

УДК 54.061:577.15

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ ГВАЯКОЛА В СИСТЕМЕ ВОДА – ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИД

© С.А. Покрышкин^{*1}, К.Г. Боголицын^{1,2}

¹Северный (Арктический) федеральный университет, Набережная Северной Двины, 17, Архангельск, 163002 (Россия), e-mail: serge.physchem@yandex.ru

²Институт экологических проблем Севера УрО РАН, Набережная Северной Двины, 23, Архангельск, 163000 (Россия)

Методом газовой хромато-масс-спектрометрии установлен компонентный состав продуктов пероксидазного окисления гваякола в водных растворах и смесях воды с диметилсульфоксидом (ДМСО).

В качестве начальных продуктов реакции окислительного сочетания гваякола идентифицированы пять димерных соединений. Дейтерирование продуктов реакции и анализ масс-спектров полученных производных позволили идентифицировать два компонента как простые эфиры и три соединения, принадлежащих к классу диметоксифенолов. Для системы вода – ДМСО показано, что состав продуктов реакции сохраняется при переходе от водного к водно-органическому растворителю с содержанием органической фазы до 30%.

Ключевые слова: фермент, пероксидаза хрена, гваякол, окислительное сочетание.

Введение

В настоящее время задача мониторинга качества вод промышленных предприятий является актуальной. Так, технологические растворы предприятий целлюлозно-бумажной промышленности обладают многокомпонентным составом и содержат ионы тяжелых металлов, анионы, фенолы, хлорорганические соединения. Их органическая часть определяется технологическими процессами – делигнификацией и отбелкой, в ходе которых происходит перевод лигнинных веществ в растворимую форму, частичное разрушение до мономерных фенолов и переход их в технологический раствор. Фенольные компоненты в технологических водах обнаруживаются на всем протяжении техпроцесса. Поэтому определение их содержания является актуальным с точки зрения оптимизации технологии и экологического мониторинга, так как мономерные фенолы являются высокотоксичными веществами.

Разработанные инструментальные методы определения не всегда позволяют идентифицировать групповой состав фенольных соединений. Одним из перспективных направлений является использование биосенсоров, основанных на ферментах, что позволяет повысить экспрессность анализа, увеличить его чувствительность и селективность [1, 2].

Покрышкин Сергей Александрович – младший научный сотрудник,
e-mail: serge.physchem@yandex.ru

Боголицын Константин Григорьевич – директор Института экологических проблем Севера УрО РАН, проректор по научной работе, заведующий кафедрой теоретической и прикладной химии Северного (Арктического) федерального университета, заслуженный деятель науки РФ, доктор химических наук, профессор,
e-mail: bogolitsyn@ierp.ru, bogolitsyn@agtu.ru

Одним из наиболее широко применяемых в аналитических целях классов ферментов являются оксидоредуктазы и в частности пероксидаза (КФ 1.1.11.7). Этот биокатализатор – один из ключевых ферментов, контролирующих рост растений, их дифференциацию и развитие. *In vitro* этот фермент широко применяется в иммуноферментном анализе и при конструировании ферментных электродов. Показана [3–6] возможность использования ферментативных методов для определения как органических,

* Автор, с которым следует вести переписку.

так и неорганических компонентов вод. Литературные данные свидетельствуют о возможности проведения ферментативных реакций в водно-органической среде, что позволяет повысить растворимость и доступность для ферментативной системы исходных олигомеров фенольных соединений и продуктов реакции.

Так, по данным [6], пероксидаза хрена сохраняет реакционную способность в среде вода – этанол и вода – диметилсульфоксид (ДМСО). По данным обзора [7], возможно проведение ферментативной реакции в неводных и смешанных водно-органических средах (толуола, бензола, этилацетата, бутилацетата, метанола, диоксана, ацетонитрила и т.д.). В то же время хорошим растворителем моно-, олиго- и полимерных фенольных компонентов является ДМСО [8]. Согласно исследованиям [9, 10], в системе вода – ДМСО происходит избирательная сольватация родственных лигнину фенолов в зависимости от содержания органического компонента. Исследования [5, 6, 11] показывают возможность проведения ферментативной реакции в смесях воды с ДМСО.

