

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования
“Уральский государственный экономический университет”

На правах рукописи

Маркина Мария Геннадьевна

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

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор Стожко Н.Ю.

Екатеринбург – 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1 КОЖА ЧЕЛОВЕКА КАК ОБЪЕКТ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	11
1.1 Понятие окислительного стресса.....	11
1.2 Кожа как барьер неблагоприятному воздействию среды.....	13
1.3 Строение кожи: анатомический, биохимический аспекты.....	14
1.4 Методы определения антиоксидантов кожи человека.....	18
1.4.1 Определение неферментативных низкомолекулярных антиоксидантов.....	18
1.4.2 Роль тиолов, их вклад в антиоксидантную активность.....	20
1.5 Поиск подходов для неинвазивной оценки антиоксидантных свойств кожи вне лаборатории.....	21
1.5.1 Общая характеристика внелабораторных методов анализа.....	21
1.5.2 Подходы к определению антиоксидантов в различных объектах.....	24
1.5.3 Использование наночастиц для определения антиоксидантов.....	33
1.5.4 Определение биотиолов с использованием наночастиц.....	34
1.6 Постановка задачи исследования.....	46
Глава 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	48
2.1 Аппаратура.....	48
2.2 Реактивы и материалы.....	49
2.3 Синтез и характеристика наночастиц золота.....	50
2.4 Расчет состава раствора, моделирующего кожу человека.....	51
2.5 Методика потенциометрического определения АОА кожи с использованием геля и медиаторной системы.....	53
2.6 Методика анализа экстрактов из кожи методом КЗЭ.....	54
Глава 3 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КОЖИ.....	56
3.1 Математическая модель.....	56
3.2 Сопоставление теоретических и экспериментальных результатов.....	62
Глава 4 РАЗРАБОТКА ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО СЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КОЖИ.....	70
4.1 Потенциометрическое определение АОА кожи с помощью геля и медиаторной системы: недостатки и пути их преодоления.....	70
4.1.1 Скорость установления потенциала.....	70
4.1.2 Хранение геля с медиаторной системой.....	72
4.2 Разработка чувствительного слоя потенциометрического сенсора.....	76
4.2.1 Выбор раствора реагента: медиаторная система.....	77

4.2.2	Выбор раствора реагента: гексацианоферрат (III) калия.....	81
4.2.3	Выбор материала-основы чувствительного слоя.....	81
4.4	Выбор рабочих условий.....	83
4.4.1	Концентрация и рН нейтрального электролита.....	83
4.4.2	Время выдерживания фильтра.....	85
4.4.3	Хранение раствора реагента.....	85
4.5	Исследование мешающего влияния.....	86
4.6	Аналитические характеристики методики.....	88
4.7	Анализ кожи респондентов.....	91
4.8	Сравнение данных КЗЭ с данными потенциометрии.....	93
Глава 5 РАЗРАБОТКА СЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИОЛ-СОДЕРЖАЩИХ АНТИОКСИДАНТОВ В КОЖЕ.....		99
5.1	Индикаторная реакция.....	99
5.2	Выбор способа проведения индикаторной реакции.....	100
5.3	Выбор условий формирования сенсора.....	104
5.3.1	Материал подложки.....	104
5.3.2	Условия сорбции наночастиц золота.....	105
5.4	Выбор рабочих условий анализа.....	107
5.4.1	Вариант использования сенсора.....	107
5.4.2	Влияние рН.....	109
5.4.3	Время отклика.....	109
5.5	Исследование мешающего влияния.....	111
5.6	Выбор способов регистрации и обработки отклика сенсора.....	112
5.6.1	Выбор устройства для регистрации сигнала.....	112
5.6.2	Выбор условий регистрации сигнала.....	113
5.6.3	Выбор способа обработки отклика сенсора.....	114
5.7	Аналитические характеристики сенсора.....	115
5.8	Анализ кожи респондентов.....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....		122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		123
Приложение А – Методика определения антиоксидантной активности кожи с помощью потенциометрического сенсора		
Приложение Б – Методика определения тиолов кожи с помощью колориметрического сенсора		

Введение

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

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

отношении тиолов. Поэтому разработка неинвазивных методов определения тиолов кожи человека является отдельной, актуальной задачей.

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

Немногочисленная группа неинвазивных методов оценки антиоксидантных свойств кожи имеет ряд недостатков. Например, метод резонансной спектроскопии комбинационного рассеяния света позволяет оценивать только содержание каротиноидов, к другим АО кожи метод не чувствителен. Метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса сложен в реализации, требует лабораторных условий, воздействия на кожу микроволнового излучения и магнитного поля. В случае вольтамперометрической оценки окислительно-восстановительного состояния кожи интерпретацию результатов затрудняют невоспроизводимость поверхности рабочего электрода и низкая электропроводность объекта анализа. Простота аппаратного оформления, возможность создания миниатюрных приборов для работы в “полевых” условиях позволяет рассматривать неинвазивный потенциометрический метод оценки АОА кожи как перспективный. Недостатками существующего потенциометрического способа являются длительность процедуры анализа, неустойчивость используемой смеси медиаторной системы с гелем при хранении, недостаточная воспроизводимость результатов. Теоретические основы этого метода еще не разработаны. Следует также отметить отсутствие опубликованных данных по неинвазивным методам определения тиолов в коже человека.

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

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

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

Научная новизна работы состоит в следующем:

1. Разработаны теоретические основы потенциометрического метода определения АОА кожи. Показано, что аналитический сигнал зависит от скоростей диффузионного отвода АО от поверхности раздела «кожа–экстрагент» и химического взаимодействия АО с окисленной формой медиаторной системы в среде экстрагента, толщины слоя экстрагента и эпидермиса кожи, длительности измерения. Адекватность модели подтверждена согласованностью теоретических и экспериментальных данных.
2. Впервые установлено, что константы скоростей взаимодействия водорастворимых АО кожи человека с гексацианоферратом (III) калия в среде геля на порядок меньше, чем в водном растворе. Обоснована замена геля с медиаторной системой на пропитанный водным раствором гексацианоферрата (III) калия пористый материал в качестве чувствительного слоя потенциометрического сенсора для неинвазивного определения АОА кожи человека.
3. На основании результатов анализа водных экстрактов из кожи человека методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) с ультрафиолетовой (УФ)

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы:

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

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту:

1) теоретические представления о физико-химических процессах, протекающих при потенциометрическом определении АОА кожи человека, и результат сопоставления теоретических и экспериментальных исследований;

2) потенциометрический сенсор, чувствительным слоем которого является ацетат-целлюлозная мембрана, пропитанная раствором гексацианоферрата (III) калия, и методика неинвазивного потенциометрического определения АОА кожи;

3) колориметрический сенсор на основе наночастиц золота и методика неинвазивного определения содержания тиолов в коже человека.

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

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

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

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 3 статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях,

определенных ВАК (2 статьи в журналах, входящих в базы цитирования Scopus и Web of Science, 1 статья – в базу Chemical Abstracts), и тезисы 12 докладов всероссийских и международных конференций.

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

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

КОЖА ЧЕЛОВЕКА КАК ОБЪЕКТ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (Литературный обзор)

1.1. Понятие окислительного стресса

Кислород является самым распространенным химическим элементом биосферы Земли, его соединения входят в состав всех живых организмов на планете [1]. Большинство живых существ нашей планеты потребляют молекулярный кислород и используют его в процессе метаболизма. В качестве продуктов постоянно протекающих в живых организмах реакций ферментативной активации кислорода образуются “активные формы кислорода”: (АФК), O_2^- , O_2^1 , H_2O_2 , HO^\cdot , OCl^- , RO_2^\cdot и др., в том числе свободные радикалы. Другой источник АФК – неблагоприятное воздействие окружающей среды: различных загрязнителей, УФ и других видов излучения, химических окислителей и патогенных микроорганизмов. Установлено, что все АФК обладают высокой цитотоксичностью в отношении любых типов клеток и клеточных образований, что обусловлено их химической активностью [1]. Наиболее вероятные мишени окислительной атаки АФК: липиды биологических мембран [2], мембрансвязанные белки [3], ферменты [4] и ДНК клеток [5]. В результате усиления процессов радикального окисления в организме происходит накопление токсических продуктов окисления перечисленных компонентов клеток.

Антиоксидантная система защиты – комплекс ферментативных и неферментативных антиоксидантов – противостоит разрушающему действию АФК. В зависимости от механизма действия выделяют антирадикальные ингибиторы, взаимодействующие с органическими радикалами; антиокислители, разрушающие органические перекиси; хелаторы – вещества, связывающие катализаторы окисления (ионы металлов переменной валентности); “тушители” – соединения, безызлучательно инактивирующие возбужденные триплетные состояния молекул, в частности O_2^1 [1,6]. Весь этот обширный класс веществ

объединяют следующим определением: “антиоксидант – это любое вещество, которое, присутствуя в низких по сравнению с окисляемым субстратом концентрациях, существенно задерживает или ингибирует его окисление” [7].

Для описания дисбаланса между процессом образования АФК и защитным действием антиоксидантной системы в последние годы активно применяют термин “окислительный стресс” (ОС). Термин позволяет описывать состояния, наблюдаемые в клетках, тканях и целом организме. В настоящее время показано участие АФК в патогенезе более чем 100 заболеваний и патологических состояний, многие из них являются экологическими или возрастными патологиями [1]. Усиление деструктивных процессов в результате развития ОС может являться патогенетическим фактором заболевания, но не обязательно лежать в его основе. Вместе с тем вопрос о механизме действия АФК остается открытым, поскольку утверждение о патофизиологической роли АФК пока строится на косвенных аргументах, а именно: интенсивность продукции АФК коррелирует с развитием патологического процесса; ингибиторы АФК обладают защитным действием [1].

Показателем уровня ОС в организме может служить снижение активности компонентов системы антиоксидантной защиты и/или увеличение продуктов окисления различных молекул в клетках, тканях и органах [8]. Важными показателями ОС являются АОА [9], соотношение окисленных и восстановленных SS-/SH- групп белковых молекул [10] или содержание восстановленных форм низкомолекулярных тиольных соединений [11] в биологическом объекте. Поскольку окислительному действию АФК, в первую очередь, подвергаются SH-группы белков или низкомолекулярных тиолов, их окисление приводит к снижению содержания восстановленных групп и повышению уровня окисленных SS-групп [12,13]. Распространен анализ достаточно стабильных продуктов окисления различных молекул, например, малонового диальдегида или диеновых конъюгатов – продуктов перекисного окисления липидов [8].

Следует отметить, что не существует общепринятой единой терминологии: антиоксидантная активность [14,15], статус [16], ёмкость [17] и общая восстанавливающая сила (“total reducing power”) [18] – эти термины используются для описания суммарного содержания АО в биологических объектах.

Стандартных методов количественной оценки степени выраженности ОС нет. Методы определения АО [14,15,19–22], в большинстве случаев, являются лабораторными, дорогостоящими, длительными, требующими квалифицированного персонала и инвазивными, т.е. отбор проб осуществляется с помощью игл и других медицинских инструментов. Несомненный интерес представляет разработка неинвазивных методов определения АО для проведения, в частности, скрининг-исследований больших групп населения, анализа вне лаборатории, у постели больного. Подобные методы в литературе практически не встречаются. Таким образом, разработка и развитие неинвазивных методов определения АО в живых организмах являются актуальным направлением.

1.2. Кожа как барьер неблагоприятному воздействию среды

Среди биологических объектов весьма перспективным для неинвазивных исследований является кожа. Это один из самых больших органов, который постоянно находится в прямом контакте с окружающей средой и защищает тело от её неблагоприятного воздействия. Кожа является потенциальной мишенью для окислительного повреждения, поскольку она непрерывно подвергается воздействию УФ и видимого излучения, кислорода воздуха. Кожа содержит множество способных к окислению структур, что имеет решающее значение для поддержания клеточного гомеостаза. На коже обитает большое количество сапрофитных микроорганизмов, в их числе есть и патогенные виды. Кожные инфекции и последующие воспалительные реакции могут привести к автоокислительному поражению ткани. Кожа – периферический орган иммунной системы. Клетки Лангерганса кожи участвуют в сложном процессе регулирования иммунной системы кожи. Они восприимчивы к окислительным стрессовым

факторам, таким как солнечное излучение и действие соединений-окислителей [23].

Пути образования АФК в коже, прежде всего, связаны с непосредственным воздействием на нее стресс-факторов окружающей среды. Так, атомарный кислород O_2^1 постоянно образуется в коже под действием УФ излучения и, следовательно, рассматривается в качестве главного источника ОС в коже [24]. С другой стороны, различные системные и внутренние патологические состояния также оказывают влияние на состояние кожи [25]. Показано, что контроль содержания АО, в частности, тиол-дисульфидных групп (SH/SS), в коже человека имеет большое значение для оценки защитных свойств кожи и организма в целом, особенно при патологических состояниях организма, таких как диабет, псориаз и др. [26]. Антиоксидантная система кожи играет главную роль в защите от воздействия АФК.

Итак, кожа является “зеркалом” эндогенных патологий, поэтому мониторинг её антиоксидантного статуса позволил бы отслеживать общее состояние здоровья человека, тяжесть и прогрессирование различных заболеваний [27], эффективность проводимой терапии.

1.3. Строение кожи: анатомический, биохимический аспекты

Кожа представляет собой крайне сложную многокомпонентную систему, состоящую из трёх основных, расположенных друг за другом слоёв с различными структурными, функциональными и физико-химическими свойствами. Это эпидермис, дерма (собственно кожа) и гиподерма (подкожно-жировая клетчатка) (Рисунок 1.1).

Эпидермис – наружный слой кожи, представлен многослойным плоским ороговевающим эпителием. Эпидермис состоит из 5 слоев: базального, шиповатого, зернистого, блестящего и рогового. Большинство клеток эпидермиса являются кератиноцитами, которые по мере развития (дифференцировки) продвигаются от базальной мембраны по направлению к поверхности кожи. Наружный слой – роговой (stratum corneum) – образован полностью

ороговевшими безъядерными клетками – корнеоцитами (роговыми пластинками), содержащими нерастворимый белок кератин, и межклеточным цементирующим веществом, состоящем из липидных систем [28,29].

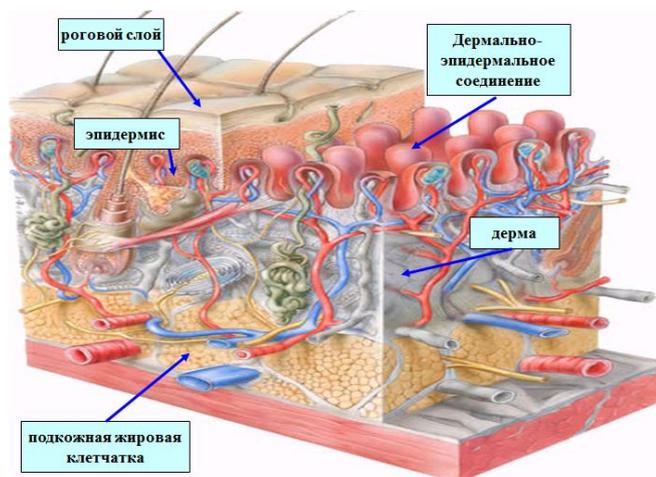


Рисунок 1.1 – Строение кожи человека

Эпидермис отделен от дермы базальной мембраной, толщиной 40—50 нм с неровными контурами, повторяющими рельеф внедряющихся в дерму эпидермальных тяжей. Базальная мембрана является эластической опорой, не только прочно связывающей эпителий с коллагеновыми волокнами дермы, но и препятствующей росту эпидермиса в дерму [28].

Дерма является опорой для придатков кожи (волос, ногтей, потовых и сальных желез), сосудов и нервов. Дерма – соединительнотканная часть кожи – состоит из трех компонентов: волокон, основного вещества и немногочисленных клеток. Клеточная часть представлена фибробластами, основная функция которых заключается в утилизации поврежденных и синтезе новых волокон и межклеточного вещества. Основными являются коллаген I и III типов (механическая прочность кожи), и эластин (эластичность кожи). Межклеточное вещество представлено гликозаминогликанами – группой соединений (гиалуроновая кислота, хондроитин сульфат, гепаран сульфат и др.), обладающих свойством накапливать и удерживать воду (тургор кожи), обеспечивающих правильное пространственное расположение и ориентацию волокон дермы,

расположение клеток кожи, депонирующих сигнальные молекулы, которые высвобождаются при необходимости [30].

Гиподерма – это самая глубокая часть кожи. Гиподерма состоит из жировых клеток (адипоцитов), располагающихся группами в рыхлой волокнистой соединительной ткани. Основная функция гиподермы – защита тела от холодных температур, смягчение ударов, запас питательных веществ и энергии. Межклеточное вещество содержит небольшое количество волокон коллагена и эластина, основное вещество состоит из гликозаминогликанов и протеогликанов [30].

Поверхность кожи, волос покрыта водно-жировой плёнкой (“мантей”), образующейся из продуктов деятельности сальных, потовых желёз и отшелушивающейся поверхности рогового слоя.

Антиоксидантная система кожи человека представлена молекулами, которые синтезируются в процессе метаболизма – глутатион, мочева кислота; витаминами, которые поступают с пищей – витамины С (аскорбиновая кислота) и Е (группа соединений, важнейшие из которых – токоферолы и токотриенолы); и ферментами – супероксид дисмутазой, каталазой и глутатионпероксидазой. Эта система обеспечивает защиту различных внутри- и межклеточных элементов кожи [6].

В последнее десятилетие опубликовано большое количество данных по содержанию и активности АО в тканях человека, но данные по коже практически отсутствуют. Вследствие использования разных единиц измерения, референтных значений, условий эксперимента данные не всегда легко сопоставимы. Большинство методов определения содержания АО в коже человека являются инвазивными [31–36].

Ферментативные АО, такие как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, неравномерно распределены в тканях человека, в том числе и в коже. Подобное явление обнаружено и для низкомолекулярных неферментативных АО, таких как аскорбиновая кислота, глутатион, мочева кислота и др. Установлено, что в эпидермисе кожи человека содержится больше

АО (как ферментативных, так и неферментативных), чем в дерме [18,23]. Литературные данные о содержании неферментативных АО в коже условно здоровых людей разных возрастных групп представлены в Таблице 1.1.

Таблица 1.1. Содержание антиоксидантов в коже условно здоровых людей

АО	Содержание в коже		Исследованная группа людей	Метод определения	Лит-ра
	Эпидермис	Дерма			
1	2	3	4	5	6
АК	3798±1016*	723±320*	n=6; 45-75 лет; США	ВЭЖХ/ЭХ	[36]
		41**			[24]
	363.7±24.8*	162.4±18.6*	n=15; 19-28 лет; Корея	ВЭЖХ/УФ	[34]
	252.2±19.4*	102.1±22.8*	n=15; 71-86 лет; Корея		
МК	1071±242*	182±24*	n=6; 45-75 лет; США	ВЭЖХ	[36]
	419.0±21.7*	193.2±24.1*	n=15; 19-28; Корея	ВЭЖХ/УФ	[34]
	351.1±28.8*	202.9±36.1*	n=15; 71-86 лет; Корея		
GSH+GSSG	484.3±81.4*	84.8±11.5*	n=6; 45-75 лет; США	СФ/ДТНБ-ГР	[36]
	550.5±43.4*	306.0±20.1*	n=15; 19-28 лет; Корея		[34]
	326.4±24.2*	283.5±22.2*	n=15; 71-86 лет; Корея		[35]
	627±400***		n=5; 19-67 лет; Эстония		[36]
GSH	460.9±77.4*	75.1±9.0*	n=6; 45-75 лет; США	СФ/ДТНБ-ГР	[36]
	521.8±40.7*	286.8±17.5*	n=15; 19-28 лет; Корея		[34]
	307.6±24.6*	267.7±21.7*	n=15; 71-86 лет; Корея		[35]
	457±400***		n=5; 19-67 лет; Эстония		[36]
Токоферол (общее содержание)	34.2*	18.0*	n=6; 45-75 лет; США	ВЭЖХ/ЭХ	[36]
витамин Е	0.189-0.675****				[32]
α-токоферол	26.3±3.4*	4.2±0.5*	n=15; 19-28 лет; Корея	ВЭЖХ/УФ	[34]
	14.6±1.9*	4.9±0.8*	n=15; 71-86 лет; Корея		
α-токоферол	31.0±3.8*	16.2±1.1*	n=6; 45-75 лет; США	ВЭЖХ/ЭХ	[36]

Продолжение Таблицы 1.1

1	2	3	4	5	6
Убихинол и убихинон (общее содержание)	7.66±0.45*	3.15±0.87*		ВЭЖХ/ЭХ, УФ	
Убихинол-10 (восстановленная форма)	3.53±0.79*	0.35±0.08*		ВЭЖХ/УФ	
Ретиноиды	~2.0****	-			[33]
Витамин А	1.3-2.2****	393****			[37]
β-каротин	13.7****	-			[33]
	1.3-2.2****	0.775****			[37]
β-каротин и ликопин (в роговом слое кожи)	1. при 488 нм. (22±10)·10 ⁻⁵ (лев.рука); (22±10)·10 ⁻⁵ (прав.рука); 2. при 514 нм. (8,3±5,2) 10 ⁻⁵ (лев.рука); (9,1±6,2)·10 ⁻⁵ (прав.рука). [произвольные единицы]		n=17; 20-50 лет; Германия	Рамановская спектроскопия	[20]

* нмоль/г сырой кожи; ** мкг/г сухого веса кожи; *** мг/г сырой кожи; **** мкг/мг белка; АК – аскорбиновая кислота; МК – мочевая кислота; GSH – глутатион; GSSG – глутатиона дисульфид; ВЭЖХ/ЭХ – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией; ВЭЖХ/УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовой детекцией; СФ/ДТНБ–ГР – спектрофотометрический метод с использованием 5,5'-дителиобис-2-нитробензойной кислоты и глутатиоредуктазы.

На основании приведенных в таблице 1.1 данных можно заключить, что основными неферментативными низкомолекулярными АО эпидермиса кожи человека являются аскорбиновая кислота (70% от общего содержания водорастворимых АО кожи), мочевая кислота (17%) и глутатион (7%).

1.4. Методы определения антиоксидантов кожи человека

1.4.1. Определение неферментативных низкомолекулярных антиоксидантов

Большинство методов определения АО, в том числе неферментативных низкомолекулярных АО, в коже человека предполагают инвазивный отбор пробы [31–36,38,39]. Полученные хирургическим путем образцы кожи замораживают до низких температур (-80°C), отделяют слой эпидермиса от дермы, каждый слой

гомогенизируют отдельно в буферном растворе и центрифугируют. Надосадочную жидкость анализируют в основном методами спектрофотометрии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (с УФ или электрохимическим детектированием). Для выполнения пробоотбора необходим квалифицированный медицинский работник, соблюдение санитарных и гигиенических норм, лабораторных условий проведения анализа. Поэтому существует потребность в развитии неинвазивных, легко переносимых пациентами методов определения АО в коже.

Неинвазивные методы редко упоминаются в литературе. К ним относятся, например, методы резонансной спектроскопии комбинационного рассеяния света и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [20, 40–42], вольтамперометрии [43] и потенциометрии [25,44,45]. Процедура измерения проводится непосредственно на исследуемом участке кожи *in vivo*. Недостатком метода резонансной спектроскопии комбинационного рассеяния света является ограниченный круг определяемых соединений, а именно, только каротиноиды кожи (β -каротин, ликопин). К другим АО кожи (например, водорастворимым ферментативным АО) этот метод не чувствителен. Метод спектроскопии ЭПР сложен в реализации, требует лабораторных условий, обработки кожи микроволновым излучением и магнитным полем. В случае вольтамперометрического метода трудности могут возникнуть при выборе материала электрода и интерпретации результатов. Потенциометрический метод с медиаторной системой лишён перечисленных недостатков. Этот метод основан на взаимодействии АО кожи с медиаторной системой, введённой в электропроводный гель, который наносят на кожу. Источником информации об АОА кожи служит сдвиг потенциала медиаторной системы в результате этого взаимодействия.

Ивановой А.В. и соавт. [46,47] предложен потенциометрический способ определения суммарной антиоксидант/оксидантной активности широкого круга объектов. Определение АО/ОА проводят по разности потенциалов, один из которых измеряется после прохождения химической реакции между АО/ОА

аналита и реагентом, а второй – после следующей добавки реагента или аликвоты анализа. В качестве реагентов предложено использовать комплексные соединения металлов переменной валентности с неорганическими лигандами (например, $K_3[Fe(CN)_6]$, $K_4[Fe(CN)_6]$, $K_3[Mn(CN)_6]$, $K_4[Mn(CN)_6]$, $K_3[Mo(CN)_8]$, $K_4[Mo(CN)_8]$, $[Fe(SCN)_3]$, $[Fe(SCN)_2]$), а также комплексные соли металлов переменной валентности с органическими лигандами, такие как тетраэтиламмония гексацианоферрат (III), тетраэтиламмония гексацианоферрат (II), тетрабутиламмония гексацианоманганат (III), тетраэтиламмония тетрахлорферрат (II) и ряд других. В качестве растворителей авторы предлагают различные соединения, в частности, воду, спирты, хлороформ, ацетонитрил, гексан, ацетон, эфиры. Рабочий электрод может быть платиновым, золотым, стеклоуглеродным; электрод сравнения – хлоридсеребряный в водных растворах, $Ag/AgNO_3$ в органических растворителях. Подход апробирован на модельных растворах антиоксидантов, пероксида водорода, реальных объектах – зеленый чай, подсолнечное нерафинированное масло.

Неинвазивный подход к определению АО кожи, описанный в работах [27,48], основан на анализе смывов с кожи человека. Полученный кожный экстракт предложено анализировать трудоемкими лабораторными методами, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимическим детектированием и ORAC (oxygen radical absorbance capacity, определение кислородрадикальной поглотительной емкости). Предложенный подход не является экспрессным, требует дорогостоящего оборудования и материалов.

1.4.2. Роль тиолов, их вклад в антиоксидантную активность

Низкомолекулярные биотиолы (например, цистеин и глутатион) – важные физиологические компоненты организма человека и животных. Биотиолы играют ключевую роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза благодаря существованию равновесия их восстановленных и окисленных форм (тиольных и дисульфидных групп) [49]. Показано, что тиол-дисульфидное соотношение играет важную роль в здоровье и развитии патологических

состояний человека [50–52]. Тиол-дисульфидная система может рассматриваться как “redox buffer”, например, “буфер” на основе глутатиона GSH/GSSG [53]. Доказано, что отклонение от нормы тиол-дисульфидного соотношения может приводить к нарушению физиологических функций, например, к заболеваниям сердца, неврологическим болезням [54,55], а также служить информацией об уровне ОС в организме [56,57]. Важные результаты для клинической терапии были получены при исследовании пациентов в критических состояниях [58]. Показано, что контроль содержания (-SH/SS) групп в коже человека имеет большое значение для оценки защитных свойств кожи и организма в целом, особенно при патологических состояниях организма, таких как диабет, псориаз и др. [26].

Содержание глутатиона, основного тиола кожи, составляет около 7% от общего содержания водорастворимых АО в коже [36], что обуславливает его незначительный вклад в интегральную величину АОА кожи и делает этот показатель неинформативным в отношении тиолов. В связи с этим актуальным направлением исследования является разработка простых, доступных, экспрессных, неинвазивных методов и сенсоров для определения тиолов в коже человека.

1.5. Поиск подходов для неинвазивной оценки антиоксидантных свойств кожи человека вне лаборатории

1.5.1. Общая характеристика внелабораторных методов анализа

В современном мире растет потребность в экспрессных средствах химического анализа во внелабораторных условиях, без привлечения дорогостоящего, громоздкого оборудования и высококвалифицированных специалистов. Например, больным сахарным диабетом необходимо определение уровня сахара в крови и моче в домашних условиях, а также другие экспресс – анализы клинического назначения. Подобные аналитические задачи могут быть решены с помощью тест-систем (как правило, качественный и

полуколичественный анализ), а также химических сенсоров (количественный анализ).

Тест-системы представляют собой простые, портативные, легкие и дешевые аналитические средства и соответствующие экспрессные методики для обнаружения и определения веществ без существенной пробоподготовки (иногда без отбора проб), без использования сложных стационарных приборов, лабораторного оборудования, без самой лаборатории, без сложной обработки результатов, а также подготовленного персонала; в большинстве случаев применяют автономные средства однократного использования [59].

Интерес к исследованию ОС и систем антиоксидантной защиты человека, животных и растений сподвигнул учёных к созданию экспрессных методов “полевого” анализа, применимых в этой области. Предложено большое количество подходов и ряд устройств для определения индивидуальных АО или их суммарного содержания в различных объектах: биологических жидкостях и тканях, продуктах питания, косметике, лекарственных препаратах, экстрактах растений. Разработанные подходы реализованы в форме тест-полос или тест-порошков, где реагент иммобилизован на твёрдом носителе (подложке), либо в форме тест-растворов (раствор реагента). Общий принцип почти всех химических тест-методов — это использование аналитических реакций и реагентов в условиях и в формах, обеспечивающих получение визуально наблюдаемого или легко измеряемого эффекта; это, например, интенсивность окраски бумаги или длина окрашенной части индикаторной трубки [59].

Для экспрессного анализа в полевых условиях наибольший интерес представляют тест-полоски, тест-порошки. Как правило, в качестве материала для подложки используют неорганические или органические полимерные материалы, химически инертные и оптически прозрачные, например, силикагель, ксерогель, желатин, полиметилакрилат, пластифицированный поливинилхлорид, полистерен, пенополиуретан, нафион, а также фильтровальную бумагу. В качестве тест-реагентов в работах упоминаются следующие соединения:

- а) хромогенные радикалы (2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил радикал);

б) комплексы переходных металлов (Cu^{2+} , Fe^{3+}) с органическими лигандами (тетрабензо-[b,f,j,n][1,5,9,13]-тетраазациклогексадецин, неокупроин, 2,2'-дипиридил, 1,10-фенантролин, 4-(2-пиридилазо)резорцинол);

в) окислительно-восстановительные индикаторы (индофенолы (2,6-дихлороиндофенол, 2,6-дибромоиндигогваякол), индамины (Вариаминовый синий, зеленый Биндшедлера)), тиазиновые красители (метиленовый синий трийодид);

г) неорганические окислители (молибдофосфорная кислота, $\text{H}_4\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}$ (молибдокремниевая гетерополикислота), $\text{FeCl}_3 + \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, берлинская лазурь, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$);

д) полимеры (полианилиновая плёнка).

В результате взаимодействия реагента с АО аналита происходит изменение окраски системы. Содержание прореагировавших АО определяют по интенсивности окраски (сравнивают со шкалой или определяют спектрофотометрически).

В отличие от тест-систем, использование химических сенсоров позволяет количественно определять весьма малые содержания анализируемого компонента, в том числе и в “полевых” условиях. Согласно Ю.А. Золотову [60], химический сенсор – это устройство для химического анализа, позволяющее обратимо, непрерывно, в режиме реального времени или с малым временем отклика определять одно вещество или группу близких веществ в определенной среде; часто это миниатюрное устройство, которое можно массово тиражировать. Похожее определение дано IUPAC: химический сенсор – это устройство, которое преобразует химическую информацию, начиная от концентрации специфического компонента и заканчивая общим анализом состава пробы, в аналитически полезный сигнал. Данная химическая информация может быть как результатом химической реакции анализируемого вещества, так и каким-либо физическим свойством анализируемой системы.

Химический сенсор включает следующие функциональные единицы: рецептор (чувствительный слой) и трансдьюсер. В чувствительном слое сенсора

химическая информация трансформируется в ту форму энергии, которая может быть распознана трансдюсером. Трансдюсер преобразует энергию, несущую химическую информацию об образце, в полезный аналитический сигнал. Этот сигнал затем измеряется с помощью светочувствительного, электронного или другого устройства.

1.5.2. Подходы к определению антиоксидантов в различных объектах

В Таблице 1.2 представлены подходы к определению АО в биологических и пищевых объектах, которые могут быть заложены в основу работы сенсоров или тест-систем. Некоторые из перечисленных в Таблице 1.2 подходов реализованы в форме тест-систем.

Рассмотрим кратко представленные в Таблице 1.2 литературные данные. Гетерополисоединения – хорошо изученные реагенты для фотометрического определения восстановителей. Исследователи рассматривают их как перспективные соединения для развития тест-методов благодаря контрастному цветовому переходу между окисленной и восстановленной формой гетерополисоединения [95].

Например, известный реактив Фолина-Чокальтеу (жёлтого цвета) в щелочной среде восстанавливается в присутствии фенолов, тиолов и дисульфидов, пуриновых оснований, мочевой кислоты, некоторых пептидов и белков с образованием комплекса синего цвета с максимумом поглощения вблизи 760 нм [88]. Разработан коммерческий вариант теста на аскорбиновую кислоту, в состав которого входит молибдофосфорная кислота [61]. Однако метод Фолина-Чокальтеу не обладает узкой специфичностью, мешающее влияние оказывают ароматические амины, оксалат, цитрат, сульфит и тартрат-ионы, высокий уровень сахарозы, диоксид серы и др., не позволяет определять жирорастворимые антиоксиданты. Некоторые попытки модифицировать метод предприняты, например, в работах [84,86].

