

УДК 544.653

## ЭЛЕКТРОХИМИЯ АЗУРА С, АДсорБИРОВАННОГО НА СТЕКЛОУГЛЕРОДЕ И ПЕЧАТНОМ ГРАФИТОВОМ ЭЛЕКТРОДЕ ИЗ РЕЛИНА И ФОСФАТНОГО БУФЕРНОГО РАСТВОРА<sup>1</sup>

© 2024 г. А. В. Порфирьева<sup>a, \*</sup>, Т. Н. Куликова<sup>a</sup>, Г. А. Евтюгин<sup>a, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казань, Россия

\*e-mail: Anna.Porfireva@kpfu.ru

\*\*e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 30.05.2024 г.

Изучена электрохимическая активность феноксиазинового красителя Азура С, адсорбированного путем однократного циклирования потенциала из фосфатного буферного раствора и глубокого эвтектического растворителя релина на стеклоуглеродном и печатном графитовом электродах. Установлена возможность получения устойчивого вольтамперометрического сигнала красителя, сохраняющегося при последующем многократном сканировании потенциала. При проведении адсорбции Азура С из фосфатного буферного раствора образуется полислоистое покрытие, в пределах которого электронный обмен формально соответствует диффузионно-сорбционному контролю лимитирующей стадии. Супернернстовский наклон рН-зависимости равновесного потенциала адсорбированного Азура С указывает на значительный вклад протонирования различных форм адсорбированного красителя и многостадийный характер процесса. При адсорбции Азура С из релина морфология вольтамперограмм меняется незначительно. Меньшая эффективность адсорбции выражается в снижении токов пика красителя и сорбционном контроле лимитирующей стадии. Различия в поведении Азура С, адсорбированного из фосфатного буферного раствора и релина, могут быть связаны с изменением степени агломерации красителя и его гидратации. Модифицированные Азуром С электроды показали способность к электростатической аккумуляции нативной и термически денатурированной ДНК, подавляющей редокс-пики Азура С на вольтамперограммах. Полученные данные могут найти применение при последующей разработке способов электрополимеризации феноксиазинового красителя и создании электрохимических сенсоров и биосенсоров, основанных на количественной оценке редокс-активности красителей на электроде.

**Ключевые слова:** сорбция, Азур С, вольтамперометрия, глубокий эвтектический растворитель

DOI: 10.31857/S0424857024110022, EDN: NPZCJM

## ELECTROCHEMISTRY OF AZURE C ADSORBED ON GLASSY CARBON AND SCREEN-PRINTED GRAPHITE ELECTRODE FROM RELINE AND PHOSPHATE BUFFER<sup>2</sup>

© 2024 A. V. Porfireva<sup>a, \*</sup>, T. N. Kulikova<sup>a</sup>, and G. A. Evtugyn<sup>a, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Kazan (Volga region) Federal University, Alexander Butlerov Institute of Chemistry, Kazan, Russia

\*e-mail: Anna.Porfireva@kpfu.ru

\*\*e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

Electrochemical activity of phenothiazine dye Azure C adsorbed by a single potential scanning from phosphate buffer and deep eutectic solvent (reline) at glassy carbon and screen-printed graphite electrodes was studied. The possibility to get a stable voltammetric signal was established. It remained constant after subse-

<sup>1</sup> Статья представлена участником Всероссийской конференции “Электрохимия-2023”, состоявшейся с 23 по 26 октября 2023 года в Москве на базе ИФХЭ РАН.

<sup>2</sup> The article was presented by a participant in the All-Russian Conference “Electrochemistry-2023”, held from October 23 to October 26, 2023 in Moscow at the Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry named after A.N. Frumkin RAS.

quent multiple scans of the potential. The Azure C adsorption from phosphate buffer led to multilayer coating formation with the electron exchange properties formally corresponding to adsorption-diffusion control of the limiting step. Super-Nernstian slope of the pH dependence of the equilibrium potential of adsorbed Azure C demonstrates significant contribution of various forms of adsorbed dye and multistep process nature. After the Azure C adsorption from reline, the morphology of voltammograms changed insignificantly. Less efficiency of adsorption results in the dye currents decay and in the adsorption control of the limiting step. Difference in the behavior of the Azure adsorbed from phosphate buffer and from the reline can be attributed to changes in the dye agglomeration and its hydration. Electrodes modified with the Azure C showed capacity of electrostatic accumulation of native and thermally denatured DNA, that suppressed the redox peaks of Azure C on voltammograms. The data obtained can find application in the further development of the phenothiazine dyes electropolymerization protocols and for the electrochemical sensors and biosensors development based on quantitative evaluation of the dye redox activity at the electrode.

**Keywords:** adsorption, Azure C, voltammetry, deep eutectic solvent

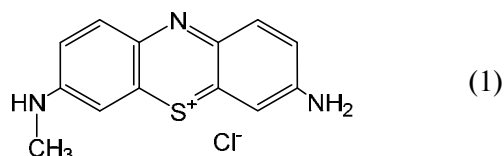
## ВВЕДЕНИЕ

Электрополимеризованные материалы находят широкое применение в составе электрохимических сенсоров и биосенсоров [1]. В соответствии с их электрохимическими свойствами их подразделяют на электропроводящие (такие, как полианилин и полипиррол) [2], электроактивные (феназины, фенотиазины, феноксазины и трифенилметановые красители) [3] и непроводящие. Последние находят применение для обеспечения необходимых механических характеристик сенсоров и ограничения массопереноса в приэлектродном слое [4]. Получение подобных покрытий с помощью электрополимеризации часто ограничено недостаточной растворимостью мономеров в водных средах, формированием ассоциатов и агломератов, влияющих на воспроизводимость характеристик покрытий. Для повышения растворимости можно использовать растворители, смешивающиеся с водой [5], или проводить электролиз в неводных средах, что влечет за собой усложнение эксперимента и дополнительные затраты времени и ресурсов на соответствующие фоновые электролиты, очистку и абсолютирование растворителей и т. д. [6]. Альтернативным подходом, развиваемым в последнее время, является использование в электрохимии глубоких эвтектических растворителей, обеспечивающих необходимые условия электродных реакций, но получаемых из недорогих, нетоксичных и биосовместимых компонентов [7].

