

УДК 543.552.054.1:543.64

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТИОНИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

© 2019 г. В. В. Шелковников^а, *, А. М. Алтыев^а, М. Е. Виноградов^а

^аНациональный исследовательский Томский государственный университет, химический факультет
просп. Ленина, 36, Томск, 634050 Россия

*e-mail: shvv@chem.tsu.ru

Поступила в редакцию 05.06.2018 г.

После доработки 13.05.2019 г.

Принята к публикации 31.05.2019 г.

Предложен способ определения метионина методом инверсионной вольтамперометрии на модифицированном витамином В₁₂ углеродсодержащем электроде. В основе методики лежит реакция восстановления метионина до гомоцистеина. Подготовка электрода заключается в формировании на поверхности углеродсодержащего электрода, модифицированного углеродными нанотрубками, пленки витамина В₁₂ методом циклической вольтамперометрии при развертке потенциала от –1.4 до +1 В. Оптимизированы условия анализа: потенциал накопления, время накопления, скорость развертки. Предел обнаружения метионина составляет 1×10^{-7} М.

Ключевые слова: инверсионная вольтамперометрия, метионин, витамин В₁₂, углеродные нанотрубки, модифицированный электрод.

DOI: 10.1134/S0044450219120119

Аминокислоты – органические соединения, разнообразные реакции которых объясняются одновременным присутствием в молекуле основной аминогруппы –NH₂ и кислой карбоксильной группы –COOH. В природе чаще всего встречаются α-аминокислоты. Аминокислоты как основные составные части белков участвуют во всех жизненных процессах наряду с нуклеиновыми кислотами, углеводами и липидами. Кроме аминокислот, входящих в состав белков, живые организмы обладают постоянным резервом “свободных” аминокислот, содержащихся в тканях и в клеточном соке. Они находятся в динамическом равновесии при многочисленных обменных реакциях. Аминокислоты участвуют в биосинтезе полипептидов и белков, а также в синтезе фосфатидов, порфиринов и нуклеотидов. Свободные аминокислоты нужны в живом организме и для выполнения специфических задач [1].

Незаменимые аминокислоты, такие как метионин, триптофан, фенилаланин, являются необходимыми веществами для построения белков, улучшения выделения специфических гормонов и участия в биохимических реакциях, например в синтезе серотонина [2]. Данные аминокислоты не вырабатываются в организме человека, и источником их поступления являются продукты питания, биологически активные добавки и лекарственные препараты, поэтому необходимы надежные и экспрессные методы их определения.

Данная работа посвящена определению метионина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках (БАД).

Метионин (схема 1) – алифатическая серосодержащая α-аминокислота, в чистом виде представляющая собой бесцветные кристаллы со специфическим неприятным запахом. Метионин служит донором метильных групп при образовании адреналина, холина, а также источником серы при биосинтезе цистеина [3].

В настоящее время метионин определяют методами хромато-масс-спектрометрии, хемилюминесценции, спектрофотометрии, ВЭЖХ [3–6]. Для определения метионина данными методами необходима длительная пробоподготовка и использование дорогостоящих реагентов. Перспективным, на наш взгляд, является метод инверсионной вольтамперометрии, не требующий сложного аппаратного оформления и обладающий высокой чувствительностью. Описаны [7–14] методики определения метионина методом инверсионной вольтамперометрии на угольно-пастовых электродах, углеродных электродах, модифицированных бензоилферроценом, многослойными рутениевыми металлодендимерами, наночастицами благородных металлов. Данные модификаторы сложны в приготовлении и нанесении на поверхность, поэтому разработка новых методов контроля метионина в сложных по составу объектах является актуальной задачей.

