

УДК 543.94

## КИНЕТИЧЕСКИЕ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ТРИФЕНИЛ-4-СУЛЬФОНАТА НАТРИЯ

© 2022 г. С. А. Пиденко<sup>а</sup>, И. С. Москвичева<sup>а</sup>, Н. А. Бурмистрова<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт химии  
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

\*e-mail: naburmistrova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2021 г.

После доработки 17.09.2021 г.

Принята к публикации 18.09.2021 г.

Изучена возможность ферментативного окисления сульфопроизводных ди- и триариламинов пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена (ПХ). Показано, что продукт ферментативного окисления трифениламин-4-сульфоната натрия (ТФАС) является более устойчивым по сравнению с дифениламин-4-сульфонатом натрия. Исследовано влияние различных факторов (природы буферных растворов, концентраций реагентов, а также присутствия в реакционной среде катионных комплексов Ir(IV) и Rh(III)) на скорость окисления ТФАС. Изучены кинетические закономерности реакции ферментативного окисления ТФАС и оценены кинетические параметры ( $k_{\text{кат}}$ ,  $K_m$ ), сделано предположение о механизме активации процесса в присутствии каталитически активных комплексов Ir(IV) и Rh(III). Показана возможность аналитического применения реакции ферментативного окисления ТФАС для определения ПХ ( $5.0 \times 10^{-2}$  нМ), пероксида водорода (0.6 мМ) и катионных комплексов Ir(IV) (5 нМ) и Rh(III) (60 нМ).

**Ключевые слова** ариламины, трифениламин-4-сульфонат натрия, ферментативное окисление, пероксидаза хрена, пероксид водорода, кинетические закономерности.

DOI: 10.31857/S0044450222080096

Ферментативные методы анализа, основанные на измерении скорости химических реакций, катализируемых ферментами, — широко распространенный инструмент аналитической химии [1, 2]. Это обусловлено рядом преимуществ ферментативных реакций, включая высокую скорость, специфичность, возможность проведения в водных растворах. Накопленные к настоящему времени теоретические знания и практический опыт работы, возможность подбора компонентов и условий проведения ферментативных реакций с учетом поставленной задачи лежат в основе их применения при определении широкого круга неорганических и органических веществ в объектах окружающей среды, медицине, пищевой и фармацевтической промышленности, при контроле микробиологических и биохимических процессов.

Особое место среди ферментов занимает пероксидаза из корней хрена (ПХ). Высокая каталитическая активность и стабильность ПХ, ее субстратная специфичность лежат в основе широкого применения фермента в различных форматах био- и иммунохимического анализа, а также в ка-

честве распознающего элемента при разработке биосенсоров [3–6]. Уникальная структура ПХ, которая является гликопротеидом, состоящим из полипептидной цепи, формирующей двухдоменную глобулу, и гемовой протетической группы с атомом железа между доменами, определяет возможность прямого взаимодействия фермента с ароматическими донорными молекулами [6–8]. Измерение оптического сигнала методами фотометрического, хемилюминесцентного, флуоресцентного анализа при изучении взаимодействий ароматических соединений с ПХ широко используется для определения активности ПХ, а также при определении широкого круга субстратов и эффекторов фермента [4, 9–14].

Среди хромогенных субстратов ПХ определенного внимания заслуживают ароматические амины, для которых характерно образование ярко окрашенных продуктов ферментативного окисления, что дает возможность проводить прямое определение активности ПХ. Наиболее известными представителями хромогенных субстратов этого класса соединений являются коммерчески доступные 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и

3,3'-диаминобензидин, а также *o*-дианизидин, *o*-фенилендиамин, *o*-толуидин. Использование реакций на их основе позволяет реализовать высокочувствительные методики определения ПХ, однако возможность неспецифического окисления субстратов в присутствии различных окислителей существенно ограничивает область их применения [15]. В плане расширения возможностей спектрофотометрического определения ПХ перспективными являются реакции окисления производных ди- и триариламинов, которые характеризуются более высокой специфичностью по сравнению с первичными ароматическими аминами. При этом продукты окисления третичных ариламинов характеризуются большей устойчивостью и высокими коэффициентами молярного поглощения по сравнению с первичными и вторичными ариламинами. Ранее нами показана [16] перспективность применения реакции окисления трифениламин-4-сульфоната натрия (ТФАС), включенного в состав полимерной пленки полиуретана, пероксидом водорода для определения ПХ. Однако детального изучения реакции окисления ТФАС в растворе и кинетических закономерностей процесса не проводили.

