

УДК 543.559

ИМПЕДАНСОМЕТРИЧЕСКИЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА ДЛЯ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ГИДРОКСИЛЬНЫМ РАДИКАЛАМ

© 2024 г. А. В. Еркович^{а,*}, Е. И. Короткова^а, Е. В. Дорожко^а, А. Н. Соломоненко^а, Н. В. Асеева^а

^аНациональный исследовательский Томский политехнический университет
просп. Ленина, 30, Томск, 634050 Россия
*E-mail: avg48@tpu.ru

Поступила в редакцию 02.11.2023 г.

После доработки 01.12.2023 г.

Принята к публикации 04.12.2023 г.

Гидроксильный радикал является наиболее агрессивным и опасным продуктом неполного восстановления кислорода в организме, в связи с чем его определение и влияние различных антиоксидантов на ингибирование ОН-радикалов является актуальной задачей. Предложен импедансометрический сенсор для определения гидроксильных радикалов на основе графитового электрода, модифицированного электрохимически осажденным золотом и самоорганизующимся монослоем N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ). Применение АЦЦ обуславливает высокую селективность сенсора, а использование нефарадеевского импеданса в качестве способа регистрации аналитического сигнала позволяет достичь предела обнаружения ОН-радикалов 0.01 нМ при линейном диапазоне определяемых концентраций 0.08–8 нМ. Разработанный сенсор успешно применен для оценки активности некоторых антиоксидантов (аскорбиновая кислота, глутатион, коэнзим Q10) по отношению к ОН-радикалам.

Ключевые слова: гидроксильный радикал, импедансная спектроскопия, антиоксидантная активность, аскорбиновая кислота, глутатион, коэнзим Q10.

DOI: 10.31857/S0044450224060022, EDN: tvigon

Гидроксильный радикал (ОН[•]) образуется в организме человека в процессе восстановления кислорода [1] и является наиболее реакционно-способным и опасным его продуктом. Время жизни гидроксильного радикала составляет около 10⁻⁹ с, а радиус миграции меньше 100 Å, что сравнимо с размерами органических молекул [2]. В связи с этим ОН[•] способен повреждать нуклеиновые кислоты [3], липиды [4] и белки [5].

Радикал ОН[•] считается одним из основных маркеров окислительного стресса, который является причиной развития многих патологий, включая нейродегенеративные [6] и сердечно-сосудистые заболевания [7], а также рак [8]. В связи с этим количественная оценка уровня ОН[•] в биологических образцах и способности различных антиоксидантов ингибировать ОН-радикалы имеет большое значение для медицинских и аналитических исследований. Однако мониторинг ОН[•] все еще представляет определенную сложность для исследователей, что связано с высокой реакционной способностью и сверхкоротким временем свободного существования гидроксильного радикала в биологических объектах.

К методам определения гидроксильных радикалов относятся ЭПР-спектроскопия [9], высокоэффективная жидкостная хроматография [10] и флуориметрия [11], однако каждый из этих подходов обладает определенными недостатками, связанными с невозможностью прямого детектирования ОН[•] и сложностью адаптации методик для анализа биологических образцов. Несмотря на это, некоторые из указанных методов успешно использованы для исследования антиоксидантных свойств различных веществ [12, 13].

Определение гидроксильных радикалов с помощью электрохимических сенсоров является перспективным направлением благодаря использованию специальных модификаторов, селективно окисляющих ОН[•], что позволяет быстро и с высокой чувствительностью определять концентрацию ОН-радикалов без применения дополнительных радикальных ловушек [14]. В качестве модификаторов электродной поверхности наибольшую популярность приобрели органические соединения серы, которые позволяют не только определять концентрацию ОН[•] в клеточных культурах [15], но и оценивать антиоксидант-

ную активность различных экстрактов растений по отношению к гидроксильным радикалам [16]. Общим недостатком большинства органических соединений серы является их высокая токсичность, что обуславливает необходимость поиска новых селективных модификаторов для определения $\text{OH}\cdot$.

В данной работе представлен новый импедансометрический сенсор для быстрого определения $\text{OH}\cdot$ и оценки активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам. Новизна данного сенсора в основном заключается в использовании нетоксичного модификатора N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ). Константа скорости реакции между АЦЦ и $\text{OH}\cdot$ составляет $1.36 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ [17], что на несколько порядков выше констант скорости реакции АЦЦ с другими активными формами кислорода. Этот факт обуславливает высокую селективность разработанного сенсора, а применение метода нефарадеевского импеданса для регистрации аналитического сигнала позволяет достичь высокой чувствительности определения. Импедансометрический сенсор не только характеризуется широким диапазоном определяемых концентраций и низким пределом обнаружения, но также успешно применен для оценки антиоксидантных свойств некоторых биологически активных веществ (глутатион, аскорбиновая кислота и коэнзим Q10) в отношении $\text{OH}\cdot$ -радикалов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Хлорид калия, серная кислота, пероксид водорода (35%), фосфатный буферный раствор (ФБР, pH 6.86), гипохлорит натрия, гидроксид калия, раствор золотохлористоводородной кислоты (1 г/л), N-ацетил-L-цистеин, D-глюкоза, L-аргинин, аскорбиновая кислота, L-глутатион, коэнзим Q10, используемые в работе, приобретали у компании Sigma-Aldrich (США). Гексааммин рутений(III) хлорид ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$) приобретали у компании Senzhuo Industry Co., LTD (Китай). Все реактивы имели квалификацию ос. ч. и не подвергались дополнительной очистке. Для приготовления всех растворов использовали бидистиллированную воду.

