

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Башкирский государственный университет»

На правах рукописи

ДУБРОВСКИЙ ДМИТРИЙ ИГОРЕВИЧ

**ХИРАЛЬНЫЕ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
КОМПОЗИТОВ ХИТОЗАНА ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЭНАНТИОМЕРОВ АТЕНОЛОЛА И ТИРОЗИНА**

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Майстренко Валерий Николаевич

Уфа – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	14
1.1. Энантиселективные сенсоры в анализе лекарственных средств	14
1.2. Вольтамперометрические энантиселективные сенсоры	15
1.2.1. Энантиселективные сенсоры на основе углеродных материалов.....	17
1.2.2. Энантиселективные сенсоры на основе наночастиц металлов	18
1.2.3. Энантиселективные сенсоры на основе супрамолекулярных сборок	21
1.2.4. Сенсоры на основе циклодекстринов.....	26
1.3. Хиральные селекторы на основе полимеров и полимерных композитов	28
1.4. Хитозан и его производные в ЭВС.....	31
1.5. Хемометрические методы обработки данных в вольтамперометрии	33
1.5.1. Изучение данных, классификация и регрессионный анализ.....	34
1.6. Постановка задачи.....	38
ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА	40
2.1. Оборудование	40
2.2. Реагенты и материалы.....	40
2.3. Методика модифицирования рабочих электродов	41
2.3.1. Приготовление полиэлектролитного комплекса на основе хитозана.....	41
2.3.2. Модифицирование стеклоуглеродного электрода с использованием композитов на основе хитозана и α -, β -, γ -циклодекстринов	42
2.3.3. Модифицирование стеклоуглеродного электрода с использованием композита на основе хитозана и ПТКК	42
2.4. Приготовление анализируемых растворов	43
2.4.1. Приготовление стандартных растворов.....	43

2.4.2. Приготовление модельных растворов реальных образцов.....	44
2.4.3. Приготовление модельных растворов смеси энантиомеров тирозина.....	45
2.5. Электрохимические измерения.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	47
3.1. Вольтамперометрическое распознавание и определение энантиомеров атенолола с использованием композитов на основе хитозана и α -, β -, γ -циклодекстринов	47
3.1.1. Выбор оптимального состава композита на основе ПЭК хитозана и α -, β -, γ -циклодекстринов	49
3.1.2. Изучение морфологии поверхности сенсоров	51
3.1.3. Зависимость величины тока пика от скорости развертки потенциала.....	55
3.1.4. Вольтамперометрическое поведение энантиомеров атенолола на модифицированных электродах	56
3.1.5. Распознавание и определение энантиомеров атенолола в реальных объектах	62
3.1.6. Хемометрическое распознавание энантиомеров атенолола.....	64
3.2. Вольтамперометрическое распознавание и определение энантиомеров тирозина с использованием композитов на основе хитозана и 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты.....	69
3.2.1. Выбор оптимального состава композита на основе ПЭК хитозана и нанокластеров ПТКК	71
3.2.2. Изучение поверхности сенсора.....	72
3.2.3. Зависимость величины тока пика от скорости развертки потенциала.....	75
3.2.4. Электрохимическое окисление энантиомеров тирозина	76
3.2.5. Апробация сенсора на модельных растворах.....	79
3.2.5.1. Модельные растворы L-и D- тирозина и биологические жидкости	79

3.2.5.2. Определение энантиомеров тирозина в их смеси.....	81
3.2.6. Регрессионный анализ смеси энантиомеров тирозина.....	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Хиральное распознавание энантиомеров одна из наиболее важных областей аналитической химии, особенно для фармацевтической промышленности, клинического анализа, анализа пищевых продуктов и судебно-медицинской экспертизы. Известно, что основная масса синтетических лекарственных препаратов, представленных на европейском рынке является смесью изомеров, однако один из энантиомеров может иметь желаемые физиологические, фармакологические, фармакодинамические и фармакокинетические свойства, в то время как другой энантиомер зачастую проявляет нежелательную роль и активность в биохимических процессах. Кроме того, разработка энантио-чистых лекарственных средств, которые изначально были одобрены в виде рацематов, открыла новую рыночную стратегию, позволяющую производителю получить патент на отдельный энантиомер. В связи с этим необходим простой и качественный контроль энантиомерной чистоты на различных стадиях производства и реализации лекарственных препаратов, пищевых добавок и т. д. В настоящее время для этих целей в основном используются спектральные и хроматографические методы аналитической химии, а также капиллярный электрофорез. Однако они недостаточно экспрессные, требуют наличия высококвалифицированных специалистов, являются относительно дорогими и не позволяют работать в полевых условиях. Для простого и недорогого распознавания и определения энантиомеров биологически активных веществ все чаще используются электрохимические энантиоселективные сенсоры. Основными преимуществами таких сенсоров является относительная простота пробоподготовки и конструкции сенсоров, дешевизна оборудования и расходных материалов, а также возможность миниатюризации и применения сенсоров в режимах как online, так и in situ непосредственно на контролируемом объекте.

Таким образом, исследования в области создания и применения хиральных электрохимических сенсоров являются перспективным направлением, которое позволяет решать ряд основных задач, таких как: разработка экспресс-методов

контроля качества лекарственных средств, пищевых добавок и пестицидов, содержащих оптически активные вещества; разработка методов непрерывного контроля оптически активных веществ на стадиях производства, а также в сфере судебно-медицинской экспертизы.

Все это обуславливает необходимость поиска новых решений в области конструирования и исследования возможностей применения энантиоселективных вольтамперометрических сенсоров (ЭВС) и сенсорных систем, позволяющих решать конкретные аналитические задачи.

Степень разработанности темы исследования

Для электрохимического распознавания аналитических откликов оптических антиподов необходимы электроды, модифицированные соответствующими хиральными селекторами. Существуют различные способы модификации электродов, включая формирование хиральных матриц на поверхности электрода, полимеры с молекулярными отпечатками, композитные материалы из проводящих полимеров и углеродных материалов. Хитозан представляет особый интерес в качестве модификатора электродов, пленки которого используются для энантиоселективного распознавания лекарств из-за хиральных свойств их поверхности. Однако растворимость и недостаточная стабильность пленок хитозана в водных растворах ограничивает их использование при создании хиральных электрохимических сенсоров. Для повышения эффективности распознавания энантиомеров проводят структурную модификацию пленки хитозана путем осаждения на поверхность электрода гидроксипропилхитозана, ковалентно связанного с многослойными углеродными нанотрубками сульфированного хитозана, а также модификацию электродов пленками хитозана, легированными углеродными наноточками и графеном. Помимо гидроксипропил- и сульфированного хитозана существуют другие производные, такие как О-карбоксиметил и N-карбоксиметилхитозан. Недавно сообщалось о высокой хиральной способности распознавания хитозана на основе его полиэлектролитных комплексов с натрий-карбоксиметилцеллюлозой и нанокристаллами целлюлозы. Эффективность хирального распознавания хитозана заметно повышается также

при введении популярных хиральных селекторов, таких как циклодекстрины, хорошо известных своей способностью образовывать стабильные комплексы включения хозяин-гость или наноструктурированные супрамолекулярные сборки различных органических и биологических молекул, образующиеся посредством межмолекулярных взаимодействий с небольшими молекулами, особенно с теми, которые содержат ароматические фрагменты. К сожалению, сами по себе циклодекстрины редко используются в качестве модификаторов для вольтамперометрических электродов из-за двух присущих им недостатков - плохой электропроводности и растворимости в воде. Следует заметить, что электрохимическое хиральное распознавание с полисахаридами в качестве хиральных элементов привлекает к себе большое внимание из-за их доступности и обширных источников получения, однако легкая агрегация полисахаридов, вызванная межмолекулярными взаимодействиями, снижает эффективность распознавания и ограничивает их практическое применение, в случае поликатиона хитозана, макромолекула разбухает и повышается вязкость в водных растворах. Рационализировать подходы к созданию сенсоров на основе хитозана можно с применением композитных материалов.

В первой части работы изучен композит на основе новой электропроводящей подложки -полиэлектrolитного комплекса хитозана и структурно родственного ему сукцинамида хитозана (ПЭК). При этом на поверхности стеклоуглеродного электрода (СУЭ) формируются стабильные и тонкие пленки из электронейтральных комплексов хитозана, содержащие популярные хиральные селекторы - α -, β -, γ -циклодекстрины (α -, β -, γ -ЦД), которые используются для распознавания и определения энантиомеров атенолола (Атн), и для которого на данный момент описан лишь один сенсор на основе полимера (метилметакрилата) с молекулярными отпечатками R-атенолола без оценки аналитических возможностей и практического применения сенсора. Это стимулирует развитие исследований, связанных с распознаванием и определением энантиомеров атенолола и необходимостью создания простых по конструкции сенсорных платформ. Во второй части работы предложен ранее не изученный композит на

основе ПЭК хитозана и новых хиральных селекторов - нанокластеров 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты (ПТКК), осажденных на поверхности графитированной термической сажи. Оценка энантиоселективных и аналитических возможностей сенсора проведена на примере хорошо известной аминокислоты - тирозина (Тир).

Для повышения достоверности распознавания в работе использованы хемометрические методы обработки данных - метод главных компонент (МГК) и проекция на латентные структуры (ПЛС), в том числе с дискриминантным анализом (ПЛС-ДА), основанные на обработке большого массива экспериментальных данных и использовании сенсорной системы. Работа является частью исследований, проводимых на кафедре аналитической химии Башкирского государственного университета, поддержана грантами РНФ (№ 16-13-10257, № 19-73-10079) и РФФИ (№ 18-03-00537).

Цель работы: разработка вольтамперометрических энантиоселективных сенсоров на основе композитов полиэлектrolитного комплекса хитозана с α -, β -, γ -циклодекстринами и нанокластерами 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты для распознавания и определения энантиомеров атенолола и тирозина, исследование их электрохимических характеристик и оценка аналитических возможностей.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Разработка сенсоров на основе СУЭ, модифицированных композитами полиэлектrolитного комплекса хитозана с α -, β -, γ -ЦД и нанокластерами ПТКК, оптимизация их состава.
2. Исследование морфологии поверхности и электрохимических характеристик разработанных сенсоров.
3. Изучение вольтамперометрического поведения энантиомеров атенолола и тирозина на предложенных сенсорах, оценка их энантиоселективности.
4. Распознавание и определение энантиомеров атенолола и тирозина с использованием сенсоров на основе СУЭ, модифицированных композитами

полиэлектролитного комплекса хитозана с α -, β -, γ -ЦД и нанокластерами ПТКК, в том числе в биологических жидкостях и смеси энантиомеров.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

1. Впервые в ЭВС в качестве модификаторов изучены новые композитные материалы на основе электронейтрального полиэлектролитного комплекса хитозана со структурно родственными ему сукцинамидами хитозана, что позволило сформировать на поверхности стеклоуглеродного электрода тонкие и стабильные в водных растворах электропроводящие пленки.

2. Впервые разработаны и изучены новые хиральные вольтамперометрические сенсорные платформы на основе стеклоуглеродных электродов, модифицированных композитами ПЭК хитозана с α -, β -, γ -ЦД для распознавания и определения энантиомеров атенолола, позволяющие контролировать их содержание в лекарственных средствах и биологических жидкостях.

3. Установлено, что при объединении единичных сенсоров на основе композитов ПЭК хитозана с α -, β -, γ -циклодекстринами в сенсорную систему с хемометрической обработкой данных измерений методом ПЛС-ДА, достоверность распознавания энантиомеров атенолола по сравнению с единичными сенсорами существенно возрастает.

4. Впервые разработан и изучен вольтамперометрический сенсор на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного композитом ПЭК хитозана с новым хиральным материалом – нанокластерами 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты, осажденными на поверхности графитированной сажи Carboblack C, для распознавания и определения энантиомеров тирозина в биологических жидкостях и смеси энантиомеров.

Практическая значимость

1. Разработана относительно простая по конструкции и дешевая сенсорная система на основе СУЭ, модифицированных композитами ПЭК хитозана с α -, β -, γ -ЦД, проявляющая высокую специфичность и чувствительность к энантиомерам атенолола, для их экспрессного распознавания и определения в лекарственных

средствах и биологических жидкостях. В литературе практически нет информации по применению ЭВС для распознавания и определения энантиомеров атенолола, за исключением нескольких работ по сенсорам более сложной конструкции на основе полимеров с молекулярными отпечатками.

2. Разработан простой и экспрессный сенсор на основе СУЭ, модифицированного композитом ПЭК хитозана с хиральными нанокластерами 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты, осажденными на поверхности графитированной сажи Carbolblack C для распознавания и определения энантиомеров тирозина, имеющий хорошие эксплуатационные и аналитические характеристики.

3. Показана и обоснована возможность практического применения разработанных ЭВС для определения и распознавания энантиомеров атенолола и тирозина с высокой воспроизводимостью и правильностью в биологических жидкостях и растворах смеси энантиомеров.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследования электрохимических и аналитических характеристик сенсоров на основе СУЭ, модифицированных композитами ПЭК хитозана с α -, β -, γ -ЦД и нанокластерами ПТКК, включая выбор оптимального состава композитов.

2. Результаты исследования морфологии поверхности СУЭ, модифицированных полимерными пленками ПЭК хитозана и его композитами с α -, β -, γ -ЦД и нанокластерами ПТКК.

3. Результаты энантиоселективного распознавания и определения энантиомеров атенолола с помощью сенсорной системы на основе СУЭ, модифицированных композитами ПЭК хитозана с α -, β -, γ -ЦД, в том числе в моче человека.

4. Результаты энантиоселективного распознавания и определения энантиомеров тирозина с использованием сенсора, содержащего композит ПЭК хитозана с хиральными нанокластерами ПТКК, осажденными на поверхности

графитированной термической сажи, в том числе в моче и плазме крови человека, а также в смеси энантиомеров.

Методология и методы исследований

Основными методами в представленной диссертационной работе являются электрохимические методы определения лекарственных препаратов, а также современные методы изучения поверхности электродов. С помощью вольтамперометрии и спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ) проведена оценка электрохимических и аналитических характеристик разработанных сенсоров, рассчитаны эффективные площади их поверхности, определены лимитирующие стадии электродных процессов и установлены условия регистрации аналитического сигнала. Морфология поверхности разработанных сенсоров изучена методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для обработки экспериментальных данных использовались хемометрические методы (МГК, ПЛС и ПЛС-ДА).

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных данных определяется использованием в работе современных физико-химических методов исследования и высокотехнологичного оборудования, а также математической обработкой полученных результатов. Результаты исследований были представлены на научных конференциях: XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019); V Юбилейная конференция МОБИ-ХимФарма 2019 (Судак, 2019); V Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Краснодар, 2018); X Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальная математика и ее приложения в естествознании» (Уфа, 2018); IV Всероссийская молодежная конференция «Достижение молодых ученых: химические науки» (Уфа, 2018); Четвёртый Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике. (Крым, 2018); III Всероссийская молодежная конференция «Проблемы и достижения химии

кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений» (Уфа, 2018); Третий съезд аналитиков России (Москва, 2017).

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, входящих в базы цитирования Scopus и Web of Science, и 1 статья в Российском рецензируемом научном издании, рекомендованном ВАК РФ. Представленные публикации отражают содержание диссертации.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в проведении исследований и постановке задач, в разработке сенсоров, изучении их электрохимических характеристик, проведении анализа энантиомеров атенолола и тирозина, статистической и хемометрической обработке полученных результатов, а также в написании статей и докладов по материалам исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит введение, 3 главы, выводы и список цитируемой литературы, состоящий из 192 наименований. Работа изложена на 110 страницах машинописного текста, включая 31 рисунок и 9 таблиц.

Во введении изложены основные положения об актуальности и степени разработанности темы диссертационной работы, определены цели и задачи исследования, сформулирована научная новизна и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту диссертации.

В первой главе рассмотрены основные достижения в области разработки вольтамперометрических энантиоселективных сенсоров и сенсорных систем для распознавания оптических изомеров биологически активных соединений и лекарственных средств, новые подходы и решения по их разработке и практическому применению. Рассмотрены также основные способы определения энантиомеров лекарственных средств и биологически активных соединений. Описаны способы модифицирования электродов энантиоселективными селекторами, аналитические характеристики некоторых сенсоров и сенсорных систем для распознавания и определения энантиомеров в различных объектах, применяемые хемометрические методы обработки экспериментальных данных – МГК, ПЛС.

Во второй главе представлены сведения о реактивах, материалах, методологической и инструментальной базе диссертационного исследования. Приведены методики модифицирования электродов, приготовления растворов, условия регистрации экспериментальных данных.

Третья глава включает в себя два основных раздела, посвященных определению и распознаванию энантиомеров атенолола и тирозина. В данной главе приведены результаты исследований поверхности модифицированных электродов, результаты вольтамперометрического и импедансметрического исследования поверхности сенсоров, обсуждаются результаты вольтамперометрического распознавания и определения энантиомеров атенолола и тирозина с использованием хиральных вольтамперометрических сенсоров и сенсорных систем и хемометрических методов обработки данных.

Автор выражает признательность и искреннюю благодарность своему научному руководителю д.х.н., проф. Майстренко Валерию Николаевичу (Башкирский государственный университет), а также д.х.н. Сидельникову Артему Викторовичу (Уфимский государственный нефтяной технический университет), д.х.н. Корнилову Виктору Михайловичу (Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы), к.х.н. Гуськову Владимиру Юрьевичу (Башкирский государственный университет) и всему научному коллективу кафедры аналитической химии Башкирского государственного университета.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Энантоселективные сенсоры в анализе лекарственных средств

Создание энантиоочищенных лекарственных препаратов является перспективным направлением современной фармацевтической промышленности. Организм человека обладает хиральной избирательностью, в которой оптически активные эндогенные молекулы обычно присутствуют только в одной из хиральных форм, что является основой одной из теорий происхождения жизни [1]. Например, человеческие белки строятся исключительно из L-аминокислот, тогда как глюкоза, имеющая асимметричные атомы углерода, биологически встречается только в виде D-изомера. Это является следствием того факта, что ферменты, которые участвуют в синтезе хиральных биомолекул, также являются хиральными. При этом энантиомеры фармакологически активных соединений, поступающие в организм, метаболизируются отдельными путями, вызывая различную фармакологическую активность, проявляя разные фармакокинетические и фармакодинамические эффекты. Стоит также упомянуть и экономический эффект от применения энантиоочищенных препаратов, поскольку в настоящее время хиральные лекарственные средства составляют более половины лекарств, одобренных для терапии во всем мире. В 2008 году из общего количества препаратов, одобренных «Food and Drug Administration», 63% были единичными энантиомерами, 32% ахиральными препаратами и только 5% рацематов [2]. Продажи только одного энантиоочищенного препарата в 2005 году составили 225 миллиардов долларов, что составляет 37% от общего фармацевтического рынка в 602 миллиарда долларов, основываясь на оценках Technology Catalysts International и IMS Health [3]. В результате достижений в области химических технологий, связанных с синтезом, разделением и анализом отдельных энантиомеров, подкрепленных недавними международными нормативными требованиями в области фармацевтики, число хиральных лекарств, продаваемых как отдельные энантиомеры, постоянно растет [4, 5]. Таким образом, хиральный анализ постепенно становится органичной частью фармацевтического анализа. Одной из альтернатив хроматографическим методам в хиральном анализе, благодаря более

простой конструкции, изготовлению и обслуживанию, является использование хиральных электрохимических сенсоров. Энантиоселективность таких сенсоров может быть основана на различных принципах молекулярного распознавания целевых аналитов на хиральном сенсорном интерфейсе. Они могут включать использование квазихиральных одностенных углеродных нанотрубок, композитов с ионными жидкостями [6], хиральных ионофоров [7], основаны на механизмах естественного биохимического распознавания (например, хиральных ферментативных биосенсоров или иммуносенсоров) [8] или биомиметики с использованием синтетических хиральных селекторов [9]. Как правило, электрохимическая дискриминация между энантиомерами основана на разнице в константах устойчивости диастереоизомерных комплексов, образованных с хиральным сенсорным интерфейсом. Основное различие и в то же время самая большая проблема в хиральном распознавании с помощью вольтамперометрических сенсоров по сравнению с хиральным разделением обусловлены тем фактом, что в случае устройств прямого хирального зондирования существует только один единственный процесс разделения, который соответствует одной теоретической тарелке при хроматографическом разделении [10]. Тем не менее, электрохимические датчики стали все более широко использоваться для обнаружения различных ионных и/или молекулярных частиц из-за возможности их воспроизводимого и недорогого массового производства, с большим потенциалом для одноразового анализа, избегая перекрестного загрязнения, особенно в случае биологических образцов.

1.2. Вольтамперометрические энантиоселективные сенсоры

Энантиоселективные вольтамперометрические сенсоры нашли свое применение в основном в медицинской и фармацевтической промышленности для распознавания и определения энантиомеров в лекарственных средствах и биологически активных добавках [11-17]. Они привлекают к себе внимание именно потому, что с их помощью можно достаточно просто и селективно распознать

присутствие энантиомеров в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях.

Оценивая перспективы применения энантиосенсоров, заметим, что развитие вольтамперометрии, как и других методов электрохимического анализа, все больше смещается в сторону, связанную с разработкой сенсоров и датчиков, позволяющих проводить определения «быстрее, дешевле, проще и лучше». Наличие большого количества публикаций по использованию и выбору хиральных селекторов, их иммобилизации на поверхности электрода, использованию электропроводящих полимерных пленок и медиаторов электронного переноса свидетельствует о растущем интересе к этой проблеме.

В настоящее время идет активное создание сенсоров, модифицированных наночастицами оксидов металлов [18, 19], углеродными нанотрубками и композитами оксида графена [20-22], ДНК и аптамерами [23], которые проявляют высокую энантиоселективность, что позволяет использовать их в аналитических целях. При этом биологические платформы для распознавания обладают большей селективностью, чем их синтетические аналоги, и могут лучше взаимодействовать с определенными энантиомерами. Одним из эффективных способов повышения чувствительности и селективности измерений является иммобилизация хиральных селекторов на электродах, покрытых функционализированными полимерами, например, с молекулярными отпечатками [16, 24].

При разработке ЭВС следует помнить, что выбор матрицы обусловлен не только хорошей иммобилизацией хиральных селекторов, но и материалом самого электрода. Широкое применение получили электроды на основе стеклоуглерода и углеродосодержащих паст [25, 26]. На сегодняшний день они остаются популярными из-за своей простоты и дешевизны. В последнее время повысился интерес к пастовым электродам на основе фуллеренов [27], углеродных нано- и волокнистых материалов [28, 29], нанотрубок [30, 31], оксида графена [20-22] и др.

1.2.1. Энантиоселективные сенсоры на основе углеродных материалов

Наибольшую популярность в ЭВС среди гибридных материалов имеют материалы на основе графена (оксид графена и восстановленный оксид графена) [20, 32-36]. Высокая чувствительность сенсоров на основе графена и его оксида напрямую зависит от его уникальных физико-химических свойств, высокой электропроводности и большой площади поверхности. В следствие чего появляется возможность прямого переноса электрона на молекулу аналита с электрода. Еще одним достоинством является отсутствие различных примесей, в отличие от углеродных нанотрубок (УНТ), в которых присутствуют примеси металлов, используемых в качестве катализаторов.

Из-за хорошей диспергации оксида графена в воде, его легко осаждать на различных поверхностях (электродах), таких как Au, Pt, стеклоуглерод, с целью образования тонких проводящих пленок, содержащих хиральные селекторы. Достоинствами применения оксида графена является простота синтеза, простая методика получения композитных пленок с другими функциональными материалами. Обычный процесс модифицирования оксидом графена заключается в нанесении на поверхность электрода жидкой суспензии с последующим его вращением для получения тонкой пленки. Толщина и морфологические особенности пленки зависят от скорости вращения электрода, числа циклов нанесения и концентрации суспензии.

Еще одним способом нанесения графена на поверхность электрода является электростатическое взаимодействие отрицательно заряженных функциональных групп оксида графена с поверхностью подложки, которую заряжают положительно. Распределение наночастиц оксида графена на поверхности электрода зависит от pH среды, состава индифферентного электролита, времени осаждения и др. Кроме того, на этот процесс влияет и гидрофобное взаимодействие между поверхностью электрода и самим графеном.

Как уже отмечалось, материалы на основе графена не обладают хиральностью. В основном они используются для иммобилизации хиральных селекторов на поверхность электрода [20, 37-41] или выступают в качестве

подложки для получения хиральных композитов на основе хитозана [42], биотина [43], сывороточного альбумина [44], ДНК [45], циклодекстринов и их производных [46-49], наночастиц Au и Pt [49, 50], хиральных ионных жидкостей [51], полимерных наногибридов и др.

Кроме графена, в создании вольтамперометрических сенсоров часто используются углеродные нанотрубки [14, 15]. В основном УНТ используются для иммобилизации на поверхности стеклоуглеродных и металлических электродов или же их добавляют в объем пастовых электродов. Кроме этого, они также применяются для создания композитных модификаторов на основе оксида графена, полимерных материалов, производных хитозана или микрокристаллической целлюлозы [52-60].

Чтобы повысить специфичность распознавания углеродных нанотрубок, обычно их функционируют селекторами, обладающими хиральностью [61]. В литературе описано большое количество работ с применением сенсоров на основе УНТ для определения и распознавания аминокислот [55-60], лекарственных соединений [11, 14, 62, 63], пестицидов [18] в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях.

1.2.2. Энантиселективные сенсоры на основе наночастиц металлов

Чувствительность и селективность ЭВС возрастает при введении в состав композитов наночастиц металлов и их оксидов. Их основная функция заключается в улучшении проводимости материала сенсора, снижении перенапряжения вследствие электрокаталитических свойств наночастиц и возможности непосредственного контакта молекул аналита с поверхностью электрода [19, 62]. Кроме того, они могут использоваться в качестве маркеров и трассеров при проведении электрохимических исследований.

Форма и размеры (от 1 до 100 нм) наночастиц металлов в полимерных нанокompозитах зависят от условий и способов их осаждения, природы полимеров (полипиррола, политиофена, полианилина и др.) и модификаторов. На рисунке 1.1 приведена общая схема получения нанокompозитов металлов, среди которых

наиболее широко в ЭВС используются композиты на основе наночастиц Au [63, 64, 65]. Сенсоры с проводящими полимерами, структурированными наночастицами Au, демонстрируют высокую чувствительность и каталитическую активность, способствующую снижению перенапряжения электродного процесса.

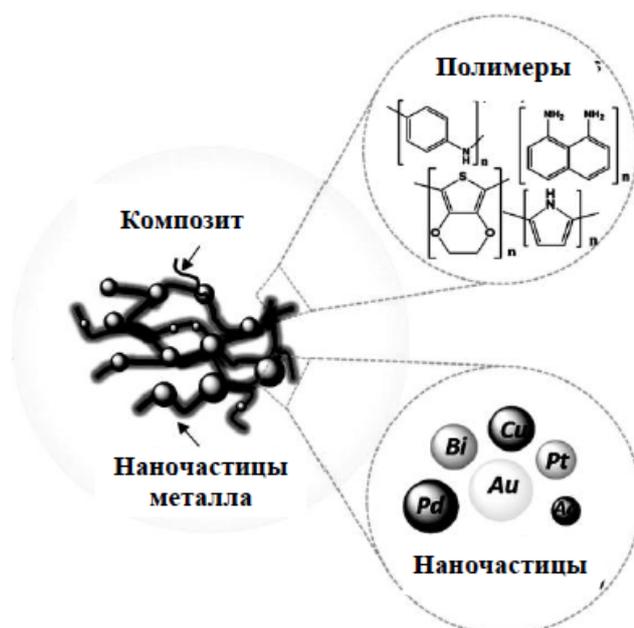


Рисунок 1.1 – Схема получения нанокompозитов металлов

Наилучшим способом получения Au-нанокompозитов является включение предварительно синтезированных наночастиц Au в проводящие полимеры при электрополимеризации либо их капельное осаждение на поверхности электрода. В качестве предшественника для получения наночастиц Au чаще всего используется HAuCl_4 с концентрацией от 3 до 10 ммоль/л. Размер наночастиц Au зависит от концентрации HAuCl_4 , природы полимера, его соотношения в композите, времени и условий синтеза. В частности, однородные наночастицы Au размером около 2 нм образуются при осаждении на поверхности полианилина [66].

Наночастицы Pt размером от одного до нескольких сотен нанометров также привлекают к себе внимание исследователей из-за больших возможностей использования в вольтамперометрических сенсорах [19, 62, 67]. Как и наночастицы Au, их осаждают либо в процессе получения композита, либо непосредственно на модифицированной поверхности электрода с использованием H_2PtCl_6 в качестве

прекурсора. Свойства нанокompозитов платины чувствительны к матричным эффектам и зависят от структуры используемых для их получения полимеров. При этом наночастицы Pt помогают сохранить конформацию молекул полимера, необходимую для функционирования сенсора. Аналогичную функцию они выполняют при сохранении конформации нативных белковых молекул в биосенсорах. Заметим, что нанокompозиты Pt эффективны в качестве матрицы именно при обнаружении биомолекул, таких как ДНК, ферменты, антитела и др.

Имеются сообщения о гибридных нанокompозитах проводящих полимеров на основе наночастиц Pt-Pd, имеющих сферическую форму размером 1-7 нм [68]. При этом их свойства сильно зависят от размера частиц и способа получения. Сами по себе наночастицы палладия также используются для получения полимерных нанокompозитов [69]. Вольтамперометрические сенсоры на их основе позволяют определять глюкозу с пределом обнаружения до 1.6 мкмоль/л. В качестве новых материалов для изготовления вольтамперометрических сенсоров находят применение гибридные нанокompозиты на основе проводящих полимеров и наночастиц Ag [70]. Для их получения используются различные методы: УФ-облучение, электроосаждение наночастиц, химическое восстановление и др.

Большие перспективы имеют также металлоорганические каркасные материалы (Metal-organic frameworks – MOF), образующие наноразмерные поры. Особенно интересны хиральные MOF-структуры, которые находят применение для селективного распознавания и обнаружения энантиомеров [71, 72]. При этом можно использовать как гомохиральные пленки, так и хирально модифицированные ахиральные MOF. По сравнению с хиральными электропроводящими полимерами композиты на основе MOF проявляют более высокую энантиоселективность, имеют хорошую пористость и проводимость. В частности, модифицированный камфосульфоновой кислотой композит полианилина с MOF позволяет с высокой селективностью распознавать L- и D-энантиомеры карвона в диапазоне концентраций от 1.0 до 15.0 мг/мл [72]. Более компактная конфигурация L-карвона способствует лучшему проникновению

молекул энантиомера в поры композита, что является причиной более высокого электрохимического отклика.

Еще один класс сенсоров на основе нанокompозитов металлов – использование магнитных материалов, облегчающих предварительное концентрирование и разделение энантиомеров [73]. В этом случае появляется возможность их выделения из образца с помощью внешнего магнитного поля вместо того, чтобы выполнять стадии фильтрации или центрифугирования. Такой подход позволяет упростить экспериментальные процедуры и, более того, повысить чувствительность сенсоров. На сегодняшний день используются, в основном, три типа магнитных наночастиц: на основе никеля, Fe_3O_4 и биметаллических наночастиц, состоящих из железа и других металлов, таких как Cu или Ag.

