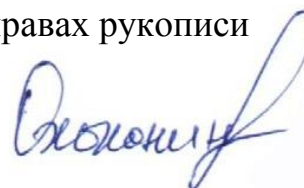


На правах рукописи



**Охохин Андрей Викторович**

**РАЗРАБОТКА БЕСФЕРМЕНТНОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ХОЛЕСТЕРИНА**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2017

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химико-технологического института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Научный руководитель: кандидат химических наук, доцент  
**Козицина Алиса Николаевна**

Официальные оппоненты: **Короткова Елена Ивановна**,  
доктор химических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», профессор кафедры физической и аналитической химии Института природных ресурсов;

**Супрун Елена Владимировна**,  
кандидат химических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», г. Москва, старший научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии

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

Защита состоится «05» сентября 2017 г. в 15-00 ч на заседании диссертационного совета Д **212.285.09** на базе ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, зал Ученого совета (ауд. И-420)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» <http://lib.urfu.ru/mod/data/view.php?id=51&rid=268186>

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

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Семенищев Владимир Сергеевич

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Постоянное развитие методов определения параметров биологических жидкостей и тканей организма человека является особо важной задачей современной медицины, особенно в тех случаях, когда определяемое вещество отражает состояние организма в целом и позволяет оценивать риски возникновения и развития тех или иных заболеваний.

В настоящее время заболевания сердца и сосудов стоят на первом месте среди причин смерти во всем мире, поэтому возможность ранней диагностики таких заболеваний способствует своевременному оказанию медицинской помощи и снижает угрозу развития их тяжелых или хронических форм. Одним из важнейших физиологических показателей при постановке диагноза и назначении медицинских процедур является содержание холестерина в крови.

Сегодня для определения холестерина широко применяют, например, колориметрию и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). Кроме того, в последние годы разработаны оптические и электрохимические биосенсоры для определения холестерина. В большинстве биосенсоров в качестве чувствительных и селективных агентов используют ферменты – холестериноксидазу, холестеринэстеразу или цитохром P450. Эти ферменты используют также в различных тест-системах на холестерин, например, основанных на реакции Триндера. Однако, несмотря на активные разработки, широкое применение биосенсоров ограничено высокой стоимостью применяемых ферментов, их низкой стабильностью в связи с чувствительностью к изменению pH и температуры и ограниченным сроком хранения. Имеющиеся бесферментные методы, такие как хроматография, колориметрия и масс-спектрометрия, требуют сложного аппаратного оформления, высокой квалификации персонала и трудоемки. Поэтому на сегодняшний день актуальными задачами являются упрощение и удешевление процедур по определению холестерина в целях создания возможности их проведения в небольших клиниках и лабораториях.

### **Степень разработанности темы исследования**

Электрохимические методы анализа, и, в частности, применение электрокатализаторов в качестве чувствительных элементов сенсоров, благодаря высокой чувствительности и скорости анализа, компактности и доступности

соответствующего оборудования и, как следствие, возможности работать в полевых условиях активно используются во всем мире в области аналитической химии и медицины. Бурное развитие технологий молекулярного распознавания, в том числе полимеров с молекулярными отпечатками, позволяет разрабатывать селективные элементы сенсоров без использования ферментов.

Сочетание электрокаталитических свойств неорганических солей и наночастиц золота и серебра, исключительных сорбционных свойств полимеров с молекулярными отпечатками и миниатюрного исполнения даст возможность упростить, ускорить и удешевить процедуру определения холестерина в крови.

**Цель работы:** разработка бесферментных электрохимических методов и сенсоров на основе катализаторов наночастиц золота и серебра индивидуальных и смешанного состава, тиоцианата калия и неорганических солей никеля (II) и кобальта (II) в качестве чувствительных элементов определения холестерина, а также полимеров с молекулярными отпечатками холестерина как распознающих элементов.

Для достижения указанной цели необходимо решить следующие **задачи**:

— выбрать оптимальный метод синтеза и состав наночастиц золота и серебра индивидуальных и смешанного состава. Исследовать влияние типа ПАВ, используемого для создания эмульсии холестерина в воде, на каталитическую активность синтезированных наночастиц в электрохимическом окислении холестерина;

— исследовать каталитическую активность тиоцианата калия, хлоридов никеля (II) и кобальта (II) в электрохимическом окислении холестерина в среде ацетонитрила и ДМФА, выбрать эффективный электрокатализатор;

— исследовать кинетику электрохимического окисления холестерина в присутствии каталитической системы;

— определить аналитические характеристики применения выбранных катализаторов для электрохимического определения холестерина;

— синтезировать полимеры с молекулярными отпечатками холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита, исследовать их способность к селективной сорбции холестерина из модельных растворов;

— разработать аппаратную основу нового бесферментного селективного электрохимического метода определения холестерина с использованием выбранного катализатора и частиц ПМО холестерина в проточном режиме.

### **Научная новизна:**

1. Впервые показано, что электрохимическое окисление холестерина на стеклоуглеродном электроде (СУЭ), модифицированном электроосажденными наночастицами серебра и наночастицами, состоящими из золотого «ядра» и серебряной «оболочки», является каталитическим процессом, а его лимитирующей стадией – диффузия аналита к поверхности электрода. Показано, что наиболее выраженная каталитическая активность в электрохимическом окислении холестерина наблюдается при использовании наночастиц, состоящих из золотого «ядра» и серебряной «оболочки», и цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) в качестве ПАВ для создания эмульсии холестерина в воде. Установлена линейная зависимость величины прироста пика тока окисления электроосажденных индивидуальных наночастиц серебра и наночастиц с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой» от концентрации холестерина в рабочем растворе.

2. Впервые показана каталитическая активность тиоцианата калия, хлориды никеля (II) и кобальта (II) в электрохимическом окислении холестерина в апротонной среде. Методами вольтамперометрии со стационарным и вращающимся дисковым электродом показано, что лимитирующей стадией электрохимического окисления этих солей является диффузия катионов к поверхности электрода. Установлена линейная зависимость величины прироста пика тока окисления в присутствии солей от концентрации холестерина в рабочем растворе.

3. Впервые установлено, что электрокаталитическое окисление холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в ацетонитриле в качестве катализатора подчиняется ферментативной кинетике, уравнению Михаэлиса-Ментен. Рассчитаны константа Михаэлиса и каталитическая константа, и показано, что по эффективности данный катализатор не уступает природному ферменту холестериноксидазе.

4. Впервые рассчитаны метрологические характеристики электрокаталитического метода и сенсоров в определении холестерина с использованием в качестве катализаторов электроосажденных наночастиц серебра и наночастиц

смешанного состава с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой», хлоридов никеля (II) и кобальта (II) и тиоцианата калия: чувствительность, минимальная определяемая концентрация холестерина, предел обнаружения. Показано, что активность катализаторов зависит от природы используемых в рабочем растворе ПАВ и растворителей, от составов и способов синтеза наночастиц и от концентрации катализаторов в рабочем растворе. Выбран эффективный катализатор – хлорид кобальта (II) концентрацией 25 мМ в ацетонитриле.

5. Впервые синтезированы методом радикальной полимеризации на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита полимеры с молекулярными отпечатками холестерина на основе 4-винилпиридина, дивинилбензола и этиленгликольдиметакрилата. Подтверждена возможность селективного определения холестерина в модельных растворах.

