

Том 79, Номер 6

ISSN 0044-4502
Июнь 2024



ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ



НАУКА

— 1727 —

Российская академия наук

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Том 79 № 6 2024 Июнь

Основан в январе 1946 г. Выходит 12 раз в год. ISSN: 0044-4502
Журнал издается под руководством Отделения химии и наук о материалах РАН

Главный редактор **В.П. Колотов**
Почетный главный редактор **Ю.А. Золотов**

Редакционная коллегия

В.Г. Амелин, В.В. Апяри, М.К. Беклемишев (зам. главного редактора), А.В. Булатов, В.И. Вершинин, И.Ю. Горячева, Г.А. Евтюгин, Н.Б. Зоров, Б.К. Зуев, В.К. Карандашев, Л.А. Карцова, Д.О. Кирсанов, Т.А. Кучменко, П.Н. Нестеренко, А.В. Паршина, М.А. Проскурнин, И.А. Родин, И.В. Рыбальченко, З.А. Темердашев, П.С. Федотов (ответственный секретарь), Р.Х. Хамизов, Г.И. Цизин, О.А. Шпигун, С.Н. Штыков

Редакционный совет

Ю.А. Золотов (Председатель, Россия),
Р. Апак (Турция), И. Барек (Чехия),
Г.К. Будников (Россия), Б. Бушевский (Польша),
Ван Жанхуа (Китай),
Г. Кристиан (США), В.В. Кузнецов (Россия),
Р. Лобинский (Франция, Польша),
Л.Н. Москвин (Россия), Б.Ф. Мясоедов (Россия),
В. Энгевальд (Германия)

Зав. редакцией **Л.В. Колодяжная**

Адрес редакции: 119991 Москва, ул. Косыгина, 19 ГЕОХИ РАН
тел./факс: +7(495) 9390210/(495)9382054, эл. почта: zhakh@geokhi.ru

Интернет: <http://www.zhakh.ru>

© Российская академия наук, 2024
© Редакция "Журнала аналитической химии" (составитель), 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Том 79, номер 6, 2024

Номер посвящен памяти заведующего кафедрой аналитической химии
Башкирского государственного университета
профессора Валерия Николаевича Майстренко
Редактор-составитель – Г.А. Евтюгин

Вступительное слово 543

ОБЗОРЫ

История развития метода бесконтактной кондуктометрии
Е. А. Юськина, В. В. Панчук, Д. О. Кирсанов 544

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Импедансометрический сенсор на основе N-ацетил-L-цистеина
для оценки активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам
А. В. Еркович, Е. И. Короткова, Е. В. Дорошко, А. Н. Соломоненко, Н. В. Асеева 555

Хроноамперометрическое определение антиоксидантной емкости
с использованием комплекса железа с 2,2'-бипиридином
*Е. Р. Салимгареева, Е. Л. Герасимова, А. В. Карманова,
К. К. Саликова, С. Ю. Сараева, А. В. Иванова* 563

Вольтамперометрический сенсор на основе композита хитозана, графитированной сажи
и полиариленфталида с молекулярными отпечатками для определения кларитромицина
Ю. А. Яркаева, М. И. Назыров, Д. А. Дымова, В. Н. Майстренко 573

Вольтамперометрическое определение левофлоксацина в мясе и молоке
с использованием сенсора на основе электровосстановленного оксида графена
и функционализированного фуллерена
И. А. Абрамов, С. И. Гайнанова, Л. Р. Загитова, В. Н. Майстренко 583

Вольтамперометрические сенсоры на основе мезопористой графитированной сажи
и производных циклопентадиена для определения и распознавания энантиомеров клопидогреля
М. И. Назыров, Ю. А. Перфилова, Я. Р. Абдуллин, П. В. Ковязин, В. Н. Майстренко 591

Вольтамперометрический сенсор на основе карбоксилированных углеродных нанотрубок
и поли(пирогаллолового красного) для определения эвгенола в эфирных маслах
А. Д. Калмыкова, Г. К. Зиятдинова 603

Вольтамперометрическое определение кофеина на электроде, модифицированном пленкой Nafion
и смешанновалентными оксидами иридия, в энергетических напитках
Л. Г. Шайдарова, И. А. Челнокова, Д. А. Коряковцева, Д. А. Кириленко, Г. К. Будников 617

Возможности супрамолекулярной системы на основе гексамолибденовых кластерных комплексов
при определении амитриптилина амперометрическими иммуносенсорами
в моче человека
*Д. В. Брусницын, Э. П. Медянцева, А. Н. Рамазанова, А. В. Прыткова, Э. Р. Каримова, Ю. Г. Елистратова,
А. Р. Мустафина, М. Н. Соколов, С. А. Еремин, Л. И. Мухаметова* 623

Вольтамперометрическое определение потенциального противовирусного лекарственного средства
натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид моногидрата
*П. Н. Можаровская, А. В. Ивойлова, Н. А. Малахова, Р. А. Дрокин,
И. А. Балин, А. Н. Козицина, А. В. Иванова, В. Л. Русинов* 631

Электрохимический ДНК-сенсор на доксорубин на основе композитов оксида графена,
электрополимеризованного Азура А и Метиленового зеленого
А. В. Порфирьева, З. Ф. Хуснутдинова, Г. А. Евтюгин 639

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Идентификация производителей и определение действующих веществ лекарственных средств
цветометрическим методом в ближней ИК-области с использованием смартфона
В. Г. Амелин, О. Э. Емельянов, А. В. Третьяков 653

Определение норфлоксацина методом сенсibilизированной флуоресценции тербия
в присутствии наночастиц серебра и мицелл поверхностно-активных веществ
Т. Д. Смирнова, Е. А. Алябьева, Н. А. Юрасов 668

CONTENTS

V. 79, № 6, 2024

This issue is dedicated to the memory of the Head of the Department of Analytical Chemistry
of the Bashkir State University Prof. Valery Nikolaevich Maistrenko

Editor-Compiler – G.A. Evtyugin

Introductory speech 543

OVERVIEWS

History of development of non-contact conductometry method 544
E. A. Yuskina, V. V. Panchuk, D. O. Kirsanov

ORIGINAL ARTICLES

Impedance sensor based on n-acetyl-l-cysteine for evaluation of antioxidant activity
against hydroxyl radicals 555
A. V. Erkovich, E. I. Korotkova, E. V. Dorozhko, A. N. Solomonenko, N. V. Aseeva

Chronoamperometric determination of antioxidant capacity using iron complex with 2,2'-bipyridine 563
E. R. Salimgareeva, E. L. Gerasimova, A. V. Karmanova, K. K. Salikova, S. Y. Saraeva, A. V. Ivanova

Voltammetric sensor based on a composite of chitosan, graphitized carbon black
and polyarylenephthalide with molecular imprints for the determination of clarithromycin 573
Yu. A. Yarkaeva, M. I. Nazyrov, D. A. Dymova, V. N. Maistrenko

Voltammetric determination of levofloxacin in meat and milk
using a sensor based on electrically reduced graphene oxide and functionalized fullerene 583
I. A. Abramov, S. I. Gainanova, L. R. Zagitova, V. N. Maistrenko

Voltammetric sensors based on mesoporous graphitized carbon black
and cyclopentadiene derivatives for determination and recognition of clopidogrel enantiomers 591
M. I. Nazyrov, Yu. A. Perfilova, Ya. R. Abdullin, P. V. Kovyazin, V. N. Maistrenko

Voltammetric sensor based on carboxylated carbon nanotubes
and poly(pyrogallol red) for determination of eugenol in essential oils 603
A. D. Kalmykova, G. K. Ziyatdinova

Woltamperometric determination of copheine on electrode
modified by nafion film and mixed valent iridium oxides in energy beverages 617
L. G. Shaydarova, I. A. Chelnokova, D. A. Koryakovtseva, D. A. Kirilenko, G. K. Budnikov

Possibilities of a supramolecular system based on hexamolybdenum cluster complexes
in the determination of amitriptyline by amperometric immunosensors in human urine 623
*D. V. Brusnitsyn, E. P. Medyantseva, A. N. Ramazanova, A. V. Prytkova,
E. R. Karimova, Y. G. Elistratova, A. R. Mustafina, M. N. Sokolov, S. A. Eremin, L. I. Mukhametova*

Voltamper-metrical definition of potential protective virus medicine sodium salt
of 3-nitro-4-hydroxy-7-metiltio-4h-[1,2,4]triazolo[5,1-c][1,2,4]triazinide monohydrate 631
*P. N. Mozharovskaya, A. V. Ivoylova, N. A. Malakhova, R. A. Drokin,
I. A. Balin, A. N. Kozitsina, A. V. Ivanova, V. L. Rusinov*

Electrochemical dnc-sensor for doxorubicin based on composites of graphene oxide,
electropolymerized azur a and methylene green 639
A. V. Porfirieva, Z. F. Khusnutdinova, G. A. Evtyugin

ORIGINAL ARTICLES

Identification of manufacturers and determination of active ingredients in medicinal products
using a colorimetric method in the near-ir range with a smartphone 653
V. G. Amelina, O. E. Emelyanova, A. V. Tretyakov

Determination of norfloxacin by sensitized terbium fluorescence in the presence of silver nanoparticles
and surfactant micelles 668
T. D. Smirnova, E. A. Alyabyeva, N. A. Yurasov

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО

В специальный выпуск “Журнала аналитической химии” вошли статьи, посвященные памяти Валерия Николаевича Майстренко, доктора химических наук, профессора, заведующего кафедрой аналитической химии Башкирского государственного университета (г. Уфа), члена-корреспондента АН Республики Башкортостан, заслуженного деятеля науки и техники Республики Башкортостан, члена бюро Научного совета по аналитической химии РАН. Валерий Николаевич Майстренко скоропостижно скончался 17 мая 2023 г. в последний день своего нахождения на должности заведующего кафедрой, переданной его ученику профессору В.Ю. Гуськову.

В.Н. Майстренко активно работал по многим направлениям аналитической химии, включая эколого-аналитический контроль суперэкоксикантов, решение технологических проблем в природоохранной деятельности, применение сорбентов, в том числе для разделения и определения энантиомеров биологически активных соединений. Он создал широко известный в стране научный центр по электроаналитической химии, занимавшийся широким спектром исследований, в том числе связанных с применением хеометрики для анализа многокомпонентных сред, созданием электрохимических

энантиосенсоров, модификацией электродов полимерами и сорбентами. Он является автором многих монографий и учебных пособий в области экоаналитической химии и электроанализа, широко известен благодаря организаторской деятельности, в том числе в связи с проведением конференций и школ по электрохимическим методам анализа.

В специальном выпуске “Журнала аналитической химии” публикуются статьи учеников Валерия Николаевича, продолжающих его дело в Уфимском университете науки и технологий, а также коллег, работающих в различных областях аналитической химии и электроанализа, созвучных делу жизни Валерия Николаевича. География авторов статей выпуска очень широка. Это Московский и Санкт-Петербургский государственные университеты, Уральский и Казанский федеральные университеты, Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Уральский экономический университет, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН. Их публикация – лучшая память о Валерии Николаевиче, знак того, что его дело, идеи и взгляды продолжают жить и развиваться в трудах учеников и последователей.

УДК 543.555

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ МЕТОДА БЕСКОНТАКТНОЙ КОНДУКТОМЕТРИИ

© 2024 г. Е. А. Юськина^a, В. В. Панчук^{a, b}, Д. О. Кирсанов^{a, *}

^aСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии
Университетский просп. 26, Санкт-Петербург, Петергоф, 198504, Россия

^bИнститут аналитического приборостроения Российской академии наук
ул. Ивана Черных, 31–33, Санкт-Петербург, 198095, Россия

*E-mail: d.kirsanov@gmail.com

Поступила в редакцию 01.11.2023 г.

После доработки 27.12.2023 г.

Принята к публикации 27.12.2023 г.

Создание химических сенсорных устройств, работающих в бесконтактном режиме, является актуальной задачей в связи с потребностью различных отраслей промышленности в быстром, простом и недорогом определении химического состава сред неинвазивным способом. Одним из перспективных направлений при разработке аналитических устройств с такими характеристиками является использование высокочастотных электрических сигналов. В обзоре рассматривается эволюция метода высокочастотной бесконтактной кондуктометрии, а также других методов и устройств, работающих на аналогичных физических принципах (диэлектрической спектроскопии, микроволновых сенсоров, С4D-детекторов).

Ключевые слова: электромагнитный сенсор, высокие частоты, кондуктометрия, микроволновые сенсоры, диэлектрическая спектроскопия, С4D детектор.

DOI: 10.31857/S0044450224060017, EDN: tvyoys

В настоящее время происходит бурное развитие отраслей аналитической химии, связанных с разработкой сенсорных устройств, что обусловлено запросом со стороны экономики на быстрое, простое и недорогое определение химического состава различных сред. Химические сенсоры и мультисенсорные системы, разработанные к настоящему времени, нашли широкое применение в медицинской диагностике, в контроле технологических процессов, а также в экологическом мониторинге. Отдельный интерес представляет разработка бесконтактных химических сенсоров, которые позволяли бы получать информацию о химическом составе анализируемых сред без физического контакта чувствительных элементов сенсора с образцом. При создании таких сенсоров (это могут быть оптические химические сенсоры или электрохимические сенсоры) могут применяться различные принципы. Один из таких принципов — использование радиочастотного электромагнитного излучения (~10 кГц–300 ГГц), поскольку источники и регистраторы такого излучения могут быть реализованы на доступной и недорогой компонентной базе.

Такие методы исторически были предложены одними из первых для создания бесконтактных сенсоров, и до сих пор это направление является весьма перспективным.

Одним из первых бесконтактных методов измерений в низкочастотном диапазоне стал метод безэлектродной или бесконтактной кондуктометрии, широко изучавшийся в 1950–60-х гг. [1]. Метод измерения на низких частотах применялся в основном для оценки солености воды и в настоящее время мало востребован [2].

В середине XX в. был предложен другой вариант метода бесконтактной кондуктометрии — высокочастотная бесконтактная кондуктометрия. Устройства работали на высоких частотах (50 кГц/1 МГц–300 МГц), а регистрируемый электрический сигнал сложным образом зависел от проводимости образца, диэлектрической проницаемости, магнитных свойств и емкости цепи. Поскольку аналитический сигнал являлся сложной функцией многих параметров, а также из-за трудностей с математической обработкой данных, эти приборы применялись только для кондуктометрического титрования, где катушка

индуктивности наматывалась на бюретку. Необходимо подчеркнуть, что в ряде работ отмечалось, что с середины прошлого века до 1980-х гг. оба метода редко использовались в аналитической практике [3].

В дальнейшем идеи метода бесконтактной кондуктометрии легли в основу целого ряда экспериментальных подходов, которые сейчас активно используются в аналитической химии. К ним относятся диэлектрическая спектроскопия, микроволновые сенсоры и С4D-детекторы (емкостно-связанный бесконтактный детектор проводимости). В табл. 1 дана их краткая характеристика. Цель данного обзора — обсуждение развития этих методов и их возможностей в аналитической химии.

БЕСКОНТАКТНАЯ КОНДУКТОМЕТРИЯ

Первое описание метода бесконтактной кондуктометрии было дано в отчете об экспериментах, проведенных в 1920 г., “Демонстрация индукционных токов, получаемых в электролитах без электродов” [32].

Существует две частотные области, в которых измерения электропроводности могут проводиться в бесконтактном режиме [3]. В 1947 г. был разработан метод безэлектродной кондуктометрии или низкочастотной кондуктометрии (~20 кГц), при котором измерения проводились без непосредственного контакта электродов с анализируемым раствором [1]. Было показано, что безэлектродный метод дает результаты, идентичные полученным при “классическом” контактном методе кондуктометрии, но без помех, вызванных поляризацией контактирующих электродов.

Устройства состояли из соединенных между собой тороидов генератора и приемника, а генерацию сигнала осуществляли переменным током звуковых частот (рис. 1). Ток, проходящий через тороиды, зависел от проводимости раствора.

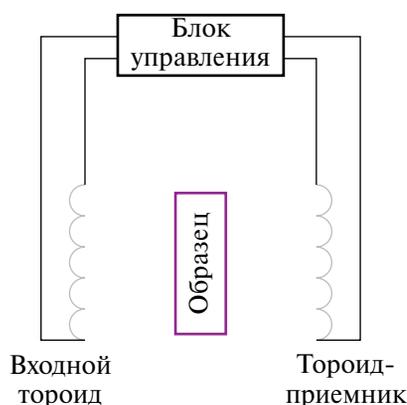


Рис. 1. Общая схема детектора, основанного на методе бесконтактной кондуктометрии.

Наиболее ранние применения данного варианта метода бесконтактной кондуктометрии были связаны с измерением солености воды на различных глубинах океана [2], определением содержания различных электролитов в морской воде [4]. Эти приборы также использовались для определения эквивалентной проводимости растворов солей при высоких концентрациях [5–7] и для мониторинга концентрации азотной кислоты в радиоактивных отходах [8].

Безэлектродный метод измерения электропроводности получил широкое распространение в химической промышленности в 1980-х гг. Этот принцип применялся для определения аналитов в агрессивных средах, поскольку коррозионные, высокотемпературные, насыщенные твердыми частицами, маслами или жирами растворы не мешали измерениям, как в случае контактных детекторов [3]. Так, для измерений методом безэлектродной низкочастотной кондуктометрии применялся детектор, состоящий из двух герметичных тороидов, расположенных в непосредственной близости друг от друга. Один тороид создает электрическое поле в растворе, а другой выступает в роли приемника переменного тока, индуцированного в растворе электролита. Эквивалентную электрическую схему ячейки можно сравнить с преобразователем, в котором тороиды образуют первичную и вторичную обмотки, а сердечник заменен соединительным контуром, который является проводящим раствором. Тороиды покрыты химически стойким фторопластом или другим термостойким непроводящим материалом. Преимущество этого метода заключается в том, что любые осадки, прилипающие к стенкам детектора, практически не влияют на измеряемую проводимость. Заметное изменение проводимости раствора может возникнуть лишь в том случае, если осадки вытеснят значительный объем анализируемого раствора.

Недостатками метода безэлектродной низкочастотной кондуктометрии являются размер детектора и большой объем пробы. Самый маленький безэлектродный детектор, разработанный к 1985 г., имеет диаметр около 3.6 см, а объем раствора должен составлять несколько сотен миллилитров; для детектора диаметром ~9 см требуются литры анализируемого раствора [3].

ВЫСОКОЧАСТОТНАЯ БЕСКОНТАКТНАЯ КОНДУКТОМЕТРИЯ

Другим вариантом метода бесконтактной кондуктометрии является высокочастотная кондуктометрия (область частот, измеряемых в мегагерцах), также называемая осциллографией, которая широко изучалась в 1952–1965 гг. [9]. В варианте высокочастотной кондуктометрии электроды имеют форму металлических листов

Таблица 1. История развития метода бесконтактной кондуктометрии

| Метод | Годы | Применение | Литература |
|--|--------------------------|---|------------|
| Бесконтактная кондуктометрия | 1940–1960 | Оценка солености воды на различных глубинках океана | [2] |
| | | Определение различных электролитов в морской воде | [4] |
| | | Определение эквивалентной проводимости солей при высоких концентрациях | [5–7] |
| | | Мониторинг концентрации HNO_3 в радиоактивных отходах | [8] |
| | 1980-е | Определение аналитов в агрессивных средах | [3] |
| Высокочастотная бесконтактная кондуктометрия | 1950-е (осциллография) | Определение солесодержания природной воды | [9] |
| | | Кондуктометрическое титрование: кислотно-основное титрование, осадительное титрование, комплексометрическое титрование, окислительно-восстановительное титрование | [9–11] |
| | | Использование в хроматографии при измерении обменной емкости колонок, заполненных ионообменниками | [9] |
| Микроволновые сенсоры | с 1990 | Определение молекулярных структур и дипольных моментов | [12] |
| | | Анализ и контроль качества питьевой воды в режиме реального времени | [13] |
| | | Выявление загрязнения поверхностных вод | [14] |
| | | Определение $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, NaNO_3 , KNO_3 в воде | [15] |
| | | Определение NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 , Na_2CO_3 в водных растворах | [16, 17] |
| | | Определение содержания глюкозы | [18] |
| | | Анализ многокомпонентных двухфазных смесей | [19] |
| | | Биомедицинские применения, | [20] |
| Диэлектрическая спектроскопия | 1980-е – настоящее время | Анализ клеточных культур и микроорганизмов | [21, 22] |
| | | Приборы для контроля качества пищевых продуктов | [23, 24] |
| С4D детектор | 1998 – настоящее время | Определение катионов с помощью КЭ-С4D технологии | [25–27] |
| | | Определение анионов с помощью КЭС4D технологии | [28] |
| | | Микрофлюидное бумажное аналитическое устройство | [29, 30] |
| | | Электрический датчик роста бактерий с помощью детектора С4D | [31] |

или полос на внешней стороне ячейки, которую изготавливают из изоляционного материала, например стекла. Либо образец в стеклянном сосуде помещают внутрь индукционной катушки, которая является частью цепи (рис. 2). Стекло в этом случае играет роль диэлектрика в конденсаторе. Сопротивление конденсатора на высокой частоте настолько низкое, что переменный ток свободно проходит в образец, и регистрируемый сигнал становится сложной функцией сопротивления раствора, его диэлектрической проницаемости и емкости цепи.

Как уже отмечалось, при всей своей простоте и удобстве метод высокочастотной бесконтактной кондуктометрии ранее активно не использовался

в аналитической химии [3]. Это связано прежде всего с тем, что сигнал детектора зависел не только от электропроводности, но и от магнитных, емкостных и диэлектрических свойств образца. Точность оценки электропроводности в этом случае снижалась из-за отсутствия математических способов учета этих влияний, метод применялся в основном для кондуктометрического титрования. Однако в середине XX века было проведено несколько экспериментов по изучению возможностей данного метода.

Во-первых, экспериментально было показано, что эффективная полная электропроводность и емкость изолированной ячейки, содержащей раствор электролита, изменяются как с концен-



Рис. 2. Общая схема детектора, основанного на методе высокочастотной бесконтактной кондуктометрии.

трацией, так и с частотой. Это позволило получить спектр: частотную зависимость аналитического сигнала от набора различных факторов, включая проводимость и диэлектрическую проницаемость. Кроме того, были проведены эксперименты по изучению зависимости частоты от концентрации электролита. Экспериментально показано, что такая зависимость имеет S-образную форму, что связано с изменением диэлектрической проницаемости раствора. Кроме того, экспериментально установлено, что отклик высокочастотного детектора зависит только от удельного сопротивления раствора и изменений, происходящих в растворе, и не зависит от типа электролита. Этот факт подтвержден с тремя различными типами электролитов: NaCl , BaCl_2 , $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [10, 33].

Таким образом, несмотря на сложность получаемого сигнала, в те годы было проведено множество экспериментов по выяснению факторов, влияющих на аналитический сигнал, и найдены некоторые практические применения этого метода.

В 1952 г. опубликована работа [34] по определению содержания воды в спиртах методом высокочастотной кондуктометрии. Предложен бесконтактный датчик на основе катушки индуктивности, подключенной к генератору высокочастотного электрического поля на частоте ~ 6 кГц. Наиболее точные результаты получены для системы $\text{EtOH}-\text{H}_2\text{O}$. Предложенный метод рекомендован для рутинного применения в производстве спирта [34].

Авторы работы [9] описали ряд применений метода высокочастотной кондуктометрии в хро-

матографии, например для измерения обменной емкости колонок с ионообменниками, для оценки поверхности пятен в бумажной хроматографии и при определении содержания природных вод. Метод высокочастотной кондуктометрии также может применяться для определения конечной точки титрования в методе кислотно-основного, осадительного, комплексонометрического и окислительно-восстановительного титрования. Высокочастотное кондуктометрическое титрование можно применять для определения кислот и оснований Льюиса (например, NH_4Cl или SnCl_4) в органических средах в ацетонитриле и бензоле [11].

В работе [35] предложена классификация методов кондуктометрического высокочастотного титрования, основанная на измеряемых параметрах. В соответствии с этой классификацией можно выделить три группы методов:

- приборы, отклик которых зависит от изменения высокочастотной проводимости или диэлектрических потерь;
- устройства, в которых происходит изменение емкости и на основании этого возникает аналитический сигнал;
- приборы, которые дают сигнал, зависящий как от емкости, так и от высокочастотной проводимости.

МИКРОВОЛНОВЫЕ СЕНСОРЫ

Одно из новых направлений исследований, в котором используются идеи метода высокочастотной бесконтактной кондуктометрии, — микроволновые сенсоры. Устройства работают в микроволновом диапазоне частот. Их принцип действия основан на определении свойств молекулы в результате ее взаимодействия (поглощения, пропускания, отражения, рассеяния) с электромагнитными волнами в диапазоне частот от 300 МГц до 300 ГГц. Любое изменение геометрической структуры или типа молекулы приводит к изменению проницаемости материала и, соответственно, спектра микроволнового излучения. Метод применим для изучения твердых тел, жидкостей, газов и суспензий [12, 36, 37].

Традиционно микроволновая спектроскопия используется для определения молекулярных структур и дипольных моментов, однако метод имеет некоторые области применения и в аналитической химии. Стоит отметить, что микроволновые сенсоры для количественного анализа веществ имеют ряд преимуществ: неdestructивность, низкую стоимость приборов, высокую чувствительность и возможность измерений в режиме онлайн. В работе [13] предложены сенсоры на основе микроволнового излучения для контроля качества питьевой воды в режиме реального времени. Авторы работы [14] описывают ми-

кроволюнный сенсор, работающий в диапазоне частот 200–2000 МГц, для обнаружения загрязнения поверхностных вод в режиме реального времени. Экспериментальная установка состояла из генератора и приемника излучения, усилителя мощности и векторного анализатора цепей. Показано, что система дает различный отклик на чистую воду и растворы $ZnSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ в диапазоне концентраций 2–4 мг/л.

В работе [38] рассмотрено применение гибкого микроволнового сенсора, работающего в диапазоне частот 1–15 ГГц, для анализа качества воды. Авторы получили спектры водных растворов неорганических солей: $CuCl$, $MnCl_2$, KCl в сантиметри и децимолярном диапазоне концентраций и показали, что каждый образец имеет уникальный отклик на микроволновый сигнал. При этом процедура измерения предполагает проведение анализа в непрерывном режиме. Схожий принцип использован для определения примесей серебра ($AgCl/Ag_2O$) в водной суспензии в работе [39]. Несмотря на то, что практическая значимость этого исследования не вполне очевидна, авторы показали зависимость аналитического сигнала от размера частиц в анализируемом растворе. В работе [40] предложен микроволновый датчик на основе копланарного волновода с электрическим колебательным контуром, реализованным в виде встречно-штыревого конденсатора. Устройство позволяет получать спектры PO_4^{3-}/NO_3^- в диапазоне частот от 1 до 5 ГГц, диапазон рабочих концентраций сенсора составляет 0–1000 мг/л.

Микроволновые сенсоры могут применяться в качестве детектирующих элементов в микрофлюидных устройствах. В работе [15] исследовалась возможность использования бесконтактного сенсора на частоте 500 МГц в сочетании с хемометрической обработкой данных для определения неорганических солей в водных растворах. Датчик состоял из спирального индуктора и конденсатора. Такой подход использован для определения содержания $Pb(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Ca(NO_3)_2$, $Mg(NO_3)_2$, $NaNO_3$ и KNO_3 в диапазоне 0–100 мМ. В работах [16, 17] описан бесконтактный планарный микроволновый сенсор, работающий в диапазоне частот 0.5 ГГц–2.2 ГГц, для обнаружения $NaCl$, KCl , $MgCl_2$, $CaCl_2$, Na_2CO_3 в водных растворах. Предложенный сенсор пригоден для обнаружения неорганических солей в диапазоне концентраций от 4 до 20 мас.%. Кроме того, данный сенсор в сочетании с методом главных компонент позволил различить неорганические и органические вещества в растворах. Эти же авторы разработали микроволновый сенсор для неинвазивного измерения уровня глюкозы в водных растворах в диапазоне концентраций 0–150 мг/дл [18]. Сенсор выполнен на основе планарного встречно-штыревого конденсатора, оснащенного резонатором с разрезным кольцом

(HCSRR – hexagonal complementary split-ring resonator). Предложенный микроволновый сенсор работает в диапазоне частот 1–5 ГГц и имеет довольно простую конструкцию.

В литературе имеется мало сведений о применении подобных сенсорных устройств для анализа сложных многокомпонентных реальных объектов. Однако, например, в работе [19] показаны возможности микроволнового резонаторного сенсора в анализе двухфазных смесей, состоящих из несмешивающихся жидкостей. Предложенный сенсор применяли для определения содержания воды в нефти, когда жидкости не эмульгированы и образец существует в виде двухфазной системы. Устройство работает в диапазоне частот 1.5–10 ГГц, при этом обрабатывается многомерный спектр (сдвиг частот различных гармоник резонатора) вместо использования только одной резонансной частоты, как это принято при работе с “классическими” микроволновыми сенсорами. В обзоре [20] рассмотрены некоторые биомедицинские приложения электромагнитных резонансных сенсоров, такие как мониторинг роста бактерий, определение жизнеспособных/нежизнеспособных клеток, обнаружение чередования буферного раствора и клеток в микрофлюидных каналах, анализ мышечной ткани, мониторинг гемодинамики. Биологические ткани прозрачны для излучения радиочастотного диапазона, поэтому применение этой технологии в определенных областях достаточно эффективно.

В работе [41] показано применение микроволновой спектроскопии (рабочий диапазон частот сенсора 100 МГц–40 ГГц) для определения содержания мочевины/воды в молоке, поскольку добавление мочевины является одним из способов фальсификации коровьего молока. Предполагается, что большое количество воды в коровьем молоке может взаимодействовать с мочевиной, образуя кластеры вода–мочевина, что приводит к изменению диэлектрической проницаемости молока.

ДИЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

На основе физических принципов, аналогичных методу высокочастотной бесконтактной кондуктометрии, работает метод диэлектрической спектроскопии, в котором анализируется изменение диэлектрической проницаемости образцов на различных частотах переменного электрического тока (рис. 3). Метод применяется для изучения свойств неорганических солей в водных растворах, для создания биосенсоров и сенсоров для контроля качества пищевых продуктов. Так, авторы работы [23] разработали сенсор для определения классов качества свиного мяса. Проведена оценка применимости диэлектрических спектров для определения классов качества мяса

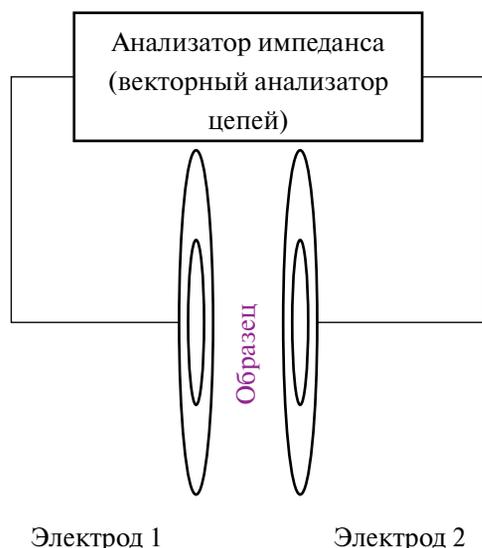


Рис. 3. Общая схема экспериментальной установки для реализации метода диэлектрической спектроскопии.

(PSE/ Pale, Soft and Exudative – бледное, мягкое и эксудативное, DFD/ Dark, Firm and Dry – темное, твердое и сухое, RFN/ Red Firm and Non-exudative – красное твердое и неэксудативное) в мышцах умерших свиней. Авторами получены диэлектрические спектры в диапазоне 100 Гц–0.4 МГц. Показано, что диэлектрические свойства мяса в процессе старения отличаются для разных классов качества мяса. Также показано, что для получения аналитической информации можно пользоваться только некоторыми частотами из спектра (140 Гц, 500 Гц и 300 кГц).

В работе [24] продемонстрировано применение диэлектрической спектроскопии для определения начала различных стадий молочнокислого свертывания молока с помощью коммерчески доступного векторного анализатора цепей (VNA/ Vector Network Analyzer), работающего в диапазоне частот 100 МГц–20 ГГц. Подобные анализаторы используются для генерации переменного тока различных частот и в других аналогичных методах. Следует отметить относительно высокую стоимость оборудования для реализации метода.

Ряд работ в области диэлектрической спектроскопии направлен на исследование бактерий и клеток. Для биологических проб зависимость аналитического сигнала от диэлектрической проницаемости среды имеет сложный характер. Электрические свойства анализируемой среды можно охарактеризовать, как правило, двумя параметрами: диэлектрической проницаемостью (ϵ) и проводимостью (σ). На частотах < 1 ГГц электрические свойства ионных растворов не зависят от частоты, и могут быть оценены путем измерения емкости C и проводимости G образца, удер-

живаемого между двумя плоскопараллельными электродами площадью A , разделенными расстоянием d . В отличие от простых ионных растворов, электрические свойства биологических клеток и микробных суспензий сильно зависят от частоты: их диэлектрическая проницаемость увеличивается, а проводимость уменьшается при уменьшении частоты, при которой проводятся измерения. Это связано с тем, что потенциал в электрическом поле либо накапливается, либо теряется, т.е. проводимость и диэлектрическая проницаемость взаимосвязаны [21].

В случае если электрические свойства вещества сильно зависят от частоты, то такое явление называют диэлектрической дисперсией. Согласно данным [42–44], биологические клетки, включая микроорганизмы, в целом обладают тремя основными дисперсиями в диапазоне от 0 Гц до 1 ГГц, известными как α , β , γ , δ -дисперсии:

- α -дисперсия обусловлена тангенциальным потоком ионов через поверхности клеток;
- β -дисперсия возникает в результате накопления заряда на клеточных мембранах из-за эффекта Максвелла–Вагнера;
- δ -дисперсия связана с вращением боковых цепей макромолекул и “связанной” воды;
- γ -дисперсия обусловлена дипольным вращением малых молекул, особенно воды.

Биологические материалы могут демонстрировать довольно большие дисперсии, особенно на низких частотах [21].

Простейшая интерпретация метода диэлектрической спектроскопии основана на оценке величины β -дисперсии в радиочастотном диапазоне. Клетки ведут себя как крошечный конденсатор, и сигнал таких сенсоров линейно коррелирует с объемной долей биомассы: чем больше концентрация биологического материала, тем меньше проводимость (G) среды и больше емкость цепи (C). Увеличение макроскопической емкости связано с тем, что электрические заряды не могут пересечь клеточную мембрану в диапазоне низких частот из-за изоляции проводящей цитоплазмы. На значения получаемого аналитического сигнала (т.е. изменение β -дисперсии) могут оказывать влияние и другие процессы, связанные со строением клетки: поступательное и вращательное движения мембранных липидов и белков, наличие двойных электрических слоев, возникающих на поверхности клетки. Тем не менее считается, что диэлектрические свойства биологических клеток в радиочастотном диапазоне определяются лишь зарядом “статической” емкости относительно ионопроницаемой клеточной мембраны [21].

Подобный подход, основанный на методе высокочастотной диэлектрической спектроскопии, применен в 2018 г. для классификации двух типов бактерий: *Bacillus Subtilis* (грамположительная

бактерия) и *E. coli* (грамотрицательная бактерия) [22]. В работе для генерации сигнала использовался коммерческий мультиметр Agilent E8362B. Прибор работал в диапазоне частот от 0.01 Гц до 20 ГГц, а в области частот от 14 до 18 ГГц наблюдались видимые различия в спектрах для двух типов бактерий. Различия в спектрах обусловлены отличающимися электропроводностями для грамположительных и грамотрицательных бактерий. Поверхность бактериальных клеток содержит полисахариды и гликопротеины S-слоя, в то время как их клеточные мембраны обладают липидными бислоями с характерной электрофизиологией, обусловленной наличием воды в различных связанных формах (δ , γ -дисперсии). Основной причиной более высокой электропроводности у грамположительных бактерий является их выступающая клеточная стенка и отсутствие внешнего слоя липидной мембраны [45]. Электропроводность грамположительных и отрицательных бактерий может варьироваться в зависимости от их формы, состава и геометрии каждого субклеточного слоя, где они получают возможность для селективной поляризации. Помимо типа бактерий, на аналитический сигнал влияет также размер/форма самой бактерии. Размер *E. coli* составляет примерно 0.50–2.00 μm , а *B. subtilis* — 1.00–10.0 μm [45]. Приведенные выше параметры могут быть использованы в качестве маркеров для простого и быстрого распознавания различных видов бактерий.

Диэлектрическая спектроскопия имеет ряд преимуществ перед традиционными оптическими методами определения количества бактерий (помимо возможности бесконтактного обнаружения). Закон Бугера—Ламберта—Бера дает некорректные результаты для определения биологических клеток при концентрациях более ~ 1 мг/мл, в то время как значения высокочастотной проницаемости линейно зависят от концентрации клеток в диапазоне до 100 мг/мл. Анализ бактерий методом молекулярной спектрофотометрии в мутных или окрашенных растворах также приводит к некорректному определению оптической плотности, т.е. этот метод, в отличие от диэлектрической спектроскопии, не подходит, например, для изучения влияния наночастиц на рост бактерий. Кроме того, метод диэлектрической спектроскопии можно применять для получения кривых роста бактерий и отслеживания гибели клеток в культуральной среде после химических, гидродинамических и других бактериальных стрессов. Подход основан на различии диэлектрических свойств жизнеспособных и мертвых клеток, возникающем после воздействия на бактериальную культуру. Живые клетки имеют неповрежденные мембраны, и поэтому их собственная проводимость обычно выше, чем у мертвых клеток [46].

Заметным недостатком микроволновых сенсоров и диэлектрической спектроскопии является использование частот в гигагерцовом диапазоне, требующих дорогостоящих векторных анализаторов цепей и анализаторов импеданса. Преимуществом является применение для анализа информационно насыщенного гигагерцового диапазона частот.

C4D ДЕТЕКТОРЫ

В 1998 г. [47, 48] двумя независимыми научными группами разработана технология C4D (емкостно-связанный бесконтактный детектор проводимости, capacitively coupled contactless conductivity detection). Обычно технология C4D используется в трубчатой конструкции, где два электрода располагаются вокруг измерительной ячейки (например, стеклянного капилляра или полимерной трубки) с небольшим зазором и не находятся в непосредственном контакте с исследуемым раствором (рис. 4). Переменное напряжение подается на первый электрод, а второй служит приемником для генерируемого переменного тока. В настоящее время C4D-детекторы применяются в качестве детекторов в капиллярном электрофорезе (КЭ) для определения различных ионов. Так, например, в работе [25] показаны возможности технологии КЭ-C4D для определения катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} и K^{+} в биодизельном топливе с пределами обнаружения в диапазоне от 0.06 до 0.6 мг/л. В работе [49] продемонстрировано применение аналогичной технологии для определения шести различных неорганических и органических катионов (K^{+} , Na^{+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^{+} , $[\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3]^{+}$) в реальных объектах анализа: трех биодизельных топливах и маслах с пределами обнаружения в диапазоне 0.001–0.005 мг/л. Авторы работы [26] показали применимость КЭ-C4D для одновременного определения 14 редкоземельных элементов (РЗЭ) с пределами обнаружения около 0.24 мг/л. В работе [27] исследована первая полностью автоматизированная

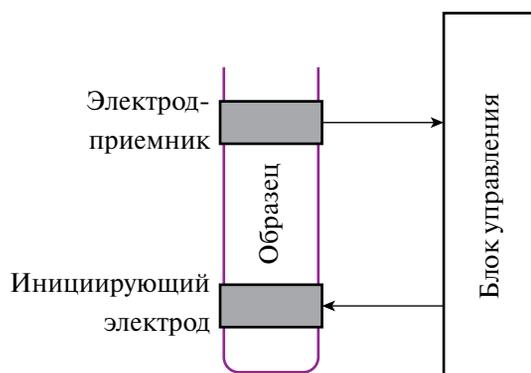


Рис. 4. Общая схема C4D-детектора.

система капиллярного электрофореза на основе бесконтактного кондуктометрического детектирования для определения Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} в микромолярных концентрациях. Также показано, что данная концепция применима и для определения неорганических анионов в реальных объектах анализа. Так, пять анионов (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , F^- , HCOO^-) были определены с помощью КЭ-С4D в оливковом масле с пределом обнаружения от 0.01 до 0.7 мг/кг [28].

В последнее время этот тип сенсоров широко применяется для решения и других аналитических задач. В работе [50] продемонстрировано микрофлюидное определение NaCl в водных растворах с помощью технологии С4D. Авторы описали сенсорное устройство, которое определяет проводимость анализируемого раствора в микрофлюидном потоке на основе сдвига резонансной частоты. Устройство работает за счет взаимной индуктивной связи между считывающей катушкой и индуктором. Результаты экспериментов показали, что детектор хорошо работает в диапазоне концентраций 0.01–1 М.

В исследовании [29] представлена разработка бесконтактного сенсора проводимости с емкостной связью, изготовленного на печатной плате, в качестве детектора для бумажных микрофлюидных устройств. Авторы объединяют два перспективных направления аналитической химии: бесконтактные сенсорные устройства и их миниатюризацию. Устройство нашло применение для определения сульфита в соках и винах. Для измерения электропроводности на верхнюю часть С4D-детектора помещают полоску обычной бумаги (20 × 25 мм), на которую затем дозируют небольшой объем аналита (100 мкл). Аналогичный принцип применяли для контроля поглощения газа влажной бумагой с целью определения содержания карбонатов в цементном порошке [30].

В работе [31] предложен автоматический электрический датчик роста бактерий (EBGS — electrical bacterial growth sensor) на основе С4D-детектора. Авторами получена зависимость нормированного значения кажущейся проводимости от времени инкубации, показано влияние токсических и стрессовых воздействий химических веществ на рост бактериальных культур. Данная технология может быть актуальной во многих областях: медицинские исследования, клиническая диагностика, биотехнологическая промышленность и экологический мониторинг.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ОБРАБОТКИ МНОГОМЕРНЫХ ДАнных В ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ КОНДУКТОМЕТРИИ

В связи со сложной природой регистрируемых сигналов в высокочастотных электрических полях

и их зависимостью от многочисленных свойств образца (проводимости, диэлектрической проницаемости, емкостных и магнитных свойств и т.д.) применение многомерных методов обработки данных представляется перспективным направлением для этих методов. Это может способствовать извлечению более ценной аналитической информации из одних и тех же инструментальных сигналов и привести к решению более сложных аналитических задач. Действительно, ряд исследований подтверждает это утверждение. В работе [51] сочетались хемометрическая обработка данных и микроволновые диэлектрические спектры при анализе состава пищевых продуктов. Детектор позволял определять содержание воды, белка, NaCl и фосфора в различных пищевых продуктах: курице, свинине, креветках, треске, рыбных смесях, сельди. Детектор работал в диапазоне частот от 0.2 до 12 ГГц, а при обработке данных использовали сигналы на 31 различной частоте. В работе [52] продемонстрировано успешное сочетание диэлектрической спектроскопии и хемометрики для обнаружения фальсификации виноградного сиропа. Устройство работало в диапазоне частот 0–150 МГц и оказалось способным обнаруживать различные фальсификаты, такие как финиковый сироп, виноградная паста, смесь водных растворов сахаров, на основе различий в их диэлектрической проницаемости. Для предварительной обработки данных применяли метод главных компонент, позволяющий кластеризовать различные классы фальсификатов. Далее классифицировали фальсификаты с использованием метода опорных векторов и линейного дискриминантного анализа, что дало 100%-ную точность. В работе [53] описано определение доли нефти в эмульсиях типа “масло-в-воде” с различным содержанием солей с помощью диэлектрической спектроскопии (0.2–6 ГГц) в сочетании с хемометрической обработкой данных. В различных смесях “масло-в-воде” удалось оценить содержание неорганических солей в диапазоне концентраций 0.17–5 М. В нашей работе [54] этот подход получил дальнейшее развитие; было предложено простое и недорогое устройство на основе катушки индуктивности, работающее в диапазоне 2–112 МГц и имеющее множество возможных аналитических применений. Детектор — своеобразный гибрид высокочастотной бесконтактной кондуктометрии и упрощенной диэлектрической спектроскопии. Измерительной ячейкой служит катушка индуктивности, намотанная на дно стандартной центрифужной пробирки, что позволяет проводить быстрые бесконтактные измерения. Регистрируемый сигнал зависит от диэлектрической проницаемости, магнитных свойств, емкости, поляризуемости и проводимости образца. Многомерная обработка данных позволила определять содержание неорганических солей в водном растворе,

определять физические свойства органических соединений (дипольный момент), количественно оценивать интегральные показатели качества (содержание жира в молоке, %), распознавать сложные биологические среды, содержащие различные культуры бактерий и раковых клеток.

Такая комбинация методов высокочастотных электрических сенсоров с обработкой многомерных данных представляется весьма перспективной и может позволить решить некоторые сложные аналитические задачи простым и изящным способом.

* * *

Идеи высокочастотных бесконтактных измерений применительно к химическому анализу, впервые высказанные в середине XX в., сегодня преобразовались в несколько быстро развивающихся направлений исследований: микроволновые сенсоры, методы диэлектрической спектроскопии и С4D-детекторы. Каждое направление имеет свои особенности, но всех их объединяет возможность бесконтактных измерений, широко востребованная в современной аналитической химии. С помощью подобных устройств в настоящее время предложены способы анализа самого широкого круга объектов: водные растворы, биологические культуральные среды, многофазные системы, биологические ткани. Возможности современной компонентной базы микроэлектроники и методов обработки данных способствуют развитию новых аналитических приложений этого класса анализаторов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-23-00114.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Relis M.* An Electrodeless Method for Measuring the Low-Frequency Conductivity of Electrolytes. M.S. Thesis. Cambridge: Mass. Institute of Technology, 1947.
2. *Brown N.L., Hamon B.V.* An inductive salinometer // *Deep Sea Res.* 1961. V. 8. P. 65. [https://doi.org/10.1016/0146-6313\(61\)90015-6](https://doi.org/10.1016/0146-6313(61)90015-6)
3. *Light T.S.* Electrodeless conductivity / *Electrochemistry, Past and Present.* United States: ACS Symposium Series, 1989. V. 390. P. 429. <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0390.ch029>
4. *Park K.*, Partial equivalent conductance of electrolytes in sea water // *Deep Sea Res.* 1964. V. 11. P. 729. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(64\)90946-5](https://doi.org/10.1016/0011-7471(64)90946-5)
5. *Calvert R., Cornelius J.A., Griffiths V.S., Stock D.I.* The determination of the electrical conductivities of some concentrated electrolyte solutions using a transformer bridge // *J. Phys. Chem.* 1958. V. 62. P. 47. <https://doi.org/10.1021/j150559a013>
6. *Lavagnino B., Alby B.* Differential transformer for resistance measurements // *Ann. Chim.* 1959. V. 49. P. 1272.
7. *Gupta S.R., Hills, G.J. J.* A precision electrode-less conductance cell // *Sci. Instrum.* 1956. V. 33. P. 313.
8. *Johnson C.M., Hart G.E.* Improved electrodeless toroidal conductivity analyzer // *Anal. Instrum.* 1967. V. 4. P. 23.
9. *Pungor E.* Conductometry and oscillometry // *J. Electroanal. Chem.* 1962. V. 3. P. 289. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(62\)85022-0](https://doi.org/10.1016/0022-0728(62)85022-0)
10. *Hall J. L.* High-frequency titration theoretical and practical aspects // *Anal. Chem.* 1952. V. 28. № 8. P. 1240. <https://doi.org/10.1021/ac60068a002>
11. *Hitchcock E.T., Elving P.J.* Lewis acid-base titrations employing megacycle-frequency oscillators: Titration involving stannic chloride in acetonitrile and benzene solution // *Anal. Chim. Acta.* 1963. V. 28. P. 301. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)87237-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)87237-2)
12. *Ateeq M., Wylie S., Al-Shammaa A., Al-Nageim H.* Microwave spectroscopy: A potential technique to analyse bitumen dielectric and physical properties // *Meas. Sci. Technol.* 2012. V. 23. Article 085503. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/23/8/085503>
13. *Yaroshenko I., Kirsanov D., Marjanovic M., Lieberzeit P.A., Korostynska O., Mason A., et al.* Real-time water quality monitoring with chemical sensors // *Sensors.* 2020. V. 20. P. 1. <https://doi.org/10.3390/s20123432>
14. *Tang P., Zhao L., Ren L., Zhao Z., Yao Y.* Real time monitoring of surface water pollution using microwave system // *J. Electromagn. Waves Appl.* 2008. V. 22. P. 767. <https://doi.org/10.1163/156939308784159570>
15. *Liang Y., Ma M., Zhang F., Liu F., Lu T., Liu Z., Li Y.* Wireless microfluidic sensor for metal ion detection in water // *ACS Omega.* 2021. V. 6. P. 9302. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00941>
16. *Harnsoongnoen S., Wanthong A.* A non-contact planar microwave sensor for detection of high-salinity water containing NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ and Na₂CO₃ // *Sens. Actuators B.* 2021. V. 331. Article 129355. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129355>
17. *Harnsoongnoen S., Wanthong A., Charoen-In U., Siritaratiwat A.* Planar microwave sensor for detection and discrimination of aqueous organic and inorganic solutions // *Sens. Actuators B.* 2018. V. 271. P. 300. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.077>
18. *Harnsoongnoen S., Buranrat B.* Advances in a microwave sensor-type interdigital capacitor with a hexagonal complementary split-ring resonator for glucose level measurement // *Chemosensors.* 2023. V. 11. P. 257. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11040257>

19. *Baghelani M., Hosseini N., Daneshmand M.* Non-contact real-time water and brine concentration monitoring in crude oil based on multi-variable analysis of microwave resonators // *Measurement*. 2021. V. 177. Article 109286. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.109286>
20. *Carr A.R., Chan Y.J., Reuel N.F.* Contact-Free, Passive, electromagnetic resonant sensors for enclosed biomedical applications: A perspective on opportunities and challenges // *ACS Sens.* 2023. V. 8. P. 943. <https://doi.org/10.1021/acssensors.2c02552>
21. *Markx G.H., Davey C.L.* The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: Applications in biotechnology // *Enzyme Microb. Technol.* 1999. V. 25. P. 161. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00008-3)
22. *Russel M., Sophocleous M., JiaJia S., Xu W., Xiao L., Maskow T., et al.* High-frequency, dielectric spectroscopy for the detection of electrophysiological/biophysical differences in different bacteria types and concentrations // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1028. P. 86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.045>
23. *Castro-Giráldez M., Botella P., Toldrá F., Fito P.* Low-frequency dielectric spectrum to determine pork meat quality // *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2010. V. 11. P. 376. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.01.011>
24. *Harindran A., Madhurima V.* On the efficacy of dielectric spectroscopy in the identification of onset of the various stages in lactic acid coagulation of milk // *J. Microw. Power Electromagn. Energy.* 2020. V. 54. P. 161. <https://doi.org/10.1080/08327823.2020.1755484>
25. *Nogueira T., do Lago C.L.* Determination of Ca, K, Mg, Na, sulfate, phosphate, formate, acetate, propionate, and glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection // *Microchem. J.* 2011. V. 99. P. 267. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.05.014>
26. *Nguyen T.A.H., Nguyen V.R., Le D.D., Nguyen T.T.B., Cao V.H., Nguyen T.K.D., et al.* Simultaneous determination of rare earth elements in ore and anti-corrosion coating samples using a portable capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1457. P. 151. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.050>
27. *Drevinskas T., Mora M.F., Ferreira Santos M.S., Noell A.C., Willis P.A.* Submersible capillary electrophoresis analyzer: A proof-of-concept demonstration of an in situ instrument for future missions to ocean worlds // *Anal. Chem.* 2023. V. 95. № 27. P. 10249. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00572>
28. *Travassos Lemos M.A., Cassella R.J., de Jesus D.P.* A simple analytical method for determining inorganic anions and formate in virgin olive oils by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection // *Food Control.* 2015. V. 57. P. 327. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.026>
29. *Fukana N., Sonsa-ard T., Chantipmanee N., Hauser P.C., Wilairat P., Nacapricha D.* Contactless conductivity sensor as detector for microfluidic paper-based analytical device with application to unique rapid method for quantifying sulfite preservative // *Sens. Actuators B.* 2021. V. 339. Article 129838. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129838>
30. *Sonsa-ard T., Chantipmanee N., Fukana N., Hauser P.C., Wilairat P., Nacapricha D.* Contactless conductivity sensor employing moist paper as absorbent for in-situ detection of generated carbon dioxide gas // *Anal. Chim.* 2020. V. 1118. P. 44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.044>
31. *Zhang X., Jiang X., Yang Q., Wang X., Zhang Y., Zhao J., et al.* Online monitoring of bacterial growth with an electrical sensor // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. P. 6006. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01214>
32. *Piccard A., Frivold A.* Demonstration de courants d'induction produits sans électrodes dans électrolyte // *Archives des Sciences Physiques et Naturelles.* 1920. V. 5. № 2.
33. *Forman J., Crisp D.* The radio-frequency absorption spectra of solutions of electrolytes // *Trans. Faraday Soc.* 1946. V. 42. P. 186. <https://doi.org/10.1039/TF946420A186>
34. *West P.W., Senisei P., Burkhalter T.S.* Determination of water in alcohols by means of high-frequency oscillators // *Anal. Chem.* 1952. V. 28. № 8. P. 1250. <https://doi.org/10.1021/AC60068A006>
35. *Reilley C.N., Mccurdy W.H. JR.* Principles of high frequency titrimetry // *Anal. Chem.* 1953. V. 25. № 1. P. 86. <https://doi.org/10.1021/ac60073a014>
36. *Mason A., Wylie S., Korostynska O., Cordova-lopez L. E., Al-Shamma'a A. I.* Flexible e-textile sensors for realtime health monitoring at microwave frequencies // *Int. J. Smart Sens. Intell. Syst.* 2014. V. 7. № 1. P. 31. <https://doi.org/10.21307/ijssis-2017-644>
37. *Goh J.H., Mason A., Al-Shamma'a A.I., Field M., Browning P.* Lactate detection using microwave spectroscopy for in situ medical applications // *Int. J. Smart Sens. Intell. Syst.* 2011. V. 4. № 3. P. 338. <https://doi.org/10.21307/ijssis-2017-443>
38. *Korostynska O., Mason A., Al-Shamma'a A.I.* Flexible microwave sensors for real-time analysis of water contaminants // *J. Electromagn. Waves Appl.* 2013. V. 27. № 16. P. 2075. <https://doi.org/10.1080/09205071.2013.832393>
39. *Ateeq M., Shaw A., Garrett R., Dickson P.* A proof of concept study on utilising a non-invasive microwave analysis technique to characterise silver based materials in aqueous solution // *Sens. Imaging.* 2017. V. 18. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11220-017-0162-y>
40. *Harnsoongnoen S., Wanthong A., Charoen-In U., Siritaratiwat A.* Microwave sensor for nitrate and phosphate concentration sensing // *IEEE Sens. J.* 2019. V. 19. P. 2950. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2018.2890462>
41. *Zhao K., Liu Y., Zhang Q.* Dielectric behavior of adulterated milk with urea and water // *J. Mol. Liq.* 2019. V. 273. P. 37. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.09.133>

42. *Harris C.M., Kell D.B.* The estimation of microbial biomass // *Biosensors*. 1985. V. 1. P. 17. [https://doi.org/10.1016/0265-928X\(85\)85005-7](https://doi.org/10.1016/0265-928X(85)85005-7)
43. *Grant E.H., Sheppard R.J., South G.P.* Dielectric Behaviour of Biological Molecules in Solution. London: Oxford University Press, 1978. P. 237.
44. *Pethig R.* Dielectric properties of biological materials: Biophysical and medical applications // *IEEE Trans. Electr. Insul.* 1984. V. 19. № 5. P. 453. <https://doi.org/10.1109/TEI.1984.298769>
45. *Fernandez R.E., Rohani A., Farmehini V., Swami N.S.* Review: Microbial analysis in dielectrophoretic microfluidic systems // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 966. P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.024>
46. *Harris C.M., Todd R.W., Bungard S.J., Lovitt R.W., Morris J.G., Kell D.B.* Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: A novel method for the real-time estimation of microbial biomass // *Enzyme Microb. Technol.* 1987. V. 9. P. 181. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90075-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90075-5)
47. *Zemann A.J., Schnell E., Volgger D., Bonn G.K.* Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 563. <https://doi.org/10.1021/ac9707592>
48. *Fracassi da Silva J.A., do Lago C.L.* An oscillometric detector for capillary electrophoresis // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 4339. <https://doi.org/10.1021/ac980185g>
49. *Feng Z., Li F., Huang Y., Gao J., Hu J., Xu Y.* Simultaneous quantitative analysis of six cations in three biodiesel and their feedstock oils by an ion-exchange chromatography system without chemical suppression // *Energy Fuels*. 2017. V. 31. P. 3921. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b01574>
50. *Hoang B.A., Tran Thanh H., Nguyen Thi Ngoc, Pham Ngoc T., K. Do Trung, Le N.T., et al.* A wireless passive capacitively coupled contactless conductivity detection (WPC4D) for microfluidic flow monitoring // *IEEE Sensors*. 2021. P. 2. <https://doi.org/10.1109/SENSOR47087.2021.9639815>
51. *Kent M., Knöchel R., Daschner F., Berger U.-K.* Composition of foods including added water using microwavedielectricspectra // *Food Control*. V.12. P.467. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00021-4)
52. *Naderi-Boldaji M., Mishra P., Ahmad-pour-Samani M., Ghasemi-Varnamkhas-ti, M., Ghanbarian D., Izadi Z.* Potential of two dielectric spectroscopy techniques and chemometric analyses for detection of adulteration in grape syrup // *Measurement*. 2018. V. 127. P. 518. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.06.015>
53. *Regier M., Yu X., Ghio S., Danner T., Schubert H.* Dielectric spectroscopy and principal component analysis as a method for oil fraction determination in oil-in-water-emulsions with varying salt content / *Advances in Microwave and Radio Frequency Processing* / Ed. Willert-Porada M. Springer, 2006. P. 129. https://doi.org/10.1007/978-3-540-32944-2_15
54. *Yuskina E., Makarov N., Khaydukova M., Filatenkova T., Shamova O., Semenov V., Panchuk V., Kirsanov D.* A simple contactless high-frequency electromagnetic sensor: Proof of concept // *Anal. Chem.* 2022. V. 94. № 35. P. 11978. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02067>

OVERVIEWS

EVOLUTION OF CONTACTLESS CONDUCTOMETRY METHODS

E. A. Yuskina^a, V. V. Panchuk^{a, b}, D. O. Kirsanov^{*, a}

^a*St. Petersburg State University, Institute of Chemistry, 198504 St. Petersburg, Peterhof, Russia*

^b*Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, 198095 St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: d.kirsanov@gmail.com*

Received November 1, 2023. Revised December 12, 2023. Accepted December 12, 2023.

Abstract. The development of chemical sensor devices operating in non-contact mode is of primary interest due to the demand from various industries for a fast, simple and inexpensive determination of chemical composition in different media in a non-invasive way. One of the promising directions for the development of analytical devices with such characteristics is the use of high-frequency electrical signals. The paper discusses the evolution of high-frequency contactless conductometry method, likewise other methods and devices operating on similar physical principles (dielectric spectroscopy, microwave sensors, C4D detectors).

Keywords: electromagnetic sensor, high frequencies, conductometry, microwave sensors, dielectric spectroscopy, C4D detector.

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-

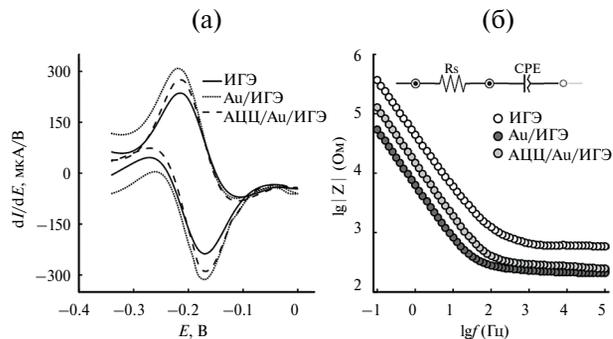


Рис. 1. (а) Циклические вольтамперограммы в режиме первой производной в 0.1 М растворе КСl, содержащем 1 мМ $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$; (б) импедансные спектры в виде логарифмической амплитудно-частотной характеристики, полученные методом нефаарадеевского импеданса. На вставке приведена эквивалентная схема (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 $(3.2 \pm 0.8) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

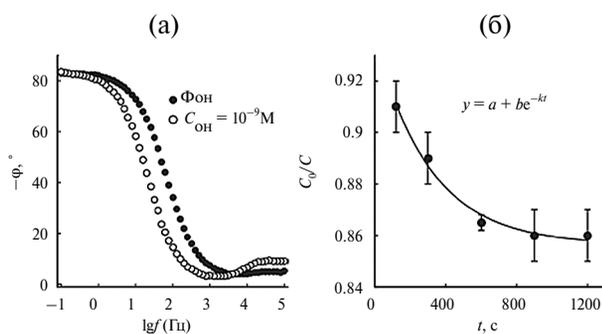


Рис. 2. (а) Аналитический сигнал, зарегистрированный методом нефарадеевского импеданса; (б) кинетика разрушения монослоя АЦЦ ОН-радикалами в диапазоне времени от 120 до 1200 с ($n = 3$, $P = 0.95$).

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 ($F_{\text{эсп}}$) | Коэффициент детерминации (R^2) |
|-------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| a | 0.18 | 0.01 | 0.0005 | 0.70 | 0.9883 |
| b | 0.428 | 0.008 | 0.00001 | | |

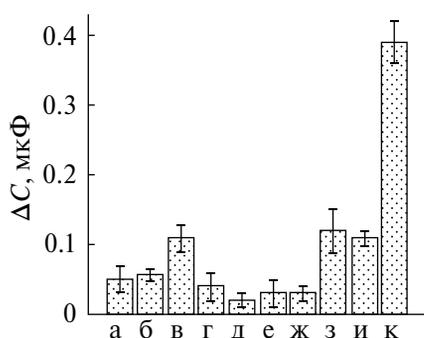


Рис. 3. Селективность сенсора АЦЦ/Au/ИГЭ по отношению к активным формам кислорода и биологически активным веществам: $^1\text{O}_2$ (а), ClO^- (б), H_2O_2 (в), D-глюкозе (г), L-аргину (д), аскорбиновой кислоте (е), глутатиону (ж), кверцетину (з), коэнзиму Q10 (и), OH^\cdot (к) ($n = 3$, $P = 0.95$).

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

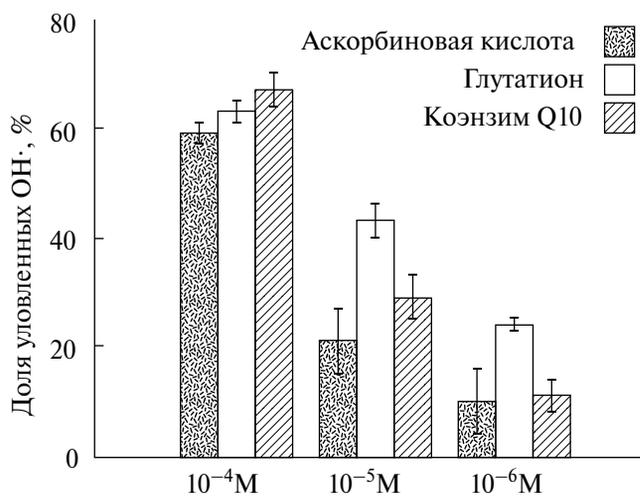


Рис. 4. Оценка активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам ($n = 3$, $P = 0.95$).

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 антигиперлипидемических 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 antithyroid and antiox-

- idant properties of cysteine, glutathione, and methionine by spectrophotometry and high performance liquid chromatography // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. P. 476.)
13. *Алексенко С.С., Казмирова К.О., 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 П.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.*

УДК 543.062

ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЕМКОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С 2,2'-БИПИРИДИНОМ

© 2024 г. Е. Р. Салимгареева^a, Е. Л. Герасимова^{a,*}, А. В. Карманова^a,
К. К. Саликова^a, С. Ю. Сараева^a, А. В. Иванова^a

^aУральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,

Химико-технологический институт
ул. Мира, 19, Екатеринбург, 620002, Россия,

*E-mail: e.l.gerasimova@urfu.ru

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 23.11.2023 г.

Принята к публикации 26.11.2023 г.

Предложенный подход к определению антиоксидантов с различной гидрофильностью основан на использовании комплекса железа(III) с бипиридином в качестве модели окислителя и хроноамперометрической регистрации аналитического сигнала. Выбор окислителя обусловлен его растворимостью в водной, органической и водно-органической средах. Выбраны условия регистрации хроноамперограмм: состав фона (ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с рН 3.6 (9 : 1)), фоновый электролит (LiClO₄), потенциал ($E = 1.25$ В), время регистрации тока (80 с). Исследованы антиоксиданты, растворимые в органических и водно-органических средах: α -токоферол, кверцетин, катехин, кофейная кислота. Диапазоны определяемых концентраций составляют $(0.5–4) \times 10^{-4}$ М. Определена антиоксидантная емкость (АОЕ) этанольных экстрактов лекарственного растительного сырья. Наблюдается высокая корреляция значений АОЕ, полученных хроноамперометрическим и спектрофотометрическим методами, но только для объектов, собственная окраска которых не вносит вклад в величину поглощения Fe(II)–бипиридинового комплекса. Применение предложенного подхода и потенциометрического метода с использованием системы K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] показало, что значения, полученные потенциометрическим методом, значительно ниже для большинства исследованных настоев. Таким образом, при анализе многокомпонентных объектов, содержащих вещества с различной гидрофильностью, целесообразно применение окислителей с различной растворимостью, таких как Fe(III)–бипиридиновый комплекс.

Ключевые слова: антиоксидантная емкость, хроноамперометрия, экстракты лекарственного растительного сырья.

DOI: 10.31857/S0044450224060039, EDN: tutqbe

Исследование антиоксидантных свойств различных объектов продолжает оставаться актуальной задачей. В частности, речь идет об объектах фармации как одном из основных источников экзогенных антиоксидантов и биологических объектов и как источнике информации о возникновении и интенсивности окислительного стресса в организме [1]. Большинство растительных объектов, а также биологические жидкости содержат смеси гидрофильных и липофильных антиоксидантов, при этом водорастворимые антиоксиданты сконцентрированы в цитозоле клетки и плазме крови, в то время как липофильные антиоксиданты защищают клеточные мем-

браны от пероксидного окисления липидов. Оба этих типа антиоксидантов важны для функционирования антиоксидантной системы и совместно присутствуют во многих объектах [1, 2]. Для получения полной информации об антиоксидантных свойствах необходим подход, позволяющий определять гидрофильные и липофильные антиоксиданты при совместном присутствии.

Вследствие сложности поставленной аналитической задачи и наличия широкого круга объектов разработано большое количество способов исследования антиоксидантных свойств объектов [3–7]. Большинство подходов разработано только для водных сред и позволяет определять

водорастворимые или растворимые в органических растворителях антиоксиданты, но только в присутствии поверхностно-активных веществ [6, 7], что достаточно проблематично.

Наиболее распространенными методами исследования антиоксидантов, в том числе с различным типом растворимости, являются спектроскопические [3–5, 8]. К ним относятся походы, использующие в качестве модели окислителя специфические окрашенные свободные радикалы (катион-радикал 2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфонат (АВТС) и радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ)), либо комплексы железа с 1,10-фенантролином, 4,7-дифенил-1,10-фенантролином (бато-фенантролином), 2,4,6-трис(2-пиридил)-1,3,5-триазином с выраженной окраской. Как радикальные системы, так и комплексы железа с различными лигандами позволяют анализировать объекты как в водной, так и в водно-органической средах. Однако спектрофотометрический метод имеет ряд концентрационных ограничений, а также связанных с анализом окрашенных объектов.

Описанных недостатков лишены электрохимические методы исследования антиоксидантов [9–15]. К тому же в основе реакции антиоксиданта с окислителем как радикальной, так и нерадикальной лежит перенос электрона [1, 2], что позволяет рассматривать электрохимические методы как наиболее полно отвечающие донорно-акцепторной природе реакции антиоксидантов (АО) с окислителями. Среди электрохимических методов для исследования антиоксидантов широко применяют методы циклической вольтамперометрии и гальваностатической кулонометрии [9, 10], позволяющие проводить анализ в органической и водно-органической средах. Однако стоит отметить, что к недостаткам циклической вольтамперометрии относится зависимость аналитического сигнала от состояния поверхности электрода, т.е. природы материала, его дефектности и механической неоднородности, что особенно заметно в органических растворителях. Кроме того, при исследовании объектов сложного состава часто наблюдается перекрывание пиков окисления-восстановления, что затрудняет интерпретацию результатов. В методе гальваностатической кулонометрии с использованием электрогенерированных молекул галогенов возможно проведение анализа в органической среде за счет растворимости в ней молекулярного иода и брома, которые, однако, могут вступать не только в окислительно-восстановительные реакции с антиоксидантами, но и в реакции присоединения/замещения с рядом органических соединений, что также приведет к неверной интерпретации аналитического сигнала.

Достаточно перспективным является потенциометрический метод с использованием во-

дорастворимой системы гексацианоферратов [11–13]. Сдвиг потенциала происходит за счет взаимодействия антиоксиданта с окислителем и образованием/изменением состава потенциалоопределяющей окислительно-восстановительной пары гексацианоферратов. Данный метод прост в исполнении, доступен и экспрессен, апробирован на большом количестве индивидуальных природных и синтетических антиоксидантов и объектов сложного состава. Однако применение потенциометрии в исследовании АО различной гидрофильности ограничено выбором модельного окислителя, так как для получения стабильного и воспроизводимого сигнала необходима обратимая/квазиобратимая система, и в случае использования комплексных соединений окислитель и восстановитель системы должны обладать достаточными и близкими по величине константами устойчивости.

Описано [16, 17] использование комплексов железа с бипиридином для исследования антиоксидантных свойств спектрофотометрическим методом. Поскольку комплексы железа с 2,2'-бипиридином растворимы в водных, органических и водно-органических средах, достаточно перспективным является их применение при анализе объектов, содержащих антиоксиданты различной липофильности. Изменение окраски в данном случае происходит за счет электронного перехода и изменения степени окисления железа, поэтому комплекс железа с бипиридином может быть перспективным в качестве источника аналитического сигнала в электрохимических методах. Однако комплекс железа(III) с 2,2'-бипиридином характеризуется невысокой устойчивостью в сравнении с комплексом железа(II) с 2,2'-бипиридином, что ограничивает применение в потенциометрии этой потенциалоопределяющей окислительно-восстановительной пары. Комплекс железа(III) с 2,2'-бипиридином может быть успешно применен в других электрохимических методах, например в хроноамперометрии.

Описан [14, 15] хроноамперометрический подход, основанный на использовании в качестве источника информации тока электроокисления ферроцианида калия, образующегося при взаимодействии определяемых антиоксидантов с феррицианидом калия в водных средах. Преимуществом хроноамперометрического метода перед потенциометрическим является возможность использования одной формы окислительно-восстановительной пары.

Цель данной работы – разработка подхода для исследования липофильных антиоксидантов и объектов, содержащих гидрофильные и липофильные антиоксиданты при совместном присутствии, с использованием электрохимических методов.

В данной работе предлагается использовать железо-бипиридиновые комплексы и хроноамперометрическое детектирование аналитического сигнала. Использование комплекса железа с 2,2'-бипиридином позволит расширить возможности хроноамперометрического метода при исследовании антиоксидантов, а именно: проводить анализ объектов в водно-органической и органической средах и определять как гидрофильные, так и липофильные антиоксиданты, в том числе при совместном присутствии. Использование хроноамперометрической регистрации аналитического сигнала, в отличие от потенциометрической, позволит определять антиоксиданты с применением одной окисленной формы комплекса железа(III) с 2,2'-бипиридином, что создаст перспективы для использования для этой цели и других комплексов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Использовали следующие реактивы $K_4[Fe(CN)_6]$, $K_3[Fe(CN)_6]$, KH_2PO_4 , $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ х. ч. (Реахим, Россия); $FeCl_2$, $FeCl_3$, $LiClO_4$, глутатион, α -токоферол, кверцетин, катехин (Sigma-Aldrich, США); аскорбиновую кислоту, цистеин, галлову, кофейную кислоты (Fluka, Германия); 2,2'- бипиридин (PanReas AppliChem, Барселона, Испания); ацетонитрил, уксусную кислоту, $NaOH$ х. ч. (Гамма, Россия); спирт этиловый 95% (Росбио, Москва). Растворы антиоксидантов глутатиона, аскорбиновой кислоты, цистеина, галловой кислоты готовили в дистиллированной воде. Кверцетин, α -токоферол, катехин, кофейную кислоту растворяли в этиловом спирте. Антиоксидантную емкость хроноамперометрическим методом определяли в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), потенциометрическим – в фосфатном буферном растворе с pH 7.4.

Объектом анализа служили этанольные настои лекарственного растительного сырья, приобретенные в аптечной сети: боярышника плоды (70% этанол), пустырника трава (70% этанол), валерианы корни (70% этанол) (Гиппократ, Россия), лимонника семена (95% этанол) (ООО “Тульская фармацевтическая фабрика”, Россия), ноготков цветки (70% этанол) (ОАО “Синтез”, Россия), полыни трава (70% этанол) (ЗАО “Ярославская фармацевтическая фабрика”, Россия), мяты перечной листья (95% этанол) (ОАО “Ивановская фармацевтическая фабрика”). Водно-этанольный экстракт цветков каркаде готовили следующим образом: 2 г цветков каркаде измельчали и заливали 20 мл водно-спиртового раствора (95% этанола). Настаивали в темном месте в течение суток при комнатной температуре, затем экстракт отфильтровывали и анализировали фильтрат.

Приборы и оборудование. Хроноамперограммы и циклические вольтамперограммы регистрировали с использованием потенциостат-гальваностата μ AUTOLAB Type III (Metrohm Autolab, Голландия). Для измерений применяли стеклоглеродный дисковый электрод, хлорид-серебряный электрод ($Ag/AgCl/3$ М KCl) и графитовый стержень в качестве вспомогательного электрода (Metrohm, Голландия).

Для потенциометрических измерений использовали pH-метр Эксперт-pH (Эконикс-Эксперт, Россия) с редокс-платиновым электродом ЭПВ-1 и хлоридсеребряным электродом ЭВЛ-1 ($Ag/AgCl/3$ М KCl) (Гомельский ЗИП, Беларусь).

