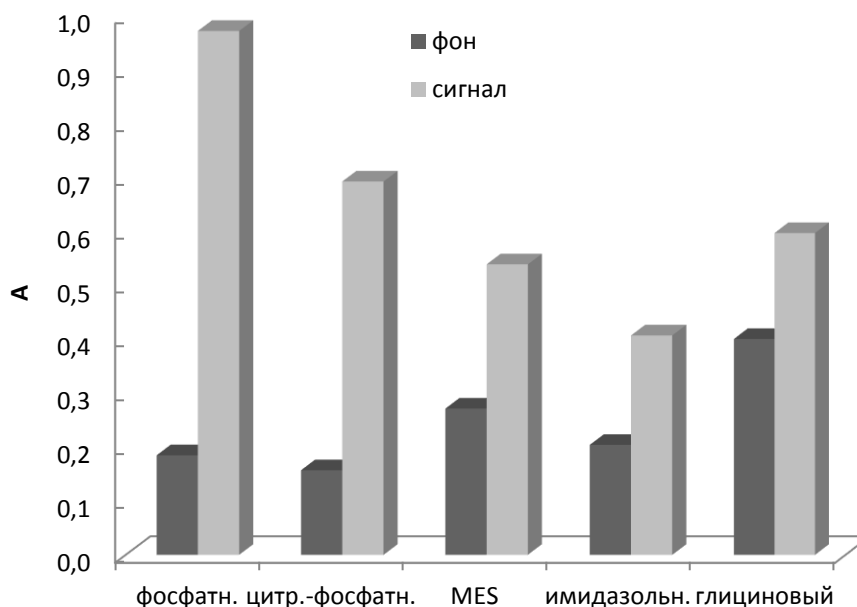
Установили, что независимо от природы биокатализатора, в случае окисления простейших фенольных соединений поглощение прореагировавшей хитозановой пленки максимально при рН 5,8-7,0 (рис. 40). Как было установлено ранее, именно в этом интервале рН пероксидаза в составе каталитическая активность комплекса с хитозаном максимальна. При повышении рН из-за электростатических взаимодействий молекула хитозана сворачивается в глобулу, и аминогруппы становятся стерически менее доступными [130].



**Рис. 40.** Зависимость поглощения биочувствительного слоя сенсорной системы от pH раствора. Состав чувствительного слоя на основе пероксидазы: хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, пероксидаза – 50 пмоль, концентрации в растворе: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 5 мМ, ГХ – 100 мкМ. Состав чувствительного слоя на основе тирозиназы: тирозиназа – 8 у.е., хитозан – 0,3 мг/см<sup>2</sup>, концентрация в растворе пирокатехина – 50 мкМ. Состав чувствительного слоя на основе лакказы: 1,25 у.е. лакказы, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, концентрация в растворе гидрохинона – 100 мкМ. 0,05 М фосфатный буферный раствор, объем реакционного раствора – 5 мл, время выдерживания – 24 ч.

Исследовали влияние природы буферного раствора на эффективность взаимодействия продуктов ферментативного окисления фенольных соединений и, как следствие, на значение аналитического сигнала. Для этого выбрали следующие буферные растворы с pH 6,5: 0,05 М фосфатный, 0,05 М цитратно-фосфатный, 0,2 М глициновый, 0,05 М MES (2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота), 0,01 М имидазольный. Проводя индикаторную реакцию в каждом из перечисленных буферных растворов, регистрировали два параметра: оптическую плотность чувствительного слоя при 345 нм («сигнал») и его поглощение при 700 нм («фон», который использовали для оценки прозрачности пленки, поскольку при этой длине волны аналитический сигнал отсутствовал). Как показывает рис. 41, в фосфатном буферном растворе оба параметра имеют наилучшие значения, в то время как после пребывания в органических буферных растворах пленка мутнела или даже деформировалась, возможно, вследствие сорбции компонентов буфера на ее поверхности. В

глициновом буферном растворе реакция практически не шла, по-видимому из-за более эффективного конкурентного взаимодействия хинонов с более стерически доступной аминогруппой в молекуле глицина. Таким образом, на основе полученных результатов все дальнейшие эксперименты проводили в фосфатном буферном растворе.

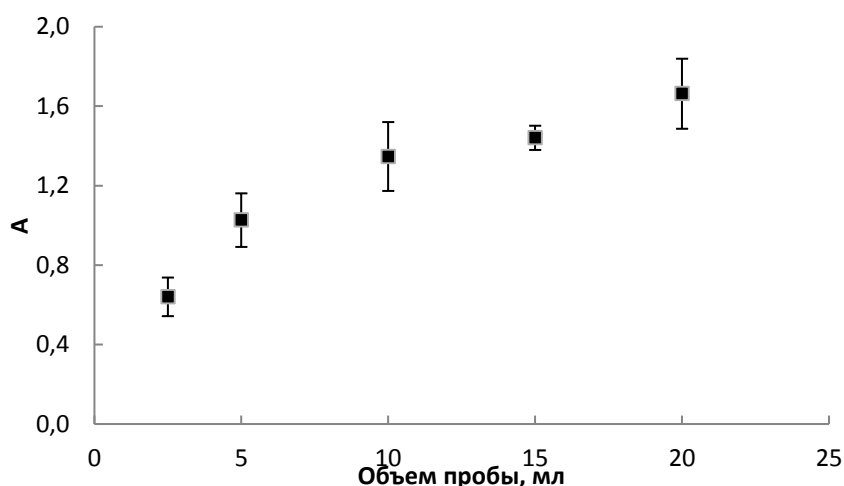


**Рис. 41.** Зависимость поглощения биочувствительного слоя сенсорной системы при аналитической длине волны (345 нм) и при 700 нм (фон) от природы буферного раствора (концентрации в растворе:  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 5 мМ, ГХ – 0.1 мМ, состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, рН 6,5, буферные растворы – 0,05 М фосфатный, 0,05 М цитратно-фосфатный, 0,2 М глициновый, 0,05 М MES, 0,01 М имидазолевый; объем реакционного раствора – 5 мл, время выдерживания – 24 ч).

Изменение концентрации фосфатного буферного раствора в диапазоне 0,025 – 0,1 М не оказывало существенного влияния на величину аналитического сигнала пероксидазной сенсорной системы. При дальнейшем увеличении его концентрации величина отклика уменьшалась, что, по-видимому, связано с инактивацией фермента при более высокой ионной силе раствора. В последующих экспериментах использовали буферный раствор концентрации 0,05 моль/л, поскольку это

значение находится примерно в середине исследованного диапазона и, кроме того, является типичной концентрацией буферного раствора при работе со многими ферментами.

Увеличение *объема пробы* ожидаемо приводило к повышению аналитического сигнала (рис. 42), но для дальнейшей работы мы выбрали объем 5 мл, как наиболее удобный при работе с биочувствительным элементом сенсорной системы.



**Рис. 42.** Зависимость поглощения чувствительного слоя сенсора от объема пробы (концентрации в растворе:  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 5 мМ, ГХ – 50 мкМ, состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 М фосфатный буферный раствор рН 6,5, время выдерживания 24 ч).

Все выбранные условия проведения твердофазной спектрофотометрической реакции окисления фенольных соединений с последующим взаимодействием с чувствительным полимерным слоем на основе хитозана в присутствии различных ферментов представлены в табл. 7.



**Таблица 7.** Условия проведения твердофазной спектрофотометрической реакции окисления фенольных соединений с последующим взаимодействием с чувствительным полимерным слоем на основе хитозана в присутствии различных ферментов

Фермент	<i>Пероксидаза</i>	<i>Лакказа</i>	<i>Тирозиназа</i>
Состав чувствительного слоя	0,4 мг/см <sup>2</sup> хитозана, 50 пмоль фермента	0,4 мг/см <sup>2</sup> хитозана 1.25 у.е. фермента	0,4 мг/см <sup>2</sup> хитозана, 8 у.е. фермента
Концентрация субстрата – окислителя, мМ	5	-*	
Буферный раствор	0,05 М фосфатный с pH 6,5		
Объем реакционной системы, мл	5		
Время выдерживания	1 сутки (около 24 ч)		
Длина волны	~ 345 нм		

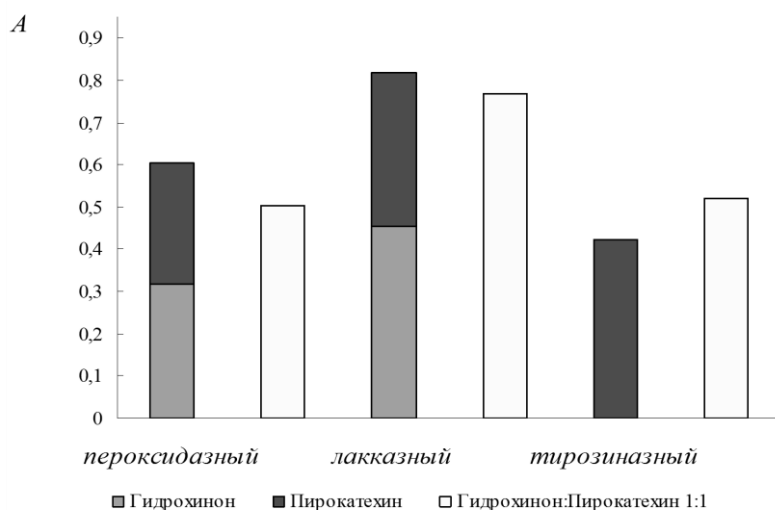
\*Субстрат-окислитель – кислород воздуха.

### 3.1.3. Аналитические характеристики методик определения водорастворимых фенольных соединений

В выбранных условиях разработали методики определения гидрохинона и пирокатехина с использованием разработанных твердофазных спектрофотометрических сенсорных систем на основе пероксидазы, тирозиназы и лакказы. Методика выполнения эксперимента была следующей [25, 143]: В стеклянную кювету объемом 5 мл добавляли 0,05 М фосфатный буферный раствор (pH 6,5), в случае пероксидазы раствор пероксида водорода до достижения его концентрации в смеси 5 мМ и водные растворы определяемого фенольного соединения с разными концентрациями. Полученные смеси с разным содержанием аналита тщательно пере-

мешивали стеклянной палочкой, после чего в нее вводили кварцевую пластинку с биочувствительным слоем на основе хитозана и одного из ферментов (рис. 23, Глава 2). На следующий день пластинку извлекали из кюветы и высушивали на воздухе, после чего измеряли спектр поглощения чувствительной пленки в диапазоне 200 – 700 нм и фиксировали максимальное поглощение пленки в области 300 – 400 нм (~345 нм). Затем строили градуировочные зависимости в координатах: поглощение биочувствительного слоя - концентрация фенольного соединения, результаты обрабатывали методами математической статистики [179] с использованием программных пакетов Excel 2016 и Excel 2017. Полученные аналитические характеристики методик определения фенольных соединений на основе предложенной оптической сенсорной системы представлены в табл. 8.

Как видно из данных таблицы, разработанные твердофазные сенсорные системы позволяют определять фенольные соединения на уровне их микромолярный содержания; чувствительность сенсорного устройства по отношению к фенольным соединениям несколько зависит как от природы аналита, так и от природы фермента.



**Рис. 43.** Проверка аддитивности отклика биочувствительных слоев, содержащих различные ферменты, на присутствие пирокатехина и гидрохинона при их концентрациях 50 мкМ.

Кроме того, изучили возможность индивидуального и совместного определения гидрохинона и пирокатехина и исследовали влияние отклика пероксидазной,

тирозиновой и лакказной сенсорных систем на совместное присутствие фенолов. Величина отклика бичувствительного слоя являлась аддитивной к выбранным фенолам (различия в оптических плотностях статистически незначимыми) (рис. 43).

**Таблица 8.** Аналитические характеристики методик определения фенольных соединений на основе твердофазной спектрофотометрической сенсорной системы в присутствии трех различных ферментов ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

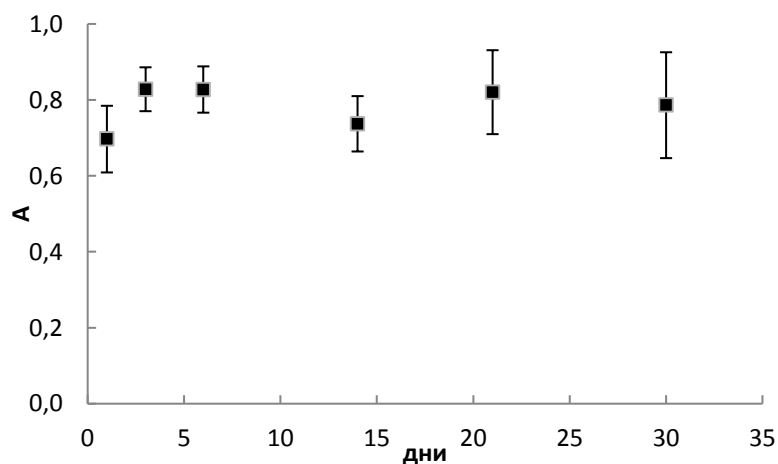
Фермент, субстрат-аналит	Уравнение градуировочной зависимости, диапазон определяемых концентраций	Кoeff. корреляции, $r$	$C_{min}$ , мкМ	$S_r$ при $C_n$
<i>Пероксидазный:</i>				
а) гидрохинон	$A = (0,22 \pm 0,06) + (6,8 \pm 0,5)10^3 c$ , 20 – 200 мкМ	0,998	3	0,02
б) пирокатехин	$A = (0,22 \pm 0,04) + (3,2 \pm 0,3)10^3 c$ , 20 – 250 мкМ	0,997	7	0,02
<i>Лакказный:</i>				
а) гидрохинон	$A = (0,18 \pm 0,09) + (8 \pm 2)10^3 c$ , 10 – 100 мкМ	0,987	3	0,06
б) пирокатехин	$A = (0,18 \pm 0,05) + (5,7 \pm 0,8)10^3 c$ , 10 – 100 мкМ	0,994	4	0,05
<i>Тирозиназный:</i>				
Пирокатехин	$A = (0,15 \pm 0,08) + (8 \pm 1)10^3 c$ , 10 – 100 мкМ	0,991	3	0,04

$A$  – аналитический сигнал,  $c$  – концентрация определяемого соединения,  $M$

Однако, поскольку коэффициенты чувствительности в градуировочных зависимостях определения фенолов несколько различаются по величине, то определение суммарного количества гидрохинона и пирокатехина может не соответствовать их истинным значениям в анализируемых образцах. В то же время, учитывая,

что тирозиназная сенсорная система дает селективный отклик на пирокатехин, совместное использование пероксидазного (или лакказного) и тирозиназного сенсорных устройств позволит определить содержание пирокатехина, а, соответственно, и гидрохинона в таком объекте. Таким образом, разработанные твердофазные спектрофотометрические сенсорные системы в этой работе можно применять либо для анализа объектов, содержащих только одно фенольное соединение, либо для общей оценки или скрининга содержания фенольных соединений, что, как отмечено в литературе [65], является типичным для ферментных сенсоров для определения фенольных соединений.

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



**Рис. 44.** Зависимость отклика твердофазной сенсорной системы на основе пероксидазы от длительности его хранения при 4°C перед анализом (концентрация в растворе  $H_2O_2$  – 5 мМ, состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 6,5, время выдерживания - 24 ч).

Нами была изучена стабильность сенсорной системы на основе пероксидазы при хранении: отклик после 5 дней хранения при комнатной температуре (25°C) составил (69±7) % (n=5, P=0,95), а после 90 дней хранения этого же сенсора при

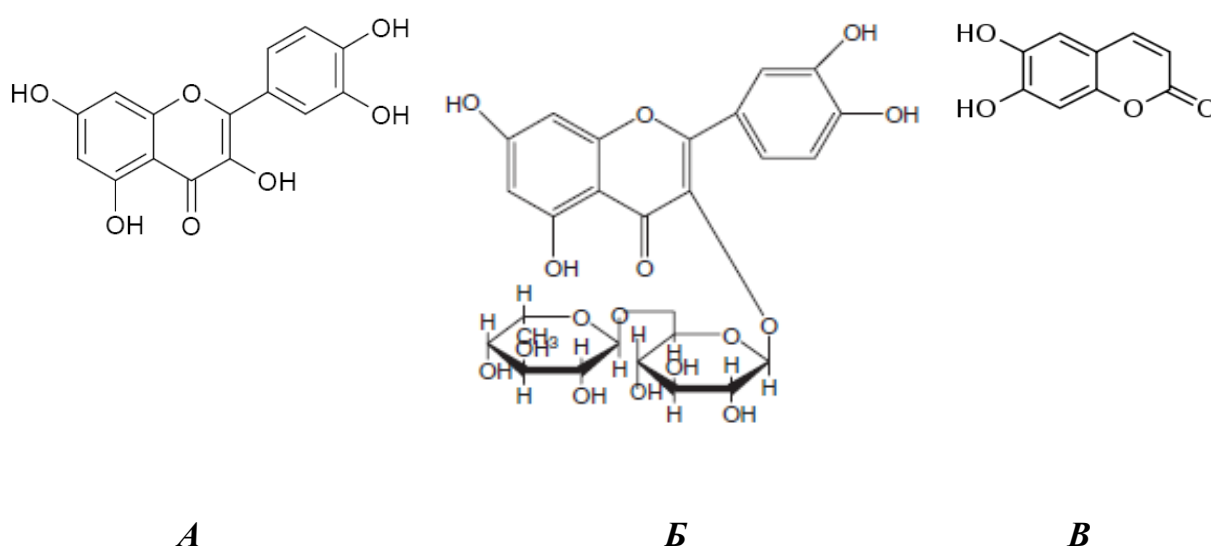
4°C – (98±8) % (n=5, P=0,95) (рис. 44). Следовательно, перед использованием сенсорное устройство можно хранить не менее трех месяцев в холодильнике.

Таким образом, выбранная нами конструкция оптической сенсорной системы и новая твердофазная индикаторная система, основанная на взаимодействии хитозана с продуктом ферментативного окисления фенольного соединения с образованием аддукта по механизму Михаэля, поглощающего в видимой области спектра, удовлетворяет требованиям, сформулированным нами в начале работы, а именно, позволяет регистрировать аналитический сигнал от аналитов – водорастворимых фенольных соединений в режиме пропускания непосредственно в распознающем слое сенсорного устройства.

Наиболее перспективным ферментом для создания сенсорных устройств такого типа представляется пероксидаза из корней хрена. Существенным преимуществом этого фермента, по мнению автора работы, является не только его высокая каталитическая активность и стабильность в составе комплекса с хитозаном, но и более широкая специфичность по сравнению с узкоспецифичными тирозиназой и лакказой. Благодаря этому свойству пероксидазы, появляется возможность создание универсальных твердофазных оптических сенсорных систем для определения широкого круга аналитов в различных по природе объектах. Кроме того, при использовании пероксидазы можно легко варьировать концентрацию субстрата-окислителя (пероксида водорода) в системе и поддерживать его выбранное оптимальное содержание, чего нельзя сказать о кислороде, который является субстратом-окислителем лакказы и тирозиназы. Последний фактор особо значим при переходе от анализа в водных к анализу в водно-органических средах, поскольку известно [180], что растворимость кислорода в ДМСО в 6 раз выше, чем в воде, и, соответственно, его концентрация может существенно зависеть от содержания органического растворителя, что усложняет обеспечение оптимальных условий при проведении индикаторной реакции и сужает возможности применения сенсорных систем в целом.

### 3.1.4. Выбор условий определения нерастворимых в воде фенольных соединений

Следующим этапом работы стало изучение возможности применения оптической сенсорной системы с выбранной конструкцией и индикаторной реакцией для определения фенольных соединений, ограниченно растворимых в водных и водно-органических средах. В качестве нерастворимых в воде фенольных соединений для исследования выбрали кверцетин, рутин, эскулетин (рис. 45).

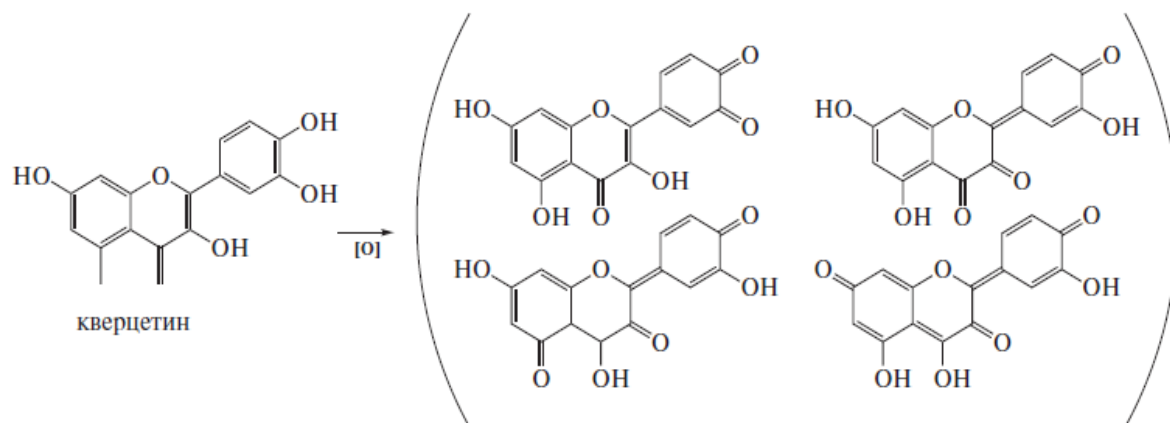


**Рис 45.** Структурные формулы кверцетина (а), рутина (б) и эскулетина (в).

Эти соединения относятся к природным полифенолам, которые содержатся в растительном сырье, продуктах питания и фармацевтических препаратах и обладают антиоксидантным и антимикробным действием. Круг природных соединений, содержащих фрагменты *ди*- и *три*-фенолов, очень широк, и эти три соединения были выбраны нами как модели соединений с разным размером молекулы и структурой: так, кверцетин и рутин относятся к флавоноидам, причем рутин является гликозидом кверцетина, а эскулетин является кумарином с существенно меньшим размером молекулы.

Окисление флавоноидов и кумаринов катализируют такие растительные ферменты, как пероксидаза из корней хрена, грибная тирозиназа и лакказа. Полученные нами результаты кинетических исследований показали, что наиболее эффективным биокатализатором в реакциях окисления ряда флавоноидов, в том числе кверцетина и рутина, является пероксидаза из корней хрена [181].

Тем не менее, механизм и кинетика их окисления в литературе мало изучены: в работе [182] сообщается, что при пероксидазном окислении кверцетина образуются около 20 соединений (по данным хроматографии), в то время как в работе [183] сделан вывод о том, что при пероксидазном окислении кверцетина образуется один продукт, который, по-видимому, является кверцетин-ортохиноном/хинонметидом, имеющим следующие таутомерные формы (рис. 46):



**Рис. 46.** Таутомерные формы продукта пероксидазного окисления кверцетина [183].

Рутин также может окисляться в присутствии пероксидазы, как указано в работе [184], причем наиболее вероятным продуктом его окисления также является *o*-хинон. Пероксидазное окисление эскулетина детально описано в работе [185].

Все три соединения малорастворимы в воде, однако, хорошо растворимы в полярных растворителях, в том числе в ДМСО, который используют либо для экстракции этих соединений из растительного сырья, либо для приготовления лекарственных инъекционных растворов на их основе [186-187].

Были рассчитаны значения кинетических параметров реакции пероксидазного окисления кверцетина в присутствии некоторых полярных органических растворителей (этанола, ацетонитрила, ДМСО) и водной среде путем линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен в двух различных координатах – Лайнуивера-Берка и Иди-Ховсти (табл. 9).

Установлено, что кажущаяся константа Михаэлиса  $K_M$  уменьшалась в следующем ряду растворителей: этанол > ацетонитрил > ДМСО > вода, что свидетельствует о том, что чем выше полярность среды, тем эффективнее кверцетин связывался с ферментом в реакции его пероксидазного окисления пероксидом водорода.

Параметр  $k_{cat}$  для пероксидазного окисления кверцетина был намного выше в этаноле, чем в других вышеперечисленных растворителях. Это позволяет заключить, что именно в этом растворителе скорость высвобождения продуктов реакции из фермент-субстратного комплекса. Однако, значение отношения  $k_{cat}/K_M$  при проведении реакции в водно-органической среде было в 2-3 раза ниже, чем при ее проведении в водной среде (табл. 9). Последнее свидетельствовало о том, что специфичность действия пероксидазы в реакции окисления флавоноидов в присутствии органических растворителей уменьшалась, что является дополнительным аргументом при разработке сенсорных систем в пользу переноса каталитического процесса из раствора в матрицу биочувствительного полимерного слоя на основе хитозана.

Взаимодействие с хитозаном выбранных нами полифенольных соединений после их окисления ранее не было изучено, однако у нас были все основания предполагать, что они будут вступать в эту реакцию аналогично простым водорастворимым фенольным соединениям, изученным выше (в частности, пирокатехина). В качестве реакционной среды для изучения возможностей спектрофотометрической сенсорной системы выбрали раствор состава вода-ДМСО по причинам, указанным выше. Кроме того, данные нашего исследования, приведенные в Главе 1, показали, что пероксидаза в составе комплекса с хитозаном в присутствии ДМСО сохраняет высокую каталитическую активность при больших содержаниях полярного растворителя в системе.

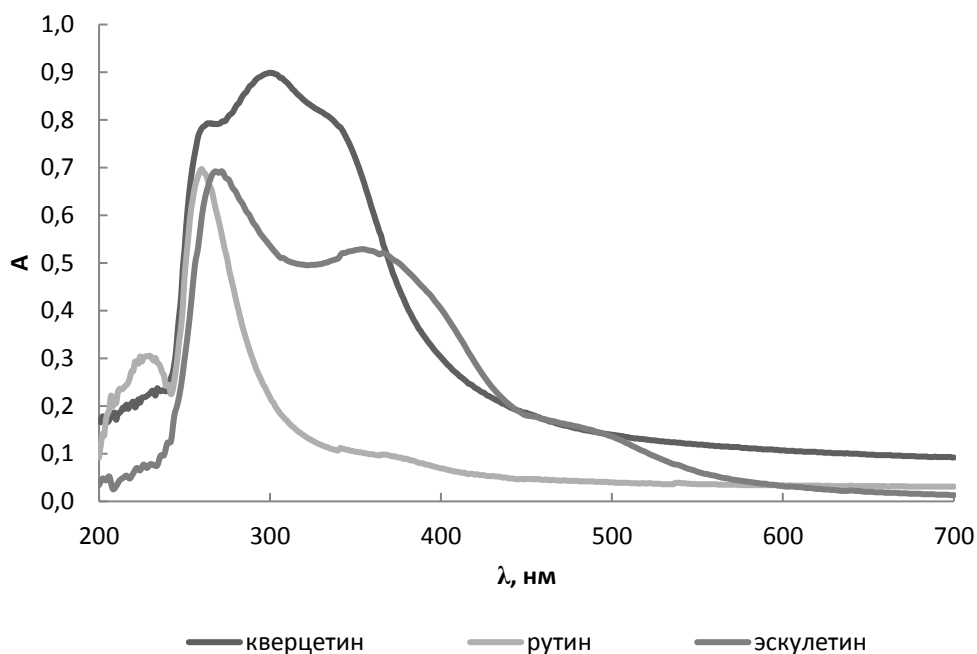


**Таблица 9.** Кинетические параметры реакции пероксидазного окисления кверцетина в присутствии 20% об. этанола, ацетонитрила, ДМСО (n=4, P=0,95)

Метод расчета	$K_M$ , мкМ	$k_{кат}$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{кат}/K_M$ , мин <sup>-1</sup> × мкМ <sup>-1</sup>
<i>Водный раствор</i>			
Лайнуивера-Берка	20 ± 3	208 ± 5	10 ± 1
Иди-Хофсти	22 ± 1	214 ± 5	9 ± 1
<i>В присутствии этанола</i>			
Лайнуивера-Берка	209 ± 3	562 ± 3	2,7 ± 0,1
Иди-Хофсти	208 ± 2	559 ± 9	2,7 ± 0,1
<i>В присутствии ацетонитрила</i>			
Лайнуивера-Берка	51 ± 4	266 ± 8	5,2 ± 0,1
Иди-Хофсти	51 ± 4	258 ± 8	5,1 ± 0,1
<i>В присутствии ДМСО</i>			
Лайнуивера-Берка	45 ± 2	178 ± 2	4,0 ± 0,1
Иди-Хофсти	46 ± 3	180 ± 3	3,9 ± 0,1

При проведении индикаторной реакции с кверцетином, рутином и эскулетинном согласно методике, описанной выше для простейших фенолов, подтвердили,

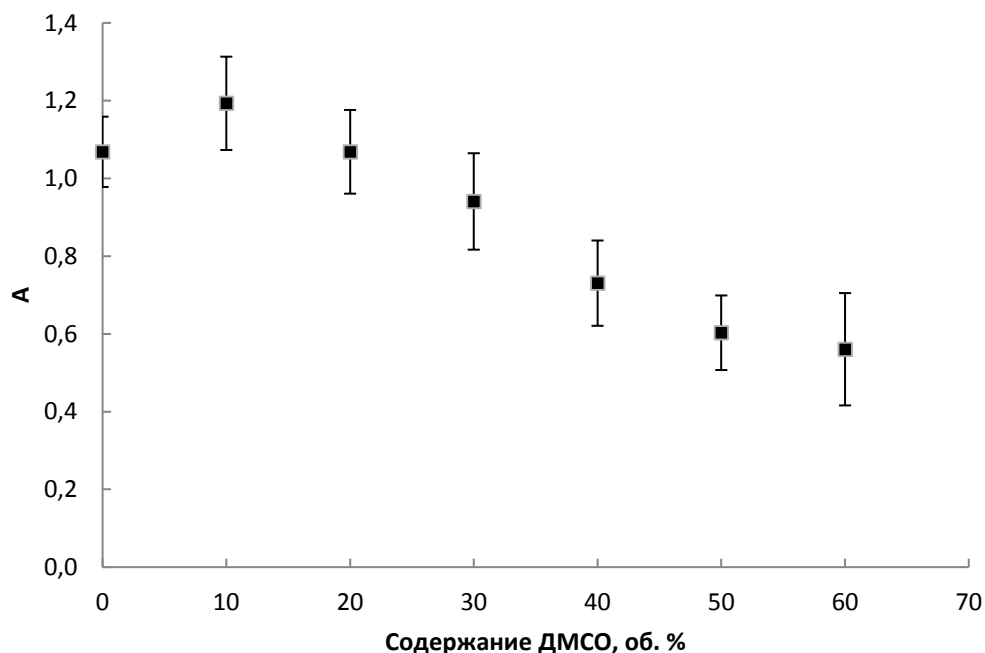
что эти соединения после пероксидазного окисления также вступают во взаимодействие с хитозаном с образованием продукта, поглощающего в УФ. На рис. 47 в качестве примера представлены соответствующие спектры, демонстрирующие наличие максимумов поглощения аддукта хитозана с продуктом окисления кверцетина в области 280-300 нм, увеличение максимума поглощения хитозана при 265 нм в случае окисления рутина и эскулетина, а также появление максимума поглощения при 350 нм в реакции окисления эскулетина. Поглощение прореагировавшего биочувствительного слоя на поверхности кварцевого стекла при указанных характеристических длинах волн и было использовано в качестве отклика сенсорной системы.



**Рис. 47.** Спектры поглощения биочувствительного слоя на основе хитозана после взаимодействия с кверцетином (концентрации в растворе: кверцетин – 100 мМ,  $H_2O_2$  – 1 мМ), рутином (концентрации в растворе: рутин – 100 мМ,  $H_2O_2$  – 1 мМ) и эскулетином (концентрации в растворе: эскулетин – 100 мкМ,  $H_2O_2$  – 2 мМ). Условия: состав биочувствительного слоя – 50 пмоль пероксидазы, 0,4 мг/см<sup>2</sup> хитозана, 0,05 М фосфатный буферный раствор, 10 об. % ДМСО, время выдерживания 24 ч.

Далее на примере реакции окисления кверцетина изучили влияние концентрации ДМСО и пероксида водорода на величину аналитического сигнала. На рис.

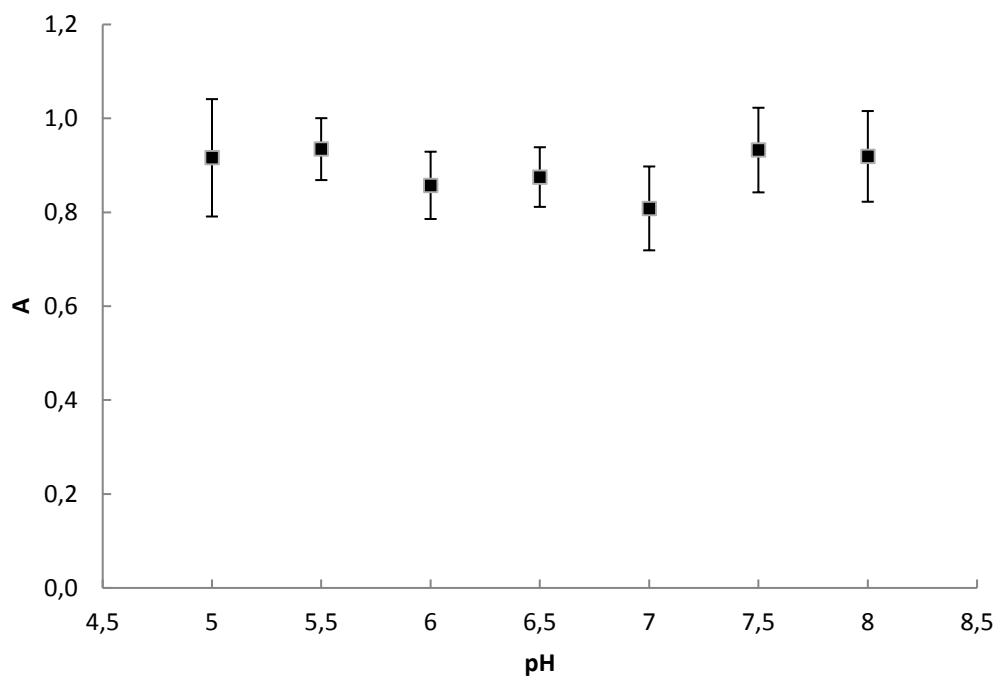
48 приведена зависимость поглощения прореагировавшей с продуктом окисления кверцетина чувствительной пленки от содержания ДМСО, которая показывает, что аналитический сигнал максимален при 10 об. % ДМСО. Введение 20 об. % ДМСО практически не оказывало влияние на величину отклика сенсора, в то время как более высокое содержание ДМСО понижает скорость каталитического процесса. Тем не менее, следует отметить, что при необходимости анализ можно проводить и при 60 об. % ДМСО в системе после 24 ч выдерживания сенсорного устройства в среде органического растворителя.



**Рис. 48.** Зависимость поглощения чувствительного слоя сенсорной системы при окислении кверцетина от концентрации ДМСО в реакционной смеси (концентрации в растворе:  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 1 мМ, кверцетин – 100 мкМ; состав биочувствительного слоя: 50 пмоль пероксидазы, 0,4 мг/см<sup>2</sup> хитозана, 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 6,5, время выдерживания 24 ч).

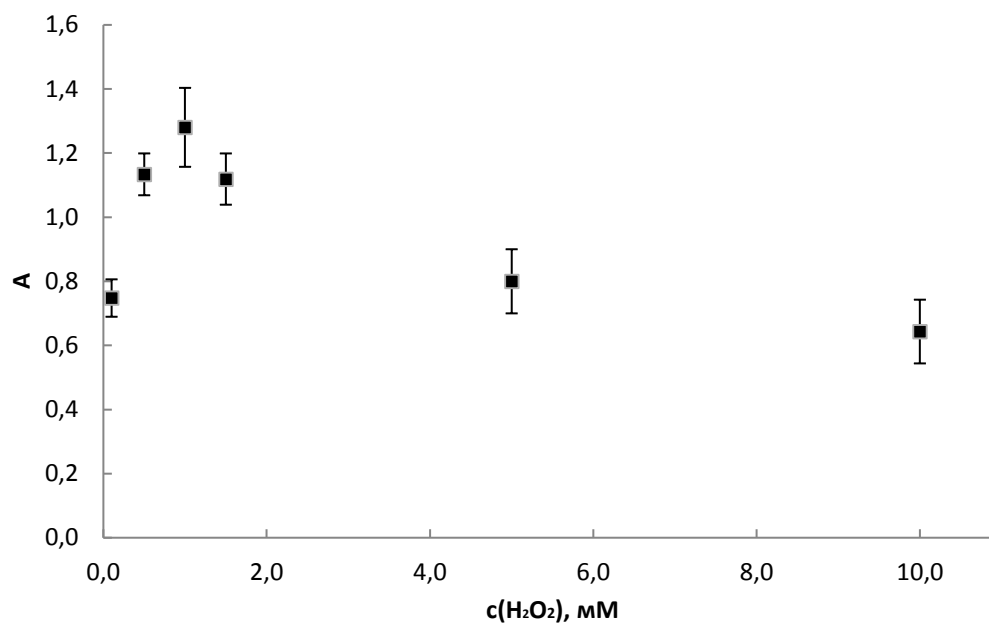
В случае окисления нерастворимых в воде фенольных соединений мы не обнаружили столь четкой зависимости отклика сенсора от рН, как в случае определения ранее описанных водорастворимых фенолов, что, видимо, связано с их более сложной структурой, наличием нескольких диссоциирующих групп и усилением

влияния гидрофобных взаимодействий с биочувствительным слоем на основе хитозана. На рис. 49 в качестве примера представлена рН зависимость поглощения чувствительного слоя сенсора при окислении кверцетина. Для дальнейших экспериментов по аналогии с водорастворимыми соединениями выбрали рН 6,5.



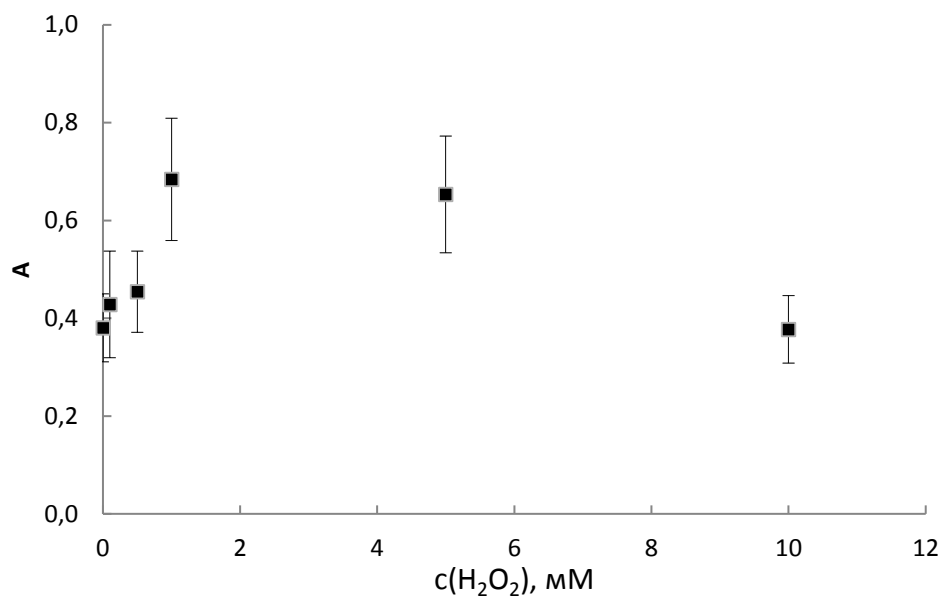
**Рис. 49.** рН зависимость поглощения чувствительного слоя сенсорной системы в реакции окисления кверцетина (концентрации в растворе:  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 5 мМ, кверцетин – 100 мкМ; состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 М фосфатный буферный раствор, время выдерживания 24 ч).

Также изучили зависимость аналитического сигнала от концентрации пероксида водорода в реакциях окисления фенольных соединений. Эти зависимости для реакций окисления кверцетина и эскулетина представлены на рис. 50 и 51. Как и в случаях водорастворимых фенольных соединений, эти зависимости представляют собой кривые с максимумом, который появляется при концентрации пероксида водорода 1 мМ.



**Рис. 50.** Зависимость поглощения чувствительного слоя сенсорной системы от концентрации пероксида водорода в реакции окисления кверцетина (концентрация в растворе кверцетина – 100 мкМ; состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, фосфатный буферный раствор, рН 6,5, 10 об. % ДМСО, время выдерживания 24 ч).

Таким образом, условия проведения твердофазной спектрофотометрической реакции на основе биочувствительного слоя пероксидаза-хитозан в присутствии кверцетина, рутина и эскулетина были следующие: аналитические длины волн – 280, 265 и 350 нм соответственно, 0,05 М фосфатный буферный раствор рН 6,5, концентрация Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> – 5 мМ.



**Рис. 51.** Зависимость поглощения биочувствительного слоя сенсорной системы от концентрации пероксида водорода в реакции окисления эскулетина (концентрация в растворе эскулетина – 100 мкМ; состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, фосфатный буферный раствор, рН 6,5, 10 об. % ДМСО, время выдерживания 24 ч).

### 3.1.5. Аналитические характеристики методик определения нерастворимых в воде фенольных соединений

Методика определения фенольных соединений, ограниченно растворимых в воде, была следующей: в стеклянной кювете объемом 5 мл тщательно смешивали рассчитанный объем 0,05 М фосфатного буферного раствора с рН 6,5 и 0,5 мл ДМСО (10 об. % от общего объема смеси), раствор пероксида водорода до достижения его концентрации в системе 5 мМ, и раствор фенольного соединения в ДМСО; полученную смесь, общий объем которой составлял 5 мл, тщательно перемешивали стеклянной палочкой, после чего в раствор вводили кварцевую пластинку с биочувствительным слоем на основе хитозана, прислоняли ее к стенке кюветы чувствительным слоем в сторону анализируемого раствора. На следующий день пластинку извлекали из кюветы, высушивали на воздухе и измеряли спектр поглощения чувствительной пленки в диапазоне 200 – 700 нм, фиксируя поглощение пленки при аналитической длине волны.

В выбранных условиях строили градуировочные зависимости для определения эскулетина, рутина и кверцетина в координатах: поглощение биочувствительного слоя от концентрации фенольного соединения. Полученные аналитические характеристики методик определения фенольных соединений на основе предложенной оптической сенсорной системы представлены в табл. 10.

Следует отметить, что при определении рутина наблюдается высокое значение свободного члена уравнения градуировочной зависимости, а также худшая по сравнению с другими веществами воспроизводимость результатов измерений (табл. 10). Мы связываем это с тем, что рутин является гликозидом кверцетина, при ковалентном закреплении рутина в биочувствительном слое сенсорной системы остаток сахара (дисахарида рутинозы) может взаимодействовать с хитозаном посредством нековалентных (электростатических) взаимодействий, что приводит к помутнению полимерного слоя и, как следствие, повышению фонового сигнала.

**Таблица 10.** Аналитические характеристики методик определения фенольных соединений на основе твердофазной спектрофотометрической сенсорной системы ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

Субстрат	Уравнение градуировочной зависимости, диапазон определяемых концентраций	Коэфф. корреляции, $r$	$C_{\min}$ , мкМ	$S_r$ при $C_H$
Эскулетин	$A=(0,12\pm 0,07) + (3,6\pm 0,3)10^3 c,$ 10 – 200 мкМ	0,9981	10	0,05
Кверцетин	$A=(0,22\pm 0,08) + (13\pm 1)10^3 c,$ 10 – 150 мкМ	0,9971	3	0,06
Рутин	$A=(0,47\pm 0,05) + (3,9\pm 0,5)10^3 c,$ 10 – 150 мкМ	0,9945	10	0,08

$A$  – аналитический сигнал,  $c$  – концентрация определяемого соединения,  $M$

Таким образом, предложенное нами спектрофотометрическое сенсорное устройство на основе оптически прозрачного биочувствительного слоя пероксидаза – хитозан с твердофазной регистрацией аналитического сигнала для определения микромолярных содержаний фенольных соединений способно функционировать как в водных, так и водно-органических средах. По чувствительности и воспроизводимости предложенные методики на его основе не уступают другим оптическим сенсорам для определения указанных соединений [65, 144]. Как и большинство ферментативных сенсоров для определения фенолов, разработанная сенсорная система не обеспечивает селективное определение какого-либо конкретного фенола, однако за счет сочетания двух последовательных процессов: ферментативной реакции окисления и реакции присоединения образующегося хинона к матрице – хитозану отклик биочувствительного слоя на соединения нефенольной природы (за исключением хинонов) маловероятен. Вследствие этого разработанную сенсорную систему можно применять для анализа объектов (например, фармацевтических препаратов), содержащих одно какое-либо фенольное соединение или же он может быть использован для оценки общего содержания фенолов или полифенолов в пересчете на выбранный фенол-эквивалент (в сточных водах, травяном сырье или напитках, как это, например, было сделано в работах [97, 158, 188, 189]). Следует особо подчеркнуть, что от ранее предложенных оптических сенсоров для определения фенолов он отличается тем, что дает принципиальную возможность анализировать непрозрачные и неоднородные растворы, что позволяет минимизировать и упростить подготовку образца; этому также способствует длительная операционная стабильность сенсорной системы в среде вода–ДМСО. Существенным недостатком и ограничением применения в химическом анализе предложенной спектрофотометрической сенсорной системы является длительность получения аналитического сигнала (24 ч), однако это компенсируется простотой выполнения определения, небольшими непосредственными затратами времени аналитика и длительной стабильностью индикаторного вещества в биочувствительном слое при хранении.



### 3.2. Спектрофотометрические твердофазные сенсорные системы для определения пероксидов различного строения

Пероксид водорода и органические пероксиды часто используют в качестве дезинфицирующих и отбеливающих компонентов продуктов фармацевтической и косметической промышленности. Уровень пероксида водорода в крови, поте, выдыхаемом воздухе является важным показателем для диагностики различных заболеваний. Органические пероксиды служат маркерами качества некоторых пищевых продуктов [190]. В связи с этим в настоящее время разработано большое количество различных методов определения пероксидов различного строения, прежде всего пероксида водорода: титриметрические [191-192], хроматографические [193-203], электрохимические [204-220], спектрофотометрические [221-224], хеми- [224-231] и флуоресцентные [232-237]. Большинство потенциальных объектов на основе органических пероксидов нерастворимы или ограниченно растворимы в воде, и, следовательно, их анализ требует сложной и длительной пробоподготовки [238-240]. Очевидно, что в дополнение к уже существующим инструментальным методам целесообразно разрабатывать новые чувствительные, селективные и простые методики и средства определения пероксидов различного строения в объектах на основе матриц сложного состава без (или при минимальной) пробоподготовки. Как и в случае фенольных соединений на сегодняшний день поставленная проблема прежде всего решается с использованием электрохимических сенсоров [204-220], в том числе и ферментативных. Следует отметить, что основой разработок последних являются исследования по влиянию органических растворителей на поведение ферментативных сенсоров при определении указанных аналитов. Пероксидазные и каталазные амперометрические сенсоры для определения органических пероксидов были апробированы в анализе реальных объектов в целях контроля качества пищевых, фармацевтических продуктов и некоторых других [241-244]. Пределы обнаружения пероксидов различного строения с помощью таких сенсоров составляют  $n \cdot 10^{-6} - n \cdot 10^{-5}$  моль/л, а диапазоны линейности в большинстве случаев -  $n \cdot 10^{-4} - n \cdot 10^{-2}$  моль/л.

В целом, пероксидазные сенсоры проявляют несколько более высокую чувствительность по отношению к пероксидам по сравнению с каталазными. Отмече-

ны две основные сложности в создании и использовании пероксидазных биосенсоров для определения указанных соединений, а именно закрепление медиатора в биочувствительном слое или на поверхности электрода и обеспечение каталитической активности фермента в присутствии органических растворителей [245].

В литературе приведено относительно небольшое число работ, посвященных оптическим сенсорам для определения пероксида водорода и органических пероксидов [78, 83 – 86, 246-248]. Следует отметить, что перечисленные сенсоры имеют аналогичную конструкцию и основаны на тех же принципах формирования чувствительного слоя и измерения аналитического сигнала, что и рассмотренные ранее сенсорные системы для определения фенольных соединений.

Действие оптических сенсоров для определения различных пероксидов основано на двух принципах: разложении определяемого соединения или окислении компонентов индикаторной системы в его присутствии [78, 83 – 86]. В зависимости от механизма формирования отклика чувствительного слоя, в случае обратимых проточных сенсоров фазу с реагентом восстанавливают промыванием проточной ячейки буферным раствором, не содержащим определяемое соединение [246], или содержащим восстановитель (тиосульфат натрия) [247].