Таблица 1.2 – Подходы к определению АО в биологических и пищевых объектах

Реагент, подложка	Тип сигналообразующей реакции/ метод детекции	Объект анализа	Аналит	ПрО, диапазон определяемых величин	Ссылка
1	3	4	5	6	7
DRPH/GV, ПВХ+ПЭ, тест-пластина	ОВР/СФ, визуальный	Продукты питания	АОА	1–50 ммоль/дм ³	[62]
DRPH, ПВХ, тест- пластина	ОВР/СФ	Экстракты растений	АОА	40-200 мкг/см ³ (АК)	[63]
Fe(III)-ДП ФТ, желатиновая фотопленка, тест- пластина	ОВР/СФ	Фармпрепараты	АК, анальгин	23-51 мкмоль/дм ³	[64]
Fe(III)-ДП ФТ, раствор	ОВР/СФ	Вино, пиво экстракты растений	АОА, [мг АК/г продукта]	0.26–3.30 мг АК/г продукта	[65,66]
Fe(III)-ДП ФТ, нафион, оптоволокно, ПУ	ОВР/СФ	Фармпрепараты	АК	2.5-100 ммоль/дм ³	[67,68]
Fe(III)-ФТ, ПМА	ОВР/СФ	Чай	АОА	0-0.03 мг/см ³ , Sr≤0.10	[69]
Fe(III)-ДП, раствор	ОВР/СФ	Ткани растений	АК	0.38 – 1.07 мкмоль/г живого веса (АК)	[70]
Fe(III)-ДП, МФК, ПМА, тест-пластина	ОВР/СФ, визуальный	Фруктовые соки	АК, ДАК	Цветовая шкала: 1, 10, 30, 50, 70, 100 мг/дм ³	[71]
Fe(III)-Ф, раствор	ОВР/СФ	Ткани млекопитающих	АК, ДАК	0.49–3.21 мкмоль/г(АК)	[72]
Fe(III)-ПАР, раствор	ОВР/СФ	Фарм. препараты, молоко, фрукты и овощи	АК	0-5.5 мкг/см ³	[73]

Продолжение Таблицы 1.2

1	2	3	4	5	6
ТБТАЦ Cu(II), силикагель, тест-порошок	ОВР/СФ, визуальный	Фарм.препараты, чай	Анальгин, АК, АОА, ОСТ, ОСК	1.5-7.1 г кверцетина/ 100 г листьев чая	[74,75]
Cu(II)-НК, нафион, оптоволокно, миниатюрный спектрометр	ОВР/СФ	Продукты питания, биологические объекты	АОА	$Sr \leq 0.05$	[76]
Cu(II)-НК, раствор	ОВР/СФ	Фарм.препараты	α -токоферол	2.4-90 мкмоль/дм ³	[77]
Cu(II)-НК, раствор	ОВР/СФ	Крупы	АОА	10.46–26.35 ммоль ТЕ/кг	[78]
ДФИФ, ПМА, тест-пластина	ОВР/СФ	Пищевые продукты	АК	8.7-147 мг/дм ³ , $Sr \leq 0.14$	[79]
1. BG/SG-SO ₃ H, 2. SG, МСТ, индикаторные порошки, трубки	ОВР/СФ, визуальный	Модельные растворы	АК, Fe(II)	1. 0.3-5.0 (ТФСФ), 5-100 (визуально), 20-1000 (ИТ) [мг/дм ³], 2. 10-380 мг/дм ³ (ИТ)	[80,81]
Ce(IV), H ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₄ , раствор	ОВР/флуоресцентный	Продукты питания	АОА	0.5-10 мкмоль/дм ³ кверцетина	[82,83]
	ОВР/СФ	Экстракты растений	АОА	0.2 мкмоль/дм ³ кверцетина	[84]
	ОВР/СФ	Фарм.препараты, фруктовый сок	АК	6.9; 23-200 мкмоль/дм ³	[85]
Ce(SO ₄) ₂ , ИнК	ОВР/СФ	Продукты питания, экстракты растений	АОЕ	0.11 мкмоль/дм ³ , 0.2-7 мкмоль/дм ³ , (танниновая к-та) $Sr \leq 0.4\%$	[86]
H ₄ SiMo ₁₂ O ₄₀ , ППУ, тест-таблетки	ОВР/диффузионная спектроскопия отражения	Фруктовые соки, фарм.препараты	АК	0.6-40 мг/см ³	[87]

Продолжение Таблицы 1.2

1	2	3	4	5	6
ФЧ, раствор, микропланшетное устройство (Synergy HT, Bio-Tek)	ОВР/СФ	Экстракты растений	ОСФ	50 мкмоль/дм ³ – 2.5 ммоль/дм ³ GA	[88]
ФЧ, раствор	ОВР/СФ	Экстракты растений	ОСФ	-	[89]
ФЧ, раствор	ОВР/СФ	Листва северной ивы	Фенолы	-	[90]
Ванилин, раствор	Комплексообразование/СФ	Листва и корни растений, экстракты	Танины (полифлаванолы)	5-500 мг	[91]
TiOС ₂ O ₄ , Cu(II), раствор	Комплексообразование/СФ	Фарм.препараты	Кверцетин	-	[92]
TiCl ₄ , раствор	Комплексообразование/СФ	Подсолнечная мука	Фенолы	-	[93]
ПА/ПС, микропластины	ОВР/СФ	Фруктовый сок, безалкогольные напитки	АК	5.7 мкмоль/дм ³	[94]
PВ-Cu(II), ксерогель, индикаторный порошок	ОВР/СФ, визуальный	Сухие фруктовые напитки	АК	50 мкМ (визуально), 2 мкМ (СФ)	[95]
FeCl ₃ + K ₃ [Fe(CN) ₆], раствор	ОВР/колориметрический, визуальный	Злаки	ОСТ, ОСП	-	[96]
K ₃ [Fe(CN) ₆]+FeCl ₃ , раствор	ОВР/колориметрический	Фрукты	ОСФ	150-400 мг/100 г	[97]
K ₃ [Fe(CN) ₆]+FeCl ₃ , гуммиарабик, коллоидный раствор	ОВР/колориметрический	Растительные экстракты (хлебное дерево, кора Маби)	Полифенолы	12-100 мг/100 г	[98]
FeCl ₃ + K ₃ [Fe(CN) ₆], раствор	ОВР/СФ	Соки, биологические объекты	АК и аскорбат-фосфат	Sr=0.33 %, 0.061 мкг/мл, 0.45-68 мкмоль/дм ³	[99]

Продолжение Таблицы 1.2

1	2	3	4	5	6
FeCl ₃ +NH ₄ SCN, раствор	ОВР/СФ	Экстракт корня имбиря	АОА	-	[15]
1. МГА- Н ₂ O ₂ -ФД- LnH1-ТН, 2. МГА- Н ₂ O ₂ -ФД- ПМХ, растворы	ОВР/СФ	Сыворотка крови человека	АОА	мкг LnH1/мкг РМС на мг сыворотки крови	[100]

ВГ – зеленый Биндшедлера; DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил радикал; ГА – галловая кислота; GV – 2,6-ди-трет-бутил- α -(3,5-ди-трет-бутил-оксо-2,5-циклогексадиен-1-илиден)-п-толилокси радикал; H₄SiMo₁₂O₄₀ – молибдокремниевая гетерополикислота; SG – силикагель; SG-SO₃H – ионообменник на основе силикагеля; ТЕ – эквиваленты тролокса; АОЕ – антиоксидантная емкость; ДАК – дегидроаскорбиновая кислота; ДП – 2,2'-дипиридил; ДФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенол; ИнК – индигокармин; ИТ – индикаторные трубки; МГА-Н₂O₂-ФД-LnH1-ТН – метгемальбумин-Н₂O₂-о-фенилендиамин –(2,6-дигидрокси-4,6-ди-третбутилфенил)-S-тиосульфат натрия; МГА-Н₂O₂-ФД-ПМХ – метгемальбумин – Н₂O₂ – о-фенилендиамин – 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-ол; МСТ – метиленовый синий трийодид; МФК – молибдофосфорная кислота; НК – неocupроин; ОСК – общее содержание производной кофейной кислоты; ОСП – общее содержание полифенолов; ОСТ – общее содержание таннинов; ОСФ – общее содержание фенолов; ПА – полианилиновая плёнка; ПАР – 4-(2-пиридилазо)резорцинолом; ПВС – поливинилспиртовая пленка; ПВХ – поливинилхлорид; ПМА – полиметилакрилат; ПС – полистерен; ПУ – проточные условия; ПЭ – полиэстер; РВ – реагент Вэйвил (серия 12, 18 фосфорномолибденовые кислоты); ТБТАЦ Cu(II) – тетрабензо-[b,f,j,n][1,5,9,13]-тетраазациклогексадецин меди (II); ТФСФ – твердофазная спектрофотометрия; Ф – ферроцин; ФТ – 1,10-фенантролин; ФЧ – реактив Фолина-Чокальтеу (PMoW₁₁O₄₀⁴⁻).

Существует ряд окрашенных малорастворимых гексацианоферратов (III) переходных металлов, реакция образования которых может быть использована в качестве индикаторной на АО. Например, в системе $\text{FeCl}_3 + \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ионы Fe^{3+} ($E_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}^0 = 0.77 \text{ В}$) способны окислять физиологически важные антиоксиданты, имеющие стандартный окислительно-восстановительный потенциал в диапазоне 0.2–0.6 В. В результате ОВР образуются ионы Fe^{2+} , они связываются феррицианид-ионами $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ в комплекс берлинской лазури (гексацианоферрат (III) железа (II)) синего цвета. Для предотвращения гидролиза ионов железа (III) необходимо использовать сильноокислую среду.

Подобная система впервые предложена около полувека назад для спектрофотометрического и визуального определения танина и полифенолов в зёрнах сорго [96]. Метод достаточно экспрессный (время инкубации 20-30 мин), экономичный, не требует дорогостоящего оборудования и высокой квалификации персонала. К достоинствам метода относится возможность определения, в том числе, и биотиолов, которые не обнаруживаются другими методами на основе $\text{Fe}(\text{III})$ [101], более высокая чувствительность по сравнению с методами, использующими ванилин и соединения титана [97].

Тем не менее, используемые в анализе растворы солей при смешивании стабильны всего несколько часов при хранении в тёмном месте. Дневной свет вызывает изменение цвета раствора в течение нескольких минут после смешения реагентов. Это происходит в результате образования берлинской лазури в этой системе даже в отсутствии АО. В темноте этот процесс протекает медленнее, через образование промежуточного соединения – берлинской зелени $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6$ тёмно-зеленого цвета [102,103]. Для стабилизации этой системы предложено использовать гуммиарабик и H_3PO_4 [98], додецилсульфат натрия [104].

Интересным является способ оценки АОА пищевых продуктов с помощью ПВХ/ПВС мембраны с иммобилизованным 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил радикалом [62,63]. Хромогенный радикал реагирует с антиоксидантами в водном растворе, при этом происходит изменение его окраски с фиолетовой на жёлтую.

Недостатком этой системы является сложность её изготовления, а также невозможность количественной оценки АОА, только качественный анализ.

Значительная часть исследований посвящена разработке тест-систем для определения АОА, в качестве реагента которых используется комплекс переходного металла (Cu^{2+} , Fe^{3+}) с органическим лигандом (тетрабензо-[b,f,j,n][1,5,9,13]-тетраазациклогексадецин, неокупроин, 2,2'-дипиридил, 1,10-фенантролин, 4-(2-пиридилазо)резорцинол) [64–78].

Например, в работах [74,75] водный раствор индикатора тетрабензо-[b,f,j,n][1,5,9,13]-тетраазациклогексадецин меди (II) нитрат иммобилизовали на силикагеле. Полученной тест-системой определяли содержание аскорбиновой кислоты ($\text{ПО}=0.06 \text{ мг/дм}^3$) и анальгина ($\text{ПО}=0.91 \text{ мг/дм}^3$) в лекарственных препаратах [74], общую антиоксидантную активность, общее содержание таннинов, производных кофейной кислоты в черном и зеленом чае, экстракте эхинацеи сорбционно-спектрофотометрически (712 нм, 879 нм) и визуально (по шкале, 0.025 мг/образец). Переход окраски: желтый – синий. Время измерения при анализе лекарственных препаратов составило 5 мин, чая – 10 мин. Процедура измерения достаточно проста: аналит добавляли к индикаторной системе с буфером, выдерживали 2-10 мин, фотометрировали. Относительное стандартное отклонение для визуального определения составило не более 0.30. Недостаток данного метода заключается в сложности процедуры фотометрирования индикаторного порошка.

Комплексы железа (III) с гетероциклическими аминами 2,2'-дипиридилом и 1,10-фенантролином, иммобилизованные в желатиновый слой фотоплёнки Микра т-300, предложены для определения концентрации аскорбиновой кислоты и анальгина в фармацевтических препаратах [64]. Иммобилизацию индикаторов проводили погружением плёнок в растворы комплексов железа на 20 мин, периодически перемешивая. Затем плёнки высушивали на воздухе. Для анализа готовые пластины погружали в раствор аналита на 10-30 с и подсушивали на воздухе 15–20 мин, затем оценивали интенсивность красной окраски пластин визуально или спектрофотометрически (525 нм). В работе показано, что

наилучшими химико-аналитическими характеристиками обладает плёнка с иммобилизованным комплексом Fe(III)–2,2'-дипиридил.

Индикаторная система железо (III)-о-фенантролин, иммобилизованная в полиметакрилат, предложена в работе [66] для определения интегральной антиоксидантной активности растительного сырья и продуктов питания на его основе. Аналитическим сигналом служила величина светопоглощения при (510 ± 20) нм, координаты цвета или интенсивность окраски оптической мембраны (визуальная оценка). Количественную и/или качественную оценку интегральной антиоксидантной активности проводили по градуировочному графику и/или цветовой шкале, построенных для аскорбиновой кислоты, используемой в качестве вещества-стандарта. Время измерения составило 45 мин. Определение проводили при pH=3. Относительная систематическая погрешность определения составила не более 10%, $Sr \leq 0.06$. Недостатком предложенной системы железо (III)–фенантролин является неселективное окисление восстановителей вследствие высокого окислительно-восстановительного потенциала системы ($E^0_{\text{Fe(III)phen/Fe(II)phen}} = 1.06 \text{ В}$).

Гораздо реже упоминаются в литературе подходы, основанные на использовании комплекса переходного металла с неорганическим лигандом. Например, спиртовой раствор тиоцианата железа (III) предложен для определения АОА корня имбиря [15]. Исходный раствор комплекса железа имеет насыщенный красный цвет, а в результате взаимодействия с АО раствор обесцвечивается. Основным недостатком метода связан с тем, что система железо (III) – тиоцианат не подчиняется закону Бера. Отклонения от закона Бера составляют 3–6 %, что связано, прежде всего, с двумя причинами. Во-первых, роданид реагирует с Fe^{3+} с образованием нескольких, а не одного комплексного соединения, при этом все они имеют одинаковую окраску растворов (красную). Во-вторых, водный раствор комплекса быстро обесцвечивается на свету из-за восстановления Fe^{3+} тиоцианатом или продуктом его разложения [104]. Добиться относительной устойчивости окраски в растворе и соблюдения закона Бера возможно при использовании органической среды (например, трибутиламмоний и

амилацетат, ацетон, этанол), обладающей сравнительно невысокой токсичностью. Однако на подложке подобная система быстро и необратимо обесцвечивается.

Хинониминные соединения (индофенолы и индамины) часто используются в титриметрическом определении восстановителей в качестве окислительно-восстановительных индикаторов [105]. Эти соединения широко доступны, обладают контрастным цветовым переходом от окисленной формы к восстановленной. Однако исследований, посвященных иммобилизованным на твёрдых матрицах окислительно-восстановительным индикаторам и определению АОА различных объектов с их помощью, сравнительно немного. В работах [79,80] показано, что в результате иммобилизации происходит изменение окислительно-восстановительных свойств индикаторов: как правило, снижение окислительной способности. Полиметакрилатную матрицу с иммобилизованным 2,6-дихлорфенолиндофенолом предложено использовать для определения содержания аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах – соках, пюре, сиропе шиповника [79]. Время измерения составило 15 мин. Относительная погрешность не превышала 14 %, $Sr \leq 0.04$.

Ещё одна группа работ, посвящённых развитию простого, дешёвого, чувствительного спектрофотометрического метода определения АОА биологических объектов связана с использованием сульфата церия (IV) в качестве реагента-окислителя [82–85]. Несмотря на высокий окислительно-восстановительный потенциал сульфата церия (IV) ($E_{Ce^{4+}/Ce^{3+}}^0 = 1.77$ В), авторы утверждают [84], что при комнатной температуре, подобранной концентрации окислителя, сульфат-ионов и рН окислению подвергаются исключительно антиоксиданты пробы, а не другие органические соединения. Полученные результаты – величина АОА и содержание восстановленных фенолов в экстрактах растений – согласуются с результатами методов ABTS и CUPRAC [82–84].

Итак, рассмотренные подходы не обладают узкой специфичностью на АО, а, в ряде случаев, позволяют определять содержание АО лишь полуколичественно. Мешающее действие оказывают многие органические

восстановители, содержащиеся в анализируемых объектах: ароматические амины, моно-, ди-сахариды, сульфиды и SO_2 , индолы и др.

Упомянутые выше реагенты вступают, как правило, в окислительно-восстановительную реакцию с АО анализируемого объекта. Подходы, основанные на реакции комплексообразования, встречаются в литературе гораздо реже. Например, способность ионов титана Ti^{4+} образовывать окрашенные комплексы с кверцетином, полифенолами использована в работах [92,93] для их определения.

Следует упомянуть также серию работ, посвященную созданию портативного сенсора на АО [106–108]. В его основу положена реакция между антиоксидантами аналита и наночастицами (НЧ) CeO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , $\text{Ti}(\text{C}_2\text{O}_4)_2$, в результате которой образуется комплекс с переносом заряда. Наночастицы иммобилизованы на фильтровальной бумаге. Происходящее в результате комплексообразования изменение цвета фиксируется портативным устройством – колорридером.

1.5.3. Использование наночастиц для определения антиоксидантов

В последнее десятилетие возрос интерес к использованию различных НЧ (объектов, хотя бы один из размеров которых составляет менее 100 нм) в создании высокочувствительных, экономичных, миниатюрных химических и биосенсорах [например, работы 106–114 в Таблице 1.3]. Это связано с уникальными оптическими и электронными свойствами НЧ, зависящими от их формы и размеров [109–111].

Итак, предложены различные подходы к определению АО широкого круга объектов, но лишь немногие из них реализованы в виде сенсоров или тест-систем, позволяющих проводить анализ вне лаборатории. Огромный интерес также представляет информация о содержании тиолов и их окисленных форм в биологических объектах.

Таблица 1.3 – Определение антиоксидантов с использованием наночастиц

Реагент, форма его использования	Механизм сигналообразующей реакции/метод детекции	Объект анализа	Аналит	ПрО, ДОВ	Лит-ра
1	2	3	4	5	6
ZnO, Fe ₂ O ₃ , CeO ₂ , TiOC ₂ O ₄ , целлюлозные волокна	Образование комплекса с переносом заряда/колориметрический (портативное устройство)	Вино, соки	АОА	0.05 экв. GA	[106–108]
SG-TiO ₂	Фото-электрохимический	Чай	АОА	24.9-867.6; 12.2 мкмоль/дм ³ (GA)	[112]
Ag, родамин В/бумажный фильтр	Агрегация НЧ/колориметрический (по интенсивности окраски бумаги, по длине окрашенной зоны)	Аэрозоль (сжигание биомассы), городской воздух, вторичный дым сигарет	уровень окисления по кол-ву потребл. GSH	0.5 нмоль GSH–3.7 нг НХ, 0-25 нг НХ	[113]
AgNO ₃ + Na ₃ Cit+Ag (зёрна-зародыши), раствор	ОВР (восстановление ионов Ag ⁺ , образование Ag НЧ)/СФ	Сок, чай	АОА	1-10 мкмоль/дм ³	[114]

НХ – 1,4 – нафтохинон; SG – сульфонируемый графен; GA – галловая кислота; GSH – восстановленная форма глутатиона

1.5.4. Определение биотиолов с использованием наночастиц

Благодаря недавним достижениям в области нанотехнологии появилась возможность создавать новые подходы и устройства для определения содержания тиолов и их окисленных форм (дисульфидов) в различных биологических объектах (Таблица 1.4).

Данные, представленные в Таблице 1.4, демонстрируют преобладание оптических методов детекции биотиолов. Одно из направлений применения

нанообъектов в определении биотиолов основано на способности НЧ имитировать активность ферментов – пероксидазы, оксидазы, СОД-каталазы [115,144,145]. Другое направление связано с высоким сродством серы ($-SH$) группы к благородным металлам (золото, серебро). При флуоресцентном методе детекции тиолов используют свойство люминесцентных НЧ выступать донорами энергии. В результате взаимодействия реагента с тиолами происходит изменение флуоресценции реагента [119,120,122–127,135,137,138]. Достигнута чувствительность определения биотиолов на уровне нмоль/дм^3 , разработаны методики определения тиолов в среде живых клеток [137,139]. Тем не менее, остается нерешенной проблема деградации флуоресцентных реагентов в процессе анализа биологических объектов.

Значительный интерес к использованию НЧ благородных металлов в колориметрических сенсорах на биотиолы обусловлен их уникальными оптическими и электронными свойствами [110], зависящими от формы и размера НЧ и основанными на явлении поверхностного плазмонного резонанса. Это явление проявляется во взаимодействии делокализованных электронов проводимости на поверхности НЧ с внешним электромагнитным полем. В случае совпадения частоты электромагнитного излучения с частотой колебаний поверхностных плазмонов возникает резонанс, что приводит к появлению максимума в спектре поглощения НЧ. Положение и форма полосы поверхностного плазмонного резонанса зависят от формы и размера НЧ, модификации поверхности частицы [110].

Таблица 1.4 – Определение тиолов с использованием наночастиц

Реагент	Сигналообразующий процесс/метод детекции	Аналит	Объект анализа	ПрО, ДОВ	Ссылка
1	2	3	4	5	6
Au НЧ (16 нм), ДТНБ	оболочка НЧ: $RS^- + Ell-S-S-Ell = R-S-S-Ell + TNB^-$ /колориметрический	Cys, GSH, Hcy, ЦА, ДЛК, ДТЭ, АЦис	Биообъекты, фармпрепараты	0.57/0.4-29 (Cys); 0.68/0.55-29.4 (GSH); 0.87/0.61-20.96 (Hcy); 0.36/0.58-52.69 (ЦА); 0.33/0.24-21.06 (ДЛК); 0.02/0.02-14.6 (ДТЭ); 0.26/0.82-30.9 (АЦис) [мкмоль/дм ³]	[116]
Ni(OH) ₂ , (20 нм), пленка на СУЭ	Электрокаталитическое окисление/ ЦВА	Cys	Моча человека	1.2 мкмоль/дм ³ , 10-1000 мкмоль/дм ³	[117]
C наноточки	Наноточки катализируют образование радикалов из тетраметил бензидина, ОВР (передача водорода)/ колориметрический	GSH	Венозная кровь человека	0-7 мкмоль/дм ³ , 0.3 мкмоль/дм ³	[118]
Au ₈ кластеры, ССПДТГ и немодифицированные	Фотоиндуцированный электронный перенос от НЧ к 2-пиридилтиолу (образуется из модификатора, лиганд-обмен)/флуоресцентный (ON-OFF)	Низко- и высокомолекулярные биотиолы	Живые клетки	16.2 мкмоль/дм ³ (вода), 15.4 мкмоль/дм ³ (среда клеток)	[119]
CdTe-Hg ²⁺ КТ	$CdTe-Hg^{2+}(OFF) + R-SH \rightarrow Hg-S + CdTe(ON)$ /флуоресцентный (OFF-ON)	GSH, Cys, Hcy	Клетки HeLa	0.1/0.6-20 мкмоль/дм ³ (GSH), 0.6/2-20 мкмоль/дм ³ (Cys)	[120]

Продолжение Таблицы 1.4

1	2	3	4	5	6
Au наностержни	Одноосная димеризация наностержней /спектроскопия плазмонного поглощения	Cys, GSH	Модельные растворы	-	[121]
Au НЧ (32 нм), НК	Флуоресцентный резонансный переход энергии между НК и НЧ, агрегация НЧ, появление флуоресценции модификатора/флуоресцентный, колориметрический	ЦА, Hcy, GSH; тип тиола (заряд)	Модельные растворы	10.2 нмоль/дм ³ (ЦА); 10.9 нмоль/дм ³ (Hcy)	[122]
Au НЧ, PFS	Флуоресцентный резонансный переход энергии между PFS и НЧ, агрегация НЧ, появление флуоресценции модификатора/флуоресцентный	Cys	Модельные растворы	0.025 мкмоль/дм ³ ; 0.05-4 мкмоль/дм ³	[123]
Au НЧ, FSN	Агрегация НЧ/флуоресцентный	Hcy Thio	Моча	100 нмоль/дм ³	[124]
	Агрегация НЧ/флуоресцентный	Cys, разделение Cys и Hcy	Моча	1 мкмоль/дм ³ , 25–200 мкмоль/дм ³	[125]

Продолжение Таблицы 1.4

1	2	3	4	5	6
Ag-ПМА кислота, кластеры	Cys подвliegt флуоресценцию кластеров/флуоресцентный	Cys	Модельные растворы	20 нмоль/дм ³ , 25–6000 нмоль/дм ³	[126]
Нафтален- тиомочевина- тиадиазол, НЧ (100 нм),	Взаимодействие с Cys приводит к смещению полосы флуоресцентного испускания/флуоресцентный	Cys	Модельные растворы	1.5 нмоль/дм ³ , 0-100 мкмоль/дм ³	[127]
Au, НЧ, КМЦ	Агрегация НЧ в присутствии NaCl/СФ	Cys	Моча	10.0-100.0 мкмоль/дм ³	[128]
Cu-Au НЧ	Адсорбция тиола на НЧ/ СФ, визуальный	S ²⁻ , Cys	Модельные растворы	3 мкмоль/дм ³ (S ²⁻), 0.4 мкмоль/дм ³ (Cys)-визуально, 0.3 мкмоль/дм ³ (S ²⁻), 50 нмоль/дм ³ (Cys) – СФ	[129]
Ag-Pd НЧ	Агрегация НЧ в присутствии NaCl/СФ, визуальный	Cys	Фарм. препараты	3.3 нмоль/дм ³	[130]
Ag НЧ	Агрегация НЧ/СФ, визуальный	Hcy	Плазма крови человека	2–12 мкмоль/дм ³ , 0.5 мкмоль/дм ³	[131]
Ag НЧ	Агрегация НЧ/ аналитическое устройство на основе бумаги	GSH	Сыворотка крови человека	6-25 мкмоль/дм ³	[132]
V ₂ O ₅ НЧ	ОВР/ СФ	Cys	Биологические макромолекулы	-	[133]
Au наностержни	Сборка наностержней/ СФ	Cys	Модельные растворы	10 пмоль/дм ³	[134]

Продолжение Таблицы 1.4

1	2	3	4	5	6
Fe ₃ O ₄ (ядро)/Ag(оболочка) НЧ, ФИ	Замещение –SCN на –S, флуоресценция Off-On/флуоресцентный, Fe ₃ O ₄ – для магнитной сепарации перед определением флуоресценции	GSH, Cys	Живые клетки	10 нмоль/дм ³ (GSH), 20 нмоль/дм ³ (Cys)	[135]
Au НЧ, МЭНИ	Антиагрегация НЧ под действием тиола+ионов Hg ²⁺ / СФ, визуальный	GSH, Cys, Hcy	Моча человека	17 нмоль/дм ³ /0.025-2.28 мкмоль/дм ³ ; 9 нмоль/дм ³ /0.035-1.53 мкмоль/дм ³ ; 18 нмоль/дм ³ /0.04-2.2 мкмоль/дм ³	[136]
Fe ₃ O ₄ (ядро)/PFR, Au НЧ	Вз-ие Au НЧ с тиолами/ флуоресцентный	Hcy, ТГК, GSH, ДТиол, ЦА, Cys, АЦис	Природные воды	0.14-0.49 мкмоль/дм ³	[137]
Au НЧ, С КТ	Вз-ие Au НЧ и GSH/ Флуоресцентный	GSH	Плазма крови человека	50 пмоль/дм ³	[138]
PuSSCou-ZG-20 NPs.	Флуоресцентный	Cys	Живые клетки	5.75 мкмоль/дм ³	[139]
Au НЧ, АК	Агрегация НЧ под действием тиолов/ СФ	Cys, GSH	Моча, плазма крови человека	5.3 нмоль/дм ³ , 0.01-5.0 мкмоль/дм ³ (Cys), 0.1 мкмоль/дм ³ , 0.25-2.5 мкмоль/дм ³ (GSH)	[140]
Au НЧ	Квази-стабильное состояние Au НЧ в присутствии GSH и NaNO ₃ / СФ, визуальный	GSH	Модельные растворы	0.5 мкмоль/дм ³ , 0.5-1.25 мкмоль/дм ³	[141]

Продолжение Таблицы 1.4

1	2	3	4	5	6
Au НЧ	Дезагрегация НЧ в присутствии S-аденозила-L-метионина/ СФ	Cys, GSH, Hcy	Сыворотка крови человека	21.7 нмоль/дм ³ , 0.4-1.2 мкмоль/дм ³ (Cys), 35.8 нмоль/дм ³ , 0.2-0.9 мкмоль/дм ³ (GSH), 62.4 нмоль/дм ³ , 0.6-3.0 мкмоль/дм ³ (Hcy)	[142]
Au НЧ, покрытых цитрат-ионами, цетилтриметиламмония бромидом, боргидридом натрия	Агрегация НЧ и изменения в УФ-спектре/ СФ	Cys, GSH, GSSG	Плазма крови человека	0.5 мкмоль/дм ³ (Cys), 10 мкмоль/дм ³ , 10-100 и 200-800 мкмоль/дм ³ (GSH), 10 мкмоль/дм ³ , 10-300 и 400-800 мкмоль/дм ³ (GSSG)	[143]
Ce-MOF	Ce-MOF окисляет TMB; взаимодействие тиола с охTMB/ СФ	Cys, GSH, Hcy	Модельные растворы	0.14 мкмоль/дм ³ (Cys), 0.13 мкмоль/дм ³ (GSH), 0.14 мкмоль/дм ³ (Hcy), 0-40 мкмоль/дм ³	[144]
Ag НЧ, допированные азотом графеновые КТ	Окисление TMB; взаимодействие тиола с охTMB/ СФ	GSH	Сыворотка крови человека	31 нмоль/дм ³ , 0.1-157.6 мкмоль/дм ³	[145]
HAuCl ₄ , треонин	Ингибирование тиолами фотоиндуцированного образования Au НЧ/ СФ, визуальный	Cys, GSH, Hcy	Плазма крови человека	76 мкмоль/дм ³ (Cys), 44 мкмоль/дм ³ (Hcy), 65 мкмоль/дм ³ (GSH), 0-300 мкмоль/дм ³	[146]
Ag НЧ, С КТ	Образование Ag НЧ в присутствии тиолов/ СФ	Cys, GSH, Hcy	Плазма крови человека	1.2 нмоль/дм ³ (Cys), 2.6 нмоль/дм ³ (Hcy), 1.2 нмоль/дм ³ (GSH)	[147]

Cys – цистеин; FSN – флуоросурфактант (поверхностно-активное вещество); GA – галловая кислота; GSH – глутатион; Hcy – гомоцистеин; Hcy Thio – гомоцистеина тиолактон; MOF – metal-organic framework (металлоорганическая структура); oxTMB – окисленная форма 3,3',5,5'-тетраметилбензидина; PFR – фенол-формальдегидная резина; PFS – полифлуорен; PySSCou – флуоресцентная проба, реагирующая на тиол (thiol-responsive fluorescence probe); SG – сульфонируемый графен; ZG-20 NPs – наночастицы на основе полиакрилата; АЦис – N – ацетилцистеин; ДЛК – дигидролипоевая кислота; ДОВ – диапазон определяемых величин; ДТиол – додекантиол; ДТНБ – 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислотой) (реактив Элмана); ДТЭ – 1,4-дитиоэритритол; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; КТ – квантовые точки; МЭНИ – 4-(2-меркаптоэтиламино)-1,8-нафталимидом; НК – Нильский красный; НХ – 1,4 нафтохинон; ССПДТГ – сульфосукцинимидил-6-[α -(2-пиридилдитио)толуамидо]гексаноат; СУЭ – стеклоуглеродный электрод; ТГК – тиогликолевая кислота; ТДС – тиол-дисульфидное соотношение; ФИ – флуоресцеина изотиоцианатом; ЦА – цистиамин; ЦВА – циклическая вольтамперометрия.

Благодаря явлению поверхностного плазмонного резонанса НЧ золота и серебра обладают интенсивной окраской, хорошо различимой человеческим глазом. Например, НЧ золота диаметром 10 нм сферической формы в водной среде имеют максимум поглощения вблизи 520 нм, золь обладает насыщенной красной окраской. При увеличении диаметра наночастиц золота максимум поглощения смещается в длинноволновую область, и золь приобретает синюю окраску. Это явление объясняет контрастное изменение окраски золя, например, золота, с красного на синий, которое наблюдается при агрегации сферических НЧ золота диаметром 3.5 – 50 нм [148]. Контрастное изменение цвета в процессе агрегации НЧ создает практическую основу для создания колориметрических сенсоров на любые аналиты, которые способны напрямую или косвенно вызывать агрегацию НЧ [110]. Например, в работе Bhamore и соавт. [140] агрегация НЧ золота, покрытых аскорбиновой кислотой, использована для спектрофотометрического определения цистеина и глутатиона в моче, плазме крови человека. Метод, основанный на дезагрегации цитратных НЧ золота под действием биотиолов в присутствии S-аденозила-L-метионина, разработан Li и соавт. [142] для определения тиолов в сыворотке крови человека.

Возникновение квази-стабильного состояния системы Au НЧ – NaNO_3 в присутствии глутатиона используется для его определения в растворах [141]. В работе Ghasemi и соавт. [143] в качестве реагентов для селективного определения цистеина, глутатиона и глутатиона дисульфида при совместном присутствии предложены наночастицы золота трех типов (покрытых цитрат-ионами, цетилтриметиламмония бромидом, боргидридом натрия). Авторы в присутствии каждого из упомянутых веществ получили свой уникальный набор спектров поглощения для трех типов золь золота. Оценку спектральных изменений предложено выполнять с применением подхода цифрового картографирования (иерархический кластерный анализ, анализ главных компонент). В ряде работ описано использование биметаллических НЧ для спектрофотометрического определения тиолов – Ag НЧ/Pd НЧ [130], Cu/Au НЧ [129].

Анализ литературных данных показывает, что существенная доля работ посвящена колориметрическим сенсорам на биотиолы, основанным на агрегации/деагрегации наночастиц или отсутствии/протекании процесса образования наночастиц [Таблица 1.4]. Несмотря на высокую селективность и чувствительность, разработанные подходы сложны для применения в полевых условиях, требуют квалифицированного персонала для проведения анализа, и, зачастую, пробоподготовки.

Крайне актуальной остается проблема создания методов для определения тиолов в биологических объектах. Опубликованные данные по этому направлению включают метод и устройство на основе бумаги для определения глутатиона в сыворотке крови [132] и уровня окислительной активности аэрозоля по количеству потреблённого глутатиона [113]. В качестве реагента предложено использовать покрытые метилцеллюлозой НЧ серебра, сорбированные на бумажном носителе. Аналитическим сигналом служит длина окрашенной зоны или интенсивность окраски индикаторной бумаги. Однако для анализа глутатиона с помощью предложенной системы [132] необходим инвазивный отбор пробы.

Таким образом, наиболее простой в аппаратурном оформлении является подход, использующий колориметрический метод детектирования сигнала. При выборе реагента для колориметрического сенсора необходимо принять во внимание следующее:

- высокое сродство серы ($-SH$) группы;
- высокий коэффициент экстинкции;
- биосовместимость реагента.

Все перечисленные требования выполняются в случае, когда в качестве реагента выбран золь золота.

Для сферических НЧ золота коэффициент экстинкции при длине волны 520 нм составляет $10^8-10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, что более чем в 1000 раз превышает соответствующий показатель органических красителей [149].

Крайне важным при анализе биологических систем является вопрос о токсичности НЧ, предлагаемых в качестве реагентов. Основные факторы,

позволяющие оценить отклик биологической системы на введение НЧ – форма и размер НЧ и среда (растворитель) [150]. Сферические Au НЧ диаметром 10–20 нм не способны преодолевать кожный барьер [151,152] и вызывать токсические поражения клеток [150,153]. Au НЧ меньшего диаметра, напротив, более токсичны [154], они способны проникать в волосяные фолликулы, роговой слой кожи, преодолевать клеточные мембраны [151]. Более токсичны НЧ серебра, способные проникать через неповрежденную и поврежденную кожу, обнаруживая своё присутствие в самых дальних слоях эпидермиса [155]. Таким образом, использование в сенсорах реагентов на основе Au НЧ сферической формы диаметром 10–20 нм с точки зрения токсичности более предпочтительно. Кроме того, Au НЧ обладают широкими возможностями функционализации поверхности, что также делает предпочтительным их применение для клинических исследований [136]. В настоящее время наблюдается значительное увеличение числа работ, посвящённых развитию сенсорных устройств на основе Au НЧ для терапевтического и диагностического применения [156]. Приведенные данные подтверждают перспективность использования НЧ золота сферической формы диаметром 10–20 нм, покрытых цитратной оболочкой, в качестве реагента для колориметрического сенсора на биотиолы.

Колориметрические сенсоры и подходы, основанные на агрегации Au НЧ, достаточно изучены. Как правило, аналит может вызывать агрегацию НЧ благодаря специфическому взаимодействию с лигандами на поверхности НЧ и с самой НЧ. Так, биотиолы (глутатион, цистеин и др.) вследствие сильного сродства серы к золоту способны ковалентно связываться тиольной группой (-SH) с НЧ; при этом происходит перенос заряда с поверхностного тиола на ядро [157–159]. Механизм же агрегации НЧ в данном случае остаётся дискуссионным. Ряд исследователей полагают, что агрегация происходит в результате образования водородных связей между атомами кислорода и водорода концевых карбоксильных групп глутатиона, связанных с двумя разными НЧ [160,161] (Рисунок 1.2).

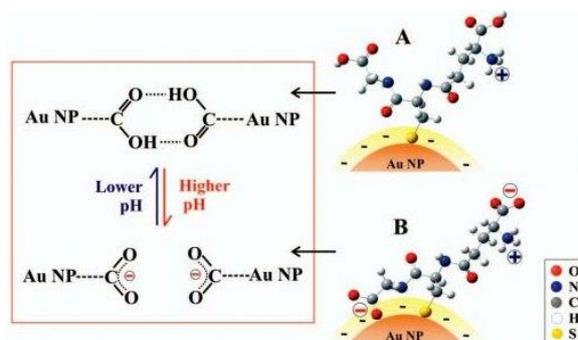


Рисунок 1.2 – Схема механизма агрегации (Au НЧ – глутатион) в кислой (**Lower pH**) и щелочной среде (**Higher pH**) [161]

Другие учёные полагают, что объединение Au НЧ (в частности, наностержней) под действием глутатиона, цистеина, гомоцистеина происходит благодаря электростатическому взаимодействию между цвиттер-ионными группами глутаматного фрагмента молекулы глутатиона [121] (Рисунок 1.3).

