

**Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова**

**Химический факультет
Кафедра аналитической химии**

*Ферментативное определение фенолов
с использованием пероксидазы хрена после их разделения
методом тонкослойной хроматографии*

*Курсовая работа
студентки 2XX группы
XXXXX X.X.*

*Научные руководители:
м.н.с., к.х.н. XXXX X.X.
м.н.с., к.х.н. XXXXXXXXXXXX X.X.*

*Преподаватель:
доцент, к.х.н. XXXXXXXXXXXX X.X.*

Москва 2000

Содержание

Введение	3
Обзор литературы	4
Глава 1. Ферментативное определение фенолов.....	4
Глава 2. Разделение фенолов методом тонкослойной хроматографии	13
Экспериментальная часть	19
Глава 3. Исходные вещества, посуда, аппаратура, обработка результатов измерений, методика эксперимента	19
3.1. Исходные вещества	19
3.2. Посуда и аппаратура	21
3.3. Обработка результатов измерений	21
3.4. Методика эксперимента	22
Глава 4. Ферментативный метод определения фенолов с их предварительным разделением методом ТСХ	23
4.1. Выбор индикаторной системы	23
4.2. Проведение реакции пероксидазного окисления ОД и ТМБ на силикагелях.....	26
4.3. Изучение влияния 1– и 2–нафтолов на каталитическую активность пероксидазы хрена на силикагеле	28
4.4. Изучение влияния фенолов на каталитическую активность пероксидазы хрена на силикагеле	29
4.5. Разделение фенолов методом ТСХ с последующим проявлением йодом	32
4.6. Разделение фенолов методом ТСХ с последующим ферментативным проявлением.	33
Выводы	35
Список литературы	36

Введение

В условиях возвращающегося внимания к проблемам охраны окружающей среды, создание безвредных производств, получение экологически чистых продуктов питания все более актуальной становится задача разработки простых, высокочувствительных методов определения биологически активных неорганических и органических соединений; всё острее встаёт вопрос создания тест-методов, позволяющих быстро, надёжно, с низким пределом обнаружения (на уровне и ниже ПДК) контролировать содержание вредных примесей в объектах окружающей среды.

В этих целях весьма перспективно использование ферментативных методов анализа, сочетающих высокую чувствительность с простотой и экономичностью используемой аппаратуры. Ферментативными методами можно определять сами ферменты, их субстраты, эффекторы. При этом следует отметить, что определение эффекторов ферментов отличается высокой чувствительностью и, следовательно, наиболее перспективно. Более широкое внедрение в аналитическую практику несколько ограничено недостаточной высокой селективностью этих методов.

Улучшение селективности определения эффекторов можно достичь сочетанием ферментативного определения с предварительным хроматографическим разделением, разрабатывая, таким образом, гибридные методы анализа.

Цель настоящей работы заключается в разработке тест-метода определения фенолов по их влиянию на каталитическую активность пероксидазы хрена в реакции окисления арилдиаминов с предварительным разделением фенолов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Обзор литературы

Полифенолы, фенол и его производные относятся к широко распространённым высокотоксичным загрязнителям природных объектов [1]. Фенолы содержатся в продуктах крекинга нефти и горючих сланцев, применяются в производстве пластмасс, искусственного волокна, при создании новых видов полимерных материалов, синтетического каучука, поверхностно-активных веществ, пластификаторов, стабилизаторов для нефтепродуктов, в качестве исходных реагентов для синтеза красителей, пестицидов, антиоксидантов для масел и жиров.

Несмотря на очистку сточных вод и воздуха на химических предприятиях, фенольные соединения присутствуют в природных объектах. Фенолы попадают в сточные воды в результате смывов с полей остатков пестицидов. При хлорировании фенолсодержащих вод с целью их бактерицидной обработки образуются хлорфенолы, которые при окислении превращаются в диоксины – особо опасные канцерогены.

Предельно допустимые концентрации фенолов в водах и воздухе варьируют в широком интервале 0,0005 – 0,05 мг/л и 0,001 – 0,05 мг/м³, соответственно [2].

Объекты анализа на содержание фенольных соединений весьма различны. Ими могут быть питьевые и сточные промышленные воды, воздух производственных помещений и атмосферный воздух, выхлопные газы, табачный дым, коксовые и смоляные дистилляты, различные пластические материалы, древесина и продукты питания. В связи с этим разработка методов определения фенола и его производных остается актуальной задачей аналитической химии.

Глава 1. Ферментативное определение фенолов

Благодаря высокой чувствительности, простоте в использовании и экспрессности, биосенсоры занимают важную роль в мониторинге окружающей среды. Биосенсор – это индикаторный электрод, активной частью которого является иммобилизованный фермент, а определяемое вещество может быть либо его субстрат, либо эффектор. Разработано и описано большое число биосенсоров для определения органических и неорганических соединений с использованием различных ферментов таких как холинэстераза, пероксидаза, тирозиназа.

Тирозиназа (полифенилоксидаза) – это Cu-содержащий фермент класса оксидоредуктаз, который катализирует окисление фенолов кислородом воздуха. В

литературе описан ряд работ по ферментативному определению фенолов с использованием этого фермента [3–5].

Принцип действия биосенсора на основе тирозиназы на примере субстрата пирокатехина можно описать следующей схемой 1 [3]:

Схема 1

В результате реакции (1), катализируемой тирозиназой, из фенолов образуются соответствующие хиноны, а на электроде в присутствии протонов происходит обратная реакция восстановления до исходного соединения.

В работе [3] описан амперометрический биосенсор на основе тирозиназы гриба, позволяющий определять фенол, пирокатехин, *m*-крезол и допамин. Для иммобилизации тирозиназы предварительно готовили гель смешением определённых количеств поливинилового спирта и пологидроксилцеллюлозы. Аликвоту смеси, полученной растворением фермента в геле, наносили на поверхность стеклоуглеродного электрода. Для получения механически прочного электрода его выдерживали в течение 12 часов при температуре -5°C , а затем 1 час при комнатной температуре $(15\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Эту операцию повторяли трижды.

Все амперометрические измерения проводили в стандартной трёхэлектродной измерительной ячейке, термостатированной при температуре $(25\pm 0,1)^{\circ}\text{C}$. Рабочим электродом являлся стеклоуглеродный диск диаметром 4 мм с иммобилизованным на его поверхности ферментом, в качестве электрода сравнения использовали хлоридсеребряный электрод Ag/AgCl (нас. KCl), а платиновая проволока была вспомогательным электродом.

Измерения проводили при $-0,2$ В в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 6,9) при постоянном перемешивании анализируемого раствора.

Кажущуюся активность фермента, иммобилизованного в криогидратную матрицу, определяли спектрофотометрически. Ферментный электрод помещали в кювету, содержащую 2 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,5) и $1\cdot 10^{-4}$ М пирокатехина. По истечении трёх минут электрод вынимали и измеряли оптическую плотность раствора при 380 нм. При иммобилизации активность фермента была на 22 % выше, чем нативной тирозиназы.

Было показано, что ферментный электрод сохраняет 98 % первоначальной активности в течение трёх месяцев при хранении при 4°C в сухом виде. Это позволяет легко транспортировать электрод.

Метрологические характеристики метода приведены в табл. 1.

Таблица 1

Метрологические характеристики метода определения фенолов с использованием биосенсора на основе тирозиназы ($P=0,95$, $n=3$)[3].

Фенольное соединение	Линейный диапазон определяемых содержаний, М	Предел обнаружения, мкМ	s_f
Фенол	$1,0 \cdot 10^{-6} - 1,0 \cdot 10^{-4}$	0,10	0,04
Пирокатехин	$1,0 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^{-5}$	0,02	0,04
<i>n</i> -Крезол	$1,0 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^{-5}$	0,02	0,04
Допамин	$1,0 \cdot 10^{-6} - 1,0 \cdot 10^{-4}$	0,10	0,04

Описан электрохимический метод определения фенола и пирокатехина с использованием тирозиназы гриба, иммобилизованной в пористом геле $Al_2O_3 \cdot xH_2O$ [4].

Выбор гексацианоферрата (II) $Fe(CN)_6^{4-}$ в качестве переносчика электронов обусловлен простотой закрепления его на положительно-заряженной матрице Al_2O_3 в следствие электростатического взаимодействия.

