



УДК 543.067.5

## СЕНСОРНЫЕ МИКРОПЛАНШЕТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ТРИФЕНИЛАМИН-4-СУЛЬФОКИСЛОТЫ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА



И. С. Зубарева, О. А. Колонтаева,  
Е. В. Чернозубова, Н. А. Бурмистрова

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского  
E-mail: naburmistrova@mail.ru

Спектрофотометрическим методом изучена реакция окисления трифениламин-4-сульфоукислоты (ТФАСК) пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена (ПХ) в слабoкислых растворах и при включении ТФАСК в полимерную матрицу гидрогеля полиуретана (тип D4). Исследована устойчивость продукта ферментативного окисления ТФАСК при варьировании условий проведения реакции (концентрации исходных веществ, кислотности среды). Выбраны оптимальные условия и показана возможность определения ПХ в микропланшетах с сенсорными пленками с пределом обнаружения  $0.3 \cdot 10^{-4}$  ус. ед./мл.

**Ключевые слова:** ароматические амины, ферментативное окисление, трифениламин-4-сульфоукислота, пероксидаза хрена, сенсорный микропланшет.

### Sensor Plate in Horseradish Peroxidase Determination Based on Oxidation of Triphenylamine-4-sulphonic Acid by Hydrogene Peroxide

I. S. Zubareva, O. A. Kolontaeva,  
E. V. Chernozubova, N. A. Burmistrova

The oxidation of triphenylamine-4-sulphonic acid (TPASA) by hydrogen peroxide in presence of horseradish peroxidase (HRP) in weak acid medium and after incorporation of TPASA in polymeric hydrogel matrix of polyurethane (type D4) was investigated by spectrophotometry. The stability of TPASA product enzymatic oxidation under variation of reaction condition (reagents concentration, acidity) was studied. The optimum condition was selected and the possibility of HRP detection in sensor plate was shown with limit of detection  $0.3 \cdot 10^{-4}$  U/mL.

**Key words:** arylamines, enzymatic oxidation, triphenylamine-4-sulphonic acid, horseradish peroxidase, sensor plate.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-10-13

Реакции окисления ароматических аминов в присутствии пероксидазы хрена (ПХ) традиционно широко применяются в различных форматах иммуноферментного анализа. В то же время круг применяемых для этих целей субстратов ограничен, а их основным недостатком является неспецифическое окисление в присутствии различных окислителей.

Наличие общих закономерностей в механизмах окисления ароматических аминов позволило предположить возможность окисления

трифениламина (ТФА) пероксидом водорода в присутствии ПХ в слабoкислых средах. При этом особенности электронного и пространственного строения молекул ТФА являются причиной высокой специфичности реакций окисления и устойчивости продуктов окисления данного реагента [1] и, как следствие, открывают возможность улучшения аналитических характеристик методик иммуноферментного анализа.

Целью данной работы явилось изучение реакции окисления трифениламин-4-сульфоукислоты (ТФАСК) пероксидом водорода в присутствии ПХ в слабoкислых растворах и при включении органического реагента в полимерную пленку полиуретана (типа D4). Использование сульфопроизводного ТФА позволяет проводить реакцию окисления реагента в водных слабoкислых растворах.

### Экспериментальная часть

В работе использовали ТФАСК, синтезированный по разработанной методике [2], пероксид водорода (ч.д.а.), ПХ (Sigma, ~150 ус. ед./мг). Рабочие растворы ТФАСК ( $1 \cdot 10^{-3}$  М),  $H_2O_2$  ( $1 \cdot 10^{-3}$  М), ПХ ( $1 \cdot 10^{-3}$  ус.ед./мл) готовили разведением в бидистиллированной воде.

Оптически прозрачные и устойчивые в водных растворах пленки полиуретана (HydroMed D4), содержащие ТФАСК, получали растворением навески реагента (из расчета  $3 \cdot 10^{-3}$  М) в гидрогеле полиуретана D4 (5 мас.%,  $C_2H_5OH$ ). Для получения сенсорных пленок коктейль (15 мкл) помещали в лунки микропланшета (96 лунок) и сушили в течение 2 часов при  $40^\circ C$ .

