

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

Дёрина Ксения Владимировна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ**

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

Доктор химических наук,

профессор

Короткова Елена Ивановна

Томск-2016

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. Литературный обзор.....	15
1.1 Биологическая роль холестерина в организме человека.....	15
1.2 Биологический синтез холестерина: стадии и регуляция.....	19
1.3 Физические и химические свойства холестерина.....	24
1.4 Методы определения холестерина	27
1.4.1 Спектрофотометрические и колориметрические методики определения холестерина.....	27
1.4.2 Флуориметрические методики определения холестерина.....	30
1.4.3 Хроматографические методики определения холестерина.....	31
1.4.4 Ферментативные методики определения холестерина	34
1.4.5 Электрохимические методики определения холестерина	38
1.4.5.1 Применение биосенсоров.....	38
1.4.5.2 Применение модифицированных электродов.....	49
ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА.....	55
2.1 Оборудование, ячейка, электроды и растворы.....	55
2.2. Объекты исследования	65
2.3.Методика эксперимента	66
2.3. 1 Вольтамперометрическая методика определения холестерина на поверхности электрода с иммобилизованными ферментами.....	66

2.3.2	Вольтамперометрическая методика определения холестерина на поверхности модифицированного электрода.....	68
2.3.3	Спектрофотометрическая методика определения холестерина с треххлористым железом.....	69
2.3.4	Методика проведения микроскопических исследований поверхности электродов.....	69
2.3.5.	Методика проведения ИК-спектроскопических исследований поверхности электродов.....	70
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ОКИСЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА НА ФЕРМЕНТНОМ ЭЛЕКТРОДЕ.....		72
3.1.	Влияние различных факторов на аналитический сигнал окисления холестерина на ферментном электроде	72
3.1.1.	Влияние материала индикаторного электрода на аналитический сигнал окисления холестерина на ферментном электроде.....	73
3.1.2	Влияние природы фонового электролита на аналитический сигнал.....	75
3.1.3.	Влияние рН фонового электролита на аналитический сигнал.....	77
3.1.4	Расчет кинетических параметров ферментативной реакции.....	78
3.1.5	Влияние компонентов матрицы пробы на аналитический сигнал электровосстановления перекиси водорода как продукта ферментативного окисления холестерина.....	82
3.2	Исследование морфологии электродной поверхности	84
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА НА ХМЭ		87
4.1.	Влияние различных факторов на аналитический сигнал окисления холестерина на ХМЭ.....	89

4.1.1. Влияние материала подложки ХМЭ на аналитический сигнал окисления холестерина.....	89
4.1.2 Влияние природы фонового электролита на сигнал электроокисления холестерина на ХМЭ.....	92
4.1.3. Влияние рН фонового электролита на сигнал окисления холестерина на ХМЭ.....	94
4.1.4. Влияние параметров электролиза (время и потенциал электролиза) на сигнал окисления холестерина на ХМЭ.....	97
4.1.5 Влияние компонентов матрицы пробы на аналитический сигнал окисления холестерина на ХМЭ.....	99
4.2 Расчет параметров электродного процесса.....	101
4.3 Исследование физико-химических закономерностей протекания реакции окисления холестерина на химически модифицированном электроде.....	103
4.4 Исследование морфологии электродной поверхности.....	108
ГЛАВА 5. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА В ПРОДУКЦИИ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ НА ХМЭ.....	115
Глава 5.1. Разработка вольтамперометрической методики определения содержания холестерина в продукции пищевой промышленности и биологических объектах.....	115
5.1.1. Методика выполнения измерений количественного содержания холестерина в продуктах пищевой промышленности и биообъектах.....	120
5.1.2. Подготовка вольтамперометрической методики определения холестерина к метрологической аттестации.....	123

5.2. Определение содержания холестерина в пищевых продуктах и биологических объектах объектах методами вольтамперометрии и спектрофотометрии. Сравнительный анализ.	126
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ.....	131
Список литературы	137
Приложение 1	153

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

СЛОС – синдром Сита-Лемли-Опитца

ХМЭ – химически модифицированный электрод

ХСЭ – хлоридсеребряный электрод

СУЭ – стеклоуглеродный электрод

ГЭ – графитовый электрод

КЭ – композитный углеродсодержащий электрод с обновляемой поверхностью

ПВД – полиэтилен высокого давления

ПХ – пероксидаза хрена

ХО – холестерин оксидаза

ДАГУДФК – 2,6-диацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновая кислота

ФАД – флавинадениннуклеотид

БАС – биологически активные соединения

ИК – инфракрасный

ДМСО – диметилсульфоксид

ТДАС – трифторид диэтиламиносеры

ТМОС – тетраметоксисилан

ТЕОС – тетраэтоксисилан

ЕС – механизм, включающий электрохимическую реакцию и последующую химическую реакцию

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. По статистике Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) сердечно сосудистые заболевания (ССЗ) представляют собой основную причину смертности во всем мире. В частности, в 2008 году от сердечно сосудистых заболеваний умерло 17,3 миллиона человек, среди которых 7,3 миллиона человек умерло от ишемической болезни сердца и 6,2 миллиона по причине инсульта. По прогнозам специалистов ВОЗ к 2030 году около 23,3 миллионов человек могут умереть от ССЗ [1]. Также прогнозируется, что к 2030 году ССЗ останутся единственной причиной смерти от неинфекционных заболеваний. Одним из методов предотвращения большинства ССЗ является снижением повышенного уровня липидов. Не смотря на то, что холестерин вырабатывается организмом человека, значительное его количество поступает с пищей. Поэтому, контроль содержания холестерина в крови человека и продуктах питания очень важен для профилактики и терапии ССЗ. Согласно рекомендациям Российского кардиологического общества от 2012 года, одним из важнейших параметров в определении риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) является определение биохимических маркеров атеросклероза. Для оценки уровня риска развития ССЗ применяется шкала SCORE (Systemic Coronary Risk Evaluation) [2]. Указанная шкала применяется в странах с высоким уровнем смертности от ССЗ (куда относится РФ) и включает в себя, в качестве одного из ключевых параметров, содержание общего холестерина в крови пациента.

Кроме того, по данным Американской ассоциации сердечных заболеваний в 85% случаев при диагностике ишемической болезни, гипертензии, атеросклероза и тромбоза одним из важнейших показателей наличия заболеваемости являлся повышенный уровень свободного и эстерифицированного холестерина.

В современных медицинских учреждениях существует достаточно богатая диагностическая база, разрабатываются и внедряются новые приборы и методы анализа биообъектов. Однако, сердечно сосудистые заболевания относятся к такой группе заболеваний, при которых зачастую происходят внезапные случаи поражения сосудов, что приводит к смерти даже молодых людей.

В связи со всем вышеизложенным, разработка новых экспрессных тест-систем для определения холестерина как в биологических жидкостях человека, так и в продуктах питания обладает высокой актуальностью. В свою очередь необходимость создания портативных тест-систем требует, прежде всего, изучения физико-химических основ методик определения холестерина. В настоящее время существует достаточно много работ по электрохимическому определению холестерина с использованием биосенсоров, в основе которых лежит реакция окисления холестерина на поверхности электрода, модифицированного ферментами (холиноксидаза, пероксидаза хрена). Использование ферментов несомненно имеет ряд преимуществ (высокая селективность, чувствительность), но и ряд недостатков (нестабильность ферментов во времени, их высокая стоимость). Поэтому разработка новых неферментативных способов определения холестерина как в биологических объектах, так и в пищевых продуктах является актуальной задачей.

Цель работы. Исследовать физико-химические закономерности окисления холестерина с целью разработки методик его количественного определения в продукции пищевой промышленности и биологических объектах.

В соответствии с этим в работе поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать влияние азагетероциклического соединения ряда бисмочевин на процесс электрохимического окисления холестерина.

2. Исследовать природу сигнала и физико-химические закономерности окисления холестерина на электроде, модифицированном азагетероциклическим соединением ряда бисмочевин.

3. Исследовать влияние различных факторов на процесс электрохимического окисления холестерина (природа фонового электролита, рН раствора, материал электрода).

4. Разработать неферментативный способ определения холестерина на электроде, модифицированном азагетероциклическим соединением ряда бисмочевин

5. Провести сравнительные определения содержания холестерина в продукции пищевой промышленности и биологических объектах, используя разработанный биосенсор, ХМЭ и арбитражный метод сравнения (спектрофотометрический).

Научная новизна

1. Впервые исследованы физико–химические закономерности реакции окисления холестерина на композитном углеродсодержащем электроде с обновляемой поверхностью, модифицированном 2,6 – диацетил- 2,4,6,8 - тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновой кислотой, с применением метода циклической вольтамперометрии. Показано, что электродный процесс имеет квазиобратимый характер, осложненный наличием последующей химической реакцией. Предложена схема протекания процесса окисления холестерина в водных нейтральных средах на модифицированном композитном углеродсодержащем электроде с обновляемой поверхностью.

2. Впервые исследовано влияние ряда веществ, присутствующих в матрице проб, на ток электроокисления холестерина, регистрируемый на модифицированном композитном углеродсодержащем электроде с обновляемой поверхностью. Показано, что присутствие компонентов органической матрицы пробы (включая сходные по структуре и классу) не

оказывает существенного влияния на аналитический сигнал окисления холестерина.

3. Разработан новый неферментативный способ определения холестерина в биологических жидкостях человека и продуктах питания методом анодной ступенчатой вольтамперометрии, отличающийся высокой чувствительностью, простотой, экспрессностью и удобством анализа. Проведено сопоставление результатов анализа независимым спектрофотометрическим методом.

Практическая значимость

Разработана вольтамперометрическая методика определения холестерина в биологических жидкостях человека и пищевых продуктах. Установлены метрологические характеристики методики. Показано, что разработанная вольтамперометрическая методика сочетает высокую чувствительность и простоту конструкции рабочего электрода с высокой селективностью и позволяет исключить использование токсичных реагентов, а также сократить время анализа по сравнению со спектрофотометрической методикой

Разработанная методика рекомендована к использованию в аналитических лабораториях пищевой промышленности для контроля содержания холестерина в готовой продукции. А также в клинических лабораториях с целью диагностики и мониторинга успешности терапии сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследования влияния различных факторов на электрохимический сигнал холестерина (природа фонового электролита, pH раствора, материал электрода).
2. Физико-химические закономерности протекания реакции окисления холестерина на композитном углеродсодержащем электроде с

обновляемой поверхностью, модифицированном 2,6-диацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновой кислотой.

3. Оценка влияния веществ различной природы на аналитический сигнал холестерина.
4. Вольтамперометрическая методика определения холестерина в продукции пищевой промышленности и биологических жидкостях человека.
5. Результаты сравнительных испытаний определения содержания холестерина в пищевых продуктах и биологических жидкостях человека вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных данных обусловлена представительным объемом проведенных экспериментов, применением современных аналитических методов и метрологической обработкой результатов, которые хорошо согласуются с литературными данными и результатами, полученными референтным спектрофотометрическим методом.

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях:

- XVII международной конференции EuroFoodChem – XVII, 2-10 мая 2013 г. (Стамбульский Технический Университет, Стамбул, Турция);
- «XVII Международный симпозиум имени академика М. А. Усова студентов и молодых ученых», 1-5 апреля 2013 (Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Российская Федерация);
- Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых с международным участием Химия и химическая технология в XXI веке, 13-16 мая 2013 (Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего

- образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Российская Федерация);
- Международной научной конференции по аналитической химии и экологии, посвященной 110-летию со дня рождения академика М.Т. Козловского, 9-11 октября 2013 (КазНУ, Алматы, Республика Казахстан);
 - Международном молодежном научном форуме «Ломоносов – 2014», 7-11 Апреля 2014 (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация);
 - IV Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия под знаком СИГМА: исследование, инновации, технологии», 12-18 Мая 2014 (ОмГУ, Омск, Российская Федерация);
 - Международного молодежного научного форума «Ломоносов – 2015», 13-17 апреля 2015 (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация);
 - XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва, «Химия и химическая технология в XXI веке», 25-29 Мая 2015 (Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Российская Федерация);
 - Международной научной конференции «Теоретическая и экспериментальная химия глазами молодежи – 2015», 18-22 мая 2015 (ИрГУ, Иркутск, Российская Федерация);
 - XVIII международной конференции EuroFoodChem – 2015, 13-16 октября 2015 (Университет Комплутенсе, Мадрид, Испания);
 - XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва, «Химия и химическая технология в XXI веке», 17-20 Мая 2016 (Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Российская Федерация);

– IX Всероссийской конференции «ЭМА», 29 мая – 3 июня 2016 (УрФУ, Екатеринбург-Леневка, Российская Федерация).

Публикации.

По результатам работы опубликовано 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, и 14 тезисов докладов.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, двух глав результатов исследований и их обсуждения, главы, содержащей метрологические аспекты разработанной методики, заключения, списка сокращения и списка используемой литературы. Работа изложена на 152 страницах, содержит 45 рисунков, 10 таблиц, список литературы из 136 наименований и приложение. Первая глава (литературный обзор) дает представление об объекте анализа, способах его определения в объектах различной природы, об особенностях применения вольтаперометри для количественного определения холестерина в различных объектах и о применении модифицированных электродов для определения холестерина. Во второй главе приводится описание условий проведения эксперимента и объекты исследования. В третьей главе представлены результаты исследования электрохимического поведения холестерина на углеродсодержащих электродах с иммобилизованными ферментами, а также результаты изучения морфологии получаемой электродной поверхности. В четвертой главе представлены результаты исследования электрохимического поведения холестерина на полученных углеродсодержащих электродах, модифицированных 2,6-диацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновой кислотой, а также результаты исследования морфологии получаемых ХМЭ. В пятой главе рассмотрены метрологические аспекты

разработанной вольтамперометрической методики количественного определения холестерина на ХМЭ.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю доктору химических наук, профессору Коротковой Е.И., кандидату химических наук, доценту Дорожке Е.В. кандидату химических наук, доценту Вороновой О.А., а также кафедре Органической химии и полимеров КарГУ им. Букетова и лично доктору PhD Тайшибековой Е.К. за предоставленные образцы модификатора.

Личный вклад автора.

Автор принимал непосредственное участие в выполнении эксперимента, обработке, обсуждении и обобщении полученных результатов. Основная часть экспериментальной работы выполнена лично автором. Опубликованные работы написаны в соавторстве с научным руководителем д.х.н. профессором Коротковой Е.И., а также к.х.н. доцентом Е.В. Дорожке, к.х.н. доцентом О.А. Воронова, , которые принимали участие в обсуждении и обобщении полученных экспериментальных данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов:

- Проект ВИУ_ИПР_109_2014 (2014-2015 г) по теме: «Разработка биосенсора и тест-системы на холестерин для контроля качества пищевых продуктов (руководитель – профессор, д.х.н. Короткова Е.И.
- Проект №16-33-00319 мол_a, грант РФФИ «Мой первый грант» (2015-2016 г) по теме: «Разработка электрохимической методики определения содержания холестерина в биологических объектах (сыворотка крови и продукты питания)» (руководитель – Дёрина К.В.).

ГЛАВА 1. Литературный обзор

1.1 Биологическая роль холестерина в организме человека

Холестерин играет ключевую роль в организме человека, за счет участия в выработке витамина D, выработке надпочечниками ряда стероидных гормонов (в том числе, кортизола, альдостерона, эстрогенов и прогестерона) [3]. Согласно последним данным, играет важную роль в деятельности иммунной системы. Помимо этого, выполняет важную структурную функцию и является компонентом клеточных мембран, а также предохраняет эритроциты крови от гемолитических ядов.

Все клетки в организме млекопитающих содержат холестерин. Данный стерин входит в состав клеточных мембран, где в неэтерифицированной форме совместно с фосфолипидами и белками обеспечивает избирательность проницаемости мембраны. Помимо этого, способствует регуляции ее состояния, а также – активности связанных с мембраной ферментов. В цитоплазме холестерин содержится, преимущественно, в виде эфиров с жирными кислотами, которые образуют вакуоли [4]. Транспорт как неэтерифицированного, так и этерифицированного холестерина в плазме крови осуществляется за счет липопротеинов. В организме млекопитающих холестерин является источником образования желчных кислот. Под воздействием УФ-лучей в коже происходит превращение в витамин D₃ продукта окисления холестерина (7-дегидрохолестерин).

Кроме того, холестерин участвует в липидном обмене. Как известно, повышенное содержание холестерина в крови человека может привести к заболеваниям сердечно-сосудистой системы, а именно излишний жир не может полностью транспортироваться липопротеидами высокой плотности и выводиться из организма. Таким образом, холестерин может накапливаться на стенках кровеносных сосудов в виде бляшек, которые затрудняют движение крови, тем самым, делая сосуды более жесткими, что служит причиной развития ишемической болезни сердца, инфаркта или инсульта.

Тем не менее, известно наличие корреляции между повышенным уровнем холестерина в крови пациента и риском развития различных сердечно-сосудистых заболеваний: инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, атеросклероза и других. Поэтому в клинической диагностике и терапии сердечно-сосудистых заболеваний широко применяются различные методы анализа, позволяющие определить содержание холестерина в крови пациента.

Нормальным считается уровень холестерина в плазме крови человека менее 5,2 мМ, повышенным содержанием считается свыше 6,2 мМ. Таким образом, определение холестерина как в биологических жидкостях (сыворотка и плазма крови), так и в продуктах питания является необходимой и важной задачей для контроля содержания холестерина в лабораториях различного профиля.

С другой стороны, низкий уровень холестерина может привести к развитию анемии.

Кроме того, терапия такого заболевания, как синдром Смита-Лемли-Опица (СЛОС) требует постоянного поступления в организм пациента холестерина, либо с соответствующими продуктами питания, либо искусственно синтезированного. СЛОС является заболеванием с аутосомно-рецессивным типом наследования, связанным с нарушением холестеринового метаболизма. Заболевание встречается у 1 из 20000–40000 новорожденных. Однако носителями данного гена является 1 из 30 человек [3]. Синдром Смита – Лемли – Опитца характеризуется множественными врожденными аномалиями и умственной отсталостью. В настоящее время идентифицирован ген, ответственный за развитие данного синдрома. Это ген, кодирующий 7-стеролредуктазу, необходимую для биосинтеза холестерина, мутации в нем приводят к недостаточной активности микросомального фермента 7-дегидрохолестерол редуктазы [5,6]. 7-дегидрохолестерин накапливается в плазме и клетках пациентов с синдромом Смита – Лемли–Опитца, вызывая нарушение их функции. Симптомы синдрома Смита –

Лемли –Опитца могут широко варьироваться. При легкой форме заболевания наблюдаются незначительные физические и интеллектуальные нарушения. В тяжелых случаях возможны выраженные физические пороки и перинатальная смертность [7]. Типичными для пациентов со СЛОС являются низкие масса и длина тела при рождении (наблюдается в 100% случаев), микроцефалия, сопровождаемая различными деформациями черепа, деформированные и низко расположенные ушные раковины, эпикантус, наличие блефароптоза и косоглазия, микрогнатия и широкий альвеолярный край верхней челюсти (наблюдается в 100% случаев), наличие расщелины нёба. Также отмечаются гипоспадия и крипторхизм. Наблюдаются врожденные пороки сердца, различные аномалии почек (в том числе, поликистоз, удвоение лоханок, гидронефроз, аномалии мочеточников), аномалии лобуляции легких, пилоростеноз, гипоплазия тимуса [8,9]. Пациенты с синдромом Смита – Лемли –Опитца в большинстве случаев имеют отставание в умственном развитии, у 50% диагностируется аутизм [10,11]. Из скелетных аномалий следует отметить одно- или двустороннюю постаксиальную полидактилию кистей и/или стоп. Первый палец обычно короткий и проксимально смещен с характерной гипоплазией метакарпальной кости и возвышенности тенара. Из других пороков описаны эктродактилия, монодактилия и олигодактилия, брахидактилия, отсутствие средней фаланги второго пальца, радиальная или ульнарная девиация пальцев, клинодактилия, камптодактилия и различные синдактилии, ризо- и мезомелическое укорочение костей, полисиндактилия стоп, вальгусная и варусная деформация стоп, вывих бедра, Y-образная синдактилия II–III пальцев на стопах. Реже встречаются такие скелетные аномалии, как сколиоз, кифоз, шейные ребра, отсутствие ребер, тонкие ребра [12,13].

Холестерин является важным липидом, участвующим в обмене веществ, клеточных функциях и выполняющим структурную функцию в организме человека. Так, например, является структурным компонентом клеточной мембраны [14], обеспечивает структуру и регулирует текучесть

фосфолипидного бислоя. Мембранные липиды образуют, смешиваясь, как монослойные, так и бислойные структуры, в которых реализуется два типа взаимодействий:

1. ионные взаимодействия между полярными частями молекул;
2. гидрофобные взаимодействия между цепями жирных кислот.

Благодаря указанным особенностям липосомы и мицеллы, которые создаются протяженными бислойными структурами, обладают высокой стабильностью в водных средах. В плазматических (наружных) мембранах клеток животных преобладает холестерин (содержание порядка 21 моль%).

Кроме того, холестерин входит в состав липидных рафтов – это скопления белков и липидов (включая холестерин сфинголипидов), которые плавают в клеточной мембране, и играют важную роль в регуляции ее функции [15]. Липидные рафты более упорядочены и обладают более жесткой структурой, чем бислой мембраны, окружающий их. Их участие в регуляции происходит главным образом из их способности к связыванию с белками. После связывания субстратов, некоторые белки имеют более высокое сродство для крепления к рафтам. Таким образом, позволяя им опосредованно влиять на сигнальные пути. Холестерин выступает в липидных рафтах в качестве своеобразной прокладки и одновременно склеивающего вещества. Отсутствие холестерина приводит к диссоциации белков [16, 17, 18]. Учитывая его распространенность в клеточных мембранах, холестерин принимает весьма активное участие в транспортных процессах. Он способен оказывать влияние на функцию ионных каналов и других мембранных транспортеров. Например, холестерин необходим для связывания лиганда активности рецептора серотонина [19, 20]. Кроме того, по-видимому, играет важное значение в экзоцитозе.

Как отмечалось ранее, холестерин регулирует свойства клеточных мембран, в частности, модулирует свойства мембраны (например, ее кривизну), и может регулировать слияние пузырьков с клеточной мембраной. Он также может способствовать набору комплексов, необходимых для

экзоцитоза. Учитывая, что нейроны в значительной степени зависят от экзоцитоза для передачи импульсов, холестерин является очень важной частью нервной системы [21].

Одним из наиболее важных путей, в которых холестерин принимает участие, является сигнальный путь Hedgehog. Данный путь играет важную роль в период эмбрионального развития [22]. Hedgehog белки также участвуют в транскрипции генов, отвечающих за пролиферацию и дифференцировку клеток. Холестерин является одним из регуляторов данного пути [23]. Регуляция производится посредством ковалентного связывания с белками Hedgehog, в результате чего происходит их активация. Без холестерина, активность сигналов нарушается и дифференцировка клеток может быть нарушена [24].

Холестерин является предшественником для многих важных молекул. Таких как желчные кислоты (необходимы в обработке пищевых жиров), оксистеролы и нейростероиды (участвуют в синапсах и регуляции возбуждения), глюкокортикоиды (необходимы в иммунной системе и борьбе с воспалительными процессами), минералокортикоиды (поддерживают осмотический баланс), и половых стероидов (например, эстроген и тестостерон имеют широкий диапазон функций, но, также, принимают участие во внутриутробном половом развитии) [25,26,27,28,29]. Кроме того, холестерин является основным компонентом миелина, образующего защитный слой вокруг нейронов. Миелинизация происходит наиболее быстро в течение внутриутробного развития, что означает, необходимость биосинтеза холестерина [30].

1.2 Биологический синтез холестерина: стадии и регуляция

Порядка половины количества всего холестерина, содержащегося в организме, образуется посредством биосинтеза (порядка 500 мг в сутки). Остальное количество поступает в организм с продуктами питания. Синтез

холестерина происходит преимущественно в печени (порядка 50% от общего количества образующегося стерина), кишечнике (порядка 15%), а также в коже (порядка 10%).

Все животные клетки, имеющие ядро, способны осуществлять синтез холестерина [31]. Биосинтез холестерина происходит в микросомах (эндоплазматическом ретикулуме) и цитозоле. Источником углерода, входящего в молекулу холестерина, является ацетилкофермент А (ацетил-CoA). Путь биосинтеза молекулы холестерина исследован во многих работах [32,33,34,35, 36, 37], и в настоящее время удалось установить происхождение каждого из фрагментов молекулы данного стерина.

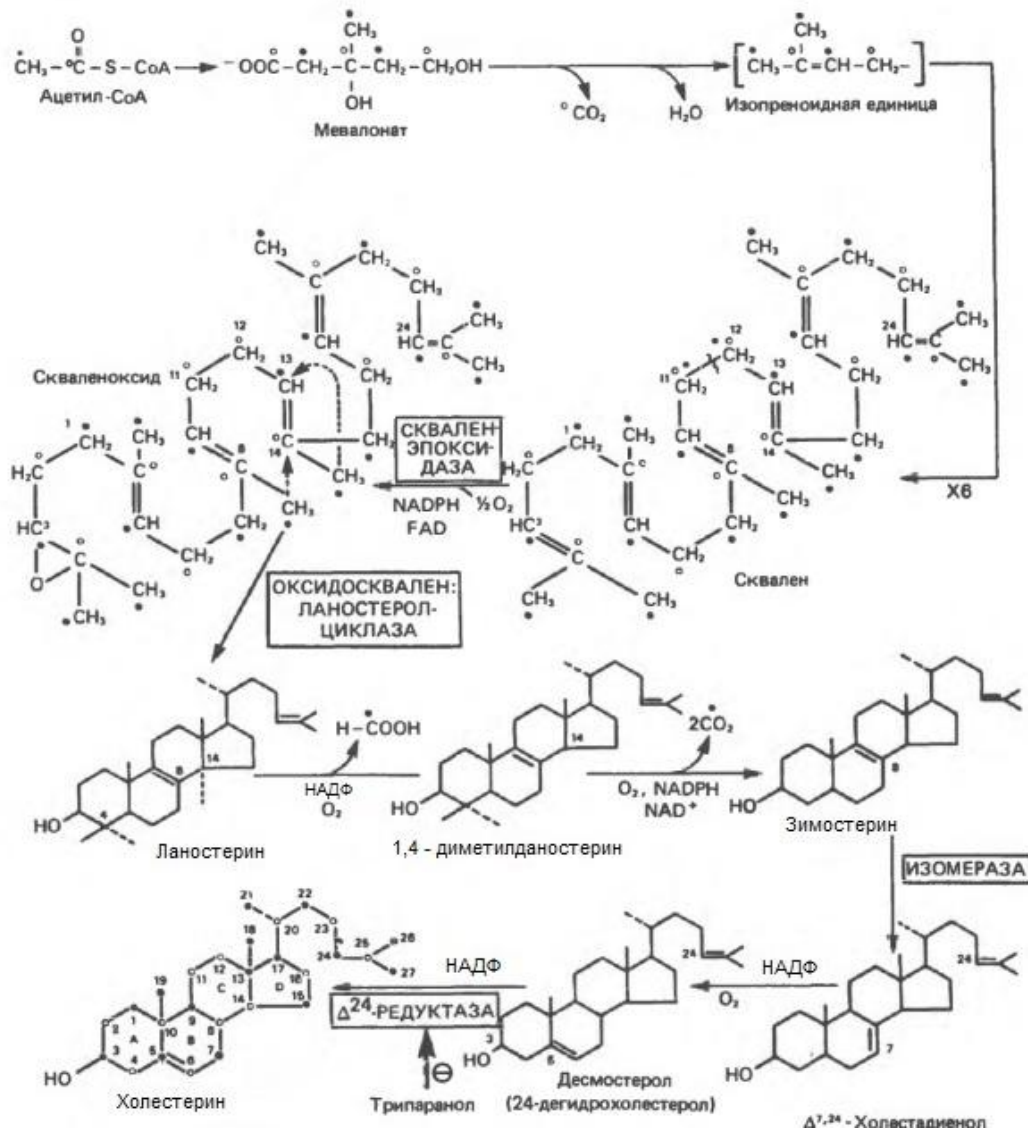


Рисунок 1.2.1– Схема биосинтеза холестерина

Синтез осуществляется в несколько стадий. На первой стадии из ацетил-СоА образуется мевалонат, содержащий 6 углеродных атомов. Мевалонат образуется через 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА (ГМГ-СоА) в цитозоле. На первом этапе синтеза холестерина происходит конденсация двух молекул ацетил-СоА под действием тиолазы – фермента, содержащегося в цитозоле, с образованием ацетоацетил-СоА [38]. В случае реализации альтернативного пути, ацетоацетат образуется в митохондриях печени по пути кетогенеза и затем диффундирует в цитозоль, где превращается в ацетоацетил-СоА (данная реакция катализируется ацетоацетил-СоА-синтазой при участии СоА и АТР). Конденсация ацетоацетил-СоА с ацетил-СоА с образованием ГМГ-СоА катализируется ГМГ-СоА-синтазой. Затем происходит превращение ГМГ-СоА в мевалонат посредством двухступенчатого восстановления за счет никотинамидаденуклеотидфосфата (НАДФ). Данное превращение катализируется микросомальным ферментом ГМГ-СоА-редуктазой. Именно эта реакция является лимитирующей стадией синтеза холестерина [39].

На следующей стадии от мевалоната происходит отщепление СО-группы с образованием изопреноидной единицы. Для этого происходит фосфорилирование мевалоната АТР с образованием активных фосфорилированных интермедиатов. Затем образовавшийся 3-фосфо-5-пирофосфомевалонат декарбоксилируется. В результате чего, происходит образование изопентилпирофосфата — активная изопреноидная единица.

Следующий этап начинается тем, что три молекулы изопентенилпирофосфата конденсируются с образованием фарнезилпирофосфата. Началом данного процесса служит изомеризация изопентенилпирофосфата (посредством перемещения двойной связи) в диметилаллилпирофосфат, конденсирующийся с новой молекулой изопентенилпирофосфата с образованием геранилпирофосфата, содержащего 10 атомов углерода. Данный интермедиат затем подвергается конденсации с еще одной молекулой изопентенилпирофосфата. В результате чего происходит образование фарнезилпирофосфата. Далее происходит

конденсация двух молекул фарнезилпирофосфата. Молекулы конденсируются пирофосфатными концами. Сначала происходит отщепление одной пирофосфатной группы и образование промежуточного соединения прескваленпирофосфата. После чего, интермедиат восстанавливается НАДФ с последующим отщеплением пирофосфатной группы и превращением в сквален. Известно также, что также может функционировать побочный путь, имеющий название «транс-метилглутаконатный шунт». При реализации указанного пути значительная доля (порядка 20%) диметилаллилпирофосфата переходит через транс-3-метилглутаконат-СоА в ГМГ-СоА [39]. Вероятно, данный путь способен оказывать регулирующее воздействие на скорость холестерина синтеза.

После чего под действием скваленэпоксидазы в эндоплазматическом ретикулуме образуется эпоксид сквалена, подвергающийся циклизации с образованием ланостерина. На следующем этапе происходит окисление метильной группы при С14, сопровождающееся образованием 14-десметилланостерин. Затем происходит образование зимостерина посредством удаления двух метильных групп при С4. Далее происходит перемещение двойной связи между атомами углерода С8 и С9 в положение С8=С7 с образованием $\Delta^{7,24}$ -холестадиенола. Затем происходит дальнейшее перемещение двойной связи в положение С5=С6 с образованием десмостерола. После чего, двойная связь в боковой цепи подвергается восстановлению с образованием холестерина.

Регуляция синтеза данного стерина осуществляется по принципу ингибирования его синтеза, а не по принципу обратной связи. Так, холестерин, поступающий в организм млекопитающих с пищей, подавляет свой собственный синтез из ацетата в тканях. Такой тип регуляции не направлен непосредственно на подавление первого фермента биосинтетического пути. Ингибирование, в таком случае, затрагивает один из ферментов (HMG-СоА-редуктазу). Механизм, функционирующий на первых стадиях синтеза, включает ингибирование экспрессии генов, которые

кодируют образование HMG-CoA-редуктазы, холестерином или его метаболитами. В случае непосредственного внесения холестерина в систему, содержащую HMG-CoA-редуктазу, никакого воздействия на каталитическую активность фермента данный стерин не оказывает.

Поскольку прямого ингибирования фермента не наблюдается, по-видимому, холестерин (либо его метаболит) оказывает опосредованное действие: либо подавляя синтез редуктазы *de novo*, либо индуцируя синтез ферментов, катализирующих дезактивацию фермента [40]. Ингибирование синтеза холестерина осуществляется также посредством блокировки соответствующих рецепторов (apo-B-100) холестеринсодержащими липопротеинами низкой плотности. Активность ГМГ-CoA-редуктазы, а вместе с тем, и интенсивность синтеза холестерина, изменяется в течение суток и напрямую зависит от времени. В ряде исследований показано весьма быстрое воздействие холестерина на активность редуктазы. Высокую скорость такого воздействия весьма затруднительно объяснить исключительно влиянием на скорость ферментативного синтеза. Например, введение инсулина или тиреоидного гормона провоцирует повышение активности ГМГ-CoA-редуктазы, а введение глюкагона или глюкокортикоидов – снижение. ГМГ-CoA-редуктаза в организме находится в активной или неактивной форме. Переход из одной формы в другую осуществляется за счет реакций фосфорилирования и дефосфорилирования, некоторые из них, по-видимому, являются сАМР-зависимыми и поэтому регулируются глюкагоном. Влияние количества холестерина, поступающего в организм с пищевыми продуктами, на образование эндогенного холестерина изучалось на крысах. В случае, когда пища содержала 0,06% холестерина, 70—80% холестерина, который обнаруживался в печени, тонком кишечнике и надпочечниках, синтезировалось эндогенно. В случае когда пища содержала 2% холестерина, эндогенный синтез холестерина снижался [39]. Тем не менее, при увеличении содержания холестерина в пище полного прекращения его синтеза в организме не происходит.

Вероятно, таким образом происходит подавление синтеза холестерина только в печени.

У людей наблюдается различная степень ингибирования биосинтеза холестерина при избыточном его потреблении. Тем не менее, показано, что снижение его уровня в пищевых продуктах, позволяет понизить содержание холестерина в крови [41].

1.3 Физические и химические свойства холестерина

Холестерин (3-гидрокси-5,6-холестен) представляет собой вторичный спирт, мононенасыщенный стерин состава $C_{27}H_{45}OH$. Как и для всех стеринов, для него характерно наличие гидроксильной группы при атоме углерода 3, а также боковой цепи в положении 17. Все кольчатые структуры в холестерине располагаются в транс-положении. Помимо этого, имеется двойная связь между 5-м и 6-м атомами углерода. Основой структуры холестерина является конденсированная кольцевая система циклопентадигидрофенантрена [42].

Вне организма существует в виде кристаллического порошка, температура плавления которого составляет $149^{\circ}C$. На рисунке 1.2.2 представлена структурная формула холестерина. Указанный стерин является составной частью желчных камней, которые могут образовываться в желчных протоках человека.

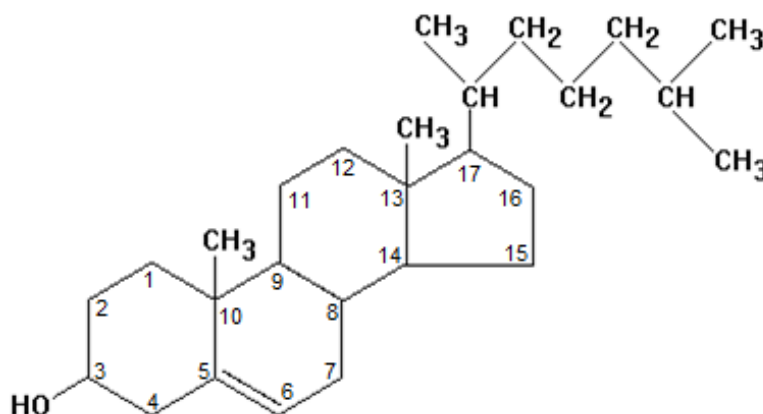


Рисунок 1.2.2 – Структурная формула холестерина

Температура кипения холестерина равна $360^{\circ}C$.

Кольцевая структура в составе холестерина характеризуется значительной жесткостью, в то время как, боковая цепь отличается существенной подвижностью.

В ряде реакций холестерина наблюдается замещение 3 β -гидроксигруппы. Такие реакции применяются для синтеза различных производных данного стерина, но не используются в качестве качественных. Так, например, известно, что трифторид диэтиламиносеры (ДАСТ), как правило, реагирует со спиртами по S_N2 механизму или S_Ni [42]. Продуктом взаимодействия холестерина с ДАСТ в фуране (рисунок 1.2.3) является фторированный продукт S_N2 (взаимодействие с фурановым кольцом не наблюдается) [42].

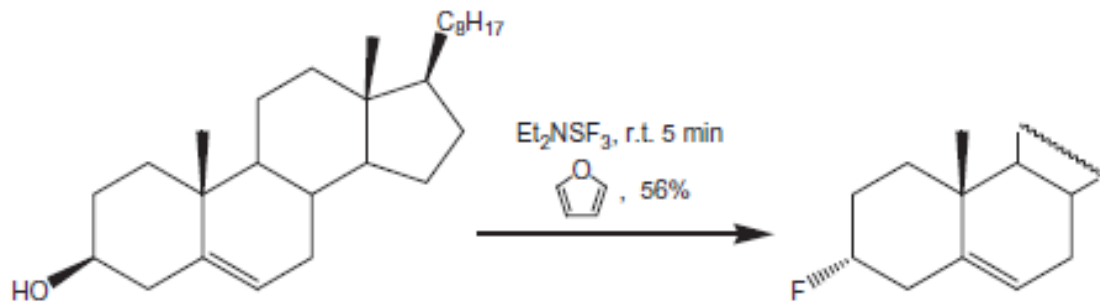


Рисунок 1.2.3 – Схема фторирования холестерина трифторид диэтиламиносерой в фуране. Также возможно фторирование холестерина 1,1,2,2-тетрафторэтил-N, N-диметиламином. При этом холестерин превращается во фторид с сохранением конфигурации (рисунок 1.2.4) [42].

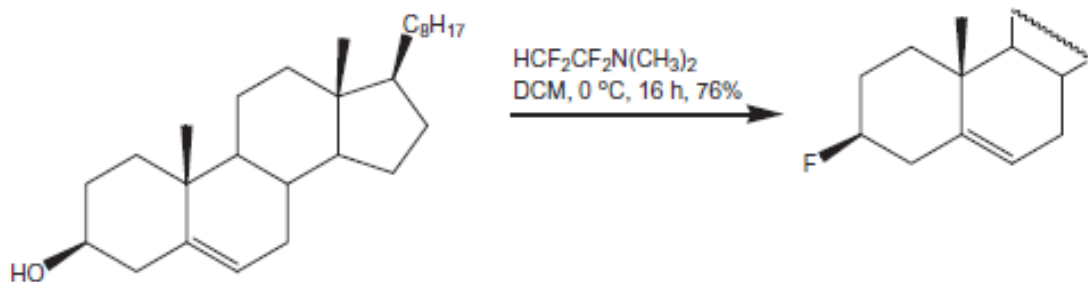


Рисунок 1.2.4 – Схема фторирования холестерина 1,1,2,2-тетрафторэтил-N, N-диметиламином

Ранее показано, что хлорид N-фенилбензимидазола может выступать в качестве эффективного хлорирующего агента в катализируемых диметилсульфоксидом (ДМСО) превращениях спиртов в соответствующие

хлориды (например, холестерин превращается в холестерин пеларгонат хлорид с выходом 90%) [43]. Описана также реакция галогенирования сульфонатами, катализируемая железом (III) [44]. Данная реакция позволяет эффективно синтезировать структурно разнообразные вторичные хлориды, бромиды и йодиды. Так, например, холестерина мезилат можно превратить в соответствующие галогениды с высокими выходами при общем сохранении конфигурации исходного соединения. Также разработано значительное количество катализаторов для бромирования холестерина и его производных по Аппелю [45]. В данной реакции холестерин превращается в холестерин бромид с сохранением конфигурации двойной связи. Холестерин может быть преобразован в 3 α -амино производное по реакции Мицунобу с азидным замещением и последующим восстановлением LiAlH_4 . Получение 3 β -производных возможно посредством двойной инверсии через 3 α -йодид и 3 β -азид [46].

