

ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



На правах рукописи

Нурпейис Енлик

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

1.4.2 Аналитическая химия

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель: **Слепченко Галина Борисовна**

доктор химических наук, профессор исследовательской школы химических и биомедицинских технологий, профессор инженерной школы природных ресурсов Национального исследовательского Томского политехнического университета

Официальные оппоненты: **Нехорошев Сергей Викторович**

Доктор технических наук, главный научный сотрудник Ханты-Мансийской государственной медицинской академии в г. Ханты- Мансийск

Шилова Инесса Владимировна

доктор фармацевтических наук, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, старший научный сотрудник фармацевтической группы лаборатории фитофармакологии и специального питания

Защита состоится 12 декабря 2024г в 11:00 часов на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.08 Национального исследовательского Томского политехнического университета по адресу: *г.Томск, пр-кт Ленина 43а.*



С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Томского политехнического университета и на сайте dis.tpu.ru при помощи QR-кода.

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь

диссертационного совета ДС.ТПУ.08 *Е.В. Дорожко* Дорожко Е.В.
ученая степень, ученое звание

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Контроль органических соединений с широким спектром биологической активности в качестве основы для создания лекарственных препаратов является актуальной задачей в аналитической химии. На сегодняшний день одними из наиболее широко распространенных соединений природных классов с обширными биологическими свойствами являются бетулин и его производные. Их получают из растений и особенно из коры березы, а также из корней лакрицы, где они особенно обильны.

Терапевтические препараты на основе пентациклических тритерпенов обладают широким спектром биологической активности: антибактериальной, антиоксидантной, противовоспалительной, противоопухолевой, антигипергликемической и анти-ВИЧ.

Для определения тритерпенов применяют различные физико-химических методов анализа. 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.

Целью данной работы является выделение бетулина и его производного диацетата бетулина (ДАБ), очистка и исследование физико-химических закономерностей электроокисления – восстановления данных аналитов на 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, идентифицировать структуру методом ИК, 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 арендиазоний 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 БАД для вольтамперометрического определения бетулина и ДАБ. Проведенные экспериментальные исследования показали перспективность вольтамперометрического определения аналитов на новых органо-модифицированных электродах, тем самым данные полученные автором, могут быть использованы для дальнейшей разработки методик количественного определения других представителей пентациклических тритерпеноидов. Результаты исследований физико-химического поведения бетулина и диацетата бетулина, представлены на различных международных конференциях.

Методология и методы исследования. В работе использовались различные методы вольтамперометрии, колоночной хроматографии, методы ИК, ПМР и масс-спектрометрии, которые позволяли получить необходимую аналитическую информацию; обработка результатов эксперимента выполнялась с использованием MS Office. Объектами исследования являлись некоторые представители пентациклических тритерпеноидов.

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, рН 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. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального

материала, с использованием современных методических подходов. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены экспериментальными материалами, результатами статистической обработки полученных результатов. 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. Автором лично выполнен поиск и анализ данных литературы, проведены эксперименты, обработка и интерпретация данных, сформулированы выводы, при активном участии автора подготовлены публикации 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** указана актуальность работы, цели, задачи исследования, научная новизна, практическая значимость полученных результатов.

В **первой главе** описаны свойства пентациклических тритерпеноидов, приведен обзор литературы о физико-химических методах определения данных аналитов, особенности электрохимических методов определения пентациклических тритерпеноидов. Приведены различные углеродсодержащие электроды, их способы модифицирования.

Во **второй главе** описаны методы и условия проведения экспериментов (получение и очистка бетулина и ДАБ), применяемые реактивы, растворители, электрохимические ячейки, оборудование. Приведены описание электродов, реактивов, посуды и методика поверхностной модификации углеродсодержащих электродов для определения бетулина и диацетата бетулина. Приведены методика извлечения бетулина из коры березы, а также методики получения диацетата бетулина из бересты и из бетулина и новые способы очистки исследуемых веществ. Идентификацию проводили с помощью физико-химических методов анализа: ИК, ПМР, Масс-спектрометрия. Нами впервые предложен эффективный способ очистки с помощью колоночной хроматографии. Содержание бетулина после очистки составило 98%, содержание ДАБ после очистки составила 94%. Некоторые исследования проводились с использованием средств центра коллективного пользования ТПУ «Физико-химические методы анализа».

В **третьей главе** приведены условия вольтамперометрического определения бетулина и диацетата бетулина и обсуждаются результаты выявленных закономерностей процессов электроокисления данных аналитов.