Варьируя соотношение $Al : H_2O$ в геле, можно получить поры разной величины, что позволяет использовать гель как матрицу как для иммобилизации макромолекул фермента, так и для закрепления низкомолекулярных соединений ($Fe(CN)_6^{4-}$).

Принцип действия электрода можно отобразить схемой 2:

Схема 2

Схематически строение ферментного электрода можно изобразить так : стеклоглерод / гель $\text{Al}_2\text{O}_3\text{--Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (внутренний слой) / гель Al_2O_3 –тирози́наза (внешний слой).

Для приготовления геля Al_2O_3 изопропоксид алюминия $\text{Al}(\text{i-PrO})_3$ растворяли в дистиллированной воде. После перемешивания раствора в течение 45–60 минут добавляли 1,0 М HCl . Полученную смесь нагревали в течение 16 часов при 90°C с открытой крышкой для испарения изопропанола i-PrOH .

Поверхность стеклоглеродного электрода, являющегося основой ферментного электрода, тщательно полировали бумагой с напылением алмаза и частиц алюминия, последовательно промывали деионизованной водой, азотной кислотой (1 : 1), ацетоном и сушили на воздухе.

На поверхность электрода наносили гель Al_2O_3 (соотношение $\text{Al} : \text{H}_2\text{O}$ равно 1 : 100), содержащего 50 ммоль/л $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ и сушили в течение часа. Для иммобилизации тирозиназы 10 мкл коллоида, полученного смешением геля Al_2O_3 (1 : 200) и 0,1 мл/мл раствора тирозиназы, наносили вторым слоем на электрод и сушили в течение суток при комнатной температуре. Полученный электрод промывали фосфатным буферным раствором (рН 7,4).

Амперометрические измерения проводили в электрохимической ячейке, содержащей 2 мл 0,02 М фосфатного буфера (рН 7,4) при постоянном перемешивании. Оптимальным рабочим потенциалом был выбран $-0,16$ В (относительно насыщенного каломельного электрода (НКЭ)) при температуре $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Линейный диапазон определяемых содержаний фенола данным методом составляет $1,0 \cdot 10^{-7} - 2,5 \cdot 10^{-4}$ М, предел обнаружения фенола – 50 нМ.

Электрод сохраняет активность в течение месяца при хранении при 4°C .

Для повышения чувствительности ферментативного определения фенола при создании биосенсора использовали два биокатализатора: тирозиназу гриба и пероксидазу хрена. Благодаря более высокой активности и меньшей молекулярной массы пероксидазы хрена по сравнению с тирозиназой, процесс окисления пирокатехина до *o*-хинона, катализируемый пероксидазой в присутствии H_2O_2 более вероятен, чем этот же процесс, катализируемый тирозиназой. Вследствие этого процесс окисления ускоряется, а значит и уменьшается время отклика электрода.

Для изготовления биосенсора аликвоту водного раствора, содержащего ферменты, наносили на стеклоглеродный электрод (диск диаметром 3 мм) и под давлением удаляли воду. Полученный адсорбированный ферментный слой полимеризовали в течение 30 минут

при потенциале электролиза 0,76 В (отн. НКЭ) в 0,1 М водном растворе LiClO₄. Измерение силы тока проводили в трёхэлектродной электрохимической ячейке при –0,2 В (отн. НКЭ), термостатированной при 25±0,1°С. Платиновая проволока и НКЭ служили измерительным электродом и электродом сравнения, соответственно. В измерительную ячейку помещали 10,0 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН 6,5), содержащего фенол и пероксид водорода. Было показано, что наибольшая чувствительность сенсора достигается при отношении массовых долей ферментов в электроде тирозиназа : пероксидаза 1 : 3 и содержании H₂O₂ 0,5 мМ.

Двухферментный электрод оставался стабильным в течение четырёх недель при хранении сухим при –18°С.

Предел обнаружения фенола данным методом составляет 2 нмоль/л ($s_r = 0,03$).

Новый электрокаталитический подход с использованием предварительного химического модифицирования фенолов и ферментативной реакции был использован для определения ряда хлорфенолов с использованием глюкозооксидазы [6].

Хлорфенолы окисляли до хлорбензохинонов сульфатом церия в водном растворе, содержащем 2–5 % 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина, который образует растворимые комплексы с водонерастворимыми соединениями. Окисление проводили в фосфатном буфере (рН 6,5).

Также окислить хлорфенолы можно с помощью пероксида водорода в присутствии хлорперооксидазы как катализатора. В этом случае реакцию проводили в 0,05 М тартратном буфере (рН 3,0), содержащем 2–5 % 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина.

Было показано, что бензохиноны (А) являются эффективными электрохимическими медиаторами переноса электронов в системе глюкозооксидаза – глюкоза, так как они регенирируют восстановленную глюкозооксидазу до её активного окисленного состояния, обеспечивая перенос электронов от фермента к электроду.

Принцип действия электрода можно изобразить следующей схемой 3 :

Схема 3

Глюкозооксидазу иммобилизовали на стеклоуглеродном электроде в присутствии глутарового альдегида. Измерение тока проводили в трёхэлектродной ячейке при потенциале 0,43 В (отн. Ag/AgCl) в 0,1 М фосфатном буферном растворе (pH 5,0).

Хранили электрод при 4°C в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0).

Разработанный биосенсор позволяет селективно определять 2,4,6-трихлорфенол в присутствии других хлорфенолов. Предел обнаружения этого соединения уникально низкий, равен 1,5 нМ. Для других моно-, би- и трихлорпроизводных фенола предел обнаружения составляет 10–20 мМ.

В описанных выше индикаторных системах [3–6] определяемые фенолы являлись субстратами ферментов. Как правило, определение соединений, являющихся эффекторами ферментов отличается большей чувствительностью по сравнению с чувствительностью определения субстратов.

В настоящее время известны работы по использованию пероксидаз различного происхождения для ферментативного определения фенолов-эффекторов этих биокатализаторов.

Пероксидаза – фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, содержит простетическую группу (гемин) и катализирует окисление ряда органических и неорганических восстановителей перекисными соединениями.

В работах [7,8] в качестве индикаторной была выбрана реакция окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода, катализируемая нативной пероксидазой. Скорость индикаторной реакции контролировали спектрофотометрически по нарастанию оптической плотности вследствие образования окрашенного продукта реакции окисления ($\lambda_{\max} = 460$ нм).

Известно, что пероксидазы, выделенные из различных источников – арахиса, корней хрена, клеток люцерны *Medicago Savita*, ксилотрофного гриба *Phellinius Igniarius*, несмотря на определённую гомологию строения, имеют различия в их аминокислотном составе, термостабильности, субстратной специфичности, каталитических свойствах. Однако, характер влияния фенолов на нативные пероксидазы различного происхождения аналогичен, а изученные фенолы [7,8] можно разделить на 2 группы : ингибиторы и вторые субстраты пероксидаз.

В присутствии ингибиторов наблюдается понижение скорости индикаторной реакции, прямо пропорциональное концентрации фенолов в реакции. К этой группе относятся фенол, резорцин, 2-нафтол, 2- и 4-бромфенолы, 2,6- и 3,4- диметилфенолы, пентабромфенол и 4-хлорфенол. В присутствии вторых субстратов пероксидаз на

кинетических кривых возникает индукционный период, продолжительность которого пропорциональна концентрации соответствующего фенола в реакции. Ко вторым субстратам относятся пирокатехин, гидрохинон, пирогаллол, 1-нафтол и 2- и 4-аминофенолы.

Было установлено [8], что характер влияния фенолов на скорость индикаторного процесса определяется, главным образом, их окислительно-восстановительными свойствами : фенолы, обладающие окислительно-восстановительным потенциалом меньшим, чем потенциал основного субстрата – *o*-дианизида, являются вторыми субстратами в данной индикаторной реакции. В течение индукционного периода происходит окисление фенолов, и лишь после его завершения начинаются окисление *o*-дианизида; при этом оптическая плотность раствора возрастает, так как скорость индикаторной реакции контролируют по продукту окисления основного субстрата. Наклон второго восходящего участка кинетической кривой в присутствии фенолов несколько ниже, чем в их отсутствие, что связано с частичным расходом пероксида водорода на окисление фенолов.

