

УДК 547.794.3

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГЛИКОЛУРИЛА

© 2019 г. Л. К. Салькеева^{a,*}, Е. И. Короткова^a, К. В. Дёрина^b, Е. К. Тайшибекова^a,
Е. В. Минаева^a, А. А. Муратбекова^c, А. К. Салькеева^c

^a Карагандинский государственный университет имени Е. А. Букетова,
ул. Университетская 28, Караганда, 100028 Казахстан

*e-mail: LSalkeeva@mail.ru

^b Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

^c Карагандинский государственный политехнический университет, Караганда, Казахстан

Поступило в Редакцию 30 августа 2018 г.

После доработки 20 сентября 2018 г.

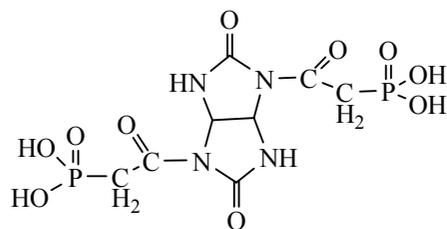
Принято к печати 26 сентября 2018 г.

На примере природного жирного липофильного спирта холестерина изучена комплексообразующая способность гликолурилдифосфоновой кислоты, синтезированной на основе классической реакции Арбузова. В результате проведенных вольтамперометрических исследований предложен способ формирования нового чувствительного электрохимического сенсора по определению общего холестерина, обладающего высокой эффективностью в сравнении с имеющимися образцами.

Ключевые слова: гликолурил (бисмочевина), бисфосфоновая кислота, холестерин, электрохимический сенсор

DOI: 10.1134/S0044460X19030168

Производные гликолурила привлекают внимание исследователей в связи с возможностью их функционализации и практического применения в различных областях [1–11]. Ранее нами была показана возможность синтеза {(2,5-диоксогексагидроимидазо[4,5-*d*]имидазол-1,4-диил)бис(2-оксоэтан-2,1-диил)}бис(фосфоновой кислоты) **1** по схеме классической реакции Арбузова на основе 1,4-бис(бромацетил)тетрагидроимидазо[4,5-*d*]имидазол-2,5(1*H*,3*H*)-диона и триэтилфосфита [12].



1

Структура полученной дифосфоновой кислоты **1** предполагает ее высокую способность к комплексообразованию и, очевидно, возможность создания супрамолекулярных систем по типу *гость–хозяин*, в которых могут координироваться несколько молекул кислоты **1** в образовании нового комплекса включения. С этой целью была исследована возможность использования дифосфоновой кислоты **1** в комплексообразовании с соединениями различной природы. В частности, проведены исследования по применению {(2,5-диоксогексагидроимидазо[4,5-*d*]имидазол-1,4-диил)бис(2-оксоэтан-2,1-диил)}бис(фосфоновой кислоты) **1** в качестве модификатора поверхности углеродсодержащих электродов для определения холестерина.

Холестерин представляет собой природный жирный спирт. Данное соединение играет существенную роль в организме человека: участвует в синтезе витамина D, различных стероидных гормонов (в том числе, женских половых гормонов эстрогена и прогестерона, а также мужского полового гормона тестостерона), участвует в

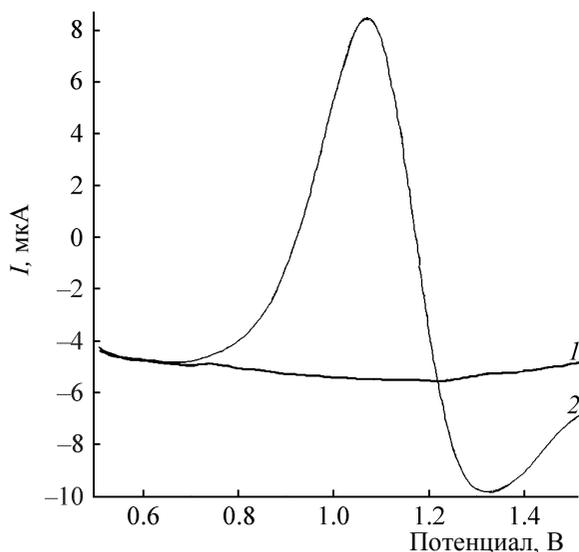


Рис. 1. Вольтамперограмма холестерина (10 мкмоль/дм^3). 1 – немодифицированный стеклоуглеродный электрод, 2 – модифицированный электрод. Фоновый электролит – фосфатный буфер с $\text{pH} = 6.86$, $\nu = 0.04 \text{ В/с}$, $E_n = +1.06 \text{ В}$.