Вольтамперометрическое определение бетулина на золото-графитовом электроде

Для выбора условий вольтамперометрического определения бетулина получена зависимость по влиянию катионно-анионного состава и рН фонового электролита на аналитические сигналы бетулина (рисунок 1).

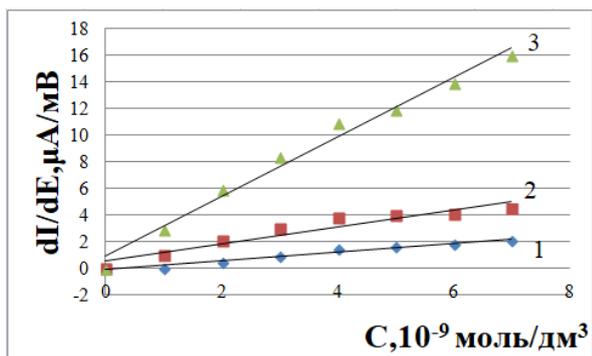


Рисунок 1 – Градуировочная зависимость бетулина на различных фоновых электролитах:
 1. pH 6.86 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$;
 2. pH 9.18 буфер Бриттона-Робинсона;
 3. pH 12 0.1н NaOH;

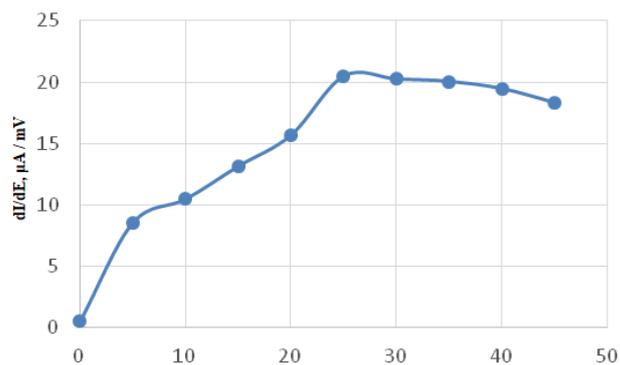


Рисунок 2 – Зависимость аналитического сигнала бетулина от времени накопления на золото-графитовом электроде (ЗГЭ) на фоне 0.1н NaOH

Из рисунка 1 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 депольаризатора к электроду или протекать одновременно с ней. По мере повышения pH 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 2), что тоже свидетельствует об адсорбционном характере аналитического сигнала. На основании изученных зависимостей (рисунок 3 и 4) и рассчитанному коэффициенту Семерано более 0,5, установлено, что процесс носит адсорбционный характер.

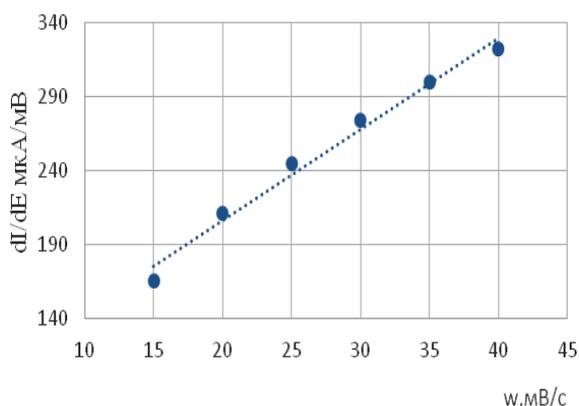


Рисунок 3 – Зависимость высоты аналитического сигнала бетулина от скорости развертки потенциала

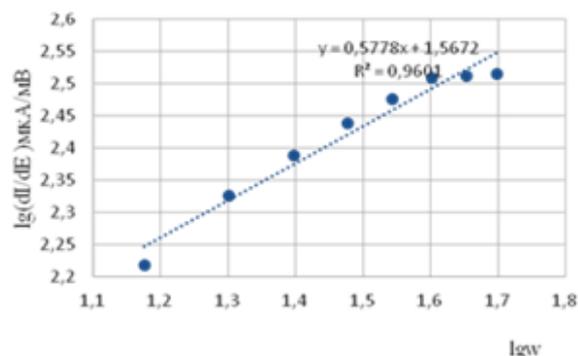


Рисунок 4 – Зависимость логарифма высоты аналитического сигнала бетулина от логарифма скорости развертки потенциала

Для понимания типа электродного процесса (обратимый или необратимый) получена циклическая вольтамперограмма (Рисунок 5). 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 групп (Рисунок 6).

