

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

На правах рукописи



Нурпейис Енлик

Вольтамперометрическое определение бетулина и его производного
диацетата на модифицированных углеродсодержащих электродах в БАДах

1.4.2 Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

Д.х.н., профессор Слепченко Галина Борисовна

Томск, 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	10
1.1 Основные свойства пентациклических тритерпеноидов.....	10
1.2 Методы определения пентациклических тритерпеноидов.....	18
1.3 Особенности электрохимических методов определения пентациклических тритерпеноидов	23
1.4 Вольтамперометрическое определение органических соединений на модифицированных электродах	29
ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	38
2.1 Приборы, электроды, применяемые ячейки.....	38
2.2 Приготовление исходных субстратов, реагентов.	40
2.2.1 Методика извлечения бетулина из коры березы.....	40
2.2.2 Методики получения диацетата бетулина из бересты (Метод А) и из бетулина (Метод Б).....	40
2.3 Способы очистки бетулина и ДАБ	41
2.3.1 Очистка технического бетулина.....	41
2.3.2 Очистка технического диацетата бетулина	42
2.4 Методика поверхностной модификации углеродсодержащих электродов для определения бетулина и диацетата бетулина.....	43
2.5 Методика приготовления модификатора на основе мезопористого углерода ...	44
2.6 Приготовление растворов, подготовка посуды.....	44
2.7 Методика вольтамперометрического измерения бетулина и диацетата бетулина	45
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	46
3.1 Изучение вольтамперометрического поведения бетулина на золото-графитовом электроде	46

3.2 Выбор рабочих условий определения диацетата бетулина с использованием золото-графитового электрода и изучение некоторых закономерностей электродного процесса.....	51
3.3 Совместное вольтамперометрическое определение бетулина и диацетата бетулина и изучение их взаимного влияния.....	52
3.4 Применение мезопористого углерода для модификации поверхности электрода для вольтамперометрического определения бетулина.....	57
3.5 Применение АДТ для модификации поверхности электрода для вольтамперометрического определения бетулина	59
ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕТУЛИНА И ДАБ В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКЕ.....	64
4.1 Вольтамперометрическое определение бетулина в биологически активной добавке.....	64
4.1.1 Изучение мешающего влияния органических соединений на аналитический сигнал бетулина и ДАБ.....	64
4.1.2 Оценка предела обнаружения и нижней границы определяемых содержаний	66
4.2. Методика количественного определения ДАБ в биологической активной добавке «Кубебон».....	70
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	72
ВЫВОДЫ	77
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	79
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	80
Приложение Б. ПМР спектр бетулина	93
Приложение В. Масс-спектр бетулина	94
Приложение Г. ИК спектр ДАБ.....	95
Приложение Д. ПМР-спектр ДАБ	96
Приложение Е. Масс-спектр ДАБ	97
Приложение Ж. Диаграмма Исикава	98

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Пентациклические тритерпеноиды содержатся в различных растениях и известны своими противовоспалительными, противомикробными, противовирусными и противоопухолевыми свойствами. Их структура обеспечивает значительную степень функционализации, что приводит к получению широкого спектра производных с различной биологической активностью. Изучение пентациклических тритерпеноидов - это обширная область, объединяющая, среди прочего, аспекты органической химии, фармакологии и медицины. Тритерпеновые кислоты (бетулиновая кислота и урсоловая кислота) проявляют значительную антиканцерогенную и анти-ВИЧ активность, лупеол является конкурентным ингибитором, как трипсина, так и химотрипсина, а противовоспалительная активность бетулина была подтверждена в различных экспериментальных моделях. Доказано, что бетулин и его производные (сложные эфиры и эфиры) оказывают антиноцицептивное действие против висцеральной боли у мышей, вызванной внутрибрюшинной инъекцией уксусной кислоты. При определении этих уникальных соединений в различных объектах и в том числе в фармпрепаратах применяются различные физико-химические способы оценки пентациклических тритерпеноидов. Их идентифицируют спектральными (ИК, ЯМР, масс-спектрометрия), хроматографическими (ВЭЖХ, плоскостная хроматография, ВЭТСХ) и электрохимическими (вольтамперометрия, электрофорез) методами. Вследствие незначительной стоимости и простоты оборудования, в последнее время более привлекательными становятся электрохимические методы анализа, в частности, вольтамперометрические. Применение вольтамперометрии позволило существенно упростить и ускорить процесс получения информации о количественном содержании бетулина и диацетата бетулина в различных объектах. Насколько нам известно, опубликовано лишь несколько работ, посвященных электроанализу пентациклических тритерпеноидов. Поиск состава современных углеродных материалов для индикаторных электродов и различных

органических и металлических модификаторов поверхности, обеспечивающих необходимый уровень чувствительности, точности и прецизионности полученных результатов вызывает повышенный интерес у разработчиков новых методик. Выбор такого материала зависит, главным образом, от природы окислительно-восстановительного поведения целевых аналитов.

Среди широкого круга применяемых органических модификаторов перспективными органическими агентами являются тозилатные соли арендиазония, которые в ходе электродного процесса организуют ковалентное связывание функциональных групп арена (Ar) с углеродной поверхностью электрода. Поэтому проведение исследований по разработке органо-модифицированного электрода тозилатными солями арендиазония и золота для определения лекарственных веществ вольтамперометрическими методами, весьма актуально и имеет большую практическую значимость. Объектами исследования являются природные соединения – бетулин (*3 β ,28-дигидрокси-20(29)-лупен или луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол*), диацетат бетулина (*3 β ,28-диацетокси-луп-20(29)-ен*). Разработка методик определения бетулина и ДАБ необходима для проведения дополнительного контроля содержания данных веществ на всем цикле производства препаратов.

Таким образом, применение вольтамперометрии целесообразно в условиях современной аналитической практики и *целью данной работы* является выделение бетулина и его производного - диацетата бетулина (ДАБ), очистка и исследование физико-химических закономерностей электро-окисления – восстановления данных аналитов на органо-модифицированном углеродсодержащем электроде с последующей разработкой методик их количественного определения в БАДах.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- Выделить природные тритерпеноиды: бетулин и ДАБ из коры березы, разработать способ их очистки методом колоночной хроматографии, идентифицировать структуру методами ИК-спектроскопии, ПМР, масс-спектрометрии для дальнейшего вольтамперометрического определения данных тритерпеноидов

- Установить рабочие условия вольтамперометрического определения бетулина на золото-графитовом электроде и исследовать физико-химические закономерности его электрохимического поведения;
- Разработка нового электрохимического сенсора на основе золото-графитового электрода, модифицированного мезопористым углеродом и арендиазония тозилатами;
- Разработать способы совместного вольтамперометрического определения бетулина и ДАБ на новом органо-модифицированном электроде.
- Разработать вольтамперометрическую методику определения бетулина и ДАБ в БАДах, рассчитать основные метрологические характеристики полученной методики.

Научная новизна

- Предложены оптимальные способы очистки с использованием колоночной хроматографии наиболее важных представителей лупанового ряда (бетулин, ДАБ) для их вольтамперометрического определения.
- Изучены физико-химические закономерности электродного процесса бетулина на золото-графитовом электроде методом циклической вольтамперометрии. Показано, что электрохимический процесс окисления бетулина на золото-графитовом электроде является необратимым и носит адсорбционный характер и это подтверждено с помощью критерия Семерано.
- Впервые получен новый органо-модифицированный электрод на основе графита, модифицированного мезопористым углеродом, золотом и солями арендиазония для вольтамперометрического определения бетулина и ДАБ.
- Впервые установлены основные рабочие параметры совместного вольтамперометрического определения бетулина и ДАБ и разработана вольтамперометрическая методика их определения в БАДах в широком диапазоне определяемых содержаний.

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа содержит ключевые аспекты темы. На основании проведенных исследований предложены алгоритмы методик количественного химического анализа биологически активных

добавок для определения содержания бетулина и диацетата бетулина. Эксперименты показали перспективность использования новых органо-модифицированных электродов для определения аналитов методом вольтамперометрии, что открывает возможности для разработки методов определения других пентациклических тритерпеноидов. Результаты исследований физико-химического поведения бетулина и диацетата бетулина были представлены на различных российских и международных конференциях.

Методология и методы исследования. Для исследования закономерностей электрохимического поведения данных аналитов на органо-модифицированном углеродсодержащем электроде с последующей разработкой методик их количественного определения в БАДах в работе применялись разнообразные методы, такие как вольтамперометрия, колоночная хроматография, а также методы ИК, ПМР и масс-спектрометрия. Полученные данные обрабатывались с применением MS Office. Объекты исследования включали в себя некоторые представители пентациклических тритерпеноидов, а именно бетулин и ДАБ.

Положения, выносимые на защиту.

- Выделение, очистка и идентификация структуры природного тритерпеноида (бетулина и ДАБ) с помощью методов ИК, ПМР, Масс-спектрометрия и сравнением $T_{пл}$ с лит. данными;
- Результаты изучения закономерности физико-химических процессов электроокисления-восстановления бетулина и ДАБ на углеродсодержащих электродах с учетом влияния различных факторов (материал электрода, pH фонового электролита, и др.);
- Разработка нового органо-модифицированного графитового электрода для вольтамперометрического определения бетулина и ДАБ;
- Вольтамперометрические методики определения бетулина и ДАБ в биологически активных добавках;

Степень достоверности и апробация работы. Результаты исследования были представлены и обсуждены на Всероссийской конференции по методам электрохимического анализа с международным участием и молодежной научной

школе "ЭМА-2024" (Екатеринбург, 2024), на Международной научно-практической конференции "Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы" (Томск, 2021, 2023, 2024г), 21-й Международной научно-практической конференции молодых студентов и ученых "Химия и химические технологии в XXI веке" (Томск, 2021)., Society 2022), XI Всероссийская научная конференция и школа «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», посвященная 100-летию со дня рождения И.Г. Юделевича (Новосибирск 2021г), на Всероссийской конференции по методам электрохимического анализа с международным участием и молодежной научной школе "ЭМА-2020" (Казань, 2020), Международной научно-практической конференции "Интеграция науки, образования и производства – основы реализации Плана нации" (Сагиновские чтения № 13), (Караганда, 2021), на Межшкольном международном конгрессе (Москва, 2021), 18-й Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" (Москва, 2021), в конкурсе "Молодые ученые" Фонд поддержки молодых ученых имени Геннадия Комиссарова (Москва, 2021). Все конференции являются важной базой для ученых, выпускников и молодых специалистов.

Личный вклад автора. Исследование было проведено автором лично, включая поиск и анализ литературы, эксперименты, обработку данных, их интерпретацию, формулирование выводов, а также активное участие в подготовке публикаций по теме диссертации.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 работ: 4 статьи в журналах, индексируемые базами Scopus, Web of Science, 4 статьи, включенные в РИНЦ, 11-тезисов в материалах научных конференций и съездов. Отправлен 1 патент на изобретение.

Объем и структура работы. Структура диссертации изложена на 98 страницах и включает в себя введение, четыре главы, заключение, выводы, перечень использованной литературы, состоящий из 119 источников и приложения.

Благодарность. Выполнение работы было возможно благодаря финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-90293, предоставленного

аспирантам и некоторые исследования проводились с использованием средств центра коллективного пользования ТПУ «Физико-химические методы анализа».

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, д.х.н., профессору Инженерной школы природных ресурсов, профессору Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий Слепченко Галине Борисовне, за ценные наставления, терпение и поддержку на протяжении всего времени работы над диссертацией., а также д.х.н., профессору Научно-образовательного центра Н.М.Кижнера Филимонову Виктору Дмитриевичу, за предоставленные материалы, без которых исследование не было бы возможным и к.х.н., доценту Инженерной школы природных ресурсов Мамаевой Елене Андреевне, за помощь в выделении и очистке объектов исследования.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Основные свойства пентациклических тритерпеноидов

Пентациклические тритерпеноиды - это разнообразные химические соединения, содержащиеся в растениях, в том числе в бересте. Они известны своим широким спектром биологической активности, в том числе противовоспалительными, противовирусными и противораковыми свойствами.

Тритерпены являются одними из наиболее распространенных природных продуктов, на сегодняшний день идентифицировано около 30000 структур [1].

С биологической точки зрения пентациклические тритерпены привлекли большое внимание, и некоторые из них, включая производные пентациклических тритерпенов, продаются в качестве терапевтических средств или пищевых добавок по всему миру [2]. Эти соединения можно найти в нескольких лекарственных растениях, они являются естественными составляющими рациона человека, поскольку были обнаружены в большом разнообразии фруктов, растительных масел и злаков [3]. В западном мире среднее потребление тритерпенов человеком оценивается примерно в 250 мг в день, а в странах Средиземноморья среднее потребление может достигать 400 мг в день [4].

Кора березы издавна привлекала внимание людей [5-7] и продолжает оставаться объектом интереса, как в науке, так и в промышленности [8-16]. Богатая полезными свойствами, внешняя часть коры находит широкое применение в медицине и косметологии.

Пентациклические тритерпены были обнаружены во фруктах и овощах, таких как кожура яблока [17-18], кожура груши [19], манго [20], зеленый перец [20], клубника [20], шелковица, гуава [21], или оливки [19,21], а также в ароматических травах, таких как базилик [21-22], орегано [19], розмарин [23] и лаванда [19]. Они также были обнаружены в листьях эвкалипта [23] и в коре березы [19], а также в некоторых травах восточной и народной медицины, широко распространенных во всем мире [24-26]. Пентациклические тритерпеноиды можно

найти в составе отваров лекарственных растений, в которых их биодоступность считается достаточной для поддержания биологической активности [26].

Кора березы — это уникальный природный материал, который традиционно используется в различных сферах благодаря своим антисептическим, водонепроницаемым и прочным свойствам. В России кора березы издавна применялась для изготовления различных предметов быта, таких как корзины и берестяные письма.

Современные исследования показывают, что кора березы содержит бетулин **1** (3 β ,28-дигидрокси-20(29)-лупен или луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол) (рис 1)— соединение, которое обладает мощными лечебными свойствами и может использоваться в медицине и косметологии [27].

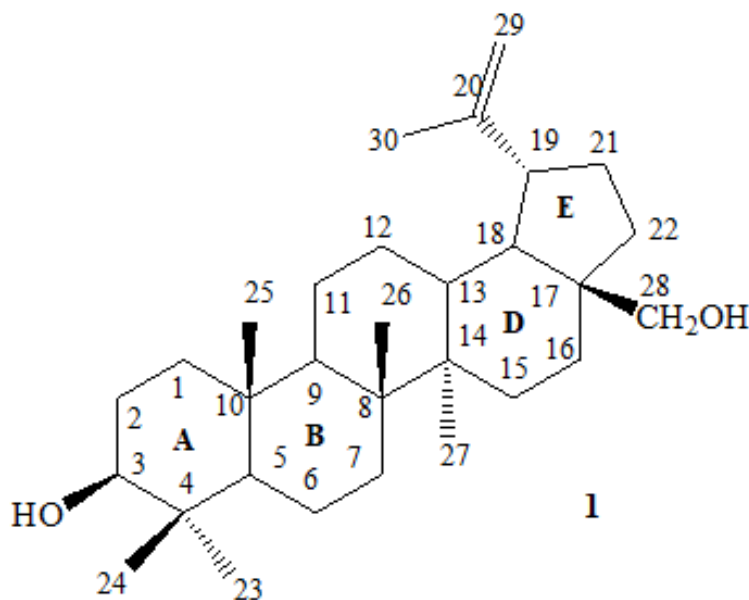


Рисунок 1 – Структурная формула бетулина

Этот вид тритерпеноида содержится во внешней части коры. Величина урожайности берёзы может варьироваться от 10 до 45 % в зависимости от различных факторов, таких как климатические условия, почва, возраст дерева и уход за ним. [28].

Кроме бетулина, в составе экстрактов коры могут присутствовать окисленные производные естественного соединения, такие как, бетулиновый

альдегид **2**, бетулоновый альдегид **3**, бетулиновая кислота **4**, метиловый эфир кислоты, полученной из березы **5**, бетулоновая кислота **6** (рис 2) [29].

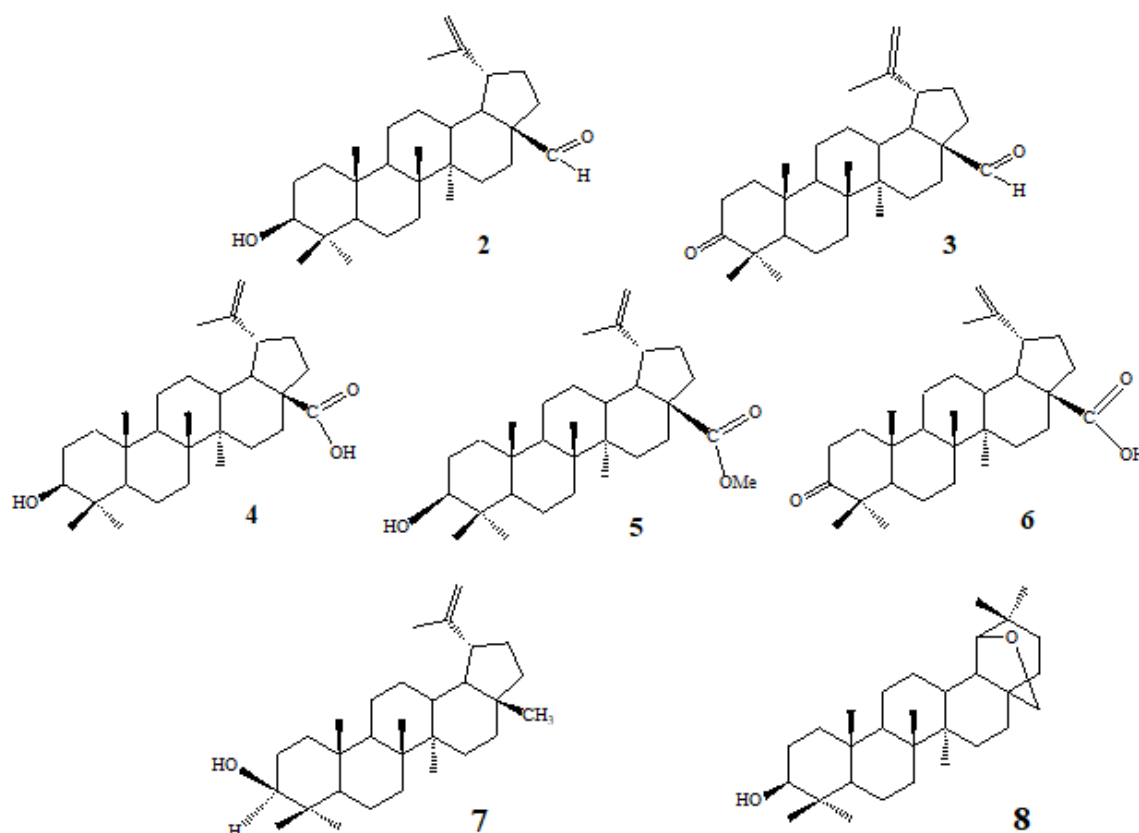


Рисунок 2 – Структурные формулы тритерпеноидов, содержащихся в коре березы

Лупеол — это ещё один пентациклический тритерпеноид, который, как и бетулин, обладает рядом полезных фармакологических свойств. Он встречается во многих растениях, включая берёзу, и известен своими противовоспалительными, антиоксидантными и антиканцерогенными эффектами [30].

В научных исследованиях лупеол привлекает внимание благодаря своей способности модулировать различные молекулярные пути, что может быть полезно при лечении рака и других заболеваний [31].

Бетулин и его производные привлекают внимание в фармацевтике, благодаря своим многочисленным биологическим эффектам. Экстракты березовой коры, содержащие бетулин, обладают лечебными свойствами, такими как заживляющее, противовоспалительное и желчегонное действие. [24-26].

Бетулин обладает свойствами, которые могут подавлять развитие вирусов герпеса [32-34]. Исследования показывают, что он может мешать репликации вируса, что делает его потенциально полезным в лечении герпеса. Кроме того, бетулин и его производные изучались на предмет туберкулостатического действия, и было обнаружено, что они могут оказывать ингибирующее воздействие на микобактерии туберкулёза. Научные исследования подтверждают, что бетулин может действовать как эффективный анти-ВИЧ-агент. Он проявляет ингибирующее действие на различные этапы жизненного цикла ВИЧ, включая вступление вируса в клетку, обратную транскрипцию и транскрипцию. Это связано с его способностью изменять структуру клеточной мембраны, что затрудняет проникновение вируса в клетку, а также с его воздействием на ферменты, участвующие в репликации ВИЧ [35-37]. Бетулин и его производные, такие как бетулиновая кислота и лупеол, продолжают изучаться как потенциальные антиретровирусные препараты, которые могут быть использованы в комплексной терапии ВИЧ-инфекции. Эти исследования открывают новые перспективы для разработки лекарственных средств, основанных на природных соединениях, и могут внести значительный вклад в борьбу с ВИЧ/СПИДом. Эти свойства делают бетулин и его производные интересными для дальнейших исследований и разработки новых лекарственных средств.

Бетулин и бетулиновая кислота вызывают повышенный интерес в медицинских исследованиях как возможные кандидаты для разработки новых антивирусных средств. Изучения подтвердили, что бетулин и его производные эффективны против вируса гриппа типа А [38].

Производные бетулина, такие как бетулиновая и бетулоновая кислоты, действительно обладают улучшенными фармакологическими свойствами по сравнению с чистым бетулином. Это связано с различиями в их химической структуре, которые могут усиливать или придавать новые свойства соединениям.

- Бетулиновая кислота обладает выраженными противовоспалительными свойствами, что делает её перспективной для лечения состояний, связанных с воспалением [39-42].

- Бетулоновая кислота проявляет противоязвенные эффекты, что может быть полезно для создания новых лекарственных средств для лечения язвенной болезни [43-44].

- Производные бетулоновой кислоты также известны своими антиоксидантными свойствами, что может способствовать защите клеток печени от окислительного стресса и других повреждающих факторов [45].

Эти свойства делают производные бетулина многообещающими кандидатами для разработки новых гепатопротекторных препаратов, которые могут помочь в лечении заболеваний печени и других, связанных с ними состояний.

Согласно исследованию [46], диацетат бетулина проявляет свои свойства как гиполипидемическое и желчегонное средство.

Сравнительный анализ показывает, что тритерпеноиды, такие как бетулин и его производные, могут быть эффективными в снижении уровня холестерина. В исследованиях на животных моделях гиперлипидемии бетулин и его диацетат при дозировках 75 и 150 мг/кг проявили значительную активность, что делает их обещающими кандидатами для дальнейшего изучения и потенциального использования в лечении гиперлипидемии [27].

Эти данные подчеркивают важность продолжения исследований, чтобы полностью понять механизмы действия соединений и определить их безопасность и эффективность для возможного применения в клинических условиях.

Исследование проведено на белых крысах, где было выявлено, что при введении диацетата бетулина в сочетании с физической нагрузкой происходит снижение окислительных процессов в организме. Уровень малонового диальдегида снижается, а активность антиоксидантных ферментов - супероксиддисмутазы и каталазы - повышается. Этот эффект связан с антирадикальной активностью диацетата бетулина, что подтверждает его антиоксидантные свойства[47].

Диацетат бетулина — это производное бетулина, которое является ещё одним пентациклическим тритерпеноидом, найденным в коре берёзы и других растениях. Диацетат бетулина получают путём химической модификации

бетулина, при которой две гидроксильные группы бетулина ацетируются. Это соединение привлекает внимание исследователей благодаря своим потенциальным противоопухолевым свойствам. В лабораторных исследованиях диацетат бетулина показал способность индуцировать апоптоз (программируемую клеточную смерть) в раковых клетках, что делает его интересным кандидатом для разработки новых онкологических препаратов.

В настоящее время новые биологически активные пищевые добавки и препараты разрабатываются на основе бетулина и его производных. Существующие способы извлечения и очистки этих веществ являются сложными и требуют больших энергозатрат, что увеличивает их стоимость и ограничивает области их применения[48-49].

Разработка новых пищевых добавок и лекарственных препаратов на основе бетулина включает в себя множество этапов, начиная от изучения биохимических свойств и заканчивая клиническими испытаниями. Это открывает перспективы для создания новых продуктов, которые могут улучшить здоровье и благополучие людей.

Издавна наружная часть бересты была известна как источник берестового дегтя. Берестовый дёготь, получаемый из внешнего слоя берёзы, используется в народной медицине. Он обладает антисептическими, противовоспалительными и противозудными свойствами, что делает его эффективным средством при лечении различных кожных заболеваний, включая чесотку. Берестовый дёготь содержит фенольные соединения, такие как гваякол и крезол, которые и обуславливают его лечебные свойства. Кроме того, он используется в ветеринарии для лечения кожных заболеваний у животных. В народной медицине береста также использовалась как антисептик для лечения гнойных ран и кожных заболеваний. Ученый Велер отметил, что бетулин, содержащийся в бересте, обладает антиоксидантным, противовоспалительным и антиканцерогенным свойствами, тем самым может влиять на различные биологические пути, что делает его перспективным кандидатом для разработки новых лекарственных препаратов. [50].

Исследование цитотоксической активности производных бетулина является важным аспектом в разработке новых противоопухолевых препаратов. Бетулин и его производные показали обещающие результаты в ингибировании роста различных типов раковых клеток.

В ходе таких исследований обычно оценивают способность соединений уменьшать жизнеспособность раковых клеток в культуре [51-52], а также может подавлять вирус ВИЧ-инфекции.