1.2.3. Энантиоселективные сенсоры на основе супрамолекулярных сборок

Самоорганизующиеся супрамолекулярные сборки используются в ЭВС как средство иммобилизации хиральных селекторов на поверхности электрода для дискриминации электроактивных энантиомеров при их электроокислении или электровосстановлении [87]. В большинстве случаев они образуются при взаимодействии цистеина или родственных соединений с поверхностью Au-электрода. Самоорганизующиеся монослои обычно образуются либо при адсорбции модификатора на поверхности электрода из Au, Ag или Hg либо вследствие химических реакций тиолов с поверхностью, за которыми следует процесс самосборки. Для модифицирования SiO_2 используются алкилсиланы, тогда как амины, производные карбоновых и фосфорных кислот образуют монослои при взаимодействии с оксидами металлов [74, 75]. Первые попытки создания хиральных электродов были предприняты в 70-х годах прошлого века [76, 77]. Впоследствии были предложены различные способы и методы модифицирования электродов, включая проводящие хиральные полимеры, золь-гель и супрамолекулярные структуры, элементы живых систем и др. В середине 90-х годов появились публикации по электродам на основе хиральных

самоорганизующихся монослоев [78]. В частности, первая статья, в которой описан такой электрод, была опубликована в 1995 году и посвящена образованию монослоя тиолированных молекул энантиомеров метилового эфира фенилаланина на поверхности Hg-электрода.

Во многих публикациях, посвященных хиральным сенсорам, рассматриваются самоорганизующиеся сборки на основе цистеина или гомоцистеина (гомолога цистеина, отличающегося одной метиленовой группой) [79-85]. При этом установлено [80, 81], что на Au- электроде, модифицированном монослоем цистеина, при окислении дигидроксифенилаланина (ДОФА) хиральный эффект наблюдается только для оптимальной концентрации цистеина, когда поверхность электрода не блокируется молекулами монослоя и на ней может протекать соответствующая редокс-реакция. Показано также влияние pH на энантиоселективность электрода [82].

Оригинальная технология изготовления ЭВС для обнаружения энантиомеров L-цистеина предложена в работе [63]. В этом случае самоорганизующийся монослой L-цистеина получали на поверхности СУЭ, модифицированного наночастицами золота. Затем на него осаждали тонкую пленку электрополимеризованного полипиррола и удаляли L-цистеин электрохимическим окислением с образованием пленки с молекулярными отпечатками. Осаждением на электроде получены очень тонкие золь-гель пленки с молекулярными отпечатками L- и D-энантиомеров ДОФА и диметилферроценилэтиламина [86]. Сенсоры на основе этих пленок имеют быстрый отклик, хорошую селективность и предел обнаружения на уровне 1.0 нмоль/л.

Показано также [87-89], что на поверхности углеродных материалов урацил образует супрамолекулярные структуры (рисунок 1.2). Сами по себе молекулы урацила не образуют оптических изомеров, но их супрамолекулярные структуры проявляют эффект хиральности в тех случаях, когда формируются параллельно поверхности электрода и могут принимать одну из двух возможных ориентаций с образованием гомохиральных R- и S-доменов.

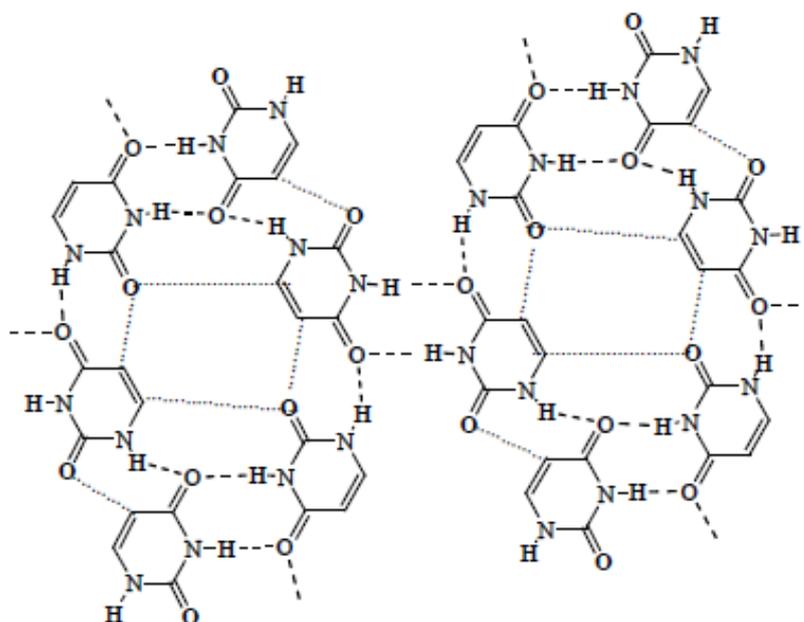


Рисунок 1.2– Фрагмент супрамолекулярной структуры урацила

В результате молекулярно-динамического моделирования процесса модифицирования угольно-пастового электрода (УПЭ) молекулами урацила установлено [90], что при образовании супрамолекулярных структур при модифицировании частиц графита (графена) урацилом присутствуют фрагменты, имеющие как ленточную, так и сетчатую структуру. Поскольку графен является двумерной гексагональной плоскостью, отделенной от объемного кристалла графита, молекулярно-динамическое моделирование процессов взаимодействия энантиомеров пропранолола с модифицированным урацилом УПЭ проводили на примере графена. Различия в энергиях взаимодействия энантиомеров пропранолола модифицированной поверхностью графена обуславливаются образованием одной связи в случае R-пропранолола и двух в случае S-изомера (рисунок 1.3).

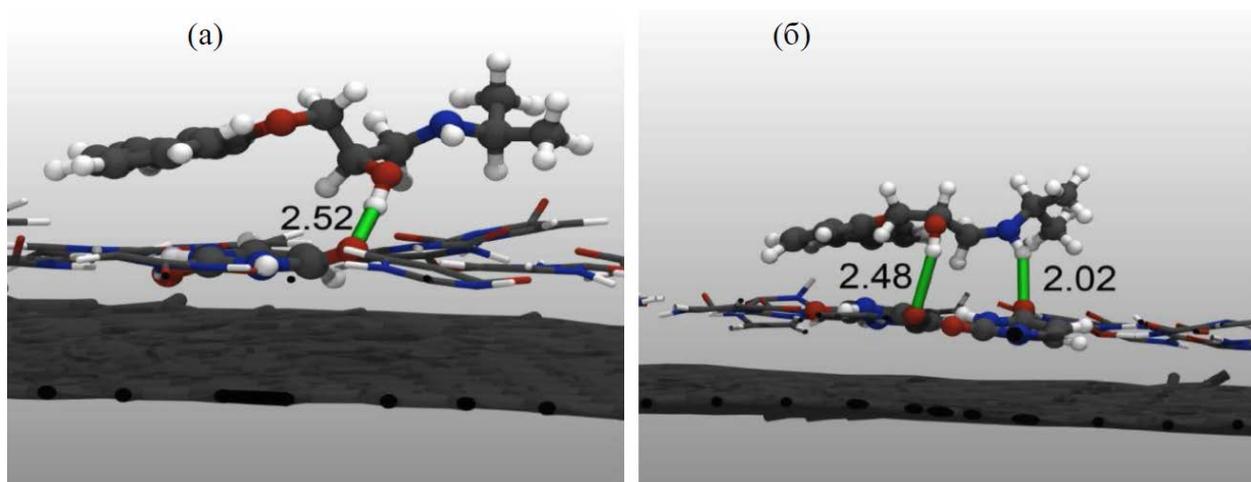


Рисунок 1.3 – Структура комплексов R- (а) и S-пропранолола (б) с поверхностью графита, модифицированной урацилом; длины связей – в Å

Также известно [91], что другие гетероциклические соединения, такие как меламина или циануровая кислота (ЦК), склонны к образованию супрамолекулярных ассоциатов. Меламина – важное вещество, имеющее различные применения [92]. Было обнаружено, что самоорганизующиеся монослои меламина плотно упакованы [93]. Молекулы меламина в таких слоях связаны многочисленными межмолекулярными водородными связями N–H...N, стабилизирующими двумерную сеточную структуру. Сама молекула меламина не имеет полостей, в отличие от его супрамолекулярных структур. Повторяющаяся единица в таких супрамолекулярных структурах состоит из семи молекул меламина. Шесть из них связаны водородными связями в форме цветка. Седьмая молекула связана со своими шестью соседями более слабыми ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. При этом десорбция (например, при умеренном нагревании) может привести к образованию полости размером 5 Å. [93, 94]. ЦК – уникальный циклический амид, имеющий три донорных и три акцепторных центра для водородных связей, что способствует его легкому связыванию с полярными растворителями и другими молекулами ЦК. Подобно урацилу, ЦК может образовывать супрамолекулярные ансамбли. Известно, что ЦК на твердых телах, таких как золото и графит, образует сетчатые структуры с полостями определенных размеров и форм. В работе [95] представлены сенсоры на основе композитов

меламина и ЦК для распознавания энантимеров пропранолола (рисунок 1.4). В данном случае наблюдались различия в вольтамперограммах энантимеров как по току, так и по потенциалу окисления пропранолола. Данные различия объясняются различиями в энергиях взаимодействий энантимеров с модифицированной поверхностью сенсоров [95, 96]. Также разработан сенсор на основе угольно-пастового электрода, модифицированного супрамолекулярными структурами ЦК, для распознавания энантимеров тирозина [97].

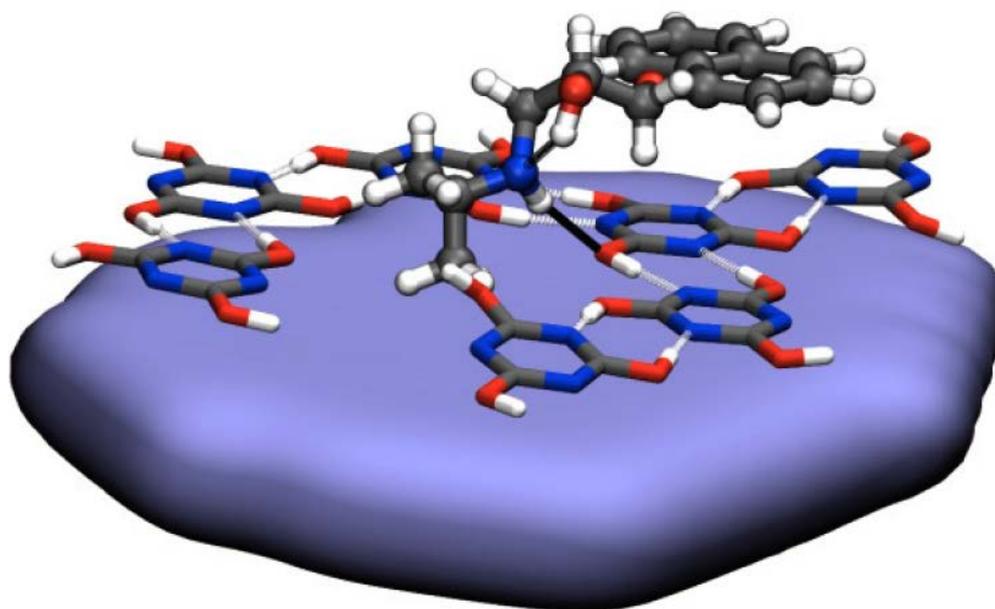


Рисунок 1.4 – Структура комплекса R-пропранолола с циануровой кислотой

Потенциальной возможностью образовывать при внешнем воздействии (интенсивное перемешивание) хиральные нанокластеры обладает 3,4,9,10-перилентетракарбоновая кислота, получаемая из ее диангида. В отличие от диангида, подвижные карбоксильные группы в молекулах ПТКК имеют 2D-пространственную симметрию [98], что способствует образованию при самосборке молекул ПТКК хиральных нанокластеров [99]. В литературе имеются данные о хиральных вольтамперометрических сенсорах на основе нанокомпозитов ПТКК [54, 100-102].

Наконец, хиральные сборки находят применение в спинтронике для изготовления спиновых фильтров [103-105]. Зависимые от спина электрона

электрохимические характеристики могут использоваться для создания хиральных сенсоров. Такие исследования проводились с ферромагнитными электродами, модифицированными хиральными молекулами, включая самоорганизующиеся монослои.

1.2.4. Сенсоры на основе циклодекстринов

Циклодекстрины представляют собой соединения, принадлежащие к группе макроциклов, состоящих из 6, 7 и 8 единиц глюкопиранозы. Они обладают исключительной способностью образовывать устойчивые комплексы посредством молекулярного распознавания хозяин-гость; α -, β - и γ -ЦД образуют липофильную внутреннюю полость в виде конуса. Внешняя поверхность молекул циклодекстринов обладает гидрофильными свойствами. Они имеют разностороннее применение: в фармацевтической, пищевой, швейной, косметической и химической промышленности [106, 107]. Образование соединений включения из циклодекстринов и других соединений возможно в газообразном, жидком и твердом состояниях. Эти реакции основаны на многочисленных слабых межмолекулярных взаимодействиях, таких как водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса, диполь-дипольные и другие взаимодействия [108]. Включение может происходить в результате пространственного совпадения между хозяином и гостем. Это так называемый стерический эффект, который зависит от размера молекулы гостя, а также от наличия функциональных групп [109].

Возникновение стерического эффекта и других эффектов, связанных с межмолекулярными взаимодействиями, зависит от природы конкретных соединений. Из-за размера липофильной полости циклодекстрины предпочитают связи с ароматическими и гетероциклическими группами. В последнее десятилетие были разработаны электрохимические сенсоры на основе циклодекстринов. Некоторые примеры наиболее популярных циклодекстринов представлены на рисунке 1.5.

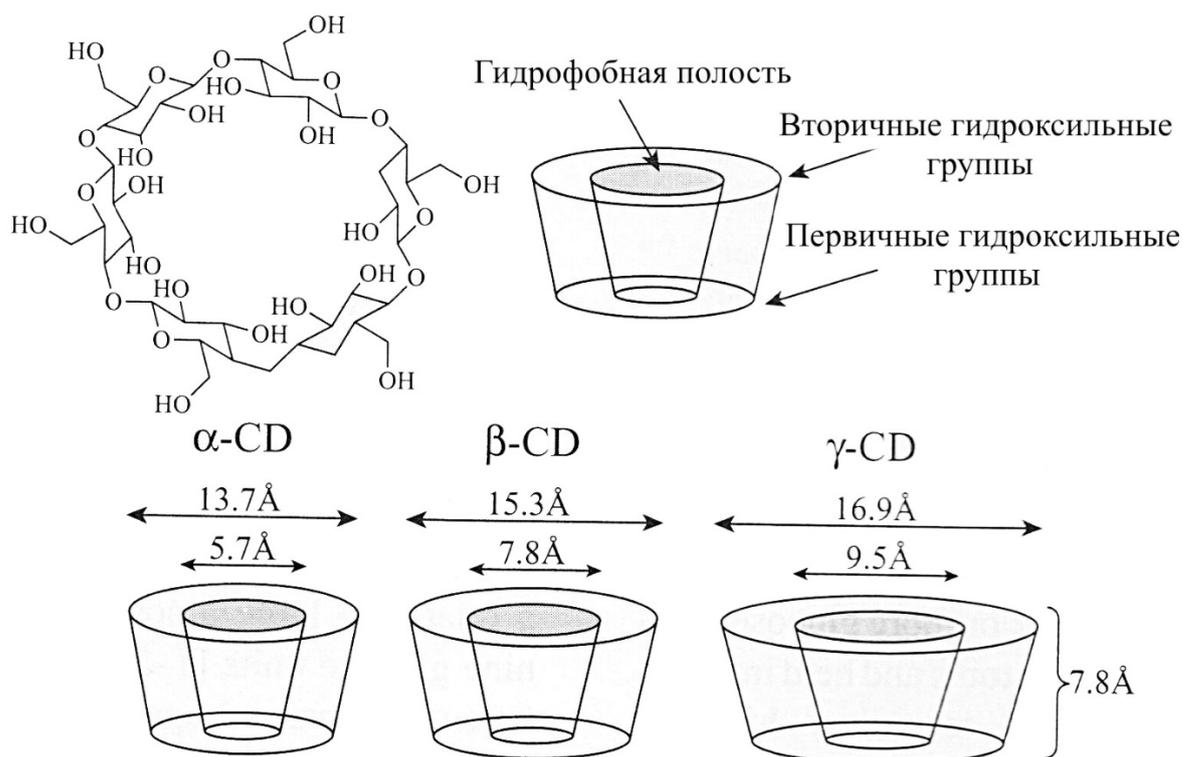


Рисунок 1.5 – Структуры трёх основных циклодекстринов

В области биомедицинского и фармацевтического анализа различные типы электрохимических сенсоров, особенно на основе углеродных материалов, модифицированных циклодекстринами, по-прежнему относятся к наиболее популярным сенсорам. Циклодекстрины и их производные, благодаря своим свойствам, все чаще используются для изготовления вольтамперометрических и потенциометрических модифицированных электродов. Потенциометрические устройства, модифицированные циклодекстринами, углеродными наноматериалами или циклодекстриновыми нанокомпозитами, обеспечивают более высокую чувствительность, чем немодифицированные электроды. Это может быть связано с взаимодействием «хозяин-гость» и инкапсуляцией молекул лекарства в липофильную полость циклодекстринов. В случае вольтамперометрических сенсоров эффект модифицирования циклодекстринами улучшает кинетику электродного процесса и увеличивает накопление аналита на поверхности. В результате это способствует повышению чувствительности

электрода. Модифицированные электроды обладают высокой селективностью, хорошей стабильностью и хорошей воспроизводимостью.

ЦД для энантиселективного определения применяют в составе композитов с полимерами на основе полипиррола, политиофена и полианилина, которые обладают хиральностью и электропроводностью [110-112], в виде супрамолекулярных структур [113] или самоорганизующихся систем на основе, например, L-глутаминовой кислоты [114]. Также для иммобилизации ЦД на поверхность электрода используют нанокompозиты [115, 116], углеродные нанотрубки, графен [117, 118] и др.

1.3. Хиральные селекторы на основе полимеров и полимерных композитов

Полимеры являются незаменимым компонентом современных сенсорных устройств [16, 119, 120]. Исследования в этой области ведутся по различным направлениям, в том числе в области создания и применения «умных» полимеров – полимерных материалов, которые воспроизводимо реагируют на изменение состава внешней среды [121, 122]. Благодаря разнообразию физических и химических свойств «умные» полимеры могут адаптироваться к изменению структуры и концентрации многих органических (биоорганических) соединений, в том числе хиральных молекул [17, 123, 124].

Энантиселективный молекулярный импринтинг, т.е. создание полимерных материалов с наноразмерными молекулярными отпечатками (МИП), широко используется для создания ЭВС [16, 125, 126]. Распознавание энантиомеров в этом случае достигается с помощью полимеров, полученных в присутствии молекул-шаблонов. После их удаления полимерная матрица сохраняет распознающие полости, которые могут связываться с молекулами-мишенями. По сравнению с биомолекулами (в частности, с антителами) МИП-полимеры получить проще и дешевле, они имеют более длительный срок годности и могут быть изготовлены для распознавания практически любых энантиомеров. Основная проблема при разработке и функционировании таких сенсоров – получение на электроде как можно более тонких сенсорных пленок, поскольку от их толщины и пористости во

многим зависит время отклика и стабильность показаний сенсора. Для улучшения диффузионного проникновения молекул аналитов в полимерную матрицу применяют золь-гель технологию [127, 86]. Мягкие условия протекания процесса, возможность использования широкого спектра функционализированных мономеров, образование относительно жестких матриц, химическая инертность и температурная устойчивость золь-гель материалов сделали эту технологию привлекательной для молекулярного импринтинга.

В качестве темплатов при образовании хиральных полостей в полимерах могут использоваться как молекулы-мишени, так и «псевдошаблоны», позволяющие после их вымывания из полимерной матрицы распознать хиральные молекулы. Так, сенсор в виде нанопроволоки из полипиррола диаметром около 100 нм с молекулярными отпечатками D- или L-камфоросульфоновой кислоты распознает энантиомеры фенилаланина в диапазоне концентраций от 2 до 120 мкмоль/л [77].

Одним из примеров хиральных сенсоров является сенсор на основе угольно-пастового электрода, модифицированного полиметакрилатом с молекулярными отпечатками R-атенолола [128, 129]. Ультратонкий слой МИП получали электрополимеризацией метакриловой кислоты в потенциодинамических условиях с последующей кросс-сшивкой. Сенсор интересен тем, что процесс хирального распознавания в этом случае связан не с классическим «трехточечным» взаимодействием селектора с энантиомером (модель Далглиша), а с «эффектом ворот», зависящим от пространственных различий между энантиомерами, то есть от скорости проникновения молекул деполяризатора через поры МИП-слоя к поверхности электрода (динамическая модель).

Описан хиральный электрохимический сенсор для распознавания D- и L-энантиомеров аскорбиновой кислоты на основе МИП-композиата полианилина с ферроценсульфоновой кислотой, допированного квантовыми точками углерода. В условиях электрохимической импедансной спектроскопии нижняя граница детектируемых содержаний для D- и L-энантиомеров составляет 0.73 и 0.16 пмоль/л, соответственно [130, 131].

Сенсор для аспарагиновой кислоты на основе модифицированного поли-(N-акрилоилпирролидин-2,5-дионом) импрегнированного энантиомерами аспарагиновой кислоты графитового электрода с диспергированными УНТ позволяет распознать содержание D- и L-энантиомеров на уровне 4.08 нг/мл [64]. После удаления молекул шаблона энантиомеры определяли методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии, используя $K_3[Fe(CN)_6]$ в качестве медиатора электронного переноса.

Наряду с синтетическими МИП-материалами в ЭВС используются и другие полимерные композиты, например, на основе хитозана и его производных [59, 60, 132-139], нанокристаллической целлюлозы [57, 132, 139], а также с добавлением ионных жидкостей [63, 51]. Их основное преимущество – хорошая электрическая проводимость в сочетании с низкой стоимостью, гибкостью и технологичностью. В этом плане УНТ и наноматериалы на основе графена являются наиболее перспективными наполнителями. Однако для достижения хорошей дисперсности и однородного распределения в полимерной матрице, как правило, необходимо проводить процедуры функционализации этих наполнителей или обработку ионными жидкостями [140]. Ионные жидкости представляют собой органические или неорганические соли, образованные крупными катионами и анионами. Как следствие, они имеют температуру плавления ниже 100 °С, а некоторые из них остаются жидкими даже при комнатной температуре. Их уникальные характеристики, такие как высокая проводимость и возможность образования хиральных структур путем подбора соответствующих катионов и анионов [51], делают ионные жидкости привлекательными материалами для создания ЭВС.

Для повышения чувствительности измерений и снижения нижней границы распознаваемых концентраций предложены гибридные нанокompозитные материалы, содержащие проводящие полимеры (полипиррол, полианилин и др.), наночастицы Au и углерода, многостенные углеродные нанотрубки [55, 63, 130, 64, 141, 142].

Хотя число примеров использования полимерных нанокompозитов для распознавания и обнаружения хиральных молекул относительно небольшое,

исследованиям по созданию на их основе энантиоселективных вольтамперометрических сенсоров в настоящее время уделяется повышенное внимание. Однако, для применения наноконпозитов в ЭВС необходимо учитывать следующие ограничения:

- наноконпозиты могут неспецифически связываться с биологическими компонентами, особенно при проведении измерений в растворах, содержащих несколько таких компонентов;
- импринтинг высокомолекулярных соединений, в том числе белков, по-прежнему представляет собой реальную проблему;
- не всегда существует взаимосвязь между величиной сигнала- отклика и содержанием энантиомера;
- время, необходимое для установления равновесия на электроде, довольно большое.

1.4. Хитозан и его производные в ЭВС

К полимерам с изначальной хиральностью относятся также природные олиго- и полисахариды, например, целлюлоза, хитозан и их композиты с электропроводящими материалами [57, 132, 133, 139, 143-145]. Не рассматривая подробно методы модифицирования электродов полисахаридами, остановимся на особенностях их применения в энантиоселективных сенсорах. Целлюлозы объединяют группу веществ, вырабатываемых из растительного сырья и состоящих преимущественно из линейных полимеров глюкопиранозы, соединенных 1–4-мостиковыми связями [146]. Наличие асимметричного атома углерода придает глюкопиранозному циклу макромолекулы целлюлозы хиральность. В отличие от других природных полисахаридов, целлюлоза не растворяется, а лишь набухает в воде, что накладывает ограничения на хиральность поверхностного слоя сенсоров и селективность их взаимодействий с энантиомерами. Исключение составляют модификаторы на основе микрокристаллической целлюлозы, образующей коллоидные системы. Однако их

применение ограничено необходимостью стабилизации таких систем на стадиях иммобилизации других компонентов при получении композитов.

Микрокристаллическая целлюлоза и композиты на ее основе используются в ЭВС в основном для распознавания и определения хиральных аминокислот [57, 132, 139, 143]. В частности, на основе производных целлюлозы с 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксилом, иммобилизованных на модифицированном L-цистеином Au-электроде, разработан сенсор для определения энантиомеров фенилаланина, лейцина и валина [139]. Для повышения чувствительности определений в матрицу целлюлозы вводят наночастицы оксида графена, УНТ, фуллерены, либо модифицируют поверхность электрода таким образом, чтобы она имела различное сродство к энантиомерам. При этом наблюдается синергетический эффект хирального распознавания энантиомеров вследствие усиления сигнала из-за введения УНТ [57].

Кроме целлюлозы, внимание исследователей привлекают хитозан и его хиральные нанокомпозиты [133-137, 143, 147–150]. Хитозан – продукт деацетилирования хитина (полимера 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-глюкозы) – образует на электроде прочные и устойчивые хиральные пленки. В отличие от синтетических полимеров, он обладает высокой биологической совместимостью, что имеет существенное значение при создании сенсоров, имплантируемых в живые организмы. Как и для целлюлозы, наличие асимметричных атомов углерода в глюкозаминных циклах хитозана является причиной хиральности макромолекул в целом, которая зависит от их конформации и надмолекулярной структуры. Из-за плохой электропроводности пленок хитозана для распознавания и определения энантиомеров биологически активных и лекарственных соединений в ЭВС обычно используют композиты с УНТ, наночастицами золота, платиновых металлов и оксида графена.

Так, для определения энантиомеров фенилаланина, атенолола, триптофана и миндальной кислоты предложены вольтамперометрические сенсоры на основе N-карбоксиметил- и гидроксипропилхитозана [147, 148], полиэлектролитного комплекса хитозана с его сукцинамидом [28], композитов с УНТ [59, 147],

наночастицами оксида графена [135, 137], либо последний применяют для непосредственного модифицирования электродной поверхности [136]. С помощью таких сенсоров определяют энантиомеры фенилаланина [133, 136], триптофана [59, 134, 137, 147] и ДОФА [135]. Для экспрессного распознавания и определения энантиомеров в лекарственных средствах и установления их соотношения разработана универсальная сенсорная платформа на основе композитной пленки хитозана и оксида графена с молекулярными отпечатками R- и S-пропранолола [150]. Разность потенциалов между E_p энантиомеров пропранолола в диапазоне концентраций от 50 до 1000 мкМ составляет 135 мВ. Заметим, что применение природных полисахаридов в электрохимических сенсорах, столь популярное в начале века, в настоящее время сокращается из-за недостаточной стабильности и дрейфа показаний сенсоров, а также вследствие появления других, более удобных хиральных модификаторов.

1.5. Хемометрические методы обработки данных в вольтамперометрии

В последние годы большое основное внимание уделялось различным аспектам применения хемометрики в электроаналитической химии, что демонстрирует большой интерес исследователей к этому вопросу и потенциал для будущих применений. Среди них применение хемометрики к электрохимическим сенсорам, сенсорным массивам и электронным языкам. Мультисенсорные системы типа электронный язык представляют собой мощные аналитические инструменты, предлагающие уникальные возможности для оценки вкуса пищевых продуктов [151, 152], определения интегральных параметров качества в газах и жидкостях [153], анализа биологических образцов, для диагностики [154, 155] и распознавания многокомпонентных систем [156, 157]. Использование мультисенсорных матриц позволяет количественно определять различные химические соединения [158], как и другие традиционные аналитические способы. Общая идея мультисенсорных систем заключается в том, что отсутствие избирательности отдельных сенсоров при количественном определении конкретных аналитов в сложных средах можно успешно компенсировать с

помощью использования нескольких перекрестно-чувствительных сенсоров с различной чувствительностью и инструментов машинного обучения для обработки сигналов. Данные, полученные от массивов сенсоров, могут быть дополнительно обработаны с использованием различных хемометрических алгоритмов для получения количественной и качественной информации об образцах.

Хемометрика может применяться на различных этапах электроанализа и с различными целями. Среди них можно упомянуть: экспериментальный дизайн и оптимизацию соответствующих экспериментальных и инструментальных параметров, подготовку и преобразование данных для дальнейшей обработки, исследование данных и классификация, определение концентраций, калибровка и идентификация.

1.5.1. Изучение данных, классификация и регрессионный анализ

Наибольший прогресс в применении хемометрики для электроаналитических определений отмечен в распознавании анализируемых компонентов в сложных системах. Эти приложения включают в себя несколько конкретных задач, таких как, например, определение смесей аналитов, которые не могут быть физически выделены, с получением перекрывающихся сигналов, калибровка и химическая идентификация в сложных динамических системах.

Метод главных компонент является основным инструментом для визуализации данных в больших многомерных наборах, предварительной обработки данных для различения информации перед построением моделей калибровки или классификации. МГК позволяет изучить структуру данных в общем виде и понять взаимоотношение между образцами и переменными, например, наличие групп схожих образцов, наличие выбросов, наличие скоррелированных переменных, несущих схожую информацию и т.д.

Для наиболее обычного случая вольтамперометрии фундаментальной отправной точкой является расположение данных в виде матрицы токов I (nR , nC), где nR обозначает количество строк как количество регистрируемых вольтамперограмм (разных образцов или та же система, но при некоторых

различных условиях любой соответствующей переменной), а nC указывает количество столбцов, например, потенциалы, отсканированные во время текущих измерений. Основная цель различных методов многомерного анализа - математически разложить экспериментальную матрицу текущих данных I на произведение двух матриц (или векторов, в зависимости от случая), содержащих информацию о концентрациях (C) и отдельных вольтамперограммах (V). Это разложение основано на предположении, что измеренные инструментальные отклики являются билинейными и могут быть выражены как $I = CV + X$, где X - остаточная матрица, содержащая дисперсию, не объясняемую C и V . Использование токов во всем изучаемом диапазоне потенциалов может привести к лучшим прогнозам, чем использование только характеристических параметров (например, максимальных токов пика в фарадеевской области как в классическом случае).

Суть МГК-моделирования сводится к эффективному снижению размерности исходного пространства данных и представлению образцов в новой системе координат (главных компонент), в которой отчетливо видны сходства и различия между образцами, обусловленные значениями описывающих их переменных. Заметим, что методу не сообщалось никакой дополнительной информации о схожести или различии элементов, напротив, задача математического моделирования в случае классификации заключается в построении разделителя между классами, в определении границы принятия решений о принадлежности образца. С помощью такой границы каждый новый объект может быть приписан определённому классу. Наиболее распространенным методом классификации является метод проекций на латентные структуры с дискриминантным анализом (projection on latent structures- discriminant analysis – PLS-DA), представляющий собой многомерный вариант регрессионного анализа, который на основе вычисления регрессионных откликов позволяет решать идентификационные задачи распознавания образов.