Фенолы, обладающие большим окислительно-восстановительным потенциалом, чем потенциал *o*-дианизида, оказывают ингибирующее действие на фермент и в их присутствии индукционный период отсутствует, понижается скорость индикаторной реакции.

Таким образом, при определении фенолов-ингибиторов и фенолов-вторых субстратов следует использовать разные аналитические сигналы – либо скорость индикаторной реакции (тангенс угла наклона кинетической кривой), либо продолжительность индукционного периода, соответственно.

Установлено, что для определения фенолов (резорцин, гидрохинон, пирогаллол) можно использовать все изученные пероксидазы. Из них наиболее чувствительными к действию фенолов являются пероксидазы арахиса и гриба. Чувствительность в определении фенолов в зависимости от источника пероксидазы уменьшается в ряду арахис- ксилотрофный гриб – хрен – люцерна. Результаты определения ряда фенолов приведены в табл. 2.

Метрологические характеристики методик определения фенолов с использованием пероксидазы арахиса (I) и хрена (II) (P=0,95, n=3).

Фенол	Линейный диапазон концентраций, мкМ	C _н , мкМ	S _г	
Ингибиторы				
I	Резорцин	1–10	1,1	0,19
	2–Нафтол	1–25	1,2	0,20
	2–Бромфенол	5–50	5	0,20
	2,6–Диметилфенол	3–25	3	0,20
	3,4–Диметилфенол	25–100	25	0,23
II	Резорцин	1–10	5,4	0,17
Вторые субстраты				
I	Пирокатехин	3–7,5	3	0,08
	Пирогаллол	0,5–2,5	0,5	0,15
	1–Нафтол	0,5–5	0,5	0,20
	2–Аминофенол	0,5–2,5	0,5	0,05
	4–Аминофенол	1–5	1	0,05
II	Гидрохинон	5–50	4,5	0,12
	Пирогаллол	1–10	0,61	0,30

Установлено, что индивидуальное определение резорцина и гидрохинона при их одновременном присутствии возможно при соотношениях их концентраций 2 : 1 – 6 : 1, а в случае одновременного присутствия 1– и 2– нафтолов – при соотношениях 1 : 1 – 1 : 10 [8].

Для создания тест–метода определения фенолов по их действию на каталитическую активность пероксидазы, изученному и описанному в работах [7,8], пероксидазу хрена иммобилизовали в природном полисахариде – хитозане на пенополиуретане (ППУ) [9].

В качестве индикаторной использовали реакцию пероксидного окисления *o*–дианизидина. Скорость индикаторной реакции контролировали визуально (при этом наблюдали переход окрасок (зелёный–бурый–красный) и характеризовали временем появления конечного продукта окисления. Было установлено, что фенол, резорцин замедляют ферментативное окисление *o*–дианизидина, то есть как и в случае реакции в растворе [7,8], являются ингибиторами фермента. В присутствии этих соединений увеличивается время появления конечного продукта окисления.

Как было сказано ранее, при введении пирокатехина, гидрохинона или пирогаллола в индикаторную реакцию на кинетических кривых окисления *o*-дианизидина, катализируемого нативным ферментом, наблюдается индукционный период и эти фенолы являются вторыми субстратами [7,8]. При проведении индикаторной реакции на ППУ в присутствии этих соединений зелёный продукт не образкуется. В этом случае при протекании реакции наблюдается переход розовый–бурый–красный. Время появления красной окраски увеличивается с повышением концентрации фенолов.

Кроме того, было показано, что *o*- и *n*-нитрофенолы, не влияющие на каталитическую активность нативной пероксидазы хрена, ингибируют фермент, иммобилизованный на ППУ.

На основании полученных данных были разработаны ферментативные тест–методы определения фенолов, позволяющие определять эти соединения в природных водах на уровне ПДК (Сн 1–25 мкМ).

Была изучена возможность индивидуального определения фенолов (изомеров, оказывающих разное действие на скорость индикаторного процесса) при совместном присутствии.

Для повышения селективности определения фенолов следует сочетать ферментативный метод с предварительным их разделением. В работе [10] был разработан селективный ферментативный тест–метод определения Hg (II) и ртутьорганических соединений в сочетании с их предварительным разделением методом ТСХ. Низкая чувствительность тест–метода объясняется тем, что для усиления ингибирующего действия Hg (II), а также для оказания действия ртутьорганических соединений на пероксидазу хрена необходимо введение в реакцию окисления *o*-дианизидина дополнительного серосодержащего ингибитора – тиомочевины и фенилтиомочевины, соответственно. Это приводит к дополнительному усложнению многокомпонентной ферментативной индикаторной системы. Поскольку фенолы изменяют кинетику пероксидазного окисления *o*-дианизидина при низких концентрациях, мы сочли целесообразным применить предложенный в работе [10] гибридный метод для разработки тест–метода определения фенолов.

Глава 2. Разделение фенолов методом тонкослойной хроматографии

К плоскостным видам хроматографии относят бумажную (БХ) и тонкослойную (ТСХ). Эти два вида жидкостной хроматографии просты по технике выполнения, экспрессны, не требуют дорогостоящего оборудования. Разделение этими методами может быть выполнено с использованием различных хроматографических систем, поэтому выделяют адсорбционную, распределительную, обращённо-фазовую и ионообменную БХ и ТСХ. Тонкослойную хроматографию используют чаще, чем бумажную [11].

Количественный анализ осуществляют непосредственно на хроматограмме (на слое сорбента или на бумаге) или анализируемое вещество (пятно) вымывают из слоя сорбента (с бумажной полоски) после вырезания зоны, и полученный раствор анализируют каким-либо методом.

Непосредственно на хроматограммах количественный анализ можно осуществлять по размеру пятна (полуколичественное определение), спектрофотометрическим методом по спектрам поглощения (фотоденситометрия) и по спектрам отражения, а также флуориметрическим, рентгенофлуоресцентным и радиометрическим методами.

Реализация хромато-фотометрического метода заключается в нанесении анализируемой пробы на тонкий слой сорбента, в последующем проведении хроматографического процесса, приводящего к концентрированию или разделению определяемых элементов, в обработке (опрыскивании) сорбционного слоя растворами органических реагентов, образующих с определяемыми элементами ярко окрашенные зоны на хроматограмме [11]. В отдельных случаях в качестве подвижной фазы при хроматографировании использовали непосредственно растворы реагента, дающего окрашенные соединения с определяемым элементом. В таких случаях реагент использовался как для разделения (благодаря различию в подвижности его окрашенных комплексных соединений с элементами), так и для определения зон элементов на хроматограмме без дополнительной обработки. Кроме того, возможно проведение капельной реакции на хроматографической пластинке с образованием окрашенных продуктов после разделения компонентов смеси.

В работе [12] описана методика синтеза высокоэффективных полиамидных сорбентов на основе отечественных промышленных полиамидов поликапролактама ПА-6 и полигексаметиленсебацинамина ПА-610 для разделения фенолов методом тонкослойной хроматографии.

Порошки сорбентов получали растворением промышленных полиамидов в концентрированной соляной кислоте и последующим осаждением из раствора смесью

этанол – вода (1 : 1). Для получения носителя для ТСХ суспензию полиамидного порошка в этаноле закрепляли на стеклянных пластинках (толщина слоя 0,3 мм) с использованием крахмального клейстера.

Изучена возможность хроматографического разделения смеси фенолов на полученных сорбентах. В качестве элюентов использовали воду и 50 %-ный раствор этанола. Результаты разделения (R_f) приведены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты хроматографического разделения смеси фенолов (R_f) на полиамидах.

Фенол	Элюент			
	Вода		Этанол (50 %)	
	ПА – 6	ПА – 610	ПА – 6	ПА – 610
Фенол	0,18	0,14	0,59	0,55
Пирокатехин	0,29	0,25	0,50	0,51
Резорцин	0,15	0,13	0,45	0,49
Пирогаллол	0,39	0,31	0,61	0,56

Близкие значения R_f не позволяют разделить все четыре изучаемых фенола на предложенных сорбентах. Эффективно можно разделить смесь двух или трёх соединений. В работе не приведены условия разделения фенолов (концентрации фенолов, растворитель для приготовления растворов соединений, размеры пластин) и способ детектирования.