Бетулин всегда сопровождается лупеолом, составляющим 10% от общего содержания. Ранее было установлено, что лупеол обладает цитостатическим действием. Исследования показали, что лупеол сильно ингибирует активность лейкоцитарной эластазы человека и обладает свойствами подавления роста клеток лейкемии.

Одной из ключевых особенностей тритерпеноидов лупанового ряда является их естественное происхождение, что делает их привлекательными для использования в фармацевтической сфере. Благодаря своим свойствам, бетулин и его производные открывают широкие перспективы для применения в различных отраслях, включая медицину, косметическую и пищевую промышленность и другие.

Среди других представителей пентациклических тритерпеноидов немаловажную роль в жизни людей играют олеановая кислота **5**, и урсоловая кислота **6** (рис.3).

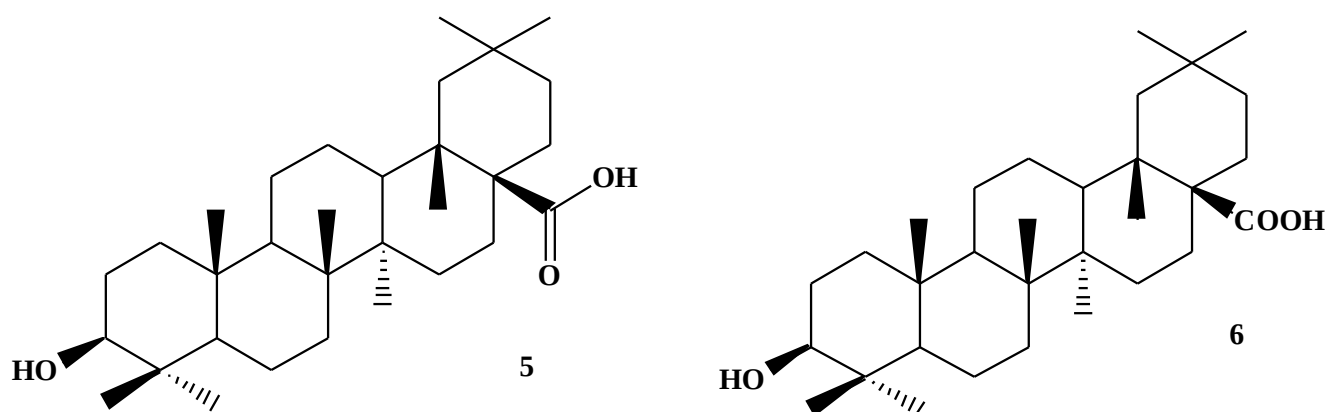


Рисунок 3 – Структурная формула олеановой и урсоловой кислот

Олеановая кислота встречается в различных растениях, включая оливковое масло, яблочная кожура и многие лекарственные травы. Она обладает антиоксидантными, противовоспалительными, антимикробными и антиканцерогенными свойствами.

Исследования показывают, что олеановая кислота может способствовать снижению уровня холестерина в крови, улучшению функций печени и защите кожи от ультрафиолетового излучения. Эти свойства делают олеановую кислоту перспективной для разработки новых лекарственных препаратов и пищевых добавок.

Олеаноловая кислота расширяет сосуды сердца и мозга, улучшает кровоснабжение, обладает тонизирующим действием, повышает умственную работоспособность, регулирует процессы возбуждения и торможения в коре головного мозга, увеличивает устойчивость к стрессовым ситуациям. Известно, что при пиелонефритах и циститах данные препараты усиливают действие антибиотиков и сульфаниламидных препаратов.

Урсоловая кислота — это природный пентациклический тритерпеноид, который встречается во многих растениях, включая яблочную кожуру, лаванду, розмарин и тимьян. Это соединение известно своими противовоспалительными, антиоксидантными, антимикробными и антитуморными свойствами. Урсоловая кислота также исследуется на предмет её потенциального использования в лечении диабета, улучшения здоровья кожи и стимулирования роста мышц.

В фармацевтической промышленности урсоловая кислота привлекает внимание благодаря своей способности модулировать различные биологические пути, что делает её перспективной для разработки новых лекарственных средств.

Урсоловая и олеановая кислоты были предложены для лечения и профилактики рака кожи. Исследования показывают, что они обладают значительной способностью ингибировать рост опухолей, сравнимой с действием ретиноевой кислоты - известного ингибитора опухолей.

Тритерпеновые кислоты путем стимуляции кровеносного потока к коже головы и активации материнских клеток волос, способствуют росту волос, предотвращая их выпадение и появление перхоти. Рекомендуется использовать в медицине в качестве антиоксиданта в составе косметических продуктов для сухой и стареющей кожи, для средств до и после загара, а также для укрепления волос и борьбы с перхотью и фолликулитом.

1.2 Методы определения пентациклических тритерпеноидов

Анализ пентациклических тритерпеноидов — сложных органических соединений, обнаруженных во многих растительных источниках, — требует чувствительных и специфических методов. Вот некоторые из наиболее распространенных аналитических техник, используемых для их определения:

- **Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ):** Этот метод обеспечивает мощный инструмент для анализа тритерпеноидов, позволяя идентифицировать соединения на основе их молекулярной массы и структурных фрагментов.
- **Газовая хроматография (ГХ):** Газовая хроматография (ГХ) представляет собой эффективный метод, который применяется для разделения, идентификации и количественной оценки пентациклических тритерпеноидов. Одними из основных проблем, с которыми сталкиваются при проведении анализа методом ГХ, являются необходимость дериватизации и высокая летучесть исследуемых соединений.
- **Масс-спектрометрия (МС):** МС используется в комбинации с ВЭЖХ или ГХ для определения молекулярной массы и структуры тритерпеноидов. Это мощный инструмент для структурной элюидации.
- **Ядерно-магнитный резонанс (ЯМР):** ЯМР позволяет получить детальную информацию о структуре молекул, включая тритерпеноиды. Этот метод особенно полезен для определения стереохимии соединений.

- **УФ-видимая спектроскопия:** Хотя тритерпеноиды обычно не имеют сильного поглощения в УФ-видимой области, этот метод может использоваться в комбинации с другими методами для их определения.

6. Тонкослойная хроматография (ТСХ): ТСХ — это быстрый и недорогой метод для предварительного разделения и идентификации тритерпеноидов.

Эти методы могут комбинироваться для повышения точности и надёжности результатов.

Проведенный анализ литературных данных о методах определения пентациклических тритерпеноидов указывает на активное использование хроматографических методов (таблица 1).

Таблица 1 — Определение пентациклических тритерпеноидов хроматографическими методами анализа

Объекты исследования	Метод	Метрологические характеристики	Литература
Бетулиновая кислота, бетулиновый альдегид и ацетат бетулинового альдегида.	ЖХ-МС	Диапазон концентраций 0,005 до 0,015 мг/л и 0,002 до 0,84 мг/л	[53]
маслиновая, олеаноловая и урсоловая кислот	ЖХ–МС	диапазон концентраций от 0,005 до 15 мкМ	[54]
erythodiol, betulin, acetyl ursolic acid, ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid, and pomolic acid	ВЭЖХ	Относительное стандартное отклонение (RSD) общих внутридневных колебаний составило менее 2,2%, а RSD внутридневных колебаний - менее 2,8%.	[55]

Продолжение таблицы

бетулин, эритродиол, фриделин, лупеол, β -амирин, α -амирин, бетулина, олеаноловая и урсоловая кислоты	ВЭЖХ-МС	пределы обнаружения в экстрактах биомассы растений 3 до 12 мкг л ⁻¹	[56]
---	---------	--	------

Использование комбинации жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) и жидкостной хроматографией высокого давления (ВЭЖХ) позволяет эффективно анализировать различные биологически активные соединения, такие как бетулиновая кислота, бетулиновый альдегид, ацетат бетулинового альдегида, масличная, олеаноловая и урсоловая кислоты, а также другие тритерпеноиды.

Диапазоны концентраций: Методы ЖХ-МС и ВЭЖХ позволяют работать с широким диапазоном концентраций анализируемых веществ. Для бетулиновой кислоты и связанных с ней соединений диапазон составляет от 0,005 до 0,015 мг/л и от 0,002 до 0,84 мг/л, что указывает на способность метода к количественному определению следовых веществ. Для маслиновой, олеаноловой и урсоловой кислот диапазон концентраций составляет от 0,005 до 15 мкМ, что также свидетельствует о высокой чувствительности метода.

Точность и повторяемость: ВЭЖХ показал хорошую точность и повторяемость при анализе erythodiol, бетулина и других соединений, с относительным стандартным отклонением (RSD) внутридневных колебаний менее 2,2% и RSD внутридневных колебаний менее 2,8%. Это указывает на стабильность и надежность метода при многократном анализе.

Пределы обнаружения: ВЭЖХ-МС обеспечивает низкие пределы обнаружения в экстрактах биомассы растений, варьирующие от 3 до 12 мкг л⁻¹ для бетулина, эритродиола и других соединений. Это позволяет обнаруживать и определять вещества в очень низких концентрациях.

Методы ЖХ-МС и ВЭЖХ могут быть успешно применены для анализа тритерпеноидов в различных биологических матрицах, включая экстракты растительного происхождения. Это важно для качественного и количественного контроля в фармацевтической промышленности, при изучении биологической активности растительных препаратов и в экологических исследованиях.

В целом, таблица демонстрирует эффективность и адекватность применения ЖХ-МС и ВЭЖХ для анализа тритерпеноидов, подчеркивая их важность в качестве инструментов для научных исследований и промышленного контроля качества.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) представляет собой предпочтительный метод для разделения и определения количества пентациклических тритерпеноидов. По сравнению с газовой хроматографией (ГХ), ВЭЖХ обладает рядом преимуществ, включая более быстрый анализ, высокое разрешение и чувствительность. При анализе тритерпенов методом ВЭЖХ важными факторами являются очистка образца, состав подвижной фазы, температура, скорость потока подвижной фазы, температура колонки, типы колонок и детекторы. Часто используемыми компонентами подвижной фазы являются вода, метанол и ацетонитрил. В определенных случаях при ВЭЖХ анализе в пробу добавляют муравьиную кислоту [57-59], ацетат аммония [60-61] и уксусную кислоту [62] для избежания появления хвостов и упрощения разделения компонентов.

В настоящее время метод газовой хроматографии широко применяется для исследования пентациклических тритерпеноидов. Газовая хроматография является более экономичным способом анализа, обладающим множеством преимуществ, включая быстрое время проведения анализа, высокую разрешающую способность, низкие требования к образцу и объему реагента [63]. Капиллярный электрофорез (КЭ) был использован в нескольких исследованиях для выделения и определения пентациклических тритерпеноидов в растительных веществах. Конкретно, для выявления олеанина и урсолина в образцах *Swertia mussotii* Franch был разработан капиллярный зональный электрофорез (КЗЭ), имеющий прямой УФ-детектор, этот метод требует небольшого количества электролитов, что обеспечивает высокое

разрешение и быстрое время анализа. Несмотря на свои преимущества, КЗЭ не способен различить соединения с близким отношением заряда к массе.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) - это метод, который применяется для разделения соединений в растениях. Определение и количественный анализ пентациклических тритерпеноидов можно провести с помощью ТСХ. Этот метод является доступным по цене и позволяет многократное обнаружение на одной и той же силикагелевой пластине за короткое время анализа[64-65].

ЯМР-спектроскопия представляет собой количественный аналитический метод, применяемый для изучения молекулярной структуры сложных соединений, полученных из растений. Этот метод обеспечивает объективное представление о составе образца, предоставляет детальную молекулярную информацию и позволяет одновременно анализировать несколько соединений [66-67].

В 2008 году с помощью ЯМР-спектроскопии идентифицирован диацетат бетулина [68]. В 2011 году российские учёные с применением хромато-масс-спектрометрии провели анализ экстракта берёзовой коры и установили наличие бетулина[69]. Другие исследователи успешно экстрагировали и определили бетулин и бетулиновую кислоту из берёзовой коры, используя методы высокоэффективной жидкостной хроматографии [70]. Также был проведён анализ экстракта высушенного карпофора, в результате которого хроматографическими методами был выделен и идентифицирован бетулин [71].

Традиционно пентациклические тритерпеновые соединения определяли методом газовой хроматографии, хотя их высокая молекулярная масса наряду с низкой летучестью требовала проведения стадии дериватизации перед ее анализом [72-74]. Совсем недавно для определения этих соединений была внедрена высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [75-76]. Однако низкое поглощение УФ-излучения, обеспечиваемое их насыщенным скелетом, потребовало этапа дериватизации для повышения чувствительности [77-78]. Таким образом, методы, используемые для анализа пентациклических тритерпенов, имеют ряд недостатков, и ни один из них не позволяет одновременно определить несколько разновидностей пентациклических тритерпенов.

Хотя хроматографические методы анализа остаются востребованными, для выявления пентациклических тритерпеноидов в последнее время все чаще используют электрохимические методы.

Причина заключается в том, что электрохимические методы обладают рядом преимуществ, таких как высокая чувствительность, быстрота анализа и возможность прямого анализа в сложных биологических матрицах, также являются менее затратными и способными решать сложные задачи по селективному определению аналитов с высокой точностью.

1.3 Особенности электрохимических методов определения пентациклических тритерпеноидов

Из-за описанных недостатков хроматографических и спектрометрических методов, существует необходимость в разработке более селективных методов. В настоящее время электрохимические методы, включая вольтамперометрию, широко используются для определения следовых количеств образцов [79].

Бетулиновая кислота количественно определена в 2013 году с использованием вольтамперометрического метода на свинцово-пленочном электроде. Обнаруживается в коре определенных растений, в основном, берёзы пушистой. Проявляет селективное цитотоксическое действие против различных опухолевых клеток. Доказана противоопухолевая активность на клетках опухолей человека (меланома, лимфома, нейробластома) и на модели *in vivo* на мышях с человеческой меланомой. В настоящее время бетулиновая кислота проходит клинические испытания в США как средство лечения злокачественной меланомы.

В работе [80] количественное определение проводили с помощью адсорбционной инверсионной вольтамперометрии – это быстро развивающийся метод с множеством возможностей применения в анализе органических соединений благодаря его высокой чувствительности, точности, прецизионности и дешевизне оборудования.

В 2005 году впервые использовали свинцово-пленочный электрод для определения неорганических ионов, таких как Co(II) и Ni(II) [81]. До настоящего

времени свинцово-пленочный электрод использовался для определения других неорганических ионов и биологически активных соединений, таких как тестостерон, цитрат силденафила (виагра) и кофейная кислота [82-84]. В 2011 году была описана микроскопическая и электрохимическая характеристика свинцовой пленки, нанесенной *in situ* на стеклоуглеродный электрод в ацетатных буферных растворах, в среде, обычно используемой в измерениях адсорбционной инверсионной вольтамперометрии, проводимых для количественного определения биологически активных соединений [85]. Показано, что структура осажденного слоя и отклик электрода после накопления органического соединения строго зависят от режима осаждения пленки свинца. Индуцированный свинцом пленочный электрод продемонстрировал явное преимущество простой подготовки, хорошей воспроизводимости и электрохимического обновления поверхности. Кроме того, пределы обнаружения, полученные для биологически активных соединений на свинцово-пленочном электроде, ниже, чем на других чистых и модифицированных углеродных электродах.

По причинам, указанным выше, в работе [80] в качестве рабочего электрода использовали свинцово-пленочный электрод. Исследователи смогли разработать и оптимизировать недорогой, чувствительный и точный адсорбционный инверсионный вольтамперометрический метод с использованием свинцово-пленочного электрода для определения бетулиновой кислоты в растительных экстрактах. Благодаря объединению процесса нанесения пленки свинца и накопление бетулиновой кислоты время измерений было сокращено. В данной работе было изучено влияние потенциала формирования пленки свинца и накопления природного соединения на вольтамперометрический отклик. Потенциал изменялся в диапазоне от $-0,7$ до $-1,2$ В. Полученные результаты представлены на рисунках 4а, 4б.

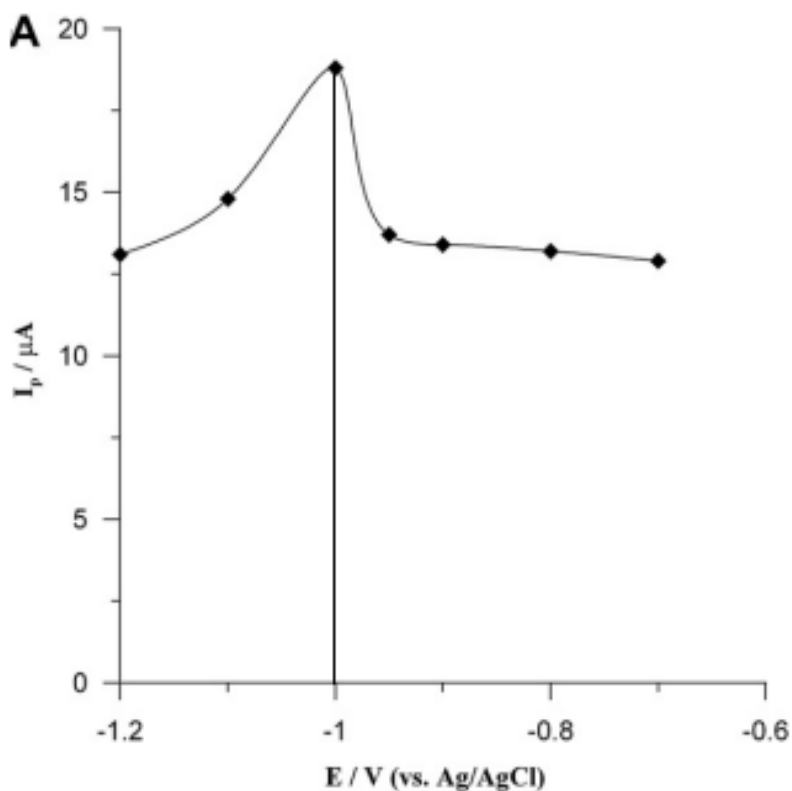


Рисунок 4а – Зависимость высот пиков окисления от потенциала одновременного осаждения свинцовой пленки и накопления бетулиновой кислоты (А)

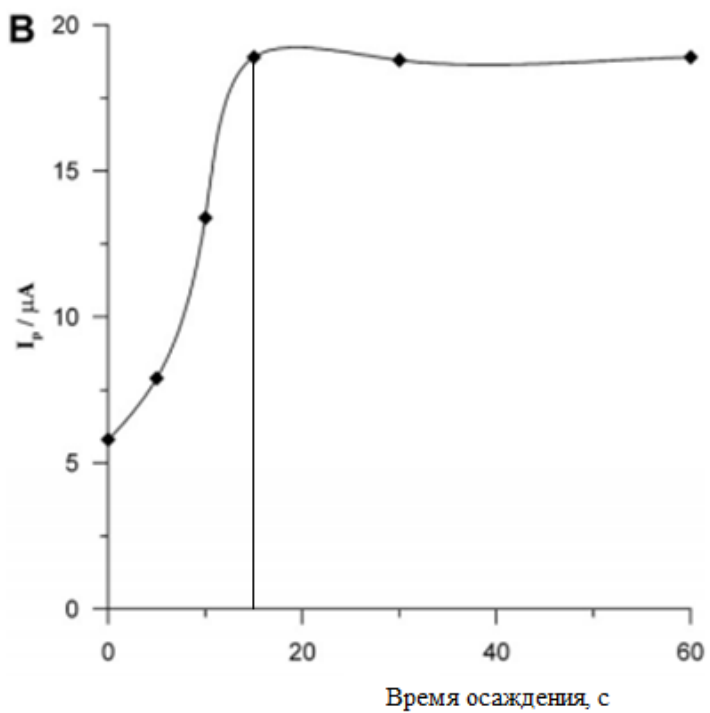


Рисунок 4б – Зависимость высот пиков окисления от времени одновременного осаждения свинцовой пленки и накопления бетулиновой кислоты (В)

Результаты показывают, что пиковый ток бетулиновой кислоты достиг максимального значения, поскольку был использован потенциал одновременного осаждения свинцовой пленки и накопления бетулиновой кислоты $-1,0$ В, поэтому для дальнейшего изучения был выбран этот потенциал. Далее, они изучили влияние времени одновременного осаждения свинцовой пленки и накопления бетулиновой кислоты в диапазоне от 0 до 60с. Полученные результаты представлены на рис. 4б. Наблюдалось, что ток пика окисления увеличивался с увеличением времени до 15с, а затем был почти стабильным. Для дальнейших измерений использовали время одновременного осаждения свинцовой пленки и накопления тритерпена 15с. На рисунке 5 приведены вольтамперограммы, полученные в ходе определения тритерпеноида в экстракте коры березы.

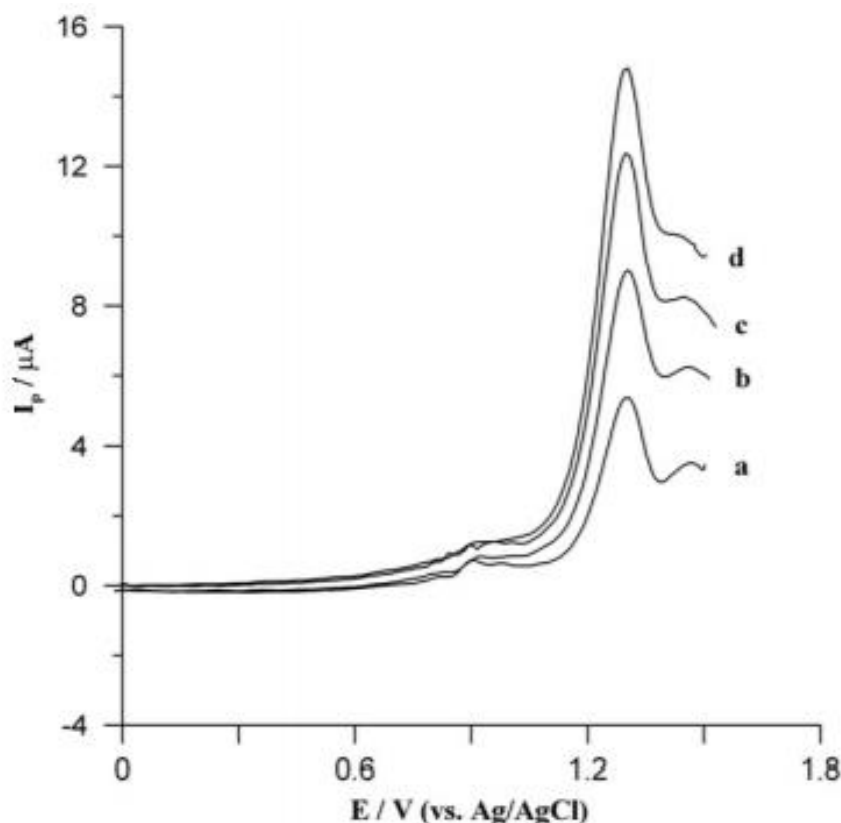


Рисунок 5 – Вольтамперограмма бетулиновой кислоты

Как видно из этого рисунка, матрица из растительного экстракта не блокировала поверхность электрода и не проявляла вольтамперометрических помех. Обнаруженное количество бетулиновой кислоты в экстракте коры березы, полученный предлагаемым вольтамперометрическим методом с использованием

свинцово - пленочного электрода с гальваническим покрытием *in situ*, составило 2,47 г/л.

Таким образом, в работе [80] электрохимическое обнаружение было впервые применено для определения пентациклического тритерпеноида. Процесс нанесения свинцовой пленки и накопление бетулиновой кислоты проводились одновременно из раствора гидроксида натрия (рН 9,18) при потенциале -1,0 В. Это позволило сократить время анализа, поскольку больше нет необходимости выполнять дополнительный этап осаждения свинцовой пленки на поверхности стеклоуглеродного электрода. Разработанная методика была успешно применена для определения тритерпена в экстрактах коры березы.

Еще одно упоминание о количественном определении пентациклических тритерпеноидов представлено в работе [86]. Исследователи количественно определяли олеановую и урсоловую кислоты, обладающие выраженными биологическими свойствами. Все вольтамперометрические измерения проводились в 2М растворе гидроксида натрия, содержащего переменные концентрации урсоловой или олеаноловой кислоты. Вольтамперограммы регистрировались в диапазоне от -1,0 до 1,7 В с амплитудой 50 мВ и частотой 200Гц. После вычитания фона вольтамперограмму вырезали в диапазоне потенциалов от 0 до 1,7В. Измерения проводились в несмешанных растворах. Олеановая и урсоловая кислоты давали пики окисления на свинцово-пленочном электроде при потенциале 1,4 В (рисунок 6). Сигнал возрастает пропорционально с увеличением концентрации тритерпенов в растворе. Это демонстрирует способность использовать вольтамперометрию в количественных анализах олеаноловой и урсоловой кислот.

