

УДК 544.47

**ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ Fe@C
В РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ О-ФЕНИЛЕНДИАМИНА****Сургутская Н.С., Постников П.С., Галанов А.И.***ГОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»,
Томск, e-mail: surgutskaya.natalya@yandex.ru*

Целью настоящей работы являлось исследование возможности использования наночастиц железа, покрытых углеродной оболочкой Fe@C в качестве каталитической системы для окисления основных субстратов пероксидазы. В качестве маркера пероксидазной активности наночастиц использовался о-фенилендиамин (OPD), который при окислительной димеризации легко превращается в 2,3-диаминофеназин (DAP) с максимумом поглощения при 420–450 нм. Наночастицы показали себя как эффективная каталитическая система, способная генерировать и стабилизировать гидроксид-радикалы из пероксида водорода подобно пероксидазе и окислять хромогенные субстраты фермента при нормальных условиях (pH = 6 и температуре 20–25 °C). Также определены основные каталитические параметры процесса и оптимальные значения pH и температуры, при которых достигается максимум активности наночастиц. Установлено, что кинетика процесса описывается уравнением Михаэлиса–Ментен для ферментативной кинетики.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, пероксидазная активность, о-фенилендиамин**PEROXIDASE-LIKE ACTIVITY OF Fe@C NANOPARTICLES
IN OXIDATION REACTION OF O-PHENYLENEDIAMINE****Surgutskaya N.S., Postnikov P.S., Galanov A.I.***National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, e-mail: surgutskaya.natalya@yandex.ru*

The aim of this work is investigation of the catalytic activity of Fe-core/carbon shell nanoparticles in reaction of basic peroxidases substrates oxidation. O-phenylenediamine (OPD) was used as a marker for detection of nanoparticles peroxidase-like activity. OPD is easily converted into dimerization product – 2,3-diaminophenazine (DAP) with absorption maximum in 420–450 nm. Nanoparticles proved as effective catalytic system, which able to generate and stabilize the hydroxide radicals from hydrogen peroxide as peroxidase. The obtained complex is able to oxidize the peroxidase chromogenic substrates at normal conditions (pH = 6 and temperature is 20–25 °C). Also, the main catalytic parameters and optimal parameters of pH and temperature for maximum nanoparticles activity were determined. Established, that the kinetic of this process described by the Michaelis-Menten equation for enzyme kinetics.

Keywords: magnetic nanoparticles, peroxidase-like activity, o-phenylenediamine

Сравнительно недавно был получен принципиально новый класс наноматериалов – наночастицы металлов, покрытые углеродной оболочкой [6, 2]. Благодаря своей структуре такие наночастицы обладают повышенной стабильностью благодаря защите металлического ядра углеродной оболочкой от факторов внешней среды, кроме того, их поверхность может быть легко модифицирована с использованием химических методов [6, 4].

Наночастицы Fe@C уже показали себя как перспективные агенты для магниторезонансной томографии [1] и целевой доставки противоопухолевых препаратов [3]. Уникален и механизм действия наночастиц в организме, связанный со способностью разрушать клетки опухоли, нарушая ее однородность. Предположительно, этот факт связан со способностью наночастиц катализировать процессы оксидативного стресса вблизи околклеточной мембраны опухоли и разрушать ее. Очевидно, это связано со способностью наночастиц металлов, имеющих на поверхности активные центры, участвовать в типичных фермент-катализируемых реакциях разложения пероксида

водорода с образованием гидроксид-радикалов [5]. Оценка активности металл-углеродных, и, в частности, железоуглеродных наночастиц, в процессах генерации активных форм кислорода не проводилась.

В связи с этим целью настоящей работы являлось исследование каталитической активности наночастиц Fe@C в процессах разложения перекиси водорода и окисления хромогенных субстратов пероксидазы, а также изучение кинетических характеристик данного процесса.

Материалы и методы исследования

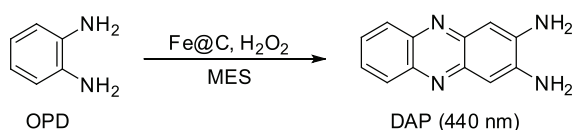
В качестве объекта исследования использовали наночастицы железа, покрытые углеродом (Fe@C) полученные методом электроимпульсного диспергирования в гексане [2]. Согласно данным, приведенным в работе [2], используемые частицы имеют в своем составе металлическое ядро, закрытое пленкой карбидов железа переменного состава, поверхность частиц покрыта пленкой гексагонального графита. Используемые частицы имеют сферическую форму со среднечисловым распределением по размерам 10–140 нм, удельная поверхность – 55,2 м²/г.