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

- Разработаны бесферментные электрохимические сенсоры для определения холестерина на основе электроосажденных наночастиц серебра и наночастиц с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой».
- Разработан электрохимический метод определения холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в качестве катализатора в ацетонитриле.
- Разработаны ПМО холестерина, обеспечивающих селективность определения.
- Разработана аппаратная платформа для проведения экспрессного бесферментного определения холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в ацетонитриле в качестве электрокатализатора и частиц ПМО в качестве селективного элемента, которая позволяет автоматизировать процесс анализа. Применение разработанного метода и сенсоров позволяет сократить время проведения анализа на холестерин до 15 мин.
- Показана и обоснована возможность практического применения разработанных сенсоров и метода определения холестерина в модельных системах. Разработанный метод не уступает по чувствительности и селективности ферментативным методам и сенсорам.

#### **Методология и методы исследования**

Синтез НЧ золота и серебра осуществляли термохимическим и электрохимическим методами. Синтез ОКНЧ проводили по методу Штобера: гидролизом тетраэтоксисилана

(ТЭОС), МНЧ – методом соосаждения, модификацию полученных наночастиц виниловыми группами вели по методу Штобера с использованием трис(2-метоксиэтокси)(винил)силана (ТМВС). Синтез ПМО на поверхности наночастиц вели методом радикальной полимеризации в толуоле. Предполимеризационная смесь содержала 0,5 мМ холестерина, 2 мМ функционального мономера 4-ВП, 0,1 мМ инициатора азобутироизонитрила (АИБН) и 10 мМ сшивающего агента (СА) в толуоле. Размеры и морфологию частиц ПМО холестерина исследовали методом сканирующей электронной микроскопии. Состав частиц ПМО изучали методом ИК-спектроскопии.

Электрохимические исследования методами циклической вольтамперометрии (ЦВА) и хроноамперометрии (ХА) проводили с использованием потенциостата/гальваностата Autolab PGSTAT128N («Metrohm», Швейцария) в комплекте с трехэлектродной ячейкой. В качестве электрода сравнения использовали Ag/AgCl с двумя мембранами («Metrohm», Швейцария) и серебряную проволоку. Вспомогательным электродом служили стержень из стеклоуглерода и палладиевая проволока. В качестве рабочего электрода использовали платиновый (ПЭ) и стеклоуглеродный (СУЭ) дисковые электроды («Metrohm», Швейцария), вращающийся дисковый платиновый электрод (ВДЭ, «Pine», США) и платиновую проволоку диаметром 0.3 мм. Индифферентным электролитом в апротонных растворителях служил перхлорат лития ( $\text{LiClO}_4$ , 99%, Acros Organics, США).

Микрофотографии образцов частиц ПМО холестерина были получены на сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss AURIGA CrossBeam (Германия) в УЦКП «Современные нанотехнологии» ИЕНиМ УрФУ»

ИК-спектры были зарегистрированы на ИК-Фурье спектрометре ALPHA производства «BrukerOptikGmbH» (Германия) в таблетках KBr. Спектральные характеристики получены в Лаборатории комплексных исследований и экспертной оценки органических материалов ХТИ УрФУ.

Селективное определение холестерина в проточном режиме осуществляли с использованием одноразовых миллифлюидных плашек  $\mu$ -Slide III<sup>3in1</sup> производства ibidi (США) и перистальтического насоса S-32 (Польша) со скоростью потока 5 мкл/с.

Водно-органическую эмульсию готовили путем смешивания одинаковых объемов 0.25 М раствора NaOH и ТГФ с последующим добавлением к полученному раствору ПАВ в количестве, соответствующем концентрации ПАВ 1 мМ.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты исследования влияния состава наночастиц золота и серебра на их каталитические свойства в электрохимическом окислении холестерина.

2. Результаты исследования влияния концентрации тиоцианата калия, хлоридов никеля (II) и кобальта (II) в объеме раствора и природы апротонного растворителя на чувствительность определения холестерина.

3. Результаты исследования электрохимического поведения изучаемых электрокатализаторов, иммобилизованных на поверхности рабочего электрода или в объеме раствора, в том числе по отношению к холестерину. Результаты изучения влияния факторов внешней среды на электрохимические характеристики катализаторов и генерируемый ими аналитический сигнал в присутствии холестерина.

4. Результаты исследования размеров, формы и морфологии полимеров с молекулярными отпечатками холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита, их способности к селективному связыванию холестерина.

5. Аппаратную платформу для бесферментного селективного электрохимического определения холестерина в проточном режиме с использованием хлорида кобальта (II) в ацетонитриле в качестве чувствительного элемента и полимера с молекулярными отпечатками холестерина, синтезированного на поверхности магнетита, в качестве селективного элемента.

**Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность полученных данных определяется использованием в работе современных физико-химических методов исследования и высокотехнологичного оборудования, а также статистической обработкой полученных результатов.

Результаты исследований были представлены на научной конференции «Достижения в химии и химической технологии» (Екатеринбург, Россия, 2011 г.); на VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012» (Уфа-Абзаково, Россия, 2012 г.); на IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной научной школой по органической химии (Уфа-Абзаково, Россия, 2013 г.); на Всероссийской конференции «Второй съезд аналитиков России» (Москва, Россия, 2013 г.); на 15 Международной конференции по электроанализу ESEAC (Мальмё, Швеция, 2014 г.); на X Всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной



научной школой (Уфа-Абзаково, Россия, 2015 г.); на IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой «ЭМА 2016» (Екатеринбург-Леневка, Россия, 2016 г.); на XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, Россия, 2016 г.).

Диссертационная работа является частью результатов исследований, проводимых на кафедре аналитической химии Химико-технологического института УрФУ имени Б.Н. Ельцина при поддержке грантов на проведение исследований молодыми учеными УрФУ 2011-2014 гг. и гранта для молодых ученых У.М.Н.И.К 2014-2017 гг.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 1 статья в российском рецензируемом научном издании, рекомендованном ВАК, 1 статья в рецензируемом журнале, входящем в базы цитирования Scopus и Web of Science, и 1 патент РФ на изобретение.

**Личный вклад соискателя** состоит в непосредственном участии в проведении исследований и общей постановке задач, в проведении анализа и статистической обработке полученных результатов. В написании статей и докладов, апробации и внедрении результатов исследования в разработку бесферментного электрохимического метода определения свободного холестерина.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация содержит введение, 5 глав, выводы и список цитируемой литературы, состоящий из 197 наименований. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, включая 31 рисунок и 13 таблиц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **введении** раскрыта актуальность и степени разработанности темы диссертационной работы, определены цели и задачи исследования, сформулирована научная новизна и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** приведены основные достижения в области разработки методов и сенсоров для определения холестерина. Особое внимание уделено бесферментным методам и сенсорам, в которых в качестве чувствительных элементов используются электрокатализаторы и ПМО холестерина в качестве селективных элементов.

Во **второй главе** представлены сведения о реактивах, материалах, методологической и инструментальной базе диссертационного исследования.

**Третья глава** посвящена исследованию каталитической активности  $KSCN$ ,  $NiCl_2$  и  $CoCl_2$  в апротонной среде: ДМФА и АН, оценке влияния факторов внешней среды на процессы формирования прямого электрохимического отклика от растворенных катализаторов в присутствии холестерина и получению аналитического сигнала для дальнейшего использования в электрохимическом определении холестерина.

