

На правах рукописи



Козицина Алиса Николаевна

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ОРГАНИЧЕСКИХ И  
НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОРАЗМЕРНЫХ МОДИФИКАТОРОВ ДЛЯ  
БЕСФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СОЕДИНЕНИЙ

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук

Екатеринбург – 2018

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 консультант: доктор химических наук, профессор  
**БРАЙНИНА Хьена Залмановна,**

Официальные оппоненты: **КАРЯКИН Аркадий Аркадьевич,**  
доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, заведующий лабораторией электрохимических методов кафедры аналитической химии Химического факультета МГУ

**ЕВТЮГИН Геннадий Артурович,**  
доктор химических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова

**ШПИГУН Лилия Константиновна,**  
доктор химических наук, профессор, ФГБУН Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук, г. Москва, главный научный сотрудник лаборатории проблем аналитической химии,

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

Защита состоится 29 мая 2018 г. в 15-00 часов 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», адрес объявления на сайте УрФУ: <http://lib.urfu.ru/mod/data/view.php?id=51&rid=276374>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Семенищев Владимир Сергеевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Эффективность первичной медико-санитарной помощи, включающей профилактику, лечение различных заболеваний, таких как диабет, сердечно-сосудистые, инфекционные и онкологические заболевания, в значительной степени зависит от правильности и своевременности постановки диагноза. В немалой степени последняя определяется доступностью и надежностью информации о состоянии больного, включая результаты анализа биологических жидкостей.

В настоящее время в клиничко-диагностических центрах используют сложное, дорогостоящее, технологичное лабораторное оборудование, требующее специальных помещений и высокой квалификации обслуживающего персонала. Совершенствование инструментальных средств медицинской диагностики в значительной степени опирается на развитие концепции биосенсоров, перспективных также в мониторинге окружающей среды, фармацевтике, пищевой промышленности и др. Биосенсор позволяет проводить надежную оценку содержания аналита, обусловленную его взаимодействием с биологическим рецептором [1]. Биосенсоры – портативные устройства, привлекающие своей мобильностью, доступностью, дешевизной и предназначенные, прежде всего, для скрининга биологически важных компонентов на месте, у больного (так называемая «point-of-care diagnostics»). Подавляющее число работ, направленных на создание биосенсоров, посвящено электрохимическим методам регистрации сигнала. В большинстве случаев это потенциометрия и амперометрия. Они обладают рядом преимуществ, таких как низкие затраты на изготовление, простота конструкции, удобный для пользователя интерфейс, возможность миниатюризации, надежность измерения, достигаемые низкие пределы обнаружения и небольшие операционные объемы. Последнее особенно важно при анализе биологических проб [2,3]. Электрохимические биосенсоры имеют преимущества перед многими альтернативными подходами, в частности, оптическими сенсорами, для которых мутность раствора или его окраска могут в значительной степени ограничивать область потенциального применения. Современный этап развития электрохимических биосенсоров характеризуется взрывным увеличением интереса к дополнительным факторам, определяющим их селективность и чувствительность, связанным с модификациями поверхности электрода как первичного преобразователя сигнала и подложки для локализации биохимического рецептора.

Однако при всех положительных качествах биосенсоров, указанных выше, они не лишены недостатков, связанных с температурной и временной нестабильностью применяемых биохимических рецепторов, их высокой стоимостью, а также с необходимостью введения в анализируемый раствор дополнительных реагентов и сигналообразующих веществ. В связи с этим в настоящее время внимание разработчиков все чаще обращается к созданию искусственных аналогов природных рецепторных структур, в том числе, ферментов. Эти работы особенно интенсифицировались в последние два десятилетия, а соответствующие синтетические аналоги получили название биомиметиков. К их числу относятся некоторые наноматериалы, органические молекулы, обладающие электрокаталитической активностью, а также полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО), имитирующие высокоспецифичное связывание аналита в комплексы по аналогии с реакциями антиген – антитело и фермент – субстрат. При этом методология создания бесферментных сенсоров на основе биомиметиков в значительной степени

повторяет подходы, апробированные и отработанные на примере традиционных биосенсоров.

Последующее развитие нового поколения сенсоров на основе биомиметиков, их внедрение в практику биомедицинского анализа требуют, тем не менее, решения ряда проблем. Сегодня специалисты в области органического синтеза благодаря возможностям современной химии могут получать более разнообразные продукты по сравнению с аналогами, существующими в природе, однако структуры таких соединений зачастую не воспроизводят свойств, присущих ферментам. В случае применения, например, наноматериалов в качестве электрокатализаторов или сигналообразующей метки остается проблема необходимости строгого контроля их структуры в процессе включения в состав сенсорного устройства, а также их конъюгации с конкретным аналитом. В случае применения ПМО актуальна задача повышения сродства к целевому аналиту, необходимость полного удаления молекул шаблона после формирования «молекулярных отпечатков» и повторного связывания аналита на стадии анализа. Также необходимо учитывать постепенное изменение геометрии пор и эффективности связывания в процессе нахождения ПМО в водных растворах.

Следует особо остановиться на проблемах химической безопасности при использовании наноматериалов. Требуется тщательная оценка их острой и хронической токсичности, исследование биологических взаимодействий, приводящих к возможным последствиям для живых организмов. Многообразие наноматериалов, разобщенность проводимых исследований их токсического воздействия на живой организм привели к противоречивым оценкам их безопасности. До конца не изучены механизмы индуцирования наночастицами деструктивных эффектов в клетках и организме в целом.

Необходимость синтеза, исследования и применения различных соединений и материалов, имитирующих биорецепторы, в составе электрохимических сенсоров, потребность в расширении способов их иммобилизации на поверхности индикаторного электрода/трансдьюсера и в конечном итоге разработка бесферментных биосенсоров/сенсоров, обладающих высокой селективностью, низким пределом обнаружения, широким диапазоном обнаружения и быстрым временем отклика для определения широкого круга аналитов биомедицинского назначения, определяют актуальность темы диссертационной работы.

### **Степень разработанности темы диссертационной работы**

Разработка чувствительных, селективных и стабильных бесферментных сенсоров и методов анализа является одним из наиболее активно развиваемых направлений исследования. Однако исследования в части поиска альтернативы ферментам носят фрагментарный характер. Они зачастую не учитывают специфики измерения биологических аналитов, особенностей состава проб и методологически повторяют работы, посвященные определению заведомо более простых объектов анализа. При этом состав материалов, используемых в качестве модификаторов, остается весьма ограниченным и, как правило, не адаптируется в зависимости от природы анализируемой пробы. В частности, недостаточно исследований в области устойчивости наноматериалов в составе сенсоров, их биосовместимости с другими модификаторами, влияния формы и способа получения наноматериалов на их вклад в улучшение характеристик сенсоров. Работы по ПМО ограничены в основном определением достаточно крупных биологических молекул, таких как белки и клеточный материал. Эффективность концепции в определении низкомолекулярных аналитов — темплатов остается вопросом дальнейших изысканий.

Существующие исследования бесферментных электрохимических сенсоров и биосенсоров достаточно редко ориентируются на требования массового производства и условий применения вне лабораторной базы. Таким образом, потребность в надежных, недорогих устройствах для определения широкого круга биологических параметров до сих пор не удовлетворена.

**Целью работы** является развитие теоретических представлений о механизме функционирования бесферментных электрохимических сенсоров и иммуносенсоров и методологических подходов к их созданию на основе наночастиц металлов и их оксидов, ряда органических модификаторов, в том числе, со свойствами ПМО для определения возбудителей инфекционных заболеваний в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и биологических жидкостях пациентов, антител, а также контроля некоторых важных биохимических показателей.

Для достижения поставленной цели требовалось сформулировать и решить ряд **задач**:

— установить взаимосвязь между структурными, размерными и морфологическими характеристиками синтезированных индивидуальных наночастиц благородных металлов (золото, серебро) и смешанного состава, оксидов никеля и железа смешанного состава, а также полимерных композитов с включением магнетита, и их функциональными характеристиками в составе электрохимических сенсоров и иммуносенсоров, включая окислительно-восстановительные превращения в водных и апротонных средах и взаимодействие с бактериальными клетками;

— разработать новые подходы для бесферментного количественного определения болезнетворных бактерий с использованием указанных наноматериалов и композитов на их основе (на примере *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*), а также антигенов вирусов (на примере антигена вируса кори);

— разработать и реализовать для конкретных соединений диагностического значения (холестерин, мочеви́на, креатинин) концепцию бесферментного определения с использованием наночастиц благородных металлов, оксидов никеля, органических, неорганических соединений на основе сочетания электрокатализа, ионообменного концентрирования и получения молекулярных отпечатков на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита; исследовать электрокаталитическое поведение и предложить механизм их действия и критерии отбора для синтезированных соединений никеля и кобальта, а также наночастиц серебра, золота и оксида никеля;

— провести оценку токсического эффекта полученных и охарактеризованных наночастиц металлов и их оксидов с учетом динамики их проникновения в клетку (на примере клеточной культуры WI 38), определить соответствие между действующими концентрациями наночастиц и параметрами жизнеспособности и функциональной активности;

— предложить простые и эффективные устройства для количественного определения возбудителей инфекционных заболеваний и метаболитов (мочеви́на, креатинин, холестерин) в модельных растворах и реальных объектах контроля с применением разработанных технологических и методических решений;

— разработанные бесферментные электрохимические способы и сенсоры, не требующие применения дорогостоящего оборудования, организации специальных помещений, дорогостоящих реагентов для прямого определения клинически важных показателей, должны совпадать или превосходить аналоги, применяемые в медицинской диагностике по аналитическим характеристикам.

### **Научная новизна работы**

1. Развита концепция применения наночастиц благородных, переходных металлов/оксидов, соединений органической и неорганической природы в качестве электрокатализаторов, сигналообразующих меток в электрохимических бесферментных вариантах биоанализа, устанавливающая алгоритмы направленного выбора, синтеза и модификации наноматериалов для решения конкретных аналитических задач, связанных с определением органических соединений диагностического значения и созданием соответствующих способов и электрохимических бесферментных сенсоров и иммуносенсоров.

2. Количественно охарактеризована связь между природой наноматериалов, способом их получения и электрокаталитической активностью и чувствительностью определения различных аналитов на примере наночастиц серебра, золота смешанного состава, оксида никеля (II), органических соединений никеля (II), тиоцианата калия, хлоридов никеля (II) и кобальта (II) в окислении мочевины, креатинина, холестерина. Исследована кинетика электродных реакций и влияние различных факторов на активность применяемых электрокатализаторов.

3. Выявлены закономерности, связывающие условия синтеза наночастиц, нанокompозитов магнетита с различным поверхностным покрытием на размерные, морфологические параметры, седиментационную устойчивость и электрохимическую активность получаемых наноматериалов.

4. Изучены особенности окислительно-восстановительных превращений наночастиц, нанокompозитов магнетита – сигналообразующих меток для количественного определения инфекционных агентов, в водных и апротонных средах. Установлена связь электрохимических параметров процессов и характера превращений магнетита, предложены возможные схемы протекания электродных реакций наночастиц  $Fe_3O_4$ , выбраны рабочие условия формирования сигнала, обусловленного указанным наноматериалом, в водных и апротонных средах.

5. Предложены новые варианты бесферментных электрохимических способов количественного анализа инфекционных агентов и некоторых биохимических параметров.

Новизна предлагаемых подходов подтверждена 6 патентами РФ.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Разработано новое поколение бесферментных сенсоров на основе наночастиц серебра, золота, оксида никеля (II), органических соединений никеля (II), различающихся составом, способом получения и введением в состав сенсора, применяемых в качестве катализаторов в электрохимическом окислении мочевины, креатинина, холестерина.

2. Разработаны новые варианты электрохимических способов количественного определения мочевины, креатинина и холестерина с использованием наночастиц оксидов никеля, серебра, золота, их сплавов, наночастиц типа ядро-оболочка с различным соотношением золота и серебра, органических соединений никеля (II), тиоцианата калия, хлоридов никеля (II) и кобальта (II) в качестве катализаторов окисления аналита, а ПМО на креатинин и холестерин или ионообменный сорбент при определении мочевины, обеспечивающих селективность определения.

3. Разработаны новые бесферментные электрохимические иммуносенсоры и гибридные варианты вольтамперометрических способов для количественного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* В-1266 с использованием в качестве прямых сигналообразующих меток нанокompозитных частиц на основе  $Fe_3O_4$  с

различным, в том числе электроактивным, покрытием и бактерий *Salmonella typhimurium* SL 7207 с использованием наночастиц магнетита.

4. Разработан новый подход к количественному определению антигенов вирусов методом бесферментного электрохимического иммуноанализа с использованием конъюгатов антител с нанокompозитными частицами на основе магнетита.

5. Разработаны и запатентованы алгоритмы, устройства для проведения количественного определения содержания возбудителей инфекционных заболеваний, а также мочевины, креатинина и холестерина. Проведенные испытания по сравнительному определению содержания инфекционных агентов, мочевины, креатинина, холестерина в модельных и реальных объектах с использованием разработанных бесферментных электрохимических иммуносенсоров, вариантов и традиционно используемых в медицинской диагностике методов показали, что предложенные разработки соответствуют по чувствительности, селективности референсным лабораторным методам анализа, но имеют преимущества в простоте использования и стоимости. В дальнейшем они могут быть переведены в форму портативных устройств.

6. Развита методология электроанализа наночастиц после их проникновения в клетки и связи этого параметра с жизнеспособностью и изменением цитокинового статуса клеток.

7. Получены акты испытаний (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск) подтверждающие возможность применения предложенных бесферментных электрохимических вариантов способов иммуноанализа и иммуносенсоров для количественного определения патогенных микроорганизмов.

8. Результаты работы использованы ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора при выполнении Федеральной целевой программы "Развитие инфраструктуры nanoиндустрии в Российской Федерации на 2008 - 2010 годы" для разработки нормативно-методического обеспечения и средств контроля содержания наночастиц на объектах производственной сферы. Получен соответствующий акт испытаний.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В рамках проведенных исследований применяли методы циклической вольтамперометрии (ЦВА), вольтамперометрии (ВА), хроноамперо- и хронопотенциометрии, электрохимической импедансной спектроскопии, спектrophотометрии. Для анализа размеров и морфологии наноматериалов применяли сканирующую электронную микроскопию, состав определяли с использованием ИК - спектроскопии. Для характеристик поверхности электродов использовали растровую электронную микроскопию. Взаимодействие наноматериалов с клетками изучали просвечивающим электронным микроскопом (ПЭМ).

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

— Результаты исследований структуры, состава, размерных и морфологических параметров наночастиц золота, серебра смешанного состава, оксидов никеля (II), железа (II, III), а также нанокompозитных частиц на основе  $Fe_3O_4$  и различного покрытия (электроактивного и неэлектроактивного) и влияние этих характеристик на электрохимическое поведение и электрокаталитические свойства наноматериалов в протонных и апротонных средах.

— Результаты изучения седиментационной устойчивости, характера окислительно-восстановительных превращений в водной и апротонной средах, скорости процесса проникновения в бактериальные клетки синтезированных наноматериалов.

— Закономерности влияния различных факторов на электрохимическое поведение изученных электрокатализаторов, иммобилизованных на поверхности рабочего электрода или введенных в объем раствора, а также генерируемый ими аналитический сигнал при количественном определении мочевины, креатинина и холестерина.

— Результаты исследования влияния размеров, формы и морфологии ПМО холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита и ПМО креатинина на их способность к селективному «захвату» холестерина и креатинина.

— Кинетика взаимодействия наночастиц  $Fe_3O_4$ , полимерных нанокомпозитов на основе  $Fe_3O_4$  с бактериальными клетками (клеточная культура WI 38).

— Концепция гибридных бесферментных электрохимических способов иммуноанализа для количественного определения патогенных микроорганизмов/антигена вирусов, включающих этапы магнитного отделения и магнитного концентрирования конъюгатов с наночастицами/нанокомпозитами для уменьшения времени измерения и увеличения его чувствительности.

— Алгоритмы и устройства проведения количественного определения содержания возбудителей инфекционных заболеваний, мочевины, креатинина и холестерина в модельных растворах и реальных пробах.

— Результаты анализа реальных и модельных образцов на содержание инфекционных агентов и биохимических показателей, а также их сравнение с аналогичными результатами референсных лабораторных методов.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Достоверность полученных результатов определяется применением в работе совокупностью современных физико-химических методов исследования и высокотехнологичного оборудования, а также статической обработкой полученных результатов и подтверждения сравнением результатов количественного определения инфекционных агентов и биохимических показателей в модельных смесях и реальных пробах, полученных с использованием разработанных бесферментных электрохимических способов, сенсоров и референсных лабораторных методов. Получены акты испытаний: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск и ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург.

**Основные положения** диссертационной работы доложены на 6, 7 и 9 - м симпозиумах «Биосенсоры и биоаналитическая техника в экологическом и клиническом анализе» (Рим, Италия, 2004 г.; Кушадаси, Турция, 2006 г.; Монреаль, Канада, 2009 г.); на Международном конгрессе по аналитическим наукам ICAS-2006 (Москва, Россия, 2004 г.); на научно-практической конференции «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве (Томск, Россия, 2007 г.); на XVIII, XX Менделеевских съездах по общей и прикладной химии (Москва, Екатеринбург, Россия, 2007, 2016 гг.); на VII, VIII и IX Всероссийских конференциях по электрохимическим методам анализа с международным участием «Электрохимические методы анализа» (Уфа, Екатеринбург, Россия, 2008, 2012, 2016 гг.); на III Всероссийской конференции по наноматериалам «НАНО-2009» (Екатеринбург, Россия, 2009 г.); на III Всероссийской конференции с международным участием «Аналитика России» (Краснодар, Россия, 2009 г.); на XV конференции по электроанализу (Инсбрук, Австрия, 2009 г.); на Съезде аналитиков России (Москва (пансионат «Клязьма»), Россия, 2010 г.); на симпозиуме с международным участием «Теория и практика электроаналитической химии (Томск, Россия, 2010 г.); на 9 - м заседании



«Международного общества по электрохимии, электрохимическим датчикам: от наномасштабного проектирования до промышленного применения» (Турку, Финляндия, 2011 г.); на III Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии (Краснодар, Россия, 2011 г.); на конференции «Нанотехнологии-2012» (Барселона, Испания, 2012 г.); на IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» (Уфа, Россия, 2013 г.); на 15 Международной конференции по электроанализу «ESEAC» (Мальме, Швеция, 2014 г.); на конференции «Анализ лекарственных препаратов 2014» (Льеж, Бельгия, 2014 г.); на конференции «Электроанализ 2015» (Бордо, Франция, 2015 г.); на конференции «Химический анализ и медицина» (Москва, Россия, 2015 г.); на Международной конференции «Последние достижения в анализе пищевых продуктов» (Прага, Чехия, 2015г.).

**Публикации.** Основные результаты по материалам диссертации опубликованы в 19 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 главах коллективных монографий, 6 патентах РФ и более чем в 100 тезисах докладов в материалах всероссийских и международных научных конференций.

**Личный вклад автора** в исследования, проводимые в рамках диссертационной работы, заключается в обосновании теоретических представлений и новых методологических подходов к созданию вариантов бесферментных электрохимических способов и сенсоров с применением в качестве альтернативы ферментам веществ и материалов небиологической природы и совершенствованию методов электроанализа для исследования цитотоксичности наноматериалов. Работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состояли в постановке целей и решении основных задач, анализе, обобщении и интерпретации полученных результатов, разработке методик и алгоритмов количественного анализа некоторых инфекционных агентов и биохимических показателей. Предложенные новые подходы в совокупности с высокой чувствительностью и селективностью, оперативностью получения результатов анализа позволили создать принципиально новые варианты бесферментных электрохимических способов анализа и типы бесферментных иммуносенсоров/сенсоров, не уступающие по своим характеристикам биосенсорам, но существенно более дешевые и лишенные известных недостатков последних (нестабильность ферментов, необходимость использования специального субстрата, обеспечивающего протекание сигналообразующей реакции).

Работа выполнена при финансовой поддержке: INCO – Copernicus (проект № ERBIC 15СТ-960804, 1998 – 2001 гг.), INTAS (проект № 00-273, 2001 – 2004 гг.), МНТЦ (проект № 3230, 2007 – 2008 гг.), Российского Фонда Фундаментальных Исследований (06-03-08141-офи, 07-03-96068-р\_урал\_a, 09-03-12242-офи\_м, 14-03-01017\_a), в рамках заданий Министерства промышленности и науки Свердловской области «Нанотехнологии в био- и химических сенсорах для мониторинга окружающей среды и здоровья человека» (2008 – 2010 гг.), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно - технической сфере (2005 – 2006 гг.), в рамках госбюджетной темы Н687.42Г.002/12.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка литературных источников, приложений. Текст диссертации изложен на 343 страницах, содержит 98 рисунков, 13 схем, 67 таблиц, 3 приложения и 388 библиографических ссылок.

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

*В первой главе* представлен обзор литературы, посвященной основным достижениям в области разработки биосенсоров для распознавания широкого круга аналитов с различными методами детектирования. Приведена критическая оценка биосенсоров на основе ферментов. Обоснована необходимость изучения и разработки бесферментных иммуносенсоров/сенсоров.

*Во второй главе* представлены сведения о материалах, методиках диссертационного исследования, а также реактивах, материалах, применяемой инструментальной базе.

*Третья глава* посвящена разработке алгоритмов нескольких вариантов бесферментного электрохимического иммуноанализа (иммуносенсоров) для количественного определения некоторых микроорганизмов и антигена вируса кори. Представлены результаты исследования структуры, состава, размерных и морфологических параметров, седиментационной устойчивости наночастиц магнетита и нанокompозитных частиц на основе  $Fe_3O_4$  с различным покрытием, влияния этих характеристик на окислительно-восстановительное поведение наноматериалов в протонных и апротонных средах, возможности применения в качестве сигналообразующей метки. Продемонстрированы результаты анализа реальных и модельных образцов на содержание бактериальных клеток с использованием разработанных способов и подтвержденные данными референсных лабораторных методов.

