

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина»

На правах рукописи

Охохонин Андрей Викторович

**РАЗРАБОТКА БЕСФЕРМЕНТНОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО
МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ХОЛЕСТЕРИНА**

02.00.02 – Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук, доцент
Козицина Алиса Николаевна

Екатеринбург – 2017

Оглавление

Список использованных сокращений	4
Введение.....	8
Глава 1. Литературный обзор.....	17
1.1. Методы определения холестерина.....	17
1.1.1. Объект исследования	17
1.1.2. Лабораторные методы определения холестерина	21
1.1.3. Ферментативные методы.....	24
1.2. Сенсорные и биосенсорные методы определения холестерина	28
1.3. Катализаторы электрохимического окисления органических соединений.....	33
1.3.1. Соединения никеля (II) и кобальта (II)	34
1.3.2. Неорганические соединения никеля и кобальта	34
1.3.3. Органические соединения никеля (II) и кобальта (II).....	36
1.3.4. Наночастицы золота и серебра.	38
1.4. Полимеры с молекулярными отпечатками. Синтез и применение в анализе органических соединений	39
1.4.1. Технология получения полимеров с молекулярными отпечатками... ..	40
1.4.2. Области применения полимеров с молекулярными отпечатками органических молекул.	47
1.4.3. Синтез ПМО на поверхности микро- и наночастиц.....	49
1.4.4. Применение полимеров с молекулярными отпечатками в сенсорных устройствах.	50
1.4.5. Полимеры с молекулярными отпечатками и рецепторы холестерина.....	51
1.5. Постановка задачи	53
Глава 2. Аппаратура и техника эксперимента	56
2.1. Оборудование и средства измерений.....	56
2.2. Реактивы и приготовление растворов.....	57
2.3. Методика эксперимента	58

Глава 3. Исследование каталитической активности хлоридов кобальта (II) и никеля (II) и тиоцианата калия в апротонной среде.....	64
3.1. Электрохимическое окисление холестерина в присутствии хлорида кобальта (II) в среде ацетонитрила.....	65
3.2. Электрохимическое окисление холестерина в присутствии хлоридов никеля (II) и кобальта (II), тиоцианата калия в среде ДМФА.....	78
Глава 4. Электрохимическое определение холестерина с использованием наночастиц золота и серебра в качестве катализаторов.....	89
4.1. Водно-органические эмульсии холестерина.....	89
4.2. Электрокаталитическая активность наночастиц золота и серебра, иммобилизованных на поверхности рабочего электрода, в водно-органической эмульсии.....	91
Глава 5. Селективное определение холестерина в модельных растворах с использованием ПМО.....	99
5.1. Синтез ПМО холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита.....	99
5.2. Морфология частиц ПМО.....	100
5.3. Определение сорбционной способности частиц ПМО относительно холестерина.....	104
Выводы.....	111
Список литературы.....	113

Список использованных сокращений

1,2-ДМЭ — 1,2-диметоксиэтан

4ААП – 4-аминоантипирин

4-ВП – 4-винилпиридин

ААРН – 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид

Ag/AuНЧ – наносплав золота и серебра

Ag-AuНЧ – наночастицы с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой»

AgНЧ – наночастицы серебра

Au-AgНЧ - наночастицы с серебряным «ядром» и золотой «оболочкой»

AuНЧ – серебряные наночастицы

$C_{хол}$ – концентрация холестерина, моль/л

$C_{дес}$ – концентрация холестерина, десорбированного из частиц ПМО, моль/л

$C_{кат}$ – концентрация катализатора, моль/л

$C_{ост}$ – концентрация холестерина, оставшегося в растворе после сорбции на частицах ПМО, моль/л

C' – концентрация стандартного раствора холестерина, моль/л

D – коэффициент диффузии, см²/с

E – электрохимический потенциал, В

$E_{1/2}$ – потенциал полуволны, В

$E_{ан}$ – потенциал анодного пика, В

$E_{кат}$ – потенциал катодного пика, В

FAD – флавинадениндинуклеотид

Fc – ферроцен

i – регистрируемый ток, А

i_d – предельный диффузионный ток, А

i_{max} – максимальный регистрируемый ток, А

k_{cat} – каталитическая константа

K_m – константа Михаэлиса

K_r – константа скорости превращения Co^{3+} в Co^{2+}

$m_{\text{ПМО}}$ – масса частиц ПМО, г

n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции

R – степень извлечения, %

r – показатель (мера) правильности, %

S_r — относительное среднеквадратичное отклонение

SAM – самоорганизующиеся пленки

SE – сорбционная емкость, моль/г

α - коэффициент переноса заряда

$\nu_{\text{хол извл}}$ – количество вещества холестерина, извлеченного из частиц ПМО, моль

$\nu_{\text{хол сорб}}$ – количество вещества холестерина, сорбированного ПМО, моль

ν – скорость сканирования потенциала, В/с

ω – скорость вращения электрода, об./мин

АИБН - азоизобутиронитрил

АН - ацетонитрил

АС – аналитический сигнал

ВДЭ – вращающийся дисковый электрод

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДВБ – дивинилбензол

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамид

З-З – реакция Златкиса-Зака

Л-Б – реакция Либерманна-Бурхарта

ЛПВП – липопротеиды высокой плотности

ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

ЛСН – лаурилсульфат натрия

М-М – уравнение Михаэлиса-Ментен

НС – нитрат серебра

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПК – предполимеризационный комплекс

ПМО – полимер с молекулярными отпечатками

ПМО-МНЧ – полимер с молекулярными отпечатками на поверхности наночастиц магнетита

ПМО-МНЧ-Д – полимер с молекулярными отпечатками на поверхности наночастиц магнетита, синтезированные с использованием ДВБ в качестве сшивающего агента

ПМО-МНЧ-Э – полимер с молекулярными отпечатками на поверхности наночастиц магнетита, синтезированные с использованием ЭГДМА в качестве сшивающего агента

ПМО-ОКНЧ – полимер с молекулярными отпечатками на поверхности наночастиц оксида кремния

ПМО-ОКНЧ-Э – полимер с молекулярными отпечатками на поверхности наночастиц оксида кремния, синтезированные с использованием ЭГДМА в качестве сшивающего агента

ПМО-ОКНЧ-Д – полимер с молекулярными отпечатками на поверхности наночастиц оксида кремния, синтезированные с использованием ДВБ в качестве сшивающего агента

СА – сшивающий агент

СУЭ – стеклоуглеродный электрод

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТГФ – тетрагидрофуран

ТМВС – трис(2-метоксиэтокси)(винил)силан

ТРИМ – триметилпропантриметакрилат

ТФЭ – твердофазная экстракция

ТХАК – тетрахлораурат калия

ТЭОС – тетраэтоксисилан

ФМ – функциональный мономер

ЦВА – циклическая вольтамперограмма

ЦМ – целевая молекула

ЦН – цитрат натрия

ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид

эAgНЧ – электроосажденные наночастицы серебра

ЭГДМА – этиленгликольдиметакрилат

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

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

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

Сегодня для определения холестерина широко применяют, например, колориметрию и ВЭЖХ. Кроме того, в последние годы разработаны оптические и электрохимические биосенсоры для определения холестерина. В большинстве биосенсоров в качестве чувствительных и селективных агентов используют ферменты – холестериноксидазу, холестеринэстеразу или цитохром Р450. Эти ферменты используют также в различных тест-системах на холестерин, например, основанных на реакции Триндера. Однако, несмотря на активные разработки, широкое применение биосенсоров ограничено высокой стоимостью применяемых ферментов, их низкой стабильностью в связи с чувствительностью к изменению рН и температуры и ограниченным сроком хранения. Имеющиеся бесферментные методы, такие как хроматография, колориметрия и масс-спектрометрия, требуют сложного аппаратного оформления, высокой квалификации персонала и трудоемки. Поэтому на сегодняшний день актуальными задачами являются упрощение и удешевление процедур по определению холестерина в целях создания возможности их проведения в небольших клиниках и лабораториях.

Решение указанных задач состоит в разработке новых бесферментных чувствительных селективных и экспрессных сенсоров и методов определения уровня холестерина и связанных с ним заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Электрохимические методы анализа, и в частности применение электрокатализаторов в качестве чувствительных элементов сенсоров, благодаря высокой чувствительности и скорости анализа, компактности и доступности соответствующего оборудования и, как следствие, возможности работать в полевых условиях активно используются во всем мире в области аналитической химии и медицины. Бурное развитие технологий молекулярного распознавания, в том числе полимеров с молекулярными отпечатками, позволяет разрабатывать селективные элементы сенсоров без использования ферментов.

Настоящая диссертационная работа посвящена разработке подходов для новых бесферментных электрохимических методов и сенсоров определения холестерина с использованием в качестве чувствительных элементов электрокатализаторов: неорганических солей и наночастиц благородных металлов, а в качестве селективных элементов – полимеров с молекулярными отпечатками холестерина.

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.

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

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

Для достижения указанной цели необходимо решить следующие задачи:

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

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

— исследовать кинетику электрохимического окисления холестерина в присутствии каталитической системы;

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

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

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

Научная новизна.

1. Впервые показано, что электрохимическое окисление холестерина на стеклоуглеродном электроде (СУЭ), модифицированном электроосажденными наночастицами серебра и наночастицами, состоящими

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

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

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

4. Впервые рассчитаны метрологические характеристики электрокаталитического метода и сенсоров в определении холестерина с использованием в качестве катализаторов электроосажденных наночастиц серебра и наночастиц смешанного состава с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой», хлоридов никеля (II) и кобальта (II) и тиоцианата калия: чувствительность, минимальная определяемая концентрация холестерина,

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

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

Теоретическая и практическая значимость

1. Разработаны бесферментные электрохимические сенсоры для определения холестерина на основе электроосажденных наночастиц серебра и наночастиц с золотым «ядром» и серебряной «оболочкой».

2. Разработан электрохимический метод определения холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в качестве катализатора в ацетонитриле.

3. Разработаны ПМО холестерина, обеспечивающих селективность определения.

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

5. 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.

Положения, выносимые на защиту:

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

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

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

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

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

Методология и методы исследований

В основе диссертационной работы лежат современные методы синтеза и исследования наноразмерных структур, а также электрохимические методы определения биологически активных соединений. Синтез наночастиц золота и серебра осуществляли термохимическим и электрохимическим методами. Синтез наночастиц оксида кремния проводили по методу Штобера, магнитных

наночастиц – методом соосаждения, модификацию полученных наночастиц вели по методу Штобера. Синтез полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) холестерина на поверхности наночастиц вели методом радикальной полимеризации в толуоле.

Размеры и морфологию частиц ПМО холестерина исследовали методом сканирующей электронной микроскопии. Состав частиц ПМО изучали методом ИК-спектроскопии.

Электрохимические исследования проводили методами циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии. Селективное определение холестерина в проточном режиме осуществляли электрохимическими методами с использованием одноразовых миллифлюидных плашек и перистальтического насоса.

Степень достоверности и апробация работы.

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

Результаты исследований были представлены на научной конференции «Достижения в химии и химической технологии» (Екатеринбург, Россия, 2011 г.); на VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012» (Уфа-Абзаково, Россия, 2012 г.); на IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной научной школой по органической химии (Уфа-Абзаково, Россия, 2013 г.); на Всероссийской конференции «Второй съезд аналитиков России» (Москва, Россия, 2013 г.); на 15 Международной конференции по электроанализу ESEAC (Мальмё, Швеция, 2014 г.); на X Всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной научной школой (Уфа-Абзаково, Россия, 2015 г.); на IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой «ЭМА 2016»

(Екатеринбург-Леневка, Россия, 2016 г.); на XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, Россия, 2016 г.).

Публикации

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

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

Структура и объем диссертации

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

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина».

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

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Методы определения холестерина

1.1.1. Объект исследования

Холестерин (рисунок 1.1) является жирным спиртом, входящим в состав всех тканей и играющим ключевую роль в метаболизме высших животных, в том числе и человека. Он выполняет большое количество важных функций в метаболизме организма, в синтезе стероидных гормонов и желчных кислот, входит в состав клеточных мембран. Однако, повышенный уровень холестерина в крови является симптомом ряда заболеваний, таких как атеросклероз, наследственные заболевания (семейная, полигенная гиперхолестеринемия, комбинированная гиперлипидемия, наследственная дисбеталипопротеинемия), хроническая почечная недостаточность, нефроптоз, гипертония, болезни печени (острые и хронические гепатиты, внепеченочные желтухи, цирроз печени), заболевания поджелудочной железы (злокачественная опухоль поджелудочной железы, острый и хронический панкреатит). По данным Всемирной организации здравоохранения на 2014 год заболевания сердца и сосудов занимают первое место среди наиболее частых причин смерти во всем мире [1]. В связи с этим проблема разработки новых быстрых и точных методов определения холестерина в целях ранней диагностики указанных заболеваний приобретает особое значение.

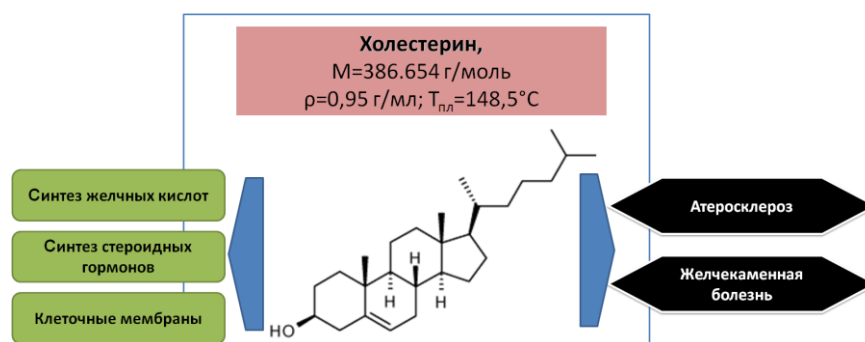


Рисунок 1.1 – Структурная формула холестерина, его физические свойства, физиологические функции и связанные с ним заболевания

Чаще всего в лабораторной диагностике решается задача определения холестерина в крови человека. В связи с этим требуется решение вопроса о пробоподготовке крови для дальнейшего анализа. Пробоподготовка предполагает отделение клеточной части крови от жидкой фазы с растворенными в ней соединениями: плазмы или сыворотки.

Несмотря на то, что содержание холестерина в сыворотке и плазме крови отличаются примерно на 5%, обе жидкости можно использовать для определения концентрации общего холестерина, фосфолипидов, триглицеридов. Для устранения различий и получения релевантных результатов при анализе плазмы рекомендуется полученные значения умножать на 1.03 [2].

Анализу плазмы крови отдают предпочтение в случае определения концентрации липопротеидов и липидов химическим методом. При этом необходимо использовать антикоагулянт, в большинстве случаев это – гепарин или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

Содержание холестерина в крови человека

Концентрация холестерина в крови человека меняется в зависимости от многих факторов [3]: возраст, пол, факторы внешней и внутренней сред, например, качество и режим питания, уровень физической активности, гормональный статус и т.д.

Сразу после рождения концентрация холестерина в плазме человека составляет около 1.71 ммоль/л, в равной степени распределяясь между липопротеидами высокой (ЛПВП) и низкой (ЛПНП) плотности. Небольшое количество приходится на липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП). Содержание триглицеридов — около 0,36 мг/мл. Концентрации липопротеидов и холестерина быстро растут в течение первых месяцев жизни человека и почти не меняется до наступления периода половой зрелости. Для

здоровых детей предпубертатного возраста концентрация общего холестерина составляет около 4.0 ммоль/л [4].

Содержание холестерина в сыворотке крови здоровых взрослых колеблется в пределах 4-8% [5]. Для холестерина, измеренного в плазме, наблюдаются сезонные колебания: от самого высокого зимой до самого низкого — летом. Эти колебания связаны с изменением рациона, режима питания и образа жизни в различное время года.

Повышение концентрации общего холестерина в сыворотке крови характерно для многих заболеваний: дислиппротеидемии, холестаза, нефротического синдрома, хронической почечной недостаточности, злокачественных опухолей простаты и поджелудочной железы, гипотиреоза, сахарного диабета, алкоголизма, гликогеноза 1 типа (болезнь Гирке), ожирения.

Уменьшение концентрации общего холестерина в сыворотке крови наблюдается при таких заболеваниях, как гипо- α -липопротеидемия, заболевания печени, миелопролиферативные заболевания, гипертиреоз, синдром мальабсорбции, мегалобластная анемия, обширные ожоги, инфекционные заболевания, хирургические операции, голодание и инфаркт миокарда [4].

В лабораторной практике сложились два основных подхода к оценке концентрации липидов в крови. Первый — популяционный, он позволяет распределить репрезентативную выборку обследованного в каком-либо регионе (например, город, район и т. д.) населения на подгруппы по уровню липидов. Для этого выделяют высокие (5–10% с самыми высокими значениями в ряду распределения), низкие (5–10% с самыми низкими значениями) и промежуточные, которые условно выбираются за норму. Примером такого популяционного подхода могут служить проведенные в Ленинграде в семидесятых годах XX века исследования. Авторы исследования установили, что нижняя граница нормы содержания общего холестерина (первые 5% выборки) в популяции мужчин 30–39 лет находится на уровне 3,98

ммоль/л, верхняя граница нормы (последние 5% выборки) —7.22 ммоль/л. Также была установлена медианная величина в 5.31 ммоль/л [6].

Также примером указанного подхода могут служить результаты, полученные в исследованиях, проведенных Фредриксоном в США [7]. В целях фенотипирования дислиппротеидемий были предложены референтные интервалы концентраций общего холестерина (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Референтные интервалы концентраций общего холестерина в сыворотке крови.

Возраст, лет	Мужчины, ммоль/л	Женщины, ммоль/л	Нормальные пределы, ммоль/л
0-19	4.44±0.88	4.62±0.85	3.10-5.95
20-29	4.73±0.96	4.62±0.90	3.10-6.21
30-39	5.43±0.85	7.62±0.96	3.62-6.98
40-49	5.94±1.42	5.61±0.90	3.88-8.02
50-59	6.20±1.24	6.48±1.27	4.14-8.53

Иной подход — т.н. «клинический» — подразумевает разделение полученных статистических значений на «нормальные» и «повышенные», и оценка дается независимо от региональных, расовых и других особенностей.

В клиническом подходе различают «идеальную» концентрацию холестерина (до 4 ммоль/л), нормальную (до 5,15 ммоль/л), умеренно повышенную (до 6,45 ммоль/л) и высокую (гиперхолестеринемия, более 6,45 ммоль/л) [3]. По рекомендациям специалистов в интерпретацию концентрации холестерина в крови были внесены некоторые изменения: разделение на т.н. *желательный*, *пограничный* и *высокий* (таблица 1.2) [8].

Таблица 1.2 – Содержание общего холестерина в сыворотке крови

Уровень общего холестерина	Взрослые, ммоль/л	Дети и подростки (12-18 лет), ммоль/л
<i>Желательный</i>	< 5.16	< 4.39
<i>Пограничный</i>	5.16-6.17	4.39-5.13
<i>Высокий</i>	> 6.19	> 5.16

«Идеальный» уровень общего холестерина наблюдается приблизительно у 10% взрослых людей обоих полов в развитых странах. У молодых людей он встречается чаще, чем у пожилых. Многие «строгие» вегетарианцы, исключая из своего рациона любые продукты животного происхождения, имеют такую концентрацию холестерина. При таком содержании холестерина практически не развивается атеросклероз. Уменьшение у пациентов с атеросклерозом концентрации холестерина до *идеального* и поддержание такого уровня в течение достаточно длительного времени коррелирует с регрессией атеросклероза [3].

1.1.2. Лабораторные методы определения холестерина

Большинство процедур для определения холестерина предполагает использование следующих реакций, как правило, с колориметрической фиксацией аналитического сигнала:

- реакция Либермана-Бурхарда (Л-Б);
- реакция Златкиса-Зака (З-З) с солями железа;
- ферментативные реакции.

Первым методом определения холестерина была цветная реакция с серной кислотой в уксусном ангидриде, предложенная Либерманом в 1885 году [9]. В 1889 году Бурхард обнаружил, что более интенсивная, чем в методе Либермана, сине-зеленая окраска наблюдается, если реакцию проводить с

холестерином, растворенным в хлороформе [10]. Реакция Либермана-Бурхарда все еще широко распространена и используется для определения холестерина в крови и других биологических материалах.

Реакцию Л-Б проводят в несколько стадий в сильноокислой среде, а именно смеси уксусной и серной кислот и уксусного ангидрида. На начальной стадии из молекулы холестерина образуется молекула 3,5-холестадиена. Последовательно окисляясь, данное соединение образует окрашенный комплекс с максимумом поглощения 610 нм и 410 нм. Долгое время реакция Л-Б была одной из наиболее часто используемых в лабораторной практике реакций для определения холестерина, хотя она не гарантирует надежных результатов по причине того, что комплексы с 7-дегидрохолестерином и 7 α -холестерином в реакции Л-Б окрашиваются, соответственно, в 2 и 4 раза интенсивнее, чем комплекс с холестерином. Помимо этого, если не был проведен гидролиз эстерифицированного холестерина до постановки реакции, использование свободного холестерина как стандарта приводит к завышению значений концентрации общего холестерина [11].

Кроме того, в крови приблизительно 1/3 холестерина находится в свободной форме и до 2/3 – в эстерифицированной. Для анализа этот факт имеет важное значение, так как в ряде химических реакций с эстерифицированным холестерином образующиеся продукты имеют более интенсивную окраску, чем продукты реакций со свободным холестерином, что может привести к искажению аналитического сигнала и неверному результату [4]. Для повышения качества анализа и уменьшения ошибки необходимо включить в процесс анализа стадию гидролиза эфиров. В этом случае в реакцию вступает свободный холестерин. Метод Абея, который использует реакцию Либермана-Бурхарда и содержит этапы экстракции и гидролиза эфиров, многими авторами рассматривается как референтный [11].

Процесс анализа образцов на холестерин как правило включает стадию экстракции холестерина из образца плазмы или сыворотки крови с использованием органических растворителей в целях удаления

неспецифичных хромогенов, влияющих на конечную окраску и вносящих дополнительную погрешность. Этот прием используется в методах Зака и Ресслера [12] и Киамори и Генри [13].

В 1953 г. Златкис и Бойл предложили колориметрический метод определения холестерина. В его основе – образование цветного комплекса в процессе реакции хлорида железа (III) в концентрированной серной кислоте с холестерином, растворенным в ледяной уксусной кислоте. Интенсивность окраски комплекса с максимальным светопоглощением при длине волны 563 нм более стабильная и интенсивная, чем в реакции Л–Б [14]. Предложенный метод почти в 7 раз чувствительнее метода Л–Б. Еще больше увеличить чувствительность метода позволило выявление хромогена, который образуется в результате реакции ионов Fe^{3+} , серной кислоты и холестерина с применением флюориметрии [15].

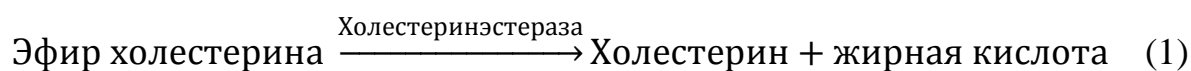
В некоторых случаях, например, при анализе тканей и тканевых экстрактов, в которых присутствуют дополнительные соединения, влияющие на конечную окраску комплекса, необходим дополнительный этап очистки экстракта от них. Как правило, дополнительная очистка осуществляется с применением дигитонина, способного реагировать с гидроксильной группой холестерина с образованием нерастворимого комплекса, который впоследствии снова переводят в раствор и анализируют. К таким методам относятся процедуры, предложенные Шенгеймером и Сперри [16] и Сперри и Уэббом [17].

Все перечисленные методы несмотря на точность получаемых результатов требуют сложной пробоподготовки образцов с использованием агрессивных реагентов: концентрированных серной и уксусной кислот, уксусного ангидрида, большого количества хлороформа. В целях упрощения процедуры определения холестерина были предложены менее трудоемкие и более безопасные методы с использованием ферментов.

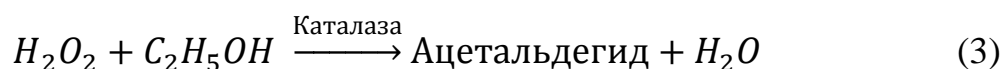
1.1.3. Ферментативные методы

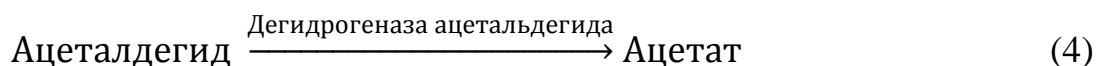
Постоянное развитие аналитической науки привело к широкому внедрению в диагностическую практику ферментативных методов определения холестерина. Ферменты – это природные катализаторы химических превращений биологически активных соединений. Ферменты, используемые в аналитических целях, как правило, состоят из белковой части, которая селективно захватывает целевую молекулу, и кофермента, который выполняет роль медиатора переноса электронов. Реакции с участием ферментов протекают строго стехиометрически и с высокой скоростью. Кроме того, благодаря высокой селективности ферментов по отношению к целевой молекуле исключается протекание побочных реакций, которые могли бы повлиять на результат определения целевой молекулы. Указанные обстоятельства объясняют повышенный интерес к использованию ферментов в аналитической и диагностической практике

В ферментативных методах определения холестерина используют ферменты холестериноксидаза и холестеринэстераза [18,19]. На первом этапе анализа холестеринэстераза катализирует гидролиз эфиров холестерина с образованием свободного холестерина и жирной кислоты (реакция 1), на втором этапе холестериноксидаза катализирует окисление холестерина молекулярным кислородом с образованием холест-4-ен-3-она и пероксида водорода (реакция 2).

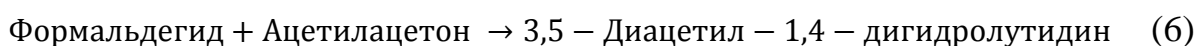


Определение концентрации образовавшегося пероксида водорода проводят с применением ферментативных индикаторных реакций (3 и 4). Анализ на холестерин проводят фотометрически при длине волны 340 нм с определенным временем инкубации [20].

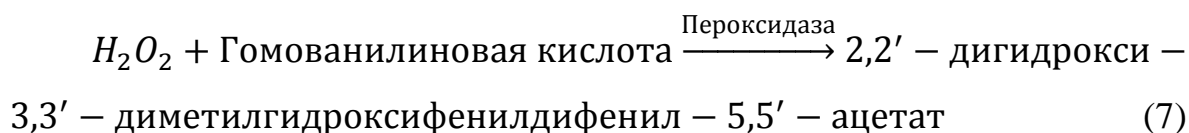




Реакция пероксида водорода и метанола, катализируемая каталазой, с добавлением ацетилацетона дает дигидролутидин (реакции 5 и 6), поглощение определяют при длине волны 405 нм [21].



Использование реакции пероксида водорода с гомованилиновой кислотой, катализируемой пероксидазой и дающей флуоресцирующее при длине волны 470 нм соединение (реакция 7), привело к разработке чувствительного метода [22].



Подход Триндера, позволяющий определять пероксид водорода с использованием реакции окислительного диазосочетания с фенолом и 4-аминоантипирином (4ААП), катализируемой пероксидазой (реакция 8), вызвал наибольший интерес.



Данная реакция, в результате которой образуется окрашенный комплекс с максимумом поглощения при длине волны 500–525 нм, является основой наибольшего количества систем определения холестерина, в том числе тест-систем [23].

4ААП используется также в реакции с 2-гидрокси-3,5-дихлорбензолсульфоновой кислотой или 3,3', 5,5'-тетраметилбензидином [24].

Правильно и точно откалиброванные ферментативные методы стали основными рутинными лабораторными методами определения холестерина. Ферментативные методы дают результаты, сравнимые с референтными методами [25]. Тем не менее, ферментативные методы, даже с использованием компактных приборов, нельзя применять повсеместно для анализа на содержание холестерина. Источником возможных ошибок и

невоспроизводимости результатов анализа является белковая природа ферментов. Колебания температуры, рН, влияние окислителей и восстановителей приводят к денатурации ферментов, что критически сказывается на их эффективности.

Референтный метод определения холестерина имеет в своей основе химический метод, разработанный Абелем и соавт. [26]. Его используют референтные лаборатории и производители тест-систем в целях калибровки и выявления ошибок.

Метод изотопного разведения и масс-спектрометрия считаются первичными и наиболее чувствительными методами определения холестерина, результаты которых максимально близки к истинным. Референтный метод Абеля по сравнению с ними завышает результаты на 1.6 % [27]. Однако первичные методы еще более сложны и дороги даже по сравнению с ферментативными методами, поэтому к ним прибегают в исключительных случаях.

Неавтоматизированные ферментативные методы, в которых применяется хиноиновиновый краситель в роли хромогена, имеют проблемы с контрольной пробой при использовании липемичных сывороток. Хиноиновиновый краситель имеет тенденцию к адсорбции на стенках трубок, изготовленных из определенных материалов, например, из тигона, с последующей десорбцией и попаданием в другие образцы.

Результаты ферментативных методов также могут значительно различаться, что связано с процессом фотометрии, чаще всего проводящейся в диапазоне длин волн от 460 до 560 нм, в то время как максимум поглощения для продуктов реакции Триндера – при длине волны 500 нм.

Проблема неполного гидролиза эфиров холестерина некоторое время назад считалась главной в ферментативных методах определения холестерина, поскольку холестеринэстераза, полученная из разных организмов, имеет различное качество и специфичность, что явным образом влияет на реакцию гидролиза эфиров холестерина. Например, некоторые ферментативные тест-

системы имеют ограниченную чувствительность к эфирам холестерина и арахидоновой кислоты [28].

Холестеринэстераза, извлеченная из микробных образцов, катализирует гидролиз эфиров холестерина с эффективностью до 99,5% [29]. Другие эстеразы, содержащиеся в крови, становятся источником различий результатов анализа на 4–6% от общего содержания холестерина. Эти различия были выявлены при сравнении результатов ферментативных методов с результатами референтного метода. Решение указанной аналитической проблемы состоит в использовании калибраторов, изготовленных из сыворотки крови, для того, чтобы компенсировать неполный гидролиз эфиров холестерина в реакциях, катализируемой холестеринэстеразой [30]. К сожалению, данный прием далеко не всегда приводит к желаемым результатам, к тому же дополнительно усложняется вся процедура анализа.

Основные преимущества ферментативных методов можно свести к следующим пунктам

- отказ от агрессивных химических реактивов;
- исключительная специфичность ферментов значительно снижает влияние на аналитическую реакцию мешающих компонентов;
- возможность определять как свободный, так и эстерифицированный холестерин.

Вместе с тем у ферментативных методов имеются существенные недостатки, которые ограничивают их повсеместное использование. К ним относится высокая стоимость ферментов, которые извлекаются из биологических образцов животного происхождения, их нестабильность и склонность к денатурации (так как ферменты имеют белковую природу) с утрачиванием каталитических свойств и, как следствие, строгие условия хранения и требования к температуре и pH. Данные обстоятельства требуют выполнения строгих требований, предъявляемых к аналитическим

лабораториям, что приводит к общему удорожанию их обслуживания и необходимости высокой квалификации персонала.

1.2. Сенсорные и биосенсорные методы определения холестерина

Сенсором называют аналитическое устройство, генерирующее сигнал, несущий информацию о концентрации неорганических, органических и биологических соединений. Сенсор состоит из трансдьюсера и рецептора. Биосенсоры обычно содержат в качестве рецептора вещество биологической природы: фермент, целую ДНК либо ее фрагменты, антитела, антигены, бактерии и т.д. Рецептор непосредственно реагирует на определяемое соединение и генерирует сигнал, функционально связанный с его концентрацией, трансдьюсер передает этот сигнал в измерительное устройство [20].

Развитие электрохимических методов в области анализа биологически активных соединений привело к бурному развитию миниатюрных и дешевых приборов для определения холестерина. Начиная с 1956 года, когда профессор Кларк изготовил первый биосенсор с электрохимической детекцией аналитического сигнала, в последующие годы особым успехом в мировой науке пользуются электрохимические биосенсоры, сочетающие в себе простоту и чувствительность электрохимических методов анализа и высокие селективность и специфичность ферментативных методов. Благодаря простоте изготовления биосенсоры позволяют значительно снизить стоимость анализа и, одновременно, расширить возможности при рутинных лабораторных аналитических операциях. Явным преимуществом электрохимических биосенсоров в отличие от, например, оптических и других типов биосенсоров, является высокая точность определения содержания аналита в пробе благодаря тому, что расчет количества производится на основе измерения электрического тока, который можно измерить с очень высокой точностью, используя дешевые и компактные приборы.

По данным системы Scopus количество работ, связанных с разработкой сенсоров для определения холестерина, неуклонно растет начиная с середины 1990-х годов (рисунок 1.2). Повышенный интерес к этой тематике в мировой науке обуславливается необходимостью создания простых, миниатюрных, точных и высокопроизводительных приборов для применения в лабораторной диагностике с целью ее удешевления и большей доступности. В перспективе, такие миниатюрные приборы могут стать востребованными даже в домашнем применении.

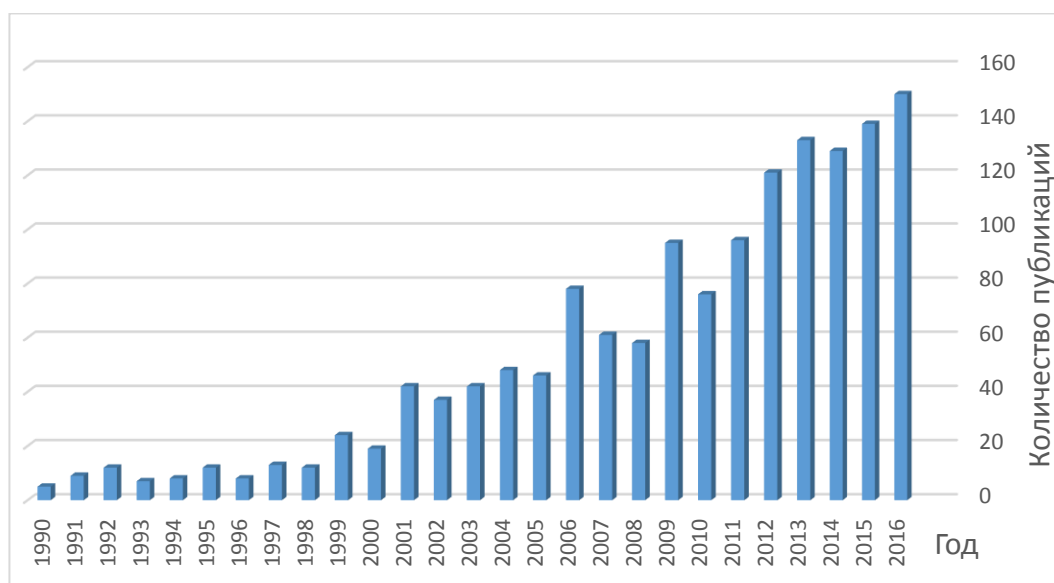


Рисунок 1.2 – Количество опубликованных работ по запросу “cholesterol biosensor” по годам. Данные системы Scopus.