Цель данной работы состояла в изучении кинетических закономерностей реакции ферментативного окисления ТФАС в присутствии ПХ и оценке их аналитических возможностей.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и методы.** В работе использовали трифениламин (ТФА) (Sigma-Aldrich, 98%), дифениламин-4-сульфонат натрия (ДФАС, Россия, ч.д.а.), ПХ (Sigma, ~150 усл. ед./мг), 2,2-азинобис(3-этилбензтиазолин-6)-сульфоновую кислоту (АБТС, Sigma), ТМБ (Sigma), пероксид водорода (х.ч.),  $\text{RhCl}_3$  (Merck, 98%),  $\text{H}_2\text{IrCl}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (Merck). Все остальные реагенты, использованные в работе, были квалификации не ниже х.ч.

Трифениламин-4-сульфонат натрия синтезировали методом прямого сульфирования ТФА серной кислотой ( $\rho = 1.8$  г/мл) [17].

Стандартные растворы ДФАС и ТФАС ( $5.0 \times 10^{-3}$  М), ПХ (1 мг/мл, ~23 мкМ) готовили растворением точной навески,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1.0 \times 10^{-2}$  М) — разбавлением аликвоты в бидистиллированной воде. Рабочие растворы реагентов готовили разбавлением стандартных растворов непосредственно перед применением. Стандартные растворы  $\text{H}_2\text{IrCl}_6$  и  $\text{RhCl}_3$  (1 мг/мл) готовили растворением точной навески в  $\text{HCl}$  (1 М). Каталитически активные формы  $\text{Ir(IV)}$  ( $1.0 \times 10^{-5}$  М) и  $\text{Rh(III)}$  ( $5.0 \times 10^{-5}$  М) готовили 3-кратной термообработкой аликвоты стандартных растворов с  $\text{HClO}_4$  (конц., 2 мл) до образования влажных солей и переводили в раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $1.0 \times 10^{-3}$  М). Приго-

товленные растворы сохраняли каталитическую активность в течение трех месяцев.

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре UV-1800 Spectrophotometer (SHIMADZU, Япония) с разрешением 1 нм. Скорость реакции определяли при 680 нм (молярный коэффициент поглощения продукта  $6.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [9]).

pH растворов измеряли pH-метром pH-150МИ (Измерительная техника, Москва, Россия) с применением комбинированного электрода ЭСК-10603/7.

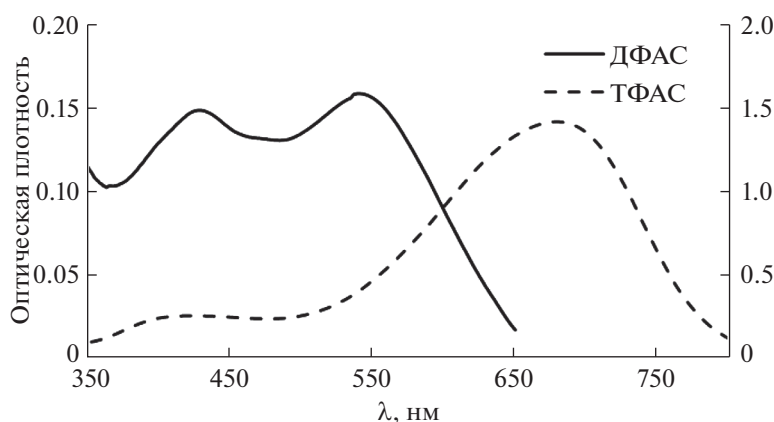
**Методика определения пероксидазы хрена.** Реакцию окисления ТФАС пероксидом водорода в присутствии ПХ проводили по следующей методике. В стеклянную пробирку вводили последовательно рассчитанное количество  $\text{H}_2\text{O}$  (суммарный объем — 5 мл), 0.5 мл  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $1.0 \times 10^{-3}$  М), ТФАС (0.3 мл,  $1.0 \times 10^{-3}$  М), ПХ (5–300 мкл, 60 нМ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.5 мл,  $1.0 \times 10^{-2}$  М),  $\text{Ir(IV)}$  (25 мкл,  $1.0 \times 10^{-5}$  М)/ $\text{Rh(III)}$  (25 мкл,  $5.0 \times 10^{-4}$  М) при комнатной температуре. Начало реакции соответствовало добавлению пероксида водорода. Для построения градуировочной зависимости оптическую плотность при 680 нм регистрировали через 110 с после начала реакции.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Реакция ферментативного окисления дифениламин-4-сульфоната натрия и трифениламин-4-сульфоната натрия пероксидом водорода.** ДФАС и ТФАС не окисляются  $\text{H}_2\text{O}_2$  в широком диапазоне кислотности среды, в то же время добавление ПХ приводит к появлению ярко окрашенных форм в слабокислых растворах  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 2.5–4.5). Следует отметить довольно высокую кислотность среды изучаемой реакции, которая не является оптимальной для каталитического действия ПХ. Однако депротонирование окисленных форм ТФАС приводит к исчезновению окраски в растворах с меньшей кислотностью.