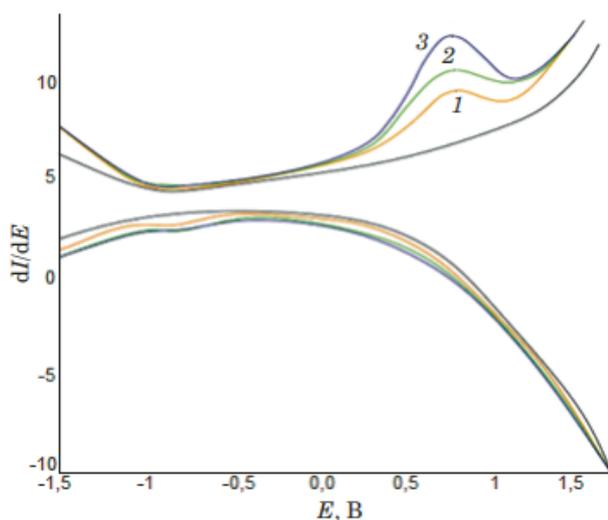


Рисунок 5 – Циклическая вольтамперограмма бетулина на золото-графитовом электроде. 1) $C = 2,6 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³; 2) $C = 5,2 \cdot 10^{-9}$ моль/ дм³; 3) $C = 7,8 \cdot 10^{-9}$ моль/ дм³;

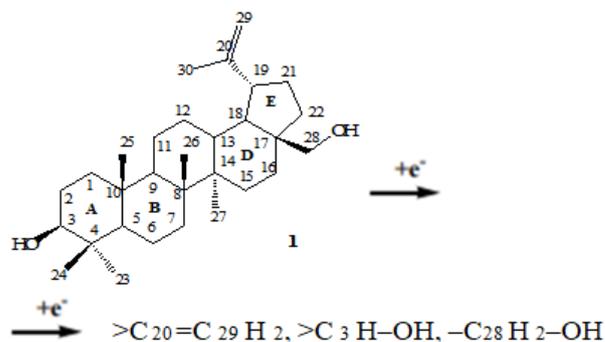


Рисунок 6 – Вероятная схема электроокисления бетулина

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.

Вольтамперометрическое определение диацетата бетулина на золото-графитовом электроде

Аналогичные исследования были проведены и для диацетата бетулина. Получена вольтамперограмма ДАБ (рисунок 7) и градуировочная зависимость диацетата бетулина на 0,1н NaOH(рисунок 8).

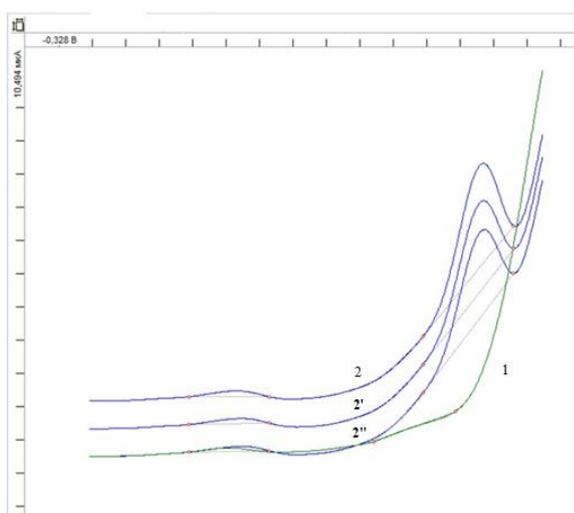


Рисунок 7 – Вольтамперограмма ДАБ на золото-графитовом электроде (ЗГЭ)
1. Фон 0,1н NaOH
2, 2', 2'' – вольтамперограмма ДАБ на воспроизводимость
 $C_{\text{ДАБ}} 10^{-9}$ моль/дм³

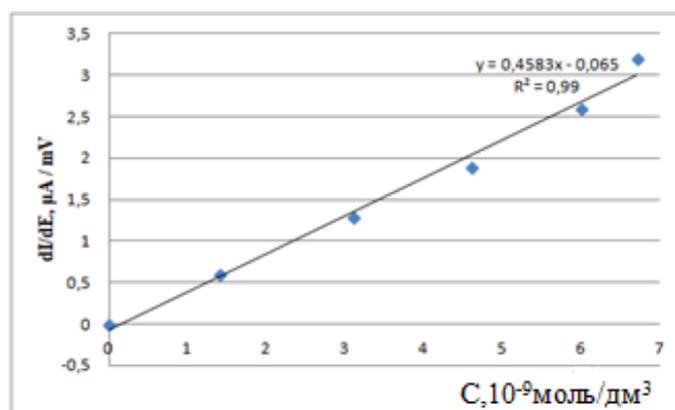


Рисунок 8 – Градуировочная зависимость диацетата бетулина на золото-графитовом электроде (ЗГЭ)

Изучена кинетика накопления ДАБ на золото-графитовом электроде. 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.