Для фотометрических измерений использовали спектрофотометр Evolution 201 (Thermo scientific, США).

Методы. Потенциометрическое определение антиоксидантной емкости с использованием системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ заключается в регистрации изменения потенциала, измеренного до (E_1) и после (E_2) введения определяемого соединения в раствор, содержащий систему гексацианоферратов калия [11]. Сдвиг потенциала является следствием химического взаимодействия антиоксидантов с окислителем $K_3[Fe(CN)_6]$ по реакции (1), т.е. изменения соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм компонентов системы:



где AO – антиоксидант; AO_{Ox} – продукт окисления антиоксиданта, f – стехиометрический коэффициент перед $K_3[Fe(CN)_6]$ в реакции с антиоксидантом.

Антиоксидантная емкость эквивалентна эффективной концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$, вступившего во взаимодействие с антиоксидантом, выражается в универсальных единицах М-экв (моль-экв/л) и рассчитывается по формулам (2), (3):

$$AOE = \frac{c_{Ox} - \alpha c_{Red}}{1 + \alpha} \cdot q, \quad (2)$$

$$\alpha = (c_{Ox} / c_{Red}) 10^{(E_2 - E_1)F/2.3RT}, \quad (3)$$

где c_{Ox} – концентрация $K_3[Fe(CN)_6]$, М; c_{Red} – концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$, М; E_1 – потенциал, измеренный до введения исследуемого образца, В; E_2 – потенциал, измеренный после добавления исследуемого образца, В; q – коэффициент разбавления образца; R – универсальная газовая постоянная, $R = 8.31$ Дж/(К·моль); T – температура, К.

В процессе анализа фиксируется стационарное значение потенциала, изменение которого не превышает 1.0 мВ за минуту.

Спектрофотометрическое определение антиоксидантной емкости с использованием комплекса $[Fe(Py)_3]^{3+}$ основано на регистрации оптической плотности ярко окрашенного комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ ($\lambda_{\max} = 535$ нм) [16], образующегося в результате взаимодействия антиоксидантов образца с модельным окислителем. В качестве стандартного раствора использовали α -токоферол.

Для определения $AOE_{\text{опт}}$ готовили раствор, содержащий $FeCl_3$ и 2,2'-бипиридин в соотношении 1 : 3. Анализ проводили в среде ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6. К 5 мл раствора комплекса железа с бипиридином добавляли аликвоту исследуемого образца объемом 0.05 мл, выдерживали 20 мин при постоянном перемешивании. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 535 нм в стеклянных кюветах толщиной 10 мм.

Зависимость оптической плотности (A) от концентрации α -токоферола ($c_{\alpha\text{-ток}}$) описывается уравнением: $A = 12.17 \times 10^3 c_{\alpha\text{-ток}} + 0.04$.

$AOE_{\text{опт}}$ рассчитывали по уравнению (4):

$$AOE_{\text{опт}} = A \cdot n / b, \quad (4)$$

где A – значение оптической плотности раствора после добавления образца, содержащего антиоксиданты; b – тангенс угла наклона зависимости оптической плотности от концентрации аскорбиновой кислоты, $b = 12.17 \times 10^3$; n – степень разбавления пробы.

Хроноамперометрическое определение антиоксидантной емкости с использованием комплекса $[Fe(L)_3]^{3+}$ основано на регистрации хроноамперограмм (ХАГ) комплекса $[Fe(L)_3]^{2+}$, образующегося в результате протекания реакции (5) [14]:



Объекты анализа чаще всего имеют сложную многокомпонентную матрицу, поэтому для определения антиоксидантной емкости хроноамперометрическим способом ($AOE_{\text{ХАГ}}$) (4) применяют метод добавок, позволяющий учесть влияние матрицы образца и таким образом снизить погрешность анализа. $AOE_{\text{ХАГ}}$ выражается в М-экв (моль-экв/л) и рассчитывается по формуле (6):

$$AOE_{\text{ХАГ}} = \frac{c_{\text{доб}} \cdot I_{\text{АО}}}{I_{\text{АО+доб}} - I_{\text{АО}}}, \quad (6)$$

где $c_{\text{доб}}$ – концентрация добавки $[Fe(L)_3]^{2+}$, М; $I_{\text{АО}}$ – ток окисления $[Fe(L)_3]^{2+}$, измеренный после добавления исследуемого образца, А; $I_{\text{АО+доб}}$ – ток окисления $[Fe(L)_3]^{2+}$, измеренный после введения добавки комплекса железа $[Fe(L)_3]^{2+}$, А.

Хроноамперограмму регистрировали после совместного выдерживания комплекса железа с исследуемым объектом в течение 20 мин при постоянном перемешивании.

Циклическую вольтамперометрию использовали для исследования окислительно-восстановительных свойств комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ и определяемых антиоксидантов. Для этого регистрировали циклические вольтамперограммы (ЦВА) 1 мМ растворов $[Fe(Py)_3]^{2+}$ и антиоксидантов в среде ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование устойчивого комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ зависит от концентрации реагирующих с ним антиоксидантов в образце, что позволяет оценивать антиоксидантную емкость по изменению электрохимических параметров комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$, например силы тока (I , А).

На рис. 1 представлена ЦВА $[Fe(Py)_3]^{2+}$. Квазиобратимый характер ЦВА позволяет разделить процессы окисления и восстановления комплекса и зарегистрировать их отдельно методом хроноамперометрии.

В качестве аналитического сигнала использовали ток окисления комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ при потенциале $E = 1.25$ В, образующегося в результате реакции (7):



При выбранном значении потенциала зарегистрировали хроноамперограммы комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ при его разных концентрациях в среде ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), 0.01 М $LiClO_4$ (рис. 2). Линейная зависимость приращения тока окисления комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ от его концентрации в диапазоне 2×10^{-6} – 9×10^{-4} М позволяет использовать выбранную систему для определения AOE . Уравнение регрессии имеет вид $I = (3.92 \pm 0.08) c - (0.031 \pm 0.001)$, $R^2 = 0.9998$. Предел обнаружения, минимальное содержание определяемого вещества в пробе, сигнал от которого можно надежно отличить от фона [18], составил $c_{\min} = 2 \times 10^{-6}$ М на примере α -токоферола.

Из ХАГ видно, что ток окисления достигает установившегося значения через 75 с после начала измерения, поэтому в дальнейшем ток регистрировали в течение 80 с.

В качестве модельных растворов антиоксидантов выбрали соединения с известными механизмами окисления, растворимые в водно-органических и органических средах: α -токоферол, кверцетин, катехин, кофейную кислоту. На рис. 3 приведены ЦВА выбранных антиок-

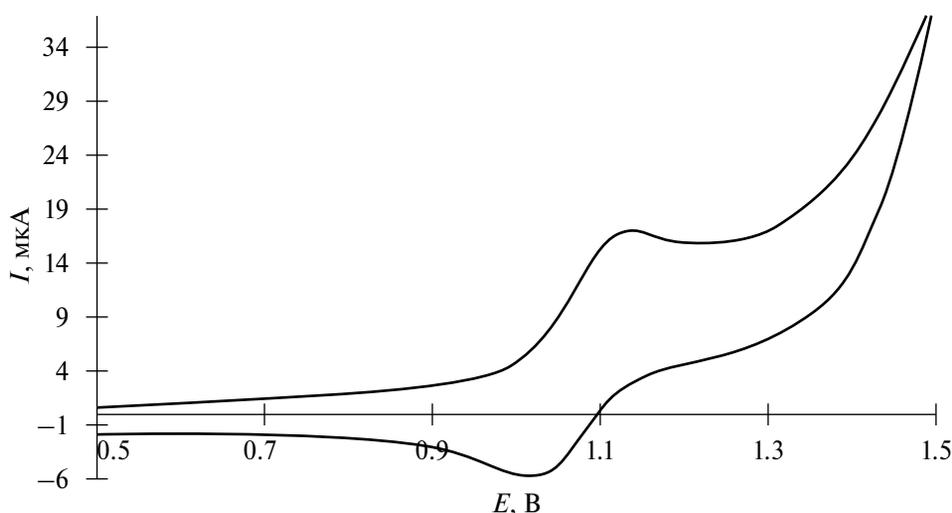


Рис. 1. Циклическая вольтамперограмма комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ ($c = 1$ мМ), зарегистрированная на стеклоглеродном электроде в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с рН 3.6 (9 : 1), содержащей с 0.01 моль/л LiClO_4 . Скорость сканирования 0.1 В/с.

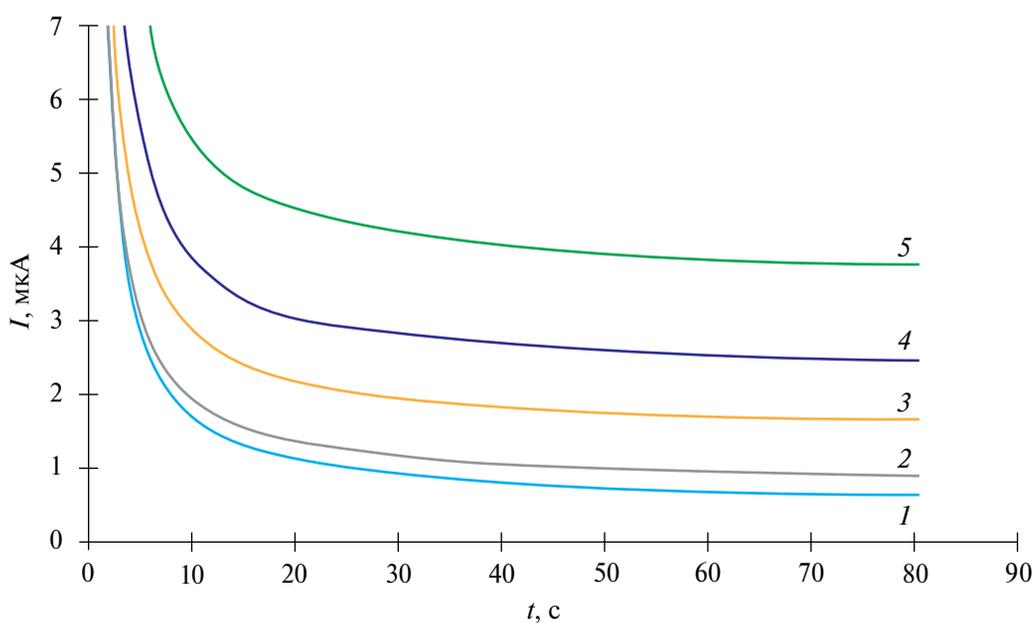


Рис. 2. Хроноамперограммы комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ ($c = 1$ мМ), зарегистрированные на стеклоглеродном электроде в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с рН 3.6 (9 : 1), содержащей 0.01 моль/л LiClO_4 , $E = 1.25$ В. $c(\text{Fe}(\text{II}))$, мМ: 1 – 0.01, 2 – 0.07, 3 – 0.3, 4 – 0.5, 5 – 0.8.

сидантов, в табл. 1 представлены потенциалы окисления комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ и выбранных антиоксидантов. Из рис. 3 и табл. 1 видно, что потенциалы окисления выбранных АО меньше потенциала окисления $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$, что обеспечивает термодинамическую возможность протекания реакции между АО образца и выбранным модельным окислителем. Реакция между окислителем, находящимся в растворе в избытке, и антиоксидантами протекает полностью,

за счет чего исключается вклад посторонних процессов окисления выбранных модельных АО.

Хроноамперометрическим способом зарегистрировали ХАГ $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$, образующегося при взаимодействии АО с $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$ при разных концентрациях АО (рис. 4). В табл. 2 представлены полученные уравнения регрессии и диапазоны определяемых концентраций модельных АО.

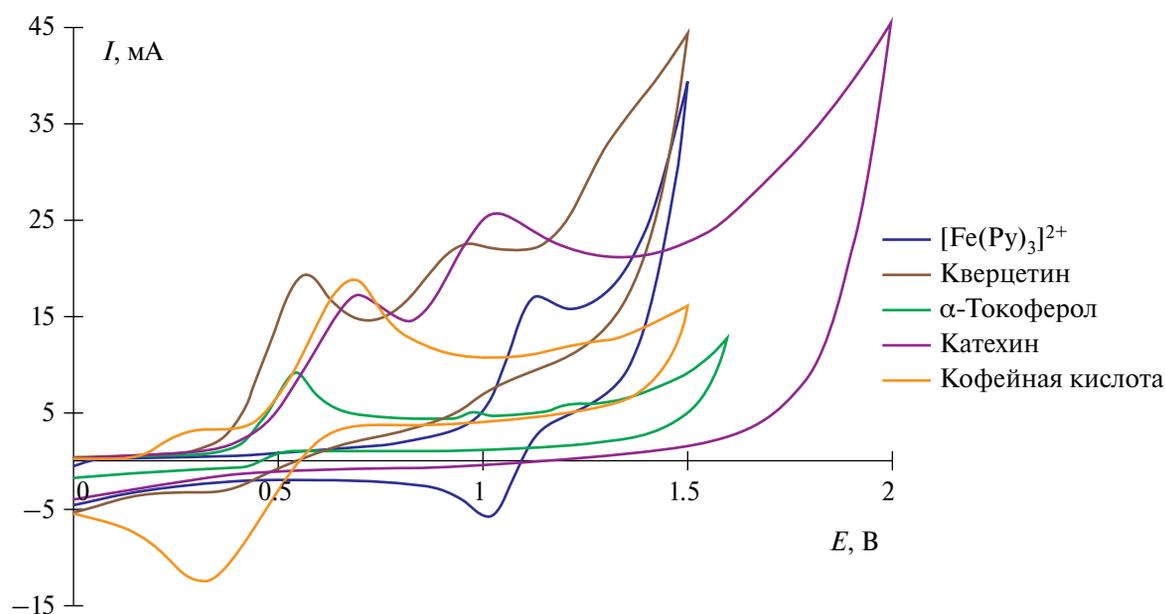


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$, α -токоферола, кверцетина, катехина и кофейной кислоты ($c = 1 \text{ mM}$), зарегистрированные на стеклоуглеродном электроде в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), содержащей 0.01 моль/л LiClO_4 , скорость развертки потенциала 0.1 В/с.

Таблица 1. Потенциалы пиков окисления комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ и модельных антиоксидантов (ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), 0.01 моль/л LiClO_4 , $E = 1.25 \text{ V}$)

| Комплекс | Потенциал пика окисления, В | АО | Потенциал пика окисления, В | |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------|
| | | | E_1 , В | E_2 , В |
| $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ | 1.25 | α -Токоферол | 0.55 | 0.95 |
| | | Кверцетин | 0.57 | |
| | | Катехин | 0.70 | |
| | | Кофейная кислота | 0.70 | |

Таблица 2. Уравнения регрессии и диапазоны определяемых концентраций модельных антиоксидантов (1 mM $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$, ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), 0.01 моль/л LiClO_4 , $E = 1.25 \text{ V}$)

| Антиоксидант | Уравнение регрессии (I , мкА; c , mM) | R^2 | Диапазон определяемых концентраций, $c \times 10^4$, M |
|---------------------|--|--------|---|
| α -Токоферол | $I = (8.57 \pm 0.17)c + (0.092 \pm 0.003)$ | 0.9993 | 0.005–4 |
| Кверцетин | $I = (2.88 \pm 0.09)c + (1.75 \pm 0.05)$ | 0.9334 | 0.005–2 |
| Катехин | $I = (21.77 \pm 0.87)c + (0.42 \pm 0.01)$ | 0.9842 | 0.005–3 |
| Кофейная кислота | $I = (11.07 \pm 0.22)c + (0.89 \pm 0.03)$ | 0.9636 | 0.005–4 |

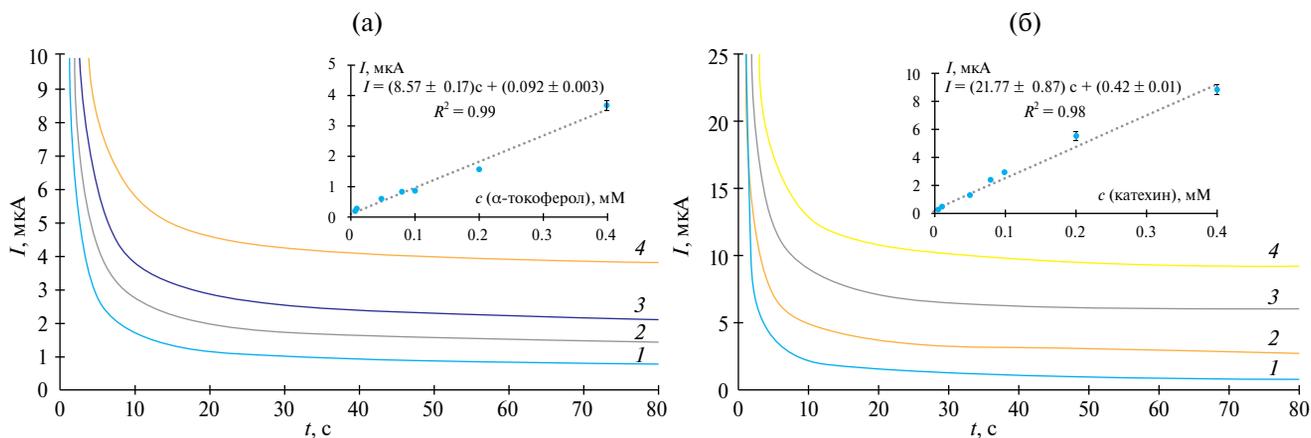


Рис. 4. Хроноамперограммы комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ ($c = 1 \text{ mM}$), образующегося при взаимодействии $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$ с (а) α-токоферолом и (б) катехином в разных концентрациях, зарегистрированные на стеклоуглеродном электроде в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), содержащей 0.01 моль/л LiClO_4 , $E = 1.25 \text{ V}$. $c(\alpha\text{-токоферол})$, mM: 1 – 0.005, 2 – 0.1, 3 – 0.2, 4 – 0.4. $c(\text{катехин})$, mM: 1 – 0.008, 2 – 0.08, 3 – 0.2, 4 – 0.4.

Методом введено–найдено определили АОЕ модельных растворов АО, расчет проводили по уравнению (6) (табл. 3). Полученные значения АОЕ с учетом стехиометрических коэффициентов согласуются с приведенными в литературе с учетом механизмов окисления АО [13].

В качестве объектов сложного состава, содержащих антиоксиданты с различной растворимостью в водных и органических растворителях, выбрали настойки лекарственного растительного сырья, приобретенные в аптечной сети, и экстракт цветков каркаде, приготовленный по методике, описанной в “Экспериментальной части”. В качестве метода сравнения выбрали известный спектрофотометрический метод определения АОЕ с использованием комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$. Антиоксидантную емкость определяли оптическим и хроноамперометрическим методами в одинаковых условиях: 0.01 М раствор LiClO_4 , ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1). Кроме того, АОЕ этих же образцов определяли потенциометрическим

методом с использованием системы $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в фосфатном буферном растворе с pH 7.4. Полученные значения АОЕ представлены в табл. 4. Высокая степень корреляции результатов, полученных разными методами, ($r = 0.9901$, $n = 7$, $r_{\text{крит}} = 0.7545$) подтверждает возможность определения АОЕ многокомпонентных объектов, содержащих вещества с различной гидрофильностью хроноамперометрическим способом с использованием комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$ в качестве модели окислителя. Значения критериев Фишера и Стьюдента для хроноамперометрического и спектрофотометрического детектирования не превышают критических значений.

Стоит отметить, что выбранные настойки лекарственного растительного сырья имеют окраску от желтого до коричневого цвета. Для таких объектов собственная окраска не влияет на величину оптической плотности $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ при 535 нм. В случае объектов, окрашенных в красный цвет, к которым относятся большое количество растительных экстрактов, про-

Таблица 3. Значения антиоксидантной емкости модельных растворов антиоксидантов, полученные хроноамперометрическим методом с использованием комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$ в качестве модели окислителя в среде ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), содержащей 0.01 моль/л LiClO_4 ($n = 5$, $P = 0.95$)

| Антиоксидант | $c_{\text{АО}} \times 10^4, \text{ M}$ | $\text{АОЕ}_{\text{теор. ожид.}} \times 10^4, \text{ M}$ | $\text{АОЕ}_{\text{бибир}} \times 10^{-4}, \text{ M}$ | s_r |
|------------------|--|--|---|-------|
| α-Токоферол | 2.00 | 4.00 | 3.94 ± 0.08 | 0.02 |
| Кверцетин | 1.00 | 5.00 | 4.51 ± 0.41 | 0.09 |
| Катехин | 2.00 | 2.00–6.00 | 6.18 ± 0.43 | 0.07 |
| Кофейная кислота | 1.00 | 2.00 | 1.89 ± 0.08 | 0.04 |

Таблица 4. Результаты определения антиоксидантной емкости этанольных настоев лекарственного растительного сырья хроноамперометрическим, спектрофотометрическим и потенциометрическим методами анализа ($n = 5$, $P = 0,95$, $F_{\text{крит}} = 6.39$, $t_{\text{крит}} = 2.78$)

| Настойка/ экстракт | | Хроноамперометрия ([Fe(Py) ₃] ³⁺ , 0.01 моль/л LiClO ₄ , ацетонитрил- ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1)) | | Спектрофотометрия ([Fe(Py) ₃] ³⁺ , 0.01 моль/л LiClO ₄ , ацетонитрил- ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1)) | | F | t | Потенциометрия (K ₃ [Fe(CN) ₆], фосфатный буферный раствор с pH 7.4) | |
|----------------------------|----------------------------|---|----------------|--|----------------|------|------|---|----------------|
| объект | содержание этанолола, % | АОЕ _{ХАГ} × 10 ² , М-экв | s _r | АОЕ _{опт} × 10 ² , М-экв | s _r | | | АОЕ _{потенц} × 10 ² , М-экв | s _r |
| Боярышника плоды | 70 | 0.37 ± 0.01 | 0.01 | 0.30 ± 0.01 | 0.02 | 1.36 | 0.03 | 0.23 ± 0.01 | 0.01 |
| Пустырника трава | 70 | 2.53 ± 0.03 | 0.01 | 2.67 ± 0.09 | 0.04 | 2.12 | 0.96 | 1.65 ± 0.02 | 0.01 |
| Ноготков цветки | 70 | 2.39 ± 0.14 | 0.06 | 2.28 ± 0.06 | 0.03 | 3.13 | 0.05 | 1.08 ± 0.03 | 0.03 |
| Лимонника семена | 95 | 1.04 ± 0.07 | 0.07 | 1.23 ± 0.01 | 0.01 | 2.04 | 0.17 | 1.72 ± 0.02 | 0.01 |
| Полыни трава | 70 | 5.19 ± 0.16 | 0.03 | 4.64 ± 0.09 | 0.02 | 2.20 | 0.35 | 4.80 ± 0.09 | 0.02 |
| Валерьяны корни | 70 | 1.64 ± 0.16 | 0.10 | 1.69 ± 0.07 | 0.04 | 1.45 | 0.04 | 1.16 ± 0.08 | 0.07 |
| Мяты перечной листья | 95 | 2.67 ± 0.13 | 0.05 | 2.46 ± 0.06 | 0.03 | 2.52 | 0.05 | 2.27 ± 0.02 | 0.01 |
| Каркаде цветки | 95 | 6.27 ± 0.06 | 0.01 | - | - | - | - | 3.58 ± 0.25 | 0.07 |

мышленные напитки, биологические объекты и др., собственная окраска может внести существенный вклад в величину оптической плотности при 535 нм.

В качестве примера выбрали этанольный экстракт цветков каркаде (*Hibiscus sabdariffa*) ярко-розового цвета, близкий по окраске к раствору [Fe(Py)₃]²⁺ (рис. 5). На рис. 6 приведены спектры поглощения указанных растворов. Определение АОЕ настоя каркаде оптическим методом невозможно, поскольку в данном случае области поглощения анализируемого раствора и [Fe(Py)₃]²⁺ практически совпадают. Антиоксидантная емкость настоя каркаде, полученная хроноамперометрическим способом, составила АОЕ_{ХАГ} = (6.27 ± 0.06) × 10⁻² М-экв, что согласуется с данными [19] о достаточно высоком содержании антиоксидантов в данном образце.

Определили АОЕ выбранных настоек и экстракта потенциометрическим методом с использованием системы K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (табл. 4). Несмотря на достаточно высокую корреляцию результатов электрохимических методов анализа ($r = 0.8412$, $n = 8$, $r_{\text{крит}} = 0.7067$), значения, полученные потен-

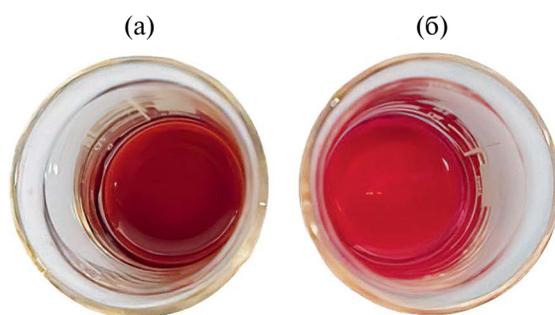


Рис. 5. Окраска (а) 0.1 мМ раствора [Fe(Py)₃]²⁺ и (б) этанольного настоя каркаде (*Hibiscus sabdariffa*).

циометрическим методом, значительно ниже для большинства исследованных настоев, что может быть связано с ограниченной растворимостью полифенольных соединений, содержащихся в выбранных объектах в высоких концентрациях, в водной среде. В этом случае анализ многокомпонентных объектов, содержащих вещества различной гидрофильности, в водных средах дает неполную информацию об их антиоксидантных свойствах.

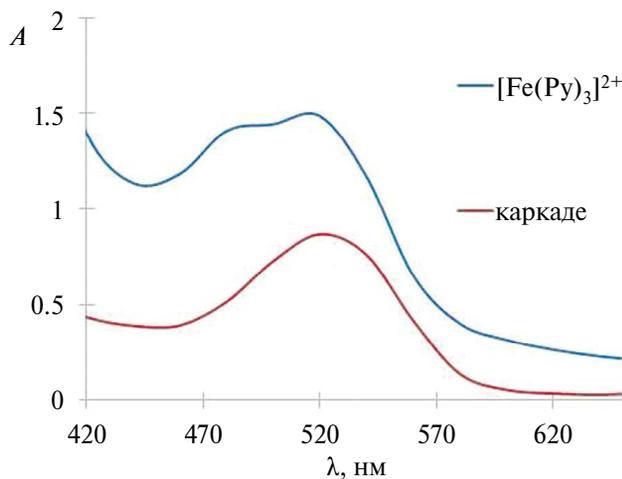


Рис. 6. Спектры поглощения 0.1 мМ раствора комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ и этанольного настоя каркаде (*Hibiscus sabdariffa*).

Таким образом, предложен подход к определению антиоксидантов с использованием комплекса железа(III) с бипиридином в качестве модели окислителя и хроноамперометрической регистрацией тока окисления комплекса железа(II) с бипиридином, образующегося при взаимодействии с антиоксидантами. Существенным преимуществом предложенного подхода является использование комплексов железа с бипиридином как универсальной модели окислителя, растворимого как в воде, так и в ряде органических растворителей, что позволяет исследовать липофильные антиоксиданты и объекты, содержащие гидрофильные и липофильные антиоксиданты при совместном присутствии, что актуально при анализе объектов сложного состава. На примере экстрактов растительного сырья как одного из основных экзогенных источников АО различной гидрофильности (α -токоферола, аскорбиновой кислоты и полифенольных соединений) показана возможность определения суммарной антиоксидантной емкости с использованием комплекса железа(III) с бипиридином. При этом хроноамперометрический метод, в отличие от метода спектрофотометрии, не обладает ограничениями при анализе объектов с собственной окраской. Предложенный подход является информативным, простым и доступным, позволяет избежать использования поверхностно-активных веществ при анализе объектов, содержащих соединения с различной растворимостью, и может быть реализован в портативном варианте, в том числе для экспресс-контроля ценности растительного сырья с позиции содержания антиоксидантов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20-13-00142 (<https://rscf.ru/project/20-13-00142/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2015. P. 961.
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2017. С. 284.
- Apak R., Ozyurek M., Guklu K., Capanoglu E. Antioxidant activity/capacity measurement. I. Classification, physico-chemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays // J. Agric. Food Chem. 2016. V. 64. P. 997.
- Apak R., Ozyurek M., Guklu K., Capanoglu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-Based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assay // J. Agric. Food Chem. 2016. V. 64. P. 1028.
- Ilyasov I.R., Beloborodov V.L., Selivanova I.A., Terekhov R.P. ABTS/PP Decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 1131.
- Зиятдинова Г.К., Зиганшина Э.Р., Будников Г.К. Использование поверхностно-активных веществ в вольтамперометрическом анализе // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. С. 968. (Ziyatdinova G.K., Ziganshina E.R., Budnikov H.C. Application of surfactants in voltammetric analysis // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. P. 869.)
- Sharma Sh., Kori Sh., Parmar A. Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices // Food Chem. 2015. V. 185. P. 284.
- La J.W., Kim M.J., Lee J.H. Evaluation of solvent effects on the DPPH reactivity for determining the antioxidant activity in oil matrix // Food Sci. Biotechnol. 2021. V. 30. P. 367.
- Зиятдинова Г.К., Жупанова А.С., Будников Г.К. Электрохимические сенсоры для одновременного определения фенольных антиоксидантов // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. С. 129. (Ziyatdinova G.K., Zhupanova A.S., Budnikov H.C. Electrochemical sensors for the simultaneous detection of phenolic antioxidants // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. P. 155.)
- Ziyatdinova G., Kalmykova A., Kupriyanova O. Constant-current coulometry with electrogenerated

- titrants as a novel tool for the essential oils screening using total antioxidant parameters // *Antioxidants*. 2022. V. 11. Article 1749.
11. Ivanova A.V., Gerasimova E.L., Brainina Kh.Z. Potentiometric study of antioxidant activity: Development and prospects // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2015. V. 45. P. 311.
 12. Иванова А.В., Герасимова Е.Л., Кравец И.А., Матерн А.И. Потенциометрическое определение водорастворимых антиоксидантов с использованием комплексов металлов // *Журн. аналит. химии*. 2015. Т. 70. № 2. С. 156. (Ivanova A.V., Gerasimova E.L., Kravets I.A., Matern A.I. Potentiometric determination of water-soluble antioxidants using metal complexes // *J. Anal. Chem.* 2015. V. 70. P. 173.)
 13. Ivanova A.V., Gerasimova E.L., Gazizullina E.R. An integrated approach to the investigation of antioxidant properties by potentiometry // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1111. P. 83.
 14. Брайнина Х.З., Варзакова Д.П., Герасимова Е.Л. Хроноамперометрический метод определения интегральной антиоксидантной активности // *Журн. аналит. химии*. 2012. Т. 67. С. 409. (Brainina Kh.Z., Varzakova D.P., Gerasimova E.L. A chronoamperometric method for determining total antioxidant activity // *J. Anal. Chem.* 2012. V. 67. P. 364.)
 15. Varzakova D.P., Brainina Kh.Z., Kazakov Y.E., Vidrevich M.B. Noninvasive electrochemical antioxidant activity estimation: Saliva analysis // *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2018. V. 8. P. 3383.
 16. Naji K.M., Thamer F.H., Numan A.A., Dauqan E.M., Alshaibi Ya.M., D'souza M.R. Ferric-bipyridine assay: A novel spectrophotometric method for measurement of antioxidant capacity // *Heliyon*. 2020. V. 6. Article e03162.
 17. Santana W.E.L., Nunez C.V., Moya H.D. Antioxidant activity and polyphenol content of some Brazilian medicinal plants exploiting the formation of the Fe(II)/2,2'-bipyridine complexes // *Nat. Prod. Commun.* 2015. V. 10. P. 1821.
 18. Экспериандова Л.П., Беликов К.Н., Химченко С.В., Бланк Т.А. Еще раз о пределах обнаружения и определения // *Журн. аналит. химии*. 2010. Т. 65. С. 229 (Eksperiandova L.P., Belikov K.N., Khimchenko S.V., Blank T.A. Once again about determination and detection limits // *J. Anal. Chem.* 2010. V. 65. P. 223.)
 19. Subhaswaraj P., Sowmya M., Bhavana V., Dyavaiah M., Siddhardha B. Determination of antioxidant activity of Hibiscus sabdariffa and Croton caudatus in Saccharomyces cerevisiae model system // *J. Food Sci. Technol.* 2017. V. 54. P. 2728.

ORIGINAL ARTICLES

CHRONOAMPEROMETRIC DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY USING IRON COMPLEX WITH 2,2'-BIPYRIDINE

E. R. Salimgareeva^a, E. L. Gerasimova^{a, *}, A. V. Karmanova^a, K. K. Salikova^a,
S. Y. Saraeva^a, A. V. Ivanova^a

^aUral Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin,
Chemical Technology Institute, 620002 Ekaterinburg, Russia
*e-mail: e.l.gerasimova@urfu.ru

Received on October 31, 2023. Revised November 23, 2023. Accepted November 26, 2023

Abstract. The proposed approach to the determination of antioxidants with different hydrophilicity is based on the use of iron(III) complex with bipyridine as an oxidant model and chronoamperometric registration of the analytical signal. The oxidant was chosen due to its solubility in aqueous, organic and aqueous-organic media. The following conditions for registration of chronoamperograms were chosen: background composition (acetonitrile-acetate buffer solution with pH 3.6 (9 : 1)), background electrolyte (LiClO₄), potential ($E = 1.25$ V), current registration time (80 s). Antioxidants soluble in organic and aqueous-organic media were studied: α -tocopherol, quercetin, catechin, caffeic acid. The ranges of determined concentrations are (0.5-4) $\times 10^{-4}$ M. The antioxidant capacity (AOE) of ethanolic extracts of medicinal plant raw materials was determined. A high correlation of AOE values obtained by chronoamperometric and spectrophotometric methods is observed, but only for the objects whose intrinsic coloration does not contribute to the absorption value of Fe(II)-bipyridine complex. Application of the proposed approach and the potentiometric method using the system K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] showed that the values obtained by the potentiometric method are significantly lower for most of the investigated infusions. Thus, when analyzing multicomponent objects containing substances with different hydrophilicity, it is advisable to use oxidizing agents with different solubility, such as Fe(III)-bipyridine complex.

Keywords: antioxidant capacity, chronoamperometry, extracts of medicinal plant raw materials.

УДК 543.552

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТА ХИТОЗАНА, ГРАФИТИРОВАННОЙ САЖИ И ПОЛИАРИЛЕНФТАЛИДА С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ОТПЕЧАТКАМИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛАРИТРОМИЦИНА

© 2024 г. Ю. А. Яркая^{a,*}, М. И. Назыров^a, Д. А. Дымова^a, В. Н. Майстренко^a^aУфимский университет науки и технологий, химический факультет

ул. Заки Валиди, 32, Уфа, 450076, Россия

*E-mail: julijajarkaeva05@gmail.com

Поступила в редакцию 13.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 27.04.2023 г.

Для селективного определения антибиотика кларитромицина разработан вольтамперометрический сенсор на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного композитом хитозана, графитированной сажи Carbolblack C и полиарилефталата, содержащего в основной цепи полимера дифенилентиио- и дифениленоксидные фрагменты в соотношении 1 : 2, с молекулярными отпечатками кларитромицина, полученными методом инверсии фаз. С использованием ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии изучены состав и морфология модифицирующего покрытия. Методами спектроскопии электрохимического импеданса, циклической и дифференциально-импульсной вольтамперометрии изучены электрохимические и аналитические характеристики сенсора. Подобраны оптимальные условия регистрации аналитического сигнала. С использованием $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ в качестве зонда линейный диапазон определяемых концентраций составил 1×10^{-7} – 5×10^{-4} М с пределом обнаружения 5.3×10^{-8} М. Показано, что применение полимера с молекулярными отпечатками кларитромицина повышает чувствительность сенсора практически в 10 раз по сравнению с неимпринтированным полимером. Предложенный сенсор апробирован на образцах урины, плазмы крови, а также пищевых продуктов (мясо, молоко), степень извлечения составила 90–96, 80 и 92% соответственно, а относительное стандартное отклонение не превышало 10% во всех случаях.

Ключевые слова: полимеры с молекулярными отпечатками, полиарилефталат, инверсия фаз, вольтамперометрический сенсор, кларитромицин, графитированная сажа.

DOI: 10.31857/S0044450224060043, EDN: tumxjo

Полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО), или молекулярно импринтированные полимеры, представляют собой синтетические аналоги природных биологических систем типа антитело–антиген и работают по принципу “ключ–замок”. При этом ПМО могут обладать специфичностью и селективностью на уровне биологических рецепторов, но с такими преимуществами как физическая прочность, надежность, устойчивость к повышенному давлению и температуре, инертность к различным химическим веществам, стабильность, а также длительность хранения в условиях окружающей среды и низкая стоимость [1, 2]. Природные рецепторы, как правило, требуют хранения при пониженной температуре, а ПМО мо-

гут храниться достаточно долго, не требуя особых условий хранения, применяться в гораздо более широком диапазоне температур и pH. Рост интереса к дизайну, разработке и применению ПМО в последние годы отражает важность этой области химической сенсорики. Сенсоры на основе ПМО используют для анализа пищевых продуктов, объектов окружающей среды и биологических образцов благодаря их высокой чувствительности, специфичности и стабильности [2].

При создании сенсоров на основе ПМО обычно используют классический метод, который заключается в полимеризации (химической, электрохимической, фотополимеризации) молекул мономера в присутствии темплата с его

последующим вымыванием из полимера с образованием полостей, комплементарных темплату по размеру, форме и молекулярным взаимодействиям [3–5]. Однако существуют и другие методы получения ПМО, такие как метод инверсии фаз (ИФ) (phase inversion) и метод мягкой литографии (soft lithography) [1, 6]. Последний заключается в создании штампа, состоящего из самоорганизующегося слоя темплата, который вдавливают в частично полимеризованную пленку и удерживают до полной полимеризации, после чего штамп удаляют вымыванием соответствующим растворителем. Обычно данный подход применяют для обнаружения больших молекул и структур, которые не могут распределиться во всем объеме полимера, например для обнаружения клеток *Escherichia coli* [7]. Метод ИФ заключается в применении готовых полимеров, которые осаждают на поверхность рабочего электрода из раствора в присутствии темплата путем добавления другого растворителя, который вызывает осаждение содержащего темплат полимера (wet phase inversion – мокрая инверсия фаз) [8, 9], либо испарением растворителя из полимера в процессе нагревания или центрифугирования (dry phase inversion – сухая инверсия фаз) [1]. Его главное преимущество – простота и быстрое изготовление ПМО-сенсора. Для растворения компонентов используют растворитель, совместимый как с основным полимером, так и с темплатом. Их смешивание позволяет формировать комплексы типа “гость–хозяин” в растворе. Метод сухой ИФ проще и удобнее, так как в отличие от метода мокрой ИФ не требует использования второго растворителя; обычно его реализуют при нагревании осажденного на поверхность электрода полимера. Кроме того, ПМО, полученные испарением растворителя, имеют плотную однородную структуру из-за постепенного увеличения концентрации полимера в формирующейся пленке вследствие испарения растворителя [10].

Метод ИФ разработан Кобаяши и коллегами в 1996 г. [11]. С тех пор ПМО, полученные инверсией фаз, применяли в энантиомерном разделении [12], твердофазной экстракции [13] и при обнаружении различных соединений в пищевых продуктах и водной среде [14, 15]. В ПМО, полученных с помощью ИФ, обычно отсутствует процесс сшивания, что в отдельных случаях может приводить к коллапсу полостей в процессе удаления темплата, однако этот метод обеспечивает самый простой способ получения тонкопленочных ПМО, необходимых при создании вольтамперометрических сенсоров. В литературе представлено лишь небольшое количество работ по созданию электрохимических сенсоров с ПМО, полученных методом ИФ [9, 16–18].

Обычно ИФ применяют при создании ПМО на основе таких полимеров, как полисахариды

(декстран, хитозан, целлюлоза) [17, 19], полиамиды (нейлон) [18], акриловые сополимеры [9, 16, 20], сополимеры полиэтилена [21], ароматические полисульфоны [22] и т.д. Для изготовления ПМО-сенсоров интерес представляют также полиариленфталиды (ПАФ) [23–26], тонкие пленки которых являются электропроводящими, химически устойчивыми к нагреванию и воздействию агрессивных сред. Полиариленфталиды ранее изучали и применяли для изготовления сенсоров на основе композитных материалов [27]. Нанесение полимера на поверхность электрода зачастую приводит к уменьшению токов из-за увеличения сопротивления, поэтому в сенсорный слой необходимо добавлять компоненты, повышающие электропроводность. В последнее время для этих целей применяют наноматериалы, такие как наночастицы Au и Pt, одностенные и многостенные углеродные нанотрубки, восстановленный оксид графена [5, 26, 28] и др.

Основной характеристикой ПМО-сенсоров является селективность связывания с определяемой молекулой – молекулой темплата. Как правило, селективность (также называемая коэффициентом селективности или фактором импринтинга F_{imp}) оценивается как отношение эффективностей связывания темплата с ПМО и неимпринтированным полимером (НИП), полученное из аналитических сигналов (чаще из чувствительностей): $F_{\text{imp}} = S_{\text{ПМО}}/S_{\text{НИП}}$.

Стоит отметить, что еще одним преимуществом ПМО является универсальность, которая заключается в том, что темплатом может быть любое вещество с некоторыми специфическими функциональными группами, от сравнительно небольших молекул аминокислот до более крупных молекул антибиотиков, белков и даже предклеточных форм (фаги и вирусы) и клеток. Наиболее часто ПМО-сенсоры используют для определения энантиомеров биологически активных соединений, а также антибиотиков [1, 2]. При этом определение антибиотиков является одной из важных практических задач аналитической химии в связи с их широким применением и, как следствие, широкой распространенностью в окружающей среде и пищевых продуктах. Среди них макролиды представляют собой группу антибиотиков, широко используемых в медицине для лечения ряда заболеваний, но наиболее важным их применением является лечение респираторных инфекций, в том числе лечение пациентов с COVID-19. Они также используются в ветеринарии. Широко используемые макролиды, такие как эритромицин, азитромицин и кларитромицин (Клр), часто обнаруживают в окружающей среде и пищевых продуктах, что приводит к развитию устойчивости живых организмов к антибиотикам. Ранее для определения макролидов разработаны электроаналитические методики, основанные

на использовании различных электрохимических (био)сенсоров [29].

В настоящей работе представлен вольтамперометрический сенсор на основе стеклоуглеродного электрода (СУЭ), модифицированного композитом хитозана (ХТЗ) и графитированной сажи Carbolblack С (СВ) и ПАФ с молекулярными отпечатками, полученными методом ИФ, для селективного определения Клр. Используемый ПАФ содержит в основной цепи полимера дифенилентио- и дифениленоксидные фрагменты в соотношении 1 : 2 [27]. Морфологию поверхности изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), состав модифицирующего покрытия исследовали методом ИК-спектроскопии. Методами спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ), циклической (ЦВ) и дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВ) изучали электрохимические и аналитические характеристики сенсора. Подбирали оптимальные условия для определения Клр с помощью предложенного сенсора. Для определения Клр использовали раствор $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ в качестве зонда. Предложенный сенсор апробировали на реальных образцах биологических жидкостей (моча и плазма крови) и пищевых продуктов (мясо, молоко). Изучали воспроизводимость, стабильность, а также селективность сенсора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и оборудование. Кларитромицин ($\geq 99.5\%$), азитромицин ($\geq 99.5\%$), линкомицин ($\geq 99.5\%$), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($\geq 99.0\%$) и $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($\geq 99.0\%$) приобретали у Sigma-Aldrich (США), порошок графитированной сажи Carbolblack С приобретали у Restek (США). Образцы полимера ПАФ ($\geq 99\%$) предоставлены лабораторией синтеза функциональных полимеров Уфимского института химии РАН (Уфа, Россия). В качестве фонового электролита для Клр использовали фосфатный буферный раствор (ФБР, $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0.1 М, рН 6.86), для $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ — 0.1 М раствор КСl. 5 мМ раствор $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ использовали в качестве зонда при определении Клр.

Все электрохимические измерения проводили на потенциостате-гальваностате Autolab PGSTAT 204 с модулем импеданса FRA32M (Metrohm Autolab Ins., Нидерланды) с программным обеспечением NOVA. Стандартная трехэлектродная ячейка состояла из модифицированного СУЭ (Metrohm Autolab Ins., Нидерланды) диаметром 3 мм в качестве рабочего электрода, платиновой пластины в качестве вспомогательного электрода и хлоридсеребряного электрода с 3.5 М раствором КСl в качестве электрода сравнения. Измерение рН растворов проводили с помощью рН-метра Seven Compact рН/Ion S220 (Mettler-Toledo AG,

Швейцария). Растворы перемешивали с помощью магнитной мешалки MR Hei-Tec (Heidolph, Германия). ИК-спектры регистрировали в диапазоне $450\text{--}3500\text{ см}^{-1}$ на спектрометре FTIR-8400S (Shimadzu, Япония) при комнатной температуре (разрешение 8 см^{-1} , число сканов 30) с программным обеспечением IR solution. СЭМ-снимки получали на сканирующем электронном микроскопе Tescan Mira (Tescan, Чехия).

Модифицирование электрода. Для модифицирования СУЭ к 1 мл ХТЗ добавляли 2 мг СВ, после чего выдерживали смесь в ультразвуковой ванне в течение 40 мин до получения однородной дисперсии. Выбор раствора ХТЗ для получения дисперсии СВ обусловлен образованием наиболее устойчивой и однородной дисперсии по сравнению с другими растворителями (диметилформамид (ДМФА), хлороформ, ацетон, этанол). Водный раствор ХТЗ получали растворением навески 0.0100 г в 5 мл деионизованной воды. Для полировки электродной поверхности использовали деагломерированную суспензию на основе $0.3\text{ мкм Al}_2\text{O}_3$ и специальный полировальный материал (Allied High Tech Products, США). Для модифицирования поверхности электрода 3 мкл дисперсии СВ наносили капельным методом и сушили под ИК-лампой до полного высыхания.

Для приготовления смеси полимера с темплатом в 1 мл ДМФА растворяли 10 мг полимера и 4 мг Клр. Соотношение полимер—темплат устанавливали экспериментально как оптимальное согласно значениям I_p и s_p . Для получения ПМО на поверхность СВ-ХТЗ/СУЭ наносили капельным методом 1 мкл полученного раствора полимера с темплатом, сушили под ИК-лампой в течение 3 мин и удаляли темплат обработкой 1 М раствором H_2SO_4 в течение 90 с при перемешивании. 1 М раствор H_2SO_4 для вымывания темплата выбрали как оптимальный согласно значениям I_p и s_p . Сенсор с неимпринтированным ПАФ (ни-ПАФ) получали по аналогичной методике, но без добавления темплата.

Методика эксперимента. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ регистрировали в диапазоне потенциалов от 0 до 0.6 В с амплитудой импульса 0.025 В, шириной импульса 0.05 с, интервалом времени 0.25 с и скоростью развертки 25 мВ/с. Спектры электрохимического импеданса регистрировали в диапазоне частот от 100 кГц до 0.1 Гц с амплитудой 5 мВ. Циклические вольтамперограммы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ регистрировали в диапазоне потенциалов от -0.1 до 0.6 В со скоростью развертки потенциала 0.1 В/с. Перед регистрацией ДИВ сенсор выдерживали в растворе аналита в течении 40 с для накопления Клр. Все измерения проводили при $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Приготовление растворов. Раствор 0.5 мМ Клр готовили растворением точной навески реагента

в 25 мл ФБР. Растворы более низких концентраций готовили последовательным разбавлением. Образцы урины получены от здорового донора, плазма крови приобретена в Уфимской Республиканской станции переливания крови. Образцы урины и плазмы крови объемом 2.5 мл центрифугировали в течение 5 мин и разбавляли в 10 раз ФБР с рН 6.86. В полученные растворы добавляли известные количества Клр для получения растворов с концентрацией 5.0 и 0.6 мкМ соответственно.

Образец пробы говяжьего фарша получали из навески 10 г, перемешивали с 10 мл ФБР с известной концентрацией Клр 0.1 мкМ с дальнейшей экстракцией в термостате при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 90 мин, затем пробу выдерживали при $65 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, после чего центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин [30].

В качестве молочного продукта использовали молоко (жирность 2.5%) объемом 10 мл, которое разбавляли 10 мл ФБР с добавлением Клр в концентрации 0.5 мкМ [30].

Для приготовления всех растворов использовали сверхчистую деионизованную воду с удельной электропроводностью 0.1 мкСм/см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологию поверхности электродов на каждом этапе модифицирования исследовали методом СЭМ. Рис. 1а показывает, что при нанесении на поверхность СУЭ композита ХТЗ с СВ образуется неоднородный слой, состоящий из частично агломерированных частиц СВ размером до 10 мкм. При увеличении разрешения (рис. 1б) наблюдаются отдельные частицы СВ сферической формы размером от 0.2 до 0.5 мкм. При нанесении ПАФ на модифицированную СВ-ХТЗ поверхность электрода с последующей сушкой под ИК-лампой образуется плотная и равномерная пленка с небольшими неровностями (рис. 1с).

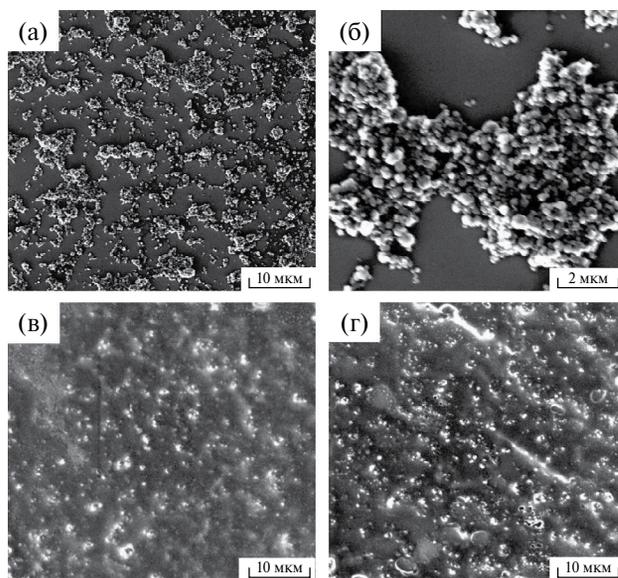


Рис. 1. СЭМ-снимки (а), (б) СВ-ХТЗ/СУЭ, (в) ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ и (г) миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ.

Это подтверждает тот факт, что ПМО, полученные испарением растворителя, имеют плотную однородную структуру из-за постепенного увеличения концентрации полимера в формирующейся пленке. После вымывания темплата из полимера и получения молекулярно импринтированного ПАФ (миПАФ) шероховатость поверхности увеличивается за счет образования пор.

ИК-спектры подтверждают наличие Клр в пленке ПАФ. На рис. 2. представлены ИК-спектры СВ, композита СВ-ХТЗ, ПАФ, Клр и ПАФ до вымывания Клр. В спектре СВ практически нет полос поглощения, кроме небольших валентных колебаний при 1640 см^{-1} , соответствующих связям С=C [28]. В спектре композита СВ-ХТЗ характерные пики при 1647 и 1618 см^{-1} соответствуют валентным колебаниям С=О из —NHCO— и деформационным колебаниям N—H

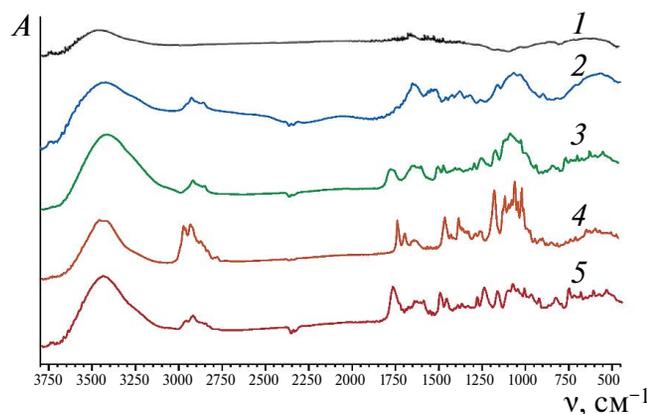


Рис. 2. ИК-спектры графитированной сажи Carbolblack C (1), композита графитированная сажа Carbolblack C-хитозан (2), полиакрилонитрида (3), кларитромицина (4), комплекса полиакрилонитрида-кларитромицин (5).

группы $-\text{NH}_2$. Полосы валентных колебаний $\text{C}-\text{H}$ и $\text{C}-\text{N}$ расположены при 2921 см^{-1} , колебаний $\text{N}-\text{H}$ в плоскости $-\text{NHCO}-$ — при 1377 см^{-1} и полосы $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ — при 1070 см^{-1} [31]. Характеристическими полосами в спектре ПАФ являются 1767 см^{-1} , соответствующая фталидной группе, 727 см^{-1} — группе $\text{Ar}-\text{S}-\text{Ar}$, 1244 см^{-1} — группе $\text{Ar}-\text{O}-\text{Ar}$. Характеристической полосой в спектре Клр является 1732 см^{-1} , соответствующая колебанию карбонильной группы лактона, и 1170 см^{-1} , соответствующая колебанию $\text{C}-\text{O}$ в лактоне. Данные полосы проявляются в спектрах пленки ПАФ с темплатом, подтверждая наличие Клр.

Электрохимические характеристики на каждом этапе модифицирования электродов изучали методами ЦВ (рис. 3а) и СЭИ (рис. 3б) с использованием стандартной редокс-системы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Циклические вольтамперограммы 5 мМ растворов $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ на всех электродах описывают типичный обратимый окислительно-восстановительный процесс, характерный для $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Количественные характеристики спектров электрохимического импеданса определяли с использованием эквивалентной схемы Рэндлса (рис. 3б, вставка). Полученные значения представлены в табл. 1, где R_s и R_{ct} — сопротивление раствора и переноса электрона соответственно, Q — элемент постоянной фазы,

W — импеданс Варбурга, N — шероховатость электродной поверхности [32]. Наибольшие значения токов и, соответственно, наименьшее значение R_{ct} наблюдали на СВ-ХТЗ/СУЭ (рис. 3, кривая 2) по сравнению с СУЭ (кривая 1). Кроме того, наименьшее значение N для СВ-ХТЗ/СУЭ свидетельствует, что поверхность данного электрода наиболее шероховатая, что согласуется с СЭМ-снимками. Наименьшие токи и наибольшее R_{ct} наблюдаются на ПАФ/СУЭ (кривая 3), что подтверждает необходимость использования СВ-ХТЗ. При нанесении на СВ-ХТЗ/СУЭ полимерной пленки ПАФ R_{ct} увеличивается, а токи уменьшаются (кривая 4) по сравнению с СУЭ, что свидетельствует о замедлении скорости переноса электрона для редокс-пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Однако после вымывания Клр из полимера и получения конечного сенсорного слоя (кривая 5) R_{ct} уменьшается, а токи достигают значений, соответствующих СУЭ, и скорость переноса электрона увеличивается за счет образования в полимере пор, через которые ионы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ проникают к поверхности электрода. При этом уменьшение N свидетельствует о том, что поверхность электрода становится более шероховатой. После накопления Клр из раствора с концентрацией 0.3 мМ (кривая 6) токи пика на ЦВ уменьшаются, а R_{ct} возрастает, подтверждая встраивание Клр.

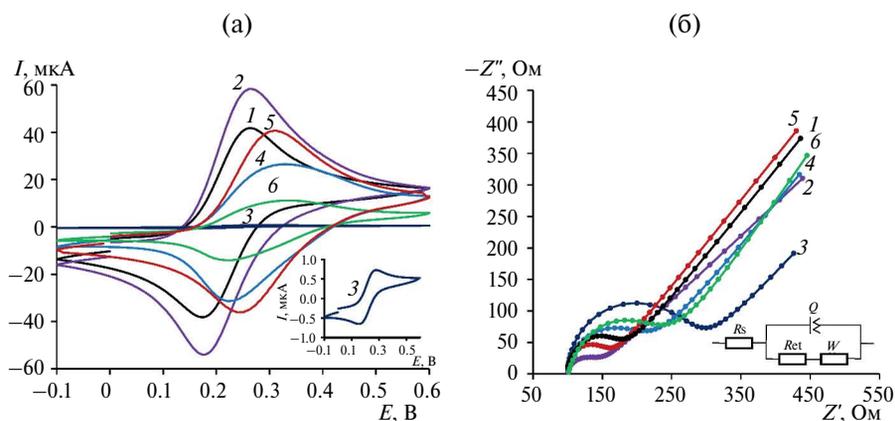


Рис. 3. (а) Циклические вольтамперограммы 5 мМ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ на СУЭ (1), СВ-ХТЗ/СУЭ (2), ПАФ/СУЭ (3), ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (4), миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (5) и миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ после накопления кларитромицина из раствора с концентрацией 0.3 мМ (6); вставка: циклические вольтамперограммы на ПАФ/СУЭ; (б) диаграммы Найквиста соответствующих электродов.

Таблица 1. Параметры спектров электрохимического импеданса для разных этапов модифицирования электрода в 5 мМ растворе $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (0.1 М KCl , $n = 5$, $P = 0.95$)

| Электрод | R_s , Ом | Q , мкСм | N | R_{ct} , Ом | W , мкСм |
|--|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| СУЭ | 107.7 ± 2.1 | 13.1 ± 0.7 | 0.96 ± 0.01 | 93.0 ± 3.8 | 427 ± 8 |
| СВ-ХТЗ/СУЭ | 102.3 ± 3.3 | 16.5 ± 1.0 | 0.76 ± 0.01 | 53.5 ± 3.6 | 367 ± 7 |
| ПАФ/СУЭ | 105.2 ± 5.6 | 10.2 ± 0.8 | 0.92 ± 0.03 | 208.3 ± 8.5 | 282 ± 9 |
| ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ | 101.6 ± 6.1 | 12.2 ± 1.0 | 0.88 ± 0.02 | 126.4 ± 4.6 | 211 ± 6 |
| миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ | 104.6 ± 3.6 | 14.9 ± 0.7 | 0.83 ± 0.01 | 68.8 ± 3.8 | 403 ± 3 |
| миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ после накопления Клр (0.3 мМ) | 108.3 ± 3.8 | 13.5 ± 0.6 | 0.84 ± 0.02 | 145.5 ± 4.2 | 310 ± 6 |

Кларитромицин определяли с использованием 5 мМ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ в качестве зонда, поскольку токи пика окисления самого Клр оказались достаточно низкими и не позволяли определить Клр с высокой чувствительностью. Использование зонда, как правило, значительно увеличивает чувствительность вольтамперометрических ПМО-сенсоров. В данном случае при увеличении концентрации Клр токи пика окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ уменьшается, а аналитическим сигналом служит разность (ΔI_p) между токами пиков окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ до и после инкубирования Клр. На рис. 4 представлены ДИВ 5 мМ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, полученные на разных этапах модифицирования СУЭ. Полученные результаты соответствуют данным ЦВ и СЭИ.

Для оптимизации состава композита и условий определения Клр изучали зависимости аналитических сигналов и относительного стандартного отклонения от количества СВ в дисперсии, массового соотношения ПАФ : Клр в растворе полимера, времени вымывания темплата

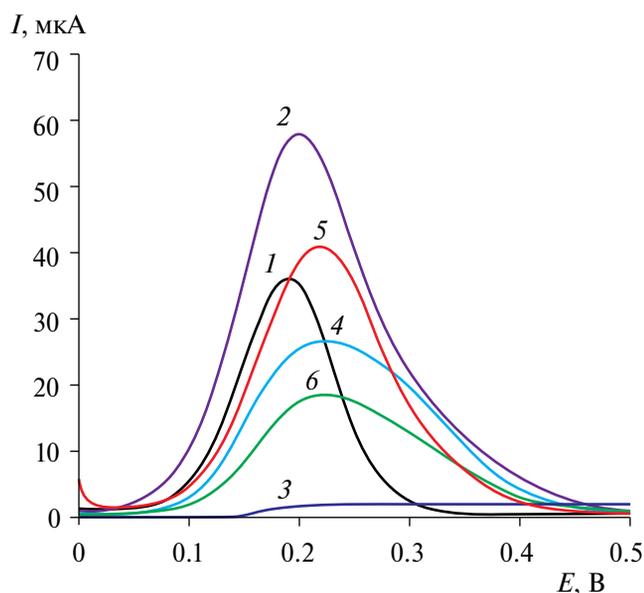


Рис. 4. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы 5 мМ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ на СУЭ (1), СВ-ХТЗ/СУЭ (2), ПАФ/СУЭ (3), ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (4), ми ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (5) и миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ после накопления кларитромицина из раствора с концентрацией 0.3 мМ (6).

из пленки ПАФ и времени инкубирования Клр на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ перед регистрацией ДИВ (рис. 5). Результаты показали, что при увеличении количества СВ в 1 мл дисперсии с ХТЗ до 3 мг токи пика $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ возрастают (рис. 5а), а наименьшие относительные стандартные отклонения наблюдаются при 1.5 и 2 мг СВ, что, по-видимому, связано с образованием однородного и устойчивого слоя композита СВ-ХТЗ, поэтому в качестве оптимального количества СВ выбрали 2 мг. Зависимость ΔI_p от соотношения ПАФ : Клр показала, что наибольший аналитический сигнал и наименьшие погрешности наблюдаются при соотношении 10 : 4 (рис. 5б). Полное вымывание темплата из пленки ПАФ достигается через 90 с выдерживания в 1 М H_2SO_4 (рис. 5в). Оптимальное время инкубирования миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ в 0.5 мМ растворе Клр составило 40 с (рис. 5г).

Линейный характер зависимости тока пика от содержания Клр в растворе сохраняется в концентрационном диапазоне 1×10^{-7} – 5×10^{-4} М с пределом обнаружения 5.3×10^{-8} М (рис. 6). Кроме того, на рис. 5б показаны линейные зависимости для НИП-сенсоров. Наличие молекулярных отпечатков значительно повышает чувствительность миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ, фактор импринтинга $F_{\text{имп}} = S_{\text{ПМО}}/S_{\text{НИП}}$ составил 9.88. Эти результаты свидетельствуют о высокой чувствительности и селективности сенсора миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ.

Оценка воспроизводимости и стабильности определения Клр на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ показала, что после 10 последовательных измерений токи пика оставались на уровне 95.8% от исходных значений с относительным стандартным отклонением 2.8%. После 14 дней хранения при комнатной температуре токи пика миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ составили 93.7% от исходного значения с относительным стандартным отклонением 3.9%.

Для оценки правильности определения Клр использовали метод введено–найдено (табл. 2), относительное стандартное отклонение не превышало 2.1 %, что указывает на хорошую воспроизводимость результатов, а значение степени извлечения 98% свидетельствует о правильности результатов определения. Для оценки аналитических возможностей предложенный сенсор апробировали при определении Клр в моче и плазме крови человека. Относительное стандартное от-

Таблица 2. Результаты определения кларитромицина с использованием дифференциально-импульсной вольтамперометрии предложенным сенсором с $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ в качестве зонда (20 мВ/с, $n = 5$, $P = 0.95$)

| Анализируемый образец | Введено, мкМ | Найдено, мкМ | s_r , % | Степень извлечения, % |
|-----------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------------------|
| ФБР | 0.50 | 0.49 ± 0.02 | 2.1 | 98 |
| Урина | 5.0 | 4.8 ± 0.3 | 5.8 | 96 |
| Плазма крови | 0.60 | 0.54 ± 0.08 | 9.3 | 90 |
| Экстракт мяса | 0.10 | 0.08 ± 0.01 | 9.8 | 80 |
| Молоко | 0.50 | 0.46 ± 0.07 | 8.3 | 92 |

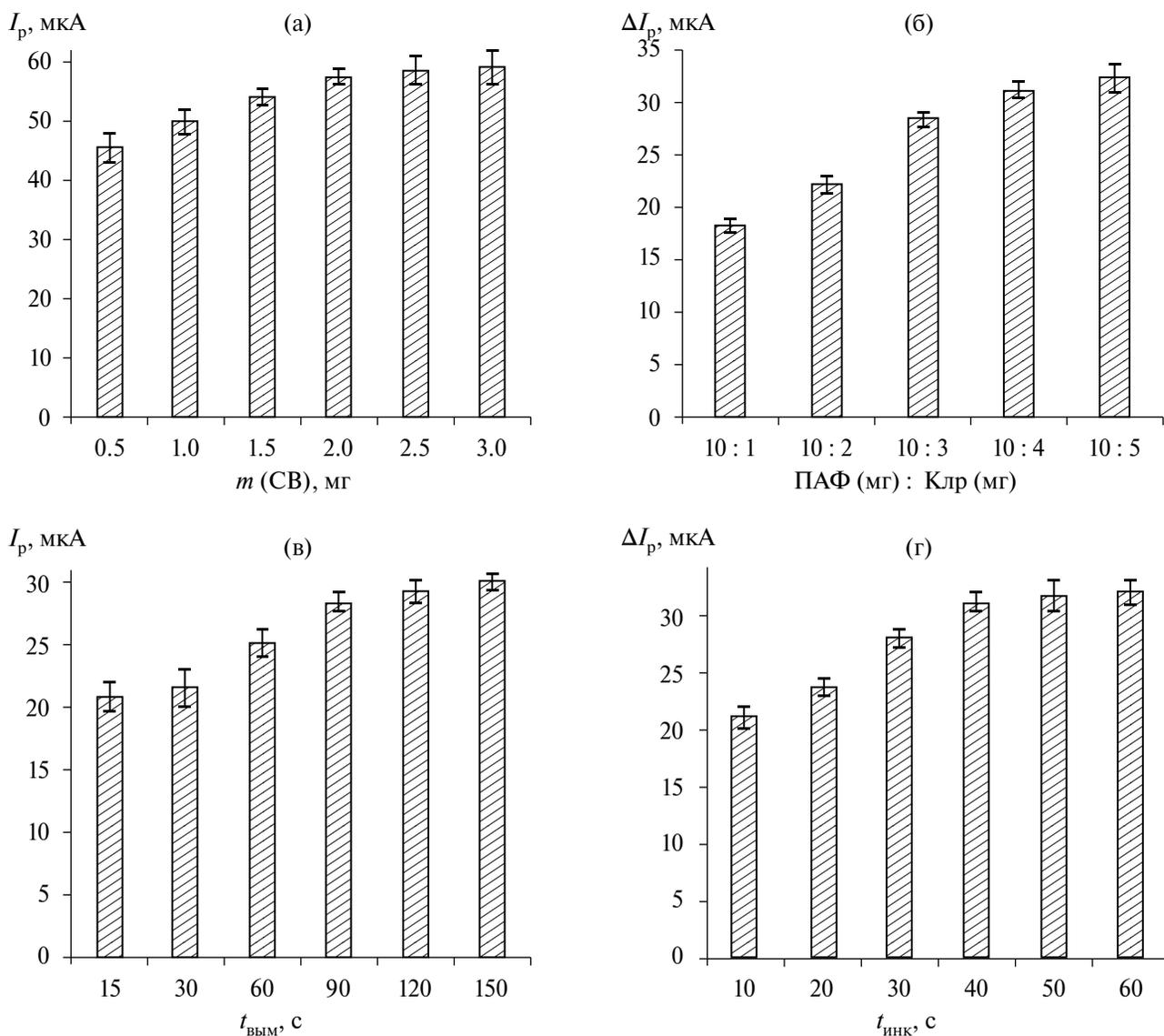


Рис. 5. (а) Зависимость тока окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ на СВ-ХТЗ/СУЭ от количества графитированной сажи Carbolblack C в дисперсии; (б) зависимости ΔI_p от массового соотношения полиариленфталид : кларитромицин в растворе полимера, (в) от времени вымывания темплата из пленки полиариленфталида и (г) от времени инкубирования кларитромицина на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ перед регистрацией дифференциально-импульсных вольтамперограмм ($n = 5, P = 0.95$).

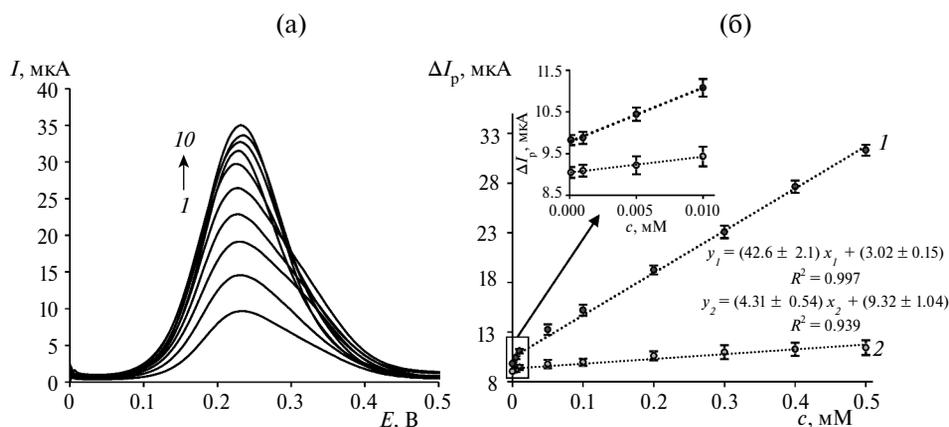


Рис. 6. (а) Дифференциально-импульсные вольтамперограммы растворов кларитромицина разной концентрации ($I - 0.5, 2 - 0.4, 3 - 0.3, 4 - 0.2, 5 - 0.1, 6 - 0.05, 7 - 0.01, 8 - 0.005, 9 - 0.001, 10 - 0.0001$ мМ) на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ; (б) соответствующие градуировочные графики на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (1) и ниПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (2) ($n = 5, P = 0.95$).

клонение при определении Клр в урине и плазме крови составило 5.8 и 9.3%, а значения степени извлечения — 96 и 90% соответственно. Более высокие погрешности при определении Клр в плазме крови связаны с ее сложным составом и большим содержанием органических структур по сравнению с уриной. Сенсор апробировали также на пищевых продуктах (мясо и молоко). Из-за сложного состава образцов можно было ожидать, что погрешности определения в них Клр будут более высокими. Относительное стандартное отклонение при определении Клр в мясе и молоке составило 9.8 и 8.3%, а значения степени извлечения — 80 и 92% соответственно. Однако данные результаты можно считать приемлемыми и использовать в дальнейшем для анализа. Выбор добавленных концентраций Клр в реальные образцы обусловлен его возможным содержанием в них согласно литературным данным [33–35].

Основной целью разработки миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ являлось повышение селективности сенсора по отношению к Клр. Для оценки влияния на аналитический сигнал Клр выбрали антибиотики азитромицин (Азт) и линкомицин (Лин). Получили ДИВ растворов Азт и Лин одинаковой концентрации (0.5 мМ) с использованием $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ в качестве зонда в тех же условиях. Из рис. 7 видно, что сенсор миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ обладает наибольшей селективностью в отношении Клр по сравнению с Азт и Лин. Это можно объяснить образованием более специфических сайтов связывания.

Таким образом, для определения Клр разработан высокоселективный вольтамперометрический сенсор на основе СУЭ, модифицированного композитом ХТЗ, графитированной сажи СВ и ПАФ с молекулярными отпечатками кларитромицина, полученными методом инверсии фаз

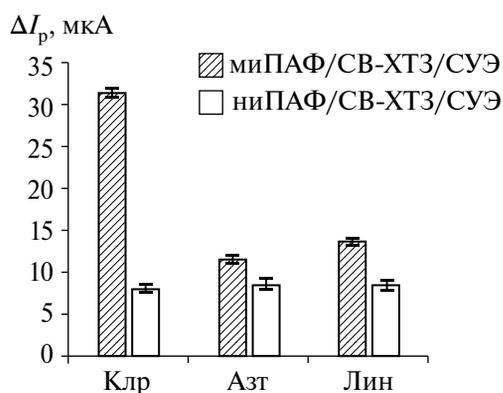


Рис. 7. Отклики миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ и ниПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ на кларитромицин (0.5 мМ), азитромицин (0.5 мМ) и линкомицин (0.5 мМ) ($n = 5$, $P = 0.95$).

путем испарения растворителя. Большим достоинством сенсора является простота изготовления за счет использования метода сухой инверсии фаз. Методом СЭМ показано образование однородной плотной полимерной пленки на поверхности электрода, а композит ХТЗ и СВ значительно увеличивает токи пиков. Оптимальное время вымывания темплата из пленки ПАФ и инкубирования предложенного сенсора в растворе Клр составило 90 и 40 с соответственно. Показано, что разработанный сенсор обладает высокой селективностью к определяемому антибиотику, а наличие специфических сайтов связывания в полимерной пленке позволяет определять Клр с чувствительностью, практически десятикратно превышающей чувствительность аналогичного сенсора без молекулярных отпечатков. Оценка селективности относительно других антибиотиков (Азт и Лин) показала, что предложенный сенсор обладает высокой селективностью к Клр. Полученный сенсор успешно применен для определения Клр в биологических жидкостях, образцах мяса и молока, степень извлечения составила 90–96, 80 и 92% соответственно, а относительное стандартное отклонение не более 10% во всех случаях.