Гидроксильные радикалы генерировали путем разложения пероксида водорода под воздействием УФ-излучения. Для этого в ячейку с 10 мл ФБР и подготовленным сенсором вносили различные объемы H_2O_2 (2×10^{-8} или 2×10^{-6} М) и облучали УФ-излучением в течение 10 мин. При построении градуировочной зависимости учитывали, что в результате разложения одной молекулы пероксида водорода УФ-излучением образуются две молекулы $\text{OH}\cdot$ [18]:



Синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) генерировали с помощью добавления NaClO (1×10^{-7} М) к водному раствору H_2O_2 (1×10^{-7} М). Пероксид водорола (1×10^{-7} М) и гипохлорит анион (ClO^-) (1×10^{-7} М) получали путем разбавления коммерческих растворов H_2O_2 и NaClO .

Аппаратура. Все электрохимические измерения, включая циклическую вольтамперометрию (ЦВА) и импедансную спектроскопию (ЭИС), проводили на потенциостате-гальваностате PalmSens 4 (Palmsens B.V., Нидерланды). Электрохимическая ячейка представляла собой трехэлектродную систему, в которой рабочим электродом являлся разработанный сенсор. В качестве электрода сравнения использовали хлоридсеребряный электрод, заполненный 1 М раствором KCl ; в качестве вспомогательного использовали платиновый электрод. Для генерации УФ-излучения применяли ультрафиолетовые лампы марки ДКБУ-11 с длиной волны 254 нм и суммарной мощностью 22 Вт, встроенные в вольтамперометрический анализатор TA-Lab (Томьаналит, Россия). Бидистиллированную воду получали на установке БЭ-4 (Ливам, Россия).

При проведении измерений методом нефарадеевского импеданса устанавливали следующие параметры: напряжение постоянного тока $E_{\text{dc}} = 0.28$ В; амплитуду напряжения $E_{\text{ac}} = 0.01$ В; диапазон частот от 0.1 до 10^5 Гц. Измерения проводили в ФБР (pH 6.86).

Емкость двойного электрического слоя (C_{dl}) рассчитывали по формуле (2) [19]:

$$C_{\text{dl}} = Q \cdot \omega_{\text{max}}^{(n-1)}, \quad (2)$$

где Q — элемент постоянной фазы (СРЕ), $\text{с}^n/\text{Ом}\cdot\text{см}^2$; ω_{max} — частота, при которой мнимая часть импеданса достигает максимального значения, рад/с; n — экспоненциальный показатель, обозначающий фазовое отклонение. Для моделирования импедансных спектров использовали программное обеспечение PSTrace 5.8 (Palmsens B.V., Нидерланды).

Методика эксперимента. *Подготовка сенсора.* В качестве рабочего электрода использовали графитовый электрод, импрегнированный полиэтиленом и парафином под вакуумом (ИГЭ), геометрическая площадь которого составляет 0.126 см^2 (ООО «ЮМХ», Россия). Перед нанесением модификаторов поверхность электрода механически очищали с помощью фильтровальной бумаги. Золото на поверхность ИГЭ наносили электрохимически из раствора HAuCl_4 (82.4 мкМ) в диапазоне потенциалов от -0.55 до 0.05 В при скорости развертки потенциала 1 мВ/с . После нанесения золота проводили электрополировку поверхности сенсора 0.05 М серной кислотой методом ЦВА в диапазоне от 0 до 1.5 В при скорости развертки 100 мВ/с в течение 10 циклов. Для по-

лучения самоорганизующегося монослоя (СОМ) N-ацетил-L-цистеина сенсор погружали в водный раствор АЦЦ с концентрацией 10 мМ на 24 ч при комнатной температуре. После проведения измерений сенсор регенировали в 0.1 М растворе КОН методом вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала в диапазоне от -0.5 до -1.3 В при скорости развертки 100 мВ/с для удаления остаточных молекул АЦЦ с поверхности электрода.

