

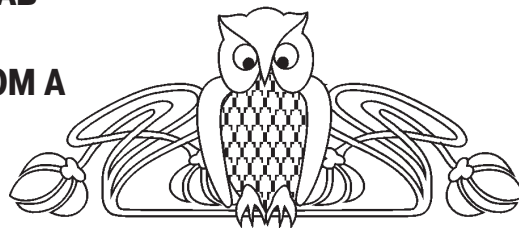


УДК 544.522.121.2:546.661:615.33

ВЛИЯНИЕ ВТОРОГО ЛИГАНДА И МИЦЕЛЛ ПАВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ В КОМПЛЕКСЕ ТЕРБИЯ (III) С ОХРАТОКСИНОМ А

Е. А. Желобницкая, И. И. Паращенко, Т. Д. Смирнова

Саратовский государственный университет
E-mail: smirnovatd@mail.ru



Показано, что охратоксин А образует в водных и мицеллярных растворах ПАВ с ионами европия (III) и тербия (III) комплексные соединения с переносом энергии, которые могут быть использованы в качестве аналитической формы для флуориметрического определения микотоксина.

Ключевые слова: охратоксин А, сенсibilизированная флуоресценция, комплексы тербия.

Fluorimetric Determination of Ochratoxin A

Е. А. Zhelobitskaya, I. I. Parashchenko, T. D. Smirnova

It is shown that forms the ochratoxin A in aqueous micellar solutions of surfactants and ions of europium (III) and terbium (III) complex compounds with the energy transfer which may be used as analytical forms for fluorimetric determination of mycotoxins.

Key words: ochratoxin A, fluorimetry, complexes of terbium.

Микотоксины – низкомолекулярные вторичные метаболиты плесневелых грибов, обладающие широким спектром токсического действия. Задача определения микотоксинов является актуальной и привлекает внимание аналитиков во всем мире. Среди микотоксинов приоритетное место занимает охратоксин А (ОТА), который обладает нефротоксическим, канцерогенным, тератогенным и эмбриотоксическим действием. ОТА является наиболее распространенным токсикантом пищевых продуктов и в этой связи объектом постоянного мониторинга зерновых продуктов, кофе, специй, сухофруктов, вина и фруктовых соков. Необходимость контроля содержания ОТА вызвана тем, что микотоксины образуются в сельскохозяйственных продуктах до сбора урожая и накапливаются в них при хранении.

Для определения микотоксинов используют различные методы анализа, преимущественно хроматографические, среди которых особое место занимает метод ВЭЖХ с флуоресцентным детектором, что обусловлено значительными флуоресцентными свойствами [1–4]. Известны варианты жидкостной хроматографии [5, 6], капиллярного электрофореза с флуоресцентным детектированием [7], ТСХ [8], иммунохимиче-

ские методы [9]. Однако общим недостатком их является высокая трудоемкость и стоимость определения, необходимость привлечения высококвалифицированного персонала.

Флуоресцентный метод анализа в последние годы занимает особое место из-за его простоты, доступности и высокой чувствительности, возможности скрининга биологически активных веществ. Измерение в качестве аналитического сигнала интенсивности сенсibilизированной флуоресценции позволяет повысить избирательность и понизить предел обнаружения.

Целью настоящей работы явилось применение сенсibilизированной флуоресценции комплексов европия (III) и тербия (III) в водных и мицеллярных растворах ПАВ для определения ОТА.

Экспериментальная часть

Реагенты. Растворы основных и вспомогательных химических реактивов готовили на бидистиллированной воде.

Раствор охратоксина А готовили разбавлением ГСО 50 мкг/см³ (бензол-уксусной кислота 99:1) в дистиллированной воде. Исходные водные растворы теноилтрифторацетона фирмы «Merk», 1,10-фенантролина солянокислого («Chemapol») и триоктилфосфиноксида («Sigma», содержание основного вещества более 99%) имели концентрацию $1 \cdot 10^{-2}$ М. Растворы EuCl_3 и TbCl_3 (х. ч.) стандартизовали комплексонометрически с индикатором ксиленоловым оранжевым. Триоктилфосфиноксид фирмы «Sigma» с содержанием основного вещества до 99%. Исходный раствор с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ М готовили растворением точной навески в этиловом спирте.

Ацетатно-аммиачные буферные растворы готовили из 2 М растворов CH_3COOH и $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Использовали препараты анионного ПАВ – додецилсульфат натрия, «AppliChem», катионного ПАВ – хлорид цетилпиридиния, «Merk», неионных – оксиэтилированный спирт Бридж-35 фирмы «Serva», оксиэтилированный алкифенол



Тритон X-100 фирмы «Merck» ПАВ, которые содержали более 98% основного вещества.