С целью разработки бесферментного электрохимического метода определения холестерина был рассмотрен хлорид кобальта (II), растворенный в ацетонитриле, в качестве электрокатализатора. На рисунке 1 представлены ЦВА, зарегистрированные на ПЭ в АН в отсутствие и в присутствии  $CoCl_2$  и холестерина. Из рисунка видно, что при потенциале около 1.47 В ЦВА 2 имеет заметную слабовыраженную волну, отвечающую, по-видимому, процессу электроокисления холестерина.

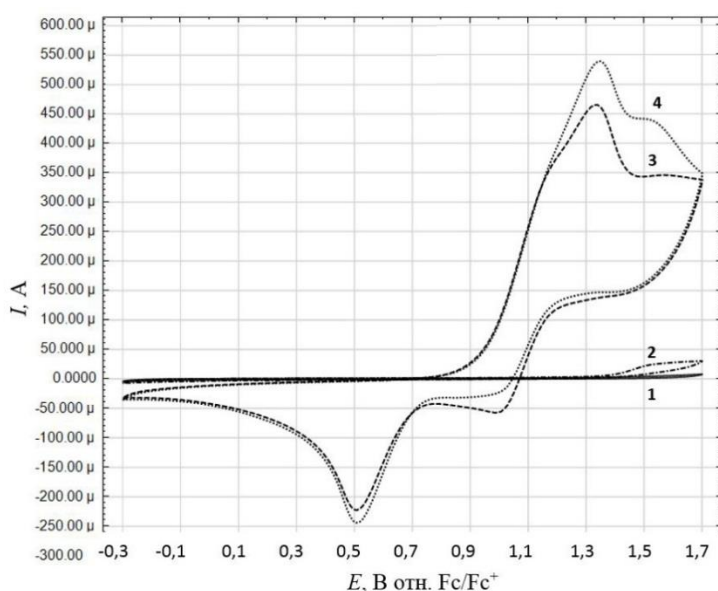


Рисунок 1 – ЦВА на ПЭ без холестерина (1), с 0.5 мМ холестерина (2), с 25 мМ  $CoCl_2$  без холестерина (3) и с 25 мМ  $CoCl_2$  и 0.2 мМ холестерина (4). Фоновый электролит 0,1 М  $LiClO_4$  в АН;  $v_{скан} = 0.1$  В/с.

На ЦВА, зарегистрированной в растворе  $CoCl_2$  (кривая 3), присутствует пара анодных и катодных пиков при потенциалах 1.35 В и 0.50 В соответственно, относящихся, очевидно, к паре  $Co(II)/Co(III)$ . Слабовыраженный анодный при 1.47 В и катодный при 1.0 В пики, вероятно, также относятся к паре  $Co(II)/Co(III)$ . По-видимому, их появление обусловлено реакцией комплексообразования между катионом кобальта, хлорид-ионами и молекулами ацетонитрила.

Интерес представляет определение возможных механизмов окислительно-восстановительных превращений  $CoCl_2$  и холестерина в апротонной среде. С использованием методов вольтамперометрии и хроноамперометрии были рассчитаны

количество электронов  $n$ , участвующих в электрохимической реакции, и коэффициент диффузии  $D$  электроактивных сольватированных ионов кобальта (II) по уравнению Левича (1) и по уравнению Коттрелля (2) с использованием платинового ВДЭ с вращением и без вращения соответственно:  $D = 6.88 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$  и  $n = 0.96$ .

$$i_d = 0.62nFC^*D^{2/3}v^{-1/6}\omega^{1/2} \quad (1)$$

$$i = nFC^*D^{1/2}\pi^{-1/2}t^{-1/2} \quad (2)$$

Таким образом, можно сделать вывод, что в процессе электроокисления хлорида кобальта (II) в среде ацетонитрила участвует один электрон.

На основании полученных экспериментальных данных можно схематично предложить следующий возможный путь протекания реакции электрокаталитического окисления холестерина с участием  $\text{CoCl}_2$  в АН на ПЭ (рисунок 2):

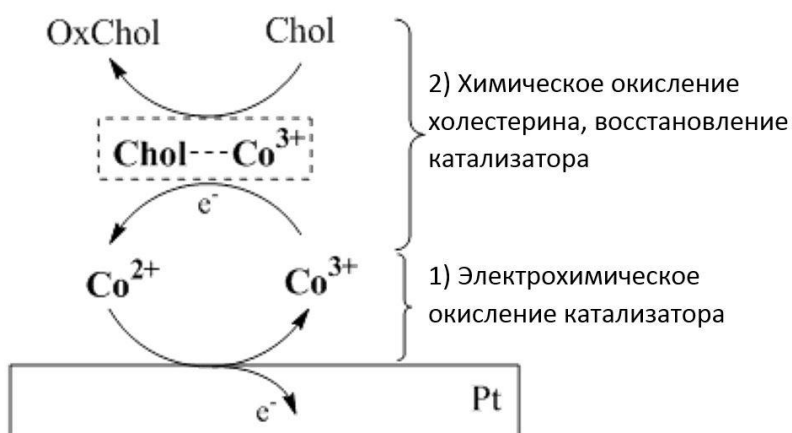


Рисунок 2 – Схема электрокаталитического окисления холестерина с участием  $\text{Co}^{2+}$  в АН на ПЭ.

где Chol – холестерин;  $\text{Co}^{3+} \cdots \text{Chol}$  – аддукт, образующийся в процессе электрокаталитической реакции между катионом металла и молекулой холестерина; OxChol – окисленный холестерин, образующийся в результате реакции.

Охарактеризовать взаимодействие электрокатализатора  $\text{CoCl}_2$  и холестерина позволяет применение ферментативной модели Михаэлис-Ментен (М-М) (уравнение 4):

$$i = \frac{nFkC_{cat}C_{хол}}{K_m + C_{хол}} = \frac{i_{max}C_{хол}}{K_m + C_{хол}} \quad (4)$$

где  $i$  – регистрируемый ток, мкА;  $i_{max}$  – максимальный регистрируемый ток, мкА. Сравнение экспериментально полученной зависимости прироста тока окисления катализатора от концентрации холестерина в рабочем растворе с рассчитанной по модели М-М представлено на рисунке 3.



Таблица 1 – Константа Михаэлиса и каталитическая константа для  $\text{CoCl}_2$  в АН и холестериноксидазы (ХО) в фосфатном буфере.

	$K_m$ , ммоль·л <sup>-1</sup>	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>
ХО из <i>Brevibacterium sterolicum</i>	0.04-1.6	26-106
ХО из <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	0.4-2.2	2-271
$\text{CoCl}_2$ в АН (эта работа)	0.370	0.94

На основе полученных результатов был предложен амперометрический метод определения содержания холестерина с использованием  $\text{CoCl}_2$  в качестве электрокатализатора. Аналитическим сигналом служил прирост предельного тока окисления  $\text{Co}^{2+}$  после добавления в рабочий раствор холестерина с установлением концентраций холестерина в диапазоне от 0 до 200 мкМ.

Оптимальная концентрация  $\text{CoCl}_2$  в разработанном методе была определена в 25 мМ после исследования каталитической активности  $\text{CoCl}_2$  различной концентрации (таблица 2).

В таблице 3 приведены аналитические характеристики определения холестерина для выбранных условий анализа. Как видно, оптимальные результаты (максимально близкие, воспроизводимые и правильные значения найденной добавки) получены для концентрации  $\text{CoCl}_2$  25 мМ.

Таблица 2 – Уравнения регрессии участка 0-200 мкМ холестерина зависимости прироста тока анодного пика окисления  $\text{Co}^{2+}$  от концентрации холестерина в растворе.

