

УДК 665.6:665.66

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕМСОДЕРЖАЩИХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ОКИСЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕРООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Н.В. Борзенкова, А.В. Кислая, И.А. Веселова, Т.Н. Шеховцова

(кафедра аналитической химии; e-mail: nvborzenkova@gmail.com)

Оптимизированы условия окисления дибензотиофена и алифатических фенотиазинов (промазина и хлорпромазина) в присутствии гемсодержащих биокатализаторов (таких, как пероксидаза хрена и гемоглобин). Показано, что гемоглобин является эффективным катализатором для быстрой и селективной конверсии дибензотиофена до соответствующего сульфоксида (выход $91 \pm 2\%$ за 5 мин); пероксидаза хрена является более перспективным катализатором при окислении фенотиазинов. Изучено влияние полярного органического растворителя (диметилсульфоксида) на кинетические параметры реакции окисления промазина в присутствии гемсодержащих биокатализаторов. Разработаны методики определения фенотиазинов, основанные на спектрофотометрическом контроле за скоростью их окисления. Диапазоны определяемых концентраций для определения промазина и хлорпромазина с использованием пероксидазы хрена в водной среде составили 10–100 и 10–200 мкМ соответственно и 25–500 мкМ при определении промазина в присутствии 10 об.% диметилсульфоксида.

Ключевые слова: фенотиазины, дибензотиофен, селективное окисление, определение, биокатализаторы, органические растворители.

Пероксидаза хрена (ПХ) – хорошо изученный гемсодержащий фермент, нашедший широкое применение в биотехнологии и аналитической практике. С использованием ПХ разработаны различные аналитические системы для определения пероксидов – основных субстратов этого фермента, в частности, пероксида водорода, а также ряда легко окисляемых органических субстратов (фенольных соединений и ароматических диаминов) [1, 2]. В ряде случаев успешное определение субстратов ПХ возможно с помощью систем, основанных на применении аналогов фермента – гемсодержащих белков (гемоглобина, цитохрома с и др.) и биомиметиков (гемина, β -циклодекстрин-гемина, металлопорфиринов и др.) [3, 4]. Преимущество использования гемсодержащих белков заключается в их большей стабильности и меньшей стоимости по срав-

нению с ПХ. Сообщалось, что среди аналогов ПХ гемоглобин (ГБ) проявляет большую каталитическую эффективность в отношении некоторых субстратов (например, *o*-фенилендиамина) [3]. Важная задача для развития биотехнологии и ферментативных методов анализа – применение ПХ и ее аналогов для окисления средне- и трудноокисляемых субстратов, которые являются важными аналитами, однако из-за трудности их окисления отсутствуют методики определения этих соединений с использованием ферментов или миметиков. К средне- и трудноокисляемым субстратам ПХ относятся серосодержащие гетероциклические соединения, которые можно разделить на два класса: производные фенотиазина (среднеокисляемые) и производные дибензотиофена (трудноокисляемые) (рис. 1).

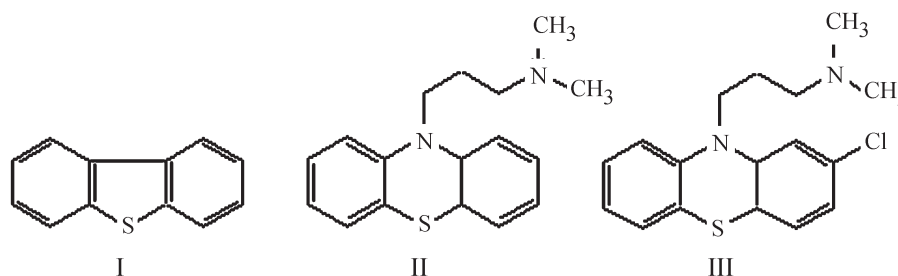


Рис. 1. Структурные формулы дибензотиофена (I), промазина (II) и хлорпромазина (III)

Дибензотиофен (ДБТ) является модельным серосодержащим соединением, характеризующим качество дизельного топлива: в соответствии с современными стандартами (Евро-4) содержание ДБТ и его производных в топливе не должно превышать 50 мкг/г. Алифатические производные фенотиазина – хлорпромазин и промазин (рис. 1), обладают выраженным нейрорепрессивным действием, их широко используют в медицине для лечения психических заболеваний и эмоциональных расстройств [5].

В литературе не описаны методики определения ДБТ с использованием ферментов или белков. Однако известны примеры применения этих катализаторов для окисления ДБТ с целью обессеривания топлива [6–9]. В литературе представлены также единичные работы по ферментативному окислению фенотиазинов [10–13]. Необходимо отметить, что в основном эти работы посвящены изучению физиологического действия фенотиазинов и их метаболизма на основании данных о кинетике и механизме их биокаталитического окисления. Возможность использования окисления для определения фенотиазинов в них не исследуется, хотя об этом иногда упоминается. В некоторых работах предложено использовать окисление фенотиазинов для определения ГБ или его пероксидазной активности [14, 15].

Для биокаталитического определения ДБТ необходимо, чтобы индикаторный процесс (реакция окисления) протекал количественно, быстро, без образования побочных веществ. Количественная конверсия ДБТ с образованием единственного продукта окисления важна также для эффективного удаления этого сернистого соединения из топлива в ходе обессеривания и является важной проблемой нефтепереработки. ДБТ и его производные мало растворимы в воде (растворимость ДБТ составляет $<0,005$ мМ [16]), а пробоподготовка содержащих фенотиазин объектов (биологические пробы и лекарственные препараты) включает экстракцию органическими растворителями, поэтому для проведения эффективной конверсии серосодержащих соединений необходимо, чтобы биокатализатор был стабилен и обладал высокой каталитической активностью не только в водной, но и в водно-органической среде.

Цель настоящей работы заключалась в выборе биокатализатора, обеспечивающего быстрое и количественное окисление серосодержащих соединений (ДБТ и фенотиазинов), кроме того, требовалось оценить эффективность биоконверсии в условиях, приближенных к анализу (в присутствии органического растворителя), рассчитать кинетические параметры

реакций и оценить перспективность использования разработанных систем в аналитической практике.

