

Том 79, Номер 7

ISSN 0044-4502
Июль 2024



ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 79, номер 7, 2024

Статьи, посвященные памяти заведующего кафедрой аналитической химии Башкирского государственного университета профессора Валерия Николаевича Майстренко (продолжение).

Редактор-составитель – Г.А. Евтюгин

ОБЗОРЫ

Искусственные модифицированные нуклеотиды для электрохимического обнаружения продуктов амплификации нуклеиновых кислот
Е. В. Супрун, С. А. Хмелева, К. Г. Птицын, Л. К. Курбатов, С. П. Радько 679

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Вольтамперометрический сенсор на основе модифицированной шунгитом и формазанатом меди углеволоконной бумаги для определения лидокаина
М. А. Бухаринова, Н. Ю. Стожко, Т. Г. Федорченко, Г. Н. Липунова, Е. В. Шаброва, Е. И. Хамзина, А. В. Тарасов 702

Электрохимический иммуносенсор на основе наночастиц золота для определения овальбумина в иммунобиологических препаратах
Е. В. Дорошко, А. Н. Соломоненко, М. Сакиб, В. О. Сёмин 716

Чувствительный электрохимический сенсор на основе органомодифицированного стеклоглеродного электрода для контроля релиза амикацина из биоразлагаемых покрытий костных имплантов
Г. Б. Слепченко, Е. В. Дорошко, Е. С. Моисеева, А. Н. Соломоненко 726

Электроанализ взаимодействия ДНК и противоопухолевого препарата метаболита абиратерона D4A
В. В. Шумянцева, А. В. Бережнова, Л. Е. Агафонова, Т. В. Булко, А. В. Веселовский 733

ХРОНИКА

Валерий Николаевич Майстренко: жизнь в науке 746

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Окситермография как новый аналитический метод исследования термостойкости полимерных материалов
Б. К. Зувев, А. Е. Зайцева, А. С. Коротков, В. Г. Филоненко, И. В. Роговая 751

Применение шипучих таблеток на основе магнитного угля для концентрирования и определения дихлорфеноксикарбоновых кислот и их метаболитов методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии в почве и природных водах
К. С. Сыпко, А. С. Губин, П. Т. Суханов, А. А. Кушнир 760

Обнаружение следовых количеств пероксидов и нитрата аммония в отпечатках пальца методом спектрометрии ионной подвижности
Т. И. Буряков, И. А. Буряков 772

Сравнение возможностей методов экспрессной оценки селективности и эффективности аналитического сигнала флуоресцентных фаз разной природы
Т. А. Кучменко, Д. Ю. Вандышев, В. В. Ягов, Р. У. Умарханов, И. В. Леденёва 782

Оптимизация условий определения низких концентраций хлорат-ионов в растворах хлоридов щелочных металлов методом капиллярного электрофореза
В. В. Сурсякова, Д. А. Шатаев, А. И. Рубайло 800

CONTENTS

V. 79, № 7, 2024

Articles dedicated to the memory of Professor Valery Nikolayevich Maistrenko,
Head of the Department of Analytical Chemistry, Bashkir State University (continued).
Compiling Editor G.A. Evtyugin

OVERVIEWS

- Artificial Modified Nucleotides for the Electrochemical Detection of Nucleic Acid
Amplification Products
E. V. Suprun, S. A. Khmeleva, K. G. Ptitsyn, L. K. Kurbatov, S. P. Radko 679

ORIGINAL ARTICLES

- A voltammetric sensor based on carbon fiber paper modified with shungite and copper formazanate
for the determination of lidocaine
*M. A. Bukharinova, N. Yu. Stozhko, T. G. Fedorchenko, G. N. Lipunova,
E. V. Shabrova, E. I. Khamzina, A. V. Tarasov* 702
- Electrochemical immunosensors based on gold nanoparticles for the determination of ovalbumin
in immunobiological preparations
E. V. Dorozhko, A. N. Solomonenko, M. Saqib, V. O. Semin 716
- A sensitive electrochemical sensor based on an organomodified glassy carbon electrode
for monitoring the release of amikacin from biodegradable coatings of bone implants
G. B. Slepchenko, E. V. Dorozhko, E. S. Moiseeva, A. N. Solomonenko 726
- Electrochemical analysis of the interaction between dna and abiraterone d4a metabolite
V. V. Shumyantseva, A. V. Berezhnova, L. E. Agafonova, T. V. Bulko, A. V. Veselovsky 733

CHRONICLE

- Valery Nikolaevich Maistrenko: life in science 746

ORIGINAL ARTICLES

- Oxythermography for exploring the thermal stability of polymer materials: a novel analytical approach
B. K. Zuev, A. E. Zaitseva, A. S. Korotkov, V. G. Filonenko, I. V. Rogovaya 751
- Application of effervescent tablets based on magnetic charcoal for the preconcentration
and determination of dichlorophenoxyacetic acids and their metabolites by gas chromatography–
mass spectrometry in soils and natural waters
K. S. Sypko, A. S. Gubin, P. T. Sukhanov, A. A. Kushnir 760
- Detecting trace amounts of peroxides and ammonium nitrate in fingerprints by ion
mobility spectrometry
T. I. Buryakov, I. A. Buryakov 772
- Comparison of methods for rapid assessment of selectivity and efficiency of the analytical signal
of fluorescent phases of different natures
T. A. Kuchmenko, D. Yu. Vandychev, V. V. Yagov, R. U. Umarhanov, I. V. Ledeneva 782
- Optimization of conditions for the determination of low concentrations of chlorate ions
in alkali metal chloride solutions by capillary electrophoresis
V. V. Sursyakova, D. A. Shataev, A. I. Rubaylo 800
-

УДК 543.9

ИСКУССТВЕННЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

© 2024 г. Е. В. Супрун^{a, b, *}, С. А. Хмелева^b, К. Г. Птицын^b, Л. К. Курбатов^b, С. П. Радько^b

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, 119991 Москва, Россия

^bНаучно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
ул. Погодинская, 10, стр. 8, 119121 Москва, Россия

*E-mail: lenasuprun@mail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 10.01.2024 г.

Принята к публикации 10.01.2024 г.

В обзоре рассмотрены основные электрохимические свойства нуклеиновых кислот, проявляющиеся на твердых электродах, с акцентом на пространственную структуру макромолекул. Образование двойной спирали блокирует контакт электроактивных групп азотистых оснований с поверхностью электрода, вследствие чего аналитический сигнал дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) пропадает. Недостаточную электроактивность двунитевой ДНК преодолевают введением электрохимически активных фрагментов в последовательность нуклеиновых кислот путем полимеразного включения химически модифицированных нуклеотидов. В настоящее время синтезирована обширная библиотека искусственных нуклеотидов, содержащих различные электроактивные группы, способные как окисляться, так и восстанавливаться на поверхности электродов при различных потенциалах. Искусственные модифицированные нуклеотиды должны обладать высокой электрохимической активностью и одновременно быть хорошими субстратами ферментов (полимераз), участвующих в реакциях амплификации нуклеиновых кислот. Введение модифицированных нуклеотидов в полимеразную реакцию взамен природных – это компромисс между числом меток в одном ампликоне, длиной и количеством образующихся продуктов. Модифицированные нуклеотиды находят свое применение при выявлении мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов генов; при секвенировании нуклеиновых кислот; определении концентрации белков и пептидов; обнаружении патогенных вирусов и бактерий. С развитием методов изотермической амплификации разработка, синтез и исследование искусственных нуклеотидов стали весьма актуальными для создания новых внелабораторных электрохимических анализаторов нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: нуклеиновая кислота, модифицированный нуклеотид, изотермическая амплификация, полимеразная цепная реакция, флуориметрия, вольтамперометрия.

DOI: 10.31857/S0044450224070014, **EDN:** TOWFEY

Нуклеиновые кислоты, неся в себе генетическую информацию, являются неотъемлемой частью всех известных живых организмов и вирусов. В аналитической химии и биохимии нуклеиновые кислоты служат надежными маркерами микробного и вирусного заражения. Анализ образцов на нуклеиновые кислоты патогенных микроорганизмов используют в различных областях: в экологии, медицине, ветеринарии,

научных исследованиях, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Классическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) и бурно развивающиеся методы изотермической амплификации способны обеспечить определение нуклеиновых кислот на сверхнизких уровнях содержания, вплоть до нескольких копий в образце [1–3]. Если ПЦР-анализ требует термоциклирования (циклического чередование температур

для проведения синтеза, включая нагрев до 90 °С), то изотермические способы амплификации работают при постоянной температуре (около 30–60 °С), что значительно упрощает техническую сторону их проведения [1–3]. Теоретически некоторые изотермические реакции могут протекать и при комнатной температуре, но чуть медленнее, что делает возможным проведение амплификации *in situ*, держа пробирку в руке. Однако для применения в медицинских учреждениях “у постели больного” или в условиях “по месту требования” ПЦР и другие реакции амплификации нуклеиновых кислот нуждаются в подходящем инструментальном методе регистрации образующихся продуктов – ампликонов. Чаще всего продукты амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) – это двунитевые молекулы размером от одной до нескольких сотен пар оснований (п. о.), однако в некоторых видах изотермических реакций ампликоны имеют одонитевую или смешанную, достаточно экзотическую структуру. В поисках надежных, портативных и чувствительных систем обнаружения нуклеиновых кислот объединение принципов электрохимического анализа с биохимическими способами амплификации ДНК или рибонуклеиновой кислоты (РНК) представляет большой интерес [4–7]. Электрохимическое определение структуры и концентрации нуклеиновых кислот является особенно привлекательной альтернативой оптическим методам, благодаря своей высокой чувствительности, сравнительно простому инструментарию и относительно низкой стоимости. Среди известных стратегий обнаружения нуклеиновых кислот прямая вольтамперометрическая регистрация ДНК или РНК может обеспечить быстрый и экономичный анализ биологических образцов *in situ*. Под “прямой” вольтамперометрической регистрацией понимают считывание аналитического сигнала, используя электроактивные свойства самих молекул нуклеиновых кислот, без применения каких-либо внешних редокс-индикаторов или медиаторов. Один из возможных путей решения данной задачи – получение продуктов амплификации нуклеиновых кислот посредством полимеразного встраивания нуклеотидов, модифицированных электроактивными группами [8, 9]. Обоснование, общие принципы, достоинства и ограничения применения искусственных модифицированных нуклеотидов в качестве электроактивных меток для

вольтамперометрического обнаружения ДНК и в меньшей степени РНК рассмотрены в настоящем обзоре.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ТВЕРДЫХ ЭЛЕКТРОДАХ

Нуклеиновые кислоты – биополимеры, способные электрохимически восстанавливаться и окисляться на поверхности электродов из различных материалов [10, 11]. В настоящее время электрохимия нуклеиновых кислот основана на их необратимом окислении на твердых (углеродных, золотых) электродах [12–17]. Известно, что нуклеиновые кислоты способны окисляться за счет остатков азотистых оснований: гуанина (Г), аденина (А), тимина (Т), цитозина (Ц) и урацила (У) [15–22]. Для свободных нуклеотидов на электродах из углеродных материалов электроактивность азотистых оснований проявляется анодными пиками при потенциалах 0.9–1.0 В (гуанозинмонофосфат, ГМФ), 1.2–1.3 В (аденозинмонофосфат, АМФ), 1.4–1.5 В (тимидинмонофосфат, ТМФ) и 1.5–1.6 В (цитидинмонофосфат, ЦМФ) (отн. Ag/AgCl, pH 7.4) [19, 23]. Интересно, что добавление остатков сахара и фосфата к азотистому основанию (с образованием нуклеозида и затем нуклеотида) сдвигает потенциал пика окисления к более высоким положительным значениям [24–29]. Соответственно показано, что гидролиз олигонуклеотидов ДНК до азотистых оснований сдвигает потенциалы окисления пиков обратно к меньшим положительным значениям [30]. Механизмы реакций окисления Г, А, Т, Ц и У на электродах из углеродных материалов детально исследованы и обсуждены в литературе [18, 19, 24–33]. Однако отчетливые сигналы окисления всех азотистых оснований получены только для нуклеотидов, некоторых коротких олигонуклеотидов и гомополинуклеотидов [19, 22, 23, 30–38]. Сигналы окисления ДНК- и РНК-олигонуклеотидов в основном генерируют остатки Г и А [23, 30, 37, 38]. На примере синтетических 15- и 19-членных ДНК-олигонуклеотидов показано [23], что только остатки Г и в некоторой степени А всегда дают отчетливые отклики на поверхности электрода даже при самом низком содержании данных азотистых оснований в олигонуклеотидной цепи. Анодный пик Г можно наблюдать на вольтамперограммах, даже если в олигонуклеотидной цепи присутствует только один остаток Г.

Среди азотистых оснований только сигнал окисления Г чувствителен как к концентрации олигонуклеотидов, так и к их составу [23]. Известно, что на вольтамперометрический отклик молекулы олигонуклеотида сильно влияют состав и последовательность нуклеотидов в цепи, а также ее длина [23, 37, 38]. В молекуле олигонуклеотида остатки разных азотистых оснований “мешают” друг другу проявиться в виде четких пиков окисления на вольтамперограммах. Только последовательно убирая из цепи остатки нуклеотидов определенного вида, можно достоверно зарегистрировать сигналы окисления остальных нуклеотидов [38]. Другая важная взаимосвязь — зависимость вольтамперометрических сигналов от пространственной структуры молекулы олигонуклеотида — показана в ряде работ на примере G-квадруплексов [36, 38–40]. G-квадруплекс — это структура молекул ДНК или РНК с последовательностями, обогащенными остатками Г (англ. G), в которых Г спарены за счет неканонических водородных связей Хугстина с образованием плоской матрицы, которая дополнительно стабилизируется взаимодействиями между положительно заряженными ионами и неподеленными электронными парами Г [41]. G-квадруплексы могут быть образованы одной, двумя, тремя или четырьмя полинуклеотидными цепями. Формирование как внутри-, так и межмолекулярных G-квадруплексов зависит от нуклеотидной последовательности и состава раствора. Последние данные свидетельствуют об участии G-квадруплексов в ключевых функциях генома, таких как транскрипция, репликация, стабильность генома и эпигенетическая регуляция, а также об их роли в биологии онкологических заболеваний [41]. Таким образом, можно заключить, что потенциалы и высоты пиков окисления азотистых оснований в одностранных ДНК (онДНК) и РНК слишком сильно зависят от концентрации, последовательности и пространственной структуры олигонуклеотидов, что затрудняет их использование для решения сложных аналитических задач. С увеличением длины олигонуклеотида величины сигналов окисления остатков азотистых оснований падают [38]. Интересно, что сверхдлинная одностранный ДНК (онДНК) в несколько десятков тысяч нуклеотидов — продукт реакции репликации по типу катящегося кольца (англ. Rolling Circle Amplification, RCA) [42, 43] — не может напрямую быть зарегистрирована вольтамперометрически из-за высоких фоновых токов [38]. Только ферментативная

“нарезка” сверхдлинной онДНК на фрагменты длиной ~70 нуклеотидов привела к появлению на вольтамперограммах кривых, характерных для олигонуклеотидов [38].

В отличие от синтетических олигонуклеотидов с искусственным несбалансированным содержанием нуклеиновых оснований и/или неслучайными последовательностями, в нативной ДНК все четыре вида азотистых оснований в среднем представлены в равной степени, а их общая последовательность случайна. Для гетерогенных препаратов ДНК из природных источников выявлены пики окисления только при 0.7–0.9 и 0.9–1.2 В (отн. Ag/AgCl) [44–50]. Эти пики отнесены к электрохимическому окислению остатков Г и А соответственно [24–29, 47]. Следует отметить, что токи пиков окисления для нативной двунитевой ДНК (днДНК) заметно ниже по сравнению с сигналами от денатурированной ДНК [44, 45, 47, 51, 52]. Кроме того, обнаружено, что токи окисления ДНК (как для нативных, так и для денатурированных биополимеров) уменьшаются с увеличением молекулярной массы ДНК [46]. Более того, продемонстрировано, что низкомолекулярные компоненты (окисляемые на электродах из углеродных материалов) даже при относительно низкой (микромольной) концентрации могут существенно влиять на результаты электроокисления ДНК [46]. Интересно, что для регистрации сигналов окисления нативной днДНК, денатурированной ДНК и даже коротких олигонуклеотидов на стеклоуглеродных и золотых электродах требовалась предварительная поляризация электрода при высоких положительных потенциалах (от 0.5 до 1.3 В; в течение 15 мин), вероятно, из-за более эффективной адсорбции отрицательно заряженных биомолекул на положительно заряженных электродах [48, 52]. С увеличением молекулярной массы нативной ДНК можно ожидать уменьшения электрохимических сигналов остатков Г и А [46, 53]. Более того, когда активные центры нуклеиновых оснований связаны водородными связями и таким образом скрыты внутри двойной спирали Уотсона–Крика, они, очевидно, становятся недоступными для электродных реакций [8, 14, 21, 53, 54]. Таким образом, низкомолекулярные фрагменты онДНК, по-видимому, вносят основной вклад в суммарные токи электроокисления, генерируемые остатками Г или А в гетерогенных препаратах ДНК природного происхождения, без заметного вклада высокомолекулярной днДНК [53]. Электрохимическое

поведение как коротких, так и длинных молекул онДНК еще до конца не изучено, и многие детали взаимосвязи между электрохимической активностью нуклеиновых кислот и их последовательностью и молекулярной структурой требуют систематического и более глубокого исследования. Очевидно, что вольтамперометрия нуклеиновых кислот проигрывает в чувствительности и селективности из-за высоких потенциалов окисления и низких значений регистрируемых токов. Это ставит под сомнение пригодность прямого электрохимического анализа (без предварительного гидролиза) для обнаружения относительно крупных молекул онДНК, таких как фрагменты, получаемые с помощью ПЦР.

СТРАТЕГИЯ МЕЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ

Для решения проблемы низкой электрохимической активности нуклеиновых кислот чешские ученые Хочек и Фойта использовали мечение полинуклеотидных последовательностей

электроактивными группами путем ферментативного включения в цепи ДНК или РНК нуклеотидов с химически модифицированными основаниями [8, 9, 55] (рис. 1). Функциональные нуклеиновые кислоты, такие как аптамеры, соматеры и ДНКзимы, достаточно давно известны и активно используются в биохимии и биоаналитической химии [55]. Модифицированные нуклеотиды появились с целью придания нуклеиновым кислотам особых свойств. Введение различных функциональных групп, особенно модификация остатков нуклеиновых оснований, позволило расширить области применения синтетических нуклеиновых кислот. Изначально производные нуклеотидов, содержащие электроактивные группы, такие как фенотиазин, порфирин, комплексы $Ru_3^{II(bpy)}$ и $Os_3^{II(bpy)}$ (где bpy – бипиридил), 1,10-фенантролин, красители TAMRA, флуоресцеин, родамин, Cu_3 и Cu_5 [55–66], присоединяемые к остатку азотистого основания, были успешно синтезированы, но использовались лишь в качестве флуоресцентных меток, а их электрохимические свойства не изучались. Другим активно развивающимся направлением модификации нуклеотидов,

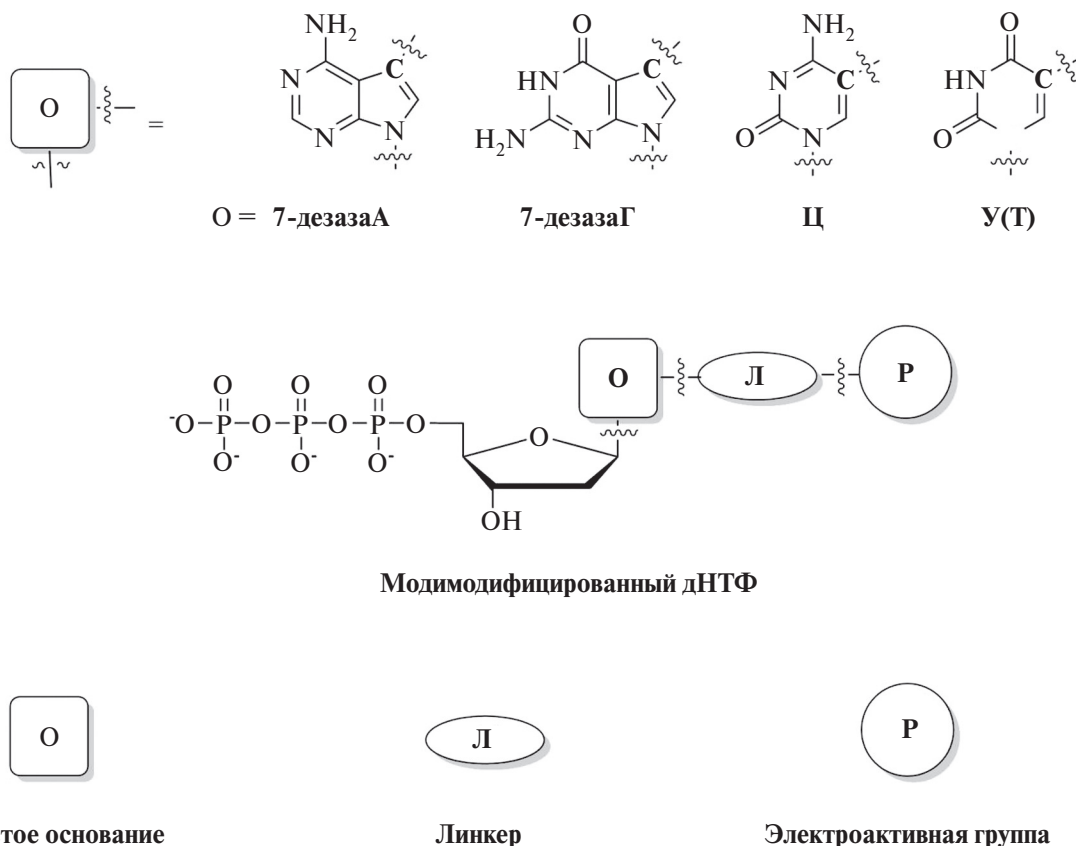


Рис. 1. Модификация нуклеотидов электроактивными группами. На примере ДНК-нуклеотида.

в том числе электроактивными группами, служит придание полинуклеотидным последовательностям сродства к определенным лигандам (пептидам, белкам, низкомолекулярным соединениям) [67–72].

За последние два десятилетия для целей электрохимии создана и протестирована целая палитра нуклеозидов и нуклеотидов с присоединенными фрагментами металлоорганических соединений (ферроцен) [73–78], хелатов переходных металлов [79], полиоксометаллатов [80, 81] или органических функциональных групп, способных восстанавливаться или окисляться на поверхности электрода [73, 82–95]. Как показано на рис. 1, при синтезе модификация нуклеотидов идет по азотистому основанию путем прямого или косвенного (через спейсер) присоединения электроактивного фрагмента к пуриновому (А, Г) или пиримидиновому (Т, У, Ц) основанию. Присоединение новой группы идет в положение С5 пиримидинового основания или в положение С7 пуринового основания. Синтетические нуклеотиды могут быть введены в последовательность нуклеиновых кислот путем различных ферментативных реакций при частичной или полной замене природных нуклеотидов в реакционной смеси. Образующаяся в результате молекула ДНК или РНК несет в себе новые электроактивные группы. Исходя из принципа метода, очевидны два основных требования, которым должен удовлетворять искусственный нуклеотид. Во-первых, модифицированный нуклеотид должен обладать высокой электрохимической активностью, в отличие от природного нуклеотида, обеспечивая селективное и чувствительное определение содержания модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты в образце при относительно низких потенциалах окисления или восстановления. Во-вторых, немаловажна совместимость синтетического нуклеотида с электроактивной меткой с ферментами, используемыми в реакциях амплификации нуклеиновых кислот. Дизайн, синтез и проверка производных нуклеотидов на электрохимическую активность и субстратную совместимость с ДНК-полимеразами – новое современное направление на стыке органической химии, биохимии и аналитической химии (в частности, электрохимии). Данный подход позволил значительно повысить чувствительность и селективность электрохимического определения концентрации нуклеиновых кислот. К сожалению, большинство опубликованных Хочеком и Фойтой работ [96–102]

посвящено исследованию электрохимической активности модифицированных нуклеотидов на ртутном или содержащем ртуть электродах, что не имеет каких-либо перспектив практического применения в современном “зеленом” мире. Стоит отметить, что существующее разнообразие конъюгатов нуклеотидов с различными электроактивными группами обеспечивает основу для мультипотенциального кодирования ДНК с перспективой электрохимического определения последовательности нуклеиновых кислот при их секвенировании (рис. 2) [8, 9, 55, 73–103]. Термин “мультипотенциальное кодирование ДНК” означает расшифровку последовательности ДНК на основе введения в нее электроактивных меченых нуклеотидов взамен природных нуклеотидов (вплоть до всех четырех). Каждая электроактивная метка, характеризующаяся потенциалом и интенсивностью пика и соответствующая определенному нуклеиновому основанию, должна обладать ортогональностью и ратиометричностью, т.е. давать вольтамперометрический сигнал, не перекрывающийся с сигналами других меток и зависящий от количества нуклеотидов данного вида в цепи. Например, модифицированные нуклеотиды, связанные с различными электроактивными фрагментами, недавно были успешно применены для мультипотенциального кодирования всех четырех оснований ДНК [78, 103]. Кроме того, искусственные электроактивные нуклеотиды используют для регистрации гибридизации ДНК, выявления однонуклеотидных полиморфизмов, обнаружения повреждения ДНК и определения содержания белков (рис. 3) [8, 9, 55, 73–103]. Другим многообещающим практическим применением модифицированных нуклеотидов является сочетание изотермической амплификации ДНК с электроактивными мечеными нуклеотидами для электрохимической регистрации нарабатываемых ампликонов и обнаружения инфекционных агентов *in situ* (рис. 3) [89]. Однако, чтобы стать широко применимой для обнаружения нуклеиновых кислот “по месту требования”, данная стратегия должна включать: (1) простую процедуру регистрации сигнала, исключаящую использование токсичной ртути или стадию шлифовки поверхности электродов; (2) набор модифицированных нуклеотидов, содержащий основания ДНК или РНК, конъюгированные с электроактивными фрагментами, которые подходят в качестве субстратов полимераз, осуществляющих амплификацию нуклеиновых кислот. В этой связи прямое

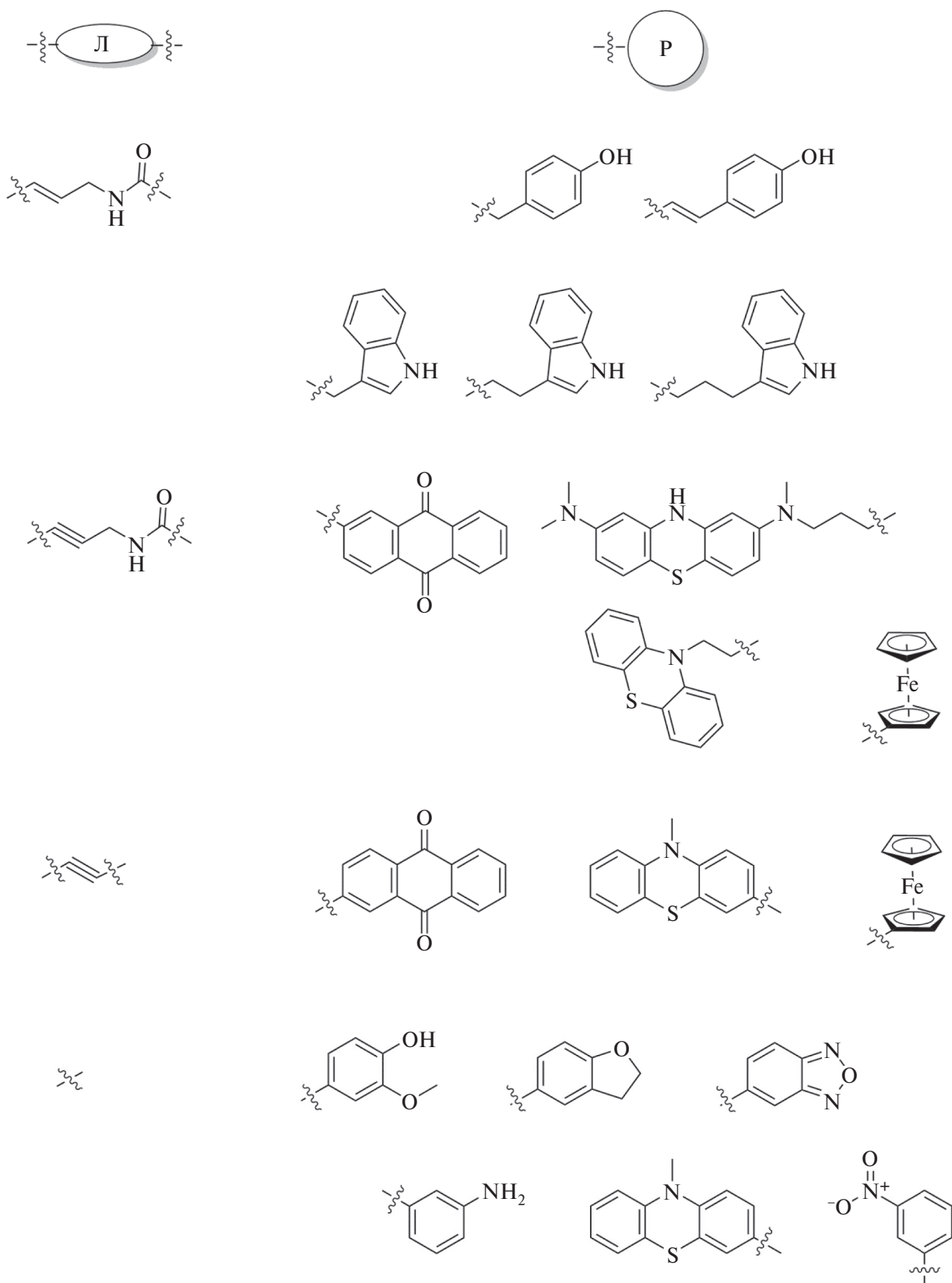


Рис. 2. Разнообразие электроактивных групп и линкеров в синтетических модифицированных нуклеотидах: ферроцен [74–77, 103–105], антрахинон [83, 91], 4-гидрокси-3-метоксифенил и 2,3-дигидробензофуран-5-ил [84], фенотиазин [85], остатки тирозина и триптофана [88, 89], 3-аминофенил и 3-нитрофенил [87, 106], бензофуразан [98]. Л – линкер, Р – электроактивная функциональная группа.

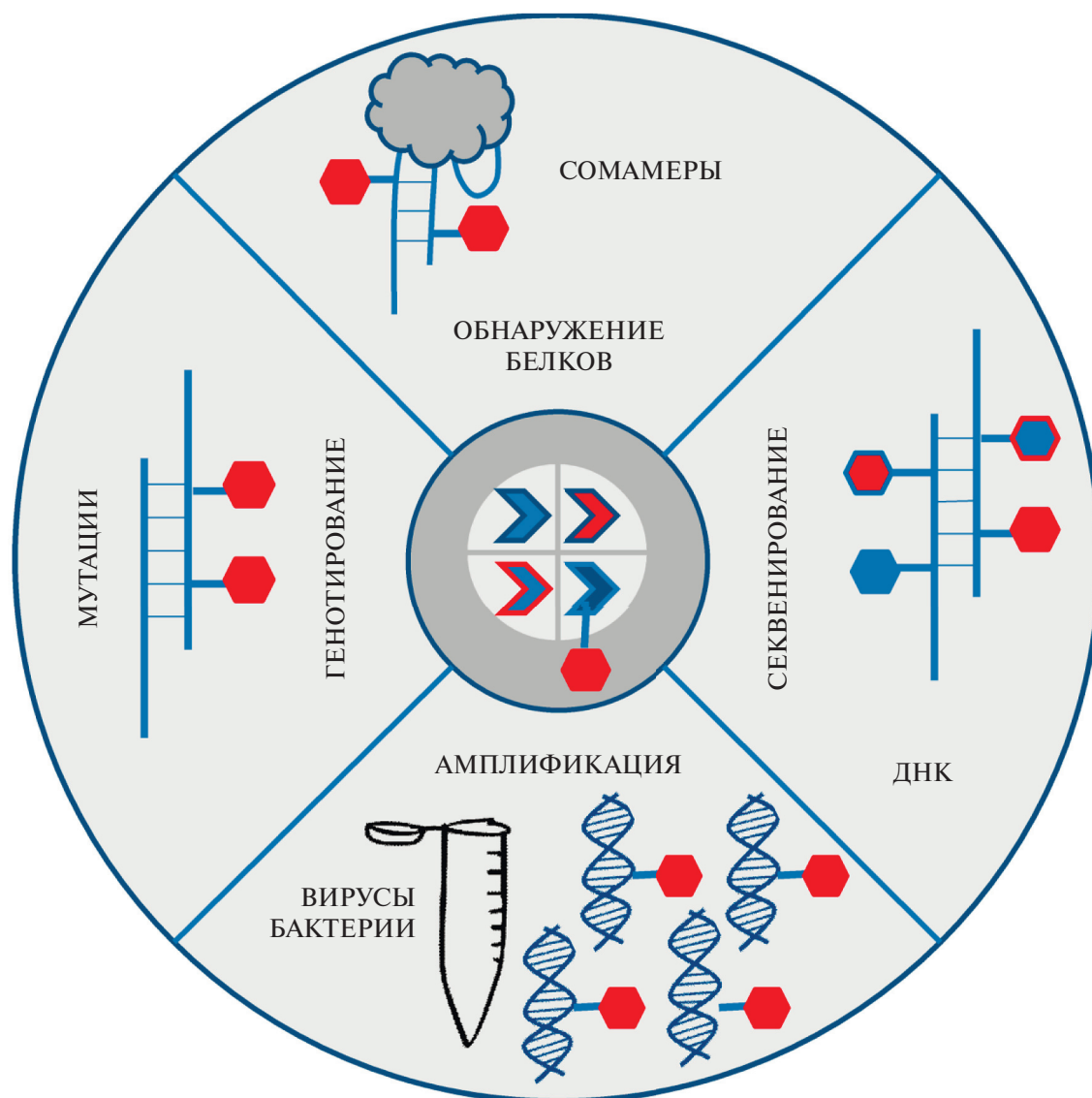


Рис. 3. Основные сферы применения искусственных электроактивных нуклеотидов.

электрохимическое обнаружение модифицированных молекул нуклеиновых кислот с помощью одноразовых печатных графитовых или золотых электродов может обеспечить технически простой, быстрый и экономичный подход к оценке результатов изотермической амплификации ДНК [88].

РАЗНООБРАЗИЕ НУКЛЕОТИДОВ С ЭЛЕКТРОАКТИВНЫМИ МЕТКАМИ

Модифицированные по азотистым основаниям нуклеотиды получают либо классическим трифосфорилированием модифицированных нуклеозидов, либо с помощью простых одностадийных реакций перекрестного связывания галогенированных дезоксинуклеозидтрифосфатов

(дНТФ) в воде [55, 83]. Напомним, что синтез производных нуклеотидов требует присоединения новой группы к остатку азотистого основания либо непосредственно, либо через линкер в положении С5 цитозина и урацила, либо в положении С7 7-дезааденина и 7-дезагуанина (рис. 1) [73, 74, 76–78, 83–85, 87, 92, 98, 104]. Это делает производные дАТФ и дГТФ более отдаленными аналогами природных нуклеотидов, чем конъюгаты дЦТФ и дУТФ (дТТФ) [92]. С5-замещенные пиримидиновые и С7-замещенные 7-дезапуриновые дНТФ обычно являются хорошими субстратами ДНК-полимераз, тогда как С8-замещенные пуриновые дНТФ – плохими [55, 83]. Также известно, что ацетиленовый спейсер между объемным ароматическим заместителем и азотистым основанием улучшает

субстратные свойства модифицированных дНТФ [83].

Палитра модифицированных нуклеотидов с электроактивными метками насчитывает несколько десятков соединений – производных всех видов природных нуклеотидов: дГТФ, дАТФ, дТТФ (дУТФ) и дЦТФ. Электроактивными группами в таких искусственных нуклеотидах выступают: цианиновые красители Cu_3 и Cu_5 [63–66], метиленовый синий [73], ТЕМРО [94], нильский синий [95], ферроцен [73–78, 103–109], антрахинон [73, 83, 91, 94, 106, 107], остатки тирозина и триптофана [88, 89], 5-(4-азидофенил) [97], бензофуразан [98], аминифенил и нитрофенил [82, 87, 110], фенотиазин [73, 85], 4-гидрокси-3-метоксифенил и 2,3-дигидробензофуран-5-ил [84], карборан или металакарборан [78], флуоресцеин и родамин [90]. Примеры структур электроактивных остатков модифицированных нуклеотидов в сочетании с линкерами приведены на рис. 2. Электрохимическое поведение искусственных меченых нуклеотидов изучают различными методами, как правило, включающими циклическую вольтамперометрию в комбинации с квадратно-волновой или дифференциальной импульсной вольтамперометрией. Необходимо отметить, что многие красители обладают электрохимической активностью и могут выступать как в роли флуоресцентных, так и электроактивных меток [90, 111]. В пионерских работах электроактивные нуклеотиды ДНК и РНК названы “электротидами” (от англ. *electrotide*) [106, 107]. Остаток гуанина или 7-дезагуанина может выступать в качестве самостоятельной электроактивной метки в онДНК из-за природной электроактивности гуанина [78, 83, 96, 103, 104]. Если нуклеотиды, меченные флуоресцентными метками, такими как флуоресцеин, родамин, Cu_3 , Cu_5 , коммерчески доступны, то большинство нуклеотидов с электроактивными метками синтезированы только в рамках конкретных научных проектов. В большинстве работ в качестве меток нуклеотидов выступают функциональные группы с заведомо известными электрохимическими свойствами [112]. Так, электрохимическое окисление фенольных и индольных соединений достаточно подробно изучено [113–115]. Тем не менее на электрохимическое поведение меток в составе конъюгатов с нуклеотидами влияют природа нуклеотида и условия проведения измерений (состав фонового электролита, pH среды, материал электрода). Нуклеотиды дАМФ, дЦМФ, дАТФ и дЦТФ,

меченные 4-гидрокси-3-метоксифенилом, демонстрируют первый пик окисления при 0.3–0.5 В [84]. Конъюгаты дАМФ и дЦМФ с фенотиозином окисляются при потенциале около 0.6 В [85]. Сигналы окисления дАМФ, дЦМФ, модифицированных 2,3-дигидробензофураном, находятся в диапазоне 0.8–1.1 В (электрод из пиролитического графита, ацетатный буферный раствор, pH 5.0) [84]. Производные дУТФ, модифицированные остатками тирозина или триптофана, дают четкие пики окисления при 0.5–0.7 В (печатный графитовый электрод, фосфатный или Трис-буферный раствор, нейтральная среда) [88, 89]. Нуклеотиды дАТФ и дЦТФ, модифицированные по азотистым основаниям окислительно-восстановительными группами, такими как ферроцен и его производные (с обратимым сигналом в диапазоне 0.05–0.5 В) [75] или антрахинон (с парой обратимых пиков при потенциале около –0.4 В) [83] продемонстрировали электроактивность при более низких значениях потенциала. Ферментативное кодирование нуклеиновых кислот требует набора нуклеотидов, конъюгированных с электроактивными группами, имеющими различные окислительно-восстановительные потенциалы, так что каждая из них может быть считана в присутствии других, давая отчетливый сигнал [85].

Среди электроактивных фрагментов, способных восстанавливаться на поверхности электродов при относительно низких отрицательных потенциалах, наиболее распространение получила ароматическая нитрогруппа [82, 87, 110]. Ароматическая нитрогруппа рассматривается как перспективная метка в стратегии мультipotенциального вольтамперометрического кодирования ДНК [82, 83, 87, 91]. Классическая схема восстановления ароматической нитрогруппы на ртутном электроде в кислой среде дана в обзоре 1978 г. [116]. Позднее механизм электровосстановления нитрогруппы был предметом детального исследования в работах Зумана и Лавирона [117, 118]. Интересно, что ароматическое нитросоединение нитробензол было первой органической молекулой, изученной методом полярографии еще в 1925 г. [119]. Восстановление ароматической нитрогруппы дает на вольтамперограмме необратимый пик при потенциалах примерно от –0.35 до –0.65 В и пару пиков – NHOH/NO при потенциале около 0 В, появляющуюся в результате окисления – NHOH и дальнейшего восстановления – NO [82, 83, 87, 92, 98, 102]. Следует отметить, что для

наблюдения окислительно-восстановительной пары $-\text{NHOH}/-\text{NO}$ на циклических вольтамперограммах требуются два последовательных скана [86, 91]. Обычно токи пиков окислительно-восстановительной пары $-\text{NHOH}/-\text{NO}$ значительно ниже значения тока пика восстановления самой ароматической нитрогруппы. На ртутном электроде для олигонуклеотида, меченного 3-нитрофенильной группой, получен симметричный пик восстановления при -0.5 В, в то время как его отклик на электроде из пиролитического графита довольно слабый [87], что, скорее всего, вызвано разной степенью адсорбции анализируемого олигонуклеотида на ртути и углероде. К сожалению, в настоящее время отсутствуют публикации, в которых был бы досконально изучен механизм восстановления нитрофенильной группы на электродах из углеродных материалов. Синтезирован полный набор нуклеотидов, модифицированных нитрофенильной группой; нитропроизводные дГТФ, дАТФ, дЦТФ или дУТФ успешно включены в цепи ДНК посредством различных ферментативных реакций как по отдельности, так и в смеси с другими модифицированными нуклеотидами [82, 83, 86, 87, 91, 110]. В дополнение к нуклеотидам, меченным одной электроактивной группой, ароматическая нитрогруппа использовалась в составе полифункциональных фрагментов, в частности в нуклеотидах, меченных 2,4-динитрофенилгидразоном, нитробензофуразаном [92] или N-метил-4-гидразино-7-нитробензофуразаном [102].

Следует отметить, что наблюдаемые различия в значениях потенциалов пиков модифицированных нуклеотидов обусловлены не только природой электроактивного фрагмента, но и различием в длине и структуре спейсера, с помощью которого электроактивная группа конъюгирована с азотистым основанием нуклеотида. В частности, данный эффект наблюдали для дУТФ, модифицированных ароматическими группами тирозина, триптофана [88, 89], или ферроцена [106, 108]. Значения токов и потенциалов пиков окисления или восстановления модифицированных нуклеотидов сильно зависят от параметров регистрации вольтамперограмм, например скорости развертки потенциала, а также от общих условий эксперимента — материала электрода, состава фонового электролита, pH среды. В зависимости от условий эксперимента различные дезокси-нуклеозидтрифосфаты, меченные нитрофенильной группой (в основном

производные дАТФ и дЦТФ), генерировали пики восстановления ароматической нитрогруппы при потенциалах: от -0.5 до -0.65 В (ацетатный буферный раствор, pH 5.0 и Трис-буферный раствор, pH 7.3) на электроде из пиролитического графита [82, 87]; около -0.35 или -0.5 В (ацетатный буферный раствор, pH 5.0) [87, 92] и около -0.45 В (формат аммония + фосфат натрия, pH 6.9) [91] на ртутном электроде; около -0.6 В (ацетатный буферный раствор, pH 5.0) на алмазном электроде, допированном бором [86]. Кроме того, показано, что значения токов и потенциалов регистрируемых пиков (восстановления или окисления) меченых дНТФ сильно зависят от типа модифицированного азотистого основания [75, 82, 86, 87, 91, 92]. Например, значения потенциалов пиков восстановления дНТФ, меченных 3-нитрофенилом, увеличиваются в ряду $\text{дГТФ} < \text{дЦТФ} < \text{дАТФ} < \text{дУТФ}$ (дТТФ), что указывает на наиболее трудное восстановление ароматической нитрогруппы в дУТФ (при -0.665 В, электрод из пиролитического графита, Трис-буферный раствор, pH 7.3) [82, 87].

Основной задачей многих экспериментальных работ стало получение новых модифицированных нуклеотидов и изучение их электрохимических свойств с целью выбора метки, способной окисляться или восстанавливаться при наиболее низких положительных или отрицательных потенциалах с высокой аналитической чувствительностью для последующего определения концентрации ДНК или регистрации нуклеотидных замен и мутаций [74, 76, 77, 78, 103]. При этом сигнал введенной метки может накладываться на сигналы остатков Г и/или А в ДНК-олигонуклеотидах, чего лучше избегать. Кроме того, желательно, чтобы встроенная метка давала только один четкий пик окисления или восстановления без каскада электрохимических превращений. При выборе метки немаловажное значение имеет, обладает ли новая группа интеркалирующим эффектом в ДНК. Например, остатки тирозина и триптофана не включены в список интеркаляторов ДНК, в отличие от метиленового синего [73] или комплексов катионов металлов с полициклическими ароматическими лигандами [79]. На практике выбор четырех электроактивных групп, дающих при совместном присутствии отдельные сигналы на вольтамперограмме, является непростой задачей. Одновременно проводят биохимические исследования с целью выяснить, насколько хорошим субстратом ДНК- или РНК-полимераз является искусственный нуклеотид

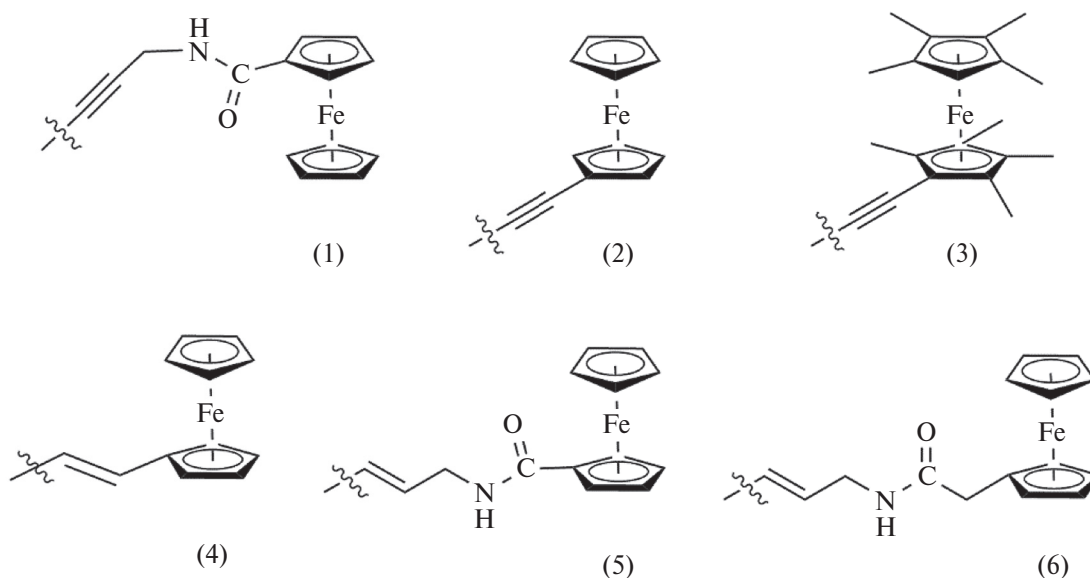


Рис. 4. Ферроцен и его производные в качестве электроактивных меток нуклеотидов: ферроценкарбоксамид (1), незамещенный ферроцен (2), октаметилферроцен (3), ферроценвинил (4), 5-(3-ферроценкарбоксамидопропенил-1) (5) и 5-(3-ферроценацетамидопропенил-1) (6), связанные линкером с атомом углерода С7 или С5 пуринового или пиримидинового азотистого основания нуклеотида (ДНК или РНК) соответственно [74–78, 103–109, 120]. Для модифицированных дУТФ от (1) к (3) [75], от (4) к (5) [106] и от (6) к (5) [108] значения потенциалов пиков окисления возрастают.

по сравнению с природным, включая его в различные реакции амплификации.

На сегодняшний день широкое распространение получили нуклеотиды, меченные ферроценом и его производными (рис. 3) [74–78, 103–109, 120]. Заместители в молекуле ферроцена сильно влияют на потенциалы окисления модифицированных нуклеотидов [121]. Конъюгаты с ферроценом получены для всех дНТФ, а ферроценовые производные дАТФ и дЦТФ стали коммерчески доступными через Jena Bioscience (<https://www.jenabioscience.com>) [76]. Это достижение стало результатом многолетних совместных исследований ученых из разных стран. Например, сконструированы и синтезированы три 7-дезаадениновых и цитозиновых нуклеозидтрифосфата, содержащих незамещенный ферроцен, октаметилферроцен или ферроценкарбоксамид, связанные алкиновым линкером в положении С7 или С5 соответственно (рис. 4) [75]. Электрохимическое поведение модифицированных ферроценом нуклеотидов изучали с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии на электроде из пиролитического графита (ацетатный буферный раствор, pH 5.0). Производные дНТФ, конъюгированных с разными

производными ферроцена, продемонстрировали вольтамперометрические пики, соответствующие обратимому одноэлектронному окислению фрагмента ферроцена [75]. В случае конъюгатов ферроцена с 7-дезааденином наблюдали дополнительный пик необратимого окисления пирролопиримидиновой группы при 1.03–1.10 В (отн. Ag/AgCl). Обогащенный электронами октаметилферроцен окисляется при потенциале, примерно на 300 мВ более низком, чем потенциал окисления незамещенного ферроцена. Данная модификация молекулы ферроцена облегчает его окисление, однако ведет к нестабильности меток на воздухе. С другой стороны, обедненные электронами связанные амидной связью производные ферроцена дают сигнал окисления, смещенный примерно на 100 мВ к более высоким значениям. Нуклеотиды, содержащие октаметилферроцен, демонстрируют дополнительный необратимый пик при 1.20 В [75]. Поскольку меченные октаметилферроценом нуклеотиды и олигонуклеотиды склонны к окислению на воздухе, дальнейшие исследования проводили только на стабильных производных, содержащих незамещенный ферроцен и карбоксамидоферроцен [75]. Конъюгация

нуклеотида с электроактивными функциональными группами может приводить как к смещению потенциала окисления или восстановления метки по сравнению с ее свободной формой, так и не менять его. Так, свободный ферроцен дает хорошо выраженный пик, благодаря обратимому одноэлектронному окислительно-восстановительному процессу Fe(II)/Fe(III) при 0.245 В (электрод из пиролитического графита, Трис-буферный раствор, pH 7.3) [104]. Аналогичные обратимые электрохимические сигналы наблюдали для несущих ферроценовые метки на ацетиленовых линкерах дУТФ и дАТФ: потенциалы их окисления заметно смещены (на 105 мВ и 155 мВ соответственно) по сравнению со свободным ферроценом. Электроноакцепторные эффекты электронного сопряжения ароматических нуклеиновых оснований и меток затрудняют окисление комплексов металлов по сравнению с несвязанными комплексами (в данном случае ферроцена), что приводит к положительным сдвигам окислительно-восстановительных потенциалов. Влияние 7-дезааденина на окислительно-восстановительный потенциал ферроценовой метки более значимо, чем влияние урацилового остатка. Результирующая разница в потенциалах пиков окисления модифицированных ферроценом нуклеотидов (около 50 мВ) достаточна для обеспечения дифференциации между конъюгатами дУТФ и дАТФ [104]. На примере нуклеотидов дУТФ, меченных ферроценом, также прослеживается зависимость окислительно-восстановительных потенциалов пары пиков Fe(II)/Fe(III) от длины линкера, связывающего метку и нуклеотид [106, 108]. Так, два меченных ферроценом аналога дТТФ, 5-(3-ферроценкарбоксамидопропенил-1) дУТФ (дУТФ-**Fc1**) и 5-(3-ферроценацетамидопропенил-1) дУТФ (дУТФ-**Fc2**) (рис. 4), на циклических вольтамперограммах показали обратимое окислительно-восстановительное поведение ферроценильных фрагментов в Трис-ацетатном буферном растворе со значениями $E_{1/2}$, равными 398 и 260 мВ соответственно (отн. Ag/AgCl, pH 7.4) [108]. На циклической вольтамперограмме интервал между потенциалами пиков окисления и восстановления дУТФ-**Fc1** составил 60 мВ, что соответствует обратимой окислительно-восстановительной реакции ферроценильного фрагмента в данной буферной системе. Окислительно-восстановительный потенциал дУТФ-**Fc1** на 90 мВ превышает потенциал ферроценкарбоксилата (310 мВ, отн. Ag/AgCl),

измеренный в том же буферном растворе, что отражает замену заместителя пентадиенильного кольца на более электроноакцепторный ($-\text{COO}^-$ на $-\text{CONHR}$) [108].

Первоначально метод ферментативного введения электроактивных меток в нуклеиновые кислоты был сосредоточен на мультипотенциальном кодировании ДНК путем объединения нескольких ортогональных (дискретных) функциональных групп для разработки методов электрохимического определения оснований при секвенировании нуклеиновых кислот [8, 78, 82, 83, 85, 87, 91, 98, 103]. Идея использования электроактивных меток для мультипотенциального кодирования требовала мечения всех четырех нуклеотидных оснований в качестве альтернативы многоцветному флуоресцентному методу. В этом ключе большие надежды возлагались на ароматическую нитрогруппу, дающую четкий пик восстановления, в сочетании с другими метками, способными окисляться на поверхности электрода [82, 91]. Другой подход – гибридизация иммобилизованного ДНК-праймера с исследуемой последовательностью, а затем ферментативное удлинение с помощью реакции удлинения праймера (англ. primer extension reaction, **PEX**) [78, 103]. Однако из-за довольно узких рабочих окон потенциалов (отличающихся на разных электродах), применимых для анализа ДНК, и трудностей в разработке и синтезе ортогональных и радиометрических электроактивных меток этот подход долгое время оставался нереализованным. Только недавно разработан и опубликована комбинация из четырех окисляемых меток (дикарбанидоундекаборат ($[\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]^-$); [3,3-железо-бис(1,2-дикарболлид)]– ($[\text{Fe}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^{2-}$); 7-ферроценилэтинил и 7-дезагуанин), которые могут быть присоединены к четырем нуклеотидам, ферментативно включаемым ДНК-полимеразой в олигонуклеотидные цепи, содержащие до 16 модифицированных нуклеотидов подряд [78]. Благодаря уникальным окислительно-восстановительным потенциалам, данные метки можно одновременно и радиометрически обнаруживать с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии на стеклоуглеродных электродах [78]. Это первая демонстрация концепции мультипотенциального кодирования оснований ДНК, которая позволила определить относительное содержание (соотношение) всех четырех нуклеотидных оснований в неизвестной последовательности ДНК, но количественная оценка общего количества

нуклеотидов каждого вида оставалась нерешенной задачей. В работе [103] этот вопрос был рассмотрен путем сравнения двух вариантов количественной оценки числа нуклеотидов: (1) использования внутреннего стандарта в праймере (7-дезаза-2'-дезоксигуанозина в ДНК-праймере) и (2) использования пятой электроактивной метки (модифицированного виологена праймера), которое облегчает получение реперного аналитического сигнала, позволяющего определить точное количество каждой метки и, следовательно, каждого нуклеотидного основания, присутствующего в определенной последовательности ДНК. Эта пятая ортогональная электроактивная метка выступала в качестве точки отсчета для нормализации сигнала, что позволило провести точный электрохимический анализ последовательности за одно считывание. Оба способа были протестированы с применением различных последовательностей ДНК, и полученные вольтамперметрические сигналы нормализованы с использованием либо внутреннего стандарта (7-дезаза-2'-дезоксигуанозина), либо пятой метки (виологена). Было продемонстрировано полное соответствие фактическому составу нуклеотидов, что открывает перспективы для целенаправленного анализа последовательности ДНК [103].

АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С УЧАСТИЕМ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ МЕЧЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Амплификация нуклеиновых кислот с участием искусственных модифицированных нуклеотидов была впервые использована для синтеза функциональных нуклеиновых кислот, аптамеров и соматомеров, обладающих сродством к различным лигандам, а также флуоресцентных меченых олигонуклеотидов как альтернатива классическим методам синтеза [55]. Классическими способами получения модифицированных нуклеиновых кислот являются твердофазный синтез олигонуклеотидов с использованием фосфоамидитов функционализированных нуклеозидов и постсинтетическая модификация олигонуклеотидов [55]. Твердофазный химический синтез модифицированных олигонуклеотидов с использованием фосфоамидитов нуклеозидов, конъюгированных с дополнительными функциональными группами, часто проблематичен из-за их несовместимости с условиями определенных

стадий синтеза (кислотного детритилирования, конденсации, экпирования, окисления и удаления ацильных защитных групп с отщеплением синтезированных олигонуклеотидов от твердофазного носителя обработкой аммиаком на финальной постсинтетической стадии), необходимости использования дополнительных защитных групп и иногда низкого выхода на стадии конденсации. С другой стороны, постсинтетическая модификация олигонуклеотидов требует селективных и мягких реакций и в большинстве случаев используется только для дальнейших преобразований функциональных групп уже модифицированных олигонуклеотидов. Помимо химического синтеза, модифицированные нуклеиновые кислоты могут быть получены ферментативным путем посредством включения модифицированных нуклеозидтрифосфатов ДНК- или РНК-полимеразами [55]. Детальный экскурс в историю ферментативного синтеза функциональных нуклеиновых кислот дан в обзорах Хочека и Фойты [8, 55]. Первая работа по полимеразному включению функционализированного по азотистому основанию нуклеотида в цепь ДНК была опубликована в 1981 г. [122]: был получен дУТФ, биотинилированный в положении С5, и обнаружено, что он является субстратом для нескольких ДНК-полимераз. Позже нуклеотид дУТФ, меченный красителем FluoroRed, и нуклеотид дЦТФ, меченный родамином 110, применили для флуоресцентного мечения ДНК путем удлинения праймера с использованием экзополимеразы Klenow [123]. Далее получили дУТФ, меченные красителем TAMRA, где флуоресцентная метка прикреплена к нуклеотиду с помощью ацетиленового линкера к положению С5 урацила [124]. Затем данные модифицированные нуклеотиды были включены полимеразой TaqFS путем удлинения праймера с получением флуоресцентных конъюгатов ДНК. Саваи и др. [125] синтезировали модифицированные дУТФ, содержащие аминокислотные остатки в положении С5, и исследовали их субстратные свойства относительно ДНК-полимеразы КОД Dash в ходе ПЦР. ПЦР с внесением С5-модифицированного дУТФ, имеющего аминокислотную группу (аргинил, гистидил, лизил, фенилаланил, триптофанил, лейцил, пролил, глутаминил, серил, О-бензилсерил или треонил), дала соответствующие полноразмерные продукты ПЦР с хорошим выходом. Хотя было обнаружено, что аналоги дУТФ, содержащие аспартил, глутамил или цистеинил, являются плохими субстратами

для ДНК-полимеразы KOD Dash, оптимизация условий ПЦР привела к получению значимого количества полноразмерных продуктов. В случае реакции с использованием аналога дУТФ, имеющего цистеинильную группу, добавление восстановителя улучшало выход реакции [125]. Позже были получены несколько типов нуклеотидов, модифицированных ферроценом, привлекательных для электрохимического обнаружения, которые были включены в последовательность ДНК и использованы для решения различных биоаналитических задач [74–78, 103–106, 108, 109]. Возникает закономерный вопрос о совместимости модифицированных нуклеотидов с существующими классами различных ДНК-полимераз. К сожалению, из опубликованных исследований нельзя сделать однозначный вывод об универсальной ДНК-полимеразе. Саваи и др. [126, 127], исследуя эффективность различных ДНК-полимераз относительно включения С5-замещенных пиримидиновых дНТФ, подтвердили, что полимеразы семейства В (KOD Dash, Pwo и Vent), как правило, более эффективны, чем полимеразы семейства А. Однако для каждого нового модифицированного нуклеотида необходим скрининг нескольких полимераз, чтобы найти наиболее эффективную для конкретного нуклеотида. Совместимость искусственных электроактивных нуклеотидов с рядом ДНК-полимераз проанализирована в обзоре [55]. Из-за широкого структурного разнообразия и целого спектра биологических функций конструирование модифицированных молекул РНК даже более привлекательно, чем модификация ДНК. Нуклеозидтрифосфаты (НТФ), функционализированные по основанию, также были получены и успешно включены в цепь РНК с помощью соответствующих полимераз [55]. Биотинилированный УТФ был первым примером модифицированного НТФ, инкорпорированного РНК-полимеразой T7 [122]. Конъюгаты УТФ с ферроценом или антрахиноном были успешно встроены в цепь РНК с помощью T7 и SP6 РНК-полимераз [107].

В целом модифицированные нуклеотиды с электроактивными метками хорошо работают в формате РЕХ [82, 83, 87, 92, 98, 102, 106, 108] или присоединяются к 3'-концу ДНК-олигонуклеотида терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (англ. terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) [85, 87]. В то же время искусственные модифицированные нуклеотиды во многих случаях препятствуют амплификации

днДНК (вплоть до полной остановки реакции) за некоторыми исключениями [74, 76, 84, 85, 88, 89, 97, 108, 109, 110, 125]. Предположительно, это связано с тем, что в ходе амплификации полимеразы должна "считывать" модифицированную цепь ДНК, служащую матрицей. В целом скорость реакции амплификации снижается в присутствии искусственных модифицированных нуклеотидов [64, 74, 76, 83, 85, 97, 108]. Например, увеличение концентрации флуоресцентных меченых дУТФ-Су5 в реакционной смеси выше уровня 8% (вместо природного дТТФ) значительно снижало выход продукта ПЦР как для Taq, так и для Vent (exo-) ДНК-полимераз; оптимальный процент замещения составил 3–5% в зависимости от типа модифицированного нуклеотида и полимеразы [64]. Помимо этого, как показал собственный опыт авторов данного обзора, включение модифицированных нуклеотидов в цепь днДНК требует высокой активности фермента. Даже небольшое снижение активности фермента приводит к падению уровня встраивания модифицированных нуклеотидов в днДНК и, вероятно, служит причиной образования укороченных продуктов [110]. Интересно, что для встраивания искусственных нуклеотидов имеет значение соотношение концентраций всех нуклеотидов в реакционной смеси. Так, увеличение концентрации модифицированного антрахиноном дНТФ в десять раз по сравнению с природным дНТФ приводило к ингибированию реакции РЕХ [83].

Изучено влияние структуры модифицированных нуклеотидов на совместимость с различными полимеразами в реакциях амплификации. Так, на примере дУТФ, меченных красителем Су5, показано, что в ПЦР наиболее эффективным субстратом для полимераз Taq и Vent (exo-) характеризуется электронейтральность флуорофора и средней или большой длины связующих звеньев между репортерной группой и пиримидиновым основанием [64]. Нуклеотиды дУТФ, меченные электронейтральными цвиттер-ионными аналогами флуорофоров Су3 или Су5, вступали в ПЦР, катализируемую Taq-полимеразой, примерно на порядок эффективнее, чем дУТФ, меченные отрицательно заряженными аналогами цианиновых красителей [65]. Введение взаимокompенсирующих зарядов во флуорофоры или другие функциональные группы, сопряженные с нуклеотидами, можно рассматривать как основу для создания ПЦР-совместимых модифицированных нуклеотидов

[65]. Эффективность флуоресцентного мечения ДНК Таq-полимеразой в ПЦР при введении дУТФ, модифицированных аналогами красителя Су5 (2–10% замещения дТТФ в реакционной смеси), распознавание образования дуплексов ДНК зависят также от относительной ориентации красителя и линкера между красителем и пиримидиновым основанием, а также от присутствия гидрофильных групп в красителе [128]. Аналогично в реакциях РЕХ два дУТФ, меченных ферроценом и отличающихся друг от друга лишь длиной линкера, связывающего метку с нуклеотидом, показали разную совместимость с ферментами [108]. Тем не менее в недавних публикациях РЕХ и изотермическую амплификацию ДНК с модифицированными ферроценом нуклеотидами использовали для разработки диагностических платформ для выявления однонуклеотидного полиморфизма, основанных на электрохимическом детектировании сигнала меченых нуклеотидов [66, 73].

Введение в реакцию амплификации синтетических модифицированных нуклеотидов вносит в ее течение свои особенности. Показано, что присутствие модифицированного нуклеотида в реакционной смеси для амплификации обычно приводит к более низкому выходу продуктов или даже полному ингибированию реакции амплификации [8, 74, 76, 85, 90, 97, 107, 108]. Следовательно, общий выход встроенных меток, который обычно определяет чувствительность электрохимического детектирования, становится компромиссом между уровнем мечения отдельного ампликона и выходом меченых ампликонов в реакции амплификации [74, 76, 85, 90, 97, 107]. Например, модифицированный флуоресцеином или родамином дУТФ продемонстрировал значительное снижение выхода реакций амплификации ПЦР и изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА, англ. recombinase polymerase amplification, RPA) с увеличением доли нуклеотида в реакционной смеси относительно природного дТТФ при повышении уровня мечения ампликонов [90]. Другим примером включения модифицированных нуклеотидов в ПЦР является использование 5-(4-азидофенил)-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфатов (дЦТФ-А3Ф), где ампликоны днДНК ожидаемого размера получены при 10–80%-ной замене дЦТФ на дЦТФ-А3Ф, в то время как при 100%-ной замене дЦТФ на дЦТФ-А3Ф полноразмерных продуктов ПЦР не наблюдалось [99]. Практически неизменный

выход ампликонов зарегистрирован вплоть до 60%-ного замещения дЦТФ на дЦТФ-А3Ф, в то время как для 80%-ной замены наблюдалось заметное снижение интенсивности полосы ампликонов на гель-электрофореграмме [97]. Ранее показано, что заметный выход продукта ПЦР может наблюдаться только при 50%-ной замене дАТФ на связанный с фенотиразином дАТФ [85]. При включении в ПРЦ дУТФ, меченных ферроценом, на гель-электрофореграмме наблюдали выход полноразмерных продуктов (длиной 998 п.о.) при 25–75%-ном замещении дТТФ на дУТФ-Fc [108].

Сегодня сформировался запрос на вывод ДНК-диагностики за стены специализированных лабораторий и проведения тестирования “на месте оказания медицинской помощи” и “в полевых условиях” в медицине, экологии и сельском хозяйстве [4, 129]. В рамках этой тенденции использование изотермической амплификации ДНК рассматривается как привлекательный подход к обнаружению инфекционных агентов *in situ*, благодаря постоянной температуре реакции, которая снижает сложность требуемого оборудования, обеспечивая при этом время и чувствительность тестирования, сравнимые с таковыми при ПЦР [2, 130–134]. Изотермическая амплификация может быть интегрирована в различные биосенсорные системы, в том числе основанные на электрохимической регистрации результата реакции [6, 7, 129]. Помимо этого, появляются новые задачи для классических методов амплификации, таких как ПЦР. Так, производные дУТФ, меченные аналогом Су5, использовали в реакции ПЦР для идентификации циркулирующих в России вариантов коронавируса SARS-CoV-2 с помощью системы ПЦР в реальном времени, основанной на праймерах, специфичных к консервативному генетическому локусу, фрагменту (при 2%-ном замещении природных дТТФ) [135]. Выбор консервативного участка E-гена, кодирующего малый трансмембранный белок E, в качестве мишени для обратной транскрипции с последующей амплификацией позволил выявлять коронавирус независимо от его подтипов, характеризующихся антигенной гетерогенностью в N- и S-белках [135]. Комбинация электроактивных меченых нуклеотидов с изотермической амплификацией ДНК и последующим прямым электрохимическим детектированием модифицированных ампликонов днДНК перспективна для обнаружения патогенных микроорганизмов или вирусов

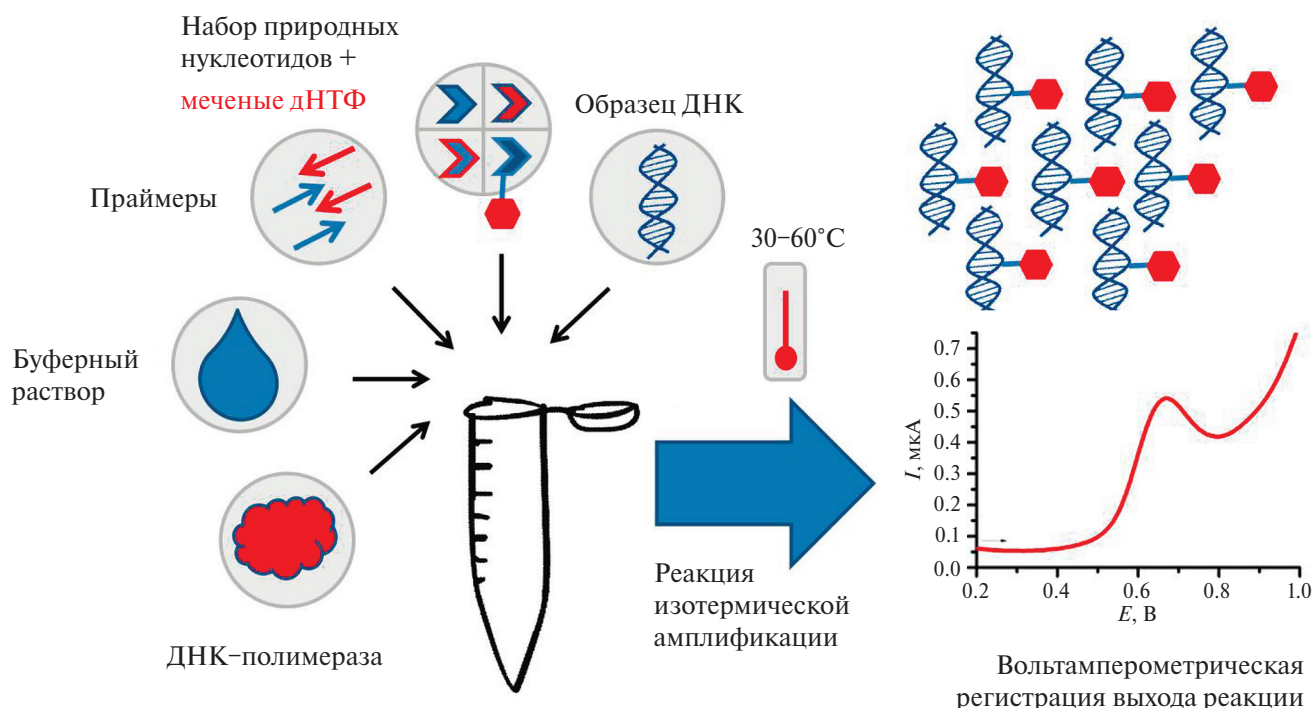


Рис. 5. Объединение реакции изотермической амплификации с внесением модифицированных нуклеотидов и вольтамперометрической регистрации выхода — путь к определению вирусного или бактериального заражения *in situ*.

в “полевых условиях” с использованием портативных и технически простых электрохимических устройств (рис. 5). Предпринято несколько попыток включить модифицированные нуклеотиды с электроактивными метками в ампликоны ДНК с помощью методов изотермической амплификации, таких как РПА [76, 89] и амплификации с использованием полимеразы и nicking фермента (*nicking enzyme amplification reaction*, NEAR, в результате которой генерируются многочисленные короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, копирующие матричную последовательность) [85, 136]. Следует отметить, что в NEAR фрагменты онДНК синтезируются на немодифицированной матрице, в то время как в РПА, аналогично ПЦР, требуется полимеразы для “считывания” модифицированной цепи ДНК [76, 85, 89, 134]. На практике ферменты, используемые в РПА, более “капризны” по отношению к искусственным нуклеотидам по сравнению с ферментами, используемыми в ПЦР [89, 90]. Так, производные дУТФ, меченые остатками тирозина, были успешно включены в ампликоны днДНК с помощью РПА при 100%-ной замене дТТФ [89]. В другом случае при 100%-ной замене немодифицированного нуклеотида на модифицированный ферроценом на гель-электрофореграмме не наблюдалось

образования полноразмерных ампликонов [76]. Предположительно, существует зависимость скорости и выхода реакций амплификации ДНК в присутствии искусственных модифицированных нуклеотидов от последовательности образующегося ампликона. Флуоресцентно меченные дУТФ и дЦТФ, содержащие цвиттер-ионный индодикарбоцианиновый краситель, аналог Су5, показали хорошую совместимость с РПА, дав полноразмерные целевые продукты фрагмента гена *ebpS* возбудителя бактериальной пневмонии (*Staphylococcus aureus*) с высокой плотностью флуоресцентной метки (при 4%-ном замещении соответствующих природных нуклеотидов в реакционной смеси) [137]. Кроме того, электроактивные модифицированные нуклеотиды использовались для детектирования белков (например, белка p53) [100], создания геносенсоров [74] и выявления однонуклеотидных полиморфизмов [73, 76, 77, 106], ассоциированных с различными заболеваниями (рис. 3).

