

СОДЕРЖАНИЕ

Том 77, номер 8, 2022

Развитие аналитической химии в Саратове.

Редактор-составитель – Т.Ю. Русанова

Предисловие к специальному выпуску 681

ОБЗОРЫ

Применение спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния для определения лекарственных и наркотических средств в биожидкостях человека

Н. Е. Маркина, И. Ю. Горячева, А. В. Маркин 684

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Сравнительная оценка содержания свободных фенольных соединений и антиоксидантной активности различных образцов гречихи

С. С. Алексенко, К. О. Казимирова, С. Н. Штыков 704

Фотометрическое определение новокаина с предварительным концентрированием мицеллами ПАВ

Т. А. Соколова, С. Ю. Доронин 714

Потенциометрические сенсоры, чувствительные к некоторым цефалоспориновым антибиотикам: свойства, применение

Е. Г. Кулапина, О. И. Кулапина, Е. Н. Чердакова, В. Д. Анкина 721

Тест-системы на основе нановолокон, полученных методом электроформования, для определения ионов никеля

*Н. С. Комова, А. И. Данчук, В. В. Галушка, А. М. Павлов,
А. А. Сердобинцев, Т. Ю. Русанова* 734

Экспресс-определение некоторых бета-лактамных антибиотиков

А. В. Тумская, И. В. Косырева 742

Кинетические и аналитические характеристики реакции пероксидазного окисления трифенил-4-сульфоната натрия

С. А. Пиденко, И. С. Москвичева, Н. А. Бурмистрова 748

Мицеллярная тонкослойная хроматография и концентрирование L-карнитина наночастицами магнетита

Е. Г. Сумина, С. Н. Штыков, И. С. Решетникова, Н. А. Юрасов, В. З. Уланова 755

Влияние плазмонного резонанса наночастиц серебра на флуоресцентные свойства доксицилина

Т. Д. Смирнова, Е. А. Желобицкая, Т. Г. Данилина 763

ИСТОРИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Идеи А.И. Черкесова в некоторых взаимосвязанных областях аналитической и теоретической химии

А. Н. Панкратов 769

ПРЕДИСЛОВИЕ К СПЕЦИАЛЬНОМУ ВЫПУСКУ

DOI: 10.31857/S0044450222080126

Началом становления и развития аналитической химии в г. Саратове можно считать образование в 1929 г. кафедры аналитической химии в составе химического факультета Саратовского государственного университета (первый заведующий – воспитанник Санкт-Петербургского университета профессор В.П. Голуб). До 1950-х гг. научная работа на кафедре проводилась по широкому спектру направлений в области различных методов химического анализа: изучались комплексные соединения для колориметрического определения металлов, совершенствовались электроды для электрохимического анализа, были исследованы сланцы Поволжья.

Начиная с 1950 г. под руководством профессора Л.М. Кульберга, приехавшего из Киева, исследования на кафедре приобретают единое научное направление: изучение и применение органических реагентов (ОР) в анализе, по которому за 5 лет защищается 11 кандидатских диссертаций, выпускается первая отечественная монография (Л.М. Кульберг “Органические реактивы в аналитической химии”. М.-Л.: Госхимиздат, 1950. 260 с.). Три его аспиранта в будущем становятся докторами, профессорами и заведующими кафедрами (А.И. Черкесов, В.Ф. Барковский, М.З. Ямпольский).

В 1955 г. заведующим кафедрой становится доцент И.С. Мустафин, который, развивая идеи Л.М. Кульберга, в 1958 г. защищает докторскую диссертацию “Исследование в области аналитического применения органических веществ”. Под его руководством синтезируются новые ОР, продолжается развитие теории их действия; разрабатываются способы определения ионов металлов; защищается 10 кандидатских диссертаций. В рамках докторской диссертации И.С. Мустафин разработал концепцию предела чувствительности органических аналитических реактивов. Авторитет аналитиков Саратова в стране возрос после проведения в 1966 г. 2-й Всесоюзной конференции по применению органических реагентов в анализе. В 1963 г. в Саратове появился второй центр изучению ОР для анализа – кафедра химии в Педагогическом институте, которую возглавил доцент, а затем профессор А.И. Черкесов. За 20 лет в 15 защищенных под его руководством кандидатских диссертациях детально изучались свойства большой группы новых ОР класса фта-

лексанов и началось использование для их исследования квантово-химических методов.

В течение 41 года (1971–2012 гг.) кафедрой аналитической химии СГУ заведовала Заслуженный деятель науки РФ, доктор химических наук, профессор Р.К. Чернова. Начался активный поиск новых путей увеличения эффективности действия ОР, который увенчался в 1976 г. организацией систематических работ по влиянию поверхностно-активных веществ (ПАВ) на комплексобразование ионов металлов с ОР. Итогом интенсивной работы явилась защита Р.К. Черновой в 1981 г. в ГЕОХИ АН СССР докторской диссертации “Эффекты гидрофобных взаимодействий в системах органические реагенты–поверхностно-активные вещества–ионы металлов и их значение для анализа”, в которой рассматривалась методология получения “гидрофобно-гидратированных” органических реагентов, позволивших увеличить интенсивность аналитического сигнала при фотометрическом определении металлов в 10–20 раз. Модифицирование ОР ионами ПАВ, а затем и солиubilизация ОР и их комплексов с металлами в мицеллах ПАВ позволили создать новое направление в теории и практике применения ОР в анализе и на три десятилетия стимулировали исследования в этом направлении в стране. Под руководством Р.К. Черновой защитилось 19 кандидатских наук, она была консультантом по докторским диссертациям Е.Г. Кулапиной (1999 г.), Н.Н. Гусаковой (2002 г.), А.И. Кулапина (2003 г.), С.Ю. Доронина (2009 г.). В настоящее время исследования в области мицеллярного катализа, мицеллярной экстракции, разработки новых сорбентов и тест-средств для определения ионов тяжелых металлов, фенолов и нафтолов, других органических соединений продолжают под руководством профессора С.Ю. Доронина.

В конце 1980-х гг. С.П. Муштакова осваивает новое для того времени направление – квантово-химические методы исследования строения молекул органических реагентов и их применение для изучения окислительно-восстановительных свойств реагентов дифениламинового класса (защита докторской диссертации в 1987 г.). Под руководством С.П. Муштаковой свои работы защитили 16 аспирантов и 2 докторанта. Ученик Светланы Петровны профессор А.Н. Панкратов

продолжает традиции этой школы в плане установления связи физико-химических, аналитических и иных свойств, реакционной способности, биологической активности веществ с энергетикой, пространственным и электронным строением молекул или других структурных единиц. Сейчас на кафедре общей и неорганической химии, которой 20 лет заведовала С.П. Муштакова, ее ученицы – доктора наук Ю.Б. Монахова и Н.А. Бурмистрова – проводят активные исследования в областях хемометрической обработки данных и кинетических методов анализа.

В 1990 г. ученик Р.К. Черновой – С.Н. Штыков – защищает докторскую диссертацию “Сольватационные эффекты в системах органические реагенты–их комплексы с металлами–поверхностно-активные вещества” (Москва, ГЕОХИ АН СССР), в которой показано, что основным результатом при использовании ионов ПАВ и организованных систем на их основе является локальное изменение полярности микроокружения аналитической системы. Результаты более чем 10-летних исследований кафедры были обобщены в монографии: Саввин С.Б., Чернова Р.К., Штыков С.Н., Поверхностно-активные вещества (серия “Аналитические реагенты”). М.: Наука, 1991. 251 с. Постепенно стало понятно, что ПАВ как в ионном, так и в мицеллярном состояниях позволяют улучшать аналитические характеристики не только в фотометрическом, но и в люминесцентном методе анализа, жидкостной хроматографии, экстракции, ионометрии, химических сенсорах и при определении не только ионов элементов, но и органических соединений. В связи с этим область исследований значительно расширилась, начали использовать другие организованные системы, такие как микроэмульсии, циклодекстрины, каликсарены, пленки Ленгмюра – Блоджетт. За последние 25 лет под руководством С.Н. Штыкова защищены 21 кандидатская диссертация, он являлся научным консультантом докторских диссертаций Е.Г. Суминой (2004 г.), И.Ю. Горячевой (2007 г.), Т.Ю. Русановой (2009 г.), Т.Д. Смирновой (2012 г.). Под руководством новых докторов наук исследования интенсивно продолжаются.

Начиная с 2014 г., С.Н. Штыков развивает более широкое научное направление, которое формулируется как “Развитие принципов супрамолекулярной химии, нанохимии и нанотехнологий в химическом анализе и формирование “наноаналитики” как нового направления в аналитической химии”. В рамках этого направления выполняется проект РНФ, опубликованы десятки статей, вышла монография *Nanoanalytics: Nanoobjects and Nanotechnologies in Analytical Chemistry* / Ed. Sergei Shtykov. Berlin: De Gruyter, 2018. 446 p.

С 1990-х гг. под руководством Е.Г. Кулапиной (докторская диссертация 1999 г.) проводятся ис-

следования в области ионометрии, начатые в 1980-х годах при участии д.х.н. Е.А. Матеровой, приехавшей из Ленинградского университета. Е.Г. Кулапина создала новое научное направление – потенциметрические сенсоры и сенсорные системы для определения гомологов поверхностно-активных веществ, β -лактамных антибиотиков, по которому защитили диссертации 11 аспирантов и докторскую диссертацию Н.М. Михалева.

В научной группе профессора И.Ю. Горячевой развивается направление биоаналитической химии, связанное с использованием многофункциональных наноматериалов и наноплатформ для определения и мониторинга маркеров заболеваний и других биологически-активных соединений. В 2016 г. ею опубликована монография: *Goryacheva I.Y. Rapid Immunotests for Clinical, Food and Environmental Applications*. Elsevier, 2016. 222 p. Под ее руководством защищено 10 кандидатских диссертаций и 2 диссертации на соискание степени PhD, выполняется большое число проектов, поддержанных грантами, включая международные.

Профессор Е.Г. Сумина исследует и использует в жидкостной хроматографии организованные наносистемы на основе ПАВ и молекулы-рецепторы (циклодекстрины, каликсарены, циклоалканы и др.). Профессором Т.Д. Смирновой развивается простой и высокочувствительный флуориметрический метод, основанный на измерении сенсibilизированной флуоресценции хелатов лантанидов. Дальнейшее развитие метода люминесцентного определения биологически активных веществ заключается в оценке влияния наночастиц серебра на эффективность переноса энергии в лантанидных хелатах некоторых антибиотиков. Д.х.н. Т.Ю. Русановой разрабатываются подходы к улучшению метрологических характеристик сенсоров, оптических и тест-методов анализа, основанные на использовании принципов биораспознавания, нанотехнологий и хемометрических алгоритмов.

Докторант А.В. Маркин в 2020 г. получил премию НСАХ РАН за работу по применению наноструктурированных материалов в аналитической химии и, в частности, за разработку аналитических систем экспресс-анализа биологических жидкостей на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света.

Исследования частично аналитической направленности проводятся также в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Под руководством профессора Н.Г. Хлебцова осуществляется синтез золотых и гибридных плазмонных наноструктур для аналитических и биомедицинских применений. Профессора С.Ю. Щеголев и Л.Ю. Матора, основная

тематика исследований которых посвящена комплексному изучению межклеточных и межорганизменных коммуникаций в растительно-микробных ассоциациях и модельных системах животных клеток, также разрабатывают биологические тест-системы, развивают методы иммунохимического анализа.

Выпускники-аналитики СГУ успешно работают и в других организациях Саратова и других городов, среди них можно отметить докторов наук Н.Н. Гусакову (Саратовский государственный аграрный университет), А.И. Кулапина (Министерство энергетики РФ), В.Г. Амелина (Владимирский госуниверситет), А.Л. Лобачева (ранее работал в Самарском госуниверситете), С.С. Алексенко (ГосНИИОХТ, Москва), Н.М. Макарову (Росатом, Москва). Подготовленные на кафедре СГУ кандидаты наук работают в вузах Саратова – аграрном (СГАУ), медицинском (СГМУ), техническом (СГТУ) университетах и на крупных предприятиях. На предприятии NITA-FARM, одном из лидеров по разработке и производству ветеринарной фармацевтики в России, создан лабораторно-исследовательский комплекс, оснащенный современным аналитическим оборудованием, проводится разработка и валидация методик анализа выпускаемой продукции (антибактериальные, противопаразитарные, витаминно-минеральные и другие препараты) и других объектов (корма, сточные воды, плазма крови, молоко, мясо и органы животных). Современная аналитическая лаборатория действует на инновационном биотехнологическом предприятии “Биоамид”, разрабатывающем кормовые добавки для сельского хозяйства, фармацевтические препараты, биокатализаторы для производства акриламида, L-аспарагиновой кислоты и др. веществ. На предприятиях нефтехимического профиля (ПАО “Саратовский нефтеперерабатывающий завод”, ООО “Оргсинтез”, ООО “Волгатранснефть”, РегионГазПоволжье и др.) внедрены и активно используются системы контроля, в том числе онлайн, исходного сырья, технологических процессов, продукции, выбросов. В городе успешно функционирует Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний

им. Б.А. Дубовикова, который не только оказывает услуги в области технического регулирования, стандартизации и обеспечения единства измерений, но и проводит анализ пищевых продуктов, различных вод, продукции предприятий общественного питания, смывов с объектов окружающей среды, предметов обихода. В городе работают как коммерческие испытательные лаборатории различного профиля, так и лаборатории при вузах, выполняющие хозяйственную работу: экологическая и исследовательская лаборатория (СГТУ), пищевая (СГАУ), нефтехимического и экологического профиля (СГУ).

Аналитики Саратова неоднократно организовывали международные и всероссийские конференции, в числе которых три конференции по теории и практике применения органических реагентов в анализе (1966, 1989 и 1999 гг.), российско-японский симпозиум (1996 г.), симпозиум по тест-методам анализа (2004 г.), X аналитический Российско-Германско-Украинский симпозиум (ARGUS-2007), Winter Symposium on Chemometrics (2020 г.).

В настоящий момент в Институте химии СГУ работает 10 докторов наук по специальности “Аналитическая химия”, 8 кандидатов наук, 1 PhD, обучается 12 аспирантов. Ежегодно аналитиками Саратова публикуется порядка 40 статей в журналах, в том числе первого и второго кварталей. Выполняются гранты РНФ (на настоящий момент 5 грантов), РФФИ, Минобрнауки РФ, проводится повышение квалификации для специалистов региона.

Настоящий выпуск представляет примеры исследований саратовских аналитиков в различных областях аналитической химии, включая применение наноматериалов (наночастицы магнетита, ГКР-платформы, наночастицы серебра в флуориметрии, нановолокна в тест-методах), мицеллярных сред (мицеллярная экстракция и ТСХ), а также посвященных развитию различных методов анализа (ВЭЖХ, биокаталитические методы, потенциометрические сенсоры и др.).

Редактор-составитель – Т.Ю. Русанова

УДК 543.424.2

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В БИОЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. Н. Е. Маркина^а, И. Ю. Горячева^а, А. В. Маркин^а, *^аСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Институт химии Астраханская ул., 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: av_markin@mail.ru

Поступила в редакцию 24.06.2021 г.

После доработки 30.07.2021 г.

Принята к публикации 30.07.2021 г.

Обзор посвящен анализу возможностей, ограничений и особенностей применения спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) для определения лекарственных и наркотических средств в биологических жидкостях человека (БЖЧ) (кровь, моча, слюна). Анализ литературы показал, что в большинстве работ усилия исследователей направлены на преодоление основного недостатка ГКР как метода анализа – низкой селективности, что особенно актуально в случае таких сложных объектов, как биожидкости. В связи с этим основные положительные результаты в ГКР-анализе БЖЧ на настоящий момент связаны с разработкой методик, позволяющих минимизировать уровень фонового сигнала. Методики основаны на различных вариантах сочетания ГКР с методами разделения и концентрирования, использовании пробоподготовки, а также применении хемотроники для учета фоновой составляющей аналитического сигнала. Существенный прогресс также связан с созданием мультифункциональных ГКР-активных материалов, позволяющих улучшить селективность анализа. Однако именно аналитическая часть большинства работ является наиболее слабым местом, что требует дальнейших исследований, включая проверку методик ГКР-анализа контрольными методами.

Ключевые слова: гигантское комбинационное рассеяние света, биоанализ, лекарства, наркотики, кровь, моча, слюна.

DOI: 10.31857/S0044450222080072

Лекарственные (ЛС) и наркотические (НС) средства являются основными экзогенными компонентами биожидкостей человека (БЖЧ) (кровь, моча, слюна), подлежащими количественному определению. Необходимость определения ЛС в БЖЧ обусловлена развитием персонализированной медицины, одним из инструментов которой является терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) [1, 2]. Такой мониторинг необходим для достижения эффективного лечения пациентов и одновременного сведения к минимуму побочных эффектов, возникающих при применении ЛС с узким терапевтическим окном, например противоопухолевых и противоэпилептических препаратов. Также ТЛМ проводят для некоторых антибиотиков, поскольку их нерациональное использование вызывает токсическое действие на организм пациентов и образование новых резистентных штаммов бактерий. Определение НС в БЖЧ широко используется в судебно-медицинской экспертизе и при

медицинском освидетельствовании с целью снижения количества криминальных случаев. Идентификация конкретного НС и его определение необходимы для проведения адекватного лечения и спасения жизни пациентов, пострадавших от передозировки неизвестным НС.

Определение ЛС и НС в БЖЧ является трудной задачей из-за сложного состава последних. Кроме того, концентрации основных компонентов БЖЧ (белки, мочевины, креатинин, мочевая кислота и др.) на порядок и более превышают содержание ЛС и НС, что приводит к низким соотношениям сигнал/шум. Помимо этого ЛС и НС могут связываться с белками и липидами БЖЧ, что дополнительно снижает концентрацию свободных молекул аналитов в пробах.

В настоящее время хромато-масс-спектрометрия является стандартным методом определения различных ЛС и НС в БЖЧ [3, 4]. Тем не менее высокая стоимость, трудоемкость, необходимость тщательной пробоподготовки и возмож-

ность работы только в стационарном варианте не позволяют широко использовать этот метод в экспресс-анализе и ТЛМ. Для обеспечения возможности экспресс-контроля в условиях лечебных учреждений активно разрабатывают портативные и экономичные системы. На сегодня такие системы чаще всего основаны на иммунохимических методах анализа и тест-методах на их основе [4, 5]. Главными преимуществами этих методов являются простота реализации, доступность портативных ридеров и высокая скорость анализа, что позволяет быстро определять концентрации аналитов на месте. В то же время необходимость разработки иммунореагентов для каждого конкретного аналита и зависимость селективности анализа от аффинности антител несколько ограничивают гибкость иммунохимических методов. Разработка и внедрение новых методов (био)химического экспрессного анализа все еще является актуальной задачей аналитической химии.

В качестве альтернативного метода определения ЛС и НС в БЖЧ все чаще предлагается спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) [6–8]. Спектроскопия ГКР основана на усилении интенсивности спектров комбинационного рассеяния (КР) молекул, находящихся вблизи металлических плазмонных наноструктур (ГКР-подложек), таких как металлические наночастицы (НЧ) и различные наноструктурированные материалы на их основе. Для изготовления ГКР-подложек чаще всего используют серебро и золото благодаря их высокой химической стабильности и возможности генерации поверхностного плазмонного резонанса в видимой области спектра [9].

Цель настоящего обзора – критический анализ публикаций, посвященных ГКР-определению ЛС и НС в БЖЧ, с целью оценки возможностей и ограничений спектроскопии ГКР. Для наиболее реального отражения уровня развития ГКР-методик для целей ТЛМ и наркоконтроля в обзоре проанализированы работы, посвященные ГКР-определению ЛС и НС в образцах реальных БЖЧ. Особое внимание в обзоре уделено анализу подходов, используемых для снижения влияния матричных эффектов БЖЧ.

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В БИОЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА

Сравнение спектроскопии ГКР с другими методами анализа биожидкостей. Преимущества спектроскопии ГКР становятся очевидными при сравнении ее со стандартными методами опреде-

ления ЛС и НС в БЖЧ. Аналогично хромато-масс-спектрометрии ГКР позволяет идентифицировать неизвестные аналиты, поскольку колебательные спектры содержат информацию о структуре определяемых молекул. Однако пробоподготовка образцов БЖЧ перед ГКР-анализом в основном проще. Также в настоящее время доступны портативные, относительно недорогие и простые в использовании КР-спектрометры, пригодные для проведения экспрессного анализа неспециалистами в условиях лечебных учреждений [6].

В отличие от иммунохимических методов, ГКР-анализ требует большего числа манипуляций, но без необходимости создания молекул-рецепторов для каждого аналита в отдельности. Более того, иммунореагенты имеют ограниченные сроки хранения, их создание требует времени и значительных финансовых затрат, что ограничивает возможности иммунохимических подходов в условиях быстрого внедрения большого числа новых структурно-родственных ЛС и НС. При проведении ГКР-анализа значительно легче устанавливать ложноположительные результаты, вызванные присутствием компонентов БЖЧ или нецелевых ЛС и НС благодаря различию профилей ГКР-спектров целевого аналита и мешающих соединений. Таким образом, по сравнению с иммунохимическим анализом спектроскопия ГКР является более универсальным инструментом, который можно адаптировать для определения различных веществ в разнообразных объектах с минимальными модификациями базовых реагентов (ГКР-подложек) и методик анализа.

Как и в случае других методов анализа, наибольшее негативное влияние на точность ГКР-определения ЛС и НС оказывает сложный состав БЖЧ. Так, присутствие внутренних компонентов БЖЧ может сильно влиять на ГКР-сигнал аналита, поскольку происходит усиление КР-сигнала любых молекул, находящихся вблизи ГКР-подложки [10]. Таким образом, затруднено ГКР-определение молекул аналита, которые слабее взаимодействуют с ГКР-подложкой по сравнению с компонентами БЖЧ и/или имеют слабый ГКР-сигнал.

Важно отметить, что в настоящее время активно ведутся работы по стандартизации метода ГКР, что в будущем позволит добиться его признания наравне с другими методами анализа [11, 12]. Например, проведена оценка межлабораторной воспроизводимости нескольких модельных методик ГКР-измерений в 15 разных лабораториях Европы, оснащенных КР-спектрометрами различных производителей (6 производителей) [11]. Результаты этого исследования показали, что относительное стандартное отклонение результатов измерений составило 12–13%, что является многообещающим, учитывая, что использовали различные спектрометры с различными па-

раметрами настройки и сбора данных (мощность лазера, время накопления сигнала и т.д.).

Как и любой метод анализа, спектроскопия ГКР имеет ряд особенностей, которые могут как положительно, так и отрицательно влиять на результаты ГКР-анализа и должны учитываться и контролироваться при разработке новых методик определения аналитов в БЖЧ. Так, интенсивность ГКР-сигнала существенно зависит от экспериментальных условий (ионная сила, pH, длина волны и мощность возбуждающего излучения), а также от особенностей оптической системы прибора [13–15]. Для устранения проблем, связанных с воспроизводимостью ГКР-сигнала, предложено использование внутренних стандартов. Подход основан на нормировании интенсивности ГКР-сигнала аналита на интенсивность сигнала реагента, специально добавленного к анализируемой смеси и обладающего относительно интенсивным сигналом, при условии, что его спектр не перекрывается со спектром аналита [16–18].

Влияние величины pH на ГКР-сигнал. Следует отметить важность контроля уровня pH анализируемого раствора при измерении ГКР-спектров. Во-первых, pH среды определяет коллоидную и/или химическую стабильность ГКР-подложек на основе коллоидных растворов металлических наночастиц. Во-вторых, изменение величины pH значительно изменяет профиль и интенсивность ГКР-спектров молекул, поскольку (де)протонирование молекул приводит к изменению их поляризуемости (и, как следствие, интенсивности КР-сигнала), механизма адсорбции на поверхности ГКР-подложек и механизма усиления сигнала. Так, изменение pH может привести к значительному снижению интенсивности фонового ГКР-сигнала; например, креатинин и мочевая кислота имеют очень слабый ГКР-сигнал в кислой среде [19]. В-третьих, значение pH и буферная емкость БЖЧ могут варьироваться от образца к образцу, поэтому их следует учитывать при разработке методик анализа. Таким образом, контроль и корректировка величины pH позволяют управлять воспроизводимостью и интенсивностью ГКР-сигнала при разработке новой методики анализа.

Влияние длины волны возбуждающего излучения на интенсивность ГКР-сигнала. Другой особенностью ГКР-анализа является необходимость выбора оптимальной длины волны возбуждающего лазера. Этот параметр может влиять на результаты ГКР-измерений несколькими способами. Во-первых, длина волны лазера должна попадать в область длин волн, соответствующих поверхностному плазмонному резонансу материала ГКР-подложки. Например, для получения ГКР-спектров с использованием ГКР-подложек на основе меди длина волны возбуждающего лазера должна быть более 600 нм [20]. Во-вторых, при попадании длины волны лазера в диапазон

электронных переходов аналита реализуется резонансное ГКР, которое имеет большую интенсивность сигнала. Резонансное ГКР придает также дополнительную селективность по отношению к аналитам, для которых возможна реализация данного эффекта. Это можно наблюдать в случае некоторых ЛС, которые поглощают свет в видимой области спектра (например, доксорубин [21], митоксантрон [22]). Однако некоторые компоненты БЖЧ (например, каротиноиды и метаболиты гемоглобина) также поглощают свет в видимой области спектра, тем самым увеличивая фоновый ГКР-сигнал за счет реализации резонансного ГКР. В-третьих, лазерное излучение может вызвать появление интенсивного сигнала флуоресценции, обусловленного наличием эндогенных флуорофоров БЖЧ. Для снижения интенсивности флуоресценции и ее влияния на ГКР-сигнал используют лазеры с максимально большой длиной волны излучения (>600 нм).

ВИДЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Анализ публикаций показал, что методики ГКР-определения ЛС и НС в БЖЧ разработаны для большого числа соединений, разнообразных по структуре (рис. 1). Наибольшее количество публикаций посвящено определению противоопухолевых ЛС [18, 22–34] (рис. 1а). Метод спектроскопии ГКР применяли также для определения представителей различных классов антибиотиков: цефалоспоринов [17, 35, 36], фторхинолонов [37, 38], пенициллинов [39], сульфаниламидов [19] и других природных [40] и синтетических [41] антибиотиков. Помимо противоопухолевых и антибактериальных ЛС, разработаны методики ГКР-определения представителей противоэпилептических [42–46], противопаркинсонических [47, 48], противогрибковых [49] и антигистаминных [50] ЛС, а также нейрорепараторов [16] и бета-адреномиметиков [51]. Представлены методики ГКР-определения следующих НС в БЖЧ: наиболее распространенных опиоидных наркотических анальгетиков [42, 44, 52–54], природных [43, 44, 55–60] и синтетических [43, 44, 61] НС, а также психостимуляторов [44, 62–67] (рис. 1б).

Важно отметить, что в некоторых публикациях разработаны методики определения нескольких представителей различных групп ЛС и НС разной химической природы [33, 42–44, 54]. Наибольшую универсальность, т.е. возможность одновременного определения более четырех разнородных НС и ЛС, продемонстрировали методики, основанные на сочетании ГКР с ВЭЖХ [42] и твердофазной экстракцией [43, 44].

Актуальным направлением является разработка методик ГКР-анализа с учетом структурной родственности аналитов. Так, имеются работы по определению в БЖЧ нескольких представителей цефалоспориновых антибиотиков [17, 36], бензо-

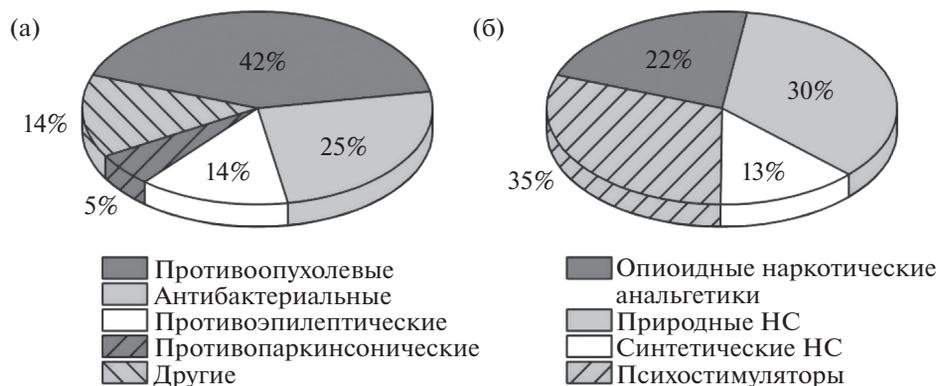


Рис. 1. Основные виды лекарственных (а) и наркотических (б) средств, которые определяли в биожидкостях человека с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния.

диазепинов [45, 46], психостимуляторов [66] и природных НС [55]. Однако в большинстве опубликованных исследований представлены методики, которые разработаны и протестированы с использованием только одного аналита (табл. 1). Трудности разработки универсальных методик определения даже представителей ЛС и НС одного класса связаны с тем, что изменение функциональных групп молекул аналита может значительно изменить их ориентацию и степень адсорбции на поверхности ГКР-подложки. Такие изменения, в свою очередь, часто влияют на интенсивность и профиль ГКР-спектра, приводя к необходимости корректировки методики пробоподготовки для каждого конкретного аналита. Дополнительно отметим, что пока нет работ по одновременному ГКР-определению нескольких ЛС или НС в БЖЧ. Таким образом, актуальным направлением является повышение универсальности и мультиплексности методик ГКР-анализа с учетом природы и класса ЛС или НС, а также вида БЖЧ.

ВИДЫ БИОЖИДКОСТЕЙ

Наибольшее количество методик ГКР-определения ЛС и НС разработано для образцов мочи (примерно половина работ, рис. 2). Такая популярность данной БЖЧ обусловлена простотой и неинвазивностью ее сбора. Однако важно отметить, что разработка методик определения ЛС именно в крови (плазме или сыворотке) является наиболее актуальной задачей ТЛМ (рис. 2а), поскольку терапевтический эффект конкретного ЛС напрямую зависит от его концентрации именно в крови пациента. Для определения НС популярными БЖЧ являются моча и слюна, пригодные для неинвазивного и оперативного скрининга потребления НС (рис. 2б).

Несмотря на достаточно большое число публикаций, посвященных работе с образцами реальных БЖЧ (табл. 1), лишь в двух работах [42, 54] предложены достаточно универсальные методики ГКР-анализа, пригодные для определения НС в различных БЖЧ. Так, авторы показали возможность регистрации ГКР-спектров нескольких НС в моче и в крови [42], а также в слюне [54]. Значительная часть работ, приведенных в табл. 1, имеет существенные методологические недостатки, снижающие ценность полученных результатов. Так, примерно в 20% работ образцы БЖЧ разбавляли чистой водой или буферным раствором перед введением добавки аналита. Использование такого приема свидетельствует о недостаточной селективности предложенных методик при высокой концентрации внутренних компонентов БЖЧ.

Более чем в половине работ анализировали только один образец БЖЧ, либо данные о количестве использованных образцов отсутствовали (табл. 1). Это ставит под сомнение полученные результаты, поскольку в этих случаях не учитывалась вариативность состава БЖЧ, например, от человека к человеку или в зависимости от времени сбора образцов.

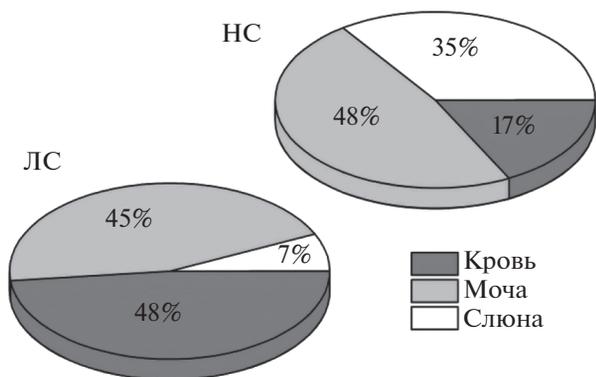


Рис. 2. Распределение разработанных методик ГКР-определения лекарственных и наркотических средств по типам объектов анализа.

Таблица 1. Примеры методик ГР-определения лекарственных средств в биожидкостях человека, сгруппированные по подходам и методам, использованным для улучшения точности анализа

Подходы и методы	БЖЧ (количество образцов)	Аналит	ГР-подложка (λ_{ex} , нм)	ПрО, мкМ (наличие ГГ)	Литература	
Математическая обработка результатов анализа (применение хемометрики)	ГР-определение ЛС и НС в БЖЧ без использования методов разделения и концентрирования					
	Разбавленная плазма крови (1)	Паклитаксел	Полистирольные микрочастицы с золотым покрытием (785)	0.004 (+)	[25]	
	Разбавленная сыворотка крови (н.д.)	Метотрексат	Фильтровальная бумага, покрытая НЧ золота (785)	– (+)	[27]	
	Плазма крови (6*)	Имагиниб	Кремниевая подложка с серебряным покрытием (785**)	0.43 (+)	[30]	
	Моча (3)	Моксифлоксацин	Кремниевая подложка с золотым покрытием (785)	65 (+)	[37]	
	Разбавленная моча (9)	Левифлоксацин	Гидроксиламиновые НЧ серебра в микрофлюидной системе (532**)	– (+)	[38]	
	Плазма крови (1)	Кодеин	Цитратные НЧ серебра (633**)	1.39 (+)	[52]	
	Слюна (1)	Кокаин	Покрывание из наноразмерных дендритов серебра (633)	– (–)	[57]	
	Моча (50*)	Метамфетамин	Золотые наностержни, стабилизированные ЦТАБ (785**)	– (–)	[63]	
	Плазма крови (н.д.)	Доксорубин	Покрывание из золота, модифицированное самособирающимся монослоем поликарбоксибетаина (785)	– (+)	[28]	
Модификация поверхности ГР-подложек	Плазма крови (10)	Эрлотиниб	НЧ золота, покрытые модификатором с азидной группой (785)	– (+)	[32]	
	Сыворотка крови (н.д.)	Паклитаксел, циклофосфамид	Покрывание из золотых нанозвезд, модифицированных самособирающимся монослоем L-цистеина (785)	– (+)	[33]	
	Моча (7)	Цефтриаксон	Цитратные НЧ меди (638**)	13 (+)	[17]	
		Цефазолин		19 (+)		
		Цефоперазон		56 (+)		
	Сыворотка крови (н.д.)	Митоксантрон	Цитратные НЧ серебра в проточной системе (633)	4×10^{-5} (+)	[22]	
	Слюна (н.д.)	5-Фторурацил	Покрывание из НЧ серебра внутри стеклянного капилляра (785)	1.15 (+)	[24]	
	Цельная кровь (1)	6-Меркаптопурин	Игла, модифицированная наноструктурами ядро-оболочка на основе золота (785)	– (–)	[26]	
	Простая пробоподготовка	Моча (7)	Цефтриаксон	Цитратные НЧ меди (638**)	13 (+)	[17]
			Цефазолин		19 (+)	
Цефоперазон			56 (+)			
Сыворотка крови (н.д.)	Митоксантрон	Цитратные НЧ серебра в проточной системе (633)	4×10^{-5} (+)	[22]		
Слюна (н.д.)	5-Фторурацил	Покрывание из НЧ серебра внутри стеклянного капилляра (785)	1.15 (+)	[24]		
Цельная кровь (1)	6-Меркаптопурин	Игла, модифицированная наноструктурами ядро-оболочка на основе золота (785)	– (–)	[26]		

Таблица 1. Продолжение

Подходы и методы	БЖЧ (количество образцов)	Аналит	ГКР-подложка (λ_{ex} , нм)	ПрО, мкМ (наличие ГГ)	Лите- ратура	
Простая пробоподготовка	Разбавленная сыворотка крови (н.д.)	6-Тиогуанин	Цитратные НЧ золота в микрофлюид- ной системе (638)	0.66 (+)	[34]	
	Моча (6*)	Берберин	Цитратные НЧ серебра (633)	0.0016 (+)	[40]	
	Разбавленная моча (10)	Нитроколин	Гидроксиламиновые НЧ серебра в микрофлюидной системе (532)	3.43 (+)	[41]	
	Плазма крови (15*)	Допамин	Покрывтие из НЧ серебра на оптически прозрачной токопроводящей подложке (633**)	- (+)	[48]	
	Моча (7*)	Цетиризин	Цитратные НЧ серебра (785)	0.013 (+)	[50]	
	Разбавленная слона (1)	Метамфетамин	Цитратные НЧ серебра в микрофлюид- ной системе (633)	- (-)	[62]	
	Моча (1)	Метамфетамин, амфета- мин	Кремниевая подложка с серебряным покрытием (785**)	- (-)	[66]	
	ГКР-определение ЛС и НС в БЖЧ с привлечением методов разделения и концентрирования					
	ВЭЖХ	Моча (4*)	Метотрексат	Цитратные НЧ серебра (785**)	2.36 (+)	[29]
		7-гидроксиметотрексат		1.84 (+)		
		2,4-диамино-N(10)- метилптериновая кислота		3.26 (+)		
ТСХ	Моча (2*), кровь (1*)	Дигидрокодеин, кодеин, доксепин, циталопрам, карбамазепин, метадон	Пластиковая подложка с серебряным покрытием (514)	- (-)	[42]	
	Моча (1)	Клозапин	Цитратные НЧ серебра (785**)	0.3 (+)	[16]	
		N-десметилклозапин		- (-)		
		Клозапин N-оксид		- (-)		
	Плазма крови (1)	Апоморфин	Цитратные НЧ серебра (785)	- (-)	[47]	
	Моча (3*)	Котинин	Цитратные НЧ серебра (647)	0.01 (+)	[55]	
Электрофорез		Гидрококсикотинин		0.2 (+)		
	Плазма крови (н.д.)	Кокаин	Цитратные НЧ золота (785)	0.033 (+)	[58]	
	Моча (1*)	Тетрагидроканнабинол	Цитратные НЧ золота (785**)	- (-)	[59]	
	Слона (2*)	Параксантин	Серебряный электрод с покрытием из НЧ серебра (1064)	- (-)	[67]	

Таблица 1. Продолжение

Подходы и методы	БЖЧ (количество образцов)	Аналит	ГКР-подложка (λ_{ex} , нм)	ПрО, мкМ (наличие ГГ)	Лите- рагура
ЖЖЭ	Моча (13)	Сульфаметоксазол	Гидроксиламиновые НЧ серебра (488)	6.7 (+)	[19]
	Моча (1)	Флунирацепам, диазепам, нордиазепам	Цитратные НЧ золота (785)	0.006–0.037 (+)	[45]
	Моча (н.д.)	7-аминофлунирацепам	Цитратные НЧ золота (785)	0.031 (+)	[46]
		Алпразолам	3.56 (+)		
		Хлордиазепоксид	4.68 (+)		
		Клоназепам	2.82 (+)		
		Диазепам	0.019 (+)		
		Флунирацепам	0.128 (+)		
		Лоразепам	4.67 (+)		
		Мидазолам	33.8 (+)		
		Нордиазепам	1.551 (+)		
		Оксазепан	0.837 (+)		
	Триазолам	20.4 (+)			
	Моча (15*)	Кленбутерол	Композит НЧ золота с оксидом графена (785**)	0.0018 (+)	[51]
	Разбавленная моча (5*)	Морфин	Золотые наностержни, стабилизированные ЦТАБ (785**)	– (–)	[53]
Разбавленная моча (1)	Кокаин	НЧ золота, стабилизированные ЦТАБ (785**)	– (–)	[56]	
Слона (н.д.)	Кокаин	Планарные коммерческие ГКР-подложки (785)	– (–)	[60]	
Моча (30)	Метамфетамин	Золотые наностержни, стабилизированные ЦТАБ (785**)	– (–)	[64]	
Моча (6)	Метамфетамин	Эмульсия масло-в-воде с НЧ серебра (532)	– (–)	[65]	

Таблица 1. Окончание

Подходы и методы	БЖЧ (количество образцов)	Аналит	ГКР-подложка (λ_{ex} , нм)	ПрО, мкМ (наличие ГГ)	Литература	
ТФЭ	Моча (11)	Метотрексат	Порошок оксида алюминия со встроеными НЧ серебра (532**)	9.3 (+)	[18]	
	Слюна (н.д.)	5-Фторурацил	Силикатный золь-гель материал со встроеными НЧ серебра (785)	15.4 (-)	[23]	
	Сыворотка крови (1)	6-Тиогуанин	Альгинатные микрокапсулы со встроеными НЧ золота (638)	- (-)	[31]	
	Плазма крови (н.д.)	Клоксациллин	Кремниевая подложка с золотым покрытием (780)	- (-)	[39]	
	Слюна (н.д.)	Кокаин, фенциклдин, диазепам, парацетамол	Силикатный золь-гель материал со встроеными НЧ золота (785)	- (-)	[43]	
	Слюна (н.д.)	Кокаин, амфетамин, диазепам, метадон, фенциклдин	Силикатный золь-гель материал со встроеными НЧ золота (785)	- (-)	[44]	
	Разбавленная слюна (1)	Синтетический каннабиноид	Цитратные НЧ золота (785)	0.077 (+)	[61]	
	Моча (5)	Цефтриаксон	Гидроксиламиновые НЧ серебра (473)	0.7 (+)	[35]	
	Моча (5)		Цефазолин	Гидроксиламиновые НЧ серебра (638**)	12.8 (+)	[36]
			Цефоперазон		21.1 (+)	
Цефотаксим			22.6 (+)			
Цефтриаксон			50.3 (+)			
Сыворотка крови (1)	Цефуросим	Нитроцеллолозные мембраны с наносенными НЧ серебра (785#)	199.8 (+)			
Слюна (1), плазма крови (1), кровь (1)		Флуцитозин	Нитроцеллолозные мембраны с наносенными НЧ серебра (785#)	- (+)	[49]	
		Кодеин, фентанил	Тест-полоска с ГКР-активной областью из НЧ золота (785**)	- (-)	[54]	

* Использование клинических образцов биожидкостей; ** использование поргитивного спектрометра КР.

Обозначения: БЖЧ – биологическая жидкость человека; ПрО – предел обнаружения; λ_{ex} – длина волны лазерного излучения, использованного для генерации ГКР-сигнала; ГГ – градуировочный график; ЛС – лекарственные средства; НС – наркотические средства; н.д. – нет данных; ТСХ – тонкослойная хроматография; ЖЖЭ – жидкостно-жидкостная экстракция; ТФЭ – твердофазная экстракция; НТФЭ – неударживающая твердофазная экстракция; ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид.

Тем не менее примеры корректных методик ГКР-определения ЛС и НС (в том числе с учетом вариативности состава БЖЧ) [17–19, 29, 30, 35–37, 40, 50, 51, 55] показывают принципиальную возможность нивелирования отрицательного влияния сложного состава БЖЧ на точность ГКР-анализа. Для достижения максимального контроля над ГКР-сигналом при анализе БЖЧ требуется дополнительное изучение взаимодействий металлической ГКР-активной поверхности или аналита с компонентами БЖЧ и их влияния на ГКР-сигнал.

ПОДЛОЖКИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Эффект ГКР реализуется только при адсорбции молекул аналита на поверхности ГКР-подложки. Рассмотрим виды подложек, применяемых для определения ЛС и НС в БЖЧ, их преимущества и ограничения. Вопросам создания и изучения ГКР-подложек посвящено большое число оригинальных и обзорных статей [9, 68], поэтому в данном разделе рассмотрим лишь самые общие моменты, а некоторые важные и интересные примеры будут рассмотрены ниже.

ГКР-подложки, применяемые для регистрации спектров ЛС и НС в БЖЧ, можно условно разделить на три группы: коллоидные НЧ, планарные подложки и мультифункциональные композиты (табл. 1). Примерно в половине работ для ГКР-анализа использовали коллоидные НЧ металлов, и из них наиболее популярными оказались НЧ, стабилизированные цитрат-ионами, что обусловлено простотой и воспроизводимостью их синтеза. В качестве других стабилизаторов использовали гидроксилламин и ЦТАБ, причем важным преимуществом последнего стабилизатора является возможность его использования при ГКР-определении гидрофобных соединений, например морфина [53].

Планарные ГКР-подложки использовали примерно в трети работ, и их главным элементом является наноструктурированная ГКР-активная поверхность. Такие подложки получают либо огрублением металлической поверхности до получения наноразмерной шероховатости, либо нанесением ГКР-активного слоя на какую-либо поддерживающую матрицу. Поддерживающую матрицу также иногда используют для задания и/или дополнительного контроля морфологии поверхности конечной ГКР-подложки. Наиболее распространенными вариантами получения планарных ГКР-подложек являются нанесение заранее синтезированных коллоидных НЧ на твердую основу [27, 33, 49, 54], электрохимическая обработка токопроводящей поверхности [48, 57] и физическое нанесение ГКР-активного слоя из вакуума на подложки из кремния или других материалов [25, 37, 39, 60]. Важно, что в случае

электрохимического и вакуумного нанесения получают ГКР-активный слой без использования дополнительных стабилизирующих агентов, которые могут формировать фоновый ГКР-сигнал.

Мультифункциональные композитные ГКР-подложки используют реже, их главным отличием от двух предыдущих типов подложек является наличие дополнительного компонента, служащего для значительного улучшения результатов анализа. Например, композитными ГКР-подложками являются ГКР-активные сорбенты, состоящие из (не)органических сорбентов со встроенными металлическими НЧ. Матрица сорбента придает подложке большую сорбционную емкость, а в некоторых случаях дополнительно отделяет молекулы аналита от компонентов БЖЧ.

В качестве материала ГКР-активных участков всех типов подложек в равной степени используют золото и серебро. Наночастицы меди при ГКР-определении ЛС в БЖЧ использовали только в одной работе [17]. Важно отметить, что в данной работе НЧ меди продемонстрировали эффективность усиления КР-спектров некоторых цефалоспориновых антибиотиков, сравнимую с таковой для НЧ на основе серебра и золота. Также, несмотря на низкую стабильность медных НЧ во времени (окисление и потеря усиливающих свойств происходит в течение получаса), авторы показали, что использование свежеприготовленных НЧ меди позволяет достичь воспроизводимого ГКР-сигнала.

Однако, несмотря на высокий уровень развития подходов, связанных с получением и изучением ГКР-подложек, создание “универсальной” подложки для определения ЛС и НС в БЖЧ невозможно. Это связано со значительным различием степени взаимодействия разных аналитов с ГКР-подложками различного состава, что напрямую сказывается на интенсивности и воспроизводимости аналитического сигнала и на вероятности возникновения конкурентных взаимодействий с мешающими компонентами. В связи с этим перспективным направлением является разработка базовых ГКР-подложек, ориентированных на отдельные типы БЖЧ (с учетом присутствия основных мешающих веществ) и группы аналитов (с учетом особенностей их строения). В этом случае главной задачей является достижение компромиссной универсальности, способствующей определению аналитов внутри группы при минимальной корректировке базовой методики.

Другой проблемой, связанной с ГКР-подложками, является отсутствие стандартизации при оценке их аналитических характеристик. Так, на настоящий момент отсутствуют готовые методики, позволяющие объективно сравнивать аналитическую эффективность различных ГКР-подложек. Об отсутствии единого мнения относительно того, какие подложки работают лучше, также

свидетельствует большое разнообразие использованных подложек (табл. 1). Таким образом, разработка и апробация методик анализа с использованием доступных, стандартизированных и недорогих ГКР-подложек и сегодня является актуальной задачей для обеспечения возможности применения ГКР вне исследовательских лабораторий.

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В БИОЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ РАЗДЕЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ

Для достижения максимальной эффективности ГКР при определении ЛС и НС в БЖЧ предложено использование различных подходов, в основном нацеленных на увеличение селективности анализа путем уменьшения влияния мешающих компонентов (эндо- и экзогенных компонентов БЖЧ) на аналитический сигнал. В данном обзоре все методики ГКР-анализа условно разделены на две группы: без и с разделением молекул аналита и мешающих компонентов перед ГКР-определением.

Ниже рассмотрим методики без предварительного отделения аналитов, основанные на использовании: (i) обработки аналитического сигнала с помощью многомерного анализа данных (хеометрики) для снижения влияния фонового сигнала на результаты анализа; (ii) простых способов пробоподготовки (например, изменение рН и разбавление), которые изменяют силу взаимодействия ГКР-подложек с молекулами аналита и/или мешающими компонентами; (iii) модификации поверхности ГКР-подложек молекулами-модификаторами, изменяющими взаимодействие между подложкой и аналитом, а также примесями.

Обработка результатов ГКР-измерений методами хеометрики. Использование подходов хеометрики для учета фонового сигнала и нивелирования его влияния на точность результатов ГКР-анализа БЖЧ – весьма популярное направление [25, 27, 30, 37, 38, 52, 57, 63]. Повышение точности и селективности анализа в таком случае достигается за счет, во-первых, предварительной обработки зарегистрированных ГКР-спектров и удаления вкладов рэлеевского рассеяния и флуоресценции, а также спектральных артефактов и промахов и, во-вторых, использования в качестве аналитического сигнала всего профиля ГКР-спектра аналита вместо какого-либо единичного пика. Одним из преимуществ применения хеометрики является возможность упрощения или даже исключения тщательной пробоподготовки образцов, ограничиваясь, например, только разбавлением образцов и/или удалением белков [30, 52, 57]. Эффективность использования хеомет-

рики подтверждена в некоторых работах путем валидации построенной математической модели контрольными методами с использованием клинических образцов [30, 63]. Однако данный подход имеет ограниченную применимость (вплоть до его полной непригодности) в случаях слабого собственного ГКР-сигнала аналита, или когда мешающие компоненты БЖЧ подавляют взаимодействие аналита с ГКР-подложкой, что может привести к полному исчезновению аналитического сигнала и необходимости использования дополнительной пробоподготовки.

Модификация поверхности ГКР-подложек. Модифицирование ГКР-активных поверхностей молекулами, улучшающими селективность ГКР-анализа, предложено для отделения целевых аналитов от компонентов БЖЧ. Например, для предотвращения блокировки ГКР-активной поверхности белками плазмы использовали модифицирование поверхности ГКР-подложки самособирающимся монослоем цвиттер-ионного ПАВ [28]. Разработанную подложку интегрировали в проточную систему, что позволило определять концентрацию доксорубина в плазме крови без пробоподготовки и максимально автоматизированно. Аналогичный подход использовали для определения противоопухолевых ЛС в сыворотке крови [33]. При этом поверхность ГКР-подложки покрывали самособирающимся монослоем аминокислоты (L-цистеином), что позволило уменьшить степень сорбции белка на модифицированной подложке примерно на 80%.

Другим направлением является модификация поверхности ГКР-подложки молекулами, которые вступают с аналитом в химическую реакцию, приводящую либо к образованию продукта с интенсивным ГКР-сигналом [32, 69], либо к снижению ГКР-сигнала исходной молекулы-модификатора (КР-маркера) [70]. Например, разработана методика конкурентного формата определения противоопухолевого препарата эрлотиниба в плазме крови [32], основанная на химической реакции между азидной группой модификатора ГКР-подложки и алкильной группой аналита или конкурирующего КР-маркера. Несмотря на трудоемкость и длительность (время анализа достигает одного часа), предложенный авторами подход позволяет проводить ГКР-определение веществ, не обладающих собственным интенсивным ГКР-сигналом.

Несмотря на перспективность применения разнообразных селективных модификаторов (аптамеры, циклодекстрины, пептиды, полимеры с молекулярными отпечатками и др.), возможность их использования в ГКР-определении ЛС и НС в реальных БЖЧ пока не изучена. Тем не менее предложена методика ГКР-определения биомаркера опухолевого роста (ацетил амантадин) в искусственной моче с применением ГКР-подложки, поверхность которой модифицирована молекулами

β -циклодекстринов [71]. Супрамолекулярные взаимодействия позволяют также контролировать ориентацию молекул аналитов по отношению к поверхности ГКР-подложки [72]. Данная особенность имеет важное значение, поскольку известно, что помимо прочего ГКР-сигнал зависит от ориентации молекул относительно электромагнитных полей, возникающих при генерации поверхностного плазмонного резонанса.