Авторы выражают благодарность лаборатории синтеза функциональных полимеров УФИЦ РАН под руководством Крайкина В.А. за предоставленные образцы полимера.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (номер гранта 21-73-00295, <https://rscf.ru/en/project/21-73-00295/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *BelBruno J.* Molecularly imprinted polymers // *Chem. Rev.* 2019. V. 119. P. 94. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>
2. *Benachio I., Lobato A., Goncalves L.M.* Employing molecularly imprinted polymers in the development of electroanalytical methodologies for antibiotic determination // *J. Mol. Recognit.* 2021. V. 34. P. 2878. <https://doi.org/10.1002/jmr.2878>
3. *Crapnell R.D., Hudson A., Foster C.W., Eersels K., Grinsven B., Cleij T.J. et al.* Recent advances in electrosynthe-

- sized molecularly imprinted polymer sensing platforms for bioanalyte detection // *Sensors*. 2019. V. 19. P. 204. <https://doi.org/10.3390/s19051204>
4. *Wulff G.* Forty years of molecular imprinting in synthetic polymers: Origin, features and perspectives // *Microchim. Acta*. 2013. V. 180. № 15. P. 1359. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-0992-9>
 5. *Yarkaeva Y., Maistrenko V., Dymova D., Zagitova L., Nazrov M.* Polyaniline and poly(2-methoxyaniline) based molecularly imprinted polymer sensors for amoxicillin voltammetric determination // *Electrochim. Acta*. 2022. V. 433. Article 141222. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.141222>
 6. *Dmitrienko E.V., Pyshnaya I.A., Martyanov O.N., Pyshnyi D.V.* Molecularly imprinted polymers for biomedical and biotechnological applications // *Russ. Chem. Rev.* 2016. V. 85. P. 513. <https://doi.org/10.1070/RCR4542>
 7. *Poller A.-M., Spieker E., Lieberzeit P.A., Preininger C.* Surface imprints: Advantageous application of ready2use materials for bacterial quartz-crystal microbalance sensors // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. V. 9. P. 1129. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b13888>
 8. *Dima S.-O., Meouche W., Dobre T., Nicolescu T.-V., Sarbu A.* Diosgenin-selective molecularly imprinted pearls prepared by wet phase inversion // *React. Funct. Polym.* 2013. V. 73. P. 1188. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.05.014>
 9. *Yang Q., Wu X., Peng H., Fu L., Song X., Li J., Xiong H., Chen L.* Simultaneous phase-inversion and imprinting based sensor for highly sensitive and selective detection of bisphenol A // *Talanta*. 2018. V. 176. P. 595. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.075>
 10. *Mulder M.* Basic Principles of membrane technology. Kluwer: Dordrecht, 1991.
 11. *Wang H.Y., Kobayashi T., Fujii N.* Molecular imprint membranes prepared by the phase inversion precipitation technique // *Langmuir*. 1996. V. 12. P. 4850. <https://doi.org/10.1021/la960243y>
 12. *Noaman U.H., Park J.K.* Optical resolution of phenylalanine using D-Phe-imprinted poly(acrylic acid-co-acrylonitrile) membrane: Racemate solution concentration effect // *Polym. Composite*. 2008. V. 29. P. 949. <https://doi.org/10.1002/pc.20479>
 13. *Tasselli F., Donato L., Drioli E.* Evaluation of molecularly imprinted membranes based on different acrylic copolymers // *J. Membrane Sci.* 2008. V. 320. P. 167. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.03.071>
 14. *Silvestri D., Barbani N., Cristallini C., Giusti P., Ciardelli G.* Molecularly imprinted membranes for an improved recognition of biomolecules in aqueous medium // *J. Membrane Sci.* 2006. V. 282. P. 284. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.05.031>
 15. *Mkhize D.S., Nyoni H., Quinn L.P., Mamba B.B., Msagati T.A.M.* Molecularly imprinted membranes (MIMs) for selective removal of polychlorinated biphenyls (PCBs) in environmental waters: fabrication and characterization // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2017. V. 24. P. 11694. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8829-4>
 16. *Kobayashi T., Murawaki Y., Reddy P.S., Abe M., Fujii N.* Molecular imprinting of caffeine and its recognition assay by quartz-crystal microbalance // *Anal. Chim. Acta*. 2001. V. 435. P. 141. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01281-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01281-2)
 17. *Qiu Z., Fan D., Xue X., Guo S., Lin Y., Chen Y., Tang D.* Molecularly imprinted polymer functionalized Bi₂S₃/Ti₃C₂TX MXene nanocomposites for photoelectrochemical/electrochemical dual-mode sensing of chlorogenic acid // *Chemosensors*. 2022. V. 10. P. 252. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10070252>
 18. *Reddy P.S., Kobayashi T., Abe M., Fujii N.* Molecularly imprinted Nylon-6 as a recognition material of amino acids // *Eur. Polym. J.* 2002. V. 38. P. 521. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(01\)00212-9](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(01)00212-9)
 19. *Abdel-Shafy H.I., Sayour H.E., Mansour M.S.M.* Molecularly imprinted membrane based on molecularly imprinted nanoparticles polymer for separation of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Polym. Adv. Technol.* 2016. V. 27. P. 724. <https://doi.org/10.1002/pat.3704>
 20. *Donato L., Tasselli F., Drioli E.* Molecularly imprinted membranes with affinity properties for folic acid // *Sep. Sci. Technol.* 2010. V. 45. P. 2273. <https://doi.org/10.1080/01496395.2010.510089>
 21. *Barbani N., Rosellini E., Donati M., Costantino P., Cristallini C., Ciardelli G.* Molecularly imprinted polymers by phase inversion technique for the selective recognition of saccharides of biomedical interest in aqueous solutions // *Polym. Int.* 2017. V. 66. P. 900. <https://doi.org/10.1002/pi.5334>
 22. *Ciobanu M., Marin L., Cozan V., Bruma M.* Aromatic polysulfones used in sensor applications // *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2009. V. 22. P. 89
 23. *Kraikin V., Fatykhov A., Gileva N., Kravchenko A., Salazkin S.* NMR study of dyadic and triadic splitting in copoly(arylene)phthalides based on diphenyl oxide and diphenyl sulfide // *Magn. Reson. Chem.* 2020. V. 59. № 1. P. 61. <https://doi.org/10.1002/mrc.5079>
 24. *Салазкин С.Н., Шапошникова В.В., Мачуленко Л.Н., Гилева Н.Г., Крайкин В.А., Лачинов А.Н.* Синтез полиариленфталидов, перспективных в качестве “умных” полимеров // 2008. Т. 50. № 3. С. 399. (*Salazkin S., Shaposhnikova V., Machulenko L., Gileva N., Kraikin V., Lachinov A.* Synthesis of polyarylenephthalides prospective as smart polymers // *Polym. Sci. Ser. A*. 2008. V. 50. № 3. P. 243. <https://doi.org/10.1134/S0965545X08030024>)
 25. *Гилева Н.Г., Крайкин В.А., Седова Э.А., Лобов М.С., Кузнецов С.И., Салазкин С.Н.* Регулирование состава и микроструктуры сополиариленфталидов // *Журн. прикл. химии*. 2005. Т. 78. № 10. С. 1712. (*Gileva N., Kraikin V., Sedova E., Lobov M., Kuznetsov S., Salazkin S.* Control over the composition and mi-

- crostructure of copoly(arylene phthalides) // Russ. J. Appl. Chem. 2005. V. 78. № 10. P. 1683.
<https://doi.org/10.1007/S11167-005-0586-3>
26. Salikhov R., Zilberg R., Mullagaliev I., Salikhov T., Teres Y. Nanocomposite thin film structures based on polyarylenephthalide with SWCNT and graphene oxide fillers // Mendeleev Commun. 2022. V. 32. P. 520.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2022.07.029>
 27. Yarkaeva Y., Maistrenko V., Zagitova L., Nazyrov M., Berestova T. Voltammetric sensor system based on Cu(II) and Zn(II) amino acid complexes for recognition and determination of atenolol enantiomers // J. Electroanal. Chem. 2021. V. 903. Article 115839;
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115839>
 28. Zagitova L., Yarkaeva Y., Zagitov V., Nazyrov M., Gainanova S., Maistrenko V. Voltammetric chiral recognition of naproxen enantiomers by N-tosylproline functionalized chitosan and reduced graphene oxide based sensor // J. Electroanal. Chem. 2022. V. 992. Article 116774.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116774>
 29. Jafari S., Dehghani M., Nasirizadeh N., Azimzadeh M. An azithromycin electrochemical sensor based on an aniline MIP film electropolymerized on a gold nano urchins/graphene oxide modified glassy carbon electrode // J. Electroanal. Chem. 2018. V. 829. P. 27.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.09.053>
 30. Шендерович В.А., Пастернак Н.А., Столярова Л.Г., Соловьева В.Е., Власова И.В., Ведьмиа Е.А., Шевелева С.А. Экспресс-метод определения антибиотиков в пищевых продуктах. Методические указания. 29 марта 1995 г. МУК 4.2.026–95.
 31. Jafari M., Tashkhourian J., Absalan G. Chiral recognition of tryptophan enantiomers using chitosan-capped silver nanoparticles: Scanometry and spectrophotometry approaches // Talanta. 2018. V. 178. P. 870.
<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2017.10.005>
 32. Lasia A. Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. Springer: New York, 2014. 10.1007/978-1-4614-8933-7
 33. Kul A., Ozdemir M., Sagirl O. Pharmacokinetic study of clarithromycin in human breast milk by UPLC–MS/MS // J. Pharm. Biomed. Anal. 2022. V. 208. Article 114438.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114438>
 34. Chu S.-Y., Sennello L.T., Sonders R.C. Simultaneous determination of clarithromycin and 14(R)-hydroxy-clarithromycin in plasma and urine using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 1991. V. 571. № 1–2. P. 199.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80446-J](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80446-J)
 35. Zuckerman J.M., Qamar F., Bono B.R. Review of macrolides (azithromycin, clarithromycin), ketolids (telithromycin) and glycylicyclines (tigecycline) // Med. Clin. North Am. 2011. V. 95. № 4. P. 761.
<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2011.03.012>

ORIGINAL ARTICLES

VOLTAMMETRIC SENSOR BASED ON A COMPOSITE OF CHITOSAN, GRAPHITIZED CARBON BLACK AND POLYARYLENEPHTHALIDE WITH MOLECULAR IMPRINTS FOR THE DETERMINATION OF CLARITHROMYCIN

Yu. A. Yarkaeva^a*, M.I. Nazyrov^a, D.A. Dymova^a, and V.N. Maistrenko^a

^aChemistry Faculty, Ufa University of Science and Technology, 450076 Ufa, Russia

*e-mail: julijajarkaeva05@gmail.com

Received April 13, 2023. Revised April 27, 2023. Accepted April 27, 2023

Abstract. For selective determination of the antibiotic clarithromycin, a voltammetric sensor based on a glass-carbon electrode modified with a composite of chitosan, Carboblack C graphitized carbon black and polyarylenephthalide containing diphenylene-thio- and diphenylene oxide fragments in the main chain of the polymer in the ratio of 1 : 2 with molecular imprints of clarithromycin obtained by phase inversion method was developed. The composition and morphology of the modifying coating were studied using IR spectroscopy and scanning electron microscopy. The electrochemical and analytical characteristics of the sensor were studied by electrochemical impedance spectroscopy, cyclic and differential-pulse voltammetry. Optimal conditions for analytical signal registration were selected. Using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as a probe, the linear range of determined concentrations was 1×10^{-7} – 5×10^{-4} M with a detection limit of 5.3×10^{-8} M. It is shown that the use of a polymer with molecular imprints of clarithromycin increases the sensitivity of the sensor almost 10 times compared to the non-imprinted polymer. The proposed sensor was tested on samples of urine, blood plasma, as well as food products (meat, milk), the degree of extraction was 90–96, 80 and 92%, respectively, and the relative standard deviation did not exceed 10% in all cases.

Keywords: molecular imprinted polymers, polyarylenephthalide, phase inversion, voltammetric sensor, clarithromycin, graphitized carbon black.

УДК 543.552

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА В МЯСЕ И МОЛОКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЕНСОРА НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОВОССТАНОВЛЕННОГО ОКСИДА ГРАФЕНА И ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОГО ФУЛЛЕРЕНА

© 2024 г. И. А. Абрамов^{a,*}, С. И. Гайнанова^a, Л. Р. Загитова^a, В. Н. Майстренко^a

^aУфимский университет науки и технологий, кафедра аналитической химии
ул. Заки Валиди, 32, Уфа, 450076 Россия

*E-mail: papa.abramov@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Антибактериальные препараты стали неотъемлемой частью пищевой промышленности и сельского хозяйства в современном мире. Присутствие даже следовых количеств антибиотиков в продуктах питания животного происхождения может приводить к развитию аллергических реакций и к прямым токсическим эффектам в организме человека. В связи с этим требуется создание чувствительных и селективных методик определения антибактериальных препаратов с целью предотвращения их чрезмерного потребления. В работе предложен стеклоуглеродный вольтамперометрический сенсор на основе послойно нанесенного электровосстановленного оксида графена и функционализированного S-N,N'-бис(1-фенилэтил)малонамидом фуллерена для определения левофлоксацина (**Лев**, S(-)-офлоксацин) методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии. Градуировочный график линеен в двух диапазонах 1.0×10^{-6} – 6.0×10^{-5} М и 6.0×10^{-5} – 5.0×10^{-4} М Лев с коэффициентами чувствительности 107 и 58.0 мкА/мМ соответственно. Предел обнаружения и нижняя граница определяемых содержаний составили 1.8×10^{-7} М и 6.04×10^{-7} М соответственно. Оценена селективность сенсора к Лев относительно некоторых антибиотиков фторхинолонового ряда: ципрофлоксацина, ломефлоксацина, энрофлоксацина. Сенсор использован для определения Лев в мясе и молоке методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии.

Ключевые слова: вольтамперометрический сенсор, функционализированный фуллерен, электровосстановленный оксид графена, левофлоксацин, продукты питания животного происхождения.

DOI: 10.31857/S0044450224060057, EDN: tuhbfp

Антибиотики – одна из важнейших биоактивных и химиотерапевтических групп соединений. Они широко применяются в сельском хозяйстве, и несоблюдение норм применения антибактериальных препаратов может приводить к появлению новых резистентных штаммов бактерий и развитию аллергических реакций у людей [1, 2]. При несоблюдении дозировок применяемых препаратов и отсутствии контроля времени выведения лекарственного соединения перед забоем антибиотики могут накапливаться в мясе крупного рогатого скота и птиц. Некоторые препараты добавляют непосредственно в продукты питания, в частности в молоко и сливки. Таким образом, существует потребность в создании чувствительных и селективных

методик определения антибиотиков в продуктах питания животного происхождения как средств контроля за их надлежащим использованием.

Левофлоксацин (**Лев**) – антибактериальный препарат, который входит в группу фторхинолонов III поколения и представляет (S)-изомер офлоксацина. Он активно применяется в качестве лекарственного средства в сельском хозяйстве и ветеринарии [3], при этом максимально допустимый уровень фторхинолонов в продуктах питания животного происхождения составляет от 100 до 500 мкг/кг [4]. Разработано множество методик определения фторхинолонов, в частности Лев, в реальных образцах. В работах [5–7] рассматривается определение антибиотиков, в том числе фторхинолонов, методом высоко-

эффективной жидкостной хроматографии с различными способами детектирования [5], в том числе в сочетании с тандемной масс-спектрометрией [6, 7]. Несомненными достоинствами хроматографического метода определения являются возможность одновременного определения различных соединений с высокой точностью и низкие пределы обнаружения. К недостаткам можно отнести высокую стоимость оборудования, необходимость предварительного выделения аналита из анализируемого объекта, использование токсичных растворителей, таких как ацетонитрил и метанол. Широко применяется иммуноферментный метод определения. Так, предложенный в работе [8] экспресс-тест для определения ряда фторхинолонов в мясе и крови характеризуется высокими специфичностью и надежностью, а также достаточно простой пробоподготовкой и методикой проведения анализа, но тест-полоски сложны в изготовлении и имеют относительно высокую стоимость. Для определения широкого спектра антибиотиков хорошо зарекомендовали себя биосенсоры [9] с использованием в составе чувствительного слоя антител, ферментов, аптамеров и клеток. Тем не менее применение биологических материалов требует создания специфических условий для проведения эксперимента. Использование электрохимических методов анализа позволяет не только уменьшить время пробоподготовки при сохранении уровня значений аналитических характеристик, но и снизить стоимость и упростить процедуру проведения анализа [10, 11].

В настоящее время для определения Лев разработаны различные вольтамперметрические сенсоры. В работе [12] предложен иммуносенсор на основе многостенных углеродных нанотрубок, модифицированных поли(L-лизин) и мечеными мультиферментными комплексами наночастиц золота. Главными достоинствами сенсора являются низкий предел обнаружения 4.2×10^{-10} М и высокая селективность к аналиту, однако он сложен в изготовлении и требует соблюдения специфических условий анализа, таких как строгий температурный режим и стерильность места проведения анализа. Предложены сенсоры на основе стеклоуглеродного электрода (СУЭ) с использованием восстановленного оксида графена (эВОГ) как в качестве индивидуального селектора [13], так и в составе композитного материала с поли(*para*-аминобензолсульфоновой кислотой) [14]. В роли углеродсодержащих подложек широко применяются и другие материалы: графен [15], графитированная сажа [16], многостенные углеродные нанотрубки [17]. Использование последних позволяет не только увеличить интенсивность аналитического сигнала, но и упростить иммобилизацию селекторов на поверхность электрода. Большой популярностью пользуются наноча-

стицы металлов, в особенности серебра и золота [16, 18]. В качестве селекторов, обеспечивающих селективное взаимодействие с Лев, применяются металлоорганические каркасные структуры [17] и полимерные пленки [13–17].

В работе [19] нами предложен СУЭ, модифицированный эВОГ для увеличения интенсивности аналитического сигнала и функционализированным фуллереном (С60) для селективного взаимодействия с Лев [20]. Уникальной особенностью фуллерена является легкая функционализация, благодаря которой возможно варьировать структуру селектора и количество сайтов связывания. В работе получены следующие метанопроизводные фуллерена: S/R-2-хлоро-N-(1-фенилэтил)ацетамид (С60АА) и S/R-N,N'-бис(1-фенилэтил)малонамид фуллерена (С60МА). Исследование показало, что наилучшим связыванием обладают селекторы с S-конфигурацией, в то время как количество оптических центров не влияет на распознавание Лев. Сенсор СУЭ/эВОГ/S-С60АА использовали для определения Лев в биологических жидкостях.

Настоящее исследование направлено на определение Лев в продуктах питания животного происхождения с использованием сенсора СУЭ/эВОГ/S-С60МА. Изучены электрохимическое поведение Лев в зависимости от состава чувствительного слоя сенсора, зависимость аналитического сигнала от скорости сканирования, построена градуировочная зависимость в диапазоне концентраций от 1.0×10^{-6} до 5.0×10^{-4} , представлены результаты определения Лев в мясе и молоке, полученные методом введено-найденно, изучена селективность сенсора к Лев относительно ципрофлоксацина, ломефлоксацина, энрофлоксацина в таблетированной форме. Проведено сравнение предложенной методики с описанными в литературе для определения Лев в продуктах питания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и оборудование. Левофлоксацин ($\geq 98\%$), порошок оксида графена (15–20 слоев, 4–10% краевого окисления), S- и R- α -метилбензиламин ($\geq 98\%$), малоновую кислоту (99%), L-цистеин (**L-Цис**, $\geq 97\%$), L-метионин (**L-Мет**, $\geq 98\%$), L-триптофан (**L-Трип**, $\geq 98\%$), L-тирозин (**L-Тир**, $\geq 98\%$), лактозу (**Лак**, $\geq 98\%$), глюкозу (**Глю**, $\geq 97.5\%$) приобретали у Merck Life Science LLC (Россия). Фуллерен С60 (99.9%) приобретали у NeoTechProduct (Россия). В качестве фонового электролита для Лев использовали буферный раствор гидрофталата калия (**БРГ**, 0.05 М раствор $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ с pH 4.01), для электровосстановления оксида графена – фосфатный буферный раствор (**ФБР**, 0.05 М раствор $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ с pH 6.86, Ecroskhim Co., Ltd. Россия).

Деагломерированную суспензию 0.3 мкм Al_2O_3 приобретали у Allied High Tech Products (США).

Все электрохимические измерения проводили на потенциостате-гальваностате CS100 (Wuhan Corrtest Instruments Corp., Ltd, Китай) с программным обеспечением CS Studio. Стандартная трехэлектродная ячейка состояла из модифицированного СУЭ диаметром 3 мм в качестве рабочего электрода, хлоридсеребряного электрода с 3.5 М раствором KCl в качестве электрода сравнения и платинового вспомогательного электрода.

Модифицирование электрода. Чувствительный слой сенсора состоял из послойно нанесенного эВОГ и S-C60MA. Суспензию ОГ в N,N-диметилформамиде (4 мг/мл) после выдерживания в ультразвуковой ванне наносили капельным методом (0.6 мкл) на предварительно отполированный СУЭ, далее проводили электрохимическое восстановление ОГ согласно методике [21]. Модифицированный СУЭ сушили под ИК-лампой в течение 90 с. Селектор S-C60MA растворяли в толуоле (0.25 мг/мл) и наносили капельным методом (1.5 мкл) на СУЭ/эВОГ, затем СУЭ/эВОГ/S-C60MA сушили под ИК-лампой в течение 30 с.

Регистрация аналитического сигнала. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы (ДИВ) регистрировали в диапазоне потенциалов от 0.6 до 1.5 В с амплитудой 0.075 В, временем модуляции 0.075 с, скоростью сканирования 30 мВ/с. Затем ДИВ обрабатывали, используя коррекцию базовой линии. Циклические вольтамперограммы (ЦВА) регистрировали в диапазоне потенциалов от 0 до 1.9 В со скоростью сканирования от 50 до 250 мВ/с. Все электрохимические измерения повторяли пять раз при $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Приготовление растворов. Раствор Лев (0.5 мМ) готовили растворением точной навески реагента в 25 мл БРГ, растворы более низких концентраций готовили последовательным разбавлением.

Растворы Лев (0.05 мМ) с добавлением мешающих компонентов (L-Цис, L-Мет, L-Трп, L-Тир, Лак и Глю) готовили разбавлением 0.5 мМ раствора Лев с добавлением точной навески реагентов.

Растворы коммерчески доступных лекарственных препаратов в таблетированной форме с одинаковым составом вспомогательных веществ (Лев, энрофлоксацин, ломефлоксацин и ципрофлоксацин) готовили растворением навески растертых таблеток в 100 мл БРГ, затем отбирали аликвоту 10 мл и разбавляли необходимым объемом БРГ до концентрации 0.5 мМ.

Пробу мяса получали из навески 10 г говяжьего фарша, перемешивали с 10 мл БРГ с дальнейшим термостатированием при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 90 мин, затем при $65 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, после чего центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин. Затем в супернатант вносили Лев для получения растворов с концентрациями 4, 15 и 35 мкМ [22].

Образец молока (жирность 2.5%) объемом 10 мл разбавляли 10 мл БРГ с добавлением Лев известной концентрации (4, 15 и 35 мкМ) [22].

Для приготовления всех растворов использовали деионизованную воду с удельной электропроводностью 0.1 мкСм/см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Работа [19] посвящена изучению электрохимических характеристик сенсора в зависимости

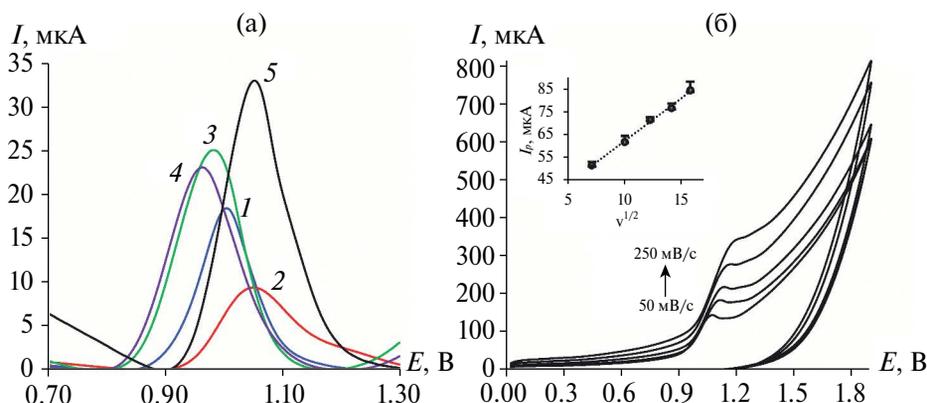


Рис. 1. (а) Дифференциально-импульсные вольтамперограммы 0.5 мМ раствора левофлоксацина на СУЭ (1), СУЭ/С60 (2), СУЭ/эВОГ (3), СУЭ/эВОГ/С60 (4), СУЭ/эВОГ/S-C60МА (5); (б) циклические вольтамперограммы 0.5 мМ раствора левофлоксацина, скорость сканирования в диапазоне от 50 до 250 мВ/с (вставка: зависимость тока пика окисления от квадратного корня скорости сканирования, $n = 5$, $P = 0.95$). Буферный раствор гидрофталата калия с рН 4.01.

от состава чувствительного слоя с использованием стандартной редокс-пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ с помощью циклической вольтамперометрии и спектроскопии электрохимического импеданса. Морфологические характеристики сенсоров изучены с помощью сканирующей электронной микроскопии, а также подобраны оптимальные условия регистрации аналитического сигнала. В настоящей работе акцент сделан на изучении аналитических возможностей сенсора при определении Лев в продуктах питания животного происхождения.

Электрохимическое поведение Лев в зависимости от состава чувствительного слоя изучали методом ДИВ в исследуемом диапазоне потенциалов (рис. 1а). Как видно из вольтамперограмм, внесение в состав чувствительного слоя чистого С60 вызывает резкое снижение аналитического сигнала, что, предположительно, связано с диэлектрическими свойствами С60. Для решения этой проблемы в соответствии с ранее проведенным исследованием [19] предложено использовать углеродсодержащую подложку эвоГ и функционализацию С60. Показано, что введение эвоГ способствует увеличению тока пика, а введение С60 вызывает его снижение. Наиболее интенсивный аналитический сигнал окисления Лев получен с помощью сенсора СУЭ/эвоГ/S-С60МА с послойно нанесенными эвоГ и функционализированным фуллереном.

Для выявления лимитирующей стадии электродного процесса исследовали зависимость величины тока пика окисления Лев от скорости сканирования потенциала в режиме ЦВА (рис. 1б). Получили линейный график зависимости $I_p = f(v^{1/2})$, который описывается уравнением (1), что свидетельствует о преимущественно диффузионном характере протекания процесса электроокисления Лев.

$$I_p = (3.8 \pm 0.1)v^{1/2} + (23.6 \pm 1.6), R^2 = 0.997 \quad (1)$$

Левифлоксацин определяли в режиме ДИВ. При построении градуировочного графика получили два линейных диапазона 1×10^{-6} – 6×10^{-5} М и 6×10^{-5} – 5×10^{-4} М Лев, которые описываются уравнениями (2) и (3) соответственно (рис. 2). Предел обнаружения и нижнюю границу определяемых содержаний рассчитывали по $3s_b/m$ и $10s_b/m$ критериям, они составили 1.8×10^{-7} и 6.04×10^{-7} М.

$$I_p = (107 \pm 2)c + (0.13 \pm 0.06), R^2 = 0.998, \quad (2)$$

$$I_p = (58.0 \pm 0.3)c + (2.7 \pm 0.1), R^2 = 1. \quad (3)$$

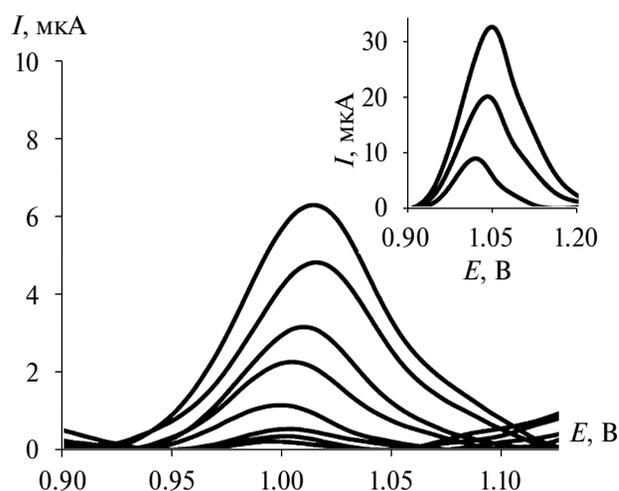


Рис. 2. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы левофлоксацина в диапазоне концентраций 0.001–0.06 мМ на СУЭ/эвоГ/S-С60МА (вставка: в диапазоне 0.06–0.5 мМ) (буферный раствор гидрофталата калия с рН 4.01).

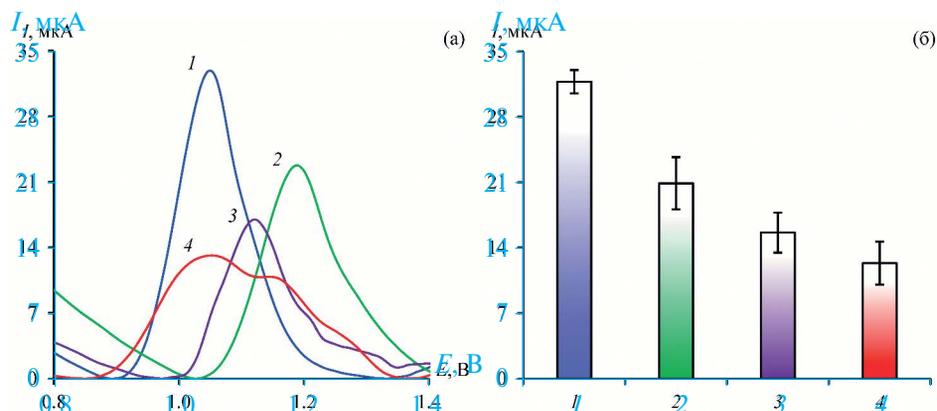


Рис. 3. (а) Дифференциально-импульсные вольтамперограммы и (б) диаграмма токов пика окисления 0.5 мМ растворов левофлоксацина (1), ципрофлоксацина (2), ломефлоксацина (3), энрофлоксацина (4) на СУЭ/эвоГ/S-С60МА ($n = 5$, $P = 0.95$, буферный раствор гидрофталата калия с рН 4.01).

Для оценки селективности сенсора СУЭ/эВОГ/S-C60MA по отношению к аналиту регистрировали ДИВ в растворах других антибиотиков фторхинолонового ряда: энрофлоксацина, ломефлоксацина, ципрофлоксацина. Как видно из ДИВ на рис. 3а, для аналитов характерно различие по потенциалам и форме пика окисления. Из диаграммы (рис. 3б) видно, что Лев характеризуется наибольшим током пика окисления.

С целью изучения влияния мешающих компонентов на определение Лев регистрировали ДИВ в 0.05 мМ растворах Лев с добавлением 25-кратного избытка аминокислот (L-Цис, L-Мет, L-Трп, L-Тир) и 100-кратного избытка углеводов (Лак, Глю). Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии значимого

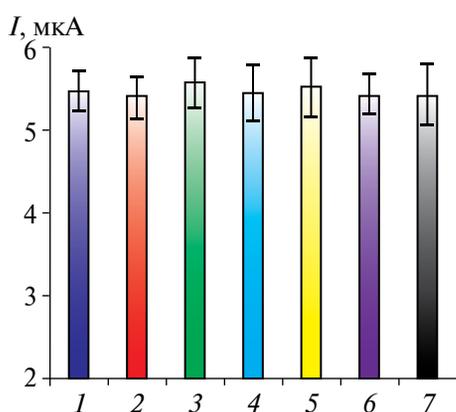


Рис. 4. Диаграмма токов пика окисления чистого 0.05 мМ раствора левофлоксацина (1) и с добавками 25-кратных избытков L-Цис (2), L-Мет (3), L-Трп (4), L-Тир (5) и 100-кратных избытков Лак (6), Глю (7) ($n = 5$, $P = 0.95$, буферный раствор гидрофталата калия с рН 4.01).

влияния мешающих компонентов, так как величина аналитического сигнала для чистого раствора Лев и для растворов с добавками с учетом погрешности практически одинакова (рис. 4).

Сенсор СУЭ/эВОГ/S-C60MA применили для определения Лев в чистых растворах, мясе и молоке стандартным методом введено—найдено (табл. 1). Сенсор правильно определил концентрацию Лев во всех исследуемых растворах. Относительное стандартное отклонение при определении Лев в мясе и молоке составило 0.7–8.0%. Степень открытия внесенного Лев в пределах 87.6–102.2% подтверждает возможность применения разработанного сенсора для определения Лев в продуктах питания животного происхождения.

Разработанный сенсор сравнили с существующими методами определения фторхинолонов в мясе и молоке (табл. 2). Предел обнаружения, несмотря на более высокое значение по сравнению с другими методами, удовлетворяет максимальному допустимому уровню содержания фторхинолонов в продуктах питания. Несомненным достоинством вольтамперометрического определения, как отмечено выше, является экспрессность, невысокая стоимость и упрощенная пробоподготовка, исключая предварительное выделение определяемого вещества.

Таким образом, для определения Лев в продуктах питания животного происхождения использован сенсор на основе послойно нанесенных эВОГ и синтезированного ранее [19] S-C60MA. Левофлоксацин определяли методом ДИВ, предел обнаружения при этом составил 1.8×10^{-7} М. Показана селективность сенсора к Лев относительно некоторых антибиотиков фторхинолонового ряда: ципрофлоксацина, ломефлок-

Таблица 1. Результаты определения левофлоксацина методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии с использованием СУЭ/эВОГ/S-C60MA ($n = 5$, $P = 0.95$)

| Объект анализа | Введено, мкМ | Найдено, мкМ | s_r , % | Степень открытия, % |
|----------------|--------------|----------------|-----------|---------------------|
| Чистый раствор | 4 | 3.9 ± 0.4 | 3.7 | 98.2 |
| | 15 | 15.1 ± 0.7 | 1.8 | 100.7 |
| | 35 | 35.2 ± 0.6 | 0.7 | 100.5 |
| Мясо | 4 | 3.6 ± 0.4 | 3.9 | 90.0 |
| | 15 | 14.9 ± 1.1 | 2.9 | 99.1 |
| | 35 | 35.6 ± 1.6 | 1.8 | 101.8 |
| Молоко | 4 | 3.5 ± 0.7 | 8.0 | 87.6 |
| | 15 | 15.3 ± 1.2 | 3.2 | 102.2 |
| | 35 | 35.6 ± 0.6 | 0.7 | 101.7 |

Таблица 2. Сравнение методов определения фторхинолонов в реальных образцах

| Метод | Определяемое вещество | Объект анализа | Линейный диапазон | Предел обнаружения | Литература |
|---------------------------------------|---|-----------------------|-------------------------------|--------------------|------------------|
| ВЭЖХ-УФ | Нор, Цип, Пеф, Лом, Дан, Энр, Офл, Сар, Диф | Куриное мясо | 5–400 мкг/л | 1.0–2.2 мкг/л | [23] |
| МЭКХ с флуоресцентным детектором | Дан | Говяжье и свиное мясо | 30–50 мкг/кг | 10 мкг/кг | [24] |
| | Цип | | 10–50 мкг/кг | 3 мкг/кг | |
| | Энр | | 20–50 мкг/кг | 7 мкг/кг | |
| ВЭЖХ с люминесцентным детектором | Цип | Молоко | 7.2–900 мкг/л | 2.5 мкг/л | [25] |
| | Дан | | 6–900 мкг/л | 2 мкг/л | |
| | Энр | | 50–900 мкг/л | 20 мкг/л | |
| | Флу | | 7–900 мкг/л | 2.5 мкг/л | |
| | Мар | | 65–900 мкг/л | 35 мкг/л | |
| ВЭЖХ-МС | Флу, Энр, Дан, Сар, Диф, Нор, Пеф, Лом, Офл | Куриное мясо и яйца | 0.2–200 мкг/кг | 0.1–0.16 мкг/кг | [7] |
| ФПИА | 16 фторхинолонов | Молоко и куриное мясо | 0.76–120.1 мкг/л | 0.46–4.40 мкг/л | [26] |
| Биосенсор с люминесцентным детектором | Цип | Молоко и куриное мясо | 0.1–1 и 1–100 мкг/л | 0.07 мкг/л | [27] |
| ДИВ | Лев | Молоко и говяжье мясо | 0.36–21.66 и 21.66–180.7 мг/л | 0.065 мг/л | Настоящая работа |

Обозначения: УФ – УФ-спектрофотометрический детектор, МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая хроматография, ВЭЖХ-МС – ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, ФПИА – флуоресцентный поляризационный иммуноанализ, Нор – норфлоксацин, Цип – ципрофлоксацин, Пеф – пефлоксацин, Лом – ломефлоксацин, Дан – данофлоксацин, Энр – энрофлоксацин, Офл – офлоксацин, Сар – сарафлоксацин, Диф – дифлоксацин, Фле – флероксацин, Флу – флумехин, Мар – марбофлоксацин.

сацина, энрофлоксацина. Аналитический сигнал Лев максимален, а также отличается от других фторхинолонов по потенциалу окисления. Установлено отсутствие значимого влияния 25-кратного избытка аминокислот и 100-кратного избытка углеводов на величину аналитического сигнала окисления Лев. Доказана возможность использования разработанного вольтамперометрического сенсора для определения Лев в молоке и мясе без предварительного выделения с достаточными чувствительностью и селективностью к Лев, соответствующими максимальным допустимым уровням содержания фторхинолонов в продуктах питания животного происхождения.

Авторы выражают благодарность лаборатории синтеза низкомолекулярных биорегуляторов УФИХ УФИЦ РАН за синтез селекторов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-73-00073 (<https://rscf.ru/project/22-73-00073/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stavroulaki A., Tzatzarakis M.N., Karzi V., Katsikantami I., Renieri E., Vakonaki E., Avgenaki M., Alegakis A., Stan M., Kavvalakis M., Rizos A.K., Tsatsakis A. Antibiotics in raw meat samples: Estimation of dietary exposure and risk assessment // *Toxics*. 2022. V. 10. № 8. P. 456. <https://doi.org/10.3390/toxics10080456>
2. Evtugyn G., Porfireva A., Tsekenis G., Oravczova V., Hianik T. Electrochemical aptasensors for antibiotics detection: Recent achievements and applications for monitoring food safety // *Sensors*. 2022. V. 22. № 10. P. 3684. <https://doi.org/10.3390/s22103684>
3. Sitovs A., Sartini I., Giorgi M. Levofloxacin in veterinary medicine: A literature review // *Res. Vet. Sci.* 2021. V. 137. P. 111. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.031>
4. Xiaoying X., Lihong L., Zhimin J., Yang S. Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in foods of animal origin by capillary electrophoresis with field amplified samplestacking–sweeping technique // *Food Chem.* 2015. V. 176. P. 219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.054>
5. Peris-Vicente J., Peris-García E., Albiol-Chiva J., Durgbanshi A., Ochoa-Aranda E., Carda-Broch S. et al. Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples // *Microchem. J.* 2022. V. 177. Article 107309. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107309>
6. Elsayed A.S., Abusham A., Al-Touby S.S.J., Al-Rajhi W.K.H., Hossain M.A. Determination of antibiotic residues in boiler chickens by liquid chromatography-mass spectrometry // *Food Anal. Methods*. 2023. V. 16. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s12161-023-02530-4>
7. Zhuliangzi L., Fenfang D., Rong H., Lei T., Xiaoyan L., Xinhong P., Zhicong Y. A pass-through solid-phase extraction clean-up method for the determination of 11 quinolone antibiotics in chicken meat and egg samples using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Microchem. J.* 2019. V. 151. Article 104213. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104213>
8. Serrano M.J., Mata L., Pellicer S., Segura-Gil I., Razquin P., Pagán R. Development and validation of a rapid lateral flow test for the detection of fluoroquinolones in meat and blood // *Food Control*. 2024. V. 156. Article 110116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110116>
9. Gaudin V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 90. P. 363. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.005>
10. Майстренко В.Н., Зильберг Р.А. Энантиоселективные вольтамперометрические сенсоры на основе хиральных материалов // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. С. 1080. 10.31857/S0044450220120105 (*Maistrenko V.N., Zil'berg R.A.* Enantioselective voltammetric sensors on the basis of chiral materials // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. P. 1514. <https://doi.org/10.1134/S1061934820120102>)
11. Maduraiveeran G., Sasidharan M., Ganesan V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications // *Biosensor. Bioelectron.* 2018. V. 103. P. 113. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.031>
12. Zuyu H., Shuai Z., Yingju L., Yuan H., Hongtao L. A multi-walled carbon nanotubes-poly(L-lysine) modified enantioselective immunosensor for ofloxacin by using multienzyme-labeled gold nanoflower as signal enhancer // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 73 P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.054>
13. de Farias D.M., de Faria L.V., Lisboa T.P., Matos M.A., Munoz R., Matos R. Determination of levofloxacin in pharmaceutical formulations and urine at reduced graphene oxide and carbon nanotube-modified electrodes // *J. Solid. State Electrochem.* 2020. V. 24. P. 1165. <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04589-z>
14. Lei H., Yanfang Z., Chao C., Feng Li. A novel electrochemical sensor based on poly(p-aminobenzenesulfonic acid)-reduced graphene oxide composite film for the sensitive and selective detection of levofloxacin in human urine // *J. Electroanal. Chem.* 2018. V. 817. P. 141. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.04.008>
15. Huang J.Y., Bao T., Hu T.X., Wen W., Zhang X., Wang S.F. Voltammetric determination of levofloxacin using a glassy carbon electrode modified with poly(o-aminophenol) and graphene quantum dots // *Microchim. Acta.* 2017. V. 184. P. 127. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1982-5>
16. Ademar W., Anderson M. S., Orlando F.-F. Simultaneous determination of paracetamol and levofloxacin using a glassy carbon electrode modified with carbon black, silver nanoparticles and PEDOT:PSS film // *Sens. Actuators B: Chem.* 2018. V. 255. Part 2. P. 2264. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.020>
17. Wei W., Dong-Ming Z., Xiu-Hua Z., Hua-Yu X., Sheng-Fu W., Wei C., Yuan-Di Z. One-step fabrication of poly(o-aminophenol)/multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode and its application for levofloxacin determination in pharmaceuticals // *Sens. Actuators B: Chem.* 2012. V. 174. P. 202. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.08.010>
18. Liu T., Yan T., Rongfeng Z., Weilu L., Yue G., Cong L., Ruixue C., Zhiquan Z. Ag nanoparticles and electrospun CeO₂-Au composite nanofibers modified glassy carbon electrode for determination of levofloxacin // *Sens. Actuators B: Chem.* 2014. V. 203. P. 95. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.06.089>
19. Zagitova L.R., Abramov I.A., Zagitov V.V., Gainanova S.I., Maistrenko V.N. Effect of the chiral blocks of functionalized fullerene on levofloxacin enanti-

- oselective voltammetric sensing // *J. Electroanal. Chem.* 2023. V. 940. Article 117508.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2023.117508>
20. Zagitova L., Yarkaeva Y., Zagitov V., Gainanova S., Maistrenko V. Voltammetric chiral recognition of naproxen enantiomers by N-tosylproline functionalized chitosan and reduced graphene oxide based sensor // *J. Electroanal. Chem.* 2022. V. 922. Article 116744.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116744>
 21. Yuan Z., Xuecheng Z., Wei J., Huilin L., Jing W., Baoguo S. Natural and artificial chiralbased systems for separation applications // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2021. V. 53. P. 27.
<https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1932408>
 22. Шендерович В.А., Пастернак Н.А., Столярова Л.Г., Соловьева В.Е., Власова И.В., Ведьмина Е.А., Шевелева С.А. Экспресс-метод определения антибиотиков в пищевых продуктах. Методические указания. 29 марта 1995 г. МУК 4.2.026–95.
 23. Kardani F., Mirzajani R., Tamsilian Y., Kiasat A. The residual determination of 39 antibiotics in meat and dairy products using solid-phase microextraction based on deep eutectic solvents@UMCM-1 metal-organic framework /molecularly imprinted polymers with HPLC-UV // *Food Chem. Adv.* 2023. V. 2. Article 100173.
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100173>
 24. Terrado-Campos D., Tayeb-Cherif K., Peris-Vicente J., Carda-Broch S., Esteve-Romero J. Determination of oxolinic acid, danofloxacin, ciprofloxacin, and enrofloxacin in porcine and bovine meat by micellar liquid chromatography with fluorescence detection // *Food Chem.* 2017. V. 221. P. 1277.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.029>
 25. Yáñez-Jácome G.S., Aguilar-Caballeros M.P., Gómez-Hens A. Luminescent determination of quinolones in milk samples by liquid chromatography/post-column derivatization with terbium oxide nanoparticles // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1405. P. 126.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.070>
 26. Mi T., Wang Z., Eremin S., Shen J., Zhang S. Simultaneous determination of multiple (fluoro)quinolone antibiotics in food samples by a one-step fluorescence polarization immunoassay // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. P. 9347.
<https://doi.org/10.1021/jf403972r>
 27. Yuphintharakun N., Nurerk P., Chullasat K., Kanatharana P., Davis F., Sooksawat D., Bunkoed O. A nanocomposite optosensor containing carboxylic functionalized multiwall carbon nanotubes and quantum dots incorporated into a molecularly imprinted polymer for highly selective and sensitive detection of ciprofloxacin // *Spectrochim. Acta. A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. V. 201. P. 382.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.034>

 ORIGINAL ARTICLES

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF LEVOFLOXACIN IN MEAT AND MILK USING A SENSOR BASED ON ELECTRICALLY REDUCED GRAPHENE OXIDE AND FUNCTIONALIZED FULLERENE

I.A. Abramov^{a, *}, S.I. Gainanova^a, L.R. Zagitova^a, V.N. Maistrenko^a

Ufa University of Science and Technology, Department of analytical chemistry, 450076 Ufa, Russia

**e-mail: papa.abramov@mail.ru*

Received October 13, 2023. **Revised** December 12, 2023. **Accepted** December 12, 2023

Abstract. Antibacterial drugs have become an integral part of the food industry and agriculture in the modern world. The presence of even trace amounts of antibiotics in food of animal origin can lead to the development of allergic reactions and direct toxic effects in the human body. In this regard, it is required to create sensitive and selective methods for the determination of antibacterial drugs in order to prevent their excessive consumption. In this work, a glass-carbon voltammetric sensor based on layer-by-layer deposited electrospun graphene oxide and functionalized S-N,N'-bis(1-phenylethyl)malonamide fullerene is proposed for the determination of levofloxacin (Lev, S-(-)-ofloxacin) by differential pulse voltammetry. The calibration plot is linear over two ranges of 1.0×10^{-6} – 6.0×10^{-5} M and 6.0×10^{-5} – 5.0×10^{-4} M Lev with sensitivity factors of 107 and 58.0 $\mu\text{A}/\text{mM}$, respectively. The detection limit and lower limit of detectable contents were 1.8×10^{-7} M and 6.04×10^{-7} M, respectively. The selectivity of the sensor to Lev was evaluated with respect to some fluoroquinolone antibiotics: ciprofloxacin, lomefloxacin, enrofloxacin. The sensor was used for the determination of Lev in meat and milk by differential pulse voltammetry.

Keywords: voltammetric sensor, functionalized fullerene, electrically reduced graphene oxide, levofloxacin, food of animal origin.

УДК 543.552

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ МЕЗОПОРИСТОЙ ГРАФИТИРОВАННОЙ САЖИ И ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛОПЕНТАДИЕНА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И РАСПОЗНАВАНИЯ ЭНАНТИОМЕРОВ КЛОПИДОГРЕЛЯ

© 2024 г. М. И. Назыров^{а,*}, Ю. А. Перфилова^а, Я. Р. Абдуллин^а,

П. В. Ковязин^б, В. Н. Майстренко^а

^аУфимский университет науки и технологий, Институт химии и защиты в чрезвычайных ситуациях
ул. Заки Валиди, 32, Уфа, 450076, Россия,

^бИнститут нефтехимии и катализа Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук

ул. Проспект Октября, 141, Уфа, 450075, Россия,

*E-mail: mnazyrov@list.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 23.11.2023 г.

Для распознавания и определения энантиомеров клопидогреля создана сенсорная система на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного мезопористой сажей Carborack X и производными циклопентадиена – (1S)-2-циклопента-2,4-диен-1-ил-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан; (1S, 2S, 4R)-2-циклопента-1,3-диен-1-ил-1-изопропил-4-метилциклогексан; 9-[(1S,2S,5R)-2-изопропил-5-метилциклогексил]-9H-флуорен. Благодаря уникальным свойствам Carborack X, таким как большая площадь поверхности и высокая проводимость, удалось получить механически стабильный и чувствительный сенсорный слой, который прочно удерживает молекулы хирального селектора на своей поверхности. Методами сканирующей электронной микроскопии, спектроскопии электрохимического импеданса, циклической и дифференциально-импульсной вольтамперометрии изучены морфологические, электрохимические и аналитические свойства полученных сенсоров. Проведено определение энантиомеров клопидогреля в биологических жидкостях, линейные зависимости токов пиков окисления от их концентрации в растворе для всех сенсоров сохраняются в диапазоне концентраций от 1×10^{-6} до 5×10^{-4} М. Сенсоры обладают перекрестной чувствительностью, что позволило объединить их в сенсорную систему с высокой энантиоселективностью и чувствительностью по отношению к энантиомерам клопидогреля. При использовании предложенной сенсорной системы вероятность правильного распознавания образцов возрастает по сравнению с единичными сенсорами. Во всех случаях содержание R-клопидогреля в смеси установлено правильно с относительной погрешностью, не превышающей 9%, и степенью открытия от 96 до 102%.

Ключевые слова: вольтамперометрические сенсоры, энантиоселективная сенсорная система, клопидогрел, энантиомеры, производные циклопентадиена.

DOI: 10.31857/S0044450224060068, EDN: tubyts

Клопидогрел (Клп) используют для предотвращения накопления тромбоцитов и образования сгустков в кровеносных сосудах людей, перенесших инсульт, сердечный приступ или сильную боль в груди. Он относится к классу антитромбоцитарных препаратов [1].

Молекула Клп существует в виде двух оптических изомеров с различной биологической ак-

тивностью: S-Клп активен и проявляет необходимый терапевтический эффект, в то время как R-Клп лишен антиагрегационной активности [2, 3]. Более того, исследования на животных показали, что R-Клп в больших дозах может вызывать судороги [4, 5]. Следовательно, хиральное распознавание обоих изомеров имеет большое значение в фармацевтической промышленно-

сти. Анализ литературы показывает, что для подобных задач применяют жидкостную хроматографию [6] и капиллярный электрофорез [7], но реализация этих методов требует использования дорогостоящих хиральных колонок и включает стадии подготовки пробы. Электрохимические методы характеризуются более простой подготовкой пробы, более низкой стоимостью, а также экспрессностью анализа. Описаны [8–10] электрохимические сенсоры для обнаружения Клп, однако данные по вольтамперометрическому определению энантиомеров Клп ограничены [11].

На сегодняшний день существует множество вариантов изготовления электродов, но для достижения энантиоселективности необходимо их модифицирование хиральными селекторами. Правильный подбор состава селектора и условий его нанесения при модифицировании является ключевым моментом для получения энантиодифференцированного отклика. Для модифицирования используют вещества с хиральной структурой, которые благодаря специфическим взаимодействиям с энантиомерами позволяют получить различия в токах пиков и потенциалах. В качестве хиральных селекторов могут использоваться комплексы включения [12–17], полимеры с молекулярными отпечатками [18–21], металлоорганические каркасные структуры [22–26], хиральные металлические поверхности [27, 28], селекторы на основе хиральных органических и неорганических соединений, иммобилизованных на поверхности электрода [29–31]. Однако зачастую хиральные селекторы либо обладают низкой электропроводностью и снижают чувствительность сенсора, либо их слой на поверхности электрода оказывается механически хрупким и нестабильным во времени. Для устранения подобных недостатков успешно применяют комбинации селекторов с углеродными наноматериалами, такими как оксид графена [32], графитированная сажа [33], фуллерены [34] и др. Благодаря своей большой площади поверхности и адсорбционным свойствам они прочно удерживают молекулы селектора на поверхности электрода.

Для надежного распознавания энантиомеров лекарственных соединений в смесях и при наличии мешающих компонентов энантиоселективность получаемых сенсоров может оказаться недостаточной. В таком случае целесообразно использование хемометрической обработки вольтамперограмм [35, 36]. Обычно применяют метод главных компонент (МГК) и проекции на латентные структуры (ПЛС). Для повышения вероятности распознавания применяется сенсорная система с несколькими индикаторными электродами. В таких систе-

мах каждый сенсор проявляет чувствительность к распознаваемому аналиту, причем чувствительность и селективность отклика у разных сенсоров различны (перекрестная чувствительность). Подобный подход применялся при распознавании энантиомеров атенолола [37], триптофана [38, 39] и пропранолола [40].

Настоящая работа посвящена разработке сенсорной системы на основе стеклоуглеродного электрода (СУЭ) для распознавания энантиомеров Клп. Энантиоселективный сенсорный слой создавали с использованием комбинации мезопористой сажи Carborack X (СрХ) и производных циклопентадиена (ЦП) с хиральными центрами: (1S)-2-циклопента-2,4-диен-1-ил-1,7,7-триметилбисцикло[2.2.1]гептаном (ЦП1), (1S, 2S, 4R)-2-циклопента-1,3-диен-1-ил-1-изопропил-4-метилциклогексаном (ЦП2); 9-[(1S,2S,5R)-2-изопропил-5-метилциклогексил]-9H-флуореном (ЦП3). Ранее успешно исследована возможность создания сенсоров на основе комбинации СрХ и ЦП по отношению к энантиомерам триптофана [33, 38]. Наличие в молекулах ЦП1, ЦП2 и ЦП3 циклопентадиенильного кольца в структуре (схема 1) предположительно может обеспечить π - π стекинг с ароматическими фрагментами молекулы аналита. Методами спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ), циклической (ЦВА) и дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВ) изучали электрохимические и аналитические характеристики сенсоров. С помощью хемометрических методов обработки полученные данные объединили в сенсорную систему для более надежного распознавания R- и S-Клп в смеси и биологических жидкостях.

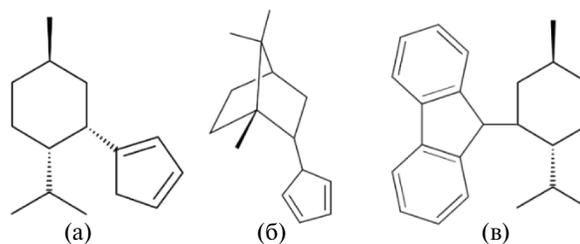


Схема 1. Структуры хиральных селекторов ЦП1 (а), ЦП2 (б), ЦП3 (в).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В качестве исследуемых лекарственных соединений использовали энантиомеры R- и S-Клп ($\geq 99.5\%$) (Sigma-Aldrich, США). Фоновым электролитом служил универсальный буферный раствор (УБР) (рН 4.22).

Раствор УБР готовили из смеси 0.04 М H_3BO_3 , 0.04 М H_3PO_4 и 0.04 М CH_3COOH . Стандартные растворы R- и S-Клп с концентрацией 0.5 мМ готовили путем растворения навески массой 0.0021 г в 10 мл УБР (рН 4.22). Для изучения концентрационной зависимости готовили 0.5 мМ раствор путем растворения 0.0021 г Клп и последующим разбавлением аликвоты исходного раствора до 0.25, 0.1, 0.05, 0.025, 0.01, 0.005, 0.0025, 0.001 мМ. Для приготовления растворов использовали сверхчистую деионизованную воду с удельной проводимостью 0.1 мкСм/см. Гидрохлорид хитозана (ГХТЗ) приобретали у Глювекс (Россия), порошок мезопористой сажи Carborack X (СрХ) – у Sigma-Aldrich (США).

Образцы спектрально чистых соединений ЦП1 [41], ЦП2 [42] и ЦП3 [43] были получены в Уфимском институте химии УФИЦ РАН (Уфа, Россия) и охарактеризованы методами ЯМР ^1H , ЯМР ^{13}C и поляриметрии.

ЯМР ^1H ЦП1: δ_{H} (м.д.) 0.71–1.31 (м, 9H, CH_3), 1.11–2.47 (м, 9H), 2.84–2.94 (м, 1H, CH), 3.1–3.3 (м, 1H, ЦП), 5.1 (с, 2H, ЦП), 6.0 (с, 2H, ЦП). ЯМР ^{13}C ЦП1: δ_{C} (м.д.) 20.4; 20.6; 21.5; 27.6; 28.9; 37.1; 38.6; 45.9; 46.4; 50.4; 54.0; 126.7; 127.0; 132.3; 136.4. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +29^\circ$ ($c = 2.3$ мг/мл, CH_2Cl_2).

ЯМР ^1H ЦП2: δ_{H} (м.д.) 0.71–1.09 (м, 9H, CH_3), 1.14–2.62 (м, 8H), 2.62–2.98 (м, 1H, ЦП), 5.0–5.84 (м, 2H, ЦП), 5.84–6.32 (м, 2H, ЦП). ЯМР ^{13}C ЦП2: δ_{C} (м.д.) 14.1; 18.7; 19.9; 27.2; 29.8; 37.8; 42.5; 44.6; 46.7; 47.6; 55.8; 131.2; 132.0; 135.8; 136.4. $[\alpha]_{\text{D}} = -6.3^\circ$ ($c = 0.9$ мг/мл, CH_2Cl_2).

ЯМР ^1H ЦП3: δ_{H} (м.д.) 0.45 (д, 3H, $J = 6.1$ Гц, CH_3), 1.22 (д, 3H, $J = 6.4$ Гц, CH_3), 1.32 (д, 3H, $J = 6.1$ Гц, CH_3), 0.51–1.96 (м, 8H), 2.1–2.31 (м, 1H, $\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.91–3.0 (м, 1H, $\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.35 (с, 1H, флуорен), 7.23–7.33 (м, 2H), 7.33–7.45 (м, 2H), 7.51 (д, 1H, $J = 7.4$ Гц), 7.77

(д, 1H, $J = 7.8$ Гц), 7.80 (д, 2H, $J = 7.8$ Гц). ЯМР ^{13}C ЦП3: δ_{C} (м.д.) 21.8; 22.0; 23.0; 26.5; 27.4; 30.4; 35.8; 36.5; 40.6; 47.6; 48.1; 119.3; 123.2; 125.9; 126.8; 127.9; 141.5; 142.5; 146.7; 149.6. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +41^\circ$ ($c = 4.0$ мг/мл, CH_2Cl_2).

Модифицирование стеклоглеродного электрода. Перед проведением эксперимента поверхность СУЭ полировали на специальном полировальном материале (Allied High Tech Products, США) с помощью деагломерированной суспензии Al_2O_3 (0.3 мкм) (Allied High Tech Products, США) и тщательно промывали деионизованной водой.

Суспензию СрХ готовили путем растворения 0.001 г сажи в 1 мл водного раствора ГХТЗ, после чего раствор в течение 2 ч выдерживали в ультразвуковой ванне до достижения однородности.

Растворы ЦП1, ЦП2, ЦП3 готовили путем растворения точной навески в 0.001 г в 1 мл хлороформа. Далее капельным методом наносили на тщательно отполированную поверхность СУЭ 1 мкл раствора СрХ, сушили поверхность под ИК-лампой в течение 3 мин до равномерного высыхания, после чего на СУЭ/СрХ наносили 1 мкл раствора ЦП1, ЦП2 или ЦП3 с последующей сушкой под ИК-лампой до полного испарения хлороформа. Количество наносимого модификатора и концентрацию селективов выбирали, основываясь на коэффициенте энантиоселективности как соотношении токов пиков R- и S-Клп ($I_{\text{pR}}/I_{\text{pS}}$) на вольтамперограммах и величине их относительных стандартных отклонений (s_r) (рис. 1, 2).

Раствор смеси солей $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\geq 99.0\%$) и $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\geq 99.0\%$) (Sigma-Aldrich, США) готовили на фоне 0.1 М раствора KCl в мольном соотношении 1 : 1 и использовали в качестве стандартного при электрохимических измерениях. Для приготовления водных растворов

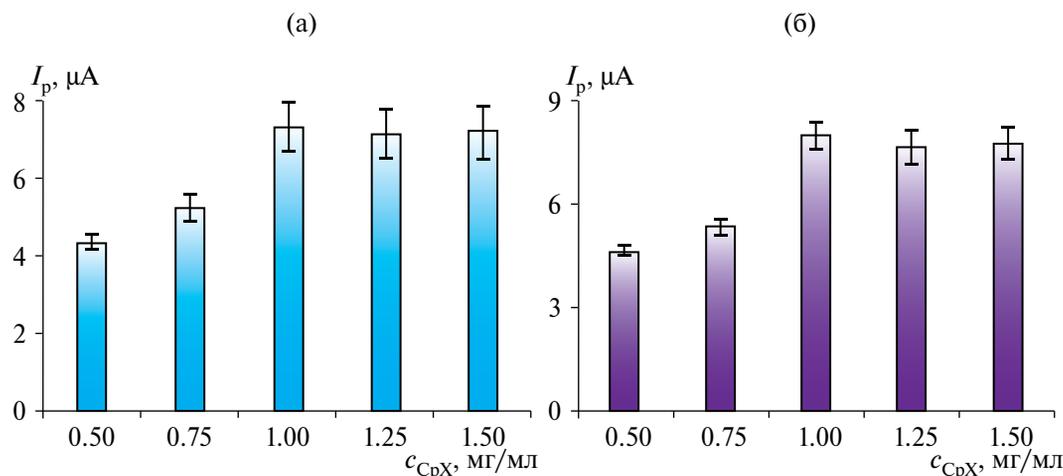


Рис. 1. Зависимости токов пиков окисления клопидогреля и s_r от концентраций Carborack X в диметилформамиде (а) и гидрохлориде хитозана (б).

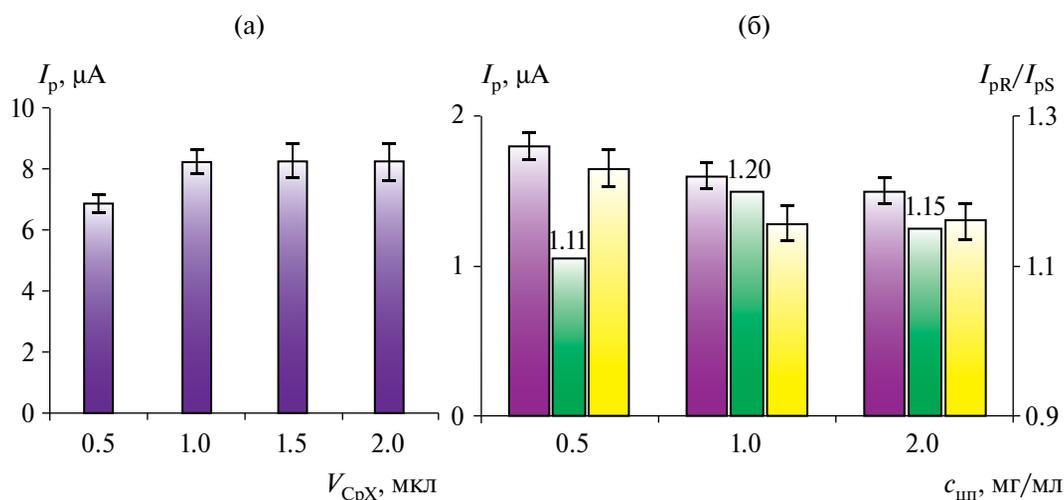


Рис. 2. Зависимости токов пиков окисления клопидогреля от объема нанесения дисперсии Carborack X (а); зависимости токов пиков окисления R- и S-Клп, и I_{pR}/I_{pS} от концентрации производных цикlopentадиена в хлороформе (б).

применяли сверхчистую деионизованную воду с удельной проводимостью 0.1 мкСм/см. Все реагенты были химически чистыми. Все измерения проводили при $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Оборудование. Электрохимические измерения выполняли на потенциостате-гальваностате Autolab PGSTAT 204 (Metrohm Autolab Ins., Нидерланды) с модулем импеданса FRA 32M (Metrohm Autolab Ins., Нидерланды) с программным обеспечением NOVA 2.1. Измерения проводили в стандартной трехэлектродной ячейке объемом 20 мл, состоящей из “чистого” или модифицированного стеклоглеродного электрода диаметром 3 мм, платиновой пластинки в качестве вспомогательного электрода и хлоридсеребряного электрода сравнения. pH растворов измеряли с помощью pH-метра Seven Compact pH/Ion S220 (Mettler-Toledo AG, Швейцария). Для перемешивания растворов использовали магнитную мешалку MR Hei-Tec (Heidolph, Германия). Для создания дисперсий растворы выдерживали в ультразвуковой ванне Elmasonic S10H (Elma, Германия). Для характеристики поверхности модифицированных СУЭ использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) Tescan Mira (Tescan, Чехия); СЭМ-изображения регистрировали при ускоряющем напряжении 10 кэВ. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance-400 (400.13 MHz [^1H], 100.62 MHz [^{13}C]) (Bruker, Германия). В качестве растворителя и внутреннего стандарта использовали CDCl_3 . Оптический угол вращения $[\alpha]_D$ определяли на поляриметре Perkin Elmer-341 (PerkinElmer, США).

Техника эксперимента. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы регистрировали в диапазоне потенциалов от 0.5

до 1.2 В с амплитудой 0.075 В. Спектры электрохимического импеданса стандартного раствора $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ регистрировали в диапазоне частот от 500 кГц до 0.1 Гц с амплитудой 5 мВ при равновесном потенциале 0.21 В. Параметры импеданса определяли путем аппроксимации данных по эквивалентной ячейке Рэндлса. Эквивалентную схему подбирали, основываясь на значении критерия χ^2 . Циклические вольтамперограммы стандартного раствора $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ регистрировали в диапазоне потенциалов от -0.2 до 0.6 В со скоростью сканирования потенциала 0.1 В/с.

Анализ реальных объектов. Правильность распознавания и определения энантиомеров Клп с помощью предложенных сенсоров устанавливали на матрицах реальных образцов мочи и плазмы крови. Образцы мочи получали у здорового донора, плазму крови приобретали в Уфимской Республиканской станции переливания крови (Россия). Образцы мочи и плазмы крови объемом 2.5 мл центрифугировали в течение 10 мин и разбавляли в 10 раз УБР с pH 4.22. В полученные растворы добавляли известные количества энантиомеров R- и S-Клп для получения растворов с концентрацией 0.1 мкМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Условия регистрации аналитического сигнала подбирали, основываясь на токах пиков окисления и величине s_p . Установили, что наибольший аналитический сигнал Клп и наименьшая погрешность измерений наблюдаются в УБР при pH 4.22 (рис. 3). Все дальнейшие измерения проводили в указанном буферном растворе.

Растворитель для создания дисперсии СрХ выбирали по следующим критериям: он должен обеспечивать получение однородной дисперсии, достаточно быстро высыхать на поверхности электрода, равномерно наноситься и сохранять стабильность дисперсии в течение длительного времени. Сравнивали N,N-диметилформамид (ДМФА) и водный раствор ГХТЗ. Дисперсия на основе ДМФА не обладает достаточной стабильностью и не обеспечивает равномерное покрытие на поверхности СУЭ, отрицательно влияя на воспроизводимость результатов (рис. 2а). В связи с этим для дальнейших исследований выбрали водный раствор ГХТЗ, обеспечивающий более интенсивный аналитический сигнал и меньшее значение s_r (рис. 2б). Подбор концентрации СрХ в дисперсии основывался на величине аналитического сигнала и s_r .

Объем растворов модификаторов для нанесения на электрод выбирали на основе значений токов окисления Клп, s_r и I_{pR}/I_{pS} получаемого сенсора. Установили, что оптимальный объем для нанесения дисперсии СрХ и раство-

ров ЦП составляет 1 мкл (рис. 2а), а концентрацию ЦП в хлороформе выбрали равной 1 мг/мл (рис. 2б).

Микроструктуру поверхности модифицированного СУЭ изучали методом СЭМ. На рис. 4а и б наблюдаются различия в структуре поверхностей после нанесения дисперсии СрХ на основе ДМФА и ГХТЗ. В случае СрХ в ДМФА образуется неравномерная поверхность с отдельными агломератами и участками немодифицированного стеклоуглерода, в то время как использование СрХ в ГХТЗ обеспечивает более равномерное заполнение поверхности. Видно, что при нанесении ЦП1 на СУЭ/СрХ образуется плотный равномерный слой, пористость которого меньше, чем для СУЭ/СрХ (рис. 4б). Аналогичные СЭМ-изображения получили для СУЭ/СрХ/ЦП2 и СУЭ/СрХ/ЦП3 (рис. 4в).

Электрохимические характеристики модифицированных электродов получали методами ЦВА (рис. 5а) и СЭИ (рис. 5б) с использованием стандартного редокс-индикатора $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. На рис. 5а показано, что по срав-

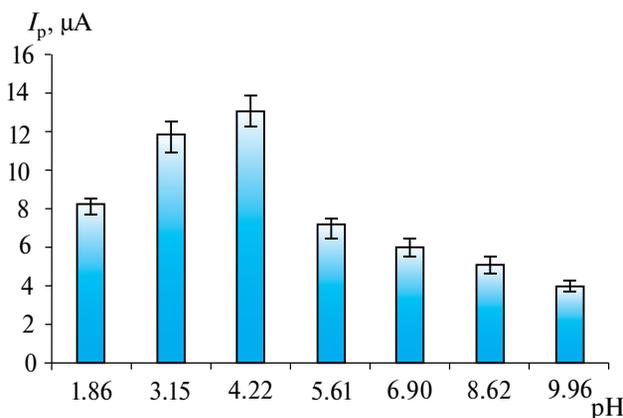


Рис. 3. Зависимость токов пиков окисления клопидогреля от pH.

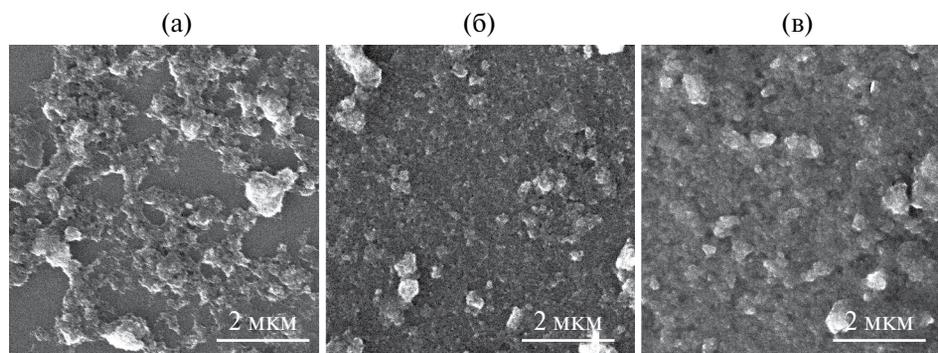


Рис. 4. СЭМ-изображения поверхности СУЭ/СрХ в диметилформамиде (а), СУЭ/СрХ в гидрохлориде хитозана (б), СУЭ/СрХ/ЦП1 (в).

нению с немодифицированным СУЭ (кривая 5) токи пиков $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ на СУЭ/СрХ (кривая 1) заметно выше, что объясняется увеличением активной площади поверхности сенсора. При нанесении ЦП на поверхность СУЭ/СрХ (кривые 2–4) величина токов пиков уменьшается по сравнению с СУЭ/СрХ, тем не менее превышает токи на немодифицированном СУЭ (кривая 5). На рис. 5б представлены диаграммы Найквиста для разработанных сенсоров и немодифицированного СУЭ. Диаметр полукруга отражает сопротивление переноса заряда как лимитирующей стадии электрохимического процесса, а прямолинейные отрезки соответствуют диффузионной составляющей. Количественные параметры спектров электрохимического импеданса определяли с использованием эквивалентной схемы Рэндлса (рис. 5б, вставка), где R_s и R_{ct} – сопротивление раствора и сопротивление переноса заряда, Q – элемент постоянной фазы, W – импеданс Варбурга. Полученные значения представлены в табл. 1, где N – коэффициент шероховатости поверхности электрода, свидетельствующий о неоднородности электродной поверхности [44]. Как видно из таблицы, для модифицированных электродов сопротивление переноса заряда снижается по сравнению с немодифицированным СУЭ, что подтверждает увеличение скорости переноса электрона. Увеличение сопротивления переноса заряда для СУЭ/СрХ/ЦП по сравнению с СУЭ/СрХ обусловлено непроводящей природой ЦП. Также видно, что коэффициент N для модифицированных поверхностей значительно отличается от единицы, что можно объяснить неравномерным распределением модификаторов на поверхности электрода или высокой шероховатостью и пористостью поверхностного слоя на электроде, а также формировани-

ем смешанного отклика из-за наличия “окон” и прямого контакта электрод–электролит.

Влияние скорости сканирования потенциала на величины максимальных токов пиков окисления изучали на 0.5 мМ растворе Клп в диапазоне от 20 до 300 мВ/с. Расчет критерия Семерано $\lg i_p/\lg v$, где i_p – ток пика, а v – скорость сканирования потенциала, показал, что лимитирующей стадией электродного процесса является диффузия (рис. 6). На СУЭ/СрХ/ЦП2 и СУЭ/СрХ/ЦП3 наблюдали аналогичные результаты. Критерий Семерано принимал значения 0.47 ± 0.04 и 0.51 ± 0.05 соответственно.

Для определения и распознавания энантиомеров Клп использовали ДИВ на предложенных сенсорах. Полученные значения токов и потенциалов пиков окисления (рис. 7) согласуются с ранее полученными данными ЦВА (рис. 5). Из рис. 7 видно, что на СУЭ и СУЭ/СрХ нет различий между энантиомерами Клп, в то время как на сенсорах на основе комбинаций СрХ и ЦП1, ЦП2, ЦП3 вольтамперные кривые R- и S-Клп отличаются друг от друга как по высотам токов пиков, так и по потенциалам окисления.