Исследование пероксидазной активности наночастиц Fe@C проводили по методике [7], основанной на протекании процесса димеризации О-фенилендиамина (OPD) с образованием

хромогенного субстрата – 2,3-диаминофеназина (DAP). Оценку пероксидазной активности проводили при нормальных условиях: pH 6,0 при температуре 20°C. Для этого методом ультразвукового диспергирования были приготовлены серии суспензий наночастиц Fe@C в 2,5 мл буферного раствора 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES) при концентрации 0,05 М и pH 6,0 при 20°C. Концентрация частиц во всех опытах составляла 0,5 мг/мл. К полученной суспензии добавляли 0,4 мл 0,0022 М раствора OPD и 1,2 мл перекиси водорода с диапазоном концентраций 0,017–0,5 М. Отбор проб осуществлялся через каждые 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 минут. Каждая проба анализировалась фотометрическим методом на УФ-спектрофотометре SF-102 при длине волны 440 нм. Из данных спектрофотометрических измерений оценивалась общее содержание целевого продукта пероксидазного окисления (DAP). Концентрации реагентов рассчитывали из полученных значений поглощения согласно закону Бугера–Ламберта–Бэра используя молярный коэффициент абсорбции $13000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для DAP [8].

Результаты исследования и их обсуждение

Наночастицы железа, покрытые углеродом способны катализировать окисление хромогенных субстратов пероксидазы при комнатной температуре с образованием коричнево-оранжевого продукта реакции, имеющего максимум поглощения при 420–450 нм по реакции:



При протекании данной реакции под действием Fe@C на спектре поглощения реакционной массы наблюдается появление полосы поглощения в области 420 нм, свидетельствующее об образовании целевого продукта реакции – 2,3-диаминофеназина (DAP), а также наблюдается снижение поглощения при 290 нм, ассоциируемого с OPD. При проведении реакции в отсутствие катализатора в реакционной массе не наблюдается образование продукта димеризации.

Основные кинетические параметры реакции определяли по известным методикам [5, 7, 9] посвященные изучению кинетики известных качественных реакций с субстратами пероксидазы и нахождению основных параметров каталитической активности наночастиц при комнатной температуре.

Расчет скорости реакции при различных концентрациях вносимой перекиси водорода определяли по тангенсу угла наклона линейного участка кривой зависимости изменения концентрации DAP от времени реакции. Кривая, представленная на рис. 1,

подтверждает, что реакция окисления, катализируемая наночастицами Fe@C, соответствует кинетическому уравнению Михаэлиса-Ментен для ферментативной кинетики [5]. Трансформация полученной кривой, согласно методу Лайнуивера–Берка [7], позволяет определить основные каталитические параметры реакции.

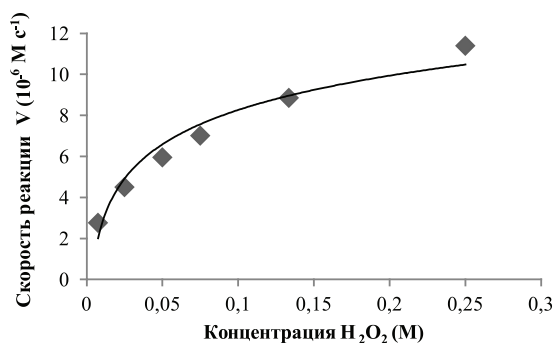


Рис. 1. Зависимость скорости реакции катализируемой наночастицами Fe@C от концентрации перекиси водорода

Рассчитанные кинетические параметры сравнивали с известными литературными данными для пероксидазы хрена (HRP). Значение константы Михаэлиса для наночастиц по отношению к H₂O₂ составляет 37,1 мМ, что почти в 10 раз выше, чем для HRP. Этот факт свидетельствует, что для достижения максимальной активности наночастицы требуют большую концентрацию H₂O₂ чем для фермента HRP. При этом скорость протекания реакции составляет $1,11 \cdot 10^{-5} \text{ M c}^{-1}$ и на несколько порядков превышает данный показатель для фермента. Данный факт связан с увеличением активных центров разложения перекиси на поверхности наночастиц по сравнению с ферментом, содержащим только один активный центр.