* * *

Обнаружение и идентификация нуклеиновых кислот — одно из центральных направлений современной биологической химии. Ферменты, модифицирующие нуклеиновые кислоты, такие как полимеразы, лигазы и нуклеазы,

используемые в генотипировании, пока не нашли широкого применения в электрохимических методах анализа. Таким образом, необходимо прилагать дополнительные усилия для более тесной интеграции электрохимии и молекулярной биологии. Электрохимические методы, обладающие высокой чувствительностью, низкими затратами на оборудование, возможностью миниатюризации и прямым электронным считыванием, являются привлекательной альтернативой общепринятым методам обнаружения нуклеиновых кислот, основанным на колориметрии или турбидиметрии. Хотя регистрация сигнала электроактивных нуклеиновых кислот может быть достигнута с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии или капиллярного электрофореза в сочетании с электрохимическим детектором, эти методы не подходят для миниатюризации анализа. Из известных электрохимических подходов маркировка электроактивными фрагментами обладает совокупными преимуществами: положительным сигналом обнаружения, низким фоном и возможностью введения нескольких электрохимически различимых меток. Современное развитие ДНК-технологий открывает все новые области применения синтетических модифицированных нуклеотидов, несущих электроактивные фрагменты, включая разработку портативных анализаторов для обнаружения патогенных микроорганизмов и вирусов *in situ*, электрохимических подходов к генотипированию, систем для анализа экспрессии генов, секвенирования нуклеиновых кислот, методов определения гибридизации и повреждения нуклеиновых кислот, а также регистрации взаимодействий ДНК–белок. Разработка, синтез и проверка производных нуклеотидов на электрохимическую активность и в качестве субстратов ДНК- и РНК-полимераз – новое направление на стыке органической, биологической и аналитической химии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-14-00247, <https://rscf.ru/project/19-14-00247/>

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mahanama A., Wilson-Davies E. Insight into PCR testing for surgeons // *Surgery (Oxford)*. 2021. V. 39. № 11. P. 759. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.09.016>
2. Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. № 22. P. 12491. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
3. De Felice M., De Falco M., Zappi D., Antonacci A., Scognamiglio V. Isothermal amplification-assisted diagnostics for COVID-19 // *Biosens. Bioelectron.* 2022. V. 205. Article 114101. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114101>
4. Wang C., Liu M., Wang Z., Li S., Deng Y., He N. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices // *Nano Today* 2021. V. 37. Article 101092. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101092>
5. Mukama O., Nie C., de Dieu Habimana J., Meng X., Ting Y., Songwe F. et al. Synergetic performance of isothermal amplification techniques and lateral flow approach for nucleic acid diagnostics // *Anal. Biochem.* 2020. V. 600. Article 113762. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113762>
6. Qi H., Yue S., Bi S., Ding C., Song W. Isothermal exponential amplification techniques: From basic principles to applications in electrochemical biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 110. P. 207. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.065>
7. Trotter M., Borst N., Thewes R., von Stetten F. Electrochemical DNA sensing – Principles, commercial systems, and applications // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 154. Article 112069. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112069>
8. Hocek M., Fojta M. Nucleobase modification as redox DNA labelling for electrochemical detection // *Chem. Soc. Rev.* 2011. V. 40. P. 5802. <https://doi.org/10.1039/C1CS15049A>
9. Fojta M. Redox Labeling of nucleic acids for electrochemical analysis of nucleotide sequences and DNA damage / *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications* / Eds. D.P. Nikolelis, G.-P. Nikoleli. New York: Springer, 2016. P. 309.
10. Супрун Е.В., Будников Г.К. Биоэлектрохимия как область анализа: исторические аспекты и современное состояние // *Журн. аналит. химии*. 2022. Т. 77. № 6. С. 490. <https://doi.org/10.31857/S0044450222060184> (*Suprun E.V., Budnikov H.C. Bioelectrochemistry as a Field of Analysis: Historical Aspects and Current Status* // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. № 6. P. 643. <https://doi.org/10.1134/S1061934822060168>)
11. de-los-Santos-Álvarez P., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Ordieres A.J., Tunon-Blanco P. Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications // *Electroanalysis*. 2004. V. 16. P. 1193. <https://doi.org/10.1002/elan.200402995>

12. *Diculescu V.C., Chiorcea-Paquim A.M., Oliveira-Brett A.M.* Applications of a DNA-electrochemical biosensor // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 79. P. 23. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.019>
13. *Fojta M., Daňhel A., Havran L., Vyskočil V.* Recent progress in electrochemical sensors and assays for DNA damage and repair // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 79. P. 160. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.018>
14. *Ferapontova E.E.* DNA electrochemistry and electrochemical sensors for nucleic acids // *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2018. V. 11. P. 197. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061417-125811>
15. *Oliveira S.C.B., Oliveira-Brett A.M.* Boron doped diamond electrode pre-treatments effect on the electrochemical oxidation of dsDNA, DNA bases, nucleotides, homopolynucleotides and biomarker 8-oxoguanine // *J. Electroanal. Chem.* 2010. V. 648. P. 60. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.06.020>
16. *Balučhová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.* Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1077. P. 30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.041>
17. *Hason S., Danhel A., Schwarzova-Peckova K., Fojta M.* Carbon electrodes in electrochemical analysis of biomolecules and bioactive substances: Roles of surface structures and chemical groups / *Nanotechnology and Biosensors* / Eds. D.P. Nikolelis, G.-P. Nikoleli. Amsterdam, Oxford, Cambridge: Elsevier, 2018. P. 51.
18. *Oliveira Brett A.M., Matysik F.M.* Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode // *J. Electroanal. Chem.* 1997. V. 429. P. 95. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(96\)05018-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(96)05018-8)
19. *Oliveira-Brett A.M., Piedade J.A.P., Silva L.D., Diculescu V.C.* Voltammetric determination of all DNA nucleotides // *Anal. Biochem.* 2004. V. 332. P. 321. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.021>
20. *Ferapontova E.E.* Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes // *Electrochim. Acta.* 2004. V. 49. P. 1751. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2003.12.006>
21. *Oliveira-Brett A.M.* Electrochemical DNA assays / *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications* / Ed. P.N. Barlett. John Wiley & Sons, 2008. P. 411.
22. *Špaček J., Daňhel A., Hason S., Fojta M.* Label-free detection of canonical DNA bases, uracil and 5-methylcytosine in DNA oligonucleotides using linear sweep voltammetry at a pyrolytic graphite electrode // *Electrochem. Commun.* 2017. V. 82. P. 34. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.07.013>
23. *Stempkowska I., Ligaj M., Jasnowska J., Langer J., Filipiak M.* Electrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode // *Bioelectrochemistry.* 2007. V. 70. P. 488. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.07.012>
24. *Dryhurst G., Elving P.J.* Electrochemical oxidation of adenine: Reaction products and mechanisms // *J. Electrochem. Soc.* 1968. V. 115. P. 1014. <https://doi.org/10.1149/1.2410847>
25. *Dryhurst G., Pace G.F.* Electrochemical oxidation of guanine at the pyrolytic graphite electrode // *J. Electrochem. Soc.* 1970. V. 117. P. 1259. <https://doi.org/10.1149/1.2407283>
26. *Goncalves L.M., Batchelor-McAuley C., Barros A.A., Compton R.G.* Electrochemical oxidation of adenine: a mixed adsorption and diffusion response on an edge-plane pyrolytic graphite electrode // *J. Phys. Chem. C* 2010. V. 114. № 33. P. 14213. <https://doi.org/10.1021/jp1046672>
27. *Li Q., Batchelor-McAuley C., Compton R.G.* Electrochemical oxidation of guanine: Electrode reaction mechanism and tailoring carbon electrode surfaces to switch between adsorptive and diffusional responses // *J. Phys. Chem. B* 2010. V. 114. № 21. P. 7423. <https://doi.org/10.1021/jp1021196>
28. *Dryhurst G.* Electrochemical determination of adenine and adenosine: Adsorption of adenine and adenosine at the pyrolytic graphite electrode // *Talanta.* 1972. V. 19. P. 769. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(72\)80004-3](https://doi.org/10.1016/0039-9140(72)80004-3)
29. *Dryhurst G.* Adsorption of guanine and guanosine at the pyrolytic graphite electrode: Implications for the determination of guanine in the presence of guanosine // *Anal. Chim. Acta.* 1971. V. 57. P. 137. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)80138-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80138-0)
30. *Hason S., Fojta M., Ostatna V.* Label-free electrochemical analysis of purine nucleotides and nucleobases at disposable carbon electrodes in microliter volumes // *J. Electroanal. Chem.* 2019. V. 847. Article 113252. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113252>
31. *de-los-Santos-Álvarez N., de-los-Santos-Álvarez P., Jesús Lobo-Castañón M., López R., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco P.* Electrochemical oxidation of guanosine and adenosine: Two convergent pathways // *Electrochem. Commun.* 2007. V. 9. № 8. P. 1862. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.04.018>
32. *Goyal R.N., Sangal A.* Electrochemical oxidation of adenosine monophosphate at a pyrolytic graphite electrode // *J. Electroanal. Chem.* 2003. V. 557. P. 147. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(03\)00367-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(03)00367-X)
33. *Goyal R.N., Singh U.P., Abdullah A.A.* Electrochemical oxidation of uracil and 5-halouracils at pyrolytic graphite electrode // *Indian J. Chem.* 2003. V. 42A. P. 42. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/20491>
34. *Brotons A., Vidal-Iglesias F.J., Solla-Gullón J., Iñiesta J.* Carbon materials for the electrooxidation of nucleobases, nucleosides and nucleotides toward cytosine methylation detection: A review // *Anal. Methods.* 2016. V. 8. P. 702. <https://doi.org/10.1039/C5AY02616D>

35. *Brotons A., Mas L.A., Metters J.P., Banks C.E., Iniesta J.* Voltammetric behaviour of free DNA bases, methylcytosine and oligonucleotides at disposable screen printed graphite electrode platforms // *Analyst*. 2013. V. 138. P. 5239. <https://doi.org/10.1039/c3an02050a>
36. *Vidláková P., Pivoňková H., Kejnovská I., Trnková L., Vorlíčková M., Fojta M., Havran L.* G-quadruplex-based structural transitions in 15-mer DNA oligonucleotides varying in lengths of internal oligo(dG) stretches detected by voltammetric techniques // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. P. 5817. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8768-1>
37. *Brotons A., Sanjuán I., Foster C.W., Banks C.E., Vidal-Iglesias F.J., Solla-Gullón J., Iniesta J.* A facile and cost-effective electroanalytical strategy for the quantification of deoxyguanosine and deoxyadenosine in oligonucleotides using screen-printed graphite electrodes // *Electroanalysis*. 2016. V. 28. P. 3066. <https://doi.org/10.1002/elan.201600272>
38. *Suprun E.V., Kutdusova G.R., Khmeleva S.A., Ptitsyn K.G., Kurbatov L.K., Radko S.P.* Voltammetric oxidation behavior of single-stranded DNA on carbon screen printed electrodes: From short oligonucleotides to ultralong amplification products // *Microchem. J.* 2023. V. 191. Article 108800. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108800>
39. *Chiorcea-Paquim A.M., Oliveira-Brett A.M.* Redox behaviour of G-quadruplexes // *Electrochim. Acta*. 2014. V. 126. P. 162. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.07.150>
40. *Rodrigues Pontinha A.D., Chiorcea-Paquim A.M., Eritja R., Oliveira-Brett A.M.* Quadruplex nanostructures of d(TGGGGT): Influence of sodium and potassium ions // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 5851. <https://doi.org/10.1021/ac500624z>
41. *Spiegel J., Adhikari S., Balasubramanian S.* The structure and function of DNA G-quadruplexes // *Trends Chem.* 2020. V. 2. № 2. P. 123. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.07.002>
42. *Ali M.M., Li F., Zhang Z., Zhang K., Kang D.K., Ankrum J.A. et al.* Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. № 10. P. 3324. <https://doi.org/10.1039/C3CS60439J>
43. *Tang J., Liang A., Yao C., Yang D.* Assembly of rolling circle amplification-produced ultralong single-stranded DNA to construct biofunctional DNA materials // *Chem. Eur. J.* 2023. V. 29. Article e202202673. <https://doi.org/10.1002/chem.202202673>
44. *Brabec V.* Study of thermal and acid denaturation of DNA by means of voltammetry at graphite electrodes // *Biopolymers*. 1979. V. 18. P. 2397. <https://doi.org/10.1002/bip.1979.360181003>
45. *Brabec V.* 314 – Electrochemical oxidation of nucleic acids and proteins at graphite electrode. Qualitative aspects // *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1980. V. 7. P. 69. [https://doi.org/10.1016/0302-4598\(80\)87033-4](https://doi.org/10.1016/0302-4598(80)87033-4)
46. *Brabec V., Koudelka J.* 394 – Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes. The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1980. V. 116. P. 793. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80307-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80307-X)
47. *Brabec V.* Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1981. V. 128. P. 437. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(81\)80236-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(81)80236-7)
48. *Ferapontova E.E., Domínguez E.* Direct electrochemical oxidation of DNA on polycrystalline gold electrodes // *Electroanalysis*. 2003. V. 15. P. 629. <https://doi.org/10.1002/elan.200390079>
49. *Oliveira Brett A.M., Serrano S.H.P.* The electrochemical oxidation of DNA // *J. Braz. Chem. Soc.* 1995. V. 6. P. 97.
50. *Honeychurch K.C., O'Donovan M.R., Hart J.P.* Voltammetric behaviour of DNA bases at a screen-printed carbon electrode and its application to a simple and rapid voltammetric method for the determination of oxidative damage in double stranded DNA // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 22. P. 2057. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.09.019>
51. *Brabec V.* Interaction of nucleic acids with electrically charged surfaces: VI. A comparative study on the electrochemical behaviour of native and denatured DNAs at graphite electrodes // *Biophys. Chem.* 1979. V. 9. P. 289. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(75\)80045-7](https://doi.org/10.1016/0301-4622(75)80045-7)
52. *Brett C.M.A., Oliveira Brett A.M., Serrano S.H.* On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes // *J. Electroanal. Chem.* 1994. V. 366. P. 225. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)02994-S](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)02994-S)
53. *Suprun E.V., Kutdusova G.R., Khmeleva S.A., Radko S.P.* Towards deeper understanding of DNA electrochemical oxidation on carbon electrodes // *Electrochem. Commun.* 2021. V. 124. Article 106947. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.106947>
54. *Suprun E.V.* Direct electrochemistry of proteins and nucleic acids: The focus on 3D structure // *Electrochem. Commun.* 2021. V. 125. Article 106983. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.106983>
55. *Hocek M., Fojta M.* Cross-coupling reactions of nucleoside triphosphates followed by polymerase incorporation. Construction and applications of base-functionalized nucleic acids // *Org. Biomol. Chem.* 2008. V. 6. № 13. P. 2233. <https://doi.org/10.1039/B803664K>
56. *Wagner C., Wagenknecht H.A.* Reductive electron transfer in phenothiazine-modified DNA is dependent on the base sequence // *Chem. Eur. J.* 2005. V. 11. № 6. P. 1871. <https://doi.org/10.1002/chem.200401013>
57. *Fendt L.A., Bouamaied I., Thöni S., Amiot N., Stulz E.* DNA as supramolecular scaffold for porphyrin arrays on the nanometer scale // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. № 49. P. 15319. <https://doi.org/10.1021/ja075711c>
58. *Hurley D.J., Tor Y.* Metal-containing oligonucleotides: Solid-phase synthesis and luminescence properties // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. № 9. P. 2194. <https://doi.org/10.1021/ja9739998>

59. Hurley D.J., Tor Y. Donor/acceptor interactions in systematically modified RuII–OsII oligonucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 44. P. 13231. <https://doi.org/10.1021/ja020172r>
60. Hurley, D.J., Tor Y. Ru (II) and Os (II) nucleosides and oligonucleotides: Synthesis and properties // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 14. P. 3749. <https://doi.org/10.1021/ja0123103>
61. Hurley D.J., Seaman S.E., Mazura J.C., Tor Y. Fluorescent 1,10-phenanthroline-containing oligonucleotides distinguish between perfect and mismatched base pairing // *Org. Lett.* 2002. V. 4. № 14. P. 2305. <https://doi.org/10.1021/ol026043x>
62. Walton T.A., Lyttle, M.H., Dick, D.J., Cook R.M. Evaluation of new linkers and synthetic methods for internal modified oligonucleotides // *Bioconjug. Chem.* 2002. V. 13. № 5. P. 1155. <https://doi.org/10.1021/bc0200125>
63. Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Guseinov T.O., Fesenko E.E., Lapa S.A. et al. Novel fluorescently labeled nucleotides: Synthesis, spectral properties and application in polymerase chain reaction // *Mendeleev Commun.* 2016. V. 2. № 26. P. 95. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2016.03.002>
64. Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Polyakov S.A. et al. Comparative study of novel fluorescent cyanine nucleotides: Hybridization analysis of labeled PCR products using a biochip // *J. Fluoresc.* 2017. V. 27. P. 2001. <https://doi.org/10.1007/s10895-017-2139-6>
65. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O. et al. dUTPs conjugated with zwitterionic Cy3 or Cy5 fluorophore analogues are effective substrates for DNA amplification and labelling by Taq polymerase // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. № 12. Article e73. <https://doi.org/10.1093/nar/gky247>
66. Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Miftakhov R.A., Solyev P.N., Novikov R.A. et al. Synthesis of Cy5-labelled C5-alkynyl-modified cytidine triphosphates via Sonogashira coupling for DNA labelling // *Bioorg. Chem.* 2023. V. 131. Article 106315. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106315>
67. Hunziker J. Synthesis of 5-(2-amino-2-deoxy- β -d-glucopyranosyloxymethyl)-2'-deoxyuridine and its incorporation into oligothymidylates // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 1999. V. 9. № 2. P. 201. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00700-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00700-8)
68. Matsuura K., Hibino M., Ikeda T., Yamada Y., Kobayashi K. Self-organized glycoclusters along DNA: Effect of the spatial arrangement of galactoside residues on cooperative lectin recognition // *Chem. Eur. J.* 2004. V. 10. № 2. P. 352. <https://doi.org/10.1002/chem.200305465>
69. Лана С.А., Ромашова К.С., Спицын М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О. и др. Получение модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек методом ПЦР в обратной эмульсии с последующим разделением цепей // *Молекулярная биология.* 2018. Т. 52. № 6. С. 984. (Lapa S.A., Romashova K.S., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Guseinov T.O., Zasedateleva O.A., Radko S.P., Timofeev E.N., Lisitsa A.V., Chudinov A.V. et al. Preparation of modified combinatorial DNA libraries via emulsion PCR with subsequent strand separation // *Mol. Biol.* 2018. V. 52. № 6. P. 854. <https://doi.org/10.1134/S0026893318060110>)
70. Чудинов А.В., Киселева Я.Ю., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О. и др. Ферментативный синтез ДНК с высокой степенью модификации // *Молекулярная биология.* 2017. Т. 51. № 3. С. 534. (Chudinov A.V., Kiseleva Y.Y., Kuznetsov V.E., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O. et al. Structural and functional analysis of biopolymers and their complexes: enzymatic synthesis of high-modified DNA // *Mol. Biol.* 2017. V. 51. № 3. P. 474. <https://doi.org/10.1134/S0026893317030025>)
71. Zasedateleva O.A., Surzhikov S.A., Shershov V.E., Miftakhov R.A., Yurasov D.A., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V. PCR incorporation of dUMPs modified with aromatic hydrocarbon substituents of different hydrophilicities: Synthesis of C5-modified dUTPs and PCR studies using Taq, Tth, Vent (exo-) and Deep Vent (exo-) polymerases // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 99. Article 103829. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103829>)
72. Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. The toolbox for modified aptamers // *Mol. Biotechnol.* 2016. V. 58. № 2. P. 79. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9907-9>
73. Debla A.M., Thorimbert S., Hasenknopf B., O'Sullivan C.K., Ortiz M. Electrochemical primer extension for the detection of single nucleotide polymorphisms in the cardiomyopathy associated MYH7 gene // *Chem. Commun.* 2016. V. 52. P. 757. <https://doi.org/10.1039/C5CC07762A>
74. Magriňá I., Toldrà A., Campàs M., Ortiz M., Simonova A., Katakis I., Hocek M. et al. Electrochemical genosensor for the direct detection of tailed PCR amplicons incorporating ferrocene labelled dATP // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 134. P. 76. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.060>
- Simonova A., Magriňá I., Sýkorová V., Pohl R., Ortiz M., Havran L., et al. Tuning of oxidation potential of ferrocene for ratiometric redox labeling and coding of nucleotides and DNA // *Chem. Eur. J.* 2020. V. 26. P. 1286. <https://doi.org/10.1002/chem.201904700>
75. Ortiz M., Jauset-Rubio M., Kodr D., Simonova A., Hocek M., O'Sullivan C.K. Solid-phase recombinase polymerase amplification using ferrocene-labelled dNTPs for electrochemical detection of single nucleotide polymorphisms // *Biosens. Bioelectron.* 2022. V. 198. Article 113825. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113825>
76. Ortiz M., Jauset-Rubio M., Trummer O., Foessel I., Kodr D., Acero J.L. et al. Generic platform for the multiplexed targeted electrochemical detection of

- osteoporosis-associated single nucleotide polymorphisms using recombinase polymerase solid-phase primer elongation and ferrocene-modified nucleoside triphosphates // *ACS Cent. Sci.* 2023. V. 9. P. 1591. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00243>
77. Kodr D., Yenice C.P., Simonova A., Pavlović Saftić D., Pohl R., Sýkorová V., Ortiz M., Havran L., Fojta M., Lesnikowski Z.J., O'Sullivan C.K., Hocek M. Carborane- or metallacarborane-linked nucleotides for redox labeling. orthogonal multipotential coding of all four DNA bases for electrochemical analysis and sequencing // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. V. 143. P. 7124. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c02222>
78. Havranová-Vidláková P., Krömer M., Sýkorová V., Trefulka M., Fojta M., Havran L., Hocek M. Vicinal diol-tethered nucleobases as targets for DNA redox labeling with osmate complexes // *ChemBioChem.* 2020. V. 21. P. 171. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900388>
79. Debela A.M., Ortiz M., Beni V., Thorimbert S., Lesage D., Cole R.B. et al. Biofunctionalization of polyoxometalates with DNA primers, their use in the polymerase chain reaction (PCR) and electrochemical detection of PCR products // *Chem. Eur. J.* 2015. V. 21. № 49. P. 17721. <https://doi.org/10.1002/chem.201502247>
80. Ortiz M., Debela A.M., Svobodova M., Thorimbert S., Lesage D., Cole R.B. et al. PCR incorporation of polyoxometalate modified deoxynucleotide triphosphates and their application in molecular electrochemical sensing of yersinia pestis // *Chem. Eur. J.* 2017. V. 23. № 44. P. 10597. <https://doi.org/10.1002/chem.201701295>
81. Cahová H., Havran L., Brázdilová P., Pivoňková H., Pohl R., Fojta M., Hocek M. Aminophenyl- and nitrophenyl-labeled nucleoside triphosphates: Synthesis, enzymatic incorporation, and electrochemical detection // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 2059. <https://doi.org/10.1002/anie.200705088>
82. Balintová J., Pohl R., Horáková P., Vidláková P., Havran L., Fojta M., Hocek M. Anthraquinone as a Redox Label for DNA: Synthesis, enzymatic incorporation, and electrochemistry of anthraquinone-modified nucleosides, nucleotides, and DNA // *Chem. Eur. J.* 2011. V. 17. P. 14063. <https://doi.org/10.1002/chem.201101883>
83. Simonova A., Balintová J., Pohl R., Havran L., Fojta M., Hocek M. Methoxyphenol and dihydrobenzofuran as oxidizable labels for electrochemical detection of DNA // *ChemPlusChem.* 2014. V. 79. P. 1703. <https://doi.org/10.1002/cplu.201402194>
84. Simonova A., Havran L., Pohl R., Fojta M., Hocek M. Phenothiazine-linked nucleosides and nucleotides for redox labelling of DNA // *Org. Biomol. Chem.* 2017. V. 15. P. 6984. <https://doi.org/10.1039/C7OB01439B>
85. Vosáhlová J., Koláčná L., Daňhel A., Fischer J., Balintová J., Hocek M. et al. Voltammetric and adsorption study of 4-nitrophenyl-triazole-labeled 2'-deoxycytidine and 7-deazaadenosine nucleosides at boron-doped diamond electrode // *J. Electroanal. Chem.* 2018. V. 821. P. 111. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.01.003>
86. Horáková P., Macíčková-Cahová H., Pivoňková H., Špaček J., Havran L., Hocek M., Fojta M. Tail-labelling of DNA probes using modified deoxynucleotide triphosphates and terminal deoxynucleotidyl transferase. Application in electrochemical DNA hybridization and protein-DNA binding assays // *Org. Biomol. Chem.* 2011. V. 9. P. 1366. <https://doi.org/10.1039/C0OB00856G>
87. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Kutdusova G.R., Duskaev I.F., Kuznetsova V.E., Lapa S.A. et al. Deoxyuridine triphosphates modified with tyrosine or tryptophan aromatic groups for direct electrochemical detection of double-stranded DNA // *Electrochim. Acta.* 2020. V. 362. Article 137105. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.137105>
88. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Kutdusova G.R., Ptit-syn K.G., Kuznetsova V.E., Lapa S.A., Chudinov A.V., Radko S.P. Deoxyuridine triphosphates modified with tyrosine aromatic groups for direct electrochemical detection of double-stranded DNA products of isothermal recombinase polymerase amplification // *Electrochem. Commun.* 2021. V. 131. Article 107120. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107120>
89. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Bibik K.V., Ptit-syn K.G., Kurbatov L.K., Radko S.P. Polymerase incorporation of fluorescein or rhodamine modified 2'-deoxyuridine-5'-triphosphates into double-stranded DNA for direct electrochemical detection // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2023. V. 236. Article 115737. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115737>
90. Vidláková P., Pivoňková H., Fojta M., Havran L. Electrochemical behavior of anthraquinone- and nitrophenyl-labeled deoxynucleoside triphosphates: A contribution to development of multipotential redox labeling of DNA // *Monatsh. Chem.* 2015. V. 146. P. 839. <https://doi.org/10.1007/s00706-015-1435-6>
91. Raindlová V., Pohl R., Klepetářová B., Havran L., Šimková E., Horáková P. et al. Synthesis of hydrazone-modified nucleotides and their polymerase incorporation onto DNA for redox labeling // *ChemPlusChem.* 2012. V. 77. P. 652. <https://doi.org/10.1002/cplu.201200056>
92. Pheeney C.G., Guerra L.F., Barton J.K. DNA sensing by electrocatalysis with hemoglobin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. № 29. P. 11528. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201551109>
93. Gorodetsky A.A., Green O., Yavin E., Barton J.K. Coupling into the base pair stack is necessary for DNA-mediated electrochemistry // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. № 5. P. 1434. <https://doi.org/10.1021/bc0700483>
94. Gorodetsky A.A., Hammond W.J., Hill M.G., Slowinski K., Barton, J.K. Scanning electrochemical microscopy of DNA monolayers modified with Nile Blue // *Langmuir.* 2008. V. 24. № 24. P. 14282. <https://doi.org/10.1021/la8029243>

95. Dudová Z., Špaček J., Tomaško M., Havran L., Pivoňková H., Fojta M. Electrochemical behavior of 7-deazaguanine- and 7-deazaadenine-modified DNA at the hanging mercury drop electrode // *Monatsh. Chem.* 2016. V. 147. P. 3. <https://doi.org/10.1007/s00706-015-1584-7>
96. Danhel A., Trosanova Z., Balintova J., Havran L., Hocek M., Berek J., Fojta M. Voltammetric analysis of 5-(4-Azidophenyl)-2'-deoxycytidine nucleoside and azidophenyl-labelled single- and double-stranded DNAs // *Electrochim. Acta.* 2016. V. 215. P. 72. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.08.096>
97. Balintová J., Plucnara M., Vidláková P., Pohl R., Havran L., Fojta M., Hocek M. Benzofurazane as a new redox label for electrochemical detection of DNA: towards multipotential redox coding of DNA bases // *Chem. Eur. J.* 2013. V. 19. № 38. P. 12720. <https://doi.org/10.1002/chem.201301868>
98. Ménová P., Cahová H., Plucnara M., Havran L., Fojta M., Hocek M. Polymerase synthesis of oligonucleotides containing a single chemically modified nucleobase for site-specific redox labelling // *Chem. Commun.* 2013. V. 49. P. 4652. <https://doi.org/10.1039/C3CC41438H>
99. Hermanová M., Orság P., Balintová J., Hocek M., Fojta M. Dual redox labeling of DNA as a tool for electrochemical detection of p53 protein-DNA interactions // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1050. P. 123. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.053>
100. Daňhel A., Trošanová Z., Balintová J., Simonová A., Pospíšil L., Cvačka J. et al. Electrochemical reduction of azidophenyl-deoxynucleoside conjugates at mercury surface // *Electrochim. Acta.* 2018. V. 259. P. 377. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.10.128>
101. Danhel A., Raindlova V., Havran L., Berek J., Hocek M., Fojta M. Voltammetric study of dsDNA modified by multi-redox label based on N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 129. P. 348. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.02.137>
102. Kodr D., Ortiz M., Sýkorová V., Yenice C.P., Lesnikowski Z.J., O'Sullivan C.K., Hocek M. Normalized multipotential redox coding of DNA bases for determination of total nucleotide composition // *Anal. Chem.* 2023. V. 95. № 34. P. 12586. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02023>
103. Brázdilová P., Vrbel M., Pohl R., Pivoňková H., Havran L., Hocek M., Fojta M. Ferrocenylethynyl derivatives of nucleoside triphosphates: synthesis, incorporation, electrochemistry, and bioanalytical applications // *Chem. Eur. J.* 2007. V. 13. P. 9527. <https://doi.org/10.1002/chem.200701249>
104. Ortiz M., Jauset-Rubio M., Skouridou V., Machado D., Viveiros M., Clark T.G. et al. Electrochemical detection of single-nucleotide polymorphism associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using solid-phase primer elongation with ferrocene-linked redox-labeled nucleotides // *ACS Sensors.* 2021. V. 6. P. 4398. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c01710>
105. Di Giusto D.A., Wlassoff W.A., Giesebrecht S., Gooding J.J., King G.C. Multipotential electrochemical detection of primer extension reactions on DNA self-assembled monolayers // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. No. 13. P. 4120. <https://doi.org/10.1021/ja0319036>
106. Di Giusto D.A., Wlassoff W.A., Giesebrecht S., Gooding J.J., King G.C. Enzymatic synthesis of redox-labeled RNA and dual-potential detection at DNA-modified electrodes // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. V. 43. P. 2809. <https://doi.org/10.1002/anie.200352977>
107. Wlassoff W.A., King G.C. Ferrocene conjugates of dUTP for enzymatic redox labelling of DNA // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. Article e58. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf058>
108. Yeung S.S., Lee T.M., Hsing I.M. Electrochemical real-time polymerase chain reaction // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 13374. <https://doi.org/10.1021/ja065733j>
109. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Duskaev I.F., Kurbatov L.K., Kuznetsova V.E., Shershov V.E. et al. Polymerase incorporation of 4-nitrophenyl modified 2'-deoxyuridine-5'-triphosphates into double-stranded DNA for direct electrochemical detection // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2024. V. 241. Article 115977. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.115977>
110. Zahran M. Conducting dyes as electro-active monomers and polymers for detecting analytes in biological and environmental samples // *Heliyon.* 2023. V. 9. № 9. Article e19943. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19943>
111. Weinberg N.L., Weinberg H.R. Electrochemical oxidation of organic compounds // *Chem. Rev.* 1968. V. 68. № 4. P. 449. <https://doi.org/10.1021/cr60254a003>
112. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Pathways of electrochemical oxidation of indolic compounds // *Electroanalysis.* 2011. V. 23. № 6. P. 1337. <https://doi.org/10.1002/elan.201000671>
113. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways // *J. Electroanal. Chem.* 2011. V. 655. № 1. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.02.022>
114. Suprun E.V., Shumyantseva, V.V., Archakov A.I. Protein electrochemistry: application in medicine. A review // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 140. P. 72. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.089>
115. Smyth M.R., Smyth W.F. Voltammetric methods for the determination of foreign organic compounds of biological significance. A review // *Analyst.* 1978. V. 103. P. 529. <https://doi.org/10.1039/AN9780300529>
116. Zuman P., Fijalek Z., Dumanovic D., Sužnjević D. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds, part I:

- General mechanistic aspects // *Electroanalysis*. 1992. V. 4. P. 783.
<https://doi.org/10.1002/elan.1140040808>
117. *Laviron E., Vallat A., Meunier-Prest R.* The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium: Part V. The reduction of nitrosobenzene between pH 0.4 and 13 // *J. Electroanal. Chem.* 1994. V. 379. P. 427.
[https://doi.org/10.1016/0022-0728\(94\)87167-1](https://doi.org/10.1016/0022-0728(94)87167-1)
118. *Shikata M.* The electrolysis of nitrobenzene with the mercury dropping cathode // *Trans. Faraday Soc.* 1925. V. 21. P. 42.
<https://doi.org/10.1039/TF9252100042>
119. *Magrina I., Ortiz M., Simonova A., Hocek M., O'Sullivan C.K., Forster R.J.* Ferrocene-containing DNA monolayers: Influence of electrostatics on the electron transfer dynamics // *Langmuir*. 2021. V. 37. № 11. P. 3359.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c03485>
120. *Batterjee S.M., Marzouk M.I., Aazab M.E., El-Hasshish M.A.* The electrochemistry of some ferrocene derivatives: redox potential and substituent effects // *Appl. Organomet. Chem.* 2003. V. 1. No. 5. P. 291.
<https://doi.org/10.1002/aoc.414>
121. *Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C.* Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981. V. 78. № 11. P. 6633.
<https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.663>
122. *Brakmann S., Löbermann S.* High-density labeling of DNA: Preparation and characterization of the target material for single-molecule sequencing // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001. V. 40. № 8. P. 1427. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010417\)40:8<1427::AID-ANIE1427>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010417)40:8<1427::AID-ANIE1427>3.0.CO;2-T)
123. *Thoresen L.H., Jiao G.S., Haaland W.C., Metzker M.L., Burgess K.* Rigid, conjugated, fluoresceinated thymidine triphosphates: syntheses and polymerase mediated incorporation into DNA analogues // *Chem. Eur. J.* 2003. V. 9. № 19. P. 4603.
<https://doi.org/10.1002/chem.200304944>
124. *Kuwahara M., Hanawa K., Ohsawa K., Kitagata R., Ozaki H., Sawai H.* Direct PCR amplification of various modified DNAs having amino acids: Convenient preparation of DNA libraries with high-potential activities for *in vitro* selection // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. V. 14. № 8. P. 2518.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.11.030>
125. *Sawai H., Nagashima J., Kuwahara M., Kitagata R., Tamura T., Matsui I.* Differences in substrate specificity of C (5)-substituted or C (5)-unsubstituted pyrimidine nucleotides by DNA polymerases from thermophilic bacteria, archaea, and phages // *Chem. Biodiversity*. 2007. V. 4. P. 1979.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200790165>
126. *Sawai H., Ozaki-Nakamura A., Mine M., Ozaki H.* Synthesis of new modified DNAs by hyperthermophilic DNA polymerase: Substrate and template specificity of functionalized thymidine analogues bearing an sp³-hybridized carbon at the C5 α-position for several DNA polymerases // *Bioconjug. Chem.* 2002. V. 13. P. 309.
<https://doi.org/10.1021/bc0100881>
127. *Иконникова А.Ю., Лисица Т.С., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О., Фесенко Д.О. и др.* Влияние строения флуоресцентно-меченных производных нуклеотидов на эффективность их встраивания в ДНК в ходе полимеразной цепной реакции // *Биофизика*. 2017. Т. 62. № 6. С. 1093. (*Ikonnikova A.Y., Lisitsa T.S., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Fesenko D.O. et al.* The effect of the structure of fluorescently labeled nucleotide derivatives on the efficiency of their incorporation in DNA in the polymerase chain reaction // *Biophysics*. 2017. V. 62. P. 900.
<https://doi.org/10.1134/S0006350917060082>)
128. *Ortiz D.A., Loeffelholz M.J.* Practical challenges of point-of-care testing // *Clin. Lab. Med.* 2023. V. 43. P. 155.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2023.02.002>
129. *De Falco M., De Felice M., Rota F., Zappi D., Antonacci A., Scognamiglio V.* Next-generation diagnostics: Augmented sensitivity in amplification-powered biosensing // *Trends Anal. Chem.* 2022. V. 148. Article 116538.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116538>
130. *Li J., Macdonald J.* Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 64. P. 196. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.069>
131. *Lobato I.M., O'Sullivan C.K.* Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 98. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
132. *Бодулев О.Л., Сахаров И.Ю.* Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе // *Биохимия*. 2020. Т. 85. № 2. С. 174. <https://doi.org/10.31857/S0320972520020037> (*Bodulev O.L., Sakharov I.Y.* Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis // *Biochemistry (Mosc)*. 2020. V. 85. P. 147.
<https://doi.org/10.1134/S0006297920020030>)
133. *Mayboroda O., Katakis I., O'Sullivan C.K.* Multiplexed isothermal nucleic acid amplification // *Anal. Biochem.* 2018. V. 545. P. 20.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.005>
134. *Лана С.А., Шингарева А.А., Файзулов Е.Б., Ам-мур Ю.И., Шершов В.Е., Чудинов А.В.* Видовая идентификация коронавируса SARS-COV-2 по консервативному участку E-гена // *Биоорганическая химия*. 2023. Т. 49. № 5. С. 543. (*Lapa S.A., Shingareva A.A., Faizuloev E.B., Ammour Y.I., Shershov V.E., Chudinov A.V.* Species-level identification of SARS-CoV-2 by an E gene conservative site // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 912.
<https://doi.org/10.1134/S1068162023040131>)
135. *Ménová P., Raindlová V., Hocek M.* Scope and limitations of the nicking enzyme amplification reaction for the synthesis of base-modified oligonucleotides

- and primers for PCR // *Bioconjug. Chem.* 2013. V. 24. P. 1081.
<https://doi.org/10.1021/bc400149q>
136. Шершов В.Е., Лана С.А., Левашова А.И., Шишкин И.Ю., Штылев Г.Ф., Шекалова Е.Ю. и др. Синтез флуоресцентно-меченых нуклеотидов для маркирования продуктов изотермической амплификации // *Биоорганическая химия.* 2023. Т. 49. № 6. С. 649. (Shershov V.E., Lapa S.A., Levashova A.I., Shishkin I.Y., Shtylev G.F., Shekalova E.Y. et al. Synthesis of fluorescent-labeled nucleotides for labeling of isothermal amplification products // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 1151. <https://doi.org/10.1134/S1068162023050242>)

ARTIFICIAL MODIFIED NUCLEOTIDES FOR THE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF NUCLEIC ACID AMPLIFICATION PRODUCTS

E. V. Suprun^{a, b, *}, S. A. Khmeleva^b, K. G. Ptitsyn^b, L. K. Kurbatov^b, S. P. Radko^b

^a*Department of Chemistry, Moscow State University, 119991, Moscow, Russia*

^b*Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, 119121, Moscow, Russia*

*E-mail: lenasuprun@mail.ru

Abstract. The review describes the fundamental electrochemical properties of nucleic acids manifested on solid electrodes, with an emphasis on the spatial structure of macromolecules. The formation of the double helix impedes the contact of the electroactive groups of the nitrogenous bases with the electrode surface, resulting in the disappearance of the analytical signal of deoxyribonucleic acid (DNA). The insufficient electroactivity of the double-stranded DNA is overcome by introducing electrochemically active fragments into the nucleic acid sequence through the polymerase incorporation of chemically modified nucleotides. Currently, an extensive range of artificial nucleotides has been synthesized, which contain various electroactive groups capable of both oxidation and reduction on electrode surfaces at different potentials. Artificial modified nucleotides must exhibit high electrochemical activity while also serving as good substrates for enzymes (polymerases) involved in nucleic acid amplification reactions. Introducing modified nucleotides instead of natural ones into polymerase reactions represents a compromise between the number of labels inserted in one amplicon and the length and quantity of the resulting products. Modified nucleotides find application in the detection of gene mutations and single-nucleotide polymorphisms, nucleic acid sequencing, determination of protein and peptide concentrations, and the detection of pathogenic viruses and bacteria. With the advancement of isothermal amplification methods, the development, synthesis, and investigation of artificial nucleotides have become highly relevant for creating new off-laboratory electrochemical nucleic acid analyzers.

Keywords: nucleic acid, modified nucleotide, isothermal amplification, polymerase chain reaction, fluorimetry, voltammetry.

УДК 543.25

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ШУНГИТОМ И ФОРМАЗАНАТОМ МЕДИ УГЛЕВОЛОКОННОЙ БУМАГИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИДОКАИНА

© 2024 г. М. А. Бухаринова^а, Н. Ю. Стожко^{а, *}, Т. Г. Федорченко^б,
Г. Н. Липунова^б, Е. В. Шаброва^а, Е. И. Хамзина^а, А. В. Тарасов^а

^аУральский государственный экономический университет,
ул. 8 Марта, 62/ул. Народной Воли, 45, 620144, Екатеринбург, Россия

^бИнститут органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук,
ул. С. Ковалевской, 20/22, 620990 Екатеринбург, Россия

*E-mail: sny@usue.ru

Поступила в редакцию 24.01.2024 г.

После доработки 06.02.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Представлен высокочувствительный сенсор на основе углеволоконной бумаги, модифицированной композитом из шунгита и формазаната меди, для вольтамперометрического определения лидокаина. Синтезированный металлоорганический комплекс, композит и модифицированный электрод охарактеризованы методами инфракрасной спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, элементного анализа, сканирующей электронной микроскопии, циклической и линейной вольтамперометрии. Двукратное увеличение тока пика окисления лидокаина на модифицированном электроде, по сравнению с немодифицированным, связано с сенситизирующим эффектом композитного модификатора, обусловленным увеличением электроактивной площади и числа сайтов связывания лидокаина на электродной поверхности. Сенсор демонстрирует широкий динамический диапазон от 2 до 2120 мкМ с низким пределом обнаружения 0.18 мкМ лидокаина и высокой чувствительностью 0.7553 мкА/В×мкМ. Межеlectродная и внутриelectродная повторяемость аналитического сигнала не превышают 3.5%. Реакция сенсора стабильна в течение трех недель. Разработанный сенсор использован для определения лидокаина в фармацевтических препаратах. Результаты анализа реальных образцов продемонстрировали хорошие воспроизводимость ($s_r \leq 5.5\%$) и показатель правильности (98–102%).

Ключевые слова: электрохимический сенсор, углеволоконный материал, металлоорганический комплекс, формазанаты, лидокаин, фармпрепараты.

DOI: 10.31857/S0044450224070027, EDN: TOTSNS

Лидокаин является широко распространенным местным анестетиком амидного типа (схема 1). Он эффективен для уменьшения боли, связанной с хирургическими процедурами, в стоматологической, отоларингологической, офтальмологической, косметологической практиках. Лидокаин входит в состав многих анестезирующих кремов. Механизм действия лидокаина основан на блокировании передачи возбуждающих нервных импульсов в аксонах за счет уменьшения переноса ионов натрия через каналы нейронных мембран. Чрезмерное

употребление лидокаина вызывает побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. Содержание лидокаина в плазме крови на уровне 5 мкг/мл (2.13×10^{-5} М) и выше оказывает токсический эффект [1, 2]. В связи с этим необходим мониторинг содержания лидокаина в биологических жидкостях и фармпрепаратах.

Разработаны способы определения лидокаина как в индивидуальных растворах, так и в смеси с другими веществами методами

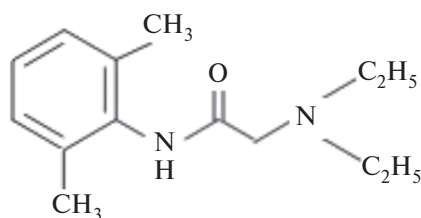


Схема 1. Структурная формула лидокаина.

спектрофотометрии, тонкослойной, газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии, капиллярного электрофореза. Спектрофотометрический метод не обеспечивает высокую селективность определения и используется чаще в качестве метода детектирования после хроматографического или электрофоретического разделения. Хроматографические методы отличаются селективностью определения лидокаина, но требуют больших материальных (сложное оборудование, реактивы) и временных затрат, высококвалифицированного персонала, использования токсичных растворителей и реагентов. Разделение методом капиллярного электрофореза предполагает использование хрупких тонких капилляров из плавленого кварца, в том числе с различными покрытиями. К простым и при этом высокочувствительным и селективным следует отнести электрохимические методы анализа, обладающие возможностью миниатюризации и проведения экспрессного анализа в режиме реального времени.

В электроанализе наиболее часто используют электроды из угольной пасты, толстопленочные углеродсодержащие электроды и стеклоуглеродные электроды. Совсем недавно стали применять углеволоконные материалы, в том числе углеволоконную бумагу для создания новых электродов/сенсоров [3–6]. Углеволоконную бумагу (англ. carbon fiber paper) иногда называют углеродной вуалью, подчеркивая ее полупрозрачность и тонкослойность, обусловленные значительно меньшей поверхностной плотностью (масса углеродных волокон на одном квадратном метре углеродной вуали, г/м²), чем у углеродных тканей и войлоков. Для улучшения аналитических, метрологических и эксплуатационных характеристик проводят модифицирование поверхности электродов различными функциональными материалами. К ним относятся разнообразные углеродные материалы, такие как оксид графена и восстановленный оксид графена [7], пористый углерод [8], полупроводниковые нанокристаллические сплавы

[7], молекулярно-импринтированные полимеры [9], биметаллические частицы Pd–Pt [9], наночастицы CuO [10]. Модифицирование поверхности электродов обеспечивает увеличение количества реакционноспособных сайтов, улучшение электронно-транспортных, каталитических и электрохимических свойств. Разработанные к настоящему времени электрохимические сенсоры, несмотря на свои хорошие аналитические характеристики, имеют некоторые недостатки, чаще всего связанные с длительностью процесса изготовления модификатора, использованием вредных растворителей и высоких температур.

Перспективным модификатором электродной поверхности является природный наноструктурированный минерал шунгит. Основу шунгита составляет аморфная углеродная матрица, в которую вкраплены высокодисперсные кристаллические силикатные частицы. Основным элементом супрамолекулярной матрицы шунгита является глобула – многослойное образование размером до 10 нм с внутренними порами, состоящее из стопок дефектных нанолитов восстановленного оксида графена [11]. На поверхности шунгита обнаружены многочисленные функциональные группы: фенольные, спиртовые, эфирные, а также карбоксильные, карбонильные, серосодержащие и др. [12]. Эти группы придают шунгиту уникальные адсорбционные, каталитические свойства и делают его привлекательным для создания электрохимических сенсоров [13].

Металлорганические комплексы (МОК) – соединения, образованные катионами металлов и полифункциональными органическими лигандами посредством ковалентных координационных связей. Они имеют упорядоченную кристаллическую структуру и используются в качестве модификаторов рабочих электродов. Наличие у МОК координационно ненасыщенного металла обеспечивает активные центры для специфических взаимодействий с молекулами аналита. МОК обладают большой удельной площадью поверхности и настраиваемой пористостью, что

способствует эффективному концентрированию целевых аналитов, увеличению электрохимического сигнала и повышению чувствительности измерений [14]. Свойства МОК можно регулировать путем выбора металла или органического фрагмента. Представляют интерес формазаны и их металлокомплексы (формазабаты). Соединения класса формазабов являются хелатирующими анионными π -сопряженными N-донорными лигандами. Как мультидентатные лиганды формазабы способны образовывать комплексные соединения с ионами металлов. На основе формазабов получают химические реагенты, химические и электрохимические сенсоры [15]. Широкое применение чистых МОК в электрохимических сенсорах ограничено недостаточно хорошей электронной проводимостью. Эта проблема решается сочетанием МОК с другими материалами и применением полученных композитов в сенсорах, например для определения трамадола [16], кетокконазола [17], опиоидов [18]. Анализ литературы показал, что на сегодняшний день не описаны сенсоры для определения лидокаина на основе углеродной бумаги в качестве электродной платформы, шунгита и МОК в качестве модификаторов поверхности.

Цель настоящей работы состояла в разработке простого и высокочувствительного сенсора на основе модифицированной шунгитом и формазабом меди углеродной бумаги для определения лидокаина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и аппаратура. Комплекс меди (CuOK) с 1-(бензо[d]тиазол-2-ил)-3-(2-пиридил)-5-(4-метоксифенил)формазабом в качестве лиганда (L) синтезирован в Институте органического синтеза им. И.Я. Пастера Уральского отделения Российской академии наук. Реагенты для синтеза CuOK приобретали у Sigma-Aldrich (Дармштадт, Германия). В работе также использовали шунгит (Ш) дробленый (ООО “Шугге”, Петрозаводск, Россия), лидокаин (ЕМУП ГЦА, Екатеринбург), диметилсульфоксид (ЗАО НПО “Экрос”, Санкт-Петербург, Россия), уксусную кислоту (ООО “Невареактив”, Санкт-Петербург, Россия), борную кислоту (Самарская фармацевтическая фабрика, Чапаевск, Россия), фосфорную кислоту (ООО “Невареактив”, Санкт-Петербург, Россия), натрия гидроксид (ЗАО НПО “Экрос”, Санкт-Петербург, Россия), гексаацетат калия (АО “Реакхим”, Россия), сульфат

магния (АО “Химический завод им. Л.Я. Карпова”, Менделеевск, Россия), хлорид кальция (ООО “Невареактив”, Санкт-Петербург, Россия), сульфат натрия (АО “Реакхим”, Россия), карбонат натрия (АО “Реакхим”, Россия). Все реагенты были химически чистыми и применялись без дополнительной очистки. Рабочие растворы готовили с использованием деионизованной воды. Образцы фармпрепаратов (раствор для инъекций, капли, спрей для горла, анестезирующий гель) приобретали в аптечной сети.

Бумагу на основе углеродных волокон (Jiaxing Fu-Tech New Materials Co., Ltd., Китай) и полиэтилентерефталатную пленку (Fellowes Inc., Итаска, Иллинойс, США) использовали для изготовления рабочих электродов (УВЭ) с помощью ламинатора LM-260iD (Rayson Electrical MFG, Ltd., Фошань, Китай) в соответствии с технологией, описанной в работе [4]. Ультразвуковую ванну RH PS-40A (Shenzhen Codyson Electrical Co., Ltd., Гуандун, Китай) применяли для приготовления модифицирующей суспензии.

ИК-спектры поглощения комплекса CuOK регистрировали с помощью приставки DRA на спектрофотометре Spectrum One (Perkin Elmer, США). Масс-спектры записывали на приборе maXis impact HD (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Элементный анализ проводили с помощью автоматического элементного анализатора CHNS PE 2400, серия II (Perkin Elmer Instruments, США). Температуры плавления определяли с помощью аппарата Stuart SMP3 (Barloworld Scientific Ltd, Великобритания). Ход реакции и чистоту полученных продуктов контролировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil, элюент – хлороформ (АО “Экос-1”, Москва, Россия). Для микроскопических исследований использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) Jeol JSM-6490 LV (JEOL Ltd., Токио, Япония). Изображения получали при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме рассеянных электронов. Вольтамперометрический анализатор ИВА (Екатеринбург, Россия) с трехэлектродной ячейкой использовали для регистрации циклических и линейных вольтамперограмм. Ячейка состояла из хлоридсеребряного электрода сравнения ЭВЛ-1М3.1 (Ag/AgCl/KCl, 3.5 М) (ОАО “ГЗИП”, Гомель, Беларусь), углеродного стержня в качестве вспомогательного электрода и немодифицированного или модифицированного рабочего электрода, изготовленного на основе

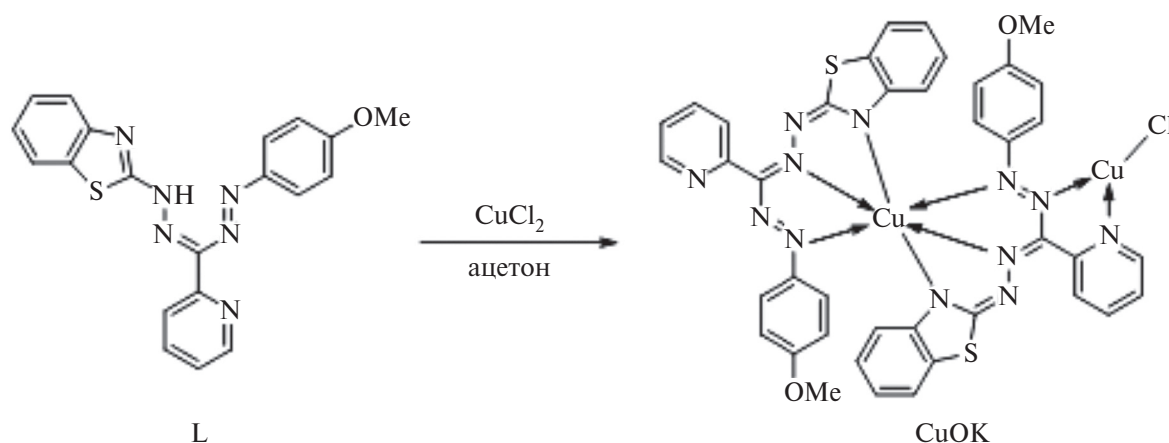


Схема 2. Схема синтеза формазаната меди (CuOK).

углеволоконной бумаги. Геометрические размеры рабочего электрода – 35×4 мм, геометрическая площадь рабочей области – 12 мм^2 . Для контроля pH фонового электролита использовали pH/иономер ТА-Ион (“Томьаналит”, Россия). Для получения деионизованной воды применяли установку Аквалаб-УВОИ-М (НПК “Медиа-Фильтр АО”, Россия).

Методика эксперимента. Синтез формазаната меди. 1-(Бензо[d]тиазол-2-ил)-3-(2-пиридил)-5-(4-метоксифенил)-формазан (L) синтезировали по описанной ранее методике [19]. Формазаны являются NH-кислотами и легко образуют комплексы с ионами металлов [15]. Комплекс с медью синтезировали кипячением формазана с хлоридом меди(II) в ацетоне (схема 2).

К горячему раствору формазана L (0.5 г, 1.3 ммоль) в ацетоне добавляли горячий раствор хлорида меди (0.22 г, 1.3 ммоль) в смеси ацетона с водой. Нагревали 10 мин, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили. Выход продукта составил 66%. Полученный металлокомплекс (CuOK) представляет собой темно-синие кристаллы с температурой плавления $289\text{--}291^\circ\text{C}$.

Приготовление модифицированного электрода. В состав композитного модификатора (Ш-CuOK) входили водная суспензия шунгита (5 мг/мл), приготовленная под воздействием ультразвуковой обработки (40 кГц, 240 Вт) в течение 15 мин, и раствор CuOK (1 мг/мл), полученный путем растворения навески CuOK в диметилсульфоксиде. Соотношение компонентов в композите варьировали для получения наилучшего аналитического сигнала. Модифицирование УВЭ проводили методом капельного литья,

электроды оставляли под лампой до полного высыхания. Полученный модифицированный электрод (Ш-CuOK-УВЭ) хранили при комнатной температуре.

Электрохимические измерения. Циклические и линейные вольтамперограммы регистрировали при скорости сканирования потенциала 50 мВ/с. Хроноамперограммы получали при потенциале 0.6 В. В качестве фонового электролита использовали универсальную буферную смесь (УБС), в состав которой входят фосфорная, уксусная, борная кислоты в концентрации 0.04 М каждая. Для получения УБС с необходимым значением pH к раствору смеси кислот добавляли определенный объем 0.2 М раствора NaOH. Образцы лекарственных препаратов анализировали без дополнительной пробоподготовки с использованием оптимального разбавления, проводили пять повторных анализов. Статистическую обработку результатов выполняли при доверительной вероятности 0.95. Результаты представлены как среднее значение \pm доверительный интервал. Предел обнаружения (ПО) рассчитывали по уравнению (1):

$$\text{ПО} = 3.3s/b, \quad (1),$$

где s – стандартное отклонение аналитического сигнала минимальной концентрации лидокаина, b – наклон градуировочной зависимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика комплекса CuOK. Предполагаемую структуру комплекса CuOK определяли на основании данных ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения и данных элементного анализа. В ИК-спектре

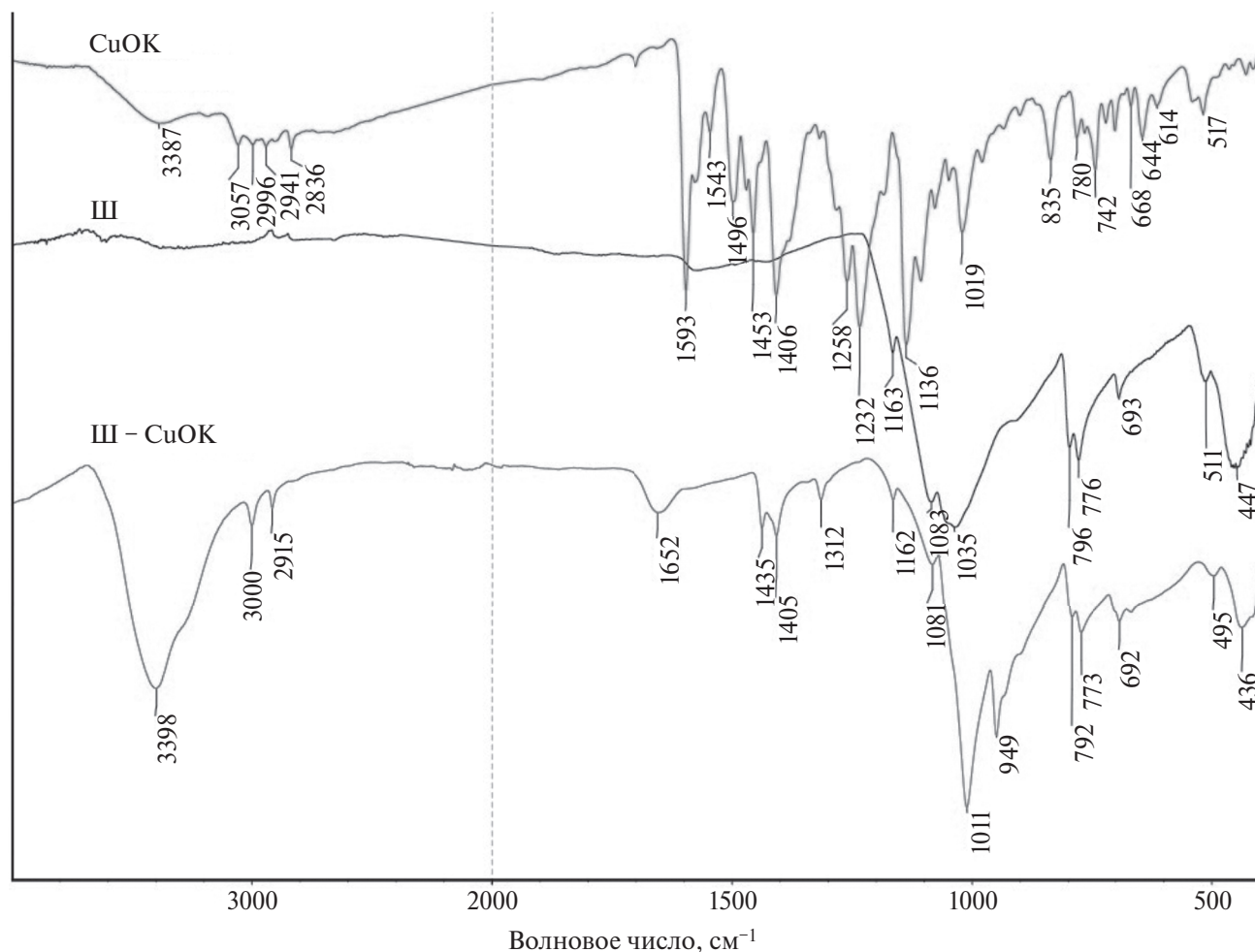


Рис. 1. ИК-спектры формазаната меди (CuOK), шунгита (Ш) и композита Ш-CuOK.

CuOK (рис. 1) обнаружены следующие характеристические полосы: широкая полоса с максимумом при 3394 (O–H воды), 3058, 2836 (C–H лиганда), полосы 1593, 1453, 1406, 1232, 1135, 1019, 835, 742, 644 cm^{-1} характеризуют систему сопряженных связей C–C, C–N, N–N, C–O, C–S, N–Cu в комплексе.

Из данных масс-спектрометрии найдено, что m/z (m – масса иона, z – заряд иона) составляет 935.0331 и соответствует молекулярному иону $[M]^+$. Вычислено, m/z : 935.0336 для состава $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{N}_{12}\text{O}_2\text{S}_2\text{ClCu}_2$ (рис. 2). По результатам элементного анализа установлено, что в состав металлокомплекса CuOK входит 51.29% C, 3.20% H, 17.94% N и 3.77% Cl.

Из литературы известно [15], что гетарил-формазаны с переходными металлами образуют внутрикомплексные соединения с октаэдрическим строением металл-хелатного узла, в котором катион металла связан с двумя анионными

фрагментами формазана. В структуре CuOK также два аниона формазана (L–H) связаны с Cu(II). Взаимодействие формазанов с солями меди, наряду с образованием комплекса, иногда сопровождается окислением части формазанов в соль тетразолия с восстановлением Cu(II) в Cu(I) [20]. Наличие метоксигруппы как сильного электронного донора в формазане способствует протеканию такого побочного процесса. В этом случае образующийся хлорид Cu(I) способен образовывать координационные связи по атому азота пиридинового и формазанового фрагментов, что приводит к возникновению структуры CuOK, представленной на схеме 2.

Микроскопические исследования. Как видно из рис. 3а, поверхность УВЭ представляет собой рыхлую структуру из углеродных волокон, переплетенных произвольным образом и соединенных между собой связующим. На СЭМ-изображении модифицированного УВЭ (рис. 3б) отчетливо видны равномерно распределенные

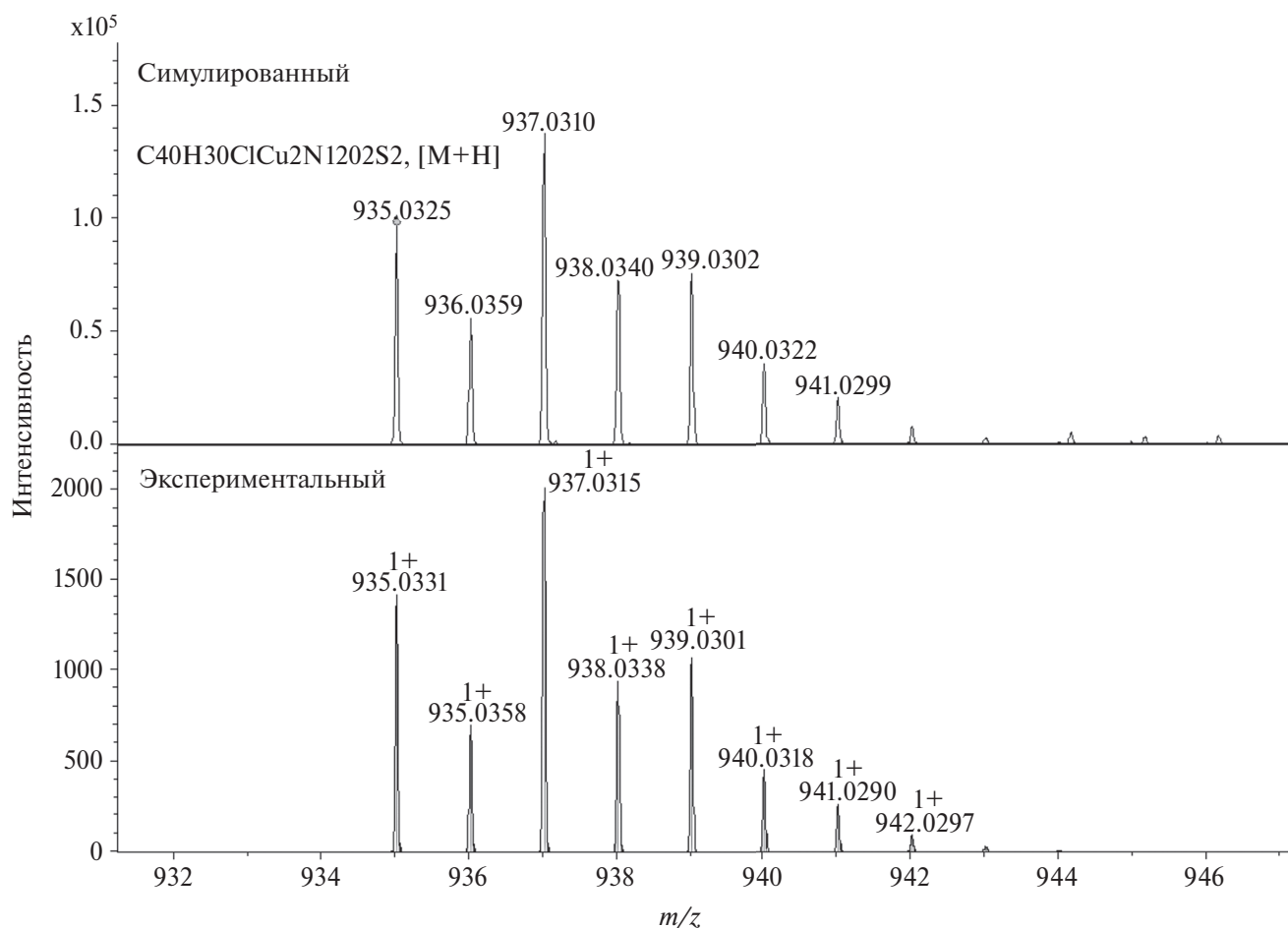


Рис. 2. Фрагмент масс-спектра комплекса CuOK, смоделированный для состава $C_{40}H_{30}N_{12}O_2S_2ClCu_2$ и экспериментальный.

на поверхности углеродных волокон мельчайшие белые пятна, представляющие собой частички композитного модификатора.

Наличие CuOK на поверхности шунгита подтверждают данные ИК-спектров (рис. 1). Сравнение спектров шунгита и композита показывает, что в последнем, наряду с полосами, характерными для шунгита, обнаружены полосы в области 3000, 2915, 1435, 1405, 1315, 1111, 949, относящиеся к CuOK, но смещенные в низкочастотную область. Этот факт, с учетом электронодефицитного характера фуллереноподобной структуры углеродной составляющей шунгита, свидетельствует о прямых контактах между шунгитом и металлорганическим комплексом.

Выбор количества модификатора. Оптимальный состав композитного модификатора выбирали по величине тока пика окисления лидокаина (I_p). На рис. 4а приведена зависимость I_p от массовой доли CuOK в композитном модификаторе. Из зависимости $I_p = f(\omega(\text{CuOK}))$

(рис. 4а) видно, что при увеличении содержания металлорганического комплекса в композите до 1.04% происходит рост I_p . Содержание CuOK в композите свыше 1.04% приводит к спаду тока окисления лидокаина, что, вероятно, связано со снижением электропроводности модифицирующего слоя УВЭ. На рис. 4б приведена зависимость I_p от количества модифицирующих слоев, которая проходит через максимум, соответствующий двухслойному покрытию УВЭ композитным модификатором Ш-CuOK. В дальнейшем использовали двухслойное модифицирование при приготовлении рабочих электродов.

Электрохимические исследования. Электроактивную площадь поверхности УВЭ и модифицированного Ш-CuOK/УВЭ оценивали с использованием стандартного редокс-зонда $K_4[Fe(CN)_6]$ и методов циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии. Как видно из рис. 5а, окисление 1 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$ протекает необратимо, что

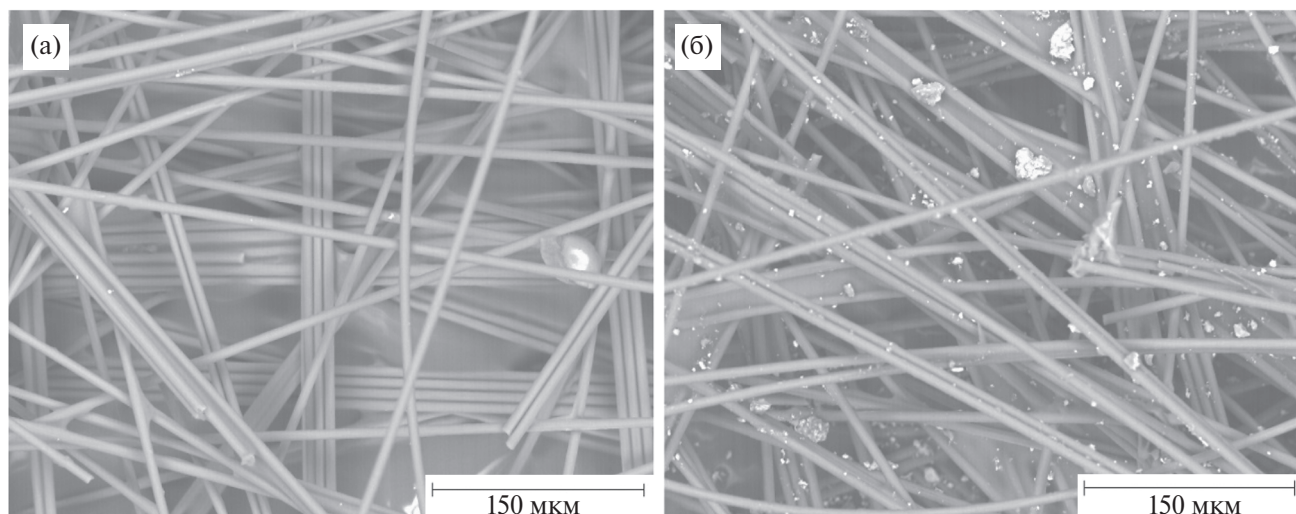


Рис. 3. СЭМ-изображения (а) немодифицированного электрода на основе углеродной бумаги (УВЭ) и (б) модифицированного Ш-CuOK/УВЭ. Ускоряющее напряжение 20 кВ в режиме рассеянных электронов.

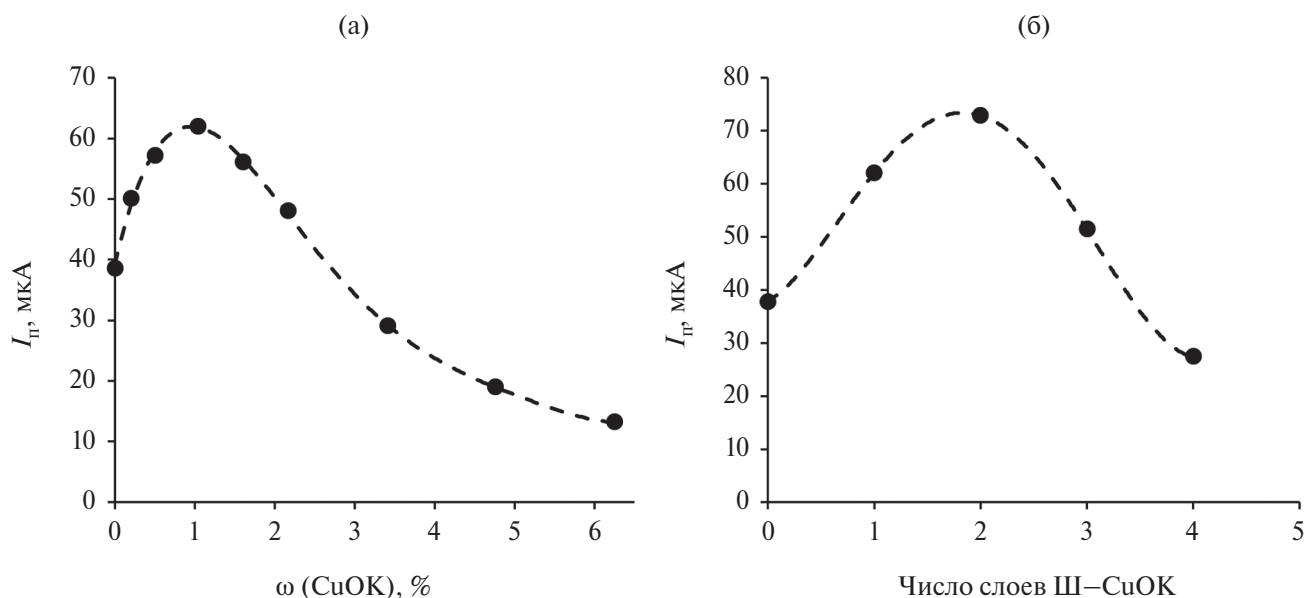


Рис. 4. Влияние (а) массовой доли комплекса CuOK в составе композитного модификатора и (б) количества слоев модификатора Ш-CuOK на углеродном электроде на сигнал 0.64 мМ лидокаина. Фон: универсальный буферный раствор с pH 8.

подтверждается большой разностью потенциалов 0.42 В между анодным и катодным пиками. Максимальный ток окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ на 35% больше на Ш-CuOK/УВЭ по сравнению с немодифицированным УВЭ.

Величины электроактивной площади УВЭ и Ш-CuOK/УВЭ рассчитывали с помощью хроноамперограмм, зарегистрированных при $E=0.6$ В (рис. 5б), и уравнения Коттрелла. Для УВЭ рассчитанная площадь составила 13.1 м^2 , для Ш-CuOK/УВЭ – 24.4 м^2 . Модифицирование УВЭ привело к возрастанию электроактивной

площади в 1.9 раза за счет большой удельной поверхности шунгита.