Помимо этого, известны качественные реакции на холестерин, сопровождающиеся окрашиванием реакционного объема. Например, данный стерин способен реагировать с CHCl_3 в H_2SO_4 с образованием слоя CHCl_3 , окрашенного в красный, и флуоресцирующего зеленым цветом кислотного слоя. Также вступает в реакции с подкисленным раствором хлороформа и уксусным ангидридом, давая окрашивание розового цвета, которое меняется на красное, затем – на синее и, окончательно, на зеленое. Одним из наиболее характерных свойств холестерина является способность к комплексообразованию с различными классами соединений: кислотами (в частности в организме человека и животных взаимодействует с высшими жирными кислотами, образуя, необходимые для нормального функционирования организма эфиры), солями, углеводами (например, в организме человека холестерин при взаимодействии с глюкозой способен к образованию глюкохолестеринов), белками, аминами, витамином D_3 , а также сапонидами [47]. Так, например, при взаимодействии соединение

холестерина с дигитонином (гликозидом, выделяемом из наперстянки пурпурной) наблюдается выпадение нерастворимого осадка. Данная реакция лежит в основе ряда методик определения холестерина в различных объектах, а также применение холестерина в качестве противоядия при отравлении сапонинами.

Гидроксильная группа холестерина способна к замещению хлором без инверсии. Так, например, при воздействии SOCl_2 или PCl_5 холестерин превращается в холестерилхлорид, который затем можно восстановить Na в амиловом спирте до Δ^5 -холестена [48]. Последнее соединение способно к гидрированию под действием катализатора до холестана.

Как отмечалось ранее, холестерин способен к омылению кислотами с образованием простых и сложных эфиров. При воздействии CrO_3 холестерин способен к превращению в 4-холестен-3-он. Под действием активного диоксида марганца (MnO_2) данный стерин формирует 4,6-холестадиен-3-он. Двойная связь холестерина позволяет присоединять Cl_2 с образованием $5\alpha,6\alpha$ - и $5\alpha,6\beta$ -дихлоридов. При гидрировании над Pt холестерин превращается в 5α -холестан-3 β -ол. При этерификации высшей жирной кислотой указанный стерин способен к образованию холестеридов.

Общее содержание холестерина в организме человека достигает при весе 80-82 кг порядка 240 г.

1.4 Методы определения холестерина

1.4.1 Спектрофотометрические и колориметрические методики определения холестерина

Фотометрические методики определения холестерина основаны практически исключительно на применении химических реакций.

Из классических колориметрических методик наибольшее значение имеет методика Либермана-Бурхарда. В основу данной методики положено

измерение интенсивности зеленовато-голубой окраски, появляющейся в результате образования окрашенного комплекса после обработки холестерина смесью серной кислоты и уксусного ангидрида в соотношении от 20:1 до 5:1. Также предложено применение предварительно разбавленного реагента. В качестве растворителей, как правило, применяют уксусную кислоту и хлороформ. В ряде работ для приготовления реагента Либермана-Бурхарда предлагается смешать один объем концентрированной серной кислоты с 20 объемами уксусного ангидрида, предварительно охлажденного до 10°C [49]. Охлаждение смеси проводится в течение 9 мин. После чего вносят 10 объемов ледяной уксусной кислоты. С данным реагентом возможно работать в течение часа. Определяемый холестерин растворяют в указанном реагенте. Скорость окрашивания и его устойчивость находится в сильной зависимости от температуры. Продолжительность реакции составляет 30-35 мин при 25°C [49]. Ряд авторов указывает на возможность получения устойчивого реагента, пригодного в течение месяца, при соблюдении определенных условий хранения (в темном прохладном месте при температуре порядка 4 °C. Данный раствор готовится из 2 %-го раствора сульфата натрия и смеси уксусного ангидрида, уксусной и серной кислот в соотношении 6:3:1 по объему. Этот реагент широко применялся в клинической практике вплоть до конца 80-х годов XX в [50].

Окрашенный исследуемый раствор характеризуется двумя максимумами поглощения при 420 и 620 нм. Данный метод не отличается высокой чувствительностью. В связи с чем, многие авторы отмечают, что молярный коэффициент поглощения для холестерина лежит в интервале 1800-2000. Кроме того, показано, что данная методика не подходит для прямого анализа смесей стероидов [49]. Данный факт обусловлен тем, что интенсивность и положение полос не зависят от природы боковых цепей при атоме углерода C-17.

Также широкое распространение для колориметрического определения холестерина получила методика Златкиса-Зака. Основой данной методики

является реакция комплексообразования с хлоридом железа (III) в кислой (смесь уксусной и серной кислот) среде. Как правило, соотношение уксусной и серной кислот в конечной реакционной смеси составляет 2:3 по объему, а концентрация железа порядка 10 мг в 100 мл. При взаимодействии окрашивающего агента наблюдается окрашивание реакционной смеси в красный цвет. Максимум поглощения наблюдается при 560 нм [50]. Основным преимуществом данной методики относительно ранее описанной является более высокая чувствительность. Однако наличествуют мешающие влияния со стороны прочих веществ, входящих в состав биологических систем. В связи с чем, данная методика требует более сложной пробоподготовки объекта анализа. Например, применение ионообменных смол и жидкостную экстракцию смесью метанола и хлорформа.

Кроме того, следует отметить применение реагента Чугаева, в котором хлорид цинка и ацетил хлорид разводятся в уксусной кислоте. В присутствии холестерина и его эфиров раствор приобретает красно-розовую окраску. Максимум поглощения наблюдается при 526 нм. Данная методика менее чувствительна ($\epsilon=8800$), по сравнению с методикой основанной на реакции Златкиса-Зака, однако более чувствительна, чем методика Либермана-Буркхарда [51].

Однако активное развитие данной группы методик анализа холестерина продолжается. Так, например, группой ученых из Бенаресского индуистского университета предложена колориметрическая методика определения холестерина, основанная на применении графеновых пероксидазо-подобных частиц [52]. Подобный подход примечателен попыткой комбинирования двух классических методов – ферментативного и колориметрического – с целью использования достоинств указанных методов и минимизации их недостатков. Однако указанная методика предполагает применение также холестерол оксидазы (ХО) и 3,3',5,5' –тетраметилбензидина. Таким образом, основным недостатком указанной методики остается необходимость использования фермента, а также сложность стандартизации получаемых

сенсоров (в силу природы фермента и особенностей синтеза графеновых частиц).

Как указывалось ранее, известна способность холестерина к связыванию различными сапонинами. В частности, с дигитонином. Данный факт послужил основой одного из классических методов определения стероидов [51].

Несмотря на то, что подобные методы относятся к классическим, они продолжают активно развиваться. Так, например, объединенной группой ученых из университетов Бордо и Института Шри Читра разработана спектрофотометрическая методика определения холестерина с применением золотых наночастиц, конъюгированных дигитонином [53]. Несмотря на высокую чувствительность, селективность и простоту исполнения анализа, данная методика сложна в применении из-за технической сложности стандартизации приготавливаемых наночастиц золота.

1.4.2 Флуориметрические методики определения холестерина

В предыдущем разделе обсуждался колориметрический метод определения холестерина, в котором холестерин обрабатывался реагентами, содержащими серную кислоту, с образованием окрашенных соединений, обычно сопровождаемых флуоресценцией. Флуориметрия считается более чувствительным методом [49].

В связи с чем, на основе описанных колориметрических методик были разработаны методики флуориметрические. Так, например, возможно превращение холестерина, содержащегося в экстрактах тканей, в флуоресцирующее производное при помощи обработки холестерина реагентом, подобным реагенту Либермана-Бурхарда. А именно, экстракт обрабатывали 6 мкл серной кислоты после растворения в 150 мкл смеси 1,1,2-трихлорэтана и уксусного ангидрида в соотношении 5:1. Холестерина и его эфиры дают близкие по интенсивности, отличающиеся высокой устойчивостью сигналы, если измерение основано на регистрации красной

флуоресценции при 546 нм которая возбуждается линией ртутной лампы. Данным методом возможно определение очень небольших количеств холестерина до 1 мкг [49].

Также известно применение флуориметрического варианта реакции Сальковского [51]. Для этого смешивают в равных пропорциях раствор определяемого холестерина и концентрированную серную кислоту в дихлорметане, интенсивно перемешивают и измеряют флуоресценцию сернокислого слоя при 450 нм, используя источник возбуждения с длиной волны 415 нм. Данный метод менее чувствителен, чем ранее описанный. Тем не менее, показал высокую эффективность в отношении определения холестерина в 250 мкл сыворотки крови.

Помимо этого, известна методика, заключающаяся в применении реагента, содержащего смесь хлорида железа (III) и серной кислоты, предварительно растворенную в этилацетате [49]. Данная методика отличается высокой чувствительностью, так как позволяет определять 0,1-5 мкг холестерина. Его успешно применяли для определения холестерина в липопротеиновой фракции, полученной электрофорезом [50].

1.4.3 Хроматографические методики определения холестерина

Колоночная хроматография с фракционированием образца, зачастую, выступает в роли первой стадии большинства методик количественного анализа стерина, вообще, и холестерина, в частности. Целью введения в анализ данной стадии является, как правило, отделение фракции стерина от прочих липидов, присутствующих в образце. Также либо разделении стерина для того, чтобы повысить селективность последующего определения. Многие ученые использовали колонки с силикагелем и флорисилом и градиентное элюирование с помощью растворителей, начиная с углеводов и заканчивая метанолом или смесью уксусной кислоты и диэтилового эфира. Стерины относятся к наименее полярным компонентам липидов.

Чам с соавторами проводили разделение холестерина и его эфиры с помощью колоночной хроматографии на колонке сефадекс LH-20. В качестве элюента использовали смесь гексана и хлороформа в соотношении 7:13 [49]. Данный вид хроматографии значительно упрощает идентификацию стерина, их разделение, а также отделение от прочих веществ с целью дальнейшего анализа.

Как указывалось ранее, стерин является наименее полярным и наиболее липофильным классом стероидов, вследствие чего, их возможно отделять от стероидов других классов и от липидов

При анализе липидов оценку содержания стерина проводят непосредственно в пятнах на тонкослойной хроматограмме. Иногда достаточно полуколичественного визуального сравнения пятен стандарта и исследуемого образца. Типичным примером количественного метода является методика Виклунда и Элиассона. С помощью которой холестерин и его эфиры отделяют от других липидов методом тонкослойной хроматографии на силикагеле G, а пластинку обрабатывают смесью диэтилового эфира и уксусной кислоты в соотношении 99:1, затем смесью гексана, диэтилового эфира и уксусной кислоты в соотношении 85:15:1. Далее пятна опрыскивают 70 %-ной серной кислотой, насыщенной бихроматом калия, нагревая при 180 °C в течение 25 мин. Содержание индивидуальных липидов находят по площадям соответствующих пиков в денситограмме [51].

Кроме того, возможно осуществлять разделение на силикагеле смесью петролейного эфира, диэтилового эфира и уксусной кислоты в соотношении 90:10:1. Обнаруживающим веществом является 10%-ный раствор молибдофосфорной кислоты в 95 %-ном этаноле, далее хроматограмму холестерина сканируют, измеряя отражение при 750 нм.

Газовая хроматография, благодаря ряду преимуществ, является весьма популярным методом количественного анализа стерина. Названными преимуществами являются:

- устойчивость стеринов даже при повышенных температурах, в связи с чем, их можно хроматографировать как в исходном виде, так и в виде производных;

- разрешающая способность газового хроматографа достаточна для разделения близких по структуре стеринов;

- чувствительность газовой хроматографии позволяет получить надежные результаты количественных определений стеринов так как в большинстве исследуемых образцов обычно содержится достаточное количество стеринов;

- перед выполнением данного вида хроматографии не требуется проводить трудоемкие операции разделения и очистки.

В случае количественного определения холестерина, применяют метод внутреннего стандарта. Данный способ можно рассматривать в качестве грубого приближения, поскольку для свободного холестерина относительная весовая чувствительность составляет 0,837, для его триметилсилилового эфира 1,077 [54]. Также при анализе объектов, содержащих смеси стеринов, сложность представляет разделение стеринов, в связи с чем, полученные результаты могут быть завышены.

Методики, основанные на жидкостной (ЖХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а особенно обращено фазовая ВЭЖХ, позволяют обойти данное ограничение и пригодны для анализа объектов, содержащих смесь стеринов. Однако, несмотря на значительную привлекательность, применяются несколько реже, чем выше описанные методики. Основным недостатком методик на основе ЖХ и ВЭЖХ является низкое поглощение стеринами УФ-излучения. В связи с чем, стерины возможно обнаружить лишь при длинах волн менее 210 нм. Такое условие является практически невыполнимым для биологических образцов. Данный недостаток устраняется при разделении стеринов в форме бензоатов. В таком случае обнаружение с достаточно высокой чувствительностью можно выполнить при 230 нм [55]. Наиболее часто подобные методики

применяются для анализа пищевых продуктов [54]. Однако для объектов иной природы (например, биологические жидкости человека) данный тип методик подходит в меньшей степени из-за сильного мешающего влияния матрицы объекта.

Кроме того, для определения холестерина широко применяются бурно развивающиеся в последние годы гибридные методы (ЖХ-МС, ЖХ-МС/МС) [55]. Основной проблемой применения подобных методик в поточном клиническом анализе являются дороговизна основного оборудования, высокие требования к квалификации рабочего персонала и сложность пробоподготовки при работе с реальными объектами (например, сывороткой крови и спинно-мозговой жидкостью).

1.4.4 Ферментативные методики определения холестерина

Впервые статьи по ферментативным методам были опубликованы в 1973 году. В них было изложено об определении сывороточного холестерина, включающих ферментативное окисление холестерина и колориметрическое определение образующегося пероксида водорода [56]. Применение ферментов быстро приобрело популярность, и было использовано во многих работах.

Данный метод характеризуется тем, что холестерин определяется косвенно по содержанию пероксида водорода, который с аналитической точки зрения является более простым соединением, чем холестерин.

Также, преимуществом данного метода является то, что он не требует применения агрессивных реагентов.

Широко применяемые ферментативные методики основаны на использовании трех ферментов: холестерин оксидазы, холестерин эстеразы и пероксидазы хрена. В таких системах сначала происходит высвобождение эстрифицированного холестерина, катализируемое холестерин эстеразой. Затем окисление как свободного, так и высвобожденного холестерина кислородом воздуха, катализируемое ХО. Происходит выделение перекиси

водорода, которую затем определяют по качественной реакции с гомованилиновой кислотой, катализируемой пероксидазой хрена, либо по реакции с 4-аминоантипирином в присутствии фенола, также катализируемой пероксидазой хрена (реакция Триндера) [57, 58, 59]. Однако применение ферментов значительно осложняет использование подобных систем в поточном лабораторном анализе вследствие склонности ферментов к денатурации и потере активности, а также дороговизны их получения и очистки.

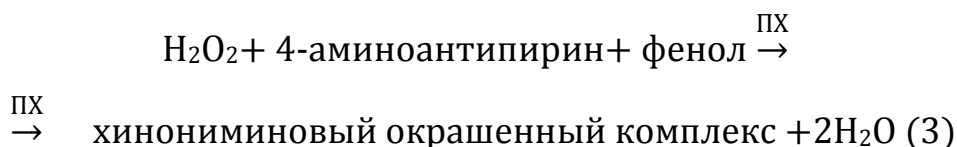


Рисунок 1.4.1 – Схема реакции окисления холестерина с образованием окрашенного комплекса по Триндеру (3)

Если выполнение анализа начинают с ферментативного окисления, определить можно только общий холестерин. Количественное определение данной группы методов всегда основано на образовании пероксида водорода.

В основе многих методик определения холестерина лежит именно реакция Триндера.

Колориметрический ферментативный метод основан на автоокислении холестерина, катализируемом ХО. Образующийся пероксид водорода реагирует с метанолом в присутствии каталазы с образованием формальдегида, который затем подвергается циклизации с ацетилацетоном и аммиаком [57].

Для определения общего содержания холестерина, перед проведением анализа необходимо провести гидролиз эфиров холестерина.

Примером является методика Ноббса, в которой применяемый реагент содержит 550 мМ фосфатного буфера со значением рН 7.0, 1,6 мМ метанола,

19 мМ ацетилацетона, $6,4 \cdot 10^6$ МЕ каталазы, 130 МЕ холестеринэстеразы, 80 МЕ холестериноксидазы и 0,1 % оксиполиэтоксидодекана. Из смеси 0,1 мл плазмы и 0,2 мл воды отбирают 20 мкл пробы и вводят в реакцию с 500 мкл этого реагента при 37°C . Содержание холестерина рассчитывают по изменению поглощения при 406 нм в течение первых 7 мин после начала реакции.

Также рядом авторов показано, что пероксид водорода в присутствии пероксидазы способен окислять *p*-оксифенилуксусную кислоту с образованием флуоресцирующих соединений [57].

Ферментативные электрохимические методы определения холестерина преимущественно основаны на измерении количества пероксида водорода, либо изменение парциального давления кислорода.

Первое применение подобной системы зафиксировано в 1975 году. В этом методе образующийся пероксид водорода обрабатывали иодид ионами с применением молибденового катализатора. Уменьшение концентрации иодид-иона измеренное с помощью иодид-селективного мембранного электрода, было пропорционально концентрации пероксида водорода, и следовательно, холестерина. Калибровочный график линейный, откалиброван до концентрации холестерина примерно 5 г/л. Данная методика поддается автоматизации, однако на данный момент в серийных клинических анализах не применяется [56].

Другой тип определения холестерина основан на измерении расхода кислорода в процессе реакции. Эти методы проводятся амперометрически при помощи кислородного электрода.

Таким методом определена концентрация кислорода при помощи электрода Кларка – мембранного электрода, состоящего из поляризуемого при $-0,6$ В платинового катода и Ag/AgCl-электрода сравнения. Ячейку заполняли водным раствором хлорида калия ($\text{pH} > 7$) и отделяют проницаемой для кислорода мембраной. При восстановлении кислорода на

катоде за счет последнего происходит изменение тока пропорционально изменению парциального давления/концентрации кислорода.

Также предлагалось проводить определение холестерина за счет амперометрической детекции, образующегося в реакции пероксида водорода. Таким методом был определен холестерин на «холестериновом электроде» с иммобилизированным ферментом. На платиновом электроде при +0,6 В восстанавливается пероксид водорода относительно каломельного электрода. ХО одну или вместе с холестерол эстеразой иммобилизируют на поверхности вращающейся пористой ячейке из стекла, содержащего остатки акриламина, модифицированные глутаровым альдегидом. Перемешивание осуществлялось с помощью магнитной мешалки [57].

Для определения холестерина можно использовать как кинетический метод, так и метод, основанный на измерении изменения общего тока. Устойчивый ток достигается после добавления сыворотки (15 мкл) в течение 10 мин. Для определения содержания общего и свободного холестерина, мешалка должна содержать только в иммобилизованном виде только ХО, а в раствор ячейки добавляется холестерол эстераза. Достоинством и преимуществом метода является то, что ферменты в таком виде очень устойчивы, и могут храниться в течение 1-2 месяцев в холодильнике и с одним образцом фермента можно выполнить большое количество анализов. Особенно это важно для клинической практики, так как данный метод позволяет проводить относительно дешевые анализы (например при помощи ферментативных наборов тест-полосок) [49]. Однако, несмотря на свою дешевизну и высокую селективность ферменты отличаются низкой стабильностью, и как следствие, сильная зависимость от внешних условий. Поэтому развитие методов анализа в области холестерина не остановилось на описанных методах.

1.4.5 Электрохимические методики определения холестерина

Электрохимические методики, благодаря простоте исполнения, относительной дешевизне и возможности миниатюризации являются наиболее перспективными как для применения как в серийном клиническом анализе, так и для удовлетворения индивидуальных потребностей населения в проведении анализа. Данный факт объясним тем, что, прежде всего, несмотря на значительное количество инструментов, которыми располагают клиницисты, зачастую критические состояния при ССЗ развиваются стремительно. В связи с чем, требуется регулярный индивидуальный контроль содержания общего холестерина в крови пациента, как первичного маркера критических состояний. В таком случае наиболее удобными для применения выглядят тест-системы для индивидуального применения. В качестве таких систем могут выступать, как биосенсоры, так и просто системы, содержащие модифицированные электроды.

1.4.5.1 Применение биосенсоров

К числу аналитических систем, которые сочетают в себе высокую селективность определения с чувствительностью, относятся биосенсоры [62]. При этом электрохимические устройства традиционно имеют наибольшее распространение среди существующих биосенсоров [63,64]. Такие устройства производят простую, недорогую и в то же время точную платформу для диагностики пациентов. Электрохимический биосенсор включает в себя элемент биохимического распознавания и трансдьюсер. Цель трансдьюсера заключается в преобразовании биохимической информации в полезный электрический сигнал.

Первое предположение о возможности иммобилизации ферментов на электрохимических датчиках было выдвинуто еще в 1962 году Лиландом Кларком-младшим и соавторами [65]. Была вынесена гипотеза, что данные

«ферментные электроды» в последствии расширят диапазон аналитических возможностей базового датчика.

Основным преимуществом биосенсоров относительно множества существующих методов является высокая специфичность биоузнающего элемента, благодаря чему можно количественно определять индивидуальные аналиты или группу аналитов в смеси сходных по строению соединений. Это значительно упрощает работу с кровью, потом и другими биологическими жидкостями.

Биосенсоры классифицируются по типам биорецепторов и трансдюсеров. В качестве распознающего элемента в биосенсорах применяются следующие типы биологических структур [66]: целые организмы, ткани, клетки, органеллы, мембраны, антитела, рецепторы, ферменты, окислительно-восстановительные белки, нуклеиновые кислоты.

Используемые в биосенсорах преобразователи сигнала (трансдюсеры) можно поделить на следующие группы [66]: физические, химические и физико-химические.

Кроме того, данная классификация подлежит дальнейшему дроблению из этих групп можно выделить среди физико-химических трансдюсеров: амперометрические, кондуктометрические, импедиметрические. Физические преобразователи можно подразделить на калориметрические, оптические, акустические, механические.

Все виды биоселективных элементов могут применяться в комбинации с разнообразными трансдюсерами. Наибольшей популярностью, в качестве биораспознающего элемента, пользуются ферментные и клеточные сенсоры. Тип применяемого трансдюсера определяется основами физико-химии его действия. Таким образом, можно разделить биологические сенсоры на категории: оптические, гравиметрические и электрохимические.

Бесспорное преимущество принадлежит электрохимическим биосенсорам, они менее зависимы от эффектов окружающей среды, чем оптические, при этом устройства позволяют осуществлять перенос

информации, преобразованной в электрический сигнал, непосредственно на персональный компьютер [67]. Как было описано в предыдущем разделе, наиболее часто в электрохимических системах для определения холестерина применяется детекция образующейся перекиси водорода, либо расход содержащегося в системе кислорода. Как правило применяются амперометрические сенсоры, благодаря высокой чувствительности и простоте минитюаризации [68]. Основным недостатком подобных работ являются высокие значения потенциалов окисления-восстановления как перекиси, так и водорода. При работе с биологическими объектами высокие значения потенциалов позволяют окисляться и восстанавливаться большому числу неключевых аналитов, что, в свою, очередь вносит погрешность в проведенные измерения.

Решением данной проблемы может послужить применение прямого электронного переноса между активным центром фермента и поверхностью электрода. В случае ранее описанных систем может применяться прямой электронный перенос непосредственно на холестерол оксидазе (в двухферментных холестерол оксидаза-холестерол эстераза системах) за счет флавинадениндинуклеотида (ФАД), являющегося активным центром данного фермента. Такой подход позволяет избежать необходимости вовлечения кислорода в реакцию [69]. Также применяется прямой электронный перенос за счет активного центра пероксидазы хрена [70,71,72]. Прямой электронный перенос является принципиальной основой биосенсоров третьего поколения.

Холестерол оксидаза (ХО) представляет собой мономерный бифункциональный ФАД-содержащий фермент (флавоэнзим), относящийся к семейству оксидоредуктаз. Особенностью данного фермента является способность к селективному окислению холестерина, выступающего в качестве субстрата к данному ферменту, кислорода, выступающего в данной реакции в качестве акцептора электронов. На данный момент является одним из наиболее широко применяющихся в клинических лабораториях ферментов, что обусловлено специфичностью, высокой чувствительностью и

простотой применения. Несмотря на несомненные достоинства применения ХО для прямого электронного переноса в различных биосенсорах, применение данного фермента характеризуется сложностями. Затрудненность электронного переноса с фермента непосредственно на электрод проистекает из глубины расположения ФАД и его изоляции в белковом ядре молекулы фермента. В связи с чем, значительно понижается чувствительность подобных сенсоров [73]. Таким образом, решением данной проблемы может послужить применение как ферментов, способных к более простому прямому электронному переносу (например, пероксидаз), либо искусственно синтезируемых медиаторов, способных к челночному переносу электрона от фермента к поверхности электрода.

Пероксидаза состоит из двух компонентов: гликопротеина (не имеет окраски) и соединенного с ним феррипорфирина (окрашен в коричнево-красный). Феррипорфирин, представляющий собой высокоароматическое гидрофобное соединение, образует порфириновое кольцо гемма. Гем также содержит ион трехвалентного железа, который способен к образованию четырех координационных связей с атомами азота в составе порфирина, а также ионной связи с атомом азота, входящим в состав гистидиновго остатка, содержащегося в белковой части фермента.

Активный центр всех пероксидаз, имеющих растительное происхождение, обладает сходным строением. На рисунке 1.4.3 представлен общий вид молекулы пероксидазы хрена (ПХ).

При наличии строго контролируемых условий гемм пероксидазы хрена способен к участию в прямом переносе электронов с электрода без необходимости применения в процессе каких-либо медиаторов. Процесс ферментативного восстановления перекиси водорода протекает по следующей схеме [73]:



(1)



Рисунок 1.4.2– Схема ферментативного восстановления перекиси

Предполагается, что прямой электронный перенос возможен благодаря неполной капсуляции ферментативного редокс-центра. Основные характеристики переноса напрямую зависят от природы электродной поверхности и метода, применяемого для иммобилизации ферментов.

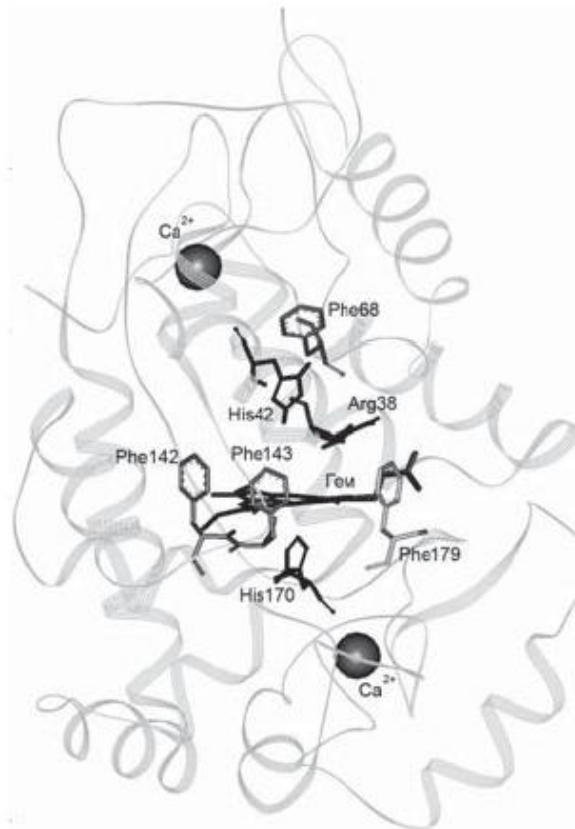


Рисунок 1.4.3– Общий вид молекулы ПХ со стороны входа в активный центр.

Так, например, проведено исследование зависимости электронного переноса и сорбции ПХ от величины заряда ее белковой поверхности. Помимо изозима С ПХ, поверхность которого имеет положительный заряд, применялась модифицированная пероксидаза с поверхностью, обладающей отрицательным зарядом. Для чего гликозидные остатки подвергли

предварительному окислению периодатом натрия, после чего, проводили модификацию сульфонатными группами. Поверхность необработанных электродов несла положительный заряд. В связи с чем, наблюдалась преимущественная сорбция отрицательно заряженной формы (поверхностная концентрация составила $19 \text{ фемтомоль/см}^2$ в сравнении с 3 фемтомоль/см^2 для нативного фермента) [73]. При анодном окислении металла происходит смена заряда поверхности, в связи с чем, порядок сорбции сменяется на обратный ($1,5$ и $22 \text{ фемтомоль/см}^2$, соответственно).

Эффективность электронного переноса меняется сходным образом: повышение поверхностной концентрации фермента влечет за собой рост биокаталитического тока восстановления. Ряду авторов удалось добиться высокой эффективности безмедиаторного переноса – величина сопоставима с величиной переноса при применении в качестве медиатора катехола. Показано, что внесение в раствор данного материала особого влияния на равновесный потенциал электронного переноса не оказывало.

Роль сорбции в переносе с активного центра фермента была показана для графитовых сенсоров с ферментом, непосредственно включенным в электродный материал [74]. Максимальная величина сигнала в сочетании с низким пороговым значением определяемой концентрации перекиси ($0,1 \text{ мкМ}$) является основным достоинством применения композиций, в которых в качестве основы используется мелкодисперсный графит. Такие композиции обладают наибольшей удельной площадью поверхности (размер зерна оставляет 6 мкм).

Безмедиаторный перенос электрона на фермент был зафиксирован также на ПХ, включенной в графитовый электрод и модифицированной при помощи полиэтиленгликоля [75]. В сравнении с применением немодифицированного фермента наблюдается понижение абсолютной величины тока электронного переноса. Однако, наблюдаются возрастание его стабильности и снижение рабочего потенциала.

Медиаторы электронного переноса представляют собой переносчики электрона, принимающие участие в окислительно-восстановительном процессе с биологическим компонентом и электродом и повышающие скорость электронного переноса. Рост скорости электронного переноса достигается за счет снижения влияния стерического блокирования редокс-центра фермента, который зачастую недоступен для прямой электродной реакции. Таким образом, медиаторы способствуют повышению чувствительности пероксидазных сенсоров к различным органическим субстратам и понижению предела обнаружения аналита. Для сравнения, безмедиаторные сенсоры демонстрируют величины предела обнаружения порядка 10-100 мкМ, в то время как ряд безмедиаторных сенсоров позволяет определять концентрации перекиси водорода на наномолярном уровне [71].

В процессе биокатализа происходит реакция медиатора с восстановленной формой фермента, после чего наблюдается его диффузия к электродной поверхности. Затем происходит возвращение окисленной формы в биологический слой и, таким образом, завершается цикл челночного переноса.

Выбор медиатора переноса электрона определяется величиной стандартного окислительно-восстановительного потенциала пары $M_{\text{окисл}}/M_{\text{восст.}}$ [70]. Близость указанного потенциала к сходной характеристике гемма ПХ обеспечивает быстроту протекания электронного переноса с точки зрения термодинамики. Также следует принимать во внимание устойчивость медиатора к прочим окислителям и восстановителям, возможно присутствующим в растворе (например, растворенный кислород, пероксид водорода, различные компоненты пробы), его склонность к диспропорционированию и прочим химическим превращениям. Как правило, предпочтение отдается медиаторам, реакции которых не связаны с расходом и генерацией катионов водорода, что позволяет снизить влияние водородного показателя раствора и его буферной емкости на отклик биосенсора. Помимо этого, медиатор должен быть способен к обратимому

восстановлению и окислению на электродной поверхности, желательно, при низких потенциалах, с целью исключения влияния электроактивных примесей.

Несмотря на приведенные ограничения, существует большое число различных неорганических и органических медиаторов, применяемых в пероксидазных сенсорах. Например, медиаторы вносят в раствор совместно с пероксидом водорода (так называемые, диффузионные медиаторы). Помимо этого, электронный перенос может осуществляться при участии компонентов полимерного слоя. Эффективность гетерогенных медиаторов напрямую связана со степенью подвижности редокс-групп, длиной линкера и способа функциоанализации полимера.

Наибольшее распространение в пероксидазных сенсорах в качестве медиаторов получили следующие соединения: производные ферроцена [76,77], фенатазина [78,79,80,81], также тионин [82, 83], гексацианоферраты [84, 85].

Необходимо отметить, что присутствие медиатора не исключает наличия также прямого переноса электронов с гема ПХ непосредственно на электрод, в случае благоприятствующей ориентации сорбированного фермента.

Электрохимические биосенсоры функционируют за счет сопряжения биохимической и электрохимической реакций. В связи с чем, при конструировании биосенсора важную роль играет не только эффективность переноса электронов на поверхность подложки, но и эффективность иммобилизации биочувствительного элемента на электродной поверхности [70]. Иммобилизация, по сути, представляет собой процесс создания гетерогенных катализаторов путем связывания ферментов с носителями, обладающими различной химической природой. Именно иммобилизация является наиболее трудоемким этапом создания биосенсора. Этот факт обусловлен прямой зависимостью стабильности работы сенсора, его

чувствительности и диапазона определяемых концентраций от эффективности процесса иммобилизации.

Среди методов иммобилизации ферментов наиболее распространены удерживание за счет физических взаимодействий (адсорбция или захват в полимерном геле) и удерживание, благодаря образованию химических связей (ковалентная сшивка с нерастворимой подложкой).

Физическая адсорбция фермента представляется наиболее простым способом создания биочувствительного слоя, являющимся, в тоже самое время, наименее разрушительным для структуры ферментов. При применении данного способа удержание глобулы фермента на поверхности происходит за счет электростатических, водородных или гидрофобных взаимодействий [86]. Основным недостатком метода физической адсорбции фермента на электродной поверхности является постепенное вымывание фермента в ходе реакции с аналитом. Применение метода «двойной иммобилизации» позволяет предотвратить вымывание [87]. В данном методе на поверхность адсорбированного фермента наносится мембранный слой, который выполняет функцию барьера для примесей, оказывающих мешающее влияние на отклик сенсора. Тем не менее, нередко нанесение дополнительной мембраны поверх адсорбированного фермента приводит к существенному снижению чувствительности сенсора.

Применение ковалентной иммобилизации фермента на электродной поверхности имеет своим преимуществом возможность достижения высокой стабильности биочувствительного слоя [88]. При ковалентной сшивке применяются следующие функциональные группы на поверхности глобулы фермента (карбоксильные, аминокислотные, гидроксильные группы и имидазольные). При этом процесс иммобилизации не затрагивает те функциональные группы, которые важны для проявления ферментативной активности. В связи с чем, иногда ковалентную модификацию осуществляют в присутствии ферментативного субстрата. Чаще всего для ковалентной сшивки используется глутаровый альдегид [89,90,91,92].

Наиболее интересным, с точки зрения сохранения ферментативной активности, представляется использование захвата фермента в мембраны из полимерного геля. При формировании геля в ферментсодержащей полимерной смеси, фермент захватывается в образующийся гелевый носитель. При контроле степени сшивки геля данный метод может использоваться для различных ферментов, благодаря способности белковых молекул удерживаться в геле в виде трехмерной решетки (как, например, в желатине), что используют при создании ферментных электродов. Данный способ иммобилизации обладает двумя основными преимуществами: есть возможность включать в гель необходимые переносчики электронов [90]; матрицы могут играть роль ионоселективных мембран и, следовательно, принимать участие в формировании отклика сенсора и предотвращать мешающее влияние прочих аналитов [93].

Метод золь-гель иммобилизации широко применяется для создания биосенсоров. Оксид кремния представляет собой матрицу с высокой биосовместимостью для стабилизации биомолекул. Золь-гель метод – низкотемпературный метод, в котором за счет гидролиза и поликонденсации алкоксидов металлов образуется материал с обширной сетью пор. Размер пор в данном методе может контролироваться, чтобы быть достаточно большим для диффузии аналита к активному центру фермента, и достаточно маленьким, чтобы удерживать фермент.

Брауном в 1990 году впервые показана возможность иммобилизации белковой молекулы в матрицу на основе геля кремния [93]. Пористая неорганическая матрица на основе геля перспективна для развития электрохимических биосенсоров, так как она обладает достаточной жесткостью, химической инертностью, высокой стабильностью и ограниченным набуханием в водном растворе.

Введение различных органических функциональных групп в матрицу на основе неорганических алкоксидов приводит к органически модифицированным гелям, имеющим ряд преимуществ по сравнению с

неорганическими. Во-первых, в такой матрице происходит специфичное связывание фермента, что повышает эффективность иммобилизации. Во-вторых, это позволяет связать кофактор фермента с матрицей посредством химической реакции его с органическими группами геля. Кроме того, посредством введения различных гидрофильных или гидрофобных функциональных групп можно контролировать смачиваемость матрицы [94], толщину мембраны и величину пор [95,96].

В качестве прекурсоров для создания геля чаще всего используются тетраметоксисилан (ТМОС) и тетраэтоксисилан (ТЕОС). В типичном золь-гель процессе гидролиз этих мономеров приводит к силанолом, связывающимся друг с другом с образованием полисилоксанов. Поликонденсация силанолов и полисилоксанов и последующее высушивание образующегося соединения на воздухе приводит к образованию пористой матрицы геля.

Таким образом, золь-гель метод широко используется при создании биосенсоров [97] и позволяет изменять характеристики электродов модификацией их поверхности матрицей на основе силоксанов, содержащей различные проводящие полимеры, медиаторы, ферменты. Использование геля в качестве матрицы дает возможность регулировать активность ферментов.

Основной сложностью развития различных биосенсоров является их низкая стабильность. Недостаточная биосовместимость материала электрода способна приводить к существенному снижению, как отмечалось ранее, активности фермента и опосредованно понижать стабильность работы биосенсора. Также немаловажным фактором является правильность ориентации фермента на поверхности электрода и, как следствие, приводит к серьезным стерическим затруднениям. Таким образом, последние исследования в области разработки биосенсоров на холестерин направлены, прежде всего, на поиск подходящей матрицы с высокой биосовместимостью, способной обеспечить высокую стабильность работы биосенсора.

1.4.5.2 Применение модифицированных электродов

Середина 70-х годов XX века ознаменовалась появлением в электрохимии модифицированных электродов [97]. До этого момента в качестве индикаторных широко применялись ртутные электроды, а также электроды, изготовленные из углеродных материалов и благородных металлов (золота, серебра, а также металлов платиновой группы). Однако подобные электроды имеют ряд недостатков:

- 1) необратимость протекания ряда электрохимических на поверхности таких электродов;
- 2) недостаточная селективность протекающих электрохимических реакций (невозможность определения веществ, имеющих близкие потенциалы восстановления (окисления));
- 3) недостаточная коррозионная стойкость материалов электрода;
- 4) необходимость приложения значительного перенапряжения для протекания электрохимической реакции.

Применение модификаторов (промоторов) поверхностей электродов позволяет снять указанные недостатки [99]. Под термином «модифицированный электрод» понимается электрод, поверхность которого обработана специальным образом с целью изменения электрохимического отклика. Модификация предполагает нанесение на поверхность электрода (химическими, либо физическими методами) химических соединений, либо полимерных пленок, обеспечивающих высокую скорость протекания и снижение величин перенапряжения в процессе переноса электронов.

Существующие на данный момент способы модификации электродных поверхностей возможно разделить на следующие группы:

- 1) применение необратимой адсорбции модификатора на поверхности электрода;

- 2) использование ковалентных связей для фиксации модификатора на поверхности электрода;
- 3) включение модификатора в неорганическую, либо полимерную пленку;
- 4) введение модификатора непосредственно в материал электрода;
- 5) электрохимический синтез модификатора.

При выборе оптимального способа модификации руководствуются, прежде всего, свойствами подложки и модификатора. Необходимыми условиями успешного применения модификатора является обеспечение прочной связи между поверхностью подложки и модификатором, а также обеспечение высокой скорости обмена электронами между подложкой и электроактивным веществом.

Одним из наиболее простых методов модификации поверхности представляется применение адсорбции модификатора [100]. Основным преимуществом указанного метода является отсутствие необходимости применения специальных реагентов для присоединения модификатора к электродной поверхности. Основным недостатком – высокая вероятность десорбции модификатора.