работе нервной и иммунной системы, а также в липидном обмене [13]. Однако, несмотря на положительную роль данного стерина в организме, он может являться одним из маркеров ряда сердечно-сосудистых заболеваний (атеросклероза, гипертонии, церебрального тромбоза, ишемической болезни сердца, инсульта и пр.), нарушений липидного обмена и сахарного диабета [14]. Таким образом, задача контроля содержания холестерина в крови пациентов имеет существенное значение в клинической диагностике и терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Высокая актуальность задачи определения холестерина обуславливает активное развитие различных аналитических методик определения, в том числе, электрохимических методик и соответствующих сенсоров. Применение электрохимических сенсоров выглядит перспективно для изготовления тест-систем и диагностики клинических анализов по месту лечения благодаря простоте и скорости исполнения, низкой стоимости и возможности миниатюризации в сочетании с высокой чувствительностью метода. Большинство существующих сенсорных методик определения холестерина основаны на применении ферментативных систем или наночастиц металлов (преимущественно, серебра и золота). Однако имеющиеся подходы обладают рядом недостатков. Ферментативные

системы, обладая высокой селективностью и относительной простотой изготовления, проявляют высокую чувствительность к внешним условиям (изменение температуры окружающей среды, водородного показателя среды и т. д.), что обусловлено склонностью ферментов к денатурации [15]. Данная особенность оказывает негативное влияние на воспроизводимость и точность ферментативных сенсоров. В свою очередь, сенсоры на основе наночастиц обладают сниженной селективностью, по сравнению с ферментативными. Кроме того, процесс синтеза наночастиц сложно поддается стандартизации, в связи с чем усложняется задача массового выпуска подобных приборов [16]. Таким образом, подбор и разработка новых модификаторов поверхностей электродов представляет собой актуальную научно-техническую задачу.

Ранее было показано, что вольтамперометрическое определение зависит от природы материала электрода, а также от величины потенциала, при котором происходит реакция с участием определяемого компонента на электроде [17]. С целью поиска новых подходов к определению холестерина и разработки методик его определения мы попытались использовать стеклоуглеродные электроды, модифицированные полифункциональным азгетероциклическим соединением ряда бициклических бисмочевин, а именно дифосфоновой кислотой 1.

Все электрохимические измерения проводили с применением трехэлектродной ячейки, состоявшей из рабочего электрода (модифицированный стеклоуглерод), вспомогательного и электрода сравнения (применяли хлоридсеребряные электроды). Все измерения проводили в фосфатном буфере с $\text{pH} = 6.86$. Таким образом, измерения проводили в условиях, приближенных к физиологическим.

Показано, что применение модификатора позволяет получить сигнал окисления холестерина в анодной области потенциалов (рис. 1). Нанесение модификатора осуществляли двумя способами: физической адсорбцией из раствора и электрохимическим нанесением. Установлено, что электрохимическое нанесение позволяет получать более стабильный отклик на стеклоуглеродном электроде. Потенциал полученного пика электроокисления составляет $+1.06 \text{ В}$. При этом модификатор в данной области потенциалов не является электрохимически активным. Кроме того,

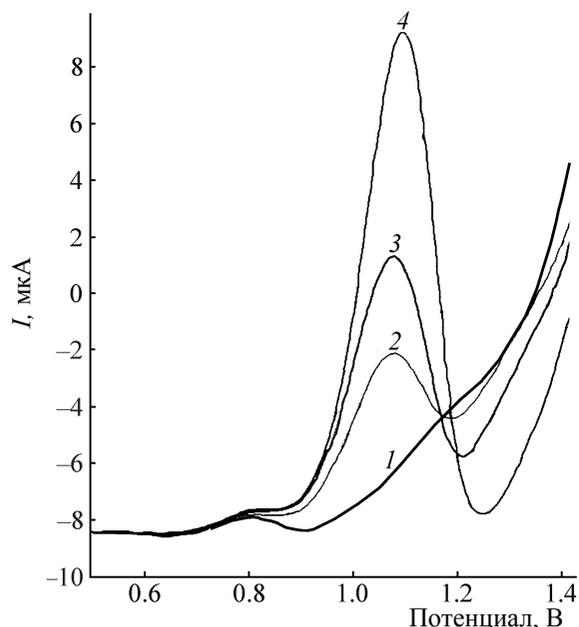


Рис. 2 Вольтамперограммы в отсутствие (1) и в присутствии (2–4) холестерина в ячейке на модифицированном электроде ($E_{\text{н}} = +1.06$ В). Концентрация холестерина, мкмоль/дм³: 6 (2), 12 (3), 18 (4).

