

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

На правах рукописи



Козицина Алиса Николаевна

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ
ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОРАЗМЕРНЫХ
МОДИФИКАТОРОВ ДЛЯ БЕСФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

02.00.02 – Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора химических наук

Научный консультант:
доктор химических наук, профессор
Брайнина Хьена Залмановна

Екатеринбург – 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	22
1.1. Классификация и общая характеристика биосенсоров	22
1.2. Ферментные биосенсоры	42
1.3. Тканевые и микробные биосенсоры	48
1.4. ДНК сенсоры	51
1.5. Биосенсоры на основе наноматериалов	55
1.6. Биосенсоры на основе биомиметиков	64
1.7. Иммуноанализ и иммуносенсоры	71
1.7.1. Емкостные и импедиметрические иммуносенсоры	83
1.7.2. Проточные иммуносенсоры и микрофлюидные системы	86
1.7.3. Иммуносенсоры на основе меток	88
1.8. Развитие биосенсоров/сенсоров. Проблемы и перспективы	100
ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА	105
2.1. Оборудование и средства измерений	105
2.1.1. Оборудование для проведения электрохимических исследований ...	105
2.1.2. Оборудование для анализа наноматериалов	107
2.1.3. Оборудование для работы с биообъектами	108
2.1.3. Другое вспомогательное оборудование	109
2.2. Реактивы и приготовление растворов	110
2.3. Методики эксперимента	119
2.3.1. Электронно-микроскопический анализ	119

2.3.2. Синтез и электронно-микроскопический анализ наночастиц NiO....	120
2.3.3. Растровая электронная микроскопия наночастиц NiO, нанесенных на рабочую поверхность ТУЭ.....	128
2.3.4. Синтез различных типов наночастиц золота и серебра термохимическим методом	130
2.3.5. Синтез и электронно-микроскопический анализ наночастиц Fe ₃ O ₄ .	131
2.3.6. Синтез, спектроскопический и электронно – микроскопический анализ различных типов нанокompозитных частиц на основе Fe ₃ O ₄	136
2.3.7. Синтез, спектроскопический и электронно-микроскопический анализ полимеров с молекулярными отпечатками холестерина на поверхности наночастиц магнетита (ПМО – МНЧ) и оксида кремния (ПМО – ОКНЧ).	154
2.3.8. Синтез полимеров с молекулярными отпечатками креатинина.....	160
2.3.9. Конъюгаты антител с НК на основе Fe ₃ O ₄ с оксидкремниевым покрытием	160
2.3.10 Культивирование бактерий (бактериальный посев).....	161
2.3.11. Антиген бактерии <i>S. typhi</i>	162
2.3.12. ПЦР анализ	162
2.3.13. ИФА анализ	163
2.3.14. Определение продуктов электропревращений наночастиц магнетита в апротонной среде с использованием фотометрического метода	164
2.3.15 Введение НЧ в культуру клеток	164
2.3.16 Определение содержания секретированных цитокинов IL1 β , IL6... ..	164
2.3.17 Введение НЧ аутобредным лабораторным крысам-самкам.	165

ГЛАВА 3 Варианты бесферментных электрохимических способов и иммуносенсоров на основе наночастиц, нанокompозитов магнетита для определения содержания патогенных микроорганизмов <i>Salmonella typhimurium</i> SL 7207, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25992, <i>Staphylococcus aureus</i> В-1266 и антигена вируса кори	166
--	------------

3.1. Электрохимический анализ патогенных микроорганизмов на примере <i>S. typhi</i> . с применением Fe_3O_4 в качестве метки.....	168
3.1.1. Определение содержания НЧ Fe_3O_4 , поглощенных клетками.....	168
3.1.2. Электронно-микроскопический анализ взаимодействия бактерий <i>S. typhi</i> . и <i>St. aureus</i> с НЧ Fe_3O_4	170
3.1.3. Определение содержания бактерий <i>S. typhi</i> . с применением наночастиц Fe_3O_4	172
3.1.4. Результаты определения правильности и специфичности разрабатываемого способа бесферментного электрохимического иммуноанализа. Анализ реальных объектов	174
3.1.5. Определение содержания <i>E. coli</i> в модельных суспензиях с использованием разработанного электрохимического способа иммуноанализа.....	177
3.2. Электрохимический иммуносенсор для определения содержания микроорганизмов на примере <i>E. coli</i> с применением НК Fe_3O_4 в качестве метки.....	178
3.2.1. Электрохимическое поведение синтезированных нанокompозитных частиц	179
3.2.2. Электронно-микроскопический анализ взаимодействия бактерий <i>E. coli</i> с НЧ Fe_3O_4	185
3.2.3. Определение содержания бактерий <i>E. coli</i> с применением НК Fe_3O_4	189
3.2.4. Результаты определения правильности и специфичности разрабатываемого бесферментного электрохимического иммуносенсора. Анализ реальных объектов.....	193
3.3. Бесферментный электрохимический иммуносенсор для определения содержания патогенных микроорганизмов на примере <i>E. coli</i> и <i>St. aureus</i> с применением НК Fe_3O_4 в качестве метки в апротонной среде	198

3.3.1. Электрохимические превращения магнитных наночастиц и синтезированных нанокompозитных частиц в апротонной среде	199
3.3.2. Электронно – микроскопический анализ взаимодействия бактерий <i>E. coli</i> и <i>St. aureus</i> с НЧ Fe ₃ O ₄	206
3.3.3. Электрохимическое определение содержания бактерий <i>E. coli</i> с применением НК Fe ₃ O ₄	209
3.3.4. Результаты определения правильности и специфичности разрабатываемых бесферментных электрохимических иммуносенсоров. Анализ реальных объектов.....	213
3.4. Бесферментный электрохимический способ определения содержания антигена вируса кори с применением конъюгатов антитело – НК магнетита с оксидкремниевым покрытием в качестве метки	215
ГЛАВА 4 Варианты бесферментных электрохимических способов и сенсоров на основе катализаторов, содержащих соединения Ni(II), Co(II) органической и неорганической природы, наноксиды никеля(II), наночастицы серебра, золота, наносплавы, наночастицы типа ядро-оболочка для определения мочевины, креатинина, холестерина	219
4.1. Методики эксперимента	220
4.1.1. Методика количественного определения мочевины, креатинина.....	220
4.1.2. Методика количественного определения холестерина с использованием электрода модифицированного наночастицами золота и серебра.....	220
4.1.3. Методика количественного определения холестерина в апротонных средах.....	221
4.2. Бесферментный электрохимический способ количественного определения мочевины и креатинина	222
4.2.1. Электрокатализаторы НЧ NiO.....	222
4.2.2. Электрокатализаторы органические соединения Ni (II)	225

4.2.3. Разработка методики хроноамперометрического селективного определения содержания мочевины в модельном растворе и образцах сыворотки крови	240
4.2.4. Хроноамперометрическое определение содержания креатинина в модельном растворе.....	242
4.3 Бесферментный электрохимический способ количественного определения холестерина.	247
4.3.1. Применение в качестве электрокатализаторов окисления холестерина НЧ золота и серебра.....	247
4.3.2 Применение в качестве электрокатализаторов окисления холестерина хлоридов никеля (II) и кобальта (II), тиоцианата калия в ДМФА.....	251
4.3.3 Применение в качестве электрокатализатора окисления холестерина хлорида никеля (II) в ацетонитриле	256
4.3.4 Хроноамперометрическое определение содержания холестерина в модельном растворе и образцах сыворотки крови.....	267
ГЛАВА 5. Вольтамперометрические методы в анализе токсичности наноматериалов.....	273
5.1 Электронно-микроскопический анализ взаимодействия НЧ Ag, Au или Fe ₃ O ₄ с клеточной культурой WI-38.....	273
5.2 Кинетика поглощения наночастиц клетками	276
5.2.1 Методики количественного определения содержания НЧ Ag, Au.....	276
5.2.2 Поглощение НЧ Au и Ag клеточными культурами.....	278
5.3 Оценка жизнеспособности и цитокинового статуса клеточной культуры WI - 38 в условиях воздействия НЧ Ag, Au или Fe ₃ O ₄	280
5.4 Оценка пульмонотоксичности и резорбтивной токсичности частиц магнетита (Fe ₃ O ₄) нано- и микрометрового диапазонов.....	282

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	285
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	289
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	293
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Акт испытаний электрохимического способа иммуноанализа	339
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Акт испытаний электрохимического иммуносенсора	341
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 Акт использования результатов исследовательской деятельности	343

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Эффективность первичной медико-санитарной помощи, включающей профилактику, лечение различных заболеваний, таких как диабет, сердечно-сосудистые, инфекционные и онкологические заболевания, в значительной степени зависит от правильности и своевременности постановки диагноза. В немалой степени последняя определяется доступностью и надежностью информации о состоянии больного, включая результаты анализа биологических жидкостей.

В настоящее время в клиничко-диагностических центрах используют сложное, дорогостоящее, технологичное лабораторное оборудование, требующее специальных помещений и высокой квалификации обслуживающего персонала. Совершенствование инструментальных средств медицинской диагностики в значительной степени опирается на развитие концепции биосенсоров, перспективных также в мониторинге окружающей среды, фармацевтике, пищевой промышленности и др. Биосенсор позволяет проводить надежную оценку содержания аналита, обусловленную его взаимодействием с биологическим рецептором [1]. Биосенсоры — портативные устройства, привлекающие своей мобильностью, доступностью, дешевизной и предназначенные, прежде всего, для скрининга биологически важных компонентов на месте, у больного (так называемая «point-of-care diagnostics»). Подавляющее число работ, направленных на создание биосенсоров, посвящено электрохимическим методам регистрации сигнала. В большинстве случаев это потенциометрия и амперометрия. Они обладают рядом преимуществ, таких как низкие затраты на изготовление, простота конструкции, удобный для пользователя интерфейс, возможность миниатюризации, надежность измерения, достигаемые низкие пределы обнаружения и небольшие операционные объемы. Последнее особенно важно при анализе биологических проб [2 - 5]. Электрохимические биосенсоры имеют преимущества перед многими альтернативными подходами, в частности, оптическими сенсорами, для которых мутность раствора или его окраска могут в

значительной степени ограничивать область потенциального применения. Современный этап развития электрохимических биосенсоров характеризуется взрывным увеличением интереса к дополнительным факторам, определяющим их селективность и чувствительность, связанным с модификациями поверхности электрода как первичного преобразователя сигнала и подложки для локализации биохимического рецептора.

Однако при всех положительных качествах биосенсоров, указанных выше, они не лишены недостатков, связанных с температурной и временной нестабильностью применяемых биохимических рецепторов, их высокой стоимостью, а также с необходимостью введения в анализируемый раствор дополнительных реагентов и сигналообразующих веществ. В связи с этим в настоящее время внимание разработчиков все чаще обращается к созданию искусственных аналогов природных рецепторных структур, в том числе, ферментов. Эти работы особенно интенсифицировались в последние два десятилетия, а соответствующие синтетические аналоги получили название биомиметиков. К их числу относятся некоторые наноматериалы, органические молекулы, обладающие электрокаталитической активностью, а также полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО), имитирующие высокоспецифичное связывание аналита в комплексы по аналогии с реакциями антиген – антитело и фермент – субстрат. При этом методология создания бесферментных сенсоров на основе биомиметиков в значительной степени повторяет подходы, апробированные и отработанные на примере традиционных биосенсоров.

Последующее развитие нового поколения сенсоров на основе биомиметиков, их внедрение в практику биомедицинского анализа требуют, тем не менее, решения ряда проблем. Сегодня специалисты в области органического синтеза благодаря возможностям современной химии могут получать более разнообразные продукты по сравнению с аналогами, существующими в природе, однако структуры таких соединений зачастую не воспроизводят свойств, присущих ферментам. В случае применения, например, наноматериалов в качестве электрокатализаторов или

сигналообразующей метки остается проблема необходимости строгого контроля их структуры в процессе включения в состав сенсорного устройства, а также их конъюгации с конкретным аналитом. В случае применения ПМО актуальна задача повышения сродства к целевому аналиту, необходимость полного удаления молекул шаблона после формирования «молекулярных отпечатков» и повторного связывания аналита на стадии анализа. Также необходимо учитывать постепенное изменение геометрии пор и эффективности связывания в процессе нахождения ПМО в водных растворах.

Следует особо остановиться на проблемах химической безопасности при использовании наноматериалов. Требуется тщательная оценка их острой и хронической токсичности, исследование биологических взаимодействий, приводящих к возможным последствиям для живых организмов. Многообразие наноматериалов, разобщенность проводимых исследований их токсического воздействия на живой организм привели к противоречивым оценкам их безопасности. До конца не изучены механизмы индуцирования наночастицами деструктивных эффектов в клетках и организме в целом.

Необходимость синтеза, исследования и применения различных соединений и материалов, имитирующих биорецепторы, в составе электрохимических сенсоров, потребность в расширении способов их иммобилизации на поверхности индикаторного электрода/трансдьюсера и в конечном итоге разработка бесферментных биосенсоров/сенсоров, обладающих высокой селективностью, низким пределом обнаружения, широким диапазоном обнаружения и быстрым временем отклика для определения широкого круга аналитов биомедицинского назначения определяют актуальность темы диссертационной работы.

Степень разработанности темы диссертационной работы

Разработка чувствительных, селективных и стабильных бесферментных сенсоров и методов анализа является одним из наиболее активно развиваемых направлений исследования. Однако исследования в части поиска альтернативы ферментам носят фрагментарный характер. Они зачастую не учитывают

специфики измерения биологических аналитов, особенностей состава проб и методологически повторяют работы, посвященные определению заведомо более простых объектов анализа. При этом состав материалов, используемых в качестве модификаторов, остается весьма ограниченным и, как правило, не адаптируется в зависимости от природы анализируемой пробы. В частности, недостаточно исследований в области устойчивости наноматериалов в составе сенсоров, их биосовместимости с другими модификаторами, влияния формы и способа получения наноматериалов на их вклад в улучшение характеристик сенсоров. Работы по ПМО ограничены в основном определением достаточно крупных биологических молекул, таких как белки и клеточный материал. Эффективность концепции в определении низкомолекулярных аналитов – темплатов остается вопросом дальнейших изысканий. Существующие исследования бесферментных электрохимических сенсоров и биосенсоров достаточно редко ориентируются на требования массового производства и условий применения вне лабораторной базы. Таким образом, потребность в надежных, недорогих устройствах для определения широкого круга биологических параметров до сих пор не удовлетворена.

Целью работы является развитие теоретических представлений о механизме функционирования бесферментных электрохимических сенсоров и иммуносенсоров и методологических подходов к их созданию на основе наночастиц металлов и их оксидов, ряда органических модификаторов, в том числе, со свойствами ПМО для определения возбудителей инфекционных заболеваний в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и биологических жидкостях пациентов, антител, а также контроля некоторых важных биохимических показателей.

Для достижения поставленной цели требовалось сформулировать и решить **ряд задач:**

— установить взаимосвязь между структурными, размерными и морфологическими характеристиками синтезированных индивидуальных наночастиц благородных металлов (золото, серебро) и смешанного состава,

оксидов никеля и железа смешанного состава, а также полимерных композитов с включением магнетита, и их функциональными характеристиками в составе электрохимических сенсоров и иммуносенсоров, включая окислительно-восстановительные превращения в водных и апротонных средах и взаимодействие с бактериальными клетками;

— разработать новые подходы для бесферментного количественного определения болезнетворных бактерий с использованием указанных наноматериалов и композитов на их основе (на примере *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*);

— разработать и реализовать для конкретных соединений диагностического значения (холестерин, мочеви́на, креатинин) концепцию бесферментного определения с использованием наночастиц благородных металлов, оксидов никеля, органических, неорганических соединений на основе сочетания электрокатализа, ионообменного концентрирования и получения молекулярных отпечатков на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита; исследовать электрокаталитическое поведение и предложить механизм их действия и критерии отбора для синтезированных соединений никеля и кобальта, а также наночастиц серебра, золота и оксида никеля;

— провести оценку токсического эффекта полученных и охарактеризованных наночастиц металлов и их оксидов с учетом динамики их проникновения в клетку (на примере клеточной культуры WI 38), определить соответствие между действующими концентрациями наночастиц и параметрами жизнеспособности и функциональной активности;

— предложить простые и эффективные устройства для количественного определения возбудителей инфекционных заболеваний и метаболитов (мочеви́на, креатинин, холестерин) в модельных растворах и реальных объектах контроля с применением разработанных технологических и методических решений;

— разработанные бесферментные электрохимические способы и сенсоры, не требующие применения дорогостоящего оборудования, организации специальных

помещений, дорогостоящих реагентов для прямого определения клинически важных показателей, должны совпадать или превосходить аналоги, применяемые в медицинской диагностике по аналитическим характеристикам.

Научная новизна работы

1. Развита концепция применения наночастиц переходных металлов/оксидов, соединений органической и неорганической природы в качестве электрокатализаторов, сигналообразующих меток в электрохимических бесферментных вариантах биоанализа, устанавливающая алгоритмы направленного выбора, синтеза и модификации наноматериалов для решения конкретных аналитических задач, связанных с определением органических соединений диагностического значения и созданием соответствующих способов и электрохимических бесферментных сенсоров и иммуносенсоров.

2. Количественно охарактеризована связь между природой наноматериалов, способом их получения и электрокаталитической активностью и чувствительностью определения различных аналитов на примере наночастиц серебра, золота смешанного состава, оксида никеля (II), органических соединений никеля (II), тиоцианата калия, хлоридов никеля (II) и кобальта (II) в окислении мочевины, креатинина, холестерина. Исследована кинетика электродных реакций и влияние различных факторов на активность применяемых электрокатализаторов.

3. Выявлены закономерности, связывающие условия синтеза наночастиц, нанокompозитов магнетита с различным поверхностным покрытием на размерные, морфологические параметры, седиментационную устойчивость и электрохимическую активность получаемых наноматериалов.

4. Изучены особенности окислительно-восстановительных превращений наночастиц, нанокompозитов магнетита – сигналообразующих меток для количественного определения инфекционных агентов, в водных и апротонных средах. Установлена связь электрохимических параметров процессов и характера превращений магнетита, предложены возможные схемы протекания электродных

реакций наночастиц Fe_3O_4 , выбраны рабочие условия формирования сигнала, обусловленного указанным наноматериалом, в водных и апротонных средах.

5. Предложены новые варианты бесферментных электрохимических способов количественного анализа инфекционных агентов и некоторых биохимических параметров.

Новизна предлагаемых подходов подтверждена 6 патентами РФ.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Разработано новое поколение бесферментных сенсоров на основе наночастиц серебра, золота, оксида никеля (II), органических соединений никеля (II), различающихся составом, способом получения и введением в состав сенсора, применяемых в качестве катализаторов в электрохимическом окислении мочевины, креатинина, холестерина.

2. Разработаны новые варианты электрохимических способов количественного определения мочевины, креатинина и холестерина с использованием наночастиц оксидов никеля, серебра, золота, их сплавов, наночастиц типа ядро-оболочка с различным соотношением золота и серебра, органических соединений никеля (II), тиоцианата калия, хлоридов никеля (II) и кобальта (II) в качестве катализаторов окисления аналита, ПМО на креатинин и холестерин или ионообменный сорбент при определении мочевины, обеспечивающих селективность определения.

3. Разработаны новые бесферментные электрохимические иммуносенсоры и гибридные варианты вольтамперометрических способов для количественного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* В -1266 с использованием в качестве прямых сигналообразующих меток нанокompозитных частиц на основе Fe_3O_4 с различным, в том числе электроактивным, покрытием и бактерий *Salmonella typhimurium* SL 7207 с использованием наночастиц магнетита.

4. Разработан новый подход к количественному определению антигенов вирусов методом бесферментного электрохимического иммуноанализа с

использованием конъюгатов антител с нанокompозитными частицами на основе магнетита.

5. Разработаны и запатентованы алгоритмы, устройства для проведения количественного определения содержания возбудителей инфекционных заболеваний, а также мочевины, креатинина и холестерина. Проведенные испытания по сравнительному определению содержания инфекционных агентов, мочевины, креатинина, холестерина в модельных и реальных объектах с использованием разработанных бесферментных электрохимических иммуносенсоров, вариантов и традиционно используемых в медицинской диагностике методов показали, что предложенные разработки соответствуют по чувствительности, селективности референсным лабораторным методам анализа, но имеют преимущества в простоте использования и стоимости. В дальнейшем они могут быть переведены в форму портативных устройств.

6. Развита методология электроанализа наночастиц после их проникновения в клетки и связи этого параметра с жизнеспособностью и изменением цитокинового статуса клеток.

7. Получены акты испытаний (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск), подтверждающие возможность применения предложенных бесферментных электрохимических вариантов способов иммуноанализа и иммуносенсоров для количественного определения патогенных микроорганизмов.

8. Результаты работы использованы ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора при выполнении Федеральной целевой программы "Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008 - 2010 годы" для разработки нормативно-методического обеспечения и средств контроля содержания наночастиц на объектах производственной сферы. Получен соответствующий акт испытаний.

Методология и методы диссертационного исследования. В рамках проведенных исследований применяли методы циклической вольтамперометрии

(ЦВА), хроноамперо- и хронопотенциометрии, электрохимической импедансной спектроскопии, спектрофотометрии. Для анализа размеров и морфологии наноматериалов применяли сканирующую электронную микроскопию, состав определяли с использованием ИК – спектроскопии. Для характеристик поверхности сенсоров использовали растровую электронную микроскопию. Взаимодействие наноматериалов с клетками изучали просвечивающим электронным микроскопом.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Результаты исследований структуры, состава, размерных и морфологических параметров наночастиц золота, серебра смешанного состава, оксидов никеля (II), железа (II, III), а также нанокompозитных частиц на основе Fe_3O_4 и различного покрытия (электроактивного и неэлектроактивного) и влияние этих характеристик на электрохимическое поведение и электрокаталитические свойства наноматериалов в протонных и апротонных средах.

- Результаты изучения седиментационной устойчивости, характера окислительно-восстановительных превращений в водной и апротонной средах, скорости процесса проникновения в бактериальные клетки синтезированных наноматериалов.

- Закономерности влияния различных факторов на электрохимическое поведение изученных электрокаталитаторов, иммобилизованных на поверхности рабочего электрода или введенных в объем раствора, а также генерируемый ими аналитический сигнал при количественном определении мочевины, креатинина и холестерина.

- Результаты исследования влияния размеров, формы и морфологии ПМО холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита и ПМО креатинина на их способность к селективному «захвату» холестерина и креатинина.

- Кинетика взаимодействия наночастиц Fe_3O_4 , полимерных нанокompозитов на основе Fe_3O_4 с бактериальными клетками (клеточная культура WI 38).

- Концепция гибридных бесферментных электрохимических способов иммуноанализа для количественного определения патогенных микроорганизмов/антигена вирусов, включающих этапы магнитного отделения и магнитного концентрирования конъюгатов с наночастицами/нанокомпозитами для уменьшения времени измерения и увеличения его чувствительности.

- Алгоритмы и устройства проведения количественного определения содержания возбудителей инфекционных заболеваний, мочевины, креатинина и холестерина в модельных растворах и реальных пробах.

- Результаты анализа реальных и модельных образцов на содержание инфекционных агентов и биохимических показателей, а также их сравнение с аналогичными результатами референсных лабораторных методов.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность полученных результатов определяется применением в работе совокупностью современных физико-химических методов исследования и высокотехнологичного оборудования, а также статической обработкой полученных результатов и подтверждения сравнением результатов количественного определения инфекционных агентов и биохимических показателей в модельных смесях и реальных пробах, полученных с использованием разработанных бесферментных электрохимических способов, сенсоров и референсных лабораторных методов. Получены акты испытаний: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск и ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург.

Основные положения диссертационной работы доложены на 6, 7 и 9 - м симпозиумах «Биосенсоры и биоаналитическая техника в экологическом и клиническом анализе» (Рим, Италия, 2004 г.; Кушадаси, Турция, 2006 г.; Монреаль, Канада, 2009 г.); на Международном конгрессе по аналитическим наукам ICAS-2006 (Москва, Россия, 2004 г.); на научно-практической конференции «Электрохимические методы анализа в контроле и производстве (Томск, Россия, 2007 г.); на XVIII, XX Менделеевских съездах по общей и прикладной химии

(Москва, Екатеринбург, Россия, 2007, 2016 гг.); на VII, VIII и IX Всероссийских конференциях по электрохимическим методам анализа с международным участием «Электрохимические методы анализа» (Уфа, Екатеринбург, Россия, 2008, 2012, 2016 гг.); на III Всероссийской конференции по наноматериалам «НАНО-2009» (Екатеринбург, Россия, 2009 г.); на III Всероссийской конференции с международным участием «Аналитика России» (Краснодар, Россия, 2009 г.); на XV конференции по электроанализу (Инсбрук, Австрия, 2009 г.); на Съезде аналитиков России (Москва (пансионат «Клязьма»), Россия, 2010 г.); на симпозиуме с международным участием «Теория и практика электроаналитической химии» (Томск, Россия, 2010 г.); на 9 - м заседании «Международного общества по электрохимии, электрохимическим датчикам: от наномасштабного проектирования до промышленного применения» (Турку, Финляндия, 2011 г.); на III Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, Россия, 2011 г.); на конференции «Наноформация-2012» (Барселона, Испания, 2012 г.); на IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» (Уфа, Россия, 2013 г.); на 15 Международной конференции по электроанализу «ESEAC» (Мальме, Швеция, 2014 г.); на конференции «Анализ лекарственных препаратов 2014» (Льеж, Бельгия, 2014 г.); на конференции «Электроанализ 2015» (Бордо, Франция, 2015 г.); на конференции «Химический анализ и медицина» (Москва, Россия, 2015 г.); на Международной конференции «Последние достижения в анализе пищевых продуктов» (Прага, Чехия, 2015г.).

Публикации. Основные результаты по материалам диссертации опубликованы в 19 статьях в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 главах коллективных монографий, 6 патентах РФ и более чем в 100 тезисах докладов в материалах всероссийских и международных научных конференций.

Личный вклад автора в исследования, проводимые в рамках диссертационной работы, заключается в обосновании теоретических представлений и новых методологических подходов к созданию вариантов

бесферментных электрохимических способов и сенсоров с применением в качестве альтернативы ферментам веществ и материалов небиологической природы и совершенствованию методов электроанализа для исследования цитотоксичности наноматериалов. Работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состояли в постановке целей и решении основных задач, анализе, обобщении и интерпретации полученных результатов, разработке методик и алгоритмов количественного анализа некоторых инфекционных агентов и биохимических показателей. Предложенные новые подходы в совокупности с высокой чувствительностью и селективностью, оперативностью получения результатов анализа позволили создать принципиально новые варианты бесферментных электрохимических способов анализа и типы бесферментных иммуносенсоров/сенсоров, не уступающие по своим характеристикам биосенсорам, но существенно более дешевые и лишенные известных недостатков последних (нестабильность ферментов, необходимость использования специального субстрата, обеспечивающего протекание сигналообразующей реакции).

Работа выполнена при финансовой поддержке: INCO – Сореникус (проект № ERVIC 15CT-960804, 1998 – 2001 гг.), INTAS (проект № 00-273, 2001 – 2004 гг.), МНТЦ (проект № 3230, 2007 – 2008 гг.), Российского Фонда Фундаментальных Исследований (06-03-08141-офи, 07-03-96068-р_урал_a, 09-03-12242-офи_м, 14-03-01017_a), в рамках заданий Министерства промышленности и науки Свердловской области «Нанотехнологии в био- и химических сенсорах для мониторинга окружающей среды и здоровья человека» (2008 – 2010 гг.), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно - технической сфере (2005 – 2006 гг.), в рамках госбюджетной темы Н687.42Г.002/12.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка литературных источников, приложений. Текст диссертации изложен на 343 страницах, содержит 98 рисунков, 13 схем, 67 таблиц, 3 приложения и 388 библиографических ссылок.

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

В первой главе представлен обзор литературы, посвященной основным достижениям в области разработки биосенсоров для распознавания широкого круга аналитов с различными методами детектирования. Приведена критическая оценка биосенсоров на основе ферментов. Обоснована необходимость изучения и разработки бесферментных иммуносенсоров/сенсоров.

Во второй главе представлены сведения о материалах, методиках диссертационного исследования, а также реактивах, материалах, применяемой инструментальной базе.

Третья глава посвящена разработке алгоритмов нескольких вариантов бесферментного электрохимического иммуноанализа (иммуносенсоров) для количественного определения некоторых микроорганизмов и антигена вируса кори. Представлены результаты исследования структуры, состава, размерных и морфологических параметров, седиментационной устойчивости наночастиц магнетита и нанокompозитных частиц на основе Fe_3O_4 с различным покрытием, влияния этих характеристик на окислительно-восстановительное поведение наноматериалов в протонных и апротонных средах, возможности применения в качестве сигналообразующей метки. Продемонстрированы результаты анализа реальных и модельных образцов на содержание бактериальных клеток с использованием разработанных способов и подтвержденные данными референсных лабораторных методов.

В четвертой главе приведены экспериментальные данные по разработке алгоритмов и устройств различных вариантов бесферментных электрохимических способов количественного определения мочевины, креатинина, холестерина с использованием электрокатализаторов (соединения Ni (II), Co (II) органической и неорганической природы, наноксиды никеля (II), наночастицы серебра, золота,

наносплавы, наночастицы типа ядро-оболочка) и ПМО креатинина, холестерина, обеспечивающие селективность определения этих веществ или ионообменного сорбента при анализе мочевины. Показано влияние различных факторов на электрохимическое поведение изучаемых электрокатализаторов и генерируемый ими аналитический сигнал, иммобилизованных на поверхности рабочего электрода или объеме раствора, в присутствии мочевины, креатинина, холестерина. Представлены результаты исследования влияния размеров, формы и морфологии ПМО холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита, а также ПМО креатинина на их способность к селективному «захвату» холестерина и креатинина.

В пятой главе обсуждены вопросы токсического воздействия наноматериалов на живой организм. Показана возможность применения методов электроанализа к исследованию накопления наночастиц в клетках, взаимосвязи этого параметра с жизнеспособностью клеток, изменением цитокинного статуса клеток.

В приложениях к диссертации представлены акты испытаний.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Классификация и общая характеристика биосенсоров

Исследование и разработка биохимических сенсоров (биосенсоров, биодатчиков) является одним из перспективных направлений современной аналитической химии, определяющее развитие последней. В соответствии с современным определением ИЮПАК, **биосенсор** – самостоятельное интегрированное устройство биорецептор/трансдюсер, предназначенный для получения селективной количественной или полуколичественной аналитической информации с использованием биораспознающего элемента [6]. Началом для разработки биосенсоров стал 1962 год, когда американский ученый Л.Кларк создал первый биодатчик для определения глюкозы, объединив высокоспецифическую ферментную реакцию и амперометрический кислородный электрод в одну систему [7].

На рисунке 1.1 приведена общая классификация биосенсоров с использованием нескольких признаков:

- по природе биораспознающего элемента (биорецептора);
- по методу иммобилизации биорецептора;
- по способу детектирования и типу трансдюсера.

В литературе можно встретить конкретные биосенсоры: «ферментный сенсор», «иммуносенсор», «ДНК сенсор», «микробный сенсор», названия которых соответствуют или типу биорецептора, или биохимической реакции, положенной в основу сигнал-отклик.

Неослабевающий интерес к биосенсорам со стороны исследователей из разных областей знаний обусловлен их возможностью применения в дифференциальной диагностике, мониторинге окружающей среды, фармацевтике, пищевой промышленности и др.



Рисунок 1.1. – Классификация биосенсоров

Многообразие биологического материала и способов иммобилизации его на поверхности или в объеме трансдьюсера, применение нанотехнологий привело к появлению лавинообразного количества различных биосенсоров, в том числе миниатюрных многофункциональных датчиков – «биочипов» [3, 8 – 12].

В период с 2000 года по 2015 опубликовано более 30000 работ, посвященных биосенсорам, большая часть которых касается ферментных и ДНК сенсоров. По-видимому, это связано с разнообразием биораспознающих компонентов, проявляющих ферментативную активность в случае ферментных сенсоров, в случае же ДНК-сенсоров, это возможность определения широкого круга носителей генетической информации.

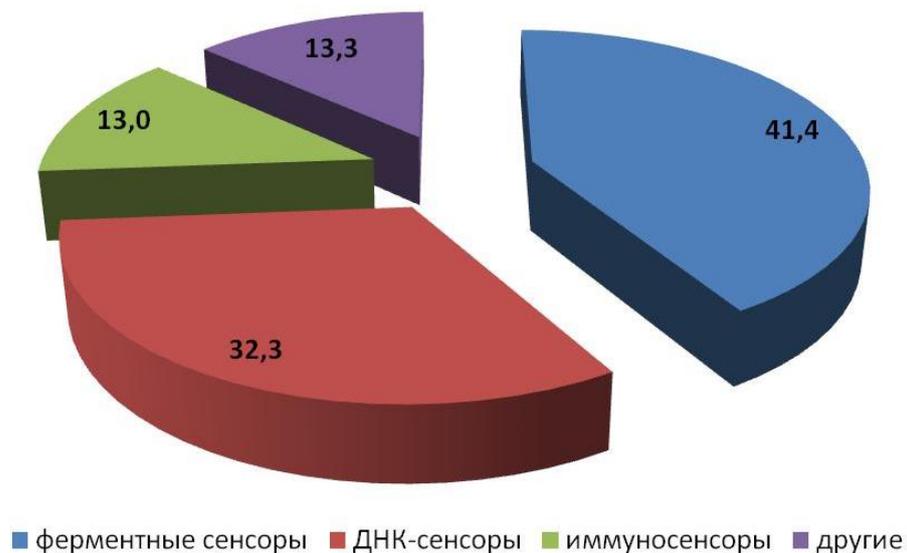


Рисунок 1.2 – Соотношение количества публикаций в период с 2000 по 2015 гг. по запросам "biosensor", "enzyme sensor", "DNA sensor", "immunosensor" базы данных Scopus

В соответствии с классификацией, в основу которой положена природа биорецептора, его взаимодействие с определяемым веществом, а также формирование сигнала – отклика биосенсора, последние можно разделить на два типа: ферментные и аффинные биосенсоры [13]. К аффинным биосенсорам относят иммуносенсоры и ДНК-сенсоры. Сигнал ферментных сенсоров регистрируют в

начальный момент времени за счет реакции изменения природы определяемого вещества – субстрата, в которой катализатором выступает фермент. Сигнал аффинных биосенсоров связан с обратимыми биохимическими процессами образования комплексов антиген – антитело или ДНК белок. Надмолекулярные и клеточные/микробные биосенсоры можно отнести к ферментным сенсорам, поскольку аналитический сигнал этих типов биосенсоров обусловлен изменением состава субстрата под действием катализаторов/внутриклеточных ферментов.

Анализ литературы позволяет сказать, что до конца 90-х годов XX века методология разработок биосенсоров была связана с применением ферментов. Последние десятилетия альтернативой для биораспознающего элемента стали аптамеры, представляющие собой синтетические нуклеотидные последовательности, синтезируемые *in vitro* с использованием комбинаторной химии. Сенсоры на основе аптамеров называют аптасенсоры [14]. Кроме аптамеров успешно применяют полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО), представляющие собой полимерные структуры, содержащие высокоспецифические центры связывания, комплементарные по размеру, форме, структуре и физико-химическим свойствам, определенным органическим и биоорганическим молекулам. ПМО, значительно более стабильные, чем белки, могут быть получены химическим синтезом в больших количествах, и поэтому имеют большие потенциальные возможности для замены антител, ферментов в биосенсорах и биочипах для селективного определения не только веществ с низкой молекулярной массой, но и белков, вирусов, живых клеток [15].

Помимо аптамеров и ПМО в разработке биосенсоров с начала 2000-х годов можно наблюдать тенденцию применения наноматериалов различной природы и структуры в качестве альтернативны для биорецептора (рисунок 1.3). Причем наноматериалы могут выступать в качестве материала трансдьюсера для усиления сигнала, либо сигналообразующей метки в различных типах иммуносенсоров, либо синтетического аналога фермента [16].

Как видно из диаграммы (рисунок 1.3) количество публикаций, посвященных бесферментным сенсорам, растет. Если еще в начале 2000-х их единицы, то сегодня это уже тысячи публикаций. Легко заметить, что подавляющее количество публикаций за приведенный период посвящено бесферментным электрохимическим биосенсорам, чуть меньше половины, из которых – это разработки электрохимических иммуносенсоров.

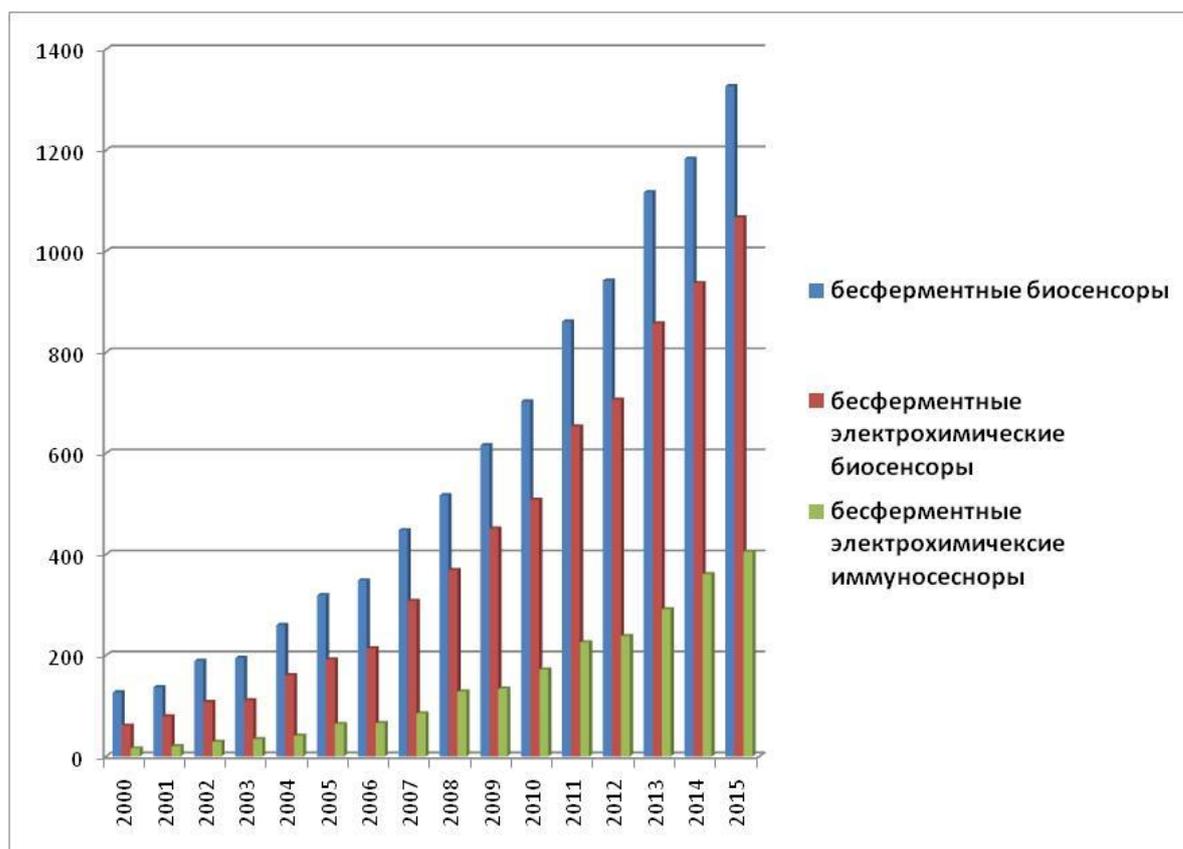


Рисунок 1.3. – Диаграмма изменения публикационной активности по бесферментным биосенсорам

Ключевой, решающей задачей в разработке биосенсора является процесс введения и закрепления биорецептора на поверхности носителя (трансдюсера), т.е. процесс иммобилизации, позволяющий разработать селективный, воспроизводимый, чувствительный, стабильный биосенсор [17–21]. Многообразие методов иммобилизации обусловлено, в том числе, и разнообразием поверхностей подложек. Классификация методов иммобилизации приведена в табл. 1.1.

Таблица 1.1. – Классификация методов иммобилизации биорецепторов

Метод иммобилизации	Описание
<i>1</i>	<i>2</i>
Введение в полимерную матрицу	<p>Для иммобилизации биорецепторов используются приемы: фотополимеризации [22], электрохимической полимеризации [23], введение в золь-гель матрицу [23]. Этот метод характеризуется относительно простой реализацией. Кроме того, биорецепторная, например, ферментативная, активность сохраняется достаточно продолжительное время, что напрямую связано с увеличением стабильности при хранении биосенсора. Однако технология требует строгого соблюдения условий эксперимента, поскольку большое значение имеет размер пор и постоянство состава полимера. Кроме того, всегда существует равновесие между процессами адсорбции и десорбции и важно выбрать такие условия, чтобы скорость десорбции была минимальной. Все чаще полимеры дополнительно модифицируют различными функциональными группами (-COOH, NH₂ и т.д.) с целью более прочного и ориентированного удерживания биорецептора.</p>
Физическая адсорбция	<p>Физическая адсорбция является самым простым способом иммобилизации биорецептора. Процедура состоит в осаждении биологического материала на поверхности трансдьюсера за счет сил Ван-дер-Ваальса [22,24, 25]. Преимуществами этого способа является простота, низкая стоимость, и возможное восстановление [22]. Существенным недостатком является низкая стабильность биосенсоров при хранении.</p>

1	2
Ковалентная иммобилизация	Поверхность подложки биосенсора модифицируют, чтобы получить химически активные группы, к которым биологический материал может быть присоединен. Поверхность биосенсора становится более однородной, что приводит к увеличению воспроизводимости в ходе анализа [26]. Однако применение токсичных реагентов, необходимых для ковалентного взаимодействия, изменение нативной структуры биорецептора, делают этот метод не таким привлекательным.
Кросс - сшивка	В этом методе наиболее часто используемым реагентом является поперечно сшивающий агент — глутаровый альдегид, который связывается с аминогруппами лизиновых остатков фермента, антител и носителя. Образование прочных поперечных связей приводит к укреплению биорецептора на поверхности биосенсора, однако ферменты становятся менее динамичными и их активность снижается [27].
Биологические методы: Аффинное взаимодействие	Иммобилизации за счет высокоэффективного и специфичного связывания белков/ДНК со специфическими сайтами [13]. Этот метод иммобилизации воспроизводит природные процессы. Недостатки: перекрестных реакций с некоторыми видами антител, дороговизна.

Одно из предположений, из которого исходят исследователи при разработке биосенсоров, следующее: кинетические параметры ферментов, включенных в поверхностный слой подложки должны быть такими же, в растворе. Это может быть верно, для методов иммобилизации, исключая изменение структуры белка, и как следствие, потерю активности фермента. Это предположение перестает быть верным, в случае применения, например, органических растворителей для формирования ферментативной мембраны в сборке биосенсора.

Таким образом, основные требования, предъявляемые к методам иммобилизации – высокая специфичность биорецептора, стабильность (рН среды, температура, ионная сила раствора, не должны влиять на систему), исключение деградации биорецептора, т.е. активность биораспознающего компонента в иммобилизованном состоянии должна быть сравнима с его активностью в растворе.

Безусловно, одним из немаловажных требований, предъявляемым к биосенсорам, является стабильность сигнала в течение самого длительного периода его использования. Это в большей мере относится к биосенсорам, для которых необходима иммобилизация ферментов или живых клеток/тканей. Принимая во внимание снижение активности фермента (индивидуального или включенного в живые клетки) в процессе иммобилизации, обусловленное использованием органических растворителей или других реагентов, введение живых клеток (микроорганизмов, микроводорослей и т.д.) проводят в основном методом физической адсорбции на твердом носителе или включением в полимерную матрицу (например, с применением полисахаридов, сефарозы, агарозы или нитрата целлюлозы). Кроме того, иммобилизация живых клеток осложнена их постоянным делением, что в свою очередь приводит к изменению количества биорецептора в течение анализа, и, что, безусловно, необходимо контролировать.

Применение быстрых, необратимых хемоспецифичных каталитических реакций с большим выходом с целью иммобилизации биорецептора – ключевой фактор развития биоанализа. Сегодня такие реакции объединены в большую группу с названием «клик-химия». Клик-химические взаимодействия протекают в водной среде и при комнатной температуре, что делает их еще более привлекательными для использования в иммуноанализе. Интересный подход к иммобилизации антител предложен в работе [28]. Авторы использовали возможности клик-химии для ковалентной иммобилизации белков на поверхности полупроводниковых нановолокон. Эффективную и контролируемую

иммобилизацию исследователи осуществляли, используя реакцию Cu(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения.

Еще одним немаловажным условием в разработке биосенсоров является, оптимальное заполнение подложки при иммобилизации, особенно это актуально для создания иммуносенсоров, в которых протекает реакция взаимодействия антиген–антитело. Кроме того, для биосенсоров на основе ДНК и иммуносенсоров, которые часто предназначены для одноразового использования, долговременная стабильность отклика менее важна, чем воспроизводимость сигнала.

В качестве биорецептора активно применяют и наноматериалы. Развитая поверхность и уникальные оптические, электрохимические, магнитные свойства позволяют существенно интенсифицировать и с легкостью контролировать процессы иммобилизации. Проблемы возникают из-за «размерного эффекта» наночастиц и нестабильности их суспензий во времени и пространстве [29].

Анализ литературы последних лет позволяет выделить в отдельную группу биологические методы иммобилизации биорецепторов. Биологические методы иммобилизации по механизму происходящих процессов могут быть отнесены как к физическим, так и к химическим, однако принципиально отличаются тем, что в качестве линкеров используются биологические макромолекулы (комплементарные участки ДНК, генетически модифицированные полипептиды, отдельные аминокислоты и т.д.), способные селективно связывать строго определенные участки антитела. Также к биологическим методам иммобилизации могут быть отнесены подходы с использованием природных карбогидратов – глюкозы, галактозы, маннозы и т.д. [30]. Такие биополимеры аналогично химически синтезированным защищают рабочую область иммуносенсора и имеют развитую удельную поверхность для последующей иммобилизации рецепторного слоя.

Методология проведения иммобилизации систем небиологической природы (аптамеров, ПМО, наноматериалов и др.) такая же, что и в случае биологического материала. Однако для небиологических рецепторов, исследователи не ограничены

жесткими требованиями по применению того или иного химического реагента, напротив эффективная «пришивка» более актуальна.

В литературе обсуждаются вопросы сравнения методов иммобилизации с целью выявления наиболее эффективного способа. Тем не менее, проблема эффективной иммобилизации биорецептора остается нерешенной, поэтому поиск и синтез новых линкеров, не только обладающих низкой токсичностью, но и в наибольшей степени биологически совместимыми с живой клеткой и/или ее отдельными органеллами, актуален, а тонкая грань, разделяющая химические и биологические способы иммобилизации, становится еще менее заметной.

Немаловажную роль в разработке биосенсоров играет выбор способа детекции аналита. Распределение публикаций по методам детекции биосенсоров в процентном соотношении приведено на рисунке 1.4. Как видно из рисунка, более 70% всех исследований в период с 2000 по 2015 годы посвящена биосенсорам, основанным на электрохимических методах регистрации сигнала.

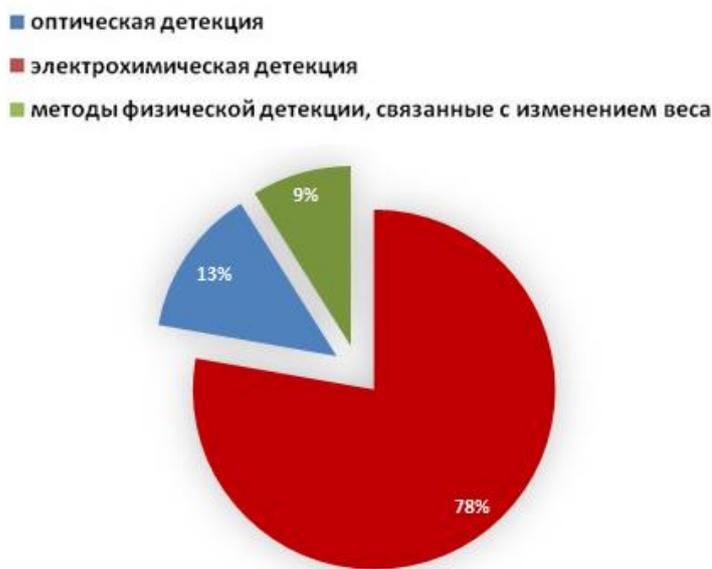


Рисунок 1.4 – Соотношение количества публикаций по методам детекции биосенсоров в процентном соотношении в период с 2000 по 2015 гг.

Данные базы Scopus

Оптические биосенсоры, среди которых планарные волноводные сенсоры, были разработаны одновременно с первыми электрохимическими устройствами, но в течение длительного времени они не получили должного внимания [13]. Большинство оптосенсоров – это оптические волокна, модифицированные различными вспомогательными химическими реагентами и биоконпонентами. Оптическое волокно представляет собой гибкий прозрачный слой (ядро) из стекла (диоксид кремния, пластик) с показателем преломления n_1 , покрытое оболочкой, с показателем преломления n_2 , причем $n_2 < n_1$. Из-за полного внутреннего отражения оптические волокна передают свет. Оптические биосенсорные волокна могут быть использованы в сочетании с различными спектроскопическими методами, например, с флуоресцентными. Хеми- и биоллюминесценции биосенсоры, а также гибридный подход электролюминесценции, обеспечивают очень чувствительное обнаружение специфических субстратов. Единственная проблема, существующая при обнаружении люминесценции биохимического сигнала, это достижение селективности системы из-за многочисленных помех в излучении света или тушении люминесценции. Оптосенсоры имеют ряд преимуществ, а именно: каждый вид анализа можно определить с помощью соответствующих спектрометрических методов; возможность осуществления дистанционного контроля и реализации неинвазивных форматов биомедицинских датчиков. Однако некоторые недостатки затрудняют их развитие: интерференция с окружающим светом, возможное фотообесцвечивание красителей и других вспомогательных компонентов, высокая оптическая плотность фона или флуоресценции волокна, довольно длительное время измерения, и ограниченная доступность аксессуаров.

За последние три десятилетия развивается направление по разработке биосенсорных систем на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Биосенсоры этого типа позволяют исследовать разнообразные межмолекулярные взаимодействия – аффинность, и, хотя они не соответствуют определению биосенсора, но традиционно сохраняют это имя.

Развитие методов инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИК - Фурье) и гигантского комбинационного рассеянии света (ГКР) [31-33] с использованием различных наноматериалов позволяет говорить сегодня о создании чувствительных биосенсоров на основе этих методов.

Основными недостатками оптических сенсоров являются: высокая, хотя и селективная чувствительность к световым помехам, а также определенная подверженность влиянию температуры (в случае использования полупроводников при изготовлении сенсора).

Наибольший интерес в настоящее время у разработчиков вызывают биосенсорные устройства на основе кварцевого резонатора, часто называемого кварцевыми микровесами (QCM) [34, 35]. Объемные акустические волны генерируются под действием электрического поля. Эти волны распространяются через субстрат, а затем, для проведения необходимых измерений, трансформируются обратно в электрическое поле. Основная частота колебаний зависит от внутренних процессов релаксации в кристалле и смещается с изменением массы поверхности. Это дает возможность обнаружения изменения массы, вызванного присоединением биохимических молекул. В такого рода устройствах применяется и обратный пьезоэлектрический эффект. Механические колебания кварцевого кристалла возбуждают переменное напряжение между парой вспомогательных электродов. При изготовлении сенсоров используют фотолитографический процесс или метод трафаретной печати. Как и в гравиметрии, в традиционном химическом анализе, в методах с использованием кварцевых микровесов нет необходимости в стандартах или калибровках. Однако подобные устройства обладают самой низкой чувствительностью массы. Для увеличения чувствительности массы необходимо создать очень тонкие устройства, работающие на более высоких частотах (больше, чем 5 – 50 МГц), что приводит к созданию непрочных устройств, которые сложно производить и эксплуатировать. К другому недостатку этих сенсоров можно отнести невозможность определения низкомолекулярных соединений из-за незначительного изменения массы, поэтому

пьезоэлектрические биосенсоры привлекательны для определения высокомолекулярных соединений.

Анализ работ позволяет выделить еще один тип устройств, применяемых в качестве биосенсоров – микроэлектромеханические системы (МЕМС) [36 – 38]. МЕМС обычно представляют собой интегрированные устройства, состоящие из полупроводниковой (чаще всего кремниевой) подложки, механических элементов и использующие технологии различных автоматизированных систем (микрофлюидики, концепции лаборатории-на-чипе и др.) и молекулярного узнавания (например, взаимодействие антиген-антитело, гибридизация комплементарных цепей ДНК и др.), размером 20 – 1000 микрон. Изготавливаемые с использованием МЕМС - технологий микробиосенсоры являются объектами особого внимания в связи с большими перспективами их применения. Их небольшой размер, низкая стоимость при массовом производстве, совместимость с микроэлектроникой и широкий спектр задач, которые необходимо решить, являются существенным преимуществом при создании на их основе автоматизированных, полуавтоматических систем, которые могут быть использованы, например, в исследованиях экспрессии генов, скрининге фармацевтических препаратов и т.д. Однако сегодня известны лишь единичные примеры применения в реальной медицинской практике, и предстоит еще долгий путь до массового коммерческого внедрения подобных разработок.

Разнообразные примеры электрохимических (потенциометрических, вольтамперометрических, амперометрических, кондуктометрических, импедиметрических полевых транзисторов) биосенсоров широко представлены в монографиях, обзорах, оригинальных статьях [3, 8, 39 – 41]. Электрохимический способ детекции в совокупности со специфическими биохимическими реакциями крайне привлекателен, более 50 % это доля электрохимических биосенсоров. Обусловлено это тем, что принципы передачи сигналов, реализованных в электрохимических сенсорах универсальны, изучены теоретические и практические принципы электродных реакций и методов, а также

электрохимические устройства простые, надежные и недорогие. Кроме того, электрохимические методы не предполагают, каких-либо жестких требований для формы или размера преобразователей и могут быть использованы в проточных и в автоматизированных аналитических системах. Одним из достоинств электрохимических способов детекции является взаимосвязь биохимических и электрохимических реакций, например, синтез АТФ, фотосинтез, гликолиз и цикл лимонной кислоты включают в себя окислительно-восстановительные реакции.

Все электрохимические биосенсоры основаны на переносе заряда, происходящего на границе раздела электрод-раствор. Даже в случае если биологический субстрат (фермент) или применяемый растворимый медиатор электронного переноса находятся в растворе, электрохимический сигнал формируется благодаря изменению поверхности электрода. Этим электрохимические методы принципиально отличаются от оптических, где сигнал обусловлен изменениями, происходящими в объеме раствора.

Принимая во внимание гетерогенный характер сигнала, можно ожидать, что локализация биорецептора приводит, как к максимальному улучшению количественных характеристик биосенсорных устройств, что является очевидным преимуществом электрохимических устройств по сравнению с оптическими, так и увеличению продолжительности измерения или уменьшению его чувствительности, вследствие массопереноса реагентов к границе электрод-раствор.

Электрохимические методы можно разделить на статические и динамические. В статических методах, сигнал не зависит от времени измерения и соответствует либо равновесию, либо стационарным условиям. Использование статических методов упрощает процедуру измерения. Динамические методы в основном представлены вольтамперметрическими и кулонометрическими методами. В этом случае регистрируемый ток при определенном потенциале соответствует окислению, или, реже, восстановлению аналита с одновременным появлением

новых химических веществ – продуктов электродных реакций, которые в некоторых случаях могут мешать анализу.

В настоящее время существует множество методов электрохимического анализа. Кроме очевидных реакций, в которых отклик напрямую зависит от электрохимического окисления/восстановления ферментов/коферментов, рассматривается огромное множество других систем, в том числе по определению электрохимически неактивных биологических молекул, и в этом случае необходимо целенаправленно изменять поверхность электрода, чтобы достичь требуемых количественных характеристик.

Ниже рассмотрены только основные подходы по разработке различных типов электрохимических биосенсоров.

В потенциометрических датчиках электродвижущая сила (ЭДС) генерируется в гальваническом элементе, который состоит из двух электродов (рабочего или индикаторного и электрода сравнения), погруженных в раствор электролита, измеряется с помощью высокоомного вольтметра [42]. В потенциометрии обеспечивается простой способ количественной оценки концентрации определяемых ионов. Формирование потенциала электрода обусловлено термодинамически самопроизвольным процессом разделения зарядов, протекающим на границе раздела электрод/электролит.

Величина электродного потенциала при 25 °С может быть записано в более привычной форме уравнения Нернста:

$$E = E^0 + \frac{2,3RT}{zF} \times \lg \frac{[Ox]}{[Red]}, \quad (1.1)$$

где E^0 – стандартный электродный потенциал, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, z – число электронов, участвующих в электродном процессе, F – постоянная Фарадея (96500 Кл/моль), $[Ox]$ и $[Red]$ – произведения концентраций (активностей) веществ, принимающих участие в соответствующей полуреакции в окисленной (Ox) и восстановленной (Red) формах.

Практически все потенциометрические биосенсоры направлены на измерение изменения рН растворов в процессе ферментативных реакций. С применением потенциометрического метода можно исследовать поведение гидролаз, оксидоредуктаз, а также ряда синтаз. Измерения необходимо проводить в присутствии буферных растворов, которые хотя и снижают сдвиг рН в процессе ферментативной реакции, но необходимы для стабилизации ферментов и снижения погрешности измерения. В 50 – 60-х годах 20 века появились так называемые время рН-статические методы, которые сегодня стали вновь популярны, что обусловлено возможностью автоматизации процесса измерения. Постоянство рН может также достигаться за счет электрохимического восстановления выделяющихся ионов водорода. В этом случае мерой скорости ферментативной реакции служит количество электричества [13].

