

*На правах рукописи*



**Маркина Мария Геннадьевна**

**ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ И КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ СЕНСОРЫ  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ И  
ТИОЛОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Екатеринбург – 2017

Работа выполнена на кафедре физики и химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный экономический университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор  
**Стожко Наталия Юрьевна**

Официальные оппоненты: **Колпакова Нина Александровна**,  
доктор химических наук, профессор, ФГАОУ  
ВО «Национальный исследовательский  
Томский политехнический университет»,  
профессор кафедры физической и  
аналитической химии Института природных  
ресурсов;

**Сидельников Артем Викторович**,  
доктор химических наук, ФГБОУ ВО  
«Башкирский государственный университет»,  
г. Уфа, профессор кафедры аналитической  
химии химического факультета;

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)  
федеральный университет», г. Казань

Защита диссертации состоится «19» декабря 2017 г. в 16:00 ч на заседании диссертационного совета Д 212.285.09 на базе ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, ауд. И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», <http://lib.urfu.ru/mod/data/view.php?id=51&rid=273544>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Семенищев  
Владимир Сергеевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В современных научных исследованиях намечается тенденция к созданию простых и экспрессных методов неинвазивного анализа кожи. Возрастающий интерес к коже как объекту анализа обусловлен тем, что кожа служит индикатором состояния здоровья организма человека. В то же время кожа является удобным объектом для неинвазивного анализа, не требующим сложной пробоподготовки, специальных лабораторных условий. Определяемые в настоящее время параметры кожи включают рН, концентрацию катионов, глюкозы, лактат-ионов. Наряду с этим, большую практическую важность и научный интерес представляет исследование антиоксидантов кожи. Известно, что постоянное негативное воздействие на кожу окружающей среды и внутренних патологических процессов приводит к интенсификации реакций свободнорадикального окисления. Антиоксидантная система защиты противостоит разрушительному воздействию свободных радикалов, в связи с чем показатель антиоксидантной активности (АОА) кожи может нести важную информацию о состоянии этой системы и здоровья человека. Прямое неинвазивное определение антиоксидантов кожи представляет интерес не только для медицины, но и при использовании антиоксидантов в косметологии, пищевой промышленности, в других областях, где возникает необходимость исследования окислительно-восстановительного баланса кожи. Вследствие этого, актуальным направлением исследования является разработка простых, доступных, неинвазивных методов определения АОА кожи человека.

Биологические тиолы (например, глутатион, цистеин) играют ключевую роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза благодаря существованию равновесия между их восстановленными и окисленными формами (тиольные и дисульфидные группы). Содержание глутатиона, основного тиола кожи, составляет около 7% от общего содержания водорастворимых антиоксидантов (АО) в коже, что обуславливает его незначительный вклад в интегральную величину АОА кожи и делает этот показатель неинформативным в отношении тиолов. Поэтому разработка неинвазивных методов определения тиолов кожи человека является отдельной, актуальной задачей.

**Степень разработанности темы исследования.** Опубликованные данные по оценке антиоксидантных свойств кожи человека немногочисленны. Из них значительное число работ посвящено инвазивным методам определения индивидуальных АО (в том числе, тиолов) в гомогенизированных образцах кожи, а именно: жидкостной хроматографии, спектрофотометрии. Эти методы требуют лабораторных условий и квалифицированного персонала, являются трудозатратными и дорогостоящими. Результаты различных методов не всегда сопоставимы из-за использования разных единиц измерения, референтных значений, условий эксперимента.

Немногочисленная группа неинвазивных методов оценки антиоксидантных свойств кожи имеет ряд недостатков. Например, метод резонансной спектроскопии комбинационного рассеяния света позволяет оценивать только содержание

каротиноидов, к другим АО кожи метод не чувствителен. Метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса сложен в реализации, требует лабораторных условий, обработки кожи микроволновым излучением и магнитным полем. В случае вольтамперометрической оценки окислительно-восстановительного состояния кожи интерпретацию результатов затрудняют невоспроизводимость поверхности рабочего электрода и низкая электропроводность объекта анализа. Простота аппаратного оформления, возможность создания миниатюрных приборов для работы в «полевых» условиях позволяет рассматривать неинвазивный потенциометрический метод оценки АОА кожи как перспективный. Недостатками существующего потенциометрического способа являются длительность процедуры анализа, неустойчивость используемой смеси медиаторной системы с гелем при хранении, недостаточная воспроизводимость результатов. Теоретические основы этого метода еще не разработаны. Следует также отметить отсутствие опубликованных данных по неинвазивным методам определения тиолов в коже человека.

**Цель работы** заключалась в разработке потенциометрического и колориметрического сенсоров для неинвазивного определения АОА и тиолов кожи человека.

Для реализации поставленной цели потребовалось решение следующих **задач**:

- 1) разработка теоретических основ потенциометрического метода определения АОА кожи;
- 2) разработка потенциометрического сенсора и методики неинвазивного определения АОА кожи человека;
- 3) разработка колориметрического сенсора и методики неинвазивного определения содержания тиолов в коже человека;
- 4) анализ кожи добровольцев с помощью разработанных потенциометрического и колориметрического сенсоров.

**Научная новизна** работы состоит в следующем:

1. Разработаны теоретические основы потенциометрического метода определения АОА кожи. Показано, что аналитический сигнал зависит от скоростей диффузионного отвода АО от поверхности раздела «кожа–экстрагент» и химического взаимодействия АО с окисленной формой медиаторной системы в среде экстрагента, толщины слоя экстрагента и эпидермиса кожи, длительности измерения. Адекватность модели подтверждена согласованностью теоретических и экспериментальных данных.

2. Впервые установлено, что константы скоростей взаимодействия водорастворимых АО кожи человека с гексацианоферратом (III) калия в среде геля на порядок меньше, чем в водном растворе. Обоснована замена геля с медиаторной системой на пропитанный водным раствором гексацианоферрата (III) калия пористый материал в качестве чувствительного слоя потенциометрического сенсора для неинвазивного определения АОА кожи человека.

3. На основании результатов анализа водных экстрактов из кожи человека методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) с ультрафиолетовой (УФ)

детекцией впервые установлено, что основным водорастворимым АО поверхностных слоев кожи человека является мочева кислота.

4. Предложен новый подход для неинвазивного определения тиолов кожи, основанный на изменении окраски сенсора в результате агрегации наночастиц золота под воздействием тиолов.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы:**

1. Разработана математическая модель физико-химических процессов, протекающих при потенциометрическом определении АОА кожи, позволившая установить влияние скоростей диффузионного отвода АО от поверхности раздела «кожа–экстрагент» и химического взаимодействия АО с окисленной формой медиаторной системы в среде экстрагента, толщины слоя экстрагента, длительности измерения на аналитический сигнал.

2. Обосновано направление развития потенциометрического метода анализа кожи, заключающееся в уменьшении толщины слоя экстрагента до величины, близкой к толщине эпидермиса кожи, в решении проблемы низкой стабильности смеси геля с медиаторной системой и в сокращении продолжительности измерения за счет повышения скорости взаимодействия АО с гексацианоферратом (III) калия в среде экстрагента.

3. Предложен потенциометрический сенсор для неинвазивного определения АОА кожи человека. Чувствительный слой сенсора состоит из пористого материала, пропитанного раствором гексацианоферрата (III) калия. Разработана методика неинвазивного определения АОА кожи человека с использованием потенциометрического сенсора. Ее преимущества по сравнению с существующей методикой (применение геля с медиаторной системой) заключаются в сокращении процедуры анализа и ее упрощении, устойчивости реагента при хранении, лучшей воспроизводимости результатов анализа кожи (в течение дня  $S_r \leq 0.08$ , в разные дни  $S_r \leq 0.13$  ( $n=15$ ,  $P=0.95$ )). Правильность результатов подтверждена корреляцией величин АОА (потенциометрический метод) и суммы водорастворимых АО (КЗЭ) кожи группы добровольцев ( $r=0.817$  при  $r_{\text{крит}}=0.410$  для  $n=23$ ,  $P=0.95$ ).