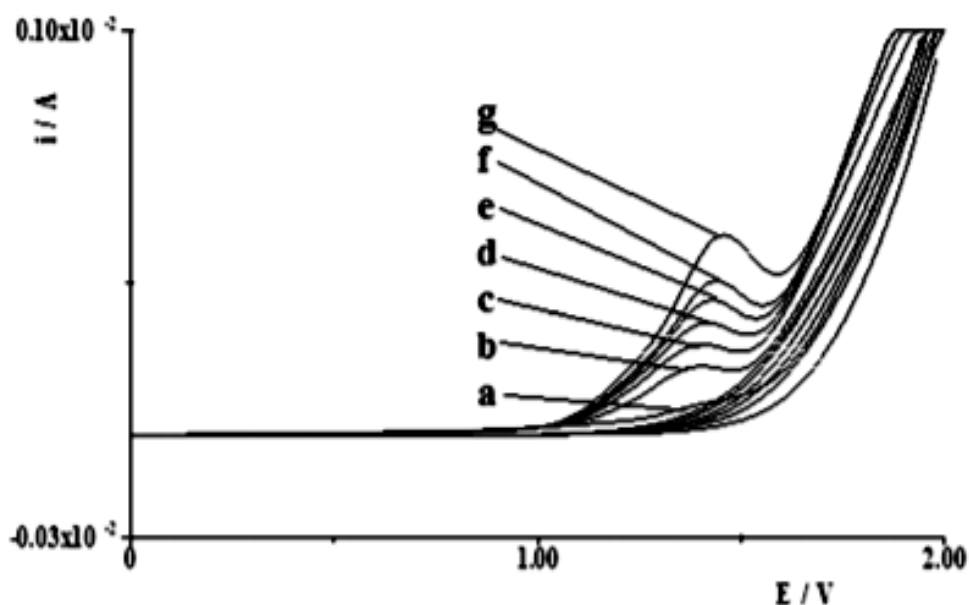


Рисунок 6 – Вольтамперограмма олеановой и урсоловой кислот на свинцово-пленочном электроде

В этой работе [86] была представлена простая и быстрая вольтамперометрическая процедура с использованием немодифицированного стеклоуглеродного электрода в качестве нового инструмента для определения олеаноловой и урсоловой кислот в растительном материале после хроматографического разделения. Это первое применение вольтамперометрии для определения олеановой и урсоловой кислот. Вольтамперограммы регистрировали из раствора, содержащего гидроксид натрия в диапазоне потенциалов от -1,0 до 1,7 В. Полученные результаты указывают на возможность использования электрохимического детектирования на стеклоуглеродном электроде.

Таким образом, в связи с тем, что данные по определению пентациклических тритерпеноидов электрохимическими методами анализа ограничены несколькими исследованиями, нами для расширения возможностей применения вольтамперометрии для определения других представителей пентациклических тритерпеноидов был и выбран этот метод исследования.

1.4 Вольтамперометрическое определение органических соединений на модифицированных электродах

Электроаналитические методы играют ключевую роль в медицинских, клинических и фармацевтических исследованиях. В последние годы особое внимание уделяется вольтамперометрическим методам определения лекарственных препаратов с использованием химически модифицированных электродов на основе наноматериалов. Эти методы привлекают внимание благодаря своей чувствительности и селективности в определении электроактивных аналитов как в качественном, так и в количественном аспектах. Химически модифицированные электроды - это электроды, которые специально обработаны каким-либо реагентом, обладающим желаемыми свойствами, чтобы придать им свойства реагента. Таким образом, можно создавать электроды для различных целей и применений, открывая новые возможности для электроанализа [87-90].

Поверхностная модификация - это процесс изменения химического состава и структуры поверхности материала без изменения его объемных свойств.

Модифицирование электродов углеродными волокнами [91], углеродными нанотрубками [92], графеном, техническим углеродом, позволяют задавать электропроводные и теплопроводные свойства материала, менять морфологию его поверхности, что является критичным для производства проводящих поверхностей для электрохимических сенсоров [93].

Углеродные материалы обладают многими подходящими свойствами для модифицирования электродов, которые достаточно часто применяются в электроаналитической химии. Мезопористый углерод является своего рода новым передовым углеродным материалом. С момента открытия мезопористого углерода в 1999 году [94] все большее внимание сосредоточено на фундаментальных исследованиях данного материала из-за их чрезвычайно однородной структуры и большого объема пор, а также высокой удельной площади поверхности перестраиваемого распределения пор по размерам и химической инертности. Во

многим благодаря способности быстрого переноса электронов, избегая поверхностного обрастания и отличной электрокаталитической активности мезопористого углерода широко используется в зондировании [95-97], конструкции биореактора [98], хранении энергии [99], электрокаталитическом применении [100-103] и т.д.

Мезопористый углерод играет важную роль в электрохимии благодаря своей уникальной структуре и свойствам. Он обладает высокой пористостью с размерами пор, лежащими в диапазоне от 2 до 50 нанометров, что обеспечивает большую площадь поверхности и способствует улучшению электрохимической активности.

Применения мезопористого углерода включают:

- Электрохимические сенсоры: Повышают чувствительность и селективность детектирования различных аналитов, включая газы и биомолекулы.
- Катализ: Улучшают каталитическую активность в реакциях, таких как водородное топливо и окисление органических соединений.

Благодаря этим свойствам, мезопористый углерод является перспективным материалом для разработки новых электрохимических устройств и технологий.

В вольтамперометрии используются различные типы электродов, каждый из которых имеет свои уникальные свойства и применение. Вот некоторые из наиболее распространенных электродов:

- Стеклоуглеродные электроды: Обладают хорошей проводимостью, химической инертностью и широким потенциальным окном. Их часто используют для окислительно-восстановительных реакций.
- Платиновые электроды: Платина является инертным металлом, который не реагирует с большинством химических веществ, что делает её идеальной для использования в электрохимии.
- Золотые электроды: Золото также инертно и может использоваться для изучения бетулина, которое образует самособирающиеся монослои на золотой поверхности.

- **Углеродные пасты и модифицированные электроды:** Эти электроды можно модифицировать для улучшения их свойств или для введения специфических функциональных групп, которые могут улучшить селективность и чувствительность.

Выбор электрода зависит от конкретного анализа и свойств анализируемого вещества.

Однако с увеличением количества задач, решаемых с помощью вольтамперометрии, и усложнением химической структуры анализируемых веществ, возникла необходимость в разработке новых типов электродов и методов модификации существующих, чтобы повысить чувствительность и селективность метода. Это включает в себя:

- **Модификацию поверхности электродов:** Например, покрытие электродов тонким слоем другого материала или внедрение специфических химических групп, которые могут улучшить взаимодействие с анализируемыми веществами.

- **Разработку композитных электродов:** Сочетание различных материалов может привести к созданию электродов с новыми свойствами, такими как улучшенная проводимость или каталитическая активность.

- **Использование нанотехнологий:** Наночастицы и наноструктуры могут быть использованы для увеличения активной поверхности электрода и улучшения его электрохимических характеристик.

- **Применение биосенсорных технологий:** Включение биологических молекул, таких как ферменты или антитела, может сделать электроды чрезвычайно селективными по отношению к определенным веществам.

Эти инновации могут значительно расширить возможности вольтамперометрии, позволяя анализировать более сложные вещества с высокой точностью и чувствительностью

Модификация электродной подложки путем нанесения химических веществ является ключевым аспектом в улучшении электрохимических методов анализа, таких как вольтамперометрия. Вот несколько методов модификации:

- **Физическое осаждение:** Нанесение слоев материала на электрод с помощью физических методов, таких как напыление или погружение.
- **Химическое осаждение:** Использование химических реакций для создания тонких пленок на поверхности электрода.
- **Самосборка:** Формирование монослоев на поверхности электрода за счет химического взаимодействия между электродом и модифицирующим агентом.
- **Электрохимическое осаждение:** Нанесение материала на электрод путем пропускания электрического тока через раствор, содержащий ион предшественника.

Эти методы позволяют улучшить свойства электродов, такие как каталитическая активность, селективность и чувствительность, что важно для анализа сложных веществ.

Хотя химически модифицированные электроды могут потерять универсальность, однако их селективность в определении элементов и органических веществ значительно возрастает.

Для изменения поверхности электрода применяют два метода: метод "in situ" и "ex situ".

В методе «in situ» модификатор добавляется непосредственно в раствор фонового электролита. В качестве модификаторов могут использоваться металлы, способствующие осаждению неорганических элементов или образующие комплексы с органическими соединениями, а также водорастворимые органические вещества, такие как лиганды, БАВы или полимерные материалы. Также возможно введение органических молекул, которые самоорганизуются на поверхности электрода, образуя упорядоченные монослои. Часто применяются комбинации модификаторов для достижения нужного уровня аналитического сигнала. При этом модификатор закрепляется за счет адсорбции, что может сократить срок службы модифицированного электрода, и перед каждым измерением требуется повторная модификация поверхности.

В альтернативном методе «ex situ» модификатор предварительно иммобилизуется на поверхности или внутри электрода. Этот способ позволяет

создать высокоселективные электроды за счет сочетания различных материалов поверхности и модификатора. Закрепление модификатора может осуществляться через физическую адсорбцию, ковалентную связь, физические процессы или включение в полимерную пленку. Преимущества этого подхода включают формирование высокоселективных электродов и сокращение времени анализа.

Выбор между этими методами зависит от конкретных требований к электроду и условий его использования. Методы "in situ" позволяют наблюдать и контролировать изменения поверхности в реальном времени, в то время как методы "ex situ" обеспечивают более равномерное покрытие и подходят для более сложных модификаций.

В последние годы сообщалось о модификации стеклоуглеродных электродов различными углеродными наноматериалами (например, углеродными нанотрубками, углеродными наночастицами и наноалмазами), и модифицированные электроды использовались для изучения окислительно-восстановительного поведения органических соединений [104-112].

Исследования по применению солей арендиазония в качестве модификатора поверхности впервые описано в работе научной группы Delamar [113].

Исследования по использованию солей арендиазония для модификации поверхности электродов действительно открыли новые перспективы в электрохимии. Соли арендиазония привлекательны благодаря своей способности образовывать ковалентные связи с углеродными материалами электродов, такими как графит или углеродные нанотрубки. Это позволяет создавать стабильные и долговечные модифицированные слои.

Преимущества использования солей арендиазония включают:

- **Высокую стабильность:** Модифицированные слои устойчивы к отмыванию и деградации.
- **Простоту модификации:** Процесс не требует сложного оборудования или дорогостоящих материалов.

- **Возможность функционализации:** Введение различных функциональных групп позволяет нацеливать модификацию на конкретные аналиты.

Эти качества делают соли арендиазония идеальными для создания электрохимических сенсоров с высокой чувствительностью и селективностью.

Использование тозилатов арендиазония в электрохимии - это тема, связанная с электрохимическими реакциями арендиазониевых соединений, которые являются производными сульфоновой кислоты.

Модификация поверхности электродов с использованием арендиазоний тозилатов - это увлекательная область электрохимии, которая включает в себя присоединение органических молекул к поверхности электродов для изменения их свойств. Этот процесс особенно полезен для создания электродов со специфическими функциональными возможностями для использования в датчиках, катализе и электронных устройствах. Эти соединения известны своей универсальностью в органическом синтезе и химии поверхности, особенно при модификации поверхностей электродов. В электрохимии тозилаты арендиазония могут быть использованы для нанесения органических слоев на поверхности электродов. Этот процесс обычно включает образование ионов диазония из производных анилина, которые затем электрохимически восстанавливаются с образованием ковалентной связи с поверхностью электрода. Тозилатная группа (п-толуолсульфонат) действует как хорошая связующая группа, способствуя образованию иона диазония.

Изучение влияния концентрации диазониевых солей показало, что структура и характеристики получаемого слоя изменяются: оптимальная плотность слоя наблюдается при концентрации вещества в 5 ммоль/л. Было обнаружено, что органические слои, сформированные в ходе химической реакции, прочно связаны с электродом и устойчивы к деструкции, даже под воздействием длительного ультразвука. Процесс функционализации поверхности можно объяснить активным участием диазокатионов в редукционных реакциях, ведущих к появлению радикалов. Это было экспериментально подтверждено с использованием ЭПР-

спектроскопии. Полученные радикалы взаимодействуют с материалом электрода, создавая ковалентные связи. Механизм присоединения арильных групп иллюстрирован на рисунке 7.

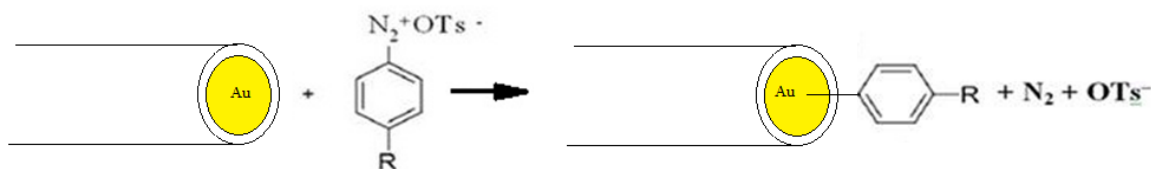


Рисунок 7 – Схема поверхностной модификации электродов солями аренидазония

Ковалентное изменение поверхности материалов позволяет получать химически стойкие продукты в различных условиях, в отличие от нековалентных взаимодействий.

Ковалентное изменение поверхности электродных материалов — это процесс, при котором атомы или молекулы химически связываются с поверхностью электрода, образуя ковалентные связи. Это может быть достигнуто различными методами, включая:

- Химическое модифицирование: Использование реактивных химических соединений, которые могут взаимодействовать с поверхностью электрода и образовывать ковалентные связи.
- Плазменная обработка: Использование плазмы для активации поверхности электрода, что способствует образованию ковалентных связей с функциональными группами.
- Фотохимическое присоединение: Использование света для активации фоточувствительных соединений, которые затем могут ковалентно связываться с поверхностью электрода.

Эти методы позволяют создавать на поверхности электродов тонкие пленки или слои с определенными химическими или физическими свойствами, что может быть полезно для улучшения электрохимической активности, стабильности или селективности электрода.

В работе [114] исследовался процесс мультислойной модификации. Для определения толщины сформировавшегося слоя использовалась сканирующая

силовая микроскопия (SFM). Результаты показали, что с увеличением продолжительности электрохимического восстановления толщина слоя возрастала с 0,8 нм до 20 нм за 30 минут. Это увеличение толщины коррелировало с ростом интенсивности характеристических полос колебаний в инфракрасных спектрах исследуемых материалов. Также было выявлено, что органическая пленка обладает полным блокирующим эффектом.

В 2001 году было выявлено, что при электрохимическом восстановлении соли диазония могут образовывать ковалентные связи с металлами [115]. Исследование активности арилдиазоний тетрафторборатов является важным в контексте химического синтеза и материаловедения. Соли диазония известны своей способностью вступать в различные химические реакции, что делает их ценными реагентами для модификации поверхностей и создания сложных органических структур.

Исследования, касающиеся использования ароматических солей диазония в качестве реагентов для модификации металлических поверхностей, открывают новые перспективы в области материаловедения и электрохимии. Эти соли могут применяться для создания тонких пленок или покрытий на металлах, что может улучшить их коррозионную стойкость, электрические свойства или каталитическую активность.

В процессе электрохимического восстановления ароматические соли диазония могут взаимодействовать с металлической поверхностью, образуя ковалентные связи и изменяя химический состав и физические свойства поверхности. Это позволяет получать металлические поверхности с новыми функциональными свойствами, что может найти применение в различных отраслях промышленности, включая электронику, медицину и защиту от коррозии.

Электрохимическая модификация представляет собой ключевую технологию для создания сенсорных устройств, применяемых в разнообразных аналитических приложениях. Недавно был разработан инновационный мультифункциональный сенсор на основе золотого электрода, модифицированного с использованием двух различных солей диазония: 4-НБДТ и диазопроизводного

фенилбора пиколината. При оптимальном выборе эксплуатационных параметров такая модифицированная пленка может сохранять электрохимическую активность и служить в качестве сенсора. Эти multifunctional пленки, способные поддерживать электрическую проводимость для дальнейших электрохимических анализов, являются перспективными кандидатами для использования в качестве основы электрохимических платформ, предназначенных для клеточных исследований и биодетекции.

Исследование, представленное в публикации [116], фокусируется на оптимизации условий для вольтамперометрического анализа витаминов и флавоноидов, применяя метод инверсионной вольтамперометрии в составе фармацевтических средств. Проведенные эксперименты с использованием стандартных методик подтвердили, что разработанные условия являются эффективными для количественного определения данных компонентов в биологически активных добавках. В свете успешного применения данных модификаторов в создании сенсоров для аналитического мониторинга органических соединений, предложено расширение области использования таких модифицированных сенсоров до включения пентациклических тритерпеноидов.

ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Данная глава содержит описание использованных приборов и проведенных исследований.

2.1 Приборы, электроды, применяемые ячейки

Регистрацию ИК-спектров проводили на спектрометре фирмы Agilent Technologies марка Cary 600 Series FTIR Spectrometer в таблетках бромида калия KBr в диапазоне от 3600 до 400 см^{-1} .

Спектры ЯМР регистрировали на ЯМР Фурье-спектрометре Avance AV 400 (Bruker) в растворах CDCl_3 при 400 МГц (^1H) и 100 МГц (^{13}C).

Температуру плавления образцов определяли с помощью прибора Melting Point System MP50 Mettler Toledo.

Хромато-масс-спектрометрический анализ проб проводили на газохроматографическом комплексе Agilent 7820 с масс-селективным квадрупольным детектором Agilent 5975 при температуре источника ионов 230°C, температуре квадрупольного 150°C, энергии ионизации 70 эВ и диапазоне сканирования масс m/z 46÷1050, а для некоторых образцов – специальным методом ионизации электроспреем (ESI) при температуре ионов 250°C и при напряжении 5,0 кВ.

Контроль индивидуальности веществ проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil с использованием элюирующих систем: хлороформ : этанол = 40 : 1, гексан : этилацетат = 1:1, дихлорэтан. Детектирование пятен осуществляли модифицированным реактивом Эрлиха (п-диметиламинобензальдегид : H_2SO_4 : CH_3COOH) с последующим нагреванием пластин в течение 2–3 мин.

Вольтамперометрические измерения производили с использованием высокочувствительных приборов, регистрирующих силу тока, протекающего в электролитической ячейке, в зависимости от приложенного поляризующего напряжения. В работе использовали комплекс аналитический

вольтамперометрический СТА (ТУ 4215-001-20694097-98), содержащий три электрохимические ячейки, в комплекте с компьютером с установленным программным обеспечением «Анализатор СТА». В данном комплексе имеется возможность реализации различных режимов регистрации вольтамперограмм: постоянноточковый, ступенчатый, дифференциально-импульсный, позволяющие выбрать оптимальные рабочие условия получения аналитических сигналов определяемых компонентов.

Для получения данных для хемометрической обработки и снятия циклических вольтамперограмм использовали потенциостат - гальваностат Palmsens 4 (PalmSens, Нидерланды) с использованием специализированного программного обеспечения PSTrace. Прибор обладает широким функционалом осуществляемых режимов регистрации и техник, включая хронопотенциометрию и хроноамперометрию. Полученные данные вольтамперометрических определений были перенесены и обработаны с использованием MS Office Excel.

В качестве электродов сравнения и вспомогательных электродов при определении лекарственных веществ использовали хлоридсеребряные электроды, представляющие собой спираль из серебряной проволоки, вкручиваемую в полый полипропиленовый корпус, закрытый полупроницаемой мембраной, изготовленной из оксида алюминия. Электроды заполнялись 1 М раствором калия хлорида. Хранение хлоридсеребряных электродов осуществляли погружением их в раствор 1М KCl при комнатной температуре, перед началом работы электроды ополаскивали бидистиллированной водой. Удаление кислорода и перемешивание раствора осуществляли путем барботирования азотом по ГОСТ 9293-74 с долей кислорода не более 0,001 %; подача газа осуществлялась под давлением в электрохимическую ячейку из баллона через силиконовый шланг, присоединенный к анализатору СТА.

В качестве индикаторных электродов (ИЭ) использовали графитовый электрод (ГЭ). Графитовый электрод изготавливали из пропитанного графитового стержня с диаметром рабочей поверхности 3 – 5 мм. Перед работой электрод

шлифовали на бумажном фильтре, обрабатывали электрохимически в 0,1М растворе серной кислоты и промывали бидистиллированной водой.

2.2 Приготовление исходных субстратов, реагентов.

2.2.1 Методика извлечения бетулина из коры березы

Луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол (бетулин) 1:

Выделение бетулина проводили из измельченной бересты на водяной бане при температуре кипения этилового спирта [117].

В колбу, снабженную обратным холодильником, помещали 15 г бересты, 450 мл этилового спирта и раствор щелочи, приготовленный растворением 27 г гидроксида калия в 105 мл воды. После кипячения в течение 4 ч, реакционную массу отфильтровывали от остатков негидролизованной бересты и получившийся фильтрат оставляли на ночь для кристаллизации бетулина в холодном месте при температуре +5°C. На следующий день осадок отфильтровывали, неоднократно промывая водой до нейтральной реакции промывных вод. Полученный технический бетулин выгружали на чашку Петри и сушили в сушильном шкафу при 100–105°C. Масса бетулина – 4 г, что в пересчете на сухую бересту составляет 27%. $T_{пл}$ 255–257°C.

2.2.2 Методики получения диацетата бетулина из бересты (Метод А) и из бетулина (Метод Б)

3 β ,28-Диацетокси-луп-20(29)-ен (диацетат бетулина):

Метод А [118]. В качестве сырья применяли наружный слой березы – бересту. Измельченную бересту (частицы диаметром 4–8 мм) помещали в круглодонную трехгорлую колбу, снабженную обратным холодильником и мешалкой, и обрабатывали безводной уксусной кислотой. Температуру доводили до 110°C и кипятили в течение 4 ч на плитке с ручной регулировкой температуры. После завершения реакции реакционную массу очищали от остатков бересты фильтрованием. Проводили концентрирование фильтрата путем частичной отгонки

кислоты (до 1/5 объема). По завершении отгонки остаток приливали при перемешивании в пятикратное количество воды (200 мл). Сформировавшийся в виде гранул осадок серо-розового цвета фильтровали, многократно промывали дистиллированной водой до pH 7 промывных вод и сушили в сушильном шкафу при температуре 70–75°C. Масса неочищенного диацетата бетулина составила 5.5 г. Выход – 31%.

Метод Б [118]. В качестве сырья применяли бетулин, полученный по методике [117]. В круглодонной трехгорлой колбе к 4.42г бетулина добавляли 50мл уксусного ангидрида и кипятили 1.5 ч. После завершения реакции реакционную массу выливали в пятикратное количество (200 мл) воды. Продукт отфильтровывали, промывая водой до нейтральной pH промывных вод. Масса диацетата бетулина составила 5.1г, выход – 97%, $T_{пл}$ 213–217°C.

2.3 Способы очистки бетулина и ДАБ

2.3.1 Очистка технического бетулина

Метод А. *Очистка бетулина перекристаллизацией из этанола.* На первом этапе для очистки природного тритерпеноида (бетулина) применяли метод перекристаллизации.

Сухой экстракт бетулина массой 0.40 г (чистота 94%) растворяли в 40 мл этанола при нагревании и перемешивании, горячий раствор отфильтровывали, нерастворимый осадок удаляли, фильтрат охлаждали. Выпавший осадок фильтровали, сушили при температуре 80–90°C, получили бежевые кристаллы с $T_{пл}$ 250–253°C (257–258°C [117]). После перекристаллизации был получен образец сухого экстракта бетулина с содержанием 96% основного вещества, что подтверждено методом хромато-масс-спектрометрии. Масса полученного образца бетулина 0.21г, составляет 53% от массы первоначальной субстанции.

Метод Б. *Очистка бетулина методом колоночной хроматографии с Al_2O_3 .* Для очистки бетулина **1** методом колоночной хроматографии в качестве сорбента использовали окись алюминия, в качестве подвижной фазы – ацетон. Через

заполненную сорбентом хроматографическую колонку пропускали ацетон до полного набухания сорбента. Навеску неочищенного бетулина 3.5 г (чистота 94%) растворяли в 500 мл ацетона. Ацетоновый раствор бетулина переносили в хроматографическую колонку, затем вносили чистый ацетон. Собирали фракции, содержащие бетулин, с R_f 0.4 в системе Б тонкослойной хроматографии, детектирование пятен осуществляли модифицированным реактивом Эрлиха (Г). Из объединенных фракций отгоняли растворитель, остаток сушили. Получили белое кристаллическое вещество массой 2.1 г (60%), $T_{пл}$ 258–260°C (257–258°C [118]) с содержанием бетулина 98% согласно данным метода хромато-масс-спектрометрии.

Регистрацию ИК - спектров бетулина проводили на спектрометре фирмы Agilent Technologies марка Cary 600 Series FTIR Spectrometer и на приставке НПВО. Измерение проводили в диапазоне от 3600 до 400 $см^{-1}$ (Приложение А).

Результаты ЯМР 1H проводили на ЯМР-Фурье-спектрометре AvanceAV 300 фирмы Bruker (Приложение Б).

Для более детального анализа бетулина использовали метод масс-спектрометрии (МС). Количественный анализ структуры бетулина проводили на масс-спектрометре AutoSpec (ESI, EI) (Приложение В).

2.3.2 Очистка технического диацетата бетулина

Метод А. *Очистка диацетата бетулина перекристаллизацией из этанола с активированным углем.* Высушенную субстанцию диацетата бетулина массой 2.5 г (чистота 89%) растворяли в 50 мл этанола при нагревании и перемешивании, затем добавляли 2,5 г активированного угля. Суспензию нагревали до кипения при перемешивании, горячий раствор отфильтровывали от угля и нерастворимых примесей, маточный этанольный раствор охлаждали. Выпавшие желтые кристаллы отделяли на воронке и сушили при температуре 60–70°C. Масса полученного осадка 1.28 г (51%), $T_{пл}$ 208–214°C (222–223°C, лит. [118]), содержание диацетата бетулина в полученном образце 91%.