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer (SHIMADZU, Япония), сенсорных пленок – на микропланшетном ридере «Sunrise» (TECAN, Австрия).

### Результаты и их обсуждение

*Реакция окисления ТФАСК пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена в слабoкислых растворах*

ТФАСК не окисляется пероксидом водорода в широком диапазоне кислотности среды. В то



же время присутствие ПХ в слабокислых средах ( $1.0 \cdot 10^{-3} - 5.0 \cdot 10^{-5}$  М по  $H_2SO_4$ ) приводит к появлению окрашенного продукта, свидетельствующего об окислении реагента в присутствии фермента. Спектр поглощения окисленной формы ТФАСК характеризуется высокоинтенсивной полосой

при 680 нм, интенсивность которой изменяется во времени (рис. 1). Увеличение концентрации пероксида водорода приводит к быстрой деградации окраски продукта окисления ТФАСК, а также появлению новой низкоинтенсивной полосы поглощения при 480 нм.

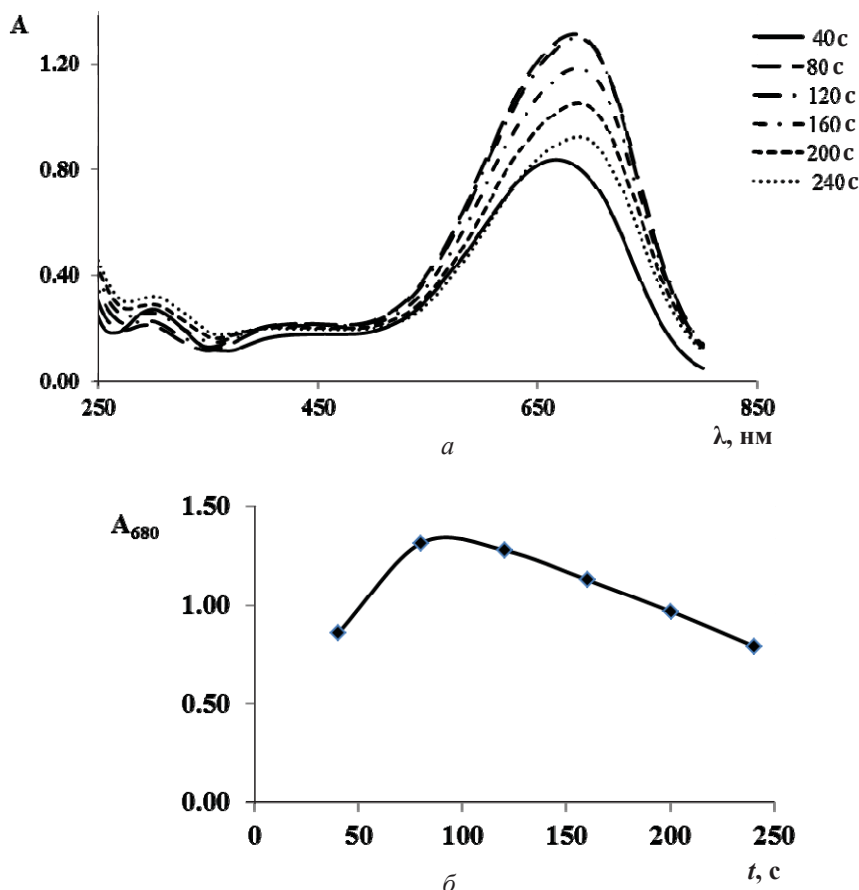


Рис. 1. Трансформация во времени спектра поглощения ТФАСК, окисленного пероксидом водорода, в присутствии ПХ (а) и изменение во времени оптической плотности при 680 нм (б):  $C_{H_2O_2} = 2.0 \cdot 10^{-3}$  М,  $C_{H_2SO_4} = 1.0 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{ТФАСК} = 6.0 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{ПХ} = 0.4 \cdot 10^{-3}$  ус.ед./мл