Несмотря на значительное число работ, посвященных сенсорам с включением электрополимеризованных покрытий, актуальна проблема дальнейшего расширения их возможностей в части электродных реакций и специфичности связывания определяемых соединений, поскольку они определяют аналитические и операционные характеристики сенсоров и биосенсоров. Сорбция мономеров на углеродных электродах может в значительной степени влиять на электродные

процессы. В свете вышесказанного, актуальна задача расширения круга мономеров и исследования их электрохимических свойств для использования в качестве медиаторов и получения электрополимеризованных покрытий.

Азур С (1) — краситель класса фенотиазинов, содержащий в молекуле одну амино- и одну метиламиногруппу



Его мономерная и полимерная формы нашли применение в составе электрохимических сенсоров [8], биосенсоров [7, 9], суперконденсаторов [10–12], биотопливных ячеек [13], полимерных катодов для Zn-органических батарей [14] и в электрохромных покрытиях [15]. При этом электрохимические реакции Азура С в различных средах исследованы недостаточно [16], хотя есть отдельные работы, посвященные электрохимическому исследованию взаимодействия Азура С с ионами меди (II) [17], железа (III) [18], а также его адсорбции на активированном угле [19].

Ранее адсорбцию Азура С из глубоких эвтектических растворителей электрохимически не исследовали. Глубокие эвтектические растворители образуются при взаимодействии донора и акцептора водородных связей — холин хлорида, органических кислот, мочевины, многоатомных спиртов, сахаров [20, 21]. Это вязкие жидкости [22], которые могут оказывать влияние на процессы массопереноса в приэлектродном слое в силу ограничения диффузии мономера. В свою очередь, это приведет к вариациям электрохимической активности и эффективности электронного обмена. В данной работе впервые проведено сравнительное исследование электрохимии Азура С, адсорбированного из фосфатного буфера и глубокого эвтектического растворителя релина

в различных условиях нанесения красителя на стеклоуглеродный (СУЭ) и печатный графитовый (ПГЭ) электроды. Полученные пленки адсорбированного Азура С также были опробованы в электростатическом накоплении нативной и термически поврежденной ДНК для оценки выявления повреждения ДНК по электрохимическим характеристикам сенсора.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Азур С (Alfa Aesar, Индия), холин хлорид (Acros Organics, Китай), мочевины (Sigma-Aldrich, Германия), ДНК из молока лосося (Sigma-Aldrich, Япония). Все остальные реагенты были категории “ч. д. а.” и analytical grade. Рабочие растворы реагентов и растворы для проведения электрохимических измерений готовили на деионированной воде Millipore®.

Глубокий эвтектический растворитель релин готовили смешением холин хлорида и мочевины в молярном соотношении 1:2. Точные навески компонентов сначала перемешивали на вортексе и далее помещали в ультразвуковую ванну на 30 мин. Для получения раствора Азура С в релине использовали точную навеску красителя или аликвоту его концентрированного раствора, которые добавляли к компонентам релина перед их перемешиванием и ультразвуковой обработкой.

Вольтамперометрические измерения проводили с помощью портативного бипотенциостата-гальваностата  $\mu$ Stat 400 Metrohm DropSens (DropSens, S.L., Испания). В работе использовали дисковые СУЭ и ПГЭ на поликарбонатной основе.

СУЭ были изготовлены из стеклоуглерода СУ 2000 (НИИГрафит, Москва), помещенного в оболочку из политетрафторэтилена с токоъемником из нержавеющей стали. Рабочая площадь поверхности СУЭ составила  $0.028 \text{ см}^2$ . Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения  $\text{Ag}/\text{AgCl}/3.0 \text{ М КCl}$ . Противоелектродом служила никелевая фольга. В случае СУЭ измерения проводили в нетермостатированной трехэлектродной ячейке объемом 5 мл.

ПГЭ изготавливали методом четырехпроходной трафаретной печати на пленке Lomond PE DS Laser Film (Lomond, остров Мэн) с помощью полуавтомата трафаретной печати DEK-248 (DEK, Англия). На подложку последовательно наносили электропроводящие дорожки, углеродную пасту C2030519P4 (Gwent group, Великобритания) и изоляционный слой D2140114D5 (Gwent group,

Великобритания). Псевдоэлектрод сравнения состоял из серебряной пасты PSP-2 (“НПП Дельтапасты”, Россия). Каждый слой ПГЭ отверждали при  $90^\circ\text{C}$ . В итоге получали трехэлектродную систему  $11 \times 27 \text{ мм}$  на едином носителе. Площадь поверхности рабочего электрода ПГЭ составляла  $0.038 \text{ см}^2$ . Для подключения ПГЭ к потенциостату использовали коннектор для планарных электродов DCS (Metrohm, Нидерланды). Вольтамперометрические измерения проводили без термостатирования. Для измерения pH использовали цифровой pH-метр-иономер “Экотест-001” (“Эконикс-Эксперт”, Москва).

Непосредственно перед использованием СУЭ полировали механически с помощью полировального набора CH Instruments (Кат. № CH1120, США), после чего ополаскивали деионированной водой, промывали ацетоном, серной кислотой, этанолом и дважды деионированной водой. Далее электрод очищали электрохимически путем десятикратного циклирования потенциала в  $0.1 \text{ М}$  фосфатном буферном растворе, содержащем  $0.1 \text{ М NaNO}_3$  (далее – ФБ), pH 7.0, между  $-1.0$  и  $1.0 \text{ В}$  при скорости сканирования  $0.1 \text{ В/с}$ . Для ПГЭ проводили только электрохимическую очистку в условиях, описанных выше. В измерениях на ПГЭ на рабочую поверхность электрода наносили  $100 \text{ мкл}$  раствора, замыкавшего контакты рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения. В серии экспериментов по изучению pH-зависимости сигналов готовили растворы с pH от 2 до 9, наносили раствор с определенным pH на поверхность электрода либо помещали электрод в ячейку, после чего регистрировали вольтамперограмму, промывали электрод, сушили на воздухе и помещали в раствор с другим значением pH. При необходимости pH фосфатного буфера корректировали добавками  $\text{NaOH}$  и  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Азур С адсорбировали на СУЭ из  $0.2 \text{ мМ}$  раствора красителя в  $0.1 \text{ М}$  ФБ, pH 7.0, и на ПГЭ из  $0.2 \text{ мМ}$  или  $0.1 \text{ М}$  раствора красителя в релине.