Суть метода ПЛС-ДА в том, что на этапе обучения (построения регрессионной модели) для K классов обучающих образцов принадлежность

каждого образца к соответствующему классу зашифровывается регрессионными уравнениями вида $XВ = D$, где X – матрица исходных данных ($N \times R$), B – матрица неизвестных коэффициентов ($R \times K$) и D – матрица регрессионных откликов ($N \times K$), состоящая для обучающей выборки из единиц и нулей (N – общее число измерений, R – количество сигналов в одной вольтамперограмме). При построении матрицы D столбцы обозначают шифром соответствующего класса, а строки – шифром обучающего образца. Для каждого обучающего образца единицы помещают в те ячейки столбца, к классу которого принадлежит образец, нуль ставят в остальные ячейки строки образца. Решение регрессионной задачи позволяет установить зависимости между вольтамперометрическими данными и регрессионными откликами матрицы D , которые в дальнейшем используются для идентификации новых (тестовых) образцов, при этом рассчитываются значения регрессионных откликов и по ним определяют принадлежность образцов к соответствующему классу.

Важнейшими параметрами при оценке классификаторов являются: чувствительность (отражает процент объектов, действительно принадлежащих данному классу и правильно распознанных моделью, как принадлежащие) и специфичность сенсоров (отражает процент объектов, не принадлежащих данному классу и правильно отвергнутых моделью). Многие методы классификации основаны на том, что строят пространство класса вокруг модели класса с шириной, соответствующей доверительному интервалу при выбранном уровне доверительной вероятности, с этой точки зрения чувствительность и специфичность классификатора являются мерами уровня доверительной вероятности.

В случае ПЛС можно решить не только качественные идентификационные задачи распознавания образов (классификации), но и количественные задачи определения различных соединений при их совместном присутствии (регрессионный анализ). Под регрессионным анализом понимают исследование влияния одной или нескольких независимых переменных x на зависимую переменную y . Простейший и наиболее распространенный случай регрессии –

одномерная линейная регрессия. Она задается линейным уравнением вида: $y=kx+b$ и устанавливает связь между переменными x и y . Применительно к химическому анализу под y обычно понимают концентрацию интересующего соединения, а под x величину аналитического сигнала. Процесс построения такой линейной регрессии принято называть калибровкой аналитического инструмента. Задача построения калибровки заключается в том, чтобы найти вид зависимости y от x , т.е. концентрации от аналитического сигнала. Для этого измеряют величину аналитического сигнала x в нескольких образцах с известной концентрацией y и строят калибровочную зависимость, из которой вычисляют k и b . Затем, зная k и b , можно определять концентрацию y в неизвестных образцах, измерив в них величину x аналитического сигнала.

В последние годы в практику фармацевтического анализа также активно внедряются экспресс-методы идентификации и контроля качества лекарственных средств. Наша группа исследователей занимается созданием и исследованием вольтамперометрических сенсоров и сенсорных систем с применением методов МГК и ПЛС-ДА для таких задач как: распознавание оригинал/дженерик [159, 160]; распознавание лекарственного препарата по производителю и сроку годности [161, 162]; распознавание энантиомеров [163]; количественное определение энантиомеров в их рацемической смеси с помощью ПЛС-регрессии [164].

В настоящее время хемометрика имеет важное значение для использования всего потенциала современных аналитических методов. Это продемонстрировано для различных аналитических сигналов, особенно в методах оптической спектроскопии. Электроаналитическая химия не может игнорировать эту доминирующую тенденцию. Современное электрохимическое приборостроение позволяет получить надежные и воспроизводимые данные, которые являются основой аналитических методов с очень низкими количественными пределами. Совместное использование этих методов с соответствующими хемометрическими способами обработки экспериментальных данных позволяет существенно повысить их возможности.

1.6. Постановка задачи

Анализ литературных данных показывает, что для решения задач определения и распознавания энантиомеров биологически активных и лекарственных препаратов необходимо создание более простых в изготовлении и при этом надежных в эксплуатации ЭВС. В этом плане интерес представляют композитные материалы на основе полисахаридов природного происхождения, в частности, хитозана и его структурных модификаций, с различными хиральными селекторами. Также стоит отметить, что для распознавания и определения энантиомеров важного в медицинской практике β -адреноблокатора атенолола на данный момент в литературе известны лишь несколько работ по применению ЭВС сложной конструкции на основе полимеров с молекулярными отпечатками. Для энантиомерного анализа лекарственных средств, содержащих атенолол, необходима разработка конструктивно более простых и надежных сенсоров. Поэтому в работе в качестве хиральных селекторов были выбраны хорошо изученные α -, β - и γ -ЦД, которые вводили в состав композита ПЭК хитозана. Высокую точность и надежность распознавания энантиомеров атенолола с помощью таких сенсоров можно достигнуть при использовании сенсорной системы на их основе с последующей хемометрической обработкой экспериментальных данных.

Кроме того, перспективными для создания ЭВС являются новые хиральные наноматериалы, в том числе на основе хиральных нанокластеров, образующихся при самосборке супрамолекулярных структур, при осаждении которых на поверхности углеродных материалов между ними образуются хиральные полости. При этом скорость проникновения молекул энантиомеров через эти полости при диффузии к поверхности электрода в результате стерических препятствий различная, что отражается на величинах токов энантиомеров. Среди таких наноматериалов особый интерес вызывают хиральные нанокластеры ПТКК, нанесенные на углеродные материалы и иммобилизованные на поверхности СУЭ в составе композитов с ПЭК хитозана. Для проверки работоспособности и оценки аналитических характеристик ЭВС на их основе предпочтительно использовать

хорошо изученные аналиты, например, энантиомеры аминокислот, в частности тирозина.

Также немаловажной задачей является распознавание и определение энантиомеров в смеси. Для этого необходимо, чтобы пики окисления (восстановления) энантиомеров на вольтамперограммах существенно отличались между собой как по потенциалам, так и по величинам максимальных токов. Однако в большинстве публикаций, в которых изучены возможности применения вольтамперометрических хиральных сенсоров для определения энантиомеров или их соотношения в смеси, между аналитическими сигналами энантиомеров наблюдаются небольшие различия, что недостаточно для их достоверного распознавания и приводит к ошибкам при определении состава смеси. В основном это обусловлено недостаточной селективностью ЭВС. Использование хемометрических методов обработки экспериментальных данных позволяет компенсировать недостаточную селективность, характерную для большинства вольтамперометрических сенсоров, и с высокой вероятностью определять соотношение энантиомеров в смеси.

Таким образом, диссертационная работа направлена на разработку вольтамперометрических энантиоселективных сенсоров на основе композитов полиэлектролитного комплекса хитозана с α -, β -, γ -циклодекстринами и нанокластерами 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты для распознавания и определения энантиомеров атенолола и тирозина, исследование их электрохимических характеристик и оценку аналитических возможностей.

ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1. Оборудование

В ходе проведения эксперимента использовали следующее оборудование:

- Потенциостатат/гальваностатат AUTOLAB PGSTAT 204 с модулем импеданса FRA32M (Metrohm Autolab Ins., Нидерланды);
- Аналитические весы «ATL-220» (Acculab, Великобритания);
- рН-метр Seven Compact pH/Ion S220 (Mettler-Toledo AG, Швейцария);
- Магнитная мешалка MR Hei-Tec (Heidolph, Германия);
- Медицинская центрифуга CM-6MT (ELMI, Латвия);
- Атомно-силовой микроскоп СММ-2000Т (Протон-МИЭТ, Россия).

2.2. Реагенты и материалы

- L-, D- энантиомеры тирозина, LD-тирозин ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, США);
- R-, S- энантиомеры атенолола, RS-атенолол ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, США);
- L-, D- энантиомеры метионина, LD-метионин ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, США);
- α -, β -, γ - циклодекстрины ($\geq 97\%$) (Sigma-Aldrich, США);
- Диангидрид перилен-3,4,9,10-тетракарбоновой кислоты $\geq 97\%$ (Sigma-Aldrich, США);
- Графитированная термическая сажа Carbolblack C (Restek, США, удельная площадь поверхности $10 \text{ м}^2/\text{г}$);
- Гидрохлорид хитозана с молекулярной массой 30 кДа и степенью деацетилирования 75% (ЗАО «Биопрогресс», Россия);
- Натриевая соль N-сукцинилхитозана с молекулярной массой 200 кДа, полученный из хитозана со степенью деацетилирования 82% (ЗАО «Биопрогресс», Россия);
- Фосфатный буферный раствор $\text{pH}=6.86$ ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) (ЗАО НПИП «Уралхиминвест», Россия);
- Боратный буферный раствор $\text{pH}=9.18$ ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (ЗАО НПИП «Уралхиминвест», Россия);

- Уксусная кислота (ЗАО НПП «Уралхиминвест», Россия);
- Фосфорная кислота (ЗАО НПП «Уралхиминвест», Россия);
- Борная кислота (ЗАО НПП «Уралхиминвест», Россия);
- Гидроксид натрия (ЗАО НПП «Уралхиминвест», Россия);
- Деагломерированная суспензия оксида алюминия (0.3 мкм) (Allied High tech products, Inc., США);
- Гексацианоферрат (II) калия (Sigma-Aldrich, США);
- Гексацианоферрат (III) калия (Sigma-Aldrich, США);
- Хлорид калия (ООО «ТД Малиновое озеро», Россия);
- Плазма крови (ГБУЗ РСПК, Россия);
- Моча здорового мужчины;
- Деионизированная вода.

2.3. Методика модифицирования рабочих электродов

2.3.1. Приготовление полиэлектrolитного комплекса на основе хитозана

Полиэлектrolитный комплекс хитозана готовился на основе гидрохлорида хитозана (с молекулярной массой 30 кДа и степенью деацетилирования 75%) и натриевой соли N-сукцинилхитозана (с молекулярной массой 200 кДа, полученный из хитозана со степенью деацетилирования 82%),

Гидрохлорид хитозана получали в виде пленки из солянокислого раствора хитозана (0.25 г хитозана в 50 мл 1%-ного раствора соляной кислоты) путем высушивания на воздухе и далее под вакуумом до постоянной массы. Водные дисперсии полиэлектrolитного комплекса получали путем добавления к водным растворам N-сукцинил-хитозана (0.005 %) по каплям водный раствор гидрохлорида хитозана (0.005 %) при интенсивном перемешивании (500 об/мин) и температуре 25°C с интервалом между введением порций 2 мин. При добавлении к полученному раствору новых порций раствора гидрохлорида хитозана происходило разделение фаз (образуется устойчивая опалесценция общей системы). Область существования дисперсий частиц полиэлектrolитного комплекса указанных полисахаридов

ограничивается мольным соотношением равным 0.1, выше которого уже в процессе смешения компонентов наблюдается выпадение осадка комплекса [165, 166]. Полиэлектролитный комплекс хранился в течении 5 суток в холодильнике.

2.3.2. Модифицирование стеклоуглеродного электрода с использованием композитов на основе хитозана и α -, β -, γ -циклодекстринов

Модификатор стеклоуглеродного электрода состоял из однородной смеси 1 мл полиэлектролитного комплекса и 1 мл 5 г/л раствора α -, β -, γ -циклодекстринов в дистиллированной воде. Модифицирование стеклоуглеродного электрода проводили путем нанесения 10 мкл раствора ПЭК и ЦД на подготовленную поверхность стеклоуглеродного электрода капельным методом и последующим высушиванием под инфракрасной лампой при температуре 80 °С в течение 10 мин, затем охлаждали при комнатной температуре и регистрировали вольтамперограммы.

2.3.3. Модифицирование стеклоуглеродного электрода с использованием композита на основе хитозана и ПТКК

В качестве твердой подложки для модифицирования 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислотой использовали графитированную сажу Carboblack C с удельной поверхностью 10 м²/г и размером частиц 0.18-0.25 мкм.

ПТКК синтезировали из 3,4,9,10-перилентетракарбонового диангидрида. Для закрепления модифицированной графитированной сажи на поверхности стеклоуглеродного электрода использовали полиэлектролитный комплекс хитозана.

Для получения модифицированной графитированной сажи Carboblack C 0.5 г 3,4,9,10-перилентетракарбонового диангидрида растворяли в 60 мл 1 М КОН и кипятили полученный раствор в течение 12 часов в колбе с обратным холодильником. Затем раствор охлаждался при комнатной температуре. После охлаждения в раствор постепенно приливали концентрированную соляную кислоту (до pH=1) при перемешивании со скоростью 1300 об/мин с добавлением 5

г стеклянных шариков ($d=2$ мм). Полученную суспензию ПТКК отделяли от шариков декантацией и полученный осадок собирали центрифугированием с последующим многократным промыванием в деионизированной воде и высушиванием в вакууме при комнатной температуре. Далее Carbolack C добавляли к суспензии ПТКК в 100 мл воды в соотношении Carbolack C к ПТКК как 10:1 и перемешивали в течение 2 часов со скоростью 200 об/мин. Модифицированный Carbolack C отфильтровывали и сушили в вакууме в течение 12 часов до постоянной массы.

На стеклоуглеродный электрод наносилась капля композита, состоящего из суспензии (10 мкл) полиэлектролитного комплекса и модифицированного ПТКК Carbolack C в соотношении 1:0.01. После нанесения высушивали под ИК-лампой при температуре 80 °С в течение 10 мин, затем охлаждали при комнатной температуре и регистрировали вольтамперограммы.

Очистку электрода от композита проводили с помощью полировки на специальном материале Spec-Cloth Adhesive black disc 200 мм, с нанесенной на него деагломерированной суспензией оксида алюминия (0.3 мкм), в течении 1 минуты, с последующим многократным промыванием деионизированной водой и высушиванием на воздухе при комнатной температуре.

2.4. Приготовление анализируемых растворов

2.4.1. Приготовление стандартных растворов

Смесь ионов гексацианоферрата (II) и гексацианоферрата (III), представляющую обратимую окислительно-восстановительную систему, готовили на фоне 0.1 М KCl. Необходимая концентрация составляла 5 мМ, для ее получения брали навески гексацианоферрата (II) – 0.1056 г., гексацианоферрата (III) – 0.0823 г., KCl – 0.745 г. помещали в колбу на 100 мл и растворяли деионизированной водой. Полученный раствор хранили в темном месте, без доступа света. Раствор $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 мМ) использовали в качестве стандартного при электрохимических измерениях.

Стандартные растворы D- и L-тирозина (0.001 М) получали растворением точных навесок соответствующего реагента в 100 мл 0.1 М фосфатного буферного раствора (рН=6.86). Растворы с меньшими концентрациями получали последовательным разбавлением исходных растворов фосфатным буферным раствором непосредственно перед измерениями.

Стандартные растворы R- и S-атенолола (0.0005 М) получали растворением точных навесок соответствующего реагента в 100 мл 0.1 М боратного буферного раствора (рН=9.18). Растворы с меньшими концентрациями получали последовательным разбавлением исходных растворов боратным буферным раствором непосредственно перед измерениями.

Стандартные растворы D- и L-метионина (0.0015 М) получали растворением точных навесок соответствующего реагента в 100 мл 0.1 М фосфатного буферного раствора (рН=6.86).

В качестве индифферентных электролитов использовали фосфатный буферный раствор с рН=6.86 и боратный буферный раствор с рН=9.18, которые готовили растворением стандарта-титра в деионизованной воде в мерной колбе на 1000 см³, рН полученной буферной смеси проверяли на рН-метре со стеклянным электродом.

2.4.2. Приготовление модельных растворов реальных образцов

Для моделирования реальных образцов использовали растворы, содержащие мочу и плазму крови человека. Образцы мочи и плазмы крови объемом 2.5 мл центрифугировали в течение 10 мин и разбавляли в 10 раз буферным раствором. В полученные растворы добавляли известные количества энантиомеров для получения растворов с концентрациями 100, 300, 700 мкМ для энантиомеров тиролина и 10, 15, 20 мкМ для энантиомеров атенолола. Образцы мочи получали с письменного согласия донора, плазма крови предоставлена Уфимской Республиканской станцией переливания крови. Все эксперименты проводили в соответствии с действующим законодательством.

2.4.3. Приготовление модельных растворов смеси энантиомеров тирозина

Для приготовления растворов смеси энантимеров тирозина были высчитаны массы навесок L- и D-Тир чтобы при растворении в 100 мл фонового раствора общая концентрация Тир в каждой колбе соответствовала 0.6 мМ, а содержание L-Тир было 0, 20, 40, 60, 80, 100 мас. %.

Для приготовления всех водных растворов использовали сверхчистую деионизованную воду с удельной проводимостью 0.1 мкСм/см.

2.5. Электрохимические измерения

Электрохимические измерения проводили в стандартной трехэлектродной ячейке со стеклоуглеродным электродом ($d=3$ мм), хлоридсеребряным электродом сравнения и вспомогательным электродом, выполненным из платиновой пластинки площадью 200 мм².

Циклические вольтамперограммы регистрировали на потенциостате-гальваностате AUTOLAB PGSTAT 204 в стандартной трехэлектродной ячейке. Регистрация циклических вольтамперограмм проводилась в диапазоне потенциалов от 0.5 до 1.3 В со скоростью развертки потенциалов 0.1 В/с.

Дифференциально-импульсные вольтамперограммы (ДИВ) регистрировались в диапазоне потенциалов от 0.5 до 1.3 В с амплитудой 50 мВ, интервалом времени 0.25 с, временем модуляции 0.025 с и скоростью развертки 20 мВ/с.

Импедансные измерения проводились на импедансметре с помощью модуля FRA32M в стандартной трех электродной ячейке. Спектры импеданса регистрировались в диапазоне частот переменного тока от 500 кГц до 0.1 Гц с амплитудой 10 мВ.

Массив данных для каждого образца состоял из 5 параллельных измерений. Перед каждым измерением поверхность электрода стабилизировали установлением соответствующего потенциала в открытой цепи (функция Open circuit potential в программном обеспечении NOVA). Все расчеты токов и

потенциалов пиков окисления и расчет эквивалентных электрических схем выполнялись в программном обеспечении AUTOLAB NOVA 2.1.

Для хемометрической обработки данных использовалось программное обеспечение The Unscrambler (CAMO, Норвегия).

Все измерения проводились в термостатируемых ячейках при температуре 25 ± 0.1 °C.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Вольтамперометрическое распознавание и определение энантиомеров атенолола с использованием композитов на основе хитозана и α -, β -, γ -циклодекстринов

Атенолол является лекарственным веществом, блокирующим кардиоселективные β -адрено-рецепторы. Это соединение чаще всего используется для лечения различных сердечно-сосудистых заболеваний, таких как инфаркт миокарда, стенокардия, сердечная аритмия и гипертония. Артериальная гипертензия – это заболевание, число которых в последние годы чрезвычайно возросло, что приводит к увеличению потребления β -блокаторов. Кроме того, АТН, выделяемый с мочой спортсмена, может быть свидетельством употребления допинга. Поэтому анализ АТН вызывает большой интерес при проведении фармакологических и химических исследований. Тем не менее, для атенолола, как одного из наиболее популярных представителей этого класса препаратов, обычно отмечается самая низкая энантиоселективность и чувствительность при использовании ЭВС, в связи с чем в литературе относительно мало работ на эту тему. Проблему можно решить, применив сенсорную систему типа «электронный язык», которая состоит из нескольких простых в изготовлении, близких по характеристикам и имеющих перекрестную чувствительность сенсоров [112, 167-169]. Для разработки таких сенсоров были выбраны сходные между собой классические хиральные селекторы α -, β -, γ -циклодекстрины. На рисунке 3.1 представлена конструкция предлагаемого сенсора, состоящего из хиральных селекторов, токопроводящей полимерной подложки и СУЭ. Для закрепления циклодекстринов на поверхности СУЭ использовали полиэлектролитный комплекс хитозана.

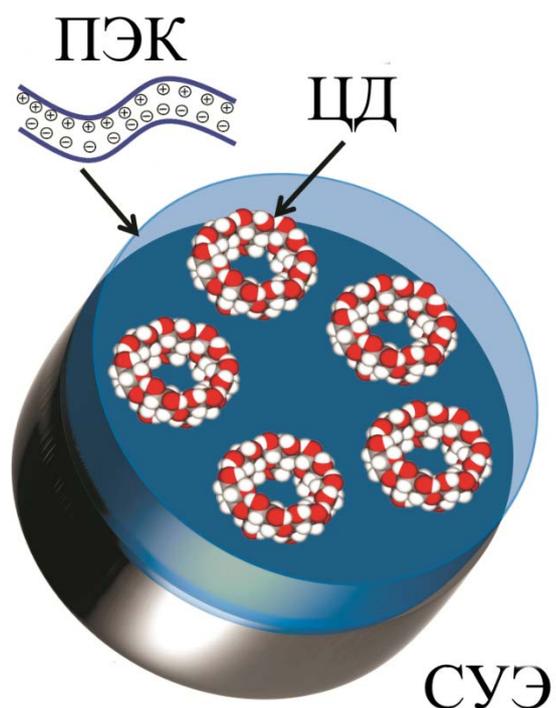


Рисунок 3.1 – Схема стеклоуглеродного электрода, модифицированного композитами на основе ПЭК хитозана и α -, β -, γ -циклодекстринов

В литературе описаны примеры использования ЦД для определения и разделения энантимеров β -адреноблокаторов с применением различных методов. Методом молекулярно-динамического моделирования показано, что водородные связи между ЦД и данными энантиомерами играют важную роль в процессе хирального распознавания [170-172] и способствуют вхождению энантиомеров в полость ЦД с образованием комплексов включения с различным числом и разной природой образующихся связей. В частности, у Атн имеется три центра взаимодействия с образованием водородных связей, а также вследствие гидрофобного взаимодействия (рисунок 3.2). Гидрофобное взаимодействие между фенильной группой Атн и полостью ЦД обуславливает образование стабильных комплексов хозяин-гость, а разница в количестве водородных связей, образованных между ЦД и энантиомерами Атн, увеличивает хиральную дискриминацию последних помимо электростатического взаимодействия между положительно заряженными атомами азота боковой цепи атенолола и отрицательными зарядами ЦД [170].

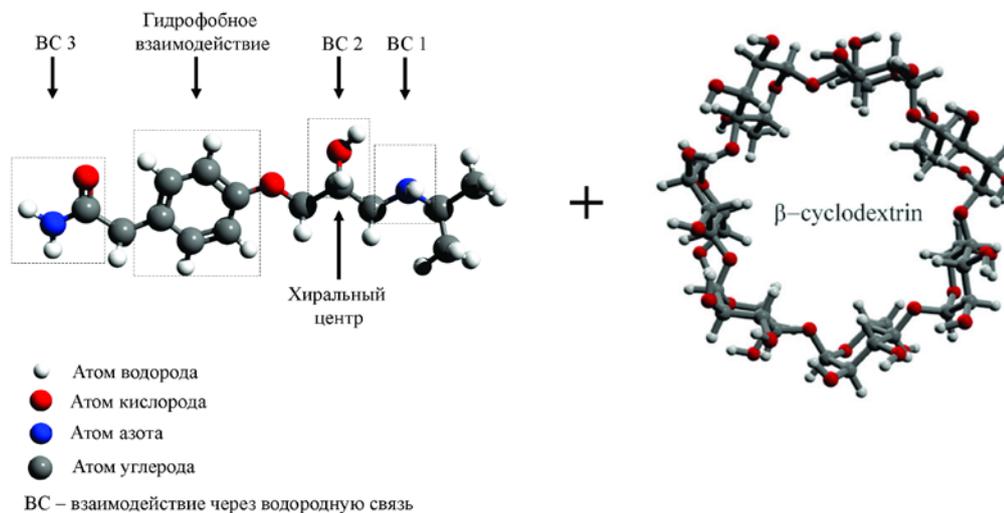


Рисунок 3.2 – Схема возможных взаимодействий молекулы Атн с β-ЦД

3.1.1. Выбор оптимального состава композита на основе ПЭК хитозана и α-, β-, γ-циклодекстринов

Электроаналитические свойства и энантиоселективность сенсоров зависят от качественного и количественного состава модифицирующего покрытия. Для разработки сенсоров с высокой воспроизводимостью и энантиоселективностью был выбран оптимальный состав компонентов модификатора. Критериями оптимальности служили значения максимальных токов пиков стандартной редокс-пары ферроцианидов $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, а также их относительное стандартное отклонение при проведении параллельных измерений и соотношение токов пиков окисления R-Атн к S-Атн.

На первом этапе была изучена зависимость относительного стандартного отклонения токов пиков стандартной редокс-пары ферроцианидов $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ от объема ПЭК хитозана, наносимого на поверхность СУЭ. Рисунок 3.3 показывает, что при увеличении объема ПЭК хитозана от 3 до 10 мкл воспроизводимость измерений возрастает, что может быть обусловлено более полным покрытием рабочей поверхности электрода. Дальнейшее увеличение объема ПЭК хитозана до 20 мкл приводит к возрастанию относительного стандартного отклонения и, соответственно, уменьшению воспроизводимости измерений, что по-видимому

связано с уменьшением электропроводности пленки ПЭК хитозана и изменением характеристик модифицирующего покрытия при увеличении его толщины.

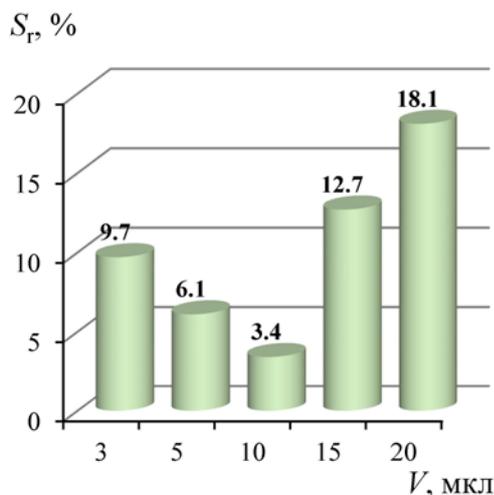


Рисунок 3.3 – Зависимость относительного стандартного отклонения тока пика окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ от объема ПЭК хитозана, наносимого на поверхность СУЭ

На следующем этапе было изучено влияние содержания ЦД на токи пиков окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ и их относительное стандартное отклонение при проведении измерений. Показано, что при увеличении содержания ЦД в диапазоне от 1 до 15 г/л ток пика окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ возрастает (рисунок 3.4 а). Можно предположить, что этот эффект связан с образованием в пленке ПЭК хитозана полостей, облегчающих перенос электрона к поверхности электрода. Однако увеличение содержания ЦД приводит к росту относительного стандартного отклонения и, следовательно, к уменьшению воспроизводимости измерений (рисунок 3.4 б). Поэтому композиты ПЭК хитозана с содержанием 10 и 15 г/л ЦД в дальнейших исследованиях не использовались.

Последним этапом при выборе оптимального состава модифицирующего покрытия было изучение влияния содержания ЦД на энантиоселективность сенсоров по отношению к энантиомерам Атн. Из рисунка 3.5 видно, что при увеличении содержания ЦД от 1 до 5 г/л энантиоселективность сенсора существенно возрастает. Поэтому для дальнейших исследований был использован композит ПЭК хитозана, содержащий 5 г/л ЦД.

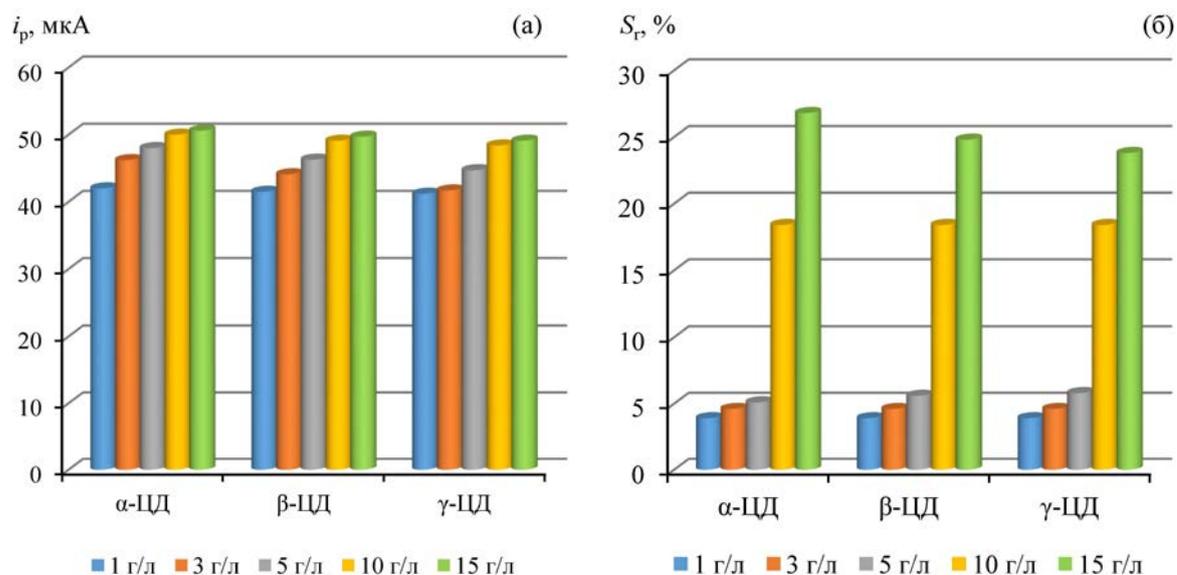


Рисунок 3.4 – Зависимость тока пика окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (а) и его относительного стандартного отклонения (б) от содержания ЦД

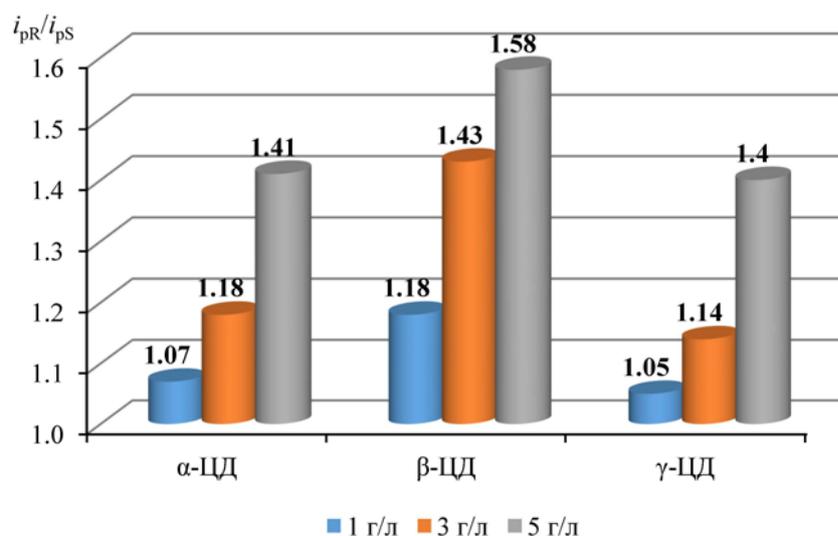


Рисунок 3.5 – Зависимость энантиоселективности (i_{PR}/i_{PS}) сенсоров по отношению к энантиомерам АТН от содержания ЦД.