Изменение интенсивности оптической плотности во времени при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения окисленных форм ТФАСК [3], позволяет предположить совместное присутствие в растворе катион-радикала ТФАСК<sup>•+</sup> ( $\lambda=647$  нм) и окисленного продукта его димеризации – дикатиона тетрафенилбензидина ТФБСК<sup>2+</sup> ( $\lambda=680$  нм) в начальный момент времени. Уменьшение концентрации катион-радикалов ТФА<sup>•+</sup>, обусловленное его участием в процессах димеризации, приводит к смещению равновесия в сторону образования бесцветного катион-радикала тетрафенилбензидина ТФБСК<sup>•+</sup> ( $\lambda=480$  нм).

Нестабильность сигнала процесса ферментативного окисления ТФАСК во времени снижает ценность использования системы для ее практи-

ческого применения. В связи с этим нами изучена возможность стабилизации аналитического сигнала при введении в систему переходных металлов. Установлено (рис. 2), что интенсивность окраски продукта ферментативного окисления ТФАСК увеличивается (~41%) и стабилизируется в присутствии каталитически активных форм Ir(IV) и Rh(III), полученных термообработкой соответствующих хлорокомплексов с хлорной кислотой согласно методике [4].

Стабильность продукта ферментативного окисления ТФАСК пероксидом водорода в присутствии каталитически активных форм иридия (IV) и родия (III) и наличие области линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации ПХ предполагают возможность использования данных систем для аналитических целей.

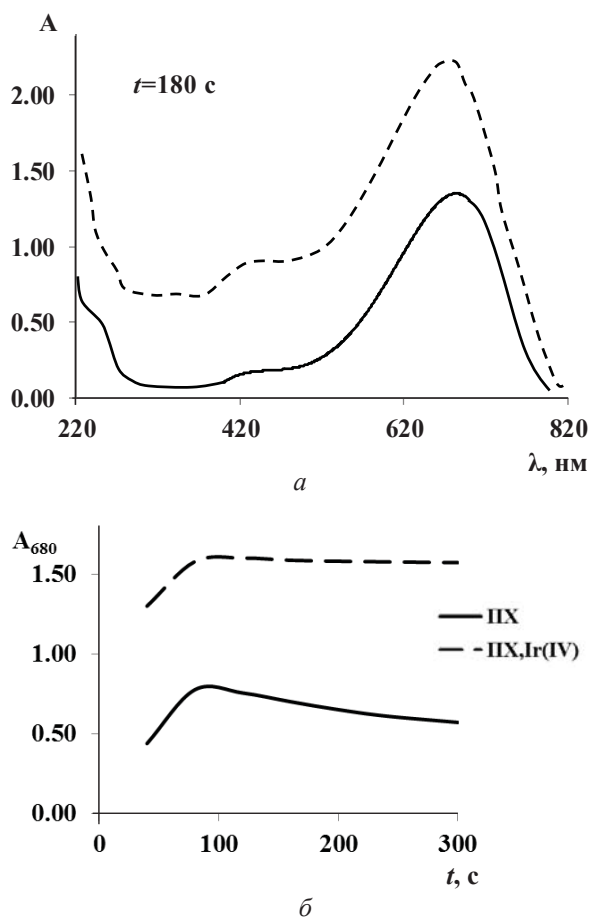


Рис. 2. Спектры поглощения (а) и кинетические кривые (б) образования окисленной формы ТФАСК в присутствии ПХ и каталитически активной формы Ir(IV):  $C_{\text{ТФАСК}} = 6.0 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 2.0 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2.5 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{\text{ПХ}} = 0.3 \cdot 10^{-4}$  ус.ед./мл,  $C_{\text{Ir}} = 1.0 \cdot 10^{-4}$  мкг/мл

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

Иммобилизация ТФАСК в полимерные пленки и проведение реакции его окисления в формате твердофазного анализа открывают возможность разработки высокопроизводительного скрининга пероксида водорода и ПХ одновременно в большом числе образцов. Для формирования оптически прозрачных и устойчивых в водных растворах пленок нами использован гидрогель полиуретана (D4). Присутствие в структуре полиуретана бензолных колец предполагает стеклинговое взаимодействие с молекулами ТФАСК и, как следствие, увеличивает однородность и устойчивость сенсорных пленок к вымыванию красителя.