Применение простой пробоподготовки. Большинство работ по ГКР-определению ЛС и НС в БЖЧ основано на простом смешивании образца БЖЧ с ГКР-подложкой [17, 22, 24, 26, 34, 40, 41, 48, 50, 62, 66]. Однако при этом молекулы аналитов должны обладать большей аффинностью к поверхности ГКР-подложки или более интенсивным ГКР-сигналом по сравнению с молекулами компонентов БЖЧ. Для дополнительного повышения точности результатов в таких методиках часто используют простые этапы пробоподготовки БЖЧ, такие как разбавление образца [17, 40], корректировку его pH [66], а также (ультра)фильтрацию для удаления белков и клеточных компонентов БЖЧ (особенно в случаях плазмы и сыворотки крови) [34, 40, 41, 50, 62].

Анализ литературы показал, что в качестве ГКР-подложек в большинстве работ с простой пробоподготовкой используют коллоидные НЧ (табл. 1). Кроме того, в качестве ГКР-подложек предложены инъекционные иглы [26] и стеклянные капилляры [24] для забора крови с нанесенным ГКР-активным слоем, что позволяет уменьшить объем используемой БЖЧ и совместить процедуру отбора проб БЖЧ и ГКР-определение аналита. Например, продемонстрирована возможность *in vivo* определения 6-меркаптопурина в цельной крови путем введения ГКР-активной иглы в ушную вену кролика [26].

Важно отметить, что при использовании коллоидных НЧ в качестве ГКР-подложек часто необходима их искусственная агрегация для дополнительного усиления ГКР-сигнала [73]. Однако процесс агрегации является динамическим, что может снижать воспроизводимость результатов ГКР-анализа. Более того, некоторые аналиты и компоненты БЖЧ (в первую очередь, неорганические соли) также могут способствовать агрегации НЧ. Особенно ярко эта проблема может проявляться при анализе мочи из-за ее переменчивого состава. Популярным подходом к улучшению контроля над агрегацией и повышению воспроизводимости ГКР-сигнала является использование проточных (в том числе микрофлюидных) систем. Данные системы обеспечивают хорошо контролируемую и автоматизированную агрегацию коллоидных НЧ и/или корректировку уровня pH образцов [22, 34, 41, 62]. Тем не менее использование микрофлюидных систем не позволяет уменьшить фоновый ГКР-сигнал или отделить молекулы аналита от компонентов БЖЧ, а также требует

применения довольно сложного и дорогостоящего оборудования.

Важным, но недооцененным этапом разработки методик ГКР-определения ЛС и НС в БЖЧ, основанных на простом смешивании образца БЖЧ и ГКР-подложки, является исследование влияния отдельных компонентов БЖЧ и их смесей на ГКР-сигнал аналита. Указанный этап позволяет выявить конкретные вещества, приводящие к увеличению фонового ГКР-сигнала или уменьшению сигнала целевого аналита. Например, в работе, посвященной определению цефалоспориновых антибиотиков в моче [17], показано, что даже патологически высокие концентрации некоторых внутренних компонентов мочи могут лишь незначительно влиять на интенсивность ГКР-сигнала аналитов. Это продемонстрировано с использованием пятикратного искусственного увеличения содержания мочевины, креатинина, глюкозы или белков относительно нормальных значений. Однако увеличение ионной силы мочи за счет добавления смеси солей, обычно входящих в ее состав, привело к снижению интенсивности ГКР-сигнала антибиотиков. Также установлено, что одновременное превышение концентрации перечисленных органических и неорганических компонентов в моче влияет на ГКР-сигнал так же, как и увеличение только ионной силы. Таким образом, авторы показали, что неорганические компоненты БЖЧ и создаваемая ими ионная сила могут значительно сильнее влиять на точность ГКР-анализа по сравнению с более КР-активными компонентами БЖЧ, такими как органические молекулы. В другой работе, посвященной определению 6-тиогуанина в сыворотке крови, авторы предварительно проверили влияние некоторых компонентов сыворотки (белок, основные анионы и катионы, а также некоторые серосодержащие аминокислоты) на ГКР-сигнал аналита [34]. Результаты показали, что для уменьшения негативного влияния аминокислот на ГКР-сигнал 6-тиогуанина достаточно откорректировать pH до значения 8, а для устранения влияния белков провести ультрафильтрацию образцов сыворотки крови. Таким образом, селективность разработанных ГКР-методик по отношению к определенному аналиту по сравнению с основными компонентами БЖЧ изучена и подтверждена лишь в нескольких работах.

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В БИОЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА С ПРИВЛЕЧЕНИЕМ МЕТОДОВ РАЗДЕЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Спектроскопия ГКР предложена в качестве метода детектирования при разделении

методом ВЭЖХ. Однако такое сочетание методов требует больших затрат труда и времени, поскольку замена УФ- или масс-селективного детектирования на ГКР не исключает необходимости тщательной пробоподготовки образцов БЖЧ перед разделением. Особое внимание при этом следует уделять выбору подвижной фазы, поскольку некоторые растворители (например, ацетонитрил) могут конкурировать с аналитом за сорбционные центры на поверхности ГКР-подложки, что приводит к подавлению ГКР-сигнала аналита или возникновению интенсивного фонового сигнала. Помимо этого, состав подвижной фазы может влиять на растворимость аналита, что приводит к уменьшению его сродства к ГКР-подложке. Наконец, подвижная фаза может влиять на коллоидную стабильность некоторых ГКР-подложек, снижая воспроизводимость результатов анализа.

Несмотря на перечисленные ограничения, немногочисленные работы по разработке методик ВЭЖХ-ГКР-определения ЛС и НС в БЖЧ [29, 42] четко демонстрируют возможность эффективной идентификации неизвестных аналитов благодаря разделению компонентов образца и многополосной структуре ГКР-спектров. Так, с помощью ВЭЖХ-ГКР идентифицированы НС в крови и моче наркозависимых пациентов [42] и показано, что в некоторых фракциях, соответствующих появлению пиков на хроматограмме (согласно результатам ВЭЖХ-УФ), содержатся смеси НС, их метаболитов и продуктов разложения, причем состав этих фракций можно различить по ГКР-спектрам. Также установлено, что метаболиты и/или продукты распада структурно-родственных НС имеют в ГКР-спектрах некоторые одинаковые пики, что важно при разработке универсальных методик анализа.

В работе [29] по применению сочетания ГКР и ВЭЖХ показана возможность определения не только основного ЛС (метотрексат) в моче, но и его метаболитов. Разработанная ВЭЖХ-ГКР-методика валидирована с использованием контрольного метода (ВЭЖХ-УФ) и образцов мочи пациентов, принимавших метотрексат для лечения артрита.

Стоит отметить, что авторами указанных работ обсуждена полезность ВЭЖХ-ГКР как метода получения дополнительной информации о неизвестных аналитах/метаболитах, которую затруднительно или нельзя получить при использовании других детекторов. Таким образом, авторы предлагают использовать ВЭЖХ-ГКР как дополнительный метод анализа при проведении, например, фармакокинетических исследований и судмедэкспертизы.

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Методики, основанные на сочетании ТСХ и ГКР, включают разделение смеси на ТСХ-пластине, добавление НЧ металла к зоне аналита и детектирова-

ние ГКР-сигнала в данной зоне [16, 47, 55, 58, 59]. В качестве стационарной фазы используют ТСХ-пластины с силикагелем [16, 47, 55] или диатомитом [58, 59]. Хорошим примером использования ТСХ-пластин с силикагелем является работа по ТСХ-ГКР-определению клозапина в моче [16]. Поскольку после добавления НЧ серебра к зоне ЛС на пластине ТСХ происходит размытие пятна аналита, а также радиальная диффузия и неравномерное распределение НЧ на поверхности пластины (рис. 3), авторы работы провели поиск оптимального участка для ГКР-детектирования и получения максимально воспроизводимого и интенсивного сигнала. Для увеличения воспроизводимости результатов анализа авторы добавляли к образцам мочи внутренний стандарт (раствор NaSCN), ГКР-сигнал которого использовали для нормировки аналитического сигнала. Результаты тестирования предложенной методики показали, что ГКР-определение аналита на пластине ТСХ примерно на порядок чувствительнее по сравнению с УФ-визуализацией, а также позволяет детектировать метаболиты клозапина.

В работе [55] по ТСХ-ГКР-определению метаболитов никотина в моче пришлось дополнительно использовать жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) аналитов из мочи перед ТСХ-разделением, чтобы достичь нужной чувствительности анализа. После разделения авторы соскабливали силикагель с пластины ТСХ в зоне аналита и элюировали молекулы аналитов перед ГКР-определением. Несмотря на значительное увеличение продолжительности анализа из-за включения дополнительных этапов, достигнутые пределы обнаружения позволили определять метаболиты никотина в моче не только активных, но и пассивных курильщиков.

Перспективно использование пластин ТСХ, модифицированных полимерами с молекулярными отпечатками, для увеличения селективности разделения и определения аналитов [74]. Другое интересное направление – применение для пластины ТСХ неорганического сорбента, преимущественно модифицированного ГКР-активными элементами [75, 76]. Такой подход усложняет приготовление ГКР-активной ТСХ-пластины, но минимизирует количество манипуляций непосредственно при проведении анализа. В данном случае не требуется поиск места регистрации аналитического ГКР-сигнала на пластине ТСХ, поскольку НЧ равномерно распределены на ее поверхности. Следует подчеркнуть, что отмеченные направления пока не реализованы для определения ЛС и НС в БЖЧ.

Во всех перечисленных выше работах для регистрации ГКР-сигнала с пластины ТСХ использовали лазеры с эмиссией в красном и ближнем ИК-диапазоне (647 и 785 нм) (табл. 1), что обусловлено следующими причинами. Во-первых, при использовании лазеров с большей энергией фотонов (473–532 нм) увеличивается вероятность

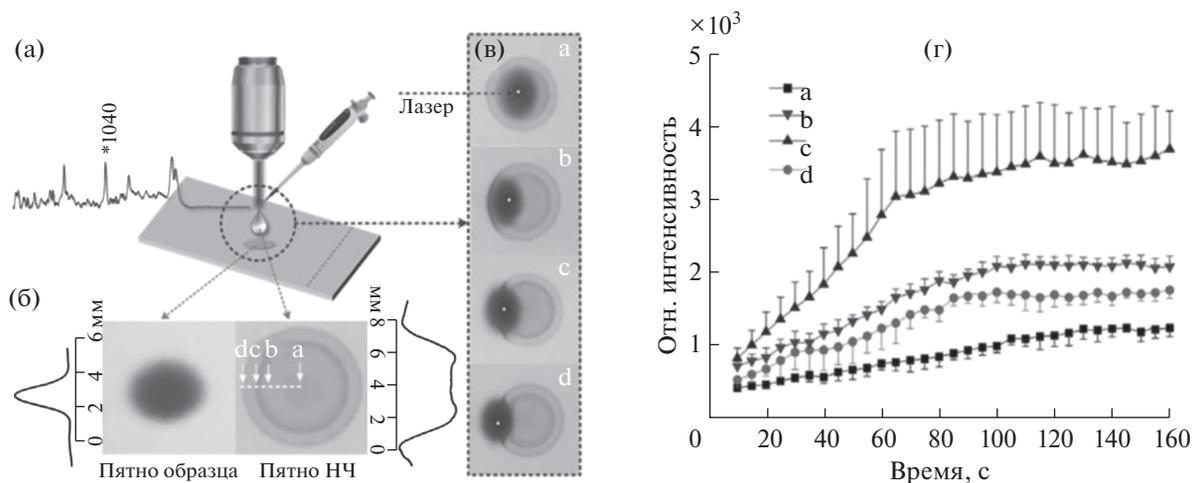


Рис. 3. (а): Схематическое изображение методики определения, основанной на сочетании тонкослойной хроматографии с ГКР-детектированием (ТСХ-ГКР). (б): Денситограмма пятна образца и пятна наночастиц серебра под УФ-излучением (254 нм); стрелками а–d показаны различные позиции регистрации ГКР-сигнала (белая точка). (в): Изображения пластины ТСХ с указанием места регистрации ГКР-сигнала (белая точка). (г): Зависимость интенсивности ГКР-сигнала на пластине ТСХ от места регистрации (а–d) и времени взаимодействия наночастиц серебра с молекулами аналита. Адаптировано из статьи [16] с разрешения правообладателя.

“горения” молекул аналита из-за быстрого высыхания матрицы сорбента. В результате в ГКР-спектре исчезают пики аналита и появляются интенсивные и широкие пики при 1350 и 1600 см^{-1} , соответствующие элементарному углероду, что дополнительно усложняет анализ. Во-вторых, фотоны синей и зеленой областей спектра могут приводить к появлению сильного фонового сигнала в результате возбуждения сигнала флуоресценции индикатора пластины ТСХ из-за высокой плотности мощности лазерного излучения.

Электрофоретическое разделение. Интеграция электрофоретического (ЭФ) разделения и ГКР заключается в использовании электрохимической ячейки для разделения заряженных эндо- и экзогенных компонентов БЖЧ и их принудительной электростатической сорбции на ГКР-активном электроде, используемом далее в качестве ГКР-подложки для регистрации сигнала. Единственным примером использования ЭФ-ГКР для анализа реальной БЖЧ является работа [67] по определению в слюне параксантина (основного метаболита кофеина). Авторы определили оптимальное значение поляризации ГКР-активного электрода, при котором достигается максимальный ГКР-сигнал аналита, однако варьирование величины поляризации не позволило устранить фоновый ГКР-сигнал слюны, обусловленный присутствием фенилаланина. Тем не менее пик ГКР параксантина, по интенсивности которого проводили определение, не перекрывается с ГКР-пиками фонового сигнала слюны, что позволило установить корреляцию между дозой и временем после приема кофеина и его концентрацией в слюне.

Опубликованы работы по ЭФ-ГКР-определению некоторых ЛС и НС в чистой воде [77] и в искусственных БЖЧ [78, 79], результаты которых можно попытаться экстраполировать и адаптировать для ГКР-определения аналитов в реальных БЖЧ. В работах [80, 81] проводили несколько циклов электростатической сорбции/десорбции аналитов на поверхности ГКР-активного электрода. Показана возможность многократного использования таких ГКР-подложек, что особенно важно в случае дорогостоящих подложек на основе благородных металлов.

Жидкостно-жидкостная экстракция. Для определения гидрофобных соединений и снижения влияния компонентов БЖЧ на аналитический ГКР-сигнал предложено использовать предварительный этап ЖЖЭ. Например, разработаны методики ЖЖЭ-ГКР-определения некоторых НС (кокаин [56], метамфетамин [64, 65], морфин [53]), а также противоэпилептических и антибактериальных ЛС [19, 45]. В ряде работ по ЖЖЭ-ГКР-анализу использовали гидрофобные ГКР-подложки, позволяющие детектировать аналиты непосредственно в среде экстрагента сразу после экстракции аналита (без высушивания и перевода в водный раствор) [53, 56, 64, 65] и, как следствие, сократить продолжительность анализа. Применимость такого подхода показана при качественном определении морфина (вариант “да/нет”) в моче наркозависимых людей [53].

Описан пример использования жидкостной экстракции в нанесенном слое для экстракции бензодиазепинов из мочи с последующим ГКР-определением элюированных аналитов [46]. Детектирование бензодиазепинов в смеси с некото-

рыми НС и ЛС показало отсутствие влияния примесей на определение целевого аналита.

Важно, что применение оптимизированного этапа ЖЖЭ позволяет снизить влияние мешающих веществ на аналитический сигнал аналитов без необходимости разработки специальных (и более трудоемких в изготовлении) ГКР-подложек [19, 45, 51]. Например, при ЖЖЭ-ГКР-определении сульфаметоксазола в моче [19] разбавление мочи, использование оптимального растворителя и корректировка рН среды позволили увеличить степень извлечения аналита, а также значительно снизить фоновый ГКР-сигнал мочи, при этом в качестве ГКР-подложки применяли коллоидные НЧ серебра, синтезированные по простой и экспрессной стандартной методике. Дополнительно эффективность и точность разработанной ЖЖЭ-ГКР-методики протестировали с использованием образцов мочи с переменным содержанием внутренних компонентов (собранных в разное время дня у здоровых добровольцев и пациентов с онкозаболеваниями). В работе [45] показано, что помимо увеличения эффективности ЖЖЭ за счет корректировки рН максимальный ГКР-сигнал бензодиазепинов достигается за счет использования хлорида магния в качестве агрегирующего агента для цитратных НЧ золота (по сравнению с хлоридами калия, натрия и кальция).

Следует отметить, что, несмотря на простоту и экономичность и экспрессность анализа (менее 30 мин), общим недостатком реализованных ЖЖЭ-ГКР-методик является использование органических растворителей, не отвечающих требованиям “зеленой химии”. Таким образом, перспективным направлением в данной области является адаптация методик экстракции с использованием, например, ПАВ или глубоких эвтектических растворителей.

Твердофазная экстракция (ТФЭ). Можно выделить двух- и одноэтапные методики, основанные на сочетании ТФЭ с ГКР, различающиеся наличием этапа элюирования. Двухэтапные ТФЭ-ГКР-методики включают стандартную процедуру ТФЭ и дальнейшее измерение ГКР-сигнала смеси раствора элюированного аналита с ГКР-подложкой. Например, такой подход применили для определения синтетического каннабиоида в слюне [61]. В качестве миниатюрной колонки для ТФЭ использовали наконечник для пипеток объемом 10 мкл, заполненный сорбентом С18. Разработанная методика позволила достичь предела обнаружения, соизмеримого с таковым для иммуноферментного метода определения каннабиноидов, а также сократить продолжительность анализа в три раза по сравнению с иммуноферментным анализом (менее 40 мин). В работе [39] в качестве сорбента использовали НЧ магнетита, покрытые полимером с молекулярными отпечатками, которые использовали для селективной экстракции антибиотика флоксациллина из плазмы крови.

Эффективность разработанного сорбента доказана отсутствием его связывания с антибиотиками других классов, такими как доксицилин, спирамицин и гентамицин. Однако разработанная ТФЭ-ГКР-методика включает продолжительный по времени этап инкубирования плазмы крови с сорбентом (1 ч).

Одноэтапные ТФЭ-ГКР-методики основаны на использовании ГКР-активных сорбентов как для концентрирования, так и для ГКР-определения аналита. Важно отметить, что в случае ГКР-активных сорбентов устраняются проблемы, связанные с коллоидной и химической стабильностью встроенных НЧ [82], что существенно улучшает воспроизводимость сигнала и точность анализа. Регистрация спектров непосредственно с ГКР-активного сорбента дополнительно позволяет исключить этап элюирования и, как следствие, снизить потери аналита, отказаться от использования растворителей и сократить продолжительность анализа. Такие методики реализованы в двух форматах: статическом и динамическом. В первом варианте ГКР-активный сорбент используют для заполнения колонки для ТФЭ [83]. В динамическом варианте микрочастицы сорбента диспергированы в анализируемом растворе и перед ГКР-определением их отделяют центрифугированием [18] или магнитной сепарацией (если сорбент имеет встроенные магнитные НЧ [31, 39, 84]).

Например, для реализации статического формата ТФЭ-ГКР и определения в слюне ЛС и НС предложено использование стеклянных капилляров, заполненных силикагелем со встроенными НЧ серебра или золота [23, 43, 44]. В указанных работах показана высокая эффективность отделения целевых аналитов от матрицы слюны матрицей силикагеля, а продолжительность ТФЭ-ГКР-анализа составила около 10 мин. Важно отметить, что реализация ГКР-активных сорбентов в виде подобных капилляров или картриджей упрощает их интеграцию в проточную систему анализа, что позволит автоматизировать процесс определения и повысит его воспроизводимость [85].

Динамический формат ТФЭ-ГКР-анализа использовали для определения в моче противоопухолевого препарата метотрексата с применением ГКР-активного сорбента на основе оксида алюминия со встроенными НЧ серебра [18]. Однако матрица оксида алюминия является сильно светорассеивающей средой, не позволяющей регистрировать ГКР-сигнал в глубине сорбента. Для увеличения ГКР-сигнала предложено растворение матрицы сорбента добавлением раствора гидроксида натрия. С одной стороны, растворение матрицы позволяет высвободить НЧ серебра и молекулы аналита, а с другой стороны, проводить одновременную корректировку рН перед ГКР-измерениями (метотрексат обладает максимальным ГКР-сигналом в щелочной среде). В работе [18] дополнительно оценили влияние основных

внутренних компонентов мочи (солей, мочевины, креатинина) и их смесей на степень сорбции метотрексата на сорбенте и его ГКР-сигнал.

Работа [31] посвящена ТФЭ-ГКР-детектированию цитостатического препарата тиогуанина в сыворотке крови с применением ГКР-активных альгинатных микрочастиц. Использование полимерной матрицы позволяет удалять белки сыворотки за счет отделения высокомолекулярных компонентов мезопористой структурой частиц сорбента, а также селективно адсорбировать аналиты по заряду благодаря сродству альгинатной матрицы к катионам.

Отметим, что модифицирование матрицы перечисленных ГКР-активных сорбентов заряженными и/или полярными фрагментами ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, Al^{3+} и т.д.) позволяет расширить области их применения благодаря увеличению селективности сорбентов по отношению к другим аналитам и/или исключению сорбции некоторых низкомолекулярных компонентов БЖЧ [86–89]. Для увеличения селективности ГКР-активных сорбентов также применяют технологию молекулярного импринтинга, что реализовано при определении ЛС и других веществ в воде и в таких сложных объектах анализа, как продукты питания [90]. Однако указанные ТФЭ-ГКР-методики пока не апробированы для определения ЛС или НС в реальных БЖЧ.

Неудерживающая твердофазная экстракция (НТФЭ). Для разделения фонообразующих компонентов БЖЧ и молекул аналита в ряде работ предложено использование НТФЭ, основанной на захвате и удерживании молекул мешающих соединений вместо молекул аналита. Например, для определения НС в образцах слюны и плазмы крови использовали ГКР-подложку в варианте ГКР-активной тест-полоски [54]. Такая полоска имеет ГКР-активную область, до которой доходят только молекулы аналита в результате вертикальной диффузии образца БЖЧ по нитроцеллюлозной мембране. В работе [49] поверх ГКР-активной поверхности расположили несколько нитроцеллюлозных мембран, при прохождении через которые происходит частичная очистка аналита от компонентов сыворотки крови перед достижением ГКР-активной области, что приводит к уменьшению фонового сигнала.

Для определения в моче цефалоспориновых антибиотиков предложены два варианта пробоподготовки, основанные на корректировке pH анализируемых растворов и НТФЭ некоторых фонообразующих компонентов мочи распространенными сорбентами [35, 36, 91]. Так, пропускание подщелоченного образца мочи через колонку с силикагелем позволило устранить сильный фоновый ГКР-сигнал мочи, обусловленный присутствием креатинина (рис. 4а) [35]. Авторы отметили, что варьирование величины pH и содержания белка в исходной моче в преде-

лах значений, характерных для здоровых людей, не влияет на эффективность отделения аналита от матрицы мочи. В работе [36] для минимизации фонового сигнала мочи с помощью НТФЭ использовали гель гидроксида алюминия, который сорбирует уробилин мочи. В отличие от креатинина, уробилин имеет интенсивный ГКР-сигнал в кислой среде, что мешает ГКР-определению некоторых аналитов, также обладающих ГКР-сигналом в кислой среде (в том числе цефалоспоринов). Наконец, для устранения фонового ГКР-сигнала мочи, обусловленного присутствием мочевой кислоты, предложено ее удаление с помощью порошка оксида цинка (30 мас. %), хорошо адсорбирующего этот метаболит [91]. Благодаря такой пробоподготовке ГКР-сигнал мочевой кислоты полностью устраняется и появляется четкий ГКР-сигнал аналита (фенилаланин) (рис. 4б).

Таким образом, удаление мешающих компонентов с помощью НТФЭ позволяет увеличить точность ГКР-определения ЛС и НС в БЖЧ без использования органических растворителей и специальных сорбентов. Стоит отметить, что использование этапа НТФЭ незначительно усложняет анализ и во всех перечисленных работах продолжительность анализа не превышала 10 мин из-за малого числа манипуляций, а в качестве ГКР-подложек применяли НЧ металлов, синтезированные по известным и простым методикам. Однако важно помнить, что в ходе НТФЭ может происходить частичная сорбция молекул аналита и снижение интенсивности аналитического сигнала. Тем не менее в рассмотренных работах показано, что высокая чувствительность спектроскопии ГКР позволяет нивелировать этот недостаток и получать аналитический сигнал с интенсивностью, достаточной для определения ЛС и НС в необходимом диапазоне концентраций.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ В АНАЛИЗЕ

К сожалению, несмотря на большое число публикаций по применению ГКР для определения ЛС и НС в БЖЧ в журналах по аналитической химии (табл. 1), сделать однозначные выводы об эффективности и практической применимости предложенных методик пока затруднительно. Например, зачастую в публикациях отсутствует анализ соответствия определяемых концентраций практическим потребностям. В основном авторы просто пытаются достичь как можно более низких пределов обнаружения и широких рабочих диапазонов концентраций, игнорируя другие важные моменты. Так, определяемые концентрации ЛС в БЖЧ при проведении ТЛМ могут иметь достаточно высокие значения (особенно в моче), что объясняется необходимостью достижения терапевтического эффекта от применения ЛС. Также ЛС

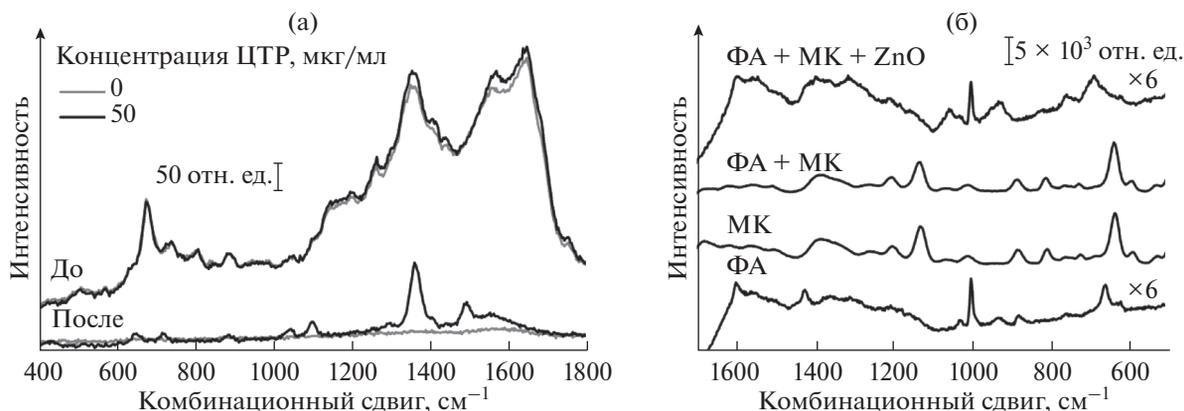


Рис. 4. (а): Спектры гигантского комбинационного рассеяния образца мочи без и с добавкой цефтриаксона (ЦТР) до и после пропускания через колонку с силикагелем. Адаптировано из работы [35]. (б): Спектры гигантского комбинационного рассеяния эквимольной (50 мкМ) смеси мочевой кислоты (МК) и фенилаланина (ФА) до и после контакта с порошком оксида цинка (2 мас. %), а также спектры МК и ФА в отдельности. Адаптировано из статьи [91] с разрешения правообладателя.

может иметь узкое окно терапевтических концентраций в пределах одного порядка. В данных случаях требования к высокой селективности и точности выходят на первое место.

Другим важным моментом, выявленным при оценке метрологических характеристик методик ГКР-анализа, является не вполне корректная обработка результатов анализа. Этот факт затрудняет сравнение эффективности различных методик, использованных для определения одного и того же аналита. Например, только в половине исследований, приведенных в таблице (табл. 1), построены градуировочные графики и корректно рассчитаны значения пределов обнаружения. Вместо предела обнаружения, рассчитанного согласно рекомендациям ИЮПАК, часто используют значения минимальной концентрации на градуировочном графике без учета погрешности измерения сигнала. Наконец, ощущается нехватка работ, содержащих результаты проверки предложенных ГКР-методик с привлечением контрольных методов.

К достоинствам рассмотренных методик ГКР-анализа можно отнести активное использование портативных КР-спектрометров (примерно в трети работ). Известно, что такие спектрометры имеют более низкую чувствительность по сравнению со стационарными КР-микроскопами, в основном используемыми в фундаментальных научных исследованиях. Этот факт дополнительно подтверждает возможность проведения экспрессного ГКР-анализа на месте.

Наконец, самым важным достижением является достаточно широкое тестирование методик ГКР-анализа с использованием клинических образцов БЖЧ, полученных от волонтеров, принимавших ЛС или НС (табл. 1). Таким образом, несмотря на отсутствие детального изучения селективности и влияющих на нее факторов,

проведенные исследования показывают, что ГКР пригоден для анализа реальных образцов БЖЧ.

Подводя итоги, можно сделать вывод, что в настоящее время основные усилия при разработке методик ГКР-определения ЛС и НС в БЖЧ в первую очередь направлены на улучшение селективности и подавление фонового сигнала. Для этого разрабатывают ГКР-методики без и с привлечением методов разделения и концентрирования. К первым относятся методики с простыми способами пробоподготовки (разбавление и варьирование рН) и с обработкой ГКР-сигнала методами хемометрики. Сюда же можно условно отнести использование модификации поверхности ГКР-подложек для улучшения сорбционных свойств и селективности (мультифункциональных ГКР-подложек). Во втором случае ГКР-методики включают предварительное отделение молекул аналита от примесей с использованием экстракции (удерживающая и неудерживающая ТФЭ, ЖЖЭ) и хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ), а также электрофоретического разделения. Анализ метрологических характеристик опубликованных методик показал, что, несмотря на положительные результаты при работе с реальными образцами БЖЧ и существенный прогресс в создании эффективных ГКР-подложек, необходимы дальнейшие исследования. На наш взгляд, перспективным направлением является создание автоматизированных систем ГКР-анализа с высокой скоростью сбора и обработки данных, что важно для внедрения ГКР в клиническую диагностику.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-00098).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burke M.D. Principles of therapeutic drug monitoring // Postgrad. Med. 1981. V. 70. P. 57.
<https://doi.org/10.1080/00325481.1981.11715801>
- Ensom M.H.H., Davis G.A., Cropp C.D., Ensom R.J. Clinical pharmacokinetics in the 21st century // Clin. Pharmacokinet. 1998. V. 34. P. 265.
<https://doi.org/10.2165/00003088-199834040-00001>
- Vogeser M., Seger C. A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory – Goals for further developments // Clin. Biochem. 2008. V. 41. P. 649.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.02.017>
- Brandhorst G., Oellerich M., Maine G., Taylor P., Veen G., Wallemacq P. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry or automated immunoassays: What are the future trends in therapeutic drug monitoring? // Clin. Chem. 2012. V. 58. P. 821.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.167189>
- Shipkova M., Petrova D.T., Rosler A.E., Orth M., Engel-mayer J., Wieland E., Brandhorst G., Oellerich M. Comparability and imprecision of 8 frequently used commercially available immunoassays for therapeutic drug monitoring // Ther. Drug Monit. 2014. V. 36. P. 433.
<https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000043>
- Jaworska A., Fornasaro S., Sergio V., Bonifacio A. Potential of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) in therapeutic drug monitoring (TDM). A critical review // Biosensors. 2016. V. 6. Article 47.
<https://doi.org/10.3390/bios6030047>
- Yu B., Ge M., Li P., Xie Q., Yang L. Development of surface-enhanced Raman spectroscopy application for determination of illicit drugs: Towards a practical sensor // Talanta. 2019. V. 191. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.032>
- Li C., Ye Z., Xu Y., Bell S.E.J. An overview of therapeutic anticancer drug monitoring based on surface enhanced (resonance) Raman spectroscopy (SE(R)RS) // Analyst. 2020. V. 145. P. 6211.
<https://doi.org/10.1039/D0AN00891E>
- Jahn M., Patze S., Hidi I.J., Knipper R., Radu A.I., Mühlhlg A., Yüksel S., Peksa V., Weber K., Mayerhöfer T., Cialla-May D., Popp J. Plasmonic nanostructures for surface enhanced spectroscopic methods // Analyst. 2016. V. 141. P. 756.
<https://doi.org/10.1039/C5AN02057C>
- Bonifacio A., Marta S.D., Spizzo R., Cervo S., Steffan A., Colombatti A., Sergio V. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: A systematic study // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. P. 2355.
<https://doi.org/10.1007/s00216-014-7622-1>
- Fornasaro S., Alsamad F., Baia M., Batista de Carvalho L.A.E., Beleites C., Byrne H.J., Chiadò A., Chis M., Chisanga M., Daniel A., Dybas J., Eppe G., Falgayrac G., Faulds K., Gebavi H., Giorgis F., Goodacre R., Graham D., La Manna P., Laing S., Liitti L., Lyng F.M., Malek K., Malherbe C., Marques M.P.M., Meneghetti M., Mitri E., Mohaček-Grošev V., Morasso C., Muhamadali H., Musto P., Novara C., Pannico M., Penel G., Piot O., Rindzevičius T., Rusu E.A., Schmidt M.S., Sergio V., Sockalingum G.D., Untereiner V., Vanna R., Wiercigroch E., Bonifacio A. Surface enhanced Raman spectroscopy for quantitative analysis: Results of a large-scale European multi-instrument interlaboratory study // Anal. Chem. 2020. V. 92. P. 4053.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05658>
- Guo S., Beleites C., Neugebauer U., Abalde-Cela S., Afseth N.K., Alsamad F., Anand S., Araujo-Andrade C., Aškrabić S., Avci E., Baia M., Baranska M., Baria E., Batista de Carvalho L.A.E., de Bettignies P., Bonifacio A., Bonnier F., Brauchle E.M., Byrne H.J., Chourpa I., Cicchi R., Cuisinier F., Culha M., Dahms M., David C., Duponchel L., Duraipandian S., El-Mashtoly S.F., Ellis D.I., Eppe G., Falgayrac G., Gamulin O., Gardner R., Gardner P., Gerwert K., Giamarellos-Bourboulis E.J., Gizurarson S., Gnyba M., Goodacre R., Grysan P., Guntinas-Lichius O., Helgadottir H., Mohaček Grošev V., Kendall C., Kiselev R., Kölbach M., Krafft C., Krishnamoorthy S., Kubryck P., Lendl B., Loza-Avarez P., Lyng F.M., Machill S., Malherbe C., Marro M., Marques M.P.M., Matuszyk E., Morasso C.F., Moreau M., Muhamadali H., Mussi V., Notingher I., Pacia M.Z., Pavone F.S., Penel G., Petersen D., Piot O., Rau J.V., Richter M., Rybarezyk M.K., Salehi H., Schenke-Layland K., Schlücker S., Schösserer M., Schütze K., Sergio V., Sinjab F., Smulko J., Sockalingum G.D., Stiebing C., Stone N., Untereiner V., Vanna R., Wieland K., Popp J., Bocklitz T. Comparability of Raman spectroscopic configurations: A large scale cross-laboratory study // Anal. Chem. 2020. V. 92. P. 15745.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02696>
- Bell S.E.J., Sirimuthu N.M.S. Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy // Chem. Soc. Rev. 2008. V. 37. P. 1012.
<https://doi.org/10.1039/B705965P>
- Fang Y., Seong N.H., Dlott D.D. Measurement of the distribution of site enhancements in surface-enhanced Raman scattering // Science. 2008. V. 321. P. 388.
<https://doi.org/10.1126/science.1159499>
- Goodacre R., Graham D., Faulds K. Recent developments in quantitative SERS moving towards absolute quantification // Trends Anal. Chem. 2018. V. 102. P. 359.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.005>
- Zhu Q., Yu X., Wu Z., Lu F., Yuan Y. Antipsychotic drug poisoning monitoring of clozapine in urine by using coffee ring effect based surface-enhanced Raman spectroscopy // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1014. P. 64.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.027>
- Markina N.E., Ustinov S.N., Zakharevich A.M., Markin A.V. Copper nanoparticles for SERS-based determination of some cephalosporin antibiotics in spiked human urine // Anal. Chim. Acta. 2020. V. 1138. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.09.016>
- Markina N.E., Zakharevich A.M., Markin A.V. Determination of methotrexate in spiked human urine using SERS-active sorbent // Anal. Bioanal. Chem. 2020. V. 412. P. 7757.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02932-x>
- Markina N.E., Markin A.V., Weber K., Popp J., Cialla-May D. Liquid-liquid extraction-assisted SERS determination of sulfamethoxazole in spiked human urine // Anal. Chim. Acta. 2020. V. 1109. P. 61.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.02.067>
- Markin A.V., Markina N.E., Popp J., Cialla-May D. Copper nanostructures for chemical analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy // Trends Anal. Chem. 2018. V. 108. P. 247.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.004>
- Beljebbar A., Sockalingum G.D., Angiboust J.F., Manfait M. Comparative FT SERS, resonance Raman and SERRS studies of doxorubicin and its complex with DNA //

- Spectrochim. Acta A. 1995. V. 51. P. 2083.
[https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01515-7](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01515-7)
22. *McLaughlin C., MacMillan D., McCardle C., Smith W.E.* Quantitative analysis of mitoxantrone by surface-enhanced resonance Raman scattering // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 3160.
<https://doi.org/10.1021/ac010067k>
 23. *Farquharson S., Gift A.D., Shende C., Maksymiuk P., Inscore F.E., Murrin J.* Detection of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy // *Vib. Spectrosc.* 2005. V. 38. P. 79.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.02.021>
 24. *Farquharson S., Gift A., Shende C., Inscore F., Ordway B., Farquharson C., Murren J.* Surface-enhanced Raman spectral measurements of 5-fluorouracil in saliva // *Molecules.* 2008. V. 13. P. 2608.
<https://doi.org/10.3390/molecules13102608>
 25. *Yuen C., Zheng W., Huang Z.* Low-level detection of anti-cancer drug in blood plasma using microwave-treated gold-polystyrene beads as surface-enhanced Raman scattering substrates // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. P. 580.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.030>
 26. *Dong J., Chen Q., Rong C., Li D., Rao Y.* Minimally invasive surface-enhanced Raman scattering detection with depth profiles based on a surface-enhanced Raman scattering-active acupuncture needle // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 6191.
<https://doi.org/10.1021/ac2007009>
 27. *Fornasaro S., Marta S.D., Rabusin M., Bonifacio A., Sergio V.* Toward SERS-based point-of-care approaches for therapeutic drug monitoring: The case of methotrexate // *Faraday Discuss.* 2016. V. 187. P. 485.
<https://doi.org/10.1039/C5FD00173K>
 28. *Sun F., Hung H.C., Sinclair A., Zhang P., Bai T., Galvan D.D., Jain P., Li B., Jiang S., Yu Q.* Hierarchical zwitterionic modification of a SERS substrate enables real-time drug monitoring in blood plasma // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. Article 13437.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13437>
 29. *Subaihi A., Trivedi D.K., Hollywood K.A., Bluett J., Xu Y., Muhamadali H., Ellis D.I., Goodacre R.* Quantitative online liquid chromatography–surface-enhanced Raman scattering (LC-SERS) of methotrexate and its major metabolites // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 6702.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00916>
 30. *Fornasaro S., Bonifacio A., Marangon E., Buzzo M., Toffoli G., Rindzevicius T., Schmidt M.S., Sergio V.* Label-free quantification of anticancer drug imatinib in human plasma with surface enhanced Raman spectroscopy // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. P. 12670.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02901>
 31. *Yue S., Sun X.T., Wang Y., Zhang W.S., Xu Z.R.* Micro-particles with size/charge selectivity and pH response for SERS monitoring of 6-thioguanine in blood serum // *Sens. Actuators B.* 2018. V. 273. P. 1539.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.062>
 32. *Litti L., Ramundo A., Biscaglia F., Toffoli G., Gobbo M., Meneghetti M.* A surface enhanced Raman scattering based colloid nanosensor for developing therapeutic drug monitoring // *J. Colloid Interface Sci.* 2019. V. 533. P. 621.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.08.107>
 33. *Panikar S.S., Ramírez-García G., Sidhik S., Lopez-Luke T., Rodríguez-González C., Ciapara I.H., Castillo P.S., Camacho-Villegas T., De la Rosa E.* Ultrasensitive SERS substrate for label-free therapeutic-drug monitoring of paclitaxel and cyclophosphamide in blood serum // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 2100.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04523>
 34. *Zhang W.S., Wang Y.N., Wang Y., Xu Z.R.* Highly reproducible and fast detection of 6-thioguanine in human serum using a droplet-based microfluidic SERS system // *Sens. Actuators B.* 2019. V. 283. P. 532.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.077>
 35. *Markina N.E., Goryacheva I.Yu., Markin A.V.* Sample pretreatment and SERS-based detection of ceftriaxone in urine // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 2221.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0888-y>
 36. *Markina N.E., Markin A.V.* Application of aluminum hydroxide for improvement of label-free SERS detection of some cephalosporin antibiotics in urine // *Biosensors.* 2019. V. 9. Article 91.
<https://doi.org/10.3390/bios9030091>
 37. *Mamián-López M.B., Poppi R.J.* Quantification of moxifloxacin in urine using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate curve resolution on a nanostructured gold surface // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 7671.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7200-y>
 38. *Hidi I.J., Jahn M., Pletz M.W., Weber K., Cialla-May D., Popp J.* Toward levofloxacin monitoring in human urine samples by employing the LoC-SERS technique // *J. Phys. Chem. C.* 2016. V. 120. P. 20613.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01005>
 39. *Ashley J., Wu K., Hansen M.F., Schmidt M.S., Boisen A., Sun Y.* Quantitative detection of trace level cloxacillin in food samples using magnetic molecularly imprinted polymer extraction and surface-enhanced Raman spectroscopy nanopillars // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 11484.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02725>
 40. *Liu J., Liu W., Huang Y., Zhao X., Feng Z., Wang D., Gong Z., Fan M.* Self-supporting liquid film as reproducible SERS platform for therapeutic drug monitoring of berberine hydrochloride in human urine // *Microchem. J.* 2021. V. 165. Article 106122.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106122>
 41. *Hidi I.J., Jahn M., Weber K., Bocklitz T., Pletz M.W., Cialla-May D., Popp J.* Lab-on-a-chip-surface enhanced Raman scattering combined with the standard addition method: Toward the quantification of nitroxoline in spiked human urine samples // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 9173.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02316>
 42. *Trachta G., Schwarze B., Sagmüller B., Brehm G., Schneider S.* Combination of high-performance liquid chromatography and SERS detection applied to the analysis of drugs in human blood and urine // *J. Mol. Struct.* 2004. V. 693. P. 175.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.02.034>
 43. *Farquharson S., Shende C., Sengupta A., Huang H., Inscore F.* Rapid detection and identification of overdose drugs in saliva by surface-enhanced Raman scattering using fused gold colloids // *Pharmaceutics.* 2011. V. 3. P. 425.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3030425>
 44. *Inscore F., Shende C., Sengupta A., Huang H., Farquharson S.* Detection of drugs of abuse in saliva by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) // *Appl.*

- Spectrosc. 2011. V. 65. P. 1004.
<https://doi.org/10.1366/11-06310>
45. *Doctor E.L., McCord B.* Comparison of aggregating agents for the surface-enhanced Raman analysis of benzodiazepines // *Analyst*. 2013. V. 138. P. 5926.
<https://doi.org/10.1039/C3AN00669G>
 46. *Doctor E.L., McCord B.* The application of supported liquid extraction in the analysis of benzodiazepines using surface enhanced Raman spectroscopy // *Talanta*. 2015. V. 144. P. 938.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.036>
 47. *Lucotti A., Tommasini M., Casella M., Morganti A., Gramatica F., Zerbi G.* TLC—surface enhanced Raman scattering of apomorphine in human plasma // *Vib. Spectrosc.* 2012. V. 62. P. 286.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.07.009>
 48. *Phung V.D., Jung W.S., Nguyen T.A., Kim J.H., Lee S.W.* Reliable and quantitative SERS detection of dopamine levels in human blood plasma using a plasmonic Au/Ag nanocluster substrate // *Nanoscale*. 2018. V. 10. P. 22493.
<https://doi.org/10.1039/C8NR06444J>
 49. *Berger A.G., Restaino S.M., White I.M.* Vertical-flow paper SERS system for therapeutic drug monitoring of flucytosine in serum // *Anal. Chim. Acta*. 2017. V. 949. P. 59.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.035>
 50. *Gan S., Shi X., Zhu X., Wu C., Li Z., Han T., Lu R.* Rapid dynamic determination of cetirizine dihydrochloride in urine using surface enhanced Raman scattering with silver colloids // *Anal. Lett.* 2018. V. 51. P. 1163.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1370597>
 51. *Cheng J., Wang S., Zhang S., Wang P., Xie J., Han C., Su X.O.* Rapid and sensitive determination of clenbuterol residues in animal urine by surface-enhanced Raman spectroscopy // *Sens. Actuators B*. 2019. V. 279. P. 7.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.103>
 52. *Subaihi A., Muhamadali H., Mutter S.T., Blanch E., Ellisa D.I., Goodacre R.* Quantitative detection of codeine in human plasma using surface-enhanced Raman scattering via adaptation of the isotopic labelling principle // *Analyst*. 2017. V. 142. P. 1099.
<https://doi.org/10.1039/C7AN00193B>
 53. *Yu B., Cao C., Li P., Mao M., Xie Q., Yang L.* Sensitive and simple determination of zwitterionic morphine in human urine based on liquid-liquid micro-extraction coupled with surface-enhanced Raman spectroscopy // *Talanta*. 2018. V. 186. P. 427.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.094>
 54. *Shende C., Brouillette C., Farquharson S.* Detection of codeine and fentanyl in saliva, blood plasma and whole blood in 5-minutes using a SERS flow-separation strip // *Analyst*. 2019. V. 144. P. 5449.
<https://doi.org/10.1039/C9AN01087D>
 55. *Huang R., Han S., Li X.* Detection of tobacco-related biomarkers in urine samples by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with thin-layer chromatography // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 6815.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7107-7>
 56. *Meng J., Tang X., Zhou B., Xie Q., Yang L.* Designing of ordered two-dimensional gold nanoparticles film for cocaine detection in human urine using surface-enhanced Raman spectroscopy // *Talanta*. 2017. V. 164. P. 693.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.101>
 57. *Dies H., Raveendran J., Escobedo C., Docoslis A.* Rapid identification and quantification of illicit drugs on nanodendritic surface-enhanced Raman scattering substrates // *Sens. Actuators B*. 2018. V. 257. P. 382.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.181>
 58. *Kong X., Chong X., Squire K., Wang A.X.* Microfluidic diatomite analytical devices for illicit drug sensing with ppb-level sensitivity // *Sens. Actuators B*. 2018. V. 259. P. 587.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.038>
 59. *Sivashanmugan K., Zhao Y., Wang A.X.* Tetrahydrocannabinol sensing in complex biofluid with portable Raman spectrometer using diatomaceous SERS substrates // *Biosensors*. 2019. V. 9. Article 125.
<https://doi.org/10.3390/bios9040125>
 60. *Alder R., Xiao L., Fu S.* Comparison of commercial surface-enhanced Raman spectroscopy substrates for the analysis of cocaine // *Drug Test. Anal.* 2021. V. 13. P. 944.
<https://doi.org/10.1002/dta.2894>
 61. *Deriu C., Conticello I., Mebel A.M., McCord B.* Micro solid phase extraction surface-enhanced Raman spectroscopy (μ -SPE/SERS) screening test for the detection of the synthetic cannabinoid JWH-018 in oral fluid // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 4780.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00335>
 62. *Andreou C., Hoonejani M.R., Barmi M.R., Moskovits M., Meinhart C.D.* Rapid detection of drugs of abuse in saliva using surface enhanced Raman spectroscopy and microfluidics // *ACS Nano*. 2013. V. 7. P. 7157.
<https://doi.org/10.1021/nn402563f>
 63. *Dong R., Weng S., Yang L., Liu J.* Detection and direct readout of drugs in human urine using dynamic surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machines // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 2937.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00137>
 64. *Han Z., Liu H., Meng J., Yang J., Liu J., Liu J.* Portable kit for identification and detection of drugs in human urine using surface-enhanced Raman spectroscopy // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 9500.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02899>
 65. *Han Z., Liu H., Wang B., Weng S., Yang L., Liu J.* Three-dimensional surface-enhanced Raman scattering hotspots in spherical colloidal superstructure for identification and detection of drugs in human urine // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 4821.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00176>
 66. *Nuntawong N., Eiamchai P., Somrang W., Detchcharoen S., Limwichean S., Horprathum M., Patthanasettakul V., Chaiya S., Leelapojanaporn A., Saiseng S., Pongsethasant P., Chindaudom P.* Detection of methamphetamine/amphetamine in human urine based on surface-enhanced Raman spectroscopy and acidulation treatments // *Sens. Actuators B*. 2017. V. 239. P. 139.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.129>
 67. *Velička M., Zacharovas E., Adomavičiūtė S., Šablinskas V.* Detection of caffeine intake by means of EC-SERS spectroscopy of human saliva // *Spectrochim. Acta A*. 2021. V. 246. Article 118956.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118956>
 68. *Fan M., Andrade G.F.S., Brolo A.G.* A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry // *Anal. Chim. Acta*. 2011. V. 693. P. 7.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.002>

69. Zhang Y., Li L., Gao Y., Wang X., Sun L., Ji W., Ozaki Y. Nitrosophthal reaction-assisted SERS assay for selective determination of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in human urine // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1134. P. 34.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.020>
70. Yang H., Xiang Y., Guo X., Wu Y., Wen Y., Yang H. Di-azo-reaction-based SERS substrates for detection of nitrite in saliva // *Sens. Actuators B.* 2018. V. 271. P. 118.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.111>
71. Cao G., Hajisalem G., Li W., Hof F., Gordon R. Quantification of an exogenous cancer biomarker in urinalysis by Raman Spectroscopy // *Analyst.* 2014. V. 139. P. 5375.
<https://doi.org/10.1039/C4AN01309C>
72. Markina N.E., Cialla-May D., Markin A.V. Cyclodextrin-assisted surface-enhanced Raman spectroscopy: A critical review // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. V. 414. P. 923.
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03704-x>
73. Kleinman S.L., Frontiera R.R., Henry A.I., Dieringer J.A., Van Duyne R.P. Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013. V. 15. P. 21.
<https://doi.org/10.1039/C2CP42598J>
74. Gao F., Hu Y., Chen D., Li-Chan E.C.Y., Grant E., Lu X. Determination of Sudan I in paprika powder by molecularly imprinted polymers—thin layer chromatography—surface enhanced Raman spectroscopic biosensor // *Talanta.* 2015. V. 143. P. 344.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.003>
75. bin Zhang B., Shi Y., Chen H., xia Zhu Q., Lu F., wei Li Y. A separable surface-enhanced Raman scattering substrate modified with MIL-101 for detection of overlapping and invisible compounds after thin-layer chromatography development // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 997. P. 35.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.006>
76. Lee B.S., Lin P.C., Lin D.Z., Yen T.J. Rapid biochemical mixture screening by three-dimensional patterned multifunctional substrate with ultra-thin layer chromatography (UTLC) and surface enhanced Raman scattering (SERS) // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. Article 516.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18967-7>
77. Li Y.T., Qu L.L., Lin D.W., Song Q.X., Fathi F., Long Y.T. Rapid and sensitive in-situ detection of polar antibiotics in water using a disposable Ag—graphene sensor based on electrophoretic preconcentration and surface-enhanced Raman spectroscopy // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 43. P. 94.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.005>
78. Bindesri S.D., Alhatab D.S., Brosseau C.L. Development of an electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) fabric-based plasmonic sensor for point-of-care diagnostics // *Analyst.* 2018. V. 143. P. 4128.
<https://doi.org/10.1039/C8AN01117F>
79. Bindesri S.D., Jebailey R., Albarghouthi N., Pye C.C., Brosseau C.L. Spectroelectrochemical and computational studies of tetrahydrocannabinol (THC) and carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) // *Analyst.* 2020. V. 145. P. 1849.
<https://doi.org/10.1039/C9AN02173F>
80. Höhn E.M., Panneerselvam R., Das A., Belder D. Raman spectroscopic detection in continuous microflow using a chip-integrated silver electrode as an electrically regenerable surface-enhanced Raman spectroscopy substrate // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. P. 9844.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01514>
81. Viehrig M., Rajendran S.T., Sanger K., Schmidt M.S., Alström T.S., Rindzevicius T., Zór K., Boisen A. Quantitative SERS assay on a single chip enabled by electrochemically assisted regeneration: A method for detection of melamine in milk // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 4317.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05060>
82. Markina N.E., Volkova E.K., Zakharevich A.M., Goryacheva I.Yu., Markin A.V. SERS detection of ceftriaxone and sulfadimethoxine using copper nanoparticles temporally protected by porous calcium carbonate // *Microchim. Acta.* 2018. V. 185. Article 481.
<https://doi.org/10.1007/s00604-018-3018-9>
83. Markina N.E., Markin A.V., Zakharevich A.M., Gorin D.A., Rusanova T.Yu., Goryacheva I.Yu. Multifunctional silver nanoparticle-doped silica for solid-phase extraction and surface-enhanced Raman scattering detection // *J. Nanopart. Res.* 2016. V. 18. Article 353.
<https://doi.org/10.1007/s11051-016-3661-1>
84. Markina N.E., Markin A.V., Zakharevich A.M., Goryacheva I.Yu. Calcium carbonate microparticles with embedded silver and magnetite nanoparticles as new SERS-active sorbent for solid phase extraction // *Microchim. Acta.* 2017. V. 184. P. 3937.
<https://doi.org/10.1007/s00604-017-2426-6>
85. Jahn I.J., Zukovskaja O., Zheng X.S., Weber K., Bocklitz T.W., Cialla-May D., Popp J. Surface-enhanced Raman spectroscopy and microfluidic platforms: Challenges, solutions and potential applications // *Analyst.* 2017. V. 142. P. 1022.
<https://doi.org/10.1039/C7AN00118E>
86. Marsich L., Bonifacio A., Mandal S., Krol S., Beleites C., Sergio V. Poly-l-lysine-coated silver nanoparticles as positively charged substrates for surface-enhanced Raman scattering // *Langmuir.* 2012. V. 28. P. 13166.
<https://doi.org/10.1021/la302383r>
87. López-Puente V., Angelomé P.C., Soler-Illia G.J.A.A., Liz-Marzán L.M. Selective SERS sensing modulated by functionalized mesoporous films // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015. V. 7. P. 25633.
<https://doi.org/10.1021/acsami.5b10543>
88. Yurova N.S., Markina N.E., Pozharov M.V., Zakharevich A.M., Rusanova T.Yu., Markin A.V. SERS-active sorbent based on aluminum oxide loaded with silver nanoparticles // *Colloids Surf. A.* 2016. V. 495. P. 169.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.02.006>
89. Markina N.E., Zakharevich A.M., Markin A.V. Improvement of creatinine SERS detection using molecularly imprinted silica gel // *Proc. SPIE.* 2019. V. 11065. Article 110651M.
<https://doi.org/10.1117/12.2521212>
90. Guo X., Li J., Arabi M., Wang X., Wang Y., Chen L. Molecular-imprinting-based surface-enhanced Raman scattering sensors // *ACS Sens.* 2020. V. 5. P. 601.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.9b02039>
91. Murugesan B., Yang J. Tunable coffee ring formation on polycarbonate nanofiber film for sensitive SERS detection of phenylalanine in urine // *ACS Omega.* 2019. V. 4. P. 14928.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01686>

УДК 543.635.6:543.544.5.068.7:543.054

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ОБРАЗЦОВ ГРЕЧИХИ

© 2022 г. С. С. Алексенко^а, К. О. Казимирова^б, С. Н. Штыков^{б, *}^аГосударственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии
и. Энтузиастов, 23, Москва, 111024 Россия^бСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
ул. Астраханская 83, к. 1, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: shtykovsn@mail.ru

Поступила в редакцию 05.08.2021 г.