Существующие оптические сенсоры позволяют определять пероксиды преимущественно на микро/миллимолярном уровне, характеризуются высокой экспрессностью (время отклика в редких случаях превышает 5 мин) и воспроизводимостью результатов измерений ( $s_r \leq 0.05 - 0.10$  при  $P = 0.95$ ,  $n = 4 - 6$ ). Стабильность аналитического сигнала в случае флуоресцентных сенсоров, как правило, не превышает нескольких дней. В свою очередь, чувствительный слой спектрофотометрических сенсоров сохраняет 90–95% исходной величины аналитического сигнала в течение от 2 недель до 2 месяцев.

Единичные оптические сенсоры были апробированы в анализе реальных объектов - оптически прозрачных сред (дождевой воде и растворе для дезинфекции контактных линз), не требующих проведения дополнительной пробоподготовки [246, 247].

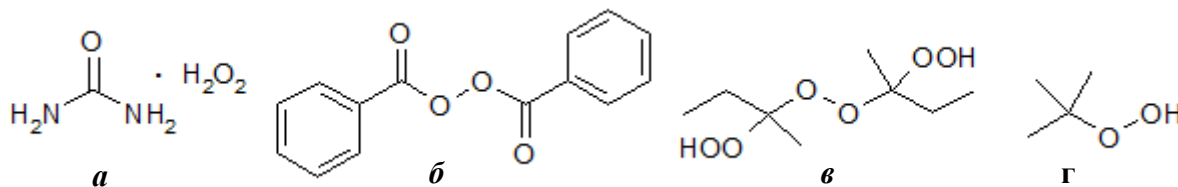
Таким образом, примеры оптических сенсоров для определения пероксида водорода и органических пероксидов малочисленны, а их возможности, согласно литературным данным, недостаточны для решения многих практических задач. В связи с этим в целях расширения круга определяемых веществ и объектов анализа актуально создание твердофазных оптических сенсорных систем, основанных на измерении аналитического сигнала вне раствора, для определения указанных аналитов непосредственно в биочувствительном слое сенсорного устройства.

Как уже было отмечено выше, выбранная нами конструкция оптической сенсорной системы и новая твердофазная индикаторная система, основанная на взаимодействии хитозана с продуктом ферментативного окисления фенольного соединения с образованием вещества, поглощающего в видимой области спектра, в случае пероксидазы из корней хрена, которая характеризуется широкой субстратной специфичностью, могут быть использованы в оптических сенсорных системах для определения более широкого круга аналитов.

Наличие пропорциональной зависимости поглощения биочувствительного слоя сенсорного устройства от концентрации пероксида водорода в диапазоне его концентраций 1 – 5 мМ в реакции окисления фенольных соединений продемонстрированное выше (рис. 40), операционная стабильность спектрофотометрической сенсорной системы в присутствии органических растворителей открывает перспективу ее использования для определения не только фенольных соединений, но и пероксидов различного строения. В качестве субстрата-восстановителя использовали пирокатехин. Определение проводили в условиях, оптимальных для определения фенольных соединений, с концентрацией пирокатехина 1 мМ, 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 6,5, 20 об.% ДМСО, время выдерживания - 24 ч; состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>).

В качестве субстратов-окислителей использовали пероксиды водорода, мочевины, бензоилпероксида, 2-бутанонпероксида и *трет*-бутилгидропероксида. Именно такой ряд органических пероксидов был выбран в связи с их широким применением в производстве косметических и фармацевтических средств, а также в связи с тем, что они являются маркерами качества ряда пищевых продуктов.

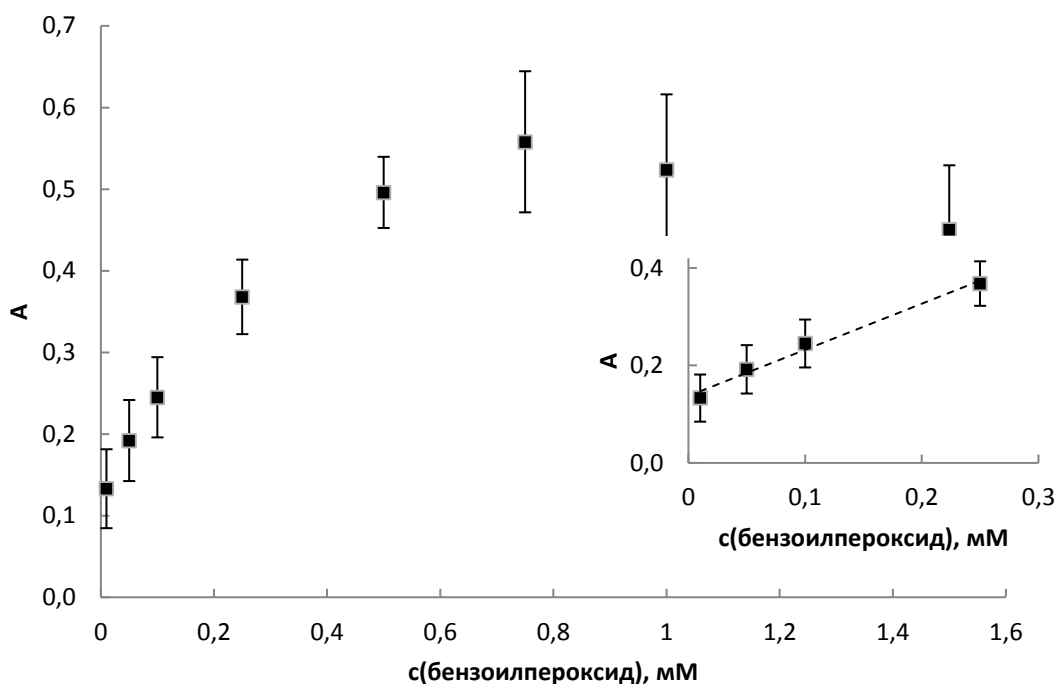
Структурные формулы перечисленных органических пероксидов представлены на рис. 52.



**Рис. 52.** Структурные формулы пероксида мочевины (а), бензоилпероксида (б), 2-бутанонпероксида (в) и *трет*-бутилгидропероксида (г).

В присутствии 20 об. % ДМСО (как показано выше, такая концентрация органического растворителя не влияет на отклик сенсорной системы) изучили зависимости поглощения биочувствительного слоя от концентрации выбранных органических пероксидов в реакции окисления пирокатехина. В качестве примера на рис. 53 приведена зависимость отклика от концентрации бензоилпероксида, которая имеет линейный участок и демонстрирует возможность определения указанного соединения.

Аналогичные зависимости и градуировочные прямые были получены для всех изученных пероксидов. Аналитические характеристики методик определения все перечисленных пероксидов на основе твердофазной спектрофотометрической сенсорной системы представлены в табл. 11.



**Рис. 53.** Зависимость поглощения чувствительного слоя сенсора от концентрации бензоилпероксида (концентрация в растворе пирокатехина – 1 мМ; состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>, фосфатный буферный раствор рН 6,5, 20% ДМСО, время выдерживания 24 часа).

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 [78, 83 – 86, 191-248].

Однако в настоящее время значительно ограничен круг анализируемых объектов вследствие ограниченной растворимости ряда пероксидов в воде. Возможность анализа мутных или непрозрачных сред представляется особенно важной, поскольку объекты, содержащие этот класс веществ, часто имеют жирную основу (продукты питания, фармацевтические препараты).

**Таблица 11.** Аналитические характеристики методик определения пероксидов различного строения на основе твердофазной спектрофотометрической сенсорной системы (в присутствии 20 об. % ДМСО ) (n = 5, P = 0,95)

Определяемое соединение	Диапазон определяемых концентраций, мкМ	$C_{\min}$ , мкМ	Кoeff. корреляции, r	$S_r$ при $C_H$
Пероксид мочевины	25–250	10	0,996	0,08
Пероксид водорода	100–1000	45	0,996	0,08
Бензоилпероксид	50–500	45	0,998	0,07
2-Бутанонпероксид	100–1000	40	0,996	0,08
<i>трет</i> -Бутилгидропероксид	250-2500	200	0,990	0,07

Один из подходов к увеличению чувствительности определения указанных аналитов, а также расширению круга определяемых соединений и анализируемых объектов заключается в проведении индикаторной реакции в мицеллярных и водно-органических средах. В результате детального подбора состава раствора – дизайна среды можно улучшить кинетические параметры ферментативного процесса и, как следствие, метрологические характеристики разрабатываемых методик на его основе путем повышения растворимости аналитов в "правильно выбранном" растворителе или в результате эффекта солюбилизации в растворах поверхностно-активных веществ (ПАВ).

### 3.2.1. Определение пероксидов различного строения в мицеллярных средах

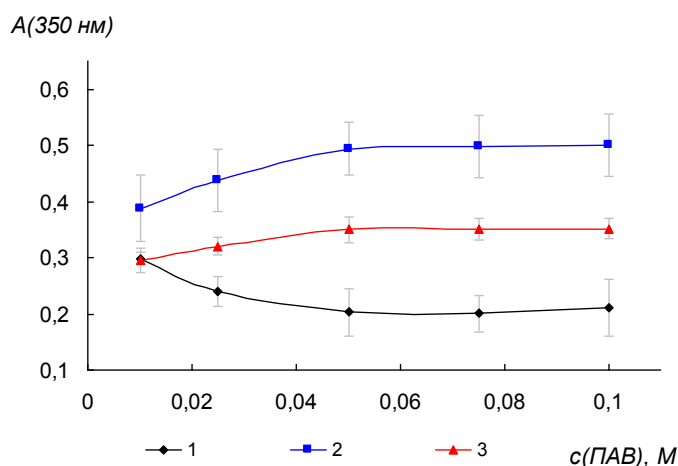
Для создания мицеллярных сред выбрали ПАВ различной природы: катионный (ЦТАБ), неионогенный (ТВИН 80) и анионный (ДДС). Их критические концентрации мицеллообразования (**ККМ**) составляют 0,9; 0,2 и 8 мМ, соответственно. Выбор именно этих ПАВ обусловлен их коммерческой доступностью и изученностью их фазовых диаграмм. Для создания водно-органических сред выбрали смешивающиеся с водой растворители, полярность которых возрастает в ряду: этанол < ацетонитрил < ДМСО < H<sub>2</sub>O [249].

Были выбраны условия (концентрации ПАВ и строение мицелл, фермента, время реакции, рН буферного раствора), позволяющие получить максимальный отклик чувствительного слоя биосенсорной системы в присутствии аналита. Следует отметить, что концентрации всех компонентов реакционной смеси (фермента, пирокатехина, буферного раствора), а также время проведения реакции в присутствии и в отсутствие ПАВ полностью совпали: состав чувствительной пленки: пероксидаза – 50 пмоль, хитозан – 0,4 мг/см<sup>2</sup>; 0,05 М фосфатный буферный раствор, 20% ДМСО, концентрация в растворе пирокатехина – 1 мМ; время выдерживания - 24 ч.

Из кривых зависимости величины отклика от концентрации ПАВ (рис. 54) видно, что при проведении реакции в средах анионного и неионогенного ПАВ эффективность окисления и количество индикаторного вещества (пропорциональное количеству продукта окисления) возрастали, а в среде катионного ПАВ, наоборот, уменьшались. Для дальнейшей работы в качестве наиболее подходящей для работы биосенсора в присутствии всех исследованных ПАВ выбрали их концентрацию 0,05 М, превышающую ККМ всех ПАВ, что говорит о существовании в растворе устойчивых мицелл.

На рис. 55 представлены зависимости величины отклика чувствительного слоя биосенсора от рН в среде прямых мицелл ПАВ: во всех случаях зависимость, как и ожидалось, проходила через максимум. Положение максимума в среде мицелл ДДС и ЦТАБ было смещено в более щелочную и кислую область, соответственно, относительно максимума в водном растворе и растворе, содержащем мицеллы на основе ТВИН 80. Такая закономерность описана в литературе [250]: рН

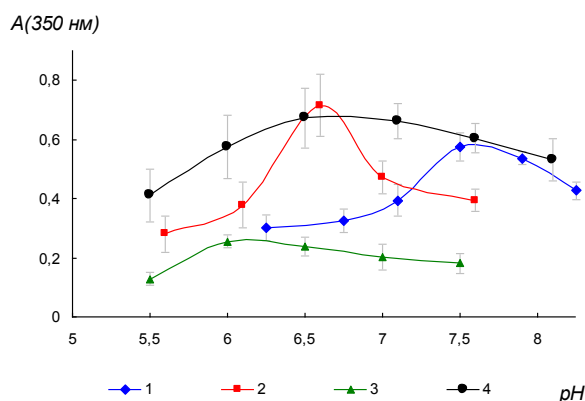
раствора может изменяться на 1 – 2 ед. при введении в него ПАВ, смещаясь в более кислую область в присутствии анионного, в более щелочную в присутствии катионного, и оставаться практически неизменной в присутствии неионогенного ПАВ. В качестве оптимальных при проведении индикаторной реакции в среде мицелл на основе ЦТАБ, ТВИН 80 и ДДС выбрали значения pH 6,0, 6,5 и 7,5 соответственно.



**Рис. 54.** Зависимость величины отклика от концентрации ПАВ: (1) ЦТАБ, (2) ТВИН 80, (3) ДДС. Условия реакции: концентрации пероксидазы - 50 нМ, 2-бутанонпероксида – 0,5 мМ, пирокатехина - 1 мМ, 0,05 М фосфатный буферный раствор, pH 7,0, время реакции 24 ч.

Следует отметить, что среда обращенных мицелл способствовала лишь незначительному увеличению отклика чувствительного слоя сенсорной системы по сравнению с откликом в немицеллярной среде и растворе прямых мицелл. Помимо этого, для создания обращенных мицеллярных сред требовалось большое количество ПАВ (до 0,5 г на 5 мл реакционной системы, при меньшем количестве ПАВ их водно-органический раствор оставался непрозрачным, следовательно, обращенные мицеллы не образовывались), а также токсичных органических растворителей (от 30 до 80 об. % гексана, бензола, изопропанола или пентанола).





**Рис. 55.** Зависимость величины отклика от pH в среде прямых мицелл ПАВ: (1) ДДС, (2) ТВИН 80, (3) ЦТАБ; и в немицеллярной среде (4). Условия реакции: концентрации пероксидазы - 50 нМ, 2-бутанонпероксида – 0,5 мМ, пирокатехина - 1 мМ, 0,05 М фосфатный буферный раствор, время реакции 24 ч.

Кроме того, после выдерживания в реакционной системе хитозановые пленки мутнели и в течение нескольких суток оставались влажными, что усложняло работу с ними. Таким образом, применение разработанной биосенсорной системы в среде обращенных мицелл ПАВ оказалось нецелесообразным и, вследствие этого дальнейшие эксперименты проводили только в среде прямых мицелл.

Введение ПАВ не изменило условия проведения реакции в среде прямых мицелл ПАВ по сравнению с водной средой. Следовательно, ПАВ влияет на состояние не иммобилизованного фермента, а хитозана. Хитозан, как известно [251], после растворения в уксусной кислоте, переходит в протонированную форму и становится положительно заряженным поликатионом. Очевидно, одноименно заряженный ПАВ (в данном случае – ЦТАБ) затрудняет перенос субстратов к поверхности сенсорного устройства, а противоположно заряженный (ДДС) наоборот способствует транспорту компонентов реакционной смеси, прежде всего аналитов, из раствора к биочувствительному слою.

В условиях, выбранных в качестве оптимальных, построили градуировочные зависимости и рассчитали метрологические характеристики методик определения пероксида водорода и ряда органических пероксидов в среде прямых мицелл ПАВ различной природы (табл. 12).

**Таблица 12.** Метрологические характеристики методик определения пероксидов в среде прямых мицелл ПАВ

ПАВ	Диапазон определяемых концентраций, мкМ	$c_{min}$ , мкМ	Коэффициент корреляции, r	$s_r$ (при $c_H$ , $n = 4$ , $P = 0.95$ )
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
<i>трет</i> -Бутилгидропероксид				
–	750-2500	200	0,990	0,07
ЦТАБ	2500 – 5000	2300	0,993	0,11
ТВИН 80	5000 – 10000	3500	0,996	0,07
ДДС	2500 – 10000	2250	0,988	0,08

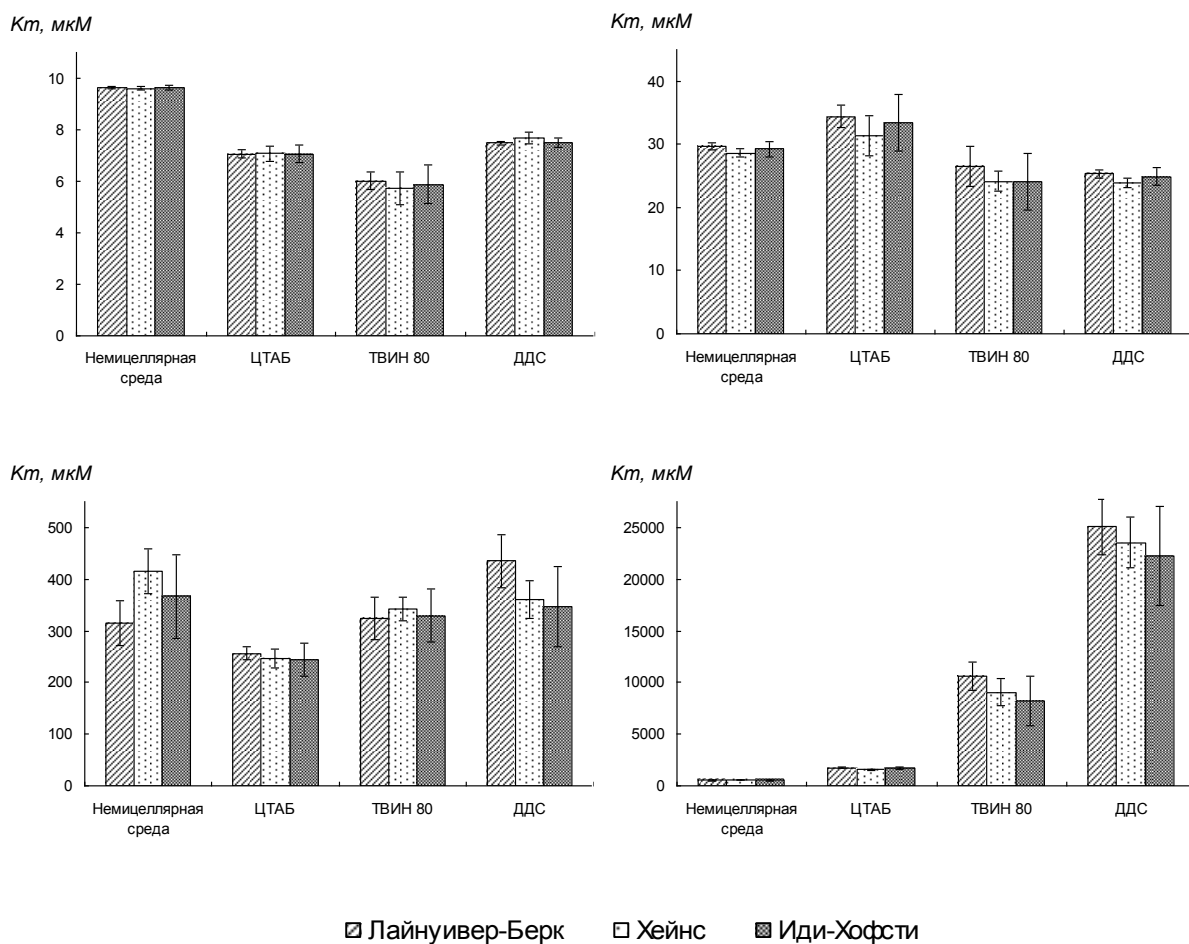
Использование ПАВ позволило в ряде случаев понизить пределы обнаружения пероксидов, причем чувствительность определения изменялась в ряду *трет*-бутилгидропероксид < 2-бутанонпероксид < пероксид водорода < пероксид моче-

вины. Полученный ряд изменения чувствительности полностью совпадает с рядом полярности этих пероксидов. Кроме того, чувствительность определения всех пероксидов, кроме *трет*-бутилгидропероксида (наименее полярного из всех пероксидов), возрастала в ряду сред: ЦТАБ < немицеллярная среда < ТВИН 80 < ДДС. Максимальная чувствительность определения *трет*-бутилгидропероксида достигалась 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 протеканию реакции.

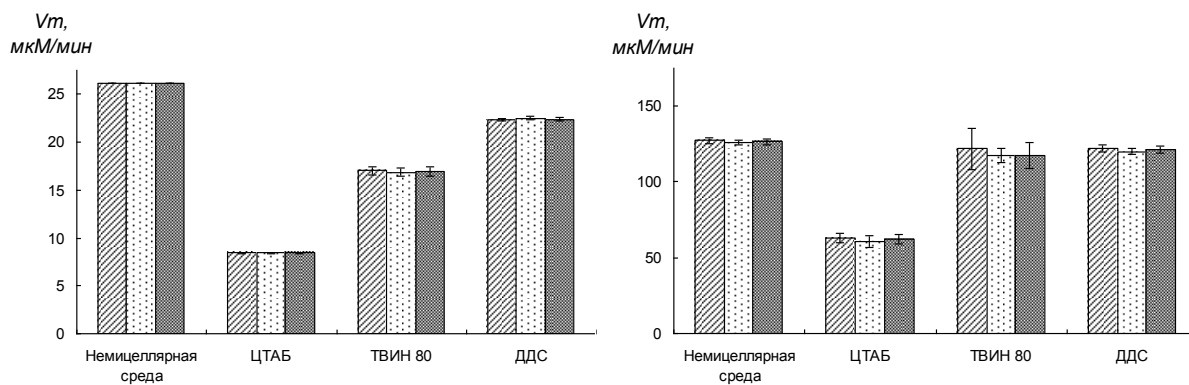
### 3.2.2. Расчет кинетических параметров реакции пероксидазного окисления пирокатехина в мицеллярных средах

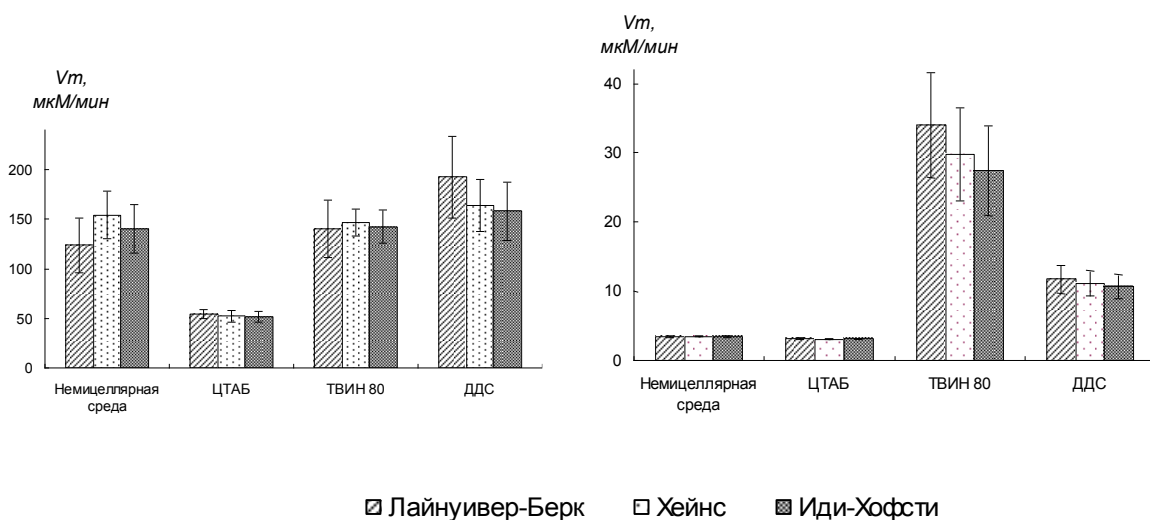
Для объяснения закономерностей, полученных при проведении индикаторных реакций пероксидазного окисления пирокатехина пероксидами в среде прямых мицелл ПАВ различной природы, установили кинетические параметры в системе пероксидаза – пероксид – пирокатехин. Для этого, построили серию кинетических кривых и линеаризовав уравнение Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнуивера-Берка, Хейнса и Иди-Хофсти, рассчитали значения кинетических параметров реакции (константы Михаэлиса,  $K_m$ , максимальной скорости реакции,  $V_m$ , и субстратной специфичности фермента по отношению к пероксидам, характеризующейся величиной  $k_{кат}/K_m$ ) [252]. Полученные тремя способами результаты расчета (рис. 56–58), характеризовались хорошей сходимостью.

Обнаружили, что кажущиеся величины  $K_m$  и  $V_m$  возрастали в ряду анализов: пероксид водорода < пероксид мочевины < 2-бутанонпероксид < *трет*-бутилгидропероксид. Константа Михаэлиса практически не изменялась в присутствии молекул ПАВ в случаях окисления пирокатехина пероксидами водорода и мочевины, 2-бутанонпероксидом; однако при окислении пирокатехина *трет*-бутилгидропероксидом константа Михаэлиса возрастала в ряду: немицеллярная среда < ЦТАБ < ТВИН 80 < ДДС (рис. 56). Максимальная скорость реакции уменьшалась при ее проведении в присутствии ЦТАБ и практически не изменялась в среде прямых мицелл ТВИН 80 и ДДС (рис. 57).

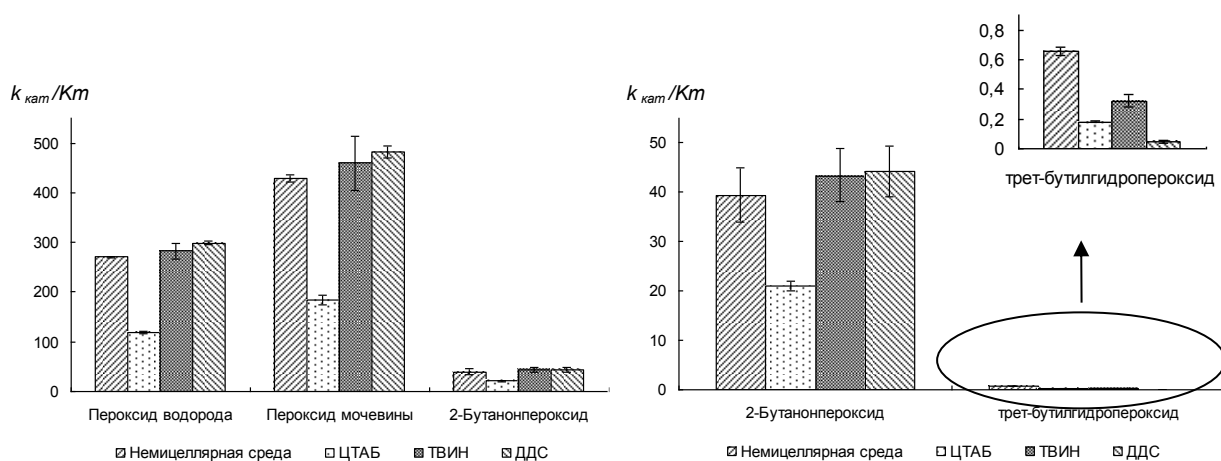


**Рис. 56.** Изменение константы Михаэлиса реакции пероксидазного окисления ПК пероксидом водорода (а), пероксидом мочевины (б), 2-бутанонпероксидом (в) и *трет*-бутилгидропероксидом (г) в немицеллярной среде и среде прямых мицелл ПАВ.





**Рис. 57.** Изменение максимальной скорости реакции ферментативного окисления ПК пероксидом водорода (а), пероксидом мочевины (б), 2-бутанонпероксидом (в) и *трет*-бутилгидропероксидом (г) в немицеллярной среде и среде прямых мицелл ПАВ.



**Рис. 58.** Изменение субстратной специфичности пероксидазы к пероксиду водорода (а), пероксиду мочевины (б), 2-бутанонпероксиду (в) и *трет*-бутилгидропероксиду (г) в немицеллярной среде и среде прямых мицелл ПАВ.

Субстратная специфичность пероксидазы по отношению к изученным пероксидам возрастала в ряду: *трет*-бутилгидропероксид < 2-бутанонпероксид < пероксид водорода < пероксид мочевины (рис. 58). Возможно, низкая эффективность окисления ПК *трет*-бутилгидропероксидом в присутствии пероксидазы связана, как было указано выше, с возникновением стерических затруднений при образова-

нии фермент-субстратного комплекса и, как следствие, уменьшением количества продукта реакции.

При проведении индикаторной реакции в среде прямых мицелл ПАВ субстратная специфичность пероксидазы по отношению к выбранным пероксидам (за исключением *трет*-бутилгидропероксида) возрастала в ряду: ЦТАБ < немицеллярная среда < ТВИН 80 < ДДС, что, вероятно, обусловлено наличием электростатических взаимодействий между молекулами фермента и ПАВ. Значение изоэлектрической точки пероксидазы из корней хрена составляет 9,0, следовательно, в условиях проведения реакции (рН 6,0, 6,5, 7,5), она представляет собой положительно заряженную молекулу. По этой причине пероксидаза наиболее каталитически активна в присутствии анионного ПАВ (ДДС) и наименее - в присутствии катионного ПАВ (ЦТАБ).

Таким образом, различие в чувствительности определения пероксидов различного строения с использованием биосенсора в немицеллярной среде и среде прямых мицелл ПАВ объясняется соответствующим различием субстратной специфичности фермента по отношению к этим пероксидам, а также природой и зарядом ПАВ.

### 3.2.3. Определение пероксидов различного строения в водно-органических средах

Влияние органических растворителей на чувствительность определения пероксидов изучили на примере полярного, гидрофильного пероксида водорода и гидрофобного *трет*-бутилгидропероксида. Установили, что с увеличением процентного содержания любого из изученных органических растворителей до 50% чувствительность определения (S) пероксида возрастает (табл. 13). Это связано, по-видимому, с улучшением диффузии компонентов индикаторной реакции к чувствительному слою биосенсора, в котором иммобилизован фермент, катализирующий протекающую реакцию. Соответственно, понижаются нижние границы определяемых концентраций пероксидов (данные приведены для пероксида водорода в качестве примера).

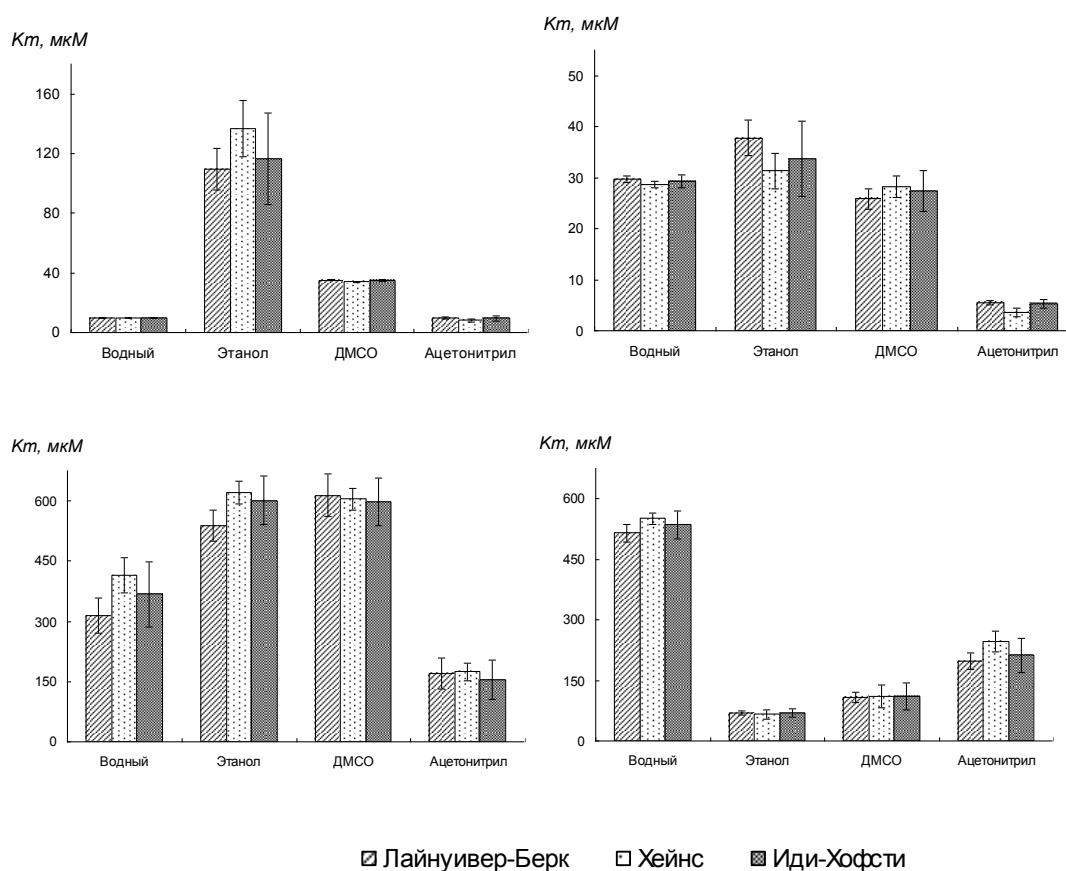
**Таблица 13.** Метрологические характеристики методик определения пероксида водорода в водно-органических средах на основе спектрофотометрической сенсорной системы

Среда	Диапазон определяемых концентраций, мкМ	$s_r$ , (n=5, P = 0,95)	S, мкМ <sup>-1</sup>
Водная среда	100 – 1000	0,08	0,48
<i>Содержание ДМСО, %</i>			
10	25 – 250	0,10	1,01
30	20 – 250	0,16	1,54
50	10 – 100	0,13	3,60
<i>Содержание этанола, %</i>			
10	25 – 250	0,10	1,99
30	10-100	0,05	2,87
50	5 -10	0,15	3,33
<i>Содержание ацетона, %</i>			
10	25 – 250	0,06	0,60
30	10 – 250	0,14	1,95
50	10 – 50	0,15	7,30
10	10 – 100	0,19	2,90
30		0,05	7,40
50		0,09	11,50

Как видно из табл. 13, чувствительность определения пероксида водорода возрастает в ряду растворителей: ДМСО < этанол < ацетон < ацетонитрил.

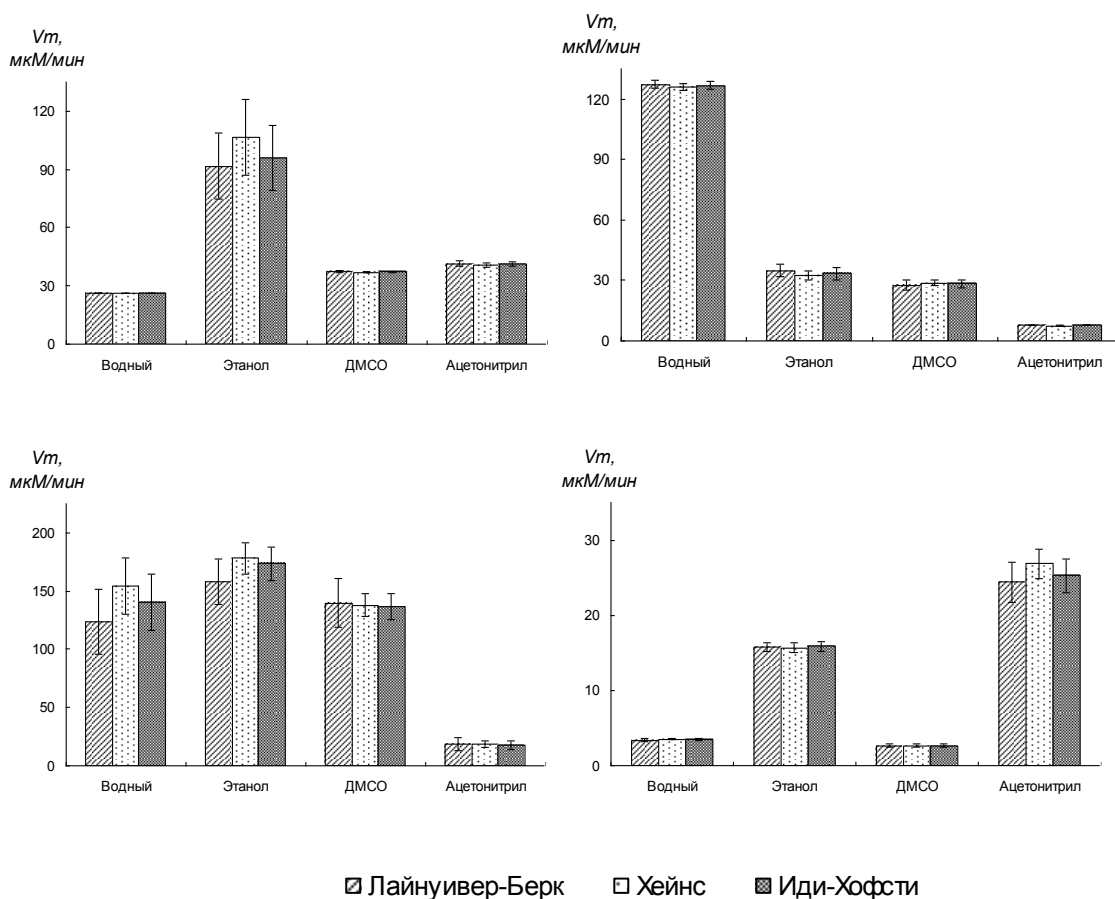
### 3.2.4. Расчет кинетических параметров реакции пероксидазного окисления пирокатехина в водно-органических средах

Для объяснения полученных закономерностей изучили кинетические параметры индикаторной реакции в присутствии различных органических растворителей, так, как это описано в предыдущем разделе. Полученные данные свидетельствуют о том, что универсальной зависимости величин  $K_m$  и  $V_m$  от строения пероксида или природы растворителя нет. Однако при использовании в качестве окислителя нерастворимого в воде *трет*-бутилгидропероксида с увеличением полярности растворителя кажущаяся константа Михаэлиса возрастает, а максимальная скорость реакции, соответственно, понижается (рис. 59). Таким образом, чем ниже полярность растворителя, тем выше скорость превращения наиболее гидрофобного субстрата с участием пероксидазы и тем выше скорость накопления индикаторного вещества. В случае наиболее полярного субстрата-окислителя пероксидазы – пероксида водорода кажущаяся  $K_m$  ферментативного процесса уменьшается, при этом его  $V_m$  закономерно повышается с увеличением полярности растворителя (рис. 60).





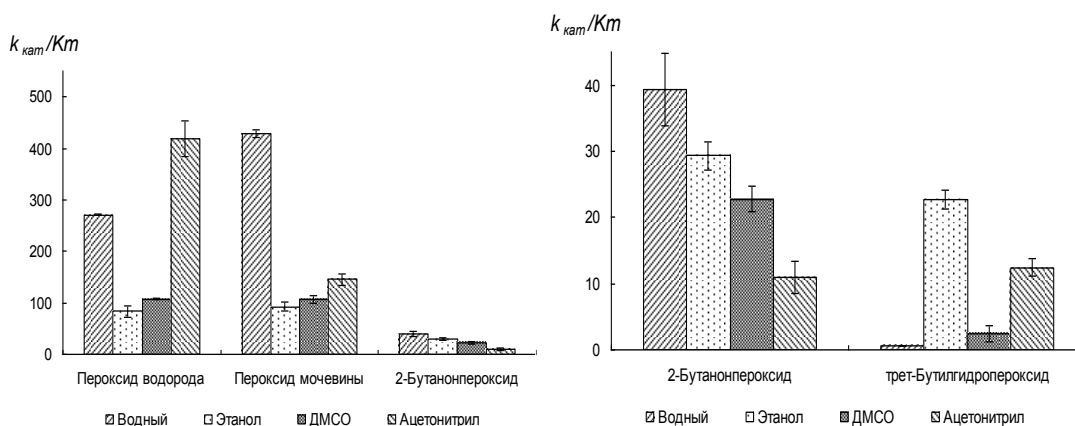
**Рис. 59.** Изменение константы Михаэлиса реакции ферментативного окисления пирокатехина пероксидом водорода (а), пероксидом мочевины (б), 2-бутанонпероксидом (в) и *трет*-бутилгидропероксидом (г) в водной и водно-органической среде.



**Рис. 60.** Изменение максимальной скорости реакции ферментативного окисления пирокатехина пероксидом водорода (а), пероксидом мочевины (б), 2-бутанонпероксидом (в) и *трет*-бутилгидропероксидом (г) в водной и водно-органической среде.

При проведении индикаторной реакции в водной и водно-органической средах субстратная специфичность пероксидазы ( $k_{\text{кат}}/K_m$ ) по отношению к определяемым пероксидам возрастает в ряду: *трет*-бутилгидропероксид < 2-бутанонпероксид пероксид < пероксид водорода < пероксид мочевины (рис. 61). Полученный ряд изменения субстратной специфичности совпадает с рядом полярности указанных пероксидов. Следовательно, направленный выбор природы растворителя позволяет регулировать эффективность превращения основных субстра-

тов пероксидазы. Например, проведение реакции окисления пирокатехина *трет*-бутилгидропероксидом в присутствии этанола (наименее полярного из изученных растворителей) позволяет в 30 раз увеличить соотношение  $k_{кат}/K_m$ .



**Рис. 61.** Изменение субстратной специфичности пероксидазы по отношению к пероксидам различного строения в водной и водно-органической среде.

Таким образом, изменение чувствительности определения пероксидов различного строения с использованием твердофазной сенсорной системы на основе пероксидазы, иммобилизованной в хитозане, в водной и водно-органической средах соответствует изменению субстратной специфичности фермента по отношению к определяемым пероксидам. Из полученных данных можно сделать вывод о необходимости учета состава среды при определении пероксидов, особенно нерастворимых в воде (слабополярных), для которых этот параметр особенно важен. Последнее было продемонстрировано на примере наименее полярного из всех изученных пероксидов - нерастворимого в воде *трет*-бутилгидропероксида. Использование ДМСО и ацетонитрила не позволило существенно улучшить метрологические характеристики соответствующих методик, однако в присутствии менее полярных этанола и ацетона чувствительность определения возросла, в присутствии 50 об.% ацетона предел обнаружения снизился более, чем в 5 раз (табл. 14).

**Таблица 14.** Метрологические характеристики методик определения *трет-*бутилгидропероксида в водно-органических средах

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

Таким образом, разработанное нами универсальное спектрофотометрическое сенсорное устройство с твердофазной регистрацией аналитического сигнала было применено для определения пероксидов различного строения и полярности в водных, водно-органических и мицеллярных растворах. Проведенное исследование продемонстрировало целесообразность направленного управления свойствами среды, в которой протекает индикаторный процесс, положенный в основу работы твердофазной спектрофотометрической сенсорной системы. Экспериментально доказано и подтверждено 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 потенциальную возможность расширения круга анализируемых объектов.

### **3.3. Спектрофотометрические твердофазные сенсорные системы для определения фенольных соединений и пероксидов в анализе реальных объектов**

Важной особенностью разработанного спектрофотометрического сенсорного устройства на основе биочувствительного слоя пероксидаза–хитозан является то, что аналитическим сигналом является поглощение самой пластинки, а не реакционного раствора.

В результате возможен анализ эмульсий и непрозрачных растворов без предварительного отделения матрицы анализируемого объекта. Если какие-либо частицы образца (например, крема) остаются на поверхности пластинки, их можно смыть с пленки водой. Биораспознающий слой обладает высокой стабильностью; перед использованием пластину с ним можно хранить в течение по меньшей мере 3 мес в холодильнике. Более того, аддукт, используемый для определения, также чрезвычайно стабилен во времени, и его поглощение практически не изменяется при хранении биосенсора в течение по крайней мере 6 недель после определения. Вследствие того, что определяемое соединение связано с хитозаном ковалентно, оно не вымывается из пленки. Кроме того, в случае разработанного нами оптического биосенсорного устройства значения поглощения при концентрациях определяемого соединения 20 – 200 мкМ находятся в диапазоне 0,4 – 1,6, и, следовательно, нет необходимости в использовании дорогих высокочувствительных приборов. Это выгодно отличает предложенное сенсорное устройство от сенсора сходной конструкции, разработанного Д. Абдуллоу и соавт. [95-97], отклик которого в присутствии значительно больших концентраций определяемого соединения (500 – 9000 мкМ пирокатехина) меняется в диапазоне 0,01 – 0,06 ед. поглощения соответственно.

Аналитические возможности спектрофотометрической сенсорной системы были апробированы для определения фенольных соединений различного строения, а также неорганических и органических пероксидов. При определении фенольных соединений (кверцетина, рутина, эскулетина) и органических пероксидов (2-

бутанонпероксида и бензоилпероксида), малорастворимых в водных растворах, реакцию проводили в присутствии ДМСО (10 и 20 об. % v соответственно); *трет*-бутилгидропероксида - в 50 об. % ацетона; а пероксидов водорода и мочевины - в прямых мицеллах ДДС (табл. 15).

**Таблица 15.** Аналитические характеристики спектрофотометрической сенсорной системы для определения различных фенольных соединений и пероксидов в различных средах

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

\*Во всех случаях  $s_r$  не превышало 0,08.

Следующим важным этапом исследования была апробация разработанных методик на основе спектрофотометрической твердофазной сенсорной системы для определения фенольных соединений и пероксидов в анализе реальных объектов без предварительной (или минимальной) пробоподготовки. Под минимальной пробоподготовкой подразумевается суспензирование или солубилизация нерастворимых в воде объектов в присутствии органических растворителей или мицеллярных средах соответственно.

### **3.3.1. Спектрофотометрические твердофазные сенсорные системы для определения фенольных соединений в анализе реальных объектов**

Для анализа выбрали следующие объекты: крем на жировой основе «Ахромин» (Болгария, Ален Мак), витамины «Аскорутин» (Фармстандарт, Уфа), порошок для инъекций «Корвитин» (Борщаговский химический завод, Украина)

*Анализ крема для лечения пигментации кожи «Ахромин», содержащий гидрохинон.* В качестве реального объекта для апробации методик определения гидрохинона часто выбирают содержащие его фармацевтические мази и гели для отбеливания кожи. Известно, что долговременное употребление гидрохинон-содержащей продукции опасно для здоровья, поэтому использование гидрохинона ограничено или запрещено во многих странах [253]. Кроме того, такие образцы представляют интерес с точки зрения подготовки их проб к анализу. Поэтому, чтобы продемонстрировать эффективность сенсора в анализе фармацевтической продукции, его применили для определения гидрохинона в креме для депигментации кожи («Ахромин» производства Ален Мак, Болгария), где он являлся единственным активным компонентом (табл. 16).

Для приготовления анализируемого раствора взвешенную порцию крема суспендировали энергичным встряхиванием в течение нескольких минут (показали, что результат анализа не зависел значимо от продолжительности встряхивания в диапазоне 5 - 40 мин) в 0,05 М фосфатном буферном растворе, рН 6,5, ДМСО, ацетонитриле или этаноле, после чего порцию суспензии (200 мкл) вводили в реакционную среду. Несмотря на то, что по визуальным наблюдениям образец лучше

всего диспергировался в спирте, а хуже всего в ацетонитриле (где в растворе оставались довольно большие кусочки образца по 1-2 мм в диаметре), статистического различия между аналитическим сигналом, зарегистрированным при использовании фосфатного буферного раствора, ацетонитрила и этанола, не найдено, так что для упрощения анализа далее применяли фосфатный буферный раствор.

Анализ был проведен методами градуировочного графика и добавок; поскольку наклоны зависимостей сигналов от концентраций, а также результаты анализа ( $1,9 \pm 0,1\%$  в обоих случаях), не отличались значимо в этих двух случаях, можно говорить о том, что матрица, многочисленные компоненты которой перечислены в табл. 16, не влияла на отклик сенсора. Также результат анализа не отличался от результата, полученного методом ВЭЖХ ( $1,9 \pm 0,1$  мас. % ( $n=3$ ,  $P=0,95$ ), и соответствовал значению, заявленному производителем (1,9 мас. %). Следует отметить, что анализ реального образца на содержание гидрохинона с использованием такого устройства значительно удобнее анализа методами ВЭЖХ и спектрофотометрии в УФ диапазоне, поскольку нет необходимости добиваться прозрачности образца; гомогенизации навески образца в одном из перечисленных выше растворителей достаточно для проведения анализа [254-255].

***Анализ витаминной добавки «Аскорутин», содержащей рутин.*** В процессе пробоподготовки таблетку препарата (0,5 г), погружали в 10 мл ДМСО и помещали на магнитную мешалку. После растворения таблетки (что занимало около 30 мин) раствор приобретал ярко-желтый цвет, и при этом был немного мутным, по видимому, за счет взвешенных частиц вспомогательных нерастворимых компонентов. Аликвоту полученного раствора вводили в реакционную систему и проводили определение согласно методике определения водонерастворимых фенольных соединений.