Важно отметить высокую устойчивость ТФАС к окислителям в слабокислой среде. При pH > 1 реагент не окисляется целым рядом окислителей ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{KBrO}_3$ ,  $\text{KIO}_3$ ,  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ) как в отсутствие, так и в присутствии ПХ.

Продукты ферментативного окисления ДФАС характеризуется полосами поглощения при 430 и 540 нм (рис. 1), соответствующими сульфопроизводным катион-радикала ( $\text{ДФБ}^{\cdot+}$ ) и дикатиона ( $\text{ДФБ}^{2+}$ ) дифенилбензидина. С течением времени наблюдается исчезновение длинноволновой полосы поглощения и полное исчезновение окраски раствора. Спектр поглощения окисленной формы ТФАС характеризуется высокоинтенсивной полосой при 680 нм, соответствующей образо-



**Рис. 1.** Спектры поглощения дифениламин-4-сульфоната натрия (ДФАС) и трифениламин-4-сульфоната натрия (ТФАС) при их окислении пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена (ПХ): ДФАС/ТФАС –  $6.0 \times 10^{-5}$  М, ПХ –  $3.0 \times 10^{-9}$  М,  $\text{H}_2\text{O}_2$  –  $5.0 \times 10^{-3}$  М,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  –  $1.0 \times 10^{-3}$  М,  $t = 40$  с.

ванию сульфоната дикатиона тетрафенилбензидина (ТФБ<sup>2+</sup>), а также низкоинтенсивной полосой ~970 нм. Яркая окраска раствора сохраняется в течение 5–10 мин, устойчивость ТФБ<sup>2+</sup> зависит от условий протекания реакции. Трансформация спектра – снижение интенсивности при 680 нм, появление новой полосы при 480 нм и увеличение интенсивности при 970 нм – позволяет предположить протекание побочных реакций, приводящих к образованию бесцветного сульфоната катион-радикала тетрафенилбензидина ТФБ<sup>•+</sup>. Последовательное образование ряда окисленных форм ТФАС хорошо согласуется с известными закономерностями окисления ариламинов.

Таким образом, ТФАС можно рассматривать как альтернативный субстрат для ПХ, устойчивый к действию широкого круга окислителей. При этом реакция окисления ТФАС пероксидом водорода в присутствии ПХ позволяет получить аналитический сигнал в длинноволновой области спектра с высоким молярным коэффициентом поглощения. Однако применение этой реакции в аналитических целях требует поиска условий стабилизации продукта окисления ТФАС. В связи с этим изучено влияние различных факторов на скорость реакции окисления ТФАС.