*В четвертой главе* приведены экспериментальные данные по разработке алгоритмов и устройств различных вариантов бесферментных электрохимических способов количественного определения мочевины, креатинина, холестерина с использованием электрокатализаторов (соединения Ni (II), Co (II) органической и неорганической природы, наноксиды никеля (II), наночастицы серебра, золота, наносплавы, наночастицы типа ядро-оболочка) и ПМО креатинина, холестерина, обеспечивающие селективность определения этих веществ или ионообменного сорбента при анализе мочевины. Показано влияние различных факторов на электрохимическое поведение изучаемых электрокатализаторов и генерируемый ими аналитический сигнал, иммобилизованных на поверхности рабочего электрода или объеме раствора, в присутствии мочевины, креатинина, холестерина. Представлены результаты исследования влияния размеров, формы и морфологии ПМО холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита, а также ПМО креатинина на их способность к селективному «захвату» холестерина и креатинина.

*В пятой главе* обсуждены вопросы токсического воздействия наноматериалов на живой организм. Показана возможность применения методов электроанализа к исследованию накопления наночастиц в клетках, взаимосвязи этого параметра с жизнеспособностью клеток, изменением цитокинного статуса клеток.

В приложениях к диссертации представлены акты испытаний.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Электрохимические исследования проводили с использованием потенциостата/гальваностата Metrohm Autolab PGSTAT128N, вольтамперметрического комплекса 639 VA Processor в комплекте с 694 VA Stand и 700 Dosino, а также инверсионного вольтамперметрического анализатора «ИВА-5». В качестве рабочих

электродов служили: дисковые платиновые электроды ( $S_{geom} = 0.196 \text{ см}^2$ ,  $S_{geom} = 0.07 \text{ см}^2$ ) (ДПЭ); стеклоуглеродный (СУЭ) электрод ( $S_{geom} = 0.07 \text{ см}^2$ ); толстопленочные углеродсодержащие планарные электроды на основе чернил (ТУЭ); графитэпоксидной пасты (ТГЭ); платиновой пасты (ТПЭ); ТГЭ, модифицированный каломелью ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) (ТМГЭ), а также платиновая проволока ( $d = 0.2 \text{ мм}$ ). Электродами сравнения служили хлоридсеребряный электрод ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$ ),  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  с двумя мембранами, внутренний объем электрода заполняли  $0.1 \text{ M}$  раствором  $\text{KCl}$  в воде, а внешний –  $0.1 \text{ M}$  раствором  $\text{LiClO}_4$  в ацетонитриле, либо серебряная проволока.

В качестве сигналообразующих меток в иммуноанализе применяли синтезированные наночастицы (НЧ) магнетита и наноккомпозитные частицы (НК) на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , функционализированные полипирролом; поливинилбензилхлоридом, модифицированным хинолином; оксидом кремния, модифицированным ферроценом; 3-аминопропилтриэтоксисиланом либо хитозаном, а также конъюгаты антител и НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  с оксидкремниевым покрытием.

Микроорганизмы бактерий *S. Typhi*, *St. aureus*, *E. coli*, антиген и гипериммунная сыворотка к микроорганизму *S. typhi* ( $10^8 \text{ КОЕ}/\text{см}^3$ ) были любезно предоставлены ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск.

В качестве электрокатализаторов использовали: синтетические производные на платформе фторированных ди- и трикетонов, макрогетероциклических систем, модифицированных азаетероциклами, любезно предоставленных ИОС УрО РАН): ацетилацетонат никеля (II) (I); 1,1,1,7,7,7-гексафторгептан-2,4,6-трикетонат диникеля (II) тетрагидрат (II) (II); 4,4,5,5,6,6,7,7,7-нонафтор-1-фенилгептан-1,3-дикетонат никеля (II) (III); 4,4,5,5,6,6,6-гептафтор-1-этоксигексан-1,3-дикетонат никеля (II) (IV); [(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-(бензотиазол-2-иламино)-s-тетразинато](ацетилацетонато) никеля (II) (V); N,N'-бис(этил-2-трифторацетилпропионат-3-ил)этилендиамин никеля (II) (VI); N,N'-бис(1,1,2,2-тетрафтор-3-оксо-4-(п-диазатолил)-нонен-4-5-ил)-о-фенилендиамин никеля (II) (VII); пятиядерный кластер состава  $\text{Ni}_5(\mu_3\text{-OH})_2(\mu\text{-OOC}(\text{CH}_3)_3)_4(\mu\text{-N,N',N''-3,5-Me}_2\text{C}_3\text{HN}_2\text{C}_2(\text{O})\text{N}_4)_4(\text{CH}_3\text{CN})_2$  (VIII); комплекс 3-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-ундециламино-1,2,4,5-тетразина с ацетатом никеля (II) состава  $\text{Ni}_3\text{tz}_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{COO})_5$ , где tz – 3-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-ундециламино-1,2,4,5-тетразин (IX); комплекс 3,6-бис(3,5-диметилпиразол-1-ил)-s-тетразин с кластером  $\text{Ni}_9(\text{HOOCMe}_3)_4(\mu_4\text{-OH})_3(\text{OOCMe}_3)_{12}$  (X); 4-тетрапиразинпорфиразин никеля (II) (XI); 2,9,16,23-тетра(4-гептилфенил) тетрапиразинпорфиразин никеля (II) (XII); никелевый комплекс 1-(2-фенил)-2-(мезо-тетрафенилпорфирин-2-ил)-этанона (XIII); никелевый комплекс 1-(2-нитрофенил)-2-(мезо-тетрафенилпорфирин-2-ил)-этанона (XIV); мезо-тетрафенилпорфиринат никеля (II) (XV); октаэтилпоририфиринат никеля (II) (XVI); синтезированные НЧ серебра, золота, а также НЧ оксида никеля (II), тиоционат калия, хлориды никеля (II) и кобальта (II).

В качестве селективных элементов применяли синтезированные полимеры с молекулярными отпечатками холестерина на поверхности наночастиц магнетита (ПМО - МНЧ) и оксида кремния (ПМО - ОКНЧ), а также полимеры с молекулярными отпечатками креатинина. Для создания водно-органической эмульсии использовали поверхностно-активные вещества (ПАВ) различной природы.

Референсными методами служили: ПЦР, ИФА анализ, бактериальный посев, стандартный уреазный метод.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Бесферментный электрохимический иммуноанализ и иммуносенсоры для определения патогенных микроорганизмов *Salmonella typhimurium* SL 7207, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Staphylococcus aureus* B-1266 и антигена вируса кори

Тенденция роста числа «традиционных» инфекционных заболеваний, появление неизвестных, а также синтез различных видов наноматериалов и внедрение их в практику электрохимических исследований приводят к генерации новых, оригинальных способов и иммуносенсоров для определения содержания различных бактериальных и вирусных агентов. В рамках исследований представлен общий подход разработки бесферментного электрохимического иммуноанализа для количественного определения бактериальных клеток и антигенов вирусов. Началом исследований явилось создание электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к вирусу клещевого энцефалита, в котором в качестве метки применяли конъюгат: белок А - коллоидное серебро. Сигналообразующая реакция - окисление серебра. В качестве трансдьюсеров использовали ТГЭ, на рабочей поверхности которого проводили образование иммунокомплекса: антиген вируса клещевого энцефалита – антитело, с последующей локализацией конъюгата белка А с коллоидным серебром. Полезный сигнал регистрировали при потенциале 0,07В. Предел обнаружения составляет  $2.0 \cdot 10^{-7}$  мг/мл.

### Электрохимический анализ патогенных микроорганизмов на примере *S. typhi*. с применением $Fe_3O_4$ в качестве метки

Одним из вариантов количественного определения содержания патогенных бактерий является электрохимический способ иммуноанализа с применением НЧ магнетита, где в качестве аналитического сигнала служил ток восстановления ионов Fe (III), полученных после растворения иммунокомплексов, содержащих наночастицы. Таким образом, вывод о концентрации микроорганизмов *S. typhi*. в пробе делали по концентрации ионов железа в растворе.

С применением метода соосаждения были синтезированы магнитные НЧ согласно уравнению:  $8NH_4OH + 2FeCl_3 + FeCl_2 \rightarrow Fe_3O_4 + 8NH_4Cl + 4H_2O$ . В синтезированном образце наблюдали полидисперсность, однако максимум распределения частиц приходится на величину 10 нм при узком разбросе величин вокруг этого максимума. В номинально 10-нанометровом материале было обнаружено всего 8.9 % частиц диаметром 50 нм или выше.

Результаты дифракционных исследований и анализа химического состава для всех образцов НЧ подтвердили природу НЧ магнетита. Магнитная восприимчивость синтезированных наноматериалов, определенная методом Фарадея, составила  $82 \text{ см}^3/\text{г}$ . Методом динамического рассеяния света было установлено, что суспензии с концентрацией НЧ  $Fe_3O_4$   $0.125 \text{ г/дм}^3$  устойчивы в течение 24 ч после прекращения УЗ воздействия.

Для электронно-микроскопических исследований взаимодействия бактерий *S. typhi*. и *St. aureus* с НЧ магнетита суспензию последних ( $0.125 \text{ г/дм}^3$ ) выдерживали с микробными клетками в течение 30 мин при постоянной температуре ( $37 \pm 0.1$ ) °С. Затем свободные НЧ отделяли от меченых клеток с помощью магнитного поля. Наблюдали полное проникновение (эндоцитоз) НЧ в клетки *S. typhi*. (рисунок 1, а). В случае образцов стафилококка агломераты НЧ магнетита наблюдали, главным образом, в межклеточном пространстве, на значительном удалении от клеток (рисунок 1, б).

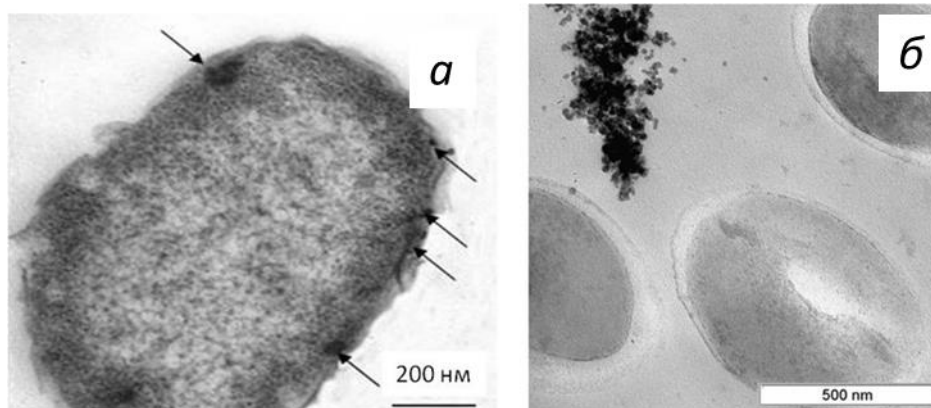


Рисунок 1 – *а* – электронные микрофотографии бактериальных клеток *S. typhi*. и *б* – *St. aureus* после взаимодействия с НЧ  $Fe_3O_4$  (время взаимодействия – 30 мин). Стрелками показаны места включения НЧ магнетита; электронный микроскоп Jem 1400 (Jeol, Япония)

Принимая во внимание принципиальные различия в строении поверхностных структур грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, можно сделать заключение, что НЧ необходимо функционализировать молекулами, «родными» для мембраны грамположительных клеток.

Определение содержания бактерий *S. typhi*. с применением НЧ  $Fe_3O_4$  проводили по следующей методике:

1. Суспензию бактериальных клеток/антигена бактериальных клеток (проба) смешивали с избытком суспензии НЧ магнетита, затем смесь инкубировали 30 мин при температуре  $(37.0 \pm 0.1) ^\circ C$ .

2. Разделение между несвязавшимися и связавшимися НЧ магнетита с бактериальными клетками/антигенами бактериальных клеток осуществляли с использованием постоянного магнита (напряженность магнитного поля  $31.83 \cdot 10^3$  А/м).

3. В емкость с исследуемой суспензией бактериальных клеток/антигена бактериальных клеток, меченных с НЧ  $Fe_3O_4$ , помещали на углеродсодержащую подложку с иммобилизованными антителами, специфичными к определяемому штамму бактерий. Образование иммунокомплекса проводили при постоянной температуре  $(37.0 \pm 0.1) ^\circ C$ . Для увеличения скорости доставки меченных бактерий/антигена к поверхности подложки и интенсификации процесса образования иммунокомплекса применяли магнитное поле с напряженностью  $31.83 \cdot 10^3$  А/м.

4. Количественное определение содержания НЧ  $Fe_3O_4$  после образования иммунокомплекса проводили методом инверсионной вольтамперометрии (ИВА). Для этого НЧ  $Fe_3O_4$ , включенных в иммунокомплекс, переводили в трехвалентную форму  $Fe^{3+}$  путем растворения иммунокомплекса в смеси азотной и серной кислот с последующим кипячением.

Измерение аналитического сигнала для каждой серии проведенных экспериментов дополняли «холостым опытом», в этом случае подложку инкубировали в суспензии бактериальных клеток, не содержащей искомого бактерии.

Принимая во внимание предложенную процедуру электрохимического иммуноанализа, полагали, что величина электрохимического отклика от НЧ магнетита, включенных в иммунокомплекс, будет пропорциональна содержанию определяемых бактериальных клеток/антигена бактериальных клеток в исследуемой суспензии. В случае

присутствия искомой бактерии *S. typhi.*/антиген бактерии *S. typhi.* в пробе происходило образование иммунокомплекса, что сопровождалось наличием на вольтамперограммах тока восстановления железа (рисунок 2, б, в). В случае холостого опыта в исследуемом интервале потенциалов тока восстановления железа на кривой не наблюдали (рисунок 2, а). Отсюда следует, что результаты предложенной процедуры бесферментного электрохимического иммуноанализа подтвердили, что аналитический сигнал (величина  $dI/dE$ ), полученный от НЧ  $Fe_3O_4$ , служит источником информации о количестве бактерий/антигена, меченных наночастицами, локализованных на поверхности подложки.

Было определено рабочее время взаимодействия НЧ магнетита с бактериальными клетками – 30 мин.

Показано, что применение магнитного концентрирования существенно увеличивает чувствительность анализа, снижает предел обнаружения и время формирования иммунокомплекса на поверхности подложки (до 15 мин.) (таблица 1). Таким образом, все дальнейшие эксперименты проводили с применением магнитного концентрирования.

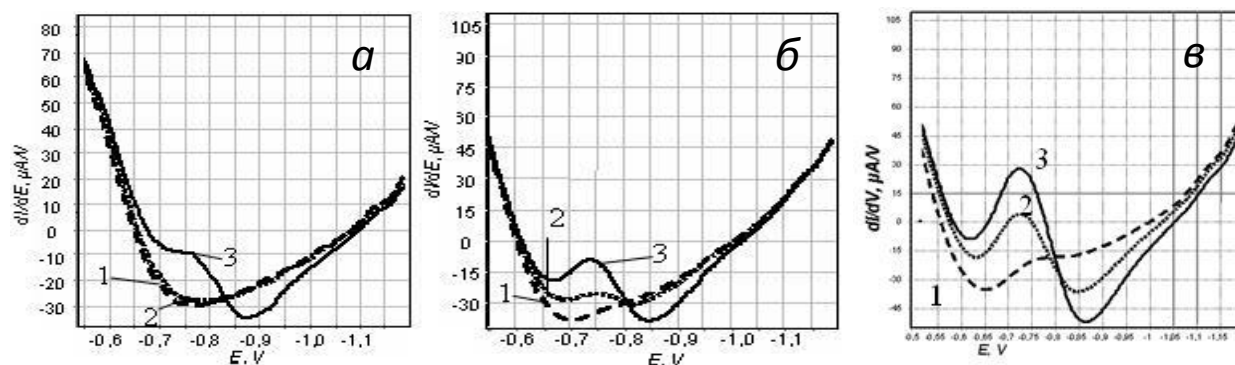


Рисунок 2 — Производные вольтамперограмм железа, полученные в растворах: а – не содержащих, б – содержащих микроорганизмы либо в – антиген *S. typhi.*; 1 – кривая фона, 2 – кривая пробы, 3 – кривая добавки аттестованного раствора Fe (III); фоновый электролит – 0.1 М раствор ацетата натрия (рН 7.5), содержащий  $5 \cdot 10^{-4}$  М пирокатехола.  $E_{\text{конц}} = 0.1$  В,  $\tau_{\text{конц}} = 60$  с,  $v_{\text{рег-ии}} = 0.5$  В/с

Таблица 1 – Аналитические характеристики разработанного способа иммуноанализа

Аналит	$\lg(dI/dE) = a + b \cdot \lg C$ (КОЕ/см <sup>3</sup> )				$C_{lim}$	Диапазон концентраций
	$a$	$b$	$R^2/S_r$	$n$		
<i>Без магнитного концентрирования</i>						
<i>S. typhi.</i>	- (1.11±0.14)	0.15±0.02	0.998 /9.8%	5	$7.4 \cdot 10^4$ КОЕ/см <sup>3</sup>	$1 \cdot 10^5 - 10^7$ КОЕ/см <sup>3</sup>
Антиген <i>S. typhi.</i>	0.05±0.01	0.32±0.03	0.997 /8.6%	5	$3.5 \cdot 10^{-5}$ мг/см <sup>3</sup>	$1 \cdot 10^{-4} - 1$ мг/см <sup>3</sup> ( $1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^8$ КОЕ/ см <sup>3</sup> )
<i>С применением магнитного концентрирования</i>						
<i>S. typhi.</i>	- (0.48±0.03)	0.08±0.01	0.995 /4.8%	5	$8.18 \cdot 10^1$ КОЕ/см <sup>3</sup>	$1 \cdot 10^3 - 10^8$ КОЕ/см <sup>3</sup>
Антиген <i>S. typhi.</i>	0.62±0.04	0.10±0.01	0.994 /5.3%	5	$1.51 \cdot 10^{-7}$ мг/см <sup>3</sup>	$1 \cdot 10^{-6} - 1$ мг/см <sup>3</sup> ( $1 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^8$ КОЕ/ см <sup>3</sup> )

Определение правильности разработанного способа бесферментного электрохимического иммуноанализа проводили с использованием методов ПЦР анализа и бактериального посева (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты исследования модельных суспензий, содержащих *S. typhi.*, различными методами ( $n = 3, P = 0.95$ )

Концентрация, КОЕ/см <sup>3</sup>	Бактериальный посев*	ПЦР*	Электрохимический способ, КОЕ/см <sup>3</sup>	
			Антиген <i>S. typhi.</i>	<i>S. typhi.</i>
1·10 <sup>6</sup>	Обнаружено	Обнаружено	9.3·10 <sup>5</sup>	8,5·10 <sup>5</sup>
1·10 <sup>5</sup>	Обнаружено	Обнаружено	1.1·10 <sup>5</sup>	9.5·10 <sup>4</sup>
1·10 <sup>4</sup>	Обнаружено	Обнаружено	0.8·10 <sup>4</sup>	9.9·10 <sup>3</sup>
1·10 <sup>3</sup>	Обнаружено	Обнаружено	930	1000
1·10 <sup>2</sup>	Не обнаружено	Обнаружено	97	Не обнаружено
1·10 <sup>1</sup>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
0	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено

\*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск)

Минимальная определяемая концентрация бактерий предлагаемым методом составляет 10<sup>2</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> (в случае антигена *S. typhi.*) и 10<sup>3</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> (в случае *S. typhi.*). Это совпадает с возможностями ПЦР анализа, однако для реализации электрохимического иммуноанализа не требуется применения дорогостоящего оборудования, организации специальных помещений, дорогостоящих реагентов. Кроме того, продолжительность электрохимического анализа значительно меньше, чем ПЦР анализа.

Для определения специфичности разрабатываемого способа подложки с иммобилизованными антителами к бактерии *S. thyphi.*, инкубировали в суспензиях, содержащих бактерии *E. coli* и бактерии *S. thyphi.* В случае инкубации подложки в суспензии, не содержащей бактериальные клетки *S. typhi.*, электрохимического отклика не наблюдали, поскольку не происходило формирование иммунокомплекса.

Реальными объектами анализа служили испражнения инфицированных животных (курица). Для количественного определения микроорганизмов *S. typhi.* в реальных объектах подложку с иммобилизованными антителами против искомой бактерии инкубировали в испражнения инфицированных куриц (третья стадия схемы иммуноанализа). Холостой опыт – испражнения неинфицированных животных (таблица 3). В качестве метода сравнения применяли метод бактериального посева.

Таблица 3 – Результаты определения бактерии *S. typhi.* в испражнениях инфицированных птиц, полученные с использованием метода бактериального посева и электрохимического иммуноанализа ( $n = 3, P = 0.95$ )

№ образца	Результаты определения бактерии <i>S. typhi.</i> , lg( $n$ , КОЕ/см <sup>3</sup> )		
	Метод бактериального посева* ( $C_1$ )	Электрохимический метод ( $C_2$ )	$C_2/C_1$ , %
1	7.0	6.7±0.5	87
2	7.0	6.8±0.3	91

\*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск)

Результаты исследований иллюстрируют корректность применения, разработанного бесферментного способа иммуноанализа на основе магнитных НЧ для количественного определения бактерий *S. typhi.*, меченных наночастицами  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### Бесферментный электрохимический иммуноанализ и иммуносенсор для определения патогенных микроорганизмов *Escherichia coli* ATCC 25992

Второй вариант иммуноанализа осуществляли с применением в качестве сигналообразующей метки синтезированных по известным и оригинальным методикам следующих типов НК магнетита:

- Нанокompозитные частицы магнетита с поливинилбензилхлоридным покрытием, модифицированным гетероциклическими соединениями (НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПВБХХ), синтезировали методом полимеризации в микроэмульсиях с последующим проведением реакции кватернизации с хинолином, хиноксалином или хинальдином (рисунок 3, а).
- Полипиррольные нанокompозиты магнетита (НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП), синтезированные методом полимеризации *in situ* (рисунок 3, б).
- Нанокompозитные частицы магнетита с оксидкремниевым покрытием, модифицированным ферроценом (НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ФЦ $\text{SiO}_2$ ) (рисунок 3, в).