3.1.2. Изучение морфологии поверхности сенсоров

Для изучения морфологии поверхности и характеристик исследуемого стеклоуглеродного электрода и вольтамперометрического сенсора на его основе использовали стандартную обратимую окислительно-восстановительную пару ферроцианидов калия. На рисунке 3.6 а изображены циклические вольтамперограммы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, из которых можно видеть, что добавление на

поверхность стеклоуглеродного электрода каждого компонента модификатора изменяет высоту пика окисления ферроцианидов. На электроде, модифицированном только полиэлектролитным комплексом гидрохлорида хитозана и сукцинил хитозана, высота тока пика окисления на циклической вольтамперограмме является наименьшей, что по-видимому связано с увеличением сопротивления переноса электрона в результате образования пленки полиэлектролитного комплекса. При добавлении α -, β -, γ -циклодекстринов высота пика окисления незначительно возрастает, причем наблюдается закономерность увеличения токов пиков окисления в ряду γ -, β -, α -циклодекстринов, что скорее всего обусловлено разным размером полостей, образующихся структур.

Площадь эффективной поверхности модифицированного электрода рассчитывали с использованием уравнения Рэндлса-Шевчика [173]:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{2/3} A D^{1/2} c v^{1/2},$$

где I_p – высота тока пика, А; n – число переносимых электронов; A – эффективная площадь поверхности электрода, см²; D – коэффициент диффузии, см²/с (для $K_4[Fe(CN)_6]$ в 0.1 М растворе KCl $n = 1$, $D = 7.6 \times 10^{-6}$ см²/с); c – концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$, моль/мл; v – скорость развертки потенциала, В/с. Рассчитанные площади эффективных поверхностей представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Эффективная площадь поверхности предложенных сенсоров, рассчитанная по уравнению Рэндлса-Шевчика

Сенсоры	Эффективная площадь поверхности электрода (A), мм ²
СУЭ	4.86
СУЭ/ПЭК	2.73
СУЭ/ПЭК- α -ЦД	3.41
СУЭ/ПЭК- β -ЦД	3.24
СУЭ/ПЭК- γ -ЦД	3.07

Из таблицы видно, что наименьшей эффективной площадью поверхности обладает электрод модифицированный только ПЭК, а с добавлением

циклодекстринов площадь несколько возрастает, что согласуется с описанными выше циклическими вольтамперограммами. Как правило, наряду с циклической вольтамперометрией для электрохимической характеристики поверхности сенсора используют спектроскопию электрохимического импеданса. СЭИ с помощью метода комплексных амплитуд позволяет получить сведения о происходящих на поверхности сенсора физических явлениях, таких как сопротивление переноса электронов на границе раздела фаз, емкость двойного электрического слоя, сопротивление раствора и множество других параметров в зависимости от сложности системы.

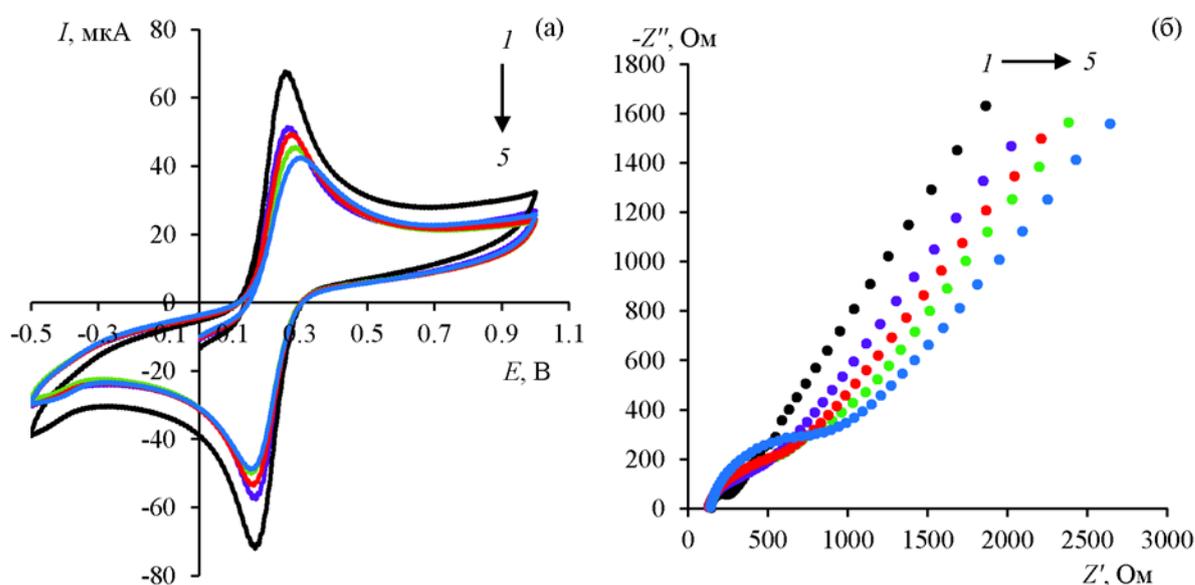


Рисунок 3.6 – (а) Циклические вольтамперограммы 5.0 мМ раствора редокс-пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) на различных электродах (1 – СУЭ; 2 – СУЭ/ПЭК- α -ЦД; 3 – СУЭ/ ПЭК- β -ЦД; 4 – СУЭ/ПЭК- γ -ЦД; 5 – СУЭ/ПЭК) на фоне 0.1 М КСl при скорости развертки потенциала 0,1 В/с. (б) Диаграммы Найквиста для различных (1 – СУЭ; 2 – СУЭ/ПЭК- α -ЦД; 3 – СУЭ/ ПЭК- β -ЦД; 4 – СУЭ/ПЭК- γ -ЦД; 5 – СУЭ/ПЭК) в 0.1 М растворе КСl, содержащем 5.0 мМ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

Из рисунка 3.6 б видно, что спектры импеданса имеют классический вид (полуокруг в высокочастотной области и прямая линия под углом 45° в низкочастотной области), которые описываются эквивалентной электрической схемой Рэндлса. Не вдаваясь в глубокую интерпретацию и расчеты предложенной

эквивалентной схемы, по полученным спектрам можно оценить сопротивление переноса электронов на границе раздела фаз электрод/раствор, которое соответствует диаметру полукруга полученных спектров. Наибольшим сопротивлением обладает электрод модифицированный только ПЭК, и как в случаи с ЦВ сопротивление переноса электронов начинает уменьшатся при добавления ЦД. Таким образом метод СЭИ также подтверждает полученные закономерности в функционировании сенсора. В результате исследования электрохимического поведения стандартной обратимой окислительно-восстановительной пары ферроцианидов калия на поверхности СУЭ, модифицированного полиэлектrolитным комплексом хитозана α -, β -, γ -циклодекстринами, с помощью ЦВ и СЭИ, можно сделать вывод, что предложенные сенсоры в различных комбинациях модифицирования могут быть использованы в дифференциально-импульсной вольтамперометрии для дальнейших исследований.

Для изучения морфологии поверхности стеклоуглеродного электрода, модифицированного полиэлектrolитным комплексом хитозана и β -циклодекстринами были использованы методы атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии. На рисунке 3.7 а представлен АСМ снимок поверхности стеклоуглеродного электрода, модифицированного только полиэлектrolитным комплексом хитозана.

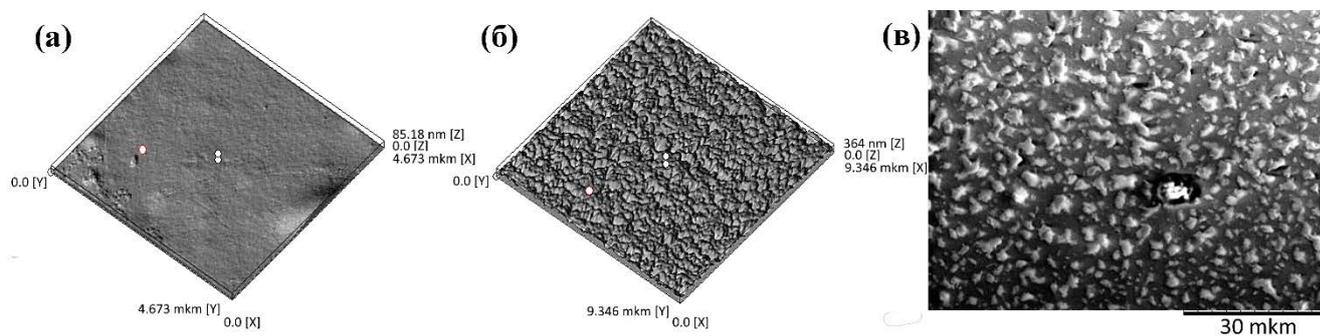


Рисунок 3.7 – АСМ снимок поверхности сенсоров СУЭ/ПЭК (а) и СУЭ/ПЭК- β -ЦД (б). СЭМ снимок поверхности СУЭ/ПЭК- β -ЦД (в)

Из снимка видно, что поверхность имеет гладкую структуру с редкими включениями. Однако при добавлении циклодекстринов в объем полимера на снимках АСМ (рисунок 3.7 б) и СЭМ (рисунок 3.7 в) отчетливо наблюдаются неровные участки с включениями сферических зерен β -циклодекстринов с диаметром от 10 до 40 нм, что подтверждает возможность использования последних в качестве хиральных селекторов для распознавания энантиомеров атенолола.

3.1.3. Зависимость величины тока пика от скорости развертки потенциала

Изучено влияние скорости развертки потенциала в диапазоне от 20 до 200 мВ/с на электрохимическое окисление энантиомеров Атн. С увеличением скорости развертки потенциала, максимальный ток пика возрастает. Для установления природы наблюдаемых токов были исследованы зависимости $\lg i_p = \lg v + \text{const}$, где v – скорость изменения потенциала электрода.

По величине тангенса угла наклона данной зависимости можно судить о природе лимитирующей стадии электродного процесса. Для диффузионных процессов тангенс угла наклона близок к 0.5, для процессов, контролируемых адсорбцией, он приближается к единице. В нашем случае тангенс угла наклона указанных зависимостей близок к 0.5 ($0.42 \div 0.50$, $R^2 = 0.98 \div 0.99$). Это позволяет сделать вывод о том, что лимитирующей стадией электродного процесса на модифицированных СУЭ является диффузия электроактивного вещества к поверхности электрода (рисунок 3.8).

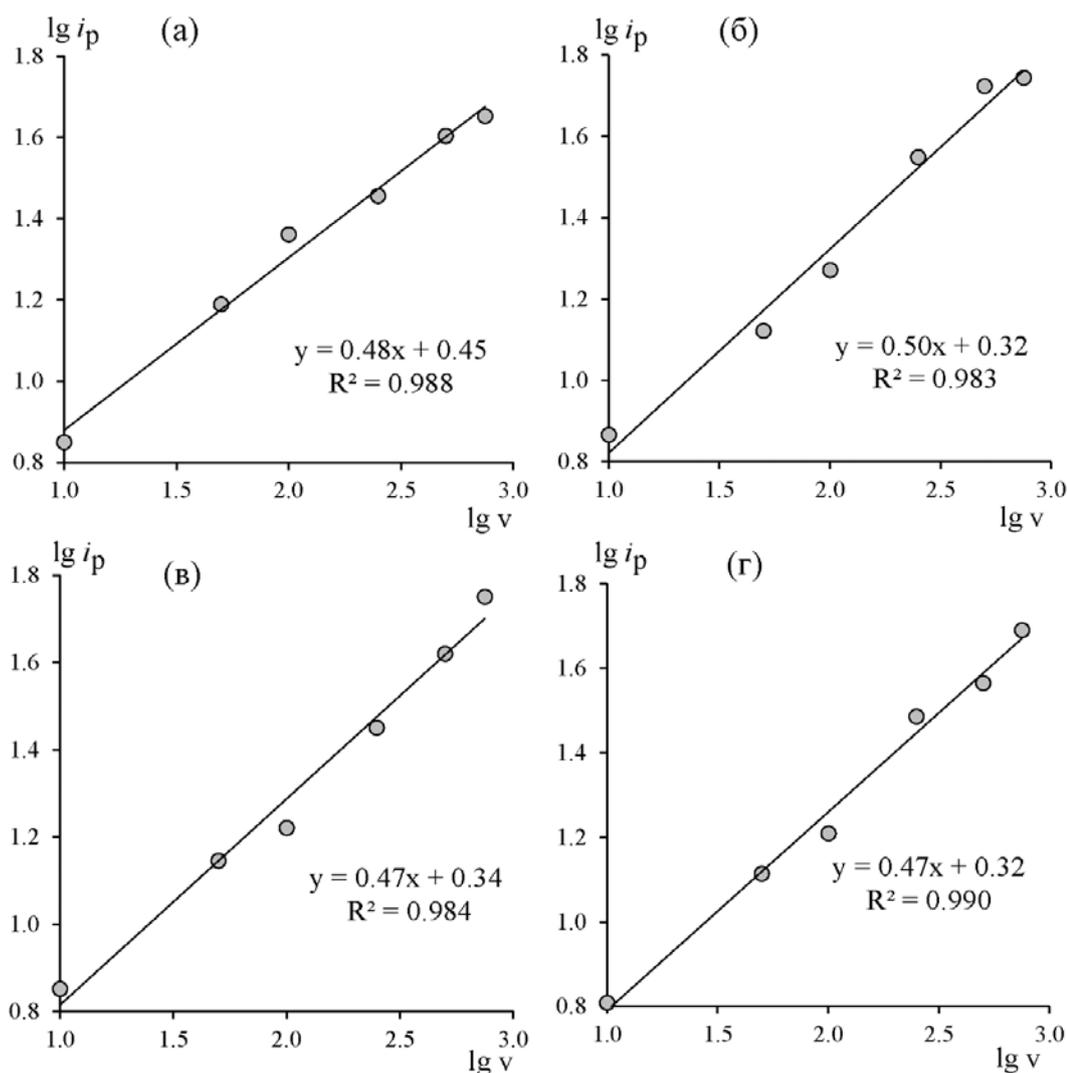


Рисунок 3.8 – Зависимость максимальных токов пиков окисления 0.5 мМ Атен от скорости наложения потенциала модифицированного ПЭК (а), СУЭ/ПЭК- α -ЦД (б), СУЭ/ ПЭК- β -ЦД (в), СУЭ/ПЭК- γ -ЦД (г) электрода

3.1.4. Вольтамперометрическое поведение энантиомеров атенолола на модифицированных электродах

Согласно литературным данным [174-176], атенолол или 4-(2-гидрокси-3-изопропиламинопропокси)-фенилацетамид окисляется на фоне буферных растворов с рН в диапазоне от 8 до 10 с переносом на первой стадии двух электронов (рисунок 3.9) и последующим окислением продуктов электрохимической реакции на второй стадии при более положительных потенциалах.

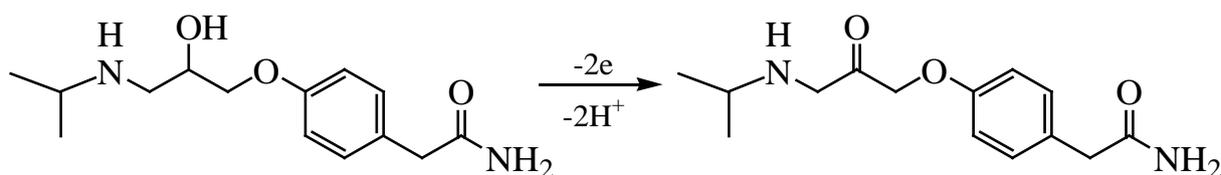


Рисунок 3.9 – Предлагаемый механизм электрохимического окисления 4-(2-гидрокси-3-изопропиламинопропокси)фенилацетамида

Было выявлено, что в кислой среде пик окисления атенолола не наблюдается, в нейтральной наблюдается слабовыраженный пик, в отличии от щелочной среды. Поэтому зависимость тока пика от рН изучали в диапазоне рН от 6 до 11. Результаты показали, что самые высокие значения тока пика наблюдаются при рН=9 (рисунок 3.10), что соответствует литературным данным [176]. Поэтому для дальнейший исследований в качестве фонового электролита был использован боратный буферный раствор с рН=9.18.

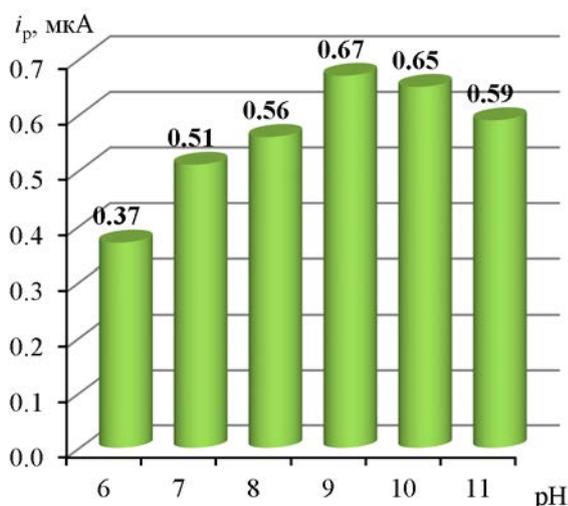


Рисунок 3.10 – Зависимость тока пика окисления 0.5 мМ S-Атн на СУЭ/ПЭК в универсальном буферном растворе (Бриттона-Робинсона) от рН

Энантиомеры Атн в боратном буферном растворе с рН 9.18 на СУЭ, модифицированном композитами ПЭК-ЦД, необратимо окисляются с образованием четких анодных пиков в исследуемом диапазоне потенциалов. На рисунке 3.11 представлены циклические вольтамперограммы для S- и R-

энантиомеров АТН с концентрацией растворов 0.5 мМ, регистрация вольтамперограмм осуществлялась на СУЭ/ПЭК-ЦД при скорости развертки, равной 100 мВ/с.

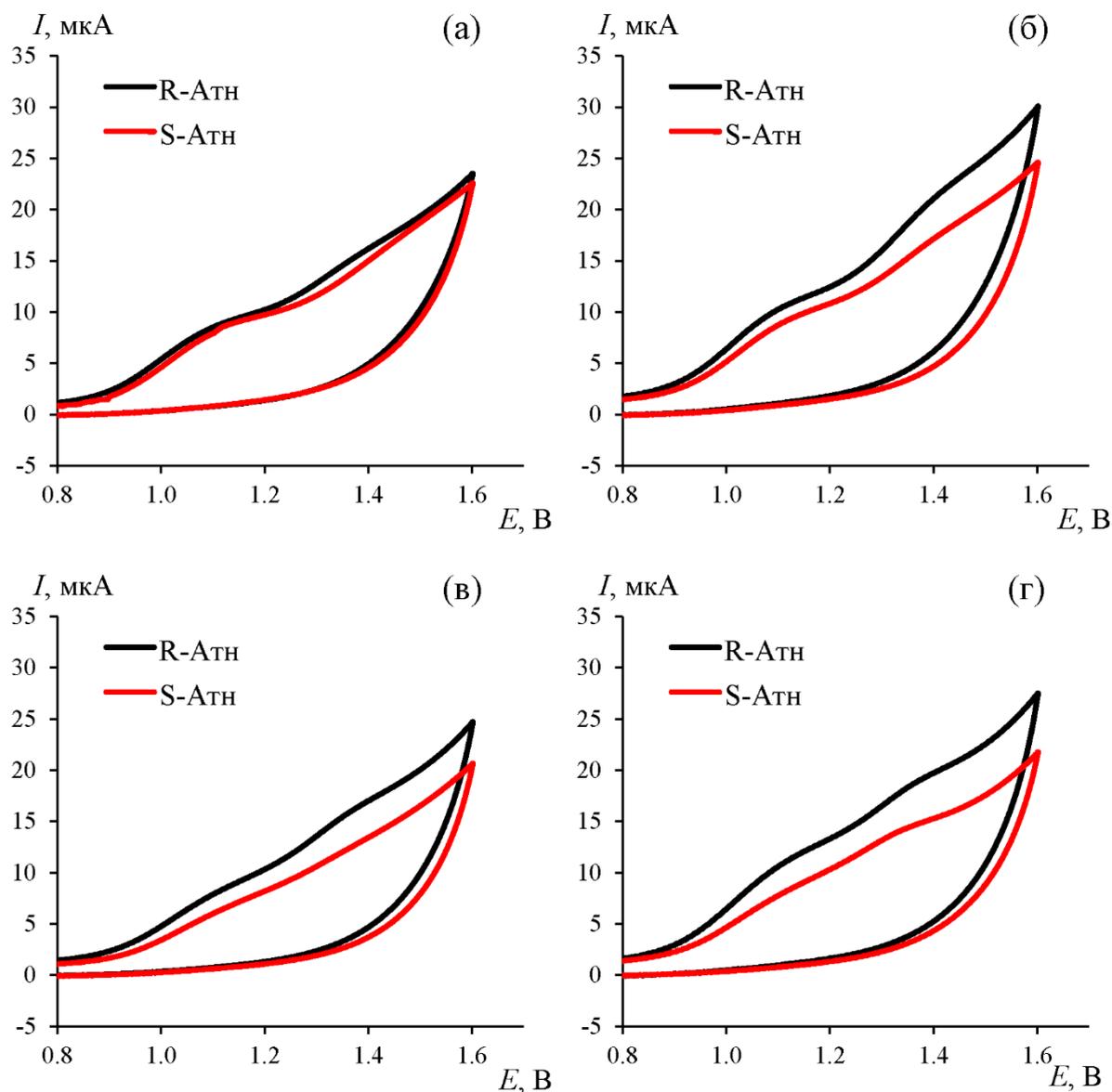


Рисунок 3.11 – Циклические вольтамперограммы 0.5 мМ растворов энантиомеров АТН на фоне боратного буферного раствора (рН 9.18) на СУЭ/ПЭК (а), СУЭ/ПЭК- α -ЦД (б), СУЭ/ПЭК- β -ЦД (в) и СУЭ/ПЭК- γ -ЦД (д)

На рисунке 3.11 также показано, что аналитические сигналы энантиомеров АТН на СУЭ/ПЭК незначительно отличаются друг от друга, тогда как с добавлением производных ЦД в модификатор эти различия более заметны. Это

связано с тем, что ЦД могут образовывать комплексы с АТН и действуют как хиральные селекторы.

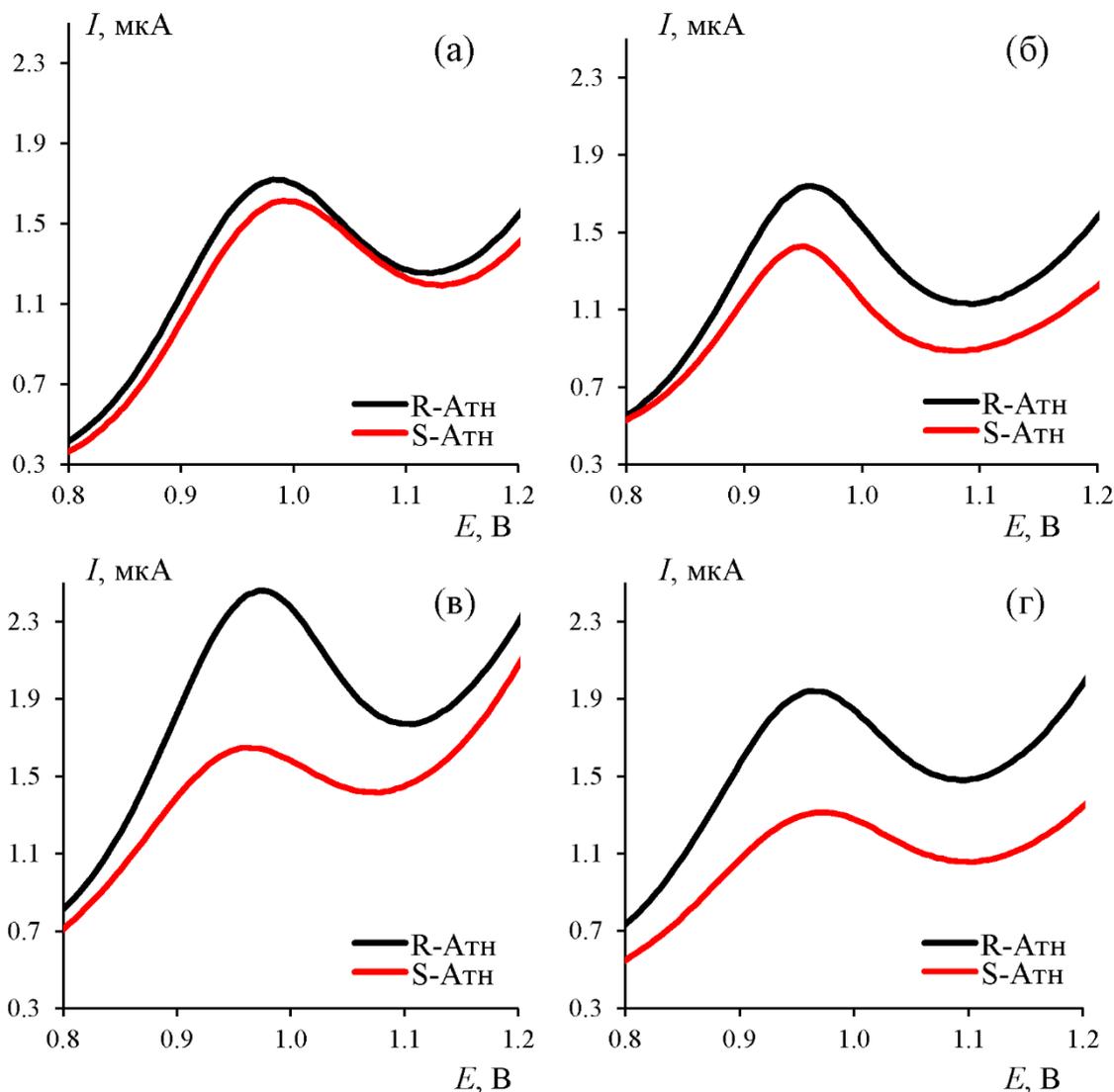


Рисунок 3.12 – Дифференциально-импульсные вольтамперограммы 0.5 мМ растворов энантиомеров АТН на фоне боратного буферного раствора (рН 9.18) на СУЭ/ПЭК (а), СУЭ/ПЭК- α -ЦД (б), СУЭ/ПЭК- β -ЦД (в) и СУЭ/ПЭК- γ -ЦД (д)

Аналогичный эффект наблюдался при регистрации дифференциально-импульсных вольтамперограмм окисления энантиомеров АТН (рисунок 3.12) [177]. Электроаналитические характеристики дифференциально-импульсных вольтамперограмм энантиомеров АТН на СУЭ, модифицированных ПЭК и композитами α -, β - и γ -ЦД, представлены в таблице 3.2.

Как видно из таблицы 3.2 пределы обнаружения энантиомеров Атн имеют низкие значения, наибольшая чувствительность наблюдается для R-Атн на всех электродах. При этом наибольшая разница в токах пиков окисления энантиомеров наблюдается на сенсоре СУЭ/ПЭК-β-ЦД ($i_{pR}/i_{pS} = 1.58$). Можно предположить, что это связано с соответствием размеров молекулы атенолола ($4.32 \times 4.88 \times 14.83 \text{ \AA}$) диаметру полости β-ЦД, равному $6.0 - 6.5 \text{ \AA}$, тогда как диаметры α- и γ-ЦД равны $4.7 - 5.3$ и $7.5 - 8.3$, соответственно [109]. Важным требованием, предъявляемым к электродам в системах типа «электронный язык», является перекрестная чувствительность, которая проявляется, в данном случае, в различной чувствительности модифицированных электродов к одному и тому же энантиомеру. Обработывая одновременно вольтамперометрические сигналы, полученные на различных электродах, можно добиться большей избирательности сигнала, чем при использовании единичного сенсора.

Таблица 3.2 – Электроаналитические характеристики сенсоров для определения энантиомеров Атн в условиях дифференциально-импульсной вольтамперометрии. $C_{\text{Атн}} = 0.5 \text{ мМ}$, фоновый электролит боратный буферный раствор (рН 9.18)

Электрод	$E_p, \text{ В}$		$i_p, \text{ мкА}$		$\Delta i_p / \Delta C, \text{ мкА/мМ}$		$C_{\text{min}}, \text{ мкМ}$	
	R-Атн	S-Атн	R-Атн	S-Атн	R-Атн	S-Атн	R-Атн	S-Атн
СУЭ/ПЭК	0.97	0.98	0.67	0.60	1.15	1.03	3.57	3.98
СУЭ/ПЭК-α-ЦД	0.96	0.95	0.96	0.68	1.63	1.11	2.52	3.69
СУЭ/ПЭК-β-ЦД	0.98	0.96	1.14	0.72	1.85	1.18	2.22	3.47
СУЭ/ПЭК-γ-ЦД	0.97	0.96	0.81	0.58	1.40	0.99	2.93	4.14

Токи пиков увеличиваются линейно с увеличением концентрации энантиомера Атн в диапазоне от 0.008 до 0.5 мМ (рисунки 3.13, 3.14). Стандартные калибровочные графики показывают, что все электроды проявляют энантиоселективную дискриминацию энантиомеров атенолола в этом диапазоне концентраций.

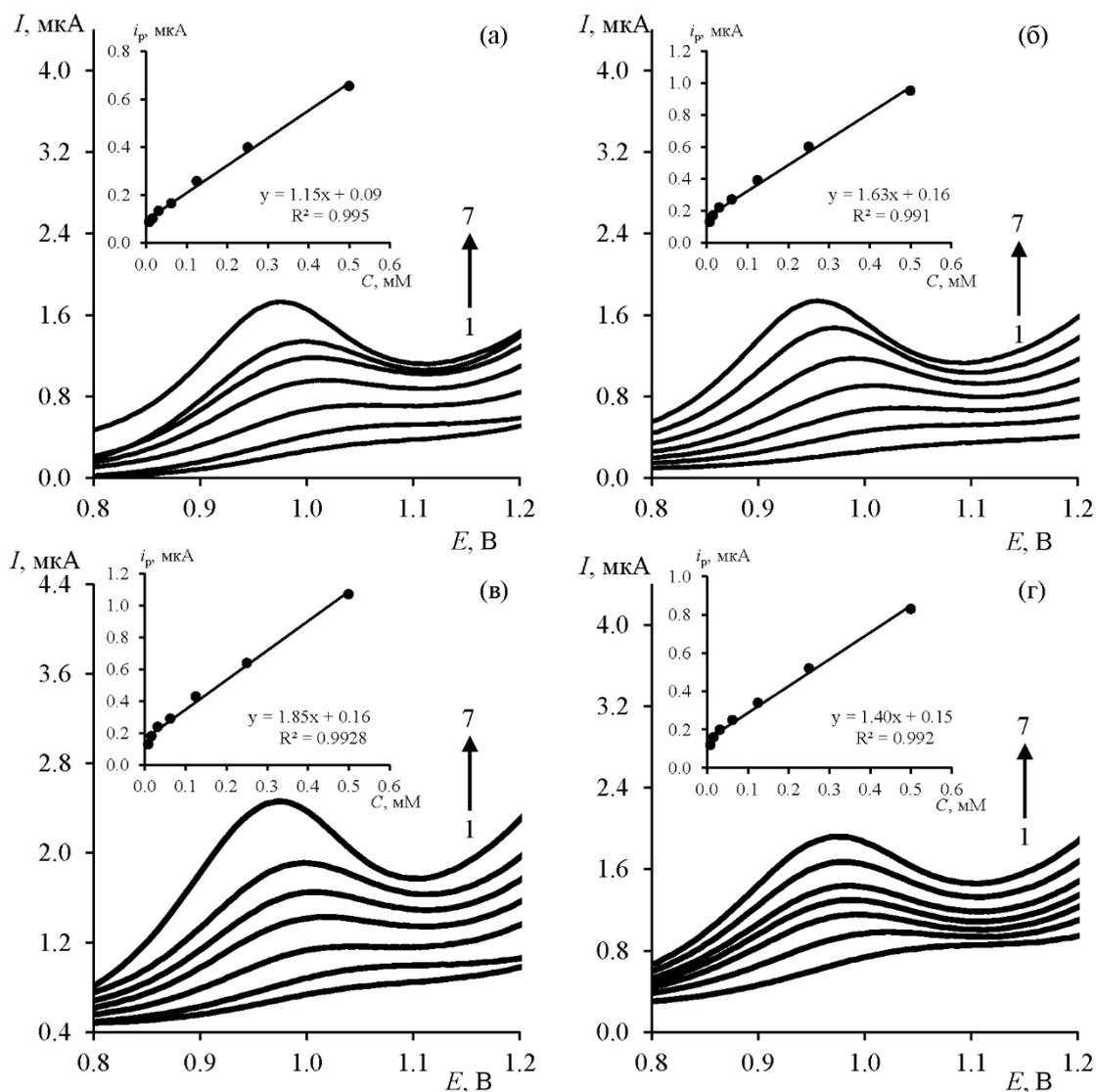


Рисунок 3.13 – Дифференциально-импульсные вольтамперограммы для электродов СУЭ/ПЭК (а), СУЭ/ПЭК-α-ЦД (б), СУЭ/ПЭК-β-ЦД (в), СУЭ/ПЭК-γ-ЦД (г) для различных концентраций R-Атн: 0.008 (1), 0.016 (2), 0.031 (3), 0.062 (4), 0.125 (5), 0.25 (6), 0.5 (7) мМ в боратном буферном растворе (рН 9.18).