Экспериментальная часть

Реагенты. Использовали ПХ (К.Ф. 1.11.1.7), тип VI; ГБ из крови быка, ДБТ, сульфон ДБТ, гидрохлориды промазина и хлорпромазина, 70%-й водный раствор *трет*-бутилгидропероксида (все производства «Sigma», США); 1,0 М раствор H_2O_2 («Merck», Германия); диметилсульфоксид (ДМСО), ацетонитрил, этанол, 1-пропанол (все производства «Химмед», Россия). Точные концентрации растворов ПХ, ГБ и H_2O_2 устанавливали спектрофотометрически с использованием $\epsilon_{403} = 9,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{522} = 3,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ и $\epsilon_{230} = 72,7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ соответственно. Растворы биокатализаторов, ДБТ, ДБТО₂, промазина и хлорпромазина хранили в холодильнике при 4°C в сосудах из темного стекла не более двух дней. Для приготовления буферных растворов применяли: ацетат натрия, уксусную кислоту, цитрат натрия, лимонную кислоту (все «ос.ч.», «Хеликон», Россия), гидрофосфат и дигидрофосфат калия «ос.ч.» («Merck», Германия). Для приготовления всех водных растворов использовали деионизированную воду с удельным сопротивлением не менее 18,2 МОм, очищенную на установке «Millipore» (Франция).

Аппаратура. Для получения спектров и определения скорости протекания индикаторной реакции по изменению интенсивности поглощения использовали спектрофотометр «UV-mini 1240» («Shimadzu», Япония) ($l = 1$ см). Хроматографические эксперименты проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1100» (США), снабженном бинарным градиентным насосом, дегазатором на потоке подвижной фазы, автосэмплером, термостатом колонок и диодно-матричным детектором. Разделение проводили на хроматографической колонке «Synergi Hydro» 2,0 мм×150 мм, размер частиц 4 мкм. Для отделения осадков использовали центрифугу «Centrifuge 5415 C eppendorf» (Германия). Измерение pH буферных растворов проводили на pH-милливольтметре «Эконикс-эксперт» (Россия, точность $\pm 0,005$ ед. pH). Для взвешивания препаратов использовали аналитические весы «OHAUS» (Швейцария, точность $\pm 0,0002$ г). Для фиксирования времени проведения реакций использовали секундомер фирмы «Agam» (Россия) с погрешностью измерения $\pm 0,2$ с.

Методика эксперимента. Для определения концентраций веществ использовали метод начальной скорости (способ тангенсов). Скорость окисления субстратов в отсутствие катализатора в условиях

проведения индикаторного процесса составляет менее 1% от скорости каталитической реакции, т.е. пренебрежимо мала.

Методика I. Окисление ДБТ в присутствии биокатализатора. В пластиковую микропробирку последовательно вводили 10 мМ ацетатный буферный раствор с рН 5,2 в объеме, требующемся для доведения конечного объема реакционной смеси до 600 мкл, а также объем органического растворителя (ацетонитрила или 1-пропанола), требующийся для доведения объема органической среды (с учетом ДБТ) до 150 мкл (25 об.%). Прибавляли по каплям 25 или 46 мкл 4,7 мМ или 2,6 мМ раствора ДБТ в органическом растворителе, затем 45–110 мкл 112 мкМ раствора ГБ или 17–200 мкл 123 мкМ ПХ и далее 12; 60 или 120 мкл 0,05 М раствора H_2O_2 или *трет*-бутилгидропероксида. В момент добавления окислителя включали секундомер, одновременно перемешивая реакционную смесь, и через пять минут центрифугировали при 16 000 об/мин в течение 1 мин. С помощью автосэмплера вводили 5 мкл надосадочного раствора в хроматографическую колонку. Использовали градиентное элюирование: элюент А – вода, элюент Б – ацетонитрил (7:3). Скорость потока 0,5 мл/мин, $\lambda_{\text{аналит}} = 230$ нм. Регистрацию данных и обработку хроматограмм проводили с использованием программного обеспечения «ChemStation» версии А 10.02.

Методика II. Биокаталитическое окисление промазина в водной среде. В пластиковую микропробирку вводили объем (25 мМ) цитратного буферного раствора с рН 3,5, необходимый для доведения конечного объема смеси до 600 мкл. Прибавляли 50–150 мкл 0,15 мМ или 100–200 мкл 0,3 мМ раствора промазина, 30 мкл 5 мкМ раствора ГБ и 40 мкл 10 мМ раствора H_2O_2 или 50 мкл 0,4 мМ раствора ПХ и 30 мкл 10 мМ раствора H_2O_2 . В момент добавления окислителя включали секундомер, одновременно перемешивая реакционную смесь. Через 10 с реакционный раствор переливали в микрокювету ($l = 1$ см) и измеряли оптическую плотность (A) реакционной смеси в течение 1 мин при 512 нм. Скорость индикаторной реакции характеризовали тангенсом угла наклона ($\text{tg } \alpha$) восходящего линейного участка кинетической кривой, построенной в координатах A –время (t , с).

Методика III. Биокаталитическое окисление хлорпромазина в водной среде. В пластиковую микропробирку вводили последовательно требуемое количество буферного раствора до объема 600 мкл, затем 21–150 мкл 0,2 мМ раствора хлорпромазина; 36

или 42 мкл 1,0 мМ раствора хлорпромазина, 32 мкл 3,8 мкМ раствора ГБ и 35 мкл 10 мМ раствора H_2O_2 или 10–185 мкл 0,76 мМ раствора хлорпромазина, далее 44 мкл 0,13 мкМ раствора ПХ и 56 мкл 2,5 мМ раствора H_2O_2 . Дальнейшие операции проводили аналогично методике II. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли при 525 нм.