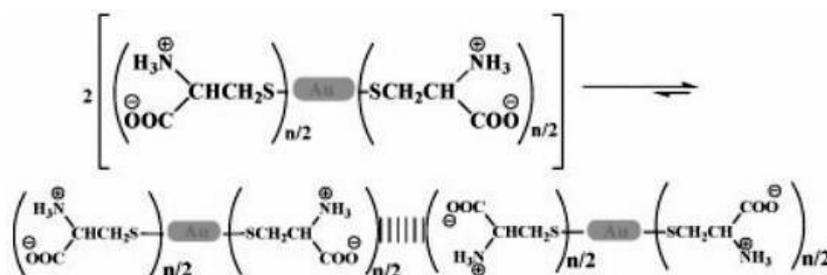


Рисунок 1.3 – Схема механизма самосборки золотых наностержней в присутствии цистеина [121]

В поддержку первого предположения говорят результаты экспериментов по влиянию pH среды на агрегацию Au НЧ в присутствии глутатиона [161]. Увеличение основности среды (например, при добавлении гидроксида или цитрата натрия) изменяет структуру поверхности НЧ, покрытых глутатионом, и приводит к их дезагрегации. Это связывают с ослаблением процесса образования водородных связей между наночастицами из-за электростатического отталкивания депротонированных карбоксильных групп глутатиона ($pK_{a1}(-COOH\text{-глутамат})=2.04$; $pK_{a2}(-COOH\text{-глицин})=3.4$). В присутствии золотых наночастиц pK_a могут принимать несколько большие значения, поэтому оптимальным pH считают область 4.0-4.5 [160,161].

1.6. Постановка задачи исследования

Приведенные в литературном обзоре данные говорят об актуальности исследований, связанных с разработкой простых, доступных методов неинвазивного определения АОА и тиолов кожи человека вне лаборатории.

Показано, что лишь немногие из опубликованных работ по исследованию кожи человека посвящены неинвазивным методам определения антиоксидантных свойств кожи. Наиболее часто в литературе упоминаются оптические и электрохимические методы, однако они не лишены недостатков. Например, метод резонансной спектроскопии комбинационного рассеяния света позволяет оценивать только содержание каротиноидов, к другим АО кожи метод не чувствителен. Метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса сложен в реализации, требует лабораторных условий. С его помощью косвенно оценивают антиоксидантную емкость кожи при воздействии на нее микроволнового излучения, магнитного поля и специального реагента радикальной природы. В случае вольтамперометрической оценки окислительно-восстановительного состояния кожи интерпретацию результатов затрудняют невоспроизводимость поверхности рабочего электрода и низкая электропроводность объекта анализа. Простота аппаратного оформления, возможность создания миниатюрных приборов для работы в “полевых” условиях позволяет рассматривать неинвазивный потенциометрический метод определения АОА кожи как перспективный. Недостатками существующего потенциометрического способа являются длительность процедуры анализа, неустойчивость используемой смеси медиаторной системы с гелем при хранении, недостаточная воспроизводимость результатов. Теоретические основы этого метода еще не разработаны. Отсутствуют опубликованные данные по неинвазивным методам определения тиолов в коже человека.

На основании вышеизложенного **цель работы** заключалась в разработке потенциометрического и колориметрического сенсоров для неинвазивного определения АОА и тиолов кожи человека.

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

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

Глава 2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Аппаратура

Определение размеров Au НЧ, ζ -потенциала методом динамического рассеяния света (ДРС) выполняли с помощью анализатора Brookhaven ZetaPlus (США) с длиной волны света 660 нм, углом рассеяния 90°.

Микроскопические исследования проводили с помощью электронного микроскопа JEM-2100 (Япония) с LaB₆ катодом и ускоряющим напряжением 200 кВ. Предварительную ультразвуковую обработку проводили с использованием ультразвукового процессора VCX 750 (США).

Спектры поглощения золя золота в ультрафиолетовой и видимой области спектра сняты на спектрофотометре Helios alpha (Thermo Electron Corporation, США).

Кислотность растворов измеряли рН-метром Та-ион (Томьаналит, Томск).

Регистрацию колориметрического сигнала выполняли с помощью цифрового фотоаппарата Olympus FE-340.

Для потенциометрических измерений использовали прибор ПА-S (УрГЭУ, Екатеринбург) с двухэлектродной системой, в которой рабочим электродом служил платиновый электрод (ООО НПВП «ИВА», Екатеринбург), изготовленный методом трафаретной печати, применявшийся ранее для потенциометрического измерения АОА/ОА различных объектов [162–165], электродом сравнения – ЭКГ электрод H92SG Ag|AgCl, KCl (Arbo, Kendal, США).

Запись спектров УФ–поглощения исследуемых соединений и электрофоретические исследования проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель 105М» (ООО «Люмэкс», Санкт-Петербург), снабжённой немодифицированным кварцевым капилляром общей длиной 60 см, эффективной длиной 50 см и внутренним диаметром 75 мкм.

2.2. Реактивы и материалы

В экспериментах были использованы следующие реактивы: L-аскорбиновая кислота, BioXtra, $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich, China); мочева кислота, BioXtra, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Germany); восстановленный глутатион, BioXtra, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Japan); соляная кислота, квалификации х.ч. (Экохим, Россия); тетрахлорауровая (III) кислота, квалификации х.ч. (Томск, Россия); цитрат натрия, квалификации х.ч. (Реахим, Россия), хлорид натрия, квалификации х.ч. (Малиновое озеро, Россия); глюкоза, квалификации х.ч. (Вектон, Россия), аммиак, квалификации х.ч. (Реахим, Россия), гидроксид натрия квалификации х.ч., L-пролин квалификации х.ч., $\geq 99.0\%$ (Panreac, Spain); L-триптофан (pharma grade), L-тирозин (квалификации х.ч.), L-аспарагина моногидрат (BioChemica grade), валин (pharma grade) (AppliChem, Germany); L-фенилаланин (квалификации х.ч.), L-серин (pharma grade), L-лейцин (квалификации х.ч.) (Ajinomoto, Japan); L-аланин (квалификации х.ч.), L-треонин (pharma grade), L-изолейцин (квалификации х.ч.) (Matrix, Switzerland); L-глицин (квалификации х.ч., $\geq 98.5\%$), гистидин (USA) (DiaM, Russia); креатинин biochemistry grade, $\geq 99\%$ (Merck, Germany); мочевины for molecular biology grade, $\geq 99.5\%$ (Fluka, Germany).

Все растворы готовили на ультрачистой дионизованной воде (Ω до 18 Мом*см), полученной с помощью системы очистки DVS-M/1NA (18)-N System (Медиана Фильтр, Россия).

Микропористый плёночный материал, изготовленный на основе смеси ацетатов целлюлозы общей пористостью 80-85% и размером пор от 0.45 до 1.2 мкм («Владипор», Россия).

Бумажный фильтр, изготовленный из целлюлозы сульфатной предгидролизной, обеззоленный (Мелиор XXI, «синяя лента», размер пор 3 – 5 мкм).

Гель электродный контактный высокопроводящий “Унимакс” (Гельтек-Медика, Россия).

2.3. Синтез и характеристика наночастиц золота

Для синтеза Au НЧ использовали цитратный модифицированный метод Туркевича [160,166]. Водный раствор 10^{-3} моль/дм³ HAuCl₄ (50 см³) нагревали в конической колбе с обратным холодильником до кипения (100°C) при перемешивании. В точке кипения к раствору быстро добавляли 5 см³ 38.8 ммоль/дм³ раствора цитрата натрия при интенсивном перемешивании (1200 об/мин) и нагревали раствор ещё 30 мин. Затем колбу снимали с плитки и охлаждали раствор до комнатной температуры при перемешивании. Золь хранили в тёмном месте при 4 °С. В результате синтеза золя золота по методике [160] концентрация наночастиц в золе составила $1.95 \cdot 10^{13}$ частиц в 1 см³. Число частиц в единице объема золя рассчитали как отношение объема золота, находящегося в золе, к объему наночастицы золота диаметром 10 нм.

На спектре поглощения полученных НЧ (Рисунок 2.1) наблюдалась типичная полоса плазмонного поглощения при 517 нм, характерная для сферических Au НЧ диаметром около 10 нм, покрытых цитратной оболочкой [167].

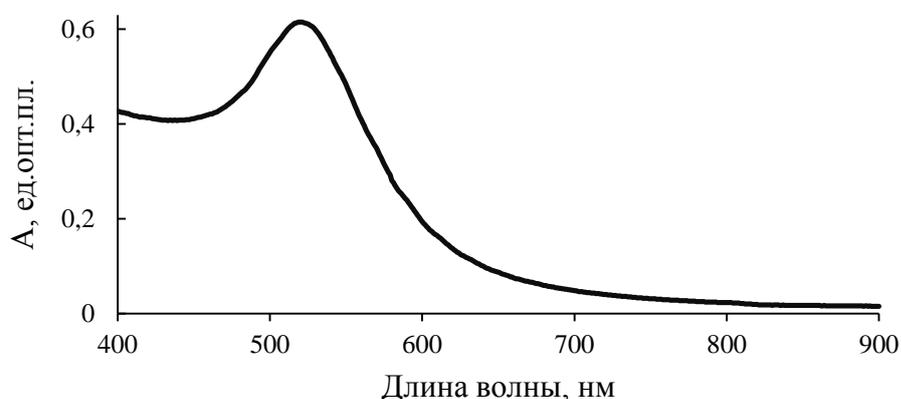


Рисунок 2.1 – Спектр поглощения золя золота ($1.95 \cdot 10^{12}$ НЧ/см³), синтезированного цитратным методом. Раствор сравнения – деионизованная вода

Анализ синтезированного золя золота методом ДРС¹ подтвердил, что НЧ имеют сферическую форму, величина среднего диаметра частиц (числовое распределение) составила 8.2 нм, что согласуется с результатами

¹ Автор выражает благодарность д.ф.-м.н., профессору УрФУ Сафронову А.П. за проведение ДРС исследования золя золота.

спектрофотометрии. Отрицательное значение ζ -потенциала полученных НЧ (-41.6 мВ) говорит о том, что их стабилизация, в основном, обусловлена электростатическими силами – отталкиванием отрицательно заряженных цитратных оболочек НЧ.

Синтезированные НЧ были также исследованы методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)². Перед микроскопическим исследованием золь золота помещали в ультразвуковое поле мощностью 300 Вт на 1-2 мин. Затем каплю диспергированного золя помещали на аморфную угольную плёнку толщиной 5–6 нм, расположенную на стандартной медной сетке для ПЭМ. Как видно из Рисунка 2.2, Au НЧ, синтезированные цитратным способом, имеют сферическую форму, диаметр частиц составляет 10–15 нм.

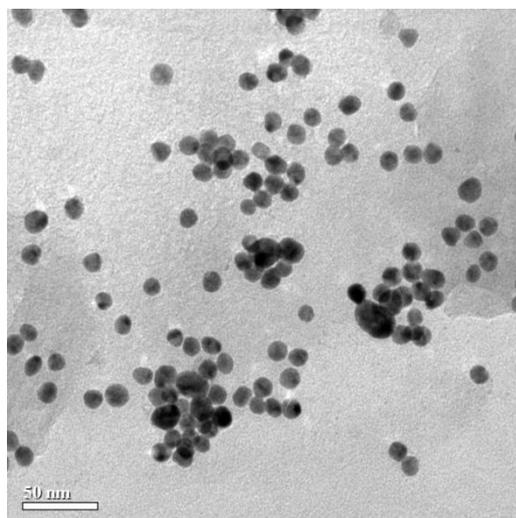


Рисунок 2.2 – ПЭМ-изображение золя золота, синтезированного цитратным способом

2.4. Расчет состава раствора, моделирующего кожу человека

Все эксперименты по выбору рабочих условий определения тиолов проводили на растворах, моделирующих состав водного экстракта из кожи человека. Состав экстракта, возникающего при контакте воды или водного раствора с кожей, использовали в качестве раствора, моделирующего кожу человека.

² Автор выражает благодарность к.ф.-м.н., старшему научному сотруднику Института электрофизики УрО РАН Мурзакаеву А.М. за проведение микроскопического исследования.

В качестве основы для расчета состава модельного раствора (экстракта) использовали величины средних концентраций водорастворимых АО эпидермиса кожи человека [36]. Предположили, что за время эксперимента определённое количество АО, содержащееся в анализируемом участке коже, экстрагируется в водный раствор известного объёма.

При этом полагали, что толщина эпидермиса кожи составляет $l = 0.1$ мм, плотность эпидермиса $\rho = 1.5 \cdot 10^{-3}$ г/мм³ [28]. В этом случае площадь 1 г сырого эпидермиса, рассчитанная по формуле $s = m/(\rho l)$, равна приблизительно 6667 мм². Масса сырого эпидермиса, соответствующая площади фильтра, использованного в колориметрическом сенсоре (около 28 мм²), приблизительно равна 4.2 мг.

Содержание аскорбиновой кислоты в роговом слое составляет 17% от её концентрации в коже [168]. Используя эту информацию и данные работы [36], рассчитали примерную молярную концентрацию водорастворимых АО в модельном растворе при разных степенях их извлечения из кожи.

Сопоставив результаты анализа водных экстрактов из кожи методом КЗЭ [169] и расчетные данные, предположили, что за время эксперимента в водный раствор экстрагируется около 20% компонентов рогового слоя эпидермиса.

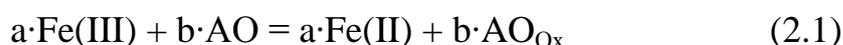
Основным компонентом ГЛМ кожи, влияющим на ионную силу экстракта из кожи, является хлорид натрия [170,171]. Проведенный нами эксперимент по оценке содержания хлорид-ионов в водном экстракте из кожи людей (18-40 лет, мужчины и женщины) методом КЗЭ [172] показал, что концентрация хлорид-ионов варьируется от 5 до 74 мг/дм³. В литературе описана возможность влияния на процесс агрегации Au НЧ хлорида натрия при содержании свыше 10^{-2} моль/дм³ [128]. Физиологический уровень концентрации хлорида натрия в экстрактах из кожи меньше 10^{-2} моль/дм³ и, следовательно, не может вызывать агрегацию Au НЧ. Таким образом, в состав модельного раствора хлорид натрия вводили в максимальной концентрации, выявленной в коже обследованных респондентов.

С учётом разброса величин кислотности здоровой кожи у разных людей [6,152] выбрано значение $pH=3.5-4$ модельного раствора.

На основании вышеизложенного, нами выбран следующий состав раствора, моделирующего экстракт из кожи: $C_{\text{NaCl}}=5$ ммоль/дм³, $C_{\text{AK}}=0.1$ ммоль/дм³, $C_{\text{МК}}=40$ мкмоль/дм³, рН=3.5–4. Исследованный диапазон концентраций глутатиона – 6.0–90.0 мкмоль/дм³.

2.5.Методика потенциометрического определения АОА кожи с использованием геля и медиаторной системы

Перед анализом исследуемый участок кожи промывали деионизованной водой и подсушивали бумажным фильтром. На кожу наносили электропроводящую среду – гель, содержащий медиаторную систему, на него помещали рабочий Pt электрод и электрод сравнения. Источником информации об АОА кожи служил сдвиг потенциала рабочего электрода от начального значения до величины, устанавливающейся через 10 мин. Этот сдвиг является следствием химического взаимодействия антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия, протекающего по уравнению (2.1):



где АО – антиоксидант; АО_{Ox} – продукт окисления антиоксиданта; a, b – стехиометрические коэффициенты реакции; Fe(III) – гексацианоферрат (III) калия; Fe(II) – гексацианоферрат (II) калия.

АОА рассчитывали по формуле (2.2) [164]

$$AOA = \frac{C_{Ox} - \alpha C_{Red}}{1 + \alpha} \quad (2.2)$$

где $\alpha = (C_{Ox} / C_{Red}) \cdot 10^{(E_1 - E)nF/2.3RT}$, $b = 2,3 \cdot RT/nF$; E – измеряемый потенциал в геле в начальный момент времени, В; E_1 – измеряемый потенциал в геле, помещённом на кожу, через 10 мин измерения, В; C_{Ox} – концентрация окисленной формы медиаторной системы в геле, моль/дм³; C_{Red} – концентрация восстановленной формы медиаторной системы в геле, моль/дм³; AOA – концентрация антиоксидантов, извлечённых из кожи в гель, моль-экв/дм³, $n=1$.

2.6. Методика анализа экстрактов из кожи методом КЗЭ³

Перед измерениями исследуемый участок кожи предварительно промывали деионизованной водой и подсушивали бумажным фильтром. Затем в пробирку Эппендорфа помещали 0.2 см³ деионизованной воды и, перевернув её, приводили воду в контакт с подготовленным участком кожи. Процедура экстракции длилась 10 мин. Полученный водный экстракт немедленно анализировали методом КЗЭ. Следует подчеркнуть, что одновременно с экстракцией на соседнем участке кожи определяли АОА потенциометрическим методом.

Кондиционирование капилляра перед работой осуществляли последовательной промывкой водой, 1 моль/дм³ раствором хлороводородной кислоты, водой, 0.5 моль/дм³ раствором гидроксида натрия, снова водой по 5 мин. и затем раствором фонового электролита в течение 15 мин. Между анализами капилляр промывали раствором фонового электролита в течение 5 мин.

Электрофоретическое разделение проводили в слабощелочной среде при рН = 7.50, чтобы обеспечить существование анионных форм определяемых соединений. В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор, приготовленный из растворов ортофосфорной кислоты и гидроксида натрия. Разделение анионов проводили при отрицательной полярности источника напряжения (анод располагался вблизи выходного конца капилляра). Чтобы обеспечить направление электроосмотического потока к аноду, в фоновый электролит добавляли катионное ПАВ – гидроксид цетилтриметиламмония (ЦТА-ОН). Общая концентрация фосфат-ионов в фоновом электролите составляла 0.025 моль/дм³, что обеспечило достаточную эффективность разделения ионов в сочетании с низкими значениями тока и приемлемым временем анализа.

Электрофореграммы (ЭФГ) записывали при следующих параметрах: напряжение -16 кВ, температура термостатирования капилляра 25°С, величину

³ Markina, M. Determination of antioxidants in human skin by capillary zone electrophoresis and potentiometry / M. Markina, E. Lebedeva, L. Neudachina, N. Stozhko, Kh. Brainina // Analytical Letters. – 2016. – V. 49. – №. 12 – P. 1804–1815.

вводимого объёма пробы и длину волны детектирования варьировали для достижения возможно большей чувствительности определения.

Для построения градуировочного графика готовили серию модельных растворов, растворяя точные навески аскорбиновой и мочевой кислот в воде в мерной колбе вместимостью 50.0 см³. Для растворения мочевой кислоты в колбу добавляли 0.5 см³ 0.5 моль/дм³ раствора гидроксида натрия. Растворы выдерживали в течение 10 мин и при необходимости разбавляли таким образом, чтобы концентрации аналитов составляли от 5·10⁻⁶ моль/дм³ до 1·10⁻³ моль/дм³. Диапазон концентраций выбран исходя из литературных данных о количестве водорастворимых АО в коже человека и величин АОА кожи, полученных потенциометрическим методом. Затем в тех же условиях регистрировали ЭФГ экстракта из кожи. При использовании метода стандартных добавок в анализируемую пробу объёмом 0.2 см³ после проведения экстракции добавляли 0.01 см³ раствора, содержащего известные количества мочевой и аскорбиновой кислот, перемешивали и подвергали электрофоретическому анализу. Концентрацию определяемого вещества C , моль/дм³, рассчитывали по формуле (2.3):

$$C = \frac{0.01 \cdot (S/t)_1 \cdot C_{доб}}{0.21 \cdot (S/t)_2 - 0.20 \cdot (S/t)_1} \quad (2.3),$$

где $(S/t)_1$ и $(S/t)_2$ – величины исправленных площадей пиков на ЭФГ исходной пробы и пробы с добавкой, соответственно, $C_{доб}$ – концентрация раствора добавки, моль/дм³.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КОЖИ

3.1. Математическая модель

Потенциометрический метод, предложенный в работе [45], основан на взаимодействии АО кожи с окисленной формой медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]$ в геле, наносимом на кожу. Источником информации об АОА кожи служит сдвиг потенциала платинового электрода (Pt SPE), наблюдающийся при контакте геля, содержащего медиаторную систему, с кожей. Этот сдвиг является результатом изменения соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм медиаторной системы. Эти изменения описываются уравнением реакции (3.1):



где АО – антиоксидант; AO_{Ox} – продукт окисления антиоксиданта.

Исходный потенциал системы определяется соотношением, описываемым уравнением (3.2)

$$E = E_0 + b \cdot \lg \frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \quad (3.2)$$

где $b=2.3 \cdot RT/nF$; F – постоянная Фарадея ($F = 96\,485.33 \text{ Кл} \cdot \text{моль}^{-1}$); R – универсальная газовая постоянная ($R=8.31446 \text{ Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})$); T – абсолютная температура, К.

Потенциометрический сигнал, измеряемый в данный момент времени, определяется соотношением концентраций $Fe(III)/Fe(II)$ – (C_{Ox}/C_{red}) – у рабочей поверхности электрода, причём изменение концентрации $Fe(II)$ равно концентрации АО ($C_{OA}=\Delta C_{Red}$) в геле.

После нанесения геля с медиаторной системой на участок кожи происходит экстракция АО из кожи в среду геля, при этом потенциал медиаторной системы описывается уравнением (3.3):

$$E_1 = E_0 + b \cdot \lg \frac{C_{Ox} - X}{C_{Red} + X} \quad (3.3)$$

где E_0 – стандартный потенциал, В; E_1 – конечный потенциал, В; C_{Ox} – концентрация окисленной формы медиаторной системы, моль/дм³; C_{Red} – концентрация восстановленной формы медиаторной системы, моль/дм³; $X = C_{АОА}$ – суммарная концентрация АО, моль-экв/дм³; $b = 2.3 \cdot RT/nF$.

Суммарная концентрация АО рассчитывается по уравнению (3.4):

$$C_{АО} = \frac{C_{Ox} - \alpha C_{Red}}{1 + \alpha}, \quad \alpha = (C_{Ox} / C_{Red}) \cdot 10^{(E_1 - E)nF/2.3RT} \quad (3.4)$$

Схема процессов, протекающих при потенциометрическом определении АОА кожи, представлена на Рисунке 3.1. Предполагается, что вещество А (АО кожи) диффундирует из кожи через границу контакта в слой экстрагента, где претерпевает химическое превращение с образованием вещества R (восстановленная форма медиаторной системы). Концентрация вещества R у рабочей поверхности электрода эквивалентна убыли вещества А (вследствие химического превращения) и напрямую определяет измеряемую величину потенциала. Система “кожа–экстрагент” аппроксимируется двумя контактирующими неограниченными плоскими пластинами, толщины которых δ_{skin} и δ – соизмеримые величины; ось x перпендикулярна граням пластин.

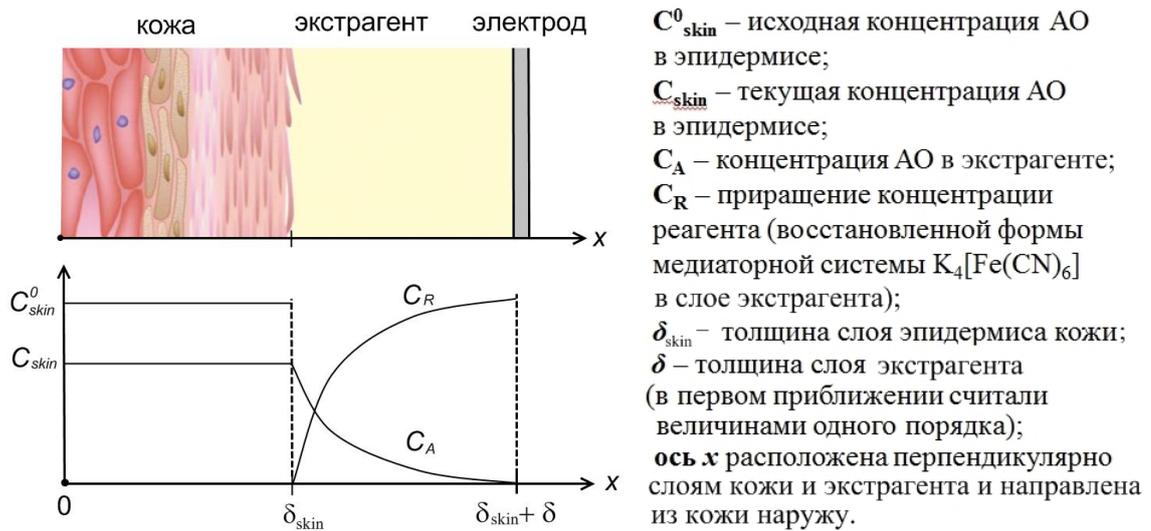


Рисунок 3.1 – Схема процессов, протекающих при потенциметрическом определении АОА кожи

Начальная концентрация АО в эпидермисе кожи постоянна и равна C_{skin}^0 . При потенциметрическом измерении концентрация АО в поверхностных слоях кожи изменяется за счет химического процесса, происходящего в слое экстрагента. Транспорт АО к границе контакта “кожа–экстрагент” осуществляется посредством диффузии в коже. В слое экстрагента происходит дальнейшая диффузия вещества А с одновременным участием в химической реакции, приводящей к образованию вещества R. Начальная концентрация АО в этой зоне равна нулю, а его концентрация в текущий момент времени – $C_A(x, t)$. Возникающее при этом в слое экстрагента вещество R диффундирует к рабочему электроду. Количество вещества R определяется скоростью реакции химического превращения вещества А (уравнение 3.1). Концентрация вещества R в слое экстрагента в текущий момент времени – $C_R(x, t)$. Стоит обратить внимание на весьма важный факт: C_R представляет собой приращение (а не абсолютную величину) концентрации восстановленной формы медиаторной системы. $C_{R(el)}$ – концентрация вблизи поверхности электрода, она определяет измеряемый сигнал, который фиксируется как сдвиг потенциала электрода в медиаторной системе, изначально введенной в среду экстрагента. В идеальном случае $\frac{C_{R(el)}}{C_{skin}^0}$ стремится к единице.

На границе контакта двух областей для вещества А реализуются граничные условия – непрерывность концентраций и величины диффузионных потоков. Внешние границы системы ($x=0$ и $x=\delta_{skin}+\delta$) непроницаемы для вещества А. Для вещества R, локализованного в области экстрагента, обе границы $x=\delta_{skin}$ и $x=(\delta_{skin}+\delta)$ непроницаемы.

Математическая модель процессов формулируется следующим образом. Концентрации АО в коже ($AOA=C_{skin}$) и восстановленной формы медиаторной системы, возникшей в результате реакции (3.1), в пространстве между поверхностью кожи и электродом определяются из решения соответствующих одномерных диффузионных задач.

Химическую реакцию (3.1) считали реакцией первого порядка, константа скорости которой k [c^{-1}]. АО поступают в гель из кожи через ее поверхность, где их концентрация является искомой функцией времени с начальным значением, равным C_{skin}^0 . Для простоты в задаче рассматривали изменение концентрации Fe(II) в результате реакции (3.1), т.е. полагали, что первоначально продукт этой реакции в слое экстрагента отсутствует.

Диффузионные задачи для расчета распределения концентраций веществ А и R в слое экстрагента имеют следующий вид

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C_A}{\partial x^2} - k \cdot C_A; C_A(x, 0) = 0; \frac{\partial C_A}{\partial x}(0, t) = 0; C_A(\delta, t) = C_{skin}(t); \quad (3.5)$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C_R}{\partial x^2} + k \cdot C_A; C_R(x, 0) = 0; \frac{\partial C_R}{\partial x}(0, t) = \frac{\partial C_R}{\partial x}(\delta, t) = 0, \quad (3.6)$$

Математическая модель в целом замыкается уравнением материального баланса для вещества А в коже, согласно уравнению (3.7):

$$\delta_{skin} \cdot \frac{dC_{skin}}{dt} = -D \cdot \frac{\partial C_A}{\partial x}(\delta, t), \quad (3.7)$$

Приведенная выше постановка задачи позволяет рассмотреть расчет динамики распределения вещества А в двузонной системе “кожа–экстрагент” независимо от распределения вещества R в слое экстрагента.

Решения, полученные точными классическими методами, не всегда оказываются удобными для практического использования, поскольку в задачах диффузии для ограниченных пространственных областей выражаются бесконечными рядами, сходимость которых в ряде случаев требует проведения отдельных исследований. Между тем, замена классического решения приближенным с двумя – тремя слагаемыми, описывающими процесс с достаточной степенью точности, имеет большое практическое значение. Метод, использованный в настоящей работе, основан на совместном применении двух современных аппаратов прикладной математики – интегрального преобразования Лапласа и вариационных методов, в частности, ортогонального метода Бубнова–Галеркина [173,174]. Решение найдено в виде функции относительных концентрации АО в коже (C_{skin}/C_{skin}^0) и у поверхности электрода ($C_{R(el)}/C_{skin}^0$) в виде функций от трех безразмерных величин B_i , F_0 , γ , представленных в формуле (3.8):

$$B_i = \frac{k \cdot \delta^2}{D}; F_0 = \frac{D \cdot t}{\delta^2}; \gamma = \frac{\delta}{\delta_{skin}}, \quad (3.8)$$

где B_i – модифицированное число Био – отношение диффузионного сопротивления ($R_D = \frac{\delta}{D}$) к сопротивлению химической реакции ($R_k = \frac{1}{k \cdot \delta}$); F_0 – число Фурье; k – константа скорости реакции взаимодействия АО с окисленной формой медиаторной системы, c^{-1} ; D – коэффициент диффузии веществ в коже (эпидермисе) и в геле, cm^2/c ; δ – толщина слоя экстрагента от электрода до поверхности эпидермиса кожи, мм; δ_{skin} – толщина эпидермиса кожи, мм; t – время, с.

Такое представление позволяет проанализировать влияние диффузии, скорости химической реакции и толщины слоя экстрагента на динамику процессов.

Общий вид зависимости $C_{R(el)}/C_{skin}^0$ от безразмерных параметров B_i и F_0 представлен на Рисунке 3.2. Зависимость C_{skin}/C_{skin}^0 от B_i и F_0 имеет аналогичный вид.

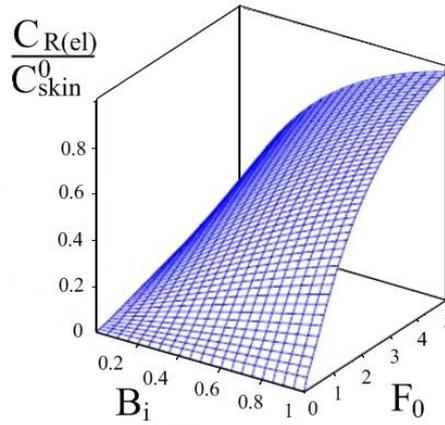


Рисунок 3.2 – Зависимость $C_{R(el)}/C_{skin}^0$ от безразмерных параметров B_i и F_0 .

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

Итак, должны проявляться следующие зависимости (уравнения (3.9, 3.10):

$$\frac{C_{skin}}{C_{skin}^0} = e^{-F_1} \cdot \{\cosh(F_2)\} + \sinh(F_2) \cdot \frac{B_i + 2.5 \cdot (1 - \gamma)}{f(B_i, \gamma)} \quad (3.9),$$

где

$$F_1 = 0.5 \cdot F_0 \cdot [B_i + (\gamma + 1) \cdot 2.5];$$

$$F_2 = 0.5 \cdot F_0 \cdot f(B_i, \gamma);$$

$$f(B_i, \gamma) = \sqrt{B_i^2 + 5 \cdot B_i \cdot (1 - \gamma) + 6.25 \cdot (1 + \gamma)^2};$$

$$\frac{C_{R(el)}}{C_{skin}^0} = \frac{d_1}{C_{skin}^0} + \frac{d_2}{C_{skin}^0} \quad (3.10),$$

где

$$\frac{d_1}{C_{skin}^0} = \frac{B_i + 15}{15 \cdot \gamma} - e^{-F_1} \left\{ \frac{B_i + 15}{15 \cdot \gamma} \cdot \cosh(F_2) + \frac{F_3 - F_4}{\gamma \cdot f(B_i, \gamma)} \cdot \sinh(F_2) \right\};$$

$$F_3 = 2.5 \cdot (\gamma + 1) + 2 \cdot B_i + 0.4 \cdot B_i^2;$$

$$F_4 = \frac{B_i \cdot (1 - \gamma) + B_i^2}{3};$$

$$\frac{d_2}{C_{skin}^0} = F_5 \cdot e^{-10 \cdot F_0} - e^{-F_1} \cdot \{F_5 \cdot \cosh(F_2) + F_6 \cdot \sinh(F_2)\};$$

$$F_5 = \frac{B_i \cdot (B_i - 10)}{5 \cdot [30 - 10 \cdot \gamma - B_i \cdot (4 - \gamma)]};$$

$$F_6 = \frac{B_i^3 - 2.5 \cdot (\gamma + 3) \cdot B_i^2 + 25 \cdot B_i \cdot (\gamma + 1)}{2.5 \cdot f(B_i, \gamma) \cdot (60 - 8 \cdot B_i - 20 \cdot \gamma + 2 \cdot \gamma \cdot B_i)}.$$

3.2. Сопоставление теоретических и экспериментальных результатов

Для доказательства адекватности теоретических представлений было выполнено их сравнение с экспериментальными результатами. На Рисунке 3.3 приведены экспериментальные кривые, наблюдающиеся в процессе измерения потенциала (1) и расчёта АОА (2) на коже человека. Эксперимент проводили, пользуясь алгоритмом, предложенным ранее. Полученные таким образом данные использованы далее как результат эксперимента.

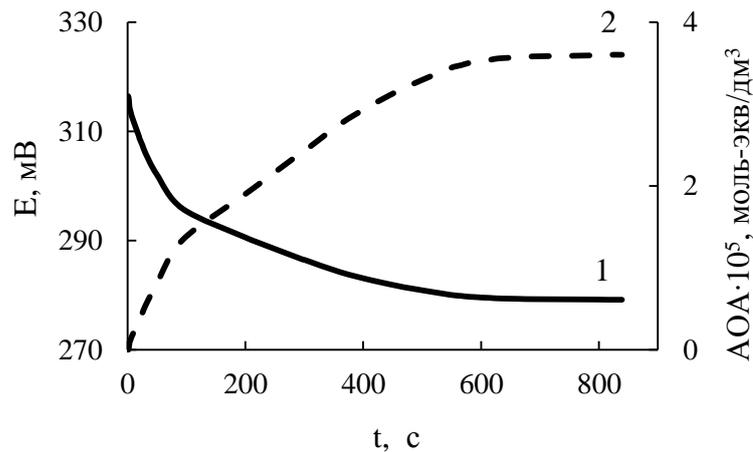


Рисунок 3.3 – Временная зависимость потенциала (1) и АОА (2), измеренная на коже человека

Для уточнения констант скоростей химической реакции взаимодействия АО кожи (аскорбиновой и мочевой кислот, глутатиона) с окисленной формой медиаторной системы в среде геля использовали экспериментальные данные. Эксперимент проводили следующим образом: 4 см³ геля и 0.2 см³ водного раствора медиаторной системы, содержащего 10⁻³ моль/дм³ K₃[Fe(CN)₆] и 10⁻⁵ моль/дм³ K₄[Fe(CN)₆], помещали в стеклянную ячейку. Погружали в ячейку электроды (рабочий платиновый и хлоридсеребряный – сравнения) и определяли

начальный потенциал системы. Затем электроды вынимали и добавляли в систему 0.2 см^3 водного раствора АО. Концентрации растворов в ячейке составили 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ аскорбиновой/мочевой кислот или глутатиона. Затем электроды снова погружали в ячейку и регистрировали изменение потенциала до момента его стабилизации. Концентрацию АО в геле рассчитывали по уравнению (3.4).

Величина найденной концентрации АО в конечный момент времени и в середине измерения были использованы для расчета константы скорости химической реакции (уравнение 3.1). Расчёт проводили по формуле (3.11), полагая, что порядок реакции равен 1, поскольку гексацианоферрат (III) калия в геле присутствовал в большом избытке, и его концентрация практически не изменялась в ходе реакции взаимодействия с АО. Это предположение подтвердилось результатами эксперимента, согласно которым на период полураспада исследованных АО их начальная концентрация не повлияла. Полученные результаты представлены в Таблице 3.1.

$$k = \ln 2 / \tau_{1/2} \quad (3.11)$$

где $\tau_{1/2}$ – период полураспада, т.е. промежуток времени, за который в химическую реакцию с $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ вступила половина от найденной АОА.