**Влияние условий на реакцию окисления трифениламин-4-сульфоната натрия пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена.** Порядок смешивания реагентов несущественно влияет на интенсивность и устойчивость аналитического сигнала, однако наиболее воспроизводимые результаты получали при смешивании растворов в следующей последовательности: реагент, ПХ, окислитель. Установлено, что состав буферного раствора существенно влияет на скорость окисления ТФАС в присутствии ПХ. Реакция практически не протекает в цитратно-фосфатном (0.01 М, рН 4) буферном растворе, скорость реакции низ-

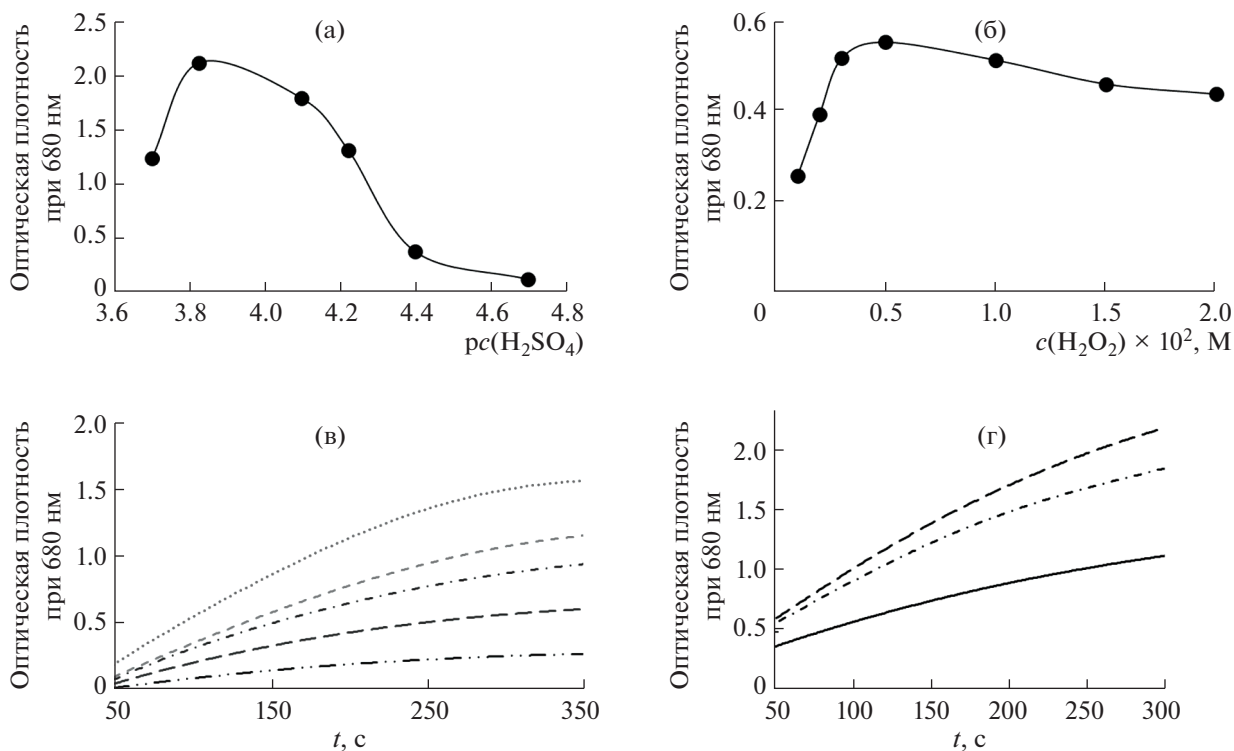
кая в ацетатном (0.01 М, рН 4–5) и НСl–глицин (рН 4) буферных растворах. Сильное влияние природы буферного раствора на скорость ферментативного окисления ТФАС, вероятно, обусловлено поляризующим действием анионов на устойчивость интермедиатов и продуктов окисления ТФАС.

Наиболее интенсивную окраску продукта окисления ТФАС и относительно устойчивые во времени продукты окисления наблюдали в слабокислых растворах серной кислоты. Использование  $\text{H}_2\text{SO}_4$  позволяет проводить измерения при постоянных значениях рН ( $\pm 0.1$ ) для серии растворов с постоянными концентрациями ТФАС и пероксида водорода. Следует отметить, что  $\text{H}_2\text{SO}_4$  является оптимальной средой и для реакции каталитического окисления ТФАС периодат-ионами [17, 18].

Показано, что интенсивность сигнала и устойчивость иона ТФБ<sup>2+</sup> максимальны при концентрации  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $5.0 \times 10^{-5}$ – $2.0 \times 10^{-4}$  М (рис. 2а), концентрацию  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1.0 \times 10^{-4}$  М выбрали в качестве оптимальной и использовали в дальнейшей работе.