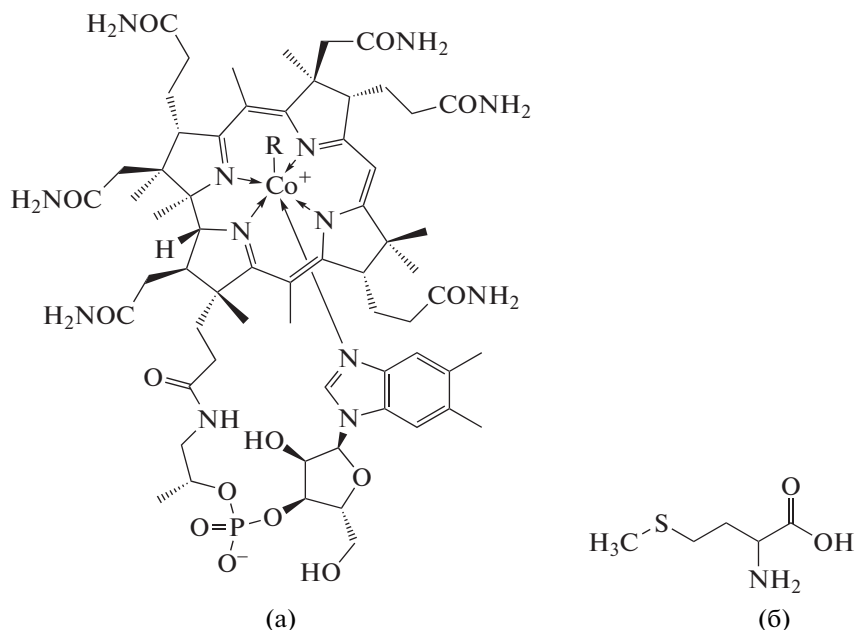


Схема 1. Структурные формулы витамина B_{12} (а) и метионина (б).

Метионин, поступая в организм человека, при взаимодействии с ферментами восстанавливается до гомоцистеина [5]. Такая реакция может служить прообразом соответствующего электродного процесса. В качестве вспомогательного вещества мы предлагаем использовать цианокобаламин (витамин B_{12}) – вещество, являющееся электроактивным за счет наличия в корриновом кольце кобальта(III) (схема 1). Известен процесс хемосорбции витамина B_{12} на мезопористом углероде [15]. Закрепив за счет адсорбции витамин B_{12} на поверхности электрода, можно создать условия, позволяющие связывать метионин из раствора для образования электроактивного соединения на электроде.

Цель данной работы – разработка способа определения метионина в лекарственных препаратах и БАДах методом вольтамперометрии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Все электрохимические измерения проводили на вольтамперометрическом анализаторе ТА-LAB (НПО “Томьаналит”) в постоянном токовом или в дифференциально-импульсном режиме в трехэлектродной ячейке. Индикаторным электродом служил модифицированный углеродсодержащий электрод, изготовленный методом “литья под давлением” ($d = 5$ мм), в качестве вспомогательного электрода и электрода сравнения использовали хлоридсеребряные электроды в 1 М растворе KCl. Многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) на поверхность углеродсодержащего электрода наносили электролизом из водной суспензии МУНТ с помощью универ-

сального источника питания УИП-2. Морфологию поверхности исследовали на растровом электронном микроскопе Hitachi TM-3000 при ускоряющем напряжении 15 кВ в условиях режима снятия зарядки с образца (электронная пушка 5×10^{-2} Па, камера для образца 30–50 Па). Спектры комбинационного рассеяния регистрировали на спектрометре Nicolet NXR 9650. Суспензию нанотрубок готовили в ультразвуковой ванне Сапфир – 2.8 ТТЦ, для анализа аминокислот методом хроматографии использовали Shimadzu LC-20 Prominence.

Реактивы. Использовали витамин B_{12} (Беларусь), метионин (Sigma, США), многостенные углеродные нанотрубки из Graphen (США) размерами 7–15 нм \times 0.5–10 мкм. Буферный раствор с рН 4.01 ($K_2C_8H_4O_4 - KHC_8H_4O_4$) готовили из стандарт-титра. Все реактивы готовили на деионированной воде, полученной на Sartorius марки agium® pro. Все эксперименты проводили при комнатной температуре.

Подготовка модифицированного углеродсодержащего электрода. Суспензию МУНТ (0.5 мг/см³) готовили следующим образом: МУНТ измельчали в фарфоровой ступке, смачивали небольшим количеством этилового спирта, добавляли воду и помещали в ультразвуковую ванну на 3 ч. Готовую суспензию использовали для нанесения нанотрубок на поверхность углеродсодержащего электрода методом анодной поляризации. В качестве катода (противоэлектрода) использовали пластину из нержавеющей стали. Выбор оптимальных условий формирования электрода описан ниже. Витамин B_{12} осаждали на модифициро-

ванном МУНТ электроде методом циклической вольтамперометрии в диапазоне потенциалов от -1.4 до $+1.0$ В при скорости сканирования потенциала 50 мВ/с в течение 40 циклов из 1.0 мМ раствора витамина B_{12} при рН 4.01 . После нанесения модификатора электрод промывали водой и высушивали на воздухе. Перед регистрацией вольтамперограмм растворенный кислород удаляли барботированием инертного газа (азота).