Таблица 3.1 – Константы скорости реакции взаимодействия АО с гексацианоферратом (III) калия, определенные потенциометрически ($n=3$, $P=0.95$)

Антиоксидант	k (в геле), с^{-1}	k (в водном растворе), с^{-1} [175]
Аскорбиновая кислота	0.014 ± 0.002	0.20 ± 0.02
Мочевая кислота	0.004 ± 0.001	0.06 ± 0.01
Глутатион	0.0005 ± 0.0002	0.0044 ± 0.0006

Следует отметить, что полученные величины констант (Таблица 3.1) на порядок меньше, чем константы скорости реакции вышеперечисленных АО с $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в водном растворе.

Коэффициенты диффузии веществ (АО и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) в коже и геле (D) в первом приближении принимали равными. Согласно литературным данным

величины D для водных растворов варьируются от $1.52 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ (в присутствии 0.1 ммоль/дм^3 гексацианоферрата (III) калия в $0.1 \text{ моль/дм}^3 \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ [176]) до $7 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ [177]. Расчет величины D в геле осуществлялся из литературных данных. Величина коэффициента диффузии гексацианоферрат (II), (III) ионов в геле рассчитывали, используя выражение $D_{\text{гель}} = D_{\text{вода}} \cdot \eta$. Вязкость геля (η) взята равной $8-9 \text{ Па} \cdot \text{с}$ [178], плотность равна $1.02-1.05 \text{ г/см}^3$. В дальнейшем $D_{\text{гель}}$ принят равным $2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$.

Рассчитанные величины констант скоростей взаимодействия АО кожи с $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в геле использовали при построении теоретических зависимостей $C_{\text{skin}}/C_{\text{skin}}^0$ и $C_{\text{R(ел)}}/C_{\text{skin}}^0$ от t , δ_{skin} , δ_{gel} при разных сочетаниях величин коэффициента диффузии (D) и k . На Рисунке 3.4 представлена теоретическая зависимость $C_{\text{R(ел)}}/C_{\text{skin}}^0$ от t . Различные значения k соответствуют разным АО: аскорбиновой кислоте, мочевой кислоте и глутатиону (Рисунок 3.4, кривые 1, 2 и 3, соответственно).

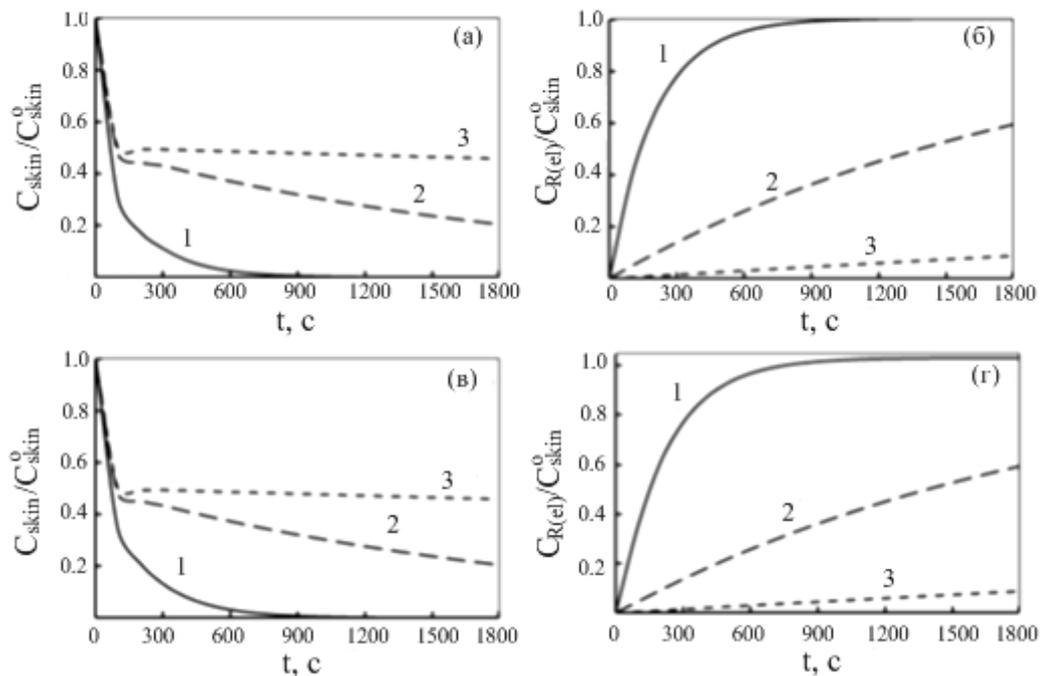


Рисунок 3.4 – Рассчитанные зависимости $C_{\text{skin}}/C_{\text{skin}}^0$ (а, в) и $C_{\text{R(ел)}}/C_{\text{skin}}^0$ (б, д) от времени (t) для различных коэффициентов диффузии (D) и констант скоростей (k): $D=10^{-4} \text{ см}^2/\text{с}$ (а, б) и $D=2 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ (в, г); $k=0.1$ (1), 0.01 (2), 0.001 (3) с^{-1} ;

$$\delta_{\text{skin}}=0.1 \text{ мм}; \delta_{\text{gel}}=0.1 \text{ мм}$$

Легко видеть, что величина $C_{\text{skin}}/C_{\text{skin}}^0$ уменьшается, а отношение $C_{\text{R(el)}}/C_{\text{skin}}^0$ возрастает во времени (Рисунок 3.4). Более того, в данный момент времени величина $C_{\text{skin}}/C_{\text{skin}}^0$ тем меньше, а значение $C_{\text{R(el)}}/C_{\text{skin}}^0$ тем больше, чем больше константа скорости реакции. Зависимости $C_{\text{R(el)}}/C_{\text{skin}}^0$ от t для $D=10^{-4} \text{ см}^2\text{с}^{-1}$ и $D=2\cdot 10^{-6} \text{ см}^2\text{с}^{-1}$ при $\delta_{\text{skin}}=0.1 \text{ мм}$, $\delta_{\text{gel}}=0.1 \text{ мм}$ оказались одинаковыми (Рисунок 3.4 **а,б** и **в,г**), поэтому было сделано заключение о том, что коэффициент диффузии практически не влияет на $C_{\text{R(el)}}/C_{\text{skin}}^0$.

На Рисунке 3.5 представлены рассчитанные зависимости $C_{\text{skin}}/C_{\text{skin}}^0$ и $C_{\text{R(el)}}/C_{\text{skin}}^0$ от толщины слоя экстрагента и эпидермиса. Зависимости $C_{\text{R(el)}}/C_{\text{skin}}^0$ от толщины кожи (δ_{skin}) при фиксированных значениях t (600 и 1000 с) имеют максимум вблизи 0.15 мм, а затем монотонно убывают с увеличением δ_{skin} .

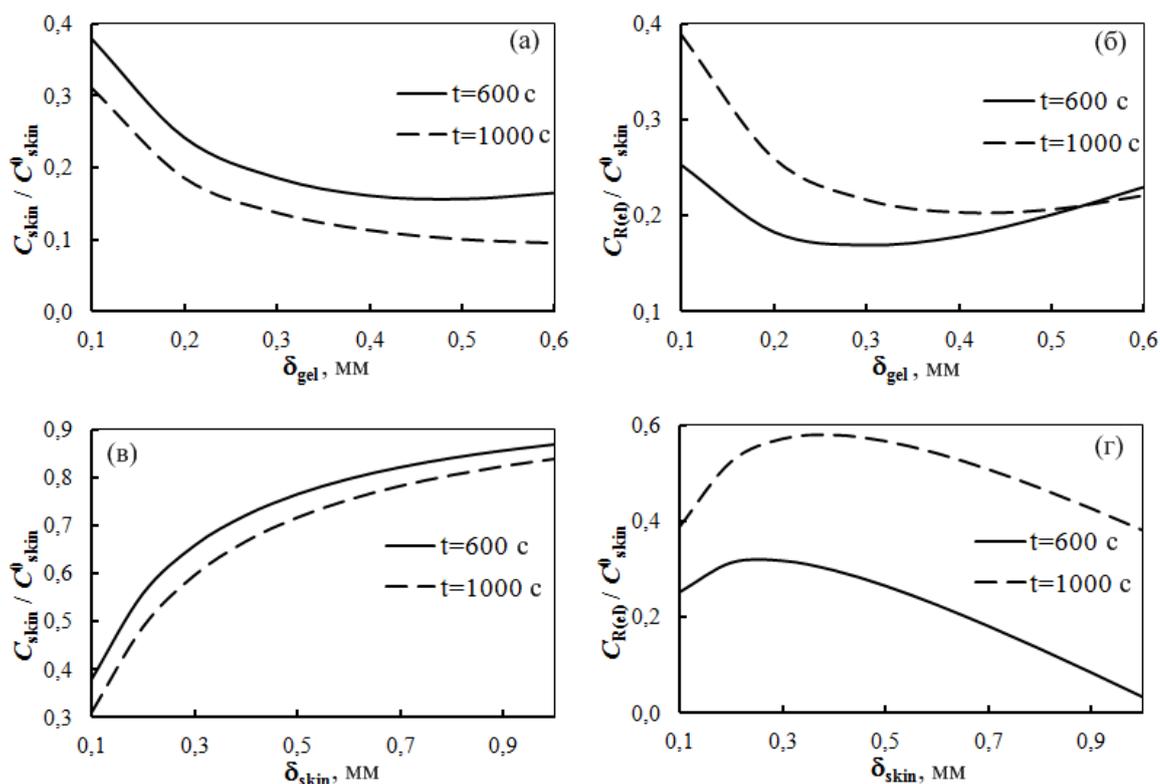


Рисунок 3.5 – Рассчитанная зависимость $C_{\text{skin}}/C_{\text{skin}}^0$ (а, в) и $C_{\text{R(el)}}/C_{\text{skin}}^0$ (б, д) от толщины слоя экстрагента (**а, б**) и эпидермиса кожи (**в, г**). $D=2\cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$, $k=0.001 \text{ с}^{-1}$, $\delta_{\text{skin}}=0.1 \text{ мм}$ (**а, б**), $\delta_{\text{gel}}=0.1 \text{ мм}$ (**в, г**)

Легко видеть, что при увеличении продолжительности измерения и уменьшении толщины слоя экстрагента величина $C_{\text{skin}}/C_{\text{skin}}^0$ уменьшается, а

отношение $C_{R(el)}/C_{skin}^0$ возрастает. Эта связь понятна, так как именно от этих параметров зависит выход АО из кожи и доставка потенциалопределяющего вещества (восстановленной формы медиаторной системы) к поверхности электрода. Важно учитывать соотношения δ_{skin} и δ_{gel} , поскольку количество АО и, соответственно, возникающего в слое экстрагента потенциалопределяющего вещества R тем меньше, чем меньше δ_{skin} , а концентрация АО и R в слое экстрагента тем меньше, чем больше толщина этого слоя.

Экспериментальные исследования влияния толщины слоя геля на потенциометрически измеряемую величину АОА кожи проведены следующим образом. Две пластины лейкопластыря помещали на тестируемый участок кожи на расстоянии 1 см друг о друга (Рисунок 3.6).

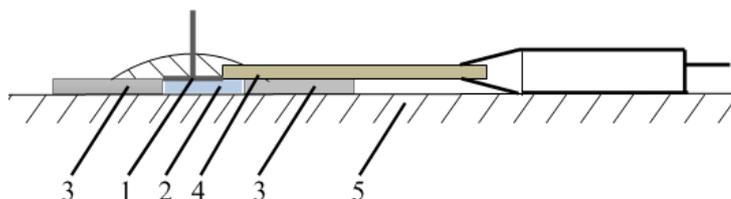


Рисунок 3.6 – Схематичное изображение процедуры измерения АОА кожи. 1 – электрод сравнения, 2 – гель с медиаторной системой, 3 – пластины лейкопластыря, 4 – рабочий электрод, 5 – кожа

В пространство между пластинами помещали гель, содержащий медиаторную систему, рабочий электрод и электрод сравнения, как показано на Рисунке 3.6. Толщину геля контролировали путем варьирования числа пластин лейкопластыря (от 1 до 5 пластин). Толщину пластин лейкопластыря измеряли микрометром. Типичный вид полученных зависимостей АОА кожи от времени изображен на рисунке 3.3 (АОА–t).

На Рисунке 3.7 представлены рассчитанная и экспериментальная зависимости относительной концентрации вещества R у поверхности электрода ($C_{R(el)}/C_{skin}^0$) от толщины слоя геля (δ_{gel}). Наблюдается хорошее соответствие результатов. Относительная концентрация $C_{R(el)}/C_{skin}^0$ стремится к 1 (т.е. определяемая АОА кожи ближе к истинной) в том случае, когда толщина слоя

экстрагирующей среды минимальна и близка к толщине эпидермиса кожи ($\delta_{\text{skin}}=0.1$ мм).

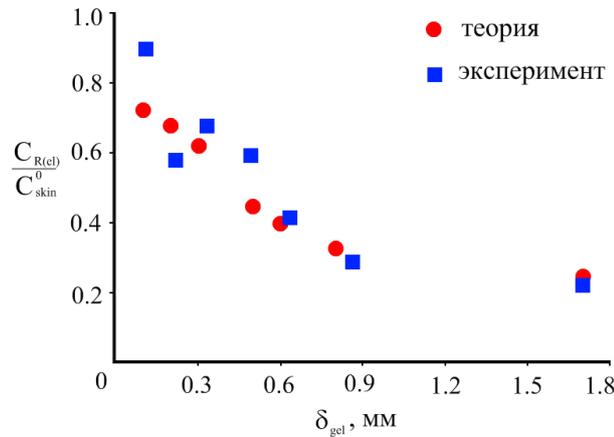


Рисунок 3.7 – Рассчитанная (●) и экспериментальная (■) зависимость $C_{R(\text{el})}/C_{\text{skin}}^0$ от толщины слоя геля; $k=0.01$ с⁻¹; $D=2 \cdot 10^{-6}$ см²с⁻¹, $\delta_{\text{skin}}=0.1$ мм

На Рисунке 3.8 представлены экспериментальная и теоретическая зависимости $C_{R(\text{el})}/C_{\text{skin}}^0$ от t . Большой разброс величин АОА респондентов связан с различным уровнем здоровья и питанием волонтеров. Например, кривая 7 снята на коже больного атопическим дерматитом. Видно, что экспериментальная кривая близка к теоретической в случае, когда константа скорости химической реакции между АО и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в геле равна 0.01 с⁻¹. Такую скорость имеет химическая реакция аскорбиновой кислоты с $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в геле. Глутатион реагирует с $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ намного медленнее ($k=5 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹). В результате вклад глутатиона в образование потенциалопределяющего вещества и, следовательно, в сигнал, оказывается меньше, чем вклад аскорбиновой кислоты. Это согласуется с литературными данными, согласно которым глутатион в эпидермисе кожи человека присутствует в низкой концентрации (около 7% от суммарного содержания водорастворимых АО в коже) [36].

Несмотря на сложность математической модели и вычислений, потерю точности, связанной с толщиной эпидермиса, диффузией АО в коже, АО и медиаторной системы в геле, скоростью химической реакции взаимодействия АО и $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, наблюдается хорошая корреляция теории и эксперимента. Это дает основание использовать результаты вычислений как источник информации,

касающейся выбора экспериментальных условий, расчета и интерпретации результатов.

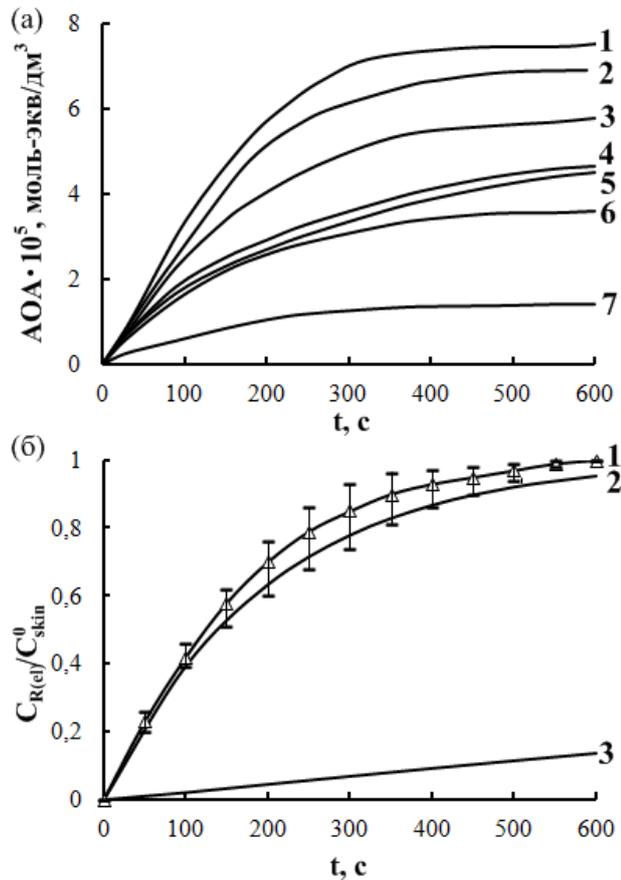


Рисунок 3.8 – Временная зависимость (а) $AOA=C_{R(el)}$ (экспериментальные данные, волонтеры 1 – 7); и (б) $C_{R(el)}/C_{skin}^0$: экспериментальная кривая – средние значения и разброс величин (1), рассчитанные кривые (2 – $k=0.01 \text{ c}^{-1}$ и 3 – $k=0.0005 \text{ c}^{-1}$)

Из предложенных теоретических представлений следует весьма важные практические выводы:

1) измерения, проводимые по методике с гелем, должны проводиться достаточно долго, чтобы обеспечить максимальный выход АО из кожи в экстрагирующую среду;

2) толщина слоя экстрагента должна быть минимальной и близкой к толщине эпидермиса кожи, воспроизводимой в различных измерениях;

3) чем меньше константа скорости взаимодействия АО с $[Fe(CN)_6]^{3-}$, тем меньше его вклад в величину регистрируемого сигнала.

Таким образом, дальнейшее развитие потенциометрического метода определения АОА кожи необходимо осуществлять по следующим направлениям:

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

ГЛАВА 4

РАЗРАБОТКА ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО СЕНСОРА ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КОЖИ4.1. Потенциометрическое определение АОА кожи с помощью геля и
медиаторной системы: недостатки и пути их преодоления

4.1.1. Скорость установления потенциала

Концентрация нейтрального электролита. Ранее для определения АОА кожи использован электродный контактный высокопроводящий гель Унимакс (ООО “Гельтек-Медика”, Россия) [25,45]. Медицинские гели легко наносятся на кожу, химически совместимы как с медиаторной системой, так и с кожей, нетоксичны, обладают электропроводностью. Однако установление стационарного значения потенциала в геле с медиаторной системой состава $C(K_3[Fe(CN)_6])/C(K_4[Fe(CN)_6])=0.001/0.00001$ (моль/дм³) происходило с неудовлетворительной скоростью: разброс значений потенциала за 10 мин измерения достигал 23 мВ. Вероятно, это связано с высокой вязкостью геля, вследствие чего в условиях отсутствия перемешивания скорость доставки ферро/феррицианид-ионов к электроду и, следовательно, скорость установления потенциала малы. Добавление нейтрального электролита (например, KCl) способствовало увеличению скорости установления потенциала в системе (Рисунок 4.1). Скорее всего, это связано с увеличением электропроводности геля при добавлении хлорида калия.

Установлено, что оптимальной концентрацией электролита в геле является 0.75 моль/дм³ (разброс значений потенциала в течение 10 мин измерения не превышал 5.5 мВ). Аналогичный разброс величин потенциала (не более 5.7 мВ) был получен в эксперименте с предварительной пропиткой мембраны электрода сравнения раствором медиаторной системы $C(K_3[Fe(CN)_6])/C(K_4[Fe(CN)_6])=0.001$ моль/дм³/0.00001 моль/дм³ и 0.75 моль/дм³. Однако вариант с пропиткой

мембраны менее удобен для практического применения, поэтому рекомендовано предварительное добавление KCl в гель ($C_{(KCl, \text{гель})}=0.75$ моль/дм³).

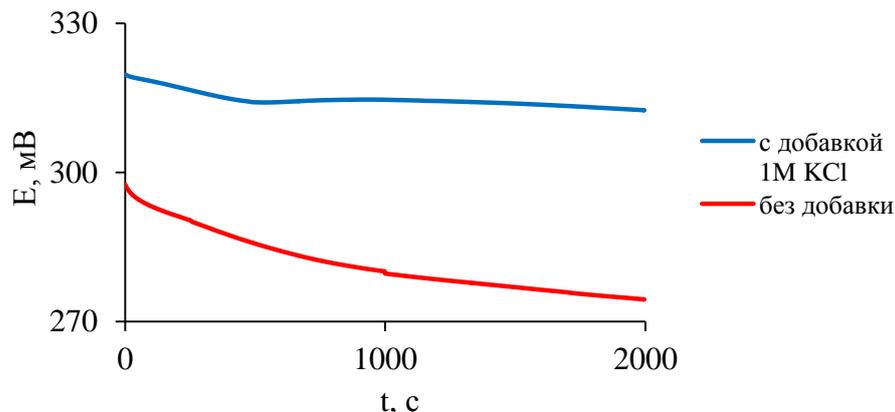


Рисунок 4.1 – Зависимость потенциала от времени в геле с медиаторной системой ($C(K_3[Fe(CN)_6])/C(K_4[Fe(CN)_6])=0.001$ моль/дм³/0.00001 моль/дм³) с добавкой 1 моль/дм³ KCl (**синий**) и без добавки (**красный**)

Взаимное расположение электродов. Обнаружено, что в процессе приклеивания рабочего электрода к защитному слою электрода сравнения возможно его механическое повреждение. Это приводило к значительному падению потенциала в геле вследствие образования малорастворимых ферро/феррицианидов серебра (Рисунок 4.2).

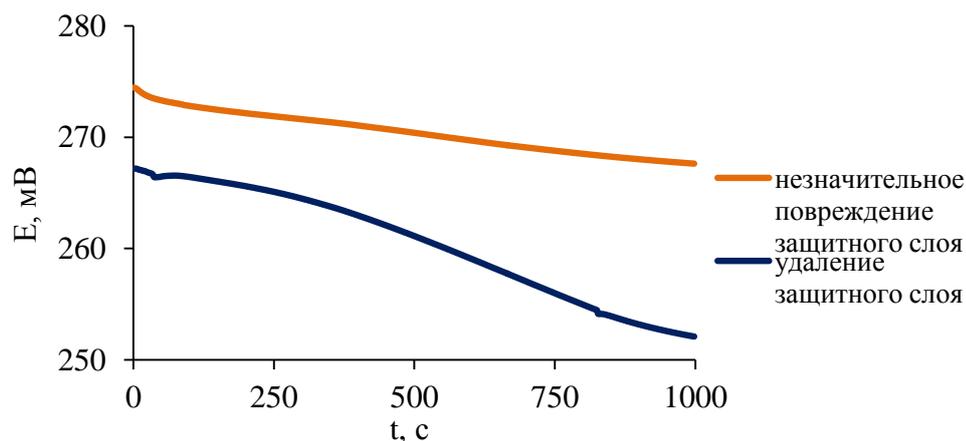


Рисунок 4.2 – Зависимости потенциала медиаторной системы в геле от времени с повреждением защитного слоя электрода сравнения (**оранжевый**) и полным его удалением (**синий**)

Повреждение защитного слоя электрода сравнения в каждом конкретном случае происходило в разной степени и было невоспроизводимо. Поэтому рекомендовано приклеивание рабочего электрода вблизи защитного слоя, на адгезивный участок электрода сравнения. При этом наблюдаемый разброс значений потенциала в течение 10 мин измерения составил не более 4.1 мВ.

Таким образом, использование геля с добавлением 0.75 моль/дм^3 KCl и размещение рабочего электрода на адгезивной части электрода сравнения способствует более быстрому установлению стационарного значения потенциала.

4.1.2. Хранение геля с медиаторной системой

Смесь геля и медиаторной системы. Исследовано изменение потенциала смеси геля и медиаторной системы состава $C(K_3[Fe(CN)_6])/C(K_4[Fe(CN)_6])=0.001/0.00001$ (моль/дм³) при хранении. Предварительно через раствор медиаторной системы, а затем через её смесь с гелем продували аргон в течение 30 мин. Дегазованную смесь втягивали в стерильные медицинские шприцы, герметизировали и упаковывали в индивидуальный полиэтиленовый пакет с застежкой, хранили в темном месте при 6°C. Зафиксировано уменьшение потенциала гелевой системы при хранении (Рисунок 4.3). Красным цветом на Рисунке 4.3 обозначены величины потенциала медиаторной системы в геле, приготовленной на воздухе, при хранении в темноте при комнатной температуре. Вероятно, уменьшение потенциала медиаторной системы в геле при хранении связано с присутствием в геле веществ восстановительной природы, способных взаимодействовать с окисленной формой медиаторной системы.

Изменение потенциала дегазованной системы за 28 дней хранения составило около 27 мВ. Эта величина согласуется с теоретически рассчитанным изменением потенциала в случае возрастания концентрации восстановленной формы медиаторной системы примерно в 3 раза (Таблица 4.1).

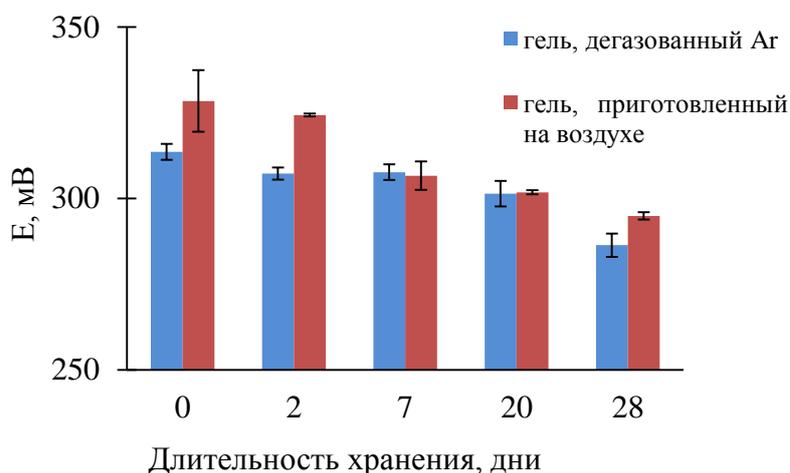


Рисунок 4.3 – Зависимость потенциала медиаторной системы в геле от времени хранения: гель с медиаторной системой, предварительно дегазованные Ar (**синий**), гель, приготовленный на воздухе (**красный**)

Таблица 4.1 – Рассчитанные величины потенциала медиаторной системы при изменении соотношения ее компонентов в процессе хранения

$\Delta E(\text{MC}),$ мВ	$E_1, \text{ мВ}$	$E_o, \text{ мВ}$	$C_{\text{ox}},$ ммоль/дм ³	$C_{\text{red}},$ ммоль/дм ³	$\lg(C_{\text{ox}}/C_{\text{red}})$
0	250.2	132.0	1.00	0.01	2.0
18.0	232.2	132.0	0.99	0.02	1.7
28.7	221.5	132.0	0.98	0.03	1.5
36.4	213.8	132.0	0.97	0.04	1.4

Очевидно, что при использовании в измерении не свежеприготовленной смеси медиаторной системы с гелем аналитический сигнал будет мал и, следовательно, ошибка определения будет значительно превышать допустимые границы. Это предположение иллюстрируют данные Таблицы 4.2, где представлены результаты расчета величины скачка потенциала (ΔE), наблюдаемого при АОА кожи= $2 \cdot 10^{-5}$ моль-экв/дм³ для медиаторной системы с разным соотношением компонентов вследствие протекающих при хранении процессов.

Поскольку совместное хранение геля и медиаторной системы невозможно, далее оценивали возможность хранения только раствора медиаторной системы, приготовленной на дегазованной воде (Ar, N₂), при 6°C в темном месте.

Таблица 4.2 – Рассчитанная величина скачка потенциала (ΔE) при изменении соотношения компонентов медиаторной системы в геле в процессе хранения

$AOA_{\text{кожи}} \cdot 10^5 \text{ моль-экв/дм}^3$	$\Delta E, \text{ мВ}$	$C_{\text{ox}}, \text{ ммоль/дм}^3$	$C_{\text{red}}, \text{ ммоль/дм}^3$	$\lg(C_{\text{ox}}/C_{\text{red}})$
2.0	28.8	1.00	0.01	2.0
	18.4	0.99	0.02	1.7
	13.7	0.98	0.03	1.5

Раствор медиаторной системы. В случае дегазованного азотом раствора медиаторной системы наблюдали рост потенциала системы через 14 дней хранения при 6°C в темном месте (Рисунок 4.4). По-видимому, это обусловлено окислением $K_4[Fe(CN)_6]$ остаточным кислородом воздуха в растворе [179].

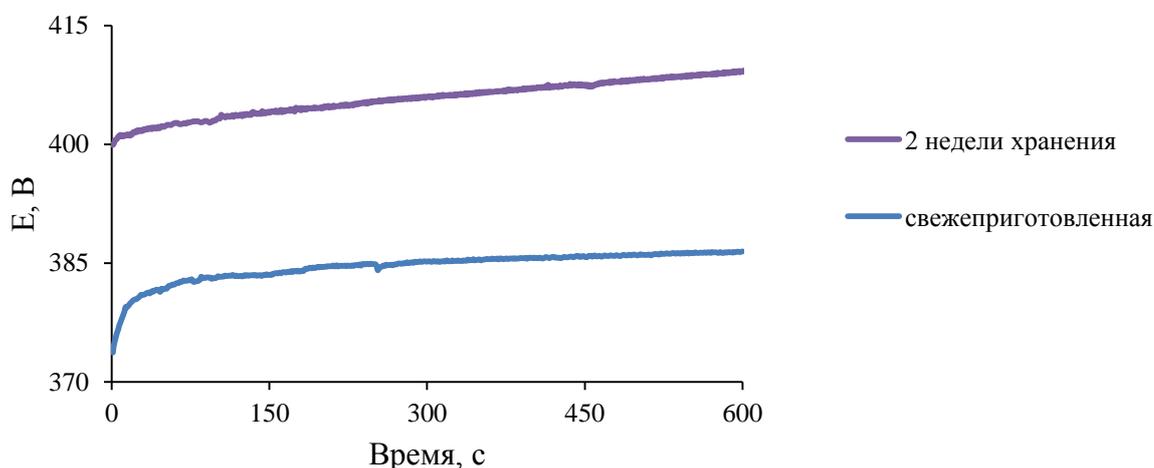


Рисунок 4.4 – Зависимость потенциала медиаторной системы от времени: свежеприготовленная медиаторная система (**синий**), медиаторная система после двух недель хранения в холодильнике (**фиолетовый**)

В случае хранения дегазованного аргоном раствора медиаторной системы при 6°C в темном месте получили следующий результат: потенциал при первом измерении оказался значительно ниже, чем у свежеприготовленной медиаторной системы, при последующих – такой же (Рисунок 4.5). Перед первым измерением раствор медиаторной системы выдерживали при комнатной температуре 30 мин для достижения теплового равновесия с окружающей средой. Интервал между первым и вторым измерением составил 24 мин. Вероятно, за это время произошло

насыщение раствора кислородом воздуха и частичное окисление $K_4[Fe(CN)_6]$ в растворе.

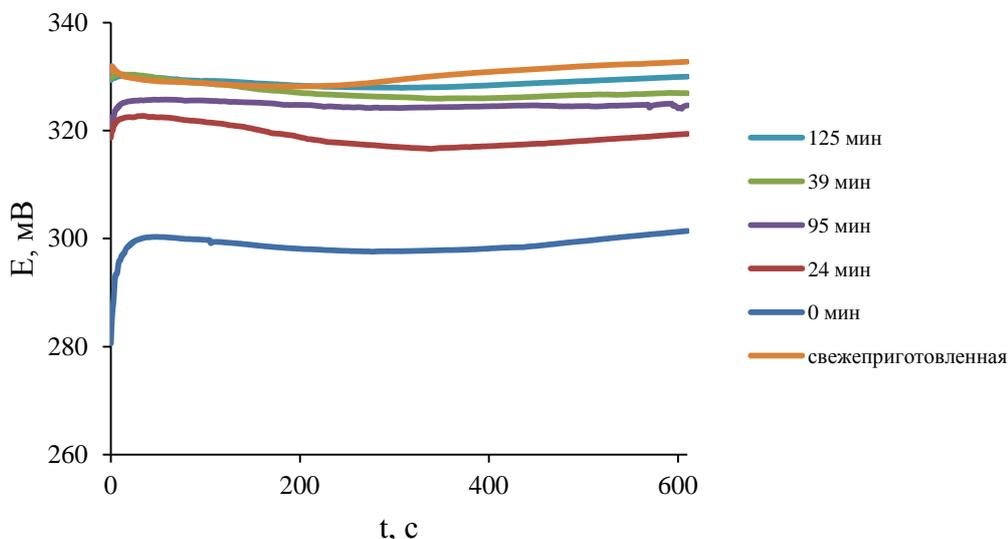


Рисунок 4.5 – Временные зависимости потенциала медиаторной системы, дегазованной аргоном (1 мес. хранения), и свежеприготовленной медиаторной системы

В результате проведенного исследования по выбору условий хранения геля с медиаторной системой можно заключить, что ни один из способов хранения не может считаться приемлемым. Раздельное хранение раствора медиаторной системы также не представляет практический интерес из-за нестабильности его состава, даже в случае предварительной дегазации раствора инертными газами (Ar , N_2).

Принимая во внимание полученные результаты, а также представленные в **Главе 3** результаты теоретических исследований, дальнейшее развитие потенциометрического метода определения АОА кожи необходимо осуществлять по следующим направлениям:

- сокращение продолжительности анализа за счет повышения скоростей взаимодействия АО с медиаторной системой;
- уменьшение толщины экстрагирующего слоя и воспроизводимость ее величины;

- преодоление проблемы неустойчивости смеси геля с медиаторной системой при хранении.

Для решения обозначенных проблем необходим поиск альтернативы гелю с медиаторной системой. Для этого решалась задача разработки потенциометрического сенсора для неинвазивного определения АОА кожи, чувствительный слой которого обеспечивает экстракцию АО из кожи, химическое взаимодействие АО с реагентом, потенциометрический отклик на присутствие АО.

4.2. Разработка чувствительного слоя потенциометрического сенсора

При выборе реагента чувствительного слоя потенциометрического сенсора для определения АОА руководствовались следующими критериями:

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

Гексацианоферрат (III) калия и пара $K_3[Fe(CN)_6]/(K_4[Fe(CN)_6])$ удовлетворяют всем предъявляемым требованиям. Исследована возможность использования водных растворов (медиаторная система, гексацианоферрата (III) калия) в качестве реагента чувствительного слоя потенциометрического сенсора для определения АОА кожи. Основное преимущество подхода с применением водного раствора реагента по сравнению с гелем и медиаторной системой заключается в сокращении времени измерения, поскольку в водном растворе скорость взаимодействия АО кожи с гексацианоферратом (III) калия больше, чем в геле (Таблица 3.1 Глава 3).

4.2.1. Выбор раствора реагента: медиаторная система

Состав медиаторной системы. Для выбора наиболее подходящего состава медиаторной системы для определения АОА кожи были рассчитаны теоретические сдвиги потенциалов, наблюдаемые при АОА кожи диапазона 10^{-5} – 10^{-4} моль-экв/дм³ (Таблица 4.3). Указанный диапазон АОА выбран на основании результатов анализа кожи респондентов, полученных ранее по методике с использованием геля и медиаторной системы.

Таблица 4.3 – Сдвиг потенциала медиаторной системы после введения антиоксидантов (10^{-5} – 10^{-4} моль-экв/дм³), рассчитанный по уравнению Нернста для 25°C

№	Состав медиаторной системы (C_{ox}/C_{red}), моль/дм ³	Сдвиг потенциала (ΔE), мВ	Диапазон АОА, $\cdot 10^5$ моль-экв/дм ³
1	$10^{-3}/10^{-5}$	19 – 65	1 – 10
2	$10^{-3}/2 \cdot 10^{-5}$	11 – 49	
3	$10^{-3}/5 \cdot 10^{-5}$	5 – 31	
4	$10^{-3}/10^{-4}$	3 – 21	
5	$10^{-3}/10^{-3}$	0.6 - 6	
6	$10^{-2}/10^{-5}$	18 - 64	
7	$10^{-2}/5 \cdot 10^{-5}$	5 - 30	
8	$10^{-2}/10^{-4}$	3 - 19	

По результатам расчета для предварительных экспериментов выбрана медиаторная система состава $10^{-3}/10^{-5}$ (моль/дм³), поскольку для нее рассчитанный сдвиг потенциала максимальный среди остальных медиаторных систем. Каплю свежеприготовленного раствора выбранной медиаторной системы (0.2 см³) наносили на электроды и распределяли по их рабочей поверхности наконечником дозатора. Запускали измерение начального потенциала в течение 10 с. Не прерывая измерение, прикладывали систему к коже запястья. На Рисунке 4.6 представлен пример полученной на коже человека зависимости потенциала от

времени. Как видно из Рисунка 4.6, установление потенциала наступает примерно через 2 мин от начала измерения.

