



Алтыев Алексей Муратович

**БИОАКТИВНЫЕ ЭЛЕКТРОДНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АМИНОКИСЛОТ МЕТОДАМИ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ**

1.4.2 – Аналитическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Научный руководитель:

Шелковников Владимир Витальевич

кандидат химических наук, доцент,
заведующий кафедрой аналитической химии
химического факультета ФГАОУ ВО
«Национальный исследовательский Томский
Государственный Университет» (ТГУ)

Официальные оппоненты:

Зенкевич Игорь Георгиевич

доктор химических наук, профессор,
профессор кафедры органической химии
Института химии ФГБОУ ВО «Санкт-
Петербургский государственный
университет» (СПбГУ)

Шафигулин Роман Владимирович

кандидат химических наук, доцент,
заведующий кафедрой физической химии и
хроматографии ФГАОУ ВО «Самарский
национальный исследовательский
университет им. академика С.П. Королева»,

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский Томский политехнический
университет» (ТПУ)

Защита состоится "3" февраля 2026 г. в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 24.2.340.04 по химическим наукам, созданного на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ) по адресу: 603022, Нижний Новгород, пр-кт. Ггаранина 23, корп. 5.

С диссертацией можно ознакомиться на сайте <https://diss.unn.ru/1586> и в библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ)

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор химических наук



Созин А. Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. На настоящий момент известно около 500 аминокислот, из них около 20 являются незаменимыми. Растения и несколько известных микроорганизмов способны синтезировать аминокислоты нужные для производства клеточных белков, однако животные могут синтезировать лишь 11 аминокислот. Недостаток оставшихся 9 аминокислот может быть компенсирован только с пищей. Дисбаланс аминокислот ведет к проявлению отрицательного азотного баланса, могут возникать задержки в развитии организма, отрицательный азотный баланс может препятствовать синтезу необходимых для существования человека белков. Человек должен получать 9 незаменимых аминокислот: валин, изолейцин, лейцин, метионин, треонин, триптофан, гистидин, фенилаланин, лизин. Потребность в незаменимых аминокислотах возрастает в периоды интенсивного роста организма, при беременности, некоторых заболеваниях. В организме человека метионин служит донором метильных групп при образовании адреналина, холина, а также источником серы при биосинтезе цистеина. Дефицит метионина приводит к снижению уровня плазменных белков (альбуминов), вызывает анемию (снижается уровень гемоглобина), при одновременном недостатке витамина Е и селена способствует развитию мышечной дистрофии. Триптофан (Трп) – незаменимая α -аминопропионовая кислота, необходимая для синтеза белков, но и не только для участия в этом процессе. Она способствует поддержанию азотистого равновесия в обменных процессах, а также является исходным веществом в синтезе гормонов млекопитающих, таких как ниацин, мелатонин и серотонин, нехватка которых приводит к психическим расстройствам и нарушению сна. 5-гидрокситриптофан является промежуточным звеном в метаболизме триптофана. Нехватка данной аминокислоты негативно влияет на получение гормона серотонина. Поскольку эти аминокислоты могут поступать в организм только с пищей, лекарствами и биологически активными добавками, необходимы надежные методы их определения. Для определения аминокислот используют хроматографию, спектрофотометрию, ЯМР, хемилюминесценцию, масс-спектрометрию, однако данные методы имеют ряд существенных недостатков: применяемое аппаратное оформление дорого и недоступно для небольших лабораторий, процесс пробоподготовки, как правило, длительный, при этом пробы могут загрязняться применяемыми реагентами. В последнее время для определения аминокислот стали использовать электрохимические методы, обладающие высокой чувствительностью, селективностью, низкой стоимостью оборудования. Однако, количество надежных методик невелико, поскольку многие аминокислоты проявляют слабую электрохимическую активность, окисляются в положительной области при близких значениях потенциалов.

Целью данной работы является изучение электрохимического поведения триптофана, 5-гидрокситриптофана и метионина на электродах, модифицированных витаминами группы В, и разработка методик их определения методами вольтамперометрии.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. На основании биохимических процессов протекающих в организме с аминокислотами выбрать модификаторы для определения метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана и предложить способ их закрепления на электроде.
2. Оценить влияние различных факторов (рН, потенциал и время электролиза, скорость развертки) на электрохимические сигналы триптофана, метионина, 5-гидрокситриптофана на модифицированном электроде
3. Изучить физико-химические закономерности окисления аминокислот на поверхности модифицированного электрода. Предложить возможные механизмы электродных процессов.
4. Оптимизировать условия определения метионина и одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана в условиях метода вольтамперометрии.
5. Оценить метрологические характеристики методик определения метионина, триптофана, 5-гидрокситриптофана в лекарственных препаратах и биологически активных добавках (БАД).

Научная новизна

1. Впервые в основу методик определения аминокислот методами вольтамперометрии положены биохимические процессы, протекающие в организме с участием витаминов группы В.
2. Предложены возможные механизмы процессов концентрирования и электрорастворения концентратов триптофана и 5-гидрокситриптофана на электродах модифицированных полифолиевой кислотой и метионина, на электродах, модифицированных цианокобаламином.
3. Впервые предложен способ модификации инертных графитосодержащих электродов путем последовательной электрохимической сборки многостенными углеродными нанотрубками и пленками цианокобаламина или полифолиевой кислоты. Изучены физико-химические закономерности электроокисления метионина на электроде, модифицированном витамином В₁₂, триптофана и 5-гидрокситриптофан на электроде, модифицированном витамином В₉.

Практическая значимость

Разработаны методики определения метионина, и одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана на электродах, модифицированных пленками витаминов В₁₂, В₉, в лекарственных средствах и БАДах. Проведена оценка отдельных метрологических характеристик методик определения метионина, триптофана, 5-гидрокситриптофана. Установлено, что присутствие других аминокислот (лизина, валина, лейцина, фенилаланина и др.) а также крахмала и метилцеллюлозы в анализируемых объектах не влияет на аналитические сигналы определяемых компонентов. Разработанные методики позволяют определять метионин, триптофан и 5-гидрокситриптофан на уровне до $0,5 \cdot 10^{-7}$ М. Разработанные методики определения метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана могут быть рекомендованы для контроля качества лекарственных средств и БАДов в аналитических лабораториях фармацевтических компаний.

Личный вклад автора состоял в обобщении и систематизации литературных данных по методам выделения, определения аминокислот в лекарственных средствах и БАДах, а также в проведении экспериментальных исследований и интерпретации полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследования ряда факторов (рН раствора, природа фонового электролита, скорость развертки потенциала, время электролиза) на аналитические сигналы аминокислот (триптофан, 5-гидрокситриптофан, метионин).
2. Физико-химические закономерности протекания реакции окисления аминокислот (триптофан, 5-гидрокситриптофан, метионин) на углеродсодержащем электроде, модифицированном пленками витаминов группы В и многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ).
3. Влияние сопутствующих компонентов матрицы лекарственных средств и БАД на аналитические сигналы аминокислот (метионин, триптофан, 5-гидрокситриптофан).
4. Вольтамперометрические методики определения индивидуальных аминокислот (триптофан, 5-гидрокситриптофан, метионин) в лекарственных препаратах и БАДах.

Апробация работы

Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» (Москва, 2018); XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019); XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» (Москва, 2020); Международной научной конференции «Полифункциональные химические материалы и технологии» (Томск, 2019); XVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2020); IV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Химические проблемы современности» (Донецк, 2020), Международной научной студенческой конференции «МНСК» (Новосибирск, 2020)

Публикации

Опубликовано 11 работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 4 статьи индексируются базами данных Web of Science и Scopus, 7 статей в сборниках материалов международных и всероссийских (в том числе с международным участием) научных конференций.

Работа выполнена при финансовой поддержке: Программы развития Томского Государственного Университета (Приоритет-2030), проект № 2.4.1.23 МЛ «Разработка научных основ для создания новых функциональных материалов на основе N-гетероциклических соединений как перспективных компонентов противоспаечных средств»; Программы развития Томского государственного университета на 2025–2036 годы, проект № 5.1.3.25 «Аналитические методы сопровождения новых химических технологий».

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 113 страницах, содержит 30 рисунков и 17 таблиц. Диссертация состоит из введения и 4 глав, включая литературный обзор. Список цитируемой литературы содержит 92 библиографические ссылки на работы российских и зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования, обозначена цель работы, сформулированы задачи исследования, отражена научная и практическая значимость исследований.