Метод Б. *Очистка диацетата бетулина методом колоночной хроматографии с Al_2O_3 .* Метод аналогичен методу очистки бетулина (Способ Б).

Масса неочищенного диацетата бетулина составляла 0.5 г (чистота 89%), навеску растворяли в 30 мл ацетона. Показатель R_f для фракций, содержащих диацетата бетулина 0.66 в системе Б тонкослойной хроматографий, проявление пятен осуществляли модифицированным реактивом Эрлиха. Из объединенных фракций отгоняли растворитель, остаток сушили. Масса полученного осадка 0.29 г, составляет 58% от массы первоначальной субстанции, $T_{пл}$ 215–219°C (222–223°C, лит. [119], а содержание диацетата бетулина в полученном образце составило 95% по данным хромато-масс-спектрометрии. Идентификацию проводили с помощью физико-химическими методами анализа (ИК (Приложение Г) , ПМР (Приложение Д), Масс-спектрометрия(Приложение Е)).

2.4 Методика поверхностной модификации углеродсодержащих электродов для определения бетулина и диацетата бетулина.

Поверхность графитового торцевого электрода перед процедурой модификации шлифовали фильтровальной бумагой. Далее проводили накопление золота в режиме «in situ», с использованием модифицирующего раствора с содержанием золота 100 мг/дм³. Модификацию графитовых электродов для определения бетулина осуществляли выдерживанием в водном растворе диазониевой соли концентрации 10 мг/дм³ при комнатной температуре в течение 5с после предварительного накопления золота в режиме «in situ». Затем модифицированный электрод промывали дистиллированной водой. Приготовленный таким образом электрод использовали для определения данных аналитов. Полученные электроды сохраняют свою стабильность в работе в течение 15- 20 опытов и устойчивы при хранении в бидистиллированной воде не менее 3-4 суток. По истечении срока службы электродов возможна их повторная модификация, по методике, описанной выше, после снятия слоя модификатора с поверхности электрода путем зачистки ее фильтровальной бумагой.

2.5 Методика приготовления модификатора на основе мезопористого углерода

Для приготовления раствора модификатора применяли следующие компоненты: полистирол, мезопористый углерод, 1,2-дихлорэтан. 0,5г полистирола смешивали с 0,01г мезопористого углерода, а затем добавляли 0,5см³ дихлорэтана. Полученный раствор тщательно перемешивали и наносили на поверхность графитовой подложки.

2.6 Приготовление растворов, подготовка посуды

Метод вольтамперометрии предъявляет повышенные требования к чистоте применяемых реактивов, очистке воды, материалам электродов и посуде. Лабораторную стеклянную посуду, сменные наконечники дозаторов, пипетки протирали фильтром с питьевой содой, промывали многократно бидистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу. При анализе изучаемых лекарственных веществ для приготовления фоновых электролитов использовали бидистиллированную воду.

Способ приготовления фонового электролита 0,1н NaOH для определения бетулина и диацетата бетулина (ДАБ).

Для приготовления рабочего раствора бетулина и диацетата бетулина мы использовали следующие растворители: хлороформ:этанол в соотношении 1:3. Рабочий раствор был получен путем растворения 0,020г бетулина и диацетата бетулина в 25см³ водно-органической смеси.

Хранение буферного раствора – при комнатной температуре, в плотно закрытой стеклянной посуде.

Рабочие растворы diazonиевых солей готовили растворением навески сухого порошка солей арендиазоний тозилатов в бидистиллированной воде при незначительном нагревании. Хранили готовые растворы модификаторов в холодильнике, в плотно закрытых пластиковых емкостях. Для приготовления растворов использовали лабораторную мерную стеклянную посуду второго класса точности по ГОСТ 1770-74Е: колбы наливные вместимостью 25.0; 50.0; 100.0;

1000.0 см³ ; цилиндры вместимостью 10.0; 25.0 см³ . Дозаторы пипеточные различной емкости типа ДПВ-1-5-40, ДПВ-1-40-200, ДПФ-1-200 или П1.

2.7 Методика вольтамперометрического измерения бетулина и диацетата бетулина

Вольтамперометрическое определение данных аналитов выполняли на анализаторе СТА с трехэлектродной системой, состоящей из индикаторного стеклоуглеродного электрода и хлоридсеребряного электрода сравнения (1М KCl). Изначально в электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита 0,1н раствор NaOH объемом 10 см³, и осуществляли проверку электрохимической системы на чистоту регистрацией вольтамперных кривых в анодной области потенциалов от $1,1 \pm 0,1\text{В}$ и $1,35 \pm 0,05\text{В}$ в дифференциально-импульсном режиме со скоростью развертки 35 мВ/с, перемешивание и подготовку раствора осуществляли с помощью мешалки, время накопления 30 секунд, время успокоения - 10 секунд. Запись вольтамперограмм фонового электролита повторяли не менее трех раз. Отсутствие посторонних пиков на вольтамперных кривых свидетельствует о чистоте электрохимической системы. С помощью дозатора количественно переносили в электрохимическую ячейку исследуемый образец, содержащий изучаемое вещество, и регистрировали вольтамперные кривые в соответствии с параметрами, указанными выше. По появлению пика в области $1,1 \pm 0,1\text{В}$ и $1,35 \pm 0,05\text{В}$ судили о присутствии бетулина, и соответственно, диацетата бетулина в системе.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Нами предварительно выделены бетулин и диацетат бетулина из коры березы. В главе 2 приведены способы их очистки методом колоночной хроматографии и идентифицированы структуры методами инфракрасной спектроскопии, протонным магнитным резонансом, масс-спектрометрии для дальнейшего вольтамперометрического определения данных тритерпеноидов. Исследования температуры плавления проводились с целью определения подлинности структур синтезированных соединений. Контрольные методы показали высокое качество полученных веществ. Сравнение наших данных, с имеющимися в литературе, однозначно подтвердило их соответствие. В последующем этапе нашего исследования перед нами стояла задача разработать методику для определения бетулина и диацетата бетулина.

3.1 Изучение вольтамперометрического поведения бетулина на золотом графитовом электроде

На модельных растворах проведены исследования по выбору рабочих условий для вольтамперометрического определения указанных выше органических веществ.

Для выбора условий вольтамперометрического определения бетулина получена зависимость по влиянию катионно-анионного состава и pH фонового электролита на аналитические сигналы бетулина (рисунок 8).

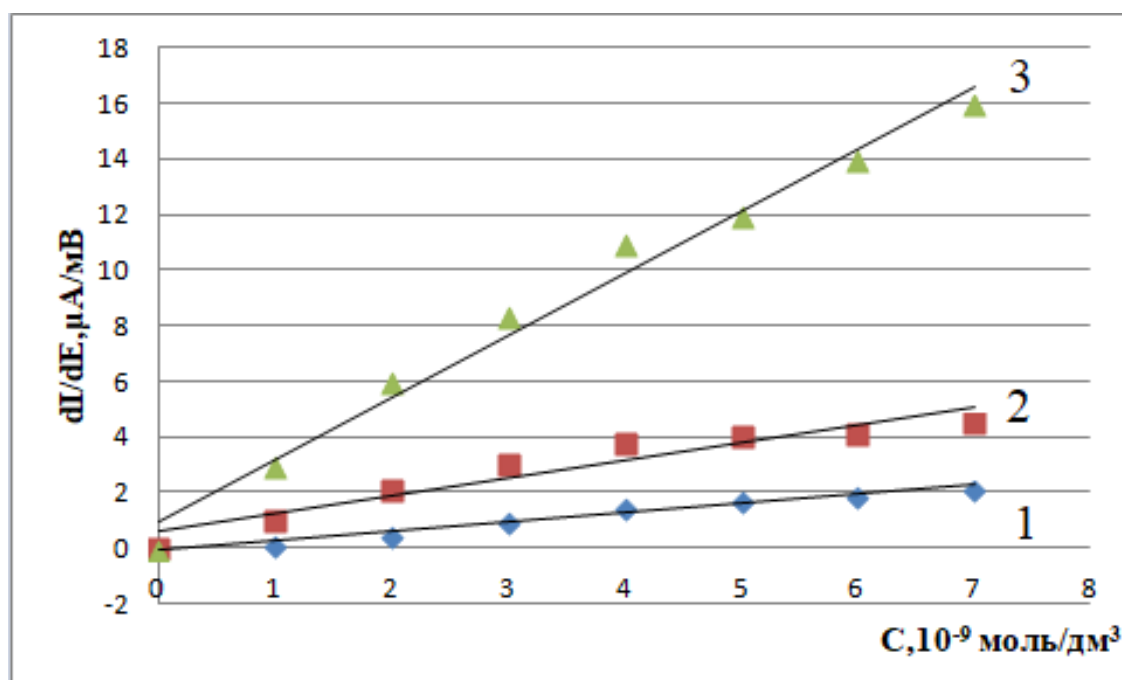


Рисунок 8 – Градуировочная зависимость бетулина на различных фоновых электролитах:

1. рН 6.86 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$;
2. рН 9.18 буфер Бриттона-Робинсона;
3. рН 12 0.1н NaOH;

Более инертным фоновым электролитом является 0,1н NaOH, на котором регистрировались хорошо воспроизводимые пики электроокисления бетулина и сохранялась линейная зависимость градуировочных графиков в широком диапазоне концентраций.

Из рисунка 8 следует, что с увеличением концентрации гидроксид-ионов происходит смещение потенциала пика в катодную область, то есть способствует облегчению процесса электроокисления бетулина, что, по-видимому, связано с протеканием ступенчатой реакции депротонизации различных форм бетулина. Депротонизация может предшествовать стадии отдачи электрона от молекулы деполаризатора к электроду или протекать одновременно с ней.

По мере повышения рН фонового электролита изменяется форма нахождения вещества в растворе, определяемая протолитическим равновесием. Так

как на отрыв электрона от нейтральной частицы требуется меньше энергии, чем от катионной, то потенциал пика бетулина в нейтральной среде, где преобладают нейтральные формы молекул, ниже, чем в щелочной. Таким образом, на основании полученных результатов предложен фоновый электролит для вольтамперометрического измерения бетулина.

В процессе изучения кинетики накопления бетулина на золото-графитовом электроде, а именно, зависимостей получаемого аналитического сигнала от потенциала накопления и времени накопления установлено, что данный процесс носит адсорбционный характер. Отмечено, что при времени накопления более 25сек, аналитический сигнал снижается (рисунок 9), что тоже свидетельствует об адсорбционном характере аналитического сигнала. На основании изученных зависимостей (рисунки 10 и 11) и рассчитанному коэффициенту Семерано более 0.5, установлено, что процесс носит адсорбционный характер.

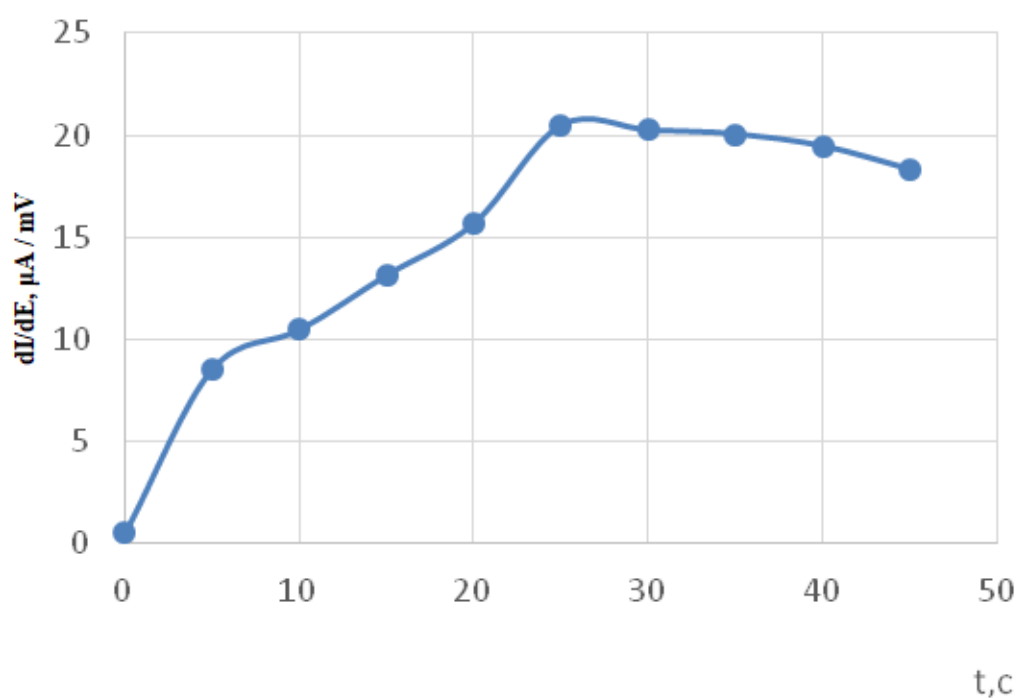


Рисунок 9 – Зависимость аналитического сигнала бетулина от времени накопления на золото-графитовом электроде (ЗГЭ) на фоне 0.1н NaOH

По критерию Семерано рассчитали коэффициент, равный 1.6, что указывает об отсутствии вклада диффузионной составляющей тока.

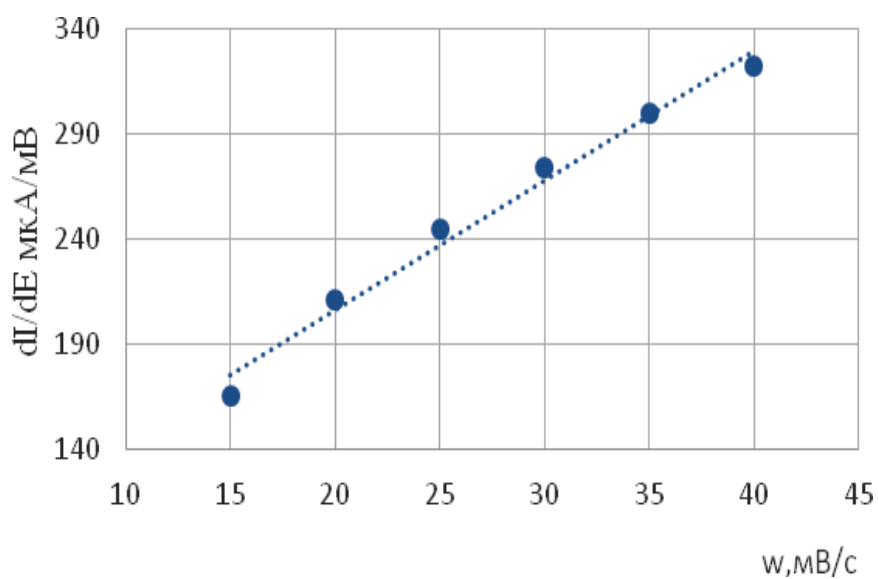


Рисунок 10 – Зависимость высоты аналитического сигнала бетулина от скорости развертки потенциала

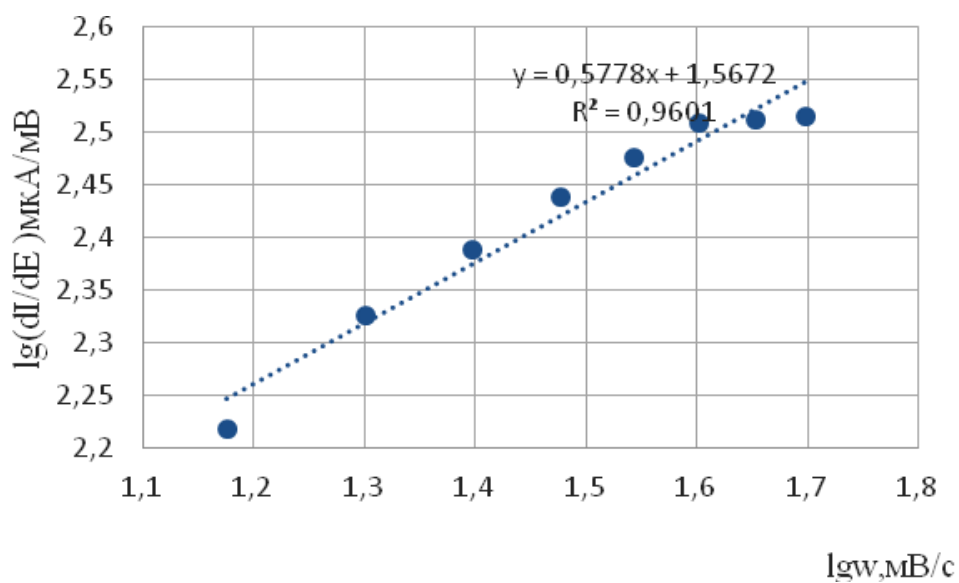


Рисунок 11 – Зависимость логарифма высоты аналитического сигнала бетулина от логарифма скорости развертки потенциала

Для понимания типа электродного процесса (обратимый или необратимый) получена циклическая вольтамперограмма (рисунок 12).

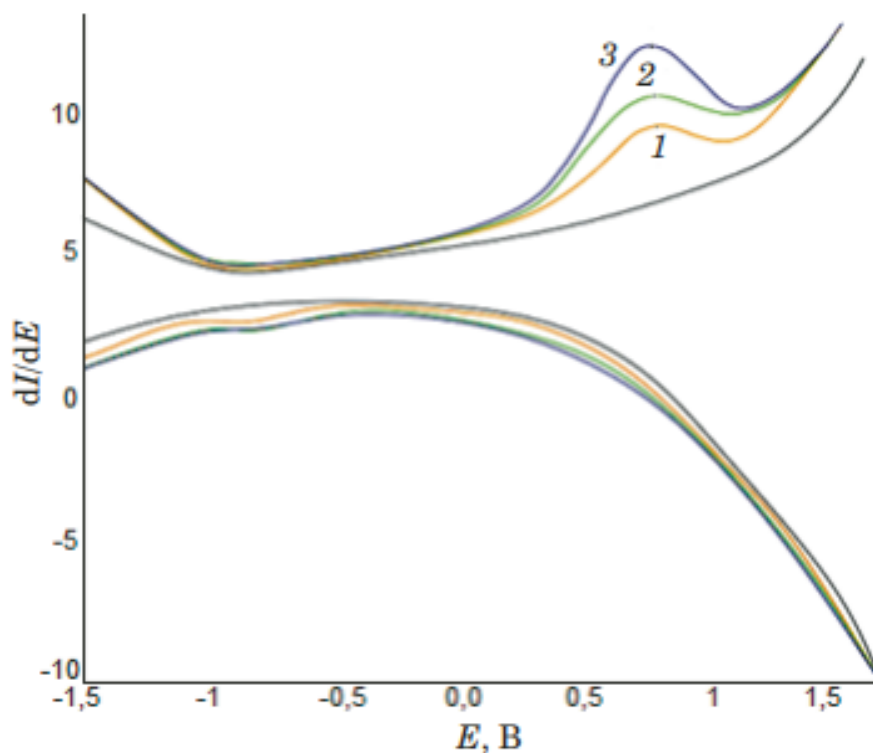


Рисунок 12 – Циклическая вольтамперограмма Бетулина на золото-графитовом электроде.

1) $C = 2.6 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³; 2) $C = 5.2 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³; 3) $C = 7.8 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³

Циклическая вольтамперограмма, полученная на золото-графитовом электроде показала, что преобладает необратимый процесс и адсорбционная составляющая. На основании чего нами предложена вероятная схема электроокисления трех потенциально активных функциональных групп (Рисунок 6).

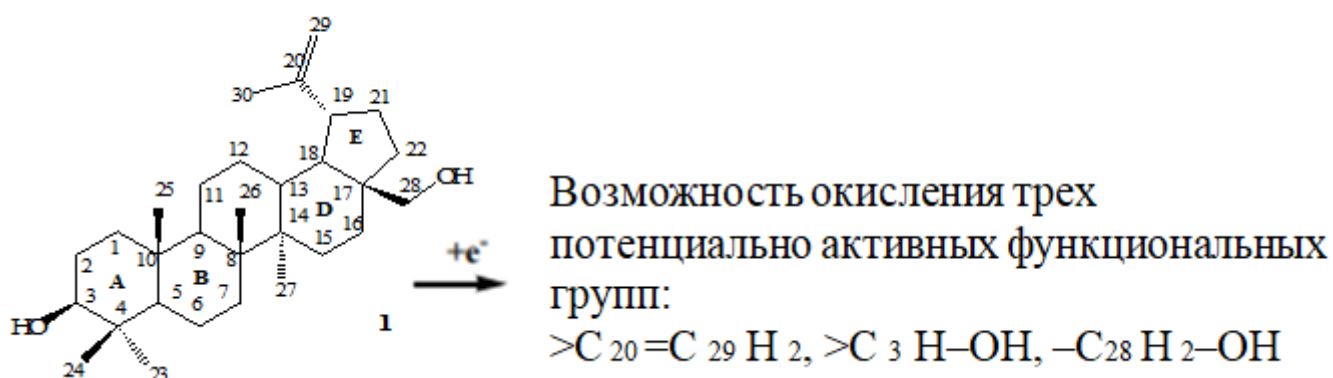


Рисунок 13 – Вероятная схема электроокисления бетулина

Таким образом, электрохимический процесс электроокисления бетулина на золото-графитовом электроде протекает с использованием 1 электрона, с возможностью окисления трех потенциально активных функциональных групп и проходит необратимо, и носит адсорбционный характер.

3.2 Выбор рабочих условий определения диацетата бетулина с использованием золото-графитового электрода и изучение некоторых закономерностей электродного процесса

Аналогичные исследования были проведены и для диацетата бетулина. Получена вольтамперограмма ДАБ (рисунок 14) и градуировочная зависимость диацетата бетулина на 0,1н NaOH (рисунок 15).

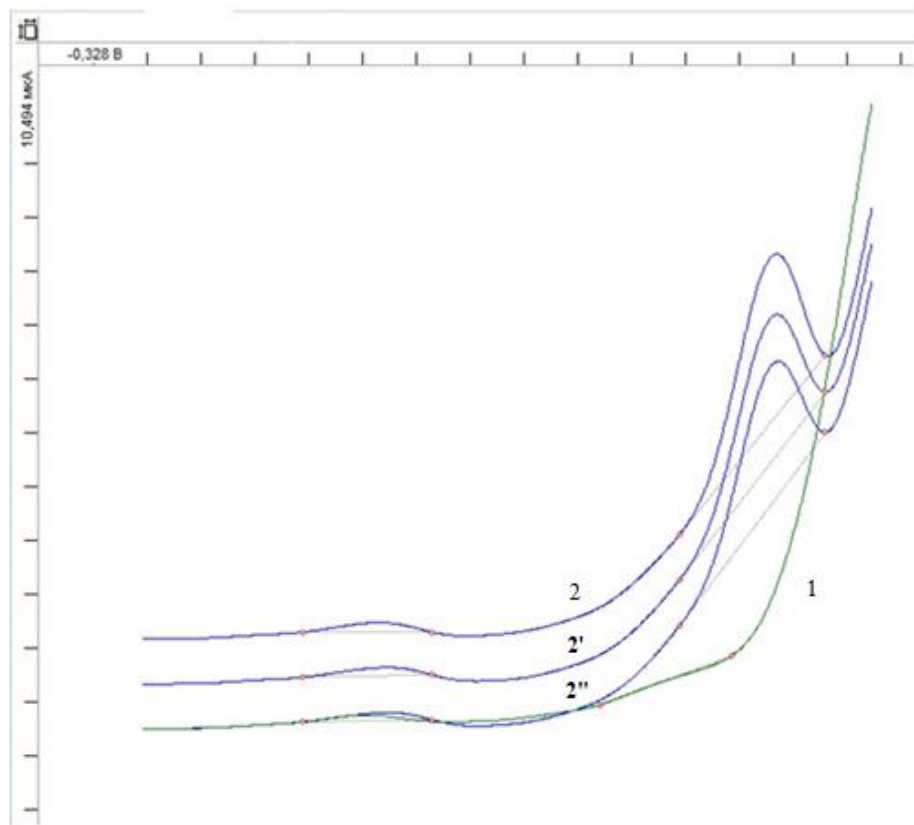


Рисунок 14 – Вольтамперограмма ДАБ на золото-графитовом электроде

1. Фон 0,1н NaOH

2, 2', 2'' – вольтамперограмма ДАБ на воспроизводимость
 $C_{\text{ДАБ}} 10^{-9} \text{ моль/дм}^3$

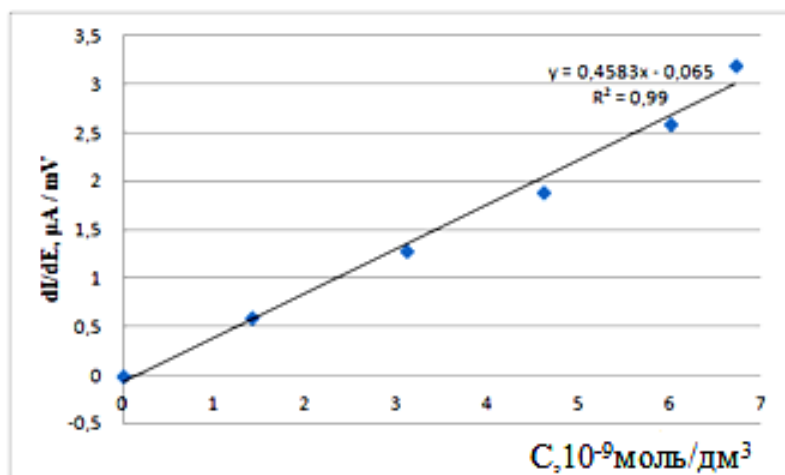


Рисунок 15 – Градуировочная зависимость диацетата бетулина на ЗГЭ

Изучена кинетика накопления ДАБ. Отмечено, что при времени накопления более 25сек, аналитический сигнал снижается, что тоже свидетельствует об адсорбционном характере аналитического сигнала диацетата бетулина.