Методика IV. Окисление промазина в присутствии ПХ и ГБ в водно-органической среде. В пластиковую микропробирку вводили последовательно требуемое количество буферного раствора до получения объема 600 мкл, затем 6; 30; 60; 120 или 180 мкл ДМСО и те же компоненты в тех же концентрациях, что и при окислении в водной среде. Дальнейшие операции проводили аналогично методике II.

Методика V. Расчет кинетических констант проводили по методу Лайнуивера–Берка. Для этого измеряли величины $\text{tg } \alpha$ восходящего линейного участка кинетической кривой, построенной в координатах A – t , с, рассчитывали начальные скорости ($v = \text{tg } \alpha / \epsilon / l$) реакций окисления промазина при концентрациях субстрата 70; 80; 90; 100; 150; 200; 250; 300 мкМ и строили полученные зависимости в двойных обратных координатах. Из уравнения полученных прямых рассчитывали K_m и k_{cat} .

Результаты и их обсуждение

Окисление ДБТ в водно-органической среде. Для достижения быстрого и количественного окисления ДБТ необходим направленный выбор биокатализатора и тщательный подбор условий проведения процесса (концентраций всех компонентов системы, природы окислителя, растворителя, ионной силы). Кроме того, для быстрого и простого контроля за эффективностью конверсии ДБТ методом спектрофотометрии необходимо, чтобы реакционный раствор был прозрачным (истинным). Был исследован ряд систем биокатализатор–окислитель: ГБ– H_2O_2 , ПХ– H_2O_2 , ГБ–*трет*-бутилгидропероксид, ПХ–*трет*-бутилгидропероксид при проведении реакции в присутствии одного из двух растворителей (1-пропанола или ацетонитрила).

Биокаталитическое окисление ДБТ протекает в две стадии с образованием сульфоксида (ДБТО) и сульфона (ДБТО₂) (рис. 2). Известно, что при экстракции сульфоксидов из топлива доля углеводородных примесей в экстрактах меньше, чем при извлечении сульфонов, поэтому наибольший для нефтепереработки практический интерес представляет окисление сернистых соединений до сульфоксидов, которое позволяет сократить потери топлива

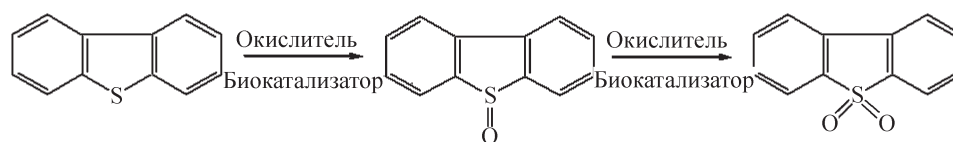


Рис. 2. Окисление ДБТ

в процессе обессеривания [17]. В связи с перекрытием спектров поглощения ДБТ и продуктов его окисления протекание реакции контролировали методом ВЭЖХ.

Варьирование содержаний ГБ и H₂O₂ в системе показало, что степень конверсии ДБТ возрастает при уменьшении концентрации ГБ с 25 до 10 мкМ (рис. 3, системы 1, 2 и 3, 4). При этом выявлено два продукта реакции: ДБТО и ДБТО₂. Однако дальнейшее снижение концентрации биокатализатора приводит к неполной конверсии ДБТ (~50%) (рис. 3, системы 5, 6). Необходимо отметить, что в системах 1 и 2 из-за высокой концентрации ГБ, присутствия избытка H₂O₂ и органической среды наблюдалась денатурация белка и выпадение осадка. В качестве оптимальной была выбрана система 3 (концентрации ГБ и H₂O₂ 10 мкМ и 10 мМ соответственно). В этой системе обеспечивалась количественная конверсия ДБТ и достигалась высокая селективность по продукту – ДБТО (выход 91±2%), кроме того, реакционная смесь была прозрачна и могла быть использована для анализа методом спектрофотометрии. При использовании в качестве катализатора ПХ даже при высоком содержании фермента в смеси (25 мкМ, аналог системы 1) не удалось зафиксировать продуктов окисления ДБТ ни за 5, ни за 45 мин. Таким образом, для превращения

такого трудноокисляемого субстрата, как ДБТ, гемсодержащий белок ГБ эффективнее, чем фермент ПХ. В связи с этим для дальнейшей работы был выбран ГБ.

На следующем этапе работы изучено влияние природы органического растворителя. Ацетонитрил и 1-пропанол, обеспечивающие хорошую растворимость ДБТ и продуктов реакции, выбрали на основании анализа литературных данных [6]. Сравнение растворителей не выявило значимой разницы в эффективности конверсии субстрата, поэтому в дальнейшем использовали более доступный ацетонитрил.

Из литературы по обессериванию топлива [6, 8] известно, что применение вместо H₂O₂ растворимых в углеводородах нефти органических гидропероксидов за счет лучшего смешения компонентов может значительно повысить скорость окисления ДБТ или даже инициировать окисление, если в случае H₂O₂ оно отсутствует. Для исследований использовали систему 1, ранее не обеспечивавшую требуемую селективность по продукту реакции. Замена H₂O₂ на *трет*-бутилгидропероксид привела к увеличению выхода ДБТО на 15%, в результате чего он составил 92% (рис. 4, а). Таким образом, селективное окисление ДБТ с образованием ДБТО (>90%) может быть достигнуто двумя способами: подбором условий процесса или использованием *трет*-