$C(\text{CoCl}_2)$	Уравнение регрессии лин. участка $i=aC+b$ , ( $i$ , мкА; $C$ , мкМ)	$R^2$
5	$i = (-0.04 \pm 0.01)C + (13.1 \pm 0.4)$	0.991
10	$i = (0.28 \pm 0.06)C + (1.9 \pm 0.5)$	0.922
15	$i = (0.07 \pm 0.04)C - (2.0 \pm 0.9)$	0.719
20	$i = (0.75 \pm 0.3)C + (69.3 \pm 3.0)$	0.690
25	$i = (0.40 \pm 0.04)C + (19.8 \pm 4.0)$	0.971
30	$i = (0.29 \pm 0.03)C + (27.9 \pm 4.1)$	0.947
40	$i = (0.17 \pm 0.10)C + (108.9 \pm 8.5)$	0.788

Таблица 3 – Аналитические характеристики определения холестерина предлагаемым методом.  $n = 6$ ,  $P = 0.95$ .

Введено, мкМ	Найдено, $c \pm \Delta c$ , мкМ	$s_r$ , %	$C_{min}$ , мкМ
50.0	48 ± 2	5.8	2
100.0	100 ± 6	4.5	
150.0	155 ± 7	6.0	

Были исследованы каталитические свойства KSCN, NiCl<sub>2</sub> и CoCl<sub>2</sub> в электрохимическом окислении холестерина на ПЭ в ДМФА (рисунок 4). Присутствие холестерина в рабочем растворе во всех случаях приводит к увеличению пика тока окисления катализатора, однако в отсутствие в растворе электрокатализатора анодных пиков не наблюдается. Данный факт указывает на электрокаталитический характер окисления холестерина у поверхности электрода в присутствии KSCN, NiCl<sub>2</sub> и CoCl<sub>2</sub>

В целях установления схем электрохимических реакций окисления катализаторов, протекающих на поверхности ПЭ, были определены потенциалы анодных пиков  $E_{an}$ , коэффициенты диффузии  $D$  электрохимически активных соединений, количество электронов  $n$ , участвующих в соответствующей реакции. Результаты представлены в таблице 4.

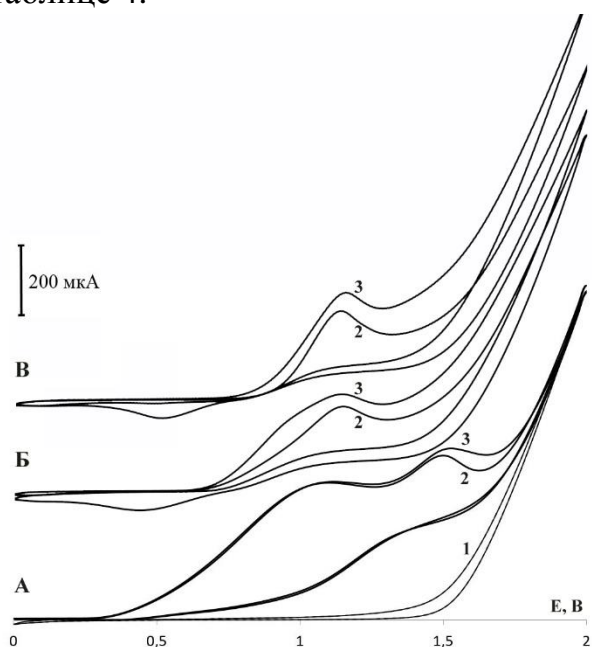


Рисунок 4 – ЦВА на ПЭ в ДМФА в присутствии растворенных катализаторов и в отсутствии и в присутствии холестерина:

(А) 15 мМ KSCN;

(Б) 10 мМ NiCl<sub>2</sub>;

(В) 10 мМ CoCl<sub>2</sub>.

Кривая 1 – фоновый электролит 0.1 М LiClO<sub>4</sub>, кривая 2 – с растворенным катализатором, кривая 3 – с 10 мМ холестерина.  $v_{скан} = 0.1$  В/с.

Таблица 4 – Результаты расчета параметров реакций электрохимического окисления Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> и KSCN.

Катализатор		$I_{an}/I_{kn}$	$E_{an}, V$	$D, \text{cm}^2\text{s}^{-1}$	$n$
NiCl <sub>2</sub>		2.60	1.12	$3.87 \cdot 10^{-6}$	1.00
CoCl <sub>2</sub>		2.75	1.12	$2.08 \cdot 10^{-6}$	1.06
KSCN	Волна I	200	1.08	$5.11 \cdot 10^{-5}$	0.98
	Волна II	60	1.52		0.94

Как видно из таблицы, процесс окисления CoCl<sub>2</sub> и NiCl<sub>2</sub> сопровождается переносом одного электрона, а KSCN – последовательным переносом двух электронов.

На основе уравнений ферментативной кинетики М-М и Лайнувера-Бурка были рассчитаны  $K_m$  и аналитические характеристики определения холестерина для каждого типа катализатора (таблица 5).

Таким образом, в ДМФА наиболее предпочтительным из рассмотренных электрокатализаторов для использования в решении задачи определения холестерина является тиоцианат калия. Однако, обнаруженные электрокаталитические свойства  $\text{CoCl}_2$  по отношению к холестерину в АН превосходят аналогичные для рассмотренных электрокатализаторов в среде ДМФА, поэтому был сделан выбор в пользу использования  $\text{CoCl}_2$  в АН для количественного определения холестерина в дальнейших исследованиях.

Таблица 5 – Аналитические характеристики определения холестерина с использованием в качестве электрокатализаторов  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  и  $\text{KSCN}$  в ДМФА.

Катализатор	$C$ , мМ	Предел обнаружения, мкМ	Область линейной зависимости $I - C_{хол}$	Уравнение регрессии, $I$ , мкА; $C$ , мкМ	$R^2$	$K_m$ , мкМ
KSCN	15	37	50-300	$I = 0.0152C + 0.8063$	0.9100	212.60
$\text{NiCl}_2$	10	43	60-500	$I = 0.0063C + 0.5541$	0.9393	313.75
$\text{CoCl}_2$	10	40	58-400	$I = 0.0075C + 1.827$	0.9007	92.06

**Четвертая глава** включает в себя результаты исследований электрохимического определения холестерина с использованием наночастиц (НЧ) золота и серебра смешанного состава в качестве катализаторов в водно-органической эмульсии. Приведены результаты сравнительных испытаний чувствительности стеклоуглеродных электродов, модифицированных индивидуальными НЧ золота и серебра, НЧ типа «ядро-оболочка», наносплавом золота и серебра и электроосажденными серебряными НЧ, в электрохимическом определении холестерина.

С целью создания сенсора для определения холестерина в водно-органической эмульсии были исследованы индивидуальные наночастицы золота и серебра ( $\text{AuНЧ}$ ,  $\text{AgНЧ}$ ), наночастицы типа «ядро-оболочка» ( $\text{Ag-AuНЧ}$  и  $\text{Au-AgНЧ}$ ), наносплав  $(\text{Au+Ag})\text{НЧ}$  и электроосажденные наночастицы серебра ( $\text{эAgНЧ}$ ), иммобилизованные на поверхности СУЭ. Полученные методом ЦВА результаты исследования наночастиц  $\text{Ag-AuНЧ}$  представлены на рисунке 5. Из рисунка видно, что  $\text{Ag-AuНЧ}$  при сканировании

потенциала подвергаются электрохимическим превращениям, что проявляется на ЦВА в виде пиков анодного и катодного токов. Присутствие в растворе 1 мМ ЦТАБ не изменяет форму ЦВА, в отличие от Triton X-100 и ЛСН, а присутствие 6 мМ холестерина приводит к росту анодного и катодного токов и смещению пика анодного тока на 0.14 В. Из полученных данных можно заключить, что электрохимическое окисление холестерина на поверхности наночастиц Ag-AuНЧ протекает по каталитическому механизму.