Оценка активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам. Для оценки способности выбранных модельных антиоксидантов улавливать гидроксильные радикалы в ячейку с 10 мл ФБР вносили определенный объем антиоксиданта, после чего вносили 250 мкл H_2O_2 (2×10^{-8} М) для генерации гидроксильных радикалов в концентрации 1×10^{-9} М. Подготовленную ячейку с внесенным сенсором облучали УФ-излучением в течение 10 мин, после чего измеряли емкость двойного электрического слоя методом нефаарадеевского импеданса. Для оценки активности антиоксидантов по отношению к ОН-радикалам использовали два критерия: концентрацию ОН \cdot , подвергнутых действию антиоксиданта, а также процент уловленных ОН-радикалов. Концентрацию ОН-радикалов, подвергнутых действию антиоксиданта ($c'_{ОН}$), рассчитывали по формуле (3):

$$c'_{ОН} = c_{ОН} - \frac{\Delta c_{ант}}{\Delta c_{ОН}} \cdot c_{ОН}, \quad (3)$$

где $\Delta c_{ант}$ — аналитический сигнал, полученный при воздействии антиоксиданта, $\Delta c_{ОН}$ — аналитический сигнал без антиоксиданта, $c_{ОН}$ — начальная концентрация ОН \cdot (1×10^{-9} М).

Процент уловленных ОН-радикалов определяли по формуле (4):

$$\%_{ОН} = 1 - \left(\frac{\Delta c_{ант}}{\Delta c_{ОН}} \right). \quad (4)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика поверхности сенсора. Для установления факта образования самоорганизующегося монослоя АЦЦ на поверхности сенсора исследовали электрод до и после модификации методами ЦВА и ЭИС. На рис. 1а представлены циклические вольтамперограммы немодифицированного ИГЭ и ИГЭ, последовательно модифицированного золотом (Au/ИГЭ) и ацетилцистеином (АЦЦ/Au/ИГЭ) в 0.1 М растворе КСl, содержащем 1 мМ $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$. Циклические вольтамперограммы снимали в диапазоне от -0.35 до -0.05 В при скорости развертки потенциала 100 мВ/с. Для увеличения отклика от окислительно-восстановительной метки вольтамперограммы регистрировали в режиме первой производной. Как видно из рис. 1а, даже немодифицированный ИГЭ обладает достаточно хорошими токопрово-

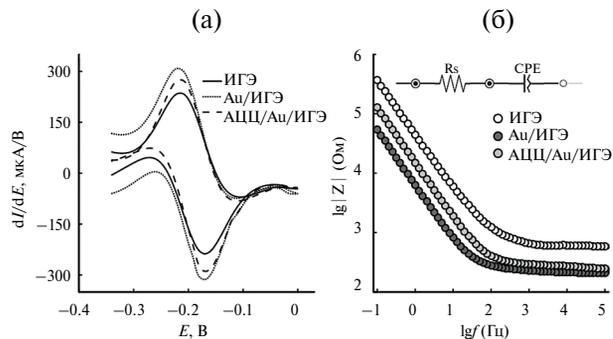


Рис. 1. (а) Циклические вольтамперограммы в режиме первой производной в 0.1 М растворе КСl, содержащем 1 мМ $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$; (б) импедансные спектры в виде логарифмической амплитудно-частотной характеристики, полученные методом нефаарадеевского импеданса. На вставке приведена эквивалентная схема (R_s — сопротивление раствора; CPE — элемент постоянной фазы).

дующими свойствами, что подтверждается наличием четко выраженных окислительно-восстановительных пиков. При этом нанесение золота заметно увеличивает электрохимический отклик от $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$, что связано с каталитическими свойствами золота. В то же время образование СОМ на поверхности электрода препятствует транспорту электронов и блокирует движение ионов $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$ к поверхности электрода, в связи с чем происходит значительное уменьшение окислительно-восстановительных пиков.

Электроактивную площадь поверхности немодифицированного ИГЭ и его модификаций рассчитывали с использованием уравнения Рэндлса—Шевчика (5) [20]:

$$I_p = 2.69 \times 10^5 \cdot A \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot \nu^{\frac{1}{2}} \cdot c, \quad (5)$$

где I_p — сила тока катодного или анодного пика, А; A — электроактивная площадь, см 2 ; n — число электронов, переносимых в процессе электродной реакции ($n = 1$); D — коэффициент диффузии, см 2 /с ($D_{Red} = 1.19 \times 10^{-5}$ см 2 /с [21]); ν — скорость развертки потенциала, В/с ($\nu = 0.1$ В/с); c — концентрация $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$, мМ ($c = 1 \times 10^{-6}$ мМ).

Таким образом, электроактивная площадь немодифицированного ИГЭ составила 0.0699 см 2 , Au/ИГЭ — 0.0893 см 2 , АЦЦ/Au/ИГЭ — 0.0787 см 2 . Полученные данные подтверждают предположение о том, что после нанесения АЦЦ поверхность сенсора становится менее доступной для переноса заряда, что косвенно указывает на формирование СОМ.

Количество адсорбированных молекул АЦЦ на поверхности сенсора оценивали путем расчета по уравнению (6):

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA}, \quad (6)$$

где Γ — поверхностная концентрация АЦЦ, моль/см²; Q — количество электричества, Кл; n — число электронов, переносимых в процессе электродной реакции ($n = 1$); F — постоянная Фарадея (96 485 Кл/моль); A — электроактивная площадь, см².