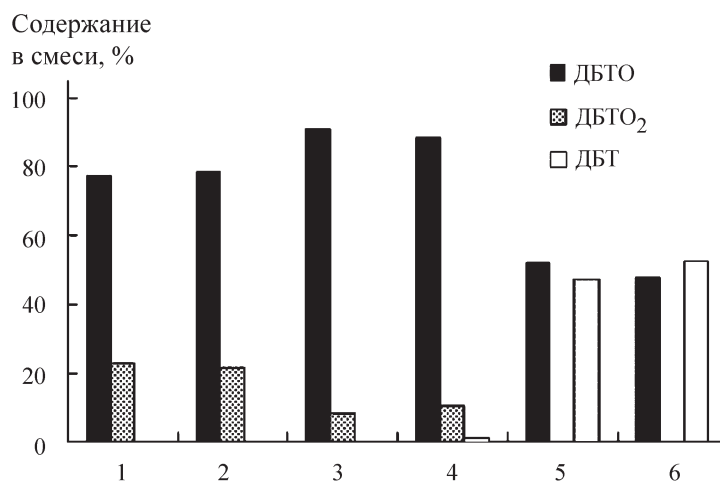


Рис. 3. Зависимость содержания в смеси ДБТ и продуктов окисления после проведения реакции от состава реакционной смеси (10 мМ ацетатный буферный раствор, pH 5,2, содержащий 25 об.% 1-пропанола; концентрации ГБ – 25 (1, 2), 10 мкМ (3, 4, 5) и 6,3 (6) мкМ; H₂O₂ – 10 (1, 3), 5 (2, 4), 1 (5, 6) мМ; время реакции 5 мин)

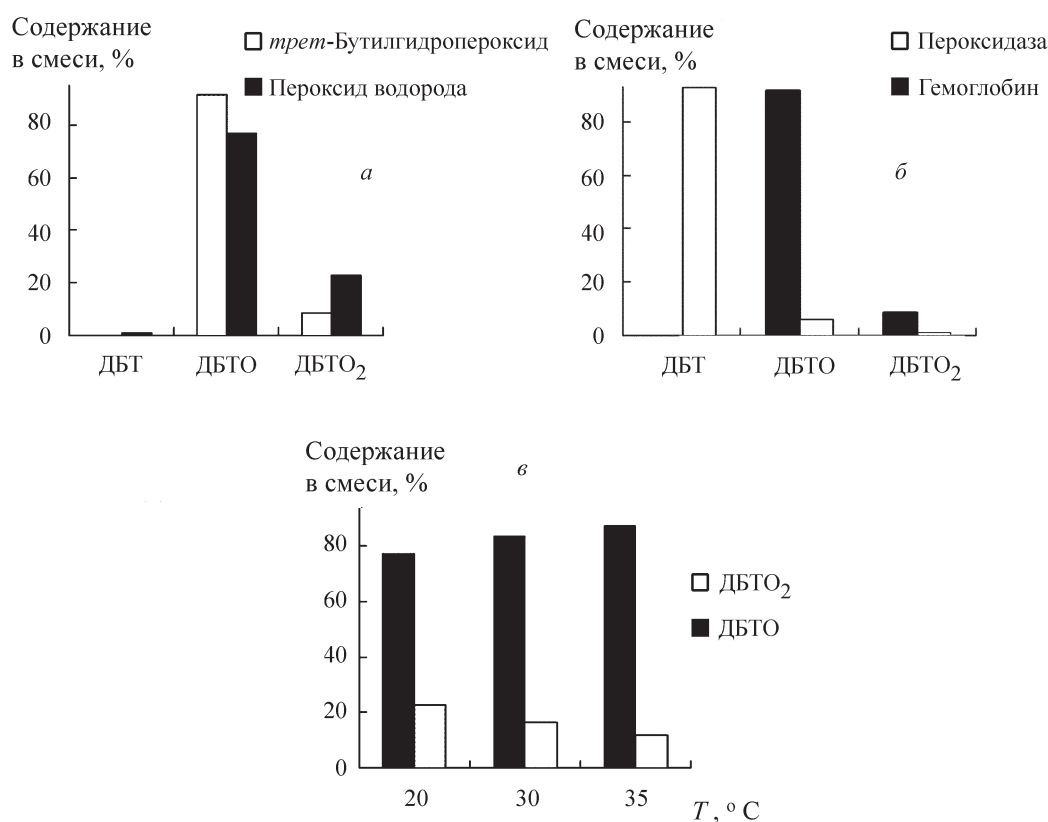


Рис. 4. Зависимость содержания компонентов в смеси после протекания реакции от природы окислителя (а), биокатализатора (б) и температуры (в) (10 мМ ацетатный буферный раствор; pH 5,2; содержащий 25 об.% ацетонитрила; концентрация: ДБТ 230 мкМ (а–в), H₂O₂ 10 мМ (а, в), *tert*-бутилгидропероксида 10 мМ (а, б), ГБ 10 (а), 25 (б) мкМ, ПХ 25 мкМ (б); время реакции 5 мин)

бутилгидропероксида. Последний случай более пригоден для использования в промышленности с целью обессеривания топлива, поскольку в нем лучше обеспечивается смешение компонентов и повышается скорость массопереноса по сравнению с использованием H₂O₂. Однако, как и в случае с H₂O₂, реакционная смесь с *tert*-бутилгидропероксидом была мутной из-за денатурации ГБ и не могла быть использована для решения аналитических задач.

Проведение окисления ДБТ *tert*-бутилгидропероксидом в присутствии ПХ позволило зафиксировать продукт окисления (ДБТО) уже через 5 мин протекания реакции (рис. 4, б). Однако сравнение с ГБ выявило низкую эффективность ПХ в этом процессе. В связи с тем, что *tert*-бутилгидропероксид неустойчив и токсичен, а в исследуемых условиях приводит к денатурации ГБ, от его применения отказались.

Изучение кинетики окисления ДБТ и образования продуктов реакции во времени показало, что на первом этапе образуется только ДБТО, который в дальнейшем окисляется до ДБТО₂ (рис. 5). Оптимальное

время селективного окисления ДБТ до ДБТО составило 5 мин, т.е. было сокращено по сравнению с литературными данными в 9 раз [6].

Нагревание может способствовать ускорению окисления и изменению соотношения концентраций продуктов реакции. Повышение температуры на 15°C приводит к увеличению соотношения ДБТО:ДБТО₂, однако также увеличивает денатурацию ГБ (рис. 4, в). В связи с этим в качестве оптимальной была выбрана температура 20°C.

Выбранные условия для быстрой и селективной конверсии 230 мкМ ДБТ в сульфоксид при сохранении прозрачности реакционной среды представлены в табл. 1.