Аналитическим сигналом служил ток электрохимических превращений: гетероциклических молекул, предварительно ковалентно «пришитых» к поливинилхлориду; электроактивного полимера полипиррола; молекул ферроцена, предварительно ковалентно «пришитых» к оксидкремниевому покрытию.

Различная толщина покрытия НК в значительной степени определялась массовым соотношением применяемых реагентов. Размер и равномерность покрытия для образцов всех типов НК изучали методом электронной микроскопии. На основе полученных результатов для дальнейших исследований были выбраны по одному образцу каждого типа НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ : НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПВБХ ( $m$  НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4/m$  винилбензилхлорида = 1:10);  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП ( $m$  (НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )/ $m$  (пиррола) = 1:1);  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ФЦ $\text{SiO}_2$  ( $m$  (НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) /  $m$  (ТЭОС) = 1:1).

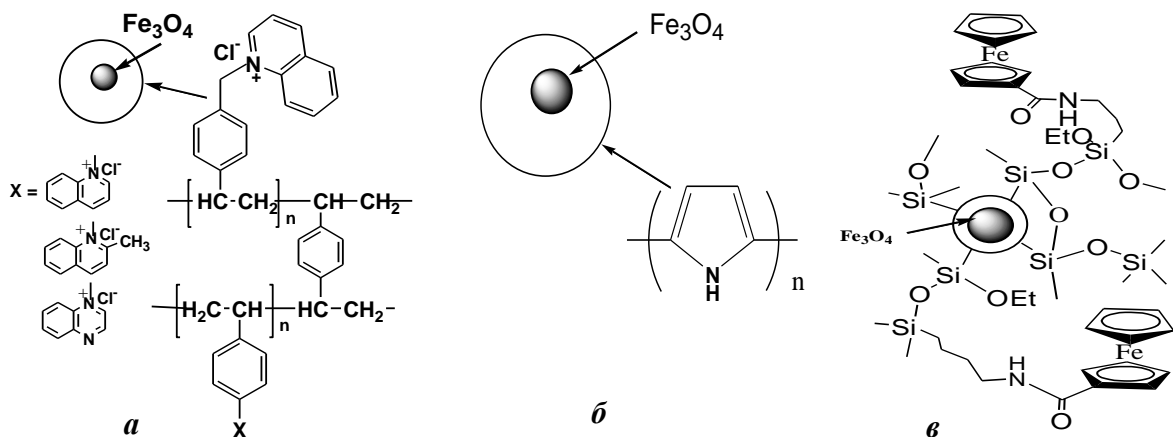


Рисунок 3 – Строение НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПВБХ (а),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП (б),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ФЦ  $\text{SiO}_2$  (в)

Выбранные образцы НК магнетита представляют собой сферические образования. Методом электронной дифракции подтверждали наличие кристаллической решетки. Средний размер составлял: для  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПВБХ около 20 нм (толщина покрытия 7 - 10 нм);



для  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП 180 нм (толщина покрытия 60 - 80 нм); для  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ФЦSiO<sub>2</sub> 20 нм (толщина покрытия 5 нм) при узком разбросе величин вокруг этого максимума.

Состав всех синтезированных образцов подтверждали методом ИК - спектроскопии.

Выбор рабочей концентрации суспензии НК магнетита проводили с помощью визуального наблюдения, а также методом динамического рассеяния света. Было установлено, что для всех типов НК агрегативная устойчивость достигается при концентрации 0.25 г/дм<sup>3</sup> НК.

Окислительно-восстановительные превращения синтезированных образцов НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  исследовали, используя в качестве рабочего толсто пленочный графитовый электрод (ТГЭ), который хорошо себя зарекомендовал в более ранних экспериментах.

На рисунках 4 - 6 приведены циклические вольтамперограммы (ЦВА), зарегистрированные в широком диапазоне потенциалов для всех типов НК магнетита.

Экспериментально установлено, что электрохимическое поведение покрытия соответствует:

- для НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПВБХ превращениям хинолиновой группы при потенциале -1.3 В;  $I$  (мкА) =  $(0.80 \pm 0.12) \cdot C - (6.00 \pm 0.94)$ ,  $S_r = 16 \%$ ,  $R^2 = 0.970$  (рисунок 4, б);
- для НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП превращениям полипиррола при потенциале -0.15 В;  $I$  (мкА) =  $(200.34 \pm 20.43) \cdot C - (3.12 \pm 0.32)$ ,  $S_r = 10 \%$ ,  $R^2 = 0.960$  (рисунок 5, б);
- для НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ФЦSiO<sub>2</sub> превращениям ферроценовой группы при потенциале 0.75 В;  $I$  (мкА) =  $(0.70 \pm 0.06) \cdot C - (0.05 \pm 0.01)$ ,  $S_r = 8.3 \%$ ,  $R^2 = 0.980$  (рисунок 6, б).

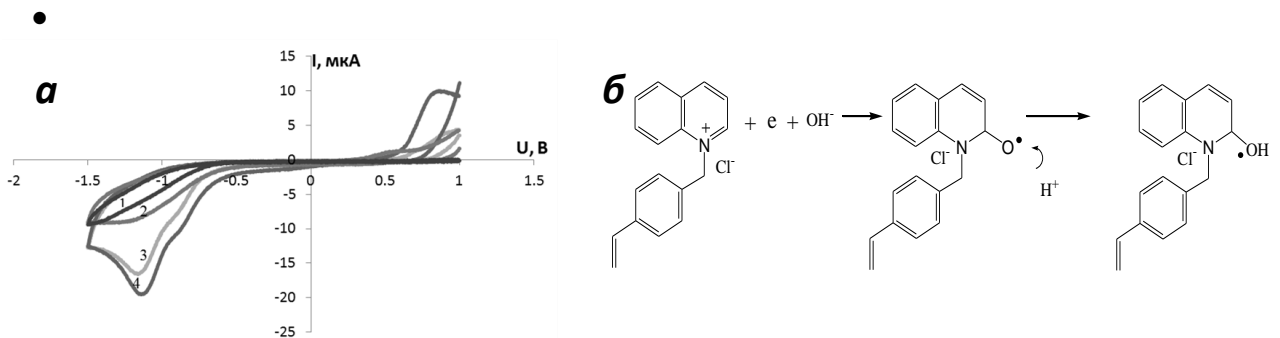


Рисунок 4 – ЦВА НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПВБХ (а): 1 – фоновый электролит 0.1 М  $\text{KNO}_3$ ; (2 – 4) – НК, нанесенный на ТГЭ: 2 –  $C_{\text{мод}} = 4$  г/дм<sup>3</sup>, 3 –  $C_{\text{мод}} = 10$  г/дм<sup>3</sup>, 4 –  $C_{\text{мод}} = 14$  /дм<sup>3</sup>;  $v_{\text{рег-ии}} = 200$  мВ/с; схема электрохимического восстановления хинолина (б)

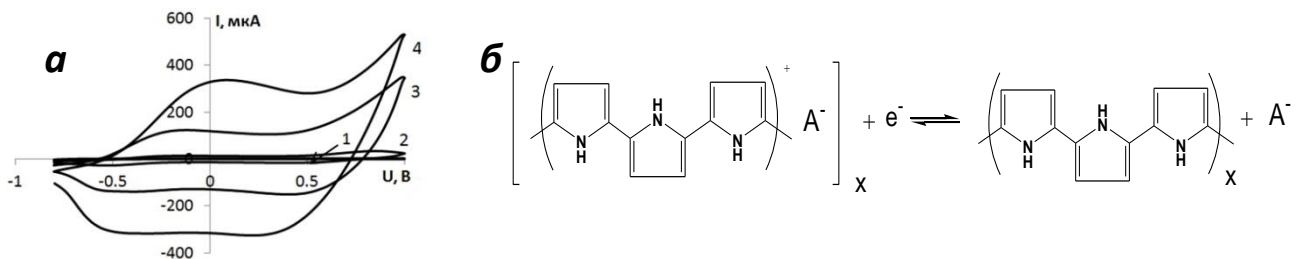


Рисунок 5 – ЦВА НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП (а): 1– фоновый электролит 0.1 М  $\text{KNO}_3$ ; (2 – 4) – НК, нанесенный на ТГЭ: 2 –  $C_{\text{мод}} = 0.25$  г/дм<sup>3</sup>, 3 –  $C_{\text{мод}} = 0.75$  г/дм<sup>3</sup>, 4 –  $C_{\text{мод}} = 1.5$  г/дм<sup>3</sup>;  $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$  В/с; схема электрохимического восстановления полипиррола (б)

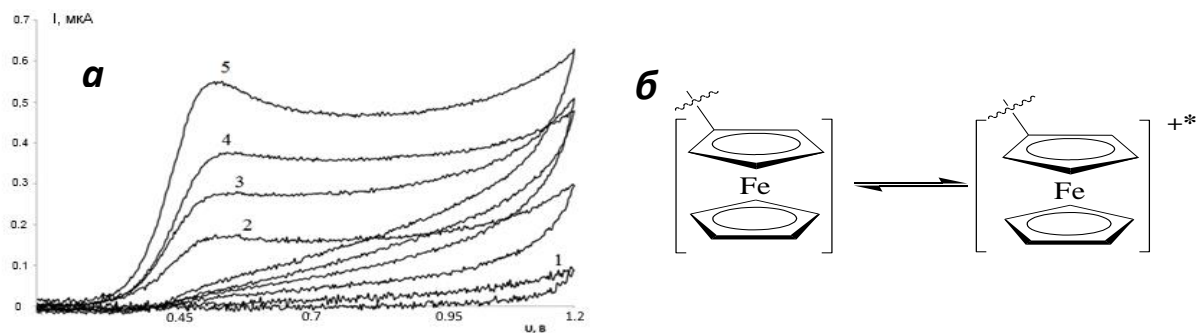


Рисунок 6 – ЦВА НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  –  $\text{ФЦSiO}_2$  (а). 1 – фоновый электролит 0.1 М  $\text{KNO}_3$ ; (2 – 5) НК, нанесенный на ГГЭ: 2 –  $C_{\text{мод}} = 0.2$  г/дм<sup>3</sup>; 3 –  $C_{\text{мод}} = 0.3$  г/дм<sup>3</sup>; 4 –  $C_{\text{мод}} = 0.45$  г/дм<sup>3</sup>; 5 –  $C_{\text{мод}} = 0.6$  г/дм<sup>3</sup>;  $v_{\text{рег-ин}} = 0.1$  В/с; схема электрохимических превращений ферроцена (б)

Для электронно-микроскопических исследований взаимодействия бактерии *E. coli* с синтезированными магнитными НК суспензию последних (0.25 г/дм<sup>3</sup>) выдерживали с микробными клетками в течение 10 и 30 мин при постоянной температуре (37.0±0.1) °С. Затем свободные НК отделяли от меченых клеток магнитным полем.

Электронные микрофотографии препаратов клеток *E. coli* до и после взаимодействия с НК, инкапсулированных в электроактивные покрытия, демонстрируют различную кинетику взаимодействия бактерий с магнитными НК (рисунки 7, 8).

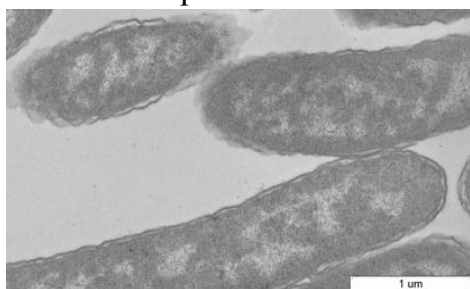


Рисунок 7 – Электронная микрофотография ультратонкого среза клеточной культуры *E. coli* (микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония))

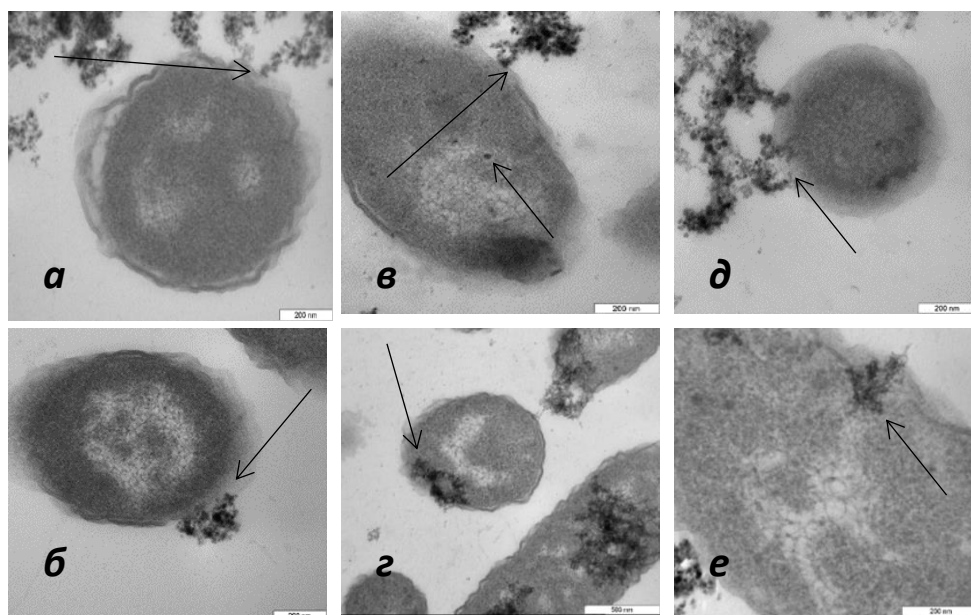


Рисунок 8 – Электронные микрофотографии ультратонкого среза клеточной культуры *E. coli* после 10-ти (а, в, д) и 30-ти (б, г, е) минутной инкубации с НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПВБХ (а, б); НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП (в, г); НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  –  $\text{ФЦSiO}_2$  (д, е); электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония)

Как видно из рисунка, НК магнетита всех трех типов представлены в виде темных скоплений сферической формы. Адсорбцию единичных НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПВБХ на клеточной мембране наблюдали только после 30-ти минутного взаимодействия (рисунок 8, а, б), тогда как НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП уже через 10 мин инкубации с клеточной линией *E. coli* присутствуют на мембране клетки (рисунок 8, в, г). НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ФЦSiO<sub>2</sub> через 10 мин инкубации их с клетками *E. coli* адсорбируются на клеточной мембране, а через 30 мин взаимодействия проникают в цитоплазму клеток (рисунок 8, д, е).

Установлено, что с увеличением времени инкубации количество эндоцитированных нанокompозитных частиц возрастает, причем следует отметить, что проникновение НК в объем цитоплазмы клетки иногда сопровождается повреждением клеточной мембраны.

Определение содержания бактерий *E. coli* с применением НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  проводили по следующей методике:

1. Суспензию бактериальных клеток (проба) смешивали с избытком суспензии НК магнетита, затем смесь инкубировали 30 мин при температуре  $(37.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ .

2. Проводили разделение между несвязавшимися и связавшимися НК магнетита с бактериальными клетками.

3. В емкость с исследуемой суспензией бактериальных клеток, меченных НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , помещали ТГЭ с иммобилизованными антителами, специфичными к определяемому штамму бактерий. Образование иммунокомплекса проводили при постоянной температуре  $(37.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ .

4. ТГЭ после образования на рабочей поверхности иммунокомплекса антитела – клетки *E. coli*, меченные НК магнетита, помещали в трехэлектродную электрохимическую ячейку (в качестве рабочего электрода) и регистрировали циклические вольтамперограммы.

Измерение аналитического сигнала для каждой серии проведенных экспериментов дополняли «холостым опытом», в этом случае подложку инкубировали в суспензии бактериальных клеток, не содержащей искомого бактерии.

В процессе проведения иммуноанализа с применением в качестве сигналообразующей метки НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПВБХ установили, что в водных растворах происходит потеря электроактивности этого типа НК, по-видимому, вследствие гидратации хинолина. Для НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП наблюдали плохо выраженные сигналы на ЦВА, несмотря на большую исходную концентрацию бактерий *E. coli* ( $6.4 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>). Причиной этого, вероятно, явилось быстрое проникновение НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ПП вглубь клеток, что в свою очередь, приводит к экранированию электроактивного покрытия на поверхности частиц клеточным веществом. Применение в иммуноанализе в качестве сигналообразующей метки НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ФЦSiO<sub>2</sub> для определения бактерии *E. coli* позволило зарегистрировать на ЦВА сигналы, соответствующие процессам восстановления/окисления электроактивной оболочки НК. В холостом опыте отклика не наблюдали.

Для предложенного алгоритма иммуноанализа время инкубации НК магнетита с клетками и время образования иммунокомплекса составляли по 30 мин.

Была получена линейная зависимость величины аналитического сигнала от десятичного логарифма концентрации бактерий *E. coli* в исходной суспензии:  $I$  (мкА) =  $(0.073 \pm 0.001) \cdot \lg C_{E.coli} - (0.203 \pm 0.007)$  в интервале концентраций *E. coli*  $2.3 \cdot 10^2 - 2.3 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup> ( $R^2 = 0.980$ ,  $C_{lim}$  составил  $1.2 \cdot 10^1$  КОЕ/см<sup>3</sup>).

Полученные аналитические характеристики (величины  $S_r$  не превышают 15 % при  $n = 5$ ) разрабатываемого иммуносенсора с применением НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ФЦSiO<sub>2</sub>, подтверждают, что сигнал электрохимических превращений ферроцена, может служить источником

информации о количестве бактерий *E. coli* в диапазоне концентраций  $2.3 \cdot 10^2 - 2.3 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>, локализованных на поверхности ТГЭ.

Определение правильности разрабатываемого сенсора для бесферментного электрохимического иммуноанализа проводили с использованием ИФА анализа и бактериального посева, применяемых в качестве методов сравнения (таблица 4).

Минимально определяемая концентрация с применением разрабатываемого бесферментного электрохимического иммуносенсора составляет  $5 \cdot 10^2$  КОЕ/см<sup>3</sup>, что совпадает с возможностями метода ИФА, однако для реализации процедуры электрохимического иммуноанализа не требуется применения дорогостоящего оборудования, организации специальных помещений, дорогостоящих реагентов, кроме того, продолжительность электрохимического анализа значительно меньше, чем для ИФА анализа.

Таблица 4 – Результаты исследования модельных суспензий, содержащих *E. coli* с применением различных методов ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ,  $F_{кр} = 6.39$ ,  $t_{кр} = 2.78$ )\*

Концентрация <i>E. coli</i> , КОЕ/см <sup>3</sup>	ИФА, КОЕ/ см <sup>3</sup>	Электрохимический метод, КОЕ/ см <sup>3</sup>	Бактериальный посев, КОЕ/ см <sup>3</sup>	<i>F</i> -критерий	<i>t</i> -критерий
$5 \cdot 10^6$	$(4.7 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(4.6 \pm 0.3) \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$		
$5 \cdot 10^5$	$(5.3 \pm 0.2) \cdot 10^5$	$(4.9 \pm 0.4) \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	2.51	0.77
$5 \cdot 10^4$	$(4.7 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$(4.7 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	3.15	2.37
$5 \cdot 10^3$	$(5.7 \pm 0.3) \cdot 10^3$	$(5.2 \pm 0.5) \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	3.56	0.30
$5 \cdot 10^2$	$(5.2 \pm 0.3) \cdot 10^2$	$(4.8 \pm 0.6) \cdot 10^2$	–	4.35	2.11
$5 \cdot 10^1$	–	–	–	5.10	1.67

\*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск).

Для определения специфичности разрабатываемого способа ТГЭ с иммобилизованными антителами к бактерии *E. coli* инкубировали в суспензиях, содержащих бактерии  $5 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> *E. coli* и бактерии  $5 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> *S. infantis*. В случае инкубации в суспензии, не содержащей клетки *E. coli*, электрохимического отклика не наблюдали, поскольку не происходило формирование иммунокомплекса.

Для подтверждения селективности разрабатываемого иммуносенсора проводили анализ модельных суспензий бактерий, в которых помимо *E. coli* ( $C_{E.coli} \approx 5 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>) содержались бактерии ( $C_{бакт} \approx 1 \cdot 10^6$  КОЕ/см<sup>3</sup>): *S. infantis*, *Micrococcus flavus*, *Bacillus licheniformis* (таблица 5).

Результаты количественного определения *E. coli* в модельных суспензиях, содержащих различные бактерии, с применением разработанного бесферментного электрохимического иммуносенсора удовлетворительно согласуются с результатами определения стандартно используемых в медицинской диагностике методов ИФА и бактериального посева.

Реальными объектами анализа служили проба воздуха и два образца воды. Отбор реальных проб воздуха и воды из природного и искусственных водоемов проводили в соответствии с ГОСТ. Пробоподготовка образцов не производилась. В качестве методов сравнения применяли ИФА и бактериальный посев (таблица 6).

