

УДК 543.866

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЯДА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРЯМЫХ И ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛАХ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ

А.В. Кирейко, И.А. Веселова, Т.Н. Шеховцова

(кафедра аналитической химии; e-mail: toshta@mail.ru)

Изучены свойства пероксидазы из корней хрена в обращенных мицеллах додецилсульфата натрия (ДДС) в водно-органической среде бензол-пентанол-вода. Показана перспективность применения прямых и обращенных мицелл ДДС в целях химического анализа на примере разработанных методик определения субстратов (пероксида водорода и цистеина), ингибитора (сульфаниламида) и активатора (имидазола) пероксидазы по реакции окисления *o*-дани-зидина пероксидом водорода.

Возможность проведения реакций с участием ферментов в средах с высоким содержанием органического растворителя, а также в безводных средах является актуальной задачей современной биоаналитической химии. Проведение ферментативных процессов в органических средах может значительно расширить круг определяемых соединений за счет нерастворимых или мало растворимых в воде субстратов и эффекторов (ингибиторов и активаторов) ферментов; позволит анализировать нерастворимые в воде объекты, а также улучшить метрологические характеристики уже разработанных методик и повысить селективность определения биологически активных веществ за счет эффекта концентрирования.

Одна из основных проблем, с которой приходится сталкиваться исследователям при использовании ферментов в неводных средах, – сохранение их активности. Анализ литературных данных показал, что при работе в неполярных органических растворителях для сохранения каталитической активности фермент включают (солюбилизируют) в полость обращенной мицеллы [1–4], получаемой с помощью поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Одним из наиболее широко используемых в аналитических целях и хорошо изученных (нами, в частности) ферментов является пероксидаза из корней хрена. Этот биокатализатор отличается высокой активностью, стабильностью в водных растворах, специфичностью по отношению к основному субстрату – пероксиду водорода, чувствительностью к действию многих неорганических и органических эффекторов. С применением пероксидазы разработано большое количество методик для определения биологически активных соединений (субстратов, ингибиторов и активато-

ров пероксидазы) [5–7]. Однако многие вещества, способные выступать в роли вторых субстратов, а также эффекторов пероксидазы, ограниченно растворимы в воде, а некоторые объекты, например, масла, гидрофобны. В связи с этим возникает потребность в разработке ферментативных методик определения эффекторов и субстратов пероксидазы в органических и водно-органических средах.

В литературе встречаются лишь единичные работы по использованию в химическом анализе пероксидазы, включенной в обращенные мицеллы анионного ПАВ – ди-2-этилгексилсульфосукцината натрия (АОТ) в среде неполярного органического растворителя [8, 9]. Другие ПАВ для солюбилизации этого фермента в аналитических целях до сих пор не применялись.

Цель данной работы заключалась в том, чтобы показать перспективность проведения индикаторных реакций, катализируемых пероксидазой, в присутствии другого анионного ПАВ – додецилсульфата натрия (ДДС), а также включения пероксидазы в обращенные мицеллы ДДС на примере разработки методик определения лекарственных веществ, проявляющих различное действие в ферментативном процессе (основного субстрата – пероксида водорода, второго субстрата – цистеина, активатора – имидазола, ингибитора – сульфаниламида).

Экспериментальная часть

Реагенты. В работе использовали лиофилизированный препарат пероксидазы из корней хрена (К.Ф. 1.11.1.7) (“Merck”, Германия) с удельной активностью 192 ед./мг. Раствор с содержанием фермента $n \times 10^{-6}$ М готовили растворением навески твердого препарата в 0,1 М фосфатном буферном растворе

(рН 7,0). Значение концентрации раствора пероксидазы устанавливали спектрофотометрически ($\epsilon = 9,4 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, $l = 1 \text{ см}$) при 403 нм [10]. Твердый препарат и растворы фермента хранили в холодильнике при 4°C.

Для приготовления буферных растворов использовали препараты тетрабората натрия (“х.ч.”), борной кислоты (“ос.ч.”), гидрофосфата (“ос.ч.”) и дигидрофосфата (“ос.ч.”) аммония (“Реахим”, Россия). Буферные растворы готовили, как описано в [11].