Таким образом, проведенные исследования выявили большую по сравнению с ферментом ПХ целесообразность использования белка ГБ в качестве катализатора конверсии трудноокисляемого серосодержащего субстрата ДБТ, что согласуется с литературными данными [6, 7]. Оптимизированы условия проведения реакции, обеспечивающие быстрое и количественное окисление 230 мкМ субстрата при со-

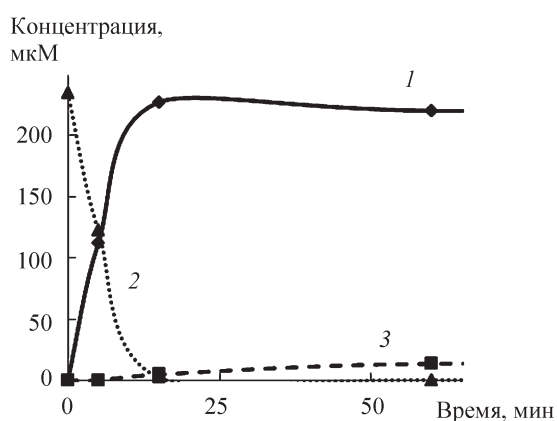


Рис. 5. Зависимость концентраций ДБТ (1) и продуктов его окисления ДБТО (2) и ДБТО₂ (3) от времени (10 мМ ацетатный буферный раствор (рН 5,2), содержащий 25 об.% ацетонитрила; концентрация: ДБТ 230 мкМ; Н₂О₂ 10 мМ; ГБ 10 мкМ; время реакции 5 мин)

хранении прозрачности реакционной среды; достигнут высокий выход сульфоксида (91±2%) за 5 мин. Сравнение с литературными данными показало, что в наиболее эффективных из описанных систем [6] и [9] достигается 99%-я конверсия 230 мкМ ДБТ за 45 мин в присутствии ГБ и 60%-я конверсия 267 мкМ ДБТ за 1 ч в присутствии ПХ соответственно. Таким образом, разработанная система более эффективна по сравнению с описанными в литературе и благодаря прозрачности реакционной смеси может быть использована для решения аналитических задач.

Окисление фенотиазинов в водной и водно-органической средах. Окисление фенотиазинов в сульфоксиды в присутствии ПХ и ГБ происходит через образование окрашенных промежуточных соединений – катион-радикалов (рис. 6). Определение про-

мазина и хлорпромазина проводили, измеряя поглощение раствора при длине волны, соответствующей максимуму поглощения их катион-радикалов (512 и 525 нм соответственно). Скорость биокаталитического окисления промазина и хлорпромазина, а также устойчивость образующихся катион-радикалов зависят от условий проведения процесса, поэтому необходимо было выбрать оптимальные значения этих параметров. С этой целью варьировали природу, рН и ионную силу буферного раствора, концентрации обоих биокатализаторов и Н₂О₂, стремясь расширить область линейности кинетической кривой для реакции накопления катион-радикалов в системе. Необходимо было достичь устойчивости катион-радикалов, достаточной для измерения скорости реакции по их накоплению, а также достичь удобных для измерения скоростей реакции. Выбранные оптимальные условия проведения биокаталитического определения промазина и хлорпромазина представлены в табл. 2. Большой расход ГБ по сравнению с ПХ в реакциях окисления фенотиазинов можно объяснить отсутствием у белка характерного для ферментов ак-

Т а б л и ц а 1

Выбранные условия окисления дибензотиофена

Биокатализатор	Гемоглобин, 10 мкМ
Окислитель	Н ₂ О ₂ , 10 мкМ
Буферный раствор	Ацетатный, 10 мМ, рН 5,2
Органический растворитель	Ацетонитрил, 25 об.%
Температура	20°С
Время реакции	5 мин

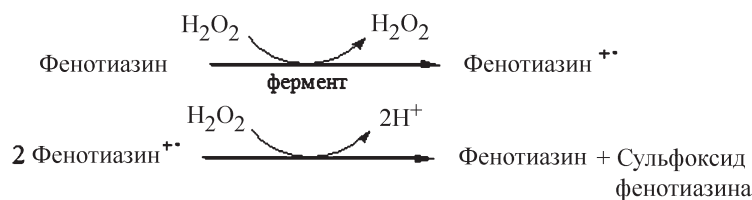


Рис. 6. Биокаталитическое окисление фенотиазинов [18]

Т а б л и ц а 2

Оптимальные условия определения фенотиазинов в присутствии двух биокатализаторов

Фенотиазин	Катализатор, нМ	Н ₂ О ₂ , мкМ	Буферный раствор
Промазин	Гемоглобин, 250	500	25 мМ цитратный, рН 3,5
	Пероксидаза, 3	670	тот же
Хлорпромазин	Гемоглобин, 200	580	25 мМ ацетатный, рН 4,0
	Пероксидаза, 8	200	тот же

тивного центра и как следствие более низкой «псевдопероксидазной» активностью. Таким образом, для окисления среднеокисляемых субстратов оказались пригодны оба биокатализатора, в отличие от трудноокисляемого субстрата ДБТ, для которого эффективен только ГБ.

Для подготовки проб содержащих фенотиазины объектов используют органические растворители, поэтому на примере промазина в выбранных оптимальных для каждого биокатализатора условиях (табл. 2) мы изучили влияние природы полярного органического растворителя на скорость реакции окисления. Для этого были выбраны растворители, наиболее часто используемые при пробоподготовке биологических объектов: ДМСО, ацетонитрил, этанол и 1-пропанол.

С увеличением содержания органического растворителя в системе скорость окисления промазина уменьшалась в присутствии как ПХ, так и ГБ (рис. 7, а, б). При этом скорость окисления убывала в ряду растворителей: ДМСО > ацетонитрил >

1-пропанол, который согласуется с рядом уменьшения их полярности: ДМСО ($\log P = -1,3$) > ацетонитрил ($-0,33$) > 1-пропанол ($0,28$) [19]. Таким образом, чем больше полярность органического растворителя, тем при большем его содержании биокатализатор сохраняет свою активность. При использовании ГБ скорость реакции мала и неудобна для измерения даже в присутствии 5 об.% 1-пропанола и ацетонитрила, в то время как в присутствии ПХ имеет вполне измеримую величину. Однако максимально возможное для протекания реакции содержание ДМСО в смеси составило 20 и 30 об.% при использовании ПХ и ГБ соответственно. Более высокое для ГБ допустимое содержание ДМСО может быть связано с бОльшим содержанием белка в смеси по сравнению с ферментом.