Электрохимическое поведение лидокаина на углеродных электродах. Циклические вольтамперограммы 0.64 мМ раствора лидокаина в УБС с pH 8, зарегистрированные на разных углеродных электродах, представлены на рис. 6. Наименьший ток пика окисления лидокаина наблюдается на немодифицированном УВЭ при 1.06 В (рис. 6, кривая 1). Модифицирование поверхности УВЭ формазанатом меди приводит к возрастанию I_p в 1.3 раза по сравнению с

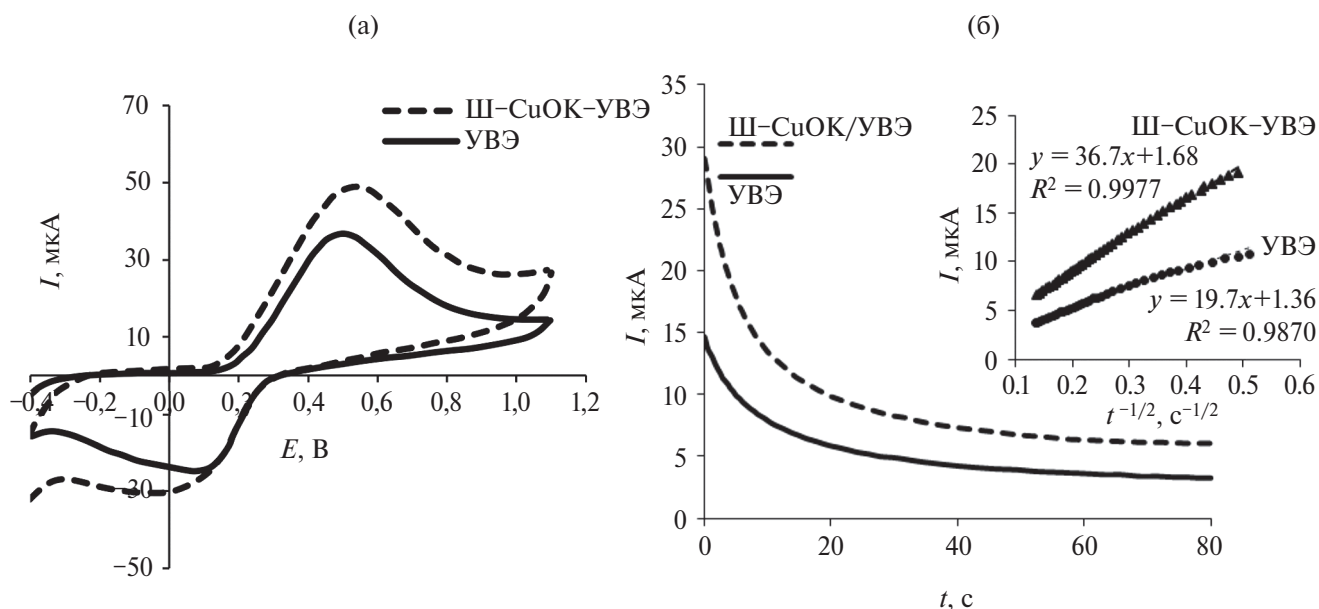


Рис. 5. (а) Циклические вольтамперограммы 1 мМ раствора $K_4[Fe(CN)_6]$, зарегистрированные в 0.1 М КСl с использованием немодифицированного углеродного электрода (УВЭ) и модифицированного Ш-CuOK/УВЭ. (б) Хроноамперограммы 1 мМ раствора $K_4[Fe(CN)_6]$, зарегистрированные при $E = 0.6$ В на разных электродах. Вставка: зависимость $I = f(t^{-1/2})$, полученная из хроноамперометрических измерений для разных электродов.

немодифицированным электродом (рис. 6, кривая 2). Вероятнее всего, это связано с возникновением контакта между лидокаином и формаза-натом меди за счет взаимодействия неподеленной электронной пары атома азота диэтиламиногруппы с Cu(I), что увеличивает концентрацию лидокаина на поверхности электрода и приводит к возрастанию тока [21]. Модифицирование УВЭ шунгитом увеличивает ток окисления лидокаина в 1.5 раза по сравнению с немодифицированным электродом (рис. 6, кривая 3). Возрастание тока лидокаина на Ш/УВЭ может быть обусловлено увеличением электроактивной площади поверхности, с одной стороны, и концентрированием лидокаина на электроде за счет образования межмолекулярных водородных связей между атомом азота диэтиламиногруппы или атомом водорода амидной группы лидокаина и функциональными группами шунгита, такими как карбоксильные и карбонильные, с другой стороны. На модифицированном Ш-CuOK/УВЭ ток окисления лидокаина (рис. 6, кривая 4) увеличивается в два раза и смещается на 20 мВ в катодную сторону относительно тока на немодифицированном электроде. Эти факты можно объяснить дополнительным увеличением концентрации лидокаина на поверхности электрода за счет его координации, обусловленной образованием связей донорно-акцепторного типа между атомом азота диэтиламиногруппы и ненасыщенным атомом

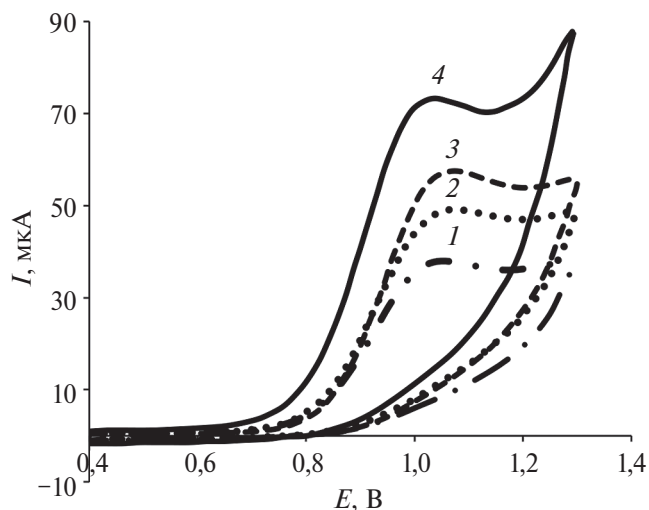


Рис. 6. Циклические вольтамперограммы 0.64 мМ раствора лидокаина на разных электродах: 1 – УВЭ, 2 – CuOK/УВЭ, 3 – Ш/УВЭ, 4 – Ш-CuOK/УВЭ. Фон: универсальный буферный раствор с pH 8, $v = 50$ мВ/с.

меди в структуре CuOK (схема 3). Координация лидокаина с CuOK приводит к ослаблению связей вблизи координационного центра, что вызывает облегчение процесса окисления лидокаина и сдвиг его сигнала в катодную область.

Влияние pH. Методом циклической вольтамперометрии изучено влияние pH УБС в диапазоне от 6.5 до 9.6 на вольт-амперные характеристики лидокаина. Потенциал пика (E_p)

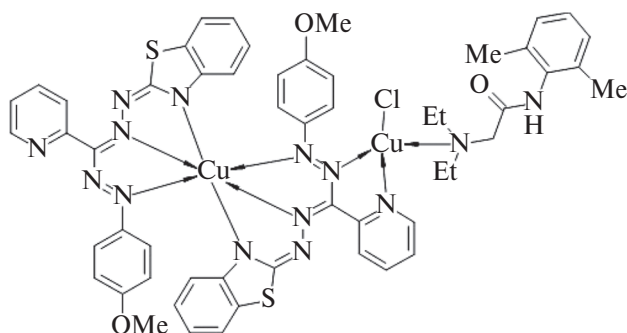


Схема 3. Предполагаемая структура комплекса лидокаин–CuOK.

окисления лидокаина сдвигается к менее анодным потенциалам с увеличением pH (рис. 7а), что свидетельствует об участии протонов в электродной реакции. Наклон зависимости $E_{\text{п}}$ от pH

(рис. 7б) составил 49 мВ/pH, что указывает на равное число протонов и электронов, участвующих в электродной реакции окисления лидокаина [22]. Отсутствие катодных пиков подтверждает необратимость окисления лидокаина во всем диапазоне pH. Ток окисления лидокаина растет с увеличением pH УБС от 6.5 до 8.0. При значении pH УБС выше 8.0 ток окисления лидокаина увеличивается более резко и достигает максимума при pH 9.0. При pH 8–9 в растворе преобладает депротонированная по амидной группе форма лидокаина, которая дополнительно способствует взаимодействию лидокаина с CuOK по типу N–Cu с участием атома азота амидной группы в анионной форме и накоплению его на поверхности электрода [10]. При pH > 9 усиливаются процессы гидролиза амидной группы лидокаина

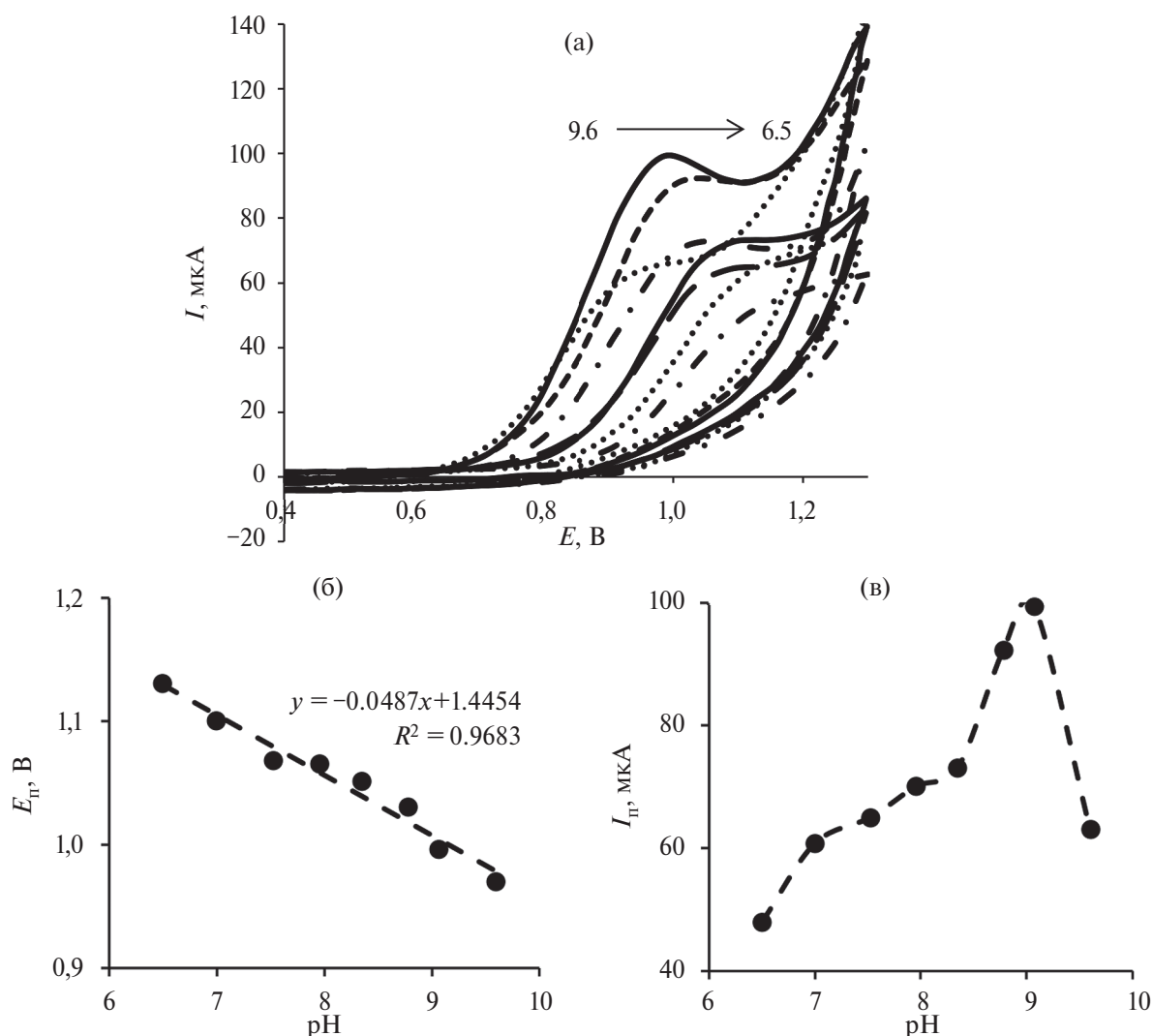


Рис. 7. (а) Циклические вольтамперограммы 0.64 мМ раствора лидокаина, зарегистрированные на Ш–CuOK/УВЭ в универсальном буферном растворе с pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.3, 8.8, 9.0, 9.6, $v = 50$ мВ/с; (б) влияние pH универсального буферного раствора на потенциал пика окисления 0.64 мМ раствора лидокаина; (в) зависимость максимального тока 0.64 мМ раствора лидокаина от pH универсального буферного раствора.

с образованием слабо растворимых в воде продуктов [23], что вызывает падение тока (рис. 7в). Для дальнейших исследований выбрали фоновый раствор с pH 9.0, обеспечивающий наибольший ток окисления лидокаина.

Влияние скорости сканирования потенциала. Для исследования особенностей процесса электроокисления лидокаина зарегистрировали вольтамперограммы с линейным сканированием потенциала в диапазоне от 0.2 до 1.3 В при различных скоростях сканирования от 50 до 300 мВ/с (рис. 8) и получили зависимости тока и потенциала от скорости сканирования потенциала.

Линейная зависимость между током пика окисления (I_p) лидокаина и скоростью сканирования потенциала описывается уравнением:

$$I_p \text{ (мкА)} = 0.283v \text{ (мВ/с)} + 34.5, \quad R^2 = 0.9760 \quad (2)$$

и является характерной для поверхностно контролируемых процессов, что согласуется с данными [9, 24].

Увеличение скорости сканирования в диапазоне от 50 до 300 мВ/с сопровождается сдвигом потенциала пика в анодную область в соответствии с уравнением:

$$E_p \text{ (В)} = 0.130 \lg v + 0.792, \quad R^2 = 0.9637, \quad (3)$$

что свидетельствует о необратимости электрохимической реакции. Число электронов электродного процесса, рассчитанное с использованием наклона зависимости E_p от $\lg v$ и уравнения Лавирона, составило 1.8, что указывает на перенос двух электронов и согласуется с данными, приведенными в более ранних исследованиях [24, 25].

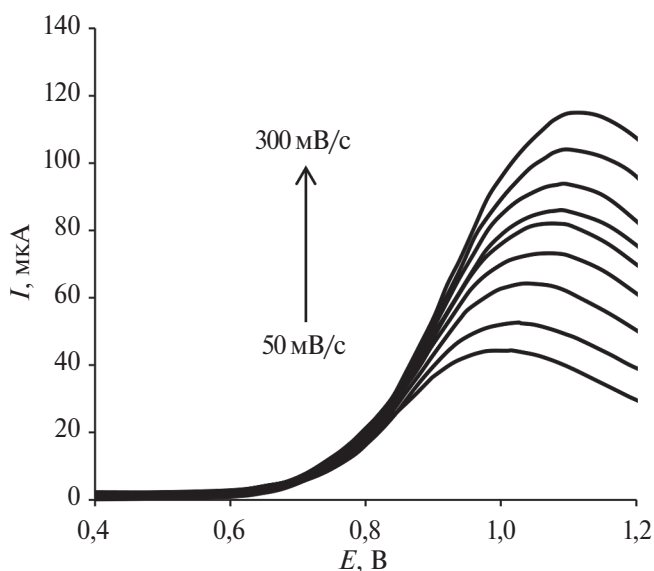


Рис. 8. Линейные вольтамперограммы с коррекцией базовой линии 0.32 мМ раствора лидокаина в универсальном буферном растворе с pH 9 при скорости развертки потенциала 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 мВ/с.

Электроактивными центрами в молекуле лидокаина являются третичный атом азота с алкильными заместителями и амидная группа. Рахбар и соавт. [25] убедительно показали, что электрохимическое окисление молекулы лидокаина происходит с большей вероятностью по аминогруппе, чем по амидной. Нури-Нигже и соавт. [26] предположили, что окисление лидокаина на аноде протекает по диэтиламиногруппе с отщеплением электронов через возможное образование катион-радикала, иминиевого промежуточного продукта с последующим N-деалкилированием. Подобный механизм, вероятно, имеет место и в нашем случае (схема 4).

Химическое и электрохимическое окисление аминов с участием двух электронов и двух протонов, сопровождающееся N-деалкилированием,

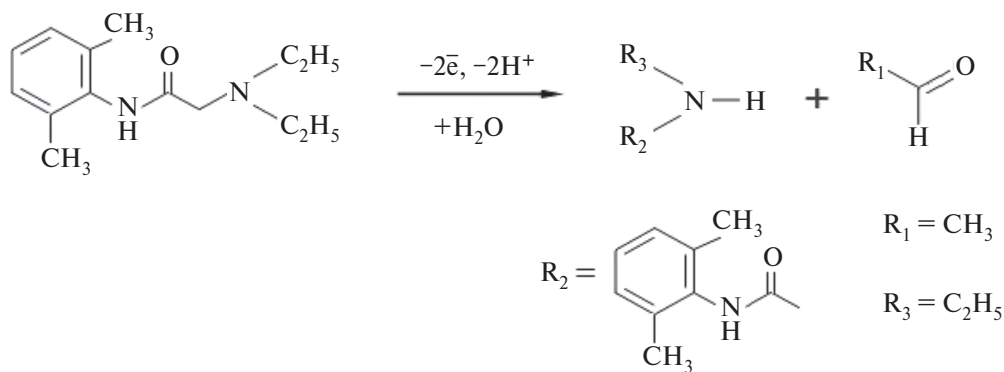


Схема 4. Предполагаемый механизм окисления лидокаина на Ш-CuOK/УВЭ.

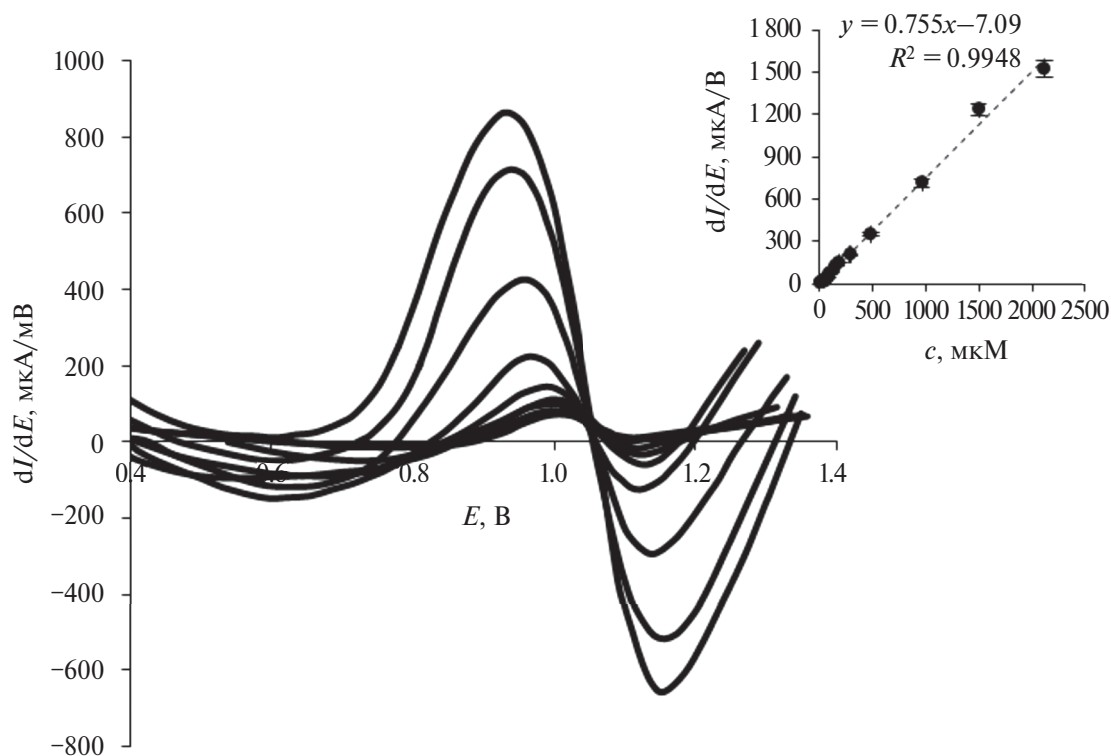


Рис. 9. Производные вольтамперограмм, зарегистрированные на Ш-СuОК/УВЭ при разных концентрациях лидокаина. Вставка: зависимость аналитического сигнала от концентрации лидокаина в растворе.

описано и другими авторами [24, 25, 27]. Конечными продуктами такой трансформации являются N-деалкилированный амин и альдегид.

Аналитические и эксплуатационные характеристики сенсора. Для оценки аналитических характеристик разработанного сенсора регистрировали линейные вольтамперограммы лидокаина в режиме производных (dI/dE), обеспечивающем большую чувствительность и разрешающую способность метода. На рис. 9 представлены производные вольтамперограммы при разной концентрации лидокаина в растворе. Ток, регистрируемый при $E = 1.05$ В, линейно зависит от концентрации лидокаина в растворе (вставка на рис. 9), что позволяет считать его аналитическим сигналом. Прямо пропорциональная зависимость между аналитическим сигналом и концентрацией лидокаина в диапазоне от 2 до 2120 мкМ описывается уравнением:

$$\begin{aligned} dI/dE \text{ (мкА/В)} &= \\ &= 0.755c \text{ (мкМ)} - 7.09 \text{ (} R^2 = 0.9948 \text{)}. \end{aligned} \quad (4)$$

Из уравнения (4) следует, что чувствительность сенсора составляет $0.755 \text{ мкА/В} \times \text{мкМ}$. Предел обнаружения, рассчитанный по формуле (1), равен 0.18 мкМ . Сравнение аналитических характеристик разработанного и описанных

ранее сенсоров для определения лидокаина в фармпрепаратах приведено в табл. 1. Разработанный сенсор характеризуется широким диапазоном определяемых концентраций и более низким пределом определения лидокаина по сравнению с другими сенсорами.

Межэлектродную повторяемость проверяли путем регистрации вольтамперометрического сигнала 0.64 мМ раствора лидокаина на восьми разных электродах. Относительное стандартное отклонение (s_r) составило 3.3% . Внутриэлектродная повторяемость, которую оценивали по восьми измерениям сигнала 0.64 мМ раствора лидокаина на одном и том же электроде, составила 3.5% . Электрод стабилен при хранении на воздухе в течение трех недель. Величина сигнала к концу третьей недели снизилась на 5% .

Исследовали влияние мешающих ионов (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-}) на сигнал 50 мкМ лидокаина. Установили, что отклик лидокаина в присутствии 200-кратного избытка Na^+ , CO_3^{2-} , 250-кратного избытка Mg^{2+} и SO_4^{2-} , 500-кратного избытка Ca^{2+} и Cl^- остается на уровне 98.7% относительно исходного сигнала.

Разработанный сенсор применили для определения лидокаина в фармацевтических препаратах. Для доказательства правильности

Таблица 1. Аналитические характеристики сенсоров для определения лидокаина в фармпрепаратах

Электрод	ПО, мкМ	ЛД, мкМ	Метод	Реальный образец	Литература
CuO-УПЭ	0.39	1–2500	КвВ	Гель, раствор для инъекции	[10]
C18 SiO ₂ -УПЭ	2.19	7.94–107	КвВ	Фармпрепараты	[22]
УПЭ	0.29	8–1000	КвВ	Фармпрепараты	[25]
BDD	42.7	24.2–114	КвВ	Фармпрепараты	[28]
Ш-CuOK/УВЭ	0.18	2–2120	ЛВ	Раствор для инъекции, капли, спрей, анестезирующий гель	Настоящая работа

Обозначения: ЛД – линейный диапазон; BDD – алмазные электроды, легированные бором; УПЭ – угольно-пастовый электрод; КвВ – квадратно-волновая вольтамперометрия; ЛВ – линейная вольтамперометрия.

Таблица 2. Результаты оценки показателя правильности определения лидокаина в фармацевтических образцах по методу введено–найдено с использованием Ш-CuOK/УВЭ ($n = 5$, $P = 0.95$)

Образец	Введено, мкМ	Найдено, мкМ	s_r , %	ПП, %
Раствор для инъекций	0	40 ± 4	4.6	–
	50	91 ± 8	3.4	102
Капли	0	47 ± 6	5.5	–
	50	97 ± 12	5.2	100
Спрей для горла	0	6.7 ± 0.5	3.1	–
	25	32 ± 1	1.9	101
Анестезирующий гель	0	5.5 ± 0.3	1.8	–
	25	30 ± 3	3.6	98

определения лидокаина с использованием разработанного сенсора в образцы вносили добавку стандартного раствора лидокаина. Результаты определения лидокаина в фармацевтических препаратах с использованием метода введено–найдено представлены в табл. 2. Показатель правильности (ПП), рассчитанный в соответствии с рекомендациям ИЮПАК [29], находится в диапазоне от 95 до 105%, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности. Относительное стандартное отклонение полученных результатов не превышает 5.5%.

* * *

Таким образом, разработан планарный сенсор на основе трехмерной углеволоконной бумаги, модифицированной шунгитом и металл-органическим комплексом. Сенсор показал высокочувствительную и избирательную реакцию на лидокаин, отличную воспроизводимость, правильность и стабильность результатов измерений. Сенсор способен обеспечить быстрое, прямое и экономичное определение лидокаина в фармпрепаратах. По сравнению с другими электрохимическими сенсорами, предназначенными для определения лидокаина в фармпрепаратах, разработанный сенсор характеризуется более

низким пределом определения, широким диапазоном определяемых концентраций и может применяться для разовых анализов. Конструктивные особенности (миниатюрность, планарность, простота) сенсора позволяют использовать его как элемент портативных, мобильных приборных устройств.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Синтез комплекса осуществлен при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках госзадания “Разработка современных методов “зеленой” химии для конструирования органических соединений как платформы для практически полезных веществ” (регистрационный номер 124020200072-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фелькер Е.Ю., Заболотский Д.В., Корячкин В.А., Малащенко Н.С., Колосов А.О., Горбачева Т.В. Эффективность и безопасность внутривенной

- инфузии лидокаина у детей // Анестезиология и реаниматология. 2021. № 2. С. 50.
2. *Leung Y.L.* Lidocaine. Encyclopedia of Toxicology. 3rd Ed. Academic Press, 2014. P. 71.
 3. *Stozhko N.Yu., Bukharinova M.A., Khamzina E.I., Tarasov A.V., Sokolov S.V.* Film carbon veil-based electrode modified with Triton X-100 for nitrite determination // Chemosensors. 2020. V. 8. Article 78.
 4. *Brainina Kh.Z., Bukharinova M.A., Stozhko N.Yu., Sokolov S.V., Tarasov A.V., Vidrevich M.B.* Electrochemical sensor based on a carbon veil modified by phytosynthesized gold nanoparticles for determination of ascorbic acid // Sensors. 2020. V. 12. Article 1800.
 5. *Stozhko N.Yu., Khamzina E.I., Bukharinova M.A., Tarasov A.V.* A novel voltammetric sensor based on carbon paper modified by graphite powder for determination of sunset yellow and tartrazine in drinks // Sensors. 2022. V. 22. Article 4092.
 6. *Stozhko N.Yu., Khamzina E.I., Bukharinova M.A., Tarasov A.V., Kolotygina V.Yu., Lakiza N.V., Kuznetsova E.D.* Carbon paper modified with functionalized poly(diallyldimethylammonium chloride) graphene and gold phytanoparticles as a promising sensing material: Characterization and electroanalysis of Ponceau 4R in food samples // Nanomaterials. 2022. V. 12. Article 4197.
 7. *Matos C.R.S., Souza Jr H.O., Santana T.B.S., Candido L.P.M., Cunha F.G.C., Sussuchi E.M., Gimenez I.F.* Cd_{1-x}Mg_xTe semiconductor nanocrystal alloys: Synthesis preparation of nanocomposites with graphene-based materials, and electrochemical detection of lidocaine and epinephrine // Microchim. Acta. 2017. V. 184. P. 1755.
 8. *Zhang J., Liu J., Zhang Y., Yu F., Wang F., Peng Z., Li Y.* Voltammetric lidocaine sensor by using a glassy carbon electrode modified with porous carbon prepared from a MOF, and with a molecularly imprinted polymer // Microchim. Acta. 2018. V. 185. Article 78.
 9. *Yang G., Zhao F.* A novel electrochemical sensor for the determination of lidocaine based on surface-imprinting on porous three-dimensional film // J. Mater. Chem. C. 2014. V. 2. P. 10201.
 10. *Rahbar N., Ramezani Z., Ghanavati J.* CuO-nanoparticles modified carbon paste electrode for square wave voltammetric determination of lidocaine: Comparing classical and Box–Behnken optimization methodologies // Chin. Chem. Lett. 2016. V. 27. P. 837.
 11. *Alham A., Ibraimov A., Alimzhanova M., Mamedova M.* Natural material shungite as solid-phase extraction sorbent for the extraction of red synthetic dye Ponceau 4R from tap water, wine, and juice // Food Anal. Methods. 2022. V. 15. P. 707.
 12. *Diyuk V.E., Ishchenko O.V., Loginova O.B., Melnik L.M., Kisterska L.D., Garashchenko V.V., Turchun O.V.* Recovery of adsorption properties of shungite // J. Superhard Mater. 2019. V. 41. P. 221.
 13. *Bukharinova M.A., Khamzina E.I., Stozhko N.Yu., Tarasov A.V.* Highly sensitive voltammetric determination of Allura Red (E129) food colourant on a planar carbon fiber sensor modified with shungite // Anal. Chim. Acta. 2023. V. 1272. Article. 341481.
 14. *Kajal N., Singh V., Gupta R., Gautam S.* Metal organic frameworks for electrochemical sensor applications: A review // Environ. Res. 2022. V. 204. Article 112320.
 15. *Бузыкин Б.И., Липунова Г.Н., Первова И.Г.* Прогресс в химии формазанов. Синтез-свойства-применение. М.: Научный мир, 2009. 296 с.
 16. *Garkani Nejad F., Beitollahi H., Sheikhshoaei I.* A UiO-66-NH₂ MOF/PAMAM dendrimer nanocomposite for electrochemical detection of tramadol in the presence of acetaminophen in pharmaceutical formulations // Biosensors. 2023. V. 13. Article 514.
 17. *Tajik S., Sharifi F., Aflatoonian B., Di Bartolomeo A.* A new electrochemical sensor for the detection of ketoconazole using carbon paste electrode modified with sheaf-like Ce-BTC MOF nanostructure and ionic liquid // Nanomaterials. 2023. V. 13. Article 523.
 18. *Zhao J., Kan Y., Chen Z., Li H., Zhang W.* MOFs-modified electrochemical sensors and the application in the detection of opioids // Biosensors. 2023. V. 13. Article 284.
 19. *Ольховикова Н.Б., Русинова Л.И., Шмелев Л.В., Липунова Г.Н., Клюев Н.А., Ельцов А.В.* Метилирование 1-арил-3-фенил-5-(бензтиазолил)формаза-нов // Журн. орг. химии. 1988. Т. 58. С. 1626.
 20. *Бузыкин Б.И., Липунова Г.Н., Сыроева Л.П., Русинова Л.И.* Химия формазанов. М.: Наука, 1992. С. 233.
 21. *Tabrizi L., Dao D.Q., Vu T.A.* Experimental and theoretical evaluation on the antioxidant activity of a copper(II) complex based on lidocaine and ibuprofen amide-phenanthroline agents // RSC Adv. 2019. V. 9. P. 3320.
 22. *Saad A.S., Al-Alamein A.M. A., Galal M.M., Zaa-zaa H.E.* voltammetric determination of lidocaine and its toxic metabolite in pharmaceutical formulation and milk using carbon paste electrode modified with C18 Silica // J. Electrochem. Soc. 2019. V. 166. P. B103.
 23. *Крылов Ю.Ф., Бобырев В.М.* Фармакология. М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. 352 с.
 24. *Krishnakumar A., Kumar Mishra R., Kadian S., Zareei A., Heredia Rivera U., Rahimi R.* Printed graphene-based electrochemical sensor with integrated paper microfluidics for rapid lidocaine detection in blood // Anal. Chim. Acta. 2022. V. 1229. Article 340332.
 25. *Rahbar N., Ramezani Z., Babapour A.* Electro-oxidation mechanism and direct square-wave voltammetric determination of lidocaine with a carbon-paste electrode // Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod. 2015. V. 10. Article 19382.
 26. *Nouri-Nigjeh E., Permentier H.P., Bischoff R., Bruins A.P.* Lidocaine oxidation by electrogenerated reactive oxygen species in the light of oxidative drug metabolism // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 7625.

27. Сурмилло А.С. N-Деалкилирование аминов при обеззараживании воды / Тез. докл. X Всерос. конф. с междунар. участием “Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы”. 2023. Москва. 30 октября–03 ноября 2023. С. 55.
28. Oliveira R.T.S., Salazar-Banda G.R., Ferreira V.S., Oliveira S.C., Avaca L.S. Electroanalytical determination of lidocaine in pharmaceutical preparations using boron-doped diamond electrodes // *Electroanalysis*. 2007. V. 19. P. 1189.
29. Burns D.T., Danzer K., Townshend A. Use of the terms “Recovery” and “Apparent recovery” in analytical procedures (IU-752 PAC Recommendations 2002) // *Pure Appl. Chem*. 2002. V. 74. P. 2201.

ORIGINAL ARTICLES

A VOLTAMMETRIC SENSOR BASED ON CARBON FIBER PAPER MODIFIED WITH SHUNGITE AND COPPER FORMAZANATE FOR THE DETERMINATION OF LIDOCAINE

M. A. Bukharinova^a, N. Yu. Stozhko^{a, *}, T. G. Fedorchenko^b,
G. N. Lipunova^b, E. V. Shabrova^a, E. I. Khamzina^a, A. V. Tarasov^a

^aUral State Economic University, 620144, Yekaterinburg, Russia

^bPostovskii Institute of Organic Synthesis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,
620990, Yekaterinburg, Russia

*E-mail: sny@usue.ru

Abstract. A highly sensitive sensor based on carbon fiber paper modified with a shungite–copper formazanate composite is presented for the voltammetric determination of lidocaine. The synthesized organometallic complex, composite, and modified electrode are characterized by infrared spectroscopy, high-resolution mass spectrometry, elemental analysis, scanning electron microscopy, and cyclic and linear sweep voltammetry. The twofold increase in the current of the lidocaine oxidation peak on the modified electrode compared to the unmodified one is associated with the sensitizing effect of the composite modifier, which is due to an increase in the electroactive area and the number of lidocaine binding sites on the electrode surface. The sensor exhibits a wide dynamic range from 2 to 2120 μM with a low limit of detection of 0.18 μM lidocaine and high sensitivity of 0.755 $\mu\text{A/V } \mu\text{M}$. The interelectrode and intraelectrode repeatability of the analytical signal do not exceed 3.5%. The sensor response is stable within three weeks. The developed sensor was used for the determination of lidocaine in pharmaceuticals. The results of an analysis of real samples demonstrated good reproducibility ($\text{RSD} \leq 5.5\%$) and recovery (98–102%).

Keywords: electrochemical sensor, carbon fiber material, organometallic complex, formazanates, lidocaine, pharmaceuticals.

УДК 543.9

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ИММУНОСЕНСОР НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОВАЛЬБУМИНА В ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

© 2024 г. Е. В. Дорожка^{a, *}, А. Н. Соломоненко^a, М. Сакиб^a, В. О. Семин^b

^aНациональный исследовательский Томский политехнический университет,
просп. Ленина, 30, Томск, 634050 Россия

^bИнститут физики прочности и материаловедения Сибирского отделения РАН,
просп. Академический, 2/4, Томск, 634055 Россия

*E-mail: evd@tpu.ru

Поступила в редакцию 09.11.2023 г.

После доработки 25.12.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

Разработан вольтамперометрический иммуносенсор типа сэндвич на основе конъюгатов наночастиц золота (НЧ Au) и специфических иммуноглобулинов (IgG) против овалбумина (IgG@НЧAu) для определения овалбумина в некоторых иммунобиологических препаратах. Конъюгат IgG@НЧAu синтезировали методом пассивной адсорбции. В качестве субстратной электродной подложки для иммобилизации рецепторного слоя специфических иммуноглобулинов использовали углеродсодержащий планарный печатный электрод, модифицированный восстановленным лазером оксидом графена. Для усиления сигнала НЧ Au рассмотрена возможность каталитического восстановления нитрата серебра смесью восстановителей – лимонной кислоты и метола. Подобраны условия вольтамперометрической регистрации электрохимического сигнала серебра на иммуносенсоре, который успешно апробирован при определении остатков овалбумина в некоторых иммунобиологических лекарственных препаратах. В качестве метода сравнения использовали твердофазный иммуноферментный анализ.

Ключевые слова: наночастицы золота, конъюгаты на основе иммуноглобулинов и наночастиц золота, электрохимический иммуносенсор, овалбумин, вакцины.

DOI: 10.31857/S0044450224070032, EDN: ТОМКOD

Овальбумин (ОВА) – примесь целого ряда вакцинных препаратов, полученных с использованием эмбрионов куриных яиц и предназначенных для профилактики кори, краснухи, паротита, бешенства, желтой лихорадки и клещевого энцефалита, которая наиболее часто вызывает аллергические реакции [1]. Овальбумин содержится в некоторых препаратах, которые либо включены в национальный календарь прививок (например, вакцина “Гриппол”), либо являются жизненно необходимыми и часто используемыми в клинической практике лекарственными средствами (препараты интерферона) [2]. Допустимое остаточное количество ОВА в отечественной гриппозной вакцине составляет не более

100 нг/мл, однако этого количества достаточно, чтобы вызвать реакцию гиперчувствительности у лиц с аллергией к яичному белку [3]. Использование зарубежных тест-систем контроля содержания ОВА в иммунобиологических препаратах в настоящее время не разрешено в связи с тем, что они не зарегистрированы в РФ, а также из-за их высокой стоимости и недоступности.

В настоящее время для оценки качества вакцин в лабораториях контроля качества на фармацевтических предприятиях наиболее часто применяют твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с ферментами в качестве маркеров протекания иммунной реакции. Наибольшей популярностью пользуются пероксидаза хрена

и щелочная фосфатаза. Несмотря на высокую чувствительность регистрации аналитических сигналов продуктов субстратных реакций с использованием данных ферментов, они обладают рядом недостатков: сложностью выделения и очистки фермента, лабильностью фермента в отношении ряда физико-химических и биологических факторов, значительной потерей активности фермента в процессе ковалентного связывания с иммуноглобулинами, влиянием на результаты анализа наличия в исследуемом образце ферментных ингибиторов. Эти недостатки обуславливают высокую стоимость, недостаточную стабильность иммуноферментных тест-систем для контроля качества вакцин и в основном связаны с биологическим характером маркера [4].

На сегодняшний день электрохимические иммуносенсоры с конъюгатами иммуноглобулинов, меченными НЧАу, широко используют для определения антигенов/антител в различных объектах, включая иммунобиологические препараты [5, 6].

В данной работе нами предложено использовать в качестве электрохимической маркерной метки НЧАу в твердофазном сэндвич-формате иммуносенсора для более экспрессного по сравнению с ИФА определения ОВА в некоторых иммунобиологических препаратах.

По сравнению с ферментами НЧАу обладают рядом преимуществ: высокой стабильностью, экономичностью, биосовместимостью с иммуноглобулинами при получении конъюгатов и возможностью регистрировать электрохимические сигналы с использованием недорогого оборудования. Синтез НЧАу осуществляли по методу Френса [7]. Конъюгаты иммуноглобулинов кролика (IgG) против овальбумина с наночастицами золота (IgG@НЧАу) синтезировали методом пассивной адсорбции [8]. В качестве твердой субстратной подложки для иммобилизации рецепторного слоя захватывающих антител кролика против овальбумина использовали углеродную поверхность планарного печатного электрода, которая была модифицирована оксидом графена (ОГ). Для увеличения токопроводящих свойств рабочей поверхности электрода ОГ восстанавливали с помощью лазерного гравера. Белковые рецепторные слои электрохимического иммуносенсора оказывали пассивирующее действие на регистрацию чувствительного вольтамперометрического сигнала от НЧАу, в связи с этим в качестве проявителя НЧАу использовали смесь

0.5%-ного раствора нитрата серебра и смеси растворов восстановителей — 0.25%-ной лимонной кислоты и 0.2%-ного метола. Для определения ОВА в некоторых иммунобиологических препаратах регистрировали чувствительный сигнал окисления серебра методом анодной инверсионной вольтамперометрии.

Новый электрохимический иммуносенсор позволил сократить время определения ОВА на 30 мин по сравнению с традиционными ИФА тест-системами в связи с отсутствием дополнительных стадий анализа, связанных с введением субстратов и стоп-реагентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика синтеза конъюгатов IgG@НЧАу.

В основе метода Френса [7] лежит восстановление НЧАу из 0.01%-ного раствора золотохлоридоводородной кислоты 1%-ным раствором цитрата натрия. Синтезировали НЧ Au со средним размером 17.3 ± 5.0 нм.

Для синтеза конъюгатов IgG@НЧАу методом пассивной адсорбции [8] использовали коммерческие иммуноглобулины класса G кролика против овальбумина (Имтек, Россия). Для подбора минимального количества иммуноглобулинов для стабилизации коллоидного раствора золота проводили титрование в лунках микротитровального планшета в присутствии 100 мкл 1 М раствора NaCl по методике [8]. В случае отсутствия изменения цвета лунки по сравнению с первоначальным винным количеством иммуноглобулинов достаточно для защитного действия НЧ Au от коагулирующего действия NaCl. Масштабируя объемы растворов иммуноглобулинов кролика против овальбумина и раствора НЧАу, установили, что на 300 мкл раствора НЧАу необходимо 700 мкл раствора иммуноглобулинов с концентрацией 0.01 мг/мл. Приведенные фактические данные характеризуют защитную способность иммуноглобулинов в условиях эксперимента в отношении НЧАу со средним размером 17.3 ± 5.0 нм.

Конъюгат IgG@НЧАу очищали от несвязанных компонентов методом центрифугирования. Центрифужную пробирку объемом 3 мл наполняли 500 мкл 96% глицерина (Sigma, США) и 1 мл раствора полученного конъюгата. Центрифугирование осуществляли при скорости 25 000 об/мин и температуре +4 °С в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отделяли, конъюгат с глицерином переносили в пробирку

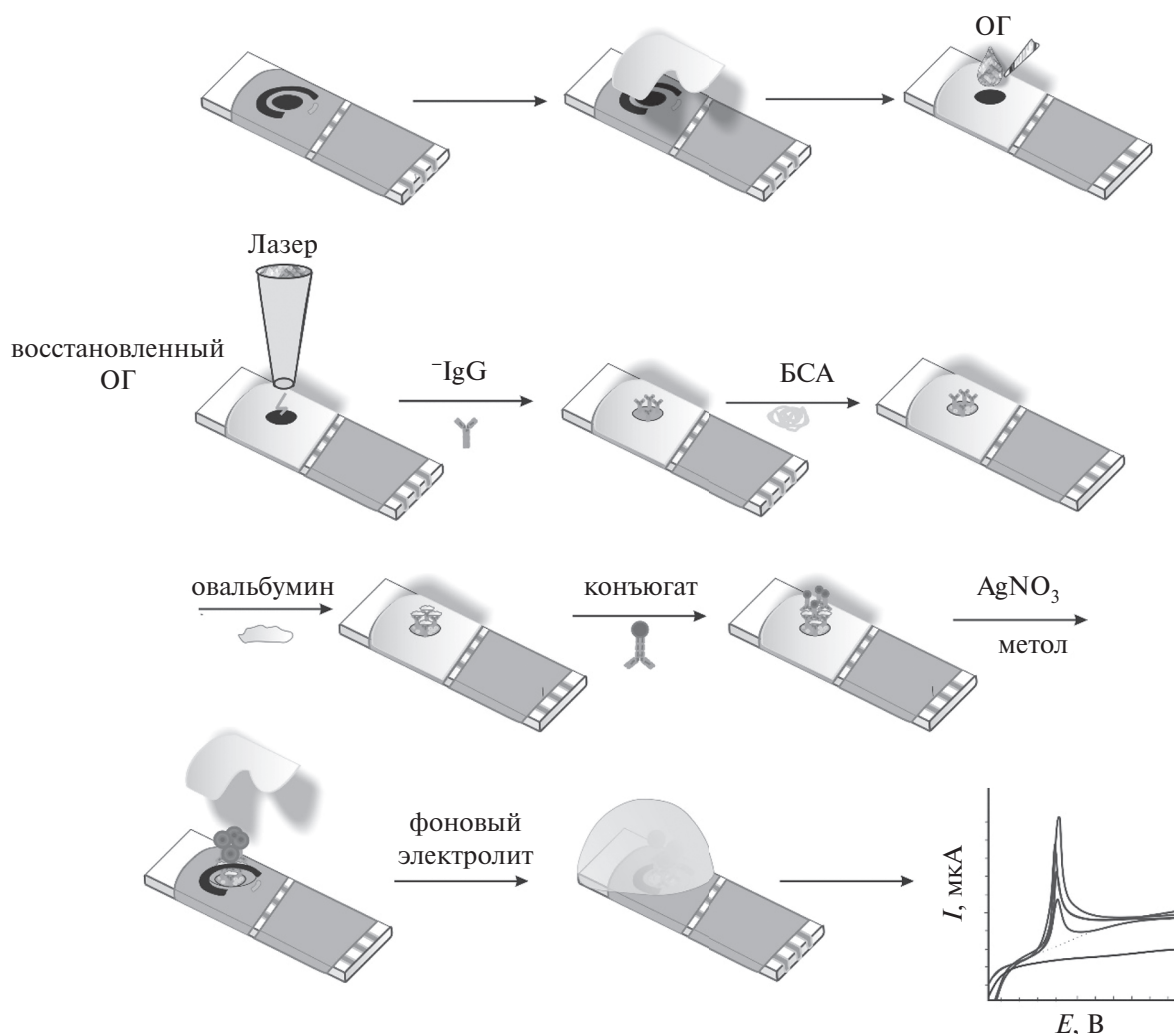


Рис. 1. Схема электрохимического иммуносенсора для определения овальбумина в вакцинах.

для хранения. Конъюгат хранили в морозильной камере при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 года. Морфологию конъюгата IgG@НЧАу исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с контрастированием белков 2.0%-ным раствором безводного уранил ацетата на просвечивающем электронном микроскопе Philips CM12 (FEI Electron Optics, Нидерланды) в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН (Томск, Россия). Средние размеры неконъюгированных НЧ Au рассчитывали по изображениям ПЭМ с помощью программного обеспечения Fiji (www.fiji.sc) и Origin Pro 8.0 (OriginLab, США). Для каждого образца брали не менее десяти репрезентативных изображений. Распределение частиц по размерам получали путем подсчета по меньшей мере 100 частиц для каждого образца.

Изготовление электрохимического иммуносенсора. Электрохимический иммуносенсор

представлял собой сэндвич-формат, где в качестве твердой подложки для иммобилизации иммуноглобулинов использовали углеродсодержащий планарный печатный электрод (ООО “Русенс”, Москва, Россия). Схема изготовления электрохимического иммуносенсора для определения овальбумина в вакцинах представлена на рис. 1.

На первой стадии разработки электрохимического иммуносенсора модифицировали углеродсодержащий планарный печатный электрод ОГ. Для того чтобы в модификации электрода не участвовали части электрода, выполняющие функцию электрода сравнения и вспомогательного электрода, поверхность предварительно закрывали трафаретом из двустороннего скотча. При этом поверхность рабочего электрода оставалась незакрытой. Далее 100 мкл суспензии ОГ (2 мг/мл) (Sigma, Германия) наносили на рабочую часть поверхности электрода и осторожно

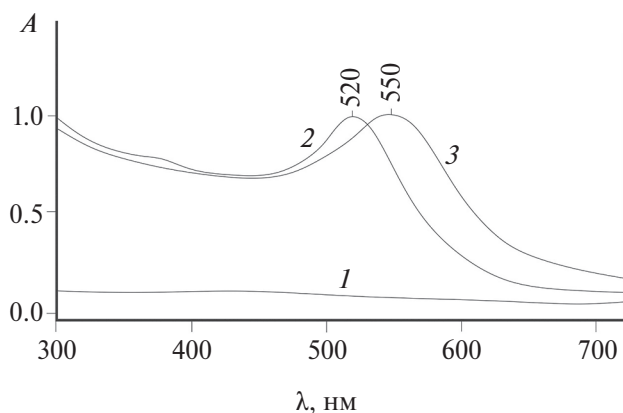


Рис. 2. Спектры светопоглощения в видимой и УФ-областях в бидистиллированной воде (1) НЧАи (2) и конъюгатов IgG@НЧАи (3).

высушивали в течение 2 ч при 22 ± 2 °С. Для улучшения токопроводящих свойств поверхности электрода и увеличения электроактивной площади поверхности ОГ восстанавливали с помощью лазерного гравера мощностью 600 мВт при длине волны 405 нм [9, 10]. Инкубационный период для каждого шага иммобилизации биологического материала на поверхности восстановленного ОГ составлял 1 ч при 37 °С. После каждого этапа иммобилизации биологического материала трижды ополаскивали поверхность сенсора дистиллированной водой для удаления несвязанных компонентов. Для иммобилизации коммерческих иммуноглобулинов кролика против овалбумина использовали 100 мкл раствора с концентрацией 1 мкг/мл. Далее на поверхность сенсора наносили блок-реагент – 0.5%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), по 100 мкл на каждый электрод. После этого на поверхности электрохимических сенсоров раскапывали по 100 мкл растворов овалбумина в концентрациях, соответствующих линейному диапазону от 0.5 до 24.0 нг/мл, или испытываемую вакцину в том же объеме. После иммобилизации овалбумина на поверхность каждого сенсора наносили по 100 мкл конъюгата IgG@НЧАи. Далее на поверхность сенсоров наносили по 100 мкл 0.5%-ного раствора AgNO₃ и 100 мкл раствора восстановителя – смеси 0.25%-ной лимонной кислоты и 0.2%-ного метола. Данная процедура позволила усилить сигнал золота серебром при его каталитическом восстановлении на поверхности НЧАи конъюгата IgG@НЧАи. Время восстановления серебра составило 3 мин. Далее на поверхность сенсора наносили 200 мкл фонового электролита и регистрировали сигнал

серебра методом инверсионной вольтамперометрии. Для контроля специфичности разработанного электрохимического иммуносенсора в качестве отрицательных контрольных образцов использовали неспецифические к овалбумину IgG свиньи, иммобилизованные на поверхности иммуносенсора, а также БСА. В качестве метода сравнения для определения овалбумина в вакцинах использовали метод ИФА.

Регистрация электрохимического сигнала серебра иммуносенсора. Для регистрации электрохимического сигнала серебра использовали фоновый электролит состава 0.05 М HCl–0.05 М раствор NaClO₄ (1 : 1, по объему). Объем фонового электролита, который наносили в виде капли на рабочую поверхность иммуносенсора, составил 200 мкл. Условия регистрации электрохимического сигнала: анодная инверсионная вольтамперометрия, потенциал накопления –0.8 В, время накопления 60 с, диапазон потенциалов от –0.6 до +1.0 В со скоростью сканирования потенциала 100 мВ/с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтезированные НЧАи и конъюгаты IgG@НЧАи для определения овалбумина в вакцинах характеризовали методами спектрофотометрии в видимой и УФ-областях и ПЭМ.

Спектры светопоглощения НЧАи и конъюгатов IgG@НЧАи регистрировали в диапазоне 300–700 нм (рис. 2). Максимум поглощения при 520 ± 2 нм обусловлен проявлением поверхностного плазмонного резонанса НЧАи, в то время как более широкий максимум поглощения при 550 нм, смещенный в более длинноволновую область по сравнению с пиком НЧАи, косвенно указывает на связывание НЧАи с IgG кролика против овалбумина.

На рис. 3 представлены ПЭМ-изображения НЧАи и конъюгатов IgG@НЧАи. На рис. 3а видны НЧАи сферической формы со средним размером 17.3 ± 5.0 нм.

После синтеза и очистки конъюгатов IgG@НЧАи отмечено, что в их состав включены белковые компоненты иммуноглобулинов кролика (IgG) белого цвета с аморфной структурой, тогда как НЧАи сферической формы, распределенные на поверхности IgG, имеют темную окраску (рис. 3б). Изображение ПЭМ подтверждает успешность синтеза конъюгатов IgG@НЧАи.

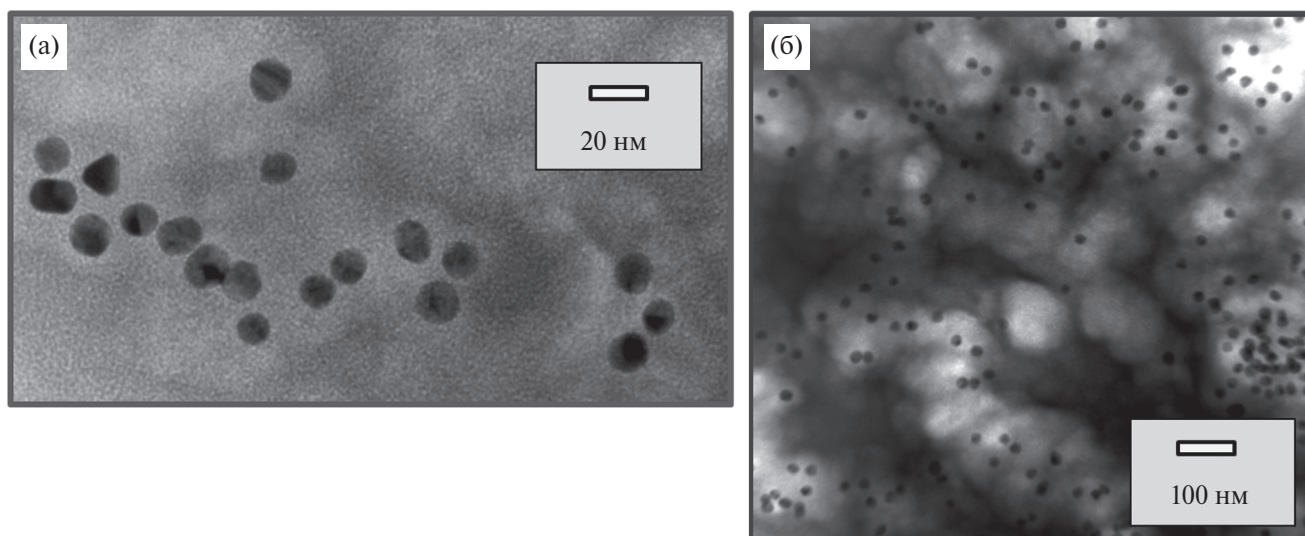


Рис. 3. Изображения, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии, (а) НЧАи и (б) конъюгатов IgG@НЧАи (контрастирование IgG 2.0%-ным раствором уранил ацетата).

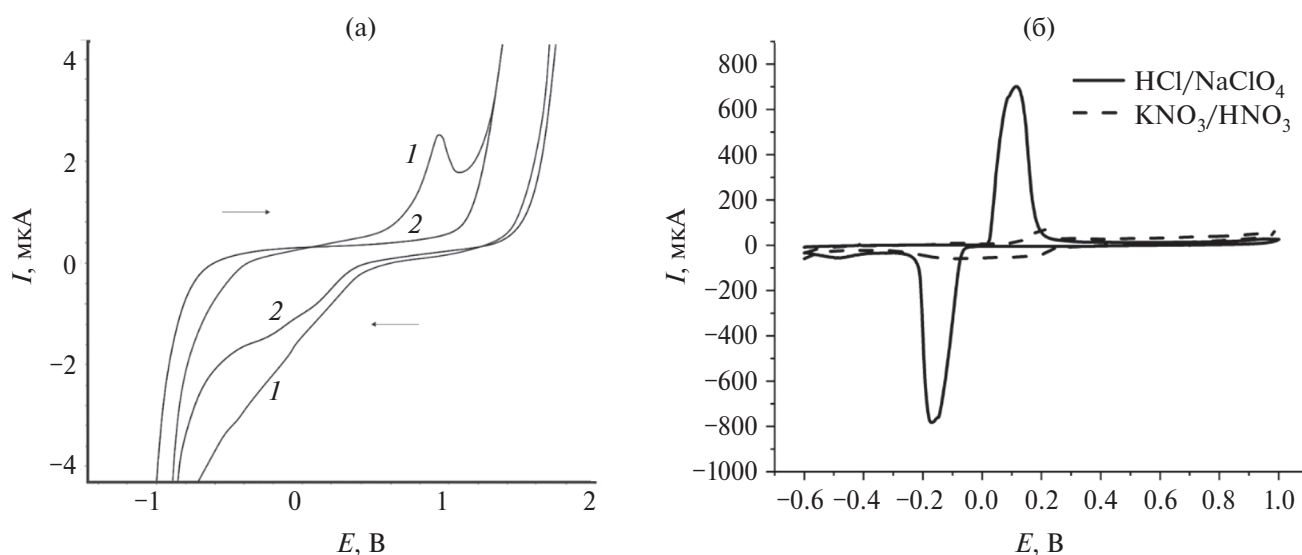


Рис. 4. Циклические вольтамперограммы (а) НЧАи конъюгатов IgG@НЧАи на углеродсодержащем планарном печатном электроде в 0.1 М растворе фонового электролита HCl–NaCl (1 : 1, по объему), $\nu = 100$ мВ/с, до иммобилизации рецепторного слоя (1), после иммобилизации рецепторного слоя (2); (б) циклические вольтамперограммы серебра после проявления на поверхности электрохимического иммуносенсора в разных фоновых электролитах: 1 – 0.05 М HCl–0.05 М раствор NaClO₄ (1 : 1), 2 – 0.25 М раствор KNO₃–0.5 М HNO₃ (1 : 1), объем фонового электролита – 200 мкл.

После синтеза конъюгатов IgG@НЧАи регистрировали циклические вольтамперограммы от золотой метки до и после сборки электрохимического иммуносенсора (рис. 4а) в фоновом электролите состава HCl–0.1 М раствор NaCl. Согласно данным [6], в HCl можно растворить коллоидное золото конъюгата. Кроме того, хлорид-ионы позволяют окислить золото с образованием комплекса $[\text{AuCl}_4]^-$, который окисляется в диапазоне потенциалов от +1.0 до +1.2 В на

электроде, изготовленном по типу трафаретной печати [6].

На рис. 4а показано, что после иммобилизации рецепторного слоя на поверхность сенсора сигнал от золотой метки конъюгатов не обнаружен, в отличие от поверхности без рецепторного слоя. Слои иммуноглобулинов и овальбумина экранируют электродную поверхность, что не позволяет зарегистрировать сигнал от золотой метки конъюгатов IgG@НЧАи в указанных

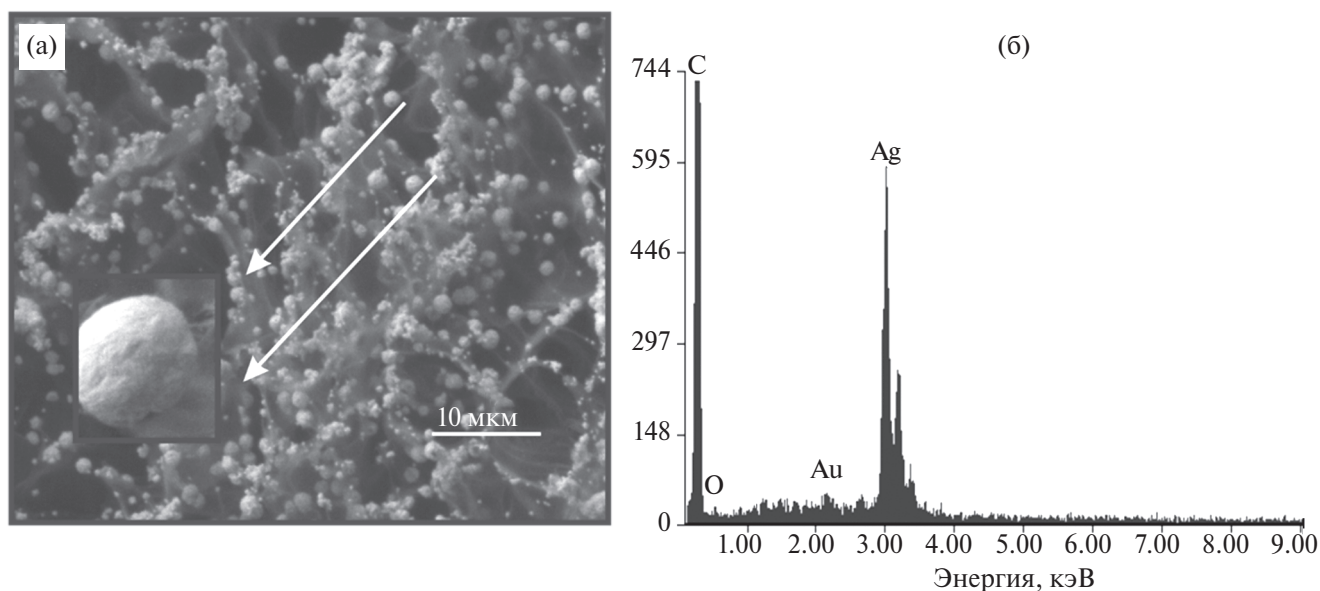
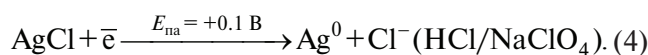
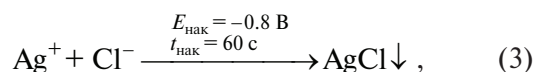
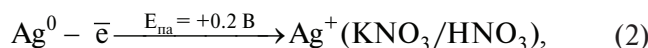
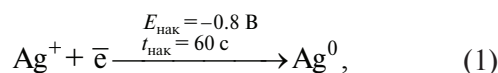


Рис. 5. (а) Изображение поверхности иммуносенсора, полученное методом сканирующей электронной микроскопии, после каталитического восстановления серебра смесью 0.2%-ной лимонной кислоты и 0.25%-ного метола на НЧАу конъюгатов IgG@НЧАу (режим обратного рассеяния электронов поверхности); (б) спектр ЭДС поверхности иммуносенсора после каталитического восстановления серебра с характерными рентгеновскими линиями С, О, Au и Ag.

электрохимических условиях. В связи с этим было решено усилить электрохимический сигнал золота серебром. Известно, что на поверхности НЧАу конъюгатов IgG@НЧАу можно каталитически восстановить другой металл, например Ag, Hg, Cu как электрохимическим, так и химическим способами [11–15]. Апробировали несколько потенциальных химических восстановителей серебра – п-фенилендиамин, гидрохинон, борогидрид натрия, метол и лимонную кислоту – на поверхности НЧАу конъюгатов IgG@НЧАу для усиления вольтамперометрического сигнала. Наилучшие результаты по регистрации чувствительного вольтамперометрического сигнала серебра для определения овальбумина в вакцинах достигнуты при использовании раствора восстановителя состава 0.2%-ная лимонная кислота и 0.25%-ный метол.

С целью выбора лучшего фонового электролита для регистрации вольтамперометрического сигнала серебра использовали два типа фоновых электролитов: смесь 0.25 М раствора KNO₃ и 0.5 М HNO₃ (1 : 1) и смесь 0.05 М HCl и 0.05 М раствора NaClO₄ (1 : 1). Для регистрации электрохимических сигналов серебра использовали метод циклической вольтамперометрии (ЦВА) со скоростью развертки 100 мВ/с в диапазоне потенциалов от –0.6 до +1 В. Электродные механизмы окисления-восстановления серебра в различных фоновых электролитах можно описать уравнениями (1), (2) для фонового электролита

KNO₃–HNO₃ и (3), (4) для фонового электролита HCl–NaClO₄:



На рис. 4б интенсивность редокс-сигналов AgCl в фоновом электролите 0.05 М HCl–0.05 М NaClO₄ в пять раз интенсивнее редокс-сигналов Ag в азотнокислом фоновом электролите 0.25 М раствор KNO₃–0.5 М HNO₃. Это свидетельствует о том, что хлорид серебра накапливается лучше на поверхностях НЧАу конъюгатов по сравнению с Ag⁰ при измерении аналитических сигналов методом ЦВА. В фоновом электролите 0.05 М HCl–0.05 М раствор NaClO₄ можно использовать как катодный, так и анодный ток в качестве аналитического сигнала. В дальнейших исследованиях применяли метод анодной инверсионной вольтамперометрии, а в качестве фонового электролита – 0.05 М HCl–0.05 М раствор NaClO₄ (1 : 1, по объему).

На рис. 5 представлено полученное методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) изображение поверхности иммуносенсора после каталитического восстановления серебра на

Таблица 1. Результаты определения правильности и воспроизводимости овальбумина в модельных образцах на трех уровнях концентрации ($n = 5$, $P = 0.95$)

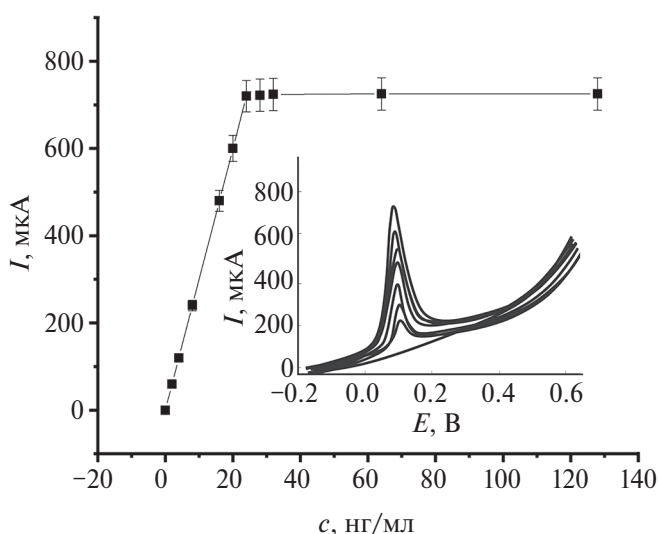
Введено ОВА, нг/мл	Найдено, $c(\text{ОВА}) \pm s$, нг/мл	Степень извлечения, %	s_r , %	s_r (между сериями), %	Найдено ИФА, $c(\text{ОВА}) \pm s$, нг/мл
0.50	0.47 ± 0.01	94	3.1	12	0.52 ± 0.02
8.0	7.7 ± 0.2	96	3.2	8	7.8 ± 0.3
24.0	23.0 ± 0.7	96	3.5	7	23.8 ± 1.0
Требуемая степень извлечения (%) для биоаналитических методик (ГФ XV), ICH		85–115			
Критерий (ГФ XV) (ICH)				20.0	

НЧАи конъюгатов IgG@НЧАи смесью 0.2%-ной лимонной кислоты и 0.25%-ного метола, а также полученный методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) спектр поверхности иммуносенсора после каталитического восстановления серебра с характерными рентгеновскими линиями С, О, Au и Ag. На рис. 5а отчетливо видны крупные сферические образования на поверхности иммуносенсора после восстановления серебра. На ЭДС-спектре (рис. 5б) присутствуют характеристические рентгеновские линии С, О, Au и интенсивная линия Ag, что подтверждает наличие серебра на поверхности иммуносенсора после его каталитического восстановления.

Для построения градуировочной зависимости интенсивности тока окисления AgCl от концентрации ОВА готовили серию градуировочных растворов ОВА с концентрациями от 0.125 до 24 нг/мл. На рис. 6 представлена градуировочная зависимость и вольтамперограммы окисления AgCl.

Линейный диапазон, включающий концентрации от 0.5 до 24 нг/мл ($\lg I = \lg c + 1.5$, $R^2 = 0.999$), находится в пределах допустимой нормы и ожидаемых концентраций ОВА в иммунобиологических препаратах [16] с учетом разведения проб. Предел обнаружения (ПО) ОВА, рассчитанный по $3s$ -критерию ($\text{ПО} = 3s/b$, где s – стандартное отклонение холостой пробы, b – наклон прямолинейного участка градуировочной прямой), составил 0.1 нг/мл [17].

Воспроизводимость работы иммуносенсора оценивали по значению относительного стандартного отклонения (s_r) в пределах одного эксперимента и между экспериментами, повторно исследуя стандартные растворы ОВА линейного диапазона на трех уровнях концентрации (0.5, 8.0 и 24 нг/мл). Значение s_r в пределах одного эксперимента оценивали по 10 параллельным определениям, между разными экспериментами – по 6

**Рис. 6.** Градуировочная зависимость для определения овальбумина с помощью электрохимического иммуносенсора в диапазоне концентраций от 0.125 до 128 нг/мл (вставка – анодные инверсионные вольтамперограммы окисления серебра).

определениям, выполненным в разные дни. Вариабельность в пределах одного эксперимента по определению концентраций ОВА в 10 повторах для каждого уровня концентраций не превышала 8% ($s_r < 8\%$). Вариабельность между сериями определений, которую оценивали по измерениям в шести повторах для каждого уровня концентраций, составила менее 12% ($s_r < 12\%$), что соответствует требованиям [16].

Правильность работы электрохимического иммуносенсора на ОВА оценивали методом введено–найдено и рассчитывали степень извлечения (%) на трех уровнях концентрации (0.5, 8.0 и 24 нг/мл). В качестве метода сравнения выбрали метод ИФА (табл. 1). Как видно из таблицы, значения степени извлечения находятся в диапазоне от 94 до 96% и укладываются в диапазон требований нормативной документации; компоненты матрицы не влияют на правильность полученных

Таблица 2. Показатели селективности электрохимического иммуносенсора для определения овальбумина

Перекрестно-реагирующий антиген	CR, %
Бычий альбумин	0.82 ± 0.20
Человеческий альбумин	0.64 ± 0.20
Лошадиный альбумин	0.34 ± 0.09
Критерий [ГФ XV, (ICH)]	Не более 1%

результатов определения ОВА предложенным электрохимическим иммуносенсором, которые согласуются с результатами ИФА.

Для оценки селективности анализа изучали перекрестную реактивность ОВА с близкими по структуре антигенами. В качестве отрицательных контрольных образцов использовали бычий, человеческий и лошадиный альбумины, которые являются перекрестно реагирующими антигенами и могут вносить ложно положительные вклады в аналитические сигналы электрохимического иммуносенсора. Для каждого перекрестно реагирующего антигена рассчитывали процент перекрестной реактивности по формуле:

$$CR (\%) = (IC_{ОВА}) / (IC_{аналог}) \times 100 \%, \quad (5)$$

где CR – перекрестная реактивность, %; IC_{ОВА} – концентрация ОВА в середине градуировочной прямой; IC_{аналог} – концентрация перекрестно реагирующего соединения, которое на 50% ингибирует максимальный сигнал овальбумина [18].

Результаты определения перекрестной реактивности представлены в табл. 2. Из данных табл. 2 можно сделать вывод, что для исследуемого электрохимического иммуносенсора не выявлено выраженной перекрестной реакции ни с одним из анализируемых антигенов, что свидетельствует о его высокой селективности в отношении определения ОВА.

В табл. 3 представлены сравнительные результаты определения ОВА в вакцинах с

Таблица 3. Сравнительные результаты определения овальбумина в иммунологических препаратах с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора и методом иммуноферментного анализа (*n* = 5, *P* = 0.95)

Название препарата	Заявлено производителем, мкг/мл	Найдено электрохимическим методом, мкг/мл	Найдено ИФА, мкг/мл
Вакцина для профилактики гриппа Ваксигрип (SANOFI PASTEUR, S.A., Франция)	Не более 2.0	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.03
Вакцина для профилактики желтой лихорадки СинСаВак (ООО “Смартбиотех”, Россия)	Не более 2.0	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.4

помощью электрохимического иммуносенсора и методом ИФА в иммунобиологических препаратах. Полученные результаты показали, что найденные с помощью разработанного электрохимического иммуносенсора концентрации ОВА соответствуют значениям, заявленным производителем, и согласуются с результатами традиционно используемого метода ИФА.

