

ВЫБОР КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА

А.В. Охохонин, А.И. Матерн

*ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург*

Цель и задачи работы

Получение аналитического отклика холестерина при использовании в качестве каталитических систем хелатных комплексов никеля (II).

ВВЕДЕНИЕ

Проблемы, связанные с охраной здоровья населения и ранней диагностикой заболеваний требуют развития новых и эффективных методов определения компонентов биологических жидкостей — маркеров функционирования органов и систем человеческого организма.

Холестерин относится к группе соединений, входящих в состав всех тканей живого организма, и выполняет множество важных физиологических функций, включая синтез желчных кислот, стероидных гормонов и клеточных мембран. Поскольку холестерину отводится решающая роль в развитии атеросклероза, определение его концентрации в крови стало одним из самых часто выполняемых лабораторных исследований.

Определение общего холестерина включает определение «свободного» и «связанного» холестерина. В сыворотке или плазме крови до 2/3 холестерина находится в эстрифицированной форме, оставшаяся часть представляет неэстрифицированный холестерин. Это имеет существенное значение, поскольку в некоторых химических реакциях интенсивность окраски эфиров холестерина более интенсивная, чем у свободного холестерина, что в свою очередь может привести к аналитической ошибке. В некоторых ферментативных реакциях неполный гидролиз длинноцепочечных эфиров холестерина, в частности с арахидоновой кислотой, может приводить к занижению результатов.

При выборе метода оценивают простоту и скорость выполнения, точность результатов. Компромиссным методом становится тот, который не вносит в деятельность лаборатории проблем и обеспечивает получение надежных результатов.

В настоящее время среди методов определения холестерина в клинической диагностике по типу используемых реагентов можно выделить две основные группы: химические и ферментативные методы, по количеству проводимых операций – одноступенчатые, трехступенчатые, двухступенчатые и многоступенчатые.

В одноступенчатых методах не требуется подготовки исследуемого образца, поскольку исключен этап экстракции холестерина и отделения других стероидов. Они просты, быстро выполнимы и не требуют сложной и длительной пробоподготовки. В то же время эти методы не свободны от вмешательства в реакцию белка, билирубина, гемоглобина, витаминов А, С, D, стероидных гормонов, мочевой кислоты, липемии.

В двухступенчатые методы включен дополнительный этап экстракции холестерина из образца сыворотки или плазмы с помощью органических растворителей. Это позволяет удалить большую часть неспецифичных хромогенов, способных вмешаться в реакцию. Поскольку этап гидролиза эфиров холестерина не включен в эти методы, проблема неодинаковой окраски свободного и эфирсвязанного холестерина в реакции Л–Б сохраняется.

Трехступенчатые методы сопряжены с дополнительным этапом — этапом гидролиза эфиров холестерина, и на заключительном этапе в реакцию вступает свободный холестерин. Метод L. Abell и соавт., принадлежащий к этой группе, в настоящее время рассматривается многими авторами в качестве референтного.

В группе многоступенчатых методов для дополнительной очистки холестерина используют способность дигитонина реагировать с гидроксильной группой в положении С-3 в кольце А молекулы холестерина. Осаждение холестерина дигитонином обеспечивает дополнительную очистку экстракта и устраняет вмешательства в реакцию различных хромогенов. Теоретически

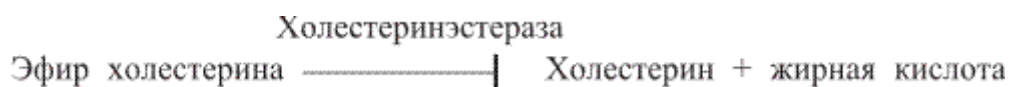
четырёхэтапные методы являются более точными и специфичными по сравнению с любыми другими методами определения холестерина. В то же время его усложнение за счет дополнительных этапов может приводить к существенным аналитическим погрешностям.

В большинстве методов определения холестерина, как правило, использованы те или иные модификации следующих реакций:

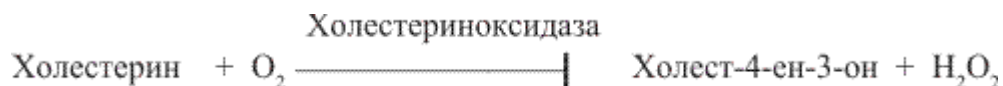
- реакция *Liebermann–Burchard*;
- реакция *Zlatkis–Zak* с солями хлорного железа;
- ферментативные.