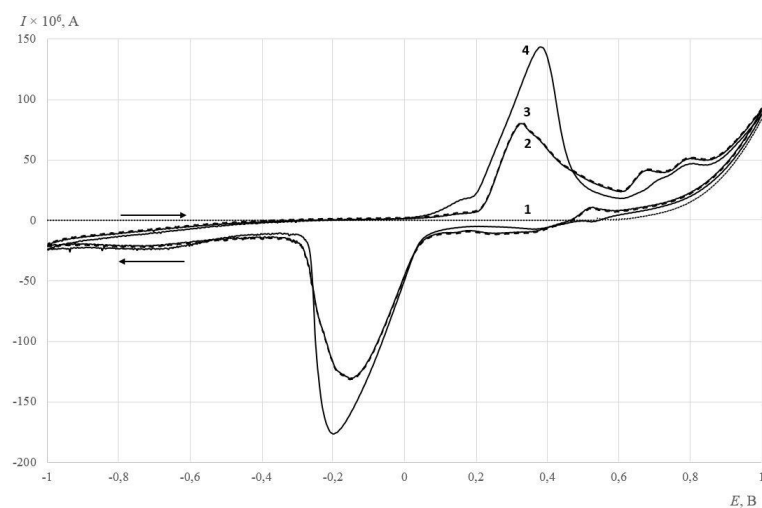


Рисунок 5 – ЦВА на СУЭ в фоновом электролите – 0.125 М в вода-ТГФ (1:1) (кривая 1); на СУЭ, модифицированном наночастицами Ag-AuНЧ (кривая 2); на СЭУ с Ag-AuНЧ в фоне с 1 мМ ЦТАБ (кривая 3) и на СЭУ с Ag-AuНЧ в фоне с 1 мМ ЦТАБ и 6 мМ холестерина (кривая 4).  $v_{скан} = 0.1$  В/с.

Для исследования электрокаталитической активности наночастиц каждого типа использовали методы ЦВА и ХА в отсутствие и в присутствии холестерина (концентрации 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 мМ). В таблице 6 приведены результаты исследований.

Таблица 6 – Уравнения зависимостей тока окисления НЧ в присутствии холестерина от концентрации холестерина в рабочем растворе (эмульсии) ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ).

Тип наночастиц	Состав наночастиц	Уравнение регрессии $I (A) = ac_{хол} (M) + b$		$R^2$	$s_r, \%$
		$a (A/M)$	$b (A)$		
1	AgНЧ	$4.5 \times 10^{-6}$	$5.7 \times 10^{-5}$	0.65	-
	AuНЧ	$2.5 \times 10^{-6}$	$4.3 \times 10^{-5}$	0.59	-
2	Ag-AuНЧ (1:1)	$1.4 \times 10^{-5}$	$5.8 \times 10^{-5}$	0.97	4.5
	Au-AgНЧ (1:1)	$8.2 \times 10^{-6}$	$9.5 \times 10^{-4}$	0.73	-
3	(Au+Ag)НЧ (1:1)	$1.3 \times 10^{-6}$	$7.5 \times 10^{-4}$	0.55	-
4	эAgНЧ	$1.0 \times 10^{-5}$	$3.0 \cdot 10^{-4}$	0.95	5.8

Относительно небольшой сигнал от наночастиц Au-AgНЧ можно объяснить растворением Au-оболочки при многократном сканировании потенциала. Наиболее



выраженный сигнал зарегистрирован для СУЭ, модифицированного наночастицами  $\text{AgNЧ}$  и  $\text{Ag-AuNЧ}$ , причем наиболее чувствительными являются последние.

**Пятая глава** посвящена синтезу ПМО холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита, исследованию их сорбционных свойств и разработке аппаратной платформы для осуществления на их основе экспрессного бесферментного электрохимического определения холестерина в модельных растворах с применением хлорида кобальта (II) в ацетонитриле в качестве электрокатализатора.

С целью селективного определения холестерина в модельных растворах были синтезированы ПМО холестерина на поверхности двух типов наночастиц и с применением одного из двух СА (ДВБ и ЭГДМА): на основе НЧ оксида кремния ПМО-ОКНЧ-Д и ПМО-ОКНЧ-Э (рисунок 6 А) и НЧ магнетита ПМО-МНЧ-Д и ПМО-МНЧ-Э соответственно (рисунок 6 Б).

Состав винил-модифицированных наночастиц и частиц ПМО подтверждали методом ИК-спектроскопии (рисунок 7). На спектрах наблюдаются полосы поглощения  $\nu = 1634.21 \text{ см}^{-1}$  и  $\nu = 967.02 \text{ см}^{-1}$ , характерные для виниловой группы, и  $\nu = 1735.07 \text{ см}^{-1}$ , характерные для бензольного кольца в ДВБ.

Размеры винил-модифицированных ОКНЧ и МНЧ, а также частиц ПМО и их морфологию изучали методом СЭМ (рисунок 8). Преобладающая фракция представлена сферическими наночастицами с диаметром от 17 до 22 нм (винил-ОКНЧ), от 20 до 27 нм (винил-МНЧ), от 21 до 27 нм (ПМО-ОКНЧ-Д) и от 25 до 34 нм (ПМО-МНЧ-Д). Из анализа микрофотографий можно сделать вывод, что после синтеза ПМО на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита их размер увеличился в среднем на 3-4 нм и 5-6 нм, то есть толщина слоя ПМО около 1.5-2 нм и 2.5-3 нм соответственно.

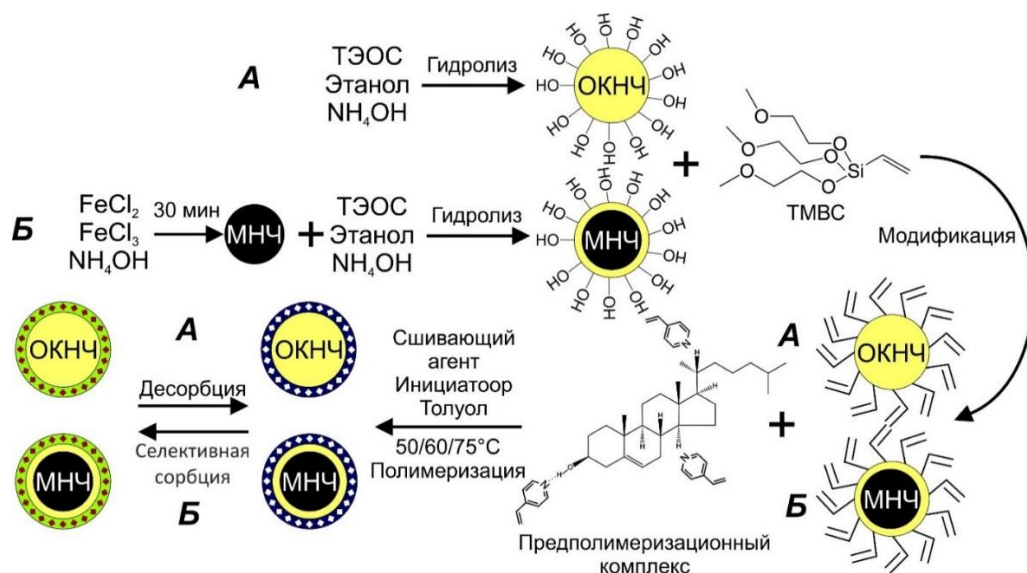


Рисунок 6 – Схема синтеза ПМО-ОКНЧ (А) и ПМО-МНЧ (Б)

