

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной деятельности
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», д.т.-м.н., профессор

Нурталиев Д.К.

« 4 »

2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Охохонина Андрея Викторовича «Разработка бесферментного электрохимического метода определения свободного холестерина», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Актуальность темы исследования. Применение явления электрокатализа для повышения чувствительности и селективности определения органических, прежде всего, соединений является мощным инструментом дальнейшего развития вольтамперометрического анализа в части создания новых подходов к определению биологически значимых соединений, имеющих диагностическое значение. В данном случае речь идет об определении холестерина, третьего по распространенности объекта биохимического анализа метаболитов после глюкозы и мочевины. Анализ холестерина необходим в связи с диагностикой атеросклероза, хронической почечной недостаточности, заболеваний поджелудочной железы и ряда других, в том числе, наследственного характера. Существующие методы рутинного анализа холестерина используют достаточно трудоемкие и недостаточно селективные варианты спектрофотометрии и хроматографии, требующие трудоемкой пробоподготовки и дериватизации аналита. Ферментативные методы анализа, в свою очередь, ограничены недостаточной устойчивостью применяемых ферментов. В этой связи актуальна задача создания бесферментных методов анализа, которые бы не уступали последним по селективности и низкому влиянию компонентов матрицы. В представленной работе решение данной задачи достигается путем сравнительного исследования широкого круга медиаторов электронного переноса, таких как соединения кобальта (II) и никеля (II), тиацианат-ион и наночастицы золота и серебра, а также за счет синтеза

#

полимеров с молекулярными отпечатками. Многие из рассмотренных наноматериалов, способов их введения в состав поверхностного слоя сенсора и особенностей проведения электрохимического измерения имеют значение также при создании аналогичных методик определения других органических соединений, интересных с точки зрения развития инструментальных методов современной диагностики. Учитывая вышесказанное, выбранная тема исследования Охохолина А.В. является *актуальной, научно и практически значимой*.

Для достижения поставленной цели - разработки бесферментных методов и сенсоров определения холестерина - были поставлены и последовательно решены задачи выбора оптимального способа синтеза упомянутых наноразмерных медиаторов, исследования кинетики и механизма каталитического окисления холестерина в органических и водно-органических средах, установления аналитических характеристик определения холестерина с использованием изученных катализаторов, а также создания инструментальной платформы для электрохимических измерений в потоке. Представленный план исследования соответствует общепринятой логике «от простого к сложному», базируется на известных из литературы и собственных предварительных результатах соискателя и на закономерностях электрокаталитического окисления органических соединений; он соответствует трендам современного электрохимического анализа с использованием диффузионно свободных медиаторов и на химически модифицированных электродах.

Диссертация Охохолина А.В. изложена на 136 страницах текста компьютерной верстки и состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованных сокращений и списка литературы, содержащего 197 библиографических описаний работ отечественных и зарубежных авторов. Диссертация содержит 31 рисунок и 13 таблиц.

Во *Введении* обоснована актуальность проведенного исследования, сформулированы цель и задачи, дана краткая характеристика научной новизны, практической значимости и методологии исследования, и положения, выносимые на защиту. Приведены сведения об апробации диссертации на конференциях различного уровня, ее структуре и публикациях по теме диссертации.

Глава 1 «Литературный обзор» начинается с характеристики холестерина и его биохимической значимости, после чего в ней представлены лабораторные методы его определения с особым вниманием к сенсорным технологиям. Далее автор

#

рассматривает использованные в работе медиаторы электронного переноса – соединения никеля и кобальта и наночастицы золота и серебра. Наиболее интересна часть литературного обзора, посвященная полимерам с молекулярными отпечатками, пока недостаточно активно используемым в составе электрохимических сенсоров. Уделено значительное внимание получению молекулярных отпечатков и даны примеры их использования в анализе холестерина. Обзор завершается формулировкой поставленной цели и задач диссертационного исследования, частично повторяющей соответствующие разделы Введения. В целом Литературный обзор адекватно отражает современный уровень исследований в области электроанализа на модифицированных электродах и подтверждает правильность выбранного направления исследований и его методологии. Обзор написан хорошим научным языком, достаточно сжато, однако содержит необходимые количественные данные об аналитических характеристиках известных сенсоров и о типичных уровнях холестерина в объектах контроля, что позволяет впоследствии судить о научной новизне и потенциальной востребованности проведенной работы.