Подготовка лекарственных препаратов к анализу. Содержимое капсул растворяли в воде. Твердый остаток отделяли центрифугированием с последующим фильтрованием через бумажный фильтр ("синяя лента"). Метионин определяли методом ВЭЖХ по ГОСТ 32195-2013 [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Чувствительность вольтамперометрического анализа можно повысить за счет увеличения рабочей поверхности электрода. Одним из способов увеличения активной поверхности является нанесение углеродных нанотрубок. В работе [16] нанотрубки наносили на полистирол методом электрофореза с последующим прокаливанием при 450°C для удаления матрицы. Процесс занимает не менее 24 ч. Мы предлагаем наносить МУНТ способом электрохимического осаждения в потенциостатическом режиме при анодной поляризации. В процессе электролиза при высоком потенциале углерод способен окисляться до карбоксильных групп, которые могут выступать в качестве адсорбционных центров при концентрировании определяемых веществ на поверхности электрода.

Для закрепления модификатора (витамина B_{12}) на поверхности электрода использовали метод циклической вольтамперометрии. В присутствии в анализируемом растворе витамина B_{12} наблюдается анодный пик при потенциале -0.75 В, характерный для окисления кобальта (рис. 1). Ток пика в процессе непрерывного циклического изменения потенциала увеличивается, что свидетельствует о росте пленки витамина B_{12} на поверхности углеродсодержащего электрода.

Оптимальные условия формирования электрода выбирали методом трехфакторного планирования эксперимента. В качестве факторов для оптимизации использовали напряжение источника питания, время нанесения нанотрубок и концентрацию витамина B_{12} . В качестве функции отклика оптимизировали плотность тока анодного пика тестовой системы $K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Для этого ток пика относили к активной площади поверхности электрода, которую оценивали по уравнению Рендлса–Шевчика по циклическим вольтамперным кривым.

В оптимальных условиях (осаждение нанотрубок при 6.5 В в течение 8 с и последующая адсорбция витамина B_{12} из раствора с концентрацией 0.025 мг/мл) плотность тока примерно в 6 раз больше, чем в случае аналогичного по параметрам немодифицированного электрода (2.02 против 0.33 мкА/см²).

На рис. 2 представлены фотографии поверхности углеродсодержащего электрода до и после модификации. При нанесении нанотрубок (рис. 2б) поверхность электрода становится более развитой. После поляризации электрода в растворе витамина B_{12} (рис. 2в) на поверхности формируется пленка из адсорбированного цианокобаламина, активные центры которого способны участвовать в формировании аналитического сигнала метионина.

На рис. 3 представлены вольтамперные кривые, полученные на модифицированном электроде при линейной развертке потенциала в постоянноточковом режиме. В присутствии метионина анодный пик, характерный для витамина B_{12} , исчезает и появляется новый пик при потенциале -0.95 В. Величина тока пика пропорциональна концентрации метионина в растворе.

Для установления возможного механизма процесса концентрирования метионина и формирования аналитического сигнала регистрировали спектры комбинационного рамановского рассеяния. Для этого проводили электрохимическое концентрирование метионина при потенциале -1.6 В на модифицированном электроде в течение 300 с, затем электрод промывали деионированной водой, помещали в чистый фоновый электролит и при линейной развертке потенциала от -1.6 до 1.5 В растворяли концентрат с электрода. Данную операцию выполняли не менее 10 раз для повышения интенсивности спектра. На рис. 4 представлены спектры рамановского рассеяния водных растворов кобаламина (1), метионина (2) и продуктов электрохимического растворения метионина (3).