Совершенствование аналитических приемов привело к повсеместному внедрению в практику ферментативных методов определения холестерина, которые следует отнести к категории прямых методов.

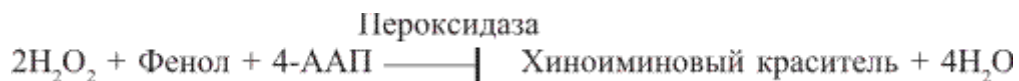
На 1-м этапе осуществляется гидролиз эфиров холестерина крови с использованием фермента холестеринэстеразы. При этом образуется свободный холестерин и жирная кислота:



На 2-м этапе фермент холестериноксидаза окисляет холестерин с образованием холест-4-ен-3-он и перекиси водорода:



Наибольший интерес вызвал подход, предложенный *P. Trinder* для определения перекиси водорода в реакции окислительного диазосочетания между фенолом и 4-аминоантипирином (4-ААП) при участии фермента пероксидазы:



Реакция Триндера, в которой образуется окрашенный комплекс (максимум поглощения 500–525 нм), является наиболее распространенной системой индикации холестерина и используется в большинстве современных тест-систем.

Однако, сложность выделения и очистки ферментов из природных объектов, их неустойчивость при хранении и, как следствие этого, необходимость соблюдения особых условий хранения и высокая стоимость ферментов

ограничивают их повсеместное использование. Кроме того, на характеристики биосенсоров влияют способ иммобилизации фермента, тип электрохимического датчика и состав реакционной смеси.

Таким образом, для решения проблемы требуется создание новых экспрессных, чувствительных и селективных методов и сенсоров для определения содержания холестерина в сыворотке крови, исключающих применение ферментов.

Настоящее исследование посвящено получению аналитического сигнала от холестерина с использованием в качестве чувствительных элементов макроциклических комплексов никеля (II).

Научный задел

Ранее были получены селективные отклики электрохимического окисления мочевины и креатинина с использованием катализаторов на основе макроциклических комплексов никеля (II). В случае применения ТУЭ, модифицированных комплексами 1,1,1,7,7,7-Гексафторгептан-2,4,6-трикетонат диникеля (II) тетрагидрат, 4,4,5,5,6,6,7,7,7-нонафтор-1-фенилгептан-1,3-дикетонат никеля (II) и [(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-(бензотиазол-2-иламино)-s-тетразина-то](ацетилацетонато) никель (II) в электрохимическом каталитическом окислении креатинина и мочевины, аналитический сигнал оказался достаточно выраженным для осуществления определения этих аналитов (рис. 1). При использовании указанных модифицированных ТУЭ были получены оптимальные результаты (максимально близкие, воспроизводимые и правильные значения найденной добавки). Получена линейная корреляция хроноамперометрического сигнала с концентрацией мочевины и креатинина (рис. 2). Основываясь на этих данных, а также на сходном строении ферментов, участвующих в окислении и гидролизе мочевины, креатинина и холестерина, мы ожидаем получить похожий электрохимический отклик окисления холестерина при использовании органических соединений никеля (II) в качестве электрокатализаторов.

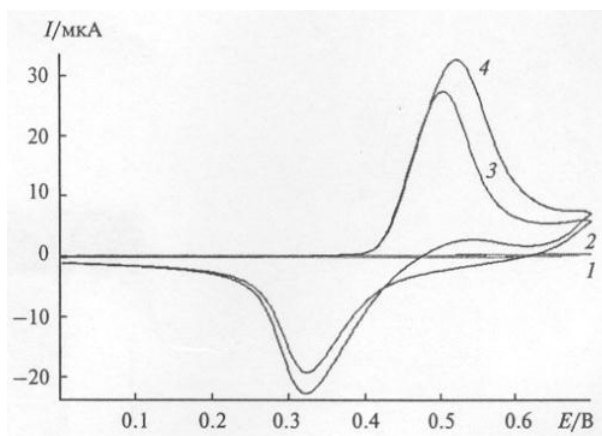


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы, регистрируемые при использовании трансдьюсера в отсутствие (1) и в присутствии $3 \cdot 10^{-3}$ М мочевины в растворе (2) и рабочего электрода в отсутствие (3) и в присутствии $3 \cdot 10^{-3}$ М мочевины в растворе (4). Фон 0.25 М NaOH. Скорость развертки потенциала 0.1 В/с