В первой главе проведен анализ литературы по описанию различных методов прямого и косвенного определения триптофана, метионина и 5-гидрокситриптофана. Большое внимание уделено электрохимическому подходу. В частности, подробно рассматриваются различные электродные материалы и способы их модификации, применяемые для количественного определения метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана. Цели и задачи работы сформулированы на основании проведенного обзора.

Во второй главе приводится описание используемого в работе оборудования, электродов, посуды, реактивов, методик проведения эксперимента, приготовления растворов и модификатора.

Третья глава посвящена исследованию поверхности модифицированного электрода и изучению физико-химических закономерностей концентрирования аминокислот и электроокисления продуктов их взаимодействия с модификаторами. Для вольтамперометрического определения метионина в качестве рабочего электрода предлагается использовать модифицированный многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) и пленкой витамина В₁₂ углеродсодержащий электрод. Модификацию электрода проводили следующим образом: рабочий углеродсодержащий электрод (диаметром 5,0 мм) опускали в раствор МУНТ и удерживали при постоянном потенциале в течение 40 секунд. В качестве катода (противоэлектрода) использовали пластину из нержавеющей стали. После нанесения МУНТ на поверхность, электрод высушивали. Для выбора оптимальных условий модификации электрода проводили трехфакторное планирование эксперимента. В качестве факторов изучали влияние потенциала электролиза (X_1), время нанесения нанотрубок (X_2) и концентрацию МУНТ (X_3). В качестве функции отклика оптимизировали плотность тока анодного пика системы гексацианоферратов. Для этого величину тока пика относили к активной площади поверхности электрода, которую оценивали по уравнению Рендлса–Шевчика по циклическим вольтамперным кривым. Уравнение, полученное в результате проведенного эксперимента, имеет вид:

$$Y=16,4+0,52X_1-0,17X_2-1,25X_3$$

После анализа данного уравнения было проведено крутое восхождение по поверхности отклика, на основании которого выбраны оптимальные условия формирования электрода. В оптимальных условиях (осаждение нанотрубок при 6,5 В в течение 8 с с концентрацией нанотрубок 0,025 мг/мл) плотность тока примерно в 6 раз больше, чем в случае аналогичного по параметрам немодифицированного электрода (2,02 против 0,33 мкА/см²). Пленку цианокобаламина наносили методом циклической вольтамперометрии в пределах потенциалов -1,4 В – +1,0 В (рис.1)

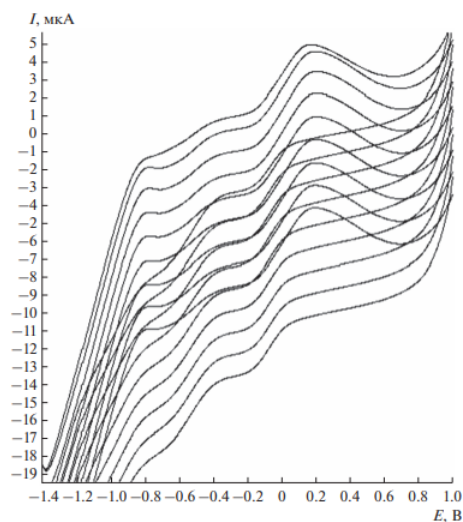


Рис. 1. Циклические вольтамперные кривые процесса осаждения витамина В₁₂ на электроде

Изучение морфологии поверхности электродов проводили при помощи сканирующей электронной микроскопии.

Для подбора оптимальных условий получения аналитического сигнала метионина исследовано влияние ряда факторов:

Влияние pH

Для установления оптимального значения водородного показателя при окислении метионина использовали растворы от 1,65 до 12,43 значений pH.

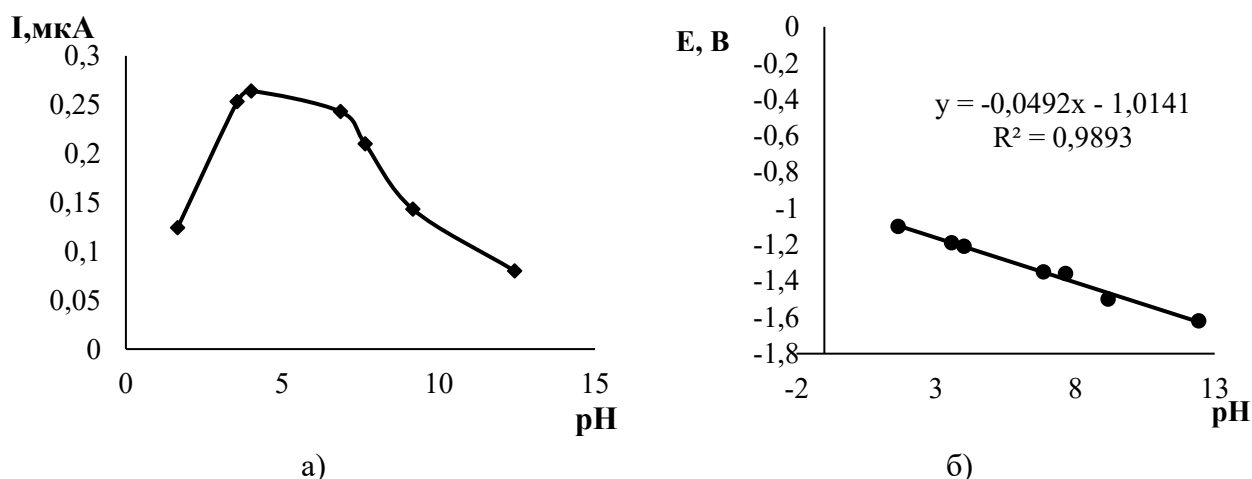


Рис. 2. Зависимость тока (а) и потенциала (б) электроокисления комплекса метионина с цианокобаламином на модифицированном МУНТ и В₁₂ электроде от pH

В ходе эксперимента выявлено, что анодный сигнал метионина сильно зависит от pH фонового электролита (рис 2а). С увеличением pH от 1,65 до 4,01 происходит увеличение тока пика окисления комплекса с метионином, который достигает максимального значения при pH 4. При смещении pH в нейтральную и щелочную область ток уменьшается, поскольку количество

протонов не является достаточным для окисления метионина. В сильнощелочной среде при $\text{pH} > 12$ изменение пика окисления метионина на электродах малозначительно. Между потенциалом пика и pH наблюдается линейная зависимость: $y = -0,0492X - 1,0141$. Величина наклона $49,2 \text{ мВ/рН}$ близка к нернстовскому наклону ($59,0 \text{ мВ/рН}$), что указывает на равное число электронов и протонов, участвующих в электрохимическом процессе (рис. 26).

Влияние параметров электролиза (потенциала и времени накопления)

При выборе потенциала электролиза исследовали область значений от $-1,9 \text{ В}$ до $-1,1 \text{ В}$ (рис.3а). Зависимость тока анодного пика от потенциала электролиза проходит через максимум. При дальнейшем смещении потенциала в отрицательную область анодные пики уменьшаются, что обусловлено конкурирующим процессом выделением водорода. Поэтому в качестве оптимального для концентрирования метионина на модифицированном электроде выбран потенциал $-1,6 \text{ В}$. Как видно из рис. 3б, после накопления более 300 с ток пика меняется незначительно, что может быть обусловлено полным заполнением поверхности электрода монослоем осажденного метионина, поэтому при дальнейших исследованиях накопление проводили не более 180 с .