Для определения мочевины в моче и других биологических жидкостей был разработан потенциометрический биосенсор с ферментом – уреазой, иммобилизованным на мембране трансдьюсера. Гидролиз мочевины уреазой приводит к образованию карбоната аммония и диоксида углерода. концентрацию которого определяют по изменению рН или кислотно-основных свойств с использованием потенциометрических методов [43, 44].

Основным ограничением для потенциометрических биосенсоров, в которых измеряется величина рН, является зависимость сигнала от буферных свойств среды. Любые неферментативные процессы, меняющие буферные свойства или рН реакционной среды, будут вносить свой вклад в измеряемый сигнал, например, поглощение некоторых летучих примесей и газов из воздуха (углекислый газ для щелочных растворов, кислые газы) или неферментативные превращения субстрата (окисление, гидролиз и др.), а также влияние поверхностно-активных веществ и полиэлектролитов, в том числе, стабилизаторы (желатин, трегалоза, агар) и балластные белки, содержащиеся в коммерческих препаратах ферментов.

Вольтамперометрические исследования проводят в электрохимической ячейке, состоящей из рабочего (индикаторного) электрода, электрода сравнения и

вспомогательного электрода, т.е. реализуется трехэлектродная система. В подавляющем большинстве случаев биосенсором является рабочий электрод, на котором протекают реакции окисления/восстановления.

Ток, регистрируемый в электролитической ячейке, количественно связан с содержанием электроактивного соединения [45]. Помимо переноса электрона, электродные реакции могут включать в себя химические стадии, например, перенос водорода/кислорода, димеризации циклизации и т.д. Электрохимические и химические стадии обозначаются "E" и "C", соответственно.

Следует отметить, что необходимо рассматривать соотношение фарадеевских (связанных с окислительно-восстановительными превращениями соединений и, следовательно, позволяющих получить информацию о количестве анализируемого вещества.) и нефарадеевских (связанных с образованием двойного слоя (зарядный ток) и омического падения напряжения из-за полного сопротивления раствора) токов. Вклад нефарадеевских токов может быть весьма значительным, особенно в органических растворителях, и для электродов, покрытых низкопроницаемыми и непроводящими покрытиями. Имобилизация белков и нуклеиновых кислот увеличивает заряд на границе раздела фаз и снижает скорость переноса ионов. Это приводит к уменьшению соотношения фарадеевского тока и токов заряднения. С другой стороны, нефарадеевские токи могут быть применены к количественной оценке содержания биополимеров, иммобилизованных или адсорбированных на поверхности электрода.

Следует иметь в виду, что для переноса электрона в реальных условиях, необходима большая энергия, чем теоретическое значение термодинамической константы. Разница между реальной и теоретической величинами потенциала называется перенапряжением. Перенапряжение может быть уменьшено за счет применения медиаторов электронного переноса (или просто медиаторов). Медиаторы могут быть введены в анализируемый раствор, или путем их полимеризации на трансдьюсере, или с использованием бифункциональных реагентов.

Амперометрический метод основан на измерении предельного диффузионного тока биохимической реакции анализируемого вещества, проходящего через раствор при фиксированном напряжении между рабочим (индикаторным) электродом и электродом сравнения. Необходимо иметь в виду, что амперометрическое обнаружение возможно только при отсутствии других соединений, которые могли бы окисляться вблизи потенциала определяемой целевой молекулы. Чтобы исключить влияние нежелательных соединений на первом этапе проводят вольтамперометрические исследования.

Принцип работы амперометрических биосенсоров достаточно прост. Определяемый компонент диффундирует через полупроницаемую мембрану в тонкий слой биологического материала, в котором протекает реакция с образованием продуктов, на которые реагирует электрод. Отклик амперометрического биосенсора остается постоянным в течение продолжительного периода, после чего заметно снижается. Амперометрические биосенсоры являются наиболее распространенными среди всех типов биосенсоров. Существуют два типа таких датчиков. В одном случае определяемый компонент взаимодействует с кислородом в присутствии фермента и регистрируется изменение концентрации O_2 . В другом – фермент превращает определяемый компонент в вещество, к которому чувствителен электрод. Например, концентрацию глюкозы можно определять по току окисления пероксида водорода, образующегося под действием глюкозооксидазы.

В хроноамперометрии потенциал ступенчато изменяется от величины E_1 на электродных реакциях до величины E_2 вблизи максимальной скорости переноса электрона. Ток в результате реакции электрода записывают как функцию времени. Увеличение реакционного слоя во времени, из-за постепенного истощения поверхностного слоя связано с более медленной скоростью диффузии.

Еще одним типом биосенсоров являются импедиметрические. Электрохимические измерения импеданса, аналогичны проводимости за исключением того, что основное внимание сосредоточено на емкости и

сопротивлении на границе раздела электрод. По этой причине, эквивалентные схемы, аналогичные приведенным на рисунке 1.5 используются для моделирования электрических явлений в электрохимической ячейке; обработка сигнала направлена на различие вклада емкости и сопротивления, но не вычитая их как в кондуктометрических методах [46].

Электрохимические импедиметрические биосенсоры основаны на детектировании изменения сопротивления между двумя электродами, модифицированными антителами, до и после протекания иммунореакции.

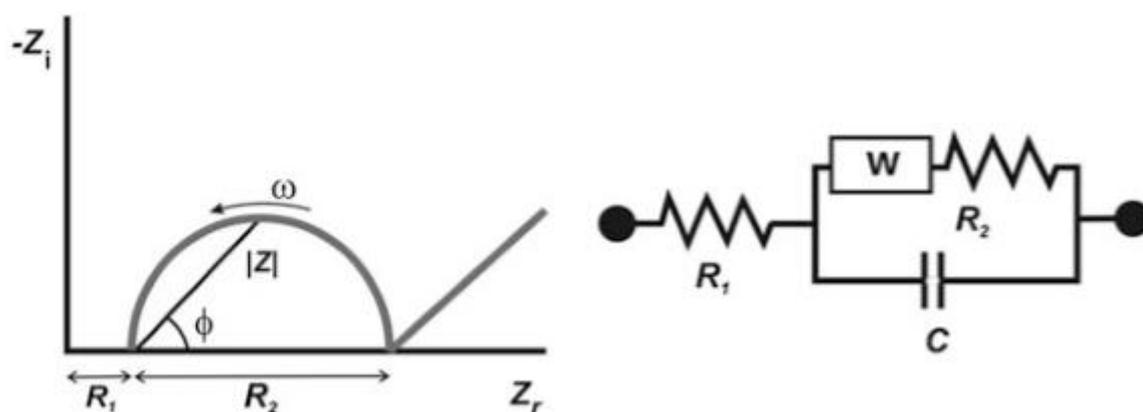


Рисунок 1.5. – Эквивалентная схема электрохимической ячейки в ЭИС.

R_1 – сопротивление раствора, R_2 – сопротивление переноса заряда, W – импеданс Варбурга, C – емкость ДЭС, ω - угловая частота

Регистрацию спектров электрохимического импеданса проводят в присутствии редокс маркера – вещества, способного к быстрому обратимому одноэлектронному окислительно-восстановительному превращению. В качестве таких маркеров используют системы феррицианидов или комплексы рутения. При этом на систему накладывают постоянное напряжение, соответствующее потенциалу электропревращения маркера, а также дополнительное переменное напряжение небольшой амплитуды. При этом частота колебаний может изменяться в широких пределах от 100 000 Гц до 0.01 Гц.

Графическая форма математического преобразования полученной при этом импедиметрической функции носит название «диаграмма Найквиста» (рисунок 5). Для интерпретации полученных результатов экспериментально полученную диаграмму соотносят с эквивалентной электротехнической схемой, состоящей из набора резисторов и конденсаторов, каждый из которых отвечает определенному элементу электрохимической ячейки. Наиболее часто используют эквивалентную схему Рэндлса, описывающую двойной электрический слой (рисунок 1.6).

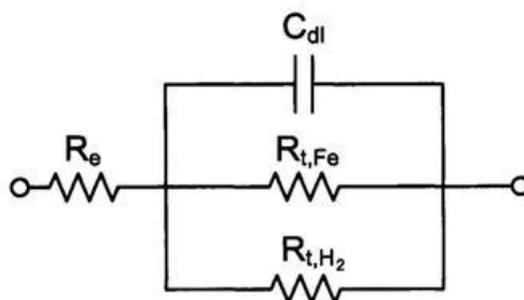
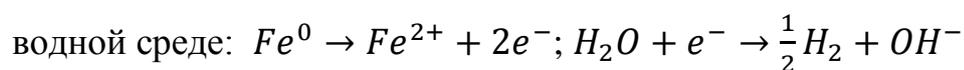


Рисунок 1.6. – Пример эквивалентной схемы Рэндлса реакции окисления железа в



Таким образом, качественной характеристикой происходящих взаимодействий является форма диаграммы Найквиста, а количественной – радиус полуокружности, возрастающий с увеличением количества вещества на поверхности рабочего электрода в результате протекания иммунореакции.

Электрохимическая импедансная спектроскопия характеризуется сверхвысокой чувствительностью детектирования (предел обнаружения достигает субнанолярных концентраций), однако точность определения в значительной мере зависит от качества подготовки поверхности рабочего электрода [47 – 49].

В предложенном обзоре рассмотрены наиболее популярные стратегии и новые тенденции, которые были предложены для разработки различных типов биосенсоров с 2000 – 2015 гг.

1.2. Ферментные биосенсоры

С 1962 года по настоящее время опубликовано свыше 15 000 оригинальных статей, обзоров, монографий, посвящённых разработке ферментных биосенсоров. Обусловлено это тем, что ферменты удобны для использования в сенсорах, как специфичные и чувствительные биорецепторы в определении концентрации широкого круга субстратов.

В таблице 1.2 приведены категории ферментов и их функции, используемые при детекции субстратов.

Таблица 1.2 – Категории ферментов и их функции, используемые при детекции субстратов (аналитов)

№	Категория ферментов	Функция
1	Оксидоредуктазы	Окислительно – восстановительные реакции
2	Трансферазы	Транспортировка биологических компонентов
3	Гидролазы	Реакции гидролиза, обратная реакция этерификации в органических средах
4	Лиазы	Добавление или удаление функциональных групп для формирования двойных связей
5	Изомеразы	Изомеризация (внутримолекулярные перегруппировки)
6	Лигазы	Присоединение двух молекул

В настоящее время разработаны десятки ферментных биосенсоров, которые успешно используются для биомедицинской диагностики, исследования качества продуктов, продовольственного сырья и других областях.

Развитие ферментных биосенсоров можно рассмотреть, согласно Ф. Шеллеру, «по трем поколениям»:

1) у первого класса биосенсоров фермент иммобилизован на поверхности трансдьюсера и аналитическим сигналом служит убыль концентрации аналита и/или продуктов ферментных реакций (убыль концентрации растворенного кислорода) (рисунок 1.7, *a*). Ферменты, используемые для этого класса биосенсоров, принадлежат к двум основным категориям: оксидазы и дегидрогеназы. Для регистрации сигнала применяют коферменты (например, НАД⁺, НАДФ⁺, НАДН, НАДФН, АТФ ФАД, FADH). Биосенсоры первого поколения характеризуются высокой чувствительностью и быстрым откликом, как правило, около одной секунды [50]. Тем не менее, этот класс имеет ряд недостатков. Во-первых, зачастую необходима предварительная обработка трансдьюсера для генерации воспроизводимого отклика. Во-вторых, длительное применение таких биосенсоров, особенно в сложных биологических матрицах или неразбавленных образцах, часто приводит к загрязнению поверхности сенсоров [51], что влияет на аналитический отклик. В-третьих, необходимо учитывать влияние матричных эффектов [52];

2) для разработки второго класса ферментных биосенсоров используют медиаторы электронного переноса (рисунок 1.7, *б*). Такой подход позволяет исключить влияние кислорода и матрицы. Наиболее распространенные и хорошо известные медиаторы электронного переноса это феррицианиды, ферроцен, метиленовый синий, феназины, метиловый фиолетовый, ализарин желтый, берлинская лазурь и др. [53]. Медиаторы могут быть добавлены к пробе или иммобилизованы на поверхности трансдьюсера. Медиаторная система должна иметь более низкий окислительно-восстановительный потенциал, чем другие электроактивные соединения, присутствующие в образце [54]. Биосенсоры второго поколения используются реже, чем биосенсоры первого поколения, поскольку они имеют низкую устойчивость вследствие иммобилизованного медиатора. В

большинстве случаев в такого рода биосенсорах для определения аналитического сигнала применяется вольтамперометрия или хроноамперометрия;

3) биосенсоры третьего класса основаны на биоэлектродкатализе [52], где есть прямой перенос электронов между ферментом и трансдьюсером (рисунок 1.7, в). Биосенсор третьего поколения состоит из трех элементов: фермент как элемент биораспознавания, окислительно-восстановительный полимер (или нанопроводимый элемент) для обеспечения распространения сигнала и трансдьюсера [51]. В качестве «проводника», между активным центром фермента и поверхности трансдьюсера используют окислительно - восстановительный полимер. Биосенсоры третьего поколения широкого применения пока не нашли. Тем не менее биосенсоры третьего поколения перспективны, так как они имеют очень короткое время отклика и влияние на результаты растворимого кислорода исключено.

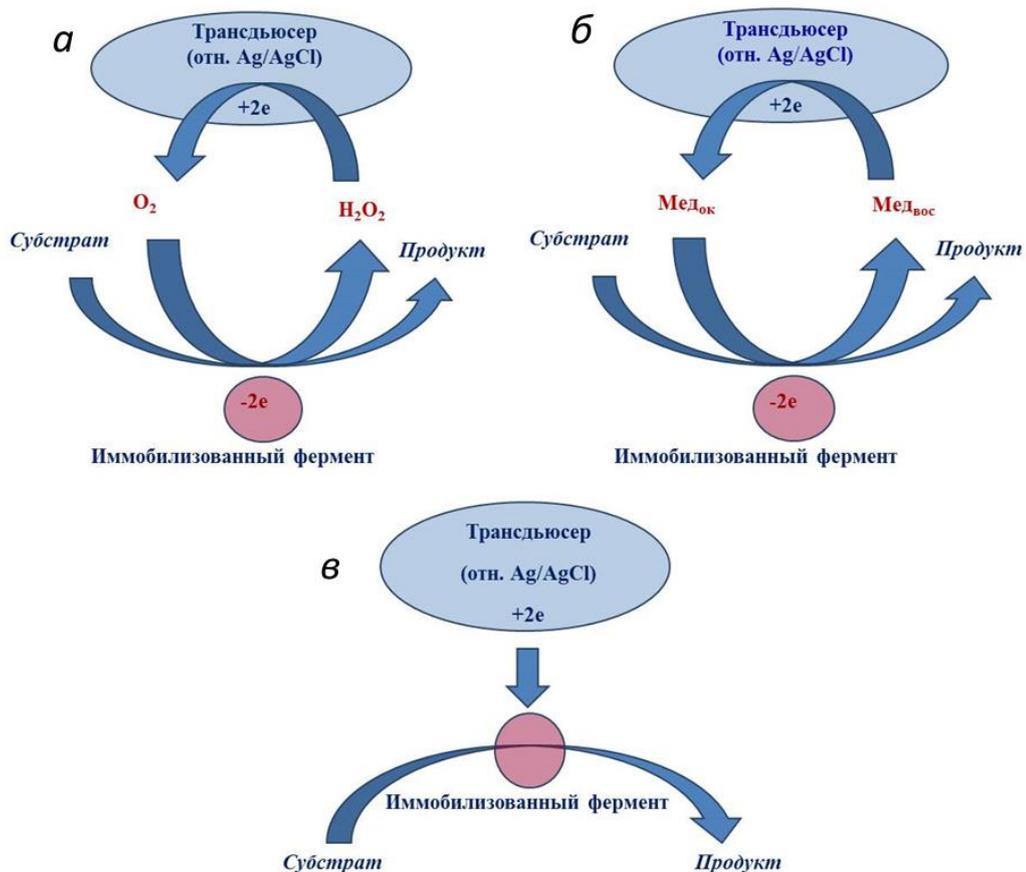


Рисунок 1.7 – Схемы трех классов биосенсоров

Кроме приведенной выше классификации, которая является ограниченной, т.к. применима, главным образом, для ферментов – оксидоредуктаз, ферментные сенсоры можно разделить на две большие группы: субстратные и ингибиторные [13]. Ферменты первой группы биосенсоров вступают в специфическую реакцию с определяемым субстратом, результатом которой является продукт реакции – низкомолекулярное вещество, например, перекись водорода. Самым распространенным представителем этой группы является биосенсор на основе глюкозооксидазы [55]. Ингибиторные биосенсоры применяют для определения веществ, которые снижают активность фермента [56 – 58].

Для количественного определения концентрации анализируемых субстратов в ферментных биосенсорах описаны соответствующие зависимости с применением уравнения Михаэлиса – Ментона [59].

$$v = \frac{V_m \times S}{S + K_m} \quad (1.2),$$

где V_m – максимальная скорость реакции окисления, определяемая как скорость убыли определяемого субстрата в процессе реакции, моль·л⁻¹·с⁻¹; S – концентрация определяемого субстрата, моль·л⁻¹; K_m – константа Михаэлиса-Ментен (М-М), численно равная концентрации определяемого субстрата, при которой скорость каталитической реакции составляет половину от максимальной, моль·л⁻¹. При этом, чем меньше K_m , тем больше сродство фермента и субстрата.

Применяют кинетический или диффузионный режимы в зависимости от лимитирующей стадии анализа. Определены параметры протекания ферментативных реакций для модели биосенсора с прямым электронным переносом между сенсором и окислительно - восстановительным центром фермента, для случаев с использованием биосенсоров с несколькими ферментами (например, для определения глюкозы в крови применяют глюкозооксидазу, катализирующую окисление глюкозы и пероксидазу, катализирующую реакцию

разложения пероксида водорода – одного из продуктов первой реакции), а также для тонкослойных биосенсоров.

Кроме того, в последние десятилетия популярны различные наноматериалы, которые используют при разработке всех типов биосенсоров, в том числе, ферментных. Применение биорецептора, интегрированного с функционализированной наноматериалами поверхностью трансдьюсера, значительно увеличивает воспроизводимость и чувствительность разрабатываемых ферментных сенсоров, однако при этом усложняет поведение последних.

Исследователи при конструировании биосенсоров в случае применения наноматериалов сталкиваются с рядом проблем. Традиционное представление поверхностного слоя с иммобилизованным ферментом - единая однородная среда, которая отличается от водного раствора только его более высокой вязкостью. Это вполне приемлемо для ультратонких слоев, с ферментами, непосредственно присоединенными к поверхности сенсора или для достаточно толстых мембран с низкой активностью фермента, изготовленных из желатина, хитозана, полисилоксанов и т.п. Использование наноразмерных носителей усложняет поведение биосенсоров. Углеродные нанотрубки, наночастицы серебра и золота обеспечивают различные условия для транспорта реагентов, особенно для заряженных частиц. В некоторых случаях могут появиться каналы повышенной проницаемости и поры, которые отличаются по размеру и доступности к подложке [60 – 64].

В таблице 1.3 приведены лишь некоторые примеры ферментных биосенсоров. Но даже из столь небольшой выборки видно, что наиболее популярными сегодня являются электрохимические биосенсоры, именно такое детектирование реализовано в коммерческих вариантах (биосенсоры на глюкозу и лактат).

Таблица 1.3. – Ферментные биосенсоры

Фермент	Определяемый субстрат	Состав иммобилизационного слоя	C_{\min} /ПО	Метод детекции	Ссылка
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
Аскорбатоксидаза	L - аскорбиновая кислота	Аскорбатоксидаза / полидиметилсилоксан	4 μ M / 1 μ M	оптический	[65]
Биферментный: салицила гидроксилаза + тирозиназа	Метилсалицилат (маркер поражения растения грибами)	Гидроксилаза + тирозиназа / углеродные нанотрубки/электрод	39 нМ / 13 нМ.	ЦВА	[66]
Протеинфосфатаза 2А	Окадаевая кислота	Протеинфосфатаза 2А /поли- <i>o</i> - аминофенол / углеродные нанотрубки / толстопленочный углеродсодержащий электрод	– / 0.55 мкг/дм ³	ЦВА	[67]
Глюкозооксидаза	Глюкоза	Электрополимеризационный комплекс полипиррол– глюкозооксидаза / металлический электрод	0.04мМ/–	потенциометрия	[68]
Глюкозооксидаза; уреаза; креатинин дезаминаза	Глюкоза, мочевины, креатинин в сыворотке крови человека	Глюкозооксидаза / альгинат натрия / магнитные частицы / полупроводник	2 мМ/–, 1/– мМ и 10 ⁻² /– мМ для глюкозы, мочевины и креатинина соответственно	потенциометрия	[69]
Глюкозооксидаза, глутаматоксидаза, глутаминаза	Глюкоза, глутамат, глутамин	Глюкозооксидаза / глутаровый альдегид / платиновый планарный электрод	–/0.05 мМ для глюкозы и глутамата, –/ 0.1 мМ для глутамина	хроноамперомет рия	[70]

1.3. Тканевые и микробные биосенсоры

Тенденцией в течение многих лет исследования и разработки биосенсоров является применение в качестве биорецепторов живых тканей, бактерий, микроорганизмов [71–74]. Безусловно, биосенсоры этого типа имеют ряд существенных преимуществ по сравнению, например, с ферментными биосенсорами:

- большинство ферментов выделяют из микроорганизмов/клеток (тканей), поэтому логично использовать собственно клетки в качестве биорецепторов, исключая трудоемкие и дорогостоящие процедуры очистки и выделения ферментов;

- ферменты являются неустойчивыми реагентами, требующими определенного окружения, тогда как ферменты микроорганизмов/клеток (тканей) находятся в привычном для себя микрочеточном окружении;

- ферменты микроорганизмов/клеток (тканей) значительно лучше защищены от воздействия различных ингибирующих веществ;

- возможность увеличения активности и специфичности биосенсоров на основе микроорганизмов за счет генетических мутаций;

- аналитический сигнал этих типов биосенсоров может быть получен с применением прямых и косвенных методов.

Метаболизм в клетках, который зависит от внутриклеточного физиологического состояния и межклеточной среды, приводит к изменению pH, концентрации кислорода и ионов. Изменение этих параметров и применяют в качестве отклика у микробных/тканевых биосенсоров [75 – 77]. Микроорганизмы, такие как бактерии, дрожжи, грибы и др. являются наиболее часто используемыми элементами распознавания для этого типа биосенсоров. Кроме того, в последние годы исследования сосредоточены на более сложных системах, таких как, клетки животных или рекомбинантных клетки [78, 79].

Большинство из них для получения информации используют кислородный электрод Кларка.

В статье [80] в качестве биораспознающего агента для количественного определения бактерий *Pseudomonas aeruginosa* были использованы фаги PaP1. Биорецепторный слой на поверхности рабочего электрода был иммобилизован посредством карбодиимидной сшивки, а аналитическим сигналом служила интенсивность электрохемилюминесценции, величина которой уменьшалась в зависимости от количества взаимодействий на поверхности сенсора. Сенсор характеризуется экспрессностью детектирования (время анализа не превышает 30 мин) достаточно низким пределом обнаружения (56 КОЕ/мл) и широким линейным диапазоном ($1.4 \cdot 10^2 - 1.4 \cdot 10^6$ КОЕ/мл).

Одним из основных аналитических приложений микробных биосенсоров является определение биологического потребления кислорода (БПК). Еще одним направлением практического применения микробных биосенсоров является определение с их помощью различных соединений, в том числе, токсикантов. Известны биосенсоры для обнаружения цианидов, тяжелых металлов, гербицидов, пестицидов, ПАВ и др. [13].

В работе [81] представлен биосенсор для количественного определения экотоксикантов в водных объектах работающий от энергии микробного топлива. Принцип действия такого устройства основан на изменении показателя биологического потребления кислорода путем измерения тока его восстановления методом хроноамперометрии. Сообщество микроорганизмов разных классов применили для создания биокатода, одновременно являющегося чувствительным элементом для определения формальдегида в экстремально низких концентрациях (на уровне 0.0005 %) и источника энергии для работы всей сенсорной системы. Разработанный сенсор был испытан как на модельных системах, так и на образцах природной и питьевой воды и зарекомендовал себя как надежное измерительное устройство, однако авторами не было представлено информации о селективности проведенных измерений и стабильности его работы.

Использование живых клеток вместо выделенных ферментов усложняет интерпретацию сигнала и в большинстве случаев наблюдается низкая селективность

субстрата, особенно для окисляющихся соединений, таких как этанол, глюкоза, органические кислоты и т.д. Ответ «Да» зависит от изменений в составе распределения клеток на сенсоре, что является еще одним слабым местом микробных сенсоров.

Перспективным направлением является разработка биосенсоров на основе тканевых материалов растительного и животного происхождения. Чаще всего, определяемыми параметрами для этого типа сенсоров также являются изменение рН, концентрации кислорода. Разработаны тканевые биосенсоры на основе томатов, хрена, картофеля и др. для определения допамина, флаваноидов, катехола [59]. Однако механизм действия тканевых биосенсоров довольно сложен вследствие сильной зависимости их характеристик от транспортных свойств молекул субстрата и продуктов реакции в иммобилизованном слое ткани.

Наличие стабильных иммобилизованных биоматериалов – культуры является одной из основных проблем. Клетки чутко реагируют на внешние раздражители, причем параллельно активируются различные сигнальные пути, поэтому возможно одновременное измерение нескольких сигналов. Создан многофункциональный интегрированный электрохимический датчик для мониторинга условий ферментации [82].

Сегодня важная роль отводится разработке клеточных биосенсоров на основе наноматериалов, применяемых в биологических, медицинских, экологических и химических областях, и с помощью которых может быть получена более качественная и надежная информация по сравнению с макросенсорами.

Накоплен определенный опыт использования биосенсоров на основе клеток при оценке эффективности лекарственных средств и токсичности. Так авторами [83] разработан микробный биосенсор, основанный на токсическом действии наночастиц Fe_3O_4 по отношению к бактериальным клеткам *Escherichia coli*. Устройство относится к группе безметочных биосенсоров, аналитическим сигналом является изменение электрической емкости мембраны бактериальных клеток после экспозиции их с наночастицами. Предложенный принцип действия и

разработанное на его основе измерительное устройство может быть успешно использовано как в аналитических, так и в научно-исследовательских целях – оценке токсического действия наноматериалов различной природы на живые клетки и ткани.

Кроме неоспоримых преимуществ микробных сенсоров, о которых много сказано выше, нельзя не упомянуть ряд трудностей и проблем, характерных для данного типа биосенсоров:

- невысокая селективность и специфичность по отношению к определяемому субстрату, поскольку клетки живых организмов содержат различные ферменты;
- ограниченность в выборе методов иммобилизации. Например, методы ковалентной иммобилизации недопустимы из-за применения токсичных реагентов;
- по сравнению с изолированными ферментами, использование живых клеток осложняется дополнительной стадией переноса субстрата через клеточную мембрану;
- достаточно большое время отклика.

В качестве приоритетных аспектов для будущего дизайна тканевых и микробных биосенсоров можно выделить следующие: новые технологии иммобилизации культуры, многофункциональный анализ, применение генной технологии и наноматериалов. Перспективным и многообещающим направлением развития конструкции биосенсоров на основе клеточных культур нового поколения является интеграция различных принципов преобразователей, что позволит проводить многофункциональную клеточную обработку входных и выходных сигналов.

1.4. ДНК сенсоры

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) является основной молекулой жизни. Молекула ДНК – это полимер, состоящий из фосфатно-сахарной цепи, несущей четыре различных заместителя на каждом кольце дезоксирибозы. В

основе лежит способность азотистых оснований (аденин и тимин; гуанин и цитозин) комплементарно образовывать водородные связи (рисунок 1.8), что и приводит к формированию молекулы ДНК, закрученной по винтовой линии. Таким образом, молекула ДНК является «двойным винтом», а не «двойной спиралью», хотя последнее название более традиционное, хотя и ошибочное. Винтовая линия может быть правой (А- и В- формы ДНК) или левой (Z-форма ДНК).

Последовательности ДНК, сохраняют свою способность к гибридизации, даже если некоторые из нуклеиновых оснований не взаимодействуют друг с другом. Такое нарушение в полной комплементарности называется несопадением. Это место, в молекулах ДНК, в которой не существует ни пуринов, ни пиримидиновых оснований. Они образуются спонтанно или в повреждении ДНК [84]. Обнаружение сайтов, лишенных основания звена является одной из целей сенсоров ДНК, по оценке потенциальной опасности.

Для разделения цепи (разрыва водородных связей), необходимо приложить значительную энергию, температура при этом около 100°C . В этом случае говорят о «плавлении ДНК». С понижением температуры цепи ДНК связываются вновь в соответствии с принципом комплементарности, структура молекулы восстанавливается. Это явление получило название «гибридизация».

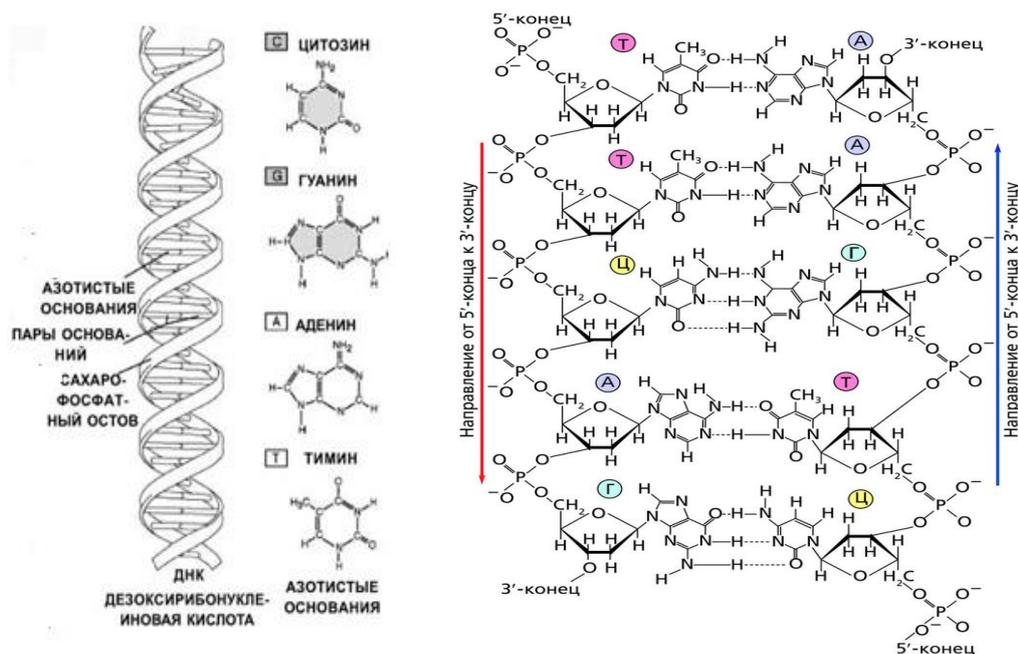


Рисунок 1.8. – Фрагмент цепи ДНК

С середины 20 века с развитием знаний о структуре ДНК, методов полимеразно-цепной реакции (ПЦР), включающих метод секвенирования (определения нуклеотидной последовательности ДНК в исследуемой пробе), стало возможным создание ДНК сенсоров, биорецептором в которых служит фрагмент ДНК. Интерес со стороны исследователей к разработке ДНК сенсоров обусловлен как высокоспецифичным взаимодействием ДНК молекул с определяемыми соединениями, так и возможностью определения широкого круга носителей генетической информации (рисунок 1.1). Развитие ДНК сенсоров можно отнести условно «к трем поколениям» (рисунок 1.9).

Наиболее широкое распространение ДНК сенсоры получили для обнаружения и количественного определения патогенных микроорганизмов и вирусов, регистрации точечных мутаций нативной ДНК, расшифровки генома [85]. В качестве биорецептора в сенсорах этого класса используют короткие одноцепочечные последовательности – ДНК-зонды, известного состава, специфичные геному в определяемом образце – пробе.



Рисунок 1.9 – Три поколения ДНК сенсоров

Некоторые молекулы могут взаимодействовать с ДНК или внедряться в структуру двойной цепи ДНК – интеркалировать. Такие молекулы должны обладать соответствующими размерами, химической природой, чтобы помещаться между основаниями ДНК. Такие сенсоры применяют для определения некоторых лекарственных препаратов, также эффективны в химиотерапии.

В отличие от ДНК-зондов, аптамеры – синтетические олигонуклеотиды, полученные с помощью комбинаторной химии [86, 87]. Аптамеры выбираются случайным образом из смеси синтезированных олигонуклеотидов (из так называемых ДНК- и РНК-библиотек) с помощью аффинной хроматографии, капиллярного электрофореза, проточной цитометрии, центрифугирования и других методов, а затем воспроизводятся те, которые специфичны по отношению к целевым определяемым веществам. Иммуобилизацию аптамеров проводят посредством ковалентного связывания через amino- и карбоксильные группы в боковых цепях молекул. Биосенсоры на основе аптамеров более стабильны по отношению к гидролизу и окислению в водной среде, чем ДНК сенсоры. Биосенсоры на основе аптамеров были успешно применены для обнаружения биомаркеров – 813 белков в диапазоне пикомолярных концентраций. Пятьдесят восемь белков были отождествлены в качестве биомаркеров при хронических заболеваниях почек.

Сенсоры на основе аптамеров охватывают большое разнообразие аналитов от неорганических ионов до больших белков. Аптамеры могут быть использованы как часть более сложных систем, например, для разработки опытных образцов биологических компьютеров.

ДНК-сенсоры нашли практическое применение в медицине и фармацевтике, экомониторинге и пищевой промышленности. Однако, при оценке полученных результатов, следует учитывать некоторые недостатки данной технологии:

- ДНК-сенсоры не позволяют оценить жизнеспособность патогенов, а определяют лишь наличие или отсутствие в анализируемой пробе их ДНК. Это в ряде случаев приводит к получению ложноположительных результатов.

- Применение ДНК-сенсоров возможно только в высокотехнологичных лабораториях. Сложность и многостадийность процедуры анализа требует высшей квалификации оператора и применения сложного оборудования.
- Высокая себестоимость анализа.

Таким образом, несмотря на большое количество научных статей, посвященных разработке ДНК-сенсоров, указанные недостатки ограничивают их повсеместное распространение и коммерческую доступность для населения.

1.5. Биосенсоры на основе наноматериалов

В настоящее время усилия исследователей, в основном сосредоточены на разработке экономически более эффективных и высоко функциональных биосенсоров по сравнению с традиционно применяемыми, в том числе, на основе синтетических рецепторов, которые позволяют связываться с субстратом, таким образом, как это осуществляется в живой природе. Реализация поставленной задачи стала возможной благодаря накопленным к настоящему времени результатам и знаниям в области нанотехнологий, органической, полимерной, аналитической химии. Во многом этому способствует синтез и применение широкого круга наноматериалов, обладающих уникальными свойствами (каталитическими, физическими, химическими или магнитными) по сравнению с материалами микронного размера [3]. Примеры наноматериалов многочисленны: однофазные наночастицы: наночастицы серебра, платины, углерода, различные флуоресцентные наночастицы (сульфиды, селениды, теллуриды кадмия и цинка); двухфазные наночастицы: состоять из инертной матрицы (например, аморфный оксид кремния) наполненной оптически- и/или электрохимически активным соединением.

Наноматериалы успешно применяются для разработки новых устройств, сенсоров – наноустройств, наносенсоров.

Создание слоя наноматериала на поверхности транзистора открывает широкие возможности иммобилизации на этой поверхности различных соединений, в том числе биологических, одновременно увеличивая его проводимость, чувствительность. Наиболее широкое применение в разработке биосенсоров наноматериалы получили в качестве меток (оптических, электрохимических), катализаторов в биоанализе, а также для визуализации областей раковых образований, диагностики инсульта и инфаркта [16].

Следует выделить наиболее часто встречающиеся в литературе в последнее десятилетие полупроводниковые квантовые точки (сульфиды, селениды, теллуриды кадмия и цинка), обладающие уникальными оптическими свойствами, что позволило применять их в качестве идеальных оптических меток для зондирования и биосенсоров. Свойства таких материалов сильно зависят от размера частиц: поглощение, высокие квантовые выходы, флуоресценция, большие сдвиги Стокса, и высокая устойчивость к фотообесцвечиванию [88]. Рисунок 1.10 схематически описывает возможные конфигурации сенсоров на основе квантовых точек.

В частности, предложены биосенсоры на основе квантовых точек для количественного определения компонентов с низкой молекулярной массой (например, нейромедиаторов), зондирования активности ферментов, выявления взаимодействий антиген-антитело, анализа ДНК, а также обнаружения аптамер – субстратных комплексов [89 – 95].

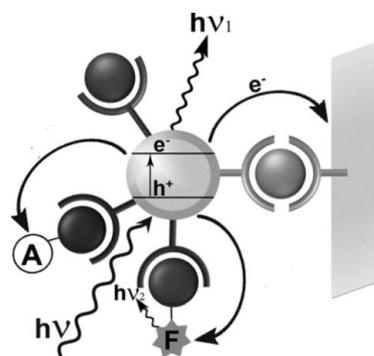


Рисунок 1.10. – Схема различных вариантов регистрации сигнала квантовых точек с использованием флуоресцентных/люминисцентных методов

Авторы [96] успешно применили квантовые точки на основе CdTe в качестве метки для количественного определения онкомаркеров. В качестве носителей антител авторы использовали магнитные микрочастицы, а аналитический сигнал детектировали методом флуоресценции. Разработанный иммуносенсор позволяет детектировать уровень экспрессии карциозембрионального антигена и альфа-фетопротеина в диапазоне концентраций 0.1 – 400 нг/см³. Предел обнаружения составляет 0.04 нг/см³ и 0.08 нг/см³ соответственно.

В работе [97] представлен аптасенсор для определения антибиотика хлормафеникола с использованием квантовых точек на основе графена, допированных азотом, в качестве сигналообразующих меток. Принцип детектирования отклика – фотоэлектрохимический, предел обнаружения сенсора 3.1 нМ, диапазон линейности от 10 до 250 нМ. Разработанный аптасенсор характеризуется высокой селективностью и стабильностью работы в модельных системах.

Однако реализация применения квантовых точек сопровождается ограничениями такими, как цитотоксичность, неспецифическая адсорбция мешающих компонентов, многоступенчатая процедура синтеза.

Другим аналитическим приложением наночастиц стала разработка биосенсоров с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния. Манипулируя формой, размерами отдельных металлических наночастиц можно добиться увеличения сигналов в этом методе [98]. Например, наночастицы серебра, были использованы для определения концентраций глюкозы и вирусных агентов с помощью ГКР [99, 100]. Главным ограничительным фактором применения ГКР является трудоемкость процедуры анализа и дороговизна применяемого оборудования.

Публикации последних десятилетий посвящены применению наночастиц золота и серебра в качестве электрокатализаторов в амперометрическом бесферментном определении различных соединений, в том числе биологически активных [101–104]. Это связано с одной стороны с простой получения таких

наночастиц, с другой стороны с возможностью варьирования размера, формы и состава наночастиц, что, безусловно, влияет на их электрохимические свойства [105]. Опубликованы результаты исследований, в которых наночастицы золота и серебра являются электрокатализаторами окисления, например, глюкозы [106], кофеина [107], дофамина [108], ДНК [109], и других соединений [110].

В частности, предложен интересный метод и биосенсор на его основе для количественного определения микроРНК - олигонуклеотидов, играющих важную роль в регуляции синтеза белков и пролиферации клеток в организме человека (в том числе и раковых клеток) с использованием в качестве биометки наночастиц золота [111]. Имобилизация комплекса на поверхности рабочего электрода осуществляется посредством авидин-биотинового взаимодействия, роль носителя метки выполняют магнитные микрочастицы. Аналитический сигнал - величина пика тока окисления золота. Разработанный сенсор характеризуется высокой чувствительностью и селективностью определения (предел обнаружения составляет $4 \cdot 10^{-15}$ М) и широким линейным диапазоном определяемых концентраций 10^{-14} – 10^{-9} М.

Высокочувствительный и точный электрохимический иммуносенсор на основе наночастиц золота для определения альфа-фетопротейна предложен авторами [112]. Нановолокна на основе полианилина, допированные наночастицами золота обладают очень хорошей электрической проводимостью, а полиэтиленгликоль защищает их поверхность от избыточной агрегации. Разработанный иммуносенсор авторы позиционировали как безметочное электрохимическое устройство с широким линейным диапазоном и ультранизким пределом обнаружения (0.007 пг/см³), способное селективно и точно определять уровень фетопротейна-альфа как в модельных растворах, так и в сыворотке крови человека.

В работе [113] нанокластеры на основе золота и серебра были использованы при создании сенсора для определения активности тирозиназы – фермента, играющего ведущую роль в биосинтезе меланина и являющегося биомаркером

меланомы. Нанокластеры "допамин – Au - Ag" с одной стороны обладают выраженными флуоресцентными свойствами, а с другой – выполняют роль медиатора переноса электрона в реакции восстановления кислорода, катализируемой тирозиназой. Такая амплификация аналитического сигнала обеспечивает высокую чувствительность биосенсора (предел обнаружения 13.5 еД/дм^3), что позволяет успешно использовать его в качестве альтернативы лабораторным методам диагностики активности тирозиназы.

Одна из главных проблем, с которой сталкиваются исследователи в случае применения наночастиц – получение стабильных устойчивых систем. Решением является использование полимерных нанокомпозитов с графеном, углеродными нанотрубками, наночастицами металлов, а также наноксида кремния (такие наночастицы стабильны, гидрофильны и легко диспергируются в воде), полимеров с молекулярными отпечатками, углеродных нанотрубок и др. [114 – 116]. Включение металлических наночастиц в проводящие полимерные матрицы привело к повышению электрокаталитической эффективности многих электродных процессов. Например, предложен биосенсор на основе композита оксида цинка-полипиррола (ZnO – PPy) с ксантиноксидазой для определения ксантина, предел обнаружения составил 0.8 мкМ . Этот биосенсор показал высокую электрокаталитическую активность в отношении ксантина [117]. Опубликована работа, посвященная определению вируса H5N1 с использованием нанокомпозита полипирролл-углеродные нанотрубки-наночастицы золота с пределом обнаружения $4.3 \cdot 10^{-13} \text{ М}$ [118].

Большой популярностью у разработчиков биосенсоров пользуются оксидкремниевые наночастицы, допированные различными соединениями [119].

В последние годы одна из стратегий использования наночастиц в биоанализе, сводится к модификации их поверхности с целью улучшения таких характеристик, как гидрофильность и би-, цитоосовместимость, а также к созданию функциональных групп доступных для образования прочных связей с биологическими молекулами. Следует отметить, что модифицированные

наночастицы обладают повышенной термической и химической стабильностью по сравнению с «голыми» НЧ [120].

Возможность «пришивки» большого числа специфичных молекул с целью селективного анализа обусловлена развитой поверхностью наночастиц. Разнообразие целей биоанализа, наночастиц, модифицирующих молекул позволили исследователям создавать наноструктуры различного типа.

Взаимодействие между наночастицей и биологической молекулой (белков, антител, ДНК и т.д.) проводят с использованием традиционных методов биоконъюгации с образованием химической связи, либо физической адсорбции с образованием гидрофобных и электростатических связей между целевой биомолекулой и НЧ. Следует отметить, что в этом случае возникает ряд проблем, связанных с оценкой количества закрепленных на наночастицах биомолекул, их ориентации, и процессов спонтанной десорбции.

Для решения этих проблем применяют химическое взаимодействие, сопровождающееся образованием ковалентной связи. Зачастую первым этапом образования ковалентной связи является «покрытие» поверхности наночастиц полимером или соединением, содержащим в своей структуре функциональные группы, например, сульфиды, амины или карбоксильные группы, которые служат в качестве «якоря» для биомолекул и оказывают влияние на агрегативную устойчивость коллоидно-дисперсной системы наночастиц [121].

Покрытые наночастицы или их можно назвать нанокомпозитами используются в качестве модифицирующего слоя сенсоров, сигналообразующей метки в иммуноанализе, медиаторов электронного переноса, катализаторов в биоанализе, а также для выделения, концентрирования и сепарации целевого анализа и др. [122].

Разработаны различные разновидности нанокомпозитов. Например, в литературе часто встречаются наночастицы, модифицированные по типу «ядро-оболочка»: металл–металл (Pt–Pd [123]), оксид металла–металл (Fe_3O_4 – Co [124]), металл–полимер (золото–полистирол [125]), сульфиды и теллуриды металла

(CdTe-CdS [126]), полимер–полимер (сополимер производного флуорена – аморфный оксид кремния [127]).

Это может быть интересным, например, в случае, когда материал ядра химически неустойчив или подвергается воздействиям окружающей среды и для стабилизации частиц ядра необходимо покрытие [128].

Интерес к нанокompозитам на основе магнитных наночастиц, покрытых различными полимерами, флуоресцентными метками и др., связан с применением их в качестве агентов для сепарации, концентрирования, катализа, сигналообразующей метки [129 – 134].

Наиболее широкое распространение для целей биоанализа получили композиции на основе неорганического наноядра, в том числе, проявляющего магнитные свойства и полимерной оболочки, которую модифицируют различными функциональными соединениями.

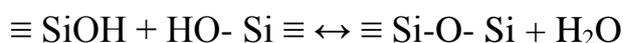
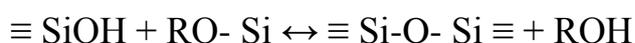
Основные методы наноконструирования:

- физическая инкапсуляция. Одностадийная или последовательная многостадийная адсорбция полимера на заряженной наночастице. Взаимодействие осуществляется, как правило, за счет электростатических сил или специфической адсорбции (например, ион-ионное, ион-дипольное, ван-дер-ваальсово взаимодействия, комплексообразование и т.д.). В результате адсорбции образуется заряженная полимерная матрица, внутрь которой внедрены неорганические наночастицы. Распространенным подходом является покрытие различных неорганических наночастиц, например, «квантовых точек» полисахаридами, посредством электростатического взаимодействия [135]. Преимуществами является простая схема процесса; доступность, недостатками Невысокая эффективность, неравномерность полимерного покрытия, неустойчивость полученных нанокompозитов к физическим воздействиям (УЗ, нагревание, изменение pH среды);

- полимеризация [136 – 142]. Один из самых распространенных методов получения, покрытых наночастиц. Наиболее часто исследователи используют

микроэмульсионную полимеризацию типа масло/вода и вода/масло. В этом случае в качестве инициатора может выступать водо- или жирорастворимое вещество. Таким образом, каждая капля становится микрореактором, в котором происходит полимеризация. В результате образуются очень маленькие коллоидные частицы (5 – 40 нм), имеющие широкое распределение по размерам. Отличием микроэмульсионной полимеризации по сравнению с эмульсионной является получение моноразмерных частиц, из-за невозможности диффузии мономера(ов) через непрерывную дисперсную фазу. ПАВ - ами служат жирные спирты, или другие гидрофобные агенты. Преимуществами этого метода являются получение равномерного покрытия, высокий процент выхода покрытых полимером наночастиц, при полимеризации не образуются коагуляты, образующиеся микрочастицы устойчивы и монодисперсны. Недостатки – трудоемкость, большое количество применяемого ПАВ, в случае получения полимеров с большой молекулярной массой продукт необходимо очищать от ПАВ;

- золь-гель метод [143, 144]. Для получения наночастиц диоксида кремния, а также пленок на поверхности различных объектов, в том числе, наночастиц используют классический метод Штобера [124]. В основе метода лежит золь-гель процесс, основанный на гидролизе и последующей конденсации кремнийсодержащих соединений:



В качестве прекурсоров используют тетраметоксисилан (ТМОС) или тетраэтоксисилан (ТЭОС), реагирующие с водой с образованием промежуточных соединений (Si-OH) и побочных продуктов (R-OH). SiOH может затем реагировать с другими SiOH или SiOR группами, с образованием диоксида кремния и побочных продуктов (ROH и H₂O). Катализаторами коллоидного роста служат либо неорганические кислоты, либо, например, аммиак. В результате синтеза получают частицы с размерами от нанометров до микрометров (в зависимости от

использованных соотношений исходных реагентов и условий протекания реакций). Преимуществами этого метода являются: простота синтеза, получаемое покрытие прочное, с широкими возможностями для функционализации и дальнейшей модификации, возможность создания различных структур с ультрадисперсной фазой, обеспечение высокой чистоты, как исходного материала, так и получаемого продукта, возможность снижения микронеоднородности образующихся соединений до молекулярного и ионного уровней, получение новых кристаллических и аморфных фаз. Недостатки – образцы, полученные с применением золь-гель метода, обладают невысокой, как правило, термостабильностью, механической прочностью.

Выбор того или иного метода синтеза зависит от характера решаемой проблемы. Очевидно, что необходимо учитывать эксплуатационные свойства будущих нанокомпозитов.

Функционализация покрытия наночастиц

После создания полимерного слоя на поверхности наночастицы появляется возможность химически «прививать» какие-либо якорные группы (рисунок 1.11).

Известны различные способы модифицирования полимерного покрытия с применением якорных групп, например: 1) карбоксильные ($-\text{COOH}$); 2) аминогруппы ($-\text{NH}_2$); 3) хлоридные ($-\text{Cl}$).

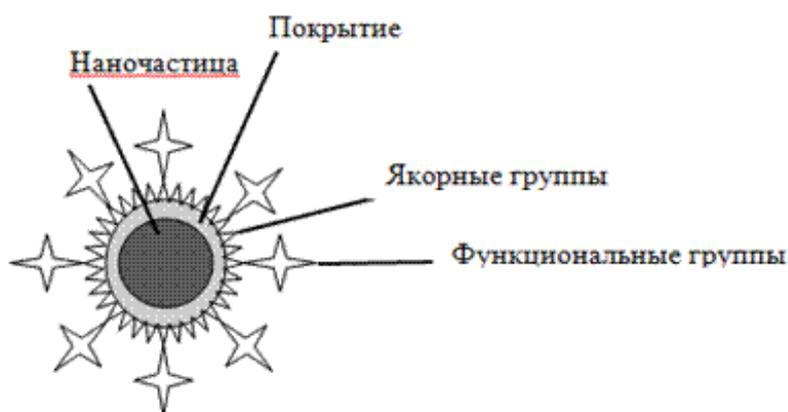


Рисунок 1.11 – Общая схема поверхностно-модифицированной нанокомпозиционной частицы

Привитые к полимерному покрытию функциональные группы могут служить для: 1) связывания наночастиц с определяемым, вспомогательным реагентом; 2) иммобилизации частиц на подложке, мембране; 3) придания наночастице электроактивности или оптической активности [145].

1.6. Биосенсоры на основе биомиметиков

Ферменты катализируют реакции в биологических системах исключительно эффективно и в «мягких» условиях. В отличие от биологических катализаторов их синтетические эквиваленты (биомиметики) лишены таких ограничений, как низкая стабильность при применении органических растворителей, экстремальных значениях рН и высоких – низких температур. Очевидно, что в настоящее время внимание исследователей все чаще обращено к созданию искусственных аналогов ферментов. Безусловно, реализация этой цели может быть связана с более глубоким пониманием основополагающих принципов супрамолекулярных систем «гость-хозяин». [146, 147]. В этой главе будут рассмотрены подходы, которые применяются для синтеза ПМО биомиметиков и реализуются в разработке бесферментных биосенсоров.

В последние два десятилетия активно ведутся исследования, посвященные разработке новой стратегии создания биомиметиков, основанных на супрамолекулярной химии, молекулярного импринтинга, нанотехнологий, биохимии [148, 149].

Около одной трети всех ферментов, известных до сих пор, содержат ионы металлов («металлоферменты») [150]. Металлы играют важную роль в катализе. Одним из подходов к синтезу молекул небиологической природы является моделирование активного участка фермента – редокс-активного металлоцентра и подходящего лигандного окружения, где возможно протекание электрокаталитических процессов, имитирующих действие гидрогеназ, металлоэнзимов. Такие синтетические катализаторы применяются, например, в топливных элементах [151].

Другим подходом к созданию искусственных ферментов является синтез полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО), являющихся простыми, экономически эффективными и весьма избирательными, с использованием технологии «молекулярный импринтинг» (от англ. *molecular imprinting*, или – молекулярное впечатывание) [152, 153]. ПМО синтезированы как для распознавания различных небольших молекул, так и белков, что является сложной задачей [154].

Молекулярный импринтинг осуществляют путем сополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии молекул-шаблонов (ион, органическая и неорганическая молекула, белок и др.). В результате этого процесса образуется полость внутри полимерной матрицы, которая по форме, размеру и энергии соответствует молекуле шаблону. Созданная полость «распознает» ту целевую молекулу, которая выступала шаблоном в процессе полимеризации [155, 156]. Впервые концепция импринтинговой технологии описана Поляковым (1930 г) и Лайнусом Полингом (1940 г.) [157]. Внимание исследователей к этой теме с тех пор не только не ослабевает, а наоборот усиливается [158].

Целевая молекула (ЦВ) – молекула, которую предполагается селективно извлечь из образца с «мешающими» соединениями. Молекула – шаблон (темплат) – это структурный аналог ЦВ или структуры переходного состояния, возникающего в ходе превращений ЦВ внутри высокоспецифичного центра связывания полимера.

Методы, используемые в настоящее время в импринтинговой технологии приведены рисунке 1.12.

ПМО синтезируют с использованием таких органических мономеров, как, например, акриловая и метакриловая кислоты, винилпиридин, винилимидазол, пиррол и др. В качестве сшивающих агентов применяют, например, этиленгликольдиметакрилат, дивинилбензол и др. [156 – 158]. Также используют неорганическую матрицу, например, оксид кремния или титана, или, состоящую из

органического мономера и сшивающего агента [159, 160], или из микро- или наночастиц неорганического материала (металл, SiO_2 и т.д.), покрытых полимерной оболочкой [161 – 163].

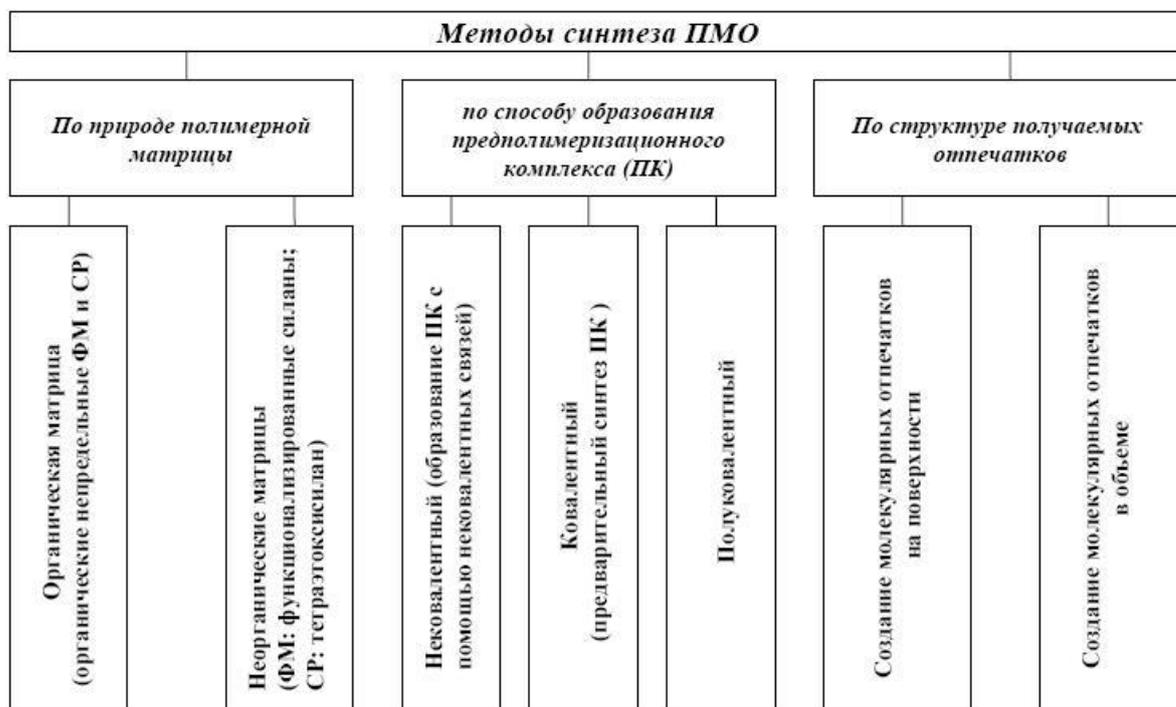


Рисунок 1.12 – Методы синтеза ПМО

(ФМ – функциональный мономер; СР – сшивающий реагент)

На рисунке 1.13 приведены основные типы синтеза ПМО, отличающиеся способом 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.

Отметим ряд трудностей и проблем, характерных для всех типов синтеза ПМО. В случае ковалентного импринтинга основные проблемы это: ограничение молекул шаблонов и трудность достижения термодинамического равновесия. Для нековалентного импринтинга, который в настоящее время является наиболее популярной стратегией синтеза ПМО, основные трудности связаны с «уходом» шаблона, несмешиваемость с гидрофобными веществами, невысокая связывающая способность. Полуковалентная технология импринтинга, которая является модификацией ковалентного и нековалентного, позволяет получать ПМО с

однородными отпечатками и снижает влияние кинетического фактора при повторном встраивании молекулы шаблона

Полимеризацию можно проводить в массе, с использованием методов преципитации, синтеза «ядро – оболочка», а также применяя микро- и миниэмульсионную, суспензионную полимеризации.

подавляющее большинство синтезированных к настоящему времени ПМО, особенно в ранних работах, были получены путем полимеризации в массе, который включает в себя несколько этапов: создание предполимеризационного комплекса, процесс полимеризации, измельчение и отмывка готовых полимеров [156, 164 – 166]. Однако исследователи сталкиваются с проблемой низкой сорбционной емкости синтезированных полимеров, невозможность получить прочные частицы со строго фиксированными порами.

Для получения микрочастиц ПМО применяют суспензионную полимеризацию, где в качестве дисперсионной фазы выступает вода, а ПАВ позволяет стабилизировать капли гидрофобной фазы мономера [167]. Применение частиц ПМО, синтезированных методом суспензионной полимеризации для биосенсоров ограничено их большими размерами.