Таким образом, нами впервые установлены рабочие условия вольтамперометрического определения диацетата бетулина, которые могут быть использованы для разработки методики определения в реальных объектах.

3.3 Совместное вольтамперометрическое определение бетулина и диацетата бетулина и изучение их взаимного влияния

В ходе исследований получены зависимости высоты аналитического сигнала бетулина и диацетата бетулина от потенциала и времени накопления ионов на ЗГЭ, которые представлены на рисунках 16 и 17.

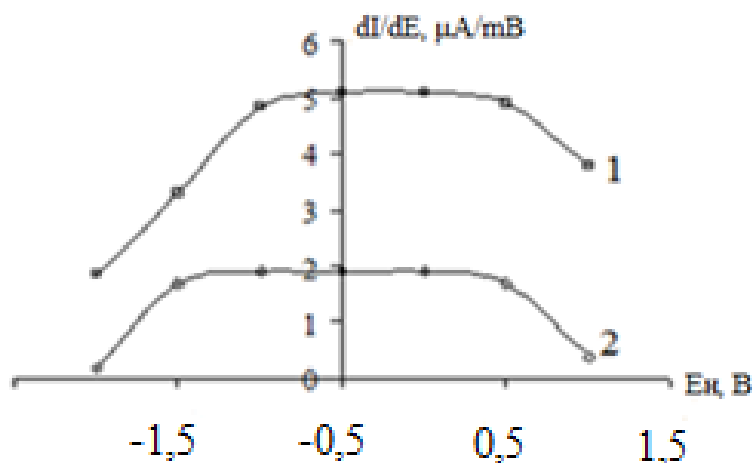


Рисунок 16 – Зависимости высоты аналитического сигнала бетулина и диацетата бетулина от потенциала электролиза на ЗГЭ

Условия: фон – 0,1 моль/дм³ NaOH, $\tau = 30$ с, $C(\text{бет.}) = 1,3 \cdot 10^{-9}$ моль/ дм³; $C(\text{ДАБ}) = 7,6 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³

Как видно из рисунка 16, на графиках наблюдаются прямолинейные участки в диапазоне потенциалов от -1.2 В до $+0.5$ В, в которых аналитические сигналы бетулина и диацетата бетулина максимальны и эти диапазоны совпадают, что свидетельствует о возможности совместного их определения. Исходя из полученных зависимостей, для дальнейших исследований выбран потенциал электролиза $E_{э} = (-1.00 \pm 0.05)$ В.

Увеличение времени электролиза более 60 с не эффективно (рисунок 17), т.к. зависимости высоты аналитического сигнала бетулина и диацетата бетулина от времени накопления выходит на предел.

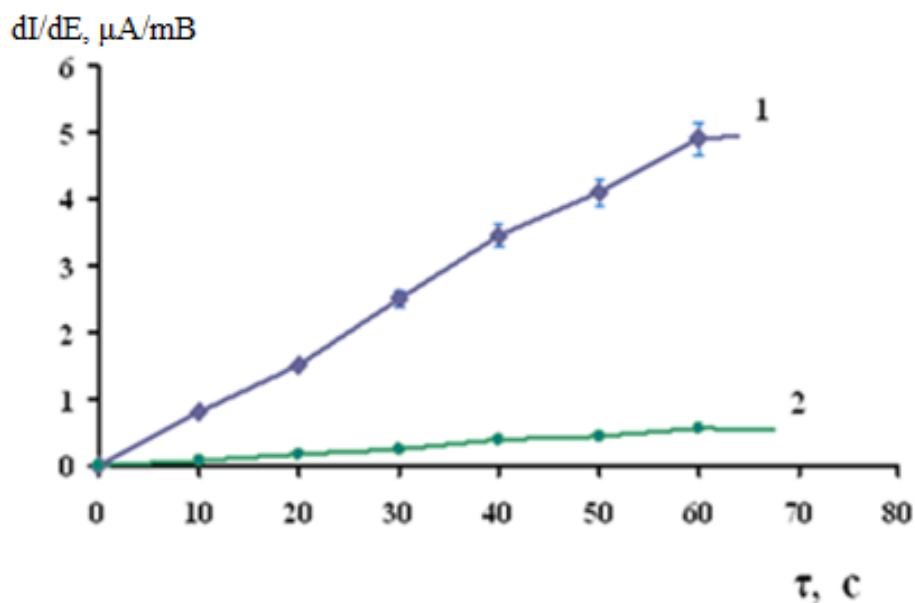


Рисунок 17 – Зависимости высоты аналитического сигнала бетулина(2) и диацетата бетулина(1) от времени накопления на ЗГЭ

$$C(\text{бет.}) = 1,3 \cdot 10^{-9} \text{ моль/дм}^3; C(\text{ДАБ}) = 7,6 \cdot 10^{-9} \text{ моль/дм}^3$$

Исходя из выбранных условий вольтамперометрического определения природных соединений, был проведен эксперимент по совместному определению бетулина и диацетата бетулина в условиях: потенциал накопления: -1,0 В, фон: 0,1н NaOH, рабочий электрод: золото-графитовый электрод. На рисунке 18 приведена вольтамперограмма совместного определения данных аналитов.

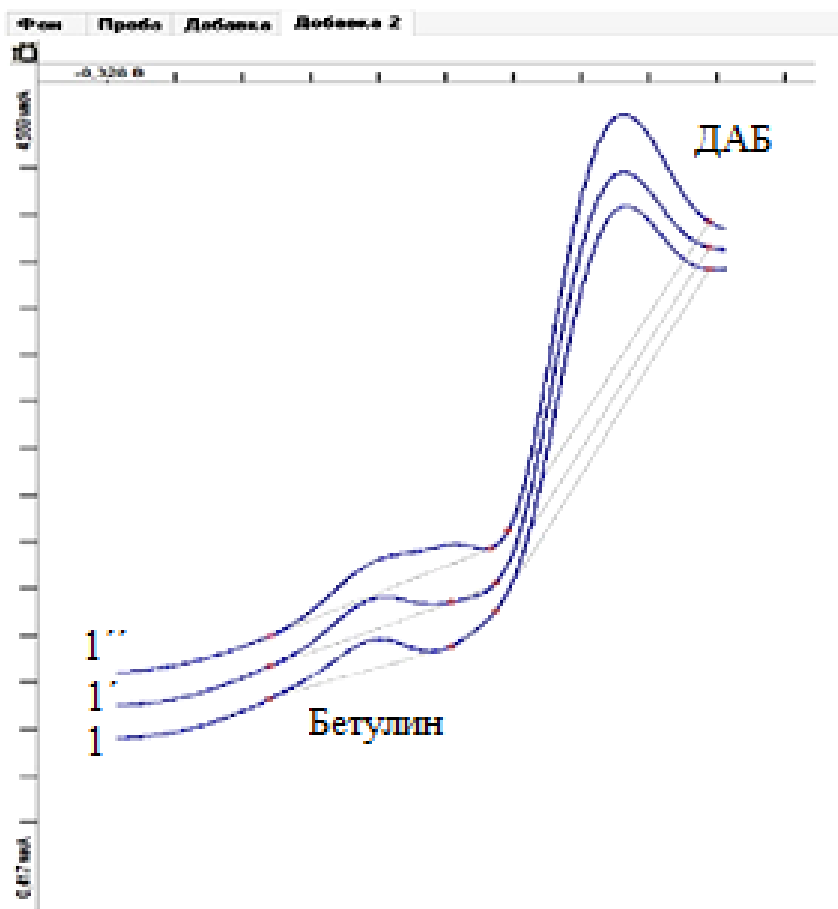


Рисунок 18 – Вольтамперограмма бетулина и ДАБ

С бетулина $1,3 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³; С Даб $7,6 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³

1, 1', 1'' вольтамперограмма Бетулина и ДАБ на воспроизводимость

Для изучения мешающего влияния бетулина и его производного нами получена зависимость производной тока пика электроокисления бетулина от концентрации диацетата бетулина в растворе (рисунок 19) и градуировочные зависимости совместного определения бетулина и диацетата бетулина (рисунок 20).

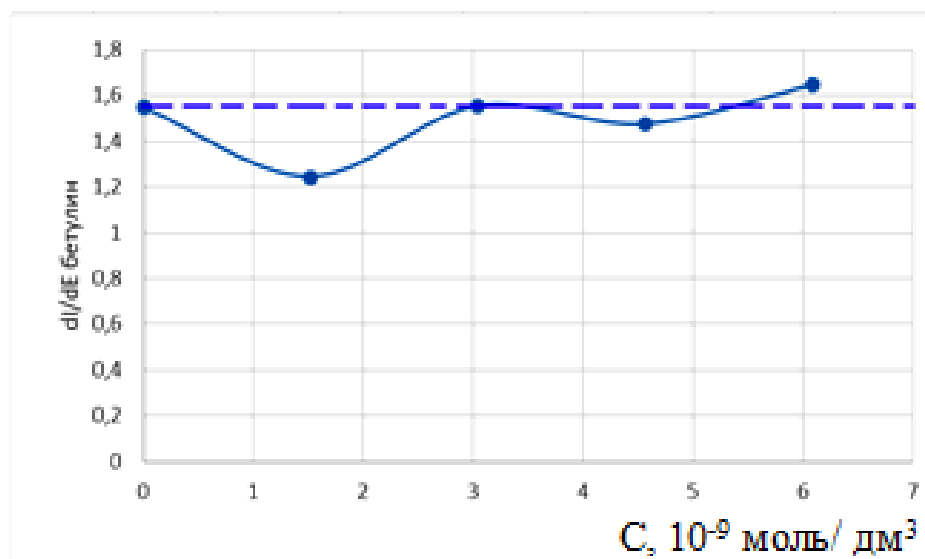


Рисунок 19 – Зависимость производной тока пика электроокисления бетулина от содержания ДАБ (C бетулина $1.3 \cdot 10^{-9} \text{ моль/дм}^3$)

Из зависимости, представленный на рисунке 16 можно сделать вывод, что отклонение высоты аналитического сигнала бетулина в присутствии ДАБ в широком диапазоне его концентрации составляет не более 10-15% при их соотношении до 1:50.

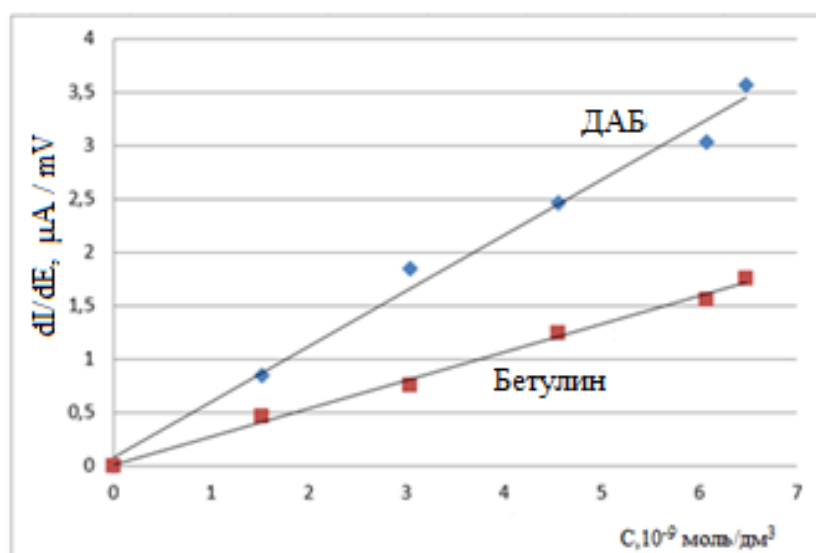


Рисунок 20 – Градуировочная зависимость бетулина и ДАБ на золото-графитовом электроде.

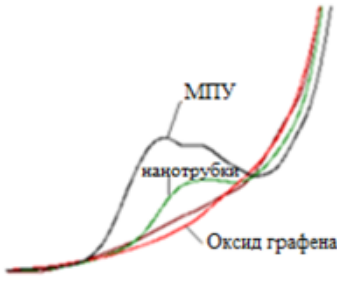
Из градуировочной зависимости видно, что линейность сохраняется в достаточно широком диапазоне, что доказывает возможность их совместного определения.

Таким образом, впервые показана возможность совместного определения бетулина и диацетата бетулина на золото-графитовом электроде с использованием фонового электролита 0,1н NaOH и при потенциале накопления -1,0 В.

3.4 Применение мезопористого углерода для модификации поверхности электрода для вольтамперометрического определения бетулина

Коллегами из ООО «НаноТехЦентр», Тамбов, РФ предоставлены различные модификаторы, такие как, мезопористый углерод (МПУ), нанотрубки, микропористый углерод. Наиболее выраженный аналитический сигнал бетулина получен с применением мезопористого углерода в качестве модификатора на рабочей поверхности графитового электрода. По литературным данным известно, что после карбонизации и активации, поверхностный слой содержит протолитически-активные карбоксильные (0,1; 0,35 ммоль/г) и гидроксильные группы, а также широкий спектр других кислородсодержащих групп. В данном материале наблюдаются узкие распределения пор по размерам (5–9 нм), микропоры практически отсутствуют. В связи с этим, лучшие метрологические характеристики наблюдаются при модифицировании поверхности мезопористым углеродом с развитой поверхностью (1680 м²/г) и сорбционной емкостью по отношению к органическим веществам. В связи с этим, дальнейшие исследования проводились на электроде, модифицированный мезопористым углеродом (таблица 2).

Таблица 2 – Выбор модификатора для графитовой подложки для вольтамперометрического определения бетулина

Модификаторы	Высота аналитического сигнала бетулина (dI/dE , $\mu A/mV$)	
Оксид графена	$2,4 \pm 0,3$	
Углеродные нанотрубки	$9,2 \pm 1,1$	
Мезопористый углерод	$18,2 \pm 1,7$	
Микропористый углерод	$10,4 \pm 1,5$	

Нами разработан способ модифицирования поверхности, заключающийся в погружении электрода в раствор модификатора. Для приготовления модификатора применяли полистирол, МПУ и 1.2-дихлорэтан. Полистирол смешивали с МПУ(1:1) и растворяли в 1.2-дихлорэтано. Полученный раствор тщательно перемешивали в течение 30-40сек и далее опускали в модификатор рабочую поверхность электрода и выдерживали в течение от 1 до 4 секунд. Исследовали зависимость условий времени контакта модификатора на аналитический сигнал бетулина и провели оценку его оптимального количества на поверхности электрода. При использовании нового модифицированного графитового электрода при вольтамперометрическом определении бетулина наблюдали увеличение аналитического сигнала при времени контакта подложки графитового электрода с раствором модификатора в пределах 1-2 секунд, однако при увеличении времени контакта, от 2,5 и больше наблюдали его снижение (рисунок 21).

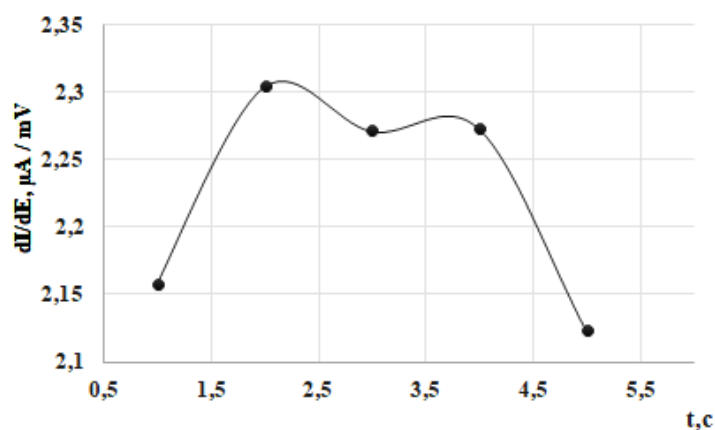


Рисунок 21 – Зависимость высоты аналитического сигнала бетулина от времени контакта модификатора МПУ с подложкой

Получены градуировочные зависимости бетулина с использованием золото-графитового электрода, модифицированного мезопористым углеродом (рисунок 22).

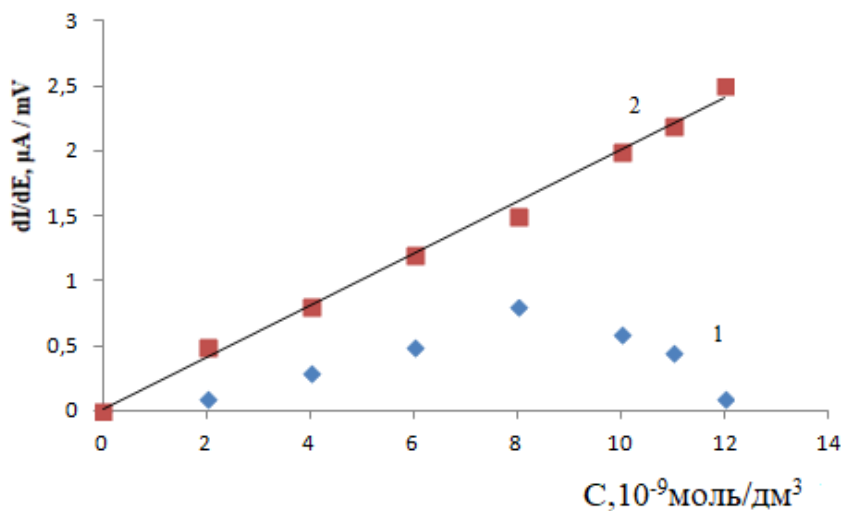


Рисунок 22 – Градуировочная зависимость бетулина на ЗГЭ(1) и ЗГЭ, модифицированный МПУ (2)

Полученные экспериментальные данные подтверждают, что использование мезопористого углерода в качестве дополнительной модификации увеличивает чувствительность определения бетулина и расширяет линейную область его определения.

3.5 Применение АДТ для модификации поверхности электрода для вольтамперометрического определения бетулина

Применение арендиазоний тозилатов при формировании органо - модифицированных электродов для вольтамперометрического определения бетулина.

Для расширения линейного диапазона определяемых концентраций, увеличения чувствительности оценена возможность использования солей арендиазоний тозилатов с карбоксильным заместителем, зарекомендовавшего себя,

как перспективный модифицирующий агент для вольтамперометрического определения органических веществ.

Нами исследованы поверхности золото-графитового и модифицированного солью арилдиазония с карбоксильной группой в качестве заместителей электродов с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). На рисунке 23 (А) представлена поверхность золото-графитового электрода и рисунке 23 (Б) золото-графитового электрода с нанесенным модификатором на поверхность.



Рисунок 23 (А) – Изображение поверхности ЗГЭ методом сканирующей электронной микроскопии



Рисунок 23 (Б) – Изображение поверхности МЗГЭ (Б) методом сканирующей электронной микроскопии

Из рисунка 23 нами замечено, что модификатор на поверхность графита «ложится» не сплошной пленкой, а располагается возле дефектов поверхности, участками, которые занимают 50-60% поверхности. Поэтому для подтверждения факта увеличения аналитического сигнала бетулина за счет нанесения модификатора, а не за счет графитовой подложки нами проведен эксперимент по изменению площади модифицированного электрода.

Для этого поверхность модифицированного электрода закрыли пленкой таким образом, чтобы получилась поверхность на половину с органическим модификатором, а вторая половина поверхности графит с золотом.

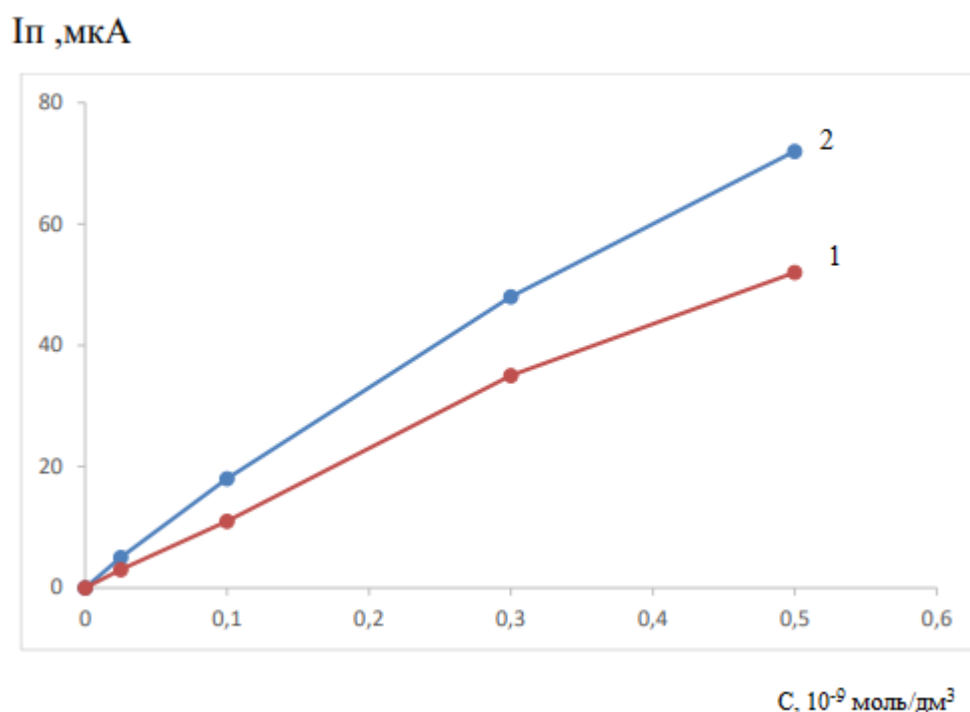


Рисунок 24 – Зависимость тока пика бетулина от концентрации на $\frac{1}{2}$ МЗГЭ и электрода $\frac{1}{2}$ поверхности ЗГЭ

Условия: Фон : 0,1 М NaOH, $E_z = -1,0 \text{ В}$, $t_z = 30 \text{ с}$

Как видно из рисунка 24 нанесение модификатора облегчает процесс электроокисления бетулина, увеличивая тем самым аналитический сигнал.

Таким образом, в результате изучения вольтамперометрического поведения бетулина на различных типах электродов нами были выбраны рабочий материал электрода, карбокси-группа соли арилдиазония и условия измерений.

Нами разработан способ модифицирования золото - графитового электрода с мезопористым углеродом солями арендиазония. Способ заключался в предварительном погружении электрода в раствор модификатора с заданной концентрацией. Были подобраны условия модифицирования, а именно время погружения электрода в раствор модификатора. Получена зависимость высоты аналитического сигнала бетулина от времени контакта с модификатором (рисунок 25).

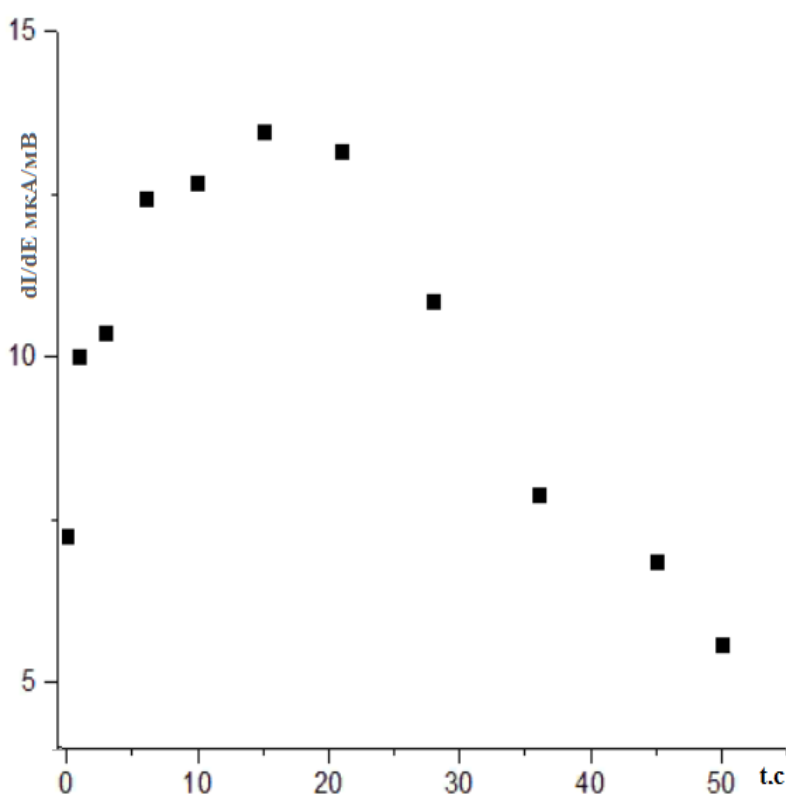


Рисунок 25 – Зависимость высоты аналитического сигнала бетулина от времени контакта электрода с арендиазоний тозилатами с заместителем –COOH.

$$C_{\text{дiaz.}} = 10 \text{ мг/дм}^3$$

При увеличении времени погружения на более, чем 15сек значение аналитического сигнала бетулина уменьшается. Данный факт можно объяснить блокировкой поверхности рабочего электрода, так как при увеличении времени контакта арендиазоний распределялся по всей площади поверхности и визуально наблюдали образование окрашенной пленки на поверхности.