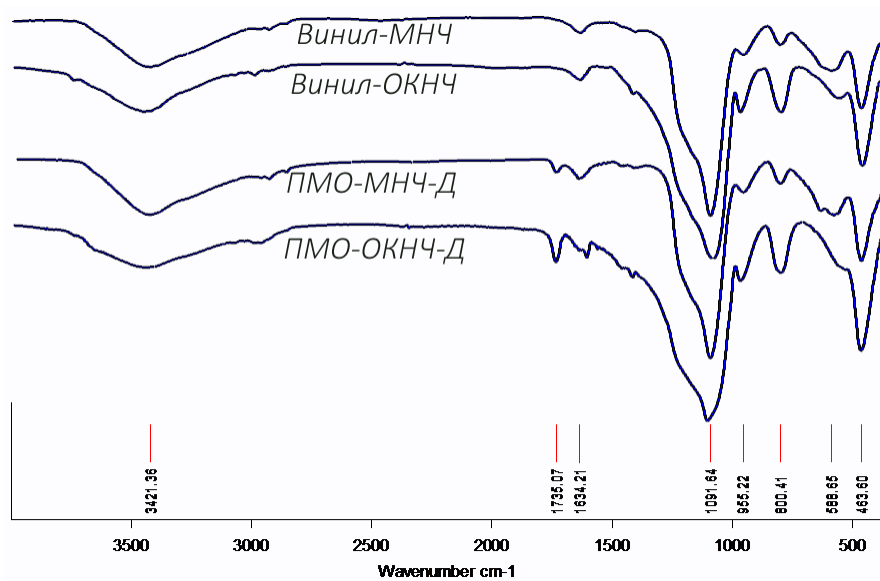


Рисунок 7 – ИК-спектры, зарегистрированные для наночастиц оксида кремния и магнетита, модифицированных виниловыми группами и ПМО холестерина на их поверхности.

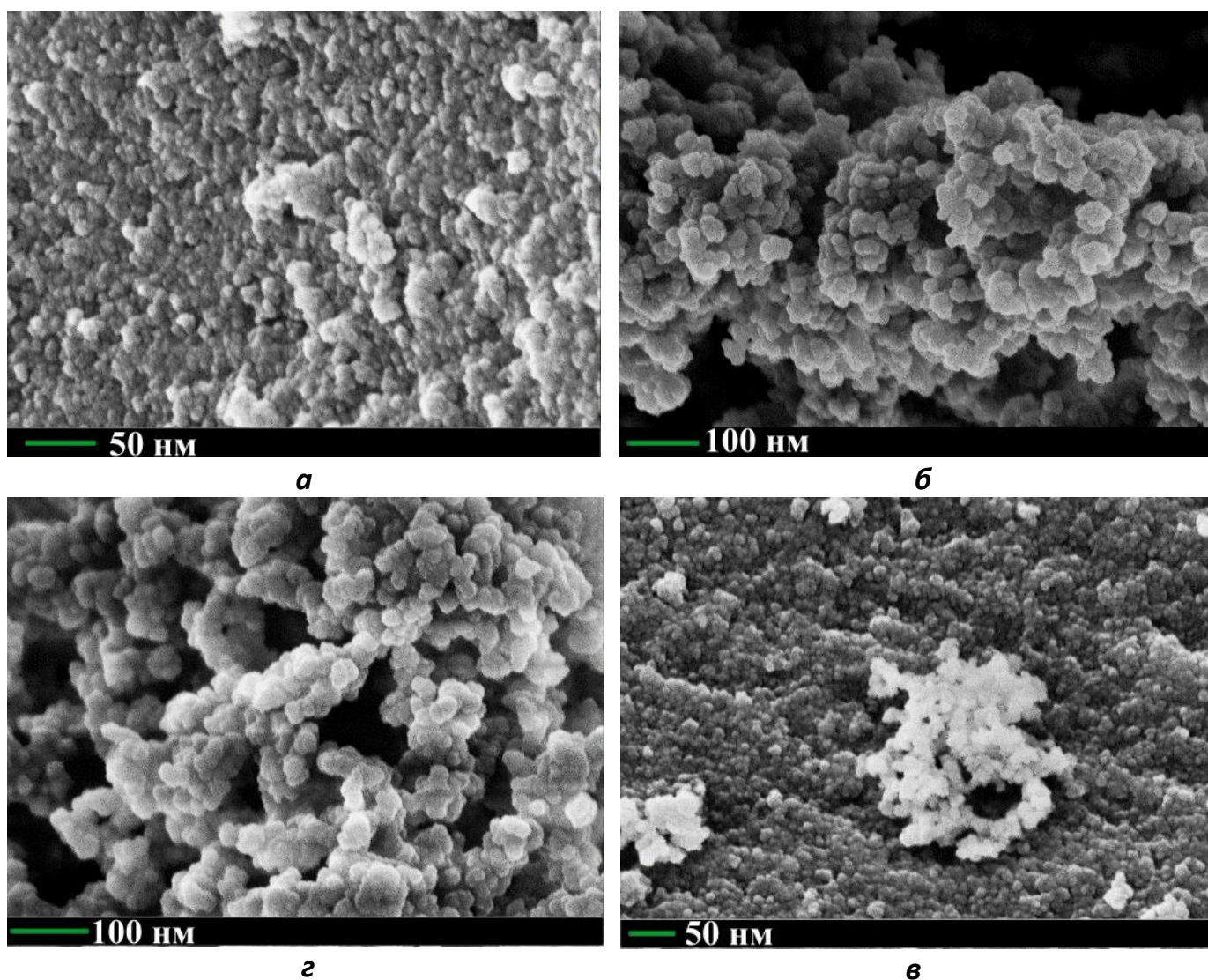


Рисунок 8 – Микрофотографии винил-модифицированных наночастиц оксида кремния (а) и магнетита (б) и частиц ПМО-ОКНЧ-Д (в) и ПМО-МНЧ-Д (г)

Выбор оптимального для использования в определении холестерина типа частиц ПМО основывался на измеренных параметрах сорбции холестерина из раствора в ацетонитриле с применением разработанного метода электрокаталитического метода на основе  $\text{CoCl}_2$  в АН. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Остаточное содержание холестерина в супернатанте после сорбции на частицах ПМО ( $C_{ост}$ ), содержание холестерина в ацетонитриле после десорбции из наночастиц ПМО ( $C_{дес}$ ), рассчитанная сорбционная емкость ПМО ( $SE$ ) и степень извлечения ( $R$ ).

