

СОДЕРЖАНИЕ

Том 77, номер 6, 2022

**Работы по аналитической химии,
выполненные в Казани.
Редактор-составитель — Г.К. Будников**

Предисловие к специальному выпуску 489

ОБЗОРЫ

Биоэлектрохимия как область анализа: исторические аспекты и современное состояние
Е. В. Супрун, Г. К. Будников 490

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Вольтамперометрическое определение тартразина на электроде, модифицированном наночастицами диоксида церия и цетилтрифенилфосфоний бромидом
Г. К. Зиятдинова, Г. К. Будников 514

Пероксидаза хрена — аналитические возможности при определении зеараленона
Э. П. Медянцева, Р. М. Бейлинсон, А. И. Николаенко, Г. К. Будников 522

Селективное вольтамперометрическое и проточно-инжекционное амперометрическое определение ацикловира и валацикловира на электроде с композитом восстановленный оксид графена-полиглициновая пленка
Л. Г. Шайдарова, А. В. Гедмина, А. А. Поздняк, И. А. Челнокова, Г. К. Будников 533

Спектрофотометрическое определение аминокислотных лекарственных препаратов в мицеллярных матрицах при использовании планов Бокса–Бенкена
Р. Ф. Бакеева, С. Ю. Гармонов, О. Е. Вахитова, В. Ф. Сопин 540

Анализ анионных поверхностно-активных веществ и моющих средств на содержание δ -гексадекансульфоната методом газовой хромато-масс-спектрометрии
Л. Р. Мубаракова, Г. К. Будников 550

ИСТОРИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Развитие газовой хроматографии в Казани
А. В. Танеева, В. Ф. Новиков 557

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Учет матричных эффектов при спектрометрическом определении следов элементов с использованием метода одной стандартной добавки
Ю. М. Садагов, О. А. Тютюнник, И. В. Кубракова, А. Ю. Садагов 563

Управление селективностью разделения дикофеоилхиновых кислот в обращенно-фазовой хроматографии
В. И. Дейнека, Е. Ю. Олейниц, А. Н. Чулков, Л. А. Дейнека 569

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ

Лаборатория спектральных и хроматографических исследований
Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН
Р. С. Борисов, А. Ю. Канатьева 576

ПРЕДИСЛОВИЕ К СПЕЦИАЛЬНОМУ ВЫПУСКУ

DOI: 10.31857/S0044450222060056

Настоящий номер журнала содержит статьи, подготовленные аналитиками Казани в рамках развиваемых ими научных направлений. Авторы статей в основном являются работниками университетов, для них оценка их публикационной активности — мерило профессионального уровня. Акцент на вузы сделан не случайно. Исторически ситуация в Казани сложилась так, что в научно-исследовательских институтах, в том числе в институтах Академии наук, исследования в области аналитической химии, ее методологии фактически не проводились. Исключение может составить короткий период всплеска интереса к хроматографии в Институте органической и физической химии Академии наук СССР, проявленный М.С. Вигдергаузом и его сотрудниками и отраженный в ряде публикаций в российских журналах, но и эта область получила в дальнейшем развитие не в Академии наук, а в Казанском государственном энергетическом университете, в работах В.Ф. Новикова, ученика М.С. Вигдергауза, что отражено в этом выпуске журнала.

В статьях выпуска, посвященных становлению и развитию научных школ в Казани, акцент сделан на электроаналитическую химию, электрохимию органических соединений и создание соответствующей аппаратуры, преимущественно вольтамперометрической. Во второй половине прошлого века труды в этих направлениях позволили создать своего рода визитную карточку Казани среди аналитиков. Сейчас картина заметно изменилась, общий тренд связан с решением проблем органического анализа в рамках биомедицины. Современная электроаналитическая химия в Казани получила развитие в рамках концепции сенсоров (биосенсоров). Многие другие методы (спектроскопия, хроматография, хро-

то-масс-спектрометрия) используются в лабораториях промышленных предприятий и различных служб; здесь решаются актуальные вопросы, которые поставлены требованиями производства. В первую очередь, это оценка качества выпускаемой продукции и состояния окружающей среды.

Не будет преувеличением сказать, что аналитики сегодня работают в обстановке, когда имеется социальный запрос на стремление сохранить и укрепить свое здоровье; отсюда необходимость систематического контроля и объективной оценки состояния организма. Здесь без методов химического анализа не обойтись, ведь человек постоянно имеет дело с биологически активными веществами, а они оказывают влияние на его здоровье либо через среду обитания, либо по пищевым цепям. Проведение же аналитиками исследований биомедицинских объектов оказывает влияние на методологию аналитической химии как науки. Даже по казанской аналитике последних лет можно сказать, что, вступая в “гуманитарную” сферу, аналитика корректирует свою парадигму, оставаясь точной и преимущественно прикладной наукой. Изменяются подходы к проведению исследований, их приемы и методы и даже способы интерпретации полученных данных. Заметно меняется и психология исследователей. Упомянутые тенденции в развитии аналитики можно увидеть и в статьях этого номера.

В одном выпуске журнала трудно полно представить все, что делается в Казани в области аналитической химии. Дополнительную информацию об аналитиках и аналитической химии в Казани можно найти на сайтах университетов.

Г.К. Будников

УДК 543.55;541.69;577.322.9;577.323.2

Посвящается 100-летию открытия полярографии Я. Гейровским

БИОЭЛЕКТРОХИМИЯ КАК ОБЛАСТЬ АНАЛИЗА: ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

© 2022 г. Е. В. Супрун^а*, Г. К. Будников^б^аНаучно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
ул. Погодинская, 10, стр. 8, Москва, 119121 Россия^бКазанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
ул. Кремлевская, 29/1, Казань, 420008 Россия

*e-mail: lenasuprun@mail.ru

Поступила в редакцию 01.09.2021 г.

После доработки 19.11.2021 г.

Принята к публикации 19.11.2021 г.

В обзоре рассмотрены исторические аспекты становления и развития биоэлектрохимии и некоторые вопросы аналитического применения электрохимических методов (преимущественно вольтамперометрии и родственных методов) в исследовании свойств биологически активных соединений и биополимеров в контексте интересов биохимии и медицины. Отмечена важность учета процессов на поверхности электродов, генерирующих аналитический сигнал. Обзор затрагивает принципы прямого электрохимического анализа биополимеров (белков и нуклеиновых кислот) за счет электроактивности аминокислотных остатков, редокс активных центров, остатков нуклеиновых оснований на немодифицированных электродах. Обсуждается электрохимическое поведение белков, пептидов, олигонуклеотидов, одно- и двунитевых молекул нуклеиновых кислот с точки зрения их пространственной структуры. Сделан акцент на направлениях развития биоэлектрохимии.

Ключевые слова: биоэлектрохимия, белок, нуклеиновая кислота, биополимер, молекулярная структура.**DOI:** 10.31857/S0044450222060184

ТЕРМИН “БИОЭЛЕКТРОХИМИЯ”

Применение методов и подходов электрохимии к изучению биомолекул стало выделяться в отдельную область знаний около полувека тому назад, хотя первые работы были опубликованы несколько ранее. Междисциплинарный характер данной области формировался постепенно, и термин “биоэлектрохимия” появился не сразу. К настоящему моменту он не имеет четких границ, поскольку в его дефиницию включены несколько концепций и познавательных подходов, объединенных приставкой “био-”. Тем не менее представляют интерес исторические аспекты становления и развития биоэлектрохимии в формате движения идей, направленных на решение аналитических задач.

В 1979 г. по инициативе Джулио Милаццо было создано международное Биоэлектрохимическое общество, официально зарегистрированное в 1981 г. во Франции (Bioelectrochemical Society, BES, <http://www.bioelectrochemical-soc.org>). Интересно, что за несколько лет до этого Милаццо был участником VI Дискуссии Гейровского (1972 г.,

замок Либлице, недалеко от Праги), посвященной вопросам электроаналитической химии применительно к биомедицине. В настоящее время продолжается серия симпозиумов Биоэлектрохимического общества под названием “Biannual Symposium series of the Society on Bioelectrochemistry and Bioenergetics”, начатая еще в 1971 г., а выпускаемый с 1974 г. международный журнал “Bioelectrochemistry and Bioenergetics” с 2000 г. сменил свое название на “Bioelectrochemistry” (официальный сайт: <https://www.journals.elsevier.com/bioelectrochemistry>). Журнал посвящен электрохимическим принципам в биологии и биологическим аспектам электрохимии. В год 40-летия Общества, в мае 2021 г. Биоэлектрохимический симпозиум прошел в двадцать шестой раз, впервые в онлайн формате (XXVI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society, <http://www.bes2021.org>). Следует упомянуть, что чешская традиция проводить Дискуссии Гейровского также сохранилась (<http://www.physchem.cz>), и почти полвека спустя конференция

была посвящена электрохимии биологически активных соединений, включая биополимеры.

Интерес представляет сама история появления в науке электрохимии термина с приставкой “био-”. Хотя биология и химия возникли независимо друг от друга, связь между соответствующими науками была осознана лишь в XIX в., когда естествоиспытатели стали целенаправленно проводить эксперименты с живыми организмами при воздействии на них различных физических факторов. Электрические эксперименты, в своем названии с приставкой “био-”, впервые были проведены еще в конце XVIII века. В 1771 г. итальянский анатом и физиолог Луиджи Гальвани открыл и исследовал феномен сокращения мышц препарированной лягушки под влиянием электрического тока [1]. Наблюдая сокращение мышц при соединении их металлом с нервами или спинным мозгом, он обратил внимание на то, что мышца сокращается при одновременном прикосновении к ней двух разных металлов. Гальвани объяснил эти явления существованием “животного электричества”, благодаря которому мышцы заряжаются подобно лейденской банке. Сами явления, открытые Гальвани, долгое время называли “гальванизмом”. В 1790-х гг., заинтересовавшись “животным электричеством”, итальянский физик и физиолог Алессандро Вольта провел ряд опытов и показал, что наблюдаемые Гальвани явления были связаны с наличием замкнутой цепи, состоящей из двух разнородных металлов и жидкости. Вольта считал причины “гальванизма” физическими, а физиологические действия — одними из проявлений этого физического процесса. Проведя опыты с разными парами электродов, Вольта установил, что физиологическое раздражение нервов тем сильнее, чем дальше отстоят друг от друга два металла в следующем ряду: цинк, оловянная фольга, олово, свинец, железо, латунь и т.д., до серебра, ртути, графита. Этот знаменитый ряд напряжений (активностей) Вольты и составлял ядро эффекта; мышца лягушки была лишь пассивным, хотя и очень чувствительным электрометром, а активными звеньями являлись металлы, от контакта которых и происходила их взаимная электризация. Проводя многочисленные сравнительно-физиологические опыты, Вольта наблюдал у животных большую электрическую возбудимость нервов по сравнению с мышцами, а также гладкой мускулатуры кишечника и желудка по сравнению со скелетной. Он обнаружил электрическую раздражимость органов зрения и вкуса у человека [1]. Сегодня изучением гальванических эффектов в биологии занимается электрофизиология, отцом которой можно по праву считать Гальвани. Отдавая дань истории, традиционно раз в два года Биоэлектрохимическое общество вручает приз имени Луиджи Гальвани молодому ученому, внесшему наиболее весомый вклад в область био-

электрохимии (<http://www.bioelectrochemical-soc.org/awards-LuigiGalvani.php>).

Под приставкой “био-” в термине “биоэлектрохимия” подразумевают биологически активные вещества, биополимеры (белки, нуклеиновые кислоты), целые клетки и живые организмы. Первые работы, посвященные электрохимическому поведению белков на ртутном электроде, появились в начале 1930-х гг., т.е. менее чем через десять лет после открытия полярографии Ярославом Гейровским. Если период практического использования электрохимических методов, начиная с полярографии, в анализе биомедицинских объектов охватывает сто лет, то собственно биоэлектрохимия как междисциплинарный раздел науки появился сравнительно недавно. В настоящее время термин “биоэлектрохимия” включает в себя достаточно широкий спектр направлений, так или иначе связанных с живыми системами и регистрацией переноса электронов. Биоэлектрохимия изучает электрохимические закономерности, лежащие в основе биологических процессов (в частности, передачи информации по нервным волокнам, преобразования энергии, фотосинтеза, рецепции), а также воздействие внешних электрических и магнитных полей на биологические системы [2]. Общая стадия всех упомянутых процессов — разделение зарядов (ионов и электронов), реализующееся в ходе окислительно-восстановительной реакции или при транспорте ионов через мембраны. Это приводит к возникновению мембранного потенциала и градиентов концентрации ионов между внутренней частью клетки и окружающей средой. Свободная энергия, накопленная в виде мембранного потенциала или концентрационных градиентов, обеспечивает генерацию и передачу нервных импульсов, синтез АТФ, некоторые виды механического движения и т.п. Согласно Березовчуку [3], биоэлектрохимия изучает структуру и свойства мембран живых клеток, механизм переноса ионов через мембрану, природу скачка потенциала на мембране живой клетки, механизм передачи потенциала вдоль нервного волокна. Знание механизма работы клеточной мембраны позволит сконструировать различные приборы, работающие по принципу живой клетки. Добавим, что, с другой стороны, процессы переноса ионов в живых системах могут быть смоделированы с использованием знаний ионометрии — одного из разделов электрохимии. Таким образом, биоэлектрохимия — это научное направление, предмет которого — электрохимические аспекты работы живых систем [4]. Под термином “биоэлектрохимия” в настоящее время также понимают область электрохимии, связанную с изучением электрохимических свойств биомолекул и разработкой способов их электрохимического определения в биообразцах.

Новое “дыхание” биоэлектрохимии дало появление биосенсоров: в 1962 г. Кларк и Лайонс [5]

предложили концепцию “ферментных мембранных электродов”. Раствор фермента (например, глюкозооксидазы или уреазы) должен был быть помещен между двумя мембранами на поверхности электрода, регистрирующего убыль субстрата или прирост продукта ферментативной реакции. В качестве сенсорного элемента были использованы рН- и pO_2 -электроды. Идея авторов заключалась в использовании свойств ферментов для определения концентрации аналита при проведении сердечно-сосудистых операций и для послеоперационного прогноза состояния пациента [5]. Таким образом, биосенсоры — это химические сенсоры, в которых распознающая система основана на биохимическом механизме. Согласно определению, принятому в 1999 г. Международным союзом теоретической и прикладной химии (ИЮПАК) [6], химический сенсор представляет собой устройство, трансформирующее химическую информацию, начиная с концентрации компонента и заканчивая композиционным составом, в аналитический сигнал. Химические сенсоры обычно состоят из двух основных частей: химической (молекулярной) распознающей системы (рецептора) и физико-химического трансдюсера. Биологическая распознающая система передает информацию от биохимического рецептора, обычно о концентрации определяемого вещества, в виде химического или физического выходящего сигнала с определенной чувствительностью. Согласно рекомендациям ИЮПАК [6], термин “биосенсор” следует отделять от аналитических систем, которые включают в себя дополнительные стадии разделения (такие как высокоэффективная жидкостная хроматография), вспомогательные устройства и/или обработку образца введением специальных реагентов (например, проточно-инжекционный анализ). Таким образом, биосенсор должен представлять собой аналитическое устройство, не требующее дополнительных реагентов помимо природных косубстратов, необходимых для определения аналита. В то же время существует и альтернативная точка зрения: Энтони Тернер [7] подразделяет современные биосенсоры на (1) сложное, высокопроизводительное лабораторное оборудование, способное быстро, легко и точно детектировать биологические взаимодействия и определять интересующие компоненты; и (2) простые в использовании, портативные устройства, рассчитанные на широкий круг потребителей, для децентрализованного, *in situ* или домашнего анализа. Первые — дорогие, последние — массово производимые и доступные. Семейства биосенсоров — это иммунодатчики, биосенсоры на основе ферментов, а также биосенсоры на основе целых клеток. Биосенсоры были применены к широкому спектру аналитических проблем, включая использование в медицине, биомедицинских исследованиях, фармакологии, эко-

гии, пищевой промышленности, перерабатывающих отраслях, сфере безопасности. Самыми известными примерами аналитического устройства на основе электрохимического биосенсора служат коммерчески доступный глюкометр. Дизайн и изучение молекулярных и супрамолекулярных структур с молекулярными биорецепторными и биомиметическими свойствами для использования в аналитических устройствах также входит в область интересов биоэлектрохимии. Здесь основное внимание уделяется комплементарному пересечению молекулярного распознавания, нанотехнологии, молекулярного импринтинга и супрамолекулярной химии для улучшения аналитических характеристик и надежности устройств. Параллельно с биосенсорикой примерно в то же время возникла область биоэлектроники, которая стремится использовать биологию в сочетании с электроникой в более широком контексте, охватывая, например, биологические топливные элементы, бионики и биоматериалы для обработки и хранения информации. Ключевым аспектом здесь является интерфейс между биологическими материалами и микро- и нанoeлектроникой.

Относительно недавно вышли рекомендации ИЮПАК [8], касающиеся терминологии методов биоаналитической химии, анализа и исследования биомакромолекул. В них вводятся четкие определения, связанные с биоаналитическими образцами, ферментативными методами, иммуноаналитическими методами, методами, используемыми в геномике и анализе нуклеиновых кислот, протеомике, метаболомике, гликомике, липидомике и интерактомике [8]. Согласно рекомендациям 2018 г., в область биоаналитической химии входят выявление (идентификация, расшифровка последовательности), характеристика (полярность и заряд, структура, межмолекулярные взаимодействия), а также количественная оценка и мониторинг (стабильность, динамика, фрагментация, деградация, метаболизм и др.). Под термином “биосенсор” понимается измерительный инструмент (устройство, средство), не требующий дополнительных реагентов и обеспечивающий получение селективной качественной и/или количественной аналитической информации с использованием элемента биологического распознавания, который удерживается в непосредственном пространственном контакте с элементом трансдукции (преобразователем) [8].

БИБИОЭЛЕКТРОХИМИЯ: ИСТОРИЧЕСКАЯ РЕТРОСПЕКТИВА

История электрохимических методов анализа прослеживается с середины XIX в. [9]. Открытие в 1922 г. Ярославом Гейровским метода полярографии означало появление новой области электрохимии, в которой основным инструментом становится полярограф, позволяющий регистриро-

вать поляризационные кривые (полярограммы) ртутного капельного электрода в испытуемых растворах. Первое время объектами исследования служили, как правило, неорганические соединения, и развитие теории метода было связано с интерпретацией их полярографического поведения. В 1925 г. Шиката в лаборатории Гейровского в Праге зарегистрировал полярограмму первого органического соединения — нитробензола [10]. Если принять во внимание, что нитрогруппа входит в структуру многих органических соединений с биологической активностью, то можно принять эту дату началом аналитической биоэлектрохимии. Таким образом, все началось с полярографии низкомолекулярных органических соединений. Из личного опыта: один из авторов настоящего обзора в 1960 г. поступил в аспирантуру Химического института Казанского филиала Академии наук СССР (КФ АН СССР, Казань) по специальности “полярография органических соединений”. Объектами исследования были семи- и тиосемикарбазоны алдегидов и кетонов, из которых ряд веществ имел противотуберкулезную активность. В период обучения в аспирантуре была пройдена стажировка в Полярографическом институте Чехословацкой академии наук, инициированная Арбузовым и Китаевым. Стажировка проходила под патронажем Гейровского, получившего накануне Нобелевскую премию “за открытие и развитие полярографических методов анализа” (1959 г.). Обстановка в институте способствовала глубокому знакомству с работами в области полярографии в биомедицине и фармации. Таким образом, вначале полярографические методы успешно развивались как эффективные по тому времени средства исследования строения и реакционной способности органических соединений в процессах с участием электронов. Постепенно обширные сведения об электрохимических свойствах органических соединений в растворах становились востребованными при разработке способов их определения в различных объектах.

Потребовалось почти полвека исследований, чтобы показать, что в качестве материала для поляризуемого электрода в вольтамперометрии можно использовать не только ртуть, но и благородные металлы, их оксиды, различные углеродные материалы, пасты и композиты на их основе; помимо обычных стали использовать и так называемые модифицированные электроды. Появление стационарного твердого электрода означало переход от катодной (восстановление) к анодной (окисление) вольтамперометрии, что для органического анализа оказалось крайне перспективным. Размеры самих электродов уменьшились в десятки и даже сотни раз, а для достижения воспроизводимости их характеристик стали применять унифицированные способы изготовления, например, трафаретную печать. Одновременно

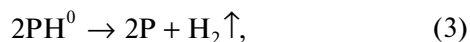
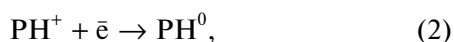
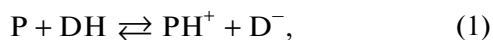
велись исследования по аппаратурной тематике, т.е. по совершенствованию приборов, обеспечивающих надежную регистрацию полезного сигнала по отношению к шуму (помехе) на принципах микроэлектроники. Современный вольтампереограф (потенциостат) мало напоминает набор реостатов и батарей Гейровского. Как правило, это небольшой блок, а иногда и плата, вставляемая в компьютер или смартфон. Например, такие мини-приборы успешно выпускает фирма “PalmSens” (Нидерланды, официальный сайт: www.palmsens.com), в частности, совместимый со смартфоном потенциостат “Sensit Smart”. Миниатюризация коснулась аппаратуры, электродов и электрохимических ячеек. Это связано с тем, что электроды стали использовать в качестве преобразователей сигнала в интегрированных устройствах, таких как проточные тонкослойные ячейки, микрофлюидные ячейки и “лаборатории на чипе”. Миниатюризация подобных систем позволила добиться выдающихся успехов в области снижения как определяемых концентраций аналитов, так и объема потребляемой пробы. Тем самым созданы предпосылки для очередного качественного скачка и перехода к имплантируемым устройствам, сочетающим функции врача-диагноста и лечебного средства. При этом определяемые количества аналита вполне могут спуститься на уровень пико- и фемтограммов в образце.

Отметим, что создание устройств, которые применяют в электрохимическом анализе, в том числе и в мобильном исполнении, возможно лишь на основе глубокого понимания как задач биоаналитической химии, так и природы процессов, происходящих на поверхности электрода. Аналитический отклик на изучаемое соединение формируется в ходе протекания на электроде процесса, часто состоящего из нескольких стадий [11]. Обычно собственно механизм электродной реакции остается вне интересов аналитика. Важно, чтобы отклик был повторяем в требуемых пределах. Тем не менее полезно иметь общие представления о механизме. Под механизмом понимают всю совокупность гетерогенных реакций переноса электронов на границе раздела электрод/раствор, а также химических гомогенных реакций вблизи электрода и в объеме раствора. Изучение механизма включает в себя определение последовательности этих электрохимических (Е) и химических (С) стадий, констант их скоростей, что позволяет выделить лимитирующую стадию переноса, а также чисел электронов и протонов, переносимых на одну молекулу, участвующую в реакции, установление других фундаментальных электрохимических характеристик отдельных стадий, определение природы образующихся частиц и так далее. Следует иметь в виду, что каждый электрохимический и химический процесс должен включать в себя только один элементарный акт [11]. В большинстве случаев лимитирую-

шей стадией процесса является одна из химических стадий, предшествующая, последующая или параллельная переносу электрона. Для установления природы продуктов реакций, образующихся на электроде, проводят электролиз при контролируемом потенциале, и затем продукты идентифицируют с помощью соответствующих физико-химических методов.

Необходимо отметить мировой тренд в электроаналитике в отношении объектов биомедицины. Из низкомолекулярных органических соединений в моде остаются различные флавоноиды, включая антиоксиданты [12]. Успехи наблюдаются и в области биосенсорики, в которой используют как природные, так и искусственные материалы для организации селективного отклика, включая “синтетические рецепторы” и “нанозимы” [13, 14]. Повторимся, сказав, что мы живем в век серьезных преобразований в областях биомедицины, а отсюда и в биоэлектрохимии. Здесь несомненный интерес для биоэлектроаналитиков представляют области с междисциплинарными взаимодействиями. Это – проблемы ранней диагностики заболеваний, функционирования клеток, контроля эффективности и токсичности лекарственных средств, контроля содержания пищевых красителей и т.д.

Белки. Началом электрохимии белков можно считать работу Гейровского и Бабицки 1930 г. [15], в которой при добавлении белка в полярографическую ячейку наблюдали появление на вольтамперограмме новой волны при потенциале -1.6 В (на 0.2 В более положительном, чем восстановление NH_4^+ -ионов аммиачного буферного раствора) [16]. Волну отнесли к процессу электрохимического восстановления водорода на поверхности ртути, катализируемого белком (рис. 1). Следом, в 1932 г., Герлз и Ванкура, два врача, изучающие по приглашению Гейровского полярографическую активность различных биологических жидкостей человека, зарегистрировали другой, менее выраженный сигнал: внесение белка в раствор хлорида натрия вызвало рост тока при потенциале, на 0.3 В более положительном, чем восстановление натриевых ионов фона [17]. Сигнал был назван “преднатриевая волна” (рис. 1). Дальнейшие исследования показали, что процессы, протекающие в полярографической ячейке с участием белка, могут быть выражены следующими уравнениями реакций [18]:



где P – белок (катализатор), PH^+ – протонированная форма белка и DH – донор протонов. Перенапряжение каталитического выделения водо-

рода, возникающее при этом, описывается уравнением Тафеля, которое можно в данном случае записать как [18]:

$$E = \frac{2RT}{F} \ln [\text{H}^+] - \frac{3RT}{2F} \ln I + a, \quad (4)$$

где E – потенциал электрода, В; I – фарадеевский ток восстановления ионов водорода, А; a – константа, зависящая от конструкции рабочего электрода; F – постоянная Фарадея (96485 Кл/моль); R – универсальная газовая постоянная (8.314 Дж/моль К); T – температура, К. Белок за счет функциональных групп аминокислотных остатков, таких как $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $-\text{SH}$ и $-\text{COOH}$, адсорбируется на поверхности ртути и сдвигает перенапряжение выделения водорода в область менее отрицательных потенциалов. Регистрируемый ток восстановления в большинстве случаев пропорционален концентрации белка-катализатора и наблюдается при его сверхнизких количествах. Активное применение явления каталитического выделения водорода для определения белков и пептидов началось со второй половины 1990-х годов, когда группой Эмилей Палечека был предложен постоянноточковый хроноамперометрический инверсионный анализ (ПХИА) [19]. ПХИА регистрирует изменение потенциала во времени при наложении на рабочий электрод небольшого постоянного тока. Метод снижает влияние фонового тока и позволяет получить вместо трудно определяемой волны ярко выраженный пик восстановления водорода в координатах: $(\Delta E/\Delta t)^{-1} - E$, где E – потенциал электрода, В; t – время, с. Сигнал, регистрируемый методом ПХИА, был назван “пик Н” в честь Нейговски (Гейровского – родоначальника полярографии), hydrogen evolution (выделения водорода) и high sensitivity (высокой чувствительности). С помощью ПХИА на ртутном электроде можно регистрировать белки и пептиды вплоть до наномолярных и субнаномолярных концентраций. За последние годы данным методом был протестирован целый ряд белковых молекул [19–22]. Однако, несмотря на известный механизм реакции, так и не было выявлено, какие именно аминокислотные остатки вносят основной вклад в регистрируемый сигнал. Считают, что в данном случае ключевую роль играют остатки цистеина (Цис). В слабощелочных средах все пептиды (с остатками Цис и без них) дают “пик Н”. В слабощелочных растворах пептиды, не содержащие Цис, не дают сигнал, тогда как Цис-содержащие пептиды в тех же условиях демонстрируют четкий пик. Исходя из данных группы Палечека [22], практически любой пептид и белок в соответствующих условиях дает “пик Н” (рис. 1).

Подобный эффект каталитического выделения водорода наблюдал и Брличка в 1933 г. [23], когда пытался подавить сигнал кобальта на фоне

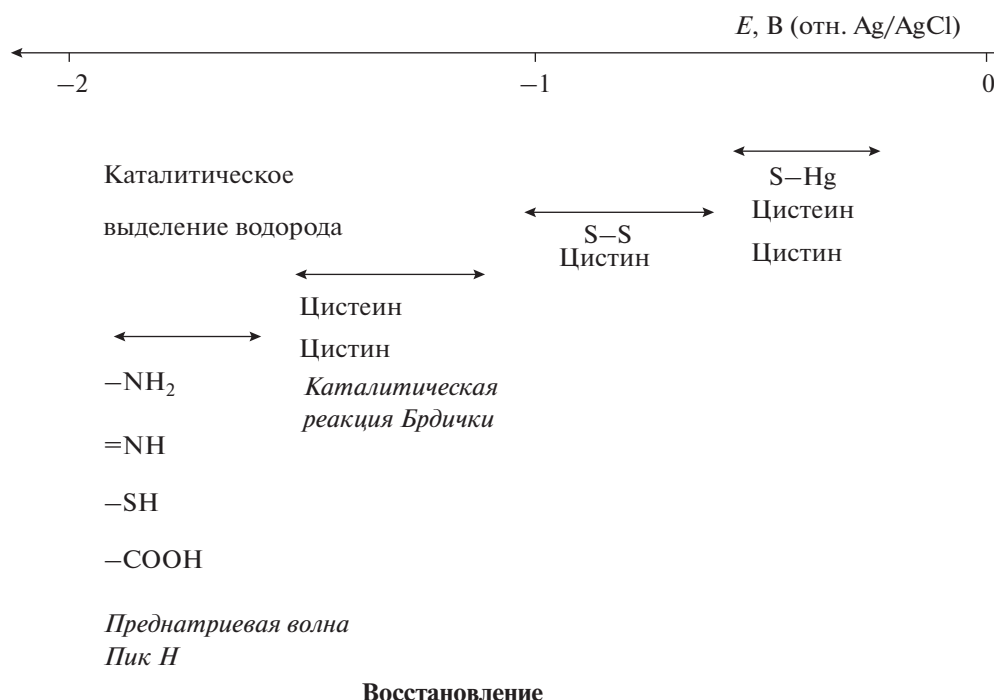
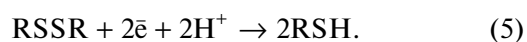


Рис. 1. Полярографические сигналы, характерные для белков.

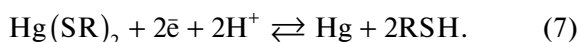
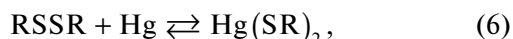
аммиачного буферного раствора сывороткой крови: сигнал был подавлен, но при потенциалах, более положительных, чем для “преднатриевой волны”, появилась новая четко выраженная двойная волна. Данное явление было названо “каталитическая реакция Брдижки” (рис. 1). Из аминокислот только цистин (**Цис-Цис**) и Цис давали рост этой волны. Высота новой волны была в сотни раз больше, чем сигнал восстановления SS-групп Цис-Цис, что говорило о ее каталитической природе. Так как высота каталитической волны для Цис была в два раза ниже, чем для Цис-Цис при той же концентрации, Брдижка заключил [24], что происходит восстановление SS-групп Цис-Цис до SH-групп, а SH-группы в свою очередь служат источниками ионов водорода для регистрируемого сигнала. С помощью данного метода был проведен анализ более 250 образцов сыворотки крови онкологических больных и здоровых доноров, который выявил существенное различие между ними [25]. Так, в случае сыворотки крови онкобольных высота характеристической волны была всегда ниже, чем для сыворотки здоровых добровольцев. Отвечая на вопрос, какие из групп – SH или SS – ответственны за полярографическую реакцию, был сделан вывод, что наблюдаемый эффект относится главным образом к SS-группам [25]. Более глубокое исследование, проведенное на образцах сыворотки крови от 386 человек (онкологических больных, больных другими заболеваниями и здоровых доноров) выявило влияние ряда факторов (возраста пациента,

вида опухоли) на равновесие Цис-Цис $\rightleftharpoons$ Цис [26]. С этого времени полярографическое изучение белков строилось главным образом на каталитических волнах в присутствии кобальта [27–29]. Каталитическая реакция Брдижки нашла свое применение в биоанализе для определения Цис-содержащих белков, таких как металлотионеины [30, 31] и фитохелатины [32]. Считается, что катализаторами реакции выступают Цис- и/или Цис-Цис-содержащие белки, однако ее механизм до сих пор до конца не изучен.

В 1950–1960-е гг. расшифровка аминокислотной последовательности инсулина (Сенгер, Нобелевская премия по химии 1958 г.) и получение пространственных структур миоглобина и гемоглобина рентгеноструктурным анализом (Перутц и Кендрю, Нобелевская премия по химии 1962 г.) вывели исследования в области белков и аминокислот, включая электрохимические, на новый уровень. В 1960-х гг. было открыто полярографическое восстановление белков за счет дисульфидных связей Цис-Цис (RSSR) [33, 34]. Суммарное уравнение процессов, протекающих при этом на поверхности ртутного электрода, можно записать как [35, 36]:



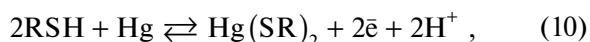
Согласно механизму реакции, предложенному для восстановления Цис-Цис [35], сначала происходит образование цистеината ртути(II) (уравнение (6)), а затем его восстановление (уравнение (7)):



Другой механизм был предложен для реакции восстановления окисленной формы глутатиона (GSSG) (уравнения (8)–(9)) [36]:



Отметим, что для каталитического электро-восстановления водорода в присутствии белка и ранее требовалось восстановление SS-групп остатков Цис-Цис (рис. 1), но сообщения такого рода не были опубликованы. Объяснением этому противоречию может служить значительная разница высот двух типов волн. Токи восстановления SS-групп Цис-Цис белков составляют порядка 0.1 мкА, тогда как токи каталитических волн выделения водорода – 10–100 мкА. Таким образом, было необходимо достичь более высокой чувствительности измерения сигнала, чтобы зарегистрировать восстановление SS-мостиков, что впервые продемонстрировали Сесил и Вейцман [33] в 1964 г. на примере инсулина и ряда других белков. Известно, что SH-группы Цис (RSH) после предварительного полярографического окисления также образуют цистеинаты ртути(I) и ртути(II) и адсорбируются на поверхности электрода (уравнения (10)–(11)) [37, 38]:



Определение концентрации белковых молекул возможно и через восстановление образующейся связи Hg–S (уравнение (7), рис. 1). Позже, в 1970-х гг., изучение полярографического восстановления гемопroteинов – белков, содержащих ион Fe(II)/Fe(III) в активном центре, выявило прямой перенос электрона между электродом и простетической группой, дав старт электрохимии содержащих кофактор белков [39–41].

В 1970-х гг. было показано, что адсорбция молекул белка на поверхности электрода – ключ к регистрации прямого переноса электрона между электродом и активным центром белка. Термин “прямой перенос электрона” означает обмен электронами между кофактором фермента (белка) и электродом в отсутствие каких-либо медиаторов [42]. Прямой перенос электрона описан для небольшого числа ферментов и белков, которые принято называть “редокс-активными”. В 1972 г. Бетсо с соавт. [39] описали восстановление иона Fe(III) гема цитохрома с (Цит с), находящегося в растворе, на ртутном, платиновом и золотом электродах без необратимой денатурации белка. Авторы заключили: “Адсорбция белка на поверхности электрода значительно влияет на наблюда-

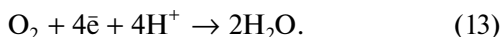
емый электрохимический сигнал, но не вызывает загрязнения электрода или потерю способности электрода переносить электроны” [39]. Позже, в 1977 г., был зарегистрирован обратимый прямой перенос электрона между Цит с, находящимся в растворе, и электродом [43, 44]:



На электроде из смешанных оксидов индия и олова методом циклической вольтамперометрии в области от 0.45 до –0.30 В (отн. Ag/AgCl) регистрировали четкую волну, характерную для контролируемого диффузией прямого переноса электрона между Цит с и электродом [43]. В то же время на золотом дисковом электроде перенос электрона между Цит с и электродной поверхностью удалось зарегистрировать только после внесения в ячейку 4,4'-бипиридила [44]. Присутствие 4,4'-бипиридила (который в данной области потенциалов неэлектроактивен) стимулировало перенос электрона между Цит с и электродом. Авторы предположили, что 4,4'-бипиридил взаимодействует с белком и/или с электродом, изменяя двойной электрический слой [44]. Позже было экспериментально подтверждено, что 4,4'-бипиридил образует адсорбционный слой на поверхности электрода, с которым Цит с связывается через остатки лизина перед переносом электрона [45]. Таким образом, 4,4'-бипиридил – первое соединение, которое послужило “мостиком” между белком и электродом, ориентируя белок на поверхности электрода и стимулируя прямой перенос электрона. Более поздние работы подтвердили важность наличия некоего связующего звена между активным центром фермента и поверхностью электрода для эффективного переноса электрона. В частности, подобный эффект наблюдали для гемопroteинов при использовании пленок поверхностно-активных веществ [46].

Дальнейшие исследования в области электрохимии содержащих кофактор белков привели к иммобилизации ферментов на поверхности электрода и открытию явления “биоэлектрокатализа”. Термин “биоэлектрокатализ” определяется как ускорение электрохимических реакций с помощью биологических катализаторов [47]. “Биоэлектрокатализом” также можно назвать биока- тализ с заменой биологических систем доставки электронов на электрохимические системы. Прямой биоэлектрокатализ предполагает отсутствие каких-либо свободно диффундирующих или иммобилизованных медиаторов; электроны беспрепятственно переходят между активным центром фермента и электродом [47]. Пионерские работы в области биоэлектрокатализа были выполнены в конце 1970–1980-х гг. советскими учеными во главе с Березиным. Первый кислородный ферментный электрод был изготовлен иммобилизацией лакказы на электроде из сажи [48]. Молекулярный кислород восстанавливался в активном

центре фермента, при этом электроны поступали из материала электрода (уравнение (13)):



Лакказа относится к семейству голубых медь-содержащих оксидаз, к которому также принадлежат билирубиноксидаза, аскорбатоксидаза и церулоплазмин. Медьсодержащие оксидазы обладают способностью к прямому восстановлению кислорода до воды (уравнение (13)) без образования высокорекреационноспособных токсичных промежуточных соединений кислорода, таких как супероксид анион-радикал (O_2^-), гидроксил радикал ($\cdot\text{OH}$) и пероксид водорода (H_2O_2). Еще один большой класс белков, содержащих редокс-активные кофакторы, — это гемопротеины. Первая работа, описывающая биоэлектродокатализ с участием гемопротеина пероксидазы, иммобилизованной на электроде из сажи [49], была опубликована в 1979 г., а пять лет спустя был открыт прямой биоэлектродокатализ с участием другого гемопротеина — гидрогеназы [50]. Очевидно, что принципы электрохимии содержащих кофактор редокс-активных белков основаны на биологических реакциях переноса электронов. Природа использует относительно ограниченную палитру редокс-активных центров: гем, хиноны, флавины, железо-серные кластеры. Понимание биологических принципов, определяющих эффективный перенос электрона, важно при использовании природных переносчиков электрона (оксидоредуктаз, НАДН-зависимых дегидрогеназ и редокс-активных белков) в биосенсорах, биотопливных элементах и биоэлектросинтезе [51].

Параллельно в 1960-х гг. было продемонстрировано и детально изучено электрохимическое окисление серосодержащих аминокислот Цис и Цис-Цис на электродах из платины и золота [52–54]. Спустя два десятилетия, в 1980 г., две независимые группы под руководством Брабека [55] и Рейно [56] описали окисление белков за счет аминокислотных остатков тирозина (**Тир**) и триптофана (**Трп**) на электродах из углеродных материалов. Сигнал окисления рибонуклеазы, альбумина, лизоцима и инсулина наблюдали на импрегнированном графитовом электроде при потенциалах около 0.7–0.8 В (отн. насыщенного каломельного электрода, НКЭ) [55]. На угольно-пастовом электроде при потенциалах 0.8–0.9 В (отн. НКЭ) удалось зарегистрировать сигналы электроокисления РНКазы (рибонуклеазы), альбумина и конканавалина А, в то время как на золотом, платиновом и стеклоуглеродном электродах четких пиков окисления этих белков получено не было [56]. С тех пор электрохимия белков и пептидов развивается преимущественно с использованием твердых электродов.

Нуклеиновые кислоты. У истоков электрохимии нуклеиновых кислот стоял Эмиль Палечек (1930–2018, Брно, Чехия). Свою жизнь он посвя-

тил исследованию свойств ДНК и других биополимеров и оставил после себя огромное число работ (книг, обзоров и оригинальных статей). Активное изучение электрохимических свойств нуклеиновых кислот началось в конце 1950-х гг., когда было показано окисление и восстановление молекул ДНК и РНК на ртутном электроде [57, 58]. Ученик Гейровского, Палечек в 1958 г., еще будучи аспирантом, наблюдал восстановление аденина (**Аде**) и цитозина (**Цит**) на ртутном каплюющем электроде, причем восстановление последнего протекало не только в кислой, но и в нейтральной среде; гуанин (**Гуа**) давал характерный анодный сигнал, обусловленный окислением продукта восстановления ДНК при высоких отрицательных потенциалах [57, 59–61] (рис. 2). До этого считалось, что из компонентов нуклеиновых кислот только Аде способен электрохимически восстанавливаться на ртути в сильноокислых средах [62]. Любопытно, что в то же самое время, в 1957 г., Берг [63], определяя следы белка в образцах ДНК и РНК в присутствии ионов кобальта, подтвердил электрохимическую инертность нуклеиновых кислот. В 1960 г. Миллер [64, 65] впервые доказал способность ДНК адсорбироваться на поверхности поляризованного ртутного электрода. Эмиль Палечек так вспоминал о своей работе в те годы [57]: “Вскоре после публикации моей статьи об осциллографической полярографии ДНК из тимуса телят и продуктов ее деградации в журнале *Nature* (1960 г.) [60] я был приглашен Юлиусом Мармуром из Гарвардского университета пройти стажировку в его лаборатории в качестве докторанта. Прошло около двух лет, прежде чем мне разрешили покинуть коммунистическую Чехословакию, но для меня это было похоже на чудо. В 1962 г. оборудование для осциллографической полярографии “Polaroskop P 524” производили только в Чехословакии. Мармур, который к этому времени перешел из Гарварда в университет Брандейса, посоветовал мне привезти прибор с собой. Таким образом, я отправил прибор авиагрузом. Вооружившись рекомендательным письмом от Гейровского, в ноябре 1962 г. я поехал в Соединенные Штаты без каких-либо сомнений о пригодности моего метода в исследовании нуклеиновых кислот. К сожалению, прибор прибыл только через девять месяцев, полностью сломанный. В лаборатории преобладало мнение, что он был тщательно “обыскан” секретными службами по обеим сторонам “железного занавеса”. В этом месте заканчиваются воспоминания, процитированные по вышестоящей ссылке [57]. В Соединенных Штатах Палечек приобрел необходимые микробиологические знания и практический опыт в молекулярной биологии. В то время Мармур был одним из ведущих специалистов в области ДНК. Мармур первым обнаружил ренатурацию и гибридизацию ДНК, т.е. ее способность восстанавливать двойную спираль из ком-

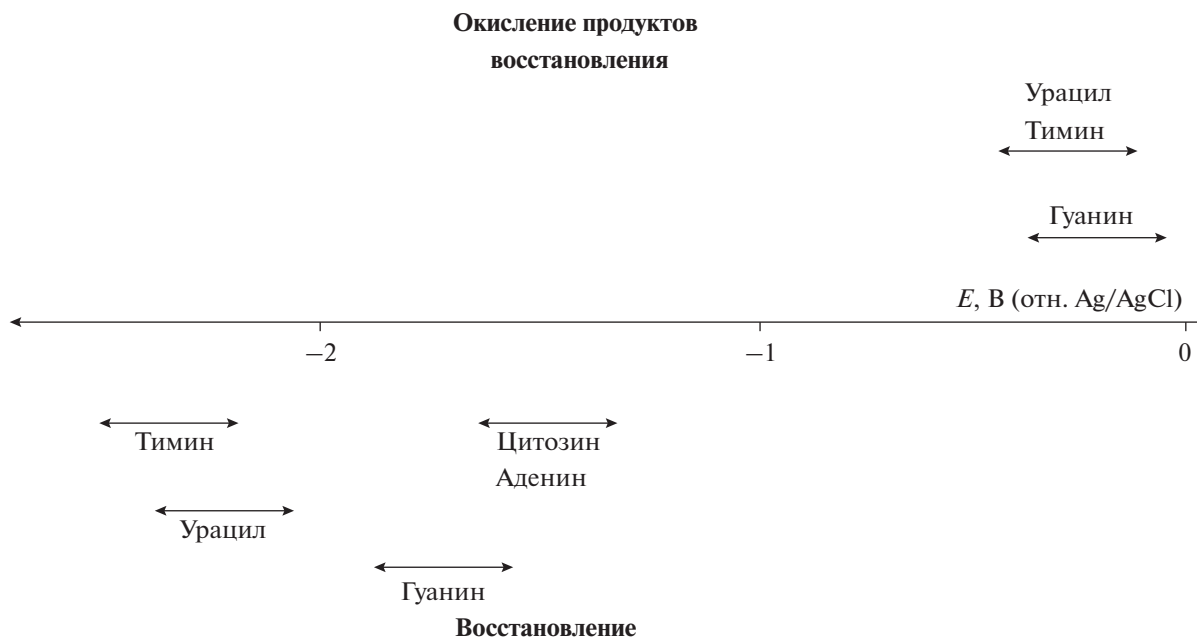


Рис. 2. Полярографические сигналы, характерные для нуклеиновых оснований.

плементарных одиночных нитей [66, 67]. Эта способность ДНК используется сегодня в целом ряде молекулярно-биологических методов, также как и в биотехнологии, включая электрохимические ДНК-датчики. Мармур также предложил метод выделения ДНК [68], который применялся с некоторыми поправками в течение нескольких десятилетий как классический метод извлечения ДНК из бактерий и других организмов. Вернувшись из США, Палечек продолжил активную работу в области электроанализа нуклеиновых кислот. Открытие Палечека заложило фундамент для дальнейшего изучения электрохимического поведения молекул нуклеиновых кислот и родственных им соединений.

В конце 1970-х гг. Каммингс и Элвинг осуществили одноэлектронное восстановление на ртути тимина (**Тим**, $E_{1/2} = -2.4$ В) [69] и урацила (**Ура**, $E_{1/2} = -2.3$ В) [70] с формированием соответствующих анион-радикалов и переносом протонов в среде из диметилсульфоксида (рис. 2). При этом, анионы Ура и Тим образовывали с ртутью нерастворимые соли, давая последующие волны окисления продуктов восстановления ($E_{1/2}$ от -0.1 до -0.3 В) [69, 70]. В отличие от Ура, в случае Тим, содержащего в пятом положении метильную группу, стабилизирующую свободный радикал и создающую стерическое препятствие для димеризации, наблюдалось восстановление образовавшегося свободного радикала [70]. Было показано, что все нуклеиновые основания и некоторые другие производные пурина и пиримидина дают анодные сигналы, благодаря формированию малорастворимых соединений с ртутью электрода, что в дальнейшем использова-

ли для их катодного инверсионного определения в наномолярных концентрациях [71–73]. В середине 1980-х гг. группой Палечека был предложен адсорбционный инверсионный анализ нуклеиновых кислот, который позволил на несколько порядков повысить чувствительность определения концентрации ДНК. Было обнаружено, что ДНК и РНК легко иммобилизуются на поверхности ртутных электродов путем простого погружения электрода в каплю раствора нуклеиновой кислоты (3–10 мкл) на короткое время (30–180 с) [74, 75]. Благодаря сильной адсорбции, ДНК и РНК формируют стабильный слой на поверхности электрода; далее электрод промывают и проводят вольтамперометрические измерения в новом растворе, уже не содержащем аналита. Такая процедура позволила снизить объем анализируемой пробы на 2–3 порядка по сравнению с классической вольтамперометрией. Данную технику назвали “адсорбционная инверсионная вольтамперометрия с переносом электрода (**АИВАПЭ**)”. Комбинирование АИВАПЭ с постоянноточковой хронопотенциометрией оказалось особенно успешным в определении нуклеиновых кислот с помощью ртутных электродов [76].

В течение первых двух десятилетий для определения содержания нуклеиновых кислот использовали только ртутные электроды. Однако, несмотря на уникальные преимущества, электроды из ртути имеют ряд ограничений, включая механическую нестабильность и узкую анодную область рабочих потенциалов, только в редких случаях подходящую для окисления органических соединений. В 1980-е гг. Брабек — аспирант Пале-

чека [77, 78], после защиты диссертации ставший сотрудником Драйхерста, вместе с последним ввел в электрохимию нуклеиновых кислот электроды из углеродных материалов [79–83]. Учитывая вклад Брабека в электрохимию белков, его смело можно назвать основателем прямого электрохимического анализа биополимеров на твердых электродах. Удивительно, что первые публикации об электрохимическом окислении высокомолекулярных нуклеиновых кислот на электродах из углеродных материалов появились только в 1978 г. [79–81]. Уже в начале 1960-х гг. Элвинг и Смит [84, 85], изучая поведение мономерных компонентов нуклеиновых кислот на электроде из графита, показали, что Гуа и Аде способны окисляться на данном типе электродов. Позже Драйхерст с соавт. [86, 87] более подробно исследовали окисление Аде и Гуа на электроде из пиролитического графита и предложили возможные механизмы электродных реакций. Важным результатом исследования электроокисления низкомолекулярных компонентов нуклеиновых кислот было открытие об окислении нуклеозидов Аде и Гуа при значительно более высоких положительных потенциалах, чем потенциалы, характерные для свободных оснований [88, 89]. Эти исследования также показали существенную разницу между потенциалами пиков окисления гуанозина и аденозина. В 1980 г. Брабек опубликовал обнаруженные им с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии количественные закономерности окисления молекул ДНК из разных природных объектов на электроде из пиролитического графита [82]. Изученные молекулы ДНК отличались суммарным содержанием оснований Гуа и Цит (Гуа + Цит). Все образцы ДНК давали на вольтамперограмме “пик Г” (при потенциале около 0.9 В отн. НКЭ, pH 6.4), соответствующий окислению остатка Гуа, и “пик А” (около 1.2 В), соответствующий окислению Аде. Отмечается, что потенциалы пиков Г и А отличались на 0.28 В и не отражали содержание (Гуа + Цит) в образце ДНК. Однако было найдено, что отношение высот пиков А и Г, обозначенное K , равно отношению (Аде + Тим)/(Гуа + Цит) образца ДНК. Этот факт использовали для разработки метода определения содержания (Гуа + Цит) в ДНК согласно формуле:

$$\text{Гуа} + \text{Цит}(\%) = \frac{100}{K + 1}, \quad (14)$$

где K – отношение высот пиков А и Г, соответствующих окислению остатков Аде и Гуа ДНК. Интересно, что отношение высот пиков А и Г было одним и тем же для нативной и термически денатурированной ДНК. В случае денатурированной ДНК величины сигналов заметно возрастали по сравнению с неденатурированной [82].

Интерес электрохимиков к нуклеиновым кислотам был в немалой степени поддержан вруче-

нием в 1962 г. Нобелевской премии по медицине Вилкинсу, Крику и Уотсону “за открытия, касающиеся молекулярной структуры нуклеиновых кислот и их значения для передачи информации в живых системах”. К моменту первых публикаций об электрохимической активности нуклеиновых кислот была известна структура ДНК в форме двойной спирали, показанная Уотсоном и Криком [90] одновременно с Франклином и Гослингом [91] в 1953 г. Это произошло спустя почти сто лет после открытия молекулы ДНК Мишером в 1869 г. [92]. Уотсон и Крик предложили систему на основе спаренных оснований [90]. Структура ДНК включала две водородные связи для пары Аде и Тим и три водородные связи для пары Гуа и Цит. Такая молекула нуклеиновой кислоты теперь известна как В-форма ДНК, стабилизируемая связанной водой, которая идеально вписывается в минорную бороздку. Альтман в 1889 г. дал имя ДНК, а ее роль в передаче генетической информации была открыта Гриффитом в 1928 г. [92]. В 1950 г. Чаргафф с соавт. [93] обнаружили, что в ДНК количество Аде всегда равно количеству Тим, а количество Гуа всегда равно количеству Цит. Эта закономерность была крайне важна при разработке модели двойной спирали. Количество пуринов (Аде + Гуа) всегда равно количеству пиримидинов (Цит + Тим), но отношение (Гуа + Цит)/(Аде + Тим) варьируется от вида к виду.

