ПЕРОКСИДАЗНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕМОГЛОБІНУ НА ПРИКЛАДІ СИСТЕМИ БРОМПІРОГАЛОЛОВИЙ ЧЕРВОНИЙ – ПЕРОКСИД ВОДНЮ

Дроздова М.В., Наджафова О.Ю.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
nadzhafova@univ.kiev.ua

Застосування в аналітичній практиці біомолекул – актуальна задача сучасної аналітичної хімії. Новий етап розвитку аналітичних методів пов'язаний із використанням біоматеріалів, іммобілізованих на поверхні сорбентів, зокрема, оксиду силіцію за золь-гель технологією, як реагентів нового покоління для створення на їх основі біосенсорів. Серед біомолекул, що застосовуються в аналізі, насамперед слід виділити ферменти, зокрема пероксидазу та каталазу. Так, пероксидазу широко використовують для спектрофотометричного визначення пероксиду водню за реакцією окиснення хромогенних органічних барвників, похідних фенолу та аніліну – донорів електронів, що каталізується пероксидазою. Менш токсичний барвник бромпірогалоловий червоний (БПЧ) запропонований для визначення мікрокількостей пероксиду водню за допомогою пероксидази. Гемоглобін (Hb) не є ферментом, однак виявляє пероксидазні властивості. Від пероксидази його вигідно відрізняє більша стабільність та дешевизна.

Метою роботи було дослідження пероксидазних властивостей гемоглобіну на прикладі каталітичного розкладу пероксиду водню у присутності БПЧ як донору електронів. Контроль за перебігом реакції проводили спектрофотометрично. Було показано, що при взаємодії БПЧ з пероксидом водню у присутності Hb вже через 10 хв спостерігалося зменшення інтенсивності поглинання спектру БПЧ при λ=540 нм та збільшення інтенсивності при λ=400 нм в результаті утворення продуктів окислення барвника. У відсутності каталізатора ніяких змін в спектрі поглинання барвника не спостерігалося. Швидкість індикаторної реакції контролювали спектрофотометрично за тангенсом кута нахилу на початковій ділянці кривої залежності зміни оптичної густини при 540 нм від часу перебігу реакції.

Встановлені оптимальні умови проведення реакції, зокрема оптимальне pH розчину 6,2±0,5, концентрації БПЧ та Hb, за яких за 10 хв оптична густина зменшувалась на 0,4 для концентрації H_2O_2 $3\cdot10^{-5}$ моль/л, що становлять $3{,}6\cdot10^{-5}$ та $5{,}28\cdot10^{-7}$ моль/дм^3, відповідно. На основі проведених досліджень була розроблена методика визначення пероксиду водню в розчині із застосуванням методу фіксованого часу. Побудований градуювальний графік для визначення пероксиду водню в розчині, лінійність якого лежить в межах $(0{,}3\text{-}5)\cdot10^{-5}$ моль/дм^3. Результати вимірювань характеризуються задовільною відтворюваністю.

Для концентрації Hb $5{,}28\cdot10^{-7}$ моль/дм^3 були розраховані максимальна швидкість реакції (V_{max}), константа Міхаеліса (K_M), що складають $2{,}9\cdot10^{-3}$ моль/дм$^3\cdot$с та $1{,}3\cdot10^{-4}$ моль/дм^3 відповідно, відносна пероксидазна активність Hb, розрахована як кількість мкмолей пероксиду, що розкладаються мкмоль Hb за секунду складає $17\cdot10^{-3}$. При зменшенні концентрації гемоглобіну в розчині, пероксидазна активність дещо збільшується.

Отже, реакція окиснення БПЧ пероксидом водню у присутності Hb як каталізатора може бути застосована для визначення мікроконцентрацій пероксиду водню, а також придатна як індикаторна система для оцінки пероксидазної активності гемоглобіну, що планується використати надалі для оцінки активності гемопротеїнів, капсульованих матрицею оксиду силіцію.