Возможность совместного определения бетулина и диацетата бетулина

В ходе исследований получены зависимости высоты аналитического сигнала бетулина и диацетата бетулина от потенциала и времени накопления ионов на ЗГЭ, которые представлены на рисунках 9 и 10.

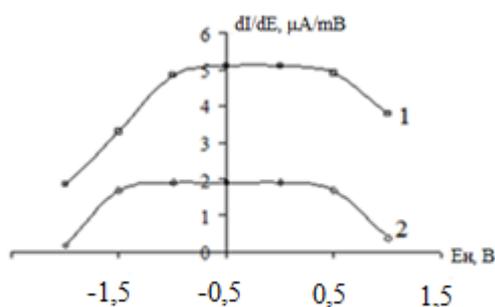


Рисунок 9 – Зависимости высоты аналитического сигнала бетулина (2) и диацетата бетулина (1) от потенциала электролиза на ЗГЭ

Условия: фон – 0,1 моль/дм³ NaOH, $\tau = 30$ с, С бетулина $1,3 \cdot 10^{-9}$ моль/ дм³; С Даб $7,6 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³

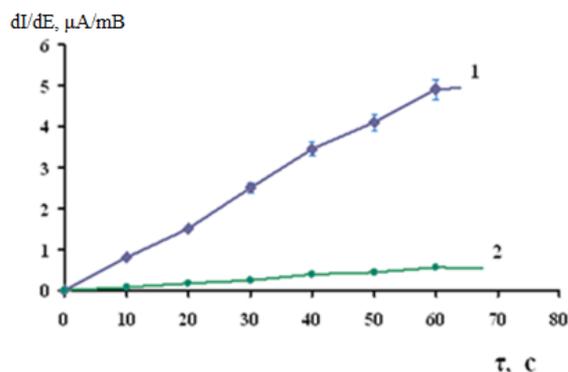


Рисунок 10 – Зависимости высоты аналитического сигнала бетулина (2) и диацетата бетулина (1) от времени накопления на ЗГЭ

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

Как видно из рисунка 9, 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 10), т.к. зависимости высоты аналитического сигнала бетулина и диацетата бетулина от времени накопления выходит на предел.

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 11 приведена вольтамперограмма совместного определения данных аналитов.

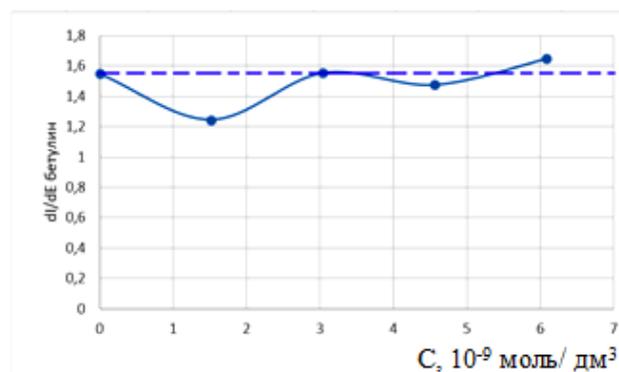
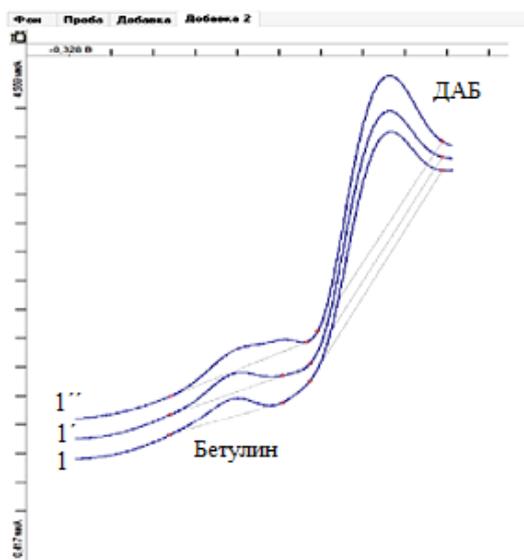


Рисунок 11– Вольтамперограмма бетулина и ДАБ

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

Рисунок 12 – Зависимость производной тока пика электроокисления бетулина от содержания ДАБ (С бетулина $1,3 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³)

Для изучения мешающего влияния бетулина и его производного нами получена зависимость производной тока пика электроокисления бетулина от концентрации диацетата бетулина в растворе (рисунок 12) и градуировочные зависимости совместного определения бетулина и диацетата бетулина (рисунок 13).