Применение ковалентной сшивки молекул модификатора с электродной поверхностью позволяет получить значительно более стабильные системы [101]. Наиболее часто в таких системах применяются соединения, содержащие карбокси-, гидроксид- и оксигруппы. Основным преимуществом данного способа является исключение возможности утечки модификатора с электродной поверхности. Однако образование ковалентной связи может сопровождаться повреждением электроактивных функциональных групп модификатора, что, в свою очередь, способно провоцировать потерю его активности.

При изготовлении электродов с полимерным покрытием закрепление модификатора на поверхности электрода представляется более простой задачей, чем при получении ковалентно связанных монослоев. Данный факт

связан с простотой закрепления полимерных пленок на поверхности электрода. Однако такой метод имеет существенный недостаток: необходимость тщательного регулирования толщины подобной пленки, что обусловлено влиянием толщины пленки на ее прочность и электропроводность, а также на перенос заряда [102]. Чем больше толщина пленки, тем она прочнее, в то же время, слишком высокая толщина пленки способствует снижению ее электропроводности и снижению полноты участия редокс-центров в переносе заряда. При таком способе изготовления электродов проводится осаждение из раствора мономера токопроводящего полимера и его полимеризация под воздействием света, радиационного излучения, тлеющего разряда, либо протекания электрического тока. К основным достоинствам электрохимической полимеризации можно отнести:

- 1) получение пленок, локализованных на поверхности электрода;
- 2) возможность контроля свойств покрытия.

Для получения подобных пленок, как правило, используются следующие полимеры: полианилин, полипиррол, полифенилен, политиофен, полиацетилен, а также их замещенные аналоги. Зачастую для достижения требуемых характеристик электрода (селективность, проводимость) применяют сополимеризацию различных мономеров.

Модификаторами поверхности могут служить различные неорганические вещества. Например, оксиды металлов [103,104], глины [105,106], цеолиты [107,108] или силикаты [109,110]. Применение цеолитов и глин позволяет проводить избирательное концентрирование аналита на поверхности электрода. Способность к концентрированию определяется размером пор модификатора и его сорбционной способностью. Однако относительно низкая электропроводность указанных материалов требует их включения либо в материал электрода, либо в токопроводящую полимерную пленку. Применение оксидов металлов позволяет эффективно катализировать многие окислительно-восстановительные процессы, благодаря переносу кислорода в оксидных пленках.

Использование полимерных пленок для включения в них модификаторов позволяет решить ряд задач:

- 1) повысить селективность посредством разделения веществ по размеру, заряду, полярности и т.д.;
- 2) обеспечить механическую защиту электродной поверхности от повреждений;
- 3) обеспечить изоляцию электродной поверхности от воздействия электролитов;
- 4) повысить степень закрепление модификатора на поверхности подложки.

Как правило, полимеры применяют в качестве защитной (а также избирательно проницаемой) пленки на поверхности электрода, либо матрицы для инкапсуляции модификатора.

Механизм действия ХМЭ разнообразен: это может быть медиаторный перенос электрона на поверхность электрода, химическое взаимодействие аналита с медиатором с переводом первого в электроактивную форму, либо разветвление электродной поверхности с повышением электроактивности аналита [111]. В случае применения медиаторного переноса роль медиатора (М) состоит в осуществлении транспорта электронов между электродной поверхностью и определяемым соединением. Тогда частицы М и М[•] выступают в качестве компонентов обратимой редокс-системы. Причем М[•] будет вступать в последующую химическую реакцию с субстратом (аналитом), сопровождающуюся образованием продукта. Схема такого электродного процесса представлена на рисунке 1.4.4.

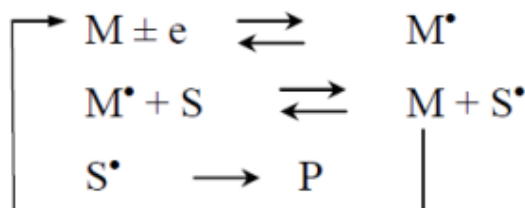


Рисунок 1.4.4 – Схема челночного переноса электронов при медиаторном катализе:

М – медиатор, S – определяемый аналит, P – продукт реакции.

Следовательно, субстрат способен к электрохимическому превращению при потенциалах, которые соответствуют формальному потенциалу пары M/M^{\bullet} , что позволяет существенно снизить перенапряжение окисления-восстановления субстрата. В ходе реакции взаимодействия M^{\bullet} и S наблюдается регенерация M , что позволяет отнести подобный процесс к каталитическому типу. Также экспериментально регистрируется прирост тока окисления (или восстановления) медиатора в присутствии субстрата в сравнении с током окисления (или восстановления) в его отсутствие.

Различают внешнесферный или внутрисферный электронный перенос [112]. Тип электронного переноса напрямую зависит от механизма реакции. Внешнесферным (редокс-катализом) называется механизм, при реализации которого обратимая пара M^{\bullet}/M непосредственно осуществляет функцию переноса электронов. Если же происходит предварительное образование аддукта $M^{\bullet}S$, который затем распадается с последующей регенерацией медиатора, процесс носит название внутрисферного (химического) катализа.

Для протекания гетерогенных реакций при определении биологически активных соединений (БАС) необходимо соблюдение некоторых критериев:

1. эффективность электрокатализа напрямую зависит от разности потенциалов систем P/S и M/M^{\bullet} : чем ниже разность потенциалов, тем выше скорость катализа (электрохимический критерий);
2. для катализа необходимо, чтобы в результате электрохимического превращения наблюдалось отрицательное изменение свободной энергии (термодинамический критерий);
3. для электрокатализа предпочтительно электрохимическое превращение веществ, которые способны к образованию неустойчивых промежуточных соединений при переносе электронов (кинетический критерий).

Помимо этого, протекание электрокатализа возможно, если стандартный потенциал пары медиатора ($E^0_{M/M^{\bullet}}$) будет выше стандартного потенциала электродной реакции с участием субстрата $E^0_{S/P}$ ($E^0_{S/P} < E^0_{M/M^{\bullet}}$).

Для изготовления сенсоров на холестерин активно применяются различные электроды, модифицированные функциональными материалами. Такими как наночастицы металлов [113,114,115,116,117,118,119,], углеродные нанотрубки [120], молекулярные пленки с памятью формы [121,122]. Также возможно комбинирование нескольких подходов к модификации. Например, использование систем, совмещающих углеродные нановолокна и наночастицы благородных металлов [123,124], молекулярные пленки с эффектом памяти и наночастицы, состоящие из металлов и углеродных нанотрубок [125]. В последнем случае, полимер с памятью формы призван обеспечить селективность, углеродные нанотрубки выступают в качестве трансдьюсера, а наночастицы металлы – медиатора электронного переноса.

Постановка задачи.

Таким образом, проведя детальный литературный обзор существующих на данный момент методов определения холестерина, следует отметить, что данному вопросу уделяется большое внимание в литературе, что говорит об актуальности проблемы. Но с другой стороны, существующие методы определения холестерина имеют ряд недостатков (высокая стоимость реагентов, ферментов, нестабильность их работы во времени, сложное аппаратное оформление и т.д.). Поэтому в данной работе исследованы физико-химические закономерности окисления – восстановления холестерина на углеродсодержащем композитном электроде, модифицированном 2,6 – диацетил- 2,4,6,8 - тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновой кислотой, с применением метода циклической вольтамперометрии с целью разработки методики его количественного определения в биологических объектах и в продуктах питания.

ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Оборудование, ячейка, электроды и растворы

Оборудование

Экспериментальные исследования в данной работе проводились с использованием универсального вольтамперометрического анализатора АТ (производства ООО «ИТМ», г. Томск, Российская Федерация), вольтамперометрического анализатора TA-Lab (производства ООО НПП «Томьаналит», г. Томск, Российская Федерация) и потенциостата-гальваностата PGSTAT 302N Metrohm-Autolab (производства Metrohm-Autolab, Швейцария), подключенного к персональному компьютеру.

Анализатор АТ предназначен для автоматизированного анализа методом вольтамперометрии различных объектов, в том числе, сыворотки крови человека и животных. Указанное оборудование позволяет применять как постоянно-токовую форму развертки поляризующего напряжения, так и дифференциально-импульсную. В данной работе использовался модифицированный вариант анализатора, имеющий разборную лапку для электродов, позволяющую варьировать объем, форму электрохимической ячейки и количество электродов в ней. Перемешивание раствора осуществлялось при помощи магнитной мешалки.

Анализатор вольтамперометрический TA-Lab предназначен, прежде всего, для высокочувствительных измерений содержания токсичных примесей в питьевых, природных, сточных водах, водных растворах проб почв, пищевых продуктов, продовольственного сырья, биологических объектов и других материалов вольтамперометрическими методами. Ориентирован на удобство проведения измерений в рутинном анализе с применением малого количества реактивов. Также пригоден для применения в исследовательских целях. Указанный анализатор позволяет применять четыре формы развертки поляризующего напряжения: постоянно-токовую, квадратно-волновую, дифференциально-импульсную. Позволяет работать

как в простом, так и дифференциальном режимах. Основными особенностями данного оборудования являются возможность одновременного анализа 3-х разных проб, возможность обработки анализируемых растворов озоном и инертными газами, наличие встроенного источника УФ – излучения, (необходимого для разрушения органических веществ и устранения мешающего влияния O_2), возможность работы как в двух – , так и в трехэлектродном режиме. Чувствительность анализатора составляет $5 \cdot 10^{-11} A$, воспроизводимость аналитических сигналов – 10-15 %. Перемешивание раствора осуществлялось при помощи стабилизированной вибрации рабочего электрода. Данный анализатор включен в Государственный реестр средств измерений РФ, номер в Госреестре 44076-10.

Потенциостат-гальваностат PGSTAT 302N Metrohm-Autolab предназначен для изучения электрохимических процессов, в том числе, коррозионных. Имеется возможность проведения импедансных спектроскопических исследований. Данный анализатор имеет максимальное выходное напряжение 30 В и диапазон измерения и поддержания тока до 2 А. Данное оборудование позволяет при подключении различных модулей позволяет проводить коррозионные исследования, биоэлектрохимические исследования, исследования аккумуляторных батарей и суперконденсаторов. Имеется возможности работы, как с трехэлектродными, так и с четырехэлектродными системами.

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре Agilent Technology Cary 60 UV-Vis (производства Agilent Technologies, США), подключенном к персональному компьютеру. Данное оборудование позволяет производить измерения в спектральном диапазоне от 190 до 1100 нм, максимальная скорость сканирования составляет 24000 нм/мин. Воспроизводимость длины волны составляет $\pm 0,1$ нм, точность установки длины волны равна $\pm 0,5$ нм. Фотометрический диапазон составляет 3,3 А.

Данное оборудование предназначено как для выполнения рутинного анализа, так и для исследовательских задач.

Флуориметрические измерения проводились с использованием спектрофлуориметра Hitachi F-7000 (производства Hitachi Ltd, Япония). Данное оборудование предназначено для работы в режиме флюоресценции, фосфоресценции и люминесценции. Скорость сканирования составляет 60000 нм/с, минимальный объем образца составляет 0,6 мл. В данном оборудовании наличествует дополнительное приспособление с автоматической блокировкой возбуждения флуоресценции после проведенных измерений, позволяющего предотвратить разложение флуоресцирующего образца. Имеется функция быстрого поиска оптимальных длин волн для возбуждения флуоресценции. В качестве источника излучения в данном оборудовании применяется ксеноновая лампа (150 В).

Подготовка и проверка оборудования проводились, согласно инструкции по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

Контроль рН осуществлялся лабораторный рН-метр-150М (производства РУП «Гомельский завод измерительных приборов», Республика Беларусь), предназначенный для определения активности ионов водорода рН. рН-метр-106М контролируется электродом ЭСКЛ-08М и автоматическим термокомпенсатором ТКА-8М. Электрод ЭСКЛ-08М представляет собой лабораторный комбинированный стеклянный электрод общего назначения со встроенным одноключевым электродом сравнения.

Деоксигенацию раствора проводили посредством барботажа анализируемого раствора газообразным азотом, содержание кислорода в котором составляло не более 0,003%. Подача азота осуществлялась из баллона под давлением посредством силиконового шланга со съемным наконечником.

Для взвешивания точной навески стандартных веществ (в том числе, ферментов) использовались лабораторные аналитические весы общего назначения ВЛ-210 (производства «Госметр», Россия), погрешность взвешивания которых составляет ± 0.0002 г, а также весы порционные A&D HL-400 (производства AND, Япония) и весы аналитические Shimadzu AUW-D120D (производства Shimadzu, Япония).

Получение дистиллированной воды производилось с использованием установки водоподготовки «Аквадистиллятор ДЭ-4», системы высокой очистки воды I типа Milli-Q Advantage A10 и системы очистки воды Millipore Direct-Q3 UV.

Стаканчики, изготовленные из кварцевого стекла, применялись в качестве электрохимической ячейки. Максимальная вместимость такой ячейки составляет 20 см^3 . При работе ячейка, в зависимости от используемого анализатора, устанавливалась на платформу магнитной мешалки, либо помещалась в гнездо анализатора.

В работе использовалась следующая мерная лабораторная стеклянная посуда: цилиндры вместимостью 10.0 и 20.0 см^3 , также колбы наливные, объемом 50 см^3 .

Добавки исследуемых объектов (сыворотка крови) делали при помощи одноканальных механических дозаторов типа Biohit Proline 8088809 с объемом дозирования $100-1000$ мкл (производства Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Финляндия), «Колор» ВК44759 с объемом дозирования $20-200$ мкл (производства «Ленпипет», Россия), ThermoScientific BP59599 с объемом дозирования $1-10$ мкл (производства «Ленпипет», Россия) с дискретностью установки доз 1.0 мкл и точностью отбора $\pm 0,4$ мкл, $\pm 0,14$ мкл и $\pm 0,09$ мкл, соответственно. Для каждой новой пробы сыворотки крови или продукта питания использовали сменный наконечник дозатора.

Значительную роль в данной работе играла чистота посуды. Сменные стаканчики из кварцевого стекла отмывали этиловым спиртом, а затем концентрированной азотной кислотой. Проверка чистоты производилась

вольтамперометрически, для чего в начале серии опытов проводился «холостой» опыт в фоновом электролите. По отсутствию пиков на вольтамперограммах как в катодной, так и в анодной областях развертки делался вывод о чистоте посуды и фонового электролита.

Электроды и электрохимические ячейки

В данной работе для экспериментальных исследований применялась электрохимическая ячейка, содержащая индикаторный (рабочий) электрод, электроды сравнения и вспомогательный.

Схема установки, использованной для проведения анализа, представлена на рисунке 2.1.1.

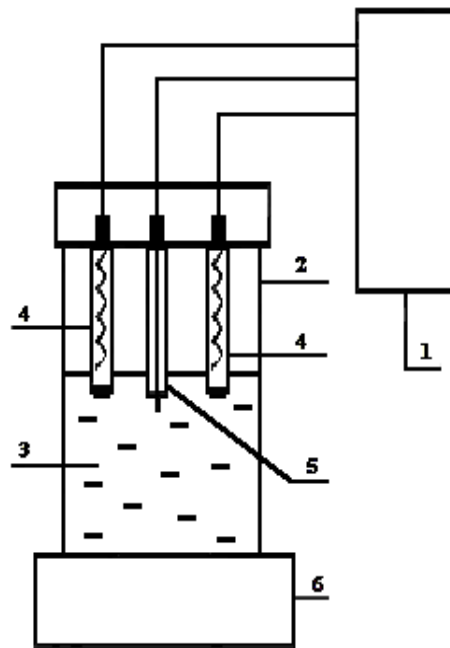


Рисунок 2.1.1 – Схема экспериментальной установки:

1 – анализатор вольтамперометрический (АТ, ТА-Lab) или потенциостат-гальваностат Autolab Metrohm; 2 – электрохимическая ячейка; 3 – электролит; 4 – хлорсеребряные электроды; 5 – рабочий (индикаторный) электрод; 6 – магнитная мешалка.

Электрохимическая ячейка представляла собой сменный стаканчик из кварцевого стекла объемом 20 см³, устанавливаемый на платформу магнитной мешалки, либо помещаемый в соответствующее гнездо анализатора.

В работе в качестве индикаторных электродов использовались: модифицированный графитовый электрод (биосенсор) с длиной графитового стержня 10 мм и диаметром 3 мм и химически модифицированные (ХМЭ) стеклоуглеродные (с длиной стержня 0,8 мм и диаметром 1 мм, площадь поверхности равна $0,075 \text{ см}^2$) и углеродсодержащие электроды с обновляемой поверхностью (площадь поверхности составляет $0,060 \text{ см}^2$).

Приготовление ферментного электрода осуществлялось путем иммобилизации на поверхности графитовой подложки ферментов для чего поверхность подложки предварительно зачищалась фильтровальной бумагой. Затем подготавливался раствор смеси холестерол окидазы и пероксидазы хрена, в который после приготовления помещали электрод. После чего, электрод с иммобилизованными ферментами тщательно просушивали в течение 36 часов при комнатной температуре. После каждой съемки индикаторный электрод тщательно промывали раствором гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) с содержанием соли $0,025 \text{ моль/дм}^3$. Затем поверхность электрода просушивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Процедуру нанесения ферментативной пленки повторяли при потере индикаторным электродом активности (отсутствие пика электровосстановления перекиси). Для чего предварительно удаляли с поверхности подложки предыдущий слой иммобилизованных ферментов выдерживанием поверхности электрода в этиловом спирте в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем тщательно промывали поверхность графитового стержня раствором гидрофосфата натрия с содержанием соли $0,025 \text{ моль/кг}$. После чего, высушивали в течение 4 часов при комнатной температуре и атмосферном давлении. Хранение электрода осуществляли при температуре 4°C в растворе гидрофосфата натрия.

Также в качестве подложки в ряде экспериментов применялся стеклоуглеродный электрод (СУЭ). Подготовка поверхности и иммобилизация ферментов на поверхности СУЭ проводилась аналогично графитовому электроду.

Изготовление ХМЭ производилось следующим образом. После тщательной полировки фильтровальной бумагой, выдерживании в этиловом спирте (с целью удаления ПАВ) и предварительной поляризации материал электрода промывался раствором фонового электролита и высушивался на воздухе при комнатной температуре в течение 30 минут. После чего помещался в насыщенный водный (молярная концентрация составляла 1 моль/дм³) раствор 2,6-диацетил- 2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновой кислоты (ДАГУДФК) и выдерживался в растворе при комнатной температуре не менее 1 часа, после чего тщательно высушивался в лиофильном шкафу в течение 30 мин.

Также применялся электрохимический способ модификации углеродной поверхности путем поляризации в течение 5 мин рабочего электрода в насыщенном водном растворе ДАГУДФК. После чего электрод вынимался и высушивался в лиофильном шкафу в течение 30 мин. О наличии модификатора на поверхности судили по изменению окраски его поверхности (с темно-серой на светло-серую) и потере поверхностью блеска.

В случае применения в качестве подложки для модификатора углеродсодержащего электрода (представляет собой полиэтиленовый корпус, заполненный электропроводящей смесью термостабилизированного полиэтилена высокого давления и технического углерода марки N220 в соотношении 30% масс. углерода и 70% масс. полиэтилена), после потери электродом активности проводилось обновление поверхности, посредством снятия резакром верхнего слоя. После чего, проводилась предварительная поляризация электрода в фоновом электролите, его отмывка и последующая сушка. Затем проводилась модификация, как описано ранее.

Стеклоуглеродные рабочие электроды (СУЭ) представляют собой стеклографитовые стержни в полиэтиленовом корпусе. Для их изготовления стержни запрессовывают в инертную полиэтиленовую (реже фторопластовую) трубку.

Композитные углеродсодержащие электроды с обновляемой поверхностью представляют собой смесь технического углерода (30%) и полиэтилена высокого давления (70%), запрессованную методом холодного прессования в полиэтиленовый корпус.

В качестве электрода сравнения, а также вспомогательного электрода в данной работе применялись хлоридсеребряные электроды (ХСЭ), представляющие собой полые цилиндры, заполненные насыщенным раствором хлорида калия (KCl), с опущенной в него серебряной проволокой, покрытой труднорастворимой солью хлорида серебра. Вновь приготовленные ХСЭ предварительно выдерживались в течение 8 часов в насыщенном растворе KCl (молярная концентрация составляла 1 моль/дм^3) с целью установления равновесного значения потенциала. Готовые электроды хранились в насыщенном растворе KCl и ополаскивались перед проведением эксперимента дистиллированной водой.

Приготовление фоновых и исследуемых растворов

Работа с ферментами накладывает определенные требования на чистоту реактивов и растворов. Вода, применявшаяся в работе, либо подвергалась очищению двойной перегонкой в кварцевом аппарате в присутствии перманганат калия (KMnO_4) с целью удаления поверхностно активных веществ, либо непосредственно в установках высокой степени очистки, либо с применением установок водоподготовки. Используемый в работе неионогенный детергент дополнительной очистке не подвергался. Для приготовления водного фонового раствора с заданным значением pH применялся либо набор стандарт-титров для pH-метрии, предназначенный для приготовления буферных растворов 2-го и 3-го разрядов, либо набор готовых буферных растворов для исследования влияния pH среды на сигнал (производства Panreac, Испания). Помимо этого для исследования влияния водородного показателя среды применялась универсальная буферная смесь

Бриттона-Робинсона, рН которой измерялся перед экспериментом потенциометрическим титрованием.

Фоновый раствор приготавливался растворением содержимого ампулы дистиллированной водой в колбе на 1000.0 см³. Растворы стандартных веществ и ферментов приготавливали растворением навесок соответствующих веществ, взвешенных с погрешностью не более 0.0002г, в воде и в неионогенном растворителе Triton X-100. Более низкие концентрации получали посредством последовательного разбавления этих растворов. Раствор ферментов приготавливался один раз в два месяца и хранился при температуре не более 4°С. Раствор ДАГУДФК (синтезированной на базе КарГУ имени Букетова) приготавливался один раз в месяц и хранился при комнатной температуре. Растворы стандартных веществ и фонового электролита приготавливались дважды в месяц. Все используемые растворы хранились в стеклянной, кварцевой посуде или посуде из темного стекла с притертыми пробками.

В качестве стандартных веществ применялись:

- холестерин (С8667-25G, содержание чистого вещества $\geq 99\%$ производства Sigma Aldrich, Германия);
- перекись водорода H₂O₂ (216763, раствор водный с содержанием чистого вещества 30% производства Sigma Aldrich, Германия);
- β-ситостерол (A540.1, содержание чистого вещества $\geq 80\%$ производства Carl Roth, Германия);
- глюкоза (D) безводная (HN06.4, содержание чистого вещества $\geq 99,5\%$ производства Sigma Aldrich, Германия Carl Roth, Германия);
- мочевая кислота (4999.2, содержание чистого вещества $\geq 99\%$ производства Carl Roth, Германия);
- молочная кислота (8360.3, содержание чистого вещества $\geq 98\%$ производства Carl Roth, Германия);

- аскорбиновая кислота (3525.3, содержание чистого вещества $\geq 99\%$ производства Sigma Aldrich, Германия);
- альбумин бычий сывороточный (A7030, содержание чистого вещества $\geq 98\%$ производства Sigma Aldrich, Германия);
- лактоза моногидрат (5989-81-1, содержание чистого вещества $\geq 99\%$ производства ЗАО Вектон, Российская Федерация);
- янтарная кислота (110-15-6, содержание чистого вещества $\geq 99\%$ производства ЗАО Вектон, Российская Федерация);
- лимонная кислота (77-92-9, содержание чистого вещества $\geq 99,5\%$ производства ЗАО Вектон, Российская Федерация);
- тиамин гидрохлорид (витамин B₁) (67-03-8, содержание чистого вещества $\geq 99,5\%$ производства Шаньдун Шэнлу Фармасьютикал Ко., Лтд, Китай);
- пиридоксин (витамин B₆) (65-23-6, содержание чистого вещества $\geq 96,5\%$ производства Шаньдун Шэнлу Фармасьютикал Ко., Лтд, Китай);
- цианокобаламин (витамин B₁₂) (68-19-9, содержание чистого вещества $\geq 96,5\%$ производства Шаньдун Шэнлу Фармасьютикал Ко., Лтд, Китай);
- калия хлорид (7447-40-7, содержание чистого вещества $\geq 99,5\%$ производства ОАО «Уралкалий», Российская Федерация).

Для приготовления раствора ферментов, подвергавшихся иммобилизации использовались лиофилизированные порошки:

- холестерол оксидазы из *Streptomyces* sp. (C8649, активность фермента ≥ 20 Ед/мг, производства Sigma Aldrich, Германия);
- холестерол эстеразы из *Pseudomonas* sp. (C1403, активность фермента ≥ 200 Ед/мг, производства Sigma Aldrich, Германия);
- пероксидазы, полученной хрена, тип VI (P8375, активность фермента ≥ 250 Ед/мг, производства Sigma Aldrich, Германия).

2.2. Объекты исследования

В данной работе, как индивидуальные вещества применялись следующие реагенты: холестерин, пероксид водорода, холестерол оксидаза, холестерол эстераза, пероксидаза хрена, 2,6-диацетил-2,4,6,8-тетраазобицикло[3.3.0.]октан-3,7-дион-дифосфоновая кислота (ДАГУДФК).

Одним из объектов исследования являлись образцы сыворотки крови пациентов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт психического здоровья» (г. Томск, Российская Федерация) и Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт кардиологии» (г. Томск, Российская Федерация).

Приготовление образцов сыворотки крови осуществлялось на базе соответствующего лечебного учреждения следующим образом. Проводился забор образцов крови, после чего они помещались в центрифужную стеклянную пробирку. В течение 30 минут при комнатной температуре осуществлялось отстаивание. Индикатором окончания данной операции служило образование сгустка. На следующем этапе производилось открытие пробирки. Затем проводили отделение столбика сгустка от стенок пробирки посредством осторожного проведения по окружности пробирки в верхнем слое крови по внутренним стенкам стеклянной палочкой или тонким запаянным капилляром пипетки Пастера. Сыворотку сливали в новую центрифужную пробирку, придерживая стеклянной палочкой сгусток. После чего пробирки подвергали центрифугированию в лабораторной центрифуге в течение 10 минут. Скорость вращения составляла 2000 об/мин. Затем производился отбор сыворотки в пробирки типа Эппендорф и тщательная маркировка образцов. Отбираемый для последующих исследований объем центрифугата составлял 1,0-1,5 мл.

Также в качестве объектов исследования использовались образцы продуктов питания (масло сливочное, молоко, яйца куриные, сливки с долей

жира 10%, кисломолочные продукты), полученные из общедоступных коммерческих источников. Для подготовки образцов проводили предварительную тепловую обработку с целью расплавления (в случае твердых продуктов), последующую гомогенизацию путем тщательного перемешивания стеклянной палочкой. При анализе желтков куриных яиц проводили предварительное механическое отделение белка. После гомогенизации осуществлялась жидкостная экстракция изопропанолом. Для чего в пробирку типа Эппендорф объемом 14 мл вносили 4 мл исследуемого гомогенизата. После чего добавляли 4 мл изопропилового спирта и центрифугировали при 18°C со скоростью 4000 об/мин в течение 30 минут. Затем из каждой пробирки дозатором проводили отбор 2 мл супернатанта в чистые пробирки типа Эппендорф соответствующего объема. Полученные растворы в смеси с неионогенным детергентом Triton X-100 использовались для анализа.

2.3.Методика эксперимента

2.3. 1 Вольтамперометрическая методика определения холестерина на поверхности электрода с иммобилизованными ферментами

Методика получения вольтамперных зависимостей катодного тока электровосстановления пероксида водорода (ЭВ H_2O_2) холестерина не отличалась от принятой в вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала.

В электрохимическую ячейку помещался раствор фонового электролита (объем варьировался от 5 до 10 см^3). В качестве фонового электролита выступал фосфатный буфер (раствор, приготовленный из фиксанала) с $\text{pH}=6.86$. Трехэлектродная ячейка состояла из индикаторного ГЭ с модифицированной поверхностью, ХСЭ применялись в качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода. Электроды помещались в раствор фонового электролита, затем осуществлялось подключение к анализатору. Использовался режим катодной вольтамперометрии с линейной разверткой

потенциала. Скорость развертки потенциала $v = 30$ мВ/с, рабочий диапазон потенциалов от 0.0 до -1.8 В, время перемешивания раствора составляло 10 сек, время успокоения – 20 сек. Затем проводили съемку волны катодного восстановления перекиси, образующейся при окислении холестерина, содержащегося в образце сыворотки крови или продукта питания, в означенной области потенциалов. Съемка вольтамперограммы повторялась не менее пяти раз. С целью исключения влияния других веществ на сигнал применяли холестерол оксидазу, селективно катализирующую реакцию окисления холестерина кислородом. Строгое выдерживание времени перемешивания и успокоения раствора позволяло значительно уменьшить ошибку эксперимента.

Известно, что на электрохимический сигнал перекиси водорода оказывает влияние аскорбиновая кислота: при добавлении в ячейку аскорбиновой кислоты происходит падение пика электровосстановления перекиси водорода. Однако благодаря применению ферментов, обладающих специфичностью действия, удалось минимизировать мешающее влияние указанного аналита на результат исследования.

Содержание холестерина в образцах определялось согласно следующей методике: снимались вольтамперограммы тока ЭВ H_2O_2 в отсутствие исследуемого вещества (фоновая кривая), как указано выше. Отсутствие посторонних пиков говорило о чистоте фонового раствора. Затем в ячейку добавлялась проба исследуемого образца и проводилась съемка катодной вольтамперограммы ЭВ H_2O_2 при тех же условиях. Повтор съемки проводили не менее 5 раз. После чего, в ячейку вносилась проба стандартного вещества (холестерин) с известной концентрацией (известного объема) и повторно снималась вольтамперограмма при тех же условиях. Измерения также повторялись не менее 5 раз. Увеличение пика перекиси при внесении в ячейку стандартного вещества показывало наличие селективно окисляемого холестерина в образце.

2.3.2 Вольтамперометрическая методика определения холестерина на поверхности модифицированного электрода

Методика получения вольтамперных зависимостей анодного тока электроокисления (ЭО) холестерина также не отличалась от традиционно принятой в вольтамперометрии с линейной и ступенчатой разверткой потенциала.

При регистрации анодных токов электроокисления холестерина в электрохимическую ячейку вносили раствор фонового электролита (объем варьировался от 5 до 10 см³). В качестве фонового электролита также выступал фосфатный буфер. Трехэлектродная ячейка состояла из индикаторного СУЭ или углеродсодержащего электрода с поверхностью, модифицированной ДАГУДФК, электрод сравнения и вспомогательный электрод применялись такие же, как в ранее описанной методике (ХСЭ).

Проводилось размещение электродов в растворе фонового электролита и подключение к анализатору. Использовался режим анодной вольтамперометрии с линейной и со ступенчатой разверткой потенциала, скорость развертки составляла $v = 50 \text{ мВ/с}$. Рабочий диапазон потенциалов составлял от +0.5 до +1.9 В. Для вольтамперометрии со ступенчатой разверткой потенциала шаг развертки составлял 4 мВ, задержка подачи импульса – 45 мс. Время перемешивания раствора в обоих случаях составляло 15 с, время успокоения – 30 с. Далее снималась волна анодного окисления холестерина, содержащегося в образцах. Съемка вольтамперограммы повторялась не менее пяти раз.

Содержание холестерина в образце определялось сходно ранее описанной методике косвенного определения холестерина.

2.3.3 Спектрофотометрическая методика определения холестерина с треххлористым железом

Для спектрофотометрических измерений применялась методика, в основу которой положен метод определения холестерина по реакции Златкиса-Зака.

Предварительно подготавливали окрашивающий агент, состоящий из хлорида железа (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), последовательно растворенного в смеси ледяной уксусной и концентрированной серной кислот.

Исполнение методики разнилось в зависимости от природы образцов.

Так, для образцов сыворотки крови в пробирку типа Эппендорф вносили аликвоту сыворотки, объемом 20 мкл. Затем туда же вносили 2 мл изопропилового спирта. После чего образец центрифугировали при 4°C в течение 15 мин при 2000 об/мин. Затем надосадочную часть собирали дозатором.

Для образцов продуктов питания пробоподготовка проводилась, как описывалось ранее. Однако для образцов с высоким содержанием холестерина проводили дополнительное разбавление полученного супернатанта.

Затем отбирали 50 мкл надосадочной части и вносили в пробирку типа Эппендорф. После чего довели объем до 1 мл изопропиловым спиртом. Затем в кювету вносили 1 мл окрашивающего агента и 1 мл супернатанта, разбавленного изопропанолом. С осторожностью перемешивали. После чего записывали УФ-спектр (в случае спектрофотометрических измерений) или спектр люминесценции (при проведении флуориметрических измерений).

2.3.4 Методика проведения микроскопических исследований поверхности электродов

Изучение морфологии электродных поверхностей проводилось в МИНОЦ «Урановая геология» при кафедре геоэкологии и геохимии ФГАОУ НИ ТПУ на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Hitachi S-3400N.

Образцы исследовались при ускоряющем напряжении 20 кВ, в низком вакууме (6 Па), в режиме обратно-рассеянных электронов.

Для изучения морфологии электродных поверхностей предварительно проводили съемку поверхности в отсутствии модификаторов. Электрод размещался на специальной столике, помещаемом непосредственно в вакуумируемую камеру. После получения снимков на электродную поверхность наносился модификатор, либо иммобилизовались ферменты. После чего вновь проводили съемку поверхности на микроскопе. Затем проводили одну экспериментальную серию на ГЭ или ХМЭ и снова получали снимки поверхности.

2.3.5. Методика проведения ИК-спектроскопических исследований поверхности электродов

Изучение морфологии электродных поверхностей проводилось методом инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопии) с обратным Фурье-преобразованием. Для спектроскопического исследования поверхностей применялся ИК-спектрометр «FTIR Cary 660» (производства Agilent Technologies, США).

Работу с образцами поверхности проводили на приставке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) MIRacle™ Single Reflection Horizontal ATR Accessory (производства Pike technologies, США) с кристаллом селенида цинка (ZnSe). Для определения спектров порошков индивидуальных веществ при помощи ручного пресса проводили таблетирование порошка вещества с бромидом калия (KBr, о.с.ч.). Полученную таблетку помещали в держатель и в соответствующий отсек ИК-спектрометра.

Для подготовки образцов поверхность брали новый углеродсодержащий электрод, с которого срезали специальным резакон поверхность. Толщина полученного образца составляла порядка 1,2 мм. Образец размещали в

приставке НВПО, заранее помещенной в рабочий отсек ИК-спектрометра, и фиксировали держателем. После чего приступали к съемке в диапазоне длин волн от 1000 до 4000 см^{-1} . Ширина щели подбиралась автоматически и составляла 9. Затем проводили нанесение ДАГУДФК на поверхность рабочего электрода. После чего, электрод подвергали сушке в сушильном шкафу в течение 10 часов при температуре 40°C или сушили на воздухе при температуре 25°C в течение 15 часов. Образцы поверхности отделяли от рабочего электрода резакром. Полученные образцы хранили в эксикаторе. ИК-спектроскопию проводили по ранее описанной методике. После чего, модификатор на рабочий наносили повторно. Поверхность электрода просушивали на воздухе при температуре 25°C в течение 30 минут. Затем проводили электрохимические измерения: в ячейку заполненную фоновым электролитом (фосфатный буфер с $\text{pH} = 6,86$) вносили стандартный образец холестерина (концентрация холестерина в ячейке составляла 10 мкмоль/дм^3).

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ОКИСЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА НА ФЕРМЕНТНОМ ЭЛЕКТРОДЕ

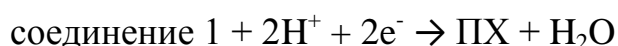
На основании проведенного литературного обзора (глава 1) было выявлено, что в настоящее время наиболее широкое применение для определения холестерина в биологических объектах имеют биосенсоры на основе холестерол оксидазы. Данный метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими традиционными методами и отличается высокой селективностью и чувствительностью. Однако, в литературе мало освещены вопросы физико-химических закономерностей окисления – восстановления холестерина на ферментных электродах. Поэтому первоначально в работе внимание было уделено именно этому методу определения холестерина и исследованию физико-химических закономерностей его окисления – восстановления на ферментных электродах (биосенсорах).

3.1. Влияние различных факторов на аналитический сигнал окисления холестерина на ферментном электроде

Как известно (глава 1), окисление холестерина в присутствии ферментов холестерол оксидазы и пероксидазы хрена протекает по механизму [73]:



(2)



На этой реакции основана работа практически всех известных на данный момент биосенсоров определения холестерина. В данном случае в качестве аналитического сигнала выступает перекись водорода как продукт каталитического ферментативного окисления холестерина.

Для оценки оптимальных условий получения аналитического сигнала холестерина в данном разделе работы было проведено исследование влияния ряда факторов (материала рабочего электрода, природы фонового электролита и рН раствора, а также время и потенциал электролиза, скорости развертки потенциала) на процесс восстановления перекиси водорода, полученной в результате ферментативного окисления холестерина, на композитном углеродсодержащем электроде.

3.1.1. Влияние материала индикаторного электрода на аналитический сигнал окисления холестерина на ферментном электроде

Применение иммобилизованных ферментов для получения сигнала перекиси водорода как продукта ферментативного окисления холестерина, потребовало, прежде всего, подбора материала подложки электрода, поскольку, как указывалось ранее (глава 1), материал подложки способен оказывать существенное влияние на эффективность получения отклика.

В данной работе для изготовления ферментного электрода был использован метод физической адсорбции на материале подложки, как наименее «травматичный» для структуры фермента. В ходе проведения исследования для подбора оптимальных условий определения холестерина в биологических жидкостях человека и продуктах пищевой промышленности применялись два вида материалов индикаторных электродов: СУЭ и ГЭ, на поверхности которых осуществлялась иммобилизация ферментов, путем вымачивания предварительно обработанной поверхности электрода в растворе ферментов.

Приготовление ферментного электрода осуществлялось посредством иммобилизации на поверхности графитовой подложки ферментов. Поверхность подложки предварительно зачищалась фильтровальной бумагой. Затем подготавливался раствор смеси холестерол оксидазы и пероксидазы хрена, в который после приготовления помещали электрод.

После чего, электрод с иммобилизованными ферментами тщательно просушивали в течение 36 часов при комнатной температуре.

В качестве вспомогательного электрода и электрода сравнения использовали хлорид-серебрянные электроды. В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор с рН 6,86. В качестве метода исследования применяли ступенчатую вольтамперометрию. Условия съемки: область потенциалов как для СУЭ, так и для ГЭ составила: от $E = + 0.0$ до -1.2 В. На рис. 3.1 представлены вольтамперограммы восстановления перекиси водорода, как продукта ферментативного окисления холестерина на электроде в зависимости от концентрации добавляемого холестерина.

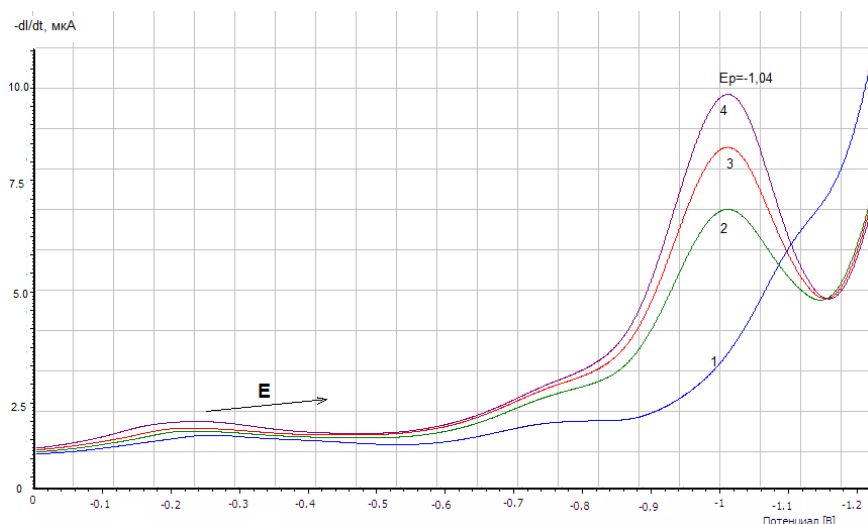


Рисунок 3.1. Вольтамперограммы перекиси водорода, как продукта ферментативного окисления холестерина, на ГЭ в фосфатном буфере (рН 6.86) (1) при разных значениях концентрации холестерина в электрохимической ячейке: 3 (2), 6 (3), 18 (4) ммоль/дм³ холестерина. Скорость развертки потенциала $30 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$.