Таким образом, можно заключить, что к концу 1980-х годов был заложен фундамент электрохимии белков и нуклеиновых кислот и опубликованы основные виды аналитических сигналов окисления и восстановления данных биомолекул на ртутном электроде и электродах из твердых материалов. Однако, несмотря на знания о сложной пространственной организации молекул биополимеров, в электрохимии господствовало представление об одномерной структуре белков и нуклеиновых кислот при интерпретации результатов. Хотя многие процессы и явления, такие как прямой перенос электрона или биоэлектрокатализ, к этому времени были открыты, природа аналитических сигналов биополимеров не была до конца объяснена.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Сегодня ученые-электрохимики приходят к пониманию необходимости расширения представлений о редокс-процессах, протекающих на поверхности электродов с участием биополимеров, таких как белки и нуклеиновые кислоты, прежде всего, принимая во внимание их пространственную (3D) структуру [94]. Долгое время электрохимическое поведение биополимеров рассматривалось с точки зрения общего числа тех или иных электроактивных групп в первичной

последовательности молекул, опираясь на число мономерных звеньев. Однако последние исследования свидетельствуют, что далеко не все потенциально электроактивные группы в полипептидной или полинуклеотидной цепи могут одновременно участвовать в электрохимических реакциях [95]. С увеличением молекулярной массы биополимера (площади его поверхности), приходящейся на одну электроактивную группу, электрохимический сигнал падает [95, 96]. С развитием компьютерных технологий и методов биоинформатики, позволяющих моделировать пространственную структуру макромолекул, становится очевидным, что электрохимический сигнал биополимера не может быть равен сумме сигналов входящих в него мономеров. Это, с одной стороны, усложняет интерпретацию аналитического сигнала, а с другой, — открывает широкие перспективы для применения электрохимии с целью решения биохимических и медицинских задач. Опираясь на структуру молекулы, с помощью электрохимического анализа ученый может зарегистрировать такие изменения, как образование биполимерных комплексов [97], агрегация [98] или деградация биополимеров [99], а также их посттрансляционные (ПТМ) [100] или пострепликативные (ПРМ) модификации [101]. Такие изменения в структуре биополимеров происходят в живых системах как в норме, так и при различных патологиях [98–105]. К тому же, если раньше господствовало четкое разделение на “электроактивные” и “неэлектроактивные” вещества, то сегодня более корректно будет сказать, что биомолекула неэлектроактивна в данных экспериментальных условиях. Возникает уверенность, что поиск подходящих условий в будущем позволит открыть новые свойства веществ, в частности, биополимеров, сахаров и липидов. Углубление понимания взаимосвязи между пространственной организацией белков и нуклеиновых кислот и их электрохимическим поведением способствует появлению принципиально новых (био)сенсорных систем как для повседневного применения, так и для биомедицинских исследований.

Белки. На сегодняшний день известно, что на твердых электродах белки способны давать электрохимический сигнал: (1) за счет окисления аминокислотных остатков (в диапазоне потенциалов от 0.5 до 1.5 В); (2) и/или за счет восстановления или окисления своих простетических групп (например, гема или флавина в диапазоне от –0.5 до 0.5 В отн. Ag/AgCl) [47, 51, 106–112] (рис. 3). Подробный анализ электрохимического поведения биомолекул, в частности, биополимеров, на электродах из углеродных материалов (графит, графен, углеродные нанотрубки, допированный бором алмаз) с учетом влияния структуры поверхности электрода на адсорбцию молекул дан в обзоре Фойты с соавт. [112]. Необходимо отметить, что, в отличие от ставших рутинными графитовых и

стеклоуглеродных электродов, допированный бором алмаз обладает более широким рабочим диапазоном положительных потенциалов. Однако, насколько известно, до сих пор не обнаружены какие-либо принципиально новые свойства белковых молекул и нуклеиновых кислот на электродах из допированного бором алмаза [113], впрочем, как и на электродах, модифицированных графеном или углеродными нанотрубками. При этом недавно показано [114], что практически все протеиногенные аминокислоты способны окисляться на поверхности печатных графитовых электродов при потенциале 0.95 В в амперометрическом проточно-инжекционном анализе, а в некоторых случаях может быть зарегистрирован и сигнал восстановления продуктов окисления аминокислот, в частности, Трп на электроде из карандашного графита [115]. Тем не менее четких аналитически значимых сигналов восстановления протеиногенных аминокислот и их остатков пока получить не удалось. Наибольший вклад в сигнал окисления молекулы белка при потенциале 0.6–0.8 В вносят остатки Тир, Трп и Цис [109, 116–124], тогда как для окисления остатков Гис, Мет и Цис-Цис требуется потенциал около или выше 1 В (отн. Ag/AgCl, нейтральная среда) [118–124] (рис. 4). Так, показано, что пептид Aβ(1–42) на квадратно-волновой вольтамперограмме дает два четких пика при потенциалах 0.6 и 1.0 В и волну в области потенциалов 1.2–1.5 В, отнесенных соответственно к остаткам Тир (Тир-10), Гис (Гис-6, -13, -14) и Мет (Мет-35) пептида [122]. На электродах из углеродных материалов и золота окисление белков за счет аминокислотных остатков протекает как необратимый pH-зависимый процесс [95, 117–120]. Необходимо отметить, что механизм окисления остатков аминокислот в составе белка остается до конца не изученным, также как и реакции окисления большинства свободных аминокислот [109, 110, 125–127]. Требуется установление продуктов электрохимических реакций с помощью различных физико-химических методов (в частности, ЯМР и ИК-спектроскопии). Возникает закономерный вопрос о связи структуры белка с его электрохимическими свойствами. Одна из первых попыток ответить на данный вопрос была предпринята Брабеком и Морнштейном, которые писали [55]: “Бычий сывороточный альбумин, также содержащий, как и лизоцим, остатки триптофана, дает, однако, только один пик при потенциалах окисления остатков тирозина. Это поведение может быть объяснено тем фактом, что бычий сывороточный альбумин содержит примерно в 10 раз больше остатков тирозина, чем триптофана”. Таким образом, видно, что в данной работе, опубликованной в 1980 г., авторы опирались лишь на первичную структуру белка, а именно на его аминокислотную последовательность, и предполагали, что количество электроактивных остатков, таких как Тир и Трп, определяет наблю-



Рис. 3. Потенциалы сигналов окисления и восстановления белков и нуклеиновых кислот на твердых электродах.

даемое электрохимическое поведение белков. Потребовалось три десятилетия, чтобы понять, что только остатки аминокислот, расположенные на поверхности молекулы белка, с электроактивными группами, ориентированными наружу, доступны для электрохимического окисления на поверхности электрода и, следовательно, определяют сигнал электроокисления [95]. Если белки имеют достаточно жесткую пространственную структуру, то конформация пептидов часто характеризуется как “случайный клубок”. Электрохимию пептидов можно выделить в отдельную область [128]: из-за небольшой молекулярной массы сигналы их аминокислотных остатков выражены ярче и легче интерпретируются. Веским аргументом в пользу тесной связи интенсивности сигнала электроокисления со структурой белка является то, что разворачивание (денатурация) белка приводит к значительному увеличению величины тока [55, 120, 129]. Напротив, агрегация белков или пептидов приводит к уменьшению тока электроокисления [130–134], что также позволяет предположить, что не общее число электроактивных остатков, а их расположение на поверхности белковой молекулы определяет наблюдаемое электрохимическое поведение. Интересно, что крупные пептидные агрегаты, такие как агрегаты β -амилоида, участвующего в патогенезе болезни Альцгеймера, неспособны производить какой-либо значимый сигнал окисления: во время агрегации пептидов основной вклад в общий сигнал образца вносят мономеры и мелкие олигомеры [130]. Фактически, это делает электрохимию уникальным методом мониторинга агрегации пептидов путем регистрации уменьшения тока окисления, вызванного исчерпанием пула пептидных мономеров/олигомеров при их включении в агрегаты [131–134]. Показано также, что сигнал электроокисления чувствителен к заменам отдельных

аминокислот в полипептидной цепи, как это происходит в случае мутантов β -амилоида [122, 123, 135] и генетически модифицированных вариантов ацетилхолинэстеразы [117]. В последнем случае некоторые замены электроактивных остатков на условно “неэлектроактивные” приводили к увеличению сигнала электроокисления, указывая на значимость конформационных изменений, связанных с заменами, для доступности электроактивных остатков для окисления на поверхности электрода [95]. Таким образом, изменения конформации также могут влиять на интенсивность сигнала электроокисления наряду с концентрацией белка или пептида [55, 120, 122, 136].

Возвращаясь к активным центрам, необходимо отметить, что регистрация редокс-активности белков, несущих простетические группы, требует специальной модификации поверхности электрода, позволяющей “соединить” активный центр и электрод [46, 47, 108]. Фактически, это также подтверждает гипотезу о сохранении пространственной структуры редокс-активного белка в условиях электрохимического эксперимента на поверхности электрода [46]. Как правило, электродные реакции с вовлечением активных центров белков протекают в тонком слое на поверхности электрода и характеризуются линейной зависимостью тока пика от скорости развертки потенциала [46, 47, 106–108]. Белок Цит *c* является, возможно, единственным исключением из этого правила и дает обратимый сигнал иона Fe(III)/Fe(II) гема из капли раствора даже на немодифицированном электроде [39, 43]. В случае редокс-активных белков их “ориентированная” иммобилизация на поверхности электрода приобретает определяющее значение для достижения эффективного переноса электронов и биоэлектрокатализа [47, 137]. Добиться упорядоченного расположения молекул фермента на поверхности

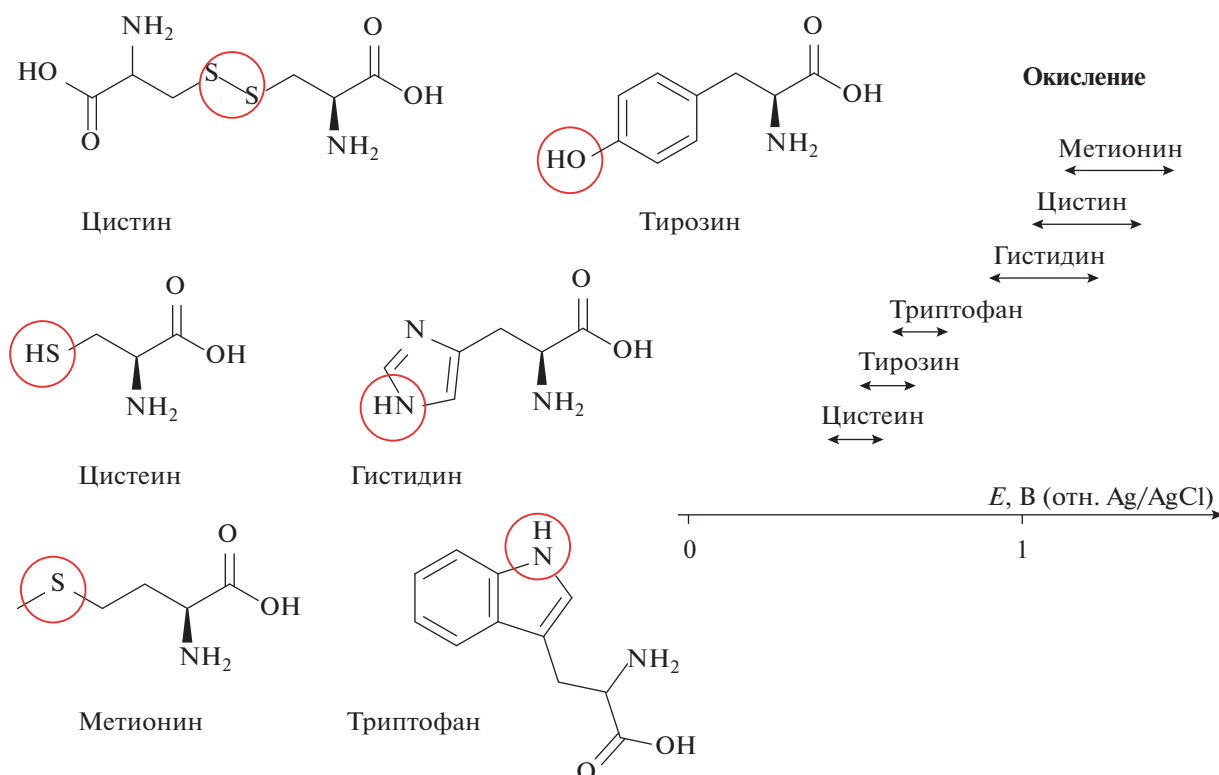


Рис. 4. Потенциалы и сайты окисления аминокислот тирозина, триптофана, цистеина, гистидина, метионина и цистина на твердых электродах.

электрода, т.е. сориентировать их для наблюдения наиболее эффективного биоэлектрокатализа, возможно, с помощью проводящих полимеров или проводящих наноматериалов. Помимо этого широко используют мутантные формы ферментов со специально введенными аминокислотными заменами. Прямой перенос электрона с электрода на активный центр фермента (белка) позволяет определить концентрацию редокс-активных белков путем регистрации величины тока пика восстановления или окисления его активных центров [138–140]; а ферментативная активность белка может быть инициирована наложением соответствующего потенциала [137, 141]. Однако поиск подходящей матрицы для иммобилизации редокс-активных белков является непростой задачей, и часто оказывается невозможным добиться эффективного соединения биохимической ферментативной реакции с электродной. В некоторых случаях прямой перенос электронов между активным центром фермента (белка) и электродом недостижим по определению из-за гликозилирования или большого размера белковой глобулы. Изучая механизмы прямого биоэлектрокатализа [47], можно выявить взаимосвязь между структурой и функциями белка-фермента, что важно для понимания биохимических процессов, а также для разработки биосенсорных систем. Направленное введение аминокислотных остат-

ков, таких как Гис и Цис, пептидов или фрагментов биотина, с использованием технологий геной инженерии позволило разработать редокс-активные ферменты с заданными электрохимическими свойствами, включая возможность их “ориентированной” иммобилизации [137, 142]. Известно, что некоторые аминокислотные замены (мутации) могут оказывать заметное влияние на ферментативную активность белков. Так, изучение электрохимической и электрокаталитической активности иммобилизованных на поверхности стеклоуглеродного электрода гемопротеинов семейства цитохромов P450 (CYP), а именно CYP 2C9 человека и двух его полиморфных вариантов, присутствующих примерно у 35% кавказской популяции, показало более низкую каталитическую активность для форм CYP 2C9*3 ($k_s = 3 \pm 1 \text{ мин}^{-1}$) и CYP 2C9*2 ($k_s = 12 \pm 2 \text{ мин}^{-1}$) по сравнению с диким типом CYP 2C9 ($k_s = 18 \pm 1 \text{ мин}^{-1}$) в присутствии S-варфарина – маркерного субстрата CYP 2C9 [143]. Разработанный биоэлектрохимический способ позволяет определять терапевтически значимые различия в метаболизме лекарственных средств, связанные с полиморфизмом, ответственным за неблагоприятные лекарственные реакции, в частности, у значительной части населения Кавказа. С помощью точечных аминокислотных замен в последовательности фермента

можно решить и задачу увеличения скорости прямого переноса электрона в электрохимических биосенсорах, как показано на примере пероксидазы из табачной мозаики [144]. Авторы наблюдали значительное увеличение скорости прямого переноса электронов между графитовым электродом и пероксидазой из табачной мозаики после замены остатка лейцина, расположенного вблизи кармана гема на поверхности фермента, на Трп [144]. Увеличение скорости прямого переноса электронов между редокс-активным центром белка и электродом и повышение чувствительности определения субстрата фермента могут быть достигнуты с помощью изменения пространственной структуры белка, т.е. направленного разворачивания (денатурации) полипептидной цепи, как показано на примерах гемоглобина [145] и Цит *c* [146] по отношению к пероксиду водорода и нитрит-иону. Стоит отметить, что для гемопротеинов обнаружено множество ПТМ [102]. На вопрос, влияют ли эти ПТМ на способность иона Fe(III)/(II) гема белка отдавать или принимать электроны, можно ответить с помощью электрохимии. Например, показано [147], что миоглобин скелетных мышц лошади с электрохимически прониженным Тир-103 дает более низкий и менее выраженный пик восстановления, чем у нативного миоглобина на циклических вольтамперограммах. К сожалению, несмотря на важность влияния ПТМ на структуру и функции редокс-активных гемопротеинов, таких как Цит *c* [148] или цитохром P450 2B1 [149], изменения в интенсивности прямого переноса электронов и биоэлектрокатализе этих белков в результате ПТМ в настоящее время изучены мало.

Современные технологии позволяют получить трехмерную структуру молекулы белка с локализацией всех аминокислотных остатков. В настоящее время в Банке данных о белках (PDB, protein data base, <https://www.rcsb.org>) доступно множество 3D моделей структур, включая сложные белковые комплексы. Конечно, результаты компьютерного моделирования не обязательно предсказывают истинную локализацию электроактивных групп аминокислотных остатков в условиях электрохимического эксперимента, и следует иметь в виду, что на их расположение могут в некоторой степени влиять: (1) состав электролита (растворителя), (2) электрическое поле электрода и (3) степень жесткости молекулы белка как таковой. Другим важным аспектом электроокисления белка является то, что некоторые аминокислотные остатки в последовательности белка могут быть модифицированы различными функциональными группами, благодаря явлению посттрансляционной модификации [150]. Эти новые функциональные группы могут генерировать свои собственные электрохимические сигналы или влиять (подавлять или усиливать) на исходный сигнал аминокислотных остатков [100, 151]. В на-

стоящее время как аминокислотные последовательности, так и ожидаемые ПТМ могут быть взяты для подавляющего числа белков во всеобъемлющей базе данных, известной как Универсальный белковый ресурс (UniProt, <https://www.uniprot.org>). Таким образом, используя Банк данных о белках и Универсальный белковый ресурс, становится возможным предсказать электрохимическое поведение на электроде практически любой белковой молекулы, что делает интерпретацию этого поведения исключительно на основе аминокислотной последовательности белка (как, например, в работах [118, 152]) довольно упрощенной. Учет пространственной структуры белка для интерпретации его электрохимических сигналов позволяет глубже понять реальные процессы, происходящие на поверхности электрода [153].

Нуклеиновые кислоты. Известно, что в процессах восстановления и окисления нуклеиновых кислот на твердых электродах участвуют остатки азотистых оснований (Гуа, Аде, Тим, Цит и Ура) [79, 82, 94, 96, 97, 112, 154–161]. Однако среди различных типов электродов только электрод из пиролитического графита позволил зарегистрировать как восстановление, так и окисление остатков азотистых оснований в нуклеозидах [162] и олигонуклеотидах [159] из-за широкого рабочего окна потенциалов от -2 до 2 В (отн. Ag/AgCl; ацетатный буферный раствор, pH 5). Кроме того и сигналы окисления продуктов восстановления, и сигналы восстановления продуктов окисления азотистых оснований в нуклеозидах и олигонуклеотидах также зарегистрированы на пиролитическом графите [159, 162] (рис. 3). Реакции восстановления или окисления нуклеиновых оснований или их остатков требуют достаточно высоких отрицательных (примерно от -1.5 до -2.0 В) или положительных (примерно от 1.0 до 1.5 В) потенциалов соответственно [79, 82, 86, 87, 154, 155, 158, 161–173]. Если сигналы окисления или восстановления оснований Гуа и Аде и их остатков в молекулах нуклеиновых кислот достаточно легко получить в различных экспериментальных условиях и на различных типах твердых электродов, то Тим, Цит и Ура требуют более высоких положительных или отрицательных потенциалов и более жестких условий эксперимента, и, как следствие, атрибуция их сигналов часто довольно сомнительна (рис. 5). Так, окисление мононуклеотидов на углеродных электродах проявлялось в виде анодных пиков при потенциалах 0.9 – 1.0 В для гуанозинмонофосфата, 1.2 – 1.3 В для аденозинмонофосфата, 1.4 – 1.5 В для тимидинмонофосфата и 1.5 – 1.6 В для цитидинмонофосфата (отн. Ag/AgCl, фосфатный буферный раствор, pH 7.4) [163, 174]. Интересно, что добавление сахара и фосфатных групп к азотистому основанию (с образованием нуклеозида или нуклеотида) сдвигает максимум потенциала окисления молекул к более положительным значениям

и наоборот [86, 87, 164, 165]. Однако процессы окисления и восстановления нуклеиновых оснований в молекулах ДНК происходят при потенциалах, отличных от потенциалов, характерных для соответствующих свободных нуклеозидов или нуклеотидов, что указывает на то, что процессы окисления остатков оснований в мономерных и полимерных молекулах протекают по разным механизмам и дают разные продукты [159, 162]. В то время как механизмы и продукты электрохимического окисления или восстановления свободных азотистых оснований, их нуклеозидов и нуклеотидов достаточно хорошо изучены [55, 86, 87, 159, 162, 164–168] (рис. 5), аналогичные подробные исследования для остатков оснований в полимерных молекулах ДНК или РНК отсутствуют, поэтому какие-либо выводы на основе знаний о мономерных оказываются довольно умозрительными [162]. Как окисление, так и восстановление нуклеиновых оснований могут включать образование промежуточных продуктов в виде радикалов и их химические реакции, которые по своей природе чувствительны к расположению активных фрагментов [162]. Многие факторы, такие как последовательность и структура нуклеиновых кислот, концентрация аналита, свойства поверхности электрода, pH и состав фоновой электролита, могут влиять на механизмы электродных реакций нуклеиновых оснований [162]. Надо сказать, что на сегодняшний день на твердых электродах не зарегистрировано сигналов восстановления остатков оснований высокомолекулярных ДНК или РНК из природных источников. В то же время сигналы окисления и восстановления получены для всех остатков оснований в коротких синтетических олигонуклеотидах определенной последовательности с преобладанием сигналов окисления остатков Гуа и Аде [159, 161, 173–176]. Однако необходимо отметить, что в большинстве работ, к сожалению, не приводится никакой информации о чистоте олигонуклеотидов или о дополнительной очистке полученных синтетических препаратов, так же как и о конформации молекул одонитевой ДНК (онДНК).

Что касается высокомолекулярной двунитевой ДНК (днДНК) из природных источников, то ее окисление на твердых электродах за счет остатков оснований, впервые продемонстрированное в пионерских работах Брабека [82, 154, 155], до сих пор остается спорным [112, 158, 169, 175]. На вольтамперограммах, снятых на электродах из углеродных материалов, молекулы днДНК дают только два пика окисления: около 0.7–0.9 В и 1.0–1.2 В (отн. Ag/AgCl, нейтральная среда), которые приписывают остаткам Гуа и Аде соответственно [79, 82, 83, 155, 172]. Выдвинута гипотеза, что электроактивные группы этих азотистых оснований, не участвующие в образовании водородных связей в двойной спирали ДНК, остаются свободными для электроокисления на поверхно-

сти электрода [82, 154, 155]. Также обнаружено, что токи пиков окисления для нативной днДНК заметно ниже по сравнению с сигналами денатурированной ДНК [82, 95, 154, 155] и закономерно уменьшаются с увеличением логарифма молекулярной массы ДНК как для нативных, так и для денатурированных биополимеров [96]. Для объяснения наблюдаемых различий в электрохимическом поведении нативной и денатурированной ДНК высказано предположение, что ДНК адсорбируется на поверхности электрода, и гибкая полимерная цепь денатурированной ДНК может лучше прилегать или повторять неровную поверхность электрода, чем более жесткая молекула нативной днДНК [154, 155, 95]. В результате количество сегментов ДНК, находящихся в контакте с поверхностью электрода или в непосредственной близости от нее так, чтобы их можно было электроокислить, выше для денатурированной ДНК, чем для нативной днДНК. На самом деле, это яркий пример рассмотрения молекулы ДНК как одномерной структуры. Действительно, данная гипотеза частично подтверждена выводами о том, что предварительная поляризация электрода при положительных потенциалах (от 0.2 до 1.3 В) в течение нескольких минут требовалась для надежной регистрации сигналов окисления как от нативной, так и от денатурированной ДНК и даже от небольших олигонуклеотидов на углеродных и золотых электродах [96, 154, 155, 169–171, 174]. Это объяснялось более эффективной адсорбцией отрицательно заряженных биомолекул на положительно заряженных электродах. Например, обнаружено, что после предполяризации электрода из высокоупорядоченного пиролитического графита при 0.4 В (отн. Ag/AgCl) в течение 15 мин днДНК из тимуса теленка дает выраженные пики окисления остатков Гуа и Аде, которые не могут быть получены без предполяризации [171]. Однако в другой работе сигнал окисления остатков Гуа нативной днДНК из тимуса теленка не удалось получить даже после предполяризации [79]. Более того, Ванг с соавт. [177], используя амперометрический проточно-инжекционный анализ при потенциале 1 В, продемонстрировали, что нативная днДНК из тимуса теленка дает на угольно-пастовых электродах более высокие токи окисления, чем денатурированная ДНК. В настоящее время все чаще признается, что азотистые основания, скрытые внутри двойной спирали ДНК, могут быть труднодоступны или недоступны совсем для электродных реакций [157, 178]. Таким образом, результаты экспериментов по электрохимическому окислению днДНК пока вызывают больше вопросов, чем ответов.

Одним из объяснений наблюдаемых расхождений в электрохимическом поведении ДНК может быть деградация, особенно с учетом известной зависимости тока электроокисления от размера ДНК [96]. Деградация может привести к

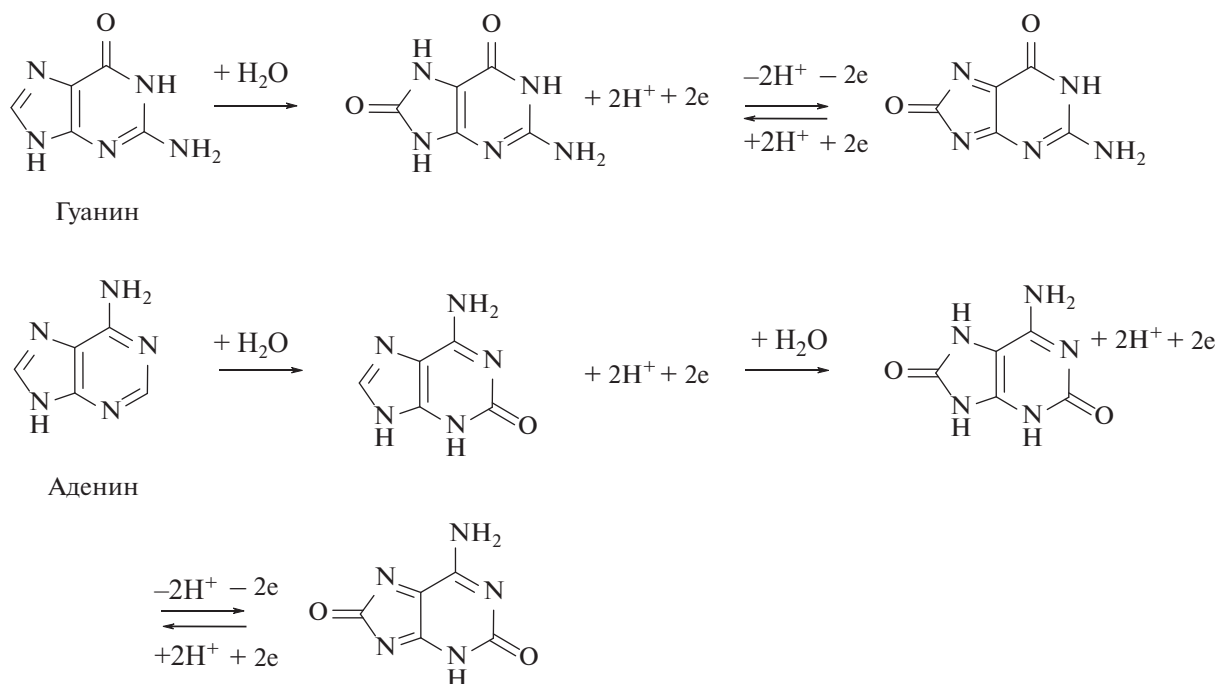


Рис. 5. Схемы реакций первичного окисления гуанина и аденина на электродах из углеродных материалов [83].

образованию низкомолекулярных фрагментов ДНК и/или, возможно, свободных мономеров, которые могут существенно повлиять на результат электрохимического эксперимента. Действительно, деградация ДНК продемонстрирована для днДНК из тимуса телят, иммобилизованной на поверхности золотого электрода при потенциале 0.5 В (отн. Ag/AgCl) [179]. Процедура предполяризации электрода потенциально может способствовать такой деградации. Присутствие в образце ионов металлов (или их комплексов) в комбинации с наложением на электрод отрицательного потенциала может разрушать молекулы ДНК, как показано для ДНК и комплексов Cu(II)-бипиридил при –0.6 В [180]. Тем не менее, деградирует ли ДНК на электродах из углеродных материалов во время электрохимического эксперимента, в настоящее время до конца не известно [155].

Хотя использование в исследованиях днДНК из природных источников представляется крайне привлекательным из-за доступности и низкой стоимости коммерческих препаратов, такие препараты страдают неоднородностью размеров молекул и потенциального присутствия как онДНК, так и днДНК, как справедливо указывали Брабек и Куделка в 1980 г. [96]. К сожалению, во многих электрохимических работах (например, [171, 172, 177, 181]) отсутствует биохимическая характеристика используемых образцов ДНК, что затрудняет сравнение результатов, полученных разными авторами, и их интерпретацию. Очевидно, что

ампликоны, полученные с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), являющиеся идеальными фрагментами днДНК заданной длины, которая может варьироваться от десятков до сотен пар оснований, — более подходящая модель для изучения электроокисления днДНК. Их применение позволило бы лучше понять механизмы, лежащие в основе электроокисления днДНК в электрохимическом эксперименте. Недавно показано [175], что электроокисление ДНК природного происхождения на печатных графитовых электродах протекает преимущественно путем окисления остатков Гуа и Аде молекул онДНК, что выражается двумя сигналами при потенциалах около 0.75 и 1.05 В (фосфатный буферный раствор, pH 7.4) соответственно. Для онДНК обнаружено, что реакции окисления обоих остатков контролируются диффузией. В молекулах днДНК, даже таких коротких, как молекулы длиной 24 нуклеотида, остатки этих оснований, по-видимому, недоступны для окисления на углеродных электродах. Можно сделать вывод, что сигналы электроокисления для конкретного гетерогенного препарата ДНК природного происхождения продуцируются преимущественно низкомолекулярными фрагментами онДНК [175]. Такое электрохимическое поведение ДНК хорошо согласуется с результатами, полученными для белковых молекул, в которых электроактивные аминокислотные остатки, скрытые внутри белковой глобулы [95] или пептидного агрегата [128, 130, 132], недоступны для электродных реакций.

Хотя прямая электрохимия нуклеиновых кислот характеризуется высокими потенциалами окисления (от 1 до 2 В) и восстановления (от –1 до –2 В) и относительно низкими значениями регистрируемых токов, некоторые системы электрохимических (био)сенсоров разработаны на основе снижения сигналов электроокисления при образовании двойной спирали [99, 178, 182]. С целью улучшения аналитических характеристик широко используют электроды, модифицированные различными материалами, позволяющие достичь электрокатализа в отношении нуклеиновых кислот и их мономеров и, как следствие, повысить чувствительность анализа [156]. Альтернативная стратегия, предложенная группой Хочека и Фойты [183, 184], основана на прямом электрохимическом зондировании ДНК с модифицированными основаниями. Разработана палитра электрохимически активных групп, которые могут быть введены в последовательности ДНК путем полимеразного включения химически модифицированных нуклеотидов [183, 184]. Такой подход позволил значительно повысить чувствительность и селективность электрохимического детектирования нуклеиновых кислот на различных электродах. Более того, стало возможным мультипотенциальное редокс-кодирование нуклеиновых кислот. Данный подход может иметь широкий спектр аналитических применений, включая регистрацию мутаций, повреждения, гибридизации, амплификации ДНК, а также анализ взаимодействия ДНК с белками. Электрохимические свойства нуклеиновых кислот потенциально могут быть использованы для мониторинга различных ПРМ ДНК и РНК [185, 101]. Подобно аминокислотным остаткам в белках, большое количество модифицированных нуклеозидов идентифицировано в ДНК и РНК живых организмов, вирусов, митохондрий и хлоропластов в результате нормальных и патогенных ферментативных или неферментативных процессов [185]. Разработаны различные электрохимические стратегии для обнаружения ДНК или РНК как потенциальных онкологических биомаркеров, например, метилированной ДНК промоторов генов, циркулирующей опухолевой ДНК, вирусных нуклеиновых кислот или коротких некодирующих молекул РНК, в частности, микроРНК [101]. В завершение необходимо отметить, что селективность электрохимического определения веществ, прежде всего, задается методами пробоподготовки, выделения и концентрирования. Анализ биобразцов на наличие ДНК вирусов или бактерий предшествует этап направленной амплификации, реализуемый за счет ПЦР или изотермической амплификации [186] и позволяющий выявить вплоть до одной молекулы нуклеиновой кислоты заданной последовательности в образце.

Нанопоровое секвенирование биополимеров. В современной биоэлектрохимии можно выде-

лить еще одно перспективное направление, основанное на изменении проводимости при прохождении биомолекулы через канал наноразмеров, так называемую “нанопору”, – “нанопоровое секвенирование”. Считываемый кондуктометрический сигнал обусловлен особенностями строения биополимеров. Нанопоровое секвенирование развивается с начала 1990-х гг. и не так давно позволила успешно секвенировать ДНК [187]. Данный способ регистрации электрохимического сигнала биомолекулы открывает возможности для изучения популяционных неоднородностей и конформационной динамики систем, начиная от отдельных ДНК и заканчивая отдельными белками [188]. Нанопоры, обеспечивающие размещение отдельных объектов анализа в ограниченном пространстве, преобразуют поведение одной молекулы в регистрируемый электрохимический сигнал с высоким соотношением сигнал/шум. Большой объем исследований посвящен электрохимическому обнаружению различных объектов, начиная с нуклеиновых кислот, пептидов, белков и биомолекулярных комплексов и заканчивая органическими низкомолекулярными и высокомолекулярными молекулами с помощью нанопор. Благодаря последовательному удержанию части молекулы в нанопоре, новые механизмы считывания сигнала проливают свет на связь структуры одной молекулы с ее кондуктометрической активностью. Так, с помощью нанопоры, изготовленной из мутантного белка аэролизина T232K/K238Q с усиленным электростатическим взаимодействием на участке T232K и высоким отталкивающим барьером на участке K238Q, было изучено фосфорилирование 9-членного пептида Тау-белка, участвующего в патогенезе болезни Альцгеймера [189]. Сигнал, производимый датчиком на основе аэролизина T232K/K238Q, позволил почти со 100%-ной точностью идентифицировать характерное распределение нефосфорилированного Тау-пептида, пептида pS262-Тау, pT263-Тау и пептида pS262/pT263-Тау (где “p” указывает на фосфорилированную аминокислоту). Превосходная чувствительность данной белковой нанопоры обусловлена чрезвычайно низкой скоростью транслокации, которая увеличивает продолжительность считывания сигнала до десятков или сотен миллисекунд для пептида из девяти аминокислотных остатков [189].

В настоящее время компания Oxford Nanopore Technologies выпускает серию устройств для секвенирования ДНК под брендом Oxford Nanopore (<https://nanoporetech.com>). В России эксклюзивным дистрибьютором продукции Oxford Nanopore Technologies является компания SkyGen (<https://www.skygen.com>). Компания SkyGen регулярно проводит конференции и семинары и оказывает научную поддержку пользователям секвенаторов Oxford Nanopore. В устройствах Oxford Nanopore регистрируется изменение ионного

тока в момент прохождения биомолекулы через нанопору. Информация об изменении тока используется для идентификации анализируемой биомолекулы. В приборах, изготовленных по технологии Oxford Nanopore, для создания пор в мембранах используются специально разработанные и запатентованные порообразующие белки. Порообразующие белки распространены в природе. Например, белок α -гемолизин и аналогичные белковые поры естественным образом существуют в клеточных мембранах, где они действуют в качестве каналов для переноса ионов или молекул в клетки и из клеток. Белок α -гемолизин представляет собой гептамер с порой внутренним диаметром 1 нм. В том же диапазоне лежат размеры многих биомолекул, включая ДНК. Поры достаточно стабильны. Необходимо отметить, что технология нанопорового секвенирования была бы неосуществима на практике без биоинформатической обработки регистрируемого сигнала. Компания также разработала и запатентовала электронику, которая позволяет параллельно проводить регистрацию сигналов нескольких нанопор, собирать и анализировать данные в режиме реального времени. Самый простой вариант прибора, основанного на данной технологии, — это MinION Oxford Nanopore Technologies, который позволяет считывать всю последовательность ДНК, соответствующую десяткам килобаз и ограниченную только собственной длиной исследуемых молекул [190]. Компания Oxford Nanopore ведет поиск новых решений для создания нанопор, обладающих свойствами, которые могут улучшить производительность приборов. Белковые нанопоры достаточно прочны, легко воспроизводимы при низких затратах и легко модифицируются. Однако будущие поколения сенсорных устройств на основе нанопор, вероятно, будут использовать нанопоры, изготовленные из синтетических материалов. Хотя в настоящее время твердотельные нанопоры не обладают химической специфичностью белковых.

Таким образом, электрохимия биополимеров основана на измерении сигналов восстановления или окисления редокс-активных центров белков или/и окисления их аминокислотных остатков, а также окисления или восстановления азотистых оснований в составе ДНК или РНК (рис. 3). Показано, что практически все протеиногенные аминокислоты подвержены специфическому электрохимическому окислению (при потенциале от 0.5 до 1.5 В); в то же время все нуклеотиды, входящие в состав ДНК и РНК, способны как необратимо окисляться (при потенциале от 1 до 2 В), так и восстанавливаться (при потенциале от -1 до -2 В) за счет остатков азотистых оснований на электродах из углеродных материалов (графит, стеклоуглерод). Электрохимические реакции свободных аминокислот и нуклеиновых оснований, а также их остатков в белках и нуклеиновых

кислотах требуют систематического исследования с целью идентификации продуктов реакций и установления механизмов. Кроме того, электрохимия биополимеров в настоящее время нуждается в характеристике рядов из белковых молекул и нуклеиновых кислот с известными пространственной структурой, последовательностью мономеров и молекулярной массой для выявления общих закономерностей “структура—свойства”. Использование в электрохимических исследованиях препаратов без дополнительной биохимической характеристики и, при необходимости, дополнительной очистки затрудняет интерпретацию и сравнение экспериментальных результатов разных научных групп. Требуется рассмотрение электрохимического поведения белков и нуклеиновых кислот с точки зрения их пространственной структуры. Современный уровень технологий позволяет моделировать пространственную структуру одной биомолекулы и регистрировать сверхнизкие токи с высоким разрешением сигнал/шум. С помощью электрохимических подходов сегодня стало возможным определение нуклеотидной последовательности молекул ДНК, а расшифровка первичной структуры белков уже не за горами.

В заключении сопоставим две рассмотренные области электрохимии биополимеров: белков и нуклеиновых кислот. Первые работы по изучению электроактивности нуклеиновых кислот появились примерно на 30 лет позже пионерских исследований в области полярографии белков и к настоящему времени, переживая бурный рост, догоняют и даже опережают их. Интересно, что одни и те же ученые внесли заметный вклад в развитие этих двух параллельных направлений — электрохимии ДНК и белков: Палечек, Брабек, Фойта, Ванг, Оливейра-Бретт и др. Те, кто начал с изучения электрохимии ДНК, затем перешел к белкам, и наоборот. Можно только восхищаться стойкостью Палечека, который до конца своих дней оставался верен ртутному электроду, изучая поведение различных классов биополимеров. Временем основания электрохимического анализа биополимеров на твердых электродах можно считать конец 1970-х начало 1980-х годов, когда Брабек опубликовал результаты своих исследований по электроокислению молекул ДНК и белков на электродах из углеродных материалов. В данном обзоре обобщены данные об известных на сегодняшний день собственных электрохимических свойствах биополимеров, проявляющихся на немодифицированных электродах. Зная фундаментальные свойства, исследователи в зависимости от конкретной аналитической задачи всегда смогут подобрать систему, где эти свойства проявятся желаемым образом. Развитие электрохимии белков и нуклеиновых кислот рас-

ширяет области применения электроанализа в целом — не только для количественного определения, но и для качественного анализа изменений структуры молекул. Моделируя сложные биологические системы и процессы *in vitro*, ученые могут исследовать влияние различных внешних и внутренних факторов, таких как pH среды или мутаций. Таким образом, электрохимия дает нам особую информацию о свойствах биомолекул, которая в комбинации с другими физико-химическими методами позволяет глубже заглянуть в молекулярные механизмы процессов в живых организмах.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудрявцев П. С. Курс истории физики. М.: Просвещение, 1982. 448 с.
2. Химическая энциклопедия / Под ред. Кнунянца И. Л. М.: Советская энциклопедия, 1988.
3. Березовчук А. В. Физическая химия: конспект лекций. М.: Эксмо, 2015. 150 с.
4. Чизмаджев Ю. А. Биоэлектрохимия: из прошлого в будущее // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6. № 3. С. 23.
5. Clark L. C. and Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962. V. 102. № 1. P. 29.
6. Theavenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification // Pure Appl. Chem. 1999. V. 71. № 12. P. 2333.
7. Turner A. P. F. Biosensors: Sense and sensibility // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. № 8. P. 3184.
8. Labuda J., Bowater R. P., Fojta M., Gauglitz G., Glatz Z., Hapala I., Havliš J., Kilar F., Kilar A., Malinová L., Sirén H. M. M., Skládal P., Torta F., Valachovič M., Wimmerová M., Zdráhal Z., Hibbert D. B. Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018) // Pure Appl. Chem. 2018. V. 90. № 7. P. 1121.
9. Lubert K. H., Kalcher K. History of electroanalytical methods // Electroanalysis. 2010. V. 22. № 17–18. P. 1937.
10. Shikata M. The electrolysis of nitrobenzene with the mercury dropping cathode // Trans. Faraday Soc. 1925. V. 21. № August. P. 42.
11. Китаев Ю. П., Тропольская Т. В., Будников Г. К. Промежуточные продукты в электрохимических реакциях. М.: Наука, 1982. 216 с.
12. Зиятдинова Г. К., Будников Г. К. Возможности электроаналитической химии в решении проблем фармацевтического анализа / Фармацевтический анализ (Серия “Проблемы аналитической химии”. Т. 16) / Под ред. Будникова Г. К., Гармонова С. Ю. М.: АРГАМАК-МЕДИА, 2013. С. 230.
13. Zavolskova M. D., Nikitina V. N., Maksimova E. D., Karyakina E. E., Karyakin A. A. Constant potential amperometric flow-injection analysis of ions and neutral molecules transduced by electroactive (conductive) polymers // Anal. Chem. 2019. V. 91. № 12. P. 7495.
14. Komkova M. A., Zarochintsev A. A., Karyakina E. E., Karyakin A. A. Electrochemical and sensing properties of Prussian Blue based nanozymes “artificial peroxidase” // J. Electroanal. Chem. 2020. V. 872. Article 114048.
15. Супрун Е. В. Электрохимические биосенсорные системы для анализа клинически значимых белков и пептидов. Дис. ... докт. биол. наук. Москва: Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, 2017. 290 с.
16. Heyrovsky J., Babicka J. Polarographic studies with the dropping mercury cathode. Part XIII — The effect of albumins // Collect. Czech. Chem. Commun. 1930. V. 2. P. 370.
17. Herles F., Vancura A. Research on the cause of the characteristic “wave” on the polarographic curve of human serum // Bull. Int. Acad. Sci. Boheme. 1932. V. 33. P. 119.
18. Bobrowski A., Zarebski J. Catalytic systems in adsorptive stripping voltammetry // Electroanalysis. 2000. V. 12. № 15. P. 1177.
19. Tomschik M., Havran L., Fojta M., Palecek E. Constant current chronopotentiometric stripping analysis of bioactive peptides at mercury and carbon electrodes // Electroanalysis. 1998. V. 10. № 6. P. 403.
20. Palecek E., Ostatna V., Masarik M., Bertonicini C. W., Jovin T. M. Changes in interfacial properties of α -synuclein preceding its aggregation // Analyst. 2008. V. 133. № 1. P. 76.
21. Zivanovic M., Aleksic M., Ostatna V., Doneux T., Palecek E. Polylysine-catalyzed hydrogen evolution at mercury electrodes // Electroanalysis. 2010. V. 22. № 17–18. P. 2064.
22. Palecek E., Ostatna V. Electroactivity of nonconjugated proteins and peptides. Towards electroanalysis of all proteins // Electroanalysis. 2007. V. 19. № 23. P. 2383.
23. Brdicka R. Polarographic studies with the dropping mercury cathode. Part XXXI. A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride // Coll. Czech. Chem. Commun. 1933. V. 5. P. 112.
24. Brdicka R. Polarographic studies with the dropping mercury cathode. Part XXXII. Activation of hydrogen in sulphhydryl group of some thio-acids in cobalt salts solutions // Coll. Czech. Chem. Commun. 1933. V. 5. P. 148.
25. Brdicka R. Polarographic investigations in serological cancer diagnosis // Nature. 1937. V. 139. № 3528. P. 1020.
26. Walker I. C., Reimann S. P. Polarographic studies of human blood sera // Am. J. Cancer. 1939. V. 37. № 4. P. 585.
27. Millar G. J. Studies on the polarography of proteins 1. The relation of wave heights to protein concentration and origin of wave III // Biochem. J. 1953. V. 53. № 3. P. 385.
28. Millar G. J. Studies on the polarography of proteins 2. The influence of pH and concentration of ammonia and ammonium ion upon the polarographic waves // Biochem. J. 1953. V. 53. № 3. P. 393.
29. Kalous V., Pavlicek Z. Polarographic characterization of proteins // Biochim. Biophys. Acta 1962. V. 57. № 1. P. 44.
30. Kizek R., Trnkova L., Palecek E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant

- current stripping chronopotentiometry // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. № 20. P. 4801.
31. *Raspor B., Paic M., Erk M.* Analysis of metallo-thioneins by the modified Brdička procedure // *Talanta*. 2001. V. 55. № 1. P. 109.
32. *Fojta M., Fojtova M., Havran L., Pivonkova H., Dorcak V., Sestakova I.* Electrochemical monitoring of phyto-chelatin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells exposed to sub-cytotoxic and cytotoxic levels of cadmium // *Anal. Chim. Acta*. 2006. V. 558. № 1–2. P. 171.
33. *Cecil R., Weitzman P.D.J.* The electroreduction of the disulphide bonds of insulin and other proteins // *Biochem. J.* 1964. V. 93. № 1. P. 1.
34. *Zikan J., Kalous V.* Polarographic reaction of proteins and peptides. II. Catalytic and reduction waves of insulin S-sulphopeptides and of S-sulphocysteine // *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1967. V. 32. № 1. P. 246.
35. *Kolthoff I.M., Stricks W., Tanaka N.* The polarographic prewaves of cystine (RSSR) and dithiodiglycolic acid (TSST) and the oxidation potentials of the systems RSSR-RSH and TSST-TSH // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. V. 77. № 18. P. 4739.
36. *Stricks W., Kolthoff I.M.* Polarography of glutathione // *J. Am. Chem. Soc.* 1952. V. 74. № 18. P. 4646.
37. *Stankovich M.T., Bard A.J.* The electrochemistry of proteins and related substances: I. Cystine and cysteine at the mercury electrode // *J. Electroanal. Chem.* 1977. V. 75. № 2. P. 487.
38. *Ralph T.R.* The electrochemistry of l-cystine and l-cysteine: Part 1: Thermodynamic and kinetic studies // *J. Electroanal. Chem.* 1994. V. 375. № 1. P. 1.
39. *Betso S.R., Klapper M.H., Anderson L.B.* Electrochemical studies of heme proteins. Coulometric, polarographic and combined spectroelectrochemical methods for reduction of the heme prosthetic group in cytochrome c // *J. Am. Chem. Soc.* 1972. V. 94. № 23. P. 8197.
40. *Scheller F., Janchen M., Lampe J., Prümke H.J., Blanck J., Palecek E.* Studies on electron transfer between mercury electrode and hemoprotein // *Biochim. Biophys. Acta*. 1975. V. 412. № 1. P. 157.
41. *Scheller F.* Functional properties of adsorbed hemoproteins // *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1977. V. 4. № 4. P. 490.
42. *Ludwig R.* Direct electron transfer to enzymes / *Encyclopedia of Applied Electrochemistry* / Eds. Kreysa G., Ota K., Savinell R.F. N.Y.: Springer, 2014. P. 330.
43. *Yeh P., Kuwana T.* Reversible electrode reaction of cytochrome c // *Chem. Lett.* 1977. V. 6. № 10. P. 1145.
44. *Eddowes M.J., Hill H.A.O.* A novel method for investigation of the electrochemistry of metalloproteins: Cytochrome c // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1977. № 21. P. 771b.
45. *Eddowes M.J., Hill H.A.O., Uosaki K.* The electrochemistry of cytochrome c. Investigation of the mechanism of the 4,4'-bipyridyl surface modified gold electrode // *J. Electroanal. Chem.* 1980. V. 116. P. 527.
46. *Rusling J.F.* Liquid crystal surfactant films for electrochemical catalysis // *Microporous Mater.* 1994. V. 3. № 1–2. P. 1.
47. *Karyakin A.A.* Principles of direct (mediator free) bioelectrocatalysis // *Bioelectrochemistry*. 2012. V. 88. P. 70.
48. *Березин И.В., Богдановская В.А., Варфоломеев С.Д., Тарасевич М.Р., Ярополов А.И.* Биокатализ. Равновесный кислородный потенциал в присутствии лакказы // *Доклады Академии наук*. 1978. Т. 240. С. 615.
49. *Ярополов А.И., Маловик В., Варфоломеев С.Д., Березин И.В.* Электровосстановление перекиси водорода на электроде с иммобилизованной пероксидазой // *Доклады Академии наук*. 1979. Т. 249. № 6. С. 1399.
50. *Yaropolov A.I., Karyakin A.A., Varfolomeyev S.D., Berezin I.V.* Mechanism of H₂-electrooxidation with immobilized hydrogenase // *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1984. V. 12. № 3–4. P. 267.
51. *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques, and applications* / Ed. Bartlett P.N. Chichester: John Wiley & Sons, 2008.
52. *Koryta J., Pradac J.* Electrode processes of the sulfhydryl-disulfide system: I. Cystine at a platinum electrode // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1968. V. 17. № 1–2. P. 167.
53. *Koryta J., Pradac J.* Electrode processes of the sulfhydryl-disulfide system: II. Cystine at a gold electrode // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1968. V. 17. № 1–2. P. 177.
54. *Koryta J., Pradac J.* Electrode processes of the sulfhydryl-disulfide system: Electrode processes of the sulfhydryl-disulfide system: III. Cysteine at platinum and gold electrodes // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1968. V. 17. № 1–2. P. 185.
55. *Brabec V., Mornstein V.* Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes: I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions // *Biochim. Biophys. Acta: Protein Structure*. 1980. V. 625. № 1. P. 43.
56. *Reynaud J.A., Malfroy B., Bere A.* The electrochemical oxidation of three proteins: RNAase A, bovine serum albumin and concanavalin A at solid electrodes // *J. Electroanal. Chem.: Interfacial Electrochem.* 1980. V. 116. P. 595.
57. *Paleček E.* Past, present and future of nucleic acids electrochemistry // *Talanta*. 2002. V. 56. № 5. P. 809.
58. *Palecek E., Fojta M., Jelen F., Vetterl V.* Electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochemistry* / *The Encyclopedia of Electrochemistry*. V. 9. Ch. 12 / Eds. Bard A.J., Stratmann M., Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2002. P. 365.
59. *Paleček E.* Oszillografische Polarographie der Nucleinsäuren und ihrer Bestandteile // *Naturwissenschaften*. 1958. V. 45. № 8. P. 186.
60. *Palecek E.* Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid // *Nature*. 1960. V. 188. P. 656.
61. *Paleček E.* Oszillografische Polarographie der Nucleinsäurekomponenten // *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1960. V. 25. № 9. P. 2283.
62. *Bendich A.* The Nucleic Acids / Eds. Chargaff E., Davidson J.N. N.Y.: Academic Press, 1955. V. 1. P. 119.
63. *Berg H.* Polarographic studies on nucleic acids and nucleases. I. Polarographic determination of proteins in the presence of nucleic acids // *Biochemische Zeitschrift*. 1957. V. 329. № 3. P. 274.
64. *Miller I.R.* The structure of DNA and RNA in the water-mercury interface // *J. Mol. Biol.* 1961. V. 3. № 3. P. 229.
65. *Miller I.R.* Temperature dependence of the adsorption of native DNA in a polarized water-mercury interface // *J. Mol. Biol.* 1961. V. 3. P. 357.