По рассчитанным значениям *F*- и *t*-критериев можно утверждать, что различие дисперсий метода ИФА и разработанного электрохимического иммуносенсора

статистически незначимо ( $F$ -критерий), а также обе выборки принадлежат к одной и той же генеральной совокупности и различие средних носит случайный характер ( $t$ -критерий).

Таблица 5 – Результаты определения концентрации микроорганизмов *E. coli* в модельных суспензиях, содержащих различные бактерии с применением методов ИФА, бактериального посева и разработанного электрохимического иммуносенсора

( $n = 5, P = 0.95, F_{кр} = 6.39, t_{кр} = 2.67$ )\*

Состав смеси $C_{E.coli} = 7 \cdot 10^4$ КОЕ/см <sup>3</sup> $C_{2\text{компонента смеси}} \approx 10^6$ КОЕ/см <sup>3</sup>	Содержание бактерии <i>E. coli</i> , КОЕ/см <sup>3</sup>			$F$ -критерий	$t$ -критерий
	ИФА	Электрохимический метод	Метод бактериального посева		
<i>E. coli</i> + <i>S. infantis</i>	$(5.8 \pm 0.3) \cdot 10^4$	$(6.0 \pm 0.5) \cdot 10^4$	$\approx 6 \cdot 10^4$	2.34	0.89
<i>E. coli</i> + <i>Micrococcus flavus</i>	$(6.0 \pm 0.3) \cdot 10^4$	$(5.8 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$\approx 6 \cdot 10^4$	2.65	1.52
<i>E. coli</i> + <i>Bac. licheniformis</i>	$(6.3 \pm 0.5) \cdot 10^4$	$(5.9 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$\approx 6 \cdot 10^4$	1.10	1.77

\*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск)

Таблица 6 – Результаты количественного определения бактерии *E. coli* в пробах воды и воздуха, полученные с использованием методов ИФА, бактериального посева и бесферментного электрохимического иммуносенсора ( $n = 5, P = 0.95, F_{кр} = 6.39, t_{кр} = 2.67$ )\*

Проба	Результат определения бактерии <i>E. coli.</i> , КОЕ/см <sup>3</sup>			$F$ -критерий	$t$ -критерий
	ИФА	Электрохимический метод	Метод бактериального посева		
Проба воздуха	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	–	–
Вода из природного водоема (р.п. Кольцово, Новосибирская область)	$(9.4 \pm 0.3) 10^2$	$(9.75 \pm 0.21) 10^2$	$\approx 1 \cdot 10^3$	2.54	2.17
Вода из искусственного водоема (г. Новосибирск)	$(5.2 \pm 0.3) 10^2$	$(5.02 \pm 0.15) 10^2$	Не обнаружено	3.97	1.86

\*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск)

Таким образом, приведенные результаты исследований демонстрируют корректность применения предложенного подхода, основанного на использовании в качестве

сигналообразующей метки магнитных НК для количественного определения бактерий, основным преимуществом которого является возможность регистрации прямого электрохимического сигнала от электроактивного покрытия, что позволило существенно сократить продолжительность иммуноанализа.

### Бесферментный электрохимический иммуносенсор для определения патогенных микроорганизмов на примере *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 с применением НК $\text{Fe}_3\text{O}_4$ в качестве метки в апротонной среде

Еще одним из разрабатываемых подходов, позволившим зарегистрировать прямой электрохимический сигнал от магнитных меток, – бесферментный электрохимический иммуносенсор на основе магнитных НК с модифицирующим покрытием, облегчающим процесс эндоцитоза. Аналитический сигнал – прямой анодный отклик от НК магнетита либо количество электричества, затраченное на электрохимические превращения НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , функционализированных либо хитозаном (для определения грамотрицательных бактерий), либо 3-аминопропилтриэтоксисиланом (для определения грамположительных бактерий) после предварительного электролиза в апротонной среде.

Были зарегистрированы ЦВА предварительно восстановленных НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  на платиновом электроде при потенциалах  $-2.50$  В и  $-1.30$  В соответственно (рисунок 9).

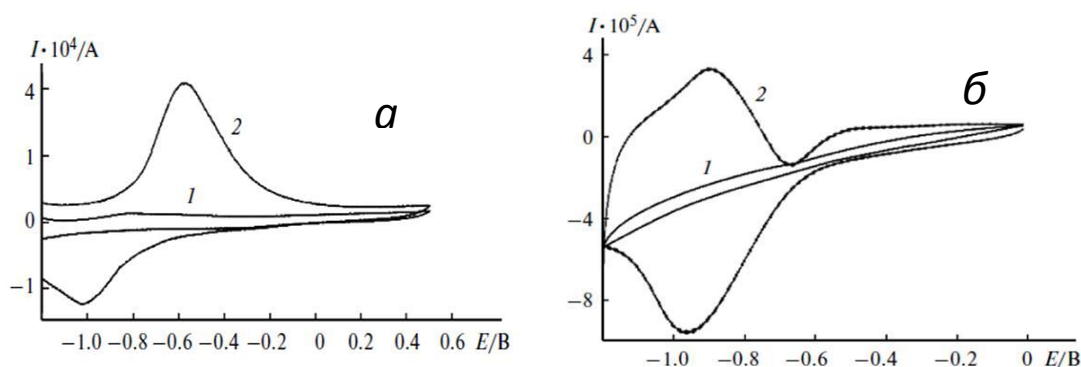


Рисунок 9 – ЦВА, зарегистрированные на платиновом дисковом электроде, модифицированном 1 немодифицированным 2 НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Потенциал предварительного восстановления  $-2.50$  В (а) и  $-1.30$  В (б).  $v_{\text{рег-ии}} = 50$  мВ/с,  $\tau_{\text{эл}} = 60$  с,  $C_{\text{НК}} = 0.1$  г/дм<sup>3</sup>; фоновый электролит 0.1 М  $\text{LiClO}_4$  в ацетонитриле

Из рисунка видно, что в случае наложения потенциала предварительного электролиза  $-1.30$  В (рисунок 9, б), на анодной ветви ЦВА наблюдали 2 сигнала при потенциалах  $-0.85$  В и  $-0.55$  В соответственно, тогда как в случае проведения предварительного электролиза при потенциале  $-2.50$  В – только один при  $-0.59$  В (рисунок 9, а). Кроме того, зарегистрированные сигналы окисления различаются по величине максимального тока анодного пика и по положению потенциала пика на шкале. Катодные процессы практически идентичны и, вероятно, протекают одинаково независимо от потенциала предварительного электролиза.

Расчет количества электронов, принимающих участие в окислительно-восстановительных превращениях НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , предварительно восстановленных на поверхности платинового электрода при потенциалах  $-2.50$  В и  $-1.30$  В соответственно, рассчитывали, используя теорию электрохимического растворения металлов с поверхности твердого индифферентного электрода. В случае реализации электролиза при  $-2.50$  В наблюдали одностадийный перенос трех электронов, а во втором случае

двухстадийный – на первом этапе двух электронов, затем еще одного. Хронопотенциограммы окисления продуктов, предварительно восстановленных НЧ магнетита, также свидетельствуют об одностадийном переносе трех электронов в случае потенциала предварительного электролиза при -2.50 В и двухстадийном превращении в случае потенциала предварительного электролиза при -1.30 В (рисунок 10).

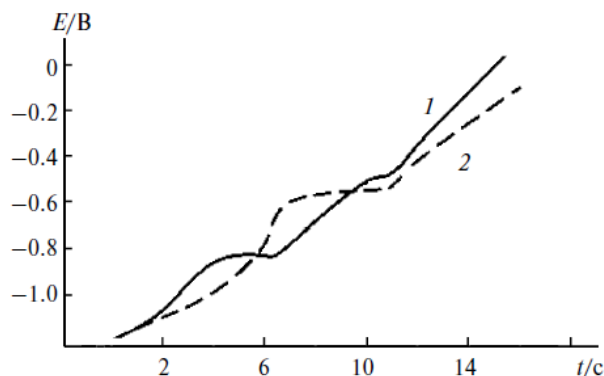
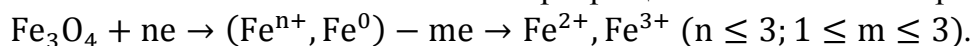


Рисунок 10 – Хронопотенциограммы окисления продуктов, предварительно восстановленных НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  на поверхности платинового электрода при потенциалах -1.30 В, 1 и -2.50 В, 2

На основании проведенных исследований была предложена вероятная схема окислительно-восстановительных превращений НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в апротонном растворе:



Различное электрохимическое поведение продуктов восстановления НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , по-видимому, связано с потенциалом предварительного электролиза. В случае значения -2.50 В происходит полный процесс восстановления  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  до  $\text{Fe}^0$ , а при менее -1.30 В, вероятно, в приэлектродном слое присутствуют также ионные формы железа. Таким образом, дальнейшие эксперименты по определению рабочих условий формирования прямого электрохимического аналитического отклика от НЧ магнетита проводили при потенциале предварительного электролиза -2.50 В.

Оценку влияния фонового электролита и протонирования среды на процессы окисления продуктов восстановления НЧ магнетита, проводили с использованием 0.1 М растворов гексафторфосфата аммония ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ), тетрафторбората тетрабутиламмония ( $\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ ) и перхлората лития ( $\text{LiClO}_4$ ) в ацетонитриле и путем добавок в раствор фонового электролита раствора бензойной кислоты в ацетонитриле (рисунок 11).

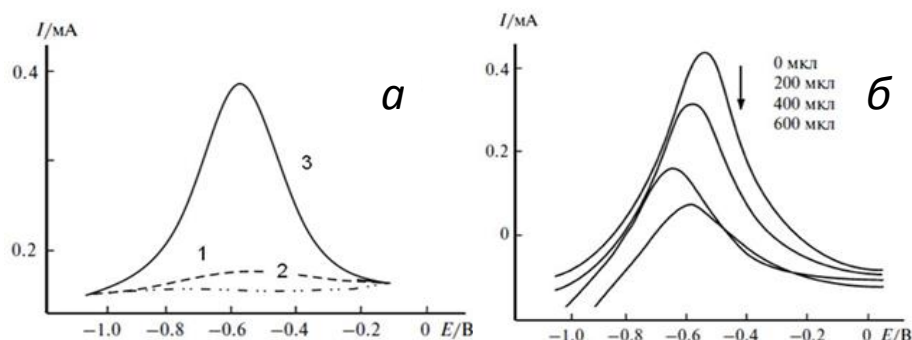


Рисунок 11 – ВА на Pt электроде, модифицированном НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ : фоновые электролиты (а): 1 – 0.1 М р-р  $\text{NH}_4\text{PF}_6$ , 2 –  $\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ , 3 –  $\text{LiClO}_4$  в  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; добавки  $\text{C}_{\text{бенз. к-ты}}$  (б) = 0.01 М.  $E_{\text{эл}} = -2.50$  В

Присутствие в качестве фонового электролита  $\text{LiClO}_4$  облегчает окислительно-восстановительные процессы НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в апротонной среде. Это может быть связано с образованием промежуточных интерметаллических соединений железа и лития на

поверхности платинового электрода. Протонирование фонового электролита изменяет электрохимический отклик, вероятно, это связано с протеканием преимущественно электролиза протонов фонового электролита, а не процессов восстановления НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  вследствие существенных различий величин электрохимического перенапряжения. Таким образом, фоновым электролитом был выбран 0.1 М раствор  $\text{LiClO}_4$ . Кроме того, были получены следующие рабочие условия регистрации прямого электрохимического сигнала от НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ : время предварительного электролиза ( $t_{\text{эл}} = 60$  с) и скорость развертки потенциала ( $v_{\text{рег-ии}} = 0.5$  В/с).

Было установлено, что покрытия НК магнетита (хитозан и 3-аминопропилтриэтоксисилан) практически не влияют на величину и форму анодного отклика. Несущественные различия потенциала пика, а именно сдвиг в анодную область, могут быть связаны с влиянием полярного полимерного покрытия (рисунок 12).

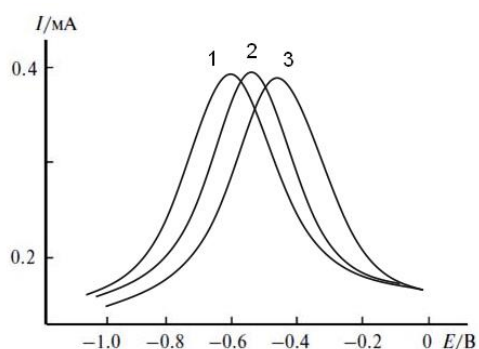


Рисунок 12 – ВА, зарегистрированные на рабочем платиновом электроде, с нанесенными 1 – НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 2 – НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – хитозан и 3 – НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – 3-аминопропилтриэтоксисилан.

$E_{\text{эл}} = -2.50$  В,  $\tau_{\text{эл}} = 60$  с,  $v_{\text{рег-ии}} = 50$  мВ/с;  
концентрация наночастиц в исходной суспензии  
0.1 г/дм<sup>3</sup>, фоновый электролит 0.1 М  $\text{LiClO}_4$  в  
ацетонитриле

Для разработки иммуносенсора применяли толстопленочные планарные электроды, причем токопроводящим слоем служат как углеродные чернила, графитовые композиции, так и платиновые или золотые пасты.

На основании зарегистрированных ВА и диаграмм Найквиста, полученных с использованием толстопленочных планарных электродов четырех типов, рабочую поверхность которых модифицировали НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , для дальнейших исследований были выбраны толстопленочные платиновые электроды (ТПЭ).

Необходимой устойчивостью обладали НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , модифицированные хитозаном и 3-аминопропилтриэтоксисиланом с концентрацией 0.4 г/дм<sup>3</sup> НК в исходной суспензии.

Для выбранных в процессе предварительных исследований толстопленочного платинового электрода (ТПЭ) и рабочих условий формирования электрохимического сигнала превращений НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  получена линейная зависимость в области концентраций исходной суспензии 0.05 – 0.5 г/дм<sup>3</sup>:

$$Q \text{ (мКл)} = (3.91 \pm 0.23) \cdot C_{\text{маг}} \text{ (г/дм}^3\text{)} + (0.10 \pm 0.03) \quad (n = 5, P = 0.95; S_r = 4.7\%, R^2 = 0.996).$$

Для электронно-микроскопических исследований взаимодействия бактерии *E. coli* и *St. aureus* с магнитными НК суспензию последних выдерживали с микробными клетками в течение 10, 20 и 30 мин при постоянной температуре  $(37.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ . Затем свободные НК отделяли от меченых клеток магнитным полем.

Электронные микрофотографии препаратов клеток *E. coli* и *St. aureus* до и после взаимодействия с НК демонстрируют различную кинетику взаимодействия бактерий с магнитными НК (рисунок 13).

10 минут инкубации недостаточно для проникновения НК в мембрану бактериальной клетки (рисунок 13, б, е). После 20 мин инкубации (рисунок 13, в, ж) в случае НК, покрытых хитозаном (НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – Х), наблюдали адсорбцию НК магнетита на мембране бактериальной



клетки, в случае НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – 3-аминопропилтриэтоксисилан (НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – АПЭС) утолщение мембраны клеток *S. aureus* за счет множественного «включения» НЧ путем химического взаимодействия покрытия с поверхностными белками. Через 30 мин инкубации НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  с хитозаном с бактериальными клетками *E. coli* происходило множественное выраженное проникновение НЧ как в клеточную мембрану, так и во внутриклеточное пространство (рисунок 3.22, з). После 30 мин практически все НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – 3-аминопропилтриэтоксисилан «встроились» в мембрану клеток *St. aureus* или проникли вглубь.

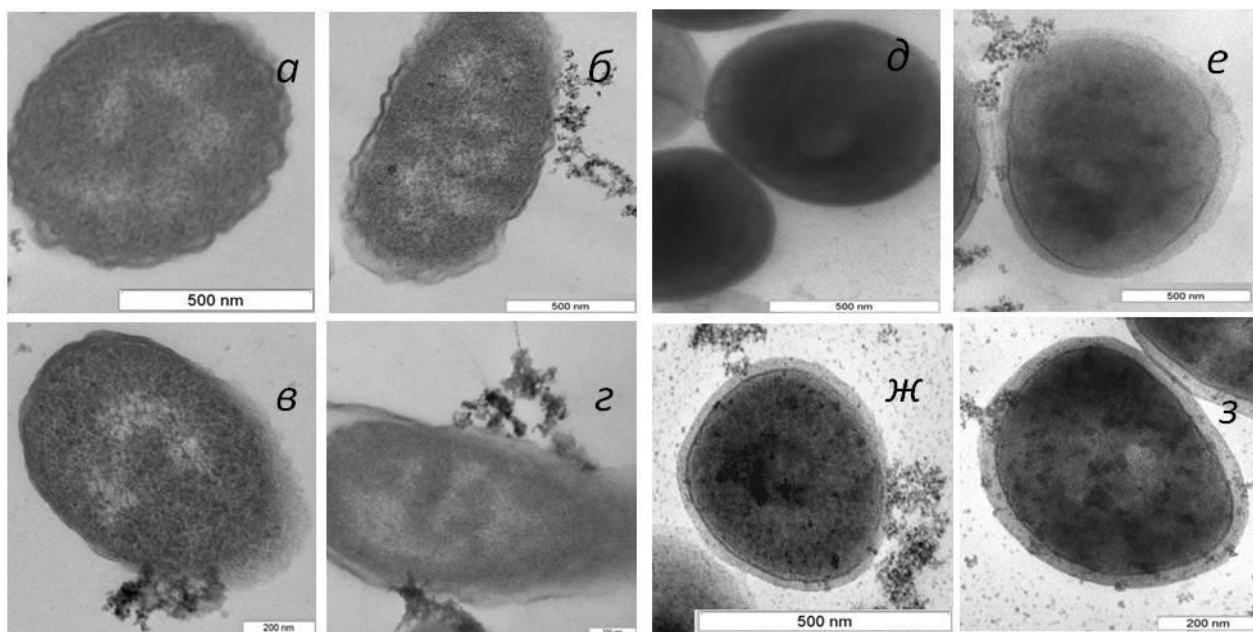


Рисунок 13– Электронные микрофотографии ультратонких срезов бактерий *E. coli* и *St. aureus* до (а, д) и после 10 (б, е), 20 (в, ж) и 30 (з, з) минут в заимодействия с НЧ « $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – Х» и « $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – АПЭС» соответственно; электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония)

Определение содержания бактерий *E. coli*. и *St. aureus* с применением НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  проводили по следующей методике:

1. Суспензию бактериальных клеток (проба) смешивали с избытком суспензии НК магнетита, затем смесь инкубировали 30 мин при температуре  $(37.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ .

2. Проводили разделение между несвязавшимися и связавшимися НК магнетита с бактериальными клетками.

3. В емкость с исследуемой суспензией бактериальных клеток, меченных НК  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – Х или  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – АПЭС, помещали ТГЭ с иммобилизованными антителами, специфичными к определяемому штамму бактерий. Образование иммунокомплекса проводили при постоянной температуре  $(37.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ .

4. ТГЭ после образования на рабочей поверхности иммунокомплекса антитела – клетки *E. coli* или антитела – клетки *St. aureus*, меченные НК магнетита, помещали в трехэлектродную электрохимическую ячейку (в качестве рабочего электрода), содержащую в качестве фонового электролита 0.1 М раствор  $\text{LiClO}_4$  в ацетонитриле, и регистрировали вольтамперограммы.

Ключевым этапом в разработке иммуносенсора является стадия введения и закрепления (иммобилизации) антител на поверхности ТГЭ. Для определения рабочих условий иммобилизации антител на рабочей поверхности электрода применяли: 1) физическую иммобилизацию на поверхности, 2) на рабочую поверхность с предварительно

электроосажденной пленкой золота, 3) на рабочую поверхность с нанесенными тиолированными углеродными нанотрубками. Оценку продуктивности применяемых методов иммобилизации антител проводили с помощью метода электрохимического импеданса.

Исследуемые электроды стабильны. Для каждого способа иммобилизации получены линейные градуировочные зависимости в координатах  $Q - \lg C$  в диапазоне от 10 до  $10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup> для бактериальных клеток *St. aureus* после образования иммунокомплекса. Наиболее заполненной антителами оказалась рабочая поверхность электрода после физической иммобилизации. Меньшее заполнение поверхностей ТПЭ для второго и третьего способа может быть связано с направленным распределением антител. Однако пространственная ориентация в случае применения поликлональных антител, вероятно, не играет существенной роли. Близкие аналитические характеристики ТПЭ, модифицированных с использованием первого и второго способов, позволяют применять их в иммуноанализе. Учитывая простоту производства иммуносенсора – ТПЭ с физической иммобилизацией, в дальнейших исследованиях применяли этот метод иммобилизации.

Для выбранных рабочих условий были получены линейные зависимости в координатах  $Q - \lg C$  в диапазоне от 10 до  $10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup> в исходной суспензии для бактериальных клеток *E. coli*:  $Q(\text{мКл}) = (0.111 \pm 0.003) \cdot \lg C_{E.coli} + (0.053 \pm 0.009)$  ( $R^2 = 0.990$ ,  $C_{lim} = 9.3$  КОЕ/см<sup>3</sup>), для *St. aureus*:  $Q(\text{мКл}) = (0.136 \pm 0.002) \cdot \lg C_{St.aureus} + (0.086 \pm 0.008)$  ( $R^2 = 0.99$ ,  $C_{lim} = 8.7$  КОЕ/см<sup>3</sup>).

Определение правильности разрабатываемого сенсора для бесферментного электрохимического иммуноанализа проводили с использованием ИФА анализа и бактериального посева, применяемых в качестве методов сравнения (таблица 7). Для определения селективности проводили анализ двух- или трехкомпонентных модельных суспензий бактерий, реальных проб, содержащих помимо *E. coli* и *St. aureus* другие бактерии (таблица 8).