Количество электричества рассчитывали методом хроноамперометрии в 0.1 М растворе КОН при потенциале -1.0 В [22]. Поверхностная концентрация частиц АЦЦ, рассчитанная по уравнению (6), составила 1×10^{-7} моль/см², что указывает на значительную площадь покрытия электрода модификатором и предполагает получение интенсивного аналитического сигнала.

Результаты исследования поверхности сенсора методом нефарадеевского импеданса представлены на рис. 1б. Импедансные спектры, представленные в виде логарифмической амплитудно-частотной характеристики, соответствуют эквивалентной схеме, состоящей из последовательно соединенных элементов: сопротивления раствора и элемента постоянной фазы, используемого вместо элемента емкости из-за неоднородности поверхности сенсора. Как видно из рисунка, при высоких частотах (от 10^5 до 10^3 Гц) основной вклад в полное сопротивление вносит независимое от частоты сопротивление раствора. Однако при низких частотах (от 10^3 до 10^{-1} Гц) в спектре появляется частотно зависимая компонента, обусловленная образованием двойного электрического слоя на границе электрод–раствор. Важно отметить, что для Au/ИГЭ наблюдается значительное уменьшение величины импеданса $|Z|$ в низкочастотной области по сравнению с немодифицированным ИГЭ, обусловленное снижением сопротивления вследствие улучшения токопроводящих свойств поверхности после нанесения золота. При этом нанесение СОМ приводит к увеличению сопротивления вследствие образования диэлектрического монослоя АЦЦ. По данным эквивалентной схемы, приведенной во вставке на рис. 1б, рассчитаны значения всех элементов, входящих в схему (табл. 1). Погрешности значений элементов, рассчитанные по данной схеме, не превышают 5%, а значение критерия согласия Пирсона (χ^2) не превышает 10^{-2} , что указывает на правильность использования данной эквивалентной схемы. Емкость двойного электрического слоя (C_{dl}) рассчитывали по уравнению (2) с использованием значений Q и n из табл. 1. Так, C_{dl} немодифицированного ИГЭ составила 1.853 мкФ. Модификация золотом увеличивает емкость двойного электрического слоя до 19.069 мкФ, что связано с более высокой адсорбционной способностью ионов из раствора на поверхности золота. Для АЦЦ/Au/ИГЭ наблюдается уменьшение C_{dl} до 11.762 мкФ, что обусловлено диэлектрическими свойствами СОМ.

Значительные изменения, наблюдаемые после каждого этапа модификации, дают основание

Таблица 1. Экстраполированные параметры импедансных спектров импрегнированного графитового электрода и его модификаций, полученные при моделировании данных нефарадеевского импеданса

Электрод	R_s , Ом	Q , с ⁿ /Ом·см ²	n	χ^2
ИГЭ	478.2	4.972	0.805	$5.0 \cdot 10^{-3}$
Au/ИГЭ	224.1	30.03	0.906	$3.6 \cdot 10^{-3}$
АЦЦ/Au/ИГЭ	214.2	20.72	0.892	$4.0 \cdot 10^{-4}$

предположить, что изменение емкости двойного электрического слоя при разрушении АЦЦ гидроксильными радикалами может быть аналитическим сигналом, пропорциональным концентрации OH^\cdot .

Регистрация аналитического сигнала и построение градуировочной зависимости. Для регистрации аналитического сигнала использовали метод нефарадеевского импеданса, поскольку он характеризуется высокой чувствительностью и позволяет избежать мешающего влияния на АЦЦ со стороны окислительно-восстановительной пары, которая необходима в измерениях фарадеевского импеданса.

Разработанный сенсор дает хороший аналитический отклик. Аналитический сигнал, полученный методом нефарадеевского импеданса от OH^\cdot с концентрацией 10^{-9} М, представлен в виде логарифмической фазовой частотной характеристики на рис. 2а. Как видно из рисунка, на импедансном спектре после воздействия OH^\cdot -радикалов в области низких частот наблюдается отчетливое снижение фазового угла по сравнению с фоновым спектром. Поскольку максимальный фазовый сдвиг конденсатора равен -90° , его снижение свидетельствует о нарушении диэлектрического слоя и его неспособности удерживать электрический заряд, что в конечном итоге приводит к снижению общего импеданса. Эти данные убедительно свидетельствуют о разрушении монослоя АЦЦ гидроксильными радикалами. Значения C_{dl} до и после воздействия OH^\cdot , рассчитанные по формуле (2), составили 12.675 и 12.959 мкФ соответственно. Таким образом, разрушение монослоя АЦЦ на поверхности сенсора под воздействием OH^\cdot приводит к увеличению емкости, поскольку десорбция АЦЦ делает поверхность сенсора более электроактивной, что позволяет большему количеству ионов из раствора адсорбироваться на ней. Как показали контрольные эксперименты, ни пероксид водорода, ни УФ-излучение по отдельности не приводят к значимому изменению емкости.