Также в качестве подложки использовался стеклоуглеродный электрод. Однако полученный аналитический сигнал в данном случае имел невоспроизводимый характер (рис.3.2.). Это может быть объяснено недостаточной эффективностью поверхности подложки (СУ) для иммобилизации ферментов.

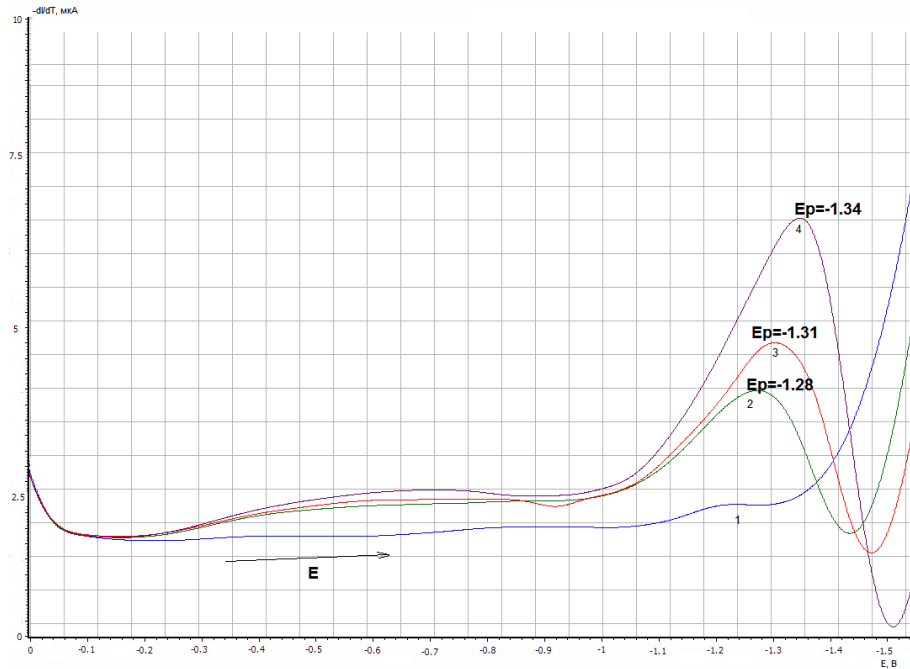


Рисунок 3.2. Вольтамперограммы перекиси водорода, как продукта ферментативного окисления холестерина, на СУЭ в фосфатном буфере (рН 6.86) (1) при разных значениях концентрации холестерина в электрохимической ячейке: 3 (2), 6 (3), 18 (4) ммоль/дм³ холестерина. Скорость развертки потенциала 30 мВ·с⁻¹

3.1.2 Влияние природы фонового электролита на аналитический сигнал

Для исследования влияния природы фонового электролита на аналитический сигнал холестерина были выбраны водные и апротонные среды.

Для исследования электрохимических свойств холестерина в водных средах использовали фосфатный буферный раствор с рН 6,86. В качестве индикаторного электрода использовался ГЭ с иммобилизованными на поверхности ферментами, в качестве электрода сравнения и вспомогательного – хлорсеребряные. Как было показано ранее, в данных условиях получены устойчивые и воспроизводимые аналитические сигналы холестерина (рис. 3.1).

Для исследования электрохимического поведения холестерина в апротонных средах использовался безводный ацетонитрил. В качестве фонового электролита выступала соль перхлората натрия NaClO₄ (0.1 М раствор),

индикаторный электрод – ГЭ (с иммобилизованными ферментами), в качестве электрода сравнения и вспомогательного использовались ХСЭ и платиновый, соответственно. В результате работы получили циклическую вольтамперограмму холестерина в безводном ацетонитриле на ГЭ (рис. 3.2). Наблюдается сдвиг пика окисления в более отрицательную область потенциалов $E_k = -1.34$ В.

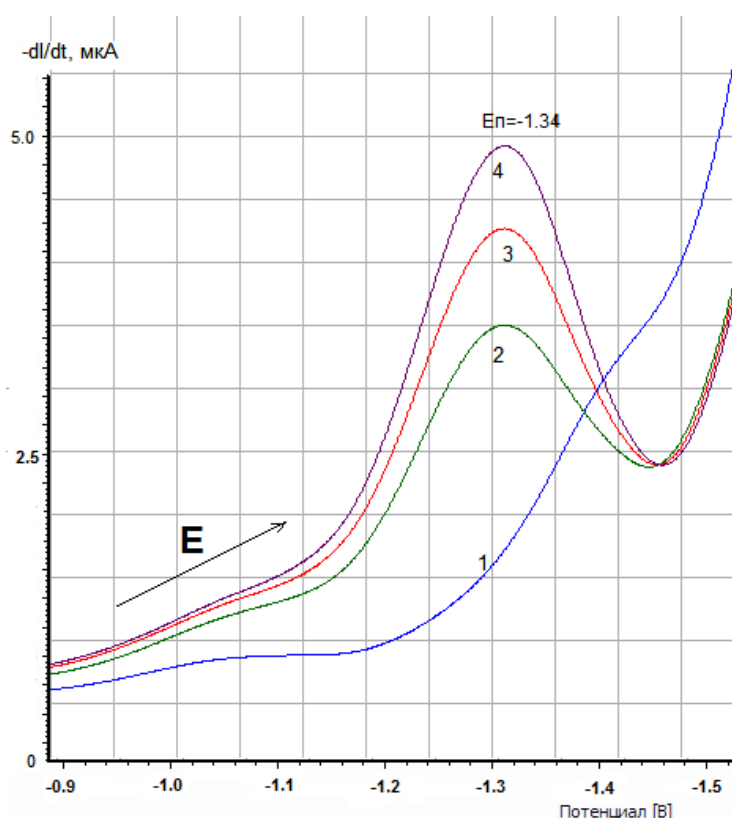


Рисунок 3.3. Вольтамперограммы перекиси водорода, как продукта ферментативного окисления холестерина, на ГЭ в безводном ацетонитриле (1) при разных значениях концентрации холестерина в электрохимической ячейке: 3 (2), 6 (3), 18 (4) ммоль/дм³ холестерина. Скорость развертки потенциала 30 мВ·с⁻¹.

Величина полученного сигнала значительно меньше, чем для сигнала в водных средах. Помимо этого, аналитический сигнал холестерина в апротонных средах отличался нестабильностью. Наблюдалось уменьшение пика восстановления перекиси с течением времени. Предполагается, что перхлорат-ионы, присутствующие в фоновом растворе и являющиеся сильными окислителями, способны оказывать дополнительное окисляющее

воздействие на холестерин. Также, токи электровосстановления холестерина в апротонных средах оказались значительно ниже, чем в водных (рис. 3.4).

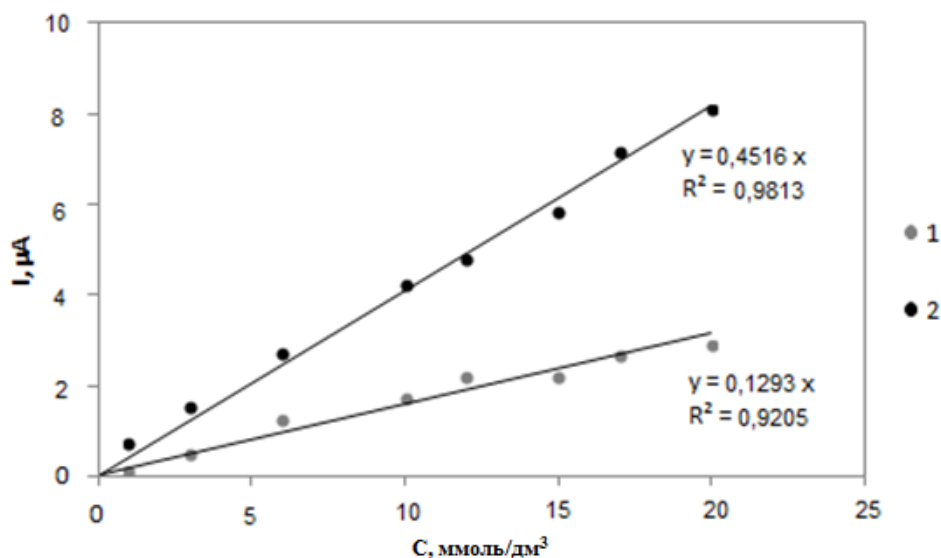


Рисунок 3.4. Зависимость предельного тока окисления от природы фонового электролита (1 – безводный ацетонитрил (0.1 М раствор NaClO_4); 2 – фосфатный буферный раствор pH 6.86).

В связи с вышеизложенным, в качестве фонового электролита для дальнейших экспериментов были выбраны водные среды.

3.1.3. Влияние pH фонового электролита на аналитический сигнал

Для оценки механизма процесса проведено исследование влияния pH фоновых электролитов на процесс окисления холестерина на модифицированном ГЭ.

Для определения оптимального фонового электролита для аналитического определения холестерина готовили фоновые буферные растворы со следующими значениями pH: 5.02, 5.72, 6.37, 6.8, 7.00, 8.36. Эксперимент проводился в условиях постоянноточковой вольтамперометрии. В качестве индикаторного электрода использовали ГЭ с нанесенными на поверхность ферментами.

Влияние pH фонового электролита на электрохимический сигнал восстановления перекиси приведено на рисунках 3.5 А и 3.5 Б.

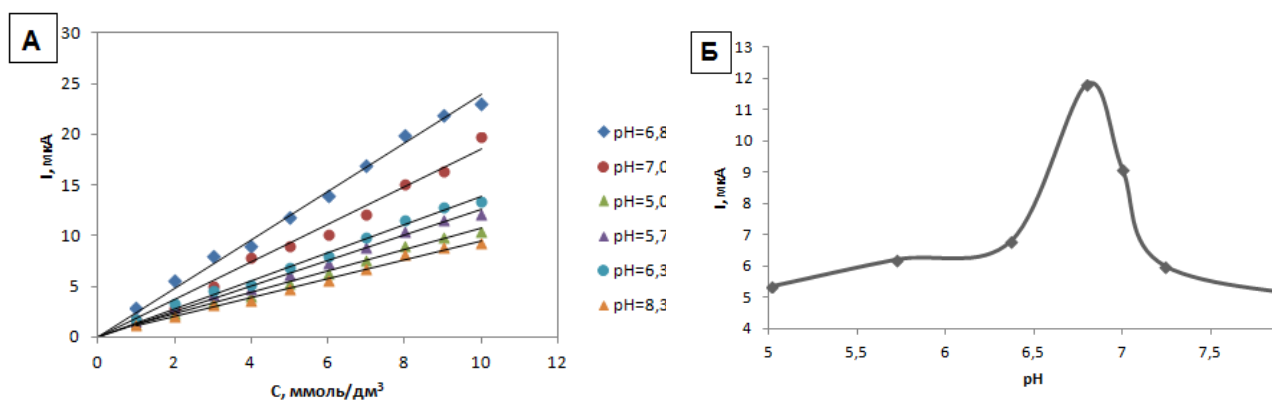
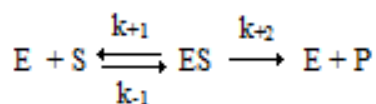


Рисунок 3.5. Исследование влияния рН среды на сигнал электровосстановления перекиси водорода как продукта ферментативного окисления холестерина, на модифицированном ГЭ (фоновый электролит – универсальная буферная смесь Бриттона-Робинсона): **А** – зависимости предельного тока окисления от концентрации холестерина в ячейке при различных рН; **Б** – зависимость предельного тока электровосстановления перекиси от рН (концентрация холестерина в ячейке составляет 10 мкмоль/дм³).

Из рисунка 3.5 Б видно, что значение предельного тока катодного восстановления перекиси водорода как продукта ферментативного окисления холестерина растет в интервале значений рН от 5.0 до 6.80. В точке, соответствующей значению водородного показателя между 6.80 и 7.0, значение тока электровосстановления перекиси проходит максимум своего значения. Подобное поведение характерно для ферментативных систем, используемых для модификации ГЭ в данной работе. Таким образом, в качестве фонового электролита был выбран фосфатный буфер, приготовляемый из стандарт-титра, с рН = 6.86

3.1.4 Расчет кинетических параметров ферментативной реакции

Кинетическая схема простейшей односторонней ферментативной реакции превращения одного субстрата в продукт можно представить следующим образом:



(3.1)

Ферментативная реакция протекает в два этапа. На первом этапе происходит образование фермент-субстратного комплекса ES (комплекса Михаэлиса). Этот этап является быстрым и обратимым, он характеризуется неизменностью структуры субстрата. В образовании фермент-субстратного комплекса принимают участие нековалентные взаимодействия.

Каталитический процесс осуществляется на втором этапе реакции с константой первого порядка k_{+2} (k_{cat} , число оборотов фермента). Комплекс Михаэлиса распадается с образованием конечного продукта реакции (P) и регенерацией исходного фермента.



Рисунок 3.3 – Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Скорость ферментативной реакции определяется в целом концентрацией фермент-субстратного комплекса и при малых концентрациях субстрата концентрация комплекса Михаэлиса пропорциональна $[S]$, тогда как при избытке субстрата фактически весь фермент находится в форме ES. Дальнейшее повышение концентрации субстрата не приводит к увеличению $[ES]$.

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]_0}{K_m + [S]_0}. \quad (3.2),$$

где V_{\max} – максимальная скорость ферментативной реакции, K_m – кажущаяся константа Михаэлиса-Ментен, $[S]_0$ – концентрация субстрата, v_0 – скорость ферментативной реакции.

Уравнение (3.2) является фундаментальным уравнением ферментативной кинетики и называется уравнением Михаэлиса-Ментен. Кинетика большинства ферментативных реакций может быть формально описана при указанном уравнении, а кажущаяся константа Михаэлиса.

Скорость реакции приближается к максимальной достаточно медленно, и даже при $[S] = 10K_m$, величина скорости достигает только $0,91 V_{max}$. В связи с этим значение максимальной скорости очень часто трудно измеримо и его приходится рассчитывать из скоростей, наблюдаемых при концентрациях субстрата ниже насыщающих.

Кажущаяся константа Михаэлиса (K_m) представляет собой кинетический параметр ферментативных реакций. Численное значение K_m равняется концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной скорости реакции. Данная константа является параметром, характеризующим сродство фермента к субстрату. Как правило, высокое значение константы соответствует более слабому взаимодействию (связыванию) между ферментом и субстратом [126; 127; 128].

Зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата представляет собой фрагмент ветви гиперболы. Зависимость $[S]_0$ от V может быть использована для определения концентрации субстрата методом градуировочного графика. Таким образом, кажущаяся константа Михаэлиса K_m может использоваться для оценки верхней границы диапазона определяемых концентраций.

Отношение V_{max} к K_m характеризует коэффициент чувствительности отдельного биосенсора в условиях эксперимента. С точностью до концентрации фермента отношение V_m/K_m равно константе специфичности, мере частоты и эффективности образования фермент-субстратного комплекса.

Для расчета K_m может применяться формула 3.3.

$$i = \frac{I*[S]}{K_m+[S]} \quad (3.3)$$

где K_M – кажущаяся константа Михаэлиса-Ментен, I – максимальное значение тока, $[S]$ – концентрация перекиси

В данной работе полученные результаты не могут быть аппроксимированы гиперболической зависимостью, в связи с чем, для расчетов потребовалось применить линеаризацию полученных данных.

Существуют различные методы линеаризации для определения K_M :

- 1) метод Лайнуивера-Берка (метод двойных обратных величин);
- 2) метод Хайнса-Вульфа;
- 3) метод Иди-Хофсти;
- 4) метод Эйзенталя и Кониш-Боудена (графический метод).

В данной работе в качестве метода расчета был выбран метод линеаризации по Лайнуиверу-Берку, благодаря простоте исполнения и высокой точности.

На рисунке 3.4 показаны полученные данные в координатах Лайнуивера-Берка.

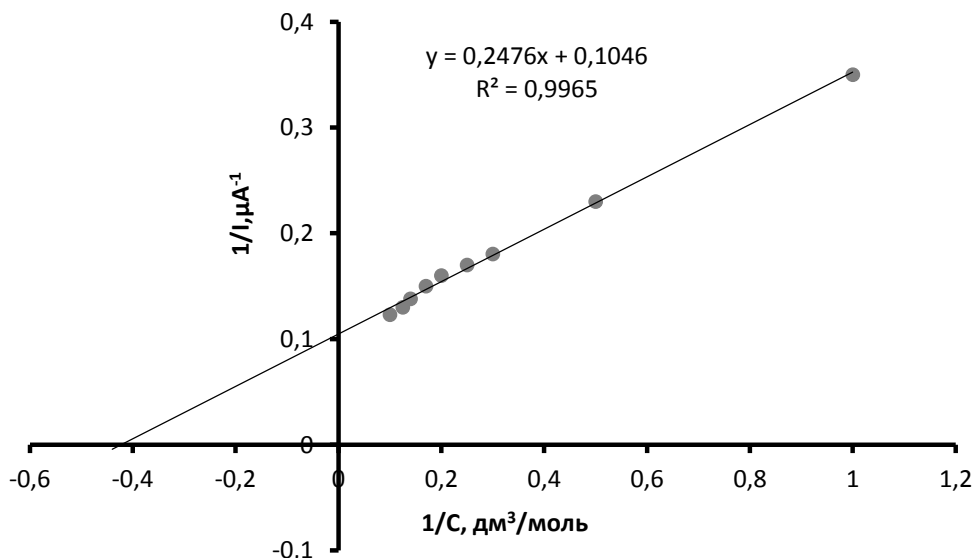


Рисунок 3.4 Зависимость обратного значения тока перекиси водорода как продукта ферментативного окисления холестерина от обратного значения его концентрации в растворе для расчета константы Михаэлиса-Ментен по методу Лайнуивера-Берка

Таким образом, расчетное значение константы Михаэлиса-Ментен составило 2,38 ммоль, что значительно выше K_M , полученной с применением берлинской лазури (0,76 ммоль) [83], что, вероятно, обусловлено стерическими затруднениями расположения фермента на подложке.

3.1.5 Влияние компонентов матрицы пробы на аналитический сигнал электровосстановления перекиси водорода как продукта ферментативного окисления холестерина

Работа с биологическими жидкостями человека и продуктами пищевой промышленности отличается сложностью органической матрицы. Это объясняется тем, что матрица данных объектов состоит из веществ, обладающих различной природой.

В диссертации проводилось исследование влияния на сигнал электровосстановления пероксида водорода различных соединений, являющихся электрохимически активными и содержащимися в указанных объектах. Концентрацию изучаемых веществ выбирали, согласно содержанию этих веществ в биологических жидкостях человека и пищевых продуктах. Полученные результаты представлены в таблице 3.1

Показано, что наиболее заметное влияние на получаемый отклик оказывают аскорбиновая кислота (приводит к снижению тока на 12,3%), витамин В₆ (приводит к уменьшению значений тока электровосстановления пероксида водорода на %) и витамин В₁ (приводит к снижению значений тока электровосстановления перекиси на 14,8 %), а также глюкоза (введение компонента в ячейку приводит к повышению аналитического сигнала на 9,9%)

Таблица 3.1 – Влияние веществ различной природы на аналитический сигнал электровосстановления перекиси на модифицированном ферментами графитовом электроде ($n=6$, $P=0.95$, $t_{\text{табл}}=2,57$)

Исследуемое вещество	Соотношение концентрации исследуемого вещества к концентрации холестерина (г/дм^3 : г/дм^3)	Ток электровосстановления H_2O_2 , I , мкА		$t_{\text{эксп}}$
		До введения исследуемого вещества в раствор	После введения исследуемого вещества в раствор	
Аскорбиновая кислота	1:1	8.1 ± 0.6	$7,1 \pm 0.9$	2,45
Мочевая кислота	1:3		$8,0 \pm 0.4$	2,34
Молочная кислота	1:25		8.2 ± 0.6	2,47
Глюкоза	1:2		8.8 ± 0.7	2,08
Витамин В ₁	1:1		$9,3 \pm 0.7$	2,14
Витамин В ₆	1:2		8.9 ± 0.5	2,38
Витамин В ₁₂	1:1,5		7.1 ± 0.5	2,29
Пировиноградная кислота	0,1:1		7.9 ± 0.5	2,21
Янтарная кислота	0,1:1		8.2 ± 0.3	2,15
Лимонная кислота	0,1:1		8.0 ± 0.5	2,18
Альбумин бычий сывороточный	10:1		$8,3 \pm 0.1$	2,24

Влияние аскорбиновой кислоты обусловлено тем, что данный компонент пробы является сильным восстановителем. Таким образом, аскорбиновая кислота приводит к восстановлению до воды пероксида водорода, образующегося в ходе ферментативной реакции.

Также показано существенное влияние витаминов группы В. Поскольку оба витамина (и тиамин, и пиридоксин) имеют в своей структуре два

подвижных иона водорода (в аминогруппе) и, как следствие, относятся к восстановителям. Таким образом, тиамин и пиридоксин также, как и аскорбиновая кислота, способны восстанавливать до воды пероксид водорода, образующийся в ходе ферментативной реакции.

В свою очередь введение в ячейку глюкозы приводит к существенному повышению получаемого аналитического сигнала. Подобное поведение аналитического сигнала можно связать с протеканием побочной реакции окисления глюкозы и дополнительным выделением перекиси водорода в результате данной реакции.

Остальные введенные в ячейку компоненты существенного влияния на сигнал электровосстановления пероксида водорода не оказали (изменения значений токов не более 3%).

3.2 Исследование морфологии электродной поверхности

Для более точного описания механизма протекающих на электроде процессов потребовалось проведение исследования морфологии электродной поверхности. Исследования проводились с применением сканирующего электронного микроскопа и вольтамперометрического анализатора.

Первый образец представляет собой поверхность чистого графического электрода, применявшегося в качестве рабочего, до нанесения ферментов. На поверхности образца наблюдается выборочная микропористость (рис. 3.6 А). Размер пор не превышает 20 мкм. На поверхности наблюдается небольшое загрязнение посторонней фазой, имеющей вид глобулярных частиц. Предположительно, данная фаза представляет собой частицы соли, входящей в состав фонового электролита. На вольтамперометрической кривой пиков не наблюдается.

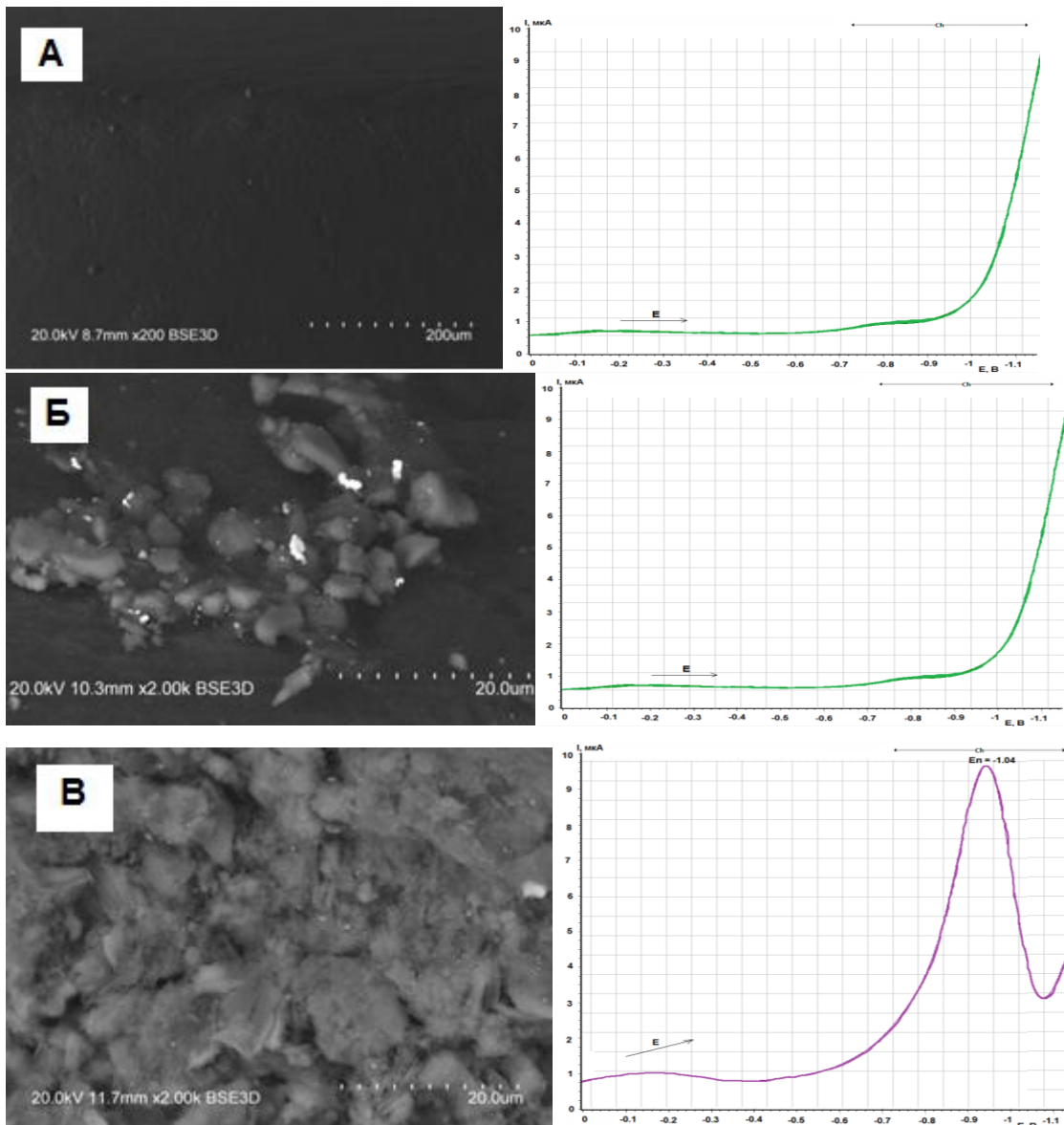


Рисунок 3.6 – Изучение морфологии поверхности ферментного электрода при помощи микроскопии и вольтамперометрии: А - поверхность графитового электрода без модификатора; Б – поверхность электрода после иммобилизации ферментов; В - поверхность графитового электрода после модификации (иммобилизации ферментов) и внесения пробы холестерина в ячейку.

Второй образец представляет собой поверхность ГЭ после иммобилизации ферментов. На микроскопическом снимке наблюдаются агрегаты фермента на поверхности электрода, размером порядка 30 мкм, закрывающие микропоры графита. Агрегаты имеют форму плохо ограниченных тетраэдрических кристаллов, напоминающих крупные чешуйки. Также наблюдаются участки с вкраплениями более тяжелой фазы размером

15-20 мкм, обладающих более высокой атомной массой (рис. 3.5 Б). Предположительно, эта фаза соответствует железосодержащему гемму ПХ.

Третий образец представляет собой поверхность ГЭ с иммобилизованными ферментами после однократного введения холестерина в ячейку (концентрация холестерина в ячейке составила 10 мкмоль/дм^3). На микроскопическом снимке (рис. 3.6 В) наблюдаются слоистые агрегаты неправильной формы, состоящие из двух фаз с более высокой атомной массой, чем углерод, из которого состоит подложка. Помимо этого, наблюдаемые агрегаты обладают более высокой атомной массой, чем агрегаты, находившиеся на поверхности второго образца, что доказывает факт протекания химической реакции на поверхности ГЭ. На вольтамперометрической кривой наблюдается пик при потенциале -1.04 , что соответствует ранее полученному перекисному отклику.

Поскольку получаемый отклик электровосстановления перекиси водорода как продукта ферментативного окисления холестерина, отличается относительно низкой стабильностью, его применение в качестве аналитического сигнала сильно осложнено. В связи с чем, было принято решение о необходимости поиска иных модификаторов электродной поверхности для прямого определения холестерина в объектах.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА НА ХМЭ

Большая часть соединений, имеющих сложную органическую природу, не способна к участию в реакциях электрохимического окисления-восстановления в доступной области потенциалов. Также для ряда веществ осуществление электрохимической реакции требует наложения высоких напряжений. Такой аналитический сигнал характеризуется низкой воспроизводимостью и неустойчивостью характеристик. Холестерин не является исключением в данном вопросе, в связи с чем, его прямое вольтамперометрическое определение весьма затруднено. Таким образом, один из подходов к вольтамперометрическому определению данного стерина, состоит в использовании ХМЭ.

Ранее была показана возможность применения гетероциклических соединений в качестве электрокатализаторов для количественного определения витаминов группы В [129]

В данной работе в качестве модификатора применялась 2,6-диацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфовая кислота (ДАГУДФК) [130], относящаяся к азаетероциклическим соединениям гликолурилового ряда.

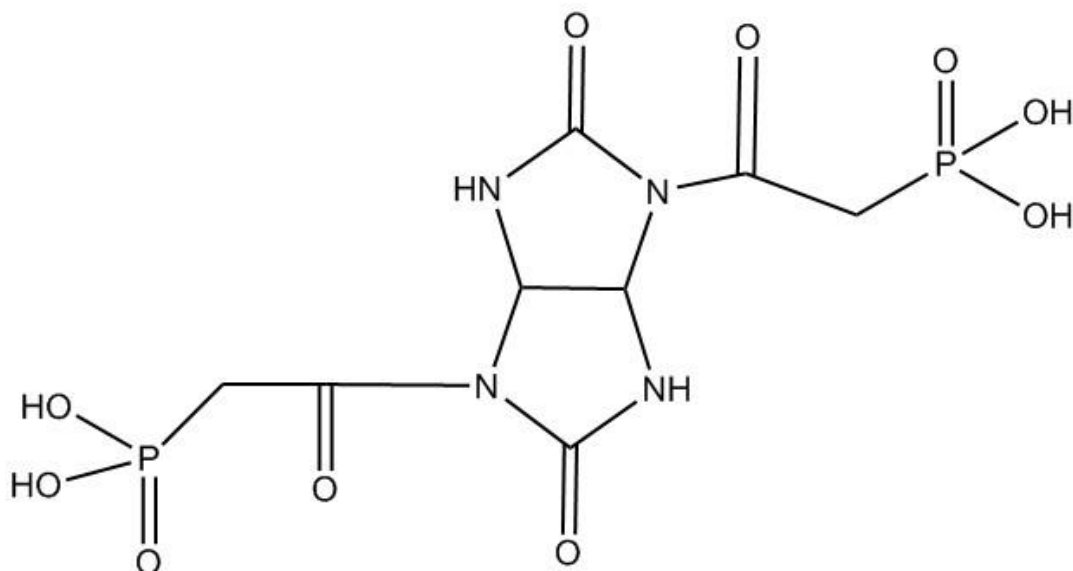


Рисунок 4.1 – Структурная формула модификатора электродной поверхности - 2,6-диацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновой кислоты (ДАГУДФК)

Процедура изготовления ХМЭ состояла из следующих этапов: тщательная очистка электродной поверхности, нанесение модификатора и тщательное высушивание получаемого электрода. В случае использования в качестве подложки СУЭ проводили предварительную полировку электродной поверхности фильтровальной бумагой. Затем удаляли ПАВ, посредством выдерживания в этиловом спирте и поляризовали материал электрода, который потом промывали раствором фонового электролита и высушивался на воздухе при комнатной температуре в течение 30 минут. Подготовка КЭ заключалась в обновлении поверхности, посредством снятия резаком верхнего слоя, последующей поляризации электрода в фоновом электролите в диапазоне от -2 до 2В и дальнейшей сушке в течение 30 минут.

После чего, подготовленный электрод помещался в насыщенный водный (молярная концентрация составляла 1 моль/дм³) раствор 2,6-диацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновой кислоты (ДАГУДФК) и выдерживался в растворе при комнатной температуре не менее 1 часа, после чего тщательно высушивался в лиофильном шкафу в течение 30 мин.

Также применялся электрохимический способ модификации углеродной поверхности путем поляризации в течение 5 мин подготовленного рабочего электрода в насыщенном водном растворе ДАГУДФК. После чего электрод вынимался и высушивался в лиофильном шкафу в течение 30 мин. О наличии модификатора на поверхности судили по изменению окраски его поверхности (с темно-серой на светло-серую) и потере поверхностью блеска.

4.1. Влияние различных факторов на аналитический сигнал окисления холестерина на ХМЭ

Для оценки оптимальных условий получения аналитического сигнала холестерина в данной работе было проведено исследование влияния на процесс его электрохимического окисления на электроде, модифицированном ДАГУДФК некоторых факторов: материала подложки рабочего электрода, природы фонового электролита и рН раствора, а также время и потенциал электролиза, скорости развертки потенциала.

4.1.1. Влияние материала подложки ХМЭ на аналитический сигнал окисления холестерина

Применение модифицированных рабочих электродов потребовало, прежде всего, подбора материала подложки, поскольку, как указывалось ранее, материал трансдьюсера играет важнейшую роль в эффективности получения отклика. В ходе проведения исследования для подбора оптимальных условий определения холестерина в биологических жидкостях человека и продуктах пищевой промышленности применялись два вида материалов индикаторных электродов: СУЭ и композитные углеродсодержащие электроды с обновляемой поверхностью (КЭ), которые подвергали модификации ДАГУДФК. В качестве вспомогательного

электрода и электрода сравнения использовали хлорид-серебряные электроды. В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор с рН 6,86. В качестве метода исследования применяли циклическую постояннотоковую вольтамперометрию с дифференцированием. Условия съемки: область потенциалов для КЭ от $E = 0.0$ до $+1.4$ В, для СУЭ $E =$ от $+0.5$ до $+1.9$ В.

При исследовании электрохимических свойств холестерина аналитический сигнал на КЭ был получен в области потенциалов $E = 0$ до $+1.4$ В. При этом потенциал окисления холестерина составил $E = +1.06$ В (рис. 4.2).

Относительно существующих и описанных в литературе методов определения холестерина применение КЭ, модифицированного ДАГУДФК имеет ряд существенных преимуществ: простота изготовления модифицированного электрода, дешевизна (в сравнении с биосенсорами, содержащими ферменты), наличие прямого сигнала окисления холестерина (в отличие от электрохимических сенсоров, в основу которых положены функциональные материалы), отсутствие необходимости работы с кислотами (как в спектрофотометрических и флюориметрических методиках), простота очистки электродной поверхности (срезание части поверхности электрода резакон).

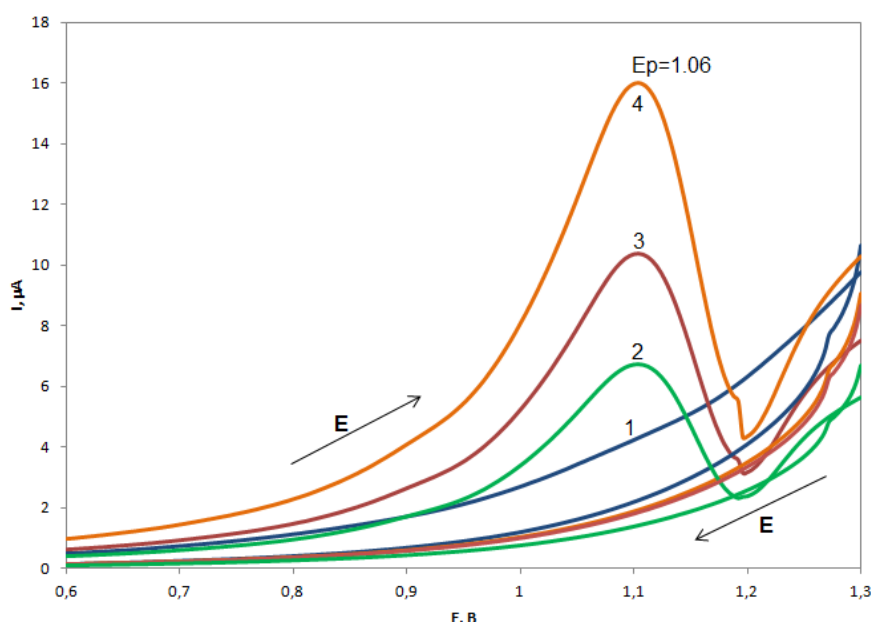


Рисунок 4.2. Циклические вольтамперограммы окисления холестерина на электроде с обновляемой поверхностью (КЭ) в фосфатном буфере (рН 6.86) (1) при разных значениях концентрации холестерина в электрохимической ячейке: 3 (2), 6 (3), 18 (4) $\mu\text{моль}/\text{дм}^3$ холестерина. Скорость развертки потенциала $50 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$.

Также в качестве материала подложки использовали СУЭ. Наличие обновляемой поверхности в таком случае позволяет избежать возможных адсорбционных явлений, за счет обновления электродной поверхности при необходимости. Также возможность обновления поверхности КЭ позволяет продлить время жизни индикаторного электрода. Однако площадь поверхности электрода, по сравнению с СУЭ несколько ниже, в связи с чем, величина получаемого аналитического сигнала ниже. Также при запрессовывании смеси графита и ПВД в трубку могут образовываться различные дефекты поверхности из-за недостаточности давления, что также отрицательно влияет на величину аналитического сигнала. Тем не менее, полученные результаты для СУЭ в качестве подложки отличались несколько меньшей воспроизводимостью, чем для модифицированного электрода с КЭ в качестве подложки.

Таким образом, для дальнейшего определения холестерина и разработки методики его определения в качестве подложки для модификатора был выбран КЭ.

4.1.2 Влияние природы фонового электролита на сигнал электроокисления холестерина на ХМЭ

Для исследования влияния природы фонового электролита на аналитический сигнал холестерина были выбраны водные и апротонные среды.

Для исследования электрохимических свойств холестерина в водных средах использовали фосфатный буферный раствор с рН 6,86. В качестве индикаторного электрода использовался модифицированный КЭ, в качестве электрода сравнения и вспомогательного – хлорсеребряные. Как было показано ранее, в данных условиях получены устойчивые и воспроизводимые аналитические сигналы холестерина (рис. 4.2).

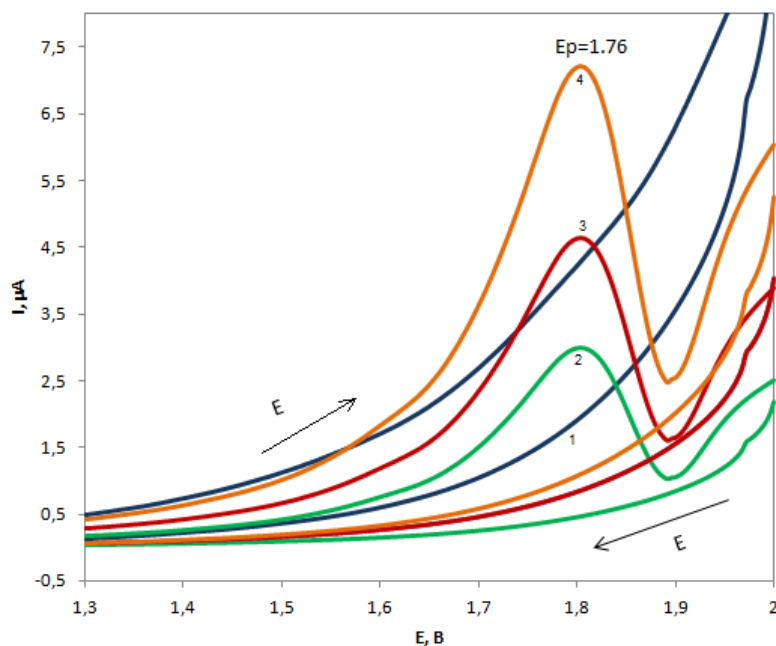


Рисунок 4.3. Циклические вольтамперограммы окисления холестерина на модифицированном КЭ в безводном ацетонитриле (0.1 М NaClO₄) (1) при различных значениях концентрации холестерина в электрохимической ячейке: 3 (2), 6 (3), 18 (4) мкмоль/дм³ холестерина. Скорость развертки потенциала 50 мВ·с⁻¹.