Аппаратура. Оптическую плотность растворов и электронные спектры поглощения в видимой и УФ-области спектра измеряли на спектрофотометре UV-1800 фирмы «Shimadzu», Япония. Спектры флуоресценции регистрировали при помощи спектрофлуориметра LS-55 фирмы «Perkin-Elmer» с источником возбуждения – импульсной ксеноновой лампой. Ширина дифракционной щели возбуждения 10 нм, флуоресценции – 5 нм. Скорость регистрации спектров 300 нм/мин. Измерения проводили в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. Сигнал регистрировали под углом 90° к возбуждающему свету в режиме времяразрешенной флуоресценции со временем задержки 0,03 мс.

Значение pH контролировали на pH-метре (pH-6,73 M) со стеклянным индикаторным электродом и хлорсеребряным электродом сравнения.

Результаты и их обсуждение

Флуориметрические свойства ОТА и его комплексов с РЗЭ. ОТА обладает собственной флуоресценцией ($\lambda_{\text{возб}} = 385$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 440$ нм) и содержит комплексообразующие группы, по которым возможно взаимодействие с ионами лантанидов. Спектрофотометрическим методом установлено, что в присутствии ионов европия (III) и тербия (III) в растворе ОТА наблюдается смещение полосы поглощения лиганда в коротковолновую область на 5–10 нм. Образующиеся в растворе комплексы характеризуются переносом энергии возбуждения, о чем свидетельствует появление в спектре флуоресценции ОТА в присутствии ионов комплексообразователей новых полос эмиссии, соответствующих сверхчувствительным переходам европия (III) ($\lambda_{\text{фл}} = 615$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 396$ нм) и тербия (III) ($\lambda_{\text{фл}} = 545$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 375$ нм). Дополнительным подтверждением переноса энергии является установленная нами линейная зависимость возрастания интенсивности полос эмиссии ионов лантанидов при увеличении концентрации ионов металлов в растворе. Увеличение интенсивности сенсibilизированной флуоресценции ионов металлов сопровождается уменьшением собственной флуоресценции микотоксина. Известно, что сенсibilизированная флуоресценция является результатом непрямого возбуждения иона металла: поглощения света органическим лигандом и передачи энергии электронного возбуждения с триплетного уровня лиганда на резонансный

уровень лантанида с последующей характерной для него эмиссией (эффект антенны). Использование в анализе комплексов с переносом энергии позволяет повысить чувствительность и точность определения ОТА.

Известно, что интенсивность сенсibilизированной флуоресценции ионов РЗЭ зависит от соотношения и близости энергии триплетного органического лиганда и излучательного уровня иона редкоземельного элемента. Вероятно, в связи с этим интенсивность сенсibilизированной флуоресценции выше в случае комплекса ОТА с тербием (III) (5D_4 20500 см^{-1}) и ниже для комплекса европия (III) (5D_1 19020 см^{-1} , 5D_0 17260 см^{-1}) (рис. 1).

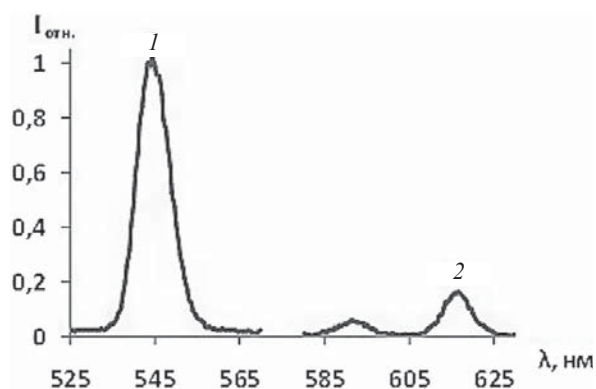


Рис. 1. Спектры флуоресценции растворов комплекса ОТА с: 1 – Tb(III) и 2 – Eu(III), $C_{\text{ОТА}} = 20$ нг/мл, $C_{\text{Ln(III)}} = 1 \cdot 10^{-4}$ M; pH = 7,0, $\lambda_{\text{возб.}} = 375$ нм и $\lambda_{\text{возб.}} = 396$ нм соответственно

Влияние второго лиганда. Во многих случаях устойчивость бинарного комплекса увеличивается в присутствии второго лиганда, что также сопровождается ростом интенсивности сенсibilизированной флуоресценции лантанида, основанным на замещении остаточных молекул воды из ближайшего окружения иона комплексообразователя и возможной дополнительной сенсibilизации лигандом. В качестве вторых лигандов нами апробированы: полидентатный, не содержащий хромофорные группы ЭДТА, монодентатный триоктилфосфиноксид (ТОФО) и хромофорные бидентатные 1,10-фенантролин (ФЕН) и теноилтрифторацетон (ТТА). Установлено, что в присутствии ЭДТА интенсивность эмиссии бинарного хелата Eu^{3+} с ОТА возрастает незначительно, добавки ФЕН сигнал не изменяют, а при введении ТОФО наблюдается опалесценция растворов.