Таблица 1. Параметры спектров электрохимического импеданса и эффективные площади поверхности для немодифицированного и модифицированного Carborask X и производными циклопентадиена стеклогуглеродного электрода ($n = 5$, $P = 0.95$)

| Электрод | R_s , Ом | R_{ct} , Ом | N | A , мм ² |
|-------------|------------|---------------|-----------------|-----------------------|
| СУЭ | 81 ± 3 | 950 ± 5 | 0.91 ± 0.01 | 4.53 ± 0.09 |
| СУЭ/СрХ | 86 ± 2 | 180 ± 4 | 0.68 ± 0.01 | 6.01 ± 0.13 |
| СУЭ/СрХ/ЦП1 | 79 ± 2 | 450 ± 3 | 0.78 ± 0.03 | 5.21 ± 0.08 |
| СУЭ/СрХ/ЦП2 | 82 ± 1 | 560 ± 2 | 0.82 ± 0.01 | 5.65 ± 0.11 |
| СУЭ/СрХ/ЦП3 | 83 ± 3 | 710 ± 4 | 0.86 ± 0.02 | 4.98 ± 0.09 |

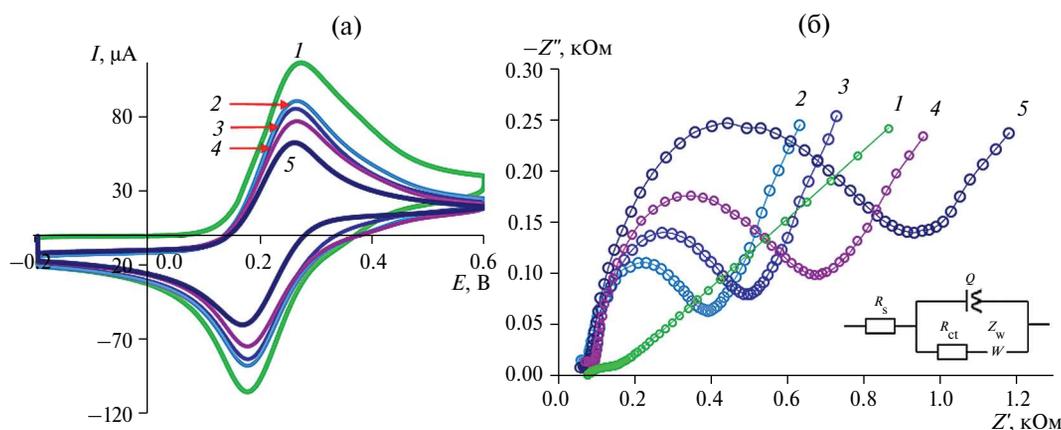


Рис. 5. (а) Циклические вольтамперограммы 5 мМ раствора $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ на СУЭ/СрХ (1), СУЭ/СрХ/ЦП1 (2), СУЭ/СрХ/ЦП2 (3), СУЭ/СрХ/ЦП3 (4) и СУЭ (5) на фоне 0.1 М КСl при скорости развертки потенциала 0.1 В/с. (б) Диаграммы Найквиста соответствующих электродов.

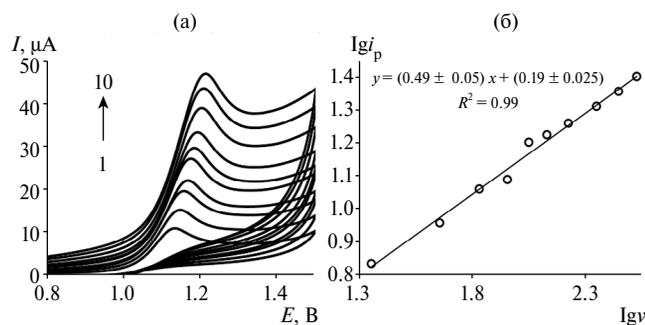


Рис. 6. (а) Циклические вольтамперограммы 0.5 мМ клопидогреля в универсальном буферном растворе (рН 4.22) на СУЭ/СрХ/ЦП1 при разных скоростях развертки ($I \rightarrow I_0$: 20 \rightarrow 300 мВ/с); (б) зависимость $\lg i_p$ от $\lg v$ на СУЭ/СрХ/ЦП1.

Линейные зависимости токов пиков окисления энантиомеров Клп от их концентрации в растворе для всех сенсоров сохраняются в диапазоне концентраций от 1×10^{-6} до 5×10^{-4} М. Уравнения регрессии и пределы обнаружения c_{\min} , рассчитанные из критерия $3\sigma/S$, где σ — стандартное отклонение сигнала фона, S — чувствительность сенсора, представлены в табл. 2.

Правильность определения энантиомеров Клп оценивали методом введено—найдено (табл. 3). Значения s_r не превышали 5.5% для обоих энантиомеров на всех сенсорах, а степень открытия была не ниже 97%. Разработанные сенсоры успешно “справляются” с определением R- и S-Клп в биологических жидкостях, где степень открытия составила от 94 до 101% для мочи и от 95 до 102% для плазмы крови с s_r , не превышающим 7.5 и 8% соответственно.

Как отмечено выше, для надежного распознавания энантиомеров лекарственных соединений в рацемических смесях энантиоселективности получаемых сенсоров может оказаться недостаточно. В таком случае целесообразна хемометрическая обработка вольтамперометрических данных с объединением трех сенсоров в сенсорную систему [45–47]. Для этого полученные на отдельных сенсорах вольтамперограммы энантиомеров Клп обрабатывали с помощью МГК. При этом каждая вольтамперограмма, содержащая

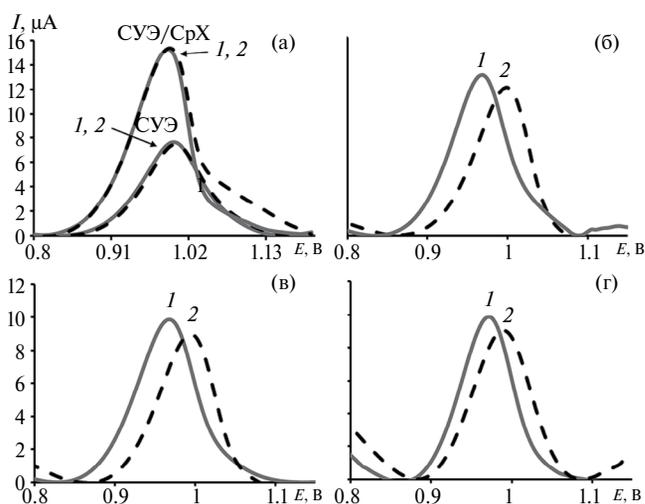


Рис. 7. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы R-Клп (1) и S-Клп (2) на СУЭ и СУЭ/СрХ (а), СУЭ/СрХ/ЦП1 (б), СУЭ/СрХ/ЦП2 (в), СУЭ/СрХ/ЦП3 (г).

159 значений мгновенных токов при различных потенциалах, преобразовывалась в точку путем использования проекции данных. Их получали, проецируя данные на построенную ось (первую главную компоненту (ГК1)) так, чтобы описывать наибольшие отклонения значений друг от друга [48]. Далее процедуру повторяли для аналогично выбранной оси, ортогональной первой главной компоненте (ГК 2). Результат построения называют картой счетов. На рис. 8 представлена карта счетов МГК-моделирования ДИВ энантиомеров Клп, полученных при использовании разработанной сенсорной системы. Видно, что точки, отвечающие отдельным образцам, образуют кластеры, соответствующие определенной концентрации аналитов. При этом образцы R- и S-Клп формируют отдельные кластеры, тем самым подтверждая возможность их разделения с помощью разработанной системы. Следующим шагом явилось построение ПЛС-модели на основе градуировочных образцов (ГО), содержащих известное количество энантиомеров Клп, и распознавание тестовых образцов, приготовленных аналогичным об-

Таблица 2. Аналитические характеристики определения энантиомеров клопидогреля (0.5 мМ) на модифицированных Сarбораск Х и производными циклопентадиена стеклоуглеродных электродах (дифференциально-импульсная вольтамперометрия, рН 4.22, скорость развертки потенциала 0.1 В/с, $n = 5$, $P = 0.95$)

| Сенсор | ΔE_p , мВ | I_{ps}/I_{pR} | $I_p (\mu A) = a c(mM) + b$ | | | | R^2 | | $c_{\min}, \mu M$ | |
|-------------|-------------------|-----------------|-----------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|-------------------|-----|
| | | | $a \pm \Delta a$ | | $b \pm \Delta b$ | | | | | |
| | | | R | S | R | S | R | S | R | S |
| СУЭ/СрХ/ЦП1 | 35 | 1.13 | 24.40 ± 0.12 | 20.39 ± 0.09 | 0.064 ± 0.006 | 0.012 ± 0.005 | 0.986 | 0.984 | 0.6 | 0.8 |
| СУЭ/СрХ/ЦП2 | 32 | 1.12 | 17.13 ± 0.14 | 17.66 ± 0.11 | 0.042 ± 0.009 | 0.101 ± 0.013 | 0.991 | 0.981 | 0.8 | 0.9 |
| СУЭ/СрХ/ЦП3 | 28 | 1.17 | 21.38 ± 0.11 | 18.88 ± 0.10 | 0.088 ± 0.011 | 0.007 ± 0.001 | 0.971 | 0.998 | 0.7 | 0.8 |

Таблица 3. Результаты определения энантимеров клопидогреля на сенсорах (дифференциально-импульсная вольтамперометрия, рН 4.22, скорость развертки потенциала 0.1 В/с, $n = 5$, $P = 0.95$)

| Сенсор | Введено, μM | | Найдено, μM | | s_r , % | | Степень открытия, % | |
|-------------------------------|------------------------|-----|------------------------|--------------|-----------|-----|---------------------|-----|
| | R | S | R | S | R | S | R | S |
| Растворы энантимеров Клп | | | | | | | | |
| СУЭ/СрХ/ЦП1 | 100 | 100 | 101 ± 6 | 99 ± 5 | 5.6 | 4.3 | 101 | 100 |
| | 500 | 500 | 503 ± 28 | 498 ± 20 | 3.7 | 4.6 | 101 | 99 |
| СУЭ/СрХ/ЦП2 | 100 | 100 | 103 ± 7 | 102 ± 4 | 5.0 | 4.1 | 104 | 101 |
| | 500 | 500 | 490 ± 27 | 489 ± 21 | 3.7 | 4.4 | 96 | 98 |
| СУЭ/СрХ/ЦП3 | 100 | 100 | 95 ± 6 | 103 ± 4 | 4.8 | 2.9 | 97 | 101 |
| | 500 | 500 | 502 ± 8 | 495 ± 31 | 2.3 | 5.1 | 101 | 98 |
| Энантимеры Клп в моче | | | | | | | | |
| СУЭ/СрХ/ЦП1 | 100 | 100 | 103 ± 3 | 97 ± 4 | 7.0 | 8.4 | 101 | 97 |
| СУЭ/СрХ/ЦП2 | 100 | 100 | 96 ± 8 | 97 ± 6 | 7.9 | 5.2 | 96 | 99 |
| СУЭ/СрХ/ЦП3 | 100 | 100 | 98 ± 7 | 96 ± 6 | 7.8 | 6.7 | 98 | 96 |
| Энантимеры Клп в плазме крови | | | | | | | | |
| СУЭ/СрХ/ЦП1 | 100 | 100 | 94 ± 8 | 95 ± 7 | 8.7 | 9.9 | 95 | 95 |
| СУЭ/СрХ/ЦП2 | 100 | 100 | 93 ± 7 | 97 ± 9 | 8.0 | 8.7 | 93 | 97 |
| СУЭ/СрХ/ЦП3 | 100 | 100 | 95 ± 6 | 95 ± 7 | 9.0 | 8.6 | 95 | 95 |

разом, но не пересекающихся с выборкой ГО. Существуют два способа построения подобных моделей (ПЛС1 и ПЛС2). ПЛС2-модель используют для первичного просмотра данных в случае, когда необходимо провести градуировку по нескольким параметрам, определяющим дисперсию. ПЛС1-модель декомпозирует данные с помощью только одного параметра, отвечающего за строгую принадлежность образца к определенной группе (классу). В связи с несколькими параметрами (концентрация и принадлежность

к R- или S-Клп) на текущем этапе использовали модель ПЛС2 [48]. Основные характеристики ПЛС2-моделей для предложенных сенсоров и сенсорной системы представлены в табл. 4. Чем меньше величина стандартной ошибки прогноза (СОП) и чем ближе коэффициент корреляции к единице, тем более адекватна градуировочная модель и тем лучше она описывает систему [48]. Как видно из табл. 4, использование сенсорной системы позволило получить наиболее адекватную градуировочную модель.

Учитывая характеристики ПЛС2-модели сенсорной системы, в дальнейшем R- и S-Клп в смеси распознавали с применением сенсорной системы. Для этого анализировали растворы с различным соотношением R-Клп и S-Клп (1 : 0, 8 : 2, 6 : 4, 4 : 6, 2 : 8, 0 : 1, где содержание R-Клп равно 100, 80, 60, 40, 20, 0% соответственно) с общей концентрацией 0.5 мМ. На рис. 9 представлен график счетов МГК-моделирования ДИВ растворов. Видно, что точки распределяются в кластеры, которые соответствуют определенной доле R-Клп. Дальнейшее построение модели для определения соотношения энантимеров в растворе проводили с помощью ПЛС1 метода. Характеристики построенных ПЛС1-моделей и СОП (рис. 10) свидетельствуют о том, что ПЛС1-модель адекватна и может быть использована для установления состава смеси энантимеров Клп. Представленные в табл. 5 результаты показывают, что во всех случаях содержание R-энантиомера Клп в смеси установлено правильно с относительной погрешностью, не превышающей 9%, и степенью открытия от 96 до 102%.

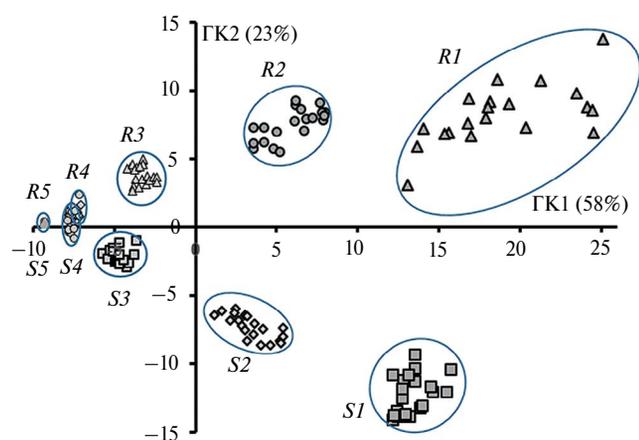


Рис. 8. График счетов МГК-моделирования дифференциально-импульсных вольтамперограмм R-Клп ($R1 - 0.5 \text{ мМ}$, $R2 - 0.25 \text{ мМ}$, $R3 - 0.1 \text{ мМ}$, $R4 - 0.05 \text{ мМ}$, $R5 - 0.0025 \text{ мМ}$) и S-Клп ($S1 - 0.5 \text{ мМ}$, $S2 - 0.25 \text{ мМ}$, $S3 - 0.1 \text{ мМ}$, $S4 - 0.05 \text{ мМ}$, $S5 - 0.0025 \text{ мМ}$) различных концентраций, полученных при использовании сенсорной системы.

Таблица 4. Основные характеристики ПЛС2-моделей при использовании отдельных сенсоров и сенсорной системы

| Сенсор | Наклон | Смещение | Корреляция | СКО |
|-------------------|--------|----------|------------|--------|
| СУЭ/СрХ/ЦП1 | 0.9636 | 0.0172 | 0.9757 | 0.1097 |
| СУЭ/СрХ/ЦП2 | 0.9395 | 0.0320 | 0.9653 | 0.1307 |
| СУЭ/СрХ/ЦП3 | 0.9553 | 0.0197 | 0.9715 | 0.1186 |
| Сенсорная система | 0.9793 | 0.0082 | 0.9837 | 0.0912 |

Таким образом, для распознавания энантиомеров Клп разработаны сенсоры на основе СУЭ, модифицированного СрХ и производными циклопентадиена. Изучены морфология поверхности, электрохимические и аналитические характеристики сенсоров, а также электрохимическое поведение Клп на предложенных сенсорах. Расчет количества электронов при электрохимической реакции показал, что механизм окисления молекулы Клп, предположительно, связан с окислением третичной аминогруппы с участием одного протона и одного электрона. Показано, что вольтамперограммы R- и S-Клп отличаются как по токам, так и по потенциалам пиков окисления. Определены энантиомеры Клп в биологических жидкостях, линейные зависимости токов пиков окисления энантиомеров Клп от их концентрации в растворе для всех сенсоров сохраняются в диапазоне концентраций от 1×10^{-6} до 5×10^{-4} М. Предложенные сенсоры обладают перекрестной чувствительностью к энантиомерам Клп, что позволило объединить их в сенсорную систему. При использовании предложенной сенсорной системы вероятность правильно распознанных образцов возрастает по сравнению с единичными сенсо-

рами. Во всех случаях содержание R-энантиомера Клп в смеси установлено правильно с относительной погрешностью, не превышающей 9%, и степенью открытия от 96 до 102%. Сенсорная система на основе СрХ и производных циклопентадиена позволяет определять содержание R-Клп в смеси энантиомеров, что дает возможность ее практического применения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (ГРАНТ НОМЕР 23-73-00119, <https://rscf.ru/en/project/23-73-00119/>).

Таблица 5. Результаты прогнозирования содержания R-Клп в смеси энантиомеров с использованием ПЛС1-модели

| Измерено | Предсказано | s_r , % | Степень открытия, % |
|----------|-----------------|-----------|---------------------|
| 0.0 | 0.06 ± 0.06 | 8.9 | - |
| 0.2 | 0.21 ± 0.05 | 7.5 | 100 |
| 0.4 | 0.39 ± 0.06 | 7.9 | 100 |
| 0.6 | 0.61 ± 0.04 | 5.6 | 101 |
| 0.8 | 0.82 ± 0.03 | 5.8 | 102 |
| 1.0 | 0.96 ± 0.06 | 8.6 | 96 |

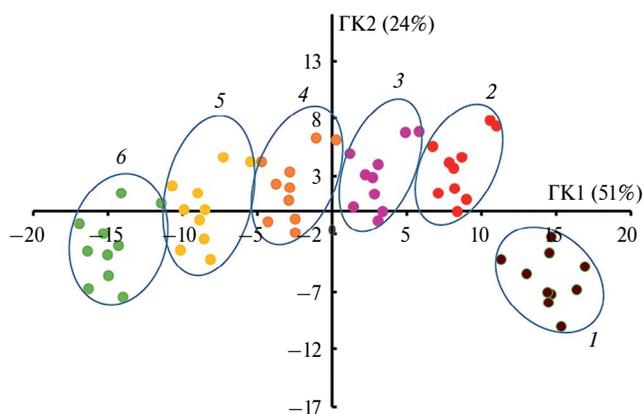


Рис. 9. График счетов МГК-моделирования дифференциально-импульсных вольтамперограмм растворов смесей с различным содержанием R-Клп (1–0%, 2–20%, 3–40%, 4–60%, 5–80%, 6–100%), полученный с использованием сенсорной системы.

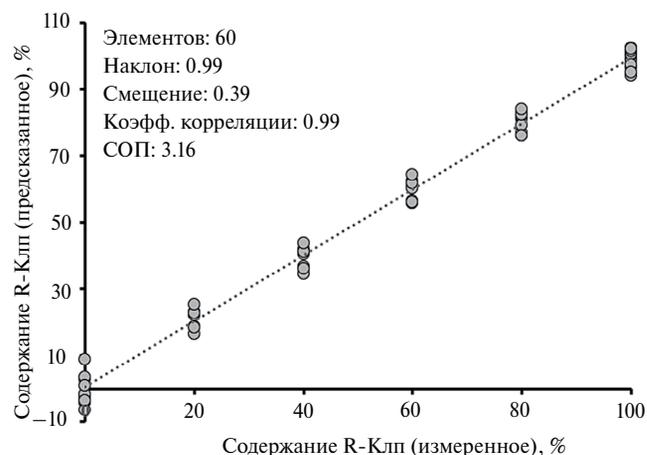


Рис. 10. График сравнения предсказанных и заданных значений содержания R-Клп в смеси при использовании сенсорной системы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Herbert J.M., Savi P.* P2Y₁₂, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel // *Semin. Vasc. Med.* 2003. V. 3. P. 113.
<https://doi.org/10.1055/s-2003-40669>
2. *Pereillo J.M., Maftouh M., Andrieu A., Uzabiaga M.F., Fedeli O., Savi P., et al.* Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel // *Drug Metab. Dispos.* 2002. V. 30. P. 1288.
<https://doi.org/10.1124/dmd.30.11.1288>
3. *Richter T., Murdter T.E., Heinkele G., Poleis J., Tatzel S., Schwab M., et al.* Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. V. 308. P. 189.
<https://doi.org/10.1124/jpet.103.056127>
4. The United States pharmacopeial convention. United States Pharmacopeia, 28th Ed. Rockville, Maryland, USA: United States Pharmacopeial Convention, 2005. 516 p.
5. *Reist M., Vos M.R., Montseny J.P., Mayer J.M., Carrupt P.A., Berger Y., Testa B.* Very slow chiral inversion of clopidogrel in rats: A pharmacokinetic and mechanistic investigation // *Drug Metab. Dispos.* 2000. V. 28. P. 1405.
6. *Gomez Y., Adams E., Hoogmartens J.* Analysis of purity in 19 drug product tablets containing clopidogrel: 18 copies versus the original brand // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004. V. 34. P. 341.
[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00533-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00533-8)
7. *Fayed A.S., Weshahy S.A., Shehata M.A., Hassan N.Y., Pauwels J., Hoogmartens J., Schepdael A.V.* Separation and determination of clopidogrel and its impurities by capillary electrophoresis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009. V. 49. P. 193.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.10.031>
8. *Mladenovic A.R., Jovanovic V.M., Petrovic S.D., Mijin D.Z., Drmanic S., Ivic M.L.A.* Determination of clopidogrel using square wave voltammetry at a gold electrode // *J. Serb. Chem. Soc.* 2013. P. 78. P. 2131.
<https://doi.org/10.2298/JSC130913116M>
9. *Dizavandi Z.R., Aliakbar A., Sheykhani M.* Electrochemical determination of clopidogrel using Bi₂O₃-pp-AP/GCE by differential pulse voltammetry in pharmaceutical productions // *J. Electroanal. Chem.* 2017. P. 805.
10. *Alghamdi A.F.* Electrochemical and chromatographic studies of clopidogrel using cathodic stripping voltammetry and HPLC under new experimental conditions and its determination in the preparation tablet, urine and plasma samples // *J. Chem. Pharm. Res.* 2015. V. 7. P. 1023.
11. *Sharad S.U., Pramod K.K., Ashwini K.S.* Enantioselective biomimetic sensor for discrimination of R and S-Clopidogrel promoted by β -cyclodextrin complexes employing graphene and platinum nanoparticle modified carbon paste electrode // *J. Electroanal. Chem.* 2019. V. 840. P. 305.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.068>
12. *Boulet L., Faure P., Flore P., Monteremal J., Ducros V.* Simultaneous determination of tryptophan and 8 metabolites in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *J. Chromatog. B.* 2017. V. 1054. P. 36.
<https://doi.org/10.1016/j.chromb.2017.04.010>
13. *Ashwin B.C.M.A., Shanmugavelan P., Mareeswaran P.M.* Electrochemical aspects of cyclodextrin, calixarene and cucurbituril inclusion complexes // *J. Incl. Phen. Macrocycl. Chem.* 2020. V. 98. P. 149.
<https://doi.org/10.1007/s10847-020-01028-4>
14. *Khan S.B., Lee S.L.* Supramolecular chemistry: Host-guest molecular complexes // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 3995.
<https://doi.org/10.3390/molecules2613399>
15. *Niu X., Mo Z., Yang X., Sun M., Zhao P., Li Z., et al.* Advances in the use of functional composites of beta-cyclodextrin in electrochemical sensors // *Microchim. Acta.* 2018. V. 185. P. 328.
<https://doi.org/10.1007/s00604-018-2859-6>
16. *Zilberg R.A., Maistrenko V.N., Kabirova L.R., Dubrovsky D.I.* Selective voltammetric sensors based on composites of chitosan polyelectrolyte complexes with cyclodextrins for the recognition and determination of atenolol enantiomers // *Anal. Methods.* 2018. V. 10. P. 1886.
<https://doi.org/10.1039/c8ay00403j>
17. *Zilberg R.A., Maistrenko V.N., Yarkaeva Yu.A., Dubrovsky D.I.* An enantioselective voltammetric sensor system based on glassy carbon electrodes modified by polyarylenephthalide composites with cyclodextrins for recognizing D- and L-tryptophans // *J. Anal. Chem.* 2019. V. 74. P. 1237.
<https://doi.org/10.1134/S1061934819110133>
18. *Moein M.M.* Advancements of chiral molecularly imprinted polymers in separation and sensor fields: A review of the last decade // *Talanta.* 2020. V. 224. P. 121.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121794>
19. *Rutkowska M., Płotka-Wasyłka J., Morrison C., Wiczorek P.P., Namieśnik J., Marć M.* Application of molecularly imprinted polymers in analytical chiral separations and analysis // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 102. P. 91.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.01.011>
20. *Zhong C., Yang B., Jiang X., Li J.* Current progress of nanomaterials in molecularly imprinted electrochemi-

- cal sensing // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2018. V. 48. P. 15. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1360762>
21. *Canfarotta F., Rapini R., Piletsky S.* Recent advances in electrochemical sensors based on chiral and nano-sized imprinted polymers // *Curr. Opin. Electrochem.* 2018. V. 7. P. 146. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.11.018>
 22. *Ma W., Xu L.G., Wang L.B., Xu C.L., Kuang H.* Chirality-based biosensors // *Adv. Func. Mater.* 2019. V. 29. Article 1805512. <https://doi.org/10.1002/adfm.201805512>
 23. *Wattanakit C., Kuhn A.* Encoding chiral molecular information in metal structures // *Chem. Eur. J.* 2019. V. 26. P. 2993. <https://doi.org/10.1002/chem.201904835>
 24. *Chen L.J., Yang H.B., Shionoya M.* Chiral metallosupramolecular architectures // *Chem. Soc. Rev.* 2017. V. 46 P. 2555. <https://doi.org/10.1039/c7cs00173h>
 25. *Zhuo C., Wen Y., Wu X.* Strategies to construct homochiral metal-organic frameworks: Ligands selection and practical techniques // *Cryst. Eng. Comm.* 2016. V. 18. P. 2792. <https://doi.org/10.1039/C5CE02593A>
 26. *Chuang C.H., Kung C.W.* Metal-organic frameworks toward electrochemical sensors: Challenges and opportunities // *Electroanalysis.* 2020. V. 32. P. 1885. <https://doi.org/10.1002/elan.202060111>
 27. *Tashiro S., Shionoya M.* Novel porous crystals with macrocycle-based well-defined molecular recognition sites // *Acc. Chem. Res.* 2020. V. 53. P. 632. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00566>
 28. *Attard G.A.* Electrochemical studies of enantioselectivity at chiral metal surfaces // *J. Phys. Chem. B.* 2001. V. 105. P. 3158. <https://doi.org/10.1021/jp0041508>
 29. *Arnaboldi S., Magni M., Mussini P.R.* Enantioselective selectors for chiral electrochemistry and electroanalysis: Stereogenic elements and enantioselection performance // *Curr. Opin. Electrochem.* 2018. V. 8. P. 60. <https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2018.01.002>
 30. *Wattanakit C., Kuhn A.* Encoding chiral molecular information in metal structures // *Chem. Eur. J.* 2019. V. 26. P. 2993. <https://doi.org/10.1002/chem.201904835>
 31. *Zagitova L.R., Maistrenko V.N., Yarkaeva Yu.A., Zagitov V.V., Zilberg R.A., Kovyazin P.V., Parfenova L.V.* Novel chiral voltammetric sensor for tryptophan enantiomers based on 3-neomenthylindene as recognition element // *J. Electroanal. Chem.* 2021. V. 880. Article 114939. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114939>
 32. *Zagitova L.R., Yarkaeva Yu.A., Zagitov V.V., Nazzyrov M.I., Gainanova S.I., Maistrenko V.N.* Voltammetric chiral recognition of naproxen enantiomers by N-tosylproline functionalized chitosan and reduced graphene oxide based sensor // *J. Electroanal. Chem.* 2022. V. 922. P. 11674. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116744>
 33. *Yarkaeva Yu.A., Nazzyrov M.I., Abdullin Y.R., Kovyazin P.V., Maistrenko V.N.* Enantioselective voltammetric sensor based on mesoporous graphitized carbon black Carbopack X and fulvene derivative // *Chirality.* 2023. V. 35. № 9. P. 625. <https://doi.org/10.1002/chir.23563>
 34. *Goyal R.N., Gupta V.K., Bachheti N.* Fullerene-C60-modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone – An anabolic steroid used in doping // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 597. P. 82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.017>
 35. *Esbensen K.H.* Multivariate Analysis – In Practice. Oslo: CAMO Process AS, 2001. 597 с.
 36. *Pomerantsev A.L.* Chemometrics in Excel. New York: Wiley, 2014. 313 с.
 37. *Yarkaeva Yu.A., Maistrenko V.N., Zagitova L.R., Nazzyrov M.I., Berestova T.V.* Voltammetric sensor system based on Cu(II) and Zn(II) amino acid complexes for recognition and determination of atenolol enantiomers // *J. Electroanal. Chem.* 2021. V. 903. Article 115839. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115839>
 38. *Zagitova L.R., Maistrenko V.N., Yarkaeva Yu.A., Zagitov V.V., Zilberg R.A., Kovyazin P.V., Parfenova L.V.* Novel chiral voltammetric sensor for tryptophan enantiomers based on 3-neomenthylindene as recognition element // *J. Electroanal. Chem.* 2021. V. 880. Article 114939. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114939>
 39. *Яркаева Ю.А., Исламуратова Е.Н., Загитова Л.Р., Гуськов В.Ю., Зильберг Р.А., Майстренко В.Н.* Сенсор для распознавания и определения энантиомеров триптофана на основе модифицированного энантиоморфными кристаллами бромтрифенилметана угольно-пастового электрода // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 11. С. 1038. <https://doi.org/10.31857/S0044450221110177> (*Yarkaeva Y.A., Islamuratova E.N., Zagitova L.R., Gus'kov V.Y., Zil'berg R.A., Maistrenko V.N.* A sensor for the recognition and determination of tryptophan enantiomers based on carbon-paste electrode modified by enantiomorphic crystals of bromotriphenylmethane // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. № 11. P. 1345. <https://doi.org/10.1134/S1061934821110162>)
 40. *Zilberg R.A., Sidelnikov A.V., Maistrenko V.N., Yarkaeva Y.A., Khamitov E.M., Kornilov V.M., Maksutova E.I.* Voltammetric sensory system for recognition of propranolol enantiomers based on glassy carbon electrodes modified by polyarylenephthalide composites of melamine and cyanuric acid // *Electroanalysis.* 2018. V. 30. P. 619. <https://doi.org/10.1002/elan.201700404>
 41. *Cesarotti E., Kagan H.B., Goddard R., Krüger C.* Synthesis of new ligands for transition metal complexes: Menthyl- and neomenthyl-cyclopentadienes // *J. Organomet. Chem.* 1978. V. 162. P. 297. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)81401-1](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)81401-1)
 42. *Silver S., Puranen A., Sjöholm R., Repo T., Leino R.* Chiral indenenes and group-4 metallocene dichlorides

- containing- and pinenyl-derived ligand substituents: synthesis and catalytic applications in polymerization and carboalumination reactions // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005. V. 2005. № 8. P. 1514.
<https://doi.org/10.1002/ejic.200400882>
43. Erker G., Aulbach M., Knickmeier M., Wingbermuhle D., Krueger C., Nolte M., Werner S. The role of torsional isomers of planarly chiral nonbridged bis(indenyl)metal type complexes in stereoselective propene polymerization // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. No.11. P.4590.
<https://doi.org/10.1021/ja00064a022>
44. Lasia A. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*. New York, NY: Springer New York. 2014. 367 с.
45. Зильберг Р.А., Яркаева Ю.А., Максютова 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.
<https://doi.org/10.7868/S004445021704020X>
 (Zil'berg R.A., Yarkaeva Yu.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.
<https://doi.org/10.1134/S1061934817040177>)
46. Зильберг Р.А., Яркаева Ю.А., Сидельников А.В., Майстренко В.Н., Крайкин В.А., Гилева Н.Г. Вольтамперометрическое определение бисопролола на модифицированном полиарилленфталидами стеклоуглеродном электроде // *Журн. аналит. химии*. 2016. Т. 71. № 9. С. 964.
<https://doi.org/10.7868/S004445021609019X>
 (Zil'berg R.A., Yarkaeva Yu.A., Sidel'nikov A.V., Maistrenko V.N., Kraikin V.A., Gileva N.G. Voltammetric determination of bisoprolol on a glassy carbon electrode modified by poly(arylene phthalide) // *J. Anal. Chem.* 2016. V. 71. № 9. P. 926.
<https://doi.org/10.1134/S1061934816090173>)
47. Сидельников А.В., Зильберг Р.А., Яркаева Ю.А., Майстренко В.Н., Крайкин В.А. Вольтамперометрическая идентификация антиаритмических лекарственных средств с использованием метода главных компонент // *Журн. аналит. химии*. 2015. Т. 70. № 10. С. 1095.
<https://doi.org/10.7868/S0044450215100151>
 (Sidel'nikov A.V., Zil'berg R.A., Yarkaeva Yu.A., Maistrenko V.N., Kraikin V.A. Voltammetric identification of antiarrhythmic medicines using principal component analysis // *J. Anal. Chem.* 2015. V. 70. № 10. P. 1261.
<https://doi.org/10.1134/S1061934815100159>)
48. Esbensen K.H. *Multivariate Data Analysis – In Practice*. CAMO Process. 2002. 158 с.

ORIGINAL ARTICLES

VOLTAMMETRIC SENSORS BASED ON MESOPOROUS GRAPHITIZED CARBON BLACK AND CYCLOPENTADIENE DERIVATIVES FOR DETERMINATION AND RECOGNITION OF CLOPIDOGREL ENANTIOMERS

M. I. Nazzyrov^{a, *}, Yu. A. Perfilova^a, Ya. R. Abdullin^a,
 P.V. Kovyazin^b, and V. N. Maistrenko^a

^a*Institute of Chemistry and Protection in Emergency Situations,
 Ufa University of Science and Technology, 450076 Ufa, Russia*

^b*Institute of Petrochemistry and Catalysis, 450075 Ufa, Russia*

*e-mail: mnazyrov@list.ru

Received October 13, 2023, Revised November 20, 2023, Accepted November 23, 2023

Abstract. To recognize and determine the enantiomers of clopidogrel, a sensor system based on a glassy carbon electrode modified with Carbpac X mesoporous carbon black and cyclopentadiene derivatives – (1S)-2-cyclopenta-2,4-dien-1-yl-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane; (1S, 2S, 4R)-2-cyclopenta-1,3-dien-1-yl-1-isopropyl-4-methylcyclohexane; 9-[(1S,2S,5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexyl]-9H-fluorene. Due to the unique properties of Carbpac X, such as large surface area and high conductivity, it was possible to obtain a mechanically stable and sensitive sensor layer that firmly retains chiral selector molecules on its surface. The morphological, electrochemical and analytical properties of the obtained sensors were studied by scanning electron microscopy, electrochemical impedance spectroscopy, cyclic and differential pulse voltammetry. The determination of clopidogrel enantiomers in biological fluids has been carried out; linear dependences of oxidation peak currents on their concentration in solution for all sensors are preserved in the concentration range from 1×10^{-6} to 5×10^{-4} M. The sensors are cross-sensitized, which allowed combining them into a sensor system with high enantioselectivity and sensitivity towards clopidogrel enantiomers. With the proposed sensor system, the probability of correctly recognizing samples increases compared to single sensors. In all cases, the content of R-clopidogrel in the mixture is correctly determined with a relative error not exceeding 9% and a degree of discovery ranging from 96 to 102%.

Keywords: voltammetric sensors, enantioselective sensor system, clopidogrel, enantiomers, cyclopentadiene derivatives.

УДК 543.552:543.8

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ КАРБОКСИЛИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И ПОЛИ(ПИРОГАЛЛОЛОВОГО КРАСНОГО) ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭВГЕНОЛА В ЭФИРНЫХ МАСЛАХ

© 2024 г. А. Д. Калмыкова^а, Г. К. Зиятдинова^{а, *}

^аХимический институт им. А.М. Бутлерова, Казанский федеральный университет
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия

*E-mail: Ziyatdinovag@mail.ru

Поступила в редакцию 13.09.2023 г.

После доработки 22.09.2023 г.

Принята к публикации 02.10.2023 г.

Разработан вольтамперометрический сенсор на основе стеклоуглеродного электрода с послойным сочетанием карбоксилированных многостенных углеродных нанотрубок и электрополимеризованного пирогаллолового красного для определения эвгенола в эфирных маслах. Найдены оптимальные условия получения пленки поли(пирогаллолового красного) в потенциодинамическом режиме в нейтральной среде, обеспечивающие наилучший вольтамперометрический отклик эвгенола. Электрод охарактеризован с помощью сканирующей электронной микроскопии и комплекса электрохимических методов. Показано значимое улучшение вольтамперных характеристик эвгенола на модифицированном полимером электроде. Рассчитаны параметры электроокисления эвгенола и показано, что реакция протекает с образованием *o*-хинона. В условиях дифференциально-импульсной вольтамперометрии на фоне буферного раствора Бриттона–Робинсона с pH 2.0 диапазон определяемых содержаний эвгенола составляет 0.75–100 мкМ с пределом обнаружения 0.73 мкМ. Показана высокая селективность определения эвгенола в присутствии неорганических ионов и типичных фенольных и терпеновых компонентов эфирных масел. Подход успешно апробирован на эвгенолсодержащих эфирных маслах и сопоставлен с независимым методом.

Ключевые слова: вольтамперометрия, химически модифицированные электроды, электрополимеризация, трифенилметановые красители, фенольные антиоксиданты, фитохимический анализ.

DOI: 10.31857/S0044450224060074, EDN: ttzyhs

Эвгенол (4-аллил-2-метоксифенол) – природное фенольное соединение, относящееся к душистым веществам. Он проявляет антиоксидантные, антисептические, обезболивающие, противовоспалительные и противомикробные свойства [1], что обуславливает его применение в медицине, фармации, ароматерапии, парфюмерной и пищевой промышленности. Эвгенол является основным компонентом эфирного масла гвоздики, а также содержится в эфирных маслах корицы, мускатного ореха и др. [2]. Терапевтический эффект эвгенола является дозозависимым, что проявляется в его прооксидантных свойствах при высоких концентрациях [3]. Согласно данным Всемирной организации здра-

воохранения, допустимая суточная доза эвгенола для человека составляет 2.5 мг/кг массы тела, а ее превышение может вызывать аритмию, повышение давления, проблемы с пищеварением и нарушение работы печени [4]. В связи с этим необходим контроль содержания эвгенола в реальных объектах.

Для решения этой задачи хорошо зарекомендовали себя электрохимические сенсоры, так как обеспечивают высокую чувствительность и достаточную селективность определения аналита, характеризуются быстрым временем отклика, простотой изготовления, экономичностью, а также возможностью миниатюризации [5]. Кроме того, минимизируется или полностью

исключается использование органических растворителей за счет применения мицеллярных сред на основе поверхностно-активных веществ [6].

Эвгенол окисляется на традиционных углеродсодержащих электродах при достаточно высоких анодных потенциалах, аналитический сигнал характеризуется низкой чувствительностью, а селективность в ряде случаев вообще не рассматривается. В настоящее время для вольтамперометрического определения эвгенола используют химически модифицированные электроды на основе углеродных наноматериалов [7–10] или наноструктур металлов, их оксидов и других соединений [11–19] и комбинаций этих модификаторов [20–22], а также полимерные покрытия различных типов [23–26], в том числе полимеры с молекулярными отпечатками [25, 26]. Модификация электродной поверхности обеспечивает электрокаталитический эффект на окисление эвгенола, выражающийся в снижении его перенапряжения и значительном увеличении токов окисления. В ряде случаев достигается высокая селективность отклика электродов на эвгенол в присутствии других фенольных соединений [11, 13–15, 18, 19] или в сложных смесях, например в эфирных маслах (каепутовое и масло мяты [15]), при использовании в качестве модификаторов наноструктур металлов и их оксидов.

Электроды с полимерными покрытиями [23–26] просты в изготовлении, не требуют применения дорогостоящих наноматериалов и характеризуются высокими чувствительностью и селективностью отклика на эвгенол (табл. 1). При этом используют проводящие полимеры, например поли(3,4-этилендиокситиофен)-полистиролсульфонат, для удерживания которого на электродной поверхности в водной среде

успешно применен поливинилпирролидон в качестве связующего компонента и стабилизатора [24]. Особое внимание уделяется полимерам с молекулярными отпечатками [25, 26], демонстрирующими селективность отклика на эвгенол в присутствии фенола [25] или ванилина, пеонола, метилэвгенола и метилизоэвгенола [26]. Трехмерная пористая структура покрытия [26], обусловленная присутствием композита графена с углеродными нанотрубками и наночастицами сополимера *n*-аминотиофенола и *n*-аминобензойной кислоты, обеспечивает наличие большого числа эффективных центров повторного связывания и быстрый массоперенос. Пастовый электрод из графитовой сажи с включенным полимером с молекулярными отпечатками на основе полиакрилонитрила [25] демонстрирует наилучшие аналитические характеристики при определении эвгенола среди всех существующих на сегодняшний день модифицированных электродов.

В качестве объектов анализа выступают главным образом специи, парфюмерная и фармацевтическая продукция. Эфирные масла, за редкими исключениями [9, 13], не рассматриваются.

Таким образом, разработка новых вольтамперометрических сенсоров на основе полимерных покрытий для определения эвгенола является актуальным направлением исследований. При этом электрохимическая полимеризация подходящего мономера является предпочтительной, так как заметно упрощает и сокращает процедуру получения полимерного покрытия, не требует большого числа вспомогательных реагентов, а также легко контролируется путем управления параметрами электролиза и обеспечивает равномерность покрытия на электродной поверхности. Среди полимеров представляют

Таблица 1. Аналитические характеристики эвгенола на электродах, модифицированных полимерами

| Электрод | Метод | ПрО, мкМ | Диапазон определяемых содержаний, мкМ | Литература |
|--|------------------------|----------|---------------------------------------|------------|
| Поливинилхлорид/графитовый электрод | Проточная система с АД | 5.48 | 3.05–183 | [23] |
| ПЭДОТ–ПСС–ПВП–ОУНТ/СУЭ | ДИВ | 0.048 | 0.15–122.4 | [24] |
| ПМО на основе полиакрилонитрила в составе пастового электрода из графитовой сажи | ДИВ | 0.0004 | 0.0005–1, 1–50 и 50–160 | [25] |
| Трехмерный ПМО на основе сополимера <i>n</i> -аминотиофенола и <i>n</i> -аминобензойной кислоты/графен–углеродные нанотрубки–ионная жидкость/СУЭ | АДАВА | 0.1 | 0.5–20 | [26] |

Обозначения: ПрО – предел обнаружения, АД – амперометрическое детектирование, ПЭДОТ–ПСС–ПВП–ОУНТ – композит поли(3,4-этилендиокситиофен)–полистиролсульфоната с поливинилпирролидоном и одностенными углеродными нанотрубками, ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия, ПМО – полимер с молекулярными отпечатками, АДАВА – адсорбционная анодная вольтамперометрия с линейной разверткой потенциала.

интерес покрытия на основе электрополимеризованных трифенилметановых красителей [27–32], хорошо зарекомендовавшие себя в качестве чувствительного слоя вольтамперометрических сенсоров на природные фенольные антиоксиданты. Применительно к эвгенолу такой подход является новым.

Настоящая работа посвящена разработке вольтамперометрического сенсора с послойным покрытием из карбоксиллированных многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ-СООН) и поли(пирогаллолового красного) (полиПК) для определения эвгенола и оценке возможностей его применения в анализе эфирных масел.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и растворы. Использовали эвгенол (99%, Aldrich, Германия) и пирогаллоловый красный (ПК) (Sigma-Aldrich, Германия). Для оценки селективности использовали карвакрол (98%, Aldrich, Германия), ванилин и фитол (99, 97% соответственно, Sigma-Aldrich, Германия), бензиловый спирт (99%), лимонен (96%), α -пинен (98%), β -пинен (98%), D-карвон (98%), камфен, α -фенхен, мирцен (75%), L-ментол (99.5%) и L-борнеол (97%) (Acros Organics, Бельгия), *транс*-анетол (98%, TCI, Япония). Их стандартные 10 мМ растворы (1.0 мМ для ПК) готовили растворением точной навески в этаноле (ректификате). Растворы с меньшей концентрацией готовили путем последовательного разбавления непосредственно перед проведением измерений.

Остальные реактивы были марки х. ч.

Модификация электродной поверхности. Для модифицирования электрода использовали МУНТ-СООН диаметром 9.5 нм, длиной 1.5 мкм и степенью карбоксиллирования >8% от Aldrich (Германия). Их гомогенную суспензию с концентрацией 1.0 мг/мл получали в 1%-ном додецилсульфате натрия (Panreac, Испания) диспергированием в течение 15 мин в ультразвуковой ванне WiseClean WUC-A03H (DAIHAN Scientific Co., Ltd, Республика Корея).

Рабочую поверхность стеклоуглеродного электрода (СУЭ) обновляли механически, полируя оксидом алюминия с размером частиц 0.05 мкм, ополаскивали ацетоном и дистиллированной водой. Затем электрод модифицировали нанесением 2 мкл суспензии МУНТ-СООН в 1%-ном додецилсульфате натрия с последующим испарением растворителя при комнатной температуре.

Полимерную пленку получали на поверхности СУЭ/МУНТ-СООН путем потенциодинамического электролиза ПК. Перед электрополимеризацией пятикратно сканировали фоновый электролит для достижения стабиль-

ной фоновой кривой. Условия электрополимеризации (концентрация мономера, число циклов сканирования потенциала, диапазон поляризации, скорость сканирования потенциала) варьировались в целях получения наилучшего оклика эвгенола. Полученный модифицированный электрод (СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК) тщательно промывали дистиллированной водой и использовали для дальнейших исследований. Электродную поверхность обновляли перед каждым измерением после механической очистки, как описано выше.

Электрохимические измерения проводили на потенциостатах/гальваностатах μ Autolab Type III (Eco Chemie B.V., Нидерланды) и Autolab PGSTAT 302N с модулем FRA32M (Metrohm B.V., Нидерланды) с программным обеспечением Nova 1.7.8 и NOVA 1.10.1.9 соответственно в стеклянной ячейке объемом 10 мл. Трехэлектродная система состояла из рабочего СУЭ (BASi, Inc., США, площадь поверхности 7.07 мм²) или модифицированного СУЭ, насыщенного хлоридсеребряного электрода сравнения и свернутой спиралью платиновой проволоки длиной 6.0 см в качестве вспомогательного электрода.

Вольтамперометрические измерения проводили в среде буферного раствора Бриттона–Робинсона, pH которого варьировали. Предварительно сканировали пять кривых для фонового электролита. Затем в ячейку вносили аликвоту раствора эвгенола. Общий объем раствора в ячейке составлял 4.0 мл. Регистрировали циклические вольтамперограммы от 0.0 до 1.2 В со скоростью сканирования потенциала 100 мВ/с. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы регистрировали в диапазоне 0.0–0.8 В при скорости сканирования потенциала 20 мВ/с. Параметры импульса варьировали. Для расчета параметров дифференциально-импульсных вольтамперограмм использовали коррекцию базовой линии в программе NOVA 1.7.8.

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

Спектрофотометрический анализ проводили на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ (НПО “Экрос”, Россия).

Анализ методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) проводили на полевом эмиссионном электронном микроскопе высокого разрешения Merlin™ (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 5 кВ и токе эмиссии 300 пА.

Все измерения проводили при комнатной температуре (25 ± 2°C).

Анализ эфирных масел. В качестве объектов анализа рассматривали коммерческие эфирные масла гвоздики, корицы и мускатного ореха.

Точную навеску эфирного масла (0.010–0.015 г) разбавляли этанолом до объема 2 мл и использовали для дальнейших исследований. Для вольтамперометрического анализа эфирных масел гвоздики полученный раствор разбавляли в 10 раз. В электрохимическую ячейку помещали буферный раствор Бриттона–Робинсона с pH 2.0 и регистрировали пять кривых. Затем в ячейку вносили 10 мкл раствора эфирного масла гвоздики или корицы (100 мкл эфирного масла мускатного ореха). Общий объем раствора в ячейке составлял 4.0 мл. Регистрировали дифференциально-импульсные вольтамперограммы в диапазоне 0.0–0.8 В при амплитуде импульса 125 мВ, времени импульса 25 мс и скорости сканирования потенциала 20 мВ/с. Для расчета параметров пиков использовали коррекцию базовой линии в программе NOVA 1.7.8.

Статистическую обработку результатов проводили для пяти параллельных измерений (трех измерений для спектрофотометрии) при доверительной вероятности 0.95. Результаты представляли как среднее значение и доверительный интервал. Случайную погрешность определения оценивали по величине относительного стандартного отклонения (s_r). Валидацию раз-

работанного вольтамперометрического сенсора проводили сопоставлением с данными спектрофотометрии с помощью t - и F -критериев.

Для выполнения регрессионного анализа применяли программу OriginPro 8.1 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электрополимеризация пирогаллолового красного на СУЭ/МУНТ-СООН. Трифенилметановые красители, содержащие в своей структуре фенольные фрагменты, формируют непроводящие покрытия [27–31], поэтому для обеспечения достаточной проводимости электродов и увеличения площади поверхности используют в качестве подложки углеродные наноматериалы. Изучали вольтамперные характеристики и электрополимеризацию ПК на СУЭ/МУНТ-СООН в условиях циклической вольтамперометрии. Обычно электрополимеризацию фенольных соединений проводят в щелочной среде, так как отрыв электрона от фенолят-иона протекает легче, чем от нейтральной молекулы [33], однако ПК в этих условиях интенсивно окисляется кислородом

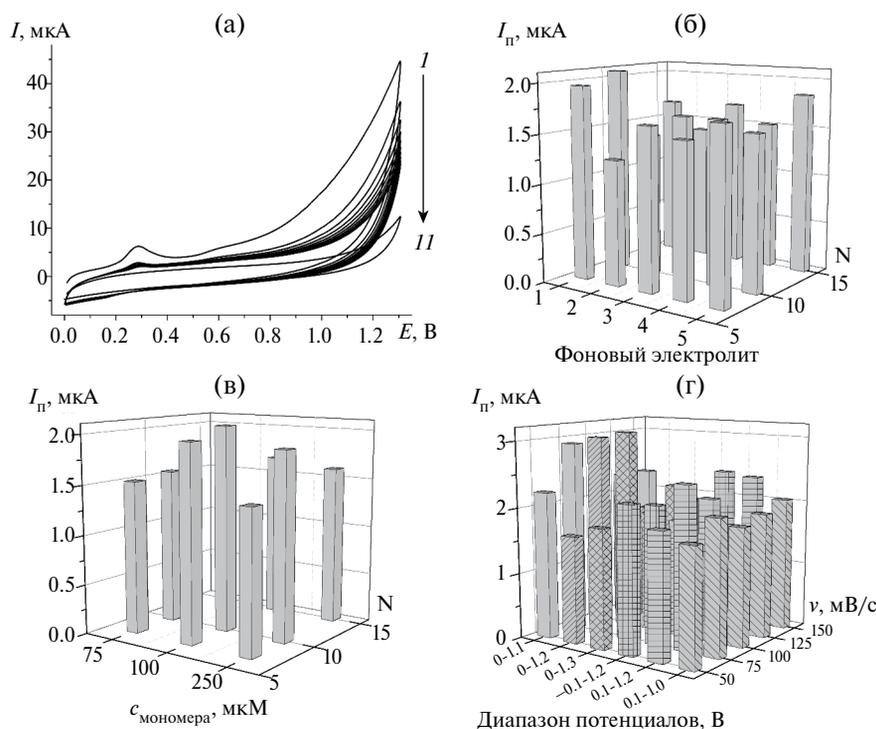


Рис. 1. (а) Циклические вольтамперограммы 100 мкМ пирогаллолового красного (кривые 1–10) на фоне буферного раствора Бриттона – Робинсона с pH 7.0 (кривая 11), $\nu = 75$ мВ/с. Влияние условий электрополимеризации на токи пика окисления эвгенола на СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК: (б) влияние числа циклов сканирования потенциала, природы и pH фонового электролита (1 – буферный раствор Бриттона–Робинсона с pH 7.0, 2 – буферный раствор Бриттона–Робинсона с pH 8.0, 3 – фосфатный буферный раствор с pH 8.0, 4 – буферный раствор Бриттона–Робинсона с pH 10.0, 5 – 0.1 М раствор NaOH), $C_{\text{мономера}} = 100$ мкМ; (в) влияние концентрации мономера и числа циклов, фонового электролит – буферный раствор Бриттона–Робинсона с pH 7.0; (г) влияние параметров электролиза.

воздуха [34], поэтому использовали нейтральную среду.

ПолиПК получали в потенциодинамическом режиме. На циклических вольтамперограммах ПК на СУЭ/МУНТ-СООН на фоне буферного раствора Бриттона–Робинсона с рН 7.0 наблюдается необратимый пик окисления при 0.28 В и слабовыраженная ступень окисления при 0.59 В (рис. 1а, кривая 1). В условиях эксперимента наблюдаемые анодные ступени соответствуют окислению частично депротонированной молекулы красителя ($pK_a = 2.6, 6.3$ и 9.8 [35]). Окисление ПК протекает с участием фенолятного фрагмента с образованием феноксильных радикалов, которые могут вступать в последующие реакции димеризации и полимеризации (схема 1).

Такое поведение согласуется с описанным ранее для других красителей, содержащих в структуре фенольные фрагменты (тимолфталина [28, 29], алюминона [30], бромкрезолового пурпурного [31] и бромтимолового синего [32]). На втором и последующих циклах наблюдается уменьшение токов окисления, что подтверждает формирование непроводящего покрытия.

Оптимизировали условия электрополимеризации ПК по отклику 10 мкМ эвгенола на модифицированном полимером электроде на фоне буферного раствора Бриттона–Робинсона с рН 2.0. Установили, что потенциал окисления эвгенола практически не изменяет-

ся, а токи окисления меняются статистически значимо. Варьирование природы и рН фонового электролита, а также числа циклов сканирования показало, что максимальные токи эвгенола достигаются на полимерном покрытии, полученном 10-кратным циклированием потенциала в среде буферного раствора Бриттона–Робинсона с рН 7.0 (рис. 1б). Дальнейшее варьирование концентрации мономера и числа циклов сканирования потенциала показало (рис. 1в), что наилучший отклик эвгенола получен для 100 мкМ ПК и десяти циклов сканирования потенциала. Семь циклов недостаточно для получения покрытия, а увеличение числа циклов до 15 приводит к уменьшению токов окисления аналита вследствие роста толщины непроводящего покрытия и частичного блокирования переноса электрона. Варьирование параметров электролиза (рис. 1г) показало, что полимерное покрытие следует получать при сканировании потенциала в диапазоне от 0 до 1.3 В со скоростью 75 мВ/с.

Таким образом, для получения максимального отклика эвгенола электрополимеризацию ПК следует проводить из 100 мкМ раствора в буферном растворе Бриттона–Робинсона с рН 7.0 десятикратным циклированием потенциала в диапазоне от 0.0 до 1.3 В со скоростью 75 мВ/с.

Характеристики электродов по данным сканирующей электронной микроскопии и электрохимических методов. Морфологию поверх-

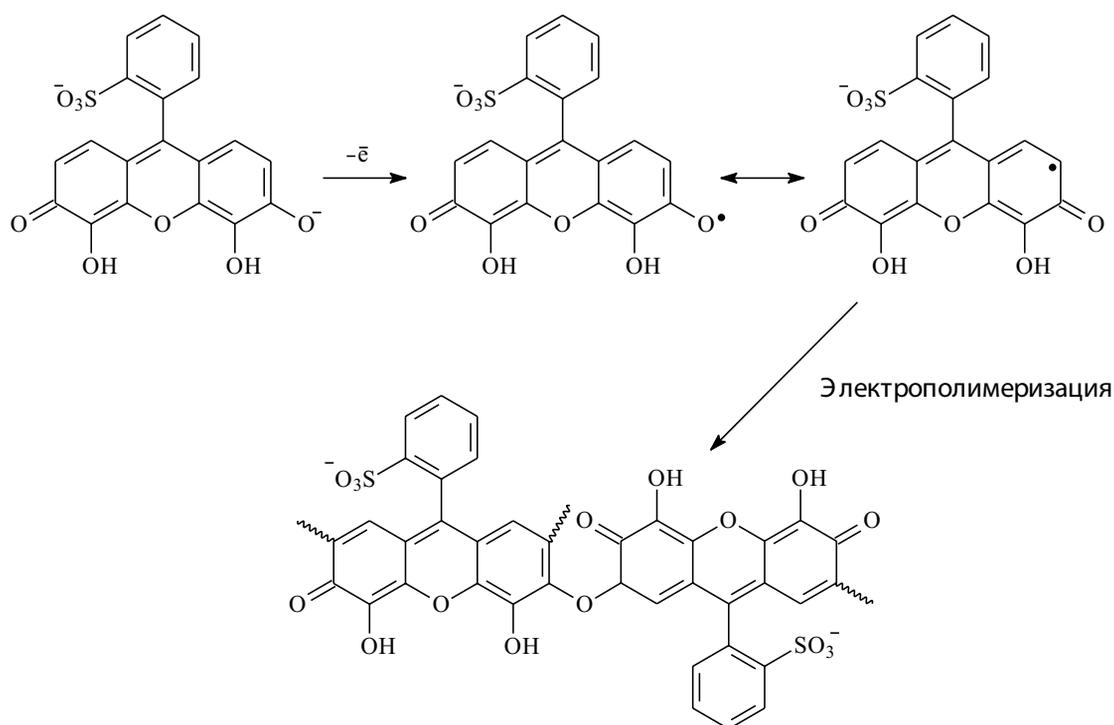


Схема 1. Электрополимеризация пирогаллолового красного при рН 7.0.

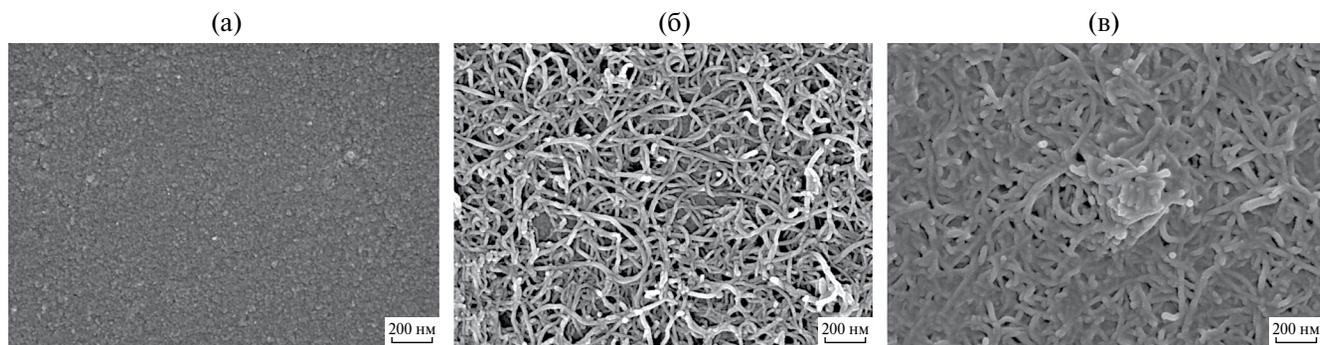


Рис. 2. Морфология поверхности (а) СУЭ, (б) СУЭ/МУНТ-СООН и (в) СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК по данным сканирующей электронной микроскопии.

ности электродов характеризовали методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 2а–в). Установили, что СУЭ обладает неструктурированной поверхностью (рис. 2а), СУЭ/МУНТ-СООН покрыт хаотично распределенными тесно переплетенными между собой трубками толщиной от 18 до 22 нм, формирующими сетчатую структуру (рис. 2б). Для СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК наблюдается тонкое пленочное покрытие (рис. 2в). Данные сканирующей электронной микроскопии подтверждают успешную иммобилизацию модификаторов, равномерное распределение покрытий и увеличение площади поверхности модифицированных электродов по сравнению с СУЭ, что подтверждается данными электрохимических измерений.

Оценили эффективную площадь поверхности электродов по электроокислению $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -ионов. Для СУЭ процесс протекает необратимо (рис. 3а, кривая 2), поэтому для расчета площади использовали данные хроноамперометрии при 0.45 В и уравнение Коттрелла [36]. Обратимое окисление на модифицированных электродах (рис. 3а, кривые 3 и 4) позволяет использовать для расчетов уравнение Рэндлса–Шевчика [36]. Установили достоверное увеличение эффективной площади поверхности модифицированных электродов ($96 \pm 3 \text{ мм}^2$ для СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК, $58 \pm 4 \text{ мм}^2$ для СУЭ/МУНТ-СООН и $8.9 \pm 0.3 \text{ мм}^2$ для СУЭ).

Характеристики электронного переноса на рассматриваемых электродах оценивали с помощью спектроскопии электрохимического импеданса в присутствии 1.0 мМ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ -ионов на фоне 0.1 М раствора КСl при 0.23 В (рис. 3б). Для количественной оценки параметров импеданса использовали моделирование с помощью эквивалентных ячеек Рэндлса [37] (табл. 2). Полученные значения χ^2 подтверждают соответствие экспериментальных и смоделированных спектров импеданса. Для модифицированных электродов наблюдается

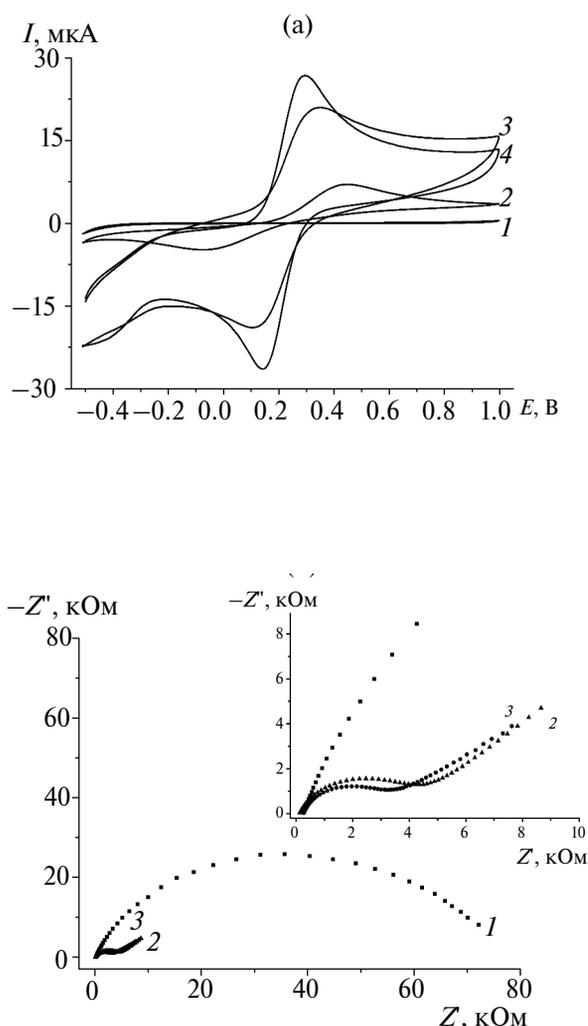


Рис. 3. (а) Циклические вольтамперограммы 1.0 мМ раствора $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -ионов на СУЭ (2), СУЭ/МУНТ-СООН (3) и СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК (4) в 0.1 М растворе КСl (1), $\nu = 100 \text{ мВ/с}$. (б) Диаграммы Найквиста для СУЭ (1), СУЭ/МУНТ-СООН (2) и СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК (3) в присутствии 1.0 мМ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ -ионов в 0.1 М растворе КСl. $E = 0.23 \text{ В}$, $10 \text{ кГц} - 0.04 \text{ Гц}$, амплитуда 5 мВ.

Таблица 2. Параметры электрохимического импеданса электродов и скорости электронного переноса ($n = 5$, $P = 0.95$)

| Электрод | R_s , Ом | R_{ct} , кОм | Q , мкОм ⁻¹ | n | W , мкОм ⁻¹ | χ^2 | k_{et} , см /с |
|----------------------|-------------|-----------------|--------------------------|-------|--------------------------|----------|-----------------------|
| СУЭ | 101 ± 6 | 72.5 ± 0.9 | 0.45 ± 0.05 | 0.860 | - | 0.02 | 4.12×10^{-5} |
| СУЭ/МУНТ-СООН | 110 ± 2 | 4.01 ± 0.11 | 6.02 ± 0.12 | 0.783 | 309 ± 6 | 0.02 | 1.15×10^{-4} |
| СУЭ/МУНТ-СООН/ПолиПК | 258 ± 2 | 3.04 ± 0.09 | 5.71 ± 0.05 | 0.805 | 324 ± 2 | 0.03 | 9.12×10^{-5} |

значимое уменьшение сопротивления переносу заряда (18- и 24-кратное для СУЭ/МУНТ-СООН и СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК соответственно), что свидетельствует об увеличении скорости переноса электрона и подтверждается рассчитанными согласно [38] значениями гетерогенной константы k_{et} (табл. 2). Величина элемента постоянной фазы увеличивается, что обусловлено пористой структурой поверхности модифицированных электродов.

Полученные результаты подтверждают эффективность послылой модификации электрода МУНТ-СООН и полиПК и перспективность применения разработанного электрода для решения аналитических задач.

Вольтамперные характеристики эвгенола на стеклоуглеродном электроде и модифицированных электродах. На циклических вольтамперограммах эвгенола на СУЭ и модифи-

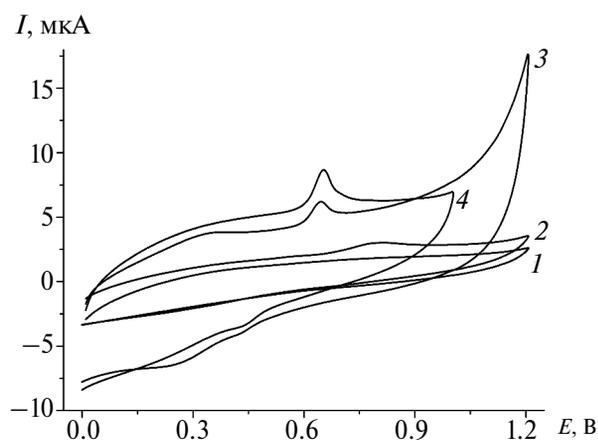


Рис. 4. Циклические вольтамперограммы 10 мкМ раствора эвгенола на СУЭ (2), СУЭ/МУНТ-СООН (3) и СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК (4) на фоне буферного раствора Бриттона – Робинсона с pH 2.0 (1), $v = 100$ мВ/с.

цированных электродах на фоне буферного раствора Бриттона–Робинсона с pH 2.0 регистрируется один выраженный пик окисления и слабовыраженная ступень восстановления (рис. 4). Разность потенциалов редокс пиков и соотношение их токов свидетельствуют о необратимости окисления. Модификация электродной поверхности МУНТ-СООН приводит к смещению потенциала окисления в область меньших значений на 140 мВ за счет каталитического эффекта МУНТ-СООН. Токи окисления эвгенола увеличиваются в 2.8 раза по сравнению с СУЭ, а также улучшается форма вольтамперограмм. В случае СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК потенциал окисления остается неизменным по сравнению с СУЭ/МУНТ-СООН, а токи окисления увеличиваются в два раза (3.1 ± 0.2 и 1.55 ± 0.05 мкА соответственно). Кроме того, на СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК наблюдается снижение фоновых токов, что обусловлено непроводящей природой полимерного покрытия и способствует улучшению формы кривой. Полученные результаты подтверждают эффективность использования модифицированного электрода на основе полиПК в электроанализе эвгенола.

Электроокисление эвгенола на СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК. Для установления параметров электроокисления эвгенола на разработанном электроде рассмотрели влияние pH фонового электролита и скорости сканирования потенциала на вольтамперные характеристики эвгенола. С ростом pH происходит смещение потенциала окисления эвгенола к меньшим значениям (рис. 5а), что свидетельствует об участии протонов в электродной реакции. Токи окисления эвгенола уменьшаются с увеличением pH (рис. 5б), что связано с окислением аналита кислородом воздуха [3]. Максимальные токи регистрируются при pH 2.0.

Изменение токов окисления эвгенола при варьировании скорости сканирования потенциала

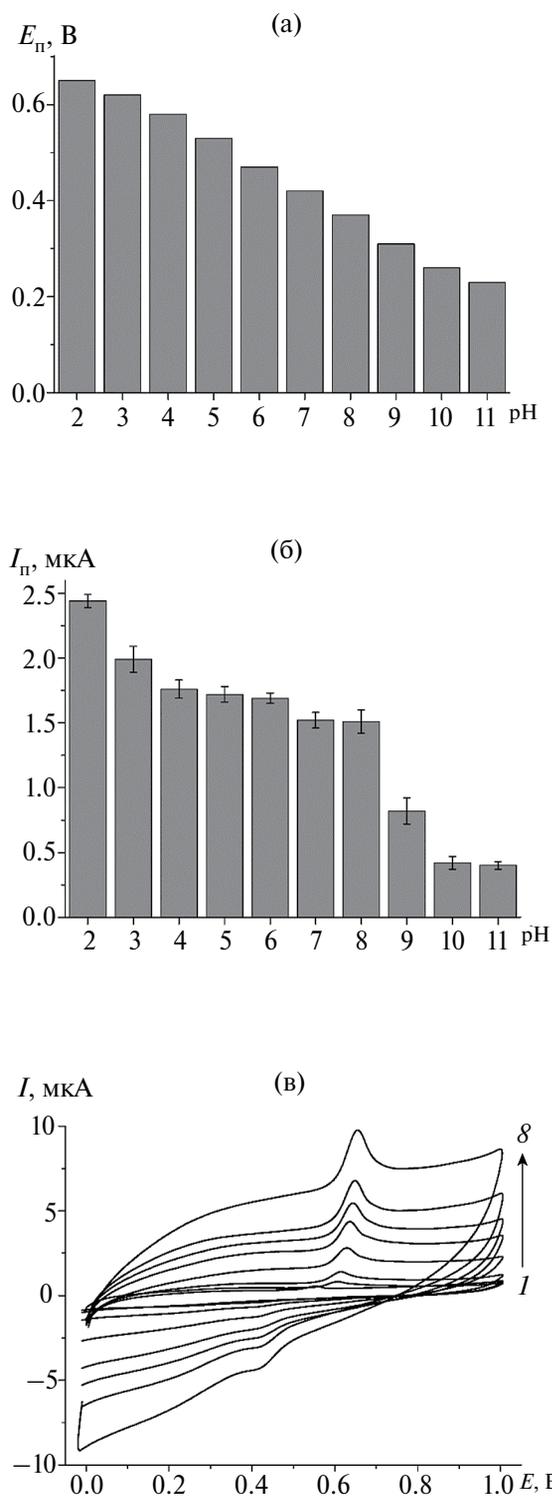


Рис. 5. Влияние pH фонового электролита на (а) потенциалы и (б) токи пика окисления 10 мкМ раствора эвгенола на СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК по данным циклической вольтамперометрии. (в) Циклические вольтамперограммы 10 мкМ раствора эвгенола на СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК на фоне буферного раствора Бриттона–Робинсона с pH 2.0 (I) в зависимости от скорости сканирования потенциала (мВ/с): 2 – 5, 3 – 10, 4 – 25, 5 – 50, 6 – 75, 7 – 100, 8 – 150.

(рис. 5в) подтверждает диффузионную природу электродного процесса (уравнения (1) и (2)):

$$I_n \text{ (мкА)} = (-0.34 \pm 0.06) + (0.285 \pm 0.006)v^{1/2} \text{ (мВ/с)}, R^2 = 0.9960, \quad (1)$$

$$\ln I_n \text{ (мкА)} = (2.26 \pm 0.02) + (0.593 \pm 0.007) \ln v \text{ (В/с)}, R^2 = 0.9990. \quad (2)$$

Электроокисление протекает необратимо, поскольку на катодных ступенях присутствует лишь слабовыраженная ступень при более высоких скоростях сканирования потенциала, а разность редокс потенциалов превышает 200 мВ. На основе полученных данных рассчитали параметры электроокисления эвгенола на СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК (табл. 3). Реакция протекает с участием двух электронов с образованием *o*-хинона согласно схеме 2, что согласуется с данными [6, 7, 13, 20, 39].

Дифференциально-импульсная вольтамперометрия эвгенола. Эвгенол определяли методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии. Варьирование параметров импульса показало, что максимальные токи пика окисления достигаются при амплитуде импульса 125 мВ и времени импульса 25 мс. При этом на вольтамперограммах эвгенола регистрируется четкий пик окисления при потенциале 0.57 В (рис. 6), токи которого линейно увеличивается с ростом концентрации (уравнение (3)):

$$I_n \text{ (мкА)} = (-0.06 \pm 0.08) + (32.6 \pm 0.2) \times 10^4 c \text{ (М)}, R^2 = 0.9997. \quad (3)$$

Диапазон определяемых содержаний эвгенола составляет 0.75–100 мкМ, а предел обнаружения 0.73 мкМ, что превосходит характеристики, полученные на СУЭ в среде 0.1 М Triton X-100 [6] и на модифицированных электродах [8, 11, 15, 16, 18]. Кроме того, предложенный сенсор прост в изготовлении, а определение эвгенола не требует стадии предварительного концентрирования, что значительно сокращает время измерения.

На модельных растворах эвгенола по методу введено—найдено (табл. 4) продемонстрированы правильность и высокая точность ($R = 99.9$ – 100.4%) результатов определения эвгенола с помощью предложенного сенсора. Значения относительного стандартного отклонения не превышают 2%, что свидетельствует об отсутствии случайной погрешности определения и хорошей воспроизводимости результатов, поскольку перед каждым измерением обновляли электродную поверхность.

Отклик СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК на 5.0 мкМ эвгенол селективен в присутствии неорганических ионов и типичных компонентов эфирных масел.