Исследование кинетики проводили при нормальных условиях, однако на скорость протекания процесса оказывают влияние внешние факторы, такие как pH, температура, концентрация вносимой H₂O₂ и концентрация катализатора. Пероксидазную активность наночастиц исследовали, изменяя pH в пределах 1,61–12 и температуру в пределах 25–40°C и сравнивали полученные данные с оптимальными условиями для работы фермента. Оптимальные значения pH и температуры лежат в пределах 4,0 и 30°C и схожи с оптимальными значениями для фермента, как представлено на рис. 2, 3.

Исследовано влияние концентрации наночастиц на скорость протекания реакции окисления OPD, как показано на рис. 4.

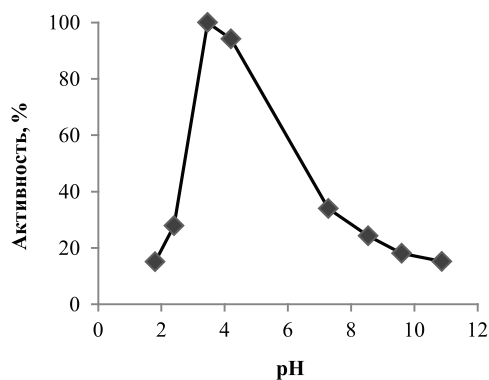


Рис. 2. Кривая зависимости относительной активности наночастиц от pH раствора

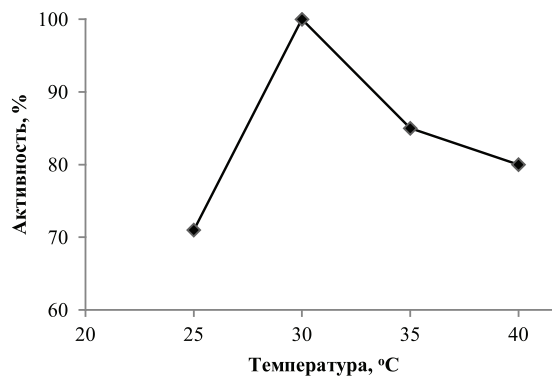


Рис. 3. Кривая зависимости активности наночастиц от температуры

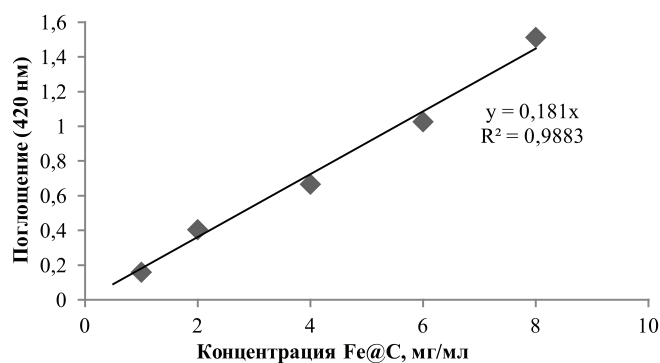


Рис. 4. Кривая зависимости поглощения от концентрации наночастиц

Полученная линейная зависимость поглощения при 420 нм от концентрации наночастиц с коэффициентом корреляции 0,987 свидетельствует о возможности применения данных свойств наночастиц в аналитических целях. Предельная концентрация наночастиц в этом составляет 8 мг/мл. При увеличении концентрации свыше 8 мг/мл наблюдается резкое снижение скорости реакции вследствие агломерации наночастиц в растворе.

Заключение

Наночастицы железа, покрытые углеродной оболочкой, проявляют ярко выраженные пероксидазные свойства, вследствие чего являются эффективными катализаторами для генерации гидроксид-радикалов в окислительных процессах. Катализ с использованием Fe@C протекает по типичному механизму ферментативной кинетики, и предложенные системы могут быть использованы в различных процессах селективного окисления органических соединений.

Работа выполнена при поддержке финансовой поддержки РФФИ, грант № 13-03-98009.