***Анализ порошка для инъекций «Корвитин», содержащий кверцетин.*** Вследствие введения повидона (поливинилпирролидона) этот препарат представляет собой водорастворимую форму кверцетина, однако в целях демонстрации возможностей биосенсора, его анализ также проводили в водно-органической среде. Для этого порошок растворяли в ДМСО, после чего аликвоту полученного раствора вводили в реакционную систему и далее проводили анализ по методике определения водонерастворимых фенольных соединений.

Результаты анализа реальных объектов представлены в табл. 16.

Таким образом, предложенный нами сенсор был успешно использован для анализа различных объектов, в том числе с матрицей сложного состава, с минимальной пробоподготовкой: без экстракции, центрифугирования или фильтрации образца.

### **3.3.2 Определение пероксидов различного строения в реальных объектах**

Разработанные методики определения пероксидов в различных средах (мицеллярных и водно-органических) были апробированы в анализе реальных объектов со сложной и ограниченно растворимой воде матрицей: косметических препаратах (креме, шампуне, зубной пасте) и продукте питания (оливковом масле).

*Оливковое масло* анализировали в водно-органической среде методом «введено-найдено» в связи с тем, что изначально в продуктах питания органические пероксиды отсутствуют. Однако, они образуются в процессе хранения и термической обработки масла в результате окисления непредельных жирных кислот [256]. Таким образом, органические пероксиды, в том числе *трет*-бутилгидропероксид, являются маркерами качества некоторых пищевых продуктов, в частности оливкового масла (табл. 17).



**Таблица 16.** Результаты определения фенольных соединений в реальных объектах с использованием спектрофотометрической сенсорной системы на основе чувствительного слоя пероксидаза-хитозан (n=5, P=0,95)

Объект/ использованная пробоподготовка	<i>Определяемое вещество</i> / сопутствующие компоненты по данным на упаковке	Найдено	Заявлено производителем
Крем « <i>Ахромин</i> » / суспензирование образца в воде, спирте или ацетонитриле	<i>Гидрохинон</i> / парафин, протегин Х, глицерин, ланолин, хлорид натрия, ютанол G, гидрохинон, витконол АРМ, парсол МСХ, отдушка розы, метабисульфит натрия, трилон ВД, трилон В, молочная кислота	(1,9±0,1) мас. %	1,9 мас. %
Витамины « <i>Аскорутин</i> » / суспензирование таблетки в ДМСО	<i>Рутин</i> / аскорбиновая кислота, сахар; крахмал картофельный; кальция стеарат; тальк	(0,051 ± 0,003) г/табл	0,05 г/табл

Порошок для инъекций « <i>Корвитин</i> » / растворение образца в ДМСО	<i>Кверцетин</i> / поливинилпирролидон, натрия гидроксид	$(0,052 \pm 0,004)$ г/0,5 г	0,05 г/0,5г
Крем « <i>Базирон</i> » / суспензирование в ДМСО	<i>Бензоилпероксид</i> / глицерин, NaOH, дина- трия эдетат, натрия диоктил сульфосукцинат, кремний коллоидный безводный, пропи- ленгликоль, акрилат сополимер, полоксамер 182, карбомер 940 (карбополь 980)	$(4,8 \pm 0,7)$ <i>мас. %</i>	5 мас. %
Шампунь « <i>Пероксидерм</i> » / суспензи- рование в ДМСО	<i>Бензоилпероксид</i> / Глицерин, салициловая кислота (10 мг), поли-сорбат 80, лаурил- сульфат натрия	$(2,8 \pm 0,4)$ <i>мас. %</i>	2,5 мас. %

**Таблица 17.** Определение *трет*-бутилгидропероксида в оливковом масле в водно-органической среде – 50 об. % ацетона (n=3, P=0,95)

Введено, мкМ	Найдено, мкМ	R, %
250	275 ± 45	110 ± 17
500	485 ± 57	97 ± 11
1000	950 ± 48	95 ± 5
2500	2570 ± 120	103 ± 5

Косметические продукты (табл. 16) анализировали способом стандартных добавок в водной, мицеллярной и водно-органической средах.

**Таблица 18.** Определение бензоилпероксида и пероксида мочевины в косметических препаратах в водной среде (I), в среде прямых мицелл ДДС (II), водно-ацетоновой (50 об. %) среде (III) (n=3, P=0,95)

Косметический препарат	Определяемое соединение	Найдено, мас. %			Заявлено, мас. %
		I	II	III	
«Базирон»	Бензоил-пероксид	4,8 ± 0,7	4,8 ± 0,7	-	5,0
«Пероксидерм»		2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,4	-	2,5
«Splat Exreem White»	Пероксид мочевины	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,1

Результаты определения пероксидов в фармацевтических препаратах хорошо согласуются с содержаниями, заявленными производителем (табл. 18).

\* \* \*

Таким образом, нами разработано сенсорное устройство, адаптированное под серийные приборы, и создана оригинальная универсальная спектрофотометрическая твердофазная индикаторная система для определения биологических активных веществ – субстратов пероксидазы (фенольных соединений различного строения, неорганических и органических пероксидов).

Выбранная нами конструкция оптической сенсорной системы и новая твердофазная индикаторная система, основанная на взаимодействии хитозана с продуктом ферментативного окисления фенольного соединения с образованием вещества, поглощающего в видимой области спектра, удовлетворяет требованиям, которые были сформулированы нами в начале работы, а именно:

- сочетает надежное удержание и стабильность дериватизирующего агента, а впоследствии индикаторного соединения, в биочувствительном (распознающем) слое сенсорной системы с требуемыми аналитическими характеристиками для конкретного аналита, объекта анализа и не зависящими от физико-химических свойств и состава последнего;
- обеспечивает регистрацию аналитического сигнала в присутствии определяемых веществ – фенольных соединений и пероксидов различного строения в режиме пропускания непосредственно в распознающем слое сенсорного устройства;
- позволяет анализировать объекты со сложной, а порой непредсказуемой матрицей без предварительной (или минимальной) пробоподготовки.

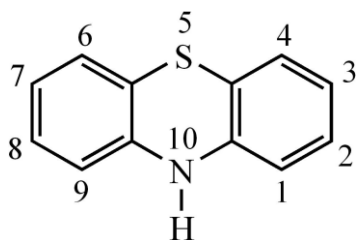
До работ автора подобный подход при создании оптических сенсорных систем для определения фенольных соединений различного строения, неорганических и органических пероксидов реализован не был.

## ГЛАВА 4. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОТИАЗИНОВ

Одной из важных задач современной аналитической химии является разработка подходов к селективному и экспрессному определению средне и трудно окисляемых ограниченно растворимых или нерастворимых в воде субстратов пероксидазы из корней хрена в матрицах сложного, изменяющегося состава. Эта проблема сегодня стоит наиболее остро для серосодержащих субстратов, например, таких как производные фенотиазина, вследствие необходимости и чрезвычайной важности постоянного контроля содержания этих соединений, являющихся нейролептическими лекарственными препаратами, в биологических жидкостях и тканях животных и человека.

Фенотиазины представляют собой класс искусственно синтезированных гетероциклических соединений, используемых в медицине в качестве транквилизаторов, антидепрессантов, нейролептиков, антиаллергенов и т.п.

В основе химической структуры этой группы препаратов лежит гетероциклическая система родоначальника этих соединений – фенотиазина (рис. 62).



**Рис. 62.** Структурная формула фенотиазина.

Фармакологическая активность препаратов этой группы зависит от заместителя при атоме азота (положение 10). Наиболее важные соединения фенотиазинового ряда имеют заместители в положениях 2 и 10, при этом заместитель в положении 10 необходим для проявления психотропного действия, а в положении 2 – способствует повышению эффективности препаратов. Модификации в алкильной цепи и расположение аминогруппы в цепи также влияет на эффективность препаратов.

Существенным требованием для проявления психотропных свойств является наличие трех атомов углерода между атомами азота фенотиазинового кольца и радикала [257].

Нейролептические препараты фенотиазинового ряда в зависимости от особенностей их химического строения принято делить на три группы:

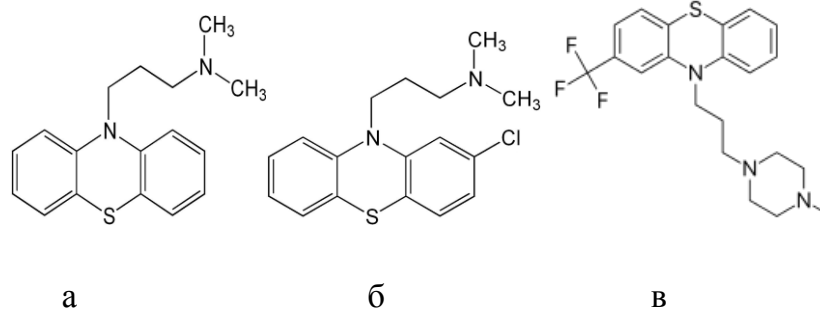
соединения, содержащие при атоме фенотиазинового ядра диалкиламиноалкильную цепь, так называемые алифатические производные (аминазин, пропазин, левомепромазин и др.);

соединения, содержащие в боковой цепи ядро пиперазина; так называемые пиперазиновые производные (метеразин, этаперазин, трифтазин, фторфеназин и др.);

соединения, содержащие в боковой цепи ядро пиперидина (тиоридазин, перициазин и др.).

Препараты первой группы обладают выраженным антипсихотическим и седативным действиями. Препаратам второй группы свойственно наличие стимулирующего эффекта. Препараты третьей группы проявляют слабое антипсихотическое действие, не оказывают седативного эффекта, редко вызывают экстрапиримидные расстройства [258].

Среди антипсихотических препаратов фенотиазинового ряда наиболее широко в медицинской практике применяют хлорпромазин (торговое название «аминазин»), промазин (торговое название «промазин») и трифторперазин (торговое название «трифтазин») (рис. 63).



**Рис. 63.** Структурные формулы промазина (а), хлорпромазина (б) и трифторперазина (в).

Фенотиазины характеризуются относительно узкими диапазонами безопасных терапевтических доз (для гидрохлорида хлорпромазина этот диапазон составляет 200 – 800 мг/день при пероральном приеме или в виде инъекций [259]). В то же время им присуще длительное выведение из организма и кумулятивный эффект, что в совокупности вызывает опасность их передозировки, которая приводит к отравлению и даже летальному исходу. В связи с этим необходим строгий контроль содержания фенотиазин в крови и моче больных, а при патологоанатомических исследованиях также и во внутренних органах (желудочно-кишечном тракте, легких, почках).

Для определения фенотиазин в фармацевтических препаратах и биологических объектах предложены различные методы: капиллярный электрофорез [260], ВЭЖХ [261], ЖХ-МС-МС [262], хемилюминесценция [263], однако наиболее простым и используемым в рутинной медицинской диагностике является метод спектрофотометрии. Определять фенотиазин можно, используя их собственное поглощение в УФ области спектра, однако основанные на этом методики недостаточны селективны. Для устранения этого недостатка предложены математические методы (дифференцирование спектров), однако эти приемы довольно сложны [264, 265]. Перспективным способом повышения селективности определения фенотиазин является применение реакций их окисления с образованием окрашенных промежуточных соединений – катион-радикалов [266 – 268].

Многокомпонентный состав биологических объектов, содержащих фенотиазин, обуславливает необходимость их предварительного извлечения из анализируемой матрицы. В настоящее время для этой цели используют длительные, трудоемкие и многоступенчатые схемы пробоподготовки с помощью экстракции органическими растворителями или лигандно-обменной хроматографии.

Производные фенотиазина выделяют из биообъектов экстракцией органическими растворителями из щелочных растворов [269]. При извлечении из твердых объектов (органов человека) в качестве экстрагента используют диэтиловый эфир, при экстракции из жидкостей (крови, мочи, водных растворов) применяют *n*-гептан

с добавлением 3% изопропилового спирта. Также производные фенотиазина можно экстрагировать из биологического материала подкисленной водой, с последующей рекстракцией органическими растворителями (диэтиловый эфир или хлороформ) из слабощелочного раствора, с добавлением 25 об. % раствора аммиака. Эти же органические растворители применяют для экстракции фенотиазинов из биологических жидкостей, тканей, а также растворения лекарственных средств при подготовке проб различных объектов к анализу [270].

В последнее время для извлечения фенотиазинов из биологических объектов (крови, мочи) широко используют твердофазную экстракцию. Причем этот способ пробоподготовки с применением коммерчески доступных картриджей широко используют в сочетании с последующим разделением и определением методом ВЭЖХ [271], капиллярной ВЭЖХ-МС [272], газовой хроматографии в сочетании с МС [273, 274] и т.п. Этот способ пробоподготовки характеризуется высокой эффективностью извлечения фенотиазинов и хорошей воспроизводимостью результатов, а также является более селективным и быстрым по сравнению с традиционной жидкостно-жидкостной экстракцией. Так, например, высокие степени извлечения (91–95 %) пяти фенотиазинов из плазмы крови были достигнуты с помощью силикагеля с привитой фазой C18, при этом воспроизводимость результатов, полученных в течение одного дня и в течение нескольких дней не превышала 11% [259]. Проведенное в работе [274] сравнение эффективности различных коммерчески доступных картриджей в извлечении фенотиазинов из плазмы крови показало, что низко липофильные сорбенты (C1 и C2) были малоэффективны (степень извлечения < 50%), в свою очередь, липофильные сорбенты (C8 и C18) излишне сильно взаимодействовали с аналитами, что вызывало сложности при переведении последних в раствор. Оптимальными оказались картриджи с цианопропиловой привитой фазой, обеспечивающие высокие (> 91%) степени извлечения различных исследованных фенотиазинов [274]. Недостатком способа твердофазной экстракции является использование метанола для перевода сорбированных фенотиазинов в жидкую фазу.

Как показывает анализ литературных данных на сегодняшний день определение указанных соединений в биологических объектах - весьма сложная и трудо-



емкая 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. Перспективным, по мнению автора работы, мог бы явиться подход, основанный на определении указанных соединений оптическими методами в сочетании с чувствительными и селективными биохимическими, в том числе ферментативными реакциями. При этом следует отметить, что в литературе отсутствуют сведения об определении фенотиазинов ферментативными методами, в том числе в присутствии пероксидазы из корней хрена. По-видимому, этот факт объясняется, как уже отмечено выше, низкой эффективностью каталитического процесса пероксидазного окисления фенотиазинов, как среднеокисляемых субстратов-восстановителей фермента [278, 279].

Для преодоления указанного ограничения мы решили апробировать в реакциях окисления фенотиазинов комплекс пероксидазы с хитозаном, отличительными особенностями которого являются высокая каталитическая активность, а также стабильность в процессе эксплуатации в водных и водно-органических средах.

Таким образом, основной задачей исследования, результаты которой представлены в этой главе, являлось создание новой спектрофотометрической индикаторной системы для определения указанных аналитов в водных и водно-органических средах. Последнее обусловлено тем, что вследствие своей амфифильной природы производные фенотиазинового ряда при попадании в организм взаимодействуют с клеточной мембраной и распределяются между двумя фазами – водным раствором и гидрофобным липидным бислоем (клеточной мембраной) [275]. Для эффективного направленного переноса производных фенотиазина в клетки (например, хлорпромазина в клетки эритроцитов [276]) часто в состав инъекционных препаратов в качестве эффективного транспортера сквозь мембранные структуры добавляют полярный органический растворитель ДМСО. Кроме того, этот же растворитель применяют для экстракции фенотиазинов из биологических жидкостей, тканей, а также растворения лекарственных средств при подготовке проб различных объектов к анализу [277]. Актуальными объектами анализа в целях клинической диагностики и контроля качества фармацевтических препаратов яв-

ляются биологические жидкости (кровь, моча) и инъекционные растворы соответственно.

#### **4.1. Спектрофотометрическое определение фенотиазинов по их пероксидазному окислению в водных и водно-органических средах**

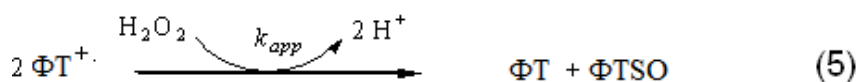
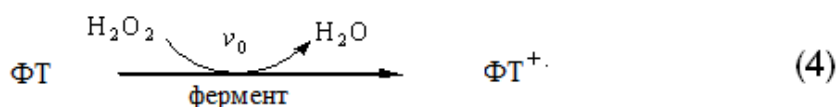
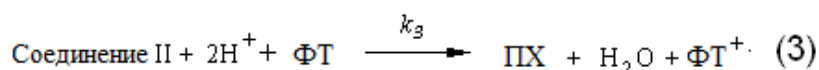
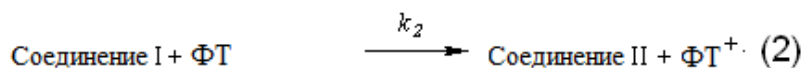
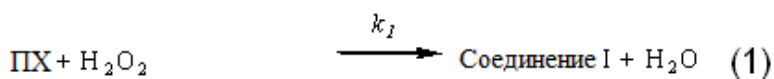
Для изучения пероксидазного окисления фенотиазинов в водных и водно-органических средах и разработки ферментативных методик их определения нами были выбраны следующие соединения: хлорпромазин, промазин и трифторперазин. Их структурные формулы приведены на схеме 9. Именно эти препараты широко применяют в медицинской практике в качестве лекарственных препаратов; они коммерчески доступны; механизм их пероксидазного окисления частично изучен и описан в литературе [279 – 284].

Окисление фенотиазинов изучено, в основном, на примере хлорпромазина. Оно протекает в две стадии (схема 5). В ходе первой ферментативной реакции окисления фенотиазина (реакции (1) – (3), суммарная схема этого процесса представлена уравнением (4)) в результате отдачи одного электрона образуется свободный окрашенный катион-радикал, устойчивость которого зависит от условий проведения реакции. Вторая, неферментативная реакция второго порядка (5), заключается в диспропорционировании катион-радикала на сульфоксид и исходный фенотиазин. Такой механизм назван как “ферментативно-химический второго порядка с регенерацией субстрата” [285]. Окисление фенотиазинов в присутствии пероксидазы, протекает через образование катион-радикала и относится к тому же кинетическому механизму.

Авторы [287] сравнили кинетику процесса окисления десяти фенотиазинов, в том числе промазина и хлорпромазина, в присутствии пероксидазы. Ферментативное окисление промазина протекало со значительно большей скоростью, чем окисление хлорпромазина. Наибольшая скорость окисления наблюдалась в случае метил- и метоксипромазина и для всех изученных соединений лимитировалась стадией (3), протекание которой зависело от электронной структуры субстрата.

Согласно литературным данным [278-279, 284], скорость ферментативных реакций окисления фенотиазинов пероксидом водорода можно контролировать

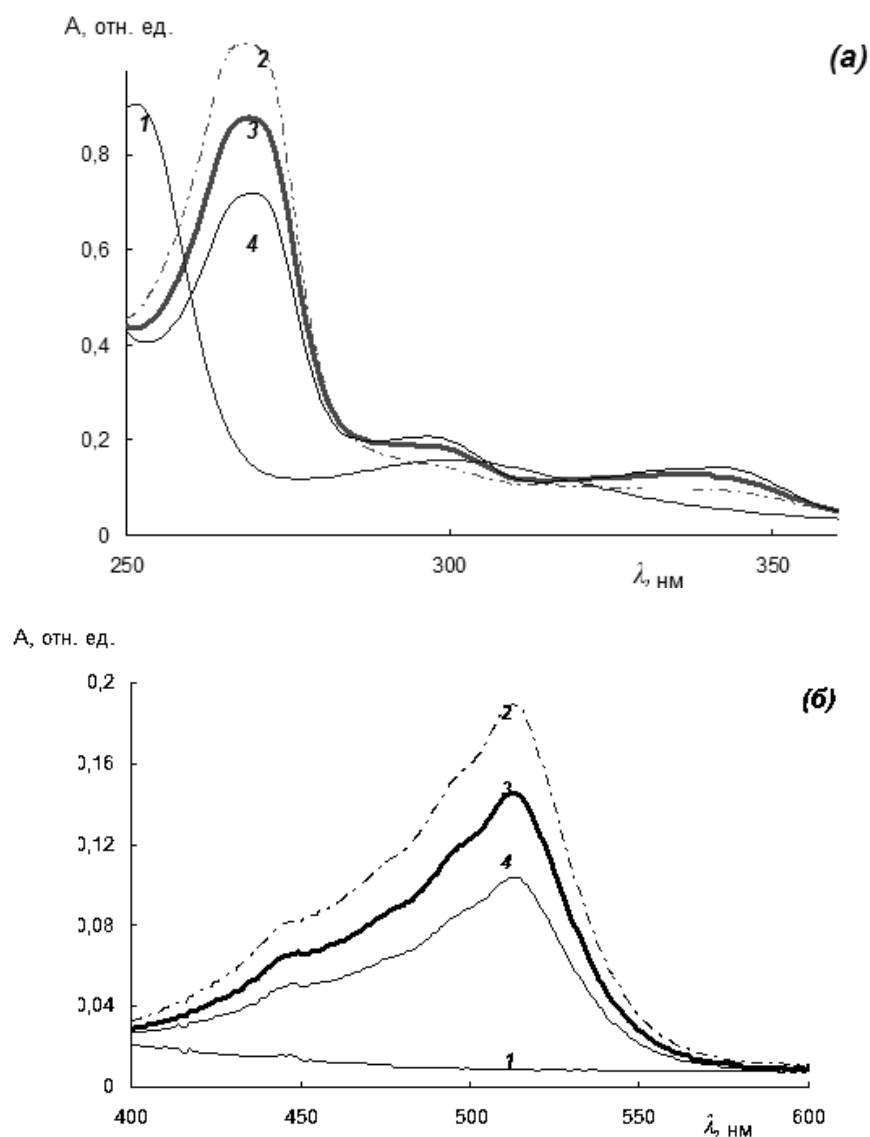
двумя способами: по нарастанию оптической плотности в видимой области спектра при длине волны, соответствующей накоплению образующегося промежуточного продукта окисления фенотиазина – катион-радикала ( $\lambda_{\max}$  равны 525, 512 и 500 нм для хлорпромазина, промазина и трифторперазина соответственно); и по убыванию оптической плотности в УФ-области при длине волны, соответствующей собственному поглощению фенотиазина ( $\lambda_{\max}$  равны 255, 251 и 256 нм для хлорпромазина, промазина и трифторперазина соответственно).



**Схема 5.** Пероксидазное окисление фенотиозинов,

где ФТ – фенотиазин, ФТ<sup>·+</sup> – катион-радикал, ФТSO – конечный продукт окисления фенотиазина – сульфоксид; ПХ – пероксидаза из корней хрена;  $k_{app}$  – константа второго порядка неферментативной «химической» стадии превращения катион-радикала;  $\nu_0$  – скорость ферментативной стадии окисления фенотиазина [286, 287].

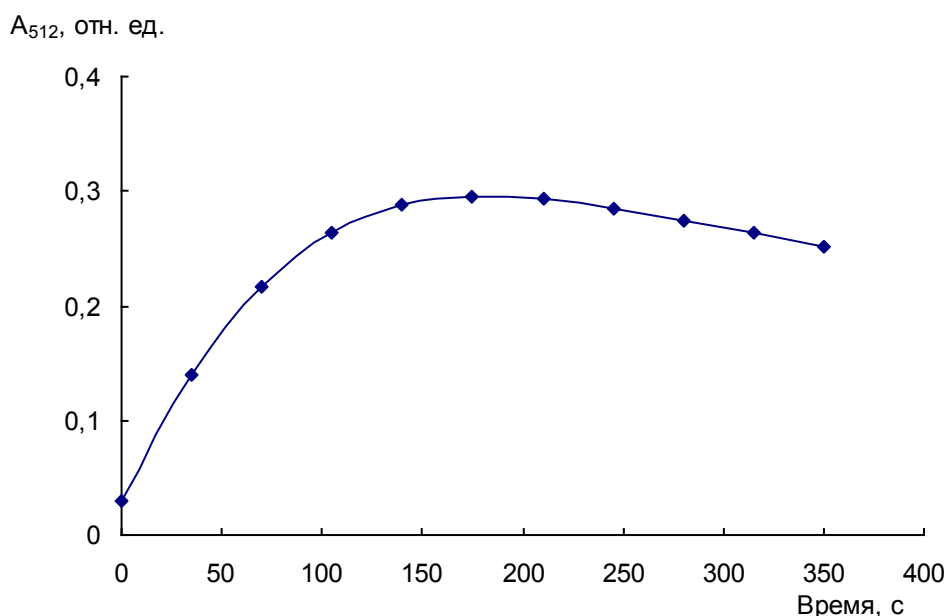
На рис. 64 представлены экспериментальные данные по изменению во времени спектров поглощения продуктов пероксидазного окисления промазина.



**Рис. 64.** Спектры поглощения промазина (1) и продуктов его пероксидазного окисления через 2 (2), 5 (3) и 10 (4) мин после смешивания компонентов в разных диапазонах длин волн (а и б). Концентрации компонентов в реакционной смеси: 0,05 М НЕРЕС буферный раствор с рН 3,5; пероксидазы – 0,3 нМ; промазина – 50 мкМ; пероксида водорода – 100 мкМ.

Профили спектров поглощения продуктов двух других фенотиазинов, выбранных для исследования, были аналогичными. На примере промазина (рис. 64) можно увидеть, что промежуточный продукт окисления фенотиазинов – окрашенный катион-радикал ( $\lambda_{\max}$  равны 275 и 525; 270 и 512; 273 и 500 нм в случаях хлорпромазина, промазина и трифторперазина соответственно) накапливается в течение нескольких первых минут после начала реакции; затем максимумы поглощения

промежуточного продукта уменьшаются (рис. 65), и на спектре появляются максимумы, соответствующие конечному продукту окисления фенотиазина ( $\lambda_{\max}$  равны 305 и 342; 297 и 340; 302 и 353 нм в случаях хлорпромазина, промазина и трифторперазина соответственно).



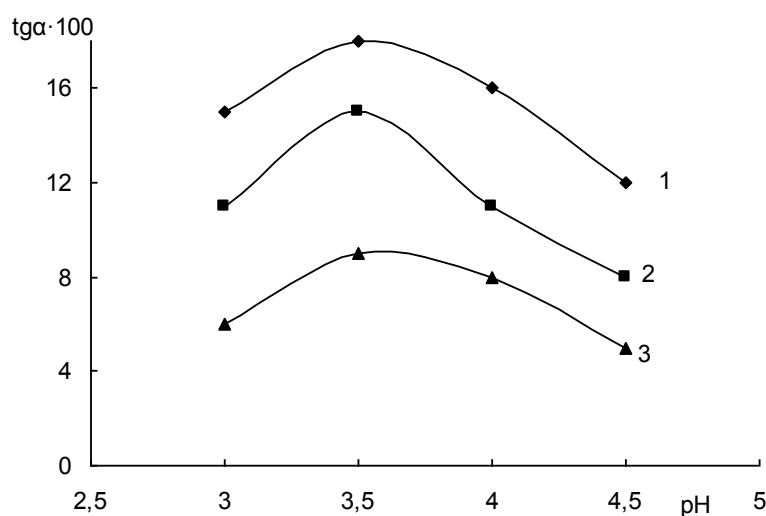
**Рис. 65.** Изменение во времени оптической плотности раствора при длине волны, соответствующей промежуточному продукту пероксидазного окисления промазина,  $\lambda_{\max}$  512 нм. Концентрации компонентов в реакционной смеси: 0,05 М *HEPES* буферный раствор с pH 3,5; пероксидазы – 0,3 нМ; промазина – 50 мкМ; пероксида водорода – 100 мкМ.

Уже на этом этапе было установлено, что спектрофотометрический контроль скорости ферментативной реакции при длинах волн, соответствующих убыли фенотиазинов, в аналитических целях нецелесообразен из-за больших погрешностей измерения, обусловленных значительным фоновым сигналом в УФ-области спектра вследствие поглощения матричных компонентов раствора и индикаторной системы. Более селективной, по нашему мнению, для определения указанных соединений является более длинноволновая спектральная область, соответствующая накоплению промежуточных продуктов окисления фенотиазинов - катион-радикалов при 512, 525 и 500 нм соответственно.

Выясненные нами условия наиболее эффективного окисления выбранных фено-тиазинов в присутствии нативной пероксидазы представлены в табл. 19.

**Таблица 19.** Выбранные условия пероксидазного окисления промазина, хлорпромазина и трифторперазина в 0,05 М HEPES буферном растворе

Параметр	Соединение		
	<i>Промазин</i>	<i>Хлорпромазин</i>	<i>Трифторперазин</i>
рН	3,5		
Длина волны, нм	512	525	500
Концентрация фермента, нМ	0,6	0,8	1,5
Концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкМ	50	50	50



**Рис. 66.** Зависимости скоростей окисления промазина (1), хлорпромазина (2) и трифторперазина (3) от pH 0,05 М HEPES буферного раствора в оптимальных условиях проведения индикаторных реакций при длинах волн, соответствующих поглощению промежуточных продуктов окисления. Концентрации: промазина – 60 мкМ, хлорпромазина и трифторперазина – 100 мкМ. Концентрации компонентов в реакционной смеси: пероксидазы – 0,5 нМ; промазина – 50 мкМ, хлорпромазина и трифторперазина – 100 мкМ; пероксида водорода – 100 мкМ.

Буферный раствор HEPES был выбран на основании литературных данных [253]. Установлено, что накопление (рис. 66) и стабильность промежуточных продуктов  $\pi$ ж окисления фенотиазинов – катион-радикалов, используемых нами в качестве индикаторных соединений для контроля скорости реакции окисления сильно зависят от pH и зависимости имеют колоколообразный характер с максимумом при pH 3,5.

Были рассчитаны кинетические параметры реакций пероксидазного окисления фенотиазинов в водном буферном растворе. Согласно литературным данным [278, 279], при избытке пероксида водорода (200 мкМ) в реакционной смеси кинетика накопления катион-радикала фенотиазинов подчиняется схеме Михаэлиса. Кинетические параметры, полученные из уравнения Михаэлиса-Ментен, линейризованного в координатах Лайнуивера-Берка, приведены в табл. 20.

**Таблица 20.** Значения кинетических параметров реакций пероксидазного окисления фенотиазинов, рассчитанных по уравнению Михаэлиса-Ментен ( $n = 5, P = 0,95$ )

Фенотиазин	Длина волны, нм	$K_M$ , мкМ	$V_{max}$ , нМ/с	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M$ , с <sup>-1</sup> мкМ <sup>-1</sup>
Промазин	512	61 ± 2	514 ± 21	780 ± 32	12,8
Хлорпромазин	525	104 ± 6	172 ± 18	207 ± 22	2,0
Трифторперазин	500	156 ± 7	101 ± 22	89 ± 17	0,6

Анализ данных табл. 20 свидетельствует о том, что в выбранных нами условиях лучше всех из изученных фенотиазинов окисляется промазин, хуже – хлорпромазин; трифторперазин окисляется труднее всех. Полученные зависимости изменения максимальных скоростей окисления различных фенотиазинов пероксидом водорода в присутствии пероксидазы и эффективности фермента к указанным субстратам хорошо согласуются с литературными данными [278, 284].

Установлено, что скорости реакций линейно зависят от концентраций промазина, хлорпромазина и трифторперазина в диапазонах 1 – 50; 5 – 100 и 10 – 150 мкМ соответственно. Это позволило разработать методики определения вышеуказанных соединений в присутствии нативной пероксидазы в водном растворе с метрологическими характеристиками, приведенными в табл. 21.

Методика ферментативного определения фенотиазинов по реакциям их пероксидазного окисления была следующей: в стеклянную пробирку с притертой пробкой вводили последовательно определенный объем 0,05 М HEPES буферного раствора с рН 3,5, необходимый для разбавления общего объема реакционной смеси до 3 мл; 50 мкл раствора пероксидазы, 10 мкл раствора соответствующего фенотиазина и 50 мкл пероксида водорода. В момент смешения растворов включали секундомер и измеряли оптическую плотность реакционной смеси на спектрофотометре ( $l = 1$  см) каждые 15 сек в течение 2 мин при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения промежуточных продуктов окисления фенотиазинов. Скорость индикаторной реакции ( $V_0$ ) (аналитический сигнал) характеризовали величиной тангенса угла наклона ( $tg\alpha$ ) начальных линейных участков кинетических кривых в координатах оптическая плотность – время ( $t$ , сек). Концентрации всех реагентов приведены в табл. 19.

Разработанные методики определения фенотиазинов в водных растворах позволяют определять указанные соединения на уровне их микромолярных концентраций, характеризуются чувствительностью, сравнимой с чувствительностью спектрофотометрических методик [266 – 269], простотой, экспрессностью выполнения и хорошей воспроизводимостью результатов анализа.

Для разработки методик определения фенотиазинов по их пероксидазному окислению в водно-органических средах *в присутствии ДМСО* (выбор этого растворителя объяснен выше) мы изучили влияние этого органического растворителя на скорость реакций окисления двух наиболее легкоокисляющихся фенотиазинов – промазина и хлорпромазина.

Выявлено, что при рН 3,5 скорости пероксидазного окисления промазина или хлорпромазина уменьшаются при добавлении даже 1 об. % ДМСО (рис. 67). При даль-



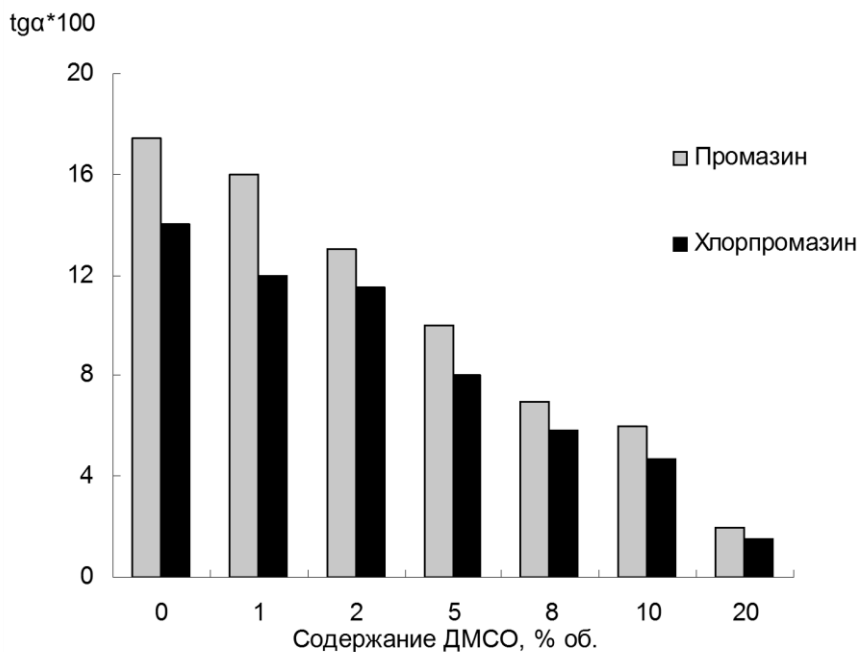
нейшем повышении содержания органического растворителя его ингибирующее действие на скорость ферментативных процессов усиливается. Так, при 8 об. % растворителя в системе скорости пероксидазного окисления фенотиазинов уменьшаются в 2,5 раза, а при 20 об. % ДМСО в реакционной смеси в 8 раз.

**Таблица 21.** Метрологические характеристики методик определения промазина, хлорпромазина и трифторперазина в водном растворе ( $n = 5, P = 0,95$ )

Параметр	Определяемое соединение		
	<i>Промазин</i>	<i>Хлорпромазин</i>	<i>Трифторперазин</i>
Длина волны, нм	512	525	500
Диапазон определяемых концентраций фенотиазинов, мкМ	1 – 50	5 – 100	10 – 150
$c_{\min}$ , мкМ	0,7	2	4
$s_r$ при $c_n$	0,03	0,04	0,06

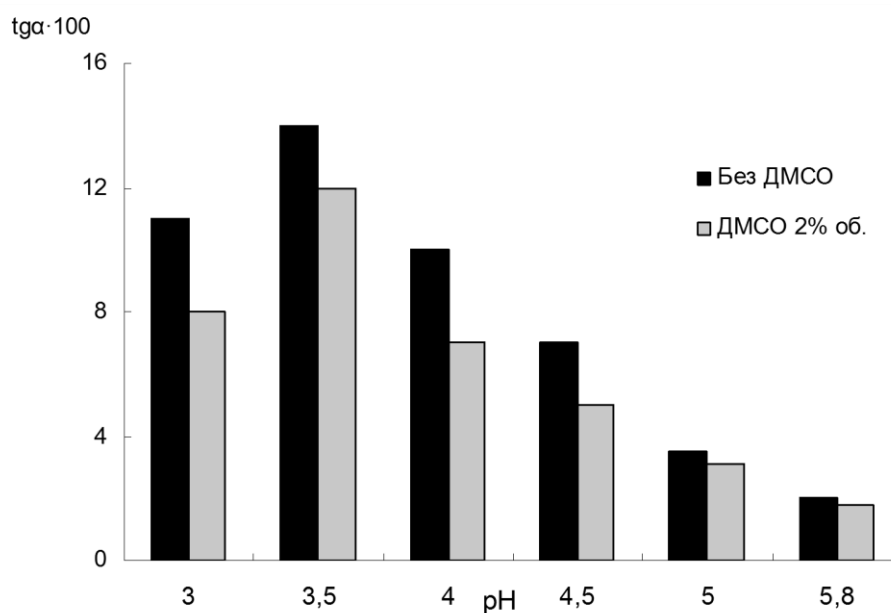
Такое резкое уменьшение каталитической активности фермента в присутствии даже малых содержаний органического растворителя обусловлено, по-видимому, довольно низким значением рН 3,5 проведения реакций. Напомним, что изоэлектрическая точка пероксидазы из корней хрена равна 7,2, а ее каталитическая активность максимальна в диапазоне рН 5,0 – 6,0. Следовательно, при рН 3,5 конформационное состояние пероксидазы сильно изменено, и любое дополнительное негативное воздействие, в том числе добавление органических растворителей, еще в большей степени влияет на структуру фермента, что, приводит к резкому снижению его каталитической активности.

Для выявления возможности уменьшения влияния органического растворителя на каталитическую активность фермента целесообразно было изучить ферментативное окисление промазина и хлорпромазина в присутствии ДМСО в широком диапазоне рН.



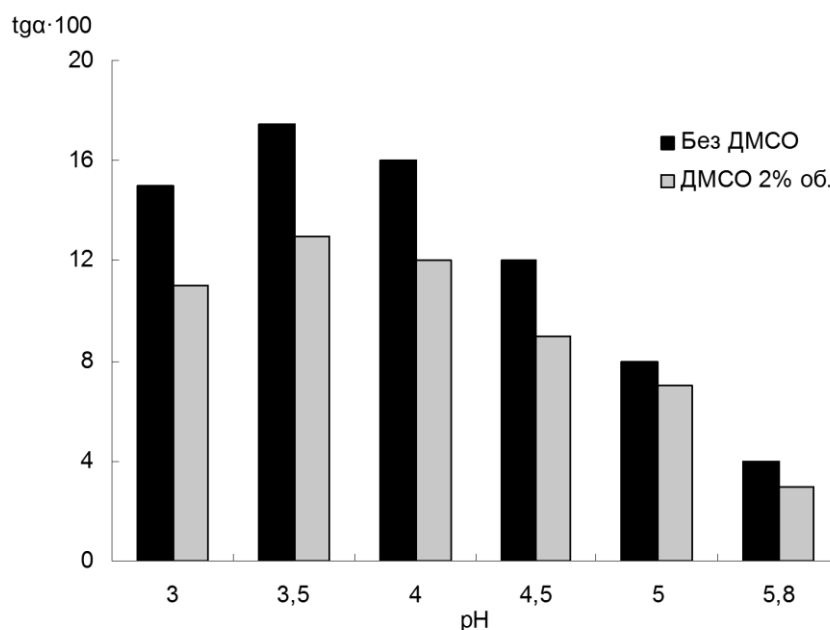
**Рис. 67.** Зависимости скорости пероксидазного окисления промазина (60 мкМ) и хлорпромазина (100 мкМ) от содержания ДМСО (в условиях, приведенных в табл. 20).

На рис. 68 и 69 приведены зависимости от pH 0,05 М HEPES буферного раствора скоростей пероксидазного окисления хлорпромазина и промазина, соответственно, в присутствии 2 об. % ДМСО. Именно в такой концентрации ДМСО используют в медицине для обеспечения транспорта указанных лекарственных препаратов сквозь клеточные мембраны [275, 276].



**Рис. 68.** Зависимости скоростей реакций пероксидазного окисления хлорпро-мазина (100 мкМ) в отсутствие и в присутствии 2 об. % ДМСО от pH 0,05 М НЕРЕС бу-ферного раствора при 525 нм в оптимальных условиях проведения реакции в вод-ном растворе (см. табл. 19).

Как видно из рис. 68, 69, денатурирующее действие ДМСО на пероксидазу мак-симально в диапазоне pH 3,0 – 4,5. При увеличении pH различие между скоростями ре-акции в отсутствие и в присутствии органического растворителя уменьшается, а при pH 5,0 – 5,8 эти скорости практически равны (в случае пероксидазного окисления хлорпро-мазина) (рис. 68) или отличаются незначительно (в случае промазина) (рис. 69). Однако, каталитическая активность биокатализатора в этом диапазоне pH столь низка, что разра-ботать методики ферментативного определения фенотиазинов по скорости накопления катион-радикалов в таких условиях проведения индикаторных реакций не представляется возможным. Попытки увеличить концентрацию пероксидазы в системе и переход для регистрации аналитического сигнала от метода тангенсов к способу фиксированному времени не увенчались успехом.



**Рис. 69.** Зависимости скоростей реакций пероксидазного окисления промазина (60 мкМ) в отсутствие и в присутствии 2 об. % ДМСО от pH 0,05 М HEPES буферного раствора при 512 нм в оптимальных условиях проведения реакции (см. табл. 20).

Таким образом, методики, основанные на реакциях собственного окисления фенотиозинов, могут быть использованы для их определения только в водных растворах, и последнее является существенным их ограничением при использовании в практике химического анализа. В связи с этим мы продолжили поиск новых подходов и схем анализа для определения средне- и трудноокисляемых субстратов ферментов в водных и водно-органических средах.

#### **4.2. Спектрофотометрическая сенсорная система на основе комплекса пероксидаза-хитозан для определения фенотиозинов по их влиянию на скорость окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода**

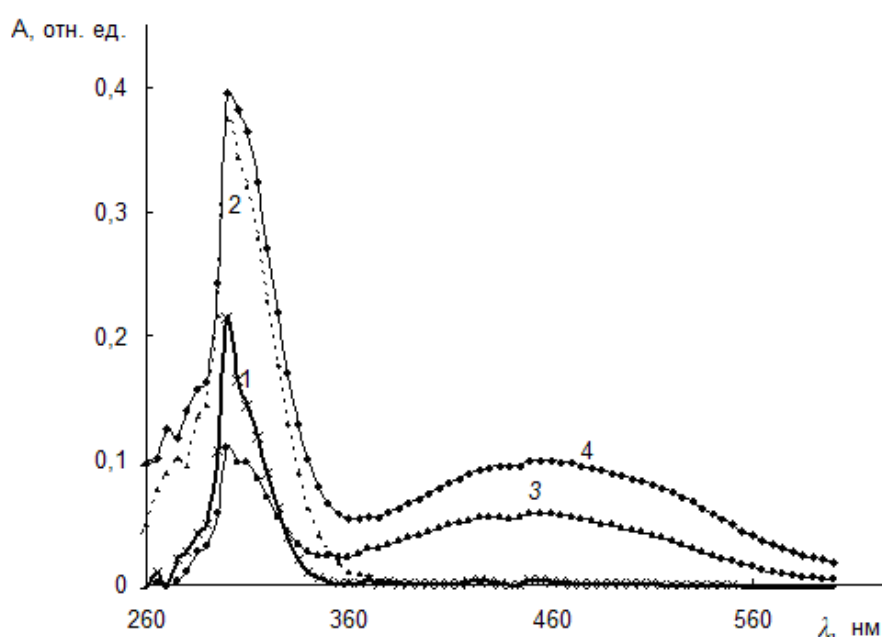
В биологических системах могут протекать реакции совместного окисления субстратов пероксидазы. Экспериментами *in vitro* показано [288], что при совместном окислении различных субстратов пероксидазы наблюдается эффект субстрат-субстратной активации, которая сопровождается ускорением окисления одного субстра-

та-восстановителя в присутствии второго. Следует отметить, что это явление довольно редкое, и его механизм мало изучен. Известно, что при совместном окислении *o*-дианизида и ферроцианида калия, окисление последнего осуществляется не свободным радикалом *o*-дианизида, а комплексом пероксидазы с полуокисленным субстратом. Несколько иной механизм установлен при совместном окислении *o*-дианизида и гидрохинона [289]. Гидрохинон и *o*-дианизидин могут конкурировать за место связывания в активном центре фермента. Предварительное связывание *o*-дианизида улучшает последующее связывание гидрохинона, ускоряя процесс его пероксидазного окисления. При этом *o*-дианизидин не ~~происходит~~ окисляется до полного окисления гидрохинона [289]. Аналогичный эффект субстрат-субстратной активации был отмечен при совместном присутствии *o*-дианизида и промазина в системе [290].

Мы решили использовать этот эффект для разработки новой индикаторной реакции в целях определения соединений фенотиазинового ряда с использованием спектрофотометрической сенсорной системы на основе биочувствительного слоя пероксидаза-хитозан. Однако, в отличие 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 5-15 сек в течение не менее 2-3 мин и не в пленке биочувствительного слоя, а непосредственно в реакционной смеси. Кроме того, неустойчивость *o*-дианизида 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.

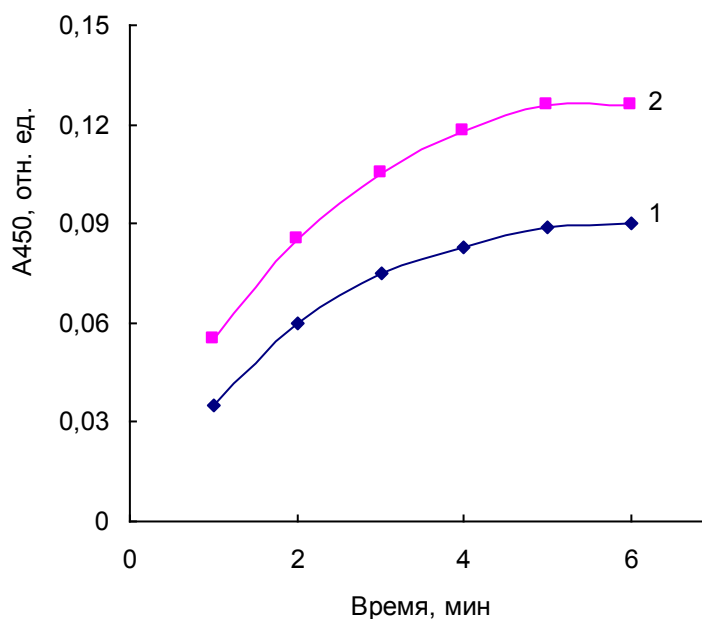
Все исследования проводили в условиях, при которых пероксидаза в составе комплекса с хитозаном, проявляет максимальную каталитическую активность в средах разной полярности (0,05 М фталатный буферный раствор pH 5,8, концентрации реагентов: пероксидаза – 0,1 нМ, *o*-дианизидин – 10 мкМ, пероксид водорода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

Было показано, что как в водном, так и в водно-органическом растворах (при 30 об. % содержании ДМСО) в присутствии фенотиазинов возрастает скорость пероксидазного окисления *o*-дианизидина, катализируемого ферментом нативным и включенным в комплекс с хитозаном. Как видно из рис. 70 и 71, в присутствии промазина максимум, характеризующий поглощение основного продукта окисления *o*-дианизидина ( $\lambda_{\text{max}} = 460$  нм), и скорость окисления *o*-дианизидина в водной среде выше, чем в отсутствие промазина, что подтверждало эффект “субстрат-субстратной” активации – активации окисления *o*-дианизидина среднеокисляемыми субстратами-восстановителями пероксидазы.



**Рис. 70.** Спектры поглощения *o*-дианизидина (1), промазина (2) и продуктов пероксидазного окисления *o*-дианизидина в отсутствие (3) и в присутствии (4) промазина через 2 мин после смешения компонент реакции. Условия: 0,05 М фталатный буферный раствор pH 5,8, концентрации: пероксидаза – 0,1 нМ, *o*-дианизидин – 10 мкМ, промазин – 50 мкМ, пероксид водорода – 100 мкМ.

Скорость пероксидазного окисления субстратов зависела от природы фенотиазина, а именно, от электронно-донорной способности заместителя в молекуле фенотиазина в положении 2 (Рис. 62). Так, скорость окисления субстратов пероксидазы уменьшалась в ряду: промазин (заместитель -H) > хлорпромазин (-Cl) > трифторперазин (-CF<sub>3</sub>).