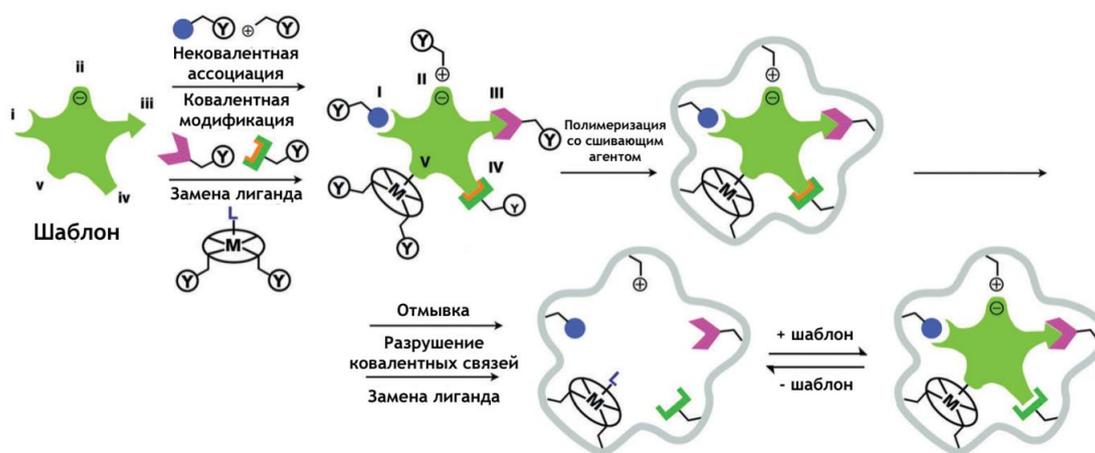


Рисунок 1.13– Пять основных типов молекулярного импринтинга:

I – нековалентный; II – электростатический/ионный; III – ковалентный;

IV – полуковалентный; V – координационный

Частицы ПМО размерами от 50 до 150 нм синтезируют с применением метода эмульсионной полимеризации [168]. В дисперсионную среду (водную или

неводную), содержащую инициатор полимеризации и ПАВ, вводят шаблон и мономер, причем в концентрациях, превышающих критическую концентрацию мицеллообразования. В результате происходит солубилизация мономеров и шаблона и внутри образующиеся мицеллы протекать процесс полимеризации с образованием частиц ПМО.

Все больший интерес в настоящее время получает стратегия синтеза ПМО на поверхности нано/микрочастиц [161, 169 – 171]. Применение этого метода позволяет получить монодисперсные частицы с высокой удельной поверхностью. Кроме того, применение этой методологии синтеза создает возможность создания сенсора, содержащего ПМО, не только как распознающий элемент, но и как чувствительный элемент.

Известны работы, в которых для реализации этого подхода применили наночастицы оксида кремния [161, 172, 173], магнетита [171, 174, 175], золота [176, 177], серебра [178], углеродных нанотрубок [179], предварительно модифицированные виниловыми группами с использованием золь - гель методов [180], графтингом [181, 182]. Еще одним из приложений исследований, выполняемых в этой области, является разработка новых систем, способных демонстрировать ферментно подобные свойства для реакций, для которых ферменты не существуют, например, реакции Дильса-Альдера [183] и др., или по улучшению работы уже существующих систем, с точки зрения надежности, селективности и эффективности [184].

Область приложения биомиметических катализаторов огромна [185, 186]. Авторы [185] предложили бесферментный сенсор для селективного определения полиолов с использованием технологии молекулярного импринтинга и основного реагента 3-аминофенилбороновой кислоты. Авторы [186] синтезировали ПМО металлоферментов, имитирующих функции пероксидазы, природного фермента, который катализирует окисление гомованилиновой кислоты.

В последние десятилетия происходит смещение акцента с разработки сенсоров на основе природных рецепторов к сенсорам на основе их синтетических аналогов.

В частности, ПМО нашли применение в электрохимических сенсорах для экологического мониторинга [187], биологического анализа [188 – 190], фармацевтического анализа [191, 192], (таблица 1.4).

Несмотря на очевидные преимущества применения биомиметиков, в том числе ПМО, следует обратить внимание на ряд задач, которые необходимо решить, чтобы появилась возможность крупномасштабного внедрения их в аналитическую практику, а именно: увеличение сродства к целевому аналиту, необходимость удаления молекул шаблона после синтеза, исключение неспецифической адсорбции как молекул аналита, так и мешающих компонентов. Однако следует отметить, что перспективы разработки и применения ПМО очевидны, особенно для создания простых портативных приборов, применение которых позволит существенно повысить качество рутинного анализа, его экспрессность и надежность.

Таблица 1.4 – Примеры применения ПМО

Аналит	Мономер	Метод детекции	C_{lim}	Ссылка
Микроцистин-LR	4-винилбензолсульфонат, винилбензилтриметиламмония хлорид, винилбензоат	потенциометрия	$6.92 \cdot 10^{-10}$ М	[193]
Альфа-фетопротеин	Акриламид	ДИВА	$9.6 \cdot 10^{-5}$ мкг/см ³	[194]
Фенолы	Cu(II)-катехол- этиловый эфир уроканиновой кислоты	Оксиметр с кислородным электродом	0.063 мМ	[195]
Глюкоза	Акриламид, акриловая кислота, аллиловый спирт, акрилонитрил	Кварцевые нановесы	4.4 мг/дм ³	[196]
Холестерин	Глицидил метакрилат на оксиде графена	ЦВА	$1 \cdot 10^{-10}$ М	[197]
Метил паратион	парааминотиофенол	ИВА	0.08 нг/ см ³	[198]
Мочевина	метилметакрилат	Ион-селективный полевой транзистор	$1.0 \cdot 10^{-4}$ М	[199]
4-хлорофеноксиуксусная, 2,4-дихлоруксусная, фумаровая, малеиновая кислоты	акриламид, акриламидфенилборная кислота	Ион-селективный полевой транзистор	$(5 \pm 2) \cdot 10^{-4}$ М $(5 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ М $1.5 \cdot 10^{-5}$ М $1.5 \cdot 10^{-5}$ М	[200]
Бисфенол А	Бисфенол А диметакрилат, метакриловая кислота	Потенциометрия	0.02 мкМ	[201]
Миоглобин	Аминопропилтриэтоксисилан, пропилтриметоксисилан	Потенциометрия	$1.3 \cdot 10^{-6}$ М	[202]
Фруктоза	4,5-бис-О-((4-винилфенил)борная кислота	Термометрия (термистор)	0.5 мМ	[203]

1.7. Иммуноанализ и иммуносенсоры

История успешного применения иммунологических биохимических методов, основанных на взаимодействии антител с антигеном, сопровождающееся образованием комплекса антиген-антитело (иммунокомплекса), насчитывает 50 лет [204]. В настоящее время коммерческое влияние этих методов в аналитической практике огромно, с помощью их можно определять концентрацию компонентов в различных матрицах. Область применения иммунологических методов от медицинской диагностики до скрининга окружающей среды и продуктов питания [205, 206].

Все методы иммуноанализа основаны на обнаружении либо комплекса Ag-Ab, либо избыточных количеств реагентов (рисунок 1.14).

Антитела различаются по типу тяжелой цепи. Выделяют пять основных классов IgM, IgG, IgA, IgD, и IgE [207].

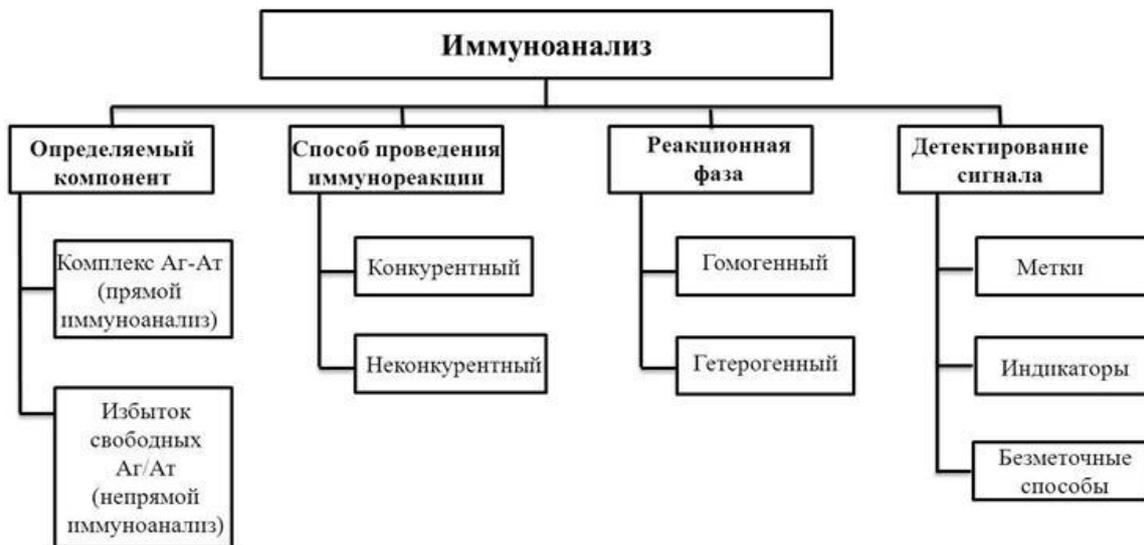
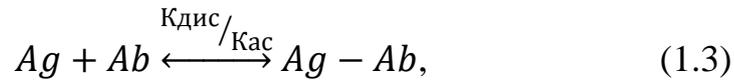


Рисунок 1.14 – Группы иммунохимических методов анализа

Для диагностики широкого круга инфекционных заболеваний, отравлений, в том числе пищевых, в экологическом мониторинге применяют антитела IgG различных подклассов. Антитела (сывороточные белки, гамма - глобулины, иммуноглобулины, *Ab*) имеют белковую природу и отвечают за селективное

извлечение из анализируемой пробы целевого анализата – антигена (Ag) согласно уравнению:



где $K_{\text{ас}}$ – константа ассоциации (связывания),

$K_{\text{дис}}$ – константа диссоциации (разрушения).

После смешивания антител с антигеном в растворе происходит процесс бимолекулярного взаимодействия, и через короткий промежуток времени - в зависимости от концентрации и свойств диффузии – достигается равновесие между свободным антигеном, свободными антителами и иммунокомплексом антиген-антитело. Равновесие в этой реакции смещено в сторону образования иммунокомплекса (константа связывания или ассоциации составляет $10^{-6} - 10^{-12}$ дм³·моль⁻¹) [208, 209].

Согласно закону действующих масс:

$$K \equiv \frac{K_{\text{ас}}}{K_{\text{дис}}} \equiv \frac{C_{AgAb}}{C_{Ag} \times C_{Ab}} \equiv \frac{C_{AgAb}}{(C_{0Ag} - C_{AgAb}) \times (C_{0Ab} - C_{AgAb})}, \quad (1.4)$$

где

C_{AgAb}	равновесная концентрация иммунокомплекса Ag- Ab
C_{Ag}	равновесная концентрация антигена
C_{Ab}	равновесная концентрация антител
C_{0Ag}	начальная концентрация антигена
C_{0Ab}	начальная концентрация антител

В уравнении константа равновесия (K) – аффинность, то есть термодинамическая характеристика, определяющая прочность связывания иммунокомплекса, определяющая специфичность антител.

В случае мультииммуноанализа или иммуноанализа на основе перекрестно реагирующих антител, ситуация становится более сложной, так как многие антигены и/или антитела присутствуют в образце одновременно. Поэтому, взаимодействие между антигенами и антителами могут быть описаны как конкурирующие реакции. Для такой ситуации разработана математическая модель [210].

В течение последних четырех десятилетий, было разработано много различных типов иммуноанализа. Один из признаков классификации иммуноанализа – реакционная фаза (рисунок 1.14). В случае проведения реакции взаимодействия антигена и антител с образованием в результате иммунного комплекса в растворе, говорят о гомогенном иммуноанализе, в случае твердой подложки – о гетерогенном. В начале 70-х годов 20 века Рубенштейн с сотрудниками [211] предложили новый подход проведения иммуноанализа в растворе, основанный на различии отклика ферментной метки в свободном состоянии и в иммунохимическом комплексе. В разработках следующих десятилетий термин «гомогенный иммуноанализ» стал применим к любой системе иммуноанализа, в которой специфическая реакция взаимодействия антигена с антителом и определение глубины ее протекания осуществляются в растворе. В данном случае результат чаще всего оценивают визуально, микроскопически или с использованием оптических методов анализа. Неоспоримым преимуществом этого метода является исключение необходимости механического разделения и удаления промежуточных продуктов, а также непрореагировавших компонентов, что в свою очередь ведет к сокращению времени анализа до нескольких минут. Наряду с положительными свойствами этого метода следует учитывать проблемы, помимо недостатков применяемого метода для регистрации отклика, связанные с влиянием на результат анализа разнообразных примесей, которые содержатся в реальных объектах. Например, предложен метод гомогенного флуоресцентного поляризационного иммуноанализа для определения антибиотиков в молоке с использованием флуоресцентной метки [212]. Продолжительность анализа

несколько минут. Предел обнаружения антибиотиков составляет 1 мкг/кг. Однако остается не решенной проблема получения ложных результатов вследствие неспецифического флуоресцентного свечения компонентов матрицы.

Наиболее широкое распространение и развитие за последние пять десятилетий получил гетерогенный (твердофазный) формат иммуноанализа. В этом случае применяют твердую фазу (подложку, нерастворимый носитель), на которой иммобилизуют антитела или антигены. В процессе гетерогенного иммуноанализа после каждой стадии необходима удаление (отмывка) от промежуточных продуктов и непрореагировавших компонентов. Следует обратить внимание на возможные биомолекулярные взаимодействия, происходящие параллельно, поэтому ситуация по сравнению с гомогенным форматом иммуноанализа становится более сложной.

В конце 60 лет 20 века был введен в практику медицинской диагностики гетерогенный иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), который в последующие годы стал активно развивающимся методом в области не только медицины, но и сельского хозяйства, микробиологической и пищевой промышленности, охраны окружающей среды. ИФА – это лабораторный метод, с помощью которого определяют антигены или антитела с использованием в процессе иммунореакции ферментативной метки с последующей фиксацией изменения окраски в присутствии соответствующего субстрата (рисунок 1.15). Таким образом, в варианте ИФА применяют ферментативные реакции. Обязателен контроль при анализе исследуемых образцов в сравнении с негативными и позитивными пробами.

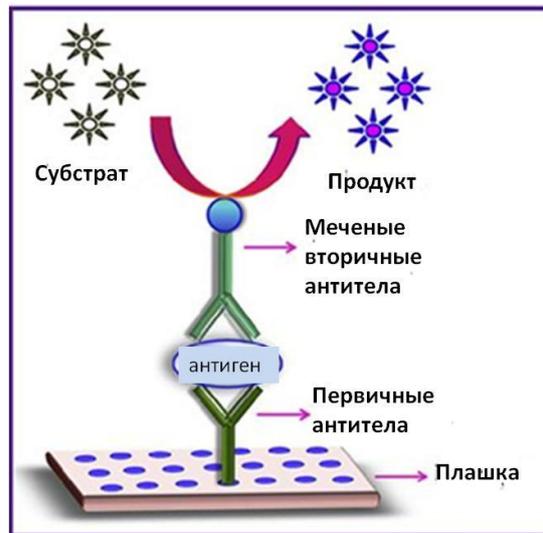


Рисунок 1.15 – Схема твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа

Кроме разграничения методов иммуноанализа на гомогенные и гетерогенные, наиболее важным представляется разделение на прямые и косвенные методы среди прочих классификационных принципов.

Прямые методы определения реакции антиген-антитело. В основе методов лежит визуальная идентификация образующегося комплекса антиген-антитело, например, с помощью простых оптических устройств. Методы преципитации в растворе (в том числе — методы турбодиметрии и нефелометрии), в геле, на полимерной пленке, агглютинация бактериальных клеток, прямая реакция агглютинации эритроцитов антителами, вирусами (реакции пассивной гемагглютинации (РНГА) и непрямой гемагглютинации (РНГА), латексагглютинации, коагглютинации, агглютинации частиц бентонита, желатиновых капсул, частицсферозы и др.). Недостатком визуальной индикации является получение лишь качественного или полуколичественного результата. Вследствие этого, для количественной оценки образовавшегося иммунокомплекса, применяют физико-химические методов детекции.

Индикаторные методы, основанные на использовании вспомогательных агентов, которые могут быть, либо ковалентно связаны с реагентом, либо существовать свободными в реакционном растворе. В первом случае соединение

или функциональная группа, называют меткой, а во втором – индикатором. В качестве меток, основной функцией которых является генерирование стабильного отклика, применяют ферменты (наиболее популярные метки) [213], наночастицы металлов [214], квантовые точки [215], органические и неорганические соединения [216, 217]. Иммунохимические методы, которые наиболее широко используются в клинической диагностике, включают радиоиммуноанализ [218], ферментный анализ (ИФА) [219], иммунофлуоресцентный [220], хемилюминесцентный и др.

Еще одно из бурно развивающихся направлений лабораторного анализа — иммуносенсоры (рисунок 1.16).



Рисунок 1.16 – Базовая схема иммуносенсора

Прямое обнаружение иммунокомплексов $Ag - Ab$ может быть выполнено с применением инструментария пьезокварцевого микровзвешивания (пьезокварцевые сенсоры).

В зависимости от того, используются ли метки для детекции сигнала или нет, применяются способы с введением метки или безметочные (таблица 1.5).

Таблица 1.5 – Типы меток в иммуноанализе.

Метка	Пример
Радиоизотопы	^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{125}I , ^{57}Co)
Флюорофоры	Флуоресцеин, умбеллиферон, родамин
Ферменты	Щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, глюкоза
Микро/наночастицы	Fe_3O_4 , SiO_2 , квантовые точки и др.
Ионы металлов	Au^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+}
Другие	Ферментативные кофакторы (ФАД), ферментативные субстраты, белки, ионофор

Прямой конкурентный иммуноанализ является одним из самых простых типов, который может быть реализован в формате автоматизированного анализа с применением иммуносенсора (рисунок 1.17, а). Сущность прямого конкурентного иммуноанализа заключается в инкубации исследуемого образца с раствором соответствующего иммунореагента, несущего метку, что приводит к взаимодействию антител, закрепленных на подложке со смесью меченых и немеченых антигенов. Несвязанный меченый реагент удаляют последующей промывкой, таким образом, регистрируемый сигнал может быть зафиксирован благодаря только связанной метке, а его интенсивность обратно пропорциональна содержанию определяемого компонента в исследуемой пробе. Измерение включает три этапа: инкубация, промывка и измерение сигнала. Однако существуют два основных ограничения: во-первых, конкуренция снижает чувствительность измерения Ag, поскольку некоторые из сайтов связывания заняты меченым вспомогательным агентом. Во-вторых, при низкой концентрации целевого антигена невозможно получить необходимую чувствительность анализа, что усложняет метрологическую характеристику результатов.

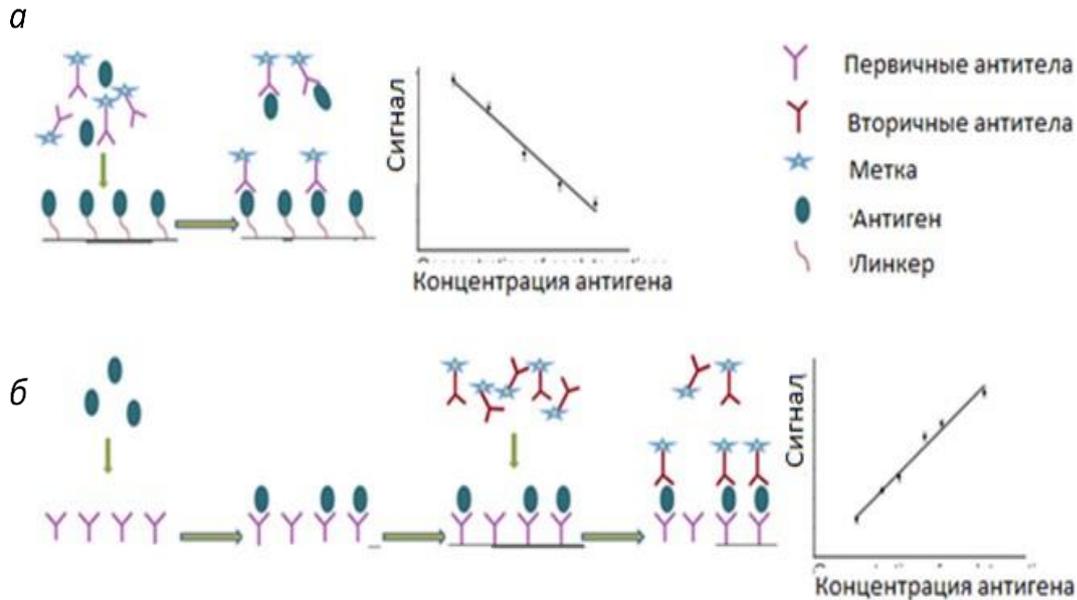


Рисунок 1.17 – Типы иммуноанализа: (а) прямой (конкурентный) иммуноанализ, (б) «сэндвич»-анализ

«Сэндвич-иммуноанализ» основан на взаимодействии специфичных антител, иммобилизованных предварительно на твердой подложке, с антигеном, с последующей локализацией на образовавшемся иммунокомплексе вторичных меченых антител (рисунок 1.17, б). Таким образом, после стадий отмывки можно говорить, что измеренный сигнал прямо пропорционален числу иммунокомплексов $Ag - Ab$ на поверхности подложки, то есть молярной концентрации определяемого компонента в образце. В отличие от конкурентного иммуноанализа, «сэндвич-иммуноанализ» более чувствителен. Определяемые концентрации могут различаться в десять и даже больше раз. Минимальные значения отклика зависят от отношения сигнал/шум, но гораздо проще наблюдать сигнал по нулевому уровню, чем по его уменьшению, как в конкурентном иммунологическом анализе. Однако значительное ограничение сэндвич-иммуноанализа связано с многостадийностью процесса, что приводит к существенному увеличению временного диапазона до нескольких часов и усложняет его реализацию в формате иммуносенсора [221, 222].

Иммуносенсоры, разрабатываемые и разработанные к настоящему времени, как правило, используют гетерогенный формат иммуноанализа. Основываясь на характере механизма детектирования, иммуносенсоры могут быть разделены на электрохимические, оптические, пьезоэлектрические и др. Для каждого типа характерны определенные преимущества и недостатки, что приводит к большому количеству исследований по разработке иммунодатчиков [223].

Несмотря на огромное разнообразие современных физико-химических способов детектирования аналитического сигнала в иммуноанализе, лидируют электрохимические методы, обладающие рядом неоспоримых преимуществ: высокая чувствительность и точность (благодаря уникальному сочетанию специфического взаимодействия антиген-антитело и чувствительной электрохимической детекции), селективность и экспрессность, невысокая себестоимость и универсальность (рисунок 1.18).

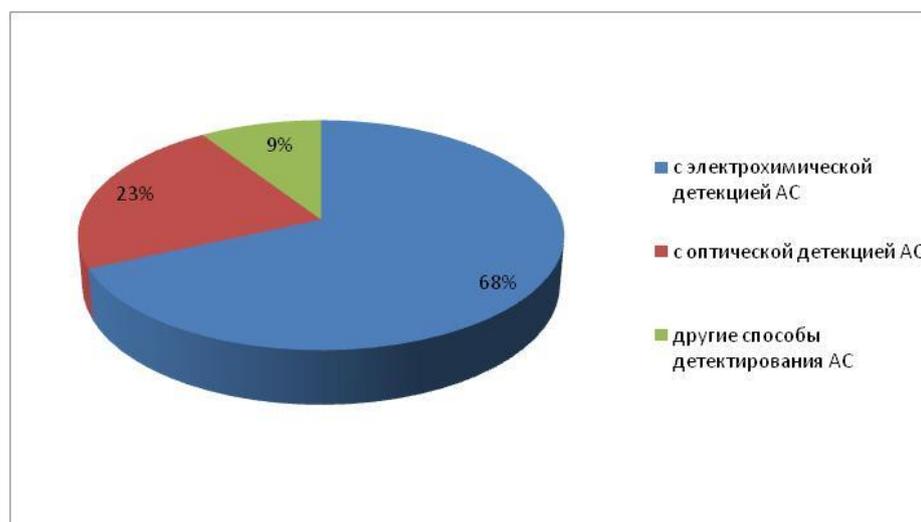


Рисунок 1.18 – Ферментные иммуносенсоры 2000 – 2015 гг по данным базы Scopus.

Ключевые слова поиска: immunosensor–enzyme–electrochemical/optic

Среди электрохимических иммуносенсоров наиболее популярными являются: а) иммуносенсоры с ферментной меткой; б) иммуносенсоры с наночастицами, в том числе, квантовыми точками; в) емкостные и

импедиметрические иммуносенсоры, и г) магнитоиммуносенсоры. Как видно из рисунков 1.19 и 1.20, ферментные и импедиметрические иммуносенсоры представляют наиболее изученные типы в период с 2000 по 2015 год. Число публикаций, посвященных иммуносенсорам на основе квантовых точек и магнитных наночастиц, которые появились в период 2000–2005 годов, заметно увеличивается и в совокупности составляет 9 % от общего количества опубликованных работ в течение второй половины десятилетия. Наконец, наибольшее количество опубликованных исследований касается иммуносенсоров на основе различных типов наночастиц.

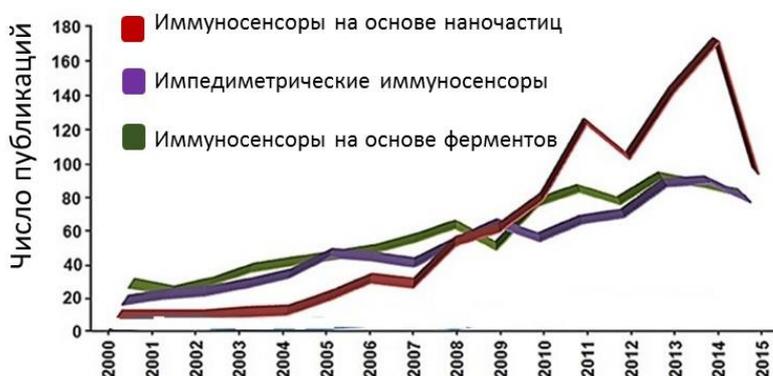


Рисунок 1.19 – Количество опубликованных статей каждой категории в период 2000 – 2015 гг. по данным базы Scopus

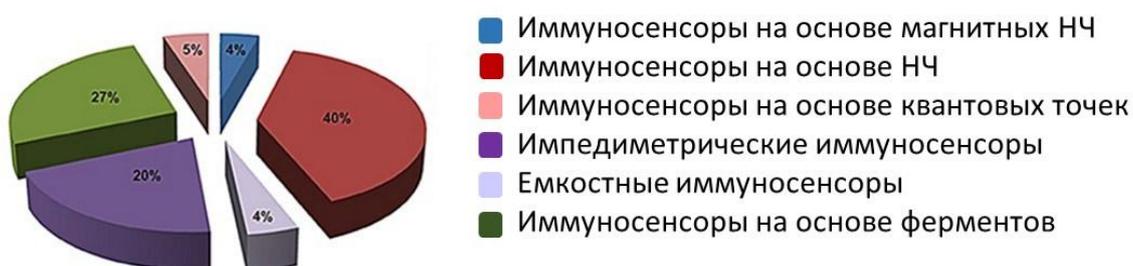


Рисунок 1.20 – Процент опубликованных статей, относящихся к каждому типу иммуносенсоров за вторую половину десятилетия.

По данным базы Scopus

Следует отметить, что компонентом всех без исключения иммуносенсоров является рецепторный слой, представляющий собой антигены, моно-/поликлональные антитела, либо их фрагменты, определенным образом нанесенные на рабочую поверхность трансдьюсера. Одна из проблем, связанная с эффективностью сэндвич-анализа, на основе антител, заключается в возможности взаимодействия не только с определяемыми антителами, но и другими иммуноглобулинами, образующимися при различных системных заболеваниях. Эти белки находятся в 40 % сыворотки здоровых пациентов и могут приводить к ложноположительным результатам анализа. В поисках альтернативных антител, применяют фрагменты антител, аптамеры и белковые каркасы неиммуноглобулинов [224 – 226]. Альтернативные молекулы должны удовлетворять ряду требований, а именно: их необходимо быстро и недорого изготавливать, должны быть стабильны в различных условиях, иметь длительный срок хранения. При этом «заменители» антител должны обладать необходимой чувствительностью и специфичностью [227]. Фрагменты антител, обладающие высокой специфичностью для их целевого анализата, способностью поддерживать распознавание антигена, небольшими размерами по сравнению с полным антителом, более применимы для иммобилизации, чем имеющиеся естественно сформированные антитела, и становятся важными инструментами в исследовании и создании иммуносенсоров [228].

Для иммобилизации биорецептора в иммуносенсорах применяют методы, которые используют при разработке биосенсоров.

Биологические методы иммобилизации эффективны, однако сложен поиск и выделение линкеров [229]. Кроме того, большие трудности их практического применения обусловлены малой скоростью переноса заряда биологическими макромолекулами. Поэтому при разработке электрохимических иммуносенсоров биологические способы иммобилизации антител используют достаточно редко.

Тем не менее, ориентированная иммобилизация позволяет наиболее компактно разместить антитела на рабочей поверхности трансдьюсера. Это дает

возможность с одной стороны получить чувствительный и воспроизводимый сигнал, особенно это касается электрохимических иммуносенсоров. Кроме того, ориентированная иммобилизация позволяет существенно сократить время протекания гетерогенной иммунореакции, что увеличивает экспрессность анализа. Во-вторых, одним из ключевых моментов является прочность иммобилизации иммуноглобулинов.

Тран и соавторы опубликовали работу, посвященную сравнительным испытаниям электрохимических иммуносенсоров с иммобилизованными четырьмя разными способами антителами [230]. Антитела против *Japanese encephalitis virus* были иммобилизованы на предварительно силанизированной поверхности рабочего электрода методом физической сорбции, ковалентного связывания с применением глутарового альдегида, ковалентного связывания с применением IgG человека и протеина А. Проведенные испытания показали, что наилучшими аналитическими характеристиками обладает последний тип сенсоров.

В таблице 1.6 приведены преимущества и недостатки известных методов иммобилизации рецепторного слоя.

В идеале иммуносенсор должен быть многократным устройством, поскольку обратимость взаимодействия антиген - антитело может позволить регенерировать иммобилизованный компонент. Однако высокая константа аффинности и проблема часто требуемых достаточно «суровых» условий иммобилизации антитела или антигена, делают регенерацию поверхности трудной для реализации, тем самым ограничивая практическое применение иммуносенсоров [231].

Таблица 1.6 - Сравнительная характеристика различных способов иммобилизации антител

	Физические	Химические	Биологические	Введение в полимерную матрицу	Кросс-сшивка
Преимущества	Простота экспрессность низкая стоимость	Прочность Целевая ориентированность	Высокая селективность взаимодействия Прочное, высокоэффективное, обратимое связывание	Прочность Целевая ориентированность	Экономичность и экспрессность, применимость к широкому кругу объектов
Недостатки	Сложность ориентированной иммобилизации Неизбежность образования массивных белковых слоев на поверхности электрода	"жесткие" условия синтеза Сложность, многостадийность	Многостадийность Высокая стоимость "белковая нагрузка" иммуносенсора	Необходимость строгого соблюдения условий эксперимента	Ограниченность использования в гомогенных системах, токсичность реагентов и невысокую хемоспецифичность.

1.7.1. Емкостные и импедиметрические иммуносенсоры

Увеличить экспрессность иммуноанализа и уменьшить количество стадий его проведения позволяет использование безметочных иммуносенсоров.

Наиболее распространенный тип – импедиметрические иммуносенсоры, работающие по принципу измерения сопротивления (импеданса) ячейки в ответ на внешнее импульсное воздействие напряжением или током. На рабочем электроде образуется блокирующий слой за счет формирования на нем иммунокомплекса. В результате этого изменяется электронный перенос. Поскольку реакция окислительно-восстановительной пары все более затрудняется, сопротивление переноса электронов будет увеличиваться, емкость уменьшится [232, 233].

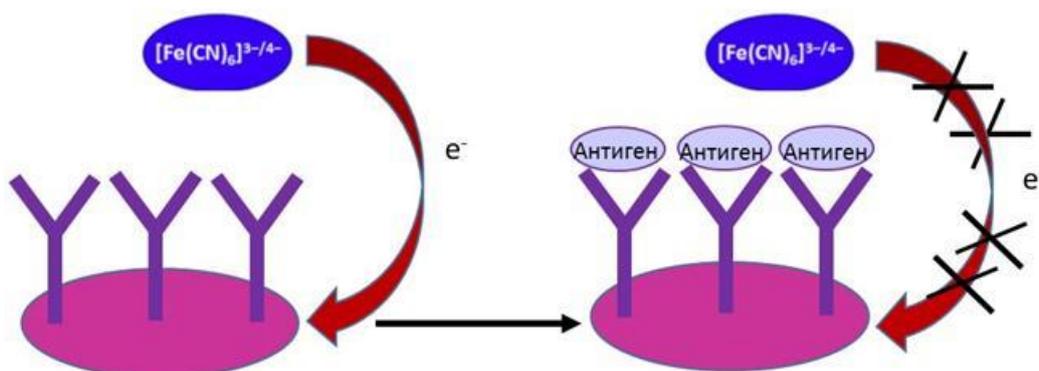


Рисунок 1.21 – Схема импедиметрического иммуносенсора

Разработке безметочных иммуносенсоров посвящено более 25% всех публикаций по электрохимическим иммуносенсорам за последние 5 лет. Некоторые примеры работ приведены в таблице 1.10. Авторы [234] разработали импедиметрический иммуносенсор для количественного определения тропонина в сыворотке крови. На поверхности золотого электрода посредством карбодиимидной сшивки с РАМАМ-дендримерами были иммобилизованы моноклональные антитела. В качестве медиаторной системы авторы использовали $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Предел обнаружения для разработанного иммуносенсора – $11.7 \cdot 10^{-15}$ М в разбавленных образцах сыворотки крови.

Важную роль играет выбор трансдьюсера. Традиционно используемые стеклоуглеродный и платиновый электроды весьма сложны в подготовке к анализу и их конструкция недостаточно компактна. Гораздо более простыми и удобными в использовании являются печатные электроды и электродные системы, включающие в себя рабочий, вспомогательный электроды и электрод сравнения. Конструкция и эксплуатационные особенности таких систем позволяют существенно экономить время иммуноанализа, производить измерения в малых объемах пробы (до нескольких микролитров), а также снизить удельную стоимость измерения [235].

В работе [236] представлен импедиметрический иммуносенсор для определения охратоксина А. Антитела иммобилизованы на рабочую поверхность предварительно модифицированного цистеамином планарного

индикаторного электрода посредством применения золотых наночастиц. Аналитическим сигналом в данном случае являлась емкость двойного электрического слоя. При выбранных оптимальных условиях разработанный иммуносенсор имеет предел обнаружения 0.25 нг/см^3 , диапазон линейности $0.3 - 20 \text{ нг/см}^3$, что сравнимо с возможностями иммуноферментного анализа.

Основные достоинства импедиметрических иммуносенсоров – простота и малостадийность анализа, низкореагентность и возможность миниатюризации. К недостаткам можно отнести невысокую точность, необходимость тщательной подготовки рабочей поверхности иммуносенсора, существенное влияние компонентов матрицы пробы и неспецифической сорбции из окружающей среды.

По схожему принципу работают и так называемые полевые транзисторы – иммуночипы, способные измерять изменение проводимости чувствительного слоя вследствие образования на его поверхности иммунокомплекса. С точки зрения электрохимии полупроводниковый транзистор представляет собой трехэлектродную ячейку, включающую в себя исток, сток и затвор. Полевые транзисторы имеют некоторое преимущество перед импедиметрическими биосенсорами – более высокая чувствительность и независимость полезного отклика непосредственно от массы/размеров иммунокомплекса на рабочей поверхности сенсора.

Однако, химическая чистота чувствительного элемента и иммобилизация рецепторного слоя в данном случае представляет более серьезную проблему из-за чрезвычайно малых размеров рабочей зоны иммуносенсора и необходимости адресной иммобилизации антител только в этих пределах. Кроме того, гораздо сильнее выражен эффект влияния матрицы пробы, необходима защита поверхности нанопроволоки.

В качестве компонентов полевых транзисторов сегодня успешно применяют наноматериалы, в частности, кремниевые нановолокна [237], углеродные нанотрубки [238], графен [239] и т.д. Несмотря на то, что иммобилизация антител является ключевым фактором при разработке

иммунотранзисторов, за последние 5 лет опубликовано не так много работ в этой области.

Следует отметить, что в случае иммунотранзисторов к проблеме прочной и ориентированной иммобилизации иммунорецепторов добавляется еще одна – весьма ограниченная поверхность иммобилизации, геометрическая площадь которой редко превышает 10 нм. На одной нанопроволоке может быть максимум ориентировано иммобилизовано всего несколько отдельных иммунорецепторов, т.к. размер одного антитела составляет от 5 до 15 нм. Поэтому характерной особенностью современных иммунотранзисторов является иммобилизация антигенраспознающих фрагментов моноклональных антител или аптамеров – синтетических аналогов антител, лишенных «всего лишнего». Авторами [240] предложен полупроводниковый иммуночип для детектирования простатспецифического антигена в сыворотке крови. С целью увеличения плотности иммобилизации рецепторного слоя на поверхности чипа авторы использовали не антитела целиком, а их половинные структуры, ориентировано иммобилизованные на поверхности наночастиц золота посредством тиолдисульфидного взаимодействия. Наночастицы золота удерживались на поверхности предварительно силанизированного рабочего электрода. Разработанный иммуносенсор характеризуется быстрым откликом (5 - 10 с), чрезвычайно низким пределом обнаружения ($23 \cdot 10^{-15}$ г/см³) и широким линейным диапазоном (около 7 порядков разведения).

1.7.2. Проточные иммуносенсоры и микрофлюидные системы

Проточные иммуносенсоры и микрофлюидные системы - перспективные мониторинговые устройства для оценки состояния здоровья человека в режиме

он - лайн. Такие системы бывают горизонтальными, вертикальными и круговыми. Потоки реагентов могут быть иметь открытый и закрытый циклы. Непрерывность работы обеспечивается способом транспортировки реагентов и регенерации проточных электрохимических ячеек в установке. В зависимости от

способа транспортировки реагентов выделяют пассивные и активные микрофлюидные системы [241].

Применение активной транспортировки реагентов с использованием микронасосов, электрической или центробежной сил позволяет интенсифицировать процесс иммуноанализа и уменьшить геометрические размеры устройства. В самом простом случае движущая сила создается микропомпой, доставляющей жидкости под действием нагнетаемого воздуха [242]. Основным преимуществом помповых систем является индифферентность к физико-химическим свойствам транспортируемых жидкостей (рН, ионная сила, химический состав и свойства). В работе [243] представлен портативный проточный иммуночип для определения кардиомаркеров.

Движение реагентов и компонентов пробы обеспечивается за счет создания отрицательного градиента давления в каналах устройства. Детектирование отклика осуществляется импедиметрически. Разработанный иммуносенсор предназначен для полностью автономной работы, имеет предел обнаружения 2.45 нг/см^3 и диапазон линейности $0.1 - 5 \text{ нг/см}^3$ в случае определения интерлейкина 6. Микрофлюидное устройство с использованием вакуума в качестве движущей силы предложено авторами [244]. Антитела иммобилизованы посредством авидин-биотинового взаимодействия на поверхности углеродных нанотрубок, которые под действием вакуумной помпы с использованием металлической маски отпечатываются на бумажном фильтре для последующего использования. Иммуночип может быть использован для детектирования широкого круга анализов белковой природы в качестве средства "point-of-care" (у постели больного) диагностики.

В отличие от предыдущего способа, применение электродвижущей силы (электроосмос и электрофорез) не требует использования насоса и потому легче поддается автоматизации и миниатюризации. Сольватированные ионы под действием электрического поля движутся к противоположно заряженным

электродам, тем самым создавая направленные потоки, контролируемые силой и направлением внешнего воздействия [245].

Применение в микрофлюидных системах центробежной силы известно с 1990 - х годов как "CD – based centrifugal microfluidic" [246]. Сегодня такие технологии продолжают развиваться в области активации интенсивности потока, смешения потоков, разделения и концентрирования дисперсных систем, анализа образцов со сложной биологической матрицей, миниатюризации устройств и применения биологически активных реагентов. Среди "CD-based centrifugal microfluidic" опубликовано не так много работ, связанных с электрохимической детекцией аналитического сигнала. Вероятно, это связано в большей степени с проблемами регенерации поверхности электродов и стабильностью электрохимически активных меток. Известны работы с амперометрической и импедиметрической детекцией аналитического сигнала [247].

Сочетание технологии проточного иммуноанализа с электрохимическим откликом на планарных электродах позволит успешно миниатюризировать и удешевить устройства для "*point-of-care*" диагностики.

1.7.3. Иммуносенсоры на основе меток.

Поскольку комплекс антитело и антиген по своей природе не является электроактивным и не обладает окислительно-восстановительными свойствами, т.е. неспособен проявлять свойства редокс-пары, то для анализа применяют сигналообразующую метку, которая конъюгирована либо с антителом, либо с антигеном. В качестве метки применяют как молекулы биологической природы, чаще всего ферменты, так и искусственные.

За последние четыре десятилетия были разработаны различные стратегии разработки иммуносенсоров на основе ИФА для определения широкого круга агентов: бактериальных, вирусных, гормонов, онкомаркеров, пестицидов и т.д. [3, 248 – 252].

Наиболее широкое распространение получили амперометрические и вольтамперометрические иммуносенсоры с ферментативной меткой, например, пероксидазой хрена [253]. Реализовано две возможности получения аналитического сигнала: катализ медиаторной системы (например, гидрохинона) в присутствии пероксидазы хрена или прямой перенос электронов фермента (рисунок 1.22, *а, б*). Для увеличения сигнала, а, следовательно, и чувствительности разрабатываемого иммуносенсора наноматериалы или наноструктуры, действующие как «электронный провод» между окислительно-восстановительным центром метки- фермента и электродом, наносят на рабочую поверхность электрода.

Еще один способ иммуноанализа включает использование ферментных меток, которые превращают электрохимически неактивный субстрат в детектируемый электроактивный продукт. Наиболее широко используемой меткой такого типа является щелочная фосфатаза (рисунок 1.22, *в*).

Одним из самых распространенных субстратов является *п*-аминофенилфосфат, который превращается в *п*-аминофенол и затем окисляется на рабочем электроде [254].

Следует отметить, что в случае применения в качестве метки в электрохимических иммуносенсорах пероксидазы хрена, исследователь ограничен в выборе метода детекции сигнала (обычно это амперометрия), но одновременно этот метод позволяет получить наилучшие метрологические и аналитические характеристики (чувствительность, предел обнаружения и др.). Применение же щелочной фосфатазы в качестве метки, хотя и позволяет осуществлять выбор среди импульсных вольтамперометрических методов, однако ограничено значением рН [255].

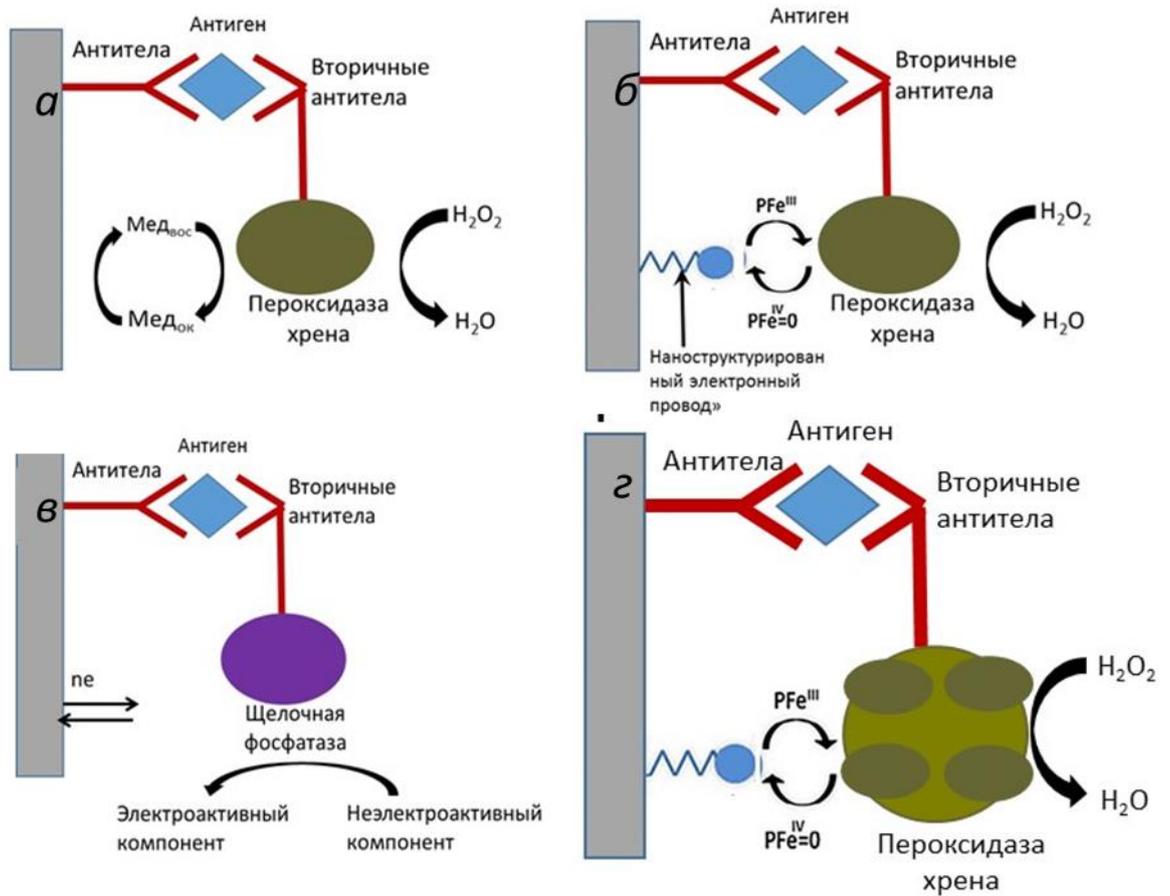


Рисунок 1.22 – Схематическое представление механизма действия различных типов электрохимических иммуносенсоров с использованием в качестве метки ферментов

За последние годы значительные усилия исследователей были направлены на увеличение чувствительности анализа в случае применения иммуносенсоров с ферментативной меткой. Однако амплификация сигнала ферментативными реакциями не является достаточной, и для преодоления этого ограничения необходимы дополнительные процессы. Перспективной является стратегия комбинированного использования антител, с несколькими ферментами [256] и наноматериалами (металлическими наночастицами, углеродными наноматериалами, нанокompозитами, наночастицами диоксида кремния и др.). Немаловажным недостатком этого подхода является существенное усложнение анализа за счет увеличения числа стадий [257 – 259].

Кроме того, недостатки присущие методу ИФА характерны и для разрабатываемых иммуносенсоров: необходимость применения дорогих и нестабильных ферментов, сложного оборудования (в случае аппаратного ИФА), а также длительность процедуры.

Альтернативой ферментным меткам в последние годы являются искусственные молекулы, например, органических красителей и синтетических/полусинтетических хромофоров. Синтетические красители получают с различными хромофорными структурами, позволяет существенно расширить область их применения [260]. Предложен оригинальный способ [261] определения бактерий на примере *E. coli* и *S. aureus* фотометрическим методом, в качестве меток применяли синтетические красители, которые изменяют цвет раствора при взаимодействии с бактериальными метаболитами. Время анализа составляет 15 – 20 минут. Недостатком этого способа является нарушение линейной зависимости в случае, когда концентрация бактерий превышает 10^3 КОЕ/см³.

В последние годы в практике биоанализа начали применять липосомальные структуры, состоящие из нескольких слоев фосфолипидов со встроенными в структуру белками. Во внутреннее пространство липосом, изолированное от внешней среды, могут быть инкапсулированы различные молекулы, например, спирты, а также помещены различные наноматериалы [262, 263], органические красители [264] и т. д.

Появились публикации, посвященные новым полимерным материалам – дендримерам, используемым в качестве иммобилизационного слоя, позволяющих улучшить поверхностную ориентацию аффинных центров антигенов и антител, являющихся компонентами самоорганизующихся монослоев [265 – 267]. Дендримеры (шарообразные макромолекулы, имеющие древовидную структуру с общей центральной группой), обладающие структурной однородностью, биосовместимостью, возможностью контроля и изменения состава и размеров,

являются неотъемлемой частью некоторых биосенсоров. Основным недостатком дендримеров является сложность и многостадийность их синтеза.

Безусловно, перспективным направлением, развиваемым в последнее десятилетие, является применение наноматериалов, таких как углеродные нанотрубки, графен, наночастицы металлов и гибридные структуры наночастиц углерода/металла и др. Это связано помимо уникальных свойств материалов в наноразмерном состоянии, возможностью иммобилизовать их на поверхности антител, что позволяет усилить аналитический сигнал, следовательно, улучшить чувствительность и точность детектирования. Кроме того, последние достижения в области материаловедения и техники позволили получить наноструктурированные материалы различной геометрии, которые были легко использованы для конъюгирования со многими биомолекулами в иммуноанализе. В таблице 1.12 приведены лишь единичные примеры разработок иммуносенсоров с использованием наноматериалов.

Включение этих компонентов в конструирование иммуносенсоров позволяет значительно улучшить характеристики последних, в частности, повысить чувствительность, линейный диапазон определения и предел обнаружения [268 - 272]. Наибольших успехов применение наноматериалов достигло при разработке электрохимических иммуноустройств. Исследователями применяются различные технологии, в том числе, «сверху вниз» и «снизу-вверх» для включения наноматериалов в конструкцию иммунодатчика [3, 40, 252].

Одним из видов наноматериалов являются квантовые точки - люминесцентные полупроводниковые нанокристаллы с уникальными электронными и оптическими свойствами. Эти материалы привлекают внимание исследователей из-за их значительных преимуществ, связанных с высоким квантовым выходом, высокими коэффициентами молярной экстинкции, широкими спектрами возбуждения, узкими и симметричными полосами излучения (30 -

50 нм), электрохимическими и магнитными свойствами [273]. Типичные диаметры квантовых точек составляют от 1 до 20 нм, и они содержат от 100 до

100000 атомов. Особые характеристики этих наноматериалов приписываются высокой степени локализации электронов в пределах радиуса частицы [274]. Безусловным достоинством квантовых точек является универсальность, поскольку длину волны фотолюминесценции можно легко изменить с ультрафиолетового видимого на инфракрасную области путем выбора размера частиц (1–12 нм), природы и состава наночастиц [275].

Квантовые точки чаще всего применяют в качестве сигналообразующих меток в электрохимических или оптических иммуносенсорах для сэндвич анализа.

Ян и др. [276] разработали простой, быстрый, сверхчувствительный электрохимически-люминисцентный конкурентный анализ, где конъюгат антител с CdSe выступал в качестве сигналообразующей метки с использованием модифицированной наночастицами золота подложки. Наночастицы золота эффективно ускоряли перенос электронов на трансдьюсере, предел обнаружения составил 0.0084 нг/см^3 для кленбутерола. Sharma et al. [277] опубликовали работу, посвященную обнаружению стафилококкового энтеротоксина В, продуцируемого грамположительными бактериями, с использованием как электрохимического, так и флуоресцентного методов иммуноанализа.

В случае применения электрохимической детекции для квантовых точек, эти метки предварительно окисляют смесью кислот и определяют образовавшиеся катионы. Обычно процесс иммуноанализа на основе квантовых точек проводят на поверхностях золота [272] или на голых и модифицированных углеродных поверхностях [278, 279]. Некоторые примеры иммуносенсоров на основе наноматериалов приведены в таблице 1.7.

Несмотря на то, что квантовые точки сегодня являются коммерчески доступными, их использование в иммуносенсорах ограничивается токсичностью, зависимостью аналитического сигнала от размера частиц, а также, в ряде случаев, сложностями их синтеза и хранения [280].

Таблица 1.7 – Иммуносенсоры на основе наноматериалов

Определяемый компонент	Способ иммобилизации биорецепторного слоя на поверхности сенсора	Метка/тип иммуноанализа	Способ детектирования аналитического сигнала	C_{lim} Диапазон линейности	Ссылка
1	2	3	4	5	6
Тропонин	Карбодиимидная сшивка	Безметочный (Fe^{3+}/Fe^{2+}) /неконкурентный	ЦВА/импедансная спектроскопия	0.07 нг/см ³ 0.1 – 10 нг/см ³	[281]
Дисмутаза	Введение в полимер с Au НЧ	Безметочный (Fe^{3+}/Fe^{2+}) /неконкурентный	ЦВА/импедансная спектроскопия	0.5 нМ 0.5 нМ – 0.5 мкМ	[282]
IgG	Ковалентное	Ag@Au-Fe ₃ O ₄ электрокатализ восстановления H ₂ O ₂ /сэндвич-анализ	Амперометрия	50 фг/см ³ 0.1 нг/см ³ – 5 мкг/см ³	[283]
Афлатоксин В1	Кросс сшивка	Безметочный/конкурентный	Оптический волновод	0.1 – 100 нг/см ³	[284]
Эстрадиол	Физическая сорбция	Безметочный/катализ /неконкурентный прямой анализ	Амперометрия	3.3 пг/см ³ 0.01 – 18 нг/см ³	[285]
Фактор некроза опухоли	Карбодиимидная сшивка	Катализ окисления катехола НК "фуллерен-углеродные нанотрубки" /неконкурентный прямой анализ	Линейная ВА	2 пг/см ³ 5 – 75 пг/см ³	[286]
Простатспецифический антиген	Тиолдисульфидное взаимодействие	KNbO ₃ -Au@Bi ₂ S ₃ НЧ /неконкурентный прямой	Электрохемилюминесценция	3 пг/см ³ 0.005 – 5 нг/см ³	[287]

Наиболее широко используемый подход для количественного определения биоконпонента включает образование иммунокомплекса с последующей локализацией на нем вторичных антител (антивидовых антител), меченых наночастицами металлов/оксидов металлов с последующим химическим растворением в кислой среде и обнаружением высвобожденных металлических катионов с помощью прямой вольтамперометрии, амперометрии или инверсионной вольтамперометрии. Поскольку концентрация ионов пропорциональна количеству наночастиц, то это напрямую связано с концентрацией целевого анализита в растворе образца [3, 288].

Перспективным является подход одновременного обнаружения трех анализитов с использованием одного интерфейса. Например, разработан иммуносенсор, который конструктивно состоял из стеклоуглеродного электрода, покрытого полимером и наночастицами золота с последующей локализацией трех первичных антител. Отклик был получен после присоединения по методу сэндвич меченых вторичных антител. Этот датчик показал превосходный предел обнаружения в пределах от 2 до 6 пг/см³ [289].

Однако основным недостатком применения наночастиц (обычно используются НЧ Au, Ag, Cu) в качестве сигналообразующей метки в конструировании электрохимических иммуносенсоров для мультианалитических вольтамперометрических определений различных анализитов за один цикл является относительная близость значений формальных потенциалов этих металлов, что приводит к перекрытию аналитических сигналов, а значит к ошибке анализа. Тем не менее, опубликованы примеры таких исследований. Например, авторами [290] сообщалось о разработке устройства, произведенного методом трафаретной печати, содержащего два отдельных графитовых рабочих электрода, которое применяли для обнаружения человеческого IgG и козьего IgG с использованием AuНЧ в качестве меток. Однако для успешного получения результата в случае мультиммуноанализа, необходимо пространственное разделение рабочих электродов для устранения явлений «перекрестных сигналов».

Хорошо известны и широко используются в биоанализе наночастицы платины (PtНЧ), однако в иммунологических методах эти наночастицы плохо исследованы. Впервые PtНЧ были использованы в качестве меток в сэндвич-анализе для конструирования полимерных бионаноконструкций (PBCNs) в качестве матрицы-носителя. Показаны амперометрические сигналы с границами обнаружения до 0.018 нг/см^3 и широким линейным диапазоном 0.05 нг/см^3 [291].

Стратегия покрытия наночастиц с целью получения функциональных групп, необходимых для связывания с иммунологическим агентом, крайне актуальна. Наноконструкции, так же, как и наночастицы, могут выступать в качестве метки при детектировании различными методами (оптическими, электрохимическими и др.), материала трансдюсера (подложки), а в случае магнитных НК в качестве агента для концентрирования и сепарации целевого анализита. Кроме того, модификация наночастиц с использованием различных покрытий, в том числе и полимерных, позволяет решить одну из основных проблем – нестабильность, склонность к агрегации НК.

Предложены различные подходы использования наноконструкционных материалов в иммуноанализе, таких как наномангнитные композиции $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ и нанополлимерные пленки с коллоидным нанозолотом [292], наноконструкции нанозолото/гексацианоферрат никеля [293], наномассив из TiO_2 и нанотрубок, электроосажденные сплавы нанозолота [294]. С применением подобных типов меток были разработаны иммуносенсоры для выявления ВИЧ [295], маркеров опухолей [296, 297], белков [298].

Для создания иммуносенсоров широко применяют в качестве чувствительных элементов наноконструкции на основе полимерных материалов с включенными наночастицами металлов/оксидов металлов, графена, углеродных нанотрубок. Например, известны работы по определению антигена простаты с использованием полианилина – наночастиц золота с $C_{lim} = 0.6 \text{ пг/см}^3$ [299], интерликина – б с использованием полианилина- наночастиц селенида кадмия с $C_{lim}=0.17 \text{ пг/см}^3$

[300], карциномозембрионального антигена с использованием полианалина – наночастиц золота – ферроцена с $C_{lim} = 0.1$ пг/см³ [301].

Комбинация различных нанокпозиционных материалов, их применение в качестве платформы для иммобилизации антител/антигенов или/и сигналообразующих меток, открывает новые возможности для конструирования высокоэффективных, чувствительных иммуносенсоров.