Таблица 3. Параметры электроокисления эвгенола на полиПК/МУНТ-СООН/СУЭ

| Формула | Параметр | Значение |
|--|---------------------------|--------------------------------|
| $\text{Slope} = \frac{\alpha_a n_a F}{2.303RT}$ | α_a | 0.31 |
| $E_{11} = \left(\frac{RT}{2\alpha_a nF} \right) \ln v + \text{const}$ | n | 2 |
| $I_{11} = \pi^{1/2} \chi(bt) n F A c D^{1/2} \left(\frac{\alpha_a n_a F}{RT} \right)^{1/2} v^{1/2}$ | $D, \text{см}^2/\text{с}$ | $(7.1 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ |
| $k^0 = 2.415 e^{-\frac{0.02F}{RT}} D^{1/2} (E_p - E_{p/2})^{-1/2} v^{1/2}$ | $k^0, \text{см}/\text{с}$ | 1.87×10^{-3} |

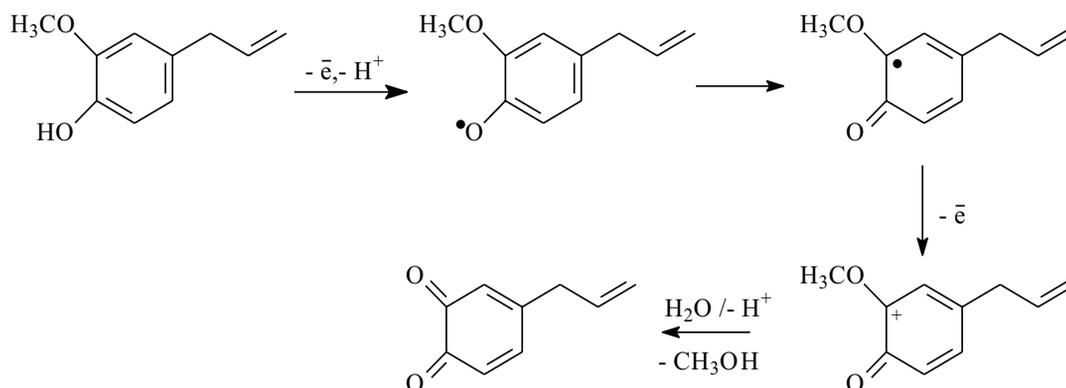
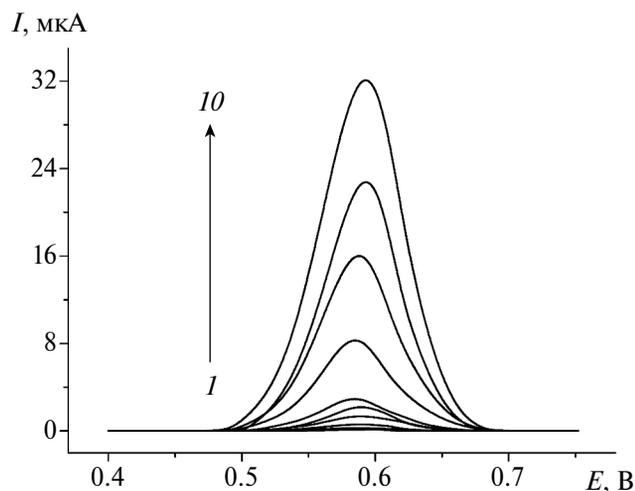

Схема 2. Электроокисление эвгенола на СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК.

Рис. 6. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы с коррекцией базовой линии 0.75 (*I*), 1.0 (2), 2.5 (3), 5.0 (4), 7.5 (5), 10 (6), 25 (7), 50 (8), 75 (9) и 100 (10) мкМ раствора эвгенола на СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК на фоне буферного раствора Бриттона–Робинсона с pH 2.0. Амплитуда импульса 125 мВ, время импульса 25 мс, скорость изменения потенциала 20 мВ/с.

Таблица 4. Результаты определения эвгенола в модельных растворах на полиПК/МУНТ-СООН/СУЭ на фоне буферного раствора Бриттона–Робинсона с pH 2.0 ($n = 5, P = 0.95$)

| Введено, мкг | Найдено, мкг | s_r |
|--------------|-------------------|-------|
| 0.493 | 0.493 ± 0.011 | 0.02 |
| 1.64 | 1.61 ± 0.08 | 0.02 |
| 4.93 | 4.95 ± 0.08 | 0.01 |
| 32.8 | 32.8 ± 0.4 | 0.009 |
| 65.7 | 65.6 ± 0.5 | 0.008 |

Неорганические ионы (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NO_3^- , Cl^- и SO_4^{2-}) не проявляют электрохимическую активность в рассматриваемых условиях и не оказывают влияние на пик окисления эвгенола даже при 1000-кратных избытках. Другие фенольные компоненты эфирных масел (ванилин, тимол и карвакрол) окисляются на СУЭ/МУНТ-СООН/полиПК при 0.82, 0.75 и 0.76 В для ванилина, тимола и карвакрола соответственно. Положение и форма их пиков окисления позволяют селективно определять эвгенол в присутствии 100-кратного избытка ванилина, 5-кратного избытка тимола и 10-кратного избытка карвакрола. Анетол и некоторые терпены (α -пинен и лимонен) также электроактивны в рассматриваемых условиях, дают пики окисления при 0.90, 1.1 и 1.3 В и не мешают определению эвгенола при 100-кратных избытках. Другие терпены (фитол, β -пинен, карвон, камфен, фенхен, мирсен, L-ментол, бензиловый спирт, L-борнеол) не окисляются в рассматриваемой области потенциалов и не влияют на отклик эвгенола. Таким образом, разработанный электрод характеризуется высокой селективностью по отношению к эвгенолу, что позволяет использовать его в анализе реальных объектов.

Определение эвгенола в эфирных маслах. Практическая применимость разработанного сенсора показана на примере эвгенолсодержащих эфирных масел (гвоздика, корица и мускатный орех). На вольтамперограммах спиртовых растворов эфирных масел наблюдается четко выраженный пик окисления эвгенола (рис. 7, кривая 1), что подтверждается методом добавок (рис. 7, кривые 2 и 3). Значения степени открытия эвгенола (табл. 5) в эфирных маслах свидетельствуют об отсутствии матричных эффектов при определении и возможности использования разработанного подхода в анализе реальных объектов.

Результаты определения эвгенола в эфирных маслах представлены в табл. 6. Полученные данные хорошо согласуются с результатами независимого спектрофотометрического определения [40]. Значения t - и F -критериев не превышают критические ($t_{\text{крит}} = 2.45$, $F_{\text{крит}} = 19.25$), что позволяет говорить об отсутствии систематических погрешностей определения и равнозначности обоих методов.

Содержание эвгенола уменьшается в ряду эфирных масел гвоздика, корица и мускатный орех. Полученные значения согласуются с данными [6, 13, 41]. Для различных образцов одного сырья наблюдаются значимые отличия, что подтверждает вариабельность объекта анализа, обусловленную как особенностями исходного растительного сырья, так и технологией изготовления эфирных масел. Содержание эвгенола можно рассматривать как один из показателей качества эфирных масел для их первичного скрининга.

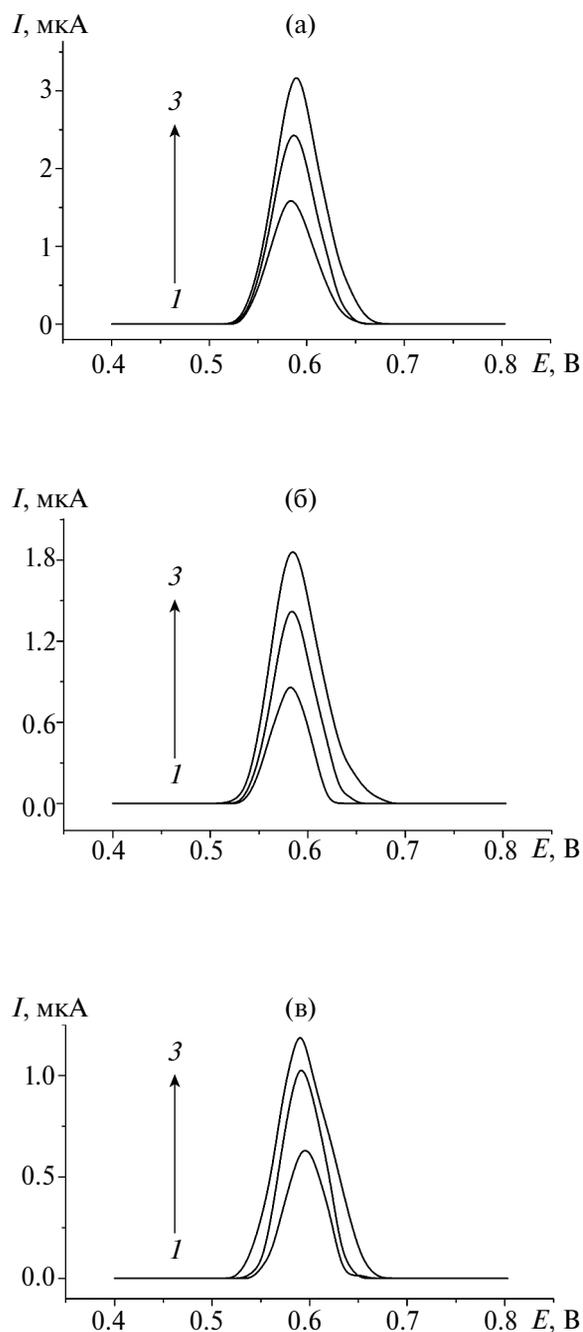


Рис. 7. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы с коррекцией базовой линии эфирных масел в отсутствие (1) и в присутствии добавок эвгенола (2, 3) на фоне буферного раствора Бриттона–Робинсона с pH 2.0. (а) 10 мкл разбавленного в 10 раз раствора эфирного масла гвоздики в этаноле (1) и с добавками 2.55 (2) и 5.10 мкМ раствора эвгенола (3). (б) 10 мкл раствора эфирного масла корицы в этаноле (1) и с добавками 1.55 (2) и 3.10 мкМ раствора эвгенола (3). (в) 100 мкл раствора эфирного масла мускатного ореха в этаноле (1) и с добавками 1.10 (2) и 1.65 мкМ раствора эвгенола (3). Амплитуда импульса 125 мВ, время импульса 25 мс, скорость изменения потенциала 20 мВ/с.

Таблица 5. Степень открытия эвгенола в эфирных маслах по данным вольтамперометрии на полиПК/МУНТ-СООН/СУЭ на фоне буферного раствора Бриттона–Робинсона с рН 2.0 ($n = 5$, $P = 0.95$)

| Эфирное масло | Введено, мкМ | Теоретическое значение, мкМ | Найдено, мкМ | s_r | R , % |
|----------------|--------------|-----------------------------|------------------|-------|----------------|
| Гвоздика | 0 | | 5.29 ± 0.08 | 0.01 | |
| | 2.55 | 7.84 | 7.80 ± 0.13 | 0.01 | 100 ± 1 |
| | 5.10 | 10.39 | 10.39 ± 0.14 | 0.01 | 100 ± 1 |
| Корица | 0 | | 3.14 ± 0.08 | 0.02 | |
| | 1.55 | 4.69 | 4.70 ± 0.14 | 0.02 | 100 ± 3 |
| | 3.10 | 6.24 | 6.22 ± 0.04 | 0.005 | 99.7 ± 0.6 |
| Мускатный орех | 0 | | 2.22 ± 0.11 | 0.05 | |
| | 1.10 | 3.3 | 3.27 ± 0.05 | 0.01 | 99 ± 1 |
| | 1.65 | 3.85 | 3.84 ± 0.09 | 0.02 | 100 ± 2 |

Таблица 6. Результаты определения содержания эвгенола в эфирных маслах ($n = 5$, $P = 0.95$)

| Эфирное масло | Образец | $\omega_{\text{эвгенола}}, \%$ | | | | t -критерий | F -критерий |
|----------------|---------|--------------------------------|-------|-------------------|-------|---------------|---------------|
| | | вольтамперометрия | s_r | спектрофотометрия | s_r | | |
| Гвоздика | 1 | 71 ± 1 | 0.01 | 71 ± 3 | 0.03 | 0.288 | 6.00 |
| | 2 | 80.0 ± 0.5 | 0.004 | 81 ± 2 | 0.01 | 0.914 | 9.39 |
| | 3 | 30 ± 1 | 0.03 | 31 ± 2 | 0.02 | 0.934 | 1.64 |
| Корица | 1 | 3.98 ± 0.06 | 0.02 | 4.01 ± 0.04 | 0.004 | 1.09 | 9.51 |
| | 2 | 10.5 ± 0.4 | 0.03 | 10.7 ± 0.8 | 0.05 | 0.636 | 3.54 |
| | 3 | 0.84 ± 0.05 | 0.04 | 0.88 ± 0.12 | 0.06 | 1.34 | 2.88 |
| | 4 | 2.33 ± 0.06 | 0.02 | 2.26 ± 0.04 | 0.008 | 2.38 | 5.42 |
| | 5 | 2.61 ± 0.03 | 0.006 | 2.7 ± 0.2 | 0.03 | 1.14 | 18.4 |
| Мускатный орех | 1 | 0.32 ± 0.02 | 0.04 | 0.34 ± 0.03 | 0.03 | 1.90 | 1.12 |

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Казанского федерального университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khalil A.A., Rahman U., Khan M.R., Sahar A., Mehmood T., Khan M. Essential oil eugenol: Sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives // RSC Adv. 2017. V. 7. № 52. P. 32669. <https://doi.org/10.1039/C7RA04803C>
2. Handbook of Herbs and Spices, 2nd Ed. / Ed. Peter K.V. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2012. V. 1. 336 p.
3. Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Природные фенольные антиоксиданты в биоаналитической химии: состояние проблемы и перспективы развития // Успехи химии. 2015. Т. 84. № 2. С. 194. (Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C. Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: State of the art and prospects of development // Russ. Chem. Rev. 2015. V. 84. № 2. P. 194. <https://doi.org/10.1070/RCR4436>)
4. WHO Food Additives Series: 56. Safety Evaluation of Certain Food Additives. Geneva: WHO Press, 2006. 440 p.
5. Ozkan S.A., Kauffmann J., Zuman P. Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 2015. 363 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47138-8>.
6. Ziyatdinova G., Ziganshina E., Budnikov H. Voltammetric sensing and quantification of eugenol using nonionic surfactant self-organized media // Anal. Methods. 2013. V. 5. № 18. P. 4750. <https://doi.org/10.1039/C3AY40693H>
7. Yildiz G., Aydogmus Z., Cinar M.E., Senkal F., Ozturk T. Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste electrode and its analytical application to pharmaceutical analysis // Talanta. 2017. V. 173. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.056>
8. Wang S., Zhang T., Wang Z., Wang D., Wang Z., Sun M., Liu H. Direct electrochemistry of eugenol at a glassy carbon electrode modified with electrochemically reduced graphene oxide // Int. J. Electrochem. Sci. 2019. V. 14. № 4. P. 3618. <https://doi.org/10.20964/2019.04.27>
9. Maciel J.V., Silva T.A., Dias D., Fatibello-Filho O. Electroanalytical determination of eugenol in clove oil by voltammetry of immobilized microdroplets // J. Solid State Electrochem. 2018. V. 22. № 7. P. 2277. <https://doi.org/10.1007/s10008-018-3933-z>
10. Verma A., Jain R. (1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate) based sensor for quantification of eugenol antioxidant // Electroanalysis. 2016. V. 28. № 10. P. 2598. <https://doi.org/10.1002/elan.201600228>
11. Afzali D., Zarei S., Fathirad F., Mostafavi A. Gold nanoparticles modified carbon paste electrode for differential pulse voltammetric determination of eugenol // Mater. Sci. Eng. C. 2014. V. 43. P. 97. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.035>
12. Lin X., Ni Y., Kokot S. Electrochemical mechanism of eugenol at a Cu doped gold nanoparticles modified glassy carbon electrode and its analytical application in food samples // Electrochim. Acta. 2014. V. 133. P. 484. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.065>
13. Ziyatdinova G., Ziganshina E., Romashkina S., Budnikov H. Highly sensitive amperometric sensor for eugenol quantification based on CeO₂ nanoparticles and surfactants // Electroanalysis. 2017. V. 29. № 4. P. 1197. <https://doi.org/10.1002/elan.201600719>
14. Muthukutty B., Ganesamurthi J., Chen T.-W., Chen S.-M., Yu J., Liu X. A novel high-performance electrocatalytic determination platform for voltammetric sensing of eugenol in acidic media using pyrochlore structured lanthanum stannate nanoparticles // J. Ind. Eng. Chem. 2022. V. 106. P. 103. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.10.015>
15. Anu Prathap M.U., Wei C., Sun S., Xu Z.J. A new insight into electrochemical detection of eugenol by hierarchical sheaf-like mesoporous NiCo₂O₄ // Nano Res. 2015. V. 8. № 8. P. 2636. <https://doi.org/10.1007/s12274-015-0769-z>
16. Kang S.Z., Liu H., Li X., Sun M., Mu J. Electrochemical behavior of eugenol on TiO₂ nanotubes improved with Cu₂O clusters // RSC Adv. 2014. V. 4. № 2. P. 538. <https://doi.org/10.1039/C3RA44895A>
17. Ganesamurthi J., Shanmugam R., Chen S.-M., Alagumalai K., Balamurugan M., Fan C.-H. A portable electrochemical sensor based on binary transition metal oxide (CoO/ZnO) for the evaluation of eugenol in real-time samples // Surf. Interfaces. 2023. V. 38. Article 102845. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2023.102845>
18. Veerapandi G., Meenakshi S., Anitta S., Arul C., Ashokkumar P., Sekar C. Precise and quick detection of ascorbic acid and eugenol in fruits, pharmaceuticals and medicinal herbs using hydroxyapatite-titanium dioxide nanocomposite-based electrode // Food Chem. 2022. V. 382. Article 132251. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132251>

19. Shi Z., Xia L., Li G., Hu Y. Platinum nanoparticles-embedded raspberry-like SiO_2 for the simultaneous electrochemical determination of eugenol and methyleugenol // *Microchim. Acta*. 2021. V. 188. № 7. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s00604-021-04892-0>
20. Fadillah G., Wicaksono W.P., Fatimah I., Saleh T.A. A sensitive electrochemical sensor based on functionalized graphene oxide/ SnO_2 for the determination of eugenol // *Microchem. J.* 2020. V. 159. Article 105353.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105353>
21. Feng Q., Duan K., Ye X., Lu D., Du Y., Wang C. A novel way for detection of eugenol via poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene- MoS_2 nano-flower fabricated electrochemical sensor // *Sens. Actuators B*. 2014. V. 192. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.087>
22. Murtada K., Moreno V., Ríos Á., Zougagh M. Decoration of graphene oxide with copper selenide in supercritical carbon dioxide medium as a novel approach for electrochemical sensing of eugenol in various samples // *J. Supercrit. Fluids*. 2019. V. 153. Article 104597.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104597>
23. Luque M., Ríos A., Valcárcel M. Use of supported liquid membranes incorporated in a flow system for the direct determination of eugenol in spice samples // *Analyst*. 2000. V. 125. № 10. P. 1805.
<https://doi.org/10.1039/B001974G>
24. Wang Z., Yao Y., Zhang H., Zhang J., Ding W., Liu Z., et al. Highly water-stable PEDOT:PSS composite electrode decorated with polyvinylpyrrolidone and carbon nanotubes for sensitive detection of eugenol // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2015. V. 10. № 9. P. 6997.
[https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)17325-1](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)17325-1)
25. Naskar H., Ghatak B., Biswas S., Singh P.P., Tudu B., Bandyopadhyay R. Electrochemical detection of eugenol (EU) using polyacrylonitrile molecular imprinted polymer embedded graphite (PAN-MIP/G) electrode // *IEEE Sens. J.* 2019. V. 20. № 1. P. 39.
<https://doi.org/10.1109/JSEN.2019.2941637>
26. Yang L., Zhao F., Zeng B. Electrochemical determination of eugenol using a three-dimensional molecularly imprinted poly (*p*-aminothiophenol-co-*p*-aminobenzoic acids) film modified electrode // *Electrochim. Acta*. 2016. V. 210. P. 293.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.05.167>
27. Ziyatdinova G., Guss E., Morozova E., Budnikov H., Davletshin R., Vorobev V., Osin Yu. Simultaneous voltammetric determination of gallic and ellagic acids in cognac and brandy using electrode modified with functionalized SWNT and poly(pyrocatechol violet) // *Food Anal. Methods*. 2019. V. 12. № 10. P. 2250.
<https://doi.org/10.1007/s12161-019-01585-6>
28. Гусс Е.В., Зиятдинова Г.К., Жупанова А.С., Будников Г.К. Вольтамперометрическое определение кверцетина и рутина при совместном присутствии на электроде, модифицированном политимолфталейном // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. № 4. С. 348.
<https://doi.org/10.31857/S0044450220040064> (Guss E.V., Ziyatdinova G.K., Zhupanova A.S., Budnikov H.C. Voltammetric determination of quercetin and rutin in their simultaneous presence on an electrode modified with polythymolphthalein // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 4. P. 526.
<https://doi.org/10.1134/S106193482004005X>)
29. Chernousova N., Ziyatdinova G. Electrode based on the MWCNTs and electropolymerized thymolphthalein for the voltammetric determination of total isopropylmethylphenols in spices // *Micromachines*. 2023. V. 14. № 3. Article 636.
<https://doi.org/10.3390/mi14030636>
30. Zhupanova A., Guss E., Ziyatdinova G., Budnikov H. Simultaneous voltammetric determination of flavanones using an electrode based on functionalized single-walled carbon nanotubes and polyaluminum // *Anal. Lett.* 2020. V. 53. № 13. P. 2170.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1732402>
31. Ziyatdinova G., Zhupanova A., Davletshin R. Simultaneous determination of ferulic acid and vanillin in vanilla extracts using voltammetric sensor based on electropolymerized bromocresol purple // *Sensors*. 2022. V. 22. № 1. Article 288.
<https://doi.org/10.3390/s22010288>
32. Chandrashekar B.N., Swamy B.E.K., Mahesh K.R.V., Chandra U., Sherigara B.S. Electrochemical studies of bromothymol blue at surfactant modified carbon paste electrode by using cyclic voltammetry // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2009. V. 4. № 3. P. 471.
33. Ziyatdinova G., Guss E., Yakupova E. Electrochemical sensors based on the electropolymerized natural phenolic antioxidants and their analytical application // *Sensors*. 2021. V. 21. № 24. Article 8385.
<https://doi.org/10.3390/s21248385>
34. Feng P.-S., Wang S.-M., Su W.-Y., Cheng S.-H. Electrochemical oxidation and sensitive determination of pyrogallol at preanodized screen-printed carbon electrodes // *J. Chinese Chem. Soc.* 2012. V. 59. № 2. P. 231.
<https://doi.org/10.1002/jccs.201100384>
35. Atala E., Velásquez G., Vergara C., Mardones C., Reyes J., Tapia R.A., et al. Mechanism of pyrogallol red oxidation induced by free radicals and reactive oxidant species. A kinetic and spectroelectrochemistry study // *J. Phys. Chem. B*. 2013. V. 117. № 17. P. 4870.
<https://doi.org/10.1021/jp400423w>
36. Bard A.J., Faulkner L.R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 2001. 850 p.

37. *Lasia A.* Electrochemical Impedance Spectroscopy and Its Applications. New York: Springer, 2014. 367 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8933-7>
38. *Randviir E.P.* A cross examination of electron transfer rate constants for carbon screen-printed electrodes using electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry // *Electrochim. Acta.* 2018. V. 286. P. 179. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.08.021>
39. *Lopez J.C., Zon M.A., Fernández H., Granero A.M.* Development of an enzymatic biosensor to determine eugenol in dental samples // *Talanta.* 2020. V. 210. Article 120647. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120647>
40. *Backheet E.Y.* Micro determination of eugenol, thymol and vanillin in volatile oils and plants // *Phytochem. Anal.* 1998. V. 9. № 3. P. 134. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199805/06\)9:3<134::AID-PCA398>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199805/06)9:3<134::AID-PCA398>3.0.CO;2-9)
41. *Chemistry of Spices / Eds. Parthasarathy V.A., Chempakam B., Zachariah T.J.* Oxfordshire: CABI, 2008. 445 p.

ORIGINAL ARTICLES

VOLTAMMETRIC SENSOR BASED ON CARBOXYLATED CARBON NANOTUBES AND POLY(PYROGALLOL RED) FOR DETERMINATION OF EUGENOL IN ESSENTIAL OILS

A.D. Kalmykova, G.K. Ziyatdinova*

A.M. Butlerov Chemical Institute, Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia

**e-mail: Ziyatdinovag@mail.ru*

Received September 13, 2023. Revised September 22, 2023. Accepted October 2, 2023

Abstract. A voltammetric sensor based on a glassy carbon electrode with a layer-by-layer combination of carboxylated multi-walled carbon nanotubes and electropolymerized pyrogallol red has been developed for the determination of eugenol in essential oils. Optimal conditions for the preparation of poly(pyrogallol red) film in potentiodynamic mode in neutral medium were found to provide the best voltammetric response of eugenol. The electrode was characterized using scanning electron microscopy and a suite of electrochemical methods. A significant improvement in the voltammetric characteristics of eugenol on the polymer-modified electrode was shown. The parameters of eugenol electrooxidation were calculated and it was shown that the reaction proceeds with the formation of *o*-quinone. Under the conditions of differential-pulse voltammetry in Britton-Robinson buffer with pH 2.0, the range of detectable eugenol content is 0.75-100 μM with a detection limit of 0.73 μM . High selectivity of eugenol determination in the presence of inorganic ions and typical phenolic and terpene components of essential oils was shown. The approach was successfully tested on eugenol-containing essential oils and compared with an independent method.

Keywords: voltammetry, chemically modified electrodes, electropolymerization, triphenylmethane dyes, phenolic antioxidants, phytochemical analysis.

УДК 543.552:541.128.13

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА НА ЭЛЕКТРОДЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ ПЛЕНКОЙ NAFION И СМЕШАННОВАЛЕНТНЫМИ ОКСИДАМИ ИРИДИЯ, В ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ НАПИТКАХ

© 2024 г. Л. Г. Шайдарова^{а,*}, И. А. Челнокова^а, Д. А. Коряковцева^а,
Д. А. Кириленко^а, Г. К. Будников^а

^аКазанский Федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия,
*E-mail: larisashaidarova@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 15.12.2023 г.

Установлено, что смешанновалентные оксиды иридия, электроосажденные на поверхности стеклоглеродного электрода, проявляют каталитическую активность при окислении кофеина. При этом более выраженный каталитический эффект получен на электроде, модифицированном композитом на основе пленки из перфторированного сульфополимера (Nafion) и смешанновалентных оксидов иридия. Разработан селективный вольтамперометрический способ определения кофеина. Линейная логарифмическая зависимость тока от концентрации кофеина наблюдается в диапазоне от 1×10^{-8} до 5×10^{-3} М. Разработанный способ использовали при определении кофеина в энергетических напитках.

Ключевые слова: вольтамперометрия, химически модифицированные электроды, оксиды иридия, перфторированный сульфополимер (Nafion), определение кофеина, энергетические напитки.

DOI: 10.31857/S0044450224060089, EDN: tttbng,

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) (КФ) – алкалоид пуринового ряда, получаемый из природного сырья [1]. Появление на рынке энергетических напитков на основе КФ вызвало большой интерес к изучению его влияния на организм человека. Оказалось, что действие КФ строго зависит от его концентрации [2]. В небольших количествах он действительно дает положительный эффект с минимумом отрицательного воздействия. Избыток КФ приводит к разнообразным нарушениям в работе центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта [3].

Арбитражным методом определения КФ в безалкогольных напитках является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), обеспечивающая высокую точность результатов анализа [4]. Однако этот метод имеет некоторые ограничения, к которым можно отнести длительную пробоподготовку, использование дорогостоящих реагентов, большие затраты времени на анализ.

В качестве альтернативного для определения органических веществ используют вольтамперометрический метод [5], который выгодно отличается от хроматографического экспрессностью, невысокой стоимостью аппаратуры, простотой эксплуатации. В вольтамперометрии в качестве индикаторного электрода используют металлические и углеродные электроды [6, 7]. Электроокисление КФ на этих электродах происходит при высоких положительных потенциалах [8], что приводит к ухудшению аналитических и метрологических характеристик его определения.

Для расширения диапазона определяемых концентраций и повышения точности определения применяют химически модифицированные электроды с каталитическими свойствами. В качестве модификаторов часто используют электролитические осадки благородных металлов, а также их соединений [9]. Для электростатического накопления противоположно заряженных молекул определяемого вещества поверхность электрода покрывают ионообменными поли-

мерными пленками. В частности, катионообменная полимерная пленка перфторированного сульфополимера (ПФСП) имеет высокое сродство к КФ в кислой среде [10].

В настоящей работе изучены электрокаталитические свойства смешанновалентных оксидов иридия (IrO_x), электроосажденных на электроде из стеклоуглерода (СУЭ), немодифицированном и модифицированном ПФСП-пленкой, при окислении КФ с целью разработки высокочувствительного вольтамперометрического способа его определения в энергетических напитках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вольтамперограммы регистрировали с помощью потенциостата-гальваностата CH Instruments. При регистрации вольтамперограмм использовали скорость наложения потенциала (ν), равную 20 мВ/с.

В работе использовали трехэлектродную ячейку. В качестве рабочего электрода применяли СУЭ, немодифицированный или модифицированный смешанновалентными оксидами иридия (IrO_x -СУЭ) или композитом на основе ПФСП-пленки и смешанновалентных оксидов иридия (ПФСП- IrO_x -СУЭ) с видимой поверхностью 0.07 см^2 .

Осаждение смешанновалентных оксидов иридия на поверхности СУЭ проводили электрохимически. Для этого использовали потенциодинамическое электроосаждение, варьируя область поляризации электрода и количество циклов изменения потенциалов. Электроосаждение проводили из раствора, содержащего хлорид иридия (IrCl_3) фирмы Aldrich (Германия). Для изготовления модифицированных электродов использовали 5.0%-ный раствор ПФСП Nafion в смеси низших алифатических спиртов (50% смеси спиртов и 45% воды) фирмы Aldrich (США), Молекулярная структура ПФСП включает $\text{SO}_3^- \text{H}^+$ -группу. Для получения полимерной пленки исходный раствор ПФСП разводили 95.57%-ным этиловым спиртом. На поверхность электрода наносили полученный 2.5%-ный спиртовой раствора ПФСП с последующим испарением растворителя на воздухе при комнатной температуре.

Электроды модифицировали композитом на основе ПФСП-пленки и IrO_x электроосаждением оксидов иридия на СУЭ с последующим капельным нанесением ПФСП-пленки. Модифицированный электрод регенерировали электрохимически, циклически изменяя потенциал электрода в $0.1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ до исчезновения пика окисления КФ.

Раствор КФ готовили растворением точных навесок в $0.1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. Серии растворов меньших концентраций готовили разбавлением исходных растворов непосредственно перед измерениями.

Для анализа энергетических напитков проводили предварительную дегазацию проб путем их отстаивания, затем аликвоту исследуемого напитка разбавляли раствором фонового электролита – $0.1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ в соотношении 1 : 1.

Определение КФ методом ВЭЖХ проводили по стандартной методике [11]. Использовали хроматографическую систему LC-20 Prominence фирмы Shimadzu (Япония), оборудованную колонкой Ascentis® Express C18 $150 \times 4.6 \text{ мм}$, 5 мкм, предколонкой Holder $200 \times 4.6 \text{ мм}$, насосом LC-20AD и диодно-матричным детектором SPD-M20A. Для управления системами хроматографа и регистрации хроматограмм использовали программное обеспечение LC Solution. Хроматографирование проводили в градиентном режиме со скоростью потока элюента 1 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали смесь хроматографически чистого ацетонитрила с фосфатным буферным раствором с pH 3.2. Детектирование осуществляли при длине волны 210 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В кислой среде электроокисление КФ на немодифицированном СУЭ происходит необратимо и при высоких анодных потенциалах – потенциал пика E_p 1.50 В (рис. 1, кривая 2). Регистрируемый сигнал плохо воспроизводим.

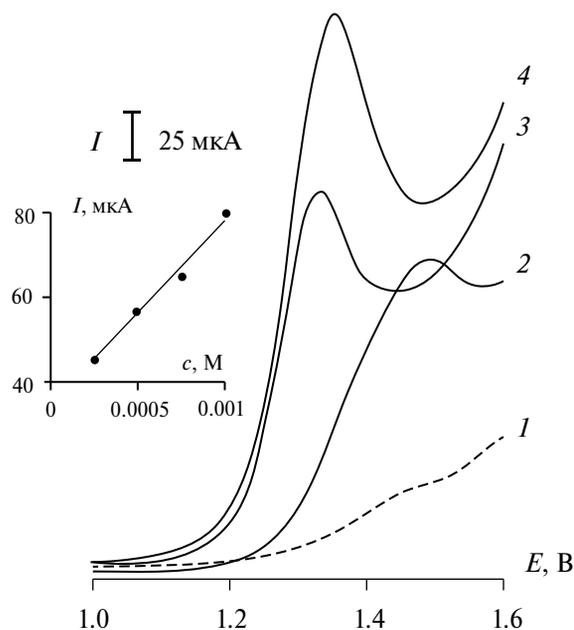


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы, полученные в отсутствие (1) и в присутствии $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ кофеина (2–4) на электродах СУЭ (2), IrO_x -СУЭ (1, 3), ПФСП- IrO_x -СУЭ (4) на фоне $0.1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. Вставка: график зависимости тока пика при E_p 1.35 В от концентрации кофеина на электроде ПФСП- IrO_x -СУЭ.

Установлена каталитическая активность оксидов иридия, иммобилизованных на поверхности СУЭ, по отношению к КФ. Каталитический эффект проявляется в увеличении тока окисления КФ при потенциалах окисления модификатора и уменьшении потенциала его окисления по сравнению с немодифицированным электродом. На рис. 1 (кривая 3) приведена вольтамперограмма окисления КФ, полученная на электроде IrO_x -СУЭ, на анодной ветви которой наблюдается один пик в области окисления модификатора при E_p 1.35 В. Высота пика зависит от концентрации КФ (рис. 1). По сравнению с СУЭ на химически модифицированном электроде наблюдается увеличение тока окисления субстрата в 1.5 раза и уменьшение потенциала пика его окисления на 150 мВ (рис. 1).

Так как в кислой среде КФ находится в катионной форме, изучили влияние катионообменных свойств ПФСП-пленки на электродные характеристики. Установлено влияние концентрации ПФСП в растворе полимера, используемого для получения пленки на поверхности электрода, на величину пиков окисления КФ (рис. 2а). По мере увеличения концентрации ПФСП сначала наблюдается увеличение регистрируемого тока пика окисления КФ, что связано с накоплением субстрата на электроде из-за ионообменных свойств ПФСП. При использовании более концентрированных

растворов ПФСП величина тока уменьшается, что, вероятно, связано с увеличением толщины полимерной пленки на поверхности электрода и уменьшением ее проводимости. Наибольшее значение тока наблюдается при концентрации ПФСП, равной 2.5%.

Использование композитного электрода ПФСП- IrO_x -СУЭ приводит к увеличению тока окисления КФ в 2.7 раза по сравнению с немодифицированным электродом (рис. 1, кривые 2 и 4, рис. 2б), что можно объяснить аддитивностью каталитических свойств IrO_x и катионообменных свойств ПФСП. При этом каталитический отклик композитного электрода обладает высокой стабильностью и воспроизводимостью. Срок эксплуатации электрода, в течение которого ток падает не менее чем на 5.0%, 24 ч.

Для оценки протяженности линейного диапазона определяемых концентраций КФ на модифицированных электродах готовили серию стандартных растворов с различной концентрацией этого соединения. Сопоставили аналитические характеристики определения КФ на немодифицированном и модифицированных электродах. Зависимость тока от концентрации аналита при окислении КФ на СУЭ линейна в интервале от 5×10^{-4} до 5×10^{-3} М, на электроде IrO_x -СУЭ – в интервале от 5×10^{-8} до 5×10^{-3} М, а на электроде ПФСП- IrO_x -СУЭ – в интервале от 1×10^{-8} до 5×10^{-3} М.

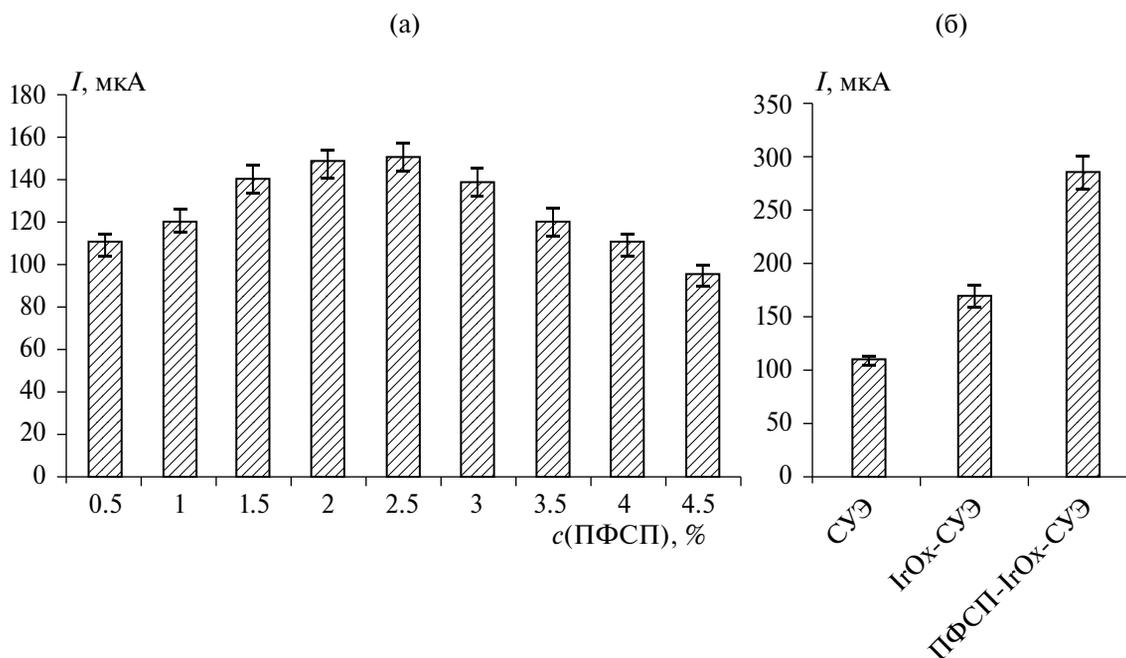


Рис. 2. (а) Зависимость величины тока окисления кофеина от концентрации ПФСП в капле водно-этанольного раствора, наносимого на поверхность электрода; (б) зависимость величины тока окисления кофеина от природы модификатора на различных электродах ($n = 3$, $P = 0.95$).

Аналитические характеристики определения КФ представлены в табл. 1.

Предел обнаружения, рассчитанный по 3s-критерию, составляет 10 и 5 нМ для электродов IrO_x-СУЭ и ПФСП-IrO_x-СУЭ соответственно.

Таким образом, композитный электрод ПФСП-IrO_x-СУЭ позволяет существенно увеличить токоокисления КФ и, соответственно, повысить чувствительность его определения. Его можно предложить в качестве химического сенсора для определения КФ в различных объектах, например в энергетических напитках. Поскольку в безалкогольных энергетических напитках в качестве вспомогательных компонентов присутствуют таурин, глюкоза, аскорбиновая кислота (витамин С), пиридоксин (витамин В₆), рассмотрели возможность избирательного определения КФ в присутствии этих соединений на электроде ПФСП-IrO_x-СУЭ.

В рассматриваемых условиях глюкоза электрохимически не активна. При электроокислении аскорбиновой кислоты, таурина или пиридоксина на электроде ПФСП-IrO_x-СУЭ наблюдаются максимумы тока при E_п 0.40, 1.10 и 1.25 В соответственно, высота которых зависит от их концентрации. В условиях циклической вольтамперометрии удалось достичь селективного определения КФ только в присутствии аскорбиновой кислоты. Разность потенциалов составляет 950 мВ. При совместном присутствии пиридоксина и КФ широкие пики окисления этих соединений перекрываются, что препятствует их определению в условиях циклической вольтамперометрии.

В условиях дифференциально-импульсного режима удалось достичь четкого разделения сигналов окисления КФ в присутствии аскорбиновой кислоты, таурина и пиридоксина. Таурин и пиридоксин окисляются в одной области потенциалов и не мешают определению КФ (рис. 3).

Таким образом, установлено, что при использовании электрода ПФСП-IrO_x-СУЭ сопутствующие компоненты, такие как аскорби-

новая кислота, таурин и пиридоксин не мешают определению КФ.

Разработанный способ дифференциально-импульсного вольтамперометрического определения КФ на электроде ПФСП-IrO_x-СУЭ использовали в анализе безалкогольных энергетических напитков. Кофеин определяли методом добавок. Результаты определения КФ в энергетических напитках приведены в табл. 2.

Полученные результаты дифференциально-импульсного вольтамперометрического определения КФ на химически модифицированном электроде в напитках сопоставили с результатами, полученными методом ВЭЖХ (табл. 2). Анализ результатов по F- и t-критериям показывает, что методы равнозначны (F_{расч} < F_{табл}), а расхождение между средними результатами незначимо (t_{расч} < t_{табл}). Результаты определения КФ, полученные методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии на модифицированном электроде и методом ВЭЖХ, указывают на удовлетворительную правильность разработанного способа.

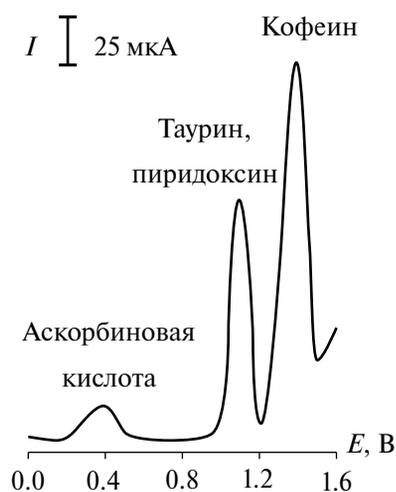


Рис. 3. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы, полученные на электроде ПФСП-IrO_x-СУЭ в растворе, содержащем аскорбиновую кислоту (5 × 10⁻³ М), таурин (5 × 10⁻³ М), пиридоксин (1 × 10⁻⁴ М) и кофеин (5 × 10⁻³ М) на фоне 0.1 М Н₂SO₄.

Таблица 1. Аналитические характеристики вольтамперометрического определения кофеина на немодифицированном и модифицированных электродах на фоне 0.1 М раствора Н₂SO₄

| Электрод | Диапазон концентраций, М | Уравнение регрессии $\lg I (\text{мкА}) = a + b \lg c (\text{М})$ | | R |
|----------------------------|---------------------------------------|---|------------------------------|--------|
| | | $a \pm \Delta a$ | $(b \pm \Delta b) \times 10$ | |
| СУЭ | $5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-3}$ | 3.84 ± 0.02 | 6.80 ± 0.03 | 0.9620 |
| IrO _x -СУЭ | $5 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-3}$ | 1.53 ± 0.02 | 0.43 ± 0.03 | 0.9982 |
| ПФСП-IrO _x -СУЭ | $1 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-3}$ | 3.12 ± 0.03 | 3.15 ± 0.05 | 0.9978 |

Таблица 2. Результаты определения кофеина в энергетических напитках методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии на электроде ПФСП-IrO_x-СУЭ (метод I) и методом ВЭЖХ (метод II) ($n = 6$, $P = 0.95$, $F_{\text{табл}} = 5.05$, $t_{\text{табл}} = 2.57$)

| Напиток | Содержание в напитке, мг/л | Найдено, мг/л | | $F_{\text{расч}}$ | $t_{\text{расч}}$ |
|-----------|----------------------------|---------------|----------|-------------------|-------------------|
| | | метод I | метод II | | |
| Coca-cola | <150 | 127±5 | 123 ± 8 | 1.10 | 1.03 |
| Tornado | <300 | 264±13 | 281 ± 14 | 1.95 | 1.32 |
| Burn | <300 | 283 ± 9 | 271 ± 8 | 1.27 | 1.27 |
| Red Bull | <320 | 298 ± 9 | 300 ± 9 | 1.33 | 1.32 |

Использование каталитического отклика электрода ПФСП-IrO_x-СУЭ для вольтамперометрического определения КФ способствует повышению чувствительности, селективности и воспроизводимости его определения. Разработанный способ может быть использован для определения КФ в энергетических и других кофеинсодержащих напитках для оценки качества выпускаемой продукции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (“Приоритет-2030”).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глуценко Н.Н., Плетенева Т.В., Попков В.А. Фармацевтическая химия. М.: Академия, 2004. 384 с.
2. Першин Г.Н., Гвоздева Е.И. Учебник фармакологии. М.: Медгиз, 1961. 405 с.
3. Андреева Е.Ю., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. Метилксантины: свойства и определение в различных объектах // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 5. С. 397.
4. ГОСТ Р 52844-2007. Напитки безалкогольные тонизирующие. Общие технические условия. М.: Стандартинформ, 2018. 8 с.
5. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Майстренко В.Н. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. 416 с.

6. Аронбаев Д.М., Аронбаев С.Д., Нармаева Г.З., Исакова Д.Т. Индикаторный угольно-пастовый электрод для вольтамперометрического анализа // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2020. Т. 86. №. 2. С. 5. (Aronbaev D. M., Aronbaev S.D., Narmaeva G.Z., Isakova D.T. Indicator carbon-paste electrode for voltammetric analysis // Ind. Lab. Diagn. Mater. 2020. T. 86. №. 2. C. 5.)
7. Мартынов Л.Ю., Наумова А.О., Зайцев Н.К., Ловчиновский И.Ю. Использование медных индикаторных электродов в вольтамперометрическом анализе // Тонкие химические технологии. 2016. Т. 11. №. 5. С. 26. (Martynov L.Y., Naumova O.A., Zaytsev N.K., Lovchinovskiy I.Y. The use of copper indicator electrodes in voltammetric analysis // Fine Chem. Technol. 2016. T. 11. №. 5. C. 26.)
8. Brunetti B., Desimoni E., Casati P. Determination of caffeine at a Nafion-covered glassy carbon electrode // Electroanalysis. 2007. V. 19. P. 385.
9. Шайдарова Л.Г., Будников Г.К. Химически модифицированные электроды на основе благородных металлов, полимерных пленок или их композитов в органической вольтамперометрии // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63. № 10. С. 1014. (Shaidarova L.G., Budnikov G.K. Chemically modified electrodes based on noble metals, polymer films, or their composites in organic voltammetry // J. Anal. Chem. 2008. T. 63. C. 922.)
10. Martinez-Huitle C.A., Suely Fernandes N., Ferro S., De Battisti A., Quiroz M.A. Fabrication and application of Nafion-modified boron-doped diamond electrode as sensor for detecting caffeine // Diam. Relat. Mater. 2010. V. 19. P. 1188.
11. Межгосударственный стандарт ГОСТ 30059-93. Напитки безалкогольные. Методы определения аспартама, сахарина, кофеина и бензоата натрия. М.: Стандартинформ, 2008. 11 с.

WOLTAMPEROMETRIC DETERMINATION OF COPHEINE ON ELECTRODE MODIFIED BY NAFION FILM AND MIXED VALENT IRIIDIUM OXIDES IN ENERGY BEVERAGES

L.G. Shaydarova^{a, *}, I.A. Chelnokova^a, D.A. Koryakovtseva^a, D.A. Kirilenko^a, G.K. Budnikov^a

^a*Kazan Federal University, A.M. Butlerov Chemical Institute, 420008 Kazan, Russia*

**e-mail: larisashaidarova@mail.ru*

Received October 13, 2023, Revised December 15, 2023, Accepted December 15, 2023

Abstract. It was found that mixed valent iridium oxides electrodeposited on the surface of a glass-carbon electrode exhibit catalytic activity in the oxidation of caffeine. A more pronounced catalytic effect was obtained on the electrode modified with a composite based on a film of perfluorinated sulfonated polymer (Nafion) and mixed valent iridium oxides. A selective voltammetric method for the determination of caffeine was developed. A linear logarithmic dependence of current on caffeine concentration was observed in the range from 1×10^{-8} to 5×10^{-3} M. The developed method was used in the determination of caffeine in energy drinks.

Keywords: voltammetry, chemically modified electrodes, iridium oxides, perfluorinated sulfopolymer (Nafion), caffeine determination, energy drinks.

УДК 543.866

**ВОЗМОЖНОСТИ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ
НА ОСНОВЕ ГЕКСАМОЛИБДЕНОВЫХ
КЛАСТЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ
ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АМИТРИПТИЛИНА
АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМИ ИММУНОСЕНОРАМИ
В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА**

© 2024 г. Д. В. Брусницын^{a,*}, Э. П. Медянцева^a, А. Н. Рамазанова^a,
А. В. Прыткова^a, Э. Р. Каримова^b, Ю. Г. Елистратова^c,
А. Р. Мустафина^c, М. Н. Соколов^d, С. А. Еремин^e,
Л. И. Мухаметова^e

^aКазанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

^bМежрегиональный клинико-диагностический центр
ул. Карбышева, 12а, Казань, 420101 Россия

^cИнститут органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, Федеральный исследовательский центр
“Казанский научный центр” Российской академии наук
ул. Ак. Арбузова, 8, Казань, 420088 Россия

^dИнститут неорганической химии им. А.В. Николаева Сибирского отделения Российской академии наук
просп. Академика Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090 Россия

^eМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*E-mail: brussman@mail.ru

Поступила в редакцию 26.09.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принята к публикации 24.10.2023 г.

Разработан способ определения амитриптилина как представителя трициклических антидепрессантов иммуносенсорами с использованием супрамолекулярных систем на основе гексамолибденовых кластерных комплексов в моче человека. Данные комплексы обладают электрохимической активностью и дают стабильный аналитический сигнал, что использовано при разработке амперометрических иммуносенсоров. Для доказательства образования супрамолекулярной системы самоорганизованных гексамолибденовых наночастиц и молекул хитозана применили методы люминесценции и динамического рассеяния света. Разработан композитный материал на основе гексамолибденовых кластерных комплексов в сочетании с восстановленным оксидом графена. Рабочий диапазон концентраций амитриптилина при определении амперометрическим иммуносенсором составил 1×10^{-9} – 1×10^{-4} М, нижняя граница определяемых содержаний лежит на уровне 5×10^{-10} М, содержание амитриптилина в образцах мочи – на уровне $(n - 7) \times 10^{-8}$ М. Сопоставление результатов анализа амперометрическим иммуносенсором и поляризационным флуоресцентным иммуноанализом показало отсутствие значимых систематических погрешностей. Возможность определения амитриптилина в биологических жидкостях позволяет подобрать оптимальную терапевтическую дозу лекарственного препарата, т.е. разработать подходы к созданию персонифицированной медицины.

Ключевые слова: кластерные комплексы молибдена, иммуносенсор, антитела, трициклические антидепрессанты.

DOI: 10.31857/S0044450224060092, EDN: ttrizi

Для определения лекарственных веществ чаще всего применяют хроматографические методы анализа, в частности газовую или высокоэффективную жидкостную хроматографию, капиллярный электрофорез, тандемную масс-спектрометрию в сочетании с хроматографией [1–10]. Данные варианты требуют проведения определенной пробоподготовки, что увеличивает продолжительность анализа, поэтому, на наш взгляд, более предпочтительно использовать иммунохимические методы анализа [11, 12].

В связи с большим количеством стрессовых ситуаций, ухудшением экологической обстановки и высокими темпами урбанизации каждый год растет число депрессивных расстройств у человека. Лечение таких заболеваний необходимо проводить в условиях строгого контроля содержания лекарственных веществ в биологических жидкостях. Для этих целей требуется разработка высокочувствительных, селективных, экспрессных иммунохимических методов анализа, которые в отдельных случаях позволяют проводить мониторинг лекарственных веществ, в частности трициклических антидепрессантов, *in situ*.

Восстановленный оксид графена — один из перспективных углеродных материалов для создания сенсоров [13–17]. За счет его применения достигнуто улучшение электрохимических характеристик разрабатываемых устройств, в частности электропроводности подложки, и увеличение удельной площади поверхности используемых трансдьюсеров [18–20].

Особое внимание исследователей в настоящее время привлекают супрамолекулярные системы на основе кластерных комплексов переходных металлов. Необходимо отметить, что области применения кластерных комплексов переходных металлов довольно разнообразны: их применяют в качестве люминесцентных и теплоизоляционных материалов, при создании датчиков кислорода, электрооптических устройств, используют для биовизуализации тканей, фотокатализа, в качестве антибактериальных и противоопухолевых фотодинамических агентов [21]. Публикации об использовании кластерных комплексов переходных металлов, в частности гексамолибденовых кластерных комплексов, а также их сочетаний с восстановленным оксидом графена в составе биосенсоров отсутствуют.

Следует отметить, что проведение анализа мочи на присутствие в ней лекарственных веществ требует от исследователей определенных навыков работы со сложными системами, в которых могут присутствовать вещества, обладающие электрохимической активностью в области рабочих потенциалов при амперометрических измерениях.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке амперометрических иммуносенсоров на основе планарных графитовых электродов,

модифицированных супрамолекулярной системой на основе гексамолибденовых кластерных комплексов в сочетании с восстановленным оксидом графена в хитозане, для определения трициклических антидепрессантов в моче человека на примере amitriptilina.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве первичного преобразователя сигнала использовали графитовые печатные (планарные) электроды конструкции три в одном. Более подробно их устройство описано в работе [22]. Электрохимическую стабилизацию и очистку поверхности планарных электродов проводили согласно методике [23].

Для проведения вольтамперометрических измерений использовали потенциостат/гальваностат 204 (Autolab, Нидерланды).

Правильность полученных результатов проверяли на многофункциональном планшетном анализаторе PolarStarOmega (BMGLabtech, Германия) в режиме поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Более подробное описание прибора и метода приведены в работе [24].

Обработку вольтамперных кривых проводили с помощью программного обеспечения для потенциостата/гальваностата Nova 2013 версии 1.10.19, построение градуировочных графиков — в наборе пакетных программ Origin 2018 версии 9.50.00, схему функционирования иммуносенсора строили в наборе пакетных программ ChemOffice 2018 версии 18.0.

Измеряли динамическое рассеяние света (DLS) и определяли электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) с помощью анализатора размера наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) при 25°C. Значения электрокинетических потенциалов рассчитывали по уравнению Гельмгольца—Смолуховского. Размер частиц определяли трижды для каждого образца.

Спектры люминесценции получали на спектрофлуориметре Hitachi F-7100 с использованием кварцевых кювет толщиной 10 мм. Длина волны возбуждения составляла 380 нм, величину люминесценции регистрировали в диапазоне 400–750 нм при напряжении 500 В, размеры щели составляли 10 мм.

Поверхность планарных электродов модифицировали, используя дисперсии восстановленного оксида графена (Sigma Aldrich, США) и гексамолибденовых кластерных комплексов в хитозане марки х. ч. (раствор хитозана готовили в 2%-ной уксусной кислоте марки х. ч.).

Октаэдрический кластерный комплекс молибдена с апикальным лигандом трифторацетатом $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ был синтезирован в Институте неорганической химии

им. А.В. Николаева Сибирского отделения РАН по методике [25].

Методика получения наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ @хитозан. Навеску кластера растворяли в 0.2 мл ацетонитрила и доводили водой до 5 мл ($c_0 = 2 \times 10^{-4}$ М). $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ ($c_1 = 3.5 \times 10^{-5}$ М) смешивали с 1 мл хитозана ($c = 0.05$ М) и подвергали УЗ-диспергированию в течение 10 мин при температуре воды $25 \pm 2^\circ\text{C}$. После этого отделяли полученные наночастицы путем центрифугирования (15 000 об/мин при 4°C в течение 15 мин). Супернатант анализировали на спектрофлуориметре.

Концентрация дисперсии комплекса $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ @хитозан составляла 3.5×10^{-6} М, а восстановленного оксида графена – 2 мг/мл.

В ходе приготовления рабочего раствора лекарственного вещества амитриптилин применяли центрифугу MiniSpin (Eppendorf, Германия).

Ацетатные буферные растворы с рН 4.5–5.5, фосфатные буферные растворы с рН 6.0–7.5 и боратные буферные растворы с рН 8.0–11.0 готовили из препаратов х. ч. и ч. д. а (ЗАО “Лаверна”, Россия).

В качестве биочувствительного компонента применяли поликлональные антитела (Ат) против трициклических антидепрессантов фирмы MicroPharm Ltd (Великобритания). Приготовление и последующее нанесение смеси для иммобилизации Ат на поверхность электрода осуществляли по методике, описанной в работе [26].

Образцы мочи человека, включающей амитриптилин, были предоставлены МСЧ КФУ (Казань, Россия).

Объект анализа: лекарственное вещество амитриптилин (Sigma-Aldrich, США) и содержащий его фармацевтический препарат “Амитриптилин” (ЗиО-Здоровье, Подольск, Россия). Серию стандартных растворов лекарственного вещества в рабочем диапазоне концентраций готовили по точной навеске.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве композитного модификатора использовали $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ @хитозан и $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ @хитозан в сочетании с восстановленным оксидом графена (ВГО) в хитозане для создания высокочувствительных и селективных иммуносенсоров.

Известно, что октаэдрические кластеры молибдена обладают высокой фотостабильностью, низкой токсичностью, хорошо выраженной люминесценцией в диапазоне 650–750 нм, их электрохимическая активность дает возможность применения в электрохимическом анализе [27]. Кроме того, вариация структуры апикальных лигандов позволяет проводить тонкую настройку люминесцентных и электрохимических характеристик кластеров [27]. Однако введение в структуру кластеров апикальных лигандов с гидрофобными заместителями приводит к плохой растворимости в воде, поэтому для перевода нерастворимых в воде кластерных солей в диспергируемые в воде формы наночастиц использовали метод наноосаждения [19], который представляет собой одностадийный процесс, известный также как метод замещения растворителя. На первом этапе кластеры растворяли в органическом растворителе, затем органический раствор кластера медленно добавляли в водную фазу. В результате получили коллоидно-устойчивые Mo_6 -наночастицы размером 234 нм, обладающие отрицательным дзета-потенциалом (ζ -потенциал = -35 мВ), которые модифицировали хитозаном. Модификация хитозаном приводит к перезарядке поверхности Mo_6 -наночастиц и увеличению размера полученных наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ @хитозан (табл. 1).

Таким образом, методы люминесценции и динамического рассеяния света позволили выявить образование супрамолекулярной системы на основе самоорганизованных Mo_6 -наночастиц и молекул хитозана.

Степень перехода кластерных блоков в наночастицы $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ @хитозан составляет 81%; такую оценку получили люминесцентным анализом супернатантов после фазового отделения наночастиц. Спектры люминесценции на рис. 1 иллюстрируют уменьшение интенсивности люминесценции наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ вследствие их перехода в $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ @хитозан. Предположительно, взаимодействие наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ с хитозаном осуществляется за счет электростатических сил, создаваемых отрицательным поверхностным зарядом $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ наночастиц (ζ -потенциал = -35 мВ) и положительным зарядом протонированных аминогрупп хитозана, что приводит к перезарядке поверхности

Таблица 1. Характеристика супрамолекулярных систем

| Соединение | d, нм | PDI (индекс полидисперсности) | ζ -потенциал, мВ |
|--|-------|-------------------------------|------------------------|
| Наночастицы Mo_6 | 234 | 0.341 | -35 |
| $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\text{Mo}_6\text{I}_8](\text{CF}_3\text{COO})_6$ @хитозан | 658 | 0.431 | +67 |

$(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$. По данным динамического рассеяния света, ζ -потенциал приобретает значение +67 мВ.

При нанесении наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозан на поверхность электрода на дифференциальной импульсной вольтамперограмме на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5 наблюдается пик окисления при потенциале $E = 127 \pm 8$ мВ, связанный с окислением кластерного ядра $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{4+}/\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{5+}$ [28].

Изменение поверхности электрода за счет нанесения композитного модификатора (ВГО в сочетании $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозан) приводит к смещению потенциала на 46 мВ в сторону менее положительных потенциалов и увеличению тока окисления более чем в 40 раз (рис. 2). Увеличение тока, возможно, связано с присутствием в составе модификатора хитозана, который является полиэлектролитом, и восстановленного оксида графена, хорошо проводящего электрический ток [29, 30].

Установили, что модификаторы на основе $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозана дают стабильный и воспроизводимый сигнал

на вольтамперной кривой, поэтому в качестве аналитического сигнала амперометрического иммуносенсора выбрали ток окисления $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозана. Это позволило разработать два иммуносенсора для определения амитриптилина (табл. 2). Первый иммуносенсор получили нанесением только наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозан, второй – композита $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозана с оксидом графена.

При разработке иммуносенсора установили, что оптимальным разбавлением Ag, которое обеспечивает получение максимального аналитического сигнала иммуносенсора, является 1 : 50.

Принцип работы иммуносенсора можно представить следующим образом (рис. 3): на поверхность чистого планарного электрода наносят капельным методом ВГО в хитозане. После высыхания наносят $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозан. Затем на полученную модифицированную поверхность наносят иммобилизованную смесь, содержащую Ag против трициклических антидепрессантов, хитозан, glutaraldehyde и фосфатный буферный раствор с pH 7.5. После высыхания в течение одного дня при комнатной температуре полученный иммуносенсор хранят в холодильнике при 4°C. Для определения антигена (Ag) (амитриптилина) иммуносенсор помещают в электрохимическую ячейку с раствором аналита.

Образование иммунного комплекса Ag–Ag на поверхности планарного модифицированного электрода приводит к изменению (уменьшению) величины аналитического сигнала (рис. 4), что может быть связано со стерическими эффектами на поверхности электрода.

Оценили аналитические характеристики разработанных иммуносенсоров при определении амитриптилина. Для иммуносенсора 1 диапазон рабочих концентраций составляет 1×10^{-9} – 1×10^{-5} М, нижняя граница определяемых содержаний – на уровне 8×10^{-10} М. Лучшие аналитические характеристики при определении амитриптилина достигнуты для иммуносенсора 2: более широкий диапазон рабочих концентраций

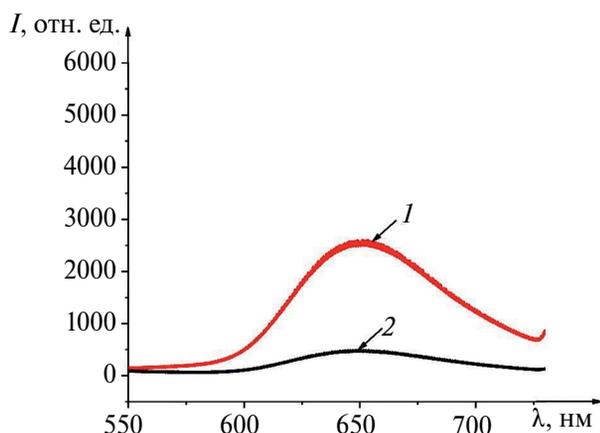


Рис. 1. Спектры люминесценции $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ (1) и супернатанта после отделения наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозан (2). $I_{\text{ex}} = 380$ нм.

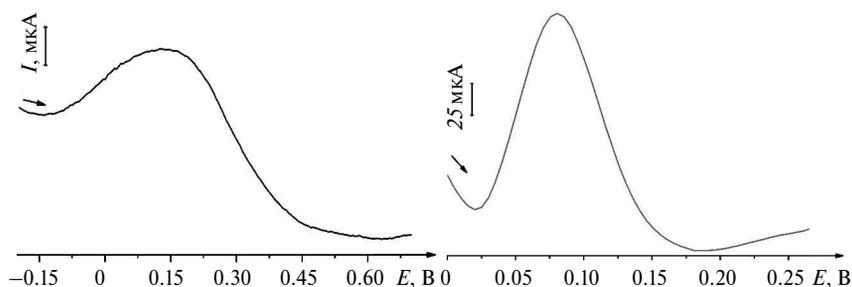


Рис. 2. Дифференциальные импульсные вольтамперограммы планарных электродов, модифицированных супрамолекулярными системами на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5: (а) $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозан; (б) ВГО–хитозан / $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @хитозан.

Таблица 2. Аналитические характеристики амперометрических иммуносенсоров при определении амитриптилина (разведение антител 1 : 50, $n = 5$, $P = 0.95$)

| Область рабочих концентраций, М | Уравнение градуировочной зависимости $I = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \times (-\lg c)$ | | | c_n , М |
|---|---|-------------------|--------|---------------------|
| | $A \pm \delta$ | $B \pm \delta$ | r | |
| Иммуносенсор 1 ((n-Bu ₄ N) ₂ {Mo ₆ I ₈ }(CF ₃ COO) ₆)@хитозан) | | | | |
| $1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5}$ | 130 ± 10 | $-(5.3 \pm 0.5)$ | 0.9915 | 8×10^{-10} |
| Иммуносенсор 2 (ВГО-хитозан/(n-Bu ₄ N) ₂ {Mo ₆ I ₈ }(CF ₃ COO) ₆)@хитозан) | | | | |
| $1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-4}$ | 245 ± 12 | $-(16.5 \pm 0.8)$ | 0.9957 | 5×10^{-10} |

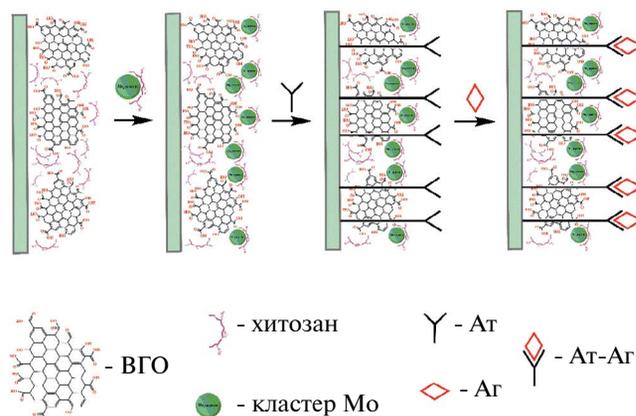
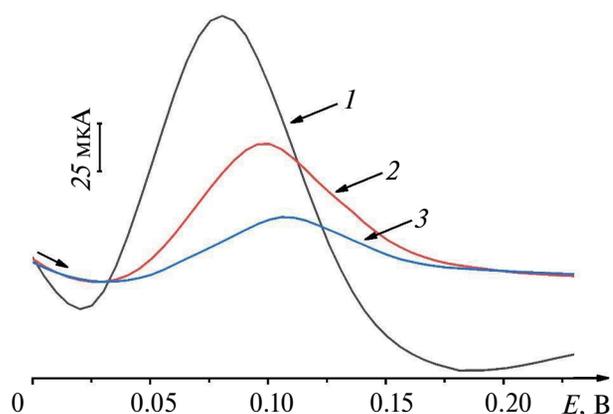
* $I = ((I_{At} - I_K)/I_{At}) \times 100\%$, где I_{At} – величина аналитического сигнала (ток) в присутствии At, I_K – величина аналитического сигнала (ток) при образовании иммунного комплекса At–Ag.

$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-4}$ М и более низкая нижняя граница определяемых содержаний на уровне 5×10^{-10} М, более высокий коэффициент чувствительности, чем для иммуносенсора 1 (табл. 2).

Методика определения амитриптилина в моче человека. Образцы мочи разбавляли в 10 раз фосфатным буферным раствором с pH 7.5 (объем пробы от 5 до 50 мл), добавляли тот же буферный раствор до объема 2 мл (электрохимическая ячейка объемом 2 мл), опускали иммуносенсор в ячейку, содержащую раствор аналита (время инкубации 5 мин). Затем регистрировали иммуносенсором токи окисления при потенциале $E = 130 \pm 8$ мВ. В растворах образца мочи человека, принимавшего амитриптин, происходит уменьшение тока окисления модификатора ВГО–хитозан/(n-Bu₄N)₂{Mo₆I₈}(CF₃COO)₆@хитозан, что указывает на присутствие Ag. По градуировочному графику рассчитывали концентрацию амитриптилина в моче (табл. 1). В образцах мочи человека, не использующего амитриптин в терапевтических целях, подобного изменения аналитического сигнала не наблюдали.

Ранее нами доказано [23], что ни лекарственные соединения других классов, ни компоненты искусственной и натуральной мочи не влияют на эффективность взаимодействия антитело–амитриптин.

Сопоставление результатов, полученных с помощью амперометрического иммуносенсора 2 и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа, по t - и F -критериям показало, что они равноточны и вклад систематической погрешности незначим. Погрешность определения не превышает 0.068 (табл. 3). Подробное

**Рис. 3.** Схема функционирования иммуносенсора.**Рис. 4.** Дифференциальные импульсные вольтамперограммы планарных электродов, модифицированных супрамолекулярными системами ВГО–хитозан / (n-Bu₄N)₂{Mo₆I₈}(CF₃COO)₆@хитозан на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5 в присутствии At (1), 1×10^{-7} М амитриптилина (2), 1×10^{-5} М амитриптилина (3).**Таблица 3.** Результаты определения амитриптилина в моче ($t_{\text{табл}} = 2.78$, $F_{\text{табл}} = 6.39$, $n = 5$, $P = 0.95$)

| Метод | Найдено, М | s_r | $t_{\text{расч}}$ | $F_{\text{расч}}$ |
|---|----------------------------------|-------|-------------------|-------------------|
| Амперометрический иммуносенсор 2 | $(7.15 \pm 0.45) \times 10^{-8}$ | 0.065 | 1.32 | 2.17 |
| Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ | $(7.25 \pm 0.48) \times 10^{-8}$ | 0.068 | | |

описание получения трейсера для поляризационного флуоресцентного иммуноанализа приведено в работе [24].