Описан метод разделения хлорзамещённых фенолов методом ТСХ с использованием алюминиевых пластин RP* –18F_{254s} (Merck) [13]. Было изучено 12 систем подвижных фаз (толуол, толуол–метанол, толуол–вода, метанол–вода, ацетонитрил–вода и другие) в различных объёмных соотношениях.

Для разделения фенольных соединений был выбран элюент ацетонитрил–вода (70:30). Результаты разделения приведены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты хроматографического разделения фенолов на пластинах RP–18F_{254s}.

Фенол	R_f	Фенол	R_f
2–Хлорфенол	0,71	Пентахлорфенол	0,34

*RP–reverse phase–обратная фаза

3-Хлорфенол	0,70	2-Бутил-4-хлорфенол	0,41
4-Хлорфенол	0,70	2,3,5,6-Тетрахлорфенол	0,29
2,4-Хлорфенол	0,61	4-Хлор-2-метилфенол	0,57
2,4,6-Трихлорфенол	0,47	2,4,5-Трихлорфенол	0,39
4-Хлор-3-метилфенол	0,64		

Детектирование фенолов проводили сканированием в УФ области при 254 или 216 нм.

Данным методом определяли содержание пентахлорфенола в образцах кожи на уровне концентраций 4мг в 100 г образца.

В работе [14] описан метод выделения и количественного определения пентахлорфенола в жире. Пентахлорфенол извлекали из анализируемых образцов методом экстракции с использованием метилхлорида.

Хроматографическое разделение проводили на пластинке силикагеля (20x20 см), которая была предварительно обработана смесью метилхлорид-метанол (1 : 1) и высушена на воздухе. Авторы изучили более 40 подвижных фаз для хроматографирования. Смесью гексан-ацетон-метанол-ледяная уксусная кислота (35 : 10 : 5 : 0,1) была выбрана в качестве оптимальной ($R_f = 0,65$). Для визуального детектирования пентахлорфенола на пластинке использовали смесь 20 %-ный водный раствор $AgNO_3$ -ацетон-деионизованная вода-конц. раствор аммиака (8 : 20 : 20 : 12), в которую полностью погружали пластинку. На светлом рыжеватом-коричневом фоне фиксировали тёмную коричнево-серую зону.

Предел обнаружения пентахлорфенола данным методом составляет 50 нг; использование денситометра позволяет понизить предел обнаружения до 0,50 ppm.

Изомеры аминифенолов (2-,3- и 4-аминифенолы) можно разделить на стеклянной хроматографической пластинке RP-18W/UV₂₅₄, используя в качестве элюента смесь ацетон-вода (60 : 40) [15]. Детектирование проводили в УФ области при 254 нм.

Предложена методика разделения гидрохинона и *o*-метоксифенола на сорбенте POLIGRAM SilN-HR (R_f равны 0,34 и 0,63, соответственно). Подвижная фаза состояла из смеси толуол-диоксан-ледяная уксусная кислота (90 : 25 : 4) [15]. Фронт растворителя равен 10 см (за 20 минут). Детектирование проводили раствором *o*-толидина.

Описаны методы тонкослойного хроматографического разделения фенолов с использованием наносиликагеля, модифицированного NH_2 -группами с последующим

УФ–детектированием при 254 нм. Используя в качестве элюента смесь хлороформ–метанол (9:5) можно разделить *n*-крезол, 2,3–диметилфенол, 2,4,6–триметилфенол; а используя смесь ацетон–хлороформ (50 : 50) – резорцин, гидрохинон, 1–нафтол и *m*-крезол. Аликвоты фенолов в обоих случаях составляют 200 нл [15].

С использованием наносиликагеля, модифицированного CN–группами, и УФ–детектированием при 256 нм разделяли гидрохинон, пирокатехин и 2–нафтол. Подвижной фазой служила смесь толуол–этилацетат (80 : 20) [15].

В работе [16] описан способ разделения хлор– и бромзамещённых фенолов методом ТСХ на силикагеле, нанесённом на стеклянную подложку, Sil C 18–50. В качестве элюентов использовали две системы: 1 М раствор аммиака в 40 % метаноле и 1 М раствор аммиака + 0,1 М раствор NH_4Cl в 40 % метаноле. Детектирование проводили последовательно помещая хроматографические пластинки в пары NO_2 и NH_3 .

В работе [17] описан метод тонкослойного хроматографического разделения ряда фенолов и фенольных соединений на силикагеле. Силикагель G наносили на стеклянную пластинку (200×200 мм) слоем толщиной 0,2 мм, высушивали на воздухе и активировали при температуре 110°C в течение 1 часа.

Растворы фенолов концентрацией 4 мг/мл готовили растворением точных навесок в метаноле. На пластинку силикагеля наносили алиquotы фенолов, равные 10 мкл.

В качестве подвижной фазы были изучены 6 смесей:

- (I) хлороформ–метанол–уксусная кислота (90 : 10 : 1)
- (II) петролейный эфир (60–80°C)– этилацетат–муравьиная кислота (40 : 60 : 1)
- (III) бензол–диоксан–уксусная кислота (85 : 15 : 1)
- (IV) хлороформ–этилацетат–уксусная кислота (50 : 50 : 1)
- (V) толуол–ацетонитрил–муравьиная кислота (70 : 30 : 1)
- (VI) петролейный эфир(60–80°C)–метанол–уксусная кислота (90 : 10 : 1)

Разделение проводили при комнатной температуре (около 20°C), сушили и детектировали фенолы четырьмя различными способами:

1) Пластинку помещали в пары йода на 10 минут, после чего проявлялись жёлтые пятна. Пределы определения составили 10 мкг для пирокатехина и 2 мкг для всех остальных фенолов.

2) Хроматограмму опрыскивали раствором FeCl_3 в метаноле (1 г безводного FeCl_3 на 100 мл метанола). Пятна большинства веществ проявлялись сразу, а пятна резорцина и

гидрохинона проявлялись после нагревания пластинки при 110°C в течение 10 минут. Предел обнаружения всех веществ составил 2 мкг.

3) Хроматограмму опрыскивали смесью хлорид железа (III)–феррицианид, приготовленной растворением 1 г безводного FeCl_3 , 1 г феррицианида калия $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и нескольких кристаллов перманганата калия KMnO_4 в 100 мл воды. Все вещества давали синие пятна непосредственно после опрыскивания пластинки раствором FeCl_3 – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Предел детектирования всех веществ равен 2 мкг.

4) Хроматограмму опрыскивали смесью ванилин–серная кислота (0,5 г ванилина в 100 мл H_2SO_4 –этанол (40 : 10)) и нагревали при 120°C 20 минут. Пределы детектирования составили 40 мкг для резорцина и 2 мкг – для всех остальных соединений.

Результаты тонкослойного разделения фенольных соединений в различных растворителях приведены в табл. 5.

Таблица 5

Величина R_f для фенольных соединений [17].

Фенолы	Подвижная фаза					
	I	II	III	IV	V	VI
Пирогаллол	0,20	0,61	0,22	0,51	0,51	0,31
Пирокатехин	0,42	0,70	0,48	0,65	0,67	0,55
Резорцин	0,27	0,66	0,36	0,62	0,60	0,42
Гидрохинон	0,26	0,64	0,33	0,62	0,59	0,42

Показано, что пирогаллол и резорцин в смеси с галловой кислотой можно разделять, используя системы II, III, IV, V.

Система IV является наиболее подходящей для разделения двух изомеров : катехина и эпикатехина. Резорцин и гидрохинон имеют практически одинаковую подвижность во всех системах за исключением системы III, которая наиболее подходит для разделения этих веществ.

Установлено, что система FeCl_3 –феррицианид не очень удобна для детектирования фенольных соединений, так как фон пластинки приобретает темно–зелёный цвет и пятна теряют контраст.

Раствор FeCl_3 окрашивает пластинку светло–жёлтый цвет, а пятна приобретают фиолетовый, сине–зелёный, жёлтый или оранжевый цвета в зависимости от фенола, что вполне удобно для визуального детектирования.

Наиболее подходящим реагентом для детектирования пятен при разделении

пирогаллола, резорцина, флороглюцина, катехина и эпикатехина является система ванилин–серная кислота.

Описанные в работе [17] системы для тонкослойного разделения фенолов предоставляют широкий выбор способа разделения и детектирования большого числа фенолов, описанные системы детектирования пятен являются экспрессными и удобными.