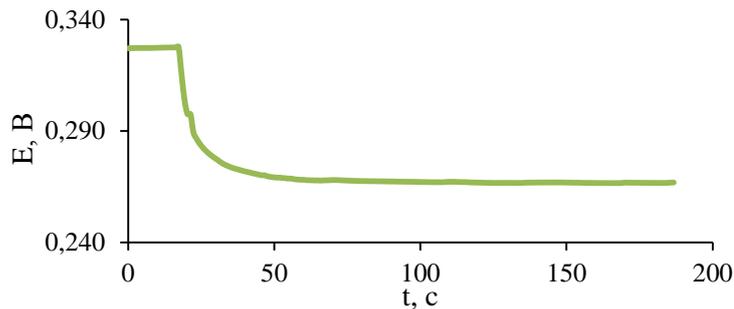


Рисунок 4.6 – Временная зависимость потенциала, полученная с использованием раствора медиаторной системы на коже

Величины АОА кожи группы условно здоровых добровольцев ($n=7$), определенные подобным образом, варьировалась в пределах $8 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$ моль-экв/дм³. Принимая во внимание этот диапазон величин АОА, а также, неустойчивость медиаторной системы, использованной в предварительном эксперименте, оправдано использование более концентрированной медиаторной системы. Так, наибольший сдвиг потенциала для величин АОА кожи диапазона $5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$ моль-экв/дм³ должен наблюдаться для медиаторной системы состава $10^{-3}/5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ – 60 мВ. Теоретическая зависимость $\Delta E - \lg(C_{ox}/C_{red})$ для указанной системы имеет линейный вид, наклон составляет -59.17 мВ при 25°C (Рисунок 4.7).

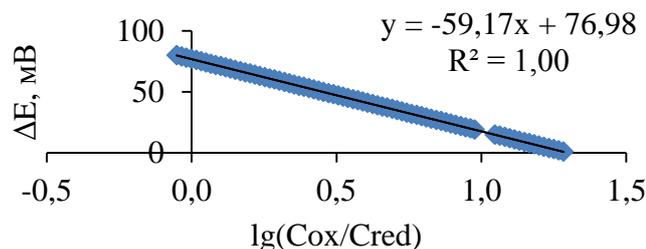


Рисунок 4.7 - Рассчитанная зависимость сдвига потенциала от логарифма соотношения окисленной и восстановленной форм медиаторной системы (отн. н.в.э.)

Оценка правильности и воспроизводимости величин АОА. Правильность результатов потенциометрического определения АОА модельных растворов

(аскорбиновая кислота, гексацианоферрат (II) калия) и кожи респондентов с использованием раствора медиаторной системы оценивали методом “введено–найдено”. Внесение добавки (раствора гексацианоферрата (II) калия или аскорбиновой кислоты) осуществляли непосредственно в раствор медиаторной системы, а затем полученную смесь использовали для определения АОА кожи (проба с добавкой). В каждом измерении участвовал новый участок кожи, но один и тот же рабочий электрод. Полученные результаты представлены в Таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Результат оценки правильности потенциометрического определения АОА модельных растворов (n=5) и кожи (n=3) с использованием водного раствора медиаторной системы ($C(K_3[Fe(CN)_6])/C(K_4[Fe(CN)_6])=0.001$ моль/дм³/0.00005 моль/дм³) методом “введено–найдено” (P=0.95)

Объект	Введено, $\cdot 10^5$, моль-экв/дм ³	Найдено, $\cdot 10^5$, моль-экв/дм ³	АОА (кожи), $\cdot 10^5$, моль-экв/дм ³	R, %
кожа	6.0*	29.9±0.2	24.5±0.3	90
	6.0**	35.9±0.5	28.4±0.4	125
модельный раствор	4.0*	4.2±0.3	-	105
	6.0**	5.6±0.3	-	93

*добавка аскорбиновой кислоты; **добавка $K_4[Fe(CN)_6]$

Воспроизводимость результатов потенциометрического определения АОА кожи, полученных по методике с использованием раствора МС, оценивали при последовательных измерениях на близкорасположенных участках кожи запястья добровольца с использованием одного и того же рабочего электрода в течение дня и в разные дни (временной интервал исследования – 3 дня). Полученные результаты говорят о неудовлетворительной воспроизводимости величин АОА кожи: $S_r \leq 0.21$; АОА=(2.2±0.6) моль-экв/дм³ в течение дня, $S_r \leq 0.22$; АОА=(2.3±0.6) моль-экв/дм³ в разные дни (n=5, P=0.95). Вероятно, это обусловлено недостаточной воспроизводимостью толщины слоя экстрагента, которая контролировалась только степенью нажатия на электроды в процессе их приклеивания к коже.

Хранение раствора медиаторной системы. Исследована возможность хранения водного раствора медиаторной системы ($C_{ox}/C_{red}=0.001/0.00005$ моль/дм³) при следующих условиях:

- 6°C в темном месте;
- комнатная температура, в тёмном месте;
- при комнатной температуре на свету.

Установлено, что на свету раствор медиаторной системы нестабилен, существенное изменение потенциала системы происходило уже после 1 суток хранения (Таблица 4.5). Наиболее благоприятные условия хранения – темнота, 6°C или комнатная температура. В этом случае изменения потенциала медиаторной системы практически не происходило (Таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Потенциал раствора медиаторной системы при хранении в различных условиях (n=5, P=0.95)

Условия хранения	Срок хранения, сутки	E, мВ
25°C, свет	0	352.5±0.9
	1	362.2±0.3
	5	392±2
	7	459±2
	16	465±3
	30	465±1
25°C, темнота	0	351.0±0.5
	1	350.01±0.02
	5	349.8±0.4
	7	348.6±0.8
	16	349±1
	30	348.7±0.5
	36	349.2±0.1
6°C, темнота	0	351.1±0.5
	1	351.2±0.2
	5	349.7±0.2
	7	348±1
	16	347.8±0.9
	30	348±2
	36	348.9±0.4
	51	350.2±0.1

Можно заключить, что использование в качестве реагента чувствительного слоя сенсора раствора медиаторной системы ($C_{ox}/C_{red} = 10^{-3}/5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³) для определения АОА кожи перспективно. Тем не менее, этот подход имеет следующие недостатки: отсутствует четкая фиксация толщины слоя раствора; измерение величины начального потенциала медиаторной системы (до взаимодействия с кожей) усложняет процедуру анализа и неудобно на практике.

4.2.2. Выбор раствора реагента: гексацианоферрат (III) калия

Раствор гексацианоферрата (III) калия имеет ряд существенных преимуществ, основное из которых – лучшая по сравнению с гелем с медиаторной системой устойчивость при хранении [180]. Отсутствие необходимости измерения величины начального потенциала (до взаимодействия с кожей) позволяет упростить процедуру анализа.

Состав раствора. Количество гексацианоферрата (III) калия должно быть в избытке для наиболее быстрого и полного протекания химической реакции взаимодействия с АО. В связи с этим, выбор концентрации раствора гексацианоферрата (III) калия был согласован с диапазоном величин АОА кожи респондентов, оцененным по результатам предварительных экспериментов. Для измерения АОА кожи использован 0.005 моль/дм³ гексацианоферрата (III) калия.

4.2.3. Выбор материала-основы чувствительного слоя сенсора

В качестве основы чувствительного слоя сенсора и носителя раствора реагента $K_3[Fe(CN)_6]$ исследованы следующие материалы:

- бумажный фильтр, изготовленный из целлюлозы сульфатной предгидролизной, обеззоленный, «Синяя лента», диаметр пор – 3-5 мкм;
- микропористый плёночный материал, изготовленный на основе смеси ацетатов целлюлозы общей пористостью 80-85%, диаметр пор 0.45, 0.8 и 1.2 мкм;
- мембрана фторопластовая гидрофильная, диаметр пор – 0.6 мкм.

Выбранные фильтры обладают гидрофильностью, дешёвизной и доступностью, химической устойчивостью к широкому кругу соединений, удобством в использовании.

Возможность использования фильтров в потенциометрическом измерении оценивали по следующим критериям:

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

Схема процедуры измерения аналогична представленной на рис. 3.5 (Глава 3), при этом вместо геля с медиаторной системой использован фильтр, пропитанный водным раствором, содержащим 1 моль/дм³ NaCl, 10⁻³ моль/дм³ $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10⁻⁵ моль/дм³ $K_4[Fe(CN)_6]$ (обозначение 2 на рис. 3.5, Глава 3). Рабочий электрод (Pt SPE) перед измерением на 3 мин погружали в раствор такого же состава. Эта процедура проводилась с целью установления равновесия на электроде. Фильтры смачивали аналогичным раствором в течение 3 мин. Затем рабочий электрод просушивали фильтровальной бумагой. Выдержанный фильтр прикладывали к электродам, помещали всю систему на фторопластовую плёнку. Измерение потенциала выполняли в течение 10 мин.

Типичный вид полученных зависимостей потенциала рабочего электрода от времени для исследованных материалов представлен на Рисунке 4.8. Установлено, что фильтры из ацетата целлюлозы с диаметром пор 1.2 мкм не удовлетворяют трём критериям. Смачивание фильтров раствором медиаторной системы происходило медленно, в течение 20 мин. Вероятно, это связано с малой величиной капиллярных сил для этих фильтров по сравнению с фильтрами с меньшим размером пор. Бумажные фильтры не удовлетворяли критериям 2 и 3: разброс величин потенциала рабочего электрода составил 8–32 мВ. Фильтры из ацетата целлюлозы (средний диаметр пор 0.8 мкм) и фторопластовые фильтры также не удовлетворяли требованиям 2 и 3. Предъявляемым требованиям в

полной мере удовлетворял фильтр из ацетата целлюлозы со средним диаметром пор 0.45 мкм. Кроме того, выбранный фильтр имеет толщину (0.16 ± 0.02) мм, близкую к толщине эпидермиса кожи человека (≈ 0.1 мм).

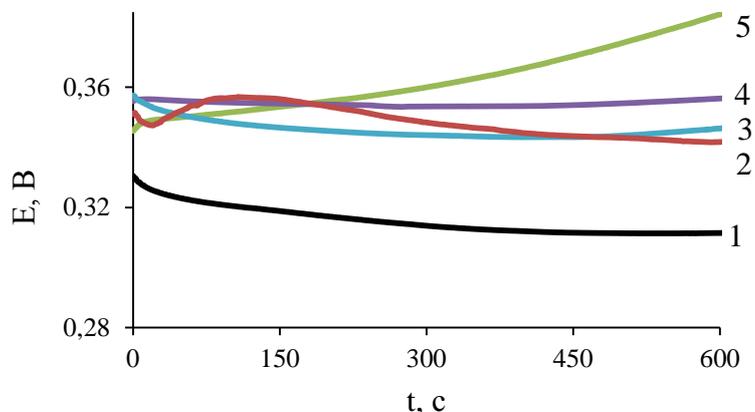


Рисунок 4.8 – Временные зависимости потенциала рабочего электрода в системе с фильтром: бумажный фильтр (1); ацетатцеллюлозный фильтр (поры 1.2 мкм) (2); фторопластовый фильтр (поры 0.6 мкм) (3); ацетатцеллюлозный фильтр (поры 0.45 мкм) (4); ацетатцеллюлозный фильтр (поры 0.8 мкм) (5)

Таким образом, чувствительный слой потенциометрического сенсора, реагирующий на концентрацию АО кожи, состоял из ацетатцеллюлозной мембраны (размер пор 0.45 мкм), пропитанной раствором гексацианоферрата (III) калия. В качестве трансдьюсера использован платиновый электрод.

4.3. Выбор рабочих условий

4.3.1. Концентрация и pH электролита

Исследована возможность использования в качестве нейтрального электролита для раствора реагента чувствительного слоя сенсора следующих растворов:

- 1 моль/дм³ KCl, применявшийся ранее в методике с гелем и медиаторной системой;
- 0.15 моль/дм³ NaCl (физиологический раствор) и 1 моль/дм³ NaCl.

Полученные результаты представлены на Рисунке 4.9.

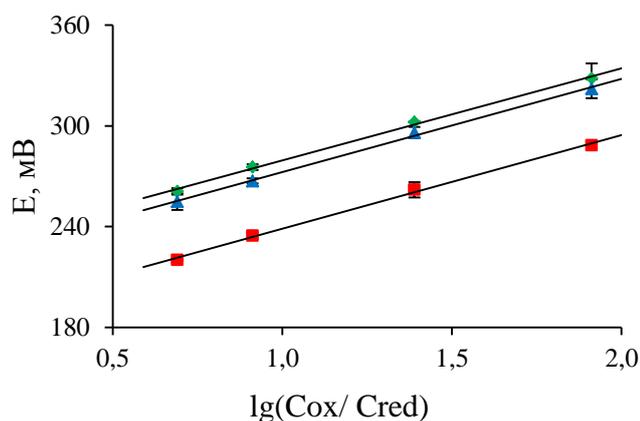


Рисунок 4.9 – Зависимость потенциала от логарифма отношения концентраций $K_3[Fe(CN)_6]$ и $K_4[Fe(CN)_6]$ в растворе. Фоновый раствор: KCl 1 моль/дм³ (◆); $NaCl$ 0.15 моль/дм³ (■); $NaCl$ 1 моль/дм³ (▲)

В качестве фонового электролита для раствора реагента выбран 1 моль/дм³ раствор $NaCl$. Выбор обусловлен биосовместимостью хлорида натрия и близостью наклона градуировочного графика к теоретическому (58.98 при 24°C). Предпочтение отдано более концентрированному раствору $NaCl$ (1 моль/дм³), поскольку при меньшей концентрации электролита разброс значений потенциала за 10 мин измерения достигал 13 мВ.

Влияние pH на измеряемую величину потенциала исследовано в диапазоне $pH=3.3-6.6$, что соответствует физиологическому диапазону pH кожи (4–6) [6,152]. Кислотность раствора варьировали путем добавления хлороводородной кислоты. Полученные результаты (Таблица 4.6) демонстрируют отсутствие влияния pH на измеряемую величину потенциала в исследованном диапазоне кислотности.

Таблица 4.6 – Результаты потенциометрического определения АОА модельных растворов аскорбиновой кислоты при $pH=3.2-6.6$ ($n=5$; $P=0.95$)

pH	Введено, $\cdot 10^4$ моль- экв/дм ³	Найдено, $\cdot 10^4$ моль- экв/дм ³	S_r	R, %
3.24	4.0	3.7 ± 0.4	0.08	93
4.24	4.0	3.7 ± 0.2	0.04	93
6.63	4.0	3.7 ± 0.5	0.10	93

В дальнейших экспериментах в качестве раствора реагента чувствительного слоя сенсора использовали раствор, содержащий 0.005 моль/дм³ гексацианоферрата (III) калия и 1 моль/дм³ хлорида натрия.

4.3.2. Время выдерживания фильтра

Исследовали зависимость АОА кожи, определенную при помощи потенциометрического сенсора, от времени выдерживания ацетатно-целлюлозного фильтра в растворе реагента. При выдерживании фильтра в растворе $K_3[Fe(CN)_6]$ в течение 15 с наблюдалась неполная его пропитка и большой разброс в полученных значениях АОА кожи. Выдерживание фильтра в растворе в течение 10 мин приводило к излишнему набуханию и разрыхлению материала фильтра, его неустойчивости к последующему механическому воздействию. Оптимальное время выдерживания составило 3-5 мин.

4.3.3. Хранение раствора реагента

Смесь геля с медиаторной системой не подлежит хранению: за 7 дней хранения в темном месте потенциал системы изменяется на 7 % относительно первоначальной величины, что составляет около 22 мВ (см. Рисунок 4.3). Установлено, что при хранении 0.005 моль/дм³ раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ в 1 моль/дм³ NaCl в темном месте при комнатной температуре в течение 3 дней коэффициенты градуировочной зависимости изменяются не более, чем на 1.2 %, а при хранении в темном месте при 6°C в течение 7 дней – не более, чем на 1.5 %.

Исследована возможность хранения раствора гексацианоферрата (III) калия в контакте с фильтром после высушивания раствора на воздухе. Об изменении содержания гексацианоферрата (III) калия при хранении судили по величине потенциала системы фильтра с гексацианоферратом (III) калия и добавленной непосредственно перед измерением аликвоты гексацианоферрата (II) калия ($C_{red}=0.00001$ моль/дм³). Установлено, что потенциал уменьшается со временем хранения (Таблица 4.7). Аналогичное изменение потенциала наблюдали и в

случае предварительной подготовки фильтров – выдерживании в деионизованной воде в течение 30 мин, а затем в растворе $K_3[Fe(CN)_6]$ в течение 60 мин.

Таблица 4.7. Результаты оценки возможности хранения фильтров, пропитанных раствором $K_3[Fe(CN)_6]$ и высушенных на воздухе

Материал фильтра	Предварительная подготовка	Время, ч	E, мВ	Изменение E, мВ	
АЦ	без подготовки	0	324		
		0.5	304	20	
		1.5	296	28	
		48	286	38	
	выдерживание в воде 30 мин	0	327		
		1.5	299	29	
		24	285	42	
	выдерживание в воде 30 мин, растворе $K_3[Fe(CN)_6]$ – 60 мин	0	327		
		1.5	325	2	
		48	306	21	
	ПТФЭ	без подготовки	0	267	
			1.5	262	5
24			247	21	
выдерживание в воде 30 мин		0	294		
		1.5	273	20	
		48	257	37	

АЦ – ацетатцеллюлозный фильтр (диаметр пор 0.45 мкм), ПТФЭ - политетрафторэтилен

Результаты демонстрируют, что при использовании фильтров наблюдается уменьшение потенциала при их совместном хранении с $K_3[Fe(CN)_6]$. Вероятно, это связано с наличием в составе материала фильтров веществ, способных к восстановлению $K_3[Fe(CN)_6]$ при длительном контакте. В связи с этим сделано заключение о том, что следует осуществлять хранение реагента в виде раствора гексацианоферрата (III) калия в NaCl, а формирование чувствительного слоя сенсора – выдерживание АЦ фильтра в растворе реагента – осуществлять непосредственно перед измерением.

4.4. Исследование мешающего влияния

Основной вклад в состав ГЛМ кожи вносят выделения потовых и сальных желёз [170]. Поскольку в потенциометрическом определении участвуют только

электроактивные водорастворимые АО кожи, при анализе мешающего влияния мы ориентировались на водорастворимую составляющую ГЛМ кожи, т.е. потовые выделения. В состав пота человека входят [170,171]:

- ион натрия – основной внеклеточный катион, содержащийся в коже преимущественно в межклеточном пространстве;
- хлорид-ион, содержание которого зависит от скорости потоотделения, температуры кожи, интенсивности метаболизма, возраста;
- продукты белкового обмена – мочевины, аммиак, мочевая кислота, креатинин;
- аминокислоты (серин, глицин, аланин, гистидин, треонин, пролин, лейцин, валин, изолейцин, фенилаланин, аспарагин, тирозин, триптофан).

Концентрация ионов натрия и хлора в растворе экстрагента составляет 1 моль/дм³, что существенно превышает возможное содержание этих ионов, экстрагируемых из ГЛМ кожи.

Исследовали влияние компонентов ГЛМ кожи – аминокислот серина, глицина, аланина, гистидина, треонина, пролина, лейцина, валина, изолейцина, фенилаланина, аспарагина, тирозина, триптофана и продуктов азотистого обмена (мочевина, аммиак, мочевая кислота, креатинин) – на потенциометрический сигнал. Для этого сравнивали градуировочную зависимость, построенную в присутствии мешающих компонентов и в их отсутствии. Состав смеси мешающих компонентов (Таблица 4.8) рассчитывали по литературным данным, исходя из состава экстрактов из кожи [181,182].

Таблица 4.8– Состав смеси мешающих компонентов

Компонент ГЛМ кожи	Концентрация, ·10 ⁴ моль/дм ³
серин	9.72
глицин	7.36
аланин	5.27
гистидин	2.70
треонин	2.16
пролин	1.01
лейцин	0.36

Продолжение Таблицы 4.8

1	2
валин	0.74
изолейцин	0.26
тирозин	0.49
фенилаланин	0.21
аспарагин	0.26
триптофан	0.18
глюкоза	0.02
креатинин	1.15
мочевина	18.2
аммиак	2.03

Как видно из рисунка 4.10, перечисленные соединения не оказывают мешающего влияния на измеряемую величину потенциала. Результаты измерений в разные дни воспроизводимы ($S_r = 0.07$).

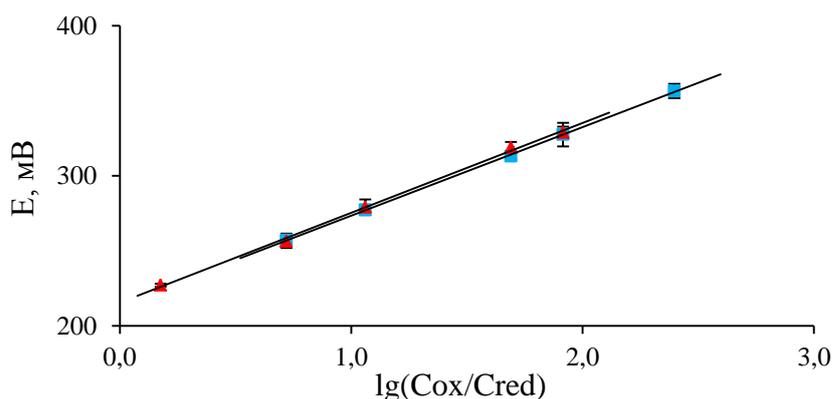


Рисунок 4.10 – Градуировочная зависимость, полученная в присутствии компонентов ГЛМ кожи (▲) и в их отсутствии (■) (n=5; P=0.95)

4.5. Аналитические характеристики методики

В выбранных рабочих условиях линейность градуировочной зависимости в координатах потенциал – логарифм отношения концентраций гексацианоферрат (III)/гексацианоферрат (II) анионов сохраняется в диапазоне $2 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-3}$ моль-экв/дм³. Нижняя граница определяемых величин АОА составила $2 \cdot 10^{-5}$ моль-экв/дм³. Наклон градуировочного графика равен 59.2 (мВ), что практически совпадает с теоретической величиной Нернстовского наклона

(58.98 при 24°C), коэффициент корреляции линейной регрессии $r = 0.999$ (рисунок 4.11).

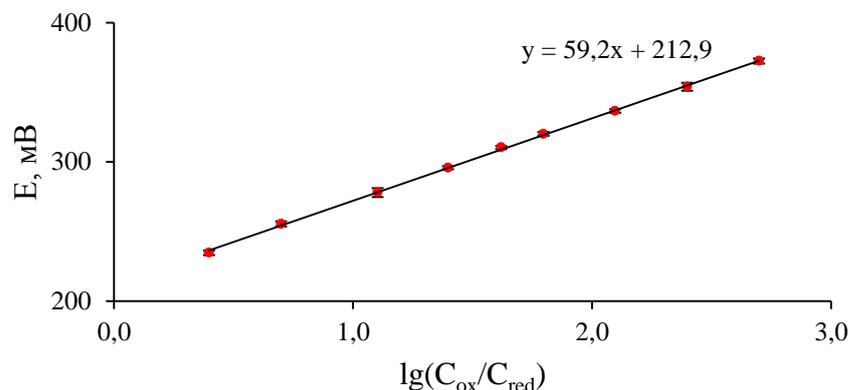


Рисунок 4.11 – Зависимость аналитического сигнала (потенциала) потенциометрического сенсора от логарифма отношения концентраций гексацианоферрат (III)/гексацианоферрат (II) ионов

Таким образом, суммарную концентрацию АО (АОА, моль-экв/дм³), вступивших в реакцию с $K_3[Fe(CN)_6]$, определяли, используя уравнение градуировочной зависимости (Рисунок 4.11).

Правильность потенциометрического определения АОА с помощью разработанного сенсора оценивали методом “введено–найдено” (таблица 4.9). Величина меры правильности варьировалась в диапазоне 89–101 %.

Таблица 4.9 – Результаты определения АОА растворов аскорбиновой кислоты с помощью потенциометрического сенсора ($n=6$, $P=0.95$)

Введено, $\cdot 10^4$, моль-экв/дм ³	Найдено, $\cdot 10^4$, моль-экв/дм ³	S_r	R, %
0.40	0.36±0.03	0.07	90
1.00	0.89±0.02	0.02	89
4.0	3.61±0.08	0.02	90
8.0	7.3±0.3	0.04	91
40.0	40.6±0.3	0.008	101

Воспроизводимость поверхности трансдьюсера потенциометрического сенсора после многократного контакта с матрицей аналита оценивали по величине потенциала раствора, содержащего 0.005 моль/дм³ $K_3[Fe(CN)_6]$, 1 моль/дм³ NaCl и 0.0001 моль-экв/дм³ аскорбиновой кислоты, с использованием

новых платиновых электродов и взятых после 20 измерений на коже. Полученные результаты (Таблица 4.10) позволяют сделать заключение о том, что влияние матрицы аналита на работоспособность трансдюсера потенциометрического сенсора отсутствует.

Таблица 4.10 – Результат измерения потенциала модельного раствора (0.005 моль/дм³ K₃[Fe(CN)₆], 1 моль/дм³ NaCl, 0.0001 моль-экв/дм³ аскорбиновой кислоты) с помощью новых и отработавших Pt электродов (n=8, P=0.95)

Электрод	Число измерений на коже	E, мВ	E _{ср} , мВ	S _r
№3	20	322.2	321±1	0.005
№ 11 14	20	319.5		
№ 10 14	20	320.8		
№ 4	20	323.3		
№ 9 10	0	319.9		
№ 7 10	0	322.9		
№ 11 10	0	323.0		
№ 10 10	0	319.7		

О работоспособности трансдюсера потенциометрического сенсора после измерений на коже судили также по найденной величине АОА раствора аскорбиновой кислоты известной концентрации (Таблица 4.11). Установлена хорошая работоспособность трансдюсера после 100 мин измерений на коже.

Таблица 4.11 – Результат определения АОА раствора аскорбиновой кислоты с помощью разработанного потенциометрического сенсора с использованием нового и проработавшего в контакте с кожей трансдюсера (n=4, P=0.95)

Электрод		Найдено, ·10 ⁴ , моль-экв/дм ³	Введено, ·10 ⁴ , моль-экв/дм ³	R, %	S _r
№1	новый	1.7±0.2	2.14	79	0.08
	100 мин измерений	1.8±0.1	2.14	84	0.04
№2	новый	1.8±0.1	2.14	84	0.05
	100 мин измерений	2.03±0.06	2.14	95	0.02

4.6. Анализ кожи респондентов

Как показано в Литературном обзоре (Глава 1), стандартных методов определения АОА кожи человека на данный момент нет. Существующие методы

неинвазивного определения АО кожи, как правило, ориентированы на определенный класс или группу АО. В связи с этим, правильность результатов определения АОА кожи с использованием разработанного потенциометрического сенсора оценивали методом “введено–найдено”.

Для фиксации чувствительного элемента сенсора на коже использовали манжету тонометра, нагнетая в ней давление 35–40 мм.рт.ст. Величина давления выбрана экспериментально, качественным путем – она должна быть достаточной для надежной фиксации электродов и фильтра на руке человека, и, в то же время, легко переносимой. Фотоизображение процесса измерения АОА кожи человека представлено на Рисунке 4.12.



Рисунок 4.12 – Фотоизображение процесса измерения АОА кожи

С использованием разработанного потенциометрического сенсора определена АОА кожи группы добровольцев ($n=15$, возраст 20-86 лет, условно здоровые, женщины и мужчины). Величины АОА варьировались в диапазоне 32.4 – 307 мкмоль-экв/дм³. Воспроизводимость величин АОА кожи в течение дня составила S_r от 0.06 до 0.08, в разные дни (временной интервал исследования – 5 дней) – S_r от 0.08 до 0.13. Полученные величины меры правильности определения добавок (таблица 4.12) позволяют говорить об отсутствии существенных матричных эффектов при определении АОА кожи с помощью разработанного сенсора.

Таблица 4.12 – Результаты оценки правильности определения АОА кожи с помощью потенциометрического сенсора (n=5, P=0.95)

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

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

С использованием разработанного потенциометрического сенсора определена АОА кожи больных (n=14) доброкачественными хроническими дерматозами (атопический дерматит, псориаз) и первичными кожными Т-клеточными лимфомами (грибовидный микоз IV-IIA ст.) на участках поврежденной и неповрежденной кожи, в сравнении с группой условно здоровых людей (n=10) (Рисунок 4.13).

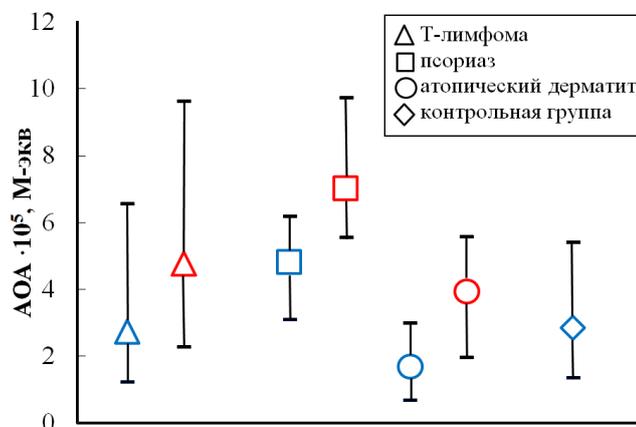


Рисунок 4.13 – АОА кожи больных дерматозами (**синим** цветом обозначены АОА неповрежденных участков кожи, **красным** – поврежденных участков) и АОА кожи условно здоровых респондентов. Результат по каждой группе респондентов представлен в виде среднего значения АОА и размаха полученных величин

АОА здоровых и поврежденных участков кожи исследованной группы респондентов составила: $АОА_{здор.} = 4.79 \cdot 10^{-5}$ моль-экв/дм³; $АОА_{поврежд.} = 7.01 \cdot 10^{-5}$ моль-экв/дм³ (псориаз); $АОА_{здор.} = 1.68 \cdot 10^{-5}$ моль-экв/дм³, $АОА_{поврежд.} = 3.93 \cdot 10^{-5}$

моль-экв/дм³ (атопический дерматит); $AOA_{здор.}=2.73 \cdot 10^{-5}$ моль-экв/дм³, $AOA_{поврежд.}=4.77 \cdot 10^{-5}$ моль-экв/дм³ (грибовидный микоз); $AOA=2.85 \cdot 10^{-5}$ моль-экв/дм³ (условно здоровые). AOA поврежденных участков кожи для каждого заболевания оказалась выше, чем AOA неповрежденных участков. Повышение уровня AO в поврежденной коже, вероятно, обусловлено необходимостью связывания избытка активных форм кислорода. AOA поврежденной и неповрежденной кожи больных псориазом выше, чем AOA кожи контрольной группы и группы больных атопическим дерматитом. Полученный результат может быть объяснен характерным для псориаза повышенным уровнем фермента хсантинооксидазы, катализирующего окисление гипоксантина в ксантин, а затем ксантин – в мочевую кислоту. Этот результат согласуется с опубликованными данными [48].

4.7. Сравнение данных КЗЭ с результатами потенциометрии

Выбор рабочих условий совместного определения AO кожи методом КЗЭ. Длину волны прямого спектрофотометрического детектирования выбирали на основании спектров поглощения модельных растворов аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, цистеина, глутатиона (Рисунок 4.14). Сравнение спектров поглощения аналитов, приведённых на Рисунке 4.14, показывает, что наиболее чувствительное определение цистеина, глутатиона и мочевой кислоты возможно при длине волны 190 нм, т.к. оптическая плотность растворов при этой длине волны максимальна. Растворы мочевой кислоты, кроме того, обладают избирательным поглощением при 290 нм. Растворы аскорбиновой кислоты слабо поглощают излучение при 190 и 290 нм, для более чувствительного её определения можно использовать длину волны 247 нм.

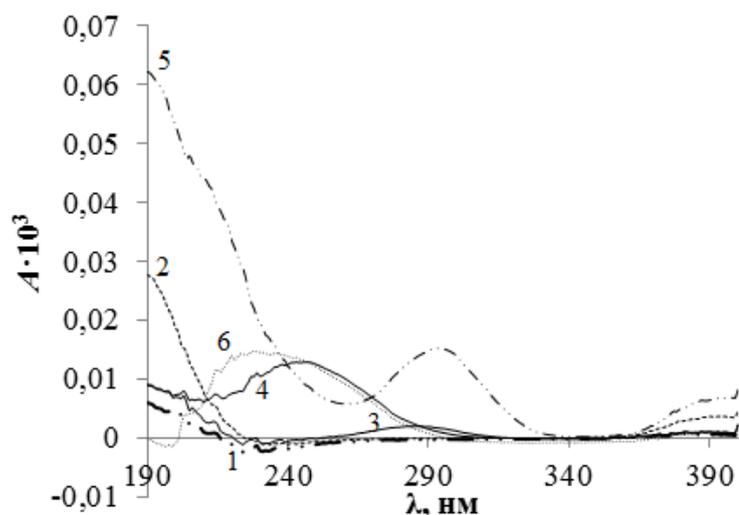


Рисунок 4.14 – Спектры поглощения УФ-излучения свежеприготовленными $1 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ растворами цистеина (1), глутатиона (2), мочевой кислоты ($2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³) (3), аскорбиновой кислоты (4); мочевой (5) и аскорбиновой (6) кислот (через сутки после приготовления раствора). «Капель 105М», $d = 75$ мкм. Раствор сравнения – деионизованная вода

Следует отметить, что спектр поглощения аскорбиновой кислоты (Рисунок 4.14, кривые 4 и 6) заметно изменяется со временем. Для количественного её определения методом добавок в водном экстракте из кожи модельные растворы выдерживали тот же промежуток времени, что и в случае процедуры экстракции.

В состав ГЛМ кожи, рогового и блестящего слоёв эпидермиса входит ряд соединений, которые поглощают излучение в УФ-диапазоне и могут мешать определению АО, например, аминокислота тирозин (поглощает в диапазоне 250-260 нм), гистамин (200-226 нм), мочевины (200-222 нм), креатинин (200-250 нм) [183–186]. В условиях эксперимента указанные соединения находятся не в анионной форме (учитывая показатели кислотности/основности входящих в их состав $-NH_2$ и/или $COOH$ -групп), что позволяет пренебречь их влиянием на результат КЗЭ измерения.

Детектирование, проведённое при длине волны 190 нм, показало, что пики всех исследованных компонентов хорошо разделяются. Однако количественное определение цистеина и глутатиона недостаточно чувствительно, что может быть обусловлено малым поглощением излучения в УФ-области этими соединениями.

В то же время возможно одновременное определение мочевой и аскорбиновой кислот при длинах волн 190, 247 или 290 нм.

Качественное определение компонентов осуществляли, измеряя время миграции ионов в стандартных растворах и исследуемой пробе. Для количественного анализа использовали методы градуировочного графика и стандартных добавок.

Пример ЭФГ пробы без добавки и с добавкой $6.8 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ аскорбиновой кислоты и $2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ мочевой кислоты приведён на рисунке 4.15. Концентрация мочевой кислоты (Рисунок 4.15, пик I), рассчитанная по формуле 2.3, составила $2.0 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; по градуировочному графику получена величина $1.8 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³. Аскорбиновой кислоты в исходной пробе не обнаружено (Рисунок 4.15, пик II).