* * *

Таким образом, установлено, что гексамолибденовые кластерные комплексы, нанесенные на поверхность графитовых печатных электродов, обладают электрохимической активностью и дают стабильный сигнал в виде пика на вольтамперограммах на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5. Совместное нанесение восстановленного оксида графена и гексамолибденовых кластерных комплексов приводит к значительному увеличению тока пика и смещению потенциала на вольтамперограмме в менее положительную область. Данные модификаторы использовали при разработке амперометрических иммуносенсоров при определении трициклического антидепрессанта амитриптилина, в том числе следовых количествах. Применение композитных материалов в составе иммуносенсоров позволило расширить диапазон определяемых концентраций, снизить нижнюю границу определяемых содержаний и улучшить коэффициент чувствительности (табл. 2). Разработанный иммуносенсор апробировали при определении амитриптилина в образцах мочи человека. Результаты определения амитриптилина амперометрическим иммуносенсором и поляризационным флуоресцентным иммуноанализом равноточны и вклад систематической погрешности незначим, что указывает на правильность разработанного способа определения трициклических антидепрессантов в образцах мочи человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Межрегионального клинико-диагностического центра (Казань, Россия) № 134 от 15 августа 2023 г. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tarley C.R.T., Gorla F.A., Oliveira de F.M., Nascentes C.C., Ferreira P. do M., Costa da F.M., Segatelli M.G. Investigation of the performance of cross-linked poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) as efficient adsorbents in SPE columns for simultaneous preconcentration of tricyclic antidepressants in water samples // *Anal. Methods*. 2022. V. 14. № 48. P. 5100. <https://doi.org/10.1039/D2AY01520J>
2. Farajzadeh M.A., Barazandeh S., Pezhhanfar S., Mogaddam A.R.M. Facile Preparation of graphene-modified magnetic nanoparticles and their application in the analysis of four anti-depressant drugs in plasma and urine // *ImmunoAnalysis*. 2023. V. 3. № 4. <https://doi.org/10.34172/ia.2023.04>
3. Zhao L.-Y., Zhao L.-L., You X.-Y., Zheng X.-X., Du Y., Tang Q.-D. Development and evaluation of a simple and easy high-performance liquid chromatography–ultraviolet system simultaneously suitable for determination of 24 anti-epileptic drugs in plasma // *J. Sep. Sci.* 2022. V. 45. № 13. P. 2161. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200246>
4. Haiyan L., Binbin C., Xiangzhen X., Chunyan Z., Chunling M., Yu D., et al. Rapid simultaneous determination of 14 antidepressants and 13 antipsychotics in human plasma by using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with dynamic multiple reaction monitoring and its application to therapeutic drug monitoring // *Ther. Drug Monit.* 2021. V. 43. № 4. P. 577. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000839>
5. Guzinski M., Lindner E., Pendley B., Chaum E. Electrochemical sensor for tricyclic antidepressants with low nanomolar detection limit: Quantitative determination of amitriptyline and nortriptyline in blood // *Talanta*. 2022. V. 239. Article 123072. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123072>
6. Oliveira de M.F., Scheel L.G., Augusti R., Tarley T.R.C., Nascentes C.C. Supramolecular microextraction combined with paper spray ionization mass spectrometry for sensitive determination of tricyclic antidepressants in urine // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1106. P. 52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.01.061>
7. Oenning L.A., Birk L., Eller S., Oliveira de F.T., Merib J., Carasek E. A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography – mass spectrometry detection // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2020. V. 1143. Article 122069. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122069>
8. Zaher El A.A., Kady El F.E., Messiry EL M.H., Ghwas El E.H., Houssini El M.O. Synchronous LC-MS/MS determination of pantoprazole and amitriptyline in rabbit plasma: Application to comparative in vivo pharmacokinetic study of novel formulated effervescent granules with its marketed tablet dosage

- form // *Heliyon*. 2021. V. 7. № 8. Article e07752. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07752>
9. *Vejar-Vivar C., Bustamante L., Lucena R., Ortega C., Valenzuela M., Mardones C.* Direct coupling of MEPS to ESI-QqTOF-MS for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressants and benzodiazepines in post-mortem blood // *Microchem. J.* 2021. V. 171. Article 106797. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106797>
 10. *Yuan J., Huang W., Tong W., Chen Z., Li H., Chen J., Lin Z.* In-situ growth of covalent organic framework on stainless steel needles as solid-phase microextraction probe coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid and sensitive determination of tricyclic antidepressants in biosamples // *J. Chromatogr. A.* 2023. V. 1695. Article 463955. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463955>
 11. *Krieg K.A., Gauglitz G.* Ultrasensitive label-free immunoassay for optical determination of amitriptyline and related tricyclic antidepressants in human serum // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. № 17. P. 8845. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b0189>
 12. *Seyfinejad B., Jouyban A.* Overview of therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs: Analytical and clinical practices // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021. V. 205. Article 114315. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114315>
 13. *Ahmed A., Singh A., Young Sh.-J., Gupta V., Singh M., Arya S.* Synthesis techniques and advances in sensing applications of reduced graphene oxide (rGO) Composites: A review // *Composites. Part A.* 2023. V. 165. Article 107373. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2022.107373>
 14. *Swetha P.D.P., Nikitha A., Shenoy M.M., Shim Y.-B., Prasad K.S.* Ni/Ni(OH)₂-rGO nanocomposites sensor for the detection of long forgotten mycotoxin, xanthomegnin // *Talanta.* 2023. V. 253. Article 123953. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123953>
 15. *Kalkal A., Pradhan R., Packirisamy G.* Gold nanoparticles modified reduced graphene oxide nanosheets based dual-quencher for highly sensitive detection of carcinoembryonic antigen // *Int. J. Biol. Macromol.* 2023. V. 242. Article 125157. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125157>
 16. *Muthu D., Govindaraj R., Manikandan M., Ramasamy P., Haldorai Y., Kumar R.T.R.* Reduced graphene oxide supported monoclinic bismuth vanadate nanoparticles as an electrocatalyst for selective determination of dopamine in human urine samples // *Mater. Chem. Phys.* 2023. V. 297. Article 127437. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127437>
 17. *Kumar S., Singh D., Pathania D., Awasthi A., Singh K.* Molybdenum disulphide-nitrogen doped reduced graphene oxide heterostructure based electrochemical sensing of epinephrine // *Mater. Chem. Phys.* 2023. V. 297. Article 127446. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127446>
 18. *Alinejadian N., Kazemi S.H., Nasirpour F., Odnevall I.* Electro-deposited nano-Ni/reduced graphene oxide composite film of corrugated surface for high voltammetric sensitivity // *Mater. Chem. Phys.* 2023. V. 297. Article 127288. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.127288>
 19. *Kalyani T., Sangili A., Kotal H., Kaushik A., Chaudhury K., Jana S.K.* Ultra-sensitive label-free detection of haptoglobin using Au-rGO decorated electrochemical sensing platform: Towards endometriosis diagnostic application // *Biosens. Bioelectron.* X. 2023. V. 14. Article 100353. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100353>
 20. *Tan Y.-Y., Tan H.-S., Liu M., Li S.-S.* Electrochemical ratiometric dual-signal immunoassay for accurate detection of carcinoembryonic antigen in clinical serum based on rGO-Pd@Au-Thi and Chi-Fc-Au // *Sens. Actuators B.* 2023. V. 380. Article 133340. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133340>
 21. *Nguyen K.T.N., Lebastard C., Wilmet M., Dumait N., Renaud A., Cordier S., Ohashi N., Uchikoshi T., Grasset F.* A review on functional nanoarchitectonics nanocomposites based on octahedral metal atom clusters (Nb₆, Mo₆, Ta₆, W₆, Re₆): Inorganic 0D and 2D powders and films // *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2022. V. 23. № 1. P. 547. <https://doi.org/10.1080/14686996.2022.2119101>
 22. *Медянцева Э.П., Брусницын Д. В., Газизуллина Э.Р., Бейлинсон Р.М., Еремин С.А., Кутырева М.П., Улахович Н.А., Будников Г.К.* Наноразмерные материалы в составе биосенсоров для определения амитриптилина // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2021. Т. 87. № 9. С. 20. (Medyantseva E.P., Brusnitsyn D.V., Gazizullina E.R., Beylinson R.M., Eremin S.A., Kutyreva M.P., Ulakhovich N.A., Budnikov H.K. Nanoscale materials in the composition of biosensors for the determination of amitriptyline // *Ind. Lab. Diagn. Mater.* 2021. V. 87. № 9. P. 20.) <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2021-87-9-20-29>
 23. *Медянцева Э.П., Газизуллина Э.Р., Брусницын Д.В., Зиганшин М.А., Елистратова Ю.Г., Мустафина А.Р., Брылев К.А., Будников Г.К.* Нанокластеры рения как модификаторы иммуносенсоров при определении трициклических антидепрессантов // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 12. С. 1123. (Medyantseva E.P., Gazizullina E.R., Brusnitsyn D.V., Ziganshin M.A., Elistratova Yu.G., Mustafina A.R., Brylev K.A., Budnikov H.C. Rhenium nanoclusters as modifiers of immunosensors in the determination of tricyclic antidepressants // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. № 4. P. 1455.) <https://doi.org/10.31857/S0044450221120070>
 24. *Медянцева Э.П., Газизуллина Э.Р., Брусницын Д.В., Федоренко С.В., Мустафина А.Р., Еремин С.А.* Определение амитриптилина методом поляризации флуоресцентного иммуноанализа // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 9. С. 828. (Medyantseva E.P., Gazizullina E.R., Brusnitsyn D.V., Fedorenko S.V., Mustafina A.R., Eremin S.A. Determination of amitriptyline by fluorescence polarization immuno-

- assay // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. № 9. P. 1147.)
<https://doi.org/10.31857/S0044450222070088>
25. *Mikhailov M.A., Brylev K.A., Abramov P.A., Sokolov M.N., Sakuda E., Kitamura N., et al.* Synthetic tuning of redox, spectroscopic, and photophysical properties of $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{4+}$ core cluster complexes by terminal carboxylate ligands // *Inorg. Chem.* 2016. V. 55. № 17. P. 8437.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01042>
 26. *Медянцева Э.П., Газизуллина Э.Р., Брусницын Д.В., Добрынин А.Б., Брылев К.А., Мустафина А.Р., Елистратова Ю.Г.* Амперометрические иммуносенсоры на основе углеродных наноматериалов и кластеров рения для определения трициклических антидепрессантов в последовательной инъекционной системе // *Аналитика и контроль.* 2022. Т. 26. № 4. С. 255.
<https://doi.org/10.15826/analitika.2022.26.4.002>
 27. *Elistratova J.G., Kholin K.V., Nizameev I.R., Khazjeva A.R., Gubaidullin A.T., Voloshina A.D., et al.* Anticancer potential of hexamolybdenum clusters $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{L})_6^{2-}$ ($\text{L} = \text{CF}_3\text{COO}^-$ and $\text{C}_6\text{F}_5\text{COO}^-$) incorporated into different nanoparticulate forms // *J. Mol. Liq.* 2021. V. 343. Article 117601.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117601>
 28. *Kirakci K., Kubát P., Dusek M., Fejfarová K., Šícha V., Mosinger J., Lang K.* A highly luminescent Hexanuclear molybdenum cluster – A promising candidate toward photoactive materials // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012. V. 2012. № 19. P. 3107.
<https://doi.org/10.1002/ejic.201200402>
 29. *Deswal R., Narwal V., Kumar P., Verma V., Dang A.S., Pundir C.S.* An improved amperometric sarcosine biosensor based on graphene nanoribbon/chitosan nanocomposite for detection of prostate cancer // *Sens. Int.* 2022. V. 3. Article 100174.
<https://doi.org/10.1016/j.sintl.2022.100174>
 30. *El-Shafai N.M., Shukry M., Sharshir S.W., Ramadan M.S., Alhadhrami A., El-Mehasse I.* Advanced applications of the nanohybrid membrane of chitosan/nickel oxide for photocatalytic, electro-biosensor, energy storage, and supercapacitors // *J. Energy Storage.* 2022. V. 50. Article 104626.
<https://doi.org/10.1016/j.est.2022.104626>

 ORIGINAL ARTICLES

**POSSIBILITIES OF A SUPRAMOLECULAR SYSTEM BASED
ON HEXAMOLYBDENUM CLUSTER COMPLEXES
IN THE DETERMINATION OF AMITRIPTYLINE
BY AMPEROMETRIC IMMUNOSENSORS IN HUMAN URINE**

D.V. Brusnitsyn^{a,*}, E.P. Medyantseva^a, A.N. Ramazanova^a, A.V. Prytkova^a, E.R. Karimova^b, Y.G. Elistratova^c, A.R. Mustafina^c, M.N. Sokolov^d, S.A. Eremin^e, L.I. Mukhametova^e

^a*Kazan (Volga Region) Federal University, A.M. Butlerov Chemical Institute, 420008 Kazan, Russia*

^b*Interregional Clinical and Diagnostic Center, 420101 Kazan, Russia*

^c*A.E. Arbuзов Institute of Organic and Physical Chemistry, Federal Research Center “Kazan Scientific Center” of the Russian Academy of Sciences, 420088 Kazan, Russia*

^d*A.V. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, 630090 Russia*

^e*M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, 119991 Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: brussman@mail.ru

Received September 26, 2023. Revised October 24, 2023. Accepted October 24, 2023

Abstract. A method for the determination of amitriptyline as a representative of tricyclic antidepressants by immunosensors using supramolecular systems based on hexamolybdenum cluster complexes in human urine was developed. These complexes are electrochemically active and give a stable analytical signal, which was utilized in the development of amperometric immunosensors. Luminescence and dynamic light scattering methods were applied to prove the formation of a supramolecular system of self-organized hexamolybdenum nanoparticles and chitosan molecules. A composite material based on hexamolybdenum cluster complexes combined with reduced graphene oxide was developed. The working range of amitriptyline concentrations when determined by amperometric immunosensor was 1×10^{-9} – 1×10^{-4} M, the lower limit of detectable contents lies at the level of 5×10^{-10} M, the content of amitriptyline in urine samples – at the level of $(n - 7) \times 10^{-8}$ M. Comparison of the results of the analysis by amperometric immunosensor and polarization fluorescence immunoassay showed the absence of significant systematic errors. The ability to determine amitriptyline in biological fluids makes it possible to select the optimal therapeutic dose of the drug, i.e., to develop approaches to the creation of personalized medicine.

Keywords: molybdenum cluster complexes, immunosensor, antibodies, tricyclic antidepressants.

УДК 543.552

**ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НАТРИЕВОЙ СОЛИ
3-НИТРО-4-ГИДРОКСИ-7-МЕТИЛТИО-4Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[5,1-с]
[1,2,4]ТРИАЗИНИД МОНОГИДРАТА**

© 2024 г. П. Н. Можаровская^{а,*}, А. В. Ивойлова^а, Н. А. Малахова^а,
Р. А. Дрокин^а, И. А. Балин^а, А. Н. Козицина^а,
А. В. Иванова^а, В. Л. Русинов^{а,б}

^аУральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина
Мира ул., 19, Екатеринбург, 620002 Россия

^бИнститут органического синтеза им. И.Я. Постовского, Уральского отделения Российской академии наук
Софьи Ковалевской ул., 22, Екатеринбург, 620137 Россия

*E-mail: pntozharovskaia@urfu.ru

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 22.11.2023 г.

Натриевая соль 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид моногидрата (соединение **1**) – одно из перспективных соединений, показавших потенциальную противовирусную активность по отношению к вирусу Коксаки В3. Методом циклической вольтамперометрии установлено, что электрохимическая активность соединения **1** на стеклоуглеродном электроде в буферном растворе Бриттона–Роббинсона (ББР) обусловлена электровосстановлением нитрогруппы. Разработан способ определения соединения **1** методом прямой катодной квадратно-волновой вольтамперометрии. Область линейности градуировочного графика с использованием разработанного метода в растворе ББР (рН 2.0 ± 0.1) составляет 10–300 мг/л ($R^2 = 0.999$) с пределами обнаружения и определения 1.27 и 4.11 мг/л соответственно.

Ключевые слова: количественный анализ вещества, квадратно-волновая вольтамперометрия, азолазины, нитрогруппа, стеклоуглеродный электрод, противовирусное средство, Коксаки В3.

DOI: 10.31857/S0044450224060103, EDN: ttpjjh

Распространение вирусных заболеваний человека наносит существенный социальный и экономический урон обществу. Несмотря на растущее многообразие противовирусных препаратов, на сегодняшний день остаются штаммы вирусов, на которые не одобрено ни одной эффективной терапии. Одним из таких возбудителей является вирус Коксаки В3, главным осложнением после которого является острая сердечная недостаточность [1], поэтому поиск и создание нового, оригинального лекарственного средства, эффективного в отношении данного вируса являются актуальной задачей.

Среди структур, обладающих широким спектром биологической активности, перспектив-

ными являются нитросодержащие азолазиниевые соединения, разработанные в УрФУ и ИОС УрО РАН [2–4]. Первый зарегистрированный на территории РФ противовирусный препарат, созданный на базе этого класса соединений, – Триазавирин® (натриевая соль 3-нитро-4-оксо-7-метилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин дигидрата). В ряду структурных аналогов Триазавирин® представляет интерес соединение **1** (натриевая соль 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид моногидрата). Методом молекулярного моделирования *in silico* продемонстрировано высокое сродство данного соединения к его потенциальной вирусной биологической мишени – белкам, регулирующим ключевые про-

цессы в жизненном цикле энтеровирусов [5]. Соединение **1** имеет огромный потенциал для выхода на фармацевтический рынок в качестве эффективного лекарственного средства в отношении вируса Коксаки В3.

Одним из ключевых этапов коммерциализации препарата является создание методики его определения для контроля качества продукции на производстве. Более того, наличие готовой методики определения позволяет ускорить процесс создания нового, оригинального лекарственного средства и его появление в аптечной сети.

К инструментальным методам количественного анализа, которые обычно используются в лабораториях фармацевтического контроля, относятся титриметрия, хроматография, спектрофотометрия и электрохимические методы. Титриметрические методы являются ведущими для оценки содержания действующего вещества, но они недостаточно селективны, что постепенно снижает их востребованность в рутинном фармаанализе. Широко используемый метод ВЭЖХ характеризуется высокой стоимостью оборудования и технического сервиса, необходимостью привлечения высококвалифицированного персонала, а также использованием большого количества токсичных растворителей, требующих грамотной утилизации. Современные электрохимические методы анализа набирают популярность в области количественного анализа лекарственных средств на содержание основного вещества и могут стать альтернативой методам титриметрии, спектрофотометрии и ВЭЖХ, поскольку являются простыми, недорогими и лишены недостатков, присущих ВЭЖХ. В некоторых случаях электрохимические методы являются более чувствительными и характеризуются весьма низкими пределами обнаружения и широким диапазоном определяемых концентраций (от 10^{-12} до 0.1 М). Наиболее широкое применение в фармаанализе нашла вольтамперометрия, которая прекрасно показала себя при определении лекарственных веществ как в фармацевтических препаратах, так и в различных биологических матрицах [6–9]. Применение вольтамперометрии в анализе лекарственных средств продемонстрировано в работах [10–13]. Способы определения соединения **1** ранее не описаны. Наличие электроактивной нитрогруппы в соединении **1** позволяет использовать электрохимические методы анализа для создания методик его определения.

Цель данной работы – разработка методики вольтамперометрического определения натриевой соли 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид моногидрата (соединения **1**).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и образцы. Натриевая соль 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид моногидрата (**1**); 3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидро-7-этилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид (**2**); 3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидро-7-пропагилтио-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид (**3**); 3-бromo-4-оксо-1,2,4-триазоло[1,2,4]триазин (**4**); 3-этоксикарбонил-4-гидрокси-1,4-дигидро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин (**5**) синтезированы на кафедре органической и биомолекулярной химии Уральского федерального университета (схема 1) [3], [14].

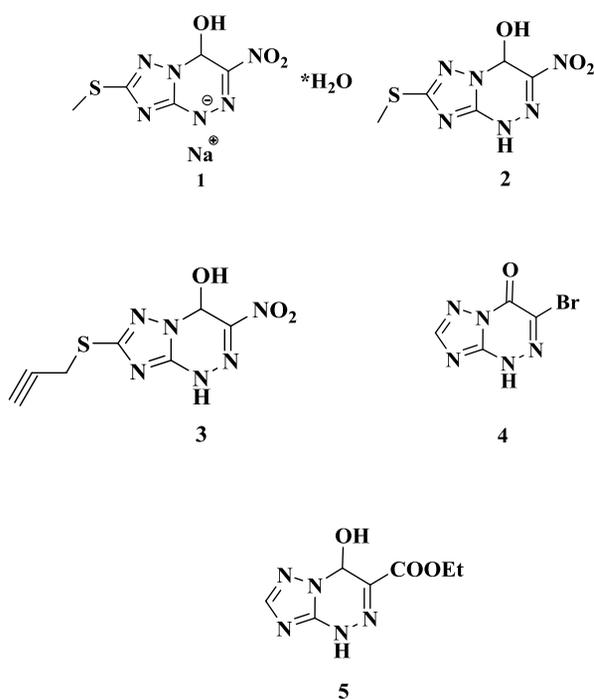


Схема 1. Структурные формулы соединений **1**–**5**.

Для исследования процессов электропревращения веществ использовали водные буферные растворы Бриттона–Роббинсона (ББР), которые готовили согласно рекомендациям [15]. Использовали кислоты и соли марки х. ч. (Химреактивснаб, Россия) без дополнительной очистки. Для приготовления растворов использовали деионизованную воду, полученную на установке ДВС-М/1НА(18)-N (Медиана фильтр, Россия). Рабочий раствор соединения **1** (чистота 99.8%) с концентрацией 5 г/л готовили растворением навески 0.005 г в 1 мл ББР (pH 2.0 ± 0.1) в пробирке Эппендорфа и хранили в темноте при комнатной температуре.

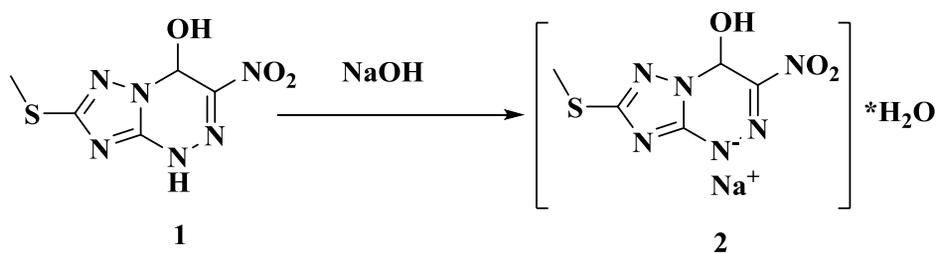


Схема 2. Получение 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с] [1,2,4]триазинид натрия моногидрата.

Получение 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинид натрия моногидрата.

2.3 г 3-нитро-4-гидрокси-7-метилтио-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина, полученного в соответствии с методикой [14], растворяли в 10%-ном растворе гидроксида натрия (схема 2). Получившийся раствор упаривали на ротационном испарителе, осадок фильтровали и далее очищали путем перекристаллизации из 80%-ного этанола. Получили осадок чистотой 99.8% ярко-оранжевого цвета, выход 2.25 г (81.5%), который затем сушили на воздухе. Т пл. полученного кристаллогидрата 223–225°C с разложением. Вычислено, %: С – 22.23, Н – 2.61, N – 31.10; $C_5H_7N_6NaO_4S$ (270.20). Найдено, %: С – 21.94, Н – 2.34,; N – 31.29. В ИК-спектре имеются следующие полосы поглощения, $\nu/\text{см}^{-1}$: 750 (С–S), 1290 (NO_2), 1451 (NO_2), 3329 (H_2O). ^1H ЯМР (400 МГц, D_2O), δ (м.д.): 6.96 (с, 1H), 2.5 (с., CH_3). Спектр ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО) δ , м.д.: 159.89, 155.45, 140.99, 71.80, 13.47.

Электрохимические приборы. Для регистрации циклических вольтамперограмм (ЦВА) и вольтамперограмм (ВА) использовали потенциостат / гальваностат $\mu\text{Autolab Type III}$ (Metrohm, Швейцария). Рабочим электродом служил стеклоуглеродный диск (Metrohm, Швейцария), $S = 0.07 \text{ см}^2$. Для полировки поверхности стеклоуглеродного электрода (СУЭ) применяли набор kit 6.2802.010 (Metrohm, Швейцария), включающий оксид алюминия с дисперсностью частиц 0.3 мкм и тканевую подложку. В качестве вспомогательного электрода использовали стержень из стеклоуглерода (Metrohm, Швейцария). Хлоридсеребряный электрод $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{нас}}$ (Metrohm, Швейцария) служил электродом сравнения.

Методика эксперимента. Перед анализом поверхность индикаторного СУЭ полировали с помощью суспензии оксида алюминия. Для удаления следов абразива поверхность СУЭ промывали 0.1 М азотной кислотой и ополаскивали деионизованной водой.

Для удаления растворенного кислорода, волна восстановления которого на СУЭ регистри-

руется в области катодного тока соединения 1, раствор активно (5–6 пузырьков в секунду) продували в течение 10 мин аргоном. Затем уменьшали скорость продувки газом до 1 пузырька в секунду, опускали электроды в раствор, сопло направляли таким образом, чтобы выходящие пузырьки газа не попадали на электроды, выключали мешалку, выжидали 5 с для успокоения раствора и регистрировали вольтамперограмму. После регистрации каждой вольтамперограммы СУЭ выдерживали в течение 3 мин при потенциале 0.0 В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электрохимическое поведение соединений 1–5 в водных растворах. Для установления природы электрохимического отклика регистрировали ЦВА соединений 1–5 (рис. 1), содержащих и не содержащих нитрогруппу, в растворе ББР при pH 2. Соединения 1–3, содержащие в своей структуре нитрогруппу, восстанавливаются необратимо в одну ступень в диапазоне потенциалов от –0.27 до –0.31 В, что сопоставимо с потенциалами восстановления содержащих ни-

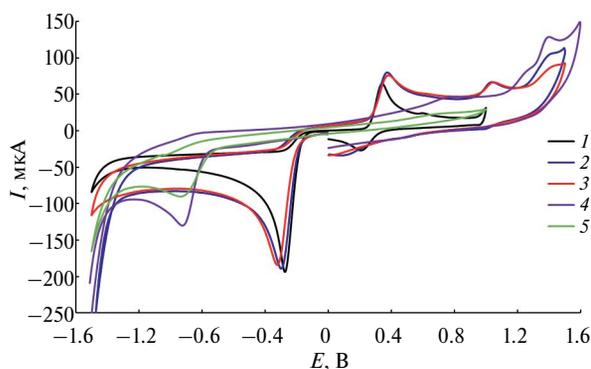


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на стеклоуглеродном электроде при скорости сканирования 0.1 В/с в буферном растворе Бриттона–Робинсона с pH 2.0 после добавления 5 мМ растворов соединений 1–5.

трогруппу гетероциклических нитросоединений [16–21]. На анодных ветвях вольтамперограмм после изменения направления развертки потенциала регистрируются необратимые пики окисления продуктов электровосстановления соединений **1–3** в диапазоне потенциалов от +0.3 до +0.4 В. Близость значений потенциалов окисления указывает на образование близких по структуре продуктов электровосстановления соединений **1–3** [16, 18]. Электропревращения нитросоединений **1–3** являются необратимыми, протекают в одну ступень, и это единственный процесс до потенциала разряда фона. Соединения **4** и **5**, содержащие в своей структуре вместо нитрогруппы бром или этоксикарбонильный фрагмент, восстанавливаются необратимо, но, в отличие от нитросоединений, при более отрицательных потенциалах (–0.9 и –0.99 В соответственно). Таким образом, можно предположить, что редокс превращения исследуемого соединения **1** соответствуют электровосстановлению нитрогруппы.

Влияние кислотности раствора на электрохимическое восстановление соединения 1. Влияние рН раствора на электрохимическое восстановление соединения **1** показано на рис. 2. Из рис. 2а следует, что увеличение рН раствора в рассматриваемом диапазоне оказывает незначительное влияние на величину тока. При этом значения потенциалов сдвигаются в катодную область (рис. 2б).

Можно предположить, что с увеличением рН раствора электровосстановление соединения **1** затруднено из-за нехватки протонов. Поскольку величина катодного тока не зависит от рН, а зависимость потенциала пика от рН линейна, вероятно, электровосстановление соединения **1** в области рН 2–11 происходит по одному механизму. Дальнейшие исследования проводили при рН 2.0, так как потенциал тока восстановления максимально сдвинут в анодную область и нет наложения линии разряда фона (рис. 2а, вставка).

Оптимизация параметров квадратно-волновой (КвВ) развертки потенциала. Величина анали-

тического сигнала (АС) в режиме КвВ зависит от инструментальных параметров: частоты амплитуды, шага импульса и амплитуды импульса. Зависимость величины тока восстановления соединения **1** от частоты импульса (рис. 3а) при амплитуде импульса 0.05 В и шаге импульса 0.01 В линейна в области от 10 до 50 Гц. После увеличения частоты до 20 Гц величина тока не возрастает. При сравнении базовых линий остаточного тока при 20 и 50 Гц не наблюдается существенного увеличения тока при 50 Гц. В связи с этим для аналитических целей выбрали частоту 20 Гц.

Величина тока восстановления соединения **1** при частоте импульса 20 Гц, шаге развертки 0.01 В и скорости сканирования 0.10 В/с линейно растет при увеличении амплитуды импульса от 0.02 до 0.05 В (рис. 3б). Дальнейшее увеличение амплитуды импульса приводит к уменьшению АС соединения **1**.

Как видно из рис. 3в, величина тока восстановления соединения **1** возрастает в интервале скоростей развертки от 0.01 до 0.15 В/с, после чего рост замедляется. Для аналитических целей выбрали амплитуду импульса 0.05 В, скорость развертки 0.10 В/с, частоту импульса 20 Гц. При этом форма пиков остается симметричной при скорости сканирования 0.10 В/с.

Аналогичным образом подбирали рабочие параметры регистрации вольтамперограмм для линейного (ЛР) и дифференциально-импульсного (ДИП) режимов. Так, при амплитуде модуляции 0.06 В и скорости сканирования 0.01 В/с величина тока соединения **1** в ДИП-режиме имеет максимальное значение. Поскольку изменяемым параметром в ЛР является скорость сканирования, то при ее увеличении в диапазоне от 0.05 до 1 В/с ток возрастает линейно ($R^2 = 0.98$). Однако форма пиков остается симметричной в более узком диапазоне (0.05–0.1 В/с), поэтому для аналитических целей выбрали скорость сканирования 0.1 В/с.

На рис. 4 приведены ВА соединения **1**, зарегистрированные на СУЭ в ЛР-, ДИП- и КвВ-режимах при выбранных рабочих условиях. Сравнение различных вольтамперометрических режимов

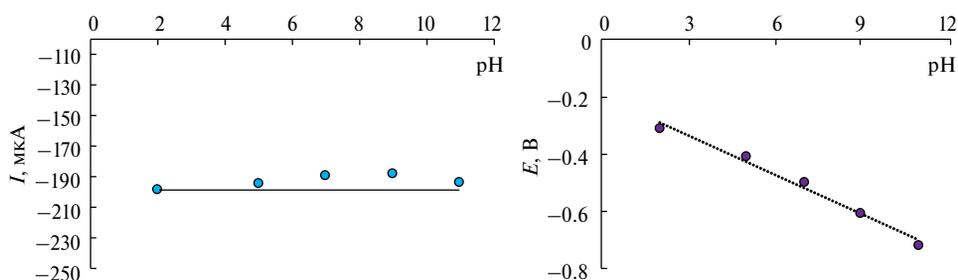


Рис. 2. Зависимости (а) величины тока и (б) значений потенциала восстановления для 5 мМ раствора соединения **1** от рН раствора.

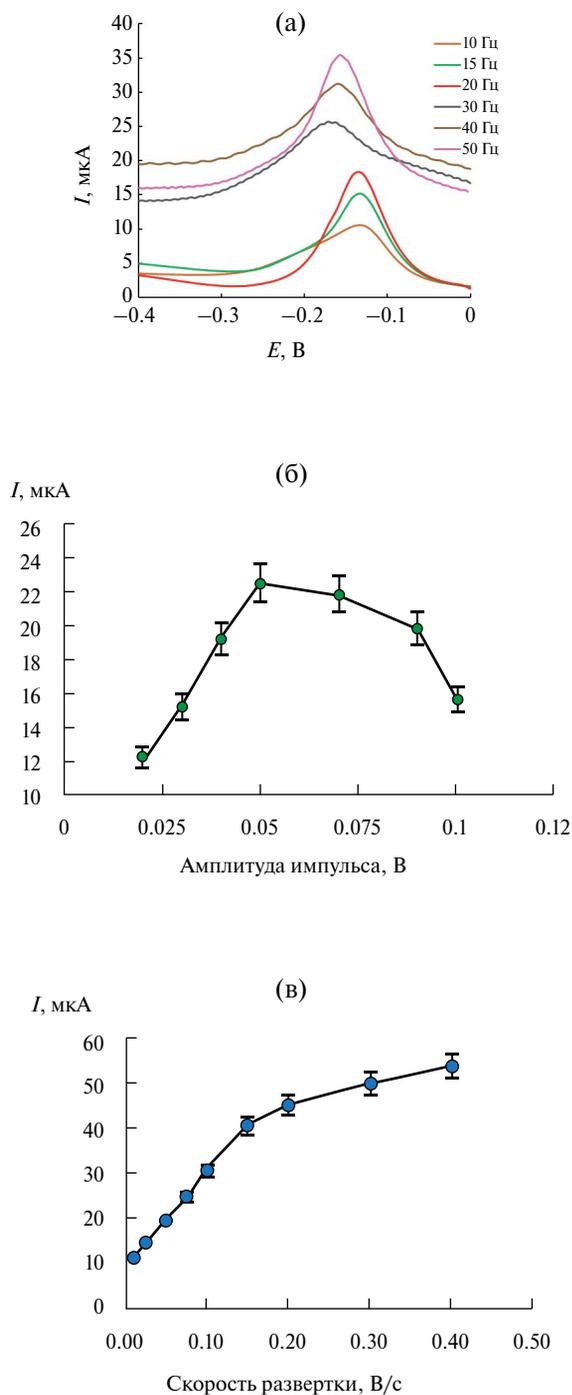


Рис. 3. (а) Вольтамперограммы, зарегистрированные при разных частотах для соединения **1** в концентрации 50 мг/л; зависимости аналитического сигнала для соединения **1** в концентрации 50 мг/л (б) от амплитуды импульса, (в) от скорости сканирования потенциала, полученные в буферном растворе Бриттона–Робинсона с рН 2.0 после физического удаления кислорода. Условия регистрации вольтамперограмм в квадратно-волновом режиме: шаг развертки 0.005 В, амплитуда импульса 0.05 В, скорость сканирования 0.10 В/с.

позволяет заключить, что КвВ-режим является предпочтительным для регистрации токов восстановления соединения **1** в ББР при рН 2.0. В случае КвВ-режима получили более симметричный пик по сравнению с ЛР, который может быть измерен с высокой точностью. Величина АС в КвВ-режиме в 4.3 раза выше, чем в режиме ДИП и в 1.6 раза выше, чем в ЛР. Таким образом, дальнейшие исследования проводили в режиме КвВ.

Характеристики градуировочного графика для определения соединения **1 на стеклоуглеродном электроде.** При оптимальных условиях регистрации АС соединения **1** площадь пика его восстановления линейно увеличивается в интервале концентраций 10–300 мг/л (рис. 5а), на что указывает коэффициент детерминации ($R^2 = 0.999$). Уравнение регрессии ($n = 5$, $P = 0.95$) $S = (0.0213 \pm 0.001)c \text{ (мг/л)} + (0.0148 \pm 0.013)$.

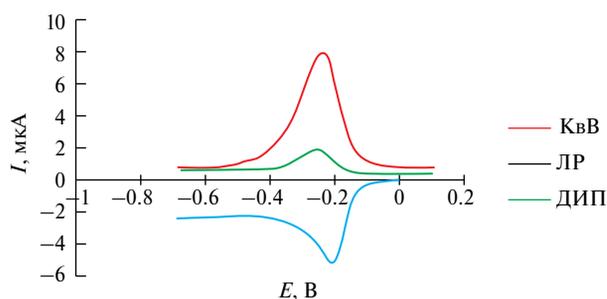


Рис. 4. Катодные вольтамперограммы, зарегистрированные в различных режимах на стеклоуглеродном электроде в буферном растворе Бриттона–Робинсона с рН 2.0 с добавлением соединения **1** в концентрации 50 мг/л: ЛР: $v = 0.1$ В/с; ДИП: $v = 0.01$ В/с, амплитуда 0.06 В; КвВ: $v = 0.1$ В/с, амплитуда импульса 0.07 В, частота 20 Гц.

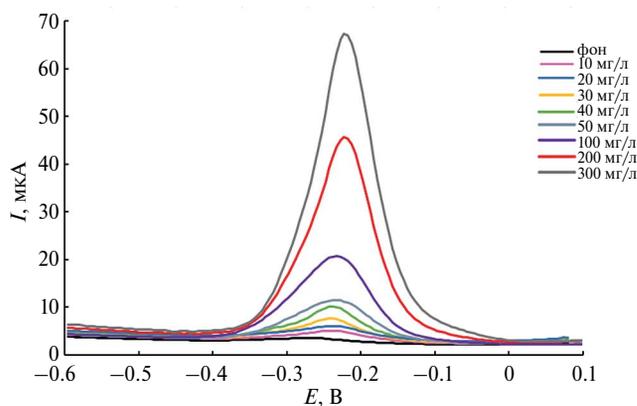


Рис. 5. Квадратно-волновые вольтамперограммы 0, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300 мг/л соединения **1** в буферном растворе Бриттона–Робинсона с рН 2.0, зарегистрированные на стеклоуглеродном электроде при скорости развертки потенциала $v = 0.1$ В/с, амплитуде импульса 50 мВ и частоте 20 Гц.

Оценка правильности разработанной методики определения соединения 1 в стандартном образце. Показатель правильности рассчитывали для уровней концентраций 50, 100, 200 мг/л по методу введено–найдено. Каждое определение повторяли три раза (табл. 1). Показатель правильности (R , %) для различных уровней концентраций близок к 100% со средним значением $100.8 \pm 2.9\%$. Доверительный интервал среднего для R включает значение 100 %. Значение стандартного отклонения составило 3.89, а относительного стандартного отклонения – 3.8%.

Пределы обнаружения и определения рассчитывали из градуировочной зависимости в диапазонах концентрации соединения 1 от 10 до 50 мг/л. Полученные данные представлены в табл. 2.

* * *

Разработан способ определения соединения из ряда нитроазолоазинов, являющегося потенциальным противовирусным лекарственным средством в отношении вируса Коксаки В3. Результаты исследования электропревращений 3-нитро-4-гидрокси-1,4-дигидро-7-Х-1,2,4-триазоло[5,1-с][1.2.4]триазинов показали, что соединения подвергаются на СУЭ в водных растворах необратимому одноволновому восстановлению в диапазоне потенциалов от -0.27 до -0.31 В. Сравнение различных вариантов вольтамперометрии (линейной, дифференциально-импульсной и квадратно-волновой) позволило

выбрать оптимальный режим регистрации вольтамперограмм – квадратно-волновой со следующими параметрами: частота импульса 20 Гц, скорость развертки 0.1 В/с, амплитуда импульса 0.05 В, шаг импульса 0.004 В. Область линейности градуировочного графика в растворе ББР ($pH 2.0 \pm 0.1$) с использованием разработанного метода составляет 10–300 мг/л соединения 1: $S = (0.0213 \pm 0.001)c$ (мг/л) + + (0.0148 ± 0.013) , коэффициент линейной регрессии 0.999. Предел обнаружения, рассчитанный по градуировочной кривой в диапазоне концентрации от 10 до 50 мг/л, составляет 1.27 мг/л, а предел определения – 4.11 мг/л. Разработанная методика, вероятно, будет интегрирована в один из финальных этапов создания лекарственного средства против вируса Коксаки В3, что поможет сократить время выхода фармпродукции на рынок.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Программы развития Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина в соответствии с программой стратегического академического лидерства “Приоритет-2030”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

Таблица 1. Результаты определения соединения 1 методом введено–найдено.

| Введено, мг/л | S | Найдено, мг/л | R, % |
|---------------|------|---------------|-------|
| 50 | 1.13 | 52.4 | 104.7 |
| | 1.04 | 48.1 | 96.3 |
| | 1.01 | 46.3 | 92.5 |
| 100 | 2.21 | 103.1 | 103.1 |
| | 2.18 | 101.7 | 101.7 |
| | 2.17 | 101.2 | 101.2 |
| 200 | 4.43 | 207.3 | 103.6 |
| | 4.39 | 205.4 | 102.7 |
| | 4.35 | 203.5 | 101.8 |

Таблица 2. Характеристики градуировочного графика соединения 1

| Характеристика | Значение |
|---|----------|
| Коэффициент корреляции | 0.995 |
| Коэффициент чувствительности, мкКл/мг/л | 0.022 |
| Стандартное отклонение аналитического сигнала | 0.0003 |
| Предел обнаружения, мг/л | 1.27 |
| Предел определения, мг/л | 4.11 |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yajima T., Knowlton K.U.* Viral myocarditis: From the perspective of the virus // *Circulation*. 2009. Т. 119. № 19. С. 2615.
2. *Русинов В.Л., Уломский Е.Н., Чупахин О.Н., Чарушин В.Н.* Азоло[5,1-с]-1,2,4-триазины – новый класс противовирусных соединений // *Изв. АН. Сер. хим.* 2008. Т. 57. № 5. С. 985. (*Rusinov V.L., Ulomskii E.N., Chupakhin O.N., Charushin V.N.* Azolo [5, 1-c]-1, 2, 4-triazines as a new class of antiviral compounds // *Russ. Chem. Bull.* 2008. V. 57. P. 985.)
3. *Русинов В.Л., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н.* Биологически активные азоло-1,2,4-триазины и азолопиримидины // *Изв. АН. Сер. хим.* 2018. № 4. С. 573. (*Rusinov V.L., Charushin V.N., Chupakhin O.N.* Biologically active azolo-1, 2, 4-triazines and azolopyrimidines // *Russ. Chem. Bull.* 2018. V. 67. P. 573.)
4. *Токин И.И., Цветков В.В., Голобоков Г.С.* Сравнительная клинико-экономическая оценка двух альтернативных схем противовирусной терапии больных гриппом // *Журн. инфектологии.* 2018. Т. 10. № 2. С. 110. (*Tokin I.I., Tsvetkov V.V., Golobokov G.S.* Comparative clinical and economic evaluation of two alternative antiviral therapy regimens for influenza patients // *J. Infectol.* 2018. V. 10. № 2. P. 110.)
5. *Дрокин Р.А.* 4-Гидрокси-1,4-дигидроазоло[5,1-с][1,2,4]триазины: синтез и биологическая активность. Дис. ... канд. хим. наук. Екатеринбург: Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 2022. 145 с.
6. *Малахова Н.А., Иванова А.В., Козицина А.Н., Матерн А.И.* Вольтамперометрия в фармацевтическом анализе // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2014. № 2. С. 90.
7. *Mokwebo K.V., Douman S.F., Uhuo O.V., Januarie K.C., Oranzie M., Iwuoha E.I.* Electroanalytical sensors for antiretroviral drugs determination in pharmaceutical and biological samples: A review // *J. Electroanal. Chem.* 2022. V. 920. Article 116621.
8. *Clares P., Pérez-Ràfols C., Serrano N., Díaz-Cruz J.M.* Voltammetric determination of active pharmaceutical ingredients using screen-printed electrodes // *Chemosensors.* 2022. V. 10. № 3. P. 95.
9. *Bitew Z., Amare M.* Recent reports on electrochemical determination of selected antibiotics in pharmaceutical formulations: A mini review // *Electrochem. Commun.* 2020. V. 121. Article 106863.
10. *Зильберг Р.А., Майстренко В.Н., Терес Ю.Б., Вакунин И.В., Булышева Е.О., Селуянова А.А.* Вольтамперометрический сенсор на основе алюмофосфатного цеолита и композита бетулиновой кислоты с полиэлектролитным комплексом хитозана для распознавания и определения энантиомеров напроксена // *Журн. аналит. химии.* 2023. Т. 78. № 7. С. 648. (*Zilberg R.A., Maistrenko V.N., Teres Y.B., Vakulin I.V., Bulysheva E.O., Seluyanova A.A.* A voltammetric sensor based on aluminophosphate zeolite and a composite of betulinic acid with a chitosan polyelectrolyte complex for the identification and determination of naproxen enantiomers // *J. Anal. Chem.* 2023. V. 78. № 7. P. 933.)
11. *Яркаева Ю.А., Исламуратова Е.Н., Загитова Л.Р., Гуськов В.Ю., Зильберг Р.А., Майстренко В.Н.* Сенсор для распознавания и определения энантиомеров триптофана на основе модифицированного энантиоморфными кристаллами бромтрифенилметана угольно-пастового электрода // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 11. С. 1038. (*Yarkaeva Y.A., Islamuratova E.N., Zagitova L.R., Gus'kov V.Y., Zilberg R.A., Maistrenko V.N.* A Sensor for the recognition and determination of tryptophan enantiomers based on carbon-paste electrode modified by enantiomorphous crystals of bromotriphenylmethane // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. P. 1345.)
12. *Зильберг Р.А., Майстренко В.Н., Кабилова Л.Р., Гуськов В.Ю., Хамитов Э.М., Дубровский Д.И.* Хиральный вольтамперометрический сенсор на основе модифицированного циануровой кислотой пастового электрода для распознавания и определения энантиомеров тирозина // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 1. С. 80. (*Zil'berg R.A., Maistrenko V.N., Kabirova L.R., Gus'kov V.Y., Khamitov E.M., Dubrovskii D.I.* A chiral voltammetric sensor based on a paste electrode modified by cyanuric acid for the recognition and determination of tyrosine enantiomers // *J Anal Chem.* 2020. V. 75. P. 101.)
13. *Зильберг Р.А., Яркаева Ю.А., Максютובה Э.И., Сидельников А.В., Майстренко В.Н.* Вольтамперометрическая идентификация инсулина и его аналогов с использованием модифицированных полиарилефталатами стеклоглеродных 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 polyaryleneftalides // *J Anal Chem.* 2017. V. 72. P. 402.)
14. *Дрокин Р.А., Фесенко Е.А., Можаровская П.Н., Медведева М.В., Свалова Т.С., Козицина А.Н., Есаулкова Я.Л., Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Русинов В.Л.* 4-гидрокси-3-нитро-1,4-дигидро-триазоло [5,1-с][1,2,4] триазины: синтез, противовирусные свойства и электрохимические характеристики // *Изв. АН. Сер. хим.* 2022. № 11. С. 2460. (*Drokin R.A., Fesenko, E.A., Mozharovskaia, P.N., Medvedeva, M.V., Svalova, T.S., Kozitsina, A. N., Esaulkova Ya. L., Volobueva A.S., Zarubaev V.V., V.L. Rusinov* 4-Hydroxy-3-nitro-1, 4-dihydrotriazolo [5, 1-c][1, 2, 4] triazines: Synthesis, antiviral activity, and electrochemical char-

- acteristics // Russ. Chem. Bull. 2022. V. 71. № 11. P. 2460.)
15. Britton H.T. S., Robinson R.A. CXCVII I. – Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal // J. Chem. Soc. (Resumed). 1931. P. 1456.
 16. Ивойлова А.В., Михальченко Л.В., Цмокалюк А.Н., Козицина А.Н., Иванова А.В., Русинов В.Л. Окислительно-восстановительные превращения нового противовирусного препарата Триазавирин®: электрохимическое исследование и ЭПР-спектроскопия // Изв. АН. Сер. хим. 2021. № 6. С. 1099. (Ivoilova A.V. Mikhal'chenko L.V., Tsmokalyuk A.N., Kozitsina A.N., Ivanova A.V., Rusinov V.L. Redox conversions of new antiviral drug triazavirin®: Electrochemical study and ESR spectroscopy // Russ. Chem. Bull. 2021. V. 70. P. 1099.)
 17. Ivoilova A., Mikhalchenko L.V., Tsmokalyuk A., Leonova M., Lalov A., Mozharovskaia P., et al. Redox conversions of 5-methyl-6-nitro-7-oxo-4, 7-dihydro-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidinide L-arginine monohydrate as a promising antiviral drug // Molecules. 2021. V. 26. № 16. P. 5087.
 18. Wardman P. Application of pulse radiolysis methods to study the reactions and structure of biomolecules // Rep. Prog. Phys. 1978. V. 41. № 2. P. 259.
 19. Lund H., Baizer M. M Organic Electrochemistry: An Introduction and a Guide New York: Marcel Dekker, 1983. P. 1393.
 20. Zuman P. Half a century of research using polarography // Microchem. J. 1997. V. 57. № 1. P. 4.
 21. Русаков А.И., Менкович А.С., Гультай В.П., Орлов В.Ю. Структура и реакционная способность органических анион-радикалов. М.: Мир, 2005. С. 294.

ORIGINAL ARTICLES

VOLTAMPER-METRICAL DEFINITION OF POTENTIAL PROTECTIVE VIRUS MEDICINE SODIUM SALT OF 3-NITRO-4-HYDROXY-7-METHYLTHIO-4H-[1,2,4]TRIAZOLO[5,1-c][1,2,4]TRIAZINIDE MONOHYDRATE

P.N. Mozharovskaya^{a, *}, A.V. Ivoylova^a, N.A. Malakhova^a, R.A. Drokin^a, I.A. Balin^a,
A.N. Kozitsina^a, A.V. Ivanova^a, V.L. Rusinov^{a, b}

^aUral Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin. N. Yeltsin, 620002 Ekaterinburg, Russia

^bI. Y. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
620137 Ekaterinburg, Russia

*e-mail: pnmozharovskaia@urfu.ru

Received October 27, 2023. Revised November 21, 2023. Accepted November 22, 2023.

Abstract. The sodium salt of 3-nitro-4-hydroxy-7-methylthio-4H-[1,2,4]triazolo[5,1-c][1,2,4]triazinide monohydrate (compound **1**) is one of the promising compounds that showed potential antiviral activity against Coxsackie B3 virus. It was established by cyclic voltammetry that the electrochemical activity of compound **1** on a glass-carbon electrode in Britton-Robinson buffer solution (**BBR**) is due to the electroreduction of the nitro group. A method for the determination of compound **1** by direct cathodic square-wave voltammetry was developed. The linearity area of the graduation plot using the developed method in BBR solution (pH 2.0 ± 0.1) is 10–300 mg/L ($R^2 = 0.999$) with detection and determination limits of 1.27 and 4.11 mg/L, respectively.

Keywords: quantitative substance analysis, square-wave voltammetry, azoloazines, nitro group, glass-carbon electrode, antiviral agent, Coxsackie B3.

УДК 543.9 + 544.6

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ДНК-СЕНСОР НА ДОКСОРУБИЦИН НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТОВ ОКСИДА ГРАФЕНА, ЭЛЕКТРОПОЛИМЕРИЗОВАННОГО АЗУРА А И МЕТИЛЕНОВОГО ЗЕЛЕНОВОГО

© 2024 г. А. В. Порфирьева^{а, *}, З. Ф. Хуснутдинова^а, Г. А. Евтюгин^а

^аКазанский федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия

*E-mail: porfireva-a@inbox.ru

Поступила в редакцию 11.07.2023 г.

После доработки 06.09.2023 г.

Принята к публикации 10.09.2023 г.

Разработан вольтамперометрический ДНК-сенсор для определения доксорубина, сигналом которого служит изменение тока редокс-медиатора Метиленового зеленого, регистрируемое с помощью циклической вольтамперометрии на стеклоуглеродном электроде, модифицированном электрохимически восстановленным оксидом графена, электрополимеризованным Азуром А и ДНК, насыщенным Метиленовым зеленым. Установлено влияние природы полимерного слоя и используемого редокс-медиатора на чувствительность определения доксорубина. При оптимальном составе поверхностного слоя ДНК-сенсор позволяет определять до 0.01 пМ доксорубина. Сенсор апробирован на ряде модельных (искусственная урина, раствор Рингера–Локка, раствор бычьего сывороточного альбумина) и биологических образцов (слюна, урина), содержащих доксорубин.

Ключевые слова: ДНК-сенсор, биосенсор, электрохимически восстановленный оксид графена, электрополимеризация, Азур А, интеркалирование ДНК, определение доксорубина.

DOI: 10.31857/S0044450224060119, EDN: ttlogg

Одним из перспективных направлений развития современной аналитической химии является разработка электрохимических сенсоров и биосенсоров для контроля лекарств, биомаркеров заболеваний и различных токсикантов [1–3]. Традиционно для анализа антрациклиновых лекарственных препаратов цитостатического действия используют высокоэффективную жидкостную хроматографию и спектроскопические методы анализа [4]. Использование спектроскопии позволяет определять антрациклины на субмикромольном уровне. Хроматографические методы более чувствительны и селективны, но требуют значительных экономических затрат, включая более дорогостоящее оборудование, необходимость высокочистых растворителей, трудоемкой пробоподготовки и высокой квалификации персонала. В связи с этим в последнее время большое внимание уделяется развитию методов электрохимического анализа. Они характеризуются относительной простотой, обладают хорошо развитой теоретической базой, их результаты легко интер-

претировать. По точности и чувствительности электрохимические сенсоры могут конкурировать с хроматографическими методами, но при этом требуют минимальной пробоподготовки и легко адаптируются для использования вне лаборатории, в том числе по месту требования – в кабинете врача или у постели больного [5].

Современные электрохимические сенсоры используют химическую модификацию поверхности электрода – преобразователя сигнала для повышения регистрируемого тока, снижения рабочего потенциала и улучшения селективности определения различных аналитов. Электрохимически восстановленный оксид графена относится к числу перспективных модификаторов, в последнее десятилетие нашедших широкое применение в составе разнообразных электрохимических сенсоров и биосенсоров [6, 7]. Его получают путем катодной поляризации оксида графена, наносимого из суспензии на поверхность рабочего электрода. По сравнению с использованием сильных восстановителей такой подход экологически безопасен,

не приводит к образованию побочных продуктов, загрязняющих поверхностный слой электрода, характеризуется высокой эффективностью и позволяет получать модифицирующий материал с хорошо воспроизводимыми электрохимическими характеристиками [8].

Электрополимеризованные материалы с проводящими (полианилин, полипиррол) [9] и электроактивными свойствами (полифеназиновые, политрифенилметановые красители) [10] также успешно используют в составе электрохимических биосенсоров в качестве медиаторов электронного переноса, матрицы для иммобилизации биологических компонентов сенсоров и сигналообразующих компонентов. Их получение путем электролиза приводит к формированию устойчивой катионной пленки, способной электростатически удерживать противоположно заряженные компоненты слоя, формируя полиэлектролитные комплексы, обладающие собственной редокс-активностью. К числу компонентов таких поверхностных слоев относятся углеродные наноматериалы, заряженные отрицательно за счет ионизации поверхностных карбоксильных групп, и молекулы ДНК. Азур А относится к классу фенотиазинов, используемых в биохимии и аналитической химии в качестве индикаторов и прокрашивающих реагентов. Он способен образовывать электрополимеризованные покрытия на различных подложках [11–13]. В то же время описано [14–16] лишь несколько примеров использования электрополимеризованного Азура А (ПАА) в составе электрохимических сенсоров для определения глюкозы и НАДН, а также в составе ДНК-сенсоров для определения соединений, повреждающих ДНК [13], и для определения интеркалятора ДНК доксорубина [17].

Сигнал полимерных редокс-активных медиаторов в составе ДНК-сенсоров на соединения, способные к специфическому связыванию с ДНК, связан с влиянием подобных взаимодействий на распределение заряда в ДНК-содержащем слое. Интеркалирование меняет форму и распределение заряда фосфатных групп остова ДНК, что приводит к смещению равновесия окисления-восстановления полифенотиазинового красителя в слое. Для увеличения чувствительности определения таких взаимодействий в состав слоя вводят также дополнительные диффузионно свободные медиаторы электронного переноса [17, 18].

В данной работе впервые описано использование сочетания углеродного наноматериала (электрохимически восстановленного оксида графена, ЭХВОГ) с электрополимеризованным Азуром А для формирования ДНК-сенсора и определения доксорубина как модельного интеркалятора нативной ДНК. Изучены медиаторы электронного переноса, усиливающие сигнал интеркалирования, и установлено синергетическое действие

компонентов слоя при регистрации взаимодействий ДНК–доксорубин в присутствии Метиленового зеленого (МЗ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали Азура А хлорид (содержание красителя $\approx 80\%$), оксид графена (ОГ), ДНК из молок рыбы, Метиленовый синий (МС), Нейтральный красный (НК), гидрохинон (ГХ), Нильский синий (НС), Метиленовый зеленый, доксорубина гидрохлорид, бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, Германия), ДНК из эритроцитов цыпленка (Реанал, Венгрия). Все реагенты были категории ч. д. а. и analytical grade. Рабочие растворы реагентов и растворы для проведения электрохимических измерений готовили на деионизованной воде Millipore®.

Оборудование. Вольтамперометрические измерения проводили с помощью портативного биопотенциостата-гальваностата μ Stat 400 Metrohm DropSens (DropSens, S.L., Испания). Для изготовления ДНК-сенсора использовали электроды, изготовленные из стеклогуглерода СУ 2000 (диаметр 1.6 мм, НИИГрафит, Москва) в оболочке из политетрафторэтилена с токоъемником из нержавеющей стали. Рабочая площадь поверхности составила 0.0283 см^2 . Потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения $\text{Ag}/\text{AgCl}/3.0\text{ М}$ раствор KCl . Противоеlectродом служила никелевая фольга. Измерения проводили в нетермостатированной трехэлектродной ячейке объемом 5 мл. Для измерения pH применяли цифровой иономер Экотест-001 (ЗАО “Эконикс-Эксперт”, Москва).

Получение покрытия электрохимически восстановленного оксида графена. Стеклогуглеродный электрод (СУЭ) полировали механически с помощью полировального набора CN Instruments (Кат. № CN1120, США), после чего ополаскивали водой, промывали ацетоном, серной кислотой, этанолом и дважды водой. Далее электрод очищали электрохимически путем циклирования потенциала между -1.0 и 1.0 В при скорости сканирования потенциала 0.1 В/с . Затем на рабочую поверхность СУЭ наносили 2 мкл водной суспензии оксида графена ($0.125\text{--}1.0\text{ мг/мл}$) и сушили на воздухе. После этого электрод, покрытый оксидом графена, помещали в ячейку, содержащую 5 мл 0.1 М фосфатного буферного раствора с pH 7.0, содержащего 0.1 М NaNO_3 , и проводили десятикратное циклирование потенциала в диапазоне от 0 до -1.3 В при скорости сканирования потенциала 0.05 В/с . В ходе сканирования наблюдали характерные катодные пики при $-0.95\text{...}-1.2\text{ В}$ (в зависимости от поверхностной концентрации оксида графена), изменение которых свидетельствовало о протекании электрохимического восстановления оксида графена.

Электрополимеризация Азура А. Стеклоуглеродный электрод, модифицированный ЭХВОГ, переносили в 0.1 М фосфатный буферный раствор с рН 7.0, содержащий 0.1 М NaNO_3 и 0.2 мМ Азура А, и поляризовали при 1.2 В в течение 300 с. Далее многократно сканировали его потенциал в интервале от -0.7 до 1.2 В при скорости сканирования потенциала 0.1 В/с (20 циклов). Электрополимеризацию контролировали по характерным изменениям пиков красителя на вольтамперограмме. Аналогичным образом получали покрытия при использовании только потенциостатического (1.2 В, 300 с) или только потенциодинамического режима электрополимеризации Азура А (область сканирования $-0.7 \dots 1.2$ В, 0.1 В/с, 20 циклов). Далее электрод переносили в рабочий буферный раствор, не содержащий мономера, и проводили 10 циклов сканирования потенциала для удаления из полимерной пленки несвязавшихся частиц красителя.

Включение ДНК из различных источников в состав поверхностного слоя сенсора. На электрод, модифицированный ЭХВОГ/ПАА, наносили 2 мкл раствора ДНК из молок рыбы или эритроцитов цыпленка с концентрацией 1 мг/мл, высушивали на воздухе либо инкубировали в течение 10, 20 или 30 мин, затем промывали дистиллированной водой для удаления несвязавшихся реагентов.

Включение ДНК из молок рыбы и редокс-медиаторов в состав поверхностного слоя сенсора. На электрод, модифицированный ЭХВОГ/ПАА, капельно наносили 2 мкл раствора, полученного смешением равных объемов раствора ДНК из молок рыбы с концентрацией 1 мг/мл и 0.01 М раствора редокс-медиатора (МС, МЗ, НК, НС или ГХ, схема 1). Каплю высушивали, электрод промывали водой, после чего проводили десятикратное сканирование потенциала, как описано

выше, в диапазоне потенциалов $-0.6 \dots 0.8$ В в случае МС, МЗ и ГХ и $-1.2 \dots 0.8$ В для НК и НС, скорость сканирования потенциала 0.1 В/с. Ниже модифицирующий слой обозначен как ЭХВОГ/ПАА/ДНК + медиатор.

Определение доксорубина. ДНК-сенсор состава ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МЗ помещали в ячейку с 0.1 М фосфатным буферным раствором с рН 7.0, содержащим 0.1 М NaNO_3 , вольтамперометрический сигнал МЗ стабилизировали, как описано выше, после чего ДНК-сенсор инкубировали в 0.01 пМ–0.1 мкМ растворе доксорубина в течение 20 мин. Регистрировали циклическую вольтамперограмму в тех же условиях. Сигналом служило изменение катодного тока пика МЗ после контакта ДНК-сенсора с доксорубином. Предел обнаружения определяли из соотношения $S/N = 3$. Градуировочную зависимость строили в полулогарифмических координатах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение электрохимически восстановленного оксида графена. Электрохимическое восстановление ОГ имеет определенные преимущества по сравнению с химическим восстановлением. Подобные покрытия не содержат примесей, вносимых за счет введения в систему химических восстановителей. Кроме того, электрохимическое восстановление позволяет путем регулирования налагаемого потенциала контролировать количество восстанавливаемого ОГ и косвенно – присутствие на его поверхности кислородсодержащих функциональных групп [19, 20]. Для выбора условий модификации электрода на его поверхность наносили 2 мкл водной суспензии с концентрацией ОГ 1, 0.5, 0.25 или 0.125 мг/мл. С увеличением количества ОГ на электроде росли катодные токи

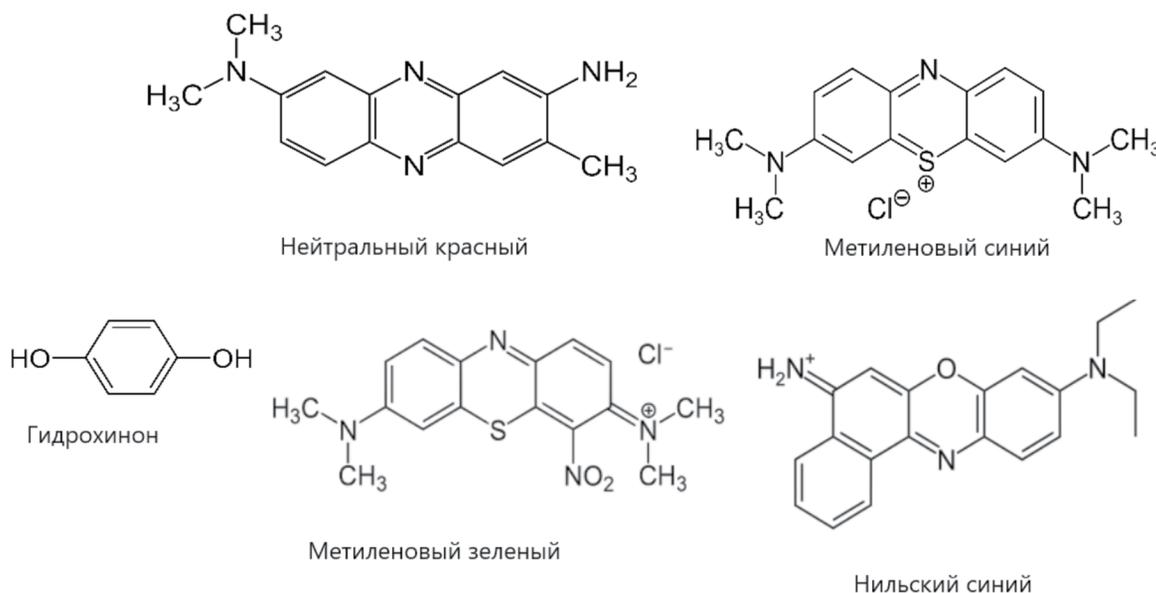


Схема 1. Структурные формулы использованных редокс-медиаторов.

электровосстановления, а пик восстановления смещался в сторону более отрицательных потенциалов.

Полученные ЭХВОГ-покрытия характеризовали методом циклической вольтамперометрии в присутствии 0.01 М феррицианида калия. Для этого сравнивали токи пиков окисления-восстановления феррицианид-иона и разность потенциалов пиков. В качестве оптимальной выбрали концентрацию суспензии ОГ 0.5 мг/мл, для которой наблюдали минимальную разность потенциалов редокс-пиков феррицианид-иона, максимальную близость соотношения токов пиков к единице и максимальные абсолютные значения токов пика окисления и восстановления (рис. 1). Рассчитанный по уравнению Рэндлса-Шевчика коэффициент шероховатости покрытия ЭХВОГ, полученного из ОГ с концентрацией 0.5 мг/мл, составил 1.13.

Нанесение электрополимеризованного Азура А и электрохимические характеристики покрытия ЭХВОГ/ПАА. Использование углеродных наноматериалов позволяет повысить эффективную площадь поверхности электрода, а наличие функциональных групп обеспечивает дополнительные взаимодействия между модифицирующими слоями. Для получения ПАА применяли потен-

циостатический и потенциодинамический режимы электрополимеризации, а также их сочетание (рис. 2а). При сравнении вольтамперограмм СУЭ с электрополимеризованными покрытиями, полученными в буферном растворе, не содержащем мономера Азура А, наблюдали две пары пиков, отнесенных к мономерной и полимерной формам фенотиразинового красителя [21]. Наибольшие токи пиков демонстрировали покрытия ЭХВОГ/ПАА, полученные при сочетании потенциостатического и потенциодинамического режимов электрополимеризации (рис. 2б). Сочетание потенциодинамического и потенциостатического режимов позволяет накопить на поверхности сенсора большее количество продукта электрополимеризации, что обеспечивает повышение чувствительности разработанного сенсора к включению в состав слоя молекул аналита за счет смещения окислительно-восстановительного равновесия в полимерном слое. Восстановленный оксид графена сохраняет после восстановления определенное количество кислородсодержащих карбоксилатных групп. Их отрицательные заряды дополнительно способствуют накоплению продукта электрополимеризации, заряженного положительно, по сравнению с чистым стеклоуглеродом.

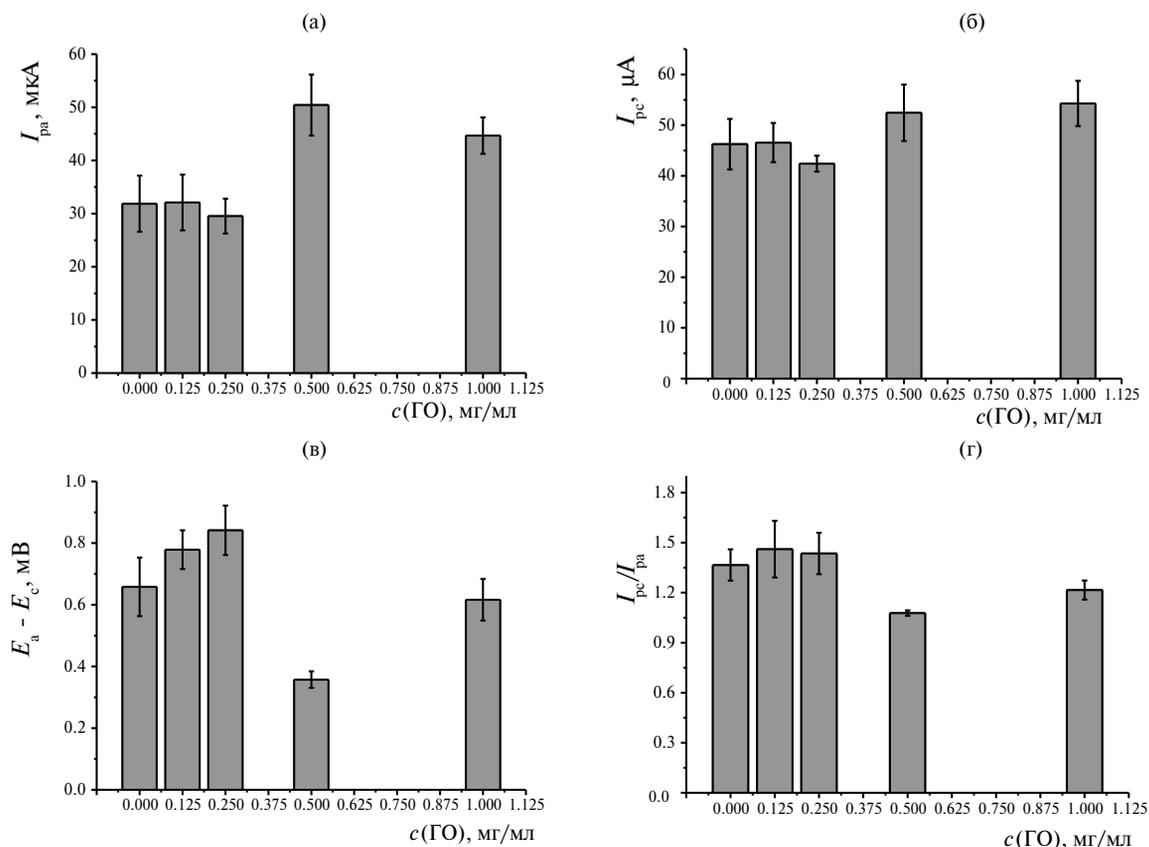


Рис. 1. (а) Токи пика окисления, (б) токи пика восстановления, (в) разность потенциалов пиков окисления и восстановления, (г) соотношение токов пиков окисления-восстановления 0.01 М феррицианида в зависимости от концентрации оксида графена, нанесенного на рабочую поверхность стеклоуглеродного электрода, на этапе его катодного восстановления.

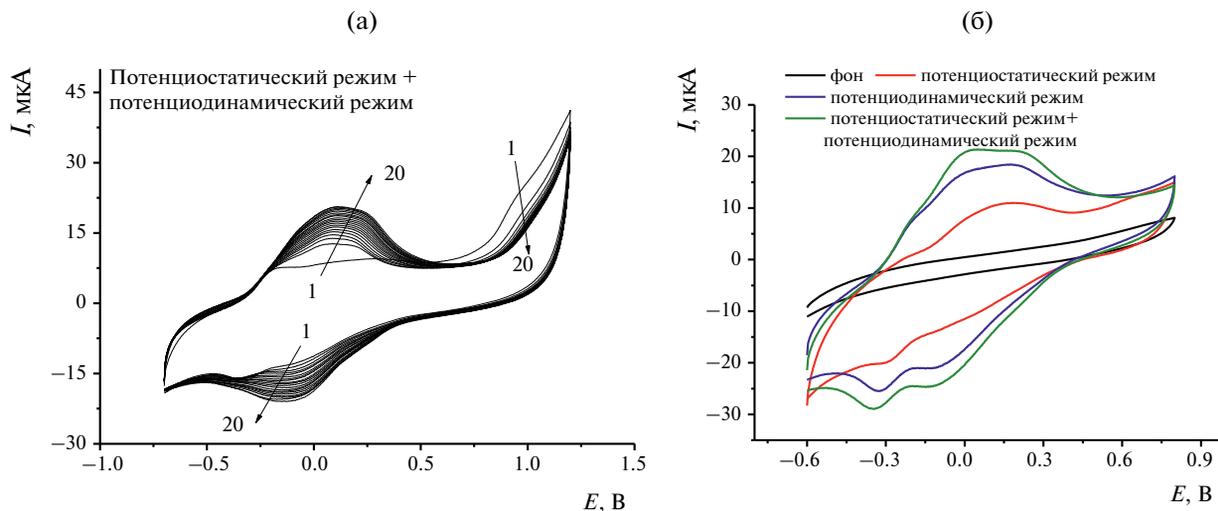


Рис. 2. (а) Циклические вольтамперограммы Азура А на СУЭ/ЭХВОГ в 0.1 М фосфатном буферном растворе с рН 7.0, содержащем 0.1 М NaNO_3 , для потенциостатического режима в сочетании с потенциодинамическим режимом; -1.2 В, 300 с, далее в интервале $-0.7 \dots 1.2$ В, 20 циклов, 0.1 В/с. (б) Циклические вольтамперограммы электрополимеризованного Азура А на СУЭ/ЭХВОГ для разных режимов электрополимеризации в 0.1 М фосфатном буферном растворе с рН 7.0, содержащем 0.1 М NaNO_3 , $-0.6 \div 0.8$ В, 0.1 В/с.

Вольтамперограммы демонстрировали достаточную стабильность полимерных покрытий при многократном циклировании потенциала, в том числе с промежуточным перемешиванием раствора в ячейке. Покрытия, синтезированные путем сочетания потенциостатического и потенциодинамического режимов электрополимеризации, отличались более высокими значениями токов покрытия. Их сигнал стабилизировался быстрее по сравнению с покрытиями, полученными с использованием только потенциостатического или только потенциодинамического режима электрополимеризации. В процессе электрополимеризации образующийся ПАА находился в окисленной форме и нес на себе положительный заряд, обеспечивающий электростатическое взаимодействие с ДНК.

Важным преимуществом указанного полимера является сохранение редокс-активности в широком диапазоне рН, включая область физиологических значений. Вид вольтамперограмм покрытия ЭХВОГ/ПАА в зависимости от рН фосфатного буферного раствора представлен на рис. 3. Ток пика окисления мономерной формы достаточно стабилен в кислой и слабокислой областях рН, при этом заметно снижается в нейтральной и слабощелочной областях. Ток пика окисления полимерной формы красителя незначительно меняется в диапазоне рН 2.0–7.0 с небольшим локальным максимумом при рН 4.0. В щелочной области токи пика окисления полимерной формы ПАА растут. Сигнал восстановления мономерной формы Азура А имеет максимум в области рН 7, тогда как ток восстановления полимерной формы красителя остается практически постоянным во всем изученном диапазоне рН, незначительно снижаясь при рН 7.0–8.0 (рис. 4).

Полусумму потенциалов пиков мономерной и полимерной форм использовали в качестве равновесного редокс-потенциала E_m . Для покрытия ЭХВОГ/ПАА наклон зависимости E_m –рН для мономера составил -72 мВ/рН (рН 2.0–7.0), что незначительно превышает нернстовский наклон для равного числа переносимых ионов водорода и электронов в потенциалоопределяющей стадии. В диапазоне рН 7.0–9.0 наклон зависимости составил 31 мВ/рН. Это может быть связано с тем, что депротонирование, приводящее к отрыву иона водорода от фенотиазинового фрагмента в щелочной среде, происходит быстро и не влияет на общую скорость электродной реакции. Соответственно в щелочной среде в потенциалоопределяющей стадии участвуют один ион водорода и два электрона. Для полимерной формы наблюдали наклон -62 мВ/рН (рН 2.0–6.0), что отвечает равному числу переносимых ионов водорода и электронов. В щелочной среде потенциал полимерной формы ПАА меняется нерегулярно.

Для установления природы лимитирующей стадии электродной реакции получили бифуркционную зависимость тока пика от скорости сканирования потенциала. Для покрытия ЭХВОГ/ПАА сигналы окисления-восстановления мономерной формы демонстрируют тангенс угла наклона, близкий к 0.5 (0.54 и 0.57 соответственно), что свидетельствует о диффузионном характере процесса, для окисления полимерной формы наклон зависимости близок к единице (0.94), что свидетельствует об адсорбционном характере процесса. Для восстановления полимера наклон зависимости составил 0.85 (смешанный диффузионно-адсорбционный характер электродного процесса).

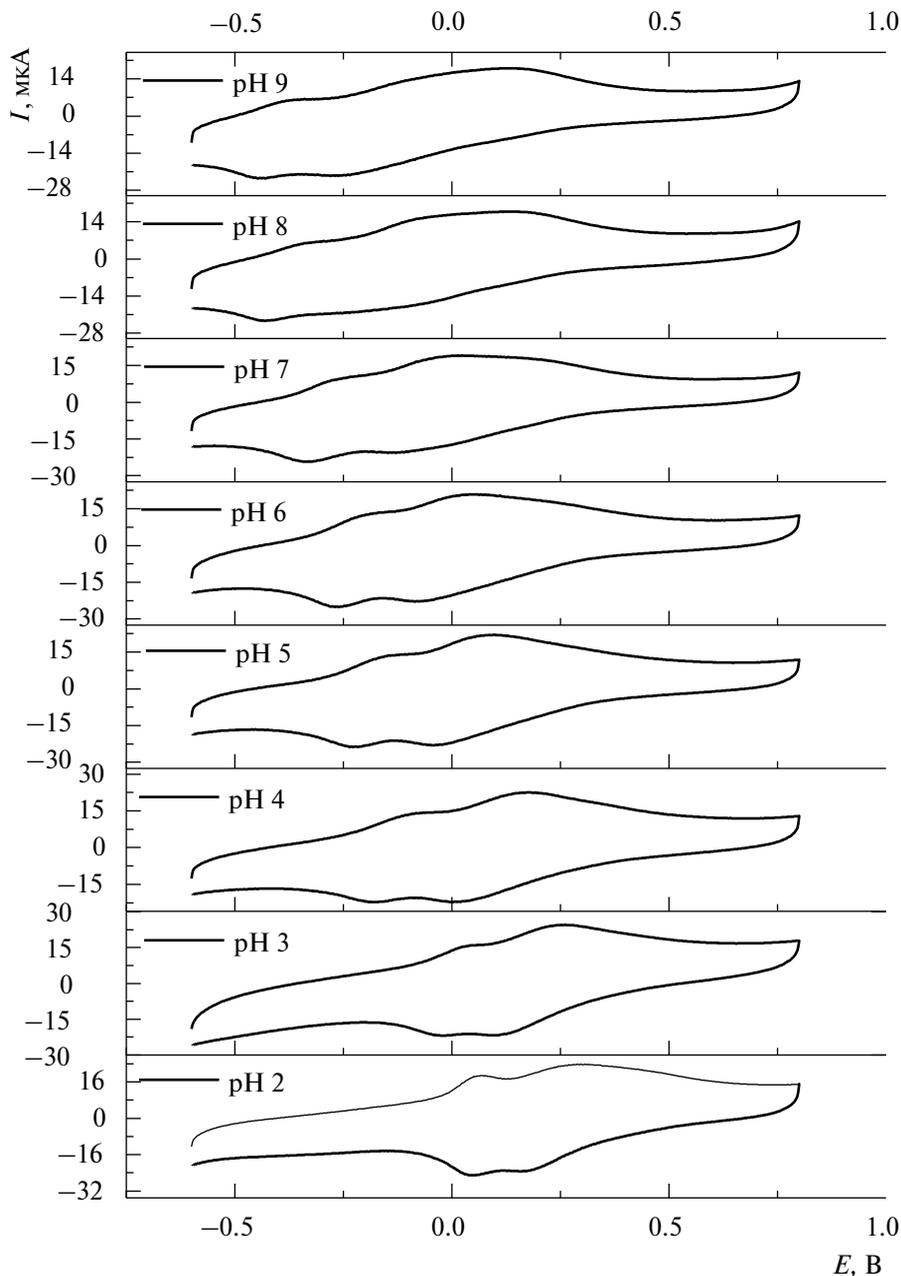


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы, полученные на СУЭ/ЭХВОГ/ПАА в 0.1 М фосфатном буферном растворе с pH 7.0, содержащем 0.1 М NaNO₃, при pH 2.0–9.0.