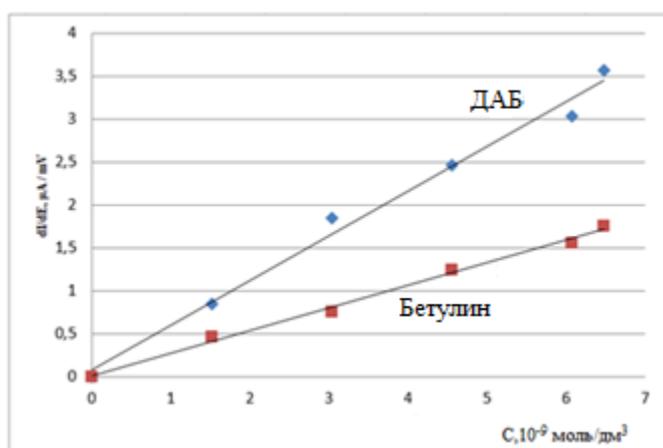


Рисунок 13 – Градуировочная зависимость бетулина и ДАБ на золото-графитовом электроде (ЗГЭ)

Из зависимости, представленного на рисунке 11 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. 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.

Вольтамперометрическое определение бетулина на золото-графитовом электроде, модифицированном мезопористым углеродом.

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 1).

Таблица 1 – Выбор модификатора для графитовой подложки для вольтамперометрического определения бетулина

Модификаторы	Высота аналитического сигнала бетулина (dI/dE, $\mu\text{A}/\text{mV}$)	
Оксид графена	2,4±0,3	
Углеродные нанотрубки	9,2±1,1	
Мезопористый углерод	18,2±1,7	
Микропористый углерод	10,4±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 наблюдается его снижение (рисунок 14). Получены градуировочные зависимости бетулина с использованием золото-графитового электрода, модифицированного мезопористым углеродом (рисунок 15).

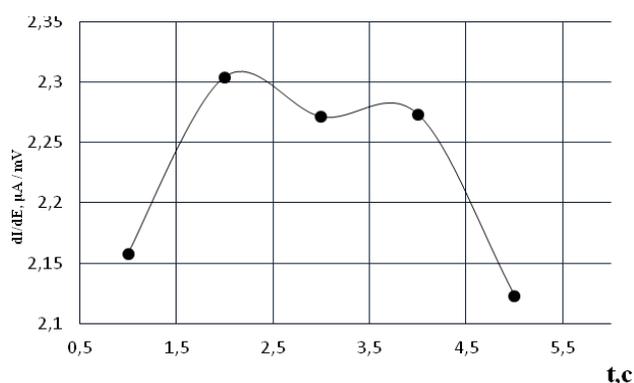


Рисунок 14 – Зависимость высоты аналитического сигнала бетулина от времени контакта модификатора МПУ с подложкой

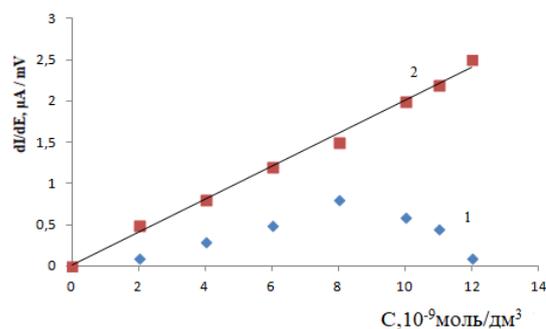


Рисунок 15 – Градуировочная зависимость бетулина на ЗГЭ(1) и ЗГЭ, модифицированный МПУ (2)

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

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, зарекомендовавший себя как перспективный модифицирующий агент для вольтамперометрического определения органических веществ.

Нами исследованы поверхности золото-графитового и модифицированного солью арендиазония с карбоксильной группой в качестве заместителей электродов с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). На рис. 16 (А) представлена поверхность золото-графитового электрода и рис. 16 (Б) золото-графитового электрода с нанесенным модификатором на поверхность.

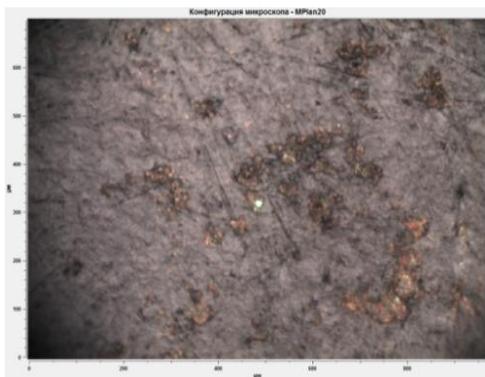


Рисунок 16 (А) – Изображение поверхности ЗГЭ методом сканирующей электронной микроскопии



Рисунок 16 (Б) – Изображение поверхности модифицированного ЗГЭ (МЗГЭ) методом сканирующей электронной микроскопии

Из рисунка 16 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.