В биосенсорах для определения холестерина используются 2 фермента: холестериноксидаза или, реже, цитохром P450. Дополнительно для гидролиза эстерифицированного холестерина в состав биосенсора иногда включают фермент холестеринэстеразу. Холестериноксидаза катализирует окисление холестерина растворенным в рабочем растворе молекулярным кислородом с образованием холест-4-ен-3-она и пероксида водорода. В качестве рецептора, чувствительного к пероксиду водорода, используют фермент пероксидазу хрена [19], берлинскую лазурь [31,32], электропроводящие полимеры [33,34], наночастицы металлов и их сплавов [35–39], углеродные наноматериалы [38,40–42]. Способ детекции аналитического сигнала в подавляющем большинстве случаев – амперометрический, единичные работы описывают

также биосенсоры на холестерин, выполненные на полевых транзисторах [43,44].

Несмотря на широкое разнообразие разработок, в большинстве электрохимических биосенсоров на холестерин источником аналитического сигнала служит пероксид водорода, образующийся в эквивалентном количестве в результате ферментативного окисления холестерина. По этой причине основные усилия разработчиков биосенсоров направлены на поиск трансдюсера, который был бы наиболее чувствителен именно к пероксиду водорода.

Один из важнейших факторов, влияющих на производительность биосенсоров, - тип иммобилизации фермента на трансдюсере. Иммобилизацию холестериноксидазы проводят методами физической адсорбции [36,39,45], ковалентного связывания [37,40,42], внедрением в слой ионной жидкости [38,46,47], гидрогеля [39], золь-гель мембраны [32] или электропроводящего полимера [19,33,34,48], «слой-за-слоем» (layer-by-layer) [41,49], с использованием пленок Лэнгмюр-Блоджет [50].

Наиболее простыми в изготовлении являются биосенсоры, содержащие только один фермент – холестериноксидазу. Однако, определение холестерина с их помощью сопряжены с дополнительными этапами подготовки биологического образца: необходимо отделить клетки от сыворотки, провести гидролиз эфиров холестерина. Эти этапы усложняют процедуру анализа и вносят дополнительную погрешность в результат.

Необходимость в отдельном этапе гидролиза эстрифицированного холестерина отпадает, если в состав биосенсора включить второй фермент – холестеринэстеразу. Такие биосенсоры более универсальны, их можно использовать в анализе цельной крови. Однако, наличие дополнительного фермента зачастую требует более строгих и жестких условий хранения биосенсора (низкая температура, контроль влажности и pH), уменьшает его срок годности и приводит к его удорожанию. Кроме того, на характеристики

биосенсора влияют способ иммобилизации ферментов, состав реакционной смеси.

Оригинальный подход к конструкции одноферментного биосенсора на холестерин на основе холестериноксидазы для анализа сыворотки крови описан в работе [32]. Авторам удалось сконструировать электрохимическое устройство, состоящее из соединенных токопроводящим материалом катода и анода. При этом оба электрода содержат в своем составе иммобилизованную холестериноксидазу. Образующийся в результате ферментативной реакции на катоде пероксид водорода электрокаталитически восстанавливается на пленке из берлинской лазури. На аноде также идет ферментативная реакция окисления холестерина, однако в данном случае происходит электронный обмен между активным сайтом фермента и фенотиразином. В результате образующийся на аноде избыток электронов перемещается на катод, обеспечивая тем самым реакцию на нем. Такой подход позволит создавать биосенсоры, для работы которых не нужны внешние источники питания.

Отдельно нужно отметить ряд работ, в которых в качестве чувствительного элемента используется другой фермент – цитохром P450. В отличие от холестериноксидазы, активным центром которой является система FAD/FADH₂ (флавинадениндинуклеотид) [51], в цитохроме P450 эту роль выполняет железный гем [52]. Процесс каталитического окисления субстрата молекулярным кислородом схематично представлен на рисунке 1.3.

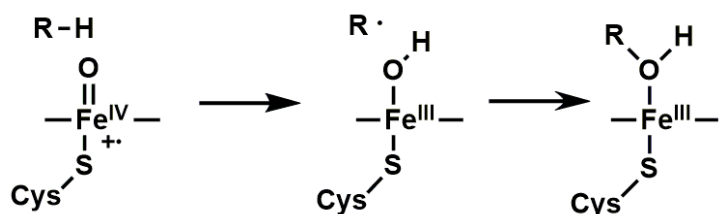


Рисунок 1.3 – Схематичное представление процесса каталитического окисления субстрата активным центром фермента Цитохром P450.

Если в качестве субстрата выступает холестерин, то его каталитическое окисление можно представить следующим образом (рисунок 1.4) [52]:

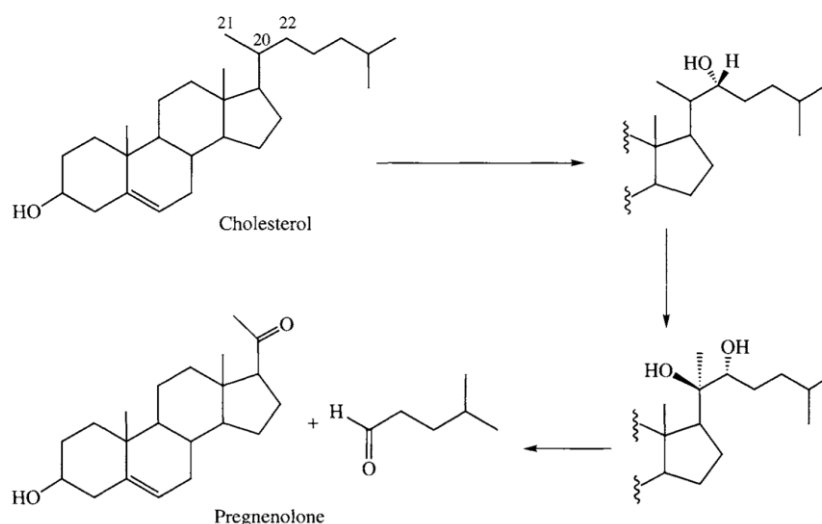


Рисунок 1.4 – Схема процесса каталитического расщепления холестерина при участии фермента цитохром P450.

Таким образом этот фермент имеет принципиально иной, нежели чем холестериноксидаза, принцип действия и, соответственно, продукты реакции, поэтому использование его в качестве чувствительной основы электрохимического биосенсора предполагает иной тип регистрации аналитического сигнала, в качестве которого выступает ток окисления железного гема с использованием медиатора переноса электронов рибофлавина. Амперометрические биосенсоры на основе такого подхода были изготовлены рядом авторов [53–55]. Однако, такие системы не получили широкого распространения вследствие сложности получения фермента цитохром P450, его низкой специфичности, то есть способности окислять не только холестерин, но и другие соединения в биологическом образце.

К сожалению, биосенсоры не лишены недостатков ферментативных методов определения холестерина, которые обуславливаются нестабильностью, склонностью к денатурации, высокой стоимостью и строгих условий хранения ферментов. Также значительные проблемы связаны с иммобилизацией ферментов на поверхности индикаторного электрода. Готовые биосенсоры пригодны к работе в течение достаточно ограниченного периода времени – всего лишь несколько месяцев при условии соблюдения

надлежащих условий хранения. Данные обстоятельства не позволяют повсеместно ввести биосенсоры в лабораторную практику и расширить количество медицинских учреждений, в которых можно было бы проводить анализ на содержание холестерина.

1.3. Катализаторы электрохимического окисления органических соединений

Исследование строения и механизмов действия каталитических центров ферментов по отношению к биологически активным веществам способствовало поиску и синтезу соединений, которые обладают похожими каталитическими и рецепторными свойствами. Благодаря не биологическому, а искусственному происхождению таких соединений, они доступнее, устойчивее и проще в эксплуатации, чем ферменты, поэтому их применение в качестве чувствительных элементов сенсоров представляет огромный научный, технический и медицинский интерес, в частности сочетание искусственных рецепторов с электрохимическими методами анализа. На сегодняшний день таких соединений открыто огромное множество, и их количество продолжает расти. Среди них соединения переходных (Ni, Co, Fe, Zn) и благородных металлов (Au, Ag, Pd, Pt): металлические наночастицы, соли и органические комплексы; углеродные наноматериалы: фуллерены, нанотрубки, графен; электропроводящие полимеры: полианилин, полипиррол, политиофен и др.; а также разнообразные сочетания указанных соединений.

Наиболее подходящими для решения задачи определения холестерина в биологических образцах без использования ферментов являются электрокатализаторы на основе органических комплексов никеля, соли никеля и кобальта и наночастицы золота и серебра различного состава.

1.3.1. Соединения никеля (II) и кобальта (II)

Известно, что переходные и благородные металлы имеют способность катализировать электрохимическое окисление неэлектроактивных или окисляющихся при больших перенапряжениях органических соединений. Огромный интерес представляют соединения никеля (II) и кобальта (II), которые являются катализаторами электрохимического окисления amino- и гидрокси- и тиосодержащих органических соединений. Нанесенные на поверхность различных электродов либо растворенные соединения никеля и кобальта позволяют определять в растворах электронеактивные соединения, к которым, в частности, относится холестерин.

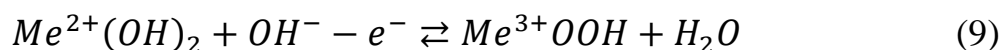
В современном электрохимическом анализе используются следующие классы соединений никеля (II) и кобальта (II): 1) оксиды и гидроксиды и 2) органические комплексные соединения [56–58].

1.3.2. Неорганические соединения никеля и кобальта

Среди опубликованных работ, посвященных исследованию электрокаталитических свойств неорганических соединений никеля и кобальта, наибольшее внимание уделяется синтезу и применению тонких пленок или наночастиц оксидов и гидроксидов этих металлов на поверхности рабочего электрода. Процессы электрохимического осаждения пленок $\text{Ni}(\text{OH})_2$ и $\text{Co}(\text{OH})_2$ во многом схожи [56,59,60]. В обоих случаях осаждение ведут из растворов солей этих металлов: нитратов, хлоридов и др. в буферных растворах на поверхности золотого [59], стеклоуглеродного [60,61], стального [62] и других электродов [63]. В работе [59] осаждение пленки $\text{Ni}(\text{OH})_2$ вели путем многократного сканирования потенциала рабочего электрода в диапазоне потенциалов от 0,0 до +1,0 В, причем в зависимости от количества циклов получались пленки различной толщины. Модифицированный таким образом рабочий электрод проявлял электрокаталитическую активность по

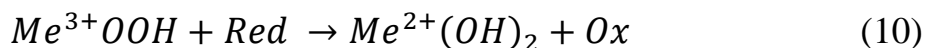
отношению к незамещенным аминокислотам в щелочной среде. Использование хроматографической колонки позволило увеличить чувствительность определения до $0,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Авторы работы [60] осаждали наночастицы $\text{Co}(\text{OH})_2$ на поверхности стеклоуглеродного электрода также путем многократного сканирования потенциала рабочего электрода в течение 4 минут, но в диапазоне потенциалов от -1,4 до 0,6 В. Полученный модифицированный пленкой гидроксида кобальта (II) электрод в щелочной среде проявляет электрокаталитические свойства по отношению к резорцину, что позволило определять его с пределом обнаружения $1,0 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

Механизмы электрокаталитической активности гидроксидов никеля (II) и кобальта (II) во многом схожи. Так, при наложении определенного потенциала или циклировании потенциала модифицированного электрода в среде NaOH идет образование оксогидроксиокомплекса:



где $\text{Me} = \text{Co}, \text{Ni}$.

Оксогидроксиокомплекс MeOOH в силу того, что металл находится в нем в степени окисления +3, обладает повышенной окислительной способностью по отношению ко многим органическим соединениям, таким как амины, спирты, тиолы [61,64]. Химическое окисление целевого соединения приводит к тому, что металл, принимая электрон, возвращается обратно в степень окисления +2:



где *Red* и *Ox* восстановленная и окисленная форма целевого соединения, соответственно. Возникающий в результате указанных реакций ток электронов через границу раздела электрод/раствор пропорционален концентрации целевого соединения, поэтому прирост анодного тока, регистрируемый после добавления в рабочий раствор аликвоты с определяемым соединением, можно использовать для его количественного определения.

Среди неорганических соединений никеля (II) и кобальта (II), используемых для модифицирования рабочего электрода, заслуживают особого внимания гексацианоферраты этих металлов [57]. Механизм электрокаталитического окисления органических соединений на таких электродах также связан с образованием оксогидрокомплексов никеля (II) и кобальта (II). Однако, наличие в модифицирующей пленке ионов железа в ряде случаев усиливает каталитический эффект. Модифицированные гексацианоферратом кобальта (II) и никеля (II) электроды успешно использовались для определения аскорбиновой кислоты [65], NADH [66], гидразина [67–69], тиосульфата, парахлорофенола [70], дофамина [71], эпинефрина, норэпинефрина [72].

1.3.3. Органические соединения никеля (II) и кобальта (II)

Органические соединения никеля (II) и кобальта (II), главным образом комплексы, нашли широкое применение в качестве катализаторов электрохимического окисления ряда органических соединений. Интерес к ним обусловлен возможностью изменять каталитическую активность и сродство к тому или иному соединению за счет варьирования типа и количества лигандов. Также важный момент состоит в том, что активные каталитические центры многих ферментов являются макроциклическими комплексами металлов, в частности никеля, например, уреазы [73], и кобальта, например, диметилмалатдигидрогеназа, нитрилгидратаза, этаноламинооксидаза [74]. Таким образом, синтетические органические комплексы металлов потенциально могут стать более доступными и эффективными аналогами природных ферментов в составе электрохимических сенсоров.

Известно, что электрохимически осажденные пленки на основе порфириновых и макроциклических комплексов никеля (II) и кобальта (II) проявляют электрокаталитическую активность по отношению к углеводам, спиртам, фенолам и их производным.

На основе порфиринов и трикетонатов никеля (II) были изготовлены сенсоры для определения мочевины и креатинина [75]. Электрокатализаторы были иммобилизованы на поверхности печатных одноразовых электродов методом капельного нанесения растворов комплексов в диметилсульфоксиде (ДМСО), диметилформамиде (ДМФА) или 1,2-диметоксиэтаноле (1,2-ДМЭ). Подготовку поверхности электрода проводили путем многократного сканирования потенциала в диапазоне 0-0,8 В. В результате удалось получить аналитический сигнал от мочевины и креатинина с пределом обнаружения $8,7 \cdot 10^{-6}$ и $2,7 \cdot 10^{-5}$ моль/л соответственно.

На настоящий момент синтезировано огромное количество металлофталоцианинов, электрокаталитическая активность которых активно изучается [58,76]. Варьируются заместители, материал рабочего электрода (стеклоуглерод, угольная паста, углеродсодержащие чернила, оксид индия-олова, пиролитический графит, золото и др.), способы иммобилизации комплексов на поверхности электродов (физическая адсорбция, (электро)полимеризация, электроосаждение, саморганизуемые монослои (SAM)), pH и способ фиксации аналитического сигнала (циклическая вольтамперометрия, дифференциально-импульсная вольтамперометрия, хроноамперометрия и др.).

В работе [77] авторы изучали электрохимические окисление цистеина и восстановление цистина на поверхности угольно-пастового электрода, модифицированного фталоцианинами железа (II), кобальта (II), никеля (II) и меди (II). Было установлено, что наилучшими характеристиками обладает комплекс кобальта (II). Предел обнаружения цистеина составил $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, цистина – $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Для создания органических комплексов металлов не обязательно использовать сложные синтетические методы, в ряде случаев удовлетворительные результаты можно получить, применяя доступные реагенты. Так, в работе [78] рабочие электроды были модифицированы комплексами никеля (II) с диметилглиоксимом двумя способами. Угольно-

пастовый электрод изготавливали путем смешивания готового комплекса с графитовой пастой; графитовый электрод модифицировали путем нанесения на поверхность сначала капли раствора диметилглиоксима в ацетоне, а после высыхания – капли водного раствора сульфата никеля (II). Полученные таким образом электроды проявляли значительную электрокаталитическую активность по отношению к метанолу и этанолу.

Электрополимеризацией комплекса Ni(II)-куркумин (куркумин – основной куркуминоид, входящий в состав корня куркумы) в щелочной среде авторы работы [79] модифицировали стеклоуглеродный электрод, который затем использовали для электрокаталитического определения глюкозы. С помощью циклической вольтамперометрии было показано, что присутствие глюкозы в рабочем растворе приводит к увеличению пика тока окисления Ni(II)/Ni(III). Предел обнаружения глюкозы при этом составил $0.1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

1.3.4. Наночастицы золота и серебра.

Современный этап развития электрохимии неразрывно связан с использованием наноструктурированных материалов, в том числе в области электроаналитических методов анализа, электрохимического катализа и преобразования энергии.

Наночастицы неорганической природы и гибридные органо-неорганические наноматериалы становятся объектом возрастающего интереса для прикладной и фундаментальной науки. В отличие от макрообъектов, наночастицы обладают рядом новых уникальных физико-химических свойств, в частности повышенной каталитической и реакционной способностями [80].

Экстремально малые размеры наночастиц обуславливают их повышенные удельную поверхность, электропроводность, адсорбционные свойства, что указывает на перспективность их использования в оптических, химических и электрохимических сенсорах. Применение наночастиц переходных и благородных металлов, в частности, наночастиц золота и

серебра, в качестве модификаторов электродов позволяет увеличить чувствительность определения широкого ряда аналитов, в том числе, электрохимически неактивных компонентов биологических тканей и жидкостей [81].

Благодаря разработанным простым методам получения наночастиц золота и серебра появилось большое число работ, посвященных их применению в качестве электрокатализаторов в амперометрическом бесферментном определении различных соединений, в том числе биологически активных [82–85]. Существует возможность варьировать размер, форму и состав наночастиц, что влияет на их электрохимические свойства [86]. В большинстве случаев наночастицы золота и серебра используют в конструкции биосенсоров для амперометрического определения пероксида водорода [84,87], являющегося продуктом ряда ферментативных реакций определяемых биологически активных соединений и кислорода. Высокая чувствительность наночастиц золота и серебра к пероксиду водорода позволяет использовать их в качестве трансдюсеров в биосенсорах на глюкозу, креатинин, ряд пестицидов, лекарственные средства, холестерин [88] и т.д. Известны работы, в которых наночастицы золота и серебра выступают в роли катализаторов электрохимического окисления определяемого вещества без использования ферментов, например глюкозы [89], кофеина [90], аргинина [91], дофамина [92], ДНК [93], этанола [94] и других соединений [83].

1.4. Полимеры с молекулярными отпечатками. Синтез и применение в анализе органических соединений

При создании методов и сенсоров для определения тех или иных соединений важной частью работы является обеспечение их чувствительности и селективности. В случае использования ферментов эта задача не стоит, так как фермент уже содержит в своем составе белковую часть, отвечающую за селективность, и кофермент, обеспечивающий химическое превращение

аналита и появление аналитического сигнала. В бесферментных методах и сенсорах задача обеспечения чувствительности решается, как правило, через использование электрокатализаторов и иных соединений, способных давать отклик в присутствии аналита. Обеспечение селективности в бесферментных методах и сенсорах требует создания материалов, способных к молекулярному распознаванию. В последние десятилетия наблюдается бурное развитие альтернатив ферментам в сфере распознавания различных соединений биологического и неорганического происхождения. Наиболее перспективным направлением в этой области на сегодняшний день являются технологии под общим названием «молекулярный импринтинг» (от англ. *molecular imprinting*, дословно – молекулярное впечатывание) [95,96].

1.4.1. Технология получения полимеров с молекулярными отпечатками

Молекулярным импринтингом называется создание распознающих сайтов в синтетических полимерах, где шаблон (атом, ион, молекула, комплекс или даже микроорганизм) применяется для создания полости внутри полимерной матрицы, которая по форме, размеру и энергии соответствует целевому компоненту. Таким образом распознающий сайт способен связывать исключительно то соединение, которое выступало шаблоном на стадии синтеза полимера [97,98]. Начиная с пионерских работ Полякова в 1930-х годах, в которых были использованы матрицы оксида кремния, методы дизайна, синтеза, анализа и применения полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) за последующие годы бурно развивались, привлекая внимание все большего количества исследователей. Количество публикаций по данной теме с тех пор неуклонно растет [99].

Целевой молекулой называют молекулу органического вещества, которое предполагается сорбировать и извлечь из смеси с другими, «мешающими», соединениями. Молекула-шаблон (или темплат) представляет

собой структурный аналог целевой молекулы или структуры переходного состояния, возникающего в ходе превращений целевой молекулы в полости высокоспецифичного центра связывания полимера.

Методы синтеза ПМО отражены на рисунке 1.4.

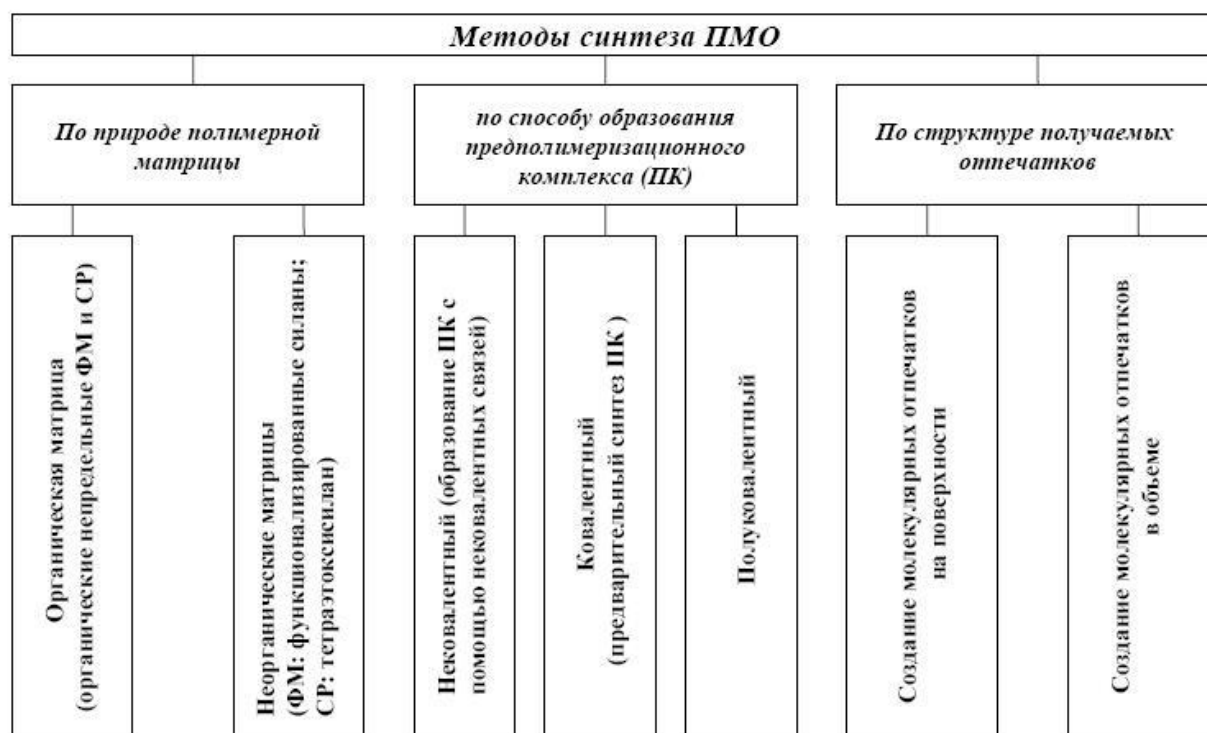


Рисунок 1.4 – Методы синтеза полимеров с молекулярными отпечатками (ФМ – функциональный мономер; СР – сшивающий реагент)

Полимерная матрица в ПМО может быть органическая, т.е. на основе органических мономеров, например, акриловой и метакриловой кислот, винилпиридина, винилимидазола, пиррола и др., и сшивающих агентов, например, этиленгликольдиметакрилата, дивилбензола и др. [98]; неорганическая – в основном на основе оксида кремния или титана, а также гибридная, состоящая, например, из органического мономера и сшивающего агента, укрепленных неорганической матрицей [100,101], или, наоборот, из микро- или наночастиц неорганического материала (металл, SiO₂ и т.д.), покрытых полимерной оболочкой [102–104].

По способу образования предполимеризационного комплекса и типа взаимодействия между целевой молекулой и функциональным мономером,

которое возникает при образовании ПК и при повторном связывании ПМО с целевой молекулой, методы синтеза ПМО можно разделить на 5 типов (рисунке 1.5):

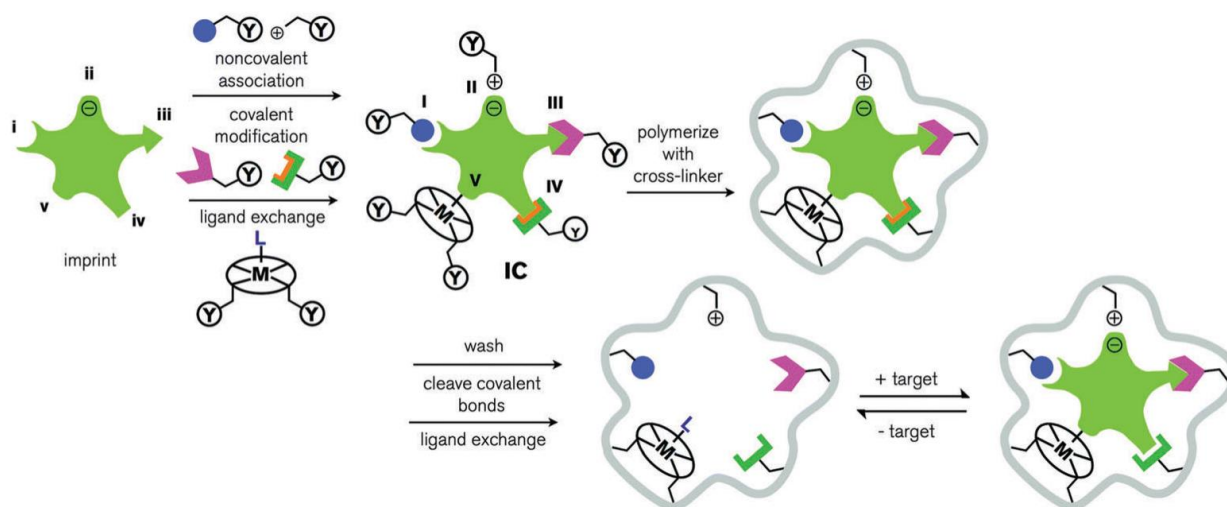


Рисунок 1.5 – Пять основных типов молекулярного импринтинга:

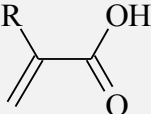
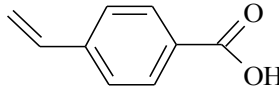
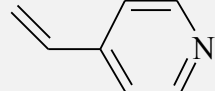
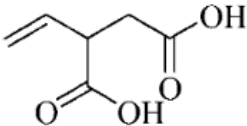
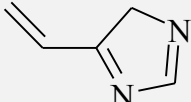
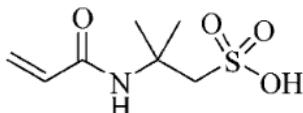
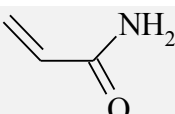
I. Нековалентный. II. Электростатический/ионный. III. Ковалентный. IV. Полуковалентный. V. Координационный.

1. *Нековалентный импринтинг* подразумевает взаимодействие функционального мономера (ФМ) с молекулой-шаблоном на основе сил Ван-дер-Ваальса, физической адсорбции, *электростатически-ионных* и *координационных* взаимодействий. Несмотря на непрочность подобных связей такой подход к синтезу обеспечивает множество точек связывания. Для синтеза достаточно смешать молекулу-шаблон с функциональным мономером и сшивающим агентом в подходящем порогенном растворителе (рисунок 4 (I, II)). Наиболее часто для нековалентного импринтинга используют производные метакриловой кислоты, винилбензойную кислоту, 4-винилпиридин и др. (таблица 3) [97].

2. *Ковалентный импринтинг* предполагает образование ковалентной связи между функциональным мономером и молекулой-шаблоном на этапах полимеризации и распознавания (рисунок 4 (III)). Преимущество ковалентного импринтинга в формировании однородных сайтов

распознавания при условии обратимости процесса образования и разрыва ковалентных связей в относительно мягких условиях.

Таблица 1.3 – Функциональные мономеры, часто используемые в синтезе ПМО нековалентным способом.

Функциональный мономер	Структурная формула мономера	Тип нековалентных взаимодействий между мономером и целевой молекулой
Акриловые кислоты (R= -H, -CH ₃ , -CF ₃ , -CH ₂ COOH)		Ион-ионные, водородные связи
Винилбензойная кислота		Ион-ионные, водородные связи
Винилпиридины, например, 4-винилпиридин		Ион-ионные, водородные связи, перенос заряда
Итаконовая кислота		Ион-ионные, водородные связи
Винилимидазолы		Ион-ионные, водородные связи
2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновая кислота		Ион-ионные, водородные связи, гидрофильное взаимодействие
Акриламид		Водородные связи

Основная задача, которую необходимо решить при постановке синтеза ПМО, состоит в подборе компонентов предполимеризационного комплекса, для которых может реализоваться вышеуказанное условие, а также может потребоваться дополнительные стадии химического модифицирования целевой молекулы для образования функциональных групп, образующих прочные ковалентные связи с полимером. Примерами ковалентного подхода

является синтез полимера с молекулярными отпечатками стигмастерола [105] и бисфенола-А [106].

3. *Полуковалентный импринтинг* (рисунок 1.5 (IV)) реализуется в том случае, когда предполимеризационный комплекс является результатом ковалентного связывания ЦМ и ФМ, ковалентная связь в процессе удаления темплата из полимера разрушается, а вторичное связывание полимера с целевой молекулой происходит за счет нековалентного взаимодействия [107].

4. *Лиганд-обменный импринтинг* – еще одна разновидность молекулярного распознавания, в котором в качестве ФМ используется соединение, содержащее в своем составе ион металла, например, Cu^{2+} [108,109], Pt^{2+} [110], способное образовывать координационную связь с шаблоном. Основная сложность состоит в синтезе подходящего мономера, поэтому этот подход получил пока лишь ограниченное применение.

К настоящему времени для синтеза ПМО наиболее широко используется метод полимеризации в массе. Процесс получения ПМО включает в себя несколько этапов [98,111–113]:

1. *Приготовление реакционной смеси — предполимеризационного комплекса (ПК)*. Смешивают шаблон, функциональный мономер, сшивающий агент, а также источник свободных радикалов (инициатор полимеризации) и порообразующий растворитель. В работах [114,115] авторы проанализировали различные соотношения концентраций шаблона, функционального мономера и сшивающего агента, обеспечивающие требуемые свойства ПМО. Обычно используется функциональный мономер в избытке по отношению к шаблону (в 4 и более раз) [115]. Количество сшивающего агента в реакционной смеси максимально и достигает 70-90% [116]. Основная функция сшивающего агента (СА) состоит в образовании жесткой полимерной сшитой матрицы, в которой сайты распознавания не подвергаются деформации в процессе использования ПМО. Для использования в качестве СА выбираются мономеры с двумя (этиленгликольдиметакрилат, ЭГДМА; дивинилбензол, ДВБ) или тремя (триметилпропан триметакрилат, ТРИМ) виниловыми

группами, обеспечивающими прочную двух- или трехмерную сшивку. Стандартное объемное соотношение мономера и порожденного растворителя составляет 3/4. Несмотря на то, что полярные растворители (например, хлороформ или дихлорметан) проявляют большую способность к порообразованию, в нековалентном импринтинге предпочтительнее менее полярные растворители, например, бензол, ацетонитрил, толуол, которые обеспечивают прочность ковалентных связей [115]. Диссоциирующие с выделением протонов растворители затрудняют полимеризацию и дестабилизируют водородные связи. По этой причине использование, например, метанола или воды в синтезе ПМО нежелательно.

2. *Реакция полимеризации.* ПМО чаще всего синтезируются методом свободнорадикальной полимеризации, который широко применяется в крупнотоннажном производстве пластмасс, так как существует возможность использования различных винилсодержащих мономеров (этилен, стирол, метакрилат и др.), а также из-за относительно мягких условий реакции, отсутствия особых требований к чистоте реагентов, а также низкой стоимостью мономеров, содержащих функциональные группы.

Механизм радикальной полимеризации состоит из трех стадий – инициации, роста полимерной цепи и терминации. Стадия инициации заключается в генерации свободных радикалов в реакционной смеси в процессе распада соединений-инициаторов. Мольное соотношение инициатора к функциональному мономеру не превышает 10^{-2} [115]. Распад наиболее часто используемых инициаторов азобисизобутиронитрила (АИБН), 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (ААРН) и перекиси бензоила на свободные радикалы происходит путем фотолиза (т.е. под действием ультрафиолетового излучения) или термолиза (нагреванием реакционной смеси до 50-75°C). УФ облучение предпочтительнее в случае нековалентного импринтинга, так как прочность водородных и ионных связей мономера с молекулами шаблона уменьшается с ростом температуры [117].

Реакция свободнорадикальной полимеризации винилсодержащих мономеров представлена на рисунке 1.6. В связи с тем, что кислород ингибирует процесс полимеризации, импринтингу обычно предшествует этап удаления кислорода путем пропускания через предполимеризационную смесь инертного газа (N_2 или Ar) или ультразвуковой обработки.