В качестве модельного соединения для разработки методик анализа родственных лигнину фенолов может быть использован гваякол как родоначальник гваяцильного ряда структурных фрагментов макромолекулы лигнина. Он также является одним из важных представителей мономерных веществ фенольной природы технологических растворов и сточных вод предприятий лесохимического комплекса. Согласно схеме реакции, приведенной на рисунке 1, окисление гваякола идет через ряд промежуточных димерных продуктов и заканчивается 3,3'-диметокси-4,4'-бифенилхиноном.

Однако для неводных и смешанных растворителей в литературе наблюдается недостаток данных по механизму окисления гваяцильных фенолов и образующимся продуктам. Получение таких данных необходимо для разработки биосенсоров с заранее заданными свойствами, высокой стабильностью и широким диапазоном измеряемых концентраций.

В связи с этим целью настоящего исследования является идентификация продуктов ферментативного окисления гваякола пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена в водной среде и смесях воды с ДМСО и выявление влияния органического соразтворителя на состав образующихся продуктов.

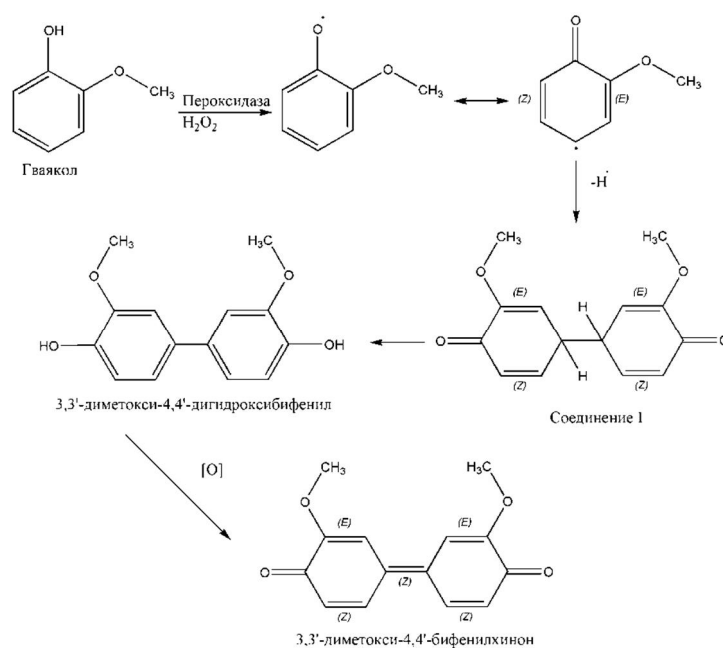


Рис. 1. Реакция пероксидазного окисления гваякола [12]

Экспериментальная часть

В работе использовали препарат пероксидазы хрена (BVI Enzymes) со спектральным показателем чистоты $R_z = 2,30$. Активность фермента определяли по скорости реакции окисления гваякола пероксидом водорода [13].

Концентрацию пероксида водорода контролировали спектрофотометрическим методом с использованием УФ спектрофотометра Specord 200 (Analytik Jena) по полосе поглощения 230 нм (молярный коэф-

фициент поглощения $72,7 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). В качестве субстрата применяли гваякол (Sigma-Aldrich). Реактивы соответствовали квалификации «ос.ч.».

Подбор условий реакции и изучение влияния компонентов реакционной смеси на скорость и кинетические параметры реакции были проведены ранее [14].