применение фосфатного буфера в качестве фонового электролита требовало применения дополнительного эмульгирующего агента. В данной работе был использован *трет*-октилфеноксиполиэтоксигидроэтанол (Triton X-100) (рис. 2).

Установлено, что наличие пика электроокисления холестерина наблюдается при наличии в системе эмульгатора (Triton X-100) (рис. 3). В отсутствие эмульгирующего агента сигнала не наблюдалось. Данный факт объясняется нахождением модификатора в водной фазе вследствие его гидрофильности. Таким образом, в отсутствие эмульгатора, молекула которого содержит в себе как гидрофобную, так и гидрофильную часть, взаимодействие холестерина с модификатором не наблюдается. Кроме того, изопропанол, несмотря на то, что он относится к классу спиртов, не взаимодействует с дифосфоновой кислотой **1**.

Показано также, что в соответствующей области потенциалов эмульгирующий агент электрохимической активности не проявляет. В отсутствие какого-либо из компонентов системы (холестерин, Triton X-100, изопропиловый спирт) наблюдается отсутствие пика электроокисления холестерина, что объясняется недостаточностью разбавления пробы при отсутствии изопро-

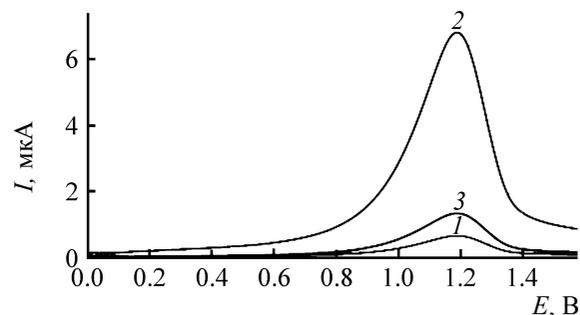


Рис. 3 Зависимость регистрируемого тока окисления холестерина от величины приложенного потенциала на модифицированном электроде при различном pH среды (состав системы: холестерин, Triton X-100, изопропиловый спирт). pH = 1.65 (1), 6.86 (2), 12.43 (3).

пилового спирта и невозможностью взаимодействия холестерина и модификатора в случае отсутствия эмульгирующего агента.

Зависимость величины тока от концентрации холестерина в ячейке линейна в диапазоне от 1×10^{-6} до 1×10^{-5} моль/дм³. Полученный линейный диапазон позволяет определять холестерин как в продуктах питания, так и в биологических жидкостях (сыворотка крови). Полученный сигнал характеризуется высокой стабильностью в модельных средах, соответствующих объектам исследования. Состав модельных сред представлен в таблице. Также проводили измерения на электродах, изготовленных методом трафаретной печати.

Таким образом, предлагаемый метод определения холестерина с использованием в качестве модификатора {(2,5-диоксогексагидроимидазо[4,5-d]имидазол-1,4-диил)бис(2-оксоэтан-2,1-диил)}бис(фосфоновой кислоты) позволяет снизить потенциал окисления холестерина и получить стабильный сигнал в области, доступной для измерения. Это открывает широкие перспективы применения модификатора в целях определения холестерина в пищевых продуктах и биологических жидкостях человека с целью ранней диагностики сердечно-сосудистых заболеваний и терапии. В дальнейшем планируется апробация полученной системы на реальных объектах, в частности на продуктах питания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дифосфоновая кислота **1** синтезирована согласно методике [12].

Состав модельных сред для определения содержания холестерина

Сыворотка крови		Продукты питания	
компонент	содержание, мМ.	компонент	содержание, мМ.
Глюкоза	6.40	Глюкоза	2.50
Аскорбиновая кислота	0.06	Галактоза	2.50
Пировиноградная кислота	0.50	Лактоза	0.03
Молочная кислота	0.20	Аскорбиновая кислота	0.01
Аспарагиновая кислота	0.02	Токоферола ацетат	0.01
Мочевая кислота	0.50	Казеин	0.50
Глутаминовая кислота	0.09	Альбумин	0.50
Аланин	0.31	Глобулин	0.50
Креатинин	1.00	Тиамин	1.00
Лейцин	0.19	Пиридоксин	1.50
Глицин	0.32	Цианокобаламин	2.00
Мочевина	5.00	Ретинола ацетат	0.01
Холекальциферол	0.10	Холин	3.50
Холестерин	5.00	Холестерин	0.05