* * *

Разработан электрохимический иммуносенсор на основе наночастиц золота для определения овальбумина, который отличается экономичностью и более высокой стабильностью конъюгатов по сравнению с ферментными тест-системами. Электрохимический иммуносенсор позволяет сократить продолжительность определения ОВА на 30 мин по сравнению с традиционными ИФА тест-системами, так как не требует дополнительных стадий введения субстратов и стоп-реагентов. Конъюгат и электрохимический иммуносенсор могут быть использованы в сэндвич-формате для высокочувствительного определения остатков овальбумина в некоторых иммунобиологических лекарственных препаратах с пределом обнаружения 0.1 нг/мл и диапазоном определяемых содержаний от 0.5 до 24 нг/мл. Значения степени извлечения при оценке правильности определения ОВА не превышали 94–96% и соответствовали требованиям нормативной документации. При исследовании селективности электрохимического иммуносенсора показана отрицательная перекрестная реактивность (CR < 1%) со структурно родственными овальбумину соединениями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены за счет субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения госзадания, 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yamamoto T., Juneja L. R., Hatta H., Kim M.* Hen Eggs: Basic and Applied Science. CRC Press, 1996. 216 p.
2. *Edevag G., Eriksson M., Granström M.* The development and standardization of an ELISA for ovalbumin determination in influenza 101 vaccines // *J. Biol. Stand.* 1986. V. 14. № 3. P. 223. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(86\)90007-7](https://doi.org/10.1016/0092-1157(86)90007-7)
3. *Давлетбаева Л.П.* Валидация количественных иммуноферментных тест-систем для контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов. Дис. ... канд. биол. наук. Уфа: Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 2007. 111 с.
4. *Полтавченко А.Г., Полтавченко Д.А., Загоскина Т.Ю.* Перспективы использования коллоидного серебра как маркера иммуноанализа // *Сибирь-Восток.* 2002. Т. 3. № 51. С. 10.
5. *Iglesias-Mayor A., Amor-Gutiérrez O., Costa-García A., de la Escosura-Muñiz A.* Nanoparticles as emerging labels in electrochemical immunosensors // *Sensors.* 2019. V. 19. № 23. Article 5137. <https://doi.org/10.3390/s19235137>
6. *Beck F., Horn C., Baeumner A. J.* Ag nanoparticles outperform Au nanoparticles for the use as label in electrochemical point-of-care sensors // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. V. 414. P. 475. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03288-6>
7. *Frens G.* Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspensions // *Nat. Phys. Sci.* 1973. V. 241. № 105. P. 20. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
8. *Schwartzbach S. D., Osafune T.* Immunoelectron Microscopy: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. 351 p.
9. *Rodriguez R.D., Khalelov A., Postnikov P.S., Lipovka A., Dorozhko E., Amin I., Murastov G.V., Chen J.-J., Sheng W., Trusova M.E., Chehimi M.M., Sheremet E.* Beyond graphene oxide: Laser engineering functionalized graphene for flexible electronics // *Materials Horizons.* 2020. V. 7. № 4. P. 1030. <https://doi.org/10.1039/C9MH01950B>
10. *Saqib M., Dorozhko E.V., Berek J., Vyskocil V., Korotkova E.I., Shabalina A.V.* A laser reduced graphene oxide grid electrode for the voltammetric determination of carbaryl // *Molecules.* 2021. V. 26. № 16. Article 5050. <https://doi.org/10.3390/molecules26165050>
11. *Rusling J. F.* Nanomaterials-based electrochemical immunosensors for proteins // *Chemical Record.* 2012. V. 12. № 1. P. 164. <https://doi.org/10.1002/tcr.201100034>
12. *Qin X., Dong Y., Wang M., Zhu Z., Li M., Chen X. et al.* C-dots assisted synthesis of gold nanoparticles as labels to catalyze copper deposition for ultrasensitive electrochemical sensing of proteins // *Sci. China Chem.* 2018. V. 61. P. 476. <https://doi.org/10.1007/s11426-017-9204-8>
13. *Chen Z.-P., Peng Z.-F., Luo Y., Qu B., Jiang J.-H., Zhang X.-B. et al.* Successively amplified electrochemical immunoassay based on biocatalytic deposition of silver nanoparticles and silver enhancement // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 23. № 4. P. 485. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.06.005>
14. *Zhao C., Wu J., Ju H., Yan F.* Multiplexed electrochemical immunoassay using streptavidin/nanogold/carbon nanohorn as a signal tag to induce silver deposition // *Anal. Chim. Acta.* 2014. V. 847. P. 37. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.035>
15. *Полтавченко А.Г., Ериш А.В., Крупническая Ю.А.* Выбор системы детекции для мультиплексного dot-иммуноанализа антител // *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016. Т. 61. № 4. С. 229.
16. ICH Q. R. The international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use (ICH). Text and methodology Q. 2022. V. 2.
17. *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. №. 3. С. 229. (*Ekспериандова Л.П., Belikov K.N., Khimchenko S.V., Blank T.A.* Once again about determination and detection limits // *J. Anal. Chem.* 2010. V. 65. P. 223. <https://doi.org/10.1134/S1061934810030020>)
18. *Dankwardt A., Hock B., Simon R., Freitag D., Kettrup A.* Determination of non-extractable triazine residues by enzyme immunoassay: Investigation of model compounds and soil fulvic and humic acids // *Environ. Sci. Technol.* 1996. V. 30 № 12. P. 3493. <https://doi.org/10.1021/es9601604>

ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSORS BASED ON GOLD NANOPARTICLES FOR THE DETERMINATION OF OVALBUMIN IN IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS

E. V. Dorozhko^{a, *}, A. N. Solomonenko^a, M. Saqib^a, V. O. Semin^b

^a*National Research Tomsk Polytechnic University, Lenin Avenue 30, Tomsk, 634050 Russia*

^b*Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Academic Avenue, 2/4, Tomsk, 634055 Russia*

*E-mail: evd@tpu.ru

Abstract. A sandwich-type voltammetric immunosensor based on conjugates of gold nanoparticles (AuNP) with specific immunoglobulins (IgG) against ovalbumin (IgG@AuNP) is developed for the determination of ovalbumin in some immunobiological preparations. The IgG@AuNP conjugate is synthesized by passive adsorption. A carbon-containing planar printed electrode modified by laser reduced graphene oxide is used as a substrate electrode for immobilizing the receptor layer of specific immunoglobulins. A possibility of the catalytic reduction of silver nitrate with a mixture of reducing agents, citric acid and metol, is considered in order to enhance the signal of AuNP. Conditions for the voltammetric recording of the electrochemical signal of silver on an immunosensor, which has been successfully tested in determining ovalbumin residues in some immunobiological drugs, are selected. Enzyme-linked immunosorbent assay is used as a reference method.

Keywords: gold nanoparticles, conjugates based on immunoglobulins and gold nanoparticles, electrochemical immunosensor, ovalbumin, vaccines.

УДК 543.552

ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ ОРГАНОМОДИФИЦИРОВАННОГО СТЕКЛОУГЛЕРОДНОГО ЭЛЕКТРОДА ДЛЯ КОНТРОЛЯ РЕЛИЗА АМИКАЦИНА ИЗ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ ПОКРЫТИЙ КОСТНЫХ ИМПЛАНТОВ

© 2024 г. Г. Б. Слепченко^а, * Е. В. Дорожко^а, Е. С. Моисеева^а, А. Н. Соломоненко^а

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

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 06.02.2023 г.

Принята к публикации 07.02.2023 г.

Высокая каталитическая активность арендиазония, а также способность ионов золота образовывать особые связи с амикацином использованы для изготовления электрохимического сенсора на основе модифицированного раствором золота и арендиазония тозилата стеклоуглеродного электрода (Ag/ЗСУЭ) для обнаружения и определения амикацина при его релизе из имплантов. Методами атомно-силовой микроскопии, циклической вольтамперометрии и инверсионной вольтамперометрии показано, что использование раствора золота и арендиазоний тозилата для модификации поверхности стеклоуглеродного электрода значительно улучшает характеристики электрода. Для определения амикацина использован метод инверсионной вольтамперометрии, который позволил определять амикацин на Ag/ЗСУЭ в диапазоне концентраций 0.2–60 мкМ и обеспечил предел обнаружения амикацина 0.058 мкМ при релизе его из имплантов.

Ключевые слова: амикацин, арендиазоний тозилат, инверсионная вольтамперометрия, имплант.

DOI: 10.31857/S0044450224070048, **EDN:** TONNYN

Исследование релиза (выпуск, освобождение) препаратов из биоразлагаемых покрытий костных имплантов — одно из активно развивающихся направлений в области персонализированной медицины. Инновационные технологии и материалы, применяемые в медицинской практике, особенно при лечении травм опорно-двигательного аппарата, способствуют появлению новых современных способов оперативного лечения. Разработка большого количества лекарственных препаратов и разнообразие лекарственных форм обеспечивают множество способов хирургической помощи при получении пациентами различных переломов. Инфекции костной ткани, в особенности хронический остеомиелит, остаются серьезной проблемой в ортопедии, травматологии и хирургии. Как правило, они ассоциируются с длительной дорогостоящей

антимикробной терапией и несколькими этапами хирургического лечения.

Альтернативой антибактериальной терапии являются биоразлагаемые покрытия костных имплантатов, насыщенные биологически активными элементами, а также антибиотиками, которые локально лечат бактериальную инфекцию, приводящую к серьезному осложнению в восстановительном этапе лечения. Амикацин (AM), или амикацина сульфат, представляет собой полусинтетический аминогликозидный антибиотик, полученный из канамицина В для решения проблемы лекарственной устойчивости. Его обычно вводят парентерально для лечения грамотрицательных инфекций, резистентных к гентамицину, канамицину или тобрамицину, поскольку молекула амикацина имеет меньше точек, чувствительных к ферментативной атаке,

чем большинство других аминогликозидов [1]. Для определения амикацина и других аминогликозидов в биологических жидкостях традиционно использовались микробиологические анализы, однако с их помощью определяют общую активность антибиотика в образце, т.е. не проводят идентификацию и определение конкретных аминогликозидов; кроме того, эти методы являются трудоемкими и занимают много времени [2]. Основным методом определения амикацина в различных матрицах является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [3–7]. Высокоэффективный капиллярный электрофорез с флуоресцентным детектированием после дериватизации амикацина 1-метоксикарбониллиндолизин-3,5-дикарбальдегидом применяется для контроля лекарственных субстанций [8, 9]. Другие описанные способы включают спектрофотометрическое и флуориметрическое детектирование [10, 11]. Все эти методы требуют много времени и сложной пробоподготовки.

Электрохимические методы характеризуются экспрессностью и экономичностью при определении некоторых органических и неорганических соединений в водных системах с чувствительностью на уровне ppb [12, 13]. Электроды с модифицированной поверхностью в вольтамперметрическом анализе стали использовать не так давно. Для модификации поверхности электродов используют в том числе золото, образующее с органическим веществом комплексы. Описанные в литературе способы вольтамперметрического определения амикацина являются достаточно сложными, поскольку основаны на использовании производного амикацина в буферном растворе Бриттона–Робинсона (БРР) с рН 8.0 либо наноразмерного электрода из модифицированной CuO углеродной пасты, а также требуют многостадийной пробоподготовки [14–17]. Таким образом, совершенствование существующих и разработка новых способов определения антибиотиков данной группы – актуальная задача.

Цель настоящей работы – создание чувствительного электрохимического сенсора на основе органомодифицированного стеклоуглеродного электрода для контроля релиза амикацина из биоразлагаемых покрытий костных имплантов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и аппаратура. В качестве объектов исследования использовали субстанцию амикацина, синтезированного в ПАО “Красфарма”

(Россия). Основной раствор, содержащий 100.0 мг/л амикацина, готовили растворением навески фармакопейного препарата сухого порошка амикацина (с содержанием основного вещества не менее 99.5%) в 10.0 мл бидистиллированной воды, перемешиванием и последующим доведением объема до метки.

Все соединения использовали без дополнительной очистки. Для приготовления всех растворов применяли бидистиллированную воду. Растворы готовили из реактивов марки х. ч. и ос. ч. Фоновый электролит для определения амикацина готовили путем смешивания конц. H_3PO_4 с бидистиллированной водой.

Для проведения электрохимических экспериментов использовали комплекс аналитический вольтамперметрический СТА, содержащий три электрохимические ячейки, в комплекте с IBM – совместимым компьютером с установленным пакетом программ СТА. Электрохимическая ячейка состояла из хлоридсеребряного электрода в качестве электрода сравнения, хлоридсеребряного электрода в качестве вспомогательного электрода и стеклоуглеродного электрода, модифицированного солями арендиазония и золотом ($\text{Ag}/\text{ZCUЭ}$) в качестве рабочего электрода. Морфологию поверхности СУЭ и $\text{Ag}/\text{ZCUЭ}$ изучали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ, Easy Scan Flex).

Получение СУЭ и $\text{Ag}/\text{ZCUЭ}$. В качестве органических модификаторов широко используют класс диазониевых солей. Для дальнейших исследований мы выбрали арендиазоний тозилаты. Данные тозилаты по сравнению с классическими солями диазония обладают рядом преимуществ: взрывобезопасностью, стабильностью при хранении и отличной растворимостью в ряде растворителей, в том числе в воде. Последнее свойство особенно важно, поскольку позволяет проводить как спонтанную, так и электрохимическую модификацию в воде без добавления дополнительных реагентов. Известно [18], что при нанесении на поверхность стеклоуглеродного электрода солей диазония происходит спонтанное выделение азота и генерирование свободных радикалов Ag^{\cdot} , ковалентно связывающихся с поверхностью электрода.

В работе в качестве органических модификаторов использовали арендиазоний тозилаты $\text{ArN}_2^+ + \text{OTs}^-$ с заместителем $-\text{COOH}$, полученные коллективом сотрудников научно-образовательного центра Н.М. Кижнера Института физики

высоких технологий ФГАОУ ВО НИ ТПУ. Для получения гладкой поверхности, что имеет решающее значение для обеспечения хорошей повторяемости результатов, поверхность СУЭ сначала полировали суспензией оксида алюминия (0.05 мкм), а затем промывали этанолом и дистиллированной водой для полной очистки. Модификацию стеклоуглеродного электрода для определения амикацина осуществляли его выдерживанием в водном растворе диазониевой соли с концентрацией 30 мг/л при комнатной температуре в течение от 5 до 10 с. Затем модифицированный электрод промывали дистиллированной водой. Накопление золота (в виде водного раствора золотохлористоводородной кислоты с концентрацией $(5.08 \pm 0.25) \times 10^{-3}$ М) происходило одновременно с определением органического вещества в режиме *in situ*. Приготовленный таким образом электрод использовали для определения амикацина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика СУЭ и Ag/ЗСУЭ методом атомно-силовой микроскопии. Морфологию поверхности немодифицированного стеклоуглеродного электрода и модифицированного солями арендиазония исследовали с помощью АСМ (рис. 1). Как видно, АСМ-изображение демонстрирует гладкую поверхность СУЭ (рис. 1а). При модификации поверхность СУЭ покрывается не сплошной пленкой, а островками лишь в энергетически выгодных активных центрах, и формируется система ансамблевых ультрамикроразрозодов, что существенно (на ~40%) увеличивает эффективную площадь поверхности электрода (рис. 1б). При более высоком разрешении (рис. 1в) видны колонии модификатора в энергетически активных центрах. Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод, что модификация поверхности углеродсодержащих электродов происходит островками либо колониями в этих центрах.

Время контакта подложки стеклоуглеродного электрода с раствором диазониевой соли в пределах 5–10 с незначительно влияет на величину аналитического сигнала амикацина, однако при увеличении времени контакта (от 15 до 30 с) происходит его снижение. Данные эффекты при увеличении концентрации диазониевых солей и продолжительном контакте с электродами можно объяснить образованием многослойных и менее проницаемых покрытий поверхности СУЭ

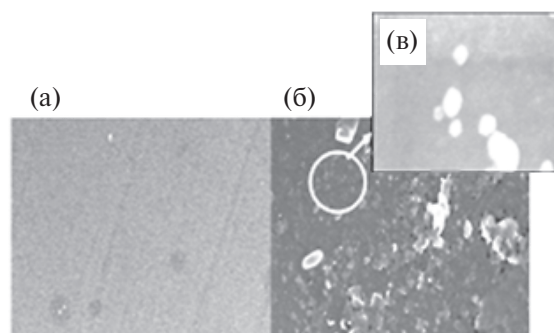


Рис. 1. АСМ-изображения поверхности СУЭ: (а) – поверхность СУЭ (5000×); (б) – поверхность Ag/СУЭ (8000×); (в) – колонии модификатора на СУЭ (120000×).

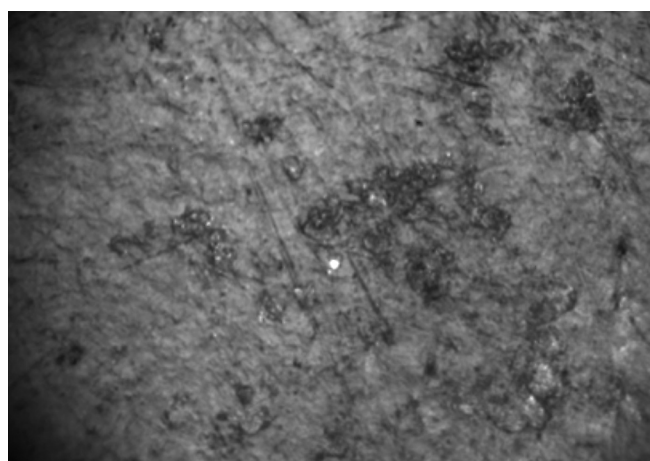


Рис. 2. АСМ-изображение поверхности СУЭ, модифицированного арендиазонием и золотом (1000×).

органическими фрагментами, которые действуют как барьер для восстановления-окисления органических веществ. Данный эффект подтверждают авторы работы [19].

Металлический модификатор – золото, попадая на поверхность, предпочтительно “связывается” с центрами, покрытыми арендиазонием (рис. 2). Таким образом, описанным выше способом мы получили органомодифицированный золотом стеклоуглеродный электрод.

Электрохимические характеристики СУЭ и Ag/ЗСУЭ оценивали методом циклической вольтамперометрии. На рис. 3 показаны циклические вольтамперограммы СУЭ и Ag/ЗСУЭ в 0.1 М H_3PO_4 (рН 2), содержащей 1 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 мМ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/0.1$ М KCl . Как видно, увеличение токов окисления и восстановления окислительно-восстановительной пары феррицианид/ферроцианид на Ag/ЗСУЭ по сравнению с чистым СУЭ и уменьшение разницы между анодным и катодным сигналами

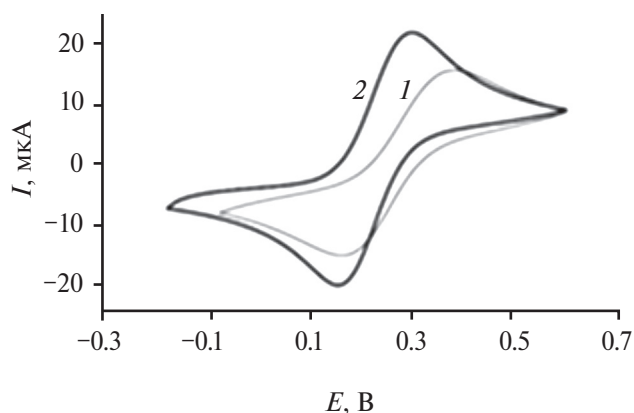


Рис. 3. Циклическая вольтамперограмма пары феррианид/ферроцианид на (1) СУЭ и (2) Ag/ZСУЭ в 0.1 М H_3PO_4 (рН 2), содержащей 1.0 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ /1.0 мМ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

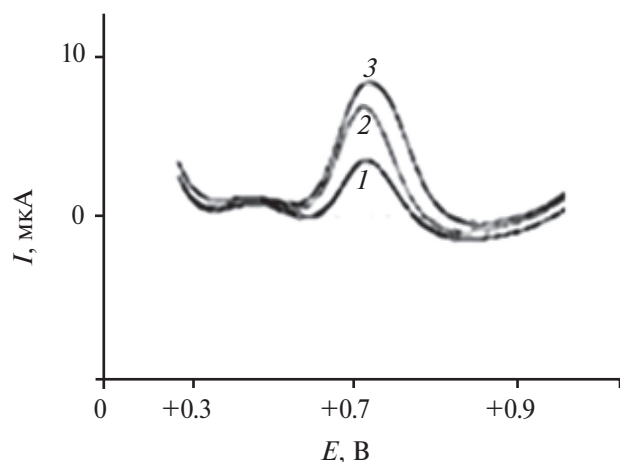


Рис. 4. Вольтамперограммы амикацина в 0.1 М H_3PO_4 (рН 2) на 1 – СУЭ; 2 – Ag/ZСУЭ ($c_{\text{AM}} = 2.0 \times 10^{-6}$ М); 3 – Ag/ZСУЭ ($c_{\text{AM}} = 3.0 \times 10^{-6}$ М).

указывают на то, что модификатор арендиазоний тозилат с золотом повышает чувствительность СУЭ.

Электрохимическое поведение амикацина на Ag/ZСУЭ. Наличие в структуре амикацина алифатических аминогрупп, а также полиольных фрагментов обеспечивает возможность электрохимического окисления.

На рис. 4 изображены вольтамперограммы амикацина в 0.1 М H_3PO_4 (рН 2) на СУЭ и на Ag/ZСУЭ с концентрациями амикацина 2.0×10^{-6} и 3.0×10^{-6} М. Как видно, пик электроокисления амикацина на СУЭ (кривая 1) находится при +0.715 В, на Ag/ZСУЭ происходит значительное увеличение аналитического сигнала амикацина при том же потенциале (кривая 2) и далее рост аналитического сигнала с увеличением концентрации амикацина (кривая 3). Полученные

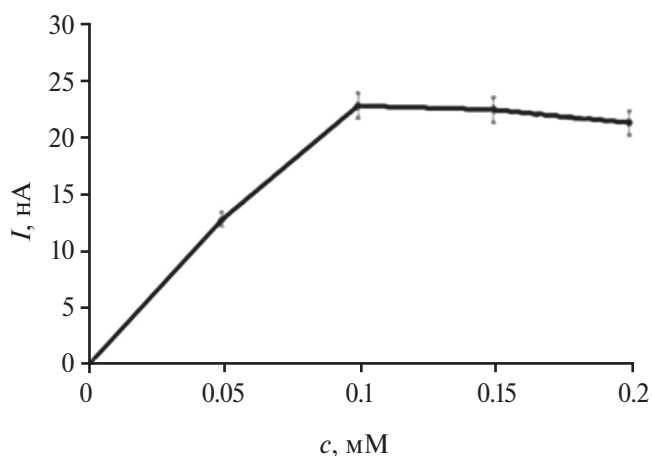


Рис. 5. Влияние содержания золота (0.05–0.2 мМ) на токи пиков окисления амикацина на СУЭ в 0.1 М H_3PO_4 (рН 2) при скорости сканирования 30 мВ/с.

результаты подтверждают высокую каталитическую активность модификаторов при электроокислении/восстановлении амикацина, которая может быть связана с хорошей проводимостью арендиазония тозилата и его способностью к переносу электронов.

Оптимальная концентрация золота для модификации поверхности СУЭ. Оптимизация эффективных параметров обнаружения аналита играет важную роль в повышении чувствительности сенсора. Влияние содержания золота на электрохимическое окисление и восстановление амикацина на Ag/ZСУЭ исследовали по изменению его аналитического сигнала. Установили, что увеличение концентрации золота до 0.1 мМ в растворе приводит к увеличению тока пика окисления амикацина, при дальнейшем изменении концентрации золота ток пика остается практически постоянным (рис. 5). Концентрацию золота 0.1 мМ приняли в качестве оптимальной для модификации поверхности СУЭ.

Влияние рН. Кислотность среды оказывает различное влияние на электрохимические сигналы амикацина. По мере увеличения рН фонового электролита наблюдается уменьшение тока электроокисления и смещение потенциала пика в более электроположительную область, что указывает на участие протонов в электрохимической реакции (рис. 6).

Для исследования влияния рН раствора на аналитический сигнал амикацина использовали буферный раствор Бриттона–Робинсона со значениями рН от 2.0 до 8.0. По мере уменьшения рН раствора облегчается протекание процессов электровосстановления и окисления вследствие

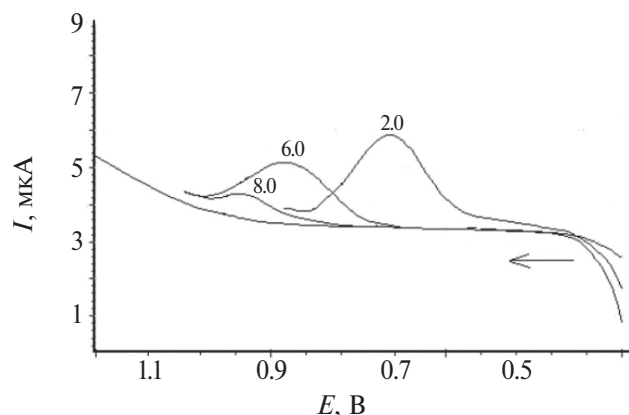


Рис. 6. Вольтамперограммы электроокисления амикацина на Ag/ЗСУЭ при разных значениях рН ($E=0.715$ В при рН 2.0; $E=0.875$ В при рН 6.0; $E=0.950$ В при рН 9.0), $c_{\text{AM}} = 2.0$ мкМ, скорость сканирования 30 мВ/с.

облегчения протонирования аминогруппы и, как следствие, наблюдается максимальный сигнал. При этом зависимость $E_{\text{п}}$ от рН линейна в диапазоне рН 2.0–8.0. В сильнощелочной среде при рН > 8.0 сигнал амикацина на Ag/ЗСУЭ отсутствует.

Предел обнаружения амикацина. Высокая чувствительность и низкий фоновый ток – очевидные преимущества метода инверсионной вольтамперометрии. Нами выбраны условия вольтамперометрического определения амикацина из релиза костных имплантов: фоновый электролит – 0.1 М H_3PO_4 (рН 2) с добавкой 0.1 мМ раствора золота; индикаторный электрод – Ag/ЗСУЭ; электрод сравнения – хлоридсеребряный; потенциал накопления – -1.0 В; потенциал пика – 0.715 ± 0.005 В. Выполнили анализ трех образцов релиза амикацина из биоразлагаемых покрытий костных имплантов, а также проверку правильности результатов методом введено–найдено. Установили удовлетворительную сходимость результатов с погрешностью, не превышающей 15%. Предложенный сенсор применили для определения амикацина в реальных объектах.

График зависимости тока пика окисления от концентрации амикацина линеен в широком диапазоне концентраций от 0.2 до 2.0 мкМ, уравнение регрессии $I_{\text{п}} = 1381.1c + 0.3577$ ($R^2 = 0.9953$). Рассчитали значения предела обнаружения ($c_{\text{мин}}$) и нижней границы определяемых концентраций ($c_{\text{н}}$) амикацина как отношение $3.3s/b$ и $10s/b$ соответственно, где s – стандартное отклонение, b – коэффициент регрессии. Предел обнаружения амикацина с применением Ag/ЗСУЭ составил 0.058 мкМ (табл. 1).

Таблица 1. Пределы обнаружения и нижние границы определяемых содержаний амикацина на различных рабочих электродах ($n = 10$, $P = 0.95$)

Рабочий электрод	$c_{\text{мин}}$, мкМ	$c_{\text{н}}$, мкМ
СУЭ	0.35	0.80
ЗСУЭ	0.12	0.38
Ag/ЗСУЭ	0.058	0.12

Возможность определения амикацина в релизе из имплантов показали на примере анализа модельных образцов релизов: к образцу добавляли 0.1 М H_3PO_4 (рН 2) в качестве фонового электролита, а затем вводили амикацин в различных концентрациях. Для каждой концентрации получали по пять параллельных результатов измерений и оценивали значение s_{r} для диапазона концентраций от 0.2 до 2.0 мкМ. Для исследования стабильности электродной системы электрод выдерживали семь дней на воздухе; после этого повторяли определение амикацина в 1.0×10^{-5} М растворе. Полученные результаты показали хорошее совпадение (96.5%) с первоначальным значением.

Для оценки $c_{\text{мин}}$ описан ряд критериев критериев: критерий оценки предела обнаружения для ограниченного числа параллельных измерений; непараметрический критерий оценки [20]. Для объективного сравнения возможностей одного метода с другим мы использовали трехсигмовый критерий Кайзера [21] (табл. 1).

Таким образом, предложенный сенсор перспективен для определения амикацина в реальных образцах.

* * *

Разработан вольтамперометрический сенсор Ag/ЗСУЭ для определения амикацина при релизе его из имплантов. Впервые показана возможность одновременного применения двух модификаторов: золота и аренадиазония тозилата для создания электрохимического сенсора на амикацин. Аналитический сигнал амикацина, полученный на Ag/ЗСУЭ, значительно выше по сравнению с сигналом, полученным на СУЭ, при этом потенциал пиков практически не изменился. Это может свидетельствовать о постоянной скорости электродных процессов с участием амикацина. Оценен предел обнаружения амикацина (0.058 мкМ), который оказался почти на порядок ниже, чем с использованием СУЭ. Модифицированный Ag/ЗСУЭ продемонстрировал удовлетворительную стабильность при хранении

и хорошую повторяемость результатов определения амикацина. Предложенный сенсор на амикацин характеризуется широким диапазоном определяемых содержаний и низким пределом обнаружения и может быть использован в анализе реальных объектах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования и эмпирические расчеты проводились в рамках гранта “Программы повышения конкурентоспособности Томского политехнического университета”. Работа выполнена при поддержке госзадания “Наука” (Наука базовая фундаментальная) № 1.0006.ГЗБ.2023. Некоторые исследования проводились с использованием оборудования центра коллективного пользования ТПУ “Физико-химические методы анализа”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brunton L.L., Lazo J.S., Parker L.K. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcers and gastroesophageal reflux / Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th Ed. McGraw-Hill Companies, 2005.
2. Serrano J.M., Silva M. Determination of amikacin in body fluid by high-performance liquid-chromatography with chemiluminescence detection // J. Chromatogr. B. 2006. V. 843. № 1. P. 20. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.05.016>
3. Usmani M., Ahmed S., Sheraz M., Ahmad I. Analytical methods for the determination of amikacin in pharmaceutical preparations and biological fluids: A review // Iran. J. Anal. Chem. 2018. V. 5. № 2. P. 29. <https://doi.org/10.30473/ijac.2018.41591.1133>
4. Wichert B., Schreier H., Derendorf H. Sensitive liquid chromatography assay for the determination of amikacin in human plasma // J. Pharm. Biomed. Anal. 1991. V. 9. № 3. P. 251. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(91\)80154-2](https://doi.org/10.1016/0731-7085(91)80154-2)
5. Lu C.Y., Feng C.H. Micro-scale analysis of aminoglycoside antibiotics in human plasma by capillary liquid chromatography and nanospray tandem mass spectrometry with column switching // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1156. № 1–2. P. 249. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.001>
6. Korany M.A.T., Haggag R.S., Ragab M.A., Elmalah O.A. Liquid chromatographic determination of amikacin sulphate after pre-column derivatization // J. Chromatogr. Sci. 2014. V. 52. № 8. P. 837. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt126>
7. Bijleveld Y., de Haan T., Toersche J., Jorjani S., van der Lee J., Groenendaal F. et al. A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study // J. Chromatogr. B. 2014. V. 951. P. 110. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.035>
8. Soliven A., Ahmad I.A.H., Tam J., Kadrichu N., Chaloner P., Markovich R., Blasko A. A simplified guide for charged aerosol detection of non-chromophoric compounds – Analytical method development and validation for the HPLC assay of aerosol particle size distribution for amikacin // J. Pharm. Biomed. Anal. 2017. V. 143. P. 68. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.013>
9. Yang M., Tomellini S.A. Non-derivatization approach to high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for aminoglycoside antibiotics based on a ligand displacement reaction // J. Chromatogr. A. 2001. V. 939. № 1–2. P. 59. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01337-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01337-1)
10. Omar M.A., Hammad M.A., Nagy D.M., Aly A.A. Development of spectrofluorimetric method for determination of certain aminoglycoside drugs in dosage forms and human plasma through condensation with ninhydrin and phenyl acetaldehyde // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2015. V. 136. P. 1760. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.079>
11. Bhatt D.A., Prajapati L.M., Joshi A.K., Lkharodiya M. Development and validation of spectrophotometry method for simultaneous estimation of cefepime hydrochloride and amikacin sulphate // World J. Pharm. Res. 2015. V. 4. № 5. P. 1482.
12. Kissinger P.T., Heineman W.R. Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry. 2nd Ed. Marcel Dekker, 1996. 1008 p.
13. Xu J.Z., Zhu J.J., Wang H., Chen H.Y. Nano-sized copper oxide modified carbon paste electrodes as an amperometric sensor for amikacin // Anal. Lett. 2003. V. 36. № 13. P. 2723. <https://doi.org/10.1081/AL-120025251>
14. Norouzi P., Nabi Bidhendi G.R., Ganjali M.R., Sepehri A., Ghorbani M. Sub-second accumulation and stripping for pico-level monitoring of amikacin sulphate by fast Fourier transform cyclic voltammetry at a gold microelectrode in flow-injection systems // Microchim. Acta. 2005. V. 152. P. 123. <https://doi.org/10.1007/s00604-005-0392-x>
15. Xue-Liang W. A. Linear sweep polarographic determination of amikacin with amaranth as electrochemical probe // Chin. J. Anal. Lab. 2006. V. 6. P. 43.
16. Wang X. L., Yu Z. Y., Jiao K. Voltammetric studies on the interaction of amikacin with methyl blue and its analytical application // Chin. Chem. Lett. 2007. V. 18. № 1. P. 94. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2006.11.028>

17. Липовая А.С., Евсеев А.К., Горончаровская И.В., Царькова Т.Г., Шабанов А.К. Электрохимический метод определения амикацина в биологических средах // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. 2022. Т. 36. № 4. С. 104.
18. Filimonov V.D., Trusova M., Postnikov P., Krasnokutskaya E.A., Lee Y.M., Hwang H.Y., Kim H., Chi K.W. Unusually stable, versatile, and pure arenediazonium tosylates: their preparation, structures, and synthetic applicability // Org. Lett. 2008. V. 10. № 18. P. 3961. <https://doi.org/10.1021/ol8013528>
19. Saby C., Ortiz B., Champagne G.Y., Bélanger D. Electrochemical modification of glassy carbon electrode using aromatic diazonium salts. 1. Blocking effect of 4-nitrophenyl and 4-carboxyphenyl groups // Langmuir. 1997. V. 13. № 25. P. 6805. <https://doi.org/10.1021/la961033o>
20. Каплин А.А., Кубрак В.А., Рубан А.И. Непараметрическая оценка предела обнаружения в методе инверсионной вольтамперометрии // Журн. аналит. химии. 1978. Т. 33. № 12. С. 2298. (Kaplin A.A., Kubrak V. A., Ruban A. I. Nonparametric estimation of the limit of detection in inverse voltammetry // J. Anal. Chem. 1978. V. 33. № 12. P. 1762.)
21. 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. № 3. 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. <https://doi.org/10.1134/S1061934810030020>)

ORIGINAL ARTICLES

A SENSITIVE ELECTROCHEMICAL SENSOR BASED ON AN ORGANOMODIFIED GLASSY CARBON ELECTRODE FOR MONITORING THE RELEASE OF AMIKACIN FROM BIODEGRADABLE COATINGS OF BONE IMPLANTS

G. B. Slepchenko^{a,*}, E. V. Dorozhko^a, E. S. Moiseeva^a, A. N. Solomonenko^a

^aNational Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634050 Russia

*E-mail: slepchenkogb@mail.ru

Abstract. The high catalytic activity of arenediazonium, along with the ability of gold ions to form specific bonds with amikacin, has been used in the fabrication of an electrochemical sensor based on a glassy carbon electrode modified with a gold solution and arenediazonium tosylate (Ar/GGCE) for the detection and quantification of amikacin upon its release from implants. Atomic force microscopy, cyclic voltammetry, and square-wave voltammetry were used to demonstrate that the use of a gold solution and arenediazonium tosylate for the surface modification of a glassy carbon electrode significantly enhances the electrode characteristics. The determination of amikacin was achieved using square wave voltammetry, which enabled the detection of amikacin at the Ar/GGCE in the concentration range 0.2–60 μM and ensured a limit of detection of 0.058 μM for amikacin released from implants.

Keywords: amikacin, arenediazonium tosylate, square-wave voltammetry, implant.

УДК 544.6

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК И ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА МЕТАБОЛИТА АБИРАТЕРОНА D4A

© 2024 г. В. В. Шумянцева^{a, b, *}, А. В. Бережнова^a, Л. Е. Агафонова^a,
Т. В. Булко^a, А. В. Веселовский^{a, b}

^aНаучно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
ул. Погодинская, 10, стр. 8, Москва, 119121 Россия

^bРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
медико-биологический факультет,
ул. Островитянова, 1, Москва, 117321 Россия

*E-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 19.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии исследованы электроаналитические характеристики двуспиральной ДНК (дсДНК) и комплекса дсДНК и метаболита противоопухолевого препарата абиратерона D4A в диапазоне концентраций 25–200 мкМ. Показано влияние D4A на дсДНК, регистрируемое по изменению интенсивности электрохимического окисления гетероциклических оснований гуанина, аденина и тимина с использованием электродов, полученных методом трафаретной печати и модифицированных углеродными нанотрубками. Для комплексов дсДНК/D4A рассчитаны константы связывания (K_b) для гуанина, аденина и тимина (1.1×10^4 , 5.5×10^3 , $2.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ соответственно). Рассчитаны ДНК-опосредованные электрохимические коэффициенты токсического эффекта как отношение интенсивности сигналов гуанина и аденина в присутствии D4A и без лекарства (Т, %). На основании анализа электрохимических параметров и значений констант связывания сделано предположение о механизме взаимодействия D4A с ДНК преимущественно за счет электростатических взаимодействий и образования водородных связей с малой бороздкой. Выводы о механизме взаимодействия метаболита абиратерона D4A с малой бороздкой дсДНК, полученные электрохимическими методами, подтверждены с помощью молекулярного моделирования комплекса ДНК/D4A.

Ключевые слова: электроанализ, метаболит абиратерона D4A, ДНК, противоопухолевые препараты, константа связывания.

DOI: 10.31857/S0044450224070057, EDN: TOFTCSJ

Фармакологический эффект лекарственных препаратов основан на строго целенаправленном взаимодействии мишень/лиганд. Такими мишенями могут быть функционально значимые белки, ферменты, клеточные рецепторы, мембраны (как совокупность мембранных белков и фосфолипидов), а также ДНК/РНК [1–3]. Выяснение механизма действия терапевтического препарата на ДНК является одним из ключевых вопросов фармакогеномных исследований для понимания природы различных заболеваний, механизма

действия лекарств на мишень и разработки новых потенциальных фармацевтических препаратов [4–7]. ДНК является фармакологической мишенью многих лекарств. Лекарства, способные связываться с ДНК, могут влиять на жизненно важные функции клеток, воздействуя на экспрессию, модифицируя гистоны, вызывая карциногенез или мутации. Химическая реакционная способность лекарственных препаратов и образование активных форм кислорода может приводить к окислительному повреждению



Рис. 1. Методы исследования комплексов ДНК/лекарство.

гетероциклических оснований ДНК и множественным разрывам сахарофосфатного остова [1, 5, 8]. Описано несколько механизмов воздействия лекарственных препаратов на молекулу ДНК, которые включают интеркаляцию молекулы лекарства между основаниями ДНК, связывание в бороздках ДНК или ковалентное связывание с основаниями ДНК [1, 4]. Нековалентные взаимодействия лекарства с ДНК происходят в основном за счет образования водородных связей, ионных связей, гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. [1, 8–11]. Количественное определение нуклеотидов, нуклеозидов, гетероциклических оснований (ГЦО) ДНК, а также анализ взаимодействий ДНК/лекарство может быть осуществлен методами абсорбционной спектроскопии, где регистрируется интегрированный спектр поглощения ДНК; флуоресцентной спектроскопии с помощью флуоресцентных “меток”; полимеразной цепной реакции (ПЦР) с необходимым набором дополнительных реактивов и автоматизированного оборудования; атомно-силовой микроскопии; электрохимическими методами; конфокальной рамановской

спектроскопий; вискозиметрии; изотермической дифференциальной сканирующей микрокалориметрии; инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье; ядерного магнитного резонанса [10–12] (рис. 1).

Электрохимический метод количественного анализа ДНК имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами. К ним относятся высокая чувствительность, малый объем проб (0.5–60 мкл), непродолжительное время анализа, регистрация пуриновых и пиримидиновых ГЦО при соответствующем выборе типа и модификации рабочих электродов [13, 14]. Рациональный дизайн сенсорных конструкций и наноструктурирование рабочей поверхности электродов позволяет подобрать оптимальные условия измерений для определяемого вещества, обеспечить биосовместимость и необходимые аналитические характеристики метода, такие как предел обнаружения, диапазон определяемых концентраций, чувствительность, что особенно важно при работе с биологическими объектами [13]. Электрохимические ДНК-биосенсоры используются для анализа взаимодействия с ДНК при обнаружении

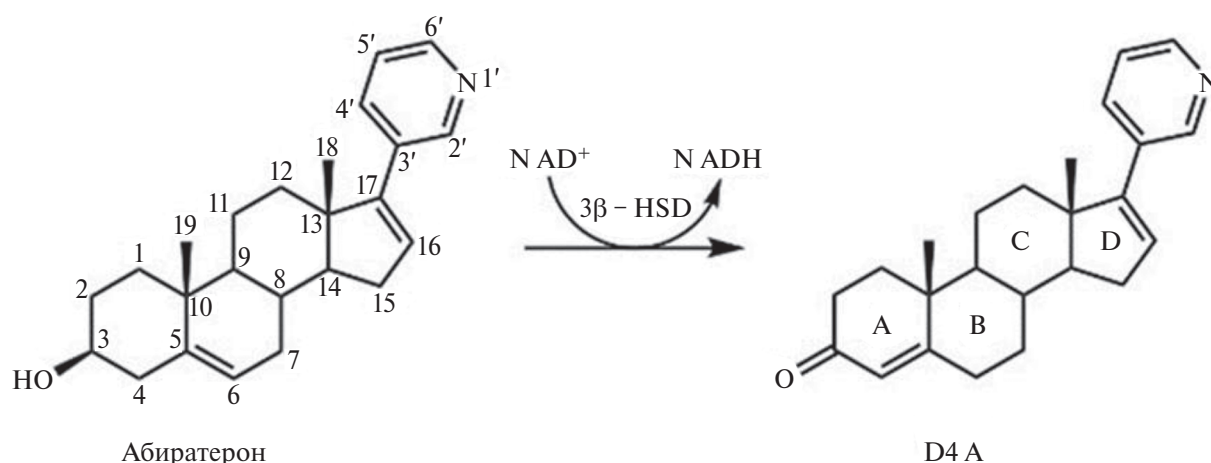


Схема 1. Окисление абиратерона под действием 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (3 β -HSD) с образованием 3-кето- Δ 4-производного абиратерона (метаболит абиратерона D4A) [20, 23, 24].

и определении таких веществ, как лекарства, метаболиты, биомаркеры [14–19]. Электрохимические сенсоры позволяют регистрировать “отклик” биоматериала на изменение свойств за счет ДНК/лигандных взаимодействий [19, 20].

Рак простаты является одним из наиболее агрессивных видов онкологических заболеваний. Препарат абиратерон (17-(3-пиридил)андроста-5,16-диен-3 β -ол) является “золотым стандартом” в лечении рака предстательной железы. Ранее мы исследовали взаимодействие абиратерона в диапазоне концентраций 0–90 мкМ с двуспиральной ДНК (дсДНК) [21]. При концентрациях выше 60 мкМ абиратерон вызывал снижение сигналов электроокисления аденина и гуанина ДНК более чем на 50%. Смещение потенциалов электроокисления в катодную область при увеличении концентрации абиратерона исключает интеркаляцию абиратерона и отражает механизм взаимодействия препарата с бороздкой дсДНК за счет образования водородных связей и возможных электростатических взаимодействий [21]. Полученные результаты согласуются с выводами о термодинамически выгодном самопроизвольном процессе, включающем механизм образования водородных связей и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия за счет связывания абиратерона с ДНК в малой бороздке на основе результатов молекулярного моделирования и исследований спектральных характеристик, а также расчетов величины изменения свободной энергии Гиббса ΔG [22].

В организме под действием 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (3 β -HSD) абиратерон подвергается окислению по гидроксильной группе в третьем положении стероидного фрагмента

(кольцо А) с образованием более активного 3-кето- Δ 4-производного абиратерона (D4A) (схема 1) [23–25]. Метаболит абиратерона D4A ингибирует цитохром P450 17A1 (CYP17A1), 3 β -гидроксистероиддегидрогеназу (3 β -HSD), а также стероид-5 α -редуктазу (SRD5A) – ключевые ферменты биосинтеза андрогенов [23–28]. Показано также, что он способен ингибировать ряд изоформ цитохрома P450 (CYP 21A2, 51A1, 11A1, 19A1, 11B2, 3A4, 2D6, 2C8), а также 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы [23–28]. Кроме того, метаболит абиратерона D4A проявляет более высокую, чем абиратерон, антагонистическую активность по отношению к рецептору андрогенов, сравнимую по эффективности с известным антагонистом рецептора андрогенов энзалутамидом (4-(3-(4-циано-3-(трифлуорометил)фенил)-5,5-диметил-4-оксо-2-тиоксоимидазолидин-1-ил)-2-флуоро-N-метилбензамид) [24, 25]. Метаболит абиратерона D4A демонстрирует большую по сравнению с абиратероном противоопухолевую активность на ксенографтах у мышей [23, 24]. В настоящее время его рассматривают как перспективное соединение для лечения рака простаты. Несмотря на высокий фармакологический потенциал D4A, его взаимодействие с ДНК – одной из главных фармакологических мишеней противоопухолевой терапии – остается малоизученным.

Цель данной работы – исследование механизма взаимодействия метаболита абиратерона D4A с дсДНК электрохимическими методами на основе регистрации изменения интенсивности сигналов и смещения потенциалов электрохимического окисления гетероциклических азотистых оснований, входящих в дсДНК, в результате образования комплекса ДНК/лекарство.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование и реагенты. Электрохимические измерения проводили на приборе PGSTAT 312N Autolab (Metrohm Autolab BV, Нидерланды) с программным обеспечением NOVA (версия 2.0). Использовали трехконтактные электроды (печатные графитовые электроды, ПГЭ), полученные методом трафаретной печати (ООО “КолорЭлектроник”, Москва, <http://www.colorel.ru/>), с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами, хлоридсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода составлял 0.2 см (площадь 0.0314 см²). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (отн. Ag/AgCl).

Использовали следующие реактивы: однозамещенный фосфат калия (Реахим, Москва, Россия), хлорид натрия (Реахим, Москва, Россия), одностенные углеродные нанотрубки (УНТ) 0.4 мас. %, стабилизированные карбоксиметилцеллюлозой 0.6 мас. % (Новосибирск, Россия, <https://ocsial.com>), двуспиральную ДНК, выделенную из молок осетровых рыб (Sigma-Aldrich, Япония) и D4A (Sigma-Aldrich, США).

Методика эксперимента. Измерения проводили методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВА) в диапазоне потенциалов 0.2–1.2 В с шагом потенциала 5 мВ, амплитудой модуляции 25 мВ, временем модуляции 50 мс и интервалом времени 0.5 с.

На рабочую поверхность ПГЭ наносили 2 мкл дисперсии 0.75 ± 0.05 мг/мл УНТ, стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой (ПГЭ/УНТ, 0.02 г исходной дисперсии с концентрацией 0.4 мас. % разводили в 100 мкл H₂O). Электроды модифицировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем выполняли их предварительную обработку (четыре скана ДИВА в диапазоне потенциалов 0–1.2 В). Эксперименты проводили в аэробных условиях при комнатной температуре в горизонтальном режиме. На электрод наносили 60 мкл анализируемого раствора в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.4) (КФБ), содержащем 0.05 М NaCl, и инкубировали в течение 5 мин на электроде перед измерением.

Исходный раствор дсДНК (3 мг/мл) готовили в КФБ. Исходный 10 мМ раствор D4A готовили в этаноле с последующим разведением КФБ до исследуемых концентраций. Перед нанесением на электрод комплекс дсДНК/D4A инкубировали в течение 5–45 мин.

Молекулярный докинг. Использовали структуру ДНК, полученную из базы PDB (ID 1BNA). Структуры абиратерона и D4A строили в программе SYBYL 8.1. Структуры молекул оптимизировали методом минимизации энергии в SYBYL 8.1 при помощи метода градиентного спуска в вакууме и с зарядами Гастайгера–Хюкеля. Докинг исследуемых соединений осуществлялся в программе Vina Autodock [29]. Докинг проводили по всей поверхности ДНК. Значение “exhaustiveness” (полнота поиска), использованное при расчетах, составляло 128. Взаимодействия ДНК с лигандами анализировали при помощи программ SYBYL 8.1 и PyMol.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электроанализ комплекса дсДНК/метаболит абиратерона D4A. Обоснованный выбор типа электродов и вариантов модификации для эффективного процесса переноса электронов и регистрации биохимического события является ключевым в электроанализе [13]. Ранее показано, что модификация рабочей поверхности электродов углеродными нанотрубками способствует повышению аналитической чувствительности сенсора [30, 31]. Для исследования механизма взаимодействия ДНК и метаболита абиратерона D4A использовали электроды, полученные методом трафаретной печати и модифицированные одностенными углеродными трубками (ПГЭ/УНТ). Такой тип электродов использован нами ранее для анализа взаимодействия дсДНК и абиратерона, доксорубицина, умифеновира, рифампицина и фосфолипидных композиций этих препаратов [7, 32–35]. Аналитические характеристики дсДНК описаны нами ранее [21, 34, 35]. При модификации ПГЭ углеродными трубками, стабилизированными карбоксиметилцеллюлозой, зарегистрировали сигналы электрохимического окисления гуанина, аденина и тимина при потенциалах $E = 0.59 \pm 0.01$, 0.88 ± 0.01 , 1.12 ± 0.05 В соответственно [21, 34].

Электроактивность 100 мкМ метаболита абиратерона D4A исследовали методами циклической вольтамперометрии и ДИВА в диапазоне потенциалов от +0.2 до +1.2 В, который соответствует диапазону значений потенциалов регистрации электрохимического окисления гетероциклических оснований ДНК (рис. 2) [14–19].

Метаболит абиратерона D4A не проявляет электроактивность в области значений потенциалов электрохимического окисления пуриновых

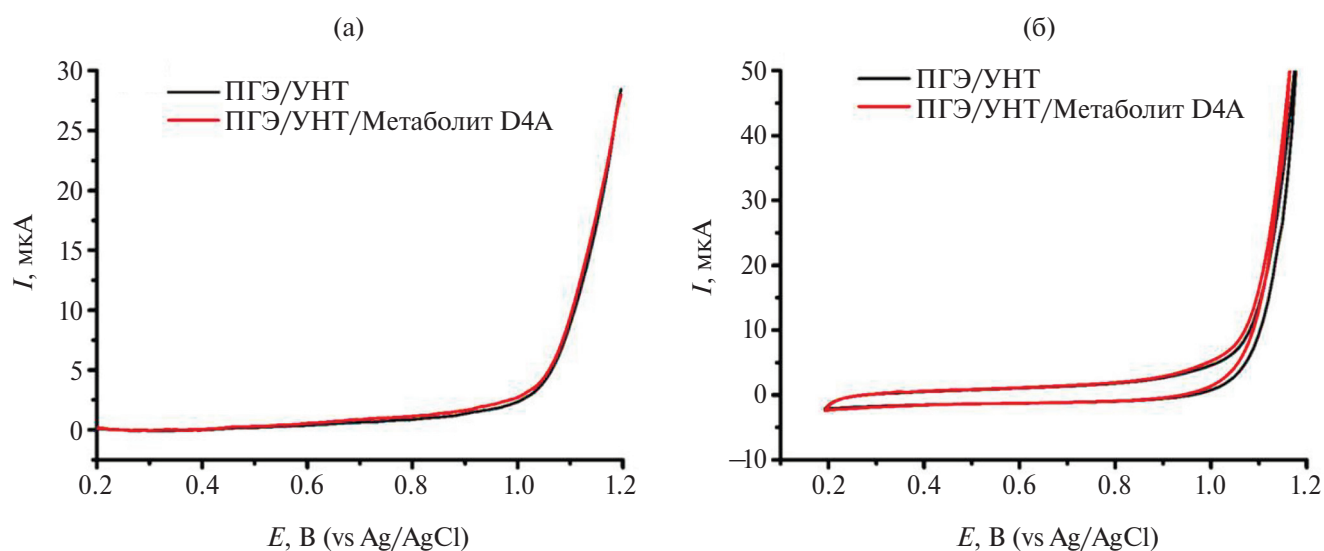


Рис. 2. (а) Дифференциально-импульсные вольтамперограммы ПГЭ/УНТ/D4A с концентрацией метаболита 100 мкМ в диапазоне потенциалов 0.2–1.2 В. (б) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/УНТ/D4A в диапазоне потенциалов 0.2–1.2 В.

Таблица 1. Электроаналитические характеристики комплекса дсДНК/D4A

Концентрация метаболита D4A, мкМ	Гуанин		Аденин		Тимин	
	$E \pm s$, В	$I \pm s$, мкА	$E \pm s$, В	$I \pm s$, мкА	$E \pm s$, В	$I \pm s$, мкА
0	0.603 ± 0.004	12.00 ± 0.38	0.890 ± 0.004	22.40 ± 0.41	1.137 ± 0.005	31.00 ± 0.68
30	0.597 ± 0.002	8.55 ± 0.51	0.883 ± 0.003	17.40 ± 0.55	1.123 ± 0.004	25.40 ± 0.49
50	0.598 ± 0.004	7.49 ± 0.83	0.882 ± 0.006	16.27 ± 1.03	1.133 ± 0.006	25.20 ± 0.86
60	0.595 ± 0.002	7.56 ± 0.03	0.880 ± 0.002	16.73 ± 0.17	1.123 ± 0.005	26.13 ± 0.73
90	0.595 ± 0.002	6.54 ± 0.20	0.877 ± 0.002	15.65 ± 0.90	1.129 ± 0.005	24.73 ± 2.15
100	0.583 ± 0.004	4.69 ± 0.79	0.870 ± 0.008	12.30 ± 1.85	1.119 ± 0.002	21.90 ± 2.43
200	0.578 ± 0.007	4.53 ± 0.12	0.862 ± 0.013	11.70 ± 0.36	1.119 ± 0.002	21.53 ± 1.03

Примечание: концентрация дсДНК во всех экспериментах 1.5 мг/мл; s – стандартное отклонение.

оснований с использованием ПГЭ/УНТ, что позволяет определять комплекс дсДНК/D4A путем регистрации изменения интенсивности сигналов электрохимического окисления гуанина, аденина и тимина.

Алгоритм контроля процесса комплексообразования заключался в исследовании влияния возрастающих концентраций метаболита абиратерона D4A на интенсивность сигналов электрохимического окисления гуанина, аденина и тимина при постоянной концентрации дсДНК (1.5 мг/мл). Такой подход дает информацию о концентрационной зависимости влияния противоопухолевого препарата метаболита абиратерона D4A на ДНК и позволяет сделать выводы о его воздействии на процессы электрохимического окисления гетероциклических оснований.

Для оптимизации условий регистрации влияния метаболита абиратерона D4A на дсДНК исследовали зависимость интенсивности амплитуды тока электрохимического окисления гуанина, аденина и тимина от времени при постоянной концентрации D4A (100 мкМ) (рис. 3). Из рис. 3б–г видно, что наиболее интенсивное снижение тока электрохимического окисления дсДНК наблюдается для продолжительности инкубации 15 мин. Дальнейшие исследования влияния концентрации метаболита абиратерона D4A на дсДНК проводили при времени образования комплекса 15 мин.

Терапевтически значимые концентрации абиратерона находятся в диапазоне микромолярных значений [22, 36–38]. В экспериментах использовали аналогичную шкалу концентраций метаболита D4A 25–200 мкМ. Для анализа влияния

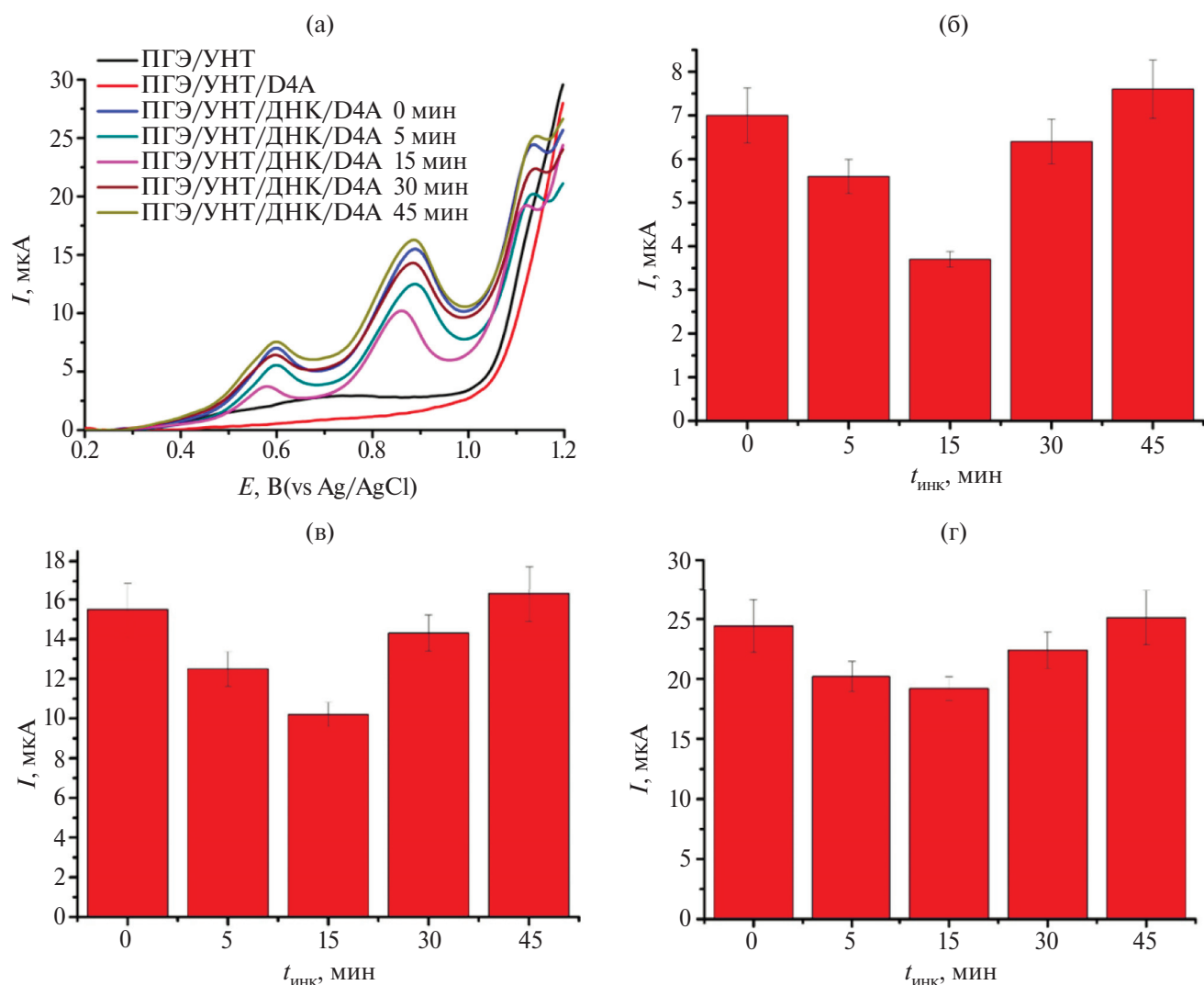


Рис. 3. (а) Дифференциально-импульсные вольтамперограммы ПГЭ/УНТ, ПГЭ/УНТ/D4A и ПГЭ/УНТ/дсДНК (1.5 мг/мл) /D4A (100 мкМ) с различным временем инкубации комплекса. Зависимости интенсивностей сигналов электроокисления при взаимодействии метаболита D4A с ДНК от времени инкубации для: (б) гуанина, (в) аденина и (г) тимина.

метаболита абиратерона D4A в диапазоне концентраций 25–200 мкМ на дсДНК комплекс инкубировали в течение 15 мин и затем регистрировали дифференциально-импульсные вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от +0.2 до +1.2 В. На вольтамперограммах наблюдаются три пика в области потенциалов +0.6, +0.9 и +1.1 В, что соответствует электрохимическому окислению гуанина, аденина и тимина соответственно (рис. 4а).

Гистограммы зависимости интенсивности электроокисления гуанина, аденина и тимина от концентрации метаболита абиратерона D4A приведены на рис. 5. Наблюдается концентрационно зависимое (в диапазоне концентраций 25–200 мкМ) снижение интенсивности

электроокисления гуанина, аденина и тимина дсДНК. В табл. 1 представлены электроаналитические характеристики комплексов дсДНК/D4A.

Необходимым условием проведения анализа комплексообразования ДНК с низкомолекулярными соединениями электрохимическим методом является смещение потенциала электрохимического окисления гетероциклических оснований ДНК (рис. 4б, в) [1–5, 9, 10, 33–35]. Смещение потенциала электроокисления гетероциклических оснований как результат образования комплексов ДНК/лекарство в катодную или анодную область является индикатором для отнесения процесса комплексообразования к определенному типу взаимодействий. В наших экспериментах регистрировали смещение

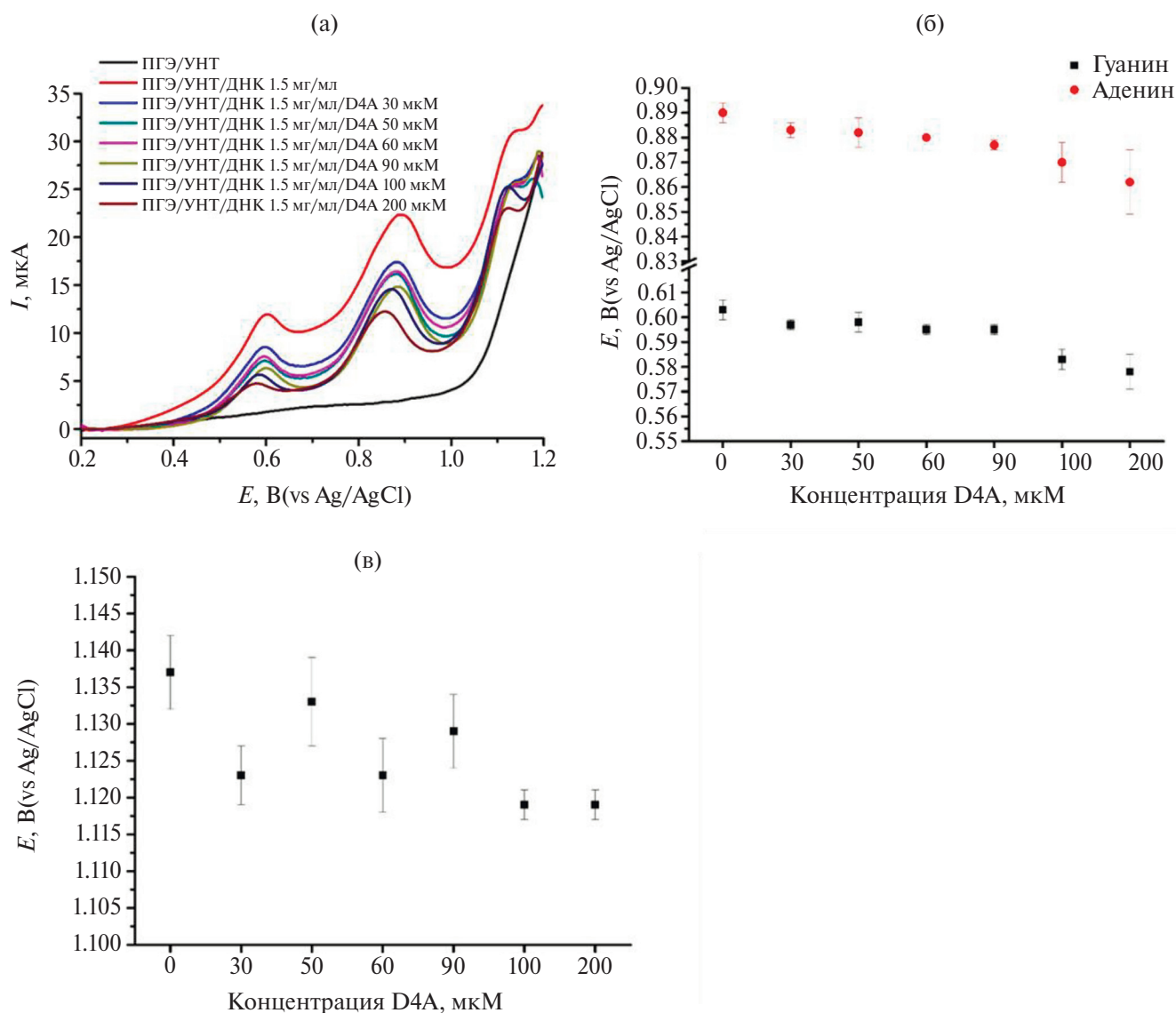


Рис. 4. (а) Дифференциально-импульсные вольтамперограммы ПГЭ/УНТ, ПГЭ/УНТ/ДНК (1.5 мг/мл) /D4A с различной концентрацией препарата. Зависимости значений потенциалов электроокисления дсДНК для (б) гуанина и аденина, (в) тимина от концентраций 0–200 мкМ метаболита абиратерона D4A.

потенциалов электроокисления гуанина и аденина в отрицательную область потенциалов, предполагающее электростатические взаимодействия и образование водородных связей, которые в данном случае могут проявляться в связывании с малой бороздкой ДНК (рис. 4б, в). Зависящее от концентрации снижение интенсивности электроокисления гетероциклических оснований (рис. 5) позволяет рассчитать константы связывания K_b комплекса ДНК/лекарство. Интеркаляционные взаимодействия характеризуются значениями констант 10^4 – 10^6 M^{-1} , электростатические взаимодействия и связывание с малой бороздкой молекулы ДНК за счет образования водородных связей характеризуется значениями порядка 10^2 – 10^4 M^{-1} [33–35, 39–43].

Константу связывания K_b для процесса образования комплекса дсДНК/D4A (1) рассчитывали по уравнению (2) при постоянной концентрации дсДНК 1.5 мг/мл:



$$\log \frac{1}{[\text{D4A}]} = \log K_b + \log \left(\frac{I_{\text{дсДНК/D4A}}}{I_{\text{дсДНК}} - I_{\text{дсДНК/D4A}}} \right), \quad (2)$$

где K_b – константа связывания, M^{-1} ; $I_{\text{дсДНК}}$ – амплитуда тока электроокисления дсДНК; $I_{\text{дсДНК/D4A}}$ – амплитуда тока электроокисления комплекса дсДНК/D4A, $[\text{D4A}]$ – концентрация D4A, μM (рис. 6, табл. 2). Значение константы связывания составило 1.1×10^4 , 5.5×10^3 и

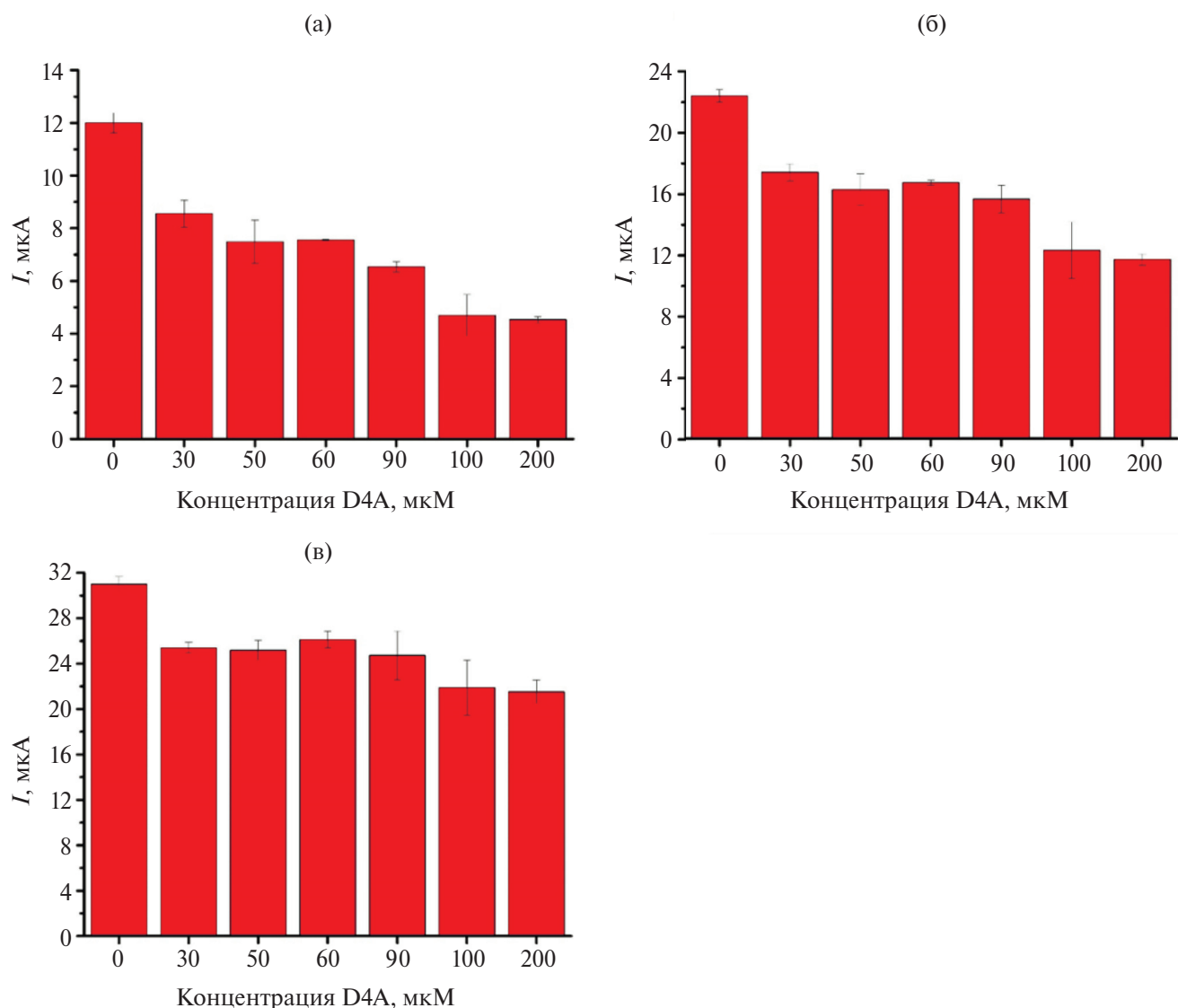


Рис. 5. Влияние терапевтических концентраций (0–200 мкМ) метаболита абиратерона D4A на интенсивность электроокисления дсДНК (1.5 мг/мл) (а) гуанина, (б) аденина и (в) тимина.

$2.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ для гуанина, аденина и тимина соответственно.

Анализ полученных результатов по смещению потенциалов электрохимического окисления гуанина, аденина и тимина при образовании комплекса ДНК-лекарство и значений констант связывания (табл. 2) позволил сделать заключение о механизме взаимодействия метаболита абиратерона D4A с малой бороздкой дсДНК за счет образования водородных связей, способствующих таким взаимодействиям [40–43].

Одной из важнейших характеристик фармакогенных исследований – ДНК-опосредованный электрохимический коэффициент токсичности препарата (T , %), который характеризует токсическое влияние лекарства на ДНК [7, 33,

Таблица 2. Константы связывания и значения изменения стандартной свободной энергии Гиббса ΔG при образовании комплекса дсДНК/D4A

Комплекс	K_b , M^{-1}	$\Delta G = -RT \ln K_b$, кДж/моль
Гуанин/D4A	1.1×10^4	-22.7
Аденин/D4A	5.5×10^3	-21.0
Тимин/D4A	2.5×10^3	-19.1

44]. Значения T оценивали при каждой концентрации метаболита абиратерона D4A как соотношение тока электроокисления оснований по формуле (3):

$$T = \left(\frac{I_s}{I_b} \right) \times 100\%, \quad (3)$$

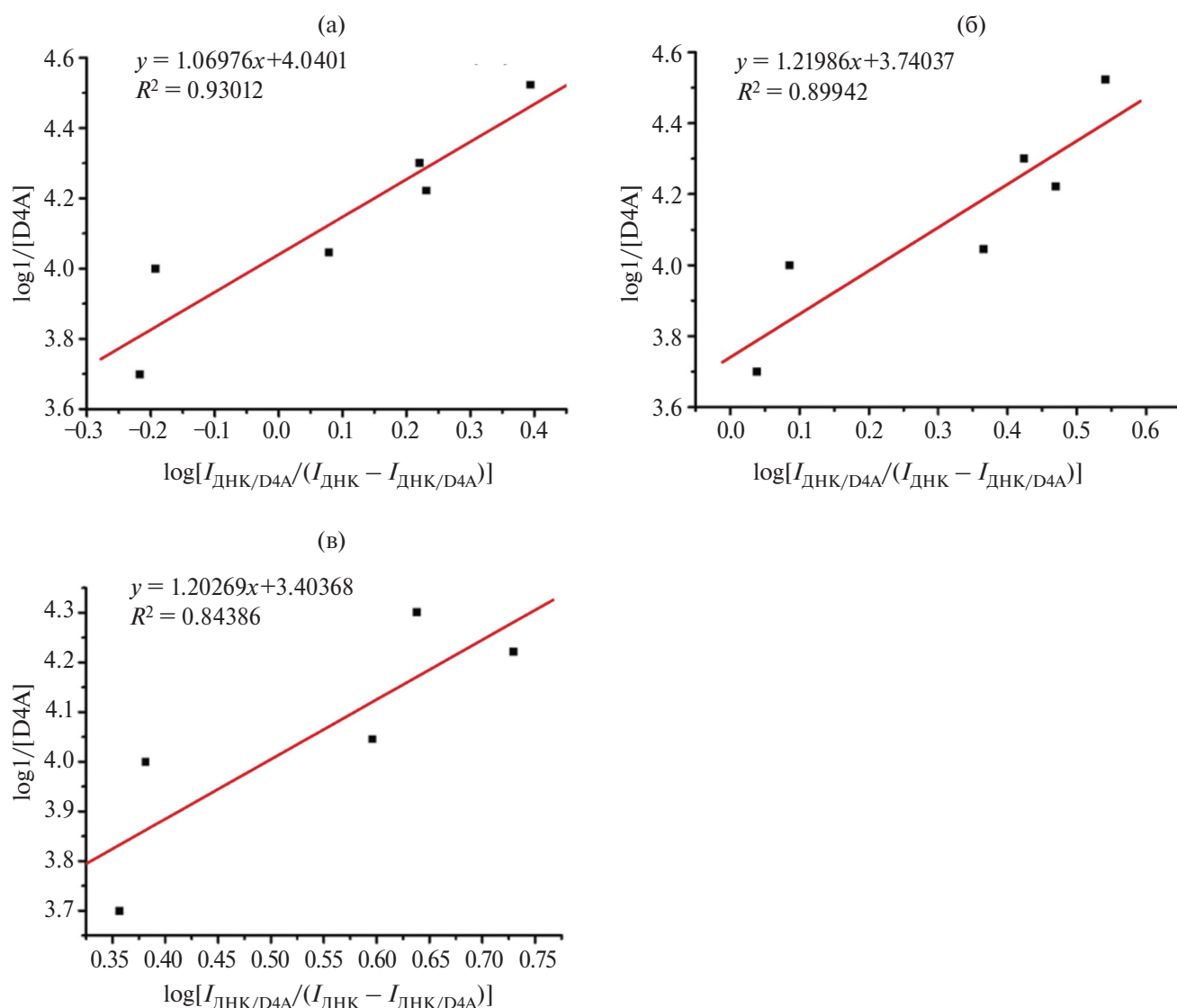


Рис. 6. Зависимость $\log(1/[D4A])$ от $\log[I_{DНК/D4A}/(I_{DНК} - I_{DНК/D4A})]$ для определения значения константы связывания по (а) гуанину, (б) аденину и (в) тимину.