Реакцию пероксидазного окисления гваякола ($2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$) пероксидом водорода ($0,2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$) проводили при $25 \text{ }^\circ\text{C}$ в среде фталатного буферного раствора ($\text{pH} = 6,0$) при концентрации ДМСО (Компонент-реактив, о.с.ч.) от 0 до 30% (масс.). Процесс инициировали введением пероксидазы хрена (1 Ед/мл) при объеме реакционной смеси 250 мл. Через заданное время производили экстракцию компонентов реакционной смеси хлороформом (15 мл) (Компонент-реактив, о.с.ч.). Для улучшения разделения использовали добавку 10 г NaCl. Экстракт осушали добавлением 1 г безводного Na_2SO_4 и упаривали под вакуумом. Остаток растворяли в 200 мкл метанола (Fluka, HPLC grade). Дейтерирование пробы проводили, растворяя остаток после упаривания в смеси 150 мкл метанола и 50 мкл D_2O (Merck, >99% grade). Для восстановления боргидридом натрия хлороформенный экстракт реекстрагировали 10 мл 1М раствором боргидрида натрия (Fluka, puris) в 0,01 М NaOH. Восстановление проходило в экстракте при комнатной температуре и сопровождалось исчезновением окраски раствора. Смесь подкисляли 0,1 М раствором HCl до $\text{pH}=6-7$ и экстрагировали восстановленные продукты реакции 15 мл хлороформа. Хлороформенный экстракт обрабатывали по описанной выше методике.

Для анализа продуктов ферментативного окисления гваякола на газовом хромато-масс-спектрометре GC-MS QP2010Plus (Shimadzu, Япония) проводили хроматографирование экстрактов реакционной смеси, полученных через 10 сек, 2, 5, 60 мин и 24 ч после начала реакции. Параметры разделения: колонка HP-5MS $60 \text{ м} \times 0,32 \text{ мм}$ (Agilent, США). Температура устройства ввода $250 \text{ }^\circ\text{C}$, температура устройства сопряжения $280 \text{ }^\circ\text{C}$, начальная температура термостата $200 \text{ }^\circ\text{C}$, изотерма 5 мин, подъем температуры до $300 \text{ }^\circ\text{C}$ со скоростью $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$, изотерма 5 мин.

Идентификацию продуктов реакции осуществляли поиском по библиотекам масс-спектров NIST'08 и Wiley-9.

Обсуждение результатов

Предварительный анализ хроматограмм продуктов реакции по полному ионному току показал присутствие в системе на начальном этапе реакции преимущественно продуктов димеризации гваякола с молекулярной массой 246. В связи с этим контроль протекания реакции на начальном этапе проводился путем мониторинга иона с $m/z=246$. При этом наблюдается образование 5 продуктов в первые 10 с реакции (рис. 2). Масс-спектры продуктов 3–5 идентифицируются библиотечным поиском как одно соединение – 3,3'-диметокси-4,4'-дигидроксифенил. Масс-спектры продуктов 1 и 2 библиотечным поиском не идентифицированы.

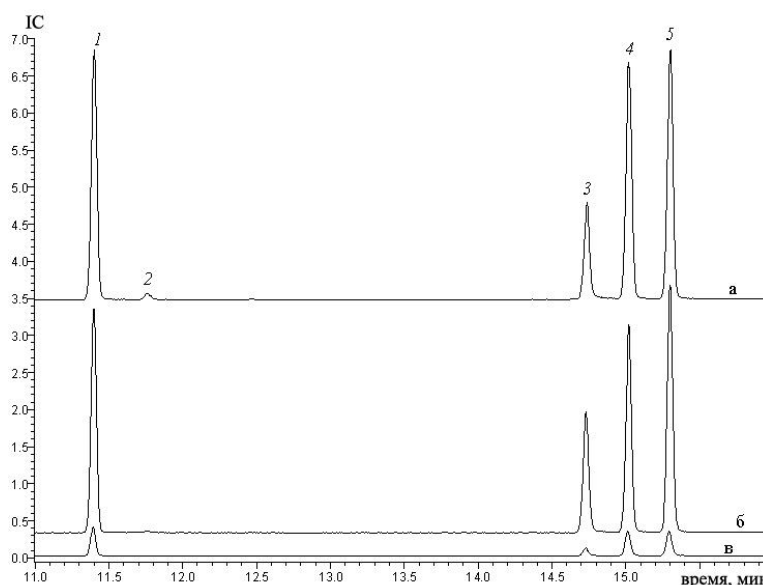


Рис. 2. Хроматограмма продуктов реакции окисления гваякола в режиме мониторинга ионов с $m/z=246$: а – водный раствор; б – 15% ДМСО; в – 30% ДМСО