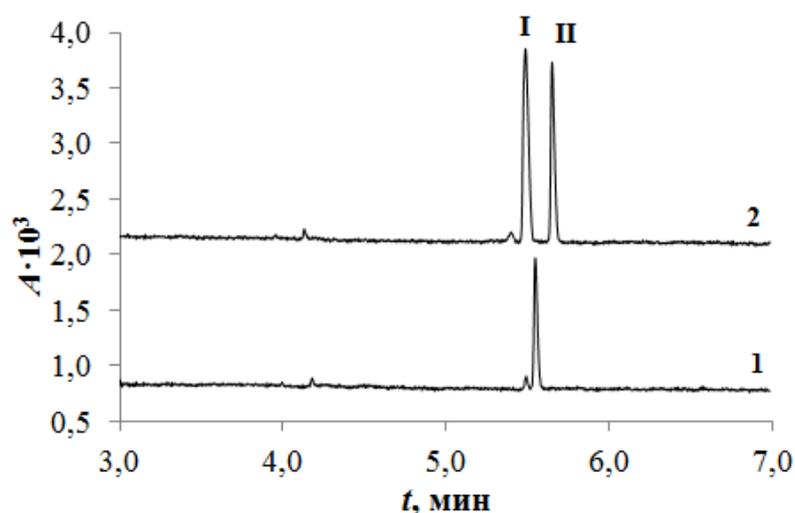


Рисунок 4.15 – ЭФГ водного экстракта из кожи без добавки (1) и с добавкой (2) аскорбиновой и мочевой кислот. Фоновый электролит: 0.025 моль/дм³ фосфатный буферный раствор, pH 7.5, $C_{\text{ЦТА-ОН}} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, $U = -16$ кВ, $\lambda = 247$ нм, $t = 25$ °С, ввод пробы 300 мбар·с

Для возможно более чувствительного определения аналитов увеличили время и давление ввода пробы. Пример ЭФГ водного экстракта, записанной при длине волны детектирования 190 нм, приведён на Рисунке 4.16.

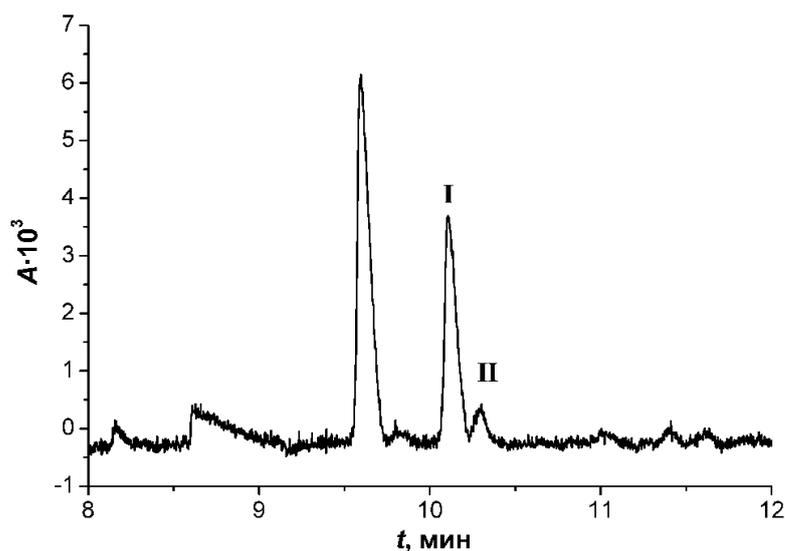


Рисунок 4.16 – ЭФГ водного экстракта из кожи. Фоновый электролит: 0.025 моль/дм³ фосфатный буферный раствор, pH 7.5, $C_{\text{ЦТА-ОН}} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, $U = -16$ кВ, $\lambda = 290$ нм, $t = 25$ °С, ввод пробы 1500 мбар·с, пик I соответствует мочево́й кислоте, пик II – аскорбиновой

Сравнение данных КЗЭ с результатами потенциометрии. Проведен анализ водного экстракта из кожи 23 добровольцев методом КЗЭ с УФ детекцией и АОА их кожи потенциометрическим методом. Анализ данных показывает, что наблюдается линейная зависимость между величиной АОА кожи, полученной потенциометрически, и суммарной концентрацией мочево́й и аскорбиновой кислот, полученной методом КЗЭ. Все параметры (высота пика, площадь под пиком, исправленная площадь под пиком) могут быть использованы для количественного анализа в исследуемом диапазоне концентраций, давая примерно равные величины наклона корреляционной зависимости. Свободный член a уравнения этой зависимости во всех трёх случаях оказался незначимым. Установлено, что результаты двух методов статистически достоверно коррелируют, лучшая корреляция результатов наблюдается при использовании в качестве аналитического сигнала площади под пиками мочево́й и аскорбиновой кислот ($r=0.817$ при $r_{\text{крит}}=0.410$ для $n=23$ и $P=0.95$). Рассчитанное значение F-критерия меньше критического значения, что говорит о равнозначности методов КЗЭ и потенциометрии ($F_{\text{эксп}} = 1.84$, $F_{\text{табл}}(f_1=22, f_2=22, P=0.95) = 2.05$). Величина t -

критерия говорит об отсутствии значимых различий между средними значениями двух выборок результатов анализа, полученных методом КЗЭ и потенциометрии ($t_{\text{экс}} = 0.35$, $t_{\text{табл}} (f = 21, P = 0.95) = 2.08$).

Содержание мочевой кислоты, обнаруженное методом КЗЭ во всех анализируемых экстрактах из кожи, составило от $1.95 \cdot 10^{-6}$ до $4.4 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³. Аскорбиновая кислота найдена только в двух пробах в количестве $5.1 \cdot 10^{-6}$ и $1.8 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³. Результаты КЗЭ анализа позволяют заключить, что в поверхностных слоях кожи человека основным водорастворимым антиоксидантом является мочевая кислота.

Возможно, отсутствие аскорбиновой кислоты в большинстве проб связано с быстрым ее окислением на воздухе. Попытка восстановить аскорбиновую кислоту путем введения в водный экстракт из кожи 1,4 – дитио – DL – треитола была описана в работе Коэна [18]. Тем не менее, и в этом случае аскорбиновая кислота не была обнаружена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Коэн [48] также провел экстракцию в анаэробных условиях, продувая через раствор экстракта азот в течение 15 мин до экстракции и в процессе экстракции. Однако восстановленной формы аскорбиновой кислоты в экстракте из кожи обнаружено не было. Эти результаты подтверждают вывод о том, что мочевая кислота является основным водорастворимым АО поверхностных слоев кожи. Тем не менее, для более корректных выводов целесообразно провести дополнительные исследования с привлечением методов, более чувствительных к другим АО.

С другой стороны, принимая во внимание результаты исследований гомогенатов кожи [36] и образцов, анализируемых другими методами [48,168], наблюдаемому явлению можно дать следующее разумное объяснение. В работе [36] показано, что в эпидермисе сосредоточено основное количество водорастворимых АО кожи человека. Распределение АО в коже и, в частности, в эпидермисе неравномерно: существует градиент концентрации водорастворимых АО – увеличение их концентрации от рогового слоя к глубоким слоям эпидермиса [36,168], что может быть обусловлено более выраженным окислением АО

поверхностных слоёв кожи под воздействием стресс-факторов окружающей среды. Согласно работе [36], основным АО эпидермиса кожи человека является аскорбиновая кислота. Но ее концентрация в поверхностном, роговом слое кожи значительно ниже, чем в глубоких слоях, и составляет около 17% от общего содержания аскорбиновой кислоты в коже человека [168].

Вебер и соавт. [168] исследовал антиоксидантный состав рогового слоя мышей (SKH-1, безволосые мыши), используя липкие ленты для отбора проб. Хроматографический анализ проб показал, что роговой слой обеднен аскорбатом и глутатионом, в наибольшей концентрации присутствует урат-анион. Аналогичные результаты представлены в работах [18,48], где использовали неинвазивный способ извлечения низкомолекулярных водорастворимых АО кожи человека – экстракцию. Результат анализа показал, что экстракты содержат преимущественно мочевую кислоту. Аскорбиновая кислота в экстрактах из кожи обнаружена не была. Величины содержания мочевой кислоты в экстрактах из кожи отличаются от наших данных, что может быть связано с различными условиями эксперимента: временем экстракции, площадью анализируемого участка кожи, объемом экстракта.

Преобладание мочевой кислоты в поверхностных слоях кожи человека можно объяснить восстановлением одних АО кожи другими. Так, аскорбат-ион способен восстанавливать витамин Е [22] в некоторых системах, включая кожу [187], и восстанавливать урат-радикал [188]. В свою очередь, урат не способен восстановить аскорбат или глутатион из-за более высокой величины окислительно-восстановительного потенциала [168]. Следовательно, обеднение аскорбатом и глутатионом может происходить в поверхностных слоях эпидермиса, особенно в стресс-условиях.

Таким образом, сочетание методов КЗЭ и потенциометрии дает новую информацию относительно АОА кожи человека. Показано, что преимущественно содержащимся в поверхностных слоях человеческой кожи антиоксидантом является мочевая кислота. Она, предположительно, вносит наибольший вклад в величину АОА кожи, определяемую потенциометрически.

РАЗРАБОТКА СЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИОЛ-СОДЕРЖАЩИХ АНТИОКСИДАНТОВ В КОЖЕ

5.1. Индикаторная реакция

Общий принцип почти всех оптических сенсоров – использование аналитических реакций и реагентов в условиях и в формах, обеспечивающих получение визуально наблюдаемого или легко измеряемого эффекта. Например, при колориметрическом определении это изменение цвета или интенсивности окраски чувствительного слоя. Желаемый эффект обеспечивает вещество, называемое реагентом. В качестве реагента могут быть использованы хромогенные радикалы, комплексы переходных металлов (Cu^{2+} , Fe^{3+}) с органическими лигандами, окислительно-восстановительные индикаторы, неорганические окислители, полимеры [*Литературный обзор*].

В последние два десятилетия значительно возрос интерес к реагентам на основе НЧ благородных металлов. Это обусловлено их уникальными оптическими и электронными свойствами, основанными на явлении поверхностного плазмонного резонанса. В *Литературном обзоре* было показано, что наночастицы золота (Au НЧ) сферической формы диаметром 10-15 нм являются перспективными для использования в качестве реагента колориметрического сенсора для оценки содержания тиолов в биологических объектах, в том числе коже человека.

Исследовано влияние на спектр поглощения золя золота добавок тиолов – глутатиона и цистеина (Рисунок 5.1). Добавка в золь золота тиолов приводит к визуальному изменению цвета золя с красного на синий, что обусловлено их агрегацией. Агрегация Au НЧ сопровождается уменьшением интенсивности полосы поглощения в области 520 нм и появлением новых полос поглощения в области 560–580 нм в случае глутатиона и 610–620 нм в случае цистеина.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что сферические Au НЧ диаметром 10-15 нм могут быть использованы в качестве реагента для

получения аналитического сигнала в колориметрическом сенсоре для определения тиолов.

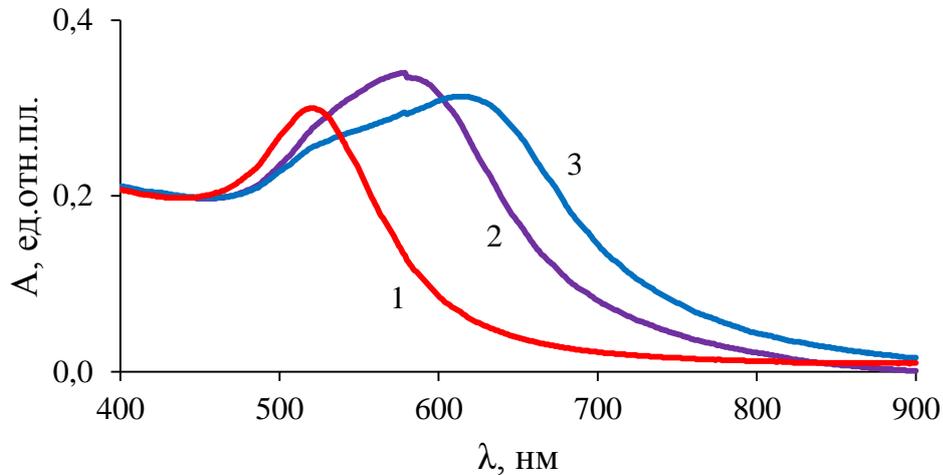


Рисунок 5.1 – Спектр поглощения золя золота ($1.95 \cdot 10^{12}$ НЧ/см³), содержащего 0.01 моль/дм³ NaCl: **1** – золь золота, **2** – золь с добавкой 1 ммоль/дм³ глутатиона, **3** – золь с добавкой 0.1 ммоль/дм³ цистеина. Раствор сравнения: деионизованная вода

5.2. Выбор способа проведения индикаторной реакции

Наиболее полный контакт с поверхностью анализируемого объекта – кожей человека – возможен при использовании чувствительного слоя сенсора в жидкой форме (раствор реагента) или в виде пористого материала, пропитанного реагентом. В связи с этим, нами исследована возможность использования двух способов проведения индикаторной реакции для определения тиолов кожи:

- в растворе (золь золота используется в жидком виде);
- в среде пористого материала, пропитанного реагентом (Au НЧ сорбированы на подложке).

Выбор материала для проведения модельных экспериментов. Выбор материала осуществляли согласно следующим требованиям: химическая инертность, в частности, по отношению к золю золота при непосредственном с ним контакте, отсутствие собственной окраски, гидрофобность и малая пористость. Протестированы следующие материалы, удовлетворяющие в той или

иной степени вышеперечисленным требованиям: стекло, стеклотекстолит, полиэтилентерефталат (ПЭТФ), политетрафторэтилен (ПТФЭ), пищевая плёнка, фольга, канцелярские скотчи, лейкопластыри (полимерный, вязкозный, хлопковый).

Эксперимент проводили, помещая капли золя золота (в день или через сутки после синтеза) на исследуемый материал. Изменение цвета капли фиксировали визуально и с помощью фотокамеры Olympus FE-340 при естественном освещении в течение 20 мин.

Изменения цвета реагента на материалах ПТФЭ, ПЭТФ и стеклотекстолит за время наблюдения не зафиксировано (Рисунок 5.2).

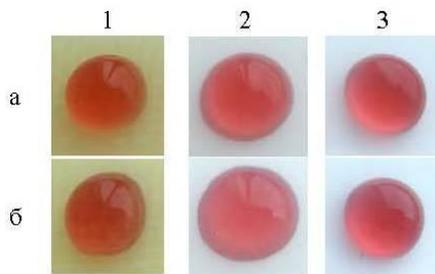


Рисунок 5.2 – Цвет капли красного золя золота в начальный момент (а) и через 20 мин (б). Материал основы: стеклотекстолит (1), ПЭТФ (2), ПТФЭ (3)

Для дальнейших исследований в качестве материала для проведения модельных экспериментов нами был выбран ПТФЭ. Выбор обусловлен прозрачностью, гидрофобностью и отсутствием собственной окраски материала.

Возможность использования раствора золя золота оценивали следующим образом. Капли золя наносили на плёнку ПТФЭ, предварительно промытую этанолом и деионизованной водой. Затем в них микродозатором добавляли аликвоту свежеприготовленного водного раствора глутатиона и перемешивали наконечником дозатора. Эксперимент показал, что сигнал (изменение цвета реагента) наблюдается при концентрации глутатиона 10^{-3} моль/дм³ и выше (Рисунок 5.3). Это свидетельствует о недостаточном уровне чувствительности исходного раствора золя золота.

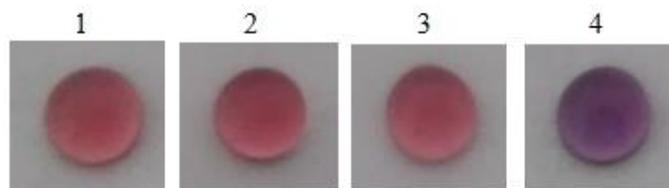


Рисунок 5.3 – Влияние внесенной добавки водного раствора глутатиона на цвет красного золя золота, нанесенного на ПТФЭ. Концентрация глутатиона 0 (1), $1 \cdot 10^{-5}$ (2), $1 \cdot 10^{-4}$ (3), $1 \cdot 10^{-3}$ (4) моль/дм³

Из литературы известно, что чувствительность золь золота к тиолам может быть повышена введением в золь следующих веществ:

- водного раствора аскорбиновой кислоты [140,189];
- “сшивающих агентов”, например, ионов металлов, образующих комплексные соединения с тиолами: Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} [190];
- водных растворов хлорида натрия (10 ммоль/дм³) и хлороводородной кислоты (до значения рН 4.5–4.7) [160].

С целью повышения чувствительности раствора мы использовали добавки:

- аскорбиновой кислоты (концентрация в золе $5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³);
- хлорида магния (концентрация в золе 0.01 моль/дм³) (выбор в качестве “сшивающего агента” хлорида магния обусловлен его сравнительно низкой токсичностью, биосовместимостью);
- хлорида натрия и хлороводородной кислоты (в количестве, предложенном авторами [160]).

К сожалению, введение этих добавок в красный золь золота не привело к увеличению его чувствительности по отношению к тиолам. В качестве примера на Рисунке 5.4 приведено фотоизображение результата эксперимента с использованием добавки хлорида магния в красный золь золота.

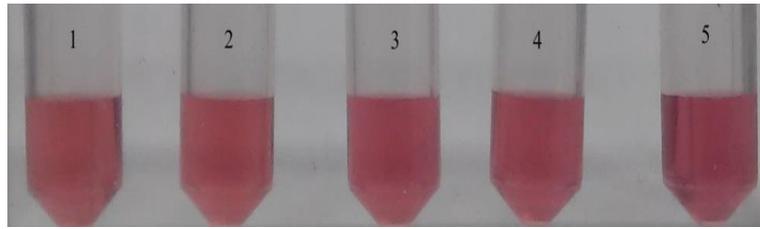


Рисунок 5.4 – Влияние внесенной добавки раствора глутатиона на изменение цвета красного золя золота в присутствии $0.01 \text{ моль/дм}^3 \text{ MgCl}_2$. Концентрация глутатиона: 0 (1), $1.3 \cdot 10^{-6}$ (2), $1.3 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ (3), $1.3 \cdot 10^{-4}$ (4) и $1.3 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ (5)

Исследована возможность получения сигнала от глутатиона путём взаимодействия красного золя золота с модельным раствором. Для этого в микропипетки, содержащие 0.2 см^3 золя золота, добавляли 0.2 см^3 модельного раствора с различной концентрацией глутатиона: 0, $1 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³. Появление сигнала наблюдали через 2 суток после начала взаимодействия в микропипетке с концентрацией глутатиона, равной $5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ (Рисунок 5.5).

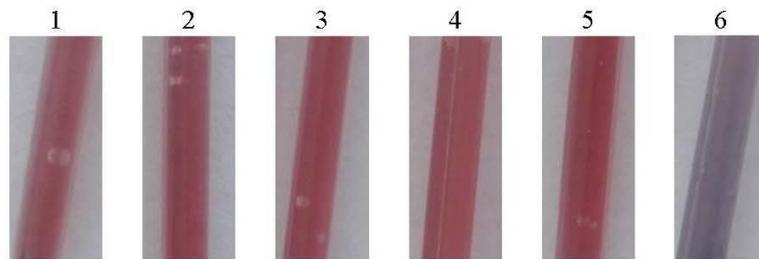


Рисунок 5.5 – Цвет красного золя золота через двое суток после начала взаимодействия с модельным раствором. Концентрация глутатиона в модельном растворе: 0 (1), 10^{-5} (2), $2 \cdot 10^{-5}$ (3), $3 \cdot 10^{-5}$ (4), $4 \cdot 10^{-5}$ (5), $5 \cdot 10^{-5}$ (6) моль/дм³

Экспериментальные результаты показывают, что растворы для определения глутатиона на основе золя золота не обладают достаточной чувствительностью и оперативностью. Кроме того, в случае использования капель золя фиксация сигнала и его интерпретация затруднены из-за бликов, отражений на поверхности капель, наложения цветов самой капли и объекта анализа – кожи. В связи с этим,

в дальнейшем рассмотрена возможность использования сенсора, чувствительный слой которого состоит из пористого материала, на котором сорбированы Au НЧ.

5.3. Выбор условий формирования сенсора

5.3.1. Материал подложки

В качестве основы чувствительного слоя сенсора и материала – носителя Au НЧ исследованы следующие материалы:

- беззольный бумажный фильтр, изготовленный из целлюлозы сульфатной предгидролизной (Мелиор XXI, синяя лента, размер пор 2-3 мкм);
- микропористый плёночный материал, изготовленный на основе смеси ацетатов целлюлозы общей пористостью 80-85% («Владипор», размер пор 0.45 мкм).

Выбор этих материалов обусловлен их гидрофильностью, дешевизной и доступностью, химической устойчивостью, отсутствием собственной окраски (белый цвет), хорошими сорбционными свойствами, удобством в использовании.

Au НЧ сорбировали на матрицу путём её погружения в золь золота с последующей сушкой на воздухе в течение 20 мин. В процессе сорбции Au НЧ на бумажном фильтре наблюдалось изменение его окраски с красной на сиреневую (Рисунок 5.6). Изменение цвета золя после сорбции говорит об укрупнении (агрегации) Au НЧ внутри пор бумажного фильтра.

Сорбция Au НЧ на микропористом пленочном материале не сопровождалась изменением исходного красного цвета золя. Это свидетельствовало о том, что сорбция НЧ на мембранном фильтре происходила без значительного изменения их размеров. Неизменность окраски сенсора с момента его пропитки до полного высыхания служила доказательством стабильности НЧ и отсутствия их агрегации на подложке. Окраска сенсора также не изменялась в холостом опыте при его взаимодействии с модельным раствором, не содержащим тиолов, что свидетельствовало об отсутствии агрегации НЧ.



Рисунок 5.6 – Изменение цвета матрицы после сорбции красного золя золота: **1** – бумажный фильтр «Мелиор XXI», **2** – микропористый плёночный материал «Владипор»

Таким образом, наиболее подходящим материалом в качестве основы чувствительного слоя колориметрического сенсора является ацетат целлюлозный фильтр. Размер пор мембранного фильтра варьировали от 0.05 до 1.2 мкм. Фильтры с большим размером пор (≥ 0.8 мкм) плохо смачивались коллоидным раствором золота. Оптимальный размер пор фильтра составил 0.45 мкм.

5.3.2. Условия сорбции наночастиц золота

Для модифицирования материала подложки выбран наиболее простой и распространённый способ – физическая иммобилизация реагента [59]. Импрегнирование фильтра реагентом осуществляли путём его погружения в золь золота с последующей сушкой, что обеспечивало равномерное распределение реагента по всей поверхности фильтра. Для ускорения процесса испарения растворителя использовали разные варианты сушки: нагревание в сушильном шкафу, сушку тёплыми/холодными потоками воздуха, сушку под настольной лампой, добавление в золь летучего растворителя (этанол, 1:5 по объёму). Значительного влияния на скорость сушки опробованные способы не оказали. Кроме того, в случае нагрева зафиксировано изменение цвета подложки (посинение), что свидетельствовало об агрегации Au НЧ. После импрегнирования и сушки в отсутствие нагрева подложка окрашивалась в цвет реагента и не изменялась во времени, что указывало на потенциальную возможность ее применения для определения тиолов.

Исследовано влияние количества Au НЧ, нанесённых на подложку, на сигнал от тиола. Об эффективности сенсора с различным количеством НЧ судили по интенсивности его окраски до и после взаимодействия с глутатионом, поскольку основным тиолом кожи является именно глутатион. В качестве отклика сенсора использовали величину $\Delta(B/R)$, равную отношению интенсивностей синего (B) канала фотоизображения сенсора к красному (R) в присутствии тиола за вычетом отношения (B/R) для холостого опыта. Концентрацию НЧ в золе варьировали путем разбавления исходного золя концентрацией $1.95 \cdot 10^{13}$ нч/см³. При разбавлении золя золота до концентраций $6.50 \cdot 10^{12}$, $3.25 \cdot 10^{12}$ и $2.17 \cdot 10^{12}$ нч/см³ контрастность цветового перехода становилась низкой, что не позволило использовать систему в анализе. В качестве оптимальной выбрана концентрация исходного золя золота – $1.95 \cdot 10^{13}$ нч/см³.

Изучено влияние количества наночастиц золота, сконцентрированных на материале подложки в процессе пропитки зодем, на сигнал сенсора в присутствии глутатиона ($C=10$ мкмоль/дм³). Количество наночастиц золота варьировали путем выдержки материала подложки в золе золота (концентрация $1.95 \cdot 10^{13}$ нч/см³) в течение разных промежутков времени (Рисунок 5.7). При времени выдерживания подложки в течение 3 и 20 мин сенсор утрачивал способность реагировать с глутатионом. Оптимальное время выдерживания составило 5–15 мин.

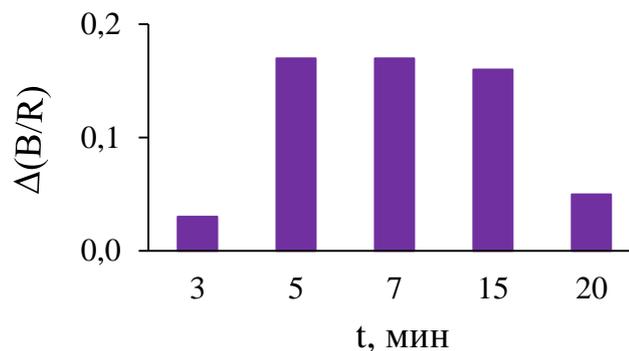


Рисунок 5.7 – Зависимость сигнала сенсора от времени выдерживания материала подложки в красном золе золота (концентрация золя золота $1.95 \cdot 10^{13}$ нч/см³, $C_{\text{глутатион}}=10$ мкмоль/дм³)

Возможность использования пропитанных золем золота фильтров для определения тиолов оценивали следующим образом. Полоски фильтра погружали в золь золота на 5–7 мин. Затем с помощью пинцета их переносили на промытую деионизованной водой плёнку ПТФЭ. Каплю водного раствора глутатиона ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³) помещали вблизи полоски таким образом, чтобы она впитала в себя каплю. В результате контакта капли с полоской наблюдали окрашивание полоски в синий цвет (Рисунок 5.8).



Рисунок 5.8 – Полоски мембранного фильтра, пропитанные золем золота, (1) после контакта с водой и (2) водным раствором глутатиона ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³)

Таким образом, микропористый материал из ацетата целлюлозы ($d_{\text{пор}}=0.45$ мкм), модифицированный Au НЧ ($d_{\text{НЧ}}=10-15$ нм), может быть использован в качестве чувствительного слоя колориметрического сенсора для определения тиолов. Дальнейшие исследования были направлены на разработку методики выполнения анализа.

5.4. Выбор рабочих условий анализа

5.4.1. Вариант использования сенсора

«Сухой вариант». Первоначально были использованы диски из ацетата целлюлозы, модифицированные реагентом и высушенные на воздухе в течение 20 мин после пропитки. При контакте с модельным раствором сигнал не наблюдали ни в первоначальный момент, ни после высыхания дисков с модельным раствором (Рисунок 5.9).

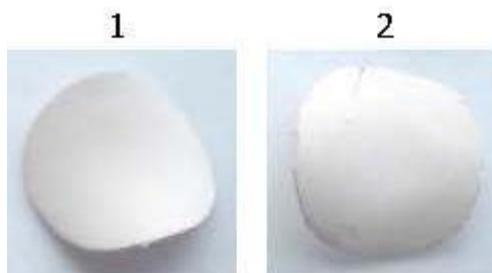


Рисунок 5.9 – Окраска чувствительного слоя сенсора («сухой вариант») после контакта с модельным раствором (концентрация глутатиона 0 (1) и 10^{-5} моль/дм³ (2))

Можно предположить, что в процессе сушки имеет место взаимодействие Au НЧ с материалом подложки, что приводит к потере их реакционной способности. Сделано заключение о том, что использование чувствительного слоя сенсора в «сухом варианте» не позволяет получить сигнал от тиолов.

«Влажный вариант». Модифицированный мембранный фильтр помещали на фильтровальную бумагу на 3-5 с для удаления излишков золя, затем переносили на ПТФЭ и сверху капали модельный раствор, содержащий 0, 10^{-5} и $2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ глутатиона. Сигнал наблюдали при использовании модельных растворов глутатиона. При увеличении концентрации глутатиона в модельном растворе сигнал усилился (Рисунок 5.10).

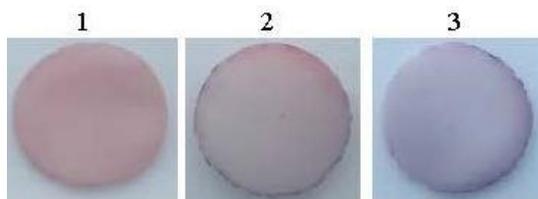


Рисунок 5.10 – Окрашивание чувствительного слоя сенсора («влажный вариант») при контакте с модельным раствором, содержащим 0 (1), 10^{-5} (2) и $2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ (3) глутатиона

Таким образом, «влажный вариант» применения чувствительного слоя сенсора позволяет идентифицировать тиолы.

5.4.2. Влияние pH

Влияние кислотности исследовали в диапазоне $\text{pH}=3.3\text{--}5.0$, что соответствует физиологическому диапазону pH кожи (4–6) [6,152]. Кислотность модельного раствора варьировали путем добавления в раствор хлороводородной кислоты. Зависимость колориметрического сигнала $\Delta(B/R)$ от pH модельного раствора представлена на Рисунке 5.11. Оптимальное значение pH составило 3.4, что согласуется с литературными данными [160,191]. Также обнаружено, что отклик системы появляется быстрее в более кислых модельных растворах.

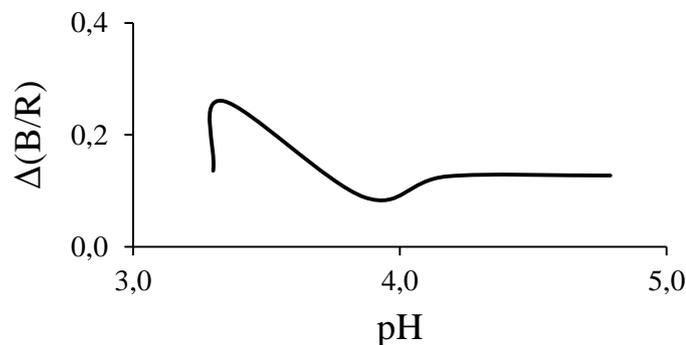


Рисунок 5.11 – Влияние pH модельного раствора на сигнал сенсора (содержание глутатиона – 10^{-5} моль/дм³)

5.4.3. Время отклика сенсора

На Рисунке 5.12 представлена временная зависимость отклика колориметрического сенсора. Эксперимент проведен в модельных условиях (модельный раствор, содержащий 10 мкмоль/дм^3 глутатиона, помещали на пленку ПТФЭ). Изменение цвета сенсора фиксировали при комнатной температуре, с помощью цифровой фотокамеры. Отклик сенсора появлялся через 20 мин после начала взаимодействия с модельным раствором. Он достигал максимальной величины через 40–45 мин. После высыхания сенсора интенсивность сигнала снижалась.

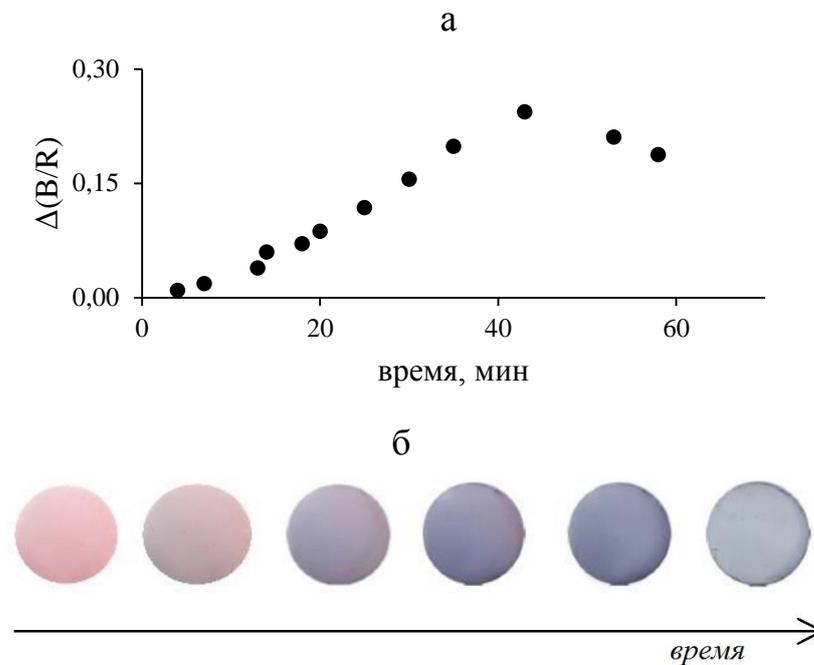


Рисунок 5.12 - Влияние времени контакта сенсора с модельным раствором (содержание глутатиона – 10^{-5} моль/дм³) на интенсивность сигнала $\Delta(V/R)$ (а) и фотоизображения колориметрического сенсора (б)

На Рисунке 5.13 представлена временная зависимость отклика колориметрического сенсора, полученная при температуре, близкой к температуре поверхности кожи. Отклик сенсора при помещении его на пленку ПТФЭ, находящуюся на коже, наступал быстрее. Максимум отклика наблюдали через 30 мин от начала взаимодействия. Время фиксации отклика сенсора на коже выбрано экспериментально. Отклик наблюдали через 8–9 мин после начала взаимодействия сенсора с кожей.

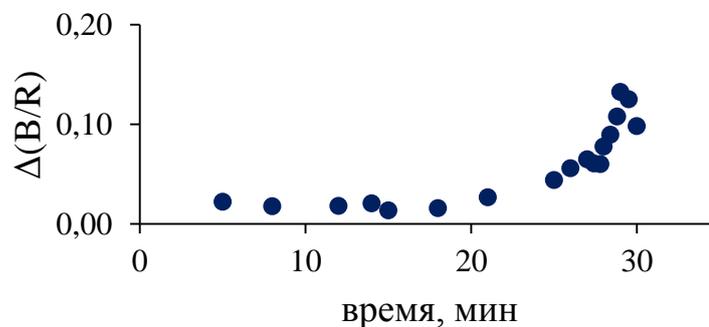


Рисунок 5.13 – Зависимость времени контакта сенсора с модельным раствором от интенсивности сигнала $\Delta(V/R)$ при температуре, близкой поверхности кожи ($C_{\text{глутатиона}}=8$ мкмоль/дм³)

5.5. Исследование мешающего влияния

Мешающее влияние компонентов ГЛМ кожи (аминокислот и продуктов азотистого обмена) оценивали путем сравнения окраски сенсора до и после внесения в модельный раствор каждого мешающего компонента в отдельности. Концентрацию мешающих компонентов в модельном растворе рассчитывали, исходя из литературных данных [181,182]. Полученный результат представлен на Рисунке 5.14. Установлено отсутствие значительного влияния на интенсивность окраски сенсора серина, аланина, гистидина, треонина, креатинина, мочевины и аммиака (концентрация 10^{-3} моль/дм³); глицина, пролина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, аспарагина (концентрация 10^{-4} моль/дм³); и валина, триптофана, тирозина и мочевой кислоты (концентрация $5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³).

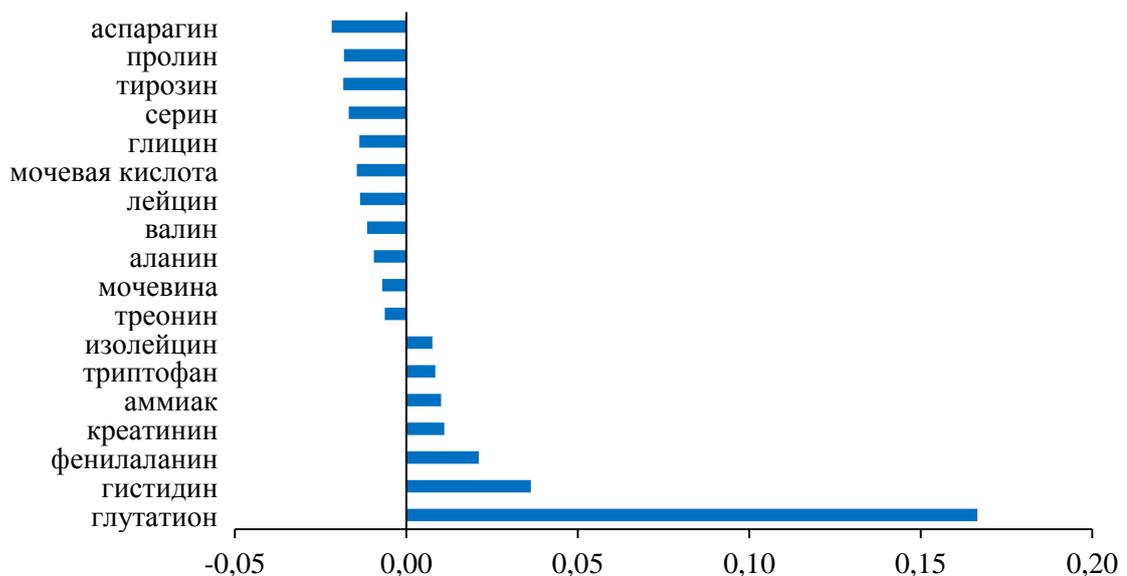


Рисунок 5.14 - Отклик сенсора ($\Delta(V/R)$) после контакта с модельным раствором, содержащим по отдельности каждый из вышеперечисленных мешающих компонентов, входящих в состав ГЛМ кожи

Таким образом, использование сенсора с чувствительным слоем («влажный вариант») позволяет определять содержание тиолов на уровне физиологических концентраций. Поскольку кислая среда способствует агрегации Au НЧ под действием глутатиона, при анализе реального объекта – кожи – желательно использовать контактный раствор, подкисленный до pH ~ 3.4.