Зависимость аналитического сигнала от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  имеет вид кривой с насыщением, которая достигает максимума при концентрации  $5.0 \times 10^{-4}$  М (рис. 2б), использование концентрации окислителя  $1.0 \times 10^{-3}$  М позволяет получить более стабильный аналитический сигнал. Таким образом, реакция окисления ТФАС протекает при более высоких концентрациях окислителя по сравнению с другими ариламинами.

Увеличение концентрации ТФАС в диапазоне  $(0.3\text{--}1.8) \times 10^{-4}$  М позволяет получить аналитический сигнал, который стабильно увеличивается в течение 10 мин и зависит от концентрации ПХ (рис. 2в). Скорость реакции линейно зависит от



**Рис. 2.** Влияние концентрации  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (а) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (б) на оптическую плотность продукта окисления трифениламин-4-сульфоната натрия (ТФАС) при 680 нм: ТФАС – 0.18 мМ, пероксидаза хрена – 3.6 нМ (а) и 1.2 нМ (б),  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 1.0 мМ (а),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  – 0.1 мМ (б),  $t$  – 60 с (а) и 100 с (б). Кинетические кривые реакции ферментативного окисления ТФАС при различной концентрации ТФАС (в); в отсутствие (1) и в присутствии каталитически активных форм Ir(IV) (0.2 мкМ, 2) и Rh(III) (0.5 мкМ, 3) (г): ТФАС – 0.18 мМ, ПХ – 1.8 нМ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 1.0 мМ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  – 0.1 мМ.

концентрации реагента при фиксированной концентрации ПХ.

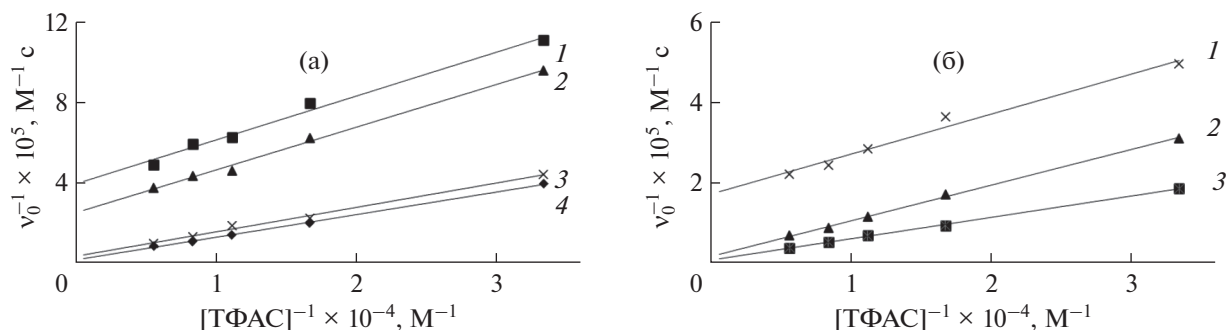
При выбранных концентрациях ( $\text{H}_2\text{O}_2$  –  $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ , ТФАС –  $1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  –  $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) интенсивность полосы поглощения  $\text{ТФБ}^{2+}$  линейно зависит от концентрации ПХ до 5.0 нМ, что позволяет использовать реагент для количественного определения активности фермента. Определение ПХ при выбранных условиях характеризуется высокой воспроизводимостью результатов ( $n = 3$ ,  $s_r \leq 5\%$ ). При более высоких концентрациях ПХ увеличиваются скорости как целевой реакции, так и побочных процессов, что приводит к снижению воспроизводимости результатов определения ПХ.

Ранее окислительно-восстановительные свойства ТФАС подробно изучали Муштакова с сотр. [17, 18]; показана возможность окисления реагента периодат-ионами в присутствии каталитически активных форм металлов платиновой группы в слабокислых средах. С другой стороны, известным фактом является возможность влияния переходных металлов на реакции окисления органических субстратов в присутствии ПХ [12]. Эти данные послужили предпосылкой для изучения влияния ионов переходных металлов на скорость

реакции пероксидазного окисления ТФАС пероксидом водорода. Установлено, что использование каталитически активных катионных форм Ir(IV) и Rh(III) позволяет существенно увеличить (до 60%) чувствительность реакции ТФАС (рис. 2г), а также стабильность и воспроизводимость системы. Для установления возможных причин стабилизации  $\text{ТФБ}^{2+}$  каталитически активными формами Ir(IV) и Rh(III) изучены кинетические закономерности протекания реакции окисления ТФАС пероксидом водорода в присутствии ПХ.