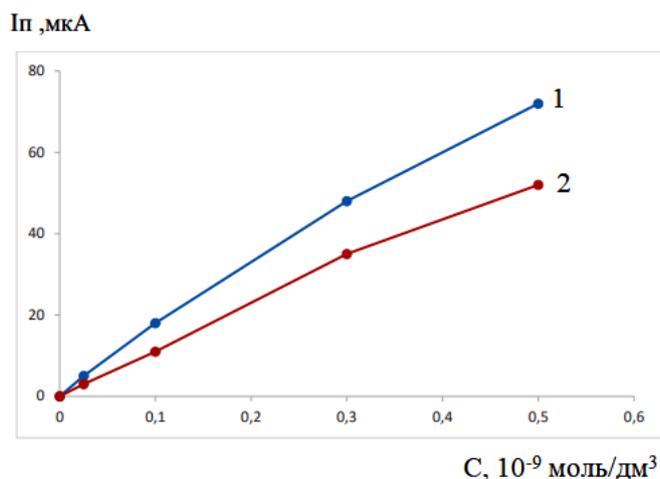


Рисунок 17 – Зависимость тока пика бетулина от концентрации на $\frac{1}{2}$ МЗГЭ (1) и электрода $\frac{1}{2}$ поверхности ЗГЭ (2)

Как видно из рисунка 17 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 арендиазония 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 18).

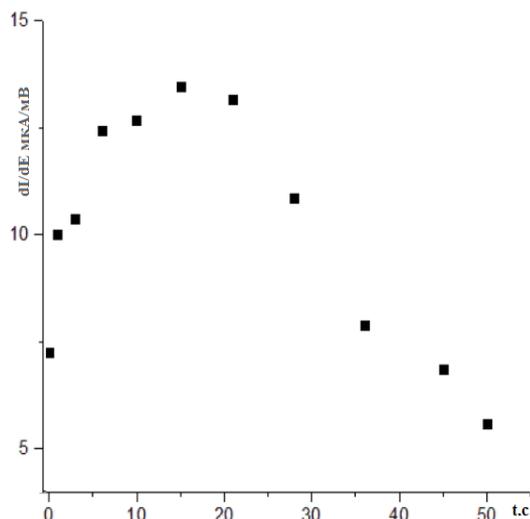


Рисунок 18 – Зависимость высоты аналитического сигнала бетулина от времени контакта электрода с арендиазоний тозилатами с заместителем –COOH.
 $C_{\text{диаз.}} = 10 \text{ мг/дм}^3$

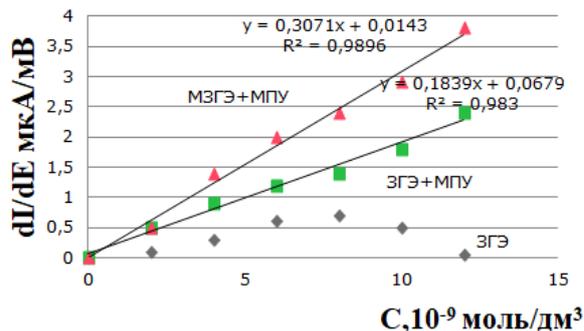


Рисунок 19 – Градуировочные зависимости бетулина на различных модифицированных электродах

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 19. Как видно из рисунка 19, 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 $0,44 \cdot 10^{-2} \div 44,2 \text{ мг/дм}^3$

В четвертой главе представлены результаты разработки методики определения объектов исследования в БАДах. Для определения бетулина изучено мешающее влияние различных органических компонентов, содержащиеся в БАДах (таблица 2).

Таблица 2 – Соотношение мешающих компонентов в БАДАх на аналитический сигнал бетулина

Мешающий компонент	Отношение концентраций мешающего компонента к бетулину	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.

Можно сделать вывод о том, что мешающее влияние при данных соотношениях не превышает 15%. Результаты исследования соотношения определяемых компонентов к вспомогательным веществам приближены к условиям их реальных содержаний и погрешность определения бетулина не превышает погрешности метода.

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 20).