Экспериментальная часть

Глава 3. Исходные вещества, посуда, аппаратура, обработка результатов измерений, методика эксперимента

Чувствительность ферментативных методов, как и других каталитических методов анализа, ограничивается тем, что почти всегда наряду с каталитической протекает некаталитическая реакция, создающая фон. Колебания фона вызываются наличием в реактивах и воде примесей, влияющих на скорость некаталитической реакции, изменениями температуры и т.д. Чувствительность можно значительно повысить с одной стороны, за счёт использования процессов с максимально различающимися константами скоростей каталитической и некаталитической реакций, а с другой – за счёт стабилизации “фона”. Колебания “фона” можно свести до минимума, применяя реактивы, воду и посуду высокой чистоты, а также строго стандартизируя условия проведения эксперимента.

При работе с ферментами и малыми количествами веществ, для оценки достоверности результатов, полученные данные необходимо обрабатывать с применением методов математической статистики. Это позволяет объективно оценить диапазон определяемых содержаний веществ, правильность и воспроизводимость метода.

3.1. Исходные вещества

В работе использовали твёрдый препарат пероксидазы из корней хрена (К.Ф. 1.11.1.7) (“Sigma”, США), $R_z=2,2$, активность по *o*-дианизидину – 75 уд. ед. на 1 мг фермента. Растворы с содержанием пероксидазы $n \times 10^{-5}$ М готовили растворением навесок твёрдого препарата в боратном буферном растворе (рН 7,0), содержащем 20 об.% 0,1 М раствора нитрата натрия для поддержания постоянной ионной силы и повышения устойчивости фермента. Точную концентрацию раствора фермента устанавливали спектрофотометрически ($\epsilon_{403}=9,4 \times 10^4$ моль⁻¹см²[18]).

Растворы с меньшим содержанием пероксидазы готовили ежедневно непосредственно перед работой разбавлением исходного раствора боратным буферным раствором (рН 7,0). Твёрдые препараты и растворы фермента хранили в холодильнике при 4°C.

Боратный буферный раствор (рН 7,0) готовили смешением 0,05 М раствора тетрабората натрия (х.ч.), дважды перекристаллизованного из воды, и 0,2 М раствора

борной кислоты (ос.ч.) в объёмном соотношении 1:19.

Фталатный буферный раствор (рН 5,0) готовили смешением 0,1 М раствора бифталата калия (х.ч.), дважды перекристаллизованного из воды, и 0,1 М раствора гидроксида калия (ос.ч.) в объёмном соотношении 5:2.

0,1 М раствор нитрата натрия готовили растворением точной навески препарата (ос.ч.) в воде.

В работе применяли 8,6 М раствор пероксида водорода (“Merck”, Германия). Точную концентрацию раствора устанавливали перманганатометрически. Растворы с меньшим содержанием пероксида водорода готовили ежедневно разбавлением водой исходного раствора.

В работе использовали твёрдые препараты *o*-дианизидина (ОД) (х.ч.), дважды перекристаллизованного из этанола-ректификата, и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) (“Sigma”, США). Растворы ОД и ТМБ готовили растворением их точных навесок в этаноле-ректификате.

В работе использовали твёрдые препараты пирокатехина, резорцина, гидрохинона, пирогаллола, 1–и 2–нафтолов (х.ч.) (“РЕАХИМ”, Россия), очищенные перекристаллизацией из этанола–ректификата или возгонкой. Растворы с содержанием фенолов $n \times 10^{-2}$ М готовили растворением навесок твёрдых препаратов в метаноле (этаноле–ректификате), а растворы с меньшим содержанием готовили разбавлением исходного раствора метанолом (водой). Растворы фенолов готовили ежедневно.

В работе использовали муравьиную кислоту, уксусную кислоту, метанол, этанол–ректификат, хлороформ, этилацетат, толуол (ос.ч., “Раахим”, Россия). Для проявления на хроматограмме использовали спиртовой раствор йода.

Для приготовления всех водных растворов и перекристаллизации реагентов использовали деионизованную воду, очищенную на установке “Milipore” (Франция).

В качестве сорбентов использовали силикагели, закреплённые на алюминиевых или полимерных подложках (“Полисорб”, Россия). Характеристики пластин силикагелей приведены в табл. 6.

Характеристики пластин силикагелей.

№ пластины	Марка силикагеля	Материал подложки	Зернение, мкм	Толщина слоя, мкм
1	СТХ-1ВЭ	Алюминий	8–12	160
2	СТХ-1А	Алюминий	8–12	110
3	СТХ-1ВЭ	Полиэтилентерефталат	8–12	110

3.2. Посуда, аппаратура

При определении ультрамалых количеств веществ большое внимание следует уделять материалу и чистоте используемой посуды.

В работе использовали стеклянные пробирки и мерные колбы с притёртыми пробками, которые предварительно очищали концентрированной перегнанной азотной кислотой, обрабатывали паром в течение 10–15 минут и тщательно промывали дистиллированной и деионизованной водой.

Точную концентрацию раствора пероксидазы хрена определяли на спектрофотометре “Shimadzu” UV-2201 (Япония) ($l=1$ см, $\lambda=403$ нм).

pH буферных растворов измеряли на pH-милливольтметре “Эксперт-001” (“Эконикс-эксперт”, Россия).

Для отбора определённых объёмов реагентов применяли микродозаторы “BIONIT” (Финляндия).

3.3. Обработка результатов измерений

Результаты измерений обрабатывали с применением методов математической статистики, применяя следующие обозначения:

\bar{x} – средняя для ряда из n значений,

V – дисперсия,

s – стандартное отклонение,

s_r – относительное стандартное отклонение,

3.4. Методика эксперимента

Методика 1: проведение индикаторной реакции на силикагеле

Поскольку в процессе пероксидазного окисления ОД и ТМБ образуются окрашенные продукты, скорость реакции контролировали визуально.

На силикагель в одну и ту же точку микродозатором последовательно наносили необходимые объёмы фталатного буферного раствора (рН 5,0), 0,5 мкМ раствора пероксидазы хрена, 5 мМ раствора субстрата (ОД или ТМБ) и 10 мМ раствора пероксида водорода. В момент введения в индикаторную систему последнего компонента включали секундомер и фиксировали время появления окраски конечного продукта окисления.

Методика 2: проведение индикаторной реакции на силикагеле в присутствии фенолов

Для изучения влияния фенолов на реакции окисления ОД и ТМБ, катализируемых пероксидазой, на пластину силикагеля наносили 2–3 мкл раствора фенола и сушили на воздухе в течение 30 с для удаления растворителя. Далее в эту же точку последовательно наносили все растворы и фиксировали скорость реакции, как указано в методике 1.

Методика 3: разделение смеси фенолов методом ТСХ на силикагелях и проявление спиртовым раствором йода.

Для разделения смеси фенолов на силикагеле использовали три системы элюентов [17]:

- (I) хлороформ–метанол–уксусная кислота (90:10:1);
- (II) хлороформ–этилацетат–уксусная кислота (50:50:1);
- (III) толуол–ацетонитрил–муравьиная кислота (70:30:1).

Объём подвижной фазы составил 6 мл. Смесь растворителей готовили в хроматографическом стакане непосредственно перед разделением.

Для хроматографирования использовали пластины силикагеля размером 3,7см×10см. На пластинке проводили две линии: линию старта на расстоянии 1 см от края и линию фронта растворителя на расстоянии 0,5 см от противоположного края. Проведение линии фронта растворителя до хроматографирования связано с затруднением фиксации фронта растворителя после хроматографирования, обусловленным высокой летучестью компонентов подвижной фазы.

Разделяемые растворы фенолов наносили на линию старта, высушивали и погружали пластину в стакан с подвижной фазой, закрывали притёртой крышкой. Хроматографирование проводили до достижения растворителем отмеченной линии фронта.

Пластину высушивали на воздухе для испарения растворителей.

Для проявления зон фенолов пластину 15–20 минут выдерживали в эксикаторе со спиртовым раствором йода.

Методика 4: разделение смеси фенолов методом ТСХ на силикагелях с последующим ферментативным проявлением.