После доработки 06.09.2021 г.

Принята к публикации 06.09.2021 г.

Во многих странах гречневая крупа считается альтернативным безглютеновым пищевым продуктом с уникальным набором белков и аминокислотным составом, а также высокой антиоксидантной активностью (АОА). Данное исследование посвящено оценке и сравнению АОА и общего содержания свободных фенольных соединений в различных гречневых продуктах, приобретенных в супермаркетах четырех стран. Показано, что оптимальным экстрагентом свободных фенолов из зерна гречихи является 50%-ный водно-этанольный раствор; для извлечения достаточно перемешивания на вортексе без нагревания. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектором на диодной матрице, флуоресцентным и МС-детекторами во всех образцах гречихи количественно определены доминирующие компоненты: рутин ($(6.7-14.1) \times 10^{-2}$ г/кг), флаван-3-олы (катехин $(1.8-8.7) \times 10^{-2}$ г/кг и эпикатехин $(2.5-11.6) \times 10^{-2}$ г/кг). Протокатеховая и галловая кислоты, а также несвязанные витексин и кверцетин детектировались в минорных количествах в основном в термообработанных зернах гречихи. Получены линейные корреляции между суммарным содержанием фенольных соединений, оцененных методом Фолина–Чеколтэу, и АОА, а также между суммой концентраций трех компонентов (рутина, катехина, эпикатехина) и АОА. Проведено сравнение хроматографических профилей и АОА гречихи, пшеницы, ячменя, кукурузы, риса.

Ключевые слова: гречиха (*Fagopyrum esculentum* М.), антиоксидантная активность, фенольные соединения, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС с электрораспылением, хроматографический профиль.

DOI: 10.31857/S0044450222080023

Гречиха обыкновенная (*Fagopyrum esculentum* Moench) широко употребляется во многих странах в пищу в виде зерен и муки для приготовления каши, лапши, хлопьев, блинов и кексов, а также хлеба; цветки гречихи – источник ценного гречишного меда [1, 2]. Гречиха – альтернативная злакам культура с высоким содержанием биологически активных веществ; она привлекает все большее внимание потребителей в связи с важностью проблемы здорового питания [2]. Привлекательная пищевая ценность гречихи определяется наличием высокого уровня белков, полиненасыщенных незаменимых жирных кислот, пищевых волокон, стойкого крахмала, витаминов (В1, В2, С и Е), антиоксидантов, глутатиона и минералов, содержащих Zn, Cu, Mn, Mg, Se [2, 3], а также ее сбалансированным уникальным аминокислотным составом. Кроме того, гречневая мука не содержит глютена и может быть использована для

приготовления безглютеновых продуктов, например, хлеба [1, 4–6]. В связи с этим в последние два десятилетия значительно вырос интерес к возделыванию гречихи и исследованию ее состава и свойств.

Наряду с указанными достоинствами гречневой крупы внимание исследователей и потребителей привлекает высокое содержание полифенолов и флавоноидов, обладающих высокой антиоксидантной активностью (АОА). Рутин является основным флавоноидным компонентом, обладающим гипотензивным действием, а также другими терапевтическими свойствами, направленными против заболеваний, связанных с наличием свободных радикалов [2, 7–9]. Помимо рутина гречиха может содержать катехины [10–12], кверцетин [9, 11–13], ориентин, изоориентин [11, 14], витексин [11, 14] и др. Наличие флавоноидов и полифенолов является основной причиной того,

что гречиха обладает более высокой АОА, чем другие злаки [15–17].

Основной аналитический метод, применяемый для определения флавоноидов в гречихе, – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с использованием спектрофотометрического детектора на диодной матрице и УФ- [8, 14, 18], масс-спектрометрического (МС) [11, 13, 19, 20] и электрохимического [21] детекторов. В различных публикациях содержание основного антиоксидантного компонента рутина, количественно определенного в зерне гречихи обыкновенной, варьировалось от 7 до 218 мг/кг [8, 16, 22, 23]. Флавоноиды присутствуют в гречихе также в связанной форме, причем количественно такие формы могут доминировать по сравнению со свободными соединениями [24], а фенольные кислоты существуют преимущественно в связанном состоянии [13]. До недавнего времени о наличии флаван-3-олов (катехинов) в экстрактах семян гречихи (*Fagopyrum esculentum* М.) практически не сообщалось. Однако в последних публикациях говорится о содержании катехина или/и эпикатехина на уровне рутина. Оно варьируется от 6 до 116 мг/кг [21, 23, 25, 26] для катехина и от 23 до 205 мг/кг [21, 26] для эпикатехина. Присутствие витексина в гречихе-ядрище доказано несколькими научными группами [11–14, 23]. Кверцетин обнаружен как в зернах татарской гречихи [23], так и в обыкновенной [9, 11, 13]. Несмотря на большое количество идентифицированных фенольных соединений в гречихе [11–13], количественный анализ зерен проводят в основном на содержание шести и менее соединений [8, 21, 22]. Круг фенолов, определяющих антиоксидантную активность гречихи, на сегодня не определен. Выраженная широкая вариабельность содержания флавоноидов и фенолов связана как с условиями выращивания и различными технологическими процессами (например, термической или механической обработкой), которые могут влиять на антиоксидантную активность и потребительские качества продуктов из гречихи [2, 27, 28], так и со способами подготовки пробы. Показано, что термообработка отрицательно влияет на количество фенолов: их общее содержание в цельной гречихе снижалось с 12.0 до 3.50 г-экв рутина/кг после термической обработки [14], а в процессе производства спагетти из гречихи потери фенолов составили 46% [20]. Существующие работы посвящены фенольным соединениям и АОА обыкновенной (*Fagopyrum esculentum* М.) гречихи [8, 10, 11, 13, 22], оценке содержания фенолов в хлебобулочных изделиях на основе гречихи или с добавками гречневой муки [5, 6], сравнению фенольного состава семян гречихи в зависимости от сорта и условий выращивания [29]. Публикации, в которых проводилось бы сравнение качественного состава и содержания свобод-

ных фенольных соединений зерновых продуктов гречихи, в том числе случайно приобретенных на рынках разных стран, авторами не найдены.

Цель данной работы – изучение и сравнение антиоксидантной активности, общего содержания фенолов и состава свободных фенольных соединений, хроматографических профилей в различных образцах гречихи, а также антиоксидантной активности пшеницы, ячменя, кукурузы и риса в условиях экстракции, оптимизированных для гречихи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В качестве растворителей использовали ацетонитрил (Merck, Германия), этанол (Solvaco, Швеция), реагенты для определения АОА – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ) и 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота (АБТС), реагент Фолина–Чеколтэу, стандарты антиоксидантов – рутин, катехин, эпикатехин, кверцетин, галловую, протокатеховую кислоты (Sigma-Aldrich, США), витексин (Fluka, Швейцария). Для приготовления растворов использовали воду, очищенную на системе Milli-Q. Стандартные растворы полифенолов и фенольных кислот готовили в 95%-ном этаноле с концентрацией 0.5 мг/мл и хранили при –18°C. Рабочие растворы и смеси веществ получали разбавлением исходных стандартных растворов этанолом непосредственно перед экспериментами.

Объекты исследования. Использовали образцы гречихи обыкновенной термообработанной (ядрища, от светло-коричневого до темно-коричневого цвета, обозначенные как ТГ1–ТГ4) и не подвергавшейся термообработке, “зеленую” гречиху (хлопья светло-зеленого цвета, мука и ядрища), ячменную, кукурузную, рисовую, пшеничную крупы, приобретенные на рынках России, Швеции, Польши и Литвы. Образцы (за исключением муки) измельчали на лабораторной мельнице ZM 1 (Retsch, Наан, Германия) с получением частиц диаметром 0.5 мм и хранили при –18°C в пакетах в атмосфере азота. Для экстракции образцы смешивали с соответствующим растворителем при соотношении массы молотого образца и объема экстрагента 1 : 10. Все образцы после экстракции центрифугировали в течение 3 мин при 2500 g. Для экстракции свободных фенолов из ячменя, кукурузы, риса и пшеницы использовали условия, оптимизированные для образцов гречихи.

Оборудование и условия экспериментов. Спектрофотометрические измерения проводили в видимой области спектра на спектрофотометре Jasco (V-530) при комнатной температуре. Использовали кюветы из оргстекла с длиной оптического пути 1 см. ВЭЖХ-эксперименты проводили на установке Agilent 1100 (Agilent, США), снабженной спек-

трофотометрическим детектором на диодной матрице и флуоресцентным детектором. Для хроматографирования использовали колонку Atlantis C₁₈, 150 × 4.6 мм, диаметр частиц 3 мкм (Waters, Ирландия) с термостатированием при 20°C и установкой длин волн 210 и 280 нм. Для обработки данных применяли программу ChemStation. Объем вводимого образца составлял 2 мкл. Использовали градиентное элюирование смесью ацетонитрила (А) и 30 мМ фосфатного буферного раствора с рН 2.3, соотношение в которой изменялось по следующей программе: 0–20 мин, А 6–20%; 20–40 мин, А 20–30%; 40–70 мин, А 30–70%; 70–85 мин, А 70%; 85–88 мин, А 70–6%; 88–100 мин, А 6%.

В эксперименте с ВЭЖХ-МС использовали установку Agilent 1100 LC/MSD со спектрофотометрическим детектором и масс-селективным квадрупольным детектором (G1946D) и ионизацией электрораспылением. Масс-спектры записывали при отрицательной и положительной ионизации в интервале m/z 150–1000. Температуру осушающего газа (N₂) устанавливали 350°C, скорость – 9.0 л/мин. Напряжение на капилляре составляло 3500 В при положительной и 3200 В при отрицательной ионизации. Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax SB C₁₈, 150 × 4.6 мм, размер частиц 3 мкм (Agilent, США). Подвижная фаза – смесь ацетонитрила и 10 мМ уксусной кислоты при скорости потока 0.35 мл/мин с использованием градиентной программы, аналогичной программе для ВЭЖХ с детектором на диодной матрице. Для идентификации использовали стандартные образцы фенольных соединений.

Количественные расчеты проводили с использованием градуировочного графика. Полученные результаты представляли как средние значения с доверительным интервалом для трех экспериментов, если не указано иное. Предел обнаружения и предел определения рассчитывали при соотношении сигнал/шум 3 : 1 и 10 : 1 соответственно.

Степень извлечения рассчитывали на основе ввода известного количества стандартного вещества в образец ТГ4 ($n = 3$). Для расчета использовали следующую формулу: $(c_1 - c_0)/c_{доб}$, где c_1 – концентрация, определенная в образце после ввода стандартной добавки, c_0 – концентрация в образце до введения стандарта, а $c_{доб}$ – добавленная концентрация. Стабильность флавоноидов в экстрактах при хранении (8°C) оценивали через 24, 48 ч и 7 сут методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором на диодной матрице по площадям пиков.

Определение антиоксидантной активности. Стандартный раствор ДФПГ с концентрацией 5×10^{-4} моль/л готовили в 95%-ном этаноле и хранили при –18°C (раствор стабилен в течение ми-

нимум одного месяца). Антиоксидантную активность экстрактов определяли по реакции с ДФПГ⁺ катион-радикалом согласно методу [30] с небольшими изменениями. К рассчитанному объему экстракта добавляли 95%-ный раствор этанола и стандартный раствор ДФПГ; момент смешивания с ДФПГ принимали за начало реакции. Реакционную смесь энергично встряхивали и измеряли изменение оптической плотности во времени при длине волны 515 нм (цвет менялся с фиолетового на бледно-желтый). Антиоксидантную активность (%) выражали уравнением:

$$AOA = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100\%,$$

где A_0 – оптическая плотность раствора, приготовленного смешиванием 0.3 мл раствора ДФПГ и 2.7 мл этанола; 95%-ный этанол служил раствором сравнения; A_s – оптическая плотность этанольного экстракта.

Во втором способе антиоксидантную активность экстрактов оценивали по реакции с АБТС⁺, оптическую плотность измеряли при 734 нм. Катион-радикал АБТС⁺ получали взаимодействием исходного водного раствора реагента (7 ммоль/л) с персульфатом калия (2.45 ммоль/л, конечная концентрация) и выдерживанием смеси при комнатной температуре в течение 12–16 ч в темноте для проявления цвета [31]. Раствор стабилен в указанных условиях 3 дня. Перед работой раствор разбавляли 95%-ным этанолом до величины оптической плотности 0.70 ± 0.02 при 734 нм в кювете толщиной 1 см. Экстракты гречихи смешивали с 95%-ным этанолом и раствором АБТС в таких пропорциях, чтобы уменьшение оптической плотности достигало 20–80% от исходной величины.

Определение суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов. Содержание суммы фенольных соединений оценивали спектрофотометрически с использованием реагента Фолина–Чеколтэу [14, 18]. Для этого 0.25 мл экстракта смешивали с 0.25 мл реагента Фолина–Чеколтэу (предварительно разбавленного водой в соотношении 1 : 1), 0.5 мл насыщенного водного раствора Na₂CO₃ и 4 мл воды. Смесь выдерживали при комнатной температуре 25 мин, центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g с последующим измерением оптической плотности при 725 нм. Отдельно проводили аналогичные эксперименты с применением растворов рутина разных концентраций с построением градуировочной зависимости. Суммарное содержание фенольных соединений в анализируемых экстрактах рассчитывали в грамм-эквивалентах рутин на 1 кг образца (г/кг).

Содержание флавоноидов в экстрактах гречихи определяли спектрофотометрически, исполь-

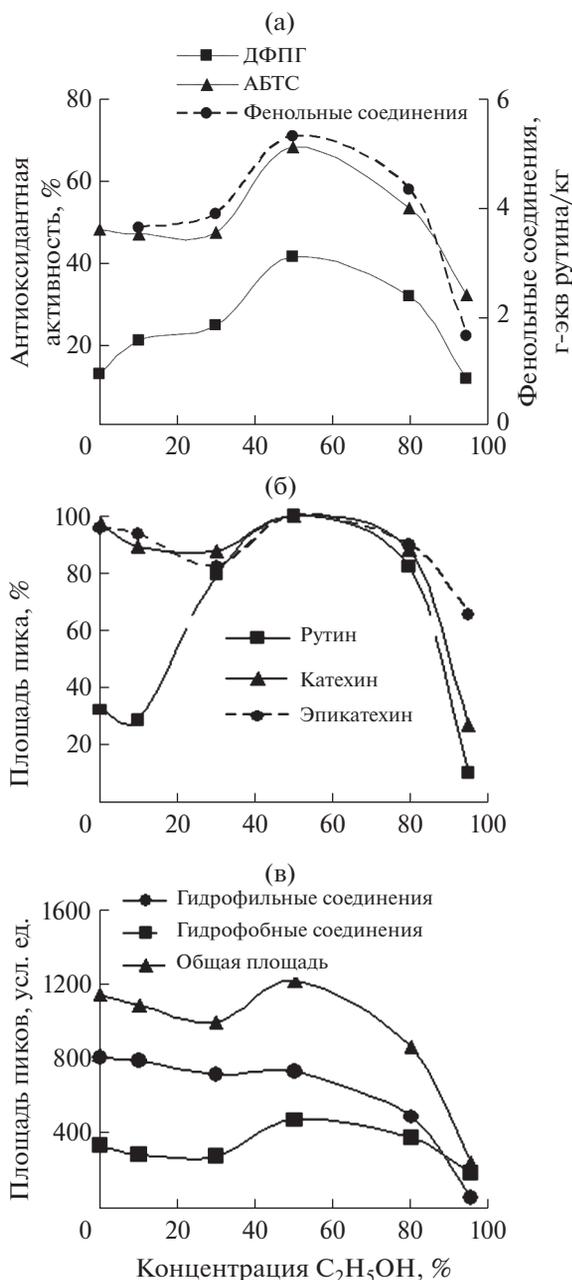


Рис. 1. Влияние концентрации этанола на (а): АОА экстракта гречихи в реакциях ДФПГ и АБТС и общее содержание фенольных соединений по методу Фолина–Чеколтэу; (б): площадь пиков рутина, катехина и эпикатехина; (в): общее количество экстрагируемых гидрофильных и гидрофобных веществ в хроматографическом профиле экстрактов гречихи.

зую методику, описанную в работе [32], с незначительной модификацией. Для этого 1 мл этанольного экстракта смешивали с 0.8 мл воды и 0.2 мл раствора 2-аминоэтилдифенилбората (10 г/л). Поглощение растворов измеряли при 404 нм с использованием дистиллированной воды в качестве раствора сравнения. Оптическую плотность экс-

трактов сравнивали с поглощением стандартных растворов рутина с концентрациями 550 мг/л, а содержание флавоноидов выражали в грамм-эквивалентах рутина на 1 кг пробы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий экстракции свободных (несвязанных) антиоксидантов. Оценка антиоксидантной активности спектрофотометрическим методом с использованием реагентов ДФПГ и АБТС показала, что максимальная экстракция свободных антиоксидантов достигается с использованием 50%-ного раствора этанола (рис. 1а). Применение 30%-ного и 80%-ного растворов этанола приводило к снижению эффективности экстракции, а при использовании 95%-ного заметно падало количество извлеченных антиоксидантов. Наблюдали подобное влияние концентрации этанола и на суммарное содержание рутина, катехина и эпикатехина, полученное методом ВЭЖХ (рис. 1б), а также на общее количество экстрагируемых соединений (рис. 1в), оцениваемых как сумма площадей пиков в ВЭЖХ-УФ. Особенно заметно снижение эффективности экстракции для гидрофильных веществ, выходящих в начале хроматограммы при использовании 95%-ного этанола. В диапазоне концентраций этанола 0–30% экстракция затруднялась из-за образования вязкой коллоидной суспензии.

В связи с устоявшейся практикой использования водно-метанольных растворов для извлечения фенолов из гречихи [14, 21, 25] нами проведено сравнение водно-метанольных и водно-этанольных экстрактов. Показано, что эффективность экстракции антиоксидантов 80%-ным раствором метанола сопоставима с таковой для 80%-ного этанола; при концентрации 50% метанол оказался менее эффективен. В качестве оптимального и более экологичного варианта извлечения свободных фенолов выбрали 50%-ный раствор этанола.

Для гречихи описаны как быстрый (1.5–2 мин) [14, 21], средней продолжительности (30 мин) при комнатной температуре, так и длительный (более 1 ч) при нагревании варианты экстракции фенольных соединений [13, 15, 18]. Нами рассмотрены условия извлечения при различных температурах и времени, а также ряд подходов [33], влияющих на эффективность экстракции. В настоящей работе оптимальные результаты экстракции достигнуты с помощью встряхивания на орбитальном шейкере (вортекс) в течение 2 мин при комнатной температуре. Применение ультразвуковой обработки не дало преимуществ. Использование повышенных температур (40°C и 55°C) и увеличение времени экстракции (2 ч) незначительно снижало (5–10%) антиоксидантную активность экстрактов гречихи с ДФПГ, что мо-

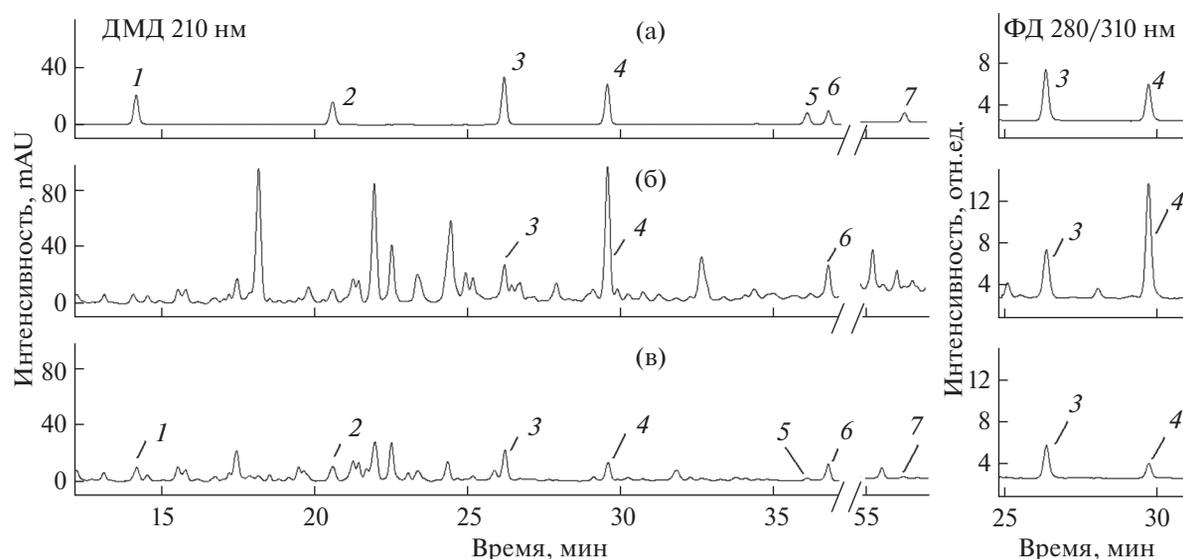


Рис. 2. Хроматограммы стандартных растворов (а) и этанольных экстрактов зерен гречихи, не подвергавшихся термообработке (б), термообработанных (в). 1 – протокатеховая кислота, 2 – галловая кислота, 3 – катехин, 4 – эпикатехин, 5 – витексин, 6 – рутин, 7 – кверцетин. Условия хроматографирования см. в “Экспериментальной части”. ДМД – спектрофотометрический детектор на диодной матрице, ФД – флуоресцентный детектор.

жет быть связано с деградацией веществ при термическом воздействии.

Характеристика этанольных экстрактов методом ВЭЖХ. На рис. 2, 3а, 3б показаны типичные хроматограммы этанольных экстрактов термообработанной крупы (ТГ) и зерен гречихи, не подвергавшихся термообработке (НТГ), с использованием спектрофотометрического, флуоресцентного и масс-спектрометрического детекторов. Для образцов НТГ гречихи в хроматографическом профиле отмечался значительно более высокий уровень экстрагируемых соединений. На основании данных литературы выбрали 16 стандартных веществ с последующей идентификацией семи фенолов в исследованных образцах гречихи (рутин, (–)-эпикатехин, (+)-катехин, витексин, кверцетин, галловая кислота и протокатеховая кислота). Результаты показали, что наряду с рутином несвязанные (–)-эпикатехин и (+)-катехин можно считать веществами, определяющими антиоксидантную активность гречихи. Витексин, кверцетин, протокатеховая и галловая кислоты обнаружены в основном в термообработанных зернах. Другие соединения: катехин-глюкозид (m/z 451, 17.7 мин), 1-О-кофеил-6-О-альфа-рамнопиранозил-бета-гликопиранозид (swertiamacroside) (m/z 487, 20.1 мин), (эпи)афзелихин(эпи)катехин (m/z 561, 27.6 мин), эпикатехин галлат (m/z 441, 33.7 мин), (эпи)афзелихин-(эпи)катехин-О-диметилгаллат (m/z 741, 42.8 мин), эпикатехин-О-3,4-диметилгаллат (m/z 469, 46.7 мин) определены по масс-спектрам, полученным методом ВЭЖХ-МС (рис. 3а, 3б) и сопоставленным с данными [11–13]. Масс-спектр пика со

временем удерживания 50.7 мин (m/z 469), обнаружен во всех термообработанных образцах (рис. 3б). При сопоставлении с масс-спектром пика, выходящего на 46.7 мин, можно предположить изомер эпикатехин-О-3,4-диметилгаллата, что согласуется с результатами [12]. (Эпи)афзелихин(эпи)катехин (m/z 561) детектировали в образцах НТГ гречихи в минорных количествах.

На хроматограмме ячменя (рис. 3в) профиль экстрагированных соединений существенно отличается по составу от гречихи, на что указывали и другие авторы [34, 35]. С применением пробоподготовки, оптимизированной для гречихи, хроматографические профили экстрактов кукурузы, риса и пшеницы (рис. 3г–е) оказались бедны фенольными соединениями, что может быть также связано с существованием фенолов в этих злаковых в связанном виде.

Валидация методики. В табл. 1 представлены результаты валидации методики. Зависимости между площадями пиков, оцененными методом ВЭЖХ, и концентрациями индивидуальных фенольных соединений линейны в интервале 0.05–20 мг/л. Коэффициенты корреляции для градуировочных кривых находились в диапазоне 0.9996–0.9999. Правильность результатов определяли методом добавок путем введения стандартных веществ, идентифицированных в гречихе, в образец ТГ4. Средние значения степени извлечения соединений ($n = 3$) находились в диапазоне 77–89% (табл. 1). Воспроизводимость результатов определения содержания для всех выбранных флавоноидов не превышала 4%.

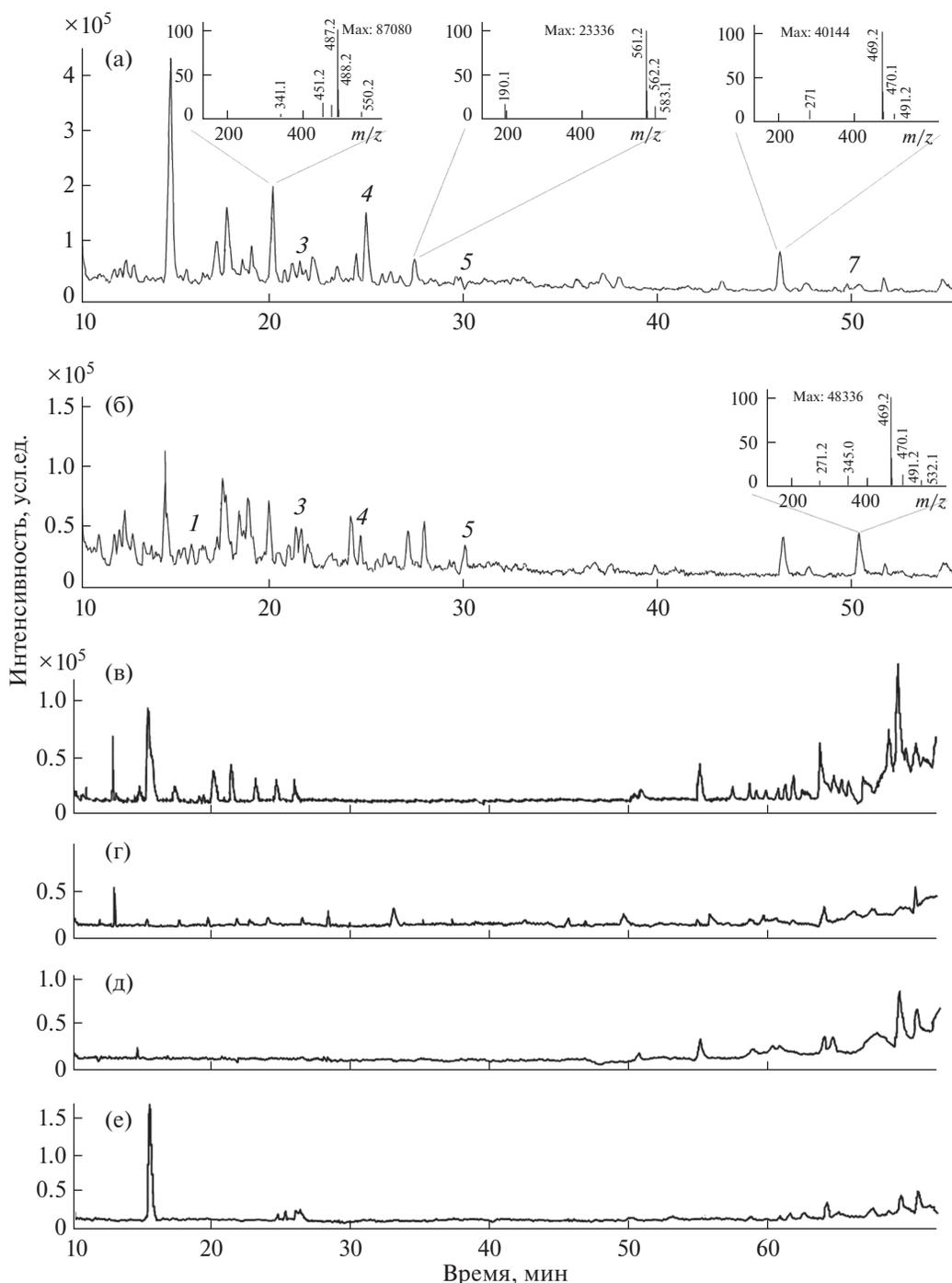


Рис. 3. Хроматограммы этанольных экстрактов “зеленой” гречихи (хлопья) (а), образца гречихи ТГ4 (б), ячменя (в), кукурузы (г), риса (д), пшеницы (е) по полному ионному току (интервал сканирования m/z 150–600) в режиме регистрации отрицательных ионов. Обозначения (а), (б) как на рис. 2.

Флавоноиды и фенольные кислоты в гречихе. На рис. 4 представлены результаты определения концентрации рутина, катехина и эпикатехина, оцененные методом ВЭЖХ-УФ. Так, в образцах содержание рутина варьировалось в диапазоне от $(6.72 \pm 0.27) \times 10^{-2}$ до $(14.1 \pm 0.6) \times 10^{-2}$ г/кг и

было несколько выше для образцов НТГ, по сравнению с ТГ1–ТГ4. Для эпикатехина наблюдали сходную тенденцию и его концентрация варьировалась от $(6.40 \pm 0.12) \times 10^{-2}$ до $(11.6 \pm 0.2) \times 10^{-2}$ г/кг в образцах НТГ и от $(2.46 \pm 0.05) \times 10^{-2}$ до $(4.57 \pm 0.09) \times 10^{-2}$ г/кг для ТГ1–ТГ4.

Таблица 1. Метрологические характеристики определения фенольных соединений

Соединение	Уравнение градуировочного графика ^a	Предел обнаружения, мкг/л	Предел определения, мкг/л	Степень извлечения, %
Катехин	$y = 77.5x - 0.12$	2.0	6.6	83 ± 2
Эпикатехин	$y = 63.1x - 0.022$	2.4	8.1	89 ± 1
Рутин	$y = 22.1x + 0.058$	4.3	14	86 ± 2
Протокатеховая кислота	$y = 47.1x - 1.17$	3.1	10	80 ± 5
Галловая кислота	$y = 41.5x - 0.95$	4.5	15	77 ± 3
Витексин	$y = 20.8x - 0.32$	8.5	28	83 ± 1
Кверцетин	$y = 40.4x - 4.6$	5.3	18	84 ± 2

^a x – концентрация вещества, мг/л.

Содержание катехина, наоборот, было выше во всех образцах термообработанной гречихи ТГ1–ТГ4 от $(4.86 \pm 0.16) \times 10^{-2}$ до $(8.70 \pm 0.28) \times 10^{-2}$ г/кг по сравнению с НТГ (от $1.81 \pm 0.06) \times 10^{-2}$ до $(3.33 \pm 0.11) \times 10^{-2}$ г/кг. Соотношение количества катехина/эпикатехина как маркера термической обработки гречихи было бы интересно оценить на большей выборке. В изученных образцах содержание эпикатехина сопоставимо с таковым для рутина. Значительный вклад в антиоксидантную активность гречихи эпикатехина отмечен также в работе [10], хотя в некоторых случаях [23] эпикатехин не детектировался.

Количество свободных фенольных кислот составило 2.86 и 2.42 мг протокатеховой кислоты/100 г, и 3.27 и 3.88 мг галловой кислоты/100 г ($n = 2$, $\Delta \pm 0.01$) для образцов ТГ3 и ТГ4 соответственно. В других образцах термообработанной гречихи (ТГ1 и ТГ2) имелось следовое содержание этих кислот. Минорные флавоноиды витек-

син и кверцетин обнаружены в образцах ТГ3 и ТГ4 в количестве 0.41 ± 0.05 и 1.13 ± 0.07 мг витексина/100 г, 0.55 ± 0.10 и 0.50 ± 0.05 мг кверцетина/100 г гречихи. Наличие следовых количеств этих соединений в НТГ подтверждено методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС.

Антиоксидантная активность и содержание фенолов в образцах гречихи. В табл. 2 представлены значения антиоксидантной активности экстрактов гречихи, рассчитанные по данным спектрофотометрии. Экстракты зерен, не подвергавшихся термообработке (НТГ), проявляли более высокую активность в реакции с ДФПГ (от 49.4 до 69.6%), по сравнению с ТГ1–ТГ4, характеризующимися значениями АОА от 36.5 до 47.6%. Результаты указывают на уменьшение количества антиоксидантов в зерне гречихи после термообработки, что приводит к снижению АОА (до 1.4 раза). Среди других зерновых можно отметить ячмень, экстракт которого характеризовался в

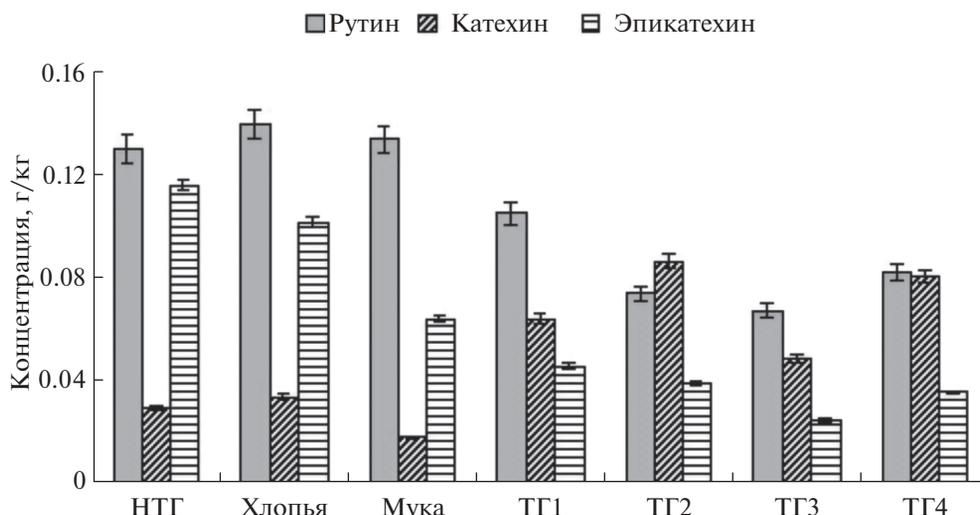
**Рис. 4.** Содержание рутина, катехина и эпикатехина в продуктах гречихи.

Таблица 2. Антиоксидантная активность, содержание фенольных соединений и флавоноидов в продуктах гречихи

Образец гречихи	Антиоксидантная активность ^а , %	Фенольные соединения ^б , г-экв рутина/кг
НТГ ^в	67.8 ± 1.7	7.84 ± 0.07
Хлопья ^в	69.6 ± 2.1	8.72 ± 0.15
Мука гречневая ^в	49.4 ± 1.8	5.56 ± 0.09
ТГ1	47.6 ± 1.3	4.44 ± 0.07
ТГ2	45.3 ± 1.5	4.40 ± 0.07
ТГ3	45.4 ± 1.3	3.77 ± 0.10
ТГ4	36.5 ± 1.1	2.83 ± 0.12

^а Реакция с ДФПГ, ^б оценка по методу Фолина–Чокалтэу, ^в образцы, не подвергавшиеся термообработке, “зеленая” гречиха.

1.5 раза меньшей АОА по сравнению с гречихой, в то время как пшеница, рис и кукуруза практически не проявляли АОА по методу ДФПГ. Это соответствует бедному хроматографическому профилю экстрактов.

Установлено, что содержание общих фенолов, найденных по методу Фолина–Чокалтэу (табл. 2) для продуктов из гречихи без термической обработки больше (от 5.56 до 8.72 г-экв рутина/кг) по сравнению с термообработанными (от 2.83 до 4.40 г-экв рутина/кг), что согласуется с результатами, полученными методом ДФПГ.

Концентрация флавоноидов, определенных с помощью реагента 2-аминоэтилдифенилбората, для всех продуктов из гречихи сопоставима и находится в диапазоне от 0.307 ± 0.006 до 0.40 ± 0.05 г-экв рутина/кг, нивелируя какие-либо различия в образцах.

Корреляция между антиоксидантной активностью и содержанием фенольных соединений и флавоноидов. Найдена линейная корреляция между общим содержанием фенолов в экстрактах гречихи и их АОА в реакции с ДФПГ ($y = 5.61x + 21.6$, $R^2 = 0.971$, где y – АОА в реакции с ДФПГ, %; x – общее содержание фенолов по методу Фолина–Чокалтэу, г-экв рутина/кг). Это позволяет говорить о доминировании фенольных соединений в гречихе среди веществ, вносящих вклад в АОА. Несмотря на неспецифичность, метод Фолина–Чокалтэу широко используется для определения общего количества фенолов [36], коррелируя с АОА для образцов, богатых антиоксидантами. Получена также линейная зависимость между суммарной концентрацией трех (рутина, катехина, эпикатехина) флавоноидов, оцененной методом ВЭЖХ, и АОА в реакции с ДФПГ ($y = 268x + 6.7$, $R^2 = 0.963$, где y – АОА в реакции с ДФПГ, %; x – сумма концентраций, г/кг), что подтверждает доминирование данных соединений среди антиоксидантов гречихи.

С помощью ВЭЖХ с разными детекторами и спектрофотометрического метода сравнили содержание и антиоксидантную активность флавоноидов и фенольных соединений для семи продуктов из гречихи. Экстракция образцов гречихи 50%-ным этанолом позволила добиться более высоких антиоксидантной активности и содержания фенола по сравнению с другими водно-спиртовыми растворами. Для всех образцов гречихи обнаружена линейная корреляция между суммарным содержанием фенольных соединений и их антиоксидантной активностью в реакции с ДФПГ. Рутин, катехин и эпикатехин – доминирующие антиоксиданты, суммарная концентрация которых коррелирует с антиоксидантной активностью. Наибольшее содержание фенольных соединений и флавоноидов и антиоксидантная активность обнаружены у “зеленой” гречихи (крупы, муки, хлопьев), не подвергавшейся термообработке.

Получен хроматографический профиль продуктов из гречихи. По сравнению с экстрактами из других злаков (с применением условий экстракции, оптимизированных для гречихи) ячмень обладал в среднем в 1.5 раза меньшей АОА, чем гречиха, в то время как пшеница, рис и кукуруза – незначительными АОА, свидетельствующими о небольшом количестве свободных фенолов. В подтверждение этого хроматографические профили пшеницы, риса и кукурузы характеризовались ограниченным количеством пиков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Шведского Института (Swedish Institute) и гранта РНФ – спектрофотометрическое определение АОА (проект №21-13-00267).

Автор С.С. Алексенко выражает глубокую благодарность к.х.н. Е.А. Ястрбовой, Шведский университет сельскохозяйственных наук (г. Упсала), за предоставленную возможность выполнения работы и критические замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giménez-Bastida J.A., Piskula M., Zieliński H.* Recent advances in development of gluten-free buckwheat products // *Trends Food Sci. Technol.* 2015. V. 44. № 1. P. 58.
2. *Sytar O., Brestic M., Zivcak M., Tran L.-S.P.* The Contribution of buckwheat genetic resources to health and dietary diversity // *Curr. Genomics.* 2016. V. 17. № 3. P. 193.
3. *Zhang Zh.-L., Zhou M.-L., Tang Y., Li F.-L., Tang Y.-X., Shao J.-R., Xue W.-T., Wu Y.-M.* Bioactive compounds in functional buckwheat food // *Food Res. Int.* 2012. V. 49. P. 389.
4. *Carbo R., Gordun E., Fernandez A., Ginovart M.* Elaboration of a spontaneous gluten-free sourdough with a mixture of amaranth, buckwheat, and quinoa flours analyzing microbial load, acidity, and pH // *Food Sci. Technol. Int.* 2020. V. 26. № 4. P. 344. <https://doi.org/10.1177/1082013219895357>
5. *Stokic E., Mandic A., Sakac M., Misan A., Pestoric M., Simurina O., Sedej I.* Quality of buckwheat-enriched wheat bread and its antihyperlipidemic effect in statin treated patients // *LWT Food Sci. Technol.* 2015. V. 63. P. 556.
6. *Verardo V., Glicerina V., Cocci E., Frenich A.G., Romani S., Caboni M.F.* Determination of free and bound phenolic compounds and their antioxidant activity in buckwheat bread loaf, crust and crumb // *LWT Food Sci. Technol.* 2018. V. 87. P. 217.
7. *Ahmed A., Khalid N., Ahmad A., Abbasi N.A., Latif M.S.Z., Randhawa M.A.* Phytochemicals and bio-functional properties of buckwheat: a review // *J. Agric. Sci.* 2014. V. 152. № 3. P. 349.
8. *Kalinova J., Vrchotová N.* The influence of organic and conventional crop management, variety and year on the yield and flavonoid level in common buckwheat groats // *Food Chem.* 2011. V. 127. № 2. P. 602.
9. *Sedej I., Sakač M., Mandić A., Mišan A., Tumbas V., Čanađanović-Brunet J.* Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain and fractions: Antioxidant compounds and activities // *J. Food Sci.* 2012. V. 77. P. 954.
10. *Kalinova J., Vrchotová N., Trška J.* Phenolics levels in different parts of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) achenes // *J. Cereal Sci.* 2019. V. 85. P. 243.
11. *Verardo V., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Marconi E., Fernández-Gutiérrez A., Caboni M.F.* Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC-ESI-TOF-MS) // *J. Cereal Sci.* 2010. V. 52: P. 170.
12. *Zhang W., Zhu Y., Liu Q., Bao J., Liu Q.* Identification and quantification of polyphenols in hull, bran and endosperm of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds // *J. Funct. Food.* 2017. V. 38. Part A. P. 363.
13. *Inglett G.E., Chen D., Berhow M., Lee S.* Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions // *Food Chem.* 2011. V. 125. № 3. P. 923.
14. *Zielińska D., Szawara-Nowak D., Zieliński H.* Comparison of spectrophotometric and electrochemical methods for the evaluation of the antioxidant capacity of buckwheat products after hydrothermal treatment // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 6124.
15. *Holasova M., Fiedlerova V., Smrcinova H., Orsak M., Lachman J., Vavrejinova S.* Buckwheat – the source of antioxidant activity in functional food // *Food Res. Int.* 2002. V. 35. № 23. P. 207.
16. *Gallardo C., Jiménez L., García-Conesa M.-T.* Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions // *Food Chem.* 2006. V. 99. № 3. P. 455.
17. *Zdunczyk Z., Flis M., Zieliński H., Wroblewska M., Antoszkievicz Z., Juskiewicz J.* In vitro antioxidant activities of barley, husked oat, naked oat, triticale, and buckwheat wastes and their influence on the growth and biomarkers of antioxidant status in rats // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. P. 4168.
18. *Şensoy İ., Rosen R.T., Ho Ch-T., Karwe M.V.* Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity // *Food Chem.* 2006. V. 99. P. 388.
19. *Öschlänger C., Regos I., Zeller F.J., Treutter D.* Identification of galloylated propylargininidins and procyanidins in buckwheat grain and quantification of rutin and flavanols from homostylous hybrids originating from *F. esculentum* × *F. Homotropicum* // *Phytochemistry.* 2008. V. 69. P. 1389.
20. *Verardo V., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Marconi E., Fernández-Gutiérrez A., Caboni M.F.* Determination of free and bound phenolic compounds in buckwheat spaghetti by RP-HPLC-ESI-TOF-MS: effect of thermal processing from farm to fork // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 7700.
21. *Danila A.-M., Kotani A., Hakamata H., Kusu F.* Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench by micro-high-performance chromatography with electrochemical detection // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. № 4. P. 1139.
22. *Jiang P., Burczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J.A., Briggs C.J.* Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation // *Food Res. Int.* 2007. V. 40. № 3. P. 356.
23. *Lee L.S., Choi E.J., Kim C.H., Sung J.M., Kim Y.B., Seo D.H., Choi H.W., Choi Y.S., Kum J.S., Park J.D.* Contribution of flavonoids to the antioxidant properties of common and tartary buckwheat // *J. Cereal Sci.* 2016. V. 68. P. 181.
24. *Hung P.V., Morita N.* Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat and their antioxidant capacities // *Food Chem.* 2008. V. 109. № 2. P. 325.
25. *Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E.* Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking // *Food Chem.* 2010. V. 119. № 2. P. 770.
26. *Watanabe M., Ayugase J.* Chiral separation of catechins in buckwheat groats and the effect of phenolic compounds in mice subjected to restraint stress // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. P. 6438.

27. Kim S.-J., Kawaharada C., Suzuki T., Saito K., Hashimoto N., Takigawa S., Noda T., Matsuura-Endo Ch., Yamauchi H. Effect of natural light periods on rutin, free amino acid and vitamin C contents in the sprouts of common (*Fagopyrum esculentum* Moench) and tartary (*F. tataricum* Gaertn.) buckwheats // *Food Sci. Technol. Res.* 2006. V. 12. № 3. P. 199.
28. Sciarini L.S., Steffolani M.E., Fernández A., Paesani C., Pérez G.T. Gluten-free breadmaking affected by the particle size and chemical composition of quinoa and buckwheat flour fractions // *Food Sci. Technol. Int.* 2020. V. 26. № 4. P. 321.
29. Siracusa L., Gresta F., Sperlinga E., Ruberto G. Effect of sowing time and soil water content on grain yield and phenolic profile of four buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) varieties in a Mediterranean environment // *J. Food Composit. Anal.* 2017. V. 62. P. 1.
30. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // *LWT Food Sci. Technol.* 1995. V. 28. P. 25.
31. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radic. Biol. Med.* 1999. V. 26. P. 1231.
32. Oomah B.D., Cardador-Martínez A., Loarca-Piña G. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L) // *J. Sci. Food Agric.* 2005. V. 85. № 6. P. 935.
33. Oroian M., Dranca F., Ursachi F. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis // *J. Food Sci. Technol.* 2020. V. 57. № 1. P. 70. doi.org/https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x
34. Verardo V., Bonoli M., Marconi E., Caboni M.F. Determination of free flavan-3-ol content in barley (*Hordeum vulgare* L.) air-classified flours: comparative study of HPLC-DAD/MS and spectrophotometric determinations // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 6944.
35. Алексенко С.С. Антиоксидантная активность и состав фенольных соединений гречихи и ячменя по данным спектрофотометрии и ВЭЖХ // *Журн. аналит. химии.* 2013. Т. 68. № 5. С. 505. (Aleksenko S.S. Antioxidant activity and phenolic compounds of buckwheat and barley by the data of spectrophotometry and HPLC // *J. Anal. Chem.* 2013. V. 68. № 5. P. 458.)
36. Naczki M., Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1054. P. 95.

УДК 543.[33+054+421]

ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОВОКАИНА С ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫМ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ МИЦЕЛЛАМИ ПАВ

© 2022 г. Т. А. Соколова^а, С. Ю. Доронин^{а, *}^аСаратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Институт химии
ул. Астраханская, 18/3, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: doroninsu@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2021 г.

После доработки 08.09.2021 г.

Принята к публикации 09.09.2021 г.

Работа посвящена извлечению и концентрированию новокаина с применением смешанных поверхностно-активных веществ неионного (Тритон X-114) и анионного (додецилсульфат натрия) типов с фотометрической регистрацией аналитического сигнала. Метод основан на реакции конденсации новокаина с *n*-диметиламинобензальдегидом (рН 2.5–3.5) и последующей мицеллярной экстракции окрашенной аналитической формы – основания Шиффа. Для эффективного извлечения этой формы оптимизированы параметры мицеллярной экстракции (концентрации реагентов: $c_{\text{NaCl}} = 0.5\text{--}1\text{ М}$, $c_{\text{Тритон X-114}} = 2 \times 10^{-3}\text{--}1 \times 10^{-2}\text{ М}$; условия: время центрифугирования 5 мин при 3000 об/мин). Предложенный способ позволяет определять новокаин в интервале концентраций 38–4800 нг/мл ($s_r \leq 7\%$, предел обнаружения 19 нг/мл), что на несколько порядков ниже, чем в известных спектрофотометрических вариантах. Закон Бугера–Ламберта–Бера выполняется в интервале $8 \times 10^{-7}\text{--}4 \times 10^{-5}\text{ М}$. Разработанный экстракционно-фотометрический способ апробирован при определении новокаина в ампульных 0.5%-ных растворах для инъекций.

