

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы

Актуальность данного исследования обусловлена необходимостью разработки новых методов определения содержания холестерина в различных объектах, особенно биологических. Традиционные методы определения содержания холестерина осложняются необходимостью применения склонных к денатурации ферментов и не являются универсальными: могут применяться либо для анализа биологических объектов, либо для анализа пищевых продуктов. В связи с чем, значительный интерес представляют неферментативные электроды, позволяющие разрабатывать экспрессные методики, также отличающиеся высокой чувствительностью и низким пределом определения. Сочетание электрокаталитических свойств неорганических солей и наночастиц золота и серебра, исключительных сорбционных свойств полимеров с молекулярными отпечатками и миниатюрного исполнения даст возможность упростить, ускорить и удешевить процедуру определения холестерина в крови. Поэтому **целью данной работы** является разработка бесферментных электрохимических методов и сенсоров на основе катализаторов наночастиц золота и серебра индивидуальных и смешанного состава, тиоцианата калия и неорганических солей никеля (II) и кобальта (II) в качестве чувствительных элементов определения холестерина, а также полимеров с молекулярными отпечатками холестерина как распознающих элементов.

Научная новизна работы обусловлена исследованием природы аналитического сигнала электрохимического окисления холестерина на стеклоуглеродном электроде (СУЭ), модифицированном электроосажденными наночастицами серебра и наночастицами, состоящими из золотого «ядра» и серебряной «оболочки». Выявлено, что данный процесс является каталитическим, а его лимитирующей стадией – диффузия аналита к поверхности электрода. Показано, что наиболее выраженная каталитическая активность в электрохимическом окислении холестерина наблюдается при использовании наночастиц, состоящих из золотого «ядра» и серебряной «оболочки», и цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) в качестве ПАВ для создания эмульсии холестерина в воде. Впервые показана каталитическая активность тиоцианата калия, хлориды никеля (II) и кобальта (II) в электрохимическом окислении холестерина в апротонной среде. Методами

вольтамперометрии со стационарным и вращающимся дисковым электродом показано, что лимитирующей стадией электрохимического окисления этих солей является диффузия катионов к поверхности электрода.

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

В работе показано, что активность катализаторов зависит от природы используемых в рабочем растворе ПАВ и растворителей, от составов и способов синтеза наночастиц и от концентрации катализаторов в рабочем растворе. Выбран эффективный катализатор – хлорид кобальта (II) концентрацией 25 мМ в ацетонитриле.

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

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в разработке бесферментных электрохимических сенсоров для определения холестерина на основе электроосажденных наночастиц серебра и наночастиц с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой». Разработан электрохимический метод определения холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в качестве катализатора в ацетонитриле. Разработана аппаратная платформа для проведения экспрессного бесферментного определения холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в ацетонитриле в качестве электрокатализатора и частиц полимера с молекулярными отпечатками в качестве селективного элемента, который позволяет автоматизировать процесс анализа. Применение разработанного метода и сенсоров позволяет сократить время проведения анализа на холестерин до 15 мин. Показана и обоснована возможность практического применения разработанных сенсоров и метода определения холестерина в модельных системах. Разработанный метод не уступает по чувствительности и селективности ферментативным методам и сенсорам.

Достоверность и степень обоснованности сформулированных в работе положений и выводов обеспечивается хорошей согласованностью полученных экспериментальных результатов с теоретическими, а также с литературными данными. В работе использованы современные методы и приборы исследования физико - химических свойств объекта анализа. Диссертантом изучены и критически рассмотрены известные достижения и теоретические положения других исследователей по вопросам определения холестерина в биологических объектах.

Достоверность экспериментальных данных обеспечивается использованием современных средств и методик проведения исследований. Диссертантом в его экспериментальной работе использовались стандартные реактивы. Результаты работы неоднократно обсуждались на различных международных и всероссийских научных конференциях по аналитической химии, химии и химической технологии как в нашей стране, так и за рубежом.

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

Структура и объем работы.

Диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, 5-ти глав, выводов и списка цитируемой литературы, состоящий из 197 наименований. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, включая 31 рисунок, 13 таблиц.

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

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

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

Третья глава посвящена исследованию каталитической активности KSCN, NiCl₂ и CoCl₂ в апротонной среде: ДМФА и АН, оценке влияния факторов внешней среды на процессы формирования прямого электрохимического отклика от растворенных катализаторов в присутствии холестерина и получению аналитического сигнала для дальнейшего использования в электрохимическом определении холестерина.