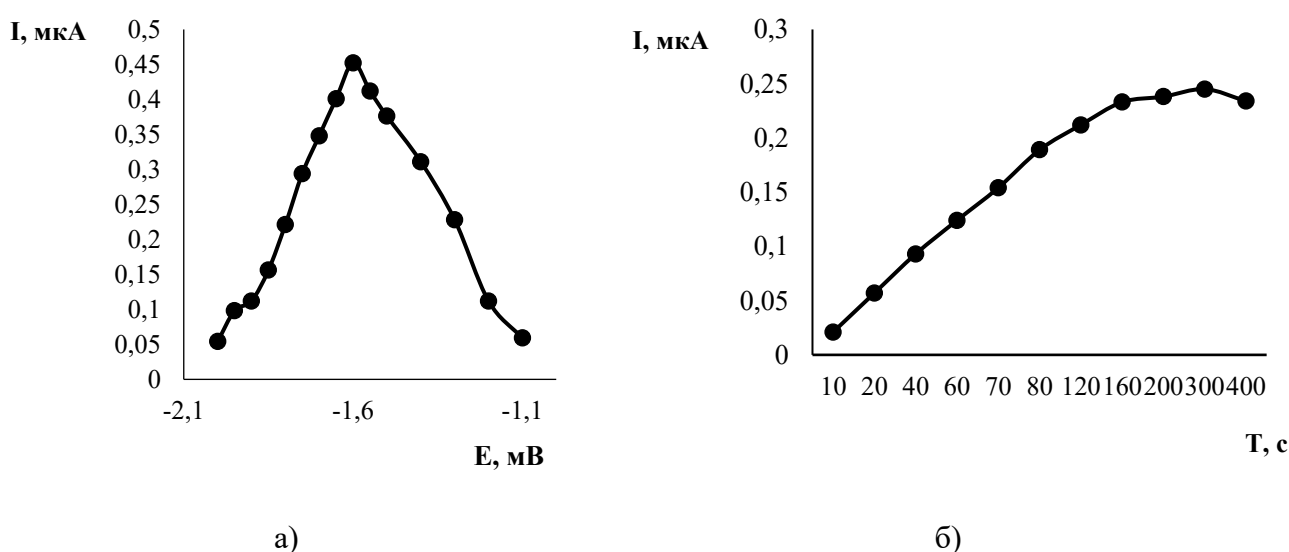


Рис. 3. Зависимость тока электроокисления комплекса метионина с цианокобаламином от потенциала (а) и времени (б) накопления на модифицированном МУНТ и V_{12} электроде: фон – буферный раствор $\text{pH}=4,01$, концентрация метионина $1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$

Механизм электроокисления комплекса витамина V_{12} с метионином

На рис. 4 представлены вольтамперные кривые окисления комплекса метионина с цианокобаламином, полученные в постоянноточковом режиме в выбранных рабочих условиях. При внесении стандартной добавки наблюдается рост аналитического сигнала при потенциале $-0,96 \text{ В}$.

Для установления механизма электроокисления комплекса метионина на модифицированном электроде построены зависимости тока (I) от $W^{1/2}$ и потенциала пика от $\ln(W^{1/2})$ в диапазоне скоростей развертки от 10 до 200 мВ/с (рис. 5а). Линейная зависимость тока пика от $W^{1/2}$ характерна как для обратимых, так и необратимых процессов (рис. 5б).

Линейная зависимость потенциала пика электроокисления метионина от $\ln(W^{1/2})$ со смещением потенциала в положительную область указывает на необратимость процесса (рис.5). Таким образом, смещение потенциала пика в положительную область при увеличении скорости развертки и линейность зависимости потенциала пика от натурального логарифма квадратного корня скорости развертки указывают на необратимый характер процесса.

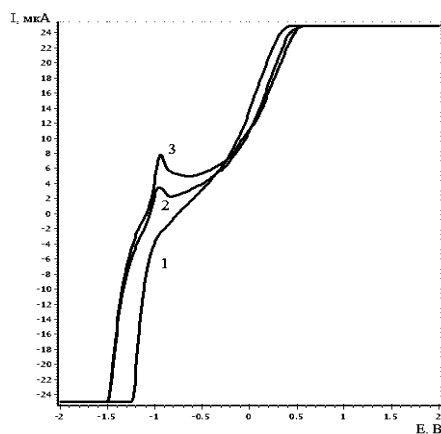


Рис. 4. Вольтамперные кривые окисления комплекса метионина. 1 – фоновый электролит (рН 4,01), кривая 2 – $2,29 \times 10^{-6}$ М метионина, кривая 3 – $4,58 \times 10^{-6}$ М метионина

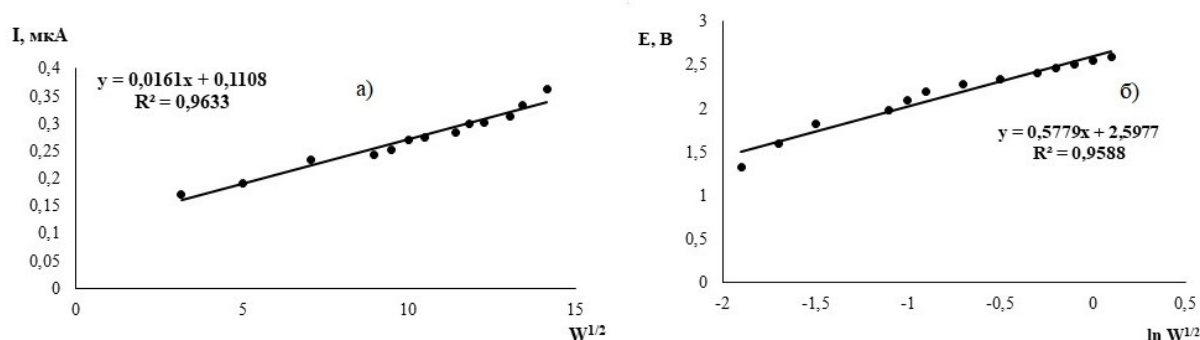


Рис. 5. Зависимости тока электроокисления комплекса метионина с цианокобаламином от скорости развертки потенциала $W^{1/2}$ (а) и потенциала электроокисления от $\ln(W^{1/2})$ (б)

На рис. 6а представлена зависимость тока пика от скорости развертки. Зависимость $I - W$ линейна, что позволяет сделать вывод об адсорбционном характере концентрирования. Однако, адсорбция не является лимитирующей стадией поскольку зависимость тока пика от времени накопления (рис. 3б) имеет достаточно большой линейный диапазон (до 180с.). Прямолинейность логарифмической зависимости (рис. 6б) не характерна для процессов, где лимитирующей стадией является диффузия. Критерий Семерано (тангенс угла наклона логарифмической зависимости) менее 0,5. Следовательно, электродный процесс определяется или скоростью собственной электрохимической стадией, либо адсорбцией метионина, или предшествующей реакцией образования комплекса с участием медиатора.

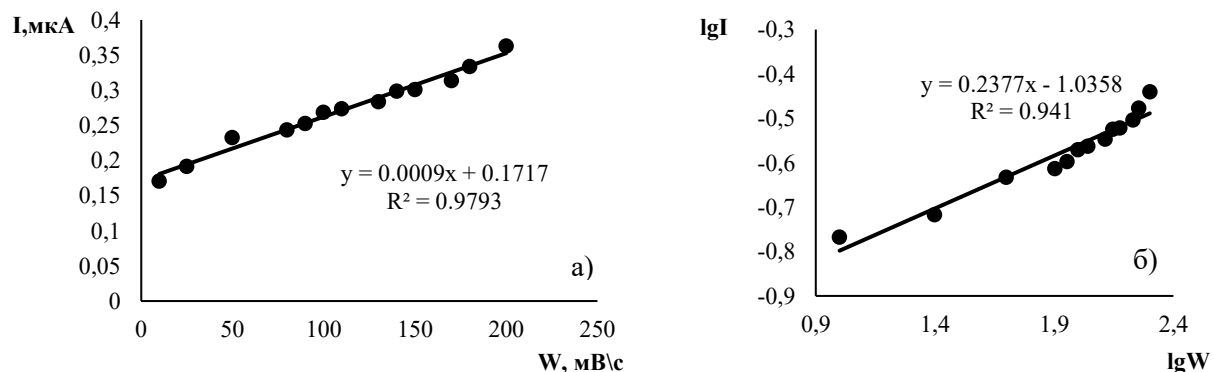


Рис. 6 Зависимости тока электроокисления комплекса метионина с цианокобаламином от скорости развертки потенциала (а) и $\lg I$ от $\lg W$ (б)

Для установления возможного механизма процесса концентрирования метионина и формирования аналитического сигнала регистрировали спектры комбинационного рамановского рассеяния. Для этого проводили электрохимическое концентрирование метионина при потенциале $-1,6$ В на модифицированном электроде в течение 180 с, затем электрод промывали деионизованной водой, помещали в чистый фоновый электролит и при линейной развертке потенциала от $-1,6$ до $1,5$ В растворяли концентрат с электрода. Данную операцию выполняли не менее 10 раз для повышения интенсивности спектра. На рис. 7 представлены спектры рамановского рассеяния водных растворов кобаламина (1), метионина (2) и продуктов электрохимического растворения концентрата (3).