Ключевые слова: новокаин, поверхностно-активные вещества (ПАВ), *n*-диметиламинобензальдегид, мицеллярная экстракция, cloud point extraction, фотометрия, смешанные мицеллы.

DOI: 10.31857/S0044450222080151

Новокаин – местноанестезирующий препарат, который при контакте с периферийной нервной тканью блокирует проведение нервного импульса и устраняет все ощущения в этой зоне без выключения сознания. Кроме того, он обладает различным аллергенным потенциалом, что непосредственно связано с его химической природой [1]. Новокаин содержит первичную аминогруппу, благодаря которой он участвует в реакциях образования окрашенных аналитических форм, на которых базируются известные фотометрические методики его определения. К таким соединениям относят азосоединения, основания Шиффа (ОШ), соли гидроксамовых кислот и т.п. [2].

Так, например, для идентификации новокаина наиболее часто применяют реакции его диазотирования с последующим азосочетанием с органическими реагентами [2]. Они включают две стадии: окисление новокаина в кислой среде нитритом натрия и сочетание в щелочной среде образующегося диазопроизводного с ароматическими аминами или фенолами. В качестве азосоставляющей применяют тимол, хинозол (8-гидроксихинолиний сульфат), 8-оксихинолин, роданин, а также 1- и 2-нафтолы. Наилучшие метрологиче-

ские характеристики для этого типа реакций достигнуты с роданином и хинозолом: пределы обнаружения составили 0.6 и 1.5 мкг/мл соответственно. Эти реакции, наряду с достоинствами (чувствительность, контрастность), имеют существенные недостатки: сложность механизма; неустойчивость растворов NaNO_2 ; необходимость строгого соблюдения условий.

Другой тип реакций фотометрического определения новокаина – его конденсация с альдегидами (*n*-диметиламинобензальдегид (ДМАБА), *n*-диметиламинокоричный альдегид) в кислых средах, протекающая, в отличие от реакций диазотирования и азосочетания, в одну стадию с образованием окрашенных ОШ [2]. Этим способом определяют новокаин в концентрации не ниже 0.1 мкг/мл, что не соответствует современным требованиям аналитического контроля.

Третий тип реакций фотометрического определения новокаина – гидроксамовая реакция, которая применяется для идентификации сложнойэфирной группы новокаина. При взаимодействии с гидросиламином в щелочной среде такие аналиты образуют гидроксамовые кислоты; в

кислой среде с солями железа(III) они дают окрашенные гидроксаматы вишневого цвета. С помощью этой реакции новокаин определяют в лекарственных средствах.

Благодаря доступности аппаратуры и простоте выполнения спектрофотометрия получила широкое распространение в анализе лекарственных препаратов, в том числе и новокаина. Недостаточную чувствительность метода успешно устраняют предварительной экстракцией, а селективность дополнительно повышают за счет применения хроматографии [3].

Способы спектрофотометрического определения новокаина и других органических аналитов, как правило, осложнены не количественным выходом соответствующих аналитических форм, что обусловлено преимущественно низкой скоростью реакций с участием органических реагентов. Такие реакции мало специфичны, осложнены побочными процессами и сильно зависят от условий (рН, температуры, природы растворителя, способов приготовления и концентрации реагентов и др.) [4]. Для улучшения метрологических характеристик фотометрического определения новокаина применяют его предварительное концентрирование с классическими растворителями или водными растворами ПАВ. Так, известны варианты концентрирования новокаина в виде интенсивно окрашенных ионных ассоциатов с кислотными красителями, такими как ализариновый красный С [5], бромтимоловый и бромфеноловый синий [2], пикрат-ионы [6] с применением хлороформа, толуола и октанола-1.

Особый интерес вызывают способы фотометрического определения новокаина, основанные на применении организованных сред водных растворов ПАВ. Последние используют для разделения и концентрирования различных по природе органических аналитов, улучшая метрологические характеристики фотометрических методик. При этом принципиальное значение имеет интервал концентраций растворов ПАВ. При концентрациях ПАВ, близких к критической концентрации мицеллообразования (ККМ), образуются "псевдофазы" – мицеллы ПАВ, выполняющие функцию "микрореакторов". При $c_{\text{ПАВ}} \gg \text{ККМ}$ формируются двухфазные жидкостно-жидкостные системы, в которых осуществляют экстракцию в "точке помутнения" (cloud point extraction), как правило, органических аналитов или их аналитических форм. Так, например, "псевдофазная" модель экстракции реализована для системы новокаин–*n*-диметиламинобензальдегид–додецилсульфат натрия (ДДС) с пределом обнаружения 0.2 мкг/мл [7]. Предложены также индикаторные пленки с иммобилизованными в желатиновый гель ДДС и альдегидами (ванилин, *n*-диметиламинокоричный альдегид) [8], позво-

ляющие определять новокаин в диапазоне содержаний от 71 до 5430 мг/л.

Цель настоящего исследования – разработка подхода к фотометрическому определению ультрамалых количеств новокаина, основанного на применении смешанных мицелл анионных и неионных ПАВ и состоящего в эффекте двойного "псевдофазного" (мицеллы анионных ПАВ) и "cloud point" (мицеллярно-насыщенные фазы неионных ПАВ) его концентрирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. *n*-Диметиламинобензальдегид, ДМАБА ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$), х.ч., исходный раствор с концентрацией 0.01 М готовили растворением точной навески в 2%-ном растворе ДДС (не менее 99%); Тритон X-114 (не менее 99%), 2%-ный раствор; новокаин (гидрохлорид-2-диэтиламиноэтилового эфира *n*-аминобензойной кислоты ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$)), ч. д. а.

Неорганические кислоты, щелочи и соли: NaOH, х. ч., 1 М раствор; HCl, х. ч., 0.100 М стандарт-титр; лимонная кислота ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), ч. д. а.; NaCl, х. ч., 20%-ный раствор.

Аппаратура. Оптическую плотность растворов и электронные спектры поглощения в видимой и УФ-областях регистрировали на двухлучевом сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). Предел допускаемых значений абсолютной погрешности: по шкале $\lambda \pm 0.3$ нм, по коэффициенту пропускания $\pm 1\%$. Использовали кварцевые кюветы с $l = 1$ см.

Значения рН контролировали рН-метром рН-673 М со стеклянным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние мицелл додецилсульфата натрия на спектральные характеристики исследуемой системы. Ароматические амины, к числу которых относят и новокаин, в кислой среде вступают в реакцию конденсации с альдегидами [9], которая подчиняется общим закономерностям реакций нуклеофильного присоединения слабоосновных соединений с образованием азометинов (оснований Шиффа, формы II и III). Основные стадии реакции: присоединение реагентов с образованием интермедиата – аминспирта (I) и его гидратация (схема 1):

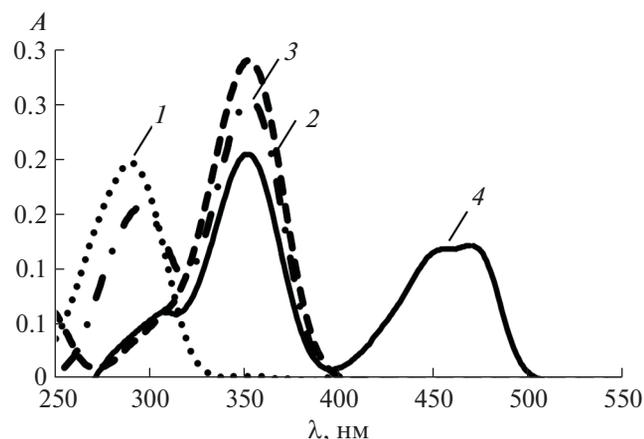


Рис. 1. Спектры поглощения: 1 – новокаин, 2 – ДМАБА, 3 – система новокаин–ДМАБА в среде цитратного буферного раствора (рН 3), $c_{\text{реагтантов}} = 1 \times 10^{-5}$ М; 4 – система новокаин–ДМАБА–ДДС в среде цитратного буферного раствора (рН 3), $c_{\text{ДДС}} = 7 \times 10^{-3}$ М.

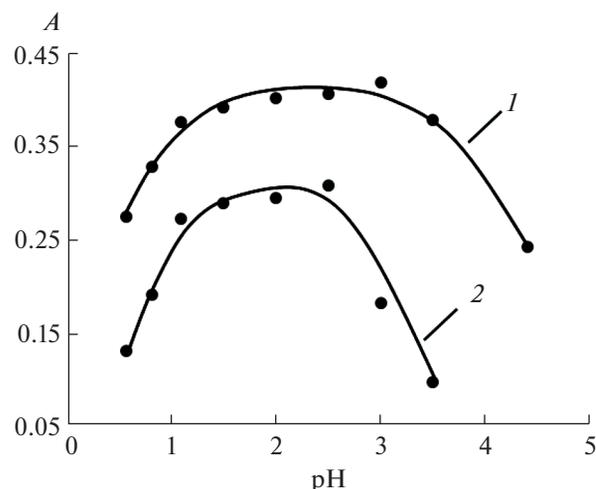


Рис. 2. Зависимость оптической плотности (469 нм) от рН для систем: 1 – новокаин (1×10^{-4} М)–ДМАБА (1×10^{-3} М); 2 – новокаин (5×10^{-6} М)–ДМАБА (1×10^{-3} М)–ДДС (7×10^{-3} М).

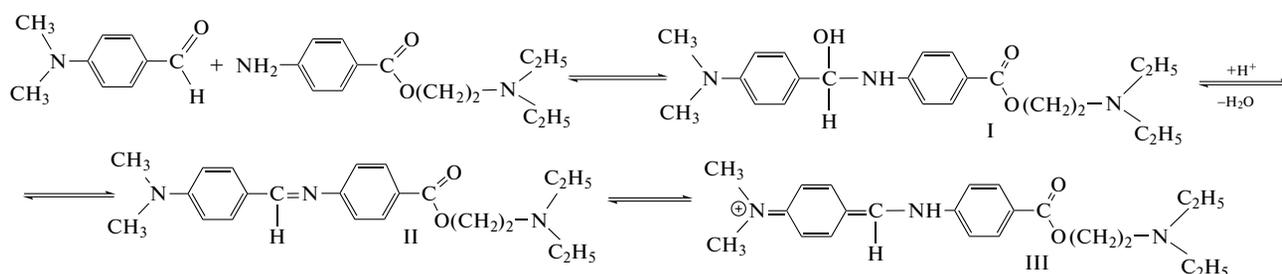


Схема 1. Реакция новокаина с *p*-диметиламинобензальдегидом в кислой среде.

Для изучения “псевдофазного” концентрирования образующегося ОШ (III) предварительно зарегистрировали спектры поглощения исходных 1×10^{-5} М растворов реагентов, а также их реакционной смеси в отсутствие и в присутствии анионного ПАВ (ДДС) в среде цитратного буферного раствора (рН 3). В полученных спектрах (рис. 1, кривые 1, 2) имеются максимумы ДМАБА и новокаина при 353 и 290 нм соответственно. В этих условиях ОШ не образуется (рис. 1, кривая 3), что связано с низкой скоростью реакции при указанных концентрациях реагентов.

Напротив, в мицеллярной среде ДДС регистрируется размытая полоса поглощения в области 450–470 нм (рис. 1, кривая 4), что обусловлено образованием аналитической формы ОШ (III). Таким образом, при введении в исследуемую систему мицелл анионного ПАВ наблюдается эффект мицеллярного катализа [4], заключающийся в электростатическом взаимодействии анионной поверхности мицеллы ДДС и катионной формы ОШ (III), что приводит к смещению равновесия реакции вправо и увеличению концентрации ОШ (III). Основание Шиффа образу-

ется и в отсутствие мицелл ДДС, но при более высоких концентрациях исходных реагентов, превышающих 1×10^{-3} М.

Влияние рН на реакцию новокаина с *p*-диметиламинобензальдегидом в мицеллах ПАВ. Зависимость суммарной скорости реакции от кислотности среды в отсутствие мицелл ПАВ достаточно хорошо изучена и для большинства карбонильных и аминсоединений представляет собой колоколообразную кривую в координатах оптическая плотность (A)–рН (рис. 2, кривая 1). Характер этой зависимости в присутствии мицелл анионных ПАВ (рис. 2, кривая 2) в интервале рН 0.5–4.5 (цитратный буферный раствор) свидетельствует о расширении рабочего диапазона рН в присутствии ДДС и эффекте “кажущегося” сдвига pK_a аминов в сторону больших значений, поскольку анионная мицелла ДДС связывает протонированную (катионную) форму ариламина, также сдвигая равновесие реакции вправо.

Влияние мицелл неионного ПАВ на спектральные характеристики исследуемой системы. Как видно, в присутствии только неионного ПАВ – Тритона X-114 (рис. 3, кривая 3) электронный

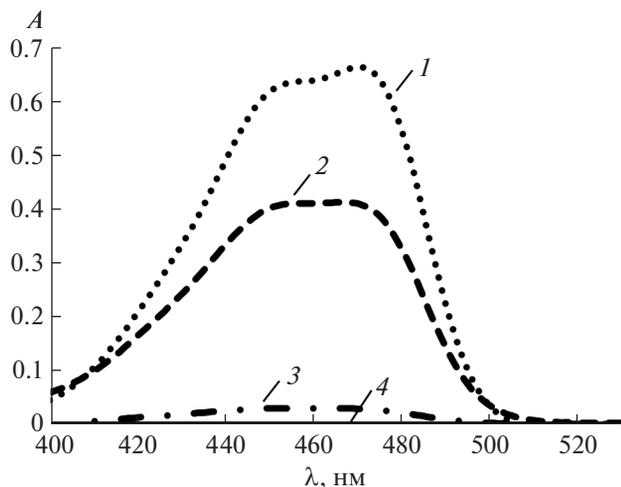


Рис. 3. Спектры поглощения системы новокаин–ДМАБА в присутствии: 1 – ДДС (7×10^{-3} М), 2 – ДДС и Тритона X-114, 3 – Тритона X-114 (4×10^{-3} М), 4 – система без ПАВ.

спектр поглощения аналогичен спектру системы в отсутствие ПАВ (рис. 3, кривая 4), что свидетельствует о низкой скорости образования ОШ. При введении в систему новокаин–ДМАБА двух типов ПАВ (рис. 3, кривая 2) наблюдается гипсохромный сдвиг полосы поглощения в области 450–470 нм относительно спектра поглощения системы только в присутствии мицелл ДДС (рис. 3, кривая 1). В присутствии мицелл неионного ПАВ образуются смешанные мицеллы ПАВ (неионного и анионного типов), вследствие чего отрицательный заряд их поверхности уменьшается, что приводит к ослаблению электростатического взаимодействия аналитической формы

(III) с такими мицеллами и в результате к уменьшению концентрации этой формы.

Таким образом, применение смешанных мицелл ПАВ, с одной стороны, приводит к уменьшению аналитического эффекта исследуемой системы, с другой стороны, как известно, водные растворы неионных ПАВ способны к фазовому разделению растворов при достижении температуры помутнения [4] и последующему концентрированию органических реагентов. При этом гомогенный раствор разделяется на две фазы: водную, в которой концентрация неионогенного ПАВ ниже ККМ, и мицеллярную, обогащенную ПАВ (рис. 4). Добавка неорганического высаливателя приводит к понижению температуры помутнения до (20–25)°С и впоследствии к фазовому разделению исследуемой системы.

Исследование фазового поведения системы новокаин–*n*-диметиламинобензальдегид–додецилсульфат натрия–Тритон X-114. Фазовое разделение в растворах с комбинированием различных типов ПАВ – малоизученный процесс, который в последнее время вызывает повышенный интерес. Исследовали влияние неорганического высаливателя (NaCl) на процесс фазового разделения системы новокаин–ДМАБА–ДДС–Тритон X-114 в интервале концентраций NaCl (0.2–1.0) М. Установили, что при концентрациях высаливателя менее 0.35 М фазовое разделение отсутствует. Определены зависимости оптической плотности ($A = 0.36c - 0.54$) и объема мицеллярной фазы от массовой доли высаливателя ($V = -0.097c + 0.47$) в интервале концентраций (0.35–0.7) М (где A – оптическая плотность; V – объем мицеллярной фазы, мл; c – концентрация NaCl, %). При увеличении концентрации NaCl отмечали рост оптической плотности в мицеллярно-насыщенной фазе

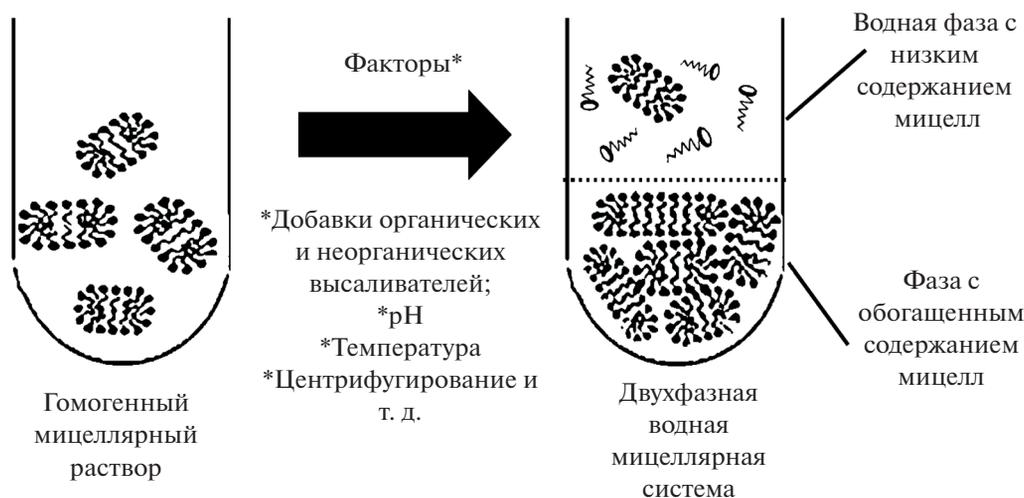


Рис. 4. Фазовое разделение растворов неионных ПАВ.

Таблица 1. Результаты (мкг/мл) определения содержания новокаина при различной концентрации NaCl ($V_{\text{DMABA/ДДС}} = 2.5$ мл, $c_{\text{DMABA/ДДС}} = 0.01/7 \times 10^{-2}$ М; $V_{\text{Тритон X-114}} = 2.5$ мл, $c_{\text{Тритон X-114}} = 4 \times 10^{-2}$ М; $V_{\text{общ}} = 25$ мл; $l = 1$ см; введено 1 мкг/мл новокаина)

NaCl		Найдено новокаина	Погрешность, %
добавлено 3.45 М р-ра, мл	$c_{\text{раб}}$, М		
3.1	0.4	1.32	32
3.4	0.5	1.08	8.0
4.4	0.6	0.94	6.0
5.0	0.7	0.96	4.0
5.6	0.8	1.05	5.0
6.3	0.9	0.95	5.0
7.5	1.0	1.06	6.0
8.1	1.1	1.20	20

Таблица 2. Результаты (мкг/мл) определения содержания новокаина при различной концентрации Тритона X-114 ($V_{\text{DMABA/ДДС}} = 2.5$ мл, $c_{\text{DMABA/ДДС}} = 1 \times 10^{-2}/7 \times 10^{-2}$ М; $V_{\text{общ}} = 25$ мл; $l = 1$ см; введено 1.00 мкг/мл новокаина)

Тритон X-114		Найдено новокаина	Погрешность, %
Добавлено 4×10^{-2} М, мл	$c_{\text{раб}}$, М		
0.5	0.8×10^{-3}	1.13	13
1.5	2.4×10^{-3}	1.05	5.0
2.5	4.0×10^{-3}	0.97	3.0
3.5	5.6×10^{-3}	0.96	4.0
4.5	7.2×10^{-3}	0.95	5.0
5.5	8.8×10^{-3}	1.06	6.0
6.5	1.0×10^{-2}	0.93	7.0
7.5	1.2×10^{-2}	1.20	20

ПАВ. Объем мицеллярной фазы при этом уменьшался. В интервале концентраций высаливателя (0.7–1.0) М и выше объем мицеллярной фазы в системе достигал равновесного значения 0.08 мл (табл. 1).

Исследовали характер фазового разделения системы при варьировании концентрации Тритона X-114 в интервале (4.0×10^{-4} – 4.8×10^{-3}) М. В рассматриваемых системах при содержании Тритона X-114 менее 2×10^{-3} М фазовое разделение отсутствует. Определили зависимости оптической плотности ($A = 6.53c - 0.11$) и объема мицеллярной фазы неионогенного ПАВ (нПАВ) от массовой доли Тритона X-114 ($V = -2.75c + 0.58$) в интервале концентраций (2×10^{-3} – 4.8×10^{-3}) М (где A – оптическая плотность; V – объем мицеллярной фазы, мл; c – концентрация Тритона X-114, %). По мере увеличения концентрации Тритона X-114 отмечался рост оптической плотности в мицеллярно-насыщенной фазе ПАВ. Объем мицеллярной фазы при этом также уменьшался. При концентрациях нПАВ 4.0×10^{-3} М и выше объем мицеллярной фазы в системе достигал равновесного значения 0.12 мл в

оптимальном интервале концентраций Тритона X-114 (2×10^{-3} –0.01) М (табл. 2).

Методика фотометрического определения новокаина. Для количественного определения новокаина в жидких лекарственных формах готовят исходный 0.01 М раствор реагента – *n*-диметиламинобензальдегида – в 7×10^{-2} М растворе анионного ПАВ додецилсульфата натрия. Для этого навески ДМАБА и ДДС помещают в мерную колбу емк. 100 мл, добавляют дистиллированную воду (2/3 объема колбы), предварительно диспергируют компоненты смеси в ультразвуковой установке в течение 5–10 мин. После осаждения пены ДДС доводят содержимое колбы дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

Построение градуировочного графика. Точную навеску сухого препарата новокаина (гидрохлорид 2-диэтиламиноэтилового эфира *n*-аминобензойной кислоты) 0.0025 г помещают в мерную колбу емк. 25 мл и растворяют в дистиллированной воде при нагревании на водяной бане. Стандартный раствор содержит 100 мкг/мл новокаина (раствор А). Для получения раствора новокаина с концентрацией 10 мкг/мл (раствор Б) стандарт-

Таблица 3. Результаты (мкг/мл) определения содержания новокаина в 0.5%-ном растворе для инъекций ($V_{\text{ДМАБА/ДДС}} = 2.5$ мл, $c_{\text{ДМАБА/ДДС}} = 0.01/7 \times 10^{-2}$ М; $V_{\text{Тритон X-114}} = 2.5$ мл, $c_{\text{Тритон X-114}} = 4 \times 10^{-2}$ М; $V_{\text{общ}} = 25$ мл; pH 2.5; $l = 1$ см; $\lambda_{\text{max}} = 469$ нм; введено 30 мкг/мл новокаина)

№ п/п	Найдено	Погрешность, %
1	28.6	4.7
2	31.5	5.0
3	28.8	4.0
4	28.2	6.0
5	31.7	5.7
6	31.9	6.3
7	28.5	5.0

ный раствор разбавляют дистиллированной водой в 10 раз.

Для построения градуировочной характеристики в 10 мерных колб емк. 25 мл помещают отмеренные объемы 0.095, 0.2, 0.5, 1.0 мл раствора Б, а также 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3 мл раствора А, в каждую колбу добавляют по 2.5 мл 0.01 М раствора ДМАБА, приготовленного в 7×10^{-2} М растворе ДДС. После этого доводят объем в каждой колбе до 15–20 мл цитратным буферным раствором с pH 2.5–3.5 и перемешивают. В течение 1 мин при комнатной температуре наблюдают развитие ярко-желтого окрашивания растворов, характерного для продукта взаимодействия новокаина с ДМАБА. Далее в каждую колбу добавляют 2.5 мл 4×10^{-2} М раствора неионного ПАВ – Тритона X-114, перемешивают, вносят 5 мл 20%-ного раствора NaCl, доводят до метки буферным раствором и снова перемешивают. Наблюдают помутнение системы. Полученные гомогенные растворы помещают в центрифугу на 5 мин (3000 об/мин) для ускорения образования мицеллярной фазы. После центрифугирования наблюдают образование двухфазной системы с окрашенной в ярко-желтый цвет мицеллярно-насыщенной фазой, локализуемой в нижней части расслаивающейся системы. При фотометрическом детектировании полученные мицеллярные экстракты отделяют от водной фазы декантацией, разбавляют цитратным буферным раствором (pH 2.5–3.5) в соотношении 1 часть мицеллярно-насыщенной фазы и 4 части буферного раствора и измеряют оптическую плотность полученного окрашенного раствора с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800 в кювете с $l = 1$ см при длине волны 469 нм относительно цитратного буферного раствора.

Получена градуировочная зависимость в координатах $A - c_{\text{новокаин}}$ ($A = 0.74c$) в диапазоне концентраций 0.038–4.8 мкг/мл. Предел обнаружения,

рассчитанный по критерию 3σ , составил 0.019 мкг/мл, погрешность определения (4.0–6.3)%.

Для количественного определения новокаина в ампульных 0.5%-ных растворах для инъекций готовят рабочий раствор, содержащий 100 мкг/мл, путем разбавления 0.5%-ного раствора новокаина дистиллированной водой.

Вносят 0.3 мл приготовленного раствора в колбу емк. 25 мл, добавляют по 2.5 мл 0.01 М раствора ДМАБА, приготовленного в 7×10^{-2} М растворе ДДС, доводят объем в колбе до 15–20 мл цитратным буферным раствором с pH 2.5–3.5 и перемешивают. Далее в колбу добавляют 2.5 мл 4×10^{-2} М раствора Тритона X-114, перемешивают, вносят 5 мл 20%-ного раствора NaCl, доводят до метки буферным раствором и перемешивают. Полученные гомогенные растворы помещают в центрифугу на 5 мин (3000 об/мин) для ускорения образования мицеллярной фазы. Полученные мицеллярные фазы фотометрируют. Концентрацию новокаина определяют с помощью описанной выше градуировочной характеристики.

Результаты определения приведены в табл. 3. Предлагаемый способ отличается хорошими воспроизводимостью и правильностью. Контроль правильности осуществляли методом введения – найдено с помощью описанной выше градуировочной характеристики.

Таким образом, предложенный в данной работе способ сочетает в себе эффекты “псевдофазного” и “cloud point” концентрирования аналитических форм ОШ (эффект “двойного” концентрирования), что позволяет повысить чувствительность определения новокаина путем снижения его предела обнаружения более чем на порядок по сравнению с известными спектрофотометрическими вариантами. Метод прост, селективен, чувствителен, экологически безопасен и может быть применен для контроля новокаина в жидких средах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Харкевич Д.С. Фармакология. Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2010. 907 с.
2. Адамова Е.М., Иванов В.М. Методы определения местноанестезирующих веществ // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 12. С. 1250.
3. Беликов В.Г. Анализ лекарственных веществ фотометрическими методами. Опыт работы отечественных специалистов // Рос. хим. журн. 2002. Т. 46. № 4. С. 52.
4. Чернова Р.К., Доронин С.Ю. Определение органических аналитов в растворах ПАВ: ионные и мицеллярные эффекты. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2017. 200 с.

5. *Иванов В.М., Адамова Е. М., Фигуровская В.Н.* Ализариновый красный С как окрашенный реагент для экстракционно-фотометрического и фотометрического определения некоторых местноанестезирующих органических оснований // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. №. 9. С. 934.
6. *Буйко А.В., Давыдова Р.Н.* Экстракция новокаина в виде ионного ассоциата с пикратом. Минск: Изд. Центр БГУ, 2011. С. 197.
7. *Чернова Р.К., Бендер К.Т., Гусакова Н.Н., Харитоновна О.М., Борисова Г.М., Подзорова Т.Н.* Способ количественного определения новокаина. А. с. 1529086 СССР. № 4312829 заявл. 05.10.87, опубл. 15.12.89. Б. и. № 46.
8. *Коновалова О.Ю., Логинова Л.П.* Особенности протекания индикаторной реакции на первичные ароматические амины в желатиновой пленке // Методы и объекты хим. анализа. 2008. Т. 3. № 2. С. 147.
9. *Нейланд О.Я.* Органическая химия. М.: Высшая школа, 1990. 750 с.
10. *Доронин С.Ю., Соколова Т.А.* Способ количественного определения новокаина. Патент № 2715997 РФ. Заявка № 2019135824 от 08.11.2019, опубл. 05.03.2020. Б. и. № 7.

УДК 543.554: 543.6: 615.33

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К НЕКОТОРЫМ ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫМ АНТИБИОТИКАМ: СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ

© 2022 г. Е. Г. Кулапина^{а, *}, О. И. Кулапина^б, Е. Н. Чердакова^а, В. Д. Анкина^б^аСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия^бСаратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского
ул. Б. Казачья, 112, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: kulapinaeg@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2021 г.

После доработки 10.08.2021 г.

Принята к публикации 11.08.2021 г.

Разработаны немодифицированные и модифицированные твердоконтактные потенциометрические сенсоры (трубчатые и планарные) для определения некоторых цефалоспориновых антибиотиков в водных, биологических средах, фармацевтических препаратах. В качестве активных компонентов мембран использовали соединения тетраалкиламмония с комплексными соединениями серебра(I)– β -lac[Ag(β -lac)₂], в качестве модификаторов – углеродные нанотрубки, полианилин, наночастицы оксида меди и NiZnFeO. Определены основные электроаналитические и операционные характеристики исследуемых сенсоров в водных растворах антибиотиков и на фоне жидкости ротовой полости. Сенсоры обеспечивают широкий диапазон определяемых содержаний антибиотиков 1×10^{-4} (1×10^{-5})– 1×10^{-2} (0.1) М, значения $c_{\min} = n \times 10^{-5}$ (1×10^{-6}) М. Модификаторы стабилизируют электродный потенциал и осуществляют функцию медиатора электронного переноса, что приводит к улучшению электроаналитических характеристик сенсоров. Показана возможность применения твердоконтактных сенсоров для определения основного вещества в лекарственных препаратах различных производителей, в модельных водных растворах и ротовой жидкости с внесенными добавками антибиотиков, а также в мультисенсорных системах типа “электронный язык” для отдельного определения цефалоспориновых антибиотиков в двухкомпонентных смесях.

Ключевые слова: цефазолин, цефалексин, цефуроксим, цефотаксим, цефтриаксон, цефиксим, цефепим, немодифицированные и модифицированные твердоконтактные сенсоры, лекарственные и биологические среды, мультисенсорные системы типа “электронный язык”.

DOI: 10.31857/S0044450222080059

β -Лактамные антибиотики широко используются в медицинской практике для лечения различных инфекционно-соматических патологий. Широкое применение антибиотиков привело к развитию резистентных штаммов основных патогенов. Исследователи и клиницисты стараются решить эту проблему следующими путями: синтезом антибиотиков новых поколений, созданием ингибиторов β -лактамаз, комбинированием уже известных антибиотиков, созданием новых лекарственных форм и изменением режима дозирования [1], что, в свою очередь, требует определения концентрации антибиотиков в диагностически значимых биосредах экспрессным и доступным для клинических лабораторий методом. Цефалоспорины различаются по фармакокинетическим параметрам, по степени всасывания при разных путях введения, скорости наступле-

ния эффекта и длительности действия, а следовательно, по необходимой частоте введения препарата, метаболизму и элиминации [2, 3].

Исследуемые в настоящей работе цефалоспорины относятся к поколениям I (цефазолин, цефалексин), II – цефутоксим, цефутоксим аксетил, III – цефотаксим, цефтриаксон, цефиксим, IV – цефепим. Цефалоспорины IV поколения – цефепим; цефпиром – высокоэффективные антибиотики с биполярной структурой. Цефемовое ядро этих антибиотиков несет отрицательный заряд, четвертичный атом азота циклопентопиридинового ядра – положительный заряд, что придает молекуле структуру цвиттер-иона [4]. Они являются парентеральными лекарственными средствами, частично противостоят гидролизу плазмидными β -лактамазами [5, 6].

Несмотря на все достоинства цефалоспориновых антибиотиков IV поколения, отмечено увеличение смертности больных с нейтропенической лихорадкой при лечении цефепимом [7, 8], а также при инфекциях кожи и мягких тканей, в то же время этот антибиотик остается действенным средством лечения больных с пневмониями и инфекциями других локализаций как в виде монотерапии, так и, при необходимости, в сочетании с другими антибиотиками (например, метронидазолом) [4].

Цефалоспориновые антибиотики определяют в сыворотке и плазме крови методами жидкостной хроматографии с УФ-детектированием и масс-спектрометрии [2, 3], требующими сложной дорогостоящей аппаратуры. Экспрессное определение антибиотиков в биосредах необходимо для исследования фармакокинетики препаратов, выбора оптимальной терапевтической дозы. Для этих целей перспективно применение потенциометрических сенсоров [2, 3, 9–14].

На кафедре аналитической химии СГУ разработаны жидкоконтактные сенсоры, чувствительные к цефалексиму, цефуоксиму, цефиксиму [3, 15, 16], на основе соединений тетраалкиламмония с комплексом серебро(I)– β -лактамный антибиотик; их основной недостаток – возможность использования только в вертикальном положении [3]. Твердоконтактные и планарные сенсоры позволяют проводить исследования при любой ориентации в пространстве, в микрообъемах проб, что важно для анализа биологических жидкостей. На электрохимические характеристики сенсоров влияют способы изготовления и составы мембран. В зависимости от активного материала и модификаторов поверхности можно конструировать планарные сенсоры для определения неорганических и органических соединений в различных объектах [17, 18].

Угольно-пастовые электроды, модифицированные рутением с диоксидом титана, применяют для определения клозапина в фармпрепаратах и в моче человека [19]; наночастицами оксида никеля – для определения сульфасалазина [20] в фармпрепаратах; наночастицами палладия – для определения тербуталина, сальбутамола, рактопамина, кленбутерола [21] в свином мясе, моче человека; наночастицами оксида цинка – для определения ацетаминофена в сыворотке крови человека [22]. В качестве модификаторов для определения дофамина в сыворотке крови и в моче человека используют оксид графена и наночастицы золота [23], для определения накроксена в фармпрепаратах и в моче человека – углеродное нановолокно и наночастицы золота [24]. Электроды на основе углеродных нанотрубок, пирографита, оксида графена, сажи использовали для

определения метотрексата, клиндамицина [25] в фармпрепаратах.

Авторами работы [26] для определения тиохинолина предложены тиолчувствительные комбинированные планарные сенсоры, модифицированные слоем диоксида марганца. Предел обнаружения составляет 1×10^{-10} М. Для определения биспролол фумарата в фармацевтических образцах и биологических жидкостях использовали угольно-пастовые электроды на основе β -циклодекстрина [27]. Модифицированные углеродной пастой планарные сенсоры предложены для определения гидрохлорида лидокаина, доксициклина [28] в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях (моча и сыворотка). Разработаны [29–32] немодифицированные и модифицированные твердоконтактные и планарные потенциометрические сенсоры для определения некоторых цефалоспориновых антибиотиков (модификаторы – углеродные нанотрубки, наночастицы NiZnFeO, CuO, полианилин).

Анализ литературы показал, что в качестве модификаторов поверхности планарных сенсоров используют токопроводящие полимеры, углеродные нанотрубки и различные наночастицы (оксиды металлов, сульфиды меди и др.). В большинстве случаев модифицирование сенсоров осуществляют непосредственным введением модификатора в материал электрода. Данный способ имеет ряд преимуществ: не изменяется состав электродноактивного вещества, остается постоянным контакт модификатора с анализируемым раствором и проводником. Введение модификаторов в мембраны сенсоров улучшает их электроаналитические свойства [29–32].

С помощью сенсоров не всегда можно избирательно определить конкретное соединение. Для решения проблемы селективности разработаны мультисенсорные системы типа “электронный язык” и “электронный нос”. “Электронный язык” – это система электрохимических сенсоров, способная обнаруживать индивидуальные вещества в смесях сложного состава [33]. Мультисенсорные системы включают массив сенсоров для определения веществ с дальнейшей обработкой многомерных данных хемометрическими методами, что позволяет определять несколько компонентов смеси при их совместном присутствии [34].

Массивы сенсоров применены для классификации фармацевтических препаратов по веществам, маскирующим вкус [35], для определения уровня креатинина в моче человека [36], метамизола натрия, псевдоэфедрина сульфата, гипромеллозы и кармеллозы в фармацевтических препаратах [37, 38]. Массив из шести потенциометрических сенсоров использовали для оценки маскирования вкуса диклофенака циклодекстрином, ацесульфамом, сахарозой, сахаринатом на-

трия и лактозой [39]. Авторами работы [40] предложена мультисенсорная система для обнаружения остатков антибиотиков в коровьем молоке, для идентификации фармацевтических препаратов различных фирм, выявления фальсификатов и аналогов лекарственных средств, содержащих бисопролол, инсулин и его аналог. Предложен [41, 42] массив из модифицированных стеклоглассеродных электродов. Для обработки аналитических сигналов использовали методы [43, 44], метод главных компонент [38] дискриминантный анализ [39], метод опорных векторов [36], а также нейронные сети [35], регрессии частичных наименьших квадратов [42]. Массивы потенциометрических сенсоров для раздельного определения пенициллиновых антибиотиков предложены авторами работ [45, 46].

В настоящей работе систематизированы результаты исследований по жидкостным, немодифицированным и модифицированным твердоконтактным (трубчатый и планарный, "screen-printed") сенсорам; модификаторы – полианилин, углеродные нанотрубки, наночастицы NiZnFeO и CuO; активные компоненты мембран – ионные ассоциаты тетраалкиламмония с комплексными соединениями серебро(I)– β -лактамам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. В качестве аналитов изучали цефалоспориновые антибиотики цефазолин, цефалексин, цефуроксим, цефуроксим ацетил, цефотаксим, цефиксим, цефтриаксон, цефепим фармакопейной чистоты (табл. 1). Исходные 0.1 М водные растворы антибиотиков готовили по точным навескам препаратов в дистиллированной воде; рабочие (свежеприготовленные) 1×10^{-6} –0.01 М растворы получали последовательным разбавлением. Кислотность свежеприготовленных водных растворов цефотаксима, цефазолина, цефуроксима с изменением их концентрации не меняется (рН 6.0).

В качестве объекта исследования выбрали жидкость ротовой полости (ЖРП) (ротовая жидкость или смешанная слюна) – легкодоступную биологическую жидкость человека. Она представляет интерес для изучения фармакокинетики антибиотиков в связи с простотой и неинвазивностью отбора проб [47–49]. Жидкость ротовой полости содержит 98–99% воды, около 0.5% неорганических солей (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , F^- , Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} и др.) и до 1% органических веществ (белки, мочевины, аммиак, креатин, остатки пищи и др.) [49]. Коэффициенты потенциометрической селективности цефалоспориновых антибиотиков по отношению к не-

органическим ионам, входящих в состав ЖРП, позволяют проводить их определение в ротовой жидкости [15, 29, 30]. Методика сбора ЖРП и способ ее пробоподготовки описаны в работе [29]. Пробу ЖРП центрифугировали в течение 15 мин при 3500 об/мин; сенсоры предварительно кондиционировали в ЖРП практически здорового человека в течение 20–30 мин.

Получение материалов сенсоров. Синтез электродноактивных компонентов (ЭАК) и получение мембран проводили согласно рекомендациям [29]. Учитывая сложность системы равновесий с участием цефепима необходимо было создать кислотность, при которой антибиотик существует в виде катиона (рН 2), поэтому ЭАК синтезировали из кислого раствора. Получали ЭАК смешением 50 мл 0.01 М тетрафенилбората натрия (ТФБ), 50 мл 0.01 М раствора цефепима и 5 мл 0.1 М HCl в стеклянном стакане. Осадок образовывался в течение суток. Затем осадок центрифугировали и высушивали в сушильном шкафу при 30°C в течение 2–3 ч. Попытки синтезировать соединение цефепим–катионы тетраалкиламмония (ТАА) не дали положительных результатов, так как в щелочной и нейтральной средах цефепим существует в виде цвиттер-иона [50].

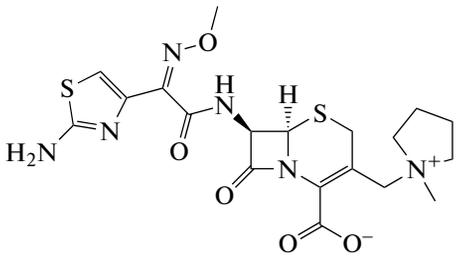
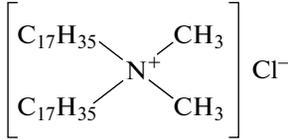
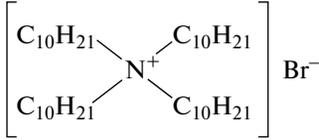
В качестве ЭАК в твердоконтактных и планарных сенсорах использовали ионные ассоциаты тетрадециламмония и диметилдистеариламмония с комплексными соединениями серебро(I)– β -лактамам $[Ag(\beta\text{-lac})_n]ТАА$; $c_{ЭАК} = 1\text{--}3\%$. Для стабилизации электродного потенциала твердоконтактных потенциометрических сенсоров в роли ионно-электронного трансдьютера использовали электропроводящий полимер полианилин (ПАНИ) (Эмеральдин, Турция), а также наночастицы оксида меди ($d = 50$ нм) (Sigma-Aldrich), NiZnFeO и углеродные нанотрубки. Модификаторы вносили непосредственно в мембрану или в углеродсодержащие чернила с ЭАК; соотношение ЭАК–модификатор составляло 2 : 1 (трубчатые) и 1 : 1 (планарные). Перед измерениями трубчатые сенсоры кондиционировали в 1×10^{-3} М растворах соответствующих антибиотиков в течение 24 ч, планарные – 1 ч для получения быстрого, воспроизводимого отклика. Синтез ЭАК, приготовление реактивов, изготовление углеродсодержащих чернил и screen-printed сенсоров, аппаратура описаны в работе [31].

Методы исследования. Для измерения ЭДС использовали элементы с переносом типа:

Таблица 1. Названия и формулы цефалоспориновых антибиотиков и компонентов мембран сенсоров

Антибиотик	Сокращение	Формула
Цефазолин; ОАО “Биосинтез” (Курган)	Cef	
Цефалексин, капсулы; “Хемофарм” (Москва)	Cefl	
Цефтриаксон; ОАО “Биосинтез” (Курган)	Ceftr	
Цефотаксим; ЗАО ф.ф. “Лекко”	Ceftx	
Цефиксим, гранулы; “Гедеон Рихтер” (Москва)	Cefix	
Цефуроксим (цефурабол); ООО “АБолмед” (Новосибирск)	Cefur1	
Цефуроксим ацетил, таблетки; “Glaxo Operation UK Limited” (UK)	Cefur2	

Таблица 1. Окончание

Антибиотик	Сокращение	Формула
Цефепим; “Линкольн Парентеральс” (Индия)	Cefet	
Диметилдистеарил-аммония хлорид	ДМДСА	
Тетрадециламмония бромид	ТДА	

(ЖК) Ag, AgCl/NaCl 0.1 М/Мембрана/Исследуемый раствор // KCl_{нас.}/AgCl, Ag;

(ТК) Ag, AgCl/KCl_{нас.} // Исследуемый раствор/Мембрана/Графит;

Ag, AgCl/KCl_{нас.} // Исследуемый раствор/Углеродсодержащие чернила.

Контакт между полуэлементами осуществлялся через солевой мостик, заполненный насыщенным раствором хлорида калия.

ЭДС цепи измеряли с помощью иономера Эксперт-001-3(0.1) при $20 \pm 3^\circ\text{C}$ (погрешность измерения ЭДС ± 1 мВ); электрод сравнения – стандартный хлоридсеребряный ЭВЛ-1М. В анализируемых растворах ЭДС измеряли от меньшей концентрации к большей. Для ускорения достижения постоянного потенциала внешний раствор перемешивали магнитной мешалкой.

Время установления стационарного потенциала сенсоров (время отклика ($t_{0.95}$)) определяли при скачкообразном изменении концентраций антибиотиков на порядок величины в 1×10^{-4} –0.1 М растворах согласно рекомендациям ИЮПАК [51, 52]. Коэффициенты потенциометрической селективности (K_{ij}) оценивали методом бионных потенциалов и смешанных растворов [53].

Для определения срока службы сенсоров регистрировали электродные функции в свежеприготовленных растворах антибиотиков на протяжении длительного времени и по изменению угла наклона судили о чувствительности данных электродов к антибиотикам.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800, совмещенном с IBM PC, использовали кюветы из

кварцевого стекла. Для измерения pH применяли pH-метр рХ-150Мп, погрешность измерения 0.01 pH. Для создания определенного значения pH к стандартным растворам антибиотиков добавляли 0.1 М HCl или 0.1 М NaOH. Ионную силу раствора $\mu = 0.1$ создавали добавлением 0.1 М NaCl. Для отделения белковых компонентов из ротовой жидкости использовали центрифугу ЦЛМИ-Р-10-0.1 “Элекон”. Пробу ЖРП центрифугировали в течение 10–20 мин при 3500 об/мин. В подготовленные пробы ЖРП вносили различные добавки растворов антибиотиков. Концентрацию антибиотиков в ЖРП находили по градуированному графику. Статистическую обработку результатов проводили согласно рекомендациям [54, 55].

Для исследования объемных свойств мембран под током использовали четырехэлектродную схему, состоящую из пары платиновых (токопроводящих) и пары хлоридсеребряных (регистрирующих) электродов. Измерения проводили в гальваностатическом режиме при силе тока 5 мкА в течение 3 ч. Направление тока поляризации изменяли каждый час. При этом оценивали падение напряжения на мембране при прохождении через ячейку постоянного тока и электрическое сопротивление мембран, контактирующих с растворами антибиотиков различных концентраций.

Сенсоры использовали для определения антибиотиков в модельных растворах, ЖРП, лекарственных препаратах различных производителей, основного вещества в препаратах “Зиннат”, “Цефалексин”, в мультисенсорных системах типа “электронный язык” для раздельного определения цефалоспориновых антибиотиков в двухкомпонентных модельных системах [45, 46], контроля фармакокинетики цефуроксим аксетила по динамике его распределения в ЖРП [56]. Содержание антибиотика в модельных водных растворах, ротовой жидкости, лекарственных препаратах определяли прямой потенциометрией (способом градуировочного графика или способом добавок); правильность контролировали методом введено–найдено.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Цефазолин и цефуроксим – антибиотики кислотного типа, полностью диссоциируют при pH 5; цефотаксим, цефтриаксон, цефалексин, цефиксим – амфотерные антибиотики, имеющие в своей структуре карбоксильную, аминную и аминотиазольную группы. Эти антибиотики существуют в виде катиона (сильнокислая среда), цвиттер-иона (слабокислая среда) и аниона (нейтральная и слабощелочная среда). Цефалоспорины подвержены гидролизу: при раскрытии β-лактамного кольца образуется 7-аминоцефалоспоровая кислота [1]. Цефуроксим аксетил (эфир цефуроксима) гидролизуется до цефуроксима (в водной среде и кишечнике) [57].

Существенной особенностью строения цефалоспориновых антибиотиков является большая доля гетероатомов (наличие групп –ОН, –NH₂, –S⁻, и др.), т.е. это потенциально комплексообразующие реагенты. Известно [58], что только ион серебра(I) образует отрицательно заряженные комплексные соединения с β-лактамами. Состав и константы образования комплексов исследуемых антибиотиков с ионами серебра(I) определены методами спектрофотометрии и потенциометрии [59]. В слабокислой среде цефазолин, цефотаксим образуют комплексы стехиометрического состава 1 : 1, в щелочной среде эти же антибиотики взаимодействуют с серебром(I) с образованием билигандных заряженных комплексных соединений (AgL₂⁻).

Константы устойчивости соединений Ag(β-lac)₂⁻ равны: lg K = 7.56 (цефазолин), lg K = 7.35 (цефотаксим), lg K = 7.56 (цефтриаксон), lg K = 7.39 (цефалексин) [59]. Комплексные соединения серебра(I) с цефалоспоридами использовали в качестве ЭАК мембран потенциометрических сенсоров, противоионами являлись катионы тетрадециламмония (ТДА); произведения растворимости [Ag(β-lac)₂]ТДА равны соответственно 1.9×10^{-8} и

2.1×10^{-8} для цефазолина и цефотаксима, для цефепима Сефер–ТФБ $K_s = (9.8 \pm 0.1) \times 10^{-9}$, а в мембранной фазе $(4.0 \pm 0.2) \times 10^{-3}$ [16, 59].

Рассмотрим основные электрохимические характеристики сенсоров на основе [Ag(β-lac)₂]ТДА. Зависимости ЭДС от концентрации антибиотиков линейны в интервале концентраций 1×10^{-4} (5×10^{-5})–0.01 (0.1) М; угол наклона электродных функций близок к теоретическому для однозарядных (цефуроксим, цефуроксим аксетил, цефотаксим, цефазолин, цефалексин, цефепим) и двухзарядных ионов (цефтриаксон, цефиксим). Оптимальная концентрация ЭАК в мембранах составляет 2–5%; дрейф потенциала сенсоров 10–20 (2–4) мВ/сут. По зависимости $E = f(-\lg c_{\beta-lac})$ определили пределы обнаружения антибиотиков (табл. 2).

Время отклика сенсоров определяли при скачкообразном изменении концентрации растворов антибиотиков на порядок величины от меньшей концентрации к большей. На рис. 1 в качестве примера приведены зависимости ЭДС от времени при скачкообразном изменении концентрации для цефуроксима. Исследуемые сенсоры на основе [Ag(β-lac)₂]ТДА характеризуются небольшим временем отклика: для модифицированных полианилином и наночастицами оксида меди в пределах 5–10 с, для немодифицированных – 10–20 с. Уменьшение времени отклика при переходе от разбавленных растворов к более концентрированным связано, вероятно, с образованием вблизи электродной поверхности со стороны водной фазы тонкого слоя, в котором происходит резкое уменьшение концентрации реагирующих веществ и толщина которого с увеличением концентрации электролита уменьшается.

Исследовали электроаналитические свойства твердоконтактных (трубчатых и планарных) сенсоров на основе [Ag(β-lac)₂]ТДА, модифицированных полианилином, наночастицами CuO, NiZnFeO в растворах β-лактамных антибиотиков. Сенсоры проявляют чувствительность к исследуемому антибиотику и могут быть использованы для их определения в водных растворах (табл. 2).