Электрохимические характеристики адсорбированных слоев Азура С изучали методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) в диапазоне потенциалов, не затрагивающем высокие анодные значения, при которых протекает необратимое окисление мономера с образованием катион-радикала, инициирующего полимеризацию. При проведении инкубирования электроды выдерживали в растворе Азура С с перемешиванием (СУЭ) или без перемешивания (ПГЭ) в бестоковом режиме с последующей поляризацией и регистрацией циклической вольтамперограммы. Вре-



электроде и разовые измерения рН на индивидуальных электродах.

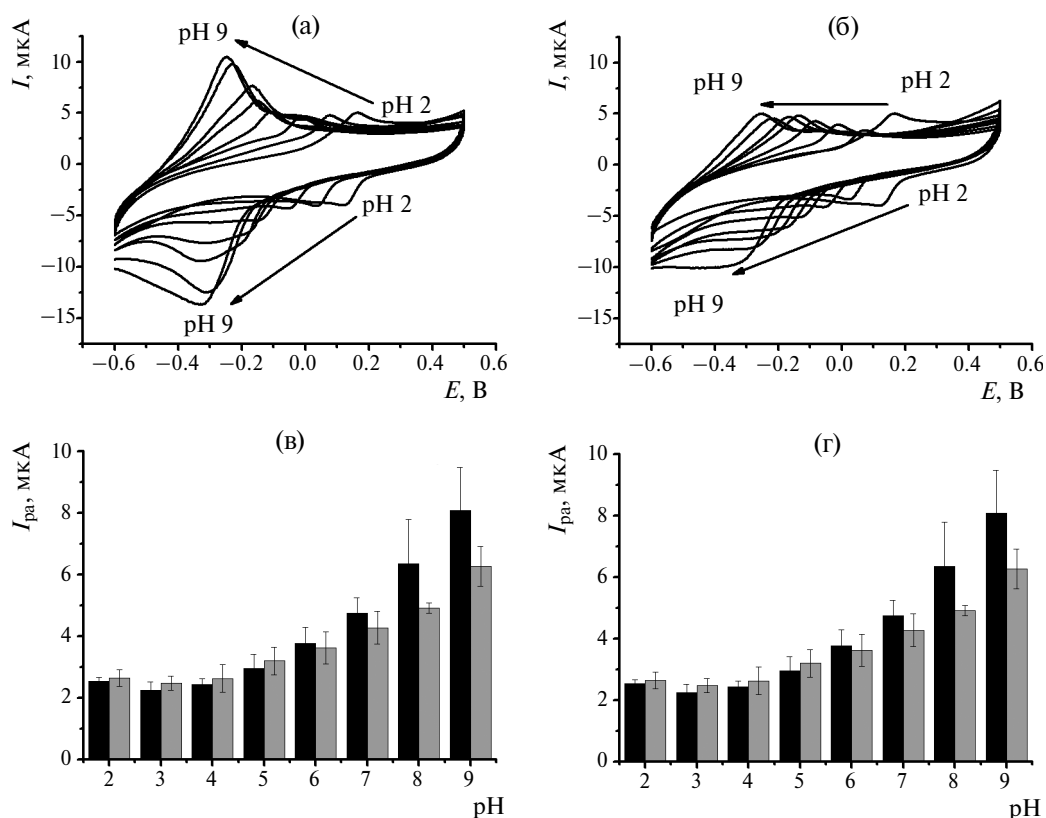
Циклические вольтамперограммы для указанных вариантов регистрации рН-зависимости представлены на рис. 2а и 2б. Токи пиков красителя увеличивались с рН в диапазоне 4.0–9.0 для обоих вариантов регистрации рН-зависимости (рис. 2в, 2г).

В кислых средах вольтамперограммы менялись незначительно. При последовательной регистрации рН-зависимости на одном электроде токи пика в щелочной области были несколько выше, возможно, в результате частичной дезагрегации сорбированного красителя при многократном взаимном переходе окисленной и восстановленной формы. Воспроизводимость токов пика для этого варианта регистрации рН-зависимости была хуже по сравнению с построением аналогичной зависимости по разовым измерениям на индивидуальных электродах.

Далее изучали рН-зависимость равновесного редокс-потенциала  $E_m$  адсорбированного Азура С, рассчитываемого как полусумма потенциалов

анодного и катодного пиков. При регистрации всей зависимости на одном электроде наблюдали два линейных участка с наклонами  $-91 \pm 2$  мВ/рС (рН = 2–5), и  $-40 \pm 2$  мВ/рС (рН = 5–9). Наклоны зависимости  $E_m$  – рН, построенной по отдельным точкам, имели сходные значения:  $-84 \pm 4$  мВ/рС (рН = 2–5), и  $-45 \pm 1$  мВ/рС (рН = 5–9).

В кислой среде указанные наклоны превышали нернстовское значение для равного числа переносимых ионов водорода и электронов в потенциалоопределяющей стадии, что свидетельствовало о многостадийном характере процесса с участием протонированных форм красителя. Подобное поведение было ранее описано для Нейтрального красного [29], где в электродной реакции с протонированной формой красителя в интервале рН 0.5–4.4 участвуют три иона водорода и два электрона. Превышение наклона рН-зависимости  $E_m$  в средах со значениями рН, близким к нейтральным, может быть связано с участием протонированной формы красителя в реакции с одним ионом водорода и двумя электронами.