4. Разработан колориметрический сенсор для неинвазивного определения тиолов в коже человека, основанный на изменении цвета сенсора в результате агрегации наночастиц золота под действием тиолов. Разработана методика определения тиолов в коже человека с помощью предложенного колориметрического сенсора. Предел обнаружения –  $6.9 \text{ мкмоль/дм}^3$  глутатиона, линейный диапазон -  $8\text{--}75 \text{ мкмоль/дм}^3$ . Воспроизводимость результатов составила  $S_r \leq 0.09$  в течение дня и  $S_r \leq 0.12$  в разные дни ( $n=5$ ,  $P=0.95$ ). Установлено отсутствие мешающего влияния компонентов гидролипидной мантии (ГЛМ) кожи (аминокислот, продуктов азотистого обмена) на аналитический сигнал. Впервые проведена неинвазивная оценка содержания тиолов в коже добровольцев. Продолжительность процедуры анализа кожи не превышает 9 мин. Правильность результатов определения тиолов в коже оценена методом “введено–найдено”. Мера правильности определения добавок глутатиона, вводимых в раствор экстрагента, варьировалась в диапазоне (90–112) %.

**Методология и методы исследования.** В процессе решения поставленных задач использован комплекс современных физических и физико-химических методов. Синтезированные по методу Туркевича наночастицы золота охарактеризованы методами абсорбционной спектрофотометрии, динамического рассеяния света, просвечивающей электронной микроскопии. Анализ водных экстрактов из кожи человека проведен методом капиллярного зонного электрофореза с УФ детекцией. Исследования по выбору рабочих условий и оценку АОА кожи осуществляли потенциометрическим методом. Фиксацию сигнала колориметрического сенсора выполняли с помощью фотокамеры Olympus FE-340, обработку сигнала - в графическом редакторе PainDotNet и с использованием специально созданной программы обработки фотоизображения.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Теоретические представления о физико-химических процессах, протекающих при потенциометрическом определении АОА кожи человека, и результат сопоставления теоретических и экспериментальных исследований.
2. Потенциометрический сенсор, чувствительным слоем которого является ацетат-целлюлозная мембрана, пропитанная раствором гексацианоферрата (III) калия, и методика неинвазивного потенциометрического определения АОА кожи.
3. Колориметрический сенсор на основе наночастиц золота и методика неинвазивного определения содержания тиолов в коже человека.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность полученных результатов подтверждается большим объемом экспериментального материала, полученным с помощью современных методов анализа на сертифицированном оборудовании, а также сопоставлением полученных результатов с данными независимых методов и литературы.

Основные результаты диссертационной работы представлены на Втором съезде аналитиков России (Москва, 2013), IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной научной школой по органической химии (Уфа, 2013), I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина» (Москва, 2015), 26<sup>ой</sup>, 27<sup>ой</sup> Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2016, 2017), XIX и XX Всероссийском форуме молодых ученых и студентов «Конкурентоспособность территорий» (Екатеринбург, 2016, 2017), IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием и Молодежной научной школе «ЭМА-2016» (Екатеринбург, 2016), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016), Всероссийской «Байкальской школе-конференции по химии – 2017» (Иркутск, 2017), 18<sup>th</sup> ISANH Middle East Antioxidants World Congress (Beirut, Lebanon, 2017).

**Личный вклад соискателя** состоял в постановке и решении основных задач, планировании и проведении экспериментальной работы, систематизации и интерпретации полученных результатов, подготовке научных статей, докладов и выступлений на конференциях.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 3 статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК (2 статьи в журналах, входящих в базы цитирования Scopus и Web of Science, 1 статья – в базу Chemical Abstracts), и тезисы 12 докладов всероссийских и международных конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы из 195 наименований. Работа изложена на 144 страницах, включает 42 рисунка, 22 таблицы, 2 приложения.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 1458 (2014-2016 гг.)) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты № 12-00-14037-Ир (2012 г.); № 13-08-96050-р\_урал\_a (2013-2014 гг.); № 13-03-00285 (2013-2015 гг.); № 16-33-00587 мол\_a (2016-2017 гг.)).

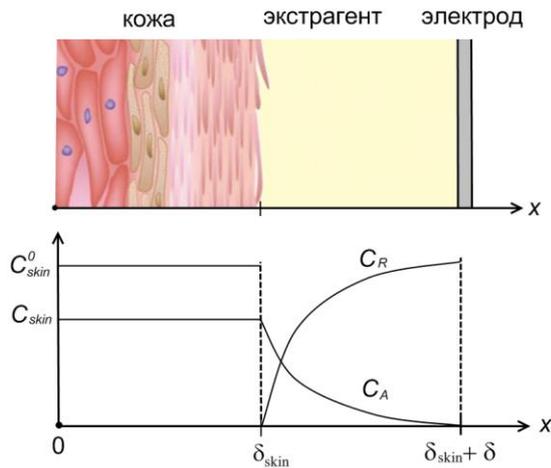
## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** раскрыта актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи, определены научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** обоснован выбор кожи человека как объекта анализа, рассмотрено строение кожи человека как барьера, защищающего организм от неблагоприятного воздействия окружающей среды, основные составляющие антиоксидантной системы защиты кожи человека и методы их определения. Описаны существующие подходы к определению величины АОА и содержания индивидуальных АО в биологических объектах, в том числе подходы с использованием наночастиц. Обоснован выбор наночастиц золота в качестве реагента колориметрического сенсора для оценки содержания тиолов в коже.

Во **второй главе** описаны аппаратура, материалы и реактивы, методика синтеза наночастиц золота. Представлена характеристика синтезированного золя золота методами спектрофотометрии, динамического рассеяния света и просвечивающей электронной микроскопии. Описаны методики потенциметрического определения АОА кожи с использованием геля и медиаторной системы, анализа водных экстрактов из кожи человека методом КЗЭ.

В **третьей главе** представлена математическая модель процессов, протекающих при потенциметрическом определении АОА кожи. Схема процессов и принятые обозначения представлены на рис. 1. Предполагается, что вещество А (АО кожи) диффундирует из кожи через границу контакта в слой экстрагента, где претерпевает химическое превращение с образованием вещества R (восстановленная форма реагента). Концентрация вещества R у рабочей поверхности электрода эквивалентна убыли вещества А (вследствие химического превращения) и напрямую определяет измеряемую величину потенциала. Система “кожа–экстрагент” аппроксимируется двумя контактирующими неограниченными плоскими пластинами, толщины которых  $\delta_{\text{skin}}$  и  $\delta$  – соизмеримые величины.



$C_{skin}^0$  – исходная концентрация АО в эпидермисе;  
 $C_{skin}$  – текущая концентрация АО в эпидермисе;  
 $C_A$  – концентрация АО в экстрагенте;  
 $C_R$  – приращение концентрации реагента (восстановленной формы медиаторной системы  $K_4[Fe(CN)_6]$  в слое экстрагента);  
 $\delta_{skin}$  – толщина слоя эпидермиса кожи;  
 $\delta$  – толщина слоя экстрагента

Рисунок 1 – Схема процессов, протекающих при потенциметрическом определении АОА кожи

Предложенная схема процессов может быть представлена в виде следующей математической модели, описываемой дифференциальными уравнениями в частных производных с соответствующими начальными и граничными условиями (уравнения 1-3):

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C_A}{\partial x^2} - k \cdot C_A; C_A(x, 0) = 0; \frac{\partial C_A}{\partial x}(0, t) = 0; C_A(\delta, t) = C_{skin}(t); \quad (1)$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C_R}{\partial x^2} + k \cdot C_A; C_R(x, 0) = 0; \frac{\partial C_R}{\partial x}(0, t) = \frac{\partial C_R}{\partial x}(\delta, t) = 0; \quad (2)$$

$$\delta_{skin} \cdot \frac{dC_{skin}}{dt} = -D \cdot \frac{\partial C_A}{\partial x}(\delta, t), \quad (3)$$

где  $\delta_{skin}$  – толщина эпидермиса кожи;  $D$  – коэффициент диффузии веществ А и R (в первом приближении считали равными);  $k$  – константа скорости реакции взаимодействия АО кожи с окисленной формой реагента;  $t$  – время.