Сравнение электроаналитических характеристик сенсоров показало, что модифицирование поверхности мембран или введение модификаторов в углеродсодержащие чернила планарных сенсоров приближает крутизну электродных функций к нернстовским значениям для одно- и двухзарядных ионов исследуемых антибиотиков; при этом сокращается время отклика, уменьшаются пределы обнаружения антибиотиков, а интервалы линейности электродных функций одинаковы для исследуемых немодифицированных и модифицированных сенсоров [29–31]. Процесс перехода от ионной проводимости мембраны к

Таблица 2. Электроаналитические характеристики немодифицированных и модифицированных β-лактамных сенсоров в растворах соответствующих антибиотиков ($c_{ЭАК} = 2\%$, соотношение ЭАК–модификатор 2 : 1, $n = 3$, $P = 0.95$)

Тип сенсора, ЭАК	Раствор антибиотика	Линейный диапазон электродных функций, М	$S \pm \Delta S$, мВ/рС	c_{min} , моль/л
Жидкостные				
[Ag(Cef) ₂]ТДА	Цефазолин	1×10^{-5} –0.1	57 ± 2	3×10^{-6}
[Ag(Cefur) ₂]ТДА	Цефуросим	5×10^{-4} –0.1	52 ± 2	1×10^{-5}
[Ag(Cefix) ₂]ТДА	Цефиксим	1×10^{-5} –0.01	28 ± 2	5×10^{-6}
Трубчатые				
[Ag(Cef) ₂]ТДА	Цефазолин	5×10^{-5} –0.1	52 ± 5	2×10^{-5}
[Ag(Cef) ₂]ТДА + ПАНИ		5×10^{-5} –0.1	56 ± 4	2×10^{-5}
[Ag(Ceftx) ₂]ТДА	Цефотаксим	5×10^{-5} –0.1	55 ± 5	3×10^{-5}
[Ag(Ceftx) ₂]ТДА + ПАНИ		5×10^{-5} –0.1	58 ± 5	2×10^{-5}
Планарные				
[Ag(Ceftx) ₂]ТДА	Цефотаксим	1×10^{-4} –0.1	52 ± 4	5×10^{-5}
[Ag(Cefur) ₂]ТДА	Цефуросим	5×10^{-5} –0.1	54 ± 4	7×10^{-6}
[Ag(Ceftx) ₂]ТДА	Цефотаксим	5×10^{-5} –0.1	54 ± 2	6×10^{-6}
[Ag(Cefur) ₂]ТДА + углеродные нанотрубки	Цефуросим	5×10^{-6} –0.1	55 ± 2	3×10^{-6}
[Ag(Cef) ₂]ТДА	Цефазолин	5×10^{-5} –0.1	48 ± 4	3×10^{-5}
[Ag(Cef) ₂]ТДА + ПАНИ		5×10^{-5} –0.1	54 ± 3	2×10^{-5}
[Ag(Cef) ₂]ТДА + NiZnFeO		5×10^{-5} –0.1	57 ± 3	2×10^{-5}
[Ag(Cef)2]ТДА + ПАНИ–NiZnFeO		5×10^{-5} –0.1	55 ± 3	2×10^{-5}
[Ag(Ceftr) ₂]ТДА	Цефтриаксон	3.1×10^{-5} –0.01	28 ± 4	2.6×10^{-5}
[Ag(Ceftr) ₂]ТДА + ПАНИ		3.1×10^{-5} –0.01	28 ± 3	2.0×10^{-5}
[Ag(Ceftr) ₂]ТДА + NiZnFeO		3.1×10^{-5} –0.01	29 ± 2	1.7×10^{-5}
[Ag(Ceftr) ₂]ТДА + ПАНИ–NiZnFeO		3.1×10^{-5} –0.01	29 ± 3	1.9×10^{-5}
[Ag(Ceflx) ₂]ТДА	Цефалексин	1×10^{-4} –0.01	46 ± 5	1×10^{-4}
[Ag(Ceflx) ₂]ТДА + ПАНИ ($c = 2\%$)		1×10^{-4} –0.01	50 ± 4	0.8×10^{-5}
[Ag(Ceflx) ₂]ТДА + ПАНИ ($c = 3\%$)		1×10^{-4} –0.01	58 ± 3	1.4×10^{-5}
[Ag(Ceftx) ₂]ДМДСА ($c = 3\%$)		1×10^{-4} –0.01	53 ± 5	9.8×10^{-5}
[Ag(Ceftx) ₂]ДМДСА + ПАНИ ($c = 3\%$)		1×10^{-4} –0.01	56 ± 4	2.1×10^{-5}

электронной в проводнике достаточно сложен. Модификаторы осуществляют функции медиатора электронного переноса (электрокатализатора), способствуют химической конверсии аналита, его физико-химическому концентрированию на поверхности электрода [60].

Срок службы немодифицированных сенсоров составил 1.5 и 2 мес – модифицированных [29–31]. Улучшение электрохимических характеристик связано с тем, что модификаторы обладают высокими электропроводящими свойствами, снижают сопротивление мембран в два раза, обеспечивают большую удельную поверхность мембран сенсоров.

Оценили коэффициенты потенциометрической селективности $K_{i/j}^{пот}$ немодифицированных и модифицированных наночастицами CuO селективных сенсоров по отношению к мешающим ионам антибиотиков. Сенсоры на основе [Ag(β-lac)₂]ТДА не обладают специфичностью по отношению к основному иону, они проявляют чувствительность и к другим цефалоспоринам. Неорганические анионы Cl⁻, I⁻, Br⁻, HCO₃⁻, H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻ также могут вступать в реакцию ионного обмена, и в этом случае зависимость ЭДС от концентрации описывается уравнением Никольского:

$$E = E^0 - \frac{2.3RT}{F} \lg(a_i + K_{i/j}^{пот} \cdot a_j), \text{ где } K_{i/j}^{пот} - \text{коэф-}$$

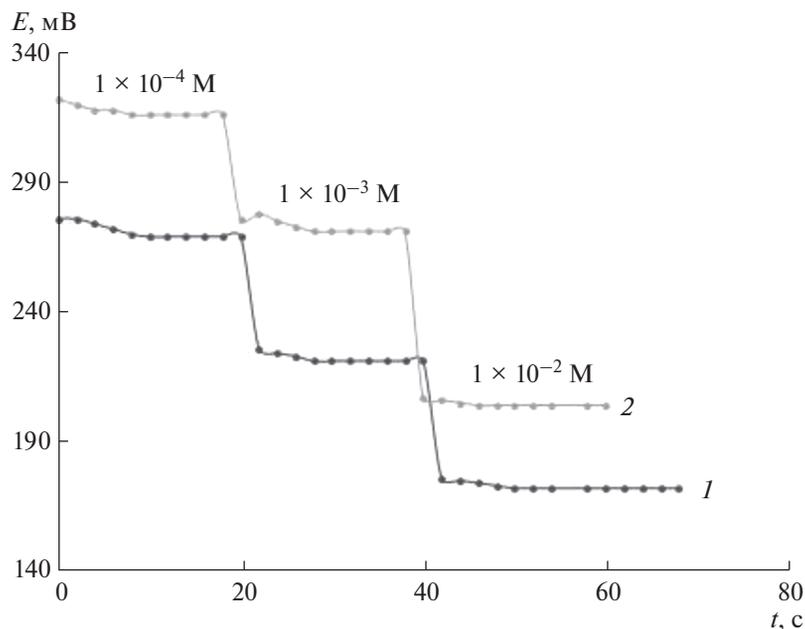


Рис. 1. Зависимость ЭДС от времени при скачкообразном изменении концентрации растворов цефуроксима для модифицированных полианилином (1) и наночастицами оксида меди (2) сенсоров.

коэффициент потенциометрической селективности, который показывает в присутствии каких количеств мешающих ионов возможно определение основного иона [51–53]. Величины $K_{i/j}^{\text{пот}}$ мембран свидетельствуют о том, что сенсоры высокоселективны по отношению к ряду неорганических ионов Cl^- , I^- , Br^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} ($K_{i/j}^{\text{пот}} < 10^{-3}$) и неселективны к антибиотикам своей группы ($K_{i/j}^{\text{пот}} \rightarrow 1$). Сенсоры можно использовать для

определения индивидуальных антибиотиков или их суммарного содержания в лекарственных препаратах, биологических жидкостях.

Электроаналитические характеристики сенсоров на фоне смешанной слюны и сыворотки крови. В качестве объекта исследования выбрали ротовую жидкость. Известно [2, 48], что в каждый момент времени плазма крови превращается в некоторое количество ЖРП, поэтому можно считать, что концентрация лекарственного препарата в ЖРП соответствует концентрации его в плазме крови.

Исследовали поведение сенсоров в пробах ЖРП практически здоровых людей с внесенными добавками β -лактамов. Установили уменьшение интервала линейности и углового коэффициента электродных функций сенсоров в ЖРП вследствие высокой ионной силы раствора и “белкового отравления” поверхности мембран. Так, в растворах цефаксима на фоне ЖРП электродная функция линейна в интервале 1×10^{-4} – 0.01 М, угловой коэффициент электродных функций составляет 28 ± 3 мВ/рс (рис. 2).

Для всех исследуемых антибиотиков интервалы линейности электродных функций составляют 1×10^{-5} – 5×10^{-3} М. Полученные градуировочные характеристики являются воспроизводимыми, и увеличение времени кондиционирования сенсоров не влияет на их свойства. Для ионометрических определений антибиотиков нет необходимости осаждать белки. Аналогичные зависимости $E = f(c)$ получены на фоне сыворотки крови

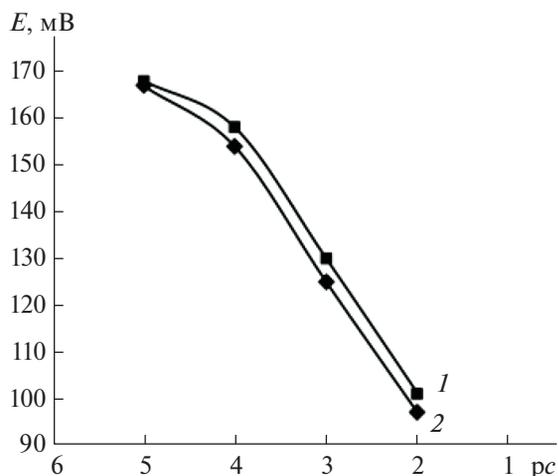


Рис. 2. Электродные функции сенсора на основе цефиксима–ДМДСА на фоне смешанной слюны в первые (1) и вторые (2) сутки; $c_{\text{ЭАК}} = 3.11\%$ (ДМДСА – диметилдистеариламмония хлорид).

практически здоровых людей и больных с различными патологиями.

С целью получения данных о транспорте ионов в мембранах на примере ЭАК Сефер–ТФБ получили зависимость сопротивления мембран от времени при различных концентрациях ЭАК. Установили, что при увеличении концентрации ЭАК стационарное сопротивление мембран уменьшается и происходит увеличение концентрации ионообменных центров в фазе мембран (рис. 3). По величинам стационарного сопротивления графическим методом Краусса–Брея [16] рассчитали кажущуюся константу диссоциации ЭАК в фазе мембраны, которая оказалась равной $(4.0 \pm 0.2) \times 10^{-3}$.

Исследовали также зависимости сопротивления мембран от времени при смене полярности при различных концентрациях цефепима в примембранных растворах. Установили уменьшение стационарного сопротивления мембран с возрастанием концентрации цефепима в примембранных растворах, что свидетельствует о проникновении антибиотика в фазу мембран.

Аналитическое применение. Исследуемые цефалоспориновые антибиотики определяли в модельных водных растворах ($s_r \leq 0.08$) и в ЖРП ($s_r \leq 0.1$) с внесенными добавками антибиотиков; анализировали препараты “Зиннат”, “Цефалексин” на содержание основного вещества. Планарные потенциометрические сенсоры применили для определения цефуросима в лекарственных препаратах различных производителей (ЭАК $[\text{Ag}(\text{Cefur})_2]\text{TDA}$). Электроаналитические характеристики сенсоров, чувствительных к цефуросиму, представлены в табл. 3. Интервал линейности электродных функций для всех препаратов одинаков (1×10^{-4} – 0.01 М), срок службы 1 мес.

В растворе цефуруса (ОАО “Синтез”, Курган) сенсоры генерируют аналитический сигнал лучше, чем в растворах препаратов других производителей. Наблюдается уменьшение времени отклика, угол наклона электродных функций приближается к теоретическому в соответствии с уравнением Нернста для однозарядных ионов.

Цефуросим определяли в препаратах различных производителей (табл. 4). Установили, что λ_{max} исследуемых препаратов цефуросима, оптическая плотность при $c = 2.5 \times 10^{-5}$ М одинаковы

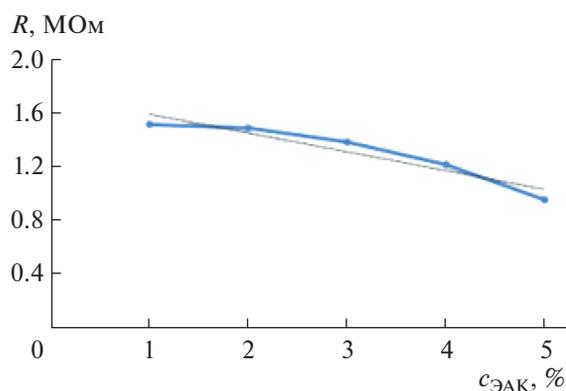


Рис. 3. Зависимость стационарного сопротивления мембран на основе цефепимтетрафенилборат от концентрации электроактивного компонента в мембране.

(λ_{max} 274–275 нм), что доказывает идентичность исследуемых лекарственных препаратов.

Применение немодифицированных и модифицированных твердоконтактных β -лактамных сенсоров в мультисенсорных системах типа “электронный язык” для отдельного определения цефалоспориновых антибиотиков. Существует необходимость отдельного экспрессного определения цефалоспориновых антибиотиков в биологических жидкостях и лекарственных формах. Сенсоры на основе $[\text{Ag}(\beta\text{-lac})_2]\text{TDA}$ не обладают специфичностью по отношению к основному иону, они проявляют чувствительность и к другим цефалоспорином. Близость значений $K_{i/j}^{\text{пот}}$ к единице свидетельствует о том, что данные сенсоры можно применять для отдельного определения цефалоспориновых антибиотиков в мультисенсорных системах типа “электронный язык”.

Наиболее перспективным является использование в составе мультисенсорной системы сенсоров с низкой селективностью и с высокой перекрестной чувствительностью, т.е. чувствительностью к максимальному числу определяемых компонентов в сложных растворах [33]. В связи с этим в настоящей работе наряду с селективностью оценивали параметры перекрестной чувствительности сенсоров в растворах β -лактамных антибиотиков согласно [61, 62]. К параметрам пере-

Таблица 3. Электроаналитические характеристики планарных сенсоров в растворах антибиотиков ($n = 3$, $P = 0.95$, $E = f(c)$, 1×10^{-4} – 0.01 М)

Производитель	$S \pm \Delta S$, мВ/рс	c_{min} , М	τ , с
Цефуросим, ОАО “Красфарма” (Красноярск)	50.6 ± 1.8	5×10^{-5}	20–30
Цефурус, ОАО “Синтез”, (Курган)	52.3 ± 1.9	6.3×10^{-5}	20–25
Цефурозин, “Протекх Биосистемс”(Индия)	48.5 ± 1.5	6.8×10^{-5}	20–30

Таблица 4. Результаты определения цефуроксима в препаратах различных производителей ($n = 3$, $P = 0.95$)

Антибиотик	Введено, мг/10 мл	Найдено, мг/10 мл	s_f	D , %
Цефуроксим	0.85	0.74 ± 0.02	0.011	12.9
Цефурус	0.85	0.81 ± 0.03	0.015	4.7
Цефурозин	0.85	0.78 ± 0.03	0.015	8.2

крестной чувствительности относятся средний наклон электродной функции сенсора S_{cp} , фактор неспецифичности F , фактор воспроизводимости K :

$$S_{cp} = 1/n \sum S_i; F = S_{cp}/s^2; K_{cp} = 1/n \sum (S_{cp}/s_i^2),$$

где S_i – угловой коэффициент электродной функции сенсора в растворе i -го иона; n – число ионов; s – среднее квадратичное отклонение среднего наклона; s_i – среднее квадратичное отклонение S_i . Для расчета параметров перекрестной чувствительности использовали угловые коэффици-

енты электродных функций сенсоров в растворах цефазолина, цефотаксима, цефуроксима. Значения параметров перекрестной чувствительности для исследуемых сенсоров составляют $46.3 < S$ (мВ/рс) < 48 ; $0.85 < F < 0.90$; $144 < K < 170$.

Количественный анализ двухкомпонентных модельных смесей антибиотиков (Cef–Ceftx, Cef–Cefur, Ceftx–Cefur) проводили с помощью массива из немодифицированных и модифицированных полианилином и наночастицами CuO сенсоров с разными составами мембран (ЭАК: [Ag(Cefur)₂]ГДА, [Ag(Ceftx)₂]ГДА, [Ag(Cef)₂]ГДА). Для анализа двухкомпонентных смесей приготовили 17 растворов различного состава: концентрации антибиотиков изменялись в интервалах 2.5×10^{-4} –0.01 М. Отклики сенсоров измеряли три раза в каждой смеси. Аналитические сигналы (ЭДС, мВ) от массива сенсоров обрабатывали методом искусственных нейронных сетей (ИНС), использовали программу Statistica 6.1. Входными данными для обучения и тестирования сети являлись значения ЭДС (мВ), а выходными – значения концентрации (рс). Далее рассчитывали значения концентрации в моль/л и пересчитывали содержание в мг/л. Использовали ИНС с обратным распространением ошибок (активационная функция – сигмоида, скорость обучения 0.1; момент 0.9; число эпох 20000). Применяли трехслойную нейронную сеть, состоящую из четырех нейронов в первом слое, двух – во втором, одного – в третьем. Результаты обучения нейронной сети можно использовать в дальнейших анализах, что сокращает продолжительность определения до 10–15 мин.

Рис. 4 иллюстрирует пример отдельного определения β-лактамов антибиотиков в двухкомпонентных модельных смесях. Показано, что мультисенсорный подход вместе с математической обработкой аналитических сигналов позволяет отдельно определять β-лактамы антибиотиков в двухкомпонентных смесях при совместном присутствии [46, 63].

Таким образом, разработанные немодифицированные и модифицированные твердоконтактные потенциометрические сенсоры на основе соединений тетрадециламмония с комплексными соединениями серебро(I)–β-лац применимы для определения цефалоспориновых антибиотиков в

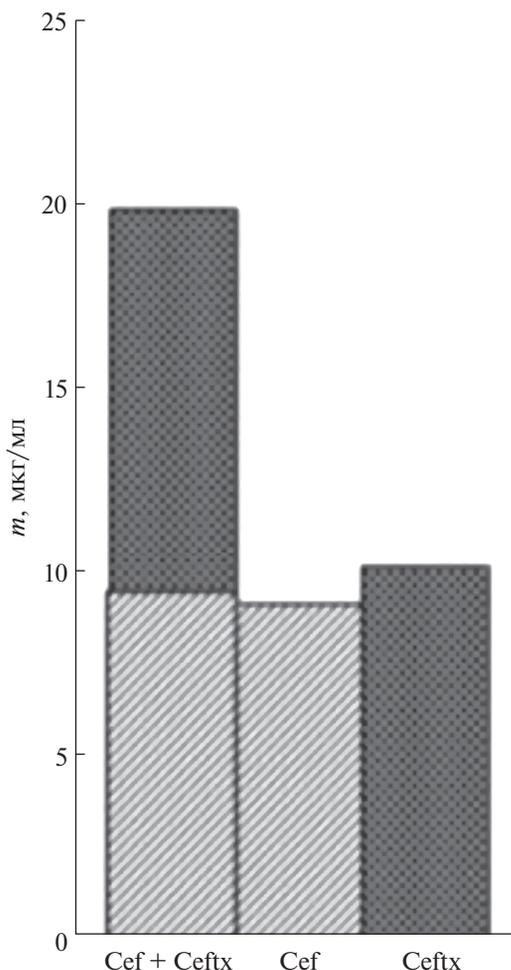


Рис. 4. Результаты отдельного определения цефазолина и цефотаксима в двухкомпонентных модельных смесях с использованием мультисенсорной системы “электронный язык”.

водных средах, ротовой жидкости, лекарственных препаратах. Слабоселективные и перекрестно-чувствительные β -лактамы сенсоры позволяют отдельно определять цефалоспориновые антибиотики с применением мультисенсорных систем и метода ИНС.

К перспективам развития следует отнести разработку планарных сенсоров различных типов, в том числе с псевдоэлектродом сравнения, выявление влияния окислителей и восстановителей, кислотности, модификаторов на электроаналитические и эксплуатационные характеристики screen-printed сенсоров; создание массивов планарных сенсоров для отдельного определения β -лактамов антибиотиков в многокомпонентных смесях в водных и биологических средах; разработку планарных сенсоров на другие группы антибиотиков – тетрациклины, макролиды, фторхинолоны и др.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Яковлев В.П.* Рациональная антимикробная фармакотерапия. М.: Литтерра, 2007. 784 с.
2. *Кулапина О.И., Кулапина Е.Г.* Антибактериальная терапия. Современные методы определения антибиотиков в биологических и лекарственных средах. Саратов: Саратовский источник, 2015. 91 с.
3. *Кулапина Е.Г., Снесарев С.В., Кулапина О.И., Баранова О.В.* Некоторые проблемы обеспечения избирательности и чувствительности определения антибиотиков в лекарственных и биологических средах / Проблемы аналитической химии. Т. 16. Фармацевтический анализ. М.: Аргмак-Медиа, 2013. С. 326.
4. *Березняков И.Г.* Цефепим сегодня и завтра // Болезни и антибиотики. 2011. Т. 5. № 2. С. 95.
5. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с.
6. *Богомолова Н.С., Орешкина Т.Д., Большаков Л.В.* Перспективы использования цефалоспоринового антибиотика четвертого поколения в хирургии // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48. № 7. С. 20.
7. *Paul M., Yahav D., Fraser A., Leibovici L.* Empirical antibiotic monotherapy for febrile neutropenia : Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // J. Antimicrob. Chemother. 2006. V. 57. P. 89.
8. *Yahav D., Paul M., Fraser A., Sarid N., Leibovici L.* Efficacy and safety of cefepime: A systematic review and meta-analysis // Lancet Infect. Dis. 2007. V. 7. P. 48.
9. *Khaled E., Khalil M.M., Abed el Aziz G.M.* Calixarene/carbon nanotubes based screen printed sensors for potentiometric determination of gentamicin sulphate in pharmaceutical preparations and spiked surface water samples // Sens. Actuators B: Chem. 2017. V. 244. P. 876.
10. *Yu J., Tang W., Wang F., Zhang F., Wang Q., He P.* Simultaneous detection of streptomycin and kanamycin based on an all-solid-state potentiometric aptasensor array with a dual-internal calibration system // Sens. Actuators B: Chem. 2020. V. 311 Article 127857.
11. *Ismail F., Adeloju S.B.* Comparison of single layer and bilayer biosensors based on crosslinking of penicillinase for potentiometric detection of penicillin in milk and antibiotics // Electroanalysis. 2015.V. 27. № 6. P. 1523.
12. *Abdel-Haleem F.M., Gamal E., Rizk M.S., El Nashar R.M., Anis B., Elnabawy H.M. Barhoum, A.* t-Butyl calixarene/Fe₂O₃@MWCNTs composite-based potentiometric sensor for determination of ivabradine hydrochloride in pharmaceutical formulations // Mater. Sci. Eng. 2020. V. 116. Article 111110.
13. *Badr I.H.A., Saleh G.A., Sayed S.M., El-Deen A.* A novel membrane sensor for batch and flow injection potentiometric determination of cefazolin sodium in pharmaceutical preparations // Int. J. Electrochem. Sci. 2014. V. 9. P. 1621.
14. *Saleh G.A., Badr I.H.A., El-Deen D.A.M.N., Derayea S.M.* Novel potentiometric sensor for the selective determination of cefotaxime sodium and its application to pharmaceutical analysis // IEEE Sensors J. 2019. V. 20. № 7. P. 3415.
15. *Кулапина О.И., Макарова Н.М., Кулапина Е.Г.* Потенциометрические сенсоры для определения некоторых цефалоспориновых антибиотиков в биологических жидкостях и лекарственных препаратах // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 4. С. 399. (*Kulapina O.I., Makarova N.M., Kulapina E.G.* Potentiometric sensors for the determination of some cephalosporin antibiotics in biological fluids and medicinal preparations // J. Anal. Chem. 2015. V. 70. № 4. P. 477.)
16. *Кулапина Е.Г., Кулапина О.И., Каренко В.А.* Потенциометрические сенсоры для определения цефепима в водных и биологических средах // Изв. Саратов. ун-та Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16. № 2. С. 138.
17. *Li M., Li Y.T., Li D.W., Long Y.T.* Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays – A review. // Anal. Chim. Acta. 2012. V. 734. P. 31.
18. *Alonso-Lomillo M.A., Domínguez-Renedo O., Arcos-Martínez M.J.* Screen-printed biosensors in microbiology; A review// Talanta. 2010. V. 82. № 5. P. 1629.
19. *Shetti N.P., Nayak D.S., Malode S.J., Kulkarni R.M.* An electrochemical sensor for clozapine at ruthenium doped TiO₂ nanoparticles modified electrode // Sens. Actuators B: Chem. 2017. V. 247. P. 858.
20. *Amani-Beni Z., Nezamzadeh-Ejehieh A.* NiO nanoparticles modified carbon paste electrode as a novel sulfasalazine sensor // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1031. № 4. P. 47.
21. *Lomae A., Nantaphol S., Kondod T., Chailapakul O., Siangproh W., Panchompoo J.* Simultaneous determination of β -agonists by UHPLC coupled with electrochemical detection based on palladium nanoparticles modified BDD electrode // J. Electroanal. Chem. 2019. V. 840. P. 439
22. *Kenarkob M., Pourghobadi Z.* Electrochemical sensor for acetaminophen based on a glassy carbon electrode modified with ZnO/Au nanoparticles on functional-

- ized multi-walled carbon nano-tubes // *Microchem. J.* 2019. V. 146. P. 1019.
23. *Chang Y.H., Woi P.M., Alias Y.* The selective electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid using electro-polymerised- β -cyclodextrin incorporated f-MWCNTs/polyaniline modified glassy carbon electrode // *Microchemical J.* 2019. V. 148. P. 322.
 24. *Afzali M., Jahromi Z., Nekoie R.* Sensitive voltammetric method for the determination of naproxen at the surface of carbon nanofiber/gold/polyaniline nanocomposite modified carbon ionic liquid electrode // *Microchem. J.* 2019. V. 145. P. 373.
 25. *Хади М., Хонарманд Э.* Применение электрода из анодированного пирографита с торцевой поверхностью для анализа клиндамицина в фармацевтических препаратах и образцах человеческой мочи // *Электрохимия.* 2017. Т. 53. № 4. С. 431. (*Hadi M., Honarmand E.* Application of anodized edge-plane pyrolytic graphite electrode for analysis of clindamycin in pharmaceutical formulations and human urine samples // *Russ. J. Electrochem.* 2017. V. 53. № 4. P. 380.)
 26. *Еременко А.В., Прокопкина Т.А., Касаткин В.Э., Осипова Т.А., Курочкин И.Н.* Планарные тиол-чувствительные сенсорные элементы для определения активности бутирилхолинэстеразы и анализа ее ингибиторов // *Вест. Моск. ун-та. Серия 2. Химия.* 2014. Т. 55. № 3. С. 174.
 27. *Frag E.Y., Mohamed S.H.* Carbon potentiometric sensors modified with beta-cyclodextrin as a carrier for the determination of bisoprolol fumarate // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2019. V. 14. № 7. P. 6603.
 28. *Ali T.A., Mohamed G.G., Yahya G.A.* Development of novel potentiometric sensors for determination of lidocaine hydrochloride in pharmaceutical preparations, serum and urine samples // *Iran. J. Pharm. Res.* 2017. V. 16. № 2. P. 498.
 29. *Кулапина Е.Г., Тютликова М.С., Кулапина О.И., Дубасова А.Е.* Твердоконтактные потенциометрические сенсоры для определения некоторых цефалоспориновых антибиотиков в лекарственных препаратах и ротовой жидкости // *Журн. аналит. химии.* 2019. Т. 74. № 7. С. 63. (*Kulapina E.G., Tyutlikova M.S., Kulapina O.I., Dubasova A.E.* Solid-contact potentiometric sensors for the determination of some cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and oral fluid // *J. Anal. Chem.* 2019. V. 74. № 7. P. 52.)
 30. *Кулапина Е.Г., Дубасова А.Е., Кулапина О.И.* Модифицированные твердоконтактные сенсоры для определения цефуроксима и цефалексина в лекарственных средствах и ротовой жидкости // *Защит. лаборатория. Диагностика материалов.* 2019. Т. 85. № 9. С. 4.
 31. *Кулапина Е.Г., Кулапина О.И., Анкина В.Д.* Планарные потенциометрические сенсоры на основе углеродных материалов для определения цефотаксима и цефуроксима // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 2. С. 145. (*Kulapina E.G., Kulapina O.I., Ankina V.D.* Screen-printed potentiometric sensors based on carbon materials for determining cefotaxime and cefuroxime // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 2. P. 231.)
 32. *Ayad M.F., Trabik Y.A., Abdelrahman M.H., Fares N.V., Magdy N.* Potentiometric carbon quantum dots-based screen-printed arrays for nano-tracing gemifloxacin as a model fluoroquinolone implicated in antimicrobial resistance // *Chemosensors.* 2021. V. 9. № 8. P. 1.
 33. *Легин А.В., Рудницкая А.М., Власов Ю.Г.* “Электронный язык” – системы химических сенсоров для анализа водных сред / *Проблемы аналитической химии.* Т. 14. Химические сенсоры / Под ред. Власова Ю.Г. М.: Наука, 2011. С. 79.
 34. *Кулапина Е.Г., Макарова Н.М.* Мультисенсорные системы в анализе жидких и газовых объектов. Саратов: ИЦ “Наука”, 2010. 165 с.
 35. *Wesoly M., Ciosek-Skibinska P.* Comparison of various data analysis techniques applied for the classification of pharmaceutical samples by electronic tongue // *Sens. Actuators. B.* 2018. V. 267. P. 570.
 36. *Saidi T., Moufi M., Zaim O., Bari N.E., Bouchikhi B.* Voltammetric electronic tongue combined with chemometric techniques for direct identification of creatinine level in human urine // *Measurement.* 2018. V. 115. P. 178.
 37. *Wesoly M., Cal K., Ciosek P., Wroblewski W.* Influence of dissolution-modifying excipients in various pharmaceutical formulations on electronic tongue results // *Talanta.* 2017. V. 162. P. 203.
 38. *Wesoly M., Zabadaj M., Amelian A., Winnicka K., Wroblewski W., Ciosek P.* Tasting cetirizine-based microspheres with an electronic tongue // *Sens. Actuators. B.* 2017. V. 238. P. 1190.
 39. *Lenik J., Wesoly M., Ciosek P., Wroblewski W.* Evaluation of taste masking effect of diclofenac using sweeteners and cyclodextrin by a potentiometric electronic tongue // *J. Electroanal. Chem.* 2016. V. 780. P. 153.
 40. *Wei Zh., Wang J.* Detection of antibiotic residues in bovine milk by a voltammetric electronic tongue system // *Anal. Chim. Acta.* 2011. V. 694. P. 46.
 41. *Зильберг Р.А., Сидельников А.В., Яркаяева Ю.А., Кабирирова Л.Р., Майстренко В.Н.* Идентификация лекарственных средств на основе бисопролола с использованием вольтамперометрического “электронного языка” // *Вестн. Башкир. ун-та.* 2017. Т. 22. № 2. С. 356.
 42. *Зильберг Р.А., Яркаяева Ю.А., Максютובה Э.И., Сидельников А.В., Майстренко В.Н.* Вольтамперометрическая идентификация инсулина и его аналогов с использованием модифицированных полиарилленфталидами стеклоуглеродных электродов // *Журн. аналит. химии.* 2017. Т. 72. № 4. С. 348. (*Zil'berg R.A., Yarkaeva Y.A., Maksyutova E.I., Sidel'nikov A.V., Maistrenko V.N.* Voltammetric identification of insulin and its analogues using glassy carbon electrodes modified with polyarylenephthalides // *J. Anal. Chem.* 2017. V. 72. № 4. P. 402.)
 43. *Safronova E., Parshina A.V., Kolganova T., Yelnikova A., Bobreshova O.V., Pourcelly G., Yaroslavtsev A.* Potentiometric multisensory system based on perfluorosulfonic acid membranes and carbon nanotubes for sulfacetamide determination in pharmaceuticals // *J. Electroanal. Chem.* 2020. V. 873. № 15. Article 114435.
 44. *Salama F.M., Attia K.A.M., El-Olemy A., Mohamad A.* Potentiometric determination of Enrofloxacin using

- PVC and coated graphite sensors // *Glob. Drugs Ther.* 2018. V. 3. № 3. P. 1.
45. Кулапина Е.Г., Снесарев С.В., Макарова Н.М., Погорелова Е.С. Массивы потенциометрических сенсоров для отдельного определения антибиотиков пенициллинового ряда с использованием метода искусственных нейронных сетей // *Журн. аналит. химии.* 2011. Т. 66. № 1. С. 82. (Kulapina E.G., Snesarev S.V., Makarova N.M., Pogorelova E.S. Potentiometric sensor arrays for the individual determination of penicillin class antibiotics using artificial neural networks // *J. Anal. Chem.* 2011. V. 66. № 1. P. 78.)
46. Кулапина Е.Г., Дубасова А.Е., Кулапина О.И., Анкина В.Д. Мультисенсорные системы типа “электронный язык” для отдельного определения цефотаксима и цефазолина // *Изв. Сарат. ун-та Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2021. Т. 21. № 1. С. 4.
47. Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская И.Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: БИНОМ, 2014. 312 с.
48. Савинов С.С., Анисимов А.А. Влияние условий отбора образцов слюны на результаты определения макро- и микроэлементов // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 4. С. 327. (Savinov S.S., Anisimov A.A. Effect of conditions for sampling of human saliva on the results of determination of macro- and micronutrients // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 4. P. 453.)
49. Жирков А.А., Ягов В.В., Антоненко А.А., Коротков А.С., Зуев Б.К. Определение минерального состава слюны человека при помощи микроплазменной атомно-эмиссионной спектроскопии // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 1. С. 43. (Zhirkov A.A., Yagov V.V., Korotkov A.S., Zuev B.K., Antonenko A.A. Determination of the mineral composition of human saliva by microplasma atomic emission spectroscopy // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 1. P. 63.)
50. Алексеев В.Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов. Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. 104 с.
51. Buck R., Lindner E. Recommendations for nomenclature of ion-sensitive electrodes (IUPAC Recommendation 1994) // *Pure Appl. Chem.* 1994. V. 66. № 12. P. 2527.
52. Umezawa Y., Buhlmann P., Umezawa K., Tohda K., Amemiya S. Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. Inorganic cations (IUPAC Technical Report) // *Pure Appl. Chem.* 2000. V. 72. № 10. P. 1851.
53. Белюстин А.А. Потенциометрия: физико-химические основы и применения. СПб: Лань, 2015. 336 с.
54. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. Медиа Сфера, 2002. 312 с.
55. Гайдышев И. Анализ и обработка данных. Специальный справочник. СПб, 2011.
56. Кулапина О.И., Михайлова М.С. Изучение фармакокинетики цефуроксима по динамике его распределения в жидкости ротовой полости больных синуситами // *Антибиотики и химиотерапия.* 2014. Т. 59. № 9–10. С. 29.
57. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2014. 1216 с.
58. Алексеев В.Г., Демская Л.В. Комплексообразование серебра(1) с ампициллином, амоксициллином и цефалексином // *Коорд. химия.* 2007. Т. 33. № 3. С. 211. (Alekseev V.G., Demskaya L.V. Ag(I) complexes with the ampicillin, amoxicillin, and cephalixin anions // *Russ. J. Coord. Chem.* 2007. V. 33. № 3. P. 203.)
59. Кулапина Е.Г., Снесарев С.В. Потенциометрические сенсоры на основе органических ионообменников тетраалкиламмония и комплексов серебра с ампициллином, оксациллином и цефазолином // *Журн. аналит. химии.* 2012. Т. 67. № 2. С. 198. (Kulapina E.G., Snesarev S.V. Potentiometric sensors based on organic ion exchangers of tetraalkylammonium and silver complexes with ampicillin, oxacillin, and ceftazolin // *J. Anal. Chem.* 2012. V. 67. № 2. P. 163.)
60. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Майстренко В.Н. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии, медицине. М.: Бином, 2009. 331 с.
61. Vlasov Yu., Legin A., Rudnitskaya A. Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions // *Sens. Actuators B: Chem.* 1997. V. 44. № 1–3. P. 532.
62. Власов Ю.Г., Легин А.В., Рудницкая А.М. Катионная чувствительность стекол системы AgI-Sb₂S₃ и их применение в мультисенсорном анализе жидких сред // *Журн. аналит. химии.* 1997. Т. 52. № 8. С. 837. (Vlasov Yu.G., Legin A.V., Rudnitskaya A.M. Cation sensitivity of AgI-Sb₂S₃ glasses and their use in the multisensor analysis of liquid media // *J. Anal. Chem.* 1997. V. 52. № 8. P. 758.)
63. Кулапина Е.Г., Дубасова А.Е., Кулапина О.И., Анкина В.Д. Массивы твердоконтактных потенциометрических сенсоров для отдельного определения некоторых цефалоспориновых антибиотиков // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов.* 2021. Т. 87. № 5. С. 5.

УДК 543.33+543.41

ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НАНОВОЛОКОН, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРМОВАНИЯ, ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ НИКЕЛЯ

© 2022 г. Н. С. Комова^{a, b}, А. И. Данчук^a, В. В. Галушка^a, А. М. Павлов^a,
А. А. Сердобинцев^a, Т. Ю. Русанова^{a, *}

^aСаратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского, Институт химии
ул. Астраханская, 8, Саратов, 410012 Россия

^bФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук”, Институт биохимии им. А.Н. Баха
Ленинский просп., 33, стр. 2, Москва, 119071 Россия

*e-mail: tatyanyars@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.08.2021 г.

После доработки 28.10.2021 г.

Принята к публикации 28.10.2021 г.

Разработаны тест-системы на основе полимерных нановолокон, полученных методом электроформования, для определения ионов никеля в природных и сточных водах. Детектирование аналитического сигнала тест-систем может проводиться как визуально, так и методом цветометрии. В качестве полимерной матрицы использовали полиакрилонитрил и фторопласт, а в качестве реагентов — рубановодородную кислоту, пиридилазонафтол, диметилглиоксим и α -фурилдиоксим. Имобилизацию реагентов в матрицу осуществляли путем их добавления в формовочный раствор полимера до начала процесса изготовления волокна. Выбраны оптимальные условия получения тест-систем (состав формовочного раствора, параметры электроформования, природа полимера и реагента) и регистрации аналитического сигнала (рН, параметр цветности, время регистрации сигнала). Определены параметры градуировочных зависимостей для определения ионов никеля с использованием различных тест-систем и изучена их селективность по отношению к ионам других тяжелых металлов. Показано, что тест-система на основе полиакрилонитрила (массовая доля полимера в формовочном растворе 12%) и рубановодородной кислоты (концентрация реагента в формовочном растворе 0.05 М) позволяет определять ионы никеля в диапазоне концентраций 1×10^{-6} М–0.01 М. Разработанные тест-системы применены для определения ионов никеля в природной, водопроводной и сточной водах. Достоинством предложенных тест-систем является простота изготовления тестов, отсутствие пробоподготовки и возможность проведения анализа в полевых условиях.

Ключевые слова: нановолокна, электроформование, никель, тест-системы, цветометрия.

DOI: 10.31857/S0044450222080047

Немаловажную роль в загрязнении окружающей среды играют тяжелые металлы, к которым относится и никель. Основные источники загрязнения окружающей среды никелем — предприятия горнорудной промышленности, цветной металлургии, металлообрабатывающие и другие. Никель является необходимым микроэлементом для млекопитающих и растений, обнаруживается во всех биологических материалах. В то же время никель относится к веществам второго класса опасности и оказывает общетоксическое действие на организм. Хроническая интоксикация приводит к возникновению заболеваний носоглотки, легких, появлению злокачественных новообразований и аллергических поражений в ви-

де дерматитов и экзем. В нашей стране установлены ПДК на никель в объектах окружающей среды. Благодаря современным достижениям в области электроники и механики стало возможным применение высокотехнологичных установок для определения ионов никеля при низких концентрациях методами спектрометрии с индуктивно связанной плазмой [1], атомно-абсорбционной спектроскопии [2] и спектрофотометрии [3]. Некоторые из перечисленных методов являются достаточно сложными, требуют дорогостоящего оборудования и непригодны для быстрого и оперативного мониторинга. В качестве альтернативы перечисленным выше методам возрастает значение тест-систем для определения

ионов никеля. Преимуществами использования тест-методов являются отсутствие высоких требований к квалификации персонала, низкая стоимость материалов, простота и экспрессность. Чаще всего такие тест-системы получают на основе фильтровальной бумаги или трубок с порошками, в которых на твердую фазу иммобилизован соответствующий аналитический реагент [4].

Для визуального определения ионов никеля предложен ряд твердофазных носителей на основе силикагеля [5, 6] и ионообменника [7], модифицированных различными реагентами. Визуальный тест-метод с иммобилизованными на силикагеле 4-(2-пиридилазо)-2-нафтолом и его комплексом с Zn(II) позволяет определять Ni(II) в питьевой воде при концентрации ≥ 3 мкг/л [5]. В работе [6] описана тест-методика концентрирования никеля сорбцией на модифицированном бензилдиоксимом и диметилглиоксимом силихроме CX-120 для определения никеля в фазе сорбента прямыми методами спектроскопии диффузного отражения и цветометрии. Разработанная методика позволила достичь предела обнаружения никеля 0.3 мкг/мл (в случае бензилдиоксима) и 0.6 мкг/мл (в случае диметилглиоксима) с использованием цветометрических характеристик (светлота, яркость и цветовой тон). Методика имеет один недостаток – окраска сорбатов комплексов никеля во влажном состоянии неравномерна, что затрудняет использование цветометрического метода. Альтернативный твердофазный носитель – макросетчатый карбоксильный катионит КБ-2Э, модифицированный диметилглиоксимом для определения никеля с помощью цветометрических характеристик (R, G, B). Предложенная методика анализа исключает стадию десорбции и позволяет достичь чувствительности определения ионов Ni²⁺ до 0.0001 ПДК в воде водоемов [7].

В настоящее время все более популярным становится метод электроформования для получения тест-систем на основе нановолокон. Наиболее важными преимуществами данных материалов являются высокая удельная площадь поверхности, большое количество используемых полимеров, а также возможность введения широкого круга реагентов. Эти достоинства позволяют создавать уникальные материалы для различных применений. Об этом свидетельствует большое количество публикаций, посвященных разработке электрохимических сенсоров [8], ферментных биосенсоров [9, 10], флуоресцентных [11] и оптических датчиков [12].

При получении систем с иммобилизованными органическими реагентами используют различные способы внедрения индикатора в структуру волокна. Органические реагенты могут фиксиро-

ваться на полимерной матрице как физическим, так и химическим способами [13, 14]. Для иммобилизации физическими способами используют адсорбцию [14], растворение [15], ионный обмен [16] и др. Данные методы достаточно просты, но ограниченная растворимость индикатора в полимерной матрице приводит к выщелачиванию реагента. На наш взгляд, перспективным способом иммобилизации реагентов в нановолокна является введение индикатора в раствор полимера непосредственно перед процессом электроформования, что позволяет избежать вымывания реагента из полученного материала.

Цель настоящей работы – создание тест-систем на основе нановолокон, полученных методом электроформования, с иммобилизованными органическими реагентами и применение данных систем для определения ионов никеля.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Исходный раствор ионов никеля (10 мМ) готовили растворением твердого Ni(NO₃)₂·6H₂O в бидистиллированной воде, рабочие растворы готовили непосредственно перед применением последовательным разбавлением исходного в бидистиллированной воде.

Использовали растворы реагентов (ч.д.а.): рубеоноводородной кислоты (РК), пиридилазоафтола (ПАН), диметилглиоксима (ДМГ), α-фурилдиоксима (α-ФДО), которые готовили растворением навесок в диметилформамиде (ДМФА, х.ч.).

Растворы полимеров готовили растворением навесок в ДМФА (полиакрилонитрил, ПАНИ, 150 кДа, Sigma-Aldrich) и смеси ДМФА–бутил-ацетат (1 : 1) (политетрафторэтилен (фторопласт, ФП) Ф42-Л, АО “Галаполимер”, Россия, 100–150 кДа). Растворы перемешивали в течение 3 ч до полного растворения.

Методика получения тест-систем на основе нановолокон с иммобилизованными органическими реагентами. Иммобилизацию реагента в волокно осуществляли путем добавления реагента к раствору полимера до начала процесса изготовления волокна. Формовочный раствор получали смешиванием в соотношении 3 : 1 раствора полимера (полиакрилонитрила или фторопласта) с определенной массовой долей (ω, %) и раствора реагента (РК, ДМГ, ПАН, α-ФДО). Постоянное электрическое напряжение 45 кВ подавали между металлической иглой (положительный электрод), через которую продавливался формовочный раствор с помощью дозатора, и металлической пластиной (отрицательный электрод, заземлен), на которой закреплялась подложка (лист офисной бумаги формата А4, 80 г/м²), на котором происходило осаждение волокон. Расстояние между иглой и подложкой составляло 30 см. Скорость

истечения полимера подбирали таким образом, чтобы выталкиваемый полимер успевал переноситься электрическим полем на подложку, не образуя капель и сгустков. После процесса электроформования полученный материал высушивали в течение 1 ч. Далее подготовленный материал удаляли с подложки и нарезали полосками размером 1×10 см. Для проведения тест-анализа растворы ионов никеля точно наносили на материал (объем капли 1 мкл).

Методика определения цветометрических характеристик. Изображения тест-систем получали, используя цифровой фотоаппарат Nikon D 3100. Полученные изображения обрабатывали в программе “Adobe Photoshop CS6”: выделяли пятна исследуемых образцов с помощью инструмента “Магнитное лассо”, далее усредняли цвета пятен согласно следующим операциям: “Фильтр” → “Размытие” → “Среднее” и, наконец, выбирали цвета с помощью инструмента “Color Picker (Пипетка)”, получая соответствующие цветовые параметры изображений – R, G и B.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Перспективной основой для тест-систем могут стать волокна, получаемые методом электроформования, в связи с высокой удельной площадью поверхности, возможностью введения широкого круга реагентов, высокой стабильностью реагента в волокне. Такие волокна получают в результате действия электростатических сил на электрически заряженную струю полимерного раствора. Электрическое напряжение от единиц до ста киловольт прикладывается к раствору полимера, который при помощи дозатора подается через капилляр. Высокое напряжение индуцирует в растворе полимера одноименные электрические заряды, которые в результате кулоновского электростатического взаимодействия приводят к вытягиванию раствора полимера в тонкую струю. В процессе электростатического вытягивания полимерной струи она может претерпевать ряд последовательных расщеплений на более тонкие струи при определенном соотношении значений вязкости, поверхностного натяжения и плотности электрических зарядов в волокне. Полученные струи затвердевают за счет испарения растворителя или в результате охлаждения, превращаясь в волокна, и под действием электростатических сил дрейфуют к заземленной подложке, имеющей противоположное значение электрического потенциала (рис. 1).

Для формирования нановолокон использовали такие полимеры, как полиакрилонитрил и фторопласт. В качестве реагентов выбрали ДМГ, α -ФДО, РК и ПАН как наиболее известные реагенты на ионы никеля. Имобилизацию реагента в волокно осуществляли путем добавления рас-

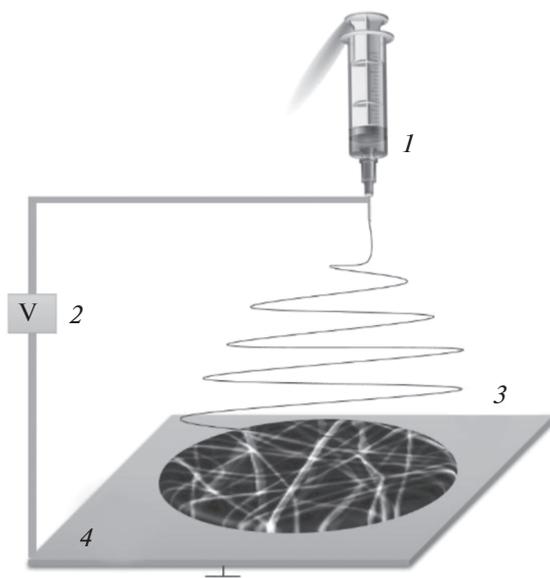


Рис. 1. Схема получения нановолокон методом электроформования: 1 – шприц с раствором полимера, 2 – высоковольтный источник тока, 3 – волокно, 4 – коллектор.

творя реагента к раствору полимера до начала процесса изготовления волокна. При этом также варьировали природу и концентрацию реагентов.

В итоге получили следующие материалы:

1) нановолокна на основе полиакрилонитрила ($\omega = 12\%$), содержащие в исходном для формования растворе 0.25, 0.125, 0.05 М РК; 2.5 мМ ПАН; 1, 0.5, 0.2 М ДМГ; 0.125 М α -ФДО.

2) нановолокна на основе фторопласта ($\omega = 5\%$), содержащие в исходном для формования растворе 0.25 М РК; 2.5 мМ ПАН.

Морфологию полученных материалов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). В качестве примера на рис. 2 представлены изображения волокон ПАН без красителя (рис. 2а) и с красителем – РК (рис. 2б). Как видно, полученные материалы имеют гладкую и однородную поверхность без узлов. Однако диаметр волокна с красителем несколько больше ($\sim 0.23 \pm 0.03$ мкм) по сравнению с волокном без красителя ($\sim 0.18 \pm 0.03$ мкм). Похожая картина наблюдалась и в случае других материалов.

Предварительные исследования полученных материалов показали, что ПАН в полиакрилонитрильном волокне при обработке ионами никеля не дает аналитический сигнал, что, возможно, связано со стерическими затруднениями при взаимодействии этого реагента с ионами металла. Остальные системы дают отклик на никель: ПАН во фторопласте образует хелаты красного цвета, РК образует с никелем голубую внутрикомплексную соль; ДМГ, реагируя с никелем в щелочной

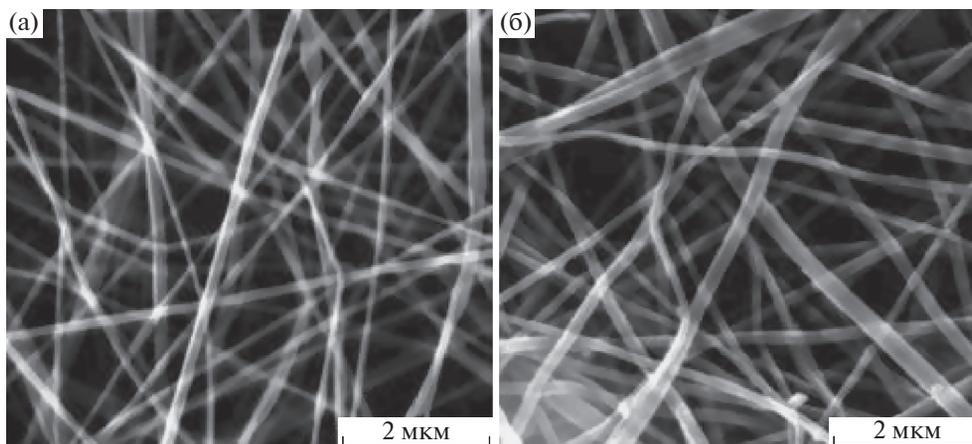


Рис. 2. СЭМ-изображение волокон полиакрилонитрила без красителя (а) и с красителем — рубеноводородной кислотой (б).

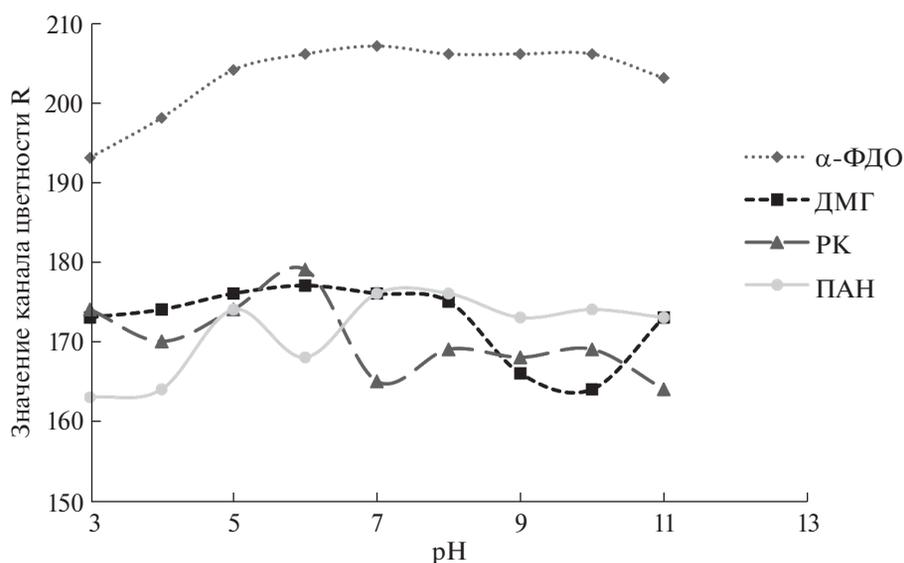


Рис. 3. Зависимость канала цветности R пятна тест-систем при определении Ni^{2+} ($c = 1 \times 10^{-3}$ М) с различными реагентами от pH среды.