Для исследования электрохимического поведения холестерина в апротонных средах использовался безводный ацетонитрил. В качестве фонового электролита выступала соль перхлората натрия NaClO₄ (0.1 М раствор), индикаторный электрод – КЭ (с нанесенной ДАГУДФК), в качестве

электрода сравнения и вспомогательного использовались ХСЭ и платиновый, соответственно. В результате работы получили циклическую вольтамперограмму холестерина в безводном ацетонитриле на КЭ (рис. 4.3). Наблюдается сдвиг пика окисления в более положительную область потенциалов $E_a = +1.76$ В.

Величина полученного сигнала значительно меньше, чем для сигнала в водных средах. Помимо этого, аналитический сигнал холестерина в апротонных средах отличался нестабильностью. Наблюдалось уменьшение пика окисления холестерина с течением времени. Предполагается, что перхлорат-ионы, присутствующие в фоновом растворе и являющиеся сильными окислителями, способны оказывать окисляющее воздействие на холестерин. Также, токи электроокисления холестерина в апротонных средах оказались значительно ниже, чем в водных (рис. 4.4).

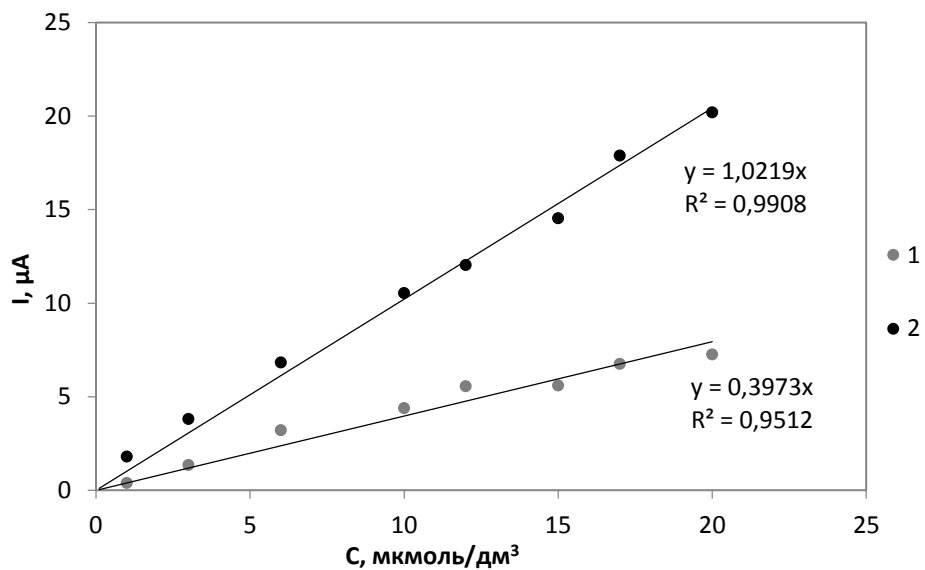


Рисунок 4.4. Зависимость предельного тока окисления от природы фонового электролита (1 – безводный ацетонитрил (0.1 М раствор NaClO_4); 2 – фосфатный буферный раствор pH 6.86).

В связи с вышеизложенным, в качестве фонового электролита для дальнейших экспериментов были выбраны водные среды.

4.1.3. Влияние pH фонового электролита на сигнал окисления холестерина на ХМЭ

С целью установления механизма процесса, проведено изучение влияния pH фоновых электролитов на процесс окисления холестерина на КЭ.

Для определения оптимального фонового электролита для аналитического определения холестерина готовили фоновые буферные растворы со следующими значениями pH: 1.65, 4.01, 9,18, 12,43. Эксперимент проводился в условиях постоянноточковой вольтамперометрии. В качестве индикаторного электрода использовали КЭ.

Влияние pH фонового электролита на электрохимический сигнал окисления-восстановления холестерина приведено на рисунках 4.5 и 4.6.

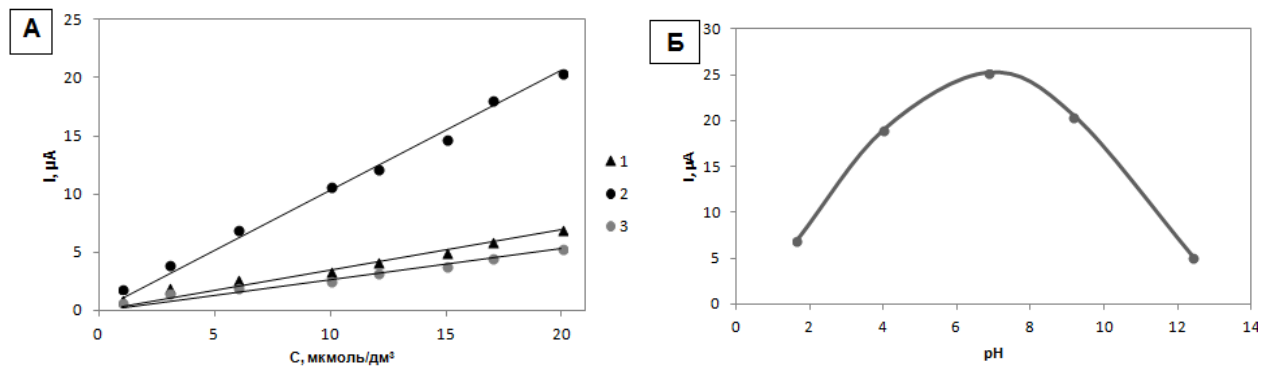


Рисунок 4.5. Исследование влияния pH среды на сигнал электроокисления холестерина на ХМЭ (фоновый электролит – стандарт-титры): **А** – зависимости предельного тока окисления от концентрации холестерина в ячейке (**1** – pH=6.86; **2** – pH=1.56; **3** – pH=12.43); **Б** – зависимость предельного тока электроокисления холестерина от pH (концентрация холестерина в ячейке составляет 10 мкмоль/дм³).

Для приготовления стандарт-титров с различным pH используются различные соли. Например, для приготовления буфера с pH=1.65 применяется тетраоксалат калия 2-водный, для приготовления буфера с pH=4.01 – гидрофталат калия, для приготовления буфера с pH=6.86 – смесь дигидрофосфата калия и гидрофосфата натрия. Таким образом, изменение аналитического сигнала в таком исследовании может быть обусловлено влиянием природы фонового электролита. Для исключения влияния природы

фонового электролита на результаты исследования были проведены измерения с использованием в качестве фонового электролита универсальной буферной смеси Бриттона-Робинсона. Показано, что максимального значения аналитический сигнал достигает при значении рН между 6.8 и 7.0 (рис. 4.5 а и б).

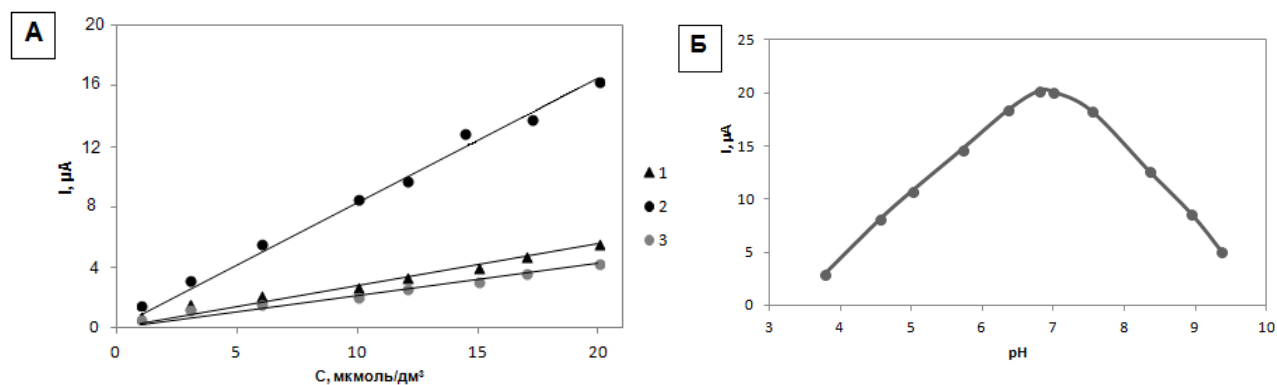


Рисунок 4.6. Исследование влияния рН среды на сигнал электроокисления холестерина на ХМЭ (фоновый электролит – универсальная буферная смесь Бриттона-Робинса): **А** – зависимости предельного тока окисления от концентрации холестерина в ячейке (**1** – рН=6.59; **2** – рН=6.09; **3** – рН=6.80; **4** – рН=7.00); **Б** – зависимость предельного тока электроокисления холестерина от рН(концентрация холестерина в ячейке составляет 10 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$).

Показано, что независимо от природы фонового электролита характер зависимости тока пика не изменяется

Из рисунка 4.6 видно, что значение предельного тока анодного окисления растет в интервале значений рН от 1.65 до 6.86. В точке, соответствующей значению водородного показателя 6.86, ток электроокисления холестерина проходит максимум. Подобное поведение характерно для амфолитов, что соответствует природе применяемого для пробоподготовки неионогенного детергента. Для подтверждения выдвинутого предположения проводилось исследование влияния наличия Triton X-100 в системе на аналитический сигнал. Полученные результаты представлены на рисунке 4.7и рисунке 4.8.

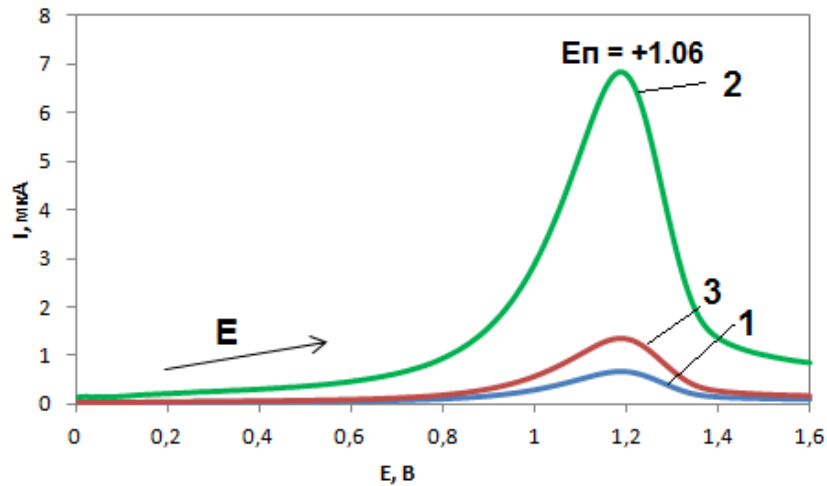


Рисунок 4.7. Зависимость регистрируемого тока окисления холестерина от налагаемого потенциала на ХМЭ при различных рН среды (состав системы: холестерин, Triton X-100, изопропиловый спирт): 1 – рН = 1.65; 2 – рН=6.86; 3 – рН=12.43.

Показано, что наличие пика электроокисления холестерина наблюдается при наличии в системе Triton X-100. В отсутствие означенного детергента наблюдается отсутствие отклика. Данный факт объясняется нахождением модификатора в водной фазе, вследствие его гидрофильности, таким образом в отсутствие детергента, молекула которого содержит в себе как гидрофобную, так и гидрофильную часть, взаимодействие холестерина с модификатором не наблюдается. Кроме того, изопропанол, несмотря на то, что он относится к классу спиртов, не взаимодействует с ДАГУДФК.

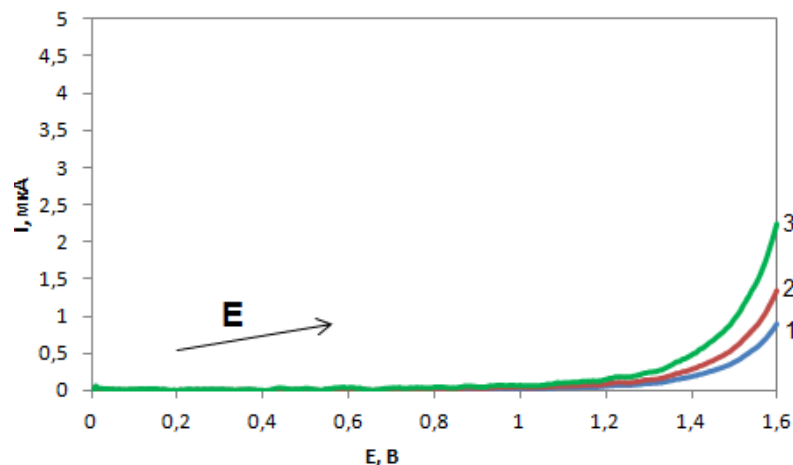


Рисунок 4.8. Зависимость регистрируемого тока окисления холестерина от налагаемого потенциала на ХМЭ при различных составах системы (рН = 6.86, фоновый элеткролит – фосфатный буфер): 1 – холестерин+изопропанол; 2 – холестерин+Triton X-100; 3 – изопропанол+Triton X-100.

Также исследования сходные тем, результаты которых представлены на рисунке 4.6 Б, проводились и при рН среды 1.65, 4.01, 9.18, 12.43. Полученные результаты сходны с полученными при рН среды, равном 6.86. В отсутствие компонента системы (холестерин, Triton X-100, изопропиловый спирт) наблюдается отсутствие пика окисления холестерина, что связано в случае отсутствия изопропилового спирта с недостаточностью разбавления пробы, в случае отсутствия Triton X-100 – с нахождением холестерина и модификатора в разных фазах (водной и неводной).

Таким образом, в качестве оптимального бы выбран рН = 6,86.

4.1.4. Влияние параметров электролиза (время и потенциал электролиза) на сигнал окисления холестерина на ХМЭ

Для разработки методики количественного определения холестерина потребовалось провести подбор условий электролиза на модельном растворе холестерина (время и потенциал электролиза).

Определяющим фактором при разработке вольтамперометрических методик определения является потенциал накопления, который должен способствовать максимально полному выделению исследуемого вещества без мешающего влияния других ионов. При подборе потенциала накопления проводили исследование в области значений от -2 В до 2 В. Показано, что при движении из области более отрицательных потенциалов, ток электроокисления холестерина возрастает, достигает своего максимального значения при значении потенциала -0.6 В. Далее до значения потенциала, равного +2 В существенных изменений значений регистрируемых токов не наблюдается (рис. 4.9). Однако все наблюдаемые изменения сигнала зарегистрированы в пределах 0,12 мкА.

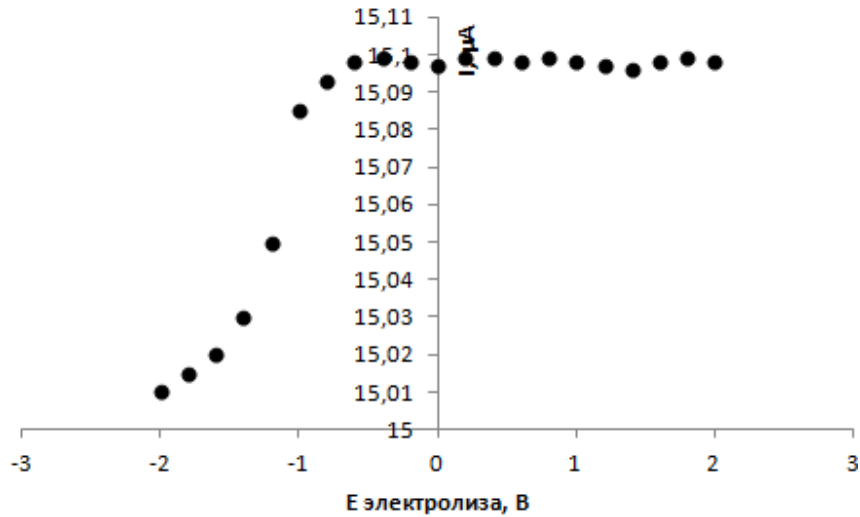


Рисунок 4.9. График зависимости тока окисления холестерина от потенциала накопления в фосфатном буферном растворе на ХМЭ. Концентрация стандартного образца холестерина в электролитической ячейке составляет 10 мкмоль/дм^3 .

Для определения времени электролиза, с целью получения более выраженного сигнала исследовали область значений от 10 до 140 с. Зависимость в области от 10 до 50 секунд носила линейный характер, а в области от 50 до 140 секунд наблюдалось пологое снижение высоты аналитического сигнала, выбор остановили на времени накопления 60 секунд (рис. 4.10). Наблюдаемые изменения сигнала зарегистрированы в пределах $0,2 \text{ мкА}$.

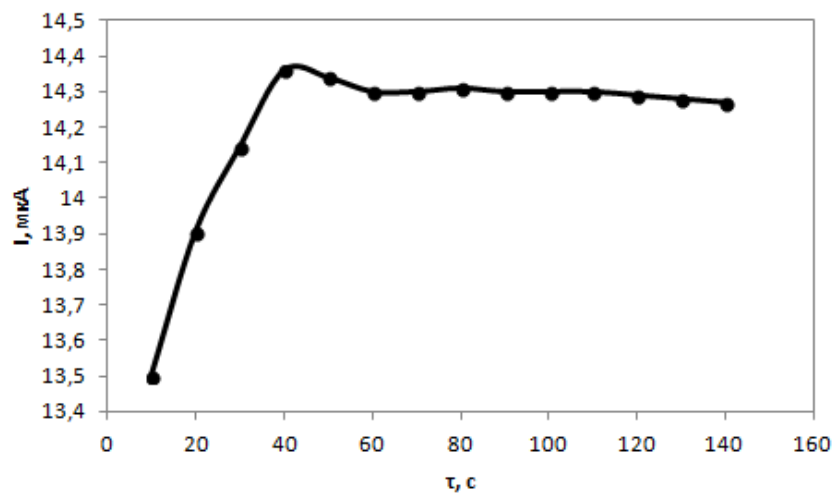


Рисунок 4.10. График зависимости тока окисления холестерина от времени накопления в фосфатном буферном растворе на ХМЭ. Концентрация стандартного образца холестерина в электролитической ячейке составляет 10 мкмоль/дм^3 .

Поскольку изменения токов невысоки в сравнении с величиной сигнала, было принято решение в дальнейшем для разработки методики не использовать этап накопления, что также важно для уменьшения времени анализа.

4.1.5 Влияние компонентов матрицы пробы на аналитический сигнал окисления холестерина на ХМЭ

Как отмечалось ранее, работа с выбранными объектами анализа затруднена в силу сложности органической матрицы. Данный факт обусловлен тем, что матрица указанных объектов состоит из веществ с различной природой. В связи с чем, в рамках данного диссертационного исследования проводилась оценка влияния на сигнал электроокисления холестерина различных соединений, являющихся электрохимически активными и содержащимися в указанных объектах. Концентрацию изучаемых веществ выбирали, согласно содержанию этих веществ в биологических жидкостях человека и пищевых продуктах. Полученные результаты представлены в таблице

Показано, что наиболее заметное влияние на получаемый отклик оказывают аскорбиновая кислота (приводит к снижению тока на 2,2%), Влияние аскорбиновой кислоты обусловлено тем, что данный компонент пробы является кислотой. И, предположительно, может оказывать кислотное воздействие на холестерин, как на жирный спирт. Однако показанное влияние невелико и может быть устранено в ходе пробоподготовки образца.

Введение остальных компонентов в ячейку существенного влияния на сигнал электроокисления холестерина не оказали (изменения значений токов не более 1,2%). Кроме того, установлено, что соединения, содержащие стероидное кольцо (холекальциферол) значимого влияния на получаемый отклик не оказывают.

Таблица 4.1 – Влияние веществ различной природы на аналитический сигнал электроокисления холестерина на ХМЭ, модифицированном ДАГУДФК (n=6, P=0.95, t_{таб} = 2,57)

Исследуемое вещество	Соотношение концентрации исследуемого вещества к концентрации холестерина (г/дм ³ : г/дм ³)	Ток электровосстановления H ₂ O ₂ , I, мкА		t _{эксп}
		До введения исследуемого вещества в раствор	После введения исследуемого вещества в раствор	
Аскорбиновая кислота	1:1	18.3±0.4	17.9±0.2	2,51
Мочевая кислота	1:3		18.1±0.1	2,34
Молочная кислота	1:25		18.5± 0.3	2,23
Глюкоза	1:2		18.1 ± 0.7	1,96
Витамин В ₁	1:1		18,2 ± 0.7	2,01
Витамин В ₆	1:2		18.5 ± 0.5	1,87
Витамин В ₁₂	1:1,5		18.0 ± 0.3	1,94
Пировиноградная кислота	1:10		18.2 ± 0.2	2,29
Янтарная кислота	1:10		18.2 ± 0.3	2,43
Лимонная кислота	1:10		18.4 ± 0.5	2,37
Альбумин бычий сывороточный	10:1		18.1±0.3	2,41
Холекальциферол	1:50		18.2 ± 0.3	2,39
Ретинола ацетат	1:10		18.0± 0.4	2,18
Токоферола ацетат	1:10		18.4±0.2	2,08
Лактоза	1:250		18.2±0.5	1,97

4.2 Расчет параметров электродного процесса

Согласно законам Фарадея, количество вещества (m), выделяющегося или превращающегося на электроде в результате электролиза, пропорционально току (I) и времени (t). И, как следствие, количеству электричества (Q), пропущенному через раствор (первый закон Фарадея). Количество образующегося продукта электролиза находится в прямой зависимости от эквивалентной массы вещества (второй закон Фарадея).

Соответственно,

$$m = \frac{M}{nF} Q = \frac{Mit}{nF}, \quad (4.1.1),$$

где I – зарегистрированный в процессе ток, Q – количество электричества, перенесенного в ходе электрохимического процесса, n – число участвующих в процессе электронов, принимающих участие в электрохимической реакции, t - продолжительность электролиза.

В случае когда количество электричества полностью израсходовано исключительно на осуществление электродного процесса (выход по току равен 100 %), измерение Q может выступать в качестве инструмента качественного и количественного анализа [131, 132]. Так, например, при известных значениях m и Q возможно рассчитать значение M/n , являющееся характеристикой как данного вещества, так и электродной реакции.

Зная значение M и количество вещества в растворе можно провести расчет числа электронов, принимающих участие в электрохимической реакции.

Для выполнения соответствующих расчетов потребовалось предварительно получить график транзientа. Была проведена регистрация зависимости тока (I) окисления холестерина на ХМЭ от времени (t), получив таким образом искомый график. В данном случае площадь интеграла под кривой представляет собой количество электричества.

Для расчета применяли формулу 4.1.2.

$$n = \frac{Q}{\nu F} \quad (4.1.2),$$

где Q – количество перенесенного в ходе электрохимической реакции электричества, n - число участвующих в электрохимическом процессе электронов, ν - количество (концентрация) исходного вещества в растворе электролита.

Процесс идет при постоянном перемешивании и неизменном потенциале ($E=0.9V$), и протекает до нуля по току. На рис. 4.10 показаны зависимости тока окисления холестерина от времени протекания процесса.

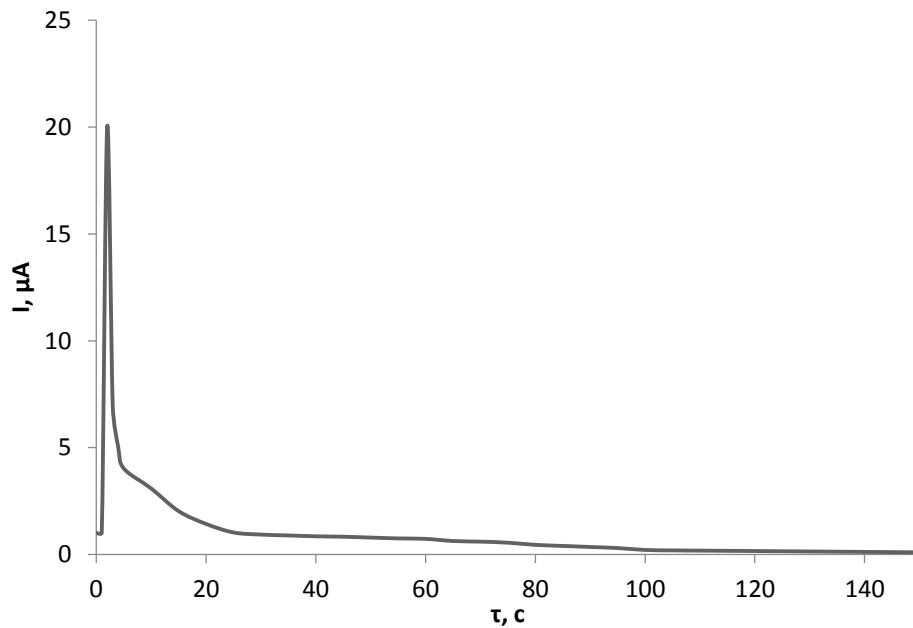


Рисунок 4.11. Зависимость тока от времени для процесса окисления холестерина на ХМЭ. Концентрация холестерина $10 \cdot \mu\text{мол}/\text{дм}^3$

Вольтамперограммы окисления холестерина, до и после электролиза представлена на рис. 4.11. Отсутствие отклика (кривая 2) на вольтамперометрической кривой после электролиза позволяет предполагать, что окисление вещества на электроде в ходе электролиза протекает наиболее полно.

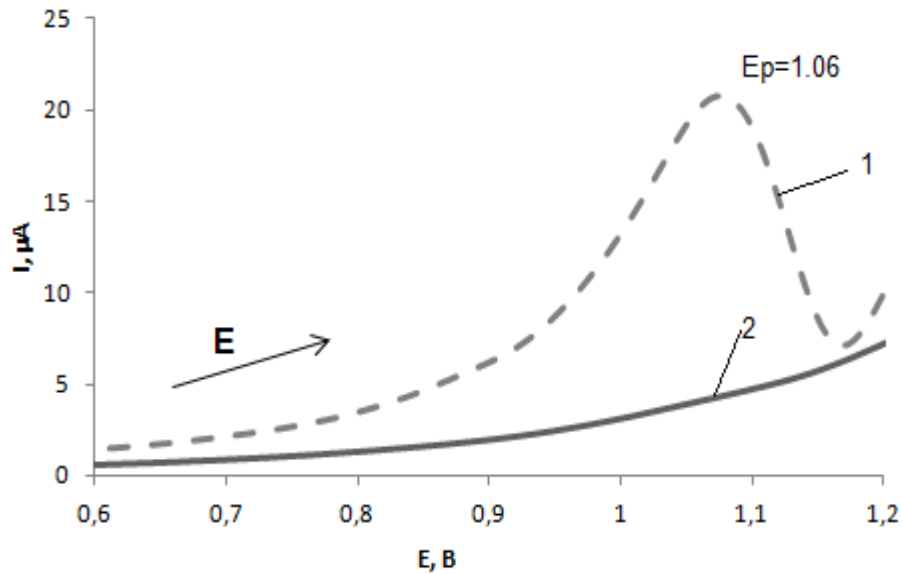


Рисунок 4.12. Вольтамперограмма окисления холестерина, до (кривая 1) и после (кривая 2) электролиза.

После проведения необходимых экспериментов, проведен расчет по формуле 4.1.2. Площадь под кривой составила 560 Кл. Таким образом, расчетное количество электронов равно 1,16. В дальнейших расчетах число электронов было принято равным 1.

4.3 Исследование физико-химических закономерностей протекания реакции окисления холестерина на химически модифицированном электроде

Для описания механизма электроокисления холестерина на ХМЭ в водных нейтральных средах провели исследование обратимости указанного процесса [131]. В вольтамперометрии одним из критериев обратимости процессов является линейная зависимость тока от скорости развертки потенциала в степени $\frac{1}{2}$ ($v^{1/2}$) для обратимых и необратимых процессов, кроме квазиобратимого процесса. Для исследования обратимости электрохимического сигнала восстановления холестерина была снята зависимость тока электроокисления холестерина от $v^{1/2}$ (рис. 4.13, 4.14).

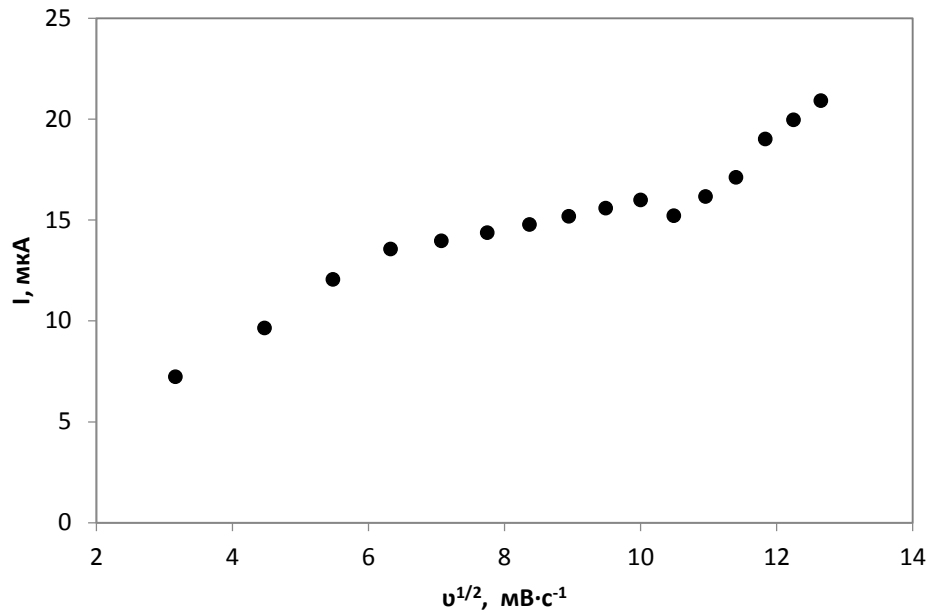


Рисунок 4.13. График зависимости тока окисления холестерина на ХМЭ от скорости развертки потенциала в степени 1/2 в фосфатном буферном растворе. Концентрация холестерина $10 \cdot \text{мкмол/дм}^3$.

Представленная на рисунке 4.7 зависимость $I=f(v)$ носит нелинейный характер, что является одним из признаков квазиобратимости [133] электрохимического сигнала окисления холестерина на ХМЭ. На представленном графике наблюдаются 3 области линейности: от 10 мВ/с до 60 мВ/с, от 60 мВ/с до 110 мВ/с и от 110 мВ/с до 200 мВ/с.

Также нелинейный характер зависимости предельного тока окисления холестерина от скорости развертки служит доказательством отсутствия на рабочем электроде адсорбционных явлений.

В качестве рабочего было предложено значение скорости развертки $50 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$, поскольку при данном значении процесс ведется в первой области и, кроме того, потенциал пика электроокисления холестерина не сильно сдвигается в более положительную область значений.

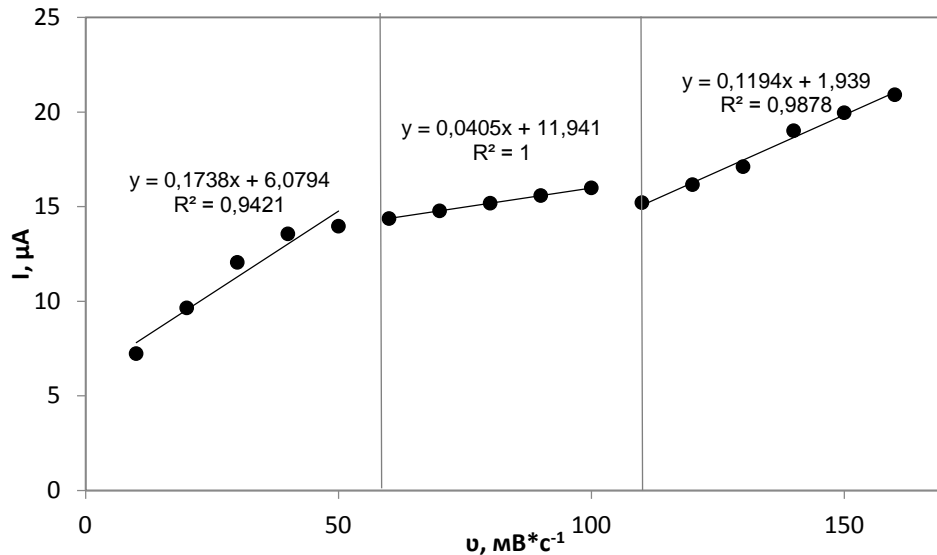


Рисунок 4.14. Зависимость предельного тока окисления холестерина на ХМЭ при разных значениях скорости развертки потенциала. Концентрация холестерина $10 \cdot \text{мкмол/дм}^3$

Характер ранее полученных зависимостей позволяет предполагать, что при окислении холестерина электродный процесс сопровождается наличием последующей химической реакции.

Точное решение для вольтамперометрического процесса с последующей химической реакцией было получено Никольсоном и Шейном [131,134].

Данное решение касается как обратимой, так и необратимой последующей химической реакции. В последующих работах были выявлены и обобщены признаки наличия последующей реакции в электродном процессе:

1. Для квазиобратимых процессов соблюдается линейность зависимости потенциала пика от логарифма $v^{1/2}$;
2. Увеличение концентрации вещества, взаимодействующего с деполяризатором, приводит к сдвигу потенциала в область положительных значений;
3. Увеличение скорости развертки потенциала приводит к сдвигу потенциала пика в область положительных значений.

В данной работе показано, что для процесса электроокисления холестерина на ХМЭ два из указанных критериев соблюдаются. Увеличение

скорости развертки приводит к сдвигу потенциала в более положительную сторону(рис. 4.15).

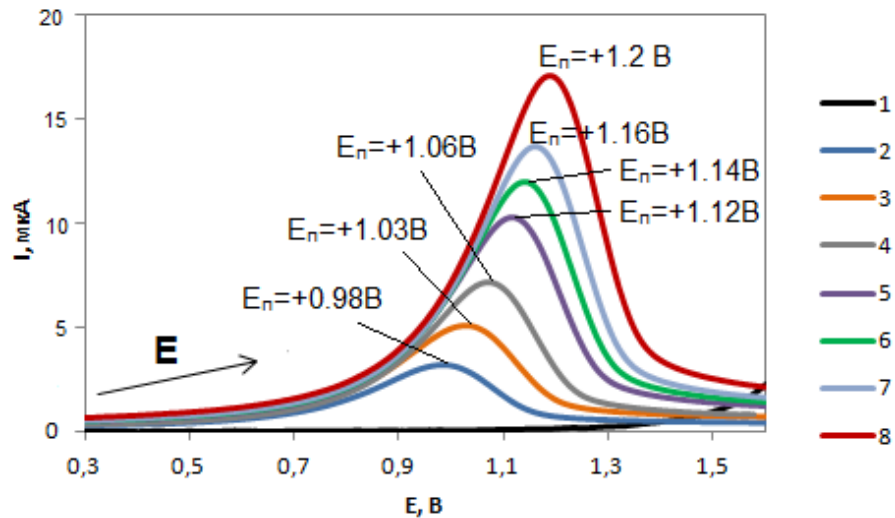


Рисунок 4.15. Исследование влияние скорости развертки на потенциал пика окисления холестерина на ХМЭ холестерина: 1 - $\nu = 20$ мВ/с; 2 - $\nu = 30$ мВ/с; 3 - $\nu = 40$ мВ/с; 4 - $\nu = 50$ мВ/с; 5 - $\nu = 60$ мВ/с; 6 - $\nu = 70$ мВ/с; 7 - $\nu = 80$ мВ/с, 8 - $\nu = 90$ мВ/с . Концентрация холестерина $10 \cdot \text{мкмол/дм}^3$

Однако два других условия реализации механизма ЕС не выполняются. Кроме того, критерий Де-Вриза, свидетельствующий о наличии предшествующей химической реакции и заключающийся в сдвиге потенциала в сторону положительных значений на $60/n$ мВ при изменении $\sqrt{\nu}$ в 10 раз, не выполняется.

На рисунке 4.16 представлена Тафельевская зависимость тока окисления от потенциала. Полученная зависимость носит линейный характер.

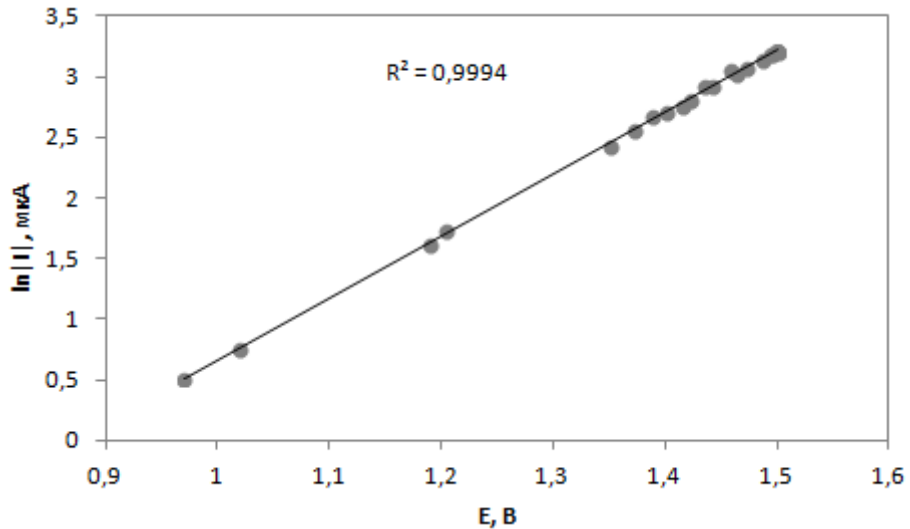


Рисунок 4.16. Зависимость тока окисления от потенциала. Концентрация стандартного образца холестерина в электролитической ячейке составляет 10 мкмоль/дм³. $v = 50$ мВ/с

Согласно, уравнениям Тафеля для процесса окисления, коэффициент переноса (β) прямо пропорционален току окисления и обратно пропорционален потенциалу [131, 132].

$$\beta = \frac{RT}{F} \frac{\partial \ln|I_{\text{окисл}}|}{\partial E} \quad (4.2)$$

Таким образом, наклон полученной зависимости (рис. 4.10) позволяет рассчитать β по уравнению 4.3.

$$\text{Наклон} = \frac{\beta F}{RT} \quad (4.3)$$

Исходя из данных зависимости, представленной на рис. 4.10, рассчитано значение β , составившее 0,5. Известно выражение:

$$\alpha + \beta = 1 \quad (4.4),$$

Откуда $\alpha = 0,5$.

Для расчета коэффициента диффузии воспользуемся уравнением Коттрелла в случае полубесконечной диффузии:

$$I_d = ZSFC_0 \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (4.5),$$

где I_d – величина диффузионного тока, Z – число электронов, S – площадь электродной поверхности, F – число Фарадея, D – коэффициент диффузии, t – время электролиза, C_0 – концентрация электроактивного вещества.

Откуда $D = \frac{I_d}{ZSFC_0} \pi t = 7,94 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2/\text{с}$ (4.6).

Далее проводим расчет константы электрохимической реакции по уравнению для квазиобратимого процесса

$$I = ZFSk_s C_{\text{ок}} D_{\text{ок}}^{1/2} \quad (4.7),$$

где Z – число электронов, S – площадь электродной поверхности, F – число Фарадея, $D_{\text{ок}}$ – коэффициент диффузии, t – время электролиза, $C_{\text{ок}}$ – концентрация электроактивного вещества

Откуда $k_s = 9,65 \text{ с}^{-1}$. Высокое значение константы скорости электрохимической реакции соответствует быстрой кинетике процесса.

Далее проводим расчет коэффициента Матсуда-Аябе (λ) по уравнению 4.8с целью подтверждения первоначальной гипотезы о характере процесса.

$$\lambda = \frac{k_s}{\left(\frac{FDv}{RT}\right)^{1/2}} \quad (4.8)$$

Расчетное значение λ составило 1.2, что соответствует значению параметра для квазиобратимого процесса, согласно данным таблицы, приведенной в [132].

Таблица 4.2– Диапазоны значений коэффициента Матсуда-Аябе для разных случаев обратимости электродного процесса на стационарных макроэлектродах, $T=298\text{K}$, $\alpha=0.5$

Тип процесса	Значение λ
Обратимый	более 15
Необратимый	менее 10^{-3}
Квазиобратимый	от 10^{-3} до 15

Таким образом, электрохимическое окисление холестерина на ХМЭ имеет квазиобратимый характер, осложненный последующей химической реакцией.

4.4 Исследование морфологии электродной поверхности

Для подтверждения механизма процесса, протекающего на электродной поверхности изучали морфологию данной поверхности. Исследования проводились с применением сканирующего электронного микроскопа и вольтамперометрического анализатора.