После растворения концентрата в чистом фоновом электролите из спектра исчезают полосы при 2930 и 1410 см⁻¹, характерные для $\text{CH}_3(\text{vs})$, полоса при 723 см⁻¹, характерная $\text{CSC}_{(\text{s})}$, смещается в более длинноволновую область до 782 см⁻¹, что отвечает $\text{HSC}_{(\text{vs})}$ [17]. Таким образом, после растворения концентрата в растворе присутствует гомоцистеин, который образуется из метионина в результате электродной реакции. Можно предположить следующий механизм процесса: атом серы метионина с частичным отрицательным зарядом за счет электростатических сил присоединяется к кобальту(III) витамина B_{12} . При катодной поляризации электронная плотность смещается к атому серы, метильная группа отрывается от метиони-

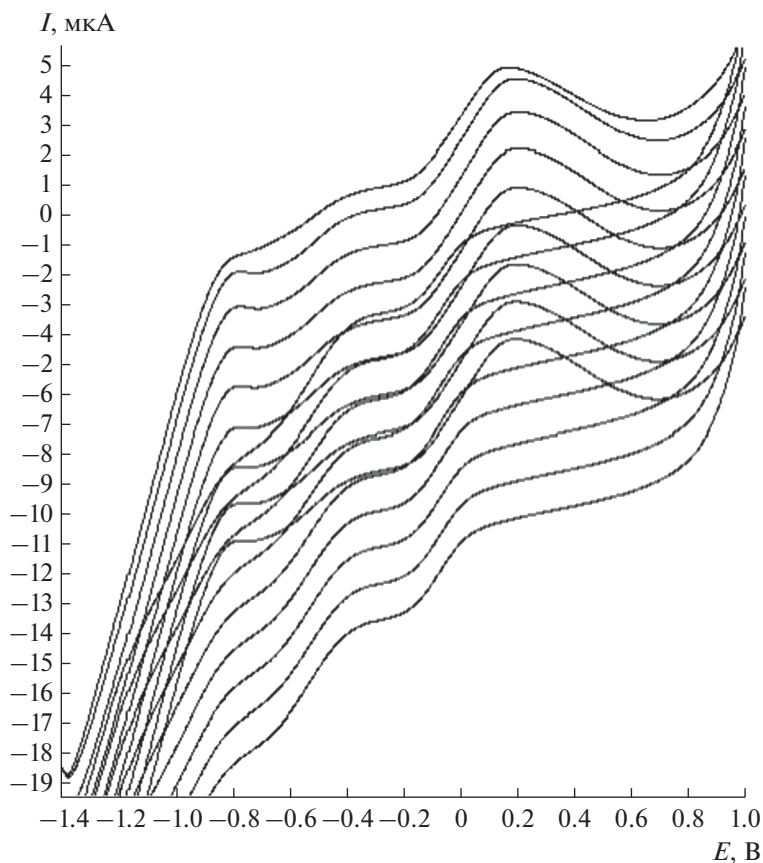


Рис. 1. Циклические вольт-амперные кривые процесса адсорбции витамина В₁₂ в буферном растворе с рН 4.01; $w = 50$ мВ/с.

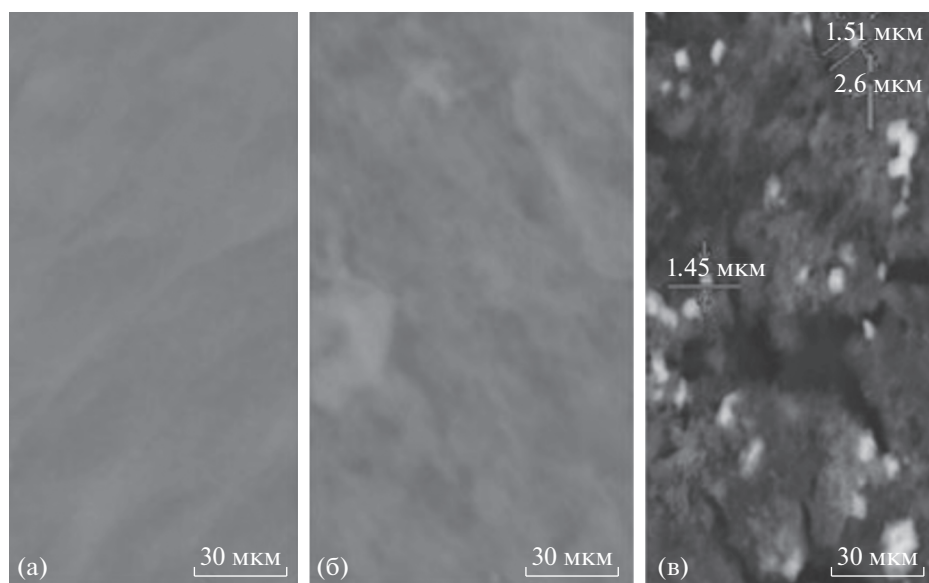


Рис. 2. Фотографии поверхности электрода при увеличении 1 : 2000: (а) – углеродсодержащий электрод; (б) – электрод после осаждения МУНТ; (в) – электрод, модифицированный витамином В₁₂.