Электрохимические измерения проводили при помощи универсального электрохимического анализатора АТ (ООО «ИТМ», Россия). Анализатор представляет собой универсальную электрохимическую станцию для фиксации изменения тока при вводе электроактивного соединения. Фиксация изменений тока происходит посредством построения катодной или анодной развертки потенциала. Доступны режимы постоянно-токовой, квадратно-волновой и дифференциально-импульсной развертки. Данный анализатор предназначен для качественного и количественного определения соединений различной природы. Фоновый электролит – фосфатный буфер (смесь 1 М. дигидрофосфата калия и 1 М. гидрофосфата натрия, рН = 6.86, ООО «Уралхиминвест», Россия). Рабочий электрод – стеклогуглеродный (ООО НПП «Томьаналит», Россия). Вспомогательный и электрод сравнения – насыщенные хлорид-серебряные электроды (ООО НПП «Томьаналит», Томск, Россия). Для приготовления стандартного раствора холестерина использовали порошок холестерина, полученный из овечьей шерсти с содержанием целевого компонента 99.5% (Sigma

Aldrich, США). В качестве растворителя применяли изопропиловый спирт с содержанием >99.7% (Sigma Aldrich, США). Для работы в водных средах дополнительно в систему вводили эмульгирующий агент Triton X-100 с содержанием целевого компонента >99% с числом агрегации 120 (Sigma Aldrich, США). Triton X-100 брали в соотношении 1:1 мас% к изопропанолу. От полученного объема дозатором со сменным наконечником отбирали аликвоту 10 мкл и вносили в кварцевый стакан объемом 15 мл, в который предварительно наливали 10 мл рабочего электролита. Затем проводили перемешивание посредством стационарной вибрации рабочего электрода в течение 20 с, после систему оставляли на 30 с. Осуществляли регистрацию полученного тока электроокисления в постоянно-токовом режиме с дифференцированием при скорости развертки потенциала $v = 0.05$ В/с. Рабочий диапазон потенциалов – +0.5–+1.0 В. Накопление в приэлектродном пространстве не проводили. Дальнейший расчет содержания холестерина в ячейке проводили по калибровочной кривой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакибаев А.А., Горшкова В.К., Яговкин А.Ю., Филимонов В.Д., Саратиков А.С. // Хим.-фарм. ж. 1994. Т. 28. № 8. С. 15; *Bakibaev A.A., Gorshkova V.K., Yagovkin A.Yu., Filimonov V.D., Saratikov A.S.* // Pharm. Chem. J. 1994. Vol. 28. N 8. P. 547. doi 10.1007/BF02219026
2. Салькеева Л.К., Бакибаев А.А., Хасенова Г.Т., Тайшибекова Е.К., Сугралина Л.М., Минаева Е.В., Салькеева А.К. // ЖПХ. 2016. Т. 89. Вып. 1. С. 103; *Sal'keeva L.K., Bakibaev A.A., Khasenova G.T., Taishibekova Ye.K., Sugralina L.M., Minaeva Ye.V., Sal'keeva A.K.* // Russ. J. Appl. Chem. 2016. Vol. 89. N 1. P. 132. doi 10.1134/S1070427216010213
3. *Grillona E., Galloa R., Pierrota M., Voileaub J., Wimmerb E.* // Tetrahedron Lett. 1988. Vol. 29. N 9. P. 1015. doi 10.1016/0040-4039(88)85322-X
4. *Jarvo E. R., Miller S.* // Tetrahedron. 2002. Vol. 58. N 13. P. 2481. doi 10.1016/S0040-4020(02)00122-9
5. *Christoffers J., Mann A.* // Angew. Chem. 2001. Vol. 113. P. 4725. doi 10.1002/1521-3757(20011217)113:24<math>\gt;1.0.CO;2-M
6. *Krause N., Hoffmann-Rouder A.* // Synthesis. 2001. Vol. 2. P. 171. doi 10.1055/s-2001-10803
7. *Sibi M.P., Manyem S.* // Tetrahedron. 2000. Vol. 56. N 41. P. 8033. doi 10.1016/S0040-4020(00)00618-9