**Рис. 2.** Циклические вольтамперограммы, полученные на СУЭ с адсорбированным Азуром С: (а) регистрация всего диапазона рН на одном электроде, (б) построение зависимости по результатам разовых измерений на индивидуальных электродах. рН-Зависимость: (в) токов пика окисления, (г) токов пика восстановления адсорбированного Азура С. Черные столбики отвечают регистрации всей рН-зависимости на одном СУЭ, серые – построению зависимости по разовым измерениям на индивидуальных электродах. ЦВА, 0.1 М ФБ, рН 2.0–9.0, диапазон сканирования потенциала –0.6 ... 0.5 В, 0.1 В/с.

Для установления природы лимитирующей стадии электродной реакции строили бифазную зависимость тока пика окисления/восстановления ( $I_p$ ) от скорости сканирования потенциала ( $v$ ). При этом использовали три варианта регистрации сигнала. В первом зависимость получали на одном СУЭ с адсорбированным Азуром С, во втором каждую вольтамперограмму регистрировали на отдельном электроде, применявшемся однократно. В третьем варианте электрод с адсорбированным красителем сначала стабилизировали пятикратным циклированием потенциала и далее регистрировали зависимость токов пиков от скорости сканирования потенциала.

Во всех вариантах регистрации сигнала токи окисления соответствовали формально смешанному диффузионно-адсорбционному характеру процесса. Тангенс угла наклона зависимости  $\lg I_p - \lg v$  находился в диапазоне 0.72–0.82. Для токов пика восстановления первый и второй варианты регистрации сигнала демонстрировали наклоны, характерные для диффузионного контроля (0.65 и 0.55), тогда как после электрохимической стабилизации СУЭ тангенс угла наклона зависимости увеличивался до 0.82. Поскольку Азур С в указанных измерениях в растворе отсутствовал, найденные значения наклона свидетельствуют о торможении переноса электрона в агрегатах красителя в результате обменных процессов с участием окисленных и восстановленных форм красителя. Ранее подобное поведение было установлено для полимерных пленок поли(нейтрального красного) [30], а также для переноса электрона в поли(этиленгликоле), несущем изолированные группы ферроцена [31]. Промежуточное значение угла наклона зависимости  $\lg I_p - \lg v$  между 0.5 (диффузионный контроль переноса электрона) и 1.0 (лимитирование поверхностной реакции переноса электрона)

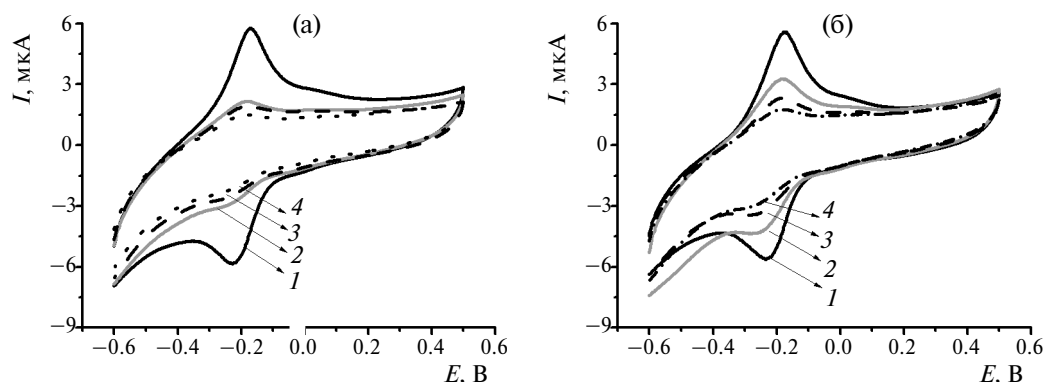
свидетельствует в пользу предположения о агрегации Азура С на электроде и формировании полислоистых покрытий, в которых подобные обменные реакции возможны.

СУЭ с адсорбированных Азуром С использовали для иммобилизации нативной и денатурированной ДНК из молок лосося, наносимой на электрод путем физической адсорбции (рис. 3).

В присутствии увеличивающихся количеств ДНК наблюдалось прогрессирующее снижение пиков Азура С при сохранении потенциалов пиков. Очевидно, что положительно заряженные молекулы красителя электростатически аккумулируют молекулы ДНК с отрицательно заряженными фосфатными группами остова спирали. Денатурация ДНК увеличивает гибкость биомолекулы за счет ее частичной дегибридации и формирования более гибких участков с однонитевой структурой. С одной стороны, это снижает влияние связывания ДНК вследствие нарушения регулярности расположения зарядов последней. С другой стороны, это увеличивает чувствительность слоя к количеству ДНК в растворе, что выражается в большем расхождении соответствующих вольтамперограмм (рис. 3б).

**Электрохимия Азура С в релине.** Выбор релина обусловлен его устойчивостью в условиях электрохимических измерений. Он активно применяется в сорбции, экстракции, в электрохимическом анализе для электрополимеризации органических соединений и электроосаждения металлов, а также в составе химических источников тока [21, 32]. Ранее нами была исследована реакция электрополимеризации Азура С в релине [7]. Поэтому представляло интерес установить особенности электрохимического поведения мономерного Азура С при его адсорбции из релина.

При адсорбции Азура С из его 0.2 мМ раствора, ранее использованного при исследовании



**Рис. 3.** Циклические вольтамперограммы, полученные на СУЭ с Азуром С, адсорбированным из ФБ, при иммобилизации нативной (а) и денатурированной (б) ДНК в концентрации, мг/мл: 1 – 0, 2 – 0.25, 3 – 0.5 мг, 4 – 1.0. 0.1 М ФБ, рН 7.0, диапазон сканирования потенциала –0.6 ... 0.5 В, 0.1 В/с.