**Кинетические закономерности реакции ферментативного окисления трифениламин-4-сульфоната натрия.** Для расчета кинетических характеристик реакции использовали модель Михаэлиса–Ментен. Зависимость начальной скорости реакции ( $v_0$ ) от концентрации ТФАС в двойных обратных координатах при различных концентрациях Ir(IV) и Rh(III) показана на рис. 3.

Полученные зависимости использовали для расчета кинетических параметров процесса – “числа оборотов” ( $k_{\text{кат}}$ ) и константы Михаэлиса ( $K_m$ ) согласно эмпирическим уравнениям (1) и (2), которые отражают зависимость констант от



**Рис. 3.** Зависимость  $v_0$  от концентрации трифениламин-4-сульфоната натрия в двойных обратных координатах в отсутствие (1) и в присутствии (2–4) каталитически активных форм (а) Ir(IV) (2 – 0.05, 3 – 0.10, 4 – 0.20 мкМ) и (б) Rh(III) (2 – 0.50, 3 – 5.0 мкМ): ПХ – (а) 1.2 нМ и (б) 1.8 нМ,  $H_2O_2$  – 1.0 мМ,  $H_2SO_4$  – 0.1 мМ.

концентрации каталитически активной формы Ir(IV)/Rh(III) [19]:

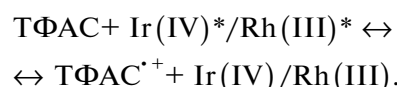
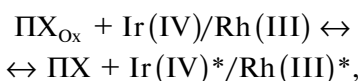
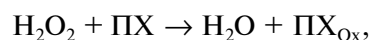
$$k_{\text{кат}}^a = k_{\text{кат}} (1 + \alpha[A]_0), \text{ с}^{-1}, \quad (1)$$

$$K_{\text{кат}}^a = K_m (1 + \alpha[A]_0), \text{ М.} \quad (2)$$

Значения  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$ , а также  $v_{\text{max}}$  определяли на основании анализа зависимостей  $v_0$  от [ТФАС] в двойных обратных координатах, с последующим расчетом коэффициента (степени) активации  $\alpha$ , характеризующего увеличение кинетического параметра в присутствии 1 моль/л активатора.

Полученные значения кинетических параметров (табл. 1) хорошо согласуются с данными [20]. Значения коэффициента активации ( $\alpha$ ) свидетельствуют об увеличении количества циклов пероксидазного окисления ТФАС в присутствии Ir(IV) и Rh(III) (из расчета на 1 моль/л активатора) и, вероятно, связаны с возможностью увеличения эффективности протекания лимитирующей стадии процесса – образования промежуточ-

ного продукта окисления катион-радикала ТФАС $^{\cdot+}$ :



**Аналитическое применение реакции окисления трифениламин-4-сульфоната натрия пероксидом водорода.** Относительно высокая стабильность ТФБ $^{2+}$  в присутствии каталитически активных форм Ir(IV) и Rh(III) и наличие линейных участков зависимостей аналитического сигнала от концентраций ПХ,  $H_2O_2$ , а также каталитически активных форм Ir(IV) и Rh(III) дает возможность применять данную реакцию для различных целей. Аналитические характеристики методик на

**Таблица 1.** Кинетические характеристики пероксидазного окисления трифениламин-4-сульфоната натрия при 20°C при различных концентрациях каталитически активных форм Ir(IV) и Rh(III)