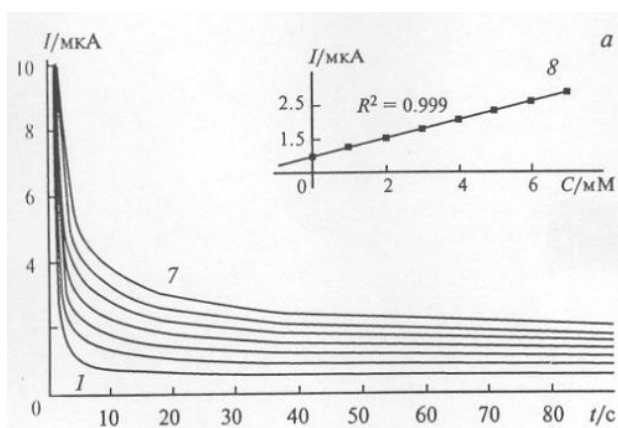


Рис. 2. Хроноамперограммы окисления мочевины, регистрируемые при использовании рабочих электродов при разных концентрациях аналита. Фон 0.25 М NaOH. На вставке – зависимость аналитического сигнала от концентрации мочевины

Используемые методы исследования

Выбор каталитической системы осуществляется на основании данных циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии.

Анализ включает две стадии:

I стадия: формирование поверхности одноразового модифицированного электрода:

- вводят в ячейку 10 мл 0,25 М NaOH, после этого погружают толсто пленочный электрод с иммобилизованным катализатором, вспомогательный электрод и электрод сравнения;

- для подготовки поверхности, модифицированный толстопленочный электрод многократно циклируют в интервале потенциалов 0,0 – 0,7 (0,9) В;
- регистрируют циклическую вольтамперограмму в выбранном диапазоне потенциалов;
- на основании зарегистрированных циклических вольтамперограмм определяют потенциал анодного пика катализатора;

II стадия: хроноамперометрическое определение содержания мочевины или креатинина:

- вводят в ячейку 10 мл 0,25 М NaOH, после этого погружают толстопленочный электрод с иммобилизированным катализатором, вспомогательный электрод и электрод сравнения;
- регистрируют хроноамперограмму окисления никеля (II) в фоновом электролите при потенциале окисления, определенном на I стадии;
- вводят порционно по 0,1 мл стандартную добавку 0,1 М раствора мочевины или 0,01 М раствора креатинина и регистрируют хроноамперограмму;
- время проведения анализа 90 с, ток измеряли по истечении 70 с;
- рассчитывают концентрацию аналита по формуле (1):

$$C = \frac{\Delta I_{\text{доб}} \cdot V_{\text{доб}}}{\Delta I_{\text{обр}} \cdot V_{\text{обр}}} \quad (1),$$

где $\Delta I_{\text{доб}}$ – ток окисления никеля (II), полученный после введения в раствор стандартной добавки мочевины или креатинина;

$\Delta I_{\text{обр}}$ – ток окисления никеля (II), полученный в присутствии стандартной добавки мочевины или креатинина (образца);

$C_{\text{доб}}$ – концентрация стандартной добавки мочевины или креатинина;

$V_{\text{доб}}$ – объем стандартной добавки мочевины или креатинина, вводимый в ячейку;

$V_{\text{обр}}$ – объем второй стандартной добавки (образца), вводимой в ячейку

Вольтамперные характеристики модифицированных ТУЭ (E_{ox} , I_p , ΔE), зарегистрированные после формирования рабочей зоны электрода, определяются для каждой группы.

Для исследования каталитической активности комплексов используется методы циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии. Каталитическую активность рассматриваемых органических комплексов никеля (II) определяется по соотношению $I_{кат}/I_{NiL}$, где $I_{кат}$ — каталитический ток окисления мочевины, регистрируемые в хроноамперометрическом режиме, I_{NiL} — ток окисления комплекса никеля (II). Влияние природы органического лиганда и условий иммобилизации на электрохимические характеристики модифицированных ТУЭ исследуется методом циклической вольтамперометрии.

Ожидаемые результаты

— Получение аналитического сигнала от электрохимического окисления холестерина с использованием искусственных металлоорганических катализаторов;

— изучение каталитических систем на основе органических комплексов никеля (II), способных генерировать воспроизводимый аналитический отклик в присутствии определяемого аналита;

— исследование кинетики электрохимического каталитического окисления мочевины и креатинина в присутствии каталитической системы.

На основании полученных данных будет разработан электрохимический сенсор для селективного определения холестерина в сыворотке крови.