Для нахождения приближенного решения использован метод интегральных преобразований Лапласа совместно с методом Бубнова–Галеркина. Решение найдено в виде функции относительных концентраций АО в коже ( $C_{skin}/C_{skin}^0$ ) и вещества R у поверхности электрода ( $C_{R(el)}/C_{skin}^0$ ) от трех безразмерных величин  $B_i$ ,  $F_0$ ,  $\gamma$ , представленных в формуле (4):

$$B_i = \frac{k \cdot \delta^2}{D}; F_0 = \frac{D \cdot t}{\delta^2}; \gamma = \frac{\delta}{\delta_{skin}}, \quad (4)$$

где  $B_i$  – модифицированное число Био, равное отношению диффузионного сопротивления ( $R_D = \frac{\delta}{D}$ ) к сопротивлению химической реакции ( $R_k = \frac{1}{k \cdot \delta}$ );  $F_0$  – число Фурье;  $\gamma$  – отношение толщины слоя экстрагента к толщине эпидермиса кожи.

Общий вид зависимости  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  от безразмерных параметров  $B_i$  и  $F_0$  представлен на рис. 2. Зависимость  $C_{skin}/C_{skin}^0$  от  $B_i$  и  $F_0$  имеет аналогичный вид.

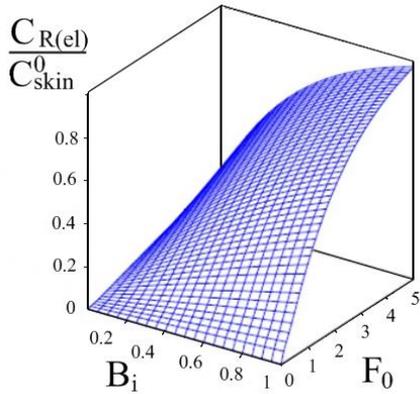


Рисунок 2 – Зависимость  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  от безразмерных параметров  $B_i$  и  $F_0$

Таким образом, величина  $C_{R(el)}$ , отражающая изменение концентрации реагента  $R$  на границе экстрагент-электрод, определяется величинами скоростей диффузионного отвода АО от поверхности раздела «кожа–экстрагент» и химического взаимодействия АО с  $K_3[Fe(CN)_6]$  в среде экстрагента, толщины слоя экстрагента и кожи, длительности измерения.

Для определения констант скоростей химической реакции взаимодействия АО кожи (аскорбиновой и мочевой кислот, глутатиона) с окисленной формой медиаторной системы в среде геля использовали методику, представленную в работе [1]. При этом полагали, что порядок реакции равен 1, поскольку гексацианоферрат (III) калия в геле присутствовал в большом избытке, и его концентрация практически не изменялась в ходе реакции взаимодействия с АО. Это предположение подтвердилось результатами эксперимента, согласно которым на период полураспада исследованных АО их начальная концентрация не повлияла. Рассчитанные величины констант скоростей взаимодействия аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты и глутатиона с  $K_3[Fe(CN)_6]$  в геле составили  $0.01 \text{ с}^{-1}$ ,  $0.004 \text{ с}^{-1}$  и  $5 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ , соответственно. Следует отметить, что полученные величины на порядок меньше, чем константы скорости реакции вышеперечисленных АО с  $K_3[Fe(CN)_6]$  в водном растворе.

Рассчитанные величины констант скоростей ( $k$ ) взаимодействия АО кожи с  $K_3[Fe(CN)_6]$  в геле использовали при построении теоретических зависимостей  $C_{skin}/C_{skin}^0$  и  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  от  $t$ ,  $\delta_{skin}$ ,  $\delta_{gel}$  при разных сочетаниях величин коэффициента диффузии ( $D$ ) и  $k$ . Зависимости  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  от  $t$  для  $D=10^{-4} \text{ см}^2\text{с}^{-1}$  и  $D=2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2\text{с}^{-1}$  при  $\delta_{skin}=0.1 \text{ мм}$ ,  $\delta_{gel}=0.1 \text{ мм}$  оказались одинаковыми, поэтому было сделано заключение о том, что коэффициент диффузии практически не влияет на  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$ . Зависимости  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  от толщины кожи ( $\delta_{skin}$ ) при фиксированных значениях  $t$  (600 и 1000 с) имеют максимум вблизи 0.15 мм, а затем монотонно убывают с увеличением  $\delta_{skin}$ . На рис. 3 представлена теоретическая зависимость  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  от  $t$ , различные значения  $k$  по порядку величины соответствуют разным АО: аскорбиновой кислоте, мочевой кислоте и глутатиону (рис. 3, кривые 1, 2 и 3, соответственно).

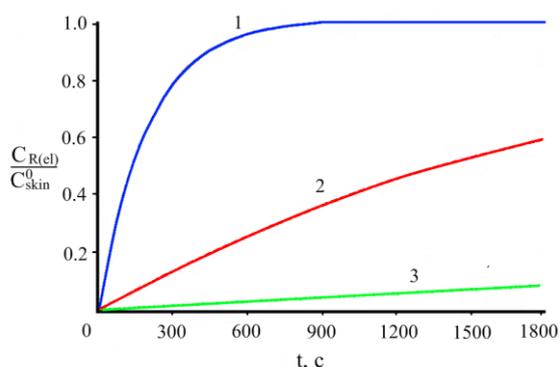


Рисунок 3 – Рассчитанная временная зависимость  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  для различных констант скоростей ( $k$ ):  $k=0.01 \text{ c}^{-1}$  (кривая 1),  $k=0.001 \text{ c}^{-1}$  (2),  $k=1 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$  (3);  $D=2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \text{ c}^{-1}$ ,  $\delta_{skin}=0.1 \text{ мм}$ ,  $\delta_{gel}=0.1 \text{ мм}$

Легко видеть, что величина  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  возрастает во времени (рис. 3). Более того, в данный момент времени величина  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  тем больше, чем больше константа скорости реакции. Как видно из рис. 3 (кривая 1), даже при высокой скорости взаимодействия требуется длительное измерение для наиболее полного извлечения АО из кожи в среду геля.

Для доказательства адекватности теоретических представлений было выполнено их сравнение с экспериментальными результатами. На рис. 4 представлены рассчитанная и экспериментальная зависимости относительной концентрации вещества R у поверхности электрода ( $C_{R(el)}/C_{skin}^0$ ) от толщины слоя геля ( $\delta_{gel}$ ). Наблюдается хорошее соответствие результатов. Относительная концентрация  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  стремится к 1 (т.е. определяемая АОО кожи ближе к истинной) в том случае, когда толщина слоя экстрагирующей среды минимальна и близка к толщине эпидермиса кожи ( $\delta_{skin}=0.1 \text{ мм}$ ).

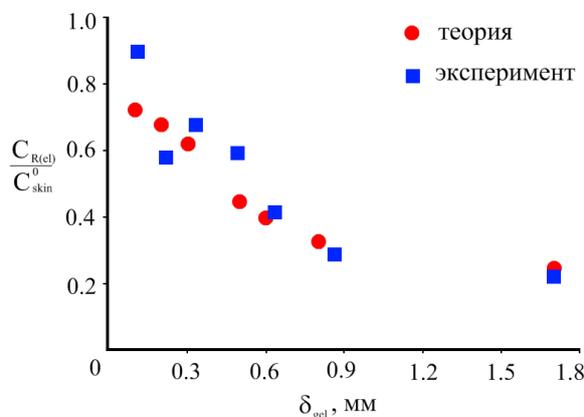


Рисунок 4 – Рассчитанная (●) и экспериментальная (■) зависимость  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  от толщины слоя геля;  $k=0.01 \text{ c}^{-1}$ ;  $D=2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \text{ c}^{-1}$ ,  $\delta_{skin}=0.1 \text{ мм}$

На рис. 5 представлены экспериментальная и теоретическая зависимости  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  от  $t$ . Видно, что экспериментальная кривая близка к теоретической в случае, когда константа скорости химической реакции между АО и  $K_3[Fe(CN)_6]$  в геле равна  $0.01 \text{ c}^{-1}$ . Такую скорость имеет химическая реакция аскорбиновой кислоты с  $K_3[Fe(CN)_6]$  в геле. Глутатион реагирует с гексацианоферратом (III) калия намного медленнее ( $k=5 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ ). В результате вклад глутатиона в образование потенциалоопределяющего вещества и, следовательно, в сигнал, оказывается меньше, чем вклад аскорбиновой кислоты. Это согласуется с литературными данными, согласно которым глутатион в эпидермисе кожи человека присутствует в низкой концентрации (около 7% от суммарного содержания водорастворимых АО в коже).