Для идентификации продуктов 1 и 2 проводилось дейтерирование пробы растворением в смеси оксида дейтерия и метанола. Замещение подвижных атомов водорода на дейтерий, которое происходило при этом, по изменению отношения m/z молекулярного иона позволяет определить наличие и количество –ОН групп в молекуле. Сравнение масс-спектров дейтерированного образца с контрольным показало наличие в соединениях 1 и 2 одной –ОН группы, а в соединениях 3, 4 и 5 – двух групп (табл. 1).

В то же время восстановление пробы боргидридом натрия в щелочной среде с последующей нейтрализацией и экстракцией реакционной смеси не изменяло количество и положение пиков. На основании полученных результатов можно предположить, что соединения 3, 4 и 5 являются диметоксифенилом с С–С связью в *пара-пара*, *пара-орто* и *орто-орто* положениях (рис. 3, в–д). Соединения 1 и 2 являются простыми эфирами (2-метокси-4-(2-метоксифенокси)-фенол и 2-метокси-6-(2-метоксифенокси)-фенол) (рис. 3, а, б).

Относительная величина пиков молекулярного иона в дейтерированном и исходном образцах

m/z	Исходный образец	Дейтерированный образец, номер пика				
		1	2	3	4	5
246,0	100,0	62,6	68,3	36,6	37,8	39,2
247,0	15,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
248,0	2,0	15,0	14,5	76,2	74,4	73,1
249,0	0,2	1,8	2,0	11,4	11,3	11,3

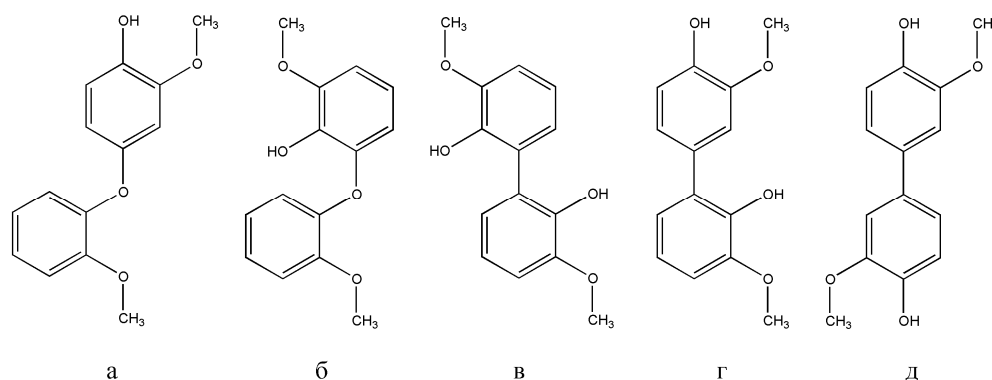


Рис. 3. Продукты ферментативной реакции окисления гваякола

На последующих стадиях реакции происходит образование более высокомолекулярных продуктов. В частности, методом ГХМС обнаружены продукты реакции с отношением m/z молекулярного иона 368, 424 и 490. Продуктам с m/z 368 и 490 можно соотнести три- и тетрамер гваякола. Поскольку хинонные продукты реакции не обнаружены, появление окраски раствора и наличие полос в электронном спектре поглощения на длинах волн 400–500 нм [15] можно объяснить поглощением радикалов, образующихся в начальный момент реакции (см. рис. 1).