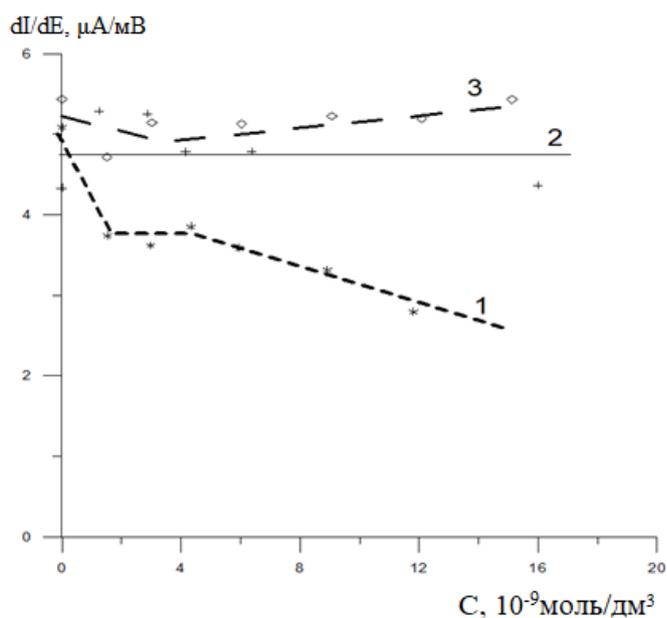


Рисунок 20 – Влияние на аналитический сигнал бетулина мешающих компонентов
1-целлюлоза; 2-глицирризиновая кислота; 3-полисахариды



Рисунок 21 – Алгоритм анализа БАД для определения бетулина и ДАБ в таблетированных формах

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

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 (Рисунок 21).

Проверку правильности методики проводили методом «введено-найдено», результаты исследования четырех образцов БАД представлены в таблице 3.

Таблица 3 – 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

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

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

Показатель расширенной неопределенности определяется по формуле:

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

Проверку правильности диацетата бетулина в БАД (кубобон) проводили методом «введено-найденно», результаты представлены в таблице 4. Результаты определения содержания ДАБ в таблетированной форме БАД и проверка правильности полученных результатов.

Таблица 4 – Проверка правильности результатов обнаружения ДАБ в БАДах

p=0.95, n=5

Содержание ДАБ мг/таб				
Объект исследования	Заявлено по рецептуре производителем	Оценено	Введено	Найдено
БАД (Кубобон)	25,0	26,3±5,8	25,0	49,6±9,8

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

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.

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

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК РФ:

1) **Е.Нурпейис**, Г.Б.Слепченко, В.Богословский, Е.С. Моисеева. Применение нового электрохимического сенсора для вольтамперометрического определения п-нитрофенола и бетулина // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2023.–Т. 89.–№4.–С.22-28.

2) Kaliyeva S. , Slepchenko G. B. , Akeneev Y. A. , **Nurpeyis E.** -, Tashenov A. K. , Mamaeva E. A. , Bakibaev A. A. Voltammetric Determination of Betulin in the Extracts of Plant Origin // Inorganic Materials. – 2018. – Vol. 54. – №. 14. – P. 1407-1411.

3) Kalieva S. S., Mamaeva E. A., **Nurpeyis E.** -, Bakibaev A. A. , Tashenov A. K. , Kets T. S., Zamanova M. K. Способы очистки некоторых пентациклических тритерпеноидов = Methods for treating some pentacyclic triterpenoids // Вестник Карагандинского университета. Химия = Bulletin of the University of Karaganda-Chemistry. – 2017.–Т.86.–№2. – С.35-41.

4) Калиева С.С., Мамаева Е.А., **Нурпейис Е.Е.**, Бакибаев А.А., Ташенов А., Заманова М.К., Кургачев Д.А., Понарин Н.В. Спектральные и хроматографические характеристики бетулина и некоторых его производных. // Вестник Евразийского национального университета. – 2017. – Т.119.–№4.–С. 235-240.

Патент:

5) Патент. Слепченко. Г.Б., **Нурпейис Е.**, Черемпей Е.Г. Способ количественного определения бетулина методом вольтамперометрии на стеклоуглеродном электроде. (в печати).

Другие публикации:

6) Воронова О.А., Плотников Е.В., Калиева С.С., **Нурпейис Е.Е.**, Мамаева Е.А., Ташенов А.К., Бакибаев А.А. Исследование антиоксидантной активности представителей тритерпеноидов лупанового и олеанового ряда методом вольтамперометрии. // Вестник Карагандинского университета, Серия Химия. – 2017.– Т. 87.–№3.– С. 31-37.