Для работы в среде обращенных мицелл использовали бензол (“Реахим”, Россия), пентанол-1 (“Acros-Organics”, США), додецилсульфат натрия (“Хеликон”, Россия). Бензол очищали перегонкой. Водные растворы ДДС готовили растворением его точной навески в воде при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке в течение 15–20 мин.

Точную концентрацию раствора пероксида водорода (“ос.ч.”, “Реахим”, Россия) устанавливали перманганатометрически [12]. Раствор *o*-дианизидина (“Sigma”, США) готовили растворением его точной навески в этаноле-ректификате. Растворы цистеина (“ИРЕА-2000”, Москва), имидазола (“Serva”, Франция) и сульфаниламида (фармацевтический препарат, ООО “Люми”, Россия) готовили растворением их точных навесок в воде (сульфаниламид нагревали на водяной бане). Для приготовления всех водных растворов использовали деионизованную воду, очищенную на установке “Millipore” (Франция).

Аппаратура. Скорость индикаторной реакции окисления *o*-дианизидина (*o*-Д) контролировали спектрофотометрическим методом по нарастанию оптической плотности (A) продуктов реакции и характеризовали тангенсом угла наклона ($\text{tg } \alpha$) начального линейного участка кинетической кривой в координатах оптическая плотность–время. Оптическую плотность растворов и спектры поглощения продуктов реакции регистрировали на спектрофотометре “UV-2201” (“Shimadzu”, Япония).

Длина волны, оптимальная для наблюдения за накоплением продукта реакции пероксидазного окисления *o*-Д (440 нм), и молярный коэффициент поглощения ($\epsilon = 10700 \text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) были определены нами в среде обращенных мицелл ДДС при степени гидратации 27.

Методика проведения индикаторной реакции окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода в водном буферном растворе. В стеклянную пробирку с притертой пробкой вводили последовательно:

1) необходимое количество буферного раствора (0,1 М фосфатного (рН 5,6) при разработке методик определения пероксида водорода, сульфаниламида и цистеина или 0,1 М боратного буферного раствора (рН 8,0) при разработке методики определения имидазола);

2) 0,1 мл 3 нМ раствора пероксидазы (для определения имидазола 9 нМ);

3) 0,1 мл 6 мМ раствора *o*-данизидина (в случае проведения индикаторной реакции без эффектора или при разработке методик определения пероксида водорода, цистеина или имидазола) или 0,6 мМ (в случае разработки методики определения сульфаниламида);

4) 0,1 мл 7,5 мМ раствора пероксида водорода.

При разработке методики определения пероксида водорода его концентрацию в реакционной смеси варьировали в диапазоне 0,1–25 мкМ. Общий объем реакционной смеси составлял 3 мл. После добавления пероксида водорода раствор перемешивали и одновременно включали секундомер. Раствор помещали в кварцевую кювету ($l = 1 \text{ см}$) и регистрировали либо спектр поглощения продуктов реакции окисления через определенное время, либо изменение оптической плотности реакционной смеси во времени при $\lambda = 460 \text{ нм}$ ($\epsilon = 31000 \text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [13]).

Индикаторную реакцию в присутствии ДДС проводили по вышеописанной методике с тем лишь отличием, что после добавления пероксидазы в реакционную смесь добавляли 0,1 мл 30 мМ раствора ДДС и оптическую плотность реакционной смеси регистрировали при $\lambda = 395 \text{ нм}$.

Реакцию в присутствии эффекторов или второго субстрата пероксидазы проводили по вышеописанной методике с той лишь разницей, что после фермента в раствор добавляли 50 мкл водного раствора эффектора (имидазола или сульфаниламида) или второго субстрата (цистеина) необходимой концентрации. При изучении систем в присутствии прямых мицелл ДДС отличие в методике состояло в том, что после раствора фермента добавляли 0,1 мл 30 мМ раствора ДДС, а после этого вводили раствор эффектора.

Методики приготовления раствора обращенных мицелл ДДС и проведения в их среде индикаторной реакции.