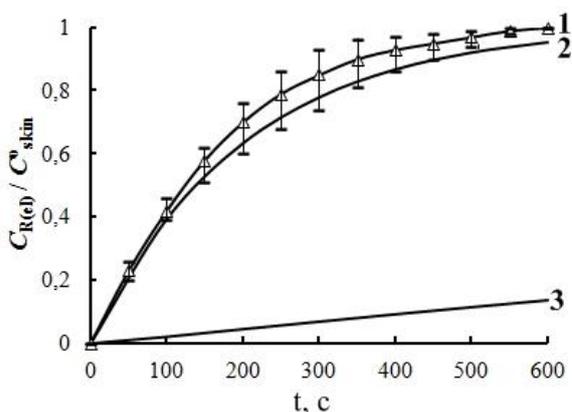


Рисунок 5 – Зависимость  $C_{R(el)}/C_{skin}^0$  от  $t$ : экспериментальная кривая – средние значения и разброс величин (1) и рассчитанные кривые (2 –  $k=0.01 \text{ c}^{-1}$  и 3 –  $k=5 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ )

Исходя из предложенных теоретических представлений, можно сформулировать основные пути развития существующего потенциометрического метода определения АОА кожи:

- сокращение продолжительности измерения;
- уменьшение толщины слоя экстрагента до величины, близкой к толщине эпидермиса кожи;
- увеличение вклада АО кожи, медленно реагирующих с  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , в величину регистрируемого сигнала за счет замены геля на менее вязкую среду.

Кроме того, необходимо решение проблемы низкой стабильности смеси геля с медиаторной системой.

**Четвертая глава** посвящена разработке потенциометрического сенсора для неинвазивного определения АОА кожи, чувствительный слой которого обеспечивает экстракцию АО из кожи, химическое взаимодействие АО с реагентом, потенциометрический отклик на присутствие АО.

*Замена геля с медиаторной системой.* При выборе реагента чувствительного слоя сенсора для определения АОА руководствовались следующими критериями:

- величина Red/Ox потенциала реагента должна быть меньше потенциала пары окисленная/восстановленная форма активных кислородных метаболитов, но больше потенциала пары  $\text{AO}_{\text{Ox}}/\text{AO}$ ;
- достаточная скорость и стехиометричность химической реакции реагента с основными АО кожи;
- сдвиг потенциала окислительно-восстановительной пары, возникающей при взаимодействии АО с реагентом-окислителем, при изменении концентрации АО должен подчиняться уравнению Нернста, величина этого потенциала должна быстро устанавливаться и быть стабильной во времени.

Гексацианоферрат (III) калия удовлетворяет предъявляемым требованиям в полной мере.

В качестве носителя раствора  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  исследованы следующие материалы:

- бумажный фильтр, изготовленный из целлюлозы сульфатной предгидролизной, обеззоленный, «Синяя лента», диаметр пор – 3-5 мкм;
- микропористый плёночный материал, изготовленный на основе смеси ацетатов целлюлозы общей пористостью 80-85%, диаметр пор 0.45, 0.8 и 1.2 мкм;

- мембрана фторопластовая гидрофильная, диаметр пор – 0.6 мкм.

Выбранные фильтры обладают гидрофильностью, дешевизной и доступностью, химической устойчивостью к широкому кругу соединений, удобством в использовании. Возможность использования фильтров в потенциометрическом измерении оценивали по следующим критериям:

1. хорошее и быстрое смачивание фильтра раствором;
2. отсутствие взаимодействия с  $K_3[Fe(CN)_6]$ ;
3. быстрое установление (1-2 мин) и стабильность во времени (за 10 мин измерения разброс величины потенциала не должен превышать 5 мВ) потенциала рабочего электрода в растворе, содержащем  $K_3[Fe(CN)_6]$  и  $K_4[Fe(CN)_6]$ .

Предъявляемым требованиям в полной мере удовлетворял фильтр из ацетата целлюлозы с диаметром пор 0.45 мкм. Выбранный фильтр имеет толщину ( $0.16 \pm 0.02$ ) мм, близкую к толщине эпидермиса кожи человека (0.1 мм). Таким образом, чувствительный слой потенциометрического сенсора представлял собой ацетатцеллюлозную мембрану, пропитанную раствором гексацианоферрата (III) калия.

*Выбор рабочих условий.* Исследована возможность использования в качестве нейтрального электролита следующих растворов:

- 1 моль/дм<sup>3</sup> KCl, применявшийся ранее в методике с гелем;
- 0.15 моль/дм<sup>3</sup> (физиологический раствор) NaCl и 1 моль/дм<sup>3</sup> NaCl.

Полученные результаты представлены на рис. 6.

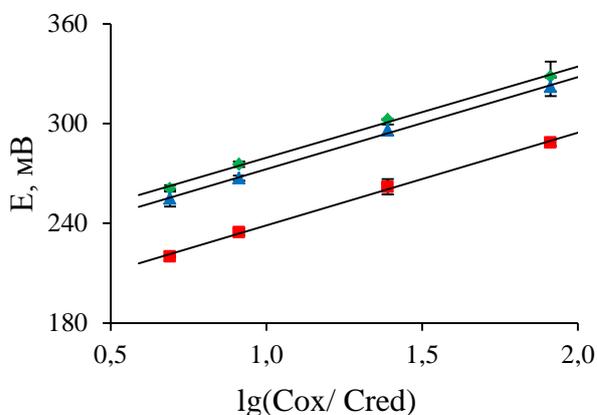


Рисунок 6 - Зависимость потенциала от логарифма отношения концентраций  $K_3[Fe(CN)_6]$  и  $K_4[Fe(CN)_6]$  в растворе. Фоновый раствор: KCl 1 моль/дм<sup>3</sup> (◆); NaCl 0.15 моль/дм<sup>3</sup> (■); NaCl 1 моль/дм<sup>3</sup> (▲)

В качестве фонового электролита выбран 1 моль/дм<sup>3</sup> раствор NaCl. Выбор обусловлен биосовместимостью хлорида натрия и близостью наклона зависимости в координатах  $E - \lg(C_{ox}/C_{red})$  к теоретическому ( $\alpha_{экср} = 55.5$ ,  $\alpha_{теор} = 58.98$  при 24°C),  $r = 0.999$ . Предпочтение отдано более концентрированному раствору NaCl (1 моль/дм<sup>3</sup>), поскольку при меньшей концентрации электролита разброс значений потенциала за время измерения достигал 13 мВ.

Исследована зависимость АОА кожи от времени выдерживания ацетатно-целлюлозного фильтра в растворе  $K_3[Fe(CN)_6]$ . При выдерживании фильтра в растворе  $K_3[Fe(CN)_6]$  в течение 15 с наблюдалась не полная его пропитка и большой разброс в полученных значениях АОА кожи. Выдерживание фильтра в растворе в течение 10 мин приводило к излишнему набуханию и разрыхлению материала

фильтра, его неустойчивости к механическому воздействию. Оптимальное время выдерживания составило 3-5 мин.

*Аналитические характеристики.* В выбранных рабочих условиях линейность градуировочной зависимости в координатах потенциал – логарифм соотношения концентраций гексацианоферрат (III)/гексацианоферрат (II) анионов сохранялась в диапазоне  $2 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-3}$  моль-экв/дм<sup>3</sup>. Наклон графика составил 59.2 (мВ), что близко к теоретической величине наклона (58.98 при 24°C),  $r = 0.999$ . Таким образом, суммарную концентрацию АО (АОА, моль-экв/дм<sup>3</sup>), вступивших в реакцию с  $K_3[Fe(CN)_6]$  по нижеприведенному уравнению, определяли по формуле (5), используя уравнение градуировочной зависимости:

$$[Fe(CN)_6]^{3-} + AO = [Fe(CN)_6]^{4-} + AO_{Ox}$$

$$AOA = \frac{C_{Ox}}{1 + 10^{(E - E_{эксп})/\alpha_{эксп}}} \quad (5),$$

где  $C_{Ox}$  – исходная концентрация  $K_3[Fe(CN)_6]$  в растворе, 0.005 моль/дм<sup>3</sup>;  $E$  – потенциал системы в присутствии АО, В;  $E_{эксп} = 212.9$  мВ;  $\alpha_{эксп} = 59.2$  мВ.