Для бетулина получены градуировочные зависимости с использованием различных модифицированных электродов, представленные на рисунке 26.

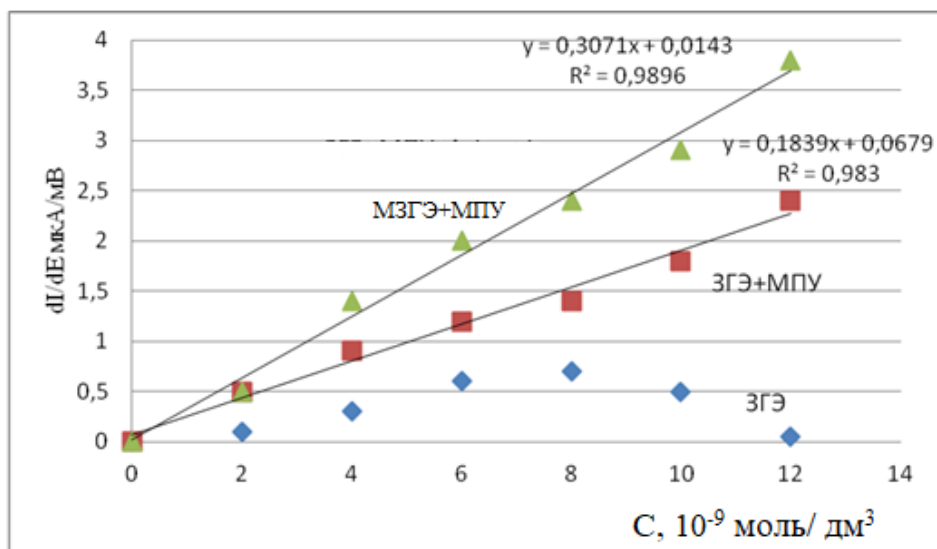


Рисунок 26 – Градуировочные зависимости бетулина на различных модифицированных электродах

Как видно из рисунка 25, что выше угол наклона градуировочной зависимости бетулина наблюдается на золото - графитовом электроде, модифицированном арендиазоний тозилатом и МПУ. Без органического модификатора чувствительность и диапазон линейности относительно ЗГЭ значительно меньше.

Таким образом, нами впервые получен новый органо-модифицированный электрод на основе графита, модифицированного мезопористым углеродом, золотом и солями арендиазония. для вольтамперометрического определения бетулина и ДАБ в диапазоне от $0,44 \cdot 10^{-2} \div 44,2$ мг/дм³

ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕТУЛИНА И ДАБ В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКЕ

4.1 Вольтамперометрическое определение бетулина в биологически активной добавке

4.1.1 Изучение мешающего влияния органических соединений на аналитический сигнал бетулина и ДАБ

Биологически активные добавки представляют собой многокомпонентные сухие витаминизированные смеси. Кроме бетулина и ДАБ в них содержатся наполнители, антиоксиданты, эмульгаторы, минеральные и другие добавки, оказывающие негативное влияние на величины аналитических сигналов определяемых компонентов.

В работе изучено влияние органических соединений на аналитический сигнал бетулина и диацетата бетулина, которые являются электрохимически активными и могут содержаться в исследуемых объектах (таблица 3).

Таблица 3 – Соотношение мешающих компонентов в БАДах на аналитический сигнал бетулина

Мешающий компонент	Отношение концентраций мешающего компонента	Содержание бетулина, мг/дм ³
До введения мешающего компонента		1,99±0,30
Целлюлоза	10:1	2,20±0,33
	50:1	2,23±0,33
	100:1	2,27±0,34
Экстракт корня солодки (глицирризиновая кислота)	10:1	2,17±0,32
	50:1	2,15±0,32
	100:1	2,15±0,32
Экстракт эхинацеи (Полисахариды)	10:1	2,08±0,31
	50:1	2,05±0,31
	100:1	2,12±0,31

Аналогичные исследования по мешающему влиянию проведены и для ДАБ.

Исследованные органические вещества: целлюлоза, экстракт корня солодки (глицирризиновая кислота), экстракт эхинацеи (полисахариды) не оказывают значимого влияния на характер вольтамперограмм и на величину тока окисления бетулина и диацетата бетулина в установленных рабочих условиях проведения электродного процесса (рисунок 27).

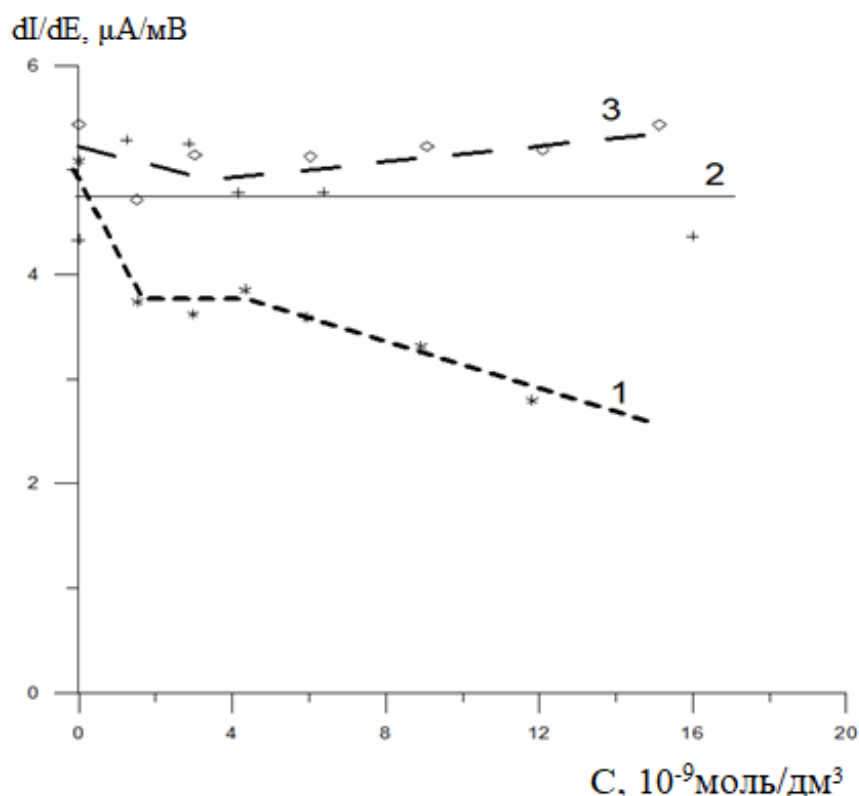


Рисунок 27 – Влияние на аналитический сигнал бетулина и диацетата бетулина мешающих компонентов.

1-целлюлоза; 2-глицирризиновая кислота; 3- полисахариды

Таким образом, изучение взаимного влияния компонентов в пробе позволило разработать экспрессные методики КХА бетулина и ДАБ в многокомпонентных БАД различного состава и производства.

4.1.2 Оценка предела обнаружения и нижней границы определяемых содержаний

Для нахождения нижней границы определяемых содержаний бетулина на фоне, содержащем максимально допустимый объем пробы БАД, строили кривые зависимости S_r от содержания компонента, определяемого по данной методике (рисунок 28).

Для оценки наименьшей концентрации ($C_{min,p}$) был использован трехсигмовый критерий Кайзера.

Значения $C_{min,p}$, определенные по этому критерию, приведены в таблице 4

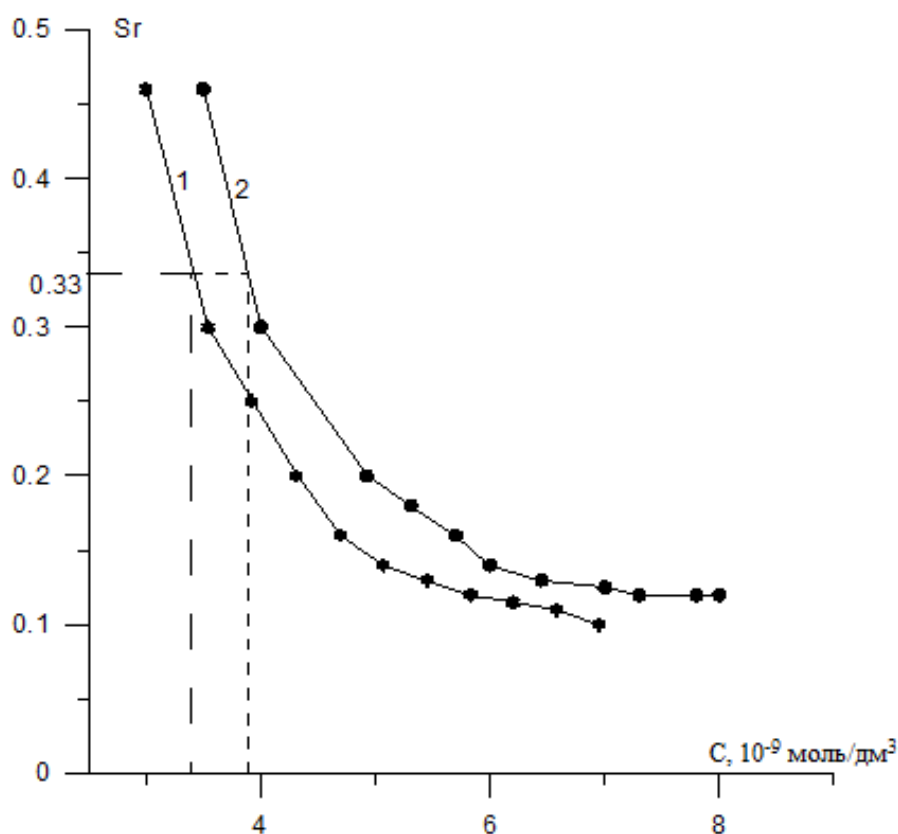


Рисунок 28 — Зависимость относительного стандартного отклонения от определяемого содержания бетулина при фоновом содержании БАД: 1 - 1,0 см³; 2 - 2,0 см³; Фон: 0, 1н NaOH.

Таблица 4 – Нижняя граница определяемых содержаний и предел обнаружения бетулина от содержания БАД

$n = 8; P = 0,95$

№ п/п	Состав пробы	C_n , моль/дм ³	$C_{min,p}$, моль/дм ³
1	0,1н NaOH + 1,0 см ³ БАД	$3.35 \cdot 10^{-9}$	$6.55 \cdot 10^{-10}$
2	0,1н NaOH + 2,0 см ³ БАД	$3.95 \cdot 10^{-9}$	$8.1 \cdot 10^{-10}$

Можно сделать вывод о том, что мешающее влияние при данных соотношениях не превышает 11%. Результаты исследования соотношения определяемых компонентов к вспомогательным веществам приближены к условиям их реальных содержаний и погрешность определения бетулина не превышает погрешности метода.

Нами предложен алгоритм методики анализа БАД для вольтамперометрического определения бетулина и ДАБ на содержание основного вещества, заключающийся в растворении навески в смеси хлороформ: этанол с последующей фильтрацией. Фильтрат отбрасывается, а полученный раствор используется для вольтамперометрического определения.

Алгоритм методики определения бетулина в таблетированной форме представлен на рисунке 29.

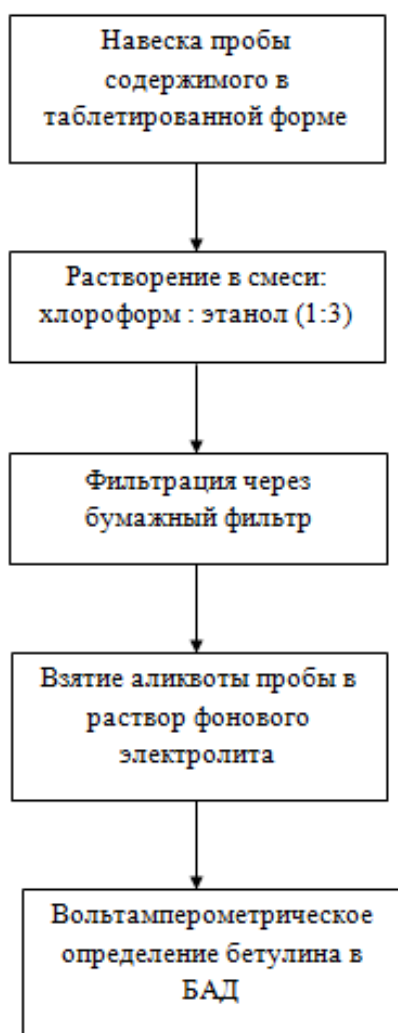


Рисунок 29 – Алгоритм анализа БАД для определения бетулина в таблетированных формах.

Проверку правильности методики проводили методом «введено-найдено», результаты обнаружения четырех образцов представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты обнаружения четырех образцов БАДов «Бетулин»

$p=0.95$, $n=5$

Образцы БАД	Содержание бетулина, мг/таб			Расширенная неопределенность измерения ($k=2$)
	по рецептуре	Введено	Найдено	
Образец 1	40.0	30.0	71.3 ± 8.4	0,16
Образец 2		40.0	82.3 ± 9.2	0,40
Образец 3		50.0	89.1 ± 9.6	0.75
Образец 4		60.0	102 ± 12	1.5

Показатели качества методики анализа (в виде характеристики погрешности и ее составляющих) оценены с применением расчетно-экспериментального метода (РМГ 61-2010).

Показатель расширенной неопределенности определяется по формуле:

$U_p = k \times U_c$, где k при $P = 0,954$ равен 2.

Результаты согласуются с данными, заявленными производителями, а в ходе проверки правильности методом «введено-найдено» получили удовлетворительные значения, погрешность определения не превышает 15%.

Неопределенность результатов измерений массовой концентрации аналитов зависит от количества факторов, которые могут иметь значительное влияние на конечную ошибку результата. Эти факторы, называемые входными величинами, могут включать в себя: точность весов, чистоту реагентов, стабильность аналитического прибора, температуру, влажность, давление воздуха и другие. Например, точность весов может повлиять на неопределенность измерения массы аналита, а чистота реагентов может повлиять на неопределенность измерения концентрации аналита. Стабильность аналитического прибора также может повлиять на неопределенность измерения, поскольку любые изменения в работе прибора могут привести к ошибкам в измерении. Некоторые из этих факторов могут быть учтены с помощью калибровки и стандартизации аналитического прибора, а также с помощью использования высококачественных реагентов и точных весов. Однако даже с учетом этих мер, неопределенность измерения все равно может быть значительной, и ее необходимо учитывать при интерпретации результатов измерения.

Диаграмма причины-следствия Исикавы (Cause-and-Effect-Diagram) — это инструмент визуализации, который используется для идентификации потенциальных причин проблемы или качества в процессе. Она помогает систематически исследовать все возможные корни проблемы.

Область применения диаграммы:

- Выявление причин возникновения проблемы;
- Анализ и структурирование процессов на предприятии;

- Оценка причинно-следственных связей.

Общий вид диаграммы Исикавы представлен в приложении Ж. Построение диаграммы Исикавы начинается с четкой формулировки проблемы, которую необходимо решить.

Разработанная методика является адекватной и может использоваться в практической деятельности для контроля качества других представителей пентациклических тритерпеноидов.

4.2. Методика количественного определения ДАБ в биологической активной добавке «Кубебон».

На основании проведенных нами исследований предложен алгоритм методики определения ДАБ в биологически активной добавке. Подготовку пробы, содержащая ДАБ, проводили следующим образом. Точную навеску пробы ДАБ помещали в колбу вместимостью 25,0 мл, растворяли в 25 мл в смеси хлороформ: этанол (1:3). Полученный раствор интенсивно помешивали. В чистый кварцевый стаканчик вместимостью 15.0 -25.0 см³ вносили 12.0 см³ раствора фонового электролита 0,1NaOH и помещали в электрохимическую ячейку вольтамперометрического анализатора. Опускали в раствор электроды и процесс электронакопления при потенциале – -1.0 В течение 25 с. По окончании электролиза регистрировали анодную вольтамперограмму ДАБ в диапазоне потенциалов от – 0.0 до 1.7 В при ступенчатом наложении потенциала и скорости развертки 35 мВ/с. Затем в стаканчик с фоновым раствором вносили аликвоту подготовленного раствора анализируемой пробы объемом 0.02 мл и вновь регистрировали вольтамперограмму в тех же условиях. Измеряли высоту пика при потенциале (1.4±0.05) В. Время анализа одной пробы не превышает 10 – 15 минут. Проверку правильности определения проводили методом «введено-найдено», данные представлены в таблице 6

Таблица 6 – Проверка правильности результатов обнаружения ДАБ в БАД

p=0.95, n=5

Содержание ДАБ мг/таб				
Объект исследования	Заявлено по рецептуре производителем	Оценено	Введено	Найдено
БАД (Кубебон)	25.0	26.3±5.8	25.0	49.6±9.8

Можно отметить удовлетворительные результаты определения ДАБ и погрешность определения не превышает 18%. Время анализа, включая пробоподготовку – 15 минут.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пентациклические тритерпеноиды представляют собой класс природных соединений, включающий более 4000 различных молекул. К основным представителям этого класса относятся бетулин и его производные. В научной литературе описано свыше 15 методов физико-химического анализа пентациклических тритерпеноидов, используемых для их определения в различных образцах, включая фармацевтические препараты. Эти методы включают хроматографические (высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография), спектральные (инфракрасная спектроскопия, ядерный магнитный резонанс, масс-спектрометрия) и электрохимические (капиллярный электрофорез, вольтамперометрия) подходы.

Электрохимические методы анализа органических соединений в последнее время становятся все более важными как в исследовательской деятельности, так и в повседневной аналитической практике благодаря их простоте и относительно низкой стоимости оборудования и расходных материалов. В частности, современные версии вольтамперометрии (ВА) обеспечивают высокую селективность анализа сложных смесей органических веществ при низких пределах обнаружения. Это достигается за счет использования современных вариантов ВА с последующей компьютерной обработкой аналитического сигнала, применения модифицированных электродов и использования хемотрических подходов. Разнообразие вольтамперометрических методов позволяет решать широкий спектр аналитических задач в медицине и фармацевтической промышленности.

Методы ВА применяются для анализа органических соединений уже несколько десятилетий, и этому посвящены многочисленные публикации в международных и отечественных научных журналах. Однако анализ существующих публикаций показывает почти полное отсутствие исследований, посвященных электрохимическому определению бетулина и его диацетата как отдельных веществ. Некоторые исследования касаются определения олеановой,

урсоловой и бетулиновой кислот с помощью ВА, в основном на углеродных и химически модифицированных электродах, но данные о электрохимической активности бетулина и его диацетата почти отсутствуют.

В нашей работе впервые получены аналитические сигналы бетулина и его диацетата на новых электрохимических сенсорах, модифицированных золотом, мезопористым углеродом и солями арендиазония. Мы разработали метод модификации графитовых электродов мезопористым углеродом для последующего определения бетулина и ДАБ. В качестве компонентов для раствора модификатора использовались полистирол, мезопористый углерод, 1,2-дихлорэтан и углеродные нанотрубки. Модификатор добавлялся в растворенную полимерную матрицу из поливинилиденфторида в виде многостенных углеродных нанотрубок, мезопористого углерода или нанопорошков оксидов металлов. Эксперименты показали, что тип и концентрация модификаторов влияют на чувствительность электрода. При длительном погружении электрода в раствор модификатора более 3 секунд аналитический сигнал бетулина снижается. Сравнительные измерения показали, что углеродсодержащий модифицированный электрод более устойчив к механическим повреждениям, не требует специальной подготовки поверхности и может использоваться длительное время в щелочных растворах. Этот электрод сохраняет свои аналитические характеристики до 1 года и способен выдерживать до 1000 циклов измерений. Он отличается высокой чувствительностью и селективностью при определении бетулина и его производных на уровне $1,3 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³ по сравнению с предыдущими методами, использующими золотографитовые электроды.

Анализ показал, что бетулин и его диацетат могут быть определены на модифицированном электроде с использованием вольтамперометрии в различных фоновых электролитах, таких как 0,1 Н NaOH (рН 12), фосфатный буфер (рН 6.56) и буфер Бриттона-Робинсона (рН 9.18).

Вольтамперометрическое определение проводилось в 0.1 Н NaOH, где наблюдался анодный пик бетулина при потенциале 1.1 ± 0.1 В. Градуировочная зависимость бетулина была получена в диапазоне концентраций от $1,3 \times 10^{-8}$ до

2×10^{-3} моль/л. Исследованы различные факторы, влияющие на электрохимические сигналы бетулина и диацетата бетулина на модифицированном электроде, включая pH, потенциал и время электролиза. Рассмотрены физико-химические закономерности окисления и восстановления бетулина на модифицированном электроде. Для установления природы токов применяли критерий Семерано. Для процессов лимитирующихся диффузией коэффициент скорости должен равняться 0.5, нами же получен коэффициент скорости равный 1.6, что указывает об отсутствии вклада диффузионной составляющей тока. Для исследования вклада адсорбции исследовалась зависимость предельного тока от скорости развертки. В литературе известно, что данный критерий используется для установления вклада адсорбции. Полученная зависимость бетулина носит линейный характер, по которому можно сделать предположение об адсорбционном характере процесса на поверхности электрода.

Аналогичные исследования были проведены и для диацетата бетулина. Получены вольтамперограмма ДАБ и градуировочная зависимость ДАБ на 0,1н NaOH. Нами впервые установлены рабочие условия вольтамперометрического определения диацетата бетулина, которые могут быть использованы для разработки методики определения в реальных объектах.

Исходя из выбранных условий вольтамперометрического определения природных соединений, был проведен эксперимент по совместному определению бетулина и диацетата бетулина в условиях: потенциал накопления: -1.0 В, фон: 0,1н NaOH, рабочий электрод: золото-графитовый электрод.

Впервые показана возможность совместного определения бетулина и диацетата бетулина на золото-графитовом электроде с использованием фонового электролита 0.1н NaOH и при потенциале накопления -1.0 В.

Предложены методы модификации электродов различными модификаторами. Предложен способ модифицирования золото-графитовых электродов тозилатами арендиазония и мезопористым углеродом. Показано увеличение чувствительности аналитического сигнала в 2-3 раза по сравнению с золото-графитовым электродом, а также разработаны условия

вольтамперометрического определения бетулина и его диацетата при их совместном присутствии в 0,1н NaOH. Исследование растворов, содержащих бетулин и диацетат бетулина, показало, что их аналитические сигналы можно одновременно измерять только в присутствии золота в щелочном фоновом электролите, где разность потенциалов пиков составляет 0,4-0,6 В. Без модификатора потенциалы анодных пиков бетулина и диацетата бетулина почти совпадают, что затрудняет их точное определение. Установлено, что в щелочном фоне с рН 12 и в присутствии золота можно идентифицировать и одновременно измерять сигналы обоих анализируемых веществ, причем сигналы линейны в рассматриваемом диапазоне концентраций.

Нами исследованы поверхности золото-графитового и модифицированного солью арилдиазония с карбоксильной группой в качестве заместителей электродов с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). По полученным данным замечено, что модификатор на поверхность графита «ложится» не сплошной пленкой, а располагается возле дефектов поверхности, участками, которые занимают 50-60% поверхности. Поэтому для подтверждения факта увеличения аналитического сигнала бетулина за счет нанесения модификатора, а не за счет графитовой подложки нами проведен эксперимент по изменению площади модифицированного электрода.

Оценено влияние компонентов биологически активной добавки «Бетулин» и «Кубебон» на аналитический сигнал бетулина и ДАБ. Выявлено, что избыток микрокристаллической целлюлозы, полисахаридов и глицирризиновой кислоты не оказывает существенного влияния на аналитические сигналы бетулина. Изучение взаимного влияния компонентов в пробе позволило разработать экспрессные методики КХА бетулина и ДАБ в многокомпонентных БАД различного состава и производства.

Разработана вольтамперометрическая методика количественного определения бетулина и ДАБ в БАДах. Проведено определение бетулина и ДАБ в БАДах, оценены метрологические параметры. Определение бетулина и ДАБ в БАДах выполнялось методом «введено-найдено». В ходе проверки правильности

методом «введено-найдено» получили удовлетворительные значения, погрешность определения не превышает 18%. Показатели качества методики анализа (в виде характеристики погрешности и ее составляющих) оценены с применением расчетно-экспериментального метода (РМГ 61-2010).

Разработанные методики являются адекватными и могут использоваться в практической деятельности для контроля качества других представителей пентациклических тритерпеноидов.

ВЫВОДЫ

Проведенная работа позволяет расширить методологию определения органических веществ, в том числе и биологически активных добавок, с использованием методов вольтамперометрии.

В ходе выполнения работы выполнены:

- 1) Выделены и синтезированы некоторые представители пентациклических тритерпеноидов (бетулин и ДАБ) из бересты и идентифицированы с помощью физико-химических методов анализа (ИК, ПМР, Масс-спектрометрии);
- 2) Разработан способ очистки бетулина и диацетата бетулина колоночной хроматографией. Содержание бетулина после очистки составило 98%, содержание ДАБ после очистки составила 94%;
- 3) Установлены рабочие условия количественного определения бетулина и диацетата бетулина методом вольтамперометрии с использованием модифицированных углеродсодержащего электродов. Показано, что отклонение высоты аналитического сигнала бетулина в присутствии ДАБ в широком диапазоне его концентрации составляет не более 10-15% при их соотношении до 1:50.
- 4) Методом циклической вольтамперометрии показано, что процесс электроокисления бетулина на золото-графитовом электроде является адсорбционным. Данный факт доказан с помощью критерия Семерано: рассчитан коэффициент равный 1.6 и его величина указывает на отсутствие вклада диффузионной составляющей тока.
- 5) Впервые разработаны вольтамперометрические условия совместного определения бетулина и диацетата бетулина на модифицированных углеродсодержащих электродах на фоне 0.1н NaOH.
- 6) Впервые предложен способ модифицирования золото-графитовых электродов мезопористым углеродом и тозилатами арендиазония. Показано увеличение чувствительности аналитического сигнала бетулина на органо-модифицированном электроде в 2-3 раза по сравнению с золото-графитовым.