На основании расчетов по фазовой диаграмме псевдотрехкомпонентной системы и эксперимента были установлены оптимальные условия получения мицеллярного раствора ДДС в органическом растворителе (рис. 1 [14]). Определенную навеску ДДС растворяли на магнитной мешалке в смеси 4,35 мл

0,02 М цитратного буферного раствора (рН 5,0), 7,35 мл пентанола-1 и 1,0 мл бензола. При проведении индикаторной реакции в мицеллярном растворе в стеклянную пробирку с притертой пробкой вводили последовательно 2,85 мл раствора ДДС в органическом растворителе, 50 мкл 6 нМ раствора фермента, 25 мкл 0,02 М цитратного буферного раствора с рН 5,0 или 50 мкл водного раствора эффектора, 50 мкл 0,06 М раствора *o*-Д (в случае определения сульфаниламида концентрация *o*-Д составляла 6 мМ) и 25 мкл 0,03 М раствора пероксида водорода. Раствор интенсивно встряхивали до получения оптически прозрачного раствора. В момент смешения растворов включали секундомер, смесь переносили в кювету и измеряли оптическую плотность раствора каждые 15 с в течение 2 мин при $\lambda = 440$ нм.

Степень ингибирующего действия сульфаниламида на каталитическую активность пероксидазы (*I*, %) рассчитывали по формуле:

$$I, \% = 1 - (tg_{SA} / tg_0) \cdot 100,$$

где tg_0 и tg_{SA} – тангенсы начальных прямолинейных участков кинетических кривых индикаторного процесса в отсутствие и в присутствии сульфаниламида соответственно.

Степень активирующего действия имидазола на каталитическую активность пероксидазы (*A*, %) рассчитывали по формуле:

$$A, \% = \{ (tg_{Im} / tg_0) - 1 \} \cdot 100,$$

где tg_0 и tg_{Im} – тангенсы начальных прямолинейных участков кинетических кривых индикаторного процесса в отсутствие и в присутствии имидазола соответственно

Результаты и их обсуждение

Для солюбилизации пероксидазы было выбрано анионное ПАВ – додецилсульфат. В литературе имеются сведения о перспективности его использования в качестве наиболее универсального среди изученных ПАВ модификатора электродов [15] и наночастиц (например, углеродных нанотрубок) [16, 17], обеспечивающего создание на их поверхностях прочных структурированных тонких пленок различных полиэлектролитов [18], в том числе ферментов [16, 17]. Эти свойства ДДС могут в дальнейшем способствовать созданию на основе пероксидазы, солюбилизованной в его мицеллы, биосенсоров, характеризующихся высокой чувствительностью, стабильностью, хорошей воспроизводимостью от сенсора к сенсору,

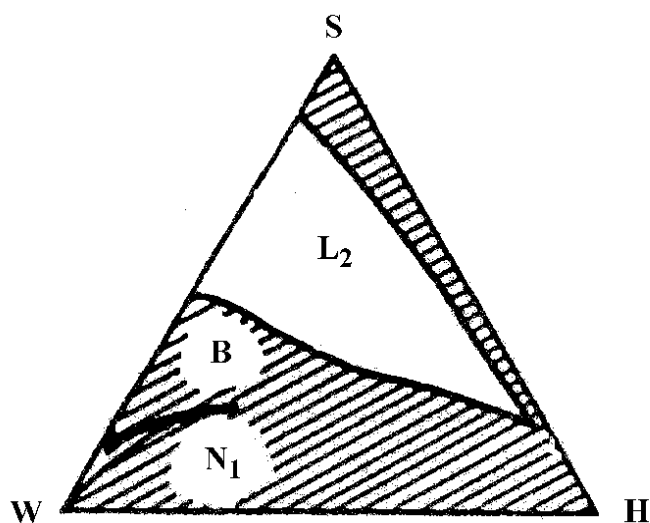


Рис. 1. Фазовая диаграмма состояния системы бензол (H)–пентанол + ДДС (S)–вода (W) (L_2 – область обращенных микроэмульсий) [14]

быстрым откликом аналитического сигнала. Кроме того, хорошо известны фазовые диаграммы состояния ДДС в водно-органических средах (рис. 1 [14]).

Выбор анионной природы ПАВ обусловлен целесообразностью закрепления (иммобилизации) пероксидазы внутри обращенной мицеллы ($pI = 7,2$ [19]) за счет электростатических взаимодействий на внутренней стороне мицеллы. Данный подход, по нашему представлению, должен обеспечить наилучшие условия для переноса (с наименьшими диффузионными препятствиями) веществ, находящихся в органической среде, к ферменту.