в ФБ, было установлено значительное искажение геометрии пиков на вольтамперограммах в силу большой вязкости среды. Поэтому скорость сканирования потенциала увеличили до 0.15 В/с. Адсорбцию в отличие от СУЭ проводили в капле релина, нанесенной на поверхность рабочего электрода. Сигнал 0.2 мМ Азура С регистрировали в интервале  $-0.5 \dots 0.4$  В. При переносе ПГЭ с адсорбированным красителем в 0.1 М ФБ происходило заметное смещение пиков на вольтамперограмме в катодную область, а сами пики были существенно меньше, чем при адсорбции красителя в водной среде (менее 1 мкА). Последовательная регистрация нескольких вольтамперограмм приводила к снижению токов пика со стабилизацией к пятому циклу. Таким образом, при использовании 0.2 мМ Азура С в релине его перенос на поверхность ПГЭ был малоэффективен по сравнению с ФБ. Поэтому дальнейшие исследования адсорбции Азура С на ПГЭ проводили из 0.1 М концентрации красителя в релине. Именно эта концентрация была использована в литературе для получения электрополимеризованных покрытий Азура С из релина [7].

Вольтамперограммы адсорбированного из релина Азура С до и после переноса электрода в ФБ приведены на рис. 4. Как видно, перенос ПГЭ в ФБ приводит к существенному смещению пары пиков без заметного изменения их морфологии.

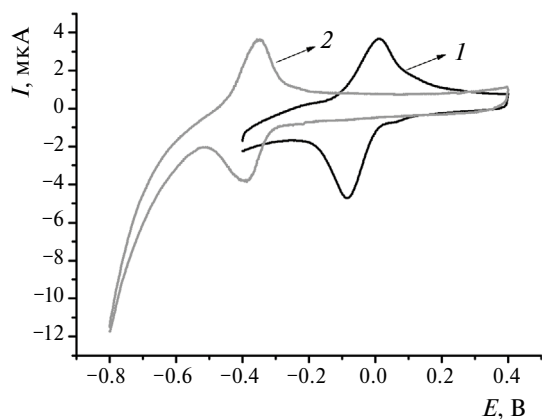
При последовательной регистрации нескольких вольтамперограмм из 0.1 М раствора Азура С в релине их вид усложнялся. В катодной области при увеличении числа циклов сканирования потенциала появлялась дополнительная пара пиков (рис. 5, пики I и II). Токи пиков редокс-пары (I) при потенциалах около  $-0.030$  и  $0.035$  В снижались с увеличением числа циклов, а токи пика

новой пары пиков (II) при  $-0.26$  и  $-0.18$  В в тех же условиях росли.

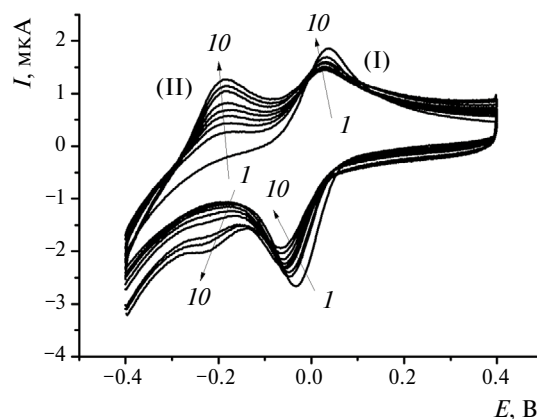
Сравнение потенциалов пар пиков I и II при последовательном сканировании потенциала (рис. 5) и при переносе ПГЭ с адсорбированным красителем в ФБ (рис. 4) позволило предположить, что краситель переходит на поверхность электрода в разных формах в зависимости от природы растворителя. Это, возможно, связано с гидратацией или ассоциацией молекул красителя. При циклировании потенциала происходит обратимое изменение заряда адсорбированных на электроде молекул, что может провоцировать взаимный переход различных форм Азура С.

Токи пика восстановления Азура С незначительно снижались с увеличением времени накопления до 10 мин. При переносе ПГЭ из релина в ФБ ток пика восстановления красителя снижался на 25%. Возможно, отсутствие зависимости количества адсорбированного красителя от времени инкубирования связано со сложностями образования мультислойных агрегатов и более быстрым насыщением поверхностного слоя электрода, чем в случае адсорбции Азура С из ФБ. Соотношение между анодными и катодными токами пиков в 0.1 М Азуре С в релине было постоянным (0.75), а разность потенциалов пиков окисления и восстановления увеличивалась почти вдвое (с 61 до 108 мВ) при увеличении времени накопления до 10 мин.

При переносе ПГЭ с Азуром С, адсорбированным из релина, в ФБ, не содержащий красителя, ток пика окисления адсорбированного Азура С соответствовал 98–115%, ток пика восстановления – 70–79% первоначальных значений токов пиков в релине. Как и в случае адсорбции из водных сред, пики на вольтамперограммах стабилизировались



**Рис. 4.** Циклические вольтамперограммы 0.1 М Азура С, адсорбированного на ПГЭ из релина, до (1) и после (2) переноса электрода в 0.1 М ФБ, рН 7.0, 0.15 В/с. Время инкубирования – 5 мин.