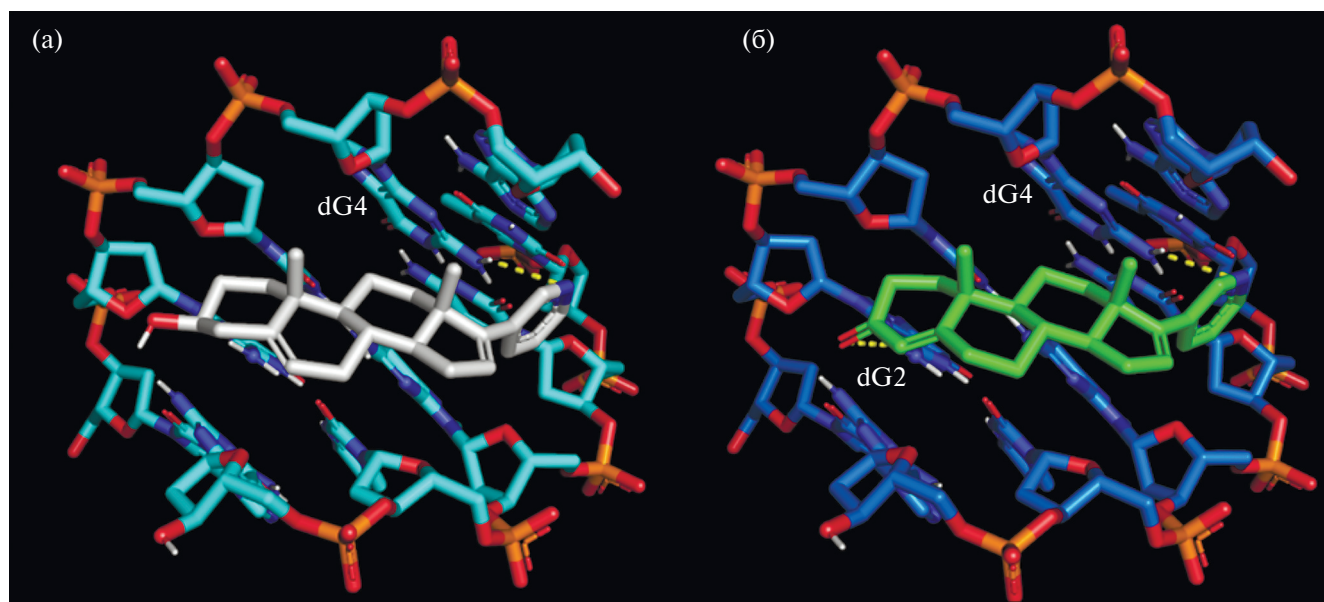
где I_b и I_s – значения токов электрохимического окисления гетероциклических оснований дсДНК до и после образования комплекса с метаболитом абиратерона D4A. Препарат считается нетоксичным, если $T > 85\%$; относится к умеренно токсичным, если $50 < T < 85\%$, и токсичен, если $T < 50\%$ [7, 33, 44]. При концентрациях метаболита абиратерона D4A 25–200 мкМ проявляется умеренно токсический эффект (табл. 3).

Для предсказания молекулярного механизма взаимодействия D4A с молекулой ДНК провели докинг D4A и абиратерона в известную структуру ДНК. Использовали кристаллическую структуру ДНК с последовательностью первой цепи dCdGdCdGdAdAdTdTdCdGdCdG, вторая цепь была полностью комплементарна первой.

Докинг абиратерона и метаболита абиратерона D4A по всей поверхности двойной спирали ДНК показал, что обе молекулы располагались в малой бороздке спирали. Абиратерон и D4A располагались в одном месте связывания, в районе dCdGdCdG первой цепи. Это согласуется с прежними экспериментами по моделированию комплекса абиратерона с ДНК [22] и нашими исследованиями D4A. Сопоставление результатов докинга для абиратерона и метаболита абиратерона D4A показало, что D4A должен более прочно связываться с ДНК, чем абиратерон. Величина оценочной функции для абиратерона составила -8.6 ккал/моль, а для D4A -9.1 ккал/моль. Анализ полученных комплексов показал, что абиратерон может образовывать одну водородную связь с молекулой ДНК,

Таблица 3. ДНК-опосредованный электрохимический коэффициент токсичности препарата, T, % метаболита абиратерона D4A

Концентрация D4A, мкМ	$T \pm s, \% (n = 3)$					
	гуанин		аденин		тимин	
30	71 ± 4	Умеренно токсичен	78 ± 2	Умеренно токсичен	82 ± 2	Умеренно токсичен
50	62 ± 7	Умеренно токсичен	73 ± 5	Умеренно токсичен	81 ± 3	Умеренно токсичен
60	63 ± 0	Умеренно токсичен	75 ± 1	Умеренно токсичен	84 ± 2	Умеренно токсичен
90	55 ± 2	Умеренно токсичен	68 ± 4	Умеренно токсичен	80 ± 7	Умеренно токсичен
100	39 ± 7	Токсичен	55 ± 8	Умеренно токсичен	71 ± 8	Умеренно токсичен
200	38 ± 1	Токсичен	52 ± 2	Умеренно токсичен	69 ± 3	Умеренно токсичен

**Рис. 7.** Модели комплексов (а) абиратерона и (б) D4A с ДНК. Желтыми пунктирными линиями показаны водородные связи.

тогда как D4A – две. Абиратерон и метаболит абиратерона D4A формируют водородную связь между атомами азота пиримидиновых колец и аминогруппой четвертого дезоксигуанина dG первой цепи ДНК. У метаболита абиратерона D4A вторая водородная связь образуется между карбонильной группой лиганда и аминогруппой второго дезоксигуанина dG. Причина такого различия заключается в разной конфигурации кольца А стероидного фрагмента (схема 1). Из-за наличия двойной связи в этом кольце изменяется его геометрия, и карбонильная группа метаболита абиратерона D4A располагается ближе к

молекуле ДНК, чем гидроксильная группа абиратерона, что и позволяет метаболиту абиратерона D4A образовывать дополнительную водородную связь (рис. 7).

Результаты молекулярного докинга подтверждают данные электрохимического анализа комплекса дсДНК/D4A. Образование более прочных связей зарегистрировано именно для гуанина с константой связывания $1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (табл. 2).

В работе [21] исследован комплекс дсДНК с абиратероном. Константы связывания комплекса ДНК/абиратерон, рассчитанные на основе

электрохимических исследований ($1.63 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ по гуанину, $1.93 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ по аденину), несколько выше, чем K_b комплекса ДНК/D4A, что подтверждает результаты и выводы, полученные с помощью молекулярного докинга.

* * *

Методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии исследованы электроаналитические характеристики двуспиральной ДНК и комплекса дсДНК и противоопухолевого препарата метаболита абиратерона D4A в диапазоне концентраций 30–200 мкМ. Показано влияние D4A на дсДНК, зарегистрированное по изменению тока электрохимического окисления гетероциклических азотистых оснований гуанина, аденина и тимина с использованием электродов, полученных методом трафаретной печати и модифицированных углеродными нанотрубками. Константы связывания (K_b) комплекса дсДНК/D4A для гуанина, аденина и тимина составили $1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $5.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $2.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Рассчитаны ДНК-опосредованные электрохимические коэффициенты токсического эффекта как отношение интенсивности сигналов регистрируемых гетероциклических оснований в присутствии D4A и без лекарства. На основании анализа электрохимических параметров и значений констант связывания сделано предположение о механизме взаимодействия D4A с ДНК преимущественно за счет электростатических взаимодействий и образования водородных связей с гетероциклическими основаниями. Электрохимический ДНК-биосенсор впервые использован для исследования механизма взаимодействия метаболита абиратерона D4A с дсДНК. Выводы о механизме взаимодействия метаболита абиратерона D4A за счет водородных связей с основаниями ДНК, полученные электрохимическими методами, подтверждены с помощью молекулярного моделирования комплекса дсДНК/D4A.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период 2021–2030 гг. (№ 122030100168-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hasanzadeh M., Shadjou N.* Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug–DNA interaction // *Mater. Sci. Eng. C.* 2016. V. 61. P. 1002.
2. *Bolat G.* Investigation of poly(CTAB–MWCNTs) composite based electrochemical DNA biosensor and interaction study with anticancer drug Irinotecan // *Microchem. J.* 2020 V. 159. Article 105426.
3. *Hua Y., Jiaming M., Dachao L., Ridong W.* DNA-based biosensors for the biochemical analysis: A review // *Biosensors.* 2022. V. 12. P. 183.
4. *Manna S., Sharma, A., Satpati A.K.* Electrochemical methods in understanding the redox processes of drugs and biomolecules and their sensing // *Curr. Opin. Electrochem.* 2022. V. 32. Article 100886.
5. *Eckel R., Ros R., Ros A., Wilking S.D., Sewald N., Anselmetti D.* Identification of binding mechanisms in single molecule–DNA complexes // *Biophys. J.* 2003 V. 85. P. 1968.
6. *Das S., Kumar G.S.* Molecular aspects on the interaction of phenosafranin to deoxyribonucleic acid: Model for intercalative drug–DNA binding // *J. Mol. Struct.* 2008. V. 63. P. 87256.
7. *Pronina V.V., Kostryukova L.V., Bulko T.V., Shumyantseva V.V.* Interaction of Doxorubicin embedded into phospholipid nanoparticles and targeted peptide-modified phospholipid nanoparticles with DNA // *Molecules.* 2023. V. 28. P. 5317.
8. *Gunaydin-Akyildiz A., Aksoy N., Boran T., Ilhan E.N., Ozhan G.* Favipiravir induces oxidative stress and genotoxicity in cardiac and skin cells // *Toxicol. Lett.* 2022. V. 371. P. 9.
9. *Ramotowska S., Ciesielska A., Makowski M.* What can electrochemical methods offer in determining DNA–drug interactions? // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 3478.
10. *Morawska K., Popławski T., Ciesielski W., Smarzewska S.* Electrochemical and spectroscopic studies of the interaction of antiviral drug Tenofovir with single and double stranded DNA // *Bioelectrochemistry.* 2018. V. 123. P. 227.
11. *Chiorcea-Paquim A.M., Oliveira-Brett A.M.* Electrochemistry of chemotherapeutic alkylating agents and their interaction with DNA // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2023. V. 222. Article 115036.
12. *Eckert K.A., Kunkel T.A.* DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction // *PCR Methods Appl.* 1991. V. 17. P. 24.
13. *Шумянцева В.В., Агафонова Л.Е., Булко Т.В., Кузиков А.В., Мамарех.А., Ян Д., Пергушов Д.В., Сиголаева Л.В.* Электроанализ биомолекул: обоснованный выбор сенсорных конструкций // *Успехи биологической химии.* 2021. Т. 61. С. 295. (*Shumyantseva V.V., Agafonova L.E., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Yuan J., Pergushov D.V., Sigolaeva*

- L.V.* Electroanalysis of biomolecules: Rational selection of sensor construction // *Biochemistry (Moscow)* B: *Biol. Chem. Rev.* 2021. V. 86. P. 140.)
14. *Paleček E., Bartošík M.* Electrochemistry of nucleic acids // *Chem. Rev.* 2012. V. 112. P. 3427.
 15. *Ferapontova E.E.* DNA electrochemistry and electrochemical sensors for nucleic acids // *Ann. Rev. Anal. Chem.* 2018. V. 11. P. 197.
 16. *Evtugyn G.A., Porfireva A.V., Belyakova S.V.* Electrochemical DNA sensors for drug determination // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022. V. 221. Article 115058.
 17. *Teles F.R.R., Fonseca L.P.* Trends in DNA biosensors // *Talanta.* 2008. V. 77. P. 606.
 18. *Trotter M., Borst N., Thewes R., Stetten F.* Review: Electrochemical DNA sensing – Principles, commercial systems, and applications // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 154. Article 112069.
 19. *Blair E.O., Corrigan D.K.* A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 134. P. 57.
 20. *Rehman S.U., Sarwar T., Husain M.A., Ishqi H.M., Tabish M.* Studying non-covalent drug–DNA interactions // *Arch. Biochem. Biophys.* 2015. V. 576. P. 49.
 21. *Пронина В.В., Агафонова Л.Е., Масамрех Р.А., Кузиков А.В., Шумянцева В.В.* Взаимодействие противоопухолевого препарата ацетата абиратерона с дцДНК // *Biomed. Chem.: Res. Methods.* 2022. Т. 5. e00174. (*Pronina V., Agafonova L., Masamrekh R., Kuzikov A., Shumyantseva V.* Interaction of the anticancer drug abiraterone with dsDNA // *Biomed. Chem.: Res. Methods.* 2022. V. 5. № 2. Article e00174.)
 22. *Wani T.A., Alsaif N., Bakheit A.H., Zargar S., Al-Mehizia A.A., Khan A.A.* Interaction of an abiraterone with calf thymus DNA: Investigation with spectroscopic technique and modelling studies // *Bioorg Chem.* 2020. V. 100. Article 103957.
 23. *Petrunak E.M., Bart A.G., Peng H.M., Auchus R.J., Scott E.E.* Human cytochrome P450 17A1 structures with metabolites of prostate cancer drug abiraterone reveal substrate-binding plasticity and a second binding site // *J. Biol. Chem.* 2023. V. 299. Article 102999.
 24. *Li Z., Bishop A.C., Alyamani M., Garcia J.A., Dreicer R., Bunch D. et al.* Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumour activity in prostate cancer // *Nature.* 2015. V. 523. P. 347.
 25. *Li Z., Alyamani M., Li J., Rogacki K., Abazeed M., Upadhyay S.K. et al.* Redirecting abiraterone metabolism to fine-tune prostate cancer anti-androgen therapy // *Nature.* 2016. V. 533. P. 547.
 26. *Masamrekh R.A., Filippova T.A., Haurychenka Y.I., Sherbakov K.A., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V.* The interactions of a number of steroid-metabolizing cytochromes P450 with abiraterone D4A metabolite: spectral analysis and molecular docking // *Steroids.* 2020. V.162. Article 108693.
 27. *Kuzikov A., Masamrekh R., Filippova T., Haurychenka Y., Shcherbakov K., Veselovsky A., Strushkevich N. et al.* Estimation of inhibiting impact of abiraterone D4A metabolite on human steroid 21-monoxygenase (CYP21A2) // *Steroids.* 2020. V. 154. Article 108528.
 28. *Масамрех Р.А., Кузиков А.В., Филиппова Т.А., Щербачков К.А., Веселовский А.В., Шумянцева В.В.* Взаимодействие абиратерона и его фармакологически активного метаболита D4A с цитохромом P450 2C9 (CYP2C9) // *Биомедицинская химия.* 2022. Т. 68. № 3. С. 201. (*Masamrekh R.A., Kuzikov A.V., Filippova T.A., Sherbakov K.A., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V.* Interaction of abiraterone and its pharmacologically active metabolite D4A with cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) // *Biochemistry (Moscow). Supplement Series B: Biomed. Chem.* 2022. V. 16. P. 328.)
 29. *Trott O., Olson A.J.* AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. P. 455.
 30. *Carrara S., Baj-Rossi C., Boero C., De Micheli G.* Do carbon nanotubes contribute to electrochemical biosensing? // *Electrochim. Acta.* 2014. V. 128. P. 102.
 31. *Alim S., Vejjayan J., Yusoff M.M., Kafi A.K.M.* Recent uses of carbon nanotubes & gold nanoparticles in electrochemistry with application in biosensing: A review // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 121. P. 125.
 32. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Tikhonova E.G., Sanzhakov M.A., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A. et al.* Electrochemical studies of the interaction of rifampicin and nanosome/rifampicin with dsDNA // *Bioelectrochemistry.* 2021. V. 140. Article 107736.
 33. *Kostruykova L.V., Tereshkina Y.A., Tikhonova E.G., Khudoklinova Y.Y., Bobrova D.V., Gisina A.M., Morozevich G.E., Pronina V.V., Bulko T.V., Shumyantseva V.V.* Effect of an NGR peptide on the efficacy of the Doxorubicin phospholipid delivery system // *Nanomaterials.* 2023. V. 13. P. 2229.
 34. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Agafonova L.E., Pronina V.V., Kostryukova L.V.* Comparative analysis of the interaction between the antiviral drug Umifenovir and Umifenovir encapsulated in phospholipids micelles Nanosome/Umifenovir) with dsDNA as a model for pharmacogenomic analysis by electrochemical methods // *Processes.* 2023. V. 11. P. 922.
 35. *Agafonova L., Tikhonova E., Sanzhakov M., Kostryukova L., Shumyantseva V.* Electrochemical Studies of the interaction of phospholipid nanoparticles with dsDNA // *Processes.* 2022. V. 10. P. 2324.
 36. *Carrara S., Cavallini A., Erokhin V., Micheli G.D.* Multi-panel drugs detection in human serum for personalized therapy // *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 26. P. 3914.
 37. *Pezaro C.J., Mukherji D., De Bono J.S.* Abiraterone acetate: Redefining hormone treatment for advanced prostate cancer // *Drug Discov. Today.* 2012. V. 17. P. 221.
 38. *Aliakbarinodehi N., Micheli G.D., Carrara S.* Enzymatic and nonenzymatic electrochemical interaction of Abiraterone (antiprostate cancer drug) with multi-walled carbon nanotube bioelectrodes // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 9347.

39. *Bagni G, Osella D, Sturchio E, Macsini M.* Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 573. P. 81.
40. *Meunier-Presta R., Bouyona A., Rampazzia E., Raveau S., Andreolettib P., Cherkaoui-Malki M.* Electrochemical probe for the monitoring of DNA–protein interactions // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. P. 2598.
41. *Lima D., Hacke A.C.M., Inaba J., Pessôa C.A., Kerman K.* Electrochemical detection of specific interactions between apolipoprotein E isoforms and DNA sequences related to Alzheimer’s disease // *Bioelectrochemistry.* 2020. V. 133. Article 107447.
42. *Zhao M., Ma J., Li M., Zhang Y., Jiang B., Zhao X. et al.* Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 12808.
43. *Findik M., Bingol H., Erdem A.* Hybrid nanoflowers modified pencil graphite electrodes developed for electrochemical monitoring of interaction between Mitomycin C and DNA // *Talanta.* 2021. V. 222. Article 121647.
44. *Muti M., Muti M.* Electrochemical monitoring of the interaction between anticancer drug and DNA in the presence of antioxidant // *Talanta.* 2018. V. 178. P. 1033.

 ORIGINAL ARTICLES

ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF THE INTERACTION BETWEEN DNA AND ABIRATERONE D4A METABOLITE

V. V. Shumyantseva^{a, b, *}, A. V. Berezhnova^a, L. E. Agafonova^a, T. V. Bulko^a, A. V. Veselovsky^a

^a*Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, 119121, Moscow, Russia*

^b*Faculty of Medicine and Biology, Russian National Research Medical University, 117321, Moscow, Russia*

^{*}*E-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru*

Abstract. The electroanalytical characteristics of double-stranded DNA (dsDNA) and the complex of dsDNA with the anticancer drug metabolite, abiraterone D4A, in the concentration range of 25–200 μM were investigated using differential pulse voltammetry. The effect of D4A on dsDNA was detected by changes in the intensity of the electrochemical oxidation of the heterocyclic bases guanine, adenine, and thymine. This investigation used screen-printed electrodes modified with carbon nanotubes. Binding constants (K_b) for guanine, adenine, and thymine in the dsDNA/D4A complexes were calculated to be 1.1×10^4 , 5.5×10^3 , and $2.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectively. The DNA-mediated electrochemical coefficients of the toxic effect were calculated as the ratio of the signal intensities of guanine and adenine in the presence of D4A compared to those without the drug ($T, \%$). Based on an analysis of electrochemical parameters and binding constant values, an assumption was made regarding the mechanism of the interaction between D4A and DNA, predominantly through electrostatic interactions and the formation of hydrogen bonds with the minor groove. Conclusions about the mechanism of the interaction of the abiraterone D4A metabolite with the dsDNA minor groove, obtained by electrochemical methods, were supported by the molecular simulation of the DNA/D4A complex.

Keywords: electroanalysis, abiraterone D4A metabolite, DNA, anticancer drugs, binding constant.

ВАЛЕРИЙ НИКОЛАЕВИЧ МАЙСТРЕНКО: ЖИЗНЬ В НАУКЕ

DOI: 10.31857/S0044450224070063, EDN: TNSJUI

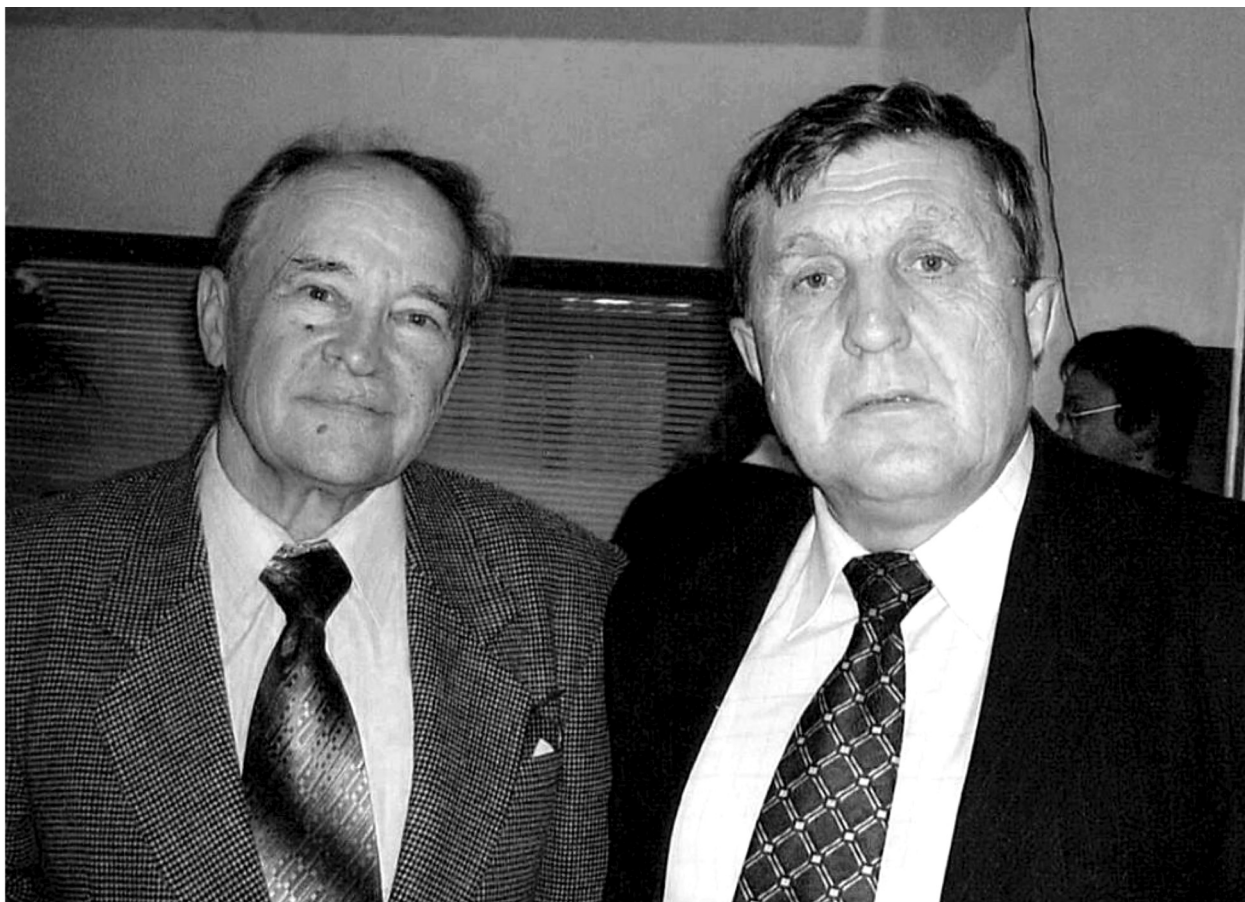
17 мая 2023 г. на 76-м году жизни скоропостижно скончался Валерий Николаевич Майстренко, известный ученый, специалист в области аналитической химии и химической экологии, доктор химических наук, член-корреспондент Академии наук Республики Башкортостан, заслуженный деятель науки и техники Республики Башкортостан, заведующий кафедрой аналитической химии Уфимского университета науки и технологий.

В.Н. Майстренко родился 8 сентября 1947 г. в поселке Новиковка в Башкирии. После окончания химического факультета Башкирского государственного университета в 1970 г. он поступил в аспирантуру кафедры аналитической химии Казанского государственного университета. В этот период в Казанском университете проводились исследования в новой области неводной электрохимии – полярографии хелатов металлов в неводных средах. Работа по этой тематике была начата выпускницей Башкирского университета аспиранткой Ф.А. Амирхановой и получила развитие с приходом В.Н. Майстренко. Однако через год аспирантуры Валерия Николаевича призвали в армию, в ракетные войска стратегического значения. После службы В.Н. Майстренко успешно завершил учебу в аспирантуре и в 1974 г. защитил кандидатскую диссертацию “Полярографическое исследование комплексов металлов с некоторыми оксиазосоединениями”. Тематика неводной полярографии хелатов оставалась еще некоторое время актуальной; так, одна из опубликованных работ с участием В.Н. Майстренко была отмечена как статья с высоким индексом цитирования.

В 1975 г. В.Н. Майстренко вернулся в Башкирский университет, где прошел обычный путь работника высшей школы – сначала был ассистентом, затем старшим преподавателем и доцентом, профессором и стал деканом

химического факультета. Проявил хорошие организаторские способности. Его приглашали на работу в партийные органы, но после некоторых колебаний он твердо решил идти по научному пути. Вместе с сотрудниками кафедры, на которой он работал, и Уфимского научного центра Академии наук он приступил к исследованию комплексобразующих и окислительно-восстановительных свойств органических сульфидов в реакциях с переходными металлами. Тема имела практическое значение в плане изучения серосодержащих соединений как компонентов нефтей Башкирии. Казанский опыт работы с ртутным капельным электродом здесь пригодился как нельзя кстати. Полярография и в первую очередь ртутный микроэлектрод вышли на авансцену аналитической химии в нашей стране, трудно назвать республику или крупный город, в которых не проводились бы исследования в области полярографии. Уфимский научный центр и Башкирский университет оказались среди них.

Результаты исследований, проведенных В.Н. Майстренко в течение почти 15 лет, были опубликованы в многочисленных статьях и доложены на различных конференциях. Совокупный научный материал “тянул” на две специальности: физическая химия и аналитическая химия. Физическая химия была представлена в диссертационном совете при Уфимском научном центре. Председатель совета академик Г.А. Толстикова предложил Валерию Николаевичу сделать доклад по теме диссертации, на заседании совета выступил Г.К. Будников и отметил, что основной материал по свойствам органических сульфидов получен с применением полярографии, аналитического метода, которым В.Н. Майстренко владеет в совершенстве. В плане развития аналитической химии в Башкирском университете неплохо бы иметь здесь доктора наук по специальности “аналитическая



В.Н. Майстренко (справа) и Г.К. Будников, 2006 г.

химия”. Г.А. Толстикова без колебаний согласился с предложением провести защиту по двум специальностям. В защите, которая состоялась 20 апреля 1990 г., приняли участие специалисты-электроаналитики, авторитеты в области полярографии. В 1991 г. В.Н. Майстренко стал первым доктором химических наук по аналитической химии в Башкортостане и единственным в республике на длительный период.

В.Н. Майстренко создал известную в стране научную школу по электроаналитической химии. Научные и практические результаты опубликованы примерно в 300 работах, в том числе в ряде монографий, учебнике для вузов, в обзорных статьях, 12 патентах и авторских свидетельствах. В.Н. Майстренко активно участвовал и в учебном процессе. Обобщенный опыт преподавания курсов неорганической химии и аналитической химии им неоднократно выносился на обсуждение в докладах на конференциях по преподаванию аналитической химии.

Конференции по электроаналитической химии в нашей стране, как известно, проводились и

проводятся по плану Научного совета по аналитической химии, в составе которого есть комиссия по ЭМА. В выборе мест проведения конференций В.Н. Майстренко проявлял инициативу. В итоге оказалось, что конференции начала XXI в. — это одновременно близкое знакомство с богатой природой родного для В.Н. Майстренко края: теплоход по маршруту “Уфа — Набережные Челны — Уфа” (VI Всероссийская конференция, 2004 г.), небольшое курортное местечко Абзакovo в 300 км от Уфы среди лесистых Уральских гор (VII и VIII Всероссийские конференции) — все это по предложению и при хорошей организации мероприятия В.М. Майстренко. Неудивительно, что к нему обратились за советом и помощью при организации конференций по химии в медицине в тех же местах.

В области электроанализа В.Н. Майстренко делал акцент на поиске материалов, способных модифицировать поверхность электрода так, чтобы амперометрический отклик обеспечил высокую чувствительность и селективность. Электрод при этом приобретает функцию сенсора. Сенсоры и сенсорные системы используют для

контроля качества пищевых продуктов, лекарственных средств, оценки степени хиральной чистоты фармацевтических препаратов и др.

В.Н. Майстренко часто выступал с докладами, и хотя они обычно были посвящены электроаналитической тематике, стоит отметить и доклады по суперэкоотоксикантам на международных конференциях по диоксинам (Италия, Нидерланды, США). В первые два десятилетия XXI в. основное внимание уделялось вопросам, связанным с сенсорами.

С 1996 по 2009 г., будучи заведующим кафедрой неорганической химии в Башкирском государственном университете, В.Н. Майстренко одновременно возглавлял Научно-исследовательский институт безопасности жизнедеятельности РБ, который в эти годы стал одним из ведущих в стране научных центров по решению экологических проблем. О деятельности В.Н. Майстренко на посту директора НИИБЖД РБ рассказал заместитель директора этого института в тот же период д.х.н. проф. У.Г. Ибатуллин.

Институт создавался в тяжелой обстановке экологического “диоксинового” кризиса начала 1990-х гг. для целенаправленного научного изучения проблем, связанных с охраной окружающей среды. Здесь начали разрабатывать системные планы по предупреждению и ликвидации чрезвычайных ситуаций в Башкортостане, республиканские экологические программы, мониторинговые технологии. Затем в сферу исследовательской деятельности института вошли вопросы утилизации и переработки промышленных и бытовых отходов, стали осуществлять инвентаризацию и составлять кадастр особо охраняемых природных территорий республики и ближайших регионов.

У.Г. Ибатуллин отмечает, что за этот период в НИИБЖД РБ было защищено восемь докторских и 13 кандидатских диссертаций по актуальным проблемам охраны окружающей среды, промышленной экологии, прогнозированию и предупреждению чрезвычайных ситуаций, экономике природопользования, регулярно проводились научно-практические специализированные конференции. В 1998 г. стал издаваться первый в регионе журнал “Башкирский экологический вестник”, был организован Учебный центр для специалистов предприятий и преподавателей учебных заведений, ведущих дисциплину ОБЖ. Продуктивно функционировали ученый совет института, куда директор сумел привлечь ряд высококвалифицированных

специалистов, научно-техническая библиотека, постоянно пополняющая фонды специализированной и нормативно-технической литературы, и собственная типография. Немалая заслуга директора в том, что в период серьезнейших проблем с финансированием он сумел наладить продуктивные контакты практически со всеми крупными промышленными предприятиями и рядом учреждений республики, что позволило институту сначала выжить за счет бартера, а потом и начать успешно развиваться, многократно увеличив финансовые и материально-технические ресурсы. С участием специалистов института были разработаны и реализованы республиканская целевая программа “Экологическая безопасность Республики Башкортостан”, а именно ее важнейшие подпрограммы: “Диоксин”, “Предупреждение ЧС и ликвидация их последствий”, “Создание единой государственной системы экологического мониторинга РБ”, “Снижение рисков для населения и территории РБ от ЧС природного и техногенного характера”. Осуществлялись мероприятия федеральной программы “Снижение рисков и смягчение последствий ЧС природного и техногенного характера в РФ до 2005 г.”. Институт принимал активное участие в разработке ряда федеральных целевых программ – “Возрождение Волги”, “Чистый воздух” и др.

Совместно с Министерством природных ресурсов РБ и Башкирской академией госслужбы и управления при Президенте РБ была разработана и реализована учебная программа повышения квалификации специалистов промышленных предприятий и других организаций для внедрения системы экологического менеджмента в соответствии с мировым стандартом ИСО-14000.

Основным итогом работы Валерия Николаевича в должности директора института является то, что он сумел создать и в какой-то мере воспитать коллектив высококвалифицированных специалистов, которых не было в республике. При нем серьезно вырос авторитет института во всероссийском масштабе, что подтверждается заявками на выполнение научно-исследовательских, проектных и практических работ из самых разных регионов. Автор настоящей статьи присоединяется к такой высокой оценке 13-летней деятельности и считает ее не менее важной, чем исследования в электроаналитической области. В этот период В.Н. Майстренко получил грант как Соросовский профессор, стал экспертом фонда Сороса по проблемам загрязнения

окружающей среды и получателем стипендии Президента РФ для выдающихся ученых России.

В.Н. Майстренко возглавлял Уральское отделение Научного совета РАН по аналитической химии, Научный совет по экологии и природопользованию АН РБ, республиканские программы “Диоксин”, “Экология Башкортостана”, “Предупреждение и ликвидация последствий чрезвычайных ситуаций”. Был главным редактором журнала “Башкирский экологический вестник” (с 1998 г.). В 2019 г. В.Н. Майстренко побывал в Сибее, в одном из городов Башкортостана, когда образовался смог при тлении породы карьера. Ему пришлось выступить как эксперту в оценке общей техногенной картины, ответить на вопрос, насколько опасен газ из карьера. Его мнение: сибайский карьер выделяет серы меньше, чем нефтяной завод в Уфе. Ситуацию в городе при нормальных метеоусловиях называл не критичной.

В списке трудов В.Н. Майстренко можно выделить наиболее важные направления, при разработке которых получены новые знания фундаментального и прикладного плана:

– оценка реакционной способности полифункциональных сероорганических соединений в реакциях комплексообразования с благородными металлами (эти результаты исследования отражены в его докторской диссертации);

– разработка высокоэффективных электрохимических сенсоров для определения металлов и токсичных органических соединений в природных средах, а также сенсоров для фармации;

– разработка современных методов определения токсичных металлов, диоксинов и других органических веществ в природных и промышленных объектах, их аттестация и внесение в Госреестр РФ;

– разработка концепций эколого-аналитического мониторинга супертоксиантов и стойких органических загрязнителей и организация соответствующих исследований в Республике Башкортостан;

– исследования по утилизации промышленных и бытовых отходов, разработка технологий утилизации отходов горнорудных и машиностроительных предприятий;

– оценка загрязнения территорий и промышленных объектов предприятий хлорорганического синтеза диоксинами и разработка технологических решений по уменьшению их эмиссии в окружающую среду;

– разработка методологии районирования территории субъекта федерации, которая учитывала бы степень опасности от природных и техногенных катастроф, чрезвычайных ситуаций.

Науку и образование делают люди, поэтому персонификация и оценка деятельности ученых на поприще науки и образования необходима. И здесь, кроме привычных наукометрических параметров (число статей или вообще публикаций, число цитирований, индекс Хирша, число аспирантов и докторов и т.д.), доступных из официальных источников, используют другие критерии, которые скорее связаны с нравственными аспектами и этикой поведения в научном сообществе. Возникает вопрос, каково было поведение Валерия Николаевича в научно-образовательной среде просто как человека? На этот вопрос отвечают коллеги, ученики и, конечно, друзья (фото).

Прежде всего, нужно отметить самостоятельность ученого, знание дела, его эрудицию, смелость при принятии решений, творческий подход к делу. Написание книг – одно из доказательств творческой активности. Деятельность как эксперта в рамках РФФИ и РНФ. Коллеги В.Н. Майстренко особо выделяли период работы, когда в республике возникли проблемы эколого-химического плана. Действительный член АНБ И.Б. Абдрахманов вспоминал годы, когда В.Н. Майстренко был деканом химического факультета БашГУ и одновременно заведующим кафедрой неорганической химии. На все у него хватало времени. Особо значима его роль по созданию программы экологического мониторинга состояния окружающей среды в республике Башкортостан после экологической фенольной катастрофы. Эту задачу В.Н. Майстренко решил, создав для этой цели одну из лучших в России лабораторий по контролю содержания диоксинов и других стойких органических загрязнителей в объектах окружающей среды, подобрав и подготовив квалифицированных специалистов. Высоко оценивая деятельность В.Н. Майстренко, Абдрахманов отметил, что он прошел славный и достойный жизненный путь и внес достойную лепту в химическую науку, воспитание молодого поколения в деле служения Отечеству, и считал, что Валерий Николаевич является достойным примером.

В книгах В.Н. Майстренко видел не только источник знаний. Он считал, что написание книги и ее выход в свет – хороший способ оценить эффективность деятельности ученого,

стремящегося получить известность и признание научного сообщества. Здесь должны проявиться и полнота знания в конкретной области, и уровень профессиональной культуры. Примером может служить книга, недавно вышедшая в Уфе (Мир печати, 2023), составленная В.Н. Майстренко по материалам семейного архива профессора Я.Ш. Шарапова, не успевшего обобщить свои тетради и записки. Название книги “Из запомнившегося: эскизы о времени и о себе (1920–2008)”.

Друзья говорили, что он был удивительным человеком. В характере Валеры, как называл его профессор С.С. Злотский, необыкновенно сочетались и переплетались внимание и забота к близким коллегам, ученикам и сотрудникам с высочайшей принципиальностью и требовательностью к научным результатам, содержанию научных исследований. Он высказывался прямо, откровенно, иногда нелестно, но строго по существу, при этом указывал на просчеты, ошибки, упущения даже самым близким друзьям, известным, заслуженным, титулованным ученым. В то же время непременно предлагал пути и способы исправления, корректировки, улучшения. Готов был тратить время и силы на поддержку и помощь. Эти качества не всегда находили понимание у окружающих, поэтому научный путь Валеры был сложным и тернистым. В его жизни общественная работа и экспериментальные исследования тесно переплетались. На позициях директора института и заведующего кафедрой он никогда не использовал административный ресурс. В каждой публикации существенным, решающим являлось его личное участие. Он был замечательным другом, родным, близким человеком

для коллег, заботливым учителем и опекуном для аспирантов и молодых сотрудников. Он оставил о себе долгую и светлую память.

Другой близкий человек (Б.И. Кутепов) отмечал удивительную любознательность Валерия Николаевича. Он говорил, что его интересовало все, прежде всего история, он даже хотел стать профессиональным историком, но стал химиком. Сочетая оба этих качества, он издал книгу “История и методология химии” для бакалавров. В 60–70-ые годы было популярно сплавать в Башкирии по реке Белой, В.Н. в таких путешествиях участвовал. В 21 веке по его инициативе мы каждое лето путешествовали по многим красивейшим местам нашей родной Башкирии, при этом за рулем всегда был Валера. Он не был заядлым грибником, но стоило его один раз свозить в лес за грибами, после этого уже он каждую осень возил нас. Еще одна составная часть нашего совместного отдыха — это круглогодичная баня в течение многих лет. Коллеги завидовали, что мы на протяжении многих лет не переставали встречаться, несмотря ни на какие препятствия. И это во многом благодаря энтузиазму Валеры. Б.И. Кутепов отмечал также обязательность Валерия Николаевича: Если что-то обещал, обязательно сделает. Это про него — умру, но вспашу.

Автор благодарит И.Б. Абдрахманова, И.Е. Алёхину, Д.М. Бикмеева, С.С. Злотского, Г.Я. Кобальнову, Б.И. Кутепова, Г.Я. Майстренко, Ю.И. Муринова за помощь при написании статьи.

Г.К. Будников

УДК 0000

ОКСИТЕРМОГРАФИЯ КАК НОВЫЙ АНАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕРМОСТОЙКОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

© 2024 г. Б. К. Зуев^а, А. Е. Зайцева^а, А. С. Коротков^а, В. Г. Филоненко^а, И. В. Роговая^а, *

^аИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН,
ул. Косыгина, 19, Москва, 119991 Россия
*E-mail: smile_mail@mail.ru

Поступила в редакцию 29.06.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 04.12.2023 г.

Контроль содержания кислорода и углекислого газа в потоке воздуха, выходящего из реактора, в котором происходит нагрев образца, может быть использован для исследования процессов термической стойкости полимерных материалов. Такого рода подход получил название метода окситермографии. Экспериментальные данные (окситермограммы) – это зависимости уменьшения содержания кислорода и появления диоксида углерода в потоке воздуха от изменения температурного режима, позволяющие контролировать влияние введения наполнителей в состав полимеров на их термическую стойкость. На примере чистого полипропилена и полипропилена с добавками диоксида титана показано применение метода окситермографии для изучения окислительной термостабильности.

Ключевые слова: контроль содержания газов в потоке воздуха, окситермография, полипропилен, диоксид титана, наполненные полимеры, окисление кислородом воздуха, термостабильность, термический анализ.

DOI: 10.31857/S0044450224070072, EDN: TNOIUG

Для исследования физико-химических свойств полимерных материалов, связанных с их нагревом, традиционно используются два метода – термогравиметрический анализ (ТГА) [1] и дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) [2]. Оба метода включают в себя программируемый нагрев образца с непрерывным фиксированием его массы либо разницы температур анализируемого и эталонного образцов. В настоящее время активно развивается окситермография – относительно новый метод анализа вещества [3]. В его основе лежит нагрев образца в токе воздуха или инертного газа, содержащего точно известное количество кислорода, с непрерывным фиксированием динамики изменения химического состава газа на выходе высокотемпературного реактора. С его помощью может быть получена информация о содержании органического вещества в объеме [4, 5] и в пленках на поверхности воды [6], на поверхности кожи

[7], химически привитого слоя на кремнеземе [8, 9], при распределении легколетучих и трудноразлетучих органических компонентов [10, 11]. Устройства с аналогичным принципом действия могут использоваться в качестве детекторов в газовой хроматографии [12, 13].

Основная цель данной работы – показать возможности практического использования метода окситермографии для исследования термической стойкости полимерных материалов при одновременной регистрации кислорода и CO₂ в потоке газа, выходящего из реактора; изучить термическую стойкость чистого полипропилена и полипропилена с добавками диоксида титана.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Использовали полипропилен марки H030 GP (ООО “Тобольск-Полимер”, Россия), диоксид титана P25 Degussa (Германия).

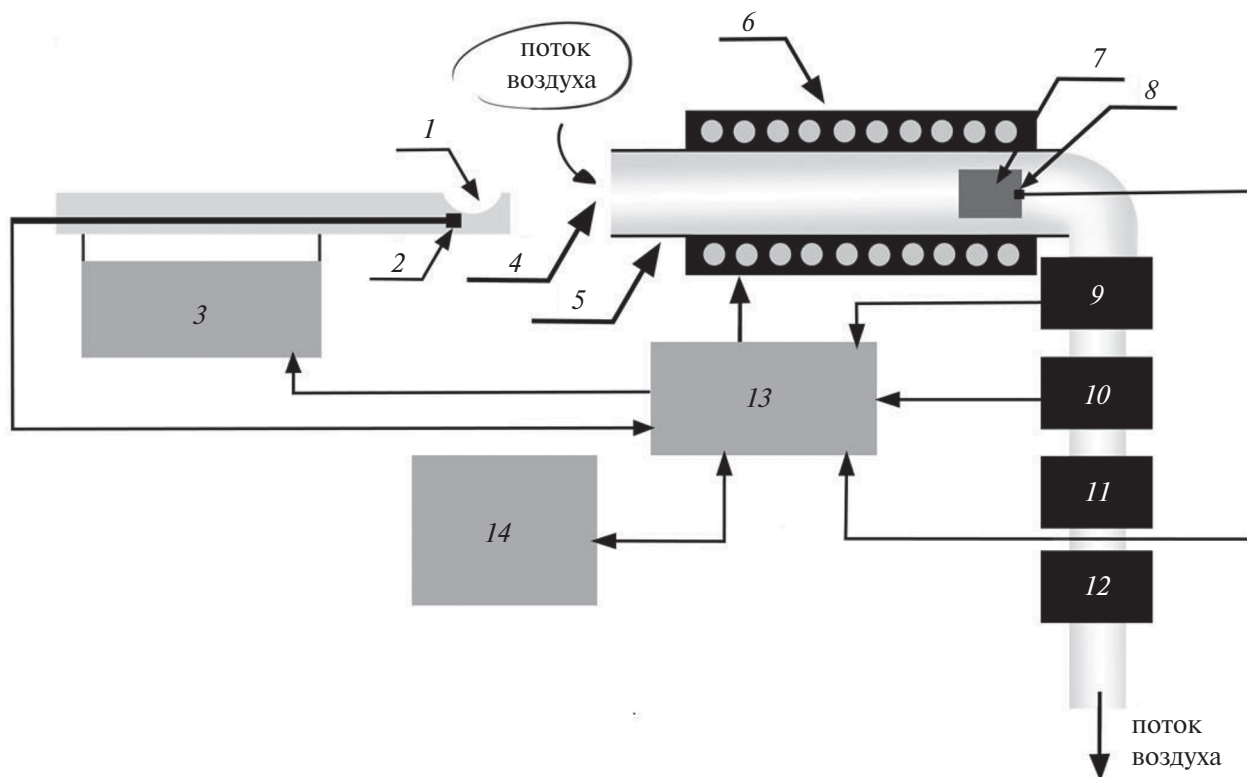


Рис. 1. Схема экспериментальной окситермографической установки для исследования образцов полимеров методом окситермографии. 1 – кварцевая лодочка, 2 – термопара, 3 – узел введения кварцевой лодочки в реактор, 4 – входное отверстие в температурный реактор, 5 – кварцевый высокотемпературный реактор, 6 – нагревательный элемент, 7 – катализатор окисления отходящих газов, 8 – термопара контролирующая нагрев реактора, 9 – датчик кислорода, 10 – датчик углекислого газа, 11 – ротаметр, 12 – побудители потока воздуха, 13 – блок управления и сбора экспериментальных данных, 14 – персональный компьютер.

Получение образцов для исследований. Образцы композиционного материала, содержащего от 1 до 5 мас. % TiO_2 , получали путем введения наполнителя в расплав полимера с использованием двушнекового микрокомпаундера (DACA Instruments, США) при $200\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 10 мин. Конечный объем материала составлял 4 см^3 .

Экструдированные образцы исходного полипропилена или наполненного композитного материала в виде цилиндров диаметром 3 мм нарезами на диски толщиной 50 мкм с использованием санного микротомы PFM Slide 4003 E (Германия).

Исследование окислительной термостойкости образцов полипропилена проводили на экспериментальной установке, схема которой изображена на рис. 1. Образец полимера помещали в кварцевую лодочку (1), в которую вмонтирована термопара (2). При помощи системы перемещения (3) по программе с компьютера лодочка перемещалась в высокотемпературную область кварцевого реактора (5), где происходило окисление полимера в потоке воздуха, который

засасывался в реактор через входное отверстие (4) высокотемпературного реактора. Содержание кислорода в воздухе составляло 20.9 об. %. Реактор выполнен в виде прямой кварцевой трубки и не имел скрытых полостей, которые могли бы влиять на ламинарный поток воздуха, протекающего через реактор. Нагрев реактора осуществляется внешней печкой, позволяющей поддерживать максимальную температуру внутри реактора на уровне $750\text{ }^\circ\text{C}$. Температура внутри реактора, в который вводилась лодочка с образцом, в зависимости от его зоны составляла от 50 до $700\text{ }^\circ\text{C}$. Это позволяло осуществлять программируемый нагрев образца, помещая лодочку с образцом в различные температурные зоны реактора. В конце реактора в самой высокотемпературной зоне ($750\text{ }^\circ\text{C}$) помещен катализатор (7). Катализатор дожига представляет собой платину (1.5 мас. %) на кварцевом стекловолокне. Его роль сводится к доокислению летучих органических веществ, которые могут образоваться в процессе нагрева образца в потоке воздуха. Исходный полимер не обладает летучестью. Однако в процессе термодеструкции существует

ненулевая вероятность формирования летучих соединений с кислородом в гидроксильной, карбонильной, карбоксильной формах, требующих доокисления до углекислого газа. При многократном (на порядки) избытке кислорода и при скоростях потока газа, реализуемых в условиях эксперимента, сомневаться в количественном превращении органического вещества в углекислый газ нет оснований. Температурный режим анализа поддерживали при помощи внешнего нагревателя (6), смонтированного непосредственно на реактор (5). Состав отходящих газов после прохождения слоя катализатора дожигания — 1.5 мас. % платины на кварцевом стекловолноке (7) — непрерывно фиксировали с использованием широкополосного λ -датчика кислорода фирмы Bosh (9) и ИК-датчика углекислого газа (10). Относительное стандартное отклонение при регистрации фоновых значений воздуха, поступающего в реактор, для датчика кислорода составляло менее 2.5×10^{-3} , для датчика диоксида углерода — менее 1×10^{-2} . Скорость потока воздуха, последовательно проходящего через реактор и датчики кислорода и углекислого газа, составляла $10 \text{ см}^3/\text{с}$ и регистрировалась при помощи газового ротаметра LZB-6M (11).

Для управления введением лодочки с образцом в реактор, нагревом реактора до заданной температуры, контролем температуры нагрева реактора, контролем температуры поверхности лодочки, на которой находится исследуемый образец, показаниями датчиков кислорода и углекислого газа использовали аппаратно-программный комплекс, включающий электронный блок (13) и персональный компьютер (14). Разработанное оригинальное программное обеспечение позволило в режиме реального времени регистрировать поступающие данные с датчика температуры поверхности лодочки, датчика температуры нагрева реактора, с датчиков кислорода и диоксида углерода. Это дало возможность получать зависимости изменения концентрации кислорода и диоксида углерода в потоке воздуха, выходящего из реактора, как от времени, так и от температуры нагрева образца. Дальнейшую обработку первичных данных, представление их в графическом виде проводили с использованием пакета Sigma Plotter.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полипропилен относится к легкоокисляемым полимерам, основная потеря массы которых по данным ТГА происходит в интервале температур

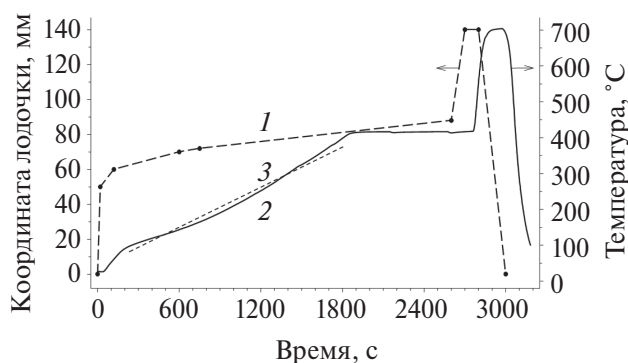


Рис. 2. Временные развертки координаты лодочки (1) и температуры поверхности лодочки с образцом (2), используемые для формирования температурного профиля нагрева образцов при изучении термодеструкции образцов исходного полипропилена (ПП) и полипропилена с добавками диоксида титана.

250–500 °C в инертной атмосфере [14–19] и 200–400 °C на воздухе [18–20]. Интенсивность и температурные границы этого процесса зависят от многих параметров, главными из которых являются состав газовой среды [18] и скорость подъема температуры [18, 20]. В случае наполненных систем появляется дополнительный фактор, влияющий на деструкцию полипропилена, — химическая природа наполнителя [14, 19].

В традиционных методах исследования полимерных материалов, таких как ТГА и ДСК, существенную роль играет изменение температуры в зависимости от времени (температурный профиль). На начальной стадии исследования применяли двухступенчатый нагрев образца. Первая ступень температуры составляла около 100 °C, вторая — 650 °C, однако в методах ТГА и ДСК используют линейный нагрев образцов. В связи с этим был сформирован алгоритм перемещения лодочки в реакторе, обеспечивающий линейный нагрев в области 50–400 °C со скоростью $\sim 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$. Линейная аппроксимация (рис. 2) дает значение $(11.6 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$. Конечная точка линейного участка нагрева составляет 400 °C. При этой температуре образец выдерживается 15 мин, затем для отжига продуктов конденсации на 3 мин перемещается в область с температурой 700 °C. Анализ газовой среды при линейном (выбранном) градиенте нагрева образца позволяет определить температуру термостойкости полимера.

Предлагаемый вариант нагрева образца отличается от традиционных схем нагрева, неподвижно размещенных внутри печи. Нагрев в градиентной печи позволяет избежать систематических погрешностей, которые возникают при

транспортировке продуктов разрушения органического вещества. Систематические погрешности могут появиться из-за сорбции органических продуктов разрушения на холодных поверхностях при их транспортировке от места нагрева до места конверсии, где эти продукты превращаются в летучие газы (CO_2 и H_2O). Очевидно, что продукты разрушения должны транспортироваться в потоке газа с температурой выше, чем температура нагрева исследуемого образца. Перемещение лодочки с образцами с помощью шагового двигателя можно организовать с высокой точностью и тем самым вводить пробу в различные температурные зоны реактора. Такой подход позволяет осуществлять как линейный нагрев образцов с небольшим градиентом температуры, так и быстрый нагрев, поскольку теплоемкость лодочки с образцом незначительная.

Аналитический сигнал непрерывно фиксируется датчиками кислорода и углекислого газа. Минимально регистрируемое количество кислорода, определяемое как площадь отрицательного пика, составляет величину 0.02 мг.

Полипропилен как типичный представитель углеводородных полимеров винильного ряда не обладает термической устойчивостью в потоке воздуха. При нагреве образцов полипропилена в потоке воздуха на описанной выше экспериментальной установке происходит его окисление, на что расходуется кислород воздуха, и появляются продукты окисления. Типичные зависимости изменения содержания кислорода от времени в потоке воздуха, выходящего из реактора при нагреве образца, для образцов исходного полипропилена и с добавками 1, 2 и 5% TiO_2 представлены на рис. 3. Типичные зависимости изменения содержания диоксида углерода от времени в потоке воздуха для тех же образцов представлены на рис. 4.

Одновременно регистрируя температуру нагрева образца в зависимости от времени, полученные экспериментальные зависимости — окситермограммы на рис. 3 и рис. 4 — можно перевести в окситермограммы зависимости аналитического сигнала от температуры, представленные на рис. 5 и 6.

На всех окситермограммах экспериментально зафиксированы два пика. На окситермограммах по кислороду два отрицательных пика, характеризующих расход кислорода при окислении полипропилена. На окситермограммах по диоксиду углерода два положительных пика,

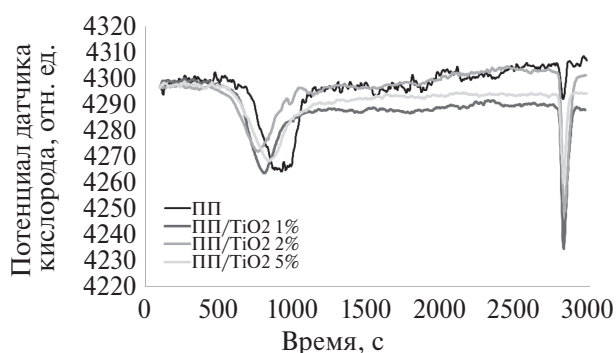


Рис. 3. Изменение содержания кислорода (отн. ед.) в потоке воздуха, выходящего из реактора, в зависимости от времени для образцов чистого полипропилена (ПП) и с содержанием 1, 2 и 5% TiO_2 .

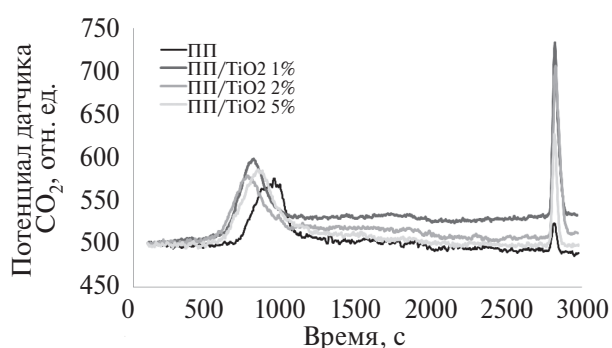


Рис. 4. Изменение содержания диоксида углерода (отн. ед.) в потоке воздуха, выходящего из реактора, в зависимости от времени для образцов чистого полипропилена (ПП) и с содержанием 1, 2 и 5% TiO_2 .

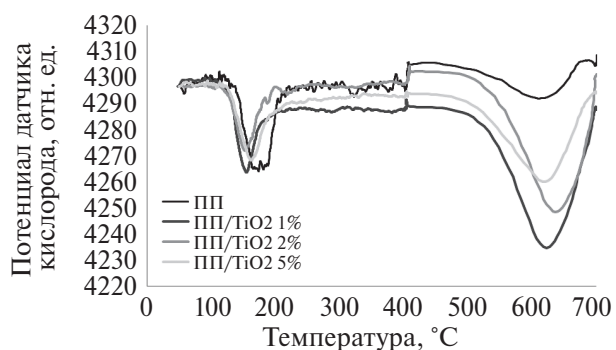


Рис. 5. Изменение содержания кислорода (отн. ед.) в потоке воздуха, выходящего из реактора, в зависимости от температуры нагрева для образцов чистого полипропилена (ПП) и с содержанием 1, 2 и 5% TiO_2 .

характеризующих появление диоксида углерода. Окситермограммы зависимости аналитического сигнала от температуры (см. рис. 5 и 6) имеют особенности построения, связанные с тем, что условия нагрева образцов для разных интервалов температур существенно отличались. Для интервала температуры от 50 до 400 °C осуществлялся линейный нагрев со скоростью около

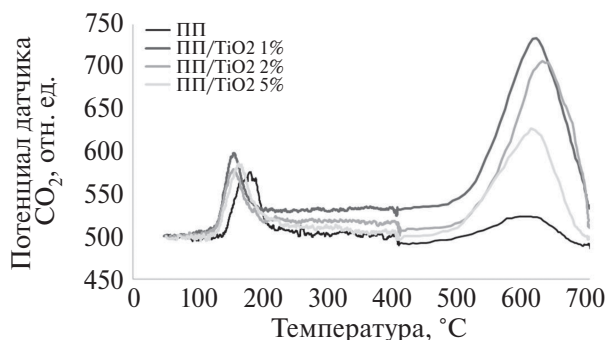
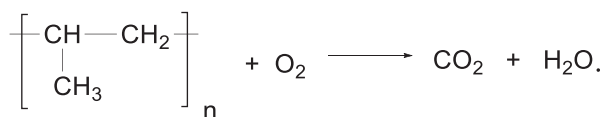


Рис. 6. Изменение содержания диоксида углерода (отн. ед.) в потоке воздуха, выходящего из реактора, в зависимости от температуры нагрева для образцов чистого полипропилена (ПП) и с содержанием 1, 2 и 5% TiO₂.

10 °С/мин. Для интервала температур от 400 до 700 °С осуществлялся ступенчатый нагрев путем быстрого введения образца в высокотемпературную зону реактора. В связи с этим некорректно сравнивать пики в низкотемпературной и высокотемпературной областях окситермограммы, поскольку скорость подъема температуры влияет на процесс термодеструкции [18, 20].

Первому (низкотемпературному) пику потребления кислорода, скорее всего, соответствует реакция окисления водородсодержащих метильных, метиленовых и метиновых фрагментов кислородом воздуха:



Кроме того, возникновение этого пика может быть обусловлено кинетическим фактором. При достижении области температур, соответствующей плавлению полимера, подвижность макромолекул радикальным образом увеличивается, что повышает вероятность процессов термодеструкции.

Наряду с реакциями глубокого окисления при взаимодействии с кислородом возможны химические взаимодействия, приводящие к образованию кратных связей, конденсированных продуктов неполного окисления (см. схему 1).

При высокой температуре они способны к глубокому окислению с формированием углекислого газа и воды. Продукты конденсации

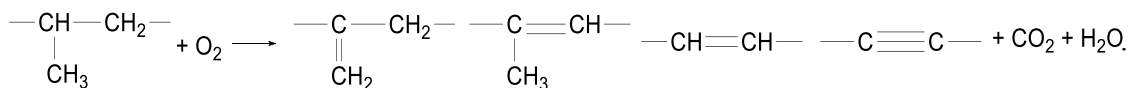


Схема 1

требуют более высокой температуры для окисления в сравнении с предшественниками, содержащими алифатические фрагменты. Протеканию такого рода реакций окисления отвечает возникновение высокотемпературного потребления кислорода.

Наличие диоксида титана способствует ускорению реакции окисления в области температур 110–180 °С. На это указывает сдвиг фронта начала окисления исходного полипропилена в область более высокой температуры по сравнению с фронтом для образцов полипропилена, содержащих диоксид титана (см. рис. 5 и 6). Кроме того, скорость окисления углеродсодержащих продуктов конденсации в его присутствии выше. Диоксид титана в области высоких температур исполняет роль катализатора глубокого окисления углеродсодержащих продуктов конденсации. Именно в этой области появляется эффект нестехиометрии, связанный с динамикой кислородной подрешетки. Эффекты, связанные с ускорением процесса окисления, скорее всего, обусловлены особенностями изменения стехиометрии титаноксидных кристаллических фаз. Известно, что оксиды титана относятся к бертоллидам – соединениям с переменной стехиометрией. Кислородная подрешетка диоксида титана в области высоких температур способна к трансформациям в зависимости от парциального давления кислорода и наличия восстановителей в окружающей газовой среде [21]. Кинетический фактор влияет на вид кривой. Это явление лежит в основе работы сенсоров, содержащих оксиды IVB группы периодической системы элементов [22]. В области низких температур подвижность кислорода, приводящая к окислению органических соединений, недостаточна для влияния на общую скорость окисления. С повышением температуры этот запрет снимается, и диоксид титана способен вносить существенный вклад в процесс глубокой деструкции полипропилена.

Для определения температуры начала разрушения образцов исходного полипропилена и полипропилена с добавками диоксида титана использовали экспериментальные кривые – окситермограммы, полученные с датчика кислорода, куда газ сразу поступает из реактора (см. рис. 5). Строго говоря, существует разница во

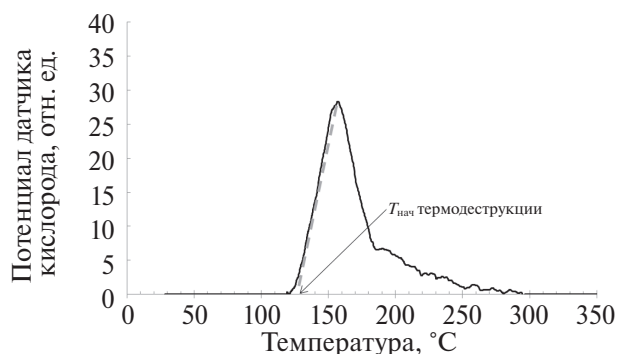


Рис. 7. Кривая, характеризующая потребление кислорода в зависимости от температуры в процессе термодеструкции полипропилена с добавкой 5% TiO_2 . Пунктиром показана прямая линия, аппроксимирующая передний фронт.

времени между регистрацией температуры образца и регистрацией аналитического сигнала датчика. Это связано с переносом газа, прореагировавшего с образцом, к датчику, который регистрирует изменения газа в потоке, выходящем из реактора. Эта разница между временем окисления и временем регистрации определяется конструкцией экспериментальной установки и расходом газа, протекающим через реактор, и может быть сведена к минимуму или учитываться при построении термоокислительных спектров. В нашем случае при расходе газа $10 \text{ см}^3/\text{с}$ и объеме камеры менее 30 см^3 , где осуществляется программируемый нагрев анализируемого образца, разница во времени составляет менее 3 с. За это время при скорости нагрева $11.6 \text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$ разница температур составляет величину, не превышающую 0.6 градуса. Эту поправку, возможно, следует вносить в термоокислительный спектр, получаемый экспериментально.

Для определения температуры начала термоокислительной деструкции использовали зависимости изменения содержания кислорода (отн. ед.) в потоке воздуха, выходящем из реактора, от температуры нагрева образца для образцов чистого полипропилена (ПП), а также полипропилена с содержанием 1, 2 и 5% TiO_2 (см. рис. 5). Эти зависимости получаются путем регистрации экспериментальных данных с датчика кислорода, который находится на выходе из высокотемпературного реактора. Необходимо далее осуществить математическую обработку этих зависимостей, провести базовые (фоновые) линии, относительно которых происходит уменьшение содержания кислорода при термодеструкции анализируемых образцов. Базовые линии соответствуют концентрации кислорода

Таблица 1. Температура, характеризующая начало процесса термоокислительной деструкции полимера

Полимер	Начальная T , $^\circ\text{C}$, по датчику кислорода	Среднее значение T , $^\circ\text{C}$, по датчику кислорода
Полипропилен	141	142
	144	
	142	
Полипропилен с добавкой TiO_2 1%	135	134
	133	
	135	
Полипропилен с добавкой TiO_2 2%	133	134
	136	
	135	
Полипропилен с добавкой TiO_2 5%	131	131
	132	
	130	

в смеси, поступающей в реактор. Выделяют информационные пики относительно базовой линии, которые характеризуют потребление кислорода при окислении полимера. Строят зависимость потребления кислорода в потоке воздуха от температуры (рис. 7 на примере полипропилена с добавкой 5% TiO_2). Прямой линией аппроксимируют передний фронт первого пика, характеризующего потребление кислорода (см. рис. 7). Точка пересечения этой линии с осью абсцисс (ось температур) определяет температуру, характеризующую начало процесса термоокислительной деструкции полимера. Такой подход к определению температуры применяется при исследовании полимеров методом термогравиметрии [23].

В табл. 1 представлены результаты обработки экспериментальных кривых, позволившие определить начальную температуру термоокислительной деструкции исследуемых образцов. Последовательно анализировали три образца чистого полипропилена, три образца полипропилена с добавкой 1% TiO_2 , три образца с добавкой 2% TiO_2 и три образца с добавкой 5% TiO_2 . Как видно из таблицы, содержание TiO_2 в полипропилене не влияет на температуру начала процесса термоокислительной деструкции. Полученные значения температуры соответствуют температуре размягчения полипропилена, которая составляет $140 \text{ }^\circ\text{C}$.

* * *

Впервые показано, что аналитический метод окситермографии пригоден для исследования полимерных материалов и способен давать

информацию о деструкции образцов [24] наряду с традиционно используемыми методами термогравиметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии. Особенностью метода окситермографии является то, что этот метод позволяет изучать образцы с небольшой массой. В данном случае начальная масса образцов составляла около 0.27 мг.

Авторы выражают благодарность Михаилу Юрьевичу Яблокову за предоставленные для исследования образцы полипропилена.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета ФГБУН “Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук”. 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. *Haines P.J.* Thermogravimetry / Thermal Methods of Analysis. Principles, Applications and Problems. Dordrecht: Springer Science Business Media, 1995. P. 22.
2. *Haines P.J., Wilburn F.W.* Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry / Thermal Methods of Analysis, Principles, Applications and problems. Dordrecht: Springer Science Business Media, 1995. P. 632.
3. *Зуев Б.К.* Способ окситермографии. Патент РФ № 2411509. Заявка № 2010101137 от 15.01.2010, опубл. 10.02.2011.
4. *Роговая И.В., Зуев Б.К., Титова Т.В., Морзухина С.В., Сараева А.Е., Филоненко В.Г.* Оптимизация условий определения органического вещества в воде “безреагентным” методом окситермографии и его применение для анализа природной воды // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71. № 10. С. 1069. (*Rogovaya I.V., Zuev B.K., Titova T.V., Morzhukhina S.V., Saraeva A.E., Filonenko V.G.* Optimization of conditions for the determination of the organic matter content of waters by reagentless oxithermography and its application to the analysis of natural waters // J. Anal. Chem. 2016. V. 71. № 10. P. 1022.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934816100117>
5. *Зуев Б.К., Филоненко В.Г., Нестерович Д.С., Поликарпова Р.Д.* Определение гиалуроновой кислоты в водных растворах с использованием воздуха в качестве окислителя // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 10. С. 763. (*Zuev B.K., Filonenko V.G., Nesterovich D.S., Polikarpova P.D.* Determination of hyaluronic acid in aqueous solutions using air as an oxidant // J. Anal. Chem. 2018. V. 73. № 10. P. 973.)
<https://doi.org/10.1134/S106193481810013>
6. *Зуев Б.К., Коваленко Е.В., Кульбачевская Е.В., Оленин А.Ю., Ягов В.В.* Определение концентрации нефтепродуктов и масел в пленках на поверхности воды с помощью твердоэлектродного анализатора // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56. № 5. С. 543. (*Zuev B.K., Kovalenko V.V., Kul'batchevskaya E.V., Olenin A.Yu., Yagov V.V.* Determination of the concentration of petroleum products and oils in films at the surface of water using a solid-electrolyte analyzer // J. Anal. Chem. 2001. V. 56. № 5. P. 481.)
<https://doi.org/10.1023/A:1016691423009>
7. *Зуев Б.К., Поликарпова П.Д., Филоненко В.Г., Коротков А.С., Сараева А.Е.* Пробоотбор и определение гиалуроновой кислоты на иммитаторе кожи человека методом окситермографии // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 4. С. 315. (*Zuev B.K., Polikarpova P.D., Filonenko V.G., Korotkov A.S., Saraeva A.E.* Sampling and determination of hyaluronic acid on a human skin imitator by oxithermography // J. Anal. Chem. 2019. V. 74. № 4. P. 410.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934819030134>
8. *Зуев Б.К., Новичков Р.В., Александрова Е.О., Оленин А.Ю.* Получение и исследование состава поверхностного слоя химически модифицированных наночастиц диоксида кремния // Российские нанотехнологии. 2015. Т. 10. № 1–2. С. 45. (*Zuev B.K., Novichkov R.V., Alexandrova E.O., Olenin A.Yu.* Preparation and study of the surface-layer composition of chemically modified silica nanoparticles // Russ. Nanotechnol. 2015. V. 10. № 1–2. P. 53.)
<https://doi.org/10.1134/S1995078015010218>
9. *Александрова Е.О., Новичков Р.В., Оленин А.Ю., Зуев Б.К.* Формирование и исследование методом окситермографии привитого поверхностного слоя на частицах диоксида кремния // Журн. физ. химии. 2017. Т. 91. № 3. С. 513. (*Aleksandrova E.O., Novichkov R.V., Olenin A.Yu., Zuev B.K.* Formation of grafted surface layers on silicon dioxide particles and their investigation by means of thermoprogrammed oxidation // Russ. J. Phys. Chem. A. 2017. V. 91. № 3. P. 555.)
<https://doi.org/10.1134/S0036024417030013>
10. *Зуев Б.К., Роговая И.В., Ларкович Р.В.* Определение труднолетучих смолистых веществ в составе бензинов различных марок методом термоокислительной спектроскопии – окситермографии // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75. № 9. С. 792. (*Zuev B.K., Rogovaya I.V., Larkovich R.V.* Determination of poorly volatile resinous substances in the composition of gasolines of different brands by thermal

- oxidation spectroscopy—oxythermography // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 9. P. 1147.)
<https://doi.org/10.1134/S106193482009018X>
11. Зуев Б.К., Дворкин В.И., Филоненко В.Г., Михайлова А.В., Бубнова И.А. Высокотемпературный сенсорный анализатор: определение труднолетучих органических примесей в растворителях // *Журн. аналит. химии.* 2007. Т. 62. № 9. С. 1000. (Zuev B.K., Dvorkin V.I., Filonenko V.G., Mikhailova A.V., Bubnova I.A. A High-temperature sensor analyzer: determination of difficult volatile organic impurities in solvents // *J. Anal. Chem.* 2007. V. 62. № 9. P. 903.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934807090171>
 12. Зуев Б.К., Оленин А.Ю. Твердоэлектродный датчик как детектор для газохроматографического определения горючих примесей в воздухе // *Журн. аналит. химии.* 2006. Т. 61. № 2. С. 157. (Zuev B.K., Olenin A.Yu. Solid electrolyte sensor as a detector for gas chromatographic determination of combustible contaminants in air // *J. Anal. Chem.* 2006. V. 61. № 2. P. 147.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934806020109>
 13. Севастьянов В.С., Галимов Э.М., Бабулевич Н.Е., Тюрина Е.Н., Аржанников А.А. Оптимизация работы твердоэлектродной ячейки на основе диоксида циркония в качестве окислительного реактора и хромотографического датчика // *Электрохимия.* Т. 45. № 6. 2009. С. 705. (Sevast'yanov V.S., Galimov E.M., Babulevich N.E., Tyurina E.N., Arzhannikov A.A. Optimizing zirconia-based solid electrolyte cell operated as oxidizing reactor and chromatographic sensor // *Russ. J. Electrochem.* 2009. V. 45. № 6. P. 662.
<https://doi.org/10.1134/S102319350906007X>)
 14. Abbas-Abadi M.S., Van Geem K.M., Fathi M., Bazgir H., Ghadiri M. The pyrolysis of oak with polyethylene, polypropylene and polystyrene using fixed bed and stirred reactors and TGA instrument // *Energy.* 2021. V. 232. Article 121085.
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.121085>
 15. Mat-Shayuti M.S., Abdullah M.Z., Megat-Yusoff P.S.M. Thermal properties and morphology of polypropylene/polycarbonate/polypropylene-graft-maleic anhydride blends // *MATEC Web Conf.* 2016. V. 6. № 4. Article 03001.
<https://doi.org/10.1051/mateconf/20166903001>
 16. Nguyen T.A., Ichise S., Kinashi K., Sakai W., Tsutsumi N., Okubayashi S. Spin trapping analysis of the thermal degradation of polypropylene // *Polym. Degrad. Stabil.* 2022. V. 197. Article 109871.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.109871>
 17. Wang K., Addiego F., Bahlouli N., Ahzi S., Rémond Y., Toniazzo V., Muller R. Analysis of thermomechanical reprocessing effects on polypropylene/ethylene octene copolymer blends // *Polym. Degrad. Stabil.* 2012. V. 97. № 8. P. 1475.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.005>
 18. Esmizadeh E., Tzoganakis C., Mekonnen T.H. Degradation behavior of polypropylene during reprocessing and its biocomposites: Thermal and oxidative degradation kinetics // *Polymers.* 2020. V. 12. № 8. Article 1627.
<https://doi.org/10.3390/polym12081627>
 19. Naseem S., Wießner S., Kühnert I., Leuteritz A. Layered double hydroxide (MgFeAl-LDH)-based polypropylene (PP) nanocomposite: Mechanical properties and thermal degradation // *Polymers.* 2021. V. 13. № 19. Article 3452.
<https://doi.org/10.3390/polym13193452>
 20. Furushima Y., Ota R., Ohkawa T. Isothermal thermogravimetric method using a fast scanning calorimeter and its application in the isothermal oxidation of nanogram-weight polypropylene // *Thermochim. Acta.* 2020. V. 694. Article 178804.
<https://doi.org/10.1016/j.tca.2020.178804>
 21. Isaac N.A., Pikaar I., Biskos G. Metal oxide semiconducting nanomaterials for air quality gas sensors: operating principles, performance, and synthesis techniques // *Microchim. Acta.* 2022. V. 189. № 5. Article 196.
<https://doi.org/10.1007/s00604-022-05254-0>
 22. Tian X., Cui X., Lai T., Ren J., Yang Z., Xiao M., Wang B., Xiao X., Wang Y. Gas sensors based on TiO₂ nanostructured materials for the detection of hazardous gases: A review // *Nano Mater. Sci.* 2021. V. 3. № 4. P. 390.
<https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2021.05.011>
 23. ГОСТ Р 56721-2015 Пластмассы. Термогравиметрия полимеров. М.: Стандартинформ, 2016. 9 с.
 24. Зуев Б.К. Способ исследования органических веществ, преимущественно характеристик окислительной термодеструкции органических полимеров. Патент РФ № 2794417. Заявка № 2022115230 от 06.06.2022, опубл. 17.04.2023.