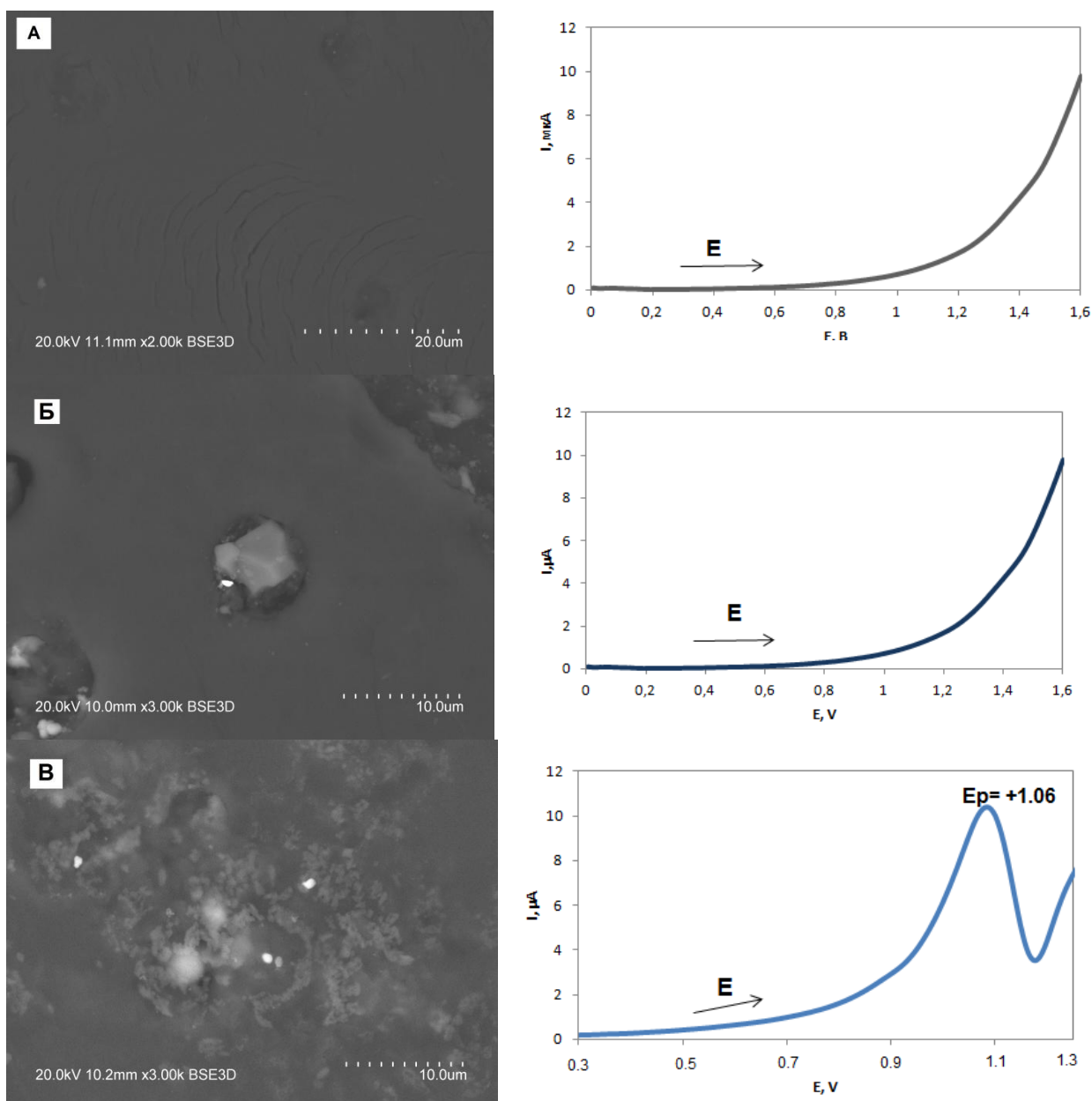


Рисунок 4.13 – Изучение морфологии поверхности ХМЭ при помощи микроскопии и вольтамперометрии: А – КЭ без модификатора; Б – поверхность электрода после нанесения ДАГУДФК; В - поверхность КЭ после модификации и внесения пробы в ячейку

Первый образец представляет собой поверхность чистого КЭ, применявшегося в качестве рабочего, до нанесения ДАГУДФК. На поверхности образца наблюдается выборочная микропористость (рис. 4.13 А). Размер пор не превышает 20 мкм. Также на участке поверхности обнаружена изломоподобная микротрещиноватость. На вольтамперометрической кривой пиков не наблюдается.

Второй образец представляет собой поверхность КЭ после нанесения на поверхность ДАГУДФК. На микроскопическом снимке в порах

наблюдаются как хорошо ограненные кристаллы (куб-октаэдр), так и плохо ограненные аморфные частицы (рис. 4.13 Б). Преимущественно частицы представляют собой кристаллы. Кроме того, частицы модификатора представляют собой более тяжелые фазы (обладающие более высокой атомной массой) по сравнению с углеродом. Также наблюдается чешуйчатая структура углерода.

Третий образец представляет собой поверхность КЭ с нанесенным модификатором после однократного введения холестерина в ячейку (концентрация холестерина в ячейке составила 10 мкмоль/дм^3). На микроскопическом снимке (рис. 4.13 В) наблюдаются пленковидные агрегаты. Неровности поверхности покрыты тонкими частицами, слагающими дендритоподобные агрегаты. Поры также плотно заполнены агломератами тонких частиц. У некоторых наночастиц (размер порядка 20 нм) наблюдается призматическая, таблитчатая огранка. Помимо этого, просматриваются покрытые наночастицами крупные кристаллы с хорошей огранкой, соответствующие частицам модификатора.

Для характеристики поверхности модифицированного электрода проведено электрохимическое исследование поверхности электрода на примере обратимой системы $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Результаты представлены в таблице 4.3.

После нанесения на поверхность модификатора наблюдается снижение токов пиков окисления и восстановления железа в системе, а также сдвиг потенциалов обоих пиков в более электроотрицательную область. Кроме того, разница потенциалов между пиками окисления и восстановления снижается на 0,03 В. Таким образом, можно сделать вывод об эффективности выбранного способа модификации электрода.

Таблица 4.3 – Параметры ЦВА 10 мМ $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ в фосфатном буфере

Тип электрода	Параметры вольтамперограммы	Значения параметра
КЭ	$I_{па}$, мкА	$+0.81 \pm 0.03$
	$I_{пк}$, мкА	-0.63 ± 0.02
	$E_{па}$, В	$+0.35$
	$E_{пк}$, В	$+0.16$
	ΔE_p , В	0.19
ХМЭ	$I_{па}$, мкА	$+0.51 \pm 0.04$
	$I_{пк}$, мкА	-0.42 ± 0.03
	$E_{па}$, В	$+0.24$
	$E_{пк}$, В	$+0.08$
	ΔE_p , В	0.16

Далее было проведено ИК-спектроскопическое исследование электродной поверхности.

Предварительно были записаны ИК-спектры индивидуальных веществ: холестерина (рисунок 4.14) и ДАГУДФК (рисунок 4.15).

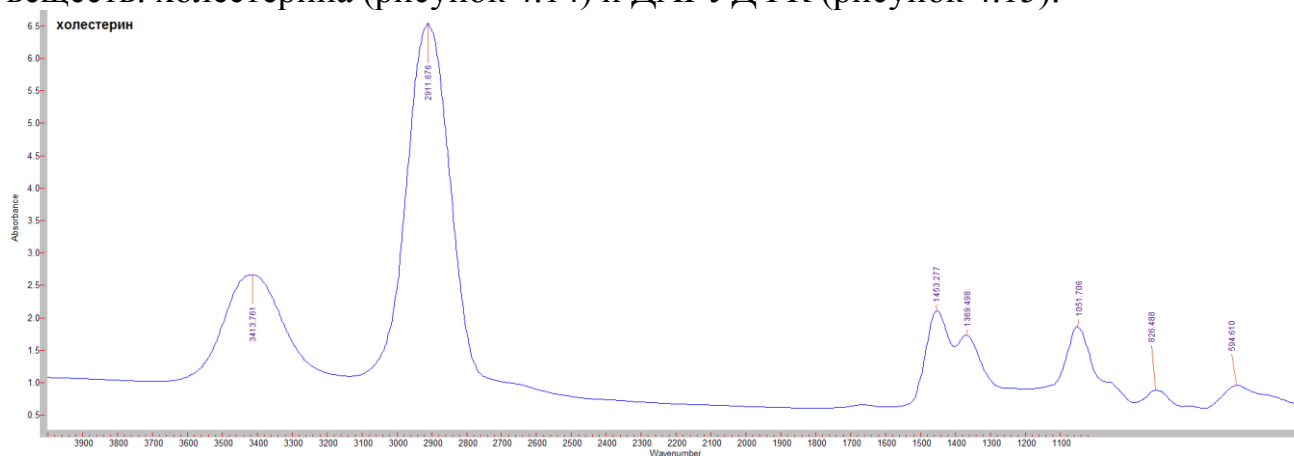


Рисунок 4.14 – ИК-спектр лиофилизированного порошка холестерина (стандарт, производства Sigma Aldrich).

В ИК-спектре стандарта холестерина наблюдаются полосы при 3413.761 см^{-1} и 2911.676 см^{-1} , соответствующие валентным колебаниям связи -О-Н в молекулах жирных одноатомных спиртов, 1051.706 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям связи С-О в sp^3 гибридизационном состоянии, полоса 594.610 см^{-1} соответствует валентным колебаниям связи -С=С- в шестичленном кольце.

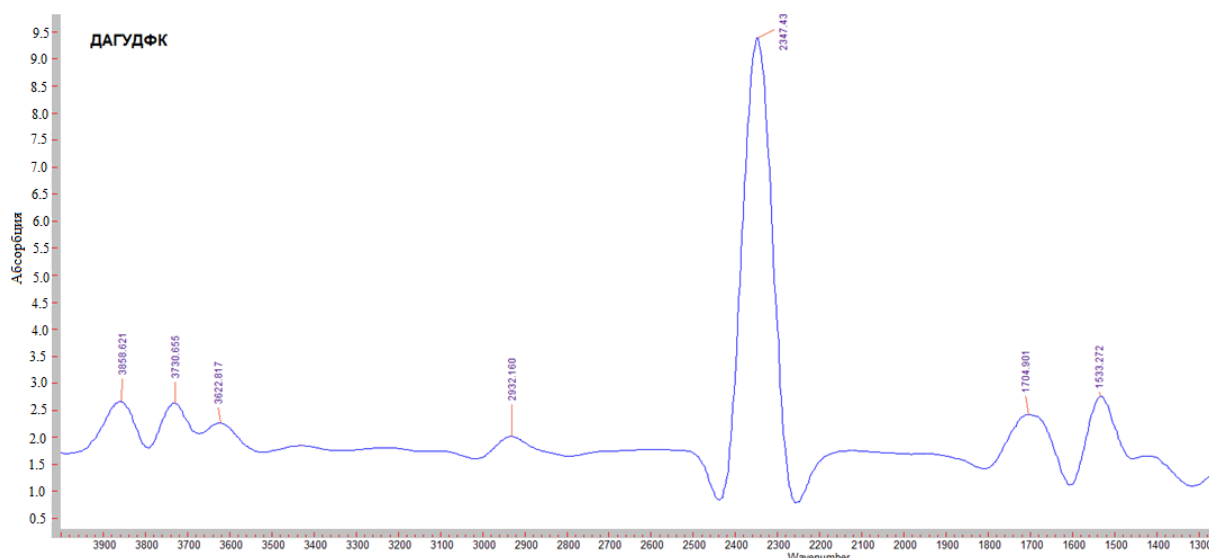


Рисунок 4.15 – ИК-спектр 2,6-диацетил-2,4,6,8-тетраазабикало[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновой кислоты (стандарт, предоставлен кафедрой органической химии и полимеров КарГУ).

В ИК-спектре стандарта ДАГУДФК наблюдаются полоса при 2347.43 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям связей $\text{P}=\text{O}$ в молекулах органических фосфорных кислот, 1533.272 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям связей $\text{C}-\text{C}$ в sp^3 гибридизационном состоянии, полоса 1704.901 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям связей $\text{C}=\text{O}$ в кетонах и подобных им соединениях. Также в указанном спектре наблюдаются при 2992.160 см^{-1} , 3622.817 см^{-1} и 3730.655 см^{-1} , которые можно идентифицировать как валентные колебания одинарных связей $\text{C}-\text{H}$ в sp^3 , sp^2 и sp гибридизационных состояниях. Полоса 3858.621 см^{-1} может быть отнесена к валентным колебаниям связей $\text{C}-\text{N}$ в гликолуриловом кольце ДАГУДФК.

На рисунке 4.16 представлены результаты ИК-спектроскопического исследования электродных поверхностей.

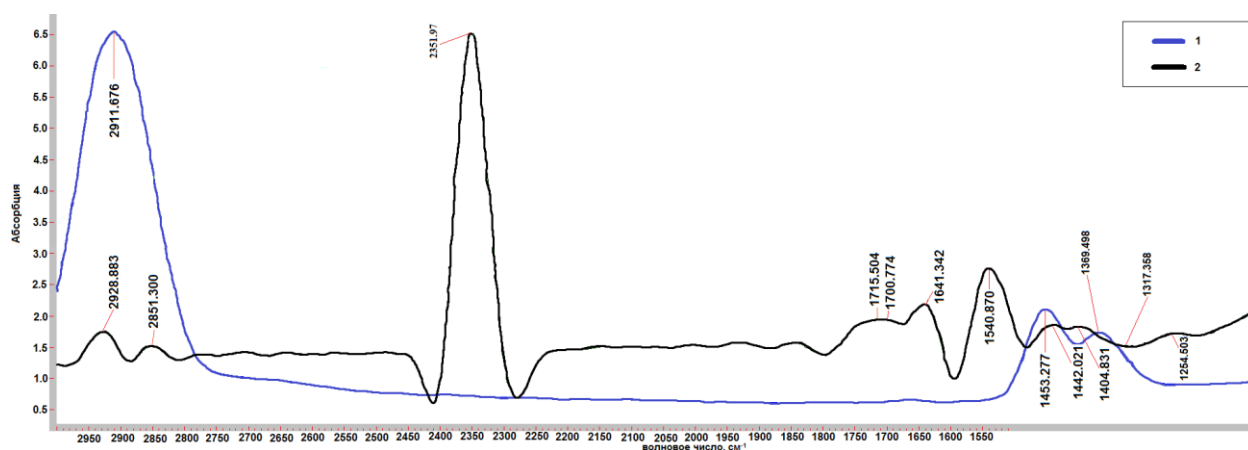


Рисунок 4.16 – ИК-спектроскопическое исследование электродной поверхности: 1 – ИК-спектр поверхности электрода, не подвергавшегося модификации; 2 – ИК-спектр поверхности электрода после модификации ДАГУДФК (поверхность ХМЭ).

В ИК-спектре поверхности КЭ до модификации, наблюдаются 3 полосы поглощения с волновыми числами, равными 1369.498 см^{-1} , 1453.277 см^{-1} и 2911.676 см^{-1} . Данными полосы предположительно соответствуют валентным колебаниям связей С-С, стабилизирующей добавки полиэтилена и связей $-\text{CH}_2-$, соответственно.

После модификации электродной поверхности появляется полоса с волновым числом 1254.503 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям связи $\text{P}=\text{O}$ в фосфорорганических кислотах и полоса с волновым числом 2351.970 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям связей в фосфорных кислотах. Также наблюдается полоса поглощения с волновым числом 1317.358 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям С- N связей в третичных аминах, что соотносится с предположением о возможной ковалентной пришивке модификатора (ДАГУДФК) к углероду подложки. Также наличествуют полосы 1700.774 см^{-1} и 2851.300 см^{-1} , соответствующие связям $\text{C}=\text{O}$, что позволяет говорить о сохранении структуры ацетильного остатка неизменной.

Согласно литературным данным [135], холестерин имеет 4 центра, по которым может происходить его электроокисление. К таким центрам относятся гидроксигруппа в положении С3, двойная связь между атомами

углерода C5-C6, аллильный центр при атоме углерода C7 и третичный атом углерода в боковой цепи (положение C25).

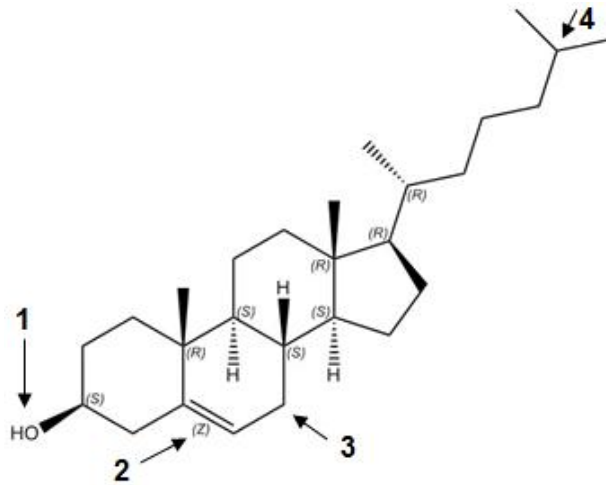


Рисунок 4.18 – Схема окисления холестерина (1,2,3,4 – обозначения центров электроокисления холестерина)

Таким образом, согласно ранее полученным данным и схеме последующей химической реакции, предполагаемый механизм электроокисления имеет вид, представленный на рисунке 4.19.

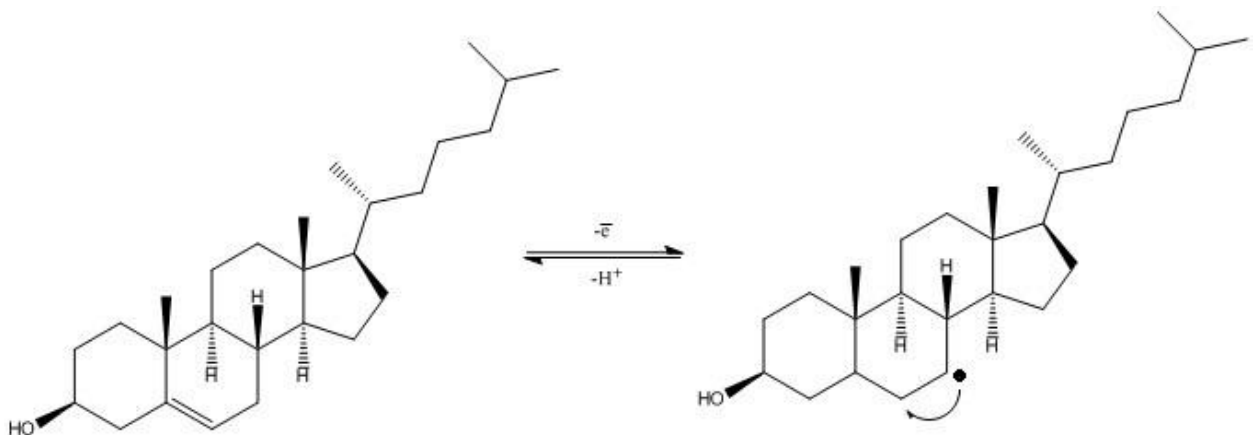


Рисунок 4.19 – Схема механизма электроокисления холестерина на ХМЭ

ГЛАВА 5. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА В ПРОДУКЦИИ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ НА ХМЭ

Глава 5.1. Разработка вольтамперометрической методики определения содержания холестерина в продукции пищевой промышленности и биологических объектах

В последние годы электроаналитические методы переживают бурное развитие в качестве новых методов анализа соединений органической природы, обладающих биологической активностью. Этот факт обусловлен наличием ряда неоспоримых преимуществ у электрохимических методов анализа, к ним следует отнести: высокую чувствительность, простоту исполнения, экспрессность и возможность минитюаризации. Последний пункт особенно важен для разработки тест-систем. Таким образом, означенная группа методов с успехом применяется в количественном анализе биологически активных веществ, обладающих органической природой.

Полученный пик электроокисления холестерина в модельных растворах на ХМЭ (КЭ, модифицированном ДАГУДФК) может применяться в качестве аналитического сигнала для разработки методики количественного определения холестерина в БАД и косметических препаратах методом вольтамперометрии.

Для разработки указанной методики в качестве аналитического сигнала был использован сигнал электроокисления холестерина при $E = +1.06$ В, в диапазоне линейности зависимости тока электроокисления холестерина от его концентрации. Эта область соответствует диапазону концентраций от 0.1 до $50 \cdot \text{мкмоль/дм}^3$ (рис. 5.1). Указанный диапазон концентраций соответствует концентрациям определения холестерина в образцах продуктов питания и биообъектах после пробоподготовки.

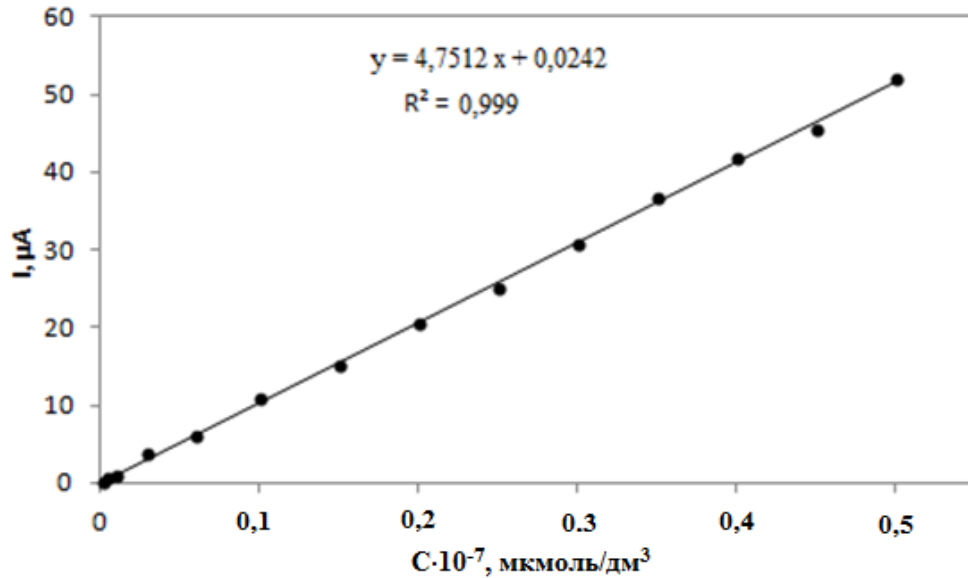


Рисунок 5.1. Градуировочный график зависимости аналитического сигнала холестерина от его концентрации в фосфатном буферном растворе pH 6.86 на ХМЭ

Согласно полученным данным, установлено уравнение регрессии зависимости изменения тока окисления холестерина от его концентрации в растворе, в диапазоне концентраций от $0,1 \cdot 10^{-6}$ до $50 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³:

$$I = 4,7512 \cdot C + 0,0242 \quad (5.1.)$$

Где, I – ток электроокисления холестерина, мкА; C – концентрация коэнзима холестерина в ячейке, моль/дм³.

Предел обнаружения холестерина составил $0,07$ мкмоль/дм³. Полученное значение является достаточным для использования разработанной методики в целях количественного анализа содержания холестерина в пищевых продуктах и биологических объектах.

Оценку адекватности модели и гипотезы линейности графика проводили по методике, описанной в работах [136, 137].

Для проверки, правильности описания процесса при помощи полученного уравнения регрессии, требуется предварительно провести оценку адекватности полученной модели. Указанные цели требуют провести построение таблицы зависимостей тока окисления холестерина от его концентрации (таблица 5.1):

Таблица 5.1. – Экспериментальные значения высоты тока электроокисления холестерина (Y) от его концентрации в растворе (x)

№	x _i , мкМ	Y _{1i} , мкА	Y _{2i} , мкА	Y _{3i} , мкА	\bar{Y}_i , мкА
1	0.1	0,499	0,482	0,5212	0,501
2	0.5	0,630	0,515	0,411	0,487
3	1.0	1,237	1,312	1,107	1,217
4	1.5	1,843	1,943	1,745	1,844
5	2.0	2,450	2,562	2,378	2,464
6	2.5	3,056	3,104	3,217	3,126
7	3.0	3,663	3,751	3,522	3,645
8	3.5	4,269	4,456	4,178	4,301
9	4.0	4,876	4,605	5,094	4,859
10	4.5	5,482	6,012	5,376	5,624
11	5.0	6,089	6,178	5,947	6,071
12	10.0	12,154	12,051	11,395	11,866
13	15.0	18,219	18,640	18,102	18,320
14	20.0	24,284	25,703	23,918	24,635
15	25.0	30,349	31,453	32,027	31,276
16	30.0	36,414	37,5438	38,560	37,506
17	35.0	42,479	41,896	43,178	42,518
18	40.0	48,5441	47,697	49,0203	48,420
19	45.0	54,609	53,902	54,013	54,175
20	50.0	60,674	61,031	59,897	60,534

Используя данные параллельных определений в каждом независимом опыте (табл. 5.1), проводим расчет дисперсии воспроизводимости измерений, согласно формуле:

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{20} \sum_{j=1}^3 (Y_{iu} - \bar{Y}_i)^2}{20(3-1)} = 0,57 \quad (5.2)$$

Далее проводим оценку адекватности модели. Расчеты приведены в таблице в таблице оценки адекватности модели (таблица 6.2), где Y_i^* - рассчитанные по уравнению (521) значения.

Таблица 5.2 – Оценка адекватности модели

№	x_i , мкм	\bar{Y}_i , мкмА	Y_i^*	$(\bar{Y}_i - Y_i^*)$	$(\bar{Y}_i - Y_i^*)^2$
1	0.1	0,501	0,465	0,036	0,0013
2	0.5	0,487	0,631	-0,144	0,0207
3	1.0	1,217	1,421	-0,204	0,0416
4	1.5	1,844	1,945	-0,101	0,0102
5	2.0	2,464	2,452	0,012	0,0001
6	2.5	3,126	3,058	0,068	0,0046
7	3.0	3,645	3,665	-0,02	0,0004
8	3.5	4,301	4,172	0,129	0,01664
9	4.0	4,859	5,179	-0,32	0,1024
10	4.5	5,624	5,486	0,138	0,0190
11	5.0	6,071	6,093	-0,022	0,0005
12	10.0	11,866	12,161	-0,295	0,0870
13	15.0	18,320	18,230	0,09	0,0081
14	20.0	24,635	24,299	0,336	0,1129
15	25.0	31,276	30,367	0,909	0,8263
16	30.0	37,506	36,436	1,07	1,1449
17	35.0	42,518	42,504	0,014	0,0002
18	40.0	48,420	47,573	0,847	0,7174
19	45.0	54,175	54,641	-0,466	0,2172
20	50.0	60,534	61,710	-1,176	1,3830
Σ					4,7145

Далее проводим оценку дисперсии адекватности по формуле:

$$S_{ад}^2 = \frac{m \sum_{i=1}^n (\bar{Y}_i - Y_i^*)^2}{n - k} \quad (5.3)$$

Полученное значение дисперсии адекватности составило 0,75

Далее проводим расчет экспериментальное значение критерия Фишера.

Для чего применяем формулу:

$$F = \frac{S_{ад}^2}{S_{ад}^2} = \frac{0,75}{0,57} = 1,32 \quad (5.4)$$

Находим табличное значение критерия Фишера для уровня значимости $(1-P) = (1 - 0.95) = 0.05$ и числа степеней свобод:

$$f_1 = n - k = 20 - 1 = 19 \quad (5.5)$$

$$f_2 = n(m-1) = 20(3-1) = 40 \quad (5.6)$$

$$F_{0,05,f_1,f_2} = 1.74 \quad (5.7)$$

Таким образом, поскольку расчетное значение критерия Фишера меньше табличного:

$$1.32 < 1.74 \quad (5.8)$$

полученная модель описывает процесс адекватно.

Правильность предложенной методики количественного определения холестерина в модельных растворах проверялась с использованием метода «введено-найдено» (табл. 5.3).

Согласно представленным в таблице 5.3 данным, можно сделать вывод об удовлетворительности получаемых по предлагаемой методике результатов.

Следовательно, оптимальные условия эксперимента, позволяют применять аналитический сигнал электроокисления холестерина в модельных растворах для разработки методики определения количественного содержания общего (суммарного) холестерина в продуктах пищевой промышленности и биообъектах.

Таблица 5.3 – Результаты количественного определения холестерина в модельных средах ($P = 0.95$, $n = 3$).

Введено, С, мкмоль/дм ³	Найдено, С мкмоль/дм ³	ε, %
0,1	0,099	1,0
1,0	1,110	11,0
10,0	9,874	1,3
20,0	20,941	4,2
30,0	29,566	1,5
40,0	39,701	0,8
50,0	51,050	2,1
60,0	60,837	1,4
70,0	68,952	1,5
80,0	81,547	1,9
90,0	88,907	1,2
100	101,400	1,4

5.1.1. Методика выполнения измерений количественного содержания холестерина в продуктах пищевой промышленности и биообъектах

При разработке пробоподготовки важным этапом является изучение влияния мешающих факторов на аналитический сигнал исследуемого вещества. В данной работе проведено изучение влияния на аналитический сигнал холестерина различных соединений, которые являются электрохимически активными и содержатся в исследуемых объектах. Показано, что существенного влияния на получаемый в модельных средах аналитический сигнал компоненты пробы не оказывают. Однако поскольку в объектах анализа холестерин находится в различных формах (в том числе, в эстерифицированной) необходимо проводить омыление указанных форм, для чего авторы предлагают применять изопропиловый спирт по примеру авторов работ [53-55]. Кроме того, холестерин по природе своей является гидрофобным соединением. Таким образом, работа с холестерином в водных

средах налагает определенные условия и требует дополнительного применения детергента. В данной работе в качестве такого детергента выступал Triton X-100.

Подготовку проб биологических объектов (сыворотка крови) и продуктов пищевой промышленности (молоко питьевое, масло сливочное, сливки, желток куриного яйца) осуществляли согласно следующему алгоритму.

В случае работы с образцами твердых пищевых продуктов (масло сливочное) проводили предварительное плавление образцов на водяной бане. Для чего на аналитических весах брали навеску масла сливочного массой 10 г с точностью до 0.0002 г вносили в колбу объемом 50 см³, которую размещали на водяной бане и осуществляли плавление образца, в течение 30 мин. В случае работы с желтком куриного яйца осуществляли предварительное механическое разделение желтка и белка. После чего, отделенный желток подвергали тщательной гомогенизации в стеклянном стаканчике стеклянной палочкой в течение 15 мин.

Дальнейшие этапы пробоподготовки сходны для всех жидких проб, включая расплав масла сливочного и гомогенизированный желток куриного яйца. При помощи дозатора отбирали 0,5 см³ исследуемого жидкой пробы растворяли, помещали в пробирку типа Эппендорф, куда также вносили 0,5 см³ 99,5-% изопропилового спирта. После чего, полученный образец при 4000 об/мин центрифугировали с поддержанием температуры 20°C в течение 30 мин. После чего, полученный центрифугат декантировали с отделением светлой части. Затем отбирали в пробирку типа Эппендорф 50 мм³ декантата, куда также помещали 50 мм³ Triton X-100. Далее тщательно перемешивали с целью эмульгации.

Методика определения холестерина заключается в регистрации вольтамперограмм окисления холестерина на ХМЭ при потенциале $E = +1.06$ В. В электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита (5 см³). В качестве фонового электролита применялся

фосфатный буферный раствор $pH = 6.86$. Трехэлектродная ячейка состояла из индикаторного ХМЭ, роль электрода сравнения и вспомогательного электрода играли ХСЭ. Электроды помещали в раствор фонового электролита и подключали к анализатору TA-Lab. Использовался ступенчатый режим анодной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала $\nu = 50$ мВ/с, рабочий диапазон потенциалов от 0.7 до 1.3 В, время успокоения 20 с. После чего, осуществляли съемку вольтамперограмм фонового электролита не менее пяти раз. Далее, убедившись в отсутствии загрязнений в фоновом растворе и получив воспроизводимую фоновую кривую, переходили к работе с исследуемым веществом.

Дозатором вносили 20 мм^3 исследуемого раствора и проводили регистрацию вольтамперограмм в соответствии с последовательностью описанной ранее. Расчет концентрации холестерина в исследуемом растворе проводили двумя методами: методом добавок и методом градуировочного графика.

1. Метод добавок.

Осуществляется регистрация вольтамперограммы исследуемого раствора, затем к раствору добавляется известное количество стандартного раствора $C_{ст}$ и снова регистрируется вольтамперограмма. Концентрация исследуемого раствора C_x находится согласно уравнению:

$$C_x = C_{ст} \cdot I_x / (I_{ст+x} - I_x) \quad (5.10)$$

где I_x – высота тока исследуемого раствора; $I_{ст+x}$ – высота тока исследуемого раствора с добавкой стандартного вещества.

2. Метод градуировочного графика.

Предварительно подготавливают серию стандартных растворов холестерина различной концентрации. Регистрируют вольтамперограммы и осуществляют измерение высоты тока пика электроокисления в одинаковых условиях. После чего, строят график зависимости полученных значений высот тока пика от концентрации холестерина. Желательно, чтобы число точек было равно пяти, так как таким образом повышается точность

определения. Далее регистрируют вольтамперограмму исследуемого образца и определяют высоту тока электроокисления исследуемого раствора I_x . Затем по ранее построенному графику находят соответствующее ей значение концентрации C_x .

Интервал концентраций стандартных растворов подбирают таким образом, чтобы концентрация исследуемого раствора соответствовала примерно середине этого интервала.

5.1.2. Подготовка вольтамперометрической методики определения холестерина к метрологической аттестации

Для подготовки методики к метрологической аттестации провели определение следующих метрологических характеристик методики:

1. Показатель повторяемости – рассчитывается в виде СКО результатов, полученных в условиях повторяемости;
2. Показатель внутрилабораторной прецизионности – рассчитывается в виде СКО результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности (в разное время, разные операторы, мерная посуда);
3. Показатель точности методики – рассчитывается в виде аддитивной суммы характеристик случайной и систематической погрешности.

Алгоритм расчета приведен в приложении 1.

Обобщенные результаты показателей качества методики для диапазона исследуемых концентраций холестерина, представлены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Значение показателей точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности ($p = 0.95$, $n = 2$, $l = 15$)

Молярная концентрация холестерина, мкМ	Показатели прецизионности (относительные значения)		Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0.95$), $\pm\Delta$, %
	Показатель повторяемости, σ_r , %	Показатель воспроизводимости σ_R , %	
0.1	0.100	6.2	14.9
1.0	0.110	5.3	10.6
10.0	0.100	4.2	7.8
20.0	0.087	3.5	5.2
30.0	0.093	3.5	3.4
40.0	0.076	2.1	2.2
50.0	0.068	1.3	1.0

Оценка численных значений качественных показателей методики рис. 5.2 позволяет говорить о тенденции к незначительному возрастанию значений показателя повторяемости (σ_r), воспроизводимости (σ_R), точности результатов измерения ($\pm\Delta$) при увеличении определяемых концентраций холестерина.

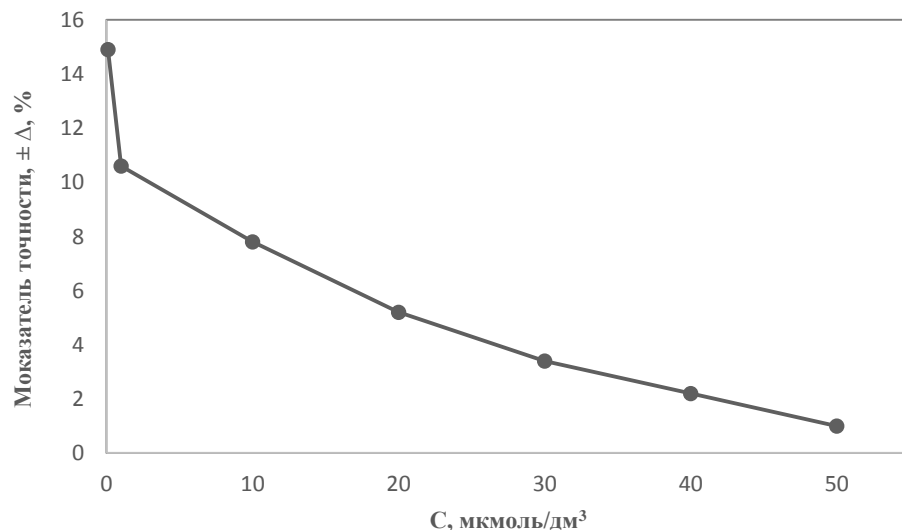


Рисунок 5.2. Изменение показателя точности вольтамперометрической методики определения холестерина в зависимости от его концентрации.

Изменение качественных характеристик МВИ носит нелинейный характер, в таком случае интервал оценки, следует разбить на диапазоны и каждому диапазону приписать количественные характеристики (табл. 5.5).

Таблица 5.5. – Диапазон измерений, значения показателей точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности ($p = 0.95$, $n = 2$, $l = 15$)

Диапазон измерений, мкМ	Показатели прецизионности (относительные значения)		Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0.95$), $\pm\Delta$, %
	Показатель повторяемости, σ_r , %	Показатель воспроизводимости σ_R , %	
От 0.1 до 1.0	0.100	6.0	13.0
От 1.0 до 50.0	0.085	3.0	4.0

Указанные показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, полученных при соблюдении требований методики при ее реализации в отдельной лаборатории. Таким образом, были установлены рабочие условия для количественного определения содержания холетсерина в продукции пищевой промышленности и биологических объектах. Найден диапазон линейной зависимости аналитического сигнал холестерина от его концентрации, проверена гипотеза линейности градуировочной зависимости, оценена адекватность модели по критерию Фишера. Проведена оценка правильности методики методом «введено-найдено». Установлены основные метрологические характеристики разрабатываемой методики количественного определения содержания холетсерина в продукции пищевой промышленности и биологических объектах (показатель точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности).

5.2. Определение содержания холестерина в пищевых продуктах и биологических объектах объектах методами вольтамперометрии и спектрофотометрии. Сравнительный анализ.

Как отмечалось ранее, на сегодняшний день спектр методов количественного определения холестерина в объектах различной природы весьма разнообразен. Однако применение данных методов требует либо использования дорогостоящих расходных материалов и аппаратного оформления, либо осложняется длительностью процедуры пробоподготовки. Кроме того, некоторые методики не обеспечивают необходимую чувствительность определения холестерина в реальных образцах.

Целью данного раздела диссертационной работы было определение количественного содержания холестерина в биологических объектах и пищевых продуктах методом градуировочного графика, используя предложенную вольтамперометрическую методику. Все образцы продуктов пищевой промышленности были получены из коммерческих источников. Образцы биологических объектов были предоставлены ФГБНУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» (Томск, Российская Федерация). В качестве метода сравнения был выбран классический спектрофотометрический метод по реакции Златкиса-Зака, применяющийся для определения холестерина как в пищевых продуктах, так и в биологических жидкостях [56].

