

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу  
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

Объект исследования диссертационной работы – молекула холестерина. Холестерин – тетрациклический ненасыщенный спирт из класса стероидов, важнейший представитель стероидов, предшественник кортикостероидов, половых гормонов, желчных кислот, витамина Д, кальциферола. Приблизительно половина холестерина, имеющегося в организме, образуется путем биосинтеза, а другая половина поступает с пищей. Холестерин синтезируется в организме человека главным образом в печени, кишечнике и коже и является незаменимым компонентом мембран и липопротеинов плазмы крови. Холестерин практически не растворим в воде. Холестерин является основным компонентом желчных камней. Главная же его патологическая роль состоит в том, что он служит фактором, вызывающим атеросклероз жизненно важных артерий головного мозга, сердечной мышцы и других органов. Нарушение обмена холестерина лежит в основе ряда генетически обусловленных заболеваний. В медицине определение содержания холестерина используют преимущественно для оценки риска развития атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний, в диагностике расстройств липидного обмена. Разработка методов определения холестерина является, безусловно, актуальной задачей, как для медицины, так и для пищевой промышленности, с целью оздоровления населения.

На сегодняшний день существует множество аналитических методов определения уровня холестерина, которые можно подразделить на колориметрические, основанные на реакциях образования цветных комплексов; нефелометрические; титрометрические; флюориметрические; газохроматографические и хроматографические. Существуют также

ферментативные методы определения холестерина с использованием холестериноксидазы и других ферментов. Важно отметить, что для массового потребителя доступны разнообразные домашние анализаторы холестерина в крови, предназначенные для самоконтроля. Например, приборы, выпускаемые под торговыми марками Accutrend Plus и CardioChek (фотометрический способ детекции холестерина); Multicare-in (рефлектометрический способ детекции); Easy Touch (электрохимический способ детекции). В таких портативных анализаторах холестерин входит в линейку биохимических показателей наряду с глюкозой, лактатом, гемоглобином.

Разработка электрохимических бесферментных методов анализа холестерина видится перспективной именно с точки зрения последующего использования в мобильных устройствах, предназначенных для работы «у постели больного». Электрохимические методы анализа отличаются высокой чувствительностью, точностью, широким диапазоном определяемых концентраций, относительной дешевизной, простотой эксплуатации и возможностью миниатюризации оборудования, а также разнообразием материалов электродов и их модификаторов (в том числе катализаторов). Сегодня электрохимические сенсоры стали общедоступным средством самоконтроля во всем мире.

В работе автором проведено подробное исследование электрохимического окисления холестерина и показано каталитическое действие на этот процесс наночастиц серебра и наночастиц, состоящих из золотого «ядра» и серебряной «оболочки»; тиоцианата калия, хлоридов никеля (II) и кобальта (II). 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. Среди протестированных соединений и наночастиц выбран наиболее эффективный катализатор окисления холестерина – хлорид кобальта (II) с концентрацией 25 мМ в ацетонитриле. Рассчитаны



метрологические характеристики электрокаталитического анализа холестерина. Кроме того, для обеспечения селективной детекции 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. Логическим завершением работы служит разработанная аппаратная платформа для проведения экспрессного бесферментного определения холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в ацетонитриле в качестве электрокатализатора и частиц, модифицированных полимерами с молекулярными отпечатками, в качестве селективного элемента, которая позволяет автоматизировать процесс анализа. Применение разработанного метода и сенсоров позволяет провести анализ на холестерин за 15 минут. Разработанный метод не уступает по чувствительности и селективности ферментативным методам и сенсорам.

Реализованная автором идея комбинирования электрохимического метода детекции с методом селективного выделения и концентрирования холестерина с помощью полимеров с молекулярными отпечатками представляется значимой для развития аналитической химии в целом. Многие вещества, способные к электрохимическому окислению или восстановлению на поверхности электрода, ранее не могли быть определены с помощью электрохимического анализа с требуемой селективностью из-за отсутствия подходящих распознающих элементов, таких как антитела, аптамеры, сомамеры и аффибоди для белков. Применение полимеров с молекулярными отпечатками позволяет значительно расширить круг веществ, определяемых электрохимическим методом и снизить стоимость анализа.