В присутствии добавок ФЕН интенсивность сенсibilизированной флуоресценции комплекса ОТА-Тб³⁺ увеличилась на 20%, в присутствии добавок ТОФО интенсивность практически не изменилась. Добавки ТТА и ЭДТА тушат флуоресценцию комплекса ОТА-Тб³⁺ (рис. 2).

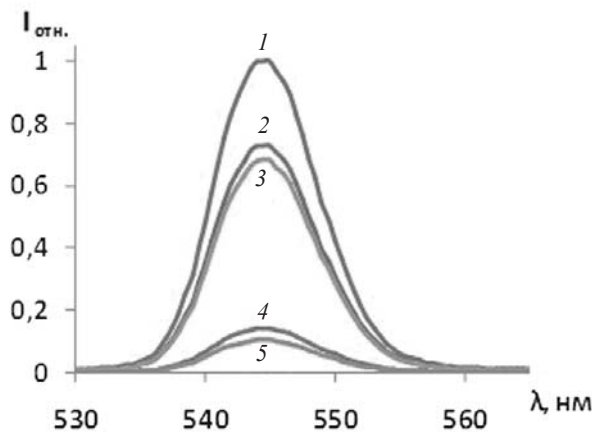


Рис. 2. Спектры флуоресценции растворов комплекса Тб(III) - ОТА - второй лиганд. 1 - ФЕН, 2 - 4-без вт. лиганда, 3 - ТОФО, 4 - ТТА, 5 - ЭДТА. $C_{\text{ОТА}} = 20$ нг/мл, $C_{\text{Тб(III)}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{втор. лиг.}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М; рН = 7,0, $\lambda_{\text{возб.}} = 375$ нм

Таким образом, разнолигандный комплекс Тб³⁺-ОТА-ФЕН характеризуется максимальной сенсibilизированной флуоресценцией и выбран нами для дальнейшего изучения.

Влияние мицелл ПАВ. Известно, что эффективность переноса энергии, а, следовательно, и интенсивность сенсibilизированной флуоресценции возрастают при переходе от гомогенных растворов к микрогетерогенным организованным средам. Роль ПАВ состоит в концентрировании компонентов реакции, увеличении устойчивости хелата. Более «жесткая» структура компонентов реакции и сближение их в мицелле облегчает перенос энергии возбуждения. Кроме того, мицелла способствует дегидратации комплекса и экранирует флуоресцирующий центр от тушителей. Нами показано, что интенсивность сенсibilизированной флуоресценции зависит от природы мицелл ПАВ. Так, в присутствии мицелл катионных и анионных ПАВ не происходит изменений интенсивности сенсibilизированной флуоресценции бинарных хелатов лантанидов. В присутствии мицелл неионогенных ПАВ наблюдается уменьшение флуоресценции бинарных хелатов, что связано, по-видимому, с частичной солубилизацией ОТА и разрушением комплекса микотоксина с тербием. Увеличение

сигнала эмиссии разнолигандного комплекса Тб(III) - ОТА - ФЕН в среде мицелл Бридж-35 основано на явлении эффективной солубилизации гидрофобного хелата. Установлены оптимальные условия флуоресценции системы Тб³⁺-ОТА-ФЕН-Бридж-35. Максимальная интенсивность эмиссии хелата наблюдается в ацетатно-аммиачном буферном растворе рН 7. Показано, что оптимальная концентрация Тб³⁺ составляет $1 \cdot 10^{-4}$ М, ФЕН - $3 \cdot 10^{-5}$ М, Бридж-35 - $1 \cdot 10^{-2}$ М. Градуировочный график для определения ОТА с помощью системы Тб³⁺-ФЕН-Бридж-35 линеен в диапазоне 5,0 - 100,0 нг/мл, описан уравнением $y = 3.84x + 6.28$, коэффициент корреляции $R^2 = 0.995$, предел обнаружения составляет 2,5 нг/мл.

Авторы выражают благодарность доктору хим. наук, профессору Владимирского государственного университета им. А. Г. и Н. Г. Столетовых В. Г. Амелину за предоставление биологически активных веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-03-00450а).