Правильность определения АОА с использованием разработанного сенсора оценивали методом “введено – найдено” (табл. 1). Величина меры правильности варьировалась в диапазоне 89–101 %.

Таблица 1 – Результаты оценки правильности определения АОА модельных растворов аскорбиновой кислоты методом “введено–найденно” с помощью потенциометрического сенсора (n=6, P=0.95)

Введено, $\cdot 10^4$ , моль-экв/дм <sup>3</sup>	Найдено, $\cdot 10^4$ , моль-экв/дм <sup>3</sup>	$S_r$	R, %
0.40	0.36±0.03	0.07	90
1.00	0.89±0.02	0.02	89
4.0	3.6±0.1	0.02	90
8.0	7.3±0.3	0.04	91
40.0	40.6±0.4	0.008	101

Исследовали влияние компонентов ГЛМ кожи – аминокислот серина, глицина, аланина, гистидина, треонина, пролина, лейцина, валина, изолейцина, фенилаланина, аспарагина, тирозина, триптофана и продуктов азотистого обмена (мочевина, аммиак, мочевая кислота, креатинин) – на потенциометрический сигнал. Для этого сравнивали градуировочную зависимость, построенную в присутствии мешающих компонентов и в их отсутствии (рис. 7). Состав смеси мешающих компонентов рассчитывали по литературным данным, исходя из состава экстрактов из кожи [2,3]. Как видно из рис. 7, перечисленные соединения не оказывают мешающего влияния на измеряемую величину потенциала.

*Хранение раствора гексацианоферрата (III) калия.* Установлено, что смесь геля с медиаторной системой не подлежит хранению: за 7 дней хранения в темном месте потенциал смеси изменился на 7 % относительно свежеприготовленной системы, что составляет около 22 мВ. Раствор  $K_3[Fe(CN)_6]$  обладает лучшей устойчивостью при хранении. Обнаружено, что при хранении раствора, содержащего

0.005 моль/дм<sup>3</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] и 1 моль/дм<sup>3</sup> NaCl, в темном месте при комнатной температуре в течение 3 дней коэффициенты градуировочной зависимости изменились не более, чем на 1.2 %, а при хранении в темном месте при 6°C в течение 7 дней – не более, чем на 1.5 %.

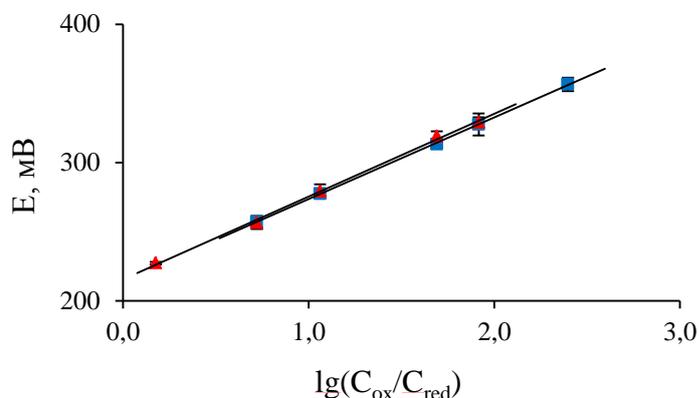


Рисунок 7 – Градуировочная зависимость, полученная в присутствии компонентов ГЛМ кожи (▲) и в их отсутствии (■) (n=5; P=0.95)

*Анализ кожи респондентов.* Для фиксации сенсора на поверхности кожи использовали манжету тонометра (давление в манжете 35 – 40 мм.рт.ст.) (рис. 8).

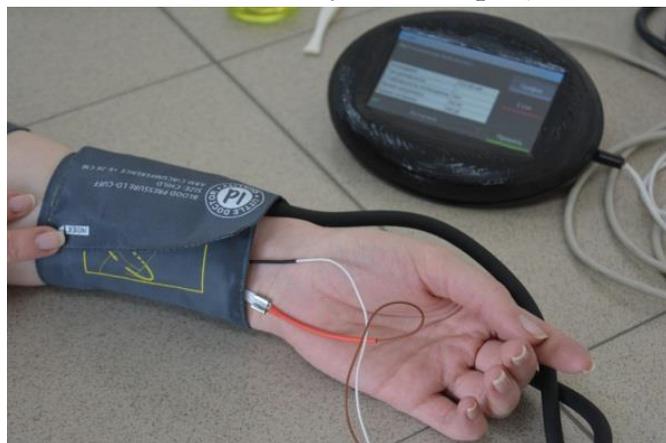


Рисунок 8 – Фотоизображение процесса измерения АОА кожи

С использованием разработанного сенсора исследована АОА кожи группы добровольцев (n=15, возраст 20-86 лет, относительно здоровые, женщины и мужчины). Полученные значения АОА варьировались в диапазоне 32.4 – 307 мкмоль-эquiv/дм<sup>3</sup>. Воспроизводимость величин АОА кожи в течение дня составила S<sub>r</sub> от 0.06 до 0.08, в разные дни (временной интервал исследования – 5 дней) – S<sub>r</sub> от 0.08 до 0.13. Полученные величины

меры правильности определения добавок (табл. 2) позволяют говорить об отсутствии существенных матричных эффектов при определении АОА кожи с помощью разработанного сенсора.

Таблица 2 – Результаты оценки правильности определения АОА кожи с помощью потенциометрического сенсора (n=5, P=0.95)

Респондент	Проба, ·10 <sup>5</sup> моль-эquiv/дм <sup>3</sup>	Введено, ·10 <sup>5</sup> моль-эquiv/дм <sup>3</sup>	Найдено, ·10 <sup>5</sup> моль-эquiv/дм <sup>3</sup>	R, %
1	6.3±0.5	10.0*	17±1	107
2	4.9±0.3	10.0*	15.1±0.2	102
3	12±2	10.0*	21±2	90
4	6.5±0.7	4.0**	9.8±0.4	83
5	7.6±0.2	4.0**	12±1	110
6	11±2	10.0**	21±2	100

\*добавка аскорбиновой кислоты, \*\* добавка гексацианоферрата (II) калия

*Анализ кожи методами КЗЭ и потенциометрии.* Проведен анализ водного экстракта из кожи 23 добровольцев методом КЗЭ с УФ детекцией и АОА их кожи потенциометрическим методом. Установлено, что результаты двух методов статистически достоверно коррелируют ( $r=0.817$  при  $r_{крит}=0.410$  для  $n=23$  и  $P=0.95$ ). Рассчитанное значение F-критерия меньше критического значения, что говорит о равнозначности методов КЗЭ и потенциометрии ( $F_{эксп} = 1.84$ ,  $F_{табл} (f_1=22, f_2=22, P=0.95) = 2.05$ ). Величина t-критерия говорит об отсутствии значимых различий между средними значениями двух выборок результатов анализа, полученных методом КЗЭ и потенциометрии ( $t_{эксп} = 0.35$ ,  $t_{табл} (f = 21, P = 0.95) = 2.08$ ).

Содержание мочевой кислоты, обнаруженное методом КЗЭ во всех анализируемых экстрактах из кожи, составило от  $1.95 \cdot 10^{-6}$  до  $4.4 \cdot 10^{-5}$  моль/дм<sup>3</sup>. Аскорбиновая кислота найдена только в двух пробах в количестве  $5.1 \cdot 10^{-6}$  и  $1.8 \cdot 10^{-5}$  моль/дм<sup>3</sup>. Результаты КЗЭ анализа позволяют заключить, что в поверхностных слоях кожи человека основным водорастворимым антиоксидантом является мочевая кислота. Полученный результат согласуется с известными механизмами восстановления одних АО кожи другими. Так, аскорбат-ион способен восстанавливать окисленную форму урата, но не наоборот. В связи с этим поверхностные слои кожи оказываются обеднены аскорбиновой кислотой, особенно в стресс-условиях.

*Анализ кожи дерматологических больных.* Потенциометрическим методом проведена оценка АОА кожи больных доброкачественными хроническими дерматозами (атопический дерматит, псориаз) и первичными кожными Т-клеточными лимфомами (грибовидный микоз ИВ-ПА ст.) на участках поврежденной и неповрежденной кожи ( $n=14$ ), в сравнении с группой условно здоровых людей ( $n=10$ ) (рис. 9).