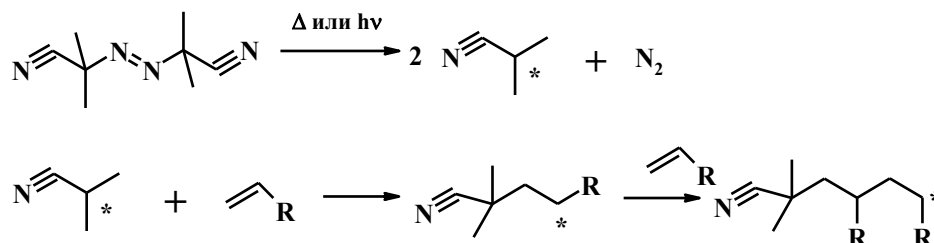


Рисунок 1.6 – Реакции распада молекулы АИБН с образованием свободных радикалов, инициации полимеризации и роста полимерной цепи.

3. *Измельчение ПМО.* Поскольку ПМО в основном используют в форме порошка микро- и наночастиц, образующийся жесткий пористый монолитный полимер необходимо механически размолоть. Гомогенизация по размеру проводится путем многократного просеивания полимерного порошка через сита с определенным размером пор и седиментации. Потеря полимерных материалов при этом могут составлять 50% и выше [118]. В хроматографии как правило используются частицы диаметром 25–38 мкм или мельче, для аналитических целей – диаметром приблизительно 25 мкм [119].

4. *Отмывка полимера.* Последний этап синтеза ПМО – удаление шаблона из молекулярных отпечатков. Выбор способа удаления шаблона определяется природой его связи с мономером. В ковалентном импринтинге разрушают химические связи, при нековалентном – многократно экстрагируют шаблон смесью органических растворителей. После вакуумной сушки частицы полимера могут храниться длительное время, не теряя сорбционных свойств.

Особенно важна возможность многократного использования полимерных частиц после регенерации и полного восстановления связывающих свойств. Устойчивость ПМО в кислых и щелочных средах,

органических растворителях, к высокой температуре и давлению обеспечивают их важные преимущества по сравнению с природными рецепторами: ферментами, антителами и др. [120]. Несмотря на высокий расход шаблона (от 50 до 500 мкмоль для синтеза 1 г сухого ПМО), значительную долю его молекул можно извлечь экстракцией и повторно использовать [121]. Были предприняты попытки разработки новых методов полного удаления шаблона [122], однако до сих пор они не увенчались успехом.

Помимо свободнорадикальной полимеризации предприняты попытки синтеза ПМО на основе несшитых электропроводящих полимеров, синтезируемых путем мягкого окисления мономера, чаще всего полипиррола, для селективной сорбции глутаминовой кислоты [123], L-лактата [124], камфорсульфоновой кислоты [125], клофибровой кислоты [126], доксицилина [127] и холестерина [128]. Преимуществами такого подхода являются более высокая, чем в случае свободнорадикальной полимеризации, скорость реакции, возможность синтеза импринтированного полимера электрохимическим окислением с контролем толщины полимерного слоя. Однако, широкого распространения указанный подход не получил из-за низкой сорбционной емкости получаемых полимеров – отсутствие сшивающего агента не позволяет получить прочные частицы со строго фиксированными порами.

1.4.2. Области применения полимеров с молекулярными отпечатками органических молекул.

1. *Твердофазная экстракция (ТФЭ) органических соединений из растворов и биологических жидкостей* [102,116,129–131]. Чаще всего ТФЭ проводят в динамических условиях, пропуская или прокачивая анализируемый раствор через микроколонку, концентрирующий патрон или диск, заполненный сравнительно малым количеством сорбента, что в свою очередь, требует меньшего расхода растворителей для последующей

десорбции сконцентрированных соединений и устраняет необходимость упаривания. Определение аналита чаще проводят хроматографическими методами. Большинство ПМО для ТФЭ синтезировано на основе метакриловой кислоты и ЭГДМА.

2. *Хроматографическое разделение органических соединений* [121,132–134].

3. *Высокоэффективная жидкостная хроматография*. ПМО уже довольно давно нашли свое применение в жидкостной хроматографии. Например, ПМО-хроматография не менее эффективнее аффинной хроматографии в процессе разделения стереоизомеров [135] по причине того, что концепция молекулярного импринтинга включает в себя энантиоселективность распознавания. Кроме того, возможен синтез ПМО-сорбентов в целях разделения смеси соединений с несколькими хиральными центрами. Примером может служить разделение дипептидов [136]. Также использование ПМО позволяет с успехом разделять изомеры некоторых углеводов [137].

4. *Капиллярная электрохроматография*. В капиллярной электрохроматографии ПМО выполняют роль высокоселективной неподвижной фазы. Этот метод с применением ПМО характеризуется улучшенным разрешением (примерно 100000 теоретических тарелок на метр) [138].

5. *Тонкослойная хроматография*. Мелкодисперсный порошок ПМО в смеси со связующим соединением, иммобилизированный на твердой подложке, используется в тонкослойной хроматографии для осуществления разделения некоторых хиральных соединений, например, производных аминокислот [139].

6. *Катализ* на основе синтетических полимеров успешно продемонстрирован для следующих типов реакций: альдольная конденсация, гидролиз эфиров, реакция Дильса–Альдера, дегидрофторирование, изомеризация [98].

7. *Сенсоры.* ПМО нашли широкое применение в изготовлении сенсоров для определения большого количества аналитов. Принцип действия ПМО-сенсоров аналогичен природным ферментам, только на преобразующий элемент вместо биомолекул наносится содержащий сайты молекулярного распознавания полимер [98].

1.4.3. Синтез ПМО на поверхности микро- и наночастиц.

Наряду с синтезом ПМО «в массе», в настоящее время все большее развитие получает направление, связанное с синтезом ПМО на поверхности нано-и микрочастиц [102,134,140–143]. Такой подход позволяет получить частицы с небольшим массовым распределением и с очень большой удельной площадью распознающего полимера, что позволяет избежать стадии перемалывания и просеивания полимера, на которой теряется большое количество ценного материала. Кроме того, появляется возможность изготовления сенсора, который будет содержать одновременно распознающий компонент – ПМО – и чувствительный компонент – катализатор.

Для данного подхода используются наночастицы оксида кремния [102,144–146], магнетита [141,147–151], золота [112,118,152], серебра [153], углеродных нанотрубок [154,155], предварительно модифицированные виниловыми группами золь-гель методами [156,157], графтингом [158–160] и другими способами. Модифицированные наночастицы затем диспергируют в подходящем растворителе, добавляют молекулу-шаблон, ФМ, СА, инициатор и проводят реакцию свободнорадикальной полимеризации.

Особо необходимо отметить, что использование в качестве ядра ферромагнитных наночастиц, например, магнетита, открывает широкие возможности для манипуляций наночастиц ПМО с помощью внешнего магнитного поля, начиная с простоты декантации на стадии отмывки полимера, заканчивая управляемыми перемещениями наночастиц.

1.4.4. Применение полимеров с молекулярными отпечатками в сенсорных устройствах.

Для применения ПМО в составе сенсорных устройств необходима иммобилизация частиц полимера либо синтез ПМО непосредственно на поверхности индикаторного электрода. ПМО, синтезированные свободнорадикальной полимеризацией, достаточно твердые и хрупкие из-за присутствия в них сшивающего реагента. Добавка пластификаторов в предполимеризационную смесь позволяет формировать полимер в достаточно тонкую и прочную мембрану без потери специфичности [112,161]. Для создания распознающего элемента на основе ПМО используется также электрохимическое осаждение на поверхности сенсора полимера из раствора его мономера в присутствии молекулы-шаблона [161,162], предварительное модифицирование поверхности электрода методами ковалентной пришивки [163,164] или самоорганизующихся слоев [165].

Наряду с простотой, высокой скоростью синтеза ПМО электрохимическим осаждением и контролируемостью толщины полимерного слоя, данный подход обладает рядом недостатков, препятствующих широкому распространению электрохимических сенсорных систем (в частности, амперометрических): 1) медленная диффузия определяемых веществ в/из полимера, что осложняет его регенерацию; 2) большое время отклика сенсоров; 3) неспецифическая адсорбция молекул как аналита, так и мешающих компонентов; 4) определение только электроактивных аналитов.

Опубликовано несколько работ [162,166,167], в которых предпринята попытка устранить последний недостаток, то есть появляется возможность определения электронеактивных соединений. С этой целью на поверхности индикаторного электрода электрохимически осаждают ПМО совместно с шаблоном, который потом вымывается. Растворенный в рабочем растворе электроактивный компонент, например, гексацианоферрат (III) калия $K_3[Fe(CN)_6]$, в отсутствие в рабочем растворе молекулы шаблона свободно

диффундирует через поры в полимере к поверхности электрода, что обуславливает амперометрический сигнал. Добавленная в раствор целевая молекула занимает поры в полимере, затрудняя тем самым доступ электроактивного компонента к поверхности электрода, тем самым обуславливая уменьшение регистрируемого тока в зависимости от концентрации целевой молекулы в растворе. Вместе с тем и этот подход имеет свои ограничения, так как все еще не решены проблемы медленной диффузии, большого времени отклика сенсора и его низкая специфичность.

1.4.5. Полимеры с молекулярными отпечатками и рецепторы холестерина

Недостатки электрохимических сенсоров на основе ферментов значительно ограничивают их применение в анализе реальных объектов. Для решения этих задач ведется поиск новых способов электрохимического детектирования холестерина, исключающих применение ферментов.

Так как определение холестерина является актуальной диагностической задачей, возможности его определения постоянно обогащаются новыми методами, в том числе и с использованием ПМО. На сегодняшний день создано большое количество ПМО холестерина.

В работе [133] описан синтез ПМО холестерина с применением свободнорадикальной полимеризации ковалентным и нековалентным методом. Полученные полимеры затем были использованы в хроматографическом определении холестерина. Авторами был сделан вывод, что ковалентный метод дает на выходе полимер, сорбционная емкость которого выше, чем полученного нековалентным импринтингом.

Синтез ПМО холестерина ковалентным методом может быть легче, чем для других соединений, благодаря способности холестерина образовывать эфиры. В связи с этим существует возможность синтезе эфиров холестерина, содержащих необходимые функциональные группы: метакриловую [105],

хлороформиатную [145], хитиновый остаток [168], гидрофильную группу для создания подобия поверхностно-активного вещества (ПАВ) [169], и даже достаточно экзотические [170]. Однако, все эти методы требуют дополнительного этапа синтеза и очистки модифицированной молекулы холестерина, что может приводить к удорожанию и усложнению синтеза ПМО холестерина.

Опубликован ряд работ с описанием изготовления электрохимических сенсоров для определения холестерина в воде с использованием электрохимически осажденного на поверхности индикаторного электрода ПМО холестерина [171,172]. Сочетая простоту изготовления и доступность используемых реактивов, такие сенсоры, однако, не нашли широкого применения вследствие низкой специфичности, так образующиеся полимерные цепочки имеют двухмерную структуру и не сшиты между собой, как в случае радикальной полимеризации с использованием сшивающих агентов.

В работе [173] был проведен анализ влияния природы сшивающего агента на сорбционную ёмкость синтезированного ПМО холестерина. Было показано, что смесь из 70% ЭГДМА и 30% ДВБ приводят к значительному увеличению сорбционной емкости полученного полимера по сравнению с полимерами, в синтезе которых использовался только один из указанных СА. Авторы связывают данный факт с реализацией различных конформаций холестерина в процессе синтеза ПМО, для каждой из которых определённый СА имеет различное сродство. Таким образом, в вопросе выбора реагентов для синтеза ПМО важное значение имеет в том числе и возможные конформации и формы молекулы-шаблона.

Определённый успех достигнут в вопросе создания ПМО холестерина, осажденного на поверхности частиц силикагеля [145,174], латекса [169], оксида железа [175] и др. Благодаря большой удельной поверхности таких ПМО холестерина эти частицы можно использовать как наполнители хроматографических колонок для извлечения холестерина. Однако, с другой

стороны, попытка применения их в составе электрохимических сенсоров успехом пока не увенчались, так как такие частицы неэлектроактивны.

Таким образом, исследования и разработки электрохимических бесферментных сенсоров для определения холестерина на основе катализаторов электрохимического окисления и полимеров с молекулярными отпечатками, не уступающих по чувствительности и селективности ферментам, но лишенных недостатков последних, представлены в литературе единичными публикациями. Тем не менее, указанные подходы имеют огромный потенциал в области создания компактных, простых и эффективных приборов для диагностики различных заболеваний, в которых повышенный или пониженный уровень холестерина является симптомом.

1.5. Постановка задачи

Из приведенных в обзоре литературы данных следует, что одним из перспективных направлений в определении холестерина в крови, тканях и пищевых продуктах является создание электрохимических сенсоров и методов с использованием электрокатализаторов на основе неорганических солей никеля (II) и кобальта (II), органических комплексов этих металлов, наночастиц золота и серебра. Применение в качестве селективного элемента сенсора или метода полимеров с молекулярными отпечатками позволит определять холестерин в присутствии мешающих компонентов, упростить методику определения и расширить возможности ее применения в небольших клиниках.

Решение поставленной задачи требует проведения следующих исследований:

1. Изучение влияния условий синтеза наночастиц золота и серебра, из состава и строения на их каталитическую активность в электрохимическом окислении холестерина.

2. Разработка методов создания эмульсии вода-тетрагидрофуран-ПАВ-холестерин, выбрать наиболее подходящее ПАВ (поверхностно-активное вещество) для создания стабильной и однородной эмульсии.
3. Выбор способа формирования аналитического отклика от металлических наночастиц в водно-органической эмульсии.
4. Исследование электрокаталитической активности наночастиц золота (AuНЧ), серебра (AgНЧ), наносплавов золото-серебро (Ag/AuНЧ) и наночастиц типа «ядро-оболочка» (Ag-AuNP и Au-AgNP), иммобилизированных на поверхности индикаторного электрода, в водно-органической эмульсии.
5. Исследование каталитических свойств роданида калия, солей никеля (II) и кобальта (II) в апротонной среде для электрохимического окисления и определения холестерина.
6. Испытание различных способов формирования аналитического отклика от роданида калия, солей никеля (II) и кобальта (II) в апротонной среде (ДМФА и ацетонитрил).
7. Исследование механизма передачи электронов между индикаторным электродом и электрокатализаторами, процессы их электрохимического взаимодействия с холестерином
8. Исследование механизма электрокаталитического окисления холестерина.
9. Исследование аналитических характеристик электрохимического определения холестерина, сравнение с природными ферментами.
10. Сравнение и выбор катализатора на основе наночастиц золота и серебра различного состава, хлоридов никеля и кобальта в апротонной среде и органических комплексов никеля (II), способных генерировать выраженный и стабильный сигнал окисления холестерина.
11. Изучение связывающей способности полимеров с молекулярными отпечатками холестерина;

12. Оптимизация условий регистрации аналитического сигнала и разработка методик определения холестерина в модельных растворах и биологических жидкостях с высокими аналитическими и метрологическими характеристиками.
13. Создание аппаратной платформы для экспрессного селективного определения холестерина в модельных растворах.

Глава 2. Аппаратура и техника эксперимента

2.1. Оборудование и средства измерений

Вольтамперометрические и хроноамперометрические исследования проводили с использованием потенциостата/гальваностата Metrohm Autolab PGSTAT128N (Metrohm AG, Нидерланды). Применяли трехэлектродную электрохимическую ячейку с рабочим объемом 10 см³. Рабочим электродом служил вращающийся дисковый электрод Ametek PAR Model 616A с платиновым наконечником Pine AFT3T050PT ($S_{\text{геом.}}=0.196$ см²) в стационарном режиме и режиме вращения с контролируемой скоростью, дисковые платиновый и стеклоуглеродный электроды производства Metrohm (Нидерланды) ($S_{\text{геом.}}=0.07$ см²). В качестве вспомогательного электрода использовали стеклоуглеродный стержень или палладиевую проволоку. В качестве электрода сравнения использовали Ag/AgCl с двумя мембранами («Metrohm», Швейцария) или серебряную проволоку. В работе значения потенциалов в апротонных средах (ДМФА и ацетонитрил) указаны относительно ферроценового стандарта (редокс-потенциал пары Fc/Fc⁺ принят за 0 В).

Все водные растворы готовили с использованием деионизированной воды, полученной перегонкой водопроводной воды в комбинированной мембранной установке для получения деионизированной воды с удельным сопротивлением до 18 МОм•см серии ДВС-М/1НА(18)-N производства ЗАО НПК «Медиана-фильтр», Москва.

Взвешивание навесок проводили на аналитических весах Shimadzu AUX220 (Япония) 1-го класса точности.

Синтезы наночастиц проводили с использованием магнитной мешалки с подогревом (модель «IKA RCT basic», Германия) для поддержания постоянной температуры реакционной смеси и с использованием верхнеприводной мешалки IKA Euro-ST D.

Коллоидные растворы наночастиц разделяли на ультрацентрифуге с охлаждением Sartorius Sigma 3-30K (Германия) со скоростью 20000 об/мин.

Суспензии наночастиц получали при помощи автоматического ультразвукового диспергатора Ultrasonic Processor Model GEX 500 (США).

Микрофотографии образцов частиц ПМО были получены с использованием сканирующего электронного микроскопа Carl Zeiss AURIGA CrossBeam (Германия).

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

Селективное определение холестерина осуществляли с использованием одноразовых миллифлюидных плашек μ -Slide III³ⁱⁿ¹ производства ibidi (США) и перистальтического насоса S-32 (Польша) со скоростью потока 5 мкл/с.

2.2. Реактивы и приготовление растворов

В качестве электрохимического катализатора использовались хлорид кобальта (II) (х.ч., Россия) и хлорид никеля (II) (х.ч., Россия). Навеску катализатора растворяли в 10 мл ацетонитрила (АН, 99,8%, Panreac, Испания) или ДМФА (99,8%, Panreac, Испания), предварительно осушенного и перегнанного, содержащим 0,1 М перхлората лития (ПЛ, LiClO₄, 99%, Acros Organics, США) в качестве индифферентного электролита.

В качестве фонового электролита использовали 0,25 М раствор NaOH (ч.д.а., «Вектон», Санкт-Петербург).

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

Используемые ПАВ: Тритон X-100 (неионогенное, Sigma-Aldrich, США), лаурилсульфат натрия (ЛСН, анионное, х.ч., Россия), цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ, катионное, х.ч., Россия).

В качестве исследуемого вещества (аналита) использовали холестерин (95%, Sigma-Aldrich, США). Раствор холестерина в ацетонитриле и ДМФА готовили путем растворения точной навески.

Для синтеза наночастиц золота и серебра термохимическим методом использовались нитрат серебра (НС, AgNO_3); тетрахлоороаурат калия (ТХАК, KAuCl_4); цитрат натрия (ЦН ос.ч., Россия).

Для синтеза наночастиц магнетита использовались хлорид железа (III) шестиводный (98,0-102%, Sigma-Aldrich, Германия), хлорид железа (II) четырехводный (99%, Sigma-Aldrich, Германия) и гидроксид аммония (ос.ч. «23-5», Сигма Тек, Россия). Покрытие наночастиц магнетита оксидом кремния и синтез наночастиц оксида кремния проводились с применением тетраэтоксисилана (ТЭОС, 98%, Aldrich, Германия). Модификация полученных наночастиц виниловыми группами проводилась с применением трис(2-метоксиэтокси)(винил)силана (ТМВС, 98%, Aldrich, США). Синтез полимеров с молекулярными отпечатками вели с использованием 4-винилпиридина (4-ВП, 95%, США) в качестве мономера, этиленгликольдиметакрилата (ЭГДМА, 98%, Германия) и дивинилбензола (ДВБ, 80%, Alfa Aesar, Великобритания) в качестве сшивающих агентов, альфа,альфа-азобисизобутиронитрила (АИБН, Mody Chemie, Индия) в качестве инициатора.

2.3. Методика эксперимента

Методика синтеза наночастиц золота и серебра термохимическим методом. *Тип 1. Наночастицы индивидуальных металлов золота (AuNC) и серебра (AgNC).* Синтез проводили по методике Френса [82]. К 20 мл кипящего 0.01%-ного водного раствора ТХАК или НС добавляли 1%-ный

раствор ЦН (стабилизационный агент и одновременно восстановитель) при постоянном перемешивании. Раствор постепенно приобретал желтую (наночастицы серебра) или рубиново-красную (наночастицы золота) окраску. Золю перемешивали еще 20 мин и охлаждали до комнатной температуры.

Тип 2. Наночастицы типа ядро–оболочка серебро на золоте Ag–AuНЧ и золото на серебре Au–AgНЧ. Наночастицы получали, используя в качестве ядер наночастицы AuНЧ или AgНЧ. К 20 мл кипящего золя AuНЧ или AgНЧ добавляли 20 мл 0.01%-ного раствора НС или ТХАК соответственно, затем добавляли 1%-ный раствор цитрата натрия в пятикратном избытке по отношению к НС или ТХАК при постоянном перемешивании, выдерживали при нагревании еще 20 мин и охлаждали до комнатной температуры.

Тип 3. Наночастицы типа наносплав серебра и золота (Ag+Au)НЧ. Наносплав готовили путем смешивания растворов НС и ТХАК в соотношении согласно табл. 1, затем добавляли 1%-ный раствор ЦН в пятикратном избытке по отношению к суммарной концентрации двух металлов.

Тип 4. Наночастицы серебра, синтезированные электрохимическим методом (эAgНЧ). В электрохимическую трехэлектродную ячейку помещали 10 мл 0.1 М раствора нитрата калия (индифферентный электролит) и 8.5 мг нитрата серебра. На СУЭ накладывали постоянный потенциал 0.3 В (отн. Ag/AgCl) в течение 120 с для электрохимического осаждения наночастиц серебра на поверхности.

В табл. 1 приведены составы полученных наночастиц золота и серебра. Полученные таким образом золи использовали для модификации электродов: на поверхность электрода наносили 5 мкл золя соответствующего типа и высушивали на воздухе 20 мин при комнатной температуре.

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

Электрохимическое определение холестерина проводили с использованием модифицированного наночастицами золота и серебра стационарного дискового СУЭ по следующей схеме:

1. Предварительно готовили поверхность модифицированного электрода путем многократной регистрации циклических вольтамперограмм (ЦВА) в 10 мл 0.25 М раствора NaOH в диапазоне потенциалов от -1 до 1 В. Скорость сканирования 100 мВ/с. Для полного формирования рабочей поверхности достаточно 60 циклов.
2. Электрод переносили в эмульсию вода–NaOH–ТГФ–ПАВ. Регистрировали вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от -1 до 1 В. Скорость сканирования 100 мВ/с.
3. Регистрировали вольтамперограмму или хроноамперограмму при потенциале, выбранном на полученной ЦВА, в течение 2 с.
4. Вводили в рабочий раствор 100 мкл 5 мМ раствора холестерина в ТГФ, перемешивали и регистрировали вольтамперограмму или хроноамперограмму в течение 2 с.
5. Содержание холестерина ($c_{\text{обр}}$, мкМ) определяли по приросту пика анодного тока по следующей формуле:

$$c_{\text{обр}} = c_{\text{доб}} \left(\frac{\Delta I_{\text{обр}}}{\Delta I_{\text{доб}}} \right) \left(\frac{V_{\text{доб}}}{V_{\text{обр}}} \right), \quad (11)$$

где $\Delta I_{\text{доб}}$ – ток окисления наночастиц, полученный после введения в раствор стандартной добавки холестерина, мкА; $\Delta I_{\text{обр}}$ – ток окисления наночастиц, полученный в присутствии стандартной добавки холестерина (образца), мкА; $c_{\text{доб}}$ – концентрация стандартной добавки холестерина, мкМ; $V_{\text{доб}}$ – объем стандартной добавки холестерина, вводимой в ячейку, мкл; $V_{\text{обр}}$ – объем второй стандартной добавки (образца), вводимой в ячейку, мкл.

Методика определения холестерина в ацетонитриле и ДМФА с использованием хлоридов кобальта (II) и никеля (II) и роданида калия.

Циклические вольтамперограммы на стационарном и вращающемся дисковом платиновом электроде регистрировали в диапазонах потенциалов от -0,33 до +1,67 В отн. Fc/Fc⁺. Исследования с использованием вращающегося дискового электрода (ВДЭ) проводились в диапазонах скоростей вращения ω от 0 до 2400 об./мин.

Вольтамперометрическое определение холестерина проводили с использованием стационарного дискового платинового электрода по следующей схеме:

1. Растворы с концентрацией катализатора 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 40 мкмоль/л готовили путем растворения точной навески в растворителе (ацетонитрил или ДМФА) с последующим разбавлением.
2. Регистрировали вольтамперограммы с линейной разверткой потенциала в 10 мл раствора фонового электролита с линейной разверткой потенциала от 0.3 В до 1.7 В отн. Fc/Fc⁺. Скорость сканирования 100 мВ/с (если не указано иное).
3. Регистрировали вольтамперограммы в 10 мл раствора фонового электролита в присутствии катализатора нужной концентрации с линейной разверткой потенциала.
4. Вводили в рабочий раствор нужный объем раствора холестерина в соответствующем растворителе. После каждой порции раствор перемешивали и регистрировали вольтамперограмму.
5. Содержание холестерина ($C_{обр}$, мкМ) определяли по приросту пика анодного тока по следующей формуле 11.

Синтез полимеров с молекулярными отпечатками холестерина на поверхности наночастиц магнетита (ПМО-МНЧ) и оксида кремния (ПМО-ОКНЧ).

На первом этапе проводили синтез наночастиц магнетита (МНЧ) и оксида кремния (ОКНЧ), покрытых виниловыми группами.

Синтез ОКНЧ вели по методу Штобера [176]. В круглодонную колбу вместимостью 100 мл, снабженной магнитной мешалкой, внесли смесь 9 мл 25% раствора аммиака и 50 мл этанола. К этой смеси медленно при перемешивании добавили раствор 5 мл тетраэтоксисилана (ТЭОС) в 30 мл этанола. Полученную смесь перемешивали 8 часов. Получившийся белый порошок наночастиц SiO_2 отделяли от жидкости с помощью центрифуги в течение 10 минут со скоростью 10000 об/мин, промывали 3 раза этанолом и 2 раза дистиллированной водой. Затем порошок сушили при температуре 100°C в течение 12 часов.

После этого наночастицы SiO_2 модифицировали с целью их покрытия виниловыми группами. Для этого 0,1 г наночастиц SiO_2 диспергировали в 20 мл толуола, добавляли 2 мл ТМВС и полученную суспензию кипятили с обратным холодильником в течение 10 часов. Получившиеся винил-модифицированные наночастицы SiO_2 отделяли с использованием центрифуги, промывали толуолом и сушили при комнатной температуре 24 часа.

ПМО холестерина синтезировали на поверхности винил-модифицированных наночастиц SiO_2 следующим способом. 0.1 г модифицированных наночастиц SiO_2 диспергировали с помощью ультразвукового воздействия в 25 мл толуола, добавляли 0.0164 г АИБН (инициатор полимеризации) и выдерживали при температуре 0°C 12 часов для того, чтобы АИБН сорбировался на поверхности наночастиц, где преимущественно в дальнейшем будет протекать полимеризация. Параллельно с этим готовился предполимеризационная смесь путем растворения в 25 мл толуола 0.5 ммоль (0.1933 г) холестерина и 2.5 ммоль

функционального мономера. Полимеризационную смесь после этого выдерживали в темном месте 12 часов для образования предполимеризационного комплекса. После выдерживания оба раствора смешивали в круглодонной колбе вместимостью 100 мл, добавляли 10 ммоль сшивающего агента (ДВБ или ЭГДМА) и грели на глицериновой бане с обратным холодильником и постоянным перемешиванием в течение 6 часов при температуре 50°C, затем 20 часов при температуре 60°C и 6 часов при температуре 75°C. В процессе полимеризации дисперсия белого цвета постепенно приобрела оранжевый цвет.

Полученные частицы ПМО холестерина отделяли в центрифуге, затем проводили извлечение холестерина в экстракторе Сокслета с использованием ТГФ в качестве растворителя. После 40 циклов промывки порошок высушивали в течение 24 часов при комнатной температуре, затем в течение 6 часов при температуре 80°C.

Синтез наночастиц магнетита вели методом соосаждения. 0.01 моль $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 0.02 моль $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворили в 80 мл деионизованной воды. В этот раствор добавляли по каплям 10 мл 25% раствора аммиака и перемешивали с использованием верхнеприводной мешалки в течение 45 минут. После этого получившийся черный порошок отделяли от реакционной смеси с помощью магнита и многократно промывали водой до полного удаления непрореагировавших компонентов.

Модифицирование наночастиц магнетита виниловыми группами проводили так же, как и наночастицы SiO_2 . Промывали 3 раза этанолом и водой, сушили 24 часа при комнатной температуре.

Синтез ПМО холестерина на поверхности винил-модифицированных наночастиц магнетита и последующую отмывку вели таким же способом, что и на поверхности наночастиц SiO_2 с той разницей, что вследствие более высокой плотности магнетита по сравнению с SiO_2 использовали навеску наночастиц 0.2 г.

Глава 3. Исследование каталитической активности хлоридов кобальта (II) и никеля (II) и тиоцианата калия в апротонной среде

Исходя из литературных данных, можно сделать вывод, что электрохимическое окисление органических соединений возможно при использовании катализатора в растворенном виде. Данный вид электрокатализа имеет явные преимущества по сравнению с использованием электрокатализатора, иммобилизованном на поверхности электрода. Во-первых, поверхность рабочего электрода более воспроизводима в случае объемного электрокатализа, соответственно есть возможность длительного использования одного электрода в процессе анализа. Во-вторых, диффузионный характер электрохимической реакции обеспечивает максимальное количество активных каталитических центров на поверхности электрода в течение длительного времени, в то время как в процессе эксплуатации сенсора с иммобилизованным на поверхности рабочего электрода катализатором количество активных центров уменьшается, что приводит к полной неработоспособности сенсора. В-третьих, определение холестерина в водосодержащих средах сопряжено с рядом трудностей, связанных с нерастворимостью его в воде; эти проблемы успешно решаются за счет использования для приготовления рабочего раствора органических растворителей, имеющих высокую растворяющую способность по отношению к холестерину.

Для разработки метода электрохимического окисления и определения холестерина в неводной апротонной среде были выбраны растворители, которые не являются легколетучими и высокотоксичными и в которых холестерин растворяется: диметилформамид и ацетонитрил. В качестве потенциальных электрокатализаторов были выбраны хлориды кобальта (II) и никеля (II) и тиоцианат калия из-за их ярковыраженных каталитических

свойств. В ДМФА растворяются и хлориды кобальта (II) и никеля (II) и тиоцианат калия, в ацетонитриле растворим только хлорид кобальта (II).

3.1. Электрохимическое окисление холестерина в присутствии хлорида кобальта (II) в среде ацетонитрила

На рисунке 3.1 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на платиновом электроде в 0.1 М растворе LiClO_4 в АН в отсутствии и в присутствии хлорида кобальта (II) и холестерина.

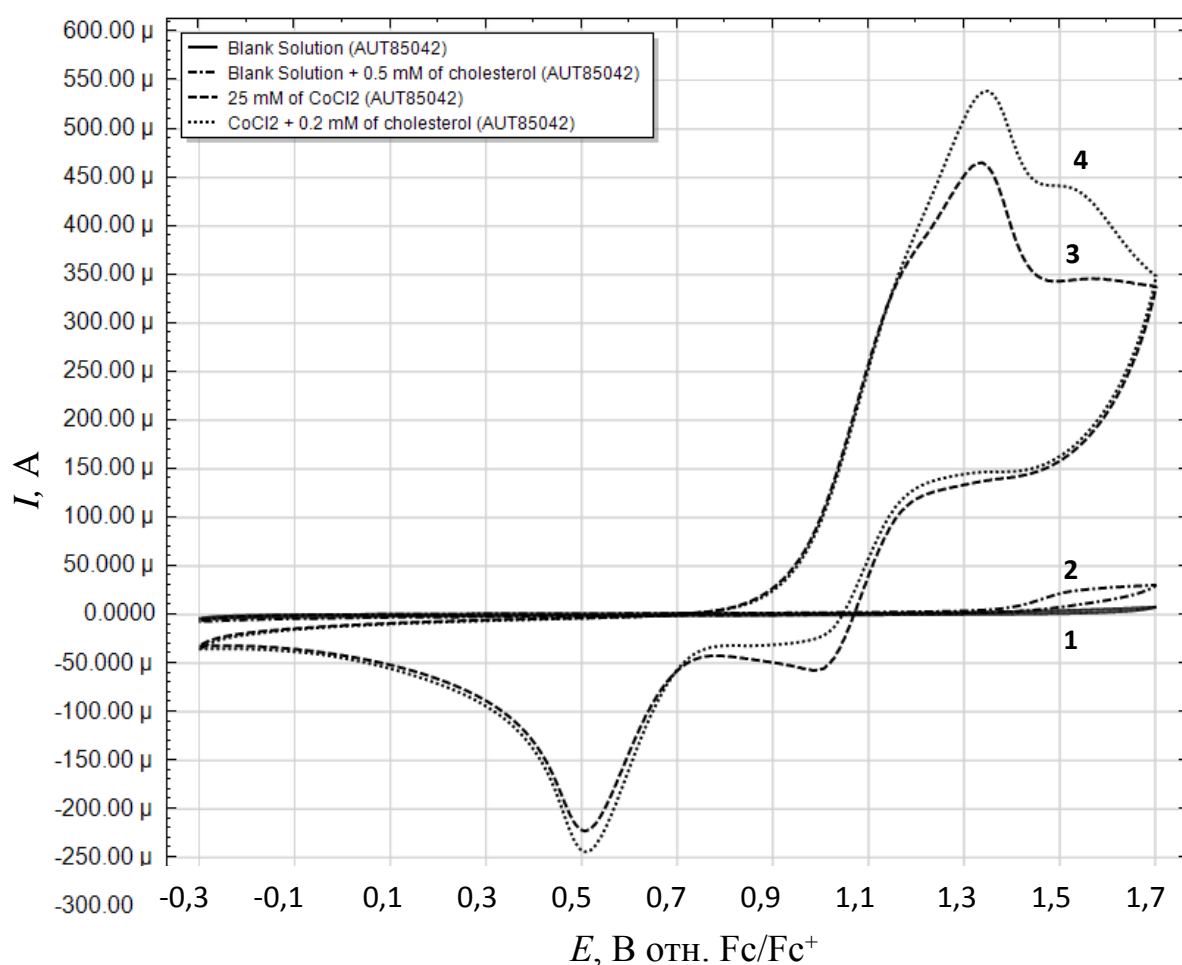


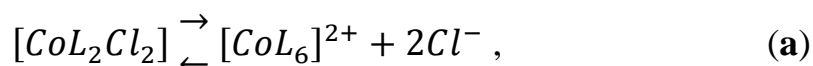
Рисунок 3.1 – Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на платиновом электроде в фоновом электролите - 0,1 М растворе LiClO_4 в АН (1), фон + 0,5 мМ холестерина (2), фон + 25 мМ CoCl_2 (3) и фон + 25 мМ CoCl_2 + 0,2 мМ холестерина (4). Скорость сканирования потенциала 100 мВ/с.