Концентрация катализатора, мкМ	$V_{\text{max}} \times 10^{-5}, \text{ М/с}$	$K_m \times 10^{-4}, \text{ М}$	$k_{\text{кат}} \times 10^4, \text{ с}^{-1}$	$\alpha(k_{\text{кат}}) \times 10^{-4}, \text{ М}^{-1}$	$\alpha(K_m) \times 10^{-4}, \text{ М}^{-1}$
ПХ – 1.2 нМ, $H_2O_2$ – 1.0 мМ, $H_2SO_4$ – 0.1 мМ, катализатор – иридий					
0	0.005	0.1	0.4	–	–
0.05	0.008	0.2	0.7	1.2	1.1
0.10	0.070	0.8	5.7	12.3	12.7
0.20	0.157	1.8	13.3	15.0	15.0
ПХ – 1.8 нМ, $H_2O_2$ – 1.0 мМ, $H_2SO_4$ – 0.1 мМ, катализатор – родий					
0	0.012	0.1	1.0	–	–
0.50	0.100	0.9	8.5	15.0	13.0
5.0	0.187	1.0	15.8	3.0	3.0

**Таблица 2.** Аналитические характеристики методик на основе реакции окисления трифениламин-4-сульфоната натрия пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена ( $c_{\text{ТФАС}} = 0.18 \text{ мМ}$ ,  $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1.0 \text{ мМ}$ ,  $c_{\text{Ir(IV)}} = 0.05 \text{ мкМ}$ ,  $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0.1 \text{ мМ}$ ,  $t = 110 \text{ с}$ )

Характеристика	ПХ, нМ	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мМ*	Ir(IV), нМ*	Rh(III), мкМ**
Диапазон определяемых концентраций (предел обнаружения)	0.1–5.0 ( $5.0 \times 10^{-2}$ )	1.0–3.0 (0.6)	20–60 (5.0)	0.25–2.5 ( $6.0 \times 10^{-2}$ )
Уравнение линейной регрессии ( $R^2$ )	$A = 0.41c_{\text{ПХ}} + 0.02$ (0.994)	$A = 1.7c_{\text{H}_2\text{O}_2} + 0.02$ (0.991)	$A = 0.28c_{\text{Ir}} + 0.05$ (0.990)	$A = 0.13c_{\text{Rh}} + 0.35$ (0.990)

\*  $c_{\text{ПХ}} = 1.2 \text{ нМ}$ , \*\*  $c_{\text{ПХ}} = 1.8 \text{ нМ}$ .

основе реакции окисления ТФАС пероксидом водорода представлены в табл. 2.

Сравнили аналитические характеристики определения ПХ с использованием реакций окисления ТФАС и коммерчески доступных АБТС и ТМБ. Реакции пероксидазного окисления АБТС и ТМБ (0.1 мМ) проводили в Na-ацетатном буферном растворе (0.1 М, рН 5.0), начало реакции инициировали добавлением раствора пероксида водорода (0.1 мМ). Полученные данные показывают, что аналитические характеристики предложенной нами методики в выбранных условиях лишь незначительно уступают характеристикам методики окисления АБТС ( $5.0 \times 10^{-3}$ –5.0 нМ, предел обнаружения  $1.0 \times 10^{-3}$  нМ) и сопоставимы с таковыми для методики окисления ТМБ ( $5.0 \times 10^{-2}$ –5.0 нМ, предел обнаружения  $2.0 \times 10^{-2}$  нМ). Кроме того, субстрат ТФАС устойчив к действию окислителей различной природы.

\* \* \*

Таким образом, показана возможность использования ТФАС в качестве альтернативного субстрата ПХ для различных областей применения. ТФАС соответствует требованиям, предъявляемым к субстратам для ферментативных методов анализа, а именно имеет определенный состав продукта окисления, характеризуется высоким молярным коэффициентом поглощения в длинноволновой области спектра, хорошо растворим в водных растворах [21]. В то же время существенным отличием ТФАС является его устойчивость в присутствии широкого круга окислителей.