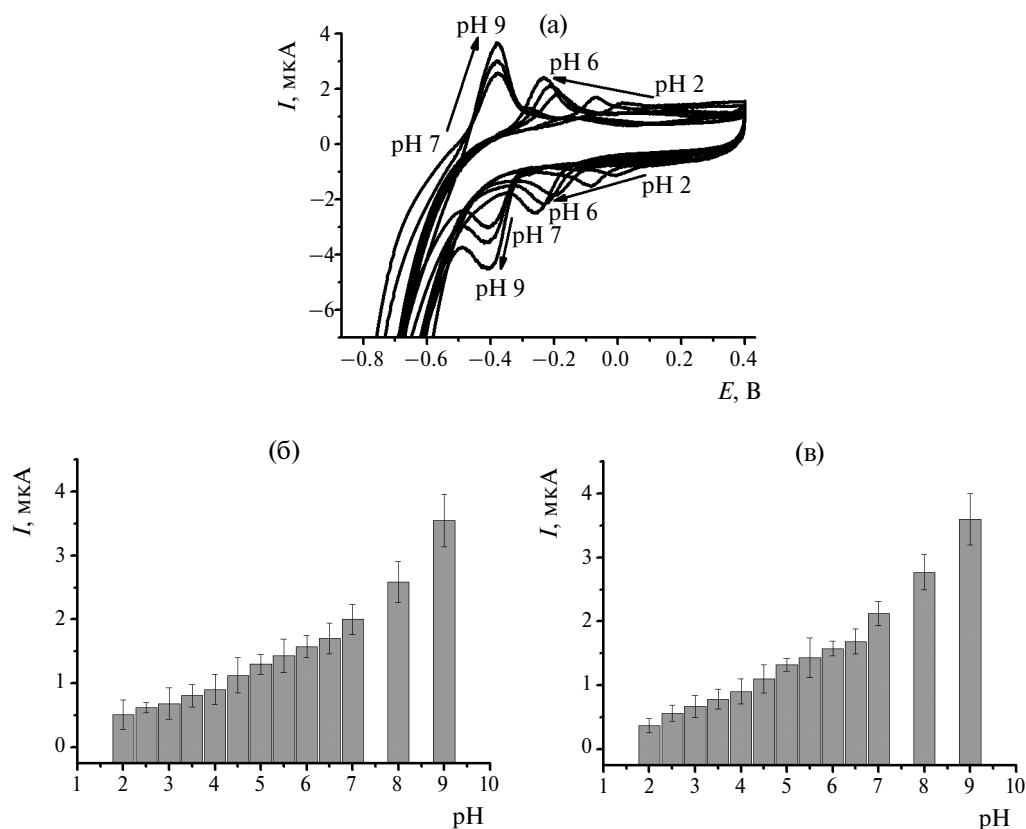


**Рис. 5.** Циклические вольтамперограммы 0.1 М раствора Азура С в релине на ПГЭ при последовательной регистрации 10 вольтамперограмм. Стрелками показано изменение редокс-сигналов с ростом числа циклов.

при времени накопления, превышающем 5 мин. Соотношение анодного и катодного токов пиков Азура С не зависело от времени накопления и было близко к единице, тогда как разность потенциалов пиков (величина  $E_m$ ) с увеличением времени накопления незначительно снижалась (от 28 к 22 мВ). Таким образом, перенос ПГЭ в водную среду способствовал увеличению обратимости электродной реакции Азура С по сравнению с релином. Вероятно, это можно связать с удалением водорастворимых компонентов глубокого эвтектического растворителя из слоя и увеличением эффективности переноса электрона в приэлектродном слое, насыщенном электролитами ФБ.

Для построения pH-зависимости токов пиков адсорбированного Азура С ПГЭ выдерживали 5 мин в 0.1 М растворе красителя в релине. Указанное время инкубирования соответствовало наилучшей стабилизации вольтамперограммы и воспроизводимости пиков. После этого электрод промывали деионированной водой и сушили на воздухе. pH-Зависимость регистрировали на одной рабочей поверхности без промежуточной механической зачистки ПГЭ, последовательно меняя pH 0.1 М ФБ (рис. 6).

Токи пиков адсорбированного красителя монотонно увеличивались во всем изученном диапазоне pH. Зависимость  $E_m$  – pH для Азура С, адсорбированного из релина, имела более сложный характер по сравнению с описанными ранее зависимостями, полученными в водных растворах. В кислых средах (pH 2.0–4.0) наклон составил  $-91 \pm 7$  мВ/рС, что превышало теоретический нернстовский наклон для равного числа ионов водорода и электронов, участвующих в лимитирующей стадии процесса. В диапазоне pH от 4.0 до 6.5 наклон составил  $-28 \pm 1$  мВ/рС (перенос двух электронов и одного иона водорода). В нейтральной и слабощелочной среде (pH 7.0–9.0) равновесный потенциал не менялся и составлял около  $-400$  мВ. Таким образом, при адсорбции из релина уменьшился вклад в потенциалопределяющую стадию протонированных форм красителя и самого процесса протонирования. По-видимому, использование менее гидрофильного, чем ФБ, релина приводило к вытеснению воды из сорбционного слоя и, возможно, к изменению ориентации адсорбированных молекул красителя относительно электрода. В пользу последнего предположения говорит сохранение формы



**Рис. 6.** (а) Циклические вольтамперограммы, полученные на ПГЭ при варьировании pH. pH-Зависимость (б) токов пика окисления, (в) токов пика восстановления Азура С, адсорбированного из релина. ЦВА, 0.1 М ФБ, диапазон сканирования потенциала  $-0.8 \dots 0.4$  В, 0.15 В/с. Представлены средние значения и ошибки измерения для пяти электродов.



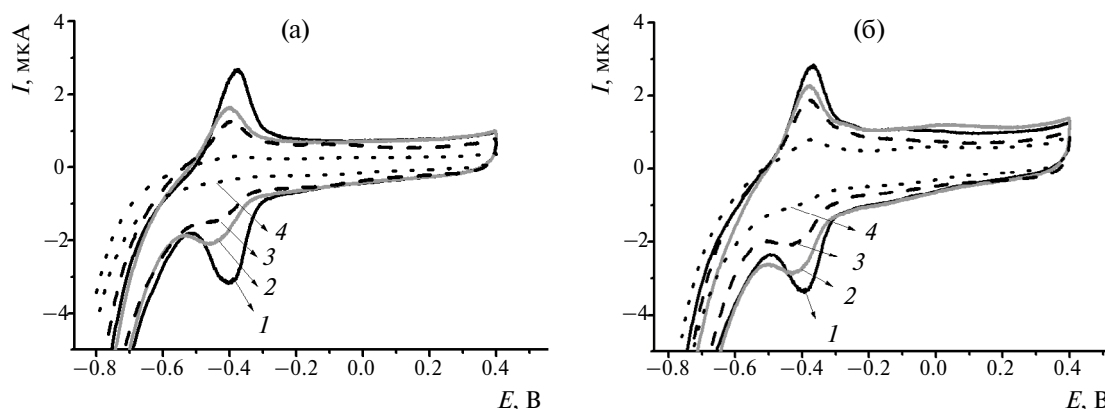


Рис 7. Циклические вольтамперограммы, полученные на ПГЭ с адсорбированным из релина Азуром С при иммобилизации нативной (а) и денатурированной (б) ДНК в концентрации, мг/мл: 1 – 0, 2 – 0.25, 3 – 0.5 мг, 4 – 1.0; 0.1 М ФБ, рН 7.0, диапазон сканирования потенциала –0.8 ... 0.4 В, 0.15 В/с.