Вставки: соответствующие калибровочные графики

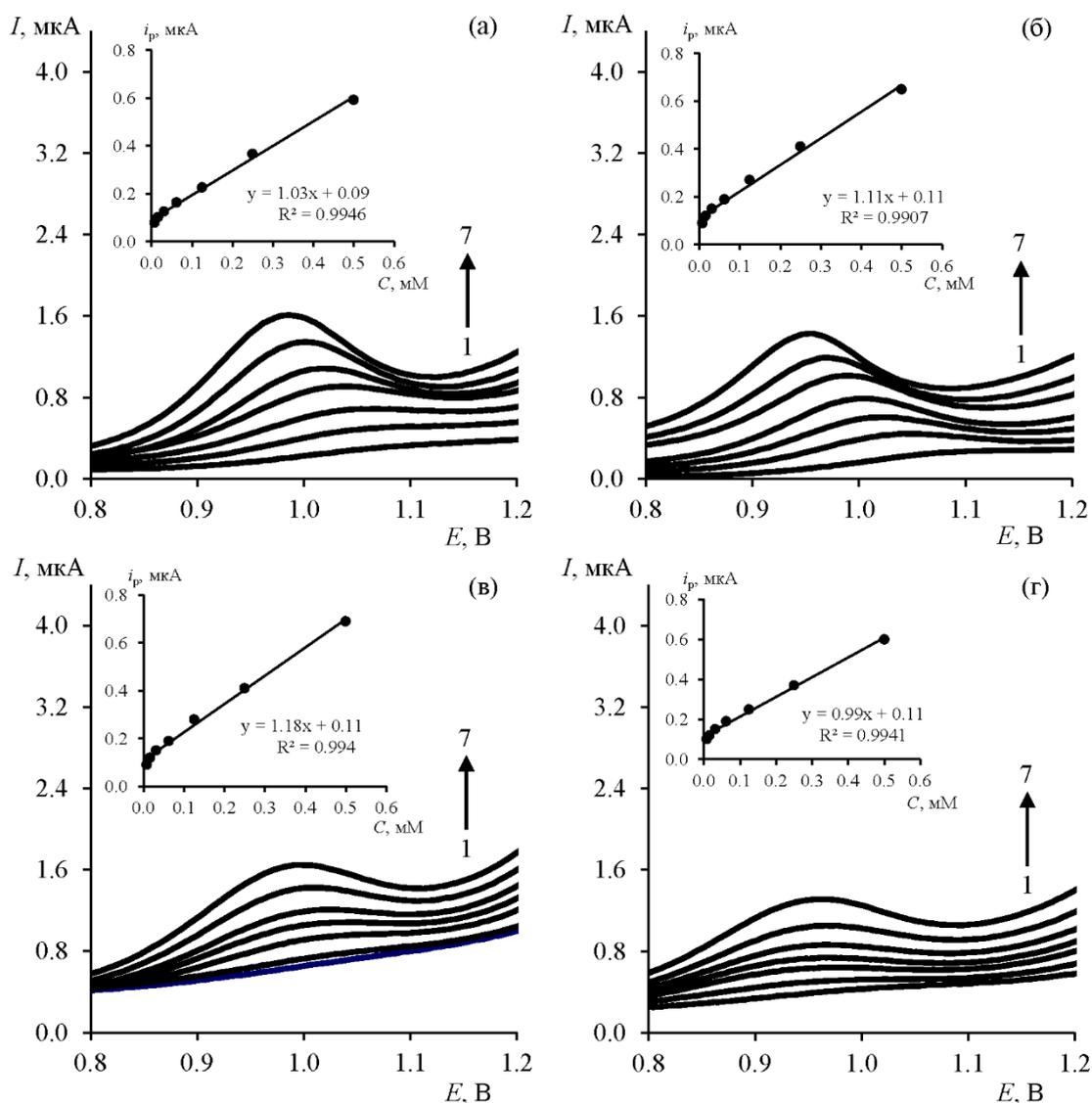


Рисунок 3.14 – Дифференциально-импульсные вольтамперограммы для электродов СУЭ/ПЭК (а), СУЭ/ПЭК- α -ЦД (б), СУЭ/ПЭК- β -ЦД (в), СУЭ/ПЭК- γ -ЦД (г) для различных концентраций S-Атн: 0.008 (1), 0.016 (2), 0.031 (3), 0.062 (4), 0.125 (5), 0.25 (6), 0.5 (7) мМ в боратном буферном растворе (рН 9.18).

Вставки: соответствующие калибровочные графики

3.1.5. Распознавание и определение энантимеров ателолола в реальных объектах

Бета-адреноблокатор ателолол при лечении снижает смертность при гипертонии и продлевает выживаемость пациентов с ишемической болезнью сердца. Он также используется для лечения тревожных расстройств, профилактики мигрени, гипертиреоза и тремора. В течение 24 часов около 50-85% введенной дозы

выводится с мочой с минимальным метаболизмом. Бета-блокаторы токсичны и имеют узкий терапевтический диапазон. Обычными эффектами, связанными с передозировкой атенолола, являются летаргия, нарушение дыхания, хрипы, синусовая пауза, брадикардия, сердечная недостаточность, гипотензия, бронхоспазм и гипогликемия. По этой причине анализ атенолола в биологических жидкостях имеет большое значение в фармацевтических исследованиях [175].

Для анализа атенолола в биологических жидкостях с использованием предложенных сенсоров были приготовлены растворы, содержащие мочу и атенолол с концентрациями 10.0, 15.0, 20.0 мкМ, что соответствует содержанию атенолола в биологических жидкостях, равному 10-120 мкМ, при его применении для лечения [176].

В таблице 3.3 приведены результаты количественного определения энантиомеров атенолола в моче методом «введено-найдено», относительное стандартное отклонение составило $1.3 \div 3.3$ %, что говорит об удовлетворительном результате определения [177].

Таким образом, чувствительные вольтамперометрические сенсоры на основе полиэлектролитных комплексов хитозана и его сукцинамида с циклодекстринами могут быть использованы для обнаружения препаратов на основе атенолола в биологических жидкостях.

Таблица 3.3 – Определение энантиомеров Атн в присутствии мочи на СУЭ/ПЭК-β-ЦД с помощью ДИВ на фоне боратного буферного раствора (рН 9.18) (n=5; P=0.95)

Образец	Введено, мкМ		Найдено, мкМ		S _r , %	
	R-Атн	S- Атн	R- Атн	S- Атн	R- Атн	S- Атн
Моча 1	10.0	10.0	9.9 ± 2.0	10.7 ± 2.3	2.0	3.3
Моча 2	15.0	15.0	14.7 ± 1.5	15.9 ± 1.1	2.5	1.2
Моча 3	20.0	20.0	21.0 ± 1.2	21.1 ± 1.6	1.3	2.9

3.1.6. Хемометрическое распознавание энантиомеров атенолола

Как видно из таблицы 3.2, пределы чувствительности и обнаружения энантиомеров АТН предлагаемых сенсоров сопоставимы с другими вольтамперометрическими сенсорами, о которых сообщалось в последние годы [174-176]. Однако, они не позволяют однозначно распознать энантиомеры АТН и их смеси из-за близости аналитических характеристик соответствующих вольтамперограмм. Вольтамперограммы энантиомеров АТН на СУЭ, модифицированных ПЭК- (α , β , γ)-ЦД, незначительно отличаются друг от друга. С целью надежного распознавания энантиомеров атенолола, вольтамперограммы обрабатывали с использованием метода главных компонент.

Вольтамперограммы были преобразованы в точки на плоскости главных компонент (ГК), построенные вдоль максимальной дисперсии экспериментальных данных (ГК1). Затем следующая главная компонента (ГК2) была построена ортогонально ГК1 и направлена вдоль следующего наибольшего изменения в экспериментальных данных. В отличие от классического подхода, когда из имеющегося массива экспериментальных данных, например, токов пиков или потенциалов, учитываются только самые важные параметры сигналов, в хемометрической обработке матрица данных формируется для всей вольтамперограммы. Для увеличения вероятности распознавания энантиомеров АТН использовалась сенсорная система с тремя индикаторными электродами, модифицированными ПЭК и композитами α -, β - и γ -ЦД с перекрестной чувствительностью к S- и R-АТН. В этом случае кластеры (данные параллельных измерений) энантиомеров не пересекаются друг с другом на графиках счетов в координатах ГК1-ГК2, наблюдается увеличение объясненной дисперсии до 65%, что обеспечивает надежное распознавание энантиомеров АТН (рисунок 3.15).

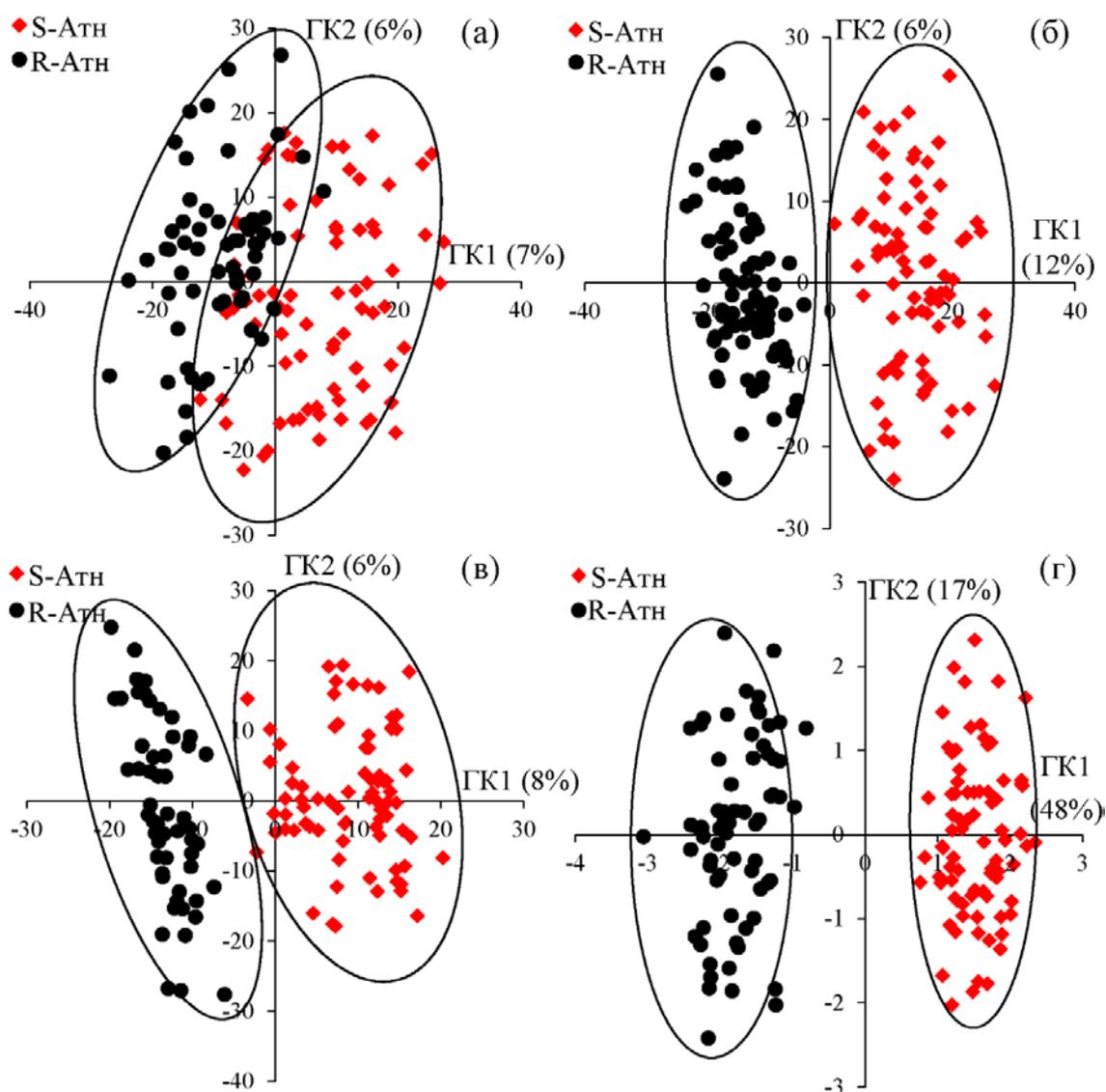


Рисунок 3.15 – Графики счетов МГК моделирования дифференциально-импульсных вольтамперограмм 0.5 мМ растворов R- и S-энантиомеров АтН на СУЭ модифицированных ПЭК- α -ЦД (а), ПЭК- β -ЦД (б), ПЭК- γ -ЦД (в) и трехэлектродной сенсорной системы (д)

МГК является популярным методом для хемометрической обработки экспериментальных данных, который позволяет экспериментатору предварительно оценить полученные результаты, но для более точного распознавания энантиомеров АтН обычно используют метод проекций на латентные структуры с дискриминантным анализом.

ПЛС-ДА – это инструмент классификации, основной целью которого является распознавание. Задача ПЛС-ДА в этом исследовании состояла в том,

чтобы предсказать принадлежность энантиомеров АТН к тому или иному классу. Значения регрессионных откликов рассчитываются на этапе идентификации тестовых выборок. Принадлежность выборок к соответствующим классам эталонных выборок определяется по близости регрессионных откликов к единице (или 100%). В качестве образцов сравнения использовали вольтамперограммы чистых растворов энантиомеров АТН с концентрацией 50 мкМ. Набор для тестирования представлен вольтамперограммами окисления чистых растворов АТН с такой же концентрацией, но приготовленных отдельно от образцов сравнения. Набор данных для каждого образца формировался из пяти параллельных измерений с регистрацией десяти вольтамперограмм, включая 100 значений мгновенных токов при различных потенциалах. Итоговая матрица была 100×100 . Перед построением модели все переменные в исходной матрице центрируются по среднему арифметическому и нормируются до стандартного отклонения, чтобы все переменные имели одинаковый статистический вес. В ПЛС-ДА предпочтительно использовать следующие показатели качества: чувствительность, специфичность и эффективность. Чувствительность класса отражает процент объектов, которые принадлежат данному классу и правильно распознаются моделью. Специфичность класса отражает процент объектов, которые не принадлежат к данному классу и правильно отклонены моделью. Среднее геометрическое значение чувствительности и специфичности - это эффективность [178]. Качество классификации наивысшее в случае использования трехсенсорной системы, модель не перепутала образцы друг с другом, классовая эффективность составила для R-АТН 96.3 % и для S-АТН 97.5 % (таблица 3.4).

Как видно из таблицы 3.4 классовая эффективность единичных сенсоров оказалась ниже, чем для трехсенсорной системы, из чего можно сделать вывод, что предлагаемые сенсоры обладают перекрестной чувствительностью и использование трехсенсорной системы целесообразно. Возможность распознавания энантиомеров с помощью предложенной сенсорной системы была проверена на другом, более доступном классе соединений – аминокислоте метионин [179].

Таблица 3.4 – Дискриминационные отклики ПЛС-ДА-модели для R- и S-Атн на стеклоуглеродных электродах, модифицированных полиэлектролитным комплексом хитозана с α -, β -, γ -циклодекстринами, и с использованием сенсорной системы

ТО** \ ОС*	СУЭ/ПЭК- α -ЦД		СУЭ/ПЭК- β -ЦД		СУЭ/ПЭК- γ -ЦД		Трехсенсорная система	
	R-Атн	S-Атн	R-Атн	S-Атн	R-Атн	S-Атн	R-Атн	S-Атн
R-Атн	83.6	16.5	94.5	6.8	89.8	11.2	97.1	3.6
S-Атн	14.1	87.7	9.7	92.1	13.9	91.2	4.4	98.7

ОС* – образцы сравнения, ТО** – тестовые образцы.

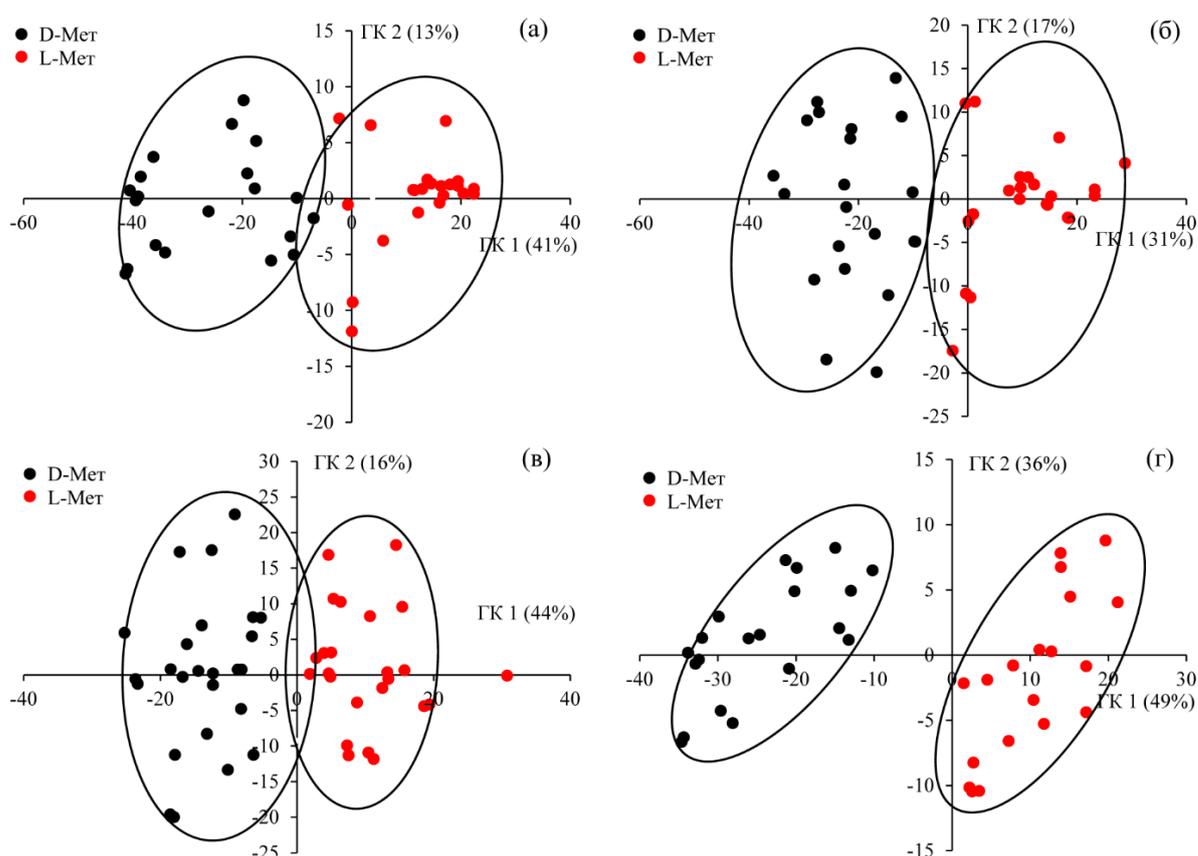


Рисунок 3.16 – Графики счетов МГК моделирования дифференциально-импульсных вольтамперограмм 1.5 мМ растворов D- и L-энантиомеров метионина на СУЭ модифицированных ПЭК- α -ЦД (а), ПЭК- β -ЦД (б), ПЭК- γ -ЦД (в) и трехэлектродной сенсорной системы (д)

Как и в случае с атенололом на единичных сенсорах наблюдаются близкие электроаналитические характеристики для вольтамперограмм L- и D- метионина, что отражается на графике счетов МГК моделирования (наблюдается пересечение двух кластеров) (рисунок 3.16). С применением сенсорной системы кластеры располагаются далеко друг от друга, свидетельствуя о хорошем результате распознавания. Классовая эффективность, оцененная с помощью метода ПЛС-ДА, в данном случае составила 99 % для обоих энантиомеров (таблица 3.5) [179]. Сравнивая эффективность распознавания энантиомеров атенолола и метионина с помощью сенсорной системы на основе циклодекстринов, можно сделать вывод, что обе системы проявляют высокую классовую эффективность (близкую к 100 %), но так как единичные сенсоры по отношению к метионину проявляют более низкую чувствительность и специфичность распознавания, то перекрестная чувствительность единичных сенсоров для создания сенсорной системы выше.

Таблица 3.5 – Дискриминационные отклики ПЛС-ДА-модели для D- и L- метионина на стеклоуглеродных электродах, модифицированных полиэлектролитным комплексом хитозана с α -, β -, γ -циклодекстринами, и с использованием сенсорной системы ($n = 5$; $P = 0.95$)

ТО** \ ОС*	СУЭ/ПЭК- α -ЦД		СУЭ/ПЭК- β -ЦД		СУЭ/ПЭК- γ -ЦД		Трехсенсорная система	
	D-Мет	L- Мет	D-Мет	L- Мет	D-Мет	L- Мет	D-Мет	L- Мет
D-Мет	84	3	76	17	60	40	99	1
L- Мет	18	62	11	79	17	59	1	99

ОС* – образцы сравнения, ТО** – тестовые образцы.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработаны сенсоры, основанные на классических хиральных селекторах – циклодекстринах, которые довольно хорошо изучены. С применением хемотрических методов предложена мультисенсорная система на основе таких сенсоров, успешно апробированная для определения и распознавания энантиомеров атенолола, по которым в мировой научной литературе имеются лишь единичные исследования.

3.2. Вольтамперометрическое распознавание и определение энантиомеров тирозина с использованием композитов на основе хитозана и 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты

Как известно, многие биохимические процессы в живых организмах протекают с участием различных хиральных рецепторов, по этой причине особого внимания заслуживает изучение в ЭВС новых хиральных материалов [87-91]. Хиральность таких материалов может быть обеспечена двумя основными способами: использование оптически чистых энантиомерных блоков для конструирования структур с заданной хиральностью и применение ахиральных блоков, которые под внешним воздействием образуют хиральные структуры. В последнем случае хиральность генерируется *in situ* в процессе самосборки.

Вследствие большого разнообразия таких материалов с их помощью можно целенаправленно проектировать высокоселективные, устойчивые и стабильные во времени хиральные ЭВС. Успехи в синтетической химии и материаловедении позволяют получать ЭВС, модифицированные простыми и доступными хиральными материалами синтетического и природного происхождения.

Во второй части диссертации разработан и изучен сенсор на основе композита ПЭК хитозана и хиральных нанокластеров 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты (рисунок 3.17). Растворимость и недостаточная стабильность пленок хитозана в водных растворах ограничивают их использование для изготовления сенсоров. Для повышения эффективности распознавания обычно проводят структурную модификацию. В нашем случае использовался полиэлектролитный комплекс хитозана и сукцинамида хитозана, преимуществом которого является стабильность пленки из-за электронейтральности комплекса, вследствие чего уменьшается вязкость и появляется возможность формирования тонких пленок на поверхности электрода.

Установлено, что эффективность хирального распознавания хитозановых пленок значительно повышается при ведении хиральных селекторов. В данном случае хиральная платформа была создана на основе самоорганизующихся нанокластеров ПТКК. В литературе имеются сведения о хиральных

вольтамперометрических сенсорах на основе нанокомпозитов ПТКК [54, 100, 180]. Нанокластеры ПТКК образуются при внешнем воздействии (интенсивном перемешивании) в результате их осаждения на поверхности частиц графитированной сажи Carboblack C. Carboblack C представляет собой углеродный наноматериал, состоящий из квазиграфитовых наночастиц с уникальными физико-химическими свойствами, такими как высокая проводимость и большая площадь поверхности, химическая стабильность и способность образовывать стабильную дисперсию без каких-либо сложных приготовлений.

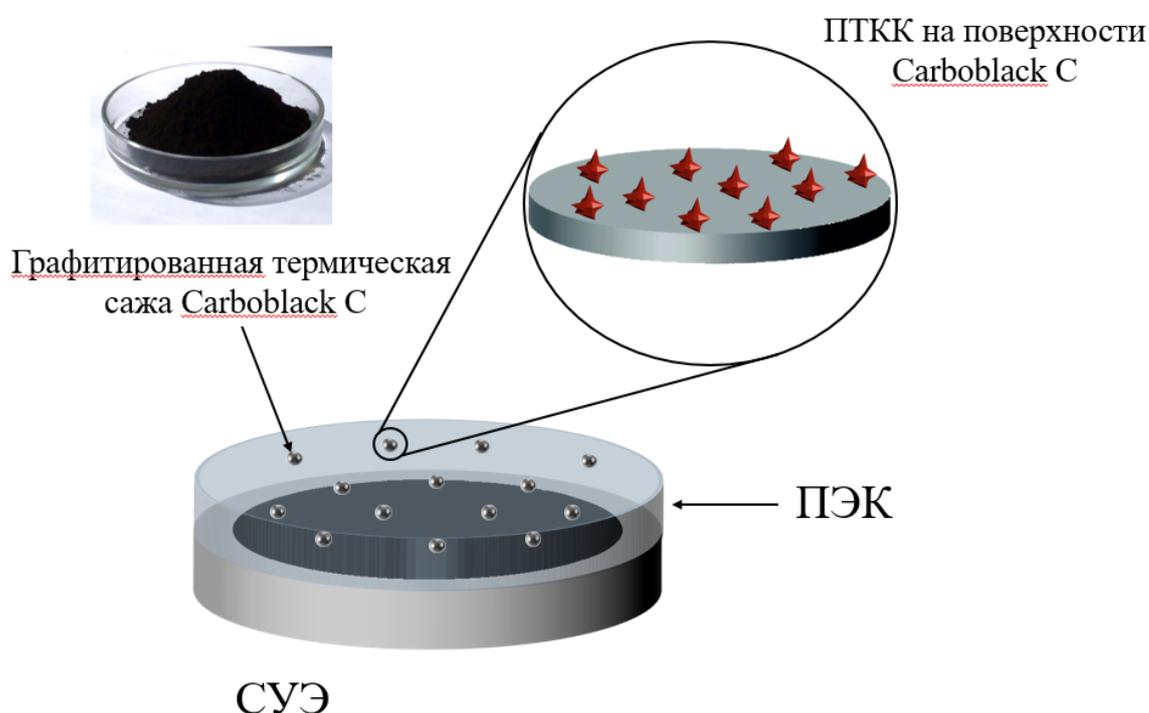


Рисунок 3.17 – Схема стеклоуглеродного электрода, модифицированного композитом на основе ПЭК хитозана и ПТКК

В качестве аналита для апробации энантиоселективности разработанного сенсора использовали хорошо изученную аминокислоту – тирозин. L-энантиомер тирозина – 2-амино-3-(4-гидроксифенил)пропионовая кислота – является ароматической альфа-аминокислотой, которая образуется в организме человека и играет важную роль в синтезе нейротрансмиттеров и липидном обмене, регулирует аппетит, нормализует работу надпочечников, гипофиза, щитовидной железы и др. [181]. Для распознавания и определения энантиомеров тирозина применяют различные методы. В последнее время из-за простоты использования,

экспрессности, низкой стоимости и высокой чувствительности возрос интерес к вольтамперометрическим сенсорам на основе стеклоуглеродных, металлических (Au, Pt и др.) и угольно-пастовых электродов, модифицированных хиральными селекторами [17, 182–184].

3.2.1. Выбор оптимального состава композита на основе ПЭК хитозана и нанокластеров ПТКК

Выбор оптимального состава композита заключался в изучении зависимости относительного стандартного отклонения тока пика окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ от объема ПЭК хитозана, наносимого на поверхность электрода, и содержания ГС-ПТКК в составе композита, а также зависимости энантиоселективности сенсора к энантиомерам Тир от соотношения (масс.) ПЭК:ГС-ПТКК (1:0.001, 1:0.005, 1:0.01, 1:0.05, 1:0.1). Влияние объема ПЭК хитозана изучено и представлено в разделе 3.1.1. (рисунок 3.3).

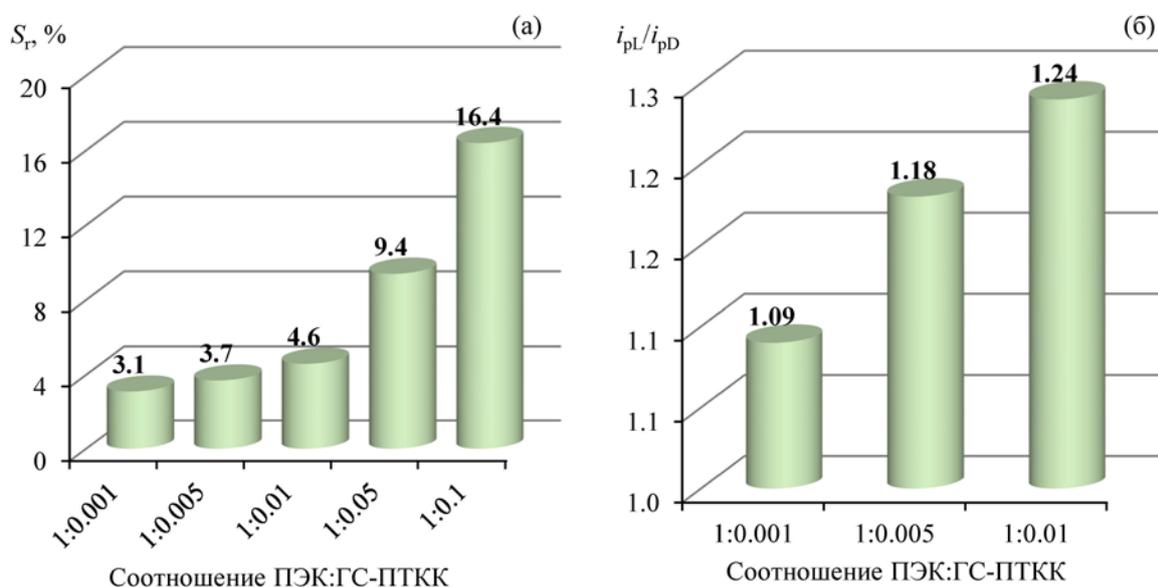


Рисунок 3.18 – Зависимость относительного стандартного отклонения тока пика окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (а) и энантиоселективности сенсора по отношению к энантиомерам Тир (б) от соотношения ПЭК:ГС-ПТКК.