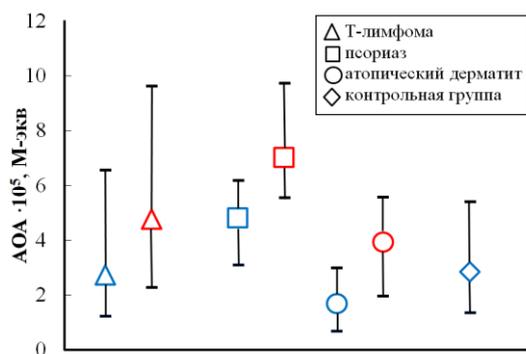


Рисунок 9 - АОА кожи больных дерматозами (синим цветом обозначены АОА неповрежденных участков кожи, красным – поврежденных участков) и АОА кожи условно здоровых респондентов. Результат по каждой группе респондентов представлен в виде среднего значения АОА и размаха полученных величин

АОА здоровых и поврежденных участков кожи исследованной группы респондентов составила:  $АОА_{здор.} = 4.79 \cdot 10^{-5}$  моль-экв/дм<sup>3</sup>;  $АОА_{поврежд.} = 7.01 \cdot 10^{-5}$  моль-экв/дм<sup>3</sup> (псориаз);  $АОА_{здор.} = 1.68 \cdot 10^{-5}$  моль-экв/дм<sup>3</sup>,  $АОА_{поврежд.} = 3.93 \cdot 10^{-5}$  моль-экв/дм<sup>3</sup> (атопический дерматит);  $АОА_{здор.} = 2.73 \cdot 10^{-5}$  моль-экв/дм<sup>3</sup>,  $АОА_{поврежд.} = 4.77 \cdot 10^{-5}$  моль-экв/дм<sup>3</sup> (грибовидный микоз);  $АОА = 2.85 \cdot 10^{-5}$  моль-экв/дм<sup>3</sup> (условно здоровые). АОА поврежденных участков кожи для каждого заболевания оказалась выше, чем АОА неповрежденных участков. Повышение уровня АО в поврежденной коже, вероятно,

обусловлено необходимостью связывания избытка активных форм кислорода. АОО поврежденной и неповрежденной кожи больных псориазом выше, чем АОО кожи контрольной группы и группы больных атопическим дерматитом. Полученный результат может быть объяснен характерным для псориаза повышенным уровнем фермента хсантиноксидазы, катализирующего окисление гипоксантина в ксантин, а затем ксантин – в мочевую кислоту. Этот результат согласуется с опубликованными данными [4].

В **пятой главе** приведены результаты разработки колориметрического сенсора для неинвазивного определения тиолов в коже человека.

*Индикаторная реакция.* В основу разработки колориметрического сенсора заложено контрастное изменение его цвета с красного на синий, происходящее в результате агрегации наночастиц золота (Au НЧ) под действием тиолов. Биотиолы вследствие сильного сродства серы к золоту способны ковалентно связываться тиольной группой (-SH) с наночастицей (НЧ). Возможной причиной агрегации НЧ является образование водородных связей между атомами кислорода и водорода концевых карбоксильных групп биотиола, связанных с двумя разными НЧ.

Приготовление сенсора и процедура анализа схематично представлена на рис. 10.

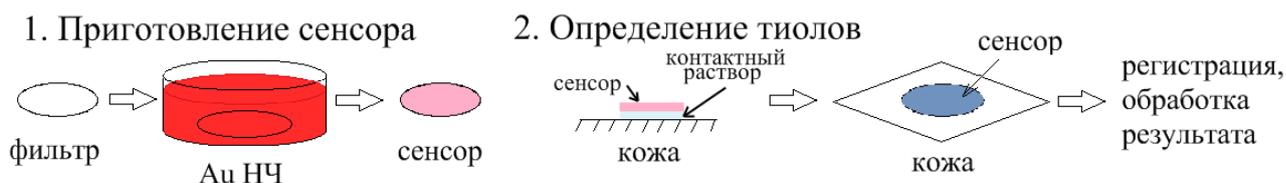


Рисунок 10 - Схематичное изображение процедуры приготовления колориметрического сенсора и определения биотиолов

Изменение цвета сенсора, происходящее в результате агрегации Au НЧ под действием тиола, представлено на рис. 11.

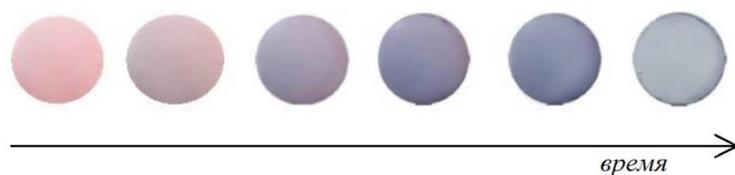


Рисунок 11 - Фотоизображения изменения цвета колориметрического сенсора в зависимости от времени взаимодействия с глутатионом ( $C_{\text{глутатион}} = 10 \text{ мкмоль/дм}^3$ )

Регистрация цвета сенсора выполнена с помощью цифрового фотоаппарата Olympus FE-340. Обработку фотоизображений выполняли с помощью специально разработанной для этих исследований компьютерной программы.

*Выбор условий формирования сенсора.* В ходе исследования варьировали следующие параметры: реагент, подложка, условия сорбции. Выбор реагента, Au НЧ сферической формы диаметром 10-15 нм, обусловлен следующими факторами: высоким сродством серы тиольной группы (-SH) к золоту, высоким коэффициентом экстинкции золя золота, биосовместимостью наночастиц (в литературе показано, что

НЧ выбранного размера и формы не способны преодолевать кожный барьер и вызывать токсические поражения клеток).

В качестве подложки для сенсора рассматривали пористый мембранный материал на основе ацетата целлюлозы (размер пор от 0.05 до 1.2 мкм) и беззольный бумажный фильтр (размер пор 2-3 мкм). Выбор материалов обусловлен их гидрофильностью, дешевизной и доступностью, химической устойчивостью к большому числу соединений, отсутствием окраски (белым цветом), хорошими сорбционными свойствами, удобством в использовании. В проведенном исследовании были исключены из рассмотрения бумажный фильтр по причине агрегации Au НЧ при контакте с ним и ацетатцеллюлозный фильтр с размером пор более 0.8 мкм из-за плохой смачиваемости золей золота. Оптимальный размер пор фильтра из ацетата целлюлозы составил 0.45 мкм. Установлено, что физическая сорбция Au НЧ на таком фильтре происходит без значительного изменения размеров НЧ, поскольку в процессе выдерживания фильтра в золе золота не наблюдалось изменения исходного красного цвета золя.

Выбор условий выдерживания материала подложки в коллоидном растворе золота включал режим и время выдерживания, концентрацию НЧ в золе. Для модифицирования подложки выбран наиболее простой и распространённый способ – физическая сорбция реагента в статическом режиме. Исследовано влияние количества Au НЧ, нанесённых на подложку, на колориметрический сигнал. Об эффективности тест-системы с различным количеством НЧ судили по интенсивности ее окраски до и после взаимодействия с глутатионом, поскольку он является основным тиолом кожи. В качестве отклика сенсора использовали величину  $\Delta(B/R)$ , равную разности отношения интенсивностей синего ( $B$ ) канала фотоизображения сенсора к красному ( $R$ ) в присутствии тиола и отношения интенсивностей ( $B/R$ ) для холостого опыта. Концентрацию НЧ в золе варьировали путем разбавления исходного золя концентрацией  $1.95 \cdot 10^{13}$  нч/см<sup>3</sup>. При разбавлении золя золота до концентраций  $6.50 \cdot 10^{12}$ ,  $3.25 \cdot 10^{12}$  и  $2.17 \cdot 10^{12}$  НЧ/см<sup>3</sup> контрастность цветового перехода становилась низкой, что не позволило использовать систему в анализе.

Кроме того, исходный золь использовали для пропитки подложки в течение различных интервалов времени, результат иллюстрирует рис. 12. При времени выдерживания 3 и 20 мин. сенсор утрачивал способность реагировать с глутатионом. Оптимальное время выдерживания составило 5-15 мин.