**Рис. 71.** Кинетические кривые пероксидазного окисления *o*-дианизидина в отсутствие (1) и в присутствии (2) 50 мкМ промазина. Условия: 0,05 М фталатный буферный раствор pH 5,8, концентрации: пероксидаза – 0,1 нМ, *o*-дианизидин – 10 мкМ, промазин – 50 мкМ, пероксид водорода – 100 мкМ.

Для выяснения влияния фенотиозинов на скорость окисления *o*-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. 22).

Следует отметить, что в присутствии промазина возрастают максимальная скорость индикаторной реакции, значения  $k_{cat}$  и специфичность фермента по отношению к *o*-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 *o*-дианизидину приблизительно в 2 раза выше, чем в случае нативного фермента. Кроме того, установлено, что кинетические параметры зависят от природы фенотиозинов. 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 22.** Кинетические параметры реакции окисления *o*-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	$17 \pm 2$	$14 \pm 2$	$16 \pm 1$	$14 \pm 3$
$V_{max}$ , нМ/с	$167 \pm 8$	$316 \pm 21$	$233 \pm 19$	$382 \pm 23$
$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$1666 \pm 78$	$3162 \pm 212$	$2330 \pm 193$	$3821 \pm 234$
$k_{cat}/K_M$ , с <sup>-1</sup> мкМ <sup>-1</sup>	98	225	145	282

Аналогичным образом была изучена кинетика реакции окисления *o*-дианизидина в присутствии 150 мкМ промазина, катализируемой нативным ферментом и комплексом пероксидаза–хитозан, в 30 об. % растворе ДМСО (табл. 23). Выбор содержания органического растворителя обусловлен тем, что ранее нами было показано, что при таком количестве ДМСО не оказывает денатурирующего действия на пероксидазу в составе комплекса с полисахаридом в реакции окисления *o*-дианизидина. Как следует из табл. 23, реакция окисления *o*-дианизидина в присутствии 150 мкМ промазина, катализируемая пероксидазой в составе комплекса с хитозаном, в водно-органической среде характеризуется лучшими кинетическими параметрами, чем реакция, катализируемая нативным ферментом. Так, в составе комплекса специфичность пероксидазы по отношению к *o*-дианизидину в присутствии 30 об. % ДМСО возрастает в 2,8 раза, а максимальная скорость – в 2 раза.

По мере дальнейшего повышения содержания органического растворителя в реакционной смеси скорость реакции окисления *o*-дианизидина (в присутствии 150 мкМ промазина) снижалась.

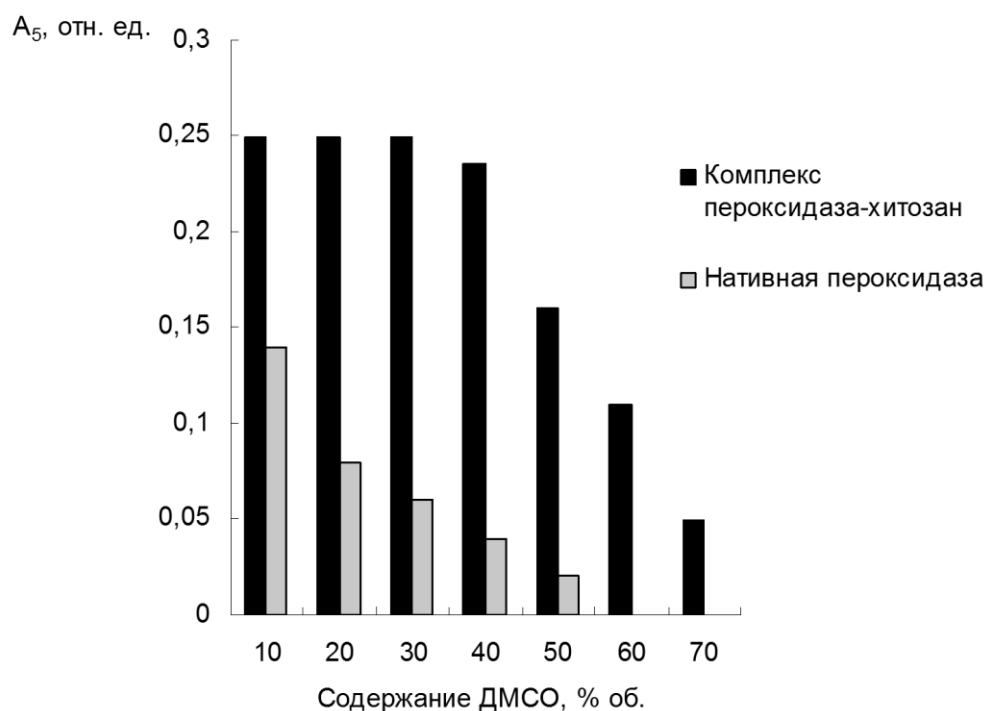


**Таблица 23.** Кинетические параметры реакции окисления *o*-дианизидина в присутствии 150 мкМ промазина, катализируемого нативной пероксидазой (I) и комплексом пероксидаза–хитозан (II), в 30 об. % растворе ДМСО ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

Параметр	Катализатор	
	I	II
$K_M$ , мкМ	$19 \pm 4$	$13 \pm 2$
$V_{max}$ , нМ/с	$218 \pm 25$	$418 \pm 30$
$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$2182 \pm 248$	$4183 \pm 302$
$k_{cat}/K_M$ , с <sup>-1</sup> мкМ <sup>-1</sup>	115	322

Однако, если в случае катализа нативной пероксидазой процесс прекращается при 60 об. % содержании ДМСО, то в присутствии хитозана реакция протекает даже в присутствии 70 об. % органического растворителя (рис. 72).

Эффект увеличения скорости окисления *o*-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. 24).



**Рис. 72.** Зависимость скорости реакции окисления *o*-дианизидина в присутствии 150 мкМ промазина, катализируемой нативной пероксидазой и комплексом от содержания ДМСО в реакционной смеси. Условия: 0,05 М фталатный буферный раствор рН 5,8, концентрации: пероксидаза – 0,1 нМ, *o*-дианизидин – 10 мкМ, промазин – 50 мкМ, пероксид водорода – 100 мкМ.

Как видно из табл. 24, метрологические характеристики методик определения фенотиазинов в водно-органическом растворе, основанные на эффекте активации ими *o*-дианизидина, значительно лучше характеристик методик определения этих соединений по их окислению с участием нативного биокатализатора (табл. 21): пределы обнаружения хлорпромазина, промазина и трифторперазина понизились в 20, 50 и 50 раз соответственно. Новая индикаторная система в сочетании с биочувствительный слой сенсорной системы на основе комплекса пероксидаза-хитозан открывает возможности для определения указанных аналитов в водно-органических средах. Кроме того, нижние границы определяемых концентраций фенотиазинов в присутствии хитозана на порядок ниже, чем в случае использования нативной пероксидазы.

**Таблица 24.** Метрологические характеристики методик определения фенотиазинов по их активирующему действию на реакцию окисления *o*-дианизидина, катализируемого нативным ферментом (I) и комплексом пероксида–хитозан (II) в водных растворах и в присутствии 30 об. % содержания ДМСО

Определяемое соединение		Диапазон определяемых концентраций, мкМ	$s_f$ при $c_H$ ( $n = 5, P=0,95$ )
<i>0,05 М Фталатный буферный раствор pH 5,8</i>			
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
<i>0,05 М Фталатный буферный раствор pH 5,8 + ДМСО (30 об.%)</i>			
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

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

Полученные результаты показывают перспективность применения новой индикаторной системы для осуществления ферментативного катализа в водно-органических средах, а высокая специфичность активирующего действия фенотиазинов на реакцию пероксидазного окисления *o*-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.

#### **4.3. Определение промазина в плазме крови человека с использованием спектрофотометрической сенсорной системы и эффекта субстрат-субстратной активации**

Спектрофотометрическая сенсорная система, основанная на эффекте активации окисления *o*-дианизидина в присутствии промазина была применена для его определения в образцах плазмы венозной крови человека методом “введено-найденно”.

Как упоминалось ранее, определению фенотиазинов в биологической матрице обычно предшествует сложная пробоподготовка — их экстракция и предконцентрирование. Необходимость проведения пробоподготовки связана, во-первых, с малыми концентрациями препаратов в биологических объектах (на уровне *ppm* или *ppb*), а, во-вторых, со способностью фенотиазинов связываться с молекулами белков, присутствующими в анализируемых объектах.

Наиболее распространенным и удобным способом выделения фенотиазинов из матрицы является их жидкостно-жидкостная экстракция в подходящий органический растворитель, не смешивающийся с водой [291]. Важным условием для наиболее полного разделения жидкостей и количественного выделения фенотиазинов в органическую фазу является выбор оптимального рН водной среды, из которой экстрагируется лекарственный препарат, и природа органического растворителя. Во многих случаях фенотиазиновые препараты экстрагируют в органическую

среду как электронейтральные частицы; это достигается за счет создания рН водной фазы, близкого к значению  $pK_a$  извлекаемого фенотиазина.

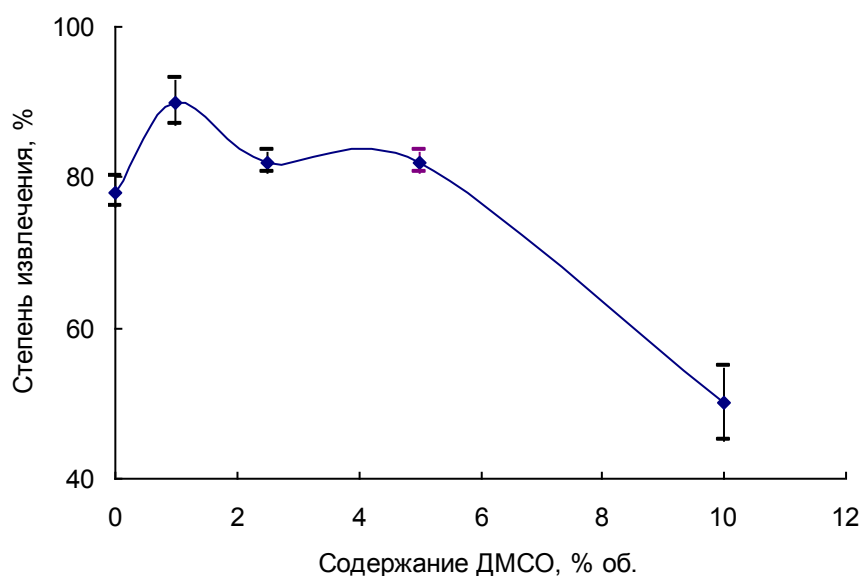
При выборе органического растворителя, используемого для экстракции фенотиазинов, необходимо учитывать его способность эффективно растворять, извлекать препараты из матрицы, т.е. учитывать полярность растворителя. Также следует принимать во внимание количество повторных экстракций, необходимых для наиболее полного извлечения фенотиазинов из образца. Во избежание потерь фенотиазина число циклов экстракции должно быть минимальным. Идеальной считается однократная экстракция с использованием десятикратного по объему избытка растворителя.

Как показал анализ литературы, в качестве растворителя для экстракции фенотиазинов из плазмы крови чаще всего используют смесь неполярного (гептана или гексана) и небольшого объема (1 – 5) % об. полярного (обычно изоамилового спирта) растворителей [292, 293]. Причем добавление полярного спирта способствует более эффективному извлечению фенотиазинов из матрицы. Иногда в качестве растворителей для экстракции фенотиазинов используют этилацетат [294].

Ранее мы обосновали целесообразность выбора в качестве растворителя фенотиазинов диметилсульфоксида; следовательно, можно было предположить, что добавление ДМСО к неполярному растворителю может способствовать повышению эффективности экстракции фенотиазинов из плазмы крови. В качестве неполярного растворителя выбрали гексан, наиболее часто используемый для этих целей.

Изучили зависимость степени извлечения промазина из плазмы крови от процентного содержания полярных растворителей, добавляемых к гексану: ДМСО и изоамилового. Полученные результаты представлены на рис. 73 и 74. Нижнюю границу диапазона изученных содержаний полярных растворителей выбрали на основании литературных данных (чаще всего используют 1 об. % изоамиловый спирт); при содержании ДМСО более 10 об. %, а изоамилового спирта – 5 об. % размывается граница раздела органической и водной фаз.

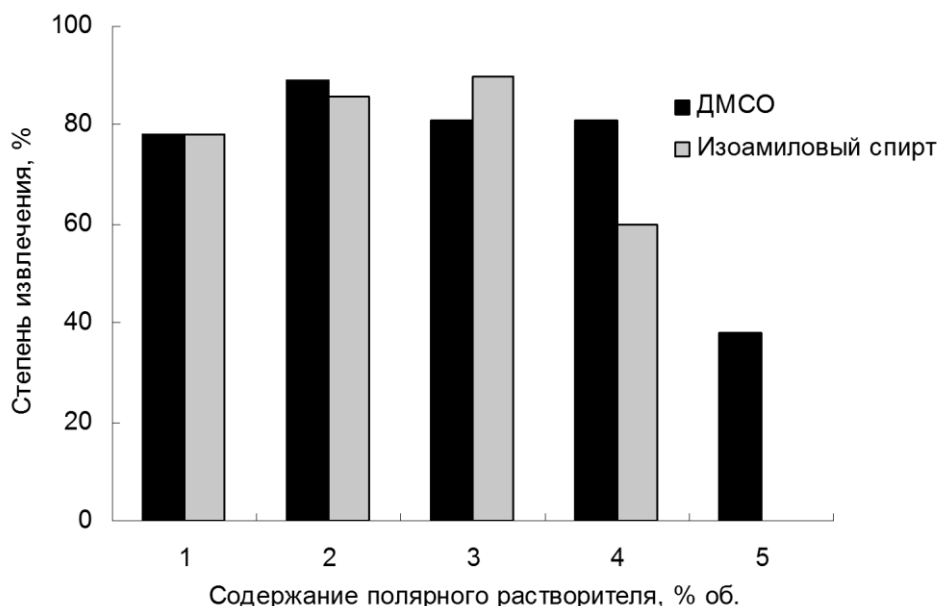
Показано, что в отсутствие промазина матрица (плазма крови) не влияет на скорость пероксидазного окисления *o*-дианизидина.



**Рис. 73.** Зависимость степени извлечения промазина из плазмы крови от содержания ДМСО в экстракционной смеси.

Из рис. 73 видно, что при добавлении ДМСО к неполярному гексану эффективность извлечения промазина из плазмы крови несколько повышается. В диапазоне содержаний ДМСО от 1 до 5 об. % степень извлечения феноптиазина практически одинакова в пределах погрешности и составляет около 85 %. При дальнейшем увеличении содержания ДМСО (до 10 об. %) степень извлечения резко снижается, частично, за счет размывания границы раздела фаз.

Аналогичная ситуация наблюдается и при использовании изоамилового спирта (рис. 74), причем степени извлечения в присутствии 0 – 2,5 об. % ДМСО или изоамилового спирта практически одинаковы. При дальнейшем увеличении содержания полярного растворителя (до 5 об. %) в случае ДМСО эффективность извлечения не меняется, а при использовании изоамилового спирта падает вследствие размывания границы раздела фаз.



**Рис. 74.** Зависимость степени извлечения промазина из крови от процентного содержания полярного растворителя: изоамилового спирта (1) или ДМСО (2), содержащегося в смеси гексан – полярный растворитель.

Таким образом, на основании проделанной работы на этом этапе можно сделать следующие выводы: на примере промазина показана возможность применения разработанных ферментативных методик для определения фенотиазинов в плазме крови человека по их активирующему действию на реакцию пероксидазного окисления *o*-дианизидина; в процессе подготовки проб плазмы крови (и, очевидно, других биологических жидкостей) для извлечения фенотиазинов целесообразно использование 1 – 5 об. % ДМСО как альтернативы изоамиловому спирту.

Методика подготовки проб крови для определения в ней промазина методом «введено-найдено» была следующей. Точную навеску промазина растворяли в 2 мл плазмы крови человека (содержание аналита составляло 1 мкМ), добавляли 2 мл 0,1 М карбонатного буферного раствора (рН 10,6). Полученный раствор помещали в делительную воронку, и экстрагировали промазин в органический слой, состоящий из 10 мл гексана или гексана с добавлением различных количеств ДМСО - 1 – 10 об. %. Для извлечения промазина в органический слой смесь интенсивно встряхивали вручную в течение 10 мин, после чего для лучшего разделения смеси на две фазы ее на 10 мин оставляли в покое. Органический слой отделяли, и испаряли гексан в потоке воздуха досуха. Сухой остаток растворяли в 1 мл ДМСО и анализировали по методике, описанной выше, только вместо

стандартного раствора фенотиазина вводили плазму крови, содержащую аналит.

Далее проанализировали пробы плазмы крови двумя способами: с предварительным выделением промазина методом жидкостной экстракции и без предварительной подготовки (непосредственно плазму крови добавляли в реакционную смесь). Результаты эксперимента представлены в табл. 25.

**Таблица 25.** Результаты определения промазина с использованием спектрофотометрической сенсорной системы, основанной на эффекте активации окисления *o*-дианизидина в органическом экстракте из плазмы крови человека (I) и в плазме крови без предварительного извлечения аналита (II)

Условия анализа	Содержание промазина, мкмоль/л	
	«Введено»	«Найдено»
I	1	$1,2 \pm 0,3$
II	1	$0,9 \pm 0,3$

Как видно из полученных результатов (табл. 25), разработанная спектрофотометрическая 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 средне окисляемых субстратов пероксидазы - фенотиазинов по их специфическому активирующему действию на ферментативную реакцию окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода. По чувствительности предложенная нами система превосходит спектрофотометрические методики определения указанных аналитов [267, 268] и сравнима с хроматографическими методиками их определения [271-274]. 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.



## **ГЛАВА 5. ТВЕРДОФАЗНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ПЕРОКСИДОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, МЕЧЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКОЙ**

В литературе отмечено [65], что флуоресцентные сенсорные системы более чувствительны, чем их спектрофотометрические аналоги; в целом характеризуются высокой экспрессностью (формирование отклика занимает от нескольких секунд до нескольких минут) и стабильностью (90 – 95% исходной величины аналитического сигнала сохраняется в течение нескольких месяцев). Это свидетельствует о том, что изменение способа регистрации аналитического сигнала переходом от спектрофотометрических к новым флуоресцентным индикаторным реакциям может позволить улучшить аналитические характеристики и расширить возможности практического использования твердофазных оптических сенсорных систем. Подход, основанный на формировании и измерении аналитического сигнала непосредственно в биочувствительном слое, не был ранее использован при создании флуоресцентных сенсорных систем для определения фенольных соединений и органических пероксидов различного строения.

В связи с этим целью следующего этапа работы было создание твердофазной флуоресцентной ферментативной сенсорной системы для определения фенольных соединений и пероксидов различного строения в матрицах различного состава.

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

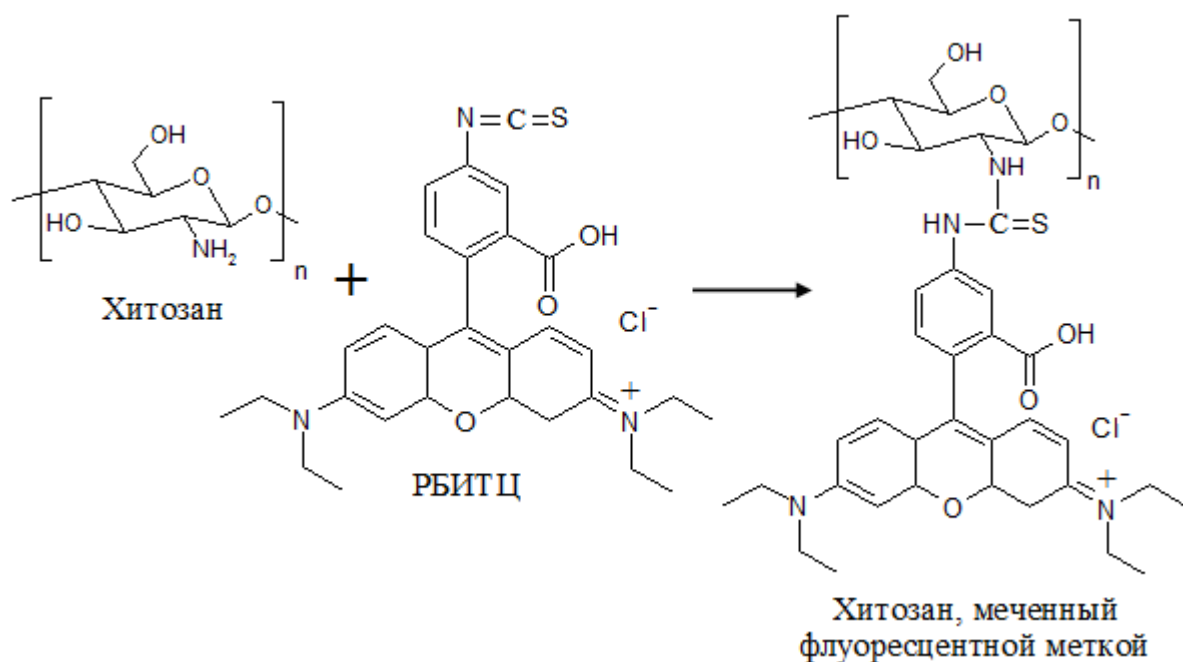
### **5.1. Оптическая сенсорная система для определения фенольных соединений на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой**

Распространенный прием при создании флуоресцентных сенсорных систем заключается во введении в их чувствительный слой молекул, обладающих сильной собственной флуоресценцией, и последующем косвенном определении компонен-

тов индикаторной системы.

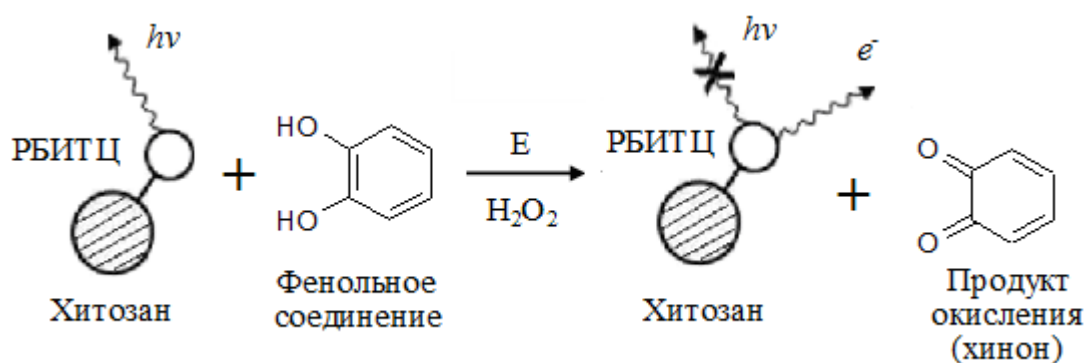
Из литературы [103] известно, что хиноны и феноксильные радикалы (акцепторы электронов), образующиеся в ходе ферментативного окисления фенолов, уменьшают собственную флуоресценцию молекул-флуорофоров (доноров электронов), что может быть использовано для косвенного определения фенольных соединений. В свою очередь, изотиоцианатные производные флуоресцентных красителей (пиронинов, флуоресцеинов, родаминов) взаимодействуют в мягких условиях с первичными аминами с образованием флуоресцирующих соединений [31]. Описанную реакцию широко применяют для введения флуоресцентных меток в состав молекул полимеров, в частности хитозана. Наиболее часто в качестве флуоресцентных меток используют изотиоцианат флуоресцеина ФИТЦ ( $\lambda_{\text{ex}} \sim 500$  нм,  $\lambda_{\text{em}} \sim 525$  нм) и изотиоцианат родамина Б (РБИТЦ) ( $\lambda_{\text{ex}} \sim 550$  нм,  $\lambda_{\text{em}} \sim 575$  нм). Для дальнейшей работы нами был выбран РБИТЦ, поскольку он характеризуется максимумами возбуждения и испускания в более длинноволновой области спектра, последнее позволяет, как показано в Главе 2, улучшить соотношение сигнал/шум при регистрации флуоресцентного сигнала с поверхности кварцевого стекла, а также повысить селективность индикаторной системы (поскольку большинство компонентов реальных объектов имеет собственные максимумы возбуждения в более коротковолновой области спектра).

Схема введения флуоресцентной метки в молекулу хитозана приведена на рис. 75.



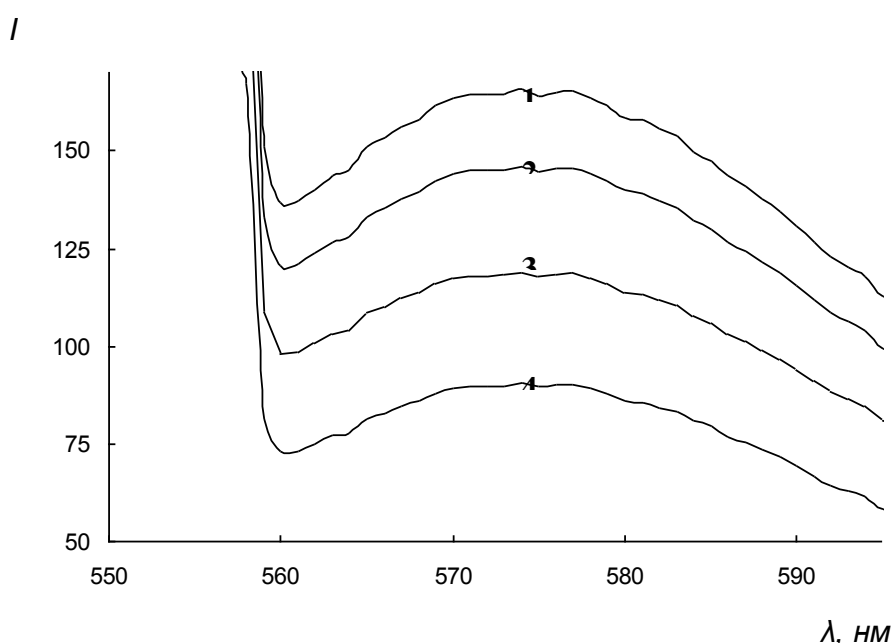
**Рис. 75.** Схема введения флуоресцентной метки родамина *В* изотиоцианата (РБИТЦ) в молекулу хитозана.

Полученный таким образом меченый хитозан (как и в случае спектрофотометрической системы) может одновременно выступать в качестве индикаторного вещества и матрицы для иммобилизации фермента. Общая схема формирования аналитического сигнала при использовании биосенсора на основе меченого хитозана приведена на рис. 76.



**Рис. 76.** Схема формирования отклика чувствительного слоя флуоресцентного биосенсора на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой родамина *В* изотиоцианата (РБИТЦ).

Чувствительный слой предложенной нами сенсорной системы представлял собой смесь хитозана, меченного флуоресцентной меткой - РБИТЦ, и фермента (пероксидазы, лакказы или тирозиназы). Выбор трех ферментов на этом этапе исследования обусловлен тем, что разная природа окислителя (кислорода воздуха в случае тирозиназы, лакказы и пероксида водорода в присутствии пероксидазы из корней хрена) также может влиять на интенсивность флуоресцентной метки в составе полимера. Интенсивность флуоресценции чувствительного слоя сенсорной системы значительно уменьшалась при ферментативном окислении фенольных соединений пропорционально содержанию аналита (рис. 77).



**Рис. 77.** Спектры флуоресценции чувствительного слоя биосенсора на основе хитозана после выдерживания в реакционной системе при разных концентрациях пероксидазы из корней хрена: (1) 0, (2) 1, (3) 3, (4) 5 мкМ. Условия реакции: 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 6,5, концентрации пероксидазы 50 нМ, пероксида водорода - 100 мкМ, содержание РБИТЦ - 25 нг·см<sup>-2</sup>,  $\lambda_{\text{ex}} = 550$  нм, время реакции - 10 мин.

В то же время, при выдерживании сенсорного устройства на основе пероксидазы в растворе, содержащем только фенольное соединение (в отсутствие окислителя – пероксида водорода) или только пероксид водорода (в отсутствие фенольного соединения) флуоресценция не уменьшалась. Аналогичные закономерности

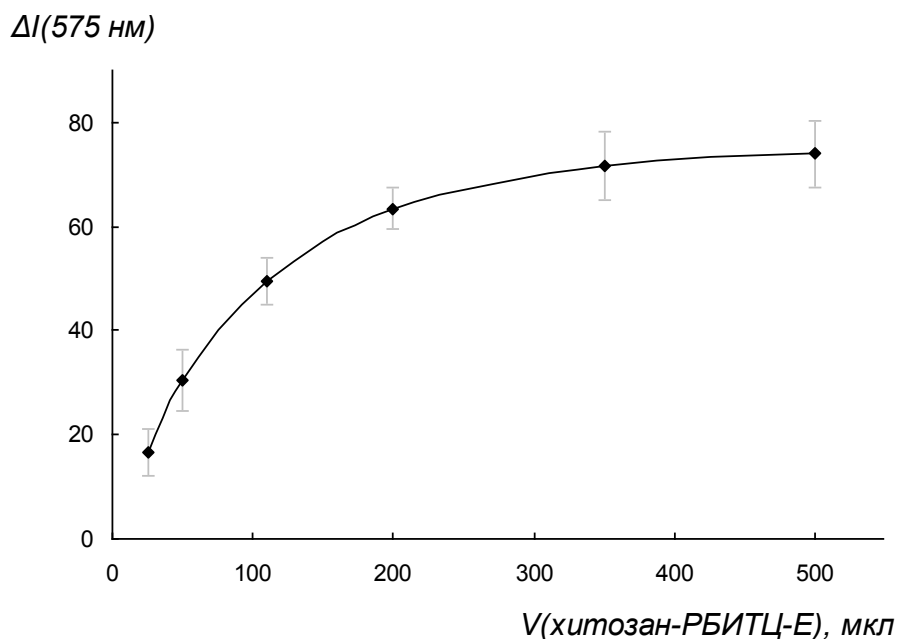
получены при окислении пирокатехина пероксидом водорода в растворе в присутствии пероксидазы и родамина Б (а также при использовании вместо хитозана водорастворимого полимера полиаллиламина, меченного флуоресцентной меткой). Результаты этого эксперимента свидетельствуют о том, что тушение интенсивности флуоресцентного сигнала происходит только в специфичном двухстадийном процессе: ферментативного окисления фенольного соединения и взаимодействия продукта окисления с полимерным слоем сенсорной системы – хитозаном, меченым флуоресцентной меткой.

### **5.1.1. Выбор условий проведения индикаторной реакции на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой**

Для получения максимального отклика чувствительного слоя флуоресцентной сенсорной системы в присутствии определяемых соединений выбрали условия и концентрации всех компонентов в реакционной системе: концентрации хитозана, флуоресцентной метки, фермента, пероксида водорода, толщины пленки, концентрации и рН буферного раствора, а также длин волн возбуждения и испускания.

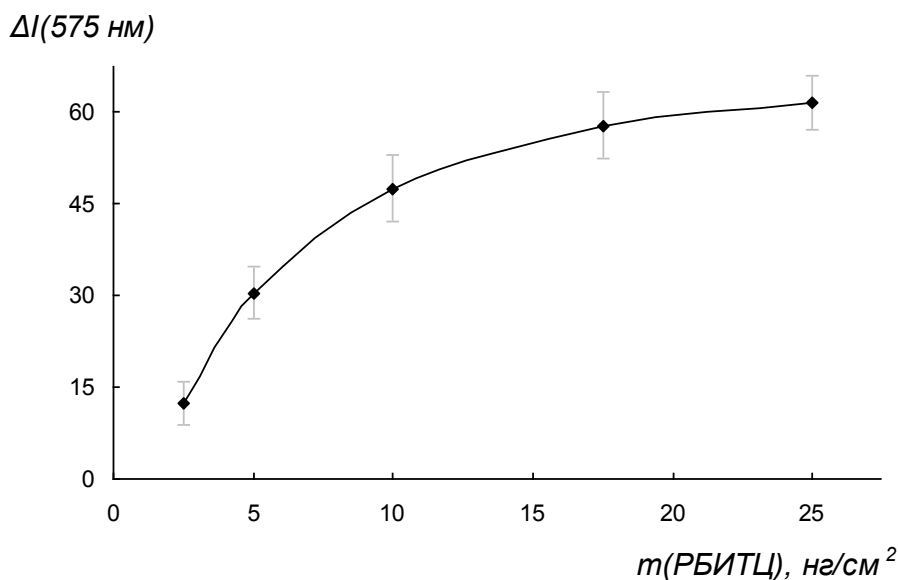
Очевидно, что увеличение концентрации хитозана на поверхности подложки из кварцевого стекла (Глава 2) позволяло ввести в его состав больше молекул флуоресцентной метки, увеличить таким образом интенсивность флуоресценции чувствительного слоя до проведения реакции и, как следствие, повысить чувствительность определения аналитов.

Установили, что аналитический сигнал максимален при объеме смеси, формирующей чувствительный слой, равном 200 мкл, что соответствовало 0,4 мг хитозана на см<sup>2</sup> поверхности (рис. 78). При больших объемах (и соответственно большей плотности нанесения) хитозановая пленка становилась механически непрочной и отслаивалась от поверхности стекла при погружении сенсорного устройства в реакционный раствор.



**Рис. 78.** Зависимость отклика чувствительного слоя на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой от толщины пленки. Условия реакции: 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 7,5, концентрации пероксидазы 50 нМ, пероксида водорода - 100 мкМ, содержание РБИТЦ -  $25 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-2}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ нм}$ , объем реакционной смеси - 5 мл, время реакции 10 мин.

Концентрацию флуоресцентной метки варьировали в диапазоне 1 –  $25 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-2}$ . Отклик чувствительного слоя сенсорной системы был максимален при самом высоком содержании флуоресцентной метки, составляющей  $25 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-2}$  (рис. 79). Ввести в полимер большее количество молекул РБИТЦ было невозможно, поскольку из-за стерических затруднений функциональные группы молекул метки и хитозана не реагировали друг с другом.

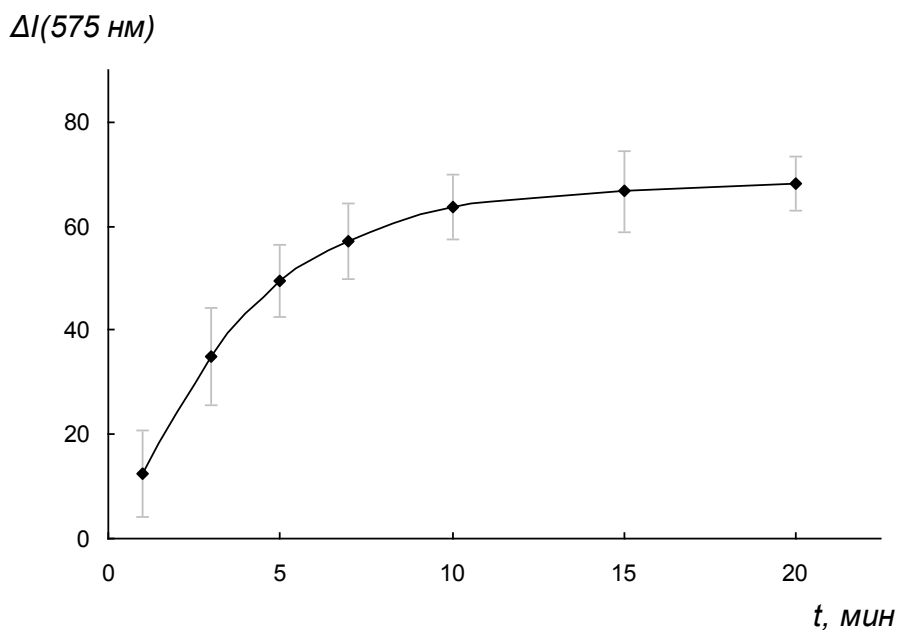


**Рис. 79.** Зависимость отклика чувствительного слоя биосенсора на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой от концентрации РБИТЦ. Условия реакции: 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 7,5, концентрации пероксидазы 50 нМ, пероксида водорода - 100 мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 550$  нм, время реакции - 10 мин,  $\lambda_{\text{ex}} = 550$  нм, объем реакционной смеси - 5 мл, время реакции 10 мин.

Кривые накопления продуктов в чувствительном слое во времени представляли собой классические кинетические кривые с насыщением (рис. 80). В качестве оптимального времени реакции выбрали 10 мин, поскольку, во-первых, к этому времени кривая накопления конечного продукта выходила на плато, и, во-вторых, это время было удобным для работы.

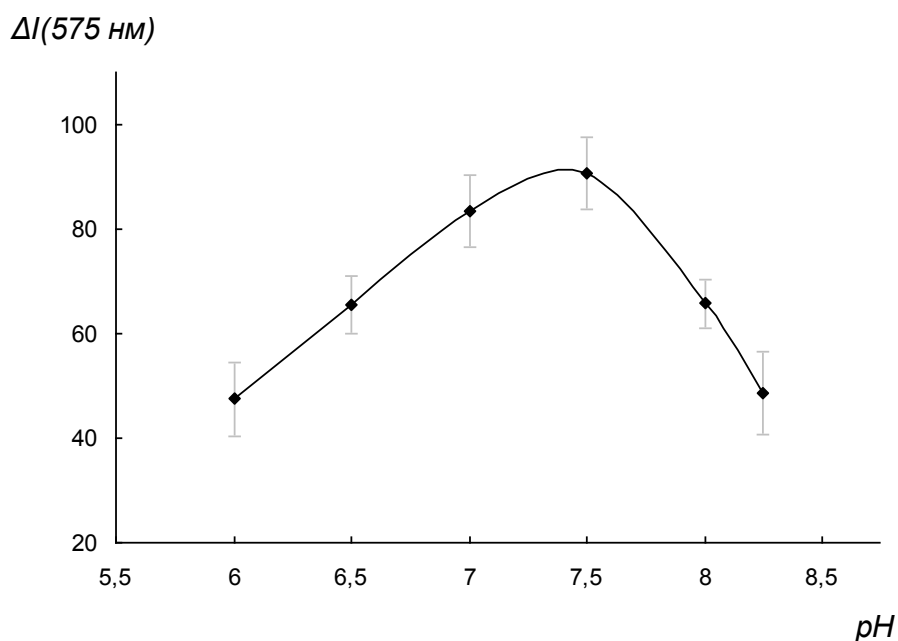
Индикаторную реакцию проводили в фосфатном буферном растворе, поскольку его наиболее часто используют при проведении биохимических реакций с участием оксидоредуктаз вследствие его стабилизирующего действия на них. Изменение концентрации буферного раствора в диапазоне 0,01 – 0,075 М существенно не влияло на аналитический сигнал. При дальнейшем увеличении концентрации (а, следовательно, и ионной силы), отклик сенсора незначительно уменьшался, предположительно, из-за инактивации фермента. Зависимость отклика чувствительного слоя биосенсора от рН буферного раствора (в диапазоне 6,0 – 8,25) проходила через максимум при рН 7,5 (рис. 81). Это значение рН близко к рКа хитозана (от 6 до 7 в зависимости от растворителя) и, как будет показано далее, не зави-

село от природы иммобилизованного фермента.



**Рис. 80.** Зависимость отклика чувствительного слоя биосенсора на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой от времени реакции. Условия реакции: 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 7,5, концентрации пероксидазы 50 нМ, пероксида водорода - 100 мкМ, содержание РБИТЦ - 25 нг·см<sup>-2</sup>,  $\lambda_{ex}$  = 550 нм, время реакции - 10 мин, объем реакционной смеси - 5 мл.





**Рис. 81.** Зависимость отклика чувствительного слоя биосенсора на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой от pH буферного раствора. Условия реакции: 0,05 М фосфатный буферный раствор, pH 7,5, концентрации пероксидазы 50 нМ, пероксида водорода - 100 мкМ, содержание РБИТЦ - 25 нг·см<sup>-2</sup>,  $\lambda_{\text{ex}} = 550$  нм, время реакции - 10 мин.

Аналогичные исследования по выбору условий формирования максимального отклика флуоресцентной сенсорной системы на основе чувствительного слоя биокатализатор-хитозан-РБИТЦ провели и для ферментов класса оксидаз (тирозины и лакказы) (табл. 26). Следует отметить, что независимо от природы биокатализатора и определяемого соединения отклик чувствительного слоя биосенсора был максимален при pH 7,5 ( $\lambda_{\text{ex}} = 550$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 575$  нм).

Условия, приведенные в табл. 26, были фактически идентичными для определения широкого круга фенольных соединений – простейших изомерных дигидроксифенолов (пирокатехина, резорцина, гидрохинона), катехоламинов (дофамина, адреналина) и метаболитов последних (гомованилиновой и ванилилминдальных кислот).

**Таблица 26.** Условия функционирования пероксидазного, лакказного и тирозиназного сенсоров на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой

Параметр	Фермент		
	Пероксидаза	Лакказа	Тирозиназа
U(E), у.е.	0,1*	0,1	2,5
c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), мкМ	100	-**	
Концентрация и pH буферного раствора	0,05 М Фосфатный буферный раствор pH 7,5		
c(хитозан), % по массе	1		
c(CH <sub>3</sub> COOH), % по объему	0,5		
m(хитозан), мг·см <sup>-2</sup>	0,4		
m(РБИТЦ), нг·см <sup>-2</sup>	25		
V(хитозан-пероксидаза), мкл	200		
Объем реакционной смеси, мл	5		
Время реакции, мин	10		
λ <sub>ex</sub> , нм	550		
λ <sub>em</sub> , нм	575		

\* U(пероксидазы) – 0,1 у.е. соответствует концентрации пероксидазы 50 нМ;

\*\* субстрат-окислитель – кислород воздуха.

Наиболее важным результатом проведенного исследования является то, что переход от твердофазной спектрофотометрической системы к новой с флуориметрическим детектированием аналитического сигнала по тушению метки РБИТЦ в структуре хитозана позволяет сократить время анализа с 24 ч до 10 мин. Для установления причин столь резкого сокращения времени отклика сенсорной системы изучили сорбцию фенольных соединений и продуктов их окисления биочувствительным слоем на основе хитозана.

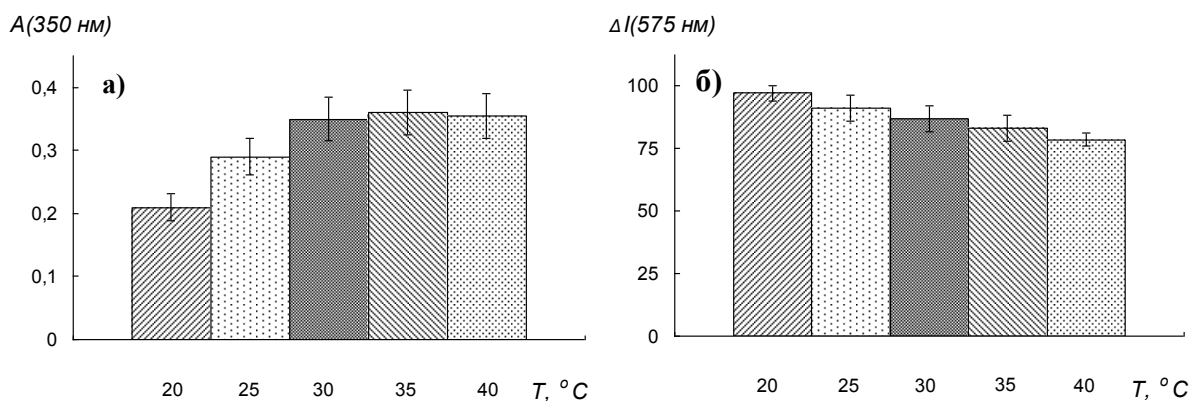
### **5.1.2. Изучение сорбции фенольных соединений и продуктов их окисления биочувствительным слоем на основе хитозана**

Природу сорбционного взаимодействия в системе хинон - меченый хитозан изучали в условиях, наиболее подходящих для работы спектрофотометрической и флуоресцентной сенсорных систем. Согласно литературным данным [295–298], фенольные соединения и продукты их окисления (*o*- и *n*-хиноны) могут сорбироваться молекулами хитозана за счет образования водородных (обратимая физическая сорбция) или ковалентных связей (необратимая химическая сорбция), соответственно. В литературе не приведены данные по изучению физической сорбции хинонов хитозановыми пленками.

При изучении сорбции в модельных системах для упрощения задачи принято выделять два крайних варианта, при которых сорбция обусловлена физическими (физическая сорбция) и химическими взаимодействиями (химическая сорбция) [299]. Однако, как правило, механизм сорбции обусловлен сразу несколькими причинами, поэтому часто можно сделать только предположение о преобладании того или иного механизма.

Мы установили, что отклик спектрофотометрической сенсорной системы увеличивался примерно на 40 % при повышении температуры в диапазоне 20 – 40°C (что может быть связано как с увеличением активности фермента, так и с увеличением эффективности химической сорбции). Отклик чувствительного слоя флуоресцентного биосенсора, наоборот, уменьшался примерно на 20 % при повы-

шении температуры в том же диапазоне (рис. 82), то есть в целом интенсивность флуоресценции увеличивалась.



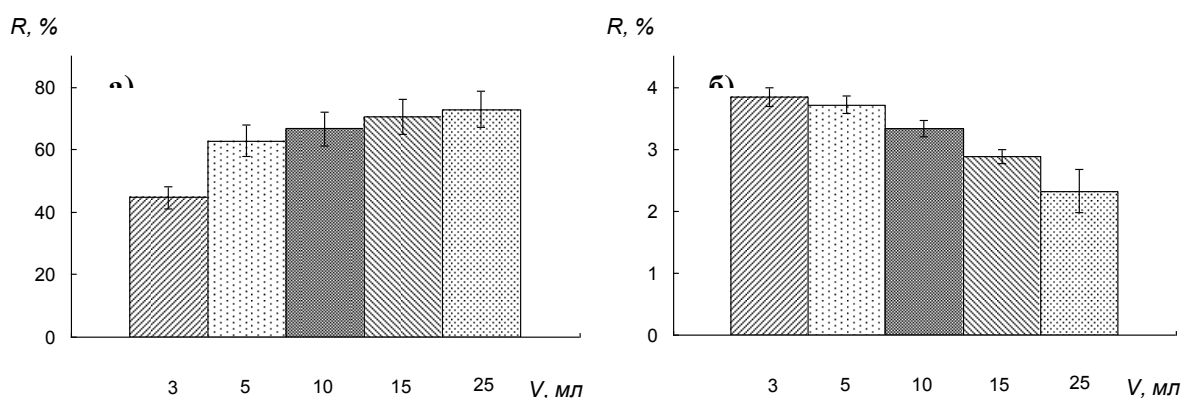
**Рис. 82.** Влияние температуры на величину поглощения (а) и интенсивность флуоресценции (б) чувствительного слоя спектрофотометрической и флуоресцентной сенсорных систем соответственно. Условия реакции: 0,05 М фосфатный буферный раствор, концентрации гидрохинона и пирокатехина – 100 (а) и 5 (б) мкМ, пероксидазы - 50 нМ, пероксида водорода - 100 мкМ,  $\lambda_{ex} = 550$  нм, объем реакционной смеси - 5 мл, время реакции - 4 ч (а) и 10 мин (б).

На основании полученных экспериментальных данных предположили, что отклики чувствительных слоев спектрофотометрического и флуоресцентного сенсоров формируются в результате протекания преимущественно химических и физических взаимодействий соответственно (схема 6). В литературе отсутствуют сведения о физической сорбции изомерных фенольных соединений хитозаном. Однако известно, что способность фенольных соединений сорбироваться на других матрицах (в частности на активированных углях) изменяется в парах пирокатехин > резорцин [300] и пирокатехин > гидрохинон [301].

Таким образом, поскольку физическая сорбция фенолов и хинонов обусловлена взаимодействиями схожей природы (образованием водородных связей), приведенная нами ранее последовательность модельных соединений, формирующих отклик чувствительного слоя разной интенсивности (пирокатехин > резорцин > гидрохинон > допамин) соответствует литературным данным.