Как и в случае ДБТ, в водно-органической среде (≥ 10 об.% ДМСО) применение *трет*-бутилгидропероксида позволило существенно повысить скорость окисления промазина, катализируемого ПХ (рис. 7, в). Так, в присутствии органического пероксида фермент катализировал реакцию даже при содер-

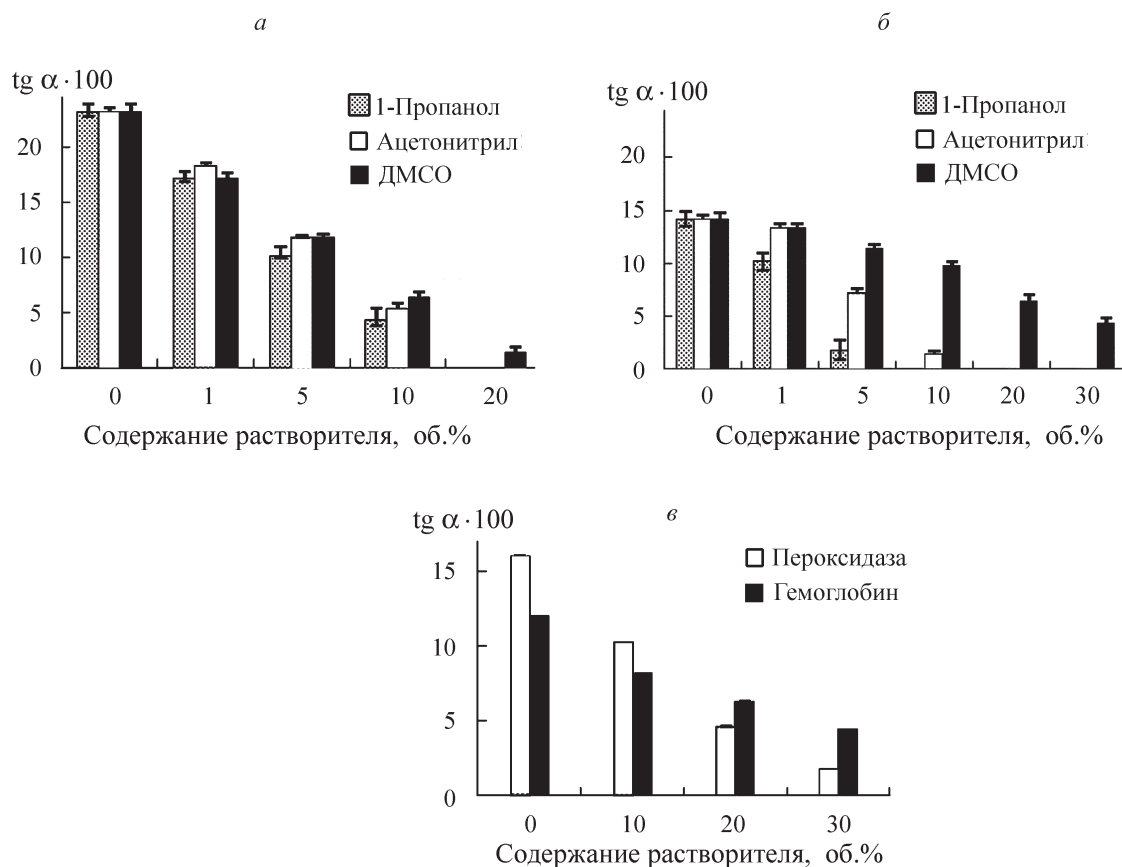


Рис. 7. Зависимость скорости реакции окисления промазина H_2O_2 в присутствии ПХ (а) и ГБ (б) от содержания органического растворителя и окисления *трет*-бутилгидропероксидом от содержания ДМСО (в) (25 мМ цитратный буферный раствор, рН 3,5; концентрации промазина – 50 мкМ (а–в), ГБ – 250 нМ (б, в), ПХ – 3 нМ (в), H_2O_2 – 670 (а) и 500 (б) мкМ, *трет*-бутилгидропероксида: для реакции, катализируемой ГБ – 20 мМ, для реакции, катализируемой ПХ – 10 мМ)

жании ДМСО 30 об.%, в то время как в присутствии H_2O_2 – лишь при 20 об.% ДМСО. В присутствии ГБ значимого увеличения скорости реакции окисления при замене H_2O_2 на органический гидропероксид не было. Более того, при содержании ДМСО 10 об.% скорость реакции была ниже в 1,2 раза. Поскольку в водно-органической среде скорость реакции, катализируемой ГБ, выше, чем ПХ, от дальнейшего использования *трет*-бутилгидропероксида отказались.

Для сравнения каталитической активности двух биокатализаторов рассчитали кинетические характеристики реакций окисления промазина H_2O_2 (табл. 3). Для расчета скорости реакций использовали измеренные значения молярного коэффициента поглощения продукта окисления промазина (катион-радикала), которые составили $(6,6 \pm 0,3) \cdot 10^3$, $(4,4 \pm 0,3) \cdot 10^3$ и $(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ при содержании ДМСО в смеси 0; 10 и 30% соответственно. Расчет кинетических характеристик показал, что удельная активность и эффективность k_{cat}/K_m ПХ в реакции окисления промазина H_2O_2 в водной среде на 5 порядков превышает эти характеристики для ее аналога ГБ (табл. 3). При этом в присутствии ПХ количественная конверсия промазина происходила за 2 мин, в то время как в присутствии ГБ степень конверсии субстрата составляла только 56% за 4 мин. В связи с тем что катион-радикал является промежуточным продуктом и диспропорционирует с течением времени, увеличение времени реакции не приводит к большей степени конверсии промазина. Таким образом, в случае ГБ условия, оптимальные для измерения скорости индикаторного процесса (т.е. для определения промазина), не оптимальны для количественного окисления суб-

страта. Количественной конверсии ($95 \pm 5\%$) 70 мкМ промазина в присутствии ГБ удалось достичь, увеличив концентрации биокатализатора и H_2O_2 в 3 и 1,8 раза соответственно.