В основу спектрофотометрической методики определения холестерина положена его способность образовывать комплекс с хлористым железом (III) в кислой среде. Названный комплекс генерирует спектр поглощения при длине волны $\lambda = 475$ нм. Схема образования комплекса представлена на рисунке 5.3

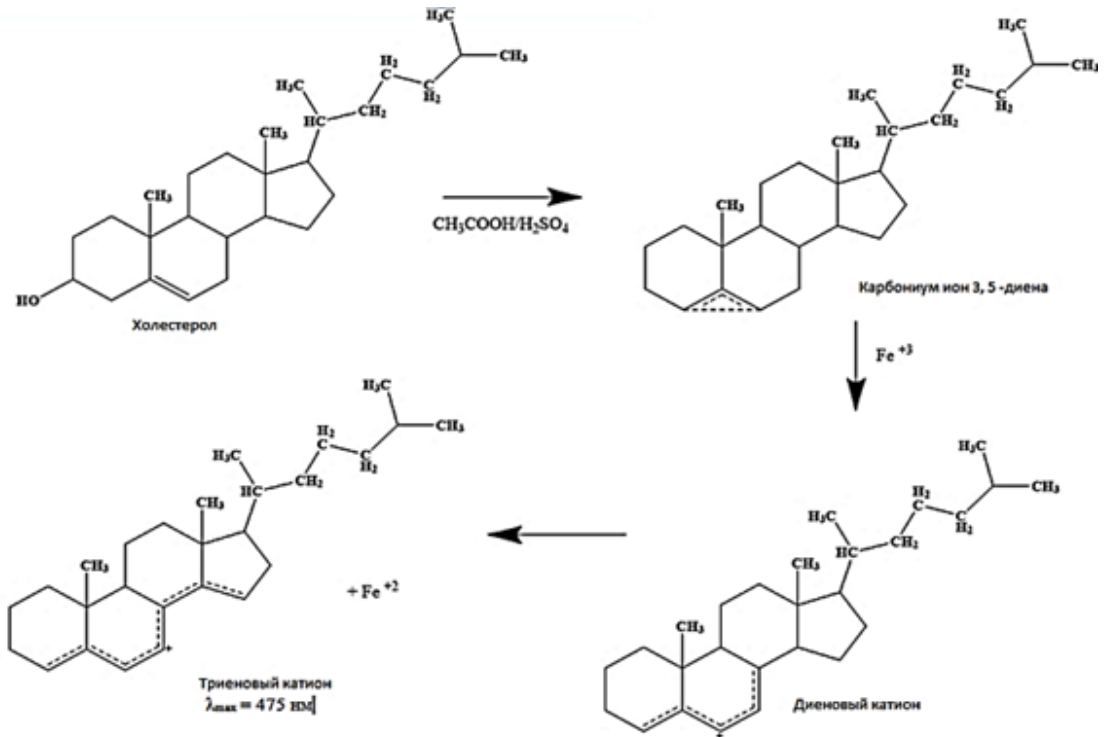


Рисунок 5.3. Схема реакции Златкиса-Зака (окисление холестерина хлористым железом в присутствии концентрированных серной и уксусной кислот)

Пробоподготовка стандартных образцов и анализируемых объектов производилась согласно методике, приведенной в п. 2.3.3, главы 2. Была построена калибровочная зависимость оптической плотности стандартного вещества холестерина от его концентрации в кювете, которая была линейна в диапазоне концентраций от 0.01 мкмоль/дм^3 до 1 мкмоль/дм^3 (рис. 5.5) при следующих условиях: время интеграции 1 сек., спектральная пропускная способность канала 2 нм, шаг сканирования 0.1 сек. Все измерения оптической плотности осуществлялись на спектрофотометре Agilent Technology Cary 60 UV-Vis.

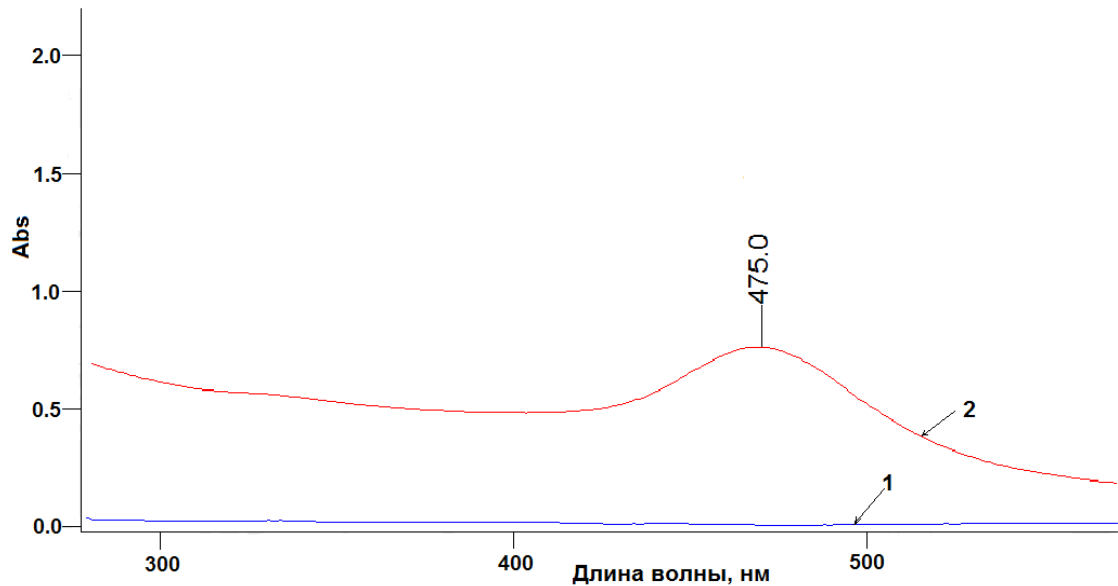


Рисунок 5.4. Спектр поглощения комплекса холестерина с треххлористым железом в среде концентрированной серной и уксусной кислот: 1- спектр растворителя; 2 – спектр раствора холестерина ($C = 0,5$ мкмоль/дм³)

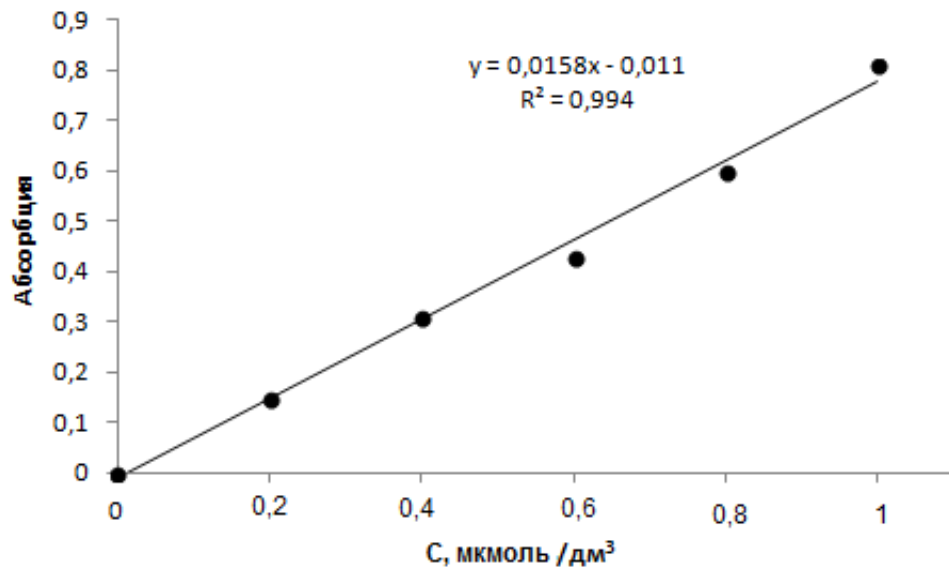


Рисунок 5.5 Градуировочный график зависимости интенсивности сигнала поглощения комплекса холестерина с хлористым железом (III) от его концентрации в ячейке

Расчет концентрации холестерина проводили методом градуировочного графика.

Результаты определения содержания холестерина в биологических объектах представлены в таблице 5.7, в пищевых продуктах – в таблице 5.8.

Таблица 5.7 – Содержание холестерина в сыворотке крови человека, определенное спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами, $n = 6$, $p = 0,95$, $t_{таб} = 2,57$

№ пациента	Пол	Измеренное содержание холестерина (на ХМЭ), мкмоль/дм ³	Измеренное содержание холестерина (спектрофотометрический метод), мкмоль/дм ³	тэксп.	Нормы содержания холестерина приведена с учетом пробоподготовки, мкмоль/дм ³
1	мужской	1,81±0.01	1,92±0.04	1,55	1,5 – 2,6
2	мужской	2,56±0.02	3,03±0.03	2,17	
3	мужской	2,07±0.02	2,85±0.02	1,97	
4	мужской	1,93±0.03	1,72±0.04	1,63	
5	мужской	1,84±0.01	2,01±0.03	2,03	
6	женский	1,95±0.02	1,86±0.01	1,83	
7	женский	1,78±0.01	1,92±0.02	2,11	
8	женский	1,87±0.01	1,77±0.04	1,74	
9	женский	2,24±0.02	3,02±0.05	2,04	
10	женский	2,48±0.02	2,78±0.01	1,67	

Показано, что, несмотря на хорошую согласуемость результатов, полученных двумя означенными методиками, применение спектрофотометрической методики затруднено как в пищевых продуктах, так и в биологических объектах, так как часто приводит к завышению полученных результатов. Данный эффект напрямую связан со стабильностью триенового радикала, образующегося по реакции Златкиса-Зака.

Подобные результаты могут привести к ошибочному назначению специализированной терапии пациентам со средним риском заболеваемости ССЗ. Кроме того, завышенные результаты могут снизить эффективность терапии СЛОС.

Таблица 5.8 – Содержание холестерина в пищевых продуктах, определенное спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами, $n = 6$, $p = 0,95$, $t_{таб} = 2,57$

Образец	Вольтамперометрический метод, мкмоль/дм ³	Спектрофотометрический метод, мкмоль/дм ³	Концентрация холестерина в продукте, согласно литературным данным, приведена с учетом пробоподготовки, мкмоль/дм ³
Молоко «Деревенское молочко», 3,5 %	9,03±0,59	10,08±0,86	4-12
Молоко «Простоквашино», 3,2 % (молоко)	8,58±0,61	13,60±1,11	
Молоко «Домик в деревне», 3,2 %	4,09±0,23	4,37±0,14	
Масло сливочное «Деревенское молочко», 72,5 %	44,15±1,23	43,87±1,04	43-46
Масло сливочное «Простоквашино», 72,5 %	43,26±1,14	43,20±1,14	
Сливки питьевые «Простоквашино» 10%	21,15±0,81	21,57±1,01	12-24
Сливки питьевые «Домик в деревне», 10%	15,73±0,73	15,43±0,82	

Установлено, что наиболее высокую согласуемость методики имеют при работе с продукцией пищевой промышленности. При работе с биологическими объектами наблюдается довольно сильное расхождение, что можно приписать особенностям спектрофотометрической методики (относительно низкая стабильность целевых радикалов в реакции Златкиса-Зака).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

В настоящее время для определения холестерина в биологических жидкостях человека наиболее часто в клинической практике применяются ферментативные наборы, основанные на принципах «сухой химии» и спектрофотометрические анализаторы с применением ферментативных систем. Для определения содержания холестерина в продуктах питания Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США) рекомендует применение высокоэффективной жидкостной хроматографии с реверсивной фазой и УФ-детектированием при 210 нм. Применение электрохимических методов анализа позволяет разработать универсальную методику определения холестерина, подходящую для работы с объектами различной природы. Кроме того, такие достоинства вольтамперометрии, как простота аппаратного оформления, возможность автоматизации и минитюаризации, а также экспрессность – позволяют изготавливать тест-системы для индивидуального point-of-care мониторинга.

Одним из важнейших этапов создания любой методики является оценка влияния различных факторов на аналитический сигнал исследуемого вещества. В вольтамперометрии с применением ХМЭ к таким факторам относят: прежде всего, материал рабочего электрода, природа модификатора, природа фонового электролита и рН рабочей среды.

В практике электрохимических исследований и анализа получили распространение различные материалы индикаторных электродов. Выбор материала электрода напрямую зависит от поставленной задачи, природы определяемого вещества, определяемой концентрации, природы фонового электролита. Одним из основных требований к материалу рабочего электрода является возможность получения воспроизводимого аналитического сигнала с применением данного электрода. При исследовании электрохимического поведения холестерина в качестве материалов индикаторного электрода были исследованы стеклоуглеродный электрод и углеродсодержащий электрод с

обновляемой поверхностью. В ходе проведения исследований был обнаружен четкий и воспроизводимый аналитический сигнал холестерина на композитном электроде, на стеклоуглеродном электроде также получен сигнал, однако из-за особенностей поверхности (невозможность периодического обновления) полученный сигнал обладает сниженной по сравнению с сигналом на КЭ воспроизводимостью. Поэтому, в дальнейшем, для создания методики использовали композитный электрод.

Дальнейшая работа потребовала проведение исследования влияния, оказываемого природой фонового электролита на аналитический сигнал холестерина. Для исследования электрохимических свойств 5-холестен-3 β -ола (холестерина) в водных средах был выбран фосфатный буферный раствор с рН 6.86. Как указывалось ранее, именно в данных условиях получен воспроизводимый и устойчивый аналитический сигнал данного стерина.

Для изучения электрохимического поведения холестерина в неводных апротонных средах был выбран безводный ацетонитрил. В качестве фонового электролита применялся перхлорат натрия. В результате чего получены циклические вольтамперограммы окисления стерина. Пик окисления находились в области потенциалов $E_a = +1.06\text{В}$. Катодный пик восстановления зарегистрировать не удалось. Показано, что в апротонных средах происходит смещение пика окисления холестерина и уменьшение токов пика, что предположительно связано с присутствием в системе перхлорат-ионов. Указанные ионы обладают высокой окислительной способностью и, предположительно могут инициировать неэлектрохимическое окисление холестерина. Таким образом, концентрация холестерина, взаимодействующего с ДАГУДФК в приэлектродном пространстве значительно снижается. В связи с чем, для дальнейшего создания вольтамперометрической методики определения холестерина в продуктах пищевой промышленности и биологических объектах, было принято решение о применении водных буферных растворов для получения

стабильного аналитического сигнала, повышения его воспроизводимости, а также для увеличения чувствительности разрабатываемой методики.

Исходя из предпосылки об участии протонов в электрохимической реакции, следующим этапом стало изучение влияния рН фонового электролита на процесс электроокисления холестерина на ХМЭ.

Показано, что сильное влияние рН среды оказывает на поведение Triton X-100 активизируя липофильный или гидрофильный фрагменты молекулы. Установлено, что при переходе из кислотной в щелочную среду значение тока пика электроокисления холестерина проходит через максимум при рН=6,86. Таким образом, в качестве фонового электролита для дальнейших исследований применялся фосфатный буферный раствор с означенным рН. Кроме того, показано, что природа электролита в данном случае существенного влияния получаемый отклик не оказывает, что подтверждается сходной формой кривых зависимостей тока пика от рН среды при использовании стандарт-титров и универсальной буферной смеси Бриттона-Робинсона.

В дальнейшем изучили влияние параметров электролиза (время и потенциал электролиза) на аналитический сигнал электроокисления холестерина. Установлено, что несмотря на оказываемое данной стадией влияние, тем не менее, изменения токов пика электроокисления холестерина не могут считаться достаточно существенными. В связи с чем, было принято решение об исключении данной стадии из методики.

Далее был проведен расчет числа электронов, принимающих участие в электродном процессе. Для чего была получена зависимость падения тока пика от времени, откуда по законам Фарадея было рассчитано число электронов. Установлено, что электродный процесс является одноэлектронным.

Следующим этапом работы стало исследование предположительного механизма электроокисления холестерина на поверхности ХМЭ. Для описания механизма электроокисления холестерина на ХМЭ в водных

нейтральных средах была исследована обратимость этого процесса. Одним из критериев обратимости в вольтамперометрическом анализе является линейность зависимости тока от $v^{1/2}$ для обратимых и необратимых процессов, кроме квазиобратимого процесса. Показано, что данная зависимость, построенная для процесса электроокисления холестерина на ХМЭ в водных нейтральных средах носит нелинейный характер, что позволило выдвинуть предположение о квазиобратимости процесса. Для подтверждения данного предположения были проведены дальнейшие расчеты критерия Матсуды-Аябе. Показано, что λ составляет 1.2, что соответствует квазиобратимому процессу. Кроме того, был проведен расчет константы электрохимической реакции и коэффициента диффузии по уравнению Котрелла. Так же были доказаны критерии наличия последующей химической реакции при протекании процесса электроокисления холестерина на ХМЭ. Наличие последующей химической реакции также подтверждено результатами ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии электродных поверхностей.

Для изучения морфологии модифицированной электродной поверхности применяли ИК-спектроскопию и сканирующую электронную микроскопию в режиме обратно рассеянных электронов, а также проводили вольтамперометрические измерения на примере обратимой системы $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. Показано, что модификатор при адсорбции на поверхности электрода располагается в виде хорошо ограниченных наноразмерных кристаллов, на поверхности которых протекает процесс окисления холестерина.

Далее в работе было изучили влияние на аналитический сигнал холестерина различных соединений, которые могут являться электрохимически активными и содержатся в исследуемых объектах. Показано, что наиболее существенное значение на аналитический сигнал из исследованных соединений оказала аскорбиновая кислота. Тем не менее,

оказанное влияние не является значимым настолько, чтобы учитывать факт его наличия в подготовке образцов к анализу. Кроме того, показано, что сходные по структуре компоненты пробы, содержащие стероидное кольцо существенного влияния на получаемый аналитический сигнал не оказывают.

Учитывая все вышеперечисленные результаты, предложена вольтамперометрическую методику определения содержания холестерина в продуктах пищевой промышленности и биологических объектах. В качестве индикаторного электрода рекомендуется использовать КЭ, модифицированный ДАГУДФК, фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с $\text{pH}=6.86$. Режим ступенчатой анодной вольтамперометрии. При данных условиях найдена линейная зависимость высоты аналитического сигнала холестерина от его концентрации в электрохимической ячейке. Данная зависимость лежит в диапазоне концентраций от $0.1 \cdot 10^{-6}$ до $50 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³. Предел обнаружения холестерина составляет $0.07 \cdot 10^{-6}$ моль/ дм³ и является достаточным для применения его в количественном анализе содержания холестерина в продукции пищевой промышленности и биологических объектах. Помимо этого, были установлены метрологические показатели качества методики.

Заключительным этапом работы стало сравнительное определение содержания холестерина в пищевых продуктах и биологических объектах спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами. Результаты, полученные двумя методами, согласуются между собой.

ВЫВОДЫ

1. Изучены физико-химические закономерности реакции окисления холестерина на поверхности углеродсодержащего композитного электрода. Предположено, что на поверхности электрода в водных средах при нейтральном рН протекает квазиобратимый процесс. Электрохимический процесс протекает с участием 1 электрона.

2. Оценено влияние веществ различной природы, содержащихся в продукции пищевой промышленности и образцах биологических жидкостей, на аналитический сигнал холестерина. Установлено, что наибольшее влияние на сигнал электроокисления холестерина оказывает аскорбиновая кислота. Однако все исследованные соединения не оказывают значимого влияния на получаемый аналитический сигнал.

3. Подобраны оптимальные условия вольтамперометрического определения холестерина в пищевой продукции и биообъектах: индикаторный электрод – ХМЭ, анодная ступенчатая вольтамперометрия с областью потенциалов от +0.6 В до +1.3 В, скорость развертки потенциала 50 мВ/с, использование калий дигидрофосфата с рН 6.86 в качестве фонового электролита. Определена область прямолинейной зависимости интенсивности аналитического сигнала от концентрации холестерина в диапазоне от 0,1 мкмоль/дм³ до 50 мкмоль/дм³.

4. Проведены сравнительные определения содержания холестерина в пищевой продукции и биологических объектах вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами.

Список литературы

1. Roth G.A. High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries / G.A. Roth, S.D. Fihn, A.H. Mokdad, W. Aekplakorn, T. Hasegawa, S.S. Lim // *Bulletin of the World Health Organization* – 2011 – Vol.89(2) – pp. 92–101.
2. Моисеев В.С. Сердечно-сосудистый риск и хроническая болезнь почек: стратегии кардио-нефропротекции / Моисеев В.С., Мухин Н.А., Смирнов А.В., Кобалава Ж.Д., Бобкова И.Н., Виллевальде С.В., Ефремовцева М.А., Козловская Л.В., Швецов М.Ю., Шестакова М.В. *Российский кардиологический журнал* – 2014 – Т.8, №112 – С. 7–37.
3. Al-Owain M. Smith-Lemli-Opitz syndrome among Arabs/ Al-Owain M., Imtiaz F., Shuaib T.// *Clin. Genet.* – 2012 – Vol. 82(2) – pp.165-172.
4. Т. Березов Биологическая химия / Т. Березов, Б.Коровкин – Москва: «Медицина», 2008 г – 704 с.
5. Bianconi S.E. Adrenal function in Smith-Lemli-Opitz syndrome / Bianconi S.E., Conley S.K., Keil M.F // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2011 – Vol. 155-A(11) – pp.2732-2738.
6. Zarowski M. Prevalence of sleep problems in Smith-Lemli-Opitz syndrome / Zarowski M., Vendrame M., Irons M., Kothare S.V. // *Am. J. Med. Genet.* – 2011 – Vol. 155-A(7) – pp. 1558-1562.
7. Quélin C. Phenotypic spectrum of fetal Smith-Lemli-Opitz syndrome / Quélin C., Loget P., Verloes A. // *Eur. J. Med. Genet.* – 2012 – Vol. 55(2) – pp. 81-90.
8. Nowaczyk M.J. Smith-Lemli-Opitz syndrome: Objective assessment of facial phenotype / Nowaczyk M.J., Tan M., Hamid J.S., Allanson J.E. // *Am. J. Med. Genet.* – 2012 – Vol. 158-A(5) – pp.1020-1028.

9. Sitaula S. Cholesterol and Other Steroids / S. Sitaula, T.P. Burris // *Encyclopedia of Cell Biology* – 2016 – Vol. 1: *Molecular Cell Biology* – pp. 173–179.
10. Sikora D.M. The near universal presence of autism spectrum disorders in children with Smith-Lemli-Opitz syndrome / Sikora D.M., Pettit-Kekel K., Penfield J., Merkens L.S., Steiner R.D. // *Am. J. Med. Genet.* – 2010 – Vol. 15 – pp. 1511-1513.
11. Svoboda M. Smith–Lemli–Opitz Syndrome *Encyclopedia of the Neurological Sciences* / M. Svoboda, E. Finanger, R. Steiner – Amsterdam: Elsevier, 2014 – 220 p.
12. Bukelis I. Smith-Lemli-Opitz syndrome and autism spectrum disorder / Bukelis I., Porter F.D., Zimmerman A.W., Tierney E. // *Am. J. Psychiatry* – 2011 – Vol.164 – pp. 1655-1661.
13. Nowaczyk M. Incidence of Smith-Lemli-Opitz syndrome in Canada: Results of three-year population surveillance / M. Nowaczyk, S. Zeesman, J.S. Waye, James D. Douketis // *The Journal of Pediatrics* – 2014 – Vol. 145, Iss. 4 – pp. 530-535.
14. Saloni P. Delivery of the 7-dehydrocholesterol reductase gene to the central nervous system using adeno-associated virus vector in a mouse model of Smith-Lemli-Opitz Syndrome / Saloni P., Omoye A., Tabron D., Ting F., Cedric S., Gordon W. // *Molecular Genetics and Metabolism Reports* – Vol. 4 – 2015 – pp. 92-98.
15. Róg T. Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: what do we know about their role in raft-like membranes? / T. Róg, I. Vattulainen // *Chem. Phys. Lipids* – Vol. 184 – 2014 – pp. 82–104.
16. Boisseau P. *Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology* / P. Boisseau, P. Houdy, M. Lahmani – Berlin: Sprienger, 2010 – 400 p.
17. Olkkonen V. M. Plant sterols, cholesterol precursors and oxysterols: Minute concentrations—Major physiological effects / V. M. Olkkonen, H. Gylling,

- E. Ikonen // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, In Press, Corrected Proof, Available online 28 December 2015.
18. Giang H. On the puzzling distribution of cholesterol in the plasma membrane / H. Giang, M. Schick // *Chemistry and Physics of Lipids*, In Press, Corrected Proof, Available online 24 December 2015.
 19. Kim J. Cholesterol and serotonin transporter polymorphism interactions in late-life depression / J. Kim, R. Stewart, S. Kim, I. Shin, S. Yang, J. Yoon // *Neurobiology of Aging* – Vol. 32, Iss.2 – 2011 – pp. 336-343.
 20. da Graça Cantarelli M. Potential neurochemical links between cholesterol and suicidal behavior / M. da Graça Cantarelli, A. Tramontina, M. C. Leite, C. Gonçalves // *Psychiatry Research* – Vol. 220, Iss.3 – 2014 – pp. 745-751.
 21. Ioannou G. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH / G. Ioannou // *Trends in Endocrinology & Metabolism* – Vol. 27, Iss. 2 – 2016 – pp. 84-95.
 22. Kyle Hadden M. Hedgehog and Vitamin D Signaling Pathways in Development and Disease / M. Kyle Hadden // *Vitamins & Hormones* – Vol. 100 – 2016 – pp. 231-253.
 23. de Berardinis A. Vitamin D₃ analogues that contain modified A- and seco-B-rings as hedgehog pathway inhibitors / A. de Berardinis, D. Raccuia, E. Thompson, C. Maschinot, M. Hadden // *European Journal of Medicinal Chemistry* – Vol. 93 – 2015 – pp. 156-171
 24. Мариловцева Е.В. Клеточная локализация и функция белка везикулярного трафика Hrs в сперматогенезе и развитии крыла *Drosophila melanogaster*: дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук: 03.01.07 / Мариловцева Екатерина Викторовна – Новосибирск, 2015 – 140 с.
 25. Norman A. *Steroid Hormones: Chemistry, Biosynthesis, and Metabolism* / A. Norman, H. Henry – *Hormones*, London: Academic Press – 2015 – pp. 27-53.

26. Kubale V. Steroid hormones, boar taint compounds, and reproductive organs in pigs according to the delay between immunocastration and slaughter / V. Kubale, N. Batorek, M. Škrlep, A. Prunier, M. Bonneau, G. Fazarinc, M. Čandek-Potokar // *Theriogenology* – Vol. 79, Iss. 1 – 2013 – pp. 69-80.
27. Yajima A. Recent Advances in the Chemistry and Chemical Biology of Quorum-Sensing Pheromones and Microbial Hormones / A. Yajima // *Studies in Natural Products Chemistry* – Vol. 47 – 2016 – pp. 331-355.
28. Matousek R. Sex steroid hormones and cognitive functioning in healthy, older men / R. Matousek, B. Sherwin // *Hormones and Behavior* – Vol. 57, Iss. 3 – 2011 – pp. 352-359.
29. Jeon S. Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development / S. Jeon, K. Hwang, K. Choi // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 9 February 2016.
30. Hughes T. Markers of cholesterol transport are associated with amyloid deposition in the brain / T. Hughes, O. Lopez, R. Evans, M. Kamboh, J. Williamson, W. Klunk, C. Mathis, J. Price, A. Cohen, B. Snitz, S. DeKosky, L. Kuller // *Neurobiology of Aging* – Vol. 35, Iss. 4 – 2014 – pp. 802-807.
31. Faust P. Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency / P. Faust, W. Kovacs // *Biochimie* – Vol. 98 – 2014 – pp. 75-85.
32. Ness G. Physiological feedback regulation of cholesterol biosynthesis: Role of translational control of hepatic HMG-CoA reductase and possible involvement of oxysterols / G. Ness // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* – Vol. 1851, Iss. 5 – 2015 – pp. 667–673.
33. Hamm R. Induction of cholesterol biosynthesis by archazolid B in T24 bladder cancer cells / R. Hamm, Y.-R. Chen, E.-J. Seo, M. Zeino, C.-F. Wu,

- R. Müller, N.-S. Yang, T. Efferth // *Biochemical Pharmacology* – Vol. 91, Iss. 1 – 2014 – pp.18–30.
34. Guo L. Monomethylarsonous acid inhibited endogenous cholesterol biosynthesis in human skin fibroblasts / L. Guo, Y. Xiao, Y. Wang // *Toxicology and Applied Pharmacology* – Vol. 277, Iss. 1 – 2014 – pp. 21–29.
35. Son H. Serum sterol profiling reveals increased cholesterol biosynthesis in childhood obesity / H. Son, S. Kim, J. Moon, B. Chung, M. Park, M. Choi // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* – Vol. 149 – 2015 – pp. 138–145.
36. Younossi Z. Dysregulation of distal cholesterol biosynthesis in association with relapse and advanced disease in CHC genotype 2 and 3 treated with sofosbuvir and ribavirin / Z. Younossi, M. Stepanova, M. Estep, F. Negro, P. Clark, S. Hunt, Q. Song, M. Paulson, L. Stamm, D. Brainard, G. Subramanian, J. McHutchison // *Journal of Hepatology* – Vol. 64, Iss.1 – 2016 – pp. 29-36
37. Patel K. Analysis of the steady-state relations and control-algorithm characterisation in a mathematical model of cholesterol biosynthesis / K. Patel, A. Belič, J. Ačimovič, A. Naik, M. Goličnik // *Simulation Modelling Practice and Theory* – Vol. 33 – 2013 – pp. 18–27
38. Strauss E. Coenzyme A Biosynthesis and Enzymology / Erick Strauss // *Chemistry and Biology* – Vol. 7: Cofactors – 2011 – pp.351–410
39. Espenshade P.J. Cholesterol Synthesis and Regulation / P.J. Espenshade, Lennarz W.J., Lane M.D. // *Encyclopedia of Biological Chemistry*, New York: Academic Press, 2013 – 848 p.
40. Abe I. Epoxidase and Oxidosqualene: Lanosterol Cyclase—Key Enzymes in Cholesterol Biosynthesis / Ikuro Abe, Glenn D. Prestwich Squalene // *Comprehensive Natural Products Chemistry* -Vol. 2: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids – 2010 – pp. 267–298,

41. McNamara D.J. Cholesterol: Sources, Absorption, Function, and Metabolism / Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition), New York: Academic Press, 2013 – 652 p.
42. Morzycki J.W. Recent advances in cholesterol chemistry / Jacek W. Morzycki // Steroids –Vol. 83 – 2014 – pp. 62-79
43. Wang Q. DMSO-catalyzed chlorination of alcohols using *N*-phenylbenzimidoyl chloride / Qiang Wang , Jian Xu, Zhou-Qing Xu, Ji-Dan Yan // Research on Chemical Intermediates – Vol.39 – 2013 – pp. 2071-2076
44. Ortega N. Iron(III)-Catalyzed Halogenations by Substitution of Sulfonate Esters / N. Ortega, A. Feher-Voelger, M. Broveto, J. I. Padrón, V.r S. Martín, T. Martín // Advanced Synthesis & Catalysis – Vol. 353, Iss. 6 – 2012 – pp. 963–972
45. Van Kalker H.A. In situ phosphine oxide reduction: A catalytic Appel reaction / Van Kalker H.A., Leender, S.H., Hommersom C.R. , Rutjes F.P, Van Delft F.L. // Chemistry - A European Journal – Vol. 17, Iss. 40 – 2011 – pp. 11290-11295
46. Kerr W. Ship inhibitors and uses thereof / W. Kerr, J. Chisholm // US Patent № WO2011127465 A2 – 2011.
47. Poirot M. Cholesterol-5,6-epoxides: Chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer / M. Poirot, S. Silvente-Poirot // Biochimie –Vol. 95, Iss. 3 – 2013 – pp. 622-631
48. Brown A.J. Cholesterol Synthesis / A.J. Brown, L J. Sharpe // Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes – New York: Academic Press – 2016 – 400 p.
49. Гёрёг Ш. Количественный анализ стероидов – пер. с англ., под ред. И.В. Торгова, В.Г. Берёзкина, «Мир», М., 1985 г, 504 с
50. T. Dinh Cholesterol: Properties, Processing Effects, and Determination / T. Dinh, L. Thompson // Reference Module in Food Science, from Encyclopedia of Food and Health, 2016, Pages 60-69

51. Nirala N. R. Colorimetric detection of cholesterol based on highly efficient peroxidase mimetic activity of graphene quantum dots / N. R. Nirala, S. Abraham, V. Kumar, A. Bansal, A. Srivastava, P. S. Saxena // *Sensors and Actuators B – Vol.218 – 2015 – pp.42–50*
52. Raj V. Detection of cholesterol by digitonin conjugated gold nanoparticles / V. Raj, R. Jaime, D. Astruc, K. Sreenivasan // *Biosensors and Bioelectronics – Vol.27 – 2011 – pp.197–200*
53. Gonçalves Albuquerque T. Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography / T. Gonçalves Albuquerque, M. Oliveira, A. Sanches-Silva, H. S. Costa // *Food Chemistry – Vol. 193 – 2016 – pp. 18–25*
54. Jeanneret F. Evaluation of steroidomics by liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry as a powerful analytical strategy for measuring human steroid perturbations / F. Jeanneret, D. Tonoli , M. F. Rossier, M. Saugy, J. Boccard, S. Rudaz // *Journal of Chromatography A – Vol.1430 – 2016 – pp.97–112*
55. Mikkelsen S. R. *Bioanalytical chemistry* / S. R. Mikkelsen, E. Corton, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004, P.361
56. Manz A. *Bioanalytical Chemistry* / A. Manz, N. Pamme, D. Iossifidis, 2nd edition, Imperial College Press, London, 2015, P. 452
57. Borner K., Klose S. Enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterins mit dem Greiner Selective Analyzer (GSA-11)//*J. Clin. Chem. Biochem.* 15:121-130, 1977
58. Kamelska A.M. A simplified enzymatic method for total cholesterol determination in milk / A. M.a Kamelska, B. Jarmołowska, K. Bryl // *International Dairy Journal – Vol. 50 – 2015 – pp. 50–57*
59. Rambaldi D. Enzymatic determination of cholesterol and triglycerides in serum lipoprotein profiles by asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line, dual detection / D. Rambaldi, P. Reschiglian, A. Zattoni , C. Johann // *Analytica Chimica Acta – Vol. 654, Iss. 1 – 2009 – pp. 64–70*

60. Karyakin A.A. Principles of direct (mediator free) bioelectrocatalysis / A. A. Karyakin // *Bioelectrochemistry* 88 – 2012 – pp. 70–75
61. Rahman M. R. The application of power-generating fuel cell electrode materials and monitoring methods to breath alcohol sensors / M. R. Rahman, J. Allan, M. Ghavidel, L.E. Prest, F. S. Saleh, E. Bradley Easton // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol.228 – 2016 – pp. 448-457
62. Wang J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics / Wang J. // *Biosens. Bioelectron* – Vol. 21, Iss.10 – 2006 – pp.1887-1892
63. Clark L. C., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1962. Т. 102, № 1. С. 29-45
64. Тернер Э. Биосенсоры: основы и приложения // Тернер Э., Карубе И., Уилсон Д. М.: Мир. 1992. 352 с.
65. Karyakin A. A. Prussian Blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications // *Electroanalysis*. 2001. Т. 13, № 10. С. 813-819
66. Chiang W.-H. Amperometric detection of cholesterol using an indirect electrochemical oxidation method / W.-H. Chiang, P.-Y. Chen, P.-C. Nien, K.-C. Ho // *Steroids* Volume 76, Issue 14, 20 December 2011, Pages 1535–1540
67. Kumari L. Cholesterol Oxidase and Its Applications / L. Kumari, Shamsheer S. Kanwar // *Advances in Microbiology* – Vol. 2 – 2012 – pp. 49-65
68. Bartlett P.N. Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental techniques and Applications / P.N. Bartlett, Wiley&Sons, Ltd. 2008, P. 478
69. Mirkin M.V. Nanoelectrochemistry / M.V. Mirkin, S. Amemiya, CRC Press Taylor&Francis Group, LLC, Abingdon, 2015, P. 506
70. Freire R.S. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity / R.S. Freire; Christiana A. Pessoa; Lucilene D. Mello; Lauro T. Kubota // *J. Braz. Chem. Soc.* – Vol 14, №2 – 2013 – pp.230-243

71. Saxena U. Nanomaterials towards fabrication of cholesterol biosensors: Key roles and design approaches / U. Saxena, A. Bikas Das // *Biosensors and Bioelectronics* – Vol. 75 – 2016 – pp.196–206
72. Honeychurch K. Nanosensors for Chemical and Biological applications:Sensing with Nanotubes, Nanowires and Nanoparticles / K. Honeychurch, Sawstone:Woodhead Publishing, 2014 – 372 p
73. Rincon R.A. Membraneless Enzymatic Flow through Biofuel Cell / R.A. Rincon, C. Lau, H.R. Luckarift, K.E. Garcia E. Adkins, G.R. Johnson and P. Atanassov // *Biosensors & Bioelectronics* – Vol. 27 – 2011 – pp. 132-136
74. Li P. Reversible redox activity of ferrocene functionalized hydroxypropyl cellulose and its application to detect H₂O₂/ P.Li, H. Kang, C. Zhang, W. Li, Y. Huang, R. Liu // *Carbohydrate Polymers* – Vol. 140 – 2016 – pp. 35–42
75. Deng K. Noncovalent nanohybrid of ferrocene with chemically reduced graphene oxide and its application to dual biosensor for hydrogen peroxide and choline / K. Deng, J. Zhou, X. Li // *Electrochimica Acta* – Vol. 95 – 2013 – pp. 18–23
76. Lin L. An electrochemical biosensor for determination of hydrogen peroxide using nanocomposite of methylene blue / L. Lin, C.-Y. Yin, S.-M. Chen // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol. 157, Iss. 1 – 2011 – pp. 202–210
77. Upadhyay A.K. Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on coimmobilized horseradish peroxidase and methylene green in ormosils matrix with multiwalled carbon nanotubes / A.K. Upadhyay, T.-W. Ting, S. Ming // *Talanta* – Vol. 79 – 2009 –pp. 38–45
78. Marinho H.S. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors /H. S. Marinho, C. Real, L. Cyrne, H. Soares, F. Antunes // *Redox Biology*, Volume 2, 2014, Pages 535–562;
79. Chang H. Layer-by-layer assembly of graphene, Au and poly(toluidine blue O) films sensor for evaluation of oxidative stress of tumor cells elicited by hydrogen peroxide / H. Chang, X. Wang, K.-K. Shiu, Y. Zhu, J. Wang, Q.