Зависимость относительного стандартного отклонения от содержания ГС-ПТКК, представленная на рисунке 3.18 а, показывает, что увеличение содержания

ГС-ПТКК в составе композита приводит к уменьшению воспроизводимости измерений. По-видимому, это связано с уменьшением однородности и ухудшением свойств модифицирующего покрытия вследствие того, что избыток ГС-ПТКК частично отслаивается и переходит в анализируемый раствор. Поэтому для дальнейших исследований композиты ПЭК хитозана с ГС-ПТКК с соотношением 1:0.05 и 1:0.1 не использовали.

На следующем этапе была изучена зависимость энантиоселективности сенсора к энантиомерам Тир от соотношения ПЭК:ГС-ПТКК (1:0.001, 1:0.005, 1:0.01). Увеличение содержания ГС-ПТКК в исследуемом диапазоне приводит к увеличению энантиоселективности сенсора (рисунок 3.18 б). Следовательно, оптимальным соотношением ПЭК:ГС-ПТКК является 1:0.01, которое было использовано в дальнейших исследованиях.

3.2.2. Изучение поверхности сенсора

Как и в случае с сенсорами на основе ЦД предлагаемый сенсор был охарактеризован методом ЦВ с использованием стандартной обратимой окислительно-восстановительной пары ферроцианидов калия. На рисунке 3.19 а представлены циклические вольтамперограммы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, из которых можно видеть, что при добавлении на поверхность СУЭ каждого из компонентов модификатора изменяется высота пика окисления ферроцианидов.

На электроде, модифицированном только полиэлектролитным комплексом, высота тока пика окисления на циклической вольтамперограмме является наименьшей, что полностью согласуется с электрохимическим поведением ферроцианидов на предложенных ранее сенсорах. При дальнейшем добавлении графитированной сажи Carbolack С и графитированной сажи, модифицированной 3,4,9,10-тетракарбоновой кислотой, высота пика окисления растет, что по-видимому обусловлено увеличением эффективной площади поверхности электрода.

Площадь эффективной поверхности модифицированного электрода рассчитывали с использованием уравнения Рэндлса-Шевчика [173]. Для СУЭ,

модифицированного только ПЭК хитозана площадь эффективной поверхности составила 2.22 мм², добавление немодифицированной графитированной сажи и модифицированной ПТКК приводит к ее увеличению до 3.75 и 4.26 мм², соответственно, тогда как для «голового» СУЭ площадь эффективной поверхности составляет 5.54 мм².

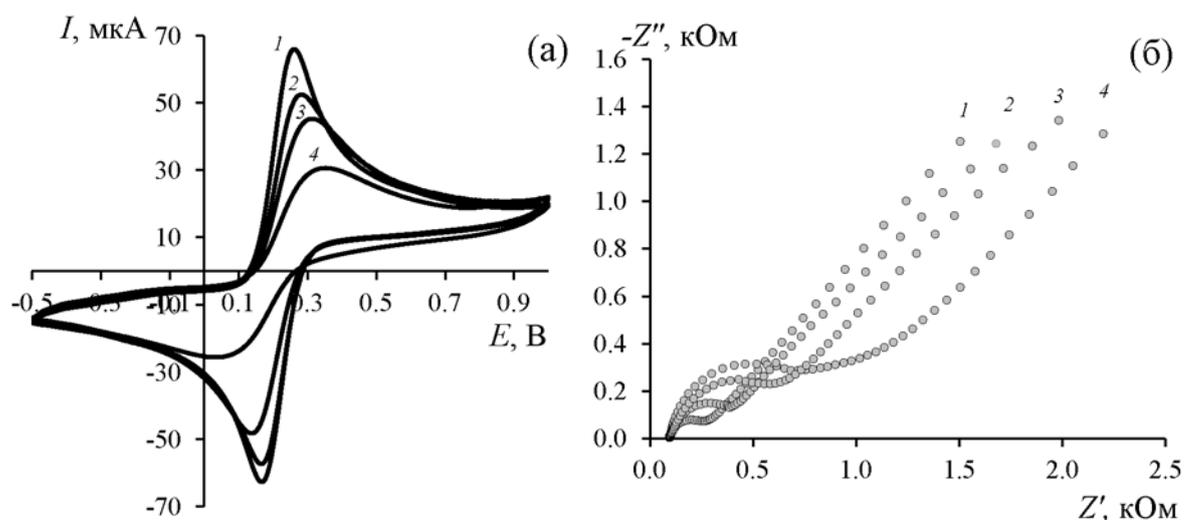


Рисунок 3.19 – (а) Циклические вольтамперограммы 5.0 мМ раствора редокс-пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) на различных электродах (**1** – СУЭ; **2** – СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК; **3** – СУЭ/ ПЭК-ГС; **4** – СУЭ/ПЭК) на фоне 0.1 М КСl; (б) Диаграммы Найквиста для различных электродов (**1** – СУЭ; **2** – СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК; **3** – СУЭ/ ПЭК-ГС; **4** – СУЭ/ПЭК) в 0.1 М растворе КСl, содержащем 5.0 мМ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

Для изучения электрохимических характеристик полученных электродов применяли спектроскопию электрохимического импеданса (рисунок 3.19 б). Спектры импеданса имеют стандартный вид – форму полукруга, и описываются эквивалентной схемой Рэндлса. Из полученных спектров импеданса видно, что данные импедансометрии и циклической вольтамперометрии согласуются между собой, наибольшим сопротивлением обладает стеклоуглеродный электрод, модифицированный только ПЭК ($R_{\text{et}} = 770.64 \text{ Ом}$), при добавлении графитированной сажи Carboblack С перенос электронов облегчается ($R_{\text{et}} = 412.21 \text{ Ом}$), а при включении в ПЭК модифицированного ПТКК ГС значение

сопротивления приближается к голому стеклоуглеродному электроду ($R_{et} = 247.1$ Ом и $R_{et} = 141.51$ Ом, соответственно).

Исходя из полученных данных, вольтамперометрический сенсор, на поверхность которого нанесен композит полиэлектролитного комплекса хитозана и графитированной сажи, модифицированной ПТКК, является стабильным, обладает достаточной проводимостью и может использоваться в дальнейшем для определения энантиомеров тирозина в условиях дифференциально-импульсной вольтамперометрии.

Для изучения морфологии поверхности модифицированных СУЭ использовали также атомно-силовую микроскопию. На рисунке 3.20 приведены АСМ-изображения поверхности СУЭ, модифицированного ПЭК хитозана и композитом ПЭК-ГС-ПТКК.

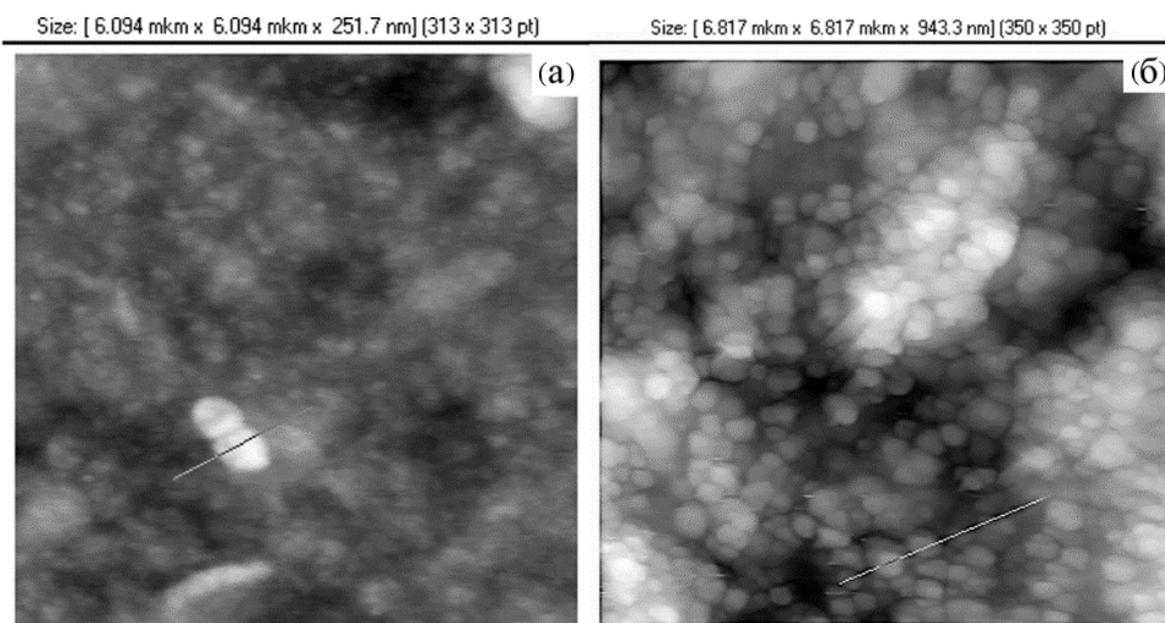


Рисунок 3.20 – АСМ-изображения поверхности СУЭ, модифицированной ПЭК (а) и ПЭК-ГС-ПТКК (б)

В отсутствие ГС-ПТКК поверхность электрода гладкая с редкими включениями в полимерной пленке (рисунок 3.20 а). При нанесении на поверхность СУЭ композита ПЭК-ГС-ПТКК наблюдается неровная зернистая поверхность с диаметром отдельных зерен порядка 300-400 нм и высотой около

100-150 нм (рисунок 3.20 б). Видно, что модификатор равномерно распределен по поверхности электрода.

3.2.3. Зависимость величины тока пика от скорости развертки потенциала

Природу наблюдаемых токов устанавливали с помощью зависимости $\lg i_p$ от $\lg v$, где v – скорость развертки потенциала электрода в диапазоне от 10 до 200 мВ/с (рисунок 3.21).

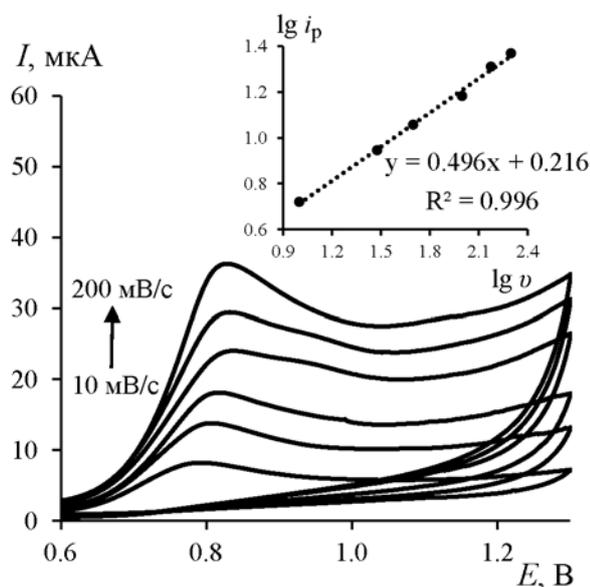


Рисунок 3.21 – Циклические вольтамперограммы 0.6 мМ раствора Тир в фосфатном буферном растворе (рН 6.86) на СУЭ, модифицированном ПЭК-ГС-ПТКК, зарегистрированные при разной скорости развертки потенциала. Вставка: соответствующий график зависимости $\lg i_p$ от $\lg v$

По величине тангенса угла наклона данной зависимости (критерий Семерано) можно определить природу лимитирующей стадии электродного процесса. При тангенсе угла наклона близком к 0.5 наблюдается диффузионный процесс, при более 0.5 – адсорбционный. В нашем случае тангенс угла наклона составляет 0.496 (рисунок 3.21, вставка), следовательно, лимитирующей стадией является диффузионный перенос электроактивного вещества к поверхности электрода.

3.2.4. Электрохимическое окисление энантиомеров тирозина

Из литературных источников известно, что тирозин окисляется (рисунок 3.22) на стеклоуглеродном электроде в диапазоне от 0.5 до 1.0 В, преимущественно в кислой и нейтральной средах [185, 186].

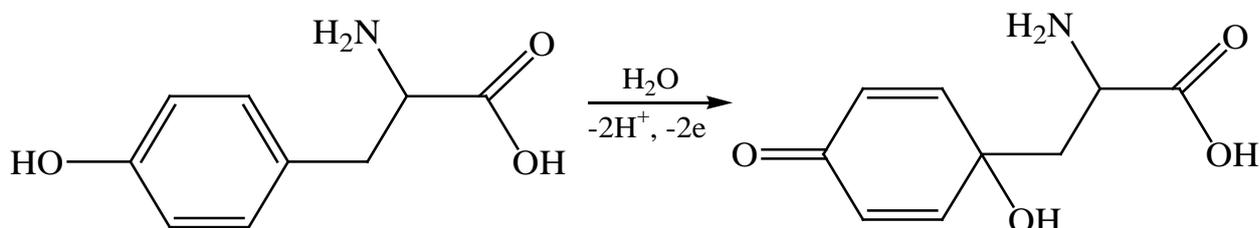


Рисунок 3.22 – Электрохимическая реакция окисления тирозина

В ходе эксперимента при использовании кислой среды подложка полиэлектролитного комплекса хитозана и сукцинил хитозана растворялась, поэтому измерения проводили в фосфатном буферном растворе с рН 6.86, в нейтральной среде подложка была устойчива. Методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии была изучена способность распознавания и определения энантиомеров тирозина с помощью разработанного вольтамперометрического сенсора. На рисунке 3.23 представлены вольтамперограммы окисления энантиомеров тирозина на электродах с различными компонентами модификатора. При нанесении только полиэлектролитного комплекса хитозана и сукцинил хитозана наблюдается небольшое различие в высоте пиков окисления энантиомеров тирозина, что свидетельствует о том, что данный комплекс за счет изначальной хиральности проявляет небольшую энантиоселективность по отношению к энантиомерам тирозина. При добавлении к полиэлектролитному комплексу хитозана и сукцинил хитозана немодифицированной графитированной сажи небольшая энантиоселективность сенсора сохраняется, при этом увеличивается высота токов пиков окисления энантиомеров, вероятно за счет увеличения активной площади поверхности, как и в случае с $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

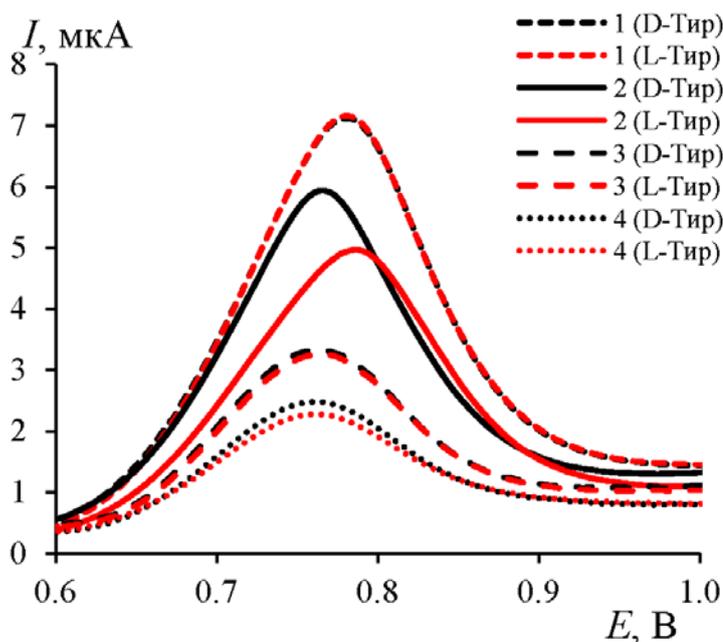


Рисунок 3.23 – Дифференциально-импульсные вольтамперограммы 0.6 мМ растворов энантиомеров тирозина в фосфатном буферном растворе (рН 6.86) на СУЭ (1), СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК (2), СУЭ/ПЭК-ГС (3), СУЭ/ ПЭК (4)

Включение в полиэлектролитный комплекс хитозана и сукцинил хитозана графитированной сажи, модифицированной 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислотой, существенно влияет на форму вольтамперограмм, как на высоту пиков, так и на потенциалы окисления тирозина (таблица 3.6). При этом чувствительность сенсора для D-тирозина больше, чем для L-тирозина. Предел обнаружения рассчитывали по 3σ -критерию.

Селективность взаимодействия между энантиомерами тирозина и хиральным селектором в этом случае может быть обусловлена следующим фактором. Для большинства селекторов обычно рассматривают различия в трехточечном взаимодействии с энантиомерами, а также в устойчивости образующихся диастереомерных комплексов, не являющихся зеркальными отражениями и отличающихся друг от друга физическими и химическими свойствами. Такие комплексы образуются за счет нековалентных взаимодействий: водородных связей, ионных, диполь-дипольных, ван-дер-ваальсовых и π - π -взаимодействий, образования супрамолекулярных структур и др. В случае ЭВС при

модифицировании электрода хиральными нанокластерами на его поверхности могут образоваться хиральные нанополости, которые играют ключевую роль в хиральном распознавании молекул энантиомеров, поскольку по-разному препятствуют их доступу к электродной поверхности, обеспечивая энантиоселективность сенсора [187, 188]. Можно предположить, что в случае использования ПТКК для распознавания энантиомеров Тир энантиоселективность сенсора обусловлена именно хиральностью нанокластеров ПТКК, образующихся за счет внешней индукции и осажденных на поверхности графитированной сажи, которые выступают в роли хирального селектора для энантиомеров тирозина вследствие образования хиральных полостей между нанокристаллами ПТКК [99, 164, 188].

Таблица 3.6 – Электроаналитические характеристики сенсоров для определения энантиомеров тирозина в условиях дифференциально-импульсной вольтамперометрии. $C_{\text{Тир}} = 0.6$ мМ, фоновый электролит фосфатный буферный раствор (рН 6.86)

Электрод	E_p , В		i_p , мкА		$\Delta i_p/\Delta c$, мкА/мМ		C_{\min} , мкМ	
	L-Тир	D-Тир	L-Тир	D-Тир	L-Тир	D-Тир	L-Тир	D-Тир
СУЭ	0.77	0.77	6.11	6.12	8.37	8.38	1.60	1.60
СУЭ/ПЭК	0.76	0.76	1.65	1.91	2.26	2.61	5.93	5.14
СУЭ/ПЭК-ГС	0.76	0.76	2.52	2.72	3.45	3.72	3.89	3.61
СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК	0.79	0.76	3.95	4.91	5.59	6.73	2.39	2.03

Различия в высоте токов пиков и потенциалах окисления энантиомеров тирозина указывают на то, что свободная энергия взаимодействия ПТКК с D-Тир отличается от свободной энергии взаимодействия с L-Тир. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что D-Тир связывается с нанокластерами ПТКК слабее и тем самым быстрее проникает через их поры к поверхности электрода,

вследствие чего для D-Тир наблюдаются более высокие токи окисления, а потенциал пика окисления наблюдается на оси потенциалов левее по отношению к L-Тир.

На рисунке 3.24 представлена зависимость высоты тока пика окисления от концентрации энантиомеров тирозина. При увеличении концентрации L- и D-тирозина наблюдается линейное увеличение высоты тока пиков окисления энантиомеров в диапазоне от 6.25 до 1000 мкМ.

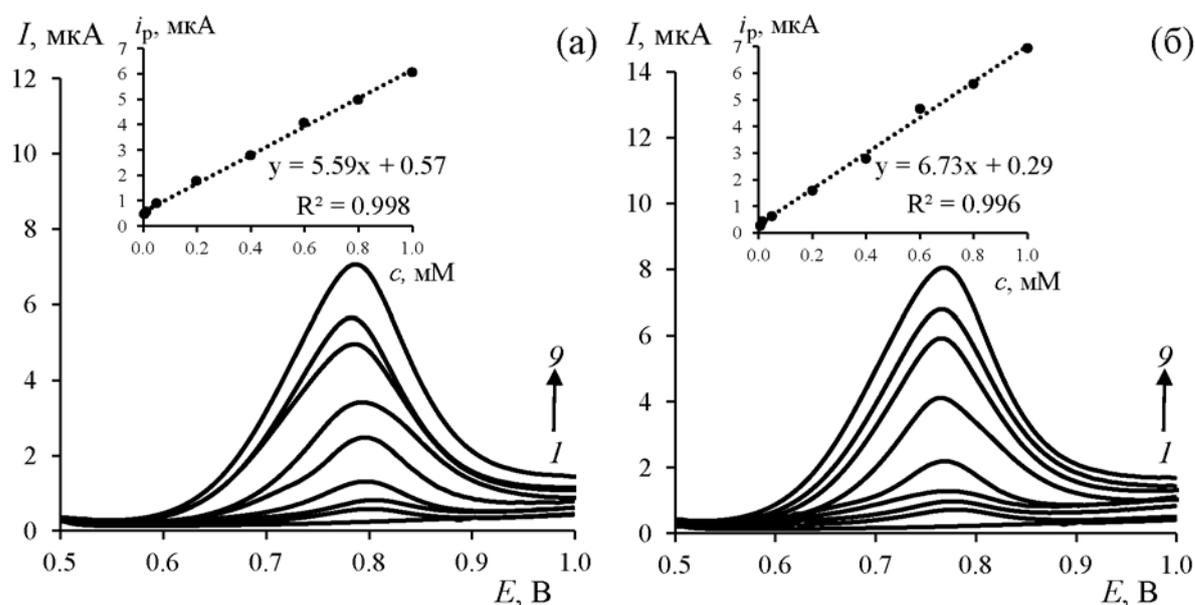


Рисунок 3.24 – Дифференциально-импульсные вольтамперограммы растворов L- (а) и D- тирозина (б) в фосфатном буферном растворе (рН 6.86) на СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК; концентрация энантиомеров, мМ: **1** – фон, **2** – 0.00625, **3** – 0.0125, **4** – 0.05, **5** – 0.2, **6** – 0.4, **7** – 0.6, **8** – 0.8, **9** – 1.0; вставки: соответствующие калибровочные графики

3.2.5. Апробация сенсора на модельных растворах

3.2.5.1. Модельные растворы L- и D- тирозина и биологические жидкости

L-тирозин известен как условно незаменимая аминокислота, синтезируемая в нашем организме путем гидроксирования L-фенилаланина, которое может быть ограничено из-за дефицита фенилаланингидроксилазы. L-тирозин является жизненно важным компонентом белков и обеспечивает положительный азотный

баланс, и поэтому должен поступать в рацион человека. L-тирозин является предшественником гормона L-ДОФА, дофамина, тироксина, норадреналина и адреналина. Нормальные концентрации L-тирозина в плазме колеблются от 50 до 300 мкМ. Аномальный уровень L-тирозина в организме человека приводит ко многим заболеваниям. Низкое количество этой аминокислоты может вызвать психологические заболевания, такие как ипохондрия, депрессия, физическое и умственное истощение, а отсутствие L-тирозина может вызвать альбинизм и алкаптонурию [189, 190]. Следовательно, анализ L-тирозина в биологических жидкостях имеет большое значение.

Точность определения энантиомеров изучали с помощью метода «введено-найдено» на модельных растворах L- и D-тирозина и растворах отдельных энантиомеров тирозина в моче и плазме крови человека. Выбранные для анализа концентрации энантиомеров тирозина соответствуют их реальному содержанию в биологических жидкостях. В результате были получены данные, представленные в таблице 3.7, из которых видно, что сенсор правильно определил содержание тирозина в модельных растворах в широком диапазоне концентраций.

Таблица 3.7 – Результаты вольтамперометрического определения энантиомеров тирозина на СУЭ, модифицированном ПЭК-ГС-ПТКК, в чистых растворах и растворах мочи и плазмы (рН 6.86; n=5; P=0.95)

Образец	Введено, мкМ		Найдено, мкМ		S _r , %	
	D-Тир	L- Тир	D- Тир	L- Тир	D- Тир	L- Тир
Чистые растворы	700	700	691±15	690±20	1.8	2.3
	300	300	291±11	289±14	3.1	3.9
	100	100	96±8	95±7	5.4	5.1
Моча	700	700	688±22	690±30	2.6	3.2
	300	300	290±21	294±15	4.5	4.1
	100	100	96±8	95±8	7.1	6.7
Плазма крови	700	700	679±28	682±40	3.3	4.2
	300	300	289±14	286±20	5.0	5.5
	100	100	93±7	93±8	5.9	7.3

Относительное стандартное отклонение в модельных растворах не превышало 5.4 %. При определении энантиомеров тирозина в моче относительное стандартное отклонение колеблется в пределах 2.6-7.1 %, а в плазме крови – в пределах 3.3-7.3 %. Менее стабильные показатели в плазме крови по-видимому связаны с ее более сложным составом по сравнению с мочой.

3.2.5.2. Определение энантиомеров тирозина в их смеси

Вольтамперометрический сенсор позволяет определять энантиомеры тирозина в рацемической смеси и в смеси с преобладанием одного из энантиомеров. На рисунке 3.25 а приведены дифференциально-импульсные вольтамперограммы 0.6 мМ растворов тирозина с различным содержанием L-тирозина (0, 20, 40, 60, 80, 100 мас. %), из которого видно, что с увеличением содержания L-тирозина и, соответственно, с уменьшением содержания D-тирозина ток пика окисления тирозина уменьшается, а потенциал пика смещается в сторону более положительных значений.

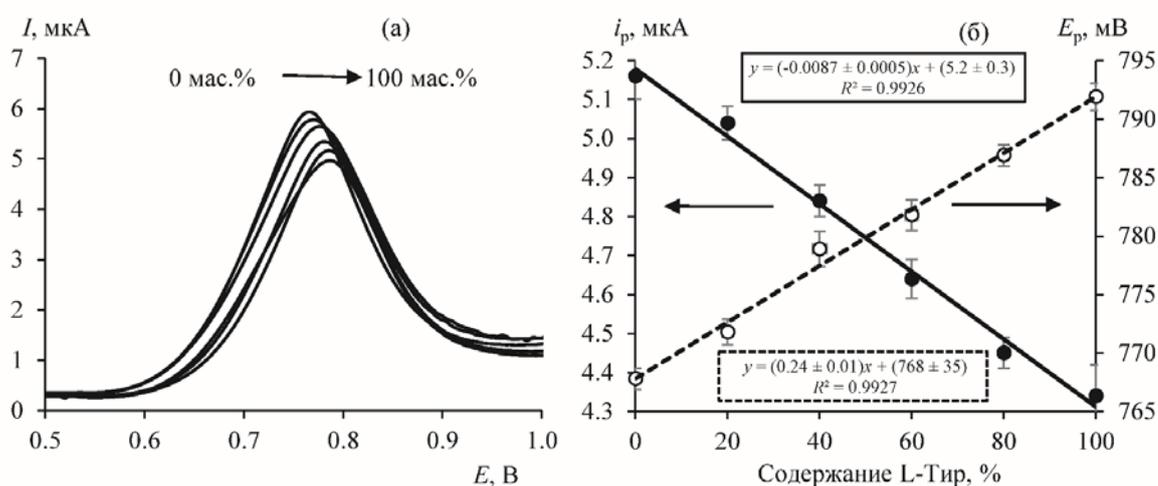


Рисунок 3.25 – (а): Дифференциально-импульсные вольтамперограммы 0.6 мМ смесей энантиомеров тирозина с разным содержанием L-Тир на СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК. (б): Зависимость потенциала и максимального тока пика от содержания L-Тир в 0.6 мМ растворе смеси энантиомеров. Содержание L-Тир, мас. %: 0, 20, 40, 60, 80, 100

На рисунке 3.25 б приведены зависимости максимальных токов и потенциалов пиков электроокисления тирозина от содержания L-тирозина в 0.6 мМ растворах смеси энантиомеров на СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК, что свидетельствует о возможности применения предложенного сенсора для определения содержания энантиомеров в смесях с различным соотношением D- и L-тирозина, но со значительными погрешностями вследствие малых различий в значениях потенциала окисления D- и L-тирозина. Погрешность таких измерений достаточно велика из-за малых различий между максимальными токами и потенциалами пиков окисления D- и L-тирозина.

Таблица 3.8 – Сравнение характеристик сенсора СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК с имеющимися в литературе сенсорами для определения энантиомеров тирозина в их смеси

Сенсор	ΔE_p , мВ	I_{pL}/I_{pD}	Ссылка
GCE/(CNT+ILC)/CW (СУЭ, модифицированный многослойными углеродными нанотрубками, ионным жидким кристаллом и 18-краун-6)	30	3.09	[156]
GCE/SS-CS (СУЭ, модифицированный крахмалом и хитозаном)	12	1.18	[97]
ГПЭ/ЦК (графитовый пастовый электрод, модифицированный циануровой кислотой)	50	1.79	[157]
MGCE/L-Cys-Au/Fe ₃ O ₄ (СУЭ, модифицированный наночастицами Fe ₃ O ₄ /Au и L-цистеином)	44	1.85	[191]
GCE/L-CCNT-3/L-Cys (СУЭ, модифицированный хиральными углеродными нанотрубками и L-цистеиновой кислотой)	24	2.29	[192]
СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК	30	1.24	В данной работе

Следует заметить, что аналогичная проблема наблюдается для многих вольтамперометрических сенсоров, описанных в литературе (таблица 3.8). Большинство из них, как правило, характеризуются небольшими различиями

потенциалов пиков окисления/восстановления энантиомеров тирозина. Эту проблему можно решить с применением хемометрических методов обработки данных.

3.2.6. Регрессионный анализ смеси энантиомеров тирозина

Хемометрическая обработка данных предполагает их многомерный анализ. Целью любого многомерного анализа является декомпозиция (разложение) данных, позволяющая выявить и промоделировать их «скрытые особенности». При этом важную роль играет понятие «изменение значений», т.е. разброс данных. Основным предположением, которое используют при нахождении таких «скрытых закономерностей», является то, что направления, в которых происходят наибольшие изменения в данных, так или иначе связаны с этими закономерностями.

Обработку данных проводили методом проекции на латентные структуры. Для построения ПЛС-модели в качестве массива X были выбраны вольтамперограммы, зарегистрированные в смеси энантиомеров тирозина с разным соотношением L и D-тирозина, описанные выше. В качестве массива Y выступает ряд переменных с соответствующими значениями соотношений L- и D-тирозина от 0 до 1. Размерность матриц для X составила 42×100 (7 параллельных вольтамперограмм для 6 растворов смесей с различным соотношением по 100 мгновенных значений для каждой вольтамперограммы) и Y составила 42×1 (присвоение для каждой вольтамперограммы соответствующего соотношения L и D-тирозина в смеси). Данные массивы получены для заведомо известных растворов и являются калибровочными для построения ПЛС-модели.

Из рисунка 3.26 а видно, что на графике счетов ПЛС-модели точки, соответствующие вольтамперограммам растворов смесей с различным соотношением L- и D-тирозина, образуют кластеры и располагаются в порядке изменения соотношения L и D-тирозина по первой главной компоненте. По значению объясненной дисперсии видно, что ГК1 описывает большую часть данных. 78% изменения в массиве X объясняет 97% изменений в массиве Y , так

как массив Y состоит из переменных, представляющих собой соотношения энантиомеров в смесях, то можно сказать, что первая главная компонента моделирует именно эту зависимость и 78% всех экспериментальных вольтамперограмм (массив X) объясняет данную зависимость, а оставшиеся 22% данных массива X не имеют отношения к ГК1 и являются лишними. Таким образом, метод проекции на латентные структуры извлекает только нужную информацию и отсеивает ненужную, в том числе шумовую составляющую эксперимента.