66. *Marmur J., Lane D.* Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: Biological studies // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1960. V. 46. № 4. P. 453.
67. *Marmur J., Rownd R., Schildkraut C.L.* Progress in Nucleic Acid Research / Eds. Davidson J.N., Cohn W.E. London: Academic Press, 1963. V. 1. P. 231.
68. *Marmur J.* A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms // *J. Mol. Biol.* 1961. V. 3. № 2. P. 208.
69. *Cummings T.E., Elving P.J.* Electrochemical reduction of thymine in dimethylsulfoxide auto-protonation of the radical-anion and reduced free-radical // *J. Electroanal. Chem.* 1979. V. 102. P. 237.
70. *Cummings T.E., Elving P.J.* Electrochemical reduction of uracil in dimethyl-sulfoxide – autoprotonation of anion radical // *J. Electroanal. Chem.* 1978. V. 94. P. 123.
71. *Paleček E.* Reaction of nucleic acid bases with the mercury electrode: Determination of purine derivatives at submicromolar concentrations by means of cathodic stripping voltammetry // *Anal. Biochem.* 1980. V. 108. № 1. P. 129.
72. *Paleček E., Jelen F., Hung M.A., Lasovsky J.* 445 – Reaction of the purine and pyrimidine derivatives with the electrode mercury // *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1981. V. 8. № 6. P. 621.
73. *Paleček E.* Determination of pseudouridine at submicromolar concentrations by cathodic stripping voltammetry at a mercury electrode // *Anal. Chim. Acta.* 1985. V. 174. P. 103.
74. *Paleček E.* Adsorptive transfer stripping voltammetry: Determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface // *Anal. Biochem.* 1988. V. 170. № 2. P. 421.
75. *Teijeiro C., Nejedly K., Palecek E.* Cyclic voltammetry of submicrogram quantities of supercoiled, linear and denatured DNAs with DNA-modified mercury electrode // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1993. V. 11. № 2. P. 313.
76. *Paleček E., Tomschik M., Stankova V., Havran L.* Chronopotentiometric stripping of DNA at mercury electrodes // *Electroanalysis.* 1997. V. 9. № 13. P. 990.
77. *Brabec V., Paleček E.* The reducibility of polynucleotides and their a.c. polarographic behavior // *J. Electroanal. Chem.* 1970. V. 27. № 1. P. 145.
78. *Brabec V.* Interaction of nucleic acids with electrically charged surfaces: VII. The effect of ionic strength of neutral medium on the conformation of DNA adsorbed on the mercury electrode I // *Biophys. Chem.* 1980. V. 11. № 1. P. 1.
79. *Brabec V., Dryhurst G.* Electrochemical behavior of natural and biosynthetic polynucleotides at the pyrolytic graphite electrode A new probe for studies of polynucleotide structure and reactions // *J. Electroanal. Chem.* 1978. V. 89. № 1. P. 161.
80. *Brabec V., Dryhurst G.* Electrochemical oxidation of polynucleotides at graphite electrodes – New probe of nucleic-acids structure // *Studia Biophysica.* 1978. V. 67. P. 23.
81. *Brabec V., Dryhurst G.* Electrochemical oxidation of polyadenylic acid at graphite electrodes // *J. Electroanal. Chem.* 1978. V. 91. № 2. P. 219.
82. *Brabec V.* Electrochemical oxidation of nucleic acids and proteins at graphite electrode. Qualitative aspects // *J. Electroanal. Chem.* 1980. V. 116. P. 69.
83. *Brabec V.* Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes // *J. Electroanal. Chem.* 1981. V. 128. P. 437.
84. *Smith D.L., Elving P.J.* Analytical utilization of the polarographic and voltammetric behavior of purines and pyrimidines // *Anal. Chem.* 1962. V. 34. № 8. P. 930.
85. *Elving P.J., Smith D.L.* The graphite electrode. An improved technique for voltammetry and chronopotentiometry // *Anal. Chem.* 1960. V. 32. № 13. P. 1849.
86. *Dryhurst G., Elving P.J.* Electrochemical oxidation of adenine: reaction products and mechanisms // *J. Electrochem. Soc.* 1968. V. 115. № 10. P. 1014.
87. *Dryhurst G., Pace G.F.* Electrochemical oxidation of guanine at the pyrolytic graphite electrode // *J. Electrochem. Soc.* 1970. V. 117. № 10. P. 1259.
88. *Dryhurst G.* Adsorption of guanine and guanosine at the pyrolytic graphite electrode: Implications for the determination of guanine in the presence of guanosine // *Anal. Chim. Acta.* 1971. V. 57. № 1. P. 137.
89. *Dryhurst G.* Electrochemical determination of adenine and adenosine: Adsorption of adenine and adenosine at the pyrolytic graphite electrode // *Talanta.* 1972. V. 19. № 6. P. 769.
90. *Watson J.D., Crick F.H.C.* Molecular structure of nucleic acids // *Nature.* 1953. V. 171. P. 737.
91. *Franklin R.E., Gosling R.G.* Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate // *Nature.* 1953. V. 17. P. 156.
92. *Wilson W.D.* Nucleic Acids in Chemistry and Biology / Eds. Blackburn G.M., Gait M.J., New York: Oxford University Press, 1996, P. 329.
93. *Zamenhof S., Brawerman G., Chargaff E.* On the desoxypentose nucleic acid from several microorganisms // *Biochim. Biophys. Acta.* 1952. V. 9. P. 402.
94. *Suprun E.V.* Direct electrochemistry of proteins and nucleic acids: the focus on 3D structure // *Electrochem. Commun.* 2021. V. 125. Article 106983.
95. *Suprun E.V., Zharkova M.S., Morozovich G.E., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Archakov A.I.* Analysis of redox activity of proteins on the carbon screen printed electrodes // *Electroanalysis.* 2013. V. 25. P. 2109.
96. *Brabec V., Koudelka J.* Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes. The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample // *J. Electroanal. Chem.: Interfacial Electrochem.* 1980. V. 116. P. 793.
97. *Chiorcea-Paquim A.M., Oliveira-Brett A.M.* Redox behaviour of G-quadruplexes // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 126. P. 162.
98. *Veloso A., Kerman K.* Advances in electrochemical detection for study of neurodegenerative disorders // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 5725.
99. *Fojta M., Daňhel A., Havran L., Vyskočil V.* Recent progress in electrochemical sensors and assays for DNA damage and repair // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 79. P. 160.
100. *Suprun E.V.* Protein post-translational modifications – A challenge for bioelectrochemistry // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 116. P. 44.
101. *Bartosik M., Jirakova L.* Electrochemical analysis of nucleic acids as potential cancer biomarkers // *Curr. Opin. Electrochem.* 2019. V. 14. P. 96.
102. *Lin Y.W.* Structure and function of heme proteins regulated by diverse post-translational modifications // *Arch. Biochem. Biophys.* 2018. V. 641. P. 1.

103. Soskic V., Groebe K., Schrattenholz A. Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing // *Exp. Gerontol.* 2008. V. 43. P. 247.
104. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 315.
105. Humphrey S.J., James D.E., Mann M. Protein phosphorylation: A major switch mechanism for metabolic regulation // *Trends Endocrinol. Metab.* 2015. V. 26. P. 676.
106. Scheller F.W., Wollenberger U., Lei C., Jin W., Ge B., Lehmann C., Lisdat F., Fridman V. Bioelectrocatalysis by redox enzymes at modified electrodes // *Rev. Mol. Biotechnol.* 2002. V. 82. P. 411.
107. Ferapontova E.E., Shleev S., Ruzgas T., Stoica L., Christenson A., Tkac J., Yaropolov A.I., Gorton L. Direct electrochemistry of proteins and enzymes // *Perspect. Bioanal.* 2005. V. 1. P. 517.
108. Scheller F.W., Bistolas N., Liu S., Janchen M., Katterle M., Wollenberger U. Thirty years of haemoglobin electrochemistry // *Adv. Coll. Interface Sci.* 2005. V. 116. P. 111.
109. Paleček E., Tkáč J., Bartosik M., Bertók T., Ostatná V., Paleček J. Electrochemistry of nonconjugated proteins and glycoproteins. Toward sensors for biomedicine and glycomics // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. P. 2045.
110. Suprun E.V., Shumyantseva V.V., Archakov A.I. Protein electrochemistry: Application in medicine. A review // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 140. P. 72.
111. Vacek J., Zatloukalova M., Novak D. Electrochemistry of membrane proteins and protein–lipid assemblies // *Curr. Opinion Electrochem.* 2018. V. 12. P. 73.
112. Hasoň S., Daňhel A., Schwaržová-Pecková K., Fojta M., Carbon electrodes in electrochemical analysis of biomolecules and bioactive substances: Roles of surface structures and chemical groups / *Nanotechnology and Biosensors* / Eds. Nikolelis D.P., Nikoleli G.P. Elsevier. 2018. P. 51.
113. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwaržová-Pecková K. Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1077. P. 30.
114. Suprun E.V., Karpova E.V., Radko S.P., Karyakin A.A. Advanced electrochemical detection of amino acids and proteins through flow injection analysis and catalytic oxidation on Prussian Blue // *Electrochim. Acta.* 2020. V. 331. Article 135289.
115. Özcan A., Şahin Y. A novel approach for the selective determination of tryptophan in blood serum in the presence of tyrosine based on the electrochemical reduction of oxidation product of tryptophan formed in situ on graphite electrode // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 31. P. 26.
116. Vestergaard M., Kerman K., Saito M., Nagatani N., Takamura Y., Tamiya E. A Rapid label-free electrochemical detection and kinetic study of Alzheimer's amyloid beta aggregation // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 11892.
117. Somji M., Dounin V., Muench S.B., Schulze H., Bachmann T.T., Kerman K. Electroanalysis of amino acid substitutions in bioengineered acetylcholinesterase // *Bioelectrochemistry.* 2012. V. 88. P. 110.
118. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): Direct electrochemical oxidation on carbon electrodes // *Bioelectrochemistry.* 2013. V. 89. P. 11.
119. Topal B.D., Özkan S.A., Uslu B. Direct electrochemistry of native and denatured alpha-2-macroglobulin by solid electrodes // *J. Electroanal. Chem.* 2014. V. 719. P. 14.
120. Chiku M., Nakamura J., Fujishima A., Einaga Y. Conformational change detection in nonmetal proteins by direct electrochemical oxidation using diamond electrodes // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 5783.
121. Dorcak V., Ostatná V., Palecek E. Electrochemical reduction and oxidation signals of angiotensin peptides. Role of individual amino acid residues // *Electrochem. Commun.* 2013. V. 31. P. 80.
122. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Radko S.P., Kozin S.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. Direct electrochemical oxidation of amyloid- β peptides via tyrosine, histidine, and methionine residues // *Electrochem. Commun.* 2016. V. 65. P. 53.
123. Suprun E.V., Radko S.P., Khmeleva S.A., Mitkevich V.A., Archakov A.I., Makarov A.A., Shumyantseva V.V. Electrochemical oxidation of amyloid-beta peptide isoforms on carbon screen printed electrodes // *Electrochem. Commun.* 2017. V. 75. P. 33.
124. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Alzheimer's disease amyloid beta peptides in vitro electrochemical oxidation // *Bioelectrochemistry.* 2017. V. 114. P. 13.
125. Nguyen N.T., Wrona M.Z., Dryhurst G. Electrochemical oxidation of tryptophan // *J. Electroanal. Chem.: Interfacial Electrochem.* 1986. V. 199. P. 101.
126. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways // *J. Electroanal. Chem.* 2011. V. 655. P. 9.
127. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Pathways of electrochemical oxidation of indolic compounds // *Electroanalysis.* 2011. V. 23. P. 1337.
128. Šek S., Vacek J., Dorčák V. Electrochemistry of peptides // *Curr. Opinion Electrochem.* 2019. V. 14. P. 166.
129. Ostatná V., Cernocka H., Kurzatowska K., Palecek E. Native and denatured forms of proteins can be discriminated at edge plane carbon electrodes // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 735 P. 31.
130. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Kiseleva Y.Y., Radko S.P., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. Quantitative aspects of electrochemical detection of amyloid- β aggregation // *Electroanalysis.* 2016. V. 28. P. 1977.
131. Suprun E.V., Radko S.P., Andreev E.A., Khmeleva S.A., Kozin S.A., Makarov A.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. Electrochemical detection of Zn(II)- and Cu(II)-induced amyloid- β aggregation: Quantitative aspects and application to amyloid- β isoforms // *J. Electroanal. Chem.* 2017. V. 791. P. 152.
132. Suprun E.V., Radko S.P., Farafonova T.E., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. Application of an electrochemical method to evaluation of amyloid- β aggregation inhibitors: Testing the RGKLVFFGR-NH₂ peptide antiaggregant // *Electroanalysis.* 2017. V. 29. P. 2906.
133. Suprun E.V., Radko S.P., Kozin S.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A. Electrochemical detection of Zn(II)-induced amyloid- β aggregation: Insights into aggregation mechanisms // *J. Electroanal. Chem.* 2018. V. 830–831. P. 34.

134. Suprun E.V., Radko S.P., Kozin S.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A. Application of electrochemical method to a comparative study of spontaneous aggregation of amyloid- β isoforms // *J. Electroanal. Chem.* 2020. V. 861. Article 113938.
135. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Radko S.P., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. Electrochemical analysis of amyloid- β domain 1-16 isoforms and their complexes with Zn(II) ions // *Electrochim. Acta.* 2016. V. 187. P. 677.
136. Chikae M., Fukuda T., Kerman K., Idegami K., Miura Y., Tamiya E. Amyloid- β detection with saccharide immobilized gold nanoparticle on carbon electrode // *Bioelectrochemistry.* 2008. V. 74. P. 118.
137. Ferapontova E.E., Grigorenko V.G., Egorov A.M., Borchers T., Ruzgas T., Gorton L. Direct electron transfer in the system gold electrode–recombinant horseradish peroxidases // *J. Electroanal. Chem.* 2001. V. 509. P. 19.
138. Ashe D., Alleyne T., Iwuoha E. Serum cytochrome c detection using a cytochrome c oxidase biosensor // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2007. V. 46. P. 185.
139. Suprun E.V., Shilovskaya A.L., Lisitsa A.V., Bulko T.V., Shumyantseva V.V., Archakov A.I. Electrochemical immunosensor based on metal nanoparticles for cardiac myoglobin detection in human blood plasma // *Electroanalysis.* 2011. V. 23. P. 1051.
140. Pandiaraj M., Sethy N.K., Bhargava K., Kameswara-rao V., Karunakaran C. Designing label-free electrochemical immunosensors for cytochrome c using nanocomposites functionalized screen printed electrodes // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 54. P. 115.
141. Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V., Masamreh R.A., Bulko T.V., Archakov A.I. From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450 // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 121. P. 192.
142. Gilardi G., Fantuzzi A., Sadeghi S.J. Engineering and design in the bioelectrochemistry of metalloproteins // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001. V. 11. P. 491.
143. Panicco P., Castrignanò S., Sadeghi S.J., Di Nardo G., Gilardi G. Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response // *Bioelectrochemistry.* 2021. V. 138. Article 107729.
144. Olloqui-Sariego J.L., Zakharova G.S., Poloznikov A.A., Calvente J.J., Hushpulan D.M., Gorton L., Andreu R. Influence of tryptophan mutation on the direct electron transfer of immobilized tobacco peroxidase // *Electrochim. Acta.* 2020. V. 351. Article 136465.
145. Wu H., Wang X., Qiao M., Zhang H., Jin X., Fan S. Enhancing sensitivity of hemoglobin-based electrochemical biosensor by using protein conformational intermediate // *Sens. Actuators B: Chem.* 2015. V. 221. P. 694.
146. Lancellotti L., Borsari M., Bellei M., Bonifacio A., Bortolotti C.A., Di Rocco G., Ranieri A., Sola M., Battistuzzi G. Urea-induced denaturation of immobilized yeast iso-1 cytochrome c: Role of Met80 and Tyr67 in the thermodynamics of unfolding and promotion of pseudoperoxidase and nitrite reductase activities // *Electrochim. Acta.* 2020. V. 363. Article 137237.
147. Gómez-Mingot M., Alcaraz L.A., Heptinstall J., Donaire A., Piccioli M., Montiel V., Iniesta J. Electrochemical nitration of myoglobin at tyrosine 103: Structure and stability // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. V. 529. P. 26.
148. Díaz-Moreno I., García-Heredia J.M., Díaz-Quintana A., Teixeira M., Miguel A. Nitration of tyrosines 46 and 48 induces the specific degradation of cytochrome c upon change of the heme iron state to high-spin // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1807. P. 1616.
149. Roberts E.S., Lin H.L., Crowley J.R., Vuletich J.L., Osawa Y., Hollenberg P.F. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine and inactivation of the catalytic activity of cytochrome P450 2B1 // *Chem. Res. Toxicol.* 1998. V. 11. P. 1067.
150. Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G.J., Jr. Protein posttranslational Modifications: The chemistry of proteome diversifications // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005. V. 44. P. 7342.
151. Suprun E.V., Radko S.P., Farafonova T.E., Kozin S.A., Makarov A.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. Electrochemical detection of protein post-translational modifications: Phosphorylation and nitration of amyloid-beta (1–16) // *Electrochim. Acta.* 2017. V. 258. P. 1182.
152. Fernandes I.P., Oliveira-Brett A.M. Caveolin proteins electrochemical oxidation and interaction with cholesterol // *Bioelectrochemistry.* 2020. V. 133. Article 107451.
153. Супрун Е.В., Жаркова М.С., Веселовский А.В., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. Электрохимическое окисление тромбина на печатных графитовых электродах // *Электрохимия.* 2017. Т. 53. С. 108.
154. Brabec V. Study of thermal and acid denaturation of DNA by means of voltammetry at graphite electrodes // *Biopolymers.* 1979. V. 18. P. 2397.
155. Brabec V. Interaction of nucleic acids with electrically charged surfaces: VI. A comparative study on the electrochemical behaviour of native and denatured dnas at graphite electrodes // *Biophys. Chem.* 1979. V. 9. P. 289.
156. de-los-Santos-Álvarez P., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Ordieres A.J., Tunon-Blanco P. Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications // *Electroanalysis.* 2004. V. 16. P. 1193.
157. Oliveira-Brett A.M. Electrochemical DNA Assays, Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques, and Applications / Ed. Bartlett P.N. Chichester: John Wiley & Sons, 2008. P. 411.
158. Ferapontova E.E. DNA electrochemistry and electrochemical sensors for nucleic acids // *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2018. V. 11. P. 197.
159. Špaček J., Daňhel A., Hasoň S., Fojta M. Label-free detection of canonical DNA bases, uracil and 5-methylcytosine in DNA oligonucleotides using linear sweep voltammetry at a pyrolytic graphite electrode // *Electrochem. Commun.* 2017. V. 82. P. 34.
160. Rodrigues Pontinha A.D., Chiorcea-Paquim A.M., Eritja R., Oliveira-Brett A.M. Quadruplex nanostructures of d (TGGGGT): Influence of sodium and potassium ions // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 5851.
161. Vidláková P., Pivoňková H., Kejnovská I., Trnková L., Vorlíčková M., Fojta M., Havran L. G-quadruplex-based structural transitions in 15-mer DNA oligonucleotides varying in lengths of internal oligo(dG) stretches detected by voltammetric techniques // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. P. 5817.
162. Špaček J., Fojta M., Wang J. Electrochemical reduction and oxidation of six natural 2'-deoxynucleosides at a pyrolytic graphite electrode in the presence or ab-

- sence of ambient oxygen // *Electroanalysis*. 2019. V. 3. P. 2057.
163. *Oliveira-Brett A.M., Piedade J.A.P., Silva L.D., Diculescu V.C.* Voltammetric determination of all DNA nucleotides // *Anal. Biochem.* 2004. V. 332. P. 321.
164. *Goncalves L.M., Batchelor-McAuley C., Barros A.A., Compton R.G.* Electrochemical oxidation of adenine: a mixed adsorption and diffusion response on an edge-plane pyrolytic graphite electrode // *J. Phys. Chem. C*. 2010. V. 114. P. 14213.
165. *Li Q., Batchelor-McAuley C., Compton R.G.* Electrochemical oxidation of guanine: Electrode reaction mechanism and tailoring carbon electrode surfaces to switch between adsorptive and diffusional responses // *J. Phys. Chem. B*. 2010. V. 114. P. 7423.
166. *Oliveira Brett A.M., Matysik F.M.* Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode // *J. Electroanal. Chem.* 1997. V. 429. P. 95.
167. *Ferapontova E.E.* Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes // *Electrochim. Acta*. 2004. V. 49. P. 1751.
168. *Goyal R.N., Singh U.P., Abdullah A.A.* Electrochemical oxidation of uracil and 5-halouracils at pyrolytic graphite electrode // *Indian J. Chem.* 2003. V. 42A. P. 42.
169. *Ferapontova E.E., Domínguez E.* Direct electrochemical oxidation of DNA on polycrystalline gold electrodes // *Electroanalysis*. 2003. V. 15. P. 629.
170. *Brett C.M., Oliveira Brett A.M., Serrano S.H.* On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes // *J. Electroanal. Chem.* 1994. V. 366. P. 225.
171. *Wu L., Zhou J., Luo J., Lin Z.* Oxidation and adsorption of deoxyribonucleic acid at highly ordered pyrolytic graphite electrode // *Electrochim. Acta*. 2000. V. 45. P. 2923.
172. *Yao T., Wasa T., Musha S.* The anodic voltammetry of deoxyribonucleic acid at a glassy carbon electrode // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1978. V. 51. P. 1235.
173. *Brotons A., Mas L.A., Metters J.P., Banks C.E., Iniesta J.* Voltammetric behaviour of free DNA bases, methylcytosine and oligonucleotides at disposable screen printed graphite electrode platforms // *Analyst*. 2013. V. 138. P. 5239.
174. *Stempkowska I., Ligaj M., Jasnowska J., Langer J., Filipiak M.* Electrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode // *Bioelectrochemistry*. 2007. V. 70. P. 488.
175. *Suprun E.V., Kutdusova G.R., Khmeleva S.A., Radko S.P.* Towards deeper understanding of DNA electrochemical oxidation on carbon electrodes // *Electrochem. Commun.* 2021. V. 124. Article 106947.
176. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Tikhonova E.G., Sanzhakov M.A., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Pergushov D.V., Schacher F.H., Sigolaeva L.V.* Electrochemical studies of the interaction of rifampicin and nanosome/rifampicin with dsDNA // *Bioelectrochemistry*. 2021. V. 140. Article 107736.
177. *Wang J., Chen L., Chicharro M.* Trace measurements of nucleic acids using flow injection amperometry // *Anal. Chim. Acta*. 1996. V. 319. P. 347.
178. *Diculescu V.C., Chiorcea-Paquim A.M., Oliveira-Brett A.M.* Applications of a DNA-electrochemical biosensor // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 79. P. 23.
179. *Ферапонтова Е.Э., Шуповсков С.В.* Электрохимически инициированное окислительное повреждение двухцепочечной ДНК из тимуса теленка, адсорбированной на золотых электродах // *Биохимия*. 2003. Т. 68. № 1. С. 118. (*Ferapontova E.E., Shipovskov S.V.* Electrochemically induced oxidative damage of double-stranded calf thymus DNA adsorbed on gold electrodes // *Biochemistry (Moscow)*. 2003. V. 68. P. 99.)
180. *Yang Z.S., Wang Y.L., Zhang Y.Z.* Electrochemically induced DNA cleavage by copper-bipyridyl complex // *Electrochem. Commun.* 2004. V. 6. P. 158.
181. *Honeychurch K.C., O'Donovan M.R., Hart J.P.* Voltammetric behaviour of DNA bases at a screen-printed carbon electrode and its application to a simple and rapid voltammetric method for the determination of oxidative damage in double stranded DNA // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 22. P. 2057.
182. *Ferapontova E.E.* Basic concepts and recent advances in electrochemical analysis of nucleic acids // *Curr. Opin. Electrochem.* 2017. V. 5. P. 218.
183. *Hocek M., Fojta M.* Nucleobase modification as redox DNA labelling for electrochemical detection // *Chem. Soc. Rev.* 2011. V. 40. P. 5802.
184. *Fojta M.* Redox labeling of nucleic acids for electrochemical analysis of nucleotide sequences and DNA damage / *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications* / Eds. Nikolelis D.P., Nikoleli G.-P. N.Y.: Springer, 2016. P. 309.
185. *Oberacher H., Erb R., Plattner S., Chervet J.P.* Mechanistic aspects of nucleic-acid oxidation studied with electrochemistry-mass spectrometry // *Trends Anal. Chem.* 2015. V. 70. P. 100.
186. *Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C.* Isothermal amplification of nucleic acids // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. P. 12491.
187. *Long Y.-T.* Nanopore confinement for single-molecule measurement of proteins // *Small Methods*. 2020. V. 4. Article 2000695.
188. *Lin Y., Ying Y.-L., Long Y.-T.* Nanopore confinement for electrochemical sensing at the single-molecule level // *Curr. Opinion Electrochem.* 2018. V. 7. P. 172.
189. *Li S., Wu X.Y., Li M.Y., Liu S.C., Ying Y.L., Long Y.T.* T232K/K238Q aerolysin nanopore for mapping adjacent phosphorylation sites of a single Tau peptide // *Small Methods*. 2020. V. 4. № 11. Article 2000014.
190. *Laver T., Harrison J., O'Neill P.A., Moore K., Farbos A., Paszkiewicz K., Studholme D.J.* Assessing the performance of the Oxford nanopore technologies MinION // *Biomol. Detect. Quantif.* 2015. V. 3. P. 1.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.25:667.622.32

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТАРТРАЗИНА НА ЭЛЕКТРОДЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ НАНОЧАСТИЦАМИ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ И ЦЕТИЛТРИФЕНИЛФОСФОНИЙ БРОМИДОМ© 2022 г. Г. К. Зиятдинова^а, *, Г. К. Будников^а^аХимический институт им. А.М. Бутлерова, Казанский федеральный университет
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

*e-mail: Ziyatdinovag@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2021 г.

После доработки 08.05.2021 г.

Принята к публикации 08.05.2021 г.

Созданы стеклоуглеродные электроды (СУЭ), модифицированные наночастицами CeO_2 и поверхностно-активными веществами (ПАВ) различной природы, и найдены вольт-амперные характеристики окисления тартразина на них. Электрод, модифицированный катионным ПАВ цетилтрифенилфосфония бромидом (ЦТФФБ), обеспечивает 72.5-кратное увеличение токов окисления тартразина по сравнению с СУЭ. Установлено, что окисление тартразина на CeO_2 -ЦТФФБ/СУЭ протекает необратимо с участием одного электрона и контролируется поверхностными процессами. Разработан способ вольтамперометрического определения тартразина на CeO_2 -ЦТФФБ/СУЭ. Диапазон определяемых содержаний составляет 2.50–250 мкМ тартразина с пределом обнаружения 2.4 мкМ. Предложенный способ применен для определения содержания тартразина в напитке “Тархун”.

Ключевые слова: вольтамперометрия, химически модифицированные электроды, наночастицы оксидов металлов, пищевые красители, анализ пищевых продуктов.

DOI: 10.31857/S0044450222060202

Для восстановления цвета, утраченного в процессе технологической обработки, или улучшения внешнего вида продуктов питания активно используются красители. Среди большого разнообразия пищевых красителей можно отметить тартразин (5-окси-1-(*n*-сульфофенил)-4-[(*n*-сульфофенил)-азо]-пиразол-3-карбоновой кислоты тринариевая соль). В пищевой промышленности он маркируется как пищевая добавка E102 [1]. Тартразин входит в состав безалкогольных напитков, соков, желе, конфет, пирожных, хлопьев, супов и других продуктов [2]. Однако тартразин, как и другие синтетические красители, проявляет токсические свойства, зависящие от его концентрации. Высокая концентрация тартразина в сочетании с бензоатом натрия – консервантом, присутствующим в пищевых продуктах, может вызывать гиперактивность у детей, аллергию и астму [1]. В результате распада красителя в организме под действием азоредуктазы образуются токсичные ароматические амины [2]. В связи с этим необходимо строго контролировать содержание тартразина в пищевых продуктах, что требует экспрессных, чувствительных и селективных способов его определения.

Азо- и гидроксильная группы в структуре тартразина электрохимически активны, поэтому для определения тартразина предложен широкий круг электрохимических способов. Так, рассмотрено электровосстановление тартразина на стеклоуглеродном электроде (СУЭ) в кислой среде [3]. Показано, что в условиях адсорбционной инверсионной вольтамперометрии диапазон определяемых содержаний составляет 0.05–0.50 мг/л с пределом обнаружения 0.011 мг/л. Для повышения чувствительности определения тартразина разработан ряд химически модифицированных электродов на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ) [4], углеродных наноматериалов [5, 6], наночастиц металлов [7, 8], полимерных покрытий [9] и их сочетаний [10–12]. Для повышения селективности определения тартразина созданы электроды на основе полимеров с молекулярными отпечатками [13–15]. Определение проводят по уменьшению токов восстановления $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ в присутствии тартразина [13, 15]. Аналитические характеристики вольтамперометрического определения тартразина на модифицированных электродах представлены в табл. 1.

Таблица 1. Аналитические характеристики вольтамперометрического определения тартразина на химически модифицированных электродах

Электрод	Метод	ПрО, мкМ	Диапазон определяемых содержаний, мкМ	Литература
УПЭ-додецилсульфат натрия	ЦВА	5.2	20–50, 60–110	[4]
Пиролитический ГЭ/МУНТ	ЦВА	0.93	3.7–130, 130–430	[5]
СУЭ/расслоенный графит	АдАДИВ	0.0028	0.0094–0.37	[6]
СУЭ/нанолиты Вi с хитозаном	ДИВ	15.12	24–980, 980–2780	[7]
УПЭ-наночастицы золота	ДИВ	0.017	0.05–1.5	[8]
УПЭ/полиглицин	ЦВА	0.283	1–27, 35–87	[9]
СУЭ/электровосстановленный оксид графена-TiO ₂	ДВА второго порядка	0.008	0.020–20	[10]
ГЭ/поли(L-фенилаланин)/графен	ДИВ	1.54	2.0–100	[11]
УПЭ-наночастицы ZnO/поли(n-аминобензолсульфоновая кислота)	ДИВ	0.080	0.0349–1.246, 1.246–5.44	[12]
СУЭ/ПМО на основе полипиролла	КВВ	0.001	0.001–0.010	[13]
СУЭ/МУНТ-1-пропаргил-3-бутилимидазольный бромид@наночастицы Pt/ПМО на основе 4-винилпиридина	ДИВ	0.008	0.03–5.0, 5.0–20	[14]
СУЭ/ПМО на основе со-электрополимеризованных m-дигидроксibenзола и o-фенилендиамина	ДИВ	0.0035	0.005–1.1	[15]

Обозначения: ПрО – предел обнаружения, УПЭ – угольно-пастовый электрод, ГЭ – графитовый электрод, МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки, ЦВА – циклическая вольтамперометрия, СУЭ – стеклоуглеродный электрод, АдАДИВ – адсорбционная анодная дифференциально-импульсная вольтамперометрия, ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия, ДВА – дифференциальная вольтамперометрия, ПМО – полимер с молекулярными отпечатками, КВВ – квадратно-волновая вольтамперометрия.

Наночастицы CeO₂ в сочетании с ПАВ представляют интерес в качестве модификатора электродной поверхности. Такой подход обеспечивает значительное повышение чувствительности и более низкие пределы обнаружения целевых аналитов, что показано на примере природных фенольных антиоксидантов [16–19]. При этом модифицированные электроды не проявляют электрохимическую активность. Это позволяет регистрировать собственный аналитический сигнал определяемого соединения, что повышает его селективность. Применительно к пищевым красителям такое сочетание модификаторов в литературе не описано.

В настоящей работе для определения тартразина предложен СУЭ, модифицированный наночастицами CeO₂ и поверхностно-активными веществами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и растворы. Использовали тартразин (85%, Sigma, США), цетилпиридиний бромид (ЦПБ) (98%, Aldrich, Германия), цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) (99% Acros Organics, Бельгия), цетилтрифенилфосфоний бромид (ЦТФФБ) (синтезирован на кафедре высокомо-

лекулярных и элементоорганических соединений Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ), додецилсульфат натрия (ДДС) фармацевтической чистоты (Panreac, Испания), Brij® 35 (Acros Organics, Бельгия) и Triton X-100 (Aldrich, Германия). Остальные реактивы были марки х. ч.

Стандартный 10 мМ раствор тартразина готовили по точной навеске, которую растворяли в 5.0 мл дистиллированной воды. Более разбавленные растворы готовили непосредственно перед измерениями в мерных колбах емк. 5.0 мл, доводя до метки дистиллированной водой.

Растворы ПАВ (5.0 мМ растворы ЦПБ и ЦТАБ, 3.0 мМ ЦТФФБ, 10 мМ ДДС, Brij® 35 и Triton X-100) готовили, растворяя точные навески в дистиллированной воде. Более разбавленные растворы готовили соответствующим разбавлением стандартных растворов.

Модифицирование электрода. В качестве модификатора поверхности электрода использовали водную дисперсию, содержащую 10 мас. % наночастиц CeO₂, с размером частиц <25 нм (Sigma-Aldrich, США). Рабочие дисперсии в растворах ПАВ различной природы и концентрации готовили последовательным разбавлением с последующей ультразвуковой обработкой в течение

10 мин. Концентрацию наночастиц варьировали от 0.5 до 1.5 мг/мл.

На поверхность СУЭ наносили 3 мкл суспензии методом капельного испарения. Перед модификацией рабочую поверхность СУЭ обновляли механически, полируя оксидом алюминия с размером частиц 0.05 мкм. Затем электрод ополаскивали ацетоном и дистиллированной водой.

Вольтамперометрические и хроноамперометрические измерения проводили на потенциостате/гальваностате Autolab PGSTAT 302N (Eco Chemie B.V., Нидерланды) с программным обеспечением NOVA 1.10.1.9 в трехэлектродной электрохимической ячейке объемом 10.0 мл. Использовали рабочий СУЭ (CH Instruments, Inc., США, площадь поверхности 7.07 мм²) и СУЭ, модифицированный наночастицами CeO_2 , насыщенный хлоридсеребряный электрод сравнения и вспомогательный платиновый электрод. Для расчетов в вольтамперометрии применяли коррекцию базовой линии по программе NOVA 1.10.1.9, что позволило точнее измерять параметры пиков. В электрохимическую ячейку вносили фоновый электролит и аликвоту раствора тартразина (общий объем раствора в ячейке 5.0 мл) и регистрировали дифференциально-импульсные вольтамперограммы при амплитуде импульса 50 мВ и времени импульса 50 мс или циклические вольтамперограммы от 0.4 до 1.5 В при различных скоростях сканирования потенциала. Для количественного определения тартразина использовали вольтамперометрию с линейной разверткой потенциала от 0.4 до 1.6 В со скоростью 250 мВ/с.

Для определения pH фонового электролита использовали pH-метр Эксперт-001 (ООО “Эко-никс-Эксперт”, Россия).

Анализ реальных образцов проводили после предварительной дегазации в ультразвуковой ванне в течение 10 мин. В электрохимическую ячейку вносили 500 мкл напитка “Тархун” и регистрировали вольтамперограммы с линейной разверткой потенциала в диапазоне от 0.4 до 1.6 В со скоростью изменения потенциала 250 мВ/с.

Статистическую обработку результатов проводили для 5 измерений при доверительной вероятности 0.95. Результаты представляли как $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$, где $\bar{X}$ — среднее значение и $\Delta\bar{X}$ — доверительный интервал. Случайную погрешность определения оценивали по величине относительного стандартного отклонения (s_r). Регрессионный анализ выполняли в программе OriginPro 8.0 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что тартразин окисляется на СУЭ при 0.890 В на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.0 (рис. 1). Несмотря на высокую

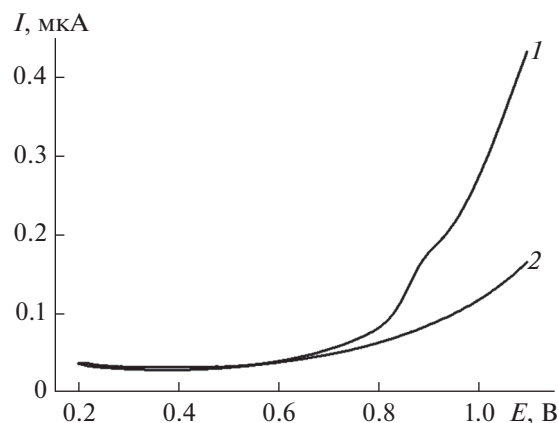


Рис. 1. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы 100 мкМ тартразина на стеклоуглеродном электроде (1) на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.0 (2). Амплитуда импульса 50 мВ, время импульса 50 мс, скорость изменения потенциала 10 мВ/с.

концентрацию тартразина в ячейке (100 мкМ), токи окисления составляют 12 ± 4 нА даже в дифференциально-импульсном режиме, что не позволяет использовать СУЭ для аналитических целей. В связи с этим рассмотрели СУЭ, модифицированные наночастицами CeO_2 , диспергированными в ПАВ. Следует отметить, что наночастицы CeO_2 имеют при pH 7.0 частичный отрицательный поверхностный заряд [20], что обуславливает их электростатическое взаимодействие с положительно заряженными “головами” катионных ПАВ. Для анионного ПАВ ДДС в этих условиях наблюдается электростатическое отталкивание, а в случае неионогенных ПАВ ключевую роль, вероятно, играют гидрофобные взаимодействия. Таким образом, катионные ПАВ более прочно удерживаются на электродной поверхности.

Варьирование природы ПАВ показало, что для всех рассматриваемых ПАВ происходит увеличение токов окисления тартразина по сравнению с СУЭ (табл. 2). Более высокие токи окисления наблюдаются на электродах, модифицированных катионными ПАВ, что объясняется электростатическими взаимодействиями катионного ПАВ с тартразином, присутствующим при pH 7.0 в виде аниона ($pK_{a1} = 2.0$, $pK_{a2} = 5.0$, $pK_{a3} = 10.89$) [21]. Кроме того, сравнение токов окисления для ЦТАБ, ЦПБ и ЦТФФБ иллюстрирует вклад гидрофобных взаимодействий, в частности взаимодействий ароматических колец в структуре ПАВ и тартразина. Максимальные токи наблюдаются в случае ЦТФФБ, обладающего наибольшей гидрофобностью среди изученных катионных ПАВ. Пик окисления тартразина расщепляется на два в случае катионных ЦТАБ и ЦПБ (табл. 2). Аналогичный эффект описан для эвгенола на CeO_2 -

Таблица 2. Вольт-амперные характеристики окисления тартразина на электродах, модифицированных CeO_2 и ПАВ различной природы ($c_{\text{ПАВ}} = 0.10$ мМ, $n = 5$, $P = 0.95$)

Электрод	E , В	I , мкА
СУЭ	0.890	0.012 ± 0.004
CeO_2 -ДДС/СУЭ	0.890	0.17 ± 0.04
CeO_2 -ЦТАБ/СУЭ	0.750	0.078 ± 0.03
	0.910	0.18 ± 0.01
CeO_2 -ЦПБ/СУЭ	0.745	0.27 ± 0.01
	0.900	0.31 ± 0.02
CeO_2 -ЦТФФБ/СУЭ	1.02	0.87 ± 0.03
CeO_2 -Brj® 35/СУЭ	0.900	0.21 ± 0.01
CeO_2 -Triton X-100/СУЭ	0.895	0.087 ± 0.005

ДДС/СУЭ [16], а также характерен для электроокисления органических соединений в ПАВ-содержащих средах и объясняется изменением скорости переноса электрона [22]. Это также подтверждается смещением потенциалов окисления тартразина.

Оценено влияние концентрации наночастиц CeO_2 и ЦТФФБ в дисперсии на вольт-амперные характеристики тартразина. Установлено, что потенциалы окисления при этом не изменяются, а токи окисления варьируются статистически значимо (рис. 2). При увеличении концентрации наночастиц CeO_2 до 1.0 мг/мл наблюдается увеличение токов окисления независимо от concentra-

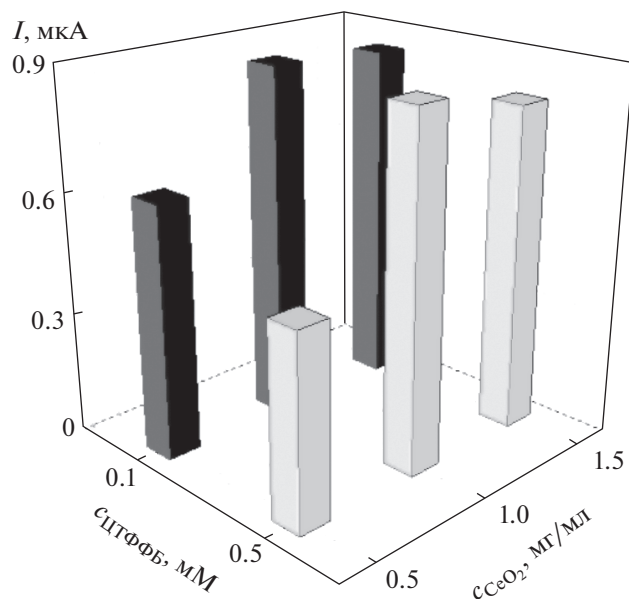


Рис. 2. Влияние концентраций наночастиц CeO_2 и бромид цетилтрифенилфосфония на токи окисления 100 мкМ тартразина на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.0 по данным дифференциальной импульсной вольтамперометрии.

ции ЦТФФБ. А при переходе к концентрации наночастиц CeO_2 1.5 мг/мл токи уменьшаются, причем для содержания ЦТФФБ 0.10 мМ статистически недостоверно. Таким образом, для дальнейших исследований выбрали электрод, полученный на основе концентрации наночастиц CeO_2 1.0 мг/мл в 0.10 мМ растворе ЦТФФБ.

Изучено электроокисление тартразина на CeO_2 -ЦТФФБ/СУЭ (рис. 3). Варьирование pH фонового электролита от 4.8 до 8.0 показало, что потенциал окисления тартразина смещается в область меньших значений по мере увеличения pH фонового электролита (рис. 3а), что свидетельствует об участии протонов в электродной реакции. Токи окисления тартразина постепенно увеличиваются вплоть до pH 7.5, а затем резко уменьшаются (рис. 3б). Дальнейшие исследования проводили при pH 7.5.

Для установления природы электрохимического процесса оценили влияние скорости изменения потенциала на токи окисления тартразина (рис. 4). Показано, что окисление контролируется адсорбцией аналита, что подтверждается линейной зависимостью токов окисления от v (уравнение (1)) и значением тангенса угла наклона зависимости $\ln I_n$ от $\ln v$ (уравнение (2)):

$$I_n (\text{мкА}) = (0.06 \pm 0.02) + (0.0189 \pm 0.0001)v (\text{мВ/с}), \quad (1)$$

$$R^2 = 0.9995,$$

$$\ln I_n (\text{мкА}) = (2.86 \pm 0.03) + (0.95 \pm 0.01) \ln v (\text{В/с}), \quad (2)$$

$$R^2 = 0.9992.$$

Отсутствие катодной ступени на циклических вольтамперограммах и смещение потенциала окисления тартразина в область более положительных значений по мере увеличения v свидетельствуют о необратимом окислении. Потенциал окисления линейно увеличивается в зависимости от $\ln v$ согласно уравнению (3):

$$E_n (\text{В}) = (1.225 \pm 0.002) + (0.050 \pm 0.001) \ln v (\text{В/с}), \quad (3)$$

$$R^2 = 0.9979.$$

Согласно уравнению Лавирона [23] (уравнение (4)) $\alpha_a n = 0.51$.

$$E_p = E^{0'} + \frac{RT}{\alpha_a n F} \ln \frac{RT k_s}{\alpha_a n F} + \frac{RT}{\alpha_a n F} \ln v. \quad (4)$$

Для необратимого процесса $\alpha_a = 0.5$ [24]. Тогда число электронов, участвующих в реакции, равно 1, что хорошо согласуется с данными для других модифицированных электродов [9–12]. Таким образом, с учетом данных [9–12] тартразин окисляется на CeO_2 -ЦТФФБ/СУЭ с участием одного электрона и одного протона согласно схеме 1.

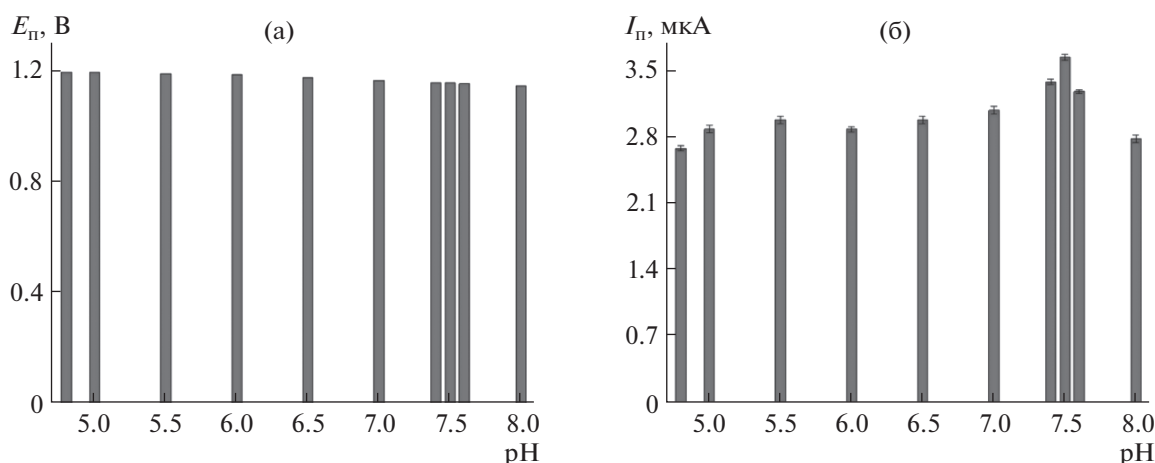


Рис. 3. Влияние pH фонового электролита на потенциал (а) и токи окисления (б) 250 мкМ тартразина по данным циклической вольтамперометрии. Скорость изменения потенциала 100 мВ/с.

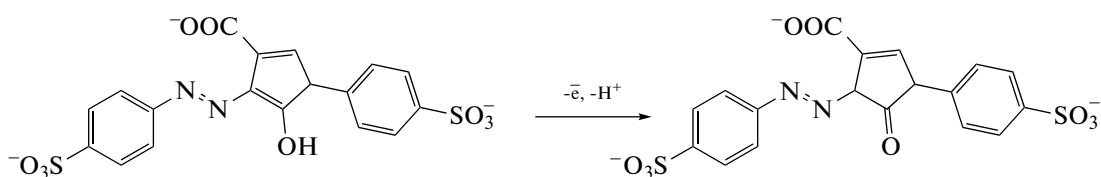


Схема 1. Окисление тартразина на стеклоуглеродном электроде, модифицированном наночастицами CeO_2 и бромидом цетилтрифенилфосфония.

Для количественного определения тартразина использовали вольтамперометрию с линейной разверткой потенциала. При этом на вольтамперограммах наблюдается четко выраженный пик окисления при 1.17 В (рис. 5), высота которого ли-

нейно связана с концентрацией тартразина в диапазоне 1.0–15 и 15–250 мкМ (уравнения (5) и (6)).

$$I_p (\mu\text{A}) = (0.008 \pm 0.002) + (14.9 \pm 0.2) \times 10^3 c(\text{M}), \quad R^2 = 0.9990, \quad (5)$$

$$I_p (\mu\text{A}) = (-0.25 \pm 0.04) + (37.9 \pm 0.3) \times 10^3 c(\text{M}), \quad R^2 = 0.9997. \quad (6)$$

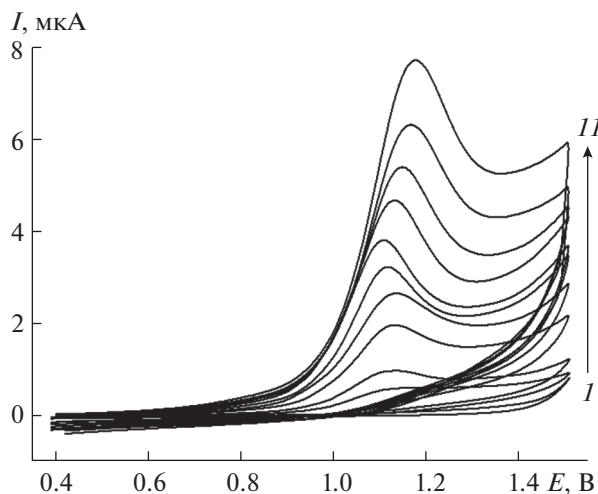


Рис. 4. Циклические вольтамперограммы 100 мкМ тартразина на CeO_2 -ЦТФФБ/СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5 (I) в зависимости от скорости изменения потенциала: 2–10, 3–25, 4–50, 5–75, 6–100, 7–120, 8–150, 9–175, 10–200, 11–250 мВ/с.

Предел обнаружения тартразина составляет 0.40 мкМ. Полученные характеристики превосходят описанные для некоторых других химически модифицированных электродов (табл. 1). Кроме того, предложенный электрод характеризуется более простой и экспрессной процедурой изготовления.

Выполнено определение тартразина в модельных растворах. Правильность результатов оценена по методу введено–найдено (табл. 3). Величина относительного стандартного отклонения не превышает 2%. Значения меры правильности свидетельствуют о высокой надежности результатов, получаемых с применением разработанного подхода.

Показана селективность отклика тартразина в присутствии 1000-кратных избытков неорганических ионов (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NO_3^- , Cl^- и SO_4^{2-}), 100-кратных избытков глюкозы, рамнозы и сахарозы,

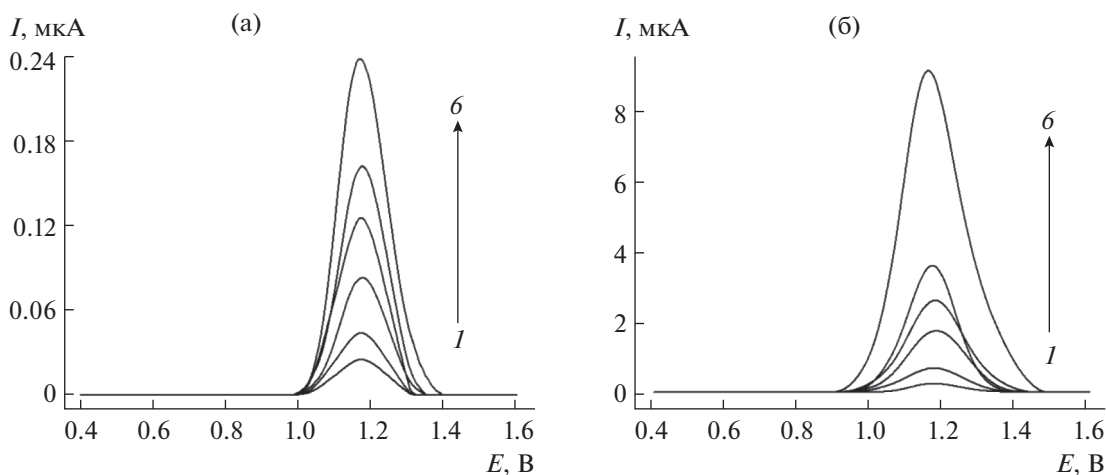


Рис. 5. Вольтамперограммы с линейной разверткой потенциала для тартразина различной концентрации на CeO_2 -ЦТФФБ/СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5. (а): 1 – 1.0, 2 – 2.5, 3 – 5.0, 4 – 7.5, 5 – 10, 6 – 15 мкМ. (б): 1 – 15, 2 – 25, 3 – 50, 4 – 75, 5 – 100, 6 – 250 мкМ. Скорость изменения потенциала 250 мВ/с.

арабиногалактана и аскорбиновой кислоты, а также пищевого красителя желтого “солнечного заката”, который часто используется совместно с тартразином.

Разработанный подход применен для определения тартразина в напитках “Тархун”. На вольт-

амперограммах регистрируется четко выраженный пик окисления тартразина при 1.17 В (рис. 6), что подтверждается данными метода добавок. Степень открытия составляет 100–101%, что свидетельствует о высокой точности определения и об отсутствии матричных эффектов.

Результаты определения тартразина представлены в табл. 4. Полученные содержания согласуются с данными спектрофотометрического определения [25] и не превышают регламентируемый верхний предел содержания тартразина в напитках [26]. Вычисленные значения t - и F -критериев меньше критических при $P = 0.95$, что свидетельствует об отсутствии систематических погрешностей измерений и равнозначности методов вольтамперометрии и спектрофотометрии. Предложенный метод характеризуется достаточной чувствительностью и высокой точностью, а также простотой и доступностью, что позволяет применять его в лабораториях по контролю качества напитков.