Для контроля активности пероксидазы как в водном растворе, так и в среде обращенных мицелл в качестве индикаторной была выбрана реакция окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода, поскольку она хорошо изучена в водном растворе; механизм ее описан в литературе [20, 21]; нами ранее были выяснены оптимальные условия ее проведения [22].

Перед изучением поведения пероксидазы в среде обращенных мицелл нами было выяснено, как ДДС влияет на каталитическую активность пероксидазы в водном буферном растворе. Ранее [22] было показано, что при проведении катализируемой пероксидазой реакции окисления *o*-дианизидина в фосфатном буферном растворе (рН 5,5) в присутствии додецилсульфата натрия в концентрации $> 0,1$ мМ изменяется ее химизм: в результате электростатического взаимодействия анионного ПАВ с положительно заряженным

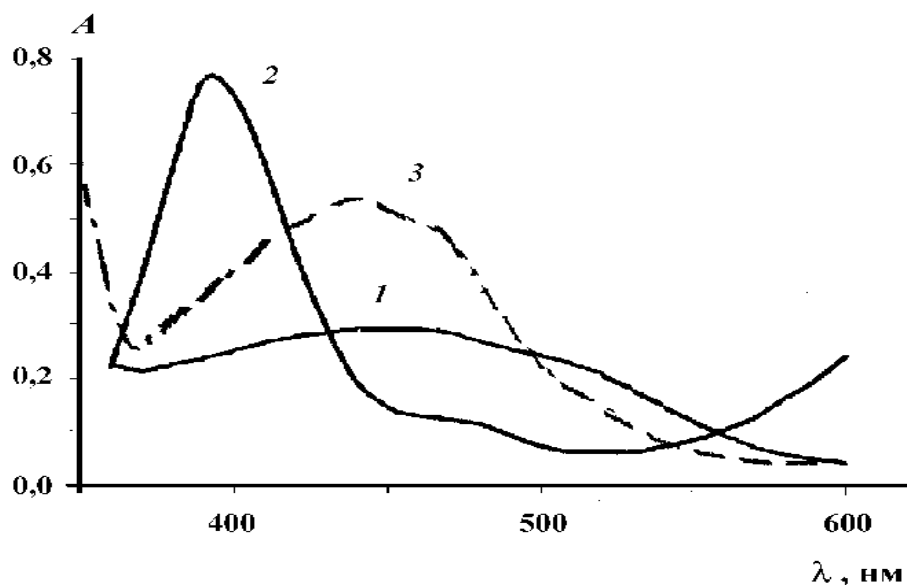


Рис. 2. Спектры поглощения продукта окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода, катализируемого пероксидазой, через определенные промежутки времени (мин) после начала реакции: 1, 2 – 1; 3 – 3 в разных средах: 1 – 0,1 М фосфатный буферный раствор (рН 5,6); 2 – 0,1 М фосфатный буферный раствор (рН 5,6) в присутствии 1 мМ ДДС; 3 – в среде обращенных мицелл ДДС

промежуточным продуктом окисления субстрата происходит стабилизация последнего (рис. 2). При концентрации ДДС < 0,1 мМ он не влияет на каталитическую активность фермента и на химизм индикаторной реакции, и спектры поглощения продуктов реакции в отсутствие и в присутствии ДДС практически совпадают. Установлено также, что в присутствии ПАВ промежуточный продукт окисления *o*-дианизидина ($\lambda_{\text{макс}} = 395$ нм) накапливается быстрее, чем основной продукт в отсутствие ДДС, что может быть использовано для улучшения метрологических характеристик методик определения эффекторов и субстратов пероксидазы.

Для солубилизации пероксидазы в обращенные мицеллы была выбрана четырехкомпонентная водно-органическая система: ДДС–пентанол–1–бензол–вода (рис. 1), которая ранее не была изучена применительно к ферментативным процессам. Были оптимизированы условия проведения реакции пероксидазного окисления *o*-Д в указанной среде: степень гидратации $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}]$ составила 27, содержание ПАВ – 60% (в смеси с пентанолом), концентрации *o*-Д, H_2O_2 и пероксидазы – 1 мМ; 0,25 мМ и 0,1 нМ соответственно; буферный раствор – 0,02 М цитратный; рН 5,0.