- 7) Мамаева Е.А., Калиева С.С., Ташенов А.К., Бакибаев А.А., **Нурпейис Е.Е.**, Заманова М.К. Синтез аллобетулина с использованием фенилтиомочевины. // Химия природных соединений.–2017.– №5.– С. 769-771.
- 8) E.A. Mamaeva, S.S. Kaliyeva, A.K. Tashenov, A.A. Bakibaev, **Y.E. Nurpeiis** and M.K. Zamanova. Synthesis of allobetulin using phenylthiourea. //Chemistry of Natural Compounds. – Vol 53.–№ 5.– P. 904-906.
- 9) Elena A. Mamaeva, Saltanat S. Kaliyeva, Abdigali A. Bakibaev, Auezkhan K. Tashenov, **Yenglik E. Nurpeiis**. A new single-stage method for obtaining of betulin phenylcarbamates. //Journal of Asian Natural Products Research. –2018. – Vol. 20. – № 12. – P. 1162–1166.
- 10) **Нурпейис Е.**, Слепченко Г.Б., Пикула Н.П., Нурмаметова А.А. Новые возможности вольтамперометрического определения тритерпеноидов и интерферонов на органо-модифицированных электродах. XI Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2024». – Екатеринбург.– Май 2024г.
- 11) **Нурпейис Е.**, Слепченко Г.Б., Пикула Н.П., Закономерности электрохимического поведения тритерпеноидов на примере бетулина и определение его в фармацевтических препаратах. X Юбилейная Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2020». – Казань:Изд-во Казанского университета. – 15-20 ноября 2024г.– С.152.
- 12) **Нурпейис Е.**, Слепченко Г.Б. Возможность вольтамперометрического определения бетулина и диацетата бетулина в фармацевтических препаратах и биологически активных добавках. Международная научно-практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы». г. Томск, 04-06 октября 2023 г.Томск:изд-во СибГМУ 2023. – С.268.
- 13) **Нурпейис Е.**, Слепченко Г.Б., Моисеева.Е.С. Электрохимические сенсоры: состояние дел и перспективы развития для контроля фармацевтических препаратов. Международная научно-практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы».г.Томск, 18-20 сентября 2024г. Томск:изд-во СибГМУ.– 2024.
- 14) **Нурпейис Е.**, Слепченко Г.Б., Пикула Н.П., Закономерности электрохимического поведения тритерпеноидов на примере бетулина и определение его в фармацевтических препаратах. X Юбилейная Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2020». – Казань:Изд-во Казанского университета. – 15-20 ноября 2020г.– С.152.

- 15) **Нурпейис Е.**, Богословский В.М., Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021»/ Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова.– М.: МАКС Пресс.–12-23 апреля 2021г.
- 16) **Нурпейис Е.**, Богословский В.М., Юленков Н.П. Создание нового электрохимического сенсора с использованием мезопористого углерода для вольтамперометрического определения пентациклических тритерпеноидов и пестицидов из класса фенолов. Сборник научных статей по итогам работы Межвузовского международного конгресса, г.Москва.–15 апреля 2021г. – Москва: Издательство Инфинити,–2021. –С.148.
- 17) **Нурпейис Е.**, Слепченко Г.Б., Богословский В.М., Новый электрохимический сенсор для определения пестицидов из класса фенолов и бетулина в пищевых продуктах методом инверсионной вольтамперометрии. Труды Международной научно – практической online конференции «Интеграция науки образования и производства – основа реализации Плана нации (Сагиновские чтения №13), посвященной 30-летию Независимости Республики Казахстан, 17-18 июня 2021г. Министерство образования и науки РК, Карагандинский тенический университет. – Караганда:Изд-во КарГУ.–2021. –С.1969.
- 18) **Нурпейис Е.**, Слепченко Г.Б., Вольтамперометрическое определение бетулина в биологической активной добавке. XI Всероссийская научная конференция и школа «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», посвященная 100-летию со дня рождения И.Г.Юделевича (АСиДВ-11) 16-20 августа, 2021. г. Новосибирск): Сборник тезисов докладов / Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН; под ред.: Цыганковой А.Р., Сапрыкина А.И. – Новосибирск: ИНХ СО РАН– 2021. –С.252.
- 19) **Нурпейис Е.**, Слепченко Г.Б., Возможность применения вольтамперометрического метода анализа для определения бетулина в биологических активных добавках. Международная научно-практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы».г.Томск, 13-16 сентября 2021г. Томск:изд-во СибГМУ.– 2021. – С.268.
- 20) **Нурпейис Е.**, Новый высокочувствительный вольтамперометрический метод определения бетулина. XXII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М.Кижнера, посвященная 125-летию со дня основания Томского политехнического университета, 17-20 мая 2021г. В 2 томах. Том 1. Томск: Изд-во Томского политехнического университета, –2021.–С.388.