Таблица 3. Результаты вольтамперометрического определения тартразина в модельных растворах на CeO_2 -ЦТФФБ/СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5 ($n = 5$, $P = 0.95$)

Введено, мкг	Найдено, мкг	s_r	R , %
2.67	2.7 ± 0.1	0.049	101 ± 4
13.3	13.3 ± 0.2	0.015	100 ± 2
26.7	26.7 ± 0.3	0.0085	100 ± 1
200	201 ± 4	0.015	100 ± 2
668	669 ± 4	0.0045	100.1 ± 0.6

Таблица 4. Результаты определения тартразина в напитках “Тархун” ($n = 5$, $P = 0.95$)

№	Найдено вольтамперометрически, мг/мл	s_r	Найдено спектрофотометрически, мг/мл	s_r	t^*	F^{**}
1	29.9 ± 0.7	0.019	31 ± 2	0.025	1.96	1.99
2	38.8 ± 0.8	0.016	38 ± 4	0.040	1.17	6.11
3	26 ± 1	0.044	27 ± 2	0.030	1.20	2.07

* $t_{\text{крит}} = 2.45$ при $P = 0.95$ и $f = 6$.

** $F_{\text{крит}} = 6.94$ при $P = 0.95$ и $f_1 = 4, f_2 = 2$.

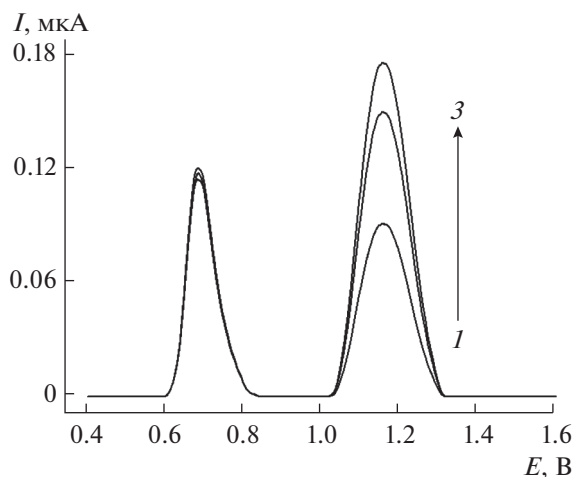


Рис. 6. Вольтамперограммы с линейной разверткой потенциала напитка "Тархун" (1 – 500 мкл напитка, 2 – 500 мкл напитка + 3.7 мкМ тартразина, 3 – 500 мкл напитка + 5.6 мкМ тартразина) на CeO_2 -ЦТФФБ/СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5.

Авторы выражают благодарность д.х.н., профессору кафедры высокомолекулярных и элементоорганических соединений Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета И.В. Галкиной за предоставление цетилтрифенилфосфоний бромида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aguilar F., Charrondiere U.R., Dusemund B., Galtier P., Gilbert J., Gott D.M., Grilli S., Guertler R., Koenig J., Lambre C., Larsen J.-C., Leblanc J.-C., Mortensen A., Parent-Massin D., Pratt I., Rietjens I.M.C.M., Stankovic I., Tobback P., Verguieva T., Woutersen R.A. Scientific opinion on the re-evaluation tartrazine (E102) // *EFSA J.* 2009. V. 7. № 11. Article 1331.
2. Demirkol O., Zhang X., Ercal N. Oxidative effects of tartrazine (CAS No 1934-21-0) and new coccin (CAS No. 2611-82-7) azo dyes on CHO cells // *J. Verbr. Lebensm.* 2012. V. 7. № 3. P. 229.
3. Липских О.И., Николаева А.А., Короткова Е.И. Вольтамперометрическое определение тартразина в пищевых продуктах // *Журн. аналит. химии.* 2017. Т. 72. № 4. С. 341. (Lipshikh O.I., Nikolaeva A.A., Korotkova E.I. Voltammetric determination of tartrazine in food // *J. Anal. Chem.* 2017. V. 72. № 4. P. 396.)
4. Raril C., Manjunatha J.G. Development of sodium dodecyl sulfate based electrochemical sensor for tartrazine determination // *Portugal. Electrochim. Acta.* 2021. V. 39. № 1. P. 59.
5. Song Y.Z., Xu J.M., Lv J.S., Zhong H., Ye Y., Xie J.M. Electrochemical reduction of tartrazine at multi-walled carbon nanotube-modified pyrolytic graphite electrode // *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2012. V. 86. № 2. P. 303.
6. Song X., Shi Z., Tan X., Zhang S., Liu G., Wu K. One-step solvent exfoliation of graphite to produce a highly sensitive electrochemical sensor for tartrazine // *Sens. Actuators B.* 2014. V. 197. P. 104.
7. Asadpour-Zeynali K., Aleshi M. Electrochemical modification of glassy-carbon electrode by bismuth-chitosan nanosheets for electrocatalytic reduction and determination of tartrazine // *Portugal. Electrochim. Acta.* 2014. V. 32. № 6. P. 369.
8. Ghoreishi S.M., Behpour M., Golestaneh M. Selective voltammetric determination of tartrazine in the presence of red 10b by nanogold-modified carbon paste electrode // *J. Chin. Chem. Soc.* 2013. V. 60. № 1. P. 120.
9. Manjunatha J.G. A novel voltammetric method for the enhanced detection of the food additive tartrazine using an electrochemical sensor // *Heliyon.* 2018. V. 4. № 11. Article e00986. 14 p.
10. He Q., Liu J., Liu X., Li G., Deng P., Liang J., Chen D. Sensitive and selective detection of tartrazine based on TiO_2 -electrochemically reduced graphene oxide composite-modified electrodes // *Sensors.* 2018. V. 18. № 6. Article 1911.
11. Tahtaisleyen S., Gorduk O., Sahin Y. Electrochemical determination of tartrazine using a graphene/poly(L-phenylalanine) modified pencil graphite electrode // *Anal. Lett.* 2020. V. 53. № 11. P. 1683.
12. Karim-Nezhad G., Khorablou Z., Zamani M., Dorraji P.S., Alamgholiloo M. Voltammetric sensor for tartrazine determination in soft drinks using poly (*p*-aminobenzene-sulfonic acid)/zinc oxide nanoparticles in carbon paste electrode // *J. Food Drug Anal.* 2017. V. 25. № 2. P. 293.
13. Jiang S., Xu J., Xu P., Liu L., Chen Y., Qiao C., Yang S., Sha Z., Zhang J. A novel molecularly imprinted sensor for direct tartrazine detection // *Anal. Lett.* 2014. V. 47. № 2. P. 323.
14. Zhao L.J., Zeng B.Z., Zhao F.Q. Electrochemical determination of tartrazine using a molecularly imprinted polymer – multiwalled carbon nanotubes – ionic liquid supported Pt nanoparticles composite film coated electrode // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 146. P. 611.
15. Zhao X., Liu Y., Zuo J., Zhang J., Zhu L., Zhang J. Rapid and sensitive determination of tartrazine using a molecularly imprinted copolymer modified carbon electrode (MIP-PmDB/PoPD-GCE) // *J. Electroanal. Chem.* 2017. V. 785. P. 90.
16. Ziyatdinova G., Ziganshina E., Romashkina S., Budnikov H. Highly sensitive amperometric sensor for eugenol quantification based on CeO_2 nanoparticles and surfactants // *Electroanalysis.* 2017. V. 29. № 4. P. 1197.
17. Ziyatdinova G., Ziganshina E., Nguyen Cong Ph., Budnikov H. Voltammetric determination of thymol in oregano using CeO_2 -modified electrode in Brij® 35 micellar medium // *Food Anal. Methods.* 2017. V. 10. № 1. P. 129.
18. Ziyatdinova G., Ziganshina E., Shamsevalieva A., Budnikov H. Voltammetric determination of capsaicin using CeO_2 -surfactant/SWNT-modified electrode // *Arab. J. Chem.* 2020. V. 13. № 1. P. 1524.
19. Зиятдинова Г.К., Захарова С.П., Зиганшина Э.Р., Будников Г.К. Вольтамперометрическое определение флавоноидов в лекарственном растительном сырье на электродах, модифицированных наноча-

- стищами диоксида церия и поверхностно-активными веществами // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 8. С. 613. (Ziyatdinova G.K., Zakharova S.P., Ziganshina E.R., Budnikov H.C. Voltammetric determination of flavonoids in medicinal plant materials using electrodes modified by cerium dioxide nanoparticles and surfactants // J. Anal. Chem. 2019. V. 74. № 8. P. 816.)
20. Berg J.M., Romoser A., Banerjee N., Zebda R., Sayes C.M. The relationship between pH and zeta potential of ~30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations // Nanotoxicology. 2009. V. 3. № 4. P. 276.
21. Klett C., Barry A., Balti I., Lelli P., Schoenstein F., Jouini N. Nickel doped Zinc oxide as a potential sorbent for decolorization of specific dyes, methylorange and tartrazine by adsorption process // J. Environ. Chem. Eng. 2014. V. 2. № 2. P. 914.
22. Зиятдинова Г.К., Зиганшина Э.Р., Будников Г.К. Использование поверхностно-активных веществ в вольтамперометрическом анализе // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 11. С. 968. (Ziyatdinova G.K., Ziganshina E.R., Budnikov H.C. Application of surfactants in voltammetric analysis // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. № 11. P. 869.)
23. Laviron E. Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry // J. Electroanal. Chem. 1974. V. 52. № 3. P. 355.
24. Bard A.J., Faulkner L.R. Electrochemical methods, fundamentals and applications. 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 2001. 850 p.
25. Güler Z. Determination of synthetic colorants in confectionery and instant drink powders consumed in turkey using UV/VIS spectrophotometry // J. Food Quality. 2005. V. 28. № 1. P. 98.
26. СанПиН 2.3.2.1293-03. Гигиенические требования по применению пищевых добавок М.: Минздрав-России, 2003. 416 с.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.866

ПЕРОКСИДАЗА ХРЕНА – АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ
ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЗЕАРАЛЕНОНА© 2022 г. Э. П. Медянцев^{а, *}, Р. М. Бейлинсон^а, А. И. Николаенко^а, Г. К. Будников^а^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
Кремлевская ул., 18, Казань, 420008 Россия

*e-mail: emedyant@gmail.com

Поступила в редакцию 18.06.2021 г.

После доработки 15.09.2021 г.

Принята к публикации 15.09.2021 г.

Показана возможность использования фермент-субстратной системы пероксидаза хрена (ПХ)–фенол при разработке амперометрического иммуноферментного сенсора (ИФС) для определения микотоксина зеараленон (ЗЕА). Предложены новые амперометрические ИФС на основе печатных графитовых электродов, в том числе модифицированных композитом фуллерен/наночастицы золота и ПХ, для определения ЗЕА в диапазоне концентраций от 1×10^{-11} до 1×10^{-6} М, s_H составила 5×10^{-12} М. Оценена константа связывания иммунных комплексов ($K_a = (5.3 \pm 0.2) \times 10^8$ моль $^{-1}$) и процент перекрестных реакций, который составляет для патулина <2.5%, для дезоксинилваленола <1.3%. Разработана и апробирована методика определения микотоксина ЗЕА с помощью предлагаемых ИФС в пищевых продуктах на уровне и ниже ПДК с s_f не более 0.063.

Ключевые слова: иммуноферментный сенсор, пероксидаза хрена, зеараленон, фуллерен C 60, наночастицы золота, пищевые продукты.

DOI: 10.31857/S0044450222060111

Среди микотоксинов своими канцерогенными, эстрогенными и тератогенными свойствами, а также широкой распространенностью выделяется зеараленон (ЗЕА) (схема 1), который синтезируется грибами из рода *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. tricinctum*), относится к лактонам резорциловой кислоты и характеризуется анаболическим и эстрогенным действием.

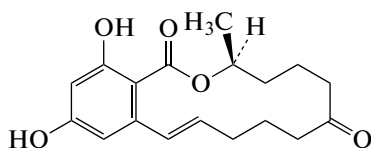


Схема 1. Структурная формула зеараленон (6,10-гидрокси-6-оксо-1-ундецил-б-лактона резорциловой кислоты).

Зеараленон является микотоксином, который в основном заражает зерновые культуры и может накапливаться в них до сбора урожая. Этот микотоксин обнаруживают в продуктах питания и кормах для животных в широком диапазоне концентраций в зависимости от состояния окружающей среды и условий хранения. С потреблением продуктов питания и кормов, загрязненных ЗЕА, могут быть связаны острые и хронические отравления и даже раковые заболевания [1].

Арбитражными методами количественного определения микотоксинов являются газожидкостная хроматография (для Т-2 токсина), ВЭЖХ с УФ-детектированием (для дезоксинилваленола), ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием (для афлатоксинов и ЗЕА). Эти методы отличаются экспрессностью, удобны для проведения серийных анализов и позволяют быстро и надежно разделять загрязненные и незагрязненные образцы. К числу скрининг-методов относятся методы тонкослойной хроматографии, флуоресцентный метод определения микотоксинов в загрязненном зерне [2–4].

В настоящее время ведутся разработки биохимических, в том числе иммунохимических, методов определения микотоксинов. Такие методы анализа удобны для первичного скрининга больших партий продукции благодаря своей простоте, экспрессности и относительно невысокой стоимости. Однако работы по применению био- и иммуносенсоров для определения микотоксинов пока немногочисленны [5–8]. Интерес к методам иммунохимического анализа связан еще и с возможностью относительно простого варьирования селективности анализа по отношению к ряду соединений, в основном за счет использования антител (Ат) с различной специфичностью.

Устройства, действие которых основано на сочетании принципов биокаталитических, иммунохимических взаимодействий и вольтамперометрической регистрации аналитического сигнала, связанных с использованием ферментов, позволяют разрабатывать простые и доступные в экономическом плане способы определения микотоксинов [8, 9]. В литературе встречаются лишь единичные упоминания об использовании ПХ в качестве метки для определения микотоксина зеараленона [10]. В описываемом варианте иммуносенсора [10] использовали в качестве модификатора углеродные нанотрубки. Это позволило достичь предела обнаружения на уровне $n \times 10^{-9}$ М, что не всегда удовлетворяет требованиям определения следовых количеств микотоксинов.

Современный подход к совершенствованию и разработке новых амперометрических био- и иммуносенсоров, в том числе и для определения микотоксинов, связан с использованием наноматериалов различной природы для модифицирования поверхности первичных преобразователей. Среди углеродных наноматериалов в качестве модификаторов чаще всего применяют углеродные нанотрубки [8, 11–13]. Другие углеродные материалы в составе иммуносенсоров пока используются весьма ограниченно. В частности, пока немногочисленны сведения о применении фуллерена. Наночастицы золота (НЧ Au) — один из наиболее изученных и хорошо зарекомендовавших себя наноматериалов, однако применение нанокompозита на основе фуллерена и НЧ Au в качестве модификатора поверхности электродов для определения микотоксинов в литературе не описано.

Ранее установлено [8, 9], что микотоксины (афлатоксин В1, патуллин, охратоксин) оказывают ингибирующий эффект на ферменты (холинэстеразу, щелочную фосфатазу, тирозиназу). Кроме того, в цитируемых работах исследована возможность использования ферментов разных классов для создания иммуносенсоров для определения ЗЕА. В большинстве случаев исследуемый микотоксин ингибировал каталитическую активность иммобилизованных ферментов (холинэстеразы, тирозиназы), что не позволило достичь требуемой селективности определений.

Одним из часто используемых ферментов при создании иммуносенсоров является пероксидаза хрена (ПХ). Например, ПХ успешно использовали в определении афлатоксина В1 и охратоксина [14, 8]. Сведения о влиянии ЗЕА на каталитическую активность ПХ отсутствуют, поэтому представляется актуальным изучение действия микотоксина в системах антиген (Ar) (ЗЕА)—Ат—фермент. Информация о действии ЗЕА на фермент-субстратную систему ПХ—фенол позволит судить об аналитических возможностях этого фермента

и различных вариантах его применения для решения проблемы селективного определения отдельного микотоксина на фоне сложных органических матриц.

Цель настоящей работы — оценка возможности использования ПХ в качестве метки при создании иммуносенсоров на основе планарных электродов, модифицированных наноструктурированными материалами различной природы, при определении микотоксина ЗЕА в пищевых продуктах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве основы разрабатываемых иммуносенсоров служили печатные графитовые электроды конструкции “3 в 1”, состоящие из рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения, полученные на полимерной подложке методом печатных технологий (изготовлены на кафедре аналитической химии Казанского федерального университета). Материалом поверхности рабочего электрода, на которой иммобилизовали модификатор и фермент, являются графитовые чернила (GwentElectronicMaterials, США). Вспомогательный электрод изготовлен также из графитовых чернил. Электрод сравнения — паста AgCl/Ag [15]. Объем рабочей ячейки системы составлял 2.0 мл. Все измерения с использованием этих электродов проводили с помощью потенциостата/гальваностата фирмы “μAutolabTypeIII” (Нидерланды). Поверхность электрода электрохимически стабилизировали и очищали путем циклического изменения потенциала в диапазоне от 0 до 1000 мВ, для этого снимали 5–7 циклических вольтамперограмм в 0.01 М растворе KCl при скорости развертки 100 мВ/с.

Для приготовления дисперсии фуллерена в аминопроизводном полиэфирополиоле (H2O-NH₂) и НЧ Au в хитозане использовали ультразвуковую ванну модели “S30H” с частотой 37 КГц (Elmasonic, Германия).

Наличие наноматериалов на поверхности электродов доказывали получением изображений на атомно-силовом микроскопе (АСМ) марки “Solver P47H” (ЗАО “НТ-МДТ”, Россия). Для доказательства наличия НЧ Au использовали однолучевой спектрофотометр марки “BioSpectrometrKinetic” (Eppendorf, Германия).

В качестве субстрата использовали фенол х.ч., растворы которого готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе и использовали в течение трех часов. Применяли: пероксидазу из корней хрена с активностью 250–330 U/mg (SigmaAldrich, США); моноклональные Ат против ЗЕА с исходной концентрацией 1.0 мг/мл (SigmaAldrich, США); 1%-ный раствор глутарового альдегида (ГА) (ICN, США) и полиэфирополиола

H₂O-NH₂ (1%-ный) (получен на кафедре неорганической химии Казанского федерального университета); фуллерен, функционализированный гидроксильными группами (Aldrich, США). Использовали хроматографически чистый препарат микотоксина ЗЕА (раствор ЗЕА в бензоле) из государственного стандартного образца (изготовитель: ГНУ ВНИИВСГЭ, Москва, Россия). Для получения рабочих растворов из стандартного образца ЗЕА проводили вакуумную отгонку органического растворителя (бензола) при комнатной температуре. Полученный препарат ЗЕА использовали для приготовления рабочих растворов путем их растворения в бидистиллированной воде. Применяли фосфатный (рН 6.86 ± 0.05 и 7.0 ± 0.2), трис-НСl (рН 7.60 ± 0.05), ацетатный (рН 4.00 ± 0.05 и 5.50 ± 0.05) буферные растворы. Значения рН водных растворов определяли рН-метром рН-150 со стеклянным электродом, градуированным по стандартным буферным растворам.

В качестве рабочих электродов использовали: иммуносенсор с пероксидазой хрена в качестве метки (ИФС № 1); иммуносенсор на основе электродов, модифицированных фуллереном C₆₀ (ИФС № 2); иммуносенсор на основе электродов, модифицированных композитом фуллерен C₆₀/НЧ Au (ИФС № 3)

Получение биочувствительной части иммуноферментного сенсора. На поверхность рабочего электрода наносили ПХ совместно с Ат против ЗЕА. Для этого готовили смесь, содержащую фермент, Ат, полиэфирополиол H₂O-NH₂, фосфатный буферный раствор (50 мМ, рН 7.0 ± 0.2) и 1%-ный раствор ГА. Глутаровый альдегид добавляли в последнюю очередь и после энергичного перемешивания на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные таким образом биосенсоры оставляли на ночь в закрытой чашке Петри при +4°C. На следующий день сенсоры промывали водой, высушивали на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике в течение не более 15 дней. Предлагаемый способ им-

мобилизации способствует сохранению каталитической активности ПХ и Ат в течение не менее 15 дней со дня изготовления ИФС. Погрешность измерения аналитического сигнала от электрода к электроду не превышает 5–8%, что указывает на хорошую воспроизводимость поверхности биочувствительной части сенсора.

Определение концентрации зеараленона, несвязанного в иммунный комплекс, для расчета констант связывания. Концентрацию ЗЕА, не связавшегося в иммунный комплекс, определяли в растворе после образования иммунного комплекса Ат–Аг (ЗЕА) на поверхности иммуносенсора после его инкубации в течение 10 мин в растворе микотоксина. Оставшуюся после образования иммунного комплекса Ат–ЗЕА концентрацию микотоксина определяли амперометрическим биосенсором (ферментным электродом) на основе щелочной фосфатазы и 1-нафтил фосфата при потенциале $E = +0.35$ В, для которого ранее установлено наличие ингибирующего эффекта данного микотоксина [16]. Полученные данные использовали для построения графика в координатах Скэтчарда.

Получение наночастиц золота. Наночастицы различных металлов все чаще используют для модификации поверхности электродов с целью придания им определенных свойств. Наночастицы золота хорошо зарекомендовали себя как модификаторы. Представляло интерес оценить влияние модификации поверхности электродов, служащих основой биосенсоров, фуллереном и нанокompозитами фуллерен/НЧ металлов (Au) на аналитические характеристики.

На сегодняшний день известно достаточно много способов получения наночастиц золота. Мы остановились на способе [17], поскольку он достаточно простой, позволяет синтезировать наночастицы золота из доступных реагентов в мягких условиях и не занимает много времени. Оптимальные условия получения наночастиц золота представлены ниже (ПЭГ – полиэтиленгликоль):

Компонент	HAuCl ₄ · 4H ₂ O	SnCl ₂	Цитратный буферный раствор, рН	ПЭГ	Хитозан	Цвет полученного раствора
Концентрация	1 × 10 ⁴ мг/л	9500 мг/л	4.3 ± 0.1	10 мг/л	0.75%	Бордовый

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных работ [5, 6] и предварительных исследований влияния ЗЕА на каталитическую активность ферментных препаратов (см. выше)

позволил предложить амперометрический иммуноферментный сенсор на основе графитового печатного электрода и биочувствительной части, включающей Ат против ЗЕА, ПХ, полиэфиропо-

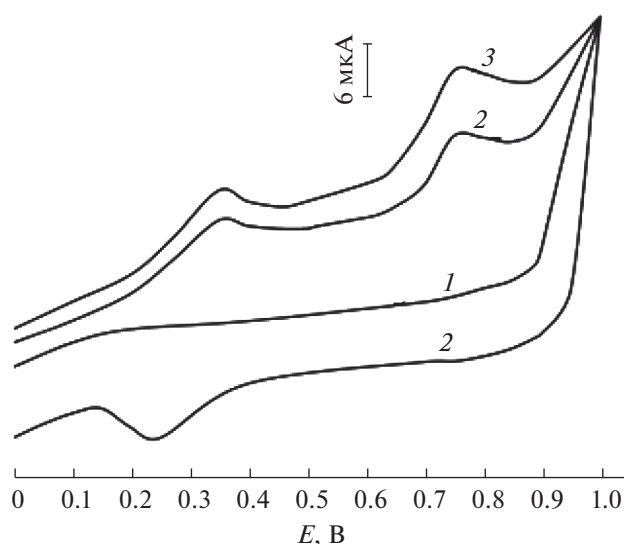


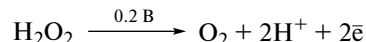
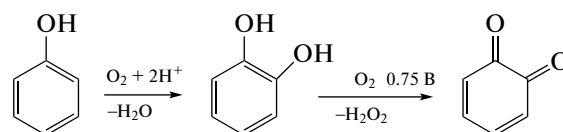
Рис. 1. Вольтамперограммы электроокисления фенола (1×10^{-3} М) — субстрата пероксидазы хрена: фоновый электролит — фосфатный буферный раствор с pH 7.0, концентрация пероксида водорода 5×10^{-5} М (1), в присутствии микотоксина зеараленона (1×10^{-8} М) (2) и в отсутствие микотоксина зеараленона (3). Иммуносенсор № 1.

лиол $\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_2$, фосфатный буферный раствор и раствор ГА.

В качестве субстратов пероксидазы могут выступать различные соединения, однако наиболее часто используют фенолы [18]. Это связано с тем, что большинство разработанных пероксидазных био- и иммуносенсоров с ПХ в качестве метки предназначено именно для определения содержания фенолов в объектах окружающей среды как загрязнителей и токсичных соединений. В то же время в рассматриваемых нами условиях использование фенола как субстрата позволит получить устойчивый во времени, хорошо выраженный и воспроизводимый сигнал. Таким образом, фермент-субстратную пару пероксидаза—фенол при определенных условиях можно использовать в качестве регистрирующей системы в иммуноферментных сенсорах.

Из литературы известно [19], что фенол подвергается электрохимическому окислению, а под действием ПХ и в присутствии пероксида водорода — ферментативному катализу (гидроксилазная активность) с образованием в качестве продукта ферментативной реакции хинона (оксидазная активность) (схема 2).

Электрохимическая реакция:



Ферментативная реакция:

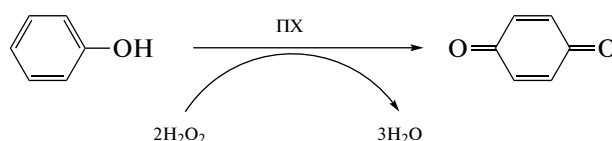


Схема 2. Ферментативный катализ фенола под действием пероксидазы хрена и в присутствии пероксида водорода.

Пик при потенциале 0.35 В соответствует квазиобратимому окислению пероксида водорода, а пик при потенциале 0.75 В относится, вероятнее всего, к электрохимическому окислению фенола до соответствующего хинона (рис. 1), что подтверждается экспериментальными и литературными данными [20].

На скорость ферментативной реакции в значительной степени влияют условия, при которых эта реакция протекает: природа и pH фонового электролита, концентрации субстрата и пероксида водорода. Известно [21], что ПХ проявляет достаточную каталитическую активность при pH от 4.0 до 8.0, поэтому исследовали влияние pH на величину отклика иммуносенсора в ацетатных (50 мМ) (pH 4.0–5.5), фосфатных (pH 6.86–7.5), трис-НСI буферных растворах (pH 7.6–8.0). Как видно из рис. 2, наибольшая активность иммобилизованной ПХ (максимум на графике) наблюдается в фосфатном буферном растворе с pH 7.0. Это связано с тем, что в этих условиях максимально возможное количество фенола подвергается ферментативному превращению и электрохимическому окислению.

Для проявления максимальной активности ПХ необходимо создать оптимальные концентрации субстрата и пероксида водорода. При избытке субстрата происходит торможение каталитической активности этого фермента. Концентрацию субстрата и пероксида водорода варьировали от 5×10^{-3} М до 1×10^{-5} М (рис. 3). Оптимальная концентрация фенола составила 1×10^{-3} М, пероксида водорода 5×10^{-5} М, фоновый электролит — фосфатный буферный раствор с pH 7.0.

Действие зеараленона на каталитическую активность иммобилизованной пероксидазы. Изучение действия ЗЕА на ПХ показало, что этот микотоксин не является эффектором данного ферментного препарата, поэтому оказалось возможным использование ПХ в качестве метки в составе соот-

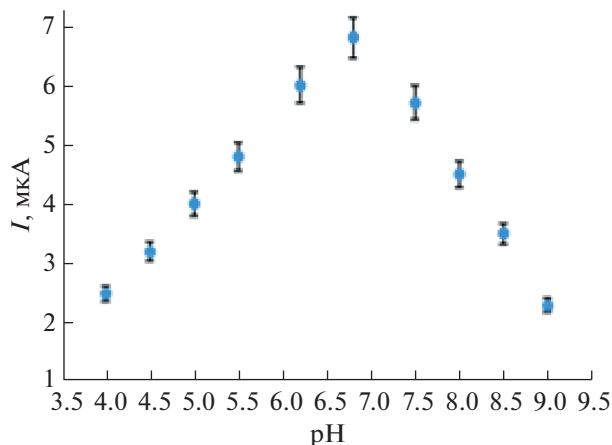


Рис. 2. Зависимость отклика иммуносенсора № 1 от pH. Концентрация фенола 1×10^{-3} М, пероксида водорода 5×10^{-5} М.

ветствующего иммуноферментного сенсора для регистрации иммунохимических взаимодействий: Ат против ЗЕА–ЗЕА.

Разработанный ИФС (рис. 4) представляет собой графитовый печатный электрод, на поверхности которого проводили соиммобилизацию ПХ и иммунореагента (Ат против ЗЕА).

Установлено, что при соиммобилизации Ат с ПХ на поверхности электрода в присутствии в растворе ЗЕА аналитический сигнал уменьшается в области концентраций (1×10^{-10} – 1×10^{-6} М), что, по-видимому, связано с образованием иммунного комплекса Ат–Аг, который является стерическим препятствием при подходе субстрата к активному центру фермента. Это приводит к тому, что в ферментативном процессе участвует меньшее количество молекул субстрата по отношению к контрольному опыту, и величина аналитического сигнала снижается.

Наибольшего ингибирующего эффекта и, следовательно, возможности проводить регистрацию аналитического сигнала с меньшей погрешностью удалось достичь при использовании Ат в разведении 1 : 50 (максимальная степень ингибирования $(80.2 \pm 0.5)\%$). Разведения Ат 1 : 1, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 100 обеспечивают более узкий интервал определяемых концентраций (1×10^{-9} – 1×10^{-6} М) и соответственно более низкие степени ингибирования $(68.0$ – $72.0) \pm 0.4\%$. Поскольку ИФС, основанный на разведении Ат 1 : 50, обладал лучшими аналитическими характеристиками, именно данную концентрацию Ат выбрали для последующих иммуноопределений. Аналитические характеристики ИФС для определения ЗЕА представлены в табл. 1. Правильность результатов определения ЗЕА, полученных с использованием разработанного ИФС, подтверждена методом введено–найдено (табл. 2).

Иммуносенсор, модифицированный фуллереном C₆₀, для определения зеараленона. Современной тенденцией развития биосенсорных технологий является использование различных наноструктурированных материалов, в частности углеродных наноматериалов, – структур, представляющих собой новую аллотропную форму углерода в виде замкнутых, каркасных, макромолекулярных систем. Добавление углеродных наноматериалов с высокой удельной площадью поверхности значительно повышает эффективность обнаружения самых различных веществ, в том числе и с помощью биосенсоров [22].

Чаше других среди углеродных наноматериалов в настоящее время используют углеродные нанотрубки [23, 24]. Гораздо реже для этих целей применяют фуллерены и их производные [25, 26]. При этом остаются нерешенными проблемы как сохранения, так и целенаправленного изменения основных свойств наноуглеродных материалов и вариантов их комбинирования в составе биосен-

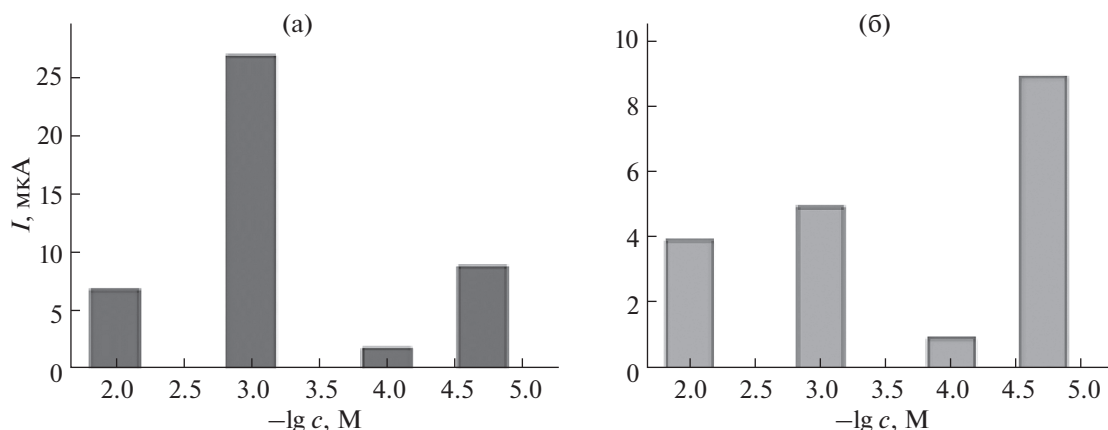


Рис. 3. Зависимость величины аналитического сигнала от концентрации фенола (а) и пероксида водорода (б). pH 7.0.

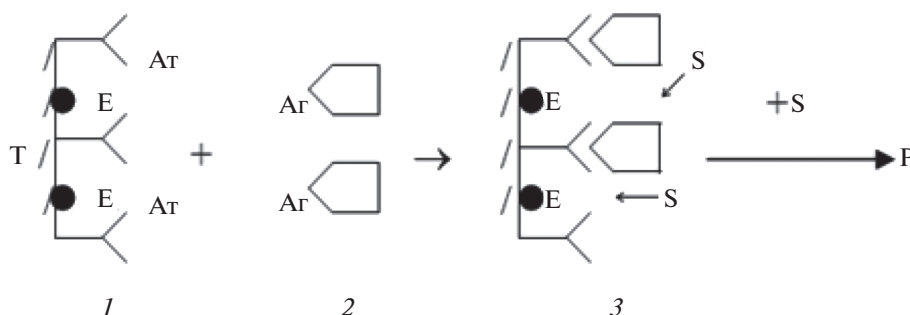


Рис. 4. Схема действия иммуноферментного сенсора на основе иммобилизованных антител (Аг) против зеараленона (ЗЕА) и пероксидазы хрена (ПХ): 1 – совместно иммобилизованные фермент (ПХ) и Аг, 2 – антиген (Аг) в растворе ЗЕА, 3 – образующийся иммунный комплекс и варианты подхода субстрата к активной поверхности фермента. Т – первичный преобразователь (в нашем случае печатный графитовый электрод), Е – фермент (ПХ), Аг – антитела к ЗЕА, Аг – ЗЕА, S – субстрат, P – продукт.

соров, например, за счет сохранения соответствующих наноразмеров путем использования различных веществ для получения устойчивых во времени дисперсий [27].

В качестве модификаторов поверхности электродов мы использовали фуллерен С60. Фуллерен – это наносферы углерода, полициклические структуры сферической формы диаметром 40 нм, состоящие из атомов углерода, связанных в шести- и пятичленные циклы. Фуллерены обладают высокой химической стабильностью и могут рассматриваться в качестве перспективных кандидатов для усиления сигнала в биосенсорах.

В настоящее время синтезированы различные стабильные производные С60, которые расширяют область их применения, в частности, за счет модификации поверхности различными полярными группами (например, амидо-, гидроксильной и карбоксильной), что приводит к получению водорастворимых и биосовместимых соединений.

Для получения дисперсий графитовых наноматериалов можно применять различные вещества, в том числе и гиперразветвленные полимеры (ГРПО) – сверхразветвленные молекулы, обладающие биоподобными структурными фрагментами и комплексом заданных практически полезных свойств [28]. Для получения дисперсии фуллерена С60 использовали водорастворимое аминопроизводное на платформе ГРПО Н20-NH₂.

Для получения модифицированной поверхности печатных электродов на их поверхность методом капельного испарения наносили полученную дисперсию фуллерена в Н20-NH₂ и ПХ совместно с Аг против ЗЕА (см. выше о получении биочувствительной части ИФС).

Изучение действия ЗЕА на модифицированный фуллереном ИФС показало, что характер действия этого соединения на иммобилизованную ПХ существенно не изменился. Модификация фуллереном позволила расширить диапазон определяемых концентраций изучаемого микотоксина, улучшить коэффициент корреляции (табл. 3).

Таблица 1. Влияние разведения антител на аналитические характеристики определения зеараленона с помощью иммуноферментного сенсора № 1 (субстрат фенол, $c_s = 1 \times 10^{-3}$ М, рН 7.0, $n = 5$, $P = 0.95$)

Разведение Аг (Аг)	Область рабочих концентраций, М	Уравнение градуировочной зависимости: $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta)(-\lg c)$			c_H , М
		(A $\pm$ δ)	(B $\pm$ δ)	r	
1 : 1	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-9}$	18 ± 3	-102.1 ± 0.3	0.9937	6×10^{-10}
1 : 10	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-9}$	16 ± 2	-94.1 ± 0.5	0.9870	5×10^{-10}
1 : 20	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-9}$	17 ± 3	-100.4 ± 0.3	0.9828	8×10^{-10}
1 : 50^a	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-10}$	19 ± 2	-110.9 ± 0.4	0.9989	7×10^{-11}
1 : 100	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-9}$	16 ± 3	-95.3 ± 0.4	0.9889	5×10^{-10}

Примечание: $I^* = I_p/I_0 \times 100$, ($I_p = I_0 - I_s$), где I_s – ток в присутствии ингибитора, I_0 – ток в отсутствие ингибитора.

^aЖирным шрифтом выделено разведение Аг, при котором наблюдаются наилучшие результаты.

Таблица 2. Результаты определения зеараленона с помощью иммуноферментных сенсоров ($n = 3$, $P = 0.95$)

Введено, М	Найдено, М	s_r	Процент открытия, %
ИФС № 1			
4×10^{-8}	$(4.1 \pm 0.2) \times 10^{-8}$	0.049	98–105
6×10^{-9}	$(5.8 \pm 0.3) \times 10^{-9}$	0.052	92–102
ИФС № 2 на основе электродов, модифицированных фуллереном C_{60}			
5×10^{-7}	$(5.1 \pm 0.3) \times 10^{-7}$	0.059	94–106
8×10^{-10}	$(7.8 \pm 0.3) \times 10^{-10}$	0.038	96–101
ИФС № 3 на основе электродов, модифицированных композитом фуллерен C_{60} /НЧ Au			
5×10^{-8}	$(4.8 \pm 0.3) \times 10^{-8}$	0.063	94–106
2×10^{-10}	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-10}$	0.048	95–105

Таблица 3. Аналитические характеристики определения зеараленона с помощью иммуносенсоров (рН 7.0, $n = 5$, $P = 0.95$)

Иммуносенсор	Область рабочих концентраций, М	Уравнение градуировочной зависимости, $I^* = (A \pm \delta)(-\lg c) + (B \pm \delta)$			c_H , М
		$(A \pm \delta)$	$(B \pm \delta)$	r	
№ 1	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-10}$	19 ± 2	-110.9 ± 0.4	0.9989	7×10^{-11}
№ 2	$1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-11}$	22 ± 2	-130 ± 3	0.9948	1×10^{-11}
№ 3	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-11}$	59 ± 1	2.9 ± 0.1	0.9969	5×10^{-12}

Примечание: $I^* = I_p/I_0 \times 100$ ($I_p = I_0 - I_s$), где I_s – ток в присутствии ингибитора, I_0 – ток в отсутствие ингибитора.

Максимальное снижение каталитической активности фермента при действии ЗЕА на модифицированный иммуносенсор в этих условиях стало несколько больше и составило $(83.0 \pm 0.9)\%$ в изученной области концентраций.

Правильность определения ЗЕА в указанных диапазонах концентраций с помощью разработанных иммуносенсоров оценивали способом введено–найденно (табл. 2).

Наночастицы золота как модификаторы поверхности печатных электродов. Наличие в растворах НЧ Au определенного размера (методику получения см. в “Экспериментальной части”) подтверждали соответствующими оптическими спектрами. Показано, что в оптических спектрах растворов НЧ Au имеются плазмонные полосы поглощения с максимумами, характерными для поглощения сферических НЧ Au в присутствии хитозана при $\lambda = 580$ нм (размер частиц около 50 нм) [29].

Предварительные исследования показали, что модификация поверхности электродов суспензиями фуллерена C_{60} и композитом C_{60} /НЧ Au изменяет аналитические возможности биосенсоров. Удобный метод визуального анализа изменения поверхности электродов при модификации фуллереном и НЧ Au – атомно-силовая микроскопия. Использование АСМ позволяет получить

изображение модифицированной поверхности электродов на разных стадиях получения биочувствительной части сенсоров в разных условиях (рис. 5). Судя по АСМ-изображениям поверхности электрода, при нанесении НЧ Au поверхность становится более развитой, НЧ достаточно однородны и равномерно распределены по поверхности электрода.

Варьирование количества раствора НЧ Au, наносимых на поверхность печатного электрода, позволило установить, что 1 мкл раствора позволяет получить более воспроизводимую однородную поверхность, обеспечивающую получение достаточного по величине аналитического сигнала, поэтому в дальнейшем использовали именно такое количество раствора НЧ Au (рис. 6). Затем на этой модифицированной поверхности проводили иммобилизацию Ат и ПХ.

Влияние модификации поверхности электродов фуллереном C_{60} и наночастицами золота на аналитические возможности иммуносенсора. Изучение действия ЗЕА на модифицированный композитом C_{60} /НЧ Au ИФС № 3 показало, что эффект уменьшения соответствующего аналитического сигнала наблюдается в более широких областях концентраций по сравнению с немодифицированным аналогом (табл. 2). Процент уменьшения

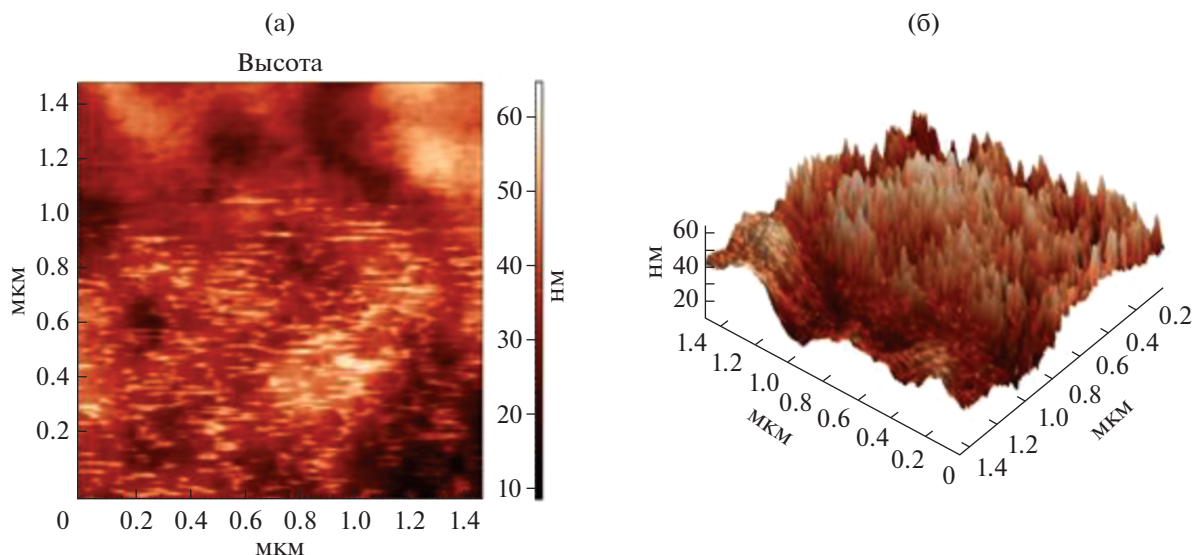


Рис. 5. АСМ-изображения в режимах топографии и фазового контраста в 2D проекции (а) поверхности графитового печатного электрода, модифицированного наночастицами золота в растворе хитозана (0.75%), и в 3D проекции (б).

каталитической активности при действии на ИФС № 3 составляет $(90.0 \pm 0.6)\%$ в изученной области концентраций. Использование модификации композитом $C_{60}/НЧ$ Au позволило улучшить аналитические характеристики разработанного сенсора.

Правильность определения ЗЕА в указанных диапазонах концентраций с помощью разработанных иммуносенсоров оценивали способом введено—найдено (табл. 1).

Оценка констант связывания иммунных комплексов и специфичности иммунохимических взаи-

модействий на ИФС № 3. При разработке методов ИХА, базирующихся на реакции $Ag-Ar$, знание физико-химических параметров специфических взаимодействий очень важно, поскольку дает возможность оценить чувствительность и специфичность метода и осуществить подбор реагентов для анализа. Графическая обработка экспериментальных данных в координатах Скэтчарда позволяет не только определить константу образования иммунных комплексов, но и рассчитать концентрацию активных Ar (Ag) в системе.

Выполнили серию опытов по определению концентрации свободного и связанного микотоксина при различных начальных концентрациях ЗЕА и постоянной концентрации Ar в системе. Характер взаимодействия микотоксин— Ar , представленный в координатах Скэтчарда, свидетельствует о преимущественном существовании одной популяции Ar с достаточно высокой специфичностью к определяемому микотоксину. Такой характер кривой характерен для моноклональных Ar . Значение константы связывания для Ar к ЗЕА ($K_{a1} = (5.3 \pm 0.2) \times 10^8$ моль $^{-1}$) лежит в оптимальном интервале величин констант связывания [16]. Данные о прочности связывания рассматриваемых иммунологических пар на сегодняшний день в литературе отсутствуют. В то же время полученные нами величины констант образования иммунных комплексов свидетельствуют о достаточно прочном связывании Ag с соответствующими Ar , что позволяет использовать разработанные ИФС для высокочувствительного и селективного определения микотоксина ЗЕА.

Неспецифическое перекрестное взаимодействие Ar является одной из основных проблем

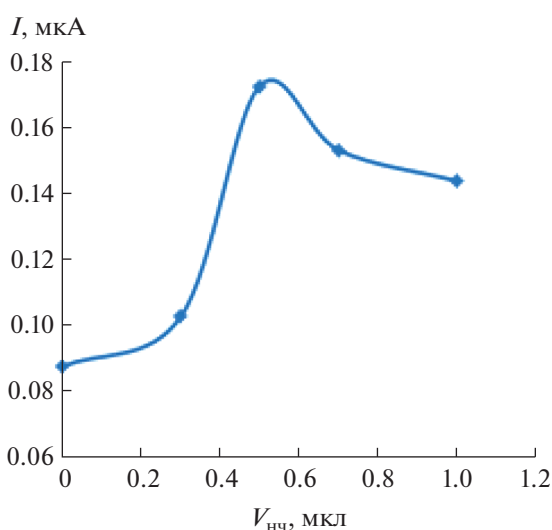


Рис. 6. Зависимость величины аналитического сигнала (тока) от количества наночастиц золота, наносимых на рабочую поверхность электрода.

при разработке новых вариантов иммуноанализа. Качество Ат зачастую является основным препятствием для увеличения чувствительности иммуноопределения, а также для сокращения продолжительности анализа за счет процедуры пробоподготовки.

В настоящей работе мы исследовали возможности перекрёстной реактивности Ат против ЗЕА к другим микотоксинам — патулину и дезоксиниваленолу, обнаруживаемым в тех же продуктах питания, что и ЗЕА. Установили, что используемые Ат обладают перекрестной реактивностью к исследуемым антигенам в очень незначительной степени (патулин $<2.5\%$, дезоксиниваленол $<1.3\%$). Это подтверждает специфичность исследуемых Ат лишь к соответствующему Аг, что позволяет селективно определять ЗЕА независимо от других микотоксинов.

Определение зеараленона в пищевых продуктах. Предложенные ИФС могут быть использованы для определения содержания ЗЕА в пищевых продуктах. Наибольшей продуцирующей способностью грибы обладают на кукурузе, овсе, рисе, сорго.

Грибы *F. graminearu*, продуцирующие ЗЕА, распространены в южной части Российской Федерации, а также во многих странах, выращивающих кукурузу на зерно. Споры гриба обитают в почве, откуда они попадают на вегетирующие растения и при благоприятных условиях (высокая влажность) прорастают, поражая колос или початок и образуя продукты своей жизнедеятельности — микотоксины.

Разработанный иммуносенсор применили для определения ЗЕА в кукурузе и ячмене и продуктах переработки кукурузной муки. При пробоподготовке образцов использовали рекомендации, предложенные в работе [30] для выделения именно ЗЕА при хроматографическом анализе.

Методика извлечения (выделения) зеараленона из круп. Навеску образца массой 1 г (круп, зерно) растирали в порошок, который суспендировали в смеси ацетонитрила и воды (5 : 1) для определения ЗЕА. Согласно данным [31], при этом должно достигаться достаточно полное извлечение определяемых компонентов. Смесь перемешивали магнитной мешалкой в течение не менее 30 мин. Затем центрифугировали в течение 20 мин при скорости 7 тысяч об/мин, надосадочную жидкость использовали для приготовления рабочих водных растворов путем последовательного разбавления для последующего определения ЗЕА с помощью ИФС, модифицированного композицией фуллерен/НЧ Au — ИФС № 3).

Предварительно установили, что при повторном экстрагировании смеси, оставшейся после однократного экстрагирования, получается раствор, не вызывающий изменения аналитического

сигнала, т.е. не содержащий компонентов, уменьшающих каталитическую активность иммобилизованной пероксидазы. Таким образом, полное извлечение микотоксина из образца происходит уже в результате однократной экстракции. Аналитический сигнал приобретает постоянное значение через 30 мин при перемешивании экстрагирующей смеси с образцом.

Установлено, что содержание органического растворителя, используемого для наиболее полного извлечения ЗЕА из образцов круп, не превышает (8–10)% от объема анализируемого раствора. Такое содержание ацетонитрила не сказывается на каталитической активности ПХ, т.е. не оказывает ни ингибирующего, ни активирующего действия. Это позволяет использовать получаемый экстракт для определения ЗЕА в образцах.

Методика определения содержания зеараленона в образцах крупы. В ячейку емк. 2000 мкл вносили растворы образца, полученного как описано выше, фенола ($c = 1 \times 10^{-3}$ М), пероксида водорода ($c = 5 \times 10^{-5}$ М), фосфатный буферный раствор (рН 7.0) и ИФС № 3. Растворы инкубировали в течение 10 мин. Затем измеряли значение тока при потенциале +0.75 В.

Содержание ЗЕА в образцах определяли по градуировочному графику (см. табл. 3, ИФС № 3). Отдельные образцы пищевых продуктов, содержащих кукурузу, протестировали также методом поляризационного флуоресцентного анализа (табл. 4), который в настоящее время достаточно часто используется для определения микотоксинов. Сравнение результатов двух методов по F - и t -критериям показало, что методы равнозначны ($F_{\text{расч}} < F_{\text{табл}}$), расхождение между средними величинами незначимы.

Найденное количество микотоксина ЗЕА в анализируемых образцах пищевых продуктов практически во всех случаях ниже ПДК. Следует, однако, отметить, что содержание ЗЕА в детском питании не допускается.

Сравнение аналитических характеристик разработанного амперометрического ИФС и аналогичных методов, описанных в литературе (табл. 5), показало, что разработанный иммуносенсор превосходит другие методы определения ЗЕА. Можно сделать вывод, что разработанный ИФС может быть использован для контроля качества ряда пищевых продуктов и в особенности детского питания.

Таким образом, показана возможность использования фермент-субстратной системы ПХ—фенол при разработке амперометрического ИФС для определения ЗЕА, действие которого основано на сочетании иммунологической, фермента-

Таблица 4. Результаты определения зеараленона в образцах, содержащих кукурузу (ИФС № 3, субстрат фенол, $c_s = 1 \times 10^{-3}$ М, $n = 5$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.78$, $F_{\text{табл}} = 6.39$)

Объект анализа	Производитель	Метод анализа	Найдено ЗЕА, М (мг/кг)	s_r	t	F
Кукурузная мука	ООО “Гарнец”, Россия	ПФИА	Не найдено ^а			
Кукурузные хлебцы “Здоровей”	ООО “Первый комбинат детского и диетического питания”, Россия	ИФА	Не найдено ^а			
		ПФИА	$(6.42 \pm 0.30) \times 10^{-5}$ (0.025)	0.047	2.21	5.15
		ИФС	$(6.31 \pm 0.30) \times 10^{-5}$ (0.020)	0.048		

Примечание: ПДК_{зеараленона} = 1 мг/кг, ПФИА – поляризационно-флуоресцентный иммуноанализ, ИФА – иммуноферментный анализ.

^аНе обнаружено в исследуемом интервале концентраций.