С увеличением содержания ДМСО эффективность обоих биокатализаторов и степень конверсии промазина в присутствии ГБ снижались (табл. 4). Степень конверсии 70 мкМ промазина, измеренная в одних и тех же условиях (500 нМ ГБ; 500 мкМ H_2O_2 , 25 мМ цитратный буферный раствор с pH 3,5), составила 45 ± 3 , 55 ± 3 и $16 \pm 3\%$ при содержании ДМСО 0; 10 и 30% соответственно.

Определение фенотиазинов в водной среде. На основе реакции биокаталитического окисления фенотиазинов в водной среде разработаны методики определения промазина и хлорпромазина с аналитическими характеристиками, приведенными в табл. 4. Аналог ПХ – белок – ГБ может быть использован для определения обоих исследованных фенотиазинов с аналитическими характеристиками, мало уступающими ПХ. Разработанные методики определения фенотиазинов в водных растворах сравнимы по чувствительности с описанными спектрофотометрическими методиками, однако отличаются от них простотой, не требуют использования концентрированных кислот и специального оборудования [20].

Определение фенотиазинов в водно-органической среде. ри максимально возможном содержании ДМСО с использованием H_2O_2 в условиях, оптимальных для водной среды, не удалось разработать методики определения промазина в присутствии ГБ и ПХ из-за узкой (<0,5 порядка величины) области линейности градуировочных зависимостей. Такой характер

Т а б л и ц а 3

Кинетические параметры биокатализаторов в реакции окисления промазина пероксидом водорода

Биокатализатор	Содержание ДМСО, %	$k_{\text{cat}} \cdot 10^{-3}, \text{c}^{-1}$	$K_m, \text{мкМ}$	$k_{\text{cat}}/K_m, \text{c}^{-1} \cdot \text{мкМ}^{-1}$	Удельная активность $n \cdot 10^{-9}, \text{c}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$	Степень конверсии, %
Пероксидаза	0	$(4,6 \pm 1,2) \cdot 10^3$	$(2,3 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(1,5 \pm 0,4) \cdot 10^6$	100±1
Тот же	10	$(8,7 \pm 4,6) \cdot 10^3$	$(7,6 \pm 4,6) \cdot 10^2$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(2,9 \pm 1,5) \cdot 10^6$	100±2
Тот же	30	$(1,3 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(5 \pm 3) \cdot 10^2$	$(2,4 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(2,5 \pm 0,8) \cdot 10^4$	100±2
Гемоглобин	0	$6,3 \pm 1,0$	$(3,4 \pm 1,1) \cdot 10^1$	$(1,9 \pm 0,4) \cdot 10^2$	$(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^1$	25±1
Тот же	10	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^1$	$(8,6 \pm 2,0) \cdot 10^1$	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^2$	$(6,3 \pm 0,8) \cdot 10^1$	17±5
Тот же	30	$6,2 \pm 2,5$	$(2,5 \pm 2,4) \cdot 10^1$	$(2,6 \pm 1,4) \cdot 10^2$	$(1,8 \pm 0,7) \cdot 10^1$	10±2

Примечание. Для измерения скорости реакции в присутствии 30 об.% ДМСО использовали следующие концентрации реагентов: промазина 70–300 мкМ, H_2O_2 670 мкМ, ПХ 15 нМ. Степень конверсии указана за время достижения плато на кинетической кривой (2–6 мин).

Т а б л и ц а 4

Аналитические характеристики методик биокаталитического определения промазина и хлорпромазина в водном растворе ($n=3, P=0,95$)

Биокатализатор	$\text{tg } \alpha = (a \pm \Delta a) \cdot 10^3 c + (b \pm \Delta b)$				$c_n - c_b$, мкМ	s_r при c_n
	a	Δa	b	Δb		
Промазин						
Пероксидаза	1,1	0,2	0,010	0,002	10 – 100	0,08
Гемоглобин	2,3	0,4	0,06	0,01	10 – 100	0,03
Хлорпромазин						
Пероксидаза	3,4	0,2	0,020	0,001	10 – 200	0,02
Гемоглобин	1,4	0,2	0,09	0,01	10 – 100	0,07

Примечание. c_n и c_b – нижняя и верхняя границы определяемых концентраций, $\text{tg } \alpha$ – скорость реакции окисления фенотиозинов, c – концентрация определяемого соединения, М.

Т а б л и ц а 5

Аналитические характеристики методик биокаталитического определения промазина в 10%-м ДМСО ($n=3, P=0,95$)

Биокатализатор	$\text{tg } \alpha = (a \pm \Delta a) \cdot 10^3 c + (b \pm \Delta b)$				$c_n - c_b$, мкМ	s_r при c_n
	a	Δa	b	Δb		
Пероксидаза	1,70	0,06	0,05	0,01	25 – 500	0,02
Гемоглобин	0,78	0,09	0,080	0,007	25 – 100	0,05
Гемоглобин	0,06	0,01	0,18	0,01	200 – 2000	0,008

градуировочных зависимостей может быть связан с быстрой инактивацией биокатализаторов при высоком (≥ 20 об.%) содержании органического растворителя. Таким образом, условия проведения определения, оптимальные для водной среды, непригодны для сред с высоким содержанием органического растворителя, в которых требуется использовать повышенное содержание биокатализатора.

В 10%-м ДМСО в условиях, оптимальных для водной среды, были разработаны методики определения промазина с аналитическими характеристиками, представленными в табл. 5. При использовании ГБ единая область линейности градуировочной зависимости была мала, однако было выявлено две области линейности, что позволило разработать методику определения промазина. Таким образом, несмотря на возможность использования ГБ для проведения окисления промазина в присутствии $\geq 10\%$ ДМСО, для решения аналитических задач в водно-органических средах предпочтительно использование ПХ.