Для определения оптимальных параметров построения градуировочной зависимости исследовали влияние времени реакции разрушения мо-

нослоя АЦЦ гидроксильными радикалами на аналитический сигнал в диапазоне от 120 до 1200 с (рис. 2б). Как видно из графика кинетической зависимости, значение отношения емкости фона к емкости аналитического сигнала (C_0/C) выходит на плато при 600 с. В связи с этим выбрали оптимальное время реакции 10 мин. Полученную зависимость аппроксимировали кинетическим уравнением первого порядка, приведенным на вставке к рис. 2б, поскольку поверхностная концентрация АЦЦ находится в избытке по отношению к концентрации ОН-радикалов (1×10^{-9} М). Результаты статистической обработки кинетического уравнения представлены в табл. 2. Удовлетворительное значение коэффициента корреляции указывает на правильность использования уравнения первого порядка. Помимо этого, значение достигнутого уровня значимости для всех коэффициентов составило менее 0.05, что говорит о значимости этих коэффициентов. Таким образом, значение константы скорости реакции разрушения монослоя АЦЦ ОН-радикалами составило $(3.2 \pm 0.8) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

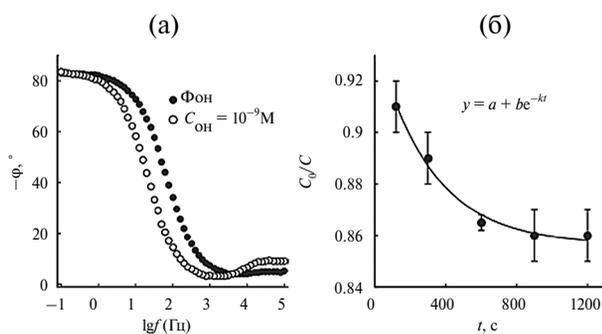


Рис. 2. (а) Аналитический сигнал, зарегистрированный методом нефарадеевского импеданса; (б) кинетика разрушения монослоя АЦЦ ОН-радикалами в диапазоне времени от 120 до 1200 с ($n = 3$, $P = 0.95$).

После исследования всех необходимых параметров построили градуировочную зависимость аналитического сигнала, представляющего собой изменение емкости двойного электрического слоя (ДЭС) ($\Delta C = C - C_0$) от десятичного логарифма концентрации ОН \cdot . Зависимость описывается уравнением: $\Delta C = a \lg(c_{\text{ОН}}) + b$, где $c_{\text{ОН}}$ — концентрация гидроксильных радикалов, нМ; ΔC — изменение емкости ДЭС, мкФ. Результаты статистической обработки полученной регрессионной зависимости приведены в табл. 3. Как видно из таблицы, данная модель характеризуется высоким коэффициентом корреляции. Кроме того, коэффициенты в уравнении регрессии являются значимыми ($p \leq 0.05$), а тот факт, что рассчитанное значение критерия Фишера намного меньше табличного значения, указывает на адекватность предложенной модели.

Разработанный сенсор применили для определения ОН \cdot в диапазоне от 0.08 до 8 нМ. Предел обнаружения, рассчитанный по $3s$ -критерию, составил 0.01 нМ. Данный диапазон концентраций и предел обнаружения соответствуют концентрациям ОН \cdot , продуцируемым в биологических системах, что делает АЦЦ/Au/ИГЭ перспективным сенсором для исследования уровня ОН \cdot в клеточных культурах или сыроворотке крови.

Метрологические характеристики. Вследствие того, что предложенный сенсор разработан для исследования биологических образцов, крайне важной метрологической характеристикой является его селективность. В данном исследовании селективность АЦЦ/Au/ИГЭ оценивали путем измерения сигнала от 1 нМ ОН \cdot и потенциально мешающих веществ: активных форм кислорода и биологически активных веществ в концентрации 100 нМ (рис. 3). Оценка мешающего влияния по t -критерию подтвер-

Таблица 2. Статистическая обработка кинетического уравнения, приведенного на рис. 2б ($n = 3$, $P = 0.95$)

Коэффициент	Оценка коэффициентов уравнения	Стандартная погрешность (SE)	Достигнутый уровень значимости	Коэффициент корреляции (R^2)
a	0.856	0.004	0.00002	0.9880
b	0.0804	0.008	0.009	
k	0.0032	0.0008	0.04	

Таблица 3. Статистическая обработка уравнения регрессии градуировочной зависимости ΔC от логарифма концентрации ОН \cdot ($n = 3$, $P = 0.95$, $F_{\text{табл}} = 3.71$)

Коэффициент	Оценка коэффициентов уравнения	Стандартная погрешность (SE)	Достигнутый уровень значимости	Критерий Фишера ($F_{\text{эмп}}$)	Коэффициент детерминации (R^2)
a	0.18	0.01	0.0005	0.70	0.9883
b	0.428	0.008	0.00001		