Таблица 5. Сравнительная характеристика способов определения зеараленона в кукурузе и продуктах на ее основе

Метод определения зеараленона	Предел обнаружения	Литература
Экспресс-иммунохроматографическая полоска (ICTS)	1.0 нг/мл	[36]
Флуороиммуноанализ (FLISA)	0.012 нг/мл	[36]
Электрохимический иммуносенсор	0.77 нг/г	[11]
ИФС	0.0159 нг/мл	Данная работа

тивной и электрохимической реакций, приводящих к эффектам уменьшения аналитического сигнала, что наиболее точно соответствует термину “квазиингибирование”. Предложены новые амперометрические ИФС на основе печатных графитовых электродов, модифицированных композитом фуллерен/НЧАи и ПХ для определения микотоксина ЗЕА, позволяющие расширить диапазон определяемых концентраций, снизить c_n , улучшить коэффициент корреляции. Условия функционирования разработанных биосенсоров: рН буферного раствора 7.0 ± 0.2 , концентрация субстрата фенола 1 мМ, концентрация пероксида водорода 50 мкМ. Разработанные иммуносенсоры позволяют определять ЗЕА в следующих концентрационных интервалах: ИФС № 1 – от 1×10^{-10} М до 1×10^{-6} М, ИФС № 2 – от 5×10^{-11} М до 1×10^{-6} М, ИФС № 3 – от 1×10^{-11} М до 1×10^{-6} М. Нижняя граница определяемых содержаний на уровне $(1-7) \times 10^{-11(-12)}$ М. Оценена константа связывания иммунного комплекса: $K_a = (5.3 \pm \pm 0.2) \times 10^8$ моль⁻¹, процент перекрестных реакций составляет для патулина <2.5%, для дезоксинилваленола <1.3% – ИФС № 3. Разработаны методики определения ЗЕА с помощью предлагаемых ИФС в пищевых продуктах (кукурузной муке, кукурузных хлебцах) на уровне ниже ПДК с s_r не более 0.048.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haque M.A., Wang Y., Shen Z., Li X., He C.* Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review // *Microb. Pathog.* 2020. V. 142. Article 104095.
2. *Yang Y., Li G., Wu D., Liu J., Li X., Luo P., Hu N., Wang H., Wu Y.* Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs // *Trends Food Sci. Technol.* 2020. V. 96. P. 233.
3. *Silva A.S., Brites C., Pouca A.V., Barbosa J., Freitas A.* UHPLC-ToF-MS method for determination of multi-mycotoxins in maize: Development and validation // *Curr. Res. Food. Sci.* 2019. V. 1. P. 1.
4. *González-Jarín J.M., Alfonso A., Rodríguez I., Sainz M.J., Vieytes M.R., Botana L.M.* A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer // *Food Chem.* 2019. V. 275. P. 703.
5. *Goud K.Y., Sunil K.V., Hayat A., Gobi K.V., Song H., Kim K.-H., Marty J.L.* A highly sensitive electrochemical immunosensor for zearealenone using screen-printed disposable electrodes // *J. Electroanal. Chem.* 2019. V. 832. P. 336.
6. *Fernández O., Vicario A., Villarreal-Rocha J., Sapag K., Messina G.A., Raba J., Bertolino F.A.* Mesoporous immunosensor applied to zearealenone determination in *Amaranthus cruentus* seeds // *Microchem. J.* 2018. V. 141. P. 388.
7. *Oliveira I.S., Junior A.G.S., Andrade C.A.S., Oliveira M.D.L.* Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food // *Curr. Opin. Food Sci.* 2019. V. 29. P. 64.

8. Варламова Р.М., Медянцова Э.П., Хамидуллина Р.Р., Будников Г.К. Амперометрические тирозиназные биосенсоры на основе модифицированных наноматериалами электродов для определения афлатоксина M1 // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 7. С. 71. (Varlamova R.M., Medyantseva E.P., Hamidullina R.R., Budnikov H.C. Amperometric tyrosinase biosensors based on modified nanomaterials electrodes for the determination of aflatoxin M₁ // J. Anal. Chem. 2019. V. 74. P. 59.)
9. Медянцова Э.П., Тхи Тхань Май Н., Варламова Р.М., Тарасова Е.Ю., Сахапова Г.Р., Николаева О.В., Будников Г.К. Амперометрические биосенсоры на основе щелочной фосфатазы и углеродных нанотрубок для определения некоторых микотоксинов // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2014. Т. 80. № 2. С. 5.
10. Panini N.V., Bertolino F.A., Salinas E., Messina G.A., Raba Panini J. Immunosensor in a continuous-flow/stopped-flow systems // Biochem. Eng. J. 2010. V. 51. P. 7.
11. Feng W., Ji P. Enzymes immobilized on carbon nanotubes // Biotechnol. Adv. 2011. V. 29. P. 889.
12. Le V.T., Vasseghian Y., Dragoi E.N., Moradi M., Mousavi Khaneghah A. A review on graphene-based electrochemical sensor for mycotoxins detection // Food Chem. Toxicol. 2021. V. 148. Article 111931.
13. Yadav N., Yadav S.S., Chhillar A.K., Rana J.S. An overview of nanomaterial based biosensors for detection of Aflatoxin B1 toxicity in foods // Food Chem. Toxicol. 2021. V. 152. Article 112201.
14. Alonso-Lomillo M.A., Dominguez-Renedo O., Torno-de Romón L., Arcos-Martinez M.J. Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A // Anal. Chim. Acta. 2011. V. 688. P. 49.
15. Май Тхи Тхань Х., Медянцова Э.П., Варламова Р.М., Сахапова Г.Р., Николаева О.В. Определение зеараленона амперометрическими биосенсорами на основе модифицированных углеродными нанотрубками электродов // Вестник Казанск. технологич. ун-та. 2012. № 15. С. 149.
16. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилов Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
17. Tarozaitq R., Juskuinas R., Kurtinaitienė M., Jagminienė A., Vaskelis A. Gold colloids obtained by Au(III) reduction with Sn(II): Preparation and characterization // Chemija. 2006. V. 17. № 2–3. P. 1.
18. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 128 с.
19. Gibson D.M., Lin E.H. The inhibition of peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activity by British antilew-
- isite // Arch. Biochem. Biophys. 1978. V. 186. № 3. P. 317.
20. Мустафанова Г.К., Конурбаев А.Е., Баешов А. Исследование электрохимического поведения фенола в водных растворах и установление оптимальных условий окисления фенола // Технические науки — от теории к практике. 2016. Т. 12. Вып. 60. С. 167.
21. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб: ГИОРД, 2004. С. 22.
22. Штыков С.Н. Нанообъекты и нанотехнологии в химическом анализе: Проблемы аналитической химии. М.: Наука, 2015. Т. 20. 431 с.
23. Лау А.К.-Т., Хуссейн Ф., Лафди Х. Нано- и биоконпозиты. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2015. 390 с.
24. Mahmoudpour M., Dolatabadi J.E.N., Torbati M., Tazehkan A.P., Homayouni-Rad A., Guardia M. Nanomaterials and new biorecognition molecules based surface plasmon resonance biosensors for mycotoxin detection // Biosens. Bioelectron. 2019. V. 143. Article 111603.
25. Camargo J.R., Baccarin M., Raymundo-Pereira P.A., Campos A.M., Oliveira G.G., Fatibello-Filho O., Oliveira J.O.N., Janegitz B.C. Electrochemical biosensor made with tyrosinase immobilized in a matrix of nanodiamonds and potato starch for detecting phenolic compounds // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1034. P. 137.
26. Shetti N.P., Mishra A., Basu S., Aminabhavi T.M. Versatile fullerenes as sensor materials // Mater. Today Chem. 2021. V. 20. Article 100454.
27. You H., Mu Z., Zhao M., Zhou J., Yuan Y., Bai L. Functional fullerene-molybdenum disulfide fabricated electrochemical DNA biosensor for Sull detection using enzyme-assisted target recycling and a new signal marker for cascade amplification // Sens. Actuators B: Chem. 2020. V. 305. Article 127483.
28. Yates C.R., Hayes W. Synthesis and applications of hyperbranched polymers // Eur. Polym. J. 2004. V. 40. P. 1257.
29. Шашканова О.Ю., Ермолаева Т.Н. Новый метод диагностики аутоиммунных заболеваний, основанный на аффинной реакции на поверхности пьезокварцевого сенсора // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. Вып. 5. С. 677.
30. ГОСТ 28001-88. Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, ЗЕА (Ф-2) и ОТ. М.: Издательство стандартов, 1988. С. 72.
31. Zhanga F., Liua B., Shenga W., Zhanga Y., Liua Q., Lia S., Wang S. Fluoroimmunoassays for the detection of zearalenone in maize using CdTe/CdS/ZnS quantum dots // Food Chem. 2018. V. 255. P. 421.

УДК 543.253:541.128.13

СЕЛЕКТИВНОЕ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ И ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЦИКЛОВИРА И ВАЛАЦИКЛОВИРА НА ЭЛЕКТРОДЕ С КОМПОЗИТОМ ВОССТАНОВЛЕННЫЙ ОКСИД ГРАФЕНА-ПОЛИГЛИЦИНОВАЯ ПЛЕНКА

© 2022 г. Л. Г. Шайдарова^а, *, А. В. Гедмина^а, А. А. Поздняк^а, И. А. Челнокова^а, Г. К. Будников^а^аКазанский федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

*e-mail: LarisaShaidarova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.06.2021 г.

После доработки 29.09.2021 г.

Принята к публикации 29.09.2021 г.

Ацикловир и валацикловир окисляются на электроде из стеклоуглерода (СУ) с иммобилизованным восстановленным оксидом графена, покрытым полиглициновой пленкой. Подобраны условия получения полимерной пленки и восстановления оксида графена на СУ, а также регистрации максимального каталитического тока на композитной поверхности. Разработан способ селективного вольтамперометрического определения ацикловира и валацикловира на электроде с композитом восстановленный оксид графена–полиглициновая пленка. Предложен способ амперометрического детектирования противовирусных препаратов на основе гуанина на этом электроде в условиях проточно-инжекционного анализа. Зависимость аналитического сигнала от концентрации ацикловира и валацикловира линейна до 5×10^{-6} М в стационарном режиме и до 1×10^{-7} М в проточной системе. Разработанный вольтамперометрический способ определения ацикловира и валацикловира апробирован при анализе лекарственных средств.

Ключевые слова: химически модифицированные электроды, оксид графена, полиглициновая пленка, ацикловир, валацикловир, электрокатализ, электроанализ, проточно-инжекционный анализ.

DOI: 10.31857/S0044450222060172

Композитные электроды на основе полимерных пленок, полученных электрополимеризацией, привлекают к себе внимание благодаря высокой селективности и чувствительности их отклика при определении широкого круга низкомолекулярных органических соединений. Такие полимерные пленки отличаются гомогенностью, сильной адгезией к поверхности СУ и химической устойчивостью.

Полимерные пленки из полиглицина (**поли-Гли**), как и большинство электропроводящих полимерных пленок, наносят на поверхность электрода осаждением из раствора соответствующего мономера с последующей его полимеризацией. При электрополимеризации глицина на поверхности углеродной подложки формируется полиглицин типа II со спиральной конформацией [1]. Анодное окисление первичного амина происходит по радикальному катионному механизму, который объясняет однородность полученного тонкого покрытия. Полиглицин нерастворим в воде и в обычных органических растворителях.

В настоящее время получение композитов из проводящих полимерных пленок с восстановленным оксидом графена особенно привлекательно благодаря аддитивности, а в некоторых случаях синергизму электрокаталитических эффектов обоих компонентов [2–6].

Один из способов получения оксида графена (**ГО**) с хорошим выходом — химическое окисление графита по методу Хаммера [7]. Для уменьшения количества оксидных форм графена обычно проводят химическое восстановление, однако для этого требуется высокотемпературная обработка, многократное повторение процесса восстановления и значительное время. Кроме того, используемый в качестве восстановителя моногидрат гидразина является токсичным реагентом и приводит к появлению в структуре графена гетероатомных примесей азота [8, 9]. По сравнению с химическим и термическим способами электрохимическое восстановление ГО является более экспрессным, технологичным и безопасным [10, 11].

Электропроводность электрохимически восстановленного оксида графена (**ГО_{вос}**) выше, чем

химически полученного $\text{GO}_{\text{вос}}$. Это возможно из-за остаточных дефектов в химически полученном $\text{GO}_{\text{вос}}$, которые могут быть сведены к минимуму в случае электрохимического восстановления GO [12]. Восстановленный GO обычно является неполной приведенной формой оксида графена и находится в промежуточном состоянии между оксидом графена и самим графеном. В этом состоянии число кислородсодержащих функциональных групп в материале мало, но имеются дефекты, которые могут удерживать химически активные участки для использования в каталитических реакциях и взаимодействовать со сложными полимерами [8].

В настоящей работе рассмотрена возможность вольтамперометрического определения в стационарных условиях и амперометрического детектирования в проточно-инжекционной системе ацикловира и валацикловира на химически модифицированном электроде (ХМЭ) на основе стеклоуглеродного электрода с иммобилизованным композитом восстановленный оксид графена–полиглициновая пленка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Циклические вольтамперограммы (ЦВА) регистрировали с помощью вольтамперометрического анализатора Экотест-ВА (ООО “Эконикс-Эксперт”, Россия). Использовали трехэлектродную ячейку, в которой в качестве электрода сравнения использовали хлоридсеребряный электрод, в качестве вспомогательного — платиновую проволоку, в качестве рабочего применяли электроды из СУ с видимой поверхностью 0.10 см^2 , покрытые полимерной пленкой полиглицина (поли-Гли-СУ) и композитом из $\text{GO}_{\text{вос}}$ и полимерной пленки полиглицина (поли-Гли- $\text{GO}_{\text{вос}}$ -СУ).

Иммобилизацию пленки из поли-Гли проводили в условиях потенциодинамического осаждения. ЦВА регистрировали при скорости наложения потенциала 20 мВ/с . При получении полимерной пленки скорость циклирования потенциала составляла 100 мВ/с , а при восстановлении иммобилизованного на поверхность СУ оксида графена — 50 мВ/с . Поверхностную концентрацию модификатора на СУ определяли по площади катодного пика на ЦВА ферроцианид-иона [13].

Композитный электрод получали в две стадии: сначала на поверхность СУ наносили слой оксида графена, который получали методом капельного испарения под ИК-лампой из суспензии оксида графена с хитозаном, после чего проводили электрохимическое восстановление GO до $\text{GO}_{\text{вос}}$ на поверхности полученного электрода. Затем на поверхность СУ с $\text{GO}_{\text{вос}}$ ($\text{GO}_{\text{вос}}$ -СУ) наносили полимерную пленку, электрохимически осажден-

ную из 5 мМ раствора глицина в фосфатном буферном растворе с pH 6.86.

Для измерений в условиях проточно-инжекционного анализа (ПИА) применяли установку, включающую перистальтический насос, инжектор, проточную электрохимическую ячейку и регистрирующее устройство [14]. Подачу и слив растворов осуществляли по проточным коммуникациям, изготовленным из силиконовых трубок внутренним диаметром 2.0 мм . Инжекцию осуществляли микрошприцем через уплотнительную мембрану.

В качестве аналитов в модельных системах использовали ацикловир и валацикловир (Aldrich, США). Стандартные растворы исследуемого объекта с концентрацией $5 \times 10^{-3} \text{ М}$ готовили путем растворения их точных навесок. Для построения градуировочной зависимости готовили растворы с меньшими концентрациями аналитов последовательным разбавлением исходных растворов непосредственно перед измерениями. В качестве фонового электролита использовали раствор серной кислоты с pH 2.0, ацетатный буферный раствор с pH 4.0 и фосфатный буферный раствор с pH 6.86. Контроль pH растворов осуществляли с помощью pH -метра типа $\text{pH}-150$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электроосаждение полиглициновой пленки на поверхности стеклоуглеродного электрода и восстановленном оксиде графена. Полиглициновую пленку осаждали на поверхности СУ с помощью электрополимеризации при многократном циклировании потенциала (E) в выбранной области его значений от -0.8 до $+1.8 \text{ В}$. Предварительно рассматривали медиаторные свойства пленки из полиглицина по отношению к окислению иона $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. ЦВА ферроцианид-иона, регистрируемые на немодифицированном СУ и на СУ с иммобилизованной пленкой из полиглицина, представлены на рис. 1. На ЦВА ферроцианид-иона, полученной на поли-Гли-СУ (кривая 2), по сравнению с СУ (кривая 1) отношение величин катодного тока (I_k) к анодному (I_a) близко к единице, а разность потенциалов катодного (E_k) и анодного (E_a) пиков составляет 60 мВ . Эти факты указывают на медиаторные свойства электропроводящей полимерной пленки поли-Гли в обратимой редокс-системе.

Изучено влияние условий электрополимеризации пленки, таких как область циклического изменения потенциала и pH фонового электролита, на электрохимические характеристики ферроцианид-иона. Наилучшие вольт-амперные характеристики окисления ферроцианид-иона, такие как отношение величин катодного тока к анодному (I_k/I_a) (рис. 2а) и разность потенциалов

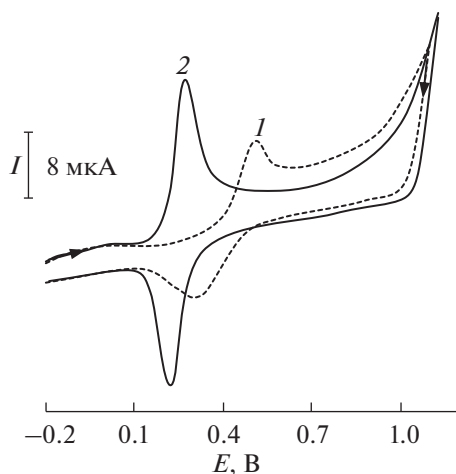


Рис. 1. Электрохимическое поведение 2.5 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$ в 0.1 М серной кислоте на СУ (1) и на поли-Гли-СУ (2).

катодного и анодного пиков ($\Delta E = E_k - E_a$) (рис. 2б), наблюдаются при получении полиглициновой пленки в потенциодинамическом режиме в области потенциалов от -0.8 до 1.8 В из раствора глицина в фосфатном буферном растворе с рН 6.86. Этот режим близок к условиям обратимого окисления ферроцианид-иона ($I_k/I_a = 1$ и $\Delta E = 60$ мВ).

Для улучшения свойств пленки поли-Гли в качестве подложки для ее иммобилизации использовали восстановленный оксид графена, нанесенный на СУ методом капельного испарения из суспензии оксида графена с хитозаном.

Поверхностную концентрацию медиатора (Γ) на поверхности СУ определяли по площади пика на катодной ветви ЦВА ферроцианид-иона, регистрируемой со скоростью наложения потенциа-

ла, равной 10 мВ/с. Размерность поверхностной концентрации представляли как отношение количества молей редокс-центров металлокомплекса, относящееся к площади поверхности электрода. Величину Γ рассчитывали по формулам [15]:

$$\Gamma = Q/nFA, \quad (1)$$

где Q – заряд, Кл или $A \cdot s$; n – число электронов; A – площадь поверхности рабочего электрода, cm^2 ; F – число Фарадея, равное 96 500 Кл/моль; Γ – поверхностная концентрация медиатора, моль/ cm^2 .

$$Q = S/v \quad (2)$$

или $Q = 1/v \int I d\phi$, где S – площадь под катодным пиком, $мкА \cdot мВ$; v – скорость наложения потенциала, мВ/с; I – значение тока, мкА; ϕ – потенциал, мВ.

Значение поверхностной концентрации модификатора увеличивается при переходе от пленки поли-Гли, нанесенной на СУ, к пленке, нанесенной на $GO_{вос}-СУ$, от 2.2×10^{-8} до 2.5×10^{-8} моль/ cm^2 , что связано с увеличением поверхности матрицы из $GO_{вос}$, на поверхность которого проводили электрополимеризацию пленки поли-Гли.

Электроокисление ацикловира и валацкловира на стеклоглереде, модифицированном композитом из поли-Гли- $GO_{вос}$. На немодифицированном СУ окисление ацикловира протекает необратимо и с большим перенапряжением. При окислении ацикловира на поли-Гли- $GO_{вос}-СУ$ на анодной ветви ЦВА при $E = 1.10$ В регистрируется пик, многократно превышающий величины токов окисления модификатора на фоновой кривой (рис. 3, кривые 1, 2) и окисления ацикловира на немодифицированном СУ (табл. 1). Ток, регистрируемый на этом электроде, линейно зависит от концентрации ацикловира. Окисление вала-

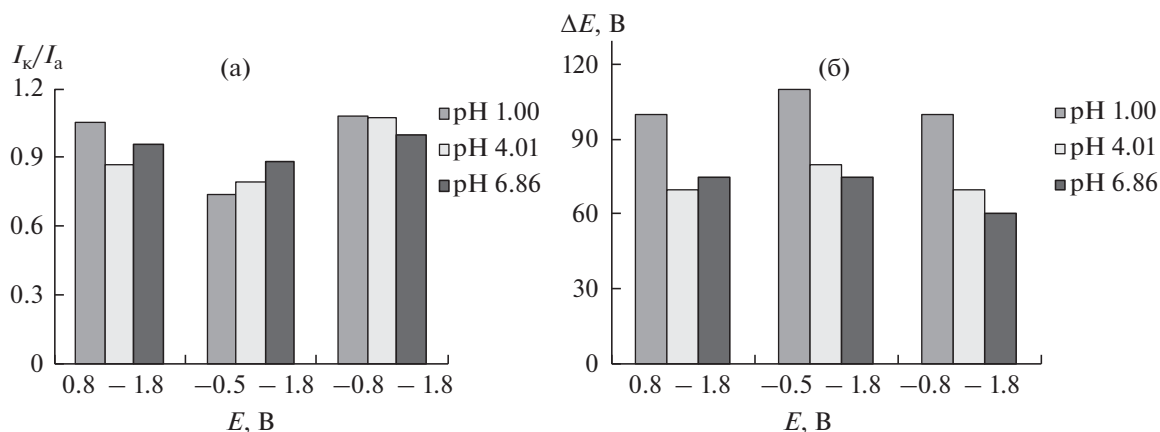


Рис. 2. Диаграммы зависимости электрохимических характеристик (отношение величин катодного к анодного токов (а) и разность потенциалов катодного и анодного пиков (б)) окисления ферроцианид-иона от области потенциалов электрополимеризации глицина и рН фонового электролита.

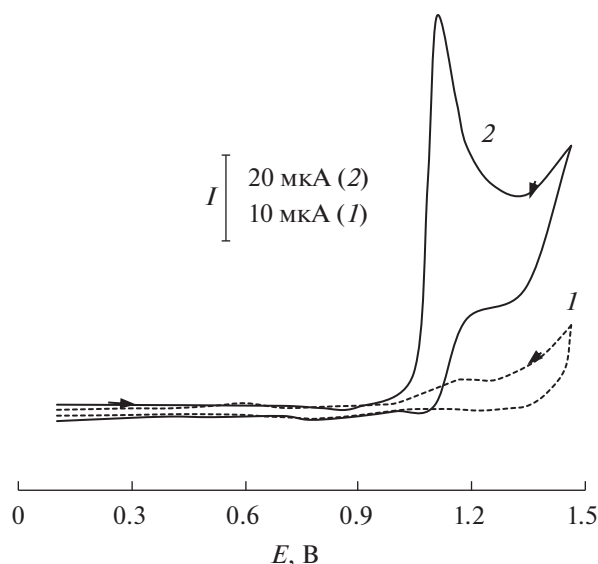


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы, полученные на поли-Гли-ГО_{вос}-СУ в отсутствие (1) и в присутствии ацикловира (5×10^{-3} М) (2) на фоне фосфатного буферного раствора с рН 6.86.

цикловира происходит при тех же потенциалах, что и окисление ацикловира. Многократный прирост тока, линейная зависимость величины тока пика от концентрации субстрата позволяют отнести ток электродной реакции к каталитическому. Наибольшее значение величины электрокаталитического эффекта, выраженного отношением величин каталитического тока окисления субстрата на ХМЭ ($I_{\text{кат}}$) и тока окисления модификатора ($I_{\text{мод}}$) — $I_{\text{кат}}/I_{\text{мод}}$, наблюдается при окислении ацикловира и валацкловира на поли-Гли-ГО_{вос}-СУ (табл. 1).

Для выяснения особенностей электроокисления ацикловира на композитном электроде изучена зависимость тока (I) и потенциала пика (E) от скорости наложения потенциала (ν), которую варьировали в диапазоне от 10 до 100 мВ/с. Полученное из линейной зависимости ($\lg I = 0.77 + 0.81 \lg \nu$) значение критерия Семерано, равное 0.81, свидетельствует об адсорбционной природе

тока. Из зависимости величины потенциала пика от логарифма скорости наложения потенциала ($E = 0.89 + 0.11 \lg \nu$) рассчитаны кинетические параметры окисления ацикловира — величина наклона Тафеля (b), коэффициент переноса электрона (α) и константа скорости электрокаталитической реакции (k_s) [16, 17]. Для электрокаталитического окисления ацикловира на немодифицированном стеклоуглеродном электроде с композитом поли-Гли-ГО_{вос} найдены следующие кинетические характеристики: $b = 110.2$ мВ, $\alpha = 0.732$ и $k_s = 0.53 \times 10^2 \text{ с}^{-1}$. Полученное значение k_s характеризует высокую скорость электронного переноса.

Установлено, что продолжительность циклирования потенциала (N — количество циклов) и величина рН фонового электрода влияют на каталитический ток электроокисления ацикловира и валацкловира. Так, максимальный каталитический эффект наблюдается при восстановлении ГО путем циклического изменения потенциала в области от 0.60 до -1.50 В в течение 20 циклов (рис. 4а) и полимеризации глицина в области потенциалов от -0.80 до 1.80 В в течение 40 циклов (рис. 4б), а также при регистрации ЦВА ацикловира и валацкловира на фоне фосфатного буферного раствора с рН 6.86 (рис. 4в).

Вольтамперометрическое определение в стационарном режиме ацикловира и валацкловира на электроде, модифицированном композитом из поли-Гли-ГО_{вос}. В мерную колбу емк. 10 мл вводили фиксированный объем раствора аналита (ацикловира или валанцикловира), в который добавляли фосфатный буферный раствор с рН 6.86 до метки. Полученный раствор количественно переносили в электрохимическую ячейку, в которую погружали электрод из СУ с композитом поли-Гли-ГО_{вос}, хлоридсеребряный и вспомогательный электроды. Регистрировали ЦВА в интервале от -0.0 до $+1.30$ В и измеряли величину $I_{\text{п}}$ окисления ацикловира при $E_{\text{п}}$ 1.10 В.

Аналитические характеристики, демонстрирующие высокую чувствительность отклика, представлены в табл. 2. Нижняя граница определяемых содержаний составляет 5×10^{-6} М, правильность предлагаемых способов определения оценена мето-

Таблица 1. Вольт-амперные характеристики окисления ацикловира и валацкловира на модифицированных электродах

Субстрат	E_s^* , В	I_s^* , мкА	Модификатор	$E_{\text{мод}}$, В	$E_{\text{кат}}$, В	$I_{\text{кат}}$, мкА	$I_{\text{кат}}/I_{\text{мод}}$
Ацикловир	1.15	18.0	поли-Гли	1.10	1.10	58.0	18.2
			поли-Гли-ГО _{вос}	1.10	1.10	104.3	26.1
Валацкловир	1.15	15.0	поли-Гли	1.10	1.10	53.2	16.6
			поли-Гли-ГО _{вос}	1.10	1.10	96.5	24.1

Примечание. E_s^* и I_s^* — потенциал и ток окисления ацикловира и валацкловира на СУ.

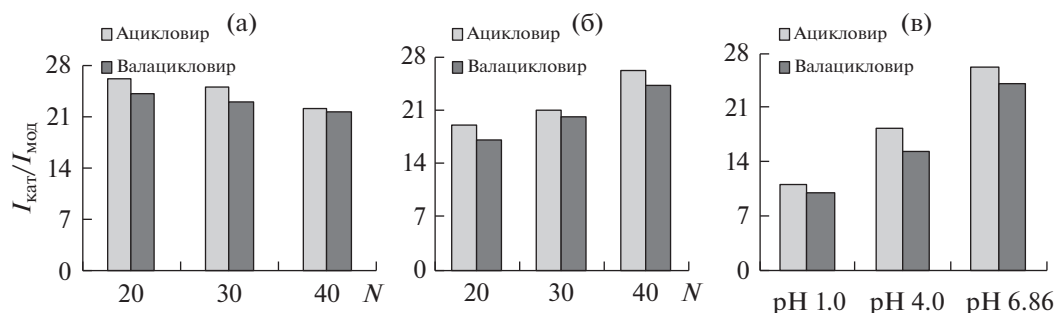


Рис. 4. Зависимость величины каталитического эффекта при окислении ацикловира и валацикловира от количества циклов при восстановлении ГО (а), от количества циклов при электрополимеризации глицина (б) и от pH фонового электролита (в).

дом введено—найденно. Относительное стандартное отклонение (S_r) не превышает 0.05 во всем рабочем диапазоне концентраций (табл. 3).

Проведен анализ лекарственных средств (в таблетках) на содержание ацикловира и валацикловира. Для этих целей использовали разработанные способы вольтамперометрического определения этих органических соединений на электроде поли-Гли-ГО_{вос}-СУ. Результаты определения представлены в табл. 4. Статистическая оценка результатов с использованием величины t -критерия свидетельствует об отсутствии значимой систематической погрешности ($t_{расч} < t_{табл}$) (табл. 4).

Показана возможность использования электрода поли-Гли-ГО_{вос}-СУ для определения рассматриваемых биологически активных соединений в условиях ПИА. В качестве потока-носителя использовали фосфатный буферный раствор с pH 6.86.

Графические зависимости аналитического сигнала от электрохимических (накладываемый потенциал (E_n)) и гидродинамических (объем инжектируемой пробы (V) и скорость потока жидкости (u)) параметров проточной системы приведены для ацикловира (рис. 5). Максимум на зависимостях величины ПИА-сигнала ацикловира от

накладываемого потенциала (рис. 5а) наблюдается при E_n 1.15 В, от объема инжектируемой пробы — при V 0.90 мл (рис. 5б), от скорости потока — при u 27.5 мл/мин (рис. 5в).

На основе полученных зависимостей выбрали рабочие условия регистрации ПИА-сигнала ацикловира и валацикловира на электроде поли-Гли-ГО_{вос}-СУ. Для ацикловира наилучшими условиями регистрации тока являются: E_n +1.15 В, V 0.90 мл и u = 27.5 мл/мин. Аналогичные характеристики амперометрического детектирования в проточных условиях получены и для валацикловира.

Для каждого аналита разработана методика амперометрического детектирования в условиях ПИА. Аналитические характеристики определения ацикловира и валацикловира представлены в табл. 2. Использование амперометрического сигнала в ПИА по сравнению со стационарными вольтамперометрическими условиями регистрации аналитического сигнала приводит к снижению нижней границы определяемых содержания аналита до 1×10^{-7} М.

Метрологические характеристики определения ацикловира и валацикловира на электроде с композитом поли-Гли-ГО_{вос} в условиях ПИА представлены в табл. 3. Нижняя граница опреде-

Таблица 2. Аналитические характеристики определения ацикловира и валацикловира на электроде поли-Гли-ГО_{вос}-СУ ($n = 6$, $P = 0.95$, $t_{табл} = 2.57$)

Субстрат	Способ регистрации	Диапазон концентраций, М	Уравнение регрессии $\lg(I) = a + b \lg(c)$ (I_n , мкА; c , М)		R
			$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	
Ацикловир	Циклическая вольтамперометрия	$5 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-6}$	2.8 ± 0.3	0.41 ± 0.02	0.996
Валацикловир		$5 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-6}$	2.7 ± 0.4	0.40 ± 0.03	0.996
Ацикловир	Амперометрия в ПИА	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-7}$	2.3 ± 0.5	0.44 ± 0.03	0.998
Валацикловир		$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-7}$	2.3 ± 0.4	0.42 ± 0.02	0.999

Таблица 3. Метрологические характеристики определения ацикловира и валацикловира на электроде поли-Гли-ГО_{вос}-СУ ($n = 6$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.57$)

Аналит	Введено, мкМ	Найдено, ($\bar{x} \pm \Delta x$), мкМ	$s_{\text{г}}$
Циклическая вольтамперометрия			
Ацикловир	5.0	4.8 ± 0.3	0.05
	10.0	9.9 ± 0.4	0.04
	100	101 ± 2	0.02
Валацикловир	5.0	4.6 ± 0.3	0.07
	10.0	9.6 ± 0.8	0.08
	100	101 ± 8	0.07
Амперометрия в ПИА			
Ацикловир	4.5	4.3 ± 0.1	0.03
	45	46 ± 1	0.02
	90	88 ± 1	0.01
Валацикловир	4.0	4.1 ± 0.1	0.03
	40	39 ± 1	0.02
	80	77 ± 2	0.02

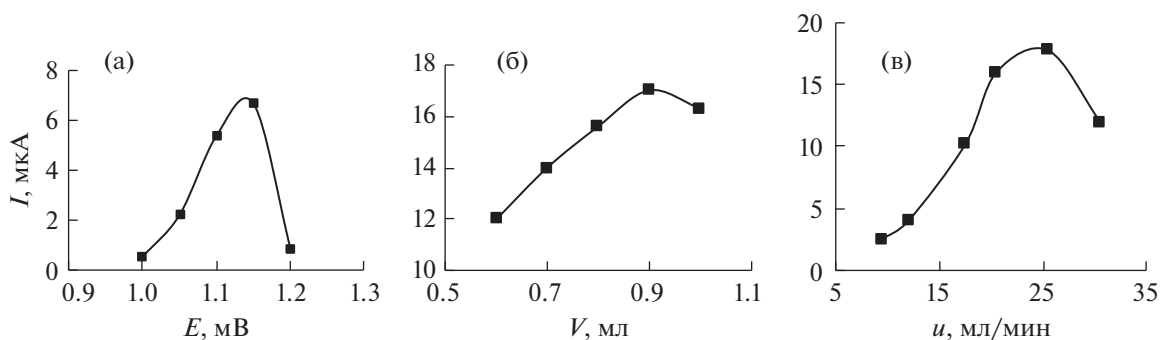
Таблица 4. Результаты определения ацикловира и валацикловира в лекарственных средствах методом вольтамперометрии на поли-Гли-ГО_{вос}-СУ ($n = 6$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.57$, $F_{\text{табл}} = 5.79$)

Объект анализа	Аналит	Заявленное содержание в препарате, г	Найдено, г	$s_{\text{г}}$	$t_{\text{расч}}$
“Ацикловир-Акри”	Ацикловир	0.40	0.38 ± 0.02	0.05	2.45
“Валвир”	Валацикловир	0.50	0.49 ± 0.02	0.04	2.44

ляемых содержаний составляет 1×10^{-7} М для проточных условий регистрации аналитического сигнала. При оценке этих характеристик сопоставили сходимость результатов анализа в стационарных и проточных системах. В условиях ПИА достигнута лучшая воспроизводимость результатов определения исследуемых аналитов по сравнению со стационарными условиями (табл. 3). Во

всех случаях регистрации аналитического сигнала в проточных условиях относительное стандартное отклонение не превышало 3%.

Повышение воспроизводимости и стабильности каталитического отклика ХМЭ в ПИА-условиях связано с обновлением поверхности электрода потоком фонового электролита, с ограничением по времени сорбции исследуемых

**Рис. 5.** Зависимость ПИА-сигнала при окислении ацикловира (5×10^{-3} М) на поли-Гли-ГО_{вос}-СУ от накладываемого потенциала (а), объема инжестируемой пробы (б) и скорости подачи потока-носителя (в).

соединений или продуктов электрохимических реакций на поверхности электрода в потоке, что, в свою очередь, уменьшает риски отравления модификатора.

* * *

Таким образом, использование ПИА способствует автоматизации анализа, сочетание ПИА с амперометрическим способом определения ацикловира и валацикловира на ХМЭ позволяет улучшить воспроизводимость электрокаталитического отклика ХМЭ, повысить чувствительность и производительность метода по сравнению со статическим вольтамперометрическим способом определения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Herlem G., Zeggari R., Rauch J.Y., Monney S., Anzola F.T., Guillaume Y., Andre C., Gharbi T. One-pot electrosynthesis of polyglycine-like thin film on platinum electrodes as transducer for solid state pH measurements // *Talanta*. 2010. V. 82. № 1. P. 417.
2. Han L., Zhao Y., Chang C., Li F. A novel electrochemical sensor based on poly(p-aminobenzene sulfonic acid)-reduced graphene oxide composite film for the sensitive and selective detection of levofloxacin in human urine // *J. Electroanal. Chem.* 2018. V. 817. P. 141.
3. Das T.K., Prusty S. Graphene-based polymer composites and their applications // *Polymer-Plastics Technol. Eng.* 2013. V. 52. № 4. P. 319.
4. Eda G., Chhowalla M. Graphene-based composite thin films for electronics // *Nano Letters*. 2009. V. 9. № 2. P. 814.
5. Terrones M., Martín O., González M., Pozuelo J., Serrano B., Cabanelas J.C., Vega-Díaz S.M., Baselga J. Interphases in graphene polymer-based nanocomposites: achievements and challenges // *Adv. Mater.* 2011. V. 23. № 44. P. 5302.
6. Liu H., Zhang G., Zhou Y., Gao M., Yang F. One-step potentiodynamic synthesis of poly(1,5-diaminoanthraquinone)/reduced graphene oxide nanohybrid with improved electrocatalytic activity // *J. Mater. Chem. A*. 2013. V. 1. № 44. P. 13902.
7. William S., Hummers J.R., Richard E.O. Preparation of graphitic oxide // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. V. 80. №. 6. P. 1339.
8. Palakollu V.N., Thapliyal N., Chiwunze T.E., Karpoor-math R., Karunanidhi S., Cherukupalli S. Electrochemically reduced graphene oxide/poly-glycine composite modified electrode for sensitive determination of L-dopa // *Mater. Sci. Eng. C*. 2017. V. 77. P. 394.
9. Shin H.-J., Kim K.K., Benayad A., Yoon S.-M., Park H.K., Jung I.-S., Jin M.H., Jeong H.-K., Kim J.M., Choi J.-Y., Lee Y.H. Efficient reduction of graphite oxide by sodium borohydride and its effect on electrical conductance // *Adv. Funct. Mater.* 2009. V. 19. № 12. P. 1987.
10. Kumar D.R., Kesavan S., Baynosa M.L., Shim J.J. 3,5-Diamino-1,2,4-triazole electrochemically reduced graphene oxide film modified electrode for the electrochemical determination of 4-nitrophenol // *Electrochim. Acta*. 2017. V. 246. P. 1131.
11. Guo H.-L., Wang X.-F., Qian Q.-Y., Wang F.-B., Xia X.-H. A green approach to the synthesis of graphene nanosheets // *ACS Nano*. 2009. V. 3. №. 9. P. 2653.
12. Kuila T., Mishra A.K., Khanra P., Kim N.H., Lee J.H. Recent advances in the efficient reduction of graphene oxide and its application as energy storage electrode materials // *Nanoscale*. 2013. V. 5. № 1. P. 52.
13. Каплун М.М., Смирнов Ю.Е., Микли В., Малеев В.В. Структурное исследование пленок гексацианоферрата кобальта, синтезированных из комплексного электролита // *Электрохимия*. 2001. Т. 37. № 9. С. 1065.
14. Шайдарова Л.Г., Зиганшина С.А., Тихонова Л.Н., Будников Г.К. Электро-каталитическое окисление и проточно-инжекционное определение серосодержащих аминокислот на графитовых электродах, модифицированных пленкой из гексацианоферрата рутения // *Журн. аналит. химии*. 2003. Т. 58. № 12. С. 1277.
15. Дамаскин Б.Б. Практикум по электрохимии: учеб. пособие для хим. спец. вузов / Под ред. Дамаскина Б.Б. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
16. Будников Г.К., Улахович Н.А., Медянцева Э.П. Основы электроаналитической химии. Казань: Изд-во КГУ, 1986. 288 с.
17. Будников Г.К. Принципы и применение вольтамперной осциллографической полярографии. Казань: Изд-во КГУ, 1975. 197 с.

УДК 543.4:543.8

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В МИЦЕЛЛЯРНЫХ МАТРИЦАХ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЛАНОВ БОКСА–БЕНКЕНА

© 2022 г. Р. Ф. Бакеева^а, С. Ю. Гармонов^{а, *}, О. Е. Вахитова^а, В. Ф. Сопин^а^аКазанский национальный исследовательский технологический университет
ул. К. Маркса, 68, Казань, 420015 Россия

*e-mail: serggar@mail.ru

Поступила в редакцию 06.06.2021 г.

После доработки 06.08.2021 г.

Принята к публикации 06.08.2021 г.

Представлены результаты использования методологии “поверхности отклика” и дизайна Бокса–Бенкена при спектрофотометрическом определении лекарственных веществ на примере дапсона и прокаина в мицеллярной матрице. В качестве реагента использовали 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуросан. Дизайн матрицы состава неонол–вода (80%)–диметилсульфоксид (20%) варьировали за счет факторов: концентрация реагента, pH, концентрация неонла. Оптимизацию проводили с использованием трехуровневого плана Бокса–Бенкена. Показано существенное увеличение интенсивности полосы поглощения продуктов реакции в мицеллярной псевдофазе. Найдены оптимальные условия, при которых возможно спектрофотометрическое определение лекарственных веществ в жидких и твердых лекарственных формах.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, спектрофотометрия, прокаин, дапсон, 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуросан, методология поверхности отклика, планы Бокса–Бенкена, лекарственные препараты.

DOI: 10.31857/S0044450222060032

Прокаин (2-(диэтиламино)этил-4-аминобензоат) и дапсон (4,4'-сульфонилбис[бензоламин]) относятся к лекарственным веществам (ЛВ), содержащим в своем составе функциональные первичные аминогруппы. Прокаин применяют в медицине как эффективное местноанестезирующее средство, а дапсон обладает оригинальным антибактериальным и противолепрозным действием [1, 2].

При фармацевтическом анализе широко используют спектрофотометрию, что обусловлено ее проработанной методической базой, доступностью аппаратуры и универсальностью по отношению ко многим объектам фармации. Однако в случае производных ароматических аминов спектрофотометрическое определение часто ограничивается проблемой избирательности и чувствительности анализа, что приводит к необходимости применения селективных реагентов, как правило, в органической или смешанной среде. Все это значительно усложняет процедуру анализа, требует обеспечения устойчивости спектрохимических реагентов и образующихся производных, повышает стоимость анализа и его опас-

ность за счет использования токсичных органических растворителей [3, 4].

Один из возможных путей решения этой проблемы — использование в фармацевтическом анализе организованных сред, в частности, содержащих мицеллярные системы. При этом в мицеллах поверхностно-активных веществ (ПАВ) увеличивается растворимость гидрофобных и гидрофильных реагентов, повышается агрегативная устойчивость фотометрируемых систем, изменяется скорость реакций реагентов с ЛВ. На практике чаще всего эти эффекты проявляются одновременно. Реализация такого подхода позволяет более широко использовать спектрофотометрию в водных средах в фармацевтическом анализе. Так, в обзоре [5] описано спектрофотометрическое определение ЛВ различных фармакологических групп на основе реакций получения их окрашенных производных (карбонильные соединения, диазотирование с последующим азосочетанием, образование хинониминных и др.) в организованных средах. Следует отметить, что из-за сложного состава анализируемой матрицы эти приемы могут быть малоизбирательными, не

всегда обеспечивать достаточную чувствительность при анализе биологических жидкостей, а также быть многостадийными и длительными.

Формирование мицеллярных систем — сложный процесс, зависящий от большого количества независимых переменных. Если мицеллярные среды используются как матрица для проведения аналитических определений, то возможна ее оптимизация с помощью дизайна Бокса—Бенкена. Аналитическому применению этого подхода посвящена обзорная статья [6]. Дизайн Бокса—Бенкена успешно зарекомендовал себя как инструмент многофакторного анализа при оптимизации ионной ловушки масс-спектрометра при определении 15 поли- и перфторалкильных веществ [7], при определении пропранолола методом капиллярного электрофореза в сочетании с индуцированной лазером флуоресценцией в биологических жидкостях [8], при экстракции флавоноидов и определении целевых аналитов в пробах оливкового, миндального, кунжутного и коричневого масел [9, 10], а также при оптимизации ряда спектроаналитических методов [11–13].

Ранее нами для спектрофотометрического определения ароматических аминов в мицеллярной среде использован 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуроксан [14], который обеспечил высокую селективность и чувствительность анализа при контроле качества токсичной примеси 4-аминофенола в лекарственных препаратах на основе парацетамола.

В настоящей работе мицеллярные системы использовали при спектрофотометрическом определении прокаина и дапсона с реагентом 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуроксаном для получения окрашенных производных в водных и водно-органических средах. Приведены результаты применения методологии поверхности отклика с дизайном Бокса—Бенкена для определения прокаина и дапсона при использовании в качестве матрицы растворов мицелл. Применение мицеллярных систем на основе оксиэтилированного нонилфенола позволяет избирательно и с высокой чувствительностью определять аналиты в лекарственных формах в виде таблеток и растворов для инъекций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и аппаратура. 5,7-Дихлор-4,6-динитробензофуроксан был синтезирован по известной методике [15] и любезно предоставлен проф. Л.М. Юсуповой. Использовали субстанции прокаина и дапсона фармакопейной чистоты. Для создания мицеллярных матриц использовали неионное ПАВ — оксиэтилированный нонилфенол (APh 9-10, неонол) (Fluka Chemie AG, Швейцария). Для определения дапсона и прокаина при-

меняли мицеллярную матрицу APh 9-10 в водном растворе диметилсульфоксида (ДМСО, 20 об. %) до и после формирования мицелл. Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) в системе APh 9-10 + H₂O (80%) + ДМСО (20%) составила 2.51×10^{-4} М. Остальные реактивы были марки х.ч. Применяли лекарственные формы прокаина и дапсона коммерческого изготовления.

Тензиометрические измерения проводили на тензиометре Дю-Нуи, оснащенный платиновым кольцом, в соответствии с ГОСТ 29232–91 (ИСО 4311–79).

Значения рН определяли на рН-метре (рН 150 М).

Для спектрофотометрических измерений применяли спектрофотометр Agilent 8453 в спектральном диапазоне от 400 до 700 нм. При измерении оптической плотности растворов использовали кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 0.1, 0.50, 1.00 см. Эксперименты проводили при 25°C.

Статистическую обработку результатов оптимального эксперимента проводили для пяти измерений при доверительной вероятности 0.95. Результаты представляли как $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$, где $\bar{X}$ — среднее значение и $\Delta\bar{X}$ — доверительный интервал. Случайную погрешность определения оценивали по величине относительного стандартного отклонения (s_r). Для расчета эффектов и построения поверхностей отклика использовали пакет программ Statistica 10.

Методика определения. Жидкие лекарственные формы (инъекционные растворы) разбавляют водой до содержания лекарственных веществ в интервале 0.01–0.05 мг/мл, далее аликвотную часть раствора помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, добавляют водный раствор ПАВ для создания концентрации APh 9-10 5.3–10 мг/мл, 2 мл 0.05 М боратного буферного раствора (рН 8.76 для прокаина и 11 для дапсона), ацетонитрильный раствор 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуроксана до концентрации $(4.6–6.8) \times 10^{-4}$ М и доводят смесью ДМСО—вода (20 : 80, по объему) до метки. Оптическую плотность раствора измеряют при длине волны 510 нм (дапсон) и 500 нм (прокаин) в кювете с длиной поглощающего слоя 1 см. Содержание лекарственных веществ находят по градуировочной зависимости или методом добавок.

При анализе таблеток их растирают до порошка, отбирают навеску 0.5 г, прибавляют 20 мл ДМСО и встряхивают 10 мин. Повторяют извлечение. Раствор переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят до метки ДМСО и выполняют определение как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве аналитической реакции использовали нуклеофильное замещение аминогрупп

при взаимодействии дапсона (ДПС) и прокаина (ПК) с 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуросаном (ДХДНБФ) в мицеллярной системе APh 9-10 + H₂O (80%) + ДМСО (20%), в результате которой появляются продукты взаимодействия с полосами поглощения (ПП) при 510 и 500 нм соответственно. Интенсивности ПП A_{510} и A_{500} выбрали как целевые функции для количественного определения ДПС и ПК.

Особенностью систем, содержащих ПАВ, является формирование мицелл с определенной критической концентрацией мицеллообразования. Влияние мицеллярных агрегатов можно проследить, если исследовать действие системы до и после формирования мицелл. Формирование мицелл происходит по достижении ККМ, значение которой определяли из тензиометрической кривой по точке изменения наклона ветвей кривых зависимости $\sigma = f(c_{\text{APh 9-10}})$ (рис. 1). Самопроизвольное образование мицелл в системе APh 9-10 + H₂O (80%) + ДМСО (20%) наблюдается при ККМ 2.51×10^{-4} М APh 9-10. Присутствие ДМСО приводит к увеличению ККМ (в системе APh 9-10 + H₂O ККМ составляет 1.02×10^{-4} М). Это отмечалось и в работах [16, 17], поэтому следует учитывать влияние природы компонентов при дизайне мицеллярных матриц.

Значимыми независимыми факторами являлись: концентрация аналитического реагента $c(\text{ДХДНБФ})$, мМ; величина pH; $c(\text{APh 9-10})$, М, поскольку в результате однофакторных экспериментов показано их влияние на аналитический сигнал.

Для трех независимых факторов число испытаний N , в соответствии с данными [6], равно $N = 2K(K-1) + \text{CP}$, где K – число независимых факторов, CP – центральные точки для оценки экспериментальной погрешности. В нашем случае CP = 3. Общее число опытов было равно 15.

Дальнейшая оптимизация включала планирование и выполнение факторного эксперимента; построение математической модели ($y = f(X_i)$); изучение влияния факторов (X_i) на целевую функцию ($Y = A_{510}$ или A_{500}) путем построения по-

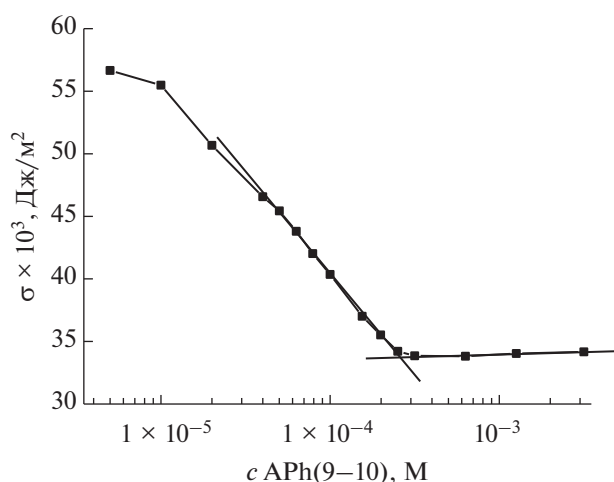


Рис. 1. Тензиометрическая кривая для системы APh 9-10 + H₂O (80%) + ДМСО (20%), 25°C, ККМ 2.51×10^{-4} М.

верхности отклика; анализ поверхности отклика с целью поиска точки оптимума; выявление оптимальных условий.

В табл. 1 и 2 приведены кодированные и декодированные значения факторов и отклика (A_{510} и A_{500}), которые использовали в дизайне Бокса–Бенкена. Диаграмма Парето основных эффектов показана на рис. 2. Для описания математической модели выбрали значения с уровнем значимости $p < 0.05$, которое соответствует доверительной вероятности 0.95. Адекватность моделей подтверждается коэффициентами детерминации ($R^2 = 0.9598$ для ДПС и $R^2 = 0.9903$ для ПК), характеризующими меру отклонения среднего в модели. Таким образом, модель может описать 95.98% влияния на отклик для ДПС и 99.03% для ПК.

Уровни факторов X_1 $c(\text{DCDNBP})$, X_2 pH, X_3 $c(\text{APh 9-10})$ кодировали в соответствии с рекомендациями [6] по формуле $X_i^* = \frac{X_i - M}{H}$, где

X_i^* – кодированный уровень i -го фактора, X_i – декодированный (реальный) уровень i -го фактора, M – среднее значение, H – полуширина интервала.

$$M = \frac{X(\text{верхний уровень}) + X(\text{нижний уровень})}{2},$$

$$H = \frac{X(\text{верхний уровень}) - X(\text{нижний уровень})}{2}.$$

Таблица 1. Факторы, действительные и кодированные уровни и матрица для дизайна Бокса–Бенкена при определении дапсона в системе APh 9-10 + H₂O (80%) + ДМСО (20%)

Фактор		Уровень					
		нижний –1		центральный 0		верхний +1	
X_1	$c(\text{ДХДНБФ})$, мМ	0.100		0.400		0.700	
X_2	pH	2.00		6.00		10.00	
X_3	pc(АPh 9-10)	4.60 ¹		3.60 ²		2.60 ³	
№ опыта	Реальные (декодированные) уровни факторов			Кодированные уровни факторов			Отклик A_{510}
	$X_{1\cdot}$	X_2	$X_{3\cdot}$	X_1^*	X_2^*	X_3^*	$Y_{\text{ср}}^4$
1	0.700	10.00	3.60	+1	+1	0	0.618
2	0.700	2.00	3.60	+1	–1	0	0.625
3	0.100	10.00	3.60	–1	+1	0	0.261
4	0.100	2.00	3.60	–1	–1	0	0.242
5	0.700	6.00	2.60	+1	0	+1	0.949
6	0.700	6.00	4.60	+1	0	–1	0.053
7	0.100	6.00	2.60	–1	0	+1	0.377
8	0.100	6.00	4.60	–1	0	–1	0.027
9	0.400	10.00	2.60	0	+1	+1	1.131
10	0.400	10.00	4.60	0	+1	–1	0.039
11	0.400	2.00	2.60	0	–1	+1	0.385
12	0.400	2.00	4.60	0	–1	–1	0.040
13	0.400	6.00	3.60	0	0	0	0.779
14	0.400	6.00	3.60	0	0	0	0.771
15	0.400	6.00	3.60	0	0	0	0.782
	0.682*	11.04	1.51	0.94	1.26	1.51	1.158 ± 0.004

Примечание: концентрацию ДПС во всех опытах поддерживали равной 1×10^{-4} М.