OXYTHERMOGRAPHY FOR EXPLORING THE THERMAL STABILITY OF POLYMER MATERIALS: A NOVEL ANALYTICAL APPROACH

B. K. Zuev^a, A. E. Zaitseva^a, A. S. Korotkov^a, V. G. Filonenko^a, I. V. Rogovaya^{a, *}

*^aVernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry,
Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia
e-mail: smile_mail@mail.ru

Abstract. The control of oxygen and carbon dioxide concentrations in an airflow released from a reactor, in which a sample is heated, can be used to investigate the thermal stability of polymer materials. This approach, known as oxithermography, involves analyzing experimental data (oxithermograms), representing the variation in oxygen concentration decrease and carbon dioxide appearance in an airflow with changing temperature conditions. This method allows for monitoring the effect of fillers introduced into polymer compositions on their thermal stability. The application of oxithermography to studying oxidative thermostability is demonstrated using pure polypropylene and polypropylene with titanium dioxide admixtures as examples.

Keywords: gas control in airflow, oxithermography, polypropylene, titanium dioxide, filled polymers, air oxidation, thermal stability, thermal analysis.

УДК 543.544

ПРИМЕНЕНИЕ ШИПУЧИХ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВЕ МАГНИТНОГО УГЛЯ ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИХЛОРФЕНОКСИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ–МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ПОЧВЕ И ПРИРОДНЫХ ВОДАХ

© 2024 г. К. С. Сышко^{a, b}, А. С. Губин^{a, *}, П. Т. Суханов^a, А. А. Кушнир^a

^aВоронежский государственный университет инженерных технологий,
просп. Революции, 19, Воронеж, 394036 Россия

^bСеверо-Кавказский федеральный университет,
ул. Пушкина, 1, Ставрополь, 355017 Россия

*E-mail: goubinne@mail.ru

Поступила в редакцию 07.08.2023 г.

После доработки 09.09.2023 г.

Принята к публикации 13.09.2023 г.

Предложен способ получения шипучих таблеток, состоящих из магнитного угля, винной кислоты, карбоната и гидрокарбоната натрия, и их применения для сорбции дихлорфеноксикарбонновых кислот (ДХФК) – 2,4-дихлорфеноксиуксусной, 2,4-дихлорфеноксипропионовой и 2,4-дихлорфеноксимасляной кислот и их метаболитов – 2,4-дихлорфенола и 4-хлорфенола. Таблетки погружали в анализируемый раствор с нейтральной реакцией среды. Для анализа почв проводили экстрагирование раствором щелочи с последующей нейтрализацией экстракта. После завершения выделения CO₂ сорбент извлекали неодимовым магнитом и десорбировали аналиты ацетоном. Ацетоновый экстракт упаривали в токе азота и концентрат анализировали методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии. Способ апробировали на модельных системах – образцах речной воды и типичного чернозема, которые искусственно загрязняли ДХФК и хлорфенолами (ХФ). При анализе речных вод пределы определения ДХФК составили 0.7–0.9 мкг/л, ХФ – 40 нг/л. В почвах предел определения составляет 3–4 и 0.1 мкг/кг для ДХФК и ХФ соответственно.

Ключевые слова: магнитная шипучая таблетка, магнитный уголь, дихлорфеноксикарбонновые кислоты, хлорфенол, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, определение.

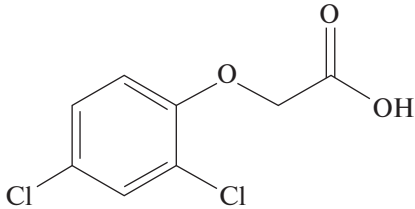
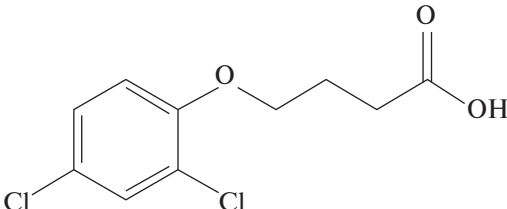
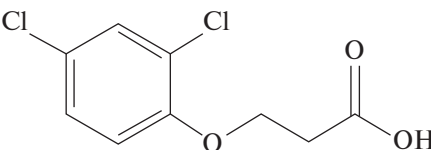
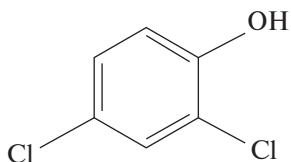
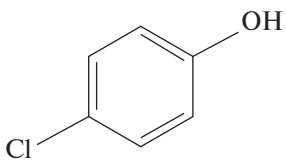
DOI: 10.31857/S0044450224070088, **EDN:** TNKYWY

Пестициды применяют во всем мире для защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков [1]. За последние десятилетия их потребление в сельском хозяйстве увеличилось более чем в 1.5 раза при ежегодном расходе до 2 млн т [1, 2]. Для человека и окружающей среды они являются наиболее опасными токсикантами [3]. В зависимости от действия на биологические объекты их подразделяют на инсектициды, родентициды, гербициды и фунгициды [4].

2,4-Дихлорфеноксиуксусная (2,4-Д), 2,4-дихлорфеноксимасляная (2,4-ДМ) и 2,4-дихлор-

феноксипропионовая (2,4-ДП) кислоты – гербициды ауксинового типа на основе хлорфеноксиалканкарбоновой кислоты (табл. 1) для борьбы с однолетними и некоторыми многолетними двудольными сорными растениями [7]. Их применяют также в качестве консервантов для фруктов и овощей для увеличения сроков хранения [8]. Наиболее широкое применение как в России, так и за рубежом находят 2,4-Д, ее соли и сложные эфиры [9]. С поверхности почвы 2,4-Д проникает вглубь, загрязняя подземные и поверхностные воды. Кроме того, 2,4-Д попадает

Таблица 1. Константы кислотной диссоциации (pK_a)*, структурные формулы дихлорфеноксикарбоновых кислот и их метаболитов, предельно допустимые концентрации в водных объектах рыбохозяйственного значения (ПДК₁) [5] и в воде водоемов (ПДК₂) [6]

Вещество	Формула	pK_a	ПДК ₁ , мг/л	ПДК ₂ , мг/л
2,4-Д		2.65	0.004	0.1
2,4-ДМ		4.95	–	0.002
2,4-ДП		3.10	–	0.02
2,4-ДХФ		7.89	0.0001	0.002
4-ХФ		9.45	–	0.01

*Приведены по данным <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

в окружающую среду в результате сброса сточных вод промышленных предприятий [10]. Даже на уровне микроколичеств дихлорфеноксикарбоновые кислоты (ДХФК) в организме могут вызвать эндокринные нарушения, повреждение почек, печени, дегенеративные изменения в центральной нервной системе, онкологические заболевания и относятся 2В группе потенциальных канцерогенов [11, 12].

Дихлорфеноксикарбоновые кислоты могут накапливаться в почве и иле с длительным периодом деградации в них [13]. В природной среде ДХФК разлагаются с образованием стабильных, токсичных метаболитов – хлорфенолов (ХФ): 2,4-дихлорфенола (2,4-ДХФ) или 4-хлорфенола

(4-ХФ) [14]. Содержание ДХФК и ХФ нормируется в России в водных объектах рыбохозяйственного назначения [5] и воде водоемов [6] (табл. 1).

Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (ДЖЖМЭ) – современный метод микроэкстракционного концентрирования органических образцов, разработанный в 2006 г. и основанный на экстракции аналитов микроэмульсией экстрагента [15, 16]. Классический вариант ДЖЖМЭ включает диспергирование в растворителе и последующее извлечение. Присутствие диспергатора или дополнительного источника энергии может уменьшить степень извлечения аналита, снизить эффективность

экстракции, поэтому их применение ограничено в полевых условиях [17, 18].

Микроэкстракция на основе шипучих таблеток (ШТ) – способ предварительной пробоподготовки образцов, не требующий применения диспергирующего растворителя или дополнительного источника энергии (например, обработки ультразвуком, нагрева, перемешивания) [18]. Впервые этот способ описан в 2014 г. Лазарте-Арагонес с соавт. [19] и применен для извлечения гербицидов (прометон, тербуметон, секбуметон, прометрин и др.) из воды [19]. Диспергирование экстрагента основано на выделении CO_2 при кислотной реакции при помещении ШТ в водный раствор. Для протекания реакции в таблетку включают источник CO_2 (агент) и кислоту. При растворении таблетки CO_2 поднимается со дна сосуда, при этом адсорбент/экстрагент быстро и эффективно диспергируется, массоперенос аналитов в акцепторную фазу ускоряется, и тем самым время, затрачиваемое на извлечение, сокращается [20, 21].

Способ применен для определения фармацевтических препаратов [17], фенольных ксеноэстрогенов [18, 22], эндогенных стероидов [23], полициклических ароматических углеводородов [20, 24, 25], синтетических пестицидов [26, 27], антипиренов [28], фталевой кислоты [29], катионов металлов [21, 30], бензоилмочевины [31] в образцах воды [17, 18, 25, 27, 28, 30, 31], растений [21], биологических жидкостях [23], пищевых продуктах (молоко, мясо, чай) [20, 22, 24, 26, 28, 29].

Ограничением применения ДЖЖМЭ в анализе является необходимость отделения экстрагента, которое обычно проводят центрифугированием [27]. Для исключения этой стадии и сокращения времени пробоподготовки при анализе сложных матриц, содержащих следовые количества поллютантов, применяют магнитную экстракцию, основанную на суперпарамагнетизме магнитных наночастиц (МНЧ), в качестве которых наиболее часто применяют наночастицы магнетита [32, 33].

Микроэкстракция на основе магнитных ШТ позволяет извлекать аналиты в полевых условиях. Магнитные ШТ стабильны при хранении, поскольку кислые и основные соли в безводной среде не взаимодействуют друг с другом, а МНЧ могут быть в дальнейшем регенерированы.

Пористые активные угли (АУ), содержащие МНЧ, обладают большей удельной

поверхностью, являются более эффективными сорбентами, по сравнению с традиционными МНЧ [18]. Для получения АУ перспективно применять органическое сырье на основе доступных сорбционных материалов, полученных из вторичных материалов сельского хозяйства, например шелухи риса (РШ) – наружной оболочки рисового зерна, удаляемой в процессе шелушения [34].

Цель настоящей работы – разработка алгоритма применения шипучих таблеток на основе магнитного угля для концентрирования ДХФК и их метаболитов из реальных объектов и последующий анализ концентратов методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии (ГХ-МС).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приборы и реактивы. Для сжигания РШ применяли муфельную печь ПМ-10 (ОАО “Электроприбор”, Россия). Уголь измельчали в планетарной мельнице Pulverisette 5 classic line (Fritsch, Германия), озвучивание проводили в ультразвуковой ванне Branson (США). Для установления сорбционных характеристик готовили растворы из стандартных образцов 2,4-D (ГСО 9105-2008, Эколан, Россия) и препаратов 2,4-DP, 2,4-DM, 2,4-DCP и 4-CP, содержащих не менее 98% чистого вещества (Merck, США). Подкисление или подщелачивание проб проводили растворами HCl или NaOH ч. д. а. (Ленреактив, Россия). Аналиты десорбировали ацетоном ч. д. а. (Ленреактив, Россия). Использовали также $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ос. ч. (Merck, США) и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ч. д. а. (Ленреактив, Россия). Для изготовления таблеток применяли винную кислоту, карбонат и гидрокарбонат натрия ч. д. а. (Ленреактив, Россия). Дзета-потенциал измеряли на анализаторе Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Характеристики синтезированных сорбентов устанавливали на оборудовании, описанном в работе [35].

Синтез магнитного сорбента на основе угля из рисовой шелухи ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$) [36]. Рисовую шелуху сжигали в муфельной печи (~600 °С с доступом кислорода). Полученный АУ (10 г) измельчали в течение 40 мин при 250 об/мин в лабораторной планетарной мельнице шарами из оксида циркония (300 г) диаметром 2 мм. Навеску измельченного АУ (3.3 г) помещали в нагретую до 70 °С колбу с деионизованной водой емк. 200 мл. На смесь 10 мин воздействовали ультразвуком, добавляли 2.7 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 1.4 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

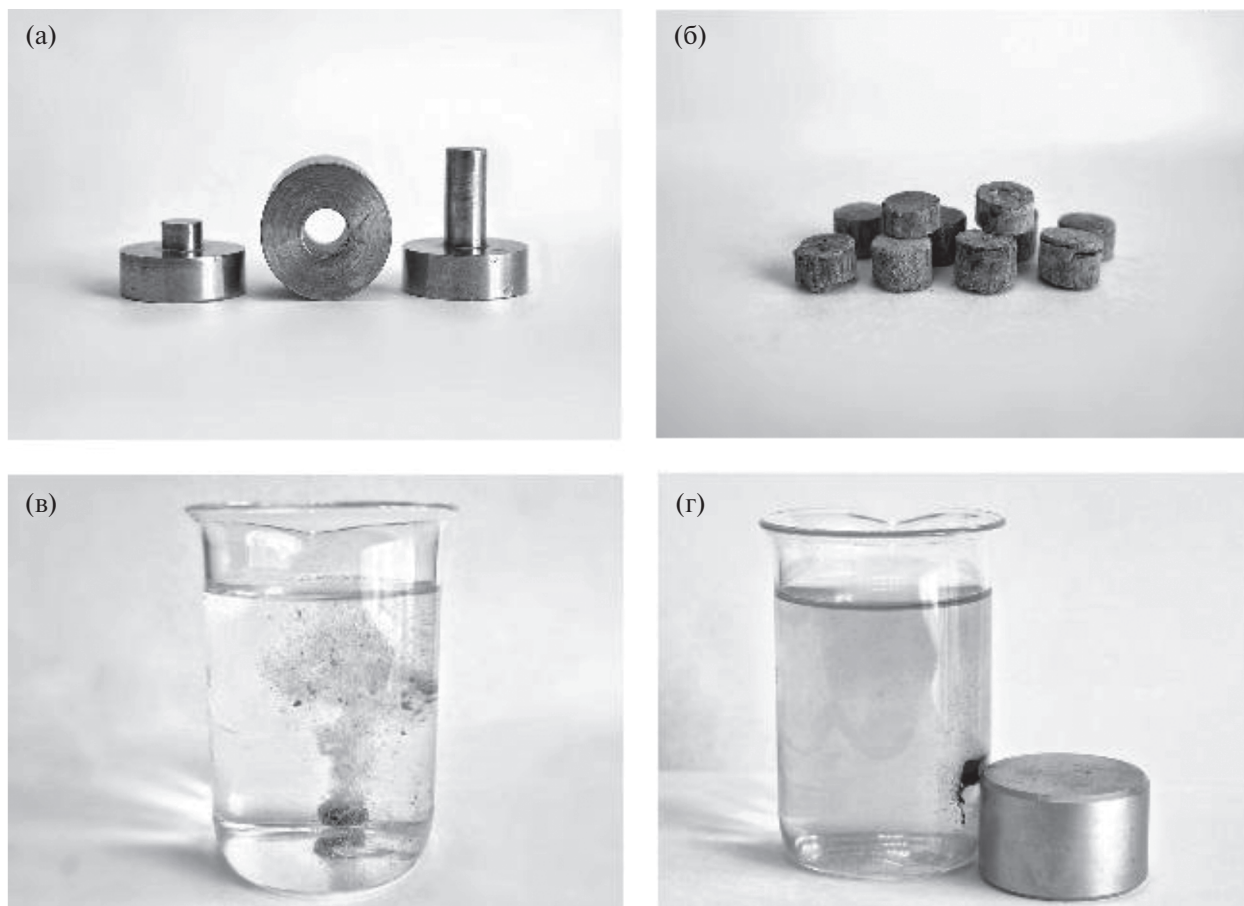


Рис. 1. Приготовление и применение шипучих таблеток для сорбции дихлорфеноксикарбоновых кислот и хлорфенолов: (а) формы для прессования таблеток, (б) внешний вид таблеток на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$, (в) растворение и перемешивание за счет выделения CO_2 , (г) извлечение $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$ неодимовым магнитом после сорбционного концентрирования.

включали мешалку (500 об/мин), постепенно добавляя 25%-ный раствор аммиака до pH 11, и 2 ч перемешивали. Полученный $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$ промывали деионизованной водой до нейтральной реакции среды промывных вод и консервировали в бидистиллированной воде. Получили сорбент $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$ со следующими характеристиками: средний размер магнитного ядра: 14 нм, средний размер частиц сорбента: 1.5–2.0 мкм, удельная площадь поверхности сорбента: 892 м²/г, объем пор: 0.29 см³/г, средний диаметр пор: 2.24 нм, намагниченность насыщения: 7–10 э.м.е./г. Величины предельной сорбции 2,4-Д, 2,4-ДП, 2,4-ДМ, 2,4-ДХФ, 4-ХФ составляют соответственно 318, 352, 382, 512 и 482 мг/г [36].

Получение шипучих таблеток. Для получения ШТ применяли смесь сорбента $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$ с винной кислотой, карбонатом и гидрокарбонатом натрия в различных соотношениях (табл. 2). Состав ШТ после их полного растворения в воде должен обеспечивать pH ~ 3.0 (рK_a ДХФК

составляет от 2.69 до 4.95, табл. 1) и максимально длительное выделение CO_2 . Таблетки прессовали вручную, используя шаблон (рис. 1а), внешний вид ШТ представлен на рис. 1б. Параллельно аналогично готовили ШТ из немагнитного угля: смешивали измельченный сразу после сжигания уголь с винной кислотой, карбонатом и гидрокарбонатом натрия в соотношениях, указанных в табл. 2. Стадии растворения ШТ представлены на рис. 1в, г.

Подготовка модельных проб для анализа. Природную воду пропускали через тefлоновый фильтр с размером пор 22 мкм, отбирали 20 мл пробы и вводили известное количество вещества ДХФК и ХФ. Пробу подкисляли или подщелачивали до pH 7.0. Пробу почвы высушивали до воздушно-сухого состояния. Отбирали 20 г и добавляли 20 мл 0.1 М раствора КОН, перемешивали 10 мин, отделяли раствор и подкисляли его конц. HCl до pH 7.0.

Таблица 2. Состав шипучих таблеток, продолжительность выделения CO_2 (t , с) и pH раствора после сорбции

№	Состав таблетки, г				t , с	pH
	$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$	винная кислота	$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	NaHCO_3		
1	0.02	0.45	0.20	0.25	339	4.07
2		0.49	0.20	0.22	318	3.84
3		0.54	0.20	0.17	308	3.72
4		0.57	0.20	0.15	296	3.52
5		0.61	0.20	0.12	257	3.39

Установление продолжительности сорбции. К нейтральному раствору аналитов добавляли одну таблетку, ожидали до ее полного растворения и прекращения выделения CO_2 . Строили зависимости площади хроматографических пиков от времени сорбции. Для десорбции аналитов использовали 1 мл ацетона. Масса углеродного сорбента составляла 0.02 г (установлена в работе [36]).

Определение аналитов методом ГХ-МС. Пробы анализировали методом ГХ-МС с применением хроматографа Agilent 7890B GC System с детектором масс Agilent 5977A MSD (Agilent Technologies, США) при следующих условиях: объем пробы: 1.0 мкл, деление потока: 30:1, неполярная колонка: HP-5MS UI (30 м × 0.250 мм × 0.25 мкм), неподвижная фаза: (5% фенил)метилполисилоксан, газ-носитель: гелий (1.0 мл/мин), температура узла ввода пробы: 270 °С, температура источника ионов масс-детектора: 250 °С, электронная ионизация с энергией электронов 70 эВ. Сканирование проводили по полному ионному току; диапазон масс: m/z 35–650 а.е.м.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Состав шипучих таблеток выбирали таким образом, чтобы обеспечить максимально длительное выделение CO_2 и кислую реакцию среды (pH~3) при растворении таблетки. При этом учитывали, что для концентрирования с применением ШТ необходима нейтральная реакция исходного раствора. В щелочных растворах (pH > 7.5) снижается выделение CO_2 и ухудшаются условия перемешивания. Таблетка сразу погружается на дно сосуда, где долго и медленно выделяет пузырьки газа, раствор перемешивается неэффективно. При pH > 9.0 таблетка не растворяется, CO_2 практически не выделяется. В кислых растворах (pH < 6) происходит слишком быстрое выделение CO_2 . Газ интенсивно

выделяется в поверхностном слое пробы, где сразу растворяется таблетка. Нижние слои не перемешиваются, эффективность сорбции снижается.

Динамика растворения ШТ в нейтральной среде наиболее благоприятна для перемешивания, массообмена и создания значений pH, необходимых для эффективного извлечения аналитов. На первой стадии (10–15 с) таблетка плавает в верхней части раствора (рис. 1в). Ее положение на поверхности поддерживается некоторое время за счет интенсивного выделения CO_2 . В следующие 20–60 с таблетка распадается на крупные фрагменты, которые постепенно оседают на дно, распадаясь на более мелкие части. Интенсивность выделения CO_2 постепенно снижается. Частицы погружаются на дно и полностью растворяются в течение 3 мин, выделяющийся газ распределяется по всему объему пробы.

Следует отметить важное значение солей винной кислоты, образующейся при растворении таблетки. Перемешивание с применением CO_2 менее интенсивно, чем было бы при использовании механического перемешивания, однако образующиеся тартраты высаливают извлекаемые вещества [37] и эффективность сорбции с применением ШТ остается практически такой же, как и при перемешивании с использованием мешалки в отсутствие высаливателя.

Сорбция с применением магнитных шипучих таблеток. Степень извлечения 2,4-Д, 2,4-ДП и 2,4-ДМ при сорбции с применением ШТ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$ составляет 85, 87 и 91% соответственно (рис. 2а). Степени извлечения ХФ достигают 98 и 99% для 4-ХФ и 2,4-ДХФ соответственно. Такие условия достигаются при продолжительности сорбции 5 мин и составе ШТ, включающем 0.02 г $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$, 0.20 г карбоната натрия, 0.57 г винной кислоты и 0.15 г гидрокарбоната натрия (табл. 2). Другие составы ШТ обеспечивают более низкие степени извлечения.

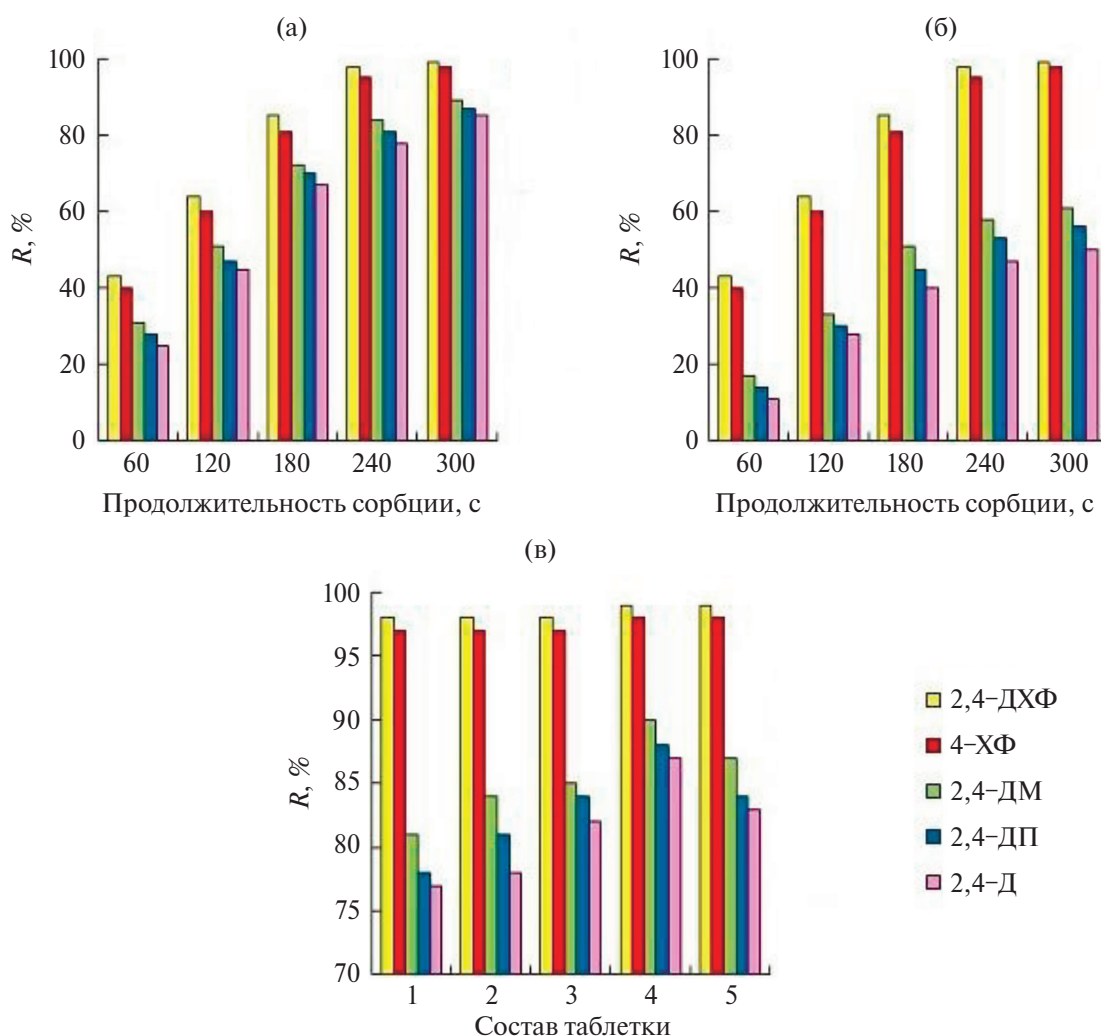


Рис. 2. Степень извлечения (R , %) дихлорфеноксикарбоновых кислот и хлорфенолов в зависимости от продолжительности сорбции углем (а) с магнитными и (б) без магнитных свойств и (в) от состава таблеток (номера соответствуют составу, приведенному в табл. 1).

Наиболее эффективна сорбция при применении ШТ состава № 4 (табл. 2). Соответствующее соотношение компонентов обеспечивает наилучшее сочетание продолжительности выделения углекислого газа (296 с, что приблизительно соответствует ранее установленному времени достижения равновесия [36]), и достижение реакции среды с pH 3.52. Таблетка, при растворении которой реакция среды оказывается более кислой (состав № 5), характеризуется меньшим временем выделения газа, что влияет на сорбционные характеристики – степени извлечения ДХФ снижаются на 2–3%. Составы № 1–3, обеспечивающие более длительное выделение CO_2 , характеризуются более высоким значением pH . В результате происходит менее интенсивное выделение CO_2 . В дополнение к этому менее кислая среда способствует более полной ионизации и повышению растворимости ДХФК. Оба фактора

приводят к снижению извлечения на 3–9%. На сорбцию ХФ изменение состава таблеток существенно не влияет, разница в степенях извлечения не превышает 1–2% (рис. 2в).

Влияние заряда поверхности и магнитного ядра на сорбцию. Наличие магнитного ядра практически не влияет на извлечение ХФ (рис. 2а, б). Однако эта характеристика сорбента существенно влияет на сорбцию ДХФК. Это обусловлено тем, что ядро из магнетита определяет положительный заряд поверхности сорбента при $pH < 5.0$ [38]. В состав сорбента также входит SiO_2 , который всегда присутствует в РШ в значительных количествах и также сообщает незначительный положительный заряд поверхности сорбента при $pH < 5.0$ [34]. Измерения ζ -потенциала сорбента Fe_3O_4/C показали, что при $pH < 4.8$ его поверхность имеет положительный заряд,

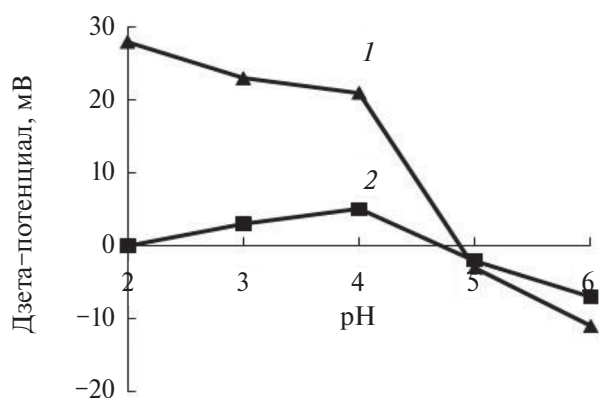


Рис. 3. Зета-потенциал сорбента Fe₃O₄/C (1) и угля (2), полученного по аналогичному алгоритму из рисовой шелухи.

достигающий максимального значения при pH 2.0–4.0 (рис. 3). Полученные данные согласуются с кривыми ζ -потенциала SiO₂ и Fe₃O₄ [38, 39]. Таким образом, в указанном интервале pH извлечение ДХФК может происходить не только за счет образования водородных связей, но и за счет электростатических взаимодействий ионизированных карбоксильных групп с положительно заряженной поверхностью. Хлорфенолы находятся в протонированной форме при pH < 5.0, поэтому заряд поверхности не влияет существенно на их извлечение.

Определение дихлорфеноксикарбоновых кислот и их метаболитов в водах и почвах. Наибольшие матричные эффекты наблюдаются при анализе

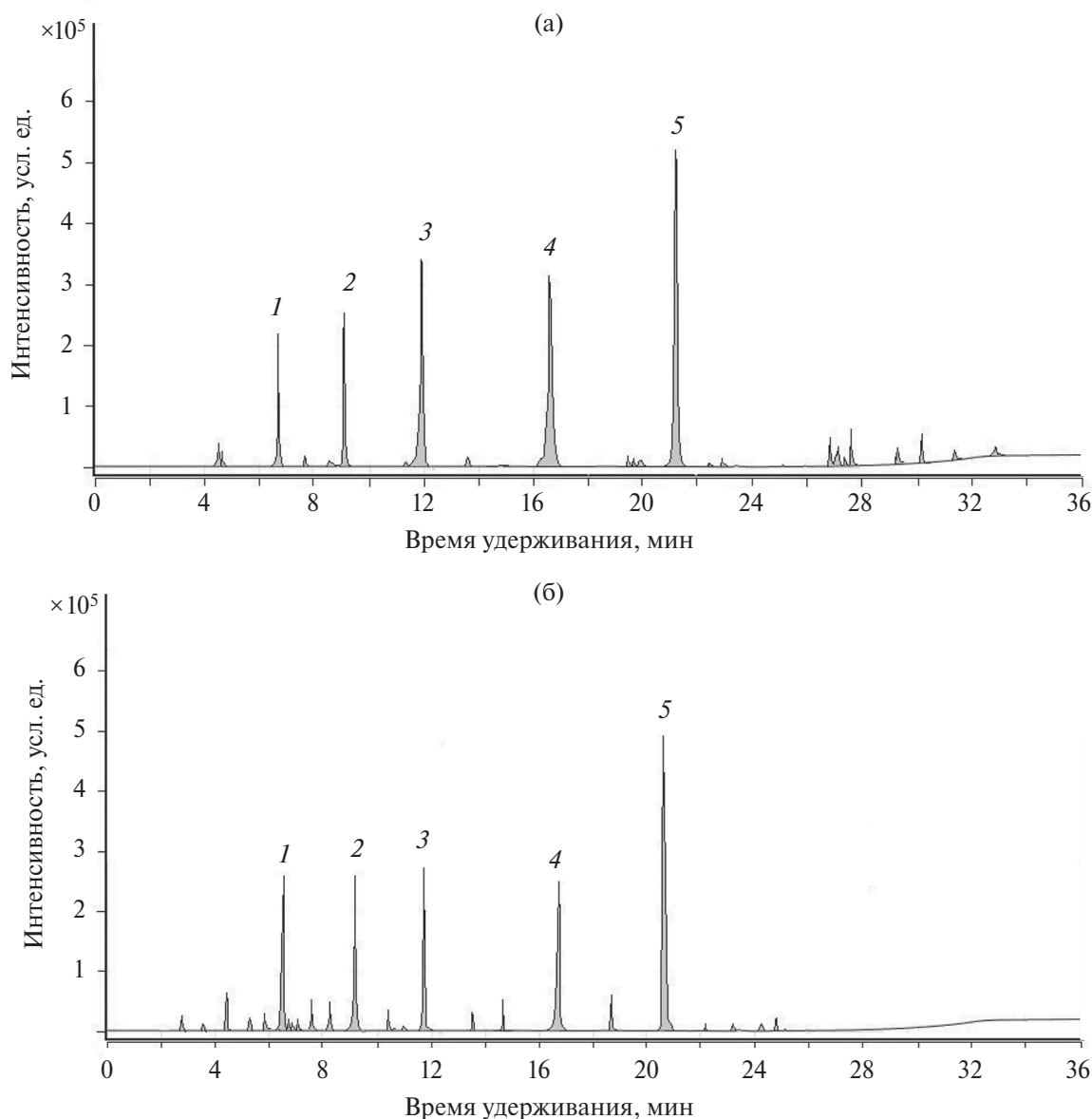


Рис. 4. Хроматограмма модельного образца (а) речной воды и (б) почвы, загрязненных дихлорфеноксикарбоновыми кислотами и хлорфенолами. Идентификация пиков: 1 – 4-ХФ; 2 – 2,4-ДХФ; 3 – 2,4-Д; 4 – 2,4-ДП; 5 – 2,4-ДМ.

Таблица 3. Результаты определения дихлорфеноксикарбоновых кислот и хлорфенолов в модельных образцах природных вод методом введено–найдено ($n = 3$, $P = 0.95$)

Вещество	Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л	s_r , %	$c_{\text{мин}}$, мкг/л	c_n , мкг/л	r^2	Диапазон линейности, мкг/л
2,4-Д	1	0.84 ± 0.18	9.0	0.2	0.7	0.996	0.7–100
	5	4.8 ± 0.6	4.7				
	10	9.9 ± 0.7	2.9				
2,4-ДП	1	0.82 ± 0.20	9.2	0.3	0.9	0.997	0.9–100
	5	4.8 ± 0.7	5.0				
	10	9.8 ± 0.9	3.1				
2,4-ДМ	1	0.81 ± 0.21	9.3	0.3	0.9	0.995	0.9–100
	5	4.8 ± 0.7	4.9				
	10	9.5 ± 0.9	3.2				
4-ХФ	0.1	0.092 ± 0.023	10.2	0.01	0.04	0.998	0.04–1.2
	0.5	0.47 ± 0.07	6.1				
	1.0	0.98 ± 0.10	3.9				
2,4-ДХФ	0.1	0.094 ± 0.021	9.8	0.01	0.04	0.998	0.04–1.1
	0.5	0.49 ± 0.06	5.7				
	1.0	0.96 ± 0.07	3.3				

почв (рис. 4). Поскольку в качестве модельной среды применяли типичный чернозем, при щелочной экстракции, помимо 2,4-Д, 2,4-ДП и 2,4-ДМ и ХФ, извлекаются продукты микробиологического распада гуминовых (ГК) и фульвокислот (ФК). Чаще всего это фенолкарбоновые кислоты, которые осложняют определение и (в отличие от гуминовых и фульвокислот) не могут быть частично удалены при пробоподготовке путем фильтрования или отстаивания [9]. Благодаря сложной структуре ГК и ФК их микробиологическая деградация сводится к образованию нескольких десятков более простых веществ фенольной природы. При их фрагментации образуется большое количество ионов с отношением m/z , совпадающим со значениями для характеристических ионов ДХФК и ХФ. На хроматограмме фенолкарбоновые кислоты проявляются в виде множества малоинтенсивных пиков с временем удерживания 2–14 мин (рис. 4б). В водах определению мешают нефтепродукты (в почвах, используемых для сельскохозяйственных целей, содержание нефтепродуктов обычно ниже предела определения). В выбранных условиях хроматографирования пики с временем удерживания в диапазоне 22–34 мин малоинтенсивны, соответствуют нефтепродуктам (рис. 4а) и практически не мешают определению целевых компонентов.

Концентрирование с применением ШТ в сочетании с ГХ-МС достаточно для определения в одной пробе 2,4-Д, 2,4-ДП, 2,4-ДМ на уровне нескольких мкг/л, 4-СР и 2,4-ДСР – на уровне десятков нг/л, что соответствует содержанию 2,4-Д, 2,4-ДП, 2,4-ДМ, 4-СР и 2,4-ДСР в воде и почвах после внесения соответствующих препаратов при проведении сельскохозяйственных работ.

Предел определения (c_n) 2,4-Д, 2,4-ДП и 2,4-ДМ в модельных средах с использованием речных вод (табл. 3) составил 0.7–0.9 мкг/л (соответствует уровню 0.01 ПДК для водоемов культурно-питьевого и рыбохозяйственного назначения, табл. 1). При анализе почв c_n ДХФК находится на уровне 3–4 мкг/кг (табл. 4). Предел определения по отношению к ХФ в 30–50 раз выше, что обусловлено очень высокими степенями извлечения (98–99%). c_n в речных водах составляет 40 нг/л (на уровне 0.4ПДК в водоемах рыбохозяйственного назначения). В почвах c_n 4-ХФ и 2,4-ДХФ составляет 0.1 мкг/кг. Анализ почвенных образцов значительно затрудняют продукты деградации гумусовых веществ – фенолкарбоновые кислоты [35]. Они образуют множество малоинтенсивных пиков с различными временами удерживания. Из-за матричных эффектов, обусловленных фенолкарбоновыми кислотами в почвах, в области низких

Таблица 4. Результаты определения дихлорфеноксикарбоновых кислот и хлорфенолов в модельных образцах почв методом введено–найдено ($n = 3$, $P = 0.95$)

Вещество	Введено, мкг/кг	Найдено, мкг/кг	s_r , %	$c_{\text{мин}}$, мкг/кг	c_n , мкг/кг	r^2	Диапазон линейности, мкг/кг
2,4-Д	5	5.5 ± 1.6	11.8	1.0	3.0	0.992	3.0–100
	10	10.4 ± 1.9	6.7				
	50	49.1 ± 4.7	3.8				
2,4-ДП	5	5.7 ± 2.0	14.5	1.0	3.0	0.992	3.0–90
	10	10.4 ± 1.8	7.0				
	50	48.9 ± 4.4	3.6				
2,4-ДМ	5	5.7 ± 1.5	9.2	1.3	4.0	0.991	4.0–90
	10	10.4 ± 1.5	5.7				
	50	49.1 ± 3.8	3.1				
4-ХФ	0.1	0.13 ± 0.05	16.1	0.03	0.1	0.993	0.1–1.3
	0.5	0.57 ± 0.16	11.2				
	1.0	1.1 ± 0.2	5.7				
2,4-ДХФ	0.1	0.12 ± 0.04	15.5	0.03	0.1	0.992	0.1–1.5
	0.5	0.56 ± 0.16	11.3				
	1.0	1.2 ± 0.2	5.0				

концентраций получены завышенные на 14–18% результаты (табл. 4).

* * *

Разработанный способ концентрирования с применением ШТ на основе магнитного угля упрощает процедуру концентрирования. При анализе водных сред способ можно применять в полевых условиях: отбирают необходимый объем воды, добавляют таблетку, после прекращения выделения углекислого газа сорбент извлекают методом магнитной сепарации. Более низкая эффективность перемешивания при выделении CO_2 компенсируется высаливающим эффектом тартратов. Эффективность извлечения составляет 85–89% для ДХФК и 97.5–99% для ХФ. Сочетание концентрирования с применением ШТ и ГХ-МС обеспечивает предел определения на уровне 0.7–0.9 мкг/л в воде и 3–4 мкг/кг в почве для ДХФК и 40 нг/л, 0.1 мкг/кг для ХФ в речной воде и почвах соответственно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках гранта “УМНИК-2021”. Договор (соглашение) № 17218ГУ/2021 о предоставлении гранта на выполнение научно-исследовательских работ и оценку перспектив коммерческого

использования результатов в рамках реализации инновационного проекта от 22 декабря 2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weiss F.T., Ruepert C., Echeverría-Sáenz S., Egen R.I.L., Stamm C. Agricultural pesticides pose a continuous ecotoxicological risk to aquatic organisms in a tropical horticulture catchment // *Environ. Advances*. 2023. V. 11. Article 100339. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100339>
2. Li J., Lv Q., Bi L., Fang F., Hou J., Di G. et al. Metal-organic frameworks as superior adsorbents for pesticide removal from water: The cutting-edge in characterization, tailoring, and application potentials // *Coord. Chem. Rev.* 2023. V. 493. Article 215303. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215303>
3. Femina C.C., Kamalesh T., Senthil Kumar P., Rangasamy G. An insights of organochlorine pesticides categories, properties, eco-toxicity and new developments in bioremediation process // *Environ. Pollut.* 2023. V. 333. Article 122114. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122114>
4. Aragay G., Pino F., Merkoçi A. Nanomaterials for sensing and destroying pesticides. *Chem. Rev.* 2012. V. 112. № 10. P. 5317. <https://doi.org/10.1021/cr300020c>

5. Приказ Минсельхоза России от 13.02.2016 года № 552. Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения. <https://rulaws.ru/acts/Prikaz-Minselhoza-Rossii-ot-13.12.2016-N-552/> (05.05.2023)
6. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 2. Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 1.2.3685-21 “Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания”. <http://pravo.gov.ru/proxy/ips/?docbody=&prevDoc=603138049&backlink=1&&nd=602092088> (05.05.2023)
7. Liu L., Chen Y., Li S., Yu W., Zhang X., Wang H. et al. Enhanced electrocatalytic cathodic degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid based on a synergistic effect obtained from Co single atoms and Cu nanoclusters // *Appl. Catal. B*. 2023. V. 332. Article 122748. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2023.122748>
8. Pan X., Xu X., Song S., Xu L., Kuang H., Wu X. et al. An ic-ELISA and immunochromatographic strip assay for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in bean sprouts and cabbage // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022. V. 209. Article 114524. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114524>
9. Song Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide // *J. Integr. Plant. Biol.* 2014. V. 56. № 2. P. 106. <https://doi.org/10.1111/jipb.12131>
10. Islam F., Wang J., Farooq M.A., Khan M.S.S., Xu L., Zhu J. et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems // *Environ. Int.* 2018. V. 111. P. 332. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.020>
11. Губин А.С., Суханов П.Т., Кушнир А.А. Применение магнитных молекулярно импринтированных полимеров для онлайн динамического концентрирования 2,4-дихлорфеноксисуксной кислоты и ее последующего определения в почве // *Химическая безопасность*. 2023. Т. 7. № 1. С. 128. <https://doi.org/10.25514/CHS.2023.1.24010>
12. Кормош Ж.А., Журба Е.С., Антал И.П., Кормош А.Ж., Базель Я.Р. Спектрофотометрическое определение 2,4-дихлорфеноксисуксной кислоты с применением экстракции астрафлоксином // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. № 7. С. 649. (Kormosh Zh.A., Zhurba E.S., Antal I.P., Kormosh A.Zh., Bazel Ya.R. Spectrophotometric determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using extraction with astraflaxin // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 7. P. 909.) <https://doi.org/10.1134/s1061934820070114>
13. Wilson R.G., Cheng H.H. Breakdown and movement of 2,4-D in the soil under field conditions // *Weed Sci.* 1976. V. 24. P. 461. <https://doi.org/10.1017/S0043174500066455>
14. Gubin A.S., Sukhanov P.T., Kushnir A.A., Shikhaliev K.S., Potapov M.A., Kovaleva E.N. Ionic-liquid-modified magnetite nanoparticles for MSPE-GC-MS determination of 2,4-D butyl ester and its metabolites in water, soil, and bottom sediments // *Environ. Nano-technol. Monit. Manag.* 2022. V. 17. Article 100652. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100652>
15. Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. Обзор обзоров // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. № 10. С. 867. (Dmitrienko S.G., Anyari V.V., Tolmacheva V.V., Gorbunova M.V. Dispersive liquid-liquid microextraction of organic compounds: An overview of reviews // *J. Anal. Chem.* 2020. Т. 75. № 10. P. 1237.) <https://doi.org/10.1134/S1061934820100056>
16. Razaee M., Assadi Y., Hosseini M.R.M., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1116. № 1–2. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>
17. Rajendran S., Hong Loh S., Mohd Ariffin M., Mohd Afiq Wan Mohd Khalik W. Magnetic effervescent tablet-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction employing the response surface method for the preconcentration of basic pharmaceutical drugs: Characterization, method development, and green profile assessment // *J. Mol. Liq.* 2022. V. 367. Article 120411. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120411>
18. Zhao W., Jing X., Tian Y., Feng C. Magnetic Fe₃O₄@porous activated carbon effervescent tablet-assisted deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction of phenolic endocrine disrupting chemicals in environmental water // *Microchem. J.* 2020. V. 159. Article 105416. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105416>
19. Lasarte-Aragonés G., Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M. Effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction with extractant removal by magnetic nanoparticles // *Anal. Chim. Acta.* 2014. V. 807. P. 61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.029>
20. Zhang W., Zhou P., Liu W., Wang H., Wang X. Enhanced adsorption/extraction of five typical polycyclic aromatic hydrocarbons from meat samples using magnetic effervescent tablets composed of dicationic ionic liquids and NiFe₂O₄ nanoparticles // *J. Mol. Liq.* 2020. V. 315. Article 113682. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113682>
21. Wang X., Xu G., Guo X., Chen X., Duan J., Gao Z. et al. Effervescent tablets containing magnetic ionic liquids as a non-conventional extraction and dispersive agent for speciation of arsenite and arsenate in vegetable samples // *J. Mol. Liq.* 2018. V. 272. P. 871. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.112>
22. Gao M., Wang H., Wang J., Wang X., Wang H. Effervescence-enhanced microextraction based on

- acidic ionic liquids and in situ metathesis reaction for bisphenol detection in milk samples // *Food Anal. Methods*. 2022. V. 15. № 7. P. 2036.
<https://doi.org/10.1007/s12161-022-02263-w>
23. Wu J., Xu Z., Pan Y., Shi Y., Bao X., Li J. et al. Combination of in situ metathesis reaction with a novel “magnetic effervescent tablet-assisted ionic liquid dispersive microextraction” for the determination of endogenous steroids in human fluids // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. № 12. P. 2921.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0973-2>
 24. Zhou P., Wang R., Fan R., Yang X., Mei H., Chen H. et al. Magnetic amino-functionalized metal-organic frameworks as a novel solid support in ionic liquids-based effervescent tablets for efficient extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in milks // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. V. 222. Article 112482.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112482>
 25. Molaie S., Saleh A., Ghoulipour V., Seidi S. Centrifuge-less emulsification microextraction using effervescent CO₂ tablet for on-site extraction of pahs in water samples prior to GC-MS detection // *Chromatographia*. 2016. V. 79. № 9-10. P. 629.
<https://doi.org/10.1007/s10337-016-3069-1>
 26. Zhou P., Chen K., Gao M., Qu J., Zhang Z., Dahlgren R.A. et al. Magnetic effervescent tablets containing ionic liquids as a non-conventional extraction and dispersive agent for determination of pyrethroids in milk // *Food Chem.* 2018. V. 268. P. 468.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.099>
 27. Yang M., Wu X., Jia Y., Xi X., Yang X., Lu R. et al. Use of magnetic effervescent tablet-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction to extract fungicides from environmental waters with the aid of experimental design methodology // *Anal. Chim. Acta*. 2016. V. 906. P. 118.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.019>
 28. Li Y., Hu J., Liu W., Jin L., Zhou P., Zhang Y. et al. Magnetic effervescent tablet-assisted ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of polybrominated diphenyl ethers in liquid matrix samples // *Talanta*. 2019. Vol. 195. P. 785.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.106>
 29. Wu J., Li J., Chen Y., Bao X., Tang H., Ma S. et al. Preconcentration/extraction of phthalate esters in milk samples using mFe₂O₄-based magnetic ionic liquid effervescent tablets consisting of accessory functional fillers // *Food Anal. Methods*. 2019. V. 12. № 9. P. 2106.
<https://doi.org/10.1007/s12161-019-01535-2>
 30. Fahimirad B., Rangraz Y., Elhampour A., Nemati F. Diphenyl diselenide grafted onto a Fe₃O₄-chitosan composite as a new nanosorbent for separation of metal ions by effervescent salt-assisted dispersive magnetic micro solid-phase extraction // *Microchim. Acta*. 2018. V. 185. Article 560.
<https://doi.org/10.1007/s00604-018-3094-x>
 31. Zhang J., Li M., Yang M., Peng B., Li Y., Zhou W. et al. Magnetic retrieval of ionic liquids: Fast dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of benzoylurea insecticides in environmental water samples // *J. Chromatogr. A*. 2012. V. 1254. P. 23.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.051>
 32. Егунова О.Р., Решетникова И.С., Казимирова К.О., Штыков С.Н. Магнитная твердофазная экстракция и флуориметрическое определение некоторых фторхинолонов // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. № 1. С. 31. (Egunova O.R., Reshetnikova I.S., Kazimirova K.O., Shtykov S.N. Magnetic solid-phase extraction and fluorimetric determination of some fluoroquinolones // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 1. P. 24.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934820010062>
 33. Ahmed S.F., Mofijur M., Parisa T.A., Islam N., Kusumo F., Inayat A. et al. Progress and challenges of contaminate removal from wastewater using microalgae biomass // *Chemosphere*. 2022. V. 286. Article 131656.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131656>
 34. Кушнир А.А., Сыпко К.С., Губин А.С., Сузо К.О., Суханов П.Т. Применение шелухи риса (*Oryza sativa*) в качестве сорбционного материала для удаления поллютантов из водных сред // *Химия растительного сырья*. 2022. № 3. С. 5.
<https://doi.org/10.14258/jcprm.20220310943>
 35. Gubin A.S., Sukhanov P.T., Kushnir A.A., Shikhaliyev Kh.S., Potapov M.A., Kovaleva E.N. Monitoring of phenols in natural waters and bottom sediments: preconcentration on a magnetic sorbent, GC-MS analysis, and weather observations // *Chem. Pap.* 2021. V. 75. № 4. P. 1445.
<https://doi.org/10.1007/s11696-020-01398-6>
 36. Сыпко К.С., Губин А.С., Кушнир А.А., Суханов П.Т. Применение магнитных углей, полученных из растительного сырья на основе шелухи риса, для извлечения хлорфеноксиуксусных кислот и их метаболитов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23. № 3. С. 395.
<https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11319>
 37. Чурилина Е.В., Кушнир А.А., Суханов П.Т., Мاستюкова Т.В., Шаталов Г.В., Зарытовских О.А. Термодинамика сорбции нитрофенолов из водных сред полимером на основе N-винилпирролидона // *Журн. общ. химии*. 2013. Т. 83. № 11. С. 1835. (Churilina E.V., Kushnir A.A., Sukhanov P.T., Mastjukova T.V., Zarytovskikh O.A., Shatalov G.V. Thermodynamics of nitrophenols sorption from aqueous media with N-vinylpyrrolidone-based polymer // *Russ. J. Gen. Chem.* 2013. V. 83. № 11. P. 2032.)
<https://doi.org/10.1134/S1070363213110108>
 38. Wee S.-B., Oh H.-C., Kim T.-G., An G.-S., Choi S.-C. Role of N-methyl-2-pyrrolidone for preparation of Fe₃O₄@SiO₂ controlled the shell thickness // *J. Nanopart. Res.* 2017. V. 19. № 4. P. 143.
<https://doi.org/10.1007/s11051-017-3813-y>
 39. Xu P., Wang H., Tong R., Du Q., Zhong W. Preparation and morphology of SiO₂/PMMA nanohybrids by microemulsion polymerization // *Colloid Polym. Sci.* 2006. V. 284. № 7. P. 755.
<https://doi.org/10.1007/s00396-005-1428-9>

APPLICATION OF EFFERVESCENT TABLETS BASED ON MAGNETIC CHARCOAL FOR THE PRECONCENTRATION AND DETERMINATION OF DICHLOROPHENOXYCARBOXYLIC ACIDS AND THEIR METABOLITES BY GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY IN SOILS AND NATURAL WATERS

K. S. Sypko^{a, b}, A. S. Gubin^{a, *}, P. T. Sukhanov^a, A. A. Kushnir^a

^aVoronezh State University of Engineering Technologies, 394036, Voronezh, Russia

^bNorth Caucasus Federal University, 355017, Stavropol, Russia

*E-mail: goubinne@mail.ru

Abstract. A method for obtaining effervescent tablets, consisting of magnetic carbon, tartaric acid, sodium carbonate and sodium bicarbonate, and their use for the adsorption of dichlorophenoxyacetic acids (DCPA)—2,4-dichlorophenoxyacetic, 2,4-dichlorophenoxypropionic and 2,4-dichlorophenoxybutyric acids and their metabolites—2,4-dichlorophenol and 4-chlorophenol is proposed. The tablets are immersed in an analyzed solution with a neutral reaction medium. To analyze soils, extraction with an alkali solution followed by the neutralization of the extract is carried out. After CO₂ separation is completed, the sorbent is removed with a neodymium magnet and the analytes are desorbed with acetone. The acetone extract is evaporated under a stream of nitrogen, and the concentrate is analyzed by gas chromatography–mass spectrometry. The method was tested on model systems—samples of river water and typical chernozem, which were artificially contaminated with DCPA and chlorophenols (CP). In analyzing river waters, the limits of determination for DCPA are 0.7–0.9 µg/L, for CP—40 ng/L. In soils, the limit of detection is 3–4 and 0.1 µg/kg for DCPA and CP, respectively.

Keywords: magnetic effervescent tablet, magnetic carbon, dichlorophenoxyacetic acids, chlorophenol, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, determination.

УДК 000

ОБНАРУЖЕНИЕ СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕРОКСИДОВ И НИТРАТА АММОНИЯ В ОТПЕЧАТКАХ ПАЛЬЦА МЕТОДОМ СПЕКТРОМЕТРИИ ИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ

© 2024 г. Т. И. Буряков^а, *, И. А. Буряков^а, **

^аНаучно-исследовательский технологический институт им. А.П. Александрова,
Копорское ш., 72, Ленинградская обл., Сосновый Бор, 188540 Россия

*E-mail: buryakovti@gmail.com

**E-mail: buryakovia@gmail.com

Поступила в редакцию 13.06.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 27.07.2023 г.

Исследовано влияние потожировых отложений (ПЖО) отпечатка пальца на эффективность обнаружения следовых количеств взрывчатых веществ – триацетона трипероксида (ТАТП), гексаметиленпероксиддиамин (ГМТД) и нитрата аммония (НА) методом спектрометрии ионной подвижности в воздушной среде при атмосферном давлении. Одними из основных компонентов ПЖО, оказывающими такое влияние, в положительной моде является мочевины, в отрицательной – молочная кислота (МК). Показано, что наличие в пробе мочевины или ПЖО существенно не влияет на регистрацию ТАТП в положительной моде, но уменьшает эффективность образования ионов ГМТД и вызывает появление аддукт-катионов ГМТД и мочевины. Наличие в пробе МК или ПЖО незначительно уменьшает эффективность образования ионов НА в отрицательной моде, сильно изменяет качественный состав ионов ГМТД, вызывая появление аддукт-анионов ГМТД и МК. В отсутствие каких-либо примесей в пробе наилучший приведенный предел обнаружения (сигнал/шум = 3σ), оцениваемый величиной 30–50 пг, зарегистрирован для ГМТД. Определено время жизни следов ГМТД, ТАТП и НА на алюминиевой фольге при лабораторных условиях, равное 1, 3 и 12 ч для проб массами $m_{\text{ГМТД}} 1 \times 10^{-9}$, 2×10^{-9} и 1×10^{-8} г и с поверхностными плотностями d_s 0.008, 0.016 и 0.08 мкг/см² соответственно; 10^2 и 10^3 с для $m_{\text{ТАТП}} 1 \times 10^{-5}$ и 1×10^{-4} г и d_s 80 и 800 мкг/см² соответственно; 12 и 25 ч для $m_{\text{НА}} 3 \times 10^{-8}$ и 5×10^{-8} г и d_s 0.24 и 0.4 мкг/см² соответственно.

Ключевые слова: спектрометрия ионной подвижности, триацетона трипероксид, гексаметиленпероксиддиамин, нитрат аммония, отпечаток пальца руки человека, мочевины, молочная кислота.

DOI: 10.31857/S0044450224070093, EDN: TNKCRB

Простота изготовления и доступность необходимых для синтеза химических компонентов является причиной высокого риска проведения террористических актов с использованием самодельных, так называемых “кухонных”, взрывчатых веществ (ВВ). К таким веществам относятся триацетона трипероксид (ТАТП), гексаметиленпероксиддиамин (ГМТД) и нитрат аммония (НА), причем последнее ВВ может быть как кустарного, так и промышленного изготовления. В табл. 1 указаны города и даты совершения

террористических актов и других противоправных деяний, связанных с использованием перечисленных выше ВВ. Из таблицы видно, какую серьезную угрозу представляют собой самодельные ВВ и насколько важна задача обнаружения взрывных устройств или зарядов на их основе.

В настоящее время одним из самых широко распространенных и эффективных методов обнаружения следов/микрочастиц ВВ является спектрометрия ионной подвижности [15–17]. Этот метод основан на отборе потенциально

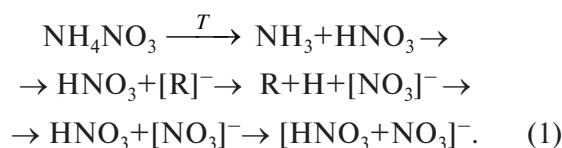
Таблица 1. Города и даты проведения террористических актов и других противоправных деяний, связанных с использованием триацетона трипероксида (ТАТП), гексаметиленрипероксиддиамина (ГМТД) и нитрата аммония (НА)

Город	Дата	Литература
ТАТП		
Теракт в г. Касабланка	16.05.2003	[1]
Теракт в г. Маракеш	28.04.2011	[2]
Теракт в г. Серанг	28.10.2015	[3]
Теракт в г. Париж	13.11.2015	[1]
Теракт в аэропорту г. Брюссель	22.03.2016	
Теракт на Манчестер-Арена	22.05.2017	
Хранение вещества, г. Москва	14.08.2017	[4]
Самоподрыв на вокзале г. Брюссель	20.06.2017	[5]
Случайный самоподрыв в г. Альканар (Испания)	17.08.2017	
Теракт в метро г. Лондон	15.09.2017	
Серия терактов в г. Сурабая	13.05.2018	[6]
Серия терактов в Шри-Ланке	21.04.2019	[7]
Хранение зарядов, г. Джакарта	29.03.2021	[8]
ГМТД		
Попытка теракта в аэропорту г. Лос-Анджелеса	Декабрь 1999	[9]
Попытка подрыва самолетов, Великобритания	28.08.2006	[10]
Хранение вещества, г. Бристоль	17.04.2008	[11]
Теракты в г. Сисайд-Парк и на Манхеттене в г. Нью-Йорк	17.09.2016	[12]
НА		
Теракт у посольства США в г. Бейрут	18.04.1983	[1]
Теракт в г. Оклахома Сити	19.04.1995	
Теракты в г. Стамбул	15.11.2003, 20.11.2003	
Теракт в г. Касабланка	16.05.2003	
Теракт в г. Маракеш	28.04.2011	[2]
Подрыв автомобиля в г. Осло	22.07.2011	[13]
Теракты в г. Сисайд-Парк и на Манхеттене в г. Нью-Йорк	17.09.2016	[12]
Теракт в г. Могадिशо	14.10.2017	[2]
Теракт в г. Ламитан, Филиппины	31.07.2018	[14]

содержащей следы/микрочастицы ВВ твердой или жидкой пробы и переводе (например, термомодесорбцией) ее в газообразное состояние, ионизации газовой пробы, разделении образовавшихся ионов по скорости их движения в газе

под действием электрического поля и регистрации разделенных ионов в виде совокупности пиков – спектра.

Ключевым процессом, обеспечивающим эффективность обнаружения того или иного вещества посредством метода спектрометрии ионной подвижности, является ионизация. Часто в спектрометрах ионной подвижности (СИП) используют ионизацию при атмосферном давлении (ИАД). В ИАД формирование ионов газовой пробы происходит в две стадии. На первой стадии происходит образование реактант-ионов из атомов и молекул газовой матрицы, на второй – образование ионов примесных веществ за счет ион-молекулярных реакций реактант-ионов с молекулами этих веществ. При ИАД с помощью коронного разряда в положительной моде (ПМ) основными типами реактант-ионов в воздухе в присутствии паров воды являются полигидраты $(H_2O)_mH^+$ ($m \geq 1$ – целое число) [18], а в отрицательной моде (ОМ) – ионы O_2^- и NO_2^- , в меньшей степени NO_3^- , CO_3^- и др., а также полигидраты на их основе [19, 20]. Образование ионов ТАТП, ГМТД происходит в ион-молекулярных реакциях реактант-ионов и молекул этих веществ. Ионы НА возникают вследствие термического разложения молекул вещества и последующих реакций автоионизации [21] ($[R]^-$ – реактант-ионы):



В СИП разделение ионов по типам проводят в дрейфовой камере, представляющей собой заполненную газом полость, образованную системой электродов, обеспечивающих внутри полости однородное электрическое поле E . Ионы различных типов, импульсно введенные через ионный затвор в дрейфовую камеру, под действием поля приобретают скорости, пропорциональные их подвижности, дрейфуют, разделяясь на концентрационные облака, и рекомбинируют на электроде электрометрической системы регистрации (ЭСР). Регистрируют величину ионного тока в зависимости от времени дрейфа $I(t_d)$ – спектр. Скорость движения ионов i -го типа характеризуется приведенной подвижностью:

$$K_{oi} = l^2 / (U t_{di}) (273.15/T) (P/760) , \quad (2)$$

Таблица 2. Приведенные подвижности K_{0i} и отношения массы к заряду (m/z) ионов триацетона трипероксида (ТАТП), гексаметилентрипероксиддиамин (ГМТД) и нитрата аммония (НА), образующихся в воздушной среде, а также предполагаемые типы этих ионов

ВВ	K_0 , см ² /(В·с)	m/z , а.е.м.	Тип иона или полярность	Литература	
ТАТП	2.15	59	$[\text{C}_3\text{H}_6\text{OH}]^+$	[18]	
	2.08	91	$[\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3\text{H}]^+$		
	1.36	240	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$		
ТАТП	2.30	73	$[\text{C}_4\text{H}_9\text{NH}_2]^+$	[21]	
	2.17	89	$[\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_2]^+$		
ГМТД	2.12	90	$[\text{NC}_3\text{H}_8\text{O}_2]^+$		
	1.74	145	$[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}_2]^+$		
	2.33	72	$[\text{NC}_2\text{H}_2\text{O}_2]^-$		
	2.05	108, 110	$[\text{NC}_2\text{H}_3\text{O}_2+\text{Cl}]^-$		
	1.82	138, 140	$[\text{M}-\text{NC}_3\text{H}_7\text{O}_3+\text{Cl}]^-$		
НА	1.83	140, 142	$[\text{M}-\text{NC}_3\text{H}_7\text{O}_3+\text{Cl}]^-$		
	2.40	62	$[\text{NO}_3]^-$		
	2.05	125	$[\text{HNO}_3+\text{NO}_3]^-$		
ТАТП	1.36	240	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	[22]	
ГМТД	2.10	90	+		
	1.73	145	+		
	1.50	209	$[\text{M}+\text{H}]^+$		
	1.49	224	+		
	1.49	226	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$		
	2.42	72	–		
	1.82	150	–		
НА		62	$[\text{NO}_3]^-$		[23]
	2.07	125	$[\text{HNO}_3+\text{NO}_3]^-$		
ТАТП	2.05	91	$[\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3\text{H}]^+$	[24]	
ГМТД	1.53	209	$[\text{M}+\text{H}]^+$		

где l – расстояние между ионным затвором и электродом ЭСР, см; U – разность потенциалов между ионным затвором и электродом ЭСР, В; t_{di} – среднее время дрейфа ионов i -го типа между ионным затвором и электродом ЭСР, с; T – температура, К; P – давление, мм рт. ст. Значения K_{0i} исследуемых веществ могут быть определены при использовании химического стандарта:

$$t_{di}/t_{dcs} = K_{0cs}/K_{0i}, \quad (3)$$

где t_{dcs} , K_{0cs} – время дрейфа и приведенная подвижность химического стандарта.

В табл. 2 указаны опубликованные значения приведенных подвижностей K_{0i} и отношения массы к заряду m/z ионов ТАТП, ГМТД и НА, образующихся в воздушной среде, а также предполагаемые типы этих ионов. Из таблицы следует, что молекулы ТАТП эффективно образуют положительные ионы, НА – отрицательные, а ГМТД – положительные и отрицательные.

При наличии в газовой пробе паров нескольких веществ возможно их взаимное влияние в процессе ионообразования. В работе [17] это влияние исследовано для случая, имеющего большую практическую значимость, – анализа отпечатка пальца (**ОП**) человека, имевшего контакт с зарядами взрывчатых веществ, содержащих нитрогруппу. В частности, показано, что основным активным компонентом потожировых отложений (**ПЖО**) отпечатка, который может воздействовать на обнаружение паров ВВ при использовании СИП в отрицательной моде, является молочная кислота (**МК**). Из литературы также известно [25, 26], что ПЖО содержит мочевины, способную активно образовывать положительные ионы. Молекулы мочевины и МК вступают в ион-молекулярные реакции с реагент-ионами, конкурируя с молекулами ВВ, а образующиеся ионы мочевины и МК взаимодействуют с молекулами ВВ. Все это может сильно уменьшать эффективность образования ионов ВВ и изменять их качественный состав.

Цель настоящей работы – выявление влияния следовых количеств мочевины и молочной кислоты, являющихся одними из основных компонентов потожировых отложений человека, в том числе отпечатков пальца, на эффективность обнаружения следовых количеств ТАТП, ГМТД и НА методом спектрометрии ионной подвижности в положительной и отрицательной ионизационных модах в воздушной среде при атмосферном давлении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Растворы триацетона трипероксида (CAS 17088-37-8) в ацетоне с концентрацией $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$ г/мл, гексаметилен трипероксидиамин (CAS 283-66-9) в ацетоне с концентрацией $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ г/мл и нитрата аммония (CAS 6484-52-2) в воде с концентрацией $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$ г/мл с массовой долей примесей не более 4×10^{-4} % (РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия); диамид угольной кислоты (мочевина, ч.д.а., CAS 57-13-6) (Экспит, Россия); 2-гидроксипропановая (молочная) кислота (80%-ный водный р-р, CAS 50-21-5) (Hugestone Enterprise Co., Ltd, Китай); ацетон для хроматографии 99.85% (CAS 67-64-1) (Компонент-Реактив, Россия), вода для инъекций (Новосибхимфарм, Россия).

Аппаратура. Салфетка для нанесения пробы – фольга алюминиевая толщиной 14 мкм. Дозаторы Лайт 2–20 мкл и Лайт ДПОП-1-100-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Весы лабораторные XS 205 DU (Mettler Toledo, Швейцария). Ионно-дрейфовый детектор (ИДД) Кербер-Т (Атомпромкомплекс, Россия) на основе спектрометрии ионной подвижности, подробно описанный в работах [17, 27]. Параметры ИДД: температура камеры термодесорбции 180 °С; источник ионизации при атмосферном давлении на основе коронного разряда с импульсным источником питания; $l = 12$ см; $U = 2.2$ кВ; газ-носитель – лабораторный воздух (объемная скорость $Q = 5$ см³/с, 180 °С, абсолютная влажность ≤ 12 г/м³); дрейфовый газ – осушенный воздух (объемная скорость 10 см³/с, 100 °С, абсолютная влажность ≤ 0.1 г/м³); чувствительность ЭСР 15 фА/(ед. АЦП); уровень шумов ЭСР (3σ) – 25 ед. АЦП, эквивалентных 0.375 пА; уровни срабатывания сигнала “тревога” $I_a = 60$ пА (ТАТП), $I_a = 45$ пА (ГМТД и НА) и $I_a = 4.5$ пА (2,4,6-тринитротолуол, ТНТ), т.е. в 160, 120 и 12 раз превышают 3σ ЭСР соответственно.

Приведенные подвижности ионов химических стандартов $K_0(\text{прокаин}) = 1.31$ см²/(В·с) в ПМ и $K_0(\text{ТНТ}) = 1.47$ см²/(В·с) в ОМ [28, 29]. Время установления показаний $t_s \leq 6$ с. Разрешающая способность, определяемая как отношение времени t_{di} ионного пика в спектре к ширине этого пика на половине высоты, составила 40–50.