Список литературы

1. Bascaran V., Rojas A. H. de, Choucino P., Delgado T. Analysis of ochratoxin A in milk after direct immunoaffinity column clean-up by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatogr. A. 2007. Vol. 1167, № 1, P. 95-101.
2. Pena A., Cerejo F., Lino C., Silveira I. Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection // Anal. and Bioanal. Chem. 2005. Vol. 382, № 5. P. 1288-1293.
3. Hernandez M. J., Garcia-Moreno Valme M., Duran E., Gukllen D., Barroso C. G. Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia // Anal. Chim. Acta. 2006. Vol. 566, № 1. P. 117-121.
4. Monaci L., Palmisano F., Matrella R., Tantillo G. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1090, № 1. P. 184-187.
5. Gonzalez-Osnaya L., Soriano J. M., Molto J. C., Manes J. Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk // Food Chem. 2008. Vol. 108, № 1. P. 272-276.
6. Gonzalez-Penas E., Leache C., Viscarret M., Obanos A. Perez de, Araguas C., Cerain A. Lopez de. Determination of ochratoxin A in wine using liquid-phase



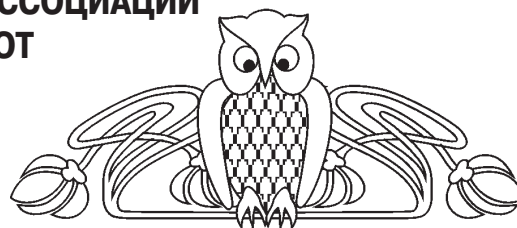
- microextraction combined with liquid chromatography with fluorescence detection // *J. Chromatogr. A*. 2004. Vol. 1025, № 2. P. 163–168.
7. *Corneli S., Maragos C. M.* Capillary electrophoresis with laser induced fluorescence: method for ochratoxin A // *J. Agr. and Food Chem.* 1998. Vol. 46, № 8. P. 3162–3165.
8. *Рикунова Е. Н., Гугучкина Т. И.* Определение содержания охратоксина А в виноградных винах // *Изв. вузов. Пищевая технология*. 2005. № 1. С. 107–108
9. *Горячева И. Ю., Русанова Т. Ю., Бурмистрова Н. А.* Иммунохимические методы определения микотоксинов // *Журн. аналит. химии*. 2009. Т. 64, № 8. С. 788–806.

УДК 544.169

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КОНСТАНТ ДИССОЦИАЦИИ НЕКОТОРЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ

М. В. Пожаров, Т. В. Захарова

Саратовский государственный университет
E-mail: pozharovmv@info.sgu.ru



Изучена геометрия и электронное строение молекул гидроксibenзойных, в частности замещенных салициловых кислот, различными квантово-химическими методами. Найдена корреляция между энергией депротонирования и константой диссоциации карбоксильной группы для исследованных соединений. **Ключевые слова:** ab initio расчеты, методы DFT, замещенные салициловые кислоты.

Correlation Analysis of the Dissociation Constants Some Hydroxybenzoate

M. V. Pozharov, T. V. Zacharova

Geometry and electronic structure of several hydroxybenzoic acids including substituted salicylic acids was studied by several quantum chemical algorithms. A correlation between deprotonation energy and carboxylic group dissociation constant was found.

Key words: ab initio calculations, DFT, substituted salicylic acids.

Введение

Гидроксibenзойные кислоты, в частности салициловая (2-гидроксibenзойная) кислота и ее замещенные, широко используются в науке и технике. Так, салициловая кислота является прекрасной моделью для изучения механизма внутри- и межмолекулярных водородных связей [1–3]. Гидроксibenзойные кислоты, адсорбированные на поверхности наночастиц серебра, могут использоваться для поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния [4]. Наиболее широко данные соединения применяются в медицине в качестве антибактериальных и антимикробных агентов [5–8].

Одним из важнейших параметров, определяющих биологическую активность соединений, является pK_a , где K_a – константа равновесия реакции депротонирования [9]. Величина pK_a

играет очень важную роль в определении таких качеств потенциального лекарственного средства, как адсорбция, распределение, метаболизм и выделение. В большинстве лекарственных препаратов содержится, по крайней мере, одна группа, способная обратимо присоединять или отщеплять протон. Согласно уравнению Хендерсона–Хассельбаха, логарифм отношения концентрации непротонированной формы вещества к концентрации протонированной формы равен разности величин pH и pK_a . Соотношение протонированной и депротонированной форм лекарственного средства является ключевым фактором, определяющим его связывающие и транспортные свойства.

pK_a связана с величиной свободной энергии Гиббса (ΔG_{aq}) для реакции протонирования соотношением:

$$pK_a = \Delta G_{aq} / (RT \ln 10) = \Delta G_{aq} / (2.303RT), \quad (1)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура.

В связи с этим для получения достоверного прогноза величины pK_a необходимо очень точно рассчитать величину ΔG_{aq} , поскольку ошибка в 5,69 кДж/моль при расчете ΔG_{aq} равносильна ошибке на порядок при расчете pK_a при комнатной температуре [9].

Свойства органических кислот в газовой фазе весьма значительно отличаются от их поведения в водном растворе. В результате расчеты, произведенные в газовой фазе, не могут быть использованы для достоверного и точного предсказания констант диссоциации этих кислот в воде. Использование современ-