Глава 2 «Аппаратура и техника эксперимента» содержит описание электрохимического оборудования, используемых технологий получения наноматериалов и их характеристики, способы модификации электродов, синтеза полимеров с молекулярными отпечатками. Подробность предоставленной информации достаточна для заключения о достоверности полученных научных результатов и их обсуждения.

Глава 3. «Исследование каталитической активности хлоридов кобальта (II) и никеля (II) и тиацианата калия в апротонной среде» посвящена характеристике механизма окисления холестерина в органических растворителях. С помощью циклической вольтамперометрии и вращающегося дискового электрода автор рассматривает детали окисления солей кобальта в ацетонитриле в присутствии и в отсутствие холестерина. На основе количественного анализа токов окисления-восстановления им предложен механизм электрокаталитического окисления холестерина, в котором промежуточно образуется комплекс состава 1:1. Использование кинетики Михаэлиса-Ментен дало значение кинетической константы и константы связывания («константы Михаэлиса»). Аналогичные исследования в диметилформамиде проводили в присутствии солей никеля, кобальта и тиацианата калия. Как и в ацетонитриле, окисление катализаторов происходит с переносом одного электрода. При этом в случае тиацианата окисление протекает стадийно с промежуточным образованием

адсорбированного радикала, его димеризацией и только потом взаимодействием с холестерином по двойной связи. Установлены параметры окисления в предположении кинетики Михаэлиса-Ментен и проведено сравнение аналитических характеристик определения холестерина с растворами различных катализаторов (пределы обнаружения и чувствительность).

Глава 4 «Электрохимическое определение холестерина с использованием наночастиц золота и серебра в качестве катализаторов» начинается с исследования водноорганических эмульсий холестерина как модели переноса аналита в кровяном русле в составе липопротеинов. Для эмульгирования использовали Тритон-Х-100, цетилтриметиламмоний бромид и лаурилсульфат натрия, индикаторным электродом служил стеклоуглеродный электрод с наночастицами серебра. По критериям влияния ПАВ на форму и высоту пиков на вольтамперограммах предпочтение было отдано цетилтриметиламмоний бромиду. Введение в раствор холестерина увеличивает пики тока, отнесенные к обратимым реакциям медиатора, что связано с электрокаталитическим процессом его окисления. Установлены аналитические характеристики окисления холестерина в зависимости от состава частиц металлов. Также показана возможность определения холестерина с помощью хроноамперометрии при постоянной поляризации электрода.

Глава 5 «Селективное определение холестерина в модельных растворах с использованием ПМО» посвящена наиболее интересной части работы – использованию технологии «молекулярных отпечатков» для повышения чувствительности окислительного определения холестерина. Полимеры с молекулярными отпечатками получали на поверхности силикатных частиц и магнетита, основой пленки служил полистирол. Продукты модификации частиц охарактеризованы с помощью ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Последние позволили оценить толщину модифицирующего слоя в 3-4 и 5-6 нм для оксида кремния и магнетита, соответственно. Также оценена сорбционная емкость материалов. Полученные результаты стали основой для создания проточной системы для определения холестерина. В ней через рабочую ячейку в зависимости от положения клапанов могут прокачиваться растворы фонового электролита, суспензия магнетита с полимерным покрытием, содержащим молекулярные отпечатки, и раствор аналита (модельная сыворотка крови). Весь процесс анализа занимает 15 минут. Определены рабочие условия измерения сигнала и отсутствие влияния возможных компонентов сыворотки крови.

#

Диссертация завершается *Выводами*, содержащими обобщение полученных результатов и закономерностей, а также уравнения градуировочных уравнений холестерина в оптимальных условиях измерения сигнала. Также представлено видение автором перспектив применения разработанных аналитических систем для решения реальных задач анализа холестерина.