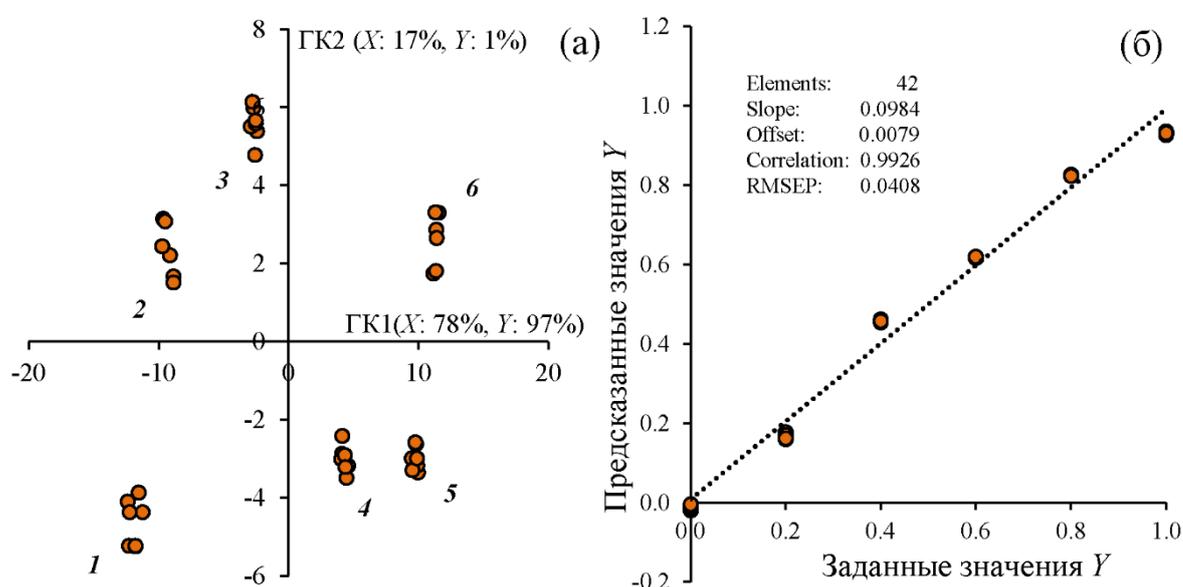


Рисунок 3.26 – (а) График счетов ПЛС-моделирования вольтамперограмм растворов смесей с различным соотношением L- и D-Тир, зарегистрированных на СУЭ/ПЭК-ГС-ПТКК; (б) график «введено-найдено» для ПЛС-модели по определению соотношения энантиомеров тирозина в смеси

Для оценки способности прогнозировать и подтверждения работоспособности полученной модели была проведена перекрестная проверка (cross-validation), при которой используются образцы только из имеющегося калибровочного набора. Часть этих образцов служит для построения модели, а другая часть – для проверки. Результатом проверки является сравнение предсказанных и калибровочных значений Y , представленное в виде графика

«введено-найдено» (рисунок 3.26 б). Идеальная ПЛС-модель имеет наклон (slope), близкий к 1, коэффициент корреляции (correlation) близкий к 1, и отсечение (offset) примерно равное нулю. При этом среднеквадратичная ошибка прогнозирования (RMSEP – root-mean square error of prediction) должна быть как можно меньше. Полученную модель можно считать адекватной и пригодной для прогнозирования.

Таблица 3.9 – Результаты прогнозирования содержания L-тирозина (масс. доли) в смеси энантиомеров тирозина с помощью ПЛС-модели

Заданное содержание L-тирозина в смеси энантиомеров тирозина, масс. доли	Прогнозируемое содержание L-тирозин в смеси энантиомеров тирозина, масс. доли	Относительная погрешность, %
0	0.006 ± 0.019	0.6
	0.013 ± 0.018	1.3
	0.037 ± 0.036	3.7
0.2	0.184 ± 0.016	7.0
	0.181 ± 0.032	5.5
	0.196 ± 0.024	2.0
0.3	0.276 ± 0.025	8.0
	0.288 ± 0.025	4.0
	0.294 ± 0.026	2.0
0.4	0.423 ± 0.027	5.7
	0.415 ± 0.026	3.7
	0.414 ± 0.027	3.5
0.5	0.528 ± 0.026	5.6
	0.527 ± 0.027	5.4
	0.528 ± 0.026	5.6
0.6	0.618 ± 0.051	3.0
	0.617 ± 0.064	2.8
	0.617 ± 0.053	2.8
0.7	0.686 ± 0.038	2.0
	0.686 ± 0.037	2.0
	0.686 ± 0.039	2.0
0.8	0.823 ± 0.021	2.9
	0.823 ± 0.022	2.9
	0.821 ± 0.022	2.6
1	0.938 ± 0.061	6.2
	0.971 ± 0.064	2.9
	0.949 ± 0.061	5.1

Вторым этапом обработки является прогнозирование тестовых образцов с помощью, полученной ПЛС-модели. В данном случае тестовыми образцами служили растворы смесей энантиомеров тирозина, приготовленные независимо от калибровочного набора. Размерность матриц тестовых образцов составила 27 x 100 (3 параллельные вольтамперограммы для 9 растворов смесей с различным соотношением по 100 мгновенных значений для каждой вольтамперограммы).

Результаты, представленные в таблице 3.9 показывают, что во всех случаях соотношения энантиомеров тирозина определены правильно, относительная погрешность измерений не превышает 8 %.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан новый сенсор на основе полиэлектролитного комплекса хитозана и хиральных нанокластеров 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты, которые образуются при внешней индукции на поверхности Carboblack C и определены его электроаналитические характеристики. Показана возможность определения энантиомеров в моче и плазме крови человека. С помощью регрессионного анализа количественно определено содержание энантимеров тирозина в их смеси.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны вольтамперометрические энантиоселективные сенсоры на основе композитов полиэлектролитного комплекса хитозана с α -, β -, γ -ЦД и ПТКК для распознавания и определения энантиомеров атенолола и тирозина. Установлен оптимальный состав композитов: содержание α -, β -, γ -ЦД в объеме полимера – 5 г/л, соотношение (масс.) ПЭК:ГС-ПТКК – 1:0.01. Оптимальный объем наносимого на поверхность СУЭ композита составил 10 мкл.

Методами ЦВ и СЭИ изучены электрохимические характеристики сенсоров и рассчитаны эффективные площади их поверхности. Методами АСМ и СЭМ изучена морфология поверхности разработанных сенсоров. Показано, что при введении циклодекстринов в пленку полиэлектролитного комплекса хитозана на АСМ и СЭМ изображениях наблюдаются включения наносферических зерен циклодекстринов с диаметром от 10 до 40 нм. При нанесении на поверхность СУЭ композита ПЭК-ГС-ПТКК наблюдается неровная зернистая поверхность с равномерно распределенными зернами ПТКК диаметром 300-400 нм и высотой 100-150 нм.

Установлены оптимальные условия электрохимического окисления энантиомеров атенолола и тирозина на предложенных сенсорах: рН 9.18 и 6.86, соответственно, скорость развертки 0.02 В/с. Показано, что лимитирующей стадией электродного процесса является скорость диффузии энантиомеров атенолола и тирозина к поверхности электрода.

Показана возможность распознавания энантиомеров атенолола с использованием предложенных вольтамперометрических энантиоселективных сенсоров на основе композитов полиэлектролитного комплекса хитозана с α -, β -, γ -ЦД и сенсорной системы, сформированной из них. Установлено, что наибольшую энантиоселективность имеет сенсор на основе β -ЦД. Получены линейные зависимости аналитического сигнала от концентрации энантиомеров атенолола в растворе в диапазоне от 0.008 до 0.5 мМ с пределами обнаружения 2.03 мкМ и 2.98 мкМ. Использование вольтамперометрической сенсорной системы позволяет повысить количество правильно распознанных образцов атенолола.

Показано, что вольтамперометрический энантиоселективный сенсор на основе СУЭ, модифицированного композитом полиэлектролитного комплекса хитозана с нанокластерами ПТКК позволяет распознать и определить энантиомеры тирозина в линейном диапазоне концентраций от 6.25 до 1000 мкМ, с чувствительностью к L- и D-энантиомерам 5.59 мкА/мМ и 6.73 мкА/мМ и пределами обнаружения 2.39 мкМ и 2.03 мкМ, соответственно. Относительное стандартное отклонение не превышало 5.4 %.

Продемонстрировано, что предложенные сенсоры позволяют определять энантиомеры атенолола и тирозина в биологических жидкостях с относительными стандартными отклонениями, не превышающими 3.3 % и 7.3 %, соответственно.

Показано, что сенсор на основе композитов полиэлектролитного комплекса хитозана с нанокластерами ПТКК позволяет с высокой вероятностью определить соотношение энантиомеров тирозина в их смеси, что подразумевает возможность практического применения разработанной сенсорной платформы для хирального распознавания энантиомеров лекарственных препаратов и биологически активных веществ.

Перспективы дальнейшей разработки темы исследований заключаются в расширении круга лекарственных средств и биологически активных добавок, а также разработке новых хиральных материалов на основе композитов хитозана для создания энантиоселективных вольтамперометрических сенсоров. Кроме того, планируется проведение исследований по апробации предложенных сенсоров в реальных условиях с целью оценки правильности определения энантиомеров атенолола и тирозина в смесях их энантиомеров в биологических жидкостях (кровь, моча).

Полученные результаты можно использовать в качестве основы для создания вольтамперометрических экспресс-анализаторов для быстрого и точного определения энантиомеров биологически активных и лекарственных соединений.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

MOF – металлоорганические каркасные материалы;

АСМ – атомно-силовая микроскопия;

Атн – атенолол;

ГК – главная компонента;

ГС – графитированная сажа;

ДИВ – дифференциальная импульсная вольтамперограмма;

МГК – метод главных компонент;

Мет – метионин;

МИП – полимер с молекулярными отпечатками;

ПЛС – метод проекций на латентные структуры;

ПЛС-ДА – метод проекций на латентные структуры с дискриминантным анализом;

ПТКК – 3,4,9,10-перилентетракарбоновая кислота;

ПЭК – полиэлектролитный комплекс;

СУЭ – стеклоуглеродный электрод;

СЭИ – спектроскопия электрохимического импеданса;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

Тир – тирозин;

УНТ – углеродные нанотрубки;

УПЭ – угольно-пастовый электрод;

ЦВ – циклическая вольтамперометрия;

ЦД – циклодекстрины;

ЦК – циануровая кислота;

ЭВС – энантиоселективный вольтамперометрический сенсор.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rubenstein, E. Supernovae and life / E. Rubenstein, W.A. Bonner, H.P. Noyes, G.S. Brown // *Nature*. – 1983. – V. 306. – P. 118.
2. Lin, G. Chiral drugs: Chemistry and biological action / G. Lin, Q.D. You, J.F. Cheng // New Jersey: John Wiley & Sons. – 2011. – 472 p.
3. Erb, S. Single-enantiomer drugs poised for further market growth / S. Erb // *Pharmaceut. Technol.* – 2006. – V. 30. - P. 14.
4. Hutt, A. The chiral switch: The development of single enantiomers drugs from racemates / A. Hutt, J. Valentová // *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae*. – 2003. – V. 50. - P. 7.
5. Agranat, I. Putting chirality to work: The strategy of chiral switches / I. Agranat, H. Caner, J. Caldwell // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2002. – V. 1. – P. 753.
6. Chen, L. A chiral electrochemical sensor for propranolol based on multiwalled carbon nanotubes/ionic liquids nanocomposite / L. Chen, K. Li, H. Zhu, L. Meng, J. Chen, M. Li, Z. Zhu // *Talanta*. – 2013. – V. 105. – P. 250.
7. Xu, L. Chiral salen Mn(III) complex-based enantioselective potentiometric sensor for l-mandelic acid / L. Xu, Y. Yang, Y. Wang, J. Gao // *Anal. Chim. Acta.* - 2009. – V. 653. – P. 217.
8. Stefan, R.I. Biosensor for the enantioselective analysis of S-captopril / R.I. Stefan, C. Bala, H.Y. Aboul-Enein // *Sensors and Actuators B: Chemical*. –2003. – V. 92. – P. 228.
9. Prasad, B. Enantioselective recognition of D- and L-tryptophan by imprinted polymer-carbon composite fiber sensor / B. Prasad, R. Madhuri, M. P. Tiwari, P. S. Sharma // *Talanta*. – 2010. – V. 81. – P. 187.
10. Trojanowicz, M. Electrochemical chiral sensors and biosensors / M. Trojanowicz, M. Kaniewska // *Electroanalysis*. – 2009. – V. 21. – P. 229.
11. Izake, E.L. Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: an overview / E.L. Izake // *J. Pharm. Sci.* – 2007. – V. 96. – P. 1659.
12. Sekhon, B.S. Enantioseparation of chiral drugs – an overview / B.S. Sekhon // *Int. J. Pharm. Tech. Res.* – 2010. – V. 2. – P. 1584.

13. Manoli, K. Chiral sensor devices for differentiation of enantiomers / K. Manoli, M. Magliulo, L. Torsi // *Top. Curr. Chem.* – 2013. – V. 341. – P. 133.
14. Trojanowicz, M. Enantioselective electrochemical sensors and biosensors: a minireview / M. Trojanowicz // *Electrochem. Commun.* – 2014. – V. 38. – P. 47.
15. Li, Z. The construction and application of chiral electrochemical sensors / Z. Li, Z. Mo, S. Meng, H. Gao, X. Niu, R. Guo // *Anal. Methods.* – 2016. – V. 8. – P. 8134.
16. Iacob, B.C. Chiral electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers with pharmaceutical applications / B.C. Iacob, E. Bodoki, R. Oprean // *Handbook of Sustainable Polimers: Processing and applications.* – 2016. – P. 587.
17. Майстренко, В.Н. Энантиселективные вольтамперометрические сенсоры: новые решения / В.Н. Майстренко, А.В. Сидельников, Р.А. Зильберг // *Журн. аналит. химии.* – 2018. – Т. 73. – С. 3.
18. Goicolea, M.A. New materials in electrochemical sensors for pesticides monitoring / M.A. Goicolea, A. Gomez-Caballero, R.J Barrio // *Pesticides – strategies for pesticides analysis.* – 2011. – P. 333.
19. George, J.M. Metal oxide nanoparticles in electrochemical sensing and biosensing: a review / J.M. George, A. Antony, B. Mathew // *Microchim. Acta.* – 2018. – V. 185. – P. 1.
20. Zor, E. Graphene based hybrid for enantioselective sensing applications / E. Zor, E. Morales-Narváez, S. Alpaydin, H. Bingol, M. Ersoz, A. Merkoçi // *Biosensor. Bioelectronic.* – 2017. – V. 87. – P. 410.
21. Sinha, A. Voltammetric sensing based on the use of advanced carbonaceous nanomaterials: a review / A. Sinha, Dhanjai, R. Jain, H.M. Zhao, P. Karolia, N. Jadon // *Microchim. Acta.* – 2018. – V. 185. – P. 1.
22. Power, A.C. Carbon nanomaterials and their application to electrochemical sensors: a review / A.C. Power, B. Gorey, S. Chandra, J. Chapman // *Nanotechnol. Rev.* – 2018. – V. 7. – P. 19.
23. Evtugyn, G. Biosensors: Essentials / G. Evtugyn // *Lecture Notes in Chemistry*, V. 84. - Berlin: Springer-Verlag. – 2014. – 265 p.

24. Gupta, R. Molecular imprinting in sol-gel matrix / R. Gupta, A. Kumar // *Biotechnol. Adv.* – 2008. – V. 26. – P. 533.
25. Svancara, I. Carbon paste electrodes in the new millennium / I. Svancara, A. Walcarius, K. Kalcher, K. Vytras // *Cent. Eur. J. Chem.* – 2009. – V. 7. – P. 598.
26. Nemcova, L. A voltammetric comparison of the properties of carbon paste electrodes containing glassy carbon microparticles of various sizes / L. Nemcova, J. Barek, J.J. Zima // *Electroanal. Chem.* – 2012. – V. 675. – P. 18.
27. Hernández, A.M. Characterization of carbon–fullerene– silicone oil composite paste electrodes / A.M. Hernández, M.E. Rincón, I. González // *Carbon.* – 2005. – V. 43. – P. 1961.
28. Hočevár, S.B. Preparation and characterization of carbon paste microelectrode based on carbon nano-particles / S.B. Hočevár, B. Ogorevc // *Talanta.* – 2007. – V. 74. – P. 405.
29. Shul, G. Effects of carbon nanofiber composites on electrode processes involving liquid vertical bar liquid ion transfer / G. Shul, M.A. Murphy, G.D. Wilcox, F. Marken, M. Opallo // *J. Solid State Electrochem.* – 2005. – V. 9. – P. 874.
30. Rivas, G.A. Carbon nanotubes paste electrodes: a new alternative for the development of electrochemical sensors / G.A. Rivas, M.D. Rubianes, M.L. Pedano, N.F. Ferreyra, G.L. Luque, M.C. Rodriguez, S.A. Miscoria // *Electroanalysis.* – 2007. – V. 19. – P. 823.
31. Antiochia, R. Single-wall carbon nanotube paste electrodes: a comparison with carbon paste, platinum and glassy carbon electrodes via cyclic voltammetric data / R. Antiochia, I. Lavagnini, F. Magno, F. Valentini, G. Palleschi // *Electroanalysis.* – 2004. – V. 16. – P. 1451.
32. Chen, D. Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications / D. Chen, H. Feng, J. Li // *Chem. Rev.* – 2012. – V. 112. – P. 6027.
33. Baig, N. Electrodes modified with 3D graphene composites: a review on methods for preparation, properties and sensing applications / N. Baig, T.A. Saleh // *Microchim. Acta.* 2018. – V. 185. – № 6. – P. 1.
34. Rajaji, U. Graphene nanoribbons in electrochemical sensors and biosensors: a review / U. Rajaji, R. Arumugam, S.M. Chen, T.W. Chen, T.W. Tseng, S. Chinnapaiyan, S.Y. Lee, W.H. Chang // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2018. – V. 13. – P. 6643.

35. Nag, A. Graphene and its sensor-based applications: a review / A. Nag, A. Mitra, S.C. Mukhopadhyaya // *Sens. Actuator. A.* – 2018. – V. 270. – P. 177.
36. Rowley-Nealea, S.J. An overview of recent applications of reduced graphene oxide as a basis of electroanalytical sensing platforms / S.J. Rowley-Nealea, E.P. Randviir, A.S.A. Dena, C.E. Banks // *Appl. Material. Today.* – 2018. – V. 10. – P. 218.
37. Ou, J. Graphene quantum dots/ β -cyclodextrin nanocomposites: a novel electrochemical chiral interface for tryptophan isomer recognition / J. Ou, Y. Zhu, Y. Kong, J. Ma // *Electrochem. Commun.* – 2015. – V. 60. – P. 60.
38. Dong, S.Q. Electrochemical sensor for discrimination tyrosine enantiomers using graphene quantum dots and beta-cyclodextrins composites / S.Q. Dong, Q. Bi, C.D. Qiao, Y.M. Sun, X. Zhang, X.Q. Lu, L. Zhao // *Talanta.* – 2017. – V. 173. – P. 94.
39. Zaidi, S.A. Facile and efficient electrochemical enantiomer recognition of phenylalanine using β -Cyclodextrin immobilized on reduced graphene oxide / S.A. Zaidi // *Biosensor. Bioelectronic.* – 2017. – V. 94. – P. 714.
40. Zor, E. An electrochemical and computational study for discrimination of D- and L-cystine by reduced graphene oxide/ β -cyclodextrin / E. Zor, H. Bingol, A. Ramanaviciene, M. Ersoz // *Analyst.* – 2015. – V. 140. – P. 313.
41. Zor, E. A reduced graphene oxide/ α -cyclodextrin hybrid for the detection of methionine: electrochemical, fluorometric and computational studies / E. Zor, M.E. Saglam, S. Alpaydin, H. Bingol // *Anal. Methods.* – 2014. – V. 6. – P. 6522.
42. Ou, J. Electrochemical enantio-recognition of tryptophan enantiomers based on graphene quantum dots–chitosan composite film / J. Ou, Y. Tao, J. Xue, Y. Kong, J. Dai, L. Deng // *Electrochem. Commun.* – 2015. – V. 57. – P. 5.
43. Borazjani, M. Enantioselective electrochemical sensor for R-mandelic acid based on a glassy carbon electrode modified with multi-layers of biotin-loaded overoxidized polypyrrole and nanosheets of reduced graphene oxide / M. Borazjani, A. Mehdinia, E. Ziaei, A. Jabbari, M. Maddah // *Microchim. Acta.* – 2017. – V. 184. – P. 611.
44. Guo, L. Electrochemical sensing for naproxen enantiomers using biofunctionalized reduced graphene oxide nanosheets / L. Guo, Y. Huang, Q. Zhang, C. Chen, D. Guo, Y. Chen, Y. Fu // *J. Electrochem. Soc.* – 2014. – V. 161. – P. B70.

45. Guo, L. The application of thionine– graphene nanocomposite in chiral sensing for tryptophan enantiomers / L. Guo, Q. Zhang, Y. Huang, Q. Han, Y. Wang, Y. Fu // *Bioelectrochem.* – 2013. – V. 94. – P. 87.
46. Feng, W.L. Electrochemical chiral recognition of tryptophan using a glassy carbon electrode modified with β -cyclodextrin and graphene / W.L. Feng, C. Liu, S.Y. Lu, C.Y. Zhang, X.H. Zhu, Y. Liang, J.M. Nan // *Microchim. Acta.* – 2014. – V. 181. – P. 501.
47. Xiao, Q. An electrochemical chiral sensor based on amino–functionalized graphene quantum dots/ β -cyclodextrin modified glassy carbon electrode for enantioselective detection of tryptophan isomers / Q. Xiao, S. Lu, C. Huang, W. Su, S. Zhou, J. Sheng, S. Huang // *J. Iran. Chem. Soc.* – 2017. – V. 14. – P. 1957.
48. Xiao, Q. Novel N-doped carbon dots/ β -cyclodextrin nanocomposites for enantioselective recognition of tryptophan enantiomers / Q. Xiao, S. Lu, C. Huang, W. Su, S. Huang // *Sensors.* – 2016. – V. 16. – P. 1874.
49. Xu, J. Chiral recognition of tryptophan enantiomers based on β -cyclodextrin–platinum nanoparticles/graphene nanohybrids modified electrode / J. Xu, Q. Wang, C. Xuan, Q. Xia, X. Lin, Y. Fu // *Electroanalysis.* – 2016. – V. 28. – P. 868.
50. Munoz, J. Chiral magnetic–nanobiofluids for rapid electrochemical screening of enantiomers at a magneto nanocomposite graphene–paste electrode / J. Munoz, A. González-Campo, M. Riba-Moliner, M. Baeza, M. Mas-Torrent // *Biosensor. Bioelectronic.* – 2018. – V. 105. – P. 95.
51. Wu, D. A facile avenue to prepare chiral graphene sheets as electrode modification for electrochemical enantioselective recognition / D. Wu, W. Tan, Y. Yu, B. Yang, H. Li, Y. Kong // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – V. 1033. – P. 58.
52. Chen, X.Q. Chiral carbon nanotubes and carbon nanotube chiral composites: preparation and applications / X.Q. Chen, X.Y. Liao, J.G. Yu, F.P. Jiao, X.Y. Jiang // *Nano: Brief Report. Rev.* – 2013. – V. 8. – P. 1330002.
53. Alhassen, H. Organic/hybrid nanoparticles and single-walled carbon nanotubes: preparation methods and chiral applications / H. Alhassen, V. Antony, A. Ghanem, M.M.A. Yajadda, Z.J. Han, K. Ostrikov // *Chirality.* – 2014. – V. 26. – P. 683.

54. Guo, D. Study on chiral nanocomposite for recognition of DOPA enantiomers via square wave voltammetry / D. Guo, P. Ran, C. Chen, Y. Chen, C. Xuan, Y. Fu // *J. Electrochem. Soc.* – 2015. – V. 162. – P. B 354.
55. Prasad, B.B. Multiwalled carbon nanotubes–based pencil graphite electrode modified with an electrosynthesized molecularly imprinted nanofilm for electrochemical sensing of methionine enantiomers / B.B. Prasad, I.Pandey, A. Srivastava, D. Kumar, M.P. Tiwari // *Sensor. Actuator. B.* – 2013. – V. 176. – P. 863.
56. Prasad, B.B. Electrochemically imprinted molecular recognition sites on multiwalled carbon-nanotubes/pencil graphite electrode surface for enantioselective detection of D- and L-aspartic acid / B.B. Prasad, I. Pandey // *Electrochim. Acta.* – 2013. – V. 88. – P. 24.
57. Zhang, Y. Electrochemical chiral sensor based on cellulose nanocrystals and multiwall carbon nanotubes for discrimination of tryptophan enantiomers / Y. Zhang, G. Liu, X. Yao, S. Gao, J. Xie, H. Xu, N. Lin // *Cellulose.* – 2018. – V. 25. – P. 3861.
58. Yu, L.Y. Chiral electrochemical recognition of tryptophan enantiomers at a multi-walled carbon nanotube-chitosan composite modified glassy carbon electrode / L.Y. Yu, Q. Liu, X.W. Wu, X.Y. Jiang, J.G. Yu, X.Q. Chen // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – P. 98020.
59. Li, Z. Electrochemical enantiorecognition of tryptophan enantiomers based on a multi-walled carbon nanotube-hydroxyethyl chitosan composite film / Z. Li, Z. Mo, R. Guo, S. Meng, R. Wang, H. Gao, X. Niu // *Anal. Methods.* – 2017. – V. 9. – P. 5149.
60. Li, Z. Chiral electrochemical recognition of tryptophan enantiomers at a multi-walled carbon nanotube-N-carboxymethyl chitosan composite-modified glassy carbon electrode / Z. Li, Z. Mo, P. Yan, S. Meng, R. Wang, X. Niu, N. Liu, R. Guo // *New. J. Chem.* – 2018. – V. 42. – P. 11635.
61. Mallakpour, S. Surface functionalization of carbon nanotubes: fabrication and applications / S. Mallakpour, S. Soltanian // *RSC Adv.* – 2016. – V. 6. – P. 109916.
62. Zhang, Q. An electrochemical chiral sensing platform for propranolol enantiomers based on size-controlled gold nanocomposite / Q. Zhang, L. Guo, Y. Huang, Y. Chen, D. Guo, C. Chen, Y. Fu // *Sensor. Actuator. B.* – 2014. – V. 199. – P. 239.

63. Chen, L. A chiral electrochemical sensor for propranolol based on multi-walled carbon nanotubes/ionic liquids nanocomposite / L. Chen, K. Li, H. Zhu, L. Meng, J. Chen, M. Li, Z. Zhu // *Talanta*. – 2013. – V. 105. – P. 250.
62. El Rhazi, M. Recent progress in nanocomposites based on conducting polymer: application as electrochemical sensors / M. El Rhazi, S. Majid, M. Elbasri, F.E. Salih, L. Oularbi, K. Lafdi // *Inter. Nano Lett.* – 2018. – V. 8. – P. 79.
63. Gu, J. Chiral electrochemical recognition of cysteine enantiomers with molecularly imprinted overoxidized polypyrrole-Au nanoparticles / J. Gu, H. Dai, Y. Kong, Y. Tao, H. Chu, Z. Tong // *Synthetic Metal*. – 2016. – V. 222. – P. 137.
64. Prasad, B.B. Ultra-trace analysis of D- and L-aspartic acid applying one-by-one approach on a dual imprinted electrochemical sensor / B.B. Prasad, S. Jaiswal, K. Singh // *Sensor. Actuator. B*. – 2017. – V. 240. – P. 631.
65. Yawari, I. Determination of S-warfarin using activated screen-printed gold electrode modified with gold nanoparticles enantioselective molecular imprinted polymer / I. Yawari, M. Kaykhahi // *Anal. Methods*. – 2017. – V. 9. – P. 6583.
66. Hung, C.C. Site-selective deposition of ultra-fine Au nanoparticles on polyaniline nanofibers for H₂O₂ sensing / C.C. Hung, T.C. Wen, Y. Wei // *Mater. Chem. Phys.* – 2010. – V. 122. – P. 392.
67. Dong, J. Decoration of glutathione with copper-platinum nanoparticles for chirality sensing of tyrosine enantiomers / J. Dong, B. Sun, T. Mao, D. Yan, C. Liu, Z. Wang, P. Jin // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. – 2018. – 497. P. 11.
68. Boomi, P. Synthesis, characterization and antibacterial activity of polyaniline/Pt-Pd nanocomposite / P. Boomi, H.G. Prabu, J. Mathiyarasu // *Eur. J. Med. Chem.* – 2014. – V. 72. – P. 18.
69. Hosseini, H. Nonenzymatic glucose and hydrogen peroxide sensors based on catalytic properties of palladium nanoparticles/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanofibers / H. Hosseini, S.J.T. Rezaei, P. Rahmani, R. Sharifi, M.R. Nabid, A. Bagheri // *Sensor. Actuator. B*. – 2014. – V. 195. – P. 85.
70. Stejskal, J. Conducting polymer-silver composites / J. Stejskal // *Chem. Pap.* – 2013. – V. 67. – P. 814.

71. Wu, T. Amperometric sensing of L-phenylalanine using a gold electrode modified with a metal organic framework, a molecularly imprinted polymer, and β -cyclodextrin functionalized gold nanoparticles / T. Wu, X. Wei, X. Ma, J. Li // *Microchim. Acta.* – 2017. – V. 184. – P. 2901.
72. Hou, X. Conductive and chiral polymer-modified metal-organic framework for enantioselective adsorption and sensing / X. Hou, T. Xu, Y. Wang, S. Liu, R. Chu, J. Zhang, B. Liu // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2018. – V. 10. – P. 26365.
73. Yanez-Sedeno, P. Electrochemical sensors based on magnetic molecularly imprinted polymers: a review / P. Yanez-Sedeno, S. Campuzano, J.M. Pingarron // *Anal. Chim. Acta.* – 2017. – V. 960. – P. 1.
74. Mandler, D. Chiral self-assembled monolayers in electrochemistry / D. Mandler // *Cur. Opinion Electrochem.* – 2018. – V. 7. – P. 42.
75. Oh, S.Y. Formation of a self-assembled monolayer of diaminododecane and a heteropolyacid monolayer on the ITO surface / S.Y. Oh, Y.J. Yun, D.Y. Kim, S.H. Han // *Langmuir.* – 1999. – V. 15. – P. 4690.
76. Watkins, B.F. Chiral electrode / B.F. Watkins, J.R. Behling, E. Kariv, L.L. Miller // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1975. – V. 97. – P. 3549.
77. Kwee, S. Asymmetric reduction of L-folic acid at chiral electrodes / S. Kwee, H. Lund // *Bioelectrochem. Bioenergetic.* – 1980. – V. 7. – P. 693.
78. Ulman, A. Formation and structure of self-assembled monolayers / A. Ulman // *Chem. Rev.* – 1996. – V. 96. – P. 1533.
79. Afkhami, A. A new chiral electrochemical sensor for the enantioselective recognition of naproxen enantiomers using L-cysteine self-assembled over gold nanoparticles on a gold electrode / A. Afkhami, F. Kafrashi, M. Ahmadi, T. Madrakian // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – P. 58609.
80. Nakanishi, T. Enantioselectivity of redox reaction of DOPA at the gold electrode modified with a self-assembled monolayer of homocysteine / T. Nakanishi, M. Matsunaga, M. Nagasaka, T. Asahi, T. Osaka // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128. – P. 13322.