По рассчитанным значениям  $F$ - и  $t$ -критериев можно утверждать, что различие дисперсий метода ИФА и разработанного электрохимического иммуносенсора статистически незначимо ( $F$ -критерий), а также обе выборки принадлежат к одной и той же генеральной совокупности и различие средних носит случайный характер ( $t$ -критерий).

Для определения специфичности разрабатываемых иммуносенсоров ТПЭ с иммобилизованными антителами к бактерии *S. aureus* или *E. coli* инкубировали в суспензиях, содержащих определяемые бактерии  $1 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> и бактерии  $1 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> *S. infantis*. В случае инкубации ТПЭ в суспензиях, не содержащих бактериальные клетки *E. coli* или *St. aureus*, электрохимического отклика не наблюдали, поскольку не происходило формирования иммунокомплекса.

Приведенные результаты исследований демонстрируют корректность применения предложенного подхода, основанного на использовании в качестве сигналообразующей метки магнитных НК для количественного определения бактерий, основным преимуществом которого является возможность регистрации прямого электрохимического сигнала от НК, что позволило существенно сократить продолжительность иммуноанализа.

Таким образом, реализована схема бесферментного иммуноанализа с использованием в качестве сигналообразующей метки магнитных НЧ/НК с тремя возможными способами регистрации аналитического сигнала (рисунок 14).

Таблица 7 – Результаты исследования модельных суспензий и реальных проб, содержащих *E. coli*, с применением различных методов ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $F_{кр} = 6.39$ ,  $t_{кр} = 2.67$ )\*

Объект	Обнаружено <i>E. coli</i> , КОЕ/см <sup>3</sup>			
	Электрохимический иммуносенсор	ИФА	Бактериальный посев	$t_{эксп}$
<i>E. coli</i> + <i>M. Flavus</i> (1:1)	$(5.0 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(5.01 \pm 0.10) \cdot 10^5$	$\sim 6 \cdot 10^5$	0.18
<i>E. coli</i> + <i>B. licheniformis</i> (1:1)	$(7.30 \pm 0.04) \cdot 10^3$	$(7.04 \pm 0.05) \cdot 10^3$	$\sim 6 \cdot 10^3$	1.37
<i>E. coli</i> + <i>S. infantis</i> (1:1)	$(9.70 \pm 0.04) \cdot 10^3$	$(1.02 \pm 0.04) \cdot 10^4$	$\sim 1 \cdot 10^4$	1.42
Проба воды из природного водоема	$(1.00 \pm 0.03) \cdot 10^3$	$(1.03 \pm 0.07) \cdot 10^3$	$\sim 1 \cdot 10^3$	1.23
Проба воздуха	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	–

\*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск)

Таблица 8 – Результаты исследования модельных суспензий, содержащих *S. aureus* В-1266, с применением различных методов ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $F_{кр} = 6.39$ ,  $t_{кр} = 2.67$ )\*

Состав смеси	Обнаружено <i>S. aureus</i> , КОЕ/см <sup>3</sup>			
	Электрохимический иммуносенсор	ИФА	Бактериальный посев	$t_{эксп}$
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (1:1)	$(1.13 \pm 0.09) \cdot 10^3$	$(1.06 \pm 0.11) \cdot 10^3$	$\sim 1 \cdot 10^3$	1.34
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (1:10)	$(1.12 \pm 0.07) \cdot 10^3$	$(1.09 \pm 0.09) \cdot 10^3$	$\sim 1 \cdot 10^3$	0.73
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (10:1)	$(1.07 \pm 0.04) \cdot 10^4$	$(1.10 \pm 0.05) \cdot 10^4$	$\sim 1 \cdot 10^4$	1.15
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i> (1:1:1)	$(1.04 \pm 0.04) \cdot 10^4$	$(1.05 \pm 0.05) \cdot 10^4$	$\sim 1 \cdot 10^4$	0.28

\*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск)

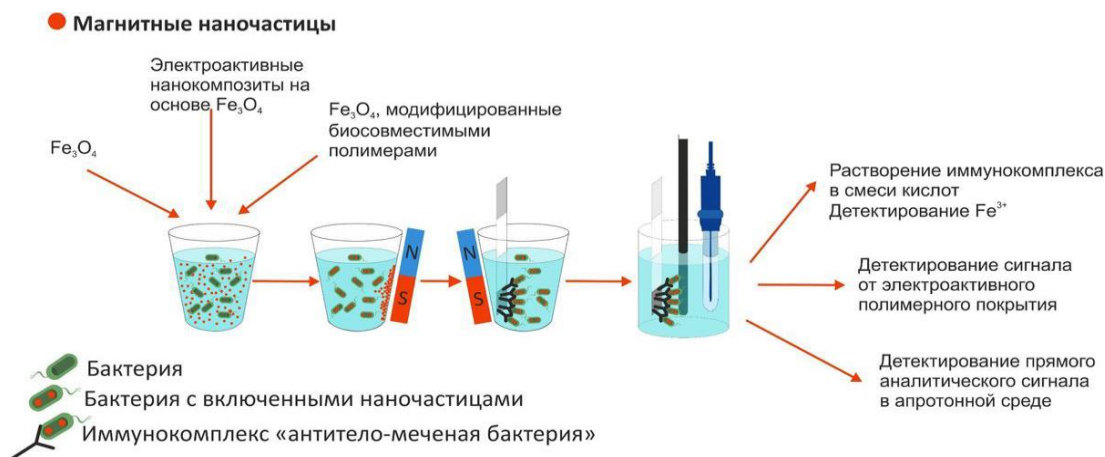


Рисунок 14 – Схема проведения бесферментного электрохимического иммуноанализа определения бактерий

### Бесферментный электрохимический способ определения антигена вируса кори с применением конъюгатов антитело – НК магнетита с оксидкремниевым покрытием в качестве метки

Синтезированные НК,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  с оксидкремниевым покрытием применяли для разработки бесферментного электрохимического способа иммуноанализа в определении антигенов вирусов на примере антигена вируса кори. Предложена следующая схема иммуноанализа (рисунок 15).

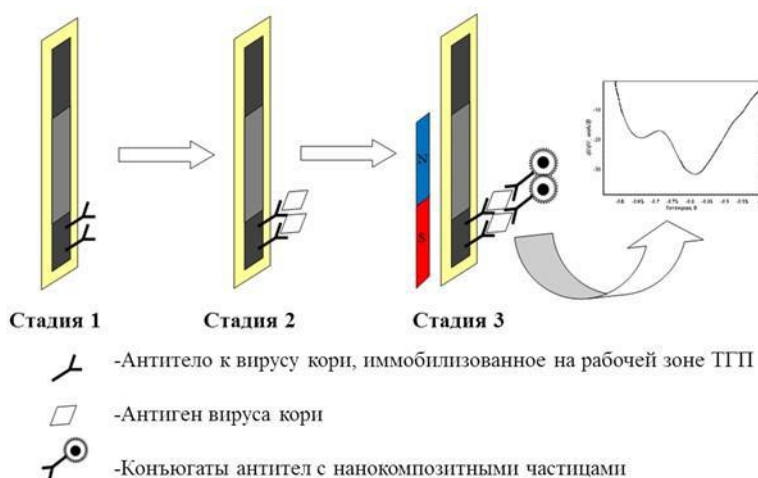


Рисунок 15 –  
Схема проведения бесферментного электрохимического иммуноанализа определения антигена вируса кори

Рабочую зону толсто пленочной планарной графитозоксидной подложки (ТГЭ) иммобилизовали антител IgG против вируса кори ( $1 \text{ мг/см}^3$ ) и высушивали. Затем в пробирки с внесённым антигеном вируса кори (NovO/96) помещали модифицированные подложки и выдерживали при  $(37.0 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 мин. Далее проводили локализацию синтезированных конъюгатов на иммунном комплексе при  $(37.0 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 мин.

Количественное определение содержания НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  после образования иммунного комплекса проводили методом инверсионной вольтамперометрии (ИВА). Для этого НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , включенных в иммунный комплекс, переводили в трехвалентную форму  $\text{Fe}^{3+}$  путем растворения иммунного комплекса в смеси азотной и серной кислот с последующим кипячением.

В случае присутствия искомого инфекционного агента в суспензии происходило образование иммунного комплекса, что сопровождалось наличием на вольтамперограммах тока

восстановления железа. В случае суспензии, не содержащей антиген вируса кори – холостого опыта, в исследуемом интервале потенциалов тока восстановления железа на кривой не наблюдали.

Для выбранных рабочих условий была получена линейная зависимость в координатах  $dI/dE - \lg C$  в диапазоне  $(2.33 \cdot 10^{-4} - 2.33)$  мг/см<sup>3</sup> в исходной суспензии  $dI/dE$  [мкА/В] =  $(2.441 \pm 0.002) \cdot \lg C_{AG} - (11.630 \pm 0.050)$  ( $R^2 = 0.990$ ,  $C_{lim} = 1.87 \cdot 10^{-5}$  мг/см<sup>3</sup>).

Результаты предложенной процедуры бесферментного электрохимического иммуноанализа подтвердили, что аналитический сигнал (величина  $dI/dE$ ), полученный от конъюгатов антитела – НК Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, локализованных на поверхности подложки, служит источником информации о количестве антигена вируса кори.

В рамках проведенных комплексных исследований представлены теоретическое обоснование применения в качестве сигналообразующих меток неферментативной природы магнитных НЧ и НК и новый общий методологический подход разработки бесферментного электрохимического иммуноанализа для количественного определения бактериальных клеток и антигенов вирусов. Реализованы схемы анализа (рисунки 14, 15) с целью создания экспрессных, дешевых, простых в употреблении иммуносенсоров для анализа биологических и природных объектов. Применение магнитных наночастиц или нанокомпозитов позволило включить в процедуру иммуноанализа магнитное разделение и концентрирование, что существенно улучшило аналитические характеристики определения инфекционных агентов.

### **Варианты бесферментных электрохимических способов и сенсоров на основе катализаторов, содержащих соединения Ni (II), Co (II) органической и неорганической природы, наноксиды никеля (II), наночастицы серебра, золота, наносплавы, наночастицы типа ядро-оболочка для определения мочевины, креатинина, холестерина**

В последнее десятилетие тенденцией развития подходов к определению диагностических важных показателей крови является синтез и применение каталитических систем небиологической природы – аналогов ферментов, которые традиционно используются в биохимическом анализе крови. Одним из таких подходов является создание и применение редокс-активных соединений с металлоцентром, в том числе нанокатализаторов, а также полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) или анионнообменных сорбентов, обеспечивающих селективность.

В рамках исследований осуществляли подход с применением электрокаталитического окисления аналита (рисунок 16).



Рисунок 16 – Механизм электрокаталитического окисления аналита

## Бесферментный электрохимический способ количественного определения мочевины и креатинина

Методика количественного определения мочевины, креатинина:

1. Предварительная подготовка модифицированного электрода – многократное циклирование в диапазоне потенциалов от 0.00 до 0.70 (0.90) В. Потенциал анодного пика катализатора определяли из зарегистрированных вольтамперограмм.
2. Регистрация хроноамперограмм окисления катализатора в фоновом электролите при выбранном предварительно потенциале, а также после введения стандартных добавок мочевины, креатинина или холестерина или раствора пробы.
3. Содержание мочевины, креатинина или холестерина ( $C_{обр}$ , мкМ) определяли по приросту пика анодного тока:

$$C_{обр} = C_{доб} \times \left( \frac{\Delta I_{обр}}{\Delta I_{доб}} \right) \times \frac{V_{доб}}{V_{обр}}, \quad (1)$$

где  $\Delta I_{доб}$  – ток окисления катализатора, полученный после введения в раствор стандартной добавки мочевины, креатинина или холестерина;

$\Delta I_{обр}$  – ток окисления катализатора, полученный в присутствии стандартной добавки мочевины, креатинина или холестерина (образца);

$C_{доб}$  – концентрация стандартной добавки мочевины, креатинина или холестерина;

$V_{доб}$  – объем стандартной добавки мочевины, креатинина или холестерина, вводимый в ячейку;

$V_{обр}$  – объем второй стандартной добавки (образца), вводимой в ячейку.

Образцы НЧ NiO, применяемые в качестве электрокатализаторов окисления мочевины/креатинина, синтезировали методом обратных микроэмульсий в присутствии цетилтриметиламмоний-N-бромида (ЦТАБ) или (бис-2-этилгексил) сульфосукцината натрия (АОТ).

Результаты дифракционных исследований, энергодисперсионного спектрального и химического анализа образцов подтвердили природу синтезированных НЧ NiO. Согласно результатам, полученным ПЭМ, НЧ NiO имеют сферическую форму, независимо от природы ПАВ. Средний диаметр НЧ варьируется от 15 нм до 24 нм в зависимости от температурного режима синтеза. На основании результатов РЭМ установлено, что НЧ NiO агрегируют на поверхности ТУЭ в виде образований неправильной формы, причем распределение частиц по размерам зависит от природы ПАВ и от температурного режима синтеза.

Были зарегистрированы ЦВА с использованием ТУЭ с нанесенными на рабочую поверхность синтезированными образцами НЧ NiO (по 3 мкл, исходная концентрация 0.5 г/дм<sup>3</sup>). Наблюдали характерные для системы Ni (II)/Ni (III) пары анодно-катодных пиков после формирования поверхности циклированием потенциала в интервале от 0.00 до 0.70 В (рисунок 17).

Полученную зависимость анодного сигнала от содержания НЧ в исходной суспензии можно объяснить, рассмотрев физико-химические процессы превращения растворенного вещества с образованием твердой фазы на электроде из капли с модификатором, представив ее в виде микрореактора. Принимая во внимание испарение растворителя, приводящее к уменьшению объема, а, следовательно, смещению границы «раствор – воздух – подложка», можно говорить, что скорость процесса высыхания и вязкость жидкости определяют

степень регулярности конечной структуры. После высыхания капли на поверхности рабочей зоны электрода возникают ансамбли наночастиц. При увеличении исходной концентрации НЧ скорость их агломерации также увеличивается, причем этот процесс происходит уже в объеме, до нанесения на электрод. Таким образом, на поверхности ТУЭ распределение НЧ плотное, но неравномерное. Увеличение величины отношения объем – поверхность приводит к существенным фазовым изменениям, в результате чего такой модификатор начинает работать как фаза, т.е. из наносостояния происходит переход в макросостояние. Величина аналитического сигнала такого модификатора существенно ниже, чем для ансамбля наночастиц.

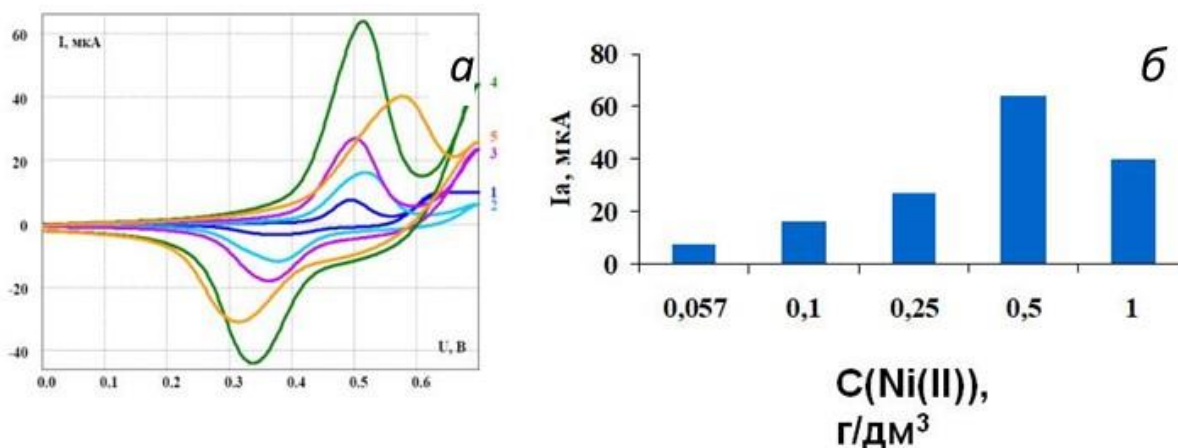


Рисунок 17 – ЦВА, зарегистрированные с использованием ТУЭ, модифицированного НЧ NiO (а). Исходная концентрация НЧ в суспензии (в пересчете на содержание Ni (II)): 1 – 0.06 г/дм<sup>3</sup>; 2 – 0.10 г/ дм<sup>3</sup>; 3 – 0.25 г/ дм<sup>3</sup>; 4 – 0.50 г/ дм<sup>3</sup>; 5 – 1.00 г/ дм<sup>3</sup>; фоновый электролит 0.25 М NaOH.  $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$  В/с; зависимость величины анодного сигнала от содержания НЧ NiO в исходной суспензии (б)

Для НЧ NiO, применяемых в качестве электрокатализатора, были получены линейные зависимости хроноамперометрического сигнала окисления мочевины от ее содержания:

$$I \text{ (мкА)} = 0.011 \cdot C + 0.012 \quad (R^2 = 0.984) \text{ в случае ТУЭ – NiO (0.10 г/дм}^3\text{);}$$

$$I \text{ (мкА)} = 0.929 \cdot C + 1.472 \quad (R^2 = 0.953) \text{ в случае ТУЭ – NiO (0.50 г/дм}^3\text{).}$$

Однако полученные зависимости не могут быть применены в дальнейших экспериментах по разработке бесферментного электрохимического способа определения мочевины/креатинина из-за недостаточной чувствительности по сравнению со стандартно применяемыми методами, а также из-за низких значений коэффициентов корреляции зависимости аналитического сигнала от концентрации мочевины.

В качестве электрокатализаторов окисления мочевины/креатинина применяли синтезированные в ИОС УрО РАН органические комплексы никеля (II), которые способны дополнительно координировать молекулы мочевины или креатинина вблизи металлоцентра за счет окружения лиганда.

Осуществляли выбор толстопленочного электрода (ТУЭ или ТГЭ) и способа модифицирования его рабочей поверхности (внесение в объем или поверхностное нанесение). Определение проводили по величине и воспроизводимости амперометрического сигнала в присутствии мочевины с заданной концентрацией с помощью методики «введено – найдено». Были получены равнозначные результаты хроноамперометрического определения мочевины с использованием ТУЭ или ТГЭ,

модифицированных комплексами II или III, что позволило применять в дальнейших экспериментах ТУЭ, изготавливаемых по более простой технологии. В случае поверхностного нанесения электрокатализатора на рабочую поверхность электрода наблюдали наилучшую воспроизводимость от электрода к электроду потенциала окисления никеля (II) по сравнению с внесением в объем электрода.

Выбор катализатора для электрохимического окисления мочевины и креатинина осуществляли на примере мочевины, т.к. мочевина, являясь первичным амином, по сравнению с креатином легче вступает в реакцию каталитического окисления под действием ионов Ni (II). Определяли электрохимические характеристики для всех 16 комплексов после нанесения на рабочую поверхность ТУЭ ( $\Delta E$ ,  $I_{\text{кат}}/I_{\text{NiL}}$ , где  $I_{\text{кат}}$  — каталитический ток окисления мочевины, регистрируемый в хроноамперометрическом режиме,  $I_{\text{NiL}}$  — ток окисления комплекса никеля (II)). В результате исследований в качестве электрокатализаторов для количественного определения мочевины и креатинина выбраны органические комплексы II, III, V, XI и XII.

Были зарегистрированы ЦВА с использованием ТУЭ, модифицированного комплексом III в отсутствие и в присутствии мочевины (рисунок 18, а) и креатинина (рисунок 18. б). Вольтамперограммы, зарегистрированные в отсутствие и присутствии мочевины/креатинина, соответствуют, по-видимому, процессу электроокисления исследуемого субстрата. Схему электрохимического каталитического окисления мочевины/креатинина можно представить, учитывая, что соединения, содержащие аминогруппу, в процессе электрохимического окисления образуют катион-радикалы:

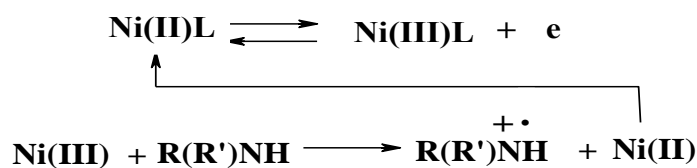


Схема 1 – Механизм электрокаталитического окисления мочевины/креатинина.

$\text{R(R')NH}_2$  — мочевина или креатинин, L — органический лиганд

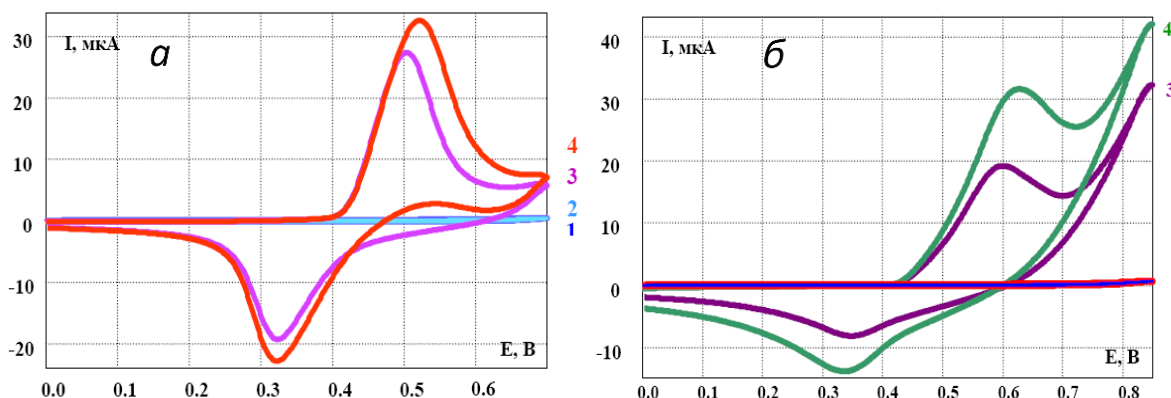


Рисунок 18 – ЦВА, зарегистрированные на немодифицированном ТУЭ: 1 – в отсутствие мочевины (а)/креатинина (б) в растворе; 2 – в присутствии 3 мМ мочевины(а)/0.02 мМ креатинина (б) в растворе, и на ТУЭ, модифицированном комплексом III: 3 – в отсутствие мочевины (а)/креатинина (б) в растворе, 4 – в присутствии 3 мМ мочевины (а)/0.02 мМ креатинина (б) в растворе; фоновый электролит 0.25 М NaOH.  $v_{\text{пер-ни}} = 0.1$  В/с



Полученная линейная зависимость величины тока окисления катализатора ( $I$ , мкА) от скорости наложения потенциала ( $v$ , мВ/с):  $I = 0.4 \cdot v + 0.25$ ;  $R^2 = 0.9997$  указывает на то, что в электрохимическом процессе принимает участие электроактивное вещество, локализованное на поверхности электрода. Вероятно, это процесс обратимого электрохимического окисления Ni (II)L/Ni (III)L.