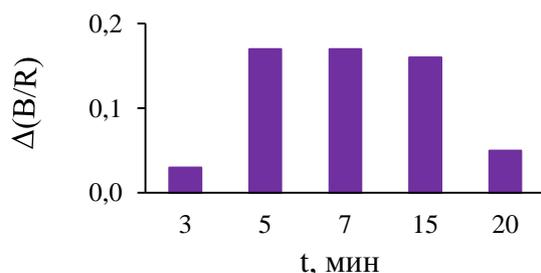


Рисунок 12 - Зависимость сигнала сенсора от времени выдерживания материала подложки в красном золе золота (концентрация золя золота  $1.95 \cdot 10^{13}$  нч/см<sup>3</sup>,  $C_{\text{глутатион}} = 10$  мкмоль/дм<sup>3</sup>)

*Выбор рабочих условий анализа.* Все эксперименты по выбору рабочих условий методики определения тиолов проводили на растворах, моделирующих состав

водного экстракта из кожи человека, следующего состава:  $C_{\text{NaCl}}=5$  ммоль/дм<sup>3</sup>,  $C(\text{аскорбиновая кислота})=100$  мкмоль/дм<sup>3</sup>,  $C(\text{мочевая кислота})=40$  мкмоль/дм<sup>3</sup>, рН=3.5-4, содержание глутатиона в модельном растворе варьировали от 0 до 90 мкмоль/дм<sup>3</sup>. Согласно литературным данным [5], основным тиолом кожи является глутатион, поэтому он был выбран в качестве модельного тиола.

Влияние кислотности исследовали в диапазоне рН =3.3–5.0, что соответствует физиологическому диапазону рН кожи (4–6). Оптимальное значение рН составило 3.4, что согласуется с литературными данными [6].

Мешающее влияние компонентов ГЛМ кожи (аминокислот и продуктов азотистого обмена) оценивали путем сравнения окраски сенсора до и после внесения каждого компонента. Концентрацию мешающих компонентов в растворе рассчитывали, исходя из литературных данных [2,3]. Установлено отсутствие значительного влияния на интенсивность окраски сенсора серина, аланина, гистидина, треонина, креатинина, мочевины и аммиака (концентрация  $10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>); глицина, пролина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, аспарагина (концентрация  $10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>); и валина, триптофана, тирозина и мочевой кислоты (концентрация  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/дм<sup>3</sup>).

*Аналитические характеристики.* Рис. 13 демонстрирует, что зависимость сигнала в единицах  $\Delta(B/R)$  от концентрации глутатиона линейна в диапазоне концентраций 8-75 мкмоль/дм<sup>3</sup>,  $r = 0.9813$ . Таким образом, фиксируемый сигнал может быть использован в качестве аналитического. Правильность определения глутатиона в модельных растворах с помощью разработанного колориметрического сенсора оценивали методом “введено–найдено”. Величины меры правильности варьировались в диапазоне (94–124)%, относительное стандартное отклонение не превышало 0.09 для результатов, выполненных в течение дня, и  $S_r \leq 0.12$  – для результатов разных дней ( $n=5$ ,  $P=0.95$ ). Рассчитанный предел обнаружения составил 6.9 мкмоль/дм<sup>3</sup>.

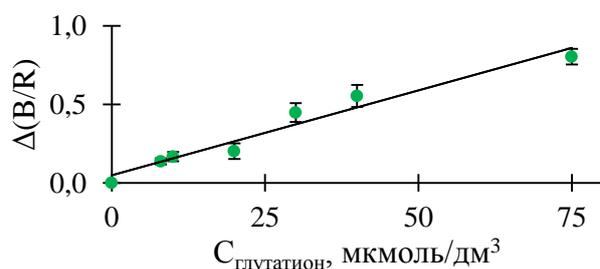


Рисунок 13 – Зависимость аналитического сигнала  $\Delta(B/R)$  от концентрации глутатиона в модельном растворе

*Анализ кожи респондентов.* Содержание тиолов в коже группы добровольцев ( $n=12$ , возраст 21-65 лет, мужчины и женщины), определенное неинвазивно с помощью предложенного колориметрического сенсора методом стандартных добавок, составило 11.6 – 47.5 мкмоль/дм<sup>3</sup>. Правильность определения тиолов в коже человека с помощью разработанного колориметрического сенсора оценивали методом “введено–найдено”, результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3 - Результаты оценки правильности определения тиолов в коже человека с помощью колориметрического сенсора (n=5, P=0.95)

Респондент	Проба, мкмоль/дм <sup>3</sup>	Введена добавка в пробу, мкмоль/дм <sup>3</sup>	Найдено в пробе, мкмоль/дм <sup>3</sup>	R, %
1	15.1±0.4	5.0	19.6±0.8	90
2	23.8±0.5	10.0	35±7	112
3	41.2±0.6	10.0	52±4	108

Мера правильности результатов открытия добавки глутатиона в экспериментах на коже респондентов составила (90–112) %. Полученные результаты не противоречат литературным данным о физиологическом содержании тиолов в коже человека, которое определяли инвазивно спектрофотометрическим методом (пересчитанная величина  $C_{cp}(\text{глутатион})=5.6 \cdot 10^{-5}$  моль/дм<sup>3</sup> [5]).

### ВЫВОДЫ

1. Разработана математическая модель физико-химических процессов, протекающих при потенциометрическом определении АОА кожи. Модель учитывает диффузию АО из кожи в слой экстрагента и их взаимодействие с медиаторной системой. Адекватность модели подтверждена хорошей согласованностью теоретических и экспериментальных данных.

2. На основе развитых теоретических представлений сформулировано направление дальнейшего развития потенциометрического метода определения АОА кожи, которое включает сокращение времени анализа, уменьшение толщины слоя экстрагента. Обоснована замена геля с медиаторной системой на водный раствор гексацианоферрата (III) калия.

3. Разработан потенциометрический сенсор для неинвазивного определения АОА кожи человека. Чувствительный слой сенсора состоит из ацетатцеллюлозного материала, пропитанного раствором гексацианоферрата (III) калия. Разработана методика определения АОА кожи человека с помощью потенциометрического сенсора, преимущества которой заключаются в сокращении процедуры анализа и ее упрощении, увеличении устойчивости системы при хранении (в 7 раз), лучшей воспроизводимости результатов анализа кожи (в течение дня  $S_r \leq 0.08$ , в разные дни  $S_r \leq 0.13$ ). Диапазон определяемых величин – 20-4000 мкмоль-экв/дм<sup>3</sup>. Мера правильности определения АОА кожи, оцененная методом добавок, составила (83–110) %.

4. Установлено, что основным водорастворимым АО, обнаруженным методом КЗЭ в водном экстракте из кожи человека, является мочевиная кислота. Она, предположительно, вносит основной вклад в величину АОА кожи, определяемую потенциометрически.

5. С использованием разработанного потенциометрического сенсора установлены достоверные отличия между величинами АОА поврежденных и здоровых участков кожи группы дерматологических больных (атопический дерматит,

псориаз, грибковидный микоз), между АОА кожи больных псориазом и кожи других респондентов.

6. Разработан колориметрический сенсор для неинвазивного определения тиолов в коже, основанный на изменении цвета сенсора в результате агрегации наночастиц золота под действием тиолов. Разработана методика определения тиолов в коже человека с помощью предложенного колориметрического сенсора. Предел обнаружения –  $6.9 \text{ мкмоль/дм}^3$  глутатиона, линейный диапазон –  $8.0\text{--}75 \text{ мкмоль/дм}^3$ . Воспроизводимость результатов составила  $S_r \leq 0.09$  в течение дня и  $S_r \leq 0.12$  в разные дни ( $n=5$ ,  $P=0.95$ ). Установлено отсутствие мешающего влияния компонентов гидролипидной мантии (ГЛМ) кожи (аминокислот, продуктов азотистого обмена) на аналитический сигнал. Впервые проведена неинвазивная оценка содержания тиолов в коже добровольцев. Продолжительность процедуры анализа кожи не превышает 9 мин. Правильность результатов определения тиолов в коже оценена методом “введено–найдено”. Мера правильности определения добавок глутатиона, вводимых в раствор экстрагента, варьировалась в пределах (90–112) %.