7) Дана оценка мешающего влияния сопутствующих органических веществ при анализе БАД на величину аналитического сигнала бетулина. Показано, что наличие сопутствующих компонентов в соотношении 100:1 не оказывают значительного влияния на аналитический сигнал бетулина.

Разработана вольтамперометрическая методика количественного определения бетулина и диацетата бетулина в БАДах. Проведены расчеты основных метрологических параметров. Погрешность определения не превышает 18%.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

УНТ – углеродные нанотрубки;

АДТ – арендиазоний тозилаты;

ГЭ – графитовый электрод;

ЗГЭ – модифицированный золото-графитовый электрод;

ДАБ–диацетат бетулина

ИЭ–индикаторный электрод

ИК – инфракрасная спектроскопия

ПМР– спектроскопия – спектроскопия протонного магнитного резонанса

ЯМР – спектроскопия – Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ТСХ – тонкослойная хроматография

КЭ – капиллярный электрофорез

КЗЭ – капиллярный зональный электрофорез

КХА – количественный химический анализ

$C_{\min,p}$ – наименьшая концентрация

МЗГЭ – модифицированный золото - графитовый электрод

4-НБДТ – 4-нонфенил-4-гидроксибутандиол-1,3 (4-nonylphenyl-4'-hydroxybutanediol-1,3)

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M.C.; Haas, C.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Neuhaus, H.E.; Mirata, M.A.; Schrader, J.; Ulber, R. Biotransformation of triterpenes// *Process Biochem.* – **2011.** – 46–P. 1–15.
2. Sheng, H.; Sun, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: A multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases// *Nat. Prod. Rep.*– **2011.**– 28.– P.543–593.
3. Siddique, H.R.; Saleem, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies// *Life Sci.*– **2011.**– V.88. – P. 285–293.
4. Moreau, R.A.; Whitaker, B.D.; Hicks, K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses// *Prog. Lipid Res.* – **2002.** – V.41. – P. 457–500.
5. Spindler, K. The Man in the Ice / K. Spindler// N.Y.: Harmony Books.–1994. – P. 305.
6. Gouldson, J. E. The Birch Tree / J. E. Gouldson (self-published), Bovey Tracey, Devon. – 1992. – P.106.
7. Peyton, J. The Birch: Bright Tree of Life and Legend / J. Peyton // Granville, OH, USA: McDonald & Woodward.– 1994. – P.73.
8. Ruzicka, L. Perspektiven der Biogenese und der Chemie der Terpene / L. Ruzicka // *Pure Appl. Chem.* – 1963. - Vol. 6. - No. 4. - P. 493-524.
9. Ukkonen, K. Birch bark extractives / K. Ukkonen, V. Era // *Kemia-Kemi.* - 1979. - V. 6. – № 5. - P. 217–220.
10. Hayek, E.W.H. A bicentennial of betulin / E.W.H. Hayek, U. Jordis, W. Moche, Sauter F. // *Phytochemistry.* - 1989. - Vol. 28. - P. 2229–2242.
11. Кислицын, А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение / А.Н. Кислицын // *Химия древесины.*– 1994.– №3.– С.3–28.
12. Eckerman C., Ekman R. Comparison of solvents for extraction and crystallisation of betulinol from birch bark waste // *Paperi ja Puu.* – 1985.– №3. –P. 100–106.

13. Похило, Н.Д. Тривтерпенониды даммаранового ряда различных видов рода *Betula* / Н.Д. Похило, Н.И. Уварова //Химия в интересах устойчивого развития. - 1998. - №6. - С.461-467.
14. Ohara, S. Utilization of bark extractives / S.Ohara, Y.Hayashi, M.Yatagai. //Henkan Keikaku Kenkyu Hokoku. - 1990. - V.24. - P.12-35.
15. Ekman, R. The suberin monomers and triterpenoids from the Outer Bark of *Betula verrucosa* Ehrh / R. Ekman // *Holzforschung*. – 1983. - Vol.57. - P. 205-211.
16. Cole, B.J.W. Triterpenoid constituent in the outer bark of *Betula alleghaniensis* (Yellow birch) / B.J.W. Cole, M.D. Bentley, Y. Hua, L. Bu // *Journal of wood chemistry and technology*. - 1991. - Vol. 11. - № 2. - P. 209-223.
17. Andre, C.M.; Greenwood, J.M.; Walker, E.G.; Rassam, M.; Sullivan, M.; Evers, D.; Perry, N.B.; Laing, W.A. Anti-inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties.// *J. Agric. Food Chem.* –**2012**. – №60. – P.10546–10554.
18. Yamaguchi, H.; Noshita, T.; Kidachi, Y.; Umetsu, H.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Funayama, S.; Ryoyama, K. Isolation of ursolic acid from apple peels and its specific efficacy as a potent antitumor agent // *J. Health Sci.* – **2008**. – V.54. – P.654–660.
19. Jäger, S.; Trojan, H.; Kopp, T.; Laszczyk, M.N.; Scheffler, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants—Rich sources for a new group of multi-potent plant extracts// *Molecules*.–**2009**. №14.– P.2016–2031.
20. Wang, W.H.; Chuang, H.Y.; Chen, C.H.; Chen, W.K.; Hwang, J.J. Lupeol acetate ameliorates collagen-induced arthritis and osteoclastogenesis of mice through improvement of microenvironment// *Biomed. Pharmacother.* – **2016**.–V.79. –P.231–240.
21. Yin, M.C.; Lin, M.C.; Mong, M.C.; Lin, C.Y. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice// *J. Agric. Food Chem.*– **2012**.– V.60. – P.7697–7701
22. Juan, M.E.; Planas, J.M.; Ruiz-Gutierrez, V.; Daniel, H.; Wenzel, U. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two

pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells// *Br. J. Nutr.* **2008.**–V.100. –P.36–43.

23. Razboršek, M.I.; Vončina, D.B.; Doleček, V.; Vončina, E. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives// *Chromatographia.* –**2008.** –V.67. –P.433–440.

24. Ovesná, Z.; Vachálková, A.; Horváthová, K.; Tóthová, D. Pentacyclic triterpenoic acids: New chemoprotective compounds. Minireview// *Neoplasma.* –**2004.** –V.51. –P. 327–333.

25. Raval, N.; Mistry, T.; Acharya, N.; Acharya, S. Development of glutathione-conjugated asiatic acid-loaded bovine serum albumin nanoparticles for brain-targeted drug delivery// *J. Pharm. Pharmacol.*–**2015.**–V.67.– P.1503–1511.

26. Judy, W.V.; Hari, S.P.; Stogsdill, W.W.; Judy, J.S.; Naguib, Y.M.; Passwater, R. Antidiabetic activity of a standardized extract (glucosol) from *Lagerstroemia speciosa* leaves in type II diabetics: A dose-dependence study.// *J. Ethnopharmacol.* –**2003.**–V.87.–P.115–117.

27. А.Л.Бромштейн, Л.В.Лобанова, Т.Б. Векслер, Тез.докл.совещ. «Лесохимия и органический синтез» Сыктывкар. –1994.– С.34.

28. Толстиков А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность /А.Г. Толстиков, О.Б. Флехтер, Э.Э. Шульц, Л.А. Балтина // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. - №3. - С. 1–30.

29. Ekman, R. The suberin monomers and triterpenoids from the Outer Bark of *Betula verrucosa* Ehrh / R. Ekman // *Holzforschung.* – 1983. - Vol.57. - P. 205-211.

30. Siddiqui S., Hafeez F., Begum S., Siddiqui B.S. Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium Oleander* // *J. Nat. Prod.* –1988. –vol. 51. –№ 2. – P. 229-233.

31. А.А Семенов, Очерк химии природных соединений, Наука, Новосибирск.– 2000

32. Г.А. Толстиков, Н.И. Петренко, Н.В. Еланцева и др., N'-{N-[3-оксо-20(29)-лупен-28-оил] -9-аминононаноил} -3-амино-3-фенилпропионовая кислота,

обладающая иммуностимулирующей и противовирусной активностью Пат. РФ 2211843, 2003.

33. Boreko, E.I. Synthesis and antiviral activity of lupane triterpenoids with modified cycle E / E.I. Boreko, N.I. Pavlova, O.V. Savinova, O.B. Flekhter // *News Biomed. Sci.*– 2002. - № 3. - P. 86.

34. R.M. Carlson, P.A. Krasutsky, M.R.U. Karim, Use of betulin and analogs thereof to treat herpesvirus infectionus US Pat. 5,750,578.

35. Л. Р. Нигматуллина, Синтез новых физиологически активных веществ на основе тритерпеноидов лупанового ряда: Автореф. дис . канд хим. наук, Уфа, 2002,– 24 с.

36. R.M. Carlson, P.A. Krasutsky, M.R.U. Karim, Use of betulin and analogs thereof to treat herpesvirus infectionus US Pat. 5,750,578.

37. Kashiwada, Y. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents / Y. Kashiwada, F. Hashimoto, L.M. Cosentino et al. // *J. Med. Chem.* – 1996. – Vol. 39. – N.5. – P.1016–1017.

38. Fujioka, T. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids / T. Fujioka, Y. Kashiwada, R. Kilkuskie et al. // *J Nat Prod.* – 1994. – Vol. 57. – N. 2. - P.243-247.

39. Флехтер О.Б., Карачурина Л.Т., Поройко В.В., Нигматулина Л.Р., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Спирихин Л.В., Байкова И.П., Галин Ф.З., Толстиков Г.А. Синтез эфиров тритерпеноидов группы лупана и их гепатопротекторная активность // *Биоорг. Химия.* –2000. – т. 26.–№ 3.– с. 215-223.

40. Флехтер, О.Б. Синтез и фармакологическая активность диникотината бетулина / О.Б. Флехтер, Л.Г. Карачурина, Л.Р. Нигматуллина и др. // *Биоорг. химия.* - 2002. - Т. 28.- С. 543-550.

41. Флехтер, О.Б. Биологическая активность отвара из листьев березы / О.Б. Флехтер, Л.Р. Нигматуллина, Л.Т. Карачурина // *Хим.-фармацевт. журн.* - 2000. - № 17. - С. 34-40.

42. Карачурина. Л.Т. Исследование некоторых фармакологических свойств бисгемифталата бетулина / Л.Т. Карачурина, Т.А. Сапожникова, Ф.С. Зарудий и др. // Эксперим. клинич. фармакол. - 2003. - Т. 66. № 4. - С. 56-59.
43. Recio.C.M. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas* / C. M. Recio, R. M. Giner, S. Manez et al. // *Planta Med.* – 1995. - Vol. 61. – N.1. - P. 9-12
44. Mukherjee.P.K. Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera* / P.K. Mukheijee, K. Saha, J. Das et al. // *Planta Med.* 1997. - Т. 63. - P. 367-369.
45. И. В. Сорокина, Е. Б. Бубнова, Т. Г. Толстикова и др., Тез. докл. XII Междунар. семинара «Медицина XXI века», Низкие Татры, Словакия.2004. - с. 21.
46. Василенко, Ю.К. Фармакологические свойства тритерпеноидов коры березы / Ю.К. Василенко, В.Ф. Семенченко, Л.М. Фролова// Экспер. и клин. фармакол.- 1993.- Т.56.-№4.- С.53-55.
47. Кузнецова, С.А. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности / С.А. Кузнецова, Н.Ю. Васильева, Г.С. Калачева и др. // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. - 2008. - Т.1. - № 2. - С. 151-165.
48. Кислицын, А. Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение / А. Н. Кислицын // Химия древесины. – 1994. – №3. – С. 3 – 28.
49. Кузнецова С.А. Изучение состава и антиоксидантных свойств гексанового и этанольного экстрактов бересты. / С.А. Кузнецова, Н.М. Титова, Г.С. Калачева, И.А. Зайбель // Вестник Красноярского государственного университета. - 2005.- Вып. 2- С. 113-118.
50. Mukherjee R. Betulinic acid derivatives as anticancer agents: structure activity relationship / R. Mukherjee, V. Kumar, S. K. Srivastava // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* – 2006. – vol. 6. – №3. – С. 271–279.

51. Толстиков И.Г. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы / И.Г. Толстиков, И.В. Сорокина, Г.А. Толстиков. // Биоорганическая химия. – 2006. – №1. Т.32. – С.42-55.
52. Matsuda H. Superoxide scavenging and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* / A. Ishikado, N. Nishida. // *Hepatoprotective Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 1998. – № 8. – P. 2939–2944.
53. Rhourri-Frih, B., Chaimbault, P., Claude, B., Lamy, C., André, P., & Lafosse, M. *Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI* // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2009. – V.44. – №1. – P.71–80.
54. Giménez, E., Juan, M. E., Calvo-Melià, S., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., & Planas, J. M. (2015). *Pentacyclic triterpene in Olea europaea L: A simultaneous determination by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*. V.–№ 1410. –P.68–75.
55. Yang, G., Fen, W., Xiao, W., & Sun, H. (2009). *Study on Determination of Pentacyclic Triterpenoids in Chaenomeles by HPLC-ELSD* // *Journal of Chromatographic Science*. – V.47. – №.8. – P.718–722.
56. Falev, D. I., Kosyakov, D. S., Ul'yanovskii, N. V., & Ovchinnikov, D. V. (2019). *Rapid simultaneous determination of pentacyclic triterpenoids by mixed-mode liquid chromatography – tandem mass spectrometry* // *Journal of Chromatography A*. – P.460-458.
57. Wang, Y., He, Y., Dai, Z., Ma, S., Simultaneous determination of five triterpenoid saponins in different parts of *Lonicera macranthoides* by RRLC–MS/MS method. // *Pharmazie*. – 2016. – V.71. – P. 306–310.
58. Tao, Y., Jiang, Y., Li, W., Cai, B., Rapid characterization and determination of isoflavones and triterpenoid saponins in Fu-Zhu-Jiang-Tang tablets using UHPLC–Q-TOF/MS and HPLC–UV // *Anal. Methods*. – 2016. – V.8. – P. 4211–4219.
59. Rong, W., Sun, Z., Li, Q., Liu, R., Zhang, T., Wang, T., Yang, W., Li, Z., Bi, K., Characterization and simultaneous quantification of seven triterpenoid saponins in

different parts of *xanthoceras sorbifolia* Bunge by HPLC–ESI-TOF// *Anal. Methods.* – 2016. –V.8.– P.2176–2184.

60. Zhang, L., Wang, Y., Yu, D.-Q., Simultaneous quantification of six major triterpenoid saponins in *Schefflera kwangsiensis* using high-performance liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry// *Nat. Prod. Res.* –2015.– №29.– P. 1350–1357.

61. Ai, Y., Wang, F., Wu, Y., Ma, W., Bian, Q., Lee, D. Y. W., Dai, R., Simultaneous determination of two flavonoids and six pentacyclic triterpenes by UPLC-0MS/MS: Application to a comparative pharmacokinetic study in normal and arthritic rats after oral administration of huo luo xiao ling dan or its single herb extract// *Anal. Methods.* – 2015. –V.7. –P. 8402–8411.

62. Rao, Y. K., Geethangili, M., Tzeng, Y.-M., Development of a high performance liquid chromatography method for the quantitative determination of bioactive triterpenoids in the extracts of *Antrodia camphorate*// *Anal. Methods.* – 2013.–V.5.– P.5724–5730.

63. Maringer, L., Ibanez, E., Buchberger, W., Klampfl, C. W., Causon, T. J., Using sheath-liquid reagents for capillary electrophoresis-mass spectrometry: Application to the analysis of phenolic plant extracts// *Electrophoresis.* –2015.– V.36.– P. 348–354.

64. Srivastava, P., Ajayakumar, P. V., Shanker, K., Box–Behnken design for optimum extraction of biogenetic chemicals from *P. lanceolata* with an energy audit (thermal × microwave × acoustic): A case study of HPTLC determination with additional specificity using on-line/off-line coupling with DAD/NIR/ESI–MS// *Phytochem. Anal.* –2014. –V.25. –P.551–560.

65. Glensk, M., Glinski, J. A., Wlodarczyk, M., Stefanowicz, P., Determination of ursolic and oleanolic acid in *Sambuci fructus*// *Chem. Biodivers.*–2014.– V.11. – P.1939–1944.

66. El-Seedi, H. R., Antimicrobial triterpenes from *Poulsenia armata* Miq. Standl// *Nat. Prod. Res.* – 2005.–V.19. –P.197–202.

67. Hesham R. El-Seedi, Rehan El-Shabasy, Hanem Sakr, Mervat Zayed, Asmaa M. A. El-Said, Khalid M. H. Helmy, Ahmed H. M. Gaara, Zaki Turki, Muhammad

- Azeem, Ahmed M. Ahmed, Loutfy Boulos, Anna-Karin Borg-Karlson, Gåransson, U., Anti-schistosomiasis triterpene glycoside from the Egyptian medicinal plant *Asparagus stipularis* // *Rev. Bras. Farmacogn.* – 2012. – V. 22. – P. 314–318.
68. Kuznetsova S.A., Vasil'eva N. Yu., Kalacheva G. S., et al. Preparation of betulin diacetate from birch bark and study of its antioxidant activity // *Zh. Sib. Fed. Univ. Khimiya.* – 2008. – Vol. 1. – № 2. – P. 151-165.
69. Koptelova E. N., Kutakova N. A., Tret'yakov S. I. Determination of composition of the ethanol extract from birch bark // *Izv. Vuzov. Lesn. Zh.* – 2011. – № 6. P. 107-111.
70. Zhao Guoling. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using PR-HPLC // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol. 43. – № 3. – P. 959-962.
71. Li Wei, Li Xian, Li Zhan-lin, et al. Chemical components of *Carpophorus Xanthoceras sorbifolia* Bunge // *J. Shenyang Pharm. Univ.* – 2005. – Vol. 22. – №5. – P. 345-347.
72. A. Guinda, M. Rada, T. Delgado, P. Gutiérrez-Adán, J.M. Castellano Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf // *J. Agric. Food Chem.*, – 2010. – V.58. – P. 9685-9691.
73. M.C. Pérez-Camino, A. Cert Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils // *J. Agric. Food Chem.*, – 1999. – V.47. – P. 1558-1562.
74. A. Caligiani, G. Malavasi, G. Palla, A. Marseglia, M. Tognolini, R. Bruni A simple GC–MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients // *Food Chem.*, – 2013. – V.136. – P.735-741.
75. J. Peragón Time course of pentacyclic triterpenoids from fruits and leaves of olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual and cv. Cornezuelo during ripening // *J. Agric. Food Chem.*, – 2013. – V.61. – P.6671-6678.
76. C. Romero, A. García, E. Medina, M.V. Ruíz-Méndez, A. de Castro, M. Brenes Triterpenic acids in table olives // *Food Chem.*, – 2010. – V.118. – P. 670 674.

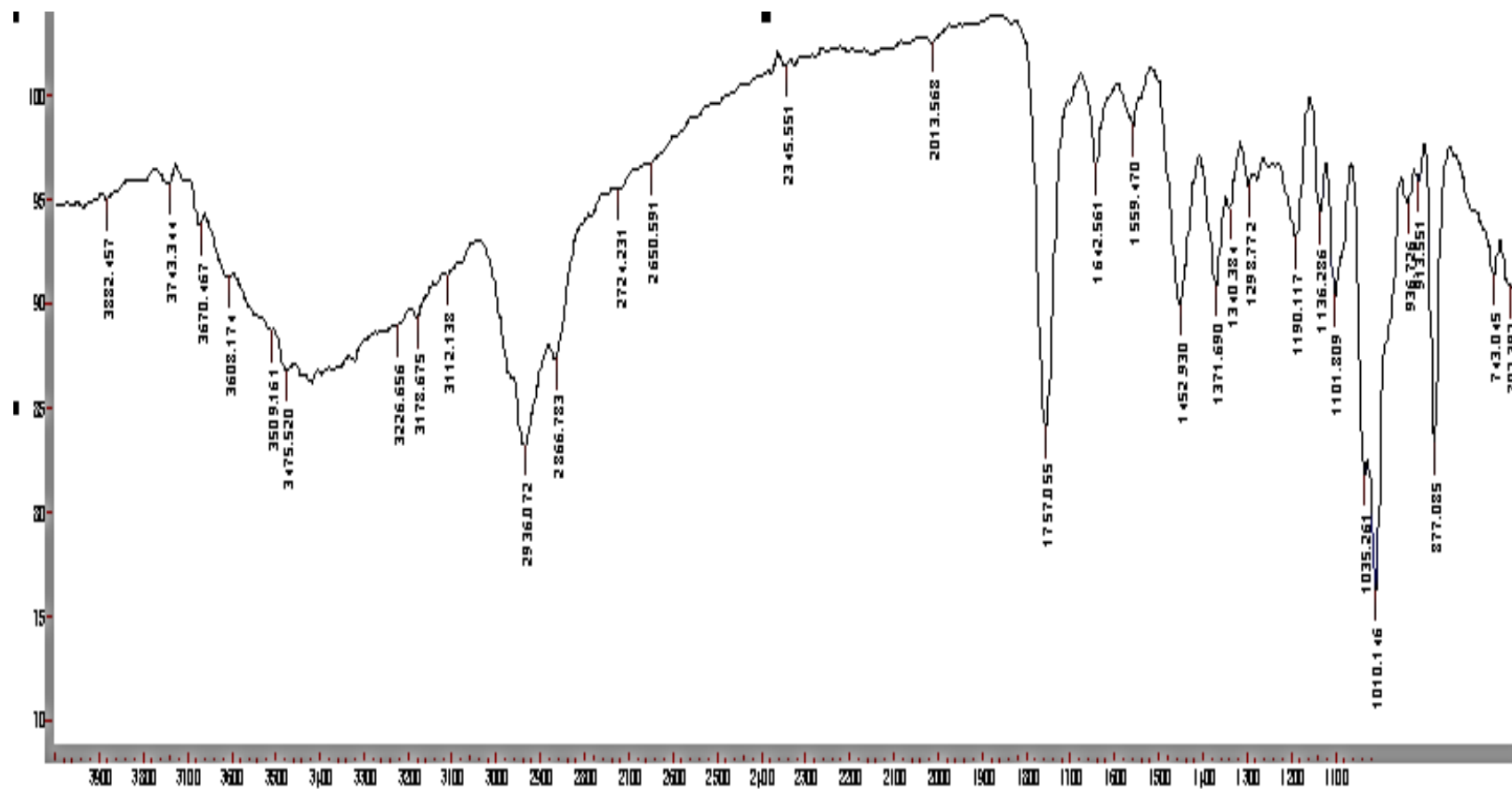
77. G.L. Li, J.M. You, C.H. Song, L. Xia, J. Zheng, Y.R. Suo Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits// *J. Agric. Food Chem.*, – 2011.– V.59.- P. 2972-2979.
78. Z. Sun, J. You, C. Song, L. Xia Identification and determination of carboxylic acids in food samples using 2-(2-(anthracen-10-yl)-1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-1-yl)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (APIETS) as labeling reagent by HPLC with FLD and APCI/MS // *Talanta*. – 2011. – V. 85.– P.1088-1099.
79. Zuman P. Past, present, and future of applications of electroanalytical techniques in analytical and physical organic chemistry // *J. Solid State Electrochem.* – 2011. – № 15. – P. 1753-1759.
80. Tyszczuk-Rotko K., Wojciak-Kosior M., Sowa I. Voltampermetric determination of betulinic acid at lead film electrode after chromatographic separation in plant material // *Anal.Biochem.*, –2013. – Vol.436.– №2.– P.121-126.
81. M. Korolczuk, K. Tyszczuk, M. Grabarczyk, Adsorptive stripping voltammetry of nickel and cobalt at in situ plated lead film electrode// *Electrochem. Commun* – 2005. – Vol 7. – P. 1185-1189.
82. K. Tyszczuk, Application of an in situ plated lead film electrode to the analysis of testosterone by adsorptive stripping voltammetry // *Anal. Bioanal. Chem.*– 2008. – Vol.390. –P. 1951-1956.
83. K. Tyszczuk, M. Korolczuk, Voltammetric methods for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations // *Bioelectrochemistry*.– 2010. – Vol.78. – P. 113-117.
84. K. Tyszczuk, A. Skalska-Kamin' ska, A. Woz' niak, Voltammetric method using a lead film electrode for the determination of caffeic acid in a plant material // *Food Chem.* – 2011. – Vol.125. – P. 1498-1503.
85. K. Tyszczuk, Correlation between the plating regime of lead film deposition and electrode response after accumulation of organic compound: Microscopic study, *Sens. Actuat.B.* –2011. – Vol 156. – P. 899-905.