Вольтамперограммы 1 и 2 зарегистрированы в ацетонитриле в отсутствии и присутствии 0.2 мМ холестерина соответственно (без катализатора). Из рисунка видно, что при потенциале около 1.47 В ЦВА 2 имеет заметную слабовыраженную волну, отвечающую, по-видимому, процессу электроокисления холестерина.

На ЦВА, зарегистрированной в растворе CoCl_2 (кривая 3), присутствует пара анодных и катодных пиков при потенциалах 1,35 В и 0,50 В соответственно, относящихся, очевидно, к паре Co(II)/Co(III) . Слабовыраженные анодный при 1.47 В и катодный при 1.0 В пики, вероятно, так же относятся к паре Co(II)/Co(III) . По-видимому, их появление обусловлено реакцией комплексообразования между катионом кобальта, хлорид-ионами и молекулами ацетонитрила [177].

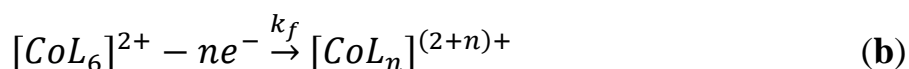
Электрохимическое поведение CoCl_2 в АН

Согласно литературным источникам [177], хлорид кобальта (II) в ацетонитриле присутствует в двух формах: $[\text{CoCl}_2\text{L}_2]$ и $[\text{CoL}_6]^{2+}$, между которыми устанавливается равновесие (а), причем электроактивным является преимущественно комплекс $[\text{CoL}_6]^{2+}$.



где L – лиганд ацетонитрил CH_3CN .

При наложении потенциала у поверхности индикаторного электрода протекает электрохимическая реакция (b) (рисунок 2, кривые 3).



где L_n – сольватная оболочка вокруг катионов кобальта, состоящая из n молекул ацетонитрила, k_f – константа скорости прямой электрохимической реакции. На первый порядок реакции (b) указывает прямолинейность зависимости $i_d^{-1} \text{ vs. } \omega^{-\frac{1}{2}}$ (i_d – значение предельного диффузионного тока при некоторой скорости вращения электрода ω рассчитанное уравнение $i_d^{-1} =$

$2,48 \cdot 10^{-4} \omega^{-\frac{1}{2}} + 7,36 \cdot 10^{-4}$, $R^2 = 0.98$) в диапазоне ω от 25 до 2400 об./мин. Первый порядок реакции означает, в частности, что концентрации ацетонитрила и хлорид-ионов остаются постоянными в течение электрохимической реакции. В этом случае у поверхности индикаторного электрода равновесие (**a**) смещается в сторону продуктов из-за снижения концентрации комплекса $[\text{CoL}_6]^{2+}$.

Расчет количества электронов n , участвующих в электрохимической реакции, и коэффициента диффузии D электроактивного комплекса кобальта (II) проводили по уравнению Левича (2) и по уравнению Коттрелля (3) с использованием ВДЭ с вращением и без вращения [178]:

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

$$i = nFC^*D^{\frac{1}{2}}\pi^{-\frac{1}{2}}t^{-\frac{1}{2}} \quad (3)$$

где i_d – плотность предельного диффузионного тока, А/см²; ν – кинематическая вязкость жидкости, для ацетонитрила 0.004536 см²/с [178]; ω – скорость вращения ВДЭ, рад/с; F – постоянная Фарадея, 96485.3 Кл·моль⁻¹; C^* – концентрация CoCl_2 в объеме раствора, моль·л⁻¹; t – время, с; π – число пи, 3,14.

Для расчета D и n были зарегистрированы вольтамперограммы с линейной разверткой потенциала от 0 до 1.7 В при скоростях вращения электрода от 25 до 2400 об./мин и концентрации CoCl_2 25 мМ (рисунок 3.2 А). Зависимость i от $t^{-1/2}$ (рисунок 3.2 В) была получена после перестройки хроноамперограммы, зарегистрированной с использованием стационарного дискового платинового электрода в ячейке, содержащей фоновый электролит и 25 мМ CoCl_2 при потенциале 1,37 В.

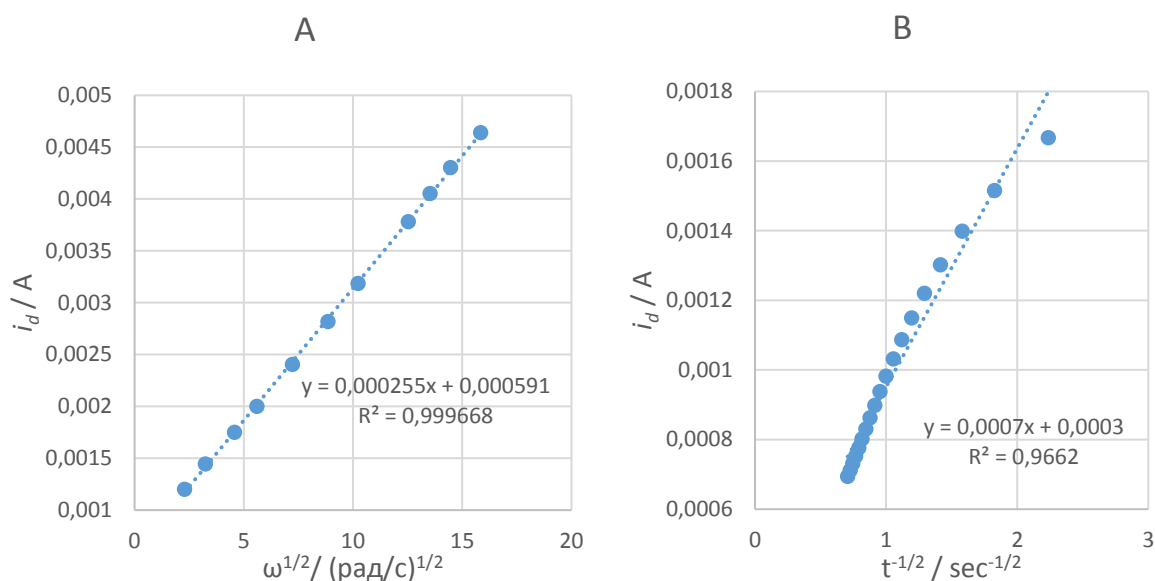


Рисунок 3.2 (А) – Зависимость i_d vs. $\omega^{1/2}$, полученная из вольтамперограмм с линейной разверткой потенциала на платиновом ВДЭ в растворе CoCl_2 в ацетонитриле в диапазоне от -0.3 до 1.7 В (скорость сканирования потенциала 50 мВ/с), и (В) – Зависимость i от $t^{-1/2}$, полученная из хроноамперограммы при $E=1.37$ В в течение 60 с. Концентрация CoCl_2 25 мМ.

После подстановки в уравнения (2) и (3) полученных экспериментально значений $\frac{di}{dt^{-1/2}}$ и $\frac{di_d}{d\omega^{1/2}}$ были рассчитаны $D = 6.88 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$ и $n = 0.96$. Таким образом электрохимическая реакция окисления кобальта (II) у поверхности индикаторного электрода проходит с участием одного электрона, и конечный продукт этой реакции, по-видимому, – катион Co^{3+} .

Таким образом можно сделать вывод, что в процессе электроокисления хлорида кобальта (II) в среде ацетонитрила участвует один электрон, поэтому уравнение электродной реакции (b) можно представить в следующем виде:

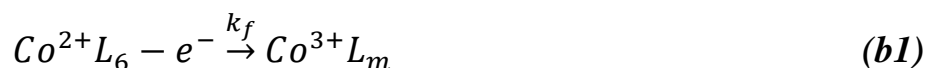


Схема электрокаталитического окисления холестерина. Кинетика окисления холестерина.

Электроокисление молекулы холестерина может протекать по гидроксогруппе (1), по двойной связи (2), в аллильном положении (3) и по третичному атому углерода (4) (схема 3.1) [179].

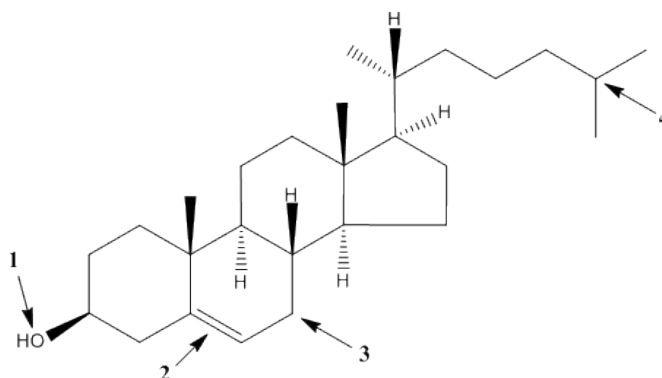


Схема 3.1 – Структурная формула холестерина. Стрелками указаны участки молекулы, которые могут подвергаться электроокислению.

Окисление в положении 4 требует достаточно жестких условий [179], и, скорее всего, не протекает в рассматриваемой в данной работе системе. Для установления возможной схемы процесса электрокаталитического окисления холестерина были зарегистрированы ЦВА CoCl_2 в АН с добавлением холестерина хлороформиата, который представляет и себя молекулу холестерина, в которой $-\text{OH}$ группа защищена неокисляемой $-\text{OSoCl}$ группой. Прирост тока в присутствии 25 мкМ холестерина хлороформиата в рабочем растворе катализатора по сравнению с фоном соизмерим с приростом тока окисления Co^{2+} , зарегистрированным в присутствии такого же количества холестерина. Таким образом, можно предположить, что реакция электрокаталитического окисления холестерина идет преимущественно в положениях 2 и/или 3. Данный факт указывает на возможность применения предлагаемого метода для определения не только свободного холестерина, но и его эфиров.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно схематично предложить следующий возможный путь протекания

реакции электрокаталитического окисления холестерина с участием хлорида кобальта (II) в качестве электрокатализаторов в ацетонитриле на платиновом электроде (рисунок 3.3):

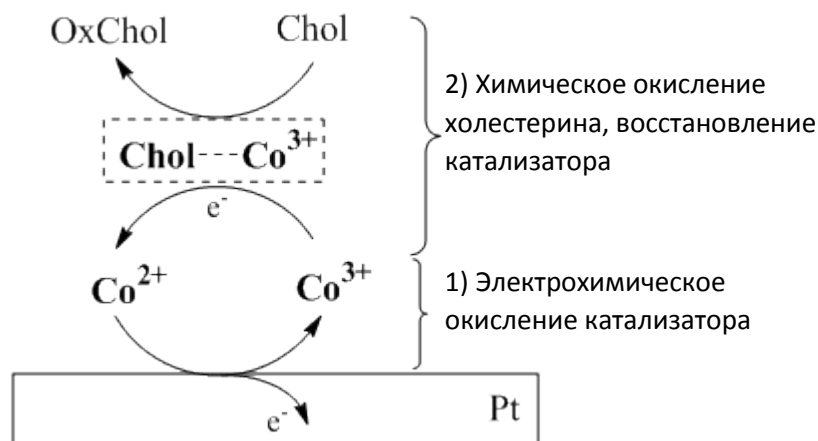
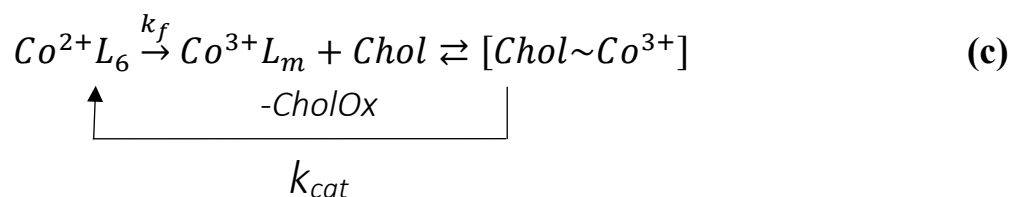


Рисунок 3.3 – Схема электрокаталитического окисления холестерина с участием катионов кобальта в ацетонитриле на поверхности платинового электрода.

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

Если предположить, что электрохимическая реакция **1** является быстрой, то есть скорость электрохимической реакции намного больше скорости химической, и электрокаталитическое окисление холестерина подчиняется ферментативной кинетике, то этот процесс можно описать следующими схемами реакций:



Каталитическая константа k_{cat} (c^{-1}) и связанная с ней константа специфичности k_{cat}/K_m отражают эффективность превращения субстрата в

ферментативной реакции, k_{cat} - число реакций с частицей катализатора в единицу времени, k_{cat}/K_m (л·моль⁻¹с⁻¹) – число молей субстрата, превращенного в продукт за единицу времени.

При электрокаталитическом окислении холестерина его концентрация в объеме раствора не меняется, она незначительно меняется в приэлектродном реакционном слое, но быстро выравняется за счет диффузии (конвективной, если применяется вращающийся диск, и естественной). В условиях постоянства концентрации субстрата реакцию восстановления Co^{3+} за счет окисления холестерина можно представить, как квазимолекулярную:



где $k_r = -\frac{dC_{Co^{3+}}}{dt}$ – константа скорости превращения Co^{3+} в Co^{2+} , л·моль⁻¹с⁻¹.

Учитывая, что реакция $Co^{3+}L_m + Chol \rightarrow Co^{2+}L_6 + CholOx$ идет стехиометрически, $k_r = -\frac{dC_{Chol}}{dt}$. Таким образом видно, что k_r эквивалентна константе специфичности k_{cat}/K_m .

k_r была рассчитана с применением метода вращающегося диска [180]. Зависимость отношения каталитического тока к предельному току от скорости вращения дискового электрода и концентрации субстрата (холестерина) описывается уравнением [180]:

$$\frac{i_k}{i_g} = B k_r^{\frac{1}{2}} C_{хол}^{\frac{1}{2}} \omega^{-\frac{1}{2}} \quad (8)$$

$$\text{где } B = 1.61 D^{-\frac{1}{6}} \nu^{\frac{1}{6}}.$$

Каталитический ток i_k – это ток, возникающий за счет каталитической реакции (с), иначе – прирост тока окисления Co^{2+} в присутствии холестерина в рабочем растворе по сравнению с предельным током i_g , регистрируемым без холестерина в тех же условиях.

На рисунке 3.4 А представлены зависимости $\frac{i_k}{i_g}$ vs. $\omega^{-\frac{1}{2}}$ для концентраций холестерина 0.1; 0.2; 0.5 и 1.0 мМ, тангенс угла которых позволяет рассчитать

величину $Bk_r^{\frac{1}{2}}C_{\text{хол}}^{\frac{1}{2}}$, зависящую линейно от $C_{\text{хол}}^{\frac{1}{2}}$. Рассчитанная из этой зависимости (рисунок 3.4 В) каталитическая эффективность составила $k_r = 2.25 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

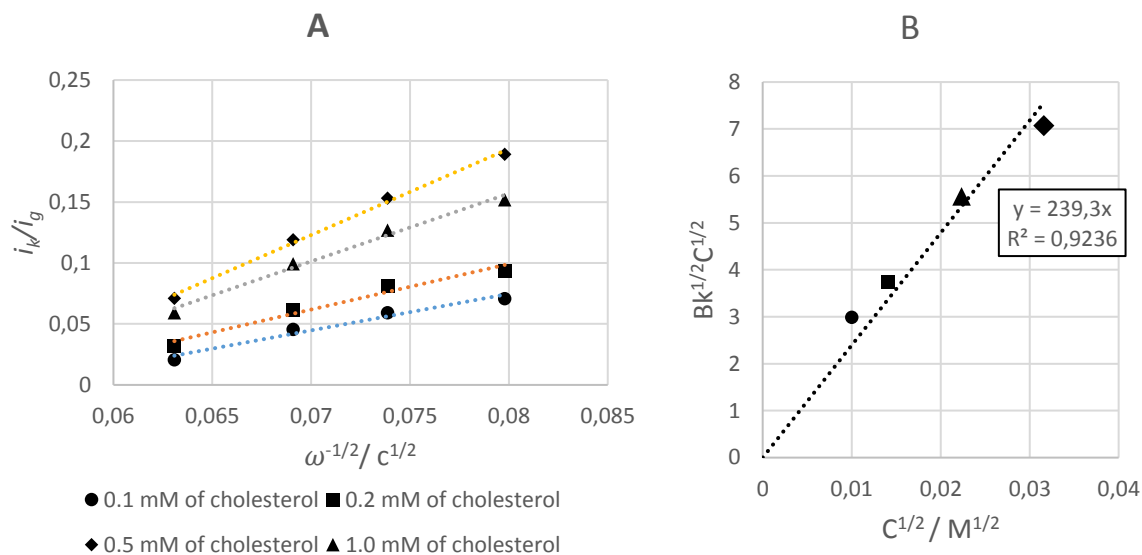


Рисунок 3.4 (А) – Зависимость $\frac{i_k}{i_g}$ от $\omega^{-\frac{1}{2}}$ для концентраций холестерина

0.1, 0.2, 0.5 и 1.0 mM. (В) Зависимость $Bk_r^{\frac{1}{2}}C_{\text{хол}}^{\frac{1}{2}}$ от $C_{\text{хол}}^{\frac{1}{2}}$ для тех же концентраций холестерина.

Расчет константы Михаэлиса K_m проводили, исходя из предположения о том, что поведение хлорида кобальта (II) по отношению к холестерину в ацетонитриле описывается теорией ферментативной кинетики и моделью Михаэлиса-Ментен.

На рисунке 3.5 точками обозначена экспериментально полученная зависимость прироста тока окисления катализатора от концентрации холестерина в рабочем растворе (0.1M LiClO₄ в АН + 25 мМ хлорида кобальта (II)) в диапазоне концентраций холестерина от 0 до 2000 мкМ с линейным участком 0-200 мкМ, подходящим для использования в аналитических целях.

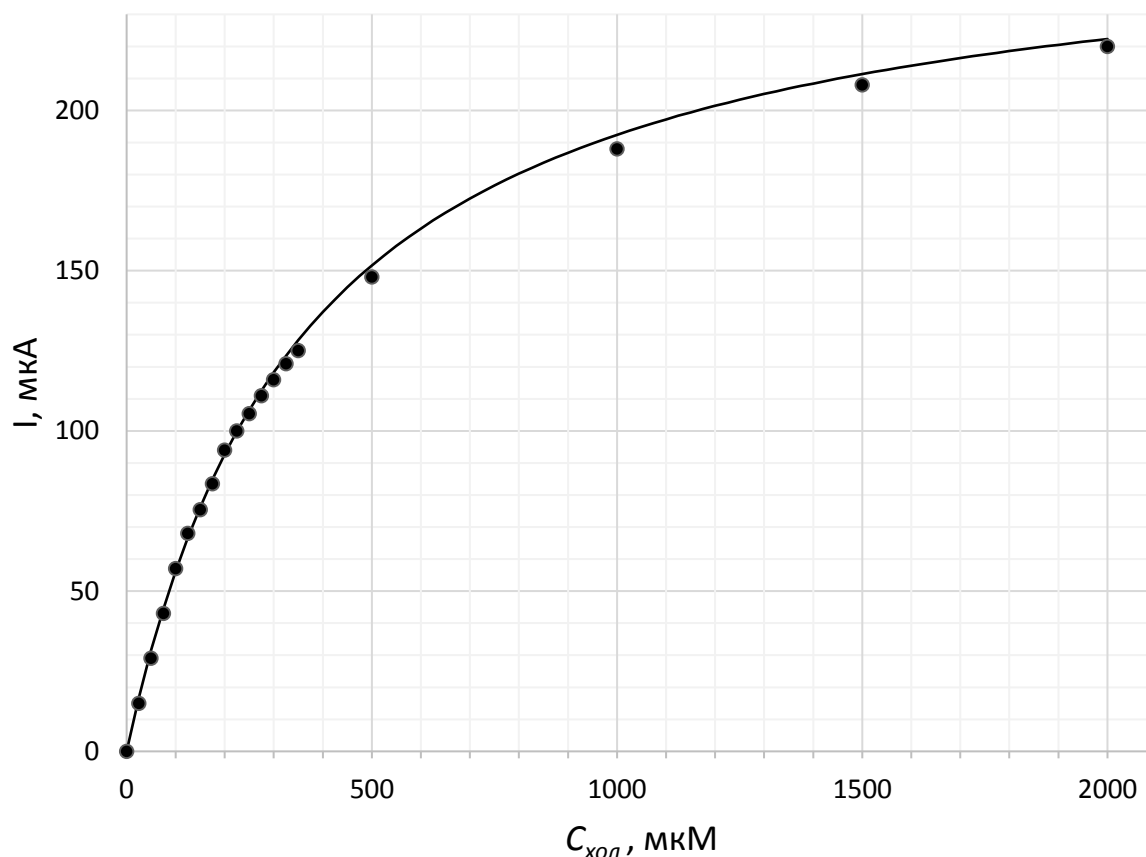


Рисунок 3.5 – Зависимость тока окисления холестерина от его концентрации (точки) и модельная кривая, полученная подстановкой полученных данных в уравнение Михаэлиса-Ментен (сплошная линия) [181].

Были исследованы кинетические параметры электроокисления холестерина с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен (М-М), которое отражает зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата [182]:

$$-\frac{dC_{хол}}{dt} = \frac{kC_{cat}C_{хол}}{K_m + C_{хол}} \quad (9)$$

где $-dC_{хол}/dt$ – скорость химической реакции окисления холестерина, определяемая как скорость убыли холестерина в процессе реакции, моль·л⁻¹·с⁻¹; $C_{хол}$ – концентрация холестерина, моль·л⁻¹; C_{cat} – концентрация электрокатализатора – катиона Co^{3+} , образующегося в результате электрохимического окисления $CoCl_2$, моль л⁻¹; K_m – константа Михаэлиса-Ментен (М-М), численно равная концентрации холестерина, при которой скорость каталитической реакции составляет половину от максимальной,

моль·л⁻¹. При этом чем меньше K_m , тем больше сродство катализатора и субстрата.

Замена скорости ферментативной реакции значением предельного тока окисления катализатора (скорость исследуемой электрокаталитической реакции ему пропорциональна) позволяет уравнение (9) представить в следующем виде:

$$i = \frac{nFkC_{cat}C_{хол}}{K_m + C_{хол}} = \frac{i_{max}C_{хол}}{K_m + C_{хол}} \quad (10)$$

i – регистрируемый ток, мкА; i_{max} – максимальный регистрируемый ток, мкА.

Для определения параметра K_m , уравнение (10) может быть переписано в уравнение Лайнуивера-Бурка [182]:

$$I^{-1} = I_{max}^{-1} + K_m I_{max}^{-1} C_{хол}^{-1} \quad (11)$$

На рисунке 3.6 представлена зависимость i^{-1} vs. $C_{хол}^{-1}$, полученная после перестройки зависимости i vs. $C_{хол}$ (рисунок 3.5, точки).

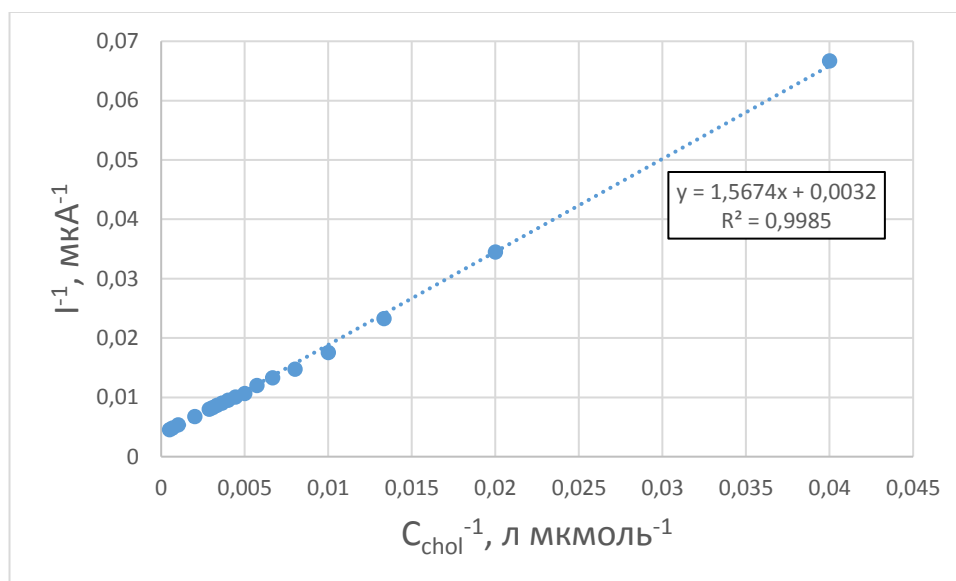


Рисунок 3.6 – График Лайнуивера-Бурка для амперометрического определения холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в качестве электрокатализатора [183]

Из уравнения полученной прямой были рассчитаны значения $K_m = 370$ мкмоль·л⁻¹ и $I_{max} = 3,12 \cdot 10^{-4}$ А. Таким образом на основании полученных расчетов можно сделать вывод, что в ацетонитриле хлорид

кобальта (II) в приэлектродном пространстве при наложении потенциала 1.37 V ведет себя по отношению к холестерину как фермент (катализатор окисления) и подчиняется кинетической модели Михаэлиса-Ментен.

В таблице 3.2 представлены значения k_{cat} и K_m , полученные в данной работе для хлорида кобальта (II), и известные из литературы для фермента холестерин оксидазы [184,185].

Как видно из таблицы, $CoCl_2$ в ацетонитриле по эффективности сопоставим с природным ферментом.

Таблица 3.2 – Константа Михаэлиса и каталитическая константа для хлорида кобальта (II) в ацетонитриле и холестериноксидазы в фосфатном буфере.

	$K_m, \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	k_{cat}, s^{-1}
<i>Холестериноксидаза [184] из <i>Brevibacterium sterolicum</i></i>	0.04-1.6	26-106
<i>Холестериноксидаза [184] из <i>Streptomyces hygroscopicus</i></i>	0.4-2.2	2-271
<i>$CoCl_2/АН$ (эта работа)</i>	0.370	0.94

Аналитические характеристики предлагаемых методов.

На основе полученных результатов был предложен амперометрический метод определения содержания холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в качестве электрокатализатора. Аналитическим сигналом служил прирост предельного тока окисления кобальта (II) после добавления в рабочий раствор холестерина (рисунок 3.1, ЦВА 3 и 4) с установлением концентраций холестерина в диапазоне от до 200 мкМ.

Была определена оптимальная концентрация хлорида кобальта (II) в разработанном методе детекции холестерина. Для этого были построены зависимости прироста пика тока окисления катализатора от концентрации холестерина в рабочем растворе для разных концентраций катализатора в

диапазоне концентраций холестерина от 0 до 2000 мкМ. Результаты представлены в таблице 2. Линейный участок, подходящий для использования в аналитических целях для определения концентрации холестерина, располагается в диапазоне концентраций холестерина от 0 до 200 мкМ для всех концентраций CoCl_2 , уравнение этих прямых также указаны в таблице 3.

Таблица 3.3 – Уравнения регрессии участка 0-200 мкМ холестерина зависимости прироста тока анодного пика окисления Co^{2+} от концентрации холестерина в растворе.

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

Растворы CoCl_2 с большей концентрацией проявляют электрокаталитические свойства по отношению к холестерину, однако наилучшее сочетание высокой чувствительности (коэффициент a уравнения регрессии) и линейности графика достигается при концентрации 25 мМ.

Оптимальные результаты – сочетание высокой чувствительности и линейности графика в диапазоне концентраций 0-200 холестерина наблюдается при использовании хлорида кобальта концентрации 25 мМ.

В случае использования в качестве электрокатализатора CoCl_2 в концентрациях 5 мМ – 20 мМ наблюдается или низкая чувствительность, или

не достигается линейная зависимость для холестерина в исследуемом диапазоне концентраций. Вероятно, это связано с недостатком электроактивного комплекса в приэлектродном слое.

Электрокатализатор CoCl_2 в концентрациях 30 мМ и 40 мМ, генерирует сигнал меньшей чувствительности, чем в случае 25 мМ, при сохранении линейности в исследуемом диапазоне концентраций. По-видимому, это связано со стерическими затруднениями.

Таким образом, 25 мМ CoCl_2 в ацетонитриле обеспечивает оптимальные аналитические характеристики в реакции электрокаталитического окисления холестерина. Эта концентрация хлорида кобальта (II) используется как основная в предлагаемом методе определения содержания холестерина в растворе.

Влияние скорости развертки потенциала на величину максимального тока окисления Co^{2+} (25 мМ) в присутствии холестерина изучали в области от 25-300 мВ/с. Было показано, что при скоростях сканирования больше и меньше 100 мВ/с диапазон линейной зависимости $i - C_{\text{хол}}$ составляет не больше 100 мкМ. Вероятно, это происходит из-за диффузионных ограничений. Таким образом дальнейшие исследования проводили при скорости сканирования потенциала 100 мВ/с.

В таблице 3.4 приведены аналитические характеристики определения холестерина для выбранных условий анализа. Как видно из таблицы, получены оптимальные результаты (максимально близкие, воспроизводимые и правильные значения найденной добавки).

Таблица 3.4 – Аналитические характеристики определения холестерина предлагаемым электрохимическим методом. $n=6$, $P=0.95$.

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

Таким образом, хлорид кобальта (II), растворенный в ацетонитриле, был применен в качестве электрокатализатора окисления холестерина на платиновом стационарном электроде. В качестве оптимального режима регистрации аналитического сигнала выбрана анодная вольтамперометрия с линейной разверткой потенциала со скоростью развертки 0.1 В/с. Предложен возможный путь протекания электрокаталитической реакции окисления холестерина на поверхности электрода. Каталитическая константа k_{cat} и константа Михаэлиса K_m составили, соответственно 0.94 с⁻¹ и 0.37 мкМ, что говорит об эффективности $CoCl_2$, сопоставимой с ферментом холестериноксидазой. Наибольшая величина и лучшая воспроизводимость АС достигается при концентрации $CoCl_2$ 25 мМ и скорости развертки 0.1 В/с. Область линейности градуировочного графика «ток-концентрация холестерина» с использованием разработанного метода в растворе 0,1 М $LiClO_4$ и 25 мМ $CoCl_2$ составляет 25-200 мкМ ($R^2=0.971$) с пределом обнаружения 2 мкМ.

3.2. Электрохимическое окисление холестерина в присутствии хлоридов никеля (II) и кобальта (II), тиоцианата калия в среде ДМФА

Представлены ЦВА, зарегистрированные на платиновом электроде в ДМФА, содержащем 0.1 М перхлората лития и 10 мМ хлорида никеля (II) (рисунок 3.7), 10 мМ хлорида кобальта (II) (рисунок 3.8) и 15 мМ тиоцианата калия (рисунок 3.9):

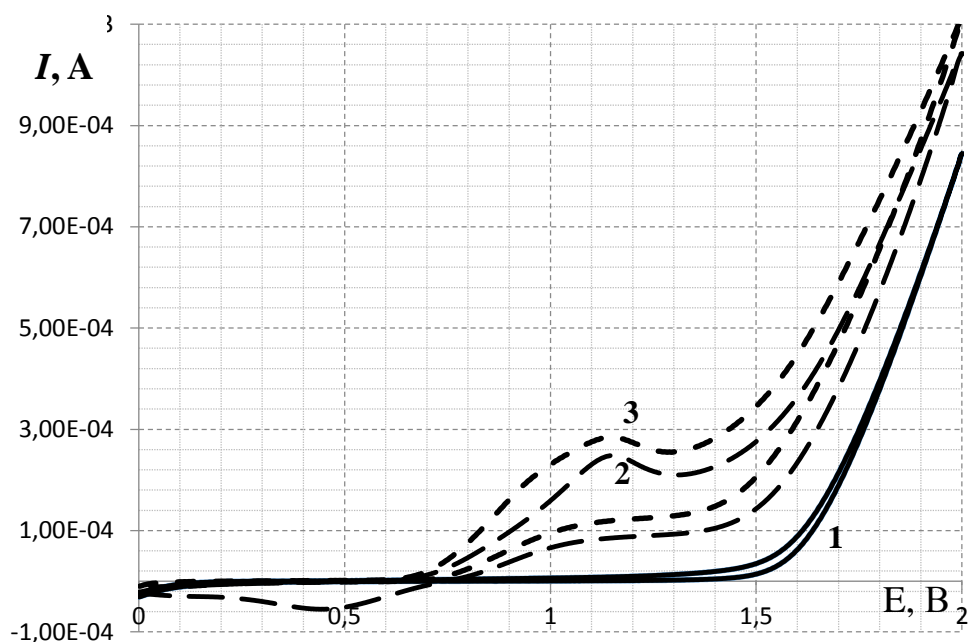


Рисунок 3.7 – ЦВА, зарегистрированные на платиновом электроде в растворе ДМФА, содержащем 0.1 М LiClO_4 (1), после добавки 10 мМ хлорида никеля (II) (2) и после добавки 10 мМ холестерина (3). $\nu = 0.1$ В/с.