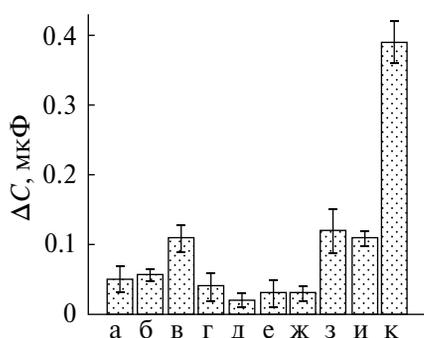


Рис. 3. Селективность сенсора АЦЦ/Au/ИГЭ по отношению к активным формам кислорода и биологически активным веществам: $^1\text{O}_2$ (а), ClO^- (б), H_2O_2 (в), D-глюкозе (г), L-аргинину (д), аскорбиновой кислоте (е), глутатиону (ж), кверцетину (з), коэнзиму Q10 (и), OH^\cdot (к) ($n = 3$, $P = 0.95$).

дила, что изменение емкости при внесении мешающих веществ незначимо. Полученные данные свидетельствуют о хорошей селективности сенсора.

Воспроизводимость оценивали путем определения 1 нМ OH^\cdot с помощью трех сенсоров, при этом стандартное отклонение составило 0.00920, что указывает на удовлетворительную воспроизводимость. Повторяемость оценивали путем определения 1 нМ OH^\cdot одним сенсором шесть раз. Стандартное отклонение составило 0.00902, что свидетельствует о хорошей повторяемости результатов. Помимо этого, АЦЦ/Au/ИГЭ показал стабильную работу в течение одного дня измерений: значение аналитического сигнала, полученного от 1 нМ OH^\cdot , изменялось не более чем на 5%. Правильность результатов, полученных с помощью сенсора АЦЦ/Au/ИГЭ, оценивали методом введено–найдено (табл. 4). Из таблицы следует, что данные, полученные методом нефарадеевского импеданса, могут считаться удовлетворительными, а разработанный сенсор можно применять для исследования антиоксидантной активности.

Оценка активности антиоксидантов по отношению к OH^\cdot -радикалам. Активность некоторых антиоксидантов (аскорбиновая кислота, глутатион и коэнзим Q10) исследовали на трех уровнях их концентраций: 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} М. Выбор данного концентрационного диапазона обусловлен перспективой дальнейшего изучения активности

антиоксидантов в биологических образцах, что предполагает использование низких концентраций антиоксидантов, а также тем фактом, что некоторые из антиоксидантов в высоких концентрациях способны действовать как прооксиданты [23]. Зависимости процента уловленных OH^\cdot -радикалов от типа и концентрации антиоксиданта представлены на рис. 4. Как видно, при высокой концентрации антиоксидантов все три вещества проявляют приблизительно одинаковую способность улавливать OH^\cdot -радикалы. Однако при уменьшении концентрации антиоксидантов активность аскорбиновой кислоты и коэнзима Q10 в отношении OH^\cdot заметно снижается, в то время как глутатион показывает самый высокий процент ингибирования гидроксильных радикалов. Данная закономерность подтверждает известные данные, согласно которым глутатион за счет наличия атома серы проявляет наибольшую способность улавливать OH^\cdot -радикалы [24].

В табл. 5 приведены результаты количественной оценки уловленных OH^\cdot -радикалов различными антиоксидантами в зависимости от их концентраций, которые коррелируют с данными рис. 4 и убедительно свидетельствуют об эффективности использования данных биологических веществ в антиоксидантной терапии для ингибирования OH^\cdot -радикалов. Следует отметить, что полученные значения наибольшей антиоксидантной активности глутатиона указывают на правильность полученных результатов и возможность

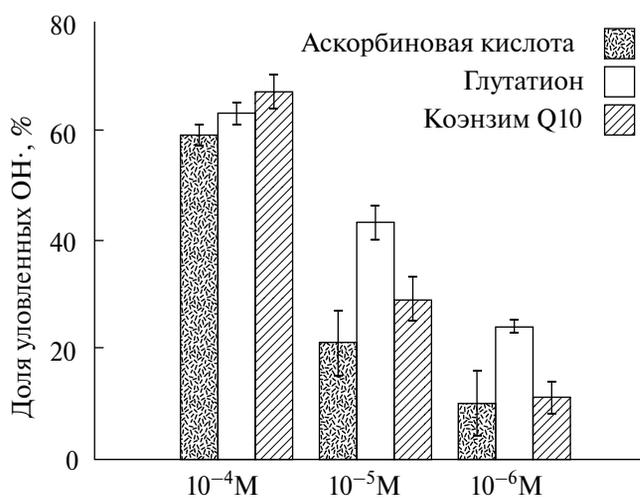


Рис. 4. Оценка активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам ($n = 3$, $P = 0.95$).