Наночастицы ПМО	$C_{ост}$ , мМ	$C_{дес}$ , мкМ	$SE$ , мкмоль/г	$R$ , %
ПМО-ОКНЧ-Д	2.95	41.50	5	83
ПМО-ОКНЧ-Э	2.97	25.50	3	85
ПМО-МНЧ-Д	2.80	18.00	20	90
ПМО-МНЧ-Э	2.86	12.18	14	87

Полученные результаты показывают, что наилучшими сорбционными характеристиками обладают наночастицы ПМО-МНЧ-Д. Это связано, предположительно, с более толстым слоем полимера на поверхности наночастиц магнетита. Кроме того, использование этого типа наночастиц в практическом анализе имеет явное преимущество по сравнению с ПМО-ОКНЧ благодаря своим магнитным свойствам, которые значительно облегчают процесс сепарации. В дальнейшей разработке селективного метода определения холестерина и соответствующей аппаратной платформы использовали этот тип ПМО.

На рисунке 9 представлена схема установки для определения холестерина в модельном растворе, имитирующем сыворотку крови.

Процесс анализа включает следующие стадии.

1. Раствор  $\text{CoCl}_2$  в АН из емкости **1** после открытия клапана **4** поступает в проточную зону **5**, в которой идет подготовка рабочего электрода (Pt проволока) путем многократного сканирования потенциала от 0 до 1.7 В отн. серебряной проволоки. Фиксируется пик тока окисления катализатора –  $I_0$  (рисунок 10, кривая 1).

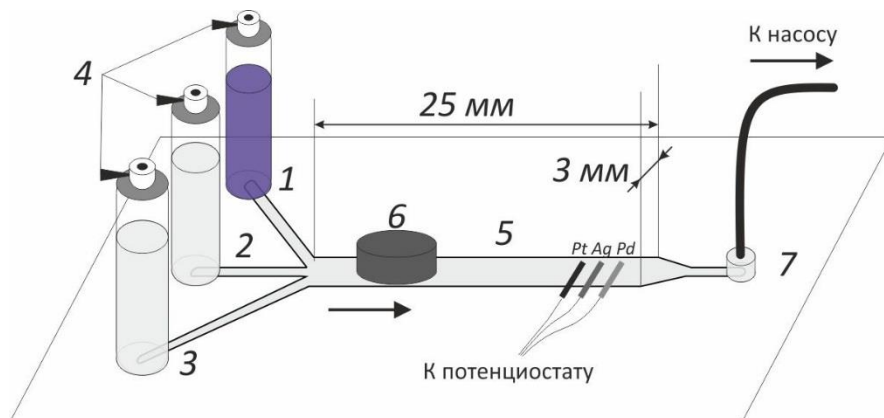


Рисунок 9 – Схема установки для определения свободного холестерина. Стрелками указано направление движения жидкости.

2. Суспензия 10 мг ПМО-МНЧ-Д холестерина в стандартном растворе холестерина в ацетонитриле ( $C_{ст} = 3 \text{ мМ}$ ) из емкости 2 поступает в проточную зону, где магнитные частицы с сорбированным на них холестерином задерживаются в проточной зоне под действием установленного магнита 6.

3. Раствор из емкости 1 медленно прокачивается через задержанные ПМО-МНЧ-Д, при этом холестерин десорбируется в ацетонитрил. Каждые 30 с регистрируется ВА. Фиксируется максимальное зарегистрированное значение тока -  $I_{ст}$ . Наблюдается постепенный рост пика тока окисления катализатора по мере пропускания раствора над электродами, а затем снижение (рисунок 10, кривая 2).

4. Магнит 6 удаляется, и раствор из емкости 1 прокачивается через проточную зону, чтобы вымыть частицы из нее.

5. Повторяются пункты 2-4, но с использованием суспензии из емкости 3 с неизвестным количеством холестерина и 10 мг ПМО-МНЧ-Д. Фиксируется максимальное зарегистрированное значение тока -  $I_{обр}$  (рисунок 10, кривая 3)

Расчет концентрации холестерина в образце рассчитывается по формуле (16):

$$C_{обр} = C_{ст} \left( \frac{I_{обр} - I_0}{I_{доб} - I_0} \right) \quad (16)$$

Весь процесс анализа занимает не более 15 минут.

Таким образом было измерено содержание холестерина в ацетонитриле, а также в двух модельных растворах, содержащих аланин (0.314 мМ), глицин (0.320 мМ), лейцин (0.187 мМ), аспарагиновую кислоту (0.022 мМ), глутаминовую кислоту (0.089 мМ), глюкозу (6.400 мМ), аскорбиновую кислоту (0.057 мМ), мочевую кислоту (0.480 мМ), креатинин (1.000 мМ), мочевины (5.000 мМ) и отличающихся концентрацией холестерина (таблица 8).

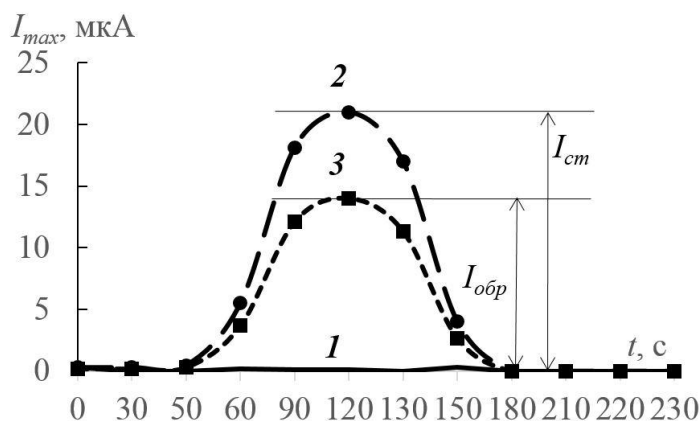


Рисунок 10 – Зависимость величины регистрируемого пика тока окисления катализатора от времени протекания раствора над электродами. Скорость потока 5 мкл/с.

Таблица 8 – Результаты определения холестерина в ацетонитриле и в двух модельных растворах, содержащих 2 мМ холестерина ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ).

Исследуемый раствор	Найдено: $C \pm \delta$ , мМ ( $S_r, \%$ )
Раствор холестерина в АН $C_{хол} = 2$ мМ	$2.20 \pm 0.28$ ( <b>16.2</b> )
Мр1 $C_{хол} = 5$ мМ	$5.41 \pm 0.35$ ( <b>18.2</b> )
Мр2 $C_{хол} = 7$ мМ	$7.37 \pm 0.29$ ( <b>17.8</b> )

Полученные результаты указывают на наличие неспецифической сорбции компонентов модельных растворов на поверхности частиц ПМО. Тем не менее частицы ПМО-МНЧ-Д демонстрируют селективность по отношению к холестерину, достаточную для их использования с целью выделения этого анализита из растворов и его экспрессного определения разработанным бесферментным электрохимическим методом.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны бесферментные электрохимические сенсоры для определения холестерина на основе электроосажденных наночастиц серебра и наночастиц с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой». Получены линейные зависимости величины прироста пика тока окисления электроосажденных индивидуальных наночастиц серебра, а также наночастиц с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой» от концентрации холестерина в рабочем растворе ( $I$ , мкА;  $C$ , мкМ):  $I = 1.0 \times 10^{-5} C_{хол} + 3.0 \times 10^{-4}$  и  $I = 1.4 \times 10^{-5} C_{хол} + 5.8 \times 10^{-5}$  соответственно. Наиболее выраженная каталитическая активность в электрохимическом окислении холестерина наблюдается при использовании наночастиц, состоящих из золотого «ядра» и серебряной «оболочки», и ЦТАБ в качестве ПАВ для создания эмульсии холестерина в воде.