Проведено изучение влияния содержания органического компонента в бинарном растворителе на количественный и качественный состав продуктов реакции. Для этого выполнены эксперименты с использованием в качестве среды 15 и 30% масс. раствора ДМСО (рис. 2). При этом наблюдалось падение скорости реакции, однако качественный состав продуктов реакции сохранялся прежним, что свидетельствует о сохранении механизма реакции в присутствии органического соразтворителя.

Выводы

1. Произведена идентификация пяти основных димерных продуктов начальной стадии реакции ферментативного окисления гваякола пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена.
2. Показана возможность применения пероксидазы хрена для ферментативного окисления гваякола в системе вода – ДМСО. Установлена идентичность основных продуктов окисления в водных растворах и в смесях воды с ДМСО.

Работа выполнена в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета при поддержке Минобрнауки РФ.

Список литературы

1. Григорьева Д.Л., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Определение ргути (II) с использованием пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на модифицированных силикагелях // Вестник Московского университета. Серия 2 : Химия. 2003. Т. 44, №3. С. 178–182.
2. Кирейко А.В., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Ферментативное определение ряда лекарственных веществ в прямых и обращенных мицеллах додецилсульфата натрия // Вестник Московского университета. Серия 2 : Химия. 2007. Т. 48, №4. С. 265–270.
3. Айзенштадт М.А., Боголицын К.Г. Пероксидазное окисление лигнина и его модельных соединений // Химия растительного сырья. 2009. №2. С. 5–18.
4. Айзенштадт М.А., Боголицын К.Г., Покрышкин С.А. Каталитическое окисление модельных соединений лигнина пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена в качестве катализатора // Химия растительного сырья. 2009. №4. С. 31–37.
5. Веселова И.А., Кирейко А.В., Шеховцова Т.Н. Повышение каталитической активности и стабильности пероксидазы хрена за счет включения ее в полиэлектролитный комплекс с хитозаном // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45, №2. С. 143–148.
6. Яблоцкий К.В. Новые аспекты применения нативной и иммобилизованной пероксидазы хрена для определения ее ингибиторов и субстратов : автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 2010. 28 с.
7. Rodakiewicz-Nowak J. Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media // Topics in Catalysis. 2000. Vol. 11/12. Pp. 419–434.
8. Боголицын К.Г., Лунин В.В., Косяков Д.С., Карманов А.П., Скребец Т.Э., Попова Н.Р., Малков А.В., Горбова Н.С., Пряхин А.Н., Шкаев А.Н., Иванченко Н.Л. Физическая химия лигнина. М., 2010. 492 с.
9. Боголицын К.Г., Косяков Д.С., Горбова Н.С. Термодинамические параметры кислотной ионизации фенолов гваяцильного ряда в системе вода – диметилсульфоксид // Журнал физической химии. 2003. Т. 77, №11. С. 1943.
10. Боголицын К.Г., Горбова Н.С., Косяков Д.С. Кислотно-основные свойства родственных лигнину фенолов в системе вода – апротонный растворитель // Журнал физической химии. 2003. Т. 77, №4. С. 667.
11. Azevedo A.M., Duarte M.F. Prazeres, Joaquim M.S. Cabral, Fonseca L.P. Stability of free and immobilized peroxidase in aqueous-organic solvent mixtures // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2001. N15. Pp. 147–153.
12. Doerge D.R., Divi R.L., Churchwell M.I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases // Analytical biochemistry. 1997. N250. Pp. 10–17.
13. Bergmeyer H.U. Methods of enzymatic analysis. 2nd edition. N.Y., 1974. 495 p.
14. Покрышкин С.А., Боголицын К.Г. Кинетика ферментативного окисления гваякола в водных и водно-органических средах // Лесной журнал. 2012. №3. С. 100–106.
15. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 303–322.

Поступило в редакцию 26 апреля 2013 г.

После переработки 14 января 2014 г.