86. Katarzyna Tyszczyk-Rotko, Katarzyna Domanska, Ilona Sadok, Magdalena Wojciak-Kosior and Ireneusz Sowab. Voltammetric procedure for the determination of oleanolic and ursolic acids in plant extracts // Royal society of chemistry. Analytical methods. – 2015.
87. Murray, R. W., //Acc. Chem. Res.,– 1980. – V.13.– P.135.
88. Faulkner, L. R., //Electrochim. Acta. – 1989. –V.34.– P.1699.
89. Patriarche, G. J., //J. Pharm. Biomed. Anal. – 1986.–V.4. –P.189.
90. Murray, R. W., Ewing, A. G., and Durst, R. A., //Anal. Chem., – 1987.– V.59.– P. 379A.
91. X.F. Tang, Y. Liu, H.Q. Hou, T.Y. You. Electrochemical determination of L-tryptophan, L-tyrosine and L-cysteine using electrospun carbon nanofibers modified electrode// Talanta.– 2010.– V.80. –P. 2182-2186.
92. Z.Y. Zeng, X.Z. Zhou, X. Huang, Z.J. Wang, Y.L. Yang, Q.C. Zhang, F. Boey, H. Zhang. Electrochemical deposition of Pt nanoparticles on carbon nanotube patterns for glucose detection// Analyst. –2010.– V.135.–P. 1726-1730.
93. Stejskal, J. Polyaniline nanostructures and the role of aniline oligomers in their formation / J. Stejskal, I. Sapurina, M. Trchová // Progress in Polymer Science. - 2010. - Vol. 35. № 12. – P.1420-1281.
94. R. Ryoo, S.H. Joo, S. Jun. Synthesis of highly ordered carbon molecular sieves via template-mediated structural transformation// J. Phys. Chem. B.–1999.–V.103.– P. 7743-7746.
95. D. Zhu, C.Y. Tian, D.X. Yang, X.Y. Jiang, R.L. Yang. Bioanalytical application of the ordered mesoporous carbon modified electrodes// Electroanalysis. –2008.– V.20.– P. 2518-2525.
96. L. Liu, L.P. Guo, X.J. Bo, J. Bai, X.J. Cui. Electrochemical sensors based on binuclear cobalt phthalocyanine/surfactant/ordered mesoporous carbon composite// Anal. Chim. Acta.– 2010.–V.673.–P. 88-94.
97. X.J. Bo, J. Bai, L.X. Wang, L.P. Guo. In situ growth of copper sulfide nanoparticles on ordered mesoporous carbon and their application as nonenzymatic amperometric sensor of hydrogen peroxide// Talanta, –2010.– № 81.–P. 339-345

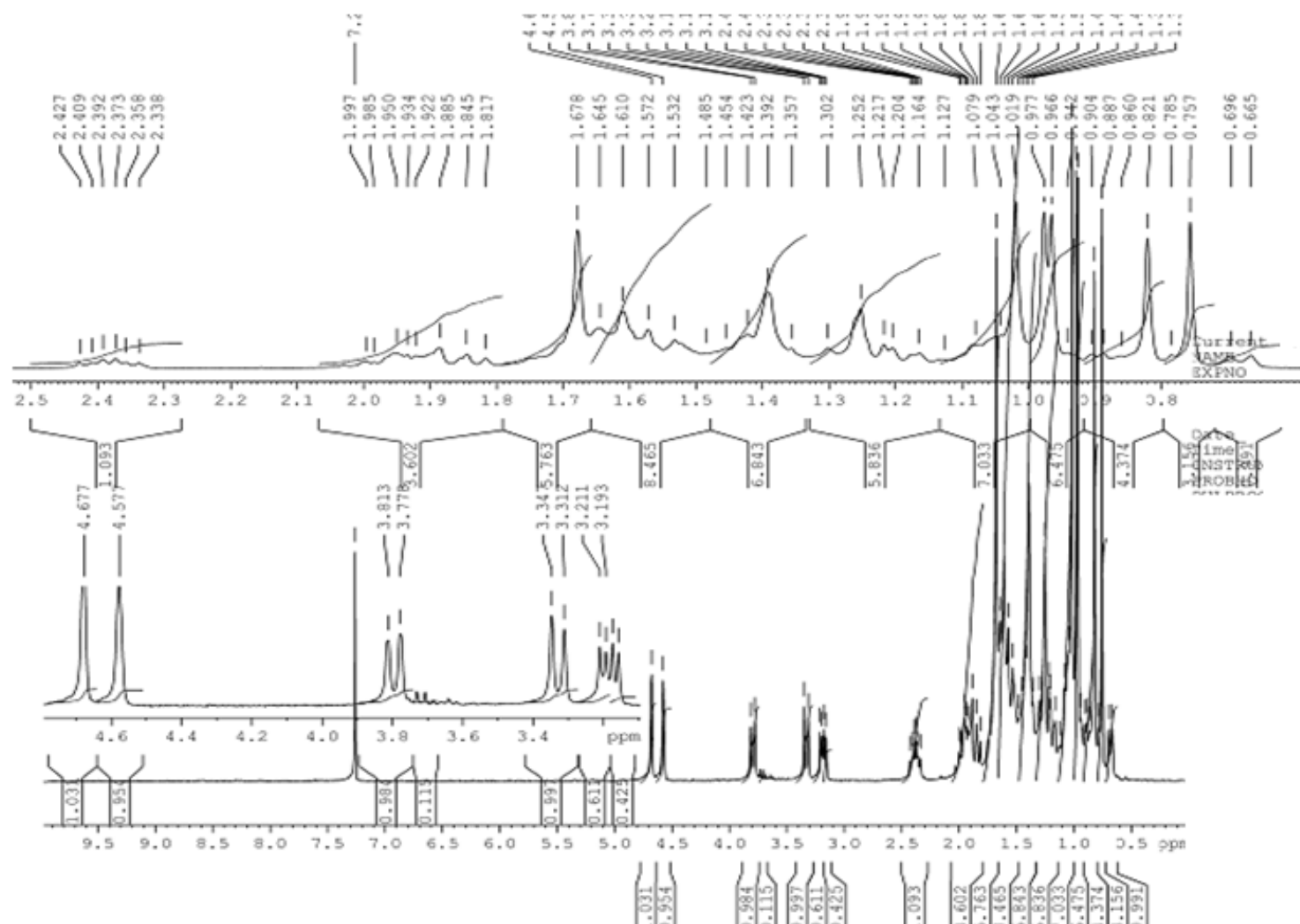
98. M. Hartmann. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis// Chem. Mater., –2005. –V.17. – P. 4577-4593.
99. H.S. Zhou, S.M. Zhu, M. Hibino, I. Honma, M. Ichihara. Lithium storage in ordered mesoporous carbon (CMK-3) with high reversible specific energy capacity and good cycling performance// Adv. Mater., –2003. –V.15. –P. 2107-2111.
100. M. Zhou, J. Ding, L.P. Guo, Q.K. Shang. Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at ordered mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode// Anal. Chem., –2007. – V.79. – P. 5328-5335.
101. M. Zhou, L.P. Guo, F.Y. Lin, H.X. Liu. Electrochemistry and electrocatalysis of polyoxometalate-ordered mesoporous carbon modified electrode// Anal. Chim. Acta.-2007. – V.587. – P. 124-131.
102. J. Bai, B. Qi, J.C. Ndamaniha, L.P. Guo. Ordered mesoporous carbon-supported prussian blue: characterization and electrocatalytic properties// Micropor. Mesopor. Mater., – 2009. – V.119. –P. 193-199.
103. J. Bai, X.J. Bo, B. Qi, L.P. Guo. A novel polycatechol/ordered mesoporous carbon composite film modified electrode and its electrocatalytic application//Electroanalysis. – 2010. –V.22. –P. 1750-1756.
104. М. Мусамех, Дж. Ван, А. Меркочи, Ю. Линь// Электрохим. Коммун., –2002. –Т.4. –с. 743.
105. И. Стритер, Г.Г. Уайлдгус, Л. Шао, Р.Г. Комптон//Sens. Actuators B. 2008. –Т.133. –стр. 462.
106. Г.. Кили, М.И.Г. Лион// Int. J. Electrochem. Наук. –2009. – Т.4. –с. 794.
107. Л. Сяо, Г.Г. Уайлдгус, Р.Г. Комптон//Sens. Actuators B. –2009. – Т.138. –С. 524.
108. М. Галхани, С. Шахрохян//Электрохим. Коммун., –2010. –Т.12. – с. 66.
109. Бэнкс, Т.Дж. Дэвис, Г.Г. Уайлдгус, Р.Г. Комптон//Chem. Commun. –2005. –С. 829
110. Бэнкс, Р.Г. Комптон//Analyst. – 2006. – V.131. – P.15.
111. S. Шахрохян, М. Галхани, М. Адели, М.К. Амини//Биосенс. Биоэлектрон., – 2009. –Т.2. –С. 3235.

112. М. Галхани, С. Шахрохян Ф. Горбани-Бидкорбех//Таланта. – 2009. – Т.80. – С. 31
113. X.F. Tang, Y. Liu, H.Q. Hou, T.Y. You. Electrochemical determination of L-tryptophan, L-tyrosine and L-cysteine using electrospun carbon nanofibers modified electrode// Talanta. –2010. –V. 80.– P. 2182-2186.
114. Kariuki, J.K. Formation of multilayers on glassy carbon electrodes via the reduction of diazonium salts / Kariuki J.K., McDermott // Langmuir.– 2001. – Vol.17. – P. 5947–5951.
115. Adenier, A. Covalent modification of iron surfaces by electrochemical reduction of aryldiazonium salts [Текст] / Adenier A., Bernard M.-C., Chehimi M.M. // J. Am. Chem. Soc. – 2001. –Vol. 123. –P. 4541–4549.
116. Слепченко, Г.Б. Новые возможности вольтамперометрического определения фармацевтических препаратов на органо-модифицированных электродах [Текст] / Г.Б. Слепченко, О.А. Мартынюк, П.С. Постников, М.Е. Трусова, А.А. Бондарев, И.В. Смирнов, Е.Л. Быстрицкий // Сибирский медицинский журнал. –2009. - Т. 24. - №2-2. – С. 21-24.
117. Кузнецова С.А., Скворцова Г.П., Маляр Ю.Н. и др. Выделение бетулина из бересты березы и изучение его физико-химических и фармакологических свойств // Химия растительного сырья. – 2013. – №2. – С. 93 – 100.
118. Кузнецова С.А., Васильева Н.Ю., Калачева Г.С., и др. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантой активност// Journal of Siberian Federal University. Chemistry 2. – 2008. – Т. 1. – С. 151–165.
119. Сымон А.В., Веселова Н.Н., Каплун А.П., Синтез циклопропановых производных бетулиновой и бетулоновой кислот и их противоопухолевая активность //Биоорганическая химия. – 2005. – Т.31.– № 3.– С. 320-325.

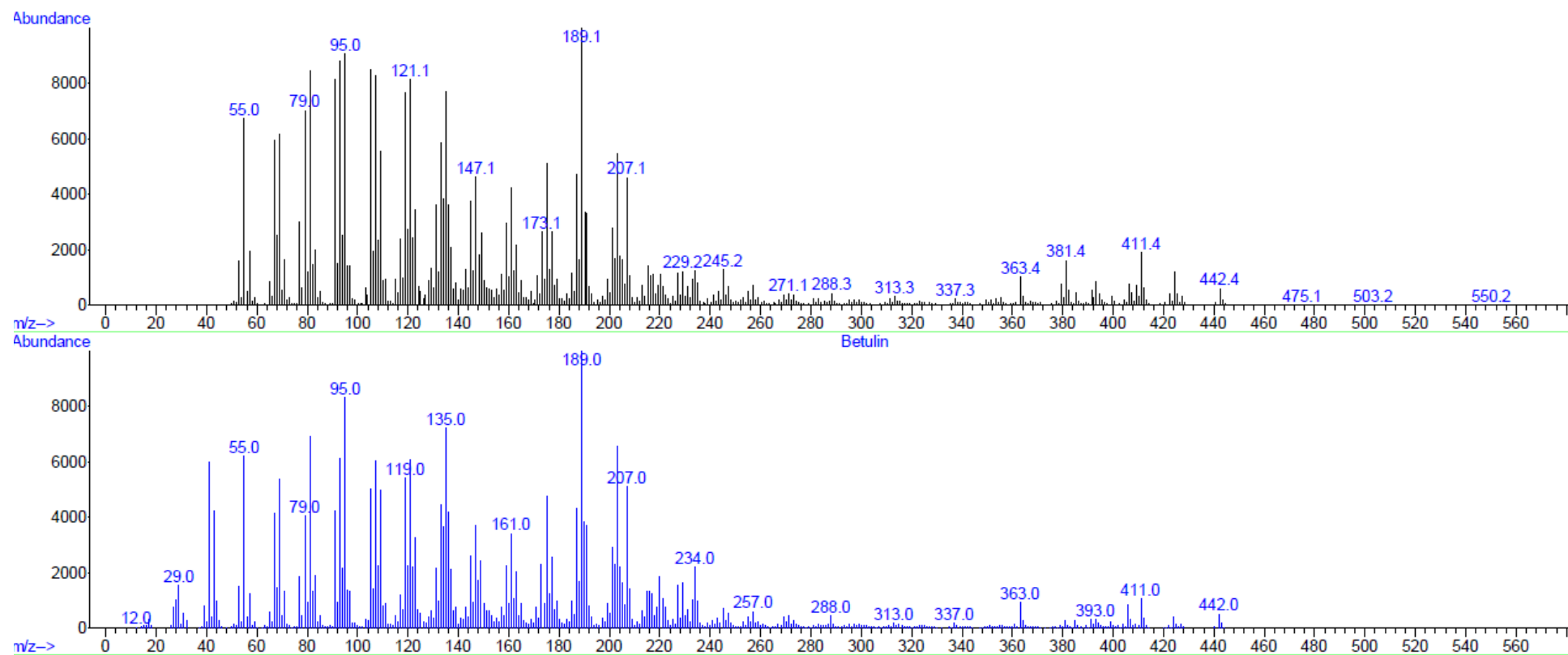
Приложение А. ИК спектр бетулина



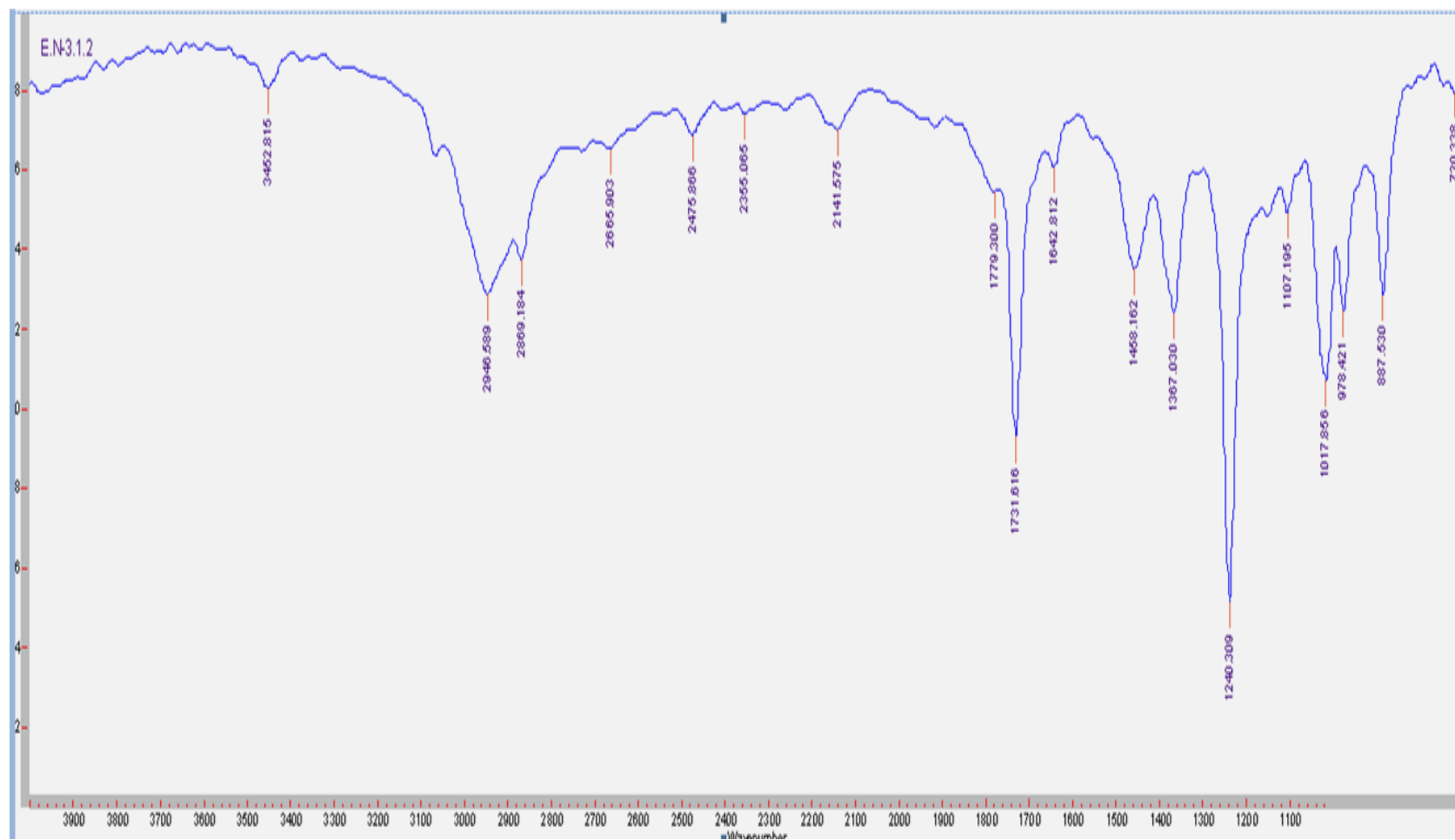
Приложение Б. ПМР спектр бетулина



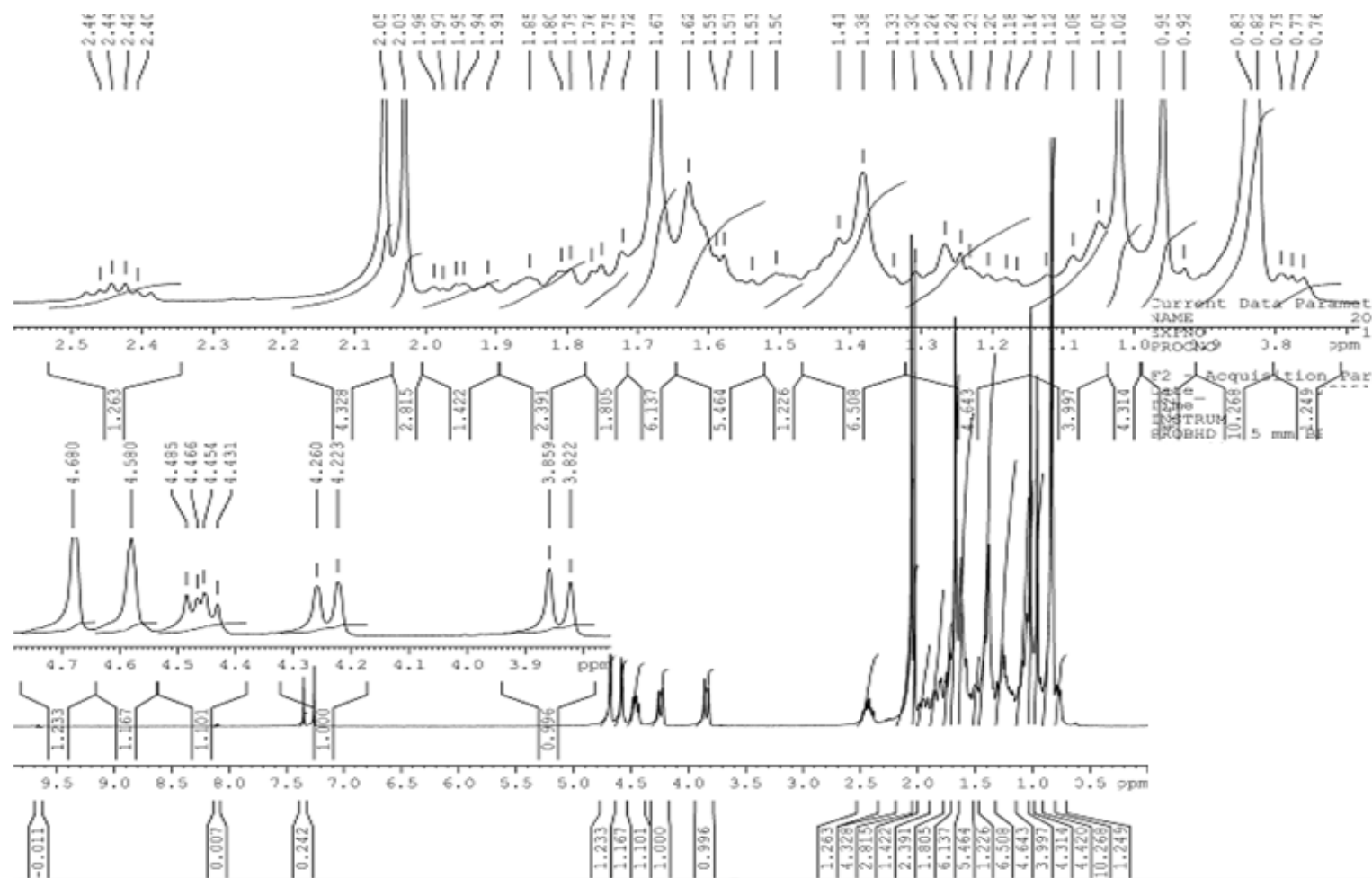
Приложение В. Масс-спектр бетулина



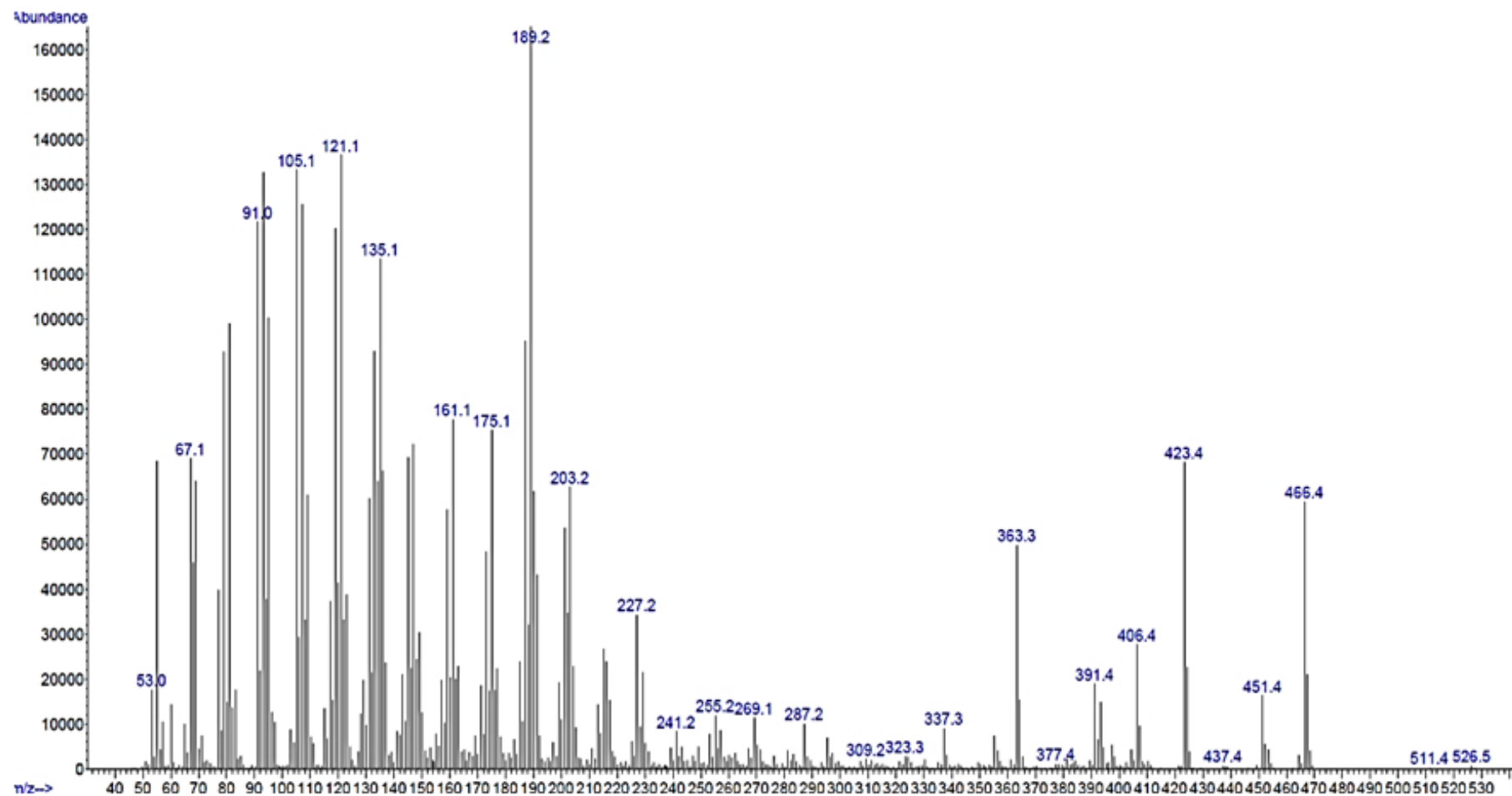
Приложение Г. ИК спектр ДАБ



Приложение Д. ПМР-спектр ДАБ



Приложение Е. Масс-спектр ДАБ



Приложение Ж. Диаграмма Исикава