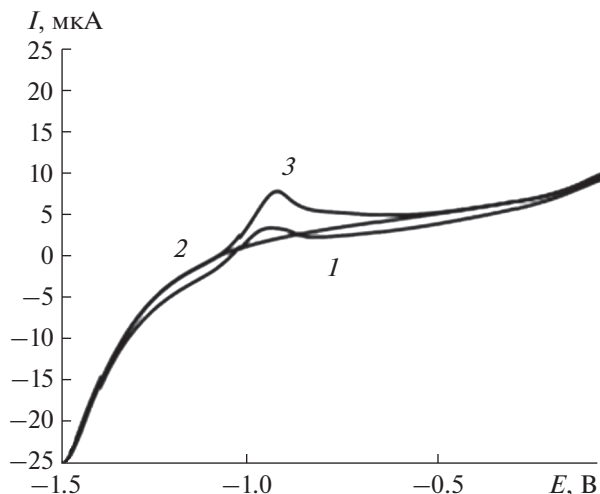


Рис. 3. Постоянноточковая вольтамперограмма метионина: 1 – фоновый электролит с рН 4,01, 2 – $2,29 \times 10^{-6}$ М раствор метионина, 3 – $4,58 \times 10^{-6}$ М раствор метионина.

на, переходя на кобаламин. При анодной развертке потенциала в раствор переходит гомоцистеин. Отсутствие в спектре 3 рис. 4 полос, характерных для функциональных групп витамина В₁₂ [18], свидетельствует о том, что пленка цианокобаламина на электроде достаточно устойчива и не растворяется при анодной поляризации.

Для увеличения чувствительности определения метионина вольт-амперные кривые реги-

стрировали в дифференциально-импульсном режиме (рис. 5). Оптимальные условия определения: фоновый электролит – буферный раствор с рН 4,01, $E_s = -1,6$ В, $t_s = 120-300$ с, $w = 50$ мВ/с, амплитуда волны 15 мВ, задержка измерения 7 мс, шаг развертки 10 мВ.

В оптимальных условиях регистрации сигнала зависимость изменения тока окисления метионина от его концентрации в растворе в диапазоне концентраций от 1×10^{-7} до 50×10^{-7} М описывается уравнением регрессии:

$$I = 0.49c - 0.063,$$

где I – ток электроокисления метионина, мкА; c – концентрация метионина в анализируемом растворе, М. Предел обнаружения, рассчитанный по 3σ -критерию, составил $1,2 \times 10^{-7}$ М.

В табл. 1 представлены результаты определения метионина в лекарственных препаратах и БАДах методами инверсионной вольтамперометрии и ВЭЖХ. Данные, полученные разными методами, хорошо согласуются между собой.

Для проверки правильности результатов использовали метод введено–найдено и расчет степени открытия R , равной отношению разности между найденной концентрацией и начальным содержанием вещества в пробе к введенной добавке. Значения R близки к 100%, что свидетельствует об отсутствии значимой систематической погрешности.

Модифицированный электрод позволяет получать стабильные аналитические сигналы в те-