Были рассчитаны значения константы скорости ($k_{\text{кат}}$) ферментативной реакции окисления *o*-Д в водной среде и в среде обращенных мицелл (1500 и 2000 с^{-1} соответственно). Из литературы [4] известно, что в той же реакции в среде обращенных ми-

целл АОТа пероксидаза проявляет “суперактивность” ($k_{\text{кат}}$ составляет 1400 и 33000 с^{-1} в водной среде и в среде обращенных мицелл соответственно). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при проведении реакции пероксидазного окисления *o*-Д в среде обращенных микроэмульсий ДДС константа скорости каталитической реакции практически не изменяется, т.е. при солубилизации пероксидазы в обращенные мицеллы ДДС ее суперактивность не проявляется. Возможно, это связано с частичной денатурацией биокатализатора под действием высоких концентраций пентанола (60% в смеси с ДДС). При переходе в среду обращенных микроэмульсий ДДС, как и в случае обращенных мицелл АОТа, уменьшается сродство пероксидазы к субстрату-восстановителю – *o*-Д: $k_{\text{кат}}/Km = 42$ и $7 \text{ с}^{-1} \times \text{мкМ}^{-1}$ в водной и органической средах соответственно. При этом возрастают $k_{\text{кат}}$ по пероксиду водорода и сродство фермента к этому основному субстрату ($k_{\text{кат}} = 2770$ и 3268 с^{-1} и $k_{\text{кат}}/Km = 5$ и $22 \text{ с}^{-1} \times \text{мкМ}^{-1}$ для водного раствора и обращенных мицелл ДДС соответственно). Благодаря этому проведение индикаторной реакции в мицеллярном растворе ДДС позволило улучшить метрологические характеристики методики определения пероксида водорода: значительно понизились предел обнаружения и нижняя граница определяемых содержаний, возрос коэффициент чувствительности градуировочного графика (таблица).

Метрологические характеристики методик определения пероксида водорода, цистеина, сульфаниламида и имидазола по реакции окисления *o*-дианизидина, катализируемой пероксидазой, в различных средах

Определяемое соединение	Среда	ДДС	Диапазон определяемых концентраций, мкМ	Уравнение градуировочного графика	$C_{\text{мин}}$, мкМ
Пероксид водорода	вода	–*	1–25	$y = 0,71 x + 0,04$	0,4
		+**	0,5–25	$y = 1,4 x + 0,2$	0,2
	обращенные мицеллы		0,1–2,5	$y = 4,03 x + 0,03$ $y - \text{tg} \cdot 10^2; x - C, \text{ мкМ}$	0,06
Цистеин	вода	–	0,5–50	$y = 23 x + 151$	0,3
		+	0,5–50	$y = 35 x + 230$	0,1
	обращенные мицеллы		0,5–50	$y = 46 x + 304$ $y - I, \%; x - \lg(C, \text{ М})$	0,08
Сульфаниламид	вода	–	1000–10000	$y = 5,5 x + 5,1$	300
		+	500–10000	$y = 7 x + 10$	100
	обращенные мицеллы		100–5000	$y = 15 x + 9$ $y - I, \%; x - C, \text{ мМ}$	30
Имидазол	вода	–	20–600	$y = 194 x + 968$	10
		+	20–600	$y = 194 x + 968$	10
	обращенные мицеллы		10–200	$y = 323 x + 1632$ $y - A, \%; x - \lg(C, \text{ М})$	5

Примечания. –* в отсутствие ДДС; +** в присутствии ДДС.

Для сравнения аналитических характеристик методик определения эффекторов пероксидазы в трех разных средах (водном растворе, в среде прямых и обращенных мицелл ДДС) были выбраны в качестве модельных соединений фармацевтические препараты: цистеин, сульфаниламид и имидазол. Выбор этих соединений обусловлен, во-первых, актуальностью их определения, а, во-вторых, тем, что, согласно литературным данным [23, 24], они оказывают разное действие на пероксидазу, являясь ее вторым субстратом (цистеин), конкурентным ингибитором (сульфаниламид) и бесконкурентным активатором (имидазол при $\text{pH} > 6,5$). Нами были оптимизированы условия определения всех указанных соединений и разработаны методики их определения в водном буферном растворе в отсутствие ($\lambda = 460 \text{ нм}$), в присутствии 1 мМ ДДС (при $\lambda = 395 \text{ нм}$) и в среде обра-

щенных мицелл ДДС ($\lambda = 440 \text{ нм}$) (таблица). Из таблицы видно, что использование как прямых, так и обращенных мицелл ПАВ позволяет понизить предел обнаружения и повысить коэффициент чувствительности (угол наклона градуировочного графика) определения всех указанных соединений.