Методика эксперимента. Растворы различных концентраций готовили из исходных растворов в день проведения экспериментов. В лабораторных условиях (23–25 °С, относительная влажность 25–40%, давление 1000–1017 гПа) с помощью дозатора растворы ВВ, мочевины и МК наносили на поверхность алюминиевой салфетки в виде пятна диаметром 4 мм, которое при анализе располагалось вблизи входного отверстия ИДД. В экспериментах со смесями веществ сначала наносили растворы мочевины или МК, затем растворы ВВ; в экспериментах с отпечатками пальца – сначала отпечаток, затем раствор ВВ в виде пятна диаметром 4 мм. После нанесения проб ожидали $\sim 10^2$ с для испарения ацетона либо $\sim 10^3$ с для испарения воды. Далее салфетку помещали в термодесорбер ИДД. Регистрировали среднее время дрейфа t_{di} ионов, а также зависимость амплитуды ионного тока A_i пика этих ионов от времени пребывания салфетки в камере термодесорбции t_h . Значения K_{0i} ионов ВВ определяли с использованием t_{dcs} и K_{0cs} химических стандартов и уравнения (3). Для определения ионизационной эффективности регистрации ВВ в присутствии или в отсутствие следовых количеств мочевины, МК или отпечатка пальца зависимости амплитуд соответствующих ионных пиков A_i интегрировали по времени t_h и полученные значения зарядов (q_i) нормировали на нанесенные массы веществ (m_i). Предел обнаружения ВВ определяли как превышение амплитуды какого-либо из пиков ионов данного ВВ соответствующего уровня срабатывания сигнала “тревога” I_a . Отпечатки пальца ранжировали на отпечатки со среднестатистическими (сс) и обильными (об) ПЖО. Их примерные массы, оцениваемые в 8–15 и 30–50 мкг, определены ранее [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты показали, что при регистрации исследуемых ВВ наличие в пробе ПЖО существенно не влияло на качественный состав ионов ТАТП или НА, однако вызывало появление новых пиков ГМТД. На рис. 1 представлены

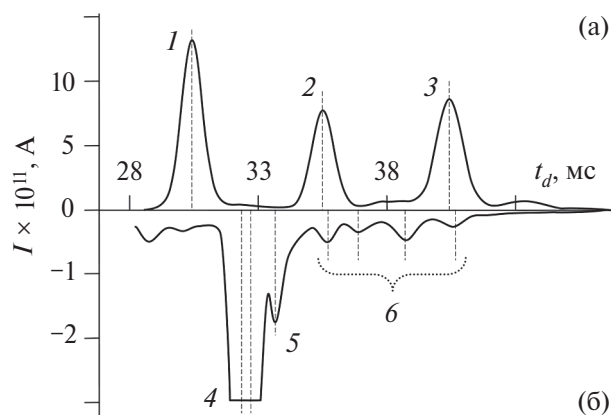


Рис. 1. Фрагменты (а) положительного и (б) отрицательного спектров при анализе отпечатка пальца, содержащего 1 мкг ГМТД. Обозначения пиков: 1 – катионы мочевины, 2 – катионы ГМТД, 3 – аддукт-катионы ГМТД и мочевины, 4 – МК, 5 – аддукт-анионы ГМТД и МК, 6 – анионы ГМТД.

фрагменты положительного и отрицательного спектров подвижности при анализе отпечатка пальца, содержащего 1 мкг ГМТД. В положительной моде время дрейфа доминирующих ионов ПЖО отпечатка пальца $t_d = 30.42$ мс (пик 1) полностью совпадало с t_d ионов мочевины, а в отрицательной моде времена дрейфа доминирующих ионов ПЖО отпечатка пальца $t_d = 32.26$ мс и $t_d = 32.80$ мс (пики 4) полностью совпадали с t_d ионов молочной кислоты. Пик (3) соответствует аддукт-катиону, так как последний образуется при наличии в пробе ГМТД и мочевины или ПЖО, а пик (5) – аддукт-аниону ГМТД, для образования которого необходимо наличие в пробе ГМТД и МК или ПЖО.

В табл. 3 представлены полярности и приведенные подвижности K_{0i} ионов мочевины, МК и ВВ, вычисленные с использованием уравнения (3), экспериментальных значений t_{dcs} и подвижностей химических стандартов $K_0(\text{прокаин}) = 1.31 \text{ см}^2/(\text{В}\cdot\text{с})$ (ПМ) и $K_0(\text{ТНТ}) = 1.47 \text{ см}^2/(\text{В}\cdot\text{с})$ (ОМ) [28, 29].

Из данных табл. 2, 3 и рис. 1 можно сделать следующие основные выводы по качественному составу ионов:

- присутствие в пробе мочевины или ОП вызывает появление в спектре пика катионов подвижностью $K_0 = 1.77 \text{ см}^2/(\text{В}\cdot\text{с})$ (рис. 1, пик 1);
- присутствие в пробе МК или ОП вызывает появление в спектре пиков анионов с подвижностями $K_0 = 1.54$ и $1.52 \text{ см}^2/(\text{В}\cdot\text{с})$ (рис. 1, пики 4);
- полученные в настоящей работе значения подвижности ионов ТАТП, ГМТД в ПМ и НА

Таблица 3. Полярности и приведенные подвижности K_{0i} ионов мочевины, молочной кислоты и взрывчатых веществ, а также ионизационная эффективность регистрации веществ e_i

Вещество	Полярность ионов	K_{0i} , $\text{см}^2/(\text{В}\cdot\text{с})$	e_i , Кл/моль	
Мочевина (ОП)	+	1.77	3.3	
МК (ОП)	–	1.54	2.8	
ТАТП	+	1.52		
		2.13	0.0002	
		2.05	0.003	
ТАТП + ОП	+	1.33	0.002	
		2.05	0.0007	
		1.33	< 0.0001	
ГМТД	+	1.50	8.2	
		–	2.13	0.1
			1.91	0.09
ГМТД + ОП	–	1.73, 1.58	≤ 0.02	
		1.66, 1.52,	≤ 0.005	
		1.42, 1.38,		
		1.33, 1.26		
		1.50	0.5	
		1.31	0.2	
НА	–	1.48	0.02	
		1.42	0.003	
		1.38	0.004	
		1.33	0.002	
НА + ОП	–	1.26	0.006	
		2.36	1.3	
		2.01	2.8	
НА + ОП	–	2.36	0.01	
		2.01	0.2	

в ОМ хорошо согласуются с опубликованными данными (см. табл. 2), на основании чего можно предположить, что в регистрируемых спектрах наиболее интенсивные пики образованы следующими типами ионов (K_{0i} , $\text{см}^2/(\text{В}\cdot\text{с})$): 2.05 (ТАТП) – $[\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3\text{N}]^+$; 1.50 (ГМТД) – $[\text{M}+\text{H}]^+$; 2.36 (НА) – $[\text{NO}_3]^-$ и 2.01 (НА) – $[\text{HNO}_3+\text{NO}_3]^-$.

– количество наблюдаемых в спектре пиков ионов ГМТД в отрицательной моде и значения их K_{0i} , полученные в настоящей работе, отличаются от опубликованных данных [21, 22];

– при анализе пробы, содержащей ТАТП и мочевины (либо ОП), качественный состав спектра ТАТП не изменяется;

– при анализе пробы, содержащей ГМТД и мочевины (либо ОП), в спектре положительной моды, помимо пика ионов ГМТД с $K_0 = 1.50 \text{ см}^2/(\text{В}\cdot\text{с})$ (рис. 1, пик 2), появляется пик

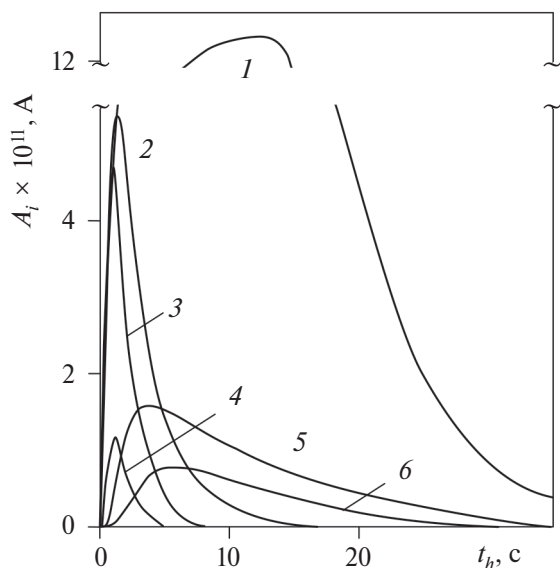


Рис. 2. Зависимости амплитуды пиков ионов от времени пребывания салфетки в камере термодесорбции $A_i(t_h)$: в положительной моде K_0 ГМТД = 1.50 $\text{см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ при массе пробы $m_{\text{ГМТД}} = 1$ мкг (1) или 10 нг (2) и K_0 ТАТП = 2.05 $\text{см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ при $m_{\text{ТАТП}} = 10$ мкг (3); в положительной моде K_0 ТАТП = 10 мкг + обильные потожировые отложения (4); в отрицательной моде K_0 НА = 2.01 $\text{см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ $m_{\text{НА}} = 50$ нг + обильные потожировые отложения (5) и K_0 ГМТД = 1.48 $\text{см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ $m_{\text{ГМТД}} = 0.5$ мкг + обильные потожировые отложения (6).

предположительно аддукт-катионов ГМТД и мочевины с подвижностью $K_0 = 1.31 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ (рис. 1, пик 3);

– при анализе пробы ГМТД в спектре отрицательной моды регистрируется по крайней мере десять пиков;

– в спектре отрицательной моды, полученном при анализе пробы, содержащей ГМТД и МК (либо ОП), по сравнению со спектром ГМТД без МК (ОП) отсутствуют пики ионов с высокой подвижностью $K_0 = 2.13, 1.91, 1.73, 1.66, 1.58 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, регистрируются пики ионов подвижностью $K_0 = 1.42, 1.38, 1.33, 1.26 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ (рис. 1, пики б), и появляется наиболее интенсивный пик предположительно аддукт-анионов фрагмента ГМТД и МК с подвижностью $K_0 = 1.48 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ (рис. 1, пик 5);

– присутствие в пробе МК или ОП заметно не влияет на качественный состав ионов НА.

Ранее предложено [17] для оценки ионизационной эффективности регистрации вещества, испаряемого с поверхности пробоотборной салфетки, использовать интеграл амплитуды пика ионов этого вещества A_i по времени

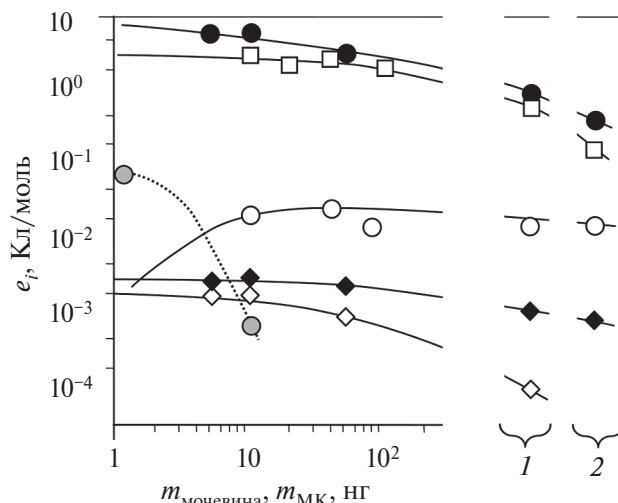


Рис. 3. Зависимости $e_i(m_{\text{мочевина}})$ в положительной моде для ионов с $K_0, \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$: черный круг – K_0 ГМТД = 1.50, черный ромб – K_0 ТАТП = 2.05, белый ромб – K_0 ТАТП = 1.33. Зависимости $e_i(m_{\text{МК}})$ в отрицательной моде для ионов: белый круг – K_0 ГМТД = 1.48, серый круг – K_0 ГМТД = 1.91, белый квадрат – K_0 НА = 2.01. 1 – среднестатистические потожировые отложения + взрывчатое вещество, 2 – обильные потожировые отложения + взрывчатое вещество.

пребывания салфетки в камере термодесорбции t_h , отнесенный к массе вещества m_i в пробе: $e_i = \int A_i(t_h) dt_h / m_i = q_i / m_i$. На рис. 2 в качестве примера приведены зависимости $A_i(t_h)$ в ПМ пика ионов с подвижностью K_0 ГМТД = 1.50 $\text{см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ при десорбции с поверхности салфетки $m_{\text{ГМТД}} = 1$ мкг (1) или 10 нг (2) и пика ионов K_0 ТАТП = 2.05 $\text{см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ при десорбции $m_{\text{ТАТП}} = 10$ мкг (3), а также пика ионов K_0 ТАТП = 2.05 $\text{см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ (4) в ПМ и пиков ионов K_0 НА = 2.01 $\text{см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ (5) и K_0 ГМТД = 1.48 $\text{см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ (6) в ОМ при одновременной десорбции с отпечатком пальца с обильными ПЖО соответственно $m_{\text{ТАТП}} = 10$ мкг, $m_{\text{НА}} = 50$ нг или $m_{\text{ГМТД}} = 0.5$ мкг.

Из рис. 2 видно, что проба $m_{\text{ГМТД}} = 10$ нг (2) малолетучего ГМТД при введении салфетки в термодесорбер, в котором поддерживается температура 180 °С, полностью испаряется с ее поверхности, проходит входной тракт ИДД и покидает камеру ионизации примерно за $t_h = 15$ с. Максимум наблюдается при $t \approx 1.2$ с. При анализе $m_{\text{ГМТД}} = 1$ мкг (кривая 1) в диапазоне $t_h \approx 5-13$ с амплитуда пика находится в насыщении $A_{\text{ГМТД}} \approx 120$ пА, при $t_h > 13$ с интенсивно спадает, но даже при $t_h = 35$ с она остается достаточно большой – $A_{\text{ГМТД}} \approx 5$ пА. Пик ионов летучего ТАТП при массе пробы $m_{\text{ТАТП}} = 10$ мкг полностью исчезает примерно за 8 с при максимуме $t_h \approx 1$ с.

Наличие в пробе отпечатка пальца с обильными ПЖО практически не влияет на динамику испарения летучего ТАТП (сравнение кривых 3 и 4), в то время как для малолетучих НА и ГМТД наблюдается более пологий спад амплитуды $A_i(t_h)$.

Из зависимостей $A_i(t_h)$ определили ионизационные эффективности e_i для наблюдаемых типов ионов мочевины в ПМ, МК в ОМ, ГМТД и ТАТП в ПМ и ГМТД и НА в ОМ при десорбции с поверхности салфеток следовых количеств этих веществ массами $m_i = 5, 1, 1, 5000, 100$ и 20 нг соответственно. Полученные значения ионизационных эффективностей e_i приведены в табл. 3. Там же даны значения e_i ионов, регистрируемых при одновременной десорбции с салфетки отпечатка пальца с обильными ПЖО и следовых количеств ТАТП, НА, ГМТД в ПМ и ОМ массами $m_i = 10, 0.1, 0.05$ и 1 мкг соответственно.

Для определения степени воздействия следовых количеств мочевины и МК, входящих в состав ОП, на ионизационную эффективность наблюдаемых типов ионов ВВ исследовали зависимости $e_i(m_{\text{мочевина}})$ в положительной и $e_i(m_{\text{МК}})$ в отрицательной модах (рис. 3). При варьировании в пробе массы мочевины от 5 до 50 нг регистрировали $A_i(t_h)$ и рассчитывали e_i для положительных ионов $K_0_{\text{ГМТД}} = 1.50 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, $K_0_{\text{ТАТП}} = 2.05$ и $1.33 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, а при варьировании МК от 1 до 100 нг определяли e_i для отрицательных ионов $K_0_{\text{ГМТД}} = 1.48$ и $1.91 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, $K_0_{\text{НА}} = 2.01 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$. На рис. 3 также даны значения e_i для указанных ионов при их регистрации в присутствии отпечатка с ссПЖО и обПЖО. Из рисунка следует, что увеличение в пробе массы мочевины вызывает существенное уменьшение e_i ионов $K_0_{\text{ГМТД}} = 1.50 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ и $K_0_{\text{ТАТП}} = 1.33 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, умеренное уменьшение e_i ионов $K_0_{\text{ТАТП}} = 2.05 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, а увеличение массы МК приводит к исчезновению наиболее интенсивного пика ионов $K_0_{\text{ГМТД}} = 1.91 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ и появлению пика ионов $K_0_{\text{ГМТД}} = 1.48 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, а также существенному уменьшению e_i ионов $K_0_{\text{НА}} = 2.01 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$. При наличии в пробе отпечатков с ссПЖО или обПЖО, содержащих существенно большие массы мочевины и МК [17, 25, 26], чем нанесенные из растворов, тенденции падения эффективностей e_i указанных ионов с увеличением массы мочевины или МК сохраняются.

Очевидно, что влияние присутствующих в ОП мочевины и МК на величину e_i ВВ будет отражаться и на их пределах обнаружения (ПО), являющихся основными параметрами,

характеризующими обнаружительную способность устройства.

Гексаметилентрипероксиддиамин (ГМТД). В отсутствие мочевины, МК или ОП, из всех исследованных веществ наилучший ПО зафиксирован с помощью ИДД Кербер-Т для ГМТД при регистрации положительных ионов с подвижностью $K_0_{\text{ГМТД}} = 1.50 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, равный $L_{\text{ГМТД}} = 10$ нг при $I_a = 45$ пА и соотношении $A_i/3\sigma = 120$. При использовании традиционного соотношения сигнал/шум = 3σ (Кербер-Т, $3\sigma = 0.375$ пА) приведенный ПО оценивали величиной $L_{\text{ГМТД}} = 30\text{--}50$ пг, что существенно меньше пределов обнаружения других СИП, равных 0.2 нг [24] и 5 нг (сигнал/шум = 3) [30, 31]. Верхняя граница динамического диапазона достигает величины $m_{\text{ГМТД}} = 0.4$ мкг при амплитуде пика ГМТД 120 пА. При дальнейшем увеличении $m_{\text{ГМТД}} > 0.4$ мкг амплитуда пика ионов $K_0_{\text{ГМТД}} = 1.50 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ уменьшается, а в спектре появляются новые пики. Таким образом, с учетом показателя шума 3σ потенциально динамический диапазон составил $\sim 10^4$.

В пробе с ссПЖО предел обнаружения ГМТД в ПМ регистрировали на уровне $L_{\text{ГМТД}} \approx 50$ нг, а в пробе с обПЖО — $L_{\text{ГМТД}} \approx 150$ нг, причем в последнем случае указанное значение $L_{\text{ГМТД}}$ фиксировали либо для пика ионов подвижностью $K_0_{\text{ГМТД}} = 1.50 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, либо для пика предположительно аддукт-катионов ГМТД и мочевины $K_0 = 1.31 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$.

В отрицательной моде наиболее представительным индикатором наличия в пробе ГМТД в отсутствие МК является пик ионов с $K_0 = 1.91 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, при регистрации которого масса пробы $m_{\text{ГМТД}} = 0.5$ мкг вызывает сигнал $A_i = 4.5$ пА = $12 \cdot (3\sigma)$. При наличии отпечатка с ссПЖО или обПЖО наиболее представительным является появляющийся именно в присутствии МК пик ионов ГМТД с подвижностью $K_0 = 1.48 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, близкий к пику ионов $K_0_{\text{ТНТ}} = 1.47 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, что при $m_{\text{ГМТД}} = 0.5$ мкг обеспечивает срабатывание сигнала “тревога” с индикацией обнаружения ТНТ ($I_a = 4.5$ пА). Значение $L_{\text{ГМТД}} = 0.5$ мкг можно считать пределом обнаружения ГМТД в отрицательной моде. К сожалению, в литературе не удалось найти ПО ГМТД в ОМ каких-либо других СИП.

Триацетона трипероксид (ТАТП). Предел обнаружения ТАТП при регистрации ионов $K_0_{\text{ТАТП}} = 2.05 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ является сравнительно высоким $L_{\text{ТАТП}} = 15$ мкг ($A_i/3\sigma = 160$). Кроме

того, с увеличением $m_{\text{ТАТП}} \geq 20$ мкг амплитуда этого пика практически не возрастает, а при $m_{\text{ТАТП}} \geq 50$ мкг уменьшается и в спектрах появляется много новых неразделенных пиков. Приведенный ПО (3σ) оценивали величиной ~ 0.1 мкг. Опубликованные значения ПО ТАТП других СИП сильно различаются – от 5 нг [31] и 23.3 нг [24] до 3.9 мкг [32] и $\sim 10^2$ мкг [22]. Приведенный ПО ИДД Кербер-Т лежит примерно в середине указанного диапазона значений.

Можно оценить предел обнаружения паров ТАТП в воздухе $L_{\nu, \text{ТАТП}}$, используя значения I_a , e_i , Q , число Авогадро $N_A = 6.02 \times 10^{23}$ моль $^{-1}$ и число Лошмидта $N_L = 2.69 \times 10^{19}$ см $^{-3}$. Например, при температуре воздуха $T = 298$ К по пику ионов $K_0_{\text{ТАТП}} = 2.05$ см 2 /(В·с), для которого $I_a = 60$ пА и $e_i = 0.003$ Кл/моль, $L_{\nu, \text{ТАТП}} = (I_a / (e_i \cdot Q)) \cdot (N_A / N_L) \cdot (298 / 273) \times 10^6 \approx 779100$ ppt, а приведенный ПО при $I_a = 3\sigma = 0.375$ пА составил $L_{\nu, \text{ТАТП}} \approx 0.6$ ppt. Для сравнения в отрицательной моде $L_{\nu, \text{ТНТ}} \approx 167$ ppt (1.5 пг/см 3), так как $e_i(\text{ТНТ}) = 11$ Кл/моль [17].

В присутствии отпечатка с ссПЖО или обПЖО предел обнаружения ТАТП по пику ионов $K_0_{\text{ТАТП}} = 2.05$ см 2 /(В·с) оценивали величиной $L_{\text{ТАТП}} = 50$ мкг. При дальнейшем увеличении $m_{\text{ТАТП}} > 50$ мкг в спектрах появляется много других неразделенных пиков в области $t_d = 35 \div 50$ мс, амплитуда пика ионов $K_0_{\text{ТАТП}} = 2.05$ см 2 /(В·с) уменьшается и сигнал “тревога” не вырабатывается.

Таким образом, необходимо особо отметить, что ИДД Кербер-Т имеет верхнюю границу обнаружения ТАТП, примерно равную $m_{\text{ТАТП}} \approx 50$ мкг. Это означает, что для проб с $m_{\text{ТАТП}} > 50$ мкг высока вероятность отсутствия сигнала “тревога” (ложноотрицательный сигнал – “пропуск цели”). Возможно, выявленное ограничение присуще любым СИП с данным типом ионизации.

Нитрат аммония (НА). Обнаружение НА имеет особенность. Так как образование ионов НА происходит посредством реакции автоионизации (уравнение (1)), зависимость амплитуды пика ионов $K_0_{\text{НА}} = 2.01$ см 2 /(В·с) от массы НА в пробе нелинейна – $A_{\text{НА}} \sim (m_{\text{НА}})^k$, где $k > 1$. Например, при $m_{\text{НА}} = 5$ нг – $A_{\text{НА}} = 0$, $m_{\text{НА}} = 10$ нг – $A_{\text{НА}} \approx 25$ пА, $m_{\text{НА}} = 20$ нг – $A_{\text{НА}} \approx 150$ пА. Из этих данных ПО НА оценивали величиной $L_{\text{НА}} \approx 15$ нг (при $A_{\text{НА}}/3\sigma = 120$). Указанное значение ПО на два порядка выше, чем, например, приведенный ПО НА (при $A_{\text{НА}}/3\sigma = 1$) 0.1 нг СИП с фотоионизацией [23].

В присутствии ссПЖО или обПЖО предел обнаружения НА по пику ионов $K_0_{\text{НА}} = 2.01$ см 2 /(В·с) оценивали величиной $L_{\text{НА}} = 100$ нг.

Экспериментально оценили время жизни следов ГМТД, ТАТП и НА на алюминиевой фольге. Время жизни следов ГМТД с массами $m_{\text{ГМТД}} = 1 \times 10^{-9}$, 2×10^{-9} , 1×10^{-8} г и поверхностными плотностями $d_s = 0.008$, 0.016 , 0.08 мкг/см 2 примерно равно 1, 3 и 12 ч соответственно. Время жизни следа ТАТП массой $m_{\text{ТАТП}} = 1 \times 10^{-5}$ г и $d_s \gg 80$ мкг/см 2 оценивается величиной $\sim 10^2$ с, а массой $m_{\text{ТАТП}} = 1 \times 10^{-4}$ г и $d_s \gg 800$ мкг/см $^2 \sim 10^3$ с. Наличие следов НА с массами $m_{\text{НА}} = 3 \times 10^{-8}$, 5×10^{-8} г и $d_s = 0.24$, 0.4 мкг/см 2 регистрировали в течение 13 и 25 ч соответственно.

* * *

Подводя итог, можно отметить следующее. Мочевина и молочная кислота являются теми компонентами ПЖО отпечатка пальца, которые могут влиять на эффективность обнаружения ГМТД, ТАТП и НА с помощью СИП с ИАД в положительной и отрицательной модах. Наличие в пробе мочевины или ПЖО оказывает небольшое влияние на регистрацию ТАТП в положительной моде, существенно уменьшает эффективность образования ионов ГМТД, вызывая появление предположительно аддукт-катионов ГМТД и мочевины с подвижностью $K_0 = 1.31$ см 2 /(В·с). Наличие в пробе МК или ПЖО незначительно уменьшает эффективность образования ионов НА в отрицательной моде, сильно изменяет качественный состав ионов ГМТД, вызывая появление наиболее интенсивного пика предположительно аддукт-анионов фрагмента ГМТД и МК с подвижностью $K_0 = 1.48$ см 2 /(В·с).

Пределы обнаружения следовых количеств ГМТД в ПМ и ОМ, ТАТП в ПМ и НА в ОМ с учетом высоких уровней срабатывания сигнала “тревога” ($\sim 100\sigma$) ИДД Кербер-Т, уменьшающих вероятность ложноположительных сигналов при решении реальных задач обнаружения ВВ в присутствии возможных мешающих веществ, составили 10 нг, 0.5 мкг, 15 мкг и 15 нг, а этих же ВВ, но в присутствии отпечатка пальца с обильными ПЖО – 150 нг, 0.5 мкг, 50 мкг и 100 нг соответственно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Научно-исследовательского

технологического института им. А.П. Александра. 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. Conklin C. Reducing the Threat of Improvised Explosive Device Attacks by Restricting Access to Explosive Precursor Chemicals. CISA, 2019. 11 p.
2. Grantham A. AMAT Insights. Reducing Risks Associated with Ammonium Nitrate. Geneva: GICHD, 2020. 26 p.
3. Bom di Mall Alam Sutera Gunakan TATP, Pertama di Indonesia. <https://www.liputan6.com/news/read/2352321/bom-di-mall-alam-sutera-gunakan-tatp-pertama-di-indonesia> (дата обращения 01.09.2022).
4. Взорвать “мать Сатаны”: ФСБ задержала боевиков, готовивших теракты в Москве. <https://ria.ru/20170814/1500327022.html> (дата обращения 01.09.2022).
5. Key Trends in Terrorism. <https://www.newamerica.org/international-security/reports/jihadist-terrorism-17-years-after-911/key-trends-in-terrorism/> (дата обращения 01.09.2022).
6. “Mother of Satan” explosives used in Surabaya church bombings: Police. <https://www.thejakartapost.com/news/2018/05/14/mother-of-satan-explosives-used-in-surabaya-church-bombings-police.html> (дата обращения 01.09.2022).
7. Gunasingham A. Sri Lanka attacks: An analysis of the aftermath // Counter Terrorist Trends and Analyses. 2019. V. 11. № 6. P. 8.
8. Indonesian police seize 5 bombs, explosives during terrorist raids. http://www.xinhuanet.com/english/2021-03/29/c_139844716.htm (дата обращения 01.09.2022).
9. Sniffing Out Terrorism. https://archives.fbi.gov/archives/news/stories/2005/december/k9_explosives122305 (дата обращения 01.09.2022).
10. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Reducing the Threat of Improvised Explosive Device Attacks by Restricting Access to Explosive Precursor Chemicals. Washington, DC: The National Academies Press, 2018. P. 154.
11. Teen charged with terrorism offences. <https://www.reuters.com/article/uk-britain-security-idUKL2932538820080429> (дата обращения 01.09.2022).
12. A look at the explosives used in the New York bombing. <https://cen.acs.org/articles/94/i38/look-explosives-used-New-York.html> (дата обращения 01.09.2022).
13. Oslo government district bombing and Utøya island shooting July 22, 2011: The immediate prehospital emergency medical service response. <https://sjtrem.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-7241-20-3> (дата обращения 01.09.2022).
14. Banlaoi R.C. The Lamitan bombing and terrorist threat in the Philippines // Counter Terrorist Trends and Analyses. 2018. V. 10. № 9. P. 1.
15. Eiceman G.A., Karpas Z., Hill H.H.Jr. Ion Mobility Spectrometry. 3rd Ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. 444 p.
16. DeBono R., Lareau R.T. Trace detection of explosives by ion mobility spectrometry / Counterterrorist Detection Techniques of Explosives / Eds. Cagan A., Oxley J. C. 2nd Ed. Elsevier, 2022. P. 163.
17. Буряков Т.И., Буряков И.А. Обнаружение следовых количеств взрывчатых веществ в присутствии молочной кислоты методом спектрометрии ионной подвижности // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 1. С. 28. (Buryakov T.I., Buryakov I.A. Detection of trace amounts of explosives in the presence of lactic acid by ion mobility spectrometry // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. № 1. P. 43.)
18. Ewing R.G., Waltman M.J., Atkinson D.A. Characterization of triacetone triperoxide by ion mobility spectrometry and mass spectrometry following atmospheric pressure chemical ionization // Anal. Chem. 2011. V. 83. P. 4838.
19. Skalny J.D., Orszagh J., Mason N., Rees J.A., Aranda-Gonzalvo Y., Whitmore T.D. Mass spectrometric study of negative ions extracted from point to plane negative corona discharge in ambient air at atmospheric pressure // Int. J. Mass Spectrom. 2008. V. 272. P. 12.
20. Ewing R.G., Waltman M.J. Mechanisms for negative reactant ion formation in an atmospheric pressure corona discharge // Int. J. Ion Mobil. Spectrom. 2009. V. 12. P. 65.
21. Kozole J., Levine L.A., Tomlinson-Phillips J., Stairs J.R. Gas phase ion chemistry of an ion mobility spectrometry based explosive trace detector elucidated by tandem mass spectrometry // Talanta. 2015. V. 140. P. 10.
22. Marr A.J., Groves D.M. Ion mobility spectrometry of peroxide explosives TATP and HMTD // Int. J. Ion Mobility Spectrom. 2003. V. 6. P. 59.
23. Cheng S., Wang W., Zhou Q., Chen C., Peng L., Hua L. et al. Fast switching of CO₃(H₂O)_n and O₂⁻(H₂O)_n reactant ions in dopant-assisted negative photoionization ion mobility spectrometry for explosives detection // Anal. Chem. 2014. V. 86. P. 2687.
24. Jiang D., Peng L., Wen M., Zhou Q., Chen C., Wang X. et al. Dopant-assisted positive photoionization ion mobility spectrometry coupled with time-resolved thermal desorption for on-site detection of TATP and HMTD in complex matrices // Anal. Chem. 2016. V. 88. № 8. P. 4391.
25. DART (Direct Analysis in Real Time) Applications Notebook. Atmospheric Pressure Ionization High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometer. JEOL Ltd, 2016. P. 40.

26. *Kalhor H., Alizadeh N.* Determining urea levels in dialysis human serum by means of headspace solid phase microextraction coupled with ion mobility spectrometry and on the basis of nanostructured polyurethane film // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 5333.
27. *Головин А.В., Васильев В.К., Иванов И.А., Беляков В.В., Громов Е.А., Малкин Е.К., Матуско М.А., Першенков В.С.* Двухполярный спектрометр ионной подвижности // *Датчики и системы.* 2018. № 2. С. 4. (*Golovin A.V., Vasilyev V.K., Ivanov I.A., Belyakov V.V., Gromov E.A., Malkin E.K., Matusko M.A., Pershenkov V.S.* Bipolar ion mobility spectrometer // *Sensors and Systems.* 2018. № 2. P. 4.)
28. *Головин А.В.* Спектрометр ионной подвижности с источником ионизации на основе импульсного коронного разряда. Дис. ... канд. тех. наук. Москва: Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", 2010. 197 с.
29. *Громов Е.А.* Система регистрации и управления спектрометрическим каналом двухполярного спектрометра ионной подвижности. Москва: Дис. ... канд. тех. наук. Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", 2018. 160 с.
30. *Ehlert S., Walte A., Zimmermann R.* Ambient pressure laser-desorption and laser induced acoustic desorption ion-mobility-spectrometry detection of explosives // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 22. P. 11047.
31. *Cook G.W.* Improving ion mobility spectrometry detection methods for trace forensics and military field applications. Dis. ... PhD. Bethesda: The Uniformed Services University of the Health Sciences, 2006. 117 p.
32. *Oxley J.C., Smith J.L., Kirschenbaum L.J., Marimanganti S., Vadlamannati S.* Detection of explosives in hair using ion mobility spectrometry // *J. Forensic Sci.* 2008. V. 53. № 3. P. 690.

ORIGINAL ARTICLES

DETECTING TRACE AMOUNTS OF PEROXIDES AND AMMONIUM NITRATE IN FINGERPRINTS BY ION MOBILITY SPECTROMETRY**T. I. Buryakov^{a, *}, I. A. Buryakov^{a, **}**^a*Alexandrov Research Institute of Technology, 188540, Sosnovy Bor, Leningrad oblast, Russia***E-mail: buryakovti@gmail.com****E-mail: buryakovia@gmail.com*

Abstract. The effect of the sweat and grease deposits (SGD) from fingerprints on the detection efficiency of trace amounts of explosive substances—triacetone triperoxide (TATP), hexamethylene triperoxide diamine (HMTD), and ammonium nitrate (AN) by ion mobility spectrometry in air at atmospheric pressure was investigated. Among the main components of SGD, urea is identified as a positive mode influencer, while lactic acid (LA) affects in a negative mode. The presence of urea or SGD in the sample does not significantly affect the detection of TATP in the positive mode but decreases the efficiency of HMTD ion formation and leads to the appearance of adduct cations of HMTD and urea. The presence of lactic acid or SGD slightly decreases the efficiency of ammonium nitrate ion formation in the negative mode and significantly alters the qualitative composition of HMTD ions, leading to the appearance of HMTD and LA adduct anions. In the absence of any impurities in the sample, the best reduced limit of detection (signal-to-noise ratio = 3σ), estimated at 30–50 pg, was observed for HMTD. The lifetime of HMTD, TATP, and AN traces on aluminum foil under laboratory conditions was determined to be 1, 3, and 12 h for samples with masses of m_{HMTD} 1×10^{-9} , 2×10^{-9} , and 1×10^{-8} g and surface densities d_s of 0.008, 0.016, and 0.08 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively; 10^2 and 10^3 s for m_{TATP} 1×10^{-5} and 1×10^{-4} g and d_s of 80 and 800 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively; 12 and 25 h for m_{AN} 3×10^{-8} and 5×10^{-8} g and d_s of 0.24 and 0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively.

Keywords: ion mobility spectrometry, triacetone triperoxide, hexamethylene triperoxide diamine, ammonium nitrate, human fingerprint residue, urea, lactic acid.

УДК 543.08:4.061

СРАВНЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МЕТОДОВ ЭКСПРЕССНОЙ ОЦЕНКИ СЕЛЕКТИВНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ФАЗ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ

© 2024 г. Т. А. Кучменко^{a, b, *}, Д. Ю. Вандышев^c, В. В. Ягов^b, Р. У. Умарханов^a, И. В. Леденева^c

^a Воронежский государственный университет инженерных технологий,
просп. Революции, 19, Воронеж, 394036, Россия

^b Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского Российской академии наук,
ул. Косыгина, 19, Москва, 119334, Россия

^c Воронежский государственный университет,
Университетская пл., 1, Воронеж, 394006, Россия

*E-mail: tak1907@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 22.09.2023 г.

Принята к публикации 25.09.2023 г.

Рассмотрены результаты оценки сорбционных и флуоресцентных свойств соединений класса азолотриазинов и фаз на основе квантовых точек сульфида кадмия в парах легколетучих органических соединений (биомаркеры состояния живых систем). Сорбционные свойства фаз на основе органических красителей и капсулированных полупроводников по отношению к парам спиртов, кетонов, аминов, кислот, аммиака, альдегидов изучены прямым высокочувствительным пьезокварцевым микровзвешиванием. Спектральные свойства и изменение их в парах аналитов изучены различными методами спектроскопии (абсорбционная, фотолюминесценция). Сопоставлены результаты исследований и возможность оптимизации этой стадии. Предложено оценивать согласованность методов по прогнозированию изменений флуоресцентных свойств в тест-системах для летучих органических соединений по коэффициенту конкордации Кендалла W . Установлено, что наибольший коэффициент согласованности оценки ($W = 0.89$) имеют методы спектрофлуориметрии и прямого микровзвешивания паров при сорбции на фазах – потенциальных наполнителях тест-систем. Корреляция результатов, полученных разными методами флуоресценции (визуальные планшетные тест-системы и флуориметрия фаз на бумажных подложках), составляет 0.80, что подтверждает высокую степень согласованности оценок с их помощью степени взаимодействия аналитов и органических, комбинированных флуорохромов. Установлено, что методы, близкие по природе возникновения аналитического отклика, согласованы не лучше, чем с методом прямого микровзвешивания паров на микрофазах флуориметрических реагентов разной природы (квантовые точки CdS/хитозан, органические соединения класса азолотриазинов, смешанных фаз). Это, в свою очередь, позволяет выбирать на стадии рутинных экспериментов более простые, доступные и экспрессные методы и средства анализа.

Ключевые слова: спектроскопия, флуоресценция, квантовые точки, органические реагенты, сорбция, органические биомолекулы, информативность.

DOI: 10.31857/S0044450224070107 EDN: TNHNCU

Наиболее перспективным и малоизученным подходом к разработке многокомпонентных, доступных и удобных в любых условиях тест-систем является применение в них в качестве реактивных центров флуоресцентных зондов. Такой способ хорошо подходит для различных биологических сред и основан на анализе изменений сигналов флуоресценции небольшим количеством молекул-зондов в биопробе малого объема [1–5].

Известно применение подобного подхода для ранней диагностики, но оно имеет ограниченное применение в животноводстве и в неинвазивных тест-средствах.

К потенциальным детектирующим зондам для различных малых биомолекул, в частности для легколетучих органических соединений (ЛОС), предъявляется ряд требований: они должны взаимодействовать с целевыми аналитами

с высокими чувствительностью и специфичностью, быть относительно устойчивыми при хранении, давать устойчивый явный аналитический отклик, в составе простых тест-средств позволять быстро определять соединения-маркеры в небольшом объеме различных биологических образцов (например, мазков биосред) без дополнительной пробоподготовки. Существующие флуоресцентные или иные тест-системы для анализа биопроб либо весьма дорогостоящие, либо имеют недостаточно высокие чувствительность и селективность к биомаркерам [6–13].

Несомненным преимуществом применения флуоресцентных зондов внутри организма является возможность исследования с их помощью молекулярных механизмов возникновения и развития патологических процессов, действия на организм биологически активных веществ и лекарственных препаратов. Флуоресцентные зонды применяются также для диагностики и прогноза развития заболеваний, выявления факторов риска и контроля эффективности лечения [14–16]. Зондовая флуоресценция чувствительна к структурно-функциональным изменениям в биологических мембранах, микровязкости липидного бислоя, связыванию с белками и другими веществами, структурным перестройкам в белках, изменению мембранного потенциала и концентрации внутриклеточного кальция и др. [15]. Все эти факторы необходимо учитывать при изучении новых реагентов, которые потенциально могут быть применены в такого рода аналитических системах.

Особое место среди соединений с ярко выраженной и стабильной люминесценцией (в том числе по отношению к различным биомолекулам) занимают неорганические квантовые точки разной структуры и органические производные азолотриазинов. Однако лишь незначительное число публикаций посвящено синтезу линейно связанных и конденсированных гетероциклических соединений, содержащих данный фрагмент. Между тем именно сочетание в одной молекуле нескольких гетероциклических фрагментов зачастую позволяет добиться более “чистой” люминесценции за счет синергетического действия и лучшего связывания с медиаторами воспалений и другими биомолекулами [17–19].

В настоящий момент известно, что производные азолотриазинов характеризуются интенсивной люминесценцией. В частности, азотсодержащие гетероциклические люминофоры являются предметом изучения органической электроники, биохимии, биофизики и микробиологии. На их основе создаются электролюминесцентные датчики, лазеры и иные полупроводниковые приборы, иммунологические люминесцентные (флуоресцентные) зонды [17–24]. При анализе биологических систем отмечено их специфическое взаимодействие с различными микроорга-

низмами, грибами, биомолекулами, приводящее к видимым изменениям цвета люминесценции. Однако следует отметить, что органические люминесцирующие соединения, в частности азолотриазины, имеют проблему фотоустойчивости в возбуждающем излучении (быстрое выгорание), а корреляция между химической структурой и эффективностью флуоресценции еще далека от удовлетворительного понимания. Схожесть в изменении спектров люминесценции не всегда дает возможность определить конкретный биомаркер без дополнительных исследований. Квантовые точки (КТ), в свою очередь, имеют более высокий выход флуоресценции, но изменять их сродство к ЛОС на стадии синтеза или при дальнейшей обработке весьма сложно.

До настоящего времени актуальными остаются проблемы, связанные с разработкой новых методов и реакций, позволяющих осуществлять направленный синтез КТ, гетероциклических систем, содержащих остов азолотриазинов, в том числе структурно близких природным. Большое значение имеют также установление взаимосвязи между строением и люминесценцией, изучение и быстрая оценка перспективности новых реагентов для дальнейшего применения в аналитических тест-системах. Быстрый синтез и варибельность свойств флуоресцентных фаз, как органических, так и неорганических, ставят задачу по оптимизации предварительного этапа оценки их оптических и реакционных свойств по отношению к конкретным анализам. Применение дорогостоящего спектрального оборудования на этом этапе неэффективно и экономически неоправданно. Однако и упрощение до простых, в том числе визуальных, методов оценки аналитического отклика не всегда информативно на стадии определения вектора синтеза реагентов, когда их характеристики могут быть еще далеки от ожидаемых. На всех этапах поиска приоритетным является решение задач ускорения и упрощения стадий получения оценочной информации, при этом с сохранением условий, близких к условиям дальнейшего применения аналитических тест-систем. Для синтеза флуоресцентных реагентов наиболее доступными являются планшетные тесты с растворами аналитов. Однако реакции в растворах и в газовой среде с летучими соединениями могут не совпадать по вызываемому аналитическому эффекту. Тем более, что дальнейшее применение тест-систем на основе флуоресцентных зондов практически не изучено для газосодержащих сред. Обозначенные противоречия могут быть устранены путем применения метода, совмещающего в себе возможность использования малых концентраций твердотельных фаз реагентов и летучих паров ЛОС с возможностью экспрессного и несложного изучения, количественной оценки скорости, эффективности их взаимодействия.

Основной идеей предлагаемой работы является обоснование возможности предсказания эффективности реакций между фазами-реагентами и веществами-аналитами, протекающих в жидкой, газовой средах и приводящих к значительным изменениям в структуре люминофора, возникновению внешнего эффекта, регистрируемого не только спектральным методом, но и другими, например сорбционным, напрямую не регистрирующим изменение спектральных свойств в системе.

Цель работы – оценить возможность и надежность предсказания флуоресцентной активности органических (азолотриазины) и неорганических (на основе квантовых точек сульфида кадмия в хитозане) реагентов по отношению к приоритетным ЛОС, в том числе биомаркерам, по результатам исследований их спектральных и сорбционных свойств.

Для оценки влияния биомаркеров на возможное изменение оптических свойств новых реагентов выбраны следующие методы: визуальная флуориметрия с оцифровкой изображения при возбуждении при 365 и 254 нм фаз в растворах и на подложках после контакта с парами и растворами тест-веществ; фотолюминесценция при освещении лазером с длиной волны 405 нм фаз реагентов, нанесенных на бумажную подложку, при контакте их с парами тест-веществ на спектрометре; высокочувствительный прямой метод изучения сорбции паров – пьезокварцевое микровзвешивание микрофаз реагентов (сорбенты) при экспозиции в парах тест-веществ (сорбаты).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика реагентов. В качестве органических реагентов синтезировали соединения, содержащие остов имидазо- и пиразолотриазинов. В исследовании оценивали свойства следующих реагентов:

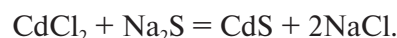
Наименование по IUPAC	Маркировка
2-(6-Оксо-2-фенилимидазо[1,2- <i>b</i>]пиридо[4,3- <i>e</i>][1,2,4]триазин-7(6 <i>H</i>)-ил)уксусная кислота	ФЗ 12
Этил-3-метил-6-фенилимидазо[1,2- <i>b</i>][1,2,4]триазин-2-карбоксилат	ФЗ 14
2-(4-Гидрокси-7-(метоксиметил)-8-фенилпиразоло[5,1- <i>c</i>][1,2,4]триазин-3-ил)бензойная кислота	ФЗ 28
2-(4-Гидрокси-8-фенилпиразоло[5,1- <i>c</i>][1,2,4]триазин-3-ил)бензойная кислота	ФЗ 32

Фазы хранили в виде растворов в неводных растворителях с концентрацией реагента 1 мг/мл.

Для оценки сорбционных свойств фазы наносили на электроды пьезокварцевых резонаторов (ПКР) и бумажные подложки.

В качестве неорганических реагентов изучали фазы на основе квантовых точек сульфида кадмия в хитозане без и с добавлением при синтезе родамина 6 G.

Синтез КТ основан на реакции



Для осуществления синтеза готовили исходные растворы хитозана с концентрацией 2 мас.% в 2%-ном растворе уксусной кислоты; 0.010 М растворы хлорида кадмия, сульфата натрия чистотой х. ч. Далее при постоянном перемешивании в раствор хитозана малыми порциями вводили растворы реагентов. Через 10–15 мин после непрерывного перемешивания коллоидный раствор приобретал характерный желтый цвет. На спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Центр коллективного пользования ФГБОУ ВО ВГУ-ИТ) регистрировали спектры поглощения полученного раствора квантовых точек относительно раствора хитозана в диапазоне 250–900 нм. Ширина запрещенной зоны полученных КТ составляла для разных партий 2.6–2.8 эВ. Полученные КТ отмывали пропанолом-2, центрифугировали, наносили на серебряные электроды ПКР с двух сторон капельным методом. Также наносили методом капли на бумажную подложку фиксированный объем изопропанольного раствора КТ.

Для изменения сродства КТ к парам ЛОС дополнительно вводили в хитозан раствор родамина 6G с разным соотношением с КТ. Далее фазы также отмывали и наносили на ПКР и бумагу.

Кроме индивидуальных, применяли комбинированные фазы: на фазы КТ и наногидроксипатита (ГА) в качестве нефлуоресцирующего наноматериала наносили капельным путем растворы органических люминофоров ГА/ФЗ 12 (ФЗ 28, ФЗ 32, ФЗ 14); CdS/ФЗ 32 (ФЗ 28, ФЗ 14, ФЗ 12). Массу фаз после удаления растворителей подбирали в диапазоне 3–8 мкг. Свободный растворитель удаляли в сушильном шкафу (20–40 мин при 50–60°C). Массу фаз контролировали по изменению базовой частоты колебания ПКР без нагрузки.

Тест-вещества. Оценивали сорбцию и спектральный отклик фаз по отношению к парам спиртов алифатических C₂–C₄ нормального и изомерного строения; метилэтилкетона, ацетона, аминов линейного и циклического строения (метиламин, диэтиламин, бутиламин, пиридин); этановой, пропановой кислот; этилацетата, ацетальдегида, раствора аммиака, воды,

других тест-веществ. Применяли индивидуальные вещества в объеме 5–10 мкл для изучения сорбции паров при 20–22°C. Для оценки отклика растворов на планшете готовили водные растворы тест-веществ на двух уровнях концентрации: низкая соответствует норме процессов в организме человека; высокая – уровень диагностирования метаболических нарушений [25].

Характеристика приборов. *Визуальная флуориметрия* на планшетах с оцифровкой результатов взаимодействия фаз ФЗ и тест-веществ на денситометре “ДенСкан” (ООО “НЦ “Ленхром”, С.-Петербург) при двух длинах волн возбуждения (365, 254 нм). Планшеты формировали по единой схеме добавления веществ с двукратным повторением.

ФЗ	H ₂ O	М	М*	О	О*	В	В*	Н	Н*	К	К*
		Т	Т*	У	У*						
		Г	Г*	З	З*	С	С*	Р	Р*	Д	Д*
		Ж	Ж*	П	П*	Б	Б*	И	И*		

(буквами обозначены растворы тест-веществ: этаноламин (Г, Г*), бутиламин (М, М*), изобутиламин (Р, Р*), циклопентиламин (П, П*), триэтиламин (Н, Н*), морфолин (О, О*), пропионовая (В, В*), масляная (Т, Т*), молочная (У, У*), этановая (Ж, Ж*), 3-фенилмолочная (Д, Д*) кислоты; ацетон (З, З*), бутан-2,3-дион (К, К*), циклогексанон (С, С*)).

Флуоресценцию нанесенных на бумагу люминофоров возбуждали твердотельным лазером 405 нм мощностью 200 мВт. Спектры регистрировали в диапазоне 200–1100 нм с помощью спектрометра Maya 2000 Pro (Ocean Optics, США) с разрешением 0.5 нм. Время интегрирования – 1 с.

Оценку сорбционного сродства фаз на основе квантовых точек CdS/хитозан, органических люминофоров, комбинированных фаз на серебряных электродах по отношению к микроконцентрациям летучих молекул выполняли на многоканальных нановесах “MCNanoW-PQ” (ООО “Сенсорика – Новые Технологии”, Россия [25]) с восемью рабочими каналами. Для микровзвешивания сорбатов в режиме реального времени с высокой чувствительностью по массе применяли ПКР объемных акустических волн (масс-чувствительные АТ-среза) с базовой частотой колебания кварцевой пластины 10.0 МГц с серебряными электродами диаметром 5 мм (ОАО “Пьезо”, Россия). Многоканальные нановесы связаны с индивидуальным программным обеспечением для регистрации изменения частоты колебания кварцевой пластины и массы в режиме реального времени с шагом 1 с и разрешением 1 Гц по модели Зауэрбрея.

Изменение частоты колебаний кварцевой пластины ($-\Delta F_i$, Гц) прямо пропорционально массе сорбента за счет адсорбции на ней паров тест-веществ. Эта закономерность позволяет устанавливать прямые зависимости кинетики сорбции (скорость изменения сигнала), массы адсорбированных молекул (величина сигнала сенсора) с их природой и концентрацией в ячейке детектирования.

На многоканальных нановесах, оснащенных герметичной ячейкой из фторопласта объемом 140 см³, с открытым входом для фронтального ввода паров от индивидуального соединения, проводили эксперимент по изучению сорбционных свойств различных сорбентов. Режим измерения эффективности неравновесной сорбции: полное время (цикл измерения) составляет 200 с; нагрузка (выдерживание над пробой тест-вещества фиксированного объема) составляет 60 с, далее следует самопроизвольная регенерация системы, во время которой также регистрируется активность десорбции паров с фаз сорбентов.

Выходные сигналы пьезосенсоров – изменение частоты колебаний ($-\Delta F_i$, Гц) при сорбции/десорбции легколетучих веществ с шагом в 1 с фиксировались в виде хроночастотограмм ($-\Delta F_i = f(\tau)$, где τ – время измерения), максимальные сигналы пьезосенсоров ($-F_{\max}$, Гц). Это наиболее полная регистрируемая характеристика и наиболее простой из рассчитываемых параметров соответственно.

Для оценки различий в сорбции легколетучих соединений и сравнения сорбционных свойств реагентов к определенным тест-веществам применяли максимальные аналитические сигналы двух сенсоров и рассчитывали коэффициент парной селективности:

$$A(i/j) = \frac{-\Delta F_{\max i}}{-\Delta F_{\max j}}$$

$-\Delta F_{\max i,j}$, Гц – фиксируемый максимальный за время нагрузки отклик сенсоров i и j соответственно. Соотношения таких сигналов характеризуют относительную скорость сорбции на фазах двух сорбентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тест-планшеты для органических люминофоров. В идентичных условиях изучали и оценивали визуально с оцифровкой результата эффекты и взаимодействие органических реагентов КТ CdS, CdS/родамин 6G на бумажных подложках с растворами тест-веществ минимальной (физиологическая норма) и максимальной (не норма) концентраций. Рис. 1 и 2 на примере органических реагентов демонстрируют системы с имеющимися и отсутствующим откликами на тест-вещества. Полученные данные система-

тизированы в табл. 1, там же дан анализ аналитического отклика.

Используемые в данном исследовании флуоресцентные зонды класса азолотриазинов являются весьма стабильными полифлуорофорами, способными к фосфоресценции. Помимо этого, в зависимости от природы аналита имеет место цветовой переход в видимой части спектра (за счет наличия значительного

количества бензольных фрагментов), что существенно упрощает процедуру регистрации эффекта взаимодействия и потенциально анализа.

Установлено, что наличие в структуре ФЗ таких функциональных групп, как карбоксильная и карбонильная способствует селективному и обратимому связыванию с первичными и вторичными аминами. Происходит образование

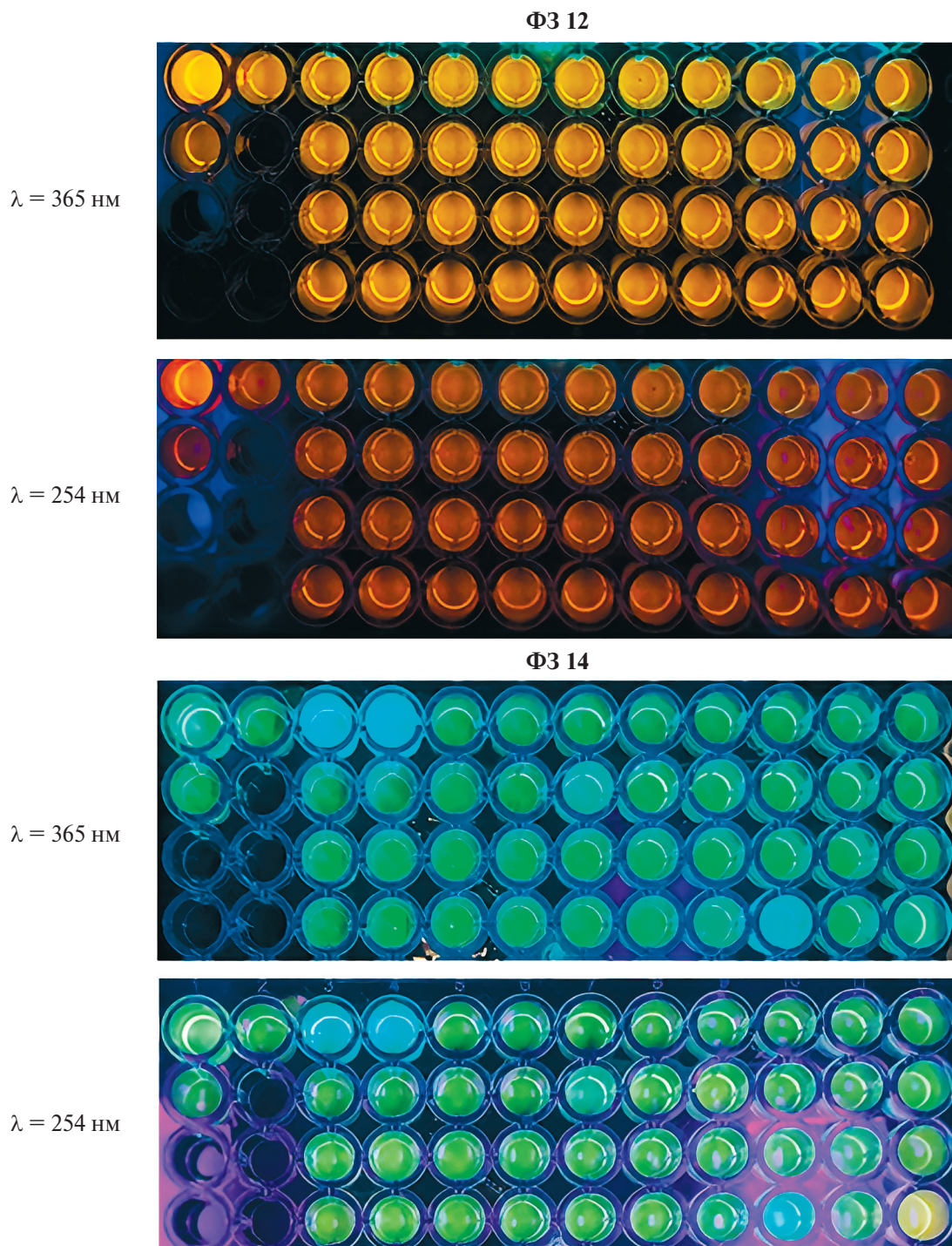


Рис. 1. Флуоресцентный отклик планшетов с ФЗ 12, ФЗ 14 с растворами тест-веществ (схема смешивания представлена в “Экспериментальной части”) при разных длинах волн источника возбуждения.

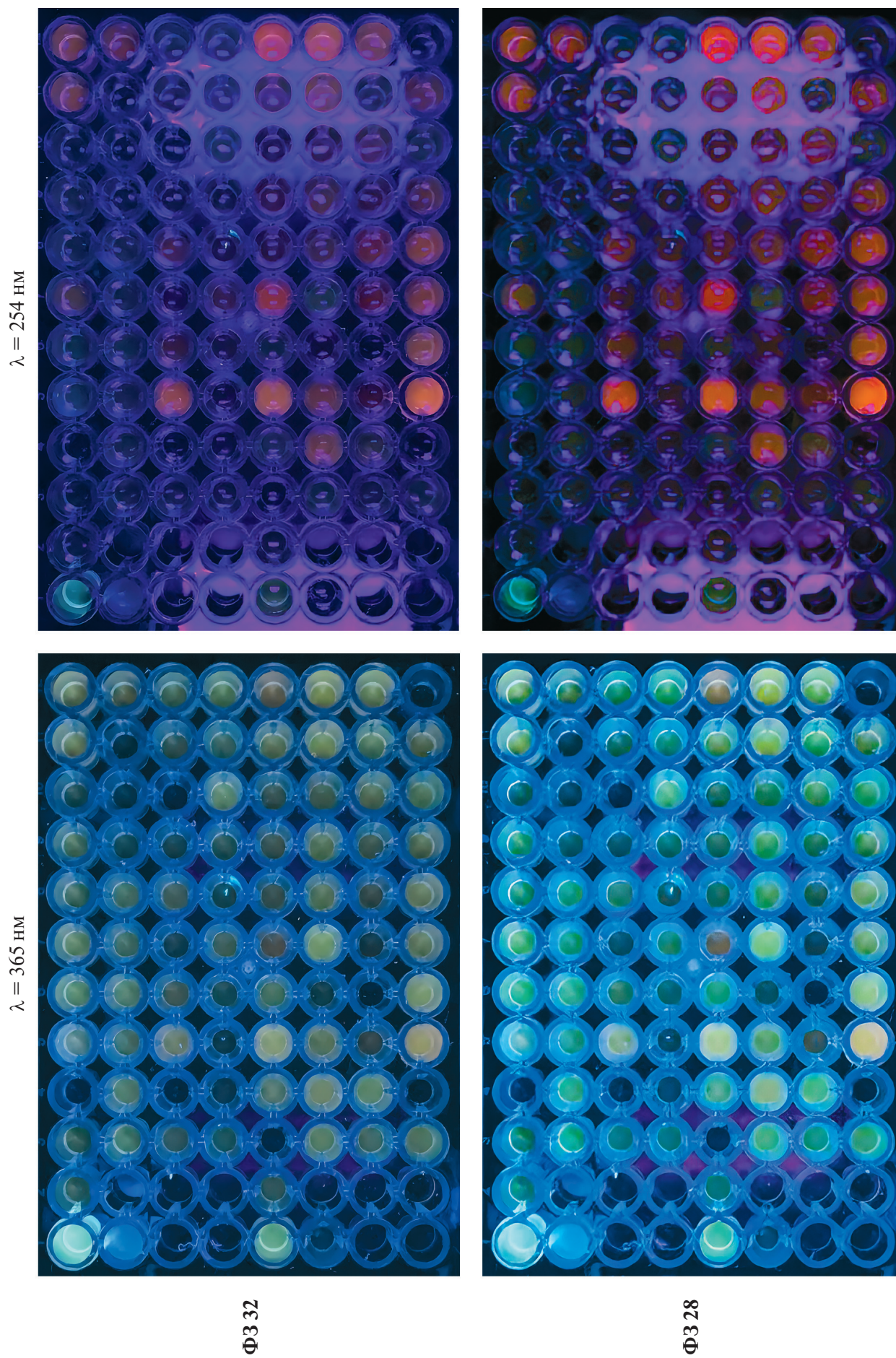


Рис. 2. Флуоресцентный отклик планшетов с Ф3 28, Ф3 32 с растворами тест-веществ (схема смешивания представлена в “Экспериментальной части”) при разных длинах волн источника возбуждения.

Таблица 1. Наблюдаемые визуально изменения в планшетных тест-системах органических люминофоров и водных растворов тест-веществ

Аналит	Ф3 14	Ф3 28	Ф3 32
Ацетоуксусная к-та	Гашение люминесценции (*)	Не меняет свойств (—)	—
Уксусная к-та	*	—	—
Пропионовая к-та	*	Зелено-оранжевое свечение (254,365 нм), высокие концентрации	—
Масляная к-та	*	365 нм, гасит свечение высокая концентрация	365 нм, гасит свечение высокая концентрация
Молочная к-та	*	365 нм, гасит свечение высокая концентрация	365 нм, гасит свечение высокая концентрация
3-Фенилмолочная к-та	*	365 нм, гасит свечение любая концентрация	365 нм, гасит свечение высокая концентрация
Пероксид водорода	*	—	—
Ацетон	*	Зелено-оранжевое свечение (254,365 нм), высокие концентрации	—
Циклогексанон	*	—	—
Этаноламин	*	Зелено-оранжевое свечение (254,365 нм), любые концентрации	—
Аммиак	Зелено-голубое свечение (365, 254 нм), любые концентрации	Зелено-оранжевое свечение (254,365 нм), высокие концентрации	—
Бутиламин	Зелено-голубое свечение (365, 254 нм), любые концентрации	Зелено-оранжевое свечение (254,365 нм), любые концентрации	Зелено-оранжевое свечение (254 нм), любые концентрации
Триэтиламин	*	Зелено-оранжевое свечение (254, 365 нм), низкие концентрации	—
Изобутиламин	*	—	—
Циклопентиламин	*	—	Зелено-оранжевое свечение (254 нм), высокие концентрации
Аналог стеарина	*	Зелено-оранжевое свечение (254 нм), низкие концентрации	—
Аналог гормона	*	Зелено-оранжевое свечение (254 нм), низкие концентрации	Зелено-оранжевое свечение (254 нм), низкие концентрации
Вода	Слабое гашение	Гашение	Гашение

ионных и/или водородных связей с кетонами и карбоновыми кислотами. Указанные взаимодействия приводят к существенному перераспределению электронных плотностей и снижению конформационной лабильности. Однако повышенная гидрофильность исследуемых зондов приводит к снижению доступности активных групп и, как следствие, к сглаживанию эффектов свечения в присутствии целевых аналитов. В связи с этим приоритетными направлениями изменения структуры люминофоров являются: увеличение липофильности и сохранение достаточной гидрофильности для обеспечения возможности взаимодействия с полярными молекулами. При этом контролируемые свойствами структур-лидеров остается интенсивность флуоресценции, фотостабильность растворов и выраженность аналитического отклика (усиление/гашение люминофора).

В условиях многовариантности синтеза наиболее простым и доступным способом контроля является визуальная индикация на бумажных подложках или в планшетах. Однако при таких подходах могут быть некорректно оценены эффекты с парами летучих соединений.

Рис. 3 иллюстрирует влияние аммиака и метиламина на спектр флуоресценции ФЗ 32.

И аммиак, и метиламин приблизительно вдвое усиливают свечение люминофора на бумажном носителе. Действие их обратимо: пары уксусной кислоты (кривая 4) тушат свечение люминофора до уровня несколько ниже исходного. Такая же картина наблюдается для ФЗ 28, что неудивительно, поскольку молекулы ФЗ 32 и ФЗ 28 отличаются единственным заместителем, незначительно влияющим на свойства ароматической системы. Основной причиной эффекта предположительно является ионизация фенольной группы, что типично для кислотно-основных индикаторов.

Помимо указанного эффекта с парами аналитов, для ФЗ 28 и ФЗ 32 обнаружена чрезвычайно высокая чувствительность яркости люминесценции к присутствию катионных ПАВ. Хотя этот эффект не реализуется напрямую при детектировании паров, он указывает на высокую чувствительность спектров флуоресценции указанных молекул к окружению, причем эффект не сводится только к влиянию pH. Это позволяет положительно оценить возможности регулировки свойств аналитических систем в дальнейшем. Свойства флуоресцентного кислотно-основного индикатора проявляет также реагент ФЗ 12, однако свечение этого вещества

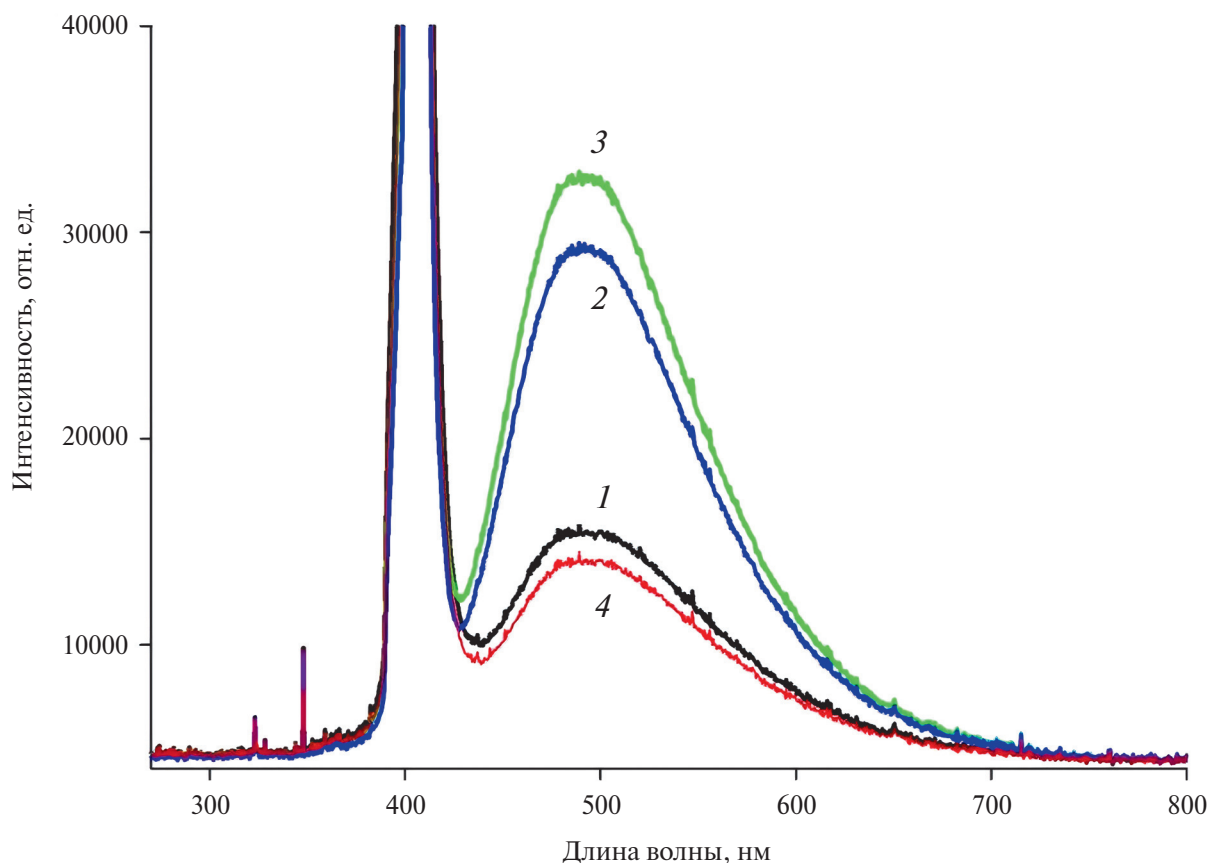


Рис. 3. Спектры флуоресценции ФЗ 32 на бумажном носителе при длине волны возбуждения 405 нм: исходный (1), под действием паров аммиака (2), метиламина (3) и уксусной кислоты (4).

подавляется только в присутствии сильной минеральной кислоты.

Оценка сорбционных свойств индивидуальных и смешанных фаз. Методом пьезокварцевого микровзвешивания сопоставлено сорбционное средство паров некоторых классов соединений к веществам – потенциальным люминофорам: неорганическим (квантовые точки сульфида кадмия в хитозане), органическим соединениям и их комбинациям. Фазы КТ и органические фазы ФЗ 12, 14, 28, 32 близких масс проявляют разное сродство к парам органических соединений, воде, аммиаку (табл. 2). Для удобства представления данных пронумеровали фазы на ПКР: CdS (1), ФЗ 14 (2), ФЗ 12 (3), ГА/ФЗ 32 (5), CdS/ ФЗ 32 (6), ГА/ФЗ 28 (7), ГА (8).

Установлено, что удельная скорость накопления паров за 1 мин ($S_{уд} = (-\Delta F_{max})/(-\Delta F_{сорбен-та})$, Гц/мин)

различается существенно как для органических, так и для комбинированных фаз (рис. 4). Органические люминофоры без подложки проявляют практически химическое сродство к аминам и к аммиаку (ФЗ 12, 14). Нанесение фазы на наноструктурированную подложку приводит к существенному изменению как эффективности, так и скорости сорбции паров.

Сопоставление результатов микровзвешивания разных по природе тест-веществ позволяет говорить о высокой избирательности фаз ФЗ 32, 28 к парам аммиака и аминов, а ФЗ 25 в большей степени к кислотам. Нанесение люминофоров на наноструктурированные фазы ГА и CdS (табл. 2) приводит к существенному нивелированию избирательности и чувствительности органических люминофоров и фаз подложек к аминам, кислотам. Если же такие фазы применять в качестве модификаторов газовых сенсоров, то

Таблица 2. Максимальные отклики ($-F_{max}$, Гц) пьезовесов с фазами разных люминофоров в парах некоторых тест-веществ

Фазы сорбентов	Масса, мкг	Вода	Аммиак, 9%-ный раствор	Аммиак, повтор	Этанол 70%-ный	<i>n</i> -Бутиламин	Раствор уксусной кислоты
ФЗ 32	6.0	40	516*	50	51	318*	76
ФЗ 14	3.7	136	263	160	140	187*	394
ФЗ 25	3.0	130	257	160	140	110*	366
ФЗ 28	5.0	11	329*	20	20	150*	42
ФЗ 28/ ГА	20.5	200	113	85	–	350	105
ФЗ 12/ ГА	15.5	80	138	98	–	145	145

*Не происходит десорбции.

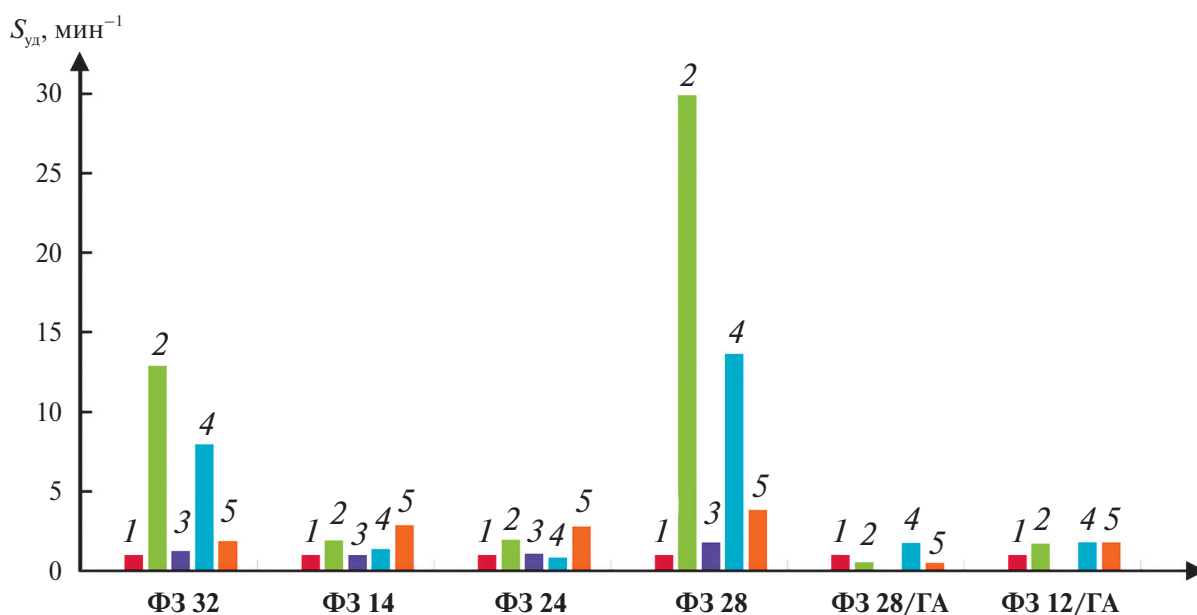


Рис. 4. Зависимость удельной скорости накопления органическими и комбинированными люминофорами паров тест-веществ: воды (1), раствора аммиака (2), этанола (3), бутиламина (4), раствора уксусной кислоты (5).

по значениям параметра парной селективности сенсоров с фазами $A(\text{CdS}/\text{CdS}/\Phi 3 \text{ 32})$ высокоизбирательно на фоне паров воды идентифицируются пары циклопентиламина, аммиака, метоксиэтанамина, изобутиламина, бутиловых спиртов (табл. 3). Анализ всех возможных параметров парной селективности пьезосенсоров с изученными индивидуальными и смешанными органическими, неорганическими модификаторами позволил выделить наиболее надежные и высокочувствительные (табл. 4). Анализ данных показал, что подложка из гидроксипатита сильно ускоряет сорбцию, при этом снижается дифференциация паров; фазы $\Phi 3 \text{ 28}$ и $\Phi 3 \text{ 14}$ на воду не реагируют, хорошо дифференцируют амины, особенно алкиламины. При этом даже подложка из ГА не меняет этой высокой селективности.