Линейная зависимость  $I$  от  $t^{0.5}$  регистрации аналитического сигнала ( $t^{0.5}$ ,  $c^{0.5}$ ) в присутствии 1 мМ мочевины подчиняется уравнению Коттрела ( $I = 0.65 \cdot t^{0.5} + 0.25$ ;  $R^2 = 0.997$ ), что указывает на лимитирующую стадию в процессе окисления мочевины – диффузию аналита из объема раствора. Также была получена линейная зависимость  $I$  от  $t^{0.5}$  процесса электрохимического окисления креатинина.

Для выбранных комплексов получены линейные зависимости аналитического сигнала от концентрации мочевины в диапазоне концентраций  $1 \cdot 10^{-5}$  М до  $1 \cdot 10^{-2}$  М. Максимально близкие, воспроизводимые значения найденной добавки зарегистрированы для ТУЭ, модифицированных комплексами II, III, V и XI. Для ТУЭ, модифицированного комплексом XII, наблюдали наименьшие по величине аналитические сигналы окисления аналита (таблица 9). В случае определения мочевины  $C_{lim}$ , рассчитанный по  $3\sigma$ -критерию –  $8.7 \cdot 10^{-6}$  М, тогда как для стандартного ферментативного метода с применением колориметрического анализатора BUN/UREA Vitrous System (Johnson & Johnson, Великобритания) составляет  $C_{lim} = 2 \cdot 10^{-4}$  М.

Креатинин является вторичным амином, поэтому ожидали, что каталитическая активность комплексов никеля (II) будет меньше по сравнению с мочевиной. Для ТУЭ с нанесенными комплексами XI и XII не наблюдалось выраженных сигналов окисления креатинина.

Для комплексов II, III, V получены линейные зависимости аналитического сигнала от концентрации мочевины в диапазоне концентраций  $5 \cdot 10^{-5}$  М до  $1 \cdot 10^{-3}$  М. В случае определения креатинина  $C_{lim}$ , рассчитанный по  $3\sigma$ -критерию –  $2.7 \cdot 10^{-5}$  М, тогда как минимальное содержание креатинина в сыворотке крови взрослого здорового человека составляет  $4.4 \cdot 10^{-5}$  М.

Таким образом, полученные аналитические сигналы при гетерогенном электрокаталитическом окислении электронеактивных мочевины или креатинина позволяют применять органические комплексы для количественного определения заявленных аминов.

В качестве селективного элемента для выделения мочевины из модельных растворов и реальных проб проводили применяли анионообменную колонку HYPERSEP ICON (Metrohm, Швейцария). В качестве модельных использовали водные растворы следующих веществ (содержание альбумина во всех модельных растворах  $45$  г/дм<sup>3</sup>):

1) Мр1 — аланин ( $3.14 \cdot 10^{-4}$  М), глицин ( $3.20 \cdot 10^{-4}$  М), лейцин ( $1.87 \cdot 10^{-4}$  М), аспарагиновая кислота ( $0.22 \cdot 10^{-4}$  М), глутаминовая кислота ( $0.89 \cdot 10^{-4}$  М), глюкоза ( $6.40 \cdot 10^{-3}$  М), аскорбиновая кислота ( $0.57 \cdot 10^{-4}$  М), мочевая кислота ( $4.8 \cdot 10^{-4}$  М), креатинин ( $1.00 \cdot 10^{-3}$  М);

2) состав Мр2 отличается от состава Мр1 присутствием мочевины, равным  $5.00 \cdot 10^{-3}$  М.

Содержание мочевины в фильтрате после разделения компонентов модельных растворов Мр1 или Мр2 на анионообменной колонке составило ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $t_{кр} = 2.78$ ):  $C = (0.92 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$  М;  $S_r = 5.2$  % и  $(5.37 \pm 0.45) \cdot 10^{-3}$  М;  $S_r = 9.6$  % соответственно.

Таблица 9 – Аналитические характеристики электрокаталитического определения мочевины/креатинина с применением модифицированных ТУЭ ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ )

Электрод	$C_{\text{аналит}}, \text{мМ}$		$S_r, \%$	$t_{\text{эксп}}$	Уравнение регрессии, ( $I_{\text{cat}}: \mu\text{А}; C: \text{мМ}$ )	$R^2$	Диапазон концентраций, мМ
	Введено	Найдено					
Мочевина							
ТУЭ-II	1	$1.11 \pm 0.09$	9.4	2.73	$I = 5.46 \cdot C + 9.08$	0.995	0.01 ÷ 10.00
ТУЭ-III		$1.09 \pm 0.09$	8.5	2.23	$I = 0.26 \cdot C + 0.55$	0.999	
ТУЭ-V		$0.98 \pm 0.05$	5.5	0.89	$I = 18.71 \cdot C + 20.62$	0.992	
ТУЭ-XI		$0.85 \pm 0.12$	6.7	2.29	$I = 5.73 \cdot C + 9.57$	0.998	
ТУЭ-XII		$0.95 \pm 0.08$	7.0	1.39	$I = 0.04 \cdot C + 0.65$	0.994	
Креатинин							
ТУЭ-II	0.5	$0.54 \pm 0.09$	14	0.99	$I = 1.88 \cdot C + 0.38$	0.997	0.03 ÷ 0.50
					$I = 1.45 \cdot C + 0.79$	0.988	0.03 ÷ 1.00
ТУЭ-III		$0.58 \pm 0.20$	28	0.89	$I = 0.92 \cdot C + 0.12$	0.999	0.05 ÷ 0.55
					$I = 0.72 \cdot C - 0.04$	0.954	0.03 ÷ 1.00
ТУЭ-V		$0.46 \pm 0.04$	7.8	2.24	$I = 2.11 \cdot C + 0.18$	0.997	0.03 ÷ 0.50

По рассчитанным значениям  $F$ - и  $t$ -критериев можно утверждать, что различие дисперсий уреазного метода и разработанного электрохимического способа статистически незначимо ( $F$ -критерий), а также выборки принадлежат к одной и той же генеральной совокупности и различие средних носит случайный характер ( $t$ -критерий) (таблица 10).

Таблица 10 – Результаты хроноамперометрического определения мочевины в сыворотке крови, полученные с использованием разработанного и независимого методов ( $n = 5$ ;  $P = 0.95$ ,  $F_{кр} = 6.39$ ,  $t_{кр} = 2.67$ )

Стандартный уреазный метод (Vitros BUN/UREA Slide, Johnson&Johnson Clinical Diagnostics, Inc.), $C_1$	Разработанный способ, $C_2$	$C_2/C_1, \%$	$t_{\text{эксп}}$	$F_{\text{эксп}}$
$13.3 \pm 0.2$	$12.4 \pm 0.7$	93	3.43	0.05
$4.8 \pm 0.1$	$5.3 \pm 0.6$	109	2.28	0.02
$2.30 \pm 0.04$	$2.3 \pm 0.3$	99	0.00	0.01
$4.0 \pm 0.1$	$4.0 \pm 0.2$	100	0.00	0.16

В качестве селективного элемента для определения креатинина в модельных растворах использовали синтезированные образцы полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) креатинина (ПМО-Кр). Также были синтезированы ПМО без молекулярных отпечатков (ПБМО).

Была рассчитана сорбционная способность ПМО-Кр и ПБМО. Рассчитанные для ПМО-Кр и ПБМО значения степеней извлечения ( $R, \%$ : 69.5 и 7.0 соответственно) и

коэффициентов распределения ( $D$ , см<sup>3</sup>/г: 36.3 0.7 соответственно) указывают на значительно более высокую сорбционную способность синтезированного ПМО-Кр по сравнению с ПБМО и косвенно подтверждают наличие в структуре полимера пор, комплементарных креатинину.

Также в случае ПМО-Кр зависимость сорбции креатинина от концентрации аналита в исследуемом растворе подчиняется уравнению Ленгмюра в отличие от ПБМО (рисунок 19).

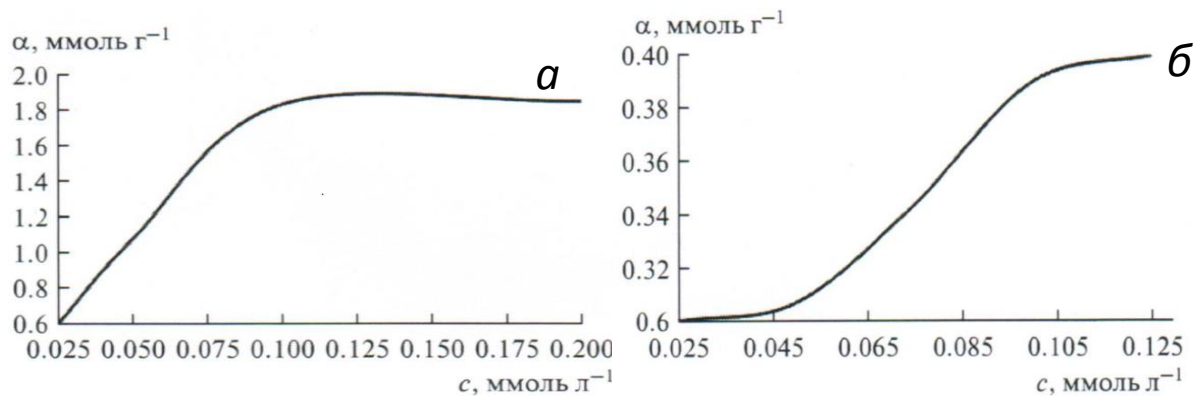


Рисунок 19 – Изотермы сорбции креатинина из водных растворов с использованием ПМО-Кр (а) и ПБМО (б)

Рассчитанное значение импринтинг - фактора для ПМО-Кр составляет 52, что позволяет применять синтезированные ПМО креатинина для эффективного выделения этого аналита из многокомпонентных растворов.

Результаты хроноамперометрического определения креатинина в фильтратах с использованием синтезированных полимеров показали, что ПМО-Кр сорбируют не менее 70 % креатинина. Вероятно, полученное значение связано с расположением функциональных групп внутри пор полимера, что может способствовать неспецифическому взаимодействию с молекулами креатинина (таблица 11).

Таблица 11 – Результаты хроноамперометрического определения креатинина в модельных растворах с использованием ПМО-Кр ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ,  $F_{кр} = 6.39$ ,  $t_{кр} = 2.67$ , введено 1 мМ креатинина)

Модельный раствор	Найдено, $C \pm \delta$ , мМ ( $Sr$ , %)	$t_{\text{эксп}}$
Мр1	$1.11 \pm 0.08$ (6.16)	3.07
Мр2	$1.17 \pm 0.07$ (4.59)	5.43

Представленные результаты исследований демонстрируют возможность применения разработанных бесферментных электрохимических способов количественного определения мочевины и креатинина в клинической лабораторной диагностике.

### **Бесферментный электрохимический способ количественного определения холестерина**

Методика количественного определения холестерина с использованием модифицированного наночастицами золота и серебра электрода:

1. Предварительная подготовка модифицированного электрода – многократное циклирование потенциала в диапазоне от  $-1.00$  до  $+1.00$  В.

2. Затем рабочий электрод переносили в эмульсию вода – NaOH – ТГФ – ПАВ. Регистрировали ЦВА в диапазоне потенциалов от  $-1.00$  до  $+1.00$  В. Раствор стандартной добавки холестерина в ТГФ (100 мкл 5 мМ раствор). Содержание холестерина ( $C_{обр}$ , мкМ) определяли по приросту пика анодного тока согласно уравнению (1).

Для исследований синтезировали НЧ индивидуальных металлов золота (НЧ Au) и серебра (НЧ Ag), типа ядро–оболочка серебро на золоте НЧ Ag–Au и золото на серебре НЧ Au–Ag, типа наносплав серебра и золота НЧ (Ag+Au), НЧ серебра с применением электрохимического метода (НЧ эAg).

Для создания растворов, имитирующих сыворотку крови, готовили эмульсии холестерина в воде с использованием ПАВ: Тритон X-100, ЦТАБ и лаурат сульфат натрия (ЛСН). 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. ЦТАБ использовали в дальнейших исследованиях.

Для всех синтезированных типов НЧ серебра и золота, используемых в качестве электрокатализаторов, получены зависимости аналитического сигнала от концентрации холестерина в диапазоне концентраций от 1 до 7 мМ (таблица 12).

Однако для НЧ Au, Au–Ag, (Au+Ag) наблюдали относительно небольшой сигнал от холестерина. Наиболее выраженный сигнал зарегистрирован для СУЭ, модифицированного наночастицами эAgНЧ и Ag–AuНЧ.

Для СУЭ, модифицированных НЧ Ag–Au, была получена линейная зависимость тока окисления НЧ от обратного квадратного корня времени регистрации аналитического сигнала ( $t^{-0.5}$ ,  $c^{-0.5}$ ) в присутствии 5 мМ холестерина ( $I = 3,55 t^{-0.5} - 0,17$ ;  $R^2 = 0.990$ ). Линейный характер зависимости указывает, что диффузия аналита из раствора является лимитирующей стадией в процессе окисления холестерина.

Таблица 12 – Зависимость анодного тока НЧ от концентрации холестерина в рабочем растворе (эмульсии) ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ )

Тип наночастиц	Состав наночастиц	Уравнение регрессии $I(A) = a \cdot C_{хол}(M) + b$		$R^2$	$S_r$
		$a$	$b$		
1	НЧ Ag	$4.5 \cdot 10^{-6}$	$5.7 \cdot 10^{-5}$	0.65	-
	НЧ Au	$2.5 \cdot 10^{-6}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$	0.59	-
2	НЧ Ag–Au	$1.4 \cdot 10^{-5}$	$5.8 \cdot 10^{-5}$	0.97	0.045
	НЧ Au–Ag	$8.2 \cdot 10^{-6}$	$9.5 \cdot 10^{-4}$	0.73	-
3	НЧ (Au+Ag)	$1.3 \cdot 10^{-6}$	$7.5 \cdot 10^{-4}$	0.55	-
4	НЧ эAg	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$3.0 \cdot 10^{-4}$	0.95	0.058

Методика количественного определения холестерина в апротонных средах:

1. В качестве катализаторов применяли  $NiCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $KSCN$  в органических растворителях (ацетонитрил или ДМФА). Регистрировали ЦВА с линейной разверткой потенциала от 0.30 В до 1.70 В отн.  $Fc/Fc^+$ .

2. Затем вводили в раствор фонового электролита стандартные добавки холестерина или пробы в соответствующем растворителе и регистрировали ЦВА. Содержание холестерина ( $C_{обр}$ , мкМ) определяли по приросту пика анодного тока по уравнению (1).

Присутствие электронеактивного холестерина в растворе ДМФА, содержащем  $\text{CoCl}_2$ , или  $\text{NiCl}_2$ , или  $\text{KSCN}$ , приводит к увеличению пика тока окисления катализатора. В отсутствие в растворе электрокатализатора анодных пиков не наблюдали (рисунок 20).

Были рассчитаны электрохимические характеристики окисления холестерина с применением уравнений Рэндлса – Шевчика и Гейровского – Ильковича (таблица 13).

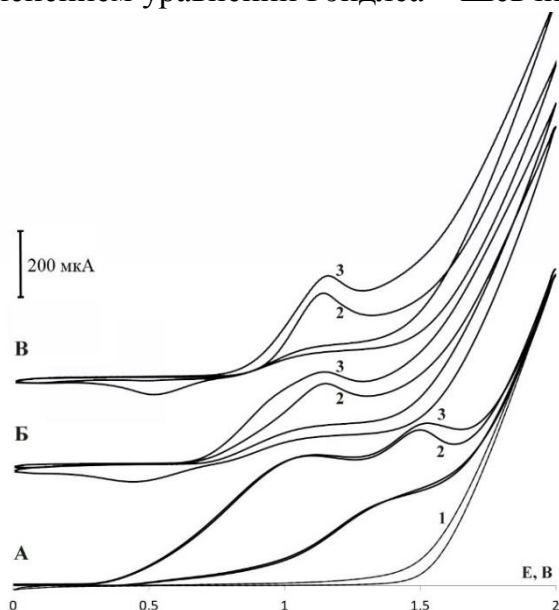


Рисунок 20 – ЦВА на ПДЭ в ДМФА в присутствии растворенных катализаторов и в отсутствии, и в присутствии холестерина:

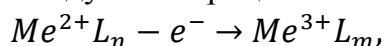
(А) 15 мМ  $\text{KSCN}$ ;

(Б) 10 мМ  $\text{NiCl}_2$ ;

(В) 10 мМ  $\text{CoCl}_2$ .

Кривая 1 – фоновый электролит 0.1 М  $\text{LiClO}_4$ , кривая 2 – с растворенным катализатором, кривая 3 – с 10 мМ холестерина.  $v_{\text{пер}} = 0.1 \text{ В/с}$

В случае применения хлорида кобальта или хлорида никеля участвует по одному электрону, следовательно, исследуемый процесс можно представить:



где  $\text{Me}$  –  $\text{Co}$ ,  $\text{Ni}$ ;  $L$  – молекула ДМФА (лиганд);  $n$  и  $m$  – количество молекул ДМФА в сольватной оболочке вокруг катиона металла.

Таблица 13 – Результаты расчета характеристик электрохимического окисления холестерина в присутствии катализаторов 10 мМ  $\text{NiCl}_2$ , 10 мМ  $\text{CoCl}_2$  и 15 мМ  $\text{KSCN}$

Катализатор		$I_{\text{ан}}/I_{\text{кат}}^*$	$E_{\text{ан}}^{**}, \text{V}$	$D, \text{м}^2\text{с}^{-1}$	$n$
$\text{NiCl}_2$		2.60	1.16	$3.87 \cdot 10^{-6}$	1.00
$\text{CoCl}_2$		2.75	1.12	$2.08 \cdot 10^{-6}$	1.06
KSCN	Волна I	200	1.08	$5.11 \cdot 10^{-9}$	0.98
	Волна II	60	1.52		0.94

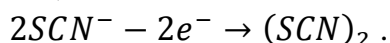
$I_{\text{ан}}/I_{\text{кат}}^*$  – отношение токов анодного и катодного сигналов;

$E_{\text{ан}}^{**}$  – потенциал анодного сигнала;

$D$  – коэффициент диффузии электрохимически активных соединений;

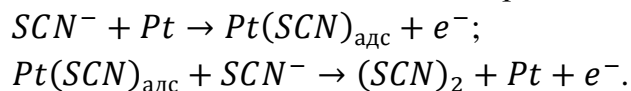
$n$  – количество электронов, участвующих в соответствующей реакции

В случае применения в качестве электрокатализатора  $\text{KSCN}$  (рисунок 20) наблюдали два сигнала окисления. Известно, что окисление тиоцианат-ионов приводит к образованию тиоцианогена  $(\text{SCN})_2$  по общей схеме:



Принимая во внимание, что тиоцианоген при комнатной температуре является сильным окислителем, а также два анодных одноэлектронных переноса процесса, то

электрохимическую реакцию окисления KSCN на поверхности платинового электрода можно представить:



Продукт же второй реакции тиоцианоген окисляет холестерин, что подтверждается появлением прироста тока на второй анодной волне. Вероятно, реакцию окисления холестерина с электрогенерированным тиоцианогеном можно представить схемой:

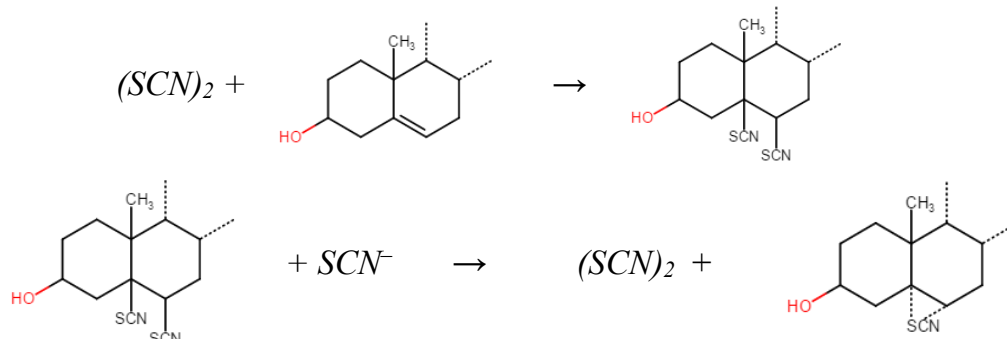
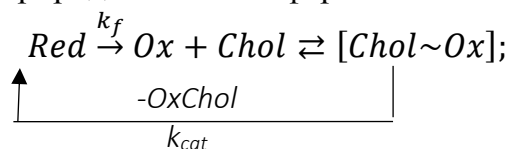


Схема 2 – Механизм окисления холестерина

Предполагая, что механизм окисления холестерина является электрокаталитическим, а скорость электрохимической реакции окисления  $CoCl_2$ ,  $NiCl_2$ , KSCN намного выше скорости химической, то можно говорить о подчинении исследуемых реакций с участием катализаторов неорганической природы кинетике ферментативного процесса:



где  $Red$  – восстановленная форма катализатора;  $Ox$  – окисленная форма катализатора;  $Chol \sim Ox$  – активированный комплекс, состоящий из молекулы холестерина, соединенной с окисленной формой катализатора;  $OxChol$  – окисленная форма холестерина.