Список литература

1. Бородин О.Ю., Беблянин М.Л., Филимонов В.Д., Ермаков А.Е., Федущак Т.А., Постников П.С., Антипов С.А., Трусова М.Е., Усов В.Ю. Возможности применения супермагнитных поверхностно карбонизированных наносфер оксида железа в качестве контрастного препарата для Т2-взвешенных МР-томографических исследований // Медицинская визуализация. Спец. Вып. – 2009. – С. 69–70.
2. Галанов А.И., Юрмазова Т.А., Митькина В.А., Савельев Г.Г., Яворовски Н.А., Лобанова Г.Л. Магнитные наночастицы, получаемые электроимпульсным методом, их физико-химические свойства и взаимодействие с доксорубицином и плазмой крови // Перспективные материалы. – 2010. – № 4. – С. 49–55.
3. Галанов А.И., Юрмазова Т.А., Савельев Г.Г., Булдаков М.А., Рудык Ю.В., Литвяков Н.В., Нечаев К.А., Тузииков С.А., Чердынцева Н.В., Яворовский Н.А. Разработка магнитоуправляемой системы для доставки химиопрепаратов на основе наноразмерных частиц железа // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 3. – С. 50–57.
4. Постников П.С., Трусова М.Е., Федущак Т.А., Уйман М.А., Ермаков А.Е., Филимонов В.Д. Арилдиазоний тозилаты как новые эффективные агенты ковалентной прививки ароматических групп к углеродным оболочкам металлических наночастиц // Российские Нанотехнологии. – 2010. – Т. 5. – № 7–8. – С. 15–16.
5. Gao L., Zhuang J., Nie L., Zhang J., Zhang Y., Gu N., Wang T., Feng J., Yang D., Perrett S., Yan X. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles // Nature Nanotechnology. – 2007. – Vol. 2. – P. 577–583.
6. Grass R.N., Athanassiou E.K., Stark W.J. Covalently functionalized cobalt nanoparticles as a platform for magnetic

separation in organic synthesis // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – Vol. 46. – P. 4909–4912.

7. Hamilton T.M., Dobie-Galuska A.A., Wietstock S.M. The o-phenylenediamine-horseradish peroxidase system: enzyme kinetics in the general chemistry laboratory // *Journal of Chemical Education.* – 1999. – Vol. 70. – № 5. – P. 642–644.

8. Fu P.K.-L., Abuzakhm S., Turro C. Photoinduced DNA cleavage and cellular damage in human dermal fibroblasts by 2,3-Diaminophenazine// *Photochemistry and Photobiology.* – 2005. – Vol. 81. – P. 89–95.

9. Zhang X., Gong S., Zhang Y., Yang T., Wang C., Gu N. Prussian blue modified iron oxide magnetic nanoparticles and their high peroxidase-like activity X.Zhang// *J. Mater. Chem.* – 2010. – Vol. 20. – P. 5110–5116.

5. Gao L., Zhuang J., Nie L., Zhang J., Zhang Y., Gu N., Wang T., Feng J., Yang D., Perrett S., Yan X., *Nature Nanotechnology*, 2007, Vol. 2, pp. 577–583.

6. Grass R.N., Athanassiou E.K., Stark W.J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, Vol. 46, pp. 4909–4912.

7. Hamilton T.M., Dobie-Galuska A.A., Wietstock S.M., *Journal of Chemical Education*, 1999, Vol. 70. no. 5, pp. 642–644.

8. Fu P.K.-L., Abuzakhm S., Turro C., *Photochemistry and Photobiology*, 2005, Vol. 81, pp. 89–95.

9. Zhang X., Gong S., Zhang Y., Yang T., Wang C., Gu N., *J. Mater. Chem.*, 2010, Vol. 20, pp. 5110–5116.

References

1. Borodin O.Yu., Belyanin M.L., Filimonov V.D., Ermakov A.E., Fedushchak T.A., Postnikov P.S., Antipov S.A., Trusova M.E., Usov V.Yu., *Medical visualization*, 2009, Special issue, pp. 69–70.

2. Galanov A.I., Yurmasova T.A., Mitkina V.A., Savelyev G.G., Yavorovsky N.A., Lobanova G.L., *Perspectivematerials*, 2010, no. 4, pp. 49–55.

3. Galanov A.I., Yurmasova T.A., Savelyev G.G., Buldakov M.A., Rudyk Yu.V., Litvyakov N.V., Nechaev K.A., Tuzikov S.A., N.V. Cherdyntseva, N.A. Yavorovsky, *Siberian Journal of Oncology*, 2008, no. 3, pp. 50–57.

4. Postnikov P.S., Trusova M.E., Filimonov V.D., Fedushchak T.A., Uimin M.A., Ermakov A.E., *Nanotechnologies in Russia*, 2010, Vol. 5. no. 7–8, pp. 15–16.

Рецензенты:

Юсубов М.С. Оглы, д.х.н., профессор, зав. кафедрой технологии органических веществ и полимерных материалов Института природных ресурсов Национального исследовательского Томского политехнического университета, г. Томск;

Романенко С.В., д.х.н., профессор, зав. кафедрой экологии и безопасности жизнедеятельности Института неразрушающего контроля, Национального исследовательского Томского политехнического университета, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 17.01.2014.