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

Пятая глава посвящена синтезу ПМО холестерина на основе 4-винилпиридина (4-ВП), дивинилбензола (ДВБ) и

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

В целом работа написана хорошим языком, легко читается, логично структурирована и характеризуется критическим осмыслением материала. Но есть ряд замечаний.

1. Из текста работы не вполне ясно, на чем основана первоначальная предпосылка о возможности описания поведения хлорида кобальта (II) в отношении холестерина теорией ферментативной кинетики. Полученный результат, безусловно, представляет значительный интерес, однако исходная гипотеза требует дополнительного теоретического обоснования.
2. Приводимая на рисунке 3.5 кривая, призванная показать, что поведение хлорида кобальта (II) в представленной в работе системе описывается теорией ферментативной кинетики и моделью Михаэлиса-Ментен, представляет собой интересный результат. Однако может, также представлять собой изотерму адсорбции холестерина на рабочем электроде. Вероятно, автор не приводит отдельно доказательств отсутствия адсорбционных явлений на поверхности электрода (например, значений критерия Семерано) вследствие ограниченности объема диссертационной работы. Тем не менее, в связи с этим, вопрос о том является ли кривая на рисунке 3.5 изотермой адсорбции остается открытым. Во избежание разногласий следовало бы внести данный материал в работу. Замечание справедливо и для исследований с тиоцианатом калия (раздел 3.2).
3. Автор пишет, что «...зависимость ... прироста тока окисления катализатора от концентрации холестерина в рабочем растворе ... с линейным участком 0-200 мкМ, подходящим для использования в аналитических целях». В то же время, приводит данные в таблице 1.1 на с. 20 с содержанием холестерина в крови человека от 3,10 до 8,53 ммоль/л. Таким образом, утверждение о достаточности линейного диапазона 0-200 мкМ для аналитического определения холестерина, выглядит спорным. Следовательно, данный момент требует дополнительного разъяснения.

4. В таблице 5.3 (с. 109) в состав модельных растворов, имитирующих сыворотку крови не включена пировиноградная кислота, содержание которой составляет порядка 30-100 мкмоль/л. В то же время, в списке компонентов наличествует креатинин, содержание которого составляет порядка 18-116 мкмоль/л. Также в таблице отсутствуют витамины, содержащиеся в сыворотке крови. В связи с чем, выбор автором компонентов модельных растворов, имитирующих сыворотку крови, требует дополнительных разъяснений.
5. На с. 72 диссертации представлена запись: «На рисунке 3.5 точками обозначена экспериментально полученная зависимость прироста тока окисления катализатора от концентрации холестерина...» в то же время подпись к рисунку 3.5 (с. 73) «Рисунок 3.5 – Зависимость тока окисления холестерина от его концентрации (точки) и модельная кривая». Таким образом, осложняется понимание того, какая именно зависимость представлена на рисунке 3.5.
6. Встречаются множество опечаток и стилистических ошибок. Например, автор не всегда использует сквозную нумерацию рисунков по работе. Так, например, рисунок 3.5 имеется на с. 73, 86; рисунок 3.4 на с. 72, 86. На с. 76 в предпоследнем абзаце указывая диапазон концентраций холестерина автор не указывает размерность концентраций «...0-200 холестерина...». Несогласованные предложения: с. 22, строка 6; с.22, строка 8; с. 23, последнее предложение абзаца 2; с. 25, абзац 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все вопросы, обсужденные в диссертации и по которым даны ответы и решения, опубликованы в научной печати, в том числе в реферируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Диссертационная работа Охохолина А.В. представляет собой большой труд, отличающийся широким охватом поставленных задач, новизной постановки решаемых вопросов и достоверностью полученных результатов.

Диссертационная работа **Охохолина Андрея Викторовича** на тему «Разработка бесферментного электрохимического метода определения свободного холестерина» выполнена на высоком профессиональном уровне, является хорошей научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны новые методологические подходы к определению холестерина в объектах.

Диссертация по актуальности, объему полученного экспериментального материала, научной новизне, теоретической и практической значимости соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с внесенными изменениями от 21 апреля 2016г № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор **Охохонин Андрей Викторович** заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Официальный оппонент

Доктор химических наук, профессор
кафедры физической и аналитической химии
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский
политехнический университет»



Короткова Елена Ивановна

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский
политехнический университет» 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30
тел. (8-382-2) 564- 320
e-mail: eikor@mail.ru
<http://www.tpu.ru/>

Подпись Е.И. Коротковой заверяю:

Ученый секретарь ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский Томский политехнический университет»

О.А. Ананьева

« 26 » июня 2017 г.