Таблица 4. Оценка правильности работы сенсора ($n = 3$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 4.303$)

Введено, нМ	Найдено, нМ	Стандартное отклонение (s)	Относительное стандартное отклонение (s_r), %	$t_{\text{эксп}}$
0.10	0.09 ± 0.03	0.000174	0.20	1.312
0.50	0.52 ± 0.03	0.0208	3.94	0.283
1.00	0.92 ± 0.05	0.0208	2.31	0.961

применения разработанной методики для оценки активности различных антиоксидантов в модельных средах, экстрактах растений и пищевых продуктах.

Таким образом, объединение экологичного сесоросодержащего модификатора АЦЦ с неструктурным методом нефарадеевского импеданса позволяет добиться крайне чувствительного и высокоселективного определения ОН-радикалов. Представленный импедансометрический сенсор показал возможность определения гидроксильных радикалов в широком диапазоне концентраций от 0.08 до 8 нМ с крайне низким пределом обнаружения 0.01 нМ. Разработанный сенсор успешно применен для исследования активности модельных антиоксидантов по отношению к ОН-радикалам. Предложенный подход может оказаться перспективным для определения антиоксидантной активности природных и синтетических антиоксидантов, а также может быть применен для анализа других биологических объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания, проект № FSWW-2023-0008. Исследование выполнено при поддержке программы развития Томского политехнического университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Таблица 5. Количество ОН-радикалов, ингибированных различными антиоксидантами, в зависимости от концентрации антиоксидантов ($n = 3$, $P = 0.95$)

Концентрация антиоксиданта, М	Доля уловленных ОН-радикалов, %	Концентрация уловленных ОН-радикалов, $c \times 10^{10}$, М
Аскорбиновая кислота		
1×10^{-4}	59 ± 2	5.9 ± 0.2
1×10^{-5}	21 ± 6	2.1 ± 0.6
1×10^{-6}	10 ± 6	1.0 ± 0.6
Глутатион		
1×10^{-4}	63 ± 2	6.3 ± 0.2
1×10^{-5}	43 ± 3	4.3 ± 0.3
1×10^{-6}	24 ± 1	2.4 ± 0.1
Коэнзим Q10		
1×10^{-4}	67 ± 3	6.7 ± 0.3
1×10^{-5}	29 ± 4	2.9 ± 0.4
1×10^{-6}	11 ± 3	1.1 ± 0.3

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Halliwel B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 2015. 906 p.
- Roots R., Okada S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells // Radiat. Res. 1975. V. 64. № 2. P. 306. <https://doi.org/10.2307/3574267>
- Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance // Mutat. Res./Rev. Mutat. 2004. V. 567. № 1. P. 20. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>
- Halliwel B., Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance // Am. J. Clin. Nutr. 1993. V. 57. № 5. P. 715S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.715S>
- Stadtman E.R., Levine R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins // Amino Acids. 2003. V. 25. P. 207. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>
- Lancelot E., Revaud M.L., Boulu R.G., Plotkine M., Callebert J. Alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron attenuates excitotoxicity in rat striatum by preventing hydroxyl radical accumulation // Free Radical Bio. Med. 1997. V. 23. № 7. P. 1031. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00128-7)
- Cuzzocrea S., Reiter R.J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury // Eur. J. Pharmacol. 2001. V. 426. № 1–2. P. 2. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01175-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01175-X)
- Sosa V., Moliné T., Somoza R., Paciucci R., Kondoh H., LLeonart M.E. Oxidative stress and cancer: An overview // Ageing Res. Rev. 2013. V. 12. № 1. P. 378. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>
- Guo Q., Rimbach G., Moini H., Weber S., Packer L. ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids // Toxicology. 2002. V. 179. № 1–2. P. 171. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00241-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00241-X)
- Cheng F.C., Jen J.F., Tsai T.H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods // J. Chromatogr. B. 2002. V. 781. № 1–2. P. 481. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00620-7](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00620-7)
- Hou J.T., Zhang M., Liu Y., Ma X., Duan R., Cao X., et al. Fluorescent detectors for hydroxyl radical and their applications in bioimaging: A review // Coordin. Chem. Rev. 2020. V. 421. Article 213457. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213457>
- Щербатых А.А., Черновьянц М.С. Исследование антигипертензивных и антиоксидантных свойств цистеина, глутатиона и метионина методами спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 4. С. 313. (Shcherbatykh A.A., Chernov'yants M.S. Study of antihypertensive and antioxidant properties of cysteine, glutathione and methionine by spectrophotometry and high performance liquid chromatography // J. Anal. Chem. 2021. V. 76. No. 4. P. 313.)