Характеризуя диссертационную работу Охохонина А.В. в целом, необходимо сделать вывод, что это цельное самостоятельное исследование, в котором автор продемонстрировал глубокое понимание явления электрокатализа и способности к кинетической оценке сложных многостадийных процессов, протекающих в апротонных органических растворителях. Он в целом грамотно использовал существующие возможности по анализу кинетики отдельных стадий и установлению механизма гомогенных стадий переноса электрона и химической трансформации аналита. К числу несомненных достоинств работы следует отнести использование современных технологий получения сложных части типа «ядро-оболочка», совмещающих электрохимический и химический подходы к осаждению металлов. Интересны и многообещающи эксперименты по получению наночастиц, покрытых полимерами с молекулярными отпечатками. К числу других результатов, отличающихся *научной новизной*, следует также отнести выявленную промежуточную стадию образования интермедиата холестерина с окисленными формами диффузионно свободных медиаторов электронного переноса. *Практическая новизна* проведенного исследования связана с предложенными технологиями синтеза наноматериалов и аппаратной платформой для определения холестерина в сыворотке крови.

Несмотря на общее положительное заключение о работе, к ней имеются замечания непринципиального характера.

1. Хотя Охохонин А.В. указывает на процессы электроокисления холестерина в органических растворителях как на альтернативу химически модифицированным электродам, по-видимому, нужны дополнительные аргументы в пользу такой точки зрения. Достаточно сложно на данном этапе предположить, что использование диметилформамида и тем более ацетонитрила, достаточно летучего, хотя автор и утверждает обратное, в практике обычной биохимической лаборатории может иметь перспективы. Ценность полученных результатов скорее в обосновании механизма окисления холестерина и самой возможности медиаторного процесса с рассмотренными кандидатами в катализаторы.

#

2. Автором используется терминология и уравнения, обычно применяемые для полярографии – уравнение формы полярографической волны, понятие потенциала полуволны. С этим трудно согласиться, поскольку ртутный капельный электрод имеет иную геометрию и условия диффузии, соответственно меняется интерпретация количественных данных и форма уравнений тока.

3. Не следует придавать большого значения формальному соответствию найденных закономерностей кинетике Михаэлиса-Ментен. Речь идет всего лишь об описании случая обратимого образования интермедиата, природа которого в работе так и не получила объяснения. Можно предположить и иные причины такого явления – например, замедленные сорбционные процессы на электроде, наличие предпочтительно ориентации реагентов при их контакте и пр. По тем же причинам сравнивать полученные значения кинетических параметров с параметрами ферментативного процесса некорректно.

4. Автор провел очень большую работу по выбору рабочих условий регистрации градуировочных уравнений, но так и не сравнил полученные результаты с литературными данными – они в диссертации присутствуют, но в ограниченном объеме в литературном обзоре, а хотелось бы получить более развернутое сравнение по конкретным образцам / катализаторам.

5. Хотя описание экспериментальной части в целом вполне адекватно, некоторые вопросы, связанные с подготовкой электродов и операционными характеристиками предложенных методик, остались нераскрытыми. Так, не вполне понятно, нужны ли какие-то процедуры для регенерации электрода после измерения, каковы метрологические характеристики измерения в предложенной проточной системе, насколько необходимы и проводились ли процедуры удаления растворенного кислорода, происходит ли процесс агрегации или разрушения частиц магнетита при их эксплуатации в потоке, можно ли регенерировать слой полимеров с молекулярными отпечатками после их контакта с холестерином и насколько обратимы процессы накопления аналита в таких слоях.

Указанные замечания не меняют общей благоприятной оценки работы. Основные полученные результаты опубликованы в 11 работах, включая две статьи из списка журналов, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований, и один патент. Они неоднократно докладывались на конференциях различного уровня и известны научной общественности.

Считаем, что диссертация диссертацию Охохонина Андрея Викторовича «Разработка бесферментного электрохимического метода определения свободного холестерина» удовлетворяет требованиям п.9-13 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациями, как научно-квалификационная работа, в которой в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для электрохимических методов анализа органических соединений. Автор работы, Охохонин Андрей Викторович, достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании кафедры аналитической химии Химического института им.А.М.Бутлерова ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» 3 июля 2017 г., протокол № 13.

Отзыв составил заведующий кафедрой аналитической химии

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

д.х.н., профессор

Геннадий Артурович Евтюгин

г.Казань, 420008, ул.Кремлевская, 18

тел. 8-843-2337491,

e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

Секретарь заседания кафедры аналитической химии

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

к.х.н., доцент

Екатерина Евгеньевна Стойкова

г.Казань, 420008, ул.Кремлевская, 18

тел. 8-843-2337682,

e-mail: Ekaterina.Stoikova@kpfu.ru

4 июля 2017 г.