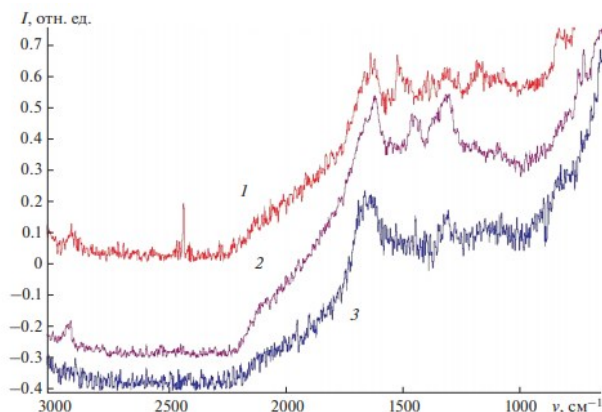


Рис. 7 Спектры комбинационного рассеяния: 1 – витамин В₁₂, 2 – 0,17 М раствор метионина, 3 – продукты растворения концентрата с электрода

После растворения концентрата в чистом фоновом электролите из спектра исчезают полосы при 2930 и 1410 см^{-1} , характерные для $\text{CH}_3(\text{vs})$, полоса при 723 см^{-1} , характерная $\text{CSC}(\text{s})$, смещается в более длинноволновую область до 782 см^{-1} , что отвечает $\text{HSC}(\text{vs})$. Таким образом, после растворения концентрата в растворе присутствует гомоцистеин, который образуется из метионина в результате электродной реакции.

Можно предложить следующий механизм процесса: атом серы метионина с частичным отрицательным зарядом за счет электростатических сил присоединяется к кобальту (III) витамина В₁₂. При катодной поляризации электронная плотность смещается к атому серы, метильная группа отрывается от метионина, переходя на кобаламин. При анодной развертке потенциала в раствор переходит гомоцистеин. Расчет коэффициента переноса для необратимого процесса (окисления метионина) проводили из Тафелевской зависимости. Величина коэффициента переноса составила 0,44. Полученное значение указывает на то, что в лимитирующей стадии процесса участвует первый электрон. Для необратимого процесса число электронов рассчитывали по формуле:

$$|E_p - E_{(n/2)}| = 47,7/\alpha n ;$$

где, E_p – потенциал пика; $E_{n/2}$ – потенциал полупика.

Значение $n=1,08$ указывает на то, что в реакции окисления принимает участие 1 электрон и один протон. Это может быть обусловлено тем, что кобальт, находящийся в корриновом кольце витамина В₁₂, в процессе анодной развертки потенциала окисляется до Co(III) . При катодной поляризации электрода кобальт в цианокобаламине сначала восстанавливается до $+2$ и именно восстановленный комплекс взаимодействует с метионином, а при анодной развертке происходит обратный процесс окисления кобальта, перенос метильной группы метионина на кобаламин и переход в раствор гомоцистеина (рис.8).

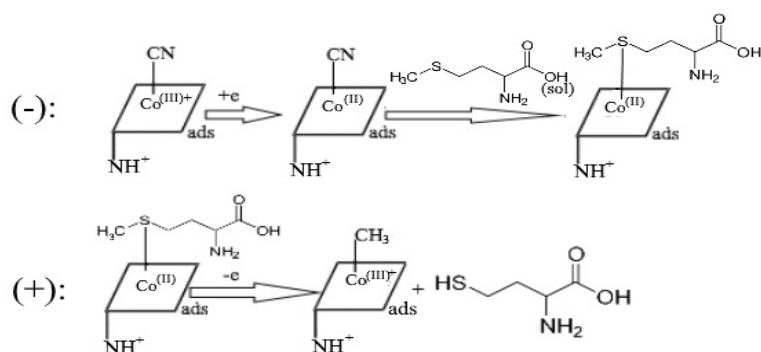
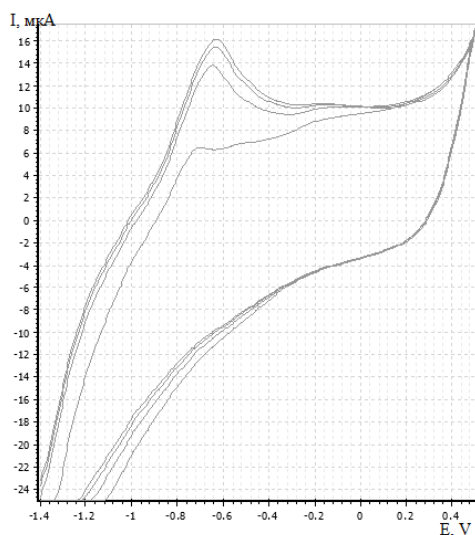


Рис. 8 Возможная схема процесса превращения метионина

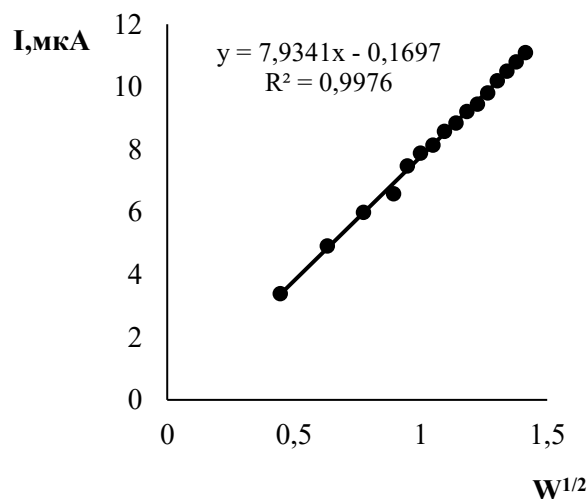
Таким образом, в результате проведенных исследований были подобраны рабочие условия вольтамперометрического определения метионина. Дальнейшее определение метионина проводили на модифицированном МУНТ и витамином В₁₂ углеродсодержащем электроде в калий гидрофталатном буферном растворе с pH 4,01 при $E_{\text{нак}} = -1,6$ В, $t_{\text{нак}} = 30$ с. Для увеличения чувствительности определения метионина вольтамперные кривые регистрировали в дифференциально-импульсном режиме. Оптимальные условия определения: амплитуда волны 15 мВ, задержка измерения 7 мс, шаг развертки 10 мВ.

Модифицированный электрод для одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана

Пленку фолиевой кислоты наносили на поверхность углеродсодержащего электрода, модифицированного МУНТ методом циклической развертки потенциала в диапазоне $-1,4 \div 0,5$ В при 80 мВ/с в течение 9 циклов из 0,02 М щелочного раствора витамина В₉ (рис. 9а)



а)



б)

Рис. 9 Циклические вольтамперные кривые процесса закрепления фолиевой кислоты на углеродсодержащем электроде, модифицированном МУНТ (а) и зависимость тока окисления $1 \cdot 10^{-5} \text{ М } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ от $W^{1/2}$ (б)

Пиковый ток при потенциале -0,75 В увеличивается, что свидетельствует о росте пленки на электроде (рис. 9а).

Механизм электрополимеризации: под действием электрического тока амин, находящийся в птеридиновом кольце молекулы фолиевой кислоты, заряжается до положительного катион-радикала. Этот катион-радикал присоединяется к свободному амину птеридиновой группы. Данный механизм хорошо согласуется с литературными данными.

График зависимости I_p от $W^{1/2}$ (рис. 9б) для тестовой системы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ носит прямолинейный характер, что указывает на обратимость протекания электрохимического процесса и возможность применения соответствующих уравнений для расчета электрохимических параметров. В результате осаждения полифолиевой кислоты на электрод, модифицированный МУНТ, электроактивная поверхность электрода увеличивается. Для подбора условий определения триптофана и 5-гидрокситриптофана на модифицированном электроде использовали анодную вольтамперометрию.

Влияние pH на анодные пики триптофана и 5-гидрокситриптофана

Для установления оптимального значения водородного показателя при окислении триптофана и 5-гидрокситриптофана использовались стандарт-титры буферных растворов от 1,65 до 12,43 и буферный раствор Бриттона-Робинсона для установления влияния состава фонового электролита. Различий между использованием буферного раствора Бриттона-Робинсона и растворами, приготовленными из стандарт-титров не замечено. С ростом pH буферного раствора потенциалы пиков смещаются к более отрицательным значениям. Между потенциалами пиков и pH наблюдаются линейные зависимости, представленные на рис. 10(б). Величины наклонов 53,8 мВ/pH для триптофана и 50,6 мВ/pH для 5-гидрокситриптофана близки к нернстовскому наклону (59,0 мВ/pH), что указывает на равное число электронов и протонов, участвующих в электрохимическом процессе.