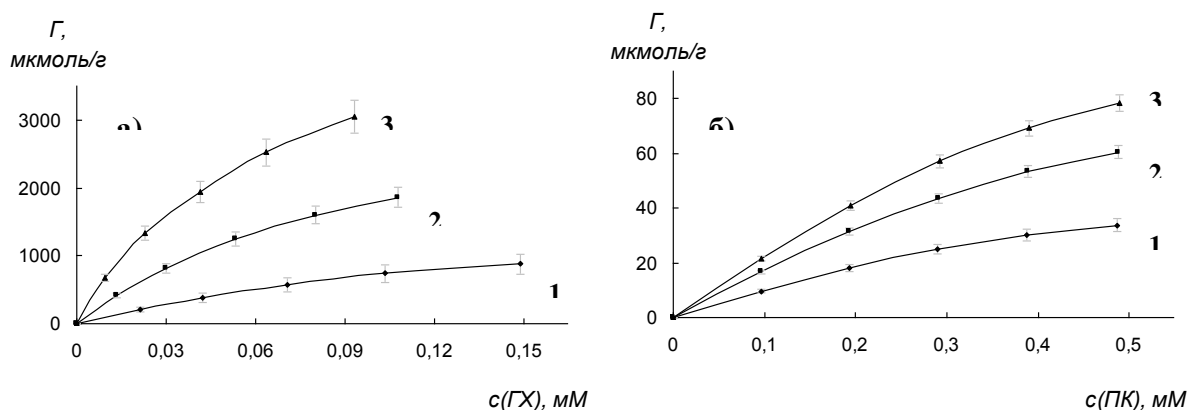


циях. Таким образом, было показано, что рост степени извлечения приводит к увеличению поглощения (эффективности тушения флуоресценции) и, как следствие, к повышению отклика чувствительного слоя сенсора.



**Рис. 84.** Зависимость степени извлечения продуктов ферментативного окисления гидрохинона (а) и пирокатехина (б) от объема реакционной системы в условиях-работы спектрофотометрической и флуоресцентной сенсорных систем, соответственно; концентрация гидрохинона и пирокатехина - 100 мкМ.

Поскольку времена выдерживания сенсорных устройств на основе хитозана для двух типов сенсорных систем существенно отличаются, то в первом случае мы можем говорить о преобладании процесса химической сорбции продуктов окисления гидрохинона, а во втором – о физической сорбции самого пирокатехина. Для подтверждения предложенных гипотез на основании данных, полученных при оценке степени извлечения фенольных соединений хитозановой пленкой, построили изотермы сорбции гидрохинона и пирокатехина (рис. 85). Они линейны в области малых концентраций и имеют вид кривых с насыщением. На основании их общего вида изотермы были отнесены к L-классу (класс Ленгмюра) [297]. Для оценки сорбционных параметров полученные изотермы были линеаризованы в рамках моделей Ленгмюра и Фрейндлиха. Из уравнений линейных зависимостей были рассчитаны значения величин предельной сорбции  $\Gamma_m$ , констант сорбции  $K$  и свободной энергии Гиббса  $\Delta G^0_{298}$  (для изотерм Ленгмюра), а также коэффициента пропорциональности  $k$  и показателя степени  $n$  (для изотерм Фрейндлиха). Количественные характеристики сорбционного процесса приведены в табл. 27.



**Рис. 85.** Изотермы сорбции продуктов окисления гидрохинона (а) и пирокатехина (б) биочувствительным слоем на основе хитозана в условиях, работы спектрофотометрической (а) и флуоресцентной (б) сенсорных систем, соответственно, и разных объемах реакционной системы: (1) 5; (2) 10, (3) 15 мл.

Величины предельной сорбции и констант сорбции, характеризуют способность сорбента сорбировать, а сорбата сорбироваться соответственно. Для обеих индикаторных систем предельная сорбция возрастала при увеличении объема реакционной смеси. При этом константа сорбции повышалась при увеличении объема в случае гидрохинона и уменьшалась в случае пирокатехина. Поскольку вещество концентрируется в поверхностном слое самопроизвольно, процесс сорбции характеризуется отрицательным значением энергии Гиббса ( $\Delta G^0 < 0$ ). Оказалось, что в случае гидрохинона это значение повышалось, а в случае пирокатехина уменьшалось по модулю с увеличением объема. Полученные данные говорят о том, что при увеличении объема пробы эффективность сорбции возрастала в условиях работы спектрофотометрической сенсорной системы и уменьшалась в условиях работы флуоресцентного устройства. Рассчитанные коэффициенты корреляции оказались выше для изотерм, описанных уравнением Фрейндлиха, следовательно, именно это уравнение более точно описывает процесс сорбции в исследуемых системах.

Таким образом, данные по изучению сорбции подтвердили высказанное нами предположение, что отклики чувствительных слоев спектрофотометрической и флуоресцентной сенсорных систем формируются в результате протекания преимущественно химических и физических взаимодействий соответственно.

**Таблица. 27.** Количественные характеристики сорбции продуктов окисления фенольных соединений биочувствительным слоем пероксидаза-хитозан в составе спектрофотометрической и флуоресцентной сенсорных систем (n = 5, P = 0,95).

V, мл	Параметры изотермы Ленгмюра				Параметры изотермы Фрейндлиха		
	$\Gamma_m$ , ммоль·г <sup>-1</sup>	K, л·ммоль <sup>-1</sup>	$\Delta G^0_{298}$ , Дж·моль <sup>-1</sup>	r <sup>2</sup>	N	K	r <sup>2</sup>
Спектрофотометрическая сенсорная система (модельное соединение – <i>гидрохинон</i> )							
3	0,7 ± 0,1	3,6 ± 0,5	- 3139 ± 251	0,968	0,79 ± 0,06	0,23 ± 0,02	0,984
5	1,9 ± 0,2	5,6 ± 0,5	- 4238 ± 389	0,976	0,77 ± 0,06	0,84 ± 0,07	0,983
10	3,8 ± 0,3	9,5 ± 0,8	- 5503 ± 440	0,987	0,71 ± 0,06	1,3 ± 0,1	0,996
15	5,1 ± 0,4	15 ± 1	- 6686 ± 525	0,996	0,66 ± 0,05	1,5 ± 0,1	0,994
25	6,5 ± 0,5	25 ± 2	- 7833 ± 627	0,994	0,58 ± 0,05	1,5 ± 0,1	0,995
Флуоресцентная сенсорная система (модельное соединение – <i>пирокатехин</i> )							
3	(0,47 ± 0,02)·10 <sup>-1</sup>	1,45 ± 0,06	- 924 ± 37	0,974	(76 ± 3)·10 <sup>-2</sup>	(6,8 ± 0,3)·10 <sup>-2</sup>	0,989
5	(0,79 ± 0,03)·10 <sup>-1</sup>	1,40 ± 0,06	- 825 ± 33	0,978	(77 ± 3)·10 <sup>-2</sup>	(12,5 ± 0,5)·10 <sup>-2</sup>	0,984



10	$(1,72 \pm 0,07) \cdot 10^{-1}$	$1,09 \pm 0,04$	$- 223 \pm 9$	0,984	$(81 \pm 4) \cdot 10^{-2}$	$(29 \pm 1) \cdot 10^{-2}$	0,995
15	$(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-1}$	$1,05 \pm 0,04$	$- 115 \pm 5$	0,992	$(81 \pm 4) \cdot 10^{-2}$	$(38 \pm 1) \cdot 10^{-2}$	0,997
25	$(3,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-1}$	$1,04 \pm 0,04$	$- 97 \pm 4$	0,991	$(81 \pm 4) \cdot 10^{-2}$	$(47 \pm 2) \cdot 10^{-2}$	0,996

### **5.1.3. Аналитические характеристики определения фенольных соединений с использованием флуоресцентной биосенсорной системы на основе меченого хитозана**

В выбранных условиях формирования аналитического сигнала флуоресцентной биосенсорной системы для определения фенольных соединений на основе хитозана, меченого РБИТЦ, построили градуировочные зависимости и рассчитали метрологические характеристики методик определения пирокатехина, резорцина, гидрохинона, допамина и адреналина с использованием пероксидазной сенсорной системы, а также пирокатехина, резорцина и гидрохинона (т.е. только простейших изомерных фенольных соединений) с использованием лакказного и тирозиназного сенсоров (табл. 28). Установили, что разработанные флуоресцентные системы на основе разных ферментов характеризовались близкими аналитическими характеристиками: позволяли определять дигидроксифенолы и катехолы на уровне их концентраций 0,1 – 10 и 1 – 100 мкМ соответственно. Время реакции (необходимое для достижения 90% величины аналитического сигнала) не превышало 15 мин. Чувствительность определения изменялась в ряду пирокатехин > резорцин > гидрохинон > адреналин ~ допамин. Из литературы известно, что в растворе тушение флуоресценции наблюдается в обратной последовательности аналитов (допамин > пирокатехин и гидрохинон > пирокатехин [65]). Таким образом, полученная нами последовательность, по-видимому, обусловлена не акцепторными свойствами хинонов, а особенностями их взаимодействия с хитозаном.

**Таблица 28.** Метрологические характеристики методик определения простейших изомерных дигидроксифенолов и катехоламинов с использованием твердофазных флуоресцентных биосенсорных систем и различных ферментов на основе хитозана, меченого флуоресцентной меткой.

Определяемое соединение	Уравнение градуировочной зависимости	Диапазон линейности, мкМ	$c_{\min}$ , мкМ	Коэффициент корреляции, r	$s_r$ (при $c_n$ , $n = 4$ , $P = 0,95$ )
<i>Пероксидаза</i>					
Пирокатехин	$I = - (15 \pm 1) 10^6 c + (165 \pm 3)$	0,5 – 5,0	0,10	0,997	0,04
Резорцин	$I = - (9.7 \pm 0.4) 10^6 c + (166 \pm 2)$	0,5 – 7,5	0,15	0,996	0,03
Гидрохинон	$I = - (9.0 \pm 0.2) 10^6 c + (168 \pm 1)$		0,20	0,999	0,03
Допамин	$I = - (8.6 \pm 0.3) 10^5 c + (163 \pm 1)$	5,0 – 50,0	2,0	0,997	0,05
Адреналин	$I = - (11.0 \pm 0.4) 10^5 c + (163 \pm 2)$		1,5	0,997	0,06

<i>Лакказа</i>					
Пирокатехин	$I = - (16 \pm 1) 10^6 c + (161 \pm 4)$	0,5 – 5,0	0,10	0,988	0,03
Резорцин	$I = - (10.4 \pm 0.4) 10^6 c + (159 \pm 2)$	0,5 – 7,5	0,15	0,998	0,04
Гидрохинон	$I = - (8.8 \pm 0.1) 10^6 c + (163 \pm 1)$		0,20	0,998	0,04
<i>Тирозиназа</i>					
Пирокатехин	$I = - (18 \pm 1) 10^6 c + (161 \pm 6)$	0,5 – 5,0	0,10	0,988	0,05

При сравнении приведенных данных с метрологическими характеристиками методик с использованием твердфазной спектрофотометрической сенсорной системы (табл. 8, гл. 3) следует отметить, что использование новой индикаторной системы с флуоресцентным детектированием аналитического сигнала позволяет больше, чем на порядок понизить пределы обнаружения фенольных соединений различного строения (табл. 28). При этом возможности применения твердофазной флуоресцентной сенсорной системы в водно-органических и мицеллярных, мутных и окрашенных средах были аналогичными, что будет продемонстрировано в дальнейшем на примере анализа конкретных реальных объектов с матрицей сложного состава без предварительной (или минимальной) пробоподготовки.

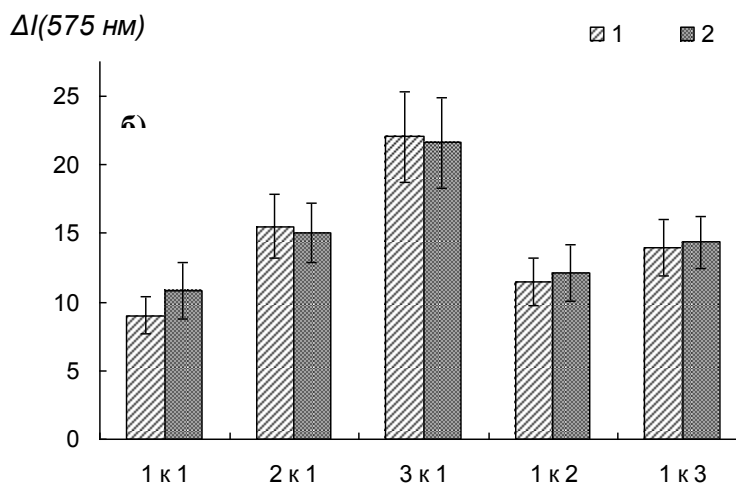
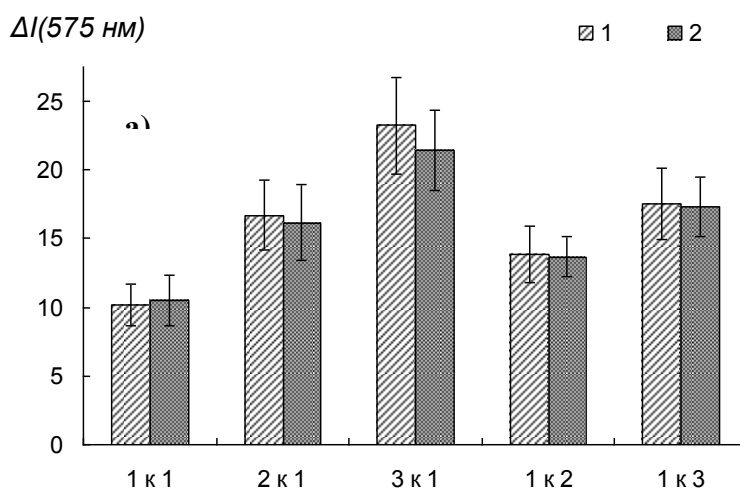
Аналитический сигнал флуоресцентного сенсорного устройства независимо от природы биокатализатора был стабилен не менее 2 недель при хранении сенсора в темном месте при температуре 4 °С. Важным результатом также является значительное сокращение времени анализа – с 24 ч до 10 мин.

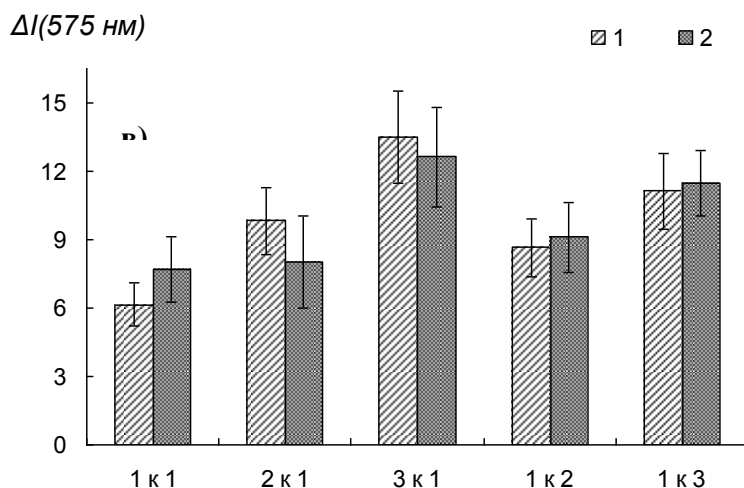
Как и ожидалось, флуоресцентные биосенсорные системы на основе хитозана, меченного родамина В изотиоцианатом, давали отклик не на все определяемые фенольные соединения. В частности, тирозиназная сенсорная система не реагировала на присутствии резорцина и гидрохинона. Очевидно, это связано с субстратной специфичностью иммобилизованных ферментов: тирозиназа катализирует окисление только *n*-замещенных фенольных соединений [302].

Подобно большинству описанных в литературе аналогов (но с регистрацией аналитического сигнала в растворе, а не в биочувствительном слое) разработанные нами флуоресцентные сенсорные системы на основе перечисленных ферментов не обладали селективностью по отношению к какому-то определенному фенольному соединению. Отклик чувствительного слоя сенсорного устройства был аддитивен при концентрациях аналитов, находящихся в рамках диапазона линейности градуировочных графиков (рис. 86). Поскольку коэффициенты чувствительности (численно равные величинам тангенсов углов наклона градуировочных графиков) различались по величине (табл.28), информация, полученная при анализе объекта, одновременно содержащего смесь фенолов, позволяет оценить только их суммарное

содержание в препарате.

Таким образом, разработанные биосенсорные системы на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой, могут быть использованы либо в анализе объектов, содержащих только одно какое-либо фенольное соединение (косметические и лекарственные препараты), либо для общей оценки содержания фенольных соединений (промышленные и сточные воды), а также при проведении анализа с использованием совокупности сенсоров, основанных на разных индикаторных реакциях. Анализ более сложных смесей (биологических жидкостей) требует создания более чувствительных, селективных и стабильных индикаторных систем.





**Рис. 86.** Проверка аддитивности отклика чувствительного слоя пероксидазной сенсорной системы в присутствии разных количеств пирокатехина и резорцина (а), пирокатехина и гидрохинона (б), резорцина и гидрохинона (в): (1) рассчитанное значение, (2) экспериментально полученное значение. Условия реакции: 0,05 М фосфатный буферный раствор, рН 7,5, пероксидазы 50 нМ, пероксида водорода - 100 мкМ, содержание РБИТЦ - 25 нг·см<sup>-2</sup>,  $\lambda_{ex}$  = 550 нм, время реакции 10 мин.

## 5.2. Оптическая сенсорная система для определения пероксидов различного строения на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой

Как и в случае твердофазной спектрофотометрической сенсорной системы отклик чувствительного слоя флуоресцентного устройства на основе пероксидазы пропорционален не только концентрации субстрата-восстановителя (фенольного соединения), но и концентрации субстрата-окислителя, поэтому перспективным представлялось его применение для определения пероксидов различного строения. В качестве субстрата-восстановителя использовали пирокатехин, поскольку отклик флуоресцентной сенсорной системы именно на это фенольное соединение был максимальным (наибольший коэффициент чувствительности определения из всех изученных фенольных соединений (табл. 28). Для исследования выбрали концентрацию пирокатехина равную 2,5 мкМ, которая соответствует середине диапазона линейности и, как правило, характеризуется минимальной погрешностью результатов измерений. Формулы изученных органических пероксидов - пероксида во-

дорода, пероксида мочевины, 2-бутанонпероксида, бензоилпероксида, *трет*-бутилгидропероксида приведены на рис. 52 (Глава 3).

Условия формирования флуоресцентного аналитического сигнала (концентрация пероксидазы, время реакции, концентрация и рН фосфатного буферного раствора) с использованием пероксидазной сенсорной системы на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой - изотиоцианатом родамина Б (РБИТЦ), оказались одинаковыми для всех изученных пероксидов и полностью совпали с таковыми для определения фенольных соединений в этой системе (табл. 26).

В этих условиях были построены градуировочные зависимости и рассчитаны метрологические характеристики методик определения пероксида водорода, пероксида мочевины, 2-бутанонпероксида, бензоилпероксида и *трет*-бутилгидропероксида. Результаты, полученные на этом этапе исследований, представлены в табл. 29. Для сравнения метрологических характеристик в этой же таблице приведены результаты определения тех же соединений, но с использованием спектрофотометрической регистрации аналитического сигнала.

Биосенсорная система на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой, позволяет определять пероксид водорода, пероксид мочевины, 2-бутанонпероксид, а также бензоилпероксид на уровне концентраций 1 – 100 мкМ, при этом отклик чувствительного слоя на присутствие нескольких пероксидов аддитивен. Методики определения *трет*-бутилгидропероксида характеризуются на порядок более низкой чувствительностью (определение на уровне 100 – 1000 мкМ) и значительно худшей воспроизводимостью результатов измерения. По чувствительности и воспроизводимости предложенное флуоресцентное сенсорное устройство сопоставимо с аналогами, основанными на измерении аналитического сигнала в растворе [190], и несколько превосходит трердофазный спектрофотометрический биосенсор 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. Результаты были настолько неудовлетворительными, что мы решили их не приводить. 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 мин. При этом спектрофотометрическая сенсорная система для определения пероксидов различного строения может быть использована для анализа более широкого круга объектов с матрицами сложного состава, в том числе в мицеллярных средах.

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 [303]. Перспективным подходом к решению обозначенной проблемы, по нашему мнению, переход от косвенных флуоресцентных сенсорных систем к прямым, в которых величина аналитического сигнала в твердофазном варианте измерений прямопропорционально зависит от концентрации аналитов в пробе.

**Таблица 29.** Метрологические характеристики методик определения пероксидов различного строения с использованием флуоресцентной сенсорной на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой, и спектрофотометрической сенсорной системы на основе хитозана.

Определяемое соединение	Уравнение градуировочной зависимости	Диапазон линейности, мкМ	$c_{\min}$ , мкМ	Коэффициент корреляции, r	$s_r$ (при $c_n$ , $n = 5, P = 0.95$ )
<i>Флуоресцентный сенсорная система</i>					
Пероксид водорода	$I = - (1,08 \pm 0,04) \cdot 10^6 c + (180 \pm 1)$	10 – 50	7	0,989	0,07
Пероксид мочевины	$I = - (1,5 \pm 0,1) \cdot 10^6 c + (200 \pm 2)$	10 – 75	5	0,985	0,06
2-Бутанонпероксид	$I = - (1,01 \pm 0,03) \cdot 10^6 c + (190 \pm 2)$	10 – 100	7	0,999	0,05
Бензоилпероксид	$I = - (0,92 \pm 0,07) \cdot 10^6 c + (212 \pm 5)$	25 – 100	10	0,989	0,06
<i>трет</i> -Бутилгидропероксид	$I = - (0,07 \pm 0,01) \cdot 10^6 c + (189 \pm 4)$	250 – 1000	100	0,989	0,12
<i>Спектрофотометрическая сенсорная система</i>					
Пероксид водорода	$A = (0,47 \pm 0,02) \cdot 10^3 c + (0,23 \pm 0,01)$	100 – 1000	45	0,996	0,08
Пероксид мочевины	$A = (1,82 \pm 0,09) \cdot 10^3 c + (0,16 \pm 0,02)$	25 – 250	10	0,996	0,08

2-Бутанонпероксид	$A = (0,57 \pm 0,05) \cdot 10^3 c + (0,12 \pm 0,01)$	100 – 1000	40	0,999	0,08
Бензоилпероксид	$A = (0,45 \pm 0,05) \cdot 10^3 c + (0,18 \pm 0,02)$	50 – 500	45	0,998	0,07
<i>трет</i> -Бутилгидро-пероксид	$A = (0,07 \pm 0,01) \cdot 10^3 c + (0,07 \pm 0,01)$	250 – 2500	230	0,990	0,07

## ГЛАВА 6. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ И ПЕРОКСИДОВ НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ДЕРИВАТИЗАЦИИ АНАЛИТОВ

Наиболее значимым ограничением применения ферментативных методов в анализе биологических объектов на содержание ряда субстратов оксидоредуктаз является недостаточная чувствительность существующих методик их определения [304]. Примерами таких соединений могут служить некоторые фенольные соединения – катехоламины и их метаболиты. В связи с тем, что содержание катехоламинов и их метаболитов в норме и при патологии различается, их возможно использовать в качестве диагностических маркеров как при проведении фундаментальных исследований, так и в клинической медицинской практике [303]. Среди методов, применяемых для диагностики нейродегенеративных и нейроэндокринных заболеваний по содержанию катехоламинов и их метаболитов в моче и крови, наиболее широко используют *хроматографические методы* в сочетании с электрохимическим (ЭХ) [305, 306] или масс-спектрометрическим (МС) [307, 308] детектированием. Благодаря предварительному разделению катехоламинов хроматографические методы обеспечивают комплексный анализ их смесей, обладают достаточной селективностью и низкими пределами обнаружения — на уровне 1 нМ. Однако, несмотря на высокую селективность, чувствительность, доступность используемых электрохимических детекторов, они характеризуются плохой воспроизводимостью, чувствительностью к флуктуациям в скорости потока подвижной фазы, загрязнением электрода, повышенными требованиями к природе подвижной фазы [309]. Для метода ВЭЖХ-ЭХ характерны высокие значения фонового шума по сравнению с полезным сигналом, не всегда достаточная чувствительность и низкая эффективность разделения компонентов [310, 311]. Метод ВЭЖХ-МС/МС характеризуется значительно большей чувствительностью определения катехоламинов и их метаболитов, однако недостаточно экспрессный и имеет ограничения, связанные с элюированием определяемых соединений в мертвое время, значительными шумовыми помехами и сложностью разрешения пиков [312–314].

В настоящее время большое внимание уделяется разработке различных *иммунохимических методов* определения катехоламинов и их метаболитов. Еще в

конце 1990-х годов несколько компаний - Immuno Biological Laboratories (Германия), Beckman Coulter (Чешская Республика), Immunodiagnostic Systems (Великобритания) и др. - стали выпускать коммерческие иммунохимические тест-наборы для диагностики нейроэндокринных катехоламинпродуцирующих опухолей [315]. В настоящее время доступны наборы для радиоиммунологического (РИА, изотопная метка ( $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ) иммуноферментного (ИФА, ферментная метка — биотин-стрептавидин, пероксидаза из корней хрена, щелочная фосфатаза) и флуороиммунологического методов анализа (ФИА, флуорофорная метка — флуоресцеин, родамин, европий) [316]. Однако, следует отметить, что в иммунохимических методах до сих пор не решена проблема получения специфических антител к отдельным катехоламинам, несмотря на периодически предпринимающиеся попытки их получения. Широко используемые антитела, индуцируемые конъюгатами бычий сывороточный альбумин-катехоламин, распознают функциональные группы бензольного кольца, но не чувствительны к структурным изменениям в непосредственной близости от концевой аминогруппы катехоламина. В результате этого они практически одинаково связывают как норадреналин, так и адреналин [317]. Таким образом, иммуноферментные методы не обеспечивают необходимую для диагностики заболеваний чувствительность и селективность определения катехоламинов и их метаболитов. В связи с этим были предприняты попытки создания комбинированного подхода к определению катехоламинов и их метаболитов, сочетающего предварительное хроматографическое разделение с последующим иммунохимическим детектированием диагностических маркеров в анализируемых биологических образцах [318].

Несмотря на кажущуюся изученность проблемы и наличие большого набора методов, позволяющих определять катехоламины в плазме крови и моче, относительная длительность анализа [319, 320], в течение которого определяемые соединения нестабильны, возможность появления погрешностей, связанных с низкой воспроизводимостью и плохим разрешением пиков [321], обуславливают многочисленные диагностические ошибки, приводящие к неэффективному лечению.

В качестве альтернативы хроматографическим и иммунохимическим методам определения маркеров нейромедиаторного обмена среди современных инстру-

ментальных методов анализа, используемых для определения индивидуальных катехоламинов и их метаболитов в биологических жидкостях, распространение получили *электрохимические и спектроскопические методы* [307].

В последние 10 – 20 лет активно ведутся разработки различных *электрохимических сенсоров* для определения маркеров нейромедиаторного обмена [322–330]. Действие большинства таких электрохимических сенсоров основано на модификации индикаторных электродов предварительно синтезированными соединениями с определенной структурой, обеспечивающими селективное определение катехоламинов, например молекулярными отпечатками ДНК [331], полимерами [332, 333], искусственными рецепторами [334], различными нанотрубками и наностержнями, модифицированными органическими молекулами - полиэтиленимином [323, 326], циклодекстрином [322], ионными жидкостями [330], комплексами металлов [329]. Методики определения катехоламинов и их метаболитов электрохимическими методами характеризуются в основном средней чувствительностью - на уровне 0,01 – 1 мкМ. Кроме того, перед проведением определения катехоламинов необходима тщательная подготовка проб реального объекта, а выбор методики, используемой для извлечения катехоламинов и их метаболитов, во многом определяется природой биообъектов (ткани, биологические жидкости, клетки). В противном случае не удастся обеспечить высокую селективность и необходимую чувствительность определения катехоламинов в биологических объектах, что затрудняет анализ *in vivo* [335]. Без учета времени, необходимого для подготовки образца, для анализа требуется обычно от 5 до 15 мин [336].

Трудность определения катехоламинов в биологических жидкостях обусловлена тем, что у здорового человека их концентрации изначально очень низки - на уровне 1 нМ, а при некоторых патологических нарушениях в ряде случаев они снижаются еще на порядок, например в случае болезней Паркинсона и Альцгеймера. Кроме того, следует учитывать, что в крови катехоламины быстро окисляются моноаминоксидазами тромбоцитов, в связи с чем определение маркеров нейромедиаторного обмена в организме (особенно при развитии кризисных состояний) должно быть очень быстрым (в течение 15 – 30 мин).

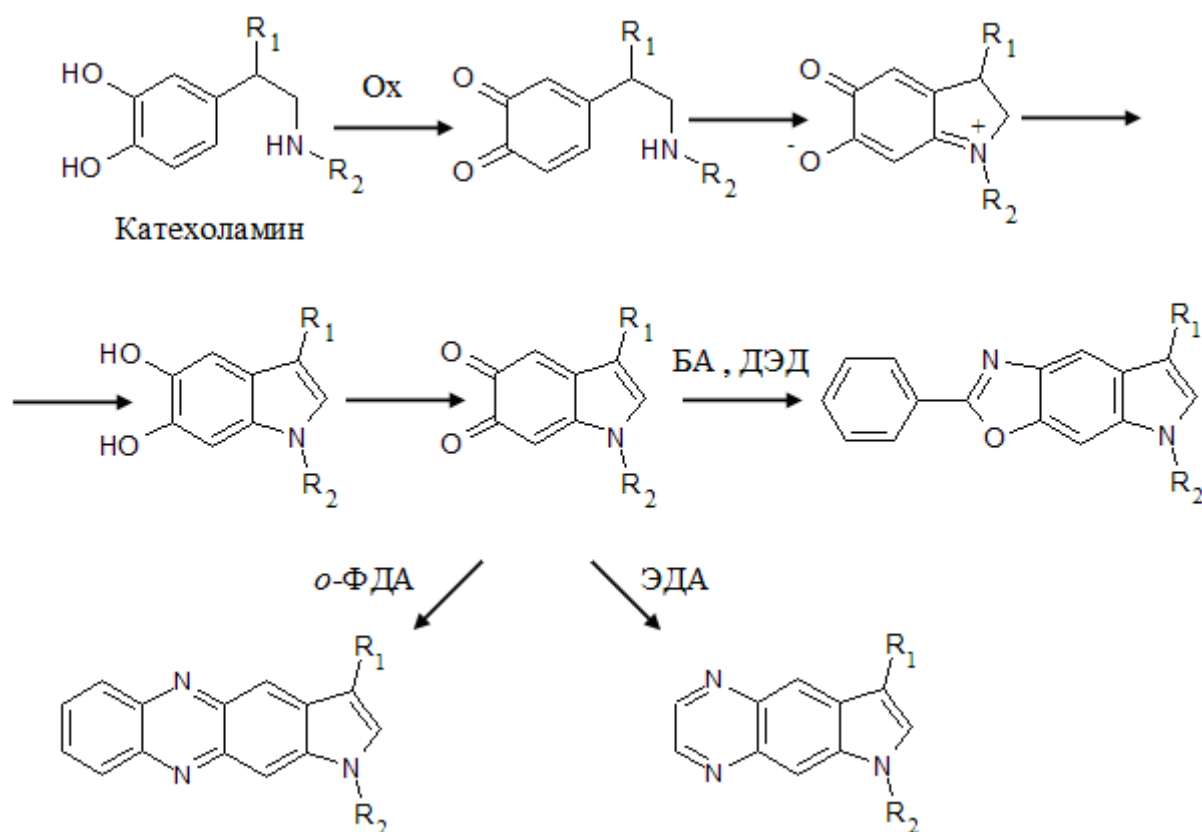
По этой причине актуальна разработка простых, экспрессных, доступных, селективных и чувствительных сенсорных систем для определения катехоламинов и их метаболитов в различных биологических жидкостях.

### **6.1. Флуоресцентная сенсорная система для определения катехоламинов на основе реакции их дериватизации с различными аминами**

Для повышения не только чувствительности (до уровня наномолярных концентраций), но и селективности флуоресцентного определения катехоламинов перспективен прием, заключающийся в дериватизации этих соединений различными органическими молекулами [304].

Процесс дериватизации катехоламинов с участием ароматических и алифатических аминов, таких как бензиламин (БА), 1,2-дифенилэтилендиамин (ДЭД), этилендиамин (ЭДА) и *o*-фенилендиамин (*o*-ФДА), включает последовательное протекание нескольких реакций: окисление определяемого соединения и взаимодействие продукта окисления с дериватирующим агентом. Окисление катехоламинов осуществляют в присутствии ферроцианида калия [337–340, 342].

Реакции дериватизации продуктов окисления катехоламинов ароматическими и алифатическими аминами протекают по схеме 7. Конечным продуктом дериватизации продуктов окисления катехоламинов этилендиамином и *o*-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 ( $\lambda_{ex} = 340 - 360$  нм,  $\lambda_{em} = 480 - 490$  нм) [337-342].



**Схема 7.** Схема реакций образования флуоресцирующих производных по реакциям продуктов окисления катехоламинов с БА, ДЭД, ЭДА и *o*-ФДА.

Согласно схеме 7, на первой стадии катехоламин окисляется до соответствующего хинона с открытой цепью, который далее вступает в реакцию внутримолекулярного присоединения по Михаэлю. В щелочной среде образовавшийся аддукт Михаэля мгновенно восстанавливается до гидроксииндола, который далее окисляется с образованием соответствующего *o*-хинона с закрытой цепью. Конечный продукт окисления взаимодействует с дериватизирующими агентами с образованием интенсивно флуоресцирующих производных бензоксазола или хиноксалина.

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<sup>0</sup>С), время анализа занимает не менее 30-45 мин [337-342].



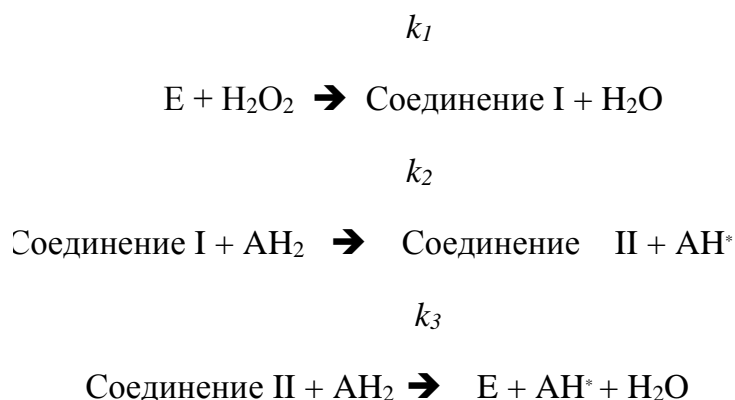
Нами предложен новый прием для преодоления вышеуказанных недостатков, заключающийся в замене неорганического окислителя - гексацианоферрата калия на более эффективную биокаталитическую систему на основе пероксидазы. Мы предположили, что использование фермента на первой стадии окисления фенольных соединений – катехоламинов позволит сократить время реакции и повысить технологичность процесса (исключить необходимость нагревания и использования органических растворителей); а создание твердофазной флуоресцентной сенсорной системы, действие которой основано на ферментативной дериватизации катехоламинов и их метаболитов, откроет новые возможности при определении перечисленных аналитов в объектах на основе матриц сложного состава, в том числе в биологических жидкостях.

#### **6.1.1. Выбор условий получения флуоресцирующих производных катехоламинов с различными аминами по реакции ферментативной дериватизации**

Как уже было отмечено, окисление фенольных соединений, в том числе катехоламинов, катализируют пероксидаза из корней хрена, грибная тирозиназа и лакказы [172-176]. При этом в случае пероксидазного катализа в роли субстрата-окислителя выступает пероксид водорода, а в случае тирозиназы и лакказы – растворенный кислород воздуха. Лакказа изначально не подходила для проведения двухстадийной реакции дериватизации катехоламинов, поскольку этот фермент проявляет максимальную каталитическую активность в интервале pH 3 – 4, в то время как для осуществления второй стадии процесса дериватизации катехоламинов с ДЭД и БА требуемый pH среды, согласно литературным данным [337-340], составляет 7 – 8 и 10 – 11 соответственно. В связи с этим сравнивали эффективность окисления катехоламинов (на примере допамина и адреналина) в присутствии только двух ферментов – пероксидазы и тирозиназы. Изучение проводили в оптимальных условиях для получения дериватизатов выбранных соединений с ДЭД [340]: 0,5 М глициновый буферный раствор pH 8,0, концентрации пероксидазы и лакказы - 1 мкМ, допамина и адреналина – 50 мкМ, пероксида водорода – 100 мкМ.

Установили, что в указанных условиях происходит быстрое накопление допамин- и адреналин-*o*-хинонов, а через 5 мин от начала реакций с участием обоих ферментов кинетические кривые выходят на плато. Скорость реакций контролировали спектрофотометрически при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения продуктов окисления допамина и адреналина, 465 и 480 нм соответственно. Положение максимумов в спектре не зависело от природы биокатализатора в системе.

Как известно [252], реакции пероксидазного и тирозиназного окисления катехоламинов протекают по «пинг-понг» механизму, при котором один или несколько продуктов высвобождаются еще до того, как все субстраты свяжутся с ферментом. В случае пероксидазного окисления субстрата-восстановителя пероксидом водорода реакция протекает в три стадии (схема 8). На первой стадии фермент (E) взаимодействует с пероксидом водорода с образованием комплекса (Соединения I). На второй стадии полученный комплекс реагирует с субстратом (АН<sub>2</sub>) с образованием нового комплекса (Соединение II) и продукта реакции (АН<sup>•</sup>), на третьей стадии комплекс (Соединение II) взаимодействует с субстратом с образованием фермента и продукта реакции (АН<sup>•</sup>).



**Схема 8.** Схема «пинг-понг» механизма на примере пероксидазы [252].

Самой медленной стадией, лимитирующей весь процесс, является реакция между Соединением II и АН<sub>2</sub>, поэтому для оценки эффективности ферментативного катализа превращения субстратов, подчиняющегося «пинг-понг» механизму,

следует рассчитать величину эффективной константы скорости реакции второго порядка  $k_3$  – стадии превращения катехоламина в его хиноидную форму. Для нахождения константы  $k_3$  измерили скорости накопления допамин- и адреналин-о-хинонов при разных начальных концентрациях допамина и адреналина. Полученные результаты представлены в табл. 30.

**Таблица 30.** Сопоставление констант  $k_3$ , характеризующих эффективность пероксидазного и тирозиназного окисления КА

Фермент	Субстрат	$k_3, \pm \Delta k_3$ (М·с) <sup>-1</sup> · 10 <sup>-3</sup>	$s_r$ (n=5; P=0,95)
<i>Пероксидаза</i>	Адреналин	17±2	0,11
	Допамин	40±6	0,14
<i>Тирозиназа</i>	Адреналин	6±1	0,17
	Допамин	22±2	0,09

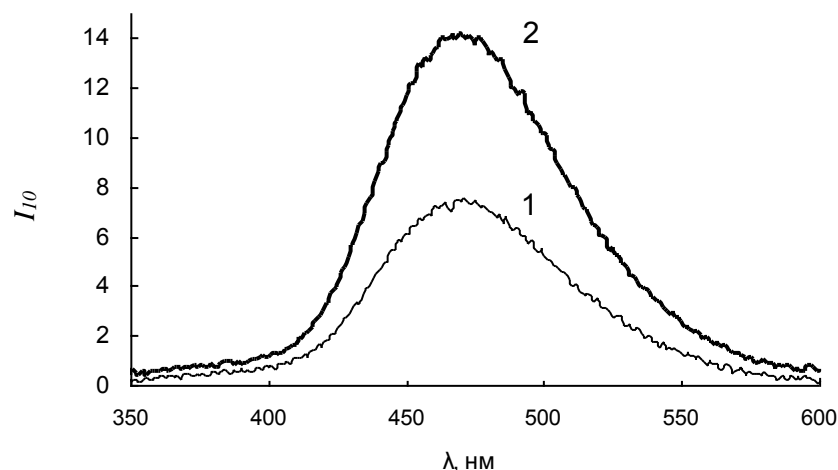
Из полученных экспериментальных данных следует, что пероксидазный катализ в целом эффективнее тирозиназного, так как константы  $k_3$  пероксидазного окисления допамина и адреналина в условиях их дериватизации с ДЭД в 2 и 3 раза больше, соответственно, констант  $k_3$  в системах их тирозиназного окисления. Поэтому в дальнейшем для разработки ферментативных методик определения катехоламинов по их флуоресцирующим производным в качестве катализатора процессов дериватизации была выбрана пероксидаза из корней хрена.

На следующем этапе работы были подобраны условия получения флуоресцирующих производных катехоламинов (допамина и адреналина). Для этого изучили влияние на скорость ферментативной дериватизации указанных соединений с ДЭД и БА рН и концентрации буферных растворов, концентрации реагентов, природы растворителя и его содержания.

Буферные растворы для ферментативной дериватизации катехоламинов и их метаболитов с ДЭД и БА выбрали на основании данных литературы [337-342], согласно которым эти реакции протекают с наибольшими выходами при использовании глицинового и CAPS буферных растворов соответственно. Использование других буферных растворов для дериватизации катехоламинов и их метаболитов в присутствии пероксидазы (фосфатного в случае дериватизации с ДЭД и глицинового – с БА) оказалось менее эффективным. Значения pH и концентрации буферных растворов также совпали с литературными, их значения представлены в табл. 31.

Процесс неферментативной дериватизации (в присутствии гексацианоферрата калия) катехоламинов с ДЭД проводят в водной среде, а адреналина с БА – при содержании 50 об. % метанола в системе [338-342]. Однако в присутствии биологического катализатора добавка в реакционную смесь 10 об. % метанола уже в два раза снижала выход флуоресцентного продукта – дериватизата катехоламинов с ароматическими аминами, что, вероятнее всего, обусловлено денатурацией фермента в присутствии этого полярного растворителя. При этом установлено, что такой растворитель как ДМСО значительно усиливает флуоресценцию допамина [343], поэтому мы изучили влияние ДМСО на интенсивность флуоресцентного сигнала продуктов дериватизации допамина с ДЭД и адреналина с БА.

Установили, что в присутствии 30 об.% ДМСО в системе флуоресцентные сигналы дериватизата допамина с ДЭД и адреналина с БА возрастают почти в 2 раза (рис. 86). При большем содержании органического растворителя интенсивность флуоресценции продукта дериватизации уменьшается вследствие инактивации биокатализатора органическим растворителем.



**Рис. 86.** Спектры флуоресценции продуктов дериватизации допамина с ДЭД в отсутствие (1) и в присутствии (2) 30 об.% ДМСО (концентрации пероксидазы – 1 мкМ, пероксида водорода – 100 мкМ, ДЭД – 3 мМ, допамина – 0,3 мкМ),  $\lambda_{ex} = 340$  нм, ширины входной и выходной щели – 10 нм.

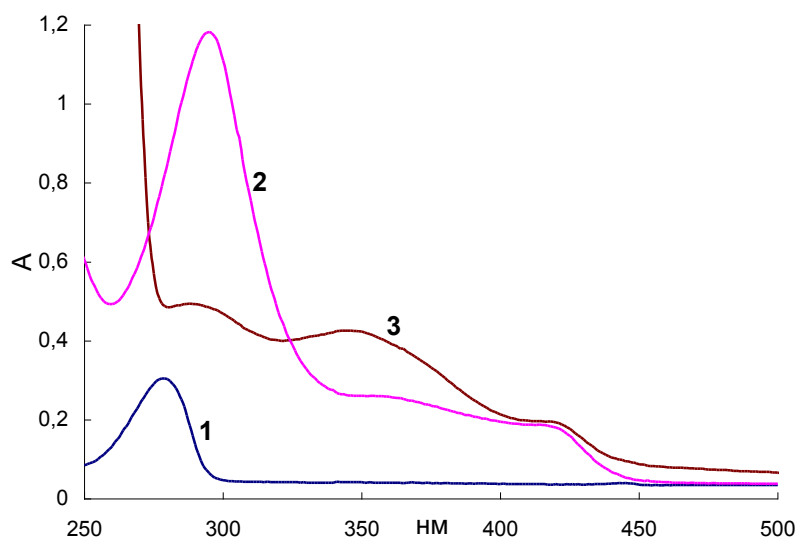
Далее подобрали концентрации всех реагентов в системах дериватизации катехоламинов с ДЭД и БА (табл.31).

**Таблица 31.** Оптимальные условия проведения реакций дериватизации допамина и адреналина с ДЭД и адреналина с БА

Параметр	Дериватизирующий реагент	
	<i>ДЭД</i>	<i>БА</i>
Буферный раствор	0,5 М глициновый	0,1 М CAPS
pH	8,0	11,0
Растворитель	Водный раствор или в присутствии 30 об. % ДМСО	
Среагента, мМ	3	3
$C_{H_2O_2}$ , мкМ	100	100
$\lambda_{ex}$ , нм	340	356
$\lambda_{em}$ , нм	470	485

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что использование биокаталитической системы на основе пероксидазы для окисления катехоламинов вместо неорганического ферроцианида калия позволяет повысить эффективность процесса образования их флуоресцирующих производных, сократить время реакции с 30-45 мин до 5 мин; исключает длительное термостатирование реакционной смеси при повышенной температуре в присутствии токсичных растворителей.

Идентичность состава продуктов дериватизации катехоламинов с ДЭД и БА на примере адреналина в присутствии пероксидазы и ферроцианида калия доказали методами спектрофотометрии (рис. 87) и ВЭЖХ-МС (рис. 88).

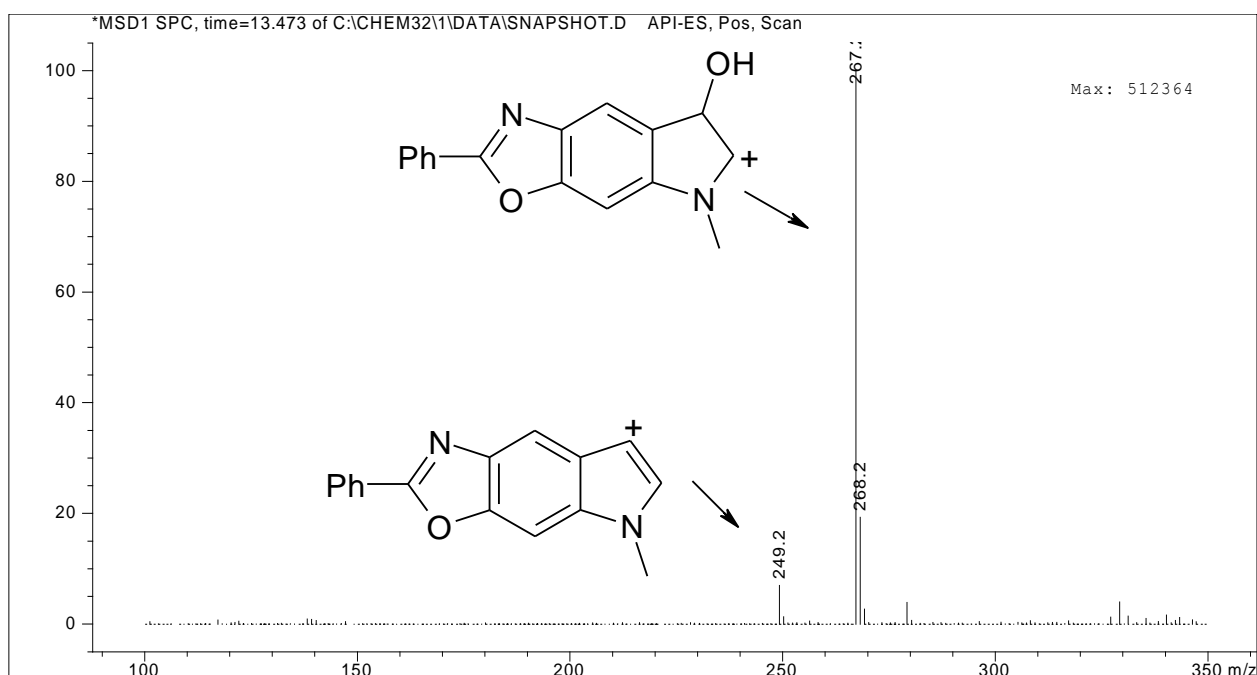


**Рис. 87.** Спектры поглощения адреналина (1), продуктов его пероксидазного окисления (2) и дериватизации с БА (3) (концентрация адреналина - 30 мкМ; время реакции 5 мин).

Из приведенных спектров поглощения видно, что в случае пероксидазного окисления адреналина наблюдается сильное поглощение при 300 нм, что соответствует продукту его окисления - *o*-хиноидному фрагменту в молекуле катехоламинов. В спектре поглощения продуктов дериватизации адреналина имеется макси-

мум при 350 нм, что соответствует длине волны возбуждения флуоресценции дериватизата адреналина, полученного в присутствии ферроцианида калия [340]. Следовательно, полученные спектральные данные свидетельствуют об идентичности продукта дериватизации АД, полученного в присутствии как ПХ, так и ферроцианида калия.

Для более строгого доказательства идентичности продуктов реакции дериватизации катехоламинов, полученных в присутствии пероксидазы с продуктами неферментативной дериватизации, изучили масс-спектры: пики молекулярных ионов, соответствующие конечным продуктам дериватизации адреналина с БА, являющимся бензоксазольными производными, представлены в спектре (рис. 88).