- idant properties of cysteine, glutathione, and methionine by spectrophotometry and high performance liquid chromatography // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. P. 476.)
13. *Aleksenko C.S., Kazimirova K.O., Штыков С.Н.* Сравнительная оценка содержания свободных фенольных соединений и антиоксидантной активности различных образцов гречихи // *Журн. аналит. химии.* 2022. Т. 77. № 8. С. 704. (*Aleksenko S.S., Kazimirova K.O., Shtykov S.N.* Comparative evaluation of the concentration of free phenolic compounds and the antioxidant activity of various buckwheat samples // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. № 8. P. 948.)
 14. *Geraskevich A.V., Solomonenko A.N., Dorozhko E.V., Korotkova E.I., Berek J.* Electrochemical sensors for the detection of reactive oxygen species in biological systems: A critical review // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2022. P. 3.
<https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2098669>
 15. *Ding S., Li M., Gong H., Zhu Q., Shi G., Zhu A.* Sensitive and selective measurement of hydroxyl radicals at subcellular level with tungsten nanoelectrodes // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 3. P. 2543.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04139>
 16. *Hilgemann M., Scholz F., Kahlert H., De Carvalho L.M., Da Rosa M.B., Lindequist U., et al.* Electrochemical assay to quantify the hydroxyl radical scavenging activity of medicinal plant extracts // *Electroanalysis.* 2010. V. 22. № 4. P. 406.
<https://doi.org/10.1002/elan.200900385>
 17. *Aruoma O.I., Halliwell B., B.M. Hoey, Butler J.* The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid // *Free Radical Bio. Med.* 1989. V. 6. № 6. P. 593.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90066-X)
 18. *Schulte P., Bayer A., Kuhn F., Luy T., Volkmer M.* H₂O₂/O₃, H₂O₂/UV and H₂O₂/Fe²⁺ processes for the oxidation of hazardous wastes // *Ozone: Sci. Eng.* 1995. V. 17 P. 119.
<https://doi.org/10.1080/01919519508547541>
 19. *Hsu C.H., Mansfeld F.* Concerning the conversion of the constant phase element parameter Y₀ into a capacitance // *Corrosion.* 2001. V. 57. № 09. P. 747. <https://doi.org/10.5006/1.3280607>
 20. *Комптон Р.Г., Бэнкс К.Е.* Постигая вольтамперометрию. Томск: Изд-во ТПУ, 2015. 509 с.
 21. *Wang Y., Limon-Petersen J.G., Compton R.G.* Measurement of the diffusion coefficients of [Ru(NH₃)₆]³⁺ and [Ru(NH₃)₆]²⁺ in aqueous solution using microelectrode double potential step chronoamperometry // *J. Electroanal. Chem.* 2011. V. 652. № 1–2. P. 13.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.12.011>
 22. *Thal D., Kahlert H., Chinnaya J., Ahrens P., Hasse U.* Impact of gold-1-decanethiol-SAM formation and removal cycles on the surface properties of polycrystalline gold and SAM quality // *J. Solid State Electr.* 2018. V. 22. № 4. P. 1149.
<https://doi.org/10.1007/s10008-017-3858-y>
 23. *Naidu K.A.* Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview // *Nutr. J.* 2003. V. 2. P. 1.
 24. *Abedinzadeh Z., Gardés-Albert M., Ferradini C.* Reactions of OH· and Br₂ radicals with glutathione. A radiolysis study // *Int. J. Radiat. App. Instrum. Part C. Radiat. Phys. Chem.* 1992. V. 40. № 6. P. 551.
[https://doi.org/10.1016/1359-0197\(92\)90223-3](https://doi.org/10.1016/1359-0197(92)90223-3)

ORIGINAL ARTICLES

IMPEDANCE SENSOR BASED ON N-ACETYL-L-CYSTEINE FOR EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AGAINST HYDROXYL RADICALS

A. V. Erkovich^a*, E. I. Korotkova^a, E. V. Dorozhko^a, A. N. Solomonenko^a, N. V. Aseeva^a

^a*National Research Tomsk Polytechnic University, 634050 Tomsk, Russia*
*e-mail: avg48@tpu.ru

Received November 2, 2023. Revised December 1, 2023. Accepted December 4, 2023

Abstract. Hydroxyl radical is the most aggressive and dangerous product of incomplete reduction of oxygen in the body, therefore its determination and the influence of various antioxidants on the inhibition of OH·-radicals is an urgent task. An impedance-metric sensor for the determination of hydroxyl radicals based on a graphite electrode modified with electrochemically deposited gold and self-organizing monolayer of N-acetyl-L-cysteine (ACC) has been proposed. The use of ACC causes high selectivity of the sensor, and the use of non-Faraday impedance as a method of analytical signal registration allows to reach the detection limit of OH·-radicals of 0.01 nM with a linear range of detectable concentrations of 0.08–8 nM. The developed sensor has been successfully applied to evaluate the activity of some antioxidants (ascorbic acid, glutathione, coenzyme Q10) in relation to OH·-radicals.

Keywords: hydroxyl radical, impedance spectroscopy, antioxidant activity, ascorbic acid, glutathione, coenzyme Q10.