Разделение фенолов проводили согласно методике 3, используя в качестве подвижной фазы систему I. Для ферментативного детектирования фенолов в определённые точки на поверхности пластинки, рассчитанные по ранее установленным для них R_f , микродозатором последовательно наносили 2 мкл раствора фталатного буферного раствора (рН 5,0), 2 мкл 0,5 мкМ раствора пероксидазы хрена, 2 мкл 5 мМ раствора ОД и 2 мкл 10 мМ раствора пероксида водорода. В момент введения в индикаторную систему последнего включали секундомер, визуально контролировали изменение окраски на поверхности силикагеля и фиксировали время появления окраски конечного продукта реакции.

Контрольный опыт проводили на “свободном” месте этой же пластинки, таким образом учитывая влияние растворителя подвижной фазы на скорость индикаторной реакции.

Глава 4. Ферментативный метод определения фенолов с их предварительным разделением методом ТСХ

4.1. Выбор индикаторной системы

Как было сказано в обзоре литературы, ранее был разработан тест–метод селективного ферментативного определения Hg(II), метил–, этил–, фенилртути в сочетании с их предварительным разделением методом ТСХ на силикагеле “Silufol” [10]. В качестве индикаторной использовали реакцию окисления ОД пероксидом водорода, катализируемую пероксидазой хрена. Кроме того, эту же индикаторную реакцию, а также реакцию окисления ТМБ, катализируемую пероксидазой хрена, иммобилизованной на силикагелях фирмы “Полисорб” (Краснодар), использовали в тест–методе определения микроколичеств Hg(II).

В литературе [17] описан метод разделения ряда фенолов и фенольных соединений (в том числе, для которых были разработаны тест–методы определения с использованием пероксидазы хрена, иммобилизованной на ППУ [9]) на силикагеле G.

Таким образом, на основании литературных данных для разработки гибридного метода определения фенолов в качестве индикаторной реакции нами были выбраны реакции пероксидазного окисления ОД и ТМБ, а в качестве неподвижной фазы–силикагели фирмы “Полисорб”. Также следует отметить, что кинетика и механизм выбранных реакций хорошо изучены и описаны в литературе.

Согласно данным работы [19], при значениях pH, близких к нейтральным, окисление ОД, катализируемое нативной пероксидазой хрена, протекает по схеме 4. Окисление ОД протекает через образование соединения зелёного цвета (схема 4, соединение I), которому была приписана мерихиноидная структура ($\lambda_{\max}=386$ и 704 нм). Стабильным продуктом окисления ОД является бис(3,3'-диметокси-4,4'-амино)азобифенил хинондиимина, образующийся при конденсации двух молекул хинондиимина и окрашенный в буро-коричневый цвет ($\lambda_{\max}=453-475$ нм).

При изучении химизма окисления ТМБ, катализируемого нативной пероксидазой хрена, было установлено, что продуктом одноэлектронного окисления является катион-радикал (схема 5), который находится в равновесии с мерихиноидным комплексом, окрашенным в голубой цвет ($\lambda_{\max}=375$ и 655 нм) [20]. Конечным продуктом окисления ТМБ является хинондиимин, окрашенный в жёлтый цвет с максимумом поглощения при 465 нм.

При изучении процессов окисления ОД и ТМБ, катализируемых пероксидазой, иммобилизованной на силикагеле, визуально наблюдали переходы окрасок зелёная–бурая–красная и голубая–зелёная–жёлтая, соответственно [9].

Следует отметить, что переходы окрасок в реакциях окисления ОД и ТМБ, катализируемых пероксидазой хрена, иммобилизованной на силикагеле, практически совпадают с изменениями окраски в тех же реакциях, катализируемых гативной пероксидазой.

Таким образом, в качестве индикаторных систем были выбраны реакции пероксидазного окисления ОД и ТМБ, проводимые на силикагелях.

4.2. Проведение реакции пероксидазного окисления ОД и ТМБ на силикагелях

В работе [9] были изучены и выбраны оптимальные условия окисления ОД и ТМБ, катализируемого пероксидазой хрена, иммобилизованной на силикагелях : фталатный буферный раствор (pH 5,0), концентрации ОД и ТМД – 5 мМ, пероксида водорода – 10 мМ.

Реакцию ферментативного окисления ОД проводили по методике 1 (разд. 3.4.) на силикагелях № 1–3.

На носителе № 1 провели четыре серии экспериментов для изучения влияния концентраций реагентов в реакционной системе на скорость индикаторной реакции, изменяя объёмы реагирующих веществ (объём фталатного буферного раствора (рН 5,0) во всех экспериментах был одинаковым, и равным 2 мкл).

Условия и результаты эксперимента приведены в табл. 7.

Таблица 7

**Проведение индикаторной реакции окисления ОД на силикагеле № 1
($P=0,95, n=5$).**

Эксперимент	Объём пероксидазы хрена, мклО	Объём субстрата, мкл	Объём пероксида водорода, мкл	Время перехода окраски, с	Цвета переходов
а	2	2	2	17,4±4,3	Зелёный– бурый– красный
б	3	2	2	17,6±1,7	
в	2	3	2	20,4±2,1	
г	2	2	3	12,4±2,6	

В процессе окисления ОД наблюдали переход окраски зелёный–бурый–красный и фиксировали время появления красного конечного продукта окисления ОД.

При увеличении объёма фермента скорость реакции не изменялась, а при введении 3 мкл ОД скорость значительно уменьшалась. При увеличении объёма пероксида водорода время появления красной окраски заметно уменьшилось, переход окрасок стал более чётким и удобным для визуальной детекции. Далее на силикагелях № 2 и № 3 индикаторные реакции проводили по методикам а и г (табл. 7).

При работе на носителях №2 и № 3 также наблюдали переход окрасок зелёный–бурый–красный, при этом на носителе № 2 он был более контрастный, а на носителе № 3 крайне нечёткий и неудобный для визуальной детекции из-за размывания пятен и сильного изменения цвета полимерной подложки при смачивании. Кроме того, ухудшалась воспроизводимость результатов измерений скорости реакции на носителе № 3 (табл. 8).

Таблица 8

**Проведение индикаторной реакции окисления ОД на силикагелях № 2,3
($P=0,95, n=5$).**

№ силикагеля	Условия	Время перехода, с	s_r	Цвета перехода
2	а	7,7±0,8	0,10	Зелёный– бурый– красный
	г	8,0±1,1	0,14	
3	а	9,5±2,9	0,31	
	г	7,2±1,7	0,24	

Силикагель № 3 в дальнейшем эксперименте решено было не использовать из-за неудобства визуального контроля скорости реакции пероксидазного окисления ОД и плохой воспроизводимости результатов измерений.

Реакцию пероксидазного окисления ТМБ проводили по методике 1 (разд. 3.4.), добавляя аликвоты компонентов согласно методам а и г (табл. 7).

При ферментативном окислении ТМБ наблюдали переход окрасок голубой–жёлтый–оранжевый и фиксировали время появления жёлтого продукта, так как этот переход резкий и более удобный для визуального контроля (в отличие от плавного перехода из жёлтого в оранжевый). При увеличении содержания пероксида водорода в индикаторной системе скорость реакции увеличивается, но воспроизводимость результатов измерений резко падает (табл. 9).

Таблица 9

**Проведение индикаторной реакции окисления ТМБ на силикагелях № 1, 2
(P=0,95, n=5).**

№ силикагеля	Условия	Время перехода, с	s_r	Цвета перехода
1	а	12,4±0,2	0,02	Голубой– жёлтый– оранжевый
	г	9,1±2,5	0,27	
2	а	6,6±0,6	0,09	
	г	5,5±0,8	0,15	

Таким образом, для дальнейших исследований была выбрана методика а проведения индикаторных реакций окисления ОД и ТМБ, катализируемых пероксидазой хрена (табл. 7).

**4.3. Изучение влияния 1– и 2–нафтолов на каталитическую
активность пероксидазы хрена на силикагеле**

Влияние нафтолов на кинетику индикаторной реакций ферментативного окисления ОД и ТМБ изучали на силикагеле № 2, так как скорость реакций на этом носителе выше и переходы окрасок более чёткие и контрастные. Индикаторные реакции в присутствии 0,1 мМ нафтолов проводили по методике 2 (разд. 3.4.). Объёмы всех реагентов составили 2 мкл.