среде, образует диоксимный хелат; α -ФГО — устойчивое комплексное соединение желто-оранжевого цвета [17]. Необходимо отметить, что тест-системы на основе фторопласта требуют больше времени для проведения анализа в связи с более высокой гидрофобностью материала.

Кислотность среды является одним из важнейших факторов, определяющих направление смещения равновесий процесса комплексообразования. Изучали влияние pH среды на интенсивность окраски комплексов с $\text{Ni}(\text{II})$. Помимо визуальной оценки отклика определяли цветометрические характеристики окрашенной зоны. Получили зависимости интенсивностей каналов цветности от pH раствора в интервале 3–11. В ка-

честве примера на рис. 3 представлены зависимости параметра R от pH для разных реагентов. Как видно, изменение pH среды в пределах от 3 до 11 практически не влияет на развитие окраски комплекса с α -ФДО, в то время как наиболее яркая окраска комплекса ионов никеля с РК наблюдается при pH ~ 7 (наиболее низкое значение параметра цветности), а с ДМГ — в диапазоне pH 9–10. Параметры G и B показывали те же результаты, хотя чувствительность каналов отличалась для различных реагентов.

Изучали кинетику образования комплексов с ионами никеля. Для этого измеряли аналитический сигнал через определенные промежутки времени после нанесения анализируемого рас-

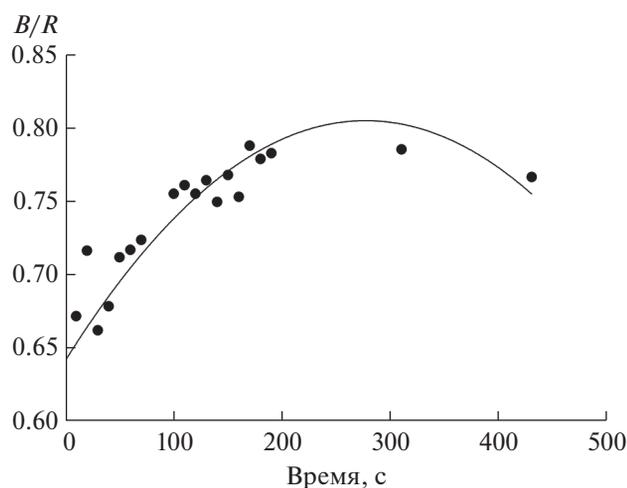


Рис. 4. Время отклика тест-системы рубеоанодородная кислота (0.05 М) + полиакрилонитрил (12%).

творя на тест-систему. В качестве примера на рис. 4 показан отклик тест-системы на основе полиакрилонитрила с РК. Для исключения влияния цвета матрицы на оси ординат показано отношение параметров цветности B/R . Установлено, что детектирование аналитического сигнала оптимально проводить через 3–5 мин после нанесения исследуемого образца на тест-полоску. Остальные исследуемые тест-системы показали аналогичное время отклика.

С помощью полученных тест-систем на основе нановолокон определяли концентрации никеля по интенсивности окрашенной зоны после контакта их с исследуемым раствором. Установили, что интенсивность окраски и площадь пятна при уменьшении концентрации никеля уменьшается. Примеры тест-систем представлены на рис. 5.

При выбранных оптимальных значениях pH построили градуировочные зависимости интенсивности различных каналов цветности от кон-

центрации никеля в растворе. В табл. 1 представлены параметры градуировочных зависимостей для определения никеля(II). Наибольшую чувствительность и хорошее значение коэффициента аппроксимации показала система РК (0.05 М) + полиакрилонитрил, а в качестве регистрируемого сигнала – канал R. Уменьшение концентрации реагента в волокнах позволило получить наиболее воспроизводимую систему при определении низких концентраций ионов никеля (от 1×10^{-6} до 0.01 М). Квадрат коэффициента аппроксимации составил 0.99 для канала R.

Сравнение отклика реагента, иммобилизованного в волокне и на фильтровальной бумаге, показало значительное различие в чувствительности определения. Так, бумага, обработанная РК, не дает отклик на ионы никеля при концентрации 5×10^{-5} М, в то время как волокнистый материал позволяет определять Ni^{2+} на уровне 1×10^{-6} М, что говорит об увеличении чувствительности нановолокон по сравнению с фильтровальной бумагой более чем в 50 раз.

В процессе анализа помимо целевых могут протекать побочные реакции с участием реагента и посторонних ионов, присутствующих в анализируемой смеси. Это может вызвать целый ряд нежелательных явлений: понижение чувствительности реакций, изменение окраски и др. Основными мешающими ионами при определении ионов никеля являются ионы меди, железа и кобальта. Для оценки селективности полученных тест-систем проанализировали растворы солей различных металлов – Cr(III), Co(II), Cu(II), Ba(II), Al(III), Pb(II), Mn(II) и Cd(II) – при варьировании их концентрации. Наблюдали, что при концентрациях ионов металлов 0.01 М тест-система с РК помимо никеля проявляла отклик на кобальт и медь, причем пятно с кобальтом окрашено в желтый цвет, с никелем и медью – в синий. При уменьшении концентрации всех металлов в анализируемом растворе в 100 раз наблюдается аналитический отклик только на ни-

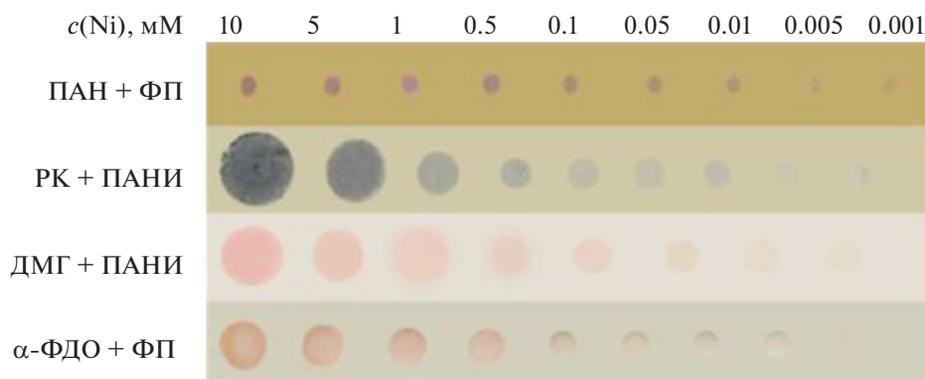


Рис. 5. Примеры тест-систем при взаимодействии с ионами Ni(II).

Таблица 1. Параметры градуировочных зависимостей для определения никеля(II)

Система	Канал цветности	$I - c$	R^2	Интервал линейности градуировочной зависимости, М
РК (0.25 М) + полиакрилонитрил	R	$y = -12756x + 170$	0.91	$1 \times 10^{-5} - 0.01$
	G	$y = -8794x + 132$	0.93	$1 \times 10^{-5} - 0.01$
	B	$y = -2267x + 65$	0.99	$1 \times 10^{-5} - 0.01$
РК (0.125 М) + полиакрилонитрил	R	$y = -3996x + 201$	0.89	$5 \times 10^{-5} - 0.01$
	G	$y = -2645x + 181$	0.88	$5 \times 10^{-5} - 0.01$
	B	$y = -912x + 135$	0.79	$5 \times 10^{-5} - 0.01$
РК (0.05 М) + полиакрилонитрил	R	$y = -4620x + 192$	0.99	$1 \times 10^{-6} - 0.01$
	G	$y = -3825x + 186$	0.98	$1 \times 10^{-6} - 0.01$
	B	$y = -1427x + 163$	0.97	$1 \times 10^{-6} - 0.01$
РК (0.25 М) + фторопласт	R	$y = -5784x + 146$	0.74	$1 \times 10^{-6} - 0.01$
	G	$y = -4142x + 125$	0.64	$1 \times 10^{-6} - 0.01$
	B	$y = 818x + 54$	0.12	$1 \times 10^{-6} - 0.01$
ПАН (2.5×10^{-2} М) + фторопласт	R	$y = 309x + 182$	0.03	$1 \times 10^{-6} - 0.01$
	G	$y = -555x + 149$	0.19	$1 \times 10^{-6} - 0.01$
	B	$y = 392x + 102$	0.28	$1 \times 10^{-6} - 0.01$
α -ФДО (0.125 М) + полиакрилонитрил ($\omega = 12\%$)	R	$y = -1116x + 208$	0.91	$1 \times 10^{-4} - 0.01$
	G	$y = -3007x + 195$	0.86	$1 \times 10^{-4} - 0.01$
	B	$y = -3217x + 188$	0.87	$1 \times 10^{-4} - 0.01$
ДМГ (1 М) + полиакрилонитрил ($\omega = 12\%$)	R	$y = -725x + 194$	0.95	$1 \times 10^{-4} - 0.01$
	G	$y = -2858x + 187$	0.99	$1 \times 10^{-4} - 0.01$
	B	$y = -1803x + 190$	0.96	$1 \times 10^{-4} - 0.01$
ДМГ (0.5 М) + полиакрилонитрил ($\omega = 12\%$)	R	$y = -496x + 191$	0.97	$5 \times 10^{-4} - 0.01$
	G	$y = 1349x + 168$	0.73	$5 \times 10^{-4} - 0.01$
	B	$y = 713x + 176$	0.67	$5 \times 10^{-4} - 0.01$
ДМГ (0.2 М) + полиакрилонитрил ($\omega = 12\%$)	R	$y = -466x + 184$	0.61	$5 \times 10^{-4} - 0.1$
	G	$y = 1132x + 165$	0.88	$5 \times 10^{-4} - 0.1$
	B	$y = 606x + 174$	0.85	$5 \times 10^{-4} - 0.1$

кель. Тест-система на основе ДМГ не давала отклик на все исследуемые металлы, кроме Со(II). Мешающие факторы для предложенных тест-систем, зафиксированные при постоянной концентрации ионов никеля 1×10^{-5} М и переменных

концентрациях ионов других металлов, представлены в табл. 2.

Тест-системы на основе полиакрилонитрила с РК (0.05 М), показавшие наилучшие результаты при определении низких концентраций ионов

Таблица 2. Мешающее влияние некоторых ионов металлов на определение Ni(II) тест-системами с рубеановодородной кислотой и диметилглиоксимом

Мешающий ион	$F_{\text{меш}}$
РК (0.05 М) + полиакрилонитрил ($\omega = 12\%$)	
Cu ²⁺	10
Co ²⁺	100
Cr ³⁺	>1000
Ba ²⁺	>1000
Al ³⁺	>1000
Pb ²⁺	>1000
Mn ²⁺	>1000
Cd ²⁺	>1000
ДМГ (1 М) + полиакрилонитрил ($\omega = 12\%$)	
Co ²⁺	5

никеля, использовали для их определения в природной и водопроводной водах. Правильность определения подтверждали методом введено–найденно. Примеры результатов тест-определения представлены в табл. 3.

Таблица 3. Проверка правильности определения ионов Ni(II) тест-системой полиакрилонитрил + рубеановодородная кислота (0.05 М) методом введено–найденно ($n = 3$, $P = 0.95$)

Вода	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	$s_r, \%$
Водопроводная	5.0×10^{-5}	$(5.2 \pm 1.4) \times 10^{-5}$	11
	1.0×10^{-4}	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	10
	5.0×10^{-4}	$(4.8 \pm 1.1) \times 10^{-4}$	9.2
Природная	5.0×10^{-5}	$(5.3 \pm 1.3) \times 10^{-5}$	9.9
	1.0×10^{-4}	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	7.3
	5.0×10^{-4}	$(5.0 \pm 1.2) \times 10^{-4}$	9.7

Таблица 4. Результаты (моль/л) определения ионов Ni²⁺ в сточной воде гальванического производства до и после очистки с использованием системы полиакрилонитрил + α -фурилдиоксим (0.125 М) ($n = 3$, $P = 0.95$)

Вода	Спектрофотометрия	Тест-метод, визуальная оценка по шкале	Тест-метод, цветометрия
До очистки	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	3×10^{-5}	$(3.1 \pm 0.5) \times 10^{-5}$
После очистки	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	Не обнаружен	Не обнаружен

Для определения ионов никеля в сточной воде гальванического производства до и после ее очистки, где содержание никеля гораздо выше по сравнению с водопроводной или природной водами, а также находится большое количество мешающих элементов, целесообразно использовать тест-систему полиакрилонитрил + α -ФДО (0.125 М). Тест-определение проводили, используя визуальную шкалу, а также методом цветометрии (с использованием градуировочной зависимости, диапазон концентраций которой расширен за счет нелинейного участка). Результаты сравнивали с результатами, полученными методом спектрофотометрии (табл. 4).

Таким образом, разработаны тест-системы на основе нановолокон, полученных методом электроформования, для определения ионов никеля в природных и сточных водах. Достоинством данных тест-систем являются простота изготовления тестов, отсутствие пробоподготовки и возможность проведения анализа в полевых условиях.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 21-13-00267).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Smirnova S.V., Ilin D.V., Pletnev I.V.* Extraction and ICP-OES determination of heavy metals using tetrabutylammonium bromide aqueous biphasic system and oleophilic collector // *Talanta*. 2021. V. 221. Article 121485.
2. *Ferreira S.L.C., Bezerra M.A., Santos A.S., Dos Santos W.N.L. et al.* Atomic absorption spectrometry – A multi element technique // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 100. P. 1.
3. *Zhou F., Li Ch., Zhu H., Li. Yo.* A novel method for simultaneous determination of zinc, nickel, cobalt and copper based on UV–Vis spectrometry // *Оптик*. 2019. V. 182. P. 58.
4. *Золотов Ю.А., Иванов В.М., Амелин В.Г.* Химические тест-методы анализа. М.: Едиториал УРС, 2002. 304 с.
5. *Запорожец О.А., Петручек Н.И., Калиниченко Е.В., Сухан В.В.* Визуальный тест-метод для определения Ni(II) на основе иммобилизованного на кремнеземе 4-(2-пиридилазо)-2-нафтолата цинка // *Химия и технология воды*. 1999. Т. 21. № 3. С. 281.
6. *Иванов В.М., Ершова В.И.* Спектроскопия диффузного отражения иммобилизованных на силикагеле комплексом никеля с диметилглиоксимом и бензилдиоксимом // *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия*. 1999. Т. 40. № 1. С. 22.
7. *Бобкова Л.А., Односторонцева Т.В., Козик В.В.* Сорбционно-цветометрическое и тест-определение ионов марганца(II), кобальта(II), никеля(II) и меди(II) в природных водах // *Ползуновский Вестник*. 2009. № 3. С. 209.
8. *Tiwari A., Terada D., Yoshikawa C., Kobayashi H.* An enzyme-free highly glucose-specific assay using self-assembled aminobenzene boronic acid upon polyelectrolytes electrospun nanofibers-mat // *Talanta*. 2010. V. 82. № 5. P. 1725.
9. *Cleeton C., Keirouz A., Chen Xi., Radacsi N.* Electrospun nanofibers for drug delivery and biosensing // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019. V. 5. № 9. P. 4183.
10. *Sapountzi E., Braiek M., Vocanson F., Chateaux J.-F., Jaffrezic-Renault N., Lagarde F.* Gold nanoparticles assembly on electrospun poly(vinyl alcohol)/poly(ethyleneimine)/glucose oxidase nanofibers for ultrasensitive electrochemical glucose biosensing // *Sens. Actuators B*. 2017. V. 238. P. 392.
11. *Tonsomboon K., Noppakudritidej P., Sutikulsombat S., Petdum A., Panchan W., Wanichacheva N., Sooksimuang T., Karoonuthaisiri N.* Turn-On fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based electrospun fibrous membranes: Rapid and ultrasensitive test strips for on-site detection of Mercury (II) ion // *Sens. Actuators B*. 2021. V. 344. Article 130212.
12. *Aydogdu S., Ertekin K., Suslu A., Ozdemir M., Celik E., Cocen U.* Optical CO₂ sensing with ionic liquid doped electrospun nanofibers // *J. Fluoresc.* 2011. V. 21. № 1. P. 607.
13. *Najafi M., Frey M.W.* Electrospun nanofibers for chemical separation // *Nanomaterials (Basel)*. 2020. V. 10. № 5. P. 982.
14. *Schoolaert E., Hoogenboom R., De Clerck K.* Colorimetric nanofibers as optical sensors // *Adv. Funct. Mater.* 2017. V. 12. № 38. Article 1702646.
15. *Mills A., Lepre A., Theobald B.R.C., Slade E. and Murrer B.A.* Use of luminescent gold compounds in the design of thin-film oxygen sensors // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 2842.
16. *Zhu Z., Wu P., Liu G., He X., Qi B., Zeng G., Wang W., Sun Y., Cui F.* Ultrahigh adsorption capacity of anionic dyes with sharp selectivity through the cationic charged hybrid nanofibrous membranes // *Chem. Eng. J.* 2017. V. 313. P. 957.
17. *Пешкова В.М., Савостина В.М.* Аналитическая химия никеля. М.: Наука, 1966. 204 с.

УДК 543.068.8

ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

© 2022 г. А. В. Тумская^а, *, И. В. Косырева^а^аСаратовский национальный (исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: marakaeva_anastasiya@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2021 г.

После доработки 29.08.2021 г.

Принята к публикации 30.08.2021 г.

Разработаны экспресс-методики определения антибактериальных соединений группы β-лактамов амоксициллина и цефалексина на основе визуально-колориметрической и цветометрической оценки с применением камеры смартфона. В качестве индикаторной выбрана реакция нингидрина с аминогруппами антибиотиков. Оценено взаимодействие иммобилизованного нингидрина с гентамицином на поверхности твердой матрицы с помощью метода спектроскопии диффузного отражения. Исследована стабильность, а также влияние температуры и времени нагревания тест-средств на ход реакции. Получены цветовые шкалы для визуально-колориметрического определения амоксициллина и цефалексина. Построены линейные зависимости интенсивностей цветового канала Green цветовой модели RGB от логарифма концентрации антибиотика. Разработанные методики применены для анализа образцов лекарственных препаратов.

Ключевые слова: экспресс-определение, индикаторные бумаги, цветометрия, цефалексин, амоксициллин.

DOI: 10.31857/S0044450222080175

Антибиотики β-лактамного ряда (пенициллины и цефалоспорины) — одни из наиболее распространенных препаратов, обладающих широким спектром антибактериальной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [1, 2]. Цефалоспорины, подобно пенициллинам, ингибируют транспептидазу белковой молекулы, участвующей в формировании структуры клеточной мембраны патогенных бактерий. Большинство препаратов данного класса соединений входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов медицинского назначения [3]. Объектами настоящего исследования являются β-лактамы цефалексин (**Ceph**, I поколение) и амоксициллин (**Amox**, II поколение).

Для определения антибиотиков в различных объектах (биологических средах, лекарственных препаратах, пищевых продуктах) в основном используют спектрофотометрические, хроматографические, потенциометрические и иммуноферментные методы анализа [4, 5]. Для испытания на подлинность фармакопеи России Европейская и

Британская фармакопеи рекомендуют методы ВЭЖХ- и ИК-спектроскопии.

В нашей стране существует более 150 зарубежных и отечественных аналогов препарата амоксициллина (в виде таблеток, капсул, суспензий и порошков для приготовления растворов), поэтому быстрый и дешевый скрининг лекарственных препаратов на предмет наличия фальсификатов и для оценки содержания основного вещества является актуальной задачей. Информация о тест-средствах для визуально-колориметрического и цветометрического определения амоксициллина и цефалексина в литературе отсутствует.

Цель настоящей работы состояла в разработке методики экспресс-определения амоксициллина и цефалексина с помощью индикаторных бумаг на основе иммобилизованного нингидрина. Широко распространен способ регистрации аналитического сигнала с помощью различных цифровых устройств: фото- и видеокамер, камер смартфонов [6, 7]. К преимуществам такого подхода можно отнести экономичность и простоту выполнения, возможность сохранения информации в электронном формате, а также возможность

анализа жидких и твердых образцов. В настоящем исследовании показана перспективность регистрации аналитического сигнала камерой смартфона для полуколичественного определения некоторых бета-лактамовых антибиотиков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Применяли антибиотики β -лактамового ряда цефалексин и амоксициллин (Sigma Aldrich, США). Исходные растворы антибиотиков с концентрацией 8 и 16 мг/мл готовили растворением навески препарата в фосфатном буферном растворе (рН 7.4). Рабочие растворы готовили в день проведения эксперимента разбавлением исходного раствора.

Определяли содержание антибиотиков в лекарственных препаратах амоксициллина (форма выпуска – таблетки “АВВА Рус”, Россия, 250 мг) и цефалексина (форма выпуска – капсулы “Немофарм”, Сербия, 500 мг). Для приготовления раствора с концентрацией 1 мг/мл навеску препарата растворяли в 25 мл дистиллированной воды, отделяли от нерастворимых компонентов фильтрованием.

Реактивы и материалы. Спиртовой 0.05 М раствор нингидрина (Реахим, Россия) готовили растворением навески препарата в этаноле.

В качестве матрицы для создания тест-средств применяли целлюлозную бумагу (фильтры обеззоленные “синяя лента”, ТУ 2642-001-13927158-2003). Для получения индикаторных бумаг фильтр размером 5 × 5 см погружали на 3 мин в свежеприготовленный спиртовой раствор нингидрина, высушивали на воздухе. Полученная индикаторная бумага имела белый цвет.

Оборудование и методы исследования. Спектры диффузного отражения регистрировали на двухлучевом сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония), диапазон измерения 200–800 нм, прибор укомплектован приставкой зеркального отражения. Измеренные значения диффузного отражения (R) пересчитывали в функцию Гуревича–Кубелки–Мунка (F) по формуле: $F = (1 - R)^2 / (2R)$.

Спектры поглощения регистрировали на двухлучевом сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония), диапазон измерения 200–800 нм, интервал измерения 1 нм. Использовали рН-метр рН-150МА (Россия).

Методики. Для определения оптимальной температуры проведения тест-реакции готовили серию индикаторных бумаг, на которые наносили определяемый антибиотик с концентрацией 7 мг/мл, помещали на 10 мин в сушильный шкаф (SNOL 58/350, Литва) при температуре от 60 до 110°C. Далее тест-средство помещали в бокс размером 22 × 23 × 24 см с двумя полосками светоди-

одного освещения (5 V, 1 A), фотографировали 13-мегапиксельной камерой смартфона Redmi 6A.

Цветометрическую обработку изображений тест-средств осуществляли в программе Adobe Photoshop®. Для этого часть изображения усредняли с помощью фильтра “Average” и определяли интенсивность цветовых каналов.

Интервал ненадежности и предел обнаружения определяли по методике [8]: готовили три тест-шкалы с концентрациями антибиотика от 0.1 до 1.4 мг/мл с шагом $\Delta c = 0.1$ мг/мл. Присутствие аналита визуально оценивали 15 наблюдателей ($n = 45$). Определяли вероятность обнаружения антибиотика по формуле: $P(c_i) = n_i / N_i$, где $P(c_i)$ – вероятность обнаружения антибиотика, n_i – число положительных ответов наблюдателей о появлении фиолетовой окраски тест-средства, N_i – общее число ответов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие амоксициллина и цефалексина с нингидрином на поверхности бумаги. Выбор оптимальных условий экспресс-определения. Для качественной реакции на амоксициллин и цефалексин при создании тест-средств выбрали взаимодействие антибиотиков с нингидрином (Схема 1). Нингидрин (трикетогидринденгидрат) широко применяют при определении аминов, аминокислот и тиофена [9]. Маккалдин предположил [10], что реакции нингидрина с аминами, аминокислотами и иминокислотами протекают по одному и тому же механизму с образованием дикетогидриндилиден–дикетогидриндамина или пурпура Руэманна. Схема 1 иллюстрирует предполагаемый ход реакции амоксициллина и цефалексина с нингидрином, включающий окислительное дезаминирование первичной аминогруппы с последующей конденсацией восстановленного нингидрина с образованием окрашенного продукта реакции пурпурного цвета с λ_{\max} 560–570 нм.

Для исследования реакции на поверхности твердой матрицы применяли метод спектроскопии диффузного отражения. На рис. 1 представлены спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича–Кубелки–Мунка (F) для систем амоксициллин/цефалексин–иммобилизованный нингидрин. Как видно, в спектрах изучаемых систем появляется полоса при 410–420 нм и широкая полоса с максимумом при 560–570 нм, что согласуется с данными [11, 12] для аналогичных систем.

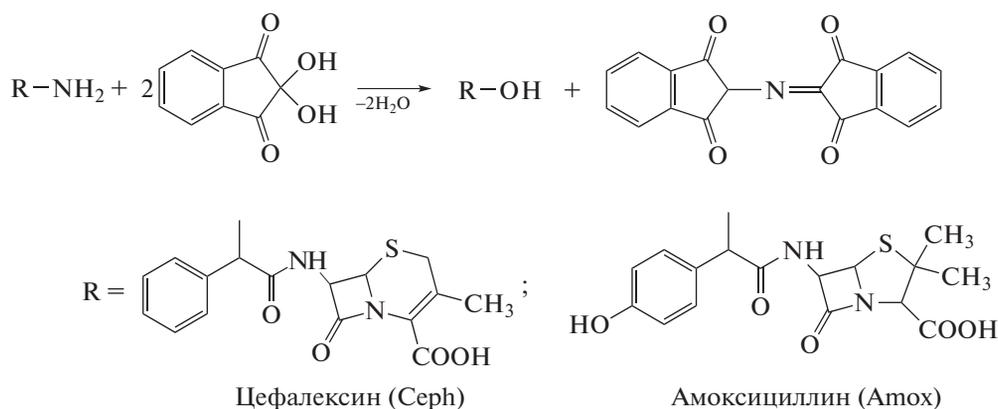


Схема 1. Схема взаимодействия антибиотиков с нингидрином.

При подборе оптимальных условий экспресс-определения на поверхности целлюлозной матрицы исследовали влияние температуры и времени проведения реакции (рис. 2а, 2б). Для выбора оптимальной температуры проведения тест-реакции строили зависимость изменения интенсивностей цветового канала Green (ΔG_{Green}) от температуры нагревания индикаторных бумаг по сравнению с контрольным образцом (рис. 2а). Как видно, с увеличением температуры нагревания от 60 до 100°C значения ΔG_{Green} увеличиваются и при 100–110°C принимают максимальные значения. Зависимость изменения интенсивностей канала Green от времени нагревания тест-средств (рис. 2б) показала, что через 15–20 мин их значения достигают максимума, и окраска при этом максимальна.

Визуально-колориметрическое определение. При тест-определении анализируемый раствор антибиотика наносили на индикаторную бумагу с иммобилизованным нингидрином, высушивали при $100 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 15 мин. Наблюдали появление фиолетового окрашивания, интенсивность которого увеличивалась с увеличением концентрации антибиотика. Концентрации антибиотиков для приготовления цветовой шкалы подбирали таким образом, чтобы ширина шага шкалы позволяла визуально распознавать изменение окраски двух ближайших концентраций и не приводила к большей погрешности определения. В результате выбрали оптимальный шаг, при котором каждая последующая концентрация отличается от предыдущей в два раза.

Предел обнаружения (ПО) определяли как правую границу интервала ненадежности (ИН) при вероятности обнаружения 99%. При определении интервала ненадежности строили зависимости вероятностей обнаружения (Рс) антибиотика от его концентрации (рис. 3). Для проверки гипотезы о законе распределения экспериментальных данных проанализировали зависимости функций нормального, логнормального, экспо-

ненциального распределений и распределения экстремального значения первого рода (Вейбулла) от концентрации антибиотиков. Полученные значения коэффициентов корреляции уравнений прямых составляли ≥ 0.93 , что подтверждает согласованность экспериментальных данных с функциями распределения и правильность выбранного диапазона ИН. Некоторые метрологические характеристики (диапазон определяемых содержаний (ДОС), ИН, ПО) разработанной методики визуальной оценки представлены в табл. 1.

Цветометрическое определение. Цветометрическую обработку изображений тест-средств осуществляли в программе Adobe Photoshop®, для этого часть изображения усредняли с помощью фильтра “Average” и определяли интенсивность каналов модели RGB (Red-Green-Blue). Получили линейные зависимости интенсивностей каналов Red, Green и Blue от I_{gc} и c (рис. 4).

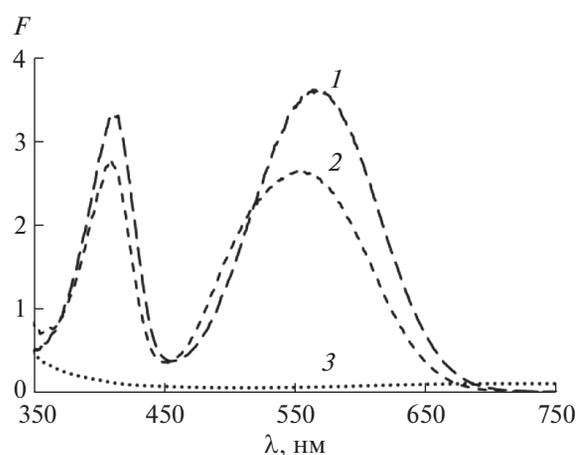


Рис. 1. Спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича–Кубелки–Мунка для систем цефалексин–иммобилизованный нингидрин (1), амоксициллин–иммобилизованный нингидрин (2), иммобилизованный нингидрин (3) ($c_{\text{Amox}} = c_{\text{Ceph}} = 8 \text{ мг/мл}$, 90°C, 20 мин).

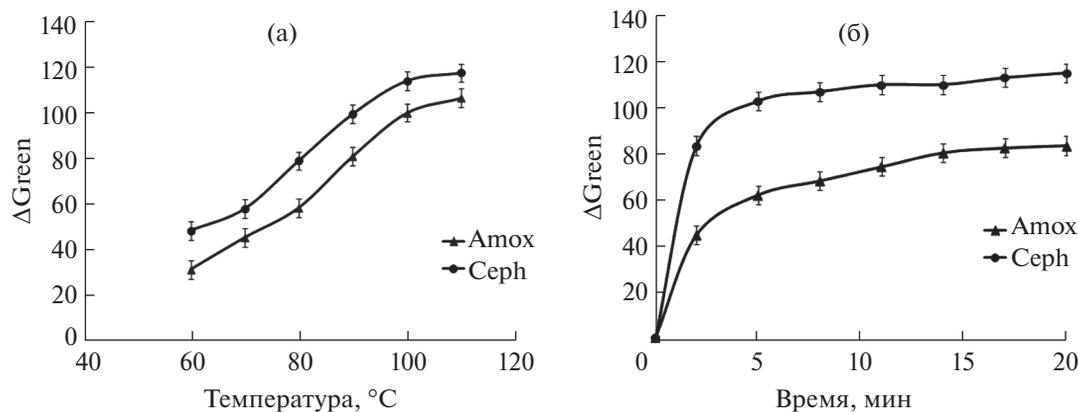


Рис. 2. Зависимости изменения интенсивностей цветового канала Green от температуры (а) и от времени нагревания (б) тест-средств: 1 – цефалексин, 2 – амоксициллин ($c_{Amox} = c_{Ceph} = 7$ мг/мл, pH 7.4).

Для цефалексина зависимости интенсивностей цветовых каналов от lgc линейны в области 0.5–8 мг/мл и 0.125–1 мг/мл для зависимостей $\Delta I - c$ (рис. 4а, 4в). Для амоксициллина зависимости $\Delta I - lgc$ линейны в области 1–16 мг/мл (0.5–16 мг/мл для канала Green) и 0.125–2 мг/мл для зависимостей $\Delta I - c$ (рис. 4б, 4г). В качестве оптимального (по чувствительности и коэффициенту регрессии) выбрали канал Green при определении Ceph и Amox. Предел обнаружения цефалексина составил 0.08 мг/мл, амоксициллина – 0.09 мг/мл.

По полученным цветовым шкалам строили профили лепестковых диаграмм (ЛД) в координатах цветовых каналов моделей RGB, CMYK, HSV (рис. 5а, 5б). Рассчитывали периметр (P) и площадь (S) профилей ЛД в MS Excel по формулам: $P = \sqrt{a^2 + b^2 - 2ab \cos(ab)}$, $S = a + b \sin(ab)$, где a, b – стороны треугольника, $\cos(ab)$ – косинус

угла между сторонами a, b , $\sin(ab)$ – синус угла между сторонами a, b .

Получили линейные зависимости периметра ($y = -292x + 748, r^2 = 0.98$ и $y = -291x + 837, r^2 = 0.98$) и площади ($y = -39496x + 56166, r^2 = 0.98$ и $y = -39849x + 67814, r^2 = 0.98$) от $lgc(Ceph)$ и $lgc(Amox)$ соответственно. Данные могут быть применены при полуколичественном определении антибиотиков с пониженным пределом обнаружения 0.04 и 0.09 (0.10) мг/мл для зависимостей периметра и площади ЛД и с погрешностью определения, не превышающей 20%.

Определение антибиотиков в лекарственных препаратах. Разработанные варианты экспресс-определения антибиотиков апробированы для оценки их содержания в лекарственных препаратах (“Амоксициллин” таблетки, “Цефалексин” капсулы). Согласно фармакопейной статье (ФС “Цефалексин, капсулы”) содержание антибиотика должно находиться в пределах не менее 90.0% и не более 110.0% от заявленного количества цефалексина, т.е. 500 ± 50 мг; и не менее 90.0% и не более 110.0% амоксициллина, т.е. 250 ± 25 мг (ФС “Амоксициллин, таблетки”). При тест-определении содержания антибиотика каплю анализируемого раствора наносили на индикаторную бумагу, нагревают до 100°C и оценивали содержание антибиотика с помощью разработанных методик визуального и цветометрического определения, а также независимого спектрофотометрическим методом (СФМ) (табл. 3). При спектрофотометрическом определении применяли градуировочную зависимость оптической плотности при 262 нм от концентрации цефалексина и при 275 нм для амоксициллина.

Найденные в препаратах содержания амоксициллина и цефалексина согласуются с заявленными интервалами содержаний определяемых компонентов. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что разработан-

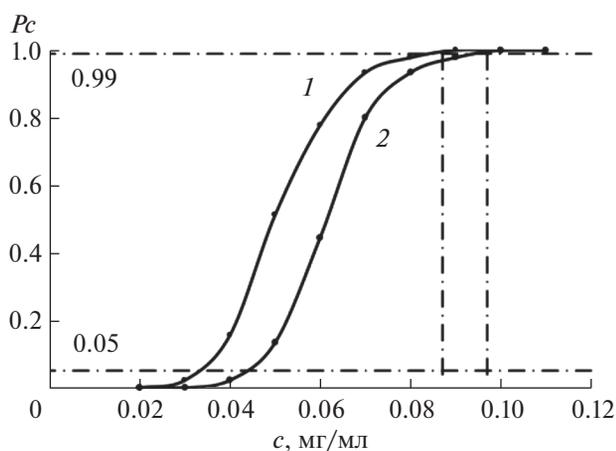


Рис. 3. Вероятности обнаружения цефалексина (1) и амоксициллина (2).

Таблица 1. Некоторые метрологические характеристики разработанных методик визуального определения цефалексина и амоксициллина

Метрологическая характеристика, мг/мл	Антибиотик	
	Ceph	Амох
ДОС	0.125–8	0.125–16
Интервал ненадежности (ИН)	0.033–0.087	0.043–0.097
Предел обнаружения (ПО)	0.087	0.097

Таблица 2. Уравнения, коэффициенты регрессии и диапазон линейности зависимостей изменения интенсивности цветных каналов модели RGB от $\lg c/c$

Антибиотик	Зависимость	Диапазон линейности, мг/мл	Уравнение	Коэффициент регрессии
Ceph	Канал Red– $\lg c$	0.5–8	$y = 91x + 39$	0.999
	Канал Blue– $\lg c$	0.5–8	$y = 81x + 34$	0.998
	Канал Green–$\lg c$	0.5–8	$y = 92x + 63$	0.992
	Канал Red– c	0.125–1	$y = 40x - 4.6$	0.983
	Канал Blue– c	0.125–1	$y = 35x - 4.3$	0.981
	Канал Green–c	0.125–1	$y = 69x - 4.5$	0.999
Амох	Канал Red– $\lg c$	1–16	$y = 84x + 14$	0.992
	Канал Blue– $\lg c$	1–16	$y = 82x + 12$	0.990
	Канал Green–$\lg c$	0.5–16	$y = 90x + 41$	0.992
	Канал Red– c	0.125–2	$y = 20x - 2.7$	0.999
	Канал Blue– c	0.125–2	$y = 18x - 3.3$	0.998
	Канал Green–c	0.125–2	$y = 33x - 1.2$	0.992

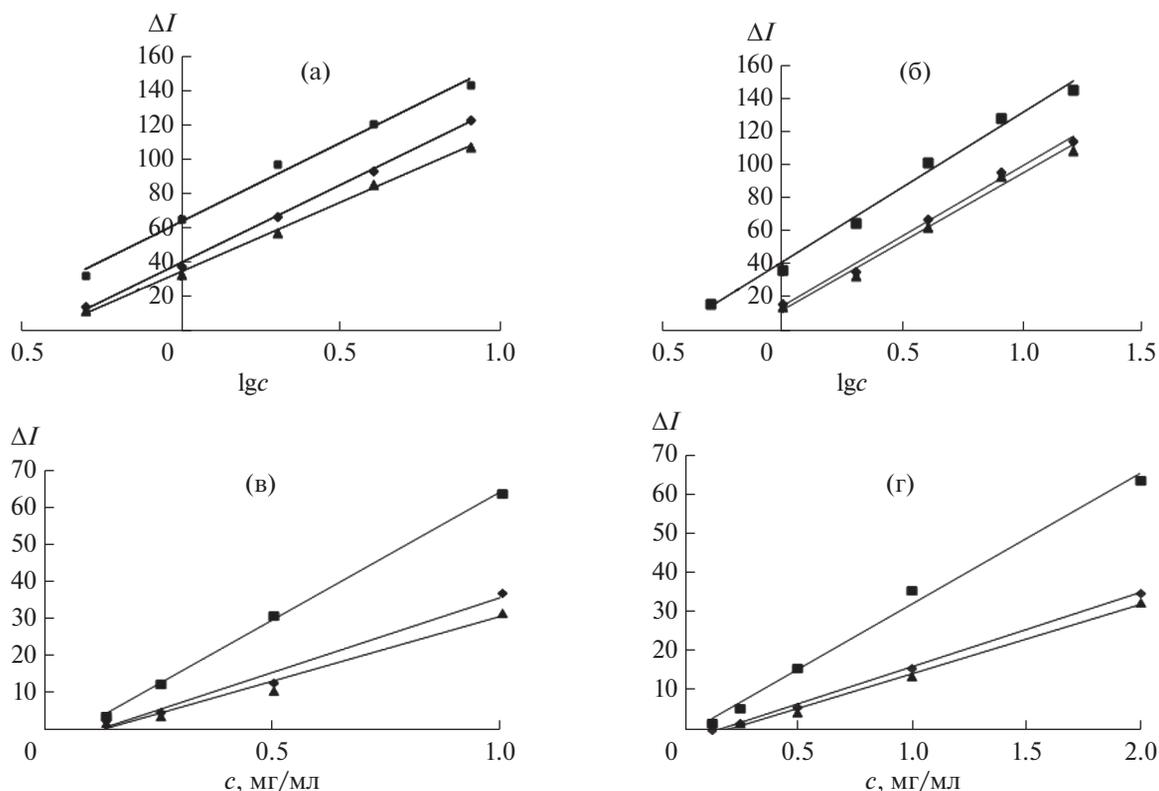
**Рис. 4.** Зависимости изменения интенсивности (ΔI) цветных каналов Red (◆) Green (■), Blue (▲) от $\lg c$ цефалексина (а) и амоксициллина (б); от c (мг/мл) цефалексина (в) и амоксициллина (г).

Таблица 3. Результаты (мг/мл) определения содержания антибиотиков в лекарственных препаратах (таблетки “Амоксициллин” и капсулы “Цефалексин”) разработанными экспресс-способами и спектрофотометрическим методом ($n = 5$, $P = 0.95$)

Заявлено в препарате, мг	Визуальная оценка	Цветометрическая оценка						СФМ	s_f
		по каналу Green	s_f	площадь ЛД	s_f	периметр ЛД	s_f		
Амоксициллин, 250 ± 25 мг	250 ± 50	225 ± 30	0.09	225 ± 25	0.08	220 ± 30	0.08	245 ± 10	0.04
Цефалексин, 500 ± 50	500 ± 50	525 ± 25	0.04	515 ± 50	0.10	525 ± 50	0.08	480 ± 20	0.05

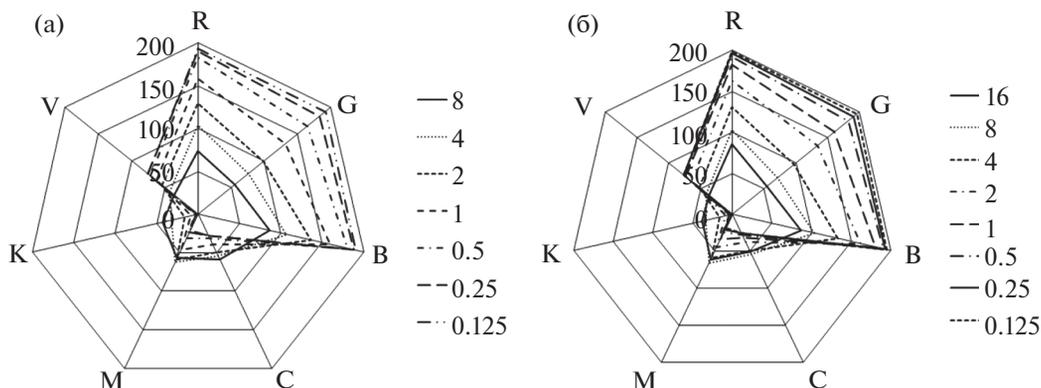


Рис. 5. Профили лепестковых диаграмм в координатах цветовых каналов R, G, B, C, M, K, V систем цефалексин (а), амоксициллин (б) – иммобилизованный нингидрин (с, мг/мл).

ные экспресс-методики можно применять для полуколичественного определения цефалексина и амоксициллина.

Финансовая поддержка работы осуществлялась в рамках гранта РФФИ (научный проект № 20-33-90020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арзамасцев А.П. Фармацевтическая химия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. 640 с.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с.
3. Распоряжение правительства РФ от 23 октября 2017 г. № 2323-р “Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2018 г.”.
4. Kahsay G., Song H., Van Schepdael A., Cabooter D., Adams E. Hydrophilic interaction chromatography (HIL-IC) in the analysis of antibiotics // J. Pharm. Biomed. Anal. 2014. V. 87. P. 142.
5. Кулапина Е.Г., Баринова О.В., Кулапина О.И., Утц И.А., Снесарев С.В. Современные методы определения антибиотиков в биологических и лекарственных средах (обзор) // Антибиотики и химиотерапия. 2009. Т. 54. №. 9–10. С. 53.
6. Martinkova P., Brtnicky M., Kynicky J., Pohanka M. Fast and simple glucose assay based on filter paper as enzymes carrier using phone camera detection // Chem. Papers. 2018. V. 72. №. 11. P. 2719.
7. Garcia A., Erenas M.M., Marinetto E.D., Abad C.A., de Orbe-Paya I., Palma A.J., Capitán-Vallvey L.F. Mobile phone platform as portable chemical analyzer // Sens. Actuators B: Chem. 2011. V. 156. №. 1. P. 350.
8. Холин Ю.В., Никитина Н.А., Пантелеймонов А.В., Решетняк Е.А., Бугаевский А.А., Логинова Л.П. Метрологические характеристики методик обнаружения с бинарным откликом. Х.: Тимченко, 2008. 128 с.
9. Файгель Ф. Капельный анализ органических веществ. М.: Госхимиздат, 1962. 836 с.
10. McCaldin D.J. The chemistry of ninhydrin // Chem. Rev. 1960. V. 60. №. 1. P. 39.
11. Frutos P., Torrado S., Perez-Lorenzo M.E., Frutos G. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin // J. Pharm. Biomed. Anal. 2000. V. 21. № 6. P. 1149.
12. Raza A., Ijaz A.S., Ahmad S. Development and application of spectrophotometric method for the determination of cefaclor in pharmaceutical formulations // Química Nova. 2009. V. 32. №. 5. P. 1180.

УДК 543.94

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

© 2022 г. С. А. Пиденко^а, И. С. Москвичева^а, Н. А. Бурмистрова^а, *^аСаратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт химии
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: naburmistrova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2021 г.

После доработки 17.09.2021 г.

Принята к публикации 18.09.2021 г.

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

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

DOI: 10.31857/S0044450222080096

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

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

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

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

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

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. В работе использовали трифениламин (ТФА) (Sigma-Aldrich, 98%), дифениламин-4-сульфонат натрия (ДФАС, Россия, ч.д.а.), ПХ (Sigma, ~150 усл. ед./мг), 2,2-азинобис(3-этилбензтиазолин-6)-сульфоновую кислоту (АБТС, Sigma), ТМБ (Sigma), пероксид водорода (х.ч.), RhCl_3 (Merck, 98%), $\text{H}_2\text{IrCl}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (Merck). Все остальные реагенты, использованные в работе, были квалификации не ниже х.ч.

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

Стандартные растворы ДФАС и ТФАС (5.0×10^{-3} М), ПХ (1 мг/мл, ~23 мкМ) готовили растворением точной навески, H_2O_2 (1.0×10^{-2} М) — разбавлением аликвоты в бидистиллированной воде. Рабочие растворы реагентов готовили разбавлением стандартных растворов непосредственно перед применением. Стандартные растворы H_2IrCl_6 и RhCl_3 (1 мг/мл) готовили растворением точной навески в HCl (1 М). Каталитически активные формы Ir(IV) (1.0×10^{-5} М) и Rh(III) (5.0×10^{-5} М) готовили 3-кратной термообработкой аликвоты стандартных растворов с HClO_4 (конц., 2 мл) до образования влажных солей и переводили в раствор H_2SO_4 (1.0×10^{-3} М). Приго-

товленные растворы сохраняли каталитическую активность в течение трех месяцев.

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

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

Методика определения пероксидазы хрена. Реакцию окисления ТФАС пероксидом водорода в присутствии ПХ проводили по следующей методике. В стеклянную пробирку вводили последовательно рассчитанное количество H_2O (суммарный объем — 5 мл), 0.5 мл H_2SO_4 (1.0×10^{-3} М), ТФАС (0.3 мл, 1.0×10^{-3} М), ПХ (5–300 мкл, 60 нМ), H_2O_2 (0.5 мл, 1.0×10^{-2} М), Ir(IV) (25 мкл, 1.0×10^{-5} М)/ Rh(III) (25 мкл, 5.0×10^{-4} М) при комнатной температуре. Начало реакции соответствовало добавлению пероксида водорода. Для построения градуировочной зависимости оптическую плотность при 680 нм регистрировали через 110 с после начала реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Реакция ферментативного окисления дифениламин-4-сульфоната натрия и трифениламин-4-сульфоната натрия пероксидом водорода. ДФАС и ТФАС не окисляются H_2O_2 в широком диапазоне кислотности среды, в то же время добавление ПХ приводит к появлению ярко окрашенных форм в слабокислых растворах H_2SO_4 (pH 2.5–4.5). Следует отметить довольно высокую кислотность среды изучаемой реакции, которая не является оптимальной для каталитического действия ПХ. Однако депротонирование окисленных форм ТФАС приводит к исчезновению окраски в растворах с меньшей кислотностью.

Важно отметить высокую устойчивость ТФАС к окислителям в слабокислой среде. При pH > 1 реагент не окисляется целым рядом окислителей (NH_4VO_3 , NaNO_2 , KBrO_3 , KIO_3 , NaIO_4 , FeCl_3) как в отсутствие, так и в присутствии ПХ.

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

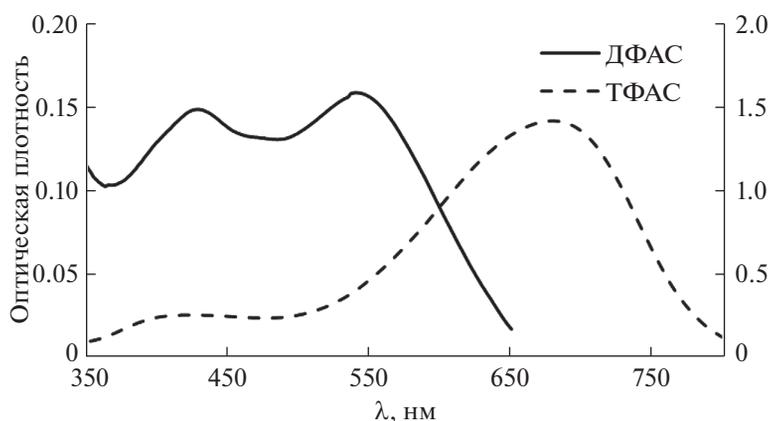


Рис. 1. Спектры поглощения дифениламин-4-сульфоната натрия (ДФАС) и трифениламин-4-сульфоната натрия (ТФАС) при их окислении пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена (ПХ): ДФАС/ТФАС – 6.0×10^{-5} М, ПХ – 3.0×10^{-9} М, H_2O_2 – 5.0×10^{-3} М, H_2SO_4 – 1.0×10^{-3} М, $t = 40$ с.

ванию сульфоната дикатиона тетрафенилбензидина (ТФБ²⁺), а также низкоинтенсивной полосой ~970 нм. Яркая окраска раствора сохраняется в течение 5–10 мин, устойчивость ТФБ²⁺ зависит от условий протекания реакции. Трансформация спектра – снижение интенсивности при 680 нм, появление новой полосы при 480 нм и увеличение интенсивности при 970 нм – позволяет предположить протекание побочных реакций, приводящих к образованию бесцветного сульфоната катион-радикала тетрафенилбензидина ТФБ^{•+}. Последовательное образование ряда окисленных форм ТФАС хорошо согласуется с известными закономерностями окисления ариламинов.

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

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

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

Наиболее интенсивную окраску продукта окисления ТФАС и относительно устойчивые во времени продукты окисления наблюдали в слабых кислых растворах серной кислоты. Использование H_2SO_4 позволяет проводить измерения при постоянных значениях pH (± 0.1) для серии растворов с постоянными концентрациями ТФАС и пероксида водорода. Следует отметить, что H_2SO_4 является оптимальной средой и для реакции каталитического окисления ТФАС периодат-ионами [17, 18].

Показано, что интенсивность сигнала и устойчивость иона ТФБ²⁺ максимальны при концентрации H_2SO_4 5.0×10^{-5} – 2.0×10^{-4} М (рис. 2а), концентрацию H_2SO_4 1.0×10^{-4} М выбрали в качестве оптимальной и использовали в дальнейшей работе.

Зависимость аналитического сигнала от концентрации H_2O_2 имеет вид кривой с насыщением, которая достигает максимума при концентрации 5.0×10^{-4} М (рис. 2б), использование концентрации окислителя 1.0×10^{-3} М позволяет получить более стабильный аналитический сигнал. Таким образом, реакция окисления ТФАС протекает при более высоких концентрациях окислителя по сравнению с другими ариламинами.