81. Matsunaga, M. Effect of surface coverage of gold (III) electrode with cysteine on the chiral discrimination of DOPA / M. Matsunaga, T. Nakanishi, T. Asahi, T. Osaka // *Chirality*. – 2007. – V. 19. – P. 295.
82. Matsunaga, M. Effect of pH on the enantiospecificity of homocysteine monolayer on Au (III) for the redox reaction of 3,4-dihydroxyphenylalanine / M. Matsunaga, M. Nagasaka, T. Nakanishi, T. Sawaguchi, T. Osaka // *Electroanalysis*. – 2008. – V.20. – P. 955.
83. Matsunaga, M. Highly enantioselective discrimination of amino acids using copper deposition on a gold electrode modified with homocysteine monolayer / M. Matsunaga, T. Nakanishi, T. Asahi, T. Osaka // *Electrochem. Commun.* – 2007. – V. 9. – P. 725.
84. Fontanesi, C. New one-step thiol functionalization procedure for Ni by self-assembled monolayers / C. Fontanesi, F. Tassinari, F. Parenti, H. Cohen, P.C. Mondal, V. Kiran, A. Giglia, L. Pasquali, R. Naaman // *Langmuir*. – 2015. – V. 31. – P. 3546.
85. Yang, F.L. Electrochemical evidences of chiral molecule recognition using L/D cysteine modified gold electrodes / F.L. Yang, N. Kong, X.A. Conlan, H.B. Wang, C.J. Barrow, F.H. Yan, J.M. Guo, W.R. Yang // *Electrochim. Acta*. – 2017. – V. 237. – P. 22.
86. Fireman-Shoresh, S. Chiral electrochemical recognition by very thin molecularly imprinted sol-gel films / S. Fireman-Shoresh, I. Turyan, D. Mandler, D. Avnir, S. Marx // *Langmuir*. – 2005. – V. 21. – P. 7842.
87. Irrera, S. A density functional theory study of the adsorption of uracil on the Au (100) surface / S. Irrera, N.H. De Leeuw // *Proc. Royal Soc. A*. – 2011. – V. 467. – P. 1959.
88. Chakraborty, S. Construction of preorganized uracil based polytopic tectons for hydrogen-bonded supramolecular architectures / S. Chakraborty, P.J. Sanz Miguel, F.M. Alberti, N. Das // *J. Mol. Struct.* – 2012. – V. 1015. – P. 99.
89. Gus'kov, V.Yu. Thermodynamics of organic molecules adsorption on modified by 5-hydroxyl-6-methyluracil sorbents by inverse gas chromatography / V.Yu. Gus'kov, Yu.Yu. Gainullina, S.P. Ivanov, F.Kh. Kudasheva // *J. Chromatog. A*. – 2014. – V. 1356. – P. 230.

90. Khamitov, E. Molecular dynamics simulation and density functional theory study of chemisorption of the propranolol optical isomers on the uracil-modified carbon paste electrode / E. Khamitov, R. Shayakhmetova, A. Sidel'nikov, V. Maistrenko // *Journal of the Chinese Chemical Society*. – 2017. – V. 64. – P. 1058.
91. Grem, J.L. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development / J.L. Grem // *Invest New Drugs*. – 2000. – V. 18. – P. 299.
92. Allcock, H.R. Contemporary polymer chemistry / H.R. Allcock, F.W. Lampe, New Jersey: Prentice Hall, 1990. – 599 p.
93. Zhang, H.M. One-step preparation of large-scale self-assembled monolayers of cyanuric acid and melamine supramolecular species on Au (111) surfaces / H.M. Zhang, Z.X. Xie, L.S. Long, H.P. Zhong, W. Zhao, B.W. Mao, X. Xu, L. S. Zheng // *J. Phys. Chem. C*. – 2008. – V. 112. – P. 4209.
94. Namiesnik, J. Evaluation of the suitability of selected porous polymers for preconcentration of volatile organic-compounds / J. Namiesnik, L. Torres, E. Kozłowski, J. Mathieu // *J. Chromatogr. A*. – 1981. – V. 208. – P. 239.
95. Zilberg, R.A. A voltammetric sensory system for recognition of propranolol enantiomers based on glassy carbon electrodes modified by polyarylene phthalide composites of melamine and cyanuric acid / R.A. Zilberg, A.V. Sidelnikov, V.N. Maistrenko, Y.A. Yarkaeva, E.M. Khamitov, E.I. Maksutova, V.M. Kornilov // *Electroanalysis*. – 2018. – V. 30. – P. 619.
96. Ilyina, M.G. A molecular dynamics simulation of the chemisorption of the optical isomers of propranolol on the graphitic electrode modified with melamine, cyanuric, and isocyanuric acids / M.G. Ilyina, E.M. Khamitov, V.N. Maistrenko // *J Chin Chem Soc*. – 2019. – 66. – P. 278.
97. Зильберг, Р.А. Хиральный вольтамперометрический сенсор на основе модифицированного циануровой кислотой пастового электрода для распознавания и определения энантиомеров тирозина / Р.А. Зильберг, В.Н. Майстренко, Л.Р. Кабирова, В.Ю. Гуськов, Э.М. Хамитов, Д.И. Дубровский // *Журн. аналит. химии*. – 2020. – Т. 75. – С. 1.

98. Plass, K.E. Molecular packing and symmetry of two-dimensional crystals / K.E. Plass, A.L. Grzesiak, A.J. Matzger // *Acc. Chem. Res.* – 2007. – V. 40. – P. 287.
99. Zilberg, R.A. Chiral voltammetric sensor for warfarin enantiomers based on carbon black paste electrode modified by 3,4,9,10-perylenetetracarboxylic acid / R.A. Zilberg, V.N. Maistrenko, L.R. Zagitova, V.Y. Guskov, D.I. Dubrovsky // *J. Electroanal. Chem.* – 2020. – V. 861. – N 113986.
100. Niu, X. Highly selective tryptophan enantiomers electrochemical chiral sensor based on poly-lysine and functionalized multi-walled carbon nanotubes / X. Niu, Z. Mo, H. Gao, R. Wang, Z. Li, S. Meng, R. Guo // *J. Solid State Electrochem.* – 2018. – V. 22. – P. 973.
101. Mo, Z. Electrochemical recognition for tryptophan enantiomers based on 3,4,9,10-perylenetetracarboxylic acid-chitosan composite film / Z. Mo, X. Niu, H. Gao, Z. Li, S. Meng, R. Guo // *J. Solid State Electrochem.* – 2018. – V. 22. – P. 2405.
102. Niu, X. Perylene-functionalized graphene sheets modified with β -cyclodextrin for the voltammetric discrimination of phenylalanine enantiomers / X. Niu, X. Yang, Z. Mo, R. Guo, N. Liu, P. Zhao, Z. Liu // *Bioelectrochem.* – 2019. – V. – 129. – P. 189.
103. Mondal, P.C. Chiro-spintronics: spin-dependent electrochemistry and water splitting using chiral molecular films / P.C. Mondal, W. Mtangi, C. Fontanesi // *Small Methods.* – 2018. – V. 2. – N1700313.
104. Mondal, P.C. Spin-dependent transport through chiral molecules studied by spin-dependent electrochemistry / P.C. Mondal, C. Fontanesi, D.H. Waldeck, R. Naaman // *Acc. Chem. Res.* – 2016. – V. 49. – P. 2560.
105. Mondal, P.C. Field and chirality effects on electrochemical charge transfer rates: spin dependent electrochemistry / P.C. Mondal, C. Fontanesi, D.H. Waldeck, R. Naaman // *Acs Nano.* – 2015. – V. 9. – P. 3377.
106. Dodziuk, H. Cyclodextrins and their complexes / H. Dodziuk. – Weinheim: Wiley, 2006. – 50 p.
107. Śliwa W. Cyclodextrins: Properties and Applications / W. Śliwa, T. Girek. – Weinheim: Wiley-Vch, 2016. – 336 p.
108. Frömring, K.H. Cyclodextrins in pharmacy / K.H. Frömring, J. Szejtli. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. – 225 p.

109. Loftsson, T. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization / T. Loftsson, M. Brewster // *J. Pharm. Sci.* – 1996. – V. 85. – P. 1017.
110. Zhu, G. Recent advances for cyclodextrin-based materials in electrochemical sensing / G. Zhu, Y. Yi, J. Chen // *Trend. Anal. Chem.* – 2016. – V. 80. – P. 232.
111. Kane-Maguire, L.A.P. Chiral conducting polymers / L.A.P. Kane-Maguire, G.G. Wallace // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – V. 39. – P. 2545.
112. Зильберг, Р.А. Энантиоселективная вольтамперометрическая сенсорная система для распознавания D- и L-триптофана на основе стеклоуглеродных электродов, модифицированных композитами полиарилефталата с α -, β - и γ -циклодекстринами / Р.А. Зильберг, В.Н. Майстренко, Ю.А. Яркаяева, Д.И. Дубровский // *Журн. аналит. химии.* – 2019. – Т. 74. – С. 941.
113. Harada, A. Supramolecular polymeric materials via cyclodextrin - guest interactions / A. Harada, Y. Takashima, M. Nakahata // *Acc. Chem. Res.* – 2014. – V. 47. – P. 2128.
114. Tao, Y. Temperature-sensitive electrochemical recognition of tryptophan enantiomers based on β -cyclodextrin self-assembled on poly(L-glutamic acid) / Y. Tao, J. Dai, Y. Kong, Y. Sha // *Anal. Chem.* – 2014. – V. 86. – P. 2633.
115. Xiao, Q. N-doped carbon dots/ β -cyclodextrin nanocomposites for enantioselective recognition of tryptophan enantiomers / Q. Xiao, S. Lu, C. Huang, W. Su, S. Huang // *Sensors.* – 2016. – V. 16. – P. 1874.
116. Xu, J. Chiral recognition of tryptophan enantiomers based on β -cyclodextrin-platinum nanoparticles/grapheme nanohybrids modified electrode / J. Xu, Q. Wang, C. Xuan, Q. Xia, X. Lin, Y. Fu // *Electroanalysis.* – 2016. – V. 28. – P. 868.
117. Zhu, G. Recent advances for cyclodextrin-based materials in electrochemical sensing / G. Zhu, Y. Yi, J. Chen // *Trend. Anal. Chem.* – 2016. – V. 80. – P. 232.
118. Zor, E. An electrochemical and computational study for discrimination of D- and L-cystine by reduced graphene oxide/ β -cyclodextrin / E. Zor, H. Bingol, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, M. Ersoz // *Analyst.* – 2015. – V. 140. – P. 313.
119. Cichosz, S. Polymer-based sensors: a review / S. Cichosz, A. Masek, M. Zaborski // *Polymer Test.* – 2018. – V. 67. – P. 342.

120. Wang, G. Nanomaterial doped conducting polymers for electrochemical sensors and biosensors / G. Wang, A. Morrin, M. Li, N. Liu, X. Luo // *J. Mater. Chem. B.* – 2018. – V. 6. – P. 4173.
121. Bogue, R. Smart materials: a review of recent developments / R. Bogue // *Assem. Automat.* – 2012. – V. 32. – P. 3.
122. Hu, J. Responsive polymers for detection and sensing applications: current status and future developments / J. Hu, S. Liu // *Macromol.* – 2010. – V. 43. – P. 8315.
123. Arnaboldi, S. Inherently chiral electrodes: the tool for chiral voltammetry / S. Arnaboldi, T. Benincori, R. Cirilli, W. Kutner, M. Magni, P.R. Mussini, K. Noworyta, F. Sannicolo // *Chem. Sci.* – 2015. – V. 6. – P. 1706.
124. Arnaboldi, S. Inherently chiral thiophene-based electrodes at work: a screening of enantioselection ability toward a series of pharmaceutically relevant phenolic or catecholic amino acids, amino esters, and amine / S. Arnaboldi, T. Benincori, R. Cirilli, S. Grecchi, L. Santagostini, F. Sannicolò, P.R. Mussini // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2016. – V. 408. – P. 7243
125. Canfarotta, F. Recent advances in electrochemical sensors based on chiral and nano-sized imprinted polymers / F. Canfarotta, R. Rapini, S. Piletsky // *Curr. Opinion Electrochem.* – 2018. – V. 7. – P. 146.
126. Cheong, W.J. Recent applications of molecular imprinted polymers for enantioselective recognition / W.J. Cheong, F. Ali, J.H. Choi, J.O. Lee, K.Y. Sung // *Talanta.* – 2013. – V. 106. – P. 45.
127. Будников, Г.К. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин, В.Н. Майстренко. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 416 с.
128. Iacob, B.C. Study of the molecular recognition mechanism of an ultrathin MIP film-based chiral electrochemical sensor / B.C. Iacob, E. Bodoki, C. Farcau, L. Barbu-Tudoran, R. Oprean // *Electrochim. Acta.* – 2016. – V. 217. – P. 195.
129. Iacob, B.C. Simultaneous enantiospecific recognition of several β -blocker enantiomers using molecularly imprinted polymerbased electrochemical sensor / B.C. Iacob, E. Bodoki, A. Florea, A.–E. Bodoki // *Anal. Chem.* – 2015. – V. 87. – P. 2755.

130. Pandey, I. Molecularly imprinted polyaniline–ferrocene–sulfonic acid carbon dots modified pencil graphite electrodes for chiral selective sensing of D-ascorbic acid and L-ascorbic acid: a clinical biomarker for preeclampsia / I. Pandey, S.S. Jha // *Electrochim. Acta.* – 2015. – V. 182. – P. 917.
131. Pandey, I. Electrochemical impedance based chiral analysis of anti-ascorbic drug: L-ascorbic acid and D-ascorbic acid using C-dots decorated conductive polymer nanocomposite electrode / I. Pandey, R. Kant // *Biosensors Bioelectron.* – 2016. – V. 77. – P. 715.
132. Bao, L. Construction of electrochemical chiral interfaces with integrated polysaccharides via amidation / L. Bao, X. Chen, B. Yang, Y. Tao, Y. Kong // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2016. – V. 8. – P. 21710.
133. Li, Z. Amino acid inspired electrochemical recognition of phenylalanine enantiomers by amphoteric chitosan / Z. Li, Z. Mo, P. Yan, S. Meng, R. Wang, X. Niu, N. Liu, R. Guo // *New J. Chem.* – 2018. – V. 42. – P. 6817.
134. Sun, YX. Electrochemical recognition of tryptophan enantiomers based on the self-assembly of polyethyleneimine and chiral peptides / YX. Sun, JH. He, JW. Huang, Y. Sheng, DF. Xu, M. Bradley, R. Zhang // *J. Electroanal. Chem.* – 2020. V. 865. – N114130.
135. Lin, L. An L-DOPA electrochemical sensor based on graphene doped molecularly imprinted chitosan film / L. Lin, H. Lian, X. Sun, Y. Yu, B. Liu // *Anal. Methods.* – 2014. – V. 7. – P. 1387.
136. Naghib, S.M. Electrochemical biosensor for L-phenylalanine based on a gold electrode modified with graphene oxide nanosheets and chitosan / S.M. Naghib, M. Rabiee, E. Omidinia // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2014. – V. 9. – P. 2341.
137. Poletti, F. Electrochemical sensing of glucose by chitosan modified graphene oxide / F. Poletti, L. Favaretto, A. Kovtun, E. Treossi, F. Corticelli, M. Gazzano, V. Palermo, C. Zanardi, M. Melucci // *J. Phys. Mat.* – 2020. – V. 3. – N014011.
138. Tao, Y. Electrochemical enantioselective recognition in a highly ordered self-assembly framework / Y. Tao, X. Gu, B. Yang, L. Deng, L. Bao, Y. Kong, F. Chu, Y. Qin // *Anal. Chem.* – 2017. – V. 89. – P. 1900.

139. Bi, Q. An electrochemical sensor based on cellulose nanocrystal for the enantioselective discrimination of chiral amino acids / Q. Bi, S. Dong, Y. Sun, X. Lu, L. Zhao // *Anal. Biochem.* – 2016. – V. 508. – P. 50.
140. Soares, B.G. Ionic liquid: a smart approach for developing conducting polymer composites: a review / B.G. Soares // *J. Molec. Liquid.* – 2018. – V. 262. – P. 8.
141. Alizadeh, T. Tryptophan assay based on the glassy carbon electrode modified with nano-sized tryptophan-imprinted polymer and multi-walled carbon nanotube / T. Alizadeh, S. Amjadi // *New J. Chem.* – 2017. – V. 41. – P. 4493.
142. Prasad, B.B. Molecularly imprinted polymer–matrix nanocomposite for enantioselective electrochemical sensing of D- and L-aspartic acid / B.B. Prasad, A. Srivastava, M.P. Tiwari // *Material. Sci. Eng. C.* – 2013. –V. 33. –P. 4071.
143. Майстренко, В.Н. Энантиоселективные вольтамперометрические сенсоры / В.Н. Майстренко, Г.А. Евтюгин, Р.А. Зильберг. Уфа: Изд-во БашГУ, 2018. – 188 с.
144. Van, R.J. Cellulose–gold nanoparticle hybrid materials / R.J. Van, W. Thielemans // *Nanoscale.* – 2017. – V. 9. – P. 8525.
145. Wang, R. A regular self–assembly micro–nano structure based on sodium carboxymethyl cellulose–reduced graphene oxide (rGO–EDA–CMC) for electrochemical chiral sensor / R. Wang, Z. Mo, X. Niu, M. Yan, H. Feng, H. Zhang, R. Guo, N. Liu // *J. Electrochem. Soc.* – 2019. – V. 166. – P. B173.
146. Суров, О.В. Функциональные материалы на основе нанокристаллической целлюлозы / О.В. Суров, М.И. Воронова, А.Г. Захаров // *Успехи химии.* – 2017. – Т. 86. – С. 907.
147. Li, Z. Chiral electrochemical recognition of tryptophan enantiomers at a multi–walled carbon nanotube–N–carboxymethyl chitosan composite–modified glassy carbon electrode / Z. Li, Z. Mo, P. Yan, S. Meng, R. Wang, X. Niu, N. Liu, R. Guo // *New. J. Chem.* – 2018. –V. 42. –P. 11635.
148. Li, Z. The construction of electrochemical chiral interfaces using hydroxypropyl chitosan / Z. Li, Z. Mo, S. Meng, H. Gao, X. Niu, R. Guo, T. Wei // *RSC Adv.* – 2017. –V. 7. – P. 8542.

149. Niu, X. Fabrication of an electrochemical chiral sensor via an integrated polysaccharides/3D nitrogen-doped grapheme-CNT frame / X. Niu, X. Yang, Z. Mo, J. Wang, Z. Pan, Z. Liu, C. Shuai, G. Liu, N. Liu, R. Guo // *Bioelectrochemistry*. – 2020. – V. 131. – N 107396.
150. Liu, B. Differential potential ratiometric sensing platform for enantio-recognition of chiral drugs / B. Liu, H. Lian, L. Chen, X. Wei, X. Sun // *Anal. Biochem.* – 2019. – V. 574. – P. 39.
151. Smyth, H. Instrumental methods (Spectroscopy, Electronic Nose, and Tongue) as tools to predict taste and aroma in beverages: Advantages and limitations / H. Smyth, D. Cozzolino // *Chem. Rev.* – 2013, – V. 113. – P. 1429.
152. Li, Z. The optoelectronic nose: Colorimetric and fluorometric sensor arrays / Z. Li, J.R. Askim, K.S. Suslick // *Chem. Rev.* – 2019. – V. 119. – P. 231.
153. Kirsanov, D. Mimicking *Daphnia magna* bioassay performance by an electronic tongue for urban water quality control / D. Kirsanov, E. Legin, A. Zagrebin, N. Ignatieva, V. Rybakin, A. Legin // *Anal. Chim. Acta.* – 2014. – V. 824. – P. 64.
154. Oh, E.H. Recent advances in electronic and bioelectronic noses and their biomedical applications / E.H. Oh, H.S. Song, T.H. Park // *Enzyme Microb. Technol.* – 2011. – V. 48. – P. 427.
155. Solovieva, S. Potentiometric multisensor system as a possible simple tool for non-invasive prostate cancer diagnostics through urine analysis / S. Solovieva, M. Karnaukh, V. Panchuk, E. Andreev, L. Kartsova, E. Bessonova, A. Legin, P. Wang, H. Wan, I. Jahatspanian, D. Kirsanov // *Sens. Actuators, B.* – 2019. – V. 289. – P. 42.
156. Wang, B. An Optimized Sensor Array Identifies All Natural Amino Acids / B. Wang, J. Han, N.M. Bojanowski, M. Bender, C. Ma, K. Seehafer, A. Herrmann, U.H.F. Bunz // *ACS Sens.* – 2018. – V. 3. – P. 1562.
157. Ciui, B. Chemical sensing at the robot fingertips: toward automated taste discrimination in food samples / B. Ciui, A. Martin, R.K. Mishra, T. Nakagawa, T.J. Dawkins, M. Lyu, C. Cristea, R. Sandulescu, J. Wang // *ACS Sens.* – 2018. – V. 3. – P. 2375.

158. Zhang, C. A colorimetric sensor array for organics in water / C. Zhang, K.S. Suslick // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – P. 11548.
159. Яркаяева, Ю.А. Вольтамперометрическая идентификация лекарственных средств на основе биспролола с использованием проекции на латентные структуры / Ю.А. Яркаяева, Р.А. Зильберг, А.И. Хаблетдинова, А.В. Сидельников, В.Н. Майстренко // *Вестник Баш. ун-та.* – 2016. – Т. 21. – С. 635.
160. Кабирова, Л.Р. Вольтамперометрическое обнаружение метионина в лекарственных средствах с использованием методов хемометрики / Л.Р. Кабирова, Д.И. Дубровский, Н.А. Никонова, Р.А. Зильберг, В.Н. Майстренко // *Известия УФИЦ РАН.* – 2019. – С. 15.
161. Зильберг, Р.А. Идентификация лекарственных средств на основе биспролола с использованием вольтамперометрического «электронного языка» / Р.А. Зильберг, А.В. Сидельников, Ю.А. Яркаяева, Л.Р. Кабирова, В.Н. Майстренко // *Вестник Баш. ун-та.* – 2017. – Т. 22. – С. 356.
162. Кабирова, Л.Р. Контроль качества ателолола с помощью вольтамперометрических сенсоров на основе «умных» полимеров / Л.Р. Кабирова, Д.И. Дубровский, Н.А. Никонова, Ю.К. Косихина, Р.А. Зильберг, В.Н. Майстренко // *Вестник Баш. ун-та.* – 2018. – Т. 23. С. 1088.
163. Сидельников, А.В. Энантиоселективный вольтамперометрический сенсор для распознавания стереоизомеров пропранолола / А.В. Сидельников, В.Н. Майстренко, Р.А. Зильберг, Ю.А. Яркаяева, Э.М. Хамитов // *Журн. аналит. химии.* – 2017. – Т. 72. – С. 486.
164. Яркаяева, Ю.А. Вольтамперометрический сенсор на основе композита 3,4,9,10-перилентетракарбоновой кислоты для распознавания и определения энантиомеров тирозина / Ю.А. Яркаяева, Д.И. Дубровский, Р.А. Зильберг, В.Н. Майстренко, В.М. Корнилов // *Журн. аналит. химии.* – 2020. – Т. 75. – С. 1108.
165. Колесов, С.В. Закономерности и особенности образования водных нанодисперсий интерполиэлектролитных комплексов на основе хитозана и сукцинамида хитозана / С.В. Колесов, М.С. Гурина, Р.Х. Мударисова // *Журн. общ. Химии.* – 2018. – Т. 88. – С. 1376-1380.

166. Колесов, С.В. Об устойчивости водных нанодисперсий полиэлектролитных комплексов на основе хитозана и п-сукцинилхитозана / С.В. Колесов, М.С. Гурина, Р.Х. Мударисова // *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* – 2019. – Т. 61. – С. 195-202.
167. Zilberg, R.A. A voltammetric sensory system for recognition of propranolol enantiomers based on glassy carbon electrodes modified by polyarylenephthalide composites of melamine and cyanuric acid /R.A.Zilberg, A.V. Sidelnikov, V/N/ Maistrenko, Y.A. Yarkaeva, E.M. Khamitov, V.M. Kornilov, E.L. Maksutova // *Electroanalysis.* – 2018. – V. 30. – P. 619.
168. Morris, K.F. Molecular dynamics simulation and NMR investigation of the association of the β -blockers atenolol and propranolol with a chiral molecular micelle / K.F. Morris, E.J. Billiot, F.H. Billiot, C.B. Hoffman, A.A. Gladis, K.B. Lipkowitz, W.M. Southerland, Y. Fang// *Chemical Physics.* – 2015. – V. 457. – P. 133.
169. Iacob, B.C. Simultaneous enantiospecific recognition of several β -blocker enantiomers using molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensor / B.C. Iacob, E. Bodoki, A. Florea, A.E. Bodoki, R. Oprean// *Anal. Chem.* – 2015.–V. 87. – P. 2755.
170. Li, W. Molecular modeling study of chiral separation and recognition mechanism of β -adrenergic antagonists by capillary electrophoresis / W. Li, C. Liu, G. Tan, X. Zhang, Z. Zhu, Y. Chai // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – V. 13. – P. 710-725.
171. Stiufiuc, R. Surface mediated chiral interactions between cyclodextrins and propranolol enantiomers: a SERS and DFT study / R. Stiufiuc, C. Iacovita, G. Stiufiuc, E. Bodoki, V. Chisb, C.M. Lucaciua // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2015. – V. 17. – P. 1281-1289.
172. Niu, X. Application of chiral materials in electrochemical sensors / X. Niu, X. Yang, H. Li, J. Liu, Z. Liu, K. Wang // *Mikrochim Acta.* – 2020. – V. 187. – P. 676.
173. Будников, Г.К. Основы современного электрохимического анализа. / Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев, – М.: Мир, 2003. – 588 с.

174. Patil, R.H. Voltammetric oxidation and determination of atenolol using a carbon paste electrode / R.H. Patil, R.N. Hegde, S.T. Nandibewoor // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2009. – V. 48. – P. 10206.
175. Goyal, R.N. Differential pulse voltammetric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine using nanogold modified indium tin oxide electrode / R.N. Goyal, V.K. Gupta, M. Oyama, N. Bachheti // *Electrochem. Commun.* – 2006. – V. 8. – P. 65.
176. Shamsipur, M. A highly sensitive electrochemical sensor based on gold nanoparticles/multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for selective determination of traces of atenolol / M. Shamsipur, R. Saber, M. Emami // *Anal. Methods.* – 2014. – V. 6. – P. 7038.
177. Zilberg, R.A. Selective voltammetric sensors based on composites of chitosan polyelectrolyte complexes with cyclodextrins for recognition and determination of atenolol enantiomers / R.A. Zilberg, V.N. Maistrenko, L.R. Kabirova, D.I. Dubrovsky // *Anal. Methods.* – 2018. – V. 10. – P. 1886.
178. Pomerantsev, A.L. Multiclass partial least squares discriminant analysis: Taking the right way - a critical tutorial / A.L. Pomerantsev, O.Ye. Rodionova // *J. Chemometr.* – 2018. – V. 32. – N e3030.
179. Дубровский, Д.И. Вольтамперометрические сенсоры на основе композитов полиэлектrolитного комплекса хитозана и α -, β -, γ -циклодекстринов для определения и распознавания энантиомеров метионина / Д.И. Дубровский, Л.Р. Кабирова, А.И. Хаблетдинова, Р.А. Зильберг, В.Н. Майстренко // *Вестник Баш. ун-та.* – 2018. – Т. 23. – С. 721.
180. Niu, X. Perylene-functionalized grapheme sheets modified with β -cyclodextrin for the voltammetric discrimination of phenylalanine enantiomers / X. Niu, X. Yang, Z. Mo, R. Guo, N. Liu, P. Zhao, Z. Liu // *Bioelectrochem.* – 2019. – V. 129. – P. 189.
181. Fernstrom, J.D. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain / J.D. Fernstrom // *J. Nutr.* – 2007. – V. 137. – P. 1539S.
182. Zhu, G. Review - recent advances in electrochemical chiral recognition / G. Zhu, O.J. Kingsford, Y. Yi, K.Y. Wong // *J. Electrochem. Soc.* – 2019. – V. 166. – P. H205.

183. Zor, E. Chiral sensors / E. Zor, H. Bingol, M. Ersoz // Trends Anal. Chem. – 2019. – V. 121. – N 115662.
184. Srivastava, A.K. Voltammetric techniques for the analysis of drugs using nanomaterials based chemically modified electrodes / A.K. Srivastava, S.S. Upadhyay, C.R. Rawool, N.S. Punde, A.S. Rajpurohit // Curr. Anal. Chem. – 2019. – V. 15. – P. 249.
185. Fang, B. The electrochemical behavior and direct determination of tyrosine at a glassy carbon electrode modified with poly (9-aminoacridine) / B. Fang, H. Liu, G. Wang, Y. Zhou, M. Li, Y. Yu, W. Zhang // Annali Di Chimica. – 2007. – V. 97. – P. 1005.
186. Cheng, H. Electrochemical behavior and sensitive determination of l-tyrosine with a gold nanoparticles modified glassy carbon electrode / H. Cheng, C. Chen, S. Zhang // Analytical sciences. – 2009. – V. 25. – P. 1221.
187. Alvarez-Rivera, G. Chiral analysis in food science / G. Alvarez-Rivera, M. Bueno, D. Ballesteros-Vivas, A. Cifuentes // Trends Anal. Chem. – 2020. – V. 123. – P. 115761.
188. Майстренко, В.Н. Энантиселективные вольтамперометрические сенсоры на основе хиральных материалов / В.Н. Майстренко, Р.А. Зильберг // Журн. аналит. химии. – 2020. – Т. 75. – С. 1080.
189. Arvand, M. Simultaneous voltammetric determination of tyrosine and paracetamol using a carbon nanotube-graphene nanosheet nanocomposite modified electrode in human blood serum and pharmaceuticals / M. Arvand, T.M. Gholizadeh // Colloids Surf., B: Biointerfaces. – 2013. – V. 103. – P. 84.
190. Rahimi-Mohseni, M. Development of a new paper based nano-biosensor based on the co-catalytic effect of tyrosinase from banana peel tissue (Musa Cavendish) and functionalized silica nanoparticles for voltammetric determination of L-tyrosine / M. Rahimi-Mohseni, J.B. Raoof, R. jani, T.A. Aghajanzadeh, A.B. Hashkavayi // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – V. 113. – P. 648.
191. Shi, X. Enantio-recognition of tyrosine based on a novel magnetic electrochemical chiral sensor / X. Shi, Y. Wang, C. Peng, Z. Zhang, J. Chen, X. Zhou, H. Jiang // Electrochimica Acta. – 2017. – V. 241. – P. 386.

192. Guo, Y. Novel potential type electrochemical chiral recognition biosensor for amino acid / Y. Guo, R. Yao, Z. Wang, Y. Zhang, M. Cui, Q. Zhao, H. Wang // J Solid State Electrochem. – 2018. – V. 22. – P. 41.