Впервые изучены кинетические закономерности пероксидазного окисления ТФАС пероксидом водорода в присутствии каталитически активных форм Ir(IV) и Rh(III), которые позволили объяснить их активирующее влияние и предположить механизм реакции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Проблемы аналитической химии. Т. 12. Биохимические методы анализа / Под ред. Дзантиева Б.Б. М.: Наука, 2010. 392 с.
2. Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В., Веселова И.А. Ферментативные методы анализа: новые подходы и области применения // Известия АН. Сер. хим. 2007. № 4. С. 583.
3. Ngo T.T. Peroxidase in chemical and biochemical analysis // Anal. Lett. 2010. V. 43. № 10–11. P. 1572.
4. Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Оптические сенсорные системы на основе полиэлектролитного комплекса пероксидазы с хитозаном для определения биологически активных веществ // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 1. С. 48.
5. Григоренко В.Г., Андреева И.П., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Рекомбинантная пероксидаза хрена: получение и использование в аналитических целях (обзор) // Биохимия. 2015. Т. 80. № 4. С. 480.
6. Преснова Г.В., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена // Рос. хим. журн. 2008. Т. 52. № 2. С. 60.
7. Захарова Г.С., Уноров И.В., Тишков В.И. Пероксидаза из корней хрена: модулирование свойств химической модификацией белковой глобулы и гема // Успехи биол. химии. 2011. Т. 51. С. 37.
8. Azevedo A.M., Martins V.C., Prazeres D.M., Vojinovic V., Cabral J.M., Fonseca L.P. Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology // Biotechnol. Annu. Rev. 2003. V. 9. № 3. P. 1387.
9. Родионов П.В., Алиева Е.А., Сергеева Е.А., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Определение пероксида водорода и органических пероксидов в мицеллярных и водно-органических средах с использованием спектрофотометрического биосенсора на основе пероксидазы из корней хрена // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 9. С. 971.
10. Veselova I.A., Malinina L.I., Rodionov P.V., Shekhovtsova T.N. Properties and analytical applications of the self-assembled complex {peroxidase-chitosan} // Talanta. 2012. V. 102. P. 101.
11. Poliakov A.E., Dumshakova A.V., Muginova S.V., Shekhovtsova T.N. A peroxidase-based method for the determination of dopamine, adrenaline, and  $\alpha$ -methyl dopa in the presence of thyroid hormones in pharmaceutical forms // Talanta. 2011. V. 84. № 3. P. 710.

12. *Мугинова С.В., Веселова И.А., Парова Л.М., Шеховцова Т.Н.* Ферментативное определение кадмия, цинка и свинца в растительных объектах // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63. № 10. С. 1103.
13. *Zhang Z., Lai J., Wu K., Huang X., Guo S., Zhang L., Liu J.* Peroxidase-catalyzed chemiluminescence system and its application in immunoassay // *Talanta*. 2018. V. 180. P. 260.
14. *Fornera S., Walde P.* Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine // *Anal. Biochem.* 2010. V. 407. № 2. P. 293.
15. *Метелица Д.И., Карасёва Е.И.* Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидазных системах (обзор) // *Прикладная биохимия и биомедицина*. 2007. Т. 43. № 5. С. 537.
16. *Зубарева И.С., Колонтаева О.А., Чернозубова Е.В., Бурмистрова Н.А.* Сенсорные микропланшеты для определения пероксидазы хрена на основе реакции окисления трифениламин-4-сульфоукислоты пероксидом водорода // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер: Химия. Биология. Экология*. 2017. Т. 17. № 1. С. 10.
17. *Никоноров П.Г., Муштакова С.П., Бурмистрова Н.А., Кожина Л.Ф.* Каталиметрическое определение родия на основе реакции окисления трифениламин-4-сульфоукислоты периодатом натрия // *Журн. аналит. химии*. 2004. Т. 59. № 2. С. 161.
18. *Никоноров П.Г., Бурмистрова Н.А., Муштакова С.П.* Трифениламин-4-сульфоукислота в каталиметрическом определении платиновых металлов // *Журн. аналит. химии*. 2008. Т. 63. № 4. С. 432.
19. *Наумчик И.В., Карасева Е.И., Метелица Д.И., Едичмечева И.П.* Ингибирование пероксидазного окисления 3,3',5,5' – тетраметилбензидина аминаофенолами // *Биохимия*. 2005. Т. 70. С. 397.
20. *Карасева Е.И., Гапоник П.Н., Метелица Д.И.* Влияние тетразола и его аминаопродуктов на кинетику пероксидазного окисления хромогенных субстратов // *Журн. биоорган. химии*. 2004. Т. 30. № 3. С. 316.
21. *Shivakumar A.* Role of peroxidase in clinical assays: A short review // *J. Clin. Nutr. Diet.* 2017. V. 3. № 2. P. 1.