2. В качестве катализаторов электрохимического окисления холестерина в апротонной среде использованы тиоцианат калия и хлорид никеля (II) в ДМФА и хлорид кобальта (II) в ДМФА и ацетонитриле. Установлены линейные зависимости величины прироста пика тока окисления этих солей от концентрации холестерина в рабочем растворе ( $I$ , мкА;  $C$ , мкМ):  $I = 0.0152C_{хол} + 0.8063$ ,  $I = 0.0063C_{хол} + 0.5541$ ,  $I = 0.0075C_{хол} + 1.8270$ ,  $I = 0.40C_{хол} + 19.8$  соответственно.

3. Рассчитаны метрологические характеристики метода и сенсоров с использованием в качестве катализаторов электроосажденных наночастиц серебра (чувствительность  $1.0 \times 10^{-5}$  А/М) и наночастиц с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой» ( $1.4 \times 10^{-5}$  А/М),  $NiCl_2$  ( $6.3 \times 10^{-3}$  А/М),  $CoCl_2$  ( $7.5 \times 10^{-3}$  А/М в ДМФА и 0.4 А/М в ацетонитриле) и  $KSCN$  ( $1.52 \times 10^{-2}$  А/М). Лучшие результаты определения холестерина наблюдаются при использовании раствора  $CoCl_2$  в ацетонитриле концентрацией 25 мМ.

4. Установлено, что процесс электрокаталитического окисления холестерина с использованием  $CoCl_2$  в ацетонитриле подчиняется ферментативной кинетике, уравнению Михаэлиса-Ментен. Рассчитаны константа Михаэлиса ( $K_m = 0.370$  ммоль·л<sup>-1</sup>) и каталитическая константа ( $k_{cat} = 0.94$  с<sup>-1</sup>). Показано, что по эффективности данный катализатор не уступает природному ферменту холестериноксидазе.

5. Методом радикальной полимеризации на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита синтезированы полимеры с молекулярными отпечатками холестерина на основе 4-винилпиридина, дивинилбензола и этиленгликольдиметакрилата. Метод позволяет выделить не менее 90% холестерина из модельных растворов.

6. Разработана аппаратная платформа для проведения экспрессного бесферментного определения холестерина с использованием  $CoCl_2$  в ацетонитриле в качестве электрокатализатора и частиц ПМО в качестве селективного элемента, которая позволяет автоматизировать процесс анализа. Применение разработанного метода и сенсоров позволяет сократить время проведения анализа на холестерин до 15 мин.

7. Разработаны и с успехом использованы в модельных растворах бесферментные электрохимические метод и сенсоры определения холестерина на основе его электрокаталитического окисления. Разработанные метод и сенсоры не требуют специальных условий хранения и обеспечивают устойчивый аналитический сигнал в течение длительного времени, а также просты в использовании и экономически доступны.

*Автор выражает благодарность заведующему кафедрой аналитической химии ХТИ УрФУ д.х.н. профессору Матерну А.И., директору ХТИ УрФУ д.х.н. профессору Русинову В.Л., директору УЦКП «Современные нанотехнологии» д.ф.-м.н. профессору Шуру В.Я., заведующему Лабораторией комплексных исследований и экспертной оценки органических материалов ХТИ УрФУ к.х.н. доценту Ельцову О.В. за содействие проведению исследований.*

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

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

1. **Охохонин, А.В.** Бесферментное определение холестерина с использованием наночастиц золота и серебра в качестве электрокатализатора / **А.В. Охохонин**, С.Ю. Сараева, А.И. Матерн, А.Н. Козицина // Журнал аналитической химии. – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 1–9. (0,75 п.л./0,6 п.л.)

2. Kozitsina, A.N. Amperometric detection of cholesterol using cobalt (II) chloride as an electrocatalyst in aprotic media / A.N. Kozitsina, **A.V. Okhokhonin**, A.I. Matern // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2016. – V. 772. – P. 89–95. (6 п.л./2 п.л.)

*Патент РФ на изобретение:*

3. Пат. 2507512 РФ. МПК G01N27/30. Способ изготовления модифицированного электрода для электрохимического анализа (варианты) / Н.А. Малахова, А.В. Иванова, А.Н. Козицина, С.Ю. Сараева, Ж.В. Шалыгина, Л.И. Колядина, **А.В. Охохонин**, А.И. Матерн; заявл. 04.06.2012; опубл. 20.02.2014.

*Публикации в прочих научных изданиях:*

4. **Охохонин, А.В.** Выбор каталитической системы для электрохимического окисления холестерина / **А.В. Охохонин**, А.И. Матерн // Труды научной конференции «Достижения в химии и химической технологии»: сборник. – Екатеринбург, 2011. – С. 15–21. (0,5 п.л./0,4 п.л.)

5. **Охохонин, А.В.** Электрохимические катализаторы окисления холестерина на основе органических комплексов переходных металлов / А.Н. Козицина, Д.Л. Чижов, Д.С. Ячевский, Е.В. Вербицкий, А. И. Матерн // Материалы VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012»: сборник. – Уфа-Абзаково, 2012. – С. 117. (0,12 п.л./0,1 п.л.)

6. **Охохонин, А.В.** Электрохимическое определение холестерина в водной эмульсии с использованием наночастиц металлов и их оксидов в качестве катализаторов / **А.В. Охохонин**, А.Н. Козицина, С.Ю. Сараева, А.И. Матерн // Тезисы докладов IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной научной школой по органической химии: сборник. – Уфа-Абзаково, 2013. – С. 253. (0,12 п.л./0,1 п.л.)

7. **Охохонин, А.В.** Электрохимическое определение концентрации холестерина с использованием роданида калия и солей никеля и кобальта в качестве электрокатализаторов / **А.В. Охохонин**, А.Н. Козицина, А.И. Матерн // Тезисы докладов всероссийской конференции «Второй съезд аналитиков России»: сборник. – Москва, 2013. – С. 318. (0,12 п.л./0,1 п.л.)

8. **Okhokhonin, A.V.** Electrochemical detection of free cholesterol using potassium thiocyanate and nickel and cobalt chlorides as electrocatalysts // **A.V. Okhokhonin**, A.N. Kozitsina, A.I. Matern / 15<sup>th</sup> International Conference on Electroanalysis. – Malmö, Sweden, 2014. – С. 193. (0,12 п.л./0,1 п.л.)

9. **Охохонин, А.В.** Электрохимическое окисление холестерина с использованием хлорида кобальта в качестве катализатора в апротонной среде / **А.В. Охохонин**, А.Н. Козицина, А.И. Матерн // Сб. мат. Тезисы докладов X Всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной научной школой: сборник. – Уфа-Абзаково, 2015. – С. 183. (0,12 п.л./0,1 п.л.)

10. **Охохонин, А.В.** Бесферментный метод определения холестерина с использованием электрокатализатора  $\text{CoCl}_2$  и полимеров с молекулярными отпечатками / **А.В. Охохонин**, А.Н. Козицина, Ж.В. Шалыгина, А.И. Матерн // IX Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой «ЭМА 2016»: сборник. – Екатеринбург, 2016. – С. 47. (0,12 п.л./0,1 п.л.)

11. **Охохонин, А.В.** Использование хлорида кобальта (II) в качестве электрокатализатора для амперометрического определения холестерина в ацетонитриле / **А.В. Охохонин**, А.Н. Козицина, А.И. Матерн // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: сборник. – Екатеринбург, 2016. – С. 309. (0,12 п.л./0,1 п.л.)