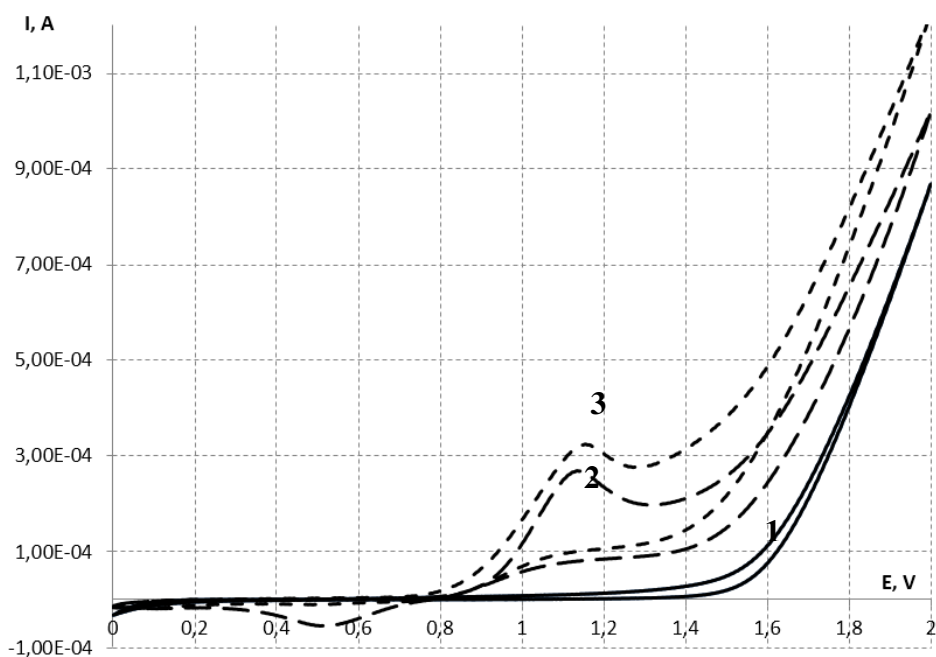


Рисунок 3.8 – ЦВА, зарегистрированные на платиновом электроде в растворе ДМФА, содержащем 0.1 М LiClO_4 (1), после добавки 10 мМ хлорида кобальта (II) (2) и после добавки 10 мМ холестерина (3). $\nu = 0.1$ В/с.

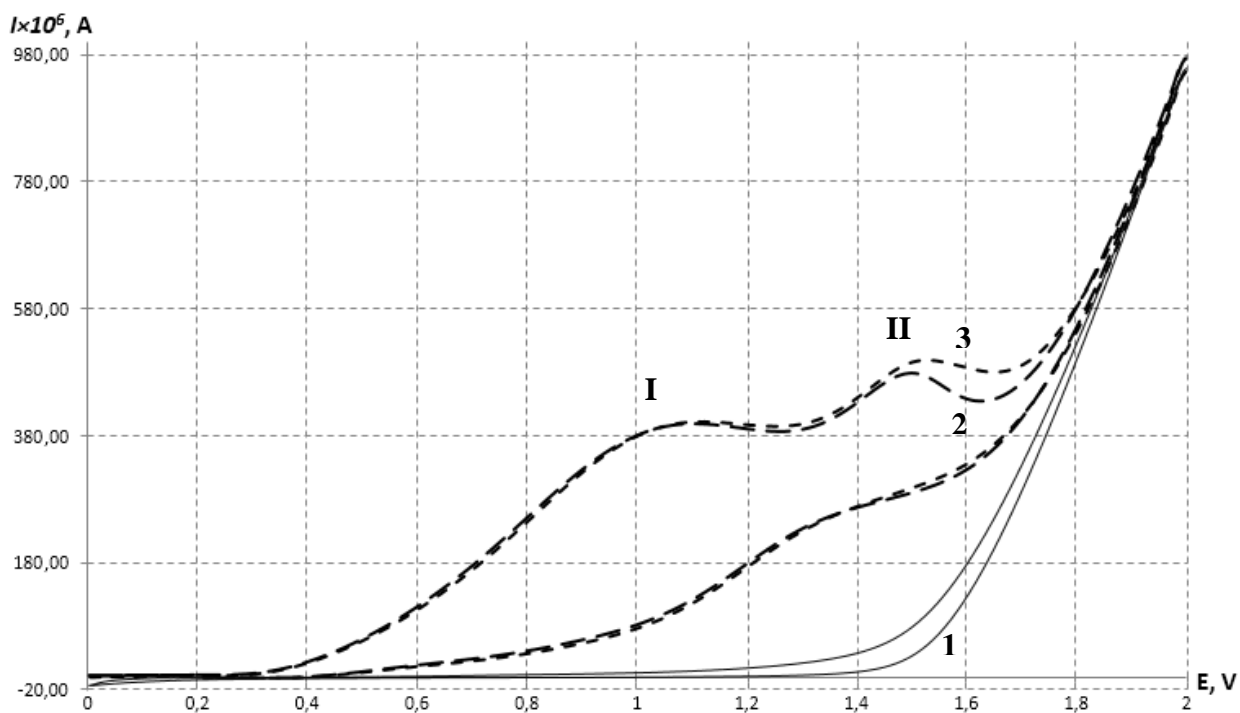


Рисунок 3.9 – ЦВА, зарегистрированные на платиновом электроде в растворе ДМФА, содержащем 0.1 М LiClO_4 (1), после добавки 15 мМ тиоцианата калия (2) и после добавки 10 мМ холестерина (3). Скорость сканирования потенциала 0.1 В/с [186].

Из рисунков видно, что при определенных потенциалах наблюдаются заметные отклики: в растворе NiCl_2 при $E = 1.12$ В, в растворе CoCl_2 $E = 1.16$ В, в растворе KSCN - 2 волны: $E_1 = 1.08$ В, $E_2 = 1.52$ В. Все указанные анодные волны отвечают, по-видимому, процессам электрохимического окисления катализаторов на поверхности платинового электрода.

На ЦВА, зарегистрированных в растворе NiCl_2 и CoCl_2 (рисунки 3.8 и 3.9), присутствуют также катодные пики при потенциалах 1.48 В, относящихся, очевидно, к паре Me(II)/Me(III) ($\text{Me} = \text{Ni}, \text{Co}$). Катодные пики на ЦВА, зарегистрированной в растворе KSCN , отсутствуют, что указывает на полностью необратимый характер окисления KSCN на поверхности платинового электрода.

Присутствие холестерина в рабочем растворе во всех трех случаях приводит к увеличению пика тока окисления катализатора (в случае KSCN – только одного анодного пика при $E = 1.52$), однако в отсутствие в растворе

электрокатализатора анодных пиков не наблюдается. Данный факт указывает на электрокаталитический характер окисления холестерина у поверхности электрода в присутствии хлоридов никеля (II), кобальта (II) и тиоцианата калия: прирост анодного тока обуславливается переносом заряда с молекулы холестерина на окисленный у поверхности электрода катализатор, что приводит к его восстановлению и повторению процесса.

Процессы, которым отвечают пары анодного и катодного пиков на зарегистрированных ЦВА (рисунки 3.1 и 3.2 кривые 2 и 3) является необратимым, на это указывают рассчитанные значения параметра I_{an}/I_{kn} (отношение тока анодного пика к току катодного пика) [187], которые приведены в таблице 3.1. Из этого следует, что продукты электроокисления солей никеля (II) и кобальта (II) достаточно неустойчивы, скорее всего вследствие своей высокой химической активности.

Для установления схем электрохимических реакций окисления катализаторов, протекающих на поверхности рабочего электрода, были рассчитаны их параметры: потенциалы анодных E_{an} и катодных E_{kn} пиков, коэффициенты диффузии D электрохимически активных соединений, количество электронов n , участвующих в соответствующей реакции. Результаты представлены в таблице 3.1.

Расчет параметров электроокисления KSCN, NiCl₂ и CoCl₂ в ДМФА проводили по уравнению Рэндлса-Шевчика (12) [187] и Гейровского-Ильковича (13) [188]:

$$i_p = -0,496\sqrt{\alpha n'} n F A C_{кат} \sqrt{\frac{F \nu D}{RT}} \quad (12)$$

$$E = E_{\frac{1}{2}} - \frac{0.0542}{\alpha n} \lg\left(\frac{i}{i_d - i}\right) \quad (13)$$

где i_{an} – ток анодного пика окисления катализатора, А; A – площадь электрода, см²; $C_{кат}$ – концентрация катализатора в рабочем растворе, моль/л; n' – число электронов, участвующих в элементарном акте, в подавляющем количестве электрохимических реакций равно 1; F – постоянная Фарадея,

96485 Кл/моль; R – универсальная газовая постоянная, 8.314 Дж/(моль*К); v – скорость сканирования потенциала, В/с; T – температура, К, E – накладываемый на рабочий электрод потенциал, В; $E_{1/2}$ – потенциал полуволны, В; i – регистрируемый ток, А; i_d – предельный диффузионный ток, А.

Таблица 3.1 – Отношение токов анодного и катодного пиков, потенциалы анодных пиков, коэффициенты диффузии D , число электронов n , участвующих в электрохимических реакциях окисления 10 мМ NiCl₂, 10 мМ CoCl₂ и 15 мМ KSCN.

Катализатор		I_{an}/I_{kn}	E_{an}, V	$D, м^2с^{-1}$	n
NiCl ₂		2.60	1.16	$3.87 \cdot 10^{-6}$	1.00
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

Из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод о возможном механизме электрохимического окисления солей никеля (II) и кобальта (II). В электрохимических реакциях окисления участвует по одному электрону, следовательно, наиболее вероятным является процесс окисления катиона металла при наложении потенциалов, отвечающим потенциалам анодных пиков 1.12 В:

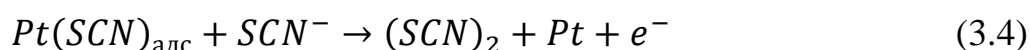
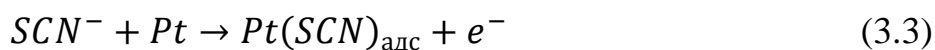


где Me = Co, Ni; L – молекула ДМФА (лиганд), n и m – количество молекул ДМФА в сольватной оболочке вокруг катиона металла.

На ЦВА, зарегистрированной в 15 мМ растворе KSCN (рисунок 3.3), наблюдаются 2 последовательных анодных пика. Из литературных данных [189] известно, что анодное окисление тиоцианат-ионов приводит к образованию тиоцианогена (SCN)₂ по общей схеме:

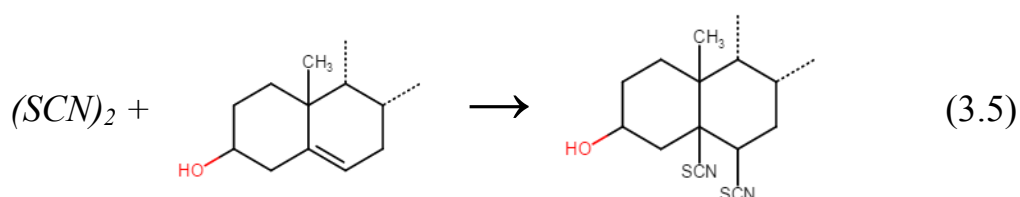


Тиоцианоген при комнатной температуре является очень неустойчивым соединением и, поэтому, сильным окислителем. Учитывая, что каждая анодная волна на ЦВА соответствует одноэлектронному переносу через границу раздела электрод/раствор, то электрохимическую реакцию окисления KSCN на поверхности платинового электрода при сканировании потенциала можно описать как 2 последовательные реакции по следующей схеме:

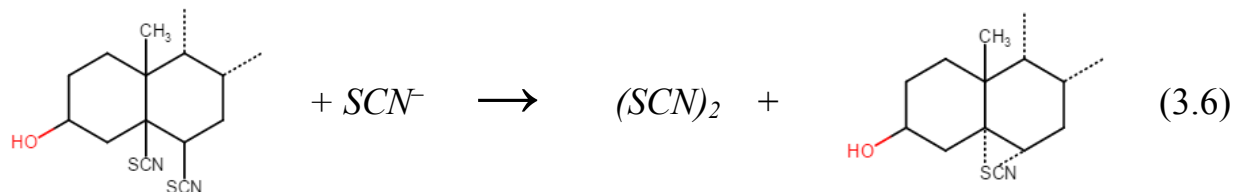


Реакция (3.3) соответствует волне I, реакция (3.4) – волне II.

Присутствие в рабочем растворе 10 мМ холестерина приводит к приросту анодного тока волны II, хотя пик тока волны I остается фактически без изменения. Это обстоятельство можно объяснить тем, что адсорбированный на первом этапе (волна I) на поверхности платинового электрода продукт окисления тиоцианат-ионов $Pt(SCN)_{адс}$ не обладает окислительными свойствами по отношению к холестерину, предположительно по причине недостатка энергии для реакции с холестерином. Однако образующийся на второй стадии (волна II) тиоцианоген вступает в химическую реакцию с холестерином. Прирост пика тока волны II в присутствии холестерина указывает на образование в результате этой реакции электроактивного соединения, которое, окисляясь на электроде при наложенном потенциале, затем снова окисляет неэлектроактивный компонент (холестерин). Из литературных данных [190,191] известно, что тиоцианоген способен вступать в реакции присоединения с алкенами и циклоалкенами с образованием преимущественно дизамещенных продуктов. По-видимому, реакцию окисления холестерина электрогенерированным тиоцианогеном можно проиллюстрировать следующей схемой:

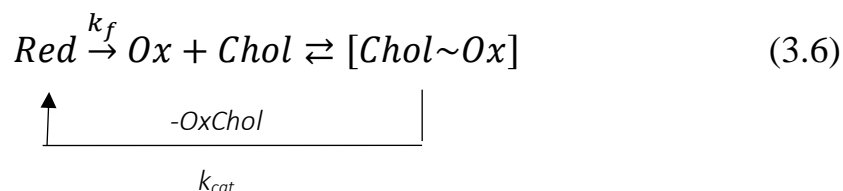


Предположительно, образующийся дизамещенный продукт сразу же окисляется на поверхности рабочего электрода с образованием новой порции тиоцианогена:



Окисление холестерина с использованием хлоридов никеля и кобальта и тиоцианата калия в ДМФА, как и в случае окисления с использованием хлорида кобальта (II) как катализатора в ацетонитриле, протекает, преимущественно через разрыв двойной связи в молекуле холестерина. На это указывает увеличение тока пиков окисления катализаторов в присутствии в рабочем растворе холестерил хлороформиата, причем величина прироста тока соразмерна с таковой в случае присутствия в растворе холестерина.

Исходя из предполагаемых механизмов электрокаталитического окисления холестерина в ДМФА и из предположения, что электрохимические реакции окисления никеля (II), кобальта (II) и тиоцианата калия являются быстрыми, то есть скорость электрохимической реакции намного больше скорости химической, можно сделать вывод о подчинении электрокаталитических реакций ферментативной кинетике. Как и в случае электрокаталитического окисления холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в ацетонитриле, полный процесс можно описать следующей общей схемой:



где Red – восстановленная форма катализатора, Ox – окисленная форма катализатора, Chol~Ox – активированный комплекс, состоящий из молекулы

холестерина, соединенной с окисленной формой катализатора, OxChol – окисленная форма холестерина.

На основе уравнения ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен и Лайнувера-Бурка были рассчитаны константы Михаэлиса K_m для каждого типа катализатора (таблица 3.3). На рисунках 3.4 и 3.5 представлены графики зависимости зарегистрированного тока окисления катализатора от концентрации холестерина в рабочем растворе, полученные экспериментально хроноамперометрическим методом при потенциале 1.21 В в случае использования $NiCl_2$ и 1.20 В в случае использования $CoCl_2$ (рисунок 3.4) и методом линейного сканирования потенциала в случае использования тиоцианата калия (рисунок 3.5). Также на рисунках представлены модельные кривые аналогичных зависимостей, полученных подстановкой рассчитанных по уравнению Лайнувера-Бурка K_m и I_{max} в уравнение Михаэлиса-Ментен. Как видно из рисунков, модельные кривые в основном совпадают с экспериментальными, таким образом подтверждается предположение о том, что поведение всех рассматриваемых электрокатализаторов по отношению к холестерину подчиняется ферментативной кинетике.

Полученные экспериментально кривые позволяют оценить области концентраций холестерина, в которых соблюдается линейная зависимость тока от концентрации и которые можно использовать в аналитических целях. В таблице 3.2 приведены границы таких областей, уравнения регрессии линейных зависимостей и их коэффициенты корреляции (r), рассчитанные пределы обнаружения холестерина для каждого рассмотренного электрокатализатора.

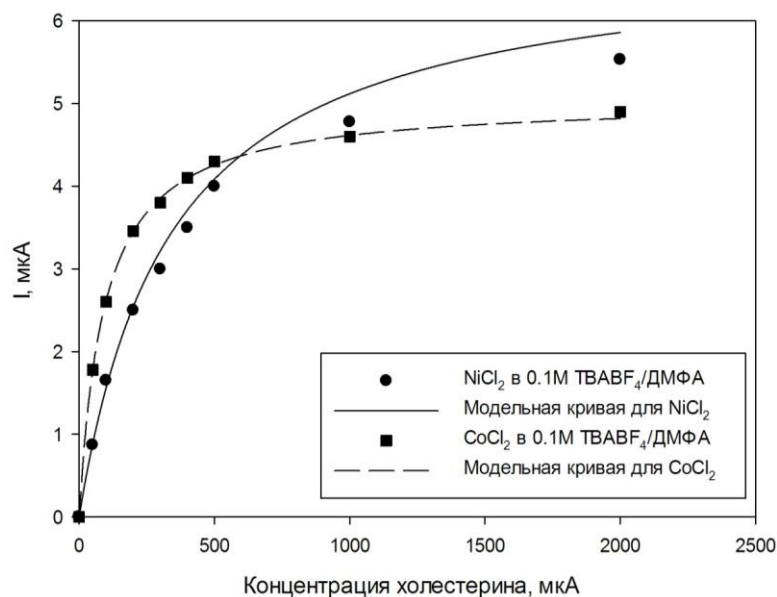


Рисунок 3.4 – Зависимости тока окисления NiCl_2 и CoCl_2 ($C = 10 \text{ мМ}$) от концентрации холестерина в ДМФА. Черными маркерами отмечены точки, полученные экспериментально методом хроноамперометрии, сплошной и прерывистой линиями – модельные кривые, построенные по результатам расчета K_m и I_{max} .

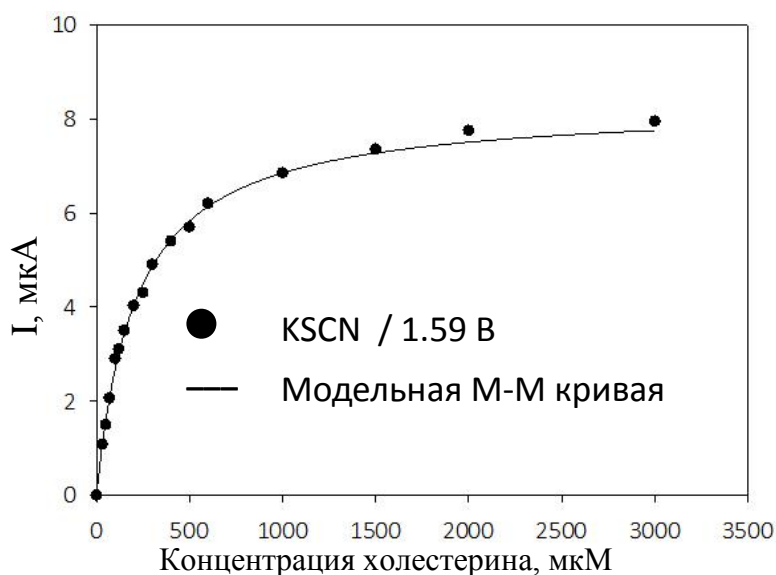


Рисунок 3.5 – Зависимость тока окисления KSCN (концентрация 15 мМ) от концентрации холестерина в ДМФА. Черными маркерами отмечены точки, полученные экспериментально методом линейного сканирования потенциала (волна II, 1.59 В), сплошной линией – модельная кривая, построенная по результатам расчета K_m и I_{max} .

Проанализировав данные, приведенные в таблице, можно сделать несколько выводов. Во-первых, наименьший предел обнаружения холестерина был достигнут при применении тиоцианата калия в качестве электрокатализатора, однако в данном случае разница с остальными соединениями оказывается несущественной, то же можно сказать и в отношении области линейности. Во-вторых, наиболее существенным является выигрыш в чувствительности (тангенс угла наклона уравнения регрессии) при использовании тиоцианата калия. Однако, в-третьих, наибольшее сродство к холестерину, а именно наименьшее значение константы Михаэлиса K_m , демонстрирует хлорид кобальта (II).

Таблица 3.2 – Аналитические характеристики определения холестерина с использованием в качестве электрокатализаторов NiCl_2 , CoCl_2 и KSCN в ДМФА.

Катализатор	Концентрация, моль/л	Предел обнаружения, мкМ	Область линейной зависимости $I - C_{хол}$	Уравнение регрессии, I , мкА; C , мкМ	r	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

Таким образом, в среде ДМФА наиболее предпочтительным из рассмотренных электрокатализаторов для использования в решении задачи определения холестерина в этом растворителе является тиоцианат калия.

Однако, обнаруженные электрокаталитические свойства хлорида кобальта (II) по отношению к холестерину в среде ацетонитрила превосходят аналогичные для рассмотренных электрокатализаторов в среде ДМФА. Учитывая также, что ацетонитрил обладает меньшей токсичностью по сравнению с ДМФА, что немаловажно при выполнении рутинных медицинских анализов, можно сделать окончательный выбор в пользу использования хлорида кобальта (II) в ацетонитриле для количественного определения свободного холестерина.

Глава 4. Электрохимическое определение холестерина с использованием наночастиц золота и серебра в качестве катализаторов

4.1. Водно-органические эмульсии холестерина

В крови холестерин находится в форме липопротеинов – микроскопических частиц, способных двигаться с кровотоком, не коагулируя и не осаждаясь на стенках сосудов. В целях создания модельных растворов холестерина в воде, имитирующих сыворотку крови, готовят эмульсии холестерина в воде с использованием ПАВ [9, 10]. Критерием отбора ПАВ для приготовления эмульсии холестерина в воде служили, во-первых, стабильность полученной эмульсии во времени, отсутствие осадка и опалесценции, во-вторых, отсутствие влияния на ток окисления катализатора при сканировании потенциала модифицированного наночастицами рабочего электрода в присутствии ПАВ в рабочем растворе.

Исследовали 3 типа водно-органических эмульсий в зависимости от используемого ПАВ: Тритон X-100, ЦТАБ и ЛСН. Регистрировали ЦВА на СУЭ, модифицированном наночастицами серебра в смеси 0.25 М раствор NaOH–ТГФ (1 : 1, по объему), а затем в присутствии 1 мМ раствора ПАВ. На рисунке 4.1 представлены ЦВА, зарегистрированные на модифицированном наночастицами серебра СУЭ (AgНЧ–СУЭ) в отсутствие (кривая 1) и в присутствии 1 мМ Тритона X-100 (кривая 2). Как видно, Тритон X-100 вызывает увеличение тока анодного пика при потенциале 0.3 В и уменьшение при 0.75 В. Это можно объяснить наличием в молекуле Тритона X-100 гидроксогруппы, которая электрокаталитически окисляется на модифицированном рабочем электроде. Так как присутствие Тритона X-100 искажает электрохимический сигнал, от его использования в качестве эмульгатора отказались.

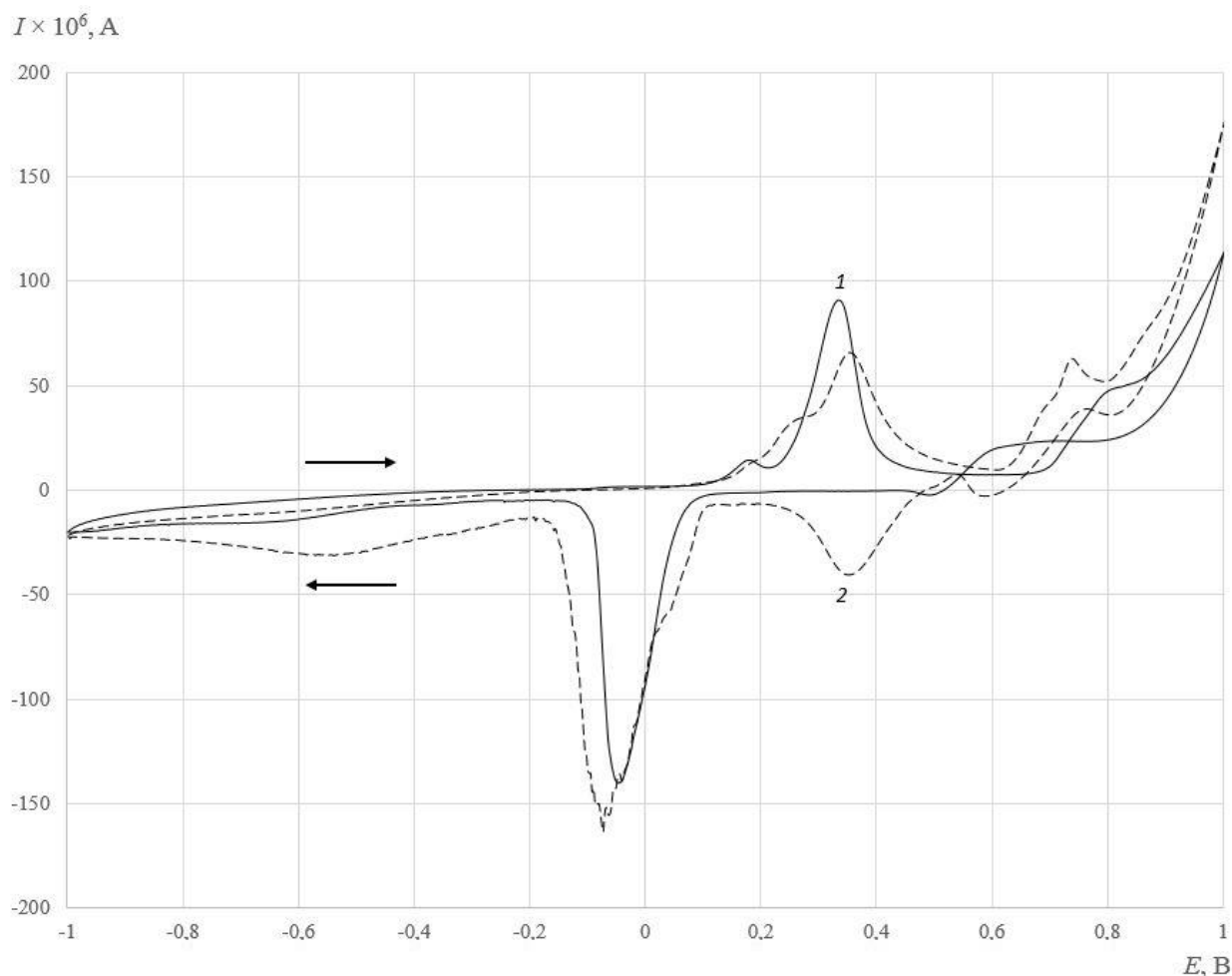


Рис. 4.1 – Циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная на AgNCH–СУЭ-электроде в 0.125 М растворе NaOH в смеси ТГФ–вода (1 : 1, по объему) в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0.1 мл Тритона X-100. Скорость сканирования 0.1 В/с; стрелками указаны направления сканирования потенциала.

Использование в качестве эмульгатора ЛСН приводит в ряде случаев к уменьшению пика тока, что может быть связано с блокированием электроактивной поверхности наночастиц. Оптимальные результаты были получены при использовании ЦТАБ. Этот ПАВ не вызывает рост пиков окисления и не блокирует поверхность наночастиц. Кроме того, электрокаталитическое окисление холестерина можно объяснить образованием мономолекулярного слоя ЦТАБ на поверхности наночастиц, который облегчает подход мицелл с холестерином к поверхности электрода и

перенос электрона с холестерина на электрод. В дальнейших исследованиях применяли ЦТАБ.

4.2. Электрокаталитическая активность наночастиц золота и серебра, иммобилизованных на поверхности рабочего электрода, в водно-органической эмульсии

На рисунке 4.2 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на немодифицированном и модифицированном наночастицами Ag-AuНЧ стеклоуглеродном дисковом электроде в фоновом электролите – 10 мл эмульсии вода/ТГФ (1 / 1 по объему), содержащей 0.125 М NaOH, фоновом электролите с 1мМ ЦТАБ и фоновом электролите с 1мМ ЦТАБ и 6 мМ холестерина.

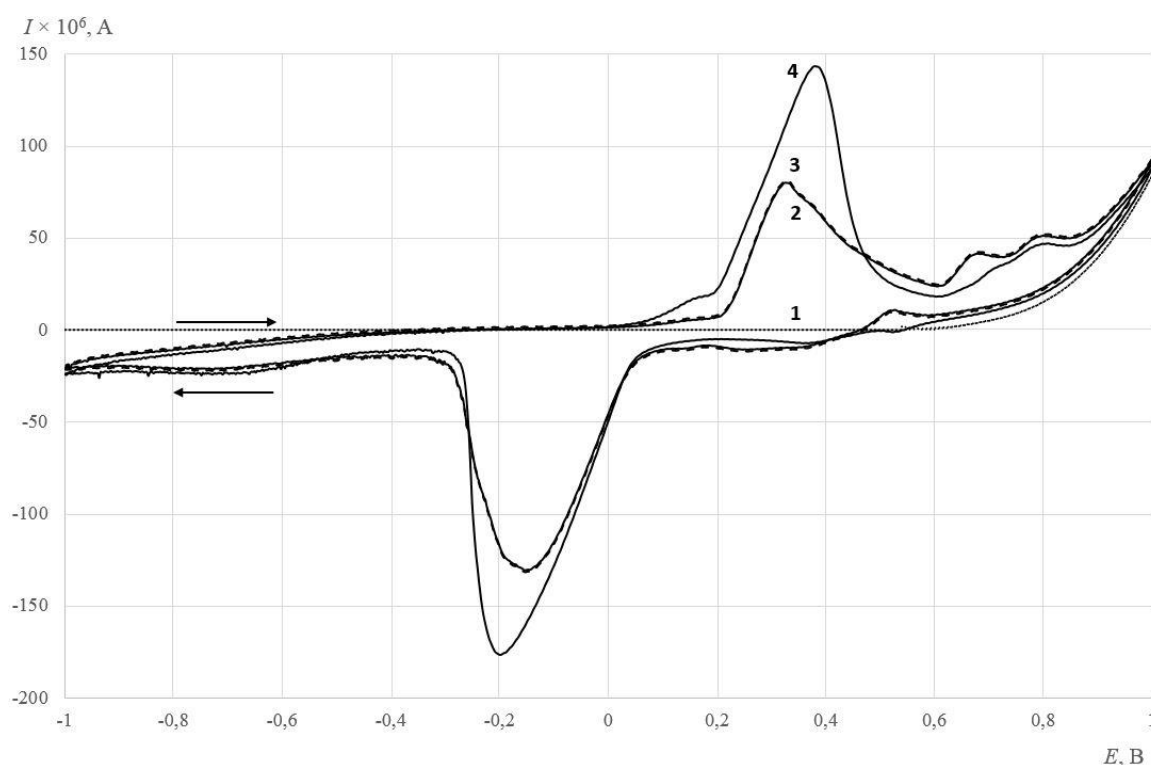


Рисунок 4.2 – Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на немодифицированном стеклоуглеродном дисковом электроде в фоновом электролите – 10 мл эмульсии вода : ТГФ (1 : 1 по объему), содержащей 0.125 М NaOH (кривая 1), на модифицированном наночастицами Ag-AuНЧ электроде в фоновом электролите (кривая 2), фоновом электролите с 1мМ ЦТАБ (кривая 3) и фоновом электролите с 1 мМ ЦТАБ и 6 мМ холестерина (кривая 4). Скорость сканирования 100 мВ/с.

Немодифицированный стеклоуглеродный электрод в эмульсии вода-ТГФ- NaOH не генерирует электрохимического сигнала (кривая 1). Имобилизованные на поверхности электрода наночастицы Ag-AuNC при наложении потенциала с циклической разверткой подвергаются электрохимическим превращениям, что проявляется на ЦВА в виде пиков анодного тока при потенциалах 0.38 В, 0.68 В и 0.8 В и пика катодного тока при потенциале -0.2 В (кривая 2). Добавка в эмульсию 1 мМ ЦТАБ (кривая 3) не приводит к заметному изменению формы вольтамперограммы, следовательно, в данных условиях данный ПАВ электрохимически на модифицированном Ag-AuNC электроде неактивен и в то же время не блокирует электрохимически активную поверхность наночастиц. Добавка к полученному раствору 6 мМ холестерина приводит к росту пиков катодного тока и анодного тока при потенциале 0.38 В (кривая 4) с увеличением потенциала пика на 0.14 В. Такое изменение формы вольтамперограммы характерно для электрокаталитического процесса окисления вещества на поверхности наночастиц благородных металлов [193]. Из этого можно заключить, что электрохимическое окисление холестерина на поверхности наночастиц Ag-AuNC также протекает по каталитическому механизму.

Для исследования электрокаталитической активности наночастиц каждого типа использовали методы ЦВА и хроноамперометрии в водно-органических эмульсиях вода- NaOH -ТГФ-ПАВ в отсутствие и в присутствии холестерина (концентрации 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 мМ). В таблице 4.1 приведены уравнения регрессии зависимостей $I = f(C_{\text{хол}})$, где I – регистрируемый ток катализатора в присутствии холестерина на модифицированном наночастицами электроде, А; $C_{\text{хол}}$ – концентрация холестерина в электрохимической ячейке, мМ.

Таблица 4.1 – Уравнения зависимостей тока окисления наночастиц в присутствии холестерина от концентрации холестерина в рабочем растворе (эмульсии) ($n = 5$, $P = 0.95$).

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

Наночастицы типов 1 и 3 не проявляют электрокаталитическую активность по отношению к холестерину. По-видимому, это связано, во-первых, с необратимой сорбцией холестерина и/или продуктов его окисления на поверхности наночастиц, которая затрудняет перенос электрона через границу наночастица–раствор, и во-вторых, с растворением золота с поверхности наночастиц AuНЧ, Au–AgНЧ и (Au+Ag)НЧ в процессе многократного сканирования потенциала СУЭ при подготовке поверхности модифицированного СУЭ.

Наночастицы типа 2 ядро–оболочка. В отличие от наночастиц индивидуальных металлов, наночастицы типа ядро–оболочка проявляют синергетический эффект [32], т.е. имеет место усиление электрокаталитических свойств одного металла другим. В этом случае скорость электрохимической реакции может возрасти сильнее, чем при использовании наночастиц только одного металла.

На рисунке 4.3 представлены ЦВА, зарегистрированные на СУЭ, модифицированном наночастицами типа 2: Au–AgНЧ и Ag–AuНЧ в эмульсии

вода–NaOH–ТГФ–ЦТАБ. Наиболее выраженный сигнал зарегистрирован для СУЭ, модифицированного наночастицами Ag–AuНЧ. Относительно небольшой сигнал от наночастиц Au–AgНЧ можно объяснить так же, как и в случае наночастиц золота, растворением Au-оболочки при многократной регистрации ЦВА.

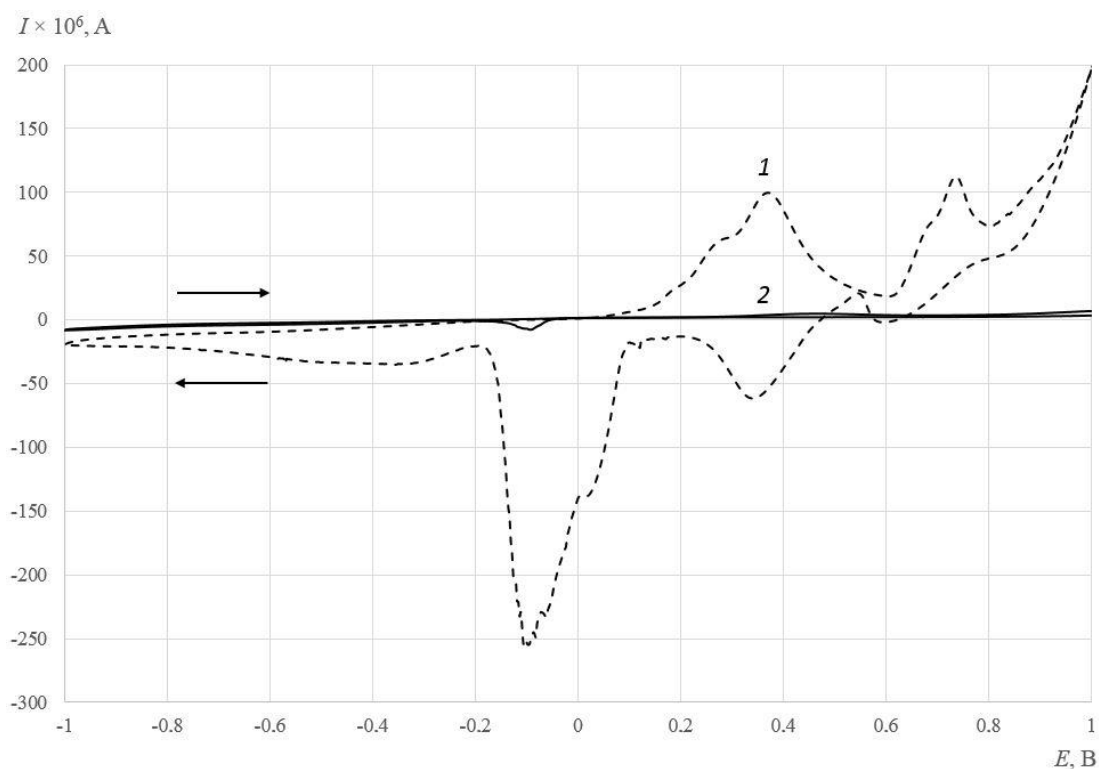


Рисунок 4.3 – Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на СУЭ, модифицированном наночастицами Ag–AuНЧ (1) и Au–AgНЧ (2) в эмульсии вода–NaOH–ТГФ–ЦТАБ. Скорость сканирования 0.1 В/с; стрелками указаны направления сканирования потенциала

Методами ЦВА и хроноамперометрии (рисунок 4.4) для Ag–AuНЧ получена линейная зависимость тока окисления холестерина от его концентрации в растворе NaOH–ТГФ–ЦТАБ ($c_{\text{ЦТАБ}} = 1 \text{ мМ}$) при потенциале 0.4 В и времени регистрации 2 с (рисунок 4.4, вставка). Чувствительность наночастиц данного типа составляет 0.585 мкА/мМ.

На рисунок 4.5 представлены хроноамперограммы, зарегистрированные на СУЭ, модифицированном наночастицами Ag–AuNP, в 0.125 М растворе

NaOH ($V_{\text{TГФ}} : V_{\text{вода}} = 1 : 1$), содержащем 1 мМ ЦТАБ, в отсутствие и в присутствии 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 мМ холестерина, а также зависимость тока окисления наночастиц от обратного квадратного корня от времени для рабочего раствора, содержащего 5 мМ холестерина (рисунок 4.5, вставка). Данная зависимость линейна с коэффициентом корреляции 0.99, что указывает на диффузионный характер процесса электрокаталитического окисления холестерина.

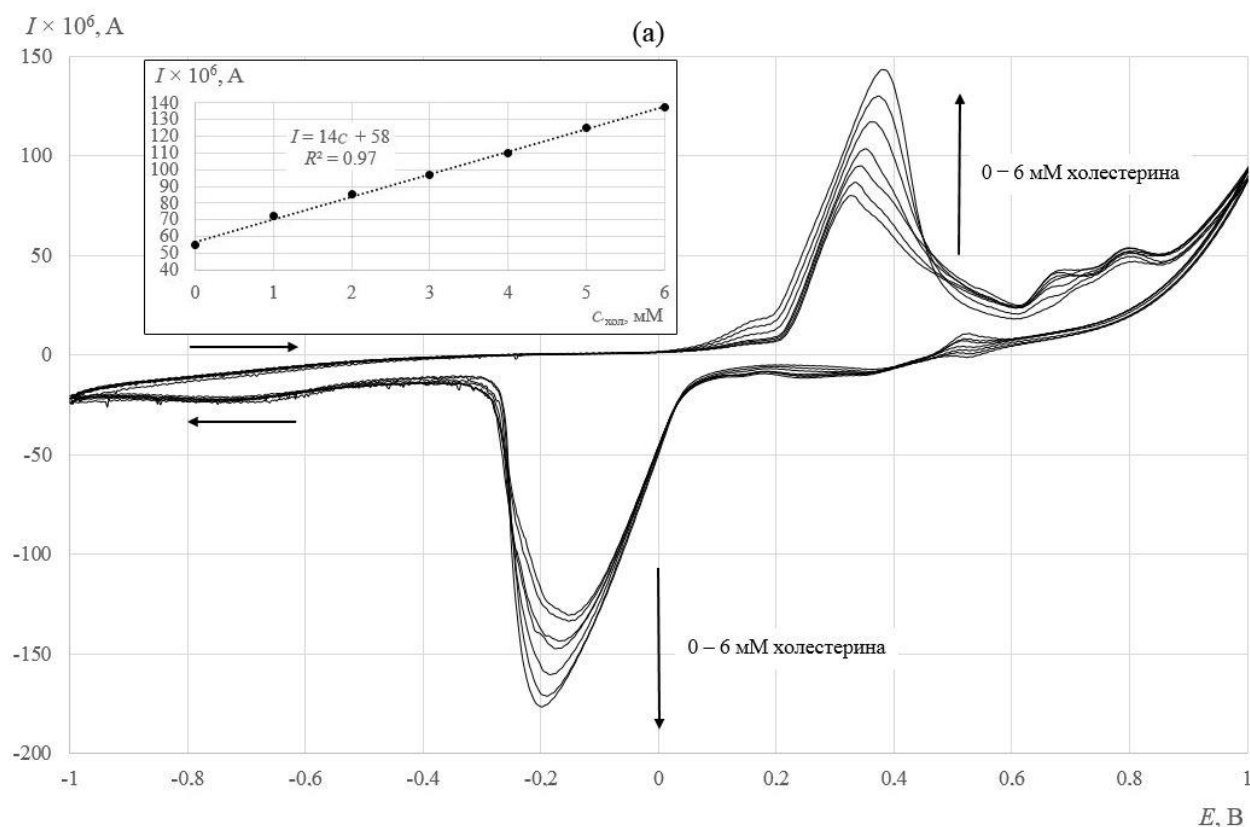


Рисунок 4.4 – Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на СУЭ, модифицированном наночастицами ядро–оболочка Ag–AuНЧ, в 0.125 М растворе NaOH в смеси ТГФ–вода (1 : 1, по объему), содержащем 1 мМ ЦТАБ, при добавлении холестерина в виде раствора в ТГФ. Скорость сканирования 0.1 В/с; стрелками указаны направления сканирования потенциала; вставка: зависимость тока окисления холестерина от его концентрации при потенциале 0.4 В, полученная методом хроноамперометрии [195].

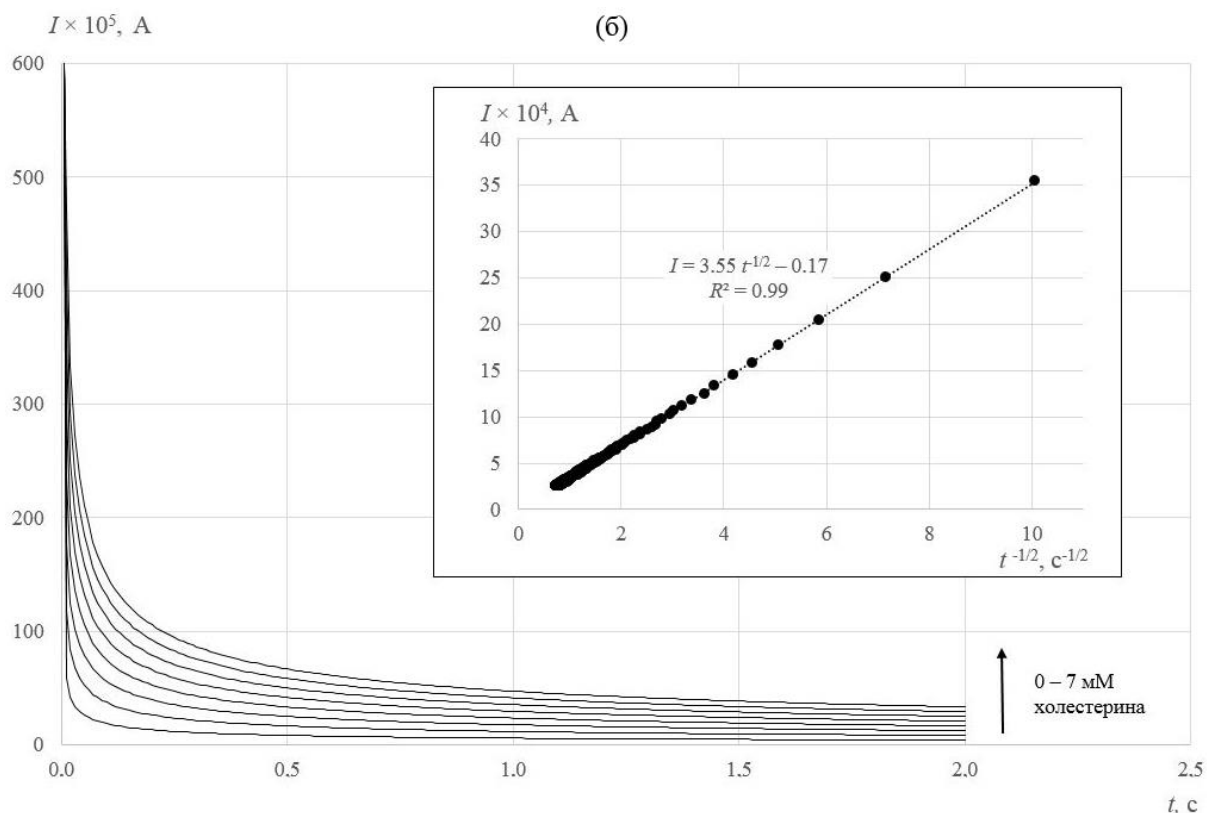


Рисунок 4.5 – Хроноамперограммы, зарегистрированные на СУЭ, модифицированном наночастицами Ag–AuНЧ, в 0.125 М растворе NaOH в смеси ТГФ–вода (1:1, по объему), содержащем 1 мМ ЦТАБ, в отсутствие и в присутствии 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 мМ холестерина; вставка: зависимость тока окисления наночастиц от обратного квадратного корня от времени в рабочем растворе, содержащим 5 мМ холестерина [196].

Наночастицы серебра, осажденные электрохимическим методом (тип 4). Электрохимическое осаждение наночастиц металлов на поверхность рабочего электрода имеет ряд преимуществ перед химическим и термохимическим. Во-первых, данный метод позволяет контролировать процесс осаждения наночастиц путем вариации потенциала осаждения, плотности тока, времени осаждения, скорости сканирования потенциала и т.д. Таким образом можно получать наночастицы с заданным размером. Во-вторых, этот метод позволяет исключить этапы подготовки наночастиц (отмывка от непрореагировавших реагентов, центрифугирование, сушка,

диспергирование в растворителе для нанесения на электроды, сушка электродов) за счет синтеза наночастиц непосредственно на электроде. Однако метод имеет недостаток – электрохимически можно получить лишь наночастицы индивидуальных металлов, наночастицы типа ядро–оболочка, наносплавы, нанонити и другие наноматериалы данным методом получить сложно. В данной работе показана возможность получения наночастиц серебра на стеклоуглеродном электроде (эAgНЧ) методом электрохимического осаждения, и изучены электрокаталитические свойства данной системы по отношению к холестерину.

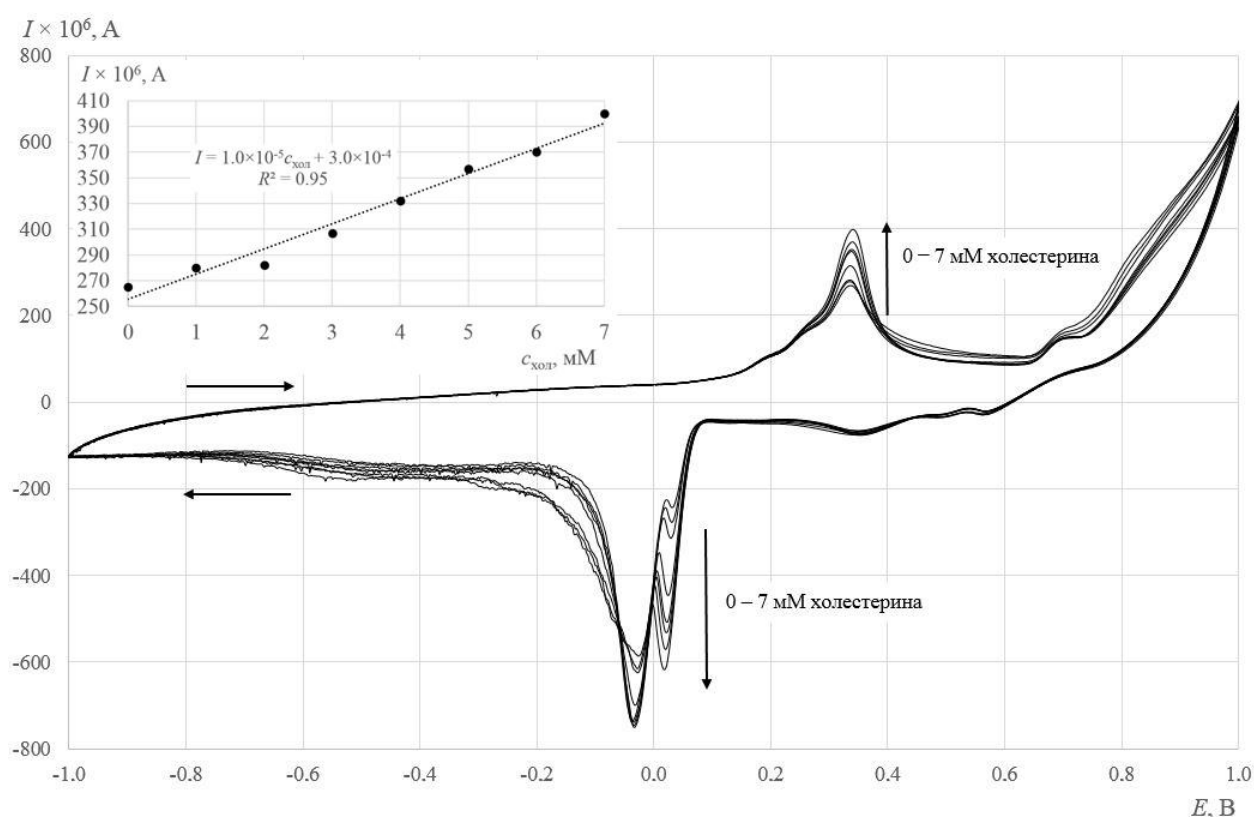


Рисунок 4.6 – Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на AgНЧ–СУЭ-электроде в 0.125 М растворе NaOH в смеси ТГФ – вода (1:1, по объему), содержащем 1 мМ ЦТАБ, в отсутствие и в присутствии 1 – 5 мМ холестерина. Скорость сканирования 50 мВ/с; вставка: зависимость тока окисления холестерина от его концентрации при потенциале 0.35 В, полученная методом хроноамперометрии.

Электрохимическое определение холестерина с использованием эAgНЧ так же, как и в случае наночастиц, полученных химическим методом, проводили в эмульсии вода–NaOH–ТГФ–ЦТАБ. ЦВА, зарегистрированные на эAgНЧ без холестерина и в присутствии 1, 2, 3, 4 и 5 мМ холестерина, представлены на рисунке 4.6. Несмотря на то, что анодный ток при добавлении холестерина в рабочий раствор заметно увеличивается. Чувствительность определения холестерина с использованием электрода, модифицированного эAgНЧ, недостаточна. Возможно, это связано с большим размером серебряных наночастиц, полученных методом электрохимического осаждения.

Сравнение полученных результатов исследования электрокаталитической активности наночастиц золота и серебра, а также неорганических солей в апротонной среде, позволяют сделать выбор оптимального электрокатализатора окисления холестерина в пользу 25 мМ раствора хлорида кобальта (II) в ацетонитриле. Этот катализатор использовался в дальнейших этапах разработки метода определения холестерина.

Глава 5. Селективное определение холестерина в модельных растворах с использованием ПМО

5.1. Синтез ПМО холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита

С целью селективного определения холестерина в модельных растворах были синтезированы ПМО холестерина на поверхности двух типов наночастиц: оксида кремния (ПМО-ОКНЧ, рисунок 5.1) и магнетита (ПМО-МНЧ, рисунок 5.2).

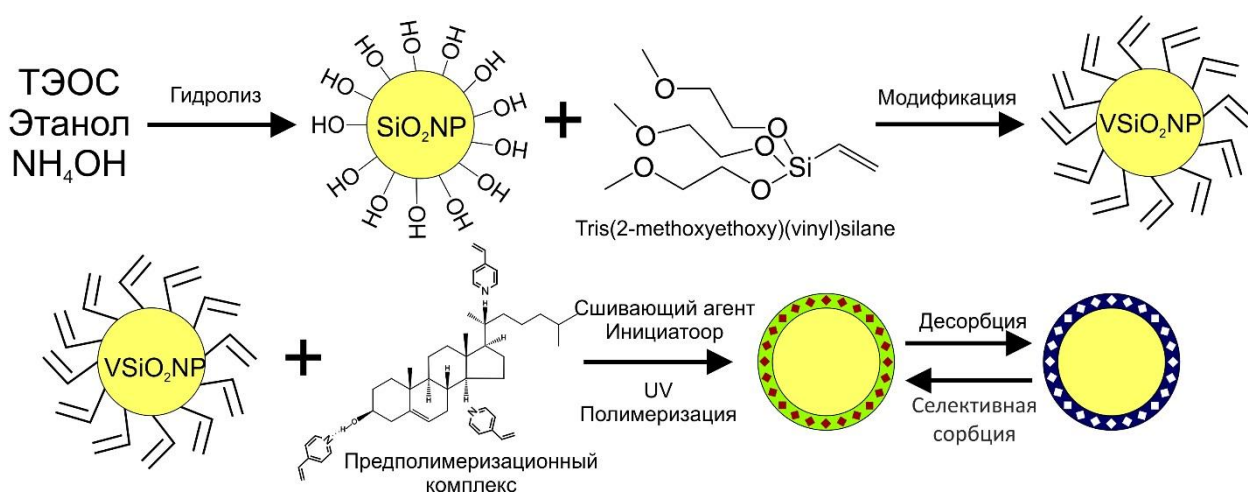


Рисунок 5.1 – Схема синтеза ПМО-ОКНЧ

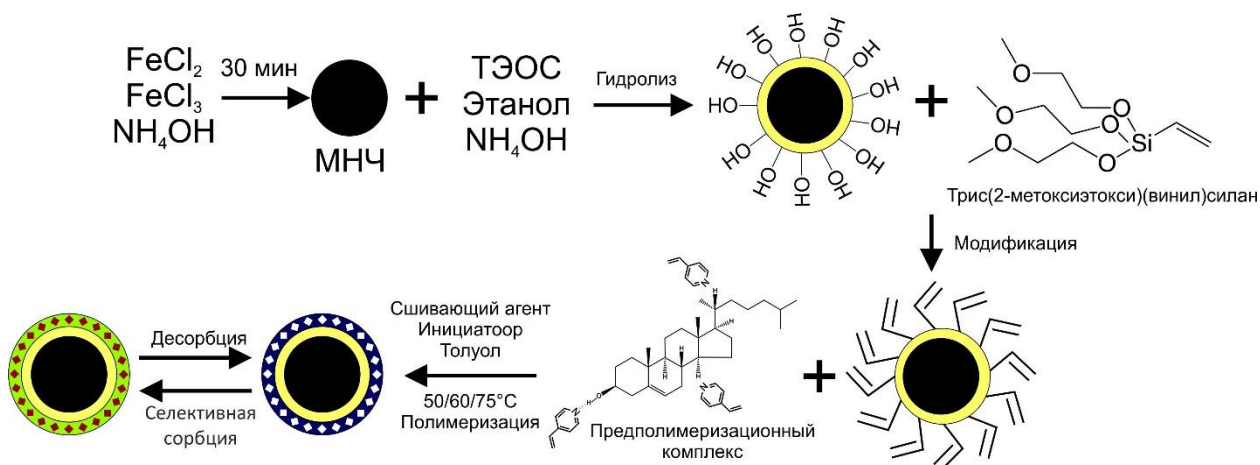


Рисунок 5.2 – Схема синтеза ПМО-МНЧ

На поверхности каждого типа наночастиц были синтезированы полимеры на основе 4-винилпиридина (функциональный мономер) и ДВБ и

ЭГДМА (сшивающие агенты). Состав предполимеризационных смесей представлен в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Состав синтезированных ПМО-ОКНЧ и ПМО-МНЧ

Молекула-темплат, холестерин, мМ	Мономер, 4-ВП, мМ	Инициатор, АИБН, мМ	Тип наночастиц-основы	Сшивающий агент, 10 мМ	
				ДВБ, Обозначение	ЭГДМА, Обозначение
0.5	2	0.1	Оксид кремния	ПМО-ОКНЧ-Д	ПМО-ОКНЧ-Э
			Магнетит	ПМО-МНЧ-Д	ПМО-МНЧ-Э

Подготовка ПМО. Каждый тип наночастиц ПМО после синтеза был подвергнут процедуре вымывания холестерина в экстракторе Сокслета с использованием растворителя тетрагидрофурана. После 40 циклов промывания наночастицы высушивали при температуре 80°C в течение 12 часов, охлаждали при комнатной температуре и использовали в дальнейших исследованиях.

5.2. Морфология частиц ПМО

На рисунке 5.3 представлены ИК-спектры синтезированных наночастиц магнетита и оксида кремния, модифицированных виниловыми группами, а также частиц ПМО, синтезированных на их поверхности. Наиболее интенсивная полоса поглощения при $\nu = 1091.64 \text{ см}^{-1}$, относящаяся к оксиду кремния, и полосы $\nu = 1634.21 \text{ см}^{-1}$ и $\nu = 967.02 \text{ см}^{-1}$, относящиеся к виниловой группе, наблюдаются на всех четырех спектрах. На спектрах ПМО-ОКНЧ-Д и ПМО-МНЧ-Д появляется полоса при $\nu = 1735.07 \text{ см}^{-1}$, относящаяся к бензольному кольцу дивинилбензола, который использовался в качестве сшивающего агента [197]. Таким образом подтверждается наличие

полимерной оболочки наночастиц оксида кремния и магнетита после синтеза ПМО холестерина на их поверхности.

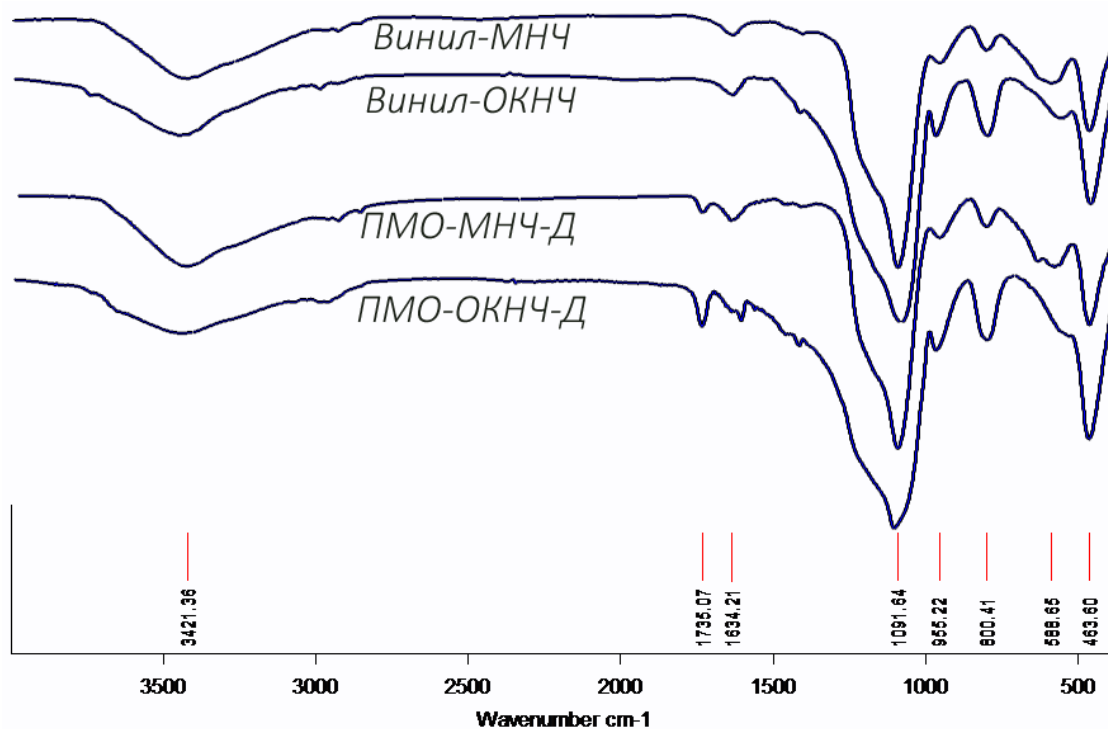
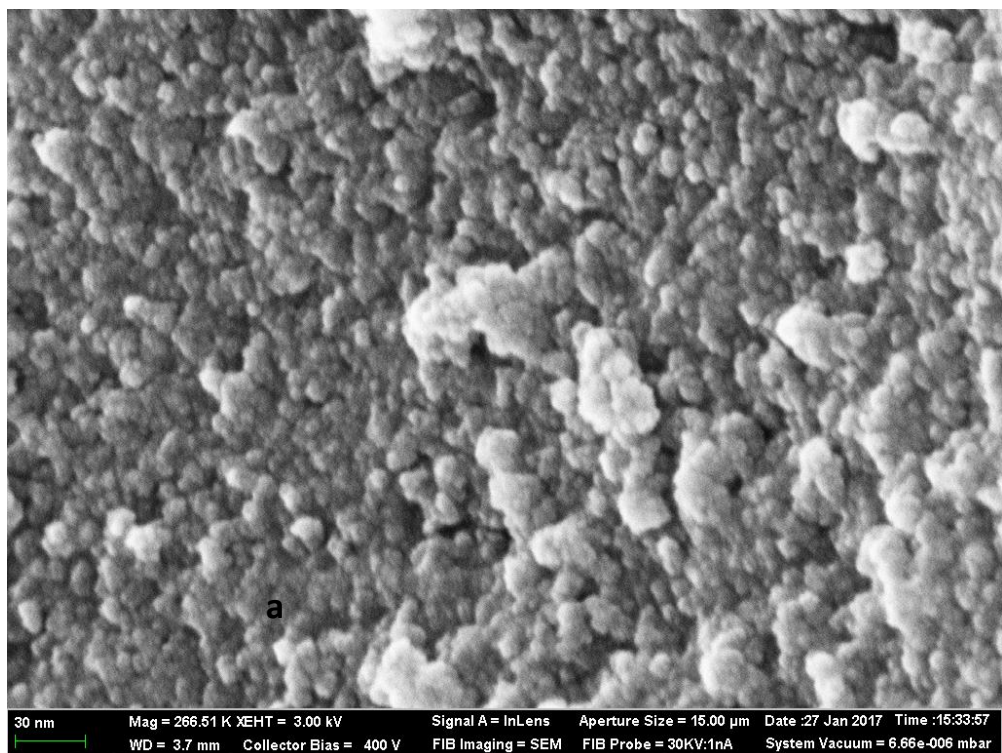


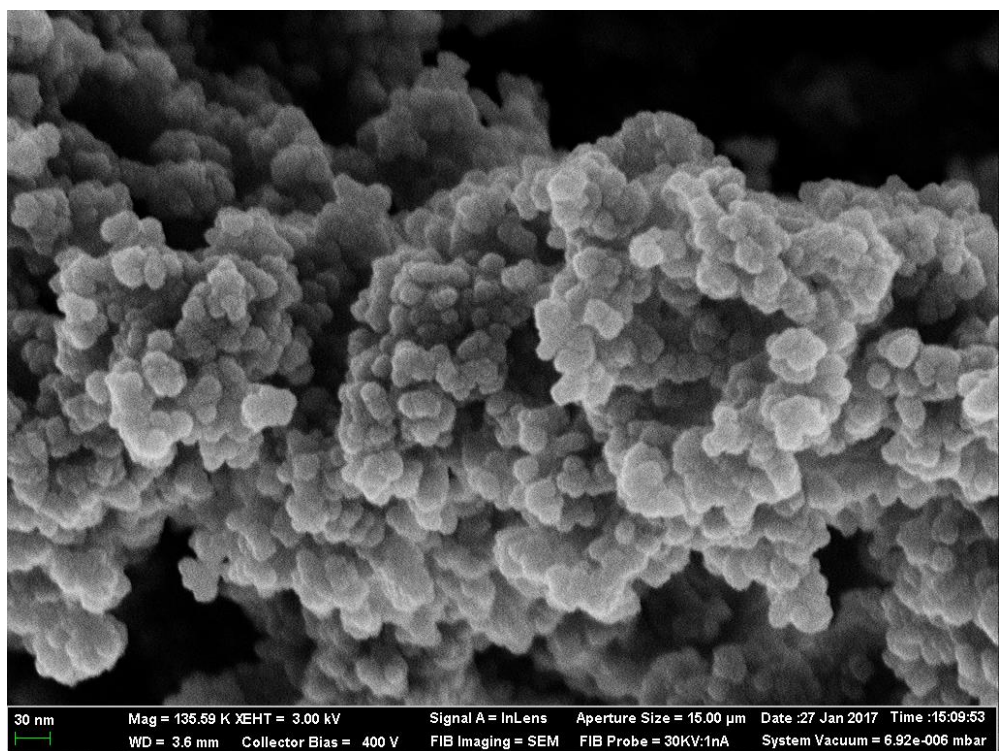
Рисунок 5.3 – ИК-спектры, зарегистрированные для наночастиц оксида кремния и магнетита, модифицированных виниловыми группами и ПМО холестерина на их поверхности.

На рисунке 5.4 представлены результаты сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцов винил-модифицированных наночастиц оксида кремния (а) и магнетита (б). Преобладающая фракция представлена сферическими наночастицами с диаметром от 17 до 22 нм и от 20 до 27 нм соответственно.

На рисунке 5.5 представлены результаты СЭМ образцов частиц ПМО-ОКНЧ-Д (а) и ПМО-МНЧ-Д (б). Преобладающая фракция представлена сферическими наночастицами с диаметром от 21 до 27 нм и от 25 до 34 нм соответственно.



а



б

Рисунок 5.4 – Микрофотографии винил-модифицированных наночастиц оксида кремния (а) и магнетита (б)

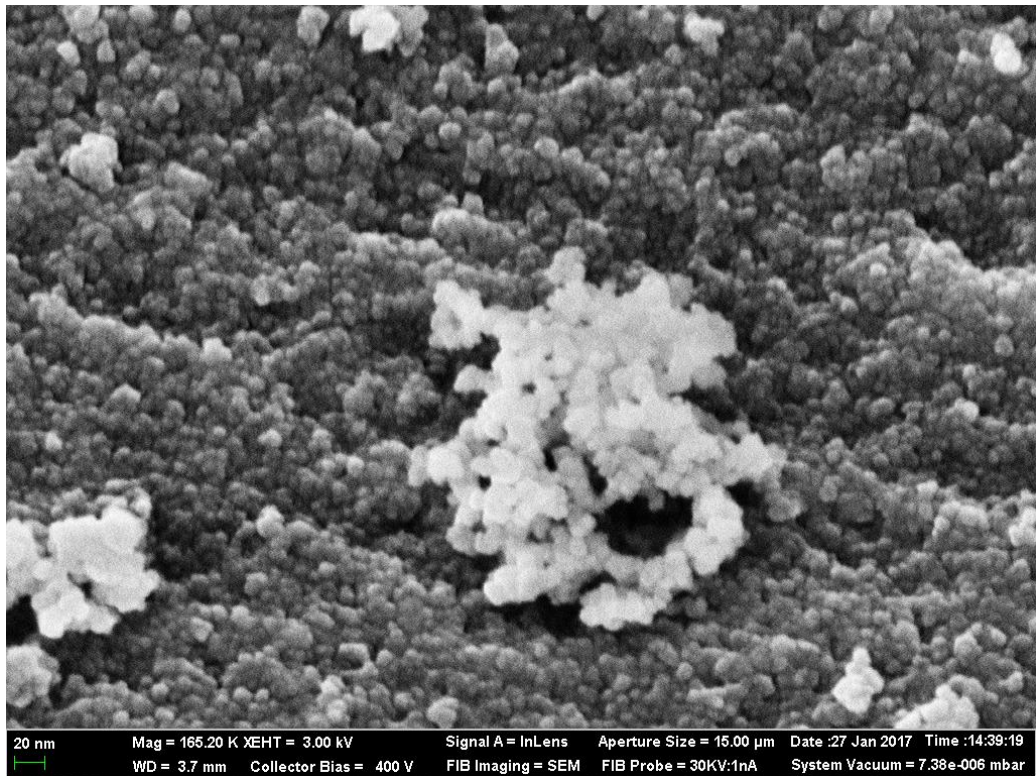
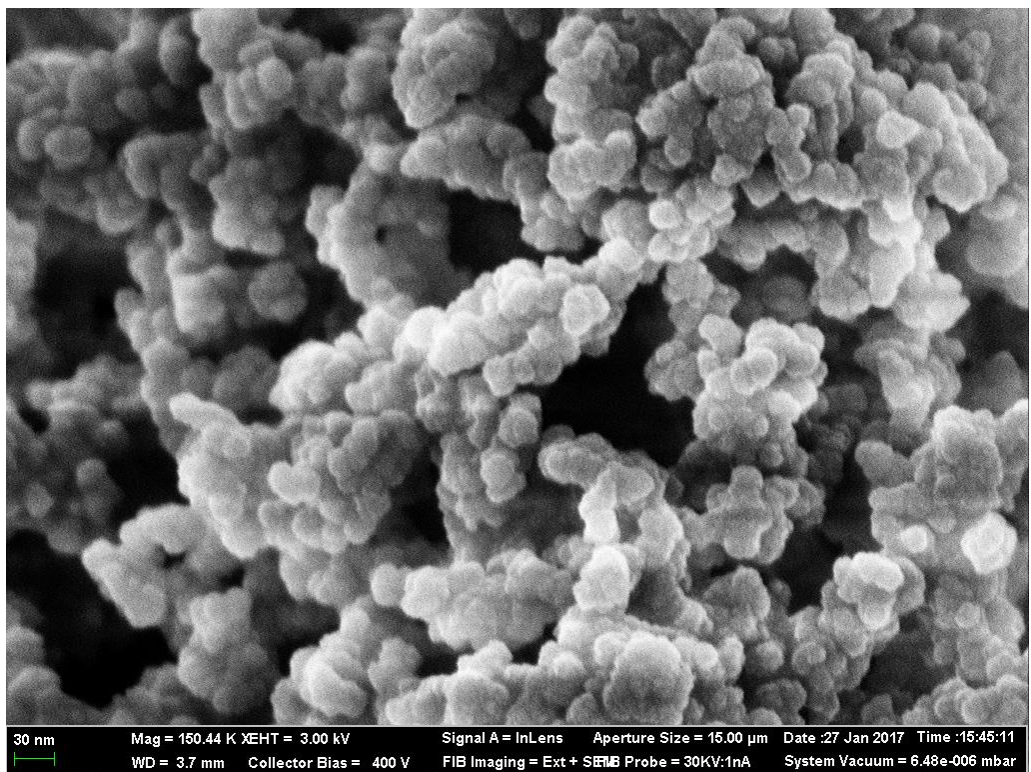
**a****б**

Рисунок 5.5 – Микрофотографии частиц ПМО-ОКНЧ-Д (а) и ПМО-МНЧ-Д (б)

Из анализа микрофотографий можно сделать вывод, что после синтеза ПМО на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита их размер увеличился в среднем на 3-4 нм и 5-6 нм, то есть толщина слоя ПМО около 1.5-2 нм и 2.5-3 нм соответственно.

5.3. Определение сорбционной способности частиц ПМО относительно холестерина

Определение сорбционной способности ПМО-ОКНЧ и ПМО-МНЧ проводили следующим способом. В пробирку Эппендорфа помещали 10 мкг наночастиц и 1 мл 3 мМ раствора холестерина (C') в ацетонитриле, подвергали ультразвуковой обработке в течение 3 минут и полученную суспензию выдерживали в течение 1 часа, после чего сепарировали наночастицы: 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 по разработанной методике с использованием хлорида кобальта (II) в качестве электрокатализатора. Рассчитанная концентрация оставшегося в супернатанте холестерина - $C_{ост}$.

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

Сорбционная емкость SE , мкмоль/г, количество холестерина, которое сорбируется 1 граммом частиц ПМО, рассчитывалась по формуле:

$$SE = \frac{v_{хол сорб}}{m_{ПМО}} = \frac{(C' - C_{ост})V}{m_{ПМО}} \quad (14)$$

где $v_{хол сорб}$ – количество вещества холестерина, сорбированного частицами ПМО, моль; V – объем анализируемого раствора холестерина, мл; $m_{ПМО}$ – масса частиц ПМО, г.

Степень извлечения R , %, доля холестерина, которая десорбируется в ацетонитрил, рассчитывалась по формуле:

$$R = \frac{v_{хол извл}}{v_{хол сорб}} 100\% = \frac{C_{дес}}{C' - C_{ост}} 100\% \quad (15)$$

где - $v_{хол извл}$ – количество вещества холестерина, десорбировавшееся из частиц ПМО, моль; $C_{ост}$ – концентрация холестерина в исследуемом растворе после сорбции частицами ПМО, моль/л. Результаты представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Остаточное содержание холестерина в супернатанте после сорбции на наночастицах ПМО ($C_{ост}$), содержание холестерина в ацетонитриле после десорбции из наночастиц ПМО ($C_{десорб}$) и рассчитанная сорбционная емкость ПМО (SE).

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

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

5.4. Разработка аппаратной платформы для анализа содержания холестерина в модельном растворе.

На рисунке 5.6 представлена схема установки для определения холестерина в модельном растворе, имитирующем сыворотку крови.

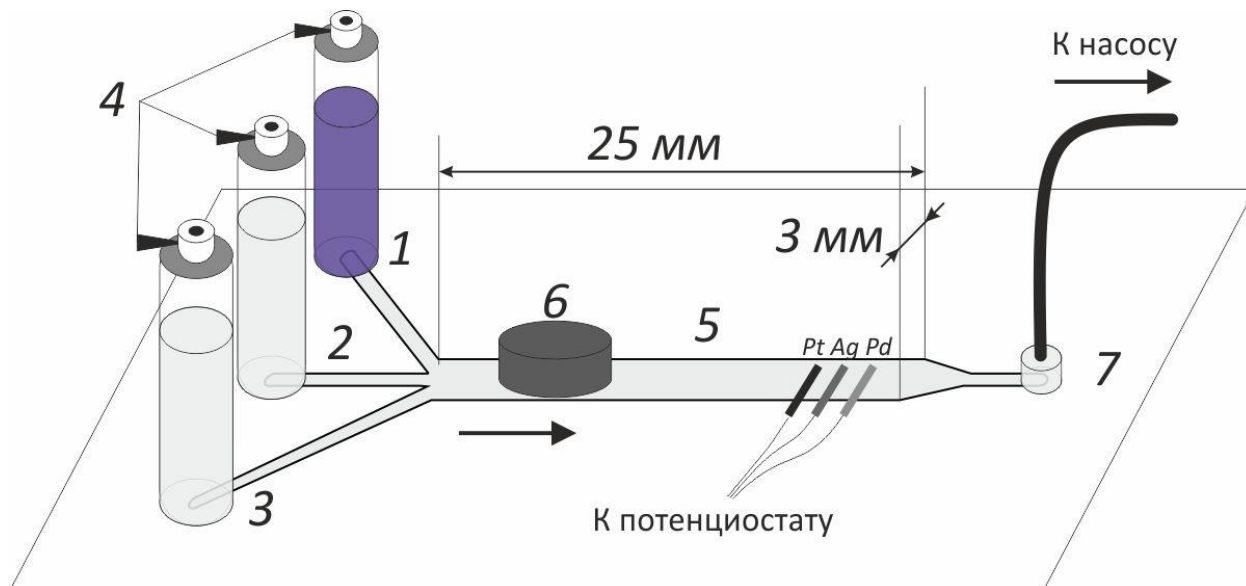


Рисунок 5.6 – Схема установки для определения свободного холестерина. Стрелкой указано направление движения жидкости. Пояснения в тексте.

Пластика μ Slide, имеющая 3 входных отверстия **1-3**, проточную зону **5** и одно выходное отверстие **7**, закрепляется на неподвижной поверхности. К входному отверстию **1** подведена емкость, содержащая раствор хлорида кобальта (II) концентрацией 25 мМ и перхлората лития концентрацией 0,1 М в ацетонитриле, ко входному отверстию **2** – емкость, содержащая суспензию 10 мг магнитных частиц с ПМО холестерина в стандартном растворе холестерина в ацетонитриле ($C_{cm} = 3$ мМ), к входному отверстию **3** – емкость, содержащая исследуемый раствор с неизвестным количеством холестерина в ацетонитриле, в котором диспергированы 10 мг ПМО-МНЧ-Д. Каждая емкость снабжена клапаном **4**. Если клапан открыт, жидкость из емкости поступает в проточную зону под действием насоса, если закрыт, то жидкость остается в емкости. Поочередное открытие и закрытие клапанов позволяет пропускать через проточную зону необходимый раствор. В проточной зоне **5**

установлены три электрода: платиновая проволока, выполняющая функции рабочего электрода, серебряная проволока – электрода сравнения, палладиевая проволока – противозлектрод. Сверху над проточной зоной устанавливается магнит **6** в целях задержки в ней магнитных частиц. Проточная зона заканчивается выходным отверстием **7** с подключенным к нему шлангом, через который раствор в процессе прокачки попадает в емкость для слива, которая соединена непосредственно с перистальтическим насосом. Насос обеспечивает движение жидкости через проточную зону со скоростью 5 мкл/с.

Процесс анализа включает в себя следующие стадии.

1. Раствор из емкости **1** поступает в проточную зону, в которой происходит подготовка рабочего электрода путем многократного циклирования потенциала. В конце процедуры регистрируется вольтамперограмма с линейной разверткой потенциала в диапазоне от 0 до 1.7 В отн. серебряной проволоки. Фиксируется пик тока окисления катализатора – I_0 .

2. Суспензия из емкости **2** поступает в проточную зону, на которую сверху установлен магнит, магнитные частицы с сорбированным на них холестерином задерживаются в проточной зоне.

3. Раствор из емкости **1** медленно протекает через задержанные магнитные частицы, при этом сорбированный холестерин десорбируется в ацетонитрил. Каждые 30 с регистрируется линейная развертка потенциала в том же диапазоне, что и в п.1. Наблюдается постепенный рост пика тока окисления катализатора CoCl_2 относительно времени пропускания раствора через проточную зону, а затем снижение. Фиксируется максимальное зарегистрированное значение тока - I_{cm} .

4. Магнит удаляется, и раствор из емкости **1** прокачивается через проточную зону, чтобы вымыть частицы из нее. Частицы ПМО попадают в емкость для слива, откуда могут быть впоследствии легко извлечены с помощью магнита и повторно использованы после отмывки.

5. Повторяются пункты 2-4, но с использованием суспензии из емкости 3 с неизвестным количеством холестерина. Фиксируется максимальное зарегистрированное значение тока - $I_{обр}$.

6. Установка готова для следующего анализа.

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

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

Весь процесс анализа занимает не более 15 минут.

На рисунке 5.7 представлена зависимость величины регистрируемого пика тока окисления катализатора от времени протекания раствора над электродами. Кривая 1 соответствует раствору, содержащему только 25 мМ $CoCl_2$ и 100 мМ перхлората лития. Так как для любой точки пик тока окисления катализатора – постоянная величина, ее можно взять за базовую линию, относительно которой следует рассчитывать прирост тока после введения раствора с аналитом. Кривая 2 соответствует раствору, содержащему помимо катализатора и индифферентного электролита холестерин, который десорбируется из частиц ПМО, предварительно выдержанных в стандартном растворе холестерина концентрацией 3 мМ. Кривая 3 соответствует раствору, содержащему холестерин, который десорбируется из частиц ПМО, предварительно выдержанных в исследуемом растворе холестерина (образце) неизвестной концентрации.

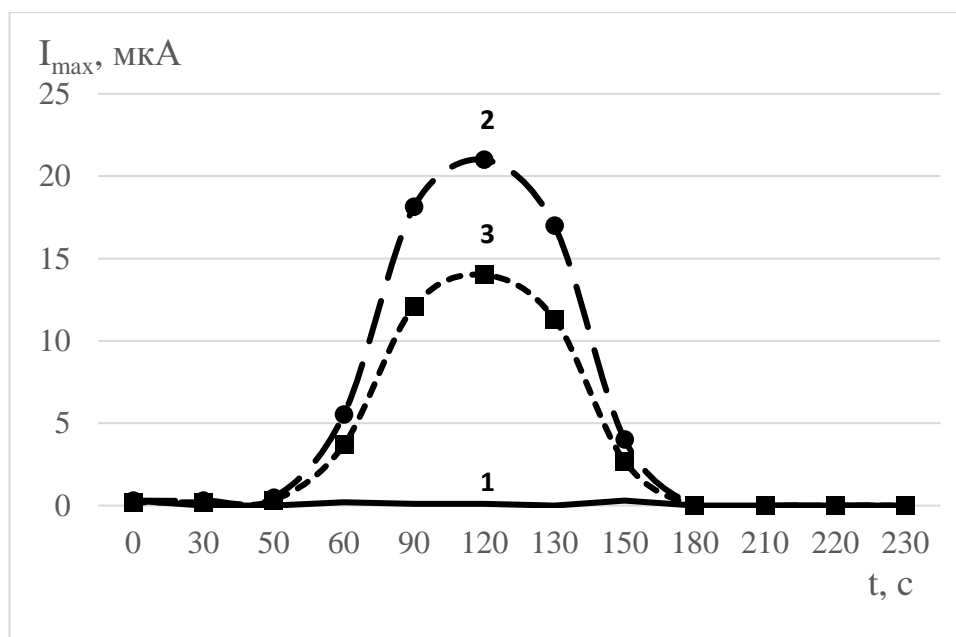


Рисунок 5.7 – Зависимость величины регистрируемого пика тока окисления катализатора от времени протекания раствора над электродами. Скорость потока 5 мкл/с.

Таким образом было измерено содержание холестерина в ацетонитриле, а также в модельных растворах двух составов Мр1 и Мр2 (состав модельных растворов указан в таблице 5.3). Результаты измерений представлены в таблице 5.4.

Таблица 5.3 – Состав модельных растворов, имитирующих сыворотку крови

№	Компоненты модельного раствора	Концентрация, мМ	
		Мр1	Мр2
1	Аланин	0.314	0.314
2	Глицин	0.320	0.320
3	Лейцин	0.187	0.187
4	Аспарагиновая кислота	0.022	0.022
5	Глутаминовая кислота	0.089	0.089
6	Глюкоза	6.400	6.4
7	Аскорбиновая кислота	0.057	0.057
8	Мочевая кислота	0,480	0.480
9	Креатинин	1	1
10	Мочевина	5	5
11	Холестерин	5	7

Таблица 5.4 – Результаты электрокаталитического определения холестерина, растворенного в ацетонитриле, а также 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 ацетонитриле $C = 2$ мМ	2.20 ± 0.28 (16.2)
Мр1	5.41 ± 0.35 (18.2)
Мр2	7.37 ± 0.29 (17.8)

Полученные результаты указывают на наличие неспецифической сорбции компонентов модельных растворов на поверхности частиц ПМО. Тем не менее частицы ПМО-МНЧ-Д демонстрируют селективность по отношению к холестерину, достаточную для их использования с целью выделения этого анализа из растворов. Собранный установка для определения холестерина может быть автоматизирована с использованием простого электронного инструментария, тем самым будет обеспечена значительная экспрессность процедуры.

Выводы

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

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

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

4. Установлено, что процесс электрокаталитического окисления холестерина с использованием $CoCl_2$ в ацетонитриле подчиняется ферментативной кинетике, уравнению Михаэлиса-Ментен. Рассчитаны константа Михаэлиса ($K_m = 0.370$ ммоль·л⁻¹) и каталитическая константа

($k_{cat} = 0.94 \text{ c}^{-1}$). Показано, что по эффективности данный катализатор не уступает природному ферменту холестериноксидазе.

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

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

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

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в применении разработанного метода определения холестерина для анализа реальных образцов плазмы и сыворотки крови человека и его внедрения в клиническую практику. Рекомендуется также провести исследования по автоматизации и миниатюризации разработанной аппаратной платформы и развить предлагаемый подход в направлении бесферментного определения эфиров холестерина, стероидных гормонов и других диагностически важных соединений стероидной природы.

Список литературы

1. Organisation mondiale de la santé. Global status report on noncommunicable diseases 2014: attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility [Текст]. – Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014. – 302 p.
2. National Cholesterol Education Program (U.S.). Recommendations for improving cholesterol measurement: a report [Текст]. – Bethesda, Md.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, 1990. – (various pagings) p.
3. Виноградов, А.В. Превентивная кардиология. Превентивная кардиология [Текст] / А.В. Виноградов А.В., А.Н. Климов А.Н., А.И. Клиорин – М.: Медицина, 1987. – 512 с.
4. Rifai, N. Handbook of lipoprotein testing 2nd ed [Текст] / Rifai N., Warnick G.R., Dominiczak M.H. – Washington, DC: AACC Press, 2000. – 819 p.
5. Fraser, C.G. Biological variation in clinical chemistry. An update: collated data, 1988-1991 [Текст] / C.G. Fraser // Archives of Pathology & Laboratory Medicine. – 1992. – V. 116, № 9. – P. 916–923.
6. Климов, А.Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения [Текст] / А.Н. Климов, Н.Г. Никульчева. – Санкт-Петербург: Питер Ком, 1999. – 512 с.
7. Fredrickson, D.S. Fat transport in lipoproteins – an integrated approach to mechanisms and disorders [Текст] / D.S. Fredrickson, R.I. Levy, R.S. Lees // New England Journal of Medicine. – 1967. – V. 276, № 1. – P. 34–42.
8. Fischbach, F.T. A manual of laboratory and diagnostic tests. Ninth edition [Текст] / F.T. Fischbach, M.B. Dunning. – Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2015. – 1261 p.
9. Liebermann C. Ueber das Oxychinoterpen [Текст] / C. Liebermann // Deutsche Chemische Gesellschaft. – 1885. – V. 18. – P. 1803–1809.
10. Burchard, H. Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins [Текст] / H. Burchard // Chem Zentralbl. – 1890. – V. 61. – P. 25–27.

11. Cooper, G.R. Interlaboratory testing of the transferability of a candidate reference method for total cholesterol in serum [Текст] / G.R. Cooper // *Clinical Chemistry*. – 1986. – V. 32, № 6. – P. 921–929.
12. Zak, B. Methodology in determination of cholesterol; a review [Текст] / B. Zak, N. Ressler // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1955. – V. 23, № 4. – P. 433–446.
13. Chiamori, N. Study of the ferric chloride method for determination of total cholesterol and cholesterol esters [Текст] / N. Chiamori, R.J. Henry // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1959. – V. 31, № 4. – P. 305–309.
14. Zlatkis, A. A new method for the direct determination of serum cholesterol [Текст] / A. Zlatkis, B. Zak, A.J. Boyle // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1953. – V. 41, № 3. – P. 486–492.
15. Solow, E.B. A fluorometric ferric chloride method for determining cholesterol in cerebrospinal fluid and serum [Текст] / E.B. Solow, L.W. Freeman // *Clinical Chemistry*. – 1970. – V. 16, № 6. – P. 472–476.
16. Schoenheimer, R. A Micromethod for the Determination of Free and Combined Cholesterol [Текст] / R. Schoenheimer, W.M. Sperry // *Journal of Biological Chemistry*. – 1934. – V. 106, № 2. – P. 745–760.
17. Sperry, W.M. A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination [Текст] / W.M. Sperry, M. Webb // *Journal of Biological Chemistry*. – 1950. – V. 187, № 1. – P. 97–106.
18. Arya, S.K. Recent advances in cholesterol biosensor [Текст] / S.K. Arya, M. Datta, B.D. Malhotra // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2008. – V. 23, № 7. – P. 1083–1100.
19. Singh, S. Cholesterol biosensor based on cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase immobilized onto conducting polyaniline films [Текст] / S. Singh, P.R. Solanki, M.K. Pandey, B.D. Malhotra // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2006. – V. 115, № 1. – P. 534–541.

20. Carlson, S.E. A sensitive enzymatic method for the determination of free and esterified tissue cholesterol [Текст] / S.E. Carlson, S. Goldfarb // *Clinica Chimica Acta*. – 1977. – V. 79, № 3. – P. 575–582.
21. Van Gent, C.M. Cholesterol determinations. A comparative study of methods with special reference to enzymatic procedures [Текст] / C.M. van Gent, H.A. van der Voort, A.M. de Bruyn, F. Klein // *Clinica Chimica Acta*. – 1977. – V. 75, № 2. – P. 243–251.
22. Huang, H. Fluorometric enzymatic determination of total cholesterol in serum [Текст] / H. Huang, J.W. Kauan, G.G. Guilbault // *Clinical Chemistry*. – 1975. – V. 21, № 11. – P. 1605–1608.
23. Borner, K. Enzymatic determination of total cholesterol with the Greiner Selective Analyzer (GSA-II) [Текст] / K. Borner, S. Klose // *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. – 1977. – V. 15, № 3. – P. 121–130.
24. Salè, F.O. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts [Текст] / F.O. Salè, S. Marchesini, P.H. Fishman, B. Berra // *Analytical Biochemistry*. – 1984. – V. 142, № 2. – P. 347–350.
25. Kaplan, L.A. *Clinical chemistry: theory, analysis, correlation: with 509 illustrations and 25 color plates*. 5th ed. [Текст] / L.A. Kaplan, A.J. Pesce. – St. Louis, Mo: Mosby/Elsevier, 2010. – 1176 p.
26. Abel, L.L. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity [Текст] / L.L. Abel, B.B. Levy, B.B. Brodie, F.E. Kendall // *Journal of Biological Chemistry*. – 1952. – V. 195, № 1. – P. 357–366.
27. Ellerbe, P. A comparison of results for cholesterol in human serum obtained by the Reference Method and by the Definitive Method of the National Reference System for cholesterol [Текст] / P. Ellerbe, G.L. Myers, G.R. Cooper, H.S. Hertz, L.T. Sniegowski, M.J. Welch, E. White 5th. // *Clinical Chemistry*. – 1990. – V. 36, №2. – P. 370–375.
28. Tel R.M., Berends G.T. Incomplete hydrolysis of cholesteryl esters during the enzymatic cholesterol determination as evidenced by aqueous cholesteryl ester

solutions: comparison of six enzymatic procedures with the Liebermann-Burchard method [Текст] / R.M. Tel, G.T. Berends // *Journal Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. – 1980. – V. 18, № 10. – P. 595–601.

29. Wiebe, D.A. Influence of incomplete cholesteryl ester hydrolysis on enzymic measurements of cholesterol [Текст] / D.A. Wiebe, J.T. Bernert // *Clinical Chemistry*. – 1984. – V. 30, № 3. – P. 352–356.

30. Deacon, A.C. Enzymic assay of total cholesterol involving chemical or enzymic hydrolysis--a comparison of methods [Текст] / A.C. Deacon, P.J. Dawson // *Clinical Chemistry*. – 1979. – V. 25, № 6. – P. 976–984.

31. Liu, X. Hydrophobic ionic liquid immobilizing cholesterol oxidase on the electrodeposited Prussian blue on glassy carbon electrode for detection of cholesterol [Текст] / L. Xiuhui, N. Zhihan, Q. Yu, Z. Lichun, L. Xiaoquan // *Electrochimica Acta*. – 2013. – V. 90. – P. 203–209.

32. Sekretaryova, A.N. Cholesterol Self-Powered Biosensor [Текст] / A.N. Sekretaryova, V. Beni, M. Eriksson, A.A. Karyakin, A.P. Turner, M.Y. Vagin // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86, № 19. – P. 9540–9547.

33. Muhammet, S.M. Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and aniline in sulphuric Acid for the determination of cholesterol in serum [Текст] / S.M. Muhammet, S. Cete, F. Arslan, A. Yaşar // *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*. – 2009. – V. 37, № 6. – P. 273–278.

34. Yıldırımoğlu, F. Preparation of a polypyrrole-polyvinylsulphonate composite film biosensor for determination of cholesterol based on entrapment of cholesterol oxidase [Текст] / F. Yıldırımoğlu, F. Arslan, S. Çete, A. Yaşar // *Sensors*. – 2009. – V. 9, № 8. – P. 6435–6445.

35. Nantaphol, S. A Novel Paper-Based Device Coupled with a Silver Nanoparticle-Modified Boron-Doped Diamond Electrode for Cholesterol Detection [Текст] / S. Nantaphol, O. Chailapakul, W. Siangproh // *Analytica Chimica Acta*. – 2015. – V. 891. – P. 136–143.

36. Singh, S.P. Cholesterol biosensor based on rf sputtered zinc oxide nanoporous thin film [Текст] / S. P. Singh, S. K. Arya, P. Pandey, B. D. M. S. Saha, K. Sreenivas, V. Gupta // *Applied Physics Letters*. – 2007. – V. 91, № 6. – P. 063901–063901.
37. Saxena, U. Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples [Текст] / U. Saxena, M. Chakraborty, P. Goswami // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – V. 26, № 6. – P. 3037–3043.
38. Gopalan, A.I. Development of a stable cholesterol biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-gold nanoparticles composite covered with a layer of chitosan-room-temperature ionic liquid network [Текст] / A.I. Gopalan, K.-P. Lee, D. Ragupathy // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2009. – V. 24, № 7. – P. 2211–2217.
39. Singh, J. Nanostructured nickel oxide-chitosan film for application to cholesterol sensor [Текст] / J. Singh, P. Kalita, M. K. Singh, B. D. Malhotra // *Applied Physics Letters*. – 2011. – V. 98, № 12. – P. 123702–123702.
40. Xu, Z. Fabrication of multi-walled carbon nanotube-polyaniline/platinum nanocomposite films towards improved performance for a cholesterol amperometric biosensor [Текст] / Z. Xu, X. Cheng, J. Tan, X. Gan // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2015. V. 63, №6 – P. 757-764.
41. Saxena, U. Multiwalled carbon nanotube-based bi-enzyme electrode for total cholesterol estimation in human serum [Текст] / U. Saxena, M. Das, S. Ahmad, L. Barbora, M. Borthakur, A. Verma, U. Bora, P. Goswami // *Journal of Experimental Nanoscience*. – 2011. – V. 6, № 1. – P. 84–95.
42. Singh, K. Polypyrrole/multiwalled carbon nanotubes-based biosensor for cholesterol estimation [Текст] / K. Singh, Pratima R. Solanki, T. Basu, B.D. Malhotra // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2012. – V. 23, № 7. – P. 1084–1091.
43. Ahmad, R. High-performance cholesterol sensor based on the solution-gated field effect transistor fabricated with ZnO nanorods [Текст] / R. Ahmad, N. Tripathy, Y.-B. Hahn // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – V. 45. – P. 281–286.

44. Ahmad, R. A comprehensive biosensor integrated with a ZnO nanorod FET array for selective detection of glucose, cholesterol and urea [Текст] / R. Ahmad, N. Tripathy, J. Park, Y. Hahn // *Chemical Communications*. – 2015. – V. 51, № 60. – P. 11968–11971.
45. Ahmadalinezhad, A. High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol [Текст] / A. Ahmadalinezhad, A. Chen // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2011. – V. 26, № 11. – P. 4508–4513.
46. Liu, X. Hydrophobic ionic liquid immobilizing cholesterol oxidase on the electrodeposited Prussian blue on glassy carbon electrode for detection of cholesterol [Текст] / X. Liu, Z. Nan, Y. Qiu, L. Zheng, X. Lu // *Electrochimica Acta*. – 2013. – V. 90. – P. 203–209.
47. Pauliukaite, R. Application of room temperature ionic liquids to the development of electrochemical lipase biosensing systems for water-insoluble analytes [Текст] / R. Pauliukaite, A. P. Doherty, K.D. Murnaghan, C.M.A. Brett // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2011. – V. 656, № 1–2. – P. 96–101.
48. Vidal J.-C., Garcia E., Castillo J.-R. Development of a platinized and ferrocene-mediated cholesterol amperometric biosensor based on electropolymerization of polypyrrole in a flow system [Текст] / J.-C. Vidal, E. Garcia, J.-R. Castillo // *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. – 2002. – V. 18, № 5. – P. 537–542.
49. Ram, M.K. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique [Текст] / M.K. Ram, P. Bertonecello, H. Dinga, S. Paddeua, C. Nicolini // *Biosensors & bioelectronics*. – 2001. – V. 16, № 9–12. – P. 849–856.
50. Ohnuki, H. Amperometric cholesterol biosensors based on hybrid organic–inorganic Langmuir–Blodgett films [Текст] / H. Ohnuki, R. Honjo, H. Endo, T. Imakubo, M. Izumi // *Thin Solid Films*. – 2009. – V. 518, № 2. – P. 596–599.
51. Vrieling A. Cholesterol Oxidase: Structure and Function // *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins: Structure and Function in Health and Disease* [Текст] / A. Vrieling, J.R. Harris. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. – V. 51. – P. 137–158.

52. de Montellano, O. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry. 3rd ed. [Текст] / O. de Montellano, R. Paul. – New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. – 689 p.
53. Carrara, S. Screen-printed electrodes based on carbon nanotubes and cytochrome P450_{scc} for highly sensitive cholesterol biosensors [Текст] / S. Carrara, V. V. Shumyantseva, A. I. Archakov, B. Samoria // Biosensors and Bioelectronics. – 2008. – V. 24, № 1. – P. 148–150.
54. Schneider, E. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors [Текст] / E. Schneider, D.S. Clark // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – V. 39, № 1. – P. 1–13.
55. Shumyantseva, V. Cholesterol amperometric biosensor based on cytochrome P450_{scc} [Текст] / V. Shumyantseva // Biosensors and Bioelectronics. – 2004. – V. 19, № 9. – P. 971–976.
56. Osgood, H. Transition metal (Fe, Co, Ni, and Mn) oxides for oxygen reduction and evolution bifunctional catalysts in alkaline media [Текст] / H. Osgood, S. V. Devaguptapua, H. Xu, J. Choc, G. Wu // Nano Today. – 2016. – V. 11, № 5. – P. 601–625.
57. de Tacconi, N.R. Metal Hexacyanoferrates: Electrosynthesis, in Situ Characterization, and Applications [Текст] / N.R. de Tacconi, K. Rajeshwar, R.O. Lezna // Chemistry of Materials. – 2003. – V. 15, № 16. – P. 3046–3062.
58. Zagal, J.H. Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions [Текст] / J. H. Zagal, S. Griveau, J. F. Silva, T. Nyokong, F. Bedioui // Coordination Chemistry Reviews. – 2010. – V. 254, № 23–24. – P. 2755–2791.
59. Casella, I.G. Amperometric determination of underivatized amino acids at a nickel-modified gold electrode by anion-exchange chromatography [Текст] / I.G. Casella, M. Gatta, T.R.I. Cataldi // Journal of Chromatography A. – 2000. – V. 878, № 1. – P. 57–67.

60. Fan, Y. Preparation of cobalt hydroxide film modified electrode and its analytical application [Текст] / Y. Fan, L. Fan, S. Meng, Y. Guo, Y. Liu // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 67, № 4. – P. 370–377.
61. Hasanzadeh, M. Cobalt hydroxide nanoparticles modified glassy carbon electrode as a biosensor for electrooxidation and determination of some amino acids [Текст] / M. Hasanzadeh, G. Karim-Nezhad, N. Shadjou, M. Hajjizadeh, B. Khalilzadeh, L. Saghatforoush, M.H. Abnosi, A. Babaei, S. Ershad // *Analytical Biochemistry*. – 2009. – V. 389, № 2. – P. 130–137.
62. Dinamani, M. Electrocatalysis of oxygen evolution at stainless steel anodes by electrosynthesized cobalt hydroxide coatings [Текст] / M. Dinamani, P.V. Kamath // *Journal of Applied Electrochemistry*. – 2000. – V. 30, № 10. – P. 1157–1161.
63. Miao, Y. Electrocatalysis and electroanalysis of nickel, its oxides, hydroxides and oxyhydroxides toward small molecules [Текст] / Y. Miao, L. Ouyang, S. Zhou, L. Xu, Z. Yang, M. Xiao, R. Ouyang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – V. 53. – P. 428–439.
64. Fleischmann, M. The oxidation of organic compounds at a nickel anode in alkaline solution [Текст] / M. Fleischmann, K. Korinek, D. Pletcher // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1971. – V. 31, № 1. – P. 39–49.
65. Cai C.-X., Xue K.-H., Xu S.-M. Electrocatalytic activity of a cobalt hexacyanoferrate modified glassy carbon electrode toward ascorbic acid oxidation [Текст] / C.-X. Cai, K.-H. Xue, S.-M. Xu // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2000. – V. 486, № 2. – P. 111–118.
66. Cai, C.-X. Cobalt hexacyanoferrate modified microband gold electrode and its electrocatalytic activity for oxidation of NADH [Текст] / C.-X. Cai, H.-X. Ju, H.-Y. Chen // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 1995. – V. 397, № 1. – P. 185–190.
67. Lin, C. Catalytic electrooxidation of hydrazine at the nickel ferricyanide modified electrode: can an array of surface bound one-electron redox centers act in

concert? [Текст] / C. Lin, A.B. Bocarsly // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1991. – V. 300, № 1. – P. 325–345.

68. Pandey, P.C. Novel synthesis of nickel–iron hexacyanoferrate nanoparticles and its application in electrochemical sensing [Текст] / P.C. Pandey, D. Panday // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2016. – V. 763. – P. 63–70.