Многообещающим направлением развития электрохимических иммуносенсоров, согласно анализу литературы, является использование магнитных наночастиц. Помимо уникальных свойств, которыми также обладают и другие типы наночастиц (например, высокой поверхностной энергией, большой удельной площадью поверхности и функционирования в качестве проводников электронов), большинство МНЧ на основе железа, особенно оксиды железа, являются биосовместимыми и не генотоксичными [302 – 306]. Более того, МНЧ играют существенную роль в процедуре иммуноанализа из-за возможности с их помощью проводить концентрирование и очистку. Таким образом, применение МНЧ на основе железа позволяет устранить необходимость предварительной обработки образца центрифугированием или хроматографией, что существенно сокращает время иммуноанализа [307].

Эмами и соавторы [308] разработали иммуносенсор на основе золотого электрода для определения антигена HER2 в образцах сыворотки. В качестве метки использовали конъюгат вторичных антител с МНП. Линейный диапазон иммуносенсора составил 0.01–10 нг/см³ и 10 –100 нг/см³, ПО 0.995 пг/см³.

В настоящее время существует потребность в быстрых методах обнаружения и определения патогенных бактерий в биологических жидкостях, пищевых продуктах в качестве альтернативы трудоемким процедурам культивирования. В этой области появились единичные работы.

Например, Freitas и соавторы [309] разработали методику электрохимического иммуноанализа с использованием наночастиц типа «ядро-оболочка» Fe@Au, конъюгированных с антителами против *Salmonella typhimurium*.

C_{lim} составил 13 клеток/см³. Кроме того, результаты, полученные в этой работе, показали, что метод, разработанный Фрейтасом и его коллегами, может определять бактерии в молоке при низких концентрациях и подходит для быстрого (время анализа менее 1 ч), чувствительного обнаружения *S. typhimurium* в реальных образцах.

Предложены электрохимические иммуносенсоры для количественного определения бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 и *Staphylococcus aureus* B-1266 в реальных образцах, где в качестве прямой сигналообразующей метки применяли МНЧ Fe₃O₄, покрытые хитозаном или 3-аминопропилтриэтоксисиланом. Линейный диапазон, разработанных иммуносенсоров составил 10 – 10⁵ КОЕ/см³. C_{lim} для бактерий *Escherichia coli* ATCC 25992 – 9.3 КОЕ/см³, для бактерий *Staphylococcus aureus* B-1266 – 8.7 КОЕ/см³ [310].

Еще один интересный подход применения магнитных наночастиц на основе наночастиц оксида железа продемонстрировали авторы [129]. Электрохимический иммуносенсор для количественного определения бактерий *E. coli* ATCC 25922 с использованием нанокompозитных частиц Fe₃O₄ с электроактивным покрытием в качестве сигналообразующей метки в реальных образцах. В качестве электроактивного покрытия применяли полипиррол; поливинилбензилхлорид, модифицированный хинолином; оксид кремния, модифицированный ферроценом. Предел обнаружения составил 1.2·10¹ КОЕ/см³.

Возможно обнаружение инфекционных агентов вирусной природы. Например, с применением метода электрохимического иммуноанализа типа сэндвич был определен антиген вируса кори. В качестве метки использовали конъюгат вторичных антител с нанокompозитными частицами Fe₃O₄ – SiO₂ с C_{lim} 1.87·10⁻⁵ мг/см³ [311].

Иммуносенсоры на основе магнитных наночастиц являются самыми «молодыми» из числа всех иммуносенсоров, однако рост количества публикаций начиная с 2003 года демонстрирует, что МНЧ будут играть все большую роль в электроаналитической науке в ближайшем будущем (рисунок 1.23).

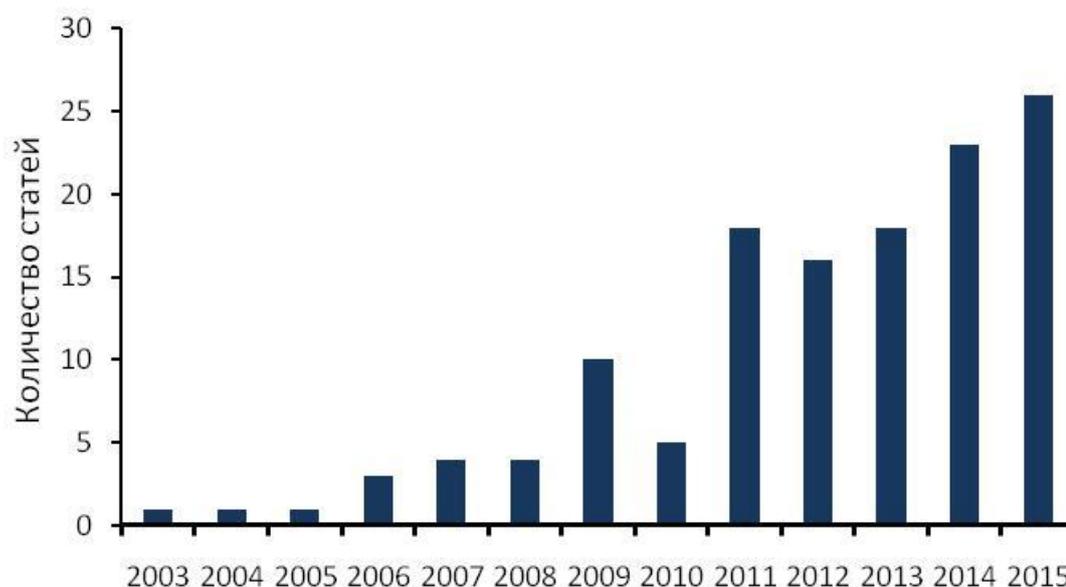


Рисунок 1.23 – Диаграмма изменения публикационной активности по бесферментным биосенсорам/сенсорам (по данным базы Scopus)

Высокая чувствительность иммуносенсоров на основе НЧ открывает новые возможности обнаружения маркеров болезни, биотирующих агентов или инфекционных агентов, которые не могут быть измерены традиционными методами, в том числе на ранних стадиях заболевания. Применение в иммуноанализе сигналообразующих нанометок небиологической природы позволяет улучшать чувствительность определения вследствие увеличения интенсивности отклика, а также создавать стабильные сенсоры с длительным сроком хранения.

Метод иммуноанализа находится в постоянном развитии. С одной стороны, расширяется число объектов исследования, с другой – совершенствуются методы самого анализа. Это приводит к тому, что упрощается схема анализа, сокращается время его проведения, уменьшается расход реагентов. Идет постоянный поиск все новых и новых веществ, используемых в качестве меток. Развитие идет, в том числе, по направлению создания одноразовых иммунострипов, проявляющих

высокую специфичность, одновременно не требующих специальных субстратов, ферментов или специальных условий измерения.

1.8. Развитие биосенсоров/сенсоров. Проблемы и перспективы

Возрастающая необходимость ранней диагностики сердечно-сосудистых, инфекционных и других социально значимых заболеваний, включая диабет, требует разработки и внедрения новых мобильных высокоэффективных инструментов анализа, ориентированных на применение вне госпиталя, «у постели больного» (bed-side testing – англ.), или «на месте оказания помощи» (point-of-care diagnostics – англ.). Обзор литературы последних десятилетий по существующим подходам к разработке и применению биосенсоров, представленный выше, показывает, что эти устройства сегодня успешно конкурируют со традиционными методами, стандартно применяемыми в клинической диагностике и предполагающими использование дорогостоящего оборудования, специальных помещений и высокую квалификацию обслуживающего персонала. Стратегия развития биоаналитических методов анализа смещается в сторону проведения первичного обследования вне лечебного учреждения в рамках реализации подходов персонализированной медицины. Исследования смещаются в сторону разработки и производства недорогих, чувствительных, селективных, а главное – удобных в употреблении неквалифицированным пользователем портативных устройств. Они могут быть использованы для быстрого скрининга биологически важных молекул для первичного диагноза, обследования пострадавших в авариях и чрезвычайных ситуациях техногенного и природного характера.

Переход от лабораторных моделей к массовому выпуску биосенсоров для их применения в реальных условиях, указанных выше, встречает свои трудности, которые ограничивают масштаб их производства (сегодня на рынке биосенсоров представлены единичные образцы) и сферу применения. Эти ограничения связаны с невысокой термической устойчивостью биоконпонентов предложенных устройств, их быстрой инактивацией при хранении и использовании. Не решены проблемы калибровки и рекалибровки биосенсоров и надежности их показаний.

Биосенсоры не допускают пока длительного непрерывного использования и проигрывают существующим тест-методам по стоимости единичного измерения.

Стремительный прогресс в нанотехнологиях, материаловедении, биохимии, безусловно, стимулирует дальнейшее развитие всех типов биосенсоров, но опирается в естественное ограничение по числу природных ферментов, включаемых в биосенсоры. И хотя генная инженерия может существенно влиять на характеристики ферментов, таких как сродство к аналиту и специфичность его связывания, синтез таких генетически модифицированных ферментов сложен и увеличивает стоимость конечного продукта.

Таким образом, сохраняет актуальность задача разработки новых экспрессных, чувствительных, селективных, недорогих и удобных в использовании сенсоров, биосенсоров и простых устройств на их основе для определения клинически значимых параметров в биологических и природных объектах, ориентированных на использование вне лабораторной базы. На наш взгляд, разработка биосенсоров/сенсоров главным образом будет вестись в направлении поиска альтернативы биологическим рецепторам, в том числе, ферментам, т.е. в направлении создания и применения в качестве аналогов ферментов (биомиметиков) различных наноматериалов, органических и неорганических соединений и комплексов переходных металлов, синтетических молекул с каталитической активностью и ПМО. Указанные синтетические рецепторы (биомиметики), а также созданные на их основе сенсоры и устройства должны быть стабильны при изготовлении сенсоров и их использовании и не должны уступать по чувствительности и селективности традиционным биосенсорам медицинского назначения.

Аналогичные проблемы стоят и перед исследователями, работающими над совершенствованием конструкции существующих биосенсоров, в том числе, реализующих принципы иммуноанализа. Несмотря на очевидные преимущества наноматериалов, ПМО и других биомиметиков, сохраняются проблемы их

сочетания с антителами и реализации условий получения максимально чувствительного отклика на различные аналиты.

Серьезной трудностью на пути коммерциализации описанных выше (био)сенсорных систем является ограниченная воспроизводимость результатов определения различных аналитов с использованием синтезированных НМ. Факторы, влияющие на аналитические и метрологические характеристики биосенсоров на их основе, включают вариации размера, формы или состава частиц наноматериалов и общую нестабильность подобных систем. Поэтому необходимо строго контролировать структуру наноматериалов на стадии их получения и введения в состав сенсоров, а также процессы биоконъюгации с другими компонентами биочувствительного слоя, чтобы свести к минимуму вариации параметров, получаемых (био)сенсоров. Разработаны и разрабатываются методы поверхностного функционирования НЧ, чтобы минимизировать их агрегацию, сохраняя при этом преимущества наноразмерного состава.

Положительные результаты применения наноматериалов в составе многих устройств, включая аналитические, сдерживаются их высокой токсичностью, проявляемой как на уровне отдельных клеток, так и сложно организованных живых организмов включая человека. Все увеличивающееся разнообразие наноматериалов и объемы их производства сопровождаются растущей обеспокоенностью в отношении экотоксикологических последствий их повсеместного использования. Выходом может стать использование гибридных материалов. Так, углеродные наноматериалы, не обладающие цитотоксическим воздействием, можно комбинировать с различными наночастицами иного состава не только для увеличения удельной площади поверхности формируемых гибридов, но и для сочетания их биосовместимости и пониженной токсичности.

В случае ПМО к указанным выше проблемам, связанным с наноразмерным составом полимерных частиц и/или их носителей, добавляются проблемы лабильности получаемых отпечатков и изменения их сродства к аналиту в процессе эксплуатации, особенно в водных растворах электролитов. Необходимо также

решать такую серьезную проблему, как возможно более полное удаление молекул шаблона после синтеза и повторного связывания в порах ПМО. Решение таких проблем актуально в свете большой перспективности разработки и применения ПМО как биомиметиков в указанных выше отраслях анализа для повышения его качества, экспрессности и надежности.

Необходимо отметить, что электрохимический способ регистрации сигнала подобного рода сенсоров в совокупности со специфическими биохимическими реакциями крайне привлекателен. Сегодня более 80% разработанных биосенсоров – это электрохимические устройства. Во многом это обусловлено тем, что принципы передачи сигналов, реализованных в электрохимических сенсорах, досконально исследованы. Изучены теоретические и практические принципы реализации электрохимических подходов к регистрации сигнала и соответствующих им методов анализа. Сами электрохимические устройства, производимые промышленностью, просты, надежны и недороги. Кроме того, электрохимические способы измерения сигнала сенсоров могут быть легко адаптированы для использования в проточных видах анализа и в автоматизированных комплексных аналитических системах.

Указанные выше проблемы развития электрохимических сенсоров и биосенсоров на основе соединений органической и неорганической природы, наноматериалов и ПМО глобальны, и их универсальное решение требует вклада всего научного сообщества. В рамках данной диссертационной работы рассмотрены и реализованы ряд новых методологических и экспериментальных подходов, которые открывают новые перспективы в указанной области. Для этого были поставлены и решены ряд задач, обеспечивших новые перспективы применения наноразмерных материалов в разработке электрохимических сенсоров и сенсорных устройств для медицинской диагностики, включая определения клинически значимых биохимических показателей, иммуноопределение патогенных микроорганизмов и их антигенов и оценку токсических свойств гибридных материалов и детали их взаимодействия с клеточными культурами.

Синтезированные и охарактеризованные комплексом современных физико-химических методов анализа гибридные наноматериалы с широким варьированием состава (оксиды металлов и их комплексы, благородные металлы, в том числе, поверхностно функционализированные) были апробированы как прямые и непрямые метки и сигналообразующие элементы. Исследование механизма реакций и кинетики каталитического эффекта выявили закономерности между составом и размерами наночастиц и эффективностью сигналообразования в соответствующих сенсорах и иммуносенсорах. Все это позволило не только предложить и реализовать новые подходы к созданию электрохимических сенсоров и биосенсоров в интересах медицинской диагностики для конкретных аналитических задач, но и создать универсальную платформу будущего развития (био)сенсоров на основе указанных и аналогичных наноматериалов.

Последовательное решение поставленных в диссертации задач открывает также путь к миниатюризации и автоматизации (био)сенсорного анализа, что позволит избежать ошибок, связанных с ручными операциями, характерными для обычных устройств биомедицинской диагностики. Современные тенденции интеграции и миниатюризации дают надежду на их будущее преобразование в формат портативных устройств, которые намного превышают существующие возможности биосенсоров.

ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1. Оборудование и средства измерений

2.1.1. Оборудование для проведения электрохимических исследований

Электрохимические исследования проводили с использованием потенциостата/гальваностата Metrohm Autolab PGSTAT128N (Metrohm AG, Нидерланды), вольтамперметрического комплекса 639 VA Processor в комплекте с 694 VA Stand и 700 Dosino (производство «Metrohm», Швейцария), а также инверсионного вольтамперметрического анализатора в комплекте с магнитной мешалкой «ИВА-5» (производство ООО НПВП «ИВА», г. Екатеринбург, Россия) и компьютером типа Pentium II (операционная система не ниже Windows 95/98). Применяли трехэлектродную электрохимическую ячейку. В случае разработки способов количественного определения мочевины, креатинина и холестерина, рабочим электродом служили либо вращающийся дисковый электрод Ametek PAR Model 616A с платиновым наконечником Pine AFT3T050PT ($S_{geom} = 0.196 \text{ см}^2$) в стационарном режиме и режиме вращения с контролируемой скоростью, либо дисковые платиновый и стеклоуглеродный электроды производства Metrohm (Нидерланды) ($S_{geom} = 0.07 \text{ см}^2$), либо толсто пленочные углеродсодержащие планарные электроды на основе чернил «Metech» (США) (ТУЭ), либо толсто пленочные электроды на основе платиновой пасты, либо проволока. В случае разработки способов количественного определения инфекционных агентов, рабочим электродом служили либо толсто пленочный графитсодержащий электрод (на основе чернил «Metech» (США)), модифицированный каломелью (Hg_2Cl_2) (ТМГЭ), либо платиновый дисковый электрод (с рабочей поверхностью диаметром 4 мм, «Metrohm», Швейцария), впрессованный во фторопласт, либо толсто пленочный электрод (ТГЭ), изготовленный на основе графито-эпоксидной пасты. В качестве вспомогательного электрода использовали стеклоуглеродный стержень или палладиевую проволоку. В качестве электрода сравнения использовали либо хлоридсеребряный электрод ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ M KCl}$) типа ЭВЛ – 1М (г. Гомель, Беларусь), либо Ag/AgCl с двумя мембранами («Metrohm»,

Швейцария), внутренний объем электрода заполняли 0.1 М раствором KCl в воде, а внешний – 0.1 М раствором LiClO₄ в ацетонитриле, либо серебряную проволоку.

Дифференциальные импульсные ВА регистрировали: амплитуда импульса 50 мВ, длительность импульса 40 мс, шаг потенциала 6 мВ. Для квадратно-волновой регистрации: частота модуляции 100 Гц, амплитуда импульса 20 мВ, продолжительность ступени 0.05 с, время измерения 2 мс, шаг потенциала 12 мВ.

Значения потенциалов в апротонных средах (ДМФА и ацетонитрил) представлены относительно редокс пары Fc/Fc⁺ (принят за 0 В).

ТГЭ/ТУЭ представляет собой дорожку графитоэпоксидной пасты или углеродсодержащих чернил, нанесенные на полимерную пластинку размером 5×40 мм через трафарет из полимерной пленки толщиной 0.2 мм. Общий вид ТГЭ/ТУЭ представлен на рисунке 2.1

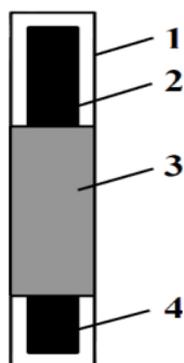
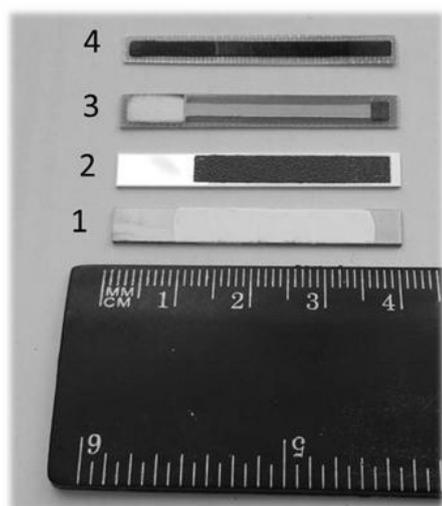


Рисунок 2.1 – Общий вид ТГЭ/ТУЭ:

- 1 – подложка из полимерного материала;
- 2 – дорожка из графито-эпоксидной пасты (контактная зона электрода);
- 3 – слой изолятора;
- 4 – рабочая зона электрода

Применяли следующие типы планарных электродов:



- 1 – планарный платиновый электрод (ТПЭ);
- 2 – толстопленочный графитсодержащий электрод с алюминиевым токоподводом;
- 3 – толстопленочный графитсодержащий электрод токоподводом из серебросодержащей пасты;
- 4 – толстопленочный графитсодержащий электрод

Рисунок 2.2 – Типы планарных электродов

Спектры электрохимического импеданса регистрировали при равновесном потенциале медиаторной системы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, с амплитудой синусоидального напряжения 10 мВ и частоте 0.01 Гц – 10 кГц, используя FRA-модуль (Metrohm Autolab, Нидерланды). Обработку результатов измерений электрохимического импеданса осуществляли с использованием программного обеспечения Nova 1.10.

2.1.2. Оборудование для анализа наноматериалов

Использовали ПЭМ высокого разрешения с LaB6 катодом (JEM-2100, "JEOL", Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ с разрешением по точкам 0,19 нм и по линиям 0.14 нм для оценки размера наночастиц NiO и энергодисперсионный спектрометр "Oxford Inca Energy TEM 250" ("Oxford Instruments" Великобритания).

Применяли рентгеновский дифрактометр "Bruker Advance D8" ("Bruker AXS", Германия) для регистрации дифракционного спектра синтезированных наночастиц NiO в излучении Cu-K α .

Исследовали распределение наночастиц на поверхности толсто пленочных углеродсодержащих электродов с использованием растрового электронного микроскопа "JSM-6490 LV" ("JEOL", Япония).

Синтезированные образцы ПМО анализировали с использованием сканирующего электронного микроскопа Carl Zeiss AURIGA CrossBeam (Германия).

Регистрировали ИК-спектры с использованием ИК-Фурье спектрометра ALPHA «BrukerOptikGmbH» (Германия) в таблетках KBr.

ИК спектры магнитных НК, ПМО регистрировали с применением Фурье-спектрометра «Bruker Alpha» с приставкой однократного горизонтального наружного полного внутреннего отражения (Eco-ART) с кристаллом ZnSe (область прозрачности 0.5–20 мкм, показатель преломления $n = 2.42$).

Измерения средневзвешенных размеров наночастиц в суспензиях проводили на универсальном анализаторе «Brookhaven 90BI-Zeta Plus» («Brookhaven Instruments Corporation», США).

2.1.3. Оборудование для работы с биообъектами

Инактивацию микроорганизмов *Salmonella thyphimurium* штамм SL 7207 (*S. thyphi*) и инкубацию растворов при $T = (37 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$ проводили с использованием мини-инкубатора «GFL-4010» (Gesellschaft fur Labortechnik, Германия).

Использовали спектрофотометр «Evolution 201» (Thermo-scientific, США) со стеклянной кюветой (толщин слоя 1 см) для фотометрических измерений (определение концентрации микроорганизмов в суспензиях).

Применяли растровый сканирующий электронный микроскоп «Quanta-200» («FEI Company», США) и просвечивающие электронные микроскопы «JEM-1400» («Jeol», Япония), «FEI MORGAGNI 286 (D)» («FEI Company», США) для микроскопических исследований. Фотосъемку проводили с использованием цифровой камеры «VELETA» (SIS, «Olympus» и программного пакета iTEM (SIS, Германия).

Использовали микроскоп Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия) для исследования морфологии клеток штаммов методом фазово-контрастной микроскопии.

Аmplификацию в ПЦР анализе осуществляли, используя амплификатор «GeneAmp PCR System 6700» (Perkin-Elmer, Foster City, США). Продукты амплификации визуализировали с помощью трансиллюминатора «Gel Doc XR System» («Bio Rad», США.).

Секретированные цитокины IL1 β , IL6 определяли с помощью ИФА-ридера Multiscan EX («Thermo Labsystems»).

2.1.3. Другое вспомогательное оборудование

Применяли комбинированную мембранную установку серии ДВС-М/1НА(18) -N ("Медиана-Фильтр", г. Москва) для получения деионизированной воды, используемой для приготовления растворов.

Взвешивание навесок проводили на аналитических весах (модель SBC 33, «Scaltec», Германия) и «Shimadzu aux 220» («Shimadzu», Япония), 1-го класса точности.

Синтез магнитных наночастиц, нанокомпозитов, наночастиц NiO – прекурсоров, наночастиц золота, серебра, наночастиц типа «core-shell» проводили с использованием:

- магнитной мешалки с нагревательным элементом «IKA WERKE RCT Basic» («ИКА», Германия). Применяли для перемешивания и нагрева жидкостей и эмульсий;

- центрифуги «Sigma 3K30» («Sigma», Германия);

- верхнеприводной мешалки IKA Eurostar digital 2482000 (ИКА, Германия).

Перемешивание суспензий наночастиц и нанокомпозитов, содержащих магнитное ядро, проведения процесса получения нанокомпозитов методом эмульсионной полимеризации осуществляли с использованием ультразвукового диспергатора с микропроцессорным управлением Ultrasonic processor 500W (Sigma-Aldrich, США) и ультразвукового диспергатора «Ultrasonic Processor VCX-750» ("Zinsser analytic GMBH", Германия).

Применяли лабораторную муфельную электропечь с программным управлением температуры (модель МПЛ-6, «Варта», г. Санкт-Петербург, Россия) для отжига наночастиц прекурсора.

Применяли одноразовые миллифлюидные плашки μ -Slide IIIin1 (США) и перистальтический насос S-32 (Польша) со скоростью потока 5 мкл/с для селективного определения холестерина.

Применяли магнитный штатив «MagneSphere®» типа «Eppendorff» (Promega, США) с величиной напряженности магнитного поля

$31.83 \cdot 10^3$ А/м для магнитной сепарации и магнитного концентрирования нанокompозитов.

Использовали магнит, сконструированный в институте физики металлов УрО РАН (ИФМ УрО РАН), с величиной магнитного поля $37.40 \cdot 10^4$ А/м, для магнитного концентрирования.

Контролировали pH растворов с применением pH-метра милливольтметра типа pH – 150 и минивольтметра «Эксперт-pH» («Эконикс-Эксперт», г. Москва, Россия).

Фотометрические исследования проводили на спектрофотометре «LEKI SS1103» («MEDIORA OY», Финляндия) с использованием стеклянной кюветы с толщиной слоя 1 см и спектрофотометра ПЭ 5400 (ООО «Экохим», Россия).

2.2. Реактивы и приготовление растворов

В качестве электрохимических катализаторов для определения холестерина использовали хлорид кобальта (II) (х.ч., Россия) и хлорид никеля (II) (х.ч., Россия). Навеску катализатора растворяли в 10 см^3 ацетонитрила (АН, 99,8 %, Panreac, Испания) или ДМФА (99,8 %, Panreac, Испания), предварительно осушенного и перегнанного, содержащего 0.1 М перхлората лития (ПЛ, LiClO_4 , 99 %, Acros Organics, США) в качестве индифферентного электролита. В качестве фонового электролита в водной среде использовали 0.25 М раствор NaOH (ч.д.а., «Вектон», Санкт-Петербург).

Водно-органическую эмульсию готовили путем смешивания равных объемов 0.25 М раствора NaOH и ТГФ и 1 мМ ПАВ.

Применяемые 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).

Наночастицы золота и серебра синтезировали термохимическим методом с использованием нитрата серебра (HCl , AgNO_3); тетрахлороаурата калия (ТХАК, KAuCl_4); цитрата натрия (ЦН о.с.ч., Россия).

Для синтеза полимеров с молекулярными отпечатками использовали 4-винилпиридин (4-ВП, 95 %, США) в качестве мономера, этиленгликольдиметакрилат (ЭГДМА, 98 %, Германия) и дивинилбензол (ДВБ, 80 %, Alfa Aesar, Великобритания) в качестве сшивающих агентов, альфа-азобисизобутиронитрил (АИБН, Mody Chemie, Индия) в качестве инициатора.

Бесферментное определение мочевины и креатинина проводили с использованием следующих каталитических систем (таблица 2.1).

Структурные формулы используемых комплексов никеля (II), синтезированных сотрудниками ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН, приведены на рис. 2.3. Соответствие полученных структур представленным формулам были подтверждены методами ИК-, ЯМР-спектроскопии и элементного анализа.

Растворы органических комплексов никеля (II) готовили растворением точных навесок соответствующего реагента в подходящем растворителе.

В качестве растворителей использовали:

- ДМФА (о.с.ч., "Экос-1", Россия)
- ДМСО (х.ч., "Экрос", Россия)
- 1,2-диметоксиэтан (х.ч., "Экрос", Россия)
- ацетонитрил (для ВЭЖХ, "Экрос", Россия)
- ТГФ (х.ч., "Реактив", Россия).

В случае низкой растворимости органических комплексов никеля (II) готовили суспензии комплексов. Суспензии получали путем ультразвуковой обработки точных навесок комплексов в наиболее подходящем растворителе.

Для приготовления модельных растворов аналитов использовали мочевины ("Fluka", Германия) – 0,1 М раствор; креатинин ("Fluka", Германия) – 0,01 М раствор. Растворы готовили путем растворения точных навесок указанных аминов в деионизированной воде.

Таблица 2.1 - Каталитические системы, применяемые для бесферментного определения мочевины и креатинина

Производные фторированных кетонов	Производные 3-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-s-тетразина	Вицинальные диамины	Производные порфирина
<p>- 1,1,1,7,7,7-Гексафторгептан-2,4,6-трикетонат никеля (II) (I);</p> <p>- 4,4,5,5,6,6,7,7,7-нонафтор-1-фенилгептан-1,3-дикетонат никеля (II) (III);</p> <p>- 4,4,5,5,6,6,6-гептафтор-1-этоксигексан-1,3-дикетонат никеля (II) (IV);</p>	<p>- [(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-(бензотиазол-2-иламино)-s-тетразина-то](ацетилацетонато) никель (II) (V);</p> <p>- пятиядерный кластер никеля Ni₅(μ₃-OH)₂(μ-ООСС(СН₃)₃)₄(μ-N,N',N''-3,5-Me₂C₃HN₂C₂(O)N₄)₄(СН₃CN)₂ (VIII);</p> <p>- комплекс 3-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-ундециламино-1,2,4,5-тетразина с ацетатом никеля (II) состава Ni₃tz₂(OH)(H₂O)₂(СН₃COO)₅, где tz – 3-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-ундециламино-1,2,4,5-тетразин (IX);</p> <p>- комплекс 3,6-бис(3,5-диметилпиразол-1-ил)-s-тетразин с кластером Ni₉(НОССMe₃)₄(μ₄-OH)₃(ООССMe₃)₁₂ (X);</p>	<p>- N,N'-бис(этил-2-трифторацетилпропеонат-3-ил)этилендиамин никеля (II) (VI);</p> <p>- N,N'-бис(1,1,2,2-тетрафтор-3-оксо-4-(п-диазатолил)-нонен-4-5-ил)-о-фенилендиамин никеля (II) (VII);</p>	<p>- 4-тетрапиразинпорфиразин никеля (II) (XI);</p> <p>- 2,9,16,23-тетра(4-гептилфенил)тетрапиразинпорфиразин никеля (II) (XII);</p> <p>- никелевый комплекс 1-(2-фенил)-2-(мезо-тетрафенилпорфирин-2-ил)-этанона (XIII);</p> <p>- никелевый комплекс 1-(2-нитрофенил)-2-(мезо-тетрафенилпорфирин-2-ил)-этанона (XIV);</p> <p>- мезо-тетрафенилпорфиринат никеля (II) (XV);</p> <p>- октаэтилпорифинат никеля (II) (XVI);</p>

— ацетилацетонат никеля (II) (I)

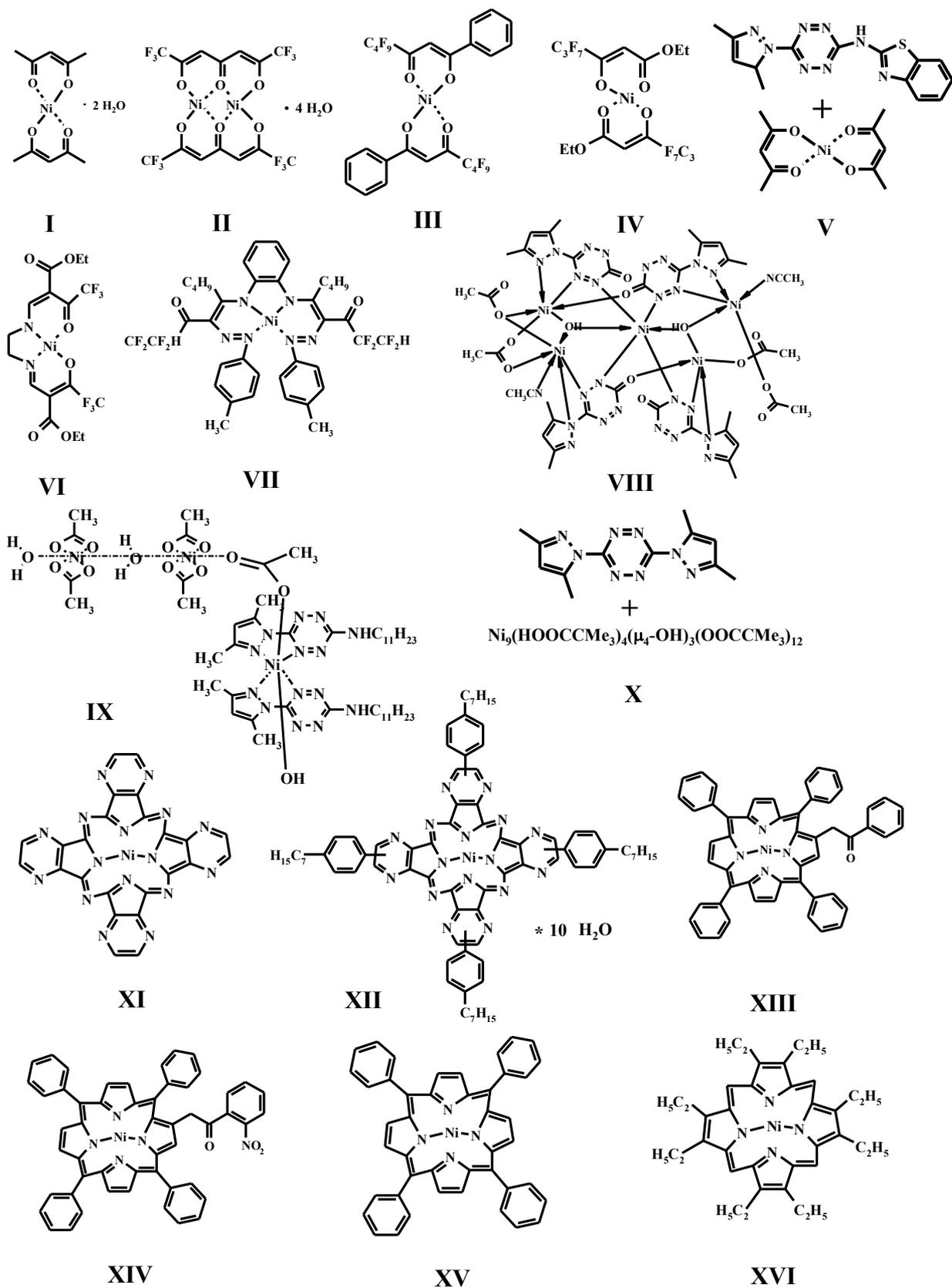


Рисунок 2.3 - Структурные формулы исследуемых комплексов никеля (II)

Методом растворения точных навесок готовили монокомпонентные модельные растворы следующих соединений:

- α ,L- аланин ("Egis", Венгрия)
- α ,L- аспарагиновая кислота ("Egis", Венгрия)
- α ,L- лейцин ("РЕАХИМ", Россия)
- α ,L- глицин ("РЕАХИМ", Россия)
- α ,L- глутаминовая кислота ("Egis", Венгрия)
- глюкоза ("РЕАХИМ", Россия)
- мочевая кислота ("Fluka", Германия)
- аскорбиновая кислота ("Merck", Германия)

Синтез наночастиц NiO в обратных мицеллах осуществляли, используя следующие реагенты:

- ацетат никеля (II) ("РЕАХИМ", Россия);
- оксалат аммония ("Merck", Германия);
- n-бутанол ("Экрос", Россия) в качестве со-ПАВ;
- октан ("Экрос", Россия) в качестве органической фазы;
- толуол (о.с.ч., "Реактив", Россия)
- цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) ("Fluka", Германия) и диоктил сульфосукцинат натрия (АОТ) ("Fluka", Германия) в качестве ПАВ;

Очистку наночастиц $\text{NiC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ от молекул ПАВ проводили с использованием хлороформа (х.ч., "Экос-1", Россия) и этанола (х.ч., Россия).

Наночастицы магнетита синтезировали, используя 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). НЧ магнетита покрывали оксидом кремния и синтезировали НЧ оксида кремния с использованием тетраэтоксисилана (ТЭОС, 98 %, Aldrich, Германия). Модификацию полученных наночастиц виниловыми группами проводили с применением трис(2-метоксиэтокси)(винил)силана (ТМВС, 98 %, Aldrich, США).

Бесферментный электрохимический иммуноанализ проводили с использованием следующих реактивов и растворов:

Модельные биологические образцы (изготовлены в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск):

- сыворотка морской свинки к *S.thyphi* титр 1:5120;
- бактерии *S.thyphi* 10⁸ КОЕ/см³;
- антиген бактерии *S.thyphi* 10 мг/см³;
- бактерии *Escherichia coli* штамм АТС 25922;
- кроличьи поликлональные антитела к *Escherichia coli* титр 1:4000;
- бактерии *Salmonella infantis* штамм В-1281;
- бактерии *Micrococcus flavus* штамм В-1132;
- бактерии *Bacillus licheniformis* штамм В-299;
- антиген вируса кори (NovO/96), концентрация 2.33 мг/см³;
- антитела к вирусу кори;
- вторичные антитела к вирусу кори;
- бактерии *Staphylococcus aureus* В-1266;
- бактерии *Escherichia coli* штамм В-79;
- бактерии *Bacillus subtilis* штамм В-654;
- кроличьи поликлональные антитела к бактерии *Staphylococcus aureus*

1 г/дм³ (Sigma Aldrich, США).

Вспомогательные реагенты для работы с биообъектами:

- фосфатный буферный раствор (ФСБ) рН=7.2, о.с.ч.;
- Твин—20;
- среда DMEM с глутамином;
- промывающий раствор содержал: фосфатный буферный раствор, натрия хлорид (0.9 %), Твин —20 (0.1 см³ на 100 см³ ФСБ);
- ПЦР буфер;
- Taq—ДНК—полимераза 5.0 Ед/1 мкл;
- магния хлорид, ос.ч. и раствор 0.0035 М;

- дезоксирибонуклеотид трифосфат 0.0002 М;
- мясопептонный агар;
- агароза;
- трипановый синий;
- жидкая среда для культивирования бактерий LB («Difco», США), рН 7.0—7.2;
- агаризованная среда для культивирования бактерий LB («Difco», США), рН 7.0—7.2;
- агаризованная среда Эндо для культивирования бактерий («Difco», США), рН 7.0—7.2;

Реагенты для синтеза наноматериалов и детектирования аналитического сигнала:

- хлорид железа (II), ос.ч.;
- хлорид железа (III), ос.ч.;
- 25 % водный раствор гидроксида аммония;
- N-октан, ч.д.а.;
- бутанол-1, ч.д.а.;
- цетилтриметиламмония бромид, ос.ч. (ЦТАБ);
- хлороформ, ч.д.а.;
- этанол, ч.д.а.;
- толуол, ч.д.а.;
- (бис-2-этилгексил)сульфосукцинат натрия, ч.д.а. (Na(AOT));
- кислота азотная, о.с.ч. плотностью 1.40 г/см³;
- кислота хлористоводородная, ос.ч. плотностью 1.19 г/см³ и раствор С(HCl) = 0.5 М.
- кислота серная, о.с.ч. плотностью 1.83 г/см³;
- роданид калия, ч.д.а и раствор 20 % водный;
- 30 % перекись водорода, х.ч.;
- натрия гидроксид, х.ч. и растворы концентрации 0.1 и 1 М;

- натрия хлорид, ос.ч. и раствор 0.5 М;
- раствор этидиум бромида 0.2 мкг/см³;
- ацетат натрия 3-водный, о.с.ч. и раствор концентрации 1 М;
- пирокатехол, о.с.ч. и растворы концентрации 0.001 – 0.1 М;
- стандартный образец состава растворов ионов железа (III), растворы концентрации 10 мг/дм³ – 0.1 мг/дм³ и ниже;
- деионизированная вода;
- универсальная индикаторная бумага.
- олеиновая кислота (Sigma - Aldrich, США);
- паравинилбензилхлорид (Sigma - Aldrich, США);
- стирол (Sigma - Aldrich, США);
- 1,4-дивинилбензол (Sigma - Aldrich, США);
- хинолин (Sigma - Aldrich, США);
- хинальдин (Sigma - Aldrich, США);
- пиррол (Sigma - Aldrich, США);
- персульфат натрия (Sigma - Aldrich, США);
- тиосульфат натрия (Sigma - Aldrich, США);
- додецилсульфат натрия (Sigma - Aldrich, США);
- тетраэтоксисилан (Sigma - Aldrich, США);
- аминопропилтриэтоксисилан (Sigma - Aldrich, США);
- 25 % водный раствор аммиака (NH₄OH), чда. (ООО «Сигма ТЕК»);
- этанол 95 % (ООО «Гиппократ»);
- ацетонитрил, хроматографически чистый (Panreac);
- толуол, хроматографически чистый (Panreac);
- калия нитрат (Sigma - Aldrich, США);
- стерильный 0.9 % раствор натрия хлорида (ОАО «Мосфарм», Москва);
- хитозан (синтезирован сотрудниками института естественных наук Уральского федерального университета),
- ГСО ионов золота («ЛенРеактив», г. Санкт-Петербург),

— нанотрубки углеродные («Sigma - Aldrich», США).

Рабочие растворы ионов железа (III) готовили последовательным разбавлением Государственных стандартных образцов (ГСО) состава раствора ионов железа (III) концентрации 1 г/дм³ деионизированной водой. Растворы концентрации 10 мг/дм³ готовили 1 раз в месяц, 1 мг/дм³ – 1 раз в неделю, 0.1 мг/дм³ и ниже – ежедневно. Все остальные рабочие растворы готовили путем растворения точных навесок твердых веществ, либо методом разбавления концентрированных жидкостей.

Коллоидный раствор наночастиц Fe₃O₄ для инкубации с биоматериалом готовили разбавлением суспензии, полученной в результате процедуры химического синтеза наночастиц, деионизированной водой и последующей УЗ обработкой.

Модельные суспензии микроорганизмов готовили путем последовательного десятикратного разбавления исходных суспензий с известным титром (титр определяли визуально по стандарту мутности либо спектрофотометрически).

Для исследования токсичности наноматериалов применяли:

— ГСО состава водных растворов ионов серебра (I) и золота (III) с аттестованным значением. Концентрации 1 мг/см³ и 0.1 мг/см³ соответственно путем разбавления ГСО растворами 0,1 М HNO₃ (для серебра) и 2 М HCl (для золота),

— 2.5 % раствор глутаральдегида,

— наборы интерлейкин-6-ИФА-Бест (ЗАО «Вектор-Бест» и интерлейкин-1бета-ИФА-Бест (ЗАО «Вектор - Бест),

— культура эмбриональных человеческих клеток легких WI-38 (клетки эмбрионального легкого человека трансформированного вирусом SV - 40).

2.3.Методики эксперимента

2.3.1. Электронно-микроскопический анализ.

Для исследования всех НЧ различной природы, а также НК с использованием просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) суспензии различных образцов наночастиц в воде подвергали ультразвуковому перемешиванию в течении 3-5 сек. Затем каплю полученной суспензии наносили на углеродную аморфную пленку толщиной 5 - 6 нм на стандартной сетке ПЭМ или на формваровую подложку медной сетки, после чего высушивали в течение 30 с. Микродифракционный анализ проводили на определенных участках образца.

Для исследования распределения наночастиц NiO на рабочей поверхности электрода с помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ), суспензии НЧ в воде подвергли ультразвуковому перемешиванию в течении 3 - 5 сек. Затем на рабочую поверхность ТУЭ наносили 3 мкл полученной суспензии, после чего ТУЭ сушили при комнатной температуре в течение 12 ч.

Подготовку клеточных культур для электронно-микроскопического изучения проводили следующим образом: культуру бактерий после инкубации с НЧ (в течение 10, 30 мин) центрифугировали в течение пяти минут, скорость 5000 об/мин, затем добавляли 4 % раствор параформальдегида и выдерживали при +4 °С в течение 24 ч. После промывки образцов фосфатным буфером раствором, проводили фиксацию 1 % - м раствором осмиевой кислоты, с предварительным обезвоживанием смесью раствора этилового спирта и ацетона, затем и добавляли в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы готовили с помощью микротомы Райхерт-Янг (Австрия), контрастировали 1 % - м водным раствором уранилацета и исследовали в электронном микроскопе. С применением цифровой камеры бокового вывода Veleta (SIS, Германия) и программного пакета iTEM (SIS, Германия) проводили съемку и обработку изображений.

2.3.2. Синтез и электронно-микроскопический анализ наночастиц NiO

Для синтеза наночастиц NiO применяли метод обратной микроэмульсии (ПАВ — ЦТАБ или АОТ) [312, 313], позволяющий получить наночастицы с узкодисперсным распределением по размерам.

Синтез проводили в два этапа: 1) получали прекурсоры — наночастицы оксалата никеля (II) (NiC₂O₄) методом осаждения в присутствии ПАВ по схеме $Ni^{2+} + (NH_4)_2C_2O_4 \rightarrow NiC_2O_4 + 2 NH_4^+$;

2) полученный осадок очищали от молекул ПАВ, высушивали при 120 °С в течение 1 часа, затем отжигали при 450 °С в течение 6 часов до образования агломератов, содержащих наночастицы NiO.

В случае использования в качестве ПАВ ЦТАБ, осаждение наночастиц NiC₂O₄ проводили путем добавления по каплям микроэмульсии **2** к микроэмульсии **1** (таблица 2.2) при интенсивном перемешивании (1000 об/мин) в течение 6 часов при комнатной температуре (~22 °С), 45 °С или 60 °С.

Таблица 2.2 Состав микроэмульсий, используемых для синтеза наночастиц NiC₂O₄

Тип компонента микроэмульсии	Состав микроэмульсии	
	Микроэмульсия 1	Микроэмульсия 2
водная фаза (10.05% мас.)	0.1M Ni(Ас) ₂	0.1M (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄
ПАВ (16.76% мас.)	ЦТАБ	ЦТАБ
со-ПАВ (13.90 % мас.)	n-бутанол	n-бутанол
органическая фаза (59.29 % мас.)	октан	октан

В случае использования в качестве ПАВ АОТ осаждение наночастиц NiC₂O₄ проводили путем добавления к микроэмульсии, содержащей 1.5 г АОТ в 100 см³ толуола и 5 см³ 0.1 М водного раствора Ni(Ас)₂ по каплям

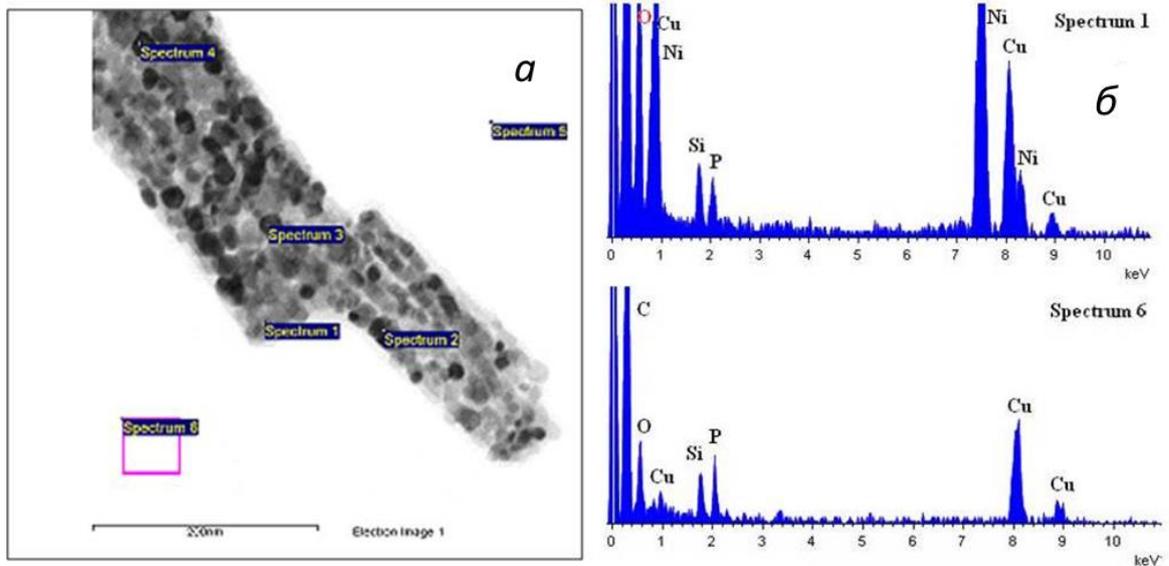
10 см³ 0.1 М раствора оксалата аммония, при интенсивном перемешивании со скоростью 1000 об/мин в течение 1 часа при различных температурных режимах: комнатная температура (~ 22°C), 45 °С или 60 °С.

Затем продукты, полученные с использованием обоих ПАВ охлаждали до комнатной температуры, осаждали путем центрифугирования со скоростью 20000 об/мин. Продукты промывали смесью хлороформа с этанолом с целью очистки от молекул ЦТАБ, а от молекул АОТ последовательно деионизированной водой и этанолом, с последующим центрифугированием для полного осаждения продукта. Очистку проводили 10-12 циклами смены растворителя и центрифугирования. Полученным образцам присвоили шифры в соответствии с таблицей 2.3.

Таблица 2.3 — Шифры образцов наночастиц NiO, полученных при разных условиях синтеза прекурсора

Шифр образца	ПАВ, используемый при синтезе прекурсора	Температурный режим синтеза, °С
NiO - 1	ЦТАБ	~22
NiO - 2	ЦТАБ	45
NiO - 3	ЦТАБ	60
NiO - 4	АОТ	~22
NiO - 5	АОТ	45
NiO - 6	АОТ	60

Результаты дифракционных исследований, энергодисперсионного спектрального и химического образцов НЧ подтвердили природу наночастиц NiO. Пример таких исследований приведен на рисунках 2.4, 2.5 для образцов NiO - 3 и NiO - 4 соответственно.



Номер спектра	Элемент, масс%					
	Cu	C	O	Si	P	Ni
Спектр 1	основа	основа	31.45	3.67	2.73	62.15
Спектр 2	основа	основа	31.12	3.19	3.81	61.88
Спектр 3	основа	основа	30.64	2.57	3.47	63.32
Спектр 4	основа	основа	29.07	3.61	3.11	64.21
Спектр 5	основа	основа	47.59	21.22	31.19	—
Спектр 6	основа	основа	42.64	25.70	31.66	—

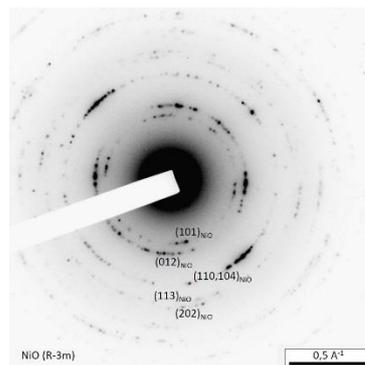


Рисунок 2.4. – Результаты энергодисперсионного спектрального анализа наночастиц NiO - 3: *a* — электронная микрофотография с указанием областей энергодисперсионного спектрального анализа; *б* — энергодисперсионные спектры соответствующих участков; *в* — химический состав исследуемых участков; *г* — электроннограммма NiO - 3

Определение структуры оксида никеля (II) по данным, полученным методом
электронной дифракции

Измеренный диаметр кольца на электронограмме, Å	Индексы Миллера для структуры NiO (<i>R-3m</i>)
2,375	101
2,073	012
1,48	110 104
1,26	113
1,22	202

На всех энергодисперсионных спектрах присутствуют линии кремния (Si) и фосфора (P), что, вероятно, связано с «загрязненностью» этими элементами углеродной аморфной пленки. Присутствие кислорода на свободных от наночастиц NiO участках, скорее всего, свидетельствует об адсорбции атмосферного кислорода на поверхности углеродной пленки.

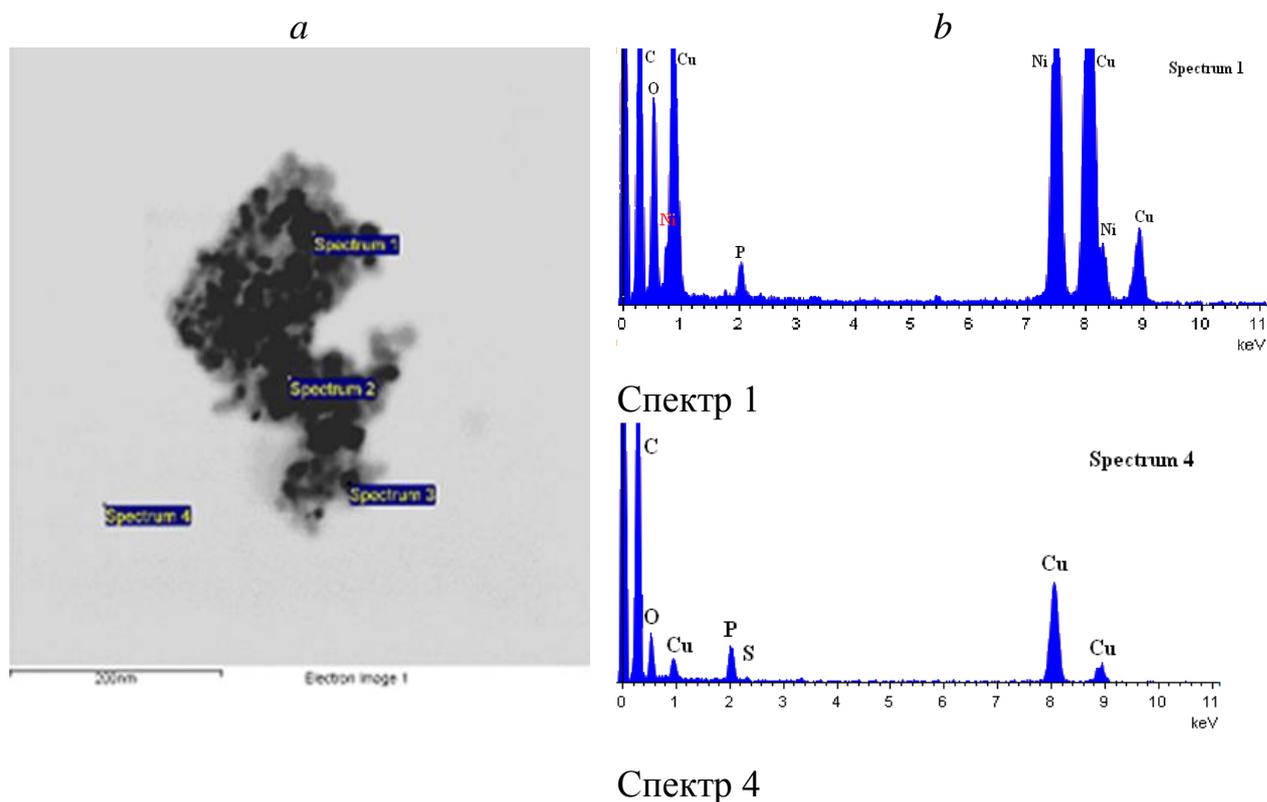


Рисунок. 2.5 – Результаты энергодисперсионного спектрального анализа наночастиц NiO - 4: *a* – электронная микрофотография с указанием областей энергодисперсионного спектрального анализа;
b – энергодисперсионные спектры соответствующих участков;
c – химический состав исследуемых участков.

На рисунке 2.6 представлены результаты ПЭМ синтезированных наночастиц с использованием ЦТАБ в качестве ПАВ. Как видно из рисунка преобладающей фракцией НЧ NiO являются сферические наночастицы диаметром от 12 нм до 24 нм в зависимости от температурного режима синтеза. Кроме того, наблюдали

самосборку наночастиц прекурсора в нанотрубки диаметром порядка 130 нм и длиной от 400 нм до 1 мкм при температуре синтеза 60 °С. Дальнейшее повышение температуры способствовало самосборке образующихся наночастиц в нанотрубки. Увеличение температуры приводило к частичному испарению органической фазы в системе и увеличению в ходе синтеза концентрации ЦТАБ выше критической концентрации мицеллообразования, а также дальнейшей трансформации сферических мицелл в образования пластинчатой или трубчатой формы.

На рисунке 2.7 представлены результаты ПЭМ синтезированных наночастиц с использованием АОТ в качестве ПАВ.

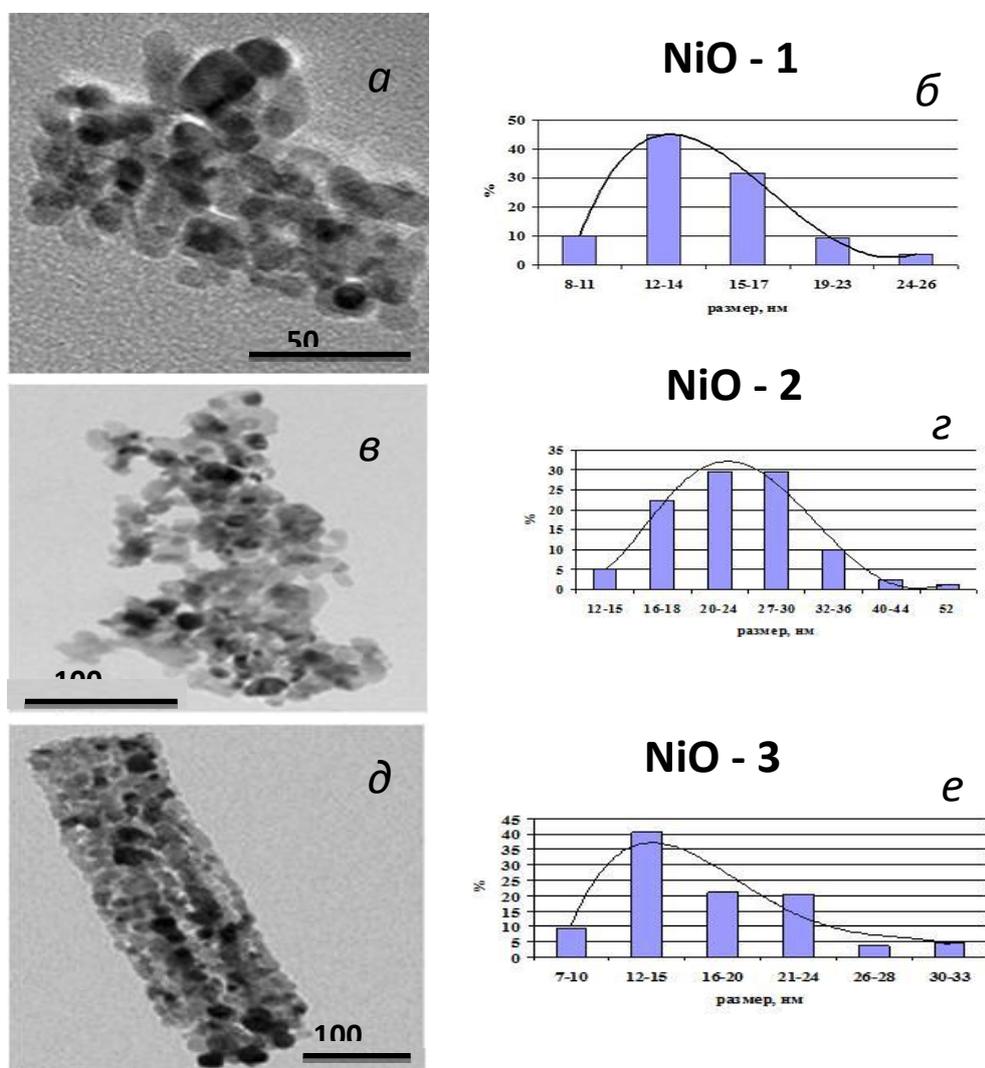


Рисунок 2.6 — Электронные микрофотографии (а, в, д) и гистограммы распределения по размерам (б, г, е) наночастиц NiO (синтез прекурсора осуществляли с использованием ЦТАБ в качестве ПАВ)

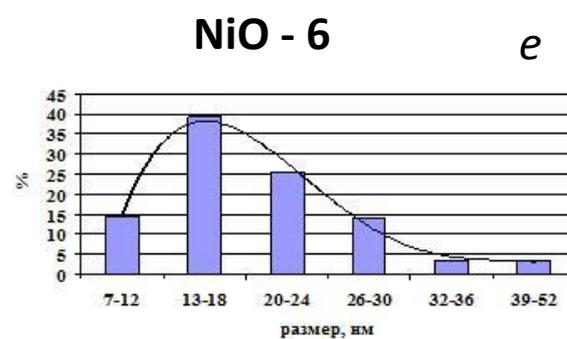
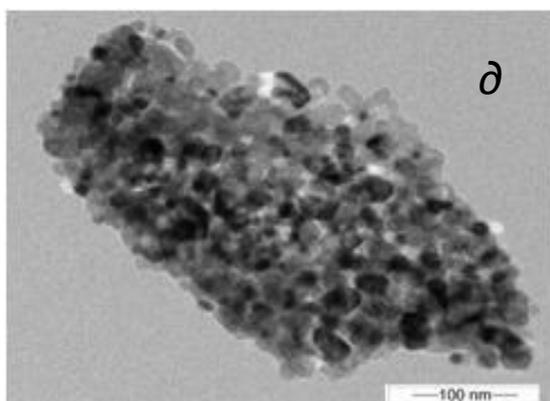
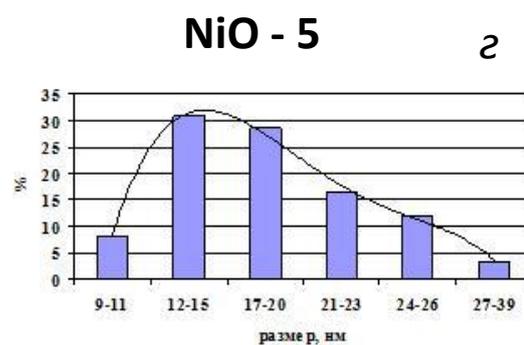
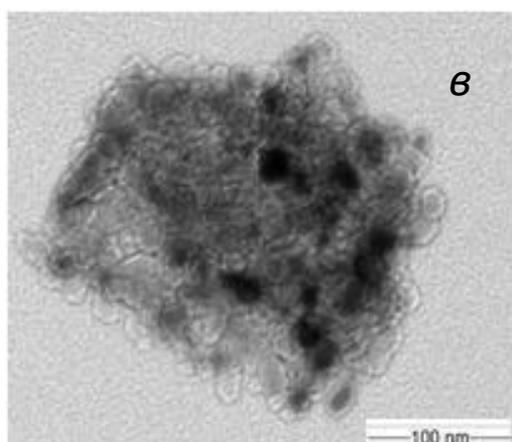
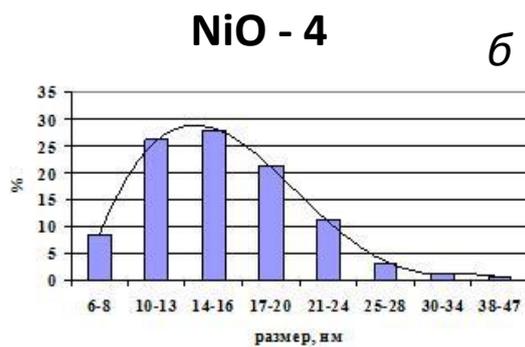
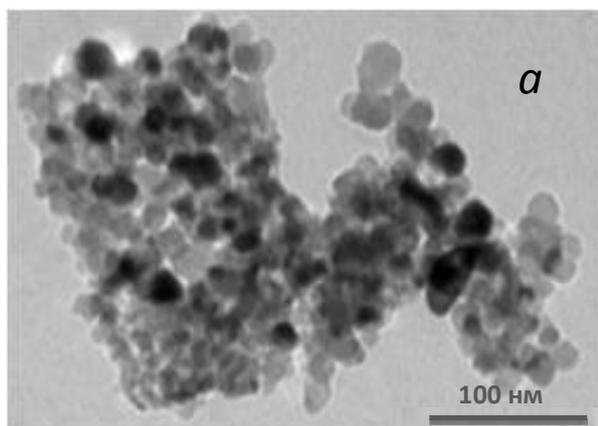


Рисунок 2.7 — Электронные микрофотографии (*а, в, д*) и гистограммы распределения по размерам (*б, г, е*) наночастиц NiO (синтез прекурсора осуществляли с использованием АОТ в качестве ПАВ)

Фазовый состав наночастиц NiO был определен с использованием рентгеновского фазового анализа. На рисунке 2.8 представлен дифракционный спектр образцов NiO - 1 и NiO - 6, а также стандартный спектр NiO (линейный спектр).

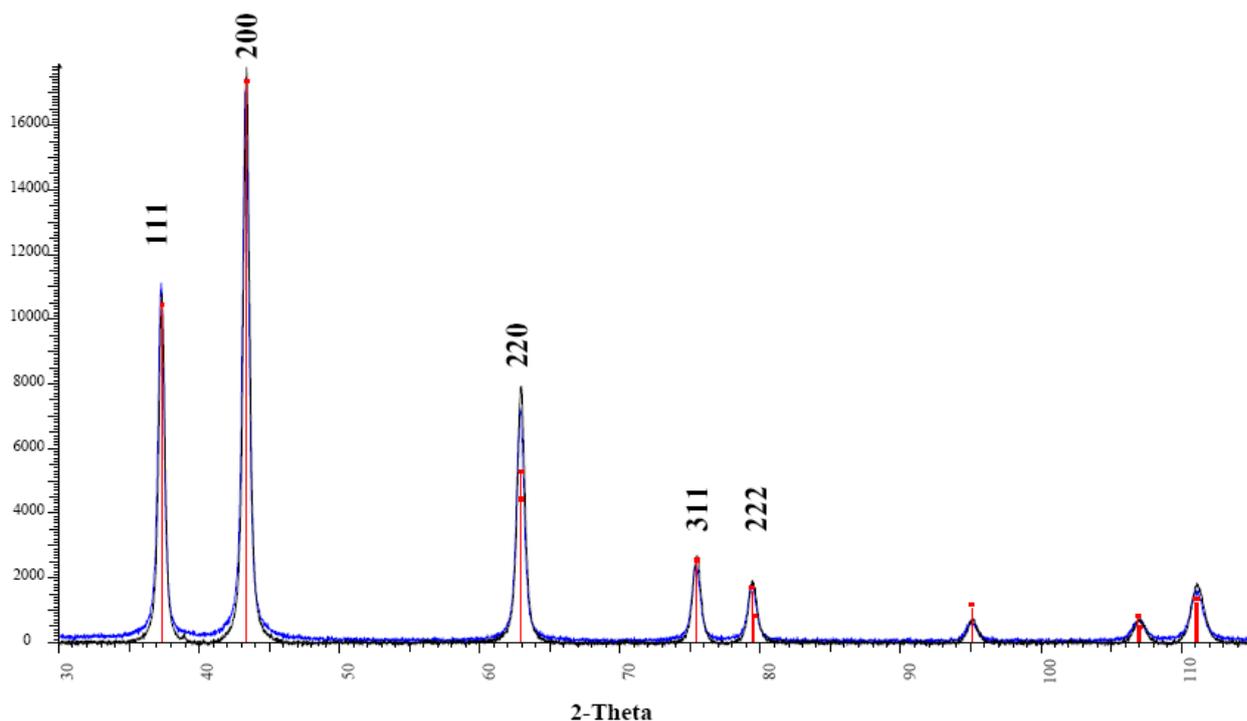


Рисунок 2.8 — Дифракционный спектр синтезированных наночастиц NiO, зарегистрированный в излучении Cu – K α :

- NiO, синтезированные с использованием AOT;
- NiO, синтезированные с использованием ЦТАБ;
- NiO - Rhombo. *H.axes* - *a* 2.95520 - *b* 2.95520 - *c* 7.22750 – alpha 90 - beta 90 - gamma-120 (картотека: pdf2)

Согласно полученным результатам, наночастицы NiO имеют ромбоэдрическую кристаллическую структуру с гексагональной сингонией.

2.3.3. Растровая электронная микроскопия наночастиц NiO, нанесенных на рабочую поверхность ТУЭ

Были получены результаты исследований РЭМ рабочих поверхностей ТУЭ с нанесенными суспензиями всех шести образцов NiO. На рисунке 2.9 приведен пример таких исследований для образца NiO -1.

Образцы НЧ NiO - 2, NiO - 4, NiO - 5 и NiO - 6 агломерировали на поверхности электродов в образования неправильной формы. Образцы НЧ NiO-1 и NiO - 3 в виде микростержней. Наблюдали достаточно широкий разброс для: NiO-1 от 500 нм до 1.5 мкм; NiO - 3 – от 100 нм до 2.1 мкм; NiO - 6 от 110 нм до 900 нм; NiO - 4 до 1800 нм. Образец НЧ NiO - 2 на поверхности электрода представлен агломератами с преобладающими размерами до 500 нм; образец NiO-5, представлен образованиями от 300 до 640 нм

Химический состав исследуемых агломератов NiO на поверхности электродов подтверждали данными энергодисперсионного спектрального анализа.

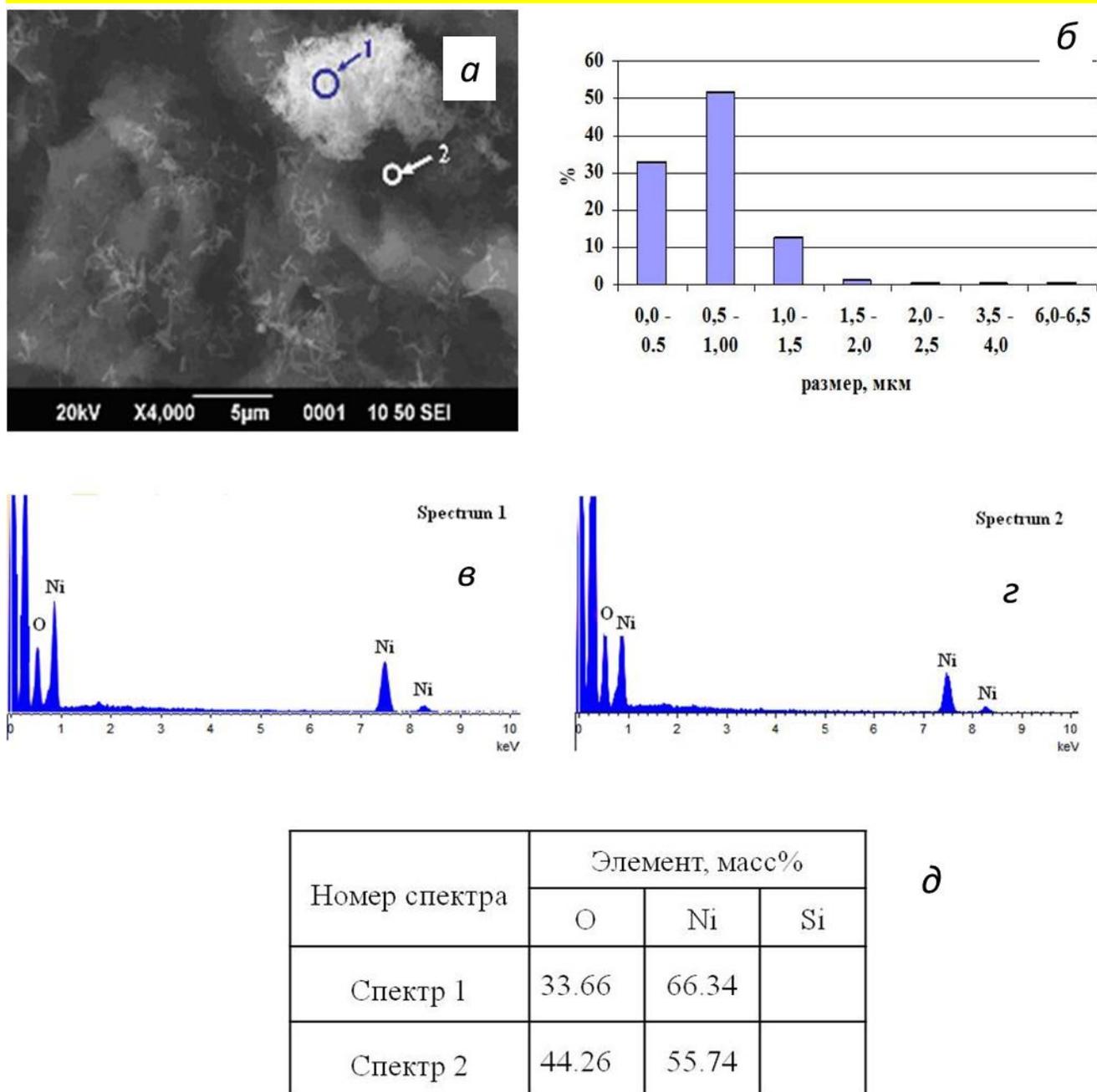


Рисунок 2.9 — Результаты исследований РЭМ и энергодисперсионного анализа рабочей поверхности ТУЭ, модифицированной наночастицами NiO-1:
а — электронная микрофотография с указанием областей энергодисперсионного спектрального анализа; *б* — гистограмма распределения наночастиц по размерам
в, *г* — энергодисперсионные спектры соответствующих участков
д — химический состав исследуемых участков

2.3.4. Синтез различных типов наночастиц золота и серебра термохимическим методом

Тип 1. Синтез НЧ индивидуальных металлов золота (НЧ Au) и серебра (НЧ Ag) проводили по известной методике Френса [314]. Для этого 20 см³ кипящего 0.01 % -ного водного раствора тетрахлораурата калия или кипящего 0.01 % -ного раствора нитрата серебра смешивали с 1 % -ный раствором цитрата натрия, который является стабилизационным агентом и одновременно восстановителем, при постоянном перемешивании. Раствор становился либо желтым (в случае синтеза НЧ серебра), либо рубиново-красным (в случае синтеза НЧ золота). Золь перемешивали еще 20 мин и охлаждали до комнатной температуры. Средний размер наночастиц серебра (20 нм), золота (25 нм) определяли спектрофотометрически с применением известных методик [315 - 318].

Тип 2. Наночастицы типа ядро–оболочка серебро на золоте Ag–AuНЧ и золото на серебре Au–AgНЧ синтезировали, используя в качестве ядер наночастицы НЧ Au или НЧ Ag [318, 319]. Для этого к 20 см³ кипящего золь НЧ Au или НЧ Ag добавляли 20 см³ 0.01 % раствора тетрахлораурата калия или 0.01 % -ного раствора нитрата серебра соответственно, затем добавляли 1 % -ный раствор цитрата натрия в пятикратном избытке по отношению к тетрахлораурату калия или нитрату серебра при постоянном перемешивании, выдерживали при нагревании еще 20 мин и охлаждали до комнатной температуры. Средний размер Ag–AuНЧ и Au–AgНЧ (40 нм) определяли спектрофотометрически с применением известных методик [317].

Тип 3. Наночастицы типа наносплав серебра и золота НЧ (Ag+Au) получали, смешивая растворы тетрахлораурата калия или нитрата серебра в соотношении согласно таблице 2.4, затем добавляли 1 %-ный раствор цитрата натрия в пятикратном избытке по отношению к суммарной концентрации двух металлов [317, 318].

Таблица 2.4 – Состав полученных НЧ и объемы (мл) используемых растворов реагентов

Тип наночастиц	Состав, мол. %		Объем, см ³ (AgNO ₃ 0.01%)	Объем, см ³ (K[AuCl ₄] 0.01%)	Объем, см ³ (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 1%)
	Au	Ag			
1	100	0	0	20	1.3
	0	100	20	0	1.3
2	50	50	20	20	2.6
3	50	50	20	20	2.6

Тип 4. Для синтеза НЧ серебра электрохимическим методом (НЧ эAg) применяли электрохимическую трехэлектродную ячейку, в которую помещали 10 см³ 0.1 М раствора нитрата калия (индифферентный электролит) и 8.5 мг нитрата серебра. На СУЭ накладывали постоянный потенциал 0.30 В (отн. Ag/AgCl) в течение 120 с для электрохимического осаждения наночастиц серебра на поверхности [318, 320].

В таблице 2.4 приведены объемы используемых растворов реагентов для определенных составов наночастиц золота и серебра.

Полученные таким образом различные образцы НЧ благородных металлов наносили на рабочую поверхность электрода в виде суспензий и высушивали на воздухе 20 мин при комнатной температуре.

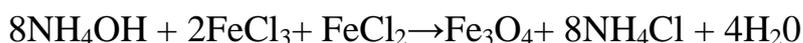
2.3.5. Синтез и электронно-микроскопический анализ наночастиц Fe₃O₄

В последние десятилетия наиболее востребованными являются химические методы синтеза магнитных наночастиц, которые позволяют контролировать размер, форму, состав, структуру, процессы самоорганизации и физические свойства наночастиц, а также получать стабильные монодисперсные образцы.

Альтернативным методом синтеза НЧ Fe₃O₄ (который применяли в дальнейших исследованиях в настоящей работе) микроэмульсионным способом

является метод соосаждения [288, 321 – 324]. Его применение позволяет получать НЧ размером 10 нм, а также в зависимости от условий синтеза частицы размерами от 10 до 100 нм. Кроме того, необходимо отметить достоинства этого метода по сравнению с микроэмульсионными: простота, доступность, экспрессность процесса синтеза, исключение стадии отмывки от побочных продуктов, а также исключение применения дорогостоящих ПАВ. Кроме того, недостаточная изученность химической кинетики в «нанореакторах» делает этот метод менее привлекательными.

При использовании метода соосаждения наночастицы Fe₃O₄ синтезировали путем добавления по каплям 2.7 мл 25 % раствора аммиака (раствор 2) к раствору солей железа (II) и (III) в 50 мл воды (раствор 1) при температуре 30 °С и постоянном интенсивном перемешивании раствора. Реагенты были взяты в стехиометрических соотношениях (таблица 2.5) согласно реакции:

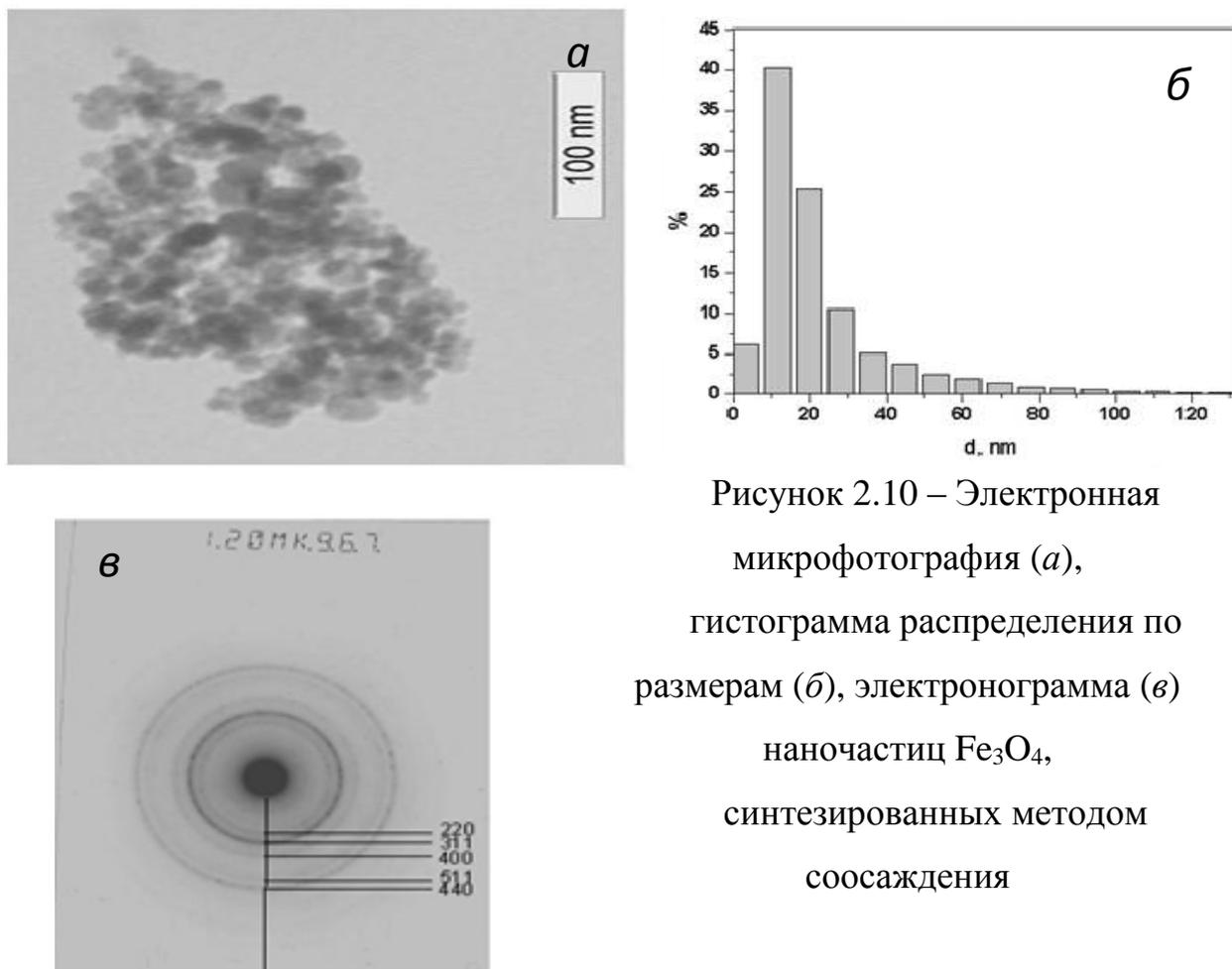


Полученный продукт осаждали с помощью магнитного поля и промывали деионизированной водой, пока pH не достигнет 7.0-7.5.

Таблица 2.5. Состав растворов, используемых для синтеза наночастиц Fe₃O₄

Раствор 1	Раствор 2
FeCl ₂ (2.25 % масс.) FeCl ₃ (4.5 % масс.) водная фаза (93.25 % масс.)	NH ₄ OH (25 % масс.) водная фаза (75 % масс.)

В синтезированном образце наблюдали полидисперсность, однако максимум распределения частиц приходится на величину 10 нм при узком разбросе величин вокруг этого максимума. В номинально 10-нанометровом материале было обнаружено всего 8,9 % частиц диаметром 50 нм или выше (рисунок 2.10).



Определение структуры магнетита по данным, полученным методом электронной дифракции

Измеренный диаметр кольца на электронограмме, Å	Индексы Миллера для структуры Fe_3O_4
2,96	220
2,53	311
2,07	400
1,70	422
1,60	511
1,47	440

Результаты дифракционных исследований и химического состава для всех образцов НЧ подтвердили природу наночастиц Fe_3O_4 . Магнитная восприимчивость синтезированных наноматериалов, определенная методом Фарадея составила $82 \text{ см}^3/\text{г}$ [288].

В связи с тем, что наночастицы Fe_3O_4 в дальнейших исследованиях будут применены в качестве сигналообразующих меток, поэтому получение их стабильных концентрированных водных суспензий являлось важной задачей. Агрегативная устойчивость водного коллоидного раствора наночастиц в течение определенного времени достигается выбором оптимальной концентрации наночастиц [325, 326]. Повышение концентрации наночастиц приводит к потере устойчивости системы за счет коагуляции и последующей седиментации образовавшихся агрегатов [327]. Изучение кинетики процесса агрегации синтезированных нанодисперсных систем Fe_3O_4 проводили с помощью метода визуального наблюдения и метода динамического рассеяния света.

Исследовали суспензии НЧ в интервале исходных концентраций от 5 г/дм^3 до 0.1 г/дм^3 . Выбор относительно устойчивой суспензии производили путем последовательного разбавления суспензии наночастиц 5 г/дм^3 и фиксированием образования агломератов. Методом визуального наблюдения за системой установили, что оптимальным является разбавление до концентрации 0.125 г/дм^3 .

Дальнейшие исследования проводили методом динамического рассеяния света на универсальном анализаторе суспензий Brookhaven ZetaPlus для суспензий с концентрацией НЧ Fe_3O_4 0.125 г/дм^3 в последовательные моменты времени.

Результаты исследования показали, что в изучаемой суспензии наблюдались агломераты (рисунок 2.11).

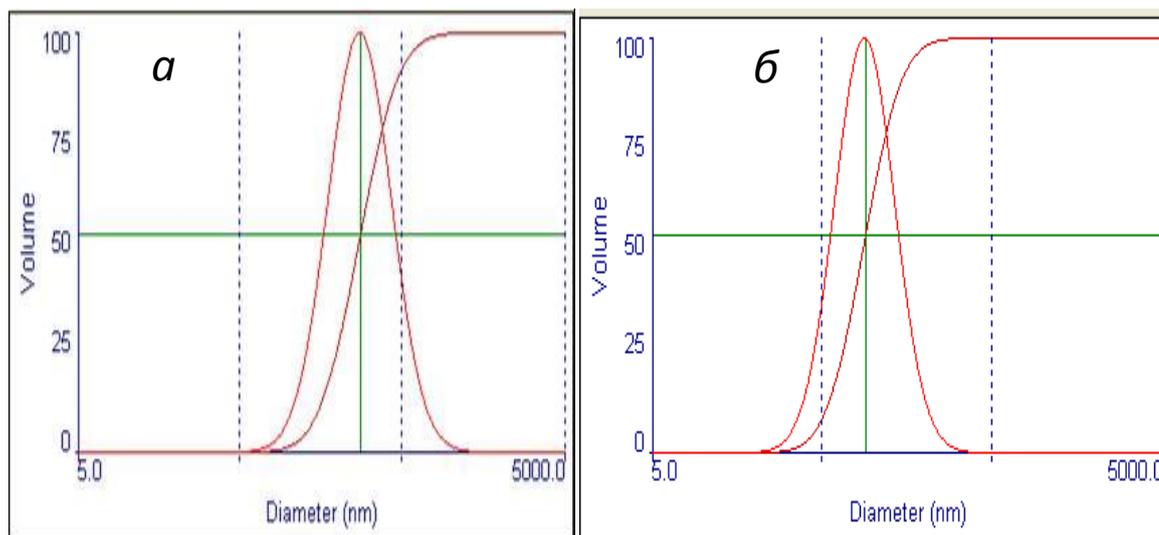


Рисунок 2.11 – Весовое логнормальное распределение частиц в суспензии Fe_3O_4 :

a – исходный образец без обработки,

б – непосредственно после 10 сек УЗ обработки

УЗ обработка эффективно дезагрегирует дисперсную фазу, которая остается стабильной в течение 24 ч после проведенной 10 с УЗ обработки, т.к. регистрируемый средневзвешенный размер частиц (агрегатов) в суспензии не изменяется (рисунок 2.9, таблица 2.6).

Таблица 2.6. Динамика изменения средневзвешенного размера агломератов в суспензии наночастиц магнетита

Момент измерения	Средневзвешенный размер агрегата, нм
Исходный образец без УЗ обработки	380.2
Непосредственно после 10 с УЗ обработки	70.6
Через 1 ч после УЗ обработки	70.2
Через 24 ч после УЗ обработки	70.7

Таким образом, было установлено, что суспензии с концентрацией наночастиц Fe_3O_4 0.125 г/дм^3 устойчивы в течение 24 ч после прекращения УЗ воздействия [288].

2.3.6. Синтез, спектроскопический и электронно – микроскопический анализ различных типов нанокompозитных частиц на основе Fe_3O_4

Нанокompозитные частицы магнетита с поливинилбензилхлоридным покрытием, модифицированным гетероциклическими соединениями (НЧ Fe_3O_4 - ПВБХХ) синтезировали в несколько стадий [130, 328]. Для покрытия поверхности НЧ гидрофобными молекулами, смешивали суспензию НЧ Fe_3O_4 0.5 г наночастиц в 200 см³ деионизированной воды с 3 см³ олеиновой кислоты, затем проводили перемешивание на верхнеприводной мешалке до обесцвечивания водной фазы, после чего отмывали избыток кислоты водой и этанолом с магнитным отделением наночастиц.

На второй стадии НЧ Fe_3O_4 , покрытые олеиновой кислотой, диспергировали в липофильной фазе, а затем смешивали с водной фазой при УЗ воздействии в течение 10 минут. Получены два типа образцов, массовые соотношения НЧ Fe_3O_4 – мономеры (винилбензилхлорид, дивинилбензол): НЧ Fe_3O_4 – 1– 3:10 или НЧ Fe_3O_4 – 2 – 1:10 (таблица 2.7). Проводили инициирование радикальной полимеризации путем добавления 0.015 г $Na_2S_2O_3$ и 0.0238 г $Na_2S_2O_8$ при температуре 80 °С и перемешивании. Непрореагировавшие компоненты удаляли промывкой ацетонитрилом с магнитным отделением.

Таблица 2.7 – Состав фаз

Компонент	Липофильная фаза		Водная фаза	
	Образец 1	Образец 2		
Наночастицы Fe_3O_4 , покрытые олеиновой кислотой	≈ 0.5 г	≈ 0.5 г	Вода	50 см ³
Винилбензилхлорид	1.30 см ³	4.20 см ³	Додецилсульфат натрия	0.1 г
Дивинилбензол	0.13 см ³	0.42 см ³		
Циклогексан	0.20 см ³	0.40 см ³		

На третьей стадии синтеза проводили реакцию кватернизации с модифицирующим агентом хинолином наночастиц, хинальдином или хиноксалином (схема 2.1). Суспензии синтезированных НЧ 0.1 г/3 см³ ацетонитрила смешивали с одним из модифицирующих агентов: хинолином (1 см³); хиноксалином (1 г) или хинальдином (1 см³). Затем кипятили в течение 3 часов.

Образцы синтезированных НК Fe₃O₄ (НК Fe₃O₄ – 1 (*a, б, c*) и НК Fe₃O₄ – 2 (*a, б, c*) отмывали с применением ацетонитрила и магнитной сепарации (напряженность магнитного поля 31.83·10³ А/м) (схема 2.1). Сушку образца осуществляли при комнатной температуре, досушку - в вакууме над Р₂О₅.

Полученные наноконпозиты визуально представляют собой мелкодисперсный порошок коричневого цвета, проявляющий магнитные свойства при наложении поля.

Предварительные электрохимические исследования синтезированных образцов показали, что НК Fe₃O₄ – 1 (*б, c*) и НК Fe₃O₄ – 2 (*б, c*) не проявляют окислительно-восстановительных свойств, поэтому в дальнейших экспериментах применяли только НК Fe₃O₄ – 1*a* и НК Fe₃O₄ – 2*a*.

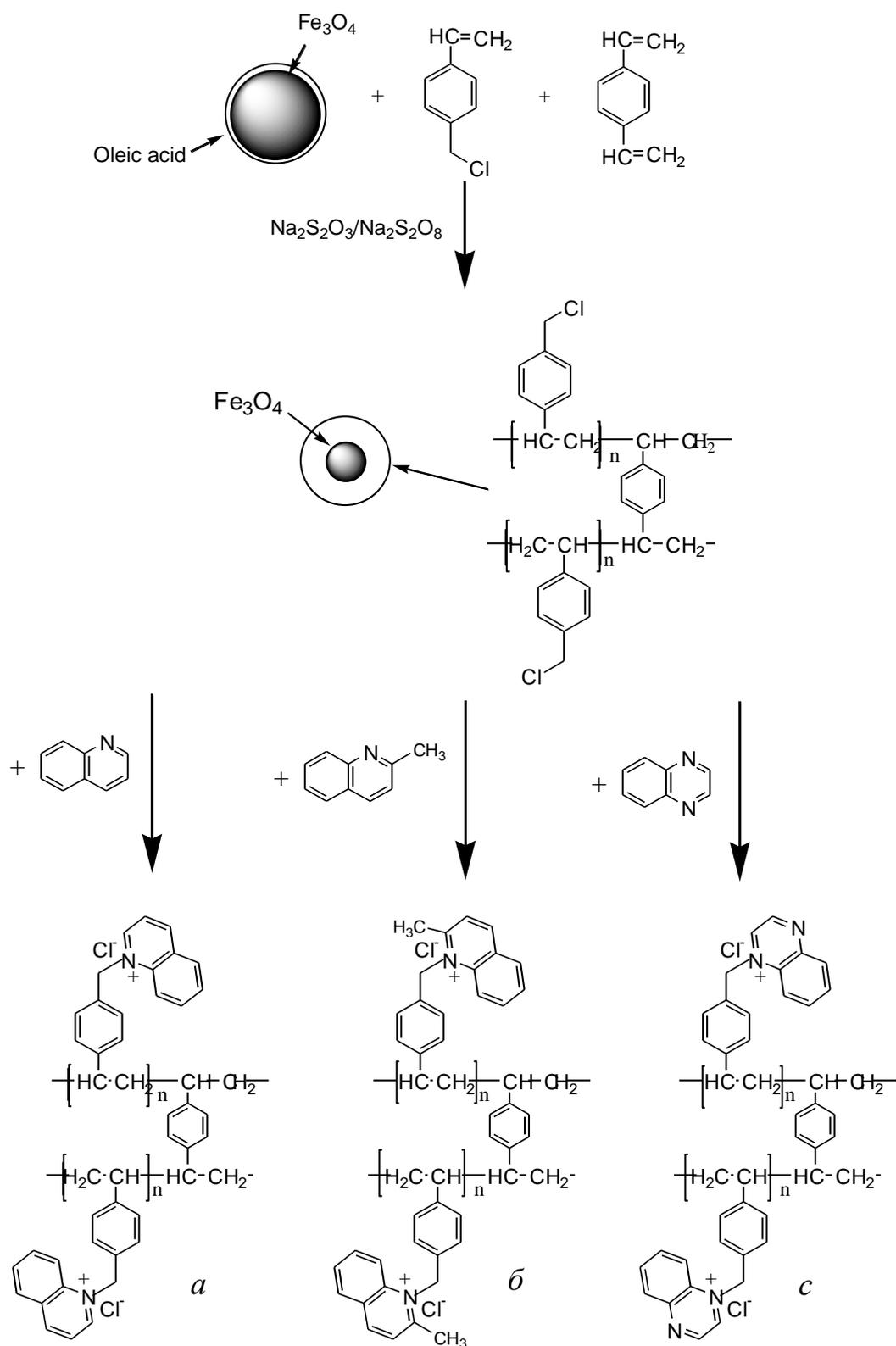


Схема 2.1 – Синтез НК магнетита, функционализированного электрохимически активными покрытиями

Спектроскопические исследования (ИК – спектроскопия) подтвердили наличие химической связи олеиновой кислоты с Fe_3O_4 , а также наличие

характеристических полос, для всех синтезированных образцов НК Fe_3O_4 с хинолином. На рисунке 2.12 приведен пример спектра образца $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2a$, на котором выделены следующие характеристические полосы: $2920,1 \text{ см}^{-1}$ – валентные колебания $\text{Csp}^3\text{-H}$; $1444,2 - 1605 \text{ см}^{-1}$ – валентные колебания $\text{C}=\text{C}$ связей бензольного кольца; $1130,2 \text{ см}^{-1}$ – валентные колебания $-\text{C}-\text{O}-$ группы, что подтверждает химическую связь олеиновой кислоты с Fe_3O_4 ; $554,7 \text{ см}^{-1}$ – полоса поглощения магнетита, перекрывается с полосой валентных колебаний $-\text{C}-\text{Cl}$; 571 см^{-1} – полоса поглощения Fe_3O_4 [130, 329].

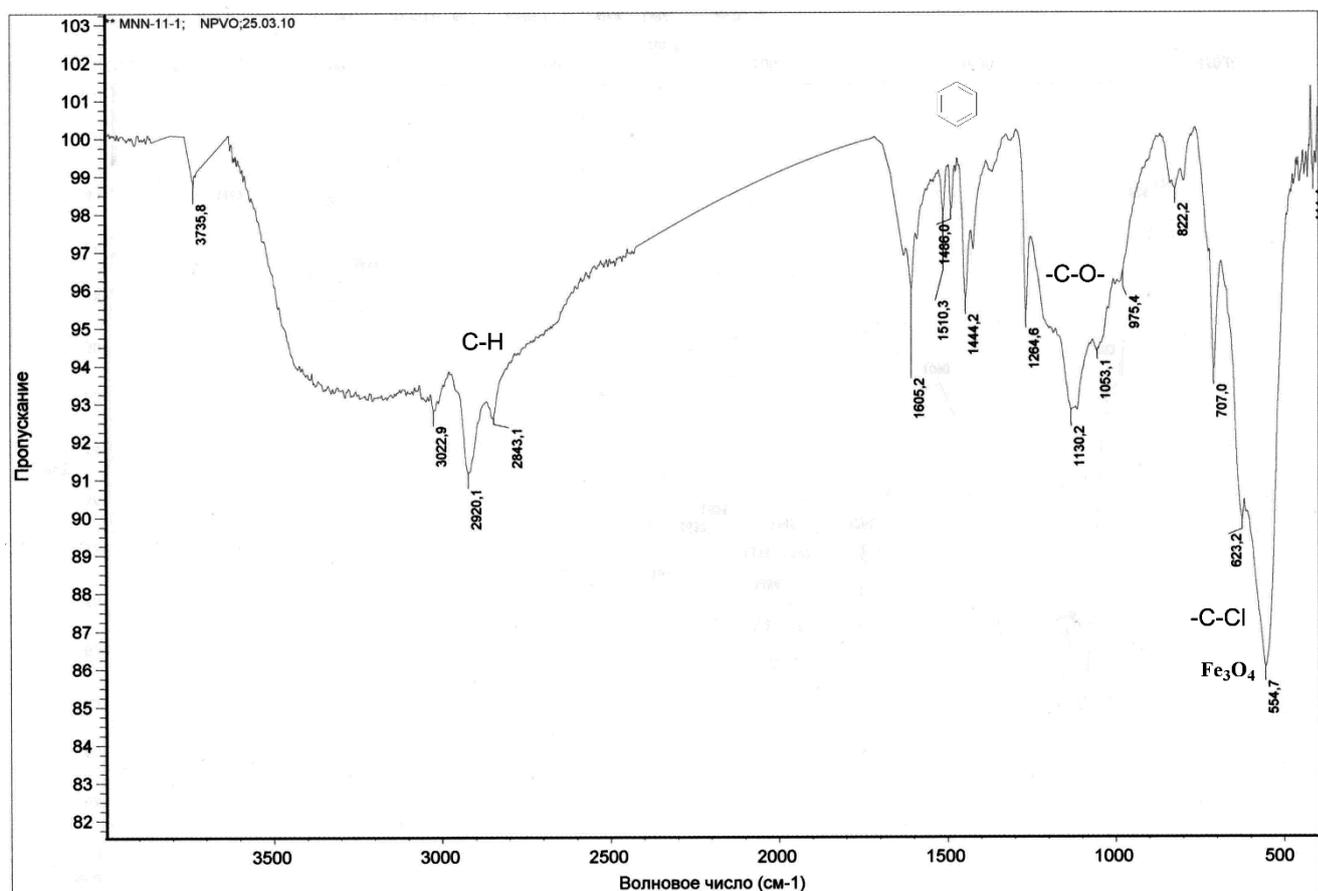


Рисунок 2.12 – ИК – спектр НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2a$

Для НК обоих типов были получены микрофотографии (рисунок 2. 13).

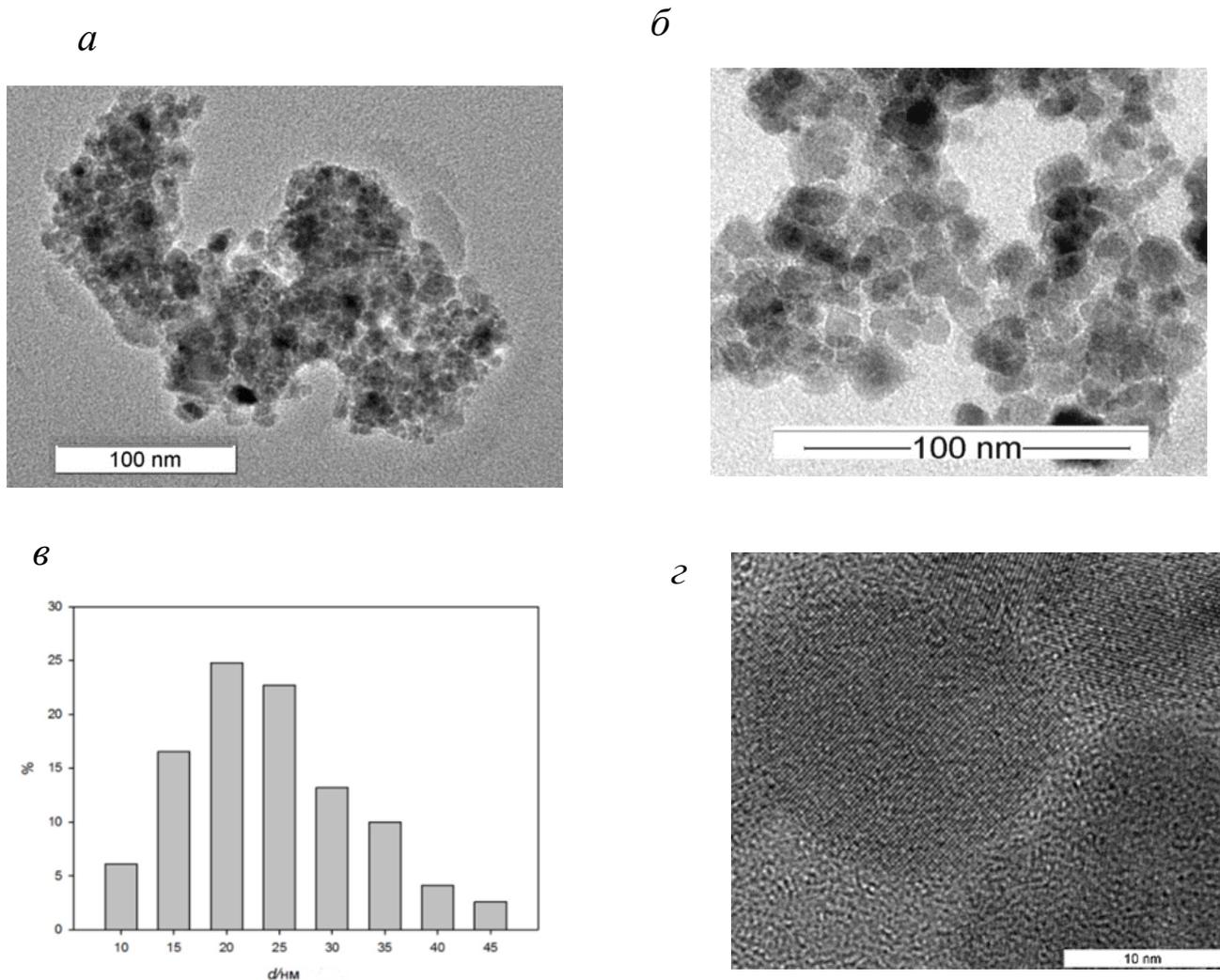


Рисунок 2.13 – Электронные микрофотографии НК Fe_3O_4 на основе поливинилбензилхлорида и хинолина: *a* – НК Fe_3O_4-1a ; *б* – НК Fe_3O_4-2a ; *в* – гистограмма распределения по размерам образца НК Fe_3O_4-2a ; *г* – электроннограмма образца НК Fe_3O_4-1a

Как видно из рисунка НК обоих выбранных типов представляют собой сферические образования. Методом электронной дифракции подтвердили наличие кристаллической решетки (темные области на микрофотографиях – наночастицы магнетита). Светлые области на микрофотографиях - полимерное покрытие, которое при увеличении не дает характерной картины кристаллической решетки. Средний размер НК Fe_3O_4-1a составлял около 20 – 40 нм с неравномерным

покрытием толщиной от 5 до 20 нм. Причиной получения такого неравномерного покрытия, послужило, вероятно, недостаточное количество мономера.

Средний размер НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2a$ составлял около 20 нм при узком разбросе величин вокруг этого максимума (рисунок 2.11) с равномерным покрытием толщиной от 7 до 10 нм. Методом электронной дифракции также подтвердили наличие магнетита (темные области) и полимерного покрытия (светлые области).

Таким образом, на основании всех полученных результатов исследования был выбран НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2a$, который применяли в дальнейших экспериментах.

Для получения НК Fe_3O_4 с полипиррольным покрытием смешивали суспензию НК Fe_3O_4 в воде с пирролом (соотношения компонентов представлены в таблице 2.8) и водным раствором FeCl_3 , взятым в эквимольном соотношении с пирролом. Реакцию проводили при постоянном диспергировании в УЗ поле (схема 2.2) [130, 330].

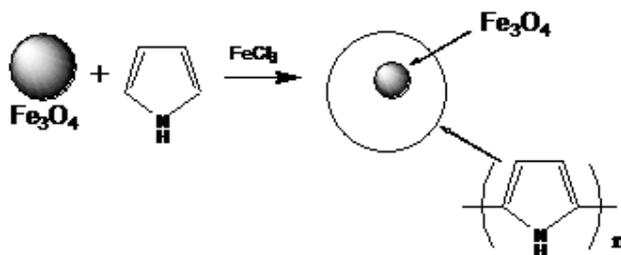


Схема 2.2 – Реакция модифицирования поверхности наночастиц Fe_3O_4 полипирролом

Синтез проводили, варьируя соотношение НК (Fe_3O_4)/мономер (таблица 2.8) и НК (Fe_3O_4)/вода (дисперсионная среда) (таблица 2.9).

Таблица 2.8 – Соотношения исходных компонентов для образцов НЧ (Fe_3O_4) – полипиррол (объем дисперсионной среды 50 мл)

№ образца	m ($\text{НЧ Fe}_3\text{O}_4$), г / m (пиррола), г
НК Fe_3O_4 -3	0.1:0.05
НК Fe_3O_4 -4	0.1:0.07
НК Fe_3O_4 -5	0.1:0.1
НК Fe_3O_4 -6	0.1:0.125

На втором этапе изменяли объем дисперсионной среды (количество воды, в которой проходит реакция) для выбранного соотношения НЧ (Fe_3O_4)/мономер 1:1.

Таблица 2.9. – Объемы дисперсионной среды в реакции получения нанокompозитов НЧ (Fe_3O_4) – полипиррол

№ образца	m ($\text{НЧ (Fe}_3\text{O}_4$)), г: m дисперсионной среды, г
НК Fe_3O_4 – 7	1:125
НК Fe_3O_4 – 8	1:250
НК Fe_3O_4 – 9	1:500

Образцы синтезированных НК Fe_3O_4 отмывали с применением воды и этанола, и магнитной сепарации (напряженность магнитного поля $31.83 \cdot 10^3$ А/м). Сушку образца осуществляли при комнатной температуре, досушку - в вакууме над P_2O_5 .

Спектроскопические исследования (ИК спектроскопия) подтвердили наличие характеристических полос, для всех синтезированных полипиррольных образцов НК Fe_3O_4 . На рисунке 2.14 приведен пример спектра образца Fe_3O_4 – 3, на котором выделены следующие характеристические полосы: 3389 см^{-1} – валентные колебания связи NH; 1574 см^{-1} – скелетные колебания пятичленного цикла; 1309 – 1218 см^{-1} – валентные колебания связей $\text{C} = \text{C}$; 571 см^{-1} – полоса поглощения Fe_3O_4 [130, 329].

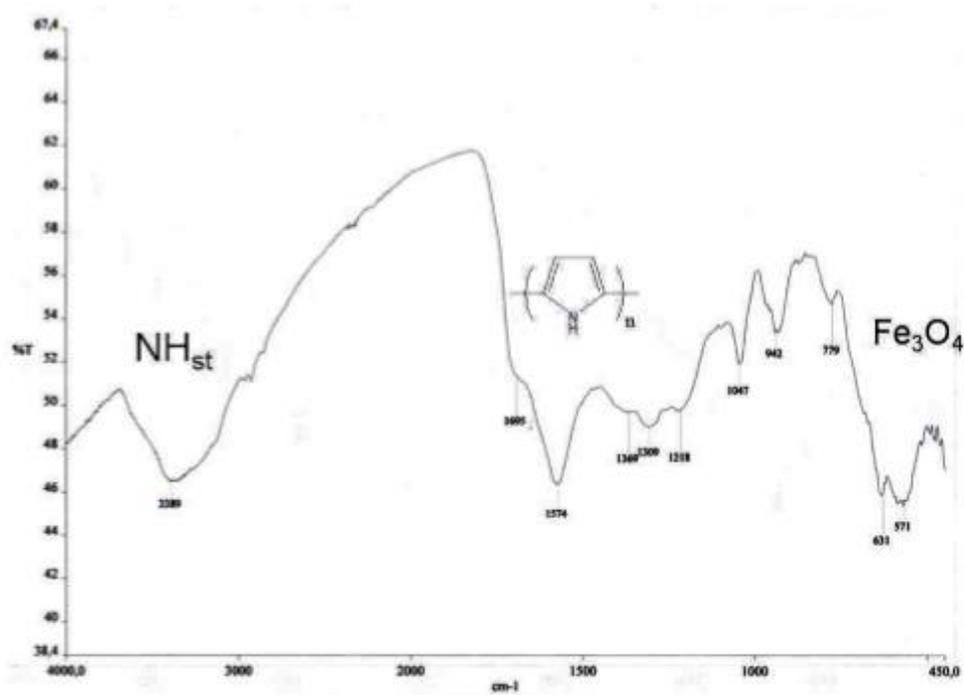


Рисунок 2.14 – ИК – спектр НК Fe₃O₄ – 3

Для полипиррольных образцов НК Fe₃O₄ – 3, 4, 5, 6 были получены микрофотографии (рисунок 2.15).

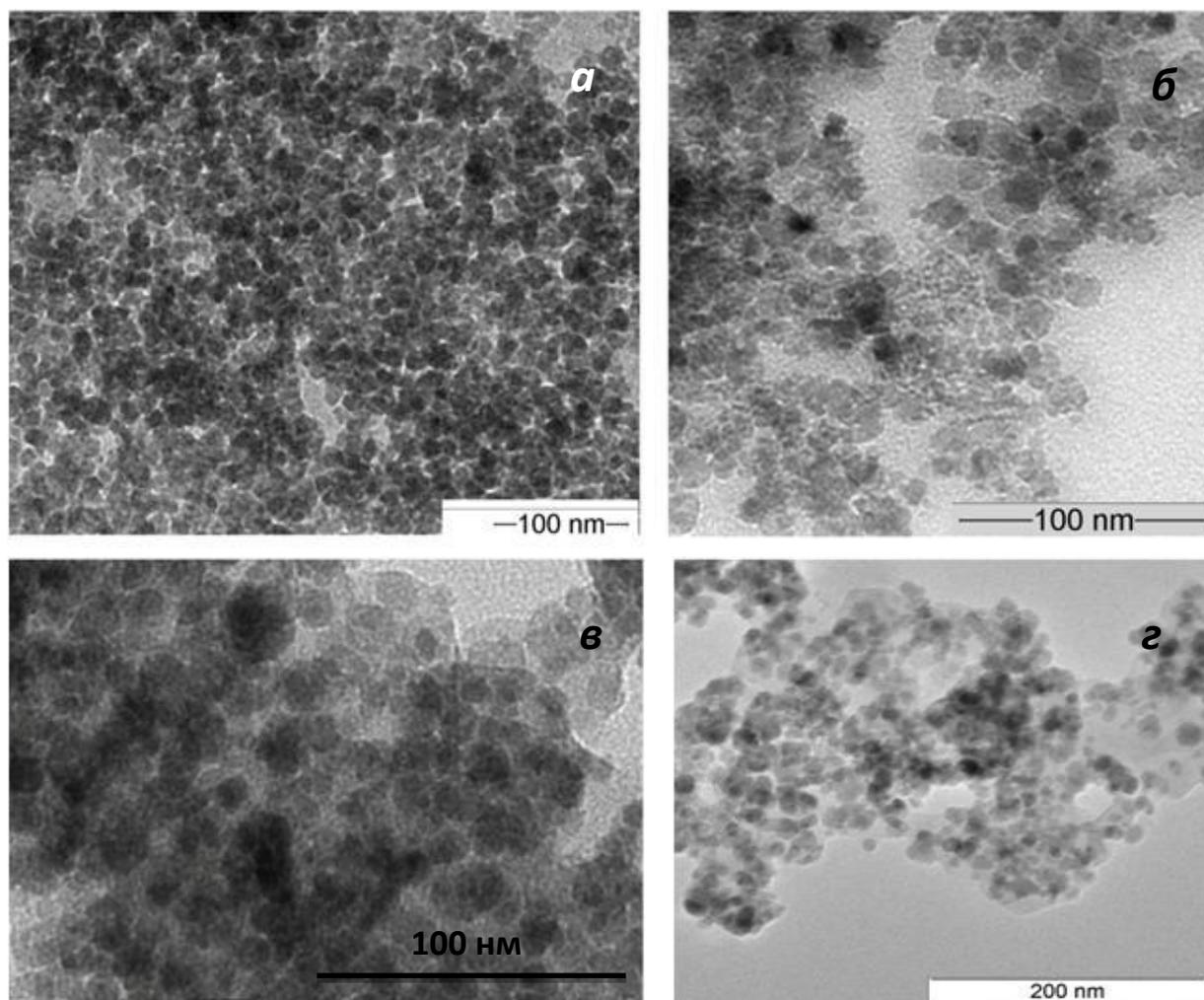


Рисунок 2.15 – Электронные микрофотографии НК Fe_3O_4 на основе полипиррола: *a* – НК Fe_3O_4 – 3; *б* – НК Fe_3O_4 – 4; *в* – НК Fe_3O_4 – 5; *г* – НК Fe_3O_4 – 6

Как видно из рисунка НК всех четырех типов представляют собой сферические образования. Методом электронной дифракции подтвердили наличие кристаллической решетки (темные области на микрофотографиях – наночастицы магнетита). Светлые области на микрофотографиях (однако, не для всех образцов) – полимерное покрытие, при увеличении не наблюдали характерной картины кристаллической решетки. Средний размер НК Fe_3O_4 составлял около 20 – 40 нм с неравномерным покрытием толщиной от 5 до 20 нм.

Средний размер НК Fe_3O_4 – 3 составлял порядка 7 – 10 нм, однако не обнаруживали характерного светлого «гало» (рисунок 2.15, *a*). Вероятно, это свидетельствует об отсутствии полипиррольного покрытия на НЧ магнетита.

Следовательно, массовое соотношение $m(\text{НЧ Fe}_3\text{O}_4)/m(\text{пиррола})$ 2:1 не позволяет получить магнитные наноконпозиционные частицы.

На НК Fe_3O_4 –4 наблюдали светлую оболочку, характеризующее покрытие, однако толщина слоя не равномерна от 2 до 10 нм, средний размер всей НК частицы составлял 15 – 20 нм (рисунок 2.15, б).

Для НК Fe_3O_4 –5 средний размер составил 30 – 40 нм, полимерный слой наиболее равномерный, размером от 10 до 15 нм (рисунок 2.15, в).

Средний размер НК Fe_3O_4 – 6 больший, чем для предыдущих образцов – от 50 до 70 нм, кроме того, видно, что в процессе полимеризации происходило агрегирование НЧ магнетита (рисунок 2.14, з).

Для полипиррольных образцов НК Fe_3O_4 –7, 8, 9 также были получены электронные микрофотографии (рисунок 2.16).

НК Fe_3O_4 –7 представляет собой частицы со средним размером около 20 нм сильно агрегированные (рисунок 2.16, а).

На микрофотографии НК Fe_3O_4 – 8 наблюдали агрегаты частиц размером от 150 до 180 нм, с толщиной полимерного слоя от 60 до 80 нм (рисунок 2.16, б). Максимум распределения для этого образца составлял 180 нм (рисунок 2.16 – з).

Особенностью НК Fe_3O_4 –9 являлось отсутствие светлого «гало», характерного для полимерного покрытия, средний размер этих частиц составлял 10 – 20 нм. Вероятно, исследуемое разбавление смеси было чрезмерным, таким образом в процессе синтеза покрытия полимером не происходило (рисунок 2.16, в).

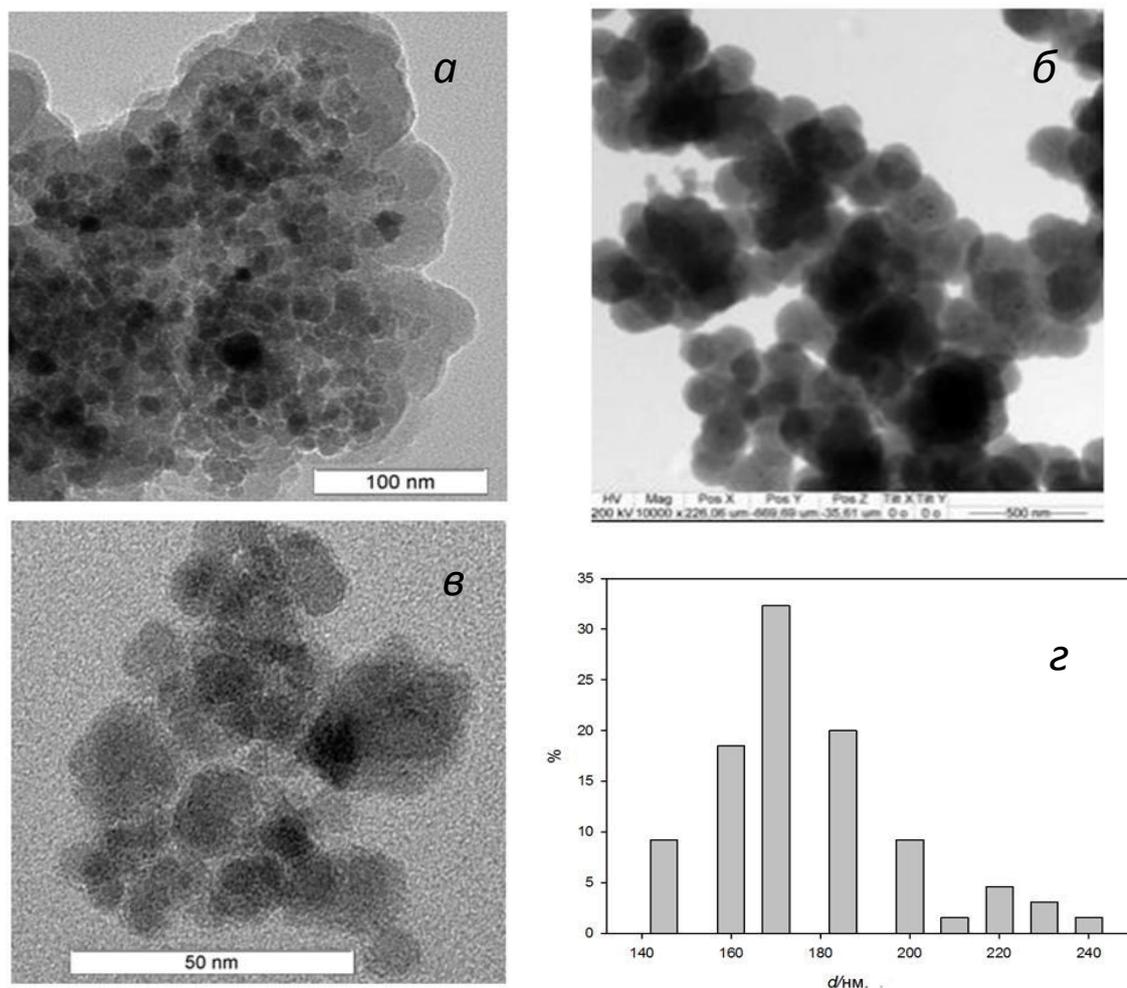


Рисунок 2.16 – Электронные микрофотографии полипиррольных НК Fe₃O₄:

a – НК Fe₃O₄-7; *б* – НК Fe₃O₄-8; *в* – НК Fe₃O₄-9;

z – гистограмма распределения по размерам образца НК Fe₃O₄-8

Нанокompозитные частицы на основе Fe₃O₄ с ферроценмодифицированной оксидкремневой оболочкой (Fe₃O₄ – ФЦSiO₂) синтезировали с применением метода Штобера также в несколько этапов [130, 331]. На первом этапе смешивали 0.5 г наночастиц магнетита в 80 см³ 95 % этанола с 0.5 см³ тетраэтоксисилана и 1 см³ 25 % раствора NH₄OH. Проводили кипячение смеси в течение 10 часов. Очистку смеси проводили этанолом, затем толуолом для отделения непрореагировавшего тетраэтоксисилана и магнитной сепарацией

На втором этапе получали (3-ферроцениламид)пропил)триэтоксисилан с использованием известной методики [332], в основе которой лежит реакция

амидирования хлорангидрида ферроценкарбоновой кислоты различными аминами. Смешивали при 0 °С суспензию ферроценкарбоновой кислоты (1.0 мМ) в 10 см³ сухого CH₂Cl₂ при 0 °С в атмосфере аргона с раствором оксалилхлорида (1.5 мМ), содержащего ДМФА (0.2 мМ), в 5 см³ сухого CH₂Cl₂. Проводили упаривание растворителя досуха. Полученный раствор ферроценоилхлорида в 25 см³ сухого CH₂Cl₂ по каплям приливали к смеси аминопропилтриэтоксисилана (1.3 мМ) и триэтиламина (2 мМ) в 10 см³ сухого CH₂Cl₂ при 0 °С. Суспензию перемешивали, затем концентрировали в вакууме. Проводили упаривание растворителя досуха. Полученный остаток подвергали колоночной хроматографии на SiO₂. Продукт реакции (желтые кристаллы) по результатам спектров ЯМР ¹H, ¹³C, элементного анализа являлся (3-(ферроцениламид)пропил)триэтоксисиланом. Полученные результаты совпадали с опубликованными [130, 333].

На третьем этапе для взаимодействия ферроцена с полученным НЧ магнетита, покрытых оксидом кремния, суспензию 0.1 г последних в толуоле смешивали с 0.03 г 3-(ферроцениламид)пропил)триэтоксисилана при температуре кипения толуола и перемешивании в течение 12 часов (схема 2.3).

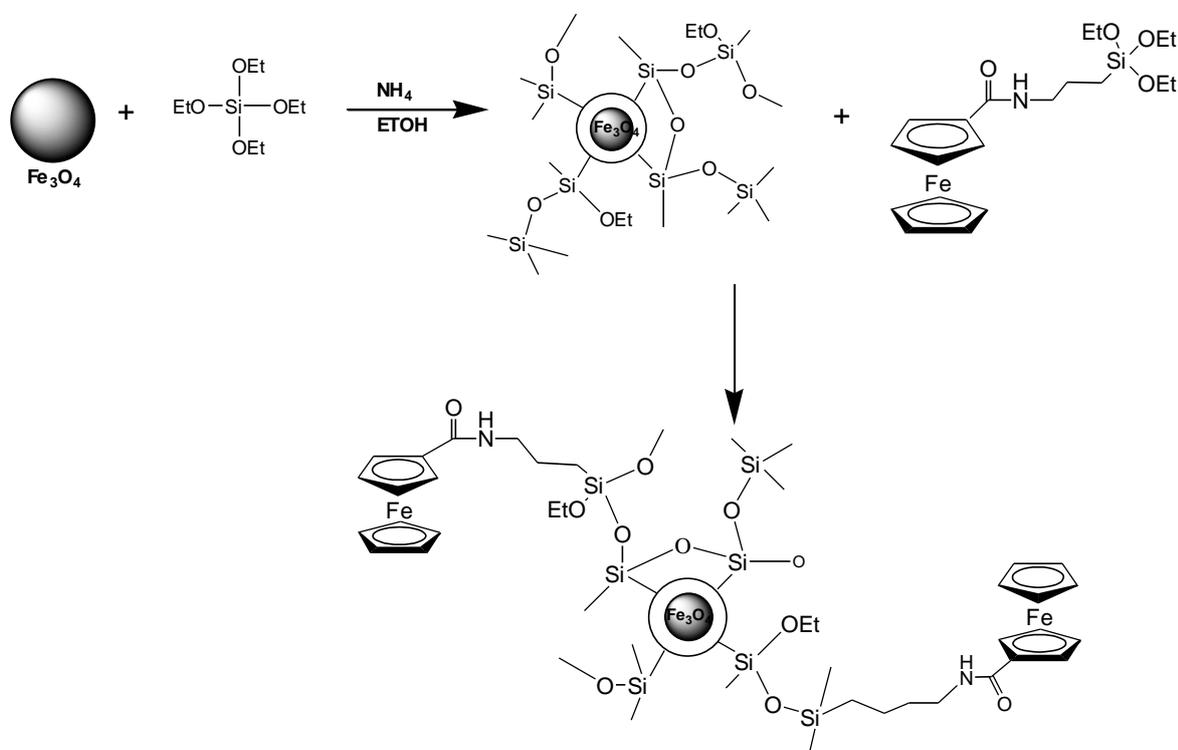


Схема 2.3 – Процесс модифицирования поверхности наночастиц Fe₃O₄ ферроценом

Синтезированный образец НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 10$ отмывали с применением толуола и магнитной сепарации (напряженность магнитного поля $31.83 \cdot 10^3$ А/м). Сушку образца осуществляли в сушильном шкафу при температуре 70°C .

Полученный НК – порошок кирпично-коричневого цвета с магнитными свойствами при наложении поля.

Спектроскопические исследования (ИК спектроскопия) подтвердили наличие характеристических полос, для всех синтезированных образцов НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 10$. На рисунке 2.17 приведен пример спектра образца $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 10$, на котором выделены следующие характеристические полосы: 3423 cm^{-1} (Si – OH), 1617 cm^{-1} (=NH), $1066 - 1119 \text{ cm}^{-1}$ (Si – O – C) и циклопентадиенильное кольца молекулы ферроцена, 578 cm^{-1} – полоса поглощения Fe_3O_4 [130, 329].

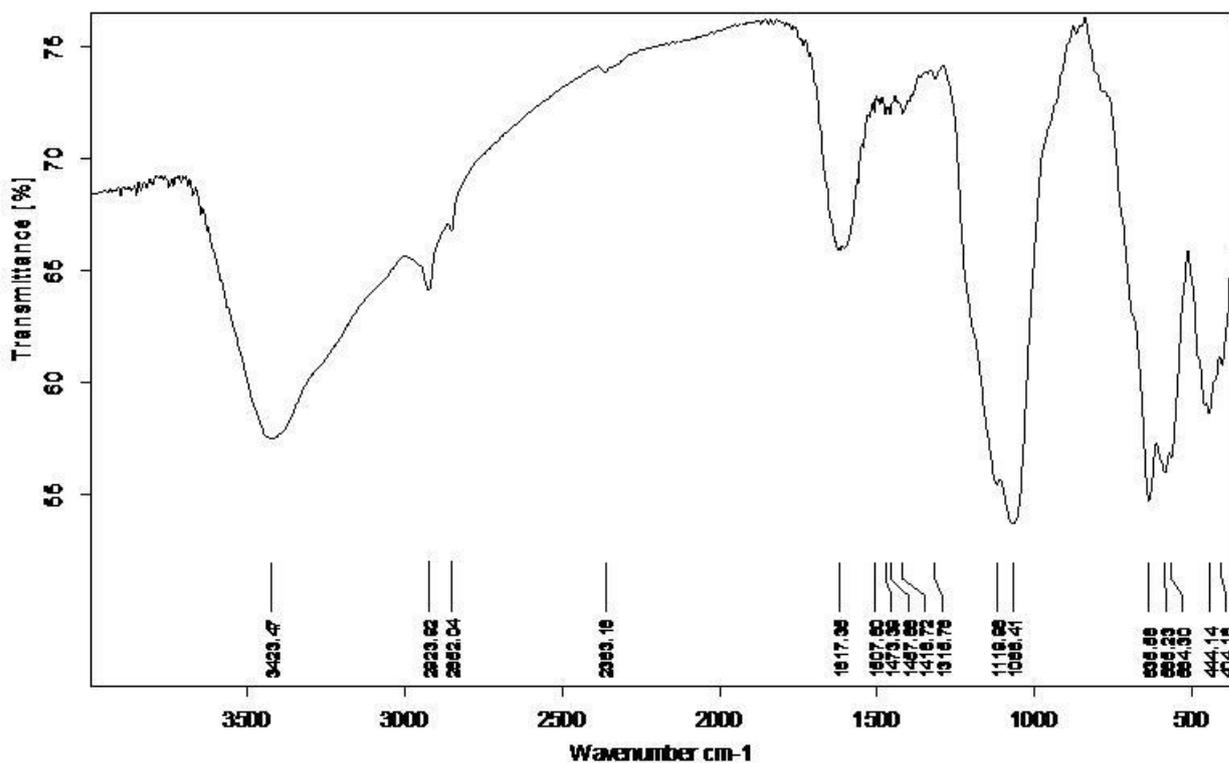


Рисунок 2.17 – ИК – спектр НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 10$

Для образца НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 10$ получены электронные микрофотографии и гистограмма распределения по размерам (рисунок 2.16).

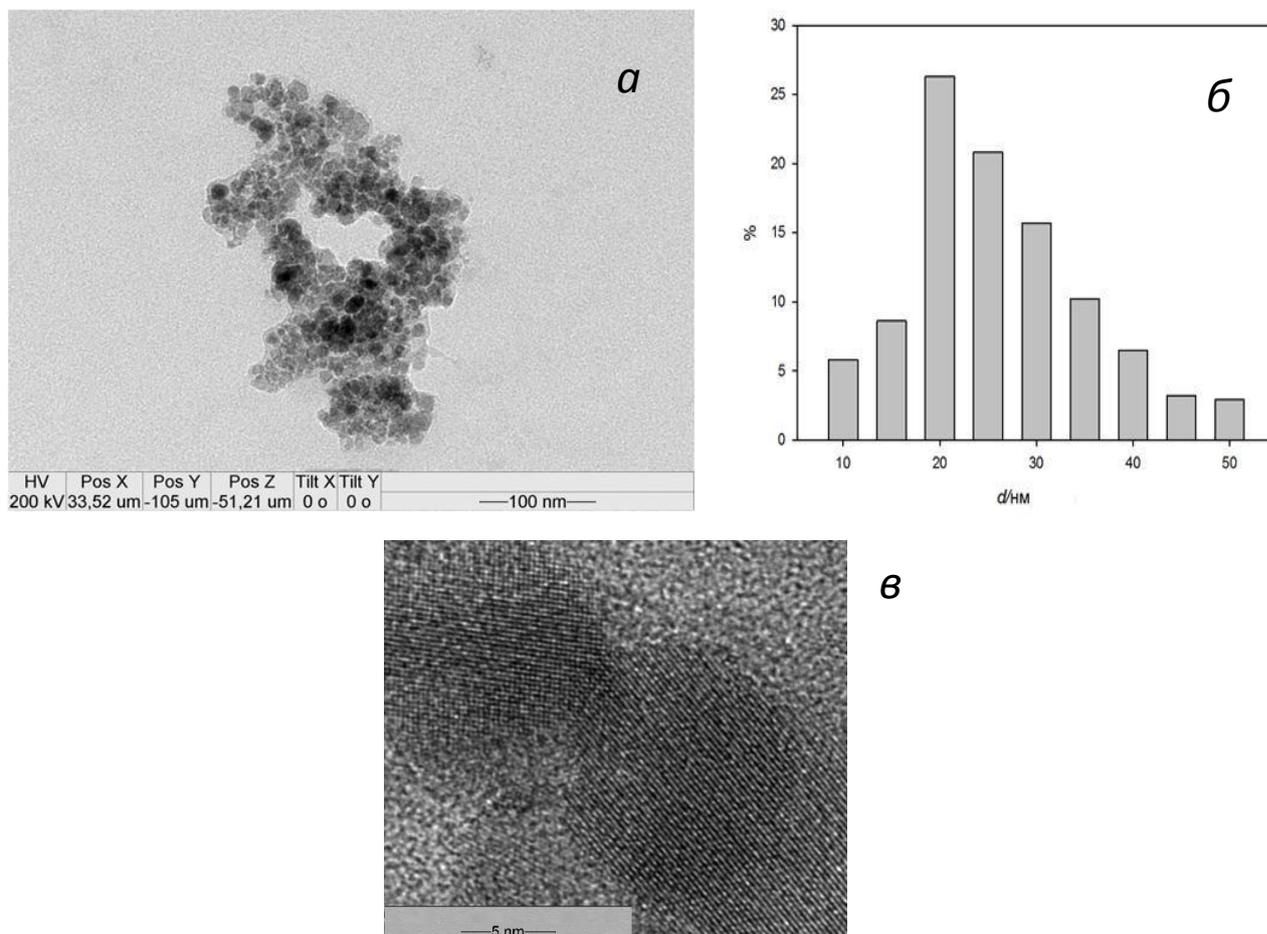


Рисунок 2.18 – Электронные микрофотография (а); гистограмма распределения по размерам (б) и электроннограмма (в) НК Fe_3O_4-10

Как видно из рисунка НК Fe_3O_4-10 представляет собой сферические частицы размером от 15 до 25 нм. Максимум распределения этих частиц соответствовал 20 нм при узком разбросе величин вокруг этого максимума (рисунок 2.18, б). Наблюдали темное ядро (методом электронной дифракции подтверждено наличие кристаллической структуры, характерной для магнетита) и светлую полимерную оболочку, толщиной около 5 нм.

В связи с тем, что нанокompозитные частицы на основе магнетита и электрохимически активных покрытий будут использованы в дальнейших экспериментах в качестве сигналообразующих меток (аналогично НЧ «голового», магнетита), то в этой части исследований проводили изучение агрегативной устойчивости синтезированных образцов. Покрытые наночастицы должны быть термодинамически более устойчивыми по сравнению с не покрытыми частицами.

Изучение кинетики процесса агрегации синтезированных НК Fe_3O_4 проводили с помощью метода визуального наблюдения и метода динамического рассеяния света. Во всех экспериментах предварительно проводили УЗ обработку суспензий в течение 1 минуты.

Для визуальных исследований готовили суспензии НК в воде последовательным разбавлением 5 г/дм^3 до 0.05 г/дм^3 . Установили, что для всех типов НК оптимальным является разбавление до концентрации 0.25 г/дм^3 .

Суспензии НК с выбранной концентрацией (0.25 г/дм^3) применяли для дальнейших исследований методом динамического светорассеяния на универсальном анализаторе суспензий Brookhaven ZetaPlus. Результаты измерений приведены в таблице 2.10.

Как видно из таблицы, суспензии НК частиц в концентрации $0,25 \text{ г/дм}^3$ устойчивы в течение 12 часов после УЗ обработки.

Таблица 2.10 – Динамика изменения средневзвешенного размера агрегатов в суспензиях нанокompозитных частиц ($C_{\text{НК}} = 0.25 \text{ г/дм}^3$).

Момент измерения	Средневзвешенный размер агрегата, нм		
	Fe_3O_4 -ПП	Fe_3O_4 -ХПВБХ	Fe_3O_4 -ФЦSiO ₂
Исходный образец (без УЗ обработки)	500	102.8	106.3
10 сек после УЗ обработки	320.5	40.6	55.2
5 мин после УЗ обработки	350.7	42.5	56.7
30 мин после УЗ обработки	365.2	41.7	54.3
1 час после УЗ обработки	355.2	41.5	55.6
12 часов после УЗ обработки	357.4	44.0	57.4

Наночастицы Fe_3O_4 , модифицированные хитозаном, синтезировали по известной методике [310, 334]. Для этого к суспензии НЧ магнетита добавляли в 0.0001 М раствор хитозана в 1 % уксусной кислоте и перемешивали в течение 6 часов. Очистку полученных НК проводили с применением магнитного поля (напряженность магнитного поля $31.83 \cdot 10^3$ А/м).

Наночастицы Fe_3O_4 , модифицированные 3-аминопропилтриэтоксисиланом (НК Fe_3O_4 – АПЭС) и хитозаном синтезировали по известной методике [310, 335]. Для этого к суспензии НЧ магнетита при постоянном перемешивании по каплям приливали 3-аминопропилтриэтоксисилан. Перемешивание не останавливали в течение 6 часов. Очистку полученных НК проводили с применением магнитного поля (напряженность магнитного поля $31.83 \cdot 10^3$ А/м).

Спектроскопические исследования (ИК – спектроскопия) подтвердили наличие характеристических полос, для всех синтезированных образцов НК Fe_3O_4 . Рисунок 2.19 демонстрирует, что в обоих случаях на спектрах присутствуют характеристические полосы поглощения: в интервале $550 - 600 \text{ см}^{-1}$, соответствующие Fe_3O_4 ; 2924 см^{-1} , 2882 см^{-1} и 1408 см^{-1} соответствуют колебаниям алкильных групп; 1153 см^{-1} характерна для карбонильной группы (рисунок 2.17, а). На спектре (рисунок 2.17, б) присутствуют следующие характерные полосы: 2921 см^{-1} и 2853 см^{-1} (C_3H_7 -), 1617 см^{-1} ($=\text{NH}$), 988 см^{-1} (Si-O-C) [329, 310].

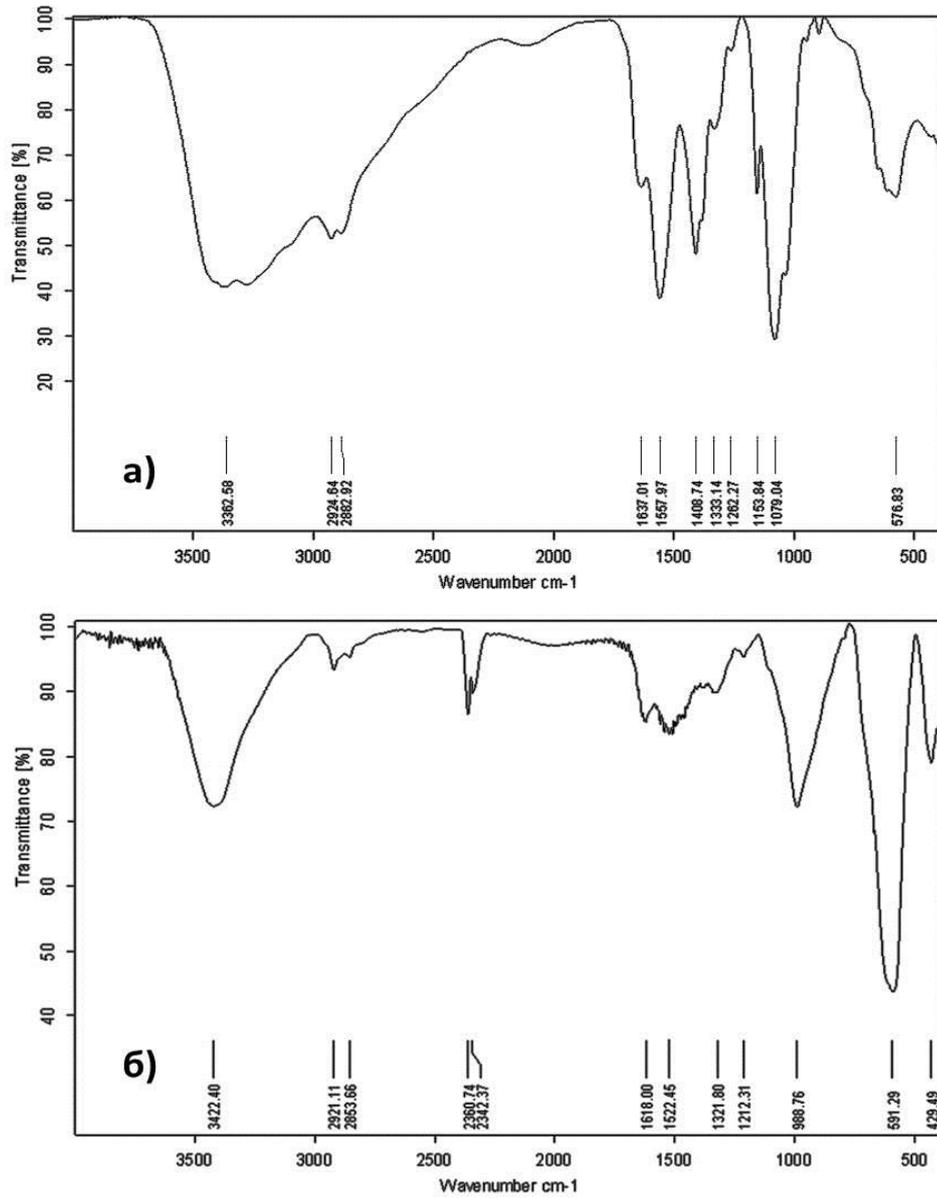


Рисунок 2.19 – ИК – спектры: *a* – НК Fe₃O₄ – X и *б* – НК Fe₃O₄ – АПЭС

Для синтезированных магнитных НК частиц, покрытых хитозаном и 3-аминопропилтриэтоксисиланом, были получены электронные микрофотографии (рисунок 2.18).

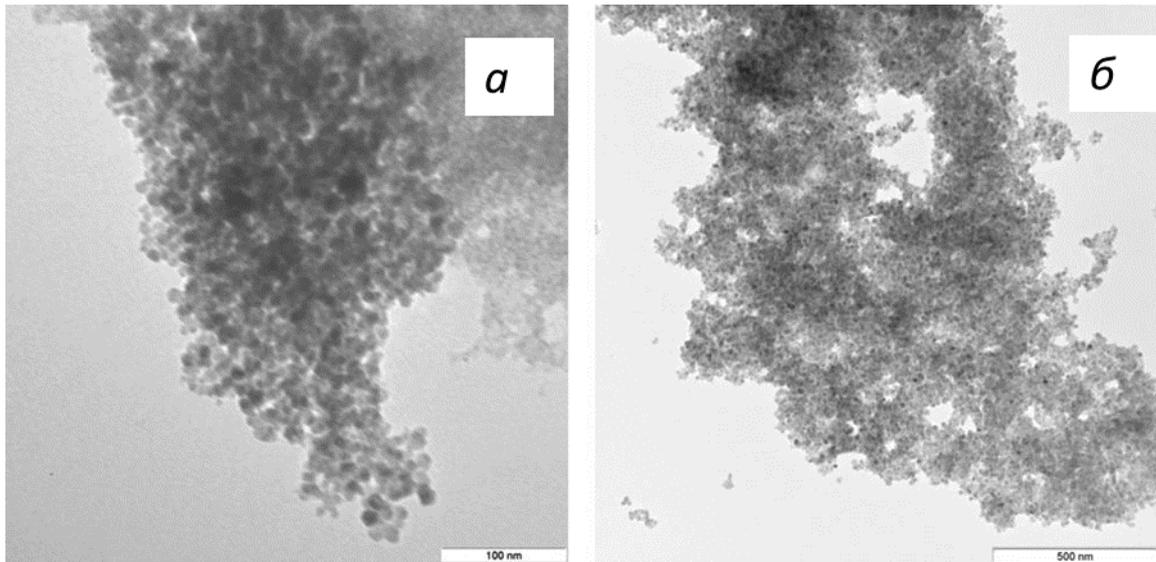


Рисунок 2.20 – Электронные микрофотографии НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{X}$ (а) и НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{АПЭС}$ (б)

Как видно из рисунка НК частицы в обоих случаях представляли собой сферические образования с темным ядром, при увеличении которого наблюдали характерную кристаллическую структуру, и светлые оболочки вокруг ядра, соответствующие модифицирующим покрытиям. Средний размер НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{X}$ порядка 20 нм. Толщина покрытия не превышает 1 нм.

Для водных суспензий, синтезированных НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{X}$ и НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{АПЭС}$ также была изучена агрегативная устойчивость с применением визуального наблюдения. Для этого суспензии НК в концентрации от 0.1 г/дм³ до 0.4 г/дм³ подвергали УЗ диспергированию. Наибольшую агрегативную устойчивость наблюдали для суспензии НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{X}$ концентрации 0.4 г/дм³ в течение 60 минут. Суспензии НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{АПЭС}$ также устойчивы в максимальной концентрации 0.4 г/дм³, но в течение только 30 минут.

Таким образом, в дальнейших исследованиях применяли суспензии НК с максимальной концентрацией 0.4 г/дм³ [310, 335].

2.3.7. Синтез, спектроскопический и электронно-микроскопический анализ полимеров с молекулярными отпечатками холестерина на поверхности наночастиц магнетита (ПМО – МНЧ) и оксида кремния (ПМО – ОКНЧ)

Синтез ПМО – МНЧ проводили в несколько стадий согласно схеме 2.4.

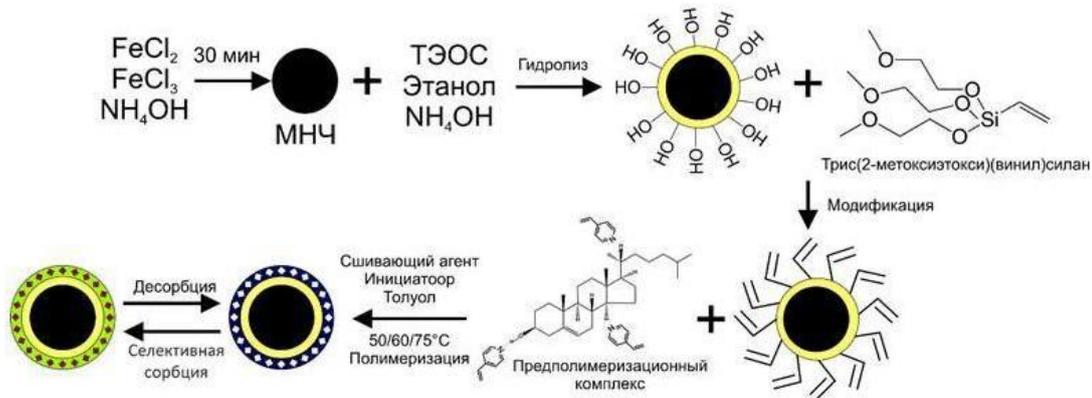


Схема 2.4 – Синтез ПМО – МНЧ

На первой стадии синтезировали НЧ магнетита по методике [324].

На второй стадии проводили функционализацию НЧ магнетита виниловыми группами [336]. Для этого после диспергирования 0,1 г наночастиц НЧ Fe_3O_4 в 20 см^3 толуола, суспензию смешивали с 2 см^3 ТМВС, затем реакционную смесь с обратным холодильником в течение 10 часов. Трехкратно промывали этанолом и водой, сушили 24 часа при комнатной температуре.

Третья стадия – синтез ПМО холестерина на поверхности винил-модифицированных НЧ Fe_3O_4 . Для этого после диспергирования 0.2 г модифицированных НЧ Fe_3O_4 в 25 см^3 толуола, полученную суспензию смешивали с 0.0164 г АИБН (инициатор полимеризации) и выдерживали при температуре 0 °С 12 часов. Результатом этой стадии является сорбция АИБН на поверхности НЧ, где преимущественно и будет протекать процесс полимеризации. Одновременно получали предполимеризационную смесь путем растворения в 25 см^3 толуола 0.5 ммоль (0.1933 г) холестерина и 2.5 ммоль функционального мономера, затем реакционную смесь выдерживали в темном месте в течение 12 часов для образования предполимеризационного комплекса. Затем обе реакционной смеси

сливали в круглодонную колбу объемом 100 см³, добавляли 10 ммоль сшивающего агента (ДВБ или ЭГДМА) и грели на глицериновой бане с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 6 часов, при температуре 50 °С, затем 20 часов, при температуре 60 °С и 6 часов при температуре 75 °С. В процессе полимеризации дисперсия белого цвета постепенно приобрела оранжевый цвет.

Очистку синтезированных ПМО-МНЧ холестерина проводили центрифугированием, затем извлекали холестерин в экстракторе Сокслета с использованием ТГФ в качестве растворителя. Сушку порошка проводили в течение суток при комнатной температуре, затем в течение 6 часов при - 80 °С.

Синтез полимеров с молекулярными отпечатками холестерина на поверхности наночастиц оксида кремния (ПМО – ОКНЧ) также проводили в несколько стадий согласно схеме 2.5.

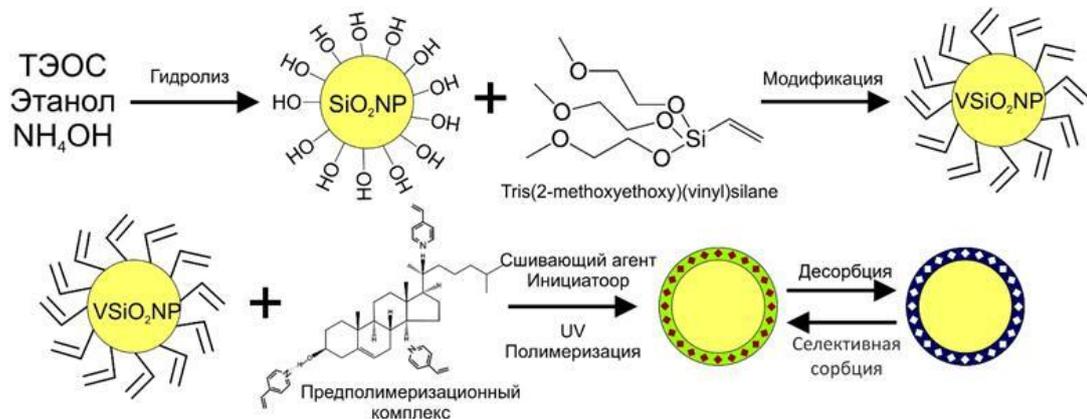


Схема 2.5 – Синтез ПМО – ОКНЧ

На первой стадии НЧ SiO₂ синтезировали с использованием известного метода Штобера [331]. Для этого в круглодонной колбе объемом 100 см³, снабженной магнитной мешалкой, смешивали 9 см³ 25 % раствора аммиака и 50 см³ этанола, затем к этой смеси медленно, при перемешивании приливали раствор 5 см³ тетраэтоксисилана (ТЭОС) в 30 см³ этанола, перемешивали в течение 8 часов. Очистку синтезированного продукта белого порошка НЧ SiO₂ проводили центрифугированием в течение 10 минут со скоростью 10000 об/мин. Трехкратно

промывали этанолом и дионизированной водой. Затем НЧ SiO_2 высушивали при температуре $100\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 12 часов.

На второй стадии наночастицы SiO_2 функционализировали виниловыми группами. Для этого после диспергирования 0.1 г НЧ SiO_2 в 20 см^3 толуола, к суспензии добавляли 2 см^3 ТМВС и полученную реакцию смесь кипятили с обратным холодильником в течение 10 часов. Очистку НЧ SiO_2 с винил-модифицированным покрытием проводили центрифугированием, затем промывали толуолом и высушивали при комнатной температуре в течение 24 часа.

Третью стадию – синтез ПМО холестерина синтезировали на поверхности винил-модифицированных НЧ SiO_2 проводили аналогично синтезу ПМО – МНЧ, лишь с одной разницей: навеску НЧ SiO_2 брали 0.1 г , а не 0.2 г , как в случае ПМО-МНЧ. При создании ПМО холестерина применяли в качестве сшивающего агента дивинилбензола (ДВБ), в результате были получены НЧ ПМО – ОКНЧ-Д и НЧ магнетита ПМО – МНЧ – Д. В случае применения этиленгликольдиметакрилата (ЭГДМА), были получены ПМО – ОКНЧ – Э и ПМО – МНЧ – Э.

Были зарегистрированы ИК – спектры синтезированных НЧ магнетита и оксида кремния, модифицированных виниловыми группами, а также частиц ПМО, синтезированных на их поверхности. Рисунок 2.21 демонстрирует, что характеристические полосы 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, наблюдали 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 [329].

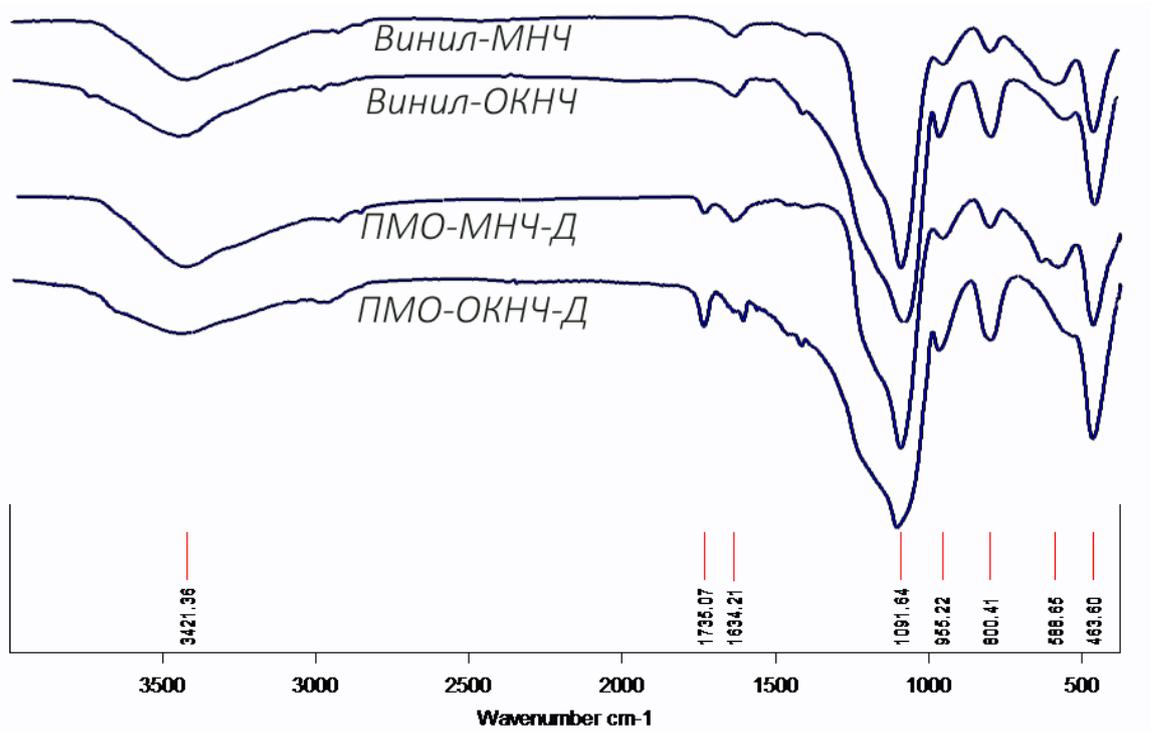


Рисунок 2.21 – ИК – спектры НЧ Fe_3O_4 и НЧ SiO_2 , покрытых виниловыми группами и ПМО холестерина на их поверхности

На рисунке 2.22 представлены микрофотографии винил-модифицированных наночастиц оксида кремния (а) и магнетита (б), полученные с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Средний размер НЧ составлял от 17 до 22 нм и от 20 до 27 нм соответственно.

На рисунке 2.23 представлены микрофотографии СЭМ частиц ПМО-ОКНЧ-Д (а) и ПМО-МНЧ-Д (б). Средний размер НЧ от 21 до 27 нм и от 25 до 34 нм соответственно.

На основании полученных результатов СЭМ можно сделать вывод, что после синтеза ПМО на поверхности НЧ SiO_2 и Fe_3O_4 их размер этих НЧ увеличился в среднем на 3 – 4 нм и 5 – 6 нм соответственно, следовательно, толщина слоя ПМО около 1.5 – 2 нм и 2.5 – 3 нм соответственно.

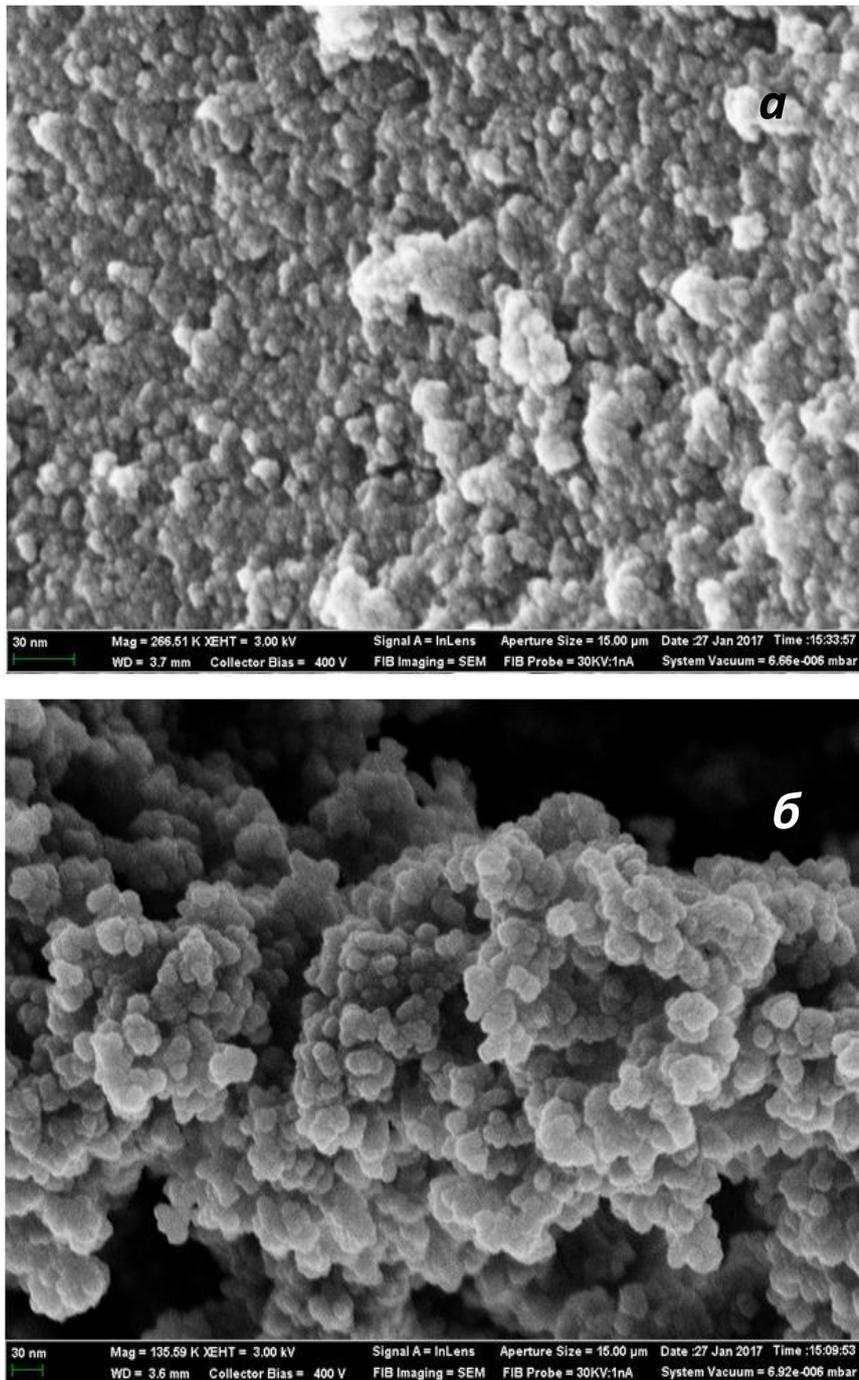


Рисунок 2.22 – Электронные микрофотографии НЧ SiO₂ (а) и НЧ Fe₃O₄ (б), покрытых виниловыми группами

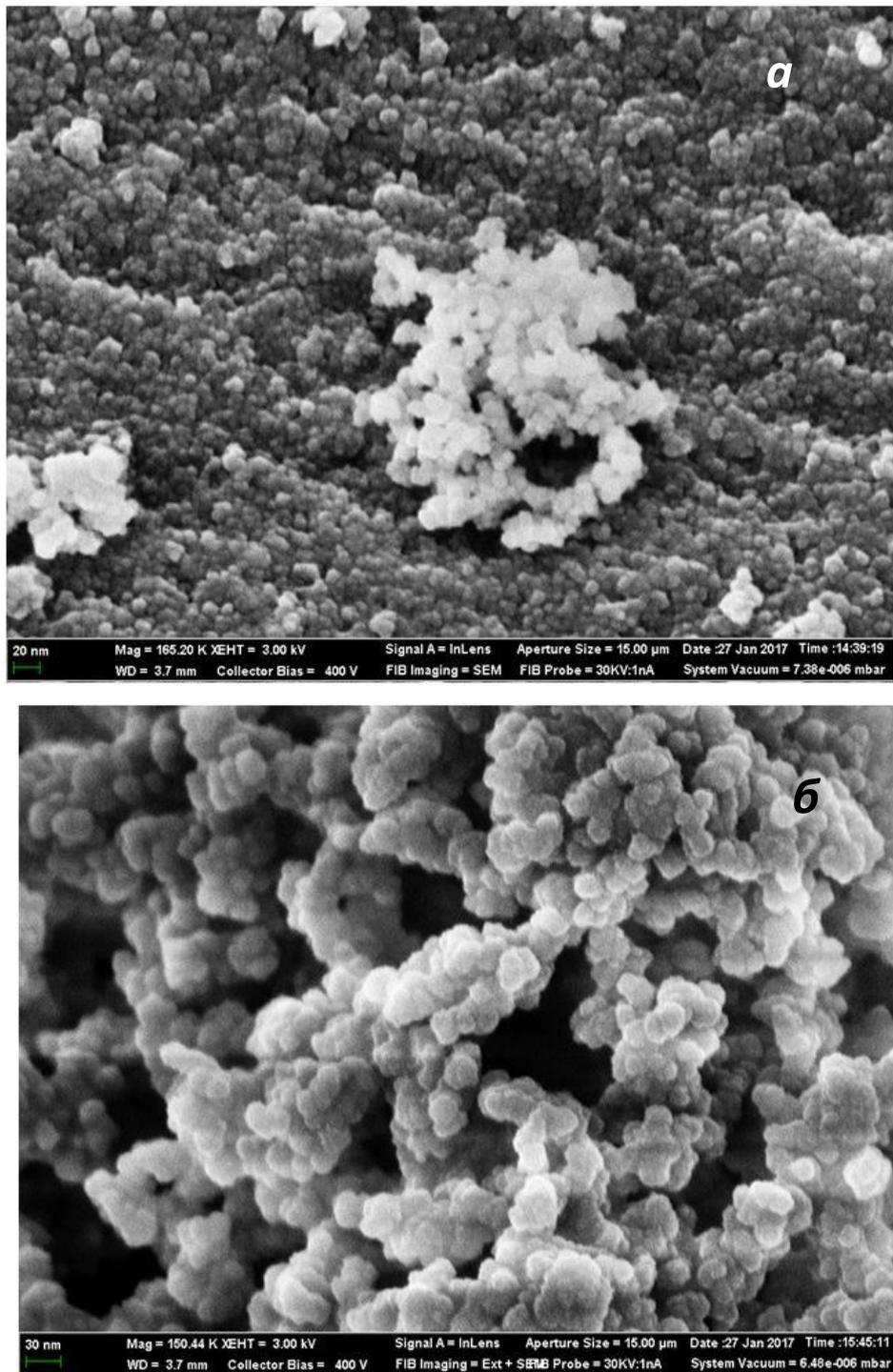


Рисунок 2.23 – Электронные микрофотографии НЧ ПМО-ОКНЧ-Д (а) и ПМО-МНЧ-Д (б)

2.3.8. Синтез полимеров с молекулярными отпечатками креатинина

56.5 мг (0.5 ммоль) креатинина смешивали с 0.136 см³ (2 ммоль) акриловой кислоты. Реакционную смесь нагревали до полного растворения креатинина. Затем в полученный раствор добавляли 1.4 см³ (10 ммоль) ДВБ и 10 мг ПБ и выдерживали в течение 1 ч при 70 °С на водяной бане. Полученный твердый полимер измельчали, промывали 10 см³ ацетона для удаления непрореагировавших мономеров, фильтровали под вакуумом [337].

Полученные полимеры растирали в агатовой ступке. Смесь просеивали через сита с размерами отверстий 0.08 и 0.04 мм. Использовали фракцию частиц с размером 0.08–0.04 мм. Измельченные сорбенты промывали 2 см³ смеси 7:3 (по объему) лед. СН₃СООН с деионизированной водой, затем 10 см³ деионизированной воды и высушивали при

100 °С. Полимеры без молекулярных отпечатков (ПБМО) синтезировали по методике, аналогичной методике синтеза ПМО-Кр, но без внесения креатинина.

2.3.9. Конъюгаты антител с НК на основе Fe₃O₄ с оксидкремниевым покрытием

Синтез конъюгатов антитела – НК Fe₃O₄ проводили в два этапа. На первом этапе НЧ Fe₃O₄ покрывали оксидом кремния по известной методике [338]. Для этого суспензию 0.5 г наночастиц Fe₃O₄ в смеси 40 см³ 95 % этанола и 10 см³ H₂O смешивали с 0.5 см³ Si(OEt)₄ (ТЭОС) и 1 см³ 25 % раствора NH₃·H₂O. После чего проводили кипячение смеси в течение 10 часов. Очистку НЧ Fe₃O₄, покрытых оксидом кремния, осуществляли трехкратной промывкой этанолом и магнитной сепарацией (напряженность магнитного поля 31.83·10³ А/м). После чего НЧ Fe₃O₄, покрытые оксидом кремния подвергали УЗ диспергированию в 50 см³ 95 % этанола, добавляли 1 см³ аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭОС), кипятили 10 часов при перемешивании. Очистку НЧ Fe₃O₄, покрытых оксидом кремния, осуществляли трехкратной промывкой этанолом и магнитной сепарацией (напряженность магнитного поля 31.83·10³ А/м).

На втором этапе синтезировали конъюгаты антител и НК Fe_3O_4 с оксидкремниевым покрытием по известной методике [339] (схема 2.6). Для этого 10 см^3 суспензии НК Fe_3O_4 с оксидкремниевым покрытием в $50 \text{ см}^3 \text{ H}_2\text{O}$ смешивали с 1 см^3 25 % глутарового альдегида, добавляли 0.2 мг антител к вирусу кори. Затем проводили перемешивание в течение 8 часов при температуре $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Очистку конъюгатов антитела – НК Fe_3O_4 осуществляли магнитной сепарации (напряженность магнитного поля $31.83 \cdot 10^3 \text{ А/м}$). Рабочую суспензию конъюгатов получали после УЗ диспергирования навески 0.005 г в 10 см^3 стерильного физиологического раствора в течение 30 секунд.

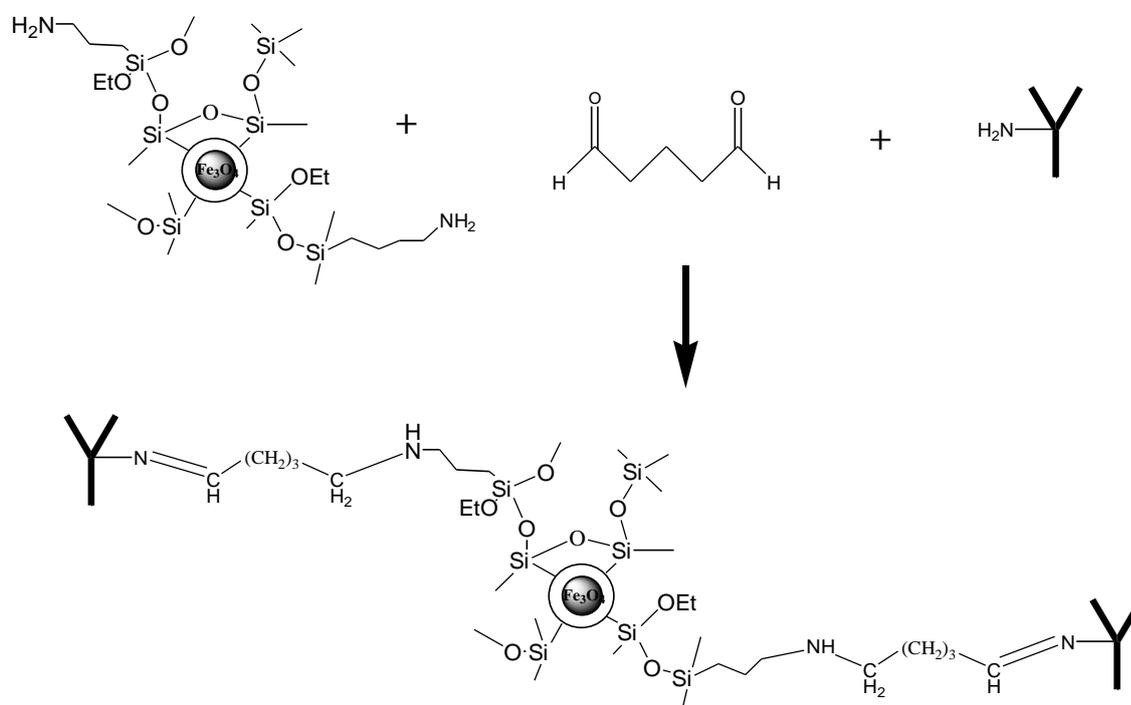


Схема 2.6 – Синтез конъюгатов "антитела – НК Fe_3O_4 "

2.3.10 Культивирование бактерий (бактериальный посев)

Культивирование бактерий *Escherichia coli* штамм ATCC 25922 проводили с использованием жидкой агаризованной среды LB («Difco», США) с pH 7.0-7.2. Для получения опытных суспензий исследуемых бактерий применяли бульонные культуры штаммов, которые нарабатывали в течение 18-24 часов, при температуре $30\text{-}37^\circ\text{C}$ с помощью термостатированной качалки. Титр клеток определяли путем подготовки в иммунологических планшетах (96 лунок) серии последовательных

десятикратных разбавлений, с последующим посевом их на агаризованной среде LB в 3-5 повторностях, затем определяли титр клеток [340].

Бактериальную культуру *Staphylococcus aureus* штамм В – 1266 разводили в стерильном физиологическом растворе (рН 7.0 – 7.2) до 10^5 – 10^6 КОЕ/см³. Полученные таким образом суспензии десятикратно разбавляли еще в пять последовательных разведений, и высевали по 10 мкл на агаризованную среду РПА, затем определяли титр клеток.

2.3.11. Антиген бактерии *S. thyphi*.

Для получения антигена бактерии *S. thyphi*. микроорганизмсодержащую LB среду прогревали в течение 30 мин при температуре 72 °С [288]. Затем разрушали микроорганизма с помощью ультразвукового дезинтегратора (трехкратно по 1 мин, мощность 600 Вт и частота 40 кГц). Для подтверждения инактивации бактерии *S. thyphi*. проводили посев полученного антигена на мясопептонный агар, выдерживали при температуре (37.0±0.1) °С. В течение 28 суток не наблюдали роста колоний микроорганизма, что свидетельствовало об отсутствии после инактивации в микроорганизм–содержащей среде жизнеспособных микроорганизмов. Концентрация антигена 10 мг/см³ соответствовала 10^8 КОЕ/см³.

2.3.12. ПЦР анализ

ДНК выделяли из клеток с применением DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Германия) [288]. Для проведения ПЦР анализа исследуемый образец был суспензирован в 100 мкл деионизированной воды. Затем в пробирке смешивали ПЦР буфер, $3.5 \cdot 10^3$ М MgCl₂, $2 \cdot 10^{-3}$ М дезоксинуклеотид трифосфат, Taq-ДНКполимеразу, а также праймеры (ST115'AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA3', ST155'GGTAGAAATTCACAGCGGGTACTG3'), которые подобраны на консервативные области, объемом 0.1 мкл. Проводили 42 цикла амплификации (денатурация 10 сек при 95°С, отжиг праймеров 10 сек при 58 °С, элонгация 10 сек

при 72 °С). Затем смесь инкубировали в течение 7 мин при 72°С. Продукты амплификации учитывали электрофоретическим методом в 5 % агарозном геле с этидиумом бромидом (0.2 мкг/см³).

2.3.13. ИФА анализ

Применяли трех стадийный сэндвич анализ (ИФА) для определения бактерий [341].

На первой стадии сорбировали в лунках планшета ИФА 100 мкл образца и 100 мкл кроличьих поликлональных антител (разведение антитела (начальная концентрация 10 мг/см³):NaHCO₃ (начальная концентрация 0.84 г/дм³) 1:500). Проводили инкубацию при 37⁰С и перемешивании 700 об/с в течение 30 мин. Фосфатно-солевым раствором с Твин-20 проводили отмывку.

На второй стадии в лунки планшета ИФА добавляли фирменный конъюгат "стрептавидин-полипероксидаза" (пр-во ООО "Биоген Текнолоджиз" Россия) в фирменном стабилизаторе 1:6000. Проводили инкубацию при 37,0 °С и перемешивании 700 об/с в течение 30 мин. Отмывку осуществляли с помощью фосфатно-солевого промывочного раствора с добавлением Твин-20.

На третьей стадии в лунки планшета ИФА добавляли 100 мкл готового раствора хромогена тетраметилбензидина, выдерживали 3 мин. Вносили по 50 мкл стоп-реагента. Планшет помещали в спектрофотометр и проводили измерение интенсивности окрашивания с помощью мультисканального спектрофотометра при $\lambda = 450$ и 655 нм.

В качестве положительного образца использовали суспензия E.coli 1:100 в специальном растворе для разведения, в качестве отрицательного 0,05 % казеин в специальном растворе для разведения.

2.3.14. Определение продуктов электропревращений наночастиц магнетита в апротонной среде с использованием фотометрического метода

Для получения продуктов электропревращений наночастиц магнетита применяли метод препаративного электролиза. Электролиз наночастиц, предварительно нанесенных на поверхность рабочего графитового электрода ($S_{\text{геом}} = 7 \text{ см}^2$), проводили при потенциалах, соответствующих потенциалам максимумов токов исследуемых процессов на вольтамперограммах. После окончания процесса электролиза, микропипеткой отбирали аликвоты фонового электролита из ячейки и фотометрировали раствор, содержащий ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} , используя соответствующие качественные реакции.

2.3.15 Введение НЧ в культуру клеток

Суспензии НЧ Ag, Au или Fe_3O_4 в питательной среде, содержащей антибиотик – гентомицин (15 см^3), вводили в исследуемую культуру клеток. Смесь клеток с НЧ инкубировали в культуральных флаконах 24 часа. Затем среду, содержащую наночастицы, удаляли и заменяли ее свежей, не содержащей наночастиц. Культуру клеток с НЧ Ag, Au оставляли на 120 часов. Культуру клеток с НЧ Fe_3O_4 оставляли на 72 часа. Образцы клеток анализировали после 24 и 120 часов инкубации.

Оценку жизнеспособности клеток проводили стандартным методом окрашивания. Использовали раствор трипанового синего.

2.3.16 Определение содержания секретированных цитокинов IL1 β , IL6

Содержание секретированных цитокинов IL1 β , IL6 в культуральной жидкости определяли методом твердофазного «сэндвич» варианта иммуноферментного анализа.

2.3.17 Введение НЧ аутобредным лабораторным крысам-самкам.

- однократно интратрахеально в дозе 2 мг в 1 см³ стерильной деионизированной воды, поскольку было найдено, что в суспензии на физиологическом растворе агломерация происходит слишком быстро;

- или по 3 раза в неделю в течение 5 недель внутрибрюшинно в дозе 500 мг/кг в 4 см³ стерильной деионизированной воды.

Животные контрольных групп получали соответствующим путём такой же воды без частиц.

ГЛАВА 3 Варианты бесферментных электрохимических способов и иммуносенсоров на основе наночастиц, нанокompозитов магнетита для определения содержания патогенных микроорганизмов *Salmonella typhimurium* SL 7207, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Staphylococcus aureus* B-1266 и антигена вируса кори

Тенденция роста числа «традиционных» инфекционных заболеваний, появление неизвестных, а также синтез различных видов наноматериалов и внедрение их в практику электрохимических исследований приводят к появлению генерации новых, оригинальных способов и иммуносенсоров для определения содержания различных бактериальных и вирусных агентов.

Началом исследований явилось создание электрохимического иммуносенсора для количественного определения антител к вирусу клещевого энцефалита, в котором в качестве метки применяли конъюгат: белок А - коллоидное серебро [342]. Сигналообразующая реакция - окисление серебра. В качестве трансдьюсеров использовали толстопленочный графитсодержащий электрод, на рабочей поверхности которого проводили образование иммунокомплекса: антиген вируса клещевого энцефалита – антитело, с последующей локализацией конъюгата белка А с коллоидным серебром. Полезный сигнал регистрировали при потенциале 0,07В. Предел обнаружения составляет $2.0 \cdot 10^{-7}$ мг/мл.

В рамках исследований этой главы представлен общий подход разработки бесферментного электрохимического иммуноанализа для количественного определения бактериальных клеток и реализована схема, приведенная на рисунке 3.1.

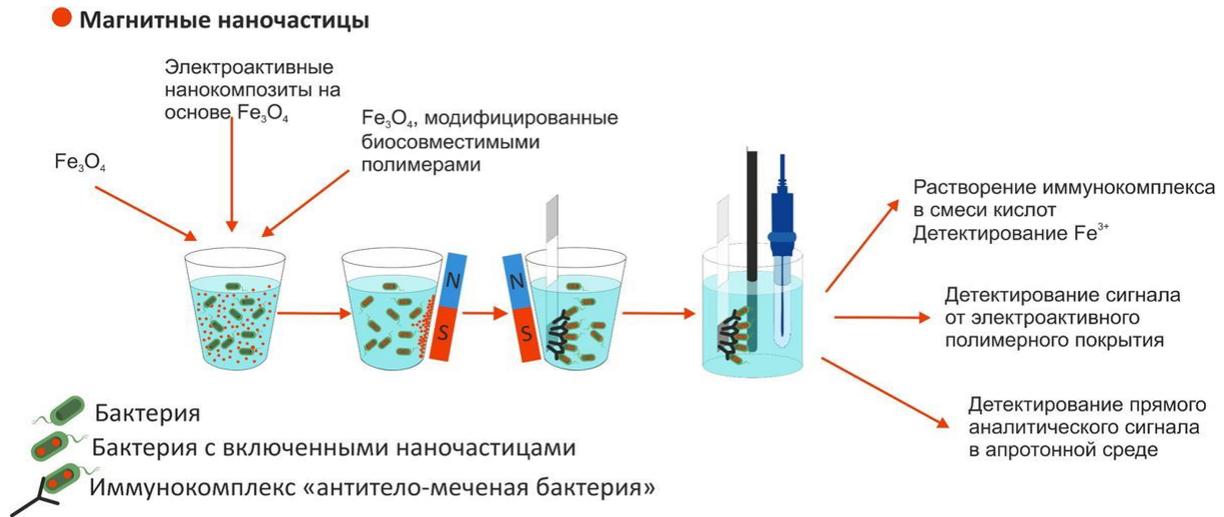


Рисунок 3.1 – Схема проведения бесферментного электрохимического иммуноанализа

Методика бесферментного электрохимического иммуноанализа:

Инкубация. Суспензию бактериальных клеток/антигена бактериальных клеток (проба), смешивали с избытком НЧ или НК магнетита в виде суспензии, затем смесь инкубировали 30 минут при температуре $(37.0 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$.

Затем проводили разделение между несвязавшимися НЧ или НК магнетита и связавшимися с бактериальными клетками/антигенами бактериальных клеток НЧ или НК магнетита с использованием постоянного магнита (напряженность магнитного поля $31.83 \cdot 10^3 \text{ A/m}$).

Далее в емкость с исследуемой суспензией бактериальных клеток/антигена бактериальных клеток, после взаимодействия их с НЧ или НК магнетита, помещали углеродсодержащую подложку/рабочий электрод, на поверхность которой/которого, были иммобилизованы антитела, специфичные к определяемому штамму бактерий. Образование иммунного комплекса проводили при постоянной температуре $(37,0 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$. Для увеличения скорости доставки меченых бактерий к поверхности подложки/рабочего электрода и интенсификации процесса образования иммунного комплекса, данную стадию проводили на магнитном штативе с напряженностью магнитного поля $31.83 \cdot 10^3 \text{ A/m}$.

Затем регистрировали аналитический сигнал от НЧ или НК магнетита. Принимая во внимание предложенную процедуру электрохимического иммуноанализа, полагали, что величина электрохимического отклика от НЧ/НК магнетита, включенных в иммунокомплекс, будет пропорциональна содержанию определяемых бактериальных клеток/антигена бактериальных клеток в исследуемой суспензии. Этот этап был оригинален для каждого из трех предлагаемых вариантов иммуноанализа и будет более подробно рассмотрен ниже.

Измерение аналитического сигнала для каждой серии проведенных экспериментов дополняли «холостым опытом», в этом случае подложку/рабочий электрод инкубировали в суспензии бактериальных клеток, не содержащей искомым бактерию. Эта процедура необходима для исключения ложных результатов, которые могут быть вызваны неспецифической сорбцией мешающих компонентов смеси на поверхности подложки/электрода.

3.1. Электрохимический анализ патогенных микроорганизмов на примере *S. typhi*. с применением Fe_3O_4 в качестве метки

Одним из реализованных вариантов количественного определения содержания патогенных бактерий является электрохимический способ иммуноанализа с применением НЧ магнетита, где в качестве аналитического сигнала служил ток восстановления ионов Fe (III), полученных после растворения иммунокомплексов, содержащих наночастицы. Таким образом, вывод о концентрации микроорганизмов *S. typhi*. в пробе делали по концентрации ионов железа в растворе [288].

3.1.1. Определение содержания НЧ Fe_3O_4 , поглощенных клетками

Для количественного определения содержания НЧ Fe_3O_4 в бактериальных клетках использовали методику определения содержания железа в природных и питьевых водах методом инверсионной вольтамперометрии (ИВ), разработанную ООО НПВП «ИВА». В соответствии с методикой НЧ Fe_3O_4 в бактериальных

клетках переводили в трехвалентную форму Fe^{3+} путем растворения конъюгата НЧ с клетками в смеси азотной и серной кислот с последующим кипячением.

Конъюгат НЧ магнетита с культурой клеток помещали в термостойкий стакан емкостью 25 см^3 с 5 см^3 деионизированной воды. Добавляли по 0.3 см^3 концентрированных серной и азотной кислот, выдерживали смесь в течение 15 мин и выпаривали на плитке до влажных солей. Процедуру повторяли трижды. Затем содержимое стакана охлаждали, добавляли $3 - 5 \text{ см}^3$ воды и 0.3 см^3 30% пероксида водорода, вновь выпаривали до влажных солей. Процедуру повторяли дважды. Полученный раствор количественно переносили в мерную колбу объемом 10 см^3 с использованием деионизированной воды. После чего в электрохимический элетролизер помещали 1 см^3 фонового электролита (1 М раствора ацетата натрия (рН 7.5), содержащий $5 \cdot 10^{-4}$ М пирокатехола) и $0.2 - 2.0 \text{ см}^3$ пробы. Общий объем раствора доводили до 10 см^3 деионизированной водой. Для определения концентрации железа выполняли измерения ИВ методом с использованием в качестве индикаторного электрода – ТМГЭ методом аналогично аттестованной методике.

На рисунке 3.2 приведен пример вольтамперограмм железа, зарегистрированных в результате ИВ анализа конъюгата клеточной культуры *S. typhi*. с НЧ Fe_3O_4 после минерализации.

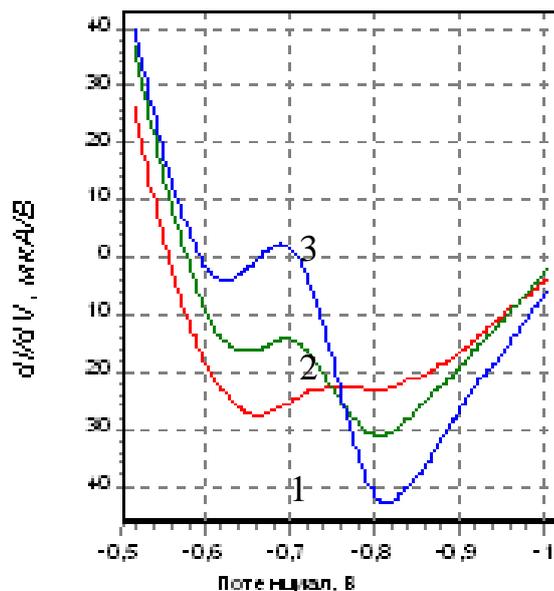


Рисунок 3.2. – Производные вольтамперограммы железа, зарегистрированные с использованием ТМГЭ. 1 – фон, 2 – проба, 3 – проба с добавкой аттестованного раствора Fe (III); фоновый электролит 0.1 М растворе ацетата натрия (рН 7.5), содержащий $5 \cdot 10^{-4}$ М пирокатехола. $E_{\text{конц}} = 0.1$ В, $\tau_{\text{конц}} = 60$ с, $\nu_{\text{рег-ии}} = 0.5$ В/с

3.1.2. Электронно-микроскопический анализ взаимодействия бактерий *S. typhi*. и *St. aureus* с НЧ Fe_3O_4

Для электронно-микроскопических исследований суспензию НЧ магнетита концентрацией 0.125 г/л выдерживали с бактериями в течение 30 мин при постоянной температуре $(37.0 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$. После инкубации свободные наночастицы отделяли от меченых клеток с помощью магнитного поля $(31.83 \cdot 10^3 \text{ А/м})$. После чего образцы клеток готовили согласно методике (глава 2.2.1). На рисунке 3.3 приведены электронные микрофотографии бактерий *S. typhi*. и *St. aureus* с НЧ Fe_3O_4 .

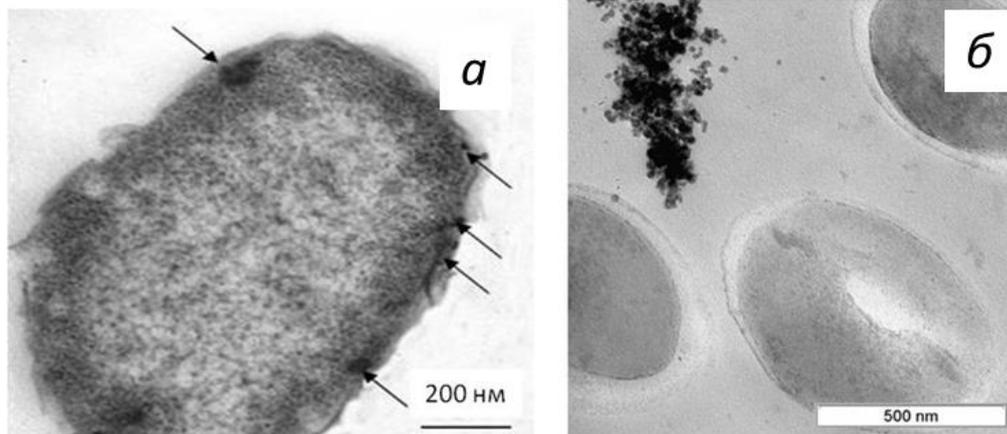


Рисунок 3.3 – Электронные микрофотографии бактериальных клеток *S. typhi* (а) и *St. aureus* (б) после взаимодействия с НЧ Fe_3O_4 (время взаимодействия – 30 мин). Стрелками показаны места включения НЧ магнетита; электронный микроскоп Jem 1400 (Jeol, Япония)

Как видно из рисунка 3.3, а после 30 минут инкубации наблюдали полное проникновение (эндоцидоз) НЧ в клетки *S. typhi*. В случае образцов стафилококка агрегаты НЧ магнетита наблюдали, главным образом, в межклеточном пространстве, на значительном удалении от клеток (рисунок 3.3, б). Таким образом, можно сделать заключение, что наночастицы не взаимодействуют с клетками стафилококка в течение выбранного времени инкубации. Принимая во внимание принципиальные различия в строении поверхностных структур грамположительных (наличие на поверхности функциональных групп карбоновых кислот, входящих в состав мембранных белков) и грамотрицательных микроорганизмов, можно сделать заключение, что НЧ необходимо функционализировать молекулами «родными» для мембраны грамположительных клеток. В этом случае наночастицы, имеющие в своей структуре свободные аминогруппы, будут образовывать ковалентной связи с мембраной клетки, помимо электростатического взаимодействия, прочно удерживаясь на поверхности клеточной стенки бактерии [335, 343]. Эти исследования предусмотрены в дальнейших исследованиях.

3.1.3. Определение содержания бактерий *S. typhi*. с применением наночастиц Fe_3O_4 .

Была реализована предложенная схема иммуноанализа (рисунок 3.1) для количественного определения бактериальных клеток *S. typhi*.

На последнем четвертом этапе после образования иммунокомплекса антитела – меченые магнетитом клетки/меченый магнетитом антиген *S. typhi*, пробы подвергали кислотной минерализации. Для этого графитозпоксидную подложку погружали в емкость со смесью кислот, таким образом, чтобы рабочая зона, на которой сформировался иммунокомплекс, была полностью в растворе, и выдерживали в течение 15 мин. Затем подложку вынимали из емкости, после чего выполняли процедуру минерализации и анализа в соответствии с гл. 3.1.1. Проводили холостой эксперимент, когда подложку инкубировали в суспензии клеток, не содержащей бактерии/антиген *S. typhi*.

Принимая во внимание предлагаемую схему иммуноанализа можно ожидать, что электрохимический отклик – ток восстановления ионов Fe^{3+} – даст информацию о наличии и количестве бактерий/антигена, локализованных на поверхности подложки.

Результаты, полученные в процессе реализации предложенной схемы иммуноанализа, подтвердили справедливость высказанного положения.

В случае присутствия искомой бактерии *S. typhi*/антиген бактерии *S. Typhi*. в пробе происходило образование иммунокомплекса, что сопровождалось наличием на вольтамперограммах тока восстановления железа (рисунок 3.4, б, в). В случае суспензии, не содержащей бактерии *S. typhi*/антиген бактерии *S. typhi*. – холостого опыта, в исследуемом интервале потенциалов тока восстановления железа на кривой не наблюдали (рисунок 3.4, а), таким образом, образование комплекса антитело – бактерии *S. typhi*/антиген бактерии *S. typhi*. отсутствовало.

Отсюда следует, что результаты предложенной процедуры бесферментного электрохимического иммуноанализа подтвердили, что аналитический сигнал (величина dI/dE), полученный от НЧ Fe_3O_4 , служит источником информации о

количестве бактерий/антигена, меченных наночастицами, локализованных на поверхности подложки.

Определение эффективности использования магнитного поля с величиной напряженности $31.83 \cdot 10^3$ А/м осуществляли, анализируя воду после сепарации НЧ. Результаты анализа показали, что в исследуемой воде содержание ионов железа (III) не превышает фонового значения. Таким образом, применяемый магнитный штатив обеспечивает полное отделение НЧ магнетита, которые не эндоцитировали в клетки.

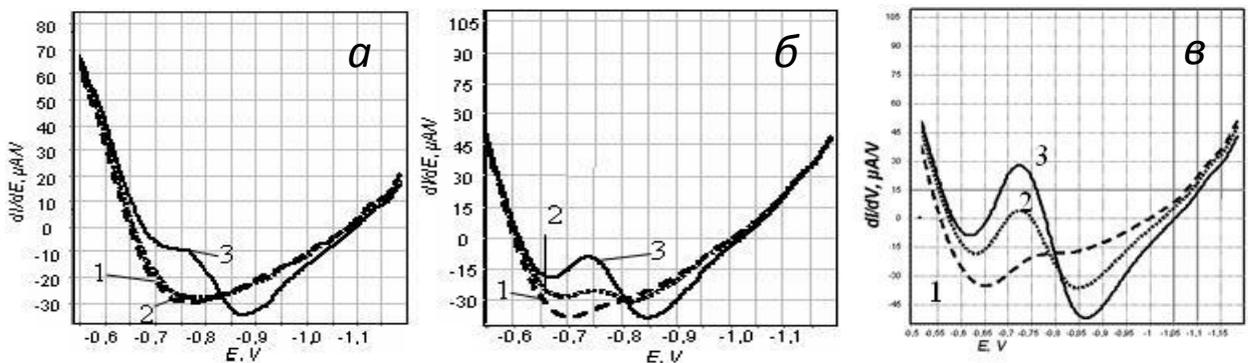


Рисунок 3.4 – Производные вольтамперограмм железа, полученные в растворах: *а* – не содержащих, *б* – содержащих микроорганизмы, *в* – либо антиген *S. typhi*.; 1 – кривая фона, 2 – кривая пробы, 3 – кривая добавки аттестованного раствора Fe(III); фоновый электролит – 0.1 М раствор ацетата натрия (pH 7.5), содержащий $5 \cdot 10^{-4}$ М пирокатехола. $E_{\text{конц}} = 0.1$ В, $\tau_{\text{конц}} = 60$ с, $v_{\text{рег-ии}} = 0.5$ В/с

В результате построения зависимости величины dI/dE , полученной после минерализации конъюгата, от времени взаимодействия НЧ с клетками было определено рабочее время взаимодействия НЧ магнетита с бактериальными клетками – 30 минут, которое использовали в дальнейших исследованиях.

В таблице 3.1. приведены аналитические характеристики разработанного способа иммуноанализа в присутствии магнитного поля (величина напряженности $31.83 \cdot 10^3$ А/м) и в отсутствии последнего.

Как видно из таблицы применение магнитного концентрирования существенно увеличивает чувствительность анализа и снижает предел

обнаружения. Кроме того, применение магнитного поля позволило снизить время формирования иммунокомплекса на поверхности подложки до 15 минут, а, следовательно, и время всей процедуры иммуноанализа в целом. Таким образом, все дальнейшие эксперименты проводили с применением магнитного концентрирования.

Таблица 3.1 – Аналитические характеристики разработанного способа иммуноанализа

Аналит	$\lg(dI/dE) = a + b \cdot \lg C$ (КОЕ/см ³)				C_{lim}	Диапазон концентраций
	a	b	R^2	n		
Без магнитного концентрирования						
<i>S. typhi.</i>	- (1.11±0.14)	0.15±0.02	0.998	5	7.4·10 ⁴ КОЕ/см ³	1·10 ⁵ – 10 ⁷ КОЕ/см ³
Антиген <i>S. typhi.</i>	0.05±0.01	0.32±0.03	0.997	5	3.5·10 ⁻⁵ мг/см ³	1·10 ⁻⁴ – 1 мг/см ³
С применением магнитного концентрирования						
<i>S. typhi.</i>	- (0.48±0.03)	0.08±0.01	0.995	5	8.18 10 ¹ КОЕ/см ³	1·10 ³ – 10 ⁸ КОЕ/см ³
Антиген <i>S. typhi.</i>	0.62±0.04	0.10±0.01	0.994	5	1.51·10 ⁻⁷ мг/см ³	1·10 ⁻⁶ – 1 мг/см ³

3.1.4. Результаты определения правильности и специфичности разрабатываемого способа бесферментного электрохимического иммуноанализа. Анализ реальных объектов

Определение правильности разработанного способа бесферментного электрохимического иммуноанализа проводили с использованием методов ПЦР анализа и бактериального посева, применяемых в качестве методов сравнения.

Для этого готовили последовательным разбавлением серию суспензий, содержащих бактериальные клетки *S. typhi.* в диапазоне концентраций от 1·10⁶ до 10 КОЕ/см³. Образец, соответствующий каждой концентрации клеток, делили на

три равных части, затем каждую из частей анализировали методами ПЦР анализа, бактериального посева и разрабатываемым методом. Исследования проводили в двух параллельных сериях опытов. Полученные результаты приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Результаты исследования модельных суспензий, содержащих *S. typhi*. различными методами

Концентрация, КОЕ/см ³	Бактериальный посев*	ПЦР*	Электрохимический способ, КОЕ/см ³	
			Антиген <i>S. typhi</i> .	<i>S. typhi</i> .
1·10 ⁶	Обнаружено	Обнаружено	9.3·10 ⁵	8,5·10 ⁵
1·10 ⁵	Обнаружено	Обнаружено	1.1·10 ⁵	9.5·10 ⁴
1·10 ⁴	Обнаружено	Обнаружено	0.8·10 ⁴	9.9·10 ³
1·10 ³	Обнаружено	Обнаружено	930	1000
1·10 ²	Не обнаружено	Обнаружено	97	Не обнаружено
1·10 ¹	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
0	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено

*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск)

Минимальная определяемая концентрация предлагаемым методом составляет 10² КОЕ/см³ (в случае антигена *S. typhi*.) и 10³ КОЕ/см³ (в случае бактерии *S. typhi*.). Это совпадает с возможностями ПЦР анализа, однако для реализации процедуры электрохимического иммуноанализа не требуется применение дорогостоящего оборудования, организации специальных помещений, дорогостоящих реагентов, кроме того продолжительность электрохимического анализа значительно меньше, чем ПЦР анализа.

Для определения специфичности разрабатываемого способа подложки с иммобилизованными антителами к бактерии *S. thyphi*, инкубировали в суспензиях, содержащих бактерии *E. coli* и бактерии *S. thyphi*. На рисунке 3.5. приведены примеры вольтамперограмм.

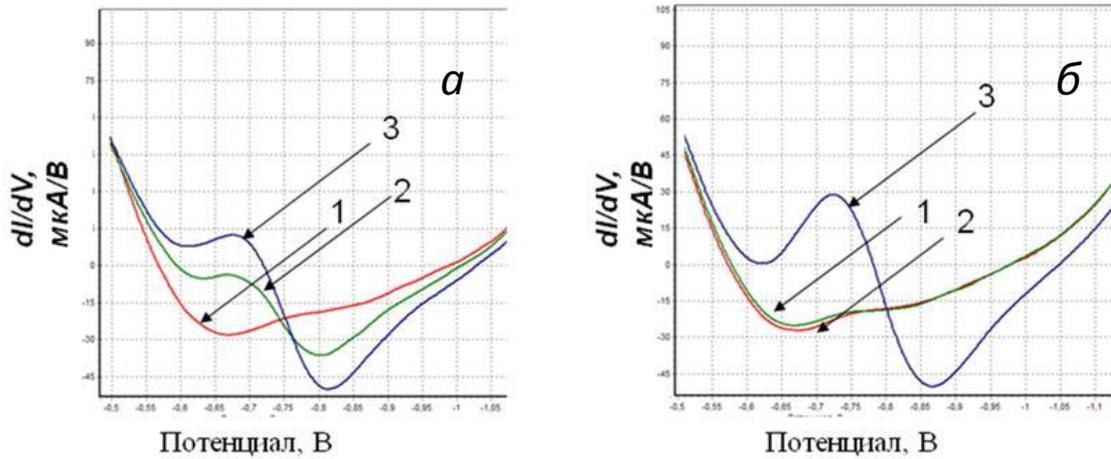


Рисунок 3.5 – Производные вольтамперограмм железа, полученные при исследовании растворов: *a* – содержащих и *б* – не содержащих микроорганизмы бактерии *S. typhi*.; 1 – кривая фона, 2 – кривая пробы, 3 – кривая добавки аттестованного раствора Fe (III); фоновый электролит – 0.1 М раствор ацетата натрия (рН 7.5), содержащий $5 \cdot 10^{-4}$ М пирокатехола. $E_{\text{конц}} = 0.1$ В, $\tau_{\text{конц}} = 60$ с, $v_{\text{рег-ии}} = 0.5$ В/с

Как видно из рисунка, в случае инкубации подложки в суспензии, не содержащей бактериальные клетки *S. typhi*, электрохимического отклика не наблюдали, поскольку не происходило формирование иммунного комплекса. Кроме того, представленные результаты демонстрируют отсутствие влияния неспецифических взаимодействий и адсорбции.

Реальными объектами анализа служили испражнения инфицированных животных (курица). Для количественного определения микроорганизмов *S. typhi* в реальных объектах, подложку с иммобилизованными антителами против искомой бактерии инкубировали в испражнения инфицированных кур (третья стадия схемы иммуноанализа). Холостой опыт – испражнения неинфицированных животных. (таблица 3.3.). В качестве метода сравнения применяли метод бактериального посева.

Полученные в процессе анализа результаты, демонстрируют удовлетворительное соответствие между предлагаемым бесферментным

электрохимическим способом анализа и традиционно используемым методом бактериального посева.

Таблица 3.3 – Результаты определения бактерии *S. typhi*. в испражнениях инфицированных птиц, полученные с использованием метода бактериального посева и электрохимического иммуноанализа ($n = 3$, $P = 0.95$)

№ образца	Результаты определения бактерии <i>S. typhi</i> ., lg(n, КОЕ/см ³)		
	метод бактериального посева* (C ₁)	Электрохимический метод (C ₂)	C ₂ /C ₁ , %
1	7.0	6.7±0.5	87
2	7.0	6.8±0.3	91

*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск)

Результаты исследований, иллюстрируют корректность применения, разработанного бесферментного способа иммуноанализа на основе магнитных НЧ для количественного определения бактерий *S. typhi*., меченных наночастицами Fe₃O₄.

3.1.5. Определение содержания E. coli в модельных суспензиях с использованием разработанного электрохимического способа иммуноанализа

Разработанный способ применили для определения бактериальных клеток *E. coli* (штамм ATCC 25922) в модельных суспензиях. Для реализации этого анализа подложку с иммобилизованными антителами против искомой бактерии инкубировали в модельных суспензиях с различной концентрацией, все остальные этапы выполняли в соответствии с разработанной схемой иммуноанализа (глава 3.1.1)

Зарегистрированные производные вольтамперограмм железа в процессе анализа суспензий, не содержащих и содержащих бактерии *E. coli*, аналогичны полученным для бактерий *S. typhi*. (рисунок 3.5).

Зависимость $\lg(dI/dE) - \lg C$ для бактерий *E. coli* линейна в диапазоне концентраций от $10^4 - 10^7$ КОЕ/см³: $\lg(dI/dE) = 1.03 \cdot \lg C - 5.49$; $R^2 = 0.997$.

Таким образом, приведенные результаты исследований подтверждают возможность применения разработанного подхода с помощью электрохимической регистрации сигнала от НЧ магнетита, используемых в качестве сигналообразующей метки, для определения широкого круга грамотрицательных бактериальных клеток. Однако, следует отметить, что для проведения предложенного варианта анализа необходимо порядка 3 часов, что является существенным недостатком, тогда как этапы с 1–3 занимают около 40 минут (рисунок 3.1). Это связано с продолжительностью четвертого этапа анализа - кислотного растворения иммунокомплекса. Поэтому далее представлялось целесообразным регистрировать прямой аналитический сигнал от НЧ магнетита. С этой целью были развиты еще два подхода.

3.2. Электрохимический иммуносенсор для определения содержания микроорганизмов на примере *E. coli* с применением НК Fe₃O₄ в качестве метки

Во втором варианте реализуемой схемы (рисунок 3.1) иммуноанализа применяли в качестве сигналообразующей метки НК магнетита, функционализированные электрохимически активным покрытием (полипиррол; поливинилбензилхлорид, модифицированный хинолином, хиноксалином или хинальдином; оксид кремния, модифицированный ферроценом). Аналитическим сигналом служили ток окислительно-восстановительных превращений: электроактивного полимера полипиррол, либо гетероциклических молекул, предварительно ковалентно «пришитых» к поливинилхлориду, либо молекул ферроцена, предварительно ковалентно «пришитых» к оксидкремниевому покрытию [130].

3.2.1. Электрохимическое поведение синтезированных наноккомпозитных частиц

3.2.1.1. Окислительно-восстановительные превращения НК, функционализированных полимерным поливинилбензилхлоридным покрытием, модифицированным хинолином

На рисунке 3.6 приведены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в широком диапазоне потенциалов: хлорида 1-(пара-винилбензил)хинолина в ацетонитриле, нанесенного на толсто пленочный графитэпоксидный электрод (ТГЭ) (рисунок 3.6, а), и ТГЭ, на рабочую поверхность которого предварительно была нанесена суспензия синтезированных НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2a$ с полимерным поливинилбензилхлоридным покрытием, модифицированным хинолином, хиноксалином, или хинальдином выбор которых приведен в главе 2 (рисунок 3.6, б).

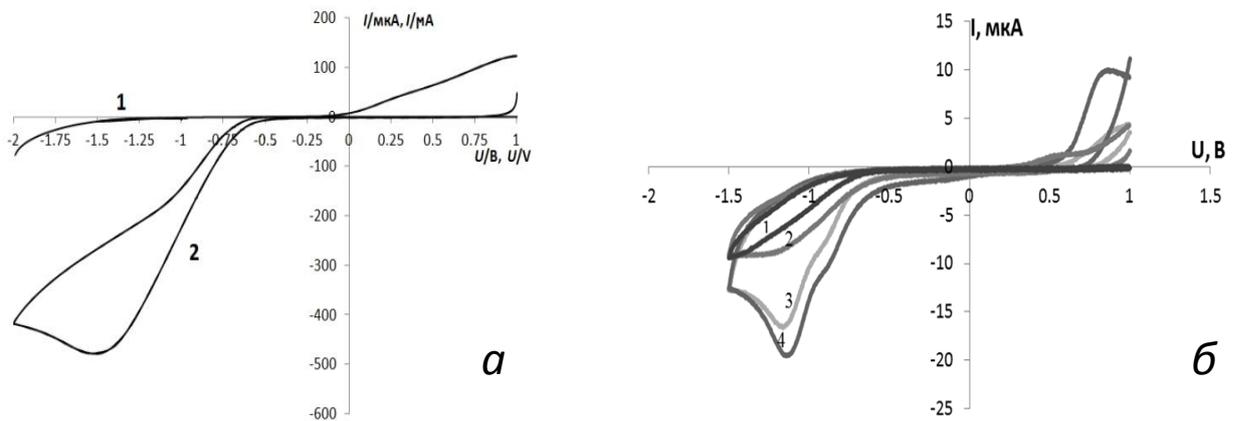


Рисунок 3.6 – ЦВА хлорида 1-(пара-винилбензил)хинолина (а): 1 – фон 0.1 М KNO_3 , 2 – ЦВА ТГЭ с нанесенным хлоридом 1-(п-винилбензил)хинолина ($C_{\text{нач}} = 8.84 \cdot 10^{-3}$ М); ЦВА НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2a$, зарегистрированные на ТГЭ (б): 1 – фоновый электролит 0.1 М KNO_3 ; 2 – 4 – ТГЭ, модифицированный образцом:

$$2 - C_{\text{нач мод}} = 4 \text{ мг/см}^3, 3 - C_{\text{нач мод}} = 10 \text{ мг/см}^3, 4 - C_{\text{нач мод}} = 14 \text{ мг/см}^3;$$

$$v_{\text{рег-ии}} = 100 \text{ мВ/с}$$

Как видно из рисунка, на обеих вольтамперограммах наблюдали выраженный катодный сигнал при потенциале в первом случае при -1.40 В, во втором при -1.30

В. Таким образом, можно сделать заключение, что процессы, протекающие на поверхности ТГЭ, модифицированного НК магнетита, соответствуют электрохимическим превращениям хинолиновой группы (схема 3.1.) [130, 344].

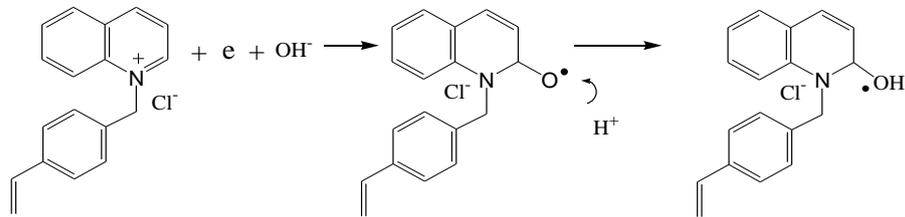


Схема 3.1 – Механизм электрохимического восстановления хинолина

Аналитические характеристики, полученные в процессе исследования окислительно-восстановительных превращений хлорида 1-(пара-винилбензил)хинолиния, нанесенного на ТГЭ и НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2a$ с полимерным поливинилбензилхлоридным покрытием, модифицированным хинолином, нанесенных на рабочую поверхность ТГЭ, приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Градуировочные характеристики ТГЭ ($n = 3, P = 0.95$)

<p>ТГЭ с нанесенным хлоридом 1-(пара-винилбензил)хинолиния, исходные концентрации модифицирующего раствора: $2.47 \cdot 10^{-3}$; $5.3 \cdot 10^{-3}$; $8.87 \cdot 10^{-3}$; $1.77 \cdot 10^{-2}$; $2.47 \cdot 10^{-2}$ М</p>	<p>ТГЭ с нанесенными НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2a$ с полимерным поливинилбензилхлоридным покрытием, модифицированным хинолином, исходные модифицирующие суспензии: 2; 4; 10; 14; 30 г/л</p>
<p>I (мкА) = $(10.05 \pm 1.60) \cdot C + (200.12 \pm 32.23)$, $S_r = 16\%$, $R^2 = 0.970$</p>	<p>I (мкА) = $(0.80 \pm 0.12) \cdot C - (6.00 \pm 0.94)$ $S_r = 15\%$, $R^2 = 0.970$</p>

3.2.1.2. Окислительно-восстановительные реакции НК, функционализированных полимерным покрытием на основе полипиррола.

На рисунке 3.7 приведены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в широком диапазоне потенциалов: НЧ полипиррола, синтезированного по аналогичной методике, что и нанокомпозит, только в отсутствие в реакционной смеси НЧ магнетита и нанесенного на ТГЭ (рисунок 3.7, а), и ТГЭ, на рабочую поверхность которого предварительно была нанесена суспензия синтезированных НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 8$ с полимерным покрытием на основе полипиррола, выбор которых приведен в главе 2 (рисунок 3.7, б).

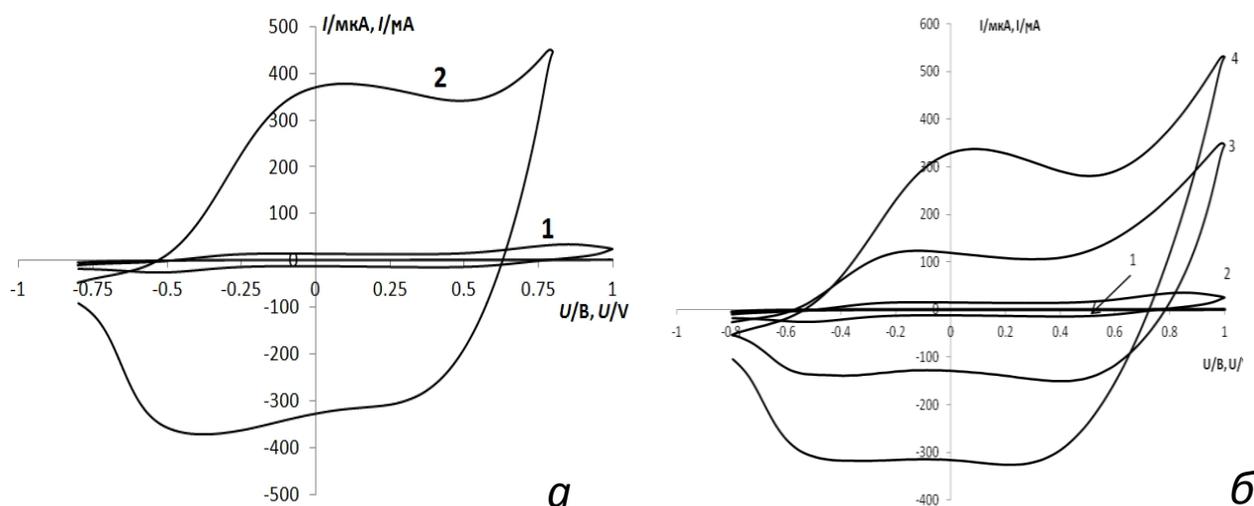


Рисунок 3.7 – ЦВА НЧ полипиррола (а): 1 – фон 0.1 М KNO_3 , 2 – полипиррол, нанесенный на ТГЭ (исходная концентрация суспензии НЧ полипиррола 1.5 г/л); ЦВА НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 8$ (б): 1 – фоновый электролит 0.1 М KNO_3 , 2 – ТГЭ с нанесенным образцом (2–4): 2 – $C_{\text{мод}} = 0.25 \text{ мг/см}^2$, 3 – $C_{\text{мод}} = 0.75 \text{ мг/см}^2$, 4 – $C_{\text{мод}} = 1.5 \text{ мг/см}^2$; $v_{\text{рег-ии}} = 100 \text{ мВ/с}$

Как видно из рисунка, на обеих вольтамперограммах наблюдали на анодной ветви электрохимический отклик при потенциале 0.00 В, а на катодной – при потенциалах -0.40 В и 0.35 В для ТГЭ, модифицированного НЧ полипиррола, и аналогичные электрохимические отклики при потенциалах -0.15 В и -0.50 В и 0.40 В для ТГЭ, модифицированного полипиррольными НК Fe_3O_4 . На основании

сравнения вольтамперограмм, можно сделать заключение, что процессы, протекающие на поверхности ТГЭ, модифицированного НК магнетита, соответствуют электрохимическим превращениям полипиррола (схема 3.2) [130, 345, 346].

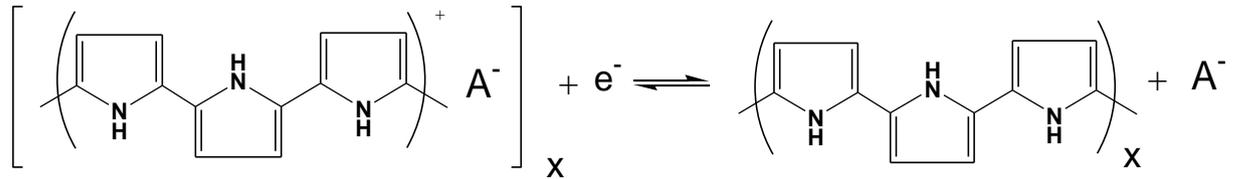


Схема 3.2 – Механизм электрохимического восстановления полипиррола

Аналитические характеристики, полученные в процессе исследования окислительно-восстановительных превращений НЧ полипиррола, нанесенного на ТГЭ и НК Fe₃O₄ -8 с полипиррольным покрытием, нанесенных на рабочую поверхность ТГЭ, приведены в таблице 3.5. Аналитическим сигналом окисления полипиррола служила величина максимального тока при потенциале 0.00 В, а в случае НК аналитическим сигналом превращения полипиррольной оболочки нанокompозита служила величина максимального тока при потенциале -0.15 В.

Таблица 3.5 – Градуировочные характеристики ТГЭ ($n = 3$, $P = 0.95$)

ТГЭ с нанесенным на рабочую поверхность НЧ полипиррола, исходные концентрации модифицирующего раствора: 0.25; 0.75; 1.50; 3.00; 7.00 г/дм ³	ТГЭ с нанесенными на рабочую поверхность НК Fe ₃ O ₄ – 8 с полипиррольным покрытием, исходные модифицирующие суспензии: 0.25; 0.75; 1.50; 3.00; 6.00 мг/см ³
I (мкА) = (200.02±19.20)· C + (70.15±6.73) $S_r = 9.6\%$, $R^2=0.980$	I (мкА) = (200.34±20.43)· C – (3.12±0.32) $S_r = 10\%$, $R^2 = 0.960$

3.2.1.3. Окислительно-восстановительные реакции НК, функционализированных оксидкремниевым покрытием, модифицированным ферроценом.

На рисунке 3.8. приведены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в широком диапазоне потенциалов: раствора хлорида (3-(ферроцениламид)пропил)триэтоксисилана (модифицирующего агента для нанокompозитных частиц) в ацетонитриле (рисунок 3.8, а), и ТГЭ, на рабочую поверхность которого предварительно была нанесена суспензия синтезированных НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 10$ с оксидкремниевым покрытием модифицированным (3-(ферроцениламид)пропил)триэтоксисиланом, выбор которых приведен в гл.2 (рисунок 3.8, б).

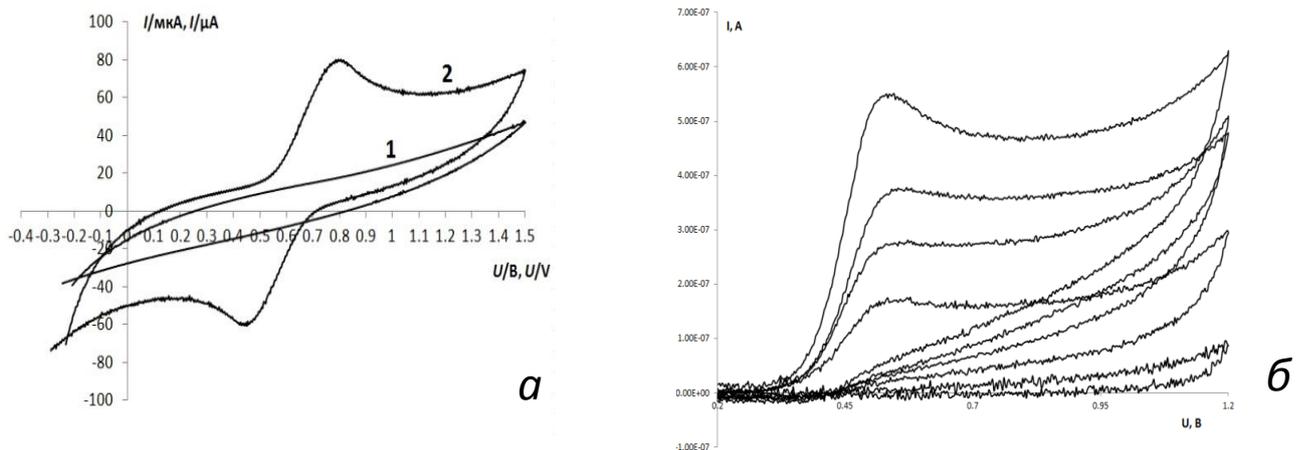


Рисунок 3.8 – ЦВА хлорида (3-(ферроцениламид)пропил) триэтоксисилана (а): 1 – фон 0.1 М LiClO_4 в ацетонитриле, 2 – (3-(ферроцениламид)пропил) триэтоксисилана в ацетонитриле ($C_{\text{нач}} = 7.25 \cdot 10^{-4}$ М); ЦВА НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 10$ (б):

1 – фоновый электролит 0.1 М KNO_3 в воде, 2 – 5 – НК, нанесенный на ТГЭ: 2

– $C_{\text{мод}} = 0.2$ мг/см³, 3 – $C_{\text{мод}} = 0.3$ мг/см³, 4 – $C_{\text{мод}} = 0.45$ мг/см³,

5 – $C_{\text{мод}} = 0.6$ мг/см³; $v_{\text{рег-ии}} = 100$ мВ/с

Как видно из рисунка, на обеих вольтамперограммах наблюдали на катодной и анодной ветвях присутствие выраженных электрохимических откликов при потенциалах 0.45 В и 0.75 В соответственно для раствора хлорида

(3-(ферроцениламид)пропил)триэтоксисилана в ацетонитриле, и выраженный анодный отклик при потенциале при потенциале 0.55 В для ТГЭ, модифицированного НК Fe_3O_4 с оксидкремниевым покрытием, с «пришитым» ферроценом. На основании сравнения анодных пиков, зарегистрированных ЦВА, можно сделать заключение, что процессы, протекающие в растворе (3-(ферроцениламид)пропил)триэтоксисилана и на поверхности ТГЭ модифицированного НК магнетита, соответствуют электрохимическим превращениям ферроценовой группы (схема 3.3) [130, 347, 348].

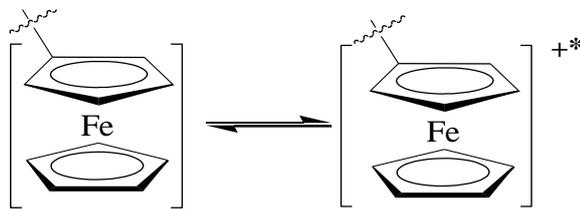


Схема 3.3 – Механизм электрохимических превращений ферроцена

Аналитические характеристики, полученные в процессе исследования окислительно-восстановительных превращений раствора (3-(ферроцениламид)пропил)триэтоксисилана в ацетонитриле и НК Fe_3O_4 -10 с оксидкремниевым покрытием, с «пришитым» ферроценом, нанесенных на рабочую поверхность ТГЭ, приведены в таблице 3.6. Аналитическим сигналом окисления ферроценовой группировки служила величина максимального тока при потенциале 0.75 В, а в случае НК – при потенциале 0.55 В.

Таблица 3.6 – Градуировочные характеристики ТГЭ ($n = 3, P = 0.95$)

<p>Раствор (3-(ферроцениламид)пропил)триэтоксисилана в ацетонитриле, концентрации раствора: $1.84 \cdot 10^{-4}$; $3.66 \cdot 10^{-4}$; $5.46 \cdot 10^{-4}$; $7.25 \cdot 10^{-4}$; $2.3 \cdot 10^{-3}$ М</p>	<p>ТГЭ с нанесенными на рабочую поверхность НК Fe_3O_4-10 с с оксидкремниевым покрытием, с модифицированным ферроценом, исходные модифицирующие суспензии: 0.2; 0.3, 0.45; 0.6 мг/см³</p>
<p>I (мкА) = $(20.02 \pm 0.20) \cdot C + (1.13 \pm 0.01)$ $S_r = 10\%$, $R^2 = 0.980$</p>	<p>I (мкА) = $(0.70 \pm 0.06) \cdot C - (0.05 \pm 0.01)$ ($S_r = 8.3\%$, $R^2 = 0.980$)</p>

Анализ представленных результатов исследования электрохимических свойств НК позволяет заключить, что все выбранные образцы синтезированных НК проявляют электрохимическую активность в рабочем диапазоне потенциалов водных растворов от -1.00 до +1.00 В, что в свою очередь дает возможность использовать их в качестве сигналообразующей метки в водных средах.

3.2.2. Электронно-микроскопический анализ взаимодействия бактерий *E. coli* с НК Fe_3O_4

Для электронно-микроскопических исследований инкубировали 2 мл суспензии клеток *E. coli* ($C = 8 \cdot 10^9$ КОЕ/см³) с 0.25 см³ суспензии нанокмпозитов (≈ 1 г/дм³) в 0.9 % стерильном растворе NaCl (0.125 г/дм³) в пластиковой пробирке при температуре $T = (37.0 \pm 0.1)$ °С. Затем консервировали и готовили образцы к микроскопическим исследованиям.

Рисунки 3.9 – 3.12 демонстрируют электронные микрофотографии препаратов клеток *E. coli* до и после взаимодействия с НК с различными типами электроактивного покрытия. Как видно из рисунков НК магнетита всех трех типов представлены в виде темных скоплений сферической формы.

Детальное рассмотрение электронных микрофотографий среза бактериальных клеток *E. coli* после инкубации с НК Fe₃O₄ – 2а показывает, что 10 - ти мин не хватает для адсорбции НК на клетке (рисунок 3.10, а), тогда как после 30 - ти минутного взаимодействия наблюдали единичные НК на клеточной мембране (рисунок 3.10, б).

Напротив, полипиррольные НК Fe₃O₄ – 8 уже через 10 мин инкубации с клеточной линией *E. coli* адсорбируются на мембране клетки (рисунок 3.11, а). Через 30 мин инкубации наблюдали глубокое проникновение частиц в цитоплазму клетку (рисунок 3.11, б). Известно [349], что полипиррол обладает хорошей биосовместимостью, что обуславливает его быстрое и глубокое проникновения в клетку.

НК Fe₃O₄ – 10 через 10 мин после инкубации их с клетками *E. coli* адсорбируются на мембране клетки и частично проникают в клеточную мембрану (рисунок 3.12, а), а через 30 мин взаимодействия наблюдали проникновение в цитоплазму клеток, однако не в такой мере, как в случае полипиррольных НК (рисунок 3.11, б).

Итак, результаты проведенных исследований взаимодействия различных типов НК с клеточной линией *E. coli* демонстрируют, что степень поглощения зависит от природы покрытия нанокompозитных частиц и времени инкубации. С увеличением времени инкубации количество эндоцитированных нанокompозитных частиц возрастает, причем следует отметить, что проникновением НК в объем цитоплазмы клетки иногда сопровождается повреждением клеточной мембраны.

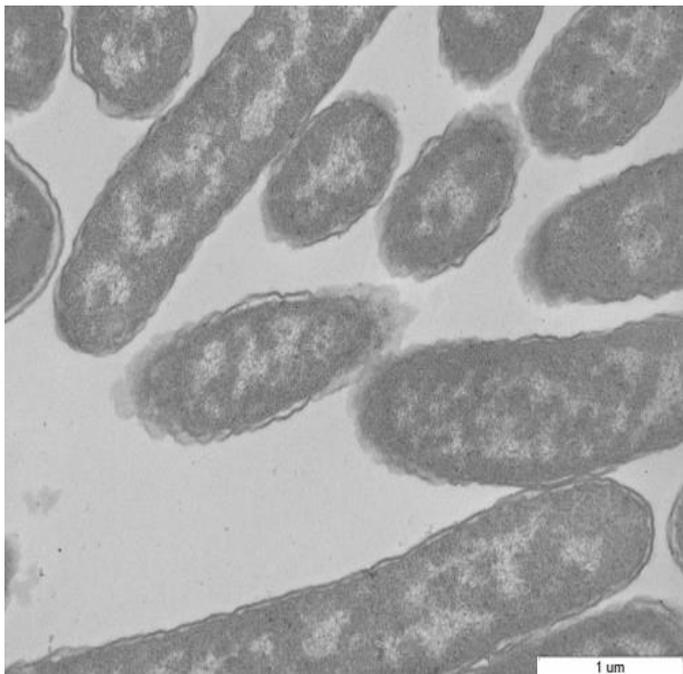


Рисунок 3.9 – Электронная микрофотография ультратонкого среза клеточной культуры *E. Coli*; электронный микроскоп JEM 1400

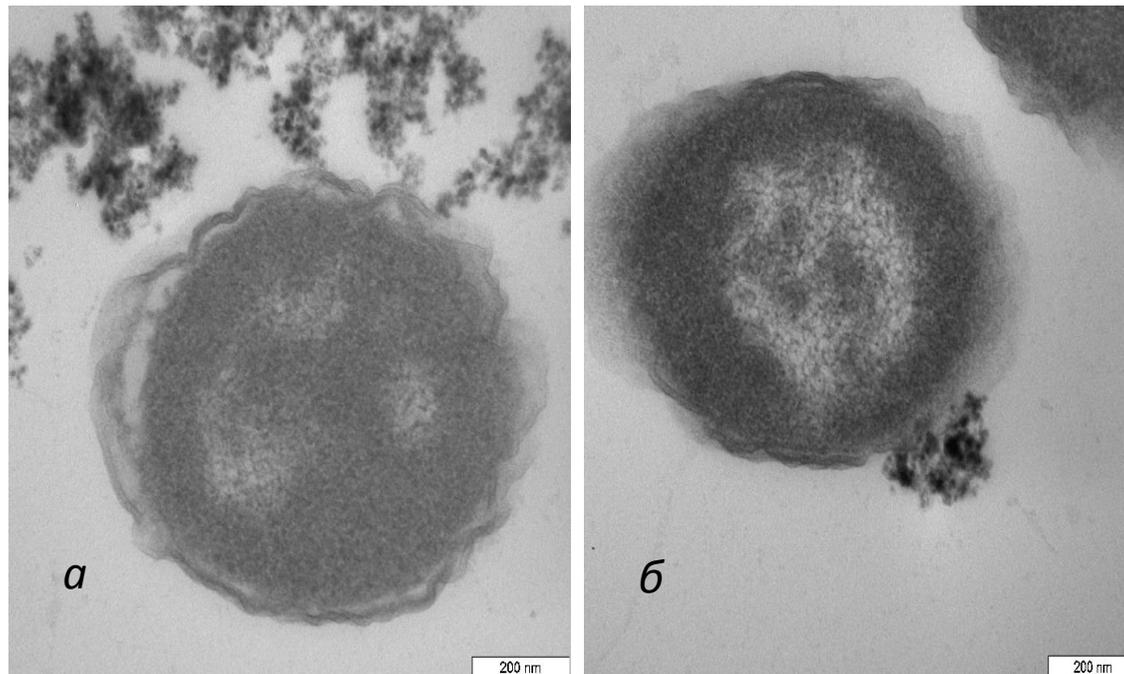


Рисунок 3.10 – – Электронные микрофотографии ультратонкого среза клеточной культуры *E. coli* после 10-ти (а) и 30-ти (б) минутного взаимодействия с НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2a$; электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония)

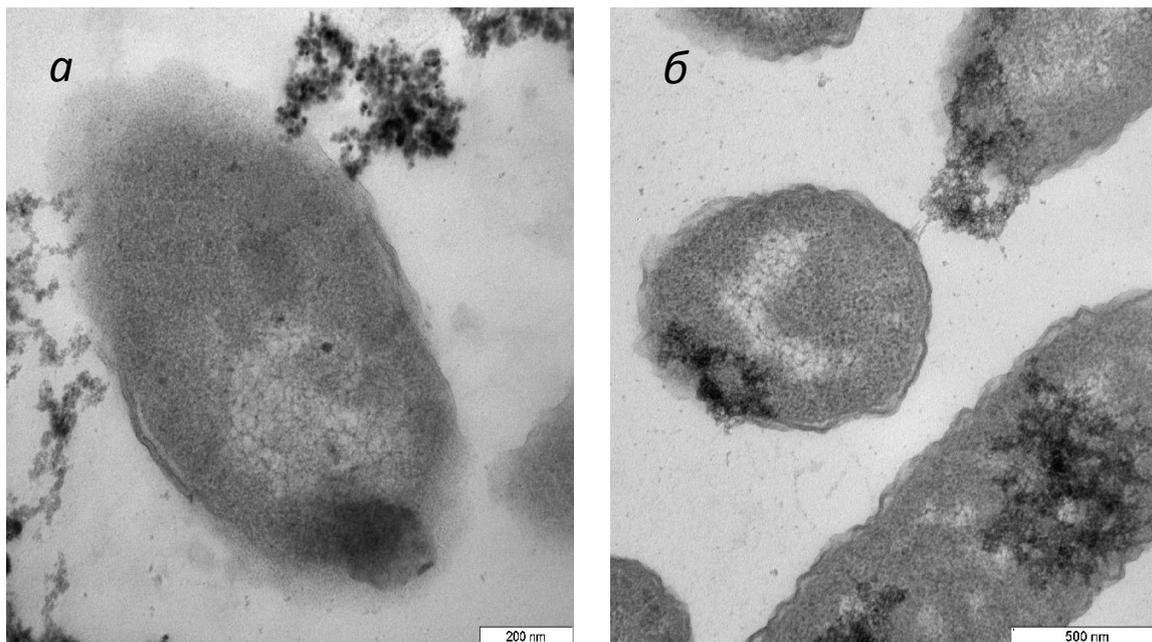


Рисунок 3.11 – Электронные микрофотографии ультратонкого среза клеточной культуры *E. coli* после 10-ти (а) и 30-ти (б) минутного взаимодействия с НК Fe₃O₄ –8; электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония)

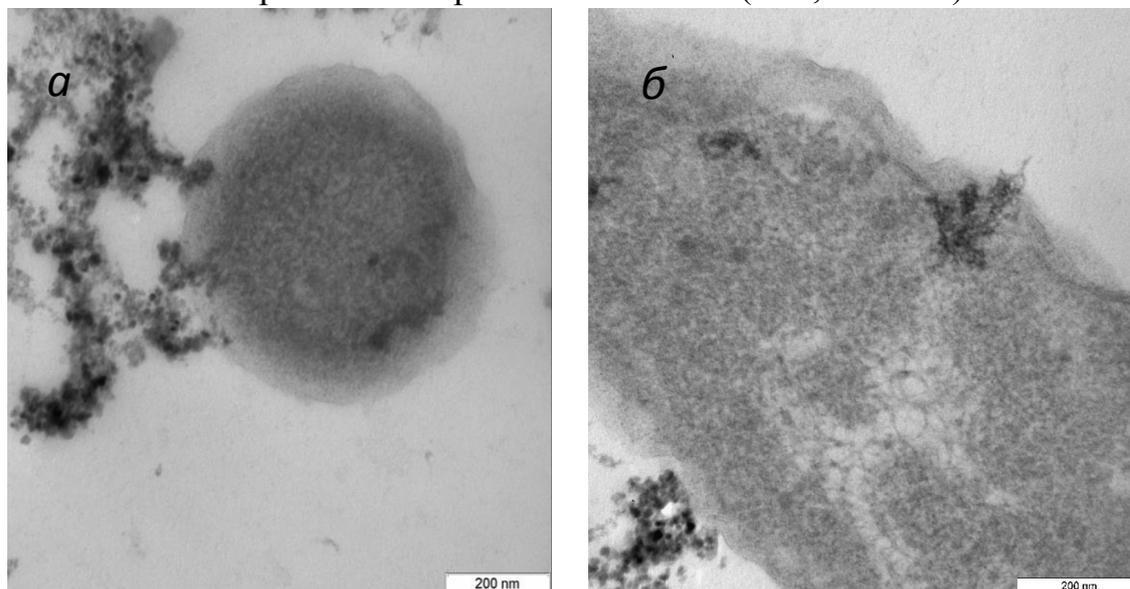


Рисунок 3.12 – Электронные микрофотографии ультратонкого среза клеточной культуры *E. coli* после 10-ти (а) и 30-ти (б) минутного взаимодействия с НК Fe₃O₄ –10; электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония)

3.2.3. Определение содержания бактерий *E. coli* с применением НК Fe_3O_4

Была реализована предложенная схема иммуноанализа (рисунок 3.1) для определения содержания бактерий *E. coli*.