¹ $c(\text{APh 9-10}) = 2.5119 \times 10^{-5}$ М, до ККМ; ² $c(\text{APh 9-10}) = 2.5119 \times 10^{-4}$ М, ККМ; ³ $c(\text{APh 9-10}) = 2.5119 \times 10^{-3}$ М, после ККМ;

⁴для определения A_{510} проводили три параллельных определения. В дальнейшем рассматривали среднее значение.

Декодирование уровней факторов выполняли по формуле $X_i = X_i^* H + M$.

Полученное нами соотношение между откликом (A_{510}) и тремя значимыми факторами для ДПС является полиномом второй степени и выглядит следующим образом:

$$Y = A_{510} = 0.777 + 0.167X_1 - 0.194(X_1)^2 + 0.335X_3 - 0.232(X_3)^2 + 0.187X_2X_3 \quad (R^2 = 0.9598),$$

а для ПК:

$$Y = A_{500} = 0.387 + 0.108X_1 + 0.053X_2 + 0.128X_3 - 0.081X_1^2 - 0.130X_2^2 - 0.878X_3^2 + 0.047X_2X_3 + 0.087X_3X_1 \quad (R^2 = 0.99027),$$

где главные факторные эффекты: X_1 – $c(\text{ДХДНБФ})$; X_2 – pH; X_3 – pc(APh 9-10). Эффекты взаимодействия – X_2X_3 , квадратичные (нелинейные) факторные эффекты – X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 .

На рис. 3–5 представлены 3D графики поверхности отклика A_{510} в зависимости от значимых факторов при определении ДПС в мицеллярной матрице APh 9-10 + H₂O (80%) + ДМСО (20%). Можно отметить, что во всех случаях форма поверхности отклика неплоская, что свидетельствует о наличии эффектов взаимодействия между факторами. Из рис. 3 следует, что интенсивность ПП A_{510} существенно возрастает при формировании мицеллярной матрицы. Это можно объяснить солюбилизацией продукта реакции с ДПС за счет концентрирования реагента на или в мицелле, что использовали для определения ДПС.

Таблица 2. Факторы, действительные и кодированные уровни и матрица для дизайна в Бокса–Бенкена для определения прокаина в системе APh 9-10 + H₂O (80%) + ДМСО (20%)

Фактор		Уровень					
		нижний −1	центральный 0		верхний +1		
X_1	$c(\text{DCDNBP})$, мМ	0.050	0.200		0.350		
X_2	pH	2.00	6.00		10.00		
X_3	$\rho c(\text{APh 9-10})$	4.60	3.60		2.60		
№ опыта	Реальные (декодированные) уровни факторов			Кодированные уровни факторов			Отклик A_{500}
	X_1	X_2	X_3	X_1^*	X_2^*	X_3^*	
1	0.350	10.00	2.60	+1	+1	0	0.351
2	0.350	2.00	2.60	+1	−1	0	0.203
3	0.050	10.00	2.60	−1	+1	0	0.101
4	0.050	2.00	2.60	−1	−1	0	0.052
5	0.350	6.00	2.60	+1	0	+1	0.570
6	0.350	6.00	4.60	+1	0	−1	0.100
7	0.050	6.00	2.60	−1	0	+1	0.164
8	0.050	6.00	4.60	−1	0	−1	0.041
9	0.200	10.00	2.60	0	+1	+1	0.382
10	0.200	10.00	4.60	0	+1	−1	0.071
11	0.200	2.00	2.60	0	−1	+1	0.174
12	0.200	2.00	0.25	0	−1	−1	0.052
13	0.200	6.00	3.60	0	0	0	0.389
14	0.200	6.00	3.60	0	0	0	0.386
15	0.200	6.00	3.60	0	0	0	0.387
	0.459•	8.76	1.830	1.7253	0.6906	1.7687	0.611 ± 0.019

Примечание: концентрацию прокаина во всех опытах поддерживали равной 1×10^{-4} М.

Диаграмма Парето, представленная на рис. 2, показывает значимость каждого из факторов и свидетельствует о взаимодействиях этих факторов. Рассматривали те эффекты, для которых уровень значимости $p < 0.05$, (что соответствует доверительной вероятности 0.95). Наиболее существенный вклад в отклик при определении ДПС вносят концентрация неионного ПАВ APh 9-10, концентрация реагента ДХДНБФ, величина же pH влияет опосредованно. Максимально возможная величина A_{510} найдена нами с помощью функции “Critical values” и равна 1.1685. При этом состав мицелярной матрицы в кодированных зна-

чениях следующий: X_1 0.9403; X_2 1.2609; X_3 1.5083. Декодированные значения составляют: $c(\text{DCDNBP}) = 6.820 \times 10^{-4}$ М, pH 11.04 и $c(\text{APh 9-10}) = 8.097 \times 10^{-3}$ М.

Для проверки модели провели пять параллельных экспериментов по определению значения отклика A_{510} в оптимальных условиях. Полученное значение (1.158 ± 0.004) вполне согласуется с расчетным. В этих условиях величина $\epsilon_{\lambda\text{max}}$ составляет 23200 л/(моль · см), что позволяет говорить о значительном увеличении чувствительности спектрофотометрического определения ДПС в

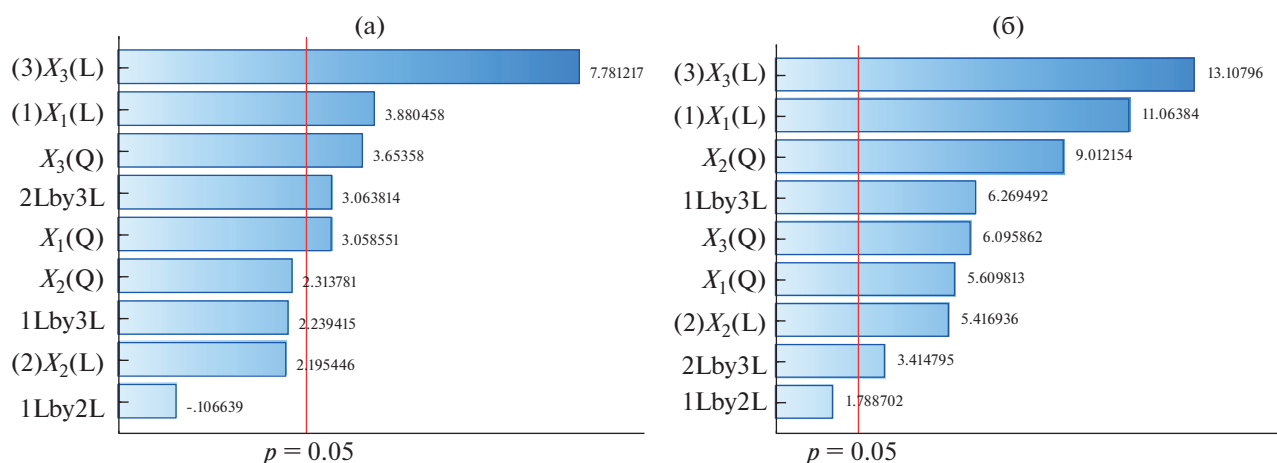


Рис. 2. Диаграмма Парето стандартизированных эффектов на отклик. (а) – интенсивность полосы поглощения A_{510} для дапсона; (б) – интенсивность полосы поглощения A_{500} для прокаина в мицеллярной матрице APh 9-10 + H_2O (80%) + ДМСО (20%). L – линейные, Q – квадратичные эффекты, X_1 – c (ДХДНБФ), мМ; X_2 – pH; X_3 – pc (APh 9-10).

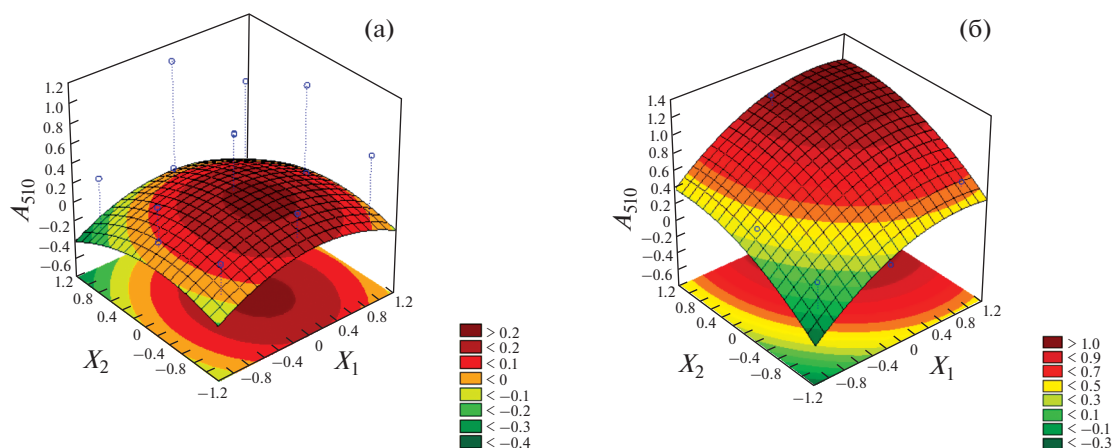


Рис. 3. Поверхность отклика зависимости A_{510} от концентрации реагента ДХДНБФ (X_1) и pH (X_2). (а) – при $pc(\text{APh 9-10}) (X_3^*) = -1$, до ККМ; (б) – при $X_3^* = +1$, после ККМ.

результате проведенной оптимизации (ранее значение $\epsilon_{\lambda_{\max}}$ составляло 11200 л/(моль · см)).

Результаты дизайна поверхности отклика для ПК приведены на рис. 6–8. Полученные значения координат оптимума (максимума) в кодированных значениях факторов составили: фактор X_1 1.7253; фактор X_2 0.6906; фактор X_3 1.7687. Декодированные значения составили: c (ДХДНБФ) = 4.59×10^{-4} М, pH 8.76 и c (APh 9-10) = 1.48×10^{-2} М. При этом величина отклика в области максимума

составляет: $Y = A_{500} = 0.612$. Полученные экспериментальные значения отклика в оптимальных условиях (0.61 ± 0.02) согласуются с расчетными.

В установленных оптимальных условиях оценили возможность спектрофотометрического определения ДПС и ПК. Результаты демонстрируют линейность градуировочных зависимостей в широком интервале определяемых концентраций 0.003–0.05 мг/мл:

$$A = 49.66c_x (\text{мг/мл}) + 0.015 \quad (r = 0.9995) \text{ для дапсона;}$$

$$A = 17.05c_x (\text{мг/мл}) - 0.020 \quad (r = 0.9985) \text{ для прокаина.}$$

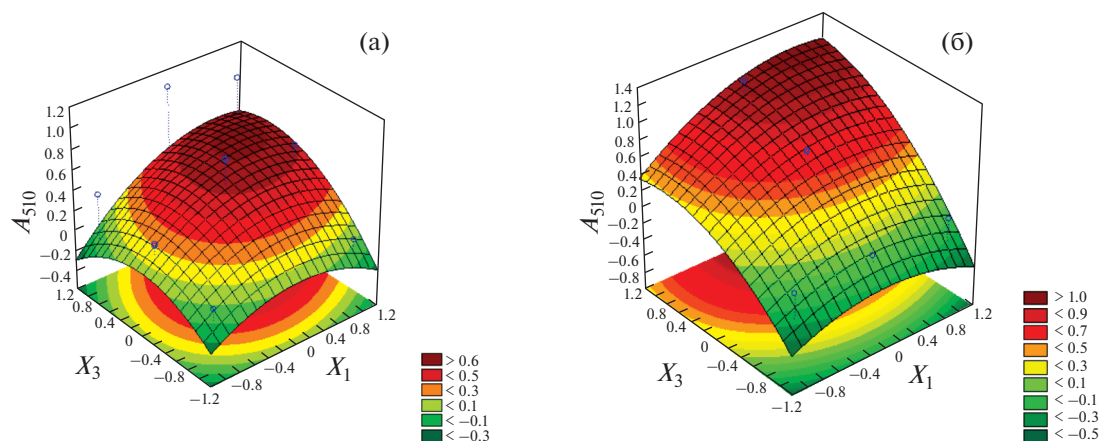


Рис. 4. Поверхность отклика зависимости A_{510} от концентрации реагента ДХДНБФ (X_1) и рс(АPh 9-10) (X_3). (а) – при $X_2^* = -1$, pH 2.00; (б) – при $X_2^* = 1$, pH 10.00.

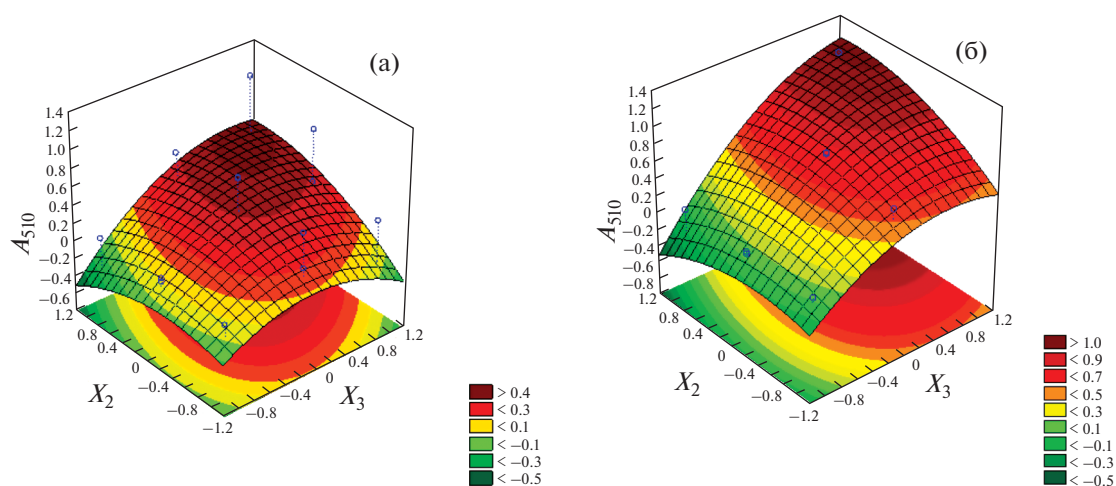


Рис. 5. Поверхность отклика зависимости A_{510} от рс(АPh 9-10) (X_3) и pH (X_2). (а) – при $X_1^* = -1$, $c(\text{ДХДНБФ}) = 0.100$ mM, (б) – при $X_1^* = 1$, $c(\text{ДХДНБФ}) = 0.700$ mM.

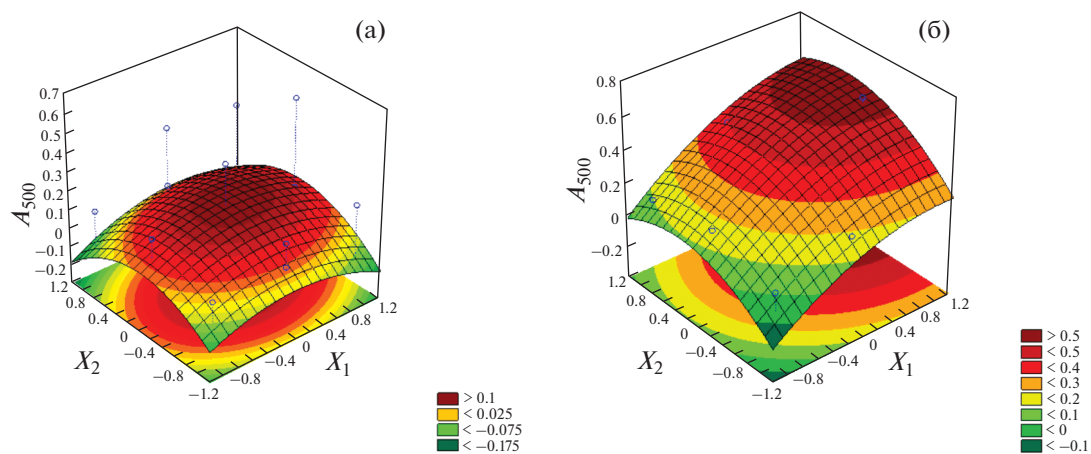


Рис. 6. Поверхность отклика зависимости A_{500} от концентрации реагента ДХДНБФ (X_1) и pH (X_2). (а) – при $X_3^* = -1$, $c(\text{АPh 9-10})$ до ККМ, (б) – при $X_3^* = 1$, $c(\text{АPh 9-10})$ после ККМ.

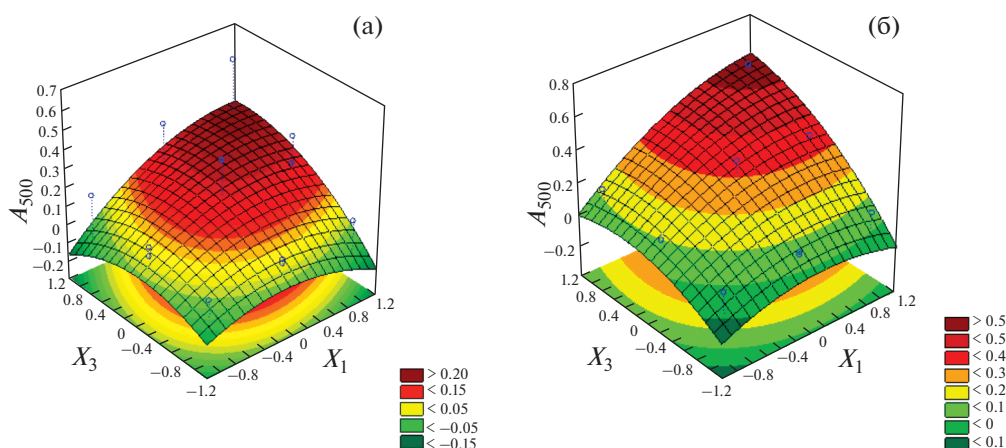


Рис. 7. Поверхность отклика зависимости A_{500} от $pc(ArPh\ 9-10)$ (X_1) и ДХДНБФ (X_3). (а) – при $X_2^* = -1$, pH 2.00; (б) – при $X_2^* = 1$, pH 10.00.

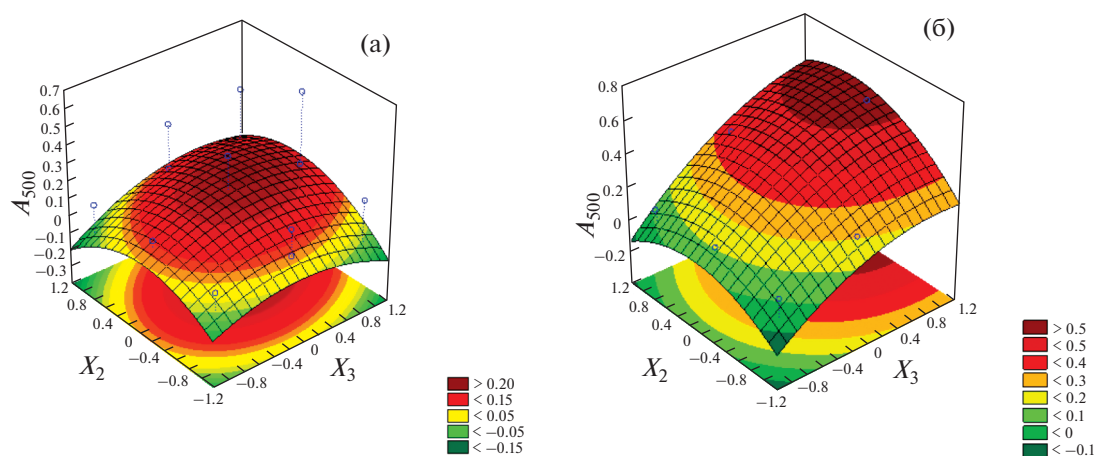


Рис. 8. Поверхность отклика зависимости A_{500} от $pc(ArPh\ 9-10)$ (X_1) и pH (X_2). (а) – при $X_3^* = -1$, $c(ДХДНБФ) = 0.100$ мМ, и (б) – при $X_3^* = 1$, $c(ДХДНБФ) = 0.700$ мМ.

Значения пределов обнаружения, рассчитанные по 3s-критерию, составили 0.75 и 1.5 мкг/мл для дапсона и прокаина соответственно.

Изучили влияние различных органических и неорганических веществ, являющихся потенциальными компонентами лекарственных форм, на результаты определения ЛВ. Присутствие неорганических солей, других действующих и вспомогательных веществ, входящих в состав лекарственных форм, определению не мешает. Правильность методик спектрофотометрического определения проверяли сопоставлением результатов анализа лекарственных форм по Фармакопее РФ (табл. 3, 4). Такая избирательность определения возможна ввиду того, что полосы поглощения производных вспомогательных компонентов сдвинуты гипсохропно

по сравнению с бензофуросановыми производными лекарственных веществ.

Таким образом, предложено использование методологии поверхности отклика и дизайна Бокса–Бенкена для спектрофотометрического определения в лекарственных препаратах ЛВ, содержащих ароматическую аминогруппу, на примере дапсона и прокаина. Существенным достижением является сокращение времени поиска оптимальной матрицы для проведения определений и экологичность предложенных мицеллярных матриц за счет существенного снижения доли органического растворителя.

Таблица 3. Мешающее влияние компонентов на результаты определения лекарственных веществ ($n = 5$, $P = 0.95$)

Компонент (А)	Содержание компонента, $c(A)$, мкг/мл	Введено аналита, мкг/мл	Найдено аналита, мкг/мл	s_T
Дапсон				
Фенол	38.0	6.21	6.25 ± 0.19	0.03
	1.90	12.40	12.20 ± 0.30	0.02
	9.50	24.80	25.30 ± 0.56	0.02
Крахмал	40.0	12.40	12.55 ± 0.17	0.01
Магния стеарат	10.0	12.40	12.25 ± 0.22	0.02
Лактозы моногидрат	40.0	12.40	12.55 ± 0.35	0.02
Натрия бензоат	2.00	12.40	12.65 ± 0.30	0.02
Глюкоза	50.0	12.40	12.15 ± 0.31	0.02
СаНРО ₄	40.0	12.40	12.63 ± 0.28	0.02
Ацетилсалициловая кислота	7.50	12.40	11.80 ± 0.48	0.03
Сульфосалициловая кислота	11.0	12.40	11.70 ± 0.51	0.03
Прокаин				
Фенол	50.0	27.28	28.00 ± 0.95	0.03
Хлорид натрия	145	27.28	27.02 ± 0.34	0.04
Хлорид кальция	27.0	27.28	27.45 ± 0.50	0.03
Оксид цинка	100	27.28	26.9 ± 0.60	0.03

Таблица 4. Результаты определения лекарственных веществ в лекарственных формах ($n = 4$, $P = 0.95$)

Состав лекарственной формы	Определяемое вещество	Найдено, г	
		по нормативной документации	по разработанной методике
Прокаина гидрохлорид 0.25 г; HCl (0.1 н) 0.3 мл; NaCl 0.85 г; вода до 100 мл	Прокаин	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01
Раствора CaCl ₂ (6.0 г) 200,0 мл; NaBr 4.0 г; прокаина гидрохлорида 1.0 г	Прокаин	0.98 ± 0.03	1.01 ± 0.03
Эфедрина гидрохлорид 6.0 г; прокаина гидрохлорид (1%-ный) 200 мл; димедрол 2.0 г	Прокаин	1.98 ± 0.06	1.99 ± 0.06
Атропина сульфат 0.02 г; эфедрина гидрохлорид 0.05 г; прокаина гидрохлорид 0.04 г; вода до 10.0 мл	Прокаин	0.043 ± 0.002	0.042 ± 0.002
Димедрол 0.025 г; эфедрин 0.025 г; прокаина гидрохлорид 0.2 г; NaCl 0.06 г	Прокаин	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Сульфокамфокаин	Прокаин	50.4 ± 0.8 мг/мл	50.3 ± 0.9 мг/мл
Бициллин-5	Прокаиновая соль бензилпенициллина	0.89 ± 0.01	0.90 ± 0.01
Таблетки дапсона 0.05 г	Дапсон	0.049 ± 0.002	0.050 ± 0.001

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Becker D.E., Reed K.L.* Essentials of local anesthetic pharmacology // *Anesth. Prog.* Fall 2006. V. 53. № 3. P. 98.
[https://doi.org/10.2344/0003-3006\(2006\)53\[98:EO-LAP\]2.0.CO](https://doi.org/10.2344/0003-3006(2006)53[98:EO-LAP]2.0.CO)
2. *Zhu Y.I., Stiller M.J.* Dapsone and sulfones in dermatology: Overview and update // *J. Am. Ac. Dermatol.* 2001. V. 45. P. 420.
<https://doi.org/10.1067/mjd.2001.114733>
3. *Полюдек-Фабини Р., Бейрих Т.* Органический анализ. Л.: Химия, 1981. 624 с.
4. *Фармацевтическая химия* / Под ред. Плетеневой Т.В. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. С. 547.
5. *Чернова Р.К., Доронин С.Ю., Гусакова Н.Н., Гаврилова Ю.Ю.* Проблема избирательности и чувствительности спектрофотометрического определения компонентов лекарственных средств в водных, неводных и организованных средах / Проблемы аналитической химии. Т. 16. Фармацевтический анализ / Под ред. Будникова Г.К., Гармонова С.Ю. М.: Аргмак-Медиа, 2013. С. 187.
6. *Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandao G.C., Silva E.G.P., Portugal L.A., Reisc P.S., Souza A.S., Santos W.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 597. P. 179.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
7. *Munoz G., Duy S., Budzinski H., Labadie P., Liu J., Sauve S.* Quantitative analysis of poly- and perfluoroalkyl compounds using high resolution mass spectrometry: Optimization for a laser diode thermal desorption method // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 881. P. 98.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.015>
8. *Schappler J., Staub A., Veuthey J.-L., Serge Rudaz S.* Highly sensitive detection of pharmaceutical compounds in biological fluids using capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1204. P. 183
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.044>
9. *Bi W., Tian M., Row K.H.* Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1285. P. 22.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.041>
10. *Tahere K., Ali D., Reza S.* A green ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of ferulic, caffeic, and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil // *Talanta.* 2016. V. 150. P. 577.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.077>
11. *Oliveira F.S., Korn M.* Spectrophotometric determination of sulphate in automotive fuel ethanol by sequential injection analysis using dimethylsulphonazo(III) reaction // *Talanta.* 2005. V. 68. P. 992.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.055>
12. *Brasil J.L., Ev R.R., Milcharek C.D., Martins L.C., Pavan F.A., Santos A.A.Jr., Dias S.L.P., Dupont J., C.P.Z. Norena C.P.Z., Lima E.C.* Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to Cr(VI) biosorption on *Araucaria angustifolia* wastes // *J. Hazard. Mater.* 2006. V. 133. № 1–3. P. 143.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.10.002>
13. *Bosque-Sendra J.M., Pescarolo S., Cuadros-Rodriguez L., Garcia-Campana A.M., Almansa-Lopez E.M.* Optimizing analytical methods using sequential response surface methodology: Application to the pararosanine determination of formaldehyde // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001. V. 369. P. 715.
<https://doi.org/10.1007/s002160100751>
14. *Бакеева Р.Ф., Горбунова Т.С., Вахитова О.Е., Гайсина А.И., Юсупова Л.М., Гармонов С.Ю., Сопин В.Ф.* Спектрофотометрическое определение *p*-аминофенола в лекарственных препаратах при использовании 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуроксана как реагента в мицеллярной среде // *Химико-фармацевтический журнал.* 2010. Т. 44. № 4. С. 51. (*Bakkeeva R.F., Gorbunova T.S., Vakhitova O.E., Gaisina A.I., Yusupova L.M., Garmonov S.Y., Sopin V.F.* Spectrophotometric determination of *p*-aminophenol in drugs using 5,7-dichloro-4,6-dinitrobenzofuroxan reagent in micellar medium // *Pharm. Chem. J.* 2010. V. 44. № 5. P. 282.
<https://doi.org/10.1007/s11094-010-0450-5>)
15. *Юсупова Л.М., Гармонов С.Ю., Горелова Е.Г., Васютина Е.А., Мухаметишина А.М.* Способ синтеза 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуроксана. Патент РФ 2013132641. Заявка 2013132641/04 от 16.07.2013, опубл. 27.01.2015.
16. *Арутюнян Л.Р., Маркарян Ш.А.* Изучение влияния диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида на мицеллообразование додецилсульфата натрия в водных растворах методом флуоресценции // *Коллоид. журн.* 2007. Т. 69. № 4. С. 444. (*Harutyunyan L., Markarian S.A.* Investigation of the effect of dimethyl sulfoxide and diethyl sulfoxide on sodium dodecyl sulfate micellization in aqueous solutions by fluorescence method // *Colloid. J.* 2007. V. 69. № 4. P. 444.)
<https://doi.org/10.1134/S1061933X07040023>
17. *Бакеева Р.Ф., Каримуллин Р.А., Курабашева Р.Ф., Горбунова Т.С., Вахитова О.Е., Сопин В.Ф.* Мицеллообразование в бинарном растворителе диметилсульфоксид–вода в присутствии NaCl. Планирование и оптимизация эксперимента // *Жидкие кристаллы и их практическое использование.* 2017. Т. 17. № 2. С. 51 DOI 10.18083/LCAppl.2017.2.51 (*Bakkeeva R.F., Karimullin R.A., Kurabasheva R.F., Gorbunova T.S., Vakhitova O.E., Sopin V.F.* Micelle formation in dimethyl sulfoxide–water binary solvent in presence of NaCl. Planning and optimization of experiment // *Liq. Cryst. Their Appl.*, 2017. V. 17. № 2. P. 51.)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АНАЛИЗ АНИОННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И МОЮЩИХ СРЕДСТВ НА СОДЕРЖАНИЕ δ -ГЕКСАДЕКАНСУЛЬТОНА МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ© 2022 г. Л. Р. Мубаракова^а, *, Г. К. Будников^а^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
ул. Кремлевская, 29, Казань, 42008 Россия

*e-mail: mubarakova.1990@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2021 г.

После доработки 02.07.2021 г.

Принята к публикации 14.08.2021 г.

Предложен способ определения сультонов в анионном поверхностно-активном веществе α -олефинсульфонате натрия (АОС Na) и продуктах на основе этого ПАВ. Важность и необходимость контроля качества при производстве АОС Na и моющих средств на содержание примесей сультонов обусловлены их токсичным влиянием на организм человека. В условиях производства процедура анализа должна быть экспрессной и обеспечивать получение результатов на уровне ppm. В настоящей работе усовершенствована методика определения сультонов, основанная на газовой хроматографии-масс-спектрометрии. В качестве стандарта при определении использован выделенный из реакционной массы сульфирования δ -гексадекансультон. Получены удовлетворительные метрологические характеристики методики, позволяющие применять ее для контроля производства. Исследованы зарубежные коммерческие образцы АОС Na разных производителей на содержание сультонов, а также модельные смеси моющих средств, приготовленные на основе этих образцов. Результаты испытаний на стабильность во времени модельных смесей моющих средств показали, что высокое содержание сультонов приводит к образованию осадка в готовой продукции.

Ключевые слова: АПАВ, сультоны, ГХ-МС, моющие средства.**DOI:** 10.31857/S0044450222060123

α -Олефинсульфонаты широко используют при производстве моющих средств различного назначения: шампуни, жидкое мыло, средства для мытья посуды и др. Такое многообразие выпускаемой моющей продукции на основе этого анионного поверхностно-активного вещества (АПАВ) объясняется его свойствами, приемлемыми в рамках требований “зеленой химии”. К ним относятся биоразлагаемость, низкий уровень токсичности, высокая пенообразующая способность, хорошая совместимость с другими видами ПАВ, высокие моющие и солюбилизирующие способности. Согласно результатам теста красных кровяных шариков (RBC тест) кожнораздражающее действие α -олефинсульфоната находится на границе между сильнораздражающими и раздражающими ПАВ, т.е. между лаурилсульфатом и сульфозоксилатом. С целью снижения дерматологического агрессивного воздействия на организм человека в рецептуры моющих средств совместно с α -олефинсульфонатами вводят более мягкие ПАВ, например алкиламидопропилбетаины. Одной из основных причин дерматологического агрессивного воздействия α -олефинсуль-

фоната на кожный покров является наличие примесей в виде сультонов, которые образуются в процессе синтеза этого АПАВ. Их содержание не регламентируется нормативной документацией, а сам показатель не входит в перечень обязательных к определению.

α -Олефинсульфонаты как продукты крупнотоннажного производства получают путем непрерывного сульфирования α -олефинов газообразным триоксидом серы. Синтез протекает с образованием промежуточного β -сультона, который в последующем трансформируется в 1-алкенсульфовую кислоту или подвергается перегруппировке в более устойчивый γ -сультон или δ -сультон. На стадии гидролиза под воздействием высококонцентрированного гидроксида натрия при высокой температуре сультоны преобразуются в гидроксикалансульфонат натрия и алкенсульфонат натрия. При несоблюдении технологического режима, в первую очередь температуры гидролиза, сультоны не проходят до конца стадию гидролиза и остаются в составе АПАВ и, как следствие, попадают в состав моющих средств.

Первые работы по определению сультонов в АПАВ принадлежат зарубежным авторам и датируются 70–80-ми гг. прошлого столетия. Высокий интерес к этим соединениям появился после вспышки аллергического контактного дерматита у женского населения Норвегии и других частей Скандинавии в эти годы. Из-за дерматита у некоторых пациентов также наблюдались проявления системных заболеваний в виде головной боли, тошноты, лихорадки и в определенной степени депрессии. Это было связано с использованием нового моющего средства для посуды, в состав которого входил лаурилэфирсульфат. Последующие вспышки дерматита наблюдались в Швеции (1968 г., использование жидкого мыла) и Дании (использование средств для посудомоечных машин) [1]. Причиной дерматита были 2-хлор- γ -сультоны и α,β -ненасыщенные γ -сультоны, образующиеся в процессе синтеза при высоких температурах. Негативное воздействие сультонов спровоцировало большое число исследований их токсичности, прежде всего, по отношению к кожному покрову. Изначально считалось, что сильные сенсибилизирующие свойства по отношению к кожному покрову проявляют лишь хлорсультоны и ненасыщенные сультоны. Авторы работы [2] доказали, что и насыщенный δ -сультон выступает в качестве электрофила. По реакции SN_2 с кольцевым открытием δ -сультон атакует нуклеофилы, что приводит к модификации белка путем присоединения сульфоалкильной группы в процессе сенсибилизации.

В работе [3] приведен краткий обзор исследований по определению сультонов в АПАВ. Методики, предложенные зарубежными авторами, мало пригодны для оперативного контроля на производстве, поскольку предусматривают применение дорогостоящей хроматографической аппаратуры и требуют сложной пробоподготовки. Предложенная нами в работе [3] методика определения δ -гексадекансультона в АОС Na и моющих средствах методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) позволяет сократить продолжительность пробоподготовки и, не теряя чувствительности, достичь предела обнаружения 0.2 ppm. Применяли метод внутреннего стандарта, в качестве стандарта использовали бутилацетат. Выбор способа определения и самого стандарта связан с отсутствием коммерчески доступных стандартов сультона. Для количественного масс-спектрометрического анализа в качестве внутреннего стандарта можно использовать любое вещество, важно только, чтобы оно было чистым, не реагировало с растворителем и другими компонентами смеси и отсутствовало в анализируемом образце. На этом основано широкое применение соединений, меченных изотопами D, ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O и т.д., особенно в анализе объектов окружающей среды [4].

Несмотря на то, что использование чистых веществ в ГХ-МС-анализе допускается и широко применяется, наличие чистых стандартов анализов улучшает метрологические характеристики методики и позволяет минимизировать погрешность метода.

Цель настоящей работы заключалась в усовершенствовании разработанного ранее способа количественного определения сультонов с применением ГХ-МС [3] в АПАВ и моющих средствах и оценке влияния содержания сультонов на стабильность модельных смесей моющих средств. Работа включала следующие этапы: 1) воспроизведение в лабораторных условиях процесса сульфирования α -олефинов с последующей стадией нейтрализации мягким щелочным агентом для исключения деструкции сультонов (10%-ный раствор карбоната натрия) без стадии гидролиза; 2) выделение из массы сульфирования δ -гексадекансультона с целью применения его в качестве образца сравнения в анализе АПАВ и моющих средств на содержание примесей δ -гексадекансультона; 3) применение метода абсолютной градуировки при ГХ-МС-определении δ -гексадекансультона в АПАВ и моющих средствах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение δ -гексадекансультона из массы сульфирования. Коммерчески доступными являются только 1,4-бутансультон, 1,3-пропансультон и 1,8-нафталинсультон, не встречающиеся в исходных сырьевых компонентах и, как следствие, в косметических продуктах и товарах бытовой химии. В связи с этим проблема получения химически чистых образцов, которые могли бы быть использованы как образцы сравнения в анализе сложных по составу моющих средств и ПАВ, сводилась к поиску условий, при которых аналиты могли бы образовываться в заметном количестве.

Так как δ -сультон является более стабильным и скорость его гидролиза намного ниже, чем γ -сультона, по скорости его превращения можно судить об остальных сультонах, если они присутствуют. Как правило, при несоблюдении технологического режима стадии гидролиза на производстве остаточными сультонами являются в основном δ -сультоны.

Для выделения δ -гексадекансультона использовали реакционную смесь α -олефинов фракций C14–C16 и олеума, из которых в процессе сульфирования образуется α -олефинсульфоновая кислота, представляющая собой эквимольную смесь алкенсульфоновой кислоты и сультонов. На стадии гидролиза гидроксидом натрия происходит превращение сультонов в смесь гидроксиалкансульфоната и алкенсульфоната натрия.

Чтобы сохранить сультоны в неизменном виде, необходимо создать мягкие условия. Для этого вместо гидроксида натрия мы использовали гидрокарбонат натрия. Реакционную смесь смешивали с охлажденной дистиллированной водой. Смесь нейтрализовали при постоянном охлаждении и перемешивании до прекращения выделения CO_2 . Полученную смесь экстрагировали диэтиловым эфиром три раза по 50 мл и промывали дистиллированной водой два раза по 50 мл, остаточную влагу удаляли с помощью безводного карбоната натрия. При фильтрации экстракта через двойной бумажный фильтр наблюдали образование кристаллов на поверхности фильтра. Для подтверждения их химической природы 0.1%-ный раствор полученных кристаллов в диэтиловом эфире анализировали методом ГХ-МС.

Материалы и оборудование. В качестве исследуемых образцов α -олефинсульфонатов использовали коммерческие продукты зарубежных производителей этого вида АПАВ: два образца производства “Jiaxing Zanyu Technology Development Co., LTD” (КНР), один образец производства “PSGLAB” (Иран) и один образец производства “Godrej Industries Limited” (Индия).

Модельные образцы моющих средств готовили по рекомендациям патента [5], в котором описаны варианты рецептур для жидких моющих средств, предназначенных для мытья посуды.

Содержание сультонов в образцах АПАВ и моющих средствах определяли методом ГХ-МС с применением хромато-масс-спектрометра Кристалл 5000 (ЗАО “Хроматэк”, Россия) с электронной ионизацией, регистрацией хроматограмм по полному ионному току, диапазон сканирования 35–450 а. е. м, скорость сканирования 2075 а. е. м/с, капиллярная колонка CR-5ms 30 м внутренним диаметром 0.25 мм с неподвижной фазой 5%-фенил-95%-полисилфениленсилоксан. Толщина пленки 0.25 мкм.

Режим работы прибора: термостат колонки 40°C, 3 мин, 20°C/мин, 250°C. Температура испарителя 250°C, температура источника ионов 200°C, температура переходной линии 250°C, деление потока 1 : 10, расход газа-носителя через линию деления потока 12 мл/мин, объем вводимой пробы 1 мкл.

Зарегистрированные компоненты идентифицировали с помощью библиотеки масс-спектров Национального института стандартов и технологий (NIST’17, США).

Все используемые реактивы имели квалификацию ос. ч.

Условия проведения ГХ-МС-анализа на содержание сультонов. По методике [3] δ -гексадекансультон определяют в АПАВ и жидких моющих средствах с применением внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали

бутилацетат квалификации ос. ч., при этом выполнялось условие отсутствия перекрывающихся пиков. Применение бутилацетата объясняется тем, что коммерчески доступные стандарты необходимых сультонов отсутствуют, а их синтез требует наличия дорогостоящих прекурсоров и специального лабораторного оборудования.

Несомненный интерес представляет способ, в котором достигаются лучшие метрологические характеристики за счет применения метода абсолютной градуировки. При этом использовали δ -гексадекансультон, который удалось выделить из реакционной массы сульфирования в лабораторных условиях. Чистоту полученных кристаллов сультона подтверждали отсутствием посторонних пиков на ГХ-МС-хроматограмме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам ГХ-МС-анализа выделенные из реакционной смеси кристаллы являются δ -гексадекансультоном (рис. 1). Содержание примесей в образце отмечено на уровне шума.

Изучали эффективность жидкостной экстракции, основанной на диспергировании экстрагента в фазе спирт–вода, различных слабополярных и неполярных органических растворителей. Установлено, что максимальная степень извлечения анализа достигается при применении диэтилового эфира. В отношении конкретной анализируемой матрицы гексан и петролейный эфир, широко применяемые с целью выделения сультонов, не дали положительного результата. При смешивании экстрагента с гексаном и петролевым эфиром сильно возрастает вязкость, и образуется эмульсия, которая не разрушается при добавлении этилового спирта. Полноту извлечения анализа при экстракции диэтиловым эфиром контролировали с помощью реакции гидролиза экстрагированной смеси – превращения сультонов в смесь гидроксикалкансульфоната и алкенсульфоната натрия [3]. В связи с тем, что при лабораторном воспроизведении процесса сульфирования в качестве примеси остается только δ -гексадекансультон, экстрагировали и определяли именно это соединение.

Коммерческие образцы α -олефинсульфонатов характеризовали по ряду показателей (табл. 1).

Образцы моющих средств получали по следующей рецептуре: α -олефинсульфонат натрия – 16.0% (по активному веществу), кокоамидопропиламиноксид – 4.0% (по активному веществу), кокоамидопропилбетаин – 2.0% (по активному веществу), этоксилированный жирный спирт C_{12} – C_{15} – 2.0% (по активному веществу), тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – 0.2%, тринатриевая соль нитрилоуксусной кислоты – 0.1%, хлорид натрия – 1.8%, глицерин –

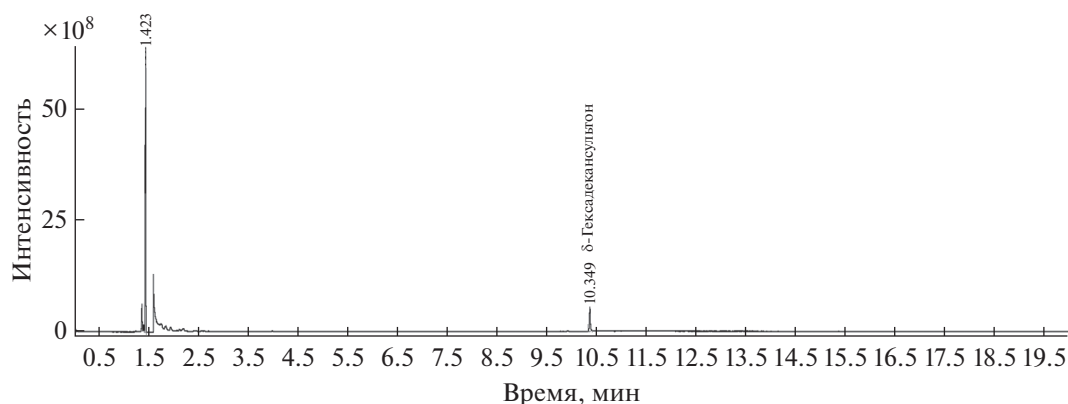


Рис. 1. Масс-хроматограмма 0.1%-ного раствора в диэтиловом эфире δ -гексадекансультона, выделенного из массы сульфирования.

0.1%, консервант — 0.075%, ортофосфорная кислота — 0.5%, вода деминерализованная — до 100%. Приготовленные образцы моющих средств помещали на две недели в климатическую камеру при 40°C и влажности 70%. Эти параметры имитируют условия ускоренного старения, а две недели в таких условиях приравняются к шести месяцам хранения при нормальных условиях. Далее образцы помещали в холодильную камеру при 0°C. По истечении 48 ч в образцах №№ 3, 4 наблюдали образование осадка в виде кристаллов, образец № 2 превратился в неподвижную гетерогенную пасту, образец № 1 остался полностью прозрачным.

Коммерческие образцы α -олефинсульфонатов натрия (рис. 2) и модельные смеси моющих средств (рис. 3) на их основе анализировали на содержание примесей δ -гексадекансультона (табл. 2). Пробоподготовку образцов проводили по методике [3] 3-кратной экстракцией диэтиловым эфиром и 2-кратной промывкой дистиллированной водой с последующим удалением оста-

точной влаги безводным сульфатом натрия и отгонкой растворителя под вакуумом.

Внешний вид модельных смесей моющих средств (рис. 4), полученные физико-химические показатели и результаты ГХ-МС-анализа на содержание примесей сультонов свидетельствуют о влиянии на стабильность продукта присутствия примесей. Под стабильностью здесь следует понимать способность продукта сохранять свои потребительские характеристики и физико-химические свойства на протяжении всего срока годности.

Уровень содержания сультонов в α -олефинсульфонатах натрия не должен превышать 5 ppm [10]. По данным [11], допустимый уровень для γ -сультонов ≤ 10 ppm, хлорсультонов ≤ 1 ppm, ненасыщенных сультонов ≤ 1 ppm.

Уровень примесей сультонов в АПАВ и моющих средствах на их основе должен строго контролироваться, в первую очередь, ввиду негативного воздействия этих примесей на организм человека.

Таблица 1. Характеристики коммерческих образцов α -олефинсульфоната натрия

Характеристика	Коммерческие образцы α -олефинсульфонатов натрия				Литература
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	
Внешний вид (визуально)	Светло-желтая жидкость	“Лапша” кремового цвета	Порошок кремового цвета	Светло-желтая жидкость	—
Содержание основного вещества, мас. %	35.5	95.0	96.6	38.6	[6]
Содержание Na_2SO_4 , мас. %	0.41	1.35	0.98	0.72	[7]
Содержание несulfированных соединений, мас. %	0.85	2.1	1.02	1.2	[8]
pH	10.6	10.8	10.5	10.3	[9]

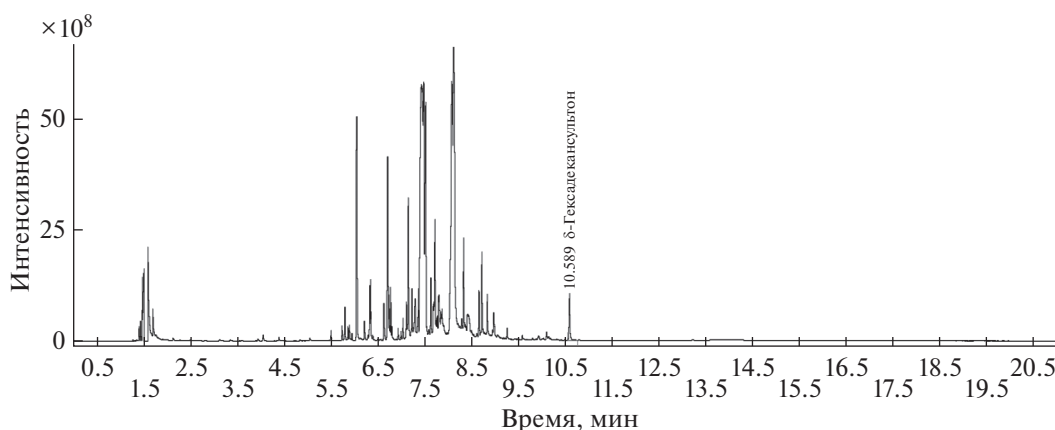


Рис. 2. Масс-хроматограмма экстракта модельной смеси на примере образца № 4.

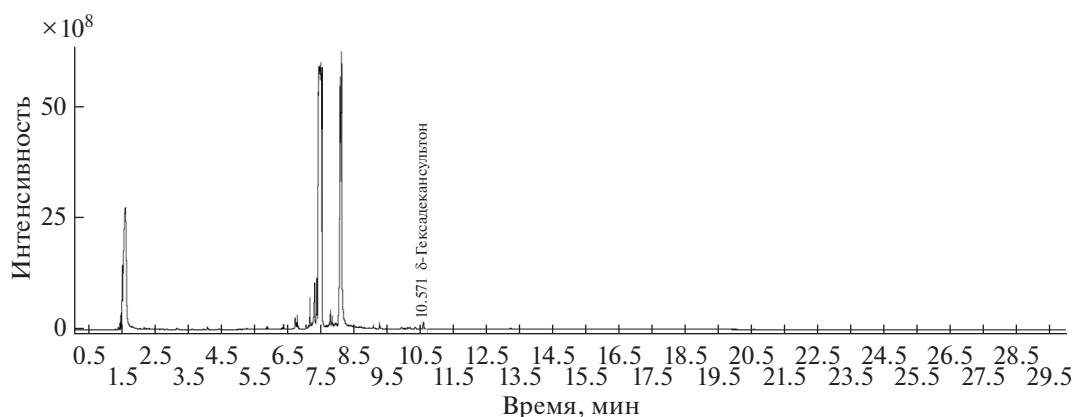


Рис. 3. Масс-хроматограмма экстракта α -олефинсульфоната натрия на примере образца № 1.

Метрологические характеристики методики ГХ-МС-определения. δ -Гексадекансульфон идентифицировали с помощью библиотеки масс-спектров Национального института стандартов и

технологий (NIST'17, США). Молекулярная масса 304; молекулярная формула $C_{16}H_{32}O_3S$; характерные пики (m/z): 41 (80%), 55 (100%), 69 (90%), 83 (80%), 98 (50%), 112 (40%), 126 (20%), 154 (10%),

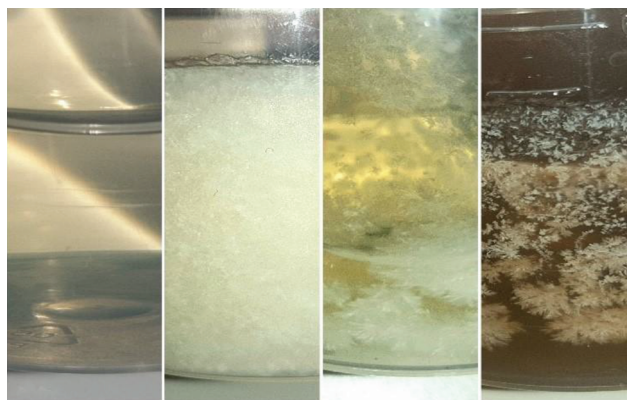


Рис. 4. Модельные смеси жидких моющих средств (слева направо образцы №№ 1, 2, 3, 4).

Таблица 2. Результаты ГХ-МС-анализа экстрактов диэтиловым эфиром коммерческих образцов α -олефинсульфоната натрия и модельных смесей моющих средств на их основе на содержание δ -гексадекансультона

Образец/модельная смесь	Содержание δ -гексадекансультона, ppm
Образец № 1	4.0
Модельная смесь № 1	0.64
Образец № 2	75.0
Модельная смесь № 2	12.0
Образец № 3	10.0
Модельная смесь № 3	1.6
Образец № 4	21.0
Модельная смесь № 4	4.0

304 (10%). Ион m/z 304 — молекулярный ион. Коэффициент подобия экспериментальных и библиотечных масс-спектров 0.92. Это свидетельствует о высокой надежности соответствия.

Сульфон количественно определяли методом абсолютной градуировки по площадям пиков. Получили градуировочную зависимость отклика от концентрации δ -гексадекансультона. Коэффициент детерминации 0.9929, относительное стандартное отклонение составило 5.8%.