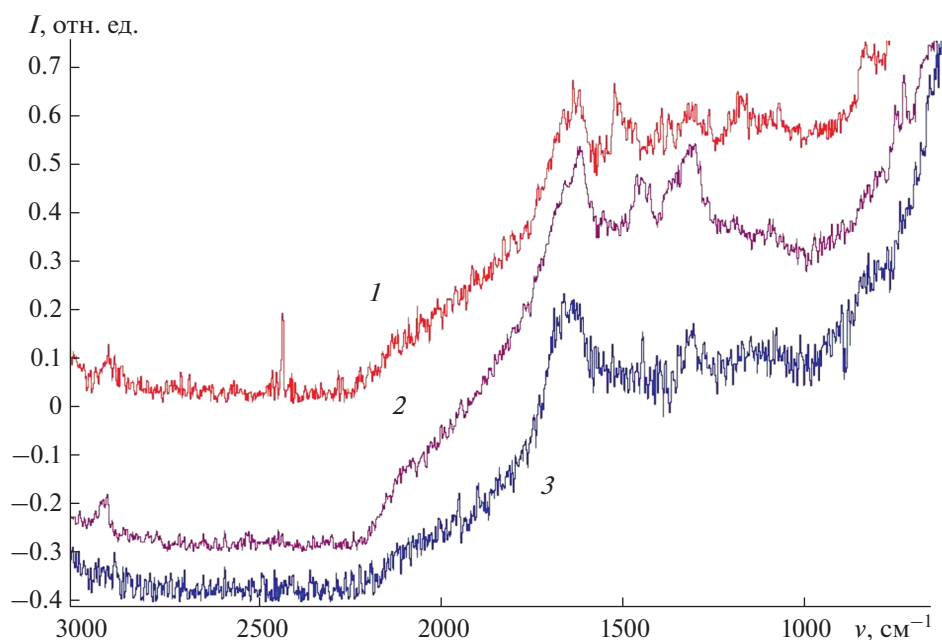


Рис. 4. Спектры комбинационного рассеяния: 1 – витамин В₁₂, 2 – 0,17 М раствор метионина, 3 – продукты растворения концентрата с электрода.

Таблица 1. Результаты определения метионина в лекарственных средствах методами ВЭЖХ и инверсионной вольтамперометрии (ИВА) ($n = 5$, $P = 0.95$)

Препарат	Номинальное содержание метионина в 1 таблетке, мг	Содержание метионина, мг/табл.	
		ВЭЖХ	ИВА
Ревалид	100	101 ± 10	98 ± 14
Витрум-Бьюти	3.3	3 ± 1	3 ± 1
Метионин	250	248 ± 31	253 ± 33

Таблица 2. Проверка правильности определения метионина методом введено—найдено

Содержание в образце, М	Введено, М	Найдено, М	Δ	R, %
3.05×10^{-6}	3.00×10^{-6}	$(6.0 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	2.90×10^{-6}	97
1.30×10^{-7}	5.00×10^{-7}	$(6.0 \pm 0.5) \times 10^{-7}$	4.72×10^{-7}	94

чение не менее 25 циклов (холостой опыт, анализируемая проба, проба с добавкой). В дальнейшем чувствительность электрода уменьшается и требуется обновление поверхности электрода. Поверхность электрода очищают электролизом в течение 300 с при потенциале -0.5 В. Затем на поверхность наносят новую пленку витамина В₁₂ методом циклического сканирования потенциала. Определению метионина не мешают присутствующие основные компоненты лекарственных средств.

* * *

Таким образом, разработана методика определения метионина методом инверсионной вольтамперометрии на модифицированном витамином В₁₂ электроде в диапазоне концентраций 1×10^{-5} – 1×10^{-7} М. Преимуществами методики являются простота формирования модифицированного электрода, широкий диапазон определяемых концентраций, высокая чувствительность и экспрессность, экономичность. Разработанную методику можно рекомендовать для контроля качества препаратов, содержащих метионин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. Пер. с нем. М.: Мир, 1985. 456 с.
2. Turner E.H., Loftis J.M. Serotonin a la carte: Supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan // *Pharmacol. Ther.* 2006. V. 109. № 3. P. 325.
3. Jiang Yi., Sun Ch.-L., Lee H.-H. Simultaneous determination of plasma total homocysteine and methionine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Clin. Chim. Acta.* 2017. V. 464. P. 93.
4. Min Z., Ziao K. Flow-based determination of methionine in pharmaceutical formulations exploiting TGA-capped CdTe quantum dots for enhancing the luminol-KIO₄ chemiluminescence // *Luminescence.* 2017. V. 183. P. 206.
5. Manta B., Relover S. Regulated methionine oxidation by monooxygenases // *Free Radical Biol. Med.* 2017. V. 109. P. 141.
6. ГОСТ 32195-2013. Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот. М.: Стандартинформ, 2016. 24 с.
7. Molaakbari E., Mostafavi A., Beitollahi H. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, melatonin, methionine and caffeine // *Sens. Actuators, B.* 2015. V. 208. P. 195.