Переходы цветов при введении 2–нафтола не изменились. В реакции окисления ОД наблюдался переход зелёный–бурый–красный; в реакции окисления ТМБ – голубой–жёлтый–оранжевый. При введении в систему 1–нафтола изменялись переходы окрасок в обеих реакциях: в случае ОД – зелёный–жёлтый–красный, в случае с ТМБ – голубой–

жёлто-зелёный–красный. Это может быть связано с взаимодействием 1–нафтола с промежуточными или конечными продуктами реакции.

Несмотря на различный характер влияния 1– и 2–нафтолов на нативную пероксидазу (1–нафтол является вторым субстратом, а 2–нафтол – ингибитором), при проведении реакций окисления ОД и ТМБ на силикагеле оба соединения замедляют скорость индикаторного процесса, то есть действуют как ингибиторы. Можно предположить, что функциональные группы носителя вмешиваются в ферментативный процесс и изменяют характер влияния фенолов на пероксидазу. Из табл. 10, 11 видно, что 2–нафтол проявляет большее ингибирующее действие в реакциях окисления ОД и ТМБ, чем 1–нафтол.

При введении в индикаторную систему нафтолов воспроизводимость результатов измерений ухудшается (особенно в реакции окисления ТМБ). Поэтому в дальнейшем при изучении влияния фенолов в качестве индикаторной использовали реакцию окисления ОД в присутствии пероксидазы хрена.

Таблица 10

**Влияние 1–нафтола на скорость индикаторных реакций
на силикагеле № 2 (P=0,95, n=3).**

Субстрат	Снафтола, мМ	Время перехода, с	s_r	Степень ингибирования I*, %	Переходы окрасок
ОД	0	10,3±0,4	0,04	—	Зелёный–бурый–красный
	0,1	15,8±2,2	0,14	35	Зелёный–жёлтый–красный
ТМБ	0	12,4±1,4	0,11	—	Голубой–жёлтый–оранжевый
	0,1	15,9±3,1	0,19	22	Голубой–жёлто-зелёный–красный

* $I=(1-t_{кр}/t_{эфф})?100\%$, где $t_{кр}$ и $t_{эфф}$ – время появления конечного продукта окисления в отсутствие и в присутствии эффектора, соответственно.

Таблица 11

**Влияние 2–нафтола на скорость индикаторных реакций
на силикагеле № 2 (P=0,95, n=3).**

Субстрат	Снафтола, мМ	Время перехода, с	s_r	Степень ингибирования I, %	Переходы окрасок
ОД	0	6,3±0,6	0,10	—	Зелёный–бурый–красный
	0,1	12,5±0,4	0,04	50	Зелёный–бурый–красный
ТМБ	0	8,2±0,9	0,11	—	голубой–жёлтый–оранжевый
	0,1	12,0±2,4	0,20	32	голубой–жёлтый–оранжевый

4.4. Изучение влияния фенолов на каталитическую активность пероксидазы хрена на силикагеле.

Согласно работе [17] для хроматографического разделения фенолов использовали силикагель G с толщиной слоя 200 мкм. Поэтому влияние фенолов (резорцин, пирокатехин, гидрохинон, пирогаллол) на скорость пероксидазного окисления ОД изучали на силикагеле № 1, так как толщина слоя сорбента больше, чем у силикагеля № 2 (160 и 110 мкм, соответственно, табл. 6).

При изучении влияния фенолов в интервале концентраций 0,5–36 мМ.на

каталитическую активность пероксидазы хрена, индикаторные реакции проводили по методике 2 (разд. 3.4.); объёмы компонентов индикаторной системы составили 2 мкл, а фенолов – 3 мкл согласно методике хроматографического разделения, описанной в работе [17].

При концентрации фенолов 0,5–5 мМ переходы окрасок продуктов окисления ОД не меняются, при этом, чем ниже концентрация фенола, тем переходы становятся более чёткими. При концентрации резорцина 36мМ наблюдается переход окраски зелёный–бурый. Можно предположить, что реакция не доходит до конца и конечный красный продукт окисления ОД не образуется. При такой же концентрации пирокатехина изменяется окраска промежуточного соединения и наблюдается переход зелёный–фиолетовый–красный. В реакции окисления ОД в присутствии 36мМ раствора пирогаллола несколько меняется оттенок конечного продукта окисления и наблюдается переход окрасок зелёный–бурый–бледно-розовый. Скорость индикаторной реакции в присутствии 0,5–5мМ фенолов контролировали по времени появления красного продукта окисления. В присутствии больших концентраций в случае резорцина фиксировали время перехода зелёный–бурый, пирокатехина – фиолетовый–красный, в случае пирогаллола – бурый–бледно-розовый, гидрохинона – бурый–красный. Результаты эксперимента приведены в табл. 12.

Таблица 12

Влияние фенолов на каталитическую активность пероксидазы хрена на силикагеле № 1 (P=0,95, n=5).

С фенола, мМ	0,5		1		5		36	
Фенол	t, с	s _r						
В отсутствие фенолов	6,3±0,4							
Резорцин	9,1±0,5	0,05	11,3±0,3	0,03	11,5±1,0	0,09	10,5±0,2	0,02
Пирокатехин	8,5±0,9	0,11	14,9±0,6	0,04	11,6±0,4	0,04	9,6±0,1	0,02
Гидрохинон	10,9±0,5	0,05	10,9±1,9	0,17	10,9±0,3	0,09	12,5±1,0	0,08
Пирогаллол	12,3±0,5	0,04	12,7±0,7	0,06	12,7±0,6	0,05	14,6±1,4	0,10

При увеличении концентрации пирогаллола скорость реакции незначительно уменьшается. Падение скорости индикаторной реакции при введении гидрохинона наблюдается только при его высокой концентрации (36 мМ). Увеличение скорости реакции в присутствии 36 мМ раствора резорцина можно объяснить тем, что мы фиксировали не время появления конечного продукта (как при более низких концентрациях), а время появления промежуточного продукта окисления ОД. Отсутствие зависимости скорости реакции от концентрации пирокатехина может быть связано с его взаимодействием с

промежуточным или конечным продуктом окисления ОД с образованием “нового” фиолетового соединения.

Как и в случае нафтолов, все изученные фенолы замедляют скорость реакции, то есть ведут себя как ингибиторы. Напомним, что резорцин также ингибирует нативную пероксидазу хрена, а пирокатехин, гидрохинон и пирогаллол являются её вторыми субстратами в реакции окисления ОД.

Однозначно сделать вывод о том, какой из изученных фенолов является наиболее сильным ингибитором пероксидазы хрена нельзя, поскольку степень их ингибирования не зависит линейно от концентраций фенолов (табл. 13).

Таблица 13

Степень ингибирования пероксидазы хрена фенолами в реакции окисления ОД на силикагеле № 1.

Сфенола, мМ	0,5	1	5	36
Фенол				
Резорцин	31	44	45	40
Пирокатехин	26	58	46	34
Гидрохинон	42	42	42	50
Пирогаллол	49	50	50	57

При этом можно отметить, что наибольшее ингибирующее действие на фермент оказывает пирогаллол.

Таким образом, при введении фенолов в реакцию окисления ОД, катализируемую пероксидазой хрена, на силикагеле скорость реакции уменьшается. Значит данную индикаторную систему можно использовать для определения фенолов по их ингибирующему действию на пероксидазу хрена.

4.5. Разделение фенолов методом ТСХ с последующим проявлением йодом

На основании литературных данных [17] было проведено разделение смесей изученных фенолов на пластинах силикагеля № 1 с использованием трёх систем элюентов:

- (I) хлороформ–метанол–уксусная кислота (90:10:1);
- (II) хлороформ–этилацетат–уксусная кислота (50:50:1);
- (III) толуол–ацетонитрил–муравьиная кислота (70:30:1).

Для расчёта R_f хроматограммы проявляли в парах спиртового раствора йода.

Были разделены фенолы с различной концентрацией: 0,1 мМ, 5 мМ, 36 мМ.

На хроматограмму на линию старта наносили в отдельные точки по 3 мкл растворов фенолов и в четвёртую точку их смесь в эквимольных соотношениях. Таким образом, для каждого соединения получали два значения R_f – индивидуальное и при разделении смеси.