Оценили метрологические характеристики методики: внутрилабораторную повторяемость, воспроизводимость, правильность (табл. 3). Сравнили метрологические характеристики, полученные в настоящей работе при использовании

в качестве образца сравнения δ -гексадекансультона и по методике [3] с бутилацетатом в качестве внутреннего стандарта. Правильность оценивали способом введено—найдено с использованием образцов α -олефинсульфоната натрия и выделенного δ -гексадекансультона. Величина добавки составляла 100–250% от содержания определяемого сультона в пробе. Значения K и $K_{\text{доп}}$ (норматив внутреннего контроля) рассчитывали по следующим формулам:

$$K = |X_{\text{д}} - X - c_{\text{д}}|,$$

$$K_{\text{доп}} = 0.84 \sqrt{[(U_{\text{отн}} X)^2 + (U_{\text{отн}} X)^2]},$$

где X — содержание сультона в анализируемой пробе без добавки, $X_{\text{д}}$ — содержание сультона в анализируемой пробе с добавкой, $c_{\text{д}}$ — величина добавки сультона, $U_{\text{отн}}$ — относительная расширенная неопределенность определения сультонов в образцах α -олефинсульфоната натрия. Сравнение K с $K_{\text{доп}}$ показало, что систематическая погрешность незначима в сравнении со случайной погрешностью, так как $K < K_{\text{доп}}$.

* * *

Таким образом, показано, что примеси в виде сультонов в α -олефинсульфонатах влияют на стабильность продукции на основе этого АПАВ. Выделенные из реакционной смеси сульфирования сультоны позволили провести анализ сложной смеси структурно близких соединений типа ПАВ с применением ГХ-МС по методу абсолютной градуировки с удовлетворительными метрологическими характеристиками. Применение в качестве стандарта чистых кристаллов искомого сультона позволило улучшить метрологические характеристики предложенного ранее способа определения сультонов в АПАВ и моющих средствах.

Таблица 3. Сравнительные метрологические характеристики ГХ-МС-определения δ -гексадекансультона при использовании разных образцов сравнения

Метрологическая характеристика	Использование δ -гексадекансультона	Использование бутилацетата
Воспроизводимость, %	13	15
Внутрилабораторная повторяемость, %	15	17
$U_{\text{отн}}^*$ ($P = 0.95$), %	19	23
Предел определения, ppm	0.2	0.2

* Относительная расширенная неопределенность определения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Magnusson B., Gilje O.* Allergic contact dermatitis from a dish-washing liquid Containing lauryl ether sulphate // *Acta. Derm. Venereol.* 1973. V. 53. № 2. P. 136.
2. *Lepoittevin J.-P., Basketter D.A., Goossens A., Karlberg A.-T.* Allergic Contact Dermatitis: The Molecular Basis. Berlin: Springer Science and Business Media, 1998. P. 186.
3. *Мубаракова Л.Р., Будников Г.К.* Определение δ -гексадекансульфата в α -олефинсульфонатах натрия и жидких моющих средствах методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов.* 2019. Т. 85. № 7. С. 16.
4. *Лебедев А.Т.* Масс-спектрометрия в органической химии. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 493 с.
5. <https://findpatent.ru/patent/224/2241741.html> (10.06.2021).
6. ГОСТ 28954-1991. Вещества поверхностно-активные и средства моющие. Определение содержания анионактивного вещества методом двухфазного титрования вручную или механическим путем (Переиздание). М.: Издательство стандартов, 2004. 6 с.
7. ГОСТ 28478-1990. Вещества поверхностно-активные. Определение содержания неорганического сульфата. Титриметрический метод (Переиздание). М.: Стандартинформ, 2004. 5 с.
8. ASTM D3673-89(2016), Standard Test Methods for Chemical Analysis of Alpha Olefin Sulfonates, West Conshohocken, PA: ASTM International, 2016.
9. ГОСТ 22567.5-1993. Средства моющие синтетические и вещества поверхностно-активные. Методы определения концентрации водородных ионов (Переиздание). М.: Издательство стандартов, 2003. 3 с.
10. *Ланге К.Р.* Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение. СПб: Профессия, 2004. 240 с.
11. *Nair B.* Final report on the safety assessment of sodium alpha-olefin sulfonates // *Int. J. Toxicol.* 1998. V. 17. № 5 (Suppl.). P. 39.

УДК 543.544.25

РАЗВИТИЕ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В КАЗАНИ

© 2022 г. А. В. Танеева^а, *, В. Ф. Новиков^а^аКазанский государственный энергетический университет, Институт теплоэнергетики
ул. Красносельская, 51, Казань, 420066 Россия

*e-mail: alinataneeva@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2021 г.

После доработки 30.06.2021 г.

Принята к публикации 30.06.2021 г.

Статья посвящена развитию газовой хроматографии в Казани под руководством доктора химических наук, профессора Марка Соломоновича Вигдергауза, который работал в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского филиала АН СССР с 1967 по 1981 год.

Ключевые слова: хроматография, углеводороды, нефтепродукты, удерживание, сорбент.**DOI:** 10.31857/S0044450222060196

Пары сорбатов в движущемся газе
Летят по слою за витком виток,
Побыв лишь миг в объятиях жидкой фазы,
Спешат обратно в газовый поток.
Смесь жидкостей в потоке элюента
Плывет под игом сильного давления,
И отвлекаясь только на мгновенья
Для кратких встреч с поверхностью сорбента.
Тончайший слой на зеркале пластин
Играет разноцветием картин,
Но только посвященному понятен
Язык передвигающихся пятен.
Вторгается в двадцатое столетие
Хроматографий яркое соцветье!

М.С. Вигдергауз [1]

Развитие газовой хроматографии в Казани, связанное с именем М.С. Вигдергауза, началось в 1960-е гг. По приглашению академика Б.А. Арбузова М.С. Вигдергауз приехал в Казань из Самары в 1967 г. и организовал нефтехимическую лабораторию в Институте органической и физической химии Казанского филиала АН СССР. В 1973 г. Марк Соломонович защитил докторскую диссертацию в МГУ им. Ломоносова, а в 1981 г. вернулся в Самару (тогда Куйбышев), где организовал кафедру общей химии и хроматографии в Самарском государственном университете. Он был автором более 700 научных работ, 14 книг, 58 изобретений; множество разработанных под его руководством методик анализа внедрены в аналитическую практику отраслевых лабораторий и предприятий.

В то время газовая хроматография находилась в начальной стадии развития. Экспериментальные работы в Казани проводить было невозмож-

но, так как отсутствовала хроматографическая аппаратура, поэтому первые исследования были проведены с использованием самодельного прибора, изготовленного на базе сушильного шкафа с терморегулятором, который выполнял функцию термостата колонок. В качестве пламенно-ионизационного детектора использовали водородную горелку, в которой были смонтированы электроды. Изготовлен был электронный усилитель сигнала детектора, регистрацию хроматограмм осуществляли потенциометром с самописцем. Тогда же на базе Всесоюзного научно-исследовательского института углеводородного сырья была создана первая в Татарстане лаборатория газовой хроматографии, которая стала заниматься разработкой методик определения качественного и количественного состава углеводородного сырья и внедрения их в аналитические лаборатории нефтеперерабатывающих и нефтехимических предприятий страны. Результаты, полученные при разработке методик, обсуждались на постоянно действующем Казанском семинаре по теории и практике газовой хроматографии и публиковались в сборнике материалов, который организовал М.С. Вигдергауз [2–4].

М.С. Вигдергауз подготовил монографию, в которой описал результаты систематического изучения нефти и продуктов ее переработки с использованием газовой хроматографии (экспрессное определение индивидуального состава нефтяных фракций, кипящих в широком температурном интервале, продуктов алкилирования и полимеризации [5]). Для работников научно-исследовательских институтов, предприятий нефтяной, химической и других отраслей промышленности, которые занимались аналитическим

контролем, был издан “Курс газовой хроматографии” [6]. В нем рассматривались теория процесса разделения, используемая аппаратура и применение газовой хроматографии для решения различных практических задач, а также освещались вопросы влияния различных факторов на четкость разделения. Были описаны методы идентификации индивидуальных компонентов анализируемых органических и неорганических смесей, определения примесных соединений, а также количественной интерпретации хроматографических результатов.

Большое внимание М.С. Вигдергауз уделял истории хроматографии, в том числе в Казани. Так, он описал защиту в Казани М.С. Цветом магистерской диссертации в 1901 г., в которой он заложил основы хроматографических методов анализа [7]. Позднее в Казанском университете была установлена мемориальная доска в честь открытия М.С. Цветом хроматографического метода [8]. М.С. Цвет начал разрабатывать хроматографию в Санкт-Петербургском университете [9]. Заслуги М.С. Цвета в разработке хроматографического метода Марк Соломонович отобразил в стихотворении “М.С. Цвет — основоположник хроматографии. Гимн хроматографии” [1].

В 1970-е гг. получили развитие исследования, направленные на увеличение селективности разделения в газовой хроматографии, создание новых неподвижных жидких фаз на основе цианэтилированных производных, жидких кристаллов. При этом разрабатывались методы классификации неподвижных фаз для газовой хроматографии [10].

Для систематизации и упрощения представления хроматографической информации в казанский период деятельности М.С. Вигдергауза была издана книга “Расчеты в газовой хроматографии”, которая представляет собой сборник задач с решениями [11]. В ней приводятся задачи определения основных хроматографических характеристик, подбора оптимальных условий работы хроматографов, идентификации индивидуальных компонентов анализируемых смесей, количественной интерпретации хроматографических данных, расчета физико-химических характеристик органических веществ. В Приложении приводятся справочные данные о факторах градиента давления, значения второго вириального коэффициента в уравнении газового состояния для газообразных веществ, давление насыщенных паров воды при различных температурах, динамическая вязкость газов, логарифмические индексы удерживания алкилбензолов, кетонов и спиртов на различных неподвижных фазах и при разных температурах, значения констант Роршнайдера для различных неподвижных фаз; приводятся аналитические и физико-химические свойства различных неподвижных фаз, значения коэффициента нормированных отклонений в зависимо-

сти от числа степеней свободы и степени надежности, а также величины обратной абсолютной температуры.

Проводились исследования, связанные с аналитическим применением в газовой хроматографии фосфорорганических неподвижных фаз, которые обладают гидроксильной селективностью разделения электронодонорных сорбатов [12]. Методом газовой хроматографии изучали межмолекулярные взаимодействия фосфорорганических соединений с протонодонорными и протоноакцепторными веществами. Проведена количественная оценка сил межмолекулярного взаимодействия и определены термодинамические характеристики протонодонорных растворенных веществ в фосфорорганических неподвижных фазах. Установлена линейная зависимость теплоты растворения бензола и циклогексана в эфирах циклоалкен-1-ил фосфиновых кислот от их показателя преломления [13].

В этот период большое внимание уделялось исследованиям в области газовой хроматографии при повышенном давлении, а также применения паров летучих веществ, используемых в качестве подвижной фазы. В работе [14] рассмотрены теоретические основы газовой хроматографии с неидеальными элюэнтами, а также особенности величин удерживания сорбатов и размывания их зон. Рассмотрено применение в качестве неподвижных фаз сверхкритических флюидов, а также паров органических веществ и воды. На эту тему опубликована монография, в которой приведена классификация хроматографических методов с учетом природы элюента и условий его работы. В соответствии с этой классификацией различают следующие виды хроматографии:

- газовая хроматография с использованием обычных газов-носителей при давлениях, близких к атмосферному;
- барохроматография, условием которой является применение перманентных газов-носителей при повышенных давлениях;
- паровая хроматография, которая реализуется в потоке паров летучих жидкостей, при этом в зависимости от природы неподвижной фазы различают паро-жидкостной и паро-адсорбционный варианты хроматографии;
- флюидная хроматография, к которой относится процесс в потоке вещества, находящемся в критическом состоянии; при этом обычно рассматривается флюид-жидкостная и флюид-адсорбционная хроматография;

– плоскостная хроматография, которая проводится в потоке вещества при давлениях, существенно превышающих критические значения.

Флюидная, плоскостная и барохроматография являются вариантами метода газовой хроматографии, использующими подвижную фазу с большой плотностью, которая может изменяться в широких пределах от плотности газа до плотности жидкости. Во флюидном варианте газовой хроматографии подвижные фазы обладают растворяющей способностью, близкой к растворяющей способности жидких растворителей, а динамической вязкостью, близкой к вязкости газа.

В 1982 г. на базе Института органической и физической химии был проведен научный семинар, посвященный газохроматографическому исследованию нефти и нефтепродуктов, результаты которого были опубликованы в сборнике “Успехи газовой хроматографии” [15]. В нем рассматривались проблемы аналитической химии нефти, газохроматографический анализ углеводородного состава, приводились результаты исследования состава масел методами жидкостной колонной хроматографии, остаточных фракций продуктов термодеструкции битуминозного пласта и воздействие на него температуры. Обсуждали результаты исследования хромадистилляционной разгонки нефтей и нефтепродуктов в широком интервале температур кипения. Приводились данные по количественной интерпретации хроматограмм нефтяных фракций, содержащих нормальные парафиновые углеводороды. Большое внимание в сборнике уделялось теории газо-жидкостной хроматографии, а также идентификации индивидуальных компонентов. Изучено влияние сорбционных эффектов на распределение *n*-парафинов и процесс их миграции через увлажненные пористые среды. Для газо-жидкостной хроматографии предложены новые неподвижные жидкие фазы на основе жидких кристаллов и на них проведено разделение ароматических изомеров с использованием капиллярных колонок. Обсуждалось применение препаративной хроматографии, с помощью которой получены образцы ароматических углеводородов и ксилолов, обладающие высокой чистотой и служащие для метрологической проверки хроматографической аппаратуры. Рассмотрены вопросы построения математических моделей хроматографического пика при аддитивном влиянии процессов диффузии и сорбции.

Большое внимание в работах М.С. Вигдергауза уделялось разработке хроматографических фрагментов “универсальной системы химического анализ” [16, 17]. Рассмотрены конкретные аналитические методы в качестве основы для создания

фрагментов такой системы. Показано, что построение многоэлементных хроматографических спектров должно проводиться таким образом, чтобы включенные в них элементы давали полную информацию о различных видах межмолекулярных взаимодействий, в которые могут вступать молекулы исследуемого вещества. С целью уменьшения избыточной информации необходимо, чтобы элементы спектра были бы взаимно независимы. Поэтому при разработке фрагментов универсальной системы химического анализа необходимо минимизировать количество неподвижных фаз, предпочтительно выбирая те из них, которые обеспечивают преобладание определенного вида межмолекулярного взаимодействия с сорбатом. При этом в случае выбора условий разделения анализируемых смесей требуются неподвижные фазы не только с экстремальной, но и с промежуточной селективностью разделения. Совокупность стандартных сорбентов должна обеспечивать “диапазон селективности”, который отличается варьированием хроматографических факторов полярности и их разностей, а также возможностью реализации разнообразных значений и их сочетаний внутри этого диапазона. Таким образом, разработка универсальной системы должна включать выбор оптимального набора предпочтительных неподвижных фаз и создание сорбатов, а также корреляции, связывающие удерживание со структурой и физико-химическими свойствами молекул сорбатов и многоэлементных хроматографических спектров.

Была издана монография о термических воздействиях на битуминозный пласт [18].

В сборнике [19] детально рассмотрены вопросы хроматографического анализа смесей углеводородов и их производных. Представлены работы, посвященные изучению теоретических аспектов хроматографии, совершенствованию количественных расчетов, выбору предпочтительных неподвижных фаз, приведены конкретные методики анализа продуктов нефтепереработки и нефтехимического анализа. Рассмотрены проблемы использования жидких кристаллов в качестве селективных неподвижных жидких фаз. Рассмотрены исследования масел методом газовой хроматографии, а также сорбционных свойств сорбентов, полученных из сополимеров нефтепродуктов, приведены результаты по ион-парной хроматографии изомеров бензойных кислот, исследован состав высших жирных кислот с использованием капиллярной хроматографии, определен групповой состав прямогонных бензинов, углеводородов нефти и диалкилселенидов. Приведена классификация неподвижных фаз для газовой хроматографии, а

также изучены сорбционные характеристики цианосодержащих неподвижных фаз в процессе газохроматографического анализа продуктов синтеза нитрилов. Ряд работ посвящен исследованию жидких кристаллов в качестве неподвижных фаз. Рассмотрено хроматографическое удерживание органических соединений некоторых классов мезогеном N,N' -метоксиэтоксизоксибензолом, проведена оценка влияния молекулярной структуры холестерических жидких кристаллов на растворимость одноатомных алифатических спиртов и исследовано растворение их в N,N -дибутиланилине, используемом в качестве неподвижной жидкой фазы. Приведены результаты количественной обработки хроматограмм с использованием метода двойного стандарта, а также с помощью автоматизированной системы обработки результатов хроматографического анализа газовых смесей. Большое внимание уделялось вопросам сорбируемости изопреноидных углеводородов в условиях фронтальной жидкостной хроматографии. При этом выявлены закономерности изменения состава смеси углеводородов изопреноидного строения в процессе ее фильтрации через пористые среды.

В работах М.С. Вигдергауза большое внимание уделялось расчетам в газовой хроматографии. В частности, разработаны некоторые альтернативные методы расчета величин удерживания, которые представлены в форме интерполяционных величин [20]. Эти методы могут быть использованы в практических целях, особенно в случаях взаимного перекрытия пиков компонентов, а также для ускорения расчетов в случае анализа многокомпонентных смесей органических соединений. В дальнейшем этот метод был усовершенствован и использован для расчета величин хроматографического удерживания органических веществ бинарными неподвижными фазами [21]. Предложено соотношение, которое связывает величины хроматографического удерживания сорбатов с составом бинарного сорбента. Показано, что можно достаточно точно определить величины удерживания. В рамках этих работ найдены корреляционные зависимости, связывающие индексы удерживания кислородосодержащих соединений на колонках с двумя неподвижными фазами [22]. На примере групп органических сорбатов близкого химического строения и хроматографических колонок, заполненных неподвижными фазами апиезон L, диоктилфталат и карбовакс 1500, было показано, что могут быть подобраны условия, которые обеспечивают априорный расчет индексов удерживания с погрешностью, отвечающей точности экспериментальных исследований.

Изучены зависимости между физическими свойствами и хроматографическими характери-

стиками полимерных неподвижных фаз [23]. Показано, что для неподвижных фаз на основе полиэтиленгликолей значения показателей преломления и диэлектрической проницаемости линейно и монотонно уменьшаются с повышением температуры хроматографической колонки. Получены корреляционные зависимости между показателем преломления, обратной величиной диэлектрической проницаемости неподвижной фазы и величинами удерживания органических сорбатов. Наличие таких корреляционных зависимостей позволяет использовать их для выбора наиболее эффективной неподвижной фазы и их смесей с использованием ограниченного количества стандартных сорбентов. При этом представляется возможным изменять состав неподвижных жидких фаз или температуру хроматографической колонки.

Методом газо-жидкостной хроматографии были изучены межмолекулярные взаимодействия фосфорорганических соединений с протонодонорными и протоноакцепторными веществами. Определены индексы удерживания и хроматографические факторы полярности для исследуемых сорбентов и показана линейная зависимость теплот растворения бензола и циклогексана от их показателей преломления для циклоалкен-1-ил фосфиновых кислот, используемых в качестве неподвижных жидких фаз [12]. Определены хроматографические факторы полярности аммониевых солей арилтрихлорметилфосфиновых кислот и показано влияние на них природы заместителей у атома фосфора и их пространственного положения. Показано, что при замещении атома водорода в *пара*-положении фенильного кольца на атом хлора существенно повышается протоноакцепторная способность исследуемых материалов [24].

К перспективным сорбентам для газовой хроматографии относятся мышьякорганические производные, которые имеют неподеленную электронную пару электронов арсенильного кислорода, способную вступать в межмолекулярные взаимодействия электронодонорной природы. Изучены сорбционные свойства бис(фениларсиновых) кислот и показано, что введение кислорода в углеводородную цепочку между атомами мышьяка приводит к существенному повышению хроматографических факторов полярности [25].

Для 10-алкилфеноксарсинов проведена сравнительная оценка вклада межмолекулярного взаимодействия в величины удерживания сорбатов на основе определения логарифмических индексов удерживания и хроматографических факторов полярности. Установлено, что при удлинении цепи алкильных заместителей у атома мышьяка наблюдается уменьшение значений характеристик удерживания по всем стандартным сорбентам, что свидетельствует об ослаблении энергии полярных взаимодействий в системе сорбат–сорбент [26].

Интересны исследования в системе газ–коллоид. Это связано с тем, что к числу основных особенностей хроматографических методов исследования веществ относится возможность одновременной реализации функций разделения, идентификации, а также качественного определения индивидуальных компонентов анализируемой смеси. В этом случае каждый ограниченный участок хроматограммы является носителем информации о наличии или отсутствии в анализируемой смеси определённого компонента и его концентрации. Поэтому хроматография рассматривается как источник многоканальной информации. В этом случае каждый канал отвечает определённому отрезку времени или интервалу значений удерживания, которые могут выражаться в форме абсолютных и относительных, а также интерполяционных величин. Высокая селективность хроматографического метода определяется наличием большого числа каналов и отсутствием взаимного перекрытия хроматографических пиков. В зависимости от задачи исследований проводится подбор сорбентов в условиях хроматографического процесса, т.е. распределяются на хроматограмме информационные каналы, соответствующие компонентам или группам веществ, наличие которых необходимо определить в соответствии с разработанной методикой анализа.

В монографии “Хроматография в системе газ–коллоид” рассмотрено применение коллоидных неподвижных фаз на основе бентонитовых глин, которые в газовой хроматографии используются в основном для разделения близкокипящих изомеров [27].

Таким образом, развитие газовой хроматографии в Казани было тесно связано с им. М.С. Вигдергауза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стихи М.С. Вигдергауза // Хроматографический журн. 1984. № 3. С. 88.
2. Вигдергауз М.С., Помазанов В.В. О влиянии четкости хроматографического разделения на результаты количественного анализа смесей // Успехи газовой хроматографии. Казань. 1969. № 1. С. 27.
3. Альперович В.Я., Вигдергауз М.С. Оценка чувствительности определения в газовой хроматографии // Успехи газовой хроматографии. Казань. 1970. № 2. С. 213.
4. Новиков В.А., Вигдергауз М.С. Хроматографическое определение индивидуального состава пиролизной смолы // Успехи газовой хроматографии. Казань. 1973. № 3. С. 147.
5. Вигдергауз М.С. Газовая хроматография как метод исследования нефти. М.: Наука, 1973. 256 с.
6. Гольберт К.А., Вигдергауз М.С. Курс газовой хроматографии. Изд. 2-е испр. и доп. М.: Химия, 1974. 356 с.
7. Вигдергауз М.С. Цвет в Казани // Успехи газовой хроматографии. Казань. 1975. № 4. Ч. I. С. 240.
8. Будников Г.К. Аналитическая химия в Казанском университете. Фрагменты истории. Казань: Изд-во Казанского ун-та, 2003. 240 с.
9. Москвин Л.Н., Родинков О.В., Никольский А.Б., Бреслер Л.С., Зенкевич И.Г., Красиков В.Д. Российская хроматография. Научные школы Санкт-Петербурга // Лаборатория и производство. 2018. № 2. С. 138.
10. Вигдергауз М.С. Хроматография: процесс, метод, наука // Успехи газовой хроматографии. Казань. 1975. № 4. Ч. II. С. 411.
11. Вигдергауз М.С. Расчеты в газовой хроматографии. М.: Химия, 1978. 247 с.
12. Новиков В.А., Вигдергауз М.С., Нуртдинов С.Х., Исмагилова Н.М. Исследование фосфорорганических неподвижных фаз на основе хроматографических факторов полярности // Журн. аналит. химии. 1979. Т. 34. № 12. С. 2381.
13. Новиков В.А., Нуртдинов С.Х., Вигдергауз М.С. Изучение межмолекулярных взаимодействий фосфорорганических соединений с протонодонорными и протоноакцепторными веществами // Журн. общей химии. 1981. Т. 51. № 3. С. 579.
14. Вигдергауз М.С., Гарусов А.В., Езрец В.А., Семкин В.И. Газовая хроматография с неидеальными элюэнтами. М.: Наука, 1980. 145 с.
15. Вигдергауз М.С. Некоторые проблемы аналитической химии нефти // Успехи газовой хроматографии. Казань. 1982. № 6. Ч. I. С. 3.
16. Вигдергауз М.С. Пути разработки хроматографических фрагментов универсальной системы химического анализа // Журн. аналит. химии. 1984. Т. 34. № 1. С. 151.
17. Вигдергауз М.С., Семенченко Л.В., Езрец В.А., Богословский Ю.Н. Качественный хроматографический анализ. М.: Наука, 1978. 243 с.
18. Вигдергауз М.С. Продукты термического воздействия на битуминозный пласт. Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1986. 102 с.
19. Семкин В.И., Лезина С.К., Вигдергауз М.С. Сорбируемость изопреноидных углеводов в условиях фронтальной жидкостной хроматографии // Изв. высш. учебн. завед. Химия и хим. технология. 1984. Т. 27. № 2. С. 215.
20. Беляев Н.Ф., Вигдергауз М.С. Некоторые альтернативные методы расчета величин удерживания в газовой хроматографии // Журн. аналит. химии. 1986. Т. 41. № 1. С. 116.
21. Вигдергауз М.С., Буланова А.В. Методы расчета хроматографического удерживания веществ бинарными неподвижными фазами // Журн. аналит. химии. 1988. Т. 44. № 1. С. 102.
22. Терентьева В.А., Вигдергауз М.С. Корреляционные зависимости индексов удерживания кислородсодержащих соединений // Журн. аналит. химии. 1985. Т. 40. № 9. С. 1670.
23. Сергеева О.А., Зубова Н.А., Митина М.Ф., Овчинникова В.Н., Вигдергауз М.С. Изучение зависимости между физическими свойствами и хроматографи-

- ческими характеристиками полимерных неподвижных фаз // Журн. аналит. химии. 1985. Т. 40. № 9. С. 1164.
24. Новиков В.Ф., Бобров Б.Н., Ардагов А.В., Харрасова Ф.М. Взаимодействие между аммониевыми солями арилтрихлорметил фосфиновых кислот и органическим растворителями // Журн. общей химии. 1986. Т. 56. № 9. С. 2009.
25. Новиков В.Ф., Шабрукова Н.В., Аверьянов Е.К., Гамаярова В.С. Изучение сорбционных свойств бис(фениларсиновых) кислот // Журн. прикл. химии. 1985. № 6. С. 1410.
26. Аликина И.Н., Новиков В.Ф. Сравнительная оценка вклада межмолекулярных взаимодействий в величины удерживания сорбатов для 10-алкил феноксарсинов // Химия и химическая технология. 1987. Т. 30. № 3. С. 46.
27. Вигдергауз М.С., Кири С.И., Карабанов Н.Г. Хроматография в системе газ–коллоид. Н. Новгород: Изд-во Нижегород. гос. ун-та, 1991. 151 с.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.42

УЧЕТ МАТРИЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРИ СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ СЛЕДОВ ЭЛЕМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ОДНОЙ СТАНДАРТНОЙ ДОБАВКИ

© 2022 г. Ю. М. Садагов^{а, *}, О. А. Тютюнник^б, И. В. Кубракова^б, А. Ю. Садагов^а^аООО “Кортэк”

ул. Никулинская, 27, кор. 2, Москва, 119602 Россия

^бИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук

ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия

*e-mail: sadagov@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.06.2021 г.

После доработки 15.09.2021 г.

Принята к публикации 04.10.2021 г.

Исследованы возможности учета матричных влияний при определении следов элементов методами электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой с использованием способа одной стандартной добавки. Установлено, что линеаризация функции преобразования позволяет применять такой подход во всем диапазоне градуировочных концентраций. На примере определения (0.0n–10n) мкг/г As, Pb, Sb, Cd, Se, Te в образцах илистых почв показано, что использованный метод упрощает процедуру анализа и снижает систематическую погрешность определения.

Ключевые слова: метод одной стандартной добавки, ЭТААС, АЭС-ИСП, матричные влияния, определение следов элементов.

DOI: 10.31857/S0044450222060160

Определение следовых ($\leq 10^{-4}\%$) содержаний элементов в объектах с соотношением аналита и матричных компонентов $\sim 1 : 10^6$ представляет особую сложность при использовании любого метода анализа. Это связано как с увеличением погрешности инструментального определения в области низких концентраций, так и со значительными влияниями со стороны больших избытков мешающих компонентов матрицы. В связи с этим развитие инструментальных методов, в частности спектрометрических, сопровождается разработкой приемов, обеспечивающих устранение (учет) матричных влияний. К ним относятся изменение состава пробы путем введения в анализируемую систему веществ-модификаторов (буферов), обеспечение условий раздельного получения сигналов аналита и матрицы, а также математическая коррекция сигнала [1, 2]. Эти методические и инструментальные подходы призваны унифицировать условия анализа различных по составу образцов и создать возможность использования для градуировки прибора простых по составу и поэтому универсальных образцов сравнения (например, одноэлементных растворов).

Альтернативой, обеспечивающей учет искажения сигнала, который формируется на фоне мат-

рицы, служит осуществление градуировки по стандартным образцам, близким по составу анализируемым. Однако в этом случае бывает сложно обеспечить нужное для построения градуировочной кривой количество надежно аттестованных стандартных образцов состава, охватывающих весь рабочий диапазон. Если количество анализируемых проб не слишком велико, то можно использовать метод добавок, но при этом обычно необходимо увеличить число анализируемых проб в несколько раз [3–5]. Кроме того, получаемая концентрационная зависимость должна быть линейной. В то же время для ряда широко используемых методов, например атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС), градуировочная зависимость нелинейна и представляет собой кривую с насыщением с небольшим (не более двух порядков) начальным линейным участком.

Рост требований к качеству аналитического обеспечения работ в различных областях — от фундаментальных исследований до контроля производственных процессов — вызывает необходимость поиска новых простых и технологичных решений, обеспечивающих получение данных с требуемыми метрологическими характеристиками. В частности, в работе [6] в качестве

первичной предложено использовать не градуировочную зависимость, получаемую в соответствии с используемой методикой анализа образца, а так называемую функцию преобразования аналитического прибора. Эта функция связывает аналитический сигнал с массой элемента, введенного в аналитическую ячейку, и в соответствии с ГОСТ [7] является метрологической характеристикой прибора. На примере исследования функции преобразования зеемановского атомно-абсорбционного спектрометра с электротермической атомизацией (ЭТААС), основанной на физических принципах метода и алгоритме обработки информации, авторы работы [6] разработали способ установления двухпараметрической функции преобразования с помощью одного градуировочного образца и на этой основе алгоритм учета матричных влияний с помощью одной стандартной добавки. Возможности аналитического применения этого способа рассмотрены авторами на единичных примерах. Можно, однако, предположить, что предложенный подход применим не только к ЭТААС, но и к другим методам неорганического элементного анализа, для которых актуальна проблема матричных влияний.

Цель данной работы — апробировать возможности данного подхода на примере определения следовых компонентов в природных объектах сложного состава.

ТЕОРИЯ

К числу наиболее распространенных и важных для аналитической практики методов неорганического элементного анализа относятся спектрометрические — атомная абсорбция в пламенном и электротермическом вариантах и атомно-эмиссионная (АЭС-ИСП) и масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. Отметим, что методы характеризуются различными концентрационным диапазоном и видом градуировочной зависимости. Наиболее сложным методом является ААС, для которого градуировочная функция существенно нелинейна. Это является основным ограничением для применения традиционного метода стандартных добавок. Кроме того, уровень матричных влияний (исключая прямые спектральные наложения) наиболее высок именно для ААС.

Рассмотрим теоретическое обоснование метода одной стандартной добавки при использовании функции преобразования АА-спектрометра.

В ЭТААС в качестве аналитического сигнала A используют амплитуду или интеграл импульса $A(t)$ атомной абсорбционности. Функция преобразования (градуировочная функция) аппроксимируется двухпараметрической функцией насыщения [6]:

$$A(m) = \lg \frac{1 + \alpha}{\exp(-\beta m) + \alpha}, \quad (1)$$

где m — масса аналита, α и β — параметры функции (1).

Для установления параметров α и β необходимо и достаточно измерить аналитические сигналы A_1 и A_2 для двух значений m_1 и m_2 массы аналита и найти корни α и β системы уравнений:

$$\{A(m_1) = A_1, A(m_2) = A_2\}. \quad (2)$$

Для измерений A_1 и A_2 используют один и тот же градуировочный образец (раствор) с массовой концентрацией (c) аналита. При этом второе измерение выполняют при удвоенном объеме V дозирования. При удвоении объема дозирования $m_2 = 2m_1$ и решение системы (2) существенно упрощается:

$$\alpha = (10^{-A_2} - 10^{-2A_1})(10^{-A_1} - 1)^{-2}, \quad (3)$$

$$\beta = -(m_1)^{-1} \ln \frac{(1 + \alpha)10^{-A_1} - \alpha}{(1 + \alpha)10^{-A_2} - \alpha}. \quad (4)$$

Функция преобразования $A = f(m)$ позволяет решить задачу определения неизвестной концентрации c аналита по измеренному значению аналитического сигнала A , для чего необходимо использовать обратную функцию $c = \varphi(A)$ по отношению к функции преобразования (1):

$$c = -(\beta V)^{-1} \ln[(1 + \alpha)10^{-A} - \alpha]. \quad (5)$$

С учётом матричного коэффициента μ функция преобразования примет вид $A = f(\mu c)$, следовательно, $c = \varphi(A)/\mu$. При условии, что в рассматриваемом концентрационном диапазоне матричный коэффициент μ не зависит от концентрации аналита в пробе, получаем, что при $\mu < 1$ матрица снижает эффективность атомизации аналита по сравнению с градуировочным образцом, а при $\mu > 1$ имеет место обратный эффект.

Для функции (5) концентрация является выходной, т.е. измеренной величиной: $c_{\text{вых}} = \varphi(A)$, а для функции преобразования концентрация является входной, т.е. измеряемой величиной: $A = f(c_{\text{вх}})$. Учитывая свойство обратной функции $\varphi(f(x)) = x$, получим $c_{\text{вых}} = c_{\text{вх}}$. Таким образом, имеет место линейаризация функции преобразования. Причем, соотношение $c_{\text{вых}} = c_{\text{вх}}$ выполняется только для градуировочных образцов, а для анализируемых образцов должен быть установлен матричный коэффициент μ .

Для установления значения коэффициента μ необходимо выполнить два измерения: измерить аналитический сигнал A_1 для анализируемого образца с искомой концентрацией c_x аналита и аналитический сигнал A_2 для анализируемого образца с добавкой c_d , т.е. для концентрации $(c_x + c_d)$

аналита. Искомое значение μ является корнем системы уравнений:

$$\{c_x = c_1/\mu, c_x + c_d = c_2/\mu, \quad (6)$$

где $c_1 = \varphi(A_1)$, $c_2 = \varphi(A_2)$, $c = \varphi(A)$ — это функция (5).

Значение матричного коэффициента определяется выражением:

$$\mu = (c_2 - c_1)/c_d. \quad (7)$$

Вторым корнем системы (6) является искомая концентрация:

$$c_x = c_d/[(c_2/c_1) - 1]. \quad (8)$$

Для определения концентрации элемента в анализируемой пробе следует использовать функцию:

$$c = -(\beta V/\mu)^{-1} \ln[(1 + \alpha)10^{-A} - \alpha]. \quad (9)$$

Отметим, что если известный метод стандартных добавок [3] “работает” на линейном участке градуировочной функции, то предлагаемый метод с использованием одной добавки применим во всем диапазоне градуировочной функции.

Функцию преобразования получают при фиксированных значениях основных параметров ААС-измерения: тока источника резонансного излучения и температуры стадии атомизации, которые определяют параметры α и β . Другие факторы (температура пиролиза, присутствие модификатора, состояние графитовой печи, состав пробы) будут учтены матричным коэффициентом μ .

Выражения (6)–(8) носят общий характер и, следовательно, предлагаемый подход тем более применим для других относительных методов анализа (например, с ИСП), для которых градуировочные функции являются существенно линейными.

Ниже приведены результаты использования метода “одной стандартной добавки” при анализе растворов сложного состава, полученных кислотным разложением геологических объектов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Использовали образцы илистых почв Международной программы тестирования геоаналитических лабораторий GeoPT (Round 47) BIM-1 и NES-1.

Оборудование, материалы, условия подготовки. Бидистиллированную воду ($R > 18.2$ М Ω /мл) и кислоты (HCl, HNO₃) очищали с помощью системы перегонки без кипения BSB-939-IR (Berghof, Германия). Стандартные растворы для добавок готовили разбавлением растворов государственных стандартных образцов.

Для микроволнового разложения проб массой 0.25 г царской водкой (7 мл смеси конц. HCl и HNO₃ (3 : 1)) использовали лабораторную систему MARSXpress (CEM Corp., США) (максимальная выходная мощность 1200 Вт, частота 2.45 ГГц) с сосудами емк. 100 мл. Температура реакционной смеси 180°C (15 мин), загрузка ротора — 8 сосудов одновременно. Температуру контролировали с помощью дистанционного ИК-датчика. Полученную после разложения смесь охлаждали, разбавляли водой и фильтровали в предварительно взвешенные пластиковые пробирки объемом 50 мл. Осадок на фильтре промывали и отбрасывали. Объем раствора доводили до 40 мл; пробирки с раствором взвешивали.

Добавки и растворы для градуировки приборов готовили из одноэлементных стандартных растворов Cd, Pb, As, Se, Sb (High Purity Standards, USA) с концентрацией 1 мг/мл. Для определения свинца и мышьяка методом АЭС-ИСП взвешивали по 4.0000 ± 0.0005 г полученных растворов и добавляли к ним по 10 мкл раствора, приготовленного из растворов одноэлементных стандартных образцов соответствующих элементов с концентрацией 100 мкг/мл. Для определения Se, Te, Sb и Cd методом ЭТААС взвешивали по 2.0000 ± 0.0005 г раствора образца и добавляли к нему 10 мкл раствора, приготовленного из растворов одноэлементных стандартных образцов соответствующих элементов с концентрацией 1 мкг/мл (Se, Te, Sb) и 0.1 мкг/мл (Cd).

Для определения Cd, Sb, Se и Te использовали атомно-абсорбционный спектрометр Solaar MQZ (Thermo Electron Corp., Великобритания) с зеемановской коррекцией фона. Измерения выполняли на линиях 228.8, 217.6, 196.0 и 214.3 нм соответственно. Введение Растворы вводили в графитовый атолизатор с помощью автодозатора. Сигнал измеряли по высоте и площади пика.

Свинец и мышьяк определяли с использованием АЭС-ИСП-спектрометра IRIS Intrepid II Duo (Thermo Electron Corp., США) с CID-детектором. Спектральный диапазон прибора 165–1050 нм. Измерения проводили при длинах волн 220.353 (152) и 189.042 (177) нм соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объектов исследования выбрали образцы илистых почв, проанализированные в 2020 г. участниками Международной программы тестирования лабораторий GeoPT (Geoanalytical Proficiency Testing), проводимой Международной ассоциацией геохимиков IAG [8]. После обработки данных, представленных 90 лабораториями, опубликован состав образцов BIM-1 и NES-1 [9, 10]. Содержание основных компонентов почв приведено в табл. 1. На рис. 1а–1г приведены

Таблица 1. Содержание (%) породообразующих элементов в образцах илистых почв BIM-1 и NES-1

Оксид элемента	BIM-1	NES-1
SiO ₂	64.69	80.15
TiO ₂	0.78	0.7
Al ₂ O ₃	14.22	5.67
Fe ₂ O ₃	6.58	3.12
MnO	0.15	0.09
MgO	2.2	0.50
CaO	0.39	0.32
Na ₂ O	1.12	—
K ₂ O	2.72	1.05
P ₂ O ₅	0.14	0.23

примеры диаграмм распределения результатов определения для некоторых элементов в образце BIM-1. Можно видеть, что данные по определению следовых количеств (0.0n–n) мкг/г селена и теллура предоставлены весьма ограниченным числом участников программы, а данные по мышьяку и свинцу получены лишь половиной лабораторий. Этот факт свидетельствует о существовании проблем в определении следов элементов в

сложных природных объектах современными инструментальными методами и подтверждает актуальность поиска подходов к повышению качества анализа.

На примере анализа выбранных образцов почв рассмотрели возможность использования метода одной добавки при решении двух задач. Первая заключалась в определении содержаний, близких к пределам обнаружения элементов. В этом случае матричные влияния проявляются в наибольшей степени, однако градуировочный график линейен. Вторая задача — применение метода в условиях выраженной нелинейности градуировочной зависимости.

В табл. 2 приведены результаты, полученные нами для Se, Te, Cd, As, Sb и Pb (ЭТААС и АЭС-ИСП). С целью оценки величины случайной погрешности определяли относительное стандартное отклонение (s_r) инструментального определения, s_r при определении с внешней градуировкой (четыре параллельные навески), s_r для анализа нескольких аликвот одного раствора с добавками, s_r для анализа растворов после разложения четырех параллельных навесок каждого материала методом одной добавки. Для упрощения общей картины в табл. 2 сопоставлены данные анализа с использованием внешней градуировки и с при-

Таблица 2. Результаты (мкг/г) определения элементов в почвах ($n = 4$, $P = 0.95$)

Образец	Найдено при определении с внешней градуировкой		Найдено методом одной добавки		Данные GeoPT
	c_{cp}	s_r	c_{cp}	s_r	
Селен, ЭТААС					
BIM-1	0.89	0.08	1.28	0.12	(1)
NES-1	0.75	0.12	1.23	0.18	(1)
Теллур, ЭТААС					
BIM-1	0.03	0.15	0.05	0.10	(0.05)
NES-1	0.09	0.14	0.11	0.18	(0.1)
Кадмий, ЭТААС					
BIM-1	0.28	0.02	0.42	0.06	0.39 ± 0.03
Сурьма, ЭТААС					
BIM-1	0.31	0.19	1.52	0.13	1.63 ± 0.12
NES-1	0.75	0.13	1.23	0.08	1.16 ± 0.09
Мышьяк, АЭС-ИСП					
BIM-1	10.3	0.017	12.15	0.025	12.0 ± 0.7
NES-1	8.09	0.035	9.95	0.052	10.0 ± 0.5
Свинец, АЭС-ИСП					
BIM-1	42.0	0.032	39.8	0.019	40.0 ± 1.8
NES-1	24.5	0.048	25.0	0.047	25.1 ± 1.2

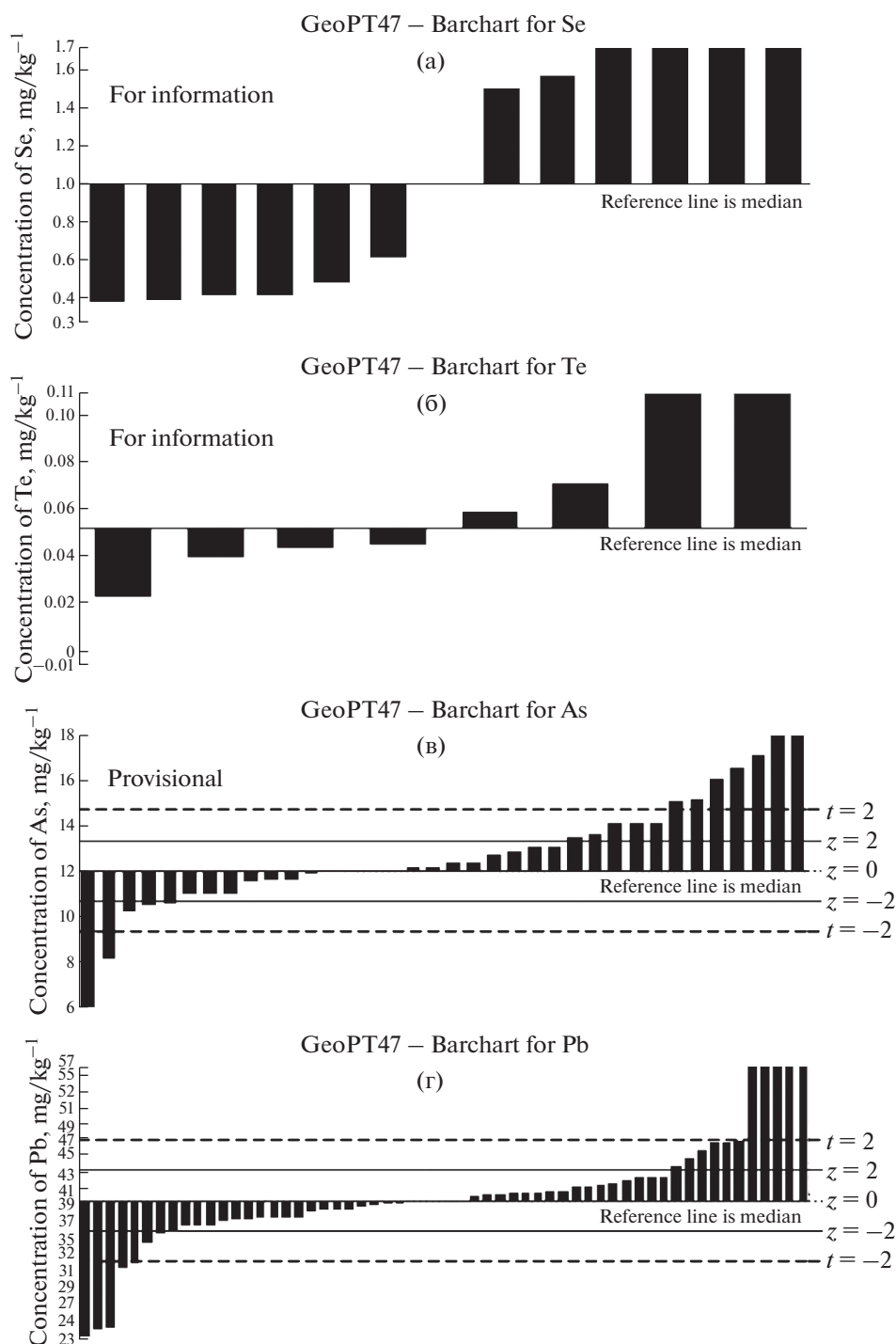


Рис. 1. Диаграммы распределения результатов определения селена (а), теллура (б), мышьяка (в) и свинца (г) в образце илстой почвы VIM-1 [8, 9] (данные лабораторий-участников программы GeoPT).

менением одной добавки; для сравнения приведены данные программы GeoPT.

Способы подготовки образцов почв приведены выше. При использовании метода добавок в аликвоту раствора добавляли рассчитанные количества стандартного раствора определяемого элемента, близкие к его предполагаемому содер-

жанию в анализируемой пробе, и измеряли аналитический сигнал; измеряли также сигнал от раствора без добавки. Содержание элемента в исходном образце рассчитывали по формуле (8).

Установлено, что значения s_r для прямого анализа полученных растворов и для анализа с использованием одной стандартной добавки сопо-

ставимы, т.е. случайная погрешность метода одной стандартной добавки не намного выше погрешности прямого определения.

Следует отметить, что наблюдается расхождение средних значений, полученных при определении элементов с внешней градуировкой, и результатов международной программы, что свидетельствует о наличии систематической погрешности, обусловленной влиянием матрицы пробы. Эта погрешность заметно снижается при определении с использованием добавки.

Возможность использования одной добавки в случае нелинейной градуировочной зависимости, описываемой полиномом, рассматривали на примере ЭТААС-определения кадмия. Из табл. 2 видно, что использование такого подхода обеспечивает получение данных, совпадающих с данными международной аттестации; при этом случайная погрешность не увеличивается.

Таким образом, метод “одной стандартной добавки” можно использовать на практике для учета матричных влияний (систематической погрешности) при определении следов элементов в объектах сложного состава. Это особенно важно для лабораторий, осуществляющих рутинные анализы образцов различных типов. Предлагаемый подход позволяет исключить использование стандартных образцов состава для градуировки прибора, заменяя эту процедуру анализом раствора пробы с добавкой на основе одноэлементного раствора. При этом метрологические характеристики получаемых результатов свидетельствуют о возможности и целесообразности использования единственной добавки. Предложенный метод получения двухпараметрической функции преобразования, объединенный с методом одной стандартной добавки, позволяет перевести градуировочную функцию в ранг основных

метрологических характеристик аналитического прибора и отделить (исключить) процедуру градуировки от аналитических измерений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пунушев А.А. Атомно-абсорбционный спектральный анализ. М.: Техносфера, 2009. 784 с.
2. Agatemor C., Beauchemin D. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review // *Anal. Chim. Acta*. 2011. V. 706. P. 66.
3. Основы аналитической химии. В 2-х тт. Т. 1 / Под ред. Золотова Ю.А. М.: Издательский центр “Академия”, 2012. 384 с.
4. Дворкин В.И. Метрология и обеспечение качества химического анализа. М.: Техносфера, 2020. 317 с.
5. Frenich A.G., Vidal J.L.M., Moreno J.L.F., Romero-Gonzalez R. Compensation for matrix effects in gas chromatography–tandem mass spectrometry using a single point standard addition // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 4798.
6. Садагов Ю.М., Левин А.Д., Бирюкова И.В. Функции преобразования в электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии // *Измерительная техника*. 2021. № 4. С. 63.
7. ГОСТ 8.009-84. Нормируемые метрологические характеристики средств измерений. М.: Стандартинформ, 2006. 26 с.
8. www.geoanalyst.org (14.01.2022).
9. Webb, P.C., Potts, P.J., Thompson, M., Gowing, C.J.B. GeoPT47 – An international proficiency test for analytical geochemistry laboratories – Report on round 47 (Silty Soil BIM-1) // December 2020. International Association of Geoanalysts: Unpublished report.
10. Webb, P.C., Potts, P.J., Thompson, M., Gowing, C.J.B. GeoPT47A – An international proficiency test for analytical geochemistry laboratories – Report on round 47A (Silty Soil NES-1) // December 2020. International Association of Geoanalysts: Unpublished report.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.544.52

УПРАВЛЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОСТЬЮ РАЗДЕЛЕНИЯ
ДИКОФЕОИЛХИННЫХ КИСЛОТ В ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ© 2022 г. В. И. Дейнека^а, *, Е. Ю. Олейниц^а, А. Н. Чулков^б, Л. А. Дейнека^а^аБелгородский государственный национальный исследовательский университет,

Институт фармации, химии и биологии

ул. Победы, 85, Белгород, 308015 Россия

^бФедеральный центр оценки безопасности и качества зерна и продуктов его переработки,

филиал по г. Белгороду

ул. Щорса, 8, Белгород, 308015 Россия

*e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 09.09.2021 г.

После доработки 26.09.2021 г.

Принята к публикации 27.09.2021 г.

Показано, что хроматографическое поведение (изменение логарифма фактора удерживания при изменении состава подвижной фазы) дикофеоилхинных (ДКХ) кислот определяется хроматографическим поведением монокофеоилхинных кислот. При этом наиболее эффективна традиционная стационарная фаза С18 (марки Kromasil) и экологически безвредные подвижные фазы, в которых ацетонитрил заменен на пропанол-2, при подкислении подвижной фазы добавкой 0.25 об. % орто-фосфорной кислоты для стабилизации зарядовой формы кислот. Удерживание дикофеоилхинных кислот можно объяснить одновременной сорбцией двумя ароматическими кольцами радикалов кофейной кислоты для обоих исследованных органических модификаторов подвижной фазы. Замена С18-фазы на фенилгексильную фазу не привела к существенным изменениям селективности разделения изомерных ДКХ-кислот. При этом не все изомеры разделяются при использовании подвижных фаз на основе обоих органических модификаторов — ацетонитрила и пропанола-2. Разработанные условия разделения ДКХ (градиентный режим с “зелеными” элюентами А — 10 об. % изопропанола и 0.25 об. % фосфорной кислоты в воде, Б — 20 об. % изопропанола и 0.25 об. % фосфорной кислоты в воде) использованы для определения видового состава кофеоилхинных кислот в кофе, напитке мате и в артишоковом чае.

Ключевые слова: дикофеоилхинные кислоты, разделение, стационарные фазы октадецильная и фенилгексильная, “зеленая” хроматография.

DOI: 10.31857/S0044450222060068

Дикофеоилхинные (ДКХ) кислоты наряду с монокофеоилхинными (МКХ) кислотами синтезируются во многих растениях [1]. Эти соединения благодаря наличию *орто*-гидроксильных групп в ароматических кольцах заместителей обладают высокой антиоксидантной активностью [1, 2] и связанными с ней проявлениями биологической активности [1–3]. При этом в работе [4] установлено, что при совместном присутствии МКХ- и ДКХ-кислот в соотношении 12 : 2 в готовом напитке кофе в плазме крови это соотношение уменьшается до 0.6–2.9, что указывает на большую биодоступность именно ДКХ-кислот.

Вследствие наличия четырех гидроксильных групп в молекуле хинной кислоты (схема 1) возможно существование четырех изомерных МКХ-кислот, из которых в кофе (как и в “чае” мате) обнаруживают три изомера: 3СQA, 4СQA и 5СQA [4, 5]. Соответственно набор ДКХ-кислот включает также три изомера 3,4diCQA, 3,5diCQA и 4,5diCQA. Если в образце осуществляются пути биосинтеза, включающие этерификацию гидроксильной группы в положении 1, то возможно образование еще трех изомеров ДКХ-кислот: 1,3diCQA, 1,4diCQA и 1,5diCQA.