Pokryshkin S.A.^{1*}, Bogolytsin K.G.² THE INVESTIGATION OF THE PRODUCT OF GUAIACOL ENZYMATIC OXIDATION IN WATER – DMSO BINARY SOLVENTS

¹Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Naberezhnaia Severnoi Dviny, 17, Arkhangelsk, 163000 (Russia), e-mail: serge.physchem@yandex.ru

²Institute of Ecological Problems of the North, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Naberezhnaia Severnoi Dviny, 23, Arkhangelsk, 163000 (Russia)

The investigation on the reaction of enzymatic oxidation of guaiacol as lignin model compound with hydrogen peroxide in the presence of horseradish peroxidase in water – DMSO binary solvents was done. Using the method of gas chromatography – mass spectrometry the five dimeric products of guaiacol oxidative coupling are identified. The possibility of the using of peroxidase in the mixtures of water with DMSO in the range of solvent compositions up to 30% (w/w) DMSO is shown. For the solvent compositions up to 30% vol. of DMSO the absence of the solvent effect on guaiacol oxidation products is stated.

Keywords: enzyme, horseradish peroxidase, guaiacol, oxidative coupling.

References

1. Grigor'eva D.L., Veselova I.A., Shekhovtsova T.N. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiia*, 2003, vol. 44, no. 3, pp. 178–182. (in Russ.).
2. Kireiko A.V., Veselova I.A., Shekhovtsova T.N. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiia*, 2007, vol. 48, no. 4, pp. 265–270. (in Russ.).
3. Aizenshtadt M.A., Bogolitsyn K.G. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2009, no. 2, pp. 5–18. (in Russ.).
4. Aizenshtadt M.A., Bogolitsyn K.G., Pokryshkin S.A. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2009, no. 4, pp. 31–37. (in Russ.).
5. Veselova I.A., Kireiko A.V., Shekhovtsova T.N. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 2009, vol. 45, no. 2, pp. 143–148. (in Russ.).
6. Iablotskii K.V. *Novye aspekty primeneniia nativnoi i immobilizovannoi peroksidazy khrena dlia opredeleniia ee inhibitorov i substratov : avtoref. dis. ... kand. khim. nauk.* [New aspects of the use of native and immobilized horseradish peroxidase for determination of its inhibitors and substrates: the dissertation author's Ph.D. in Chemistry]. Moscow, 2010, 28 p. (in Russ.).
7. Rodakiewicz-Nowak J. *Topics in Catalysis*, 2000, vol. 11/12, pp. 419–434.
8. Bogolitsyn K.G., Lunin V.V., Kosiakov D.S., Karmanov A.P., Skrebets T.E., Popova N.R., Malkov A.V., Gorbova N.S., Priakhin A.N., Shkaev A.N., Ivanchenko N.L. *Fizicheskaiia khimiia lignina*. [Physical chemistry of lignin]. Moscow, 2010, 492 p. (in Russ.).
9. Bogolitsyn K.G., Kosiakov D.S., Gorbova N.S. *Zhurnal fizicheskoi khimii*, 2003, vol. 77, no. 11, p. 1943. (in Russ.).
10. Bogolitsyn K.G., Gorbova N.S., Kosiakov D.S. *Zhurnal fizicheskoi khimii*, 2003, vol. 77, no. 4, p. 667. (in Russ.).
11. Azevedo A.M., Duarte M.F., Prazeres, Joaquim M.S., Cabral, Fonseca L.P. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, no. 15, pp. 147–153.
12. Doerge D.R., Divi R.L., Churchwell M.I. *Analytical biochemistry*, 1997, no. 250, pp. 10–17.
13. Bergmeyer H.U. *Methods of enzymatic analysis*. 2nd edition. New York: Academic Press, 1974. 495 p.
14. Pokryshkin S.A., Bogolitsyn K.G. *Lesnoi zhurnal*, 2012, no. 3, pp. 100–106. (in Russ.).
15. Gazarian I.G., Khushpul'ian D.M., Tishkov V.I. *Uspekhi biologicheskoi khimii*, 2006, vol. 46, pp. 303–322. (in Russ.).

Received April 26, 2013

Revised January 14, 2014

* Corresponding author.