**Перспективы дальнейшей разработки темы** заключаются в создании портативных устройств, в основе которых будут лежать разработанные потенциометрический и колориметрический сенсоры. Исследование антиоксидантных показателей кожи (АОА и содержания тиолов) условно здоровых людей и людей с патологиями, установление диагностических критериев и значений нормы. Такие параметры, как чувствительность, экспрессность, возможность использования в полевых условиях позволяют рассматривать предложенные подходы как перспективную стратегию мониторинга антиоксидантных свойств кожи. Развитие методов неинвазивной оценки антиоксидантных свойств кожи впервые позволит осуществлять массовый скрининг населения, сделает более доступным с экономической и технической точки зрения процесс массовой диспансеризации населения, своевременно и целенаправленно применять меры первичной профилактики основных социально значимых заболеваний.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНО В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ:

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

1. **Markina, M.G.** Mathematical modelling and numerical simulation of the processes in noninvasive potentiometric method of evaluating anti-oxidant/oxidant state of skin/ Kh.Z. Brainina, L.G. Galperin, M.G. Markina, N.Yu. Stozhko // *Advances in Analytical Chemistry*. – 2013. – V. 3, № 3A. – P. 1–8. (0.5 п.л./0.125 п.л.).

2. **Markina, M.G.** Determination of Antioxidants in Human Skin by Capillary Zone Electrophoresis and Potentiometry / M.G. Markina, E.L. Lebedeva, L.K. Neudachina, N.Yu. Stozhko, Kh.Z. Brainina // *Analytical Letters*. – 2016. – V. 49, № 12. – P. 1804–1815. (0.75 п.л./0.25 п.л.).

3. **Markina, M.G.** Nanoparticle-based paper sensor for thiols evaluation in human skin / M.G. Markina, N.Yu. Stozhko, V.G. Krylov, M.B. Vidrevich, Kh.Z. Brainina // *Talanta*. – 2017. – V 165. – P. 563–569 (0.44 п.л./0.2 п.л.).

***Материалы научных конференций, конгрессов и симпозиумов:***

4. Варзакова, Д.П. Потенциометрический метод оценки антиоксидантной активности кожи / Д.П. Варзакова, Е.Л. Герасимова, **М.Г. Маркина**, Е.В. Викулова // Тезисы докладов IX Всероссийской конференции с молодёжной научной школой по органической химии «Химия и медицина». Уфа-Абзаково, 2013. – С. 151 (0.06 п.л./0.015 п.л.).

5. Брайнина, Х.З. Неинвазивный метод оценки оксидант/антиоксидантной активности кожи / Х.З. Брайнина, Д.П. Варзакова, Е.Л. Герасимова, **М.Г. Маркина**, Е.В. Викулова, Л.А. Судакова, Я.Е. Казаков, Л.Г. Гальперин // Тезисы докладов Второго съезда аналитиков России. Москва, 2013. – С. 444 (0.06 п.л./0.015 п.л.).

6. Лебедева, Е.Л. Неинвазивное определение антиоксидантов в коже человека / Е.Л. Лебедева, Л.К. Неудачина, **М.Г. Маркина**, Н.Ю. Стожко, Х.З. Брайнина // Сборник тезисов I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина». Москва, 2015. – С. 40 (0.06 п.л./0.015 п.л.).

7. **Маркина, М.Г.** Фотоиндикация сигнала тест-системы / Е.О. Юрова, М.Г. Маркина // Тезисы докладов 26<sup>ой</sup> Российской молодёжной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». Екатеринбург, 2016. – С. 199–200 (0.125 п.л./0.06 п.л.).

8. Лебедева, Е.Л. Капиллярный электрофорез и потенциометрия в определении антиоксидантов кожи / Е.Л. Лебедева, **М.Г. Маркина**, Л.К. Неудачина // Тезисы докладов 26<sup>ой</sup> Российской молодёжной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». Екатеринбург, 2016. – С. 143–144 (0.125 п.л./0.06 п.л.).

9. **Маркина М.Г.** Оценка суммарного содержания антиоксидантов в коже потенциометрическим методом // Материалы XIX Всероссийского экономического форума молодых ученых и студентов «Конкурентоспособность территорий». Екатеринбург, 2016. С. 220–223 (0.25 п.л.).

10. **Маркина, М.Г.** Потенциометрическое определение антиоксидантной активности кожи / Х.З. Брайнина, Л.Г. Гальперин, И.А. Куклин, М.Г. Маркина, Н.Ю. Стожко // Тезисы докладов IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием и Молодежной научной школой «ЭМА-2016». Екатеринбург, 2016. – С. 130 (0.06 п.л./0.015 п.л.).

11. **Маркина, М.Г.** Тест-система на основе наночастиц золота для оценки биотиолов / М.Г. Маркина, Х.З. Брайнина, Н.Ю. Стожко // Тезисы докладов XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Екатеринбург, 2016. – С. 298 (0.06 п.л./0.015 п.л.).

12. Тютрюмова, Т.А. Оптимизация методики потенциометрического определения антиоксидантной активности кожи / Т.А. Тютрюмова, **М.Г. Маркина** // Тезисы докладов 27<sup>ой</sup> Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». Екатеринбург, 2017. С. 152–153 (0.125 п.л./0.06 п.л.).

13. **Маркина М.Г.** Оценка суммарного содержания тиолов в коже колориметрическим методом // Материалы XX Всероссийского экономического форума молодых ученых и студентов «Конкурентоспособность территорий». Екатеринбург, 2017. С. 87–89 (0.188 п.л./0.188 п.л.).

14. **Markina, M.G.** On-site evaluation of antioxidant activity of human skin / Kh.Z. Brainina, M.G. Markina, N.Yu. Stozhko // The Abstracts book of ISANH Middle East world congress. Beirut, 2017. P. 49 (0.06 п.л./0.015 п.л.).

15. **Маркина, М.Г.** Новый подход к определению антиоксидантных параметров кожи / М.Г. Маркина, Т.А. Тютрюмова, Н.Ю. Стожко, Х.З. Брайнина // Сборник научных трудов Всероссийской школы-конференции с международным участием БШКХ – 2017. Иркутск, 2017. С. 336 (0.06 п.л./0.015 п.л.).

### Список цитируемой литературы

1. Ivanova, A.V. Potentiometric study of antioxidant activity: development and prospects / A.V. Ivanova, E.L. Gerasimova, Kh.Z. Brainina // Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2015. – V. 45. – P. 311–322.

2. Sylvestre, J.-P. Extraction and quantification of amino acids in human stratum corneum in vivo / J.-P.Sylvestre, C.C. Bouissou, R.H. Guy, M.B. Delgado-Charro // British journal of Dermatology. – 2010. – V. 163. – P. 458–465.

3. Храмов, В.А. Определение в одной пробе лактата и ряда азотистых шлаков, экскретируемых кожей человека // Теория и практика физической культуры. – 1996. – № 9.

4. Portugal-Cohen, M. Non-invasive skin biomarkers quantification of psoriasis and atopic dermatitis: Cytokines, antioxidants and psoriatic skin auto-fluorescence / M. Portugal-Cohen, L. Horev, C. Ruffer, G. Schlippe, W. Voss, Z. Ma'or, M. Oron, Y. Soroka, M. Frusic-Zlotkin, Y. Milner, R. Kohen // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2012. – V. 66. – P. 293–299.

5. Shindo, Y. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin / Y. Shindo, E. Witt, D. Han, W. Epstein, L. Packer // Journal of Investigative Dermatology. – 1994. – V. 102. – P. 122–124.

6. Hormozi-Nezhad, M.R. Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles / M.R. Hormozi-Nezhad, E. Seyedhosseini, H. Robotjazi // Scientica Iranica F. – 2012. – V. 12. - № 3. – P. 958 – 963.

*Автор выражает глубокую признательность и искреннюю благодарность заслуженному деятелю науки РФ, д.х.н., профессору Брайниной Х.З. за научные консультации и помощь в обсуждении результатов экспериментов; научному руководителю, д.х.н., профессору Стожко Н.Ю. за ценные советы и замечания, помощь в обсуждении результатов; д.т.н., профессору Гальперину Л.Г. за помощь в создании математической модели; к.ф.-м.н., доценту Крылову В.Г. за разработку компьютерной программы и участие в математической обработке фотографических данных; а также своей семье за понимание и неоценимую поддержку на всех этапах выполнения исследования.*