5.6. Выбор способов регистрации и обработки отклика сенсора

5.6.1. Выбор устройства для регистрации сигнала

При использовании метода колориметрии в литературе описано применение различных устройств для фиксации отклика чувствительного слоя сенсоров – сканер [192], калибратор мониторов [193], фотоаппарат [194], портативный анализатор цвета [106].

Для фиксации сигнала нами были использованы следующие приборы:

- Фотоаппарат Canon, 15-18 МП, CMOS-датчик. Достоинства: возможность ручной настройки параметров съёмки, качественная светочувствительная матрица. Недостатки: отсутствие приближения к объекту менее, чем на 25 см (поэтому получаются очень мелкие снимки, их сложно обрабатывать), дополнительные аксессуары для макросъёмки дорогостоящие.

- Цифровой фотоаппарат Olympus FE-340, 8 МП. Достоинства: есть режим макросъёмки (расстояние до объекта около 5 см), возможность ручной настройки параметров съёмки, экономичная цена. Недостатки: менее светочувствительная матрица, чем у фотоаппарата Canon 15-18 МП, что ухудшает качество распознавания цветовых оттенков на фотоизображении.

- Камера сотового телефона LG G3S. Достоинства: возможность макросъёмки, разрешение 8 МП, BSI с лазерным автофокусом. Недостатки: автоматическая настройка всех параметров съёмки, поэтому при изменении условий (освещение и проч.) невозможно контролировать параметры съёмки, а сравнивать фотографии, снятые в разных условиях, нецелесообразно.

- Веб-камеры (Web-Camera Canyon CNR-WCAM 813, 1,3 МП, встроенный CMOS-сенсор; HD Webcam C 615, 2 МП, с корректировкой освещения). Достоинства: возможность видеосъёмки в режиме реального времени. Недостатки: сложность математической обработки видеоизображений (выделения нужного объекта из фона и оценки изменения его цвета), низкое разрешение камеры, отсутствие возможности настройки (и контроля) параметров съёмки.

- Оптический микроскоп в комбинации с веб-камерой. Веб-камеру присоединяли к объективу оптического микроскопа (работающего на просвет), при этом использовали освещение лампой накаливания 60 Вт. Увеличение изображения оказалось значительным, но при работе на просвет изменение цвета практически не различимо.

- Портативный спектрофотометр ColorMunki Design/Photo (X-Rite, США). Достоинства: подходящая апертура - около 8 мм (диаметр), удобная подставка к образцу. Недостатки: прибор не внесен в Государственный реестр средств измерений, фиксированный тип осветителя (D50) и геометрии съёмки (ось освещающего светового потока располагается под углом $0\pm 10^\circ$ относительно нормали к поверхности образца, а наблюдение выполняется под углом $45\pm 2^\circ$ относительно той же нормали, углы раскрытия освещающего и наблюдаемого световых пучков не должны превышать 8°); недостаточная чувствительность.

- Портативный спектрофотометр (3NH, Китай). Достоинства: возможность представления информации в нескольких цветовых координатах (RGB, XYZ, LAB и ряд др.), возможность выбора источника освещения, апертуры (4 и 8 мм), способа расчета координат цвета, одновременная фиксация результата и обработка изображения, экспрессность. Недостатки: громоздкая конструкция для образцов малого размера, не предусмотрена работа с сырой поверхностью, высокая стоимость прибора, производитель подробно не поясняет, каким образом происходит расчёт цвета неоднородно окрашенной поверхности.

В результате проведённых испытаний перечисленных приборов и, исходя из критериев качества и оперативности снимаемой информации, удобства использования, ценовой доступности, для дальнейших исследований выбран цифровой фотоаппарат Olympus FE-340.

5.6.2. Выбор условий регистрации сигнала

Цвет – свойство тела вызывать определённое зрительное ощущение в соответствии со спектральным составом отражаемого или испускаемого излучения [195]. Таким образом, на параметры отклика сенсора может оказывать

влияние используемый осветитель. Исследована возможность использования следующих типов осветителей при фиксации сигнала:

- энергосберегающая лампа 20 Вт (4200 К);
- прожектор 150 Вт (2800-3000 К);
- лампа 12 Вт (2200 К);
- лампы дневного света (6500 К);
- лампа накаливания 60 Вт (2680 К);
- дневной солнечный свет (6500-7500 К);
- фотовспышка фотоаппарата Olympus FE-340 (5500-5600 К).

Первые пять из перечисленных источников располагали под навесом из белой хлопчатобумажной ткани. Сигнал фиксировали фотоаппаратом Olympus FE-340. В результате в качестве рабочих были выбраны следующие условия фиксации сигнала: естественное освещение, съёмка на окне; геометрия съёмки – угловая.

5.6.3. Выбор способа обработки отклика сенсора

Существуют широкие возможности для автоматизированной оценки индикационного эффекта реакции чувствительного слоя сенсора как по характеристикам цветности, так и по общей оценке цифрового изображения: отражающей способности или светлоте. В литературе описан способ обработки изображений с помощью программы Adobe Photoshop 6.0 [192], при этом необходимую часть изображения усредняли до 1 пикселя и оценивали его цветность в стандартных единицах цветности RGB. Нами были использованы следующие способы обработки сигнала:

- с помощью графического редактора PainDotNet, при этом рассчитывали усредненное значение каждой координаты цвета для необходимой части фотоизображения (в пространстве RGB);

- с помощью созданной специальной программы обработки изображения.

Обработка сигнала с использованием первого способа крайне субъективна и трудоёмка. Создана специальная программа автоматической обработки

изображений, в которой оценивали цветовые координаты каждого пикселя изображения с последующим вычислением среднего значения цветности образца в координатах RGB. Выбор цветового пространства RGB обусловлен тем, что информация от светочувствительной матрицы цифрового фотоаппарата передается в формате RGB (или соответствует стандарту RGB) и представляет собой 4 байтовое поле (32 бита), состоящее из полей по 8 бит для каждого канала цвета (red, green, blue — красный, зелёный, синий). Созданная программа извлекает из 4-го байтового поля значение цвета соответствующего канала в виде целого числа со значением от 0 до 255. Форматы представления цвета HSV, Lab получали из формата RGB с использованием известных уравнений преобразования [195]. Достоинства созданной программы заключаются в ее узкой специализации и компактности (нет “лишних” функций), возможности внедрения программы в портативное устройство в будущем. При использовании рабочего варианта созданной программы требовалось предварительное отделение анализируемого изображения от фона фотографии. Эта процедура выполнялась с использованием программы PainDotNet.

5.7. Аналитические характеристики сенсора

Для того чтобы определить аналитические характеристики сенсора, проведены эксперименты на пленке ПТФЭ, инертной по отношению к компонентам модельного раствора и золю золота. Рисунок 5.15 демонстрирует, что зависимость сигнала сенсора в единицах $\Delta(B/R)$ от концентрации глутатиона линейна, $R^2=0.9629$ ($r=0.9813$). Таким образом, фиксируемый сигнал может быть использован в качестве аналитического.

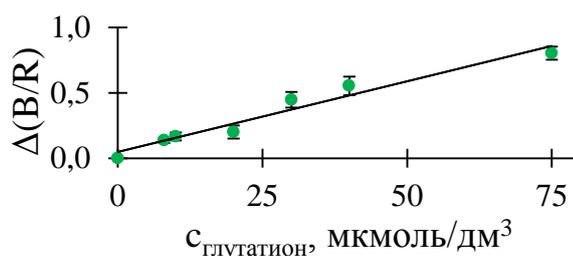


Рисунок 5.15 – Зависимость аналитического сигнала $\Delta(B/R)$ от концентрации глутатиона в модельном растворе

Результаты проверки правильности определения глутатиона в модельных растворах с помощью разработанного сенсора представлены в таблице 5.1. Меру правильности (R) определения добавки глутатиона оценивали как отношение найденной концентрации добавки ко введенной. Относительное стандартное отклонение результатов определения 10 мкмоль/дм³ глутатиона в течение дня не превышало 0.09, в разные дни составило не более 0.12. Рассчитанный предел обнаружения составил 6.9 мкмоль/дм³ глутатиона.

Таблица 5.1 – Результаты оценки правильности определения глутатиона в модельном растворе с использованием колориметрического сенсора (n=5, P=0.95)

Введено глутатиона, мкмоль/дм ³	Найдено глутатиона, мкмоль/дм ³	R, %	S _r
8	9±1	118	0.10
10	11±1	111	0.09
25	31±7	124	0.12
50	47±5	94	0.11

5.8. Анализ кожи респондентов

С помощью разработанного колориметрического сенсора исследована кожа группы условно здоровых респондентов (n=12, возраст 21-65 лет, мужчины и женщины). Содержание тиолов в коже исследованной группы людей составило 11.6–47.5 мкмоль/дм³. Полученный результат согласуется с литературными данными о содержании тиолов в коже условно здоровых людей, которое определяли в гомогенатах эпидермиса спектрофотометрическим методом (пересчитанная величина C_{ср}(глутатион)=5.6·10⁻⁵ моль/дм³ [36]).

Подход с использованием разработанного колориметрического сенсора является новым, впервые реализующим неинвазивное определение тиолов в коже человека, что следует из анализа литературных данных. Поэтому не существует необходимых данных, которые позволили бы сравнить разработанный подход с другими. В связи с этим правильность результатов определения тиолов в коже человека с помощью разработанного сенсора была оценена методом “введено –

найденно”. Добавки глутатиона вносили в контактный раствор, наносимый на кожу респондентов. Результаты оценки правильности определения тиолов в коже человека с помощью колориметрического сенсора представлены в таблице 5.2. Мера правильности результатов определения добавки глутатиона в экспериментах на коже респондентов составила (90–112) % (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Результаты оценки правильности определения тиолов в коже человека с помощью колориметрического сенсора (n=5, P=0.95)

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

Таким образом, разработан колориметрический сенсор для неинвазивного определения тиолов кожи человека. В роли материала-основы чувствительного слоя сенсора выступил пористый материал на основе ацетата целлюлозы (диаметр пор 0.45 мкм). В качестве реагента чувствительного слоя выбраны НЧ золота, покрытые цитратной оболочкой, сферической формы диаметром 10-15 нм. Аналитическим сигналом служило изменение цвета чувствительного слоя сенсора в результате агрегации НЧ под действием тиолов. Поскольку глутатион является основным тиолом кожи человека, Диапазон линейности составил 8.0 – 75 мкмоль/дм³ глутатиона, предел обнаружения – 6.9 мкмоль/дм³. Найденное содержание тиолов в коже человека согласуется с известным физиологическим содержанием, определяемым инвазивно. Получена информация об агрегативной устойчивости НЧ в присутствии аминокислот, хлорида натрия, глутатиона и продуктов азотистого обмена, которые экстрагируются из кожи.

Новизна предложенного подхода заключается в разработке чувствительного колориметрического сенсора на основе Au НЧ, позволяющего неинвазивно определять тиолы в коже человека. Подобный колориметрический сенсор, в основе работы которого заложены наноэффекты, ранее еще не описан в литературе. Более того, разработка сенсоров для исследования кожи является

актуальной и перспективной задачей. Любой результат в этом направлении будет добавлять новые знания и пользу для потенциального применения.

Такие параметры, как чувствительность, экспрессность, возможность использования в полевых условиях позволяет рассматривать предложенный подход как перспективную стратегию мониторинга содержания тиолов в коже. Это даст возможность получать весьма ценную дополнительную информацию для оценки окислительного стресса и выбора адекватной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

3. Разработан потенциометрический сенсор для неинвазивного определения АОА кожи человека. Чувствительный слой сенсора состоит из ацетатцеллюлозного материала, пропитанного раствором гексацианоферрата (III) калия. Разработана методика определения АОА кожи человека с помощью потенциометрического сенсора, преимущества которой заключаются в сокращении процедуры анализа и ее упрощении, увеличении устойчивости системы при хранении (в 7 раз), лучшей воспроизводимости результатов анализа кожи (в течение дня $S_r \leq 0.08$, в разные дни $S_r \leq 0.13$). Диапазон определяемых величин – 20-4000 мкмоль-экв/дм³. Мера правильности определения АОА кожи, оцененная методом добавок, составила (83–110) %.

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

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

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

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

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

Список сокращений и условных обозначений

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry;

АО – антиоксиданты;

АОА – антиоксидантная активность;

АФК – активные формы кислорода;

АЦ – ацетатцеллюлозный мембранный материал;

ГЛМ – гидролипидная мантия;

ДОВ – диапазон определяемых величин;

КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез;

НЧ – наночастицы;

ОВР – окислительно–восстановительная реакция;

ОА – оксиданты;

ОС – окислительный стресс;

ПВХ/ПВС –

ПрО – предел обнаружения;

ПТФЭ – политетрафторэтилен;

СФ – спектрофотометрия;

УФ – ультрафиолетовый;

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;

ЭФГ – электроферограмма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенков, Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М.: МАИК “Наука/Интерпериодика”, 2001. – 343 с.
2. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев [и др.] // Итоги науки и техники. Серия Биофизика. – 1991. – Т. 29. – С. 1–249.
3. Richards, D.M.C. Membrane proteins are critical targets in free radical mediated cytolysis / D.M.C. Richards, R.T. Dean, W. Jessup // *Biochimica et biophysica acta*. – 1988. – V. 946. – P. 281–288.
4. Drapier, J.C. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells / J.C. Drapier, J.B. Hibbs // *The Journal of Immunology* – 1988. – V. 140. – P. 2829–2838.
5. Hoffmann, M.E. Correlation between cytotoxic effect of hydrogen peroxide and the yield of DNA strand breaks in cells of different species / M.E. Hoffmann, A.C. Mello-Filho, R. Meneghini // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1984. – V. 781. – P. 234–238.
6. Barel, A.O. Handbook of Cosmetic Science and Technology / A.O. Barel, M. Paye, H.I. Maybatch. – N.Y.: Informa Healthcare USA, Inc., 2009. – 869 p.
7. Gutteridge, J.M.C. Signal, messenger and trigger molecules from free radical reactions and their control by antioxidants. In: Packer L., Wirtz K.W.A. (eds) Signalling mechanisms – from transcription factors to oxidative stress / J.M.C. Gutteridge, NATO ASI Series (Series H: Cell Biology). – Berlin, Heidelberg: Springer, 1995. – V. 92. – P. 157–164.
8. Попов, И.Н. Антиокислительный гомеостаз организма человека: методы изучения, критерии оценки (обзор литературы) / И.Н. Попов, Г. Левин, А.К. Аносов, А.А. Маркин, Б.В. Моруков // *Вестник РГМУ*. – 2013. – №2. – С. 69–74.

9. Kilinc, F. Oxidative stress parameters in localized scleroderma patients / F. Kilinc, S. Sener, A. Akbas, A. Metin, S. Kirbas, S. Neselioglu, O. Erel // *Archives of Dermatological Research*. – 2016. – V.308. – P. 625–629.
10. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
11. Frijhoff, J. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress / J. Frijhoff, P.G. Winyard, N. Zarcovic [et al.] // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2015. – V. 23. – № 14. – P. 1144–1170.
12. Adams, J.D.J. Plasma glutathione disulfide as an index of oxidant stress in vivo: Effect of carbon tetrachloride, dimethylnitrosamine, nitrofurantoin, metronidazole, doxorubicin and diquat / J.D.J. Adams, B.H. Lauterburg, J.R. Mitchel // *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. – 1984. – V. 46. – P. 401–410.
13. Siems, W. Changes in the glutathione system of erythrocytes due to enhanced formation of oxygen free radicals during short-term whole body cold stimulus / W. Siems, R. Brenke // *Arctic medical research* – 1992. – V. 51. – P. 3–9.
14. Niki, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo / E. Niki // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2010. – V. 49. – № 4. – P. 503–515.
15. Alam, M.N. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity / M. N. Alam, N.J. Bristi, M. Rafiquzzaman // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2013. – V. 21. – № 2. – P. 143–152.
16. Zhang, Y. Oxidative stress and antioxidant status in a lizard *Phrynocephalus vlangalii* at different altitudes or acclimated to hypoxia / Y. Zhang, S. Liang, J. He, Y. Bai, Y. Niu, X. Tang, D. Li, Q. Chen // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. – 2015. – V. 190. – P. 9–14.
17. Fraga, C.G. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity / C.G. Fraga, P.I. Oteiza, M. Galleano // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – V. 1840. – № 2. – P. 931–934.
18. Kohen, R. Low molecular weight antioxidants released from the skin's epidermal layers: An age dependent phenomenon in the rat / R. Kohen, M. Oron, A. Zelkowicz, E.

- Kanevsky, S. Farfour, U. Wormser // *Experimental Gerontology*. – 2004. – V. 39. – № 1. – P. 67–72.
19. Beljakova, N.A. Antioxidant activity of human biological fluids: methodology and clinical value / N.A. Beljakova, S. G. Semesko // *Efferent Therapy*. – 2005. – V. 11. – P. 5–21.
20. Haag, S.F. Determination of the antioxidative capacity of the skin in vivo using resonance Raman and electron paramagnetic resonance spectroscopy / S.F. Haag, B. Taskoparan, M.E. Darvin, N. Groth, J. Lademann, W. Sterry, M.C. Meinke // *Experimental Dermatology*. – 2011. – V. 20. – P. 483–487.
21. Gupta, D. Methods for determination of antioxidant capacity: A review / D. Gupta // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2015. – V. 6. – P. 546–566.
22. Pisoschi, A.M. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review / A.M. Pisoschi, A. Pop // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – V. 97. – P. 55–74.
23. Fuchs, J. *Oxidative Injury in Dermatopathology*. –Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag GMBN, 1992. – 360 p.
24. Riad, H.M.A. The role of antioxidants in dermatology / H.M.A. Riad // *The Gulf Journal of Dermatology*. – 2001. – V. 8. – № 2. – P. 1–14.
25. Brainina, K.Z. Noninvasive Method Of Determining Skin Antioxidant/Oxidant Activity: Clinical And Cosmetics Applications / K.Z. Brainina, E.L. Gerasimova, D.P. Varzakova, Y.E. Kazakov, L.G. Galperin // *Analytical And Bioanalytical Electrochemistry*. – 2013. – №5. – С. 528–542.
26. Моренкова, С.А. Флуорометрический метод определения SH-групп кератина эпидермиса человека / С.А. Моренкова, Л.Г. Наглер // *Биомедицинская химия*. – 2005. – Т. 51. – № 2. – С. 220–223.
27. Portugal-Cohen, M. Non-invasive evaluation of skin cytokines secretion: An innovative complementary method for monitoring skin disorders / M. Portugal-Cohen, R. Kohen // *Methods*. – 2013. – V. 61. – P. 63–68.
28. Иванов, О.Л. *Кожные и венерические болезни* – М.: Шико, 2006. – 480 с.

29. Oxidants and antioxidants in cutaneous biology / J.J. Thiele, P. Elsner // *Current Problem in Dermatology*/ Ed. G. Burg. – Basel, Switzerland: Karger, 2001. – V. 29. – 193 p.
30. Биохимия: учебник для вузов/ под ред. Е.С.Северина, 5-е изд., 2009. – 768 с.
31. Kohen, R. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification / R. Kohen, A. Nyska // *Toxicologic Pathology*. – 2002. – V. 30. – № 6. – P. 620–650.
32. Yen, K.S. Alpha-tocopherol, an inhibitor of epidermal lipid peroxidation, prevents ultraviolet radiation from suppressing the skin immune system / K.S. Yen, G.M. Halliday // *Photochemistry and Photobiology*. – 1997. – V. 65. – № 3. – P. 587–592.
33. Vahlquist, A. Vitamin A in human skin: II concentrations of carotene, retinol and dehydroretinol in various components of normal skin / A. Vahlquist, J.B. Lee, G. Michaelsson, O. Rollman // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1982. – V. 79. – P. 94–97.
34. Rhie, G. Aging– and photoaging–dependent changes of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo / G. Rhie, M.H. Shin, J.Y. Seo [et. al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2001. – V. 117. – № 5. – P. 1212–1217.
35. Kaur, S. Patients with allergic and irritant contact dermatitis are characterized by striking change of iron and oxidized glutathione status in nonlesional area of the skin / S. Kaur, S.M. Zilmer, M. Eisen [et. al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2001. – V. 116. – № 6. – P. 886–890.
36. Shindo, Y. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin / Y. Shindo, E. Witt, D. Han, W. Epstein, L. Packer // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1994. – V. 102. – P. 122–124.
37. Hennekens, C.H. Vitamin A, carotenoids and retinoids / C.H. Hennekens, S.L. Mayrent, W. Willent // *Cancer*. – 1986. – V. 58. – № 8. – P. 1837–1841.

38. Diaconu, R. E. Analysis of oxidative stress in sun-exposed and unexposed skin / R.E. Diaconu, A. E. Macarie, R. Orasan // *Human and Veterinary Medicine Bioflux.* – 2014. – V. 6. – P. 153–157.
39. Sander, C.S. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer / C.S. Sander, F. Hamm, P. Elsner, J.J. Thiele // *British Journal of Dermatology.* – 2003. – V. 148. – P. 913–922.
40. Fuchs, J. Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2,2,5,5-tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl (tempo) redox reactions in human skin / J. Fuchs, N. Groth, T. Herrling, G. Zimmer // *Free Radical Biology and Medicine.* – 1997. – V. 22. – P. 967–976.
41. Ermakov, I.V. Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissues / I.V. Ermakov, M.R. Ermakova, R.W. McClane, W. Gellermann // *Optics Letters.* – 2001. – V. 26. – P. 1179–1181.
42. Darvin, M.E. Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin / M.E. Darvin, M. C. Meinke, W. Sterry, J. Lademan // *Journal of Biomedical Optics.* – 2013. – V. 18. – P. 061230 1 – 061230 9.
43. Pat. 2008/0294026 A1 US, Int. Cl A61B 5/04, US. Cl. 600/345. Electrochemical device and method for measuring the redox state of the skin / S. Arbault, C. Cecile, C. Amatore, N. Lachmann-Weber, C. Heusele, I. Renimel. № 12/159,051, appl. 22.12.2006; pub. 27.11.2008. – 6 p.
44. Pat. 6108570A US, Int. Cl A61B 5/05, US. Cl. 600/345; 600/354. Non-invasive device and method for quantitative determination of oxidants and/or antioxidants in the skin / Kohen R., Fanberstein D., Tirosh O. № 08/817,222, appl. 10.10.1995; pub. 22.08.2000. – 8 p.
45. Brainina, K.Z. Noninvasive Potentiometric Method of Determination of Skin Oxidant/Antioxidant Activity / K.Z. Brainina, L.G. Galperin, E.L. Gerasimova, M.Ya. Khodos // *IEEE Sensors Journal.* – 2012. – V. 12. – № 3. – P. 527–532.
46. Ivanova, A.V. Potentiometric determination of water-soluble antioxidants using metal complexes / A.V. Ivanova, E.L. Gerasimova, I.A. Kravets, A.I. Matern // *Journal of Analytical Chemistry.* – 2015. – V. 70. – № 2. – P. 173–177.

47. Пат. 2532406 RU, МПК G01N27/26. Способ потенциометрического определения антиоксидантной/оксидантной активности с использованием комплексов металлов / А.В. Иванова, Е.Л. Герасимова, И.А. Кравец, А.И. Матерн, № 2013113028/15; заявл. 22.03.2013; опубл. 10.11.2014. – 12 с.
48. Portugal-Cohen, M. Non-invasive skin biomarkers quantification of psoriasis and atopic dermatitis: Cytokines, antioxidants and psoriatic skin auto-fluorescence / M. Portugal-Cohen, L. Horev, C. Ruffer, G. Schlippe, W. Voss, Z. Ma'or, M. Oron, Y. Soroka, M. Frusic-Zlotkin, Y. Milner, R. Kohen // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2012. – V. 66. – P. 293–299.
49. Ghezzi, P. Thiol–Disulfide Balance: From the Concept of Oxidative Stress to that of Redox Regulation / P. Ghezzi, V. Bonetto, M. Fratelli // *Antioxidants and Redox Signaling* – 2005. – V. 7. – № 7,8. – P. 964–972.
50. Vural, G. Impairment of dynamic thiol–disulphide homeostasis in patients with idiopathic Parkinson's disease and its relationship with clinical stage of disease / G. Vural, S. Gumusyayla, H. Bektas, O. Deniz, M. Alisik, O. Erel // *Clinical Neurology and Neurosurgery*. – 2017. – V. 153. – P. 50–55.
51. Dinc, M.E. Thiol/Disulfide Homeostasis As a Novel Indicator of Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea Patients / M.E. Dinc, C. Ozdemir, N.N. Ayan, N. Bozan, S. Ulusoy, C. Koca, O. Erel // *Laryngoscope*. – 2017. – V. 127. – № - 7. – P. E244–E250.
52. Korkmaz, V. Thiol/disulfide homeostasis in postmenopausal osteoporosis / V. Korkmaz, Z. Kurdoglu, M. Alisik, E. Turgut, O.O. Sezgin, H. Korkmaz, Y. Ergun, O. Erel // *Journal of endocrinological investigation*. – 2017. – V. 40. – № 4. – P. 431–435.
53. Jones, D.P. Redox state of glutathione in human plasma / D.P. Jones, J.L. Carlson, V.C. Mody, J. Cai, M.J. Lynn, P. Sternberg // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2000. – V. 28. – № 4. – P. 625–635.
54. Erel, O. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis / O. Erel, S. Neselioglu // *Clinical Biochemistry*. – 2014. – V. 47. – P. 326–332.
55. Vural, G. Dynamic thiol-disulphide homeostasis in patients with multiple sclerosis / G. Vural, S. Gumusyayla, H. Bektas, O. Deniz, M. Ergin, O. Erel // *World Journal of Neuroscience*. – 2016. – V. 6. – P. 214–219.

56. Blanco, R.A. Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasma / R.A. Blanco, T.R. Ziegler, B.A. Carlson, P.-Y. Cheng, Y. Park, G.A. Cotsonis, C.J. Accardi, D.P. Jone // *The American Journal of Clinical Nutrition* – 2007. – V. 86. – P. 1016–1023.
57. Hansen, R.E. Quantifying the global cellular thiol– disulfide status / R.E. Hansen, D. Roth, J.R. Winther // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – V. 106. – № 2. – P. 422–427.
58. Zakharchuk, N.F. Determination of thiols and disulfides in whole blood and its fractions by anodic stripping voltammetry and anodic stripping voltammetric titration / N.F. Zakharchuk, N.S. Borisova, E. Guselnikova, Kh.Z. Brainina // *Electroanalysis*. – 2006. – V. 18. – № 23. – P. 2343–2353.
59. Золотов, Ю.А. Химические тест-методы анализа / Ю.А. Золотов, В.М. Иванов, В.Г. Амелин. – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 304 с.
60. Золотов, Ю.А. Что есть что. О неустоявшихся дефинициях / Ю.А. Золотов // *Журнал аналитической химии*. – 2005. – Т. 60, № 10. – С. 1013–1014.
61. EMD Millipore Reflectoquant™ Ascorbic Acid Test Strips [Электронный ресурс] // Thermo Fisher Scientific Inc. [Official website]. – 2015. – Режим доступа: <https://www.fishersci.com/shop/products/emd-millipore-mquant-ascorbic-acid-test-strips/m1100230001>.
62. Steinberg, I.M. Chromogenic radical based optical sensor membrane for screening of antioxidant activity / I.M. Steinberg, S. Milardovic // *Talanta*. – 2007. – V. 71. – P. 1782–1787.
63. Lee, P.M. Colored thin film for screening and evaluation of antioxidants / P.M. Lee, M.S.M. Arsad, A.C. Yussoff, L.K. Hung // *International Conference on Science and Social Research*. – Kuala Lumpur, Malaysia. – 2010. – P. 717–720.
64. Логинова, Л.П. Метрологические характеристики обнаружения восстановителей с реагентами, иммобилизованными в желатиновой плёнке / Л.П. Логинова, О.Ю. Коновалова // *Вестник Харьковского национального университета. Выпуск Химия*. – 2007. – Т. 15(38). – № 770. – С. 90–98.

65. Темердашев, З.А. Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe(III)/Fe(II) – органический реагент / З.А. Темердашев, Н.В. Храпко, Т.Г. Цюпко, О.Б. Воронова, А.Н. Балаба // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2006. – Т. 72. – № 11. – С. 15–19.
66. Пат. 2282851 RU, МПК G01N 33/02. Способ определения суммарной антиоксидантной активности / Цюпко Т.Г., Темердашев З.Ф., Воронова О.Б., Храпко Н.В. // № 2004138188/13; заявл. 27.12.2004; опубл. 27.08.2006. – 9 с.
67. Newcombe, D.T. An optical redox chemical sensor based on ferriin immobilized in a Nafion membrane / D.T. Newcombe, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, S.D. Kolev // *Analytica Chimica Acta*. – 1999. – V. 401. – P. 137–144.
68. Newcombe, D.T. An optical membrane redox chemical sensor for the determination of ascorbic acid / D.T. Newcombe, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, S.D. Kolev // *Laboratory Robotics and Automation*. – 2000. – V. 12. – № 4. – P. 200–204.
69. Пат. 2391660 RU, МПК G01N 33/00, G01N 31/22. Способ определения интегральной антиоксидантной активности с использованием полиметакрилатной матрицы / Гавриленко Н.А., Саранчина Н.В. // № 2009112919/04; заявл. 06.04.2009; опубл. 10.06.2010. – 8 с.
70. Kampfengel, K. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue / K. Kampfengel, M.V. Montagu, D. Inze // *Analytical Biochemistry*. – 1995. – V. 225. – P. 165–167.
71. Gavrilenko, N.A. An optical sensor for the determination of ascorbic acid / N.A. Gavrilenko, G.M. Mokrousov, O.V. Dzhiganskaya // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2004. – V. 59. – № 9. – P. 871–874.
72. Atanasova, B.D. Extraction and spectrophotometric analysis of ascorbic and dehydroascorbic acids in mouse and human intestine / B.D. Atanasova, R.J. Simpson, I.S. Mudway, A.C.Y. Li, K.N. Tzatchev, T.J. Peters // *Bulgarian Chemical Communications*. – 2003. – V. 35. – № 3. – P. 167–173.

73. Arya, S.P. Spectrophotometric determination of vitamin C with iron(II) -4-(2-pyridilazo)resorcinol complex /S.P. Arya, M. Mahajan, P. Jain // *Analytica Chimica Acta*. – 2001. – V. 427. – P. 245–251.
74. Zaporozhets, O.A. Solid-phase Reagent for analgin and ascorbic acid on the basis of a copper (II) complex with tetrabenzotetraazacyclohexadecine immobilized by adsorption on silica gel / O.A. Zaporozhets, O.A. Krushynska, N.A. Lipovska, V.V. Sukhan // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2001. – V. 56. – №. 6. – P. 524–529.
75. Zaporozhets, O.A. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products / O.A. Zaporozhets, O.A. Krushynska, N.A. Lipovska, V.N. Barvinchenko // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – V. 52. – P. 21–25.
76. Bener, M. Novel optical fiber reflectometric CUPRAC sensor for total antioxidant capacity measurement of food extracts and biological samples / M. Bener, M. Ozyurek, K. Guclu, R. Apak // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – V. 61(35). – P. 8381–8388.
77. Tutem, E. Spectrophotometric determination of vitamin E using copper (II)-neocuproine reagent / E. Tutem, R. Apark // *Talanta*. – 1997. – V. 44. – №. 2. – P. 249–255.
78. Tufan, A.N. Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method / A.N. Tufan, S.E. Celik, M. Ozyurec, K. Guclu, R. Apak // *Talanta*. – 2013. – V. 108. – P. 136–142.
79. Суханов, А.В. Химико-аналитические свойства хинониминных индикаторов, иммобилизованных в полиметакрилатную матрицу: автореф. дис. на соискание уч. степ. канд. хим. наук: 02.00.02 / Суханов Алексей Викторович. – Томск, 2011. – 20 с.
80. Morosanova, E.I. Test determination of reducing agents using noncovalently immobilized quinonimine indicators / E.I. Morosanova, D.Yu. Marchenko, Yu.A. Zolotov // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2000. – V. 55 – № 1. – P. 76–81.

81. Marchenko, D.Yu. Indicator tubes for the determination of reducing agents in solutions / D.Yu. Marchenko, E.I. Morosanova, N.M. Kuz'min, Yu.A. Zolotov // *Journal of Analytical Chemistry*. – 1997. – V. 52. – № 12. – P. 1162–1166.
82. Ozyurt, D. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrofluorometric method based on Ce(IV) reduction: Ce(III) fluorescence probe for CERAC assay / D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apak // *Journal of fluorescence*. – 2011. – V. 21. – № 6. – P. 2069–2076.
83. Ozyurt, D. Modified cerium (IV)-based antioxidant capacity assay with selectivity over citric acid and simple sugars / D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apark // *Journal of food composition and analysis*. – 2010. – V. 23. – P. 282–288.
84. Ozyurt, D. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce (IV) reducing capacity measurement / D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apark // *Talanta*. – 2007. – V. 71. – P. 1155–1165.
85. Olgun, F.A.O. Folin–Ciocalteu spectrophotometric assay of ascorbic acid in pharmaceutical tablets and orange juice with pH adjustment and pre-extraction of lanthanum(III)–flavonoid complexes / F. A. O. Olgun, D. Ozyurt, K. I. Berker, B. Demirata, R. Apak // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2014 – V. 94. – № 12. – P. 2401–2408.
86. Nagaraja, P. Quantification of antioxidants in medicinal plants and foodstuffs using Ce(IV) with indigo carmine as chromogenic probe / P. Nagaraja, A. Suma, N. Aradhana, A. Shivakumar, K. Avinash, H.Krishna // *Food Analytical Methods*. – 2012. – V. 5. – P. 909–919.
87. Dmitrienko, S.G. Sorption-photometric determination of ascorbic acid using molybdosilicic heteropolyacid and polyurethane foam after microwave irradiation / S.G. Dmitrienko, L.V. Goncharova, A.V. Zhigulev, R.E. Nosov, N.M. Kuzmin, Yu.A. Zolotov // *Analytica Chimica Acta*. – 1998. – V. 373. – P. 131–138.
88. Ainsworth, E.A. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent / E.A. Ainsworth, K.M. Gillespie // *Nature protocols*. – 2007. – V. 2. – № 4. – P. 875–877.

89. Stratil, P. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods / P. Stratil, B. Klejdus, V. Kuban // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – V. 56. – P. 607–616.
90. Julkunen-Tiitto, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics / R. Julkunen-Tiitto // *Journal of Agriculture Food Chemistry*. – 1985. – V. 33. – P. 213–217.
91. Broadhurst, R.B. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin / R.B. Broadhurst, W.T. Jones // *Journal of Science of Food Agriculture*. – 1978. – V.29. – P. 788–794.
92. Dmitrienko, S.G. Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin / S.G. Dmitrienko, V.A. Kudrinskaya, V.V. Apyari // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 67. – № 3. – P. 299–311.
93. Eskin, N.A.M. A simple and rapid quantitative method for total phenols / N.A.M. Eskin, E. Hoehn, Ch. Frenkel // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1978. – V. 26. – № 4. – P. 973–975.
94. Bossi, A. An assay for ascorbic acid based on polyaniline-coated microplates / A. Bossi, S.A. Piletsky, E.V. Piletska, P.G. Righetti, A.P.F. Turner // *Analytical Chemistry*. – 2000. – V. 72. – P. 4296–4300.
95. Morosanova, E.I. Modified xerogel-based indicator powders for determining ascorbic acid and hydrazines by solid-phase spectrophotometry and visual tests / E.I. Morosanova, E.A. Reznikova, A.A. Velikorodnyi // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2001. – V. 56. – № 2. – P. 195–200.
96. Price, M.L. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain / M.L. Price, L.G. Butler // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1977. – V. 25. – № 6. – P. 1266–1273.
97. Budini, R. Analysis of total phenols using the Prussian blue method / R. Budini, D. Tonelli, S. Girotti // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1980. – V. 28. – P. 1236–1238.