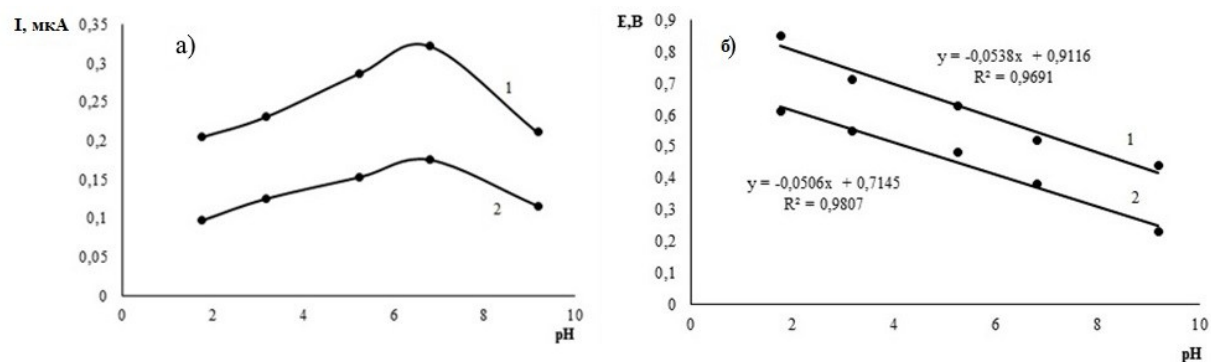


Рис. 10 Зависимость анодного тока (а) и потенциала пика (б) триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от pH

Для установления возможного механизма процессов, происходящих на электроде, провели расчёты мольных долей триптофана и 5-гидрокситриптофана. Из расчетов выявлено, что при $\text{pH}=6,85$ триптофан и 5-гидрокситриптофан находятся в виде цвиттер-ионов. Поскольку при данном pH у полифолиевой кислоты присутствуют COO^- группы то концентрирование аминокислот происходит за счет электростатического взаимодействия между COO^- и NH_3^+ . При переходе в более щелочную область данные аминокислоты депротонируются, вследствие чего электростатическое взаимодействие ослабевает. В кислой среде полифолиевая кислота протонирована, что замедляет электростатическое взаимодействие пленки с аминокислотами

Влияние параметров электролиза (потенциала и времени накопления) на определение триптофана и 5-гидрокситриптофана.

Основной задачей при разработке методики количественного определения вещества является подбор оптимальных условий для процесса его окисления и/или восстановления. На рис. 11 представлена вольтамперограмма одновременного определения 5-гидрокситриптофана и триптофана.

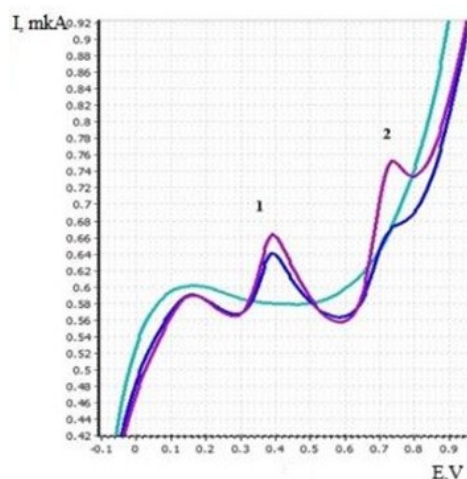


Рис. 11 Вольтамперные кривые окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана при pH = 6,85 (1 – 5-гидрокситриптофан и триптофан с концентрациями $1,0 \times 10^{-6}$ М; 2 – 5-гидрокситриптофана и триптофана с концентрацией 2×10^{-6} М

Установлено, что значение тока достигает максимума при потенциале $-0,1$ В, а при более положительных потенциалах интенсивность сигнала уменьшается (рис 12а). Далее исследовали влияние времени накопления на сигнал электроокисления триптофана и 5-гидрокситриптофана при потенциале накопления $-0,1$ В.

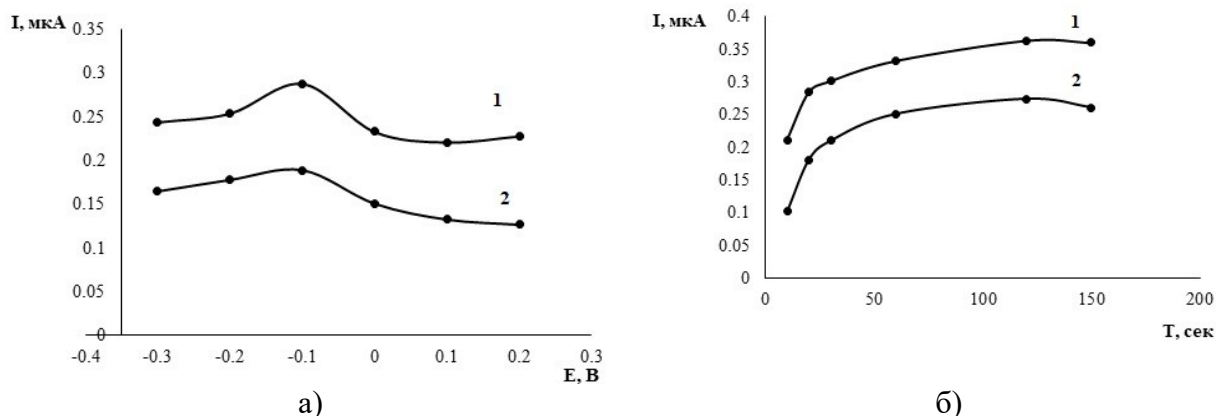


Рис. 12 Зависимость тока электроокисления триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от потенциала (а) и времени (б) накопления на модифицированном электроде в растворе pH=6,86

Как видно из рис. 12б, после накопления более 120 с интенсивность сигнала изменяется незначительно, что связано с нестабильностью триптофана. Аналогичная картина наблюдается так же и для 5-гидрокситриптофана. При совместном присутствии триптофана и 5-гидрокситриптофана аналитические сигналы не искажаются при соотношении 1:100, 100:1. Установлены рабочие параметры накопления: время 120 с, потенциал $-0,1$ В.

Механизм окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана

Для установления механизма окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана на модифицированном МУНТ и витамином В₉ электроде исследовали влияние скорости сканирования потенциала на ток и потенциал анодного пика. Соотношение между пиковым током/потенциалом и скоростью развертки потенциала дает конструктивную информацию относительно механизма электрохимической реакции. Электрохимическое поведение триптофана и 5-гидрокситриптофана исследовали методом вольтамперометрии при различных скоростях развертки потенциала в диапазоне от 25 до 280 мВ/с.

Для оценки механизма окисления построены зависимости тока пика от $W^{1/2}$ (рис.13).

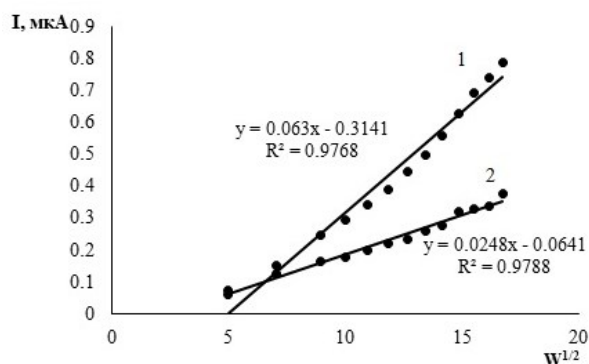


Рис. 13. Зависимости тока электроокисления триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от корня квадратного скорости развертки $W^{1/2}$

Потенциалы пиков сдвигаются к более положительным значениям с ростом скорости развертки потенциала для обеих аминокислот, что косвенно подтверждает необратимость процесса окисления. Доказательством необратимости является и линейная зависимость между потенциалом пика и $\ln W^{1/2}$ (рис. 14а). Линейная зависимость тока от скорости развертки потенциала (рис. 14б) указывает, что процесс может контролироваться адсорбцией.

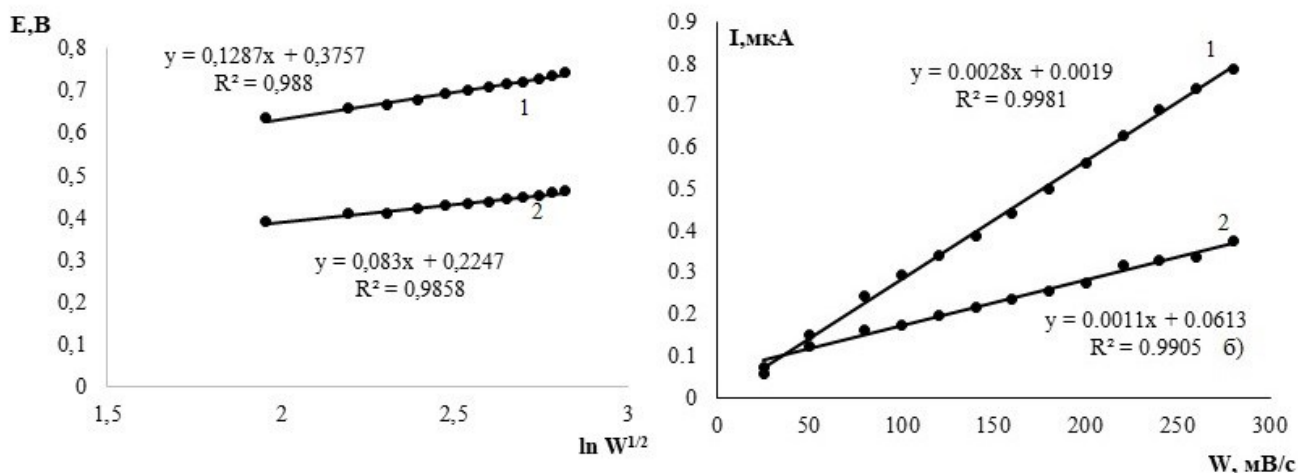


Рис. 14. Зависимости потенциала и тока пика электроокисления триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от $\ln W^{1/2}$ (а) и скорости развертки (б).