- Li, B. Chen, H. Jiang // *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 41, 2013, Pages 789-794
80. Chen C. Hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto a poly(aniline-co-N-methylthionine) film /C. Chen, X. Hong, T. Xu, A. Chen, L. Lu, Yu. Gao // *Synthetic Metals*, Volume 212, 2016, Pages 123–130
81. Kang X. Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan / X.Kang, G.Pang, X.Liang, M. Wang, J. Liu, W. Zhu // *Electrochimica Acta* 62 (2012) 327– 334
82. Sekretaryova A. Cholesterol Self-Powered Biosensor / A. Sekretaryova, V. Beni, M.Eriksson, A. Karyakin, A. Turner, and M.Vagin// *Anal. Chem.* – Vol.86, Iss.19 – 2014 –pp. 9540–9547
83. Ghaderi S. Prussian blue-modified nanoporous gold film electrode for amperometric determination of hydrogen peroxide / S.Ghaderi, M. Mehrgardi // *Bioelectrochemistry* –Vol. 98 – 2014 – pp. 64-69
84. Santoro K. Biosensors / K. Santoro, C. Ricciardi// *Encyclopedia of Food and Health*, New York:Academic Press, 2016 – 500p.
85. Singh P. SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges / P. Singh // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol. 229 – 2016 – pp. 110–130
86. Wu J. Enhanced Enzyme Stability Through Site-Directed Covalent Immobilization / J. Wu, C. Hutchings, M.Lindsay, C.Werner, B. Bundy // *Journal of Biotechnology* – Vol. 193 – 2015 – pp. 83-90
87. Christwardana M. Effects of multiple polyaniline layers immobilized on carbon nanotube and glutaraldehyde on performance and stability of biofuel cell / M. Christwardana, Y. Kwon // *Journal of Power Sources* – Vol. 299 – 2015 – pp. 604-610
88. Mehrotra P. Biosensors and their applications – A review / P. Mehrotra // *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* – Vol. 6, Iss. 2 – 2016 - pp.153-159

89. Wang W. Effect of vapor-phase glutaraldehyde crosslinking on electrospun starch fibers / W. Wang, X. Jin, Y. Zhu, C. Zhu, J. Yang, H. Wang, T. Lin // *Carbohydrate Polymers* – Vol. 140 – 2016 – pp. 356-361
90. Poon L. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties / L. Poon, L. D. Wilson, J. V. Headley // *Carbohydrate Polymers* – Vol. 109 – 2014 – pp. 92-101
91. Amine A. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition / A. Amine, F. Arduini, D. Moscone, G. Palleschi // *Biosensors and Bioelectronics* – Vol. 76 – 2016 – pp. 180-194
92. Rathee K. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review / K. Rathee, V. Dhull, R. Dhull, S. Singh // *Biochemistry and Biophysics Reports* – Vol. 5 – 2016 – pp. 35-54
93. Reverté L. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems / L. Reverté, B. Prieto-Simón, M. Campàs // *Analytica Chimica Acta* – Vol. 908 – 2016 – pp. 8-2
94. Mankiewicz-Boczek J. Application of cellular biosensors for detection of atypical toxic bioactivity in microcystin-containing cyanobacterial extracts / J. Mankiewicz-Boczek, I. Karwaciak, M. Ratajewski, I. Gaęała, T. Jurczak, M. Zalewski, Ł. Pułaski // *Aquatic Toxicology* – Vol. 168 – 2015 – pp. 1-10
95. Oujji N. Sol-gel immobilization of acetylcholinesterase for the determination of organophosphate pesticides in olive oil with biosensors / N. Oujji, I. Bakas, G. Istamboulié, I. Ait-Ichou, E. Ait-Addi, R. Rouillon, T. Noguier // *Food Control* – Vol. 30, Iss. 2 – 2013 – pp. 657-661
96. Oldham K. B. *Electrochemical Science and Technology: Fundamentals and applications* / K. B. Oldham, J. C. Myland, A. M. Bond – New York: John Wiley & Sons, 2011, 456 p.
97. Sajid M. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review / M. Sajid,

- M. Nazal, M. Mansha, A. Alsharaa, S. Jillani, C. Basheer // *TrAC Trends in Analytical Chemistry* – Vol. 76 – 2016 – pp. 15-29
98. Fagan-Murphy A. Chemically modified multiwall carbon nanotube composite electrodes: An assessment of fabrication strategies / A. Fagan-Murphy, M. Allen, B. Patel // *Electrochimica Acta* – Vol. 152 – 2015 – pp. 249-254
99. Xu X. A novel protocol for covalent immobilization of thionine on glassy carbon electrode and its application in hydrogen peroxide biosensor / X. Xu, Y. Feng, J. Li, F. Li, H. Yu // *Biosensors and Bioelectronics* – Vol. 25, Iss. 10 – 2010 – pp. 2324-2328
100. Bakker E. Enhancing ion-selective polymeric membrane electrodes by instrumental control / E. Bakker // *TrAC Trends in Analytical Chemistry* – Vol. 53 – 2014 – pp. 98-105
101. Tyagi P. Metal oxide catalyst assisted SnO₂ thin film based SO₂ gas sensor / P. Tyagi, A. Sharma, M. Tomar, V. Gupta // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol. 224 – 2016 – pp. 282-289
102. Manfredi G. Comparison of solid metal–metal oxide reference electrodes for potentiometric oxygen sensors in liquid lead–bismuth eutectic operating at low temperature ranges / G. Manfredi, J. Lim, K. Rosseel, J. Van den Bosch, Th. Doneux, C. Buess-Herman, A. Aerts // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol. 214 – 2015 – pp. 20-28
103. El Kasmi S. Electrochemical determination of paraquat in potato, lemon, orange and natural water samples using sensitive-rich clay carbon electrode / S. El Kasmi, S. Lahrich, A. Farahi, M. Zriouil, M. Ahmamou, M. Bakasse, M.A. El Mhammedi // *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* – Vol. 58 – 2016 – pp. 165-172
104. Azad U.P. Selective determination of isoniazid using bentonite clay modified electrodes / U. P. Azad, N. Prajapati, V. Ganesan // *Bioelectrochemistry* – Vol. 101 – 2015 – pp. 120-125

105. Nezamzadeh-Ejhi A. Voltammetric determination of riboflavin based on electrocatalytic oxidation at zeolite-modified carbon paste electrodes / A.Nezamzadeh-Ejhi, P. Pouladsaz // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* – Vol. 20, Iss. 4 – 2014 – pp. 2146-2152
106. Siara L.R. Electrochemically pretreated zeolite-modified carbon-paste electrodes for determination of linuron in an agricultural formulation and water / L.R. Siara, F. de Lima, C.A.L. Cardoso, G.J. Arruda // *Electrochimica Acta* – Vol. 151 – 2015 – pp. 609-618
107. Sassi W. Study of the electroplating mechanism and physicochemical properties of deposited Ni-W-Silicate composite alloy / W. Sassi, L. Dhoubi, P. Berçot, M. Rezrazi, E. Triki // *Electrochimica Acta* – Vol. 117 – 2014 – pp. 443-452
108. Xu R. Non-conductive nanomaterial enhanced electrochemical response in stripping voltammetry: The use of nanostructured magnesium silicate hollow spheres for heavy metal ions detection / R. Xu, X. Yu, C. Gao, Y. Jiang, D. Han, J. Liu, X. Huang // *Analytica Chimica Acta* – Vol. 790 – 2013 – pp. 31-38
109. Gebicki J. Application of electrochemical sensors and sensor matrixes for measurement of odorous chemical compounds / J. Gebicki // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 77, March 2016, Pages 1–13
110. Xie S. Application of Inorganic Layered Materials in Electrochemical Sensors / S.Xie, Y. Liu , Z. Wu , G. Shen, R. Yu // *Chinese Journal of Analytical Chemistry* – Vol. 43, Iss. 11 – 2015 – pp. 1648–1655
111. Ji R. Synthesize Thickness Copper (I) Sulfide nanoplates on Copper Rod and It's Application as Nonenzymatic Cholesterol Sensor / R. Ji, L. Wang, G. Wang, X. Zhang // *Electrochimica Acta* – Vol. 130 – 2014 – pp. 239–244
112. Raj V. Cholesterol aided etching of tomatine gold nanoparticles: A non-enzymatic blood cholesterol monitor / V. Raj, T. Johnson , K. Joseph // *Biosensors and Bioelectronics* – Vol. 60 – 2014 – pp. 191–194

113. Joshi N. Enzyme-free and biocompatible nanocomposite based cholesterol sensor / N. Joshi, K. Rawat, P. Solanki, H.B. Bohidar // *Biochemical Engineering Journal* – Vol. 102 – 2015 – pp. 69–73
114. Giri A. Phase and composition selective superior cholesterol sensing performance of ZnO·ZnS nano-heterostructure and ZnS nanotubes / A. Giri, C. Charan, S. Ghosh, V. Shahi, A. Panda // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol. 229 – 2016 – pp. 14–24
115. Nantaphol S. Sensitive and selective electrochemical sensor using silver nanoparticles modified glassy carbon electrode for determination of cholesterol in bovine serum / S. Nantaphol, O. Chailapakul, W. Siangproh // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol. 207, Part A – 2015 – pp. 193–198
116. Gomathi P. Fabrication of novel chitosan nanofiber/gold nanoparticles composite towards improved performance for a cholesterol sensor / P. Gomathi, D. Ragupathy, J. Choi, J. Yeum, S. Lee, J. Kim, S. Lee, H. Ghim // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol. 153, Iss. 1 – 2011 – pp. 44–49
117. Cinti S. Cholesterol biosensor based on inkjet-printed Prussian blue nanoparticle-modified screen-printed electrodes / S.Cinti, F. Arduini, D. Moscone, G. Palleschi, L. Gonzalez-Macia, A. J. Killard // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol. 221 – 2015 – pp. 187–190
118. Lawa A.T. Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors / A.T. Lawa // *Materials Research Bulletin* – Vol. 73 – 2016 – pp. 308–350
119. Chunta S. Low-Density Lipoprotein Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer / S. Chunta, R. Suedee, and P. A. Lieberzeit // *Anal. Chem.* – Vol. 88 (2) – 2016 – pp.1419–1425
120. Aghaei A. A novel capacitive biosensor for cholesterol assay that uses an electropolymerized molecularly imprinted polymer / A. Aghaei, M. R. M. Hosseini, M. Najafi // *ElectrochimicaActa* – Vol. 55 – 2011 – pp. 1503–1508

121. Tanaka K. Carbon Nanotubes and Graphene / K.Tanaka, S.Iijima – Amsterdam: Elsevier, 2014 – 290 p.
122. Zhang Ion X. complexation-controlled columnar mesophase of calix[4]arene–cholesterol derivatives with Schiff-base bridges / X. Zhang, H. Guo, F. Yang, J. Yuan // Tetrahedron Letters – Vol. 57, Iss. 8 – 2016 – pp. 906–909
123. Yang J. Nonenzymatic cholesterol sensor based on spontaneous deposition of platinum nanoparticles on layer-by-layer assembled CNT thin film / J. Yang, H. Lee', M. Cho, J. Nam, Y.Lee // Sensors and Actuators B: Chemical – Vol. 171–172 – 2012 – pp. 374–379
124. Ji J. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted film at Au nanoparticles-carbon nanotubes modified electrode for determination of cholesterol / J.Ji, Zh.Zhou, X.Zhao, J.Sun, X.Sun // Biosensors and Bioelectronics – Vol. 66 – 2015 – pp. 590–595
125. Fersht A. Strure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding / A. Fersht, New York: W.H.Freeman and Company, 1999 – 631p 127.
126. Bezerra R. Enzyme inhibition studies by integrated Michaelis–Menten equation considering simultaneous presence of two inhibitors when one of them is a reaction product / R. Bezerra, P. Pinto, I. Fraga, A. Dias // Computer Methods and Programs in Biomedicine – Vol. 125 – 2016 – pp. 2-7
128. Toulías T. Fitting the Michaelis–Menten model / T.Toulías, C.Kitsos // Journal of Computational and Applied Mathematics – Vol.296 – 2016 – pp. 303-319
129. Слепченко Г. Б. Новые возможности вольтамперометрического определения фармацевтических препаратов на органофункционализированных электродах / Слепченко Г. Б., Мартынюк О. А., Постников П. С., Труслова М. Е., Бондарев А. А., Смирнов И. В.,

- Быстрицкий Е. Л. // Сибирский медицинский журнал – 2009 – №2-2 – том 24, 21-25 с
130. Тайшибекова Е.К. Фосфорорганические производные на основе аминотиазолов и гликолурила: дисю на соискание уч. степени доктор философии (PhD):6D060600 / Тайшибекова Екатерина Каримовна – Караганда, 2015 – 170 с.
131. Галюс З. Теоретические основы электрохимического анализа. М.: Мир, 1974. - 552. с.
132. Шольц Ф. Электроаналитические методы теория и практика. М: «Бином. Лаборатория знаний », 2010 - 326 с.
133. Compton R. Understanding voltammetry (2nd edition) / R. Compton, C. Banks – London: «Imperial College Press», 2011 – 497 p.
134. Bard A.J. Electrochemical methods: Fundamentals and Applications / A.J. Bard, L.R. Faulkner – New York: «Wiley&Sons», 2001 – 808 p.
135. Morzycki J.W. Electrochemical oxidation of cholesterol / J.W. Morzycki, A. Sobkowiak // Beilstein Journal of Organic Chemistry – Vol. 11 – pp. 392-402
136. Chen S. Sensitivity and Detection limit analysis of bio (chemical) sensors / S. Chen, A. van den Berg, E.T. Carlen A // Sensors and actuators B: Chemical – Vol. 209 – pp. 486-489
137. Гармаш А.В., Сорокина Н.М. Метрологические основы аналитической химии. М: МГУ им. М.В. Ломоносова. 2012. С.47

Оценка показателей прецизионности (повторяемости и воспроизводимости) неферментативной методики анализа

1.1 Оценка показателя повторяемости методики анализа

1.1.1 Проводят расчет среднего арифметического X_{ml} и выборочной дисперсии S_{ml}^2 результатов единичного анализа содержания компонента в m -м ОО, полученных в условиях повторяемости (параллельных определений):

$$X_{ml} = \frac{\sum_{i=1}^N X_{mli}}{N}, \quad (1)$$

$$S_{ml}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (X_{mli} - X_{ml})^2}{N-1}, \quad (2)$$

$$m = 1, \dots, M; \quad l = 1, \dots, L.$$

1.1.2 На основе полученных значений выборочных дисперсий проверяют гипотезу о равенстве генеральных дисперсий, используя критерий Кохрена.

Значение критерия Кохрена $G_{m(\max)}$ рассчитывают по формуле

$$G_{m(\max)} = \frac{(S_{ml}^2)_{\max}}{\sum_{l=1}^L S_{ml}^2} \quad (3)$$

и сравнивают его с табличным значением этого критерия $G_{\text{табл}}$ для числа степеней свободы $\nu = N-1$, соответствующего максимальной дисперсии, и $f = L$, соответствующего числу суммируемых дисперсий, и принятой доверительной вероятности $P = 0,95$ (значения $G_{\text{табл}}$).

Если $G_{m(\max)} > G_{\text{табл}}$, то соответствующее $(S_{ml}^2)_{\max}$ из дальнейших расчетов исключают и процедуру повторяют до следующего по значению S_{ml}^2 и т.д. до тех пор, пока $G_{m(\max)}$ не станет меньше либо равно $G_{\text{табл}}$.

1.1.3 Не исключенные из расчетов S_{ml}^2 считают однородными и по ним оценивают средние квадратические отклонения (далее - СКО), характеризующие повторяемость результатов единичного анализа

(параллельных определений), полученных для содержания, соответствующего содержанию компонента в m -м ОО. Эти СКО - S_{rm} рассчитывают по формуле

$$S_{rm} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L S_{ml}^2}{L}}, \quad (4)$$

где в числе слагаемых нет отброшенных значений.

1.1.4 Показатель повторяемости методики анализа в виде СКО повторяемости - σ_{rm} для содержания, соответствующего содержанию компонента в m -м ОО, устанавливают, принимая равным S_{rm}

$$\sigma_{rm} \approx S_{rm}. \quad (5)$$

1.1.5 Показатель повторяемости методики анализа в виде предела повторяемости* - r_{nm} для содержания, соответствующего содержанию компонента в m -м ОО, рассчитывают по формуле

$$r_{nm} = Q(P, n)\sigma_{rm}, \quad (6)$$

где n - число параллельных определений, предусмотренных методикой анализа для получения результата анализа, $Q(P, n) = 3,31$ при $n = 3$, $P = 0,95$;

1.2 Оценка показателя воспроизводимости методики анализа

1.2.1 Рассчитывают выборочное СКО результатов анализа m -го ОО, полученных в условиях воспроизводимости, - S_{Bm} по формуле

$$S_{Bm} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X_{ml} - X_m)^2}{L-1} + \left(\frac{1}{n} - \frac{1}{N}\right) S_{rm}^2}, \quad m = 1, \dots, M, \quad (7)$$

где X_m - общее среднее значение результатов анализа, полученных в условиях воспроизводимости.

X_m рассчитывают по формуле

$$X_m = \frac{\sum_{l=1}^L X_{ml}}{L}, \quad (8)$$

1.2.2 Оценка показателя воспроизводимости методики анализа

Показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО воспроизводимости - σ_{Rm} для содержания, соответствующего содержанию компонента в m -м ОО, устанавливают, принимая равным S_{Rm} :

$$\sigma_{Rm} \approx S_{Rm}. \quad (9)$$

Показатель воспроизводимости методики анализа в виде предела воспроизводимости* - R_m для содержания, соответствующего содержанию компонента в m -м ОО, рассчитывают по формуле

$$R_m = Q(P, 2) \sigma_{Rm}, \quad (10)$$

где $Q(P, 2) = 2,77$ при $P = 0,95$.

Значение предела воспроизводимости используют при проверке приемлемости результатов анализа, полученных в условиях воспроизводимости.

Примечание - В случае невозможности организации эксперимента в разных лабораториях экспериментальные данные получают в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности (серии результатов единичного анализа получают в разное время, разные операторы, используя разные партии реактивов одного типа, разные наборы мерной посуды и т.п.). Результаты единичного анализа внутри каждой серии получают в условиях повторяемости. В этом случае показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО рассчитывают по формуле

$$\sigma_{Rm} \approx k S_{R,m} \quad (11)$$

где $S_{R,m}$ - выборочное СКО результатов анализа, рассчитанное в соответствии с 1.2.1 на основе результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности; k - коэффициент, учитывающий условия проведения эксперимента. k может принимать значения от 1,2 до 2,0.

1.3 Оценка показателя правильности методики анализа

1.3.1 Рассчитывают оценку математического ожидания систематической погрешности методики анализа - Θ_m как разность между средним значением результатов анализа X_m и аттестованным значением m -го ОО (СО или АС) - C_m

$$\Theta_m = X_m - C_m, \quad m = 1, \dots, M. \quad (12)$$

1.3.2 Проверяют значимость вычисленных значений Θ_m по критерию Стьюдента. Для этого рассчитывают значение t -критерия для m -го ОО - t_m :

$$t_m = \frac{|\Theta_m|}{\sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{\Delta_{0m}^2}{3}}}, \quad (13)$$

где $S_m^2 = \frac{\sum_{l=1}^L (X_{ml} - X_m)^2}{L-1}$ - дисперсия, характеризующая разброс средних

арифметических значений результатов единичного анализа X_{ml} , полученных в l -й лаборатории, относительного среднего значения результатов анализа X_m ;

Δ_{0m} - погрешность аттестованного значения.

1.3.3 Полученное значение t_m сравнивают с $t_{\text{табл}}$ при числе степеней свободы $f = L - 1$ для доверительной вероятности $P = 0,95$.

1.3.4 Если $t_m \leq t_{\text{табл}}$, то оценка систематической погрешности незначима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю ($\Theta_m = 0$).

1.3.5 Если $t_m > t_{\text{табл}}$, то оценка систематической погрешности значима на фоне случайного разброса и для принятия решения о приемлемости методики анализа вводят еще один дополнительный критерий:

$$|\Theta_m| \leq \xi \sigma_{\text{РМ}},$$

где ξ может принимать значения от 0,5 до 1 в зависимости от используемых в методике анализа метода, условий, средств измерений и т.п., а также характеристик объекта анализа.

При выполнении данного критерия может быть принято решение о введении в результаты анализа, получаемые при реализации данной методики, поправки на значение Θ , т.е. значение Θ , соответствующее содержанию $C - \Theta(C)$, вычитают из любого результата анализа, полученного по методике.

Если данный критерий не выполняется, принимают решение о доработке методики.

1.3.6 При незначимости Θ или при принятом для методики анализа решении о введении в результаты анализа поправки показатель правильности методики анализа [верхнюю ($\Delta_{с.в.м}$) и нижнюю ($\Delta_{с.н.м}$) границы, в которых неисключенная систематическая погрешность методики анализа (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в m -м ОО) находится с принятой вероятностью $P=0,95$ рассчитывают по формуле

$$\Delta_{с.в.м} = |\Delta_{с.н.м}| = \Delta_{с.м} = 1,96 * \sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{\Delta_{см}^2}{3}} = 1,96\sigma_{см}. \quad (14)$$

1.4 Оценка показателя точности методики анализа

Верхнюю ($\Delta_{в.м}$) и нижнюю ($\Delta_{н.м}$) границы, в которых погрешность результата анализа* (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в m -м ОО) находится с принятой вероятностью $P=0,95$, рассчитывают по формуле

$$\Delta_{в.м} = |\Delta_{н.м}| = \Delta_m = 1,96\sqrt{\sigma_{Рм}^2 + \sigma_{см}^2} = 1,96\sigma_m(\Delta). \quad (15)$$

Примечания

1. Здесь и далее: при выполнении условия $\frac{\Delta_{см}}{\sigma_{Рм}} < 0,8$

показатель точности методики анализа может быть рассчитан по формуле

$$\Delta_{\text{в(н)т}} = \pm 1,96\sigma_{\text{Рт}}. \quad (16)$$

2. В случае, если учет $\Theta(C)$ при вычислении показателя правильности методики анализа

$$\Delta_{\text{с.в(н)т}} = \Theta_m \pm 1,96\sigma_{\text{с.т}}, \quad (17)$$

где $\Delta_{\text{с.в(н)т}}$ - верхняя и нижняя границы, в которых систематическая погрешность методики анализа находится с принятой вероятностью $P = 0,95$, не приводит к превышению приписанной характеристики погрешности результата анализа над нормой погрешности, поправку в результат на значение $\Theta(C)$ можно не вносить.

В этом случае показатель точности методики анализа (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в m -м ОО) рассчитывают по формуле

$$\Delta_{\text{в(н)т}} = \Theta_m \pm 1,96\sigma_m(\Delta), \quad (18)$$

Для оценки метрологических показателей неферментативной вольтамперметрической методики определения холестерина в продукции пищевой промышленности была выбрана прямолинейная область градуировочной зависимости тока электроокисления холестерина от его концентрации в электрохимической ячейке (рис.1)

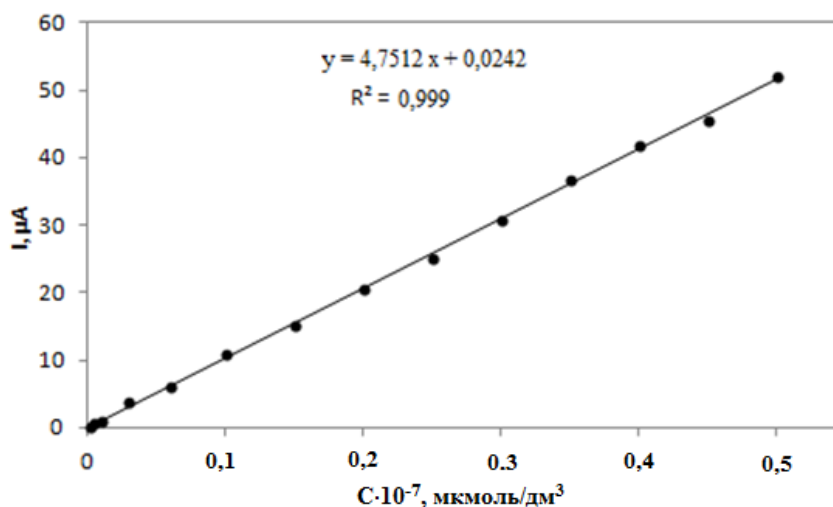


Рисунок 1. График зависимости высоты тока окисления от его концентрации в электрохимической ячейке

1. Содержание холестерина 0,1 мкМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора холестерина, мкМ	Погрешность стандартного раствора, Δ_0 , мкМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	S^2_L
			1	2		
0,1	0,0015	1	5,46E-06	5,28E-06	5,37015E-06	8,46E-15
		2	4,82E-06	4,51E-06	0,000004663	2,31E-14
		3	4,53E-06	4,89E-06	4,71143E-06	3,28E-14
		4	5,36E-06	5,02E-06	5,1891E-06	2,76E-14
		5	5,21E-06	5,12E-06	5,16606E-06	2,32E-15
		6	4,93E-06	4,80E-06	4,866E-06	3,80E-15
		7	5,21E-06	5,00E-06	5,10885E-06	1,11E-14
		8	5,25E-06	5,32E-06	5,28242E-06	1,18E-15
		9	4,90E-06	4,91E-06	4,90282E-06	3,66E-17
		10	5,14E-06	5,08E-06	5,11327E-06	9,89E-16
		11	4,72E-06	4,75E-06	4,73488E-06	3,82E-16
		12	5,40E-06	5,26E-06	5,32576E-06	5,00E-15
		13	4,56E-06	4,95E-06	4,75803E-06	3,81E-14
		14	4,82E-06	4,53E-06	4,67377E-06	2,06E-14
		15	5,18E-06	5,09E-06	5,13269E-06	1,89E-15

S^2_{\max}	ΣS^2	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости S_r в конкретной лаборатории
4,76E-13	2,35E-12	2,03E-03	4,71E-03	3,96E-08
				СКО повторяемости $\sigma^*_r = S_r = 3,96E-08$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	6,33309E-08
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{Rл} = S_{Rл} = 5,46114E-06$

Оценивание систематической погрешности θ^*	1,33309E-06
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	1,385
t табличное для 14 серий	2,0930
σ^*_c	1,60492E-07

Границы, в которых находится не исключенная погрешность
$\Delta^*_{в,с} = \Delta^*_{н,с} = \Delta^*_c = 1,64766E-07$
$\Delta^*_в = \Delta^*_н = \Delta^* = 2,44874E-07$

σ^*_r %	σ^*_R %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
0,11	0,08	12,00	14,50

2. Содержание холестерина 1 мкМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора холестерина, мкМ	Погрешность стандартного раствора, Δ_0 , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	S^2_L
			1	2		
1,0	0,0041	1	10,92426E-06	10,55635E-06	0,000114438	3,38E-14
		2	9,63021E-06	9,02179E-06	0,000106087	9,25E-14
		3	9,06046E-06	9,78526E-06	0,000128623	1,31E-13
		4	10,71024E-06	10,04617E-06	0,000110285	1,10E-13
		5	10,42837E-06	10,23587E-06	0,000116264	9,26E-15
		6	9,85526E-06	9,60875E-06	0,000126607	1,52E-14
		7	10,42837E-06	10,00701E-06	0,000112312	4,44E-14
		8	10,49617E-06	10,63352E-06	0,000119168	4,72E-15
		9	9,79354E-06	9,81775E-06	9,86017E-06	1,47E-16
		10	10,28943E-06	10,16366E-06	0,000112204	3,95E-15
		11	9,43068E-06	9,50885E-06	0,000108362	1,53E-15
		12	10,79298E-06	10,51007E-06	9,2763E-06	2,00E-14
		13	9,12554E-06	9,90656E-06	9,75619E-06	1,52E-13
		14	9,63462E-06	9,06046E-06	8,82454E-06	8,24E-14
		15	10,35225E-06	10,1785E-06	0,000118768	7,55E-15

S^2_{\max}	ΣS^2	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости S_r в конкретной лаборатории
1,16393E-10	4,32078E-10	0,3222	0,471	5,36706E-06
				СКО повторяемости $\sigma^*_r = S_r = 4,32706E-07$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	8,7389E-05
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{R,l} = S_{R,l} = 2,10273E-07$

Оценивание систематической погрешности θ^*	1,00193E-07
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	1,8683
t табличное для 14 серий	2,0930
σ^*_c	2,53243E-07

Границы, в которых находится не исключенная погрешность
$\Delta^*_{в,с} = \Delta_{н,с} = \Delta^*_c = 1,71389E-07$
$\Delta^*_в = \Delta^*_н = \Delta^* = 3,4084E-07$

С учетом систематической погрешности:

σ^*_r %	σ^*_R %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
0,14	5.1	10	17

3. Содержание холестерина 10 мкМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора холестерина, мМ	Погрешность стандартного раствора, Δ_0 , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	S^2_L
			1	2		
10,0	0,0015	1	4,2E-05	4,3E-05	4,23336E-05	6,56E-13
		2	4,1E-05	4E-05	4,09469E-05	2,27E-13
		3	4,4E-05	4,2E-05	4,32009E-05	1,22E-12
		4	4,2E-05	4,3E-05	4,24698E-05	5,76E-13
		5	4,1E-05	3,9E-05	4,00339E-05	6,44E-13
		6	3,9E-05	4,2E-05	4,05166E-05	1,47E-12
		7	4,5E-05	4,4E-05	4,48789E-05	3,07E-13
		8	4,1E-05	4,3E-05	4,19792E-05	3,80E-13
		9	4,8E-05	4,7E-05	4,73691E-05	7,21E-13
		10	3,9E-05	4,2E-05	4,01795E-05	1,87E-12
		11	4,8E-05	5E-05	0,000048621	9,15E-13
		12	4,3E-05	4E-05	0,000041545	1,22E-12
		13	4,2E-05	4,3E-05	4,23336E-05	6,56E-13
		14	4,1E-05	4E-05	4,09469E-05	2,27E-13
		15	4,4E-05	4,2E-05	4,32009E-05	1,22E-12

S^2_{\max}	ΣS^2	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости S_r в конкретной лаборатории
1,5412E-10	2,8187E-09	0,237	0,471	1,37082E-06
				СКО повторяемости $\sigma^*_r = S_r = 1,37082E-07$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,0000432707
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{Rл} = S_{Rл} = 2,25021E-07$

Оценивание систематической погрешности θ^*	2,4857E-07
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	1,9010
t табличное для 14 серий	2,0930
σ^*_c	1,06886E-07

Границы, в которых находится не исключенная погрешность	
$\Delta^*_{в,с} = \Delta^*_{н,с} = \Delta^*_c = 5,34604E-06$	
$\Delta^*_{в} = \Delta^*_{н} = \Delta^* = 8,91076E-06$	

С учетом систематической погрешности:

σ^*_r %	σ^*_R %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
3,5	7	13	22

4. Содержание холестерина 20 мкМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора Холестерин, мМ	Погрешность стандартного раствора, Δ_0 , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	S^2_L
			1	2		
20,0	0,002	1	0,000506211	0,000630002	0,000618106	1,82997E-10
		2	0,000555784	0,000658249	0,000657016	3,03975E-12
		3	0,000658073	0,000685758	0,000671915	3,83228E-10
		4	0,000748469	0,000726185	0,000737327	3,48306E-10
		5	0,000652661	0,000638193	0,000645427	1,04669E-10
		6	0,000621402	0,000674968	0,000648185	1,43466E-09
		7	0,000639164	0,000680368	0,000609766	2,72844E-09
		8	0,000630664	0,000652684	0,000641624	2,44631E-10
		9	0,000535766	0,00065842	0,000647093	2,56609E-10
		10	0,000654311	0,000685758	0,000670034	4,94452E-10
		11	0,000630862	0,000667555	0,000649208	6,73173E-10
		12	0,000707965	0,000630697	0,000669281	2,99288E-09
		13	0,000618153	0,000658409	0,000638281	1,1027E-10
		14	0,00068573	0,000545452	0,000665591	6,11159E-10
		15	0,000692007	0,000664383	0,000678195	3,8155E-10

S^2_{\max}	ΣS^2	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости S_r в конкретной лаборатории
2,99288E-09	1,08501E-08	0,275840013	0,471	2,68949E-06
				СКО повторяемости $\sigma^*_{r} = S_r = 2,68949E-06$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,000643137
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{Rл} = S_{Rл} = 4,23376E-06$

Оценивание систематической погрешности θ^*	4,31368E-06
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	2,6531
t табличное для 14 серий	2,0930
σ^*_c	1,62596E-06

Так как $t_{\text{расч}} > t_{\text{табл}}$, делаем вывод, что оценка систематической погрешности лаборатории значима на фоне случайного разброса и учитываем ее при дальнейших расчетах:

Границы, в которых находится не исключенная погрешность
$\Delta^*_{в,с} = \Delta^*_{н,с} = \Delta^*_c = 7,50066E-06$
$\Delta^*_{в} = \Delta^*_{н} = \Delta^* = 0,000132028$

С учетом систематической погрешности:

σ^*_r %	σ^*_R %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
5	7	12	22

5. Содержание холестерина 30 мкМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора Холестерин, мМ	Погрешность стандартного раствора, Δ_0 , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	S^2_L
			1	2		
30,0	0,0027	1	0,000942142	0,000952645	0,000947394	5,51514E-11
		2	0,000823067	0,000798726	0,000810891	2,96003E-10
		3	0,000840113	0,000861653	0,000850883	2,31987E-10
		4	0,000794385	0,000818048	0,000806217	2,79986E-10
		5	0,000858315	0,00088145	0,000869883	2,67596E-10
		6	0,000800954	0,000829638	0,000815296	4,11367E-10
		7	0,000810922	0,000841993	0,000826458	4,82727E-10
		8	0,000914088	0,000939462	0,000926775	3,21913E-10
		9	0,000831011	0,000869866	0,000850439	7,54851E-10
		10	0,000898571	0,000859319	0,000878945	7,70361E-10
		11	0,000942164	0,000990154	0,000966159	1,15149E-09
		12	0,00090946	0,00086729	0,000888375	8,89155E-10
		13	0,000815274	0,000831348	0,000823311	1,29182E-10
		14	0,000886497	0,000906211	0,000896354	1,94326E-10
		15	0,00079599	0,000773352	0,000784671	2,56234E-10

S^2_{\max}	ΣS^2	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости S_r в конкретной лаборатории
1,15149E-09	6,49233E-09	0,177361846	0,471	2,08044E-06
				СКО повторяемости $\sigma^*_r = S_r = 2,08044E-06$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,000662803
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{R1} = S_{R1} = 5,44156E-07$

Оценивание систематической погрешности θ^*	6,28032E-07
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	2,1045
t табличное для 14 серий	2,0930
σ^*_c	2,13299E-06

Так как $t_{\text{расч}} > t_{\text{табл}}$, делаем вывод, что оценка систематической погрешности лаборатории значима на фоне случайного разброса и учитываем ее при дальнейших расчетах:

Границы, в которых находится не исключенная погрешность
$\Delta^*_{в,с} = \Delta_{н,с} = \Delta^*_c = 0,00010461$
$\Delta^*_в = \Delta^*_н = \Delta^* = 0,000177359$

С учетом систематической погрешности:

σ^*_r %	σ^*_R %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
2	4	11	15

6. Содержание холестерина 40 мкМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора Холестерин, мМ	Погрешность стандартного раствора, Δ_0 , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	S^2_L
			1	2		
40,0	0,034	1	0,001022235	0,001088427	0,001065331	2,19071E-09
		2	0,001094186	0,0010225	0,001068343	2,56946E-09
		3	0,001000171	0,001021926	0,001011049	2,36644E-10
		4	0,00096734	0,000989139	0,000978239	2,37606E-10
		5	0,00103351	0,000994854	0,001014182	7,47155E-10
		6	0,001088427	0,001060014	0,001069221	7,37802E-10
		7	0,001023151	0,001049407	0,001036279	3,44696E-10
		8	0,000996735	0,000981582	0,000989158	1,14799E-10
		9	0,00104062	0,000989139	0,001014879	1,32515E-09
		10	0,000950792	0,000983838	0,000967315	5,46036E-10
		11	0,000995207	0,001020206	0,001007706	3,12466E-10
		12	0,001024243	0,00106147	0,001037856	3,70657E-10
		13	0,001061652	0,000996828	0,00102424	1,50282E-09
		14	0,001038193	0,001060753	0,001049473	2,54489E-10
		15	0,001016372	0,001045954	0,001031163	4,3756E-10

S^2_{\max}	ΣS^2	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости S_r в конкретной лаборатории
2,56946E-09	1,1928E-08	0,215413176	0,471	2,81993E-06
				СКО повторяемости $\sigma^*_{r} = S_r = 2,81993E-06$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,001022962
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{R1} = S_{R1} = 2,97212E-06$

Оценивание систематической погрешности θ^*	2,29623E-06
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	1,072
t табличное для 14 серий	2,0930
σ^*_c	2,14785E-06

Границы, в которых находится не исключенная погрешность	
$\Delta^*_{в,с} = \Delta^*_{н,с} = \Delta^*_c = 4,20979E-06$	
$\Delta^*_в = \Delta^*_н = \Delta^* = 7,18729E-06$	

σ^*_r %	σ^*_R %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
3	3	4	7

7. Содержание холестерина 50мкМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора Холестерин, мМ	Погрешность стандартного раствора, Δ_0 , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	S^2_L
			1	2		
10	0,034	1	0,001022235	0,001088427	0,001065331	2,19071E-09
		2	0,001094186	0,0010225	0,001068343	2,56946E-09
		3	0,001000171	0,001021926	0,001011049	2,36644E-10
		4	0,00096734	0,000989139	0,000978239	2,37606E-10
		5	0,00103351	0,000994854	0,001014182	7,47155E-10
		6	0,001088427	0,001060014	0,001069221	7,37802E-10
		7	0,001023151	0,001049407	0,001036279	3,44696E-10
		8	0,000996735	0,000981582	0,000989158	1,14799E-10
		9	0,00104062	0,000989139	0,001014879	1,32515E-09
		10	0,000950792	0,000983838	0,000967315	5,46036E-10
		11	0,000995207	0,001020206	0,001007706	3,12466E-10
		12	0,001024243	0,00106147	0,001037856	3,70657E-10
		13	0,001061652	0,000996828	0,00102424	1,50282E-09
		14	0,001038193	0,001060753	0,001049473	2,54489E-10
		15	0,001016372	0,001045954	0,001031163	4,3756E-10

S^2_{\max}	ΣS^2	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости S_r в конкретной лаборатории
2,56946E-09	1,1928E-08	0,215413176	0,471	2,81993E-06
				СКО повторяемости $\sigma^*_r = S_r = 2,81993E-06$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,001022962
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{R1} = S_{R1} = 2,97212E-06$

Оценивание систематической погрешности θ^*	2,29623E-06
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	1,069080849
t табличное для 14 серий	2,0930
σ^*_c	2,14785E-06

Границы, в которых находится не исключенная погрешность	
$\Delta^*_{в,с} = \Delta^*_{н,с} = \Delta^*_c = 4,20979E-06$	
$\Delta^*_в = \Delta^*_н = \Delta^* = 7,18729E-06$	

σ^*_r %	σ^*_R %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
3	3	4	7

Обобщая полученные данные для всего диапазона определяемых концентраций, получаем следующее:

Концентрация холестерина, См, мМ	σ^*_{Γ}	σ^*_{R}	$\pm \Delta^*_c$	$\pm \Delta^*$
0.1	0.100	6.2	6.5	14.9
1.0	0.110	5.3	4.6	10.6
10.0	0.100	4.2	4.1	7.8
20.0	0.087	3.5	3.4	5.2
30.0	0.093	3.5	3.6	3.4
40.0	0.076	2.1	2.7	2.2
50.0	0.068	1.3	2.3	1.0

Согласно полученным данным, при определении холестерина неферментативным вольтамперометрическим методом показатель точности не превышает 15 %, показатели повторяемости и воспроизводимости 0,1 % и 7 %, соответственно.

При рассмотрении численных значений качественных показателей методики можно заметить, что идет возрастание значений показателя повторяемости (σ_{Γ}), воспроизводимости (σ_R), точности результатов измерения ($\pm\Delta$) при возрастании концентрации холестерина в ячейке.

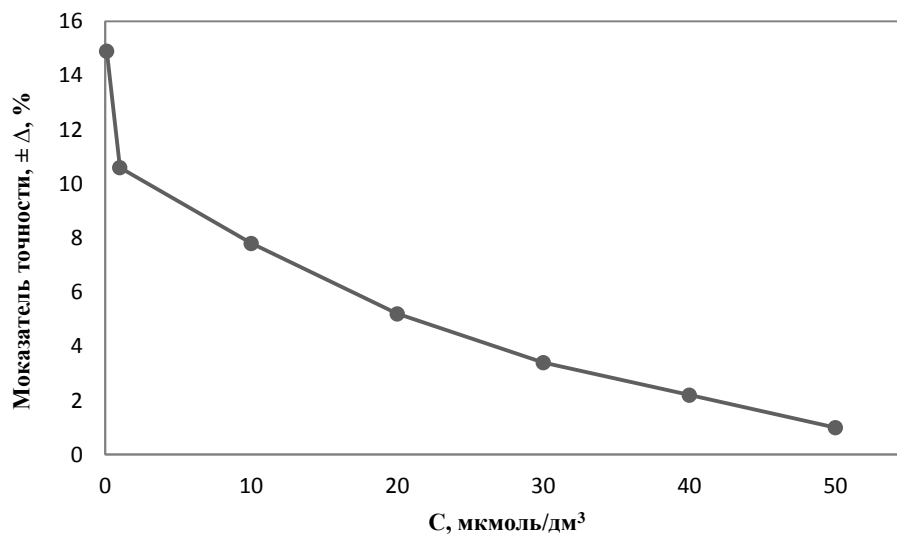


Рисунок 2. Изменение показателя точности неферментативной вольтамперометрической методики определения холестерина в зависимости от его концентрации.

Изменение качественных характеристик МВИ носит нелинейный характер, в таком случае интервал оценки, разбиваем на диапазоны и каждому диапазону приписываем количественные характеристики (табл).

Таблица 1 - Диапазон измерений, значения показателей точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности ($p = 0.95$, $n = 2$, $l = 15$)

Диапазон измерений, мкМ	Показатели прецизионности (относительные значения)		Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0.95$), $\pm\Delta$, %
	Показатель повторяемости, σ_r , %	Показатель воспроизводимости σ_R , %	
От 0.1 до 1.0	0.100	6.0	13.0
От 1.0 до 50.0	0.085	3.0	4.0

Указанные выше показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, полученных при соблюдении требований методики при ее реализации в отдельной лаборатории. Таким образом, были установлены рабочие условия для количественного определения содержания холестерина в продукции фармацевтической и косметической промышленности. Найден диапазон линейной зависимости аналитического сигнал холестерина от его концентрации, проверена гипотеза линейности градуировочной зависимости, оценена адекватность модели по критерию Фишера. Проведена оценка правильности методики методом «введено-найденно». Установлены основные метрологические характеристики разрабатываемой методики количественного определения содержания холестерина в продукции фармацевтической и косметической промышленности (показатель точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности).