

Бесферментный электрохимический метод определения антигена вируса кори с использованием синтезированных конъюгатов IgG—(Fe₃O₄—SiO₂) в качестве сигналообразующей метки*

Н. Н. Малышева,^{а,б*} Ю. А. Глазырина,^{а,б} В. О. Ждановских,^а Т. С. Свалова,^а А. И. Матерн,^{а,б} А. Н. Козицина^{а,б}

^аУральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Российская Федерация, 620002 Екатеринбург, ул. Мира, 19.

Факс: (343) 375 4461. E-mail: a.n.kozitsina@urfu.ru

^бУральский центр биофармацевтических технологий,

Российская Федерация, 624130 Новоуральск Свердловской обл., ул. Подгорная, 11.

E-mail: pavel.sorokin@ucbt.uphc.ru

Разработан электрохимический метод определения вирусных агентов на примере антигена вируса кори. Методом инверсионной адсорбционной вольтамперометрии с использованием синтезированных конъюгатов антител с нанокompозитными частицами Fe₃O₄—SiO₂ в качестве сигналообразующей метки получен чувствительный, легко измеряемый аналитический сигнал.

Ключевые слова: нанокompозитные частицы, иммуноанализ, инверсионная вольтамперометрия, антиген вируса кори.

Своевременное лечение и профилактика вирусных болезней с использованием противовирусных препаратов, иммуномодуляторов и вакцин с различным механизмом действия нуждаются в быстрой и точной лабораторной диагностике. Помимо установления этиологии заболевания она имеет большое значение в организации противоэпидемических мероприятий (карантин, госпитализация, вакцинация и др.¹). Ранняя диагностика первых случаев инфекций позволяет своевременно провести такие мероприятия.

Корь является одним из самых «заразных» заболеваний. Она быстро распространяется воздушно-капельным путем и может стать причиной серьезных осложнений со стороны центральной нервной системы (энцефалиты), дыхательной системы (пневмонии) и желудочно-кишечного тракта. Для этой инфекции характерна почти 100%-ная восприимчивость. Значение лабораторных исследований при диагностике кори постоянно возрастает. Это связано в том числе с наличием атипичных форм заболевания, при которых наблюдается сокращение инкубационного периода, уменьшение выраженности симптомов, изменение характера сыпи и т.п. Постановка диагноза у ранее вакцинированных лиц со стертой формой инфекции, а также в случаях появления сыпи в ответ на введение живой коревой вакцины затруднена^{2,3}.

В лабораторной диагностике вирусных инфекций применяются три основных подхода⁴: 1) серологическая диагностика, основанная на установлении значи-

тельного прироста вирусных антител в течение болезни; 2) выделение вируса из клинического материала и его идентификация; 3) непосредственное исследование материала на наличие вирусного антигена или нуклеиновых кислот. Серологическая диагностика, основанная на реакции антиген—антитело, может быть использована для определения обоих агентов и имеет значение в установлении этиологии вирусной инфекции даже при отрицательных результатах выделения вируса. Специфические антитела IgG вырабатываются организмом в достаточной для определения концентрации спустя определенный промежуток времени (2—3 недели) после заражения, что делает метод непригодным для выявления заболевания на начальной стадии. Серологическое обследование каждого больного с подозрением на корь нередко вызывает трудности из-за сложности доставки сывороток из отдаленных, труднодоступных регионов, а также необходимости соблюдения «холодовых» условий транспортирования материала⁵.

Выделение вирусов — один из самых старых и трудоемких методов диагностики. Для этого используют культуры клеток, лабораторных животных, эмбрионы кур. Процесс длительный, иногда требующий проведения нескольких пассажей, прежде чем вирус будет обнаружен и идентифицирован с помощью одного или нескольких методов — в реакциях нейтрализации и иммунофлюоресценции, иммуноферментным анализом (ИФА) или полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Такой подход позволяет получить результат уже через 24—72 ч после инфицирования клеток культуры тканей. Вирусологический метод диагностики можно использовать только в специализированных

* Посвящается академику Российской академии наук О. Н. Чупахину в связи с его 80-летием.

лабораториях в редких случаях, что связано со сложностью исследования⁶.

Прямые методы (электронная микроскопия, реакция иммунофлюоресценции, ИФА, молекулярные (ПЦР) и цитологические методы), которые применяются в настоящее время в ведущих коревых лабораториях страны, как и в большинстве стран мира, позволяют обнаружить вирус, вирусный антиген или вирусную нуклеиновую кислоту непосредственно в клиническом материале, т.е. являются наиболее быстрыми (2–24 ч). Однако из-за ряда особенностей возбудителей прямые методы имеют свои ограничения (возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов). Необходимость использования дорогостоящих и нестойких ингредиентов (ферментов) для постановки иммуноферментных реакций снижает доступность ИФА^{7,8}.

В настоящее время подавляющее большинство исследовательских работ по определению вирусных агентов посвящено развитию новых вариантов метода ПЦР^{9–14}. Однако предложенные методики сложны, дорогостоящи и пока недостаточно унифицированы для рутинного применения. В связи с этим разработку методов и сенсоров, позволяющих экспрессно, «на месте» проводить диагностические мероприятия по обнаружению вирусных агентов, весьма актуально. Привлечение электрохимических методов анализа с применением биосенсоров для диагностики опасных инфекций представляется перспективным направлением. Для этих методов характерны высокая чувствительность, хорошая воспроизводимость и селективность, простота аппаратного оформления и возможность создания портативных приборов, пригодных для использования как в лабораторных условиях, так и в небольших клиниках, низкая стоимость анализа по сравнению с другими методами^{15–17}.

Целью настоящей работы являлась разработка бесферментного метода электрохимического иммуноанализа для определения антигена вируса кори с использованием конъюгата вторичных антител с нанокompозитными частицами на основе наночастиц Fe_3O_4 с оксидкремниевым покрытием в качестве сигналообразующей метки в модельных растворах.

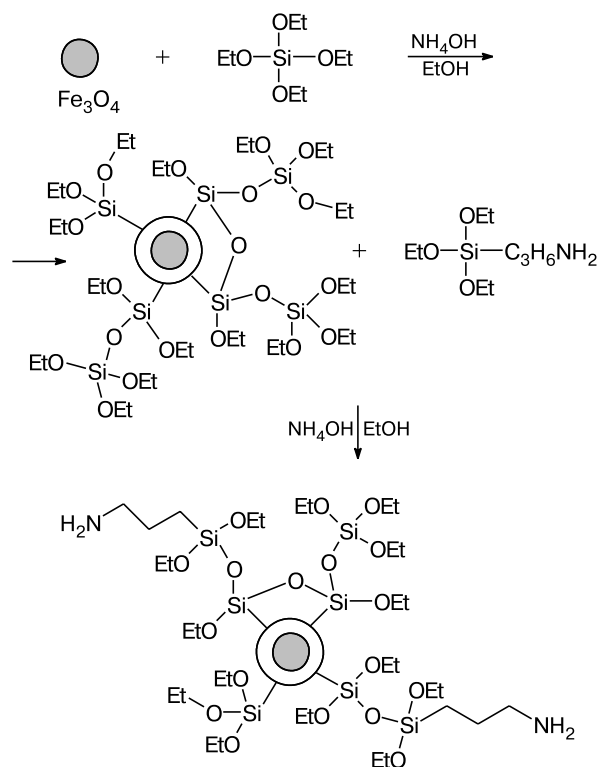
Обсуждение полученных результатов

Для реализации разработанной процедуры иммуноанализа использовали конъюгат антител с нанокompозитными частицами (схемы 1 и 2).

Синтезированный конъюгат представляет собой водную суспензию тонкодисперсного порошка, проявляющего магнитные свойства при наложении поля.

Принимая во внимание предлагаемый ход анализа (рис. 1) — образование «сэндвич»-иммунокомплекса, включающего антитело—антиген—конъюгат вторичных антител с нанокompозитными частицами $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{—SiO}_2$, на поверхности толстопленочного графитэпоксидного электрода (ТГЭ) и последующую кислотную обработку — можно ожидать, что ток восстановления ионов Fe^{3+} даст информацию о наличии

Схема 1



и количестве антигена в пробе. При наличии в анализируемом растворе искомого антигена на вольтамперограмме наблюдали появление пика восстановления ионов железа(III) (рис. 2, а). В холостом опыте (проба не содержала антиген вируса кори) в области потенциалов $E = -0.6\text{—}(-1.0)$ В пиков не наблюдалось (см. рис. 2, б), так как иммунокомплекс не образовывался. Полученные результаты также свидетельствуют об отсутствии неспецифического связывания конъюгатов вторичных антител и нанокompозитных частиц с рабочей частью ТГЭ, модифицированного антителами.

На рисунке 3 приведена зависимость величины аналитического сигнала от времени формирования «сэндвича» между иммунокомплексом на поверхности ТГЭ и конъюгатом антител с нанокompозитными частицами (стадия 3 на рис. 1). Кривая выходит на плато в течение 30 мин, что, по-видимому, обусловлено максимальным заполнением всех сайтов связывания. Поэтому в дальнейших исследованиях формирование «сэндвич»-иммунокомплекса проводили в течение 30 мин.

На рисунке 4 приведена зависимость величины аналитического сигнала от времени формирования иммунокомплекса между антигеном вируса кори и антителами, иммобилизованными на поверхности ТГЭ (стадия 2 на рис. 1). Кривая выходит на плато в первые 20 мин образования иммунокомплекса между антигеном вируса кори и соответствующими антителами. Вероятно, это обусловлено максимальным заполнением поверхности ТГЭ. В связи с этим в дальнейших исследованиях формирование иммунокомплекса проводили в течение 20 мин.

Схема 2

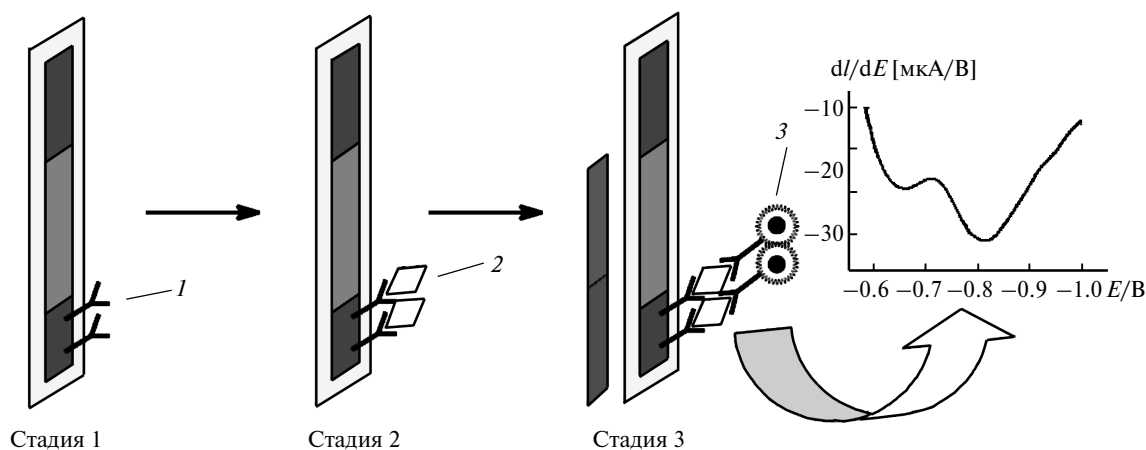
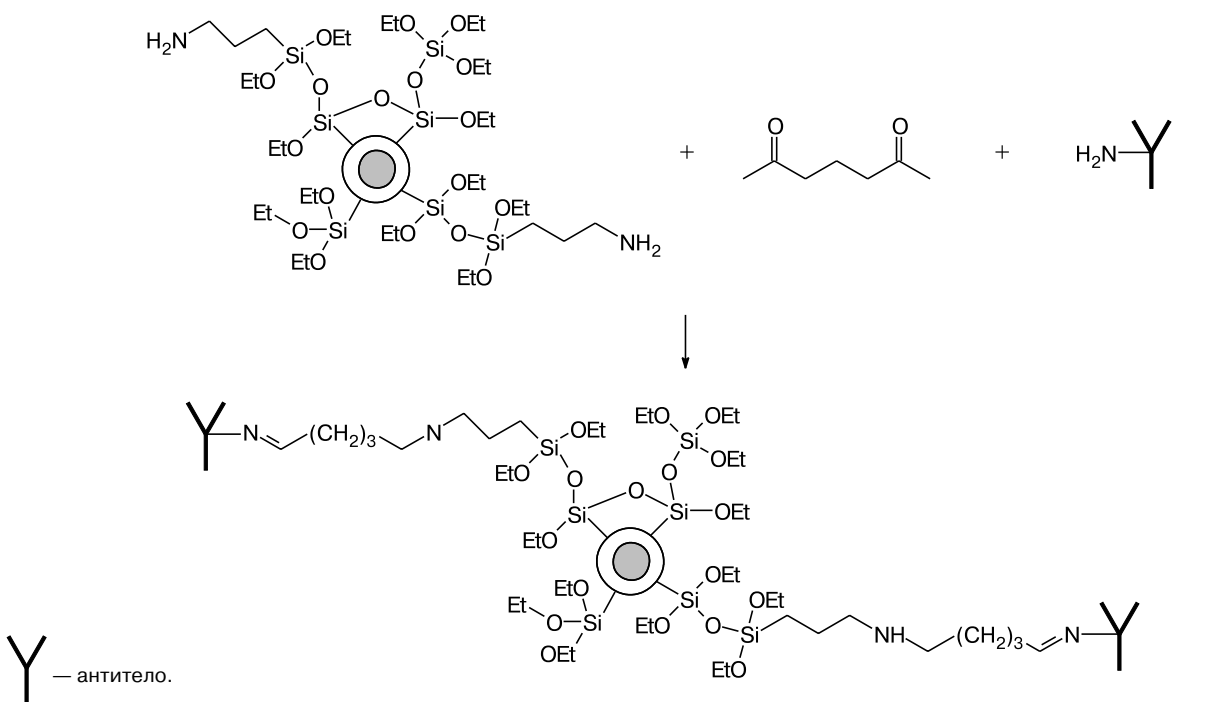


Рис. 1. Процедура иммуноанализа. 1— Антитело к вирусу кори, иммобилизованное на рабочей зоне ТГЭ, 2 — антиген вируса кори, 3 — конъюгат вторичных антител к вирусу кори с нанокompозитными частицами Fe₃O₄—SiO₂.

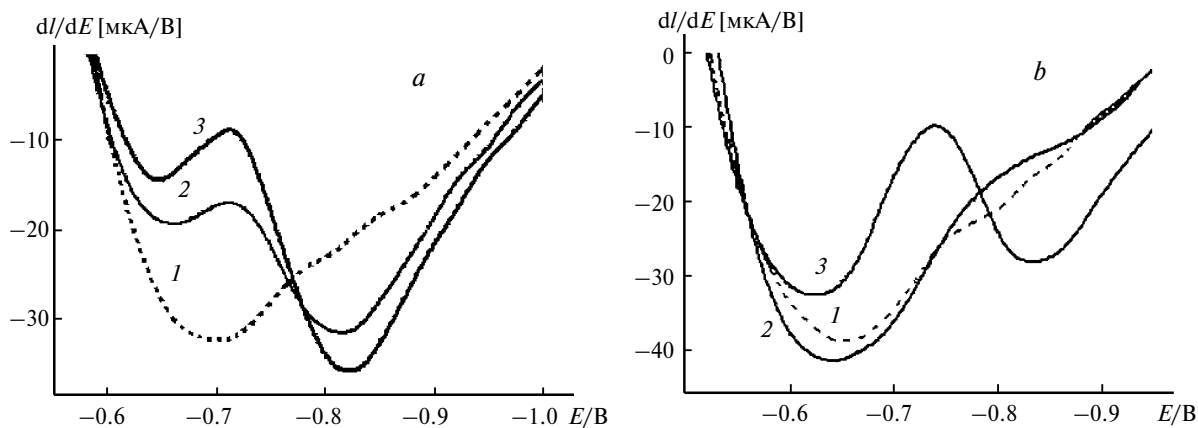


Рис. 2. Дифференциальный вид вольтамперограмм растворов с антигеном вируса кори (а) и без него (b): фоновый раствор (0.1 M раствор CH₃COONa, содержащий 5 · 10⁻⁴ моль · л⁻¹ пирокатехола, pH 7.5) (1), проба (2), проба + добавка Fe³⁺ (3). Концентрация антигена 2.33 · 10⁻² мг · мл⁻¹. Потенциал накопления 0.1 В, время накопления 60 с, скорость развертки потенциала 0.5 В · с⁻¹.

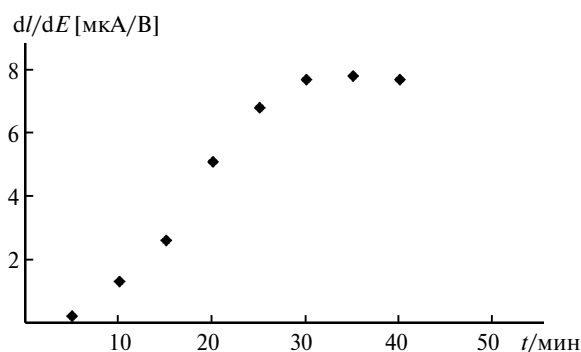


Рис. 3. Зависимость величины dI/dE , полученной при анализе растворов после кислотной обработки «сэндвич»-иммунокомплекса, от времени его формирования. Концентрация антигена $2.33 \cdot 10^{-2}$ мг · мл⁻¹. Приведены средние значения для $n = 5$.

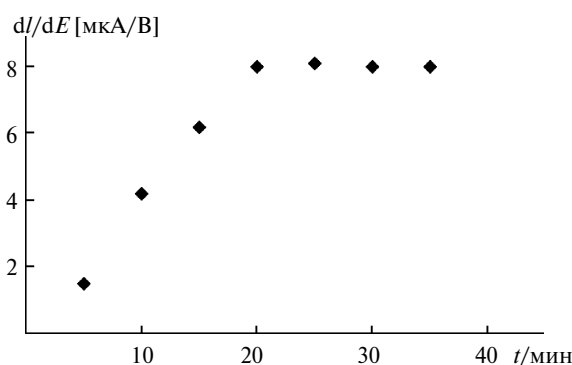


Рис. 4. Зависимость величины dI/dE , полученной при анализе растворов после кислотной обработки «сэндвич»-иммунокомплекса, от времени формирования иммунокомплекса между антигеном вируса кори и антителами, иммобилизованными на поверхности ТГЭ. Концентрация антигена $2.33 \cdot 10^{-2}$ мг · мл⁻¹. Приведены средние значения для $n = 5$.

Далее регистрировали вольтамперограммы, используя выбранные условия проведения иммуноанализа, и получили линейную зависимость изменения величины аналитического сигнала от логарифма концентрации антигена вируса кори в интервале концентраций $2.33 \cdot 10^{-4}$ — 2.33 мг · мл⁻¹ в соответствии с уравнением $dI/dE = 2.44 \cdot \lg C + 11.6$ ($R = 0.995$). Предел обнаружения, рассчитанный по $3S$ -критерию, составляет $1.87 \cdot 10^{-5}$ мг · мл⁻¹.

В таблице 1 приведены аналитические характеристики определения антигена вируса кори в различные периоды времени после приготовления иммунореагентов. Установленные значения коэффициентов воспроизводимости и повторяемости не превышают 0.01. Таким образом, предложенный метод обеспечивает воспроизводимые результаты измерений содержания антигена вируса кори в диапазоне концентраций $2.33 \cdot 10^{-4}$ — 2.33 мг · мл⁻¹.

Для оценки специфичности разработанного метода ТГЭ с иммобилизованными антителами к вирусу кори инкубировали в растворе, содержащем антиген вируса клещевого энцефалита. Затем согласно схеме иммуноанализа добавляли меченые нанокompозит-

Таблица 1. Аналитические характеристики электрохимического метода определения антигена вируса кори

C^a /мг · мл ⁻¹	N , сутки	dI/dE /мкА · В ⁻¹			CR^b	K^c
$2.33 \cdot 10^{-4}$	1	2.21	2.23	2.20	0.007	0.006
	2	2.22	2.20	2.24	0.009	
	3	2.21	2.20	2.22	0.005	
$2.33 \cdot 10^{-3}$	1	5.25	5.26	5.20	0.006	0.005
	2	5.22	5.20	5.24	0.004	
	3	5.27	5.25	5.20	0.007	
$2.33 \cdot 10^{-2}$	1	8.12	8.13	8.10	0.002	0.007
	2	8.21	8.21	8.05	0.010	
	3	8.17	8.22	8.14	0.005	
0.233	1	10.26	10.08	10.18	0.009	0.006
	2	10.17	10.10	10.08	0.005	
	3	10.20	10.15	10.14	0.003	
2.33	1	12.15	12.27	12.30	0.006	0.009
	2	12.32	12.00	12.25	0.010	
	3	12.31	12.13	12.31	0.009	

^a Концентрация антигена. ^b Коэффициент воспроизводимости. ^c Коэффициент повторяемости.

ными частицами вторичные антитела к кори и измеряли аналитический сигнал. После инкубации в растворе, не содержащем антиген вируса кори, сигналов не наблюдалось, поскольку иммунокомплекс на поверхности ТГЭ не формировался. Это указывает на отсутствие влияния на аналитический сигнал неспецифических взаимодействий и адсорбции.

Таким образом, на основании проведенных исследований показано, что разработанный вариант электрохимического метода иммуноанализа позволяет определять антиген вируса кори в модельном растворе в концентрации $2.33 \cdot 10^{-4}$ — 2.33 мг · мл⁻¹. Применение нанокompозитных частиц на основе магнетита Fe_3O_4 в качестве сигналообразующей метки позволило получить легко измеряемый аналитический сигнал. Исходя из принципов данного метода и процедуры анализа, можно также предположить, что возможен перенос метода на другие вирусные агенты. В дальнейшем разработанный метод может быть адаптирован для определения антигенов вирусов непосредственно в биологических объектах, таких как слюна, назальные смывы, кровь.

Экспериментальная часть

В работе использовали стерильный физиологический раствор (0.9%-ный раствор NaCl, НПП «ПанЭко»), антиген вируса кори (NovO/96) в концентрации 2.33 мг · мл⁻¹, антитела к вирусу кори, вторичные антитела к вирусу кори (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск), 57%-ная H_2SO_4 , 57%-ная HNO_3 («ос.ч.», ОАО «Гиредмет», Москва), H_2O_2 медицинская (36—38%, ООО «Лега», Дзержинск), $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ («ос.ч.»), пирокатехол («ос.ч.»), государственный стандартный образец ионов Fe^{III} , $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $Si(OEt)_4$, глутаровый альдегид (25%), (3-аминопропил)триэтоксисилан (25%) получены от фирмы «Sigma-Aldrich», $NH_3 \cdot H_2O$ («ч.д.а.», ООО «Сигма ТЕК», Москва), 95%-ный этанол (ООО «Гиппократ», Самара).

Деионизированную воду для приготовления растворов получали на комбинированной мембранной установке серии ДВС-М/1НА(18)-N («Медиана-Фильтр», Москва).

Для получения суспензий нанокompозитных частиц использовали ультразвуковой гомогенизатор с микропроцессорным управлением «Ultrasonic processor 500W» («Sigma-Aldrich», США). Для проведения стадии образования иммунокомплекса «вторичные антитела IgG — антиген вируса — конъюгат антител IgG с нанокompозитом» использовали инкубатор «GFL type 1010». В синтезе наночастиц и нанокompозитов использовали магнитную мешалку с подогревом «С-MAG HS 7 IKAMAG» («IKA», Германия), верхнеприводную мешалку «IKA Eurostar digital 2482000» («IKA», Германия) и магнитный штатив «MagneSphere» для 12 микропробирок «Eppendorf» («Promega», США) с напряженностью магнитного поля $31.83 \cdot 10^3 \text{ А} \cdot \text{м}^{-1}$. В качестве инертной подложки для иммобилизации антител использовали толсто пленочный графитэпоксидный электрод (ТГЭ).

Электрохимические исследования проводили с использованием инверсионного вольтамперометрического анализатора ИВА-5 («ИВА», Екатеринбург). В качестве рабочего электрода использовали толсто пленочный графитсодержащий электрод, модифицированный каломелью (ТМГЭ), электрод сравнения — насыщенный Ag/AgCl-электрод («Metrohm», Швейцария), вспомогательный электрод — стеклоуглеродный стержень («Metrohm», Швейцария).

Синтез нанокompозитных частиц и конъюгация их с антителами. Наночастицы Fe_3O_4 получали методом соосаждения¹⁸, добавляя по каплям 25%-ный раствор $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ к водному раствору, содержащему 4.5 мас.% FeCl_3 и 2.25 мас.% FeCl_2 . Реагенты использовали в стехиометрических соотношениях (кроме аммиака, который был взят в небольшом избытке) согласно уравнению



Нанокompозитные частицы получили, покрывая наночастицы Fe_3O_4 оксидом кремния¹⁹. Наночастицы Fe_3O_4 (0.5 г) диспергировали в смеси 40 мл 95%-ного EtOH и 10 мл H_2O . Добавили 0.5 мл $\text{Si}(\text{OEt})_4$ и 1 мл 25%-ного раствора $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Кипятили при перемешивании в течение 10 ч. Удалили непрореагировавший $\text{Si}(\text{OEt})_4$ трехкратным промыванием EtOH с магнитным отделением нанокompозита. Затем покрытые оксидом кремния наночастицы вновь диспергировали в 50 мл 95%-ного EtOH, обработали ультразвуком в течение 1 мин, добавили 1 мл (3-аминопропил)триэтоксисилана, после чего кипятили 10 ч при перемешивании (см. схему 1). Непрореагировавший (3-аминопропил)триэтоксисилан удалили трехкратным промыванием EtOH с магнитным отделением нанокompозита при помощи постоянного магнита с величиной поля $37.40 \cdot 10^4 \text{ А} \cdot \text{м}^{-1}$.

«Пришивку» вторичных антител к оксидкремниевому покрытию наночастиц (см. схему 2) проводили по известной методике²⁰. Нанокompозит диспергировали в 50 мл H_2O , отобрали мерной пипеткой 10 мл суспензии и обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин. Добавили 1 мл 25%-ного глутарового альдегида, затем 0.2 мг вторичных антител к вирусу кори. Перемешивали в течение 8 ч при $\sim 10^\circ \text{C}$. Конъюгат антитела—нанокompозитные частицы очищали от непрореагировавших компонентов с использованием постоянного магнита. Рабочую суспензию конъюгата получили путем диспергирования навески (0.005 г) в 10 мл стерильного физиологического раствора. Затем обработали суспензию ультразвуком в течение 30 с.

Процедура иммуноанализа. На рабочую зону ТГЭ наносили 10 мкл антител IgG к вирусу кори (концентрация $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) и высушивали до полного испарения дисперси-

онной среды (стадия 1 на рис. 1). Готовили растворы антигена вируса кори (NovO/96) в стерильном физиологическом растворе (концентрации $2.33 \cdot 10^{-1}$, $2.33 \cdot 10^{-2}$, $2.33 \cdot 10^{-3}$, $2.33 \cdot 10^{-4} \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Затем в пробирки вносили по 200 мкл раствора каждой концентрации, помещали в них ТГЭ с предварительно иммобилизованными антителами IgG к вирусу кори и инкубировали при $37 \pm 0.1^\circ \text{C}$ в течение 20 мин (стадия 2 на рис. 1). После этого в каждую пробирку добавляли 200 мкл суспензии конъюгата вторичных антител к вирусу кори с нанокompозитными частицами. Образование конъюгатов проводили при помощи магнитного штатива, расположенного за ТГЭ с иммунокомплексом, при $37 \pm 0.1^\circ \text{C}$ в течение 30 мин (стадия 3 на рис. 1). После промывки ТГЭ с образовавшимся на поверхности «сэндвич»-иммунокомплексом «вторичные антитела IgG—антиген вируса—конъюгат антител IgG с нанокompозитом» электрод помещали в термостойкий стеклянный стакан и проводили разрушение иммунокомплекса методом кислотного разложения.

В электрохимическую ячейку помещали 1 мл 1 М раствора CH_3COONa , затем добавляли 0.1 мл $5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ водного раствора пирокатехола (для образования электроактивного комплекса с железом(III)) и 0.2—2.0 мл пробы. Общий объем раствора доводили до 10 мл деионизированной водой. Погружали в ячейку электроды и проводили определение концентрации железа методом инверсионной вольтамперометрии с использованием ТМГЭ²¹. Условия измерений: предварительное концентрирование ионов Fe^{3+} на поверхности ТМГЭ в течение 60—120 с (с перемешиванием при потенциале $E = 0.1 \text{ В}$), время успокоения раствора — 10 с при потенциале 0.1 В, скорость развертки потенциала (в дифференциальном режиме) $0.5 \text{ В} \cdot \text{с}^{-1}$ в интервале потенциалов $E = 0.10$ — $(-1.20) \text{ В}$, область поиска аналитического сигнала Fe^{3+} — $(-0.80) \pm 0.05 \text{ В}$. Регенерация ТМГЭ — 10 разверток со скоростью $0.5 \text{ В} \cdot \text{с}^{-1}$ в интервале $E = 0.1$ — $(-1.20) \text{ В}$. Максимальный катодный ток восстановления комплексного соединения пирокатехола с железом(III) прямо пропорционально зависит от содержания ионов Fe^{3+} в растворе.

В холостом опыте процедуру иммуноанализа проводили по приведенной выше схеме, однако на стадии 2 (см. рис. 1) ТГЭ, модифицированный антителами, инкубировали в растворе, не содержащем антиген вируса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-03-01017-а), Правительства Российской Федерации (программа № 211 поддержки ведущих университетов Российской Федерации в целях повышения их конкурентоспособности, грант 02.A03.21.0006), Министерства образования и науки Российской Федерации (госзадание УрФУ № 2014/236, Н.687.42Б.037/14).

Список литературы

1. А. П. Агафонов, Г. М. Игнатьев, С. А. Пьянков, М. В. Лосев, *Корь. Современные представления о возбудителе. Клиника. Диагностика. Профилактика*, ВОЗ, Новосибирск, 2005, 38 с.
2. А. Г. Букринская, *Вирусология*, Медицина, Москва, 1986, 336 с.
3. Г. Лолор, Т. Фишер, Д. Адельман, *Клиническая иммунология и аллергология*, Практика, Москва, 2000 [G. M. Lawlor, Jr., T. J. Fischer, D. C. Adelman, *Manual of Allergy and Immunology*, 3rd ed., Mass: Little, Brown & Co, Boston, 1995].

4. В. В. Зверев, С. Г. Маркушин, Н. В. Юминова, *Корь*, СПбГУ, Санкт-Петербург, 2003, 110 с.
5. E. W. Konen, S. D. Allen, W. M. Janda, P. Schreckenberger, C. W. Washington, Jr., *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997, p. 1177–1265.
6. R. H. Yolken, D. A. Lennette, T. F. Smith, J. L. Waner in *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., ASM Press, Washington, D. C., 1995, p. 843.
7. А. В. Масыго, *Некоторые ошибки при постановке ИФА*, Вектор-Бест, Новосибирск, 2001, 36 с.
8. S. Donovan, *Clinical Infection Disease*, 1997, **24**, 271.
9. J. M. Hubschen, J. R. Kremer, S. De Landtsheer, C. P. Muller, *J. Virological Methods*, 2008, **149**, 246.
10. H. S. El-Mubarak, R. L. De Swarta, A. D. M. E. Osterhaus, M. Schutten, *J. Clinical Virology*, 2005, **32**, 313.
11. K. B. Hummel, L. Lowe, W. J. Bellini, P. A. Rota, *J. Virological Methods*, 2006, **132**, 166.
12. J. A. C. Schalk, C. van den Elzen, H. Ovelgönne, C. Baas, P. M. J. M. Jongen, *J. Virological Methods*, 2004, **117**, 179.
13. Y. Ammour, E. Faizuloev, T. Borisova, A. Nikonova, G. Dmitriev, S. Lobodanov, V. Zverev, *J. Virological Methods*, 2013, **187**, 57.
14. A. Chakravarti, D. Rawat, S. Yadav, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003, **47**, 563.
15. H. Bridle, *Nanotechnology for Detection of Waterborne Pathogens*, Academic Press, London, 2014, p. 291.
16. E. Polo, S. Puertas, P. Batalla, in *Nanobiotechnology — Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles*, Elsevier, Amsterdam, 2012, p. 247.
17. A. Ivaska, in *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, Elsevier, Amsterdam, 2008, p. 441.
18. Z. L. Liu, Y. J. Liu, K. Yao, *J. Materials Synthesis and Processing*, 2002, **10**, 83.
19. Z. Li, Y. Li, X. Wei, *J. Solid State Chemistry*, 2008, **181**, 480.
20. Z.-M. Liu, H.-F. Yang, Y.-F. Li, Y.-L. Liu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Sensors and Actuators B: Chem.*, 2006, **113**, 956.
21. Kh. Z. Brainina, A. N. Kozitsina, Y. A. Glazyrina, *IEEE Sensors J.*, 2010, **10**, 1699.

Поступила в редакцию 17 марта 2014;
после доработки — 19 июня 2014