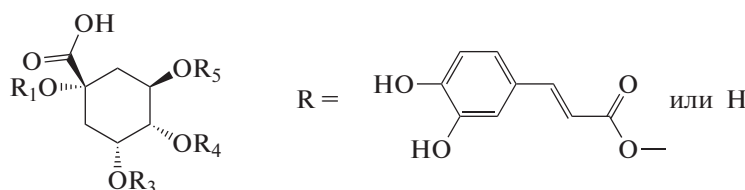


Схема 1. Положения ацилирования кофейной кислотой молекулы хинной кислоты.

Для разделения ДКХ высокую эффективность показала обращенно-фазовая ВЭЖХ. Так, в работе [6] на колонке Synergi™ Polar-RP (привитая по эфирной связи фенильная фаза с гидрофильным эндкеппингом) в условиях градиентного элюирования определен следующий порядок элюирования изомеров:

$$t_R(3,4\text{diCQA}) < t_R(3,5\text{diCQA}) < t_R(4,5\text{diCQA}). \quad (1)$$

Такой же порядок, но уже на обычной C18 обращенной фазе в градиентных условиях с использованием метанола и подкисленной муравьиной кислотой воды получен в работе [7], а также в других элюентах на фазах C18 в работах [8–12]. Применение другого варианта стационарной фазы, фенилгексильной фазы, также привело к аналогичному порядку элюирования [13], перечень diCQAs в экстракте *Gynura procumbens* дополнен еще двумя изомерами:

$$t_R(1,3\text{diCQA}) < t_R(3,4\text{diCQA}) < t_R(1,5\text{diCQA}) < t_R(3,5\text{diCQA}) < t_R(4,5\text{diCQA}). \quad (2)$$

Для дифференциации изомеров обычно используют полный комплект стандартных веществ, но, учитывая их высокую стоимость, возникает вопрос о возможности дифференциации diCQAs в сложных смесях по характерным электронным спектрам поглощения (при применении диодно-матричных детекторов) и по масс-спектрам. Сюда следует добавить и характерное хроматографическое поведение, которое обычно не используют при дифференциации diCQAs.

Цель настоящей работы – определение селективности разделения изомерных ДКХ-кислот в условиях обращенно-фазовой хроматографии на традиционной C18 и на набирающей популярность фенилгексильной фазе, включая оценку эффективности замены экологически неблагоприятного ацетонитрила на пропанол-2 (изопропанол, ИП) в рамках задач “зеленой” хроматографии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали кофе молотый (марка “Петр Великий”), кофе растворимый (марка “Ambassador”), кофе зеленый (арабика, Бразилия), чай мате (Pajarito, Парагвай), чай мате (Pipore, Аргентина), чаи из артишока (Lado Actiso, Вьетнам) и

(Lado Herbal, Вьетнам), артишок консервированный (Santolino, Италия), Артишока экстракт (ЗАО “Эвалар”, Россия), приобретенные на рынке г. Белгорода и/или через сеть Интернет. Для градуировки отклика детектора использовали 5CQA (chlorogenic acid hemihydrate, Aldrich, США).

Для приготовления водных настоев сухие навески материала массой 0.50 ± 0.10 г заливали кипятком (50 мл) и выдерживали в течение 10 мин. Настой отделяли от твердого остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Аликвотную порцию 10 мл (20 мл для напитка из артишока) очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК C18 (БиоХимМак СТ, Россия) после подкисления 1 М водным раствором HCl (10 об. %). Кислоты реэкстрагировали с патрона 2 мл смеси 30 об. % ацетонитрила и 30 об. % муравьиной кислоты в воде. Полученный раствор разбавляли водой в соотношении 1 : 2. Для экстракции кислот из артишока консервированный растительный материал обезжиривали *n*-гексаном, измельчали и навеску 1.00 ± 0.10 г переносили в 50 мл 0.1 М HCl и настаивали сутки. После фильтрования экстракт очищали твердофазной экстракцией, как указано выше.

Кофеилхинные кислоты разделяли на хроматографе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором с записью электронных спектров поглощения в диапазоне 250–450 нм. Хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали, используя программное обеспечение Agilent ChemStation.

Для разделения использовали хроматографические колонки 4.6×250 мм Kromasil 100-5-C18 и 4.6×250 мм Gemini® 5 мкм C6-Phenyl 110 Å.

Для определения кофеилхинных кислот использовали колонку Kromasil 100-5-C18 и градиентный режим элюирования с подвижными фазами А (10 об. % ИП и 0.25 об. % фосфорной кислоты в воде) и Б (20 об. % ИП и 0.25 об. % фосфорной кислоты в воде), 1 мл/мин. Режим: 0–10 мин – 40% Б; 20 мин – 100% Б; 21–30 мин – 40% Б. Для градуировки отклика детектора использовали растворы 5CQA. Температура термостата колонки 30°C.

Для регистрации масс-спектров использовали жидкостной тандемный хроматомасс-спектрометр Shimadzu LCMS-8060 в отрицательном режиме сканирования в диапазоне масс 150–750.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выборе состава подвижных фаз учитывали необходимость подкисления для стабилизации состояния ионизации кофеилхинных кислот. Создавали pH ~ 1.9–2 добавлением ортофосфорной кислоты (0.25 об. %), что обеспечивает подавление диссоциации карбоксильной группы хинной кислоты [14] и не сильно выходит за рамки устойчивости к гидролизу традиционных обращенных фаз [15].

Разделение дикофеоилхинных кислот на фазе C18. В качестве стационарной фазы данного типа использовали хорошо зарекомендовавшую себя в наших исследованиях фазу Kromasil 110-5-C18, имеющую большую удельную поверхность (349 м²/г) и высокую степень покрытия поверхности силикагеля модификатором (3.45 мкмоль/м²) [16].

Подвижные фазы системы ацетонитрил–0.25 об. % H₃PO₄–вода. Карта разделения ДКХ-кислот в указанной элюентной системе представлена на рис. 1, а в табл. 1 приведены параметры уравнений относительного удерживания, в которых в качестве реперного соединения использована 5CQA:

$$\lg k(i) = a_1 \lg k(5CQA) + a_2. \quad (3)$$

В этом уравнении параметр a_1 соответствует соотношению числа молей ацетонитрила, высвобождающегося при сорбции соответствующей дикофеоилхинной кислоты, к аналогичному числу молей при сорбции 5CQA. Действительно, по модели Мураками [17] при сорбции аналита A на стационарной фазе высвобождается $n(A)$ моль органического модификатора M с концентрацией c (моль/л):

$$\lg k(A) = a_{01} - n(A) \lg c(M). \quad (4)$$

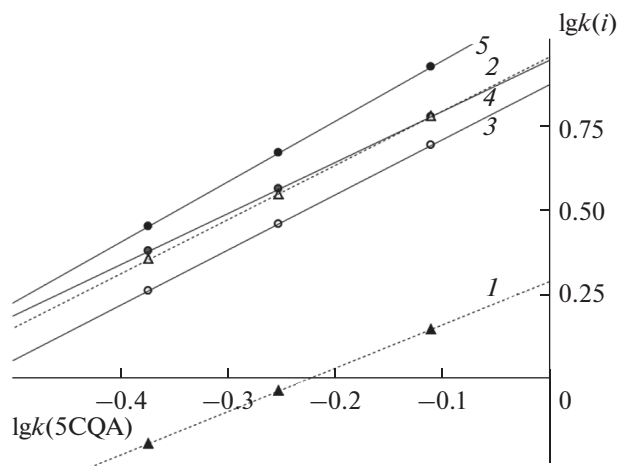


Рис. 1. Карта разделения ДКХ-кислот в элюентной системе ацетонитрил–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода для стационарной фазы Kromasil 110-5-C18 при 30°C. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

Аналогичное выражение может быть записано для вещества B , принятого в качестве вещества сравнения:

$$\lg k(B) = a_{02} - n(B) \lg c(M). \quad (5)$$

Исключая органический модификатор из уравнений (4) и (5), получаем:

$$\lg k(A) = \frac{n(A)}{n(B)} \lg k(B) + \text{const} = a_1 \lg k(B) + a_2. \quad (6)$$

Из представленных данных следует, что при сорбции четырех из пяти дикофеоилхинных кислот параметр $a_1 > 1.5$, что может свидетельствовать об одновременном участии обоих радикалов кофейной кислоты при сорбции молекулы дикофеоилхинной кислоты на поверхности обращен-

Таблица 1. Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеоилхинных кислот на стационарной фазе Kromasil 110-5-C18 в элюентах органический модификатор–0.25 об. % H₃PO₄–вода

Органический модификатор	Аналит	Параметры уравнения (3)	
		a_1	a_2
Ацетонитрил	1,3-Дикофеоилхинная кислота, 1,3diCQA	1.281	0.301
	1,5-Дикофеоилхинная кислота, 1,5diCQA	1.601	0.963
	3,4-Дикофеоилхинная кислота, 3,4diCQA	1.628	0.881
	3,5-Дикофеоилхинная кислота, 3,5diCQA	1.509	0.953
	4,5-Дикофеоилхинная кислота, 4,5diCQA	1.786	1.130
Изопропанол	1,3-Дикофеоилхинная кислота, 1,3diCQA	1.263	0.165
	1,5-Дикофеоилхинная кислота, 1,5diCQA	1.803	0.942
	3,4-Дикофеоилхинная кислота, 3,4diCQA	1.746	1.768
	3,5-Дикофеоилхинная кислота, 3,5diCQA	1.555	0.836
	4,5-Дикофеоилхинная кислота, 4,5diCQA	2.060	1.213

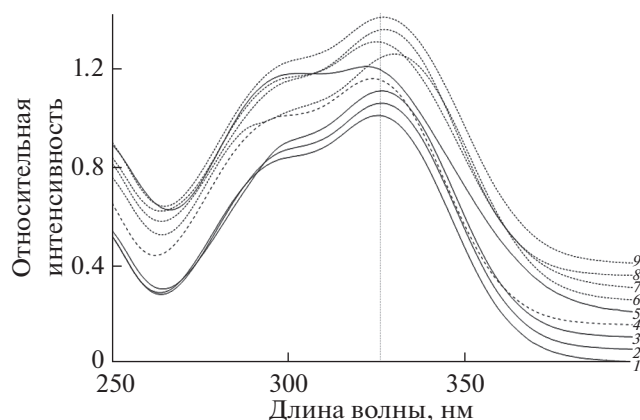


Рис. 2. УФ-спектры веществ, записанные в кювете детектора. Вещества: 1 – 3CQA; 2 – 4CQA; 3 – 5CQA; 4 – кофейная кислота; 5 – 1,3diCQA; 6 – 1,5diCQA; 7 – 3,4diCQA; 8 – 3,5diCQA; 9 – 4,5diCQA. Растворитель: 20 об. % пропанола-2, 0.25 об. % ортофосфорной кислоты в воде.

ной фазы. Это согласуется с ранее высказанным предположением о том, что сорбция на поверхности привитой фазы является основным механизмом удерживания монокофеилхинных кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ [18]. Сорбционный механизм подтверждается и разделением изомерных ДКХ-кислот, что нехарактерно для распределительного механизма.

Неожиданно низкое относительное удерживание 1,3diCQA связано с особенностями строения этой кислоты, для которой по крайней мере в одной из конформаций наблюдается внутримолекулярная ассоциация с параллельным выстраиванием ароматических колец двух радикалов кофейной кислоты, приводящая вследствие π -взаимодействий к существенному отличию этого изомера от других по УФ-спектру (рис. 2).

Рассматриваемая хроматографическая система удобна для определения ДКХ-кислот в кофе и мате, в которых отсутствуют изомеры, содержащие кофейный радикал в положении 1. Однако присутствие изомера 1,5diCQA делает эту систему не очень удобной из-за проблем в разделении 1,5diCQA и 3,5diCQA.

В настоящей работе отнесение ДКХ-кислот выполняли по порядку их удерживания (после подтверждения их состава методами УФ-спектроскопии и масс-спектроскопии) в соответствии с литературными данными (см. выше). При этом такое отнесение подтверждается хроматографическим методом – соотношением параметров a_1 , согласующимся с параметрами a_1 линий трендов для МКХ-кислот, найденных в этой же системе:

$$a_1(3CQA) < a_1(5CQA) < a_1(4CQA). \quad (7)$$

При сохранении аддитивности параметр a_1 должен возрастать именно в ряду (табл. 1):

$$a_1(3,5diCQA) < a_1(3,4diCQA) < a_1(4,5diCQA). \quad (8)$$

В таком случае при составах подвижных фаз, при которых фактор удерживания лежит в диапазоне от 2 до 10, порядок элюирования для соответствующих ДКХ-кислот остается неизменным и соответствует порядку (1). Тем не менее из-за разности наклонов линий трендов при уменьшении концентрации ацетонитрила в “медленных” элюентах произойдет инверсия времен удерживания в одной из пар diCQA:

$$t_R(3,5diCQA) < t_R(3,4diCQA) < t_R(4,5diCQA). \quad (9)$$

И, наоборот, в подвижных фазах с большей элюирующей силой (с большей концентрацией ацетонитрила) возможна другая инверсия:

$$t_R(3,4diCQA) < t_R(4,5diCQA) < t_R(3,5diCQA). \quad (10)$$

Иными словами наклон линий относительно удерживания является более информативным параметром по сравнению с порядком элюирования. При этом даже в указанных выше удобных подвижных фазах порядок элюирования пары 1,5diCQA и 3,5diCQA может изменяться, так как наклон линии тренда для 1,5diCQA больше, чем для 3,5diCQA.

Подвижные фазы системы изопропанол–0.25 об. % H_3PO_4 –вода. В поисках “зеленых” растворителей для отказа от экологически неблагоприятного ацетонитрила заменили его на пропанол-2. Карта разделения, в которой указаны также две линии тренда из предыдущего рисунка, представлена на рис. 3, а параметры линий трендов – в табл. 1.

Из полученных данных следует, что диапазон времен удерживания пяти изомерных ДКХ расширен по сравнению с предыдущей элюентной системой, а параметры a_1 оказались немногим больше, чем для элюентов на основе ацетонитрила, что также соответствует одновременной сорбции обеими заместителями кофейной кислоты. При этом заметно изменилась и селективность разделения изомерных ДКХ-кислот. Так, существуют диапазоны составов подвижной фазы, в которых полностью разделяются все пять изомеров за время, не превышающее 20 мин, т.е. такая замена ацетонитрила на ИП не только целесообразна с точки зрения экологии, но и улучшает селективность разделения пяти изомеров дикофеилхинных кислот. Отметим, что 1,4diCQA по имеющимся у нас данным в природных объектах встречается очень редко, а в фундаментальной работе [19] по дифференциации всех шести синтетических ДКХ-кислот по данным масс-спектров высокого порядка хроматографическое поведение изомеров не рассматривали.

Гексилфенильная фаза (Gemini C6Phenyl, C6Ph).

Как и в случае фазы C18, для фазы C6Ph вначале исследовали разделение изомеров в элюентах с ацетонитрилом в качестве органического модификатора, а затем ацетонитрил заменили пропанолом-2. Параметры линий трендов для обоих органических модификаторов подвижной фазы представлены в табл. 2.

Замена стационарных фаз представляла интерес, поскольку предполагалось, что π -взаимодействия фенильных групп привитой фазы с ароматическими кольцами радикалов коричной кислоты могут изменить селективность разделения изомерных ДКХ-кислот. Экспериментально установлено, что при одинаковой концентрации ацетонитрила в подвижной фазе удерживание изомерных ДКХ-кислот, действительно, несколько увеличивается при переходе от фазы C18 к фазе C6Ph. Однако значения параметров a_1 линий трендов при этом заметно меньше, поэтому в “медленных” элюентах и в элюентах, в которых ацетонитрил отсутствует, порядок удерживания обращается. Следовательно, суммарно прочность связи ДКХ-кислот с фазой C6Ph меньше, чем с фазой C18. Однако порядок удерживания 3,4-diCQA, 3,5-diCQA и 4,5-diCQA остается таким же, как и для стационарной фазы C18 при концентрации ацетонитрила в диапазоне 20–25 об. %, а пара изомеров 1,5-diCQA и 3,5-diCQA также остается проблемной для разделения. Все это указывает на отсутствие изменения селективности разделения при рассмотренных условиях.

Замена ацетонитрила как компонента, который может обеспечивать π - π -взаимодействие сорбатов с компонентом подвижной фазы, на алифатический спирт (ИП) должна была бы исключить такие взаимодействия и усилить роль в суммарном удерживании π - π -взаимодействий сорбатов в сорбированном на фенилгексильной

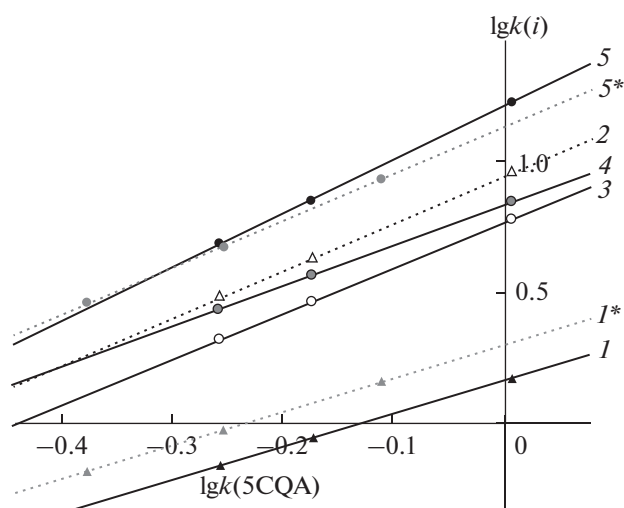


Рис. 3. Карта разделения ДКХ-кислот в элюентной системе изопропанол–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода для стационарной фазы Kromasil 110-5-C18 при 30°C. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA. Звездочкой отмечены линии трендов с рис. 1.

фазе состоянии. Однако эта замена привела только к небольшому увеличению параметров a_1 (табл. 2), хотя и для всех изомерных ДКХ кислот. Следовательно, дисперсионные взаимодействия остаются главным типом взаимодействий сорбатов со стационарной фазой, определяющих их удерживание, поэтому и порядок элюирования изомерных ДКХ-кислот мало изменился при замене растворителей – только относительное удерживание 1,5diCQA существенно снизилось, создавая новую проблемную пару, но уже с 3,4diCQA.

Таким образом, наилучший вариант хроматографической системы – это традиционная фаза

Таблица 2. Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеоилхиновых кислот для стационарной фазы Gemini® 5 мкм C6-Phenyl 110 Å в элюентах органический модификатор–0.25 об. % H₃PO₄–вода

Органический модификатор	Аналит	Параметры уравнения (3)	
		a_1	a_1
Ацетонитрил	1,3-Дикофеоилхиновая кислота, 1,3diCQA	1.119	0.358
	1,5-Дикофеоилхиновая кислота, 1,5diCQA	1.242	1.029
	3,4-Дикофеоилхиновая кислота, 3,4diCQA	1.268	0.923
	3,5-Дикофеоилхиновая кислота, 3,5diCQA	1.195	1.007
	4,5-Дикофеоилхиновая кислота, 4,5diCQA	1.371	1.175
Изопропанол	1,3-Дикофеоилхиновая кислота, 1,3diCQA	1.153	0.252
	1,5-Дикофеоилхиновая кислота, 1,5diCQA	1.309	0.858
	3,4-Дикофеоилхиновая кислота, 3,4diCQA	1.334	0.839
	3,5-Дикофеоилхиновая кислота, 3,5diCQA	1.214	0.924
	4,5-Дикофеоилхиновая кислота, 4,5diCQA	1.460	1.221

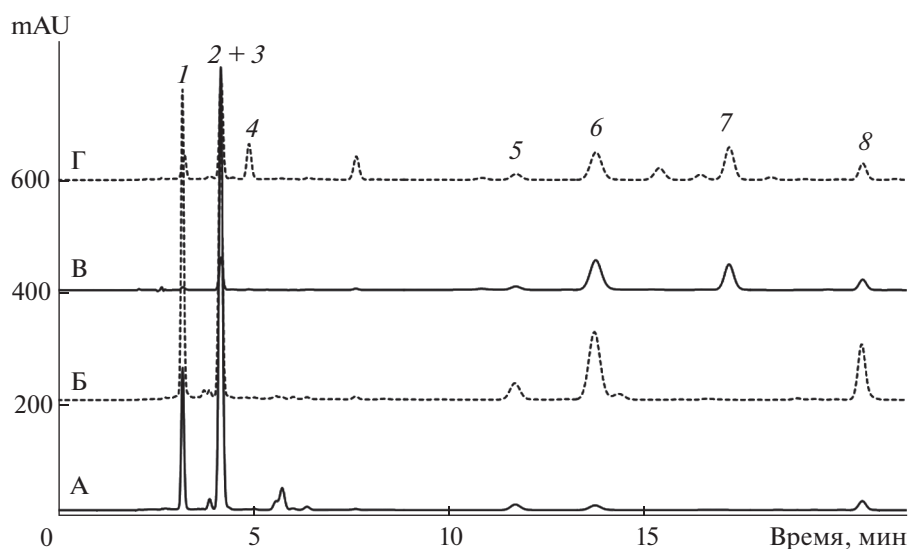


Рис. 4. Хроматограммы разделения кофейных кислот четырех напитков. Напитки из: А – зеленого кофе, Б – мате, В – экстракта консервированного артишока, Г – экстракта из препарата “Артишока экстракт” (ЗАО “Эвалар”, Россия). Колонка Kromasil 110-5-C18, градиентное элюирование (см. “Экспериментальную часть”). Вещества; 1 – 3CQA; 2 – 4CQA; 3 – 5CQA; 4 – 1,3diCQA; 5 – 3,4diCQA; 6 – 3,5diCQA; 7 – 1,5diCQA; 8 – 4,5diCQA.

C18 с элюентами на основе ИП. Именно такой вариант использовали в дальнейшем для определения содержания МКХ- и ДКХ-кислот в настоях кофе, мате и артишока (последний напиток разработан во Вьетнаме и в настоящее время импортируется в Россию).

Определение МКХ- и ДКХ-кислот в напитках. Использовали градиентный режим, обеспечивающий хорошее отделение ДКХ-кислот от сопутствующих примесей (флавоноидов) и сокращающий время полного анализа образца. Хроматограммы, полученные в таком режиме, представлены на рис. 4, а результаты определения кислот приведены в табл. 3.

Анализ показал, что во всех настоях кофе доля ДКХ-кислот от общего содержания кофейных кислот составила ~10% (по площадям пиков), а максимальное суммарное содержание кислот приходится на настой зеленого кофе. В случае мате доля ДКХ-кислот существенно больше – превышает 40%, что обеспечивает ценность этого напитка в связи с более высокой биодоступностью именно ДКХ-кислот. В обоих типах напитков основные дикофейные кислоты представлены набором 3,4diCQA, 3,5diCQA и 4,5diCQA. В напитке из артишока к основным ДКХ-кислотам присоединилась 1,5diCQA, но практически отсутствовал изомер 1,3diCQA, счи-

Таблица 3. Результаты определения доли кофейных кислот и их суммы в образцах настоев (напитков)

Тип растительного материала	Вид материала	Доля кислот в пересчете на 5CQA (по площадям пиков)								Концентрация в напитке, мг/мл*
		МКХ		ДКХ				ΣМКХ	ΣДКХ	
		3CQA	5+4CQA	3,4diCQA	3,5diCQA	1,5diCQA	4,5diCQA	mCQAс	diCQAs	
Мате	Pipore	26.3–27.6	29.7–32.6	5.0–5.6	22.9–25.9	Нет	12.2–13.3	56.0–59.2	40.8–43.9	0.75–0.87
	Pajarito	23.1–26.8	33.6–34.0	5.0–7.6	23.2–23.5	Нет	10.7–12.0	57.2–60.8	39.2–42.8	0.76–0.78
Кофе	Молотый	17.6–19.1	69.2–73.2	1.6–4.1	2.5–4.0	Нет	3.5–4.3	88.3–90.9	9.1–11.7	0.26–0.31
	Растворимый	16.8–17.0	73.2–73.4	2.7–2.8	3.7–3.8	Нет	3.3–3.4	90.0–90.1	9.9–10.0	0.12–0.13
Артишок	Зеленый	18.0–18.7	72.1–72.5	2.7–2.8	2.7–3.9	Нет	3.2–3.3	90.2–91.2	8.8–9.8	0.45–0.46
	Herbal	7.5–7.7	51.4–51.8	4.8–4.9	11.2–11.6	12.2–12.4	12.5–12.6	58.8–60.0	40.0–41.2	0.16–0.18
	Actisco	4.9–5.7	45.1–48.6	4.0–4.2	11.5–12.9	21.4–22.7	8.7–10.2	50.0–54.4	45.6–50.0	0.16–0.17
	Консервированный	1.1–2.5	13.7–19.7	4.0–4.3	34.2–41.9	27.7–30.0	9.3–11.7	14.8–22.2	77.8–85.2	0.12–0.13

*В пересчете на 5CQA.

тающийся ценным биологически активным веществом, — единственная ДКХ-кислота, получившая специальное название — цинарин [20].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-90031.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clifford M.N., Jaganath I.B., Ludwig I.A., Crozier A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity // Nat. Prod. Rep. 2017. V. 34. P. 1391.
2. Kim H.G., Oh M.S. Natural products as potential anti-convulsants: Caffeoylquinic acids // Arch. Pharm. Res. 2012. V. 35. № 3. P. 389.
3. Farah A., de Paula Lima J. Consumption of chlorogenic acids through coffee and health implications // Beverages. 2019. V. 5. P. 11.
4. Monteiro M., Farah A., Perrone D., Trugo L.C., Donangelo C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans // J. Nutr. 2007. V. 137. P. 2196.
5. Mateos R., Baeza G., Sarriá B., Bravo L. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity // Food Chem. 2018. V. 241. P. 232.
6. Stalmach A., Mullen W., Nagai C., Crozier F. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee // Braz. J. Plant Physiol. 2006. V. 18. P. 253.
7. Meinhart A.D., da Silveira T.F.F., Silva R.A., Damin F.M., Bruns R.E., Godoy H.T. Multivariate optimization of chlorogenic acid extraction from brazilian coffee // Food Anal. Methods. 2017. V. 10. P. 2943.
8. Shan Y., Jin X., Cheng Y., Yan W. Simultaneous determination of chlorogenic acids in green coffee bean extracts with effective relative response factors // Int. J. Food Prop. 2017. V. 20. P. 2028.
9. Schrader K., Kiehne A., Engelhardt U.H., Maier H.G. Determination of chlorogenic acids with lactones in roasted coffee // J. Sci. Food Agric. 1996. V. 71. P. 392.
10. Ky C.-L., Noirot M., Hamon S. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea* sp.) // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. P. 786.
11. Guerrero G., Suárez M. Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 2454.
12. Craig A.P., Fields C., Liang N., Kitts D., Erickson A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts // Talanta. 2016. V. 154. P. 481.
13. Murugesu K., Saghir S.A.M., Sadikun A., Khaw K.-Y., Murugainyan V. Exploiting column chemistry for chromatographic separation and quantification of caffeoylquinic acids in *Gynura procumbens* // Acta Chromatogr. 2021. V. 33. P. 170.
14. Šeruga M., Tomac I. Electrochemical behaviour of some chlorogenic acids and their characterization in coffee by square-wave voltammetry // Int. J. Electrochem. Sci. 2014. V. 9. P. 6134.
15. Lippert J.A., Johnson T.M., Lloyd J.B., Smith J.P., Johnson B.T., Furlow J., Proctor A., Marin S.J. Effects of elevated temperature and mobile phase composition on a novel C18 silica column // J. Sep. Sci. 2007. V. 30. P. 1141.
16. Kaliszan R., van Straten M.A., Markuszewski M., Cramers C. A., Claessens H.A. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure–retention relationships // J. Chromatogr. A. 1999. V. 855. P. 455.
17. Murakami F. Retention behavior of benzene derivatives on bonded reversed-phase columns // J. Chromatogr. 1979. V. 178. P. 393.
18. Дейнека В.И., Олейниц Е.Ю., Блинова И.П., Дейнека Л.А. // Селективность разделения изомерных хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 8. С. 588.
19. Clifford M.N., Knight S., Kuhnert N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 3821.
20. Lattancio V., Kroon P.A., Linsalata V., Cardiali A. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients // J. Funct. Foods. 2009. V. 1. P. 131.

УДК 543

ЛАБОРАТОРИЯ СПЕКТРАЛЬНЫХ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИНСТИТУТА НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ИМ. А.В. ТОПЧИЕВА РАН

© 2022 г. Р. С. Борисов^a, *, А. Ю. Канатьева^a^aИнститут нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук
Ленинский просп., 29, стр. 2, Москва, 119991 Россия

*e-mail: borisov@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 10.06.2021 г.

После доработки 23.06.2021 г.

Принята к публикации 24.06.2021 г.

Лаборатория спектральных и хроматографических исследований ИНХС РАН объединила в себе две научные школы: в области масс-спектрометрии, созданную д. х. н., проф. В.Г. Заикиным, и хроматографии, у истоков которой стоял д. х. н., профессор В.Г. Березкин. В настоящее время лаборатория оснащена широким спектром современной масс-спектрометрической и хроматографической техники, что позволяет решать широкий круг задач по анализу получаемых в институте продуктов переработки нефти и синтеза высокомолекулярных соединений, а также сырья для соответствующих процессов. Лаборатория активно ведет и собственную научную работу, направленную на развитие новых подходов к более эффективному использованию “мягких” ионизационных методов в масс-спектрометрии, изучение возможности применения двумерной газовой хроматографии/масс-спектрометрии для решения разнообразных химотологических задач, разработку и изучение свойств новых стационарных хроматографических фаз.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, хроматография, ИНХС РАН, история.**DOI:** 10.31857/S0044450222060044

Существующая в настоящее время в ИНХС РАН лаборатория спектральных и хроматографических исследований прошла длительный путь развития. Она была создана в 1943 г. как лаборатория физико-химических методов, в которой основные направления исследований были связаны с разработкой и использованием разнообразных спектральных методов при изучении нефти и нефтепродуктов. Длительное время заведующим лабораторией был д. х. н. М.М. Кусаков (фото 1), после кончины которого руководство осуществлял к. х. н. А.Ю. Кошевник. В середине 1970-х гг. лаборатория пополнилась эффективным оборудованием, что позволило начать ранее не проводившиеся в институте масс-спектрометрические исследования. В 1983 г. лаборатория была переименована в лабораторию спектральных исследований, которую возглавил защитивший к тому времени докторскую диссертацию В.Г. Заикин — один из наиболее известных специалистов в области органической масс-спектрометрии нашей страны, отмечающий в этом году 80-летний юбилей (фото 2).

В 1963 г. была создана лаборатория хроматографии. Заведующим лабораторией был назначен В.Г. Березкин (фото 1), в тот момент еще канди-

дат наук; он руководил коллективом почти 40 лет. С 2002 г. руководить лабораторией стал д. х. н. А.А. Курганов (фото 3). В 2018 г. лаборатория хроматографии была объединена с лабораторией спектральных исследований. В настоящий момент лабораторию возглавляет к. х. н. Р.С. Борисов, а входящую в ее состав группу хроматографии — к. х. н. А.Ю. Канатьева. В состав лаборатории входят 16 научных сотрудников, включая главных научных сотрудников — В.Г. Заикина и А.А. Курганова. Активно идет омоложение кадрового состава: средний возраст научных сотрудников снижается за счет привлечения молодых кандидатов наук, выполнявших свои работы непосредственно в лаборатории. За последние несколько лет было защищено четыре кандидатские диссертации, готовятся к защите два выпускника аспирантуры, по специальностям “Органическая химия” и “Нефтехимия” обучаются три аспиранта.

Лаборатория оснащена современным аналитическим оборудованием, включая масс-спектрометры с одномерным и двумерным газохроматографическим вводом, масс-спектрометр МАЛДИ, различные системы ВЭЖХ. Эти приборы позволяют решать широкий круг задач по анализу по-



Фото 1. Доктор химических наук Михаил Михайлович Кусаков (1910–1971) и доктор химических наук, профессор, лауреат Государственной премии СССР, Заслуженный деятель науки РФ Виктор Григорьевич Березкин (1931–2021).

лучаемых в институте продуктов переработки нефти и синтеза высокомолекулярных соединений, а также сырья для соответствующих процессов. Лаборатория активно ведет и собственную научную работу, направленную на развитие новых подходов к более эффективному использованию

“мягких” ионизационных методов в масс-спектрометрии, изучение возможности применения двумерной газовой хроматографии/масс-спектрометрии для решения разнообразных химмотологических задач, разработку и изучение свойств новых стационарных хроматографических фаз.

Спектральные исследования. В первые десятилетия существования лаборатории значительная часть исследовательских и аналитических работ



Фото 2. Доктор химических наук, профессор Владимир Георгиевич Заикин.

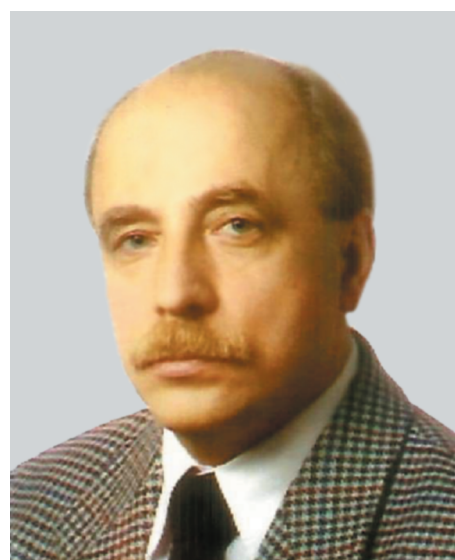


Фото 3. Доктор химических наук Александр Александрович Курганов.

выполнялась с помощью разнообразных инструментальных методов, однако спектральные методы (колебательная и электронная спектроскопия, спектроскопия ЯМР) занимали ведущее положение. В это время многие важные научные результаты были получены с участием высококвалифицированных кандидатов наук: И.К. Богатыревой, А.Н. Кислинского, А.Ю. Кошевник, И.М. Кошелевой, Н.А. Кубасовой, Н.М. Лубман, Л.И. Мекеницкой, Д.Н. Некрасова, В.Д. Оппенгейм, Э.А. Разумовской, Н.А. Тарасенко, В.Л.Ходжаевой, Н.А. Шиманко, М.В. Шишкиной. В частности, были разработаны подходы к определению структурно-группового состава нефтяных фракций (особенно тяжелых остаточных фракций: вакуумного газойля, газойля каталитического крекинга, гудронов, битумов, асфальтенов) с использованием спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C (определение числа ароматических, нафтеновых и алифатических атомов углерода, распределение углерода по моно-, би- и полициклическим соединениям, характер разветвления в алифатических цепях). Был разработан метод ИК-дихроизма для исследования ориентационных свойств, фазовых и конформационных переходов низкомолекулярных жидких кристаллов и полимеров с боковыми мезогенными группами. Методом ИК-спектроскопии изучено старение практически важных полимерных систем. С использованием методов квантовой химии интерпретированы матричные ИК-спектры нестабильных интермедиатов пиролиза напряженных кремнийорганических гетероциклов (к. х. н. В.Г. Авакян).

С приходом в лабораторию к. х. н. В.Г. Закина в начале 1970-х годов были начаты широкие масс-спектрометрические и хромато-масс-спектрометрические исследования разнообразных органических соединений и их смесей, имеющих прямое отношение к нефти, продуктам ее превращений и нефтехимического синтеза (алифатические и алициклические углеводороды, нефтяные биомаркеры, N-, O-, S-, Si (Ge)-содержащие соединения). Наряду с многочисленными работами по собственно анализу проводились методические исследования. Так, в результате систематического масс-спектрометрического исследования стереоизомеров в ряду циклических углеводородов и гетероциклических соединений сформулированы закономерности, обуславливающие стереоспецифичность фрагментации при ионизации электронами. Разработаны высокопроизводительные методы измерения энергий ионизации с использованием фотоионизационной масс-спектрометрии, позволяющие определять термодинамические характеристики органических соединений.

С конца 1970-х гг. в лабораторию пришел высококвалифицированный специалист в области органической химии к. х. н. А.И. Микая (фото 4),



Фото 4. Доктор химических наук Анзор Иванович Микая.

который начал разработку принципиально новой разновидности комбинированного метода газовой хроматографии/масс-спектрометрии, названной “реакционной ГХ/МС”. Она основана на включении химического или физико-химического превращения аналитов непосредственно в систему ввода хромато-масс-спектрометра с использованием газофазных реакций. Данный метод гораздо менее времязатратный по сравнению с проведением подобных предварительных реакций в растворе и позволяет оперировать с субмикрограммовыми количествами аналитов. При этом регистрируются масс-спектры продуктов превращения, содержащих дополнительную информацию о структуре модифицируемых аналитов. Многочисленными исследованиями показано, что для химического превращения удобно применять реакции гидрирования, дегидрирования, окисления, обменные реакции, включая H/D-обмен. Эти реакции осуществляются в инжекторе газового хроматографа, в газофазном микрореакторе, размещенном перед хроматографической колонкой или между колонкой и масс-спектрометром, а также непосредственно в колонке. Эффективность разработанного подхода была продемонстрирована на примере обнаружения и определения олефинов, малых карбоциклов, нафтеновых углеводородов, спиртов, циклических сульфидов. Особым направлением в этих исследованиях явилось изучение направленности и механизмов гетерогенно-каталитических про-

цессов, реализуемых в микрореакторах, которые устанавливались на входе системы ГХ/МС. При этом для изучения процессов гидрирования и конденсации применялись водород и дейтерий как газы-реагенты и газы-носители. Одним из важных результатов этих работ явилось обнаружение новой каталитической реакции конденсации циклических спиртов и кетонов, сопровождающейся образованием сочлененных би- и полициклических углеводов. По результатам этих исследований, которые в дальнейшем продолжались совместно с лабораторией каталитического синтеза, получены авторские свидетельства. Комплекс отмеченных исследований лег в основу докторской диссертации А.И. Микая.

В начале 1990-х гг. под руководством В.Г. Заикина и Н.А. Платэ были начаты исследования, направленные на использование пиролизической ГХ/МС с включением импульсных пиролизеров для определения микроструктуры полимеров (характер и способ соединения звеньев сополимеров, разветвление, концевые группы, дифференциация статистических, чередующихся и блок-сополимеров и др.). Различные элементы микроструктуры полимеров определялись при математической обработке хроматографических и масс-спектрометрических данных на основе теории Маркова и по выходу разнообразных диадных, триадных, тетрадных продуктов пиролиза. В частности, данный метод был использован для исследования структуры гомо- и сополимеров винилциклогексана, стирола, акрилонитрила, бутадиена, изопрена, получаемых различными способами.

В 1992 г. д. х. н. А.И. Микая, широко известный и высококвалифицированный специалист в области органической химии и масс-спектрометрии, был приглашен на работу в Национальный институт стандартов и технологий (Гейтерсбург, США) для усовершенствования, улучшения качества и расширения высокоэффективной масс-спектральной базы NIST/EPA/NIH. К решению этих задач на контрактной основе подключились и сотрудники лаборатории спектральных исследований ИНХС. В ходе этих исследований под руководством В.Г. Заикина были разработаны новые дериватизирующие агенты (например, хлорангидриды циклоалканкарбоновых кислот, циклоорганоциклориды), синтезированы производные разнообразных полезных органических соединений, получены их масс-спектры ионизации электронами, которые значительно увеличили объем базы. С использованием общих теоретических представлений, эмпирических масс-спектральных правил и разнообразного компьютерного сопровождения проведена "ручная" оценка качества каждого спектра в базе, их необходимая корректировка или исключение некорректных масс-спектров. В результате более чем двадцатилетнего сотрудничества с американскими учеными уда-

лось существенно усовершенствовать и значительно расширить высококачественную базу масс-спектров, ставшую наиболее популярной в мировой исследовательской практике.

В процессе многосторонних исследований совместно с американскими учеными были обнаружены новые неожиданные процессы диссоциации, которые могут быть полезны при интерпретации новых масс-спектров соединений, синтезируемых или обнаруживаемых в различных матрицах. В частности, такие реакции обнаружены в случае метоксиацетатов спиртов, бис(перфторацильных) производных изомерных фенилендиаминов, гидроксид- и меркаптобензенаминов, N-алкилсульфабензамидов.

С начала 2000 г. в систематические исследования включился Р.С. Борисов, по результатам работ лаборатории защитивший кандидатскую диссертацию. В последующем он предложил заняться исследованиями в области использования дериватизационных принципов в масс-спектрометрии с "мягкими" методами ионизации (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ), ионизация электрораспылением (ИЭР), прямой анализ в реальном времени (DART). Метод масс-спектрометрии МАЛДИ, в том числе в тандемном варианте (разложение после источника), был успешно применен к характеристике полиамидов (молекулярно-массовое распределение, последовательность звеньев, природа концевых групп). В этих исследованиях, а также в работе с силсесквиоксанами показана эффективность предварительной дериватизации (силилирование, ацилирование, алкилирование). Для определения числа свободных аминогрупп в полиэтиленах было предложено использовать реакцию с альдегидами, ведущую к образованию оснований Шиффа, которые обладают высокой эффективностью ионизации.

Дальнейшие исследования были направлены на разработку приемов химической модификации с введением фиксированного ковалентно-связанного заряда при обнаружении и определении различных соединений в смесях перечисленными выше масс-спектрометрическими методами. Одна из первых работ, выполненная в этом направлении, была посвящена созданию высокочувствительного и экспрессного метода характеристики и определения молекулярно-массового распределения полиэтиленов с терминальными атомами галогена методом масс-спектрометрии МАЛДИ. Предварительная дериватизация этих субстратов триарилфосфинами, триалкиламинами и некоторыми N-гетероаренами позволила количественно синтезировать соответствующие ониевые соли, катионные части которых легко десорбировались в условиях МАЛДИ, обеспечи-

вая регистрацию высококачественных масс-спектров.

Данный принцип химической модификации назван Р.С. Борисовым и В.Г. Заикиным “дери-ватизацией с генерацией заряда”. Именно он был положен в основу большой серии фундаментальных исследований по разработке и испытанию различных реагентов, обеспечивающих этот тип превращений для масс-спектрометрии с МАЛДИ, ИЭР, DART. Очень важной была разработка химической модификации этого типа с использованием бифункциональных реагентов, один конец молекул которых содержал группу, обеспечивающую взаимодействие с конкретной функциональной группой аналита, а другой являлся мишенью для генерации заряда с образованием аммониевых, фосфониевых, сульфониевых солей. Результаты показали, что предложенные дериватизационные подходы позволяют существенно увеличить выход ионов. Было обнаружено, что такая модификация может протекать и непосредственно в источнике ионов масс-спектрометра DART, давая возможность разрабатывать исключительно экспрессные методы анализа.

Лаборатория спектральных исследований активно принимает участие в работе Всероссийского масс-спектрометрического общества (ВМСО). Почетный член ВМСО Владимир Георгиевич Заикин стоял у истоков этой организации, и с момента организации печатного органа ВМСО журнала “Масс-спектрометрия” является его бес-сменным главным редактором. В.Г. Заикин и Р.С. Борисов избирались президентами ВМСО, а также входят в состав его совета. В 2021 г. решением Съезда ВМСО В.Г. Заикин награжден медалью “За выдающиеся заслуги в области масс-спектрометрии”.

Исследования в области хроматографии. Первые десятилетия работы лаборатории хроматографии неразрывно связаны с именем ее первого руководителя В.Г. Березкина. Под его руководством в лаборатории велись теоретические и прикладные исследования, направленные в первую очередь на развитие только входящего в тот момент в аналитическую практику газохроматографического метода. Сотрудниками лаборатории под руководством В.Г. Березкина была разработана аддитивная теория удерживания в газожидкостной хроматографии, которая учитывала не только распределение сорбатов в системе газ–неподвижная жидкая фаза, но и адсорбцию на поверхностях раздела фаз в хроматографической системе. Согласно аддитивной теории, хроматографический процесс в реальной ГЖХ необходимо рассматривать с точки зрения равновесия между тремя компонентами: газ–неподвижная жидкая фаза (НЖФ)—твердый носитель, считая неподвижную фазу многокомпонентной много-

фазной системой. В работах этого периода была предложена равновесная теория для относительных величин удерживания, которые практически не зависят от условий эксперимента и могут рассматриваться как хроматографические константы: инвариантного логарифмического индекса удерживания I_{io} и инвариантного относительного удерживания сорбата r_{isto} , а также предложены методы определения этих величин, основанные на зависимости их значений от эффективной толщины слоя НЖФ в хроматографической колонке. Развитие представлений об адсорбционных явлениях в ГЖХ продолжилось в дальнейших работах лаборатории: была подробно рассмотрена адсорбция на границе НЖФ—твердый носитель, проведено экспериментальное построение изотерм адсорбции, определение теплот адсорбции, а существование сорбционных явлений на границе между жидкой фазой и твердым носителем было подтверждено независимыми нехроматографическими методами. Были выведены уравнения, описывающие одновременную абсорбцию и адсорбцию аналита на реальном сорбенте и проверено их согласование с практикой, рассмотрено влияние сорбции аналита на межфазных границах на относительные величины удерживания, подробно изучены адсорбционные явления на межфазных границах в только входивших в лабораторную практику капиллярных колонках. В своих воспоминаниях В.Г. Березкин отмечал, что “основные научные результаты были получены благодаря активной работе многих сотрудников лаборатории, прежде всего В.С. Гавричева, В.М. Фатеевой, В.П. Пахомова, Т.П. Поповой, В.Е. Ширяевой. Особенно следует отметить вклад А.А. Королева, который много лет поддерживал хроматографическое оборудование лаборатории в работоспособном состоянии. Впервые в мире он выполнил экспериментальные работы, доказавшие важную роль адсорбционных явлений в капиллярной газожидкостной хроматографии, а также используемого газа-носителя в капиллярной газовой хроматографии”.

Большое внимание в лаборатории уделялось и развитию высокоэффективной капиллярной газовой хроматографии, позволяющей осуществлять разделение весьма сложных многокомпонентных смесей. Были предложены методы получения капиллярных колонок с удельной эффективностью до 30000 ТТ/м, которые были внедрены в практику. В 1970-е г. работы лаборатории были направлены как на решение различных конкретных аналитических задач, так и на развитие хроматографического метода в целом. Публикации этого периода охватывают три больших направления: исследование полимеров и непосредственно связанное с ним развитие метода обращенной газовой хроматографии, разработка теории реальной ГХ и разработка газохроматографических методик для

определения различных веществ. Сотрудниками лаборатории был предложен хроматографический экспресс-метод определения термической и термоокислительной стабильности полимеров, изучено изменение хроматографических свойств различных сорбентов при повышенной температуре, предложен хроматографический метод определения степени разветвления полимера на примере исследования полиэтиленimina, изучен процесс старения капиллярных колонок и влияние его на получаемые результаты. Были опубликованы работы, посвященные расчету времен удерживания олефинов в газожидкостной хроматографии, анализу газообразных смесей, содержащих оксиды азота, определению легколетучих примесей в фармпрепаратах, а также примесей в изопрене, идентификации продуктов синтеза витаминов на основе характеристик удерживания. Большая серия работ была посвящена применению хроматографии в нефтехимии. Проведенные исследования позволили значительно расширить возможности применения хроматографического метода и продемонстрировали широкие перспективы его внедрения в аналитическую практику.

Важным направлением работы лаборатории стало развитие приборного обеспечения хроматографического метода. Впервые в нашей стране сотрудниками лаборатории хроматографии совместно со специалистами Научно-исследовательского института электровакуумного стекла были разработаны гибкие инертные высокоэффективные кварцевые капиллярные колонки, было предложено устройство для заполнения таких колонок. В 1976 г. были опубликованы результаты работы по приготовлению медных и латунных капиллярных колонок для газовой хроматографии, а затем работы, посвященные исследованию свойств заполненных сорбентом капиллярных колонок в газовой хроматографии.

В 1980–1990-х гг. в лаборатории разрабатывалась тематика, связанная с тонкослойной хроматографией, ГЖХ с использованием паров воды в составе подвижной фазы (парофазная хроматография), продолжались работы в области теории и хроматографического приборостроения. В.Г. Березкин и С.Л. Болотов опубликовали цикл работ по тонкослойной хроматографии с малолетучими подвижными фазами, в которых были исследованы особенности течения высококипящих подвижных фаз, влияние температуры на характеристики удерживания в такой системе. В рамках тематики планарной хроматографии рассматривались возможности применения ТСХ для концентрирования малолетучих минорных органических соединений, была показана возможность концентрирования примесей тяжелых металлов в воде. В работах сотрудников лаборатории было предложено использование кристаллогидратов в качестве селективных НФ в газовой хроматографии, а также

применение водных растворов неорганических соединений, например гидроксида калия, в качестве подвижной фазы в парофазной хроматографии. Использование НФ этого типа позволило проводить высокоселективные разделения органических соединений, в частности аминов.

В 2002 г. заведующим лабораторией стал доктор химических наук А.А. Курганов, а в 2005 г. в число сотрудников лаборатории вошла А.Ю. Канатьева, в 2007 г. защитившая кандидатскую диссертацию. В последние годы в лаборатории активно проводятся исследования монолитных сорбентов для газовой и жидкостной хроматографии. Монолитные колонки в жидкостной хроматографии, в отличие от традиционных, заполненных гранулированным сорбентом, обладают уникальной морфологией стационарной фазы: размер транспортных пор в структуре монолита не зависит от размера доменных частиц полимера, определяющих эффективность разделения, поэтому монолитные сорбенты в жидкостной хроматографии дают возможность получения высокоэффективных колонок, содержащих мелкие частицы, которые в то же время не требуют для своей работы применения высоких давлений. В лаборатории активно проводилось исследование физико-химических свойств монолитных капиллярных колонок в зависимости от условий их получения, что позволило выявить закономерности формирования структуры сорбентов, необходимой для достижения быстрых и высокоэффективных разделений.

Исследованы физико-химические параметры ионных и неионных монолитных матриц и капиллярных колонок на их основе и предложен метод получения высокоэффективных монолитных ионообменных капиллярных колонок с оптимальной структурой монолита для проведения эффективных и селективных анализов в ионной хроматографии. Показано, что пористость, проницаемость монолитов и импеданс колонок в первую очередь определяются условиями синтеза, такими как температура и время полимеризации, относительные количества (со)мономеров в полимеризационной смеси, наличие сшивающего агента в исходной полимеризационной смеси, тип инициатора и способ полимеризации (фото- или термоинициируемый процесс). При этом в области ионной хроматографии селективность и ионная емкость сорбента зависят от типа используемого аминирующего реагента, и изменение состава этого агента позволяет получать колонки с заданными характеристиками. Под руководством А.А. Курганова были приготовлены монолитные капиллярные колонки на основе полярных и неполярных мономеров, пористая структура которых позволила проводить молекулярно-массовый анализ полимерных образцов в широком диапазоне молекулярных масс с высоким

разрешением с использованием несорбционного механизма. С использованием приготовленных сорбентов удалось реализовать разделение полимеров методом эксклюзионно-гидродинамической хроматографии и продемонстрировать использование этого метода для определения молекулярно-массовых характеристик полимеров. В дальнейшем с использованием разработанных монокристаллических фаз сотрудниками лаборатории исследовано поведение полимеров сверхвысокой молекулярной массы (до 1 млн Да) в узких каналах и показано, что необычное поведение аналитов этого типа в хроматографических системах связано с конформационным переходом глобула — вытянутая конформация (coil-stretch transition), приводящим к расщеплению хроматографического пика при высоких скоростях потока элюента. Изменения профиля элюирования полимеров могут быть описаны в рамках модели реакционной хроматографии при условии рассмотрения конформационного перехода как обратимой химической реакции. Применение этого подхода позволило рассчитать константы скорости прямой и обратной реакций взаимопревращения конформеров и определить условия про-

ведения анализа молекулярно-массового распределения синтетических полимеров сверхвысокой молекулярной массы хроматографическими методами.

Результаты научных работ сотрудников лаборатории опубликованы более чем в 500 статьях, 125 изобретениях и в 25 книгах. 20 изобретений были внедрены в аналитическую практику. Первый заведующий лабораторией д. х. н., профессор Виктор Григорьевич Берёзкин проработал в АН СССР и РАН 63 г., был лауреатом Государственной премии СССР (1982), принимал участие в работе редколлегии “Журнала аналитической химии”, журналов “Заводская лаборатория”, “Journal of Chromatography A”, “Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications”, “Petroleum and Coal”. А.А. Курганов и А.Ю. Канатьева являются членами Комиссии по хроматографии Научного совета РАН по аналитической химии. Александр Александрович Курганов является членом редколлегии журналов “Journal of Separation Science”, “Journal of Pharmaceutical Analysis”.