98. Graham, H.D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols / H.D. Graham // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1992. – V. 40. – P. 801–805.
99. Zhang, H. A simple and sensitive assay for ascorbate using potassium ferricyanide as spectroscopic probe reagent / H. Zhanga, J. Li, K. Wang, X. Du, Q. Li // *Analytical Biochemistry*. – 2009. – V. 388. – №. 1. – P. 40–46.
100. Метелица, Д. И. Высокоэффективные тест-системы оценки общей антиоксидантной активности биологических жидкостей человека / Д.И. Метелица, Н.В. Пивень, О.И. Шадыро, Ю.А. Григоренко, Л.Н. Лухверчик, Н.П. Денисевич // *Труды БГУ*. – 2008. – Т. 3. – Ч. 1. – С. 7–23.
101. Berker, K.I. Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method / K. I. Berker, K. Güçlü, İ. Tor, B. Demirata, R. Apak // *Food Analytical Methods*. – 2010. – V. 3. – P.154–168.
102. Khorami, H.A. Spectroscopic detection of Hydrogen peroxide with an optical fiber probe using chemically deposited Prussian blue / H. A. Khorami, J. F. Botero-Cadavid, P. Wild, N. Djilali // *Electrochimica Acta*. – 2014. – V. 115. – P. 416–424.
103. Koncki, R. Optical sensing schemes for Prussian Blue/Prussian White film system / R. Koncki, T. Lenarczuk, S. Glab // *Analytica Chimica Acta*. – 2000. – V. 424. – P. 27–35.
104. Сендел, Е. Колориметрические методы определения следов металлов / пер. с англ. Г.В. Корпусова, под ред. В.Н. Прусакова. – М.: Мир, 1964. – 898 с.
105. Бишоп, Э. Индикаторы. В 2 т. Т. 2 / пер. с англ. И.В. Матвеева, ред. И.Н. Маров. – М.: Мир, 1976. – 443 с.
106. Portable nanoparticle based sensors for antioxidant analysis / E. Sharpe, S. Andreescu in *Advanced Protocols in Oxidative Stress III. Methods in molecular biology* / Ed. N.J. Clifton. – 2015. – V. 1208. – P. 221–231.
107. Sharpe, E. Metal oxide based multisensor array portable database for field analysis of antioxidants / E. Sharpe, R. Bradley, Th. Frasco, D. Jayathilaka, A. Marsh, S. Andresscu // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – V. 193. – P. 552–562.

108. Sharpe, E. Portable ceria nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidants (NanoCerac) / E. Sharpe, Th. Frasco, D. Andresscu, S. Andresscu // *Analyst*. – 2013. – V. 138. – №. 1. – P. 249–262.
109. Zhang, F.X. Colorimetric detection of thiol-containing amino acids using gold nanoparticles / F.X. Zhang, L. Han, L. B. Israel, J. G. Daras, M. M. Maye, N. K. Ly // *Analyst*. – 2002. – V. 127. – P. 462–465.
110. Chen, L. Novel optical nanoprobe for chemical and biological analysis / L. Chen, Y. Wang, X. Fu, L. Chen. – Heidelberg: Springer, 2014. – 100 p.
111. Anker, J. N. Biosensing with plasmonic nanosensors / J.N. Anker, W.P. Hall, O. Lyandres, N.C. Shah, J. Zhao, R.P. Van Duyne // *Nature materials*. – 2008. – V. 7. – P. 442–453.
112. Wang, L. Engineered Photoelectrochemical Platform for Rational Global Antioxidant Capacity Evaluation Based on Ultrasensitive Sulfonated Graphene–TiO₂ Nanohybrid / L. Wang, W. Ma, Sh. Gan, D. Han, Q. Zhang, L. Niu // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86. – №. 20. – P. 10171–10178.
113. Dungchai, W. Determination of aerosol oxidative activity using silver nanoparticle aggregation on paper-based analytical devices / W. Dungchai, Y. Sameenoi, O. Chailapakul, J. Volckens, Ch. S. Henry // *Analyst*. – 2013. – V. 138. – P. 6766–6773.
114. Ozyurek, M. Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols / M. Ozyurek, N. Güngör, S. Baki, K. Güçlü, R. Apak // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 84. – №. 18. – P. 8052–8059.
115. Gao, L. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles / L. Gao, J. Zhuang, I. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, X. Yan // *Nature Nanotechnology*. – 2007. – V. 2. – P. 577–583.
116. Güçlü, K. Selective optical sensing of biothiols with Ellman's reagent: 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)-modified gold nanoparticles / K. Güçlü, M. Özyürek, N. Güngör, S. Baki, R. Apak // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – V. 794. – P. 90–98.
117. Jia, D. Synthesis and assembly of ultrathin film of Ni(OH)₂ nanoparticles at gas/liquid interface, its high electrocatalytic oxidation toward bio-thiols and selective

- determination of cysteine / D. Jia, F. Li, L. Sheng, Q. Ren, S. Dong, Sh. Xu, Y. Mu, Y. Miao // *Electrochemistry Communications*. – 2011. – V. 13. – P. 1119–1122.
118. Shamsipur, M. Indirect colorimetric detection of glutathione based on its radical restoration ability using carbon nanodots as nanozymes / M. Shamsipur, A. Safavi, Z. Mohammadpour // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – V. 199. – P. 463–469.
119. Liu, Ch-P. Live-cell imaging of biothiols via thiol/disulfide exchange to trigger the photoinduced electron transfer of gold-nanodot sensor / Ch-P. Liu, T.-H. Wu, Ch.-Y. Liu, Sh.-Y. Lin // *Analytica Chimica Acta*. – 2014. – V. 849. – P. 57–63.
120. Han, B. Sensitive and Selective Sensor for Biothiols in the Cell Based on the Recovered Fluorescence of the CdTe Quantum Dots–Hg(II) System / B. Han, J. Yuan, E. Wang // *Analytical Chemistry*. – 2009. – V. 81. – P. 5569–5573.
121. Sudeep, P.K. Selective Detection of Cysteine and Glutathione Using Gold Nanorods / P.K. Sudeep, S.T.S. Joseph, K.G. Thomas // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – V. 127. – P. 6516–6517.
122. Chen, Sh.-J. Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticles for Selective Determination of Thiols Based on Energy Transfer and Aggregation / Sh.-J. Chen, H.-T. Chang // *Analytical Chemistry*. – 2004. – V. 76. – P. 3727–3734.
123. Shang, L. Fluorescent Conjugated Polymer-Stabilized Gold Nanoparticles for Sensitive and Selective Detection of Cysteine / L. Shang, Ch. Qin, T. Wang, M. Wang, L. Wang, Sh. Dong // *Journal of Physical Chemistry*. – 2007. – V. 111. – P. 13414–13417.
124. Huang, C.-C. Role of Fluorosurfactant-Modified Gold Nanoparticles in Selective Detection of Homocysteine Thiolactone: Remover and Sensor / C.-C. Huang, W.-L. Tseng // *Analytical Chemistry*. – 2008. – V. 80. – P. 6345–6350.
125. Wu, H.-P. Sodium hydroxide as pretreatment and fluorosurfactant-capped gold nanoparticles as sensor for the highly selective detection of cysteine / H.-P. Wu, C.-C. Huang, T.-L. Cheng, W.-L. Tseng // *Talanta*. – 2008. – V. 76. – P. 347–352.
126. Shang, L. Sensitive detection of cysteine based on fluorescent silver clusters / L. Shang, Sh. Dong // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2009. – V. 24. – P. 1569–1573.

127. Li, H. Ratiometric fluorescent determination of cysteine based on organic nanoparticles of naphthalene–thiourea–thiadiazole-linked molecule / H. Li, j. Xu, H. Yan // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2009. – V. 139. – P. 483–487.
128. Wei, H. A colorimetric sensor for determination of cysteine by carboxymethyl cellulose-functionalized gold nanoparticles / H. Wei, L. Qia, J. Tanb, R. Liuc, F. Wang // *Analytica Chimica Acta*. – 2010. – V. 671. – P. 80–84.
129. Zhang, J. A Cu@Au Nanoparticle-Based Colorimetric Competition Assay for the Detection of Sulfide Anion and Cysteine / J. Zhang, X. Xu, Y. Yuan, C. Yang, X. Yang // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2011. – V. 3. – P. 2928–2931.
130. Farhadi, Kh. Highly sensitive and selective colorimetric probe for determination of L-cysteine in aqueous media based on Ag/Pd bimetallic nanoparticles / Kh. Farhadi, M. Forough, A. Pourhossein, R. Molaei // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – V. 202. – P. 993–1001.
131. Leesutthiphonchai, W. Selective determination of homocysteine levels in human plasma using a silver nanoparticle-based colorimetric assay / W. Leesutthiphonchai, W. Dungchai, W. Siangproh, N. Ngamrojnavanich, O. Chailapakul // *Talanta*. – 2011. – V. 85. – P. 870–876.
132. Cate, D.M. Simple, distance-based measurement for paper analytical devices / D.M. Cate, W. Dungchai, J.C. Cunningham, J. Volckens, C.S. Henry // *Lab on a Chip*. – 2013. – V. 13. – №. 12. – P. 2397–2404.
133. Bezerra, A.G. The mechanism of cysteine detection in biological media by means of vanadium oxide nanoparticles / A. G. Bezerra, Jr. A. Barison, V. S. Oliveira, L. Foti, M. A. Krieger, R. Dhalia, I.F.T. Viana, W.H. Schreiner // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2012. – V. 14. – №. 9. – P. 1123–1133.
134. Huang, X. Ultra-sensitive detection of cysteine by gold nanorod assembly / H. Huang, X. Liu, T. Hu, P. K. Chu // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – V. 25. – P. 2078–2083.
135. Chen, L. FITC functionalized magnetic core–shell Fe₃O₄/Ag hybrid nanoparticle for selective determination of molecular biothiols / L. Chen, J. Li, S. Wang,

- W. Lu, A. Wu, J. Choo, L. Chen // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014.- V. 193. – P. 857–863.
136. Xiao, Q. Gold-nanoparticle-based optical probes for sensing aminothiols / Q. Xiao, H. Gao, Ch. Lu, Q. Yuan // *Trends in analytical chemistry*. – 2012. – V. 40. – P. 64–76.
137. Roman-Pizarro, V. A general thiol assay based on the suppression of fluorescence resonance energy transfer in magnetic-resin core-shell nanospheres coated with gold nanoparticles / V. Roman-Pizarro, U. Gulzar, J.M. Fernandez-Romero, A. Gomez-Hens // *Microchim Acta*. – 2015. – V. 182. – P. 2285–2292.
138. Shi, Y. A dual-mode nanosensor based on carbon quantum dots and gold nanoparticles for discriminative detection of glutathione in human plasma / Y. Shi, Y. Pan, H. Zhang, Z. Zhang, M.-J. Li, C. Yi // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – V. – 56. – P. 39–45.
139. Ang, C.Y. “Turn-on” fluorescence probe integrated polymer nanoparticles for sensing biological thiol molecules / C.Y. Ang, S.Y. Tan, Y. Lu, L. Bai, M. Li, P. Li, Q. Zhang, S.T. Selvan, Y. Zhao // *Scientific Reports*. – 2014. – V. 4. – № 7057. – P. 1–7.
140. Bhamore, J. Influence of molecular assembly and NaCl concentration on gold nanoparticles for colorimetric detection of cysteine and glutathione / J. Bhamore, K.A. Rawat, H. Basu, R.K. Singhal, S.K. Kailasa // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2015. – V. 212. – P. 526–535.
141. Hu, B. Selective colorimetric detection of glutathione based on quasi-stable gold nanoparticles assembly / B. Hu, X. Cao, P. Zhang // *New Journal of Chemistry*. – 2013. – V. 37. – P. 3853–3856.
142. Li, Z.-J. Label-free colorimetric detection of biothiols utilizing SAM and unmodified Au nanoparticles / Z.-J. Li, X.-J. Zheng, L. Zhang, R.-P. Liang, Z.-M. Li, J.-D. Qiu // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V. 68. – P. 668–674.
143. Ghasemi, F. A colorimetric sensor array for detection and discrimination of biothiols based on aggregation of gold nanoparticles / F. Ghasemi, M.R. Hormozi-Nezhad, M. Mahmoudi // *Analytica Chimica Acta*. – 2015. – V. 882. – P. 58–67.

144. Xiong, Y. Synthesis of a mixed valence state Ce-MOF as an oxidase mimetic for the colorimetric detection of biothiols / Y. Xiong, S. Chen, F. Ye, L. Su, C. Zhang, S. Shen, S. Zhao // *Chemical Communications*. – 2015. – V. 51. – P. 4635–4638.
145. Ju, J. Photochemical deposition of surface-clean silver nanoparticles on nitrogen-doped graphene quantum dots for sensitive colorimetric detection of glutathione / J. Ju, R. Zhang, W. Chen // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2016. – V. 228. – P. 66–73.
146. Jung, Y.L. Label-free colorimetric detection of biological thiols based on target-triggered inhibition of photoinduced formation of AuNPs / Y.L. Jung, J.H. Park, M.I. Kim, H.G. Park // *Nanotechnology*. – 2016. – V. 27. – P. 055501 1–7.
147. Shen, L.-M. Assay of biothiols by regulating the growth of silver nanoparticles with C-dots as reducing agent / L.-M. Shen, Q. Chen, Z.Y. Sun, X.W. Chen, J.H. Wang // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86. – P. 5002–5008.
148. Zhao, W. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays / W. Zhao, M.A. Brook, Y. Li // *ChemBioChem*. – 2008. – V. 9. – P. 2363–2371.
149. Maye, M.M. Gold and alloy nanoparticles in solution and thin film assembly: spectrophotometric determination of molar absorptivity / M.M. Maye, L. Han, N. Kariuki, N.K. Ly, W.-B. Chan, J. Luo, Ch.-J. Zhong // *Analytica Chimica Acta*. – 2003. – V. 496. – P. 17–27.
150. Schaeublin, N.M. Does shape matter? Bioeffects of gold nanomaterials in a human skin cell model / N.M. Schaeublin, L.K. Braydish-Stolle, E.I. Maurer, K. Park, R.I. MacCuspie, A.R.M. Nabiul Afrooz, R.A. Vaia, N.B. Saleh, S.M. Hussain // *Langmuir*. – 2012. – V. 28. – P. 3248–3258.
151. Labouta, H.I. Gold nanoparticle penetration and reduced metabolism in human skin by toluene / H.I. Labouta, D.C. Liu, L.L. Lin, M.K. Butler, J.E. Grice, A.P. Raphael, T. Kraus, L.K. El-Khordagui, P. Soyer, M.S. Roberts, M. Schneider, T.W. Prow // *Pharmaceutical Research*. – 2011. – V. 28. – P. 2931–2944.
152. Baroli, B. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin / B. Baroli, M.G. Ennas, F. Loffredo, M. Isola, R. Pinna, M.A. Lo'pez-Quintela // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2007. – V. 127. – P. 1701–1712.

153. Murphy, C.J. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging / C.J. Murphy, A.M. Gole, J.W. Stone, P.N. Sisco, A.M. Alkilany, E.C. Goldsmith, S.C. Baxter // *Accounts of Chemical Research*. – 2008. – V. 41. – № 12. – P. 1721–1730.
154. Андреев, Г.Б. Материалы, производимые по нанотехнологиям: потенциальный риск при получении и использовании / Г.Б. Андреев, В.М. Минашкин, И.А. Невский, А.В. Путилов // *Российский химический журнал (Ж. Рос. хим. об-ва Д.И. Менделеева)*. – 2008. – Т. LII. – № 5. – С. 32–38.
155. Travan, A. Silver nanocomposites and their biomedical applications in Ch. 3. Nanomaterials for the lifescience. V. 8. Nanocomposites / A. Travan, E. Marsich, I. Donati, S. Paoletti, Ed. by Ch.S.S.R. Kumar, 2010. – P. 81–137.
156. Zeng, Sh. A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications / Sh. Zeng, K.-T. Yong, I. Roy, X.-Q. Dinh, X. Yu, F. Luan // *Plasmonics*. – 2011. – V. 6. – P. 491–506.
157. Mocanu, A. Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine / A. Mocanu, I. Cernica, G. Tomoaia, L.-D. Bobos, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2009. – V. 338. – P. 93–101.
158. Ansar, S.M. Organothiols self-assembled onto gold: evidence for deprotonation of the sulfur-bound hydrogen and charge transfer from thiolate / S.M. Ansar, G.S. Perera, D. Jiang, R.A. Holler, D. Zhang // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2013. – V. 117. – P. 8793–8798.
159. Aryal, S. Spectroscopic identification of S-Au interaction in cysteine capped gold nanoparticles / S. Aryal, R. B.K.C., N. Dharmaraj, N. Bhattarai, C.H. Kim, H.Y. Kim // *Spectrochimica Acta Part A*. – 2006. – V. 63. – P. 160–163.
160. Hormozi-Nezhad, M.R. Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles / M.R. Hormozi-Nezhad, E. Seyedhosseini, H. Robotjazi // *Scientica Iranica F*. – 2012. – V. 12. – № 3. – P. 958–963.

161. Lim, I.S. Interparticle interactions in glutathione mediated assembly of gold nano-particles / I.S. Lim, D. Mott, W. Ip, P.N. Njoki, Y. Pan, S. Zhou, C.-J. Zhong // *Langmuir*. – 2008. – V. 24. – P. 8857–8863.
162. Brainina, Kh. Z. New Electrochemical Method of Determining Blood and Blood Fractions Antioxidant Activity / Kh.Z. Brainina, L.V. Alyoshina, E.L. Gerasimova, Ya.E. Kazakov, A.V. Ivanova, Ya.B. Beykin, S.V. Belyaeva, T.I. Usatova, M.Ya. Khodos // *Electroanalysis*. – 2009. – V. 21. – № 3-5. – P. 618–624.
163. Brainina, Kh.Z. Potentiometric method for evaluating the oxidant/antioxidant activity of seminal and follicular fluids and clinical significance of this parameter for human reproductive function / Kh.Z. Brainina, D.P. Varzakova, E.L. Gerasimova, S.L. Balezin, I.G. Portnov, V.A. Makutina, E.V. Tyrchaninova // *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*. – 2012. – № 5. – P. 1–7.
164. Brainina, Kh.Z. Potentiometry as a method of antioxidant investigation / Kh.Z. Brainina, A.V. Ivanova, E.N. Sharafutdinova, E.L. Lozovskaya, E.I. Shkarina // *Talanta*. – 2007 – V. 71. – № 1. – P. 13–18.
165. Шарафутдинова, Е.Н. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности: оценка основных метрологических характеристик / Е.Н. Шарафутдинова, О.В. Инжеватова, Н.В. Тоболкина, А.В. Иванова, Х.З. Брайнина // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. – 2008. – Т. 74. – № 6. – С. 9–14.
166. Turkevich, J. The formation of colloidal gold / J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1953. – V. 57. – P. 670–673.
167. Bychkovskiv, P.M. Gold nanoparticles: synthesis, properties, biomedical applications / P.M. Bychkovskiv, A.A. Kladiev, S.O. Solomevich, S.Yu. Schegolev // *Russian biotherapeutic journal*. – 2011. – V. 10. – № 3. – P. 37–46.
168. Weber, S.U. Vitamin C, Uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure / S.U. Weber, J.J. Thiele, C.E. Cross, L. Packer // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1999. – V. 113. – P. 1128–1132.

169. Markina, M. Determination of antioxidants in human skin by capillary zone electrophoresis and potentiometry / M. Markina, E. Lebedeva, L. Neudachina, N. Stozhko, Kh. Brainina // *Analytical Letters*. – 2016. – V. 49. – №. 12 – P. 1804–1815.
170. Чеботарёв, В.В. Дерматовенерология: учебник для студентов высших учебных заведений / В. В. Чеботарёв, О. Б. Тамразова, Н. В. Чеботарёва, А. В. Одинец // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2013. – 584 с.
171. Скрипкин, Ю.К. Кожные и венерические болезни. Учебник для врачей и студентов медицинских ВУЗов / Ю.К. Скрипкин, А.А. Кубанова, В.Г. Акимов // М.: Триада-фарм. – 2011. – 544 с.
172. Неопубликованные данные. Автор выражает благодарность за проведение электрофоретического эксперимента к.х.н., инженеру, ассистенту-исследователю ИЕН УрФУ Лебедевой Е.А.
173. Fletcher, C.A.J. Computational Galerkin Methods / C. A. J. Fletcher. – Berlin, Germany: Springer Verlag, 1984. – 501 p.
174. Цой, П. В. Методы расчета отдельных задач тепломассопереноса / П. В. Цой. – М.: Энергия, 1971. – 383 с.
175. Ivanova, A.V. Potentiometric study of antioxidant activity: development and prospects / A.V. Ivanova, E.L. Gerasimova, Kh.Z. Brainina // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2015. – V. 45. – P. 311–322.
176. Perenlei, G. Voltammetric detection of potassium ferricyanide mediated by multi-walled carbon nanotube/titanium dioxide composite modified glassy carbon electrode / G. Perenlei, G. T. W. Tee, N. A. Yusof, G. J. Kheng // *International Journal of Electrochemical Science*. – 2011. – V. 6. – P. 520–531.
177. Petrovic, S. Cyclic voltammetry of hexachloroiridate (IV): an alternative to the electrochemical study of the ferricyanide ion / S. Petrovic // *The Chemical Educator*. – 2000. – V. 5. – № 5. – P. 231–235.
178. “Унимакс”, Гель электродный контактный высокопроводящий, Гельтек-Медика, Россия. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.geltek-medica.ru/medicine/catalog/6/136/>.

179. Тананаев, И.В. Химия ферроцианидов / И.В. Тананаев, Г.Б. Сейфер, Ю.Я. Харитонов, В.Г. Кузнецов, А.П. Корольков // М.: Наука. – 1971. – 320 с.
180. ПНД Ф 14.1:2.104-97 Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации (суммарной) летучих фенолов в пробах природных и очищенных сточных вод ускоренным экстракционно-фотометрическим методом без отгонки. – Москва: Изд-во стандартов, 2004. – С. 8.
181. Sylvestre, J.-P. Extraction and quantification of amino acids in human stratum corneum in vivo / J.-P.Sylvestre, C.C. Bouissou, R.H. Guy, M.B. Delgado-Charro // British journal of Dermatology. – 2010. – V. 163. – P. 458–465.
182. Храмов, В.А. Определение в одной пробе лактата и ряда азотистых шлаков, экскретируемых кожей человека // Теория и практика физической культуры. – 1996. – № 9.
183. Кожа (конспект). 1. Анатомия и физиология кожи. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://cosmoinform.ru/Home/Doc/175>.
184. NIST Chemistry WebBook // National Institute of Standards and Technology, USA. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://webbook.nist.gov/chemistry/.html>.
185. Витамин С. Химия и биохимия / Дэвис М., Остин Дж., Патридж Д., М.: Мир, 1999. – 176 с.
186. Химические основы жизни / Румянцев Е.В., Антина Е.В., Чистяков Ю.В., Иваново: Колосс, 2007. – 560 с.
187. Kagan, V. Ultraviolet light-induced generation of vitamin E radicals and their recycling. A possible photosensitizing effect of vitamin E in skin / V. Kagan, E. Witt, R. Goldman, G. Scita, L. Packer // Free Radical Research Communications. – 1992. – V. 16. – P. 51–64.
188. Maples, K. R. Free radical metabolite of uric acid / K.R. Maples, R.P. Mason // Journal of Biological Chemistry. – 1988. – V. 263. – P. 1709–1712.
189. D'souza, S.L. Ascorbic acid-functionalized Ag NPs as a probe for colorimetric sensing of glutathione / S.L. D'souza, R. pati, S.K. Kailasa // Applied Nanoscience. – 2015. – V. 5. – № 6. – P. 747–753.

190. Li, L. Sensitive and selective detection of cysteine using gold nanoparticles as colorimetric probes / L. Li, B. Li // *Analyst*. – 2009. – V. 134. – P. 1361–1365.
191. Hepel, M. Detection of oxidative stress biomarkers using novel nanostructured biosensors / M. Hepel, M. Stobiecka // *New Perspectives in Biosensors Technology and Applications* (InTech, Ed. by P.A. Serra). – 2011. – Ch. 17. – P. 343–372.
192. Селифонова, Е.И. Цветометрическое определение α -аминокислот в смешанных растворах после электрофоретического разделения / Е.И. Селифонова, Р.К. Чернова, М.В. Пысина // *Известия Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология*. – 2013. – Т. 13. – № 3. – С. 30–33.
193. Аруари, V.V. Unusual application of common digital devices: potentialities of eye-one pro mini-spectrophotometer – a monitor calibrator for registration of surface plasmon resonance bands of silver and gold nanoparticles in solid matrices / V.V. Аруари, S.G. Dmitrienko, Y.A. Zolotov // *Sensors and Actuators B*. – 2013. – V. 188. – P. 1109–1115.
194. Климин, О.А. Определение взаимосвязи рН среды с оттенками цвета твердофазного индикатора / О.А. Климин, Т.А. Черкасова, Ю.А. Лейкин // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2012. – Т. 12. – № 5. – С. 746–751.
195. Оценка качества цветопередачи в системах визуализации цифровых изображений. Учебно-методическое пособие к лабораторным работам. Под ред. Г.В. Тихомировой. СПб.: Изд. СПбГУКиТ. – 2010. – 95 с.

Методика определения антиоксидантной активности кожи с помощью потенциометрического сенсора

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Методика предназначена для определения антиоксидантной активности кожи человека с помощью потенциометрического сенсора.

2. ПРИПИСАННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ И ЕЕ СОСТАВЛЯЮЩИХ

Настоящая методика обеспечивает получение результатов анализа с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в таблице А1.

Таблица А1 – Диапазон измерений, значения показателей повторяемости и воспроизводимости.

Диапазон измерений, мкмоль экв/дм ³	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %
от 20 до 4000 вкл.	8	13

3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, МАТЕРИАЛЫ, РАСТВОРЫ

3.1 Потенциометрический сенсор, в состав которого входят:

- потенциометрический анализатор ПА–S по ТУ 4215-001-02069214-2013 (УрГЭУ, Екатеринбург);
- электрод рабочий платиносодержащий планарный (ООО НПВП "ИВА", Екатеринбург);
- электрод сравнения – хлорсеребряный ЭКГ электрод H92SG Ag|AgCl, KCl (Arbo, Kendal, США);

- микропористый плёночный материал, изготовленный на основе смеси ацетатов целлюлозы общей пористостью 80-85% и размером пор от 0.45 мкм («Владипор», Россия), пропитанный раствором реагента ($K_3[Fe(CN)_6]$).

3.3 Весы лабораторные аналитические общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г, 2-го класса точности по ГОСТ 24104.

3.4 Дозаторы типа ПЛ-01-20, ПЛ-01-200, ПЛ-01-100 или другие с дискретностью установки доз 1.0 или 2.0 мкл, 10 мкл.

3.5 Колбы мерные наливные стеклянные 1-го класса точности по ГОСТ 1770-74 исполнения 1 или 2 вместимостью 500 см³, 100 см³ и 25 см³ с притертыми пробками.

3.6 Аппарат для приготовления ультрачистой воды с удельным сопротивлением 18.18 МОм*см при 25 °С (вода 1 типа по ASTM, NCCLS, ISO 3696, CAP).

3.7 Тонометр LD-61 Little Doctor или аналогичный, с манжетой для окружности руки 18-26 см.

3.8 Натрия хлорид (NaCl) по ГОСТ 4233-77, х.ч.

3.9 Гексацианоферрат (III) калия ($K_3[Fe(CN)_6]$) ГОСТ 4206-75, х.ч.

3.10 Вода деионизованная ультрачистая.

3.11 Фильтры обеззоленные (синяя лента).

3.12 Приспособления ортопедические для стопы (силиконовые кольца).

4. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

4.1 Приготовление растворов, необходимых для выполнения измерений.

4.1.1 Приготовление раствора реагента, содержащего – 0.005 моль/дм³ гексацианоферрата (III) калия ($K_3[Fe(CN)_6]$) и 1 моль/дм³ хлорида натрия (NaCl).

На аналитических весах взвешивают 0.8231 г $K_3[Fe(CN)_6]$ и 29.2214 г NaCl и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 500 см³. Объем раствора доводят до метки на колбе деионизованной водой.

Раствор хранится в темном месте при комнатной температуре не более 3 дней, в темном месте при 6°С – не более 7 дней.

4.2 Подготовка объекта к проведению измерения.

Анализируемый участок кожи запястья промыть струей деионизованной воды, обсушить фильтровальной бумагой.

4.3 Используя пинцет, поместить мембранный материал в раствор реагента, содержащий $0.005 \text{ моль/дм}^3 \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и $1 \text{ моль/дм}^3 \text{ NaCl}$, на 3–5 мин.

4.4 Подготовка прибора к работе.

4.4.1 Расположить на манжете тонометра силиконовые кольца, как показано на рис. А1 и А2.



рис. А1



рис. А2

4.4.2 Подсоединить электроды к контактам прибора ПА–S.

4.4.3 Расположить Pt электрод таким образом, как показано на рис. А3.



рис. А3

4.4.4 Используя пинцет, перенести мембранный материал, смоченный раствором реагента, на электроды, избегая возникновения пузырьков воздуха между фильтром и поверхностью электродов.

5. ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

5.1 Подготовленный участок кожи запястья приложить к мембранному материалу и электродам, как показано на рис. А4, А5.

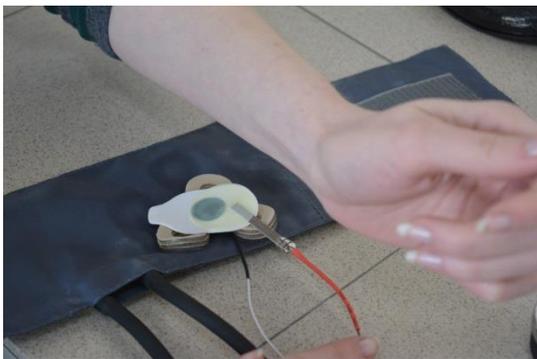


рис. А4



рис. А5

5.2 Зафиксировать манжету на запястье с помощью вшитой липкой ленты и создать в ней давление 30-35 мм.рт.ст. (рис. А6).



рис. А6

5.3 Положить руку локтевой частью на стол и запустить измерение (рис. А7).



рис. А7

6. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ.

Величина АОА кожи (моль-экв/дм³) вычисляется по формуле (А1):

$$АОА = \frac{C_{ox}}{1+10^{(E-E_0)/\alpha}} \quad (A1),$$

где C_{ox} – исходная концентрация $K_3[Fe(CN)_6]$ в растворе, 0.005 моль/дм³;

E – потенциал системы в присутствии АО, В;

E_0 – формальный окислительно-восстановительный потенциал пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $E_{0(\text{эксп})}=212.9$ мВ;

$\alpha = 2.303 \cdot R \cdot T / (n \cdot F)$, где F – постоянная Фарадея ($F = 96485,33$ Кл·моль⁻¹),

R – универсальная газовая постоянная ($R=8.31446$ Дж/(моль·К)),

T – температура (в Кельвинах),

$n=1$,

$\alpha_{\text{эксп}}=59.2$, мВ.

Методика определения тиолов кожи с помощью колориметрического сенсора

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Методика предназначена для определения тиолов кожи человека с помощью колориметрического сенсора.

2. ПРИПИСАННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ И ЕЕ СОСТАВЛЯЮЩИХ

Настоящая методика обеспечивает получение результатов анализа с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в таблице Б1.

Таблица Б1 – Диапазон измерений, значения показателей повторяемости и воспроизводимости.

Диапазон измерений, мкмоль/дм ³ глутатиона	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %
от 8 до 75.0 вкл.	9	12

3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, МАТЕРИАЛЫ, РАСТВОРЫ

3.1 Колориметрический сенсор, в состав чувствительного слоя которого входят:

- микропористый плёночный материал, изготовленный на основе смеси ацетатов целлюлозы общей пористостью 80-85% и размером пор от 0.45 мкм («Владипор», Россия);

- раствор реагента – красного золя золота.

3.2 Весы лабораторные аналитические общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г, 2-го класса точности по ГОСТ 24104.

3.3 Дозаторы типа ПЛ-01-20, ПЛ-01-200, ПЛ-01-100 или другие с дискретностью установки доз 1.0 мкл, 10 мкл.

3.4 Колбы мерные наливные стеклянные 1-го класса точности по ГОСТ 1770-74 исполнения 1 или 2 вместимостью 500 см³, 100 см³ и 25 см³ с притертыми пробками.

3.5 Обратный холодильник.

3.6 Магнитная мешалка.

3.7 рН-метр.

3.8 Лабораторная электрическая плитка.

3.9 Аппарат для приготовления ультрачистой воды с удельным сопротивлением 18,18 МОм*см при 25 °С (вода 1 типа по ASTM, NCCLS, ISO 3696, CAP).

3.10 Цифровой фотоаппарат Olympus FE-340. Параметры съемки: режим P, баланс белого – пасмурно, ISO=64, размер кадра=34, супермакросъемка, без вспышки, +/- компенсация экспозиции +0.3, автоспуск, естественное освещение.

3.11 Соляная кислота (HCl) по ГОСТ 3118-77, х.ч.

3.12 Цитрат натрия (Na₃C₆H₅O₇·5.5H₂O) по ГОСТ 22280-76, ч.д.а.

3.13 Глутатион (C₁₀H₁₇N₃O₆S), х.ч.

3.14 Тетрахлораурат (III) водорода (HAuCl₄), х.ч.

3.15 Вода деионизованная ультрачистая.

3.16 Фильтры обеззоленные (синяя лента).

4. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

4.1 Приготовление растворов, необходимых для выполнения измерений.

4.1.1 Приготовление раствора реагента – красного золя золота.

Для синтеза красного золя золота использовать цитратный модифицированный метод Туркевича [159,166]. Водный раствора 10⁻³ моль/дм³ HAuCl₄ (50 см³) нагреть в конической колбе с обратным холодильником до кипения (100°C) при перемешивании. В точке кипения к раствору быстро добавить 5 см³ 38.8 ммоль/дм³ раствора цитрата натрия при интенсивном перемешивании (1200 об/мин) и нагревать раствор ещё 30 мин. Затем колбу снять с плитки и охлаждать раствор до комнатной температуры при перемешивании. Раствор хранить в тёмном месте при 4 °С.

4.1.2 Приготовление контактных растворов:

- подкисленную хлороводородной кислотой воду (pH~3.4),
- подкисленную воду, содержащую 10 мкмоль/дм³ глутатиона,
- подкисленную воду, содержащую 20 мкмоль/дм³ глутатиона.

4.2 Приготовление колориметрического сенсора.

Из микропористого материала с помощью дырокола вырезать круги диаметром около 6 мм. Необходимое количество золь нагреть до комнатной температуры. Диски из мембранного материала с помощью пинцета погрузить в золь золота на 5–7 мин. Затем с помощью пинцета диски перенести на целлюлозный фильтр на 3–5 с для удаления лишнего раствора реагента. Пропитанные диски хранению не подлежат.

4.3 Подготовка объекта к проведению измерения.

Анализируемый участок кожи запястья промыть струей деионизованной воды, обсушить фильтровальной бумагой.

5. ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

5.1 На подготовленные, близко расположенные участки кожи запястья нанести капли ($V=7$ мкл) контактных растворов:

- (1) подкисленную хлороводородной кислотой воду (pH~3.4),
- (2) подкисленную воду, содержащую 10 мкмоль/дм³ глутатиона,
- (3) подкисленную воду, содержащую 20 мкмоль/дм³ глутатиона.

5.2 Затем на капли растворов перенести пропитанные реагентом диски мембранного материала. Фиксацию отклика сенсора производить с использованием цифрового фотоаппарата после 8-9 мин после начала контакта сенсора с кожей.

5.3 Область на фотографии с изображением сенсора отделить от фона с использованием графического редактора (PainDotNet).

6. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Величина содержания тиолов в коже (C_x , моль/дм³, экстрагируемых в чувствительный слой сенсора) вычисляется графически. Необходимо построить график в координатах « $\Delta(V/R)$ – концентрация добавки глутатиона» и по нему найти C_x как величину отрезка, отсекаемого прямой на оси абсцисс.