**Рис. 88.** Масс-спектр продуктов дериватизации адреналина с БА. Условия реакции: 0,1 М CAPS буферный раствор, pH 11, концентрации пероксидазы – 1 мкМ, БА – 3 мМ, пероксида водорода – 100 мкМ.

В выбранных условиях получения флуоресцирующих производных катехоламинов разработали ферментативные методики их определения, метрологические характеристики которых в сравнении с таковыми в случае применения в процессе дериватизации ферроцианида калия, представлены в табл. 32.

**Таблица 32.** Метрологические характеристики методик определения КА и их метаболитов по флуоресценции их производных, полученных ферментативным методом (I), и методом ВЭЖХ [340] с использованием  $K_3[Fe(CN)_6]$  (II)

Методика	Катехоламин	Реагент	$c_{мин}$ , нМ	Диапазон определяемых концентраций, мкМ	$t_{изм}$ , мин
I	Допамин	ДЭД	5	0,03 – 0,30	5
II			20	0,2 – 2,0	30
I	Адреналин	БА	3	0,03 – 0,30	5
II			5	0,05 – 0,50	45

Таким образом, нами разработана новая индикаторная система для определения наномолярных концентраций катехоламинов на основе дериватизации продуктов их пероксидазного окисления ароматическими, которая не уступает по чувствительности литературным аналогам [337-342], при этом значительно превосходит их по экспрессности, простоте и экологичности проведения анализа.

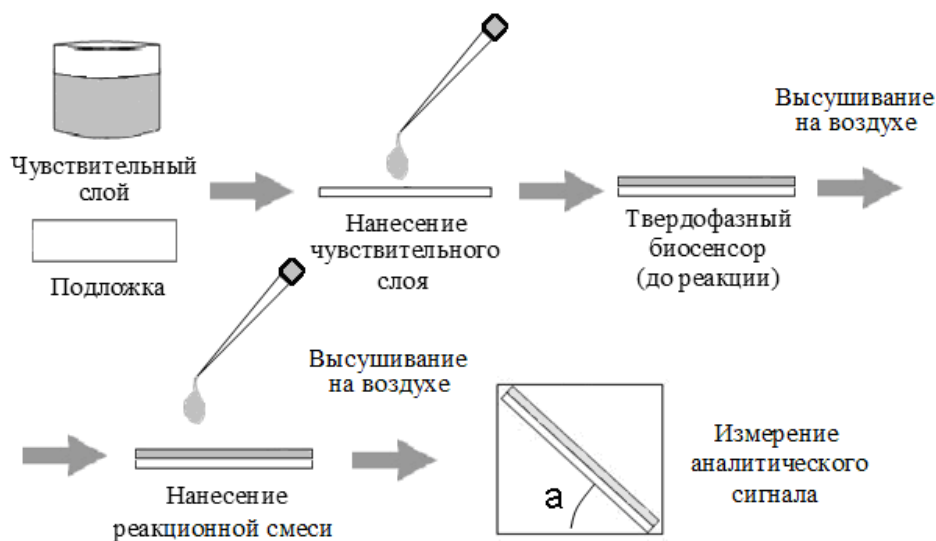
### **6.1.2. Выбор условий получения флуоресцирующих производных катехоламинов в биочувствительном слое на основе хитозана**

Продукты дериватизации катехоламинов и их метаболитов с БА и ДЭД характеризуются максимумами флуоресценции в области 450 – 500 нм (при  $\lambda_{ex} \sim 350$  нм). В то же время использование твердофазной сенсорной системы предложенной нами конструкции невозможно при  $\lambda_{em} < 500$  нм по инструментальным причинам (Глава 2). Однако, как было показано в этой же главе, при измерении аналитиче-



ского сигнала на поверхности максимум флуоресценции может смещаться как в более коротковолновую, так и в более длинноволновую области относительно положения этого же максимума в растворе. Для выбора подходящего дериватирующего агента при проведении реакции в твердофазном (сенсорном) варианте предварительно изучили возможность использования четырех дериватирующих аминов - БА, ДЭД, *o*-ФДА и ДЭД.

Чувствительный слой биосенсорного устройства представлял собой смесь хитозана и БА, равномерно нанесенную и высушенную на поверхности стеклянной пластинки. На этом этапе для проведения индикаторной реакции реакцию смесь, состоящую из буферного раствора, пероксидазы, адреналина и пероксида водорода, капельным нанесением равномерно распределяли по поверхности горизонтально расположенного биосенсора (схема 9). В качестве оптимальных для проведения реакции выбрали условия, приведенные в табл. 32.

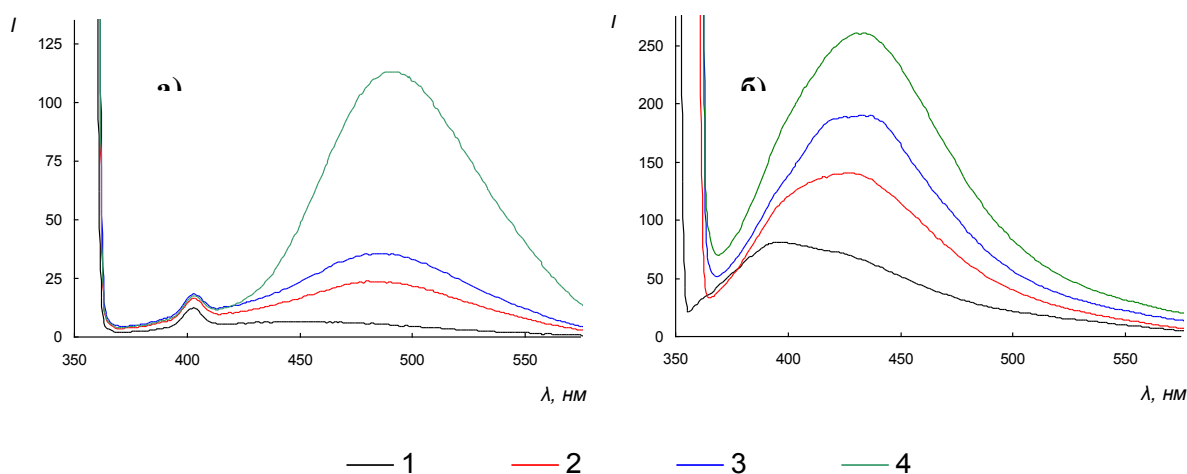


**Схема. 9.** Схема капельного нанесения реакционной системы на поверхность биосенсорного устройства.

Замена классической схемы проведения индикаторной реакции (погружение сенсорного устройства в раствор) на капельное нанесение связана с тем, что на этом этапе дериватирующий агент и продукт дериватизации могли вымываться из хитозановой пленки при выдерживании сенсорного устройства в реакционной

системе, что не позволило бы правильно трактовать полученные экспериментальные данные. После испарения жидкости биосенсорное устройство устанавливали в кюветное отделение флуориметра и в режиме отражения регистрировали спектр флуоресценции пленки на его поверхности.

На рис. 89 приведены спектры флуоресценции продуктов ферментативной дериватизации адреналина с БА, зарегистрированные при проведении индикаторной реакции в растворе и на поверхности. Увеличение концентрации фенольного соединения сопровождалось ростом интенсивности флуоресценции при 490 и 440 нм, соответственно, при этом максимум флуоресценции дериватизата на поверхности смещался в коротковолновую область спектра относительно максимума, зарегистрированного в растворе. Форма и положение максимумов флуоресценции зависели от длины волны возбуждающего излучения при измерении сигнала на поверхности и не зависели при его измерении в растворе, то есть максимумы флуоресценции, зарегистрированные на поверхности, могли быть обусловлены как полезным аналитическим, так и фоновым сигналами.



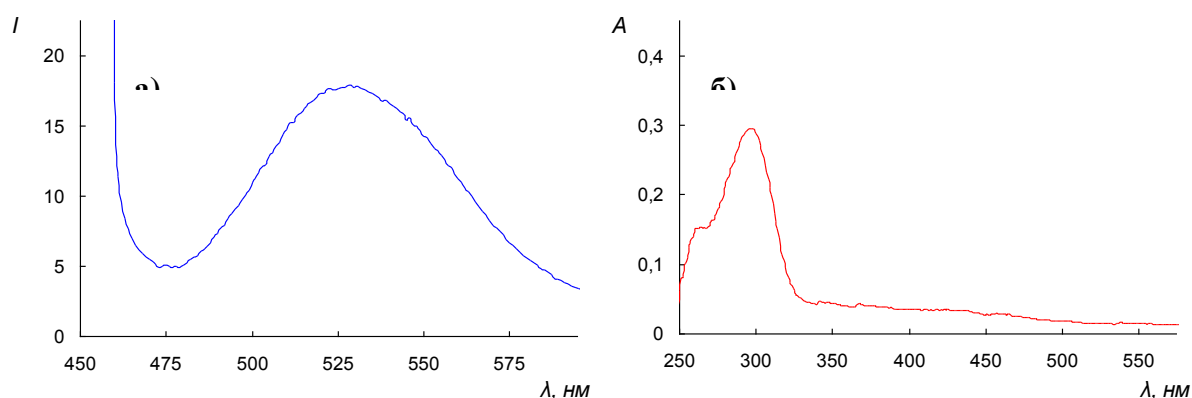
**Рис. 89.** Спектры флуоресценции продуктов ферментативной дериватизации адреналина с БА в растворе (а) и на поверхности (б) при разной концентрации фенольного соединения. Условия реакции: содержание хитозана –  $0,4 \text{ г}\cdot\text{см}^{-2}$ ,  $0,05 \text{ М}$  фосфатного буферного раствора рН 10, концентрации пероксидазы –  $1 \text{ нМ}$ , пероксида водорода –  $100 \text{ мкМ}$ , бензиламина –  $50 \text{ мкМ}$ , адреналина –  $0$  (1),  $0,1$  (2),  $1$  (3),  $5$  (4)  $\text{мкМ}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ нм}$ , время реакции 3 мин.

При этом установили, что при регистрации спектров флуоресценции на поверхности фоновый сигнал имел значительную величину даже в отсутствие АД. Таким образом, применение БА и ДЭД в качестве дериватирующих агентов на этом этапе работы представлялось технологически нецелесообразным. Для дальнейшей работы в качестве дериватирующих агентов использовали только *o*-ФДА и ЭДА, дериватизаты которых, согласно литературным данным, флуоресцируют в области 500 – 600 нм.

### **6.1.3. Флуоресцирующие производные фенольных соединений с *o*-ФДА и ЭДА в чувствительном слое пероксидаза-хитозан: выбор условий формирования аналитического сигнала в твердой фазе**

Поскольку применение реакции дериватизации катехоламинов с ароматическими аминами значительно улучшило чувствительность их определения в растворе, а использование биологического катализатора повысило экспрессность анализа и позволило проводить определение при комнатной температуре в отсутствие высокотоксичных растворителей, то мы решили использовать этот прием для определения не только катехоламинов (допамина и адреналина), но и их метаболитов (гомованилиновой и ванилилминдальной кислот), а также других *o*-дигидроксифенольных соединений – резорцина, пирокатехина и гидрохинона, которые по своей структуре также могли образовывать флуоресцирующие производные в выбранных индикаторных системах.

Как показано на рис. 90, иммобилизованный в хитозановой пленке *o*-ФДА обладает слабой собственной флуоресценцией в длинноволновой области спектра ( $\lambda_{ex} = 450$  нм,  $\lambda_{em} = 525$  нм). На спектре поглощения полимерного слоя хитозан – *o*-ФДА, зарегистрированном относительно чистой пластинки из кварцевого стекла, наблюдались максимумы при 265 нм (поглощение хитозана) и 290 нм (поглощение *o*-ФДА), а также плечо в области 350 – 500 нм (поглощение продуктов окисления *o*-ФДА). Следовательно, наличие фонового сигнала связано с частичным окислением *o*-ФДА.



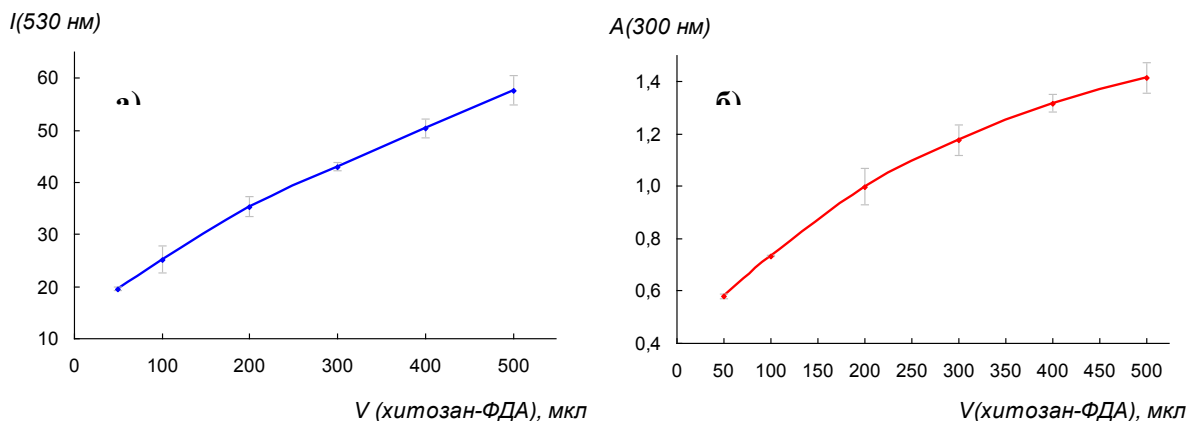
**Рис. 90.** Спектры флуоресценции (а) и поглощения (б) пленок хитозан – *o*-ФДА. Условия: концентрация *o*-ФДА – 100 мкМ, объем смеси хитозана с *o*-ФДА - 200 мкМ,  $\lambda_{ex} = 450$  нм.

Для достижения высокой чувствительности определения требовалось подобрать такие условия, при которых интенсивность флуоресценции фона (в сенсорном варианте) была бы минимальной, а количество дериватирующего агента достаточным для образования флуоресцирующего производного. Для этого на поверхность стеклянной пластинки наносили смесь хитозана и *o*-ФДА разного состава и регистрировали спектры поглощения и флуоресценции полученных пленок (т.е. спектры фона без проведения индикаторной реакции). Одновременная регистрация спектров поглощения и флуоресценции позволяла определить, связаны ли полученные закономерности с инструментальными особенностями метода флуоресценции или являются следствием изменения формы дериватирующего агента.

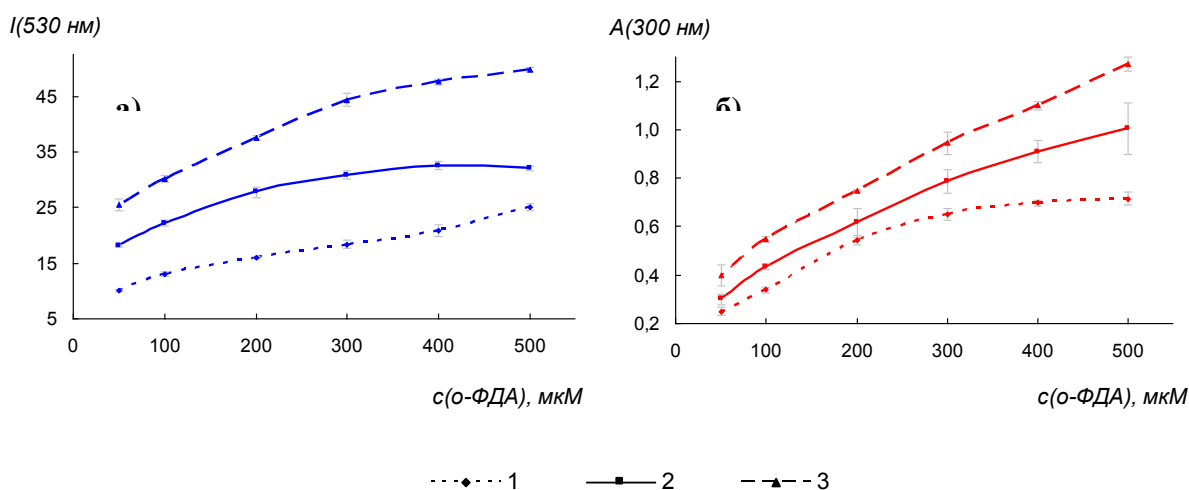
В случае ЭДА таких исследований не требовалось, поскольку на аналогичных спектрах в его присутствии, которые представлены на рис. 90, не было обнаружено никаких характеристических максимумов. По этой причине специальные исследования по уменьшению фона при использовании ЭДА в сенсорном варианте не проводили.

На рис. 91 – 94 приведены зависимости интенсивностей флуоресценции и поглощения хитозановых пленок от объема формирующей их смеси (в диапазоне 60–500 мкл) при фиксированных соотношениях компонентов в ней и фиксированной концентрации *o*-ФДА; от концентрации *o*-ФДА (в диапазоне 50 – 500 мкМ) при разных объемах смеси и фиксированном соотношении компонентов; от соотноше-

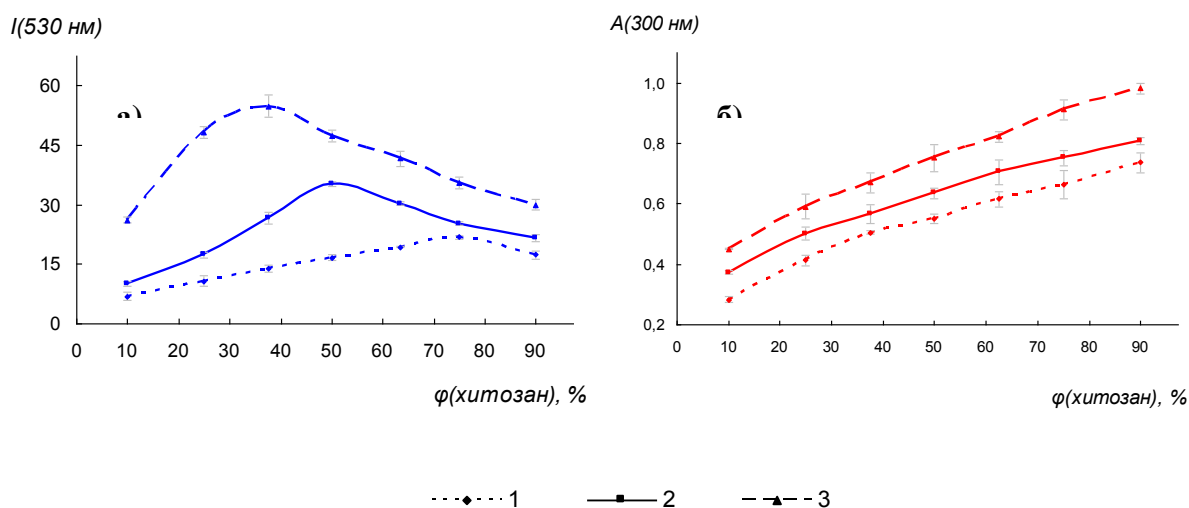
ния компонентов (варьировали объемную долю полимера в диапазоне 10 – 90%) при разных объемах смеси и фиксированной концентрации *o*-ФДА; а также от концентрации *o*-ФДА при разных объемах и соотношениях компонентов в смеси. Во всех случаях с увеличением объема смеси, а, следовательно, и толщины пленки интенсивность флуоресценции и величина поглощения симбатно возрастали. Поглощение пленки (при 300 нм) росло по мере увеличения концентрации дериватирующего агента.



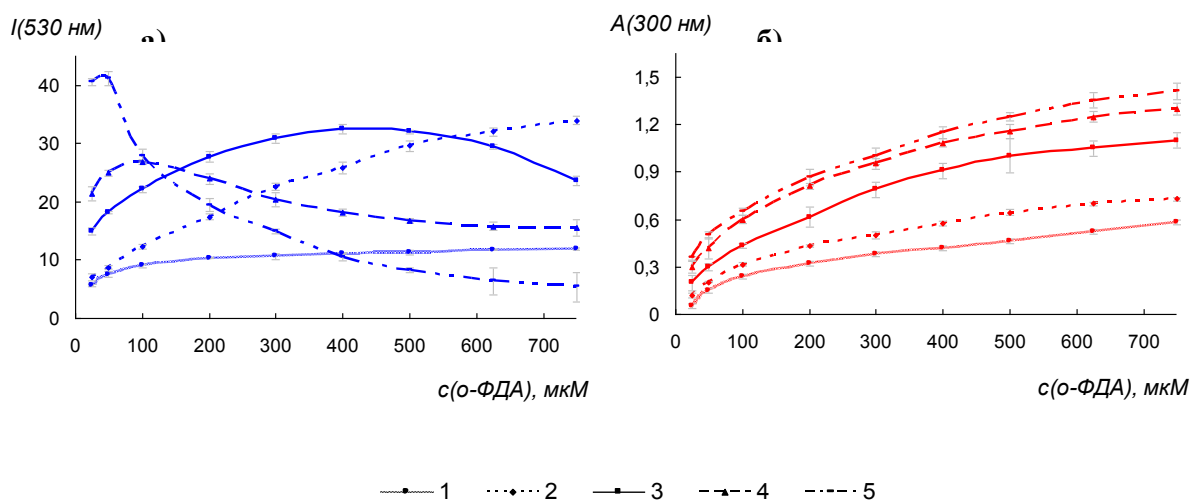
**Рис. 91.** Зависимость интенсивности флуоресценции (а) и поглощения (б) пленки хитозан – *o*-ФДА от объема смеси, формирующей чувствительный слой; концентрации *o*-ФДА - 200 мкМ,  $\lambda_{ex} = 450$  нм,  $\lambda_{em} = 525$  нм,  $\lambda_{abs} = 300$  нм.



**Рис. 92.** Зависимости интенсивности флуоресценции (а) и поглощения (б) пленки хитозан – *o*-ФДА от концентрации *o*-ФДА в ней при разных объемах смеси, формирующей чувствительный слой: (1) 50, (2) 100, (3) 200 мкМ;  $\lambda_{ex} = 450$  нм,  $\lambda_{em} = 525$  нм,  $\lambda_{abs} = 300$  нм.



**Рис. 93.** Зависимости интенсивности флуоресценции (а) и поглощения (б) пленки хитозан – *o*-ФДА от объемной доли хитозана в ней при разных объемах смеси, формирующей чувствительный слой: (1) 50, (2) 100, (3) 200 мкл; концентрация *o*-ФДА - 200 мкМ,  $\lambda_{ex} = 450$  нм,  $\lambda_{em} = 525$  нм,  $\lambda_{abs} = 300$  нм.

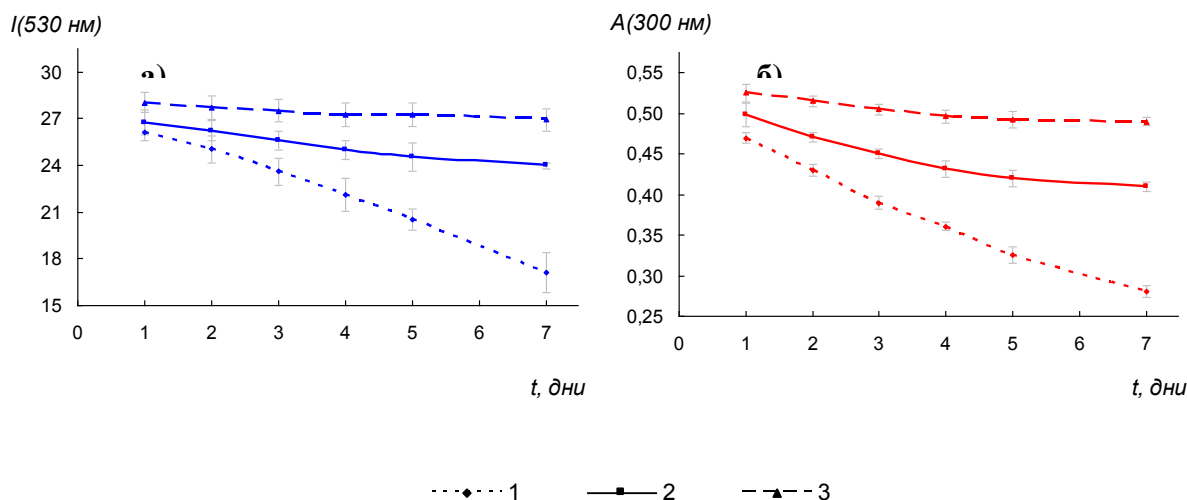


**Рис. 94.** Зависимости интенсивности флуоресценции (а) и поглощения (б) пленки хитозан – *o*-ФДА от концентрации *o*-ФДА в ней при разной объемной доле хитозана: (1) 10, (2) 25, (3) 50, (4) 75, (5) 90%; объем смеси хитозан – *o*-ФДА - 200 мкл,  $\lambda_{ex} = 450$  нм,  $\lambda_{em} = 525$  нм,  $\lambda_{abs} = 300$  нм.

При этом зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации *o*-ФДА и объемной доли хитозана в пленке проходили через максимум. Следует отметить, что в целом величина фонового сигнала уменьшалась при увеличении объемной доли полимера в пленке. На основании полученных экспериментальных

данных сделали вывод, что для уменьшения собственной флуоресценции компонентов чувствительного слоя сенсора на основе *o*-ФДА хитозановая пленка, формирующая этот чувствительный слой, должна быть тонкой и содержать как можно больше полимера.

Установили, что интенсивность флуоресценции пленок состава хитозан – *o*-ФДА уменьшалась при хранении, причем при комнатной температуре стабильность сигнала сохранялась не более суток (рис. 95). На основе наблюдаемого снижения величины поглощения при 300 нм и значительного увеличения поглощения в области 350 – 450 нм с течением времени, сделали вывод, что уменьшение фонового сигнала связано с окислением дериватизирующего агента и образованием 2,3-диаминофеназина, слабо флуоресцирующего при  $\lambda_{ex} = 450$  нм.



**Рис. 95.** Зависимости интенсивности флуоресценции (а) и поглощения (б) пленки хитозан – *o*-ФДА от времени ее хранения при разной температуре: (1) 20, (2) 0, (3) -20°C; объем смеси хитозан – *o*-ФДА - 200 мкл, концентрация *o*-ФДА - 200 мкМ,  $\lambda_{ex} = 450$  нм,  $\lambda_{em} = 525$  нм,  $\lambda_{abs} = 300$  нм.

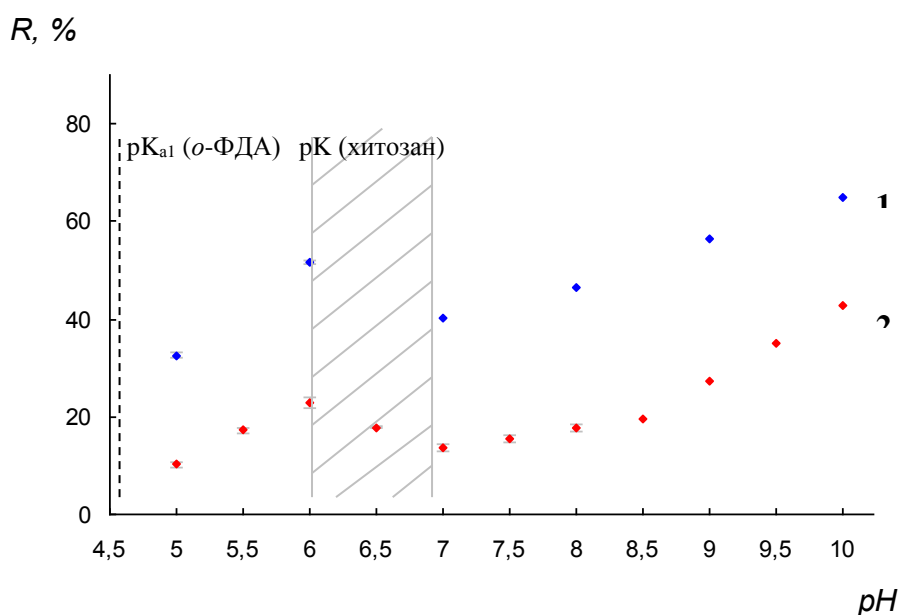
Более строго доказать образование конечного продукта окисления *o*-ФДА, зарегистрировав спектр флуоресценции пленки при  $\lambda_{ex} = 350$  нм, не представлялось возможным, поскольку предполагаемый максимум флуоресценции 2,3-диаминофеназина должен находиться в области 400 – 500 нм, в которой флуориметрические измерения на поверхности невозможны. Стабильность *o*-ФДА в пленках существенно возрастала при понижении температуры, так при -20 °С поглоще-

ние чувствительного слоя сенсора сохранялось на уровне 90 – 95 % от первоначальной величины не менее 2 недель (и не менее 50% сохранялось в течение нескольких месяцев).

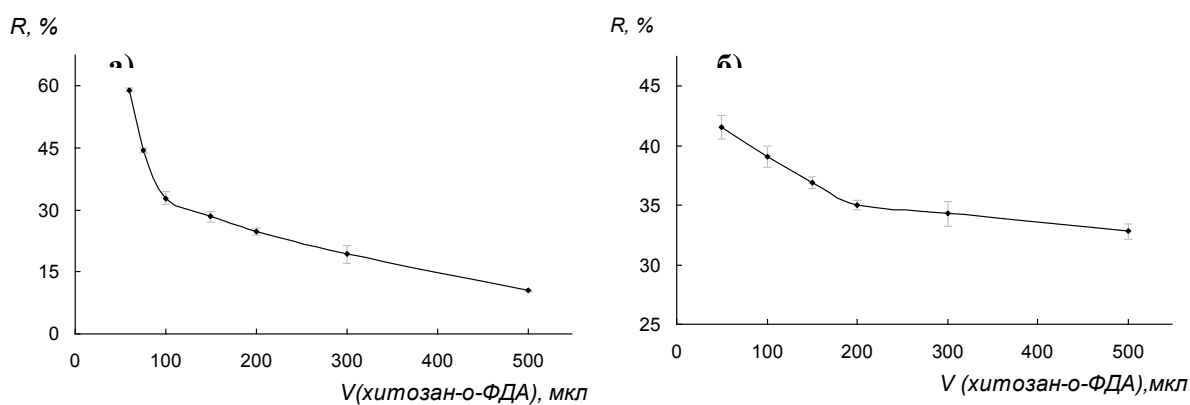
Одна из основных задач при разработке твердофазных сенсорных систем, основанных на формировании и измерении аналитического сигнала непосредственно на твердой поверхности, заключается в надежном удерживании иммобилизованных компонентов и продуктов индикаторной реакции в чувствительном слое сенсорного устройства. В предложенной нами системе удерживание компонентов матрицы в полимерных пленках достигалось за счет электростатических и диффузионных эффектов. Изучили зависимость степени извлечения *o*-ФДА из хитозановой пленки при ее выдерживании в фосфатном буферном растворе в широком диапазоне рН - от 5 до 10 (рис. 96). Вследствие растворимости хитозана в кислой среде степень извлечения при рН <5 не оценивали. Степень вымывания дериватирующего агента контролировали спектрофотометрически. Для этого предварительно строили градуировочную зависимость, связывающую величину оптической плотности раствора при 300 нм (длине волны, соответствующей максимуму поглощения реагента) и концентрацию *o*-ФДА.

Из литературы [345] известно, что *o*-ФДА представляет собой вицинальный ароматический диамин, характеризующийся двумя константами диссоциации ( $pK_{a1} = 4,6$ ,  $pK_{a2} = 2,8$ ). Хитозан - полисахарид,  $pK_a$  которого лежит в области 6 – 7 [44]. Зависимость степени вымывания *o*-ФДА из хитозановой пленки проходит через минимум при рН 7,0. Вероятно, это связано с наличием электростатических взаимодействий между полимером и дериватирующим агентом при нейтральном рН, то есть вблизи изоэлектрической точки хитозана. Согласно литературным данным, реакция дериватизации фенольных соединений с ароматическими и алифатическими аминами протекает в щелочной среде при рН > 9. В то же время, в щелочной среде и хитозан, и *o*-ФДА незаряжены, что говорит об отсутствии электростатических взаимодействий между ними. Вследствие этого в диапазоне рН 7.5 – 10 значительно возростала степень вымывания *o*-ФДА (до 60% при выдерживании пленки в растворе в течение 1 мин).





**Рис. 96.** Зависимость степени вымывания *o*-ФДА из пленок хитозан – *o*-ФДА от pH 0,05 М фосфатного буферного раствора при разном времени выдерживания пленки в растворе: 5 (1), 60 (2) сек; концентраций *o*-ФДА 350 мкМ, объем смеси хитозан – *o*-ФДА) - 200 мкл,  $\lambda_{\text{abs}} = 300$  нм.



**Рис. 97.** Зависимость степени вымывания *o*-ФДА из пленок {хитозан – *o*-ФДА} от объема смеси, формирующий чувствительный слой, при разных (а) и фиксированном (б) соотношениях компонентов в пленке: а)  $V(o\text{-ФДА}) = 50$  мкл, концентрация *o*-ФДА – 350 мкМ, 0,05 М фосфатный буферный раствор, pH 7,0, время выдерживания 1 мин,  $\lambda_{\text{abs}} = 300$  нм.

Для поиска путей повышения эффективности иммобилизации компонентов чувствительного слоя изучили возможность использования диффузионных эффектов для улучшения закрепления дериватирующего агента в хитозановой пленке. Как видно из рис. 97, *o*-ФДА лучше удерживался в пленке при увеличении ее толщины (вымывание уменьшалось с 42 до 33%) и объемной доли полимера в ней (вымывание уменьшалось с 65 до 15%).

Исходя из характера полученных зависимостей и приведенных ранее данных по уменьшению величины фонового сигнала, можно сделать вывод, что объем смеси, формирующей чувствительный слой сенсора должен составлять 100 – 200 мкл, а объемная доля полимера должна быть не менее 90 – 95%.

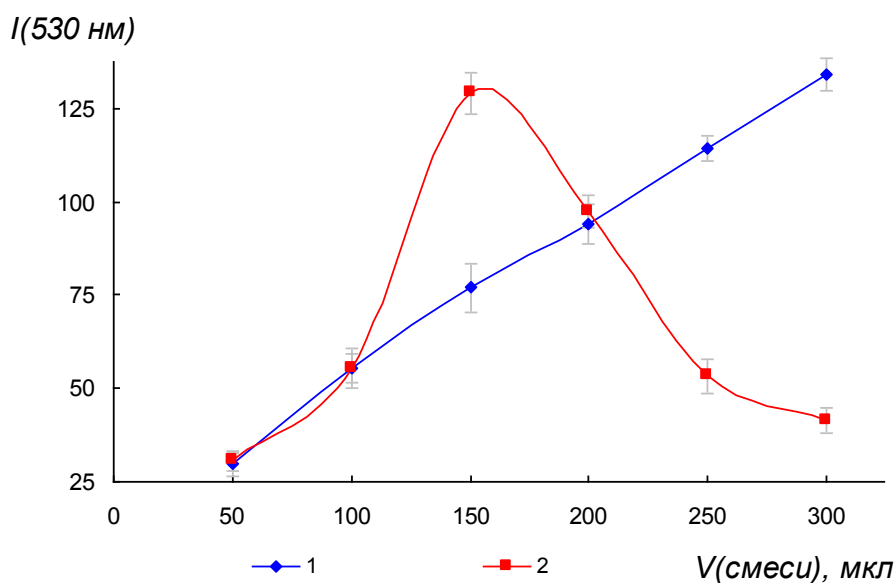
Еще один способ повышения удерживания компонентов реакции в чувствительном слое биосенсорного устройства заключается в создании двухслойных пленок, внешний слой которых содержит иммобилизованный фермент, а внутренний – иммобилизованный дериватирующий агент (рис. 98). Из литературы [95–98] известны примеры двухслойных спектрофотометрических биосенсорных систем на основе хитозана (внешний слой, содержащий иммобилизованный фермент) и силикатного золь-геля (внутренний слой, содержащий иммобилизованное хромогенное вещество – МБТГ).



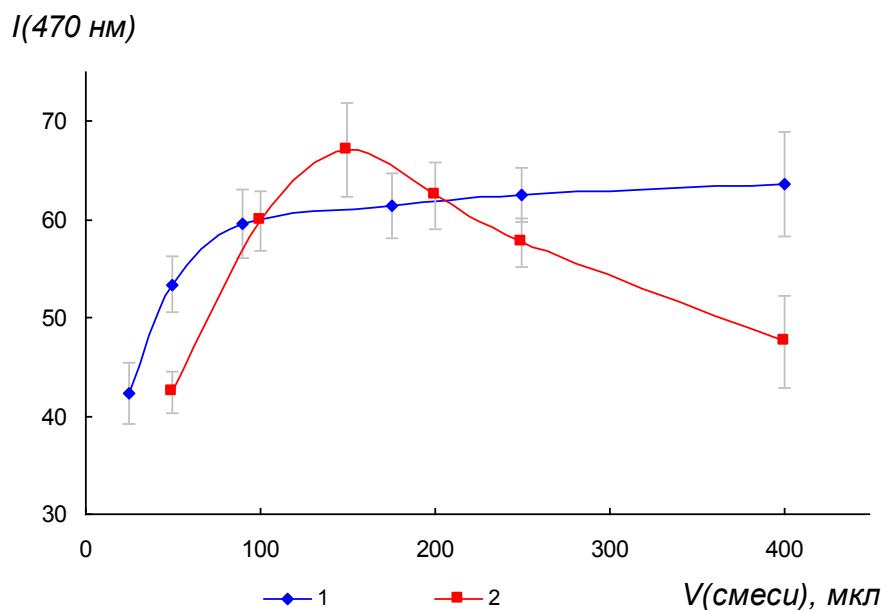
**Рис. 98.** Схема чувствительного слоя двухслойного биосенсорного устройства на основе хитозана.

На рис. 99 и 100 приведены зависимости отклика чувствительного слоя биосенсоров на основе *o*-ФДА и ЭДА, соответственно, на присутствие пирокатехина от объема смеси, формирующей чувствительный слой. При использовании обоих дериватизирующих агентов интенсивность флуоресценции закономерно возрастала при увеличении толщины внутреннего слоя. При этом зависимость интенсивности флуоресценции от толщины внешнего слоя проходила через максимум, что, вероятно, связано с возникновением эффекта внутреннего фильтра (то есть с поглощением возбуждающего и флуоресцентного излучения в объеме чувствительного слоя) при увеличении толщины пленки.

На основании полученных данных для формирования чувствительного слоя однослойного сенсорного устройства использовали 250 мкл смеси хитозан – дериватизирующий агент – фермент, а двухслойного – 100 мкл смеси хитозан – дериватизирующий агент и 150 мкл смеси хитозан – фермент. Предположительно продукт дериватизации также удерживался в полимерной пленке за счет диффузионных эффектов.

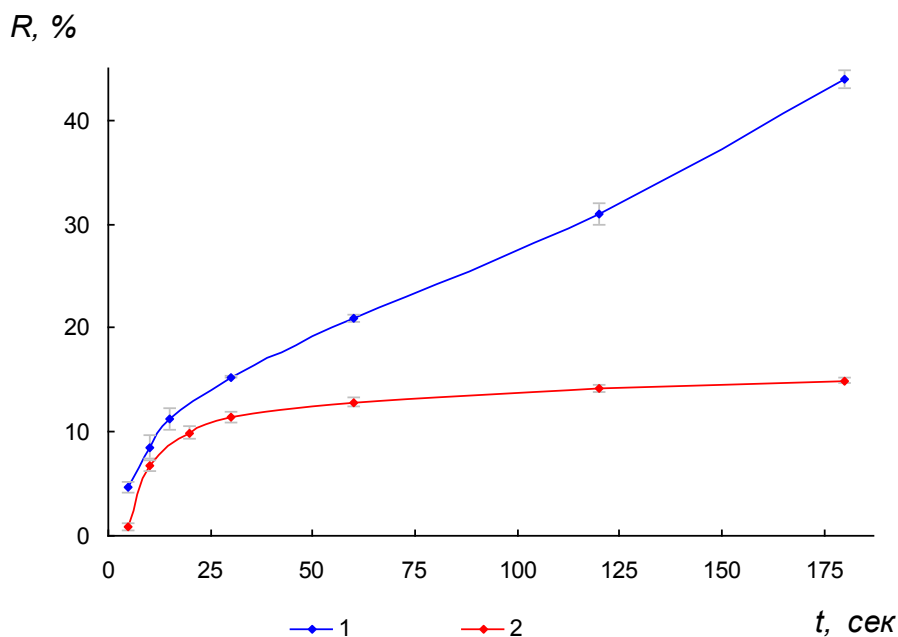


**Рис. 99.** Зависимость интенсивности флуоресценции чувствительного слоя двухслойного биосенсора на основе *o*-ФДА от толщины внутреннего (1) и внешнего слоя (2). Условия реакции: 0,05 М пирофосфатный буферный раствор, pH 9,5, концентрации пероксидазы - 1 мкМ, пероксида водорода - 100 мкМ, пирокатехина - 100 мкМ, *o*-ФДА 100 мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ нм}$ , время реакции – 3 мин.



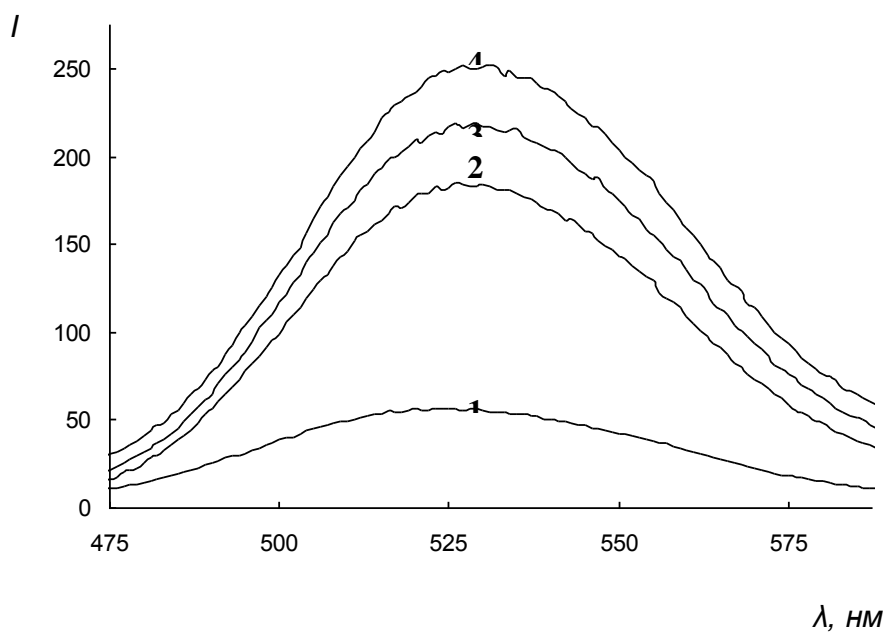
**Рис. 100.** Зависимость интенсивности флуоресценции чувствительного слоя двухслойного биосенсора на основе ЭДА от толщины внутреннего (1) и внешнего слоев (2). Условия реакции: 0,05 М пирофосфатный буферный раствор pH 10, концентрации фермента – 1 мкМ, пероксида водорода - 100 мкМ, пирокатехина - 50 мкМ, ЭДА - 0.5 мМ,  $\lambda_{ex} = 390$  нм, время реакции 15 мин.

Установили, что степень вымывания *o*-ФДА из однослойной хитозановой пленки при объеме смеси, формирующей чувствительный слой, равном 250 мкл, при выдерживании сенсора в 0,05 М пирофосфатном буферном растворе с pH 9,0 в течение 30 с составляла 16% (и далее увеличивалась, составляя примерно 40% через 3 мин). Степень вымывания *o*-ФДА из двухслойной пленки не превышала 15% даже через 3 мин (рис. 101). Исходя из полученных результатов, для дальнейшей работы использовали биосенсорные устройства на основе двухслойных хитозановых пленок.

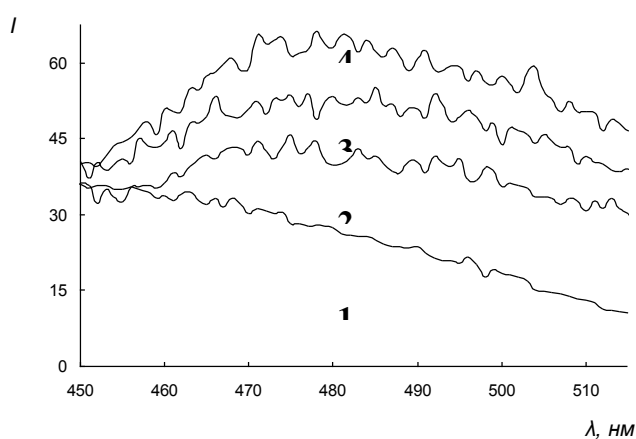


**Рис. 101.** Зависимость степени вымывания *o*-ФДА из однослойных (1) и двухслойных (2) хитиновых пленок от времени их выдерживания в растворе (0,05 М пирифосфатный буферный раствор, pH 9,0, концентрация *o*-ФДА - 350 мкМ,  $\lambda_{\text{abs}} = 300$  нм).

На рис. 102-103 приведены спектры флуоресценции чувствительного слоя на основе двухслойных хитиновых пленок, содержащих *o*-ФДА и ЭДА, зарегистрированные после их выдерживания в растворах, содержащих модельное фенольное соединение - пирокатехин. Максимумы флуоресценции на поверхности смещались в более коротковолновую область спектра по сравнению с максимумами, зарегистрированными в растворе. В случае биосенсорного устройства на основе *o*-ФДА спектры возбуждения и испускания были симметричны, а положение максимума флуоресценции не зависело от длины волны возбуждения. В случае биосенсорной системы на основе ЭДА наблюдали отклонения от законов флуоресценции, которые предположительно связаны с тем, что аналитические длины волн продукта дериватизации ПК с ЭДА (на поверхности) находились в области  $\lambda_{\text{ex}} < 400$  нм и  $\lambda_{\text{em}} < 500$  нм, то есть в области фонового сигнала, обусловленного излучением ксеноновой лампы.



**Рис. 102.** Спектры флуоресценции чувствительного слоя биосенсорного устройства на основе *o*-ФДА. Условия реакции: 0,05 М пирофосфатный буферный раствор pH, 9,5, концентрации пероксидазы – 0,1 мкМ, пероксида водорода - 500 мкМ, *o*-ФДА - 100 мкМ, пирокатехина: 0 (1), 0,5 (2), 2,5 (3), 5,0 (4) мкМ;  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  нм, время реакции - 2 мин.



**Рис. 103.** Спектры флуоресценции чувствительного слоя биосенсорного устройства на основе ЭДА. Условия реакции: 0,1 М буферный раствор CAPS-KOH, pH 10,5, концентрации пероксидазы – 2,5 мкМ, пероксида водорода -100 мкМ, ЭДА - 1 мМ, пирокатехина –0 (1), 5 (2), 25 (3), 50 (4) мкМ;  $\lambda_{\text{ex}} = 400$  нм, время реакции - 15 мин.

Выбранные условия формирования флуоресцентного аналитического сигнала: концентрации пероксидазы, пероксида водорода, дериватирующего агента, время реакции, природа, рН и концентрации буферных растворов представлены в табл. 33 и 34.

**Таблица 33.** Условия определения пирокатехина (ПК), катехоламинов (допамина (ДА) и адреналина (АД), гомованилиновой кислоты (ГВК) и ванилилминдальной кислот (ВМК)) с использованием флуоресцентной сенсорной системы на основе *o*-ФДА

Параметр	Определяемое соединение				
	ПК	ДА	ГВК	АД	ВМК
с(пероксидаза), мкМ	0,1	0,25	0,1	0,25	0,1
с(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), мкМ	500		250		350
с( <i>o</i> -ФДА), мкМ	100		75	100	50
0,05 М пирофосфатного буферного раствора, рН	9,25	9,5	10,0	9,75	9,5
с(хитозан), % по массе	1				
V(хитозан – <i>o</i> -ФДА), мкл	100				
V(хитозан – пероксидаза), мкл	150				
Объем реакционной смеси, мл	5				
Время реакции, с	30				
$\lambda_{ex}$ , нм	450				
$\lambda_{em}$ , нм	530	520	535	540	530

Для изучения влияния на величину отклика чувствительного слоя сенсора природы буферного раствора выбрали аммиачный и пирофосфатный буферные растворы. Проводя индикаторную реакцию в каждом из них, регистрировали полезный аналитический сигнал и относительное стандартное отклонение фонового сигнала. Установили, что аналитические характеристики сенсора сопоставимы при использовании обоих буферных растворов. Дальнейшие эксперименты проводили в пирофосфатном буферном растворе (то есть использовали буферный раствор по компонентному составу близкий к буферному раствору, использованному в Главе 5, при разработке косвенного флуоресцентного биосенсора на основе меченого хитозана).