Диссертационная работа построена классическим образом и состоит из введения, 5 глав, выводов и списка литературы, включающего 197

источников. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и включает 31 рисунок и 13 таблиц. Во введении обоснована актуальность выбора темы исследования, определены его цели и задачи. В литературном обзоре (глава 1) рассмотрены существующие методы определения холестерина. Описаны используемые в работе катализаторы электрохимического окисления органических молекул: соединения кобальта(II) и никеля(II), наночастицы золота и серебра. Особого внимания заслуживает раздел обзора, посвященный принципам получения полимеров с молекулярными отпечатками. Таким образом, в первой главе автор вводит читателя в научные проблемы, на стыке которых выстроена диссертационная работа, что способствует более глубокому ее пониманию. Вторая глава содержит описание экспериментальной части диссертации. Главы 3–5 посвящены обсуждению результатов исследований каталитической активности хлоридов кобальта (II) и никеля (II) и тиоцианата калия по отношению к окислению холестерина в апротонных средах ацетонитрила и ДМФА; определению холестерина с использованием наночастиц золота и серебра в качестве катализаторов в водно-органических эмульсиях; получению и применению полимеров с молекулярными отпечатками для селективного определения холестерина в модельных растворах. В завершении диссертации сделаны выводы. В целом диссертационная работа производит положительное впечатление и представляет собой законченное исследование в области аналитической химии и электрохимии.

Однако, несмотря на вышеперечисленные достоинства, после прочтения работы к диссертанту возникли следующие вопросы, рекомендации и замечания.

1. Удивило отсутствие в литературном обзоре представленных на рынке устройств для определения холестерина в крови в лабораторных и домашних условиях. Было бы важно отметить, что сегодня в некоторых моделях глюкометров анализ крови на холестерин заложен в качестве дополнительной опции. Так, портативный биохимический анализатор крови



EasyTouch GC (Bioptik Technology, Тайвань) функционирует по принципу электрохимической детекции сигнала. В связи с этим возникает вопрос о преимуществах разработанной аппаратной платформы для бесферментного электрохимического определения холестерина в проточном режиме с использованием хлорида кобальта (II) над существующими аналогами? Пригодна ли разработанная установка и метод анализа для определения холестерина в крови?

2. Предположение автора, что бесферментное электрокаталитическое окисление холестерина подчиняется ферментативной кинетике, требует, на мой взгляд, более весомых доказательств.

3. Из текста диссертации не совсем ясно при каком потенциале проводили определение холестерина в случае каждой из рассматриваемых каталитических систем? Из рис. 3.1 диссертации не следует, что хлорид кобальта(II) значительно снижает потенциал окисления холестерина. Окисление холестерина без катализатора происходит на платине в  $\text{LiClO}_4$  и ацетонитриле при 1.47 В, а электрокаталитическое окисление при 1.3 – 1.5 В (отн. Fc/Fc+).

4. В таблице 5.3 диссертации приведен состав модельных растворов, имитирующих сыворотку крови, в которых проводили определение холестерина с помощью частиц, модифицированных полимерами с молекулярными отпечатками. В составе данных растворов отсутствует альбумин – основной белковый компонент крови, так же как и другие белки. Было бы полезно внести в модельные растворы аминокислоты, способные к электрохимическому окислению на поверхности электродов: тирозин, триптофан, цистеин, гистидин, метионин и цистин.

Замечание по оформлению работы. В рукописи найдены опечатки.

Тем не менее, указанные замечания и высказанные соображения не умаляют научную ценность и значимость работы.

На основании вышесказанного считаю, что диссертационная работа Охохолина Андрея Викторовича «Разработка бесферментного электрохимического метода определения свободного холестерина» полностью соответствует требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. с изменениями № 335 от 21 апреля 2016 г., а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

119121 г. Москва, ул. Погодинская, д. 10 стр. 8. ИБМХ.

E-mail: lenasuprun@mail.ru

Тел.: 8 (499) 246 58 20

Елена Владимировна  
Супрун

Подпись Супрун Е.В.  
заверяю  
Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карлова Е.А.

«04» августа 2017 г.