и значительный сдвиг пары пиков при переносе ПГЭ в ФБ (ср. рис. 4).

Зависимость токов пика от скорости сканирования потенциала показала наклон зависимости 0.78 для анодных процессов (смешанный диффузионно-адсорбционный контроль) и 1.04 для катодного процесса (адсорбционный контроль). Это подтверждает высказанное выше предположение о сорбционном переносе меньших количеств Азура С из релина, чем из ФБ, и меньшей эффективности внутриэлектронного обмена в слое.

Полученные покрытия адсорбированного красителя были использованы для иммобилизации нативной и денатурированной ДНК из молок лосося. Соответствующие вольтамперограммы приведены на рис. 7. Нативная форма ДНК подавляла редокс-активность Азура С в большей степени по сравнению с термически денатурированной. При этом денатурированная ДНК демонстрировала более выраженную зависимость изменения токов пика от концентрации полимера, что может найти применение в создании сенсоров для оценки повреждения ДНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регистрация вольт-амперных кривых в области обратимого электронного переноса Азура С позволяет получить устойчивые слои адсорбированного красителя, которые сохраняют электрохимическую активность при последующем многократном сканировании потенциала. При проведении адсорбции из водного раствора (ФБ) происходит образование полислоного покрытия, в пределах которого электронный обмен между окисленными и восстановленными формами красителя формально соответствует смешанному диффузионно-сорбционному кон-

тролю лимитирующей стадии электродной реакции. Изменения токов пика при варьировании рН раствора (супернормальный наклон в кислой среде) указывают на значительный вклад протонирования различных форм адсорбированных молекул красителя и многостадийный характер процесса. Аналогичный процесс адсорбции из глубокого эвтектического растворителя релина происходит только при высоких концентрациях красителя. При этом морфология вольтамперограмм Азура С в релине и после переноса электрода в ФБ меняются незначительно и подобны результатам адсорбции из ФБ. Меньшие токи пика и сорбционный контроль лимитирующей стадии указывают на различия в поведении Азура С, адсорбированного из релина и из водной среды. Различия могут быть связаны как со степенью агломерации красителя, так и с различной сорбционной емкостью электродов в соответствующих средах. Многократное циклирование потенциала в релине приводит к формированию второй пары редокс-пиков Азура С, что косвенно подтверждает различия в природе и характеристиках слоя сорбированного красителя и может быть обусловлено обратимым переходом таких форм при изменении заряда молекул Азура С при регистрации вольтамперограмм. Также зависимость равновесного потенциала Азура С, адсорбированного из релина, от рН свидетельствует о меньшем вкладе протонированных форм и процесса протонирования красителя в кинетику его электродных реакций. Оба способа адсорбции красителя (из ФБ и релина) нашли применение в электростатическом аккумулировании ДНК и различии нативной и термически денатурированной ДНК по степени их участия в подавлении электрохимической активности адсорбированного красителя. Полученные данные могут найти применение