Линейная зависимость потенциала пика от корня квадратного из скорости развертки потенциала, характерна для процессов с диффузионным контролем (рис. 15а).

На основании угла наклона зависимости $\lg I$ от $\lg W$ (рис. 15б) величина критерия Семерано составила 0,65 для триптофана и 1,04 для 5-гидрокситриптофана. Для процессов, контролируемых одной только диффузией данный критерий должен составлять 0,5. Поскольку критерий Семерано больше 0,5, то можно сделать вывод, что процесс имеет и адсорбционный характер.

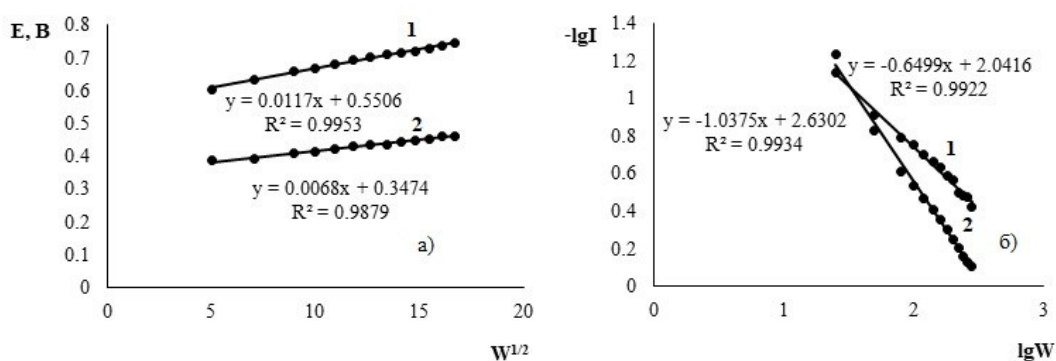


Рис. 15. Зависимости потенциала и $-lgI$ триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от $W^{1/2}$ (а) и $lg W$ (б).

Предельную адсорбцию рассчитывали по уравнению:

$$\Gamma_{\infty} = \frac{b}{9.4 \cdot 10^5 An},$$

где b – тангенс угла наклона $I - W$,

A – площадь электроактивной поверхности электрода,

n – число электронов, участвующих в процессе.

Величина предельной адсорбции для триптофана составила $1,63 \times 10^{-10}$ моль/ cm^2 , а для 5-гидрокситриптофана – $6,41 \times 10^{-11}$ моль/ cm^2 . Этим и можно объяснить более высокий коэффициент чувствительности при определении 5-гидрокситриптофана.

Для определения числа электронов и лимитирующей стадии электродной реакции провели расчет коэффициента переноса для необратимого процесса (окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана) из Тафелевской зависимости по формуле: $b = \frac{\alpha F}{RT}$; где b – тангенс угла наклона зависимости $\ln|I_{ox}| - E_p$; α – коэффициент переноса. В результате расчетов получены значения эффективных коэффициентов переноса равные 1,47 и 1,52 для триптофана и 5-гидрокситриптофана соответственно. Для необратимого процесса число электронов рассчитали по формуле: $|E_p - E_p^0| = \frac{47,7}{\alpha n}$. Получены значения равные 1,94, и 2,18 для триптофана и 5-гидрокситриптофана, т.е. близкие к 2. Рассчитанные значения эффективных коэффициентов переноса, близкие к 1,5 указывают на то, что лимитирующей стадией является процесс переноса первого электрона. Таким образом, учитывая проведенные исследования возможный механизм концентрирования и электроокисления на примере триптофана может быть представлен следующей схемой (рис. 16).

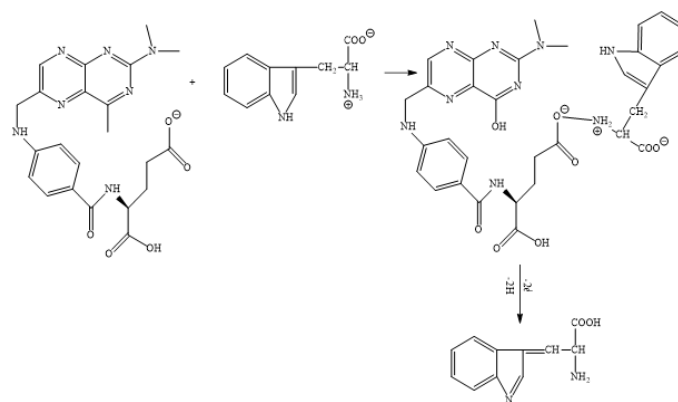


Рис.16. – Механизм концентрирования и окисления триптофана на электроде, модифицированном полифолиевой кислотой.

Четвертая глава посвящена разработке вольтамперометрических методик определения метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана на модифицированном МУНТ и пленками витаминов В₁₂ и В₉ углеродсодержащем электроде.

Вольтамперометрическое определение метионина

В оптимальных условиях регистрации сигнала зависимость изменения тока окисления метионина от его концентрации в растворе в диапазоне концентраций от 1×10^{-7} до 50×10^{-7} моль/дм³ (рис.17) описывается уравнением регрессии: $I_c = 24,3C - 0,032$ где I – ток электроокисления метионина, мкА; C – концентрация метионина в анализируемом растворе, моль/дм³. Предел обнаружения, рассчитанный по 3 σ -критерию, составил $5,0 \times 10^{-8}$ М.

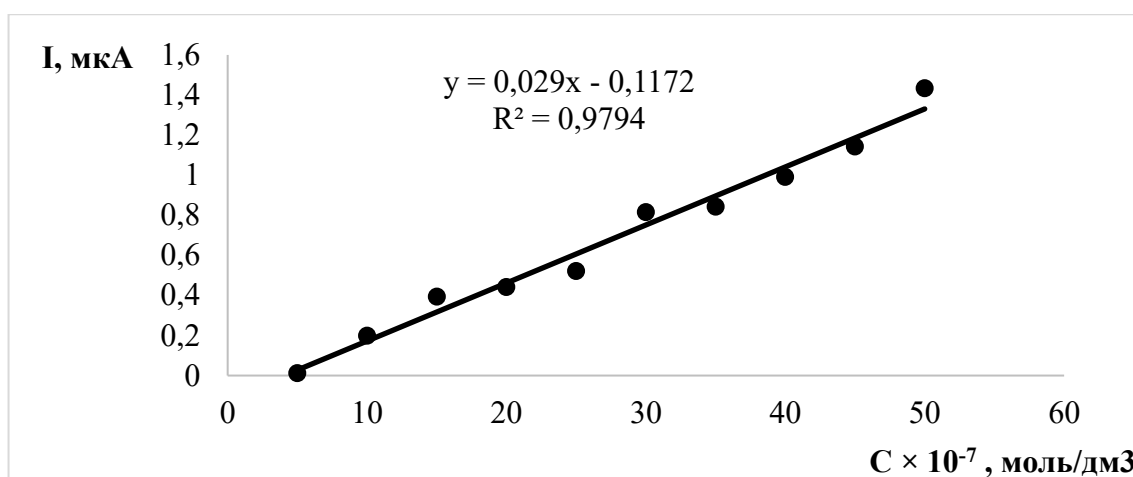


Рис. 17. Зависимость величины анодного пика метионина от концентрации

Модифицированный электрод позволяет получать стабильные аналитические сигналы в течение не менее 25 циклов (холостой опыт, анализируемая проба, проба с добавкой). В дальнейшем чувствительность электрода уменьшается и требуется обновление поверхности электрода. Поверхность электрода очищают электролизом в течение 300 с при потенциале $-0,5$ В. Затем на поверхность наносят новую пленку витамина В₁₂ методом циклического сканирования потенциала. В таблице 1 представлены результаты определения метионина в лекарственных препаратах и БАДах методами инверсионной вольтамперометрии и ВЭЖХ. ВЭЖХ проводили согласно ГОСТ 32195-2013. Данные, полученные разными методами, хорошо согласуются между собой.