Установлено, что характеристики спектра поглощения окисленной формы ТФАСК в сенсорных пленках совпадают с характеристиками в растворе, что свидетельствует об однотипности механизма окисления ТФАСК в растворе и на поверхности полимера.

Изучено влияние различных факторов на интенсивность поглощения сенсорной мембраны после взаимодействия ТФАСК с пероксидом водорода. Установлено, что наиболее устойчивые мембраны были получены при использовании сенсорного коктейля с концентрацией ТФАСК 1 мг/мл. При этом включение ПХ в состав сенсорной мембраны приводит к ухудшению ее гомогенности и устойчивости. Изменение концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в диапазоне  $2.5 \cdot 10^{-3} - 2.5 \cdot 10^{-4}$  М практически не влияет на аналитический сигнал и чувствительность определения ПХ. Кислотность среды существенно влияет на стабильность окраски окисленной формы ТФАСК. Максимальный аналитический сигнал достигается в растворах  $2.0 \cdot 10^{-5}$  М серной кислоты, что предполагает возможность использования данной сенсорной системы для анализа биосистем.

В качестве оптимальных условий для определения ПХ выбраны концентрации ТФАСК – 1 мг/мл коктейля,  $\text{H}_2\text{O}_2 - 2.5 \cdot 10^{-4}$  М,  $\text{H}_2\text{SO}_4 - 2.0 \cdot 10^{-5}$  М, время отклика сенсорной системы – 3 мин.

Вид градуировочных зависимостей для определения ПХ в оптимальных условиях описывается уравнениями прямой в диапазоне до 8.5 ус. ед./мл ПХ. Во всех случаях коэффициент корреляции составлял величину более 0.99. Низкий предел обнаружения (ПО  $0.3 \cdot 10^{-4}$  ус.ед./мл) позволяет использовать предлагаемую методику для определения ПХ в биологических системах.

#### Список литературы

1. Никонов П. Г., Бурмистрова Н. А., Муштакова С. П. Трифениламин-4-сульфокислота в каталитическом определении платиновых металлов // Журн. аналит. хим. 2008. Т. 63, № 4. С. 432–437.
2. Никонов П. Г., Муштакова С. П., Бурмистрова Н. А., Кожина Л. Ф. Каталитическое определение родия на основе реакции окисления трифениламин-4-сульфокислоты периодатом натрия // Журн. аналит. хим. 2004. Т. 59, № 2. С. 161–165.
3. Oyama M., Higuchi T., Okazaki S. Spectroscopic detection and kinetic analysis of short-lived aromatic



amine cation radicals using an electron transfer stopped-flow method // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. Part 2*. 2001. № 8. P. 1287–1293.

4. Капустина Е. В., Бурмистрова Н. А., Муштако-

ва С. П. Новые каталитические системы для определения иридия (IV) и родия (III) при их совместном присутствии в растворе // *Цветные металлы*. 2009. № 11. С. 42–45.

---

**Образец для цитирования:**

Зубарева И. С., Колонтаева О. А., Чернозубова Е. В., Бурмистрова Н. А. Сенсорные микропланшеты для определения пероксидазы хрена на основе реакции окисления трифениламин-4-сульфокислоты пероксидом водорода // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2017. Т. 17, вып. 1. С. 10–13. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-10-13.

**Cite this article as:**

Zubareva I. S., Kolontaeva O. A., Chernozubova E. V., Burmistrova N. A. Sensor Plate in Horseradish Peroxidase Determination Based on Oxidation of Triphenylamine-4-sulphonic Acid by Hydrogene Peroxide. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 1, pp. 10–13 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-10-13.

---