Для выбора системы элюента провели хроматографическое разделение фенолов ($C=36\text{мМ}$). Работу проводили по методике 3 (разд. 3.4.). Результаты разделения в сравнении с литературными данными [17] приведены в табл. 14.

Таблица 14

Результаты разделения фенолов ($C=36\text{мМ}$) на силикагеле № 1 ($P=0,95$, $n=3$).

Фенол	Элюент						
	I		II		III		
	Литер. данные	Эксперим. данные		Литер. данные	Эксперим. данные	Литер. данные	Эксперим. данные
		36 мМ	5 мМ				
Пирогаллол	0,20	0,39±0,01	0,53±0,05	0,51	0,54±0,02	0,51	0,44±0,01
Резорцин	0,27	0,56±0,02	0,53±0,02	0,62	0,68±0,01	0,60	0,55±0,01
Пирокатехин	0,42	0,73±0,01	0,67±0,05	0,65	0,72±0,02	0,67	0,60±0,01

Отличие значений экспериментально рассчитанных R_f от литературных данных можно объяснить различием используемых силикагелей и толщины слоя сорбента.

R_f гидрохинона при разделении элюентом (I) равен $0,51±0,03$.

Показано, что наибольшая эффективность разделения фенолов достигается при использовании элюента хлороформ–метанол–уксусная кислота (90:10:1).

Хроматограммы, полученные при разделении фенолов при их концентрации 0,1 мМ парами спиртового йода не проявлялись, так как предел обнаружения данным способом составляет 2 мкг [17], а наносимое количество фенола составляло 0,04 мкг, то есть мы не могли рассчитать значнее R_f .

Таким образом, показана возможность тонкослойного разделения фенолов на силикагеле № 1 и рассчитаны значения R_f при использовании различных подвижных фаз. Для ферментативного определения фенолов была выбрана смесь элюента (I) и концентрация фенолов 5 мМ, поскольку при большей концентрации фенолов изменяются цвета переходов.

4.6. Разделение фенолов методом ТСХ с последующим ферментативным проявлением

Для ферментативного определения фенолов (резорцин, пирогаллол, пирокатехин) пластинку после хроматографического разделения сушили для испарения растворителя. Работу проводили согласно методике 4 (разд. 3.4.). Растворы фталатного буфера, пероксидазы хрена, ОД и пероксида водорода наносили в одну точку, рассчитанную по экспериментально определённым R_f при этих условиях ($C_{\text{фенолов}}=5\text{мМ}$, элюент I). Для расчета степени ингибирования фенолов на “свободном” месте хроматографической пластинки проводили контрольный опыт, учитывая таким образом влияние растворителей на скорость окисления ОД. Время контрольного опыта составило $5,2 \pm 0,6$ с ($s_r=0,12$).

Также на “свободном” месте этой же пластинки проводили реакцию окисления ОД при индивидуальном присутствии резорцина, пирогаллола и пирокатехина. Для контроля скорости реакции в отсутствие и в присутствии фенолов фиксировали время появления ярко-красного продукта окисления при переходе зелёный–коричневый–красный. Отметим, что все наблюдаемые переходы окраски были очень чёткими и контрастными. Результаты определения фенолов приведены в табл. 15.

**Ферментативное определение фенолов после их хроматографического
разделения на силикагеле.**

Фенол	Определение фенолов после ТСХ		Проведение реакции на носителе после ТСХ в присутствии фенолов	
	Время перехода, с	Степень ингибирования, %	Время перехода, с	Степень ингибирования, %
В отсутствие фенола	5,2±0,6			
Резорцин	9,4±1,0	39	8,0±0,5	35
Пирогаллол	11,8±2,0	52	8,2±0,6	37
Пирокатехин	8,7±1,8	34	10,4±0,8	50

Как видно из табл. 15 степень ингибирования фенолами при проведении реакции в точках, соответствующих зонам разделяемых фенолов и на “свободных” местах сильно различаются для пирогаллола и пирокатехина. Это свидетельствует о необходимости дальнейшей оптимизации условий разделения (изменение состава подвижной фазы, методики нанесения и аликвот смесей) и проведения индикаторной реакции (варьирование рН, концентраций компонентов реакции). Такое детальное исследование необходимо для разработки чувствительного количественного тест–метода определения фенолов после их хроматографического разделения.

Таким образом, детектирование фенолов после их тонкослойного разделения на силикагеле можно проводить, используя реакцию окисления ОД, катализируемую пероксидазой хрена.

Выводы

1. Собрана и изучена литература по ферментативным методам определения фенолов и методам их тонкослойного хроматографического разделения.
2. Для проведения реакции окисления *o*-дианизида и тетраметилбензида, катализируемых нативной пероксидазой хрена, на силикагеле выбраны сорбенты на алюминиевой подложке СТХ-1ВЭ и СТХ-1А фирмы "Полисорб" (Краснодар).
3. Установлено, что пирокатехин, резорцин, гидрохинон, пирогаллол и 1-,2-нафтолы ингибируют каталитическую активность пероксидазы хрена в реакции окисления *o*-дианизида и тетраметилбензида на выбранных силикагелях.
4. Проведено разделение фенолов методом тонкослойной хроматографии на силикагеле СТХ-1ВЭ с использованием трёх подвижных фаз.
5. Показана возможность ферментативного определения фенолов после их разделения методом тонкослойной хроматографии на силикагеле СТХ-1ВЭ с использованием пероксидазы хрена.

Список литературы

1. Коренманн Я. И. Ароматические соединения – экоаналитические проблемы.// Соросовский Образовательный Журнал. 1999. №12. С.35–39.
2. Беспмятников Г. П., Кротов Ю. А. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. 1985. Л.:Химия. 528 с.
3. Deng Q., Guo Y., Dong S., // Anal. Chim. Acta.1996. V.319. №1. P. 71-77.
4. Liu Z, Deng G., Li D. //Anal. Chim. Acta. 2000. V. 407 №1. P. 87-96.
5. Cosnier S., Popescu I. C. //Anal. Chim. Acta. 1996. V. 319. № 1. P. 145-151.
6. Zhao S., Luong J. // Anal. Chim. Acta. 1996. V. 327. P. 235-242.
7. Шеховцова Т. Н., Лялюлин А.А., Кондратьева Е. И., Газарян И. Г., Долманова И.Ф., // Журн. аналит. химии. 1994. Т. 49. № 12. С. 1317-1323.
8. Багирова Н. А., Шеховцова Т. Н., Табатчикова Н. В., ван Хьюсти Р. Б.// Журн. аналит. химии. 2000. Т. 55. № 1. С. 93-101.
9. Веселова И. А. // Иммуобилизованные пероксидаза и щелочная фосфатаза в тест-методах определения биологически активных веществ. Дисс. К. х. н. М.:МГУ. 2001. 295 с.
10. Shekhovtsova T. N., Muginova S. V., Bagirova N. A. // Mendeleev Commun. 1997. P. 119-120.
11. Вольнец М. П., Гурьева Р. Ф., Дуброва Т. В., Мясоедов Б. Ф., Саввин С. Б. // Журн. аналит. химии. 1991. Т. 46. №8. С. 1591-1595.
12. Шмаков В. С., Зеленова Л. М., Ильясова А. И., Бродько А. С., Латыпова Ф. Н., Рахманкулов Д. Л. // Журн. прикл. химии. 1996. Т. 69. №4. С. 598-601.
13. Fisher W., Bund O., Hauck H. E. // Fresenius J. Anal. Chem. 1996. V. 354. №718. P. 889-891.
14. Sherma J., Boldnieks J. // J. Liquid chromatogr. 1990. V. 13. №20. P. 3941-3947.
15. TLC Application Cat. Macherly-Nagel. 1995. P. 51-53.
16. Lerpi L., Desideri P. G., Heimler D. // J. Chromatogr. 1982. V. 248. P. 308.
17. Sharma O. P., Bhat T. K., Singh B. // J. Chromatogr. A. 1998. V. 822. P. 167-171.
18. Shannon L. M., Kay E., Lew J. Y. // J. Biol. Chem. 1966. V. 249. №9. P. 2166-2172.
19. Claiborne A., Fridovich J. // Biochemistry. 1979. V. 18. №11. P. 2324-2329.
20. Josephy P. D., Eling T., Mason R.P. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. №7. P. 3669-3675.