Высоконадежно идентифицируются амины и аммиак, молочная кислота. А среди этих соединений фазы люминофоров позволяют идентифицировать отдельно: аммиак, воду (как микропримесь), метоксиэтанамин, пропиламин, бутиламины. Именно эти соединения часто входят в набор паттернов летучих соединений, характерных для распространенных социально значимых заболеваний (табл. 5).

Полученная информация согласуется с откликами визуальной планшетной тест-системы и флуоресценции фаз, нанесенных на бумажные носители. Однако уровень согласованности, строго говоря, не является максимально корректным, так как концентрация реагентов и аналитов при этом различаются значительно.

Оценка согласованности методов. Очевидно, что изменения флуоресцентного отклика и эффективности сорбции органических фаз и КТ должны быть вызваны связыванием с парами органических соединений за счет более сильных взаимодействий, чем сорбционные, поверхностные, даже водородные и донорно-акцепторные.

Для сравнения согласованности результатов применения в исследовании фаз различных методов (планшетная видимая спектроскопия (ВФл), флуориметрия (СФл), прямое микровзвешивание (ПКМ)) предложено использовать коэффициент конкордации r , который является мерой согласованности мнений экспертов в органолептических испытаниях [26]. Применяемые методы ($m = 3$) будем рассматривать как экспертов свойств в системах органических, неорганических флуоресцентных реагентов и тест-веществ (изученных на данном этапе), которые, в свою очередь, выбраны факторами ($n = 28$). Ранговыми оценками будем считать следующие эффекты: 0 – отсутствие селективности при сорбции на выбранных фазах, отсутствие видимых эффектов, а также каких-либо изменений флуоресцентных свойств при вза-

имодействии реагентов и аналитов; 1 – установленная избирательность, селективность детектирования аналитов (тест-веществ) всеми методами; 2 – интенсивные изменения откликов аналитических систем во всех методах (табл. 6). Для каждого из выбранных методов и способов фиксации взаимодействия в системе люминофор–аналит кодировали эффекты по следующим признакам: выбирали изменения, которые в системе являются для конкретного вещества отличительными среди всего набора тестируемых в выборке.

В планшетных тест-системах отсутствие визуального изменения цвета и интенсивности свечения трактовалось как не влияющее на структуру люминофора взаимодействие либо его эффект незначителен с аналитической точки зрения, отсутствует значимый отклик системы. Такой аналитический эффект кодировали как “0”. Изменения на планшетах оценивали при естественном освещении, 365 и 256 нм. Изменение цвета или усиление/гашение свечения лунок с раствором реагента и аналита хотя бы при одном источнике излучения по сравнению с раствором чистого реагента кодировали как “+1”. Если устойчивый эффект изменения наблюдался при всех условиях регистрации, то результат взаимодействия в системе кодировали как “+2”.

Для флуориметрии в качестве объекта кодировки выбрали величину аналитического сигнала: отсутствие изменений интенсивности излучения в системе (изменение аналитического сигнала на уровне шумов) кодировали как нулевой отклик с присвоением кода “0”, незначительное изменение излучения (3–6 уровней шума) без смещения исходной длины волны в системе кодировали как возникающий ответ в системе и этому эффекту присваивали код “+1”, если изменения интенсивности свечения или гашения более чем в два раза превышали исходные значения или наблюдалось смещение длины волны излучения, то аналитический сигнал в системе считали значимым и значительным, такой эффект кодировали кодом “+2”.

В наиболее чувствительном и экспрессном методе изучения сорбции паров соединений на фазах с малым содержанием реагента – пьезокварцевом микровзвешивании – как при нагрузке (контакт с аналитом), так и при десорбции (исключен контакт с парами) регистрируются скорость изменения массы сорбента, полнота его регенерации за определенный момент времени. Минимизация времени измерения соответствует задачам тест-методов, а для сорбционных методов наиболее информативным является начальный кинетический участок сорбции/десорбции. Это позволяет в первом приближении оценивать порядок реакции, обратимость взаи-

Таблица 3. Расчетные параметры парной селективности $A(i/j)$ ПКР с фазами КТ и органическими люминофорами при сорбции паров тест-веществ в закрытой ячейке детектирования

Тест-вещество	Номер сенсора для расчета A																	
	1\2	1\3	1\5	1\6	1\7	1\8	2\3	2\5	2\6	2\7	2\8	3\8	5\6	5\7	5\8	6\7	6\8	7\8
Вода 5 мл	0.65 ± 0.04*	0.36 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.70 ± 0.10	0.79 ± 0.10	0.29 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.13 ± 0.03	1.1 ± 0.1	0.40 ± 0.10	0.10 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.25 ± 0.04
Этилацетат	0.25	0.42	0.17	0.37	0.24	0.04	1.7	0.68	1.5	0.99	0.18	0.10	2.2	1.5	0.26	0.66	0.12	0.18
Молочная кислота	0.59	0.43	0.38	0.13	0.24	0.06	0.72	0.64	0.22	0.40	0.10	0.14	0.45	0.59	0.15	0.63	0.13	0.26
Метилэтилкетон	0.27	0.69	0.23	0.34	0.42	0.08	2.6	0.85	1.3	1.6	0.29	0.11	1.5	1.9	0.34	1.2	0.23	0.18
Этанол	0.31	0.48	0.27	0.40	0.27	0.08	1.6	0.87	1.3	0.88	0.25	0.16	1.5	1.0	0.29	0.70	0.20	0.29
Бутанол-1	0.33	0.83	0.40	0.60	0.48	0.15	2.5	1.2	1.8	1.4	0.45	0.18	1.5	1.2	0.37	0.81	0.25	0.31
Пропиламин	0.10	0.36	0.17	0.29	0.17	0.17	1.4	0.50	0.63	0.27	0.27	0.55	1.7	1.0	1.1	0.58	0.60	1.0
Циклопентиламин	0.23	0.42	0.40	0.90	0.26	0.22	1.9	1.8	4.2	1.2	1.0	0.52	2.3	0.63	0.54	0.28	0.24	0.85
Аммиак	0.42	1.6	0.58	1.1	1.0	0.25	4.0	1.4	2.7	2.4	0.61	0.15	1.9	1.7	0.45	0.93	0.24	0.26
Изобутиламин	0.22	0.47	0.29	0.66	0.22	0.26	2.1	1.4	3.1	1.0	1.2	0.63	2.3	0.76	0.91	0.34	0.41	1.2
Бутиламин	0.29	0.35	0.28	0.49	0.21	0.28	1.2	0.97	1.7	0.74	0.97	0.79	1.8	0.76	1.0	0.43	0.56	1.3
Метоксиэтанамин	0.23	0.75	0.88	1.5	0.41	0.31	3.3	3.8	6.6	1.8	1.4	0.41	1.7	0.46	0.35	0.27	0.20	0.77

*Доверительный интервал ($n = 3, P = 0.95$).

Таблица 4. Высоконадежные параметры парной селективности пьезокварцевых резонаторов с фазами квантовых точек и органическими люминофорами

Тест-вещество	Фаза КТ						
	CdS/ Ф3 14	CdS/ Ф3 12	CdS/ ГА с Ф3 32	CdS/ ГА с Ф3 28	Ф3 14/ Ф3 12	Ф3 12/ ГА с Ф3 32	ГА с Ф3 32/ CdS с Ф3 32
Вода	0.65	—	—	—	0.56	—	1.1
Этанол	—	—	—	—	—	—	—
Бутанол-1	—	—	—	—	—	—	—
Метилэтилкетон	—	—	—	—	—	—	—
Этилацетат	—	—	—	—	—	—	—
Молочная к-та	—	—	—	—	0.72	—	—
Метоксиэтан-амин	—	—	0.88	—	3.3	—	—
Циклопентиламин	—	—	—	—	—	—	—
Пропиламин	0.10	—	—	—	—	—	—
Изобутиламин	—	—	—	—	—	0.70	—
Бутиламин	—	—	—	—	—	0.79	—
Аммиак	0.42	1.6	—	1.0	4.0	—	—

Таблица 5. Примеры летучих органических соединений – биомаркеров для некоторых заболеваний (составлено по материалам [2])

Заболевания / характерные нарушения метаболизма	Некоторые летучие органические соединения диагностических паттернов
Расстройство дыхательной системы (астма)	Бутановая (масляная) кислота, <i>n</i> -гидроксibenзальдегид, гексанон, пентанон, 1-гидрокси-2-пентанон, сульфиды, гептанон, метилциклогексанолы, бутанон
Колоректальный рак	<i>n</i> -Гидроксibenзальдегид, этанол (продукт гликолиза)
Язвенный колит	Ацетон, этанол (продукт гликолиза), бутанолы
Эозинофильный эзофагит	4-Аминобутановая кислота, этанол (продукт гликолиза)
Печеночная энцефалопатия	4-Аминобутановая кислота
Расстройство нервной системы (болезнь Альцгеймера), алкоголизм, психические расстройства (депрессия, алкогольный синдром, шизофрения)	Ацетальдегид (этаналь), 4-аминобутановая кислота, кетоны (ацетон, дигидроксиацетон, циклогексанон, циклопентанон, ацетилацетон, 4-метил-2(3)-пентанон, 2-гексанон), 2-метилпентаналь, геканаль, акрилонитрил
Рак легких, органическая ацидемия, заболевание кленовым сиропом, расстройство центральной нервной системы	Уксусная кислота, этанол
Алкаптонурия, цистиноз, фенилкетонурия, саркозинемия, тирозинемия, расстройство кровеносной и лимфатической системы, уремия, почечная недостаточность, эозинофильный эзофагит	Аммиак, диметиламин, триметиламин

модействия. Если скорости приращения и убыли массы за определенный промежуток времени равны или близки, а максимальный сигнал сенсора за время нагрузки парами значим ($> 6\sigma$, где σ – шум системы), то система обратимая, сорбция неспецифическая и эффект взаимодействия кодировали как “0”. Если сигнал сенсора за время нагрузки составлял $\leq 6\sigma$, то кодировали как “–1”. Если в сорбционной системе существенно отличались скорости сорбции и десорбции при аналитическом сигнале, составляющем $> 6\sigma$, то эффект взаимодействия кодировали как “+2”. Такому поведению сорбционной системы соответствует также дрейф базовой линии пьезовесов с сорбентом. Базовая линия может быть возрастающей, когда наблюдается унос части сорбента, или убывающей, когда происходит неполная десорбция в условиях эксперимента. Эти эффекты соответствуют интенсивному взаимодействию сорбата и сорбента. После кодировки составляли матрицу оценок взаимодействия разными методами (табл. 6).

Так как в матрице имеются связанные ранги (одинаковый ранговый номер) в оценках всеми методами, последовательно проводили переформирование оценок. На основании переформирования рангов строили новую матрицу оценок изменения свойств аналитических систем при контакте с выбранными тест-веществами (табл. 7).

Среднюю степень согласованности мнений всех экспертов (результатов методов) оценива-

ли по коэффициенту конкордации Кендалла для случая, когда имеются связанные ранги (одинаковые значения рангов в оценках одного метода). Коэффициент конкордации Кендалла для трех методов оценки эффективности взаимодействия на фазе CdS/хитозан для 28 тест-веществ составляет $W = 0.70$. Это говорит о наличии средней степени согласованности результатов. Установлено, что это значение – величина не случайная, поэтому полученные результаты подчиняются определенной функциональной связи.

Средняя степень согласованности предсказания активности фазы CdS/хитозан по отношению к парам 28 аналитов тремя методами подтверждает влияние условий выполнения эксперимента на результаты ранговой корреляции. Доминирующими являются чувствительность фаз к парам тест-веществ, влияние растворителей на эффекты взаимодействия. Так, метод планшетной визуальной оценки флуоресценции при двух длинах волн возбуждения (365, 254 нм) существенным образом отличается от флуориметрии и микровзвешивания паров фазами КТ на бумаге и ПКР. Если сравнить согласованность оценок близких по условиям методов – флуоресценции зон КТ и микровзвешивания фазы КТ при обработке парами аналитов, то коэффициент конкордации Кендалла этих методов иной.

На примере малой выборки аналитов, которые однозначно были выделены по результатам ПКМ (табл. 8) как специфически и селективно

Таблица 6. Сводная матрица рангов методов по результатам оценки изменений флуоресценции и сорбции в системах с квантовыми точками CdS при действии паров и растворов тест-веществ

Тест-вещество	ПКМ	СФл	ВФл	Тест-вещество	ПКМ	СФл	ВФл
Бутанол-1	0	0	0	Метанпентанол-2	0	0	0
Метилэтилкетон	0	0	0	5-Метилгексанон	0	0	0
Этанол	1	1	0	Бензальдегид	0	0	0
Ацетилацетон	1	0	0	Пропанол-2	0	0	0
Малоновый эфир	0	0	0	Ацетон	0	1	0
Вода	0	0	0	Ацетальдегид	0	0	0
Салициловый альдегид	0	0	0	Гексан	0	0	0
Пиридин	1	0	0	Аммиак	1	0	1
Диоксан	0	0	0	Метиламин	1	1	1
Морфолин	1	1	1	Пероксид водорода	1	0	1
Аминол	1	0	1	Бутанол-2	0	0	0
Пропиламин	1	1	1	Пропиламин	1	1	1
Ацетон	0	1	1	Фениламин	1	1	0
Диэтанолламин	1	1	1	Молочная кислота	0	0	0

Таблица 7. Сводная матрица преобразованных оценок результатов флуоресцентных изменений и сорбционных взаимодействий в системах с квантовыми точками CdS и тест-веществами

Тест-вещество	ПКМ	СФл	ВФл	Тест-веществ	ПКМ	СФл	ВФл
Бутанол-1	8.5	10	10	Метанпентанол-2	8.5	10	10
Метилэтилкетон	8.5	10	10	5-Метилгексанон	8.5	10	10
Этанол	22.5	24	10	Бензальдегид	8.5	10	10
Ацетилацетон	22.5	10	10	Пропанол-2	8.5	10	10
Малоновый эфир	8.5	10	10	Ацетон	8.5	24	10
Вода	8.5	10	10	Ацетальдегид	8.5	10	10
Салициловый альдегид	8.5	10	10	Гексан	8.5	10	10
Пиридин	22.5	10	10	Аммиак	22.5	10	24
Диоксан	8.5	10	10	Метиламин	22.5	24	24
Морфолин	22.5	24	24	Пероксид водорода	22.5	10	24
Аминол	22.5	10	24	Бутанол-2	8.5	10	10
Пропиламин	22.5	24	24	Пропиламин	22.5	24	24
Ацетон	8.5	24	24	Фениламин	22.5	24	10
Диэтаноламин	22.5	24	24	Молочная кислота	8.5	10	10

сорбируемые фазой КТ, оценили согласованность с результатами оценки изменения флуоресценции в парах этих веществ высокой концентрации. Для полученных двумя методами данных согласованность результатов составляет $W = 0.89$ (величина не случайная, говорит о наличии высокой степени согласованности результатов разных методов). На основании полученного коэффициента ранговой корреляции для двух методов вычислили показатели весомости предсказания эффективности взаимодействия для 33 аналитических систем (табл. 9).

Оба метода показали полную согласованность оценки эффективности взаимодействия с парами морфолина фазы КТ CdS/хитозан; паров аммиака, метиламина с комбинированной фазой CdS/хитозан//ФЗ 12; паров метиламина и фазы ФЗ 14. Наименьшая согласованность оценки взаимодействия и ожидаемого эффекта изменения флуоресценции относится к 15 аналитическим системам с разными по природе фазами и органическими веществами (раствор аммиака, формальдегид, спирты C_2-C_4 , метиламин с комбинированной фазой CdS/хитозан//родамин 6 G; ацетон, раствор уксусной кислоты) практически со всеми изученными фазами. Полученные результаты подтверждают правильную стратегию синтеза органических флуориметрических реагентов для возможного применения

в аналитических тест-системах, например, для оценки процессов воспаления в организме по изменениям в биопробах, деструкции белков в пищевых системах.

* * *

Установлено, что согласованность результатов методов оценки степени взаимодействия паров аналитов по изменению флуоресценции фаз и чувствительности сорбции высокая. Этот факт можно применять для значительного сокращения времени оценки действия паров разных соединений и флуоресцентных фаз разной природы (органические и неорганические) в первом приближении. На наш взгляд, неполная корреляция оценок для тест-веществ связана с разной чувствительностью методов и ограничением концентрации при изучении сорбционных свойств фаз методом ПКМ. Полученные данные согласуются с результатами сопоставления изменения флуоресценции и эффективности пьезокварцевого микровзвешивания для некоторых органических и неорганических газов [28–30]. Сокращение времени и расхода реагентов на стадии поиска пути синтеза и направленного изменения свойств органических и неорганических реагентов значительно повышает эффективность исследований.

Таблица 8. Ранговая оценка результатов и изменений в тест-системах с неорганической, органическими и комбинированными фазами

№ п/п	Тест-вещество	Пьезокварцевое селективное микровзвешивание	Изменение флуоресценции в парах аналитов ($\lambda_{\text{возб}} = 405 \text{ нм}$)
Фаза CdS/хитозан			
1	Аммиак (9%-ный водный раствор)	0	0
2	Метиламин	1	0
3	Морфолин	2 (значительно)	2 (гашение свечения)
4	Ацетон	1	1 (усиление свечения)
5	Уксусная кислота	1	0
6	Формальдегид	0	0
7	Пропанол-1 (спирты C ₂ –C ₄)	0	0
Фаза CdS/хитозан/Родамин 6G			
8	Аммиак (9%-ный водный раствор)	1	1 (гашение свечения)
9	Метиламин	1	1 (гашение свечения)
10	Морфолин	1	0
11	Ацетон	1	0
12	Уксусная к-та	1	1 (гашение свечения)
13	Формальдегид	0	0
14	Пропанол-1 (спирты C ₂ –C ₄)	0	0
Фаза CdS/хитозан/Ф3 12			
15	Аммиак (9%-ный водный раствор)	0	0
16	Метиламин	0	0
17	Морфолин	1	1 (гашение свечения)
18	Ацетон	1	1 (гашение свечения)
19	Уксусная к-та	0	0
20	Формальдегид	0	1 (усиление свечения)
21	Пропанол-1 (спирты C ₃ –C ₄)	0	0
Ф3 32			
22	Аммиак	2	2 (усиление свечения)
23	Метиламин	2	2 (усиление свечения)
24	Ацетон	0	0
25	Пропанол-1	0	0
Ф3 28			
26	Аммиак	1	1 (усиление свечения)
27	Метиламин	1	1 (усиление свечения)
28	Ацетон	0	0
29	Пропанол-1	0	0
Ф3 14			
30	Аммиак	1	1 (гашение свечения)
31	Метиламин	1	2 (гашение свечения)
32	Ацетон	0	0
33	Пропанол-1	0	0

Таблица 9. Матрица преобразованных рангов оценок двумя методами по эффективности взаимодействия флуоресцентных фаз и паров тест-веществ

Тест-вещество*	ПКМ	СФл	Σ	Вес λ	Тест-вещество*	ПКМ	СФл	Σ	Вес λ
1	2	2	4	0.04255	18	1	1	2	0.02128
2	1	2	3	0.03191	19	2	2	4	0.04255
3	0	0	0	0	20	2	1	3	0.03191
4	1	1	2	0.02128	21	2	2	4	0.04255
5	1	2	3	0.03191	22	0	0	0	0
6	2	2	4	0.04255	23	0	0	0	0
7	2	2	4	0.04255	24	2	2	4	0.04255
8	1	1	2	0.02128	25	2	2	4	0.04255
9	1	1	2	0.02128	26	1	1	2	0.02128
10	1	2	3	0.03191	27	1	1	2	0.02128
11	1	2	3	0.03191	28	2	2	4	0.04255
12	1	1	2	0.02128	29	2	2	4	0.04255
13	2	2	4	0.04255	30	1	1	2	0.02128
14	2	2	4	0.04255	31	1	0	1	0.01064
15	2	2	4	0.04255	32	2	2	4	0.04255
16	2	2	4	0.04255	33	2	2	4	0.04255
17	1	1	2	0.02128	Итого			94	1

*Номер соответствует порядковому номеру строки в табл. 8.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Синтез и исследование органических реагентов выполнены при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-4978.2022.1.3)

Синтез и исследование квантовых точек сульфида кадмия и фаз на его основе выполнены при финансовой поддержке гранта РФФ 23-23-00609.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Drummen G.P.* Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques — Illuminating biological and biomedical research // *Molecules*. 2012. 17. № 12. P. 14067.
<https://doi.org/10.3390/molecules171214067>
- Willmann J.K., Bruggen N.V., Dinkelborg L.M., Gambhir S.S.* Molecular imaging in drug development // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2008. 7. P. 591.
- Atreya R., Goetz M.* Molecular imaging in gastroenterology // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013. 9. P. 704.
- Carter K.P., Young A.M., Palmer A.E.* Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems // *Chem. Rev.* 2014. 114. P. 4564.
- Guo Z., Park S., Yoon J., Shin I.* Recent progress in the development of nearinfrared fluorescent probes for bioimaging applications // *Chem. Soc. Rev.* 2014. 43. P. 16.
- Мартынов В.И., Пахомов А.А., Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г.* Синтетические флуорофоры для визуализации биомолекул в живых системах // *ACTA NATURAE*. 2016. Т. 8. № 4. С. 37.
- Злотина М.М., Емельянов В.В., Чиркова Т.В.* Флуоресцентные сенсоры, используемые для изучения роли вторичных посредников в клеточной сигнализации // *Вестник СПбГУ*. 2011 Сер. 3. № 2. С. 100.
- Yan Y., Zhu S., Chen Z., Ji Y.* Флуоресцентный сенсор H₂S и его применение для биовизуализации // *Журн. прикл. спектроскопии*. 2022. Т. 89. № 1. С. 139.
- Liu Y., Feng X., Yu Y., Zhao Q., Tang C., Zhang J.* A review of bioselenol-specific fluorescent probes: Synthesis, properties, and imaging applications // *Anal. Chem. Acta*. 2020 V. 1110. P. 141.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.027>

10. Wang F, Yang X, Zhan Q, Nandi C.K., Editorial: Recent advances in fluorescent probes for super-resolution // *Front. Chem.* 2021. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.698531>
11. Yang Y, Gao F, Wang Y, Li H, Zhang J, Sun Z, Jiang Y. Fluorescent organic small molecule probes for bioimaging and detection applications // *Molecules.* 2022. V. 27. P. 8421. <https://doi.org/10.3390/molecules27238421>
12. Xie C., Luo K., Tan L., Yang Q., Zhao X., Zhou L. A review for in vitro and in vivo detection and imaging of gaseous signal molecule carbon monoxide by fluorescent probes // *Molecules.* 2022. V. 27. P. 8842. <https://doi.org/10.3390/molecules27248842>
13. Wang L., Ran X., Tang H., Cao D. Recent advances on reaction-based amine fluorescent probes // *Dyes Pigm.* 2021. V. 194. Article 109634. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109634>
14. Dou W.T., Han H.H., Sedgwick A.C., Zhu G.B., Zang Y., Yang X.R., Yoon J., James T.D., Li J., He X. Fluorescent probes for the detection of disease-associated biomarkers // *Sci. Bull.* 2022. V. 67. P. 853. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2022.01.014>
15. Georgiev N.I., Bakov V.V., Anichina K.K., Bojinov V.B. Fluorescent probes as a tool in diagnostic and drug delivery systems // *Pharmaceuticals.* 2023. V. 16. P. 381. <https://doi.org/10.3390/ph16030381>
16. Zhou J., Jangili P., Son S., Ji M.S., Won M., Kim J.S. Fluorescent diagnostic probes in neurodegenerative diseases // *Adv. Mater.* 2020 V. 32. № 51. Article 2001945. <https://doi.org/10.1002/adma.202001945>
17. Zhou W., Guo H., Lin J., Yang F. Multiple BODIPY derivatives with 1,3,5-triazine as core: balance between fluorescence and numbers of BODIPY units // *J. Iran. Chem. Soc.* 2018. V. 15. P. 2559.
18. Padalkar V.S., Patil V.S., Sekar N. Synthesis and photo-physical properties of fluorescent 1,3,5-triazine styryl derivatives // *Chem. Cent. J.* 2011. V. 5. P. 77.
19. Irannejad H., Amini M., Khodagholi F., Ansari N., Tusi S.K., Sharifzadeh M., Shafiee A. Synthesis and in vitro evaluation of novel 1,2,4-triazine derivatives as neuroprotective agents // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. V. 15. P. 4224.
20. Ivashchenko A.V., Lazareva V.T., Prudnikova E.K., Ivashchenko S.P., Rumyantsev V.G. Synthesis of 1,2-diaminoimidazole derivatives by the reaction of benzaldehyde guanlylhydrazone with α -haloalkyl aryl ketones // *Chem. Heterocycl. Compd.* 1982. V. 18. P. 185.
21. Sun X., Liu T., Sun J., Wang X. Synthesis and application of coumarin fluorescence probes // *RSC Adv.* 2020. V. 10. № 18. P. 10826. <https://doi.org/10.1039/c9ra10290f>
22. Iftikhar R., Parveen I., Mazhar A., Iqbal M.S., Kamal G.M., Hafeez F., Pang A.L., Ahmadipour M. Small organic molecules as fluorescent sensors for the detection of highly toxic heavy metal cations in portable water // *J. Environ. Chem. Eng.* 2023. V. 11. № 1. Article 109030. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.109030>
23. Yinyin B. Editorial: Organic fluorescent materials as chemical sensors // *Chemosensors.* 2021 V. 9. P. 308. doi. 10.3390/chemosensors9110308
24. Jeong H., Shin H., Lee J., Kim B., Park Y.I., Yook K. S., Park J. Recent progress in the use of fluorescent and phosphorescent organic compounds for organic light-emitting diode lighting // *J. Photonics Energy.* 2015. V. 5. № 1. <https://doi.org/10.1117/1.jpe.5.057608>
25. <https://hmdb.ca/metabolites/> (дата обращения 22.05.2023 г.)
26. <https://math.semestr.ru/corel/concordance.php>. (дата обращения 28.05.2023 г.)
27. Новикова Л.Б., Кучменко Т.А. Аналитические возможности систем искусственного обоняния и вкуса. Часть 1. “Электронные носы” // *Вестник ВГУИТ.* 2019. Т. 81. № 3. С. 236. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2019-3-236-241>
28. Вандышев Д.Ю., Мангушева Д.А., Потанов А.Ю., Шихалиев Х.С., Кучменко Т.А., Скоринов В.Н., Умарханов Р.У., Михалев В.И. Применения флуоресцентных зондов на основе имидазотриазинопиримидинов для разработки экспрессных тестов эндометрита коров / Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции “Фармобразование-2022”. Воронеж. 2022. С. 74.
29. Ayad Mohamad M., Abdelghafar Mona E., Torad Nagy L., Yamauchi Yusuke, Amer Wael A. Green synthesis of carbon quantum dots toward highly sensitive detection of formaldehyde vapors using QCM sensor // *Chemosphere.* 2023. V. 312. № 1. Article 137031. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137031>
30. Dinga Liyun, Ruanb Yinlan, Lia Tao, Huang Jun, Warren-Smithb Stephen C., Ebendorff-Heidepriemb Heike, Monro Tanya M. Nitric oxide optical fiber sensor based on exposed core fibers and CdTe/CdS quantum dots // *Sens. Actuators B: Chem.* 2018. V. 273. № 10. P. 9.

COMPARISON OF METHODS FOR RAPID ASSESSMENT OF SELECTIVITY AND EFFICIENCY OF THE ANALYTICAL SIGNAL OF FLUORESCENT PHASES OF DIFFERENT NATURES

T. A. Kuchmenko^{a, b *}, D. Yu. Vandychev^c, V. V. Yagov^b, R. U. Umarhanov^a, I. V. Ledeneva^c

^a Voronezh State University of Engineering Technologies, 394036 Voronezh, Russia

^b Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

^c Voronezh State University, Universitetskaya Square, 1, 394006, Voronezh, Russia

*e-mail: tak1907@mail.ru

Received 2 June, 2023

Revised 22 September, 2023

Accepted 25 September, 2023

Abstract. The paper presents the results of assessing the sorption and fluorescence properties of compounds from the azolotriazine class and phases based on cadmium sulfide quantum dots in the presence of volatile organic compounds (biomarkers of the state of living systems). The sorption properties of phases based on organic dyes and encapsulated semiconductors in relation to vapors of alcohols, ketones, amines, acids, ammonia, and aldehydes were studied using direct high-sensitivity quartz crystal microgravimetry. Spectral properties and their changes in the presence of analyte vapors were studied using various spectroscopic methods (absorption, photoluminescence). The results of these studies and the possibility of optimizing this stage were compared. It is proposed to evaluate the consistency of methods for predicting changes in fluorescence properties in test systems for volatile organic compounds using Kendall's W concordance coefficient. It was found that the highest concordance coefficient ($W = 0.89$) was obtained with the methods of spectrofluorimetry and direct vapor microgravimetry when sorption occurs on phases—potential fillers for test systems. The correlation of results obtained by different fluorescence methods (visual plate test systems and fluorimetry of phases on paper substrates) is 0.80, which confirms a high degree of consistency in assessing the interaction between analytes and organic, combined fluorochromes. It was established that methods similar in the nature of their analytical response are not better aligned with each other than with the method of direct vapor microgravimetry on microphases of fluorimetric reagents of different natures (CdS/chitosan quantum dots, organic compounds of the azolotriazine class, mixed phases). This, in turn, allows for the selection of simpler, more accessible, and rapid methods and tools for analysis during routine experiments.

Keywords: spectroscopy, fluorescence, quantum dots, organic reagents, sorption, organic biomolecules, informativeness.

УДК 543.545

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ХЛОРАТ-ИОНОВ В РАСТВОРАХ ХЛОРИДОВ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

© 2024 г. В. В. Сурсякова^{а, *}, Д. А. Шатаев^б, А. И. Рубайло^а

^аИнститут химии и химической технологии Сибирского отделения РАН, Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН”

Академгородок, 50/24, Красноярск, 660036 Россия

^бСибирский федеральный университет,

просп. Свободный, 79, Красноярск, 660041 Россия

*E-mail: viktorija_vs@list.ru

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 31.08.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

Методом капиллярного электрофореза исследовано разделение хлорид- и хлорат-ионов в случае значительного избытка хлорид-ионов в анализируемой пробе. Установлено, что при стандартных условиях разделения с применением хроматного фонового электролита для пика хлорат-ионов при $c(\text{ClO}_3^-) = 0.1$ мМ резко ухудшается отношение сигнал/шум, когда отношение концентраций $c(\text{Cl}^-)/c(\text{ClO}_3^-) > 100$. Рассмотрен ряд подходов для устранения этого явления. Наиболее эффективным оказался подход, заключающийся во введении в капилляр после пробы зоны раствора, содержащего ацетат-ионы, для создания условий для самоиндуцированного изотахофореза. Подобраны оптимальные параметры электрофоретического разделения хлорид- и хлорат-ионов при содержании хлорид-ионов в пробе 35 мМ. Предел обнаружения составил 0.01 мМ хлорат-ионов (0.03–0.06% в пересчете на массу сухих хлоридов калия, натрия или лития). Градуировочный график линеен в диапазоне 0.01–1 мМ ClO_3^- . Выбранные условия позволяют определять хлорат-ионы при молярном отношении хлорид- к хлорат-ионам 35–3500. Факторы эффективности концентрирования составили 10–70. Перхлорат-ионы не мешают определению хлорат-ионов при концентрации обоих ионов 0.1 мМ и ниже. Методика апробирована на примере анализа поваренной соли.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, хлорат-ионы, соли, самоиндуцированный изотахофорез, концентрирование, высокопроводящие образцы.

DOI: 10.31857/S0044450224070115, EDN: TNEFVO

Хлораты широко используются в качестве окислителей, красок, пиротехнических изделий, присутствуют в отбеливающих и чистящих средствах бытовой химии, могут образовываться в процессе хлорирования питьевой воды [1]. Их содержание в различных объектах необходимо контролировать, поскольку они ядовиты и могут негативно влиять на технологические процессы. Для определения хлорат-ионов применяют целый ряд методов. В несепарационных

методах – титриметрических [1, 2], спектрофотометрических [2–4], потенциометрических [2], методах атомной адсорбции [2] и др., как правило, предусматривается предварительная дериватизация для обеспечения необходимой чувствительности или селективности определения. Среди сепарационных методов, помимо ионной хроматографии [5, 6], особое место занимает капиллярный электрофорез [5, 7–9]. К его достоинствам можно отнести простоту, высокую

селективность, малый расход реагентов, низкую себестоимость единичного анализа, а также отсутствие необходимости применения специфических реагентов или катализаторов для проведения дериватизации. Ранее метод капиллярного электрофореза применяли для определения ClO_3^- -ионов только в низкосолевых матрицах, таких как питьевая вода [5, 10–12], отбеливающие растворы [5, 12], модельные смеси [13], смывы с поверхностей для определения следов взрывчатых веществ [14] и некоторые другие объекты. В то же время при производственном контроле существует необходимость определения хлорат-ионов при их небольшом содержании в хлоридах. В литературе отсутствуют примеры применения метода капиллярного электрофореза для этой цели, поэтому исследование возможности разделения хлорид- и хлорат-ионов в случае большого избытка хлорид-ионов методом капиллярного электрофореза является актуальным.

Цель данной работы – нахождение оптимальных условий определения низких концентраций хлорат-ионов в растворах хлоридов щелочных металлов методом капиллярного электрофореза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Для электрофоретического разделения применяли приборы Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН – системы капиллярного электрофореза Agilent $^{3\text{D}}$ CE G1600 и Agilent 7100 (Agilent Technologies, Вальдбронн, Германия). Для обработки сигнала детектора, определения времен миграции, площадей пиков и отношений сигнал/шум применяли встроенное программное обеспечение HP ChemStation Rev.A.10.02 и OpenLab CDS ChemStation Edition C.01.08. Использовали немодифицированные кварцевые капилляры внутренним диаметром 50 мкм, общей/эффективной длиной 64.5/56 и 80.5/72 см. Температуру капилляра поддерживали равной 25 ± 0.04 °С. Детектирование осуществляли в УФ-области при 375 нм с опорной длиной волны 450 нм. Образцы в капилляр вводили гидродинамически. Новые капилляры промывали 15 мин 1 М раствором NaOH, дважды водой по 5 мин, затем 10 мин фоновым электролитом. В начале каждого дня капилляры промывали 0.1 М раствором NaOH в течение 10 мин, дважды водой по 5 мин, затем 10 мин фоновым электролитом. Между съемками капилляр

промывали фоновым электролитом в течение 3 мин. Для измерения pH использовали pH-метр-иономер Эксперт-001 (Москва, Россия) и pH-метр Radelkis (Будапешт, Венгрия) с предварительно откалиброванными комбинированными стеклянными электродами.

Реагенты. Использовали реактивы марки ч. д. а., х. ч. или ос. ч. Растворы готовили на деионизованной воде, полученной с помощью системы очистки воды Direct Q3 (Millipore, Франция), и фильтровали через фильтры с диаметром пор 0.2 мкм. В качестве фонового электролита использовали буферный раствор, содержащий 4.7 мМ K_2CrO_4 и 0.3 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, с pH 7.3, если не указано другое. Растворы ацетатов щелочных металлов получали доведением pH растворов уксусной кислоты до значения 7.3 растворами KOH, LiOH или NaOH.

Поваренная соль. В работе анализировали следующие объекты: “Соль пищевая, выварочная. Сорт Экстра” (ООО “ТДС”, Москва, Россия) (содержание NaCl не менее 99.7%), а также “Соль пищевая, каменная, молотая” (ОАО “Тыретский солерудник”, Россия) (содержание NaCl не менее 98.4%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разделение в стандартных условиях. На первом этапе провели разделение смесей хлорат- и хлорид-ионов с фиксированной концентраций хлорат-ионов (0.1 мМ) и увеличивающейся концентрацией хлорид-ионов методом капиллярного электрофореза с использованием хроматного фонового электролита [11, 15, 16]. Из рис. 1 видно, что при $c(\text{Cl}^-)/c(\text{ClO}_3^-) > 100$ пик хлорат-ионов становится сильно размытым, резко ухудшается отношение сигнал/шум и, следовательно, повышается предел обнаружения хлорат-ионов. Пик на рис. 1, расположенный после пика хлорат-ионов, интенсивность которого растет при увеличении концентрации хлорид-ионов, является системным и соответствующее ему время миграции согласуется с теоретическим [16, 17]. Сильное размывание пика хлорат-ионов при высоком содержании хлорид-ионов в пробе можно упрощено объяснить следующим образом. В процессе электрофоретического разделения в капилляре в каждой точке концентрация ионов остается постоянной (в упрощенном виде постоянной остается регулирующая функция Кольрауша, которая является функцией концентраций и подвижностей всех ионов) [18]. В случае ввода

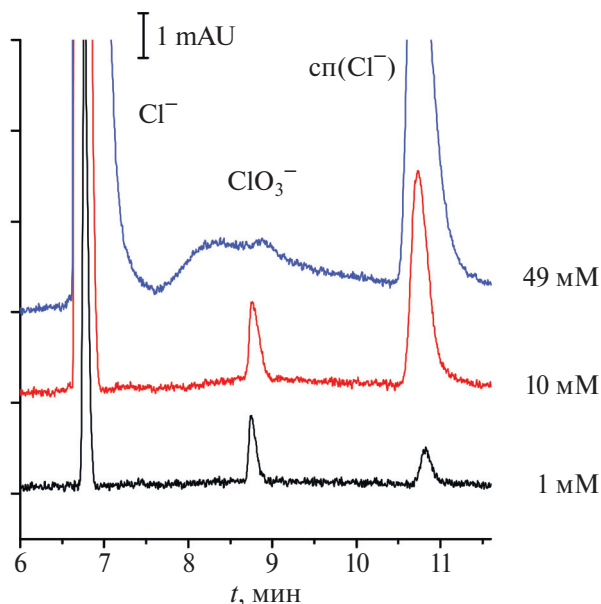


Рис. 1. Влияние концентрации хлорид-ионов в смеси с хлорат-ионами (0.1 мМ) на форму электрофоретического пика хлорат-ионов. $\text{сп}(\text{Cl}^-)$ – системный пик от присутствия в пробе хлорид-ионов (см. текст). Система капиллярного электрофореза Agilent ^{3D}CE G1600, капилляр 64.5/56 см, напряжение –15 кВ, давление 50 мбар, ввод пробы 50 мбар, 10 с.

в капилляр пробы с высокой концентрацией (49.1 мМ) при приложении напряжения зона пробы будет уширяться до тех пор, пока не выполнится условие постоянства концентрации (около 5 мМ, суммарная концентрация анионов фонового электролита). Это явление противоположно явлению стэкинга, когда вводят очень широкую зону пробы, содержащую аналиты в низкой концентрации, и при приложении напряжения зона пробы сужается в стремлении приблизиться к суммарной концентрации ионов фонового электролита [19].

Способы устранения излишнего размывания пика хлорат-ионов. Исследовали влияние условий разделения на отношение сигнал/шум пика 0.1 мМ хлорат-ионов в присутствии 49 мМ хлорид-ионов (почти 500-кратный избыток). В ряде случаев при затруднениях в идентификации пиков регистрировали электрофореграммы хлорат-ионов отдельно или в виде смеси 1 мМ ClO_3^- и 49 мМ Cl^- . При плохом разделении пиков хлорид- и хлорат-ионов применяли гидродинамическое давление.

Попытались отделить хлорид-ионы от хлорат-ионов за счет электроосмотического потока и выяснить, как влияют условия разделения на отношение сигнал/шум. Пробу вводили с

обратного торца капилляра для уменьшения времени разделения, поскольку при этом происходит уменьшение общей скорости движения. Путем подбора скорости потока электролита за счет приложения гидродинамического давления удалось добиться того, что хлорат-ионы двигались по направлению от выходного конца к детектору, а хлорид-ионы, присутствующие в пробе, выносились из капилляра потоком электролита в выходную виалку с буферным электролитом и не достигали детектора. Однако данный подход не привел к увеличению отношения сигнал/шум для хлорат-ионов.

Одним из способов уменьшения размывания пика хлорат-ионов в присутствии избытка хлорид-ионов является добавление хлорид-ионов в фоновый электролит. Однако у этого способа есть существенный недостаток, заключающийся в уменьшении чувствительности косвенного детектирования, поскольку хлорид-ионы плохо поглощают свет в УФ-области по сравнению с хромат- и дихромат-ионами, входящими в состав исходного фонового электролита. Тем не менее повышение суммарной концентрации анионов фонового электролита может позволить увеличить время ввода пробы и, соответственно, отношение сигнал/шум для хлорат-ионов. Исследовали три состава фонового электролита с добавками 20, 49 и 200 мМ KCl. Установили, что, несмотря на добавку хлорид-ионов к фоновому электролиту, отношение сигнал/шум ниже в районе 190 нм и максимально по-прежнему при 375 нм с опорной длиной волны 450 нм, как для хроматного фонового электролита без добавок. Отношение сигнал/шум для пика хлорат-ионов в смеси 0.1 мМ ClO_3^- и 49 мМ Cl^- оказалось максимальным в случае хроматного фонового электролита с добавкой 49 мМ KCl и составило 6.1 при вводе пробы при 50 мбар в течение 110 с, что почти в три раза выше по сравнению с отношением сигнал/шум для хроматного фонового электролита без добавок при стандартных условиях разделения. При этом объем пробы, введенной в капилляр, в 11 раз превышал объем при стандартных условиях (50 мбар, 10 с). Это стало возможным благодаря тому, что суммарная концентрация анионов фонового электролита (54 мМ) была сравнима с концентрацией ионов пробы (49 мМ), в то время как для стандартных условий суммарная концентрация анионов фонового электролита (5 мМ) почти на порядок ниже концентрации ионов пробы (49 мМ), что не позволяет вводить большие по объему пробы с высоким солевым содержанием.

Однако дальнейшее увеличение времени ввода пробы оказалось неэффективным. Предел обнаружения хлорат-ионов — концентрация, при которой на электрофореграмме наблюдается пик с отношением сигнал/шум, равным 3, — в этих условиях составил 0.05 мМ.

Зона ацетат-ионов после пробы. Для проб с высоким содержанием солей часто используют сочетание самоиндуцированного изотахофореза (transient isotachopheresis) для концентрирования следовых количеств аналитов с последующим разделением образовавшихся зон методом капиллярного электрофореза [7, 19–22]. В изотахофорезе пробу вводят между двумя электролитами с подвижностями ионов, большими и меньшими (ведущий и замыкающий электролит), чем подвижности ионов пробы; для низких концентраций аналитов в этих условиях из-за различия электропроводностей зон происходит стэкинг. Для рассматриваемого нами случая хлорид-ионы в пробе могут выступать как ведущий электролит [20]. В качестве замыкающего электролита выбрали 5 мМ раствор ацетата натрия с рН 7.3 (получен добавлением гидроксида натрия к раствору уксусной кислоты до заданного значения рН). Такое значение рН близко к рН фонового электролита и не должно приводить к образованию дополнительных системных пиков из-за различия кислотности. Концентрацию ацетата натрия на начальном этапе выбрали равной сумме концентраций анионов фонового электролита. Электрофоретические подвижности хлорид-, хлорат- и ацетат-ионов в данных условиях имели следующие значения: 77.6 , 64.5 и $43.4 \times 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Как видно из рис. 2, данный подход позволяет эффективно сузить зону хлорат-ионов, однако нужно подбирать ширину зоны ацетат-ионов для получения неискаженного пика хлорат-ионов. Зависимость от ширины зоны ацетат-ионов связана с тем, что хромат-ионы (фоновый электролит) имеют более высокую подвижность, чем ацетат-ионы, и при недостаточной ширине зоны ацетат-ионов хромат-ионы обгоняют ацетат-ионы и достигают границы между ацетат- и хлорат-ионами прежде, чем завершится стэкинг зоны хлорат-ионов. Хромат-ионы, в отличие от ацетат-ионов, имеют более высокую по сравнению с хлорат-ионами подвижность и не могут выступать как замыкающий электролит и вызывать стэкинг.

При использовании самоиндуцированного изотахофореза отношение сигнал/шум для пика хлорат-ионов увеличивается в 4–5 раз по сравнению с вводом пробы без зоны ацетат-ионов. Для

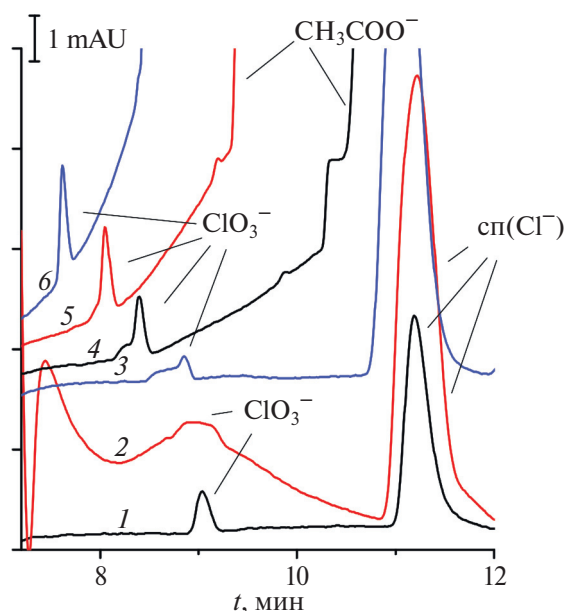


Рис. 2. Влияние зоны раствора 5 мМ ацетат-ионов с рН 7.3, введенной после пробы, на форму пика хлорат-ионов. Состав пробы: 1 — 10 мМ КСl, 0.1 мМ КСlO₃; 2–6 — 35 мМ КСl, 0.1 мМ КСlO₃. Ввод 5 мМ раствора ацетат-ионов при 50 мбар в течение, с: 3 — 40, 4 — 100, 5 — 150, 6 — 200. Система капиллярного электрофореза Agilent 7100. Остальные условия разделения см. в подписи к рис. 1.

количественной характеристики степени концентрирования обычно используют фактор эффективности концентрирования (SEF_h , stacking efficiency factor) [19]:

$$SEF_h = h_2/h_1 \cdot \Delta,$$

где h_2 — высота пика, полученного при концентрировании; h_1 — высота пика, полученного при обычных условиях ввода пробы (2 с); Δ — коэффициент разбавления. В данных условиях SEF_h составил 14 ± 1 .

Установлено, что добавка ацетат-ионов в пробу до концентрации 5 мМ эффект стэкинга не вызывает: форма пика хлорат-ионов не изменяется в присутствии в пробе ацетат-ионов (без ввода зоны ацетат-ионов после зоны пробы). Это, вероятно, связано с недостаточным временем ввода ацетат-ионов в капилляр. В этом случае оно равно времени ввода пробы, а для получения неискаженного пика время ввода зоны ацетат-иона должно быть в 20 раз больше (рис. 2, электрофореграмма б).

Важным параметром является частота сбора данных, влияющая на уровень шума и, соответственно, на предел обнаружения, обычно определяемый как концентрация, при которой

на электрофореграмме наблюдается пик с отношением сигнал/шум, равным 3. Задание частоты сбора данных в применяемом программном обеспечении для управления системой капиллярного электрофореза осуществляется путем указания пользователем ширины пика. Рекомендуется в качестве этого значения использовать ширину пика на половине высоты для самого узкого пика. Выбрали значение >0.05 мин для пика хлорат-ионов с концентрацией 0.1 мМ, программа для этого значения ширины пика задавала частоту сбора данных 5 Гц.

Для снижения предела обнаружения хлорат-ионов в случае их низкого содержания при прочих фиксированных условиях следует увеличить время ввода пробы. Однако при этом требуется увеличить и ширину зоны ацетат-ионов, иначе можно получить такие искаженные пики, как на рис. 2. Установили, что пик хлорат-ионов не виден на электрофореграмме при увеличении времени ввода пробы и зоны ацетат-ионов в два раза, поскольку, вероятно, он не успевает отделиться от зоны ацетат-ионов, которые не обладают хромофорными свойствами, в отличие от хромат-ионов. С целью дальнейшей оптимизации использовали более длинный капилляр с общей/эффективной длиной $80.5/72$ см. Для уменьшения времени миграции аналитов и устранения мешающего влияния системного пика от хлорид-иона (сп(Cl^-)) [16, 17] увеличили прикладываемое напряжение до -30 кВ и гидродинамическое давление до 100 мбар; системный пик от хлорид-ионов при этих условиях также выходит после пика хлорат-ионов и не мешает его определению. Таким образом удалось зарегистрировать пик хлорат-ионов при увеличенном в два раза времени ввода пробы. Дальнейшее увеличение длины капилляра нецелесообразно, поскольку используемое оборудование не позволяет применять напряжение >30 кВ и гидродинамическое давление >100 мбар, а при имеющихся условиях для капилляра с общей/эффективной длиной $112.5/104$ см время миграции хлорат-ионов по расчетам составит уже около 17 мин.

Исследовали влияние природы катиона в зоне ацетат-ионов и концентрации ацетат-ионов, а также продолжительности ввода пробы и зоны ацетат-ионов на форму пика хлорат-ионов. Для того чтобы можно было визуальнo по электрофореграммам определить, ухудшает или улучшает тот или иной фактор форму пика хлорат-ионов, в качестве начальных выбрали условия, при которых пик хлорат-ионов имеет частично

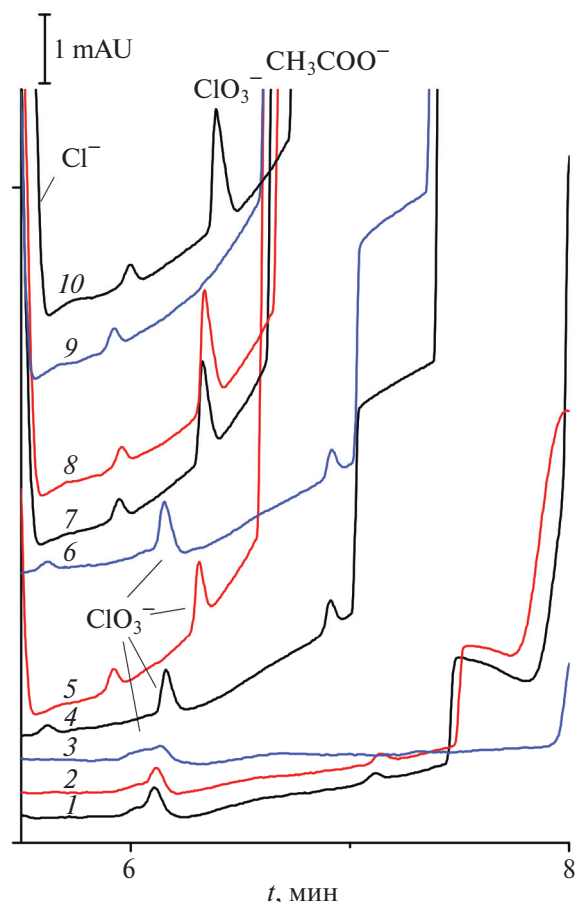


Рис. 3. Электрофореграммы смеси 35 мМ KCl и 0.1 мМ KClO_3 (1–8, 10) и 35 мМ KCl (9). Система капиллярного электрофореза Agilent 7100. Капилляр $80.5/72$ см, напряжение -30 кВ, давление 100 мбар. Ввод пробы при 100 мбар в течение, с: 1–5 – 5; 6, 7 – 10; 8, 9 – 15; 10 – 20. Дополнительно после пробы ввод зоны ацетата калия (1, 3–10) или лития (2) с pH 7.3 при 100 мбар, 60 с. Концентрация ацетата калия или лития, мМ: 1, 2 – 5; 3 – 2; 4, 6 – 10; 5, 7–10 – 20.

искаженную форму. В ряду щелочных металлов Li^+ имеет самую низкую подвижность, Na^+ – промежуточную, K^+ , Rb^+ и Cs^+ – наибольшие и близкие значения. Установили, что природа катиона (калий или литий) не влияет на форму пика хлорат-ионов (рис. 3, электрофореграммы 1 и 2).

Повышение концентрации ацетат-ионов при фиксированном времени ввода в капилляр зоны ацетат-ионов в целом приводит к получению более узких пиков хлорат-ионов (рис. 3), что, вероятно, связано с уширением зоны ацетат-ионов (с концентрацией выше концентрации фонового электролита) в процессе приложения напряжения для выполнения постоянства регулирующей функция Кольрауша. Однако при концентрации ацетат-ионов 30 мМ пик хлорат-ионов не отделяется до базовой линии от пика ацетат-ионов

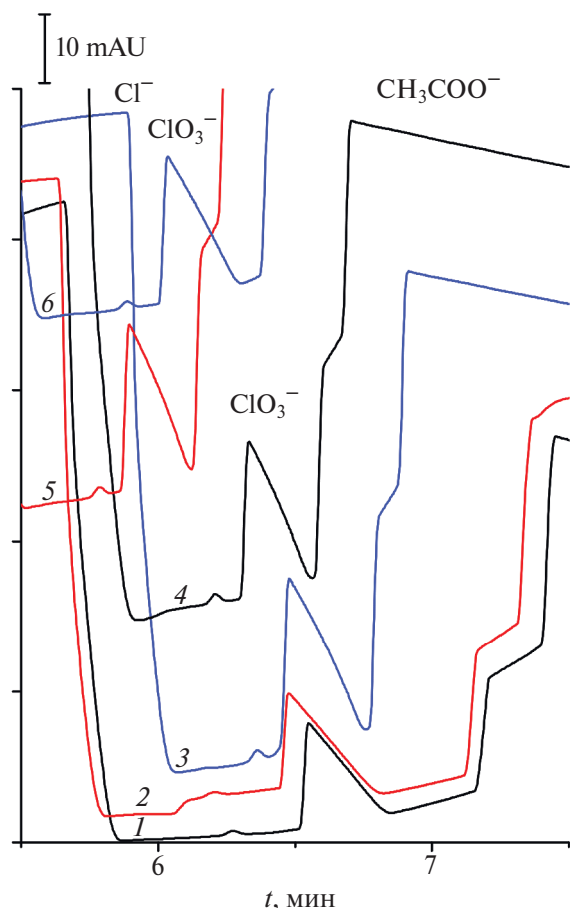


Рис. 4. Электрофореграммы смеси 35 мМ KCl и 1 мМ KClO₃. Система капиллярного электрофореза Agilent 7100. Капилляр 80.5/72 см, напряжение –30 кВ, давление 100 мбар. Ввод пробы при гидродинамическом давлении 100 мбар в течение, с: 1 – 15; 2, 3 – 25; 4–6 – 20. Дополнительно после пробы ввод зоны ацетата калия с рН 7.3 при 100 мбар в течение, с: 1–4 – 60; 5 – 90; 6 – 80. Концентрация ацетата калия, мМ: 1, 2, 5, 6 – 20; 3, 4 – 30.

(рис. 4). Оптимальные условия для получения неискаженного пика хлорат-ионов, отделенного от пика ацетат-ионов до базовой линии, при максимально возможном времени ввода пробы для наименьшего предела обнаружения оказались следующими: ввод пробы при гидродинамическом давлении 100 мбар в течение 20 с, а затем ввод зоны 20 мМ ацетат-ионов при гидродинамическом давлении 100 мбар в течение 80 с. Фактор концентрирования SEF_n для этих условий в случае 0.1 мМ хлорат-ионов составил 29 ± 1 , для 1 мМ – 10.4 ± 0.8 .

Исследовали влияние типа катиона (литий, калий, натрий) в самой пробе, а также концентрации хлорид-ионов на форму, площадь и время миграции пика хлорат-ионов. Первый фактор исследовали на примере проб с содержанием

0.1 мМ хлората калия и 35 мМ хлоридов щелочных металлов, при этом влияния не обнаружили. Для исследования влияния второго фактора зарегистрировали электрофореграммы проб с концентрацией 10–40 мМ хлорид-ионов при фиксированном содержании хлорат-ионов (0.1 мМ). Установили, что при концентрациях хлорид-ионов 10 и 20 мМ пик хлорат-ионов не отделяется до базовой линии от зоны ацетат-ионов. Площадь пика хлорат-ионов при содержании хлорид-ионов в пробе 25–35 мМ в пределах погрешности одинакова, а для содержания 40 мМ она занижена и слева от пика наблюдается ступенька, аналогично пику хлорат-ионов на рис. 2 (электрофореграмма 5). С понижением концентрации хлорид-ионов время миграции пика хлорат-ионов уменьшается. Рекомендуется разбавлять пробы таким образом, чтобы концентрация хлорид-ионов в пробе была близка к 35 мМ.

Изучили мешающее влияние перхлорат-ионов на определение хлорат-ионов в оптимальных условиях разделения, поскольку эти ионы имеют близкие электрофоретические подвижности [11]. Как видно из рис. 5, пик перхлорат-ионов в концентрации 0.1 мМ делится до базовой линии с пиком хлорат-ионов с такой же концентрацией. Однако при повышении концентрации хлорат-ионов до 1 мМ рассматриваемые пики перестают делиться до базовой линии (рис. 5). Тем не менее максимум пика перхлорат-ионов в этом случае заметен и для устранения их мешающего влияния необходимо просто разбавить пробу.

Метрологические характеристики методики. В оптимальных условиях оценили предел обнаружения хлорат-ионов в пробе с содержанием хлорид-ионов 35 мМ. Для этого определили отношения сигнал/шум для пиков, полученных от пробы, содержащей 0.1 мМ хлорат-ионов. Поскольку для симметричных пиков высота прямо пропорциональна концентрации, на основе полученного отношения сигнал/шум рассчитали концентрацию хлорат-ионов, при которой на электрофореграммах ожидается пик с отношением сигнал/шум, равным 3. Приготовили пробы, содержащие хлорат-ионы в рассчитанной концентрации (0.02 мМ) и в два раза меньшей, зарегистрировали электрофореграммы, измерили отношение сигнал/шум. Предел обнаружения оказался равным 0.01 мМ. В пересчете на массу сухих хлоридов калия, натрия или лития он составил 0.03–0.06%. Зарегистрировали электрофореграммы проб с варьируемой концентрацией хлорат-ионов в диапазоне 0.01–1.00 мМ

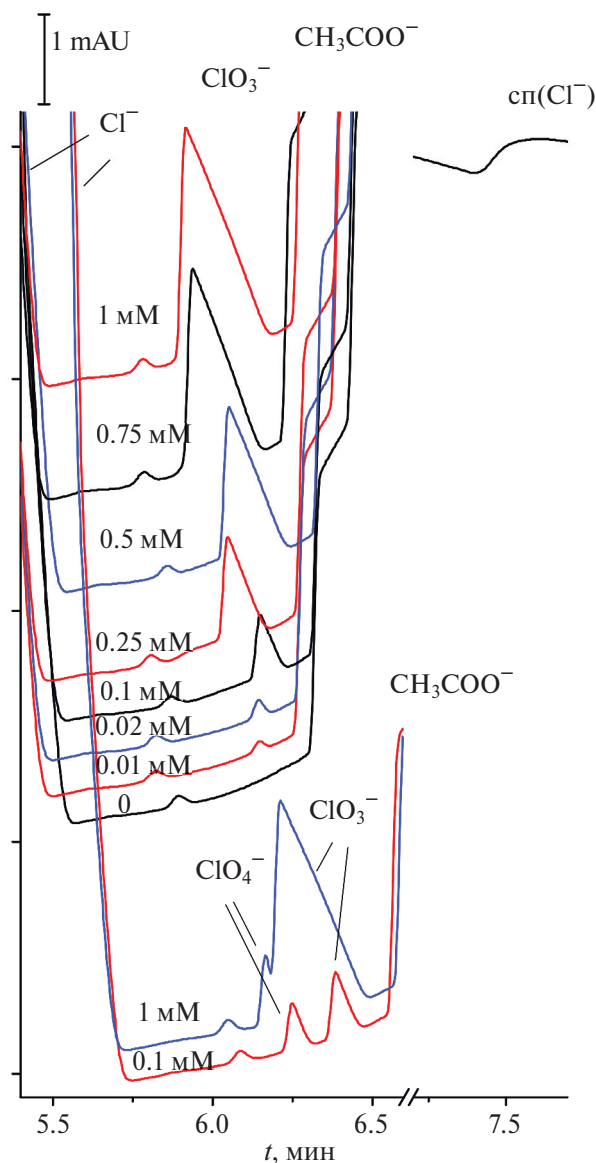


Рис. 5. Влияние присутствия 0.1 мМ перхлорат-ионов в пробе на разделение (снизу) и влияние концентрации хлорат-ионов на форму и площадь пиков (сверху). Состав пробы: 35 мМ КСl, 0–1 мМ КClO₃, 0 или 0.1 мМ NaClO₄. Система капиллярного электрофореза Agilent 7100. Капилляр 80.5/72 см; напряжение –30 кВ; давление 100 мбар; ввод пробы 100 мбар, 20 с; ввод после пробы зоны 20 мМ раствора ацетат-ионов с рН 7.3 100 мбар, 80 с.

(0.8–85 мг/л) (рис. 5). Градуировочный график в этом диапазоне линеен с $R^2 > 0.999$. Относительное стандартное отклонение для площадей электрофоретических пиков не превышает 5%, за исключением концентраций хлорат-ионов 0.01 и 0.02 мМ (для которых оно составило 42 и 28%). Из-за дрейфа электроосмотического потока относительное стандартное отклонение времен миграции при фиксированной концентрации хлорат-ионов составляет 0.1–1.4%. Ввиду этого,

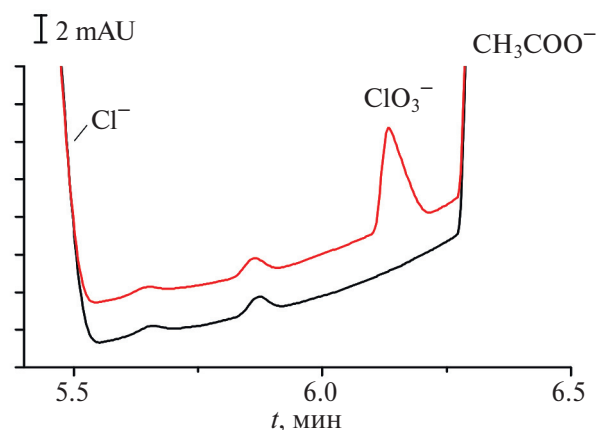


Рис. 6. Электрофореграммы раствора с содержанием 2.05 г/л поваренной соли (ООО “ТДС”, в расчете на 100% NaCl концентрация хлорид-ионов равна 35 мМ) и такого же раствора с добавкой 0.100 мМ KClO₃. Условия разделения см. в подписи к рис. 5.

а также поскольку пик по мере увеличения концентрации приобретает треугольную форму с соответствующим смещением времени миграции, для идентификации пиков при анализе реальных образцов рекомендуется использовать метод добавок. Факторы концентрирования варьируются от 10 до 70, увеличиваясь с уменьшением концентрации хлорат-ионов.

Анализ растворов поваренной соли. Проанализировали на содержание хлорат-ионов реальные объекты – растворы поваренной соли (см. “Экспериментальную часть”), искомым аналит не обнаружили (рис. 6). Правильность результатов оценили методом введено–найдено. При введении в пробу 0.100 мМ хлорат-ионов для соли ООО “ТДС” найдено 0.090 ± 0.002 мМ ($n = 5$, $P = 0.95$, пробу готовили трижды), т.е. содержание занижено на 10%; для соли ОАО “Тыретский солерудник” найдено 0.100 ± 0.002 мМ. Занижение результата анализа может быть связано с наличием в реальном объекте веществ, реагирующих с хлорат-ионами.

* * *

Таким образом, подобраны оптимальные условия определения низких концентраций хлорат-ионов в растворах хлоридов щелочных металлов методом капиллярного электрофореза с применением фонового электролита, содержащего 4.7 мМ K₂CrO₄ и 0.3 мМ K₂Cr₂O₇, с рН 7.3: капилляр с общей/эффективной длиной 80.5/72 см и внутренним диаметром 50 мкм; напряжение –30 кВ; прикладываемое гидродинамическое давление 100 мбар; ввод пробы

100 мбар, 20 с; ввод после пробы зоны 20 мМ раствора ацетат-ионов с рН 7.3, 100 мбар, 80 с; содержание хлорид-ионов в пробе 35 мМ. В этих условиях предел обнаружения хлорат-ионов составил 0.01 мМ, в пересчете на массу сухих хлоридов калия, натрия или лития – 0.03–0.06%. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций хлорат-ионов 0.01–1 мМ, что позволяет определять их при содержании хлорид-ионов, превышающем концентрацию хлорат-ионов в 35–3500 раз. Методика применена для анализа растворов поваренной соли.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания Института химии и химической технологии Сибирского отделения Российской академии наук (проект FWES-2021-0012, номер регистрации 121031500209-6 в Единой государственной информационной системе учета научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ гражданского назначения) с использованием оборудования Красноярского регионального центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сериков Ю.А., Серкова Н.В. Титриметрический метод определения хлорат-иона в природных водах // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2010. Т. 76. № 10. С. 21.
2. Фрумина Н.С., Лисенко Н.Ф., Чернова М.А. Хлор. Аналитическая химия элементов. М.: Наука, 1983. 200 с.
3. Наянова Е.В., Елипашева Е.В., Сергеев Г.М., Сергеева В.П. Фотометрическое редокс-определение оксоформ галогенов с использованием метилевого голубого // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19. № 2. С. 161. <https://doi.org/10.15826/analitika.2015.19.2.006>
4. Леванов А.В., Кусков И.В., Антипенко Э.Е., Лунин В.В. Растворимость и кинетика химических реакций озона в водных растворах хлорида натрия // Журн. физ. химии. 2008. Т. 82. № 12. С. 2271. (Levanov A.V., Kuskov I.V., Antipenko E.E., Lunin V.V. The solubility of ozone and kinetics of its chemical reactions in aqueous solutions of sodium chloride // Russ. J. Phys. Chem. A. 2008. V. 82. № 12. P. 2045.) <https://doi.org/10.1134/S0036024408120133>
5. Biesaga M., Kwiatkowska M., Trojanowicz M. Separation of chlorine-containing anions by ion chromatography and capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 1997. V. 777. P. 375. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00338-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00338-5)
6. Петренко Н.Ф., Деревянко Т.О., Кизлова М.И. Аналитические методы определения в воде диоксида хлора, хлорит- и хлорат-анионов // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2008. Т. 14. № 4. С. 95.
7. Проблемы аналитической химии. Т. 18. Капиллярный электрофорез / Под ред. Карцовой Л.А. М.: Наука, 2014. 442 с.
8. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза “КАПЕЛЬ”. СПб: ООО “Веда”, 2006. 212 с.
9. Руководство по капиллярному электрофорезу / Под ред. Волощука А.М. М.: Научный совет РАН по хроматографии, 1996. 231 с.
10. Методика М 01-52-2012. Определение хлорат-, перхлорат- и хлорит- ионов в питьевых водах, в том числе расфасованных в емкости. СПб: Люм-экс, 2012. 2 с.
11. Сурсякова В.В., Рубайло А.И. Определение хлорат- и перхлорат-ионов в питьевой воде методом капиллярного электрофореза // Журн. Сиб. фед. ун-та. Химия. 2018. Т. 11. № 3. С. 361. (Sursyakova V.V., Rubaylo A.I. Determination of chlorate and perchlorate ions in drinking water using capillary electrophoresis // J. Sib. Fed. Univ. Chem. 2018. V. 11. № 3. P. 361.) <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0082>
12. Gaspar A., Pesti A., Szabo M., Kecskemeti A. Determination of chlorine species by capillary electrophoresis – mass spectrometry // Electrophoresis. 2019. V. 40. P. 2637. <https://doi.org/10.1002/elps.201900138>
13. Будников В.Н., Давыдов М.В., Спиридонов В.А., Будникова И.К. Определение неорганических анионов применительно к исследованию смесевых взрывчатых веществ, пиротехнических составов, продуктов их взрыва и сгорания методом капиллярного электрофореза // Теория и практика судебной экспертизы. 2010. Т. 20. № 4. С. 208.
14. Пирогов А.В., Юрьев А.В., Шпигун О.А. Применение ионенов в качестве модификаторов капилляра при одновременном определении азиды, хлората и перхлората методом капиллярного электрофореза // Журн. аналит. химии. 2003. Т. 58. № 8. С. 876. (Pirogov A.V., Yur'ev A.V., Shpigun O.A. Use of ionenes as capillary modifiers in the simultaneous determination of azide, chlorate, and perchlorate ions by capillary electrophoresis // J. Anal. Chem. 2003. V. 58. № 8. P. 781.) <https://doi.org/10.1023/A:1025047913692>
15. Калякин С.Н., Сурсякова В.В., Бурмакина Г.В., Рубайло А.И. Гидродинамическое подавление электроосмотического потока в капиллярном

- электрофорезе с косвенным спектрофотометрическим детектированием // Журн. аналит. химии. 2009. Т. 64. № 4. С. 415. (*Kalyakin S.N., Sursyakova V.V., Burmakina G.V., Rubailo A.I.* Hydrodynamic suppression of the electroosmotic flow in capillary electrophoresis with indirect spectrophotometric detection // *J. Anal. Chem.* 2009. V. 64. № 4. P. 398.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934809040145>
16. *Сурсыякова В.В., Калякин С.Н., Бурмакина Г.В., Рубайло А.И.* Системные пики и оптимизация условий разделения анионов методом капиллярного электрофореза с необращенным электроосмотическим потоком // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 9. С. 871. (*Sursyakova V.V., Kalyakin S.N., Burmakina G.V., Rubaylo A.I.* System peaks and optimization of anion separation in capillary electrophoresis with non-reversed electroosmotic flow // *J. Anal. Chem.* 2012. V. 67. № 9. P. 783.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934812090080>
17. *Sursyakova V.V., Kalyakin S.N., Burmakina G.V., Rubaylo A.I.* System peaks in capillary zone electrophoresis of anions with negative voltage polarity and counter-electroosmotic flow // *Electrophoresis.* 2011. V. 32. P. 210.
<https://doi.org/10.1002/elps.201000313>
18. *Hruška V., Gaš B.* Kohlrausch regulating function and other conservation laws in electrophoresis // *Electrophoresis.* 2007. V. 28. P. 3.
<https://doi.org/10.1002/elps.200600513>
19. *Карцова Л.А., Бессонова Е.А.* Методы концентрирования в капиллярном электрофорезе // Журн. аналит. химии. 2009. Т. 64. № 4. С. 340. (*Kartsova L.A., Bessonova E.A.* Preconcentration techniques in capillary electrophoresis // *J. Anal. Chem.* 2009. V. 64. № 4. P. 326.)
<https://doi.org/10.1134/S1061934809040029>
20. *Timerbaev A.R., Hirokawa T.* Recent advances of transient isotachopheresis-capillary electrophoresis in the analysis of small ions from high-conductivity matrices // *Electrophoresis.* 2006. V. 27. P. 323.
<https://doi.org/10.1002/elps.200500320>
21. *Fukushi K., Tsujimoto J.-i., Hotta H., Okamura H., Inui H.* Determining fluoride in salts using capillary zone electrophoresis with transient isotachopheresis // *Salt Seawater Sci. Technol.* 2022. V. 2. P. 10.
https://doi.org/10.11457/ssst.2.0_10
22. *Fukushi K., Hotta H., Okamura H., Inui H.* Simultaneous determination of iodide and iodate in salts using capillary zone electrophoresis with transient isotachopheresis // *Salt Seawater Sci. Technol.* 2023. V. 3. P. 37.
https://doi.org/10.11457/ssst.3.0_37

 ORIGINAL ARTICLES

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR THE DETERMINATION OF LOW CONCENTRATIONS OF CHLORATE IONS IN ALKALI METAL CHLORIDE SOLUTIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

V. V. Sursyakova^{a, *}, D. A. Shataev^b, A. I. Rubaylo^a

^a*Institute of Chemistry and Chemical Technology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", 660036, Krasnoyarsk, Russia*

^b*Siberian Federal University, 660041, Krasnoyarsk, Russia*

*E-mail: viktoria_vs@list.ru

Abstract. The separation of chloride and chlorate ions in the case of a significant excess of chloride ions in a sample is studied by capillary electrophoresis. It is found that under standard separation conditions using a chromate background electrolyte, the signal-to-noise ratio for the chlorate ion peak at $c(\text{ClO}_3^-) = 0.1 \text{ mM}$ sharply decreases at the concentration ratio $c(\text{Cl}^-)/c(\text{ClO}_3^-) > 100$. A number of approaches are considered to eliminate this phenomenon. The most effective approach was to introduce a solution containing acetate ions into the capillary after the sample zone to create conditions for transient isotachopheresis. Optimal parameters for the electrophoretic separation of chloride and chlorate ions are selected at a chloride ion content of 35 mM in the sample. The limit of detection is 0.01 mM chlorate ions (0.03–0.06% based on the mass of dry potassium, sodium, or lithium chlorides). The calibration curve is linear in the range of 0.01–1 mM ClO_3^- . The selected conditions allow the determination of chlorate ions at a molar ratio of chloride to chlorate ions of 35–3500. The stacking efficiency factors are 10–70. Perchlorate ions do not interfere with the determination of chlorate ions at the concentrations of both ions of 0.1 mM or lower. The procedure is tested by analysis of table salt.

Keywords: capillary electrophoresis, chlorate ions, salts, transient isotachopheresis, sample preconcentration, high-conductivity samples.