В результате проведенных исследований показана возможность использования ПХ и ГБ для окисления фенотиозинов в водной среде, разработаны методики определения промазина и хлорпромазина. Выявлено,

что максимально возможное содержание ДМСО для протекания реакции, катализируемой ГБ (30 об.%), выше, чем для реакции, катализируемой ПХ (20 об.%). Таким образом, установлена возможность использования ГБ для проведения конверсии промазина в присутствии полярных органических растворителей, однако для определения в водно-органической среде (в присутствии 10 об.% ДМСО) предпочтительнее использование ПХ. Разработанные методики определения фенотиозинов отличаются простотой и экспрессностью и не требуют использования дорогостоящего оборудования.

В результате работы установлено, что в качестве катализатора окисления трудноокисляемого субстрата пероксидаз (ДБТ) более эффективен белок ГБ, напротив, для среднеокисляемых субстратов (фенотиозинов) предпочтительнее использование ПХ. Расчет каталитической эффективности ПХ и ГБ в реакции окисления промазина как в водной, так и в водно-органической средах подтверждает это заключение.

Авторы выражают благодарность профессору докт. хим. наук А.В. Пирогову и канд. хим. наук А.А. Бендрышеву за помощь в проведении анализов методом ВЭЖХ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-03-00249-а) и Министерства образования и науки РФ (Соглашение 8448 от 31.08.2012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hamid M., Khalil-ur-Rehman* // Food Chem. 2009. **115**. P. 1177.
2. *Avila G.P., Salvador A., Guardia M.* // Analyst. 1997. **122**. P. 1543.
3. *Zhang K., Mao L., Cai R.* // Talanta. 2000. **51**. P. 179.
4. *Yu J., Ju H.* // Anal. Chim. Acta. 2003. **486**. P. 209.
5. *Nagaraja P., Dinesh N.D., Gowda N.M.M., Rangappa K.S.* // Anal. Sci. 2000. **16**. P. 1127.
6. *Klyachko N.L., Klibanov A.M.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 1992. **37**. P. 53.
7. *Stachyra T., Guillochon D., Pulvin S., Thomas D.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 1996. **59**. P. 232.
8. *Ryu K., Kim J., Heo J., Chae Y.* // Biotechnol. Lett. 2002. **24**. P. 1535.
9. *Da Silva Madeira L., Ferreira-Leitao V.S., da Silva Bon E. P.* // Chemosphere. 2008. **71**. P. 189.
10. *Piette L.H., Bulow G., Yamazaki I.* // Biochim. Biophys. Acta. 1964. **88**. P. 120.
11. *Escribano J., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F., Losano J.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1985. **831**. P. 313.
12. *Kelder P.P., de Mol N.J., Fischer M.J.E., Janssen L.H.M.* // Biochim. Biophys. Acta. 1994. **1205**. P. 230.
13. *Blankert B., Hayen H., van Leeuwen S. M., Karst U., Bodoki E., Lotrean S., Sandulescu R., Diez N. M., Dominguez O., Arcos J., Kauffmann J.-M.* // Electroanalysis. 2005. **17**. P. 1501.
14. *Collier H. B.* // Clin. Biochem. 1974. **7**. P. 331.
15. *Nakamura K., Maeda H., Kawaguchi H.* // Anal. Biochem. 1987. **165**. P. 28.
16. *Caro A., Leton P., Garcia-Calvo E., Setti L.* // Fuel. 2007. **86**. P. 2632.
17. *Шарунов А.Х., Нугматуллин В.Р., Нугматуллин И.Р., Закиров Р.В.* // Хим. и технол. топлив и масел. 2006. № 6. С. 45.
18. *Vazquez A.I., Tudela J., Varon R., Garcia-Canovas F.* // J. Biochem. Biophys. Meth. 1991. **23**. P. 45.
19. *Diaz-Garcia M.E., Valencia-González M.J.* // Talanta. 1995. **42**. P. 763.
20. *Revanasiddappa H.D., Ramappa P.G.* // Talanta. 1996. **43**. P. 1291.

Поступила в редакцию 11.12.12

APPLICATION OF HEME-CONTAINING BIOCATALYSTS FOR THE OXIDATION AND DETERMINATION OF SULFUR-CONTAINING ORGANIC COMPOUNDS

N.V. Borzenkova, A.V. Kislaya, I.A. Veselova, T.N. Shekhovtsova

(Division of Analytical Chemistry)

The conditions of the oxidation of dibenzothiophene and aliphatic phenothiazines (promazine and chlorpromazine) in the presence of heme-containing biocatalysts (such as horseradish peroxidase and hemoglobin) were optimized. It was shown that hemoglobin is an effective catalyst for fast and selective conversion of dibenzothiophene to S-oxide (yield $91 \pm 2\%$ for 5 min); the using of horseradish peroxidase is a promising catalyst for the phenothiazines oxidation. The influence of the polar organic solvent dimethyl sulfoxide on the kinetic parameters of promazine oxidation in the presence of heme-containing biocatalysts was studied. The procedures for the phenothiazines determination based on the spectrophotometric measurement of the oxidation reaction rate were developed. The analytical concentration ranges in aqueous medium for the determination of promazine and chlorpromazine in the presence of peroxidase were 10 – 100 and 10 – 200 μM , respectively, and 25 – 500 μM for the determination of promazine in the presence of 10% (v/v) dimethyl sulfoxide.

Key words: phenothiazines, dibenzothiophene, selective oxidation, determination, biocatalysts, organic solvents.

Сведения об авторах: Борзенкова Наталья Витальевна – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (nvborzenkova@gmail.com); Кислая Анастасия Викторовна – студентка химического факультета МГУ; Веселова Ирина Анатольевна – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (irina.veselova@mail.ru); Шеховцова Татьяна Николаевна – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (tnshekh@yandex.ru).