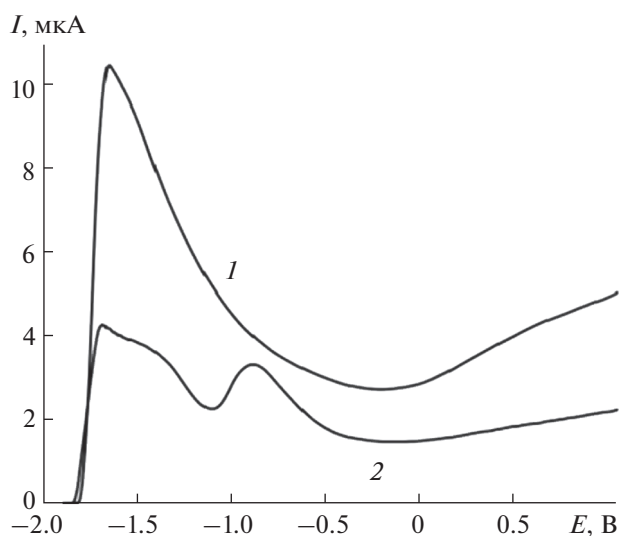


Рис. 5. Дифференциально-импульсная вольтамперограмма: $E_3 = -1.6$ В, $t_3 = 300$ с; 1 – фоновый раствор с рН 4.01, 2 – добавка 1×10^{-7} моль/л метионина.

8. *Beitollahi H., Alireza M., Ghorbanni F.* Electrochemical measurement of methionine concentration with a carbon nanotube paste electrode modified with benzoylferrocene // *Chin. J. Catal.* 2013. V. 34. P. 1333.
9. *Шайдарова Л.Г., Зиганшина С.А., Тихонова Л.Н., Будников Г.К.* Электрокаталитическое окисление и проточно-инжекционное определение серосодержащих аминокислот на графитовых электродах, модифицированных пленкой из гексацианоферрата рутения // *Журн. аналит. химии.* 2003. Т. 58. № 12. С. 1277. (*Shaidarova L.G., Ziganshina S.A., Tikhonova L.N., Budnikov G.K.* Electrochemical oxidation and flow injection determination of sulfur-containing amino acids at graphite electrodes modified with a ruthenium hexacyanoferrate // *J. Analyt. Chem.* 2003. V. 58. № 12. P. 1144.)
10. *Файзуллина Ю.Г., Яркаева Ю.А., Зильберг Р.А., Майстренко В.Н., Гилева Н.Г.* Вольтамперометрическое определение метионина на модифицированном полиариленфталидом стеклоуглеродном электроде // *Доклады Башкирского университета.* 2017. Т. 2. № 5. С. 705.
11. *Шайдарова Л.Г., Будников Г.К.* Химически модифицированные электроды на основе благородных металлов, полимерных пленок или их композитов в органической вольтамперометрии // *Журн. аналит. химии.* 2008. Т. 63. № 10. С. 1014. (*Shaidarova L.G., Budnikov G.K.* Chemically modified electrodes based on noble metals, polymer films, or their composites in organic voltammetry // *J. Analyt. Chem.* 2008. V. 63. № 10. P. 922.)
12. *Дубровский Д.И., Кабирова Л.Р., Хаблетдинова А.И., Зильберг Р.А., Майстренко В.Н.* Вольтамперометрические сенсоры на основе композитов полиэлектролитного комплекса хитозана и α -, β -, γ -циклодекстринов для определения и распознавания энантиомеров метионина // *Вестник Башкирского университета.* 2018. Т. 23. № 3. С. 723.
13. *Дорошко Е.В.* Определение некоторых тиоловых соединений в биологических объектах методом вольтамперометрии. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Томск: Томский политех. ун-т, 2010. 22 с.
14. *Cheng L., Pacey G.E., Cox J.A.* Carbon electrodes modified with ruthenium metallodendrimer multilayers for the mediated oxidation of methionine and insulin at physiological pH // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 5607.
15. *Zhuo G., Guangshan Z., Bo G., Daliang Z., Ge T., Yue C., Weiwei Z.* Adsorption of vitamin B₁₂ on ordered mesoporous carbons coated with PMMA // *Carbon.* 2005. V. 43. № 11. P. 2344.
16. *Mazurenko E., Mathieu E., Tananaiko O., Urbanova V.* Electrophoretic deposition of macroporous carbon nanotube assemblies for electrochemical applications // *Carbon.* 2013. V. 53. P. 302.
17. *Jose A., Lima Jr.* Using Raman spectroscopy to understand the origin of the phase transition observed in the crystalline sulfur based amino acid l-methionine // *Vib. Spectrosc.* 2013. V. 65. P. 132.
18. *Zhang Z., Wang B., Yin Y., Mo Y.* Surface-enhanced Raman spectroscopy of vitamin B₁₂ on silver particles in colloid and in atmosphere // *J. Mol. Struct.* 2009. V. 927. P. 88.