8. *Leonard J., Diez-Barra E., Merino S.* // Eur. J. Org. Chem. 1998. N 10. P. 2051. doi 10.1002/(SICI)1099-0690(199810)1998:10<2051::AID-EJOC2051>3.0.CO;2-T
9. Кравченко А.Н., Сигачев А.С., Газиева Г.А., Максарева Е.Ю., Трунова Н.С., Чегаев К.А., Лысенко К.А., Любецкий Д.В., Стрючкова М.И., Ильин М.М., Даванков В.А., Лебедев О.В., Махова Н.Н., *Tartakovskiy V.A.* // ХГС. 2006. № 3. С. 411; *Kravchenko A.N., Sigachev A.S., Gazieva G.A., Maksareva E.Yu., Trunova N.S., Chegaev K.A., Lyssenko K.A., Lyubetsky D.V., Struchkova M.I., Il'in M.M., Davankov V.A., Lebedev O.V., Makhova N.N., Tartakovskiy V.A.* // Chem. Heterocycl. Compd. 2006. N 3. P. 365. doi 10.1007/s10593-006-0094-2
10. *Stancel M., Khan M.S.A., Sindelara V.* // Tetrahedron 2011. Vol. 67. N 46. P. 8937. doi 10.1016/j.tet.2011.08.097
11. Кравченко А.Н., Сигачев А.С., Максарева Е.Ю., Газиева Г.А., Трунова Н.С., Ложкина Б.В., Пивина Т.С., Ильин М.М., Лысенко К.А., Нелюбина Ю.В., Даванков В.А., Лебедев О.В., Махова Н.Н., *Tartakovskiy V.A.* // Изв. АН. Сер. хим. 2005. № 3. С. 680; *Kravchenko A.N., Sigachev A.S., Maksareva E.Yu., Gazieva G.A., Trunova N.S., Lozhkin B.V., Pivina T.S., Il'in M.M., Lyssenko K.A.* // Russ. Chem. Bull. 2005. Vol. 54. N 3. P. 691. doi 10.1007/s11172-005-0307-3
12. Салькеева Л.К., Тайшибекова Е.К., Бакибаев А.А., Минаева Е.В., Макин Б.К., Сугралина Л.М., Салькеева А.К. // ЖОХ. 2017. Т. 87. Вып. 3. С. 435; *Sal'keeva L.K., Taishibekova E.K., Bakibaev A.A., Minaeva E.V., Makin B.K., Sugralina L.M., Sal'keeva A.K.* // Russ. J. Gen. Chem. 2017. Vol. 87. N 3. P. 442. doi 10.1134/S1070363217030124
13. Березов Т., Коровкин Б. Биологическая химия. М.: Медицина, 2008. 704 с.
14. *Roth G.A., Fihn S.D., Mokdad A.H., Aekplakorn W., Hasegawa T., Lim S.S.* // Bull. World Health Org. 2011. Vol. 89. P. 92. doi 10.2471/BLT.10.079947
15. *Wang J.* // Biosensors and Bioelectronics. 2006. Vol. 21. N 10. P. 1887. doi 10.1016/j.bios.2005.10.027
16. *Saxena U., Bikas Das A.* // Biosensors and Bioelectronics. 2016. Vol. 75. P. 196. doi 10.1016/j.bios.2015.08.042
17. *Bard A.J., Faulkner L.R.* Electrochemical methods. Fundamentals and applications. New York: Wiley, 2001. P. 273.

Synthesis and Electrochemical Study of The Complexing Properties of Phosphorylated Glycoluril

L. K. Salkeeva^{a*}, E. I. Korotkova^a, K. V. Dyorina^b, E. K. Taishibekova^a,
E. V. Minaeva^a, A. A. Muratbekova^c, and A. K. Salkeeva^c

^a *E. A. Buketov Karaganda State University, ul. Universitetskaya 28, Karaganda, 100028 Kazakhstan*
**e-mail: LSalkeeva@mail.ru*

^b *National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia*

^c *Karaganda State Polytechnical University, Karaganda, Kazakhstan*

Received August 30, 2018; revised September 20, 2018; accepted September 26, 2018

Using the example of natural fatty lipophilic cholesterol alcohol, the complexing ability of glycoluril diphosphonic acid synthesized through the classical Arbuzov reaction was studied. As a result of voltammetric studies, a method was proposed for producing a new sensitive electrochemical sensor for determining total cholesterol, which is highly effective in comparison with existing samples.

Keywords: glycoluril (bisurea), bisphosphonic acid, cholesterol, electrochemical sensor