Таблица 1. Результаты определения метионина в лекарственных средствах методами ВЭЖХ и инверсионной вольтамперометрии (ИВА) ($n = 5$; $P = 0,95$); $t(\text{теор}) = 2,57$

Препарат	Номинальное содержание метионина в 1 таблетке, мг	Содержание метионина, мг/табл		t (экс)
		ИВА	ВЭЖХ	
Ревалид	100	101 ± 10	98 ± 14	2,01
Витрум-Бьюти	3,3	3 ± 1	3 ± 1	1,78
Метионин	250	248 ± 31	253 ± 33	1,55

Определению метионина не мешают присутствующие основные компоненты лекарственных средств и биологически-активных добавок, такие как TiO₂, Al₂O₃, картофельный крахмал, стеариновая кислота, метилцеллюлоза, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизина ацетат, L-

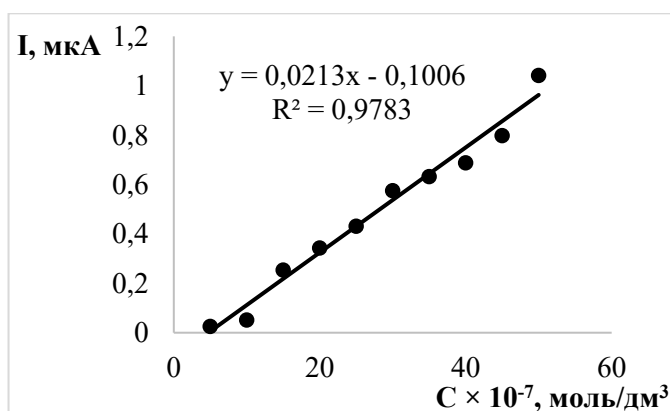
фенилаланин, L-треонин, L-триптофан, L-валин, L-аргинин, L-гистидин, L-аланин, глицин, L-пролин, L-серин, L-тирозин, таурин (табл. 2).

Таблица 2. Исследование влияния компонентов матрицы на сигнал окисления комплекса метионина, $n = 6$, $p = 0,95$, $t_{табл} = 2,57$

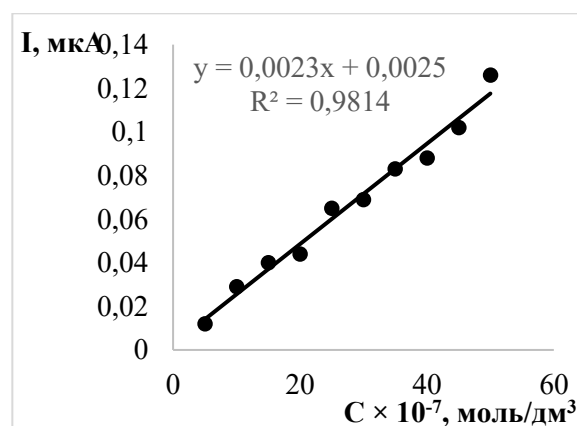
Ток метионина перед добавлением компонентов матрицы(мкА/мВ)	Компонент	Соотношение концентрации метионина к компонентам матрицы	Ток метионина после добавления компонента матрицы	t(эксп)
0,651±0,043	Метилцеллюлоза	1:10	0,622±0,039	2,01
	TiO ₂	1:10	0,631±0,048	2,54
	Al ₂ O ₃	1:10	0,679±0,053	2,23
	Крахмал	1:100	0,631±0,035	2,36
	L-изолейцин	1:1	0,662±0,051	1,95
	L-лейцин	1:1	0,611±0,071	2,07
	L-лизина ацетат	1:1	0,624±0,053	2,31
	L-фенилаланин	1:1	0,672±0,052	2,42
	L-треонин	1:1	0,657±0,049	1,97
	L-триптофан	1:1	0,625±0,033	1,79
	L-валин	1:1	0,679±0,087	1,92
	L-аргинин	1:1	0,626±0,063	1,85
	L-гистидин	1:1	0,621±0,047	2,45
	L-аланин	1:1	0,664±0,051	2,08
	Глицин	1:1	0,606±0,075	1,73
	L-пролин	1:1	0,641±0,033	1,94
	L-серин	1:1	0,652±0,047	1,65
	L-тирозин	1:1	0,636±0,048	1,91
	Таурин	1:1	0,662±0,086	2,26

Определение триптофана и 5-гидрокситриптофана при совместном присутствии

В оптимальных условиях регистрации сигнала зависимость изменения тока окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана от его концентрации в растворе в диапазоне концентраций: $5 \times 10^{-7} - 50 \times 10^{-7}$ моль/дм³ (рис.18)



а)



б)

Рис. 18. Зависимость величины анодного пика триптофана (а) и 5-гидрокситриптофана (б) от концентрации

Предел обнаружения, рассчитанный по 3 σ -критерию, составил 1,0 $\times 10^{-7}$ М для триптофана и 0,5 $\times 10^{-7}$ М для 5-гидрокситриптофана. При увеличении концентрации триптофана и 5-гидрокситриптофана в растворе происходит пропорциональное увеличение аналитических сигналов. Несмотря на то, что было установлено участие адсорбции при электроокислении триптофана и 5-гидрокситриптофана на электроде, сделан вывод, что это не мешает проводить количественную оценку в указанном диапазоне концентраций. Модифицированный электрод позволяет получать стабильные аналитические сигналы в течение не менее 60 циклов (холостой опыт, анализируемая проба, проба с добавкой). Определению триптофана и 5-гидрокситриптофана не мешают присутствующие основные компоненты лекарственных средств и биологически-активных добавок, такие как TiO₂, Al₂O₃, картофельный крахмал, стероидная кислота, метилцеллюлоза, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизина ацетат, L-фенилаланин, L-треонин, метионин, L-валин, L-аргинин, L-гистидин, L-аланин, глицин, L-пролин, L-серин, L-тирозин, таурин. В таблице 3, 4 представлены результаты определения триптофана и 5-гидрокситриптофана лекарственных препаратах и БАДах методами инверсионной вольтамперометрии и ВЭЖХ. Данные, полученные разными методами, хорошо согласуются между собой.

Таблица 3. Результаты определения триптофана в лекарственных средствах и БАДах методами ВЭЖХ и инверсионной вольтамперометрии (ИВА) (n = 5; P = 0,95)

Препарат	Номинальное содержание, мг триптофана в 1 табл.	Содержание триптофана, мг/табл.		t(эксп)
		ВЭЖХ	ИВА	
Формула №4	180	183 $\pm$ 68	179 $\pm$ 66	1,98
Альфамаинд	1,6	1,5 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,6	2,03
Брейнджайзер	3,2	3,4 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 1,1	2,31

Таблица 4. Результаты определения 5-гидрокситриптофана в лекарственных средствах и БАДах методами ВЭЖХ и инверсионной вольтамперометрии (ИВА) (n = 5; P = 0,95)

Препарат	Номинальное содержание триптофана в 1 табл.	Содержание 5-гидрокситриптофана, мг/табл.		t(эксп.)
		ВЭЖХ	ИВА	
НВ-2	40	41 $\pm$ 14	42 $\pm$ 16	2,32
Кинетоп	101	102 $\pm$ 38	104 $\pm$ 38	2,12
Ревитол стрессаут	50	50 $\pm$ 19	52 $\pm$ 20	2,01

Метрологические характеристики методик определения метионина, триптофана, 5 – гидрокситриптофана.

При подготовке методики к метрологической аттестации необходимо оценить следующие метрологические характеристики: показатель повторяемости, показатель промежуточной прецизионности, показатель точности методики. Обобщенные результаты показателей качества методик определения метионина, триптофана и 5 -гидрокситриптофана представлены в таблицах 5 – 7.