Применяя уравнения ферментативной кинетики Михаэлиса – Ментена, были рассчитаны константы Михаэлиса  $K_m$  для электрокатализаторов (таблица 14).

Лучшие аналитические характеристики электрокаталитического определения холестерина были получены для KSCN (таблица 14).

Таблица 14 – Аналитические характеристики определения холестерина с использованием в качестве электрокатализаторов  $NiCl_2$ ,  $CoCl_2$  и KSCN в ДМФА

Катализатор	Концентрация, М	$C_{lim}$ , 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
$NiCl_2$	10	43	60 – 500	$I = 0.0063C + 0.5541$	0.9393	313.75
$CoCl_2$	10	40	58 – 400	$I = 0.0075C + 1.827$	0.9007	92.06

Исследованы электрокаталитические свойства  $\text{CoCl}_2$  по отношению к холестерину в среде ацетонитрила, т.к. последний обладает меньшей токсичностью по сравнению с ДМФА.

На ЦВА (в отсутствие хлорида кобальта в рабочей ячейке) наблюдали слабовыраженный сигнал окисления, характерный для холестерина. На ЦВА в присутствии  $\text{CoCl}_2$  наблюдали пару анодных и катодных сигналов при потенциалах 1.35 В и 0.50 В соответственно, относящихся, очевидно, к паре  $\text{Co}(\text{II})/\text{Co}(\text{III})$ . Слабовыраженные сигналы окисления при 1.47 В и восстановления при 1.00 В, вероятно, также характерны для пары  $\text{Co}(\text{II})/\text{Co}(\text{III})$ . Вероятно, их присутствие обусловлено реакцией комплексообразования между катионом кобальта, хлорид-ионами и молекулами ацетонитрила (рисунок 21).

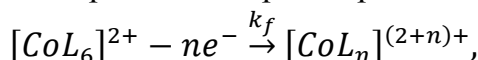
Из рисунка видно, что внесение неэлектроактивного в исследуемой области потенциалов холестерина приводит к увеличению величины тока окисления катализатора, что указывает на каталитический процесс электроокисления холестерина.

Известно, что  $\text{CoCl}_2$  в ацетонитриле присутствует в двух формах:  $[\text{CoCl}_2\text{L}_2]$  и  $[\text{CoL}_6]^{2+}$ , находящимися в равновесии, причем электроактивным является преимущественно комплекс  $[\text{CoL}_6]^{2+}$ :



где  $L$  – лиганд  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

На поверхности индикаторного электрода протекает электрохимическая реакция:



где  $L_n$  – сольватная оболочка вокруг катионов кобальта, состоящая из  $n$  молекул ацетонитрила;  $k_f$  – константа скорости прямой электрохимической реакции, и которая соответствует ЦВА 3 на рисунке 21.

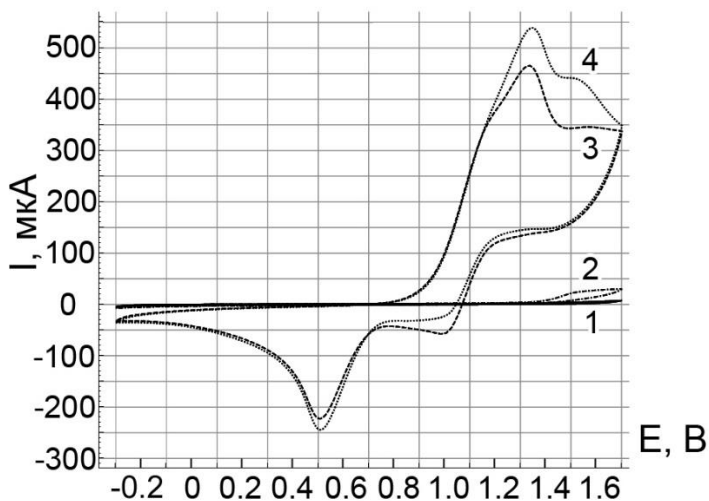


Рисунок 21 – ЦВА, зарегистрированные на ПДЭ; фоновый электролит 0.1 М  $\text{LiClO}_4$  в ацетонитриле (1), фоновый электролит + 0.5 мМ холестерина (2), фоновый электролит + 25 мМ  $\text{CoCl}_2$  (3) и фоновый электролит + 25 мМ  $\text{CoCl}_2$  + 0.2 мМ холестерина (4).  
 $v_{\text{пер-ии}} = 0.1 \text{ В/с}$

Была получена линейная зависимость  $i_a^{-1} = 2.48 \cdot 10^{-4} \omega^{-\frac{1}{2}} + 7.36 \cdot 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0.98$  в диапазоне  $\omega$  от 25 до 2400 об./мин, что определяет первый порядок реакции. В этом случае концентрации  $\text{CH}_3\text{CN}$  и хлорид-ионов остаются постоянными в процессе электрохимической реакции, т.е. на поверхности ДПЭ равновесие смещается в сторону продуктов реакции вследствие уменьшения концентрации комплекса  $[\text{CoL}_6]^{2+}$ .

Применяя уравнения Левича и Коттрела с использованием вольтамперометрии и хроноамперометрии, а также ВДПЭ с вращением и без вращения было рассчитано количество электронов  $n = 0,96$ , участвующих в электрохимической реакции, и коэффициент диффузии  $D = 6.88 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$ .

В результате приведенных исследований предлагается следующая схема электроокисления холестерина с участием  $\text{CoCl}_2$  в качестве катализатора в ацетонитриле на ПДЭ (рисунок 22).

Предполагая, что механизм окисления холестерина является электрокаталитическим, а скорость электрохимической реакции окисления  $\text{CoCl}_2$ , намного выше скорости химической, то можно прийти к выводу о зависимости исследуемых реакций с участием катализаторов неорганической природы в ферментативной кинетике:

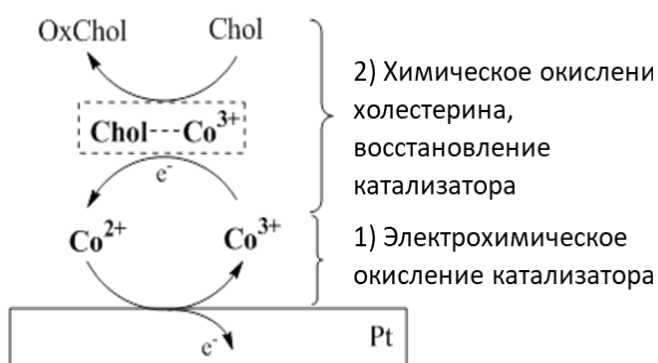
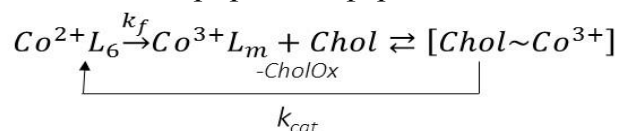


Рисунок 22 – Схема электрокаталитического окисления холестерина с участием  $\text{Co}^{2+}$  в АН на ПДЭ, где Chol – холестерин;  $\text{Co}^{3+} \sim \text{Chol}$  – аддукт, образующийся в процессе электрокаталитической реакции между катионом металла и молекулой холестерина; OxChol – окисленный холестерин (хлорпроизводные холестерина), образующийся в результате реакции

Модельная и экспериментальная зависимости прироста тока окисления катализатора от концентрации холестерина в рабочем растворе практически совпадают, что говорит о том, что  $\text{CoCl}_2$  в АН ведет себя по отношению к холестерину как фермент (катализатор окисления) и подчиняется кинетической модели Михаэлиса – Ментена (рисунок 23, а). Линейный участок 0 – 200 мкМ применяли в дальнейших исследованиях (рисунок 23, б).

Сравнивая значения  $k_{cat}$  и  $K_m$ , полученные в результате проведенных исследований для  $\text{CoCl}_2$ , и известные из литературы для фермента холестеролоксидазы, можно сделать вывод о сопоставимой эффективности приведенных катализаторов (таблица 15).

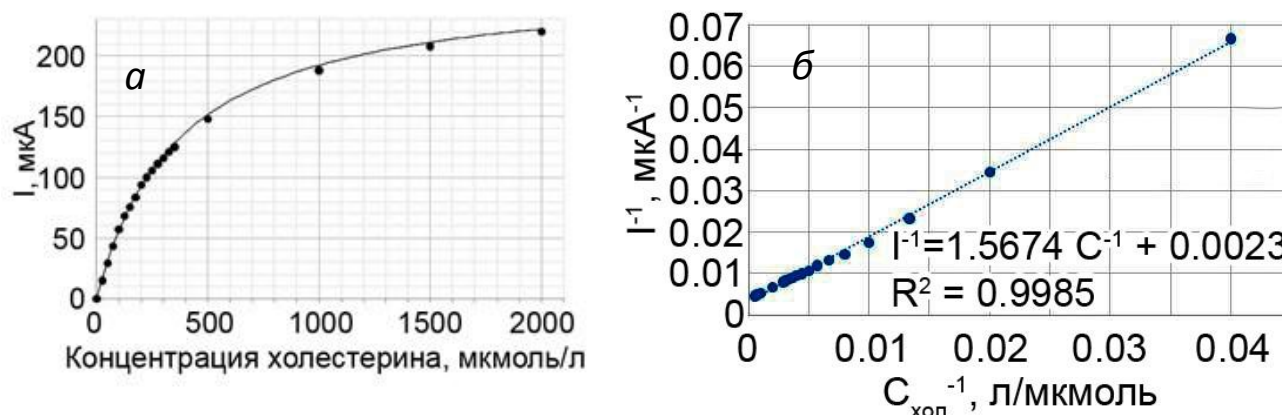


Рисунок 23 – Экспериментальная зависимость тока окисления холестерина от его концентрации (точки) и расчетная кривая (сплошная линия) (а); график зависимости  $I^{-1}$  ( $\text{мкА}^{-1}$ ) –  $C_{\text{хол}}^{-1}$  ( $\text{мкМ}$ ) (б)



Лучшие аналитические характеристики при определении холестерина были получены в случае применения 25 мМ хлорида кобальта (II). В дальнейших исследованиях применяли выбранную концентрацию электрокатализатора (таблицы 16, 17).

Таблица 15 – Значения констант Михаэлиса и каталитической константы для  $\text{CoCl}_2$  и холестериноксидазы в фосфатном буфере

	$K_m$ , мМ	$k_{cat}$ , $\text{C}^{-1}$
Холестериноксидаза из <i>Brevibacterium sterolicum</i>	0.04 – 1.6	26 – 106
Холестериноксидаза из <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	0.4 – 2.2	2 – 271
$\text{CoCl}_2$	0.370	0.94

В качестве селективного элемента для определения холестерина в модельных растворах использовали синтезированные образцы ПМО холестерина на поверхности наночастиц магнетита (ПМО-МНЧ) и оксида кремния (ПМО-ОКНЧ). При создании ПМО холестерина применяли в качестве сшивающего агента дивинилбензола (ДВБ) или этиленгликольдиметакрилата (ЭГДМА). Также были синтезированы ПМО без молекулярных отпечатков (ПБМО).

Таблица 16 – Градуировочные зависимости для различных концентраций  $\text{Co}^{2+}$  в присутствии холестерина. Диапазон концентраций холестерина 0 – 200 мкМ

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

Таблица 17 – Аналитические характеристики определения холестерина предлагаемым способом ( $n = 6$ ,  $P = 0.95$ ,  $t_{кр} = 2.78$ )

Введено, мкМ	Найдено, $C \pm \Delta C$ , мкМ	$S_r$ , %	$t_{экср}$	$C_{lim}$ , мкМ
50.0	48 ± 2	5.8	2.49	2
100.0	100 ± 6	4.5	0.00	
150.0	155 ± 7	6.0	1.51	

Состав ПМО холестерина подтверждали методом ИК – спектроскопии. Установлено методом СЭМ, что средний размер НЧ винил – ОКНЧ 17 - 22 нм, 20 - 27 нм НЧ винил – МНЧ, 21 - 27 нм НЧ ПМО – ОКНЧ-Д и 25 - 34 нм НЧ ПМО-МНЧ-Д.

Сорбционную способность ПМО – ОКНЧ и ПМО – МНЧ определяли следующим образом: в пробирке Эппендорфа смешивали 10 мкг НЧ и 1 см<sup>3</sup> 3 мМ раствора холестерина

( $C_0$ ) в ацетонитриле, диспергировали с использованием УЗ. Затем полученную суспензию выдерживали в течение 1 ч, отделяли НЧ: в случае ПМО - ОКНЧ с помощью центрифуги (15 минут при скорости вращения 10000 об/мин), в случае ПМО - МНЧ – с помощью магнита. Полученный супернатант анализировали на содержание холестерина в выбранных условиях анализа. Концентрация оставшегося в супернатанте холестерина –  $C_{ост}$ .

Наночастицы с сорбированным холестерином высушивали в течение 45 минут при температуре 80 °С, редиспергировали в 1 см<sup>3</sup> ацетонитрила также с использованием ультразвуковой обработки в течение 3 мин., выдерживали в течение 1 ч и сепарировали. Супернатант анализировали на содержание холестерина. Рассчитанная концентрация десорбированного из частиц ПМО в супернатант холестерина –  $C_{дес}$ .

Таблица 18 демонстрирует сорбционные характеристики синтезированных НЧ ПМО холестерина. Существенно лучшей сорбционной емкостью обладают НЧ ПМО – МНЧ –Д, которые применяли в дальнейших исследованиях.

Таблица 18 – Остаточное содержание холестерина в супернатанте после сорбции на частицах ПМО ( $C_{ост}$ ), содержание холестерина в ацетонитриле после десорбции из НЧ 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

Разработано и использовано в анализе модельного раствора устройство для электрохимического селективного определения содержания холестерина (рисунок 24).

Модельный раствор содержал: альбумина 45 г/дм<sup>3</sup>, аланин ( $3.14 \cdot 10^{-4}$  М), глицин ( $3.20 \cdot 10^{-4}$  М), лейцин ( $1.87 \cdot 10^{-4}$  М), аспарагиновую кислоту ( $0.22 \cdot 10^{-4}$  М), глутаминовую кислоту ( $0.89 \cdot 10^{-4}$  М), глюкозу ( $6.40 \cdot 10^{-3}$  М), аскорбиновую кислоту ( $0.57 \cdot 10^{-4}$  М), мочевую кислоту ( $4.8 \cdot 10^{-4}$  М), креатинин ( $1.00 \cdot 10^{-3}$  М), холестерин ( $5.00/7.00 \cdot 10^{-3}$  М).

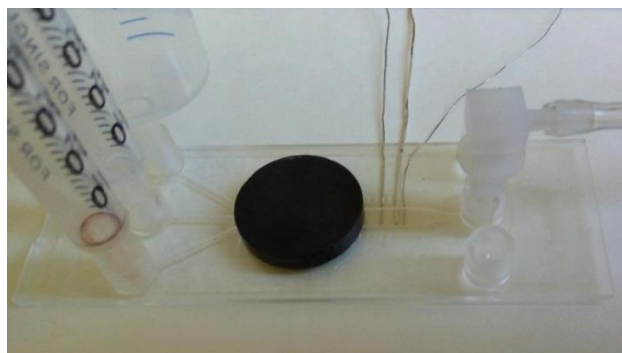
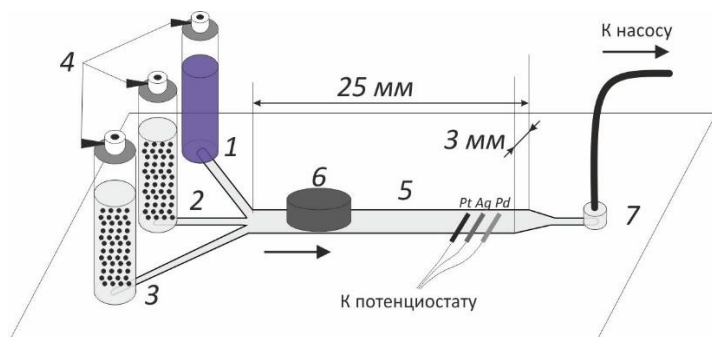


Рисунок 24 – Схема установки для определения свободного холестерина. Стрелками указано направление движения жидкости: 1– емкость с 25 мМ  $CoCl_2$  в ацетонитриле; 2 – емкость со стандартным раствором холестерина 3 мМ и диспергированными НЧ ПМО – МНЧ (10 мг); 3 – емкость с исследуемым раствором холестерина и диспергированными НЧ ПМО – МНЧ (10 мг); 4 – клапаны; 5 – проточная зона с электродами; 6 – магнит; 7 – выходное отверстие, подключенное к перистальтическому насосу

Процесс анализа включал в себя следующие стадии.

1. Раствор  $\text{CoCl}_2$  (25 мМ) и  $\text{LiClO}_4$  (0.1 М) в ацетонитриле из емкости через отверстие 1 поступал в проточную зону, в которой происходила подготовка рабочего. Далее регистрация ВА с линейной разверткой потенциала в диапазоне от 0.00 до 1.70 В относительно серебряной проволоки. Затем регистрация анодного сигнала катализатора.

2. Суспензия НЧ ПМО – МНЧ холестерина в стандартном растворе холестерина в ацетонитриле из емкости через отверстие 2 поступала в проточную зону, посредством магнитного поля магнитные частицы с сорбированным на них холестерином «оседали» в проточной зоне.

3. Сорбированный холестерин десорбируется в ацетонитрил. Регистрация ВА. Регистрация максимального значения величины тока.

4. Магнит удаляли, раствор из емкости около отверстия 1 прокачивали для вымывания частиц в емкость для слива. Эти частицы могут быть вновь извлечены с помощью магнита для многократного использования.

5. Несколько раз повторяли процедуру по п.п. 2 – 4. Регистрация значения величины тока.

6. Установка готова для следующего анализа.

В качестве модельных использовали водные растворы следующих веществ (содержание альбумина во всех модельных растворах  $45 \text{ г/дм}^3$ ):

1) Мр1 — аланин ( $3.14 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ), глицин ( $3.20 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ), лейцин ( $1.87 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ), аспарагиновая кислота ( $0.22 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ), глутаминовая кислота ( $0.89 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ), глюкоза ( $6.40 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ), аскорбиновая кислота ( $0.57 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ), мочевиная кислота ( $4.8 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ), креатинин ( $1.00 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ), холестерин  $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ;

2) состав Мр2 отличается от состава Мр1 содержанием холестерина, равным  $7.00 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ .

Результаты электрохимического определения холестерина в образце рассчитаны согласно уравнению (1) и приведены в таблице 19.

Таблица 19 – 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 $C_{хол} = 2 \text{ мМ}$	$2.20 \pm 0.28$ ( <b>16</b> )
Мр1 $C_{хол} = 5 \text{ мМ}$	$5.41 \pm 0.35$ ( <b>18</b> )
Мр2 $C_{хол} = 7 \text{ мМ}$	$7.37 \pm 0.29$ ( <b>18</b> )

Несмотря на присутствие неспецифической сорбции компонентов модельных растворов на поверхности частиц ПМО, представленные результаты исследований демонстрируют возможность применения, разработанного бесферментного электрохимического способа количественного определения холестерина в клинической лабораторной диагностике.

Разработанное устройство может служить прототипом для простой в употреблении, портативной, дешевой автоматической установки для экспресс-анализа холестерина.

В результате проведенных исследований представлено теоретическое и экспериментальное обоснование бесферментного определения конкретных соединений

диагностического значения (холестерин, мочеви́на, креатинин) с применением в качестве электрокатализаторов наночастиц Ni (II), органических и неорганических соединений Ni (II), Co (II), а также ионообменного концентрирования и синтезированных молекулярных отпечатков на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита.

Созданный на основе искусственных аналогов ферментов новый класс недорогих, надежных, экспрессных и простых в использовании сенсорных систем для определения широкого круга жизненно важных показателей будет являться альтернативой устаревающим лабораторным ферментативным методам. И, в конечном счете, будет использован для быстрого скрининга широкого спектра аналитов при низкой стоимости.

### **Вольтамперометрические методы в оценке токсичности наночастиц**

Растущее использование наноматериалов требует тщательной оценки их токсичности, биологических взаимодействий, возможных последствий для живых организмов. Многообразие наноматериалов, разобщенность проводимых исследований токсического воздействия на живой организм привели к противоречивым оценкам их безопасности. К сожалению, до конца не изучены механизмы индуцирования наночастицами деструктивных эффектов в клетках и организме в целом.