69. Yu, H. Electrochemical preparation of cobalt hexacyanoferrate nanoparticles under the synergic action of EDTA and overoxidized polypyrrole film [Текст] / H. Yu, Y. Wang, Y.-Y. Lian, S.-W. Song, Z.-Y. Liu, G.-C. Qi // *Electrochimica Acta*. – 2012. – V. 85. – P. 650–658.

70. Cataldi, T.R.I. Enhanced stability and electrocatalytic activity of a ruthenium-modified cobalt–hexacyanoferrate film electrode [Текст] / T.R.I. Cataldi, G. De Benedetto, A. Bianchini // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 1999. – V. 471, № 1. – P. 42–47.

71. Zhou, D.-M. Catalytic oxidation of dopamine at a microdisk platinum electrode modified by electrodeposition of nickel hexacyanoferrate and Nafion® [Текст] / D.-M. Zhou, H.-X. Ju, H.-Y. Chen // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 1996. – V. 408, № 1. – P. 219–223.

72. Chen, S.-M. The electrochemical properties of dopamine, epinephrine, norepinephrine, and their electrocatalytic reactions on cobalt (II) hexacyanoferrate films [Текст] / S.-M. Chen, K.-T. Peng // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2003. – V. 547, № 2. – P. 179–189.

73. Jabri, E. The Crystal Structure of Urease from *Klebsiella aerogenes* [Текст] / E. Jabri, M.B. Carr, R.P. Hausinger, P.A. Karplus // *Science*. – 1995. – V. 268, № May. – P. 998–1004.

74. Palmer, T. *Enzymes: biochemistry, biotechnology and clinical chemistry*. 2nd ed. [Текст] / T. Palmer, P.L.R. Bonner. – Chichester: Horwood, 2007. – 416 p.

75. Козицина, А.Н. Каталитические системы на основе органических комплексов никеля (II) в хроноамперометрическом определении мочевины и креатинина [Текст] / А.Н. Козицина, Ж.В. Шалыгина, С.С. Деденева, Г.Л.

Русинов, С.Г. Толщина, Е.В. Вербицкий, Х.З. Брайнина // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2009. № 6. – С. 1091–1097.

76. Sorokin, A.B. Phthalocyanine Metal Complexes in Catalysis [Текст] / A.B Sorokin // Chemical Reviews. – 2013. V. 113. – P. 8152–8191.

77. Shaidarova, L.G. Electrochemical behavior and voltammetric determination of cysteine and cystine at carbon-paste electrodes modified with metal phthalocyanines [Текст] / L.G. Shaidarova, S. A. Ziganshina, A. V. Gedmina, I. A. Chelnokova, G.K. Budnikov // Journal of Analytical Chemistry. – 2011. – V. 66, № 7. – P. 633–641.

78. Cardoso, W.S. Nickel-dimethylglyoxime complex modified graphite and carbon paste electrodes: preparation and catalytic activity towards methanol/ethanol oxidation [Текст] / W.S. Cardoso, V.L.N. Dias, W.M. Costa, I. Araujo Rodrigues, E.P. Marques, A.G. Sousa, J. Boaventura, C.W.B. Bezerra, C. Song, H. Liu, J. Zhang, A.L.B. Marques // Journal of Applied Electrochemistry. – 2008. – V. 39, № 1. – P. 55–64.

79. Yousef, E. M. Electrocatalytic oxidation of glucose at a Ni-curcumin modified glassy carbon electrode [Текст] / M. Yousef Elahi, H. Heli, S.Z. Bathaie, M.F. Mousavi // Journal of Solid State Electrochemistry. – 2006. – V. 11, № 2. – P. 273–82.

80. Sergeev, G.B. Nanochemistry [Текст] / G.B. Sergeev, K.J. Klabunde. – Oxford: Elsevier, 2013. – P. 359.

81. Johnston, R.L. Metal Nanoparticles and Nanoalloys [Текст] / R.L. Johnston // Frontiers of Nanoscience. – 2012. – V. 3. P. 1–42.

82. Дыкман, Л.А. Золотые наночастицы – синтез, свойства, биомедицинское применение [Текст] / Л.А. Дыкман. – Москва: Наука, 2008. – 318 с.

83. Larginho, M. Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics - From genomics to proteomics [Текст] / M. Larginho, P.V. Baptista // Journal of proteomics. – 2012. – V. 75, № 10. – P. 2811–2823.

84. Welch, C.M. Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the electro-analytical detection of hydrogen peroxide [Текст] / C.M.

Welch, C.E. Banks, O. Simm, R.G. Compton // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2005. – V. 382, № 1. – P. 12–21.

85. Welch, C.M. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review [Текст] / C.M. Welch, R.G. Compton // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2006. – V. 384, № 3. – P. 601–619.

86. Brainina, K.Z. Gold nanoparticles electrooxidation: comparison of theory and experiment [Текст] / K.Z. Brainina, L.G. Galperin, E.V. Vikulova, N.Y. Stozhko, A.M. Murzakaev, O.R. Timoshenkova, Y.A. Kotov // *Journal of Solid State Electrochemistry*. – 2010. – V. 15, № 5. – P. 1049–1056.

87. Safavi, A. Electrodeposited Silver Nanoparticles on Carbon Ionic Liquid Electrode for Electrocatalytic Sensing of Hydrogen Peroxide [Текст] / A. Safavi, N. Maleki, E. Farjami // *Electroanalysis*. – 2009. – V. 21, № 13. – P. 1533–1538.

88. Arduini, F. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis [Текст] / F. Arduini, L. Micheli, D. Moscone, G. Palleschi, S. Piermarini, F. Ricci, Giulia Volpe // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 79. – P. 114–126.

89. Saei, A.A. Electrochemical biosensors for glucose based on metal nanoparticles [Текст] / A.A. Saei, J.E.N. Dolatabadi, P. Najafi-Marandi, A. Abhari, M. de la Guardia // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2013. – V. 42. – P. 216–227.

90. Zheng, H. Fabrication of flower-like silver nanostructures for rapid detection of caffeine using surface enhanced Raman spectroscopy [Текст] / H. Zheng, D. Ni, Z. Yu, P. Liang, H. Chen // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2016. – V. 231. – P. 423–430.

91. Li, Y.-F. l-Arginine-assisted electrochemical fabrication of hierarchical gold dendrites with improved electrocatalytic activity [Текст] / Y.-F. Li, J.-J. Lv, A.-J. Wang, M. Zhang, R.-Z. Wang, J.-J. Feng // *Journal of Solid State Electrochemistry*. – 2015. – V. 19. – P. 3185.

92. Saha, S. Interference-Free Electrochemical Detection of Nanomolar Dopamine Using Doped Polypyrrole and Silver Nanoparticles [Текст] / S. Saha, P. Sarkar, A.P.F. Turner // *Electroanalysis*. – 2014. – V. 26, № 10. – P. 2197–2206.
93. Doria, G. Gold-silver-alloy nanoprobe for one-pot multiplex DNA detection [Текст] / G. Doria, M. Larginho, J.T. Dias, E. Pereira, R. Franco, P.V. Baptista // *Nanotechnology*. – 2010. – V. 21, № 25. – P. 255101–255101.
94. Jia, L.-P. Preparation and application of a highly sensitive nonenzymatic ethanol sensor based on nickel nanoparticles/Nafion/graphene composite film [Текст] / L.-P. Jia, H.-S. Wang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2013. – V. 177. – P. 1035–1042.
95. Mahony, J.O. Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry [Текст] / J.O. Mahony, K. Nolan, M.R. Smyth, B. Mizaikoff // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – V. 534, № 1. – P. 31–39.
96. Sharma, P.S. Bioinspired intelligent molecularly imprinted polymers for chemosensing: A mini review [Текст] / P.S. Sharma, Z. Iskierko, A. Pietrzyk-Le, F. D'Souza, W. Kutner // *Electrochemistry Communications*. – 2015. – V. 50. – P. 81–87.
97. Chen, L. Molecular imprinting: perspectives and applications [Текст] / L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li // *Chemical Society Reviews*. – 2016. – V. 45, № 8. – P. 2137–2211.
98. Гендриксон, О.Д. Молекулярно импринтированные полимеры и их применение в биохимическом анализе [Текст] / О.Д. Гендриксон, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев // *Успехи биологической химии*. – 2006. – V. 46. – P. 149–192.
99. Li, S. Molecularly imprinted sensors overview and applications [Текст] / S. Li, – Amsterdam/Boston: Elsevier, 2012. – P. 370.
100. Niu, P. Sol–Gel Nanocomposites for Electrochemical Sensor Applications // *The Sol-Gel Handbook-Synthesis, Characterization, and Applications: Synthesis, Characterization and Applications, 3-Volume Set* [Текст] / P. Niu, M. Gich, C. Fernández-Sánchez, A. Roig. – Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. – P. 1413–1434.

101. Xu, L. Preparation of vinyl silica-based organic/inorganic nanocomposites and superhydrophobic polyester surfaces from it [Текст] / L. Xu, Y. Shen, L. Wang, Y. Ding, Z. Cai // *Colloid and Polymer Science*. – 2015. – V. 293, № 8. – P. 2359–2371.
102. Zhao, W. Preparation of dummy template imprinted polymers at surface of silica microparticles for the selective extraction of trace bisphenol A from water samples [Текст] / W. Zhao, N. Sheng, R. Zhu, F. Wei, Z. Cai, M. Zhai, S. Du, Q. Hu // *Journal of Hazardous Materials*. – 2010. – V. 179, № 1–3. – P. 223–229.
103. Sun, L. Preparation and characterization of silica/polypyrrole core-shell colloidal particles in the presence of ethanol as the cosolvent [Текст] / L. Sun, Y. Shi, L. Chu, Y. Wang, L. Zhang, J. Liu // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2012. – V. 123, № 6. – P. 3270–3274.
104. Feng, X. Synthesis of Ag/Polypyrrole Core-Shell Nanospheres by a Seeding Method [Текст] / X. Feng // *Chinese Journal of Chemistry*. – 2010. – V. 28, № 8. – P. 1359–1362.
105. Hashim, S.N.N.S. A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmasterol imprinted polymers [Текст] / S.N.N.S. Hashim, R.I. Boysen, L.J. Schwarz, B. Danylec, M.T.W. Hearn // *Journal of Chromatography A*. – 2014. – V. 1359. – P. 35–43.
106. Ikegami, T. Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting [Текст] / T. Ikegami, T. Mukawa, H. Nariai, T. Takeuchi // *Analytica Chimica Acta*. – 2004. – V. 504, № 1. – P. 131–135.
107. Qi, P. Molecularly imprinted polymers synthesized via semi-covalent imprinting with sacrificial spacer for imprinting phenols [Текст] / P. Qi, J. Wang, L. Wang, Y. Li, J. Jin, F. Su, Y. Tian, J. Chen // *Polymer*. – 2010. – V. 51, № 23. – P. 5417–5423.
108. Ersöz, A. Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance [Текст] / A. Ersöz, A. Denizli, A. Özcan, R. Say // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2005. – V. 20, № 11. – P. 2197–2202.

109. Vidyasankar, S. Molecularly imprinted ligand-exchange adsorbents for the chiral separation of underivatized amino acids [Текст] / S. Vidyasankar, M. Ru, F.H. Arnold // *Journal of Chromatography A*. – 1997. – V. 775, № 1–2. – P. 51–63.
110. Brunkan, N.M. Effect of Chiral Cavities Associated with Molecularly Imprinted Platinum Centers on the Selectivity of Ligand-Exchange Reactions at Platinum [Текст] / N.M. Brunkan, M.R. Gagné // *Journal of the American Chemical Society*. – 2000. – V. 122, № 26. – P. 6217–6225.
111. Alexander, C. Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis [Текст] / C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes // *Tetrahedron*. – 2003. – V. 59, № 12. – P. 2025–2057.
112. Antuña-Jiménez, D. Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors // *Molecularly Imprinted Sensors* [Текст] / D. Antuña-Jiménez, G. Díaz-Díaz, M.C. Blanco-López, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco. – Oxford: Elsevier, 2012. – P. 1–34.
113. Batra, D. Combinatorial methods in molecular imprinting [Текст] / D. Batra, K.J. Shea // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2003. – V. 7, № 3. – P. 434–442.
114. Andersson, H.S. Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II [Текст] / H.S. Andersson, J.G. Karlsson, S.A. Piletsky, A.-C. Koch-Schmidt, K. Mosbach, I.A. Nicholls // *Journal of Chromatography A*. – 1999. – V. 848, № 1–2. – P. 39–49.
115. Cormack, P.G. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization [Текст] / P.G. Cormack, A.Z. Elorza // *Journal of Chromatography B*. – 2004. – V. 804, № 1. – P. 173–182.
116. Masqué, N. Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction [Текст] / N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2001. – V. 20, № 9. – P. 477–486.
117. Wulff, G. Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies [Текст] / G. Wulff // *Angewandte Chemie International Edition*. – 1995. – V. 34, № 17. – P. 1812–1832.

118. Brüggemann, O. New configurations and applications of molecularly imprinted polymers [Текст] / O. Brüggemann, K. Haupt, L. Ye, E. Yilmaz, K. Mosbach // *Journal of chromatography. A.* – 2000. – V. 889, № 1–2. – P. 15–24.
119. Sellergren, B. Molecularly imprinted polymers: a bridge to advanced drug delivery [Текст] / B. Sellergren, C.J. Allender // *Advanced drug delivery reviews.* – 2005. – V. 57, № 12. – P. 1733–1741.
120. Svenson, J. On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers [Текст] / J. Svenson, I.A. Nicholls // *Analytica Chimica Acta.* – 2001. – V. 435, № 1. – P. 19–24.
121. Andersson, L.I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field [Текст] / L.I. Andersson // *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications.* – 2000. – V. 745, № 1. – P. 3–13.
122. Ellwanger, A. Evaluation of methods aimed at complete removal of template from molecularly imprinted polymers [Текст] / A. Ellwanger, C. Berggren, S. Bayouth, C. Crecenzi, L. Karlsson, P.K. Owens, K. Ensing, P. Cormack, D. Sherrington, B. Sellergren // *Analyst.* – 2001. – V. 126, № 6. – P. 784–792.
123. Deore, B. Overoxidized Polypyrrole with Dopant Complementary Cavities as a New Molecularly Imprinted Polymer Matrix [Текст] / B. Deore, Z. Chen, T. Nagaoka // *Analytical Sciences.* – 1999. – V. 15, № 9. – P. 827–828.
124. Shiigi, H. Highly selective molecularly imprinted overoxidized polypyrrole colloids: one-step preparation technique [Текст] / H. Shiigi, M. Kishimoto, H. Yakabe, B. Deore, T. Nagaoka // *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry.* – 2002. – V. 18, № 1. – P. 41–44.
125. Huang, J. Molecular imprinted polypyrrole nanowires for chiral amino acid recognition [Текст] / J. Huang, Z. Wei, J. Chen // *Sensors and Actuators B: Chemical.* – 2008. – V. 134, № 2. – P. 573–578.
126. Schweiger, B. Electropolymerized Molecularly Imprinted Polypyrrole Film for Sensing of Clofibric Acid [Текст] / B. Schweiger, J. Kim, Y. Kim, M. Ulbricht // *Sensors.* – 2015. – V. 15, № 3. – P. 4870–4889.

127. Gürler, B. Voltammetric behavior and determination of doxycycline in pharmaceuticals at molecularly imprinted and non-imprinted overoxidized polypyrrole electrodes [Текст] / Gürler B., Özkorucuklu S.P., Kır E. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2013. – V. 84. – P. 263–268.
128. Nezhadali, A. Selective Extraction of Cholesterol from Dairy Samples Using a Polypyrrole Molecularly Imprinted Polymer and Determination by Gas Chromatography [Текст] / A. Nezhadali, Z. Es'haghi, A.-D. Khatibi // *Food Analytical Methods*. – 2016. – P. 1–11.
129. Asiabi, H. Preparation and evaluation of a novel molecularly imprinted polymer coating for selective extraction of indomethacin from biological samples by electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction [Текст] / H. Asiabi, Y. Yamini, S. Seidi, F. Ghahramanifard // *Analytica Chimica Acta*. – 2016. – V. 913. – P. 76–85.
130. Augusto, F. New sorbents for extraction and microextraction techniques [Текст] / F. Augusto, E. Carasek, R.G.C. Silva, S.R. Rivellino, A.D. Batista, E. Martendal // *Journal of chromatography. A*. – 2010. – V. 1217, № 16. – P. 2533–2542.
131. Caro, E. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples [Текст] / E. Caro, R. Marce, F. Borrull, P. Cormack, D. Sherrington // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2006. – V. 25, № 2. – P. 143–154.
132. Gallego-Gallegos, M. A new application of imprinted polymers: speciation of organotin compounds [Текст] / M. Gallego-Gallegos, M. Liva Garrido, R. Muñoz Olivas, P. Baravalle, C. Baggiani, C. Cámara // *Journal of Chromatography. A*. – 2010. – V. 1217, № 20. – P. 3400–3407.
133. Hwang, C.-C. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods [Текст] / C.-C. Hwang, W.-C. Lee // *Journal of Chromatography. A*. – 2002. – V. 962, № 1–2. – P. 69–78.

134. Mehdinia, A. Design of a surface-immobilized 4-nitrophenol molecularly imprinted polymer via pre-grafting amino functional materials on magnetic nanoparticles [Текст] / A. Mehdinia, S. Dadkhah, T. Baradaran Kayyal, A. Jabbari // *Journal of Chromatography A*. – 2014. – V. 1364. – P. 12–19.
135. Matsui, J. Highly stereoselective molecularly imprinted polymer synthetic receptors for cinchona alkaloids [Текст] / Matsui J., Nicholls I.A., Takeuchi T. // *Tetrahedron: Asymmetry*. – 1996. – V. 7, № 5. – P. 1357–1361.
136. Kempe, M. Receptor binding mimetics: A novel molecularly imprinted polymer [Текст] / M. Kempe, K. Mosbach // *Tetrahedron Letters*. – 1995. – V. 36, № 20. – P. 3563–3566.
137. Nilsson, K.G.I. Molecular imprinting of acetylated carbohydrate derivatives into methacrylic polymers [Текст] / K.G.I. Nilsson, K. Sakaguchi, P. Gemeiner, K. Mosbach // *Journal of Chromatography A*. – 1995. – V. 707, № 2. – P. 199–203.
138. Nilsson, K. Imprinted polymers as antibody mimetics and new affinity gels for selective separations in capillary electrophoresis [Текст] / K. Nilsson, J. Lindell, O. Norrlöw, B. Sellergren // *Journal of Chromatography A*. – 1994. – V. 680, № 1. – P. 57–61.
139. Kriz, D. Thin-Layer Chromatography Based on the Molecular Imprinting Technique [Текст] / D. Kriz, C.B. Kriz, L.I. Andersson, K.H. Mosbach // *Analytical Chemistry*. – 1994. – V. 66, № 17. – P. 2636–2639.
140. Ahmad, R. Nanocomposites of gold nanoparticles@molecularly imprinted polymers: chemistry, processing and applications in sensors [Текст] / R. Ahmad, N. Griffete, A. Lamouri, N. Felidj, M.M. Chehimi, C. Mangeney // *Chemistry of Materials*. – 2015. – V. 27. – P. 5464–5478
141. Ahmadi, M. Molecularly imprinted polymer coated magnetite nanoparticles as an efficient mefenamic acid resonance light scattering nanosensor [Текст] / M. Ahmadi, T. Madrakian // *Analytica Chimica Acta*. – V. 852. – P. 250–256.
142. Baby, T.T. SiO₂ coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticle dispersed multiwalled carbon nanotubes based amperometric glucose biosensor [Текст] / T.T. Baby, S. Ramaprabhu // *Talanta*. – 2010. – V. 80, № 5. – P. 2016–2022.

143. Ding, X. Recent Developments in Molecularly Imprinted Nanoparticles by Surface Imprinting Techniques [Текст] / X. Ding, P.A. Heiden // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2014. – V. 299, № 3. – P. 268–282.
144. Hashemi-Moghaddam, H. Synthesis and comparison of new layer-coated silica nanoparticles and bulky molecularly imprinted polymers for the solid-phase extraction of glycine [Текст] / H. Hashemi-Moghaddam, M. Toosi, M. Toosi // *Analytical Methods*. – 2015. – V. 7, № 18. – P. 7488–7495.
145. Kitahara, K. Synthesis of monodispersed molecularly imprinted polymer particles for high-performance liquid chromatographic separation of cholesterol using templating polymerization in porous silica gel bound with cholesterol molecules on its surface [Текст] / K. Kitahara, I. Yoshihama, T. Hanada, H. Kokuba, S. Arai // *Journal of chromatography. A*. – 2010. – V. 1217, № 46. – P. 7249–7254.
146. Purdy, S.C. Coating nonfunctionalized silica spheres with a high density of discrete silver nanoparticles [Текст] / S.C. Purdy, A.J. Muscat // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2016. – V. 18, № 3. – P. 1–10.
147. Darwish, M.S. Magnetite core-shell nano-composites with chlorine functionality: preparation by miniemulsion polymerization and characterization [Текст] / M.S. a. Darwish, S. Machunsky, U. Peuker, U. Kunz, T. Turek // *Journal of Polymer Research*. – 2010. – V. 18, № 1. – P. 79–88.
148. Hasantabar, V. Innovative magnetic tri-layered nanocomposites based on polyxanthone triazole, polypyrrole and iron oxide: synthesis, characterization and investigation of the biological activities [Текст] / V. Hasantabar, M.M. Lakouraj, E. Nazarzadeh Zare, M. Mohseni // *RSC Advances*. – 2015. – V. 5, № 86. – P. 70186–70196.
149. Lee, M.-H. Hydrolysis of Magnetic Amylase-Imprinted Poly(ethylene- co - vinyl alcohol) Composite Nanoparticles [Текст] / M.-H. Lee, J.L. Thomas, Y.-C. Chen, H.-Y. Wang, H.-Y. Lin // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2012. – V. 4, № 2. – P. 916–921.
150. Wang, S. Self-assembly molecularly imprinted polymers of 17 β -estradiol on the surface of magnetic nanoparticles for selective separation and detection of

- estrogenic hormones in feeds [Текст] / S. Wang, Y. Li, M. Ding, X. Wu, J. Xu, R. Wang, T. Wen, W. Huang, P. Zhou, K. Ma, X. Zhou, S. Du // *Journal of Chromatography B*. – 2011. – V. 879, № 25. – P. 2595–2600.
151. Wang, X. A molecularly imprinted polymer-coated nanocomposite of magnetic nanoparticles for estrone recognition [Текст] / X. Wang, L. Wang, X. He, Y. Zhang, L. Chen // *Talanta*. – 2009. – V. 78, № 2. – P. 327–332.
152. Fang, G. Quartz crystal microbalance sensor based on molecularly imprinted polymer membrane and three-dimensional Au nanoparticles@mesoporous carbon CMK-3 functional composite for ultrasensitive and specific determination of citrinin [Текст] / G. Fang, G. Liu, Y. Yang, S. Wang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2016. – V. 230. – P. 272–280.
153. Chang, L. Surface molecular imprinting onto silver microspheres for surface enhanced Raman scattering applications [Текст] / L. Chang, Y. Ding, X. Li // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – V. 50. – P. 106–110.
154. Chen, P.-Y. Detection of uric acid based on multi-walled carbon nanotubes polymerized with a layer of molecularly imprinted PMAA [Текст] / P.-Y. Chen, P.-C. Nien, C.-W. Hu, K.-C. Ho // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2010. – V. 146, № 2. – P. 466–471.
155. Prasad, B.B. Multiwalled carbon nanotubes-ceramic electrode modified with substrate-selective imprinted polymer for ultra-trace detection of bovine serum albumin [Текст] / B.B. Prasad, A. Prasad, M.P. Tiwari // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – V. 39, № 1. – P. 236–243.
156. Effati, E. One-pot synthesis of sub-50 nm vinyl- and acrylate-modified silica nanoparticles [Текст] / E. Effati, B. Pourabbas // *Powder Technology*. – 2012. – V. 219. – P. 276–283.
157. Marini, M. Functionally modified core-shell silica nanoparticles by one-pot synthesis [Текст] / M. Marini, B. Pourabbas, F. Pilati, P. Fabbri // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2008. – V. 317, № 1–3. – P. 473–481.

158. Bélanger, D. Electrografting: a powerful method for surface modification [Текст] / D. Bélanger, J. Pinson // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – V. 40, № 7. – P. 3995–4048.
159. Bokern, S. Polymer grafted silver and copper nanoparticles with exceptional stability against aggregation by a high yield one-pot synthesis [Текст] / S. Bokern, J. Getze, S. Agarwal, A. Greiner // *Polymer*. – 2011. – V. 52, № 4. – P. 912–920.
160. Gabriel, S. Cathodic electrografting of acrylics: From fundamentals to functional coatings [Текст] / S. Gabriel, R. Jérôme, C. Jérôme // *Progress in Polymer Science*. – 2010. – V. 35, № 1–2. – P. 113–140.
161. Piletsky, S.A. Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers [Текст] / S.A. Piletsky, A.P.F. Turner // *Electroanalysis*. – 2002. – V. 14, № 5. – P. 317–323.
162. Bai, H. A novel sensitive electrochemical sensor based on in-situ polymerized molecularly imprinted membranes at graphene modified electrode for artemisinin determination [Текст] / H. Bai, C. Wang, J. Chen, J. Peng, Q. Cao // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V. 64. – P. 352–358.
163. Palacin, S. Molecule-to-Metal Bonds: Electrografting Polymers on Conducting Surfaces [Текст] / S. Palacin, C. Bureau, J. Charlier, G. Deniau, B. Mouanda, P. Viel // *ChemPhysChem*. – 2004. – V. 5, № 10. – P. 1468–1481.
164. Sergeyev, T. Molecularly imprinted polymer membranes for substance-selective solid-phase extraction from water by surface photo-grafting polymerization [Текст] / T. Sergeyev, H. Matuschewski, S. Piletsky, J. Bendig, U. Schedler, M. Ulbricht // *Journal of chromatography. A*. – 2001. – V. 907, № 1–2. – P. 89–99.
165. Zhang, Z. Molecularly imprinted thin film self-assembled on piezoelectric quartz crystal surface by the sol-gel process for protein recognition [Текст] / Z. Zhang, Y. Long, L. Nie, S. Yao // *Biosensors & bioelectronics*. – 2006. – V. 21, № 7. – P. 1244–1251.
166. Yarman, A. The First Electrochemical MIP Sensor for Tamoxifen [Текст] / A. Yarman, F.W. Scheller // *Sensors*. – 2014. – V. 14, № 5. – P. 7647–7654.

167. Zhang, X. A novel electrochemical sensor based on electropolymerized molecularly imprinted polymer and gold nanomaterials amplification for estradiol detection [Текст] / X. Zhang, Y. Peng, J. Bai, B. Ning, S. Sun, X. Hong, Y. Liu, Y. Liu, Z. Gao // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – V. 200. – P. 69–75.
168. Li, X. Fabrication of molecularly cholesterol-imprinted polymer particles based on chitin and their adsorption ability [Текст] / X. Li, Y. Tong, L. Jia, H. Guan // *Monatshefte für Chemie*. – 2014. – V. 146, № 3. – P. 423–430.
169. Pérez, N. Surface Imprinting of Cholesterol on Submicrometer Core–Shell Emulsion Particles [Текст] / N. Pérez, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson // *Macromolecules*. – 2001. – V. 34, № 4. – P. 830–836.
170. Sellergren, B. Imprinted Polymers for Selective Adsorption of Cholesterol from Gastrointestinal Fluids [Текст] / B. Sellergren, J. Wieschemeyer, K.-S. Boos, D. Seidel // *Chemistry of Materials*. – 1998. – V. 10, № 12. – P. 4037–4046.
171. Matsumoto, H.S.H. Detection of Skin Cholesterol by a Molecularly Imprinted Electrode [Текст] / H.S.H. Matsumoto, I. Ota, T. Nagaoka // *Journal of Flow Injection Analysis*. – 2008. – V. 25, № 1. – P. 81–84.
172. Piletsky, S. Molecularly imprinted self-assembled films with specificity to cholesterol [Текст] / S. Piletsky, E. Piletskaya, T. Sergeyeva, T. Panasyuk, A. El'skaya // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 1999. – V. 60, № 2–3. – P. 216–220.
173. Villar, P. Matrix effects on the selectivity of a cholesterol-imprinted polymer [Текст] / P. Villar, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson // *Polymer*. – 2007. – V. 48, № 6. – P. 1483–1489.
174. Hsu, C.-W. Enhancement of the imprinting effect in cholesterol-imprinted microporous silica [Текст] / C.-W. Hsu, M.-C. Yang // *Journal of Non-Crystalline Solids*. – 2008. – V. 354, № 34. – P. 4037–4042.
175. Zengin, A. Molecularly imprinted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for rapid enrichment and separation of cholesterol [Текст] / A. Zengin, E. Yildirim, U. Tamer, T. Caykara // *The Analyst*. – 2013. – V. 138, № 23. – P. 7238.

176. Stöber, W. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range [Текст] / W. Stöber, A. Fink, E. Bohn // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1968. – V. 26, № 1. – P. 62–69.
177. Sestili, L. Formation equilibria of pseudotetrahedral Co (II) halogenocomplexes in acetonitrile [Текст] / L. Sestili, C. Furlani // *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. – 1970. – V. 32, № 6. – P. 1997–2008.
178. Bard, A.J. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. [Текст] / A.J. Bard, L.R. Faulkner. – New York: Wiley, 2001. – P. 833.
179. Morzycki, J.W. Electrochemical oxidation of cholesterol [Текст] / J.W. Morzycki, A. Sobkowiak // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2015. – V. 11. – P. 392–402.
180. Галюс, З. Теоретические основы электрохимического анализа [Текст] / З. Галюс. – М.: Издательство "Мир", 1974. – 552 с.
181. Kozitsina, A.N. Amperometric detection of cholesterol using cobalt (II) chloride as an electrocatalyst in aprotic media [Текст] / A.N. Kozitsina, A.V. Okhokhonin, A.I. Matern // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2016. – V. 772. – P. 89–95.
182. Lehninger, A.L. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. [Текст] / A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox. – New York: W.H. Freeman, 2005. – P. 1120.
183. Okhokhonin, A.V. Electrochemical detection of free cholesterol using potassium thiocyanate and nickel and cobalt chlorides as electrocatalysts [Текст] / A.V. Okhokhonin, A.N. Kozitsina, A.I. Matern. – Malmö, Sweden: 15th International Conference on Electroanalysis (11–15 June 2014). – P. 193.
184. Pollegioni, L. Kinetic mechanisms of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum* [Текст] / L. Pollegioni, G. Wels, M.S. Pilone, S. Ghisla // *European journal of biochemistry / FEBS*. – 1999. – V. 264, № 1. – P. 140–151.

185. Sampson, N.S. Assessment of the role of an Ω loop of cholesterol oxidase: a truncated loop mutant has altered substrate specificity [Текст] / N.S. Sampson, I.J. Kass, K.B. Ghoshroy // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37, № 16. – P. 5770–5778.
186. Охохонин, А.В. Бесферментный метод определения холестерина с использованием электрокатализатора CoCl_2 и полимеров с молекулярными отпечатками [Текст] / А.В. Охохонин, Ж.В. Шалыгина, А.В. Козицина, А.И. Матерн // IX Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой «ЭМА 2016»: сборник – Екатеринбург – Ленева (29 мая – 3 июня 2016). – С. 47.
187. Scholz, F. *Electroanalytical methods: guide to experiments and applications* [Текст] / F. Scholz, A.M. Bond. – Berlin, New York: Springer, 2002. – P. 331.
188. Дамаскин, Б.Б. *Электрохимия* [Текст] / Б.Б. Дамаскин, О.А. Петрий, Г. Цирилина. – Москва: Химия, КолосС, 2006. – 672 с.
189. Pereiro, R. Kinetics of the $\text{SCN}^-/(\text{SCN})_2$ couple on platinum in acetonitrile [Текст] / R. Pereiro, A.J. Arvía, A.J. Calandra // *Electrochimica Acta*. – 1972. – V. 17, № 10. – P. 1723–1734.
190. Gitkis, A. Anodic thiocyanation of mono- and disubstituted aromatic compounds [Текст] / A. Gitkis, J.Y. Becker // *Electrochimica Acta*. – 2010. – V. 55, № 20. – P. 5854–5859.
191. Levy, A. One-pot anodic thiocyanation and isothiocyanation of alkenes [Текст] / A. Levy, J.Y. Becker // *Electrochimica Acta*. – 2015. – V. 178. – P. 294–302.
192. Shumyantseva, V. Nanostructured nickel oxide-chitosan film for application to cholesterol sensor [Текст] / V. Shumyantseva, G. Deluca, T. Bulko, S. Carrara, C. Nicolini, S. Usanov, A. Archakov // *Biosensors & bioelectronics*. – 2004. – V. 19, № 9. – P. 971–976.
193. Murugavelu, M. Synthesis, characterization of Ag-Au core-shell bimetal nanoparticles and its application for electrocatalytic oxidation/sensing of l-methionine [Текст] / M. Murugavelu, B. Karthikeyan // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – V. 70. – P. 656–664.

194. Douglas, F. Silver, gold and the corresponding core shell nanoparticles: synthesis and characterization [Текст] / F. Douglas, R. Yañez, J. Ros, S. Marín, A. Escosura-Muñiz, S. Alegret, A. Merkoçi // Journal of Nanoparticle Research. – 2008. – V. 10, № S1. – P. 97–106.
195. Малахова, Н.А. Способ изготовления модифицированного электрода для электрохимического анализа (варианты) [Текст] / Н.А. Малахова, А.В. Иванова, А.Н. Козицина, С.Ю. Сараева, Ж.В. Шалыгина, Л.И. Колядина, А.В. Охохонин, А.И. Матерн // Патент РФ №2507512. – 19 с.
196. Охохонин, А.В. Бесферментное определение холестерина с использованием наночастиц золота и серебра в качестве электрокатализатора [Текст] / А.В. Охохонин, С. Ю. Сараева, А.И. Матерн, А.Н. Козицина // Журнал аналитической химии. – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 1–9.
197. Преч, Э. Определение строения органических соединений [Текст] / Э. Преч, Ф. Бульманн, К. Аффольтер. – Пер. с англ. – М.: Мир; БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 438 с.