Таблица 5. – Метрологические характеристики методики определения метионина ($p = 0,95$, $n = 2$, $l = 15$)

$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	σ_{Γ}^* , %	$\sigma_{Rл}^*$, %	$\pm \Delta^*_{\text{с}}$, %	$\pm \Delta^*$, %
1	9,31	12,75	19,03	41,42
5	15,15	16,08	12,70	37,44
10	10,57	10,82	10,62	27,75
15	7,25	9,17	13,70	30,36
20	9,80	12,89	11,54	34,81
25	10,94	11,16	7,23	24,69
30	8,42	8,59	7,75	22,85
35	7,19	7,99	9,37	23,54
40	5,96	6,39	7,09	18,07
45	4,94	5,99	6,66	16,06
50	2,62	2,81	10,85	15,66

Таблица 6. – Метрологические характеристики методики определения триптофана ($p = 0,95$, $n = 2$, $l = 15$)

$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	σ_{Γ}^* , %	$\sigma_{Rл}^*$, %	$\pm \Delta^*_{\text{с}}$, %	$\pm \Delta^*$, %
5	7,68	7,88	12,05	25,48
10	4,51	7,32	10,94	23,56
15	4,55	6,84	10,91	22,72
20	4,39	5,41	12,10	20,77
25	4,75	4,68	8,65	16,53
30	6,01	5,76	7,94	17,77
35	4,38	4,67	7,96	15,50
40	5,65	5,62	8,00	16,79
45	5,64	5,63	7,87	16,36
50	7,19	8,06	6,84	20,57

Таблица 7. – Метрологические характеристики методики определения 5-гидрокситриптофана ($p = 0,95$, $n = 2$, $l = 15$)

$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	σ_{Γ}^* , %	$\sigma_{Rл}^*$, %	$\pm \Delta^*_{\text{с}}$, %	$\pm \Delta^*$, %
5	12,25	13,83	9,55	33,79
10	6,10	11,57	10,26	31,56
15	5,13	10,21	9,58	27,39
20	8,47	10,16	7,96	25,98
25	7,30	8,52	11,40	23,72
30	7,58	8,01	4,21	16,63
35	5,97	6,82	5,55	15,42
40	5,33	5,37	3,99	14,33
45	2,02	2,30	9,95	13,84
50	3,43	3,91	4,25	11,33

ВЫВОДЫ

1. Исследован процесс модификации поверхности углеродсодержащего электрода многостенными углеродными нанотрубками. Выбраны рабочие условия, позволяющие

увеличить электроактивную поверхность электрода на порядок, по сравнению с немодифицированным электродом. Для закрепления на поверхности нанотубок витаминов В₁₂ и В₉ предложено использовать циклическую вольтамперометрию.

2. Исследованы физико-химические закономерности, а также возможный механизм электроокисления метионина: при катодной поляризации кобальт(III) в кобаламине восстанавливается до кобальта (II), к которому за счет электростатических взаимодействий присоединяется частично отрицательно заряженный атом серы в молекуле метионина; при анодной поляризации кобальт(II) в комплексе окисляется до Co^{3+} , метильная группа с метионина переносится на кобаламин, при этом в раствор переходит гомоцистеин. Процесс окисления необратим, лимитирующей стадией является адсорбция, а в электрохимической стадии участвует один протон и один электрон.

3. Выбраны рабочие условия вольтамперометрического определения метионина на электроде, модифицированном МУНТ и пленкой витамина В₁₂: фоновый электролит – тартратный буферный раствор pH=4,01; потенциал электролиза -1,6 В; время накопления – до 180 с, режим регистрации – дифференциально-импульсный, амплитуда волны 15 мВ, задержка измерения 7 мс, шаг развертки 10 мВ. Диапазон определяемых содержаний – $(1-50) \times 10^{-7}$ М; предел обнаружения составляет $5,0 \times 10^{-8}$ М.

4. Исследованы физико-химические закономерности электроокисления триптофана и 5-гидрокситриптофана на электроде, модифицированном МУНТ и полифолиевой кислотой: окисление триптофана и 5-гидрокситриптофана происходит при участии двух электронов и двух протонов, лимитирует электрохимическую реакцию процесс переноса первого электрона, процесс контролируется диффузией и адсорбцией. Коэффициенты диффузии равны $9,7 \cdot 10^{-6}$ см²/с и $7,4 \cdot 10^{-6}$ см²/с для триптофана и 5-гидрокситриптофана, величина предельной адсорбции для триптофана составила $1,63 \cdot 10^{-10}$ моль/см², а для 5-гидрокситриптофана – $6,41 \cdot 10^{-11}$ моль/см².

5. Оптимизированы условия вольтамперометрического определения триптофана и 5-гидрокситриптофана при совместном присутствии в анализе на электроде, модифицированном МУНТ и пленкой витамина В₉: pH 6,8; потенциал накопления –0,1 В, время электролиза до 120 с, оптимальная скорость развертки 120 мВ/с. Нижняя граница определяемых концентраций составила $5 \cdot 10^{-8}$ М.

6. Проведена оценка отдельных метрологических показателей методик определения метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана, а также апробированы методики определения аминокислот на лекарственных препаратах и биологически активных добавках. Для проверки правильности использован метод "введено-найдено" и сопоставление результатов, полученных по разработанной методике с результатами, полученными методом ВЭЖХ. Результаты показали удовлетворительную сходимость, что позволяет рекомендовать разработанные методики для определения метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана в лекарственных средствах и биологически активных добавках.

Основные публикации по теме диссертации

Публикации в рецензируемых журналах, входящих в базы цитирования Scopus и Web of Science:

1. В.В. Шелковников, А.М. Алтыев, М.Е. Виноградов. Определение метионина в лекарственных средствах методом инверсионной вольтамперометрии // Журнал аналитической химии. 2019. Т.74, № 12. С. 934–940. <https://doi.org/10.1134/S0044450219120119>

Переводная версия: Shelkovnikov V.V.; Altyev A.M., Vinogradov M. E. Determination of Methionine in Medicines by Stripping Voltammetry // J. Anal. Chem. 2019. V. 74, № 12. P. 1231–1236. <https://doi.org/10.1134/S1061934819120116>

2. Shelkovnikov, V.V., **Altyev, A.M.**, Fryanova, M.S. Study of the Methionine Electrooxidation at an Electrode Modified with Vitamin B₁₂ and Multi-Walled Carbon Nanotubes // Bulletin of the University of Karaganda Chemistry. 2022. V. 108, №4. P. 99–106. <https://doi.org/10.31489/2022Ch4/4-22-21>
3. **Altyev, A.M.**, Shelkovnikov, V.V., Fryanova, M. S. Electrochemical behavior of tryptophan and 5-hydroxytryptophan on an electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and polyfolic acid. // J. Sib. Fed. Univ. Chem. 2023. V. 16, №1. P. 36–46. EDN: RSMVUZ
4. **Alty'ev A.M.**, Fryanova M.S., Shelkovnikov V.V. A voltammetric sensor for simultaneous determination of tryptophan and 5-hydroxytryptophan // JPCS. 2020. V. 1611. P. 1–6. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1611/1/012023>

Материалы конференций:

1. **Алтыев А. М.**, Фрянова М.С., Шелковников В. В. Вольтамперометрическое определение триптофана и 5 -гидрокситриптофана // Полифункциональные химические материалы и технологии материалы Международной научной конференции. Под ред. Ю.Г. Слизова. Издательство: [Б.и.] 2019. С. 9–12.
2. **Алтыев А. М.**, Фрянова М. С., Шелковников В. В. Вольтамперометрический сенсор для одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана // Перспективы развития фундаментальных наук сборник научных трудов XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. 2020. С. 14–16.
3. **Алтыев А.М.** Определение триптофана в биологически активных добавках и лекарственных средствах методом инверсионной вольтамперометрии //Материалы XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», секция «Химия», 8–12 апреля 2019 г. М.: Перо. 2019. С.3.
4. **Алтыев А.М.** Определение метионина в модельных растворах методом инверсионной вольтамперометрии //Материалы XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018», секция «Химия», 8–12 апреля 2018 г. М.: Перо. 2018. С. 4.
5. **Алтыев А.М.** Вольтамперометрический сенсор, модифицированный пленкой витамина В₉ для одновременного определения триптофана, 5-гидрокситриптофана и дофамина // Материалы Международного научного форума «Ломоносов-2020», секция «Химия», 8–12 апреля 2018 г. М.: МАКС Пресс, 2020. С. 10.
6. **Алтыев А. М.**, Фрянова М. С., Шелковников В. В. Витамины группы В, как модификаторы электродов для вольтамперометрического определения аминокислот // Материалы VI международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Химические проблемы современности», секция «Аналитическая химия», 19-21 мая 2020 г. Донецк: ДонНУ. 2020. С. 14–17.
7. **Алтыев А.М.** Определение триптофана и 5 –гидрокситриптофана методом инверсионной вольтамперометрии в биологически активных добавках и лекарственных средствах. // Мат. 58 Межд. науч. студ. конф. «МНСК» Новосибирск 10–13 апр. 2020, С. 22.