при последующей разработке способов электрополимеризации фенотиозиновых красителей и создании электрохимических сенсоров и биосенсоров, основанных на количественной оценке редокс-активности красителей на электроде.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 23-13-00163, <https://rscf.ru/project/23-13-00163/>, дата обращения 11.03.2024).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evtugyn, G.A., Porfireva, A.V., and Belyakova, S.V., Electrochemical DNA sensors for drug determination, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2022, vol. 221, Art. 115058.
- Golba, S. and Loskot, J., The alphabet of nanostructured polypyrrole, *Materials*, 2023, vol. 16, Art. 7069.
- Dalkiran, B. and Brett, C.M.A., Polyphenazine and polytriphenylmethane redox polymer/nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors: a review, *Microchim. Acta*, 2021, vol. 188, Art. 178.
- Samet, Y., Kraiem, D., and Abdelhédi, R., Electropolymerization of phenol, o-nitrophenol and o-methoxyphenol on gold and carbon steel materials and their corrosion protection effects, *Prog. Org. Coat.*, 2010, vol. 69, no. 4, p. 335.
- Porfireva, A., Plastinina, K., Evtugyn, V., Kuzin, Y., and Evtugyn, G., Electrochemical DNA sensor based on poly(Azure A) obtained from the buffer saturated with chloroform, *Sensors*, 2021, vol. 21, Art. 2949.
- Motshakeri, M., Phillips, A.R.J., and Kilmartin, P.A., Electrochemical preparation of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) layers on gold microelectrodes for uric acid-sensing applications, *J. Vis. Exp.*, 2021, vol. 173, Art. e62707.
- Porfireva, A., Begisheva, E., Evtugyn, V., and Evtugyn, G., Electrochemical DNA sensor for valrubicin detection based on poly(Azure C) films deposited from deep eutectic solvent, *Biosensors*, 2023, vol. 13, Art. 931.
- Liu, Y., Song, N., Ma, Z., Zhou, K., Gan, Z., Gao, Y., Tang, S., and Chen, C., Synthesis of a poly(N-methylthionine)/reduced graphene oxide nanocomposite for the detection of hydroquinone, *Mater. Chem. Phys.*, 2019, vol. 223, p. 548.
- Karra, S., Zhang, M., and Gorski, W., Electrochemistry and current control in surface films based on silica-azure redox nanoparticles, carbon nanotubes, enzymes, and polyelectrolytes, *Anal. Chem.*, 2013, vol. 85, no. 2, p. 1208.
- Wu, C., Zhu, J., Zhang, B., Shi, H., Zhang, H., Yuan, S., Yin, Y., Chen, G., and Chen, C., Efficient pH-universal aqueous supercapacitors enabled by an azure C-decorated N-doped graphene aerogel, *J. Colloid Interface Sci.*, 2023, vol. 650, p. 1871.
- Liu, F., Wu, C., Dong, Y., Zhu, C., and Chen, C., Poly(azure C)-coated CoFe Prussian blue analogue nanocubes for high-energy asymmetric supercapacitors, *J. Colloid Interface Sci.*, 2022, vol. 628, p. 682.
- Gan, Z., Song, N., Zhang, H., Ma, Z., Wang, Y., and Chen, C., One-step electrofabrication of reduced graphene oxide/poly (N-methylthionine) composite film for high performance supercapacitors, *J. Electrochem. Soc.*, 2020, vol. 167, Art. 085501.
- Blackwell, A.E., Moehlenbrock, M.J., Worsham, J.R., and Minter, S.D., Comparison of electropolymerized thiazine dyes as an electrocatalyst in enzymatic biofuel cells and self powered sensors, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2009, vol. 9, p. 1714.
- Li, P., Fang, Z., Zhang, Y., Mo, C., Hu, X., Jian, J., Wang, S., and Yu, D., A high-performance, highly bendable quasi-solid state zinc-organic battery enabled by intelligent proton-self-buffering copolymer cathodes, *J. Mater. Chem. A*, 2019, vol. 7, p. 17292.
- Chen, C., Hong, X., Xu, T., Lu, J., and Gao, Y., Preparation and electrochemical and electrochromic properties of wrinkled poly(N-methylthionine) film, *Synth. Met.*, 2015, vol. 205, p. 175.
- Chakraborty, A., Ahmed, S., and Saha, S.K., Electrochemical studies of progressively alkylated thiazine dyes on a glassy carbon electrode (GCE) in water, ethanol and Triton X-100 media, *J. Chem. Eng. Data*, 2010, vol. 55, p. 1908.
- Bayındır, O., Ersin, E., Nazır, H., Atakol, O., and Çelikkan, H., Spectroscopic and electrochemical characterizations of copper complexes with thionine, azure C and azure A, *Appl. Organomet. Chem.*, 2024, Art. e7356.
- Ahmed, S. and Saha, S.K., Electrochemical study of the reaction between progressively alkylated thiazine leucodyes and Fe (III) on a glassy carbon electrode, *Can. J. Chem.*, 1996, vol. 74, p. 1896.
- Al-Rufaie, M.M., Alsultani, Z.T.A., and Waheed, A.S., Adsorption kinetics and thermodynamics of Azure C dye from aqueous solution onto activated charcoal, *Koroze a Ochrana Mater.*, 2016, vol. 60, no. 3, p. 80.
- Espino, M., de los Ángeles Fernández, M., Gomez, F.J.V., and Silva, M.F., Natural designer solvents for greening analytical chemistry, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2016, vol. 76, p. 126.
- Shishov, A., Pochivalov, A., Nugbienyo, L., Andruch, V., and Bulatov, A., Deep eutectic solvents are not only effective extractants, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2020, vol. 129, p. 115956.
- Морозова, О.В., Васильева, И.С., Шумакович, Г.П., Зайцева, Е.А., Ярополов, А.И. Глубокие эвтектические растворители в биотехнологии. *Усп. биол. хим.* 2023. Т. 63. С. 301. [Morozova, O.V., Vasil'eva, I.S., Shumakovich, G.P., Zaitseva, E.A., and

- Yaropolov, A.I., Deep eutectic solvents for biotechnology applications, *Biochem. Moscow*, 2023, vol. 88, p. S150.]
23. Murthy, A.S.N. and Reddy, K. S., Cyclic-voltammetric studies of some phenothiazine dyes, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1984, vol. 80, p. 2745.
  24. Schlereth, D.D. and Karyakin, A.A., Electropolymerization of phenothiazine, phenoxazine and phenazine derivatives: Characterization of the polymers by UV-visible difference spectroelectrochemistry and Fourier transform IR spectroscopy, *J. Electroanal. Chem.*, 1995, vol. 395, p. 221.
  25. Munteanu, F.-D., Okamoto, Y., and Gorton, L., Electrochemical and catalytic investigation of carbon paste modified with Toluidine Blue O covalently immobilised on silica gel, *Anal. Chim. Acta*, 2003, vol. 476, p. 43.
  26. Dai, H., Xu, H., Wu, X., Lin, Y., Wei, M., and Chen, G., Electrochemical behavior of thionine at titanate nanotubes-based modified electrode: A sensing platform for the detection of trichloroacetic acid, *Talanta*, 2010, vol. 81, p. 1461.
  27. Priya, C., Anuja, S., Devendiran, M., Babu, R. S., and Narayanan, S. S., Non-enzymatic determination of hydrogen peroxide in milk samples using Graphite oxide/Nafion/Azure A modified electrode, *Ionics*, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11581-024-05470-z>
  28. Tang, W., Li, J., Yang, P., He, Q., Liao, L., Zhao, M., Yang, L., Wang, Z., Wang, L., He, P., and Jia, B., Azure B microspheres/nitrogen-doped reduced graphene oxide: Non-covalent interactions based crosslinking fabrication for high-performance supercapacitors, *Electrochim. Acta*, 2023, vol. 441, Art. 141786.
  29. Halliday, C.S. and Matthews, D.B., Some electrochemical and photoelectrochemical properties of 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine (Neutral red) in aqueous solution, *Aust. J. Chem.*, 1983, vol. 36, p. 507.
  30. Smolko, V., Shurpik, D., Porfireva, A., Evtugyn, G., Stoikov, I., and Hianik, T., Electrochemical aptasensor based on poly(Neutral red) and carboxylated pillar[5] arene for sensitive determination of aflatoxin M1, *Electroanalysis*, 2018, vol. 30, p. 486.
  31. Steentjes, T., Sarkar, S., Jonkheijm, P., Lemay, S. G., and Huskens, J., Electron transfer mediated by surface-tethered redox groups in nanofluidic devices, *Small*, 2017, vol. 13, Art. 1603268.
  32. Azmi, S., Roudahi, M. F., and Frackowiak, E., Reline deep eutectic solvent as green electrolyte for electrochemical energy storage application, *Energy Environ. Sci.*, 2022, vol. 15, p. 1156.