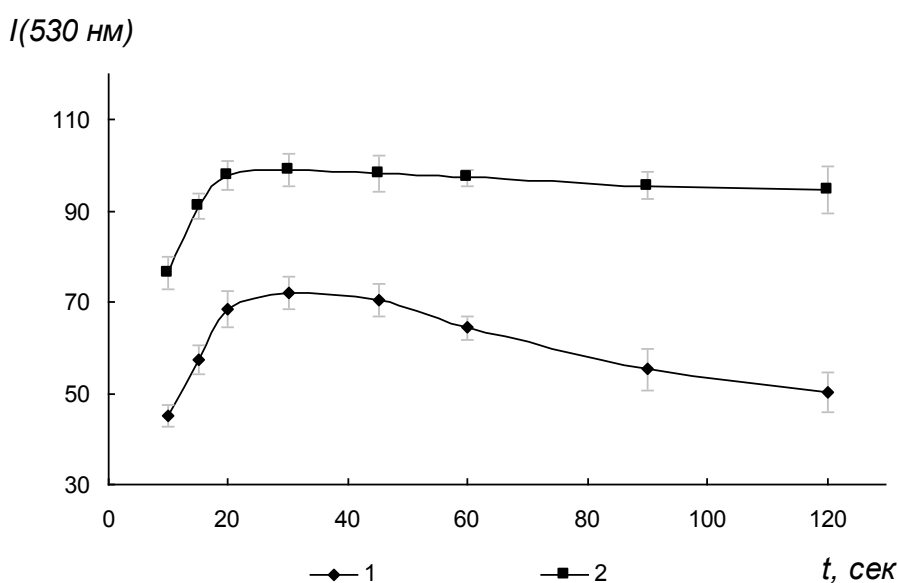
**Таблица 34.** Оптимальные условия определения пирокатехина (ПК), дофамина (ДА) и адреналина (АД) с использованием флуоресцентной биосенсора на основе ЭДА.

Параметр	Определяемое соединение		
	ПК	ДА	АД
С(пероксидаза), мкМ	0,5	1	0,5
с(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), мкМ	100	500	5
с(ЭДА), мМ	0,5		
0,05 М пирофосфатного буферного раствора, рН	10	9	9,5
с(хитозан), % по массе	1		
V(хитозан – ЭДА), мкл	100		
V(хитозан – пероксидаза), мкл	150		
объем реакционной смеси, мл	5		



время реакции, мин	15	5	2
$\lambda_{\text{ex}}$ , нм	390	390	410
$\lambda_{\text{em}}$ , нм	480	460	490

Отклик чувствительного слоя биосенсорных систем не зависел от концентрации пирофосфатного буферного раствора в широком диапазоне концентраций (0,05 – 0,2 М). В последующих экспериментах использовали буферный раствор концентрации 0,05 М, поскольку это значение является типичной концентрацией буферного раствора при работе со многими ферментами.



**Рис. 104.** Зависимости интенсивности флуоресценции чувствительного слоя однослойного (1) и двухслойного (2) биосенсоров на основе *o*-ФДА от времени его выдерживания в 0,05 М пирофосфатном буферном растворе, pH 9,5. Условия реакции: концентрации пероксидазы – 0,1 мкМ, пероксида водорода - 100 мкМ, пирокатехина - 50 мкМ, *o*-ФДА - 100 мкМ,  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  нм.

На рис. 104 приведены зависимости интенсивностей флуоресценции чувствительного слоя однослойного и двухслойного биосенсорных устройств на основе *o*-ФДА от времени реакции. Установили, что в первом случае кинетическая кривая проходила через максимум (что, по-видимому, связано с плохим удерживанием дериватирующего агента и продукта дериватизации в пленке вследствие мень-

шей эффективности диффузионных взаимодействий), а во втором выходила на плато. Полученные результаты свидетельствуют о том, что дериватирующий агент и продукт дериватизации лучше удерживались в чувствительном слое биосенсора при использовании двухслойных пленок.

Таким образом, в рамках этого исследования нами была предложена новая твердофазная флуоресцентная индикаторная система для определения фенольных соединений, основанная на дериватизации с алифатическим (этилендиамином) и ароматическим (*o*-фенилендиамином) продукта их пероксидазного окисления. Показано, что использование двухслойных пленок на основе хитозан-дериватирующий агент (внутренний слой), хитозан-фермент (внешний слой) позволяет создавать твердофазные индикаторные системы для регистрации аналитического сигнала непосредственно в чувствительном слое биосенсорного устройства даже с использованием легкоокисляемых на воздухе реагентов. Отличительной особенностью и преимуществом предложенного флуоресцентного сенсорного устройства по сравнению с сенсорной системой на основе меченого хитозана, является чрезвычайно малое время отклика – 30 с по сравнению с 10 мин, а также наличие прямопропорциональной зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого вещества.

#### **6.1.4. Аналитические характеристики методик определения фенольных соединений по реакции их ферментативной дериватизации с *o*-ФДА и ЭДА**

В выбранных условиях (табл. 33-34) построили градуировочные зависимости и установили метрологические характеристики методик определения фенольных соединений (табл. 35 – 36). При этом биосенсорную систему на основе *o*-ФДА апробировали в определении простейших изомерных дигидроксифенолов (пирокатехина, резорцина, гидрохинона), катехоламинов (допамина, адреналина) и их метаболитов (гомованилиновой и ванилилминдальной кислот). Биосенсорное устройство на основе ЭДА применяли только для определения пирокатехина, допамина и адреналина, вследствие того, что продукты дериватизации фенольных соединений с ЭДА флуоресцировали в более коротковолновой области спектра, и, следовательно, разработку методик определения широкого круга субстратов с использова-

нием такого сенсора сочли нецелесообразной.

Как и ожидалось, флуоресцирующие продукты не образовывали гидрохинон и резорцин, поскольку в реакцию дериватизации с ароматическими и алифатическими аминами вступали только те фенольные соединения, продуктами окисления которых являются *o*-хиноны. Чувствительность и воспроизводимость результатов измерений, а также экспрессность анализа существенно возросли при переходе от косвенной сенсорной системы на основе меченого хитозана к прямой – на основе образования флуоресцирующих производных, а также при использовании *o*-ФДА вместо ЭДА. Биосенсорная система на основе *o*-ФДА позволяла определять катехоламины и их метаболиты на наномолярном уровне их концентраций. Такая чувствительность достаточна для определения этих соединений в биологических жидкостях человека (прежде всего в моче и плазме крови при наличии эндокринных заболеваний [303]. При этом время реакции (необходимое для достижения 90 % величины аналитического сигнала) не превышало 30 с.

Биосенсорная система на основе ЭДА позволяла определять фенольные соединения на мкМ уровне концентраций, а время реакции составляло от 2 до 15 мин. Чувствительные слои биосенсоров на основе *o*-ФДА и ЭДА сохраняли 90 – 95% величины аналитического сигнала в течение нескольких дней при 25°C и не менее 4 недель при -20 °C.

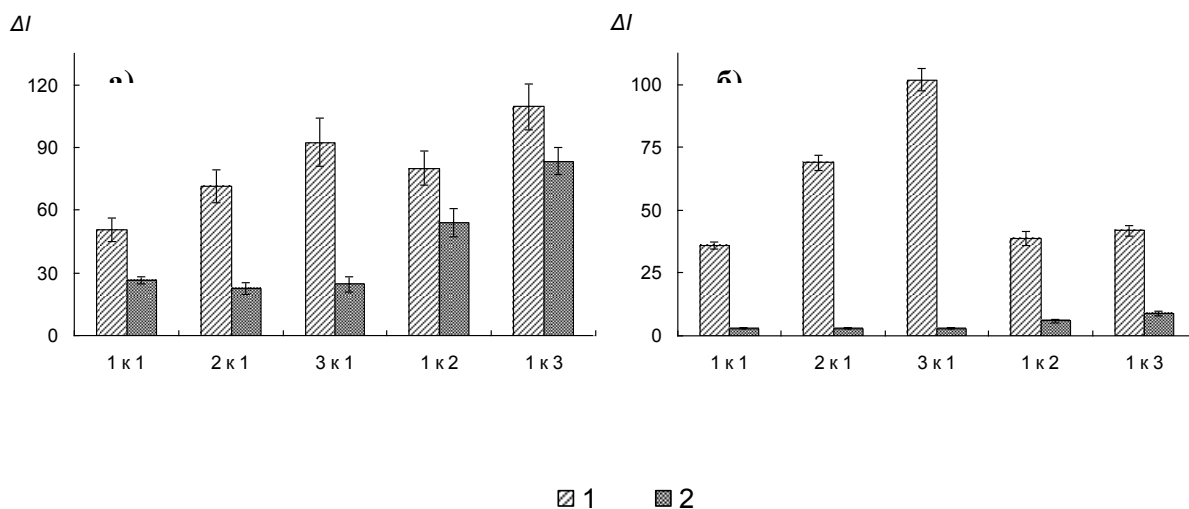
Изучили возможность определения суммарного содержания фенольных соединений с использованием флуоресцентной сенсорной системы на основе *o*-ФДА при концентрациях определяемых соединений, входящих в диапазоны линейности градуировочных графиков. На примере анализа смесей, содержащих одновременно допамин и адреналин, гомованилиновую кислоту и адреналина, а также ванилилминдальную кислоту и адреналин, показали, что адреналин по реакционной способности значительно превосходил остальные модельные фенольные соединения, вследствие чего величина аналитического сигнала в перечисленных системах не была аддитивной (рис. 105).

**Таблица 35.** Метрологические характеристики методик определения фенольных соединений с использованием биосенсорной системы на основе *o*-ФДА.

Определяемое соединение	Уравнение градуировочной зависимости	Диапазон линейности, нМ	$c_{\min}$ , нМ	Коэффициент корреляции, $r$	$s_r$ (при $c_n$ , $n = 5$ , $P = 0,95$ )
Пирокатехин	$I = (2,9 \pm 0,3) \cdot 10^7 c + (160,4 \pm 4,1)$	50 – 1000	20	0,992	0,03
Допамин	$I = (8,4 \pm 1,1) \cdot 10^7 c + (166 \pm 1)$	50 – 500	18	0,995	0,03
Адреналин	$I = (11,8 \pm 0,7) \cdot 10^7 c + (176 \pm 4)$	10 – 2500	5	0,998	0,04
Гомованилиновая кислота	$I = (13,2 \pm 0,5) \cdot 10^8 c + (183 \pm 3)$	10 – 250	5	0,998	0,03
Ванилилминдальная кислота	$I = (24,2 \pm 0,2) \cdot 10^8 c + (162,6 \pm 0,8)$	5 – 100	3	0,999	0,03

**Таблица 36.** Метрологические характеристики методик определения фенольных соединений с использованием биосенсорной системы на основе ЭДА.

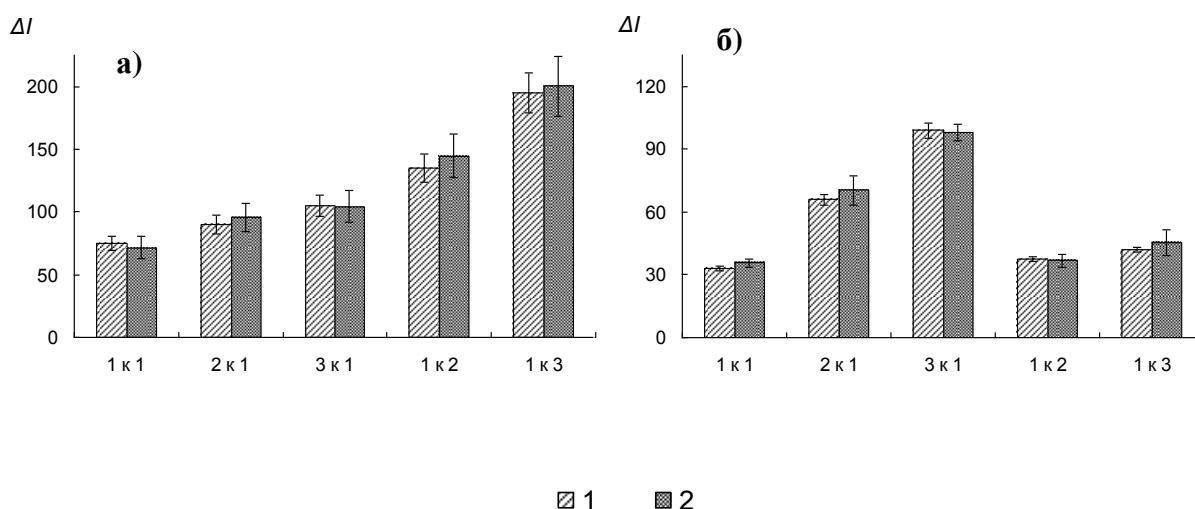
Определяемое соединение	Уравнение градуировочной зависимости	Диапазон линейности, нМ	$c_{\min}$ , нМ	Коэффициент корреляции, r	$s_r$ (при $c_n$ , $n = 5$ , $P = 0,95$ )
Пирокатехин	$I = (7,6 \pm 0,7) \cdot 10^5 c + (41 \pm 1)$	500 – 5000	180	0,993	0,04
Допамин	$I = (8,5 \pm 0,8) \cdot 10^5 c + (40 \pm 1)$	250 – 5000	75	0,988	0,06
Адреналин	$I = (14,2 \pm 0,8) \cdot 10^5 c + (46 \pm 1)$	250 – 1000	150	0,993	0,08



**Рис. 105.** Проверка аддитивности отклика чувствительного слоя биосенсора на основе *o*-ФДА в присутствии разных количеств допамина и адреналина (а), гомованилиновой кислоты и адреналина (б): (1) рассчитанное значение, (2) экспериментально полученное значение; концентрация фенольного соединения (а) 0,25, (б) 0,025 мкМ.

Так, определение допамина, гомованилиновой и ванилилминдальной кислот в присутствии адреналина возможно только при их многократном (в 100 – 1000 раз) избытке. Одновременное введение в реакционную систему смесей допамина и гомованилиновой кислоты, допамина и ванилилминдальной кислоты, а также гомованилиновой и ванилилминдальной кислот давало аддитивный аналитический сигнал (рис. 106). Следует отметить, что при рН 10 (то есть при условиях, определения гомованилиновой кислоты) скорость реакции ферментативной дериватизации ванилилминдальной кислоты с *o*-ФДА была настолько низкой, что даже при двухкратном избытке ванилилминдальная кислота не мешала определению гомованилиновой кислоты. При этом нормальное содержание гомованилиновых кислот в биологических жидкостях превышает содержание второго метаболита. Следовательно, с учетом возможного разбавления анализируемого образца, а также требуемой и достигаемой чувствительности определения катехоламинов и их метаболитов флуоресцентная биосенсорная система на основе *o*-ФДА может быть использована для индивидуального определения гомованилиновой кислоты в крови и моче (при проведении реакции при рН 10), а также совместного определения гомованилиновой и ванилилминдальной кислот в моче (при проведении реакции при рН

9,5).



**Рис. 106.** Проверка аддитивности отклика чувствительного слоя биосенсора на основе *o*-ФДА в присутствии разных количеств ГVK и ВМК при pH 9,5 (а) и 10 (б): (1) рассчитанное значение, (2) экспериментально полученное значение; концентрация фенольного соединения - 25 нМ.

Таким образом, разработанная нами флуоресцентная биосенсорная система на основе *o*-ФДА превосходит описанные в литературе аналоги по чувствительности определения и сопоставима с ними по селективности и воспроизводимости результатов измерения, а также стабильности аналитического сигнала. Достигаемые чувствительность и селективность определения позволяют использовать предложенную биосенсорную систему для индивидуального определения катехоламинов в фармацевтических препаратах, а также для определения гомованилиновой и ванилилминдальной кислот в биологических жидкостях.

## 6.2. Определение пероксидов различного строения с использованием твердофазной флуоресцентной биосенсорной системы на основе *o*-ФДА

Ранее было отмечено, что величина аналитического сигнала в системе пероксид водорода – фермент – фенольное соединение – дериватирующий агент пропорциональна концентрации не только фенольного соединения, но и окислителя (пероксида водорода). Вследствие этого описанные в настоящем разделе биосенсорные системы были использованы для разработки методик определения пе-

роксидов различного строения (пероксида водорода, пероксида мочевины, 2-бутанонпероксида, бензоилпероксида, трет-бутилгидропероксида). В качестве субстрата-восстановителя использовали пирокатехин (при концентрации 1.5 мкМ в системе). В качестве дериватизирующего агента выбрали *o*-ФДА, поскольку биосенсорная система на его основе имела лучшие метрологические характеристики, чем биосенсор на основе ЭДА. Определение проводили в водной среде и среде прямых мицелл ПАВ (ЦТАБ, ТВИН 80, ДДС).

Показали, что условия определения всех пероксидов совпадали и не отличались от условий, приведенных в табл. 33. Для проведения реакции в мицеллярной среде использовали 0,05 М растворы ЦТАБ и ТВИН 80. Определение проводили при pH 9 и 10, соответственно. Из-за нерастворимости ДДС (в широком диапазоне его концентраций от 0,01 до 0,5 М) в пирофосфатном буферном растворе (pH 9 – 10,5), исследования с применением ДДС не проводили. В выбранных условиях (табл. 33), построили градуировочные зависимости и рассчитали метрологические характеристики методик определения пероксида водорода, пероксида мочевины, 2-бутанонпероксида, бензоилпероксида и *трет*-бутилгидропероксида в водной среде, а также среде прямых мицелл ЦТАБ и ТВИН (табл. 37). Следует отметить, что, как и в случае косвенной флуоресцентной сенсорной системы использование мицеллярных сред приводило к ухудшению воспроизводимости аналитического сигнала, поэтому в мицеллярных средах удалось разработать методику только для определения пероксида водорода, и даже она характеризовалась некоторым ухудшением аналитических характеристик по сравнению с определением в водных растворах.

При проведении реакции в водной среде флуоресцентная биосенсорная система на основе *o*-ФДА позволяла определять перечисленные пероксиды на уровне 10 – 1000 мкМ. При этом чувствительность определения *трет*-бутилгидропероксида была выше, чем при использовании описанных в предыдущей главе косвенной твердофазной флуоресцентной и спектрофотометрической биосенсорной систем на основе хитозана. Однако по воспроизводимости результатов измерений и чувствительности определения остальных модельных пероксидов биосенсорная система на основе *o*-ФДА существенно уступала рассмотренным в



предыдущей главе аналогам.

**Таблица 37.** Метрологические характеристики методик определения пероксидов в водной и мицеллярной средах с использованием флуоресцентной сенсорной системы на основе *o*-ФДА.

Аналит	Уравнение градуировочной зависимости	Диапазон линейности, мкМ	$c_{\min}$ , мкМ	Коэффициент корреляции, $r$	$s_r$ (при $c_n$ , $n = 4$ , $P = 0.95$ )
Пероксид водорода	$I = (4,7 \pm 0,4) \cdot 10^5 c + (127 \pm 4)$	25 – 100	10	0,996	0,03
Пероксид водорода (ЦТАБ)	$I = (5,1 \pm 0,5) \cdot 10^4 c + (53 \pm 2)$	100 – 250	90	0,981	0,15
Пероксид водорода (ТВИН)	$I = (1,5 \pm 0,2) \cdot 10^5 c + (55 \pm 2)$	50 – 100	30	0,991	0,15
Пероксид мочевины	$I = (3,4 \pm 0,3) \cdot 10^5 c + (130 \pm 4)$	25 – 100	15	0,991	0,05
2-Бутанон-пероксид	$I = (4,9 \pm 0,6) \cdot 10^4 c + (134 \pm 5)$	100 – 1000	90	0,995	0,06
Бензоил-пероксид	$I = (1,4 \pm 0,2) \cdot 10^5 c + (134 \pm 4)$	50 – 500	30	0,991	0,07
<i>трет</i> -Бутилгидро-пероксид	$I = (1,1 \pm 0,1) \cdot 10^5 c + (132 \pm 2)$		40	0,995	0,13

Таким образом, разработанная нами прямая флуоресцентная сенсорная система на основе реакции ферментативной дериватизации фенольных соединений с ароматическим амином – *o*-фенилендиамином позволяет в мягких условиях (при комнатной температуре, в отсутствие токсичных органических растворителей) определять катехоламины и их метаболиты на уровне нано- и микромолярных концентраций. Достижимые чувствительность, а в некоторых случаях и селективность анализа позволяют определять указанные соединений 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 твердофазная 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.

### **6.3. Применение разработанных твердофазных флуоресцентных биосенсорных систем для определения фенольных соединений и пероксидов в анализе реальных объектов**

Разработанные флуоресцентные биосенсорные системы на основе двух твердофазных индикаторных реакций: *обратной* – на основе тушения продуктами окисления фенолов флуоресценции хитозана, меченного флуоресцентной меткой, и *прямой*, основанный на реакции ферментативной дериватизации с алифатическими и ароматическими аминами, позволяют определять фенольные соединения и пероксиды различного строения на уровне их нано- – микромолярных концентраций, причем в случае определения фенольных соединений прямые сенсорные системы более чувствительны и селективны, чем обратные (табл. 28-29, 35-37).

Рассмотренные нами твердофазные 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 (раствори-

мых и нерастворимых в воде). Сведения об анализируемых фармацевтических препаратах приведены в табл. 16 (Глава 3). Определение проводили способом стандартных добавок. Следует отметить, что пробоподготовка ограничивалась гомогенизацией (в случае водонерастворимых препаратов) или разбавлением (в случае инъекционных растворов) анализируемого образца в воде. Практически все анализируемые лекарственные препараты содержали в своем составе значительное количество метабисульфита натрия и глицерина. Метабисульфит (пиросульфит) натрия, используют в качестве консерванта (E223). Глицерин выполняет функцию антисептика и растворителя, повышает вязкость жидких лекарственных препаратов, предотвращает их высыхание.

Оказалось, что введение глицерина и метабисульфита в реакционную систему в широком диапазоне их концентраций (0,1 – 25 мкМ) не влияет на результаты определения фенольных соединений и органических пероксидов. Установили, что результаты определения фенольных соединений в выбранных фармацевтических препаратах хорошо согласуются с содержаниями, указанными производителем (табл. 39).

Твердофазную флуоресцентную биосенсорную систему на основе *o*-ФДА применили для определения конечных продуктов метаболизма катехоламинов гомованилиновой и ванилиминдальной кислот в моче здорового человека. Анализ проводили способом стандартных добавок при разных условиях: оптимальных для селективного определения гомованилиновой кислоты в анализируемом объекте и оптимальных для определения ванилилминдальной кислоты (определяли суммарное содержание двух кислот). Определение проводили без предварительной пробоподготовки анализируемого образца. Как показано в табл. 40, результаты определения гомованилиновой кислоты хорошо согласуются с данными, полученными альтернативным методом – методом ВЭЖХ с амперометрическим детектированием и референсными значениями по содержанию этих метаболитов в моче здорового человека [303].

Таким образом, нами продемонстрирована перспективная возможность применения разработанных флуоресцентных биосенсорных систем на основе твердо-

фазных индикаторных реакций для определения фенольных соединений и пероксидов различного строения в многочисленных объектах с матрицей сложного состава, в том числе нерастворимой в воде, биологических жидкостей без предварительной (или минимальной) пробоподготовки.

**Таблица 40.** Определение гомованилиной и ванилилминдальной кислот в моче здорового человека с использованием флуоресцентной сенсорной системы на основе *o*-ФДА (I) и методом ВЭЖХ (II) (n=5, P=0,95)

Определяемое соединение	Найдено, мкМ	
	I	II
Гомованилиновая кислота	42 ± 2	41 ± 2
Гомованилиновая и ванилилминдальные кислоты	52 ± 4	_*

\* Суммарное определение метаболитов методов ВЭЖХ не проводилось.

**Таблица 39.** Определение ряда фенольных соединений и пероксидов различного строения в фармацевтических и лекарственных препаратах с использованием флуоресцентных сенсорных систем на основе чувствительного слоя пероксидаза – хитозан (n=5, P=0,95).

<b>Тип биосенсора</b>	<b>Фармацевтический препарат</b>	<b>Определяемое соединение</b>	<b>Найдено, %</b>	<b>Паспортное содержание, %</b>
Флуоресцентная сенсорная система на основе хитозана, меченного флуоресцентной меткой	«Ахромин»	Гидрохинон	2,1 ± 0,2	1,9
	«Допамин – Ферейн»	Допамин	0,53 ± 0,04	0,5
	«Адреналина гидрохлорид»	Адреналин	0,1 ± 0,01	0,1
	«Ксилокаин – Адреналин»		(5,4 ± 0,6) · 10 <sup>-4</sup>	5 · 10 <sup>-4</sup>
	«Базирон»	Бензоилпероксид	4,7 ± 0,6	5,0
	«Пероксидерм»		2,5 ± 0,4	2,5

	«Splat Exreem White»	Пероксид моче- вины	$0,11 \pm 0,02$	0,1
Флуоресцентная сенсор- ная система на основе де- риватизации с  o-ФДА	«Допамин – Ферейн»	Допамин	$0,54 \pm 0,07$	0,1
	«Адреналина гидрохлорид»	Адреналин	$0,11 \pm 0,02$	0,5
	«Ксилокаин – Адреналин»		$(4,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$
	«Базирон»	Бензоилпероксид	$4,7 \pm 0,4$	5,0
	«Пероксидерм»		$2,4 \pm 0,4$	2,5
	«Splat Exreem White»	Пероксид моче- вины	$0,11 \pm 0,01$	0,1

## 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, прежде всего пероксидазы из корней хрена, с полиэлектролитами 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 ферментативного 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 фенотиазинового ряда в водно-органических экстрактах и плазме крови без предварительной дополни-

тельной подготовки проб к анализу по их специфическому активирующему действию (эффекту субстрат-субстратной активации) в реакции окисления *o*-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 – *косвенное* определение); б) с дериватизирующими агентами: *o*-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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захарова Г.С., Упоров В.И., В.И. Тишков. Peroxidaza из корней хрена: Моделирование свойств химической модификацией химической глобулы. // Успехи биол. хим. 2011. Т. 51. С. 37-64.
2. Minter Sh.D. Enzyme Stabilization and Immobilization. Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology. Heidelberg: Springer. 2010. 679 p.
3. Klivanov A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. // *Nature*. 2001. V. 409. P. 241 - 246.
4. Martinek K., Levashov A.V., Khmel'nitsky Y.L., Klyachko N.L., Berezin I.V. Colloidal solution of water in organic solvents: a microheterogeneous medium for enzymatic reactions. // *Science*. 1982. V. 218. P. 889 - 891.
5. Ramirez-Corredores M., Borole A. Biocatalysis in oil refining. Elsevier: London, 2007. 416 p.
6. Fitzpatrick P.A., Steinmetz A.C.U., Ringe D., Klivanov A.M. Enzyme crystal structure in a neat organic solvent. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 8653 – 8657.
7. That T. Ngo. Peroxidase in Chemical and Biochemical Analysis. // *Anal. Lett.* 2010. V. 43. N 10-11. P. 1572-1587.
8. Mozhaev V.V., Poltevisky K.G., Slepnev V.I., Badun G.A., Levashov A.V. Homogeneous solutions of hydrophilic enzymes in nonpolar organic solvents. New systems for fundamental studies and biocatalytic transformations. // *FEBS Lett.* 1991. V. 292. P. 159 – 161.
9. Zaks A., Klivanov A.M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. // *Science*. 1984. V. 224. P. 1249 - 1251.
10. Khmel'nitsky Yu. L., Mozhaev V.V., Belova A.B., Sergeeva M.V., Martinek K. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 198. P. 31 – 41.

11. Zaks A., Klibanov A.M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 3194 – 3201.
12. Vakurov A.V., Gladilin A.K., Levashov A.V., Khmel'nitsky, Y.L. Dry enzyme-polymer complexes – stable organosoluble biocatalysts for nonaqueous enzymology. // Biotechnol. Lett. 1994. V. 16. P. 175 - 178.
13. Dordick J.S. Designing enzymes for use in organic solvents. // Biotechnol. Prog. 1992. V. 8. P. 259 – 267.
14. Sears P., Schuster M., Wang P., Witte K., Wong C.-H. Engineering subtilisin for peptide coupling: studies on the effects of counterions and site-specific modifications on the stability and specificity of the enzyme. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 6521 – 6530.
15. Khmel'nitsky Yu. L., Belova A.B., Levashov A.V., Mozhaev V.V. Relationship between surface hydrophilicity of a protein and its stability against denaturation by organic solvents. // FEBS Lett. 1991. V. 284. P. 267 – 269.
16. Кудряшова Е.В., Белова А.Б., Виноградов А.А., Можяев В.В. Влияние гидрофобных свойств поверхности белка на его устойчивость к денатурации органическими растворителями (на примере модифицированного  $\alpha$ -химитрипсина). // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 274 – 280.
17. Inada Y., Takahashi K., Yoshimoto T., Ajima A., Matsushima A., Saito Y. Engineering physicochemical and biological properties by chemical modification. // Trends Biotechnol. 1986. V. 4. P. 190 – 194.
18. Rich J.O., Mozhaev V.V., Dordick J.S., Clark D.S., Khmel'nitsky Yu. L. Molecular imprinting of enzymes with water-insoluble ligands for nonaqueous biocatalysis. // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. P. 5254 – 5255.
19. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. // Science. 1997. V. 277. P. 1232 – 1237.

20. Gladilin A.K., Kudryashova E.V., Vakurov A.V., Izumrudov V.A., Mozhaev V.V., Levashov A.V. Enzyme-polyelectrolyte noncovalent complexes as catalysts for reactions in binary mixtures of polar organic solvents with water. // *Biotechnol. Lett.* 1995. V. 17. P. 1329 – 1334.
21. Karyakin A.A., Kotel'nikova E.A., Lukacheva L.V., Karyakina E.E. Optimal environment for glucose oxidase in perfluorosulfonated ionomer membranes: Improvement of first-generation biosensors. 2002. *Anal. Chem.* N. 74. P. 1593-1603.
22. Balesteros A., Plou F.J., Iborra J.L., Holling P.I. Stability and Stabilization of biocatalysts. Series: Progress of Biotechnology. 1998. Elsevier: Amsterdam, 1998. 756 p.
23. Lukacheva L.V., Zakemovskaya A.A., Karyakina E.E., Zorov I.N., Sinitsyn A.P., Sukhacheva M.V., Netrusov A.I., Karyakin A.A. Determination of glucose and lactose in food products with the use of biosensors based on Berlin blue. // *J. Analyt. Chem.* 2007. V. 62. P. 388-393.
24. Margolin A.L., Sherstyuk S.F., Izumrudov V.A., Zezin A.B., Kabanov V.A. Enzymes in polyelectrolyte complexes. The effect of phase transition on thermal stability. // *Eur. J. Biochem.* 1985. V. 146. N. 3. P. 625-632.
25. 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.
26. 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.
27. Веселова И.А., Шеховцова Т.Н., Бадун Г.А. Использование хитозана и его производных для иммобилизации ферментов. // Сборник статей 5 конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.:ВНИРО, 1999. С.265-267.
28. Chaniotakis N.A. Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. P. 89 - 95.

29. *Andersson M.M., Hatti-Kaul R.* Protein stabilising effect of polyethyleneimine. // *J. Biotechnol.* 1999. V. 72. P. 21 – 31.
30. *Zikakis J.P.* Chitin, chitosan and related enzymes. N.-Y.: Academic Press, 1984. 393 p.
31. *Kumar M.N.V., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb. A.J.* Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. // *Chem. Rev.* 2004. V. 104. P. 6017 - 6084.
32. *Скрябин К.Г., Вухорева Г.А., Варламов В.П.* Хитин, хитозан. Получение, свойства и применение. М: Наука, 2002. 365 с.
33. *Li X.W., Lee D.K.L., Chan A.S.C., Alpar H.O.* Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1630. P. 7 – 18.
34. *Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В.* Кинетическое изучение реакции окисления *o*-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена. // *Биохимия.* 1977. Т. 42. С. 1372 – 1379.
35. *Claiborne A., Fridovich I.* Chemical and enzymatic intermediates in the peroxidation of *o*-dianisidine by horseradish peroxidase. 1. Spectral properties of the products of dianisidine oxidation. // *Biochemistry.* 1979. V. 18. P. 2324 – 2329.
36. *Foster R.* Organic Charge-transfer complexes. New York: Academic Press, 1969. 36 p.
37. *Joo H., Yoo Y., Ryu D.D.Y.* A biosensor stabilized by polyethylene glycol for the monitoring of hydrogen peroxide in organic solvent media. // *Enzyme Microbiol. Techn.* 1996. V. 19. P. 50 – 56.
38. *Xu K., Griebenov K., Klibanov A.M.* Correlation between catalytic activity and secondary structure subtilisin dissolved in organic solvents. // *Biotechnol. Bioeng.* 1997. V. 56. P. 485 - 491.

39. Метелица Д.И., Карасева Е.И. Активация пероксидазного окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензида поли(5-аминодисульфидом салициловой кислоты). // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1265 - 1272.
40. Самсонов Г.В., Глазова Н.В., Писарев О.А., Гомолицкий В.Н., Пономарева Р.Б. Модификация панкреатической рибонуклеазы декстрансульфатами. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 228. С. 985 – 987.
41. Глазова Н.В., Пономарева Р.Б., Самсонов Г.В. Исследование полимерных комплексов панкреатической рибонуклеазы с декстрансульфатами. // ВМС А. 1976. Т. 18. С. 361 – 363.
42. Goldstein L. Microenvironmental effects on enzyme catalysis. A kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. // Biochemistry. 1972. V. 11. P. 4072 – 4083.
43. Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. Макромолекулярный обмен в растворах комплексов глобулярных белков с неприродными полиэлектролитами // Докл. АН СССР. 1984. Т. 275. С. 1120 – 1123.
44. J.H. Hamman. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. // Mar. Drugs. 2010. V. 8. N 4. P. 1305-1322.
45. Sidorov A.V., Vashkinskaya O.E., Grigorieva A.V., Shekhovtsova T., Veselova I.A., Goodilin E.A. Entrapment into charge transfer complexes for resonant Raman scattering enhancement. // Chem. Comm. V. 50. N 49. P. 6468-6470.
46. Кабанов В.А., Мустафаев В.И. Влияние ионной силы и рН среды на поведение комплексов бычьего сывороточного альбумина с поли-4-винил-N-этилпиридинийбромидом в водных растворах. // ВМС А. 1981. Т. 23. С. 255 – 260.
47. Евдокимов Ю.М., Саянов В.И., Семенов С.В., Ильина А.В., Варламов В.П. Образование жидкокристаллических дисперсий комплексов двухцепочечной ДНК с хитозаном. // Мол. биол. 2002. Т. 36. С. 532 – 541.

48. Кудряшова Е.В., Гладилин А.К., Левашов А.В. Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешено-временной флуоресцентной анизотропии. // Успехи биол. хим. 2002. Т.42. С. 257 – 294.
49. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. 348 с.
50. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 720 с.
51. Стрельцова З.А., Швядас В.К., Максименко А.В., Клесов А.А., Браудо Е.Е., Толстогузов В.Б., Березин И.В. Влияние полиэлектролитов на свойства пенициллинамидазы и щелочной фосфатазы. // Биоорг. химия. 1975. Т. 1. С. 1464 – 1468.
52. Стрельцова З.А., Браудо Е.Е., Толстогузов В.Б. Исследование влияния полианионов на каталитические свойства  $\alpha$ -химотрипсина. // Биоорг. химия. 1975. Т. 1. С. 267 – 271.
53. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: МГУ, 1976. 320 с.
54. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П. Пероксидазный катализ и его применение. М.: МГУ, 92 с.
55. Лебедева О.В., Домбровский В.А., Угарова Н.Н., Березин И.В. Кинетика и механизм действия нуклеофилов на реакцию окисления *o*-дианизидина, катализируемую пероксидазой из корней хрена. // Биохимия. 1978. Т. 43. С. 1024 – 1033.
56. Khmel'nitsky Yu. L., Levashov A.V., Klyachko N.L., Martinek K. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. // Enzyme Microb. Techn. 1988. V. 10. P. 710 – 728.
57. Halling P.J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. // Enzyme Microb. Techn. 1994. V. 16. P. 178 – 206.



58. *Levitsky V., Lozano P., Gladilin A., Iborra J.L.* Stability of immobilized enzyme–polyelectrolyte complex against irreversible inactivation by organic solvents. // *Prog. Biotechnol.* 1998. V. 5. P. 417 – 422.
59. *Gebicka L., Gebicki J.* Dimethyl sulfoxide rather than superoxide is the reactive species in horseradish peroxidase –  $\text{KO}_2/\text{DMSO}$  system. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995. V. 37. P. 1021 – 1026.
60. *Mozhaev V.V., Kudryashova E.V., Efremova N.V., Topchieva I.N.* Stability of  $\alpha$ -chymotrypsin conjugated with poly(ethylene glycols) and proxanols at high temperature and in water-cosolvent mixtures. // *Biotechnol. Techn.* 1996. V. 10. P. 849 – 854.
61. *Kudryashova E.V., Gladilin A.K., Vakurov A.V., Heitz F., Levashov A.V., Mozhaev V.V.* Enzyme–polyelectrolyte complexes in water-ethanol mixtures: negatively charged groups artificially introduced into  $\alpha$ -chymotrypsin provide additional activation and stabilization effects. // *Biotechnol. Bioeng.* 1997. V. 55. P. 267 - 277.
62. *Wang J., Dempsey E., Eremenko A.* Organic-phase biosensing of enzyme inhibitors. // *Anal. Chim. Acta.* 1993. V. 276. P. 203 – 208.
63. *Gebicka L., Gebicki J.* Dimethyl sulfoxide rather than superoxide is the reactive species in horseradish peroxidase –  $\text{KO}_2/\text{DMSO}$  system. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995. V. 37. P. 1021 – 1026.
64. *Gribenov K., Klibanov A.M.* Can conformational changes be responsible for solvent and excipient effects on the catalytic behavior of subtilisin *Carlsberg* in organic solvents? // *Biotechnol. Bioeng.* 1997. V. 53. P. 351 - 362.
65. *Родионов П.В., Веселова И.А. Шеховцова Т.Н.* Оптические сенсоры для определения фенольных соединений различного строения. // *Журн. аналит. хим.* 2013. Т.68. № 11. С. 1043-1139.
66. *Еремина О.Е., Сидоров А.В., Веселова И.А., Лакеев В.Г., Гудилин Е.А., Суртаев В.Н., Рудяк К.Б.* О возможности экспресс-анализа хлорсодержащих соединений в нефтепродуктах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния. // *Нефтяное хозяйство.* 2016. № 11. С. 68-71.

67. Нейродегенеративные заболевания : от генома до целостного организма. *Под ред. Угрюмова М.В.* Москва: Научный мир, 2014. 580 с.
68. *Johnson R. M., Siddiqi I. W.* The Determination of Organic Peroxides: Monographs in Organic Functional. New York: Elsevier, 2013. 117 p.
69. *Wagner M., Brumelis D., Gehr R.* Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent. // *Water Environ Res.* 2002. V. 74. N 1. P. 33-50.
70. *Linley E., Denyer St. P., Mc. Donnell G., Maillard C.S.J.-Y.* Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2012. V. 67. N 7. P. 1589–1596.
71. *Burin V.M., Arcari S.G., Costa L.L., Bordignon-Luiz M.T.* Determination of some phenolic compounds in red wine by RP-HPLC: method development and validation. // *J. Chrom. Sci.* 2011. V. 49. N 8. P. 647-51.
72. *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.
73. *Veselova I.A., Malinina L.I., Barsukova M.E., Tokareva A.I., Buslova T.S., Sokolova L.S., Pirogov A.V., Shekhovtsova T.N.* A novel multi-purpose enzymatic system and procedures for the rapid fluorescent determination of flavonoids in herbal pharmaceuticals and plant materials. // *Talanta.* 2017. V. 171. P. 108-114.
74. *Pomeranz Y., Meloan C.E.* Food Analysis: Theory and Practice. Springer. 2000. P. 778.
75. *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. хим. 2016. Т.71. № 9. С. 971-982.

76. *Dobes J., Zitka O., Sochor J., Ruttkay-Nedecky B., Babula P., Beklova M., Kynicky J., Hubalek J., Klejdus B., Kizek R., Adam V.* Electrochemical Tools for Determination of Phenolic Compounds in Plants. // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013. V.8. P. 4520 – 4542.

77. *Krawczyk T., Baj S.* Advances in the Determination of Peroxides by Optical and Spectroscopic Methods. // *Anal. Lett.* 2014. V. 47. N. 13. P. 2129-2147.

78. *Ramos M.C., Torijas M.C., Diaz A.N.* Enhanced chemiluminescence biosensor for the determination of phenolic compounds and hydrogen peroxide. // *Sens. and Act. B.* 2001. V. 73. P. 71-75.

79. *Fiorentino D., Gallone A., Fiocco D., Palazzo G., Mallardi A.* Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. P. 2033-2037.

80. *Canizares M.P., Tena M.T., Castro L.M.D.* On line coupling of a liquid-liquid extraction flow-reversal system to a spectrophotometric flow-through sensor for the determination of phenols in olive oil. // *Anal. Chim. Acta.* 1996. V. 323. P. 55-62.

81. *Medina A.R., Fernandez de Cordova M.L., Diaz A.M.* Sensitive determination of adrenaline by means of a flow-through solid phase UV spectrophotometric sensing device. // *Mikrochim. Acta.* 2000. V. 134. P. 101-105.

82. *Paranjpe P., Dutta S., Karve M., Padhye S., Narayanaswamy R.* A disposal optode using immobilized tyrosinase films. // *Anal. Biochem.* 2001. V. 294, P.102-107.

83. *Sakuragawa A., Taniai T., Okutani T.* Fluorometric determination of microamounts of hydrogen peroxide with an immobilized enzyme prepared by coupling horseradish peroxidase to chitosan beads. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 374. P. 191-200.

84. *Diaz A.N., Ramos M.C., Torijas M.C.* Sol-gel peroxidase biosensor for hydrogen peroxide detection by chemiluminescence. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 363. P. 221-227.

85. *Rubtsova M.Y., Kovba G.V., Egorov A.M.* Chemiluminescent biosensors based on po-

- rous supports with immobilized peroxidase. *Biosens. Bioelectron.* 1998. V. 12. P. 75-85.
86. *Collaudin A.B., Blum L.J.* Enhanced luminescent response of a fiber-optic sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by a high-salt-concentration medium. // *Sens. and Act. B.* 1997. V. 38 – 39. P. 189-194.
87. *Русанова Т.Ю., Штыков С.Н.* Нанотехнологии в оптических и пьезоэлектрических сенсорах. М.: Научная книга, 2009. 65 с.
88. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры. Москва: Техносфера. 2005. 335 с.
89. *Yang X., Niu C.G., Shen G.L., Yu R.Q.* Picric acid sensitive optode based on a fluorescence carrier covalently bound to membrane. // *Analyst.* 2001. V. 126. P. 349-352.
90. *Niu C.G., Li Z.Z., Zhang X.B., Lin W.Q., Shen G.L., Yu R.Q.* Covalently immobilized aminonaphthalimide as fluorescent carrier for the preparation of optical sensors. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 372. P. 519-524.
91. *Hu Y.J., Tan S.Z., Shen G.L., Yu R.Q.* A selective optical sensor for picric acid assay based on photopolymerization of 3-(N-methacryloyl) amino-9-ethylcarbazole. // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 570. P.170-175.
92. *Raymo F.M., Cejas M.A.* Supramolecular association of dopamine with immobilized fluorescent probes. // *Org. Lett.* 2002. V. 14. № 19. P. 3183-3185.
93. *Cejas M., Raymo F.M.* Fluorescent diazopyrenium films and their response to dopamine. // *Langmuir.* 2005. V. 21. P. 5795-5802.
94. *Russell I.M., Burton S.G.* Development and demonstration of an immobilized-polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water. // *Anal. Chim. Acta.* 1999. V. 389. P 161-170.
95. *Abdullah J., Ahmad M., Heng L.Y., Karuppiah N., Sidek H.* Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. // *Sens. and Act. B.* 2006. V. 114. P. 604-609.

96. *Abdullah J., Ahmad M., Karuppiah N., Heng L.Y., Sidek H.* Chitosan-based tyrosinase optical phenol biosensor employing hybrid nafion/sol-gel silicate for MBTH immobilization. // *Talanta*. 2006. V. 40. P. 527-532.
97. *Abdullah J., Ahmad M., Heng L.Y., Karuppiah N., Sidek H.* Stacked films immobilization of MBTH in nafion/sol-gel silicate and horseradish peroxidase in chitosan for the determination of phenolic compounds. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. P. 1285-1292.
98. *Abdullah J., Ahmad M., Heng L.Y., Karuppiah N., Sidek H.* An optical biosensor based on immobilization of laccase and MBTH in stacked films for the detection of catechol. // *Sensors*. 2007. V. 7. P. 2238-2250.
99. *Maue M., Shrader T.* A color sensor for catecholamines. // *Angew. Chem.* 2005. V. 44. P. 2265-2270.
100. *Apak R., Cekic S.D., Cetinkaya A., Filik H., Hayvali M., Kilic E.* Selective determination of catechin among phenolic antioxidants with the use of a novel optical fiber reflectance sensor based on indophenol dye formation on nano-sized TiO<sub>2</sub>. // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. P. 2769-2777.
101. *Patra D., Mishra A.K.* Fluorescence quenching of benzo[k]fluoranthene in poly(vinyl alcohol) film: a possible optical sensor for nitro aromatic compounds. // *Sens. and Act. B.* 2001. V.80. P. 278-282.
102. *Zhou X., Huang J., Li M., Wang B.* A novel method of adrenaline concentration detection using fiber optical biosensor based on the catalysis of iron (II) phthalocyanine. // *Proceedings of SPIE*. 2009. V. 7278. P. 1-8.
103. *Park S.A., Jang E., Koh W.G., Kim B.* Fabrication and characterization of optical biosensors using polymer hydrogel microparticles and enzyme-quantum dot conjugates. // *Sens. and Act. B.* 2010. V. 150. P. 120-125.
104. *She N., Gao M., Cao L., Wu A., Isaacs L.* Sensor for nitrophenol based on a fluorescent molecular clip. // *Org. Lett.* 2009. V. 11. № 12. P. 2603-2606.

105. *Yoon J., Czarnik A.W.* Fluorescent chemosensing of catechol and catecholamines in water. // *Bioorg. Med. Chem.* 1993. V.1. № 4. P. 267-271.
106. *Secor K., Glass T.E.* Selective amine recognition: development of a chemosensor for dopamine and norepinephrine. // *Org. Lett.* 2004. V. 6. № 24. P. 3727-3720.
107. *Coscun A., Akkaya E.U.* Three-point recognition and selective fluorescence sensing of L-DOPA. // *Org. Lett.* 2004. V. 6. № 18. P. 3107-3109.
108. *Kolusheva S., Moly O., Herm M., Schrader T., Jelinek R.* Selective detection of catecholamines by synthetic receptors embedded in chromatic polydiacetylene vesicles. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 10000-10001.
109. *Ramos M.C., Torijas M.C., Diaz A.N.* Enhanced chemiluminescence biosensor for the determination of phenolic compounds and hydrogel peroxide. // *Sens. and Act. B.* 2001. V. 73. P. 71-75.
110. *Fiorentino D., Gallone A., Fiocco D., Palazzo G., Mallardi A.* Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. P. 2033-2037.
111. *Canizares M.P., Tena M.T., Castro L.M.D.* On line coupling of a liquid-liquid extraction flow-reversal system to a spectrophotometric flow-through sensor for the determination of phenols in olive oil. // *Anal. Chim. Acta.* 1996. V. 323. P. 55-62.
112. *Medina A.R., Fernandez de Cordova M.L., Diaz A.M.* Sensitive determination of adrenaline by means of a flow-through solid phase UV spectrophotometric sensing device. // *Mikrochim. Acta.* 2000. V. 134. P. 101-105.
113. *Paranjpe P., Dutta S., Karve M., Padhye S., Narayanaswamy R.* A disposal optode using immobilized tyrosinase films. // *Anal. Biochem.* 2001. V. 294, P.102-107.
114. *Shim Y.B., Kim K.H., Wom M.S., Park H., Jin C.S.* Development of a portable phenol-sensing system with a one-chip microcomputer. // *J. Korean Chem. Soc.* 1996. V. 40. № 5. P. 333-340.
115. *Filik H., Hayvali M., Kilic E., Apak R., Aksu D., Yanaz Z., Cengel T.* Development

of an optical fiber reflectance sensor for p-aminophenol detection based on immobilized bis-8-hydroxyquinoline. // *Talanta*. 2008. V. 77. P. 103-109.

116. *Filik H., Aksu D., Apak R., Sener I., Kilic E.* An optical fiber reflectance sensor for p-aminophenol detection based on tetrahydroxycalix[4]arene as sensing reagent. // *Sens. and Act. B*. 2009. V.136. P. 105-112.