Проведены исследования взаимодействия НЧ Ag (10 и 25 мкг/см<sup>3</sup>), Au (10 и 25 мкг/см<sup>3</sup>) или Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (1000 мкг/см<sup>3</sup>) с клеточной культурой WI-38 (эмбриональные человеческие клетки легких). С применением электронной микроскопии установлено, что в первые сутки во всех контрольных образцах клеток сохранялись ультраструктуры, видны клеточные и ядерные мембраны и гомогенный хроматин. На пятые сутки в этих же образцах фиксировали небольшие деструктивные изменения. После введения НЧ серебра и золота в течение 24 ч. наблюдали неравномерное поглощение наночастиц, которые локализовались в объеме клеток или их органеллах. На мембранах НЧ не обнаружены. С увеличением концентрации НЧ в исходных суспензиях количество поглощаемых НЧ увеличивается, что коррелирует с результатами количественного определения содержания последних, полученными методом инверсионной вольтамперометрии. После 120 ч. на микрофотографиях фиксировали полную деструкцию клеточной мембраны и угнетение клеточной линии. В этом случае наблюдали уменьшение содержания серебра в клетках, что указывает на выведение ионов металлов в межклеточное пространство. Для ионов золота наблюдали, напротив, накопление при контакте с суспензией, содержащей 25 мкг/см<sup>3</sup> металла в исходной суспензии. Для НЧ магнетита с увеличением времени инкубации клеток с НЧ количество поглощаемых клетками наночастиц увеличивалось (определение содержания магнетита проводили фотометрическим методом). Введенные НЧ локализовались в объеме клеток или их органеллах. Однако в отличие от НЧ серебра и золота, НЧ магнетита не оказывали интенсивного деструктивного воздействия (таблица 20).

Методом оптической микроскопии исследована заполняемость поверхности плашек клеточной культурой в условиях воздействия наночастиц (жизнеспособность). Полученные данные подтверждают более высокую токсичность НЧ благородных металлов по сравнению с НЧ оксида железа.

Известно, что возникновение воспалительных процессов (в нашем случае токсического влияния) приводит к увеличению концентрации цитокинов либо к их сильному угнетению.

Таблица 20 – Содержание ионов Ag (I), Au (III), Fe (II) в минерализате клеток WI 38 после инкубации с НЧ Au, Ag и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Наночастицы	Концентрация наночастиц в суспензии, мкг/см <sup>3</sup>	Количество наночастиц, поглощенное клетками, мкг/г. Время инкубации, час	
		24	120
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	1000	1700,00	3834,00
Ag	10	7,70	7,40
	25	33,50	5,45
Au	10	39,00	19,96
	25	76,93	170,67

На рисунке 25 показано влияние химической природы наночастиц и их содержания на концентрацию. Наблюдали существенное изменение концентрации интерликина (цитокина) ИЛ-6 в случае НЧ золота, тем большее, чем выше концентрация наночастиц в суспензии, вводимой в клеточную культуру. В случае воздействия НЧ серебра наблюдали угнетение цитокина, что говорит о более высокой цитотоксичности этих НЧ.

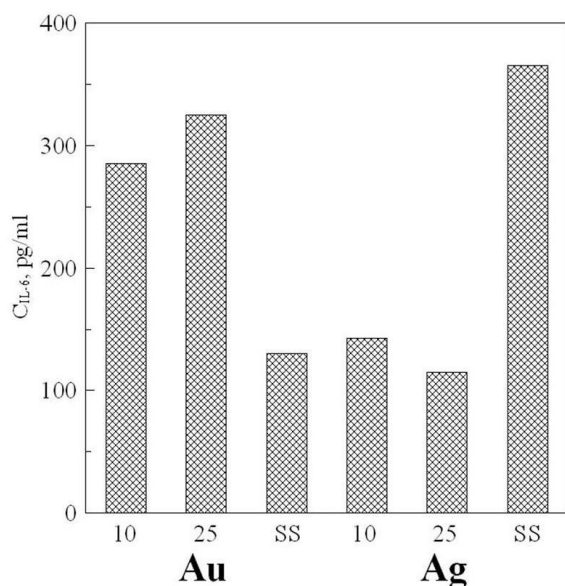


Рисунок 25 – Зависимость концентраций интерликина ИЛ-6 клеточной линии WI-38 после введения суспензии наночастиц золота и серебра 10 и 25 мкг/г (в пересчете на Au и Ag соответственно). SS – контрольный образец без наночастиц. Время инкубации 120 час

Предыдущие исследования показали низкую токсичность НЧ магнетита по сравнению с НЧ благородных металлов, несмотря на достаточно большое поглощение этого материала клетками. Представлялось интересным сравнить воздействие частиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> нанометрового и микрометрового размера на живой организм.

Показано, что при равных массовых дозах НЧ обладают значительно более выраженной биологической агрессивностью, чем частицы микрометрового диапазона, но вызывают более активную и эффективную защитную реакцию альвеолярного фагоцитоза.

В пределах нанометрового диапазона зависимость между диаметром и токсичностью частиц неоднозначна, что может быть связано с различиями токсикокинетики, которую контролируют как физиологические механизмы, так и прямая пенетрация НЧ через биологические барьеры и, наконец, неодинаковая растворимость.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют в пользу существующих представлений о значительно более высокой токсичности в нано-состоянии

даже тех веществ, которые при действии частиц микрометрового диапазона являются относительно биологически инертными. Поскольку металл в микросостоянии и тот же металл или его соединение в виде нанобъектов ведут себя по-разному, следует ожидать, что суммарное содержание металлов не позволяет оценить реальные биохимические функции и токсичность. Хотя и определение содержания наночастиц в клеточном материале, например, с применением электрохимических методов, может служить вспомогательным методом оценки негативного действия наночастиц, однако проводить исследования, направленные только на количественный анализ НЧ в живых объектах, является недостаточным. Необходимо исследовать стабилизацию, перенос через клеточные мембраны НЧ и морфологию НЧ, НЧ – клетка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования в области электрохимического анализа и сенсоров/иммуносенсоров для определения соединений диагностического значения позволили развить новые подходы в указанном направлении, связанные с двумя его аспектами:

1) бесферментные электрохимические способы генерации высокочувствительного отклика сенсоров не связанные с необходимостью включения ферментов;

2) новые методологические подходы к оценке применения наноразмерных материалов в сенсорных устройствах с точки зрения их потенциальной токсичности.

Развитие указанных направлений связано с проведением широкого круга исследований, среди которых следует выделить следующие наиболее важные компоненты:

– создание новых нанокомпозитных материалов на основе наночастиц  $Fe_3O_4$  и полимерных матриц (полипиррол, поливинилбензилхлорид, модифицированный хинолином, оксид кремния, модифицированный ферроценом, хитозан и продукт поликонденсации 3-аминопропилтриэтоксисилана), индивидуальных и смешанных наночастиц серебра (золота-серебра) и оксида никеля. Материалы различались по среднему размеру частиц, их морфология, состав и природа поверхностных групп были охарактеризованы комплексом современных физико-химических методов (просвечивающая электронная микроскопия, электронная дифракционная спектроскопия, динамическое рассеяние света, УФ – и ИК – спектроскопия). Установлены магнитная восприимчивость, агрегативная и седиментационная устойчивость суспензий наночастиц, необходимые для их применения в анализе;

– установление основных закономерностей протекания электрохимических превращений НЧ и НК на основе  $Fe_3O_4$  в водной и апротонной средах, предложены вероятные схемы исследуемых процессов;

– определение закономерностей, связывающих концентрацию наночастиц и аналитический сигнал железа, серебра, никеля и на этой основе – оценка перспектив применения новых наноматериалов как сигналообразующих меток и электрокатализаторов в составе электрохимических сенсоров;

– оценка кинетики взаимодействия синтезированных и охарактеризованных наночастиц на основе  $Fe_3O_4$  с грамположительными и грамотрицательными клетками и выявление закономерностей, определяющих характер таких взаимодействий в зависимости от природы клеточных культур и наноматериалов;

– разработка новых высокочувствительных гибридных вариантов электрохимического иммуноанализа и иммуносенсоров для количественного определения бактерий и бактериальных антигенов с использованием охарактеризованных наноматериалов как непрямых и прямых сигналообразующих меток. Обоснование алгоритмов проведения анализа модельных клеточных культур и реальных образцов с пределами обнаружения на уровне  $10 \text{ КОЕ/см}^3$ ;

– электрохимический способ бесферментного электрохимического иммуноанализа антигена с использованием конъюгатов антител с нанокompозитными частицами на основе магнетита (предел обнаружения  $1.87 \cdot 10^{-5} \text{ мг/см}^3$ );

– разработка высокочувствительных методов определения мочевины, креатинина и холестерина по току окисления оксида никеля, холестерина по электрокаталитическому отклику наночастиц серебра, золота, оксидов и комплексов. В случае холестерина эффективность электрокатализа по результатам кинетических исследований в органических растворителях не уступала по эффективности ферменту холестеролоксидазе;

– реализация преимуществ новых полимерных материалов с молекулярными отпечатками, в том числе, на платформе наночастиц кремния, магнетита и ионообменных колонок в бесферментном электрохимическом определении ряда важных биохимических показателей (содержание мочевины, креатинина и холестерина), достижение высокой селективности анализа в сыворотке крови и имитантах сыворотки крови достигается иммобилизацией. Достигнутые пределы обнаружения ( $8.7 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  для мочевины,  $2.7 \cdot 10^{-5} \text{ М}$  для креатинина и  $3.0 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  для холестерина) не уступают лучшим образцам ферментных биосенсоров;

– выявление выраженной биологической агрессивности наночастиц по сравнению с материалами микрометрового размера и установление снижения токсичности при переходе от традиционных наночастиц благородных металлов к наночастицам на основе предложенных гибридных материалов на платформе магнетита.

Совокупность полученных в работе результатов позволяет говорить о формировании нового научного направления, имеющего важное значение для создания средств электрохимической диагностики по жизненно важным показателям, а именно, использовании гибридных наноматериалов на платформе оксидов ряда металлов как универсальном приеме генерации сигнала и повышения его чувствительности за счет оптимизации условий электрокатализа, использования поверхностной модификации и реализации иных электрохимических свойств указанных материалов. Как показали примеры соответствующих способов электрохимического анализа и иммуноанализа, реализация преимуществ, заложенных в таких гибридных наноструктурах, позволяет решать широкий круг востребованных аналитических задач: выявлять возбудителей инфекционных заболеваний в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и биологических жидкостях пациентов; устанавливать присутствие соответствующих антител; контролировать важные биохимические показатели, такие как содержание мочевины, креатинина, холестерина и др. Полная реализация найденных технологических и методологических решений позволит создать аналитические устройства, выгодно отличающиеся от существующих аналогов по своим операционным и аналитическим характеристикам.

Перспективы дальнейшей разработки в указанном научном направлении связаны с расширением перечня определяемых клинических показателей и реализации предложенных методических решений в создании высокочувствительных измерительных устройств,

ориентированных на использование вне медицинских учреждений, непосредственно больными в рамках государственной стратегии развития персонифицированной медицины. Разработанные устройства и их близкие аналоги с теми же наноматериалами могут быть успешно использованы в эколого-аналитическом мониторинге, производственном контроле сырья и полуфабрикатов, качества лекарств и пищевой продукции. Самостоятельное значение имеют подходы к экспресс-оценке биологической агрессивности (токсичности) наноматериалов, позволяющие ускорить процесс их безопасного внедрения в различные сферы деятельности, включая медицину и экологию.

## ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

### *Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК:*

1. Kositzina, A.N. Electrochemical immunosensor for diagnosis of the forest-spring encephalitis / K.Z. Brainina, **A.N. Kositzina**, M.Yu. Rubtsova, B.M. Sergeev, S.Yu. Saraeva // *Comprehensive Analytical Chemistry*. – 2007. – V. 49. – P. e265 – e269 (0.8 п.л. / 0.3 п.л.) (*Scopus*).

2. Kositzina, A.N. Non-enzymatic urea sensor / K.Z. Brainina, **A.N. Kositzina**, S.Yu. Saraeva // *Comprehensive Analytical Chemistry ch. coll: Electrochemical sensor analysis*. – 2007. – V. 49. – P. e271 – e275 (0.8 п.л. / 0.5 п.л.) (*Scopus*).

3. Kositzina, A.N. Screen-printed enzyme-free electrochemical sensors for clinical and food analysis (Review) / K.Z. Brainina, **A.N. Kositzina**, A.V. Ivanova // *Comprehensive Analytical Chemistry ch. coll: Electrochemical sensor analysis*. – 2007. – V. 49. – P. 643 – 666 (3.2 п.л. / 1.5 п.л.) (*Scopus*).

4. Козицина А.Н. Каталитические системы на основе органических комплексов никеля (II) в хроноамперометрическом определении мочевины и креатинина / **А.Н. Козицина**, Ж.В. Шалыгина, С.С. Деденева, Г.Л. Русинов, С.Г. Толщина, Е.В. Вербицкий, Х.З. Брайнина // *Изв. РАН. Сер. химическая*. – 2009. – № 6. – С. 1091 – 1097 (0.9 п.л. / 0.2 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).

5. Kositzina, A.N. Some Peculiarities of Pulmonary Clearance Mechanisms in rats after Intratracheal Instillation of Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) Suspensions with Different Particle Sizes in Nanometer and Micrometer Ranges: Are We Defenseless against Nanoparticles / B. Katsnelson, L.I. Privalova, S.V. Kuzmin, T.D. Degtyareva, M.P. Sutunkova, O.S. Yeremenko, I.A. Minigalieva, **A.N. Kositsina**, N.A. Malakhova, Y.A. Glazyrina, V.Y. Shur, E.V. Nikolaeva // *J. OCCUP. ENVIRON. HEALTH*. – 2010. – V. 16. – № 4. – P. 503 – 519 (1.8 п.л. / 0.2 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).

6. Kositzina, A.N. Hybrid electrochemical magnetic assay for Salmonella Typhimurium detection / Kh.Z. Brainina, **A.N. Kozitsina**, Y.A. Glazyrina // *IEEE Sensors journal*. – 2010. – V. 10. – №11. – P. 1699 – 1704 (1.2 п.л. / 0.6 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).

7. Kositzina, A.N. Subchronic systemic toxicity and bioaccumulation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nano- and microparticles following repeated intraperitoneal administration to rats / B.A. Katsnelson, T.D. Degtyareva, I.A. Minigalieva, L.I. Privalova, S.V. Kuzmin, O.S. Yeremenko, E.P. Kireyeva, M.P. Sutunkova, I.I. Valamina, M.Y. Khodos, **A.N. Kozitsina**, V.Y. Shur, V.A. Vazhenin, A.P. Potapov, M.V. Morozova // *International Journal of Toxicology*. — 2011. — V 30. — № 1. — P. 59 – 68 (1.3 п.л. / 0.05 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).

8. Козицина, А.Н. Синтез и исследование электрохимических превращений магнитных нанокмполитов на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  / **А.Н. Козицина**, Н.Н. Малышева, Е.В. Вербицкий, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина, Т.С. Митрофанова, Г.Л. Русинов, А.И. Матерн, О.Н. Чупахин,



- Х.З. Брайнина // Изв. РАН. Сер. химическая. – 2013. – № 1. – С. 2327 – 2336 (1.0 п.л. / 0.4 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).
9. Kositzina, A. Electroanalysis in the Evaluation of nanoparticle toxicity / Y. Suntsova, **A. Kozitsina**, T. Mitrofanova, K. Brainina, J. Beykin, Y. Lagereva, L. Tulakin, A. Matern // Analytical and Bioanalytical Electrochemistry. – 2013. – V. 5. – № 5. – С. 647 – 664 (1.6 п.л. / 0.7 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).
10. Козицина, А.Н. Бесферментный электрохимический метод определения антигена вируса кори с использованием синтезированных конъюгатов IgG – (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – SiO<sub>2</sub>) в качестве сигналообразующей метки / Н.Н. Малышева, Ю.А. Глазырина, В.О. Ждановских, Т.С. Свалова, А.И. Матерн, **А.Н. Козицина** // Изв. РАН. Сер. химическая. – 2014. – № 7. – С. 1633-1638 (0.5 п.л./ 0.25 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).
11. Козицина, А.Н. Хроноамперометрическое определение мочевины и креатинина / **А.Н. Козицина**, С.С. Деденева, Ж.В. Шалыгина, А.В. Охохонин, Д.Л. Чижев, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина // Изв. РАН. Сер. химическая. – 2014. – № 8. – С. 833 – 838 (0.5 п.л. / 0.25 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).
12. Козицина, А.Н. Бесферментный электрохимический метод определения *E.coli* с использованием наноконкомпозитов Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> с оболочкой SiO<sub>2</sub>, модифицированной ферроценом / **А.Н. Козицина**, Н.Н. Малышева, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина, О.Н. Чупахин // Журн. аналитической химии. – 2015. – Т. 70. – № 5. – С. 476 – 483 (0.6 п.л./ 0.25 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).
13. Kozitsina, A. New enzyme-free electrochemical immunoassay for *Escherichia Coli* detection using magnetic nanoparticles / **A. Kozitsina**, T. Svalova, N. Malysheva, Y. Glazyrina, A. Matern // Analytical letters. – 2016. – V. 49. – Is. 2. – P. 245 – 257 (1 п.л./0.4 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).
14. Козицина, А.Н. Исследования электрохимических превращений наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в апротонных средах / **А. Н. Козицина**, Т. С. Свалова, Ю. А. Глазырина, А.В. Иванова, А. И. Матерн // Изв. РАН. Серия химическая. – 2016. – № 3. – С. 697 – 703 (0.7 п.л./0.4 п.л.).
15. 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 (1.6 п.л. / 0.8 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).
16. Козицина, А.Н. Бесферментное определение холестерина с использованием наночастиц золота и серебра в качестве электрокатализатора / А.В. Охохонин, С.Ю. Сараева, А.И. Матерн, **А.Н. Козицина** // Журн. аналитической химии. – 2017. – Т. 72. – № 4. – С. 296–304. (0.8 п.л./0.6 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).
17. Kozitsina, A. Determination of Staphylococcus aureus B-1266 by an Enzyme-Free Electrochemical Immunosensor Incorporating Magnetite Nanoparticles / **A. Kozitsina**, T. Svalova, N. Malysheva, Y. Glazyrina, A. Matern, V. Rusinov // Analytical Letters. – 2017. – V. 50. – Is. 6. – P. 924 – 935 (1 п.л./0.4 п.л.) (*Scopus u Web of Science*).
18. Козицина, А.Н. Структура рецепторного слоя в электрохимических иммуносенсорах. Современные тенденции и перспективы развития. Обзор / Т.С. Свалова, Н.Н. Малышева, **А.Н. Козицина** // Изв. РАН. Сер. химическая. – 2017. – № 10. – С. 1797 – 1811 (1.9 п.л./1.0 п.л.) (*Scopus u Web of science*).
19. Козицина, А.Н. Электрохимический метод определения концентрации наночастиц серебра и золота в живых клетках / Ю.А. Сунцова, Е.Л. Поморцева, Н.А. Малахова,

А.И. Матерн, **А.Н. Козицина** // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2012. – Т. 154. – Кн. 3. – С.105 – 115 (1.0 п.л./ 0.4 п.л.).

### ***Патенты РФ***

1. Пат. 2397243 РФ. МПК С12N 1/02. Способ определения патогенных микроорганизмов / Х.З. Брайнина, **А.Н. Козицина**, Ю.А. Глазырина, М.Я. Ходос; заявл. 19.01.2009; опубл. 20.08.2010, бюл. № 23.

2. 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, бюл. № 5

3. Пат. 2542487 РФ. МПК С12Q 1/04, С12N 1/02, G01N 33/53, В82В 1/00. Способ определения содержания грамотрицательных патогенных бактерий в анализируемой среде / **А.Н. Козицина**, Н.Н. Малышева, Ю.А. Глазырина, А.И. Матерн; заявл. 15.07.2013; опубл. 20.02.2015, бюл. № 5.

4. Пат. 2550955 РФ. МПК G01N33/58, G01N33/53 Способ электрохимического иммуноанализа для определения вирусов/антигенов вирусов / **А.Н. Козицина**, Н.Н. Малышева, Ю.А. Глазырина, А.И. Матерн, А.В. Иванова; заявл. 11.12.2013; опубл. 20.05.2015, бюл. № 14.

5. Пат. 2538153 РФ. МПК С12N1/02, С12Q1/04, G01N33/00, В82В1/00 Электрохимический способ иммуноанализа для определения микроорганизмов / **А.Н. Козицина**, Т.С. Митрофанова, А.И. Матерн; заявл. 22.03.2013; опубл. 20.02.2015, бюл. №1.

6. Пат. 2612143 РФ. Способ определения содержания бактерий с использованием в качестве метки модифицированных магнитных наночастиц / **А.Н. Козицина**, Т.С. Свалова, Ю.А. Глазырина, А.И. Матерн; заявл. 27.07.2015; опубл. 02.03. 2017, бюл. № 7.

### ***Главы в рецензируемых монографиях***

1. Козицина, А.Н. Наноматериалы: риски и использование *in vivo* и *in vitro* в диагностике [Текст] / Х.З. Брайнина, **А.Н. Козицина**, Ю.А. Глазырина, Л.В. Устинов // Проблемы аналитической химии. Т. 11 : Химический анализ в медицинской диагностике / под ред. Г.К. Будникова. – М. : Наука. – 2010. – С. 164 – 178 (3.1 п.л. / 1.5 п.л.).

2. Козицина, А.Н. Химические и биохимические сенсоры: от биосенсоров к биочипам и мультисигнальным системам. [Текст] / Х.З. Брайнина, **А.Н. Козицина** // Проблемы аналитической химии. Т. 14 : Химические сенсоры / под ред. Ю.Г. Власова. – М. : Наука. – 2011. – С. 314 – 344 (5.2 п.л. / 3.5 п.л.).

### ***Список используемой литературы:***

1. Тёрнер, Э. Биосенсоры: основы и приложения [Текст] / Э. Тёрнер, И. Карубе, Дж. Уилсон. — М. : Мир. – 1992. — 614 с.

2. Higson, S. Biosensors for medical applications [Текст] / S. Higson // Woodhead Publishing Limited. – 2012. – 337 p.

3. Wang, J. Analytical electro- chemistry [Текст] / J. Wang – Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. – 2006. – 272 p