Коэффициенты переноса электрона α , рассчитанные по уравнениям Лавирона (1) и (2) для восстановления мономера и окисления-восстановления полимера, демонстрируют смещение относительно симметричного переходного состояния электронного переноса ($\alpha = 0.5$) в сторону более стабильного окисленного состояния:

$$E_{pc} = E^{0'} + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{RTk_{et}}{\alpha nF} - \frac{RT}{\alpha nF} \ln \nu, \quad (1)$$

$$E_{pa} = E^{0'} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \frac{(1-\alpha)nF}{RTk_{et}} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \nu. \quad (2)$$

Значения коэффициента переноса для окисления мономера красителя не рассчитывали, поскольку наклон соответствующей зависимости был отрицательным. Все изученные электрохимические параметры покрытия ЭХВОГ/ПАА представлены в табл. 1.

Включение ДНК в состав поверхностного слоя.

Иммобилизация ДНК – важный этап создания биосенсора, поскольку биополимер должен не только надежно закрепиться в поверхностном слое, но и сохранить при этом доступность для молекул аналита. Физическую адсорбцию ДНК можно проводить путем капельного нанесения аликвоты ее раствора поверх слоя модификато-

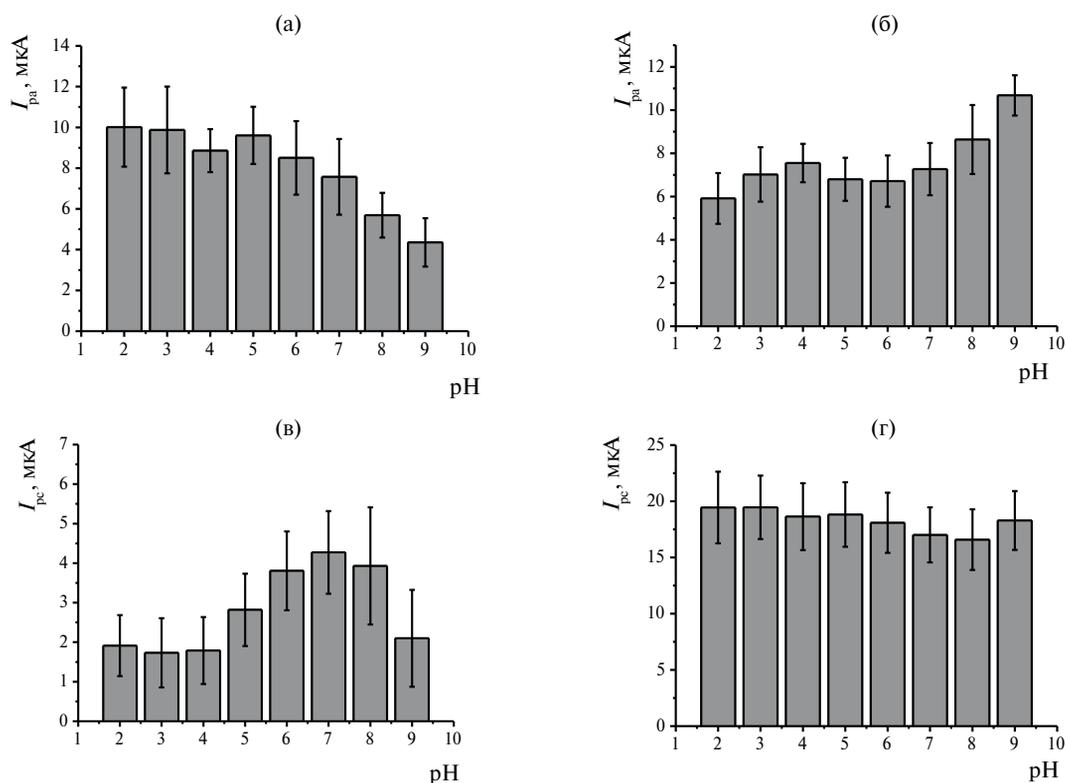


Рис. 4. Зависимость тока пика от pH на вольтамперограммах для СУЭ/ЭХВОГ/ПАА, диапазон сканирования $-0.6 \dots 0.8$ В, 0.1 В/с. (а) ток пика окисления мономерной формы, (б) ток пика окисления полимерной формы, (в) ток пика восстановления мономерной формы, (г) ток пика восстановления полимерной формы красителя.

ра с последующим высушиванием либо путем инкубирования модифицированного электрода в растворе ДНК в течение определенного времени с отмывкой несвязавшихся молекул ДНК. Для выбора оптимального варианта проводили высушивание на поверхности СУЭ/ЭХВОГ/ПАА 2 мкл раствора ДНК из молок рыбы или эритроцитов цыпленка с концентрацией 1 мг/мл, а также инкубирование электрода в растворе ДНК из молок рыбы в течение $10-30$ мин. Во всех случаях после контакта с ДНК электрод промывали водой и далее регистрировали циклическую вольтамперограмму в 0.1 М фосфатном буферном растворе

с pH 7.0 , содержащем 0.1 М NaNO_3 , в диапазоне потенциала от -0.6 до 0.8 В, скорость развертки 0.1 В/с. Контролировали изменение четырех пиков, которые относили к окислению-восстановлению мономерной и полимерной форм Азура А, дополнительных сигналов, относимых к реакциям нуклеотидов ДНК, при этом на вольтамперограмме не обнаруживали (рис. 5).

При инкубировании электрода в растворе ДНК наблюдали большой разброс результатов измерения по сравнению с высушиванием аликвоты раствора ДНК, поэтому в дальнейшем для иммобилизации ДНК выбрали ее капельное на-

Таблица 1. Электрохимические параметры покрытия ЭХВОГ/ПАА

| Ток пика | Наклон зависимости $\lg(I) - \lg v$ | Коэффициент переноса электрона | Наклон зависимости $E_p - \lg v$ |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Окисление мономера | 0.544 ± 0.014 | — | -0.030 ± 0.002 |
| Восстановление мономера | 0.566 ± 0.016 | $\alpha = 0.70$ | -0.085 ± 0.014 |
| Окисление полимера | 0.943 ± 0.028 | $1 - \alpha = 0.94$ | 0.063 ± 0.003 |
| Восстановление полимера | 0.833 ± 0.022 | $\alpha = 0.78$ | -0.075 ± 0.005 |

несение с последующим высушиванием и отмывкой. Наибольшие изменения вольтамперограмм после контакта СУЭ/ПАА с ДНК наблюдали для сигналов окисления красителя. Нанесение ДНК из эритроцитов цыпленка с большей молекулярной массой не приводит к значимой разнице сигнала ЭХВОГ/ПАА после высушивания. В связи с этим для создания ДНК-сенсора использовали ДНК из молок рыбы.

Влияние природы дополнительных медиаторов электронного переноса. Инкубирование ДНК-сенсора состава СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК в растворе модельного интеркалятора доксорубицина приводит к снижению токов пиков полимерного покрытия, однако указанные изменения невелики и не позволяют достоверно оценить вклад доксорубицина в сигнал ДНК-сенсора. Для увеличения чувствительности определения доксорубицина предложен подход, при котором ДНК предварительно насыщали растворимыми медиаторами электронного переноса – МС, НК, НС, МЗ или ГХ. Используемые компоненты (кроме ГХ) в растворе находились в катионной (окисленной) форме.

При этом МЗ, в отличие от МС, не проявляет интеркалирующей способности из-за присутствия в молекуле объемной нитрогруппы вблизи плоского фенотиазинового ядра. Вследствие этого МЗ взаимодействует с ДНК электростатически, локализуясь по малым бороздкам спирали ДНК. Гидрохинон выбрали, поскольку он часто используется в качестве редокс-индикатора, но его взаимодействие с модифицирующим покрытием не связано с электростатическими взаимодействиями.

Первоначально для оценки области редокс-активности медиаторов немодифицированный СУЭ помещали в ячейку, содержащую 1 мМ раствор индикатора в рабочем буферном растворе, и регистрировали вольтамперограмму в диапазоне потенциалов от -1.0 В до 0.6 В (0.1 В/с) (рис. 6). Во всех случаях на вольтамперограммах наблюдали хорошо выраженные редокс-пики в области -0.535 и -0.575 В для НК, -0.15 и -0.185 В для МС, 0.21 и -0.005 В для ГХ (пики окисления и восстановления соответственно). В случае МЗ наблюдали две пары редокс-пигов

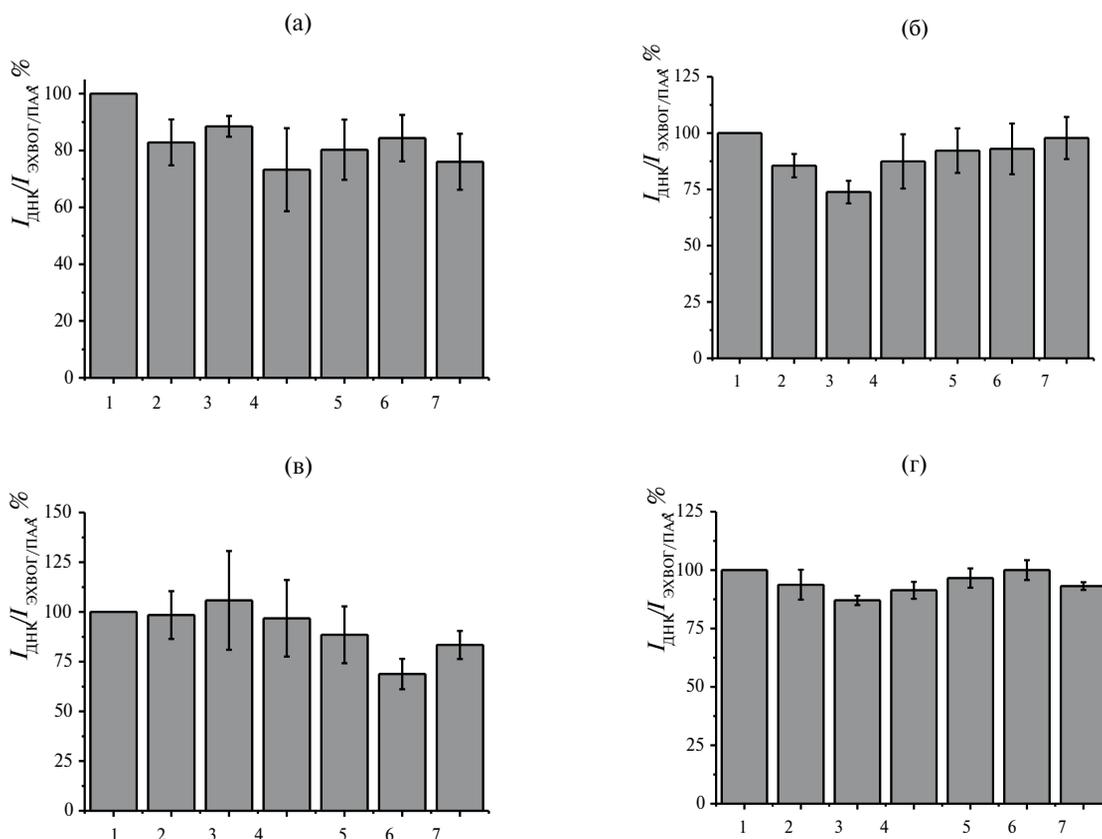


Рис. 5. Влияние способа включения ДНК из молок рыбы и эритроцитов цыпленка в состав поверхностного слоя на сигнал СУЭ/ЭХВОГ/ПАА. Циклическая вольтамперометрия, от -0.6 В до 0.8 В, 0.1 М фосфатный буферный раствор с pH 7.0, содержащий 0.1 М NaNO_3 , (а) окисление мономерной формы, (б) окисление полимерной формы, (в) восстановление мономерной формы, (г) восстановление полимерной формы. 1 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА, 2 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК из молок рыбы (высушивание), 3 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК из молок рыбы (высушивание)/ доксорубицина, 4–6 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК из молок рыбы (инкубирование 10, 20, 30 мин соответственно), 7 – СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК из эритроцитов цыпленка (высушивание).

при -0.16 и -0.235 В и при -0.03 и -0.065 В. Для НС на вольтамперограммах наблюдали две волны при -0.46 и -0.365 В, причем катодный сигнал был более выражен, чем анодный. Как видно, выбранные медиаторы проявляют собственную электрохимическую активность в разных областях потенциалов, что позволило в процессе скрининга охватить весь интересующий диапазон, включая область собственной редокс-активности ПАА.

Медиаторы в составе поверхностного слоя ДНК-сенсора. После включения медиатора в состав поверхностного слоя сенсора и стабилизации

токов на вольтамперограммах ДНК-сенсор инкубировали в течение 20 мин в 100 нМ растворе доксорубицина, промывали водой и снова регистрировали вольтамперограмму.

На вольтамперограмме, полученной на СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МС, наблюдали хорошо выраженную пару пиков при -0.35 и -0.2 В. Сигнал МС достаточно стабилен при многократном циклировании потенциала (рис. 7а), но взаимодействие ДНК с доксорубицином не влияет на его величину (рис. 7б). Соотношение величин анодных токов пика МС до и после введения 100 нМ раствора доксорубицина составило $103 \pm 2\%$.

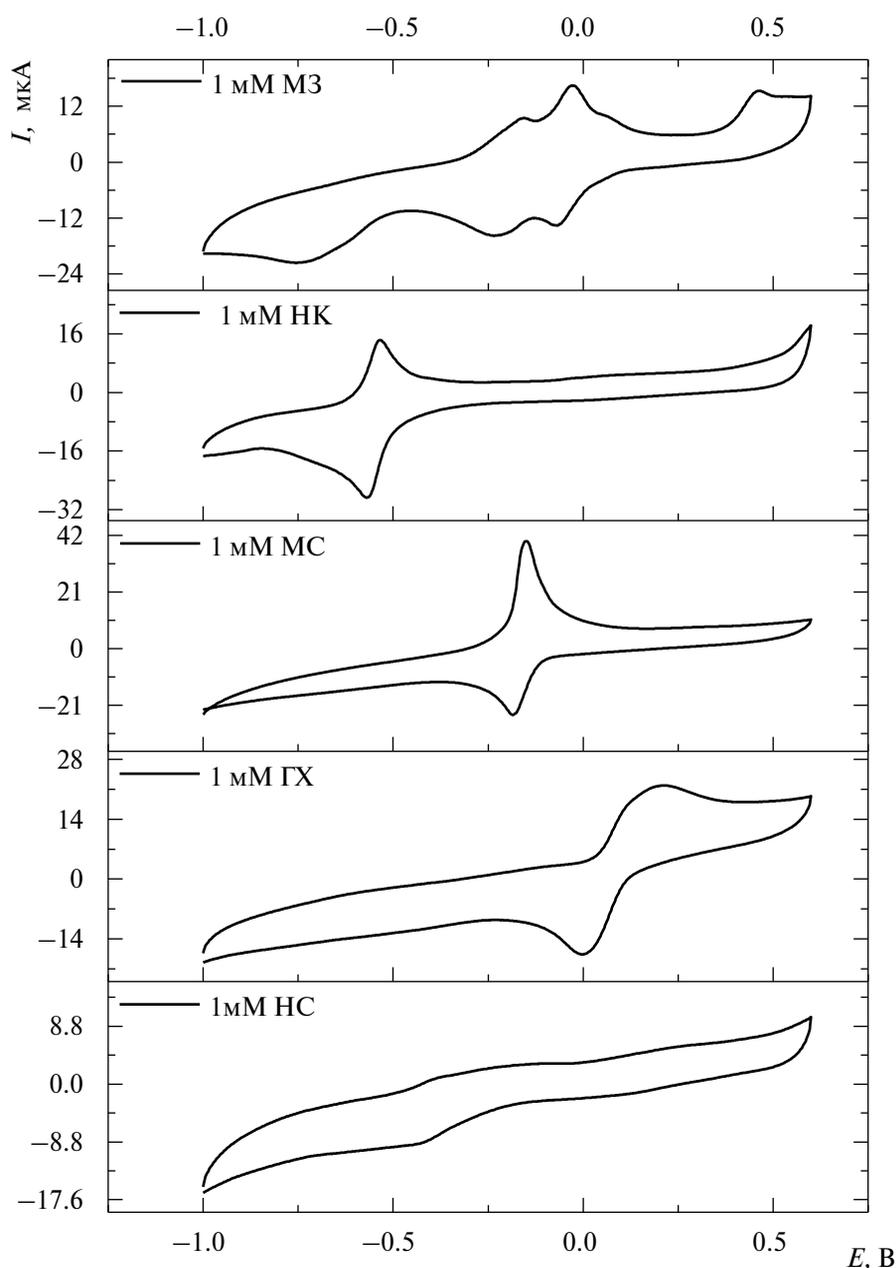


Рис. 6. Циклические вольтамперограммы 1 мМ Метиленового зеленого, Нейтрального красного, Метиленового синего, гидрохинона, Нильского синего на стеклоуглеродном электроде. Диапазон сканирования потенциала $-1.0 \dots 0.6$ В, 0.1 В/с, 0.1 М фосфатный буферный раствор с pH 7.0, содержащий 0.1 М NaNO_3

В случае НК сигналы на СУЭ/ЭХВОГ/ПAA/ДНК + НК выражены слабее. На вольтамперограмме наблюдали пару волн при -0.53 и -0.815 В (рис. 7в). Введение доксорубицина оказывает несколько большее влияние на пики медиатора по сравнению с МС, но все-таки недостаточное для количественной характеристики взаимодействия ДНК–доксорубицин (рис. 7г). Соотношение величин анодных токов НК до и после введения 100 нМ раствора доксорубицина составило $114 \pm 2\%$.

При использовании НС сигнал медиатора на вольтамперограмме отсутствует (рис. 7д, е). Возможно, его концентрация в смеси с ДНК недостаточна для проявления заметной электрохимической активности в рассмотренной области потенциалов.

В случае ГХ на первых циклах сканирования потенциала наблюдали хорошо выраженную пару пиков, пропадающую при продолжении сканирования (рис. 7ж). По-видимому, ГХ не удерживается в слое ДНК на электроде, поскольку его незаряженная форма не вступает в электростатические взаимодействия с биополимером ДНК (рис. 7з).

В отличие от других медиаторов, в случае МЗ на вольтамперограммах удалось зафиксировать не только четкий сигнал медиаторной системы (рис. 7и), но и его значимые изменения при контакте с 100 нМ доксорубицином (рис. 7к). Соотношение величин анодных токов пика МЗ до и после введения 100 нМ раствора доксорубицина составило $58 \pm 6\%$.

Вероятно, при инкубировании ДНК-сенсора в растворе доксорубицина антрациклиновый препарат вытесняет из слоя МЗ, электростатически удерживаемый на поверхности молекулы ДНК. Доксорубицин встраивается в спираль ДНК за счет интеркалирования, увеличивает объем спирали ДНК, при этом в результате протонирования аминогруппы рибозного фрагмента молекулы доксорубицина сохраняется возможность электростатического взаимодействия препарата с ДНК, приводящего к экранированию ее отрицательного заряда [22]. В результате вытеснения МЗ с поверхности ДНК его пик окисления снижается пропорционально концентрации доксорубицина. Таким образом, МЗ выбрали в качестве оптимального медиатора для построения концентрационной зависимости для определения доксорубицина.

Таким образом, МЗ показал наилучшие характеристики при регистрации влияния доксорубицина по сравнению с другими медиаторами электронного переноса. Ранее аналогичные изменения сигнала в системе ДНК–антрациклин были обнаружены для МС [18]. Таким образом, выбор МЗ не связан непосредственно с проявлением инеркалирования, его отклик на включение доксорубицина может быть отнесен к совокупно-

му влиянию всех компонентов слоя на электрохимическую доступность молекул МЗ для электронного переноса в пределах слоя.

Определение доксорубицина на СУЭ/ЭХВОГ/ПAA/ДНК + МЗ. ДНК-сенсор состава СУЭ/ЭХВОГ/ПAA/ДНК + МЗ инкубировали в растворе доксорубицина в течение 20 мин, после чего регистрировали циклическую вольтамперограмму в диапазоне потенциалов от -0.6 до 0.8 В со скоростью сканирования 0.1 В/с. Увеличение концентрации антрациклинового препарата приводит к закономерному снижению анодного тока пика медиатора. В диапазоне концентраций доксорубицина от 0.01 пМ до 100 нМ наблюдали линейную зависимость $y = (12.3 \pm 0.7) - (4.04 \pm 0.06) \lg c_{\text{доксорубицин}} (\text{М})$ с коэффициентом корреляции 0.998 , где y , %, – относительное снижение тока пика МЗ при контакте ДНК-сенсора с доксорубицином. Предел обнаружения доксорубицина составил 0.01 пМ.

В табл. 2 представлены аналитические характеристики определения доксорубицина с помощью электрохимических сенсоров и биосенсоров, описанных в литературе. В целом электрохимические сенсоры, в которых сигналом служит ток окисления самого доксорубицина, демонстрируют худшие характеристики по сравнению с ДНК- и аптасенсорами, обеспечивающими более эффективное распознавание и накопление аналита в приэлектродном слое. Разработанный ДНК-сенсор на доксорубицин демонстрирует наиболее широкий диапазон определяемых концентраций и наиболее низкий предел обнаружения по сравнению с приведенными в табл. 2 сенсорами.

Анализ реальных образцов. Для апробации разработанного ДНК-сенсора и оценки возможности его использования для определения доксорубицина в биологических средах строили градуировочные зависимости для определения доксорубицина в ряде модельных растворов и реальных биологических образцах. В качестве модельных растворов использовали раствор искусственной урины, содержащий 20 мМ КСl, 49 мМ NaCl, 15 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ CaCl_2 , 18 мМ NH_4Cl и 18 мМ мочевины [33], раствор Рингера–Локка [18] для имитации электролитов плазмы крови – 154 мМ NaCl, 5.6 мМ KCl, 2.2 мМ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 мМ NaHCO_3 , 2.5 мМ MgSO_4 , 3.2 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.3 мМ D-глюкозы и раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 41.4 мг/мл, которая соответствует нормальному уровню сывороточного альбумина у взрослых. В качестве биологических образцов использовали образцы урины и слюны от условно здорового донора. Образцы искусственной и человеческой урины подвергали корректировке pH до 7.0 с последующей фильтрацией через фильтровальную бумагу в случае визуального наблюдения выделения осадка.

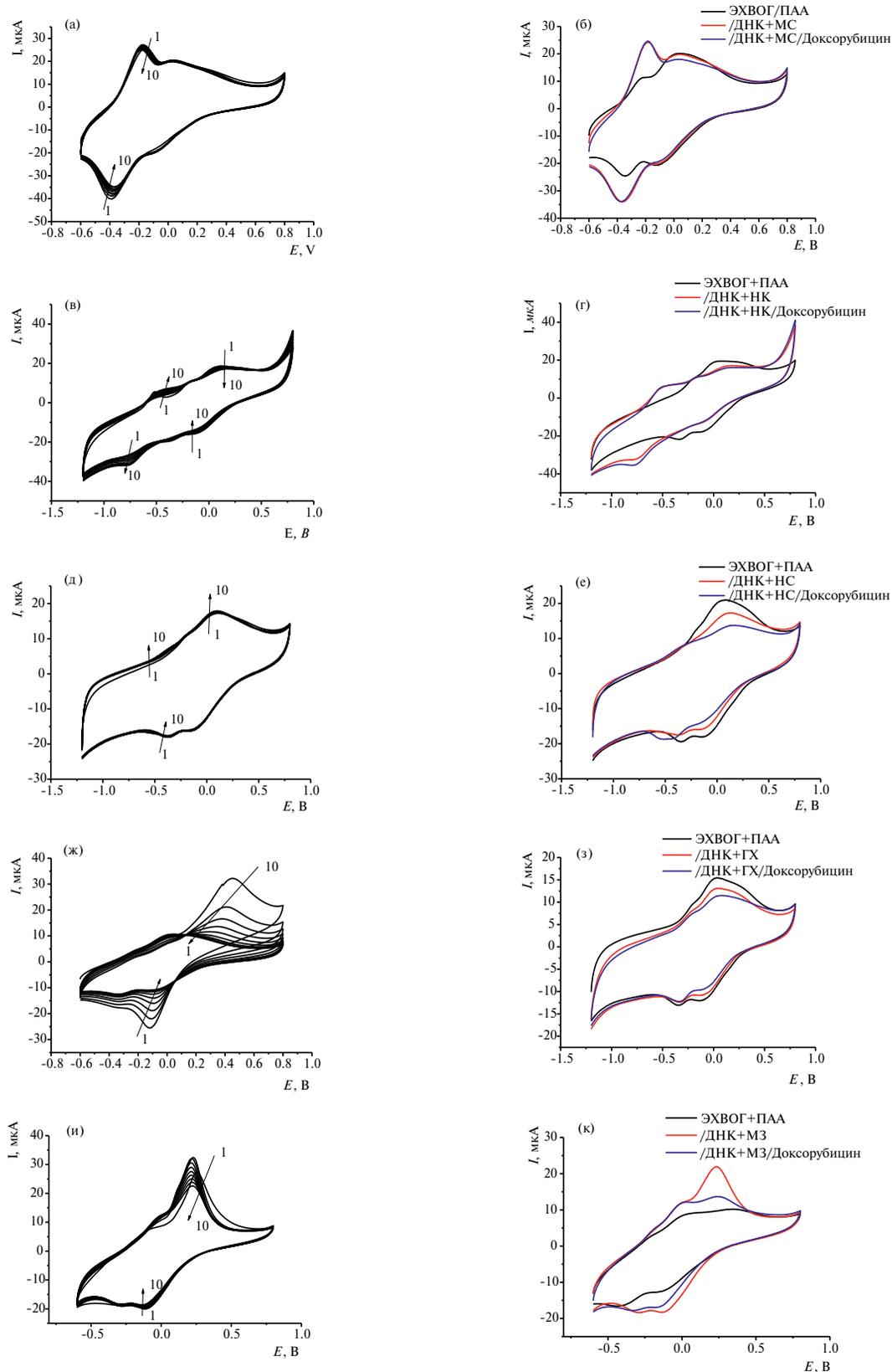


Рис. 7. Стабилизация вольтамперометрического сигнала (10 циклов, стрелки показывают изменения с увеличением числа циклов): (а) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МС, (в) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + НК, (д) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + НС, (ж) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + ГХ, (и) СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МЗ. Диапазон сканирования потенциала: (а, ж, и) $-0.6 \dots 0.8$ В, (в, д) $-1.2 \dots 0.8$ В, 0.1 В/с. Циклические вольтамперограммы для СУЭ/ЭХВОГ/ПАА, СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + медиатор, СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + медиатор/доксорубин при использовании в качестве медиатора (б) МС, (г) НК, (е) НС, (з) ГХ, (к) МЗ; в 0.1 М фосфатном буферном растворе с pH 7.0, содержащем 0.1 М NaNO_3 . Диапазон сканирования потенциала: (б, з, к) $-0.6 \dots 0.8$ В, (г, е) $-1.2 \dots 0.8$ В, 0.1 В/с.

Таблица 2. Аналитические характеристики определения доксорубина с помощью электрохимических сенсоров, ДНК- и аптасенсоров

| Электрод/модификатор | Метод определения | Линейный диапазон определяемых концентраций | Предел обнаружения | Литература |
|--------------------------------------|-------------------|---|---|------------------|
| Электрохимические сенсоры | | | | |
| СУЭ/полипиррол/нчAu/ЭХВОГ | ЦВА | 0.02 мкМ–5.2 мМ, 5.2–25 мМ | 0.02 мкМ | [23] |
| СУЭ/допированное S УНВ/FeV | Хроноамперометрия | 20 нМ–542.5 мкМ | 5.2 нМ | [24] |
| СУЭ/ПНСОК | ДИВА | 1 нМ–1 мкМ, 2–12 мкМ | 0.15 нМ | [25] |
| УПЭ/ЭХВОГ/ВУКМП | ДИВА | 1–15 мкМ | 1 нМ | [26] |
| СУЭ/ацетиленовая сажа | ЦВА | 0.01–2.5 мкМ | 3.006 нМ | [27] |
| УПЭ/MgO/УТ | ЦВА | 0.1–10 мкМ | 0.09 мкМ | [28] |
| Электрохимические ДНК- и аптасенсоры | | | | |
| СУЭ/УЧ/АЖ/ДНК | СЭИ | 0.1 пМ–1 нМ | 0.07 пМ | [29] |
| Au/ЭХВОГ/нчAu/аптамер | КВВА | 0.3 мкМ–6 мкМ | 0.1 мкМ | [30] |
| СУЭ/ОУНТ/ДНК | ДИВА | 1 нМ–20 мкМ | 0.6 нМ | [31] |
| СУЭ/УЧ/П[5]А/ПМС/ПНК/ ТКА + ДНК | ЦВА | 0.5 пМ–1 нМ | 0.13 пМ | [32] |
| СУЭ/ПАА+УЧ/ДНК+МС | ЦВА | 0.1 пМ–100 нМ | 0.03 пМ | [17] |
| СУЭ/ПАА+фМУНТ/ДНК+МС | | Анодные токи: 0.3 пМ–0.1 нМ; катодные токи: 0.3 пМ–0.03 нМ | Анодные токи: 0.3 пМ Катодные токи: 0.3 пМ | |
| СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК+МЗ | ЦВА | 0.01 пМ–100 нМ | 0.01 пМ | Данная работа |

Обозначения: АЖ – акридиновый желтый, ВУКМП – вертикально упорядоченные кремниевые мезопористые пленки, ДИВА – дифференциально-импульсная вольтамперометрия, КВВА – квадратно-волновая вольтамперометрия, нчAu – наночастицы золота, П[5]А – пиллар[5]арен, ПАА – поли(Азур А), ПМС – поли(Метиленовый синий), ПНК – поли(Нейтральный красный), ПНСОК – полые наносферы оксида кобальта, СЭИ – спектроскопия электрохимического импеданса, ТКА – тиакаликс[4]арен, УНВ – углеродное нановолокно, УПЭ – углеродсодержащий печатный электрод, УТ – углеродные точки, УЧ – углеродная чернь, фМУНТ – функционализированные многостенные углеродные нанотрубки, ЦВА – циклическая вольтамперометрия, ЭХВОГ – электрохимически восстановленный оксид графена.

Для всех использованных образцов подбিরали оптимальные условия разбавления, нивелирующие мешающее влияние матричных компонентов. Так, искусственную урину разбавляли рабочим буферным раствором в объемном соотношении 1 : 1, раствор Рингера– Локка – в пропорции 1 : 2, человеческую слюну – 1 : 5, образец урины не требовал разбавления. Наибольшее влияние оказывал бычий сывороточный альбумин, для минимизации его влияния исследуемый раствор разбавляли в соотношении 1 : 20. Некоторое занижение сигнала наблюдали для образцов слюны, что могло быть связано с частичной неспецифической сорбцией доксорубина на белках и иных олигомерных компонентах, входящих в ее состав.

Правильность определения доксорубина контролировали методом введено–найдено. Степень открытия в реальных образцах представлена в табл. 3.

ДНК-сенсор состава СУЭ/ЭХВОГ/ПАА/ДНК + МЗ показал удовлетворительные результаты определения доксорубина в модельных системах и биологических образцах. Следует отметить, что отбор подобных биологических образцов не предусматривает инвазивных процедур, поэтому определение антрациклиновых препаратов можно проводить, не травмируя физически и психологически пациентов, получающих терапию данным препаратом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 17-73-20024).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводили в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложен-

ными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Биологические образцы слюны и мочи были добровольно предоставлены авторами данного исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Congur G.* Electrochemical biosensors for monitoring of drug-DNA interactions // *Curr. Top. Med. Chem.* 2023. V. 23, № 4. P. 316.
2. *Negahdary M., Sharma A., Anthopoulos T.D., Angnes L.* Recent advances in electrochemical nanobiosensors for cardiac biomarkers // *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2023. V. 164. Article 117104.
3. *Kadam U.S., Hong J.C.* Advances in aptameric biosensors designed to detect toxic contaminants from food, water, human fluids, and the environment // *Trends Environ. Anal. Chem.* 2022. V. 36. Article e00184.
4. *Pashaei Y., Mehrabi M., Shekarchi M.* A review on various analytical methods for determination of anthracyclines and their metabolites as anti-cancer chemotherapy drugs in different matrices over the last four decades // *TrAC, Trends in Anal. Chem.* 2020. V. 130. Article 115991.
5. *Campuzano S., Pedrero M., Yáñez-Sedeño P., M. Pingarrón J.* New challenges in point of care electrochemical detection of clinical biomarkers // *Sens. Actuators, B.* 2021. V. 345. Article 130349.
6. *Huang X., Shi W., Bao N., Yu C.* Electrochemically reduced graphene oxide and gold nanoparticles on an indium tin oxide electrode for voltammetric sensing of dopamine // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. № 5. Article 310.
7. *Lin X., Lian X., Luo B., Huang X.-C.* A highly sensitive and stable electrochemical HBV DNA biosensor based on ErGO-supported Cu-MOF // *Inorg. Chem. Commun.* 2020. V. 119. Article 108095.
8. *Zhou A., Bai J., Hong W., Bai H.* Electrochemically reduced graphene oxide: Preparation, composites, and applications // *Carbon.* 2022. V. 191. P. 301.
9. *Tran L.T., Tran H.V., Cao H.H., Tran T.H., Huynh C.D.* Electrochemically effective surface area of a polyaniline nanowire-based platinum microelectrode and development of an electrochemical DNA sensor // *J. Nanotechnol.* 2022. V. 2022. Article 8947080.
10. *Dalkiran B., Brett C.M. A.* Polyphenazine and polytriphenylmethane redox polymer/nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors: A review // *Microchim. Acta.* 2021. V. 188. Article 178.
11. *Agrisuelas J., Gimenez-Romero D., Garcia-Jareno J.J., Vicente F.* Vis/NIR spectroelectrochemical analysis of poly-(Azure A) on ITO electrode // *Electrochem. Commun.* 2006. V. 8. № 4. P. 549.
12. *Chen C., Mu S.* Electrochemical polymerization of azure A and properties of poly(azure A) // *J. Appl. Polym. Sci.* 2003. V. 88. № 5. P. 1218.
13. *Evtugyn G., Porfireva A., Plastinina K., Evtugyn V., Kuzin Y.* Electrochemical DNA sensor based on poly(Azure A) obtained from the buffer saturated with chloroform // *Sensors.* 2021. V. 21. № 9. Article 2949.
14. *Gao Q., Wang W., Ma Y., Yang X.* Electrooxidative polymerization of phenothiazine derivatives on screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system // *Talanta.* 2004. V. 62. № 3. P. 477.
15. *Liu T., Luo Y., Zhu J., Kong L., Wang W., Tan L.* Non-enzymatic detection of glucose using poly(azureA)-nickel modified glassy carbon electrode // *Talanta.* 2016. V. 156-157. P. 134.
16. *Gao Q., Sun M., Peng P., Qi H., Zhang C.* Electro-oxidative polymerization of phenothiazine dyes into a multilayer-containing carbon nanotube on a glassy carbon electrode for the sensitive and low-potential detection of NADH // *Microchim. Acta.* 2010. V. 168. P. 299.
17. *Porfireva A., Begisheva E., Rogov A., Evtugyn G.* One-step electropolymerization of Azure A and carbon nanomaterials for DNA-sensor assembling and doxorubicin biosensing // *C—Journal of Carbon Research.* 2022. V. 8. Article 75.
18. *Goida A., Kuzin Y., Evtugyn V., Porfireva A., Evtugyn G., Hianik T.* Electrochemical sensing of idarubicin—DNA interaction using electropolymerized azure B and methylene blue mediation // *Chemosensors.* 2022. V. 10. Article 33.
19. *Evtugyn G.A., Porfireva A.V., Belyakova S.V.* Electrochemical DNA sensors for drug determination // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022. V. 221. Article 115058.

Таблица 3. Определение 10 пМ доксорубина в образцах по току окисления Метиленового зеленого методом циклической вольтамперометрии (сигнал стандартного образца – $56.4 \pm 7.6\%$)

| Модельный/реальный образец | Сигнал доксорубина в образце, % | Степень открытия (по логарифму концентрации), % |
|--|---------------------------------|---|
| Искусственная урина (1 : 1) | 55 ± 3 | 97 ± 6 |
| Раствор Рингера–Локка (1 : 2) | 55 ± 4 | 97 ± 7 |
| Раствор бычьего сывороточного альбумина (1 : 20) | 56 ± 9 | 98 ± 15 |
| Человеческая слюна (1 : 5) | 51 ± 6 | 90 ± 11 |
| Человеческая урина | 55 ± 3 | 98 ± 5 |

20. Zhou M., Wang Y., Zhai Y., Zhai J., Ren W., Wang F., Dong S. Controlled synthesis of large-area and patterned electrochemically reduced graphene oxide films // *Chem. Eur. J.* 2009. V. 15. № 25. P. 6116.
21. Sha Y., Gao Q., Qi B., Yang X. Electropolymerization of Azure B on a screen-printed carbon electrode and its application to the determination of NADH in a flow injection analysis system // *Microchim. Acta.* 2004. V. 148. P. 335.
22. Pérez-Arnaiz C., Busto N., Leal J.M., García B. New insights into the mechanism of the DNA/doxorubicin Interaction // *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. № 5. P. 1288.
23. Behravan M., Aghaie H., Giahi M., Maleknia L. Determination of doxorubicin by reduced graphene oxide/gold/polypyrrole modified glassy carbon electrode: A new preparation strategy // *Diamond Relat. Mater.* 2021. V. 117. Article 108478.
24. Rajaji U., Yogesh K.K., Chen S.-M., Raghu M.S., Parashuram L., Alzahrani F.M., et al. Deep eutectic solvent synthesis of iron vanadate-decorated sulfur-doped carbon nanofiber nanocomposite: electrochemical sensing tool for doxorubicin // *Microchim. Acta.* 2021. V. 188. Article 303.
25. Ouyang Y., Liang M., Wang F., Mei S., Mo G. Direct electrochemistry of doxorubicin and its ultrasensitive detection using a novel porous thorny carbon dodecahedron // *New J. Chem.* 2022. V. 46. P. 23039.
26. Lv N., Qiu X., Han Q., Xi F., Wang Y., Chen J. Anti-biofouling electrochemical sensor based on the binary nanocomposite of silica nanochannel array and graphene for doxorubicin detection in human serum and urine samples // *Molecules.* 2022. V. 27. № 24. Article 8640.
27. Sun S., Xu X., Niu A., Sun Z., Zhai Y., Li S., Xuan C., Zhou Y., Yang X., Zhou T., Tian Q. Novel electrochemical sensor based on acetylene black for the determination of doxorubicin in serum samples // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2022. V. 17. № 11. Article 221187.
28. Singh Th. A., Sharma V., Thakur N., Tejwan N., Sharma A., Das J. Selective and sensitive electrochemical detection of doxorubicin via a novel magnesium oxide/carbon dot nanocomposite based sensor // *Inorg. Chem. Commun.* 2023. V. 150. Article 110527.
29. Kulikova T., Porfireva A., Rogov A., Evtugyn G. Electrochemical DNA sensor based on acridine yellow adsorbed on glassy carbon electrode // *Sensors.* 2021. V. 21. № 22. Article 7763.
30. Kong F., Luo J., Jing L., Wang Y., Shen H., Yu R., Sun S., Xing Y., Ming T., Liu M., Jin H., Cai X. Reduced graphene oxide and gold nanoparticles-modified electrochemical aptasensor for highly sensitive detection of doxorubicin // *Nanomaterials.* 2023. V. 13. № 7. Article 1223.
31. Moghadam F.H., Taher M.A., Karimi-Maleh H. Doxorubicin anticancer drug monitoring by ds-DNA-based electrochemical biosensor in clinical samples // *Micromachines.* 2021. V. 12. № 7. Article 808.
32. Kappo D., Shurpik D., Padnya P., Stoikov I., Rogov A., Evtugyn G. Electrochemical DNA sensor based on carbon black—poly(methylene blue)—poly(neutral red) composite // *Biosensors.* 2022. V. 12. № 5. Article 329.
33. Laube N., Mohr B., Hesse A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines // *J. Cryst. Growth.* 2001. V. 233. № 1-2. P. 367.

ORIGINAL ARTICLES

ELECTROCHEMICAL DNC-SENSOR FOR DOXORUBICIN BASED ON COMPOSITES OF GRAPHENE OXIDE, ELECTROPOLYMERIZED AZUR A AND METHYLENE GREEN

A. V. Porfireva^{a, *}, Z. F. Khusnutdinova^a, G. A. Evtugyn^a

^aKazan Federal University, A.M. Butlerov Chemical Institute, 420008 Kazan, Russia

*e-mail: porfireva-a@inbox.ru

Received July 11, 2023. Revised September 6, 2023. Accepted September 10, 2023

Abstract. A voltammetric DNA sensor for the determination of doxorubicin was developed, the signal of which is the change in the current of the redox mediator Methylene green, recorded by cyclic voltammetry on a glass-carbon electrode modified with electrochemically reduced graphene oxide, electropolymerized Azur A and DNA saturated with Methylene green. The influence of the nature of the polymer layer and the redox mediator used on the sensitivity of doxorubicin determination was determined. At optimal composition of the surface layer the DNA-sensor allows to determine up to 0.01 pM of doxorubicin. The sensor was tested on a number of model (artificial urine, Ringer-Locke's solution, bovine serum albumin solution) and biological samples (saliva, urine) containing doxorubicin.

Keywords: DNA sensor, biosensor, electrochemically reduced graphene oxide, electropolymerization, Azur A, DNA intercalation, doxorubicin detection.

УДК 543.068.8:543.426:543.062:577.182.99

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ В БЛИЖНЕЙ ИК-ОБЛАСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМАРТФОНА

© 2024 г. В. Г. Амелин^{а,б *}, О. Э. Емельянов^а, А. В. Третьяков^б

^аВладимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых
ул. Горького, 87, Владимир, 60000, Россия

^бВсероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов
Звенигородское шоссе, 5, Москва, 123022, Россия

*E-mail: amelinvg@mail.ru

Поступила в редакцию 26.07.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принята к публикации 30.08.2023 г.

Предложен неdestructивный способ анализа лекарственных средств (нестероидные противовоспалительные, фторхинолоны, ацетилсалициловая кислота, винпоцетин, тетрациклины) по диффузному отражению ИК-излучения с использованием смартфона и напечатанного на 3D-принтере устройства. Установлено, что диффузное отражение ИК-излучения (850 нм) от таблетированных лекарственных средств можно зафиксировать с помощью камеры смартфона. Блистерная упаковка и оболочка таблетки незначительно снижают интенсивность сигнала диффузного отражения света с длиной волны 850 нм, что подтверждается сравнительным анализом результатов цветометрического измерения в образцах лекарственных средств, находящихся в упаковке, без упаковки и на расколе таблеток. Наблюдается корреляция аналитического сигнала с концентрацией действующего вещества вне зависимости от варианта исследования. Массив данных обрабатывали методами главных компонент (PCA), иерархического кластерного анализа (HCA), частичной регрессии метода наименьших квадратов (PLS) и методом наименьших квадратов с применением программного обеспечения для смартфонов PhotoMetrix PRO[®]. Показано, что с помощью данных алгоритмов можно идентифицировать препараты по их производителю и определить концентрацию действующих веществ. Цветометрические сигналы от таблеток одного производителя образуют отдельные кластеры на дендрограммах, созданных с использованием алгоритма HCA. Данные, полученные с помощью PCA, указывают на расположение сигналов от таблеток разных производителей в отдельных квадрантах, что способствует проведению идентификации фармацевтической компании. Рассмотрено использование хемометрических методов анализа для определения концентрации действующего вещества.

Ключевые слова: лекарственные средства, цифровая цветометрия в ближней ИК-области, смартфон, неdestructивный анализ.

DOI: 10.31857/S0044450224050077 EDN: usyuzp

Широко используемым для неdestructивного анализа лекарственных средств и выявления фальсифицированных препаратов является ИК-спектроскопия (12500–600 см⁻¹) [1, 2]. В работе [3] исследованы таблетки ацетилсалициловой кислоты разных производителей методом ближней ИК-спектроскопии (12500–4000 см⁻¹). С помощью хемометрических методов PCA

и SIMCA построены модели по ИК-спектрам таблеток ацетилсалициловой кислоты, которые позволяют идентифицировать препарат по производителю и могут быть использованы для выявления его фальсификата.

Идентификация производителей лекарственных средств, содержащих кофеин и парацетамол, с применением ИК- и комбинацион-

ного рассеяния (КР)-спектроскопии в среднем ИК-диапазоне $4000\text{--}600\text{ см}^{-1}$ рассмотрена в работах [4, 5]. Для регистрации таблеток их пресовали с бромидом калия и далее сканировали методами ИК-, КР-спектроскопии. С использованием метода главных компонент лекарственные средства классифицированы в соответствии с составом и производителем.

На наш взгляд, подобный подход не позволяет обеспечить экспресс-определение действующих веществ лекарственных средств. Альтернативой является использование простых и доступных экспресс-методов анализа. Одно из направлений в данной области – цифровая цветометрия, которую все чаще используют для решения различных проблем аналитического контроля [6–8]. Данную группу методов отличает простота аппаратного оформления, возможность использования в качестве цветорегистрирующих устройств цифровой фото-, видео- и оптической офисной техники. Значительный потенциал цветометрии обусловлен разработкой современных смартфонов и специализированного программного обеспечения [9, 10]. Ранее [11–14] нами описано использование смартфона для регистрации цветометрического сигнала твердофазной флуоресценции на целлюлозной бумаге и пластинах ТСХ. Анализируемые таблетки, содержащие хинолоны, нестероидные противовоспалительные средства, тетрациклины, растворяли в 0.01 М НСl . Каплю раствора помещали на бумагу или пластину ТСХ, облучали УФ-светом (365 нм) и регистрировали флуоресценцию с использованием смартфона. Однако данный прием можно использовать только для флуоресцирующих действующих веществ лекарственных средств после пробоподготовки, и с его использованием невозможно установить производителя фармпрепарата.

Цель данной работы состояла в изучении способа оценки качества лекарственных средств, идентификации производителя цветометрическим методом по диффузному отражению ИК-излучения таблеток в блистерной упаковке с использованием смартфона и устройства, напечатанного на 3D принтере.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Использовали устройство-бокс ($9 \times 12 \times 9\text{ см}$), напечатанный на 3D-принтере, с установленной ИК-светодиодной матрицей SHL0020IR (850 нм , 11765 см^{-1}) и блоком питания на 4.5 В (три элемента питания AA). Диффузное отражение ИК-излучения регистрировали смартфоном Samsung A51 с установленным приложением PhotoMetrix PRO® (рис. 1).

ИК-спектры таблеток в ближней инфракрасной области ($4000\text{--}10000\text{ см}^{-1}$) получали на ИК-спектрометре с преобразованием Фурье

Frontier (PerkinElmer, США) с использованием приставки NIRA (PerkinElmer, США), применяемой для сбора спектров диффузного отражения твердых тел, жидкостей и порошков. ИК-спектры обрабатывали с помощью программы TQ Analyst 9 (v. 9.7.179). Для получения инфракрасных спектров лекарственные средства в блистерной упаковке поочередно помещали на сапфировое окно для образцов и проводили сканирование в заданной области спектра. Разрешение составляло 4 см^{-1} , число сканирований 32 для каждого образца.

Анализ. Лекарственные препараты для анализа приобретали в аптеках г. Владимира. Состав и производители анализируемых проб представлены в табл. 1.

Лекарственные средства в блистерной упаковке и без нее с разной концентрацией действующего вещества поочередно вводили на середину смотрового окна устройства (рис. 1), прикладывали камеру смартфона к окну с захватом середины таблетки в области (ROI) 16×16 пикселей и проводили фотографирование с переменным фокусированием (infinity) и разрешением камеры (resolution) 640×480 .

PhotoMetrix PRO®. Приложение для смартфонов PhotoMetrix PRO® на платформе Android предназначено для одномерного (зависимость аналитического сигнала от одного параметра) и многомерного (зависимость аналитического сигнала от многих параметров – цветовых каналов) цветометрических анализов различных объектов [15–17]. Подробное описание работы с PhotoMetrix PRO® приведено в статье [18].

Многомерный анализ (multivariate analysis). Многомерный анализ с использованием цветометрических каналов R, G, B, H, S, V, L и I позволяет использовать алгоритмы методов главных компонент (PCA), иерархического кластерного анализа (HCA) и частичной регрессии метода наименьших квадратов (PLS). Используя данные алгоритмы, можно определить концентрацию действующего вещества по зависимости "измерено-предсказано", рассчитанной методом (PLS), а также установить производителя лекарственного средства. При использовании алгоритмов PCA анализируемые образцы помещали в специальное устройство-бокс (рис. 1) и проводили фотографирование в разделе Sampling. Графический результат получали в разделе Re-Processing, при этом дендрограмма (алгоритм HCA) устанавливается автоматически после использования метода PCA.

Одномерный анализ (univariate analysis). Одномерный анализ позволяет определить концентрацию по градуировочной зависимости, рассчитанной методом наименьших квадратов по отдельно выбранным цветометрическим каналам R, G, B, H, S, V, L и I.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ



Рис. 1. Устройство для цветометрического анализа.

В данной работе исследовали лекарственные средства различных классов (нестероидные противовоспалительные, фторхинолоны, ацетилсалициловая кислота, винпоцетин, тетрациклины) (схема 1).

Установлено, что диффузное отражение ИК-излучения (850 нм) от таблеток с различными действующими веществами можно зафиксировать с помощью камеры смартфона (рис. 2). Блистерная упаковка и оболочки таблеток незначительно снижают интенсивность сигнала диффузного отражения света с длиной волны 850 нм, что подтверждается сравнительным анализом результатов цветометрического измерения в образцах лекарственных средств, находящихся в упаковке, без упаковки и на расколе таблетки.

Наблюдается корреляция аналитического сигнала с концентрацией действующего вещества вне

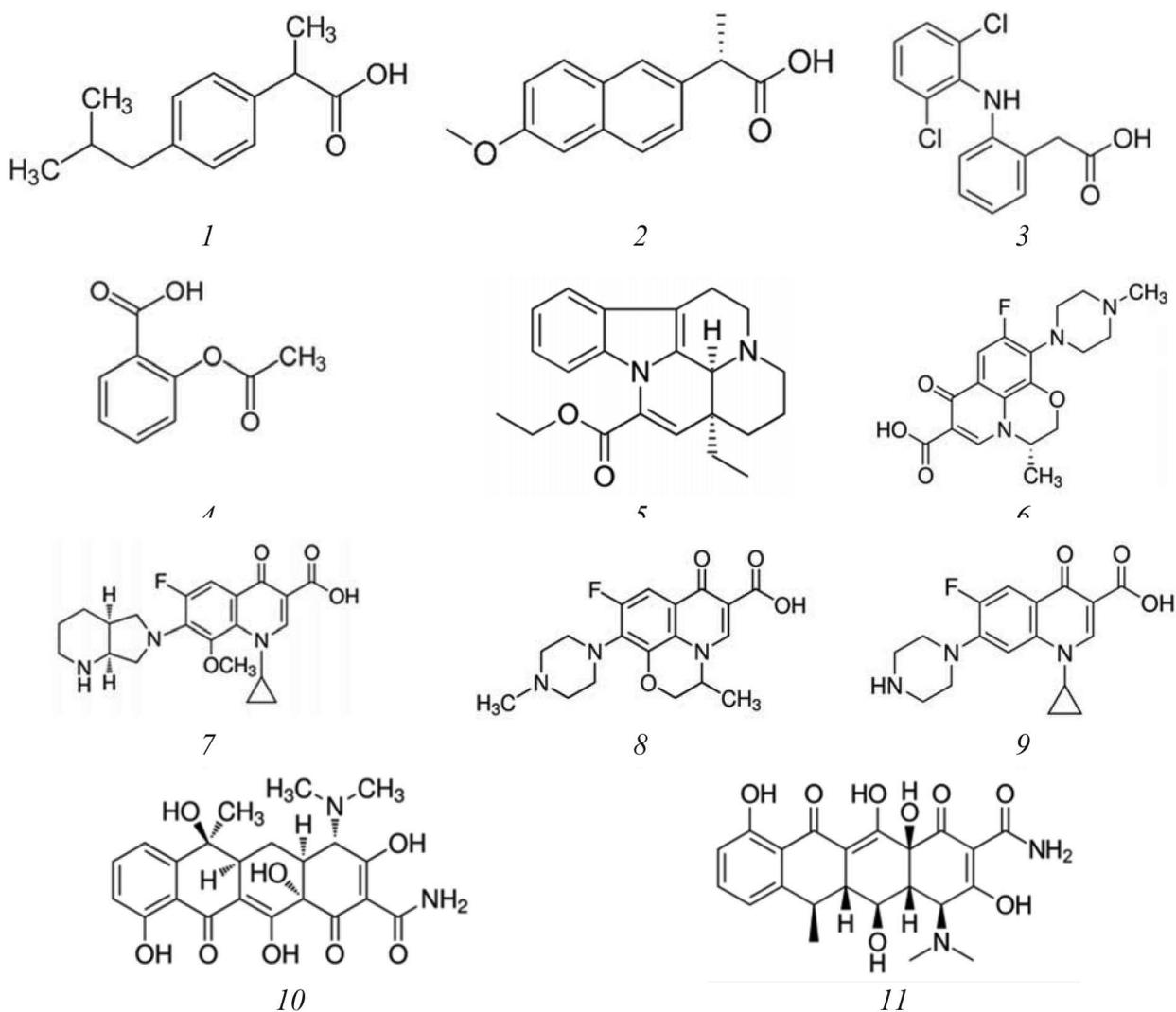


Схема 1. Структурные формулы ибупрофена (1), напроксена (2), диклофенака (3), ацетилсалициловой кислоты (4), винпоцетина (5), левофлоксацина (6), моксифлоксацина (7), офлоксацина (8), ципрофлоксацина (9), тетрациклина (10) и доксициклина (11).

Таблица 1. Состав лекарственных препаратов и их производители

| Лекарственный препарат (действующее вещество, мг в таблетке) | Вспомогательные вещества | Производитель |
|--|---|-----------------------------------|
| Ибупрофен (ибупрофен 200, 400 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ-102), крахмал кукурузный, кроскармеллоза натрия, кремния диоксид коллоидный, магния стеарат. Оболочка: поливиниловый спирт, макрогол-4000, титана диоксид | ООО "Озон", Россия |
| Ибупрофен Велфарм (ибупрофен 200, 400 мг) | Повидон К-90, целлюлоза микрокристаллическая (МС-101), тальк, кросповидон, кальция стеарат, аэросил, крахмал кукурузный. Оболочка: гипромеллоза, титана диоксид, макрогол | ООО "Велфарм", Россия |
| Диклофенак Реневал (диклофенак 50 мг) | Крахмал кукурузный, карбоксиметилкрахмал натрия, лактозы моногидрат, целлюлоза микрокристаллическая, аэросил, повидон К-30, магния стеарат. Оболочка: гидроксипропилметилцеллюлоза, тальк, железа оксид желтый (Е172), титана диоксид, макрогол, железа оксид красный (Е172)] | АО ПФК "Обновление", Россия |
| Диклофенак Реневал (диклофенак 100 мг) | Сахароза, цетиловый спирт, магния стеарат, тальк, повидон К-30, аэросил. Оболочка: гипромеллоза, тальк, титана диоксид, твин 80, макрогол-6000, Понсо 4R, хинолиновый желтый | АО ПФК "Обновление", Россия |
| Диклофенак (диклофенак 50 мг) | Лактозы моногидрат, крахмал картофельный, целлюлоза микрокристаллическая, повидон К-17, магния стеарат. Оболочка: целлацефат, титана диоксид, полисорбат-80, тропеолин-0, масло семян клещевины обыкновенной | ООО "Озон", Россия |
| Диклофенак Ретард (диклофенак 100 мг) | Гипромеллоза, целлюлоза микрокристаллическая, лактозы моногидрат, повидон К-25, магния стеарат, тальк. Оболочка: смесь метакриловой кислоты и сополимера этилакрилата, тальк, титана диоксид, кремния диоксид коллоидный, натрия гидрокарбонат, натрия лаурилсульфат, триэтилцитрат | ООО "Озон", Россия |
| Диклофенак (диклофенак 50, 100 мг) | Лактозы моногидрат, крахмал кукурузный, повидон К-30/К-25, натрия лаурилсульфат, карбоксиметилкрахмал натрия, кремния диоксид коллоидный, магния стеарат. Оболочка: смесь метакриловой кислоты и сополимера этилакрилата, макрогол 6000, тальк, титана диоксид, краситель солнечный закат желтый | "Nemofarm", Россия |
| Налгезин (напроксен 275, 550 мг) | Повидон К-30, целлюлоза микрокристаллическая, тальк, магния стеарат, вода очищенная. Оболочка: краситель Opadry YS-1-4215, макрогол, индигокармин (Е132), гипромеллоза | "KRKA", Словения |

Продолжение табл. 1

| Лекарственный препарат (действующее вещество, мг в таблетке) | Вспомогательные вещества | Производитель |
|--|---|--|
| Нексемезин (напроксен 275, 550 мг) | Коповидон, лактозы моногидрат, целлюлоза микрокристаллическая, кремния диоксид коллоидный, тальк, натрия стеарилфумарат, карбоксиметилкрахмал натрия. Оболочка: поливиниловый спирт, макрогол-6000, тальк, титана диоксид | "Фармасинтез", Россия |
| Винпоцетин / Винпоцетин Форте (винпоцетин 5, 10 мг) | Лактозы моногидрат, целлюлоза микрокристаллическая, повидон К-25, магния стеарат, карбоксиметилкрахмал натрия | ООО "Озон", Россия |
| Винпоцетин (винпоцетин 5, 10 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая, крахмал кукурузный, кремния диоксид коллоидный, магния стеарат | "Изварино Фарма", Россия |
| Тромбостен (ацетилсалициловая кислота 50, 100 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ-102), гипролоза низкозамещенная, стеариновая кислота. Оболочка: смесь метакриловой кислоты и сополимера этилакрилата, тальк, титана диоксид, кремния диоксид коллоидный, натрия гидрокарбонат, натрия лаурилсульфат | ООО "Озон", Россия |
| Ацетилсалициловая кислота Кардио (ацетилсалициловая кислота 50, 100 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая, крахмал кукурузный. Оболочка: смесь метакриловой кислоты и сополимера этилакрилата, триэтилцитрат, полисорбат 80, натрия лаурилсульфат | АО ПФК "Обновление", Россия |
| Таваник (левофлоксацин 250, 500 мг) | Гипромеллоза, кросповидон, целлюлоза микрокристаллическая, натрия стеарилфумарат. Оболочка: гипромеллоза, макрогол-8000, титана диоксид (E171), тальк, краситель железа оксид красный (E172), краситель железа оксид желтый (E172) | Санофи Винтроп Индустрия, Франция |
| Лефлобакт (левофлоксацин 250, 500 и 750 мг) | Кальция стеарат, крахмал 1500, крахмал картофельный, кросповидон, повидон К-17), лактозы моногидрат, тальк, кремния диоксид коллоидный, целлюлоза микрокристаллическая. Оболочка: оксипропилметилцеллюлоза, макрогол, титана диоксид, тропеолин-0 | ОАО "Синтез", Россия |
| Леволет (левофлоксацин 500, 750 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ-102), крахмал кукурузный, кремния диоксид коллоидный, кросповидон, гипромеллоза, магния стеарат. Оболочка: гипромеллоза, титана диоксид (E171), макрогол-400 | Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия |
| Моксифлоксацин (моксифлоксацин 400 мг) | Лактозы моногидрат, целлюлоза микрокристаллическая, магния стеарат, гипромеллоза. Оболочка: опадрай розовый (тальк, гипромеллоза, титана диоксид, макрогол, железа оксид красный) | РЕПЛЕК ФАРМ, ООО "Скопье", Россия |

Окончание табл. 1

| Лекарственный препарат (действующее вещество, мг в таблетке) | Вспомогательные вещества | Производитель |
|---|--|--|
| Мофлокс (моксифлоксацин 400 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ-102), кроскармеллоза натрия, кремния диоксид коллоидный, повидон К-30, магния стеарат. Оболочка: опадрай розовый, гипромеллоза НРМС 2910 (Е464), титана диоксид (Е171), макрогол (PEG 400), железа оксид красный (Е172), железа оксид желтый (Е172) | ООО "МАКИЗ-ФАРМА", Россия |
| Цифран (ципрофлоксацин 250, 500 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая, крахмал кукурузный, магния стеарат, тальк очищенный, кремния диоксид коллоидный, натрия крахмала гликолят. Оболочка: опадрай-ОУ-S58910 белый, тальк очищенный | Сан Фармасьютикал Индастриз Лтд., Индия |
| Ципрофлоксацин (ципрофлоксацин 250, 500 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ-101), повидон К-25, крахмал кукурузный, кросповидон, карбоксиметилкрахмал натрия, магния стеарат. Оболочка: гипромеллоза, титана диоксид, макрогол-4000 | ООО "Озон", Россия |
| Офлоксацин (офлоксацин 200, 400 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая, крахмал картофельный, повидон, кроскармеллоза натрия, магния стеарат. Оболочка: гипромеллоза, макрогол, титана диоксид | ООО "Озон", Россия |
| Ципролет (ципрофлоксацин 250, 500 мг) | Крахмал кукурузный, целлюлоза микрокристаллическая, кроскармеллоза натрия, кремния диоксид коллоидный, тальк, магния стеарат. Оболочка: гипромеллоза, сорбиновая кислота, титана диоксид, тальк, макрогол-6000, полисорбат-80, диметикон | Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия |
| Доксициклин, диспергируемые таблетки (доксициклин 100 мг) | Целлюлоза микрокристаллическая, сахарин, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметил-целлюлоза, кремния диоксид коллоидный, магния стеарат, лактозы моногидрат | ОАО "Фармстандарт- Лексредства", Россия |
| Доксициклин Солюшн, (доксициклин 100 мг) | Лактозы моногидрат, целлюлоза микрокристаллическая, гипролоза низкозамещенная, натрия сахаринат, гипромеллоза, магния стеарат, кремния диоксид коллоидный | ООО "Озон", Россия |
| Тетрациклин, (тетрациклин 100 мг) | Сахароза, крахмал кукурузный, тальк, магния карбонат основной, декстрин, натрия стеарат, желатин, кислотный красный 2С, тропеолин 0. Оболочка: поливиниловый спирт, титана диоксид, макрогол-400, железа оксид красный, железа оксид желтый | ООО "Озон", Россия |
| Тетрациклин, (тетрациклин 100 мг) | Сахароза, кальция стеарат, желатин, крахмал картофельный, тальк. Оболочка: метилцеллюлоза, макрогол-6000, титана диоксид, азорубин, тропеолин-0 | ОАО "Биосинтез", Россия |



Рис. 2. Фотографии диффузного отражения ИК-излучения таблеток диклофенака (1), левофлоксацина (2) и ацетилсалициловой кислоты (3).

зависимости от варианта исследования (рис. 3). Как видно из рисунка, влияние матрицы и блистерной упаковки лекарственных средств на значения RGB незначительное, о чем свидетельствуют малые изменения получаемого аналитического сигнала в зависимости от условий регистрации. Кроме того, интенсивность цветометрических каналов изменяется с изменением концентрации действующего вещества в таблетках независимо от способа получения результатов. При любых вариантах исследования лекарственного средства, содержащего ацетилсалициловую кислоту в количестве 50 и 100 мг, наблюдается корреляция аналитического сигнала с концентрацией действующего вещества. Аналогичные результаты получены для всех лекарственных средств, рассматриваемых в данном исследовании.

Зависимость цветометрических параметров диффузного отражения в ИК-области от концентрации и состава таблеток положена нами в основу определения содержания действующего вещества в лекарственных средствах, а также идентификации их производителя.

Как видно из табл. 1, производители лекарственных средств используют различные вспомогательные вещества, составы оболочек табле-

ток и, возможно, составы блистерной упаковки. При измерении диффузного отражения ИК-излучения фиксируется суммарное влияние вспомогательных веществ и состава блистерной упаковки, что дает возможность идентифицировать производителя.

На рис. 4 представлены графические зависимости, полученные с помощью методов PCA и НСА. Данные алгоритмы позволили идентифицировать производителей лекарственных средств с действующими веществами фторхинолонов, тетрациклинов, нестероидных противовоспалительных средств, ацетилсалициловой кислоты и винпоцетина. На рис. 4а–к приведены графики PCA для первых двух главных компонент для таблеток с одним и тем же действующим веществом, но разных производителей. Как видно, наблюдается дискриминация лекарственных средств по их производителю. Данный метод также позволил определить страну-производителя, что особенно хорошо видно на примере таблеток, содержащих цiproфлоксацин с разной концентрацией действующего вещества (рис. 5в). Так, у таблеток, произведенных в России, идентифицируемые вещества находятся в квадрантах 2 и 4, а произведенных в Индии – в квадрантах 1 и 3. Использование метода иерархического кластерного анализа (НСА) также позволило определить лекарственные средства по их производителю, при этом на дендрограммах каждый препарат одного и того же производителя образует отдельные кластеры. Кластеризация заметна также по содержанию действующего вещества. Содержание действующего вещества можно определить по тому, в какой кластер содержания попадет исследуемое лекарственное средство. Аналогичные результаты получали для таблеток без блистерной упаковки (рис. 5).

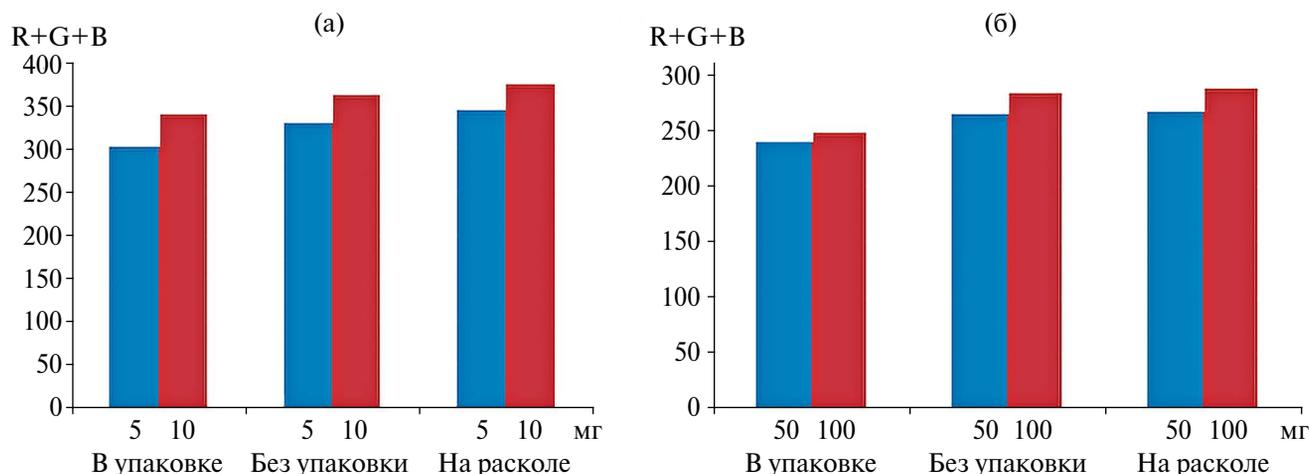
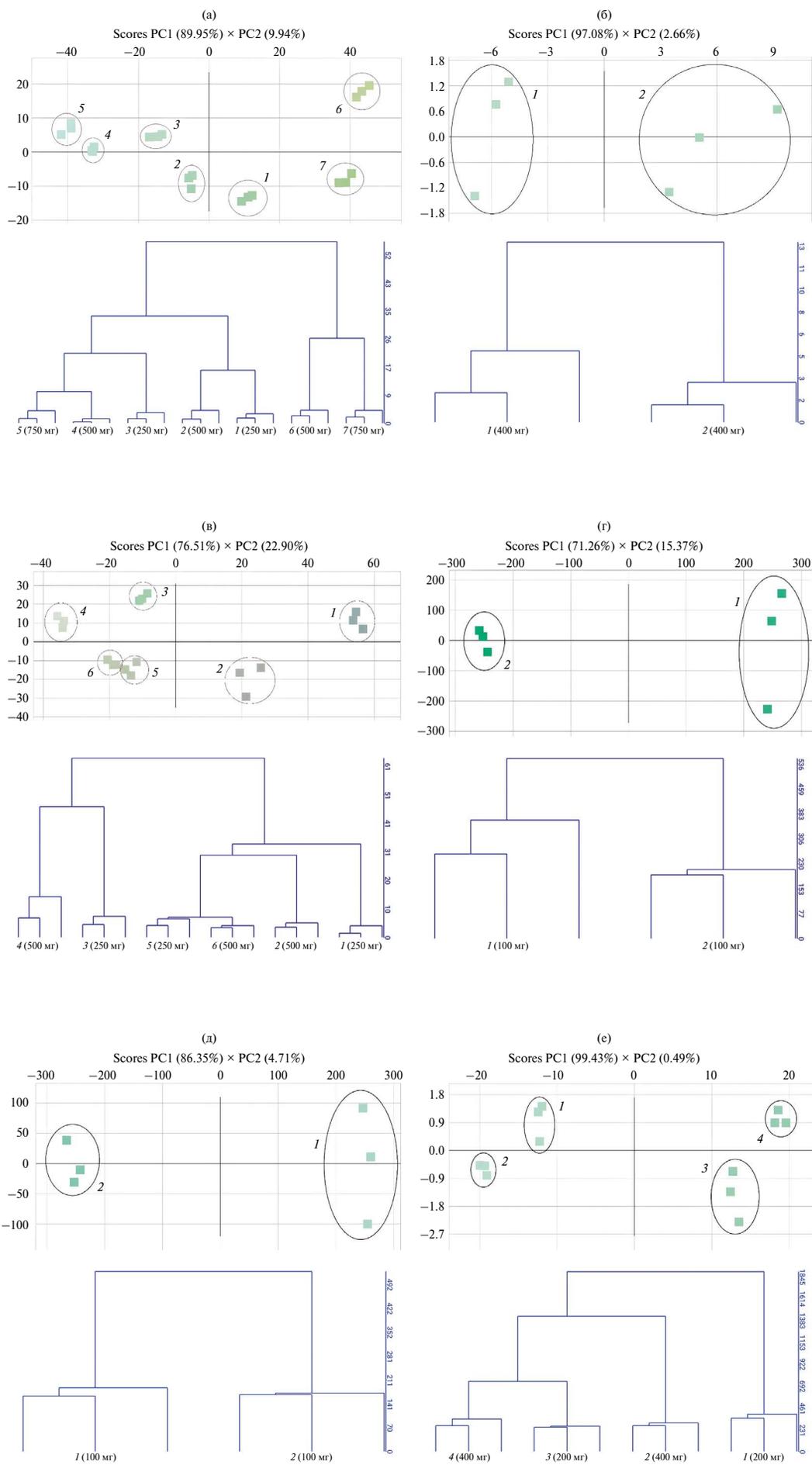


Рис. 3. Зависимость суммы цифровых цветовых каналов от концентрации и условий регистрации диффузного отражения ИК-излучения для винпоцетина (а) и ацетилсалициловой кислоты (б).



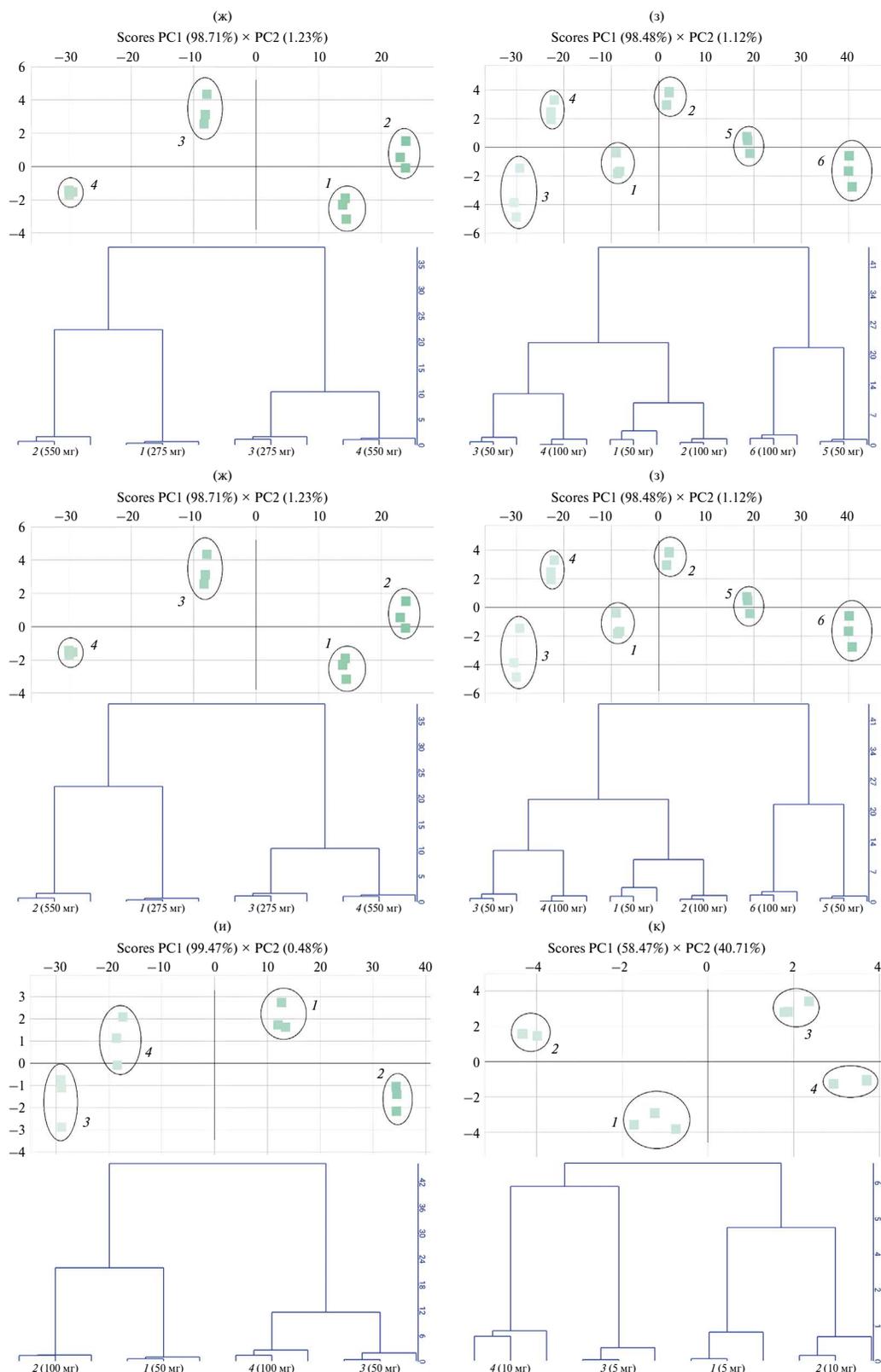


Рис. 4. Графики PCA и HCA для определения производителей лекарственных средств в blisterной упаковке. Левофлоксацин: 1, 2 – Таваник; 3–5 – Лефлобакт; 6, 7 – Леволет (а). Моксифлоксацин: 1 – Моксифлоксацин; 2 – Мофлокс (б). Ципрофлоксацин: 1, 2 – Ципрофлоксацин; 3, 4 – Цифран; 5, 6 – Ципролет (в). Доксициклин: 1 – Доксициклин, диспергируемые; 2 – Доксициклин Солюшн (г). Тетрациклин: 1 – Тетрациклин, Озон; 2 – Тетрациклин, Биосинтез (д). Ибупрофен: 1, 2 – Ибупрофен, Озон; 3, 4 – Ибупрофен, Велфарм (е). Напроксен: 1 – Нексемезин, Фармасинтез; 2 – Налгезин, КРКА (ж). Диклофенак: 1, 2 – Диклофенак, Озон; 3, 4 – Диклофенак, Хемофарм; 5, 6 – Диклофенак, Обновление ПФК (з). Ацетилсалициловая кислота: 1, 2 – Ацетилсалициловая кислота, Обновление ПФК; 3, 4 – Тромбостен, Озон (и). Винпоцетин: 1, 2 – Винпоцетин, Озон; 3, 4 – Винпоцетин, Изварино Фарма (к).