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

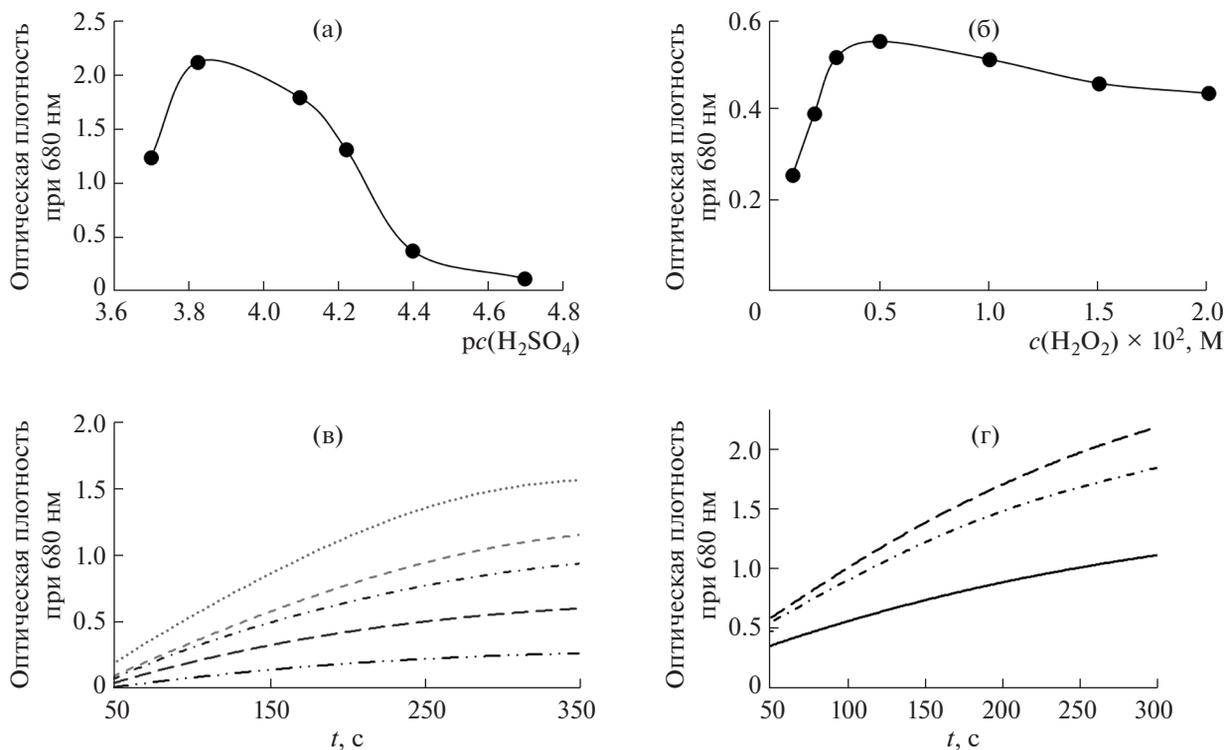


Рис. 2. Влияние концентрации H_2SO_4 (а) и H_2O_2 (б) на оптическую плотность продукта окисления трифениламин-4-сульфоната натрия (ТФАС) при 680 нм: ТФАС – 0.18 мМ, пероксидаза хрена – 3.6 нМ (а) и 1.2 нМ (б), H_2O_2 – 1.0 мМ (а), H_2SO_4 – 0.1 мМ (б), t – 60 с (а) и 100 с (б). Кинетические кривые реакции ферментативного окисления ТФАС при различной концентрации ТФАС (в); в отсутствие (1) и в присутствии каталитически активных форм Ir(IV) (0.2 мкМ, 2) и Rh(III) (0.5 мкМ, 3) (г): ТФАС – 0.18 мМ, ПХ – 1.8 нМ, H_2O_2 – 1.0 мМ, H_2SO_4 – 0.1 мМ.

концентрации реагента при фиксированной концентрации ПХ.

При выбранных концентрациях (H_2O_2 – $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, ТФАС – $1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$, H_2SO_4 – $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$) интенсивность полосы поглощения ТФБ^{2+} линейно зависит от концентрации ПХ до 5.0 нМ, что позволяет использовать реагент для количественного определения активности фермента. Определение ПХ при выбранных условиях характеризуется высокой воспроизводимостью результатов ($n = 3$, $s_r \leq 5\%$). При более высоких концентрациях ПХ увеличиваются скорости как целевой реакции, так и побочных процессов, что приводит к снижению воспроизводимости результатов определения ПХ.

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

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

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

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

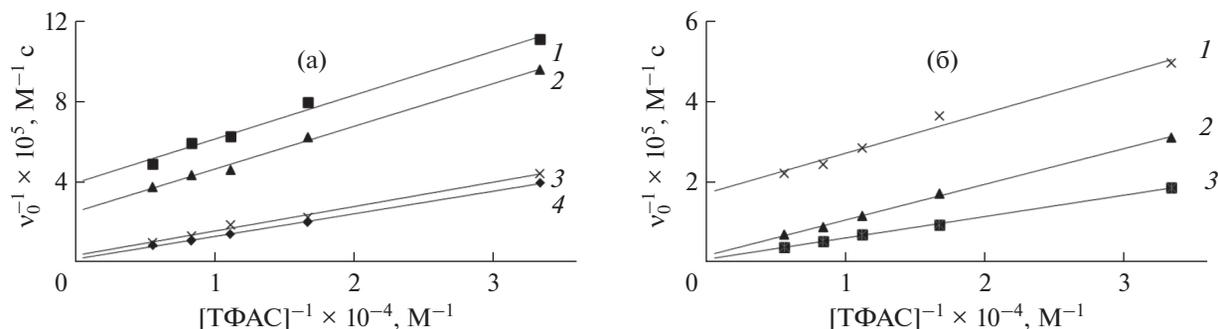


Рис. 3. Зависимость v_0 от концентрации трифениламин-4-сульфоната натрия в двойных обратных координатах в отсутствие (1) и в присутствии (2–4) каталитически активных форм (а) Ir(IV) (2 – 0.05, 3 – 0.10, 4 – 0.20 мкМ) и (б) Rh(III) (2 – 0.50, 3 – 5.0 мкМ): ПХ – (а) 1.2 нМ и (б) 1.8 нМ, H_2O_2 – 1.0 мМ,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

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

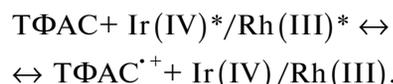
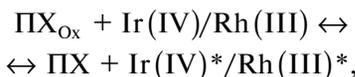
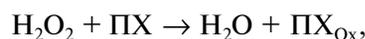
$$k_{\text{кат}}^a = k_{\text{кат}} (1 + \alpha [A]_0), \text{ с}^{-1}, \quad (1)$$

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

УДК 543.054:543.544

МИЦЕЛЛЯРНАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ L-КАРНИТИНА НАНОЧАСТИЦАМИ МАГНЕТИТА

© 2022 г. Е. Г. Сумина^{а, *}, С. Н. Штыков^{а, **}, И. С. Решетникова^а, Н. А Юрасов^а, В. З. Углонова^а

^аСаратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского, Институт химии
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: suminaeg@yandex.ru

**e-mail: shtykovsn@mail.ru

Поступила в редакцию 08.07.2021 г.

После доработки 19.11.2021 г.

Принята к публикации 22.11.2021 г.

Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) изучено хроматографическое поведение L-карнитина в водно-органических подвижных фазах (ПФ) и водной ПФ в присутствии катионного ПАВ хлорида цетилпиридиния (ЦПХ) на пластинках с нормальной неподвижной фазой на основе силикагеля. Среди водно-органических ПФ лучшие результаты получены для ПФ состава пропанол-2–ацетон–вода–уксусная кислота (4 : 5 : 2 : 2). Наилучшие хроматографические характеристики получены для водно-мицеллярной ПФ, содержащей 0.001 М ЦПХ. Впервые изучена сорбция L-карнитина на наночастицах магнетита, модифицированных бромидом цетилтриметиламмония. Установлено, что количественная сорбция аналита со степенью извлечения L-карнитина 89% протекает за 40 мин. Найден элюент – этанол, позволяющий на 95% десорбировать L-карнитин. Установлено, что применение для концентрирования 3 мг наномагнетита позволяет в пять раз уменьшить нижнюю границу определяемых содержаний L-карнитина. Разработана методика денситометрического определения L-карнитина с помощью мицеллярной ТСХ в напитке для спорта XXI Power “L-КАРНИТИН”.

Ключевые слова: L-карнитин, мицеллярная тонкослойная хроматография, магнитная твердофазная экстракция, магнетит.

DOI: 10.31857/S0044450222080163

L-карнитин – природное вещество, синтезируемое организмом, основная роль которого состоит в переносе длинноцепочечных жирных кислот в митохондрии клеток через их внутреннюю мембрану для последующего окисления и получения энергии [1–3]. L-карнитин обладает также ярко выраженным комплексом антиокислительных и антимуtagenных свойств, антиангинальным и противоишемическим эффектами, участвует в регуляции энергетического обмена сердца и вследствие этого широко используется в медицине [4–6], в том числе для поддержки здоровья пожилых людей [7] и развития выносливости в спорте [8]. Известной проблемой является дефицит карнитина у детей до 15 лет [9]. Карнитин и его производные содержатся в мясных продуктах, молоке, яйцах, рыбе, орехах, авокадо и многих других продуктах, широко применяется в биологически активных добавках (БАД), энергетических напитках [10]. Все это требует разработки разнообразных методов его определения в биологических объектах (тканях, жидкостях),

продуктах питания, пищевых добавках, БАД и фармпрепаратах.

Анализ методов определения карнитина дан в обзорах [11–14]. Показано, что карнитин определяют в нескольких формах: в свободном состоянии, в виде эфиров с короткой, средней и длинной алкильными цепочками (C₁–C₁₈), а также его суммарное содержание. Эфиры карнитина различают по их растворимости в воде. В связи с этим рассматриваются методы выделения и разделения L-карнитина и его ацильных производных [15, 16].

Вследствие сложного состава, нелетучести и необходимости определения как отдельных составляющих, так и суммарного содержания карнитина наиболее часто для его определения применяют метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии [11–15] с разными вариантами детектирования: спектрофотометрическим [17], флуориметрическим [18, 19] детекторами после реакции дериватизации, а

также кондуктометрическим [20], масс-спектрометрическим [21] и др. Кроме этого, карнитин определяют капиллярным электрофорезом [22], ионной хроматографией [23], проточно-инжекционным методом анализа [24] и различными вариантами масс-спектрометрии [25]. Так как карнитин не содержит хромофорных групп, то его фотометрическое [26], флуориметрическое [27] и радиоферментное [10], и даже хроматографическое определение [18] основано на предварительной дериватизации при взаимодействии с различными ферментами [15]. Важное значение имеет возможность раздельного определения энантиомеров карнитина, поскольку содержание D-изомера строго нормируется [19]. Для выделения карнитина из объектов и концентрирования обычно используют жидкостно-жидкостную экстракцию и микроэкстракцию или твердофазную экстракцию (ТФЭ) [15, 16, 18, 28, 29].

Одним из вариантов ТФЭ является магнитная твердофазная экстракция (МТФЭ), основанная на использовании для извлечения аналита коллоидного раствора наночастиц магнетита, обладающих суперпарамагнитными свойствами. Это явление позволяет быстро в течение нескольких десятков секунд отделять сорбент с аналитом от жидкой матрицы с помощью внешнего магнитного поля [30–34]. Сорбционное концентрирование L-карнитина с использованием магнитных наночастиц не описано.

Анализ литературы показал, что определению карнитина методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) посвящена только одна работа, в которой описан анализ пищевых добавок, напитков, капсул и таблеток на содержание карнитина [35]. Неподвижной фазой являлись целлюлозные пластины для высокоэффективной ТСХ, а подвижной фазой – смесь метанол–вода–ледяная уксусная кислота (10 : 2 : 0.1, по объему). Хроматограммы анализировали денситометрически при 420 нм после обработки нингидрином.

Более 25 лет назад широкое применение в качестве подвижных фаз в ТСХ нашли мицеллярные подвижные фазы (МПФ), исключаящие применение летучих, канцерогенных и токсичных растворителей. Показано, что метод мицеллярной ТСХ (МТСХ) не уступает, а часто превосходит по эффективности традиционный вариант ТСХ с органическими элюентами [36–40]. Метод МТСХ применяли и для определения аминокислот, к классу которых относится карнитин, но поведение карнитина не исследовали [37–39].

Цель настоящей работы – применение МПФ для мицеллярной тонкослойной хроматографии L-карнитина на пластинках с прямой фазой, а также применение концентрирования методом МТФЭ на наночастицах магнетита для снижения нижней границы определяемых содержаний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали L-карнитин (Sigma Aldrich, США) с содержанием основного вещества более 95%. Стандартный водный раствор L-карнитина (**L-Кр**) с концентрацией 20 мг/мл готовили по точной навеске. Магнетит синтезировали в деионизованной воде смешиванием в соотношении 1 : 2 растворов $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99.8%, Acros Organics, Германия) с гидроксидом натрия (99.8%, Fluka, Германия) [32, 41]. Для создания инертной среды через раствор пропускали азот (ГОСТ 9293-74). Магнетит стабилизировали и модифицировали катионным поверхностно-активным веществом (**ПАВ**) – бромидом цетилтриметиламмония (**ЦТАБ**) (99%, Acros Organics, Германия), по методике [41]. Использовали 0.06 М водный раствор ЦТАБ. Ацетатно-аммиачные буферные растворы (**ААБ**) (рН 3–8) готовили смешиванием необходимых количеств 2 М растворов уксусной кислоты и аммиака. Ионную силу раствора в водных МПФ создавали раствором хлорида натрия. Для приготовления подвижных фаз (**ПФ**) использовали водно-органические растворители: пропанол-1 (ч.д.а.), пропанол-2 (ч.д.а.), ацетон (ч.д.а.), уксусную кислоту (ч.д.а.) и мицеллярные растворы хлорида цетилпиридиния (**ЦПХ**, 96%, НПО “Синтез ПАВ”, Россия). Исходные растворы ЦПХ с концентрацией 0.1 М готовили по точной навеске растворением в дистиллированной воде при нагревании до 40–50°C. Рабочие растворы всех веществ готовили разбавлением исходных перед употреблением.

Аппаратура. Деионизованную воду получали на установке водоочистки УВОИ–“М-Ф” (Медиа-Фильтр, Россия), механическое перемешивание растворов осуществляли на орбитальном шейкере с аналоговым управлением ELMi S-3.02 (ЭЛМИ, Латвия) и с помощью магнитной мешалки MINI MR STANDARD (IKA WERKE, Германия). Для магнитной сепарации наночастиц магнетита использовали постоянный магнит Nd–Fe–В с (ВН)макс = 40 МГсЭ. Зета-потенциал частиц гидрозоля в растворах магнетита измеряли на анализаторе Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Размеры наночастиц магнетита и толщину покрытия ЦТАБ определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ.

L-Карнитин определяли на денситометре (Сорбполимер, Краснодар, Россия) с УФ-лампой (TUV PL-S PHILIPS, 254 нм) методом восходящей ТСХ на коммерческих пластинках с нормальной фазой Сорбфил (силикагель ПТСХ-П-А-УФ, ТУ26-11-17-89, размер зерен 5–17 мкм, связую-

шее силиказоль) на полимерной подложке (Сорбполимер, Краснодар, Россия). Объем наносимой пробы составлял 1 мкл. Зону основного вещества L-Кр идентифицировали, обрабатывая пластину свежеприготовленным 0.1 н раствором перманганата калия. После хроматографирования и проявления пластинки сушили в течение 10 мин при 90°C, охлаждали на воздухе, рассчитывали значения R_f аминокислоты, а также параметры эффективности разделения (число теоретических тарелок (N) и эффективную высоту теоретической тарелки, ВЭТТ (H)). Площади хроматографических зон измеряли с помощью графического редактора "Adobe Photoshop CC 2018". Для построения градуировочных графиков использовали исходные растворы L-карнитина (20 мг/мл), из которого готовили рабочие растворы в интервале концентраций от 0.4 до 2.0 мг/мл последовательным разбавлением исходного раствора в объеме 5 мл, отбирая точные аликвоты с помощью дозатора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тонкослойная хроматография L-карнитина. Особенность МПФ состоит в том, что в гомогенной водной дисперсной среде дифильные молекулы ПАВ при определенной концентрации (критической концентрации мицеллообразования, ККМ) спонтанно образуют наноразмерные (радиус 1.5–2 нм) динамические нанонагрегаты, называемые мицеллами, состоящие из нескольких десятков ионов (молекул) ПАВ. Присутствие в подвижной фазе мицелл улучшает селективность хроматографирования за счет возникновения нового равновесия, в котором сорбат распределяется между водной средой и мицеллярной псевдофазой, дополняющего равновесие в системе ПФ–модифицированный сорбент [36, 42]. Характерным свойством ПАВ, образующих МПФ, является способность изменять полярность поверхности пластин в ТСХ, позволяя в динамическом режиме её гидрофобизировать и превращать нормальную фазу в обращенную, а при избытке ПАВ придавать поверхности заряд и реализовывать ион-парный вариант ТСХ [40].

Хроматографическое поведение L-Кр методом ТСХ изучали с использованием как традиционной водно-органической ПФ, так и мицеллярной ПФ на основе катионного ПАВ хлорида цетилпиридиния. Анализ литературы показал, что обязательными компонентами водно-органических ПФ являются спирт, уксусная кислота, вода, иногда добавляют апротонный растворитель, в качестве которого применяли ацетон. Сравнивали составы пропанол-2–ацетон–вода–уксусная кислота (4 : 5 : 2 : 2), пропанол–ацетон–вода–уксусная кислота (4 : 5 : 2 : 2) и этанол–ацетон–вода–уксусная кислота (4 : 5 : 2 : 2). Установлено,

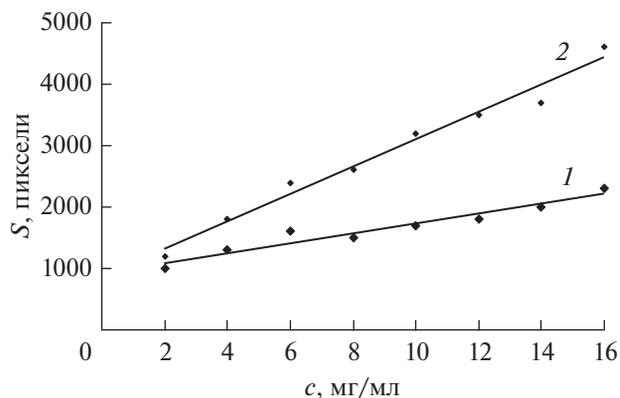


Рис. 1. Градуировочные графики зависимости площади хроматографической зоны L-карнитина от его концентрации в растворе. Подвижная фаза: 1 – водно-органическая, 2 – водно-мицеллярная (без концентрирования). Ионная сила 0.05.

что наилучшие хроматографические характеристики обеспечивает первый вариант ПФ ($R_f = 0.57$, $N = 454$, $H = 0.0154$).

Ранее на примере других аминокислот показано, что МПФ на основе ЦПХ по сравнению с другими ПАВ позволяют получать наибольшие величины числа теоретических тарелок [43]. При выборе оптимального состава МПФ концентрацию ЦПХ варьировали в интервале 4×10^{-5} – 4×10^{-2} М, а ионная сила раствора была постоянной и согласно данным [43] составляла 0.05. Увеличение концентрации электролита в растворе до указанной величины приводит к росту подвижности за счет "высаливания" (солюбилизации) аминокислоты из водной среды в мицеллярную псевдофазу [39, 43]. Наилучшие хроматографические характеристики карнитина наблюдались при концентрации ЦПХ 8×10^{-4} – 1×10^{-3} М ($R_f = 0.44$, $N = 1708$, $H = 0.0041$). Градуировочные графики для определения карнитина в водно-органической и мицеллярной ПФ и их характеристики приведены на рис. 1 и в табл. 1. Видно, что большей чувствительностью и лучшими метрологическими характеристиками характеризуется определение с использованием мицеллярной ПФ, которую в дальнейшем использовали для определения карнитина в объекте.

Сорбция L-карнитина на магнитных наночастицах (МНЧ), модифицированных бромидом цетилтриметиламмония. Наночастицы магнетита синтезировали в диапазоне pH 9–11 в соответствии с химической реакцией $Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- = Fe_3O_4 \downarrow + 4H_2O$ и модифицировали катионами ЦТАБ по разработанной ранее методике [32, 41]. Согласно ПЭМ наночастицы с оболочкой ЦТАБ имеют размер (8 ± 2) нм с толщиной оболочки (1.0 ± 0.1) нм [41]. ζ -Потенциал полученных на-

Таблица 1. Характеристики градуировочных графиков для определения L-карнитина

Характеристика	Водно-органическая ПФ	МПФ	
		без концентрирования	с концентрированием
Уравнение градуировочного графика	$y = 79.8x + 932$	$y = 221x + 882$	$y = 1544x + 597$
R^2	0.975	0.988	0.991
Интервал линейности, мг/мл	2.0–16.0	2.0–16.0	0.4–1.9

ночастиц максимален при pH 3–5 [41] и не меняет своего значения до ионной силы, равной 0.1 (NaCl). Это свидетельствует о наибольшей устойчивости коллоидного раствора МНЧ в этой области pH. Можно полагать, что и сорбция L-Кр также будет максимальной в этих условиях.

Эффективность сорбции изучали, определяя методом ТСХ содержание L-Кр в надосадочной жидкости после отделения наночастиц Fe₃O₄ постоянным магнитом. Значение степени извлечения (R_C , %) рассчитывали по формуле (1):

$$R_C, \% = \frac{c_0 - c}{c_0} \times 100, \quad (1)$$

где c_0 – молярная концентрация L-Кр в исходном растворе до сорбции; c – концентрация в надосадочной жидкости после сорбции, рассчитанная по уравнению градуировочного графика.

Степень десорбции (R_D , %) рассчитывали из отношения количества десорбированного L-Кр к количеству сорбированного наночастицами магнетита по формуле (2):

$$R_D, \% = \frac{c_{эл}}{c_{сорб}}, \quad (2)$$

где $c_{эл}$ – концентрация L-Кр в объеме элюента после десорбции, мкмоль; $c_{сорб}$ – концентрация L-Кр, сорбированного на МНЧ, мкмоль. Сорбцию изучали из объема коллоидного раствора магнетита 5 мл, содержащего магнетит, буферный раствор и аликвоту раствора карнитина.

Известно, что на сорбцию и концентрирование веществ на МНЧ влияют различные факторы: pH среды, масса сорбента, время сорбции, а также время и способ перемешивания раствора, которые варьировали при выборе оптимальных условий сорбции. Результаты представлены на рис. 2. Установили, что максимальное значение R_C L-Кр, равное 89–90%, достигается при pH 4.5–5.0. Сопоставляя этот интервал pH с величиной $pK = 4.2$ L-карнитина [44] и с величиной pH изоэлектрической точки 5.2–5.4 магнетита, можно констатировать, что сорбция карнитина обусловлена электростатическим взаимодействием диссоциированной в этой области pH карбоксильной группы аналита и положительно заряженной за счет присутствия катиона цетилтриме-

тиламмония поверхности МНЧ. Уменьшение сорбции L-Кр при pH > 5 может быть связано с резким уменьшением величины положительного ζ -потенциала поверхности наносорбента, который при pH 6 близок к нулю, а при pH 7 имеет уже отрицательное значение [41].

Из рис. 2 также видно, что при pH 4.9 для количественного извлечения L-Кр при его концентрации в растворе 4 мг/мл достаточно 3 мг магнетита. Установлено, что сорбционное равновесие достигается за 30–40 мин при степени извлечения 89%. Представленные на рис. 2 условия максимальной сорбции L-Кр модифицированными наночастицами магнетита использовали в дальнейшей работе.

Десорбция L-карнитина с поверхности магнитных наночастиц, модифицированных бромидом цетилтриметиламмония. При выборе растворителя для десорбции апробировали этанол, ацетонитрил, уксусную кислоту, варьируя их объемы от 0.5 до 5 мл. Установили (рис. 3), что количественная десорбция ($R_D = 95\%$) L-Кр достигается при использовании 1 мл этанола при механическом перемешивании в течение 20 мин. Применение больших объемов этанола нецелесообразно, так как нивелирует преимущества концентрирования.

На основании сравнения интервалов линейности градуировочных графиков ТСХ-определения L-карнитина без концентрирования и при концентрировании из 5 мл исходного водного раствора установили, что применение концентрирования позволило в 5 раз уменьшить нижнюю границу определяемых содержаний L-Кр с 2.0 до 0.4 мг/мл (табл. 1).

Определение содержания L-карнитина в напитке. Содержание L-карнитина методом мицеллярной ТСХ определяли в напитке для спортсменов XXI Power “L-КАРНИТИН” (Россия). Согласно заявленным данным концентрация карнитина в напитке должна составлять 2.4 мг/мл. Напиток был прозрачным, использовали его для анализа без разбавления. Концентрирование на МНЧ не применяли из-за высокой исходной концентрации L-карнитина. С помощью микродозатора отбирали аликвоты раствора объемом 1 мкл и наносили на стартовую линию хроматографической пластины, выполняя три параллельных определения.

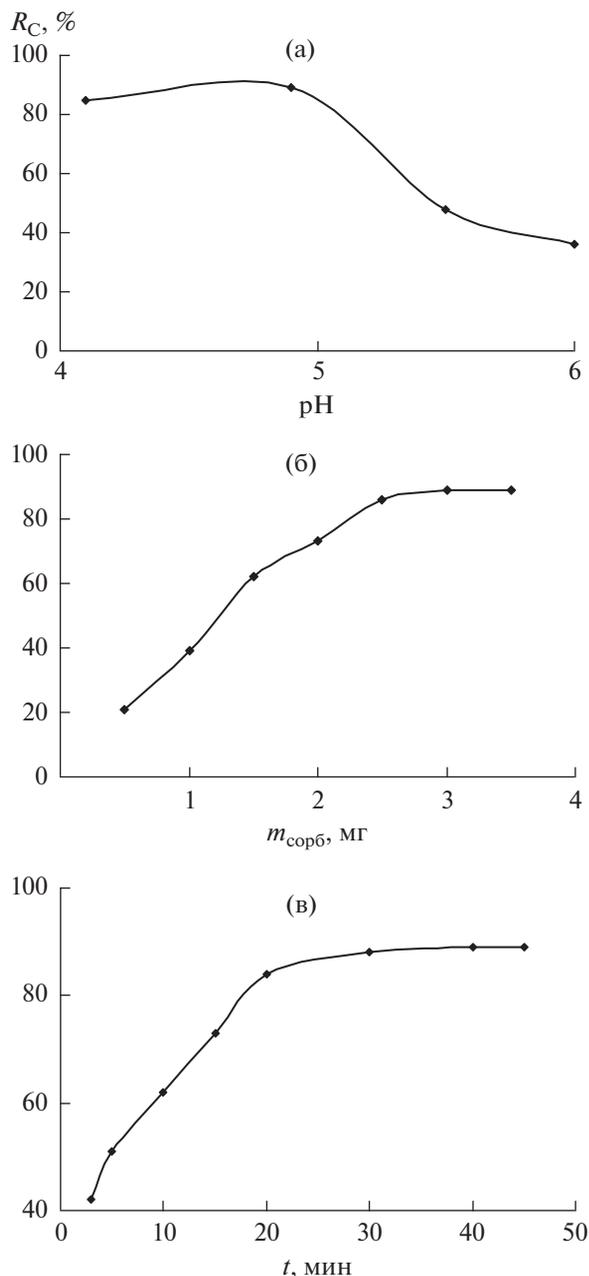


Рис. 2. Зависимость степени извлечения L-карнитина наночастицами $\text{F}_3\text{O}_4@$ ЦТАБ от pH среды (а), массы сорбента (б), времени механического перемешивания (в). $V_{\text{р-ра}} = 5$ мл, $c_{\text{L-Кр}} = 4$ мг/мл, $n = 3$, $P = 0.95$.

Хроматографический анализ выполняли без предварительного насыщения камеры мицеллярной подвижной фазой согласно рекомендациям [39, 43]. После хроматографирования пластину вынимали из камеры, сушили на воздухе в течение 3–5 мин, затем в сушильном шкафу при 90–100°C до полного удаления растворителя. Далее пластину опрыскивали свежеприготовленным раствором перманганата калия, снова помещали в су-

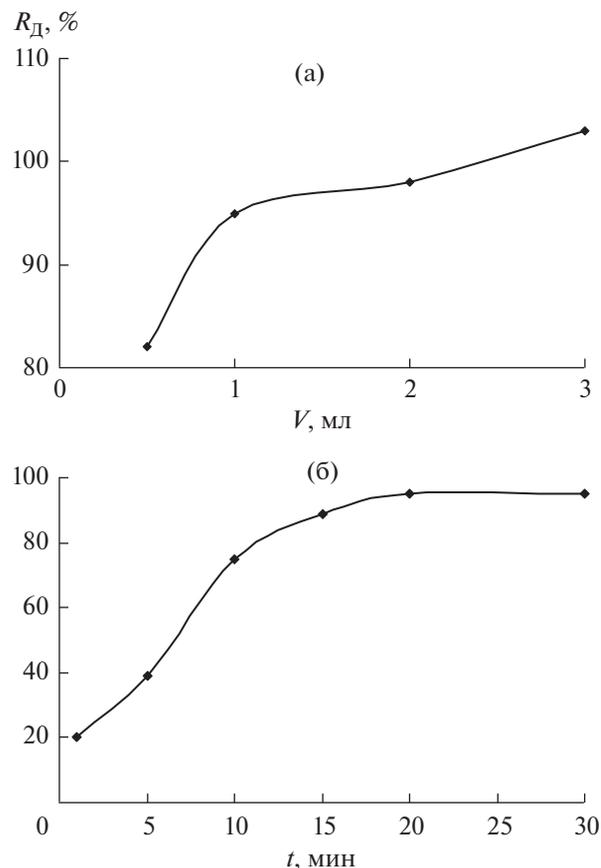


Рис. 3. Зависимость степени десорбции L-карнитина от объема этанола (а) и времени перемешивания (б). Ацетатно-аммиачный буферный раствор (pH 4.9), механическое перемешивание, $m(\text{F}_3\text{O}_4@$ ЦТАБ) = 3 мг, $V_{\text{р-ра}} = 5$ мл, $c_{\text{L-Кр}} = 4$ мг/мл, $n = 3$, $P = 0.95$.

шильный шкаф на 5 мин до проявления зон желтого цвета на сиреновом фоне пластины (рис. 4).

Установили, что величины подвижности L-карнитина в стандартном растворе и в анализируемом напитке совпадают (рис. 2), что явилось основой для идентификации и количественного определения L-карнитина. Полученное нами содержание L-Кр в напитке XXI Power “L-КАРНИТИН” методом мицеллярной ТСХ без концентрирования (неподвижная фаза: Сорбфил; ПФ: ЦПХ (1.0×10^{-3} М)—вода) составило (2.3 ± 0.2) мг/мл ($n = 3$, $P = 0.95$, $s_r = 0.10$). Видно, что найденное содержание практически соответствует заявленному, что свидетельствует о правильности определения L-карнитина методом мицеллярной ТСХ.

Таким образом, предложены новые подвижные фазы (водно-органическая на основе бутанола-2 и мицеллярная на основе 0.001 М раствора хлорида цетилпиридиния), новая неподвижная

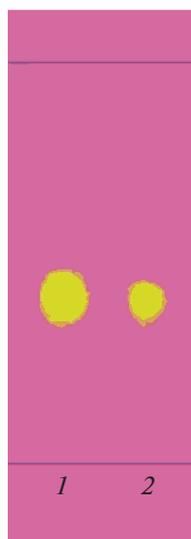


Рис. 4. Хроматограммы L-карнитина в стандартном растворе (1) и исследуемом объекте XXI Power “L-КАРНИТИН” (2). Неподвижная фаза: Сорбфил. Подвижная фаза: хлорид цетилпиридиния (1.0×10^{-3} М)–вода, 0.05 М NaCl.

фаза на основе Силуфола для тонкослойной хроматографии L-карнитина и выявлены преимущества мицеллярной ПФ. Показано, что для концентрирования L-карнитина может быть использован метод магнитной твердофазной экстракции, основанный на сорбции аналита магнитными наночастицами магнетита, модифицированными бромидом цетилтриметиламмония. При варьировании pH раствора, массы сорбента, времени сорбции, природы и объема элюента найдены оптимальные условия количественной сорбции и десорбции L-карнитина. Разработана методика денситометрического определения L-карнитина с помощью мицеллярной ТСХ в напитке для спорта XXI Power “L-КАРНИТИН”.

Работа выполнена при поддержке РФФ, проект № 21-13-00267.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bremer J.* Carnitine — Metabolism and functions // *Physiol. Rev.* 1983. V. 63. P. 1420. <https://doi.org/10.1152/physrev.1983.63.4.1420>
2. *Pekala J., Patcowska-Sokola B., Bodkowski R., Jamroz D., Nowakowski P., Lochynski S., Librowski T.* L-Carnitine — Metabolic functions and meaning in humans life // *Curr. Drug. Metabol.* 2011. V. 12. P. 667. <https://doi.org/10.2174/138920011796504536>
3. *Adeva-Andany M.M., Calvo-Castro I., Carlos Fernandez-Fernandez C., Donapetry-Garcia C., Pedre-Pineiro A.M.* Significance of L-carnitine for human health // *IUBMB Life.* 2017. V. 69. № 8. P. 578. <https://doi.org/10.1002/iub.1646>
4. *Fathizadeh H., Milajerdi A., Reiner Ž., Amirani E., Asemi Z., Mansournia M.A., Hallajzadeh J.* The effects of L-carnitine supplementation on indicators of inflammation and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *J. Diabetes Metab. Disord.* 2020. V. 19. P. 1879. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00627-9>
5. *Сизова Ж.М., Шух Е.В., Махова А.А.* Применение L-карнитина в общей врачебной практике // *Терапевт. архив.* 2019. Т. 91. № 1. С. 114. (*Sizova Z.M., Shikh E.V., Makhova A.A.* Significance of L-carnitine in internal medicine // *Therapeut. Arch.* 2019. V. 91. № 1. P. 114.)
6. *Ефимова Е.В., Гуськова Т.А., Копелевич В.М., Гунар В.И.* Ацетил-L-карнитин: биологические свойства и клиническое применение (обзор) // *Хим.-фарм. журн.* 2002. Т. 36. № 3. С. 3. (*Efimova E.V., Gus'kova T.A., Kopelevich V.M., Gunar V.I.* Acetyl-L-carnitine: Biological properties and clinical application (A review) // *Pharm. Chem. J.* 2002. V. 36. № 3. P. 111.)
7. *Sawicka A.K., Hartmane D., Lipinska P., Wojtowicz E., Lysiak-Szydłowska W., Olek R.A.* L-Carnitine supplementation in older women. A pilot study on aging skeletal muscle mass and function // *Nutrients.* 2018. V. 10. № 2. P. 255. <https://doi.org/10.3390/nu10020255>
8. *Sawicka A.K., Renzi G., Olek R.A.* The bright and the dark sides of L-carnitine supplementation: A systematic review // *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2020. V. 17. P. 49. <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00377-2>
9. *Насирова У.Ф., Таспанова Р.М., Пак А.А., Шарипова М.К.* Ранняя диагностика карнитиновой недостаточности у недоношенных новорожденных // *Рос. вестн. перинатол. и педиатрии* 2018. Т. 63. № 3. С. 39. (*Nasirova U.F., Tastanova R.M., Pak A.A., Sharipova M.K.* Early diagnosis of carnitine insufficiency in premature infants // *Russ. Bull. Perinat. Pediatr.* 2018. V. 63. № 3. P. 39.) <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-39-44>
10. *Seline K.G., Johein H.* The determination of L-carnitine in several food samples // *Food Chem.* 2007. V. 105. № 2. P. 793. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.058>
11. *Marzo A., Cardace G., Monti N., Muck S., Arrigoni Martelli E.* Chromatographic and non-chromatographic assay of L-carnitine family components // *J. Chromatogr.* 1990. V. 527. P. 247. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82109-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82109-X)
12. *Deufel T.* Determination of L-carnitine in biological fluids and tissues // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1990. V. 28. № 5. P. 307.
13. *Marzo A., Curti S.* L-carnitine moiety assay: An up-to-date reappraisal covering the commonest methods for various applications // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 702. P. 1. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00376-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00376-9)
14. *Dabrowska M., Starek M.* Analytical approaches to determination of carnitine in biological materials, foods and dietary supplements // *Food Chem.* 2014. V. 142. P. 220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.137>

15. *Mansour F.R., Wei W., Danielson N.D.* Separation of carnitine and acylcarnitines in biological samples: A review // *Biomed. Chromatogr.* 2013. V. 27. 10. P. 1339. <https://doi.org/10.1002/bmc.2995>
16. *Minkler P.E., Ingalls S.T., Hoppel C.L.* Strategy for the isolation, derivatization, chromatographic separation, and detection of carnitine and acylcarnitines // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. № 5. P. 1448. <https://doi.org/10.1021/ac0487810>
17. *Li K., Sun Q.* Simultaneous determination of free and total carnitine in human serum by HPLC with UV detection // *J. Chromatogr. Sci.* 2010. V. 48. P. 371. <https://doi.org/10.1093/chromsci/48.5.371>
18. *Park J.M., Koh J.H., Kim J.M.* Determination of L-carnitine in infant powdered milk samples after derivatization // *Food Sci. Anim. Resour.* 2021. V. 41. № 4. P. 731. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e23>
19. *Захарычев В.В., Испирян А.З., Смелкова О.И., Сысueva С.В.* Методика раздельного количественного определения содержания L- и D-изомеров карнитина // *Ветеринария.* 2021. № 8. С. 59. (*Zakharychev V.V., Ispiryani A.Z., Smelkova O.I., Sysueva S.V.* Development of a method for differential quantitative determination of L-carnitine and D-carnitine // *Veterinaria.* 2021. № 8. P. 59.) <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2021.24.8.59-64>
20. *Kakou A., Megoulas N.C., Koupparis M.A.* Determination of L-carnitine in food supplement formulations using ion-pair chromatography with indirect conductometric detection // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1069. P. 209. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.021>
21. *Nie L.-J., Liang J., Shan F., Xu Y.-Y., Yan C.-Y., Zhou X., Cheng Z.-Y., Xia Q.-R.* A UPLC-MS/MS method for determination of endogenous l-carnitine and acetyl-l-carnitine in serum of patients with depression // *Biomed. Chrom.* 2021. V. 35. № 3. Article e4991. <https://doi.org/10.1002/bmc.4991>
22. *Kong Y., Yang G., Chen S., Hou Z., Du X., Li H., Kong L.* Rapid and sensitive determination of L-carnitine and acetyl-L-carnitine in liquid milk samples with capillary zone electrophoresis using indirect UV detection // *Food Anal. Methods.* 2018. V. 11. № 1. P. 170. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0987-y>
23. *Wei D., Liu J., Guo M., Zhu Y.* Determination of betaine, L-carnitine and choline in human urine using a self-packed column and column-switching ion chromatography with non-suppressed conductivity detection // *J. Separ. Sci.* 2017. V. 40. № 21. P. 4246. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700545>
24. *Manjón A., Obón J.M., Iborra J.L.* Determination of L-carnitine by flow injection analysis with NADH fluorescence detection // *Anal. Biochem.* 2000. V. 281. № 2. P. 176. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4573>
25. *Hardy D.T., Preece M.A., Green A.* Determination of plasma free carnitine by electrospray tandem mass spectrometry // *Annals Clin. Biochem.* 2001. V. 38. P. 665. <https://doi.org/10.1258/0004563011901073>
26. *Schäfer J., Reichmann H.* A spectrophotometric method for the determination of free and esterified carnitine // *Clin. Chim. Acta.* 1989. V. 182. № 1. P. 87. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90152-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90152-6)
27. *Serdar M.A., Kurt Ü., Bayraktar Ü., Kenar L., Zelik F., Onur Ü., Kutluay T.* Optimization of fluorometric measurement of free and total carnitine in serum // *Turk. J. Med. Sci.* 2001. V. 31. P. 309.
28. *Isaguirre A.C., Olsina R.A., Martinez L.D., Lapierre A.V., Cerutti S.* Development of solid phase extraction strategies to minimize the effect of human urine matrix effect on the response of carnitine by UPLC-MS/MS // *Microchem. J.* 2016. V. 129. P. 362. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.07.018>
29. *Chen Y.-C., Tsai C.-J., Feng C.-H.* Fluorescent derivatization combined with aqueous solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction for determination of butyrobetaine, L-carnitine and acetyl-L-carnitine in human plasma // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1464. P. 32. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.030>
30. *Егунова О.Р., Константинова Т.А., Штыков С.Н.* Магнитные наночастицы магнетита в разделении и концентрировании // *Изв. Саратов. ун-та. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология.* 2014. Т. 14. № 4. С. 27. (*Egunova O.R., Konstantinova T.A., Shtykov S.N.* Magnetic Nanoparticles in Separation and Preconcentration // *Izv. Saratov Univ. (N.S.). Ser. Chemistry. Biology. Ecology.* 2014. V. 14. P. 27.) <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2014-14-4-27-35>
31. *Толмачева В.В., Аяри В.В., Кочук Е.В., Дмитриенко С.Г.* Магнитные сорбенты на основе наночастиц оксидов железа для выделения и концентрирования органических соединений // *Журн. аналит. химии.* 2016. Т. 71. № 4. С. 339. (*Tolmacheva V.V., Ayari V.V., Kochuk E.V., Dmitrienko S.G.* Magnetic adsorbents based on iron oxide nanoparticles for the extraction and preconcentration of organic compounds // *J. Anal. Chem.* 2016. V. 71. № 4. P. 321.) <https://doi.org/10.1134/S1061934816040079>
32. *Егунова О.Р., Решетникова И.С., Казимирова К.О., Штыков С.Н.* Магнитная твердофазная экстракция и флуориметрическое определение некоторых фторхинолонов // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 1. С. 31. (*Egunova O.R., Reshetnikova I.S., Kazimirova K.O., Shtykov S.N.* Magnetic solid-phase extraction and fluorimetric determination of some fluoroquinolones // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 1. P. 24.) <https://doi.org/10.1134/S1061934820010062>
33. *Пряжников Д.В., Кубракова И.В.* Магнитные наноразмерные материалы с модифицированной поверхностью: получение и исследование структуры, состава и свойств // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 6. С. 496. (*Pryazhnikov D.V., Kubrakova I.V.* Surface-modified magnetic nanoscale materials: Preparation and study of their structure, composition, and properties // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. № 6. P. 685.) <https://doi.org/10.1134/S1061934821060095>
34. *Моходоева О.Б., Максимова В.В., Дженлода Р.Х., Шкинев В.М.* Модифицированные ионными жидкостями магнитные наночастицы в анализе объектов окружающей среды // *Журн. аналит. химии.*

2021. Т. 76. № 6. С. 483. (*Mokhodoeva O.B., Maksimova V.V., Dzhenloda R.Kh., Shkinev V.M.* Magnetic nanoparticles modified by ionic liquids in environmental analysis // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. 6. P. 675.) <https://doi.org/10.1134/S1061934821060058>
35. *Dąbrowska M., Sieczka E., Starek M.* TLC assay of L-carnitine in dietary supplements // *J. Planar Chromatogr.* 2012. V. 25. № 5. P. 450. <https://doi.org/10.1556/jpc.25.2012.5.11>
36. *Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В.* Поверхностно-активные вещества в тонкослойной хроматографии // *Журн. аналит. химии.* 2003. Т. 58. № 8. С. 809. (*Sumina E.G., Shtykov S.N., Tyurina N.V.* Surfactants in thin layer chromatography // *J. Anal. Chem.* 2003. V. 58. № 8. P. 720.) <https://doi.org/10.1023/A:1025027409149>
37. *Mohammad A., Haq N.* TLC separation of amino acids with a green mobile phase // *J. Planar Chromatogr.* 2010. V. 23. № 4. P. 260. <https://doi.org/10.1556/JPC.23.2010.4.4>
38. *Bhawani S.A., Albishri H.M., Khan Z.A., Ibrahim M.N.M., Mohammad A.* Surfactant modified/mediated thin-layer chromatographic systems for the analysis of amino acids // *J. Anal. Methods Chem.* 2013. V. 2013. 973280. <https://doi.org/10.1155/2013/973280>
39. *Штыков С.Н., Сумина Е.Г., Угланова В.З., Сорокина О.Н.* Тонкослойная хроматография некоторых аминокислот на силикагеле в водно-органических и модифицированных мицеллярных подвижных фазах // *Журн. аналит. химии.* 2017. Т. 72. № 8. С. 742. (*Shtykov S.N., Sumina E.G., Uglanova V.Z., Sorokina O.N.* Thin-layer chromatography of some amino acids on silica in aqueous-organic and modified micellar mobile phases // *J. Anal. Chem.* 2017. V. 72. № 8. P. 870.) <https://doi.org/10.1134/S1061934817080111>
40. *Shtykov S.N., Sumina E.G., Smushkina E.V., Tyurina N.V.* Dynamic and static modification of the stationary phases with surfactants in TLC: A comparative study // *J. Planar Chromatogr. – Modern TLC.* 2000. V. 13. № 3. P. 182.
41. *Казимирова К.О., Хабибуллин В.Р., Решетникова И.С., Егунова О.Р., Штыков С.Н.* Концентрирование пищевых азокрасителей E110 и E124 на наночастицах магнетита, модифицированных ЦТАБ // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2017. Т.17. № 2. С. 138. (*Kazimirova K.O., Khabibullin V.R., Reshetnikova I.S., Egunova O.R., Shtykov S.N.* Preconcentration of E110 and E124 food azodyes on magnetite nanoparticles modified by СТАВ // *Izv. Saratov Univ. (N.S.). Ser. Chemistry. Biology. Ecology.* 2017. V. 17. №. 2. P. 138.) <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2017-17-2-138-142>
42. *Штыков С.Н., Сумина Е.Г., Тюрина Н.В.* Расчет коэффициентов межфазного распределения органических реагентов в мицеллярной ТСХ // *Журн. аналит. химии.* 2002. Т. 57. № 4. С. 383. (*Shtykov S.N., Sumina E.G., Tyurina N.V.* Calculation of partition coefficients of organic reagents in micellar thin-layer chromatography // *J. Anal. Chem.* 2002. V. 57. № 4. P. 322.) <https://doi.org/10.1023/A:1014950314681>
43. *Ворожейкин С.Б., Башко Е.С., Штыков С.Н.* Тонкослойная хроматография аминокислот в мицеллярных подвижных фазах на силикагеле // *Сорбционные и хроматогр. процессы.* 2011. Т. 11. № 6. С. 840.
44. *Сорокоумов П.Н., Савельева Е.И., Каракашев Г.В., Копейкин В.А., Радиков А.С.* Определение мельдония, гамма-бутиробетаина и карнитина в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2016. № 1. С. 176. (*Sorokoumov P.N., Savelieva E.I., Karakashev G.V., Kopeikin V.A., Radilov A.S.* Determination of meldonium, γ -butyrobetaine, and carnitine in blood plasma by high-performance liquid chromatography with mass-selective detection // *Drug development and registration.* 2016. № 1. P. 176.)

УДК 543.426

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ДОКСИЦИКЛИНА

© 2022 г. Т. Д. Смирнова^а, *, Е. А. Желобицкая^б, Т. Г. Данилина^а

^аСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Институт химии
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

^бООО «Нита-Фарм»
ул. Осипова, 1, к. 3, Саратов, 410010 Россия

*e-mail: smirnovatd@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2021 г.

После доработки 08.11.2021 г.

Принята к публикации 09.11.2021 г.

Показано, что наночастицы серебра, модифицированные ионами Eu^{3+} , способствуют увеличению интенсивности сигнала флуоресценции в 125 раз в аналитической системе, содержащей доксициклин, в результате сочетания резонансного и обменно-резонансного механизмов переноса энергии возбуждения. С помощью модельной системы – комплекса доксициклина с ионами Tb^{3+} – выявлена и оценена роль переноса энергии от наночастиц серебра на ион доксициклина в процессе формирования аналитического сигнала. Разработана флуориметрическая методика определения доксициклина в диапазоне концентраций 1.0×10^{-8} – 1.0×10^{-5} М, основанная на образовании комплекса антибиотика с ионами Eu^{3+} в присутствии наночастиц серебра. Уравнение градуировочного графика $y = 5.0 \times 10^7 x + 10$, $R^2 = 0.996$.

Ключевые слова: плазмонный резонанс, перенос энергии, тетрациклины, ионы европия, наночастицы серебра.

DOI: 10.31857/S004445022208014X

Определение антибиотиков тетрациклинового ряда в различных объектах является актуальной задачей аналитической химии в связи с их широким применением в медицине, животноводстве и пищевой промышленности. Флуориметрическое определение биологически активных веществ имеет ряд преимуществ, связанных с широким диапазоном определяемых концентраций, высокой чувствительностью, простотой выполнения анализа, доступностью оборудования. Использование сигнала сенсibilизированной флуоресценции, связанной с переносом энергии возбуждения, позволяет повысить чувствительность и избирательность люминесцентного определения. Участие в формировании аналитического сигнала наноматериалов с уникальными квантово-размерными свойствами способствует увеличению квантового выхода, времени жизни флуоресценции органического аналита, эффективности резонансного переноса энергии в системе донор–акцептор [1–3]. Особое значение имеет модификация поверхности нанокластеров функциональным компонентом, определяющая реакционную способность наночастиц, а также возможность повы-

шения или, наоборот, подавления эффективности резонансного переноса энергии [4–8].

Наночастицы благородных металлов характеризуются высокими молярными коэффициентами поглощения, легко перестраиваемыми спектрами флуоресценции при изменении размера и формы наночастиц, а также развитой поверхностью [9]. Оптические свойства наночастиц обусловлены наличием в области видимого света ярко выраженной резонансной полосы поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [10]. В результате взаимодействия флуорофора в возбужденном состоянии со свободными электронами наночастиц металла возможно значительное увеличение времени жизни флуоресценции органической молекулы, эффективности резонансного переноса в системе донор–акцептор.

Цель настоящей работы – изучение влияния наночастиц серебра, модифицированных ионами Eu^{3+} , на флуоресцентные свойства доксициклина и использование их при флуориметрическом определении указанного антибиотика.

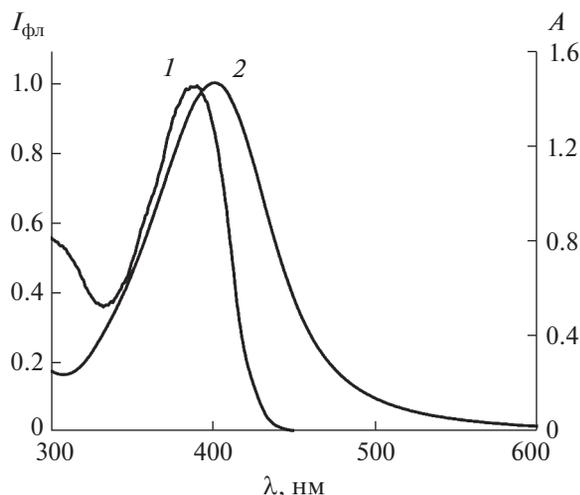


Рис. 1. Спектры возбуждения доксициклина (1) и поверхностного плазмонного резонанса наночастиц серебра (2). $c_{\text{AgNPs}} = 3.3 \times 10^{-7}$ М, $c_{\text{ДЦ}} = 1.0 \times 10^{-5}$ М.

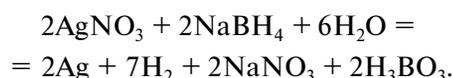
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приборы. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies, Австралия) с источником возбуждения – импульсной ксеноновой лампой. Ширина щели возбуждения – 10 нм, флуоресценции – 20 нм. Скорость регистрации спектров – 300 нм/мин. Измерения проводили в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. Сигнал регистрировали под углом 90° к возбуждающему свету. Оптическую плотность растворов в видимой и УФ-области измеряли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Значения pH растворов контролировали pH-метром pH-673 М со стеклянным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения. Размер и ζ -потенциал наночастиц серебра измеряли с помощью анализатора “Zetasizer Nano ZS” (Великобритания).