Таким образом, показано, что введение поверхностно-активного вещества в ферментативный процесс, проведение его в среде прямых и обращенных мицелл позволяет улучшить аналитические характеристики методик определения субстратов и эффекторов пероксидазы. Это открывает перспективы для разработки в дальнейшем чувствительных методик определения малорастворимых или нерастворимых в водных растворах компонентов реакций, катализируемых пероксидазой.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (проект № 04-03-33116).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин И.В. Действие ферментов в обращенных мицеллах. М., 1885.
2. Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К. // Мол. биол. 1984. **10**. С. 1019.
3. Ono T., Goto M. // Biochem. Eng. J. 2006. **28**. P. 156.
4. Клячко Н.Л., Дулькис Ю.К., Газарян И.Г. и др. // Биохимия. 1997. **62**. С. 1153.
5. Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В., Веселова И.А. // Рос. хим. журн. 2004. **48**. С. 73.
6. Долманова И.Ф., Попова И.М., Угарова Н.Н., Шеховцова Т.Н. // ЖАХ. 1981. **36**. С. 1347.
7. Шеховцова Т.Н., Лялютин А.Л., Кондратьева Е.И., Газарян И.Г., Долманова И.Ф. // ЖАХ. 1994. **49**. С. 1317.
8. Пуина А.Д., Martinez Hernandez J.L., Mauricio Benavides J.E. et al. // Luminescence. 2003. **18**. P. 31.
9. Pena N., Ruiz G., Revierjo A.J. et al. // Anal. Chem. 2001. **73**. P. 1190.
10. Shanon L.M., Lew J. Y. // Biol. Chem. 1966. **241**. P. 2166.
11. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. и др. Справочник биохимика. М., 1991.
12. Кольтгофф И.М., Сендел Е.Б. Количественный анализ. М., 1948.
13. Угарова Н.Н. Пероксидазный катализ и его применение. Методическое пособие. М., 1981.
14. Clausse M., Heil J., Zrabda A. Comunicaciones 16 Jornadas Com. Esp. Deterg. Barcelona, 1985. P. 497.
15. Udit A.K., Hill M.G., Gray H.B. // Langmuir. 2006. **22**. P. 10854.
16. Kamau G.N., Guto M.P., Munge B. et al. // Langmuir. 2003. **19**. P. 6976.
17. Song Ch., Pehrsson P.E., Zhao W. // J. Phys. Chem. 2005. **109**. P. 21634.
18. Thongngam M., McClements D.J. // J. Agric. Food. Chem. 2004. **52**. P. 987.
19. Moehly A. Methods in Enzymology / Eds. S. Colowick, N. Kaplans). V. 2. N. Y., 1955.
20. Багурова Н.А., Шеховцова Т.Н. // Кинетика и катализ. 1999. **40**. С. 265.
21. Claiborne A., Fridovich J. // Biochem. 1979. **18**. P. 2324.
22. Курейко А.В., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. // Биоорганическая химия. 2006. **32**. С. 80.
23. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Курилина Т.А., Березин И.В. // Биохимия. 1977. **42**. С. 1577.
24. Попова И.М. Ферментативные методы определения физиологически активных веществ и применение пероксидазы // Дис. ... канд. хим. наук. М., 1981.

Поступила в редакцию 21.12.06.

ENZYMATIC DETERMINATION OF SOME PHARMACEUTICALS IN DIRECT AND REVERSED MICELLS OF SODIUM DODECYLSULFATE

A.V. Kireyko, I.A. Veselova, T.N. Shekhovtsova

(Division of Analytical Chemistry)

The properties of horseradish peroxidase in reversed micelles of sodium dodecyl sulfate in water/benzene/pentanol medium were studied. The prospects of using direct and reversed micelles of sodium dodecyl sulfate for the aims of chemical analysis with the example of developing the procedures for the determination of the substrates (hydrogen peroxide, cysteine), the inhibitor (sulfanilamide), and activator (imidazole) were presented.