Использование частичной регрессии метода наименьших квадратов (алгоритм PLS) для определения содержания действующего вещества в таблетках. Алгоритм PLS удобно использовать при определении массы действующего вещества в таблетках: задается масса, указанная в инструкции к таблеткам, и проводятся цветометрические измерения ("измерено"), методом PLS рассчитывается масса ("предсказано") и погрешности анализа. С использованием исследуемых образцов таблеток построены градуировочные модели "измерено-предсказано" с применением алгоритма PLS ($n = 3$), коэффициент детерминации $R^2 \geq 0.995$ (табл. 2). Точность градуировочной модели характеризовали величиной среднеквадратичного остатка градуировки (RMSEC, root-mean square error of calibration) [19]:

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (y_i - \hat{y}_i)^2}{I}},$$

где y_i и \hat{y}_i – измеренные и предсказанные значения концентраций действующих веществ в таблетках соответственно для образцов сравнения $i = 1, \dots, I$, участвующих в построении градуировочной модели. При этом, чем меньше RMSEC, тем точнее описываются исходные данные. Значения RMSEC не превышали 17.9 мг (табл. 2).

Прогнозные свойства модели оценивали величиной среднеквадратичного остатка прогноза (RMSEP, root-mean square error of prediction) [19]:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (y_i - \hat{y}_i)^2}{M}},$$

где y_i и \hat{y}_i – измеренные и предсказанные значения концентраций действующих веществ в таблетках соответственно, M – количество образцов проверочного набора. Максимальное значение RMSEP составило 29.6 мг (табл. 2). В случае несоответствия заданной концентрации рассчитанной значения RMSEP превышали 30 мг.

Использование метода наименьших квадратов (одномерный анализ) для определения содержания действующего вещества в таблетках. В этом случае использовали цветометрические каналы R, G и B. Из трех каналов выбирали градуировочные зависимости с коэффициентом детерминации $R^2 \geq 0.9$ (табл. 2). Как видно из табл. 2, получены равноточные результаты анализа таблеток в блистерной упаковке и без нее, относительное стандартное отклонение не превышало 0.09.

Применение алгоритмов PLS и одномерного анализа способствовало получению равноточных результатов при анализе таблеток в блистерной упаковке, без упаковки и с использованием ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье в ближней ИК-области. Относительная погрешность результатов анализа не превышала рекомендуемые при приготовлении лекарственных средств согласно приказу Министерства здравоохранения РФ от 26 октября 2015 г № 751н (табл. 2).

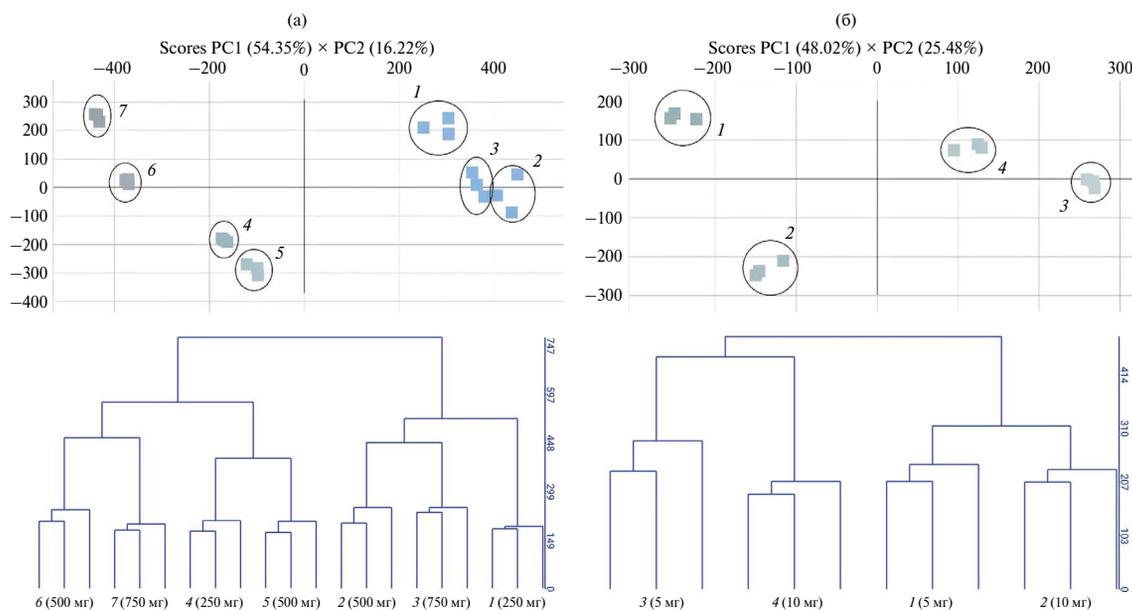


Рис. 5. Графики PCA и HCA для определения производителей лекарственных средств без упаковки. Левофлоксацин: 1–2, 3 – Лефлбакт; 4, 5 – Таваник; 6, 7 – Леволет (а). Винпоцетин: 1, 2 – Винпоцетин, Изварино Фарма; 3, 4 – Винпоцетин, Озон (б).

Таблица 2. Результаты анализа лекарственных препаратов ($n = 3$, $P = 0.95$)

| Наименование лекарственного препарата (действующее вещество/допустимые отклонения ¹) | Зависимость "измерено–предсказано" (PLS). Уравнения градуировочных зависимостей (одномерный анализ) | RMSEC, мг | Найдено, мг в таблетке | RMSEP, мг | s_r | Относительная погрешность, % |
|--|---|---|------------------------|--------------------|-------------------|------------------------------|
| PLS | | | | | | |
| Лефлобакт (250, 500, 750 мг/ ±8, ±6, ±5 %) | $y = 0.997x + 1.583^a$ $y = 0.992x + 3.851^b$ $y = 1.000x + 0.018^c$ | 11.5 ^a 17.9 ^b 1.37 ^c | 252 ± 8 ^a | 0.116 ^a | 0.01 ^a | +0.8 ^a |
| | | | 501 ± 17 ^a | 5.39 ^a | 0.01 ^a | +0.2 ^a |
| | | | 746 ± 14 ^a | 7.05 ^a | 0.01 ^a | –0.5 ^a |
| | | | 251 ± 16 ^b | 3.87 ^b | 0.03 ^b | +0.4 ^b |
| | | | 496 ± 21 ^b | 7.21 ^b | 0.02 ^b | –0.8 ^b |
| | | | 751 ± 23 ^b | 10.8 ^b | 0.01 ^b | +0.1 ^b |
| | | | 231 ± 29 ^c | 29.6 ^c | 0.05 ^c | –7.6 ^c |
| | | | 502 ± 65 ^c | 21.5 ^c | 0.05 ^c | +0.4 ^c |
| | | | 746 ± 7 ^c | 8.70 ^c | 0.01 ^c | –0.5 ^c |
| Таваник (250, 500 мг/ ±8, ±6 %) | $y = 0.996x + 1.438^a$ $y = 0.994x + 2.261^b$ | 7.74 ^a 9.71 ^b | 277 ± 6 ^a | 12.9 ^a | 0.01 ^a | +6.8 ^a |
| | | | 497 ± 14 ^a | 3.46 ^a | 0.01 ^a | –0.6 ^a |
| | | | 244 ± 29 ^b | 17.1 ^b | 0.05 ^b | –2.4 ^b |
| | | | 501 ± 5 ^b | 0.788 ^b | 0.01 ^b | +0.2 ^b |
| Леволет (500, 750 мг/ ±6, ±5%) | $y = 1.000x + 0.053^a$ $y = 0.999 + 0.350^b$ | 1.15 ^a 2.96 ^b | 508 ± 1 ^a | 7.64 ^a | 0.02 ^a | 1.6 ^a |
| | | | 744 ± 4 ^a | 5.94 ^a | 0.01 ^a | –0.8 ^a |
| | | | 496 ± 21 ^b | 13.5 ^b | 0.02 ^b | –0.8 ^b |
| | | | 746 ± 24 ^b | 1.69 ^b | 0.01 ^b | –0.5 ^b |
| Ципрофлоксацин (250, 500 мг/ ±8, ±6%) | $y = 1.000x + 0.047^a$ | 1.40 ^a | 251 ± 7 ^a | 3.62 ^a | 0.01 ^a | +0.4 ^a |
| | | | 502 ± 11 ^a | 1.999 ^a | 0.01 ^a | +0.4 ^a |
| Ципролет (250, 500 мг/ ±8, ±6%) | $y = 0.998x + 0.648^a$ | 5.20 ^a | 259 ± 10 ^a | 43.8 ^a | 0.01 ^a | +3.6 ^a |
| | | | 496 ± 7 ^a | 4.10 ^a | 0.01 ^a | –0.8 ^a |
| Цифран (250, 500 мг/ ±8, ±6%) | $y = 0.996x + 1.341^a$ | 7.47 ^a | 259 ± 3 ^a | 7.11 ^a | 0.03 ^a | +3.6 ^a |
| | | | 425 ± 9 ^a | 18.5 ^a | 0.01 ^a | –5.0 ^a |
| Офлоксацин (200, 400 мг/ ±8, ±6%) | $y = 0.999x + 0.176^a$ | 2.42 ^a | 206 ± 14 ^a | 4.96 ^a | 0.03 ^a | +3.0 ^a |
| | | | 396 ± 5 ^a | 5.94 ^a | 0.01 ^a | –1.0 ^a |
| Ибупрофен (200, 400 мг/ ±8, ±6%) | $y = 0.996x + 1.082^a$ | 6.01 ^a | 208 ± 22 ^a | 2.61 ^a | 0.04 ^a | +4.0 ^a |
| | | | 396 ± 11 ^a | 1.34 ^a | 0.01 ^a | –1.0 ^a |
| Ибупрофен Велфарм (200, 400 мг/ ±8, ±6%) | $y = 0.997x + 0.855^a$ | 5.34 ^a | 202 ± 11 ^a | 0.377 ^a | 0.02 ^a | +1.0 ^a |
| | | | 404 ± 16 ^a | 4.80 ^a | 0.02 ^a | +1.0 ^a |
| Налгезин (275, 550 мг/ ±8, ±5%) | $y = 0.998 + 0.677^a$ | 5.57 ^a | 283 ± 5 ^a | 9.15 ^a | 0.03 ^a | +2.9 ^a |
| | | | 539 ± 10 ^a | 2.80 ^a | 0.02 ^a | –2.0 ^a |
| Нексемезин (275, 550 мг/ ±8, ±5%) | $y = 0.998 + 0.990^a$ | 6.73 ^a | 281 ± 12 ^a | 8.58 ^a | 0.03 ^a | +2.2 ^a |
| | | | 548 ± 34 ^a | 17.4 ^a | 0.03 ^a | –0.4 ^a |
| Диклофенак Реневал (50, 100 мг/ ±15, ±10%) | $y = 1.000x + 0.033^a$ | 0.53 ^a | 51 ± 3 ^a | 1.97 ^a | 0.04 ^a | +2.0 ^a |
| | | | 99 ± 1 ^a | 0.158 ^a | 0.01 ^a | –1.0 ^a |
| Диклофенак, ООО "Озон" (50, 100 мг/ ±15, ±10%) | $y = 1.000x + 0.036^a$ | 0.545 ^a | 54 ± 3 ^a | 3.73 ^a | 0.07 ^a | +8.0 ^a |
| | | | 99 ± 2 ^a | 0.133 ^a | 0.01 ^a | –1.0 ^a |
| Диклофенак, "Нетофарм" (50, 100 мг/ ±15, ±10%) | $y = 0.999x + 0.100^a$ | 0.912 ^a | 51 ± 2 ^a | 0.600 ^a | 0.02 ^a | +2.0 ^a |
| | | | 98 ± 2 ^a | 2.73 ^a | 0.03 ^a | –2.0 ^a |
| Тромбостен (50,100 мг/ ±15, ±10%) | $y = 0.995x + 0.400^a$ | 1.83 ^a | 54 ± 7 ^a | 0.653 ^a | 0.05 ^a | +8.0 ^a |
| | | | 98 ± 4 ^a | 0.457 ^a | 0.02 ^a | –2.0 ^a |

Продолжение табл. 2

| Наименование лекарственного препарата (действующее вещество/допустимые отклонения ¹) | Зависимость "измерено–предсказано" (PLS). Уравнения градуировочных зависимостей (одномерный анализ) | RMSEC, мг | Найдено, мг в таблетке | RMSEP, мг | s_r | Относительная погрешность, % |
|--|---|---|---|---|--|---|
| Ацетилсалициловая кислота Кардио (50, 100 мг/ ±15, ±10%) | $y = 0.999x + 0.050^a$ | 0.646 ^a | 51 ± 1 ^a 97 ± 2 ^a | 0.476 ^a 2.38 ^a | 0.01 ^a 0.02 ^a | 0.05 ^a –3.0 ^a |
| Винпоцетин, ООО "Озон" (5, 10 мг/ ±20%) | $y = 0.999x + 0.005^a$ $y = 0.997x + 0.024^b$ | 0.0630 ^a 0.141 ^b | 5.3 ± 0.5 ^a 10.1 ± 0.3 ^a 5.1 ± 0.3 ^b 9.5 ± 0.3 ^b | 0.310 ^a 0.0310 ^a 0.134 ^b 0.378 ^b | 0.06 ^a 0.01 ^a 0.02 ^b 0.01 ^b | +6.0 ^a +1.0 ^a 0.01 ^b –5.0 ^b |
| Винпоцетин, "Изварино Фарма" (5, 10 мг/ ±20%) | $y = 1.000x + 0.003^a$ $y = 0.993x + 0.051^b$ | 0.0520 ^a 0.207 ^b | 5.5 ± 0.2 ^a 10.3 ± 0.2 ^a 5.1 ± 1.0 ^b 9.6 ± 0.3 ^b | 0.547 ^a 0.0850 ^a 0.285 ^b 0.246 ^b | 0.02 ^a 0.01 ^a 0.08 ^b 0.01 ^b | +10.0 ^a 0.01 ^a 2.0 ^b –4.0 ^b |
| Одномерный анализ (в скобках указан цветометрический канал) | | | | | | |
| Лефлобакт (250, 500, 750 мг/ ±8, ±6, ±5%) | $y = 0.011x + 222.181(B)^a$ $y = -0.028x + 150.083(R)^b$ | – | 247 ± 3 ^a 511 ± 4 ^a 746 ± 126 ^a 237 ± 50 ^b 507 ± 50 ^b 764 ± 50 ^b | – | 0.01 ^a 0.01 ^a 0.07 ^a 0.09 ^b 0.04 ^b 0.03 ^b | –1.2 ^a 2.2 ^a –0.5 ^a –5.2 ^b 1.4 ^b 1.9 ^b |
| Таваник (250, 500 мг/ ±8, ±6%) | $y = 0.034x + 141.309(B)^a$ $y = -0.072x + 206.870(R)^b$ | – | 246 ± 43 ^a 503 ± 42 ^a 244 ± 20 ^b 491 ± 20 ^b | – | 0.07 ^a 0.03 ^a 0.03 ^b 0.02 ^b | –1.6 ^a 0.6 ^a –2.4 ^b –1.8 ^b |
| Леволет (500, 750 мг/ ±6, ±5%) | $y = -0.050x + 196.696(B)^a$ $y = -0.090x + 220.919(R)^b$ | – | 496 ± 29 ^a 753 ± 27 ^a 513 ± 28 ^b 755 ± 16 ^b | – | 0.02 ^a 0.01 ^a 0.02 ^b 0.01 ^b | –0.8 ^a 0.4 ^a 2.6 ^b 0.7 ^b |
| Ципрофлоксацин (250, 500 мг/ ±8, ±6%) | $y = 0.126x + 127.145(B)^a$ | – | 248 ± 11 ^a 502 ± 11 ^a | – | 0.02 ^a 0.01 ^a | –0.8 ^a +0.4 ^a |
| Ципролет (250, 500 мг/ ±8, ±6%) | $y = -0.025x + 197.892(B)^a$ | – | 255 ± 34 ^a 505 ± 33 ^a | – | 0.05 ^a 0.03 ^a | +2.0 ^a +1.0 ^a |
| Цифран (250, 500 мг/ ±8, ±6%) | $y = 0.097x + 129.933(B)^a$ | – | 252 ± 15 ^a 509 ± 15 ^a | – | 0.02 ^a 0.01 ^a | +0.8 ^a +1.8 ^a |
| Офлоксацин (200, 400 мг/ ±8, ±6%) | $y = 0.135x + 139.055(B)^a$ | – | 21 ± 11 ^a 408 ± 18 ^a | – | 0.02 ^a 0.02 ^a | +5.0 ^a +2.0 ^a |
| Ибупрофен (200, 400 мг/ ±8, ±6%) | $y = -0.060x + 162.785(R)^a$ | – | 192 ± 24 ^a 392 ± 24 ^a | – | 0.05 ^a 0.02 ^a | –4.0 ^a –2.0 ^a |
| Ибупрофен Велфарм (200, 400 мг/ ±8, ±6%) | $y = -0.073x + 187.379(B)^a$ | – | 202 ± 20 ^a 396 ± 20 ^a | – | 0.04 ^a 0.02 ^a | 0.04 ^a –1.0 ^a |
| Налгезин (275, 550 мг/ ±8, ±5%) | $y = 0.066x + 135.895(B)^a$ | – | 244 ± 38 ^a 547 ± 65 ^a | – | 0.06 ^a 0.05 ^a | –11.3 ^a –0.5 ^a |
| Нексемезин (275, 550 мг/ ±8, ±5%) | $y = -0.052x + 196.199(B)^a$ | – | 278 ± 27 ^a 534 ± 27 ^a | – | 0.04 ^a 0.02 ^a | +1.1 ^a –2.9 ^a |
| Диклофенак Реневал (50, 100 мг/ ±15, ±10%) | $y = -0.257x + 217.362(B)^a$ | – | 52 ± 10 ^a 95 ± 10 ^a | – | 0.07 ^a 0.04 ^a | +4.0 ^a –5.0 ^a |

Окончание табл. 2

| Наименование лекарственного препарата (действующее вещество/допустимые отклонения ¹) | Зависимость "измерено–предсказано" (PLS). Уравнения градуировочных зависимостей (одномерный анализ) | RMSEC, мг | Найдено, мг в таблетке | RMSEP, мг | s_r | Относительная погрешность, % |
|--|---|-----------|--|-----------|--|--|
| Диклофенак, ООО "Озон" (50, 100 мг/ ±15, ±10%) | $y = -0.715x + 226.835(R)^a$ | – | 52 ± 3 ^a 98 ± 4 ^a | – | 0.03 ^a 0.02 ^a | 0.03 ^a –2.0 ^a |
| Диклофенак, "Немофарм" (50, 100 мг/ ±15, ±10%) | $y = -0.151x + 178.616(R)^a$ | – | 46 ± 9 ^a 95 ± 10 ^a | – | 0.08 ^a 0.04 ^a | –8.0 ^a –5.0 ^a |
| Тромбостен (50, 100 мг/ ±15, ±10%) | $y = -0.233x + 195.045(R)^a$ | – | 47 ± 1 ^a 96 ± 22 ^a | – | 0.01 ^a 0.09 ^a | –6.0 ^a –4.0 ^a |
| Ацетилсалициловая кислота Кардио (50, 100 мг/ ±15, ±10%) | $y = 0.474x + 169.125(G)^a$ | – | 52 ± 3 ^a 102 ± 3 ^a | – | 0.02 ^a 0.01 ^a | 0.03 ^a +2.0 ^a |
| Винпоцетин, ООО "Озон" (5, 10 мг/ ±20%) | $y = 3.108x + 163.947(B)^a$ $y = -2.891x + 233.043(B)^b$ | – | 5.3 ± 0.5 ^a 10.3 ± 0.8 ^a 5.1 ± 0.5 ^b 10.3 ± 1.7 ^b | – | 0.04 ^a 0.03 ^a 0.04 ^b 0.07 ^b | +6.0 ^a +3.0 ^a +2.0 ^b +3.0 ^b |
| Винпоцетин, "Изварино Фарма" (5, 10 мг/ ±20%) | $y = -3.505x + 180.266(B)^a$ $y = -2.011x + 241.853(B)^b$ | – | 5.1 ± 0.4 ^a 10.2 ± 0.4 ^a 4.7 ± 0.7 ^b 10.5 ± 1.4 ^b | – | 0.03 ^a 0.02 ^a 0.06 ^b 0.05 ^b | +2.0 ^a +2.0 ^a –6.0 ^b +5.0 ^b |

¹Приказ Министерства здравоохранения РФ от 26 октября 2015 г № 751н.^aАнализ в блистерной упаковке, ^bбез упаковки, ^cанализ методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье в блистерной упаковке.

* * *

Продемонстрировано применение ИК-устройства, напечатанного на 3D-принтере, и приложения PhotoMetrix Pro[®] для смартфонов в анализе лекарственных средств. Используются алгоритмы хемометрики – методы главных компонент, наименьших квадратов, частичной регрессии наименьших квадратов и иерархический кластерный анализ для определения концентрации действующего вещества и установления производителя лекарственной продукции. Концентрацию действующего вещества в таблетках определяли методами одномерного и многомерного анализа. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0.09. Равноточность результатов анализа подтверждена использованием метода ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета ФГБУ "Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кор-

мов". Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Косенко В.В., Трапкова А.А., Тарасова С.А. Организация государственного контроля качества лекарственных средств на базе федеральных лабораторных комплексов // Вестник Росздравнадзора. 2012. № 6. С. 17.
2. Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Романов Б.К. Проблемы использования метода БИК-спектрометрии для установления подлинности действующего вещества в лекарственных препаратах // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2021. № 11(1). С. 49.
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-1-49-54>
3. Балыклова К.С., Титова А.В., Садчикова Н.П., Родионова О.Е., Шишова Е.Ю., Скударева Е.Г., Горпинченко Н.В. Анализ таблеток ацетилсали-

- циловой кислоты методом ИК-спектроскопии в ближней области // Вестник Росздравнадзора. 2013. № 2. С. 62.
4. *Басова Е.М., Литвиненко Ю.Н., Полотнянко Н.А.* Определение производителей лекарственных препаратов с применением ИК-спектроскопии и метода главных компонент // Вестник международного университета природы, общества и человека "Дубна". 2019. Т. 43. № 2. С. 7.
 5. *Басова Е.М., Полотнянко Н.А.* Стратегия выявления возможной фальсификации лекарственных препаратов на примере таблеток "Ацетилсалициловая кислота" и "Парацетамол" // Вестник международного университета природы, общества и человека "Дубна". 2020. Т. 49. № 4. С. 3.
 6. *Моногарова О.В., Осколок К.В., Аняри В.В.* Цветометрия в химическом анализе // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 11. С. 857.
<https://doi.org/10.1134/S0044450218110063>
 7. *Аняри В.В., Горбунова М.В., Исаченко А.И., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А.* Использование бытовых цветорегистрирующих устройств в количественном химическом анализе // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 11. С. 963.
<https://doi.org/10.7868/S0044450217110019>
 8. *Иванов В.М., Кузнецова О.В.* Химическая цветометрия: возможности метода, области применения и перспективы // Успехи химии. 2001. Т. 70. № 5. С. 411.
<https://doi.org/10.1070/RC2001v070n05ABEH000636>
 9. *Huang X., Xu D., Chen J., Liu J., Li Y., Song J., Ma X., Guo J.* Smartphone-based analytical biosensors // *Analyst*. 2018. V. 143. P. 5330.
<https://doi.org/10.1039/c8an01269e>
 10. *Rezazadeh M., Seidi Sh., Lid M., Pedersen-Bjergaard S., Yamini Y.* The modern role of smartphones in analytical chemistry // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 118. P. 548.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.019>
 11. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С.* Твердофазно-флуориметрическое определение тетрациклинов в лекарственных препаратах на целлюлозной бумаге и тонком слое силикагеля с использованием смартфона // *Хим.-фарм. журн.* 2021. Т. 55. № 3. С. 52. (*Amelin V.G., Shogah Z.A.C., Bolshakov D.S.* Solid-phase fluorimetric determination of tetracyclines in medicinal preparations on cellulose paper and in thin-layer silica gel using a smartphone // *Pharm. Chem. J.* 2021. V. 55. № 3. P. 964.)
 12. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С.* Твердофазно-флуориметрическое определение хинолонов на целлюлозной бумаге и в тонком слое силикагеля в лекарственных препаратах с использованием смартфона // *Журн. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 7. С. 593. (*Amelin V.G., Shogah Z.A.C., Bolshakov D.S.* Solid-phase-fluorimetric determination of quinolones in medicinal preparations on cellulose paper and in a thin silica layer using a smartphone // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. P. 797.)
 13. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С., Третьяков А.В.* Цифровая цветометрия индикаторных тест-систем с использованием смартфона и хемометрического анализа при определении хинолонов в лекарственных препаратах // *Журн. прикл. спектроскопии.* 2022. Т. 89. № 1. С. 84.
 14. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С.* Твердофазно-флуориметрическое определение некоторых нестероидных противовоспалительных средств в лекарственных препаратах с использованием смартфона // *Хим.-фарм. журн.* 2021. Т. 55. № 9. С. 54. (*Amelin V.G., Shogah Z.A.C., Bolshakov D.S.* Solid-phase fluorimetric determination of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs in medicines with the aid of a smartphone // *Pharm. Chem. J.* 2021. V.55. № 9. P.964.)
 15. *Böck F.C., Helfer G.A., da Costa A.B., Dessuy M. B., Ferrão M. F.* PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones // *J. Chemometrics.* 2020. V. 34. P. 1.
<https://doi.org/10.1002/cem.3251>
 16. *Helfer G.A., Magnus V.S., Böck F.C., Teichmann A., Ferrão M.F., da Costa A.B.* PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices // *J. Braz. Chem.* 2017. V. 28. P. 328.
<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160182>
 17. *Ratani G., Dario P., Cavall F.* Smartphone-based food diagnostic technologies: A Review // *Sensors.* 2017. V. 17. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/s17061453>
 18. *Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Третьяков А.В.* Анализ молочной продукции: определение массовой доли молочного жира и выявление фальсификации смартфоном с приложением PhotoMetrix PRO® // *Журн. аналит. химии.* 2024. Т. 79. № 1. С. 50.
 19. *Родионова О.Е., Померанцев А.Л.* Хемометрика: достижения и перспективы // *Успехи химии.* 2006. Т. 75. № 4. С. 302.
<https://doi.org/10.1070/RC2006v075n04ABEH003599>

IDENTIFICATION OF MANUFACTURERS AND DETERMINATION OF ACTIVE INGREDIENTS IN MEDICINAL PRODUCTS USING A COLORIMETRIC METHOD IN THE NEAR-IR RANGE WITH A SMARTPHONE

V. G. Amelin^{a,b*}, O. E. Emelyanov^a, A. V. Tretyakov^b

^a *Vladimir State University named after Alexander Grigoryevich and Nikolai Grigoryevich Stoletov, 60000, Vladimir, Russia*

^b *The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 123022, Moscow, Russia*

**e-mail: amelinvg@mail.ru*

Received 26 July, 2023

Revised 30 August, 2023

Accepted 30 August, 2023

Abstract. A non-destructive method for analyzing medicinal products (non-steroidal anti-inflammatory drugs, fluoroquinolones, acetylsalicylic acid, vinpocetine, tetracyclines) based on diffuse reflection of IR radiation using a smartphone and a device printed on a 3D printer is proposed. It was established that the diffuse reflection of IR radiation (850 nm) from tabletized medicinal products can be recorded using a smartphone camera. Blister packaging and tablet coating slightly reduce the intensity of the diffuse light reflection signal at a wavelength of 850 nm, as confirmed by a comparative analysis of colorimetric measurement results in medicinal product samples inside the packaging, outside the packaging, and on tablet fractures. A correlation between the analytical signal and the concentration of the active substance is observed regardless of the study variant. The data array was processed using principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), partial least squares regression (PLS), and least squares methods using PhotoMetrix PRO® software for smartphones. It is shown that these algorithms can identify drugs by their manufacturer and determine the concentration of active ingredients. The colorimetric signals from tablets of a single manufacturer form separate clusters on dendrograms created using the HCA algorithm. Data obtained using PCA indicate the location of signals from tablets of different manufacturers in separate quadrants, facilitating the identification of the pharmaceutical company. The use of chemometric analysis methods for determining the concentration of the active substance is considered.

Keywords: medicinal products, digital colorimetry in the near-IR range, smartphone, non-destructive analysis.

УДК 543.426:543.8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОРФЛОКСАЦИНА МЕТОДОМ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТЕРБИЯ В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И МИЦЕЛЛ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2024 г. Т. Д. Смирнова*, Е. А. Алябьева, Н. А. Юрасов

^aСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Институт химии

ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012, Россия

*E-mail: smirnovatd@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 31.10.2023 г.

Изучено влияние наночастиц серебра и мицелл ПАВ при совместном присутствии на интенсивность сигнала сенсibilизированной флуоресценции комплекса норфлоксацина с ионом Tb³⁺. Показано, что интенсивность собственной флуоресценции норфлоксацина и его комплекса с ионами Tb³⁺ в присутствии наночастиц серебра незначительно уменьшается. Установлено, что в присутствии мицелл додецилсульфата происходит модификация поверхности наночастиц серебра, которая сопровождается изменением ζ-потенциала нанокластеров. Добавки модифицированных ПАВ наночастиц серебра к водным растворам хелата тербия способствуют возрастанию интенсивности сенсibilизированной флуоресценции в 11 раз. Увеличение эффективности внутримолекулярного переноса энергии в комплексе Tb³⁺ с норфлоксацином в присутствии наночастиц серебра и мицелл додецилсульфата позволило предложить способ флуориметрического определения антибиотика в природной воде в диапазоне концентраций 2×10^{-7} – 1×10^{-5} М. Уравнение градуировочного графика $y = 1.0 \times 10^7 x - 1.0$, $R^2 = 0.991$, предел обнаружения 5×10^{-8} М (3σ).

Ключевые слова: норфлоксацин, тербий, сенсibilизированная флуоресценция, наночастицы серебра, поверхностно-активные вещества, мицеллы.

DOI: 10.31857/S0044450224050098 EDN: usrhcj

Широкое применение антибиотиков в различных сферах деятельности не всегда оправдано и может пагубно влиять на организм человека, вызывая резистентность к антибактериальным препаратам [1]. Норфлоксацин (НОР) является представителем антибиотиков группы фторхинолонов третьего поколения, содержит атом фтора и пиперазиновый фрагмент (схема 1).

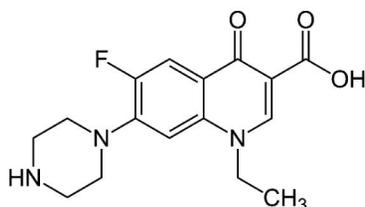


Схема 1. Структурная формула норфлоксацина.

Это одно из наиболее важных антибактериальных средств, используемых в медицине и ветеринарии. Обнаружение и контроль содержания антибиотиков в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, лекарственных препаратах остается одним из актуальных вопросов в аналитической химии. Для определения норфлоксацина наиболее часто используют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии [2, 3], капиллярного электрофореза [4, 5], спектрофотометрии [6], электрохимического анализа [7]. Успешной альтернативой известным методам является доступный, простой и высокочувствительный спектрофлуориметрический метод, развитие которого в последние годы связано с применением сенсibilизированной флуоресценции, организованных сред и наночастиц благород-

ных металлов [8], улучшающих люминесцентные свойства определяемых аналитов. Сенсибилизированная люминесценция ионов РЗЭ характеризуется большим стоксовым сдвигом, узкой высокоинтенсивной полосой излучения и обеспечивает высокоселективное и чувствительное определение фторхинолонов. При определении фторхинолонов значительное внимание уделяется использованию комплексов ионов Tb³⁺ в связи с характерной для этого иона большой энергетической щелью между возбужденным и основным состояниями. Важным фактором, повышающим интенсивность флуоресценции, является солюбилизация хелатов антибиотиков в наноразмерном объеме мицелл ПАВ, микроэмульсий, циклодекстринов [9]. Использование наноматериалов во флуориметрическом анализе основано на уникальных оптических свойствах, развитой высокоактивной поверхности наночастиц [10]. Нанокластеры легко функционализируются, что является основанием создания различных наноразмерных устройств для химического анализа [11–13]. Однако характер влияния наночастиц благородных металлов на интенсивность флуоресценции органической молекулы зависит от их формы, размера, концентрации, кислотности среды, природы используемого буферного раствора.

Цель настоящей работы – изучение влияния наночастиц серебра в мицеллярных растворах поверхностно-активных веществ на эффективность переноса энергии в комплексе норфлоксацина с ионами Tb³⁺ и применение такой системы для флуориметрического определения антибиотика.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Оптическую плотность растворов и электронные спектры поглощения в видимой и УФ- области спектра регистрировали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Оптическую плотность измеряли относительно раствора сравнения, содержащего все компоненты, кроме исследуемого.

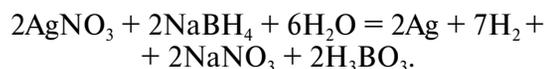
Спектры флуоресценции регистрировали при помощи спектрофлуориметра CM 2203 (ЗАО "SOLAR", Республика Беларусь) с источником возбуждения – импульсной ксеноновой лампой. Ширина щели возбуждения 10 нм, флуоресценции 20 нм. Скорость регистрации спектров 75 нм/мин. Измерения проводили в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. Сигнал регистрировали под углом 90° к возбуждающему свету. В качестве критерия эффективности переноса энергии использовали параметр интенсивности флуоресценции.

Размер и ζ-потенциал наночастиц серебра измеряли с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Значение pH контролировали на pH-метре (pH-673 M) со стеклянным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения.

Реагенты. Норфлоксацин (Merck, Германия), содержание основного вещества не менее 98%; кислота уксусная, ГОСТ 61-75, х. ч.; гидроксид натрия, 0.1 М фиксанал; 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); борогидрид натрия, х. ч., (РеаХим, Россия); хлорид тербия(III) шестиводный, 99.9%, (AcrosOrganics, Бельгия); поверхностно-активные вещества, содержание не менее 98%: додецилсульфат натрия (ДДС) (AppliChem, Германия), Бридж-35 (Merck, Германия), додецилбензолсульфонат натрия (Sigma, Германия), хлорид цетилпиридиния (Merck, Германия); ацетатно-аммиачные буферные растворы готовили из 2 М уксусной кислоты и 2 М раствора аммиака.

Синтез наночастиц серебра (НЧAg) проводили борогидридным методом, в качестве стабилизатора выступал цитрат-ион. Методика получения [14]: при перемешивании 1 мл водного раствора AgNO₃ (10 мМ), 1 мл цитрата (500 мМ) добавляли 47 мл H₂O, в течение 10 мин перемешивали при комнатной температуре, добавляли 600 мкл NaBH₄ (10 мМ). Реакция восстановления продолжалась 30 мин, реакционную смесь оставляли в холодильнике на 8–9 ч для завершения роста наночастиц:



Концентрацию наночастиц c (М) рассчитывали по формуле [15]:

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

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/см³ – плотность серебра.

Методика отличается простотой и возможностью получения наночастиц определенного размера. В качестве стабилизатора коллоидного раствора использовали цитрат-ион, который адсорбируется на поверхности наночастиц и позволяет контролировать их размер. По данным просвечивающей электронной микроско-

пии наночастицы имели сферическую форму и относительно узкий диапазон распределения по размерам со средним диаметром 7 ± 2 нм, ζ -потенциал -30 мВ, который свидетельствует о достаточно высокой стабильности зольей. Нами установлено, что в течение двух недель характеристики наночастиц оставались без изменений. Спектры поглощения синтезированных наночастиц содержали полосу поверхностного плазмонного резонанса (ППР) при $\lambda = 410$ нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние наночастиц серебра на флуоресцентные свойства норфлоксацина. В зависимости от кислотности среды, норфлоксацин при pH 6–9 участвует в протолитических процессах и может не только отдавать протон, принадлежащий карбоксильной группе, но и присоединять до двух протонов с участием атомов кислорода карбонильной группы и атома азота пиперазинового кольца, образуя цвиттер-ионы [15]. Спектры поглощения антибиотика включают две различные по интенсивности полосы при 275 и 340 нм. Спектр флуоресценции характеризуется широкой полосой в области 410–450 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 275$ нм).

Известно, что основными условиями эффективного резонансного переноса энергии в системах, содержащих наночастицы благородных

металлов и флуорофор, являются перекрытие полос спектров ППР наночастиц и флуоресценции органической молекулы, а также минимальное расстояние 50–250 Å между донором и акцептором [16]. Как видно из рис. 1а, первое условие переноса энергии для норфлоксацина и наночастиц серебра выполняется, поэтому при введении в раствор антибиотика добавок нанокластеров наблюдается незначительное тушение эмиссии норфлоксацина (рис. 1б).

Взаимодействие норфлоксацина с ионами Tb^{3+} . При комплексообразовании ионов Tb^{3+} с фторхинолоном наиболее вероятна бидентатная координация иона металла через атомы кислорода депротонированной карбоксильной и карбонильной групп. Образование комплекса с переносом энергии сопровождается появлением в спектре флуоресценции норфлоксацина ($\lambda_{\text{возб}} = 275$ нм) новых полос сенсibilизированной флуоресценции ионов Tb^{3+} при 490, 545, 585 и 620 нм, соответствующих переходам ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_6$, ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_5$, ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_4$ и ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_3$ в ионе комплексообразователя [15]. Возрастание сигнала сенсibilизированной флуоресценции в шесть раз при увеличении концентрации иона металла на порядок сопровождается двукратным уменьшением интенсивности собственной флуоресценции норфлоксацина, что подтверждает внутримолекулярный перенос энергии возбуждения с триплетного уровня лиганда антибиотика (21275 см^{-1}) на резонансный уровень иона Tb^{3+} (20500

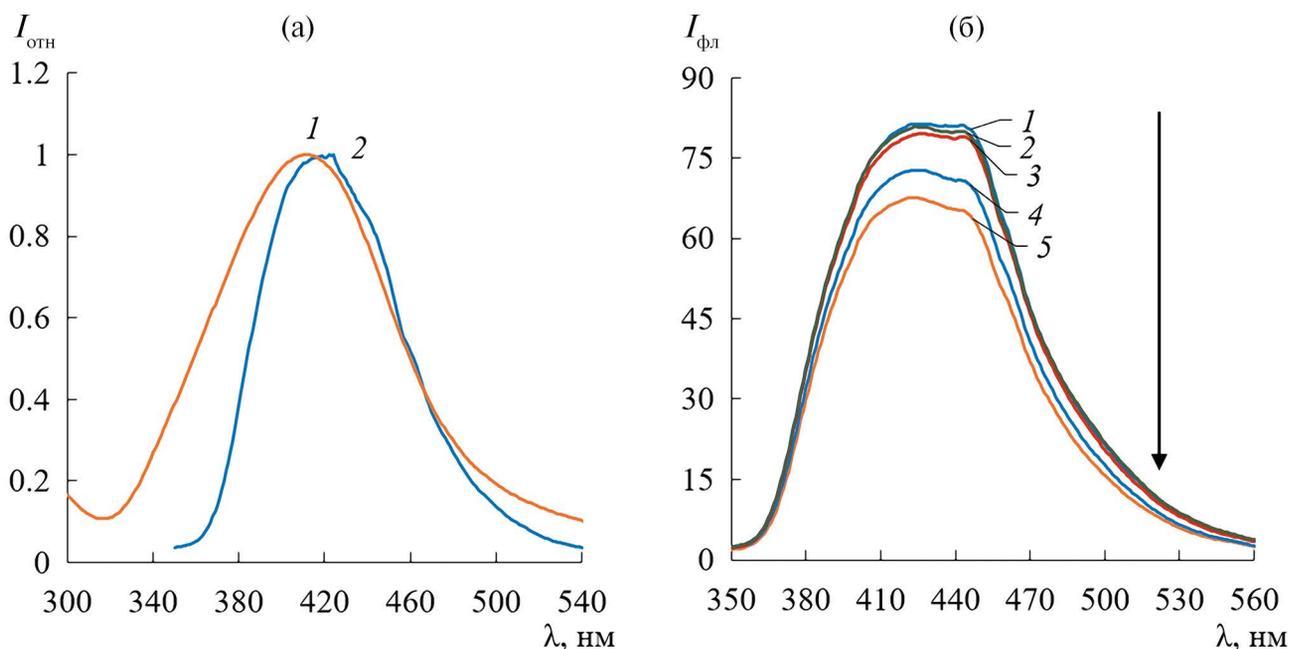


Рис. 1. (а) Приведенные спектры поверхностного плазмонного резонанса наночастиц серебра (1) и собственной флуоресценции норфлоксацина (2). $c_{\text{НОР}} = 1.0 \times 10^{-6}$ М, $C_{\text{НЧАг}} = 5.0 \times 10^{-9}$ М, $\lambda_{\text{возб}} = 275$ нм; (б) спектры флуоресценции норфлоксацина в присутствии возрастающей концентрации НЧАг: $c_{\text{НЧАг}} = 0$ (1), 3.3×10^{-9} М (2), 5.0×10^{-9} М (3), 2.0×10^{-8} М (4); $c_{\text{НОР}} = 1.0 \times 10^{-5}$ М; pH 7.0; $\lambda_{\text{возб}} = 275$ нм.

см⁻¹). Сигнал максимальной сенсibilизированной флуоресценции при 545 нм соответствует сверхчувствительному переходу ⁵D₄ → ⁷F₅ (рис. 2). Согласно данным [15] соотношение компонентов в исследуемом комплексе Tb³⁺: НОР = 1 : 2 или 1 : 3. В условиях избытка иона-комплексобразователя возможно преобладание в растворе хелата с соотношением компонентов 1 : 2, что позволяет реализоваться эффекту антенны.

Невысокая эффективность переноса энергии в образующемся неустойчивом комплексе может быть увеличена в мицеллярных растворах некоторых поверхностно-активных веществ.

Установлено, что при возбуждении аналитической системы при λ = 340 нм, соответствующей поглощению пиперазинового заместителя, сигнал сенсibilизированной флуоресценции практически не проявляется.

Комплексообразование норфлоксацина с ионами Tb³⁺ зависит от кислотности среды (рис. 3). Оптимальными условиями образования комплекса с переносом энергии являются рН 6.0–7.5 в среде ацетатно-аммиачного буферного раствора.

Влияние наночастиц серебра на сенсibilизированную флуоресценцию. В присутствии наночастиц серебра в растворе хелата Tb³⁺ наблюдается уменьшение на порядок сигнала сенсibilизированной флуоресценции и в два раза – собственной флуоресценции норфлоксацина, что связано с переносом энергии возбуждения как от лиганда, так и от иона-комплекс-

образователя на нанокластеры серебра (рис. 4а). В качестве донора энергии выступает уже не сам фторхинолон, а его комплекс с ионами Tb³⁺. Как видно из рис. 4б, выполняется основное условие реализации переноса энергии возбуждения на наночастицы серебра – перекрывание спектров флуоресценции хелата и поверхностного плазмонного резонанса нанокластеров серебра.

Зависимость Штерна – Фольмера. Данные по тушению обычно представляют в виде графиков Штерна – Фольмера, т.е. зависимости I₀/I от концентрации тушителя. Согласно уравнению Штерна – Фольмера ожидается, что этот график линеен в случае динамического или статического процесса тушения: I₀/I = 1 + K_{SV}[НЧАg], где I₀ и I – интенсивности флуоресценции флуорофора в отсутствие и в присутствии тушителя, в нашем случае – НЧАg, K_{SV} – постоянная Штерна – Фольмера, которая свидетельствует об эффективности тушения, [НЧАg] – концентрация тушителя. В случае норфлоксацина нами не установлена линейная зависимость тушения флуоресценции антибиотика наночастицами серебра. Для тушения флуоресценции комплекса график Штерна – Фольмера линеен в диапазоне концентраций наночастиц 5 × 10⁻⁹–3 × 10⁻⁸ М (рис. 5). Поскольку константы Штерна – Фольмера широко используются в литературе как мера тушения, мы рассчитали K_{SV}, значение которой составило (1.7 ± 0.3) × 10⁷ М⁻¹. Увеличение эффективности переноса энергии возбуждения в случае, когда в качестве донора выступает

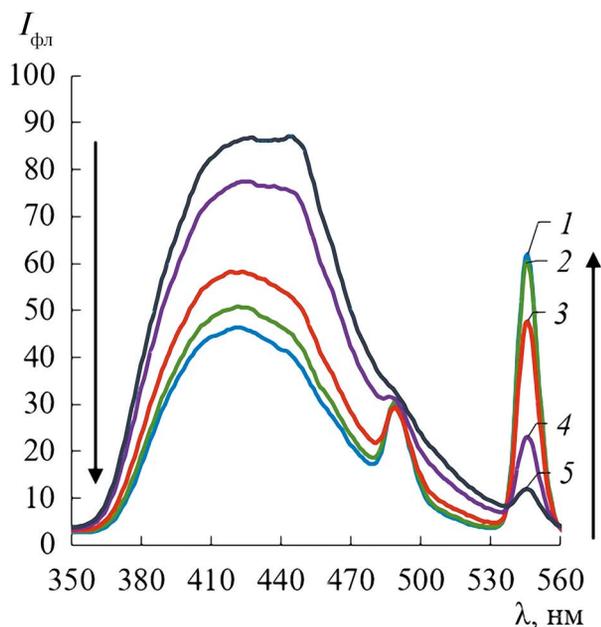


Рис. 2. Спектр флуоресценции норфлоксацина в присутствии возрастающей концентрации ионов Tb³⁺, М: 1.0 × 10⁻⁴ (1), 8.0 × 10⁻⁵ (2), 5.0 × 10⁻⁵ (3), 2.0 × 10⁻⁵ (4), 1.0 × 10⁻⁵ (5); c_{НОР} = 1.0 × 10⁻⁵ М; рН 7.0; λ_{возб} = 275 нм.

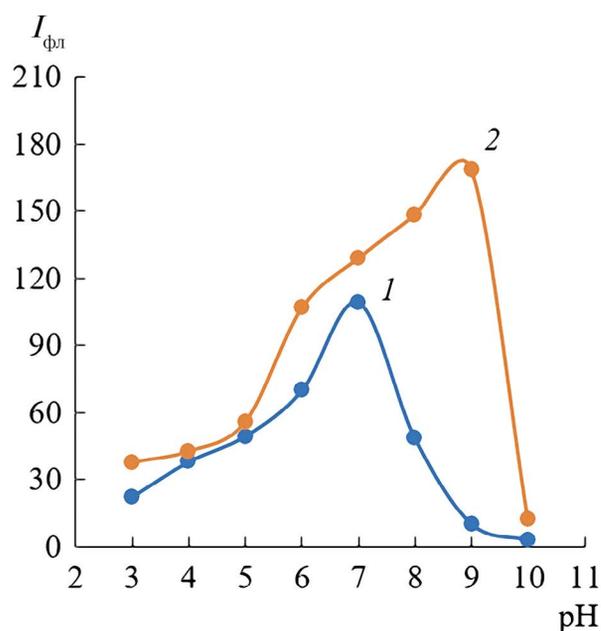


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса НОР–Тb³⁺ от рН среды в отсутствие (1) и в присутствии мицелл ДДС (2). c_{НОР} = 1.0 × 10⁻⁶ М, c_{Tb3+} = 1.0 × 10⁻⁴ М, c_{ДДС} = 1.0 × 10⁻² М, λ_{возб} = 275 нм, λ_{фл} = 545 нм.

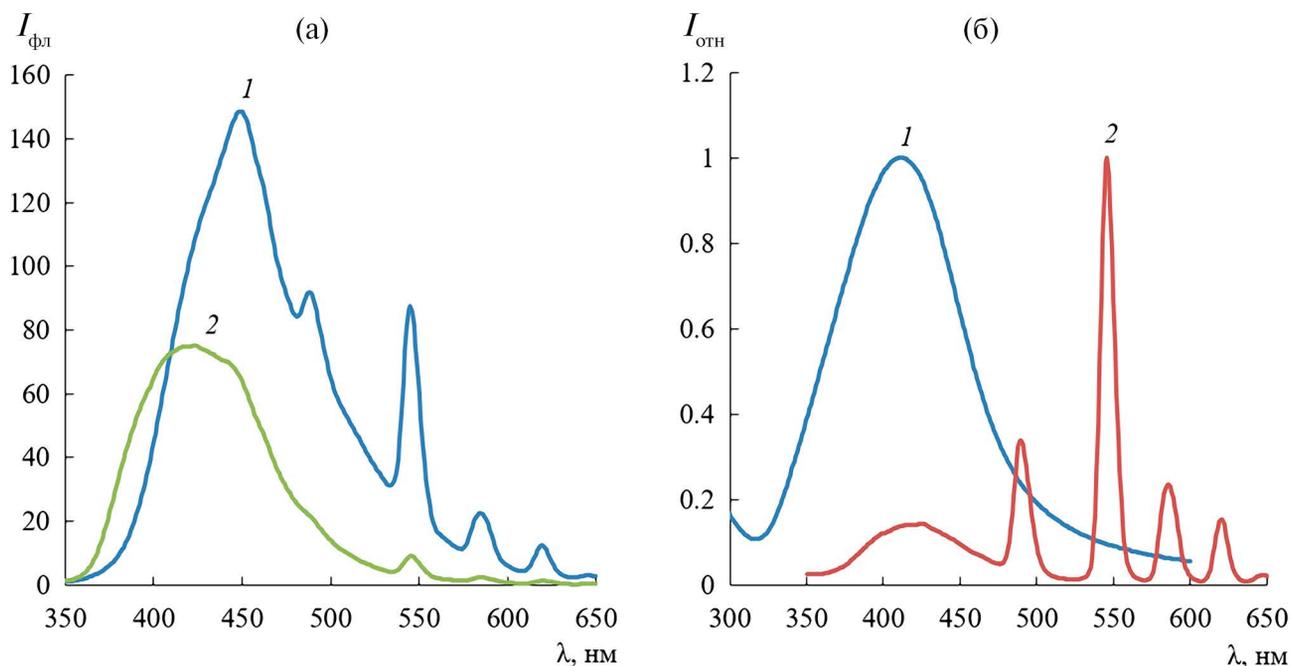


Рис. 4. (а) Спектры флуоресценции комплекса Tb^{3+} –НОР (I) в присутствии НЧАг (2): $c_{НЧАг} = 3.3 \times 10^{-8}$ М, $c_{НОР} = 1.0 \times 10^{-6}$ М, $c_{Tb^{3+}} = 1.0 \times 10^{-4}$ М, рН 9.0, $\lambda_{возб} = 275$ нм; (б) перекрытие приведенных спектров сенсibilизированной флуоресценции (2) и ППР(I).

комплекс, возможно, связано с сокращением расстояния между донором и акцептором в результате проявления дополнительных электростатических взаимодействий остаточного положительного заряда комплекса и отрицательно заряженной поверхностью наночастицы.

Влияние природы мицелл поверхностно-активных веществ. Одним из факторов увеличения собственной флуоресценции норфлоксацина является солюбилизация антибиотика в мицеллы ПАВ, которая способствует дегидратации и образованию более жесткой структуры флуоресцирующего центра. Эффективность процесса зависит от кислотности среды и состояния флуорофора в растворе. Нами показано, что в присутствии анионного ПАВ додецилсульфата натрия солюбилизация норфлоксацина способствует увеличению интенсивности собственной флуоресценции антибиотика в 3.4 раза и обусловлена главным образом гидрофобным взаимодействием с углеводородным радикалом молекул анионных ПАВ. Мицеллы неионогенного ПАВ Тритон Х-100 не оказывают влияния на флуоресценцию. Мицеллы катионного ПАВ хлорида цетилпиридиния уменьшают в 1.5 раза сигнал эмиссии в нейтральной и слабощелочной среде.

Интенсивность сенсibilизированной флуоресценции хелата Tb^{3+} с норфлоксацином также зависит от природы мицелл поверхностно-активного вещества. В присутствии мицелл катионного ПАВ хлорида цетилпиридиния сигнал уменьша-

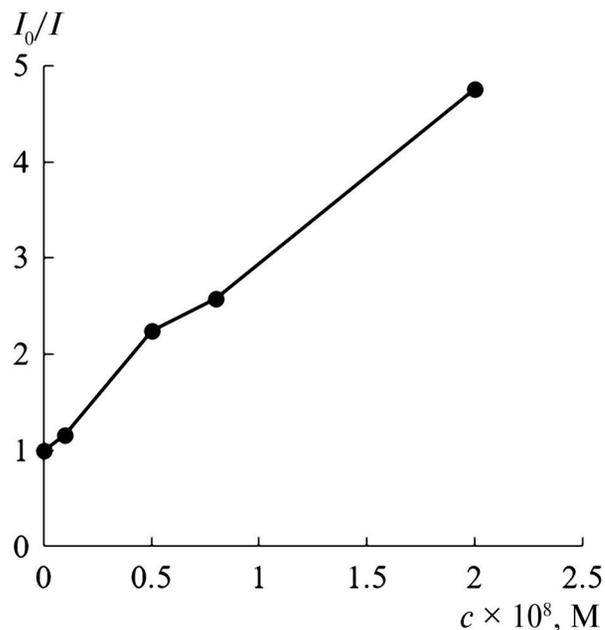


Рис. 5. Зависимость Штерна – Фольмера. Тушение флуоресценции комплекса Tb^{3+} –НОР в присутствии наночастиц серебра.

ется в три раза ввиду электростатических препятствий солюбилизации комплекса в мицеллу с положительно заряженной поверхностью. Добавки мицелл неионогенных ПАВ Тритон Х-100 и Твин-80 способствуют уменьшению интенсивности сенсibilизированной флуоресценции в полтора

раза. Введение в раствор хелата мицелл анионного додецилсульфата сопровождается возрастанием сигнала флуоресценции при рН 7–9 в пять раз (рис. 6). Особенность влияния анионных ПАВ на интенсивность флуоресценции хелата тербия проявляется в способности отрицательно заряженных мицелл концентрировать на своей поверхности хелат с остаточным положительным зарядом и эффективной солюбилизацией его в мицеллу. Расширение области кислотности комплексообразования в присутствии мицелл можно связать с изменением протолитических свойств лигандов в мицеллярной среде [10]. Процесс солюбилизации, дегидратации координационно ненасыщенных комплексов в менее полярной среде мицелл, удаление молекул воды из ближайшего окружения иона комплексообразователя способствуют росту интенсивности сенсibilизированной флуоресценции. Не исключено вхождение анионов поверхностно-активного вещества в качестве второго лиганда в координационную сферу иона-комплексообразователя, что также способствует росту интенсивности аналитического сигнала. Интенсивность флуоресценции хелата зависит от концентрации ДДС и максимальна при значении 1×10^{-2} М.

Влияние наночастиц серебра на флуоресцентные свойства комплекса Tb^{3+} с норфлоксацином в мицеллярных растворах додецилсульфата натрия. В присутствии наночастиц серебра и мицелл ДДС интенсивность сенсibilизированной флуоресценции комплекса норфлоксацина с ио-

нами Tb^{3+} не только не уменьшается, но возрастает в 11 раз по сравнению с хелатом в водной среде (рис. 6). Сигнал сенсibilизированной флуоресценции зависит от кислотности среды и максимален при рН 9. Нами установлено, что в присутствии анионов ДДС происходит модификация поверхности наночастицы серебра, которая сопровождается увеличением ζ -потенциала от -30 до -78 мВ. Можно предположить, что в присутствии мицелл ДДС подавляется процесс резонансного переноса энергии возбуждения от комплекса Tb^{3+} с норфлоксацином на наночастицы серебра в связи с возможным увеличением радиуса модифицированной наночастицы и расстояния между донором и акцептором. Возрастание сенсibilизированной флуоресценции в аналитической системе связано с проявлением уникальных свойств поверхностной активности нанокластеров серебра и сорбции на модифицированной поверхности ДДС и хелата Tb^{3+} с норфлоксацином. Дополнительное усиление сигнала флуоресценции в присутствии нанокластеров, возможно, является результатом влияния адсорбированных на поверхности наночастиц мицелл и ионов ДДС на окружение флуоресцирующего центра, которое способствует уменьшению гидратации иона-комплексообразователя и лиганда, экранированию от посторонних тушителей, сближению компонентов аналитической реакции, повышению эффективности внутримолекулярного переноса энергии, подавлению процесса диссипации энергии возбуждения (рис. 7).

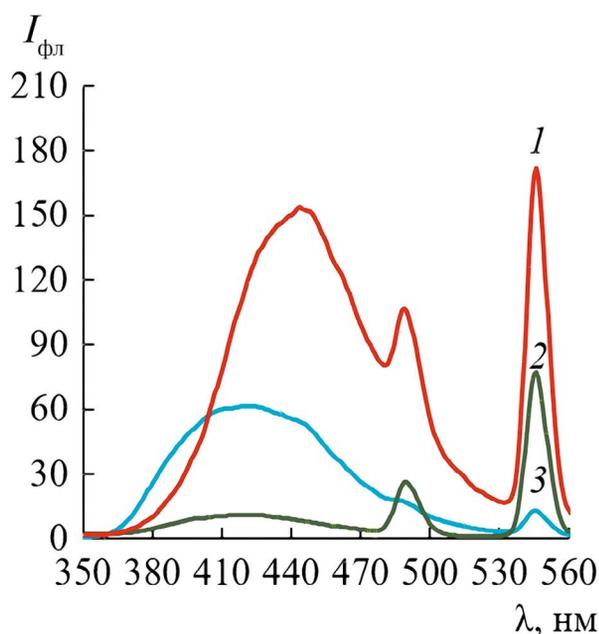


Рис. 6. Спектры флуоресценции НОР + Tb^{3+} + ДДС + НЧА_g (1), НОР + Tb^{3+} + ДДС (2), НОР– Tb^{3+} (3). $c_{НОР} = 1.0 \times 10^{-5}$ М, $c_{Tb^{3+}} = 1.0 \times 10^{-4}$ М, $c_{ДДС} = 1.0 \times 10^{-2}$ М, $c_{НЧА_g} = 3.3 \times 10^{-9}$ М, рН 9.0, $\lambda_{возб} = 275$ нм.

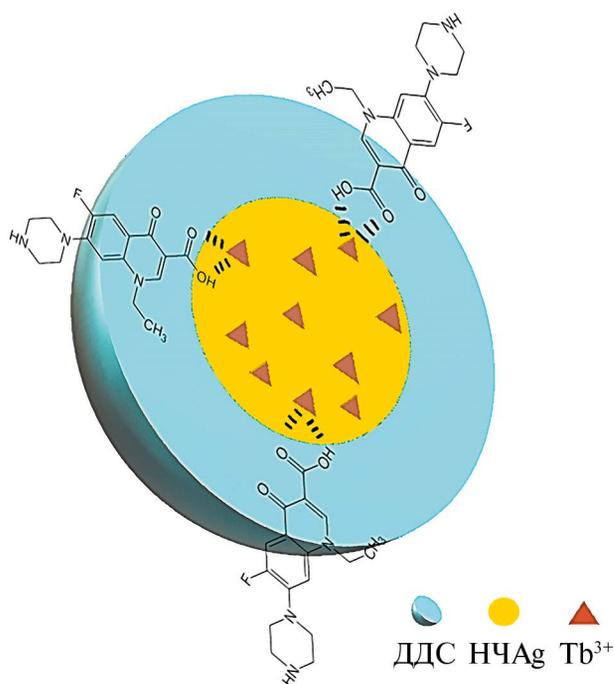


Рис. 7. Схема взаимодействия в системе Tb^{3+} –НОР–ДДС–НЧА_g.

Предлагаемый подход усиления аналитического сигнала сенсibilизированной флуоресценции может быть использован для разработки флуориметрической методики определения норфлоксацина в некоторых объектах.

Нами апробирован флуориметрический способ определения антибиотика на фоне матрицы – природной воды (Хмелевский пруд, Саратовская область). В пробы воды предварительно вводили определенное количество антибиотика. Норфлоксацин является одним из широко используемых антибактериальных средств при лечении различного рода инфекций крупного и мелкого рогатого скота в сельском хозяйстве. В водоемы вблизи животноводческих ферм попадает значительное количество сточных вод, содержащих достаточно большие концентрации антибиотиков. В оптимальных условиях получения максимального сигнала сенсibilизированной флуоресценции построен градуировочный график для флуориметрического определения норфлоксацина с помощью модифицированных мицеллами додецилсульфата натрия наночастиц серебра и ионов Tb³⁺. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации определяемого антибиотика линейна в диапазоне $2 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$ М. Уравнение градуировочного графика $y = 1.0 \times 10^7 x - 1.0$, $r^2 = 0.996$.

Методика флуориметрического определения норфлоксацина. В пробирку вносят 1.0 мл ацетатно-аммиачного буферного раствора (рН 9), 1 мл исследуемого образца воды, 0.4 мл 1.0×10^{-3} М соли Tb³⁺, 0.4 мл 0.1 М раствора ДДС, 0.4 мл 3.3×10^{-8} М раствора наночастиц серебра, буферный раствор до общего объема 4 мл. Измеряют интенсивность флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 275$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 545$ нм), с помощью градуировочного графика определяют содержание норфлоксацина в воде.

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

Таблица 1. Результаты (мг/л) определения норфлоксацина в природной воде (Хмелевский пруд, Саратовская область) ($n = 3$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 4.30$)

| Введено | Найдено | s_r | $t_{\text{эмп}}$ |
|---------|---------------|-------|------------------|
| 2.5 | 2.5 ± 0.1 | 0.08 | 0.70 |
| 10 | 10 ± 1 | 0.02 | 2.34 |
| 25 | 25 ± 1 | 0.03 | 2.45 |
| 100 | 101 ± 2 | 0.04 | 1.45 |

Установлено, что в присутствии наночастиц серебра, синтезированных борогидридным способом и стабилизированных цитрат-ионами, интенсивность флуоресценции норфлоксацина и его комплекса с ионами тербия уменьшается в результате резонансного переноса энергии на нанокластеры. Эффективность процесса выше в случае, когда в качестве донора энергии выступает хелат антибиотика. Модификация поверхности наночастиц серебра анионным поверхностно-активным веществом сопровождается возрастанием значения ζ -потенциала от -30 до -78 мВ. В присутствии модифицированных наночастиц серебра проявляется усиление сигнала сенсibilизированной флуоресценции в 11 раз в результате адсорбции комплекса Tb³⁺ с норфлоксацином на поверхности нанокластеров и проявления влияния мицелл и ионов додецилсульфата натрия на ближайшее окружение флуоресцирующего центра, вероятной солюбилизации хелата, уменьшения гидратации иона-комплексобразователя и лиганда, экранирования от посторонних тушителей (рис. 7). В результате сближения компонентов реакции, подавления процесса диссипации энергии возбуждения интенсивность флуоресценции аналитической системы увеличивается. Предложен подход к повышению интенсивности сенсibilизированной флуоресценции хелата Tb³⁺ с норфлоксацином с помощью модифицированных анионами ПАВ наночастиц серебра, который может быть реализован во флуориметрических методиках определения антибиотика в некоторых объектах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Picó Y., Andreu V.* Fluoroquinolones in soil-risks and challenges // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 387. №4. P. 1287. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0843-1>
2. *Santigosa E., MasPOCH S., Payán M.R.* Liquid phase microextraction integrated into a microchip device for the extraction of fluoroquinolones from urine samples // *Microchem. J.* 2019. V. 145. P. 280. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.051>

3. *Tsanaktsidou E., Markopoulou C.K., Tzanavaras P.D., Zacharis C.K.* Homogeneous liquid phase micro-extraction using hydrophilic media for the determination of fluoroquinolones in human urine using HPLC-FLD // *Microchem. J.* 2022. V. 172. Article 106906.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106906>
4. *Samanidou V.F., Demetriou C.E., Papadoyannis I.N.* Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 375. № 5. P. 623.
<https://doi.org/10.1007/s00216-003-1749-9>
5. *Liu Y.M., J.T. Cao J.T., Tian W., Zheng Y.L.* Determination of levofloxacin and norfloxacin by capillary electrophoresis with electro chemiluminescence detection and applications in human urine // *Electrophoresis.* 2008. V. 29. P. 3207.
<https://doi.org/10.1002/elps.200800048>
6. *Rahman N., Ahmad Y., Azmi S.N.H.* Kinetic spectrophotometric method for the determination of norfloxacin in pharmaceutical formulations // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004. V. 57. № 2. P. 359.
[https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00192-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00192-9)
7. *Thapliyal N., Karpoormath R.V., Goyal R.N.* Electro analysis of anti tubercular drugs in pharmaceutical dosage forms and biological fluids // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 853. P. 59.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.054>
8. *Mohammadian E., Rahimpour E., Alizadeh-Sani M., Foroumadi A., Jouyban A.* An overview on terbium sensitized based-optical sensors/ nanosensors for determination of pharmaceuticals // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2022. V. 57. № 1. P. 39.
<https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1843174>
9. *Штыков С.Н.* Химический анализ в нанореакторах: основные понятия и применение // *Журн. аналит. химии.* 2002. № 10. С. 1018. (*Shtykov S.N.* Chemical analysis in nanoreactors: Main concepts and applications // *J. Anal. Chem.* 2002. V. 57. P. 859.)
<https://doi.org/10.1023/A:1020410605772>
10. *Derayea S.M., Omar M.A., Hammad M.A., Hassan Y.F.* Application of surface plasmon resonance of citrate capped silver nanoparticles for the selective determination of some fluoroquinolone drugs // *J. App. Pharm. Sci.* 2017. V. 7. № 2. P. 016.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70203>
11. *Jeong Y., Kook Y-M., Lee K., Koh W-G.* Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: General approaches and a review of recent developments // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 111. P. 102.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.007>
12. *Wang H., Si X., Wu T., Wang P.* Silver nanoparticles enhanced fluorescence for sensitive determination of fluoroquinolones in water solutions // *Open Chem.* 2019. V. 17. P. 884.
<https://doi.org/10.1515/chem-2019-0094>
13. *Geddes C.D., Lakowicz J.R.* Metal-enhanced fluorescence // *J. Fluoresc.* 2002. V. 12. P. 121.
<https://doi.org/10.1023/A:1016875709579>
14. *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. № 3. С. 242. (*Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A. A., Olenin A. Yu., Lisichkin. G. V.* Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects // *Russ. Chem. Rev.* 2008. V. 77. № 3. P. 233.)
<https://doi.org/https://doi.org/10.1070/RC2008v-077n03ABEH003751>
15. *Uivarosi V.* Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: An update // *Molecules.* 2013. V. 18. № 9. P. 11153.
<https://doi.org/10.3390/molecules180911153>
16. *Ghosh D., Chattopadhyay N.* Gold and silver nanoparticle based superquenching of fluorescence: A review // *J. Lumin.* 2015. V. 160. P. 223.
<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.12.018>

DETERMINATION OF NORFLOXACIN BY SENSITIZED TERBIUM FLUORESCENCE IN THE PRESENCE OF SILVER NANOPARTICLES AND SURFACTANT MICELLES

T. D. Smirnova*, E. A. Alyabyeva, N. A. Yurasov

*Saratov National Research State University named after N. G. Chernyshevsky, Institute of Chemistry,
410012 Saratov, Russia*

**e-mail: smirnovatd@mail.ru*

Received 6 July, 2023

Revised 31 October, 2023

Accepted 31 October, 2023

Abstract. The influence of silver nanoparticles and surfactant micelles on the signal intensity of the sensitized fluorescence of the norfloxacin complex with the Tb^{3+} ion was studied. It was shown that the intensity of the intrinsic fluorescence of norfloxacin and its complex with Tb^{3+} ions slightly decreases in the presence of silver nanoparticles. It was found that the presence of dodecyl sulfate micelles leads to the modification of the silver nanoparticle surface, which is accompanied by a change in the ζ -potential of the nanoclusters. The addition of surfactant-modified silver nanoparticles to aqueous solutions of terbium chelate increases the intensity of sensitized fluorescence by 11 times. The increase in the efficiency of intramolecular energy transfer in the Tb^{3+} complex with norfloxacin in the presence of silver nanoparticles and dodecyl sulfate micelles made it possible to propose a method for the fluorimetric determination of the antibiotic in natural water in the concentration range of $2 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$ M. The calibration graph equation is $y = 1.0 \times 10^7 x - 1.0$, $R^2 = 0.991$, detection limit 5×10^{-8} M (3σ).

Keywords: norfloxacin, terbium, sensitized fluorescence, silver nanoparticles, surfactants, micelles.

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
№0110234 от 8 февраля 1993 г., выдано Министерством печати и информации Российской Федерации

| | | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|--|--------------|-------------|
| Подписано к печати xx.xx.2024 г. | Дата выхода в свет: xx.xx.2024 | Формат 60 × 88 ¹ / ₈ . | Усл. печ. л. | Уч.-изд. л. |
| | Тираж экз. Зак. | Бесплатно | | |

Учредители: Российская академия наук
Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН

16+

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14
Исполнитель по контракту № 4У-ЕП-039-24 ФГБУ «Издательство «Наука»
121099, Москва, Шубинский пер., 6, стр. 1
Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»: 121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.

Журналы РАН, выходящие в свет на русском языке

Автоматика и телемеханика
 Агрохимия
 Азия и Африка сегодня
 Акустический журнал
 Астрономический вестник. Исследования солнечной системы Астрономический журнал
 Биологические мембраны
 Биология внутренних вод
 Биология моря
 Биоорганическая химия
 Биофизика
 Биохимия
 Ботанический журнал
 Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук
 Вестник древней истории
 Вестник Российской академии наук
 Вестник российской сельскохозяйственной науки
 Водные ресурсы
 Вопросы истории естествознания и техники
 Вопросы ихтиологии
 Вопросы языкознания
 Вулканология и сейсмология
 Высокомолекулярные соединения. Серия А Высокомолекулярные соединения. Серия Б Высокомолекулярные соединения. Серия С
 Генетика
 Геология рудных месторождений
 Геомагнетизм и аэрономия
 Геоморфология и палеогеография
 Геотектоника
 Геохимия
 Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология
 Государство и право
 Дефектоскопия
 Дифференциальные уравнения
 Доклады Российской академии наук. Математика, информатика, процессы управления
 Доклады Российской академии наук. Науки о жизни
 Доклады Российской академии наук. Науки о Земле
 Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки
 Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах
 Журнал аналитической химии
 Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова
 Журнал вычислительной математики и математической физики
 Журнал неорганической химии
 Журнал общей биологии
 Журнал общей химии
 Журнал органической химии
 Журнал прикладной химии
 Журнал физической химии
 Журнал эволюционной биохимии и физиологии
 Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Записки Российского минералогического общества
 Зоологический журнал
 Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа
 Известия Российской академии наук. Механика твердого тела
 Известия Российской академии наук. Серия биологическая
 Известия Российской академии наук. Серия географическая
 Известия Российской академии наук. Серия литературы и языка
 Известия Российской академии наук. Серия физическая
 Известия Российской академии наук. Теория и системы управления
 Известия Российской академии наук. Физика атмосферы и океана
 Известия Российской академии наук. Энергетика
 Известия Русского географического общества
 Исследование Земли из Космоса
 Кинетика и катализ
 Коллоидный журнал
 Координационная химия
 Космические исследования
 Кристаллография
 Латинская Америка
 Лёд и Снег
 Лесоведение
 Литология и полезные ископаемые
 Мембраны и мембранные технологии
 Металлы
 Микология и фитопатология
 Микробиология
 Микроэлектроника
 Молекулярная биология
 Нейрохимия
 Неорганические материалы
 Нефтехимия
 Новая и новейшая история
 Общественные науки и современность
 Общество и экономика
 Океанология
 Онтогенез
 Палеонтологический журнал
 Паразитология
 Петрология
 Письма в Астрономический журнал
 Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования
 Почвоведение
 Приборы и техника эксперимента
 Прикладная биохимия и микробиология
 Прикладная математика и механика
 Проблемы Дальнего Востока
 Проблемы машиностроения и надежности машин
 Проблемы передачи информации
 Программирование
 Психологический журнал
 Радиационная биология. Радиоэкология
 Радиотехника и электроника
 Радиохимия
 Расплавы
 Растительные ресурсы
 Российская археология
 Российская история
 Российская сельскохозяйственная наука
 Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова
 Русская литература
 Русская речь
 Сенсорные системы
 Славяноведение
 Современная Европа
 Социологические исследования
 Стратиграфия. Геологическая корреляция
 США & Канада: экономика, политика, культура
 Теоретические основы химической технологии
 Теплофизика высоких температур
 Успехи современной биологии
 Успехи физиологических наук
 Физика Земли
 Физика и химия стекла
 Физика металлов и металловедение
 Физика плазмы
 Физикохимия поверхности и защита материалов
 Физиология растений
 Физиология человека
 Химическая физика
 Химия высоких энергий
 Химия твердого топлива
 Цитология
 Человек
 Экология
 Экономика и математические методы
 Электрохимия
 Энтомологическое обозрение
 Этнографическое обозрение
 Ядерная физика