Реагенты. Доксициклин (ДЦ) фирмы “Sigma”, содержание основного вещества не менее 98%; кислота уксусная, ГОСТ 61-75, х.ч.; гидроксид натрия, 0.1 М фиксагал; аммиак водный, ГОСТ 3760-79, ч.д.а.; вода бидистиллированная, ГОСТ 6709-72; нитрат серебра 99.9%, ч.д.а. (РеаХим, Россия); натрий лимоннокислый трехзамещенный 5.5-водный, ч.д.а. (РеаХим, Россия); боргидрид натрия, х.ч. (РеаХим, Россия); хлорид европия(III) шестиводный, 99.9% (AcrosOrganics, Бельгия).

Синтез наночастиц серебра (AgNPs). Наночастицы серебра синтезировали по методике [9]: 1.0 мл раствора AgNO_3 (10 мМ), 1.0 мл $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (500 мМ) и 47.0 мл бидистиллированной воды в течение 10 мин перемешивали при комнатной

температуре, добавляли 600 мкл NaBH_4 (10 мМ). Реакция восстановления продолжалась 30 мин, реакционную смесь оставляли в холодильнике на 8–9 ч для завершения роста наночастиц:



Концентрацию AgNPs в растворе (моль/л) рассчитывали по формуле:

$$c = \frac{N}{N_A V}; \quad N = \frac{3m}{4\pi r^3 \rho},$$

где N – число частиц в растворе; $N_A = 6.02 \times 10^{23}$, моль $^{-1}$ – постоянная Авогадро; V – объем раствора, л; m – масса серебра в растворе ($m = 0.0535$ г); r – радиус наночастиц, см; $\rho = 10.5$ г/см 3 – плотность серебра.

Восстановление тетрагидроборатом натрия отличается простотой и возможностью получения коллоидного раствора AgNPs определенного размера и поэтому часто используется на практике. Полученные наночастицы стремятся образовывать агрегаты, подавление этого процесса достигается в результате снижения поверхностной энергии за счет формирования двойного электрического слоя, создания кинетических препятствий и электростатического отталкивания частиц дисперсной фазы, имеющих одноименный электрический заряд. В качестве стабилизатора использовали цитрат-ион, адсорбирующийся на поверхности наночастиц и контролирующий их рост.

На положение полосы ППР наночастиц серебра влияют характеристики индивидуальных частиц и диэлектрические свойства окружающей среды [9, 10]. Спектры поглощения (рис. 1) синтезированных наночастиц содержали ярко выраженную резонансную полосу ППР при $\lambda = 405$ нм. По данным просвечивающей электронной микроскопии наночастицы имели сферическую форму и относительно узкий диапазон распределения по размерам со средним диаметром (7 ± 2) нм (рис. 2), ζ -потенциал –30 мВ, что свидетельствует об удовлетворительной стабильности золь, которая сохранялась в течение 14 сут. В течение последующих двух недель ζ -потенциал наночастиц медленно уменьшался от –30 до –20 мВ вследствие агрегации и увеличения размера наночастиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Флуоресцентные свойства доксициклина в присутствии наночастиц серебра. Можно выделить два основных условия реализации эффективного резонансного переноса энергии в системах, содержащих наночастицы серебра и флуоресцирующие биологически активные молекулы: значительное

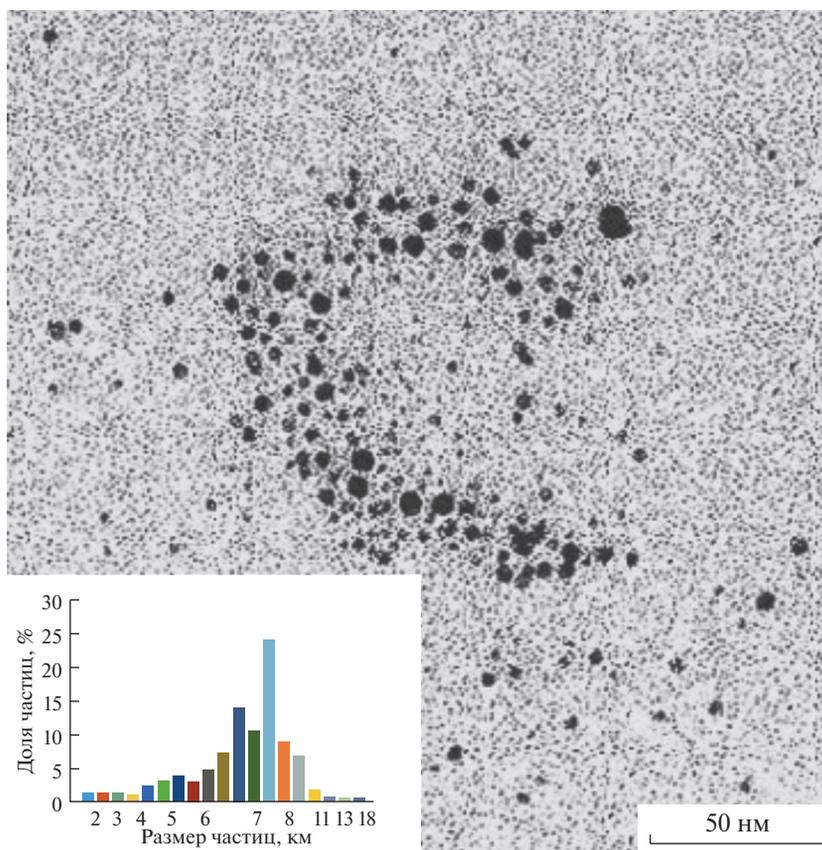


Рис. 2. Микрофотография наночастиц серебра, полученная с помощью просвечивающей электронной микроскопии, и кривая распределения наночастиц по размерам.

перекрытие полос спектров ППР наночастиц и спектров возбуждения флуоресцирующей молекулы, а также близость (расстояние 20–50 Å) компонентов пары донор–акцептор, определяющая константу скорости переноса энергии [11]. Как видно из рис. 1, первое условие выполняется для доксициклина и наночастиц серебра, синтезированных путем восстановления нитрата серебра борогидридом натрия и стабилизированных цитрат-ионом. По-видимому, высокая плотность заряда стабилизатора способствует экранированию поверхности наночастиц, увеличению расстояния в паре донор–акцептор. Ожидаемый перенос энергии возбуждения не наблюдали. С целью сокращения расстояния между доксициклином и наночастицами серебра в качестве модельного комплексообразователя использовали ион Tb^{3+} . Комплексообразование Tb^{3+} с антибактериальным лигандом исключает *внутримолекулярный* перенос энергии возбуждения ввиду того, что энергия триплетного уровня (18100–20300 cm^{-1}) доксициклина ниже резонансного уровня Tb^{3+} (5D_4 , 20500 cm^{-1}) [12]. Данная система позволила выявить и оценить вклад *межмолекулярного* переноса энергии между наночастицами серебра и ан-

тибиотиком в формирование сигнала флуоресценции аналитической системы. В качестве критерия эффективности переноса энергии использовали параметр интенсивности собственной флуоресценции доксициклина. Фотометрически установили, что в присутствии добавок доксициклина в раствор модифицированных наночастиц серебра на поверхности последних образуются смешанолигандные хелаты ионов Tb^{3+} с антибиотиком и цитрат-ионом, схема комплексов представлена на рис. 3. При комплексообразовании сокращается расстояние между донором (AgNPs) и акцептором (доксициклин) и, исключая внутримолекулярный перенос энергии, реализуются условия резонансного переноса, увеличивая интенсивность флуоресценции антибиотика в два раза (рис. 4). Возрастание люминесценции является результатом одновременного воздействия на флуорофор (доксициклин) внешнего источника излучения и локального поля поверхностного плазмона.

Влияние ионов Eu^{3+} . Дополнительно увеличить сигнал сенсibilизированной флуоресценции аналитической системы, содержащей доксициклин, возможно в случае модификации поверхности наночастиц серебра ионами Eu^{3+} . Образующийся

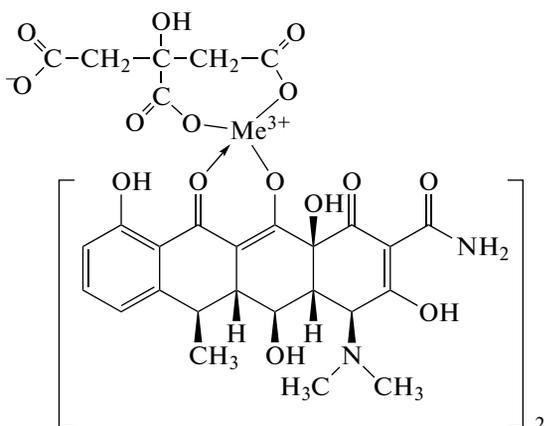


Рис. 3. Схема комплексов ионов металлов Me^{3+} (где Me^{3+} : Eu^{3+} или Tb^{3+}) с цитрат-ионом и доксициклином.

на поверхности нанообъекта смешанолигандный хелат Eu^{3+} с антибиотиком тетрациклинового ряда, таким как доксициклин, и цитрат-ионом характеризуется переносом энергии с триплетного уровня лиганда антибиотика (18100 см^{-1}) на излучательные уровни иона Eu^{3+} с последующей его флуоресценцией ($\lambda_{\text{фл}} = 615\text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}} = 390\text{ нм}$, ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ переход) [12, 13]. Наблюдаемое синергетическое увеличение интенсивности сенсibilизированной флуоресценции в 125 раз является результатом коллективного воздействия энергии внешнего возбуждения и резонансного локального поля поверхностного плазмона наночастиц серебра на доксициклин (рис. 5). В таких условиях вероятность перехода доксициклима в возбужденное состояние значительно возрастает, что способствует наиболее эффективной реализации внутримолекулярного переноса энергии возбуждения.

Модификация наночастиц серебра ионами Eu^{3+} сопровождается возрастанием и перезарядкой ζ -потенциала коллоидной частицы от -30 до $+90$ мВ (рис. 6). Предполагается, что аналогичные процессы изменения ζ -потенциала возможны в коллоидных растворах серебра в присутствии ионов Tb^{3+} . Выявлены оптимальные условия модификации наночастиц серебра, позволяющие получить максимальное увеличение сигнала сенсibilизированной флуоресценции в аналитической системе [14].

Методика модификации наночастиц серебра ионами Eu^{3+} : в полипропиленовые пробирки типа Эппендорф объемом 2.0 мл вносили 1.0 мл 3.3×10^{-7} М раствора $AgNPs$, 1.0 мл 2.0×10^{-3} М раствора Eu^{3+} , центрифугировали (12000 об/мин) в течение 20 мин, $AgNPs$ отделяли, растворяли в спирте (общий объем 2.0 мл) в ультразвуковой (УЗ) ванне в течение 20 мин.

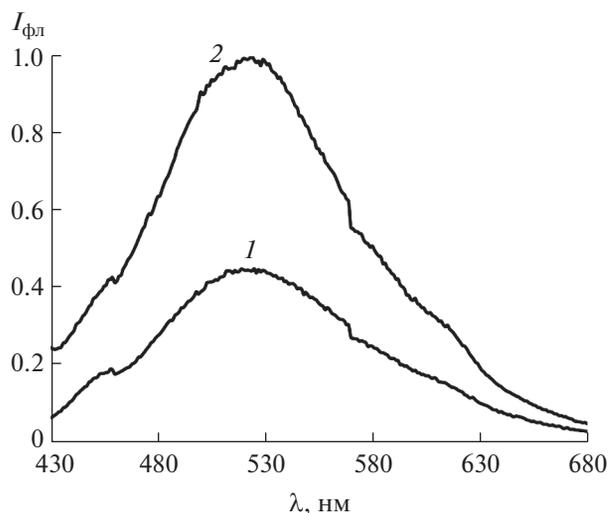


Рис. 4. Спектры флуоресценции доксициклима в отсутствие (1) и в присутствии наночастиц серебра и ионов Tb^{3+} (2). $c_{AgNPs} = 3.8 \times 10^{-7}$ М, $c_{ДЦ} = 1.0 \times 10^{-6}$ М, $c_{Tb^{3+}} = 2.5 \times 10^{-5}$ М, pH 8.0, $\lambda_{\text{возб}} = 390\text{ нм}$.

Модификация наночастиц серебра ионами Eu^{3+} происходит в результате взаимодействия ионов металла с цитрат-ионами, находящимися на поверхности наночастиц. В результате становится возможным образование смешанолигандного комплекса между координационно ненасыщенным ионом Eu^{3+} и доксициклином. Таким образом, ион антибиотика оказывается также на

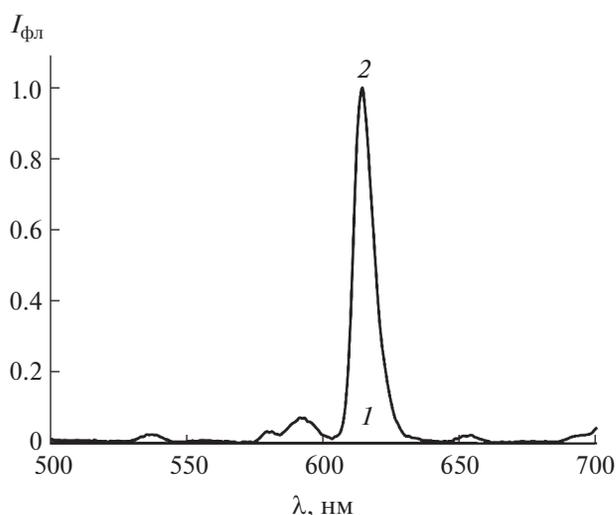


Рис. 5. Спектры флуоресценции доксициклима в отсутствие наночастиц серебра (1) и в присутствии наночастиц серебра, модифицированных ионами Eu^{3+} (2). $c_{AgNPs} = 8.0 \times 10^{-10}$ М, $c_{ДЦ} = 1.0 \times 10^{-6}$ М, $c_{Eu^{3+}} = 2.5 \times 10^{-5}$ М, pH 9.0, $\lambda_{\text{возб}} = 390\text{ нм}$.

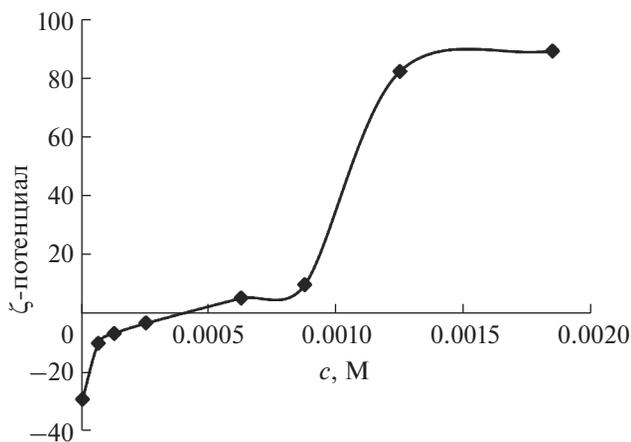


Рис. 6. Зависимость ζ -потенциала наночастиц серебра от концентрации ионов европия в растворе. $c_{\text{AgNPs}} = 3.75 \times 10^{-6}$ М.

поверхности наночастицы и создаются условия для переноса энергии.

Интенсивность сенсibilизированной флуоресценции ДЦ в присутствии модифицированных наночастиц серебра в значительной степени зависит от кислотности среды, необходимой для реализации комплексообразования ионов Eu^{3+} с доксициклином. Исследовали влияние ацетатно-аммиачного буферного раствора на интенсивность флуоресценции. Установили, что максимальный сигнал эмиссии наблюдается в слабощелочной среде при рН 8.0–9.0 в условиях, оптимальных для

Таблица 1. Результаты определения доксициклина в лекарственном препарате “Доксициклин” ($n = 3$, $P = 0.95$)

Производитель	Найдено, мг	
	$x \pm \Delta x$	s_r
Курган Синтез	101 ± 9	0.01
Озон	109 ± 4	0.03

Таблица 2. Контроль правильности определения доксициклина в препарате “Доксициклин” методом введено–найденно ($n = 3$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 4.30$)

Производство	Введено, мг	Найдено, мг	s_r	$t_{\text{эксп}}$
Курган Синтез	10	10 ± 1	0.03	2.89
	30	26 ± 14	0.14	1.87
	50	48 ± 3	0.06	2.78
Озон	10	13 ± 3	0.20	1.98
	30	29 ± 2	0.04	1.13
	50	51 ± 4	0.06	0.65

комплексообразования доксициклина с ионами Eu^{3+} . Отмеченный нами диапазон кислотности согласуется с результатом работы [15], авторы которой утверждают, что при рН 7–8.5 происходит образование достаточно прочного комплекса Eu^{3+} с тетрациклиновыми производными, сопровождающееся флуоресценцией иона металла.

В оптимальных условиях получения максимальной сенсibilизированной флуоресценции ионов Eu^{3+} построили градуировочный график для флуориметрического определения доксициклина с помощью модифицированных наночастиц серебра. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации определяемого антибиотика линейна в диапазоне концентраций 1.0×10^{-8} – 1.0×10^{-5} М. Уравнение градуировочного графика $y = 5.0 \times 10^7 x + 10$, $R^2 = 0.996$.

Методика определения доксициклина. Разработана флуориметрическая методика определения доксициклина в лекарственном препарате “Доксициклин” двух производителей. Содержимое нескольких капсул препарата измельчали в ступке, смешивали, навеску препарата, соответствующую одной капсуле, переносили в колбу емк. 25 мл с 2.0 мл соляной кислоты (1.0×10^{-8} М), растворяли с добавлением бидистиллированной воды (УЗ-ванна, 20 мин) и отделяли раствор от осадка фильтрованием (“синяя лента”), разбавляли в 100 раз, отбирали для анализа 0.1–0.5 мл в другую пробирку, смешивали с 1.0 мл буферного раствора (рН 9.0), добавляли 0.4 мл модифицированных ионами Eu^{3+} AgNPs и буферный раствор до общего объема 4.0 мл. Измеряли интенсивность флуоресценции ($\lambda_{\text{фл}} = 612$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 389$ нм), с помощью градуировочного графика определяли содержание доксициклина в лекарственном препарате.

Результаты определения представлены в табл. 1, правильность контролировали методом введено–найденно (табл. 2). Погрешность определения (s_r) не превышала 0.08.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, (проект № 21-13-00267).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tan H., Chen Y.* Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium(III) for detection of tetracycline in milk // *Sens. Actuators B.* 2012. V. 173. P. 262.
2. *Ding F., Zhao H., Jin L., Zheng D.* Study of the influence of silver nanoparticles on the second-order scattering and the fluorescence of the complexes of Tb(III) with quinolones and determination of the quinolones // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 566. P. 136.
3. *Shen J., Sun C., Wu X.* Silver nanoprisms-based Tb(III) fluorescence sensor for highly selective detection of dopamine // *Talanta.* 2017. V. 165. P. 369.
4. *Wang P., Wu T.-H., Zhang Y.* Novel silver nanoparticle-enhanced fluorometric determination of trace tetracyclines in aqueous solutions // *Talanta.* 2016. V. 146. P. 175.
5. *Thakur S., Kumar P., Reddy M.V., Siddavattam D., Paul A.K.* Enhancement in sensitivity of fluorescence based assay for organophosphates detection by silica coated silver nanoparticles using organophosphate hydrolase // *Sens. Actuators B: Chem.* 2013. V. 178. P. 458.
6. *Blake-Hedges J.M., Greenspan S.H., Kean J.A., McCarron M.A., Mendonca M.L., Wustholz K.L.* Plasmon-enhanced fluorescence of dyes on silica-coated silver nanoparticles: A single-nanoparticle spectroscopy study // *Chem. Phys. Lett.* 2015. V. 635. P. 328.
7. *Suslov A., Lama P.T., Dorsinville R.* Fluorescence enhancement of Rhodamine B by monodispersed silver nanoparticles // *Opt. Commun.* 2015. V. 345. P. 116.
8. *Yang X., Zhu S., Dou Y., Zhuo Y., Luo Y., Feng Y.* Novel and remarkable enhanced-fluorescence system based on gold nanoclusters for detection of tetracycline // *Talanta.* 2014. V. 122. P. 36.
9. *Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В.* Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // *Успехи химии.* 2008. Т. 77. С. 242.
10. *Шевцова В.И., Гайду П.И.* Положение полосы поверхностного плазмонного резонанса в коллоидных растворах наночастиц серебра и золота // *Вестник БГУ. Сер. 1.* 2012. № 2. С. 15.
11. *Ghosh D., Chattopadhyay N.* Gold and silver nanoparticle based superquenching of fluorescence: A review // *J. Lumin.* 2014. V. 160. P. 223.
12. *Erostyak J., Buzady A., Kaszas A., Kozma L., Hornyak I.* Time-resolved study of intramolecular energy transfer in Eu^{3+} , Tb^{3+} / β -diketone/o-phenanthroline complexes in aqueous micellar solutions // *J. Lumin.* 1997. V. 72–74. P. 570.
13. *Смирнова Т.Д., Штыков С.Н., Кочубей В.И., Хрячкова Е.И.* Перенос энергии возбуждения в хелате европия с доксициклином в присутствии второго лиганда в мицеллярных растворах неионогенных ПАВ // *Оптика и спектроскопия.* 2011. Т. 110. № 1. С. 65.
14. *Смирнова Т.Д., Желобицкая Е.А., Данилина Т.Г., Симбирева Н.А.* Флуоресцентные свойства доксициклина в присутствии нанокластеров серебра // *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2021. Т. 64. Вып. 1. С. 34.
15. *Hirsch L.M., Van Geel T.F., Winefordner J.D., Kelly R.N., Schulman S.G.* Characteristics of the binding of europium(III) to tetracycline // *Anal. Chim. Acta.* 1985. V. 166. P. 207.

УДК 543+547.556+547.632+544.127+541+544.18+544.58

ИДЕИ А.И. ЧЕРКЕСОВА В НЕКОТОРЫХ ВЗАИМОСВЯЗАННЫХ ОБЛАСТЯХ АНАЛИТИЧЕСКОЙ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

© 2022 г. А. Н. Панкратов*

*Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия*

*e-mail: PankratovAN@info.sgu.ru

Поступила в редакцию 06.07.2021 г.

После доработки 11.08.2021 г.

Принята к публикации 12.08.2021 г.

Статья А.И. Черкесова и Н.М. Алыкова “Спектрофотометрическое изучение некоторых бисазопродных хромотроповой кислоты и их взаимодействия с ионами металлов подгруппы скандия” стимулировала детальное изучение влияния таутомерии на аналитические свойства реагентов и их комплексов. Возникновение или усиление аналитического эффекта в спектрофотометрических реакциях часто вызвано таутомеризацией, сопутствующей, в частности, протолитическим равновесиям. Дано квантовохимическое (с явным учетом среды) обоснование протонирования ароматических аминокислот в водных растворах по β -атому азота азогруппы, которое обуславливает хиноидизацию, обеспечивающую образование аналитических форм с интенсивным аналитическим сигналом. Работы А.И. Черкесова по сульфоталексонам нашли продолжение в обосновании сравнительной устойчивости гетероциклической и открытой цвиттер-ионной форм молекул реагентов. Прогноз свойств атомов, ионов и соединений новых химических элементов на основе развития А.И. Черкесовым учения о периодичности даст ключ к выбору и адаптации аналитических методов. Предположение А.И. Черкесова о взаимосвязи ядерных и электронных степеней свободы в атоме предвосхитило исследования возможности ядерно-химических превращений при ядерной абляции, анализ звездного нуклеосинтеза. А.И. Черкесова можно считать провозвестником идеи Е.А. Смоленского, обобщившего принцип Паули и создавшего на этой основе метод многоэлектронных волновых функций, представляющий собой концептуально новое общее направление в компьютерной квантовой химии по сравнению с методами молекулярных орбиталей и валентных связей.

Ключевые слова: азо-хинонгидазонная таутомерия, прогноз аналитического сигнала в реакциях азосочетания, гетероциклическая, цвиттер-ионная формы молекул фталексонов, Периодическая система химических элементов Д.И. Менделеева, ядерно-химические превращения, принцип Паули и метод многоэлектронных волновых функций (МВФ).

DOI: 10.31857/S0044450222080084

Идеи А.И. Черкесова в области аналитической химии. В работе [1] проведено наукометрическое исследование публикаций по органическим реагентам с 1960 по 1975 гг. Выделены 11 модальных статей, на которые, по данным справочника Science Citation Index под редакцией Гарфилда, ссылались более четырех раз в течение года (при среднем в то время числе ссылок на одну химико-аналитическую статью 1.4 раза в год [1]). Одной из знаковых явилась статья Алексея Ивановича Черкесова и Наримана Мирзаевича Алыкова [2]. В ней системно исследованы более 40 азосоединений, из которых отобраны пять наилучших по чувствительности, контрастности перехода окраски, растворимости реагентов и их комплексов с ионами Sc(III), Y(III), лантаноидов в воде. Обсужден механизм реакций. Высказано предположение о хинонгидазонной структуре хелатов.

Новизна работы [2] для своего времени иллюстрируется такой деталью, как рассмотрение силы осциллятора, для которой не было устоявшегося русскоязычного названия: в статье она обозначена как “осциллирующий электронный заряд”. Возможно, исследование [2] послужило стимулом для появления работ (некоторые обобщены в обзоре [3]) по детальному изучению влияния таутомерии на аналитические свойства реагентов и их комплексов. Переход азотаутомеров *орто*- и *пара*-амино- и гидроксиазосоединений в хинонгидазонную форму происходит не только при хелатообразовании [2], но и в результате присоединения протона. Возникновение или усиление аналитического эффекта в спектрофотометриче-

ских реакциях часто вызвано таутомеризацией, сопутствующей протолитическим равновесиям [4].

В работах [5, 6] дано квантовохимическое (с явным учетом водной среды) и экспериментальное обоснование протонирования ароматических аминокзосоединений по β -атому азота азогруппы, которое обуславливает хиноидизацию, приводящую к увеличению интенсивности аналитического сигнала. На этой основе выявлена совокупность факторов, позволяющая прогнозировать аналитические эффекты при определении нитрит-иона и нитрозосоединений по реакциям азосочетания в водных и мицеллярных средах: суммарный заряд молекулярных систем реагентов и аналитических форм, энергия катионной локализации, энтальпия гидратации, индекс липофильности (гидрофобности) $\lg P$.

Установленные закономерности открывают возможность предсказывать реакционную способность, выход аналитических форм реакций азосочетания с другими азо- и диазосоставляющими и в конечном итоге сравнительные аналитические характеристики реакций. Для такого прогноза необходимо: 1) выяснить вопрос о заряде и гидрофобности реагирующих частиц и продуктов; 2) с помощью подходящего квантовохимического метода оценить энергию активации реакций или энергию катионной локализации; 3) осуществить квантовохимическую оценку энтальпии гидратации либо (при неявном рассмотрении эффекта растворителя) энергии взаимодействия поляризованного растворенного вещества с континуумом растворителя для продуктов реакций, вычислить $\lg P$; 4) с учетом пунктов 1–3 обсудить роль реагентов и интермедиатов, а также влияние водной и мицеллярной сред на реакционную способность и аналитический сигнал [5, 6].

Значительное внимание А.И. Черкесов уделит синтезу, изучению и аналитическому применению фталексонов, сочетающих хромофорную трифенилметановую основу с хелатирующими комплексоновыми фрагментами [7]. В продолжение работ А.И. Черкесова с сотрудниками на основе квантовохимического исследования показано, что для изолированных молекул сульфоталексонов гетероциклическая форма термодинамически более стабильна, чем открытая цвиттер-ионная. Последняя, напротив, преобладает в водной среде [8]. По-видимому, цвиттеризация сульфоталексонов в водных растворах, с одной стороны, является одной из причин наличия окраски у самих аналитических реагентов, а с другой – способствует их комплексообразованию с неорганическими катионами и возникновению аналитического сигнала при фотометрическом определении ионов металлов. Так, отрицательный заряд группы SO_3^- может служить предпо-

сылкой облегченного подхода катиона металла к молекуле реагента. Положительный заряд, в значительной степени локализованный на центральном атоме углерода триарилметановой системы, должен благоприятствовать отщеплению протона фенольной гидроксильной группы с хиноидизацией ароматического кольца, сопровождающейся батохромным сдвигом длинноволновой полосы поглощения в электронном абсорбционном спектре реагента [7, 9]. Кроме того, возникающий при депротонировании реагента карбонильный центр (атом кислорода) обеспечивает координацию с катионом металла при образовании хелата [7, 9].

И еще один пример научной прозорливости А.И. Черкесова. В настоящее время существуют информативные компьютерные методы определения констант устойчивости комплексов с учетом реакций взаимного превращения форм, возникновения полиядерных, полилигандных, полимерных продуктов (в том числе в условиях гидротермального и темплатного синтеза) [10]. В пионерской работе [7] (С. 29) А.И. Черкесов предложил простой расчетно-графический вариант нахождения констант образования умеренно прочных комплексных соединений по степени связывания реагента ионом металла, предполагающий знание типа и стехиометрии реакции (состава комплекса), установленных ранее независимым путем. В свою очередь, степень связывания реагента находится графически по двум значениям оптической плотности растворов: при стехиометрическом соотношении компонентов и при условии практически полного связывания реагента ионом металла. Рекомендовано применение указанного варианта как раз к системам, в которых возможно формирование полиядерных комплексов, а также для комплексов, склонных к образованию непрочных полимерных соединений.

Идеи А.И. Черкесова в области теоретической химии. А.И. Черкесов нашел закономерность: свойства изоструктурных атомов или ионов элементов и их однотипных соединений, во многом определяющие аналитические характеристики различных методов анализа, – температура кипения, энергия (потенциал) ионизации, энергия химической связи, энергия кристаллической решетки, теплота диссоциации, частота собственных колебаний и др. – находятся в гиперболической зависимости от заряда ядра и главного квантового числа (n). Названные взаимосвязи аппроксимируются уравнениями гиперболы второго и третьего порядков [11, 12]. Оценена предсказательная сила утверждения о гиперболичности в отношении свойств тяжелых элементов и их соединений [12]. А.И. Черкесов полагал, что не электронная структура атомов, а нуклонный состав и структура ядер должны быть приняты за отправную точку при конструировании системы

химических элементов [12]. Способ формирования электронных оболочек атомов в соответствии с принципом Паули остается в силе. Однако число элементов в периодах и принцип повторяемости, составляющие основу Периодического закона Д.И. Менделеева, определяются числом независимых состояний нуклонов, а не электронов [12]. А.И. Черкесов описывал квантовые состояния нуклона набором из пяти квантовых чисел: диадного (D), орбитального (l), магнитного, спинового и изоспинового, определяющего так называемый изотопический спин (изоспин) нуклона [12–14]. Проекция изоспина (как и спина) на выделенное направление принимает значения $\pm \frac{1}{2}$ [12, 13]. Введение зарядовой координаты (изоспина [15]) означает признание у нуклона пяти степеней свободы: трех пространственных, спиновой и зарядовой координат [14]. Спорными могут быть связанные с понятием изоспина воззрения [13–15] о взаимопревращениях протона и нейтрона в ядре посредством виртуальной диссоциации с образованием π -мезонов. Возможно, эти представления следует рассматривать лишь как наглядную модель, подобно тому, как спин интерпретировали как угловой момент импульса электрона, возникающий вследствие его вращения вокруг собственной оси. А.И. Черкесов предложил в качестве составляющей полной антисимметризованной волновой функции системы нуклонов рассматривать спин-изоспиновую функцию, в отличие от известной спиновой [12]. Согласно принципу Паули, волновая функция системы тождественных микрочастиц при перестановке пространственных и спиновых координат двух частиц меняет знак, если эти частицы – фермионы, и не меняет знака, если они бозоны [16]. А.И. Черкесов предложил заменить указанную формулировку более общей: волновая функция антисимметрична относительно перестановки пространственных, спиновой и изоспиновой координат для любой пары нуклонов [13, 14]. Система химических элементов А.И. Черкесова [12–14] состоит из диад, каждая из которых включает два периода. Из нее вытекают правило последовательного заполнения электронных оболочек, сформулированное В.М. Ключевским, и отступления от этого правила при высоких значениях n [12–14]. Согласно А.И. Черкесову, число элементов в диаде соответствует числу нетождественных состояний нуклона и равно $4D^2$, емкость (длина) периода составляет $2D^2$. Наименьшее значение n электрона в периоде приравнивается номеру диады D . Номер периода равен $(n + 1)$ [12–14]. Выведены уравнения, которые позволяют решить задачи об атомном номере элемента, у которого в невозбужденном состоянии впервые появляется подуровень с заданным значением l , о заряде ядра, которым заканчивается формирование заполняющегося подуровня, выделить эле-

менты-аналоги и определить инварианты (не зависящие от электронной конфигурации) их атомов [12, 14].

Логично и компактно располагаются блоки s -, p -, d - и f -элементов, легко прогнозируются свойства неоткрытых g - и h -элементов [14]. Теорией А.И. Черкесова подтверждаются актиноидная теория и суперактиноидная гипотеза Сиборга о размещении соответственно тяжелых и сверхтяжелых элементов в Периодической системе [11–13]. Предугадываются современные [17] указания на то, что в скором будущем Периодическая таблица вторгнется в восьмой период. Это вызывает вопросы о том, как следует расширить формат таблицы, и в какой мере она допускает продолжение. Несмотря на возможное расширение (scrambling – взбирание, вскарабкивание) электронных конфигураций посредством релятивистских эффектов, предполагается, что Периодическая таблица будет охватывать дискретно-оболочечный (shell-partitioned) формат отображения – *spdf*-стиль длиннопериодной формы. Чтобы понять, сколь далеко таблица может простираться, обсуждены ядерная устойчивость все больших систем, а также роль распада (деления), предопределяющего конец стабильности и обычных химических ожиданий. Значительно возрастает значимость гравитации, что обуславливает жизнеспособность стабильных ядер астрономического размера, уже присутствующих в природе в виде нейтронных звезд [17]. В начале 2017 г. в Периодическую таблицу включены оставшиеся четыре элемента, завершающих седьмой период экорадонем (атомный номер 118), который назван оганессоном (oganeson, Og) в честь советского и российского ученого, академика Юрия Цолаковича Оганесяна. Кароль оценил возможности дальнейшего заполнения Периодической таблицы и попытался ответить на следующие вопросы. В каком направлении Периодическая таблица продолжит развиваться? Насколько она расширится, будут ли и как скоро обнаружены новые элементы? Где? Существуют ли какие-либо из них в природе? Как синтезируют и регистрируют новые элементы? Каких химических свойств следует от них ожидать? [18].

Из рассуждений А.И. Черкесова следует взаимосвязь ядерных и электронных степеней свободы в атоме. Теория А.И. Черкесова не противоречит данным о происхождении химических элементов во Вселенной [12–14]. Возможно, ядерно-химические процессы инициируются при лазерной абляции [19–21], что может привести к пониманию процессов нуклеосинтеза во Вселенной и разрешить дискуссионные проблемы образования легких элементов в атмосфере Солнца и тяжелых элементов в недрах массивных звезд на поздних стадиях их эволюции [22]. Сказанное по поводу синтеза ядер легких элементов может

иметь отношение к эвристически ценному антропному принципу [23, 24], проявляющемуся в тонкой подстройке звеньев развития материи на космическом этапе для: а) энергии возбужденного уровня ядра атома углерода; б) расположения энергетических уровней ядра атома кислорода; в) автокатализа, обеспечивающего выход углерода при низкотемпературном режиме нуклеосинтеза; г) резонансного состояния бериллия в реакции ядерного синтеза; д) неблагоприятных резонансных условий для превращения углерода в кислород [24].

А.И. Черкесова можно считать провозвестником идеи Евгения Анатольевича Смоленского. Задавшись вопросом “А что же именно запрещает принцип Паули?”, Е.А. Смоленский решает его так: два электрона с параллельными спинами не могут находиться на эквипотенциальной поверхности. В частности, в триплетном состоянии атома гелия независимо от расстояния между электронами запрещено их расположение на одной сфере с центром в ядре. Гипотеза позволяет существенно сузить чрезмерно широкий класс приемлемых антисимметричных волновых функций, выделив только те, которые удовлетворяют граничным условиям, вытекающим из принципа Паули. Подходы, использующие гипотезу Е.А. Смоленского, в перспективе имеют преимущества перед требующими вычислительных мегаресурсов *ab initio* методами, и уже реализованы в методе многоэлектронных волновых функций (МВФ), представляющем новое общее направление в компьютерной квантовой химии по сравнению с методами молекулярных орбиталей и валентных связей ([25–33] и др.). Метод МВФ открывает принципиально новый способ генерации энергии, основанный на переходе возбужденных атомов гелия в суперстабильное возбужденное состояние в сильных и сверхсильных магнитных полях, допускающий создание источника когерентного излучения, мощность которого в тысячи и миллионы раз превосходит известные источники лазерного излучения [33]. В статье “Живое в концепции информационных отображений” сериального тома [34] (С. 164) А.А. Силин констатирует огромную упорядочивающую силу принципа Паули и предлагает обобщить этот принцип на всю природу, раскрыв его универсальный смысл в виде “ни шагу назад”.

* * *

Значение для аналитической химии работ, обсужденных в первой части настоящей статьи, не требует комментариев. Что касается второго раздела статьи, значимость соответствующего блока исследований А.И. Черкесова столь же очевидна и обусловлена, прежде всего, тем, что обширный ряд методов анализа и аналитических свойств ве-

ществ испытывает влияние Периодического закона Д.И. Менделеева. Прогноз свойств атомов, ионов и соединений вновь открываемых, трудных для экспериментального изучения химических элементов даст ключ к пониманию того, какие аналитические методы следует выбрать и адаптировать для их разделения, концентрирования, обнаружения и определения. Продвижение теории и компьютерных методов квантовой химии важно для развития теории строения и действия аналитических реагентов и форм, установления механизмов аналитических реакций, нахождения предсказательных соотношений структура – аналитические свойства (являющиеся в общем сложной функцией многих характеристик веществ и/или молекул и/или заместителей либо фрагментов). При этом под молекулой понимается электронейтральная молекула в обыденном понимании с закрытой электронной оболочкой (в основном и возбужденных состояниях), а также катион, анион, радикал, бирадикал, катион-радикал, анион-радикал, карбен, нитрен, илид, молекулярный комплекс, эксиплекс, эксимер, сверхвозбужденная ридберговская молекула с размером до 1000 Å, ионный или молекулярный кристалл, кластер (супермолекула), надмолекулярная, супрамолекулярная, поверхностная структура, адсорбционная или каталитическая система и т.д. Упомянутые ядерно-химические процессы могут лечь в основу усовершенствования и модифицирования метода активационного анализа. В наши дни, в период становления новой постнеклассической нелинейно-синергетической научной парадигмы ([23, 24] и др.), самое время обратиться к истокам – воззрениям, изложенным в работах [11–14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ориент И.М.* Наукометрическое исследование публикаций по органическим реагентам // Журн. аналит. химии. 1977. Т. 32. № 3. С. 502.
2. *Черкесов А.И., Алыков Н.М.* Спектрофотометрическое изучение некоторых бисазопроизводных хромотроповой кислоты и их взаимодействия с ионами металлов подгруппы скандия // Журн. аналит. химии. 1965. Т. 20. № 12. С. 1312.
3. *Берштейн И.Я., Гинзбург О.Ф.* Таутомерия в ряду ароматических азосоединений // Успехи химии. 1972. Т. 41. № 2. С. 177.
4. *Ранке-Мадсен Е., Бишоп Э., Баньяи Е., Фритц Д.С., Меджи Р.Д., Рингбом А., Веннинен Э.* Индикаторы / Под ред. Бишопа Э. / Пер. с англ. Матвеевой И.В. / Под ред. Марова И.Н. М.: Мир, 1976. Т. 1. 496 с. (*Rancke-Madsen E., Bishop E., Bányai É., Fritz J.S., Magee R.J., Ringbom A., Wänninen E., Pungor E., Schulek E., Ottaway J.M., Kirkbright G.F., Erdey L.* Indicators / Ed. Bishop E. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig: Pergamon Press, an imprint of Elsevier Ltd., 1972. 746 p. (International Series of Monographs in Analytical Chemistry. V. 51). <https://doi.org/10.1016/C2013-0-02450-4>)

5. *Pankratov A.N.* Azo-coupling reactions used in analytical chemistry: The role of reactants, intermediates, and aqueous medium // *Helvetica Chim. Acta.* 2004. V. 87. № 6. P. 1561.
<https://doi.org/10.1002/hlca.200490143>
6. *Панкратов А.Н.* Аналитические реакции азосочетания: взгляд с точки зрения квантовой химии // *Журн. аналит. химии.* 2005. Т. 60. № 10. С. 1036. (*Pankratov A.N.* Analytical azo coupling reactions: A quantum-chemical consideration // *J. Anal. Chem.* 2005. V. 60. № 10. P. 920.)
<https://doi.org/10.1007/s10809-005-0210-y>
7. *Черкесов А.И., Астахова Н.К., Осокин А.С., Пушинов Ю.В., Мысовская Е.И., Аргиева А.И., Рыжов В.Н., Алыков Н.М., Арзамасцева С.Ф., Черкесов А.А., Смирнов А.Н., Казаков Б.И., Васильчук Н.С., Грунин А.В., Краснов А.И., Тонкошкурков В.С., Посторонко А.И., Карибьянц М.А., Коняхина А.А., Задумина Э.А., Андросова Т.Д., Емжин В.В., Мамин В.И., Щепко В.И.* Фталексоны (синтезы, изучение и аналитическое применение): Науч. труды кафедры орг. химии / Под ред. Черкесова А.И. Саратов: Саратовск. гос. педагогич. ин-т, 1970. 212 с.
8. *Панкратов А.Н., Мустафин А.И.* Строение хелатообразующих аналитических реагентов сульфоталексонов // *Журн. аналит. химии.* 2005. Т. 60. № 5. С. 455. (*Pankratov A.N., Mustafin A.I.* Structure of sulphothalaxons, chelating analytical reagents // *J. Anal. Chem.* 2005. V. 60. № 5. P. 397.)
<https://doi.org/10.1007/s10809-005-0107-9>
9. *Умланд Ф., Янсен А., Тириг Д., Вюниш Г.* Комплексные соединения в аналитической химии. Теория и практика применения / Пер. с нем. Петрухина О.М. М.: Мир, 1975. 533 с. (*Umland F., Janssen A., Thierig D., Wünsch G.* Theorie und praktische Anwendung von Komplexbildnern. Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft, 1971. 759 S.)
10. *Скопенко В.В., Цивадзе А.Ю., Савранский Л.И., Гарновский А.Д.* Координационная химия. М.: ИКЦ "Академия", 2007. 487 с.
11. *Черкесов А.И.* О гиперболической зависимости некоторых физических и химических свойств изоструктурных атомов элементов и их соединений / Материалы областной науч. конференции по химии / Под ред. Усова Ю.Н. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 1972. С. 74.
12. *Черкесов А.И.* Теоретические аспекты естественной системы химических элементов. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 1974. 80 с.
13. *Черкесов А.И.* Нуклонный принцип построения естественной системы химических элементов // *Изв. вузов. Химия и хим. технол.* 1975. Т. 18. № 5. С. 691.
14. *Черкесов А.И.* Короткая диадная форма системы химических элементов Д.И. Менделеева (Методическая разработка для углублённого изучения периодического закона). Саратов: Саратовск. пед. ин-т, 1981. 4 с.
15. Изотопический спин / Википедия, Свободная энциклопедия. https://ru.wikipedia.org/wiki/Изотопический_спин (14.03.2022).
16. *Эткинс П.* Кванты. Справочник концепций / Пер. с англ. Ядровского Е.Л. / Под ред. Розенберга Е.Л. М.: Мир, 1977. 496 с. (*Atkins P.W.* Quanta: A Handbook of Concepts. Oxford Chemistry Series / Eds. Atkins P.W., Holker J.S.E., Holliday A.K. Oxford: Clarendon Press, 1974. V. 21. 309 p.) *Atkins P.W.* Quanta: A Handbook of Concepts. 2nd Ed. New York: Oxford University Press, 1991. 434 p.
<https://doi.org/10.1002/qua.560470308>
17. *Karol P.J.* The Mendeleev – Seaborg Periodic table: Through $Z = 1138$ and beyond // *J. Chem. Educ.* 2002. V. 79. № 1. P. 60.
<https://doi.org/10.1021/ed079p60>
18. *Karol P.J.* The Periodic table of the elements: A review of the future / *Elements Old and New: Discoveries, Developments, Challenges, and Environmental Implications* / Eds. Benvenuto M.A., Williamson T. Washington, DC: American Chemical Society, 2017. P. 41. (ACS Symposium Series. V. 1263).
<https://doi.org/10.1021/bk-2017-1263.ch002>
19. *Тимашев С.Ф., Симакин А.В., Шафеев Г.А.* Ядерно-химические процессы в условиях лазерной абляции металлов в водных средах (проблемы "холодного синтеза") // *Журн. физ. химии.* 2014. Т. 88. № 11. С. 1805. (*Timashev S.F., Simakin A.V., Shafeev G.A.* Nuclear-chemical processes under the conditions of laser ablation of metals in aqueous media (problems of "cold fusion") // *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2014. V. 88. № 11. P. 1980.)
<https://doi.org/10.1134/S0036024414110168>
20. *Серков А.А., Акованцева А.А., Бармина Е.В., Шафеев Г.А., Мисуркин П.И., Лакеев С.Г., Тимашев П.С.* Роль структуры поверхности в инициировании ядерно-химических процессов при лазерной абляции металлов в водных средах // *Журн. физ. химии.* 2014. Т. 88. № 11. С. 1816. (*Serkov A.A., Akovantseva A.A., Barmina E.V., Shafeev G.A., Misurkin P.I., Lakeev S.G., Timashev P.S.* Influence of the surface structure on the initiation of nuclear-chemical processes under laser ablation of metals in aqueous media // *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2014. V. 88. № 11. P. 1989.)
<https://doi.org/10.1134/S0036024414110144>
21. *Timashev S.F.* Physical vacuum as a system manifesting itself on various scales – from nuclear physics to cosmology. arXiv.org, Cornell University Library. Subject: General Physics. Comments. 45 p. <http://arxiv.org/abs/1107.1799v7> (14.03.2022).
22. *Тимашев С.Ф.* Радиоактивный распад ядер как инициируемый ядерно-химический процесс: феноменология // *Журн. физ. химии.* 2015. Т. 89. № 11. С. 1810. (*Timashev S.F.* Radioactive decay as a forced nuclear chemical process: Phenomenology // *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2014. V. 89. № 11. P. 2072.)
<https://doi.org/10.1134/S0036024415110199>
23. *Садыхин А.П.* Концепции современного естествознания. М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2006. 447 с.
24. *Лебедев С.А., Асланов Л.А., Борзенков В.Г., Казарян В.П., Кочергин А.Н., Кудрявцев И.К., Лесков Л.В., Лямин В.С., Познер А.Р., Шербаков А.С.* Философия современного естествознания / Под общ. ред. Лебедева С.А. М.: ФАИР-ПРЕСС, 2004. 304 с.

25. Смоленский Е.А. Новый подход к принципам построения волновых функций многоэлектронных систем // Изв. АН. Сер. хим. 1995. № 9. С. 1666. (Smolenskii E.A. New approach to principles of constructing wave functions for multielectron systems // Russ. Chem. Bull. 1995. V. 44. № 9. P. 1598.) <https://doi.org/10.1007/BF01151277>
26. Smolenskii E.A., Aristov P.P., Ishenko S.Ya., Shpilkin S.A., Maximoff S.N. Role of wave functions' nodal surfaces in interpretation of the Pauli principle // J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1996. V. 36. № 3. P. 402. <https://doi.org/10.1021/ci950086t>
27. Чувылкин Н.Д., Смоленский Е.А., Зефиоров Н.С. Квантово-химические методы построения волновых функций многоэлектронных систем, альтернативные приближению Хартри – Фока // Успехи химии. 2005. Т. 74. № 11. С. 1118. (Chuvylkin N.D., Smolenskii E.A., Zefirov N.S. Quantum-chemical methods for the construction of wave functions of many-electron systems alternative to the Hartree – Fock approximation // Russ. Chem. Rev. 2005. V. 74. № 11. P. 1027.) <https://doi.org/10.1070/RC2005v074n11ABEH001175>
28. Chuvylkin N.D., Smolenskii E.A., Molchanova M.S., Zefirov N.S. Geometrical properties of nodal surfaces of many-electron wave functions // Int. J. Quantum Chem. 2010. V. 110. № 10. P. 1809. <https://doi.org/10.1002/qua.22365>
29. Чувылкин Н.Д., Смоленский Е.А., Кузьмин И.В., Зефиоров Н.С. Узловые поверхности волновых функций молекулы водорода в триплетном состоянии $^3\Sigma_u^+$ // Изв. АН. Сер. хим. 2010. № 10. С. 1955. (Chuvylkin N.D., Smolenskii E.A., Kuz'min I.V., Zefirov N.S. Nodal surfaces of the wave functions of the hydrogen molecule in the triplet state $^3\Sigma_u^+$ // Russ. Chem. Bull. 2010. V. 59. № 10. P. 2005.) <https://doi.org/10.1007/s11172-010-0347-1>
30. Чувылкин Н.Д., Смоленский Е.А. Априорное определение узловых поверхностей пробных волновых функций атома лития // Изв. АН. Сер. хим. 2012. № 3. С. 649 (Chuvylkin N.D., Smolenskii E.A. A priori estimation of the nodal surfaces of trial wave functions of lithium atom // Russ. Chem. Bull. 2012. V. 61. № 3. P. 652.) <https://doi.org/10.1007/s11172-012-0094-6>
31. Чувылкин Н.Д., Смоленский Е.А., Кузьмин И.В. Априорное определение узловых поверхностей пробных волновых функций молекулы гидрида лития // Изв. АН. Сер. хим. 2013. № 11. С. 2547. (Chuvylkin N.D., Smolenskii E.A., Kuz'min I.V. A priori determination of the nodal surfaces of trial wave functions of lithium hydride molecule // Russ. Chem. Bull. 2013. V. 62. № 11. P. 2547.) <https://doi.org/10.1007/s11172-013-0369-6>
32. Чувылкин Н.Д., Смоленский Е.А. Актуальные вопросы квантовой химии многоэлектронных систем // Изв. АН. Сер. хим. 2015. № 10. С. 2277. (Chuvylkin N.D., Smolenskii E.A. Quantum chemistry of many-electron systems: High-priority aspects // Russ. Chem. Bull. 2015. V. 64. № 10. P. 2277.) <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1154-5>
33. Смоленский Е.А., Пивина Т.С., Рыжов А.Н., Маслова Л.К., Зефиоров Н.С. Компьютерное моделирование физико-химических характеристик различных источников энергии // Изв. АН. Сер. хим. 2016. № 6. С. 1395. (Smolenskii E.A., Pivina T.S., Ryzhov A.N., Maslova L.K., Zefirov N.S. Computer-aided modeling of physicochemical characteristics of various energy sources // Russ. Chem. Bull. 2016. V. 65. № 6. P. 1395.) <https://doi.org/10.1007/s11172-016-1468-y>
34. Шаталов А.Т., Олейников Ю.В., Борзенков В.Г., Батуев А.С., Соколова Л.В., Шульга Е.Н., Варанутин А.В., Авсюк А.Ю., Карпинская Р.С., Лисеев И.К., Олескин А.В., Эрлик С.Н., Волгин О.С., Силин А.А., Воейков В.Л., Добрякова А.В., Каганова З.Е., Сивоконь П.Е., Плюснин Ю.М., Фесенкова Л.В., Суворова О.С., Хен Ю.В. Биофилософия / Отв. ред. тома Шаталов А.Т. М.: Ин-т философии РАН, 1997. 250 с. (Серия: Философский анализ оснований биологии / Под науч. руководством Лисеева И.К.).