117. *Zeng H.H., Wang K.M., Liu C.L., Yu R.Q.* A reversible optode membrane for picric acid based on the fluorescence quenching of pyrene. // *Talanta*. 1993. V. 40. № 10. P. 1569-1573.

118. *Zeng H.H., Wang K.M., Yu R.Q.* Development of an optrode membrane for the determination of picric acid based on fluorescence energy transfer. // *Anal. Chim. Acta*. 1994. V. 298. P. 271-277.

119. *Ni R., Tong R.B., Guo C.C., Shen G.L., Yu R.Q.* An anthracene/porphyrin dimer fluorescence energy transfer sensing system for picric acid. // *Talanta*. 2004. V. 63. P. 251-257.

120. *Chan W.H., Lee A.W.M., Lam Y.S., Wang K.M.* Fluorescent sensor based on newly synthesized fluorescein octadecyl ether octadecyl ester (FODEE) for direct determination of phenols in aqueous solutions. // *Anal. Chim. Acta*. 1997. V. 351. P. 197-203.

121. *Wang Y., Wang K.M., Shen G., Yu R.Q.* A selective optical chemical sensor for o-nitrophenol based on fluorescence quenching of curcumin. // *Talanta*. 1997. V. 44. P. 1319-1327.

122. *Wang X., Zeng H., Zhao L., Lin J.M.* A selective optical chemical sensor for 2,6-dinitrophenol based on fluorescence quenching of a novel functional polymer. // *Talanta*. 2006. V. 70. P. 160-168.

123. *Yang R.H., Wang K.M., Xiao D., Luo K., Yang X.H.* A renewable liquid drop sensor for di- or trinitrophenol based on fluorescence quenching of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride. // *Analyst*. 2000. V. 125. P. 877-882.

124. *Wu X.J., Choi M.M.F., Wu X.M.* An organic-phase optical phenol biosensor cou-

pling enzymatic oxidation with chemical reduction. // *Analyst*. 2004. V. 129. P. 1143-1149.

125. *Huang J., Fang H., Liu C., Gu E., Jiang D.* A novel fiber optic biosensor for the determination of adrenaline based on immobilized laccase catalysis. // *Anal. Lett.* 2008. V. 41. № 8. P. 1430-1442.

126. *Lu J., Zhang Z.* A reusable optical sensing layer for picric acid based on the luminescence quenching of the Eu-thenoyltrifluoroacetone complex. // *Anal. Chim. Acta.* 1996. V. 318. P. 175-179.

127. *Wang X., Zeng H., Wei Y., Lin J.M.* A reversible fluorescence sensor based on insoluble  $\beta$ -cyclodextrin polymer for direct determination of bisphenol A (BPA). // *Sens. and Act. B.* V. 2006. P.565-572.

128. *Radu D.R., Lai C.Y., Wiench J.W., Pruski M., Lin V.S.Y.* Gatekeeping layer effect: a poly(lactic acid)-coated mesoporous silica nanosphere-based fluorescence probe for detection of amino-containing neurotransmitters. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 1640-1641.

129. *Yang R.H., Wang K.M., Long L.P., Chan W.H., Yang X.H.* A selective PVC membrane for di- or trinitrophenol based on *N,N*-dibenzy-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. // *Analyst*. 2002. V. 127. P. 119-124.

130. The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE): Research Initiatives and Results. *Ed. Navard P.* 2012. Springer. 401 p.

131. *Yang R.H., Wang K.M., Long L.P., Chan W.H., Yang X.H.* A selective PVC membrane for di- or trinitrophenol based on *N,N*-dibenzy-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. // *Analyst*. 2002. V. 127. P. 119-124.

132. *Lahaye M., Rochas C.* Chemical structure and physico-chemical properties of agar. // *Hydrobiologia*. 1991. V. 221. № 1. P. 137.

133. *B. M. Brena. F. Batista-Viera.* Immobilization of enzymes. // *Methods Biotechnol.* 2006. V. 22. P. 15-30.



134. *Dutta P.K., Dutta J., Tripathi V.S.* Chitin and chitosan: chemistry, properties and application. // *J. Sci. Ind. Res.* 2004. V. 63. P. 20-31.
135. *Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П.* ХИТИН, ХИТОЗАН. Получение, свойства и применение. М: Наука, 2002. 365 с.
136. *Wang G., Xu J.J., Ye L.H., Zhu J.J., Chen H.Y.* Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan. // *Bioelectrochemistry.* 2002. V. 57. P. 33-38.
137. *Fan Q., Shan D., Xue H., He Y., Cosnier S.* Amperometric phenol biosensor based on laponite clay-chitosan nanocomposite matrix. // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 22. P. 816-821.
138. *Han E., Shan D., Xue H., Cosnier S.* Hybrid material based on chitosan and layered double hydroxides: characterization and application to the design of amperometric phenol biosensor. // *Biomacromolecules.* 2007. V. 8. P. 971-975.
139. *Payne, G. F., M. V. Chaubal, T. A. Barbari.* Enzyme-catalyzed polymer modification: reaction of phenolic compounds with chitosan films. // *Polymer.* 1996. V. 37. P. 4643-4648.
140. *Kumar G., Bristow J.F., Smith P.J., Payne G.F.* Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. // *Polymer.* 2000. V. 41. P. 2157-2168.
141. *Kumar M. N. V., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb. A. J.* Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives // *Chem. Rev.* 2004. V. 104. P. 6017-6084.
142. *Shao L., Kumar G., Lenhart J.L., Smith P.J., Payne G.F.* Enzymatic modification of the synthetic polymer polyhydroxystyrene. // *Enzyme Microb. Technol.* 1999. V. 25. P. 660-668.
143. *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. // *Завод. лаб.* 2011. Т. 77. № 4. С. 23-28.

144. *Pelle F.D., Compagnone D.* Nanomaterial-Based Sensing and Biosensing of Phenolic Compounds and Related Antioxidant Capacity in Food. // *Sensors*. 2018. V. 18. N. 2. P. 462-494.
145. *Saini S., Hall G.F., Downs M.E.A., Turner A.* Organic-phase enzyme electrode. // *Anal. Chim. Acta*. 1991. V. 249. P. 1-15.
146. *Wang B., Dong Sh.* Organic-phase enzyme electrode for phenolic determination based on a functionalized sol-gel composite. // *J. Electroanal. Chem.* 2000. V. 487. P. 45-50.
147. *Campanella L., Favero G., Persi L., Sammartino M.P., Tomassetti M., Visco G.* Organic phase enzyme electrodes: applications and theoretical studies. // *Anal. Chim. Acta*. 2001. V. 426. P. 235-247.
148. *Yu. J, Ju H.* Pure organic phase phenol biosensor based on tyrosinase entrapped in a vapor deposited titania sol-gel membrane. // *Electroanalysis*. 2004. V. 16. P. 1305-1310.
149. *Yu J., Liu S., Ju H.* Mediator-free phenol sensor based on titania sol/gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method. // *Anal. Chim. Acta*. 2001. V. 441. P. 95-105.
150. *Zhang S., Zhao H., John R.* A dual-phase biosensing system for the determination of phenols in both aqueous and organic media. // *Anal. Chim. Acta* . 2001. V. 441. P. 95-105.
151. *Gutes A., Cespedes F., Alegret S., Valle M.* Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis. // *Biosens. Bioelectron.* 2005. V. 20. P. 1668-1673.
152. *Abdullah J., Ahmad M., Heng L.Y., Karuppiah N., Sidek H.* Evaluation of an optical phenolic biosensor signal employing artificial neural networks. // *Sens. Actuators, B*. 2008. V. 134. P. 959-965.
153. *Torrecilla J. S., Mena M. L., Yanez-Sedeno P., Garcia J.* Application of artificial neural network to the determination of phenolic compounds in olive oil mill wastewater. // *J. Food Eng.* 2007. V. 81. P. 544-552.

154. Bioelectrochemistry; fundamentals, experimental techniques, and applications. P.N Bartlett, Ed. Wiley: 2008. 478 p.
155. Wu X. J., Choi M. M. F., Wu X. M. An organic-phase optical phenol biosensor coupling enzymatic oxidation with chemical reduction. // *Analyst*. 2004. V. 129. P. 1143-1149.
156. Osina M. A., Bogdanovskaya V. A., Tarasevich M. R. Bioamperometric Assay of Phenol Derivatives Using a Laccase-Nafion Composite. // *Russian J. Electrochem.* 2003. V. 39. P. 407-412.
157. Campanella L., Favero G., Sammartino M. P., Tomassetti M. The effect of organic solvent properties on the response of a tyrosinase enzyme sensor. // *Talanta*. 1994. V. 41. P. 1015-1023.
158. Serra B., Reviejo A.J., Pingarron J. M. Composite multienzyme amperometric biosensors for an improved detection of phenolic compounds. // *Electroanalysis*. 2003. V. 15. P. 1737-1744.
159. Chang S.C., Rawson K., McNeil C.J. Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols. // *Biosens. Bioelectron.* 2002. V. 17. P. 1015-1023.
160. Kaoutit M. E., Naranjo-Rodriguez I., Temsamani K., Dominguez de la Vega M., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros J.L. Dual laccase-tyrosinase based sonogel-carbon biosensor for monitoring polyphenols in beers. // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 8011-8018.
161. Solna R., Sklada P. Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds using a biosensor with immobilized laccase, peroxidase and tyrosinase. // *Electroanalysis*. 2005. V. 17. P. 2137-2146.
162. Jarosz-Wilkolazka A., Ruzgas T., Gorton L. Amperometric detection of mono- and diphenols at Cerrena unicolor laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. // *Talanta*. 2005. V. 66. P. 1219-1224.

163. *Ettinger M., Ruchhoft C., Lishka R.* Sensitive 4-aminoantipyrine method for phenolic compounds. // *Anal. Chem.* 1951. V. 23. P. 1783-1788.
164. *Yamaguchi Y., Hayashi Ch.* Determination of urinary total phenolic compounds with use of 4-aminoantipyrine: suggested screening test for hyperthyroidism and for catecholamine-producing tumor. // *Clin. Chem.* 1977. V. 23. P. 2151-2154.
165. *Fiamegos, Y., Stalikas C., Pilidis G.* 4-Aminoantipyrine spectrophotometric method of phenol analysis: Study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection. // *Anal. Chim. Acta.* 2002. V. 467. P. 105-114.
166. *Cun-guang Y.* Progress of optical determination for phenolic compounds in sewage. // *J. Environ. Sci.* 1998. V. 10. P. 76-86.
167. *Pospisilova M., Polasek M., Svobodova D.* Spectrophotometric study of reactions of substituted phenols with MBTH in alkaline medium; the effect of phenol structure on the formation of analytically useful colored products. // *Mikrochim Acta.* 1998. V. 129. P. 201-208.
168. *Gasparic J., Svobodova D., Pospisilova M.* Investigation of the color reaction of phenols with the MBTH reagent. // *Mikrochim. Acta.* 1977. V. 1. P. 241-250.
169. *Решетняк Е.А., Никитина Н.А., Логинова Л.П., Мчедлов-Петросян Н.О., Светлова Н.В.* Протолитические и комплексообразующие свойства индикаторов в среде желатинового геля. // *Вісник Харківського національного університету.* 2005. № 669. Хімія. Вип. 13 (36). С. 67-82.
170. *Коновалова О.Ю., Логинова Л.П.* Особенности протекания индикаторной реакции на первичные ароматические амины в желатиновой пленке. // *Методы и объекты химического анализа.* 2008. Т. 3. № 2. С. 147-156.
171. *Svobodova D., Gasparic J.* Investigation of the colour reaction of phenols with 4-aminoantipyrine. // *Mikrochim. Acta.* 1971. V. 2. P. 384-390.
172. *Singh M., Thomas M.* Biocatalytic oxidation of hydroquinone to *p*-benzoquinone in a water-organic solvent two-phase system. // *Biotechnol. Lett.* 1985. V. 7. P. 663-664.

173. *Vau Maanen J.M.S., Verkerk U.H., Broersen J., Lafleur M.V.M., De Vries J., Retel J., Pinedo H.M.* Semi-quinone formation from the catechol and ortho-quinone metabolites of the antitumor agent VP-16-213. // *Free Rad. Res. Comms.* 1988. V. 4. P. 371-384.
174. *Erdem A., Pabuccuoglu A., Meric B., Kerman K., Osnoz M.* Electrochemical biosensor based on horseradish peroxidase for the determination of oxidizable drugs. // *Turk. J. Med. Sci.* 2000. V. 30. P. 349-354.
175. *Morozova O.V., Shumakovich G.P., Shleev S.V., Yaropolov Y.A.* Laccase-mediator systems and their applications: a review. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2007. V. 43. P. 523-535.
176. *Gregg D.C., Nelson J.M.* The action of tyrosinase on hydroquinone. // *J. Am. Chem. Soc.* 1940. V. 62. P. 2510-2512.
177. *Mayberry J.M., Malette M.F.* Inhibition of the tyrosinase oxidation of one substrate by another. // *J. Gen. Physiol.* 1962. V. 45. P. 1239-1245.
178. *Divi R.L., Doerge D.R.* Mechanism-based inactivation of lactoperoxidase and thyroid peroxidase by resorcinol derivatives. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 9668-9674.
179. *Battino R., Rettich T., Tominaga T.* The solubility of oxygen and ozone in liquids. // *J. Phys. Chem. Data.* 1983. V. 12. P. 163-178.
180. *Дерффель К.* Статистика в аналитической химии. М.: Мир. 1994. 267 с.
181. *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 гемоглобина. // *Прикл. Биохим. Микробиол.* 2017. Т. 53. № 2. P. 146-154.
182. *Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J., Rietjens I.M.* Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 378. P. 224-233.

183. *Boots A.W, Kubben N., Haenen G., Bast A.* Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 308. P. 560-565.
184. *Takahama U.* Spectrophotometric study on the oxidation of rutin by horseradish peroxidase and characteristics of the oxidized products. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 882. P. 445-451.
185. *Munoz-Munoz J.L., Garcia-Molina F., Varon R, Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Canovas F., Tudela J.* Kinetic characterization of the oxidation of esculetin by polyphenol oxidase and peroxidase. // *J. Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007 V. 71. P. 390-396.
186. *Leung K.-N., Leung P.Y., Kong L.P., Leung P. K.* Immunomodulatory Effects of Esculetin (6,7-Dihydroxycoumarin) on Murine Lymphocytes and Peritoneal Macrophages. // *Cell. Mol. Immunol.* 2005. V. 2. P. 181-188.
187. *Ogbu Ambrose E., Egbuonu Anthony C.C., Lawrence E.* Time and dose dependent effects of esculetin on some routine parameters of biochemical function in male wistar rats. // *U.S. Int. Res. J. Biochem. Bioinform.* 2012. V. 2. P. 105-108.
188. *Lisdat F., Wollenberger U., Paeschke M., Scheller F.W.* Sensitive catecholamine measurement using a monoenzymatic recycling system. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 368. P. 233-241.
189. *Carralero V., Mena M. L., Gonzalez-Cortes A., Yanez-Sedeno P., Pingarron, J. M.* Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines. // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 528. P. 1-8.
190. 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.* 2018. В печати.
191. *Asakawa T.M.* Colorimetric determination of peroxide value with potassium iodide-silica gel reagent. // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1978. V. 55. P. 619.

192. *Hara S., Totani Y.* A highly sensitive method for the micro-determination of lipid hydroperoxides by potentiometry. // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1988. V. 65. P. 1948.
193. *Hui S., Chiba H., Sakurai T., Asakawa C., Nagasaka H., Murai T., Ide H., Kurosawa T.* An improved HPLC assay for phosphatidylcholine hydroperoxides (PCOOH) in human plasma with synthetic PCOOH as internal standard. // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 857. №. 1. P. 158.
194. *Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В.* Определение содержания липогидропероксидов в липопротеинах сыворотки крови с использованием системы микропероксидаза–люминол. // *Вестн. РГМУ.* 2011. № 5. С. 54.
195. *Wada M., Inoue K., Ihara A., Kishikawa N., Nakashima K., Kurodab N.* Determination of organic peroxides by liquid chromatography with on-line post-column ultraviolet irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection. // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 987. P. 189.
196. *Etsuo N.* Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1840. № 2. P. 809.
197. *Tokumar S., Iguchi H., Kojo S.* Mechanisms of ageing and development. // *Mech. Ageing Dev.* 1996. V. 86. P. 67.
198. *Tokumar S., Tsukamoto I., Iguchi H., Kojo S.* Specific and sensitive determination of lipid hydroperoxides with chemical derivatization into 1-naphthylidiphenylphosphine oxide and high-performance liquid chromatography. // *Anal. Chim. Acta.* 1995. V. 307. P. 97.
199. *Asano M., Nushid H., Adachi J., Nagasaki Y., Nakagawa K., Kuse A., Ueno Y.* Lipid hydroperoxides in human plasma after ethanol consumption. // *Legal Med.* 2009. V. 11. P. S223.
200. *Miyazawa T., Fujimoto K., Suzuki T., Yasuda K.* Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 233. P. 324.

201. *Yamamoto Y.* Chemiluminescence-based high-performance liquid chromatography assay of lipid hydroperoxides. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 233. P. 319.
202. *Meguro H., Akasaka K., Ohru H.* Determination of hydroperoxides with fluorometric reagent diphenyl-1-pyrenylphosphine. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 186 P. 157.
203. *Angeli J.P.F, Garcia C.C.M., Sena F., Freitas P., Miyamoto S., Medeiros M.H.G., Mascio P.D.* Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells. // *Free Radical Biol. Med.* 2011. V. 51. P. 503.
204. *Mokrushina A.V., Heim M., Karyakina E.E., Kuhn A., Karyakin A.A.* Enhanced hydrogen peroxide sensing based on Prussian Blue modified macroporous microelectrodes. // *Electrochem. Commun.* 2013. V. 29. P. 78.
205. *Adhoum N., Monser L.* Electrochemical sensor for hydroperoxides determination based on Prussian blue film modified electrode. // *Sens. Actuators B.* 2008. V. 133. № 2. P. 588.
206. *Chang H., Wang X., Shiu K. K., Zhu Y., Wang J., Li Q., Chen B., Jiang H.* Layer-by-layer assembly of graphene, Au and poly(toluidine blue O) films sensor for evaluation of oxidative stress of tumor cells elicited by hydrogen peroxide. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 41. P. 789.
207. *Moozarm N.P., Lorestani F., Meng W.P., Alias Y.* A novel non-enzymatic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor based on polypyrrole nanofibers–silver nanoparticles decorated reduced graphene oxide nano composites. // *Appl. Surf. Sci.* 2015. V. 332. P. 648.
208. *Koodlur L.S.* Layer-by-layer self assembly of a water-soluble phthalocyanine on gold. Application to the electrochemical determination of hydrogen peroxide. // *Bioelectrochem.* 2013. V. 91. P. 21.
209. *Pillay J., Ozoemena K.I.* Layer-by-layer self-assembled nanostructured phthalocyaninatoiron(II)/SWCNT-poly(m-aminobenzenesulfonic acid) hybrid system on gold surface: Electron transfer dynamics and amplification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response. // *Electrochim. Acta.* 2009. V. 54. № 22. P. 5053.



210. *Dontsova E.A., Zeifman Y.S., Budashov I.A., Eremenko A.V., Kalnov S.L., Kurochkin I.N.* Screen-printed carbon electrode for choline based on MnO<sub>2</sub> nanoparticles and choline oxidase/polyelectrolyte layers. // *Sens. Actuators B: Chemical*. 2011. V. 159. № 1. P. 261.
211. *Campanella L., Giancola D., Gregori E., Tomassetti M.* Determination of hydroperoxides in nonaqueous solvents or mixed solvents, using a biosensor with two antagonist enzymes operating in parallel. // *Sens. Actuators B*. 2003. V. 95. P. 321.
212. *Lin X.Q., Chen J., Chen Z.H.* Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on immobilization of horseradish peroxidase on methylene blue modified graphite electrode. // *Electroanal*. 2000. V. 12. № 4. P. 306.
213. *Ahammad S.* Hydrogen peroxide biosensors based on horseradish peroxidase and hemoglobin. // *J. Biosens. Bioelectron*. 2013. P. 39.
214. *Kogularasu S., Govindasamy M., Chen S.-M., Akilarasan M., Mani V.* 3D graphene oxide-cobalt oxide polyhedrons for highly sensitive non-enzymatic electrochemical determination of hydrogen peroxide. // *Sens. Actuators B*. 2017. V. 253. P. 773.
215. *Ensafi A.A., Rezaloo F., Rezaei B.* Electrochemical sensor based on porous silicon/silver nanocomposite for the determination of hydrogen peroxide. // *Sens. Actuators B*. 2016. V. 231. P. 239.
216. *Zhang R., Chen W.* Recent advances in graphene-based nanomaterials for fabricating electrochemical hydrogen peroxide sensors. // *Biosens. Bioelectron*. 2017. V. 89. P. 249.
217. *Hu Y., Zhang Q., Guo Z., Wang S.* CoA-dependent coordination polymer as a novel electrochemical sensing platform for sensitive detection of hydrogen peroxide in biological environments. // *J. Electroanal. Chem*. 2017. V. 801. P. 306.
218. *Ben-Amor S., Vanhovec E., Belaidi F.S., Charlot S., Colin D., Rigoulet M., Devin A., Sojic N., Launay J., Temple-Boyer P., Arbault S.* Enhanced detection of hydrogen peroxide with platinized microelectrode arrays for analyses of mitochondria activities. // *Electrochim. Acta*. 2014. V. 126. P. 171.

219. *Dutta A.K., Das S., Samanta P.K., Roy S., Adhikary B., Biswas P.* Non-enzymatic amperometric sensing of hydrogen peroxide at a CuS modified electrode for the determination of urine. // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 144. P. 282.
220. *Chunmei Y., Wang L., Lia W., Zhub C., Baoa N., Gua H.* Detection of cellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in living cells based on horseradish peroxidase at the interface of Au nanoparticles decorated graphene oxide. // *Sens. Actuators B.* 2015. V. 211. P. 17.
221. *Gay C.A., Gebicki J.M.* Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylene orange method. // *Anal. Biochem.* 2003. V. 315. № 1. P. 29.
222. *Banerjee D., Madhusoodanan U.K., Sharanabasappa M., Ghosh S., Jacob J.* Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. // *Clin. Chim. Acta.* 2003. V. 337. № 1-2. P. 147.
223. *Bou R., Codony R., Tres A., Decker E.A., Guardiola F.* Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylene orange method: a review of the factors that influence the method's performance. // *Anal. Biochem.* 2008. V. 377. № 1. P. 1.
224. *Arab K., Steghens J.P.* Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylene orange method. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. № 1. P. 158.
225. *Jimenez A.M., Navas M.J.* Chemiluminescence methods (present and future). // *Grasas y Aceites.* 2002. V. 53. № 1. P. 64.
226. *Navas M. J., Jimenez A.M.* Review of chemiluminescent methods in food analysis. // *Food Chem.* 1996. V. 55. P. 7.
227. *Rolewski P., Siger A., Nogala-Kalucka M., Polewski K.* Chemiluminescent assay of lipid hydroperoxides quantification in emulsions of fatty acids and oils. // *Food Res. Int.* 2009. V. 42. P. 165.

228. *Проскурнина Е.В., Джатдоева А.А., Лобиченко Е.Н., Шалина Р.И., Владимиров Ю.А.* Хемилюминесцентное определение гидропероксидов липидов в биологических жидкостях. // Журнал анал. химии. 2017. Т. 72. № 7. С. 639.
229. *Волкова П.О., Алексеев А.В., Джатдоева А.А., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А.* Определение гидропероксидов липидов методом активированной хемилюминесценции. // Вестн. Моск. Ун-та. 2016. Т. 57. № 1. С. 34.
230. *Yamamoto Y., Frei B., Ames B.N.* Assay of lipid hydroperoxides using high-performance liquid chromatography with isoluminal chemiluminescence detection. // Methods Enzymol. 1990. V. 186. P. 371.
231. *Demiyanova A.S., Sakharov I.Yu.* High chemiluminescent activity of Fe III-TAML activator in aqueous-organic media and its use in determination of organic peroxides. // The Analyst. 2015. V. 140. P. 2964.
232. *Nakahara R., Fujimoto T., Doi M., Morita K., Yamaguchi T., Fujita Y.* Fluorophotometric determination of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species with fluorescein hydrazide (FH) and its crystal structure. // Chem. Pharm. Bull. 2008. V. 56. № 7. P. 977.
233. *Nakahara R., Kashitani S., Hayakawa K., Kitani Y., Yamaguchi T., Fujita Y.* Fluorophotometric determination of hydrogen peroxide with fluorescein in the presence of cobalt (II) and reaction against other reactive oxygen species. // J. Fluoresc. 2009. V. 19. № 5. P. 769.
234. *Biswaranjan P.* A modified fluorimetric method for determination of hydrogen peroxide using homovanillic acid oxidation principle. // Bio. Med. Res. Int. 2014. V. 2014. P. 1
235. *Beltyukova S.V., Vityukova E.O., Egorova A.V.* Spectral luminescence properties of Eu(III) complexes with tetracycline antibiotics and hydrogen peroxide. // J. Appl. Spectrosc. 2007. V. 74. № 3. P. 344.

236. Courrol L., Bellini M.H., Tarelho L.V.G., Silva F.R.O., Mansano R.D., Gomes L., Vieira N.D., Sho N. Urea hydrogen peroxide determination in whole blood using europium tetracycline probe. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 355. P. 140.
237. Wolfbeis O.S., Durkop A., Wu M., Lin Z. Europium ion-based luminescent sensing probe for hydrogen peroxide. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002. V. 41. P. 4495.
238. Reed T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. // *Free Radical Biol. Med.* 2011. V. 51. № 7. P. 1302.
239. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 482. № 3. P. 419.
240. Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 338. № 1. P. 668.
241. Konash A., Magner E. Characterization of an organic phase peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized in Eastman AQ. // *Biosens. Bioelectron.* V. 22. 2006. P. 116-123.
242. Campanella L., Martini U., Sammartino M.P., Tomassetti M. A new catalase enzyme sensor able to determine the hydrogen peroxide directly in chloroform. // *Analisis.* 1996. V. 24. P. 288-294.
243. Campanella L., Martini U., Sammartino M.P., Tomassetti M. The effect of organic solvent properties on a catalase enzyme sensor for monitoring hydrogen peroxide in non aqueous solutions. // *Electroanalysis.* 2005. V. 8. P. 1150-1154.
244. Joo H., Yoo Y., Ryu D. A biosensor stabilized by polyethylene glycol for the monitoring of hydrogen peroxide in organic solvent media. // *Enzyme Microb. Technol.* 1996. V. 19. P. 50-56.
245. Bioelectrochemistry; fundamentals, experimental techniques, and applications. P.N Bartlett, Ed. Wiley: 2008. 478 p.

246. *Porsh H.E., Wolfbeis O.S.* Optical sensor for hydrogen peroxide. // *Mikrochim Acta.* 1989. V. 1. P. 41-50.
247. *Lobnik A., Cajlakovic M.* Sol-gel based optical sensor for continuous determination of dissolved hydrogen peroxide. // *Sens. and Act. B.* 2001. V. 74. P. 194-199.
248. *Hanko M., Bruns N., Tiller J.C., Heinze J.* Optical biochemical sensor for determining hydroperoxides in nonpolar organic liquids as archetype for sensors consisting of amphiphilic conetworks as immobilization matrices. // *Anal. Bioanal Chem.* 2006. V. 386. P. 1273-1283.
249. *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.
250. *Левашов А. В.* Катализ ферментами в агрегатах поверхностно-активных веществ. Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. М.: 1987. Т. 4. С.112-158.
251. *Dutta P.K., Dutta J., Tripathi V.S.* Chitin and chitosan: chemistry, properties and application.// *J.Sci.Ind. Res.* 2004. V.63. P.20-31.
252. *Келету Т.* Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. 348 с.
253. *Siddique S., Parveen Z., Ali Z., Zaheer M.* Qualitative and Quantitative Estimation of Hydroquinone in Skin Whitening Cosmetics. // *J. Cosmet., Dermatol. Sci. Appl.* 2012. V. 2. P. 224-228.
254. *Desiderio C., Ossicini L., Fanali S.* Analysis of hydroquinone and some of its ethers by using capillary electrochromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 887. P. 489-496.
255. *Wang L.-H.* Simultaneous determination of hydroquinone ethers in cosmetics after preconcentration at a carbon paste electrode. *Analyst.* 1995. V. 120. P. 2241-2244.
256. *Mailer R., Beckingham C.* Testing olive oil quality: chemical and sensory methods.// *Premefact.* 2006. V. 231. N 1. P.1-5.

257. *Sudeshna G., Parimal K.* Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: A review // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. V. 648. P. 6–14.
258. *Машиковский М.Д.* Лекарственные средства // М.: Медицина. 1972. Т. 1. С. 40 – 57.
259. *Kumazawa T., Hasegawa C., Uchigasaki S., Lee X.-P., Suzuki O., Sato K.* Quantitative determination of phenothiazine derivatives in human plasma using monolithic silica solid-phase extraction tips and gas chromatography–mass spectrometry. // *J. Chromatogr., A.* 2011. V. 1218. P. 2521–2527.
260. *Leung G.N.W., Tang H.P.O., Tso T.S.C., Wan T.S.M.* Separation of basic drugs with non-aqueous capillary electrophoresis. // *J. Chromatogr., A.* 1996. V. 738. P. 141-154.
261. *Tanaka E., Nakamura T., Terada M., Shinozuka T., Hashimoto C., Kurihara K., Honda K.* Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr., B.* 2007. V. 854. P. 116–120.
262. *Zhang G., Terry Jr. A.V., Bartlett M.G.* Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of the lipophilic antipsychotic drug chlorpromazine in rat plasma and brain tissue. // *J. Chromatogr., B.* 2007. V. 854. P. 68–76.
263. *Aly F.A., Alarfaj N.A., Alwarthan A.A.* Flow-injection chemiluminometric determination of some phenothiazines in dosage forms and biological fluids. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 358. P. 255–262.
264. *Karpinska, J.* Simultaneous quantification of promazine hydrochloride. and its sulfoxide in pharmaceutical preparations. // *Anal. Sci.* 2001. V. 17. P. 249 – 253.
265. *Kitamura K., Goto T., Kitade T.* Second derivative spectrophotometric determination of partition coefficients of phenothiazine derivatives between human erythrocyte ghost membranes and water. // *Talanta.* 1998. V. 46. P. 1433–1438.

266. *Ramappa P.G., Sanke G.H., Nayak A.N.* Spectrophotometric method for the determination of phenothiazines and its application to phenothiazine drugs. // *Analyst*. 1980. V.105. P. 663 – 668.
267. *Kojlo A., Puzanowska-Tarasiewicz H., Calatayud J.M.*, Spectrofotometric determination of phenothiazine with an oxidative column FIA manifolds. // *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 1992. V.10. P.785-788.
268. *Revanasiddappa H.D., Ramappa P.G.* Spectrophotometric determinations of some phenothiazine drugs. // *Talanta*. V. 43. 1996. P. 1291-1796.
269. *Hefzel C.A.* Method for the estimation of phenothiazine derivatives in urine and blood. // *Clin. Chem*. V. 7. N. 2. 1961. P. 130 – 135.
270. *Mou C., Ganju N., Sridhar K.S., Krishan A.* Simultaneous quantitation of plasma doxorubicin and prochlorperazine content by high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr., B*. 1997. V. 703. P. 217–224.
271. *Mizuno Y., Sato K., Sano T., Kurihara R., Kojima T., Yamakawa Y., Ishii A., Katsumata Y.* Identification and characterization of 17 phenothiazine compounds by capillary high-performance liquid chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry. // *Leg. Med*. 2002. V. 4. P. 207–216.
272. *Ventura R., Casasampere M., Berges R., Fernandez-Moran J., Segura J.* Quantification of perphenazine in Eurasian otter (*Lutra lutra lutra*) urine samples by gas chromatography–mass spectrometry. // *J. Chromatogr., B*. 2002. V. 769. P. 79–87.
273. *Turunen E., Lehtonen M., Jarvinen T., Jarho P.* Development and validation of a gas chromatographic–mass spectrometric method for quantitative determination of perphenazine in rabbit plasma after sublingual administration. // *J. Chromatogr., B*. 2008. V. 872. P. 51–57.
274. *Saracino M.A., Amore M., Baioni E., Petio C., Raggi M.A.* Determination of selected phenothiazines in human plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with coulometric detection. // *Analyt. Chim. Acta*. 2008. V. 624. P. 308–316.

275. *Pola A., Michalak K., Burliga A., Motohashi N. Kawase M.* Determination of lipid bilayer/water partition coefficient of new phenothiazines using the second derivative of absorption spectra method. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004. V. 21. P. 421 – 427.
276. *Gordeliy V.I., Kiselev M.A., Pole A.V., Teixeira J.* Lipid membrane structure and interactions in DMSO/water mixture. // *Biophys. J.* 1998. V. 75. P. 2343 – 2351.
277. *Веселовский В.П., Богоявленский И.Ф., Сергеев В.П.* Применение диметилсульфоксида в медицине. М: Медицина, 1998. 150 с.
278. *Рогожин В.В.* Peroxidase как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: ГИОРД, 2004. 240 с.
279. *Рогожина Т.В., Рогожин В.В.* Стационарная кинетика индивидуального и совместного окисления фенотиозинов в присутствии пероксидазы хрена. // *Электронный журнал “Исследовано в России”*. 2002. С. 767 – 780.
280. *Escribano J., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F., Losano J.A.* Kinetic study of the transient phase of a second-order chemical reaction coupled to an enzymic step: application to the oxidation of chlorpromazine by peroxidase– hydrogen peroxide. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 831. P. 313 – 320.
281. *Vazquez A., Tudela J., Varon R., Garcia-Canovas F.* Determination of hemoglobin through its peroxidase activity on chlorpromazine. // *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1991. V. 23. P. 45 – 52.
282. *Piette L.H., Bulow G., Yamazaki I.* Electron paramagnetic resonance studies of the chlorpromazine free radical formed during enzymic oxidation by peroxidase – hydrogen peroxide. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1964. V. 88. P. 120 – 129.
283. *Nakano M., Sugoika K., Nakano H., Takyu C., Inaba H.* Generation of electronically excited species during enzymatic oxidation of chlorpromazine and related compound. // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1985. V. 3. P. 952 – 956.
284. *Kelder P.P., de Mol N.J., Fischer M.J.E., Janssen L.H.M.* Kinetic evaluation of the oxidation of phenothiazine derivatives by methemoglobin and horseradish peroxidase in



the presence of hydrogen peroxide. Implications for the reaction mechanisms. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. V. 1205. P. 230 – 238.

285. *Escribano J., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F., Losano J.A.* Kinetic study of the transient phase of a second-order chemical reaction coupled to an enzymatic step: application to the oxidation of chlorpromazine by peroxidase – hydrogen peroxide // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 831. P. 313-320.

286. *Piette L.H., Bulow G., Yamazaki I.* Electron paramagnetic resonance studies of the chlorpromazine free radical formed during enzymatic oxidation by peroxidase – hydrogen peroxide. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1964. V. 88. P. 120-129.

287. *Kelder P.P., de Mol N.J., Fischer M.J.E., Janssen L.H.M.* Kinetic evaluation of the oxidation of phenothiazine derivatives by methemoglobin and horseradish peroxidase in the presence of hydrogen peroxide. Implications for the reaction mechanisms. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. V. 1205. P. 230-238.

288. *Лебедева О.В., Угарова Н.Н.* Механизм пероксидазного окисления. Субстрат-субстратная активация в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена. // *Известия РАН. Сер. Химическая.* 1996. № 1. С. 25-32.

289. *Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И.* Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений. // *Успехи биол. Химии.* 2006. Т. 46. С. 303-322.

290. *Рогожина Т.В., Рогожин В.В.* Фенотиазины – медленно окисляемые субстраты пероксидазы хрена. // *Биомедицинская химия.* 2011. Т. 57. С. 544-553.

291. *Vandemark F.L., Adams R.F., Schmidt G.J.* Tricyclic antidepressants. // *Clin. Chem.* 1978. V. 24. P. 190 - 213.

292. *Aly F., Alarfaj A., Alwarthan A.* Flow-injection chemiluminometric determination of some phenothiazines in dosage forms and biological fluids. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 358. P. 255 - 262.

293. *Madej K., Kala M., Wozniakiewicz M.* LC and non-aqueous CE determination of phenothiazines in autopsy samples. // *Chromatographia*. 2005. V. 62. P. 533 -535.
294. *Milhaud G., Courtot D.* Current techniques and recent advances in veterinary drug analysis with special reference to anthelmintics and tranquilizers. // *Vet. Res. Commun.* 1983. V. 7. P. 107 - 112.
295. *Yamada K., Akiba Y., Shibuya T., Kashiwada A.* Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads. // *Biotechnol. Prog.* 2005. V. 21. P. 823-829.
296. *Jian-Mei Li, Xiang-Guang Meng, Chang-Wei Hu, Juan Du.* Adsorption of phenol, *p*-chlorophenol and *p*-nitrophenol onto functional chitosan. // *Bioresource Technology*. 2009. V. 100. P. 1168-1173.
297. *Kumar N.S., Suguna M., Subbaiah M. V., Reddy A. S., Kumar N. P., Krishnaiah. A.* Adsorption of Phenolic Compounds from Aqueous Solutions onto Chitosan-Coated Perlite Beads as Biosorbent. // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2010. V. 49. P. 9238-9247.
298. *Paine G.F., Chaubal M.V., Barbari T.A.* Enzyme-catalysed polymer modification: reaction of phenolic compounds with chitosan films. // *Polymer*. 1996. V. 37. P. 4643-4648.
299. *Еремин В.В., Каргов С.И.* Основы физической химии. Теория и задачи: Учебное пособие для вузов. М.: Экзамен, 2005. 158 с.
300. *Suresh S., Srivastava V.C., Mishra I.M.* Isotherm, thermodynamics, desorption and disposal study for the adsorption of catechol and 4-nitrophenol by granular activated carbon. // *J. Chem. Eng. Data*. 2011. V. 56. P. 811 – 818.
301. *Blanco-Martinez D.A., Giraldo L., Moreno-Pirajan J.C.* Effect of the pH in the adsorption and in the immersion enthalpy of monohydroxylated phenols from aqueous solutions on activated carbons. // *J. Haz. Mater.* 2009. V. 169. P. 291-296.
302. *Gregg D.C., Nelson J.M.* The action of tyrosinase on hydroquinone. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 62. P. 2510-2512.

303. *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. хим. 2016. Т. 71. № 12. С. 1-15.
304. *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.
305. *Yubero-Lahoz S., Rodríguez J., Faura A., Pascual J., Oliveras A., Cao H., Farré M., Torre R.* Determination of free serotonin and its metabolite 5-HIAA in blood human samples with consideration to pre-analytical factors.// Biomed. Chromatogr. 2014. V. 28. № 12. P. 1641-1646.
306. *Barco S., Alpigiani M.G., Ghiggeri G.M., Talio M., Maffia A., Tripodi G., Cangemi G.* Amoxicillin-associated interference in an HPLC-EC assay for urinary fractionated metanephrines: Potential pitfall in pheochromocytoma biochemical diagnosis// Clin. Biochem. 2014. V. 47. № 15. P. 119-121.
307. *Shen Y., Lu J., Tang Q., Guan Q., Sun Z., Li H., Cheng L.* Evaluation of interferon-gamma release assays in extrasanguineous body fluids for diagnosing tuberculosis: A systematic review and meta-analysis // J. Chromatogr. B. 2015. V. 1002. P. 92-98.
308. *Tohmola N., Itkonen O., Turpeinen U., Joenväärä S., Renkonen R., Hämäläinen E.* Preanalytical validation and reference values for a mass spectrometric assay of serum vanillylmandelic acid for screening of catecholamine secreting neuroendocrine tumors. // Clin. Chim. Acta. 2015. V. 446. P. 206-212.
309. *Bicker J., Fortuna A., Alves G., Falcão A.* Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples// Anal. Chim. Acta. 2013. V. 768. P. 12-34.
310. *Hubbard K., Wells A., Owens T., Tagen M., Fraga C., Stewart C.* Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. // Biomed. Chromatogr. 2010. V. 24. P. 626-631.

311. *Parrot S., Neuzeret P., Denoroy L.* Rapid and sensitive method for the analysis of brain monoamine neurotransmitters using ultra-fast liquid chromatography coupled to electrochemical detection. // *J. Chromatogr. B.* 2011. № 32. V. 879. P. 3871-3878.
312. *Nirogia R., Komarnenia P., Kandikerea V., Boggavarapua R., Bhyrapunenia G., Benadea V., Gorentlab S.* A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2013. V. 913-914. P. 41-48.
313. *Syslová K., Rambousek L., Kuzma M., Najmanová V., Bubeniková-Valešová V., Slamberová R., Kačer P.* Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: method combining freeze-drying with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 21. P. 3382-3391.
314. *Zhu K., Fu Q., Leung K., Wong Z., Choi R., Tsim K.* The establishment of a sensitive method in determining different neurotransmitters simultaneously in rat brains by using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2011. V. 879. № 1-2. P. 737-742.
315. *Wassell J., Reed P., Kane J., Weinkove C.* Freedom from drug interference in new immunoassays for urinary catecholamines and metanephrines. // *Clin. Chem.* 1999. V. 45. № 12. P. 2216-2223.
316. *Пивень Н. В., Бураковский А. И.* // *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2012. №1. P. 93-98.
317. *Spector S.* Catecholamine antigens and antibodies specifictherefor. Patent USA, Int.01. C08G20/38; C08H1/ 00, 3.704.282, 1972.
318. *Weismann D., Peitzsch M., Raida A., Prejbisz A., Gosk M., Riester A., Willenberg H.S., Klemm R., Manz G., Deutschbein T., Kroiss M., Därr R., Bidlingmaier M., Januszewicz A., Eisenhofer G., Fassnacht M.* Measurements of plasma metanephrines by immunoassay vs liquid chromatography with tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma. // *Eur. J. Endocrinol.* 2015. V. 172. № 3. P. 251-260.

319. *Nirogia R., Komarnenia P., Kandikerea V., Boggavarapua R., Bhyrapunenia G., Benadea V., Gorentlab S.* Simultaneous quantification of metronidazole, tinidazole, ornidazole and morinidazole in human saliva. // *J. Chromatogr. B.* 2013. V. 913-914. P. 41-49.
320. *Zhao X., Suo Y.* Simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat endbrain tissues by pre-column derivatization with high-performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification. // *Talanta.* 2008. V.76. № 3. P. 690-697.
321. *Kim J.H., Jin S.-Y., Hong S.S., Lee T.H.* A carcinoid tumour arising within a tailgut cyst: a diagnostic challenge. // *Scott. Med. J.* 2014. V. 59. № 1. P. 14-17.
322. *Elhag S., Ibupoto Z.H., Nur O., Willander M.* Incorporating  $\beta$ -Cyclodextrin with ZnO Nanorods: A Potentiometric Strategy for Selectivity and Detection of Dopamine. // *Sensors.* 2014. V. 14. P. 1654-1664.
323. *Rodriguez M. C., Rubianes M. D., Rivas G. A.* Highly selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and serotonin at glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2008. V. 8. № 11. P. 6003-6009.
324. *Selvaraju T., Ramaraj R.* Electrochemically deposited nanostructured platinum on Nafion coated electrode for sensor applications. // *J. Electroanal. Chem.* 2005. V. 585. P. 290-300.
325. *Li Y. X., Huang X., Chen Y. L., Wang L., Lin X. Q.* Sensitive determination of dopamine and uric acid by the use of a glassy carbon electrode modified with poly(3-methylthiophene)/gold nanoparticle composites. // *Anal. Sci.* 2008 V. 12. P. 1563-1568.
326. *Yogeswaran U., Chen S. M.* Multi-walled carbon nanotubes with poly(methylene blue) composite film for the enhancement and separation of electroanalytical responses of catecholamine and ascorbic acid. // *Sens. Actuat. B.-Chem.* 2008. V. 130. P. 739-749.

327. *Hu W. N., Sun D. M., Ma W.* Simultaneous electrochemical determination of dopamine and epinephrine with a silver-doped poly-(L-glutamic acid) modified electrode// *Chem. Anal.* 2008. V. 53. P. 703-716.
328. *Kang W. J., Niu L. M., Ma L.* Improved one-pot synthesis of 4,6-dihydroxyisophthalic acid and 2,3-dihydroxyterephthalic acid. // *Chin. Chem. Lett.* 2012. V. 20. P. 221-242.
329. *Jiang G., Gu X., Jiang G., Chen T., Zhan W., Tian S.* Detection of dopamine on a mercapto-terminated hexanuclear Fe(III) cluster modified gold electrode.// *Sens. Actuat. B.* 2015. V. 209. P. 122.
330. *Mazloun-Ardakani M., Khoshroo A.* Co/Al layered double hydroxides nanostructures: A binderless electrode for electrochemical capacitor. // *Electrochem. Comm.* 2014. V. 42. P. 9-12.
331. *Rezaei B., Boroujeni M. K., Ensafi A. A.* Fabrication of DNA, o-phenylenediamine, and gold nanoparticle bioimprinted polymer electrochemical sensor for the determination of dopamine. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 66. P. 490-496.
332. *Thayyath S. A., Sheeba A., Aswathy L.* Surface modified multiwalled carbon nanotube based molecularly imprinted polymer for the sensing of dopamine in real samples using potentiometric method. // *Polymer.* 2014. V. 55. P. 4820.
333. *Bouri M., Lerma-García M.J., Salghi R., Zougagh M., Ríos A.* Selective extraction and determination of catecholamines in urine samples by using a dopamine magnetic molecularly imprinted polymer and capillary electrophoresis. // *Talanta.* 2012. V. 99. P. 897-903.
334. *Nikolelis D. P., Petropoulou S.-S. E.* Investigation of interactions of a resorcin[4]arene receptor with bilayer lipid membranes (BLMs) for the electrochemical biosensing of mixtures of dopamine and ephedrine. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1558. P. 238-245.
335. *Sabioni C., Saracino M.A., Mandrioli R.* Simultaneous liquid chromatographic analysis of catecholamines and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol in human plas-

ma. Comparison of amperometric and coulometric detection. // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1032. № 1-2. P. 65-71.

336. *Lee N.S., Hsieh Y.Z., Paisley R.F., Morris M.D.* Surface-enhanced Raman spectroscopy of the catecholamine neurotransmitters and related compounds. // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. P. 442-446.

337. *Kehr J., Yoshitake T., Wang F.H., Wynick D., Holmberg K., Lendahl U., Bartfai T., Yamaguchi M., Hokfelt T., Ogren S.O.* Microdialysis in freely moving mice: determination of acetylcholine, serotonin and noradrenaline release in galanin transgenic mice. // *J. Neurosci. Methods*. 2001. V. 109. P. 71-80.

338. *Yoshitake T., Fujino K., Kehr J., Ishida J., Nohta H., Yamaguchi M.* Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. // *Anal. Biochem.* 2003. V. 312. P. 125-133.

339. *Fujino K., Yoshitake T., Kehr J., Nohta H., Yamaguchi M.* Simultaneous determination of 5-hydroxyindoles and catechols by high-liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1012. P. 169-177.

340. *Yoshitake T., Kehr J., Yoshitake S., Fujino K., Nohta H., Yamaguchi M.* Determination of serotonin, noradrenaline, dopamine and their metabolites in rat brain extracts and microdialysis samples by column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. // *J. Chromatogr. B*. 2004. V.807. P. 177-183.

341. *Simeon N., Myers R., Bayle C., Nertz M., Stewart J.K., Couderc F.* Some application of near-ultraviolet laser-induced fluorescence detection in nanomolar- and subnanomolar-range high performance liquid chromatography or micro-high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B*. 2001. V. 913. P. 253-259.

342. *Tsunoda M., Takezawa K., Masuda M., Imai K.* Rat liver and kidney catechol-*O*-methyltransferase activity measured by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. // *Biomed. Chromatogr.* 2002. V. 16. P. 536-541.
343. *Wang H.Y., Sun Y., Bo T.* Study on fluorescence property of dopamine and determination of dopamine by fluorimetry. // *Talanta.* 2002. 57 № 5. P. 899 – 907.
344. *Kaizer J., Csonka R., Speier G.* TEMPO-Initiated oxidation of *o*-phenylenediamine to 2,3-diaminophenazine. // *React. Kinet. Catal. Lett.* 2002. V. 75. № 2. P. 367-374.
345. *Dong S., Chi L., Yang Z., He P., Wang Q., Fang Y.* Simultaneous determination of dihydroxybenzene and phenylenediamine positional isomers using capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection. // *J. Sep. Sci.* 2009. V. 32. P. 3232–3238.
346. *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.
347. *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. Mat. Interfaces.* 2017. V. 9. № 17. P. 15058-15067.