На последнем четвертом этапе ТГЭ после образования на рабочей поверхности иммунокомплекса антитела – меченые НК магнетита клетки *E. coli* помещали в трехэлектродную электрохимическую ячейку (в качестве рабочего электрода) и регистрировали циклические вольтамперограммы. Фоновым электролитом служил 0.1 М водный раствор KNO_3 . Этот этап иммуноанализа проводили с применением магнитного концентрирования.

Проводили холостой эксперимент, когда ТГЭ инкубировали в суспензии клеток, не содержащей бактерии *E. coli*.

Принимая во внимание предлагаемую схему иммуноанализа можно ожидать, что электрохимический отклик – ток восстановления/окисления электрохимически активного покрытия НК даст информацию о наличии и количестве бактерий, локализованных на поверхности электрода.

Результаты, полученные в процессе реализации предложенной схемы иммуноанализа, подтвердили справедливость высказанного положения.

В случае присутствия искомой бактерии *E. coli* в пробе происходило образование иммунокомплекса, что сопровождалось наличием на вольтамперограммах сигналов, соответствующих процессам восстановления/окисления электроактивной полимерной оболочки нанокомпозита. В случае суспензии, не содержащей бактерии *E. coli* – холостого опыта, в исследуемом интервале потенциалов тока окисления-восстановления на кривой не наблюдали, таким образом, образование комплекса антитело – бактерии *E. coli* отсутствовало.

В процедуру иммуноанализа было включено магнитное концентрирование, как эффективный этап.

3.2.3.1. Наноккомпозиты магнетита, функционализированные покрытием на основе поливинилбензилхлорида, модифицированного хинолином

В процессе проведения иммуноанализа с применением в качестве сигналообразующей метки НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 2\text{a}$ установили, что в водных растворах происходит потеря электроактивности этого типа НК, по-видимому, вследствие взаимодействия с водой и протеканием процесса, приведенного на схеме 3.4.

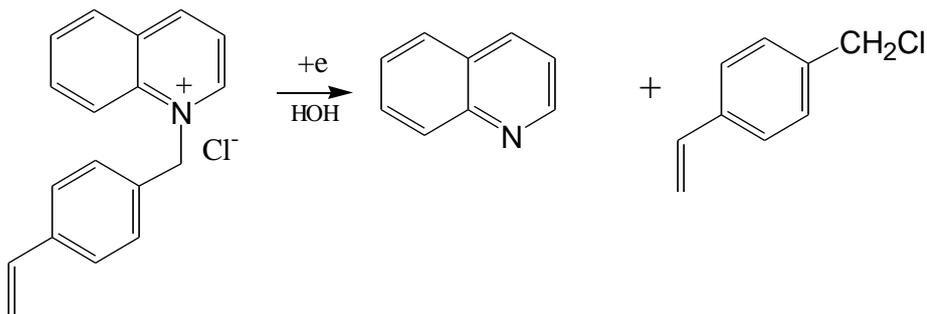


Схема 3.4 – Механизм гидратации хинолина

НК становится электрохимически неактивным уже через 5 минут после погружения в водный раствор. Продолжительность проведения процедуры иммуноанализа существенно больше, поэтому дальнейшее применение Этого типа НК оказалось нецелесообразным.

3.2.3.2. Наноккомпозиты магнетита, функционализированные электроактивным полипиррольным покрытием

Результатом проведенной процедуры иммуноанализа в соответствии с разработанной схемой с применением в качестве сигналообразующей метки полипиррольных НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 8$ стали циклические вольтамперограммы, приведенные на рисунке 3.13. Как видно из рисунка, наблюдали лишь увеличение значений величин анодных токов при потенциале -0.25 В на ЦВА, зарегистрированных после инкубации ТГЭ, модифицированного соответствующими антителами в суспензии, содержащей меченые НК бактерии

E. coli (рисунок 3.13, кривая 1), по сравнению с фоновой кривой и кривой, зарегистрированной после инкубации ТГЭ, модифицированного соответствующими антителами в суспензии, не содержащей меченые НК бактерии *E. coli* (рисунок 3.13, кривая 2).

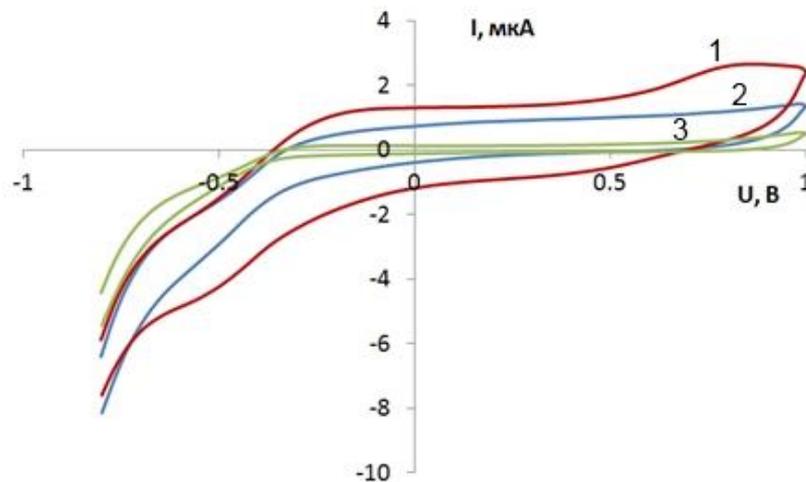


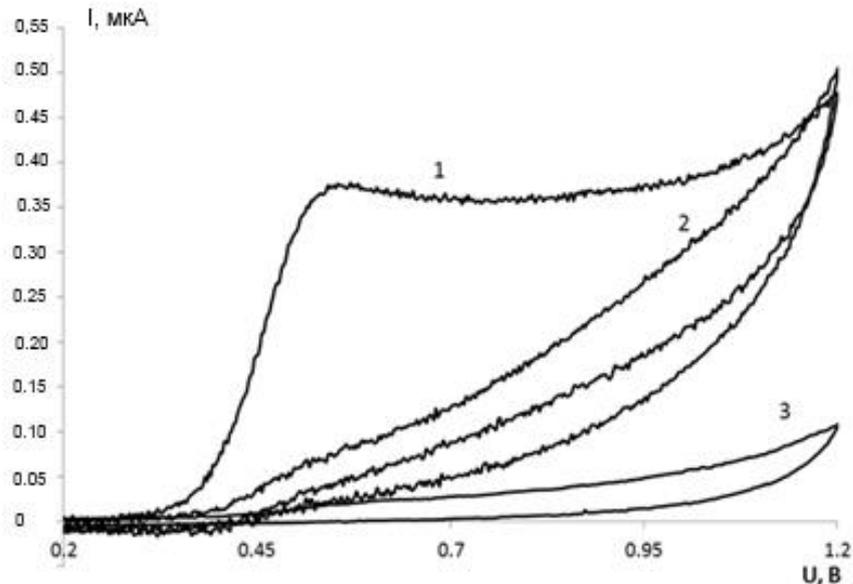
Рисунок 3.13 – ЦВА, зарегистрированные после проведения процедуры иммуноанализа в суспензиях, содержащих ($C_{E.coli} = 6.4 \cdot 10^7$ КОЕ/см³) (1) и не содержащих (2) бактерии *E. coli* меченые НК Fe₃O₄-8; фоновый электролит 0.1 М KNO₃ (3), $v_{рег-ии} = 250$ мВ/с

Рисунок наглядно иллюстрирует плохо выраженные сигналы на ЦВА, соответствующей ТГЭ, модифицированного антителами в суспензии, содержащей меченые НК бактерии *E. coli* после проведения иммуноанализа, несмотря на большую исходную концентрацию бактерий *E. coli* ($6.4 \cdot 10^7$ КОЕ/см³). Таким образом, применение НК Fe₃O₄ – 8 в качестве сигналообразующей метки в дальнейших экспериментах было нецелесообразным.

Принимая во внимание результаты исследований кинетики взаимодействия полипоррольных НК магнетита с клетками *E. coli*, можно ожидать, что образцы этого типа очень легко и быстро проникают вглубь клетки, следствием этого является экранирование электроактивного покрытия на поверхности частиц клеточным веществом.

3.2.3.3. Наноконпозиты магнетита, функционализированные с электроактивным ферроценмодифицированным оксидкремниевым покрытием

Применение в иммуноанализе сигналообразующих электроактивных НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 10$ привело к регистрации хорошо выраженных сигналов от ферроцена после образования иммунотомплекса (рисунот 3.14).



Рисунот 3.14 – ЦВА зарегистрированные после проведения процедуры иммуноанализа в суспензиях, содержащих (концентрация *E. coli* $2.3 \cdot 10^6$ КОЕ/см³) (1) и не содержащих (2) бактерии *E. coli*, меченные НК $\text{Fe}_3\text{O}_4 - 10$; фоновый электролит 0.1 М KNO_3 (3), $v_{\text{рег-ии}} = 250$ мВ/с

Было определено рабочее время инкубации НК магнетита с бактериальными клетками – 30 мин, которое использовали в дальнейших исследованиях. Время формирования иммунотомплекса на поверхности ТГЭ составило 30 мин.

Для определенных рабочих условий была получена линейная зависимость величины аналитического сигнала от десятичного логарифма концентрации бактерий *E. coli* в исходной суспензии:

I (мкА) = $(0.073 \pm 0.001) \cdot \lg C_{E.coli} - (0.203 \pm 0.007)$ в интервале концентраций *E. coli* $2.3 \cdot 10^2 - 2.3 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ ($R^2 = 0.980$). Предел обнаружения составил $1.2 \cdot 10^1$ КОЕ/см³.

В таблице 3.7 приведены аналитические характеристики разрабатываемого иммуносенсора с применением НК Fe_3O_4 – 10.

Приведенные результаты подтверждают, что аналитический сигнал окислительно-восстановительных превращений ферроцена, включенного в оксидкремниевое покрытие, в которое были инкапсулированы магнитные наночастицы, может служить источником информации о количестве бактерий, локализованных на поверхности ТГЭ.

Таблица 3.7 – Аналитические характеристики электрохимического иммуносенсора для определения бактерии *E. coli* ($n = 3$, $P = 0.95$)

Концентрация <i>E. coli</i> , КОЕ/см ³	Аналитический сигнал $I \pm \Delta I$, мкА <i>Sr</i> , %		
	1 день	2 день	3 день
$2.3 \cdot 10^2$	0.0273±0.0100 15	0.0271±0.0105 15	0.0270±0.0106 15
$2.3 \cdot 10^3$	0.0533±0.0190 14	0.0538±0.0186 14	0.0530±0.0194 15
$2.3 \cdot 10^4$	0.1237±0.0314 10	0.1185±0.0310 10	0.1232±0.0320 11
$2.3 \cdot 10^5$	0.1707±0.0397 9.4	0.1910±0.0385 9.3	0.1803±0.0391 9.7
$2.3 \cdot 10^6$	0.2393±0.0448 7.5	0.2480±0.0480 8.6	0.2289±0.0491 9.1
$2.3 \cdot 10^7$	0.3613±0.0658 7.3	0.3820±0.0621 6.4	0.3508±0.0661 7.6

3.2.4. Результаты определения правильности и специфичности разрабатываемого бесферментного электрохимического иммуносенсора. Анализ реальных объектов

Определение правильности разрабатываемого сенсора для бесферментного электрохимического иммуноанализа проводили с использованием ИФА анализа и бактериального посева, применяемых в качестве методов сравнения.

Для этого готовили последовательным разбавлением серию суспензий, содержащих бактериальные клетки *E. coli* в диапазоне концентраций от $5 \cdot 10^6$ до $5 \cdot 10^1$ КОЕ/см³. Образец, соответствующий каждой концентрации клеток, делили на три равных части, затем каждую из частей анализировали методами ИФА, бактериального посева и разрабатываемым иммуносенсором. Исследования проводили в трех параллельных сериях опытов (таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Результаты исследования модельных суспензий, содержащих *E. coli* с применением различных методов ($n = 3$, $P = 0.95$, $F_{кр} = 6.39$, $t_{кр} = 2.78$)*

Концентрация <i>E. coli</i> , КОЕ/см ³	ИФА, КОЕ/ см ³	Электрохимический метод, КОЕ/ см ³	Бактериальный посев, КОЕ/ см ³	F-критерий	t-критерий
$5 \cdot 10^6$	$(4.7 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(4.6 \pm 0.3) \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	2.51	0.77
$5 \cdot 10^5$	$(5.3 \pm 0.2) \cdot 10^5$	$(4.9 \pm 0.4) \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	3.15	2.37
$5 \cdot 10^4$	$(4.7 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$(4.7 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	3.56	0.30
$5 \cdot 10^3$	$(5.7 \pm 0.7) \cdot 10^3$	$(5.2 \pm 0.5) \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	4.35	2.11
$5 \cdot 10^2$	$(5.2 \pm 0.3) \cdot 10^2$	$(4.8 \pm 0.6) \cdot 10^2$	-	5.10	1.67
$5 \cdot 10^1$	-	-	-	-	-

*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск).

Приведенные результаты наглядно демонстрируют, что минимально определяемая концентрация с применением разрабатываемого бесферментного электрохимического иммуносенсора составляет $5 \cdot 10^2$ КОЕ/см³. Это совпадает с возможностями метода ИФА, однако для реализации процедуры электрохимического иммуноанализа не требуется применение дорогостоящего оборудования, организации специальных помещений, дорогостоящих реагентов, кроме того продолжительность электрохимического метода значительно меньше, чем для ИФА анализа.

Для определения специфичности разрабатываемого метода ТГЭ с иммобилизованными антителами к бактерии *E. coli*, инкубировали в суспензиях, содержащих бактерии $5 \cdot 10^4$ КОЕ/см³ *E. coli* и бактерии $5 \cdot 10^4$ КОЕ/см³ *S. infantis*. На

рисунке 3.15 приведены примеры вольтамперограмм, полученных в результате анализа.

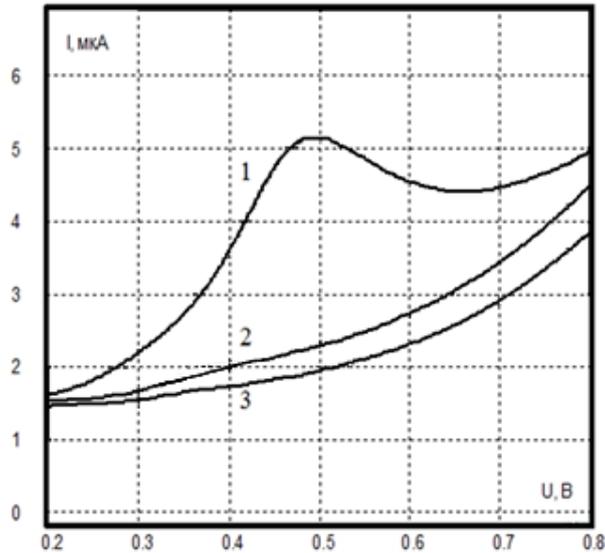


Рисунок 3.15 – Анодные вольтамперограммы, зарегистрированные в суспензиях, содержащих бактерии *E. coli* (1); бактерии *S. infantis* (2); фоновый электролит 0.1 М KNO_3 (3)

Как видно из рисунка, в случае инкубации ТГЭ в суспензии, не содержащей бактериальные клетки *E. coli*, электрохимического отклика не наблюдали, поскольку не происходило формирование иммунного комплекса. Кроме того, представленные результаты демонстрируют отсутствие влияния неспецифических взаимодействий и адсорбции.

Для подтверждения селективности разрабатываемого иммуносенсора проводили анализ модельных суспензий бактерий, в которых помимо *E. coli* ($C_{E.coli} \approx 5 \cdot 10^4$ КОЕ/см³) содержались бактерии ($C_{\text{бакт}} \approx 1 \cdot 10^6$ КОЕ/см³): *S. infantis*, *Micrococcus flavus*, *Bacillus licheniformis* (таблица 3.9). Образец, соответствующий каждой концентрации клеток, делили на три равных части, затем каждую из частей анализировали методами ИФА, бактериального посева и разрабатываемым методом. Исследования проводили в трех параллельных сериях опытов.

Таблица 3.9 – Результаты определения концентрации микроорганизмов *E. coli* в модельных суспензиях, содержащих различные бактерии с применением методов ИФА, бактериального посева и разработанного электрохимического иммуносенсора ($n = 5$, $P = 0.95$, $F_{кр} = 6.39$, $t_{кр} = 2.67$)*

Состав смеси $C_{E.coli} = 7 \cdot 10^4$ КОЕ/см ³ $C_{2\text{компонента смеси}}$ $\approx 10^6$ КОЕ/см ³	Содержание бактерии <i>E. coli</i> , КОЕ/см ³			<i>F</i> -критерий	<i>t</i> -критерий
	ИФА*	Электрохимический метод	Метод бактериального посева*		
<i>E. coli</i> + <i>S. infantis</i>	$(5.8 \pm 0.3) \cdot 10^4$	$(6.0 \pm 0.5) \cdot 10^4$	$\approx 6 \cdot 10^4$	2.34	0.89
<i>E. coli</i> + <i>Micrococcus flavus</i>	$(6.0 \pm 0.3) \cdot 10^4$	$(5.8 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$\approx 6 \cdot 10^4$	2.65	1.52
<i>E. coli</i> + <i>Bac. licheniformis</i>	$(6.3 \pm 0.5) \cdot 10^4$	$(5.9 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$\approx 6 \cdot 10^4$	1.10	1.77

*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск).

Таблица наглядно демонстрирует, что результаты количественного определения

E. coli в модельных суспензиях, содержащих различные бактерии, с применением разработанного бесферментного электрохимического иммуносенсора удовлетворительно согласуются с результатами определения стандартно используемых в медицинской диагностике методов ИФА и бактериального посева.

Реальными объектами анализа служили проба воздуха и два образца воды. Отбор реальных проб воздуха и воды из природного и искусственных водоемов проводили в соответствии с ГОСТ [350]. Иммуноанализ проводили в соответствии с алгоритмом, приведенным для модельных систем. Пробоподготовки образцов не производилось. В качестве методов сравнения применяли ИФА и бактериальный посев (таблица 3.10).

По рассчитанным *F*- и *t* - критериям можно утверждать, что различие дисперсий метода ИФА и разработанного электрохимического иммуносенсора статистически незначимо (*F*-критерий), а также обе выборки принадлежат к одной

и той же генеральной совокупности и различие средних носит случайный характер (t -критерий).

Таблица 3.10 – Результаты количественного определения бактерии *E. coli* в пробах воды и воздуха, полученные с использованием методов ИФА, бактериального посева и бесферментного электрохимического иммуносенсора

($n = 5, P = 0.95, F_{кр} = 6.39, t_{кр} = 2.67$)*

Проба	Результат определения бактерии <i>E. coli</i> , КОЕ/см ³			F -критерий	t -критерий
	ИФА	Электрохимический метод	Метод бактериального посева		
Проба воздуха	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	–	–
Вода из природного водоема (р.п. Кольцово, Новосибирская область)	$(9.4 \pm 0.3) 10^2$	$(9.75 \pm 0.21) 10^2$	$\approx 1 \cdot 10^3$	2.54	2.17
Вода из искусственного водоема (г. Новосибирск)	$(5.2 \pm 0.3) 10^2$	$(5.02 \pm 0.15) 10^2$	Не обнаружено	3.97	1.86

*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г.Новосибирск).

Полученные в процессе анализа результаты, демонстрируют удовлетворительное соответствие между предлагаемым бесферментным электрохимическим методом анализа и традиционно используемыми методами ИФА и бактериального посева. Следует отметить, что применение метода бактериального посева позволило определить кроме *E. coli* другие виды бактериальных клеток. В пробе воды из природного водоема выделены сапрофитные микроорганизмы (титр $1.1 - 1.5 \cdot 10^3$ кл/см³). В пробе воды из искусственного водоема титр этих же бактерий составляет $6.1 - 2.3 \cdot 10^2$ КОЕ/см³. Кроме того, в исследуемых образцах преобладают

спорообразующие бактерии, неспороносные присутствуют в количестве 35 КОЕ/см³. В качестве среды применяли рыбно-пептонный агар (рисунок 3.16).

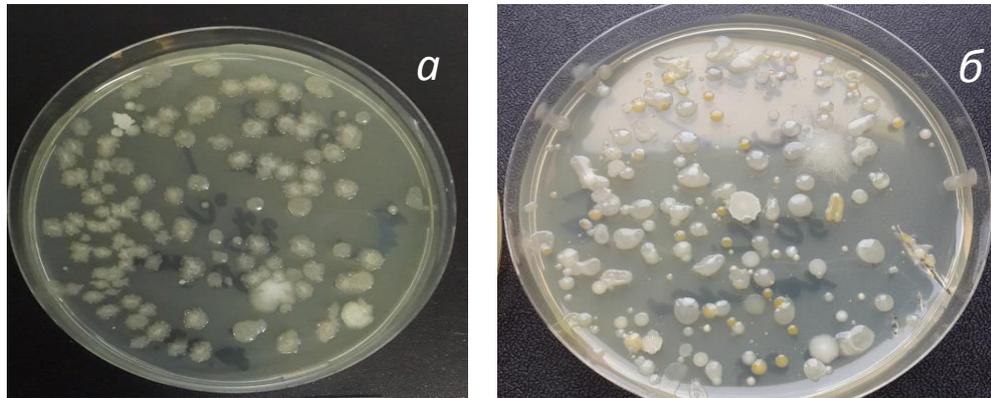


Рисунок 3.16 – Фотографии бактерий и грибов, содержащихся в пробе воды из природного водоема, после высева на питательную среду агар: *а* – 2-е суток после посева; *б* – 3-е суток после посева

Приведенные результаты исследований демонстрируют корректность применения предложенного подхода, основанного на использовании в качестве сигналообразующей метки магнитных НК, функционализированных электроактивным ферроценмодифицированным оксидкремниевым покрытием для количественного определения бактерий. Основным преимуществом этого варианта определения перед ранее рассмотренным, является возможность регистрации прямого электрохимического сигнала от электроактивного покрытия, что позволило существенно сократить продолжительность иммуноанализа.

3.3. Бесферментный электрохимический иммуносенсор для определения содержания патогенных микроорганизмов на примере *E. coli* и *St. aureus* с применением НК Fe₃O₄ в качестве метки в апротонной среде

Еще один из разрабатываемых подходов, позволивший зарегистрировать прямой электрохимический сигнал от магнитных меток – разработка бесферментного электрохимического иммуносенсора на основе магнитных НК с модифицирующим покрытием, облегчающим процесс эндоцитоза. Аналитический сигнал – либо прямой анодный отклик, либо количество электричества,

затраченное на окисление продуктов, предварительно восстановленных НЧ магнетита, функционализированных хитозаном (для определения грамотрицательных бактерий) или 3-аминопропилтриэтоксисиланом (для определения грамположительных бактерий) в апротонной среде [310, 335].

3.3.1. Электрохимические превращения магнитных наночастиц и синтезированных наноконкомпозитных частиц в апротонной среде

Прямой электрохимический отклик от НЧ Fe_3O_4 в водной среде зарегистрировать представляется маловероятным в силу достаточно большого перенапряжения окислительно - восстановительных реакций, исследуемых наночастиц и мешающего влияния разряда – ионизации воды. Применение апротонных (безводных) растворителей (например, ацетонитрила) позволило существенно расширить рабочий диапазон потенциалов и получить прямой электрохимический отклик от НЧ магнетита [351].

Были зарегистрированы ЦВА НЧ Fe_3O_4 на платиновом электроде, предварительно восстановленные при потенциалах -2.50 В и -1.30 В соответственно (рисунок 3.17).

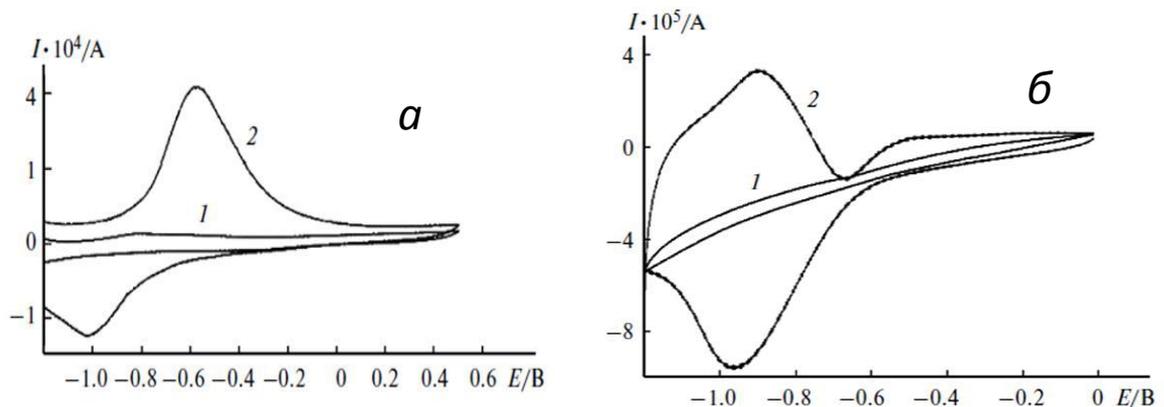


Рисунок 3.17 – ЦВА, зарегистрированные на платиновом дисковом электроде, модифицированным (1) немодифицированным (2) НЧ Fe_3O_4 : потенциал предварительного восстановления -2.50 В (а) и -1.30 В (б); $\nu_{\text{рег-ии}}=50$ мВ/с;

$\tau_{\text{эл}}$ 60 с, концентрация НЧ в исходной суспензии 0.1 г/л,

фоновый электролит 0.1 М LiClO_4 в ацетонитриле

Из рисунка видно, что изменение потенциала предварительного электролиза, влияет на количество и форму откликов на анодной ветви ЦВА. В случае наложения потенциала предварительного электролиза -1.30 В (рисунок 3.17, б), на анодной ветви ЦВА наблюдали 2 сигнала при потенциалах -0.85 В и -0.55 В соответственно, тогда как в случае проведения предварительного электролиза при потенциале -2.50 В – только один при -0.59 В. Кроме того, зарегистрированные сигналы окисления различаются по величине максимального тока анодного пика и по положению потенциала пика на шкале. Катодные процессы практически идентичны и, вероятно, протекают одинаково независимо от потенциала предварительного электролиза.

Представлялось интересным исследовать особенности окислительно-восстановительного поведения НЧ магнетита в апротонной среде, что в свою очередь позволило получить прямой аналитический сигнал от НЧ Fe_3O_4 .

Количество электронов, принимающих участие в окислительно-восстановительных превращениях НЧ Fe_3O_4 , предварительно восстановленных на поверхности платинового электрода при потенциалах -2.50 В и -1.30 В соответственно, рассчитывали, используя теорию электрохимического растворения металлов с поверхности твердого индифферентного электрода [352] (таблица 3.11).

Таблица 3.11 – Результаты расчета количества электронов, участвующих в электрохимическом окислении продуктов, предварительно восстановленных НЧ Fe_3O_4

Потенциал пика, В	Количество электронов
Предварительный электролиз при -2.50 В	
$E_{pa} = -0.59$	3
Предварительный электролиз при -1.30 В	
$E_{pa1} = -0.85$	2
$E_{pa2} = -0.5$	1

Расчет показал, что окисление продуктов, предварительно восстановленных НЧ Fe_3O_4 как в случае потенциала предварительного электролиза при -2.50 В , так и для -1.30 В , вероятно, протекает с переносом трех электронов. Однако в случае реализации электролиза при -2.50 В наблюдали одностадийный перенос трех электронов, а во втором случае двух стадийный – на первом этапе двух электронов, затем еще одного. Были зарегистрированы хронопотенциограммы окисления продуктов, предварительно восстановленных НЧ магнетита, которые свидетельствуют об одностадийном переносе трех электронов в случае потенциала предварительного электролиза при -2.50 В и двухстадийном превращении в случае потенциала предварительного электролиза при -1.30 В (рисунок 3.18).

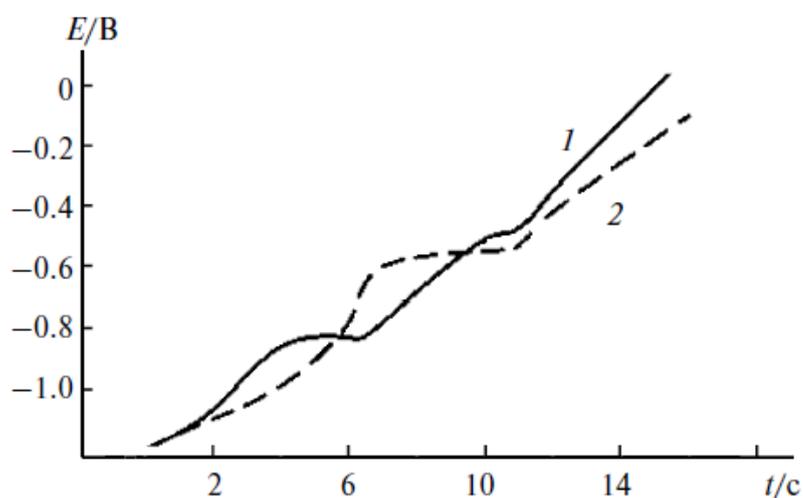


Рисунок 3.18 – Хронопотенциограммы окисления продуктов, предварительно восстановленных НЧ Fe_3O_4 на поверхности платинового электрода при потенциалах -1.30 В (1) и -2.50 В (2)

Из рисунка видно, что в случае окисления продуктов, предварительно восстановленных НЧ Fe_3O_4 при потенциале -1.30 В , наблюдали две горизонтальные площадки при потенциалах -0.85 В и -0.55 В , тогда как для продуктов НЧ, предварительно восстановленных при потенциале -2.50 В – только одна при -0.59 В .

Для изучения возможного механизма окислительно-восстановительных превращений НЧ Fe_3O_4 применяли метод реакций с использованием 1,10-фенантролина и NH_4SCN [353]. Продукты окисления предварительно

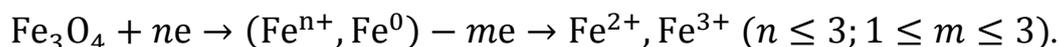
восстановленных НЧ Fe_3O_4 образовывали: трис-1,10-фенантролиновый комплекс железа (II) (максимум светопоглощения при длине волны 508 нм) или в случае качественного определения железа (III) – смесь ярко-красных роданидных комплексов железа $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$, $[\text{Fe}(\text{SCN})_2]^+$, $\text{Fe}(\text{SCN})_3$, $[\text{Fe}(\text{SCN})_4]^-$ (максимум светопоглощения при длине волны 480 нм). Продукты реакций определяли спектрофотометрически (таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Результаты фотометрического определения продуктов окислительно-восстановительных превращений НЧ Fe_3O_4

$E, \text{В}$	$\text{Fe}^{3+} (\lambda_{\text{max}} = 480\text{нм})$	$\text{Fe}^{2+} (\lambda_{\text{max}} = 508\text{нм})$
Предварительный электролиз при потенциале -2.5 В		
Сразу после электролиза	-	-
$E_{pa} = -0.59$	+	-
$E_{pc} = -1.00$	-	-
Предварительный электролиз при потенциале -1.3 В		
Сразу после электролиза	-	-
$E_{pa1} = -0.85$	-	+
$E_{pa2} = -0.50$	+	-
$E_{pc} = -1.00$	-	-

Полученные результаты указывают на наличие ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} , присутствие которых зависит от потенциала предварительного электролиза НЧ магнетита на поверхности платинового электрода.

На основании проведенных исследований была предложена вероятная схема окислительно-восстановительных превращений НЧ Fe_3O_4 в апротонном растворе:



Различное электрохимическое поведение продуктов восстановления НЧ магнетита, по-видимому, связано с потенциалом предварительного электролиза. В случае значения -2.50 В происходит полный процесс восстановления Fe_3O_4 до Fe^0 , а при менее -1.30 В, вероятно, в приэлектродном слое присутствуют также ионные формы железа. Таким образом, дальнейшие эксперименты по определению рабочих условий формирования прямого электрохимического аналитического

отклика от НЧ магнетита проводили при потенциале предварительного электролиза -2.50 В.

Оценку влияния фонового электролита и протонирования среды на процессы окисления – восстановления продуктов, предварительно восстановленных НЧ магнетита, проводили с использованием 0.1 М растворов гексафторфосфата аммония (NH_4PF_6), тетрафторбората тетрабутиламмония (Bu_4NBF_4) и перхлората лития (LiClO_4) в ацетонитриле и путем добавок в раствор фонового электролита раствора бензойной кислоты в ацетонитриле. Для всех исследуемых вариантов регистрировали анодные вольтамперограммы (рисунок 3.19).

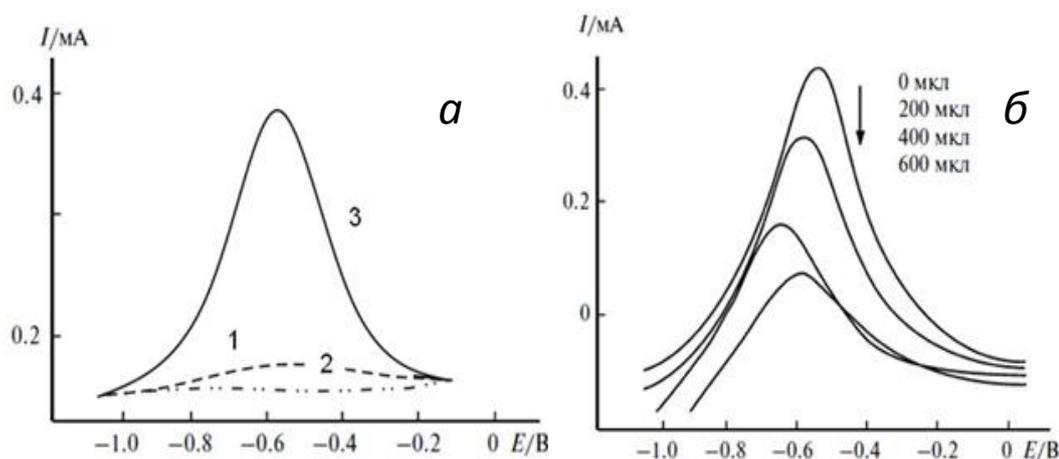


Рисунок 3.19 – ВА на Pt электроде, модифицированном НЧ Fe_3O_4 : *а* – фоновые электролиты: 0.1 М р-р NH_4PF_6 (1), Bu_4NBF_4 (2), LiClO_4 (3) в CH_3CN ; *б* – добавки $C_{\text{бенз. к-ты}} = 0.01$ М; $E_{\text{эд}} = -2.50$ В

Полученные результаты наглядно демонстрируют, что присутствие в качестве фонового электролита LiClO_4 облегчает окислительно-восстановительные процессы НЧ Fe_3O_4 в апротонной среде. Это может быть связано с образованием промежуточных интерметаллических соединений железа и лития на поверхности платинового электрода [354]. Протонирование фонового электролита изменяет электрохимический отклик, наблюдается затруднение процессов окислительно – восстановительных превращений НЧ Fe_3O_4 . Это в свою очередь может быть связано протеканием преимущественно электролиза протонов фонового

электролита, а не процессов восстановления НЧ Fe_3O_4 , вследствие существенных различий величин электрохимического перенапряжения. Таким образом, фоновый электролит был выбран 0.1 М раствор LiClO_4 .

Кроме того, из проведенных экспериментов были получены следующие рабочие условия регистрации прямого электрохимического сигнала от НЧ Fe_3O_4 : время предварительного электролиза ($\tau_{\text{эл}} = 60$ с) и скорость развертки потенциала ($\nu_{\text{рег-ии}} = 0.5$ В/с).

Еще одним этапом по разработке иммуносенсора было изучение влияния покрытия НЧ магнетита, преимуществом которого является увеличение биосовместимости, на формирование электрохимического отклика от НЧ. Для этого регистрировали линейные анодные ВА предварительно восстановленных немодифицированных НЧ Fe_3O_4 и НЧ, покрытых хитозаном и 3-аминопропилтриэтоксисиланом – НК (рисунок 3.20).

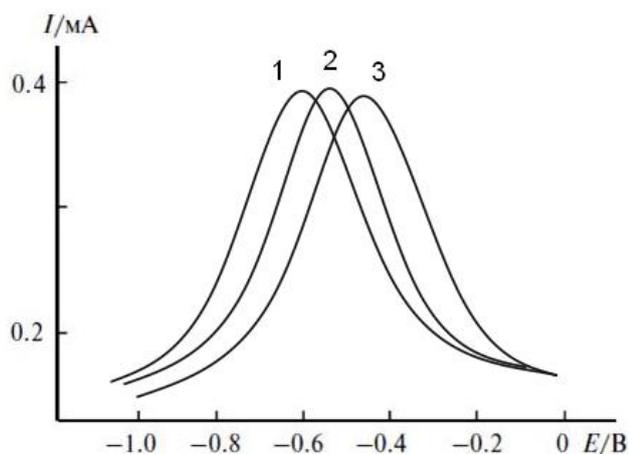


Рисунок 3.20 – ВА, зарегистрированные на рабочем платиновом электроде, с нанесенными НК Fe_3O_4 (1), Fe_3O_4 - хитозан (2) и Fe_3O_4 - 3-аминопропилтриэтоксисилан (3); $E_{\text{эл}} -2.50$ В, $\tau_{\text{эл}} = 60$ с, $\nu_{\text{рег-ии}} = 50$ мВ/с, концентрация наночастиц в исходной суспензии 0.1 г/дм³, фоновый электролит 0.1 М LiClO_4 в ацетонитриле

Величина и форма анодного отклика практически одинакова для всех рассмотренных видов НК. Несущественные различия потенциала пика, а именно

сдвиг в анодную область, может быть связан с влиянием полярного полимерного покрытия. Таким образом, НК Fe_3O_4 , покрытые хитозаном и 3-аминопропилтриэтоксисиланом, могут быть использованы в качестве прямой сигналообразующей метки для разработки электрохимического иммуносенсора.

Хотя платиновый дисковый электрод, используемый в процессе предварительных исследований в качестве рабочего, и обладает рядом преимуществ: невысокое электрическое сопротивление, рабочую поверхность, близкую к идеальной, однако его высокая стоимость, не позволяют применять в разработке экспрессного, дешевого, простого в употреблении электрохимического иммуносенсора. Альтернативой могут быть широко применяемые в практике аналитической химии толсто пленочные планарные электроды, причем токопроводящим слоем служат как углеродные чернила, графитовые композиции, так и платиновые или золотые пасты.

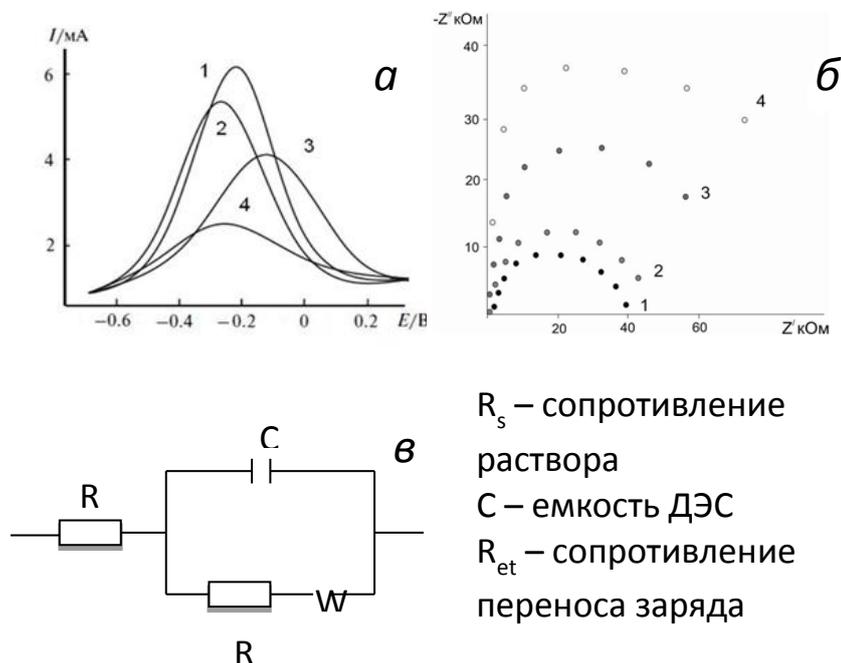
Выбор рабочего электрода осуществляли из 4 типов толсто пленочных планарных электродов (рисунок 2.2, глава 2).

Регистрировали ВА (рисунок 3.21, *а*) и диаграммы Найквиста (рисунок 3.21, *б*), полученные с использованием толсто пленочных планарных электродов четырех типов, рабочую поверхность которых модифицировали НК Fe_3O_4 .

Легко видеть, что электрохимический отклик уменьшается при переходе от платинового к толсто пленочному графитсодержащему электроду. Это обусловлено, вероятно, различием величин электрического сопротивления, а также сопротивления переноса заряда для каждого из планарных электродов. Результаты, полученные с применением электрохимической импедансной спектроскопии, в качестве модельной системы использована эквивалентная ячейка Рэндлса, подтверждают результаты вольтамперометрии.

Для выбранных в процессе предварительных исследований толсто пленочного платинового электрода (ТПЭ) и рабочих условий формирования электрохимического сигнала превращений НК Fe_3O_4 получена линейная зависимость в области концентраций исходной суспензии 0.05-0.5 г/дм³:

Q (мКл) = $(3.91 \pm 0.23) \cdot C_{\text{магнетита}}(\text{г/дм}^3) + (0.10 \pm 0.03)$ ($n = 5, P = 0.95; S_r = 4.73\%$, $R^2 = 0.996$).



R_s – сопротивление
раствора
 C – емкость ДЭС
 R_{et} – сопротивление
переноса заряда

Рисунок 3.21 – ВА (а), диаграммы Найквиста (б) и схема эквивалентной электрической ячейки, полученные с использованием планарных электродов четырех типов с нанесенными НК Fe_3O_4 ; $E_{\text{эл}} = -2.50 \text{ В}$, $\tau_{\text{эл}} = 60 \text{ с}$, $v_{\text{рег-ции}} = 0.5 \text{ В/с}$, фоновый электролит 0.1 М LiClO_4 в ацетонитриле (а) и $0.01 \text{ М р-р ферроцена}$ в ацетонитриле (б), $E_{\text{рег-ии}} = -0.05 \text{ В}$

Приведенные результаты исследований подтверждают возможность применения НК Fe_3O_4 , способных генерировать прямой электрохимический аналитический отклик в выбранных рабочих условиях, что позволяет применить эти НК в качестве сигналообразующей метки в разработке иммуносенсора для определения бактериальных клеток.

3.3.2. Электронно – микроскопический анализ взаимодействия бактерий *E. coli* и *St. aureus* с НК Fe_3O_4

Одним из обязательных этапов разработки способа иммуноанализа/ иммуносенсора является исследование кинетики эндоцитоза НК с клетками, и выбор рабочего времени этого взаимодействия. Ранее было показано, что

эндоцитоз у грамотрицательных и грамположительных клеток протекают по-разному (глава 3.1). Это связано с различным строением клеточной мембраны: у грамположительных бактерий она более плотная (трехслойная складчатая структура), состоящая из липополисахаридов и белков, в отличие от более тонкой и проницаемой мембраны грамотрицательных бактерий.

Получены электронные микрофотографии препаратов культуры *E. coli* и *St. aureus* после 10, 20, 30 мин взаимодействия с НЧ магнетита, покрытыми хитозаном и 3-аминопропилтриэтоксисиланом соответственно (рисунок 3.22). Легко видеть, что НЧ магнетита на всех микрофотографиях представлены в виде темных скоплений сферической формы. 10 мин инкубации недостаточно для проникновения НЧ в мембрану бактериальной клетки (рисунок 3.22, б, е). После 20 мин инкубации (рисунок 3.22, в, ж) в случае НЧ покрытых хитозаном наблюдали адсорбцию НЧ магнетита на мембране бактериальной клетки, в случае НЧ Fe_3O_4 – АПЭС утолщение мембраны клеток *St. aureus* за счет множественного «включения» НЧ путем химического взаимодействия покрытия с поверхностными белками. Через 30 мин инкубации НЧ Fe_3O_4 - X бактериальными клетками *E. coli* происходило множественное выраженное проникновение НЧ как в клеточную мембрану, так и во внутриклеточное пространство (рисунок 3.22, з). После 30 мин практически все НЧ Fe_3O_4 – АПЭС «встраивались» в мембрану клеток *St. aureus* или проникали вглубь бактерий.

Таким образом, результаты приведенных исследований взаимодействия различных типов, модифицированных НЧ с бактериальными клетками, демонстрируют, что степень поглощения зависит от природы покрытия и времени инкубации. С увеличением времени инкубации количество эндоцитированных НЧ возрастает. Рабочее время взаимодействия для НК Fe_3O_4 – X составляет 30 мин, для НК Fe_3O_4 – АПЭС – 20 мин.

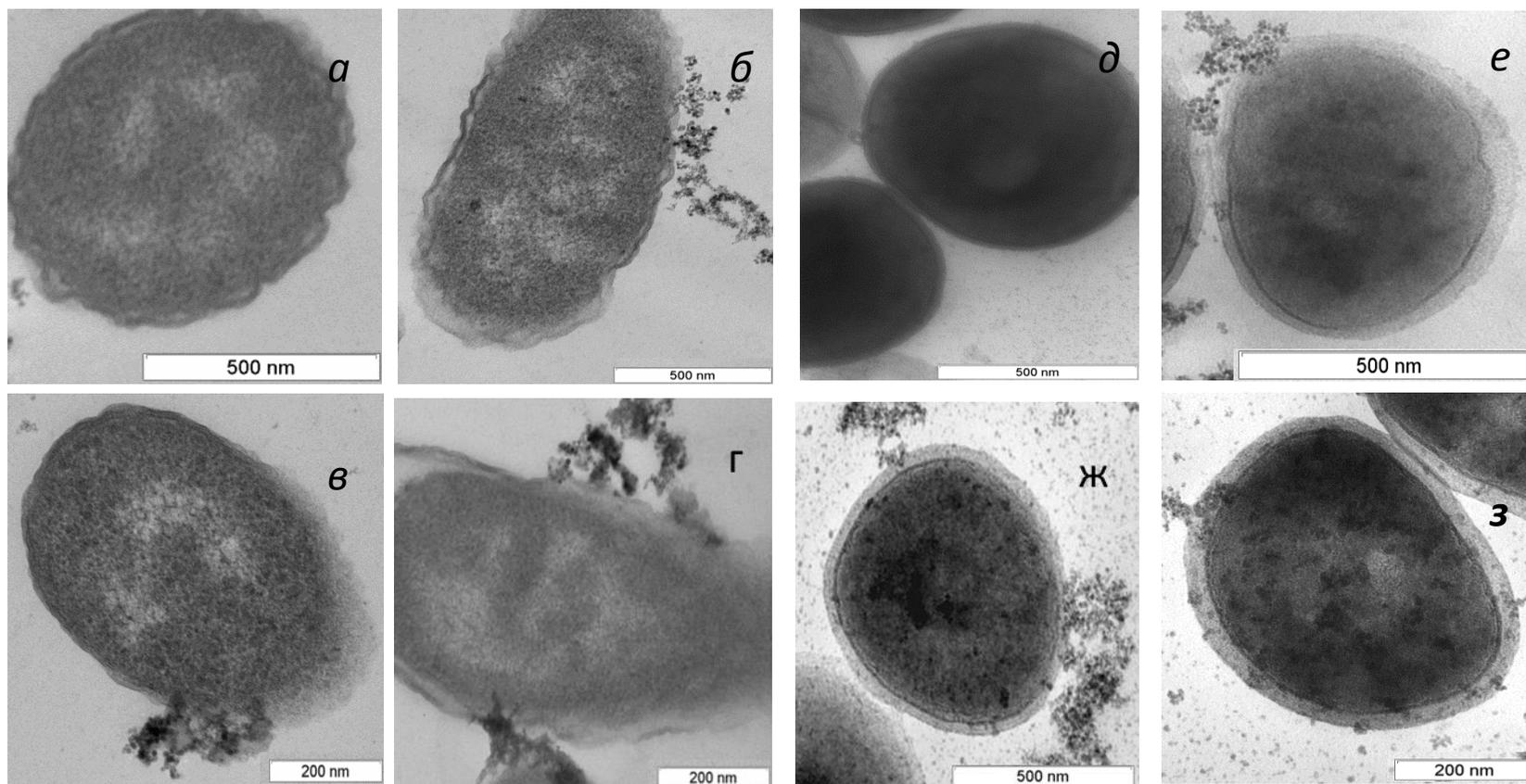


Рисунок 3.22 – Электронные микрофотографии ультратонких срезов клеток *E. coli* и *St. aureus* до (а, д) и после 10 (б, е), 20 (в, ж) и 30 (г, з) минут инкубации с НК «Fe₃O₄- X» и «Fe₃O₄- АПЭС» соответственно; электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония)

3.3.3. Электрохимическое определение содержания бактерий *E. coli* с применением НК Fe_3O_4

По предложенной выше схеме иммуноанализа были проведены эксперименты по количественному определению бактериальных клеток *E. coli*.

На последнем четвертом этапе после образования на рабочей поверхности ТПЭ иммунокомплекса антитела – меченые НК магнетитом бактериальные клетки, последний (в качестве рабочего электрода) помещали в трехэлектродную электрохимическую ячейку и регистрировали анодные вольтамперограммы. В качестве фонового электролита использовали 0.1 М раствор $LiClO_4$ в ацетонитриле. Этот этап иммуноанализа проводили с применением магнитного концентрирования (величина напряженности $31.83 \cdot 10^3$ А/м).

Проводили холостой эксперимент, когда ТПЭ инкубировали в суспензии клеток, не содержащей бактерии *E. coli* или *St. aureus*.

Принимая во внимание предлагаемую схему иммуноанализа можно ожидать, что электрохимический отклик – анодный ток либо количество электричества, затраченного на окисление продуктов, предварительно восстановленных НК магнетита, даст информацию о наличии и количестве бактерий, локализованных на поверхности электрода.

Результаты, полученные в процессе реализации предложенной схемы иммуноанализа, подтвердили справедливость высказанного положения.

В случае присутствия искомой бактерии *E. coli* или *St. aureus* в пробе происходило образование иммунокомплекса, что сопровождалось наличием на вольтамперограммах сигналов, соответствующих процессам окисления продуктов, предварительно восстановленных НК Fe_3O_4 в апротонной среде. В случае суспензии, не содержащей бактерии *E. coli* или *St. aureus* – холостого опыта, в исследуемом интервале потенциалов тока окисления на кривой не наблюдали (рисунок 3.23). В процедуру иммуноанализа было включено магнитное концентрирование, как эффективный этап.

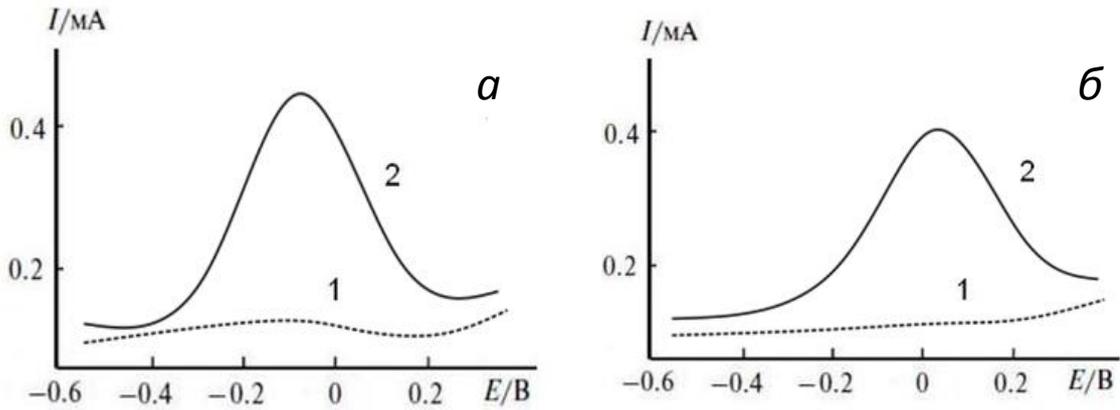


Рисунок 3.23 – ВА, зарегистрированные с помощью ТПЭ не содержащего (1) и содержащего (2) иммунокомплекс с клетками *E. coli* (а) и с клетками *St. aureus* (б) на поверхности; концентрация бактерий *E. coli* и *St. aureus* в модельных суспензиях

$$10^4 \text{ КОЕ/см}^3, E_{\text{эл}} = -2.50 \text{ В}, \tau_{\text{эл}} = 60 \text{ с}, v_{\text{рег-ции}} = 0.5 \text{ В/с},$$

фоновый электролит 0.1 М LiClO₄ в ацетонитриле

Ключевым этапом в разработке иммуносенсора является стадия введения и закрепления (иммобилизации) антител на поверхности ТПЭ. Для определения оптимальных условий иммобилизации антител применяли: физическую иммобилизацию на поверхности ТПЭ (ТПЭ 1), иммобилизация, на рабочую поверхность предварительно электроосадили пленку золота (ТПЭ 2), иммобилизация, на рабочую поверхность наносили тиолированные углеродные нанотрубки (ТПЭ 3).

Оценку продуктивности применяемых методов иммобилизации антител проводили с помощью метода электрохимического импеданса. Для этого измеряли сопротивление переноса заряда в эквивалентной ячейке Рэндлса до и после модифицирования рабочего электрода антителами (таблица 3.13).

Таблица 3.13 – Результаты измерения сопротивления переноса заряда в эквивалентной ячейке Рэндлса (0.01 М раствор ферроцена в ацетонитриле) до и после модифицирования рабочего электрода антителами ($n = 5, P = 0.95$)

$R, \text{кОм}$	ТПЭ 1	ТПЭ 2	ТПЭ 3
До иммобилизации антител	42.8 ± 1.8	30.8 ± 2.3	53.2 ± 1.5
После иммобилизации антител	112.0 ± 1.4	89.4 ± 1.6	67.8 ± 1.5

Как видно из таблицы, исследуемые электроды стабильны. Наиболее заполненной антителами оказалась рабочая поверхность электрода после физической иммобилизации. Меньшее заполнение поверхностей ТПЭ 2 и ТПЭ 3 может быть связано с направленным распределением антител. Кроме того, получены линейные градуировочные зависимости в координатах $Q - \lg C$ в диапазоне от 10 до 10^5 КОЕ/см³ для бактериальных клеток *St. aureus* после образования иммунокомплекса с использованием ТПЭ трех типов:

ТПЭ 1: $Q \text{ (мКл)} = (0.120 \pm 0.005) \cdot \lg C - (0.060 \pm 0.002)$ ($n = 5, P = 0.95; S_r = 3.35\%, R^2 = 0.994$);

ТПЭ 2: $Q \text{ (мКл)} = (0.080 \pm 0.006) \cdot \lg C - (0.030 \pm 0.003)$ ($n = 5, P = 0.95; S_r = 6.03\%, R^2 = 0.998$);

ТПЭ 3: $Q \text{ (мКл)} = (0.270 \pm 0.008) \cdot \lg C - (0.020 \pm 0.006)$ ($n = 5, P = 0.95; S_r = 2.38\%, R^2 = 0.991$).

Для первого и второго типов электродов наблюдали более высокую чувствительность определения, в отличие от третьего типа. В связи с тем, что в экспериментах использовали поликлональные антитела, в этом случае пространственная ориентация, вероятно, не играет существенной роли. Близкие аналитические характеристики первого и второго типов ТПЭ позволяют применять их в иммуноанализе. Однако, учитывая простоту производства иммуносенсора – ТПЭ 1, в дальнейших исследованиях применяли этот метод иммобилизации.

В результате изучения влияния рН буферного раствора на процессы взаимодействия НК магнетита с бактериями *E. coli* и *St. aureus* обнаружили, что при

pH = 6 максимально эффективно протекают процесс эндоцитоза. В связи с этим в дальнейших экспериментах применяли слобокислую среду на этапах с 1 – 3 процедуры иммуноанализа

Время формирования иммунного комплекса на поверхности ТПЭ составило 30 мин для бактерии *E. coli* и 20 мин для – *St. aureus*.

Для определенных рабочих условий были получены линейные зависимости в координатах $Q - \lg C$ в диапазоне от 10 до 10^5 КОЕ/см³ в исходной суспензии для бактериальных клеток *E. coli*: Q (мКл) = $(0.111 \pm 0.003) \cdot \lg C_{E.coli} + (0.053 \pm 0.009)$

($R^2 = 0.990$, C_{lim} составил 9.3 КОЕ/см³), для *St. aureus*: Q (мКл) = $(0.136 \pm 0.002) \cdot \lg C_{St.aureus} + (0.086 \pm 0.008)$ ($R^2 = 0.99$, C_{lim} составил 8.7 КОЕ/см³).

В таблице 3.14 приведены аналитические характеристики разрабатываемых иммуносенсоров с применением НК Fe₃O₄.

Таблица 3.14 – Аналитические характеристики иммуносенсоров для определения бактерий *E. coli* и *St. aureus*, полученные в разные дни ($n = 5$, $P = 0.95$)

Концентрация бактерий в модельных суспензиях, КОЕ/см ³	<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>	
	S _r , %	Определенная концентрация с использованием электрохимического иммуносенсора, КОЕ/см ³	S _r , %	Определенная концентрация с использованием электрохимического иммуносенсора, КОЕ/см ³
$1 \cdot 10^1$	9.7	10.90 ± 1.31	9.1	10.80 ± 1.30
$1 \cdot 10^2$	8.1	$(1.10 \pm 0.11) \cdot 10^2$	8.3	$(0.86 \pm 0.11) \cdot 10^2$
$1 \cdot 10^3$	5.8	$(1.07 \pm 0.08) \cdot 10^3$	7.8	$(0.95 \pm 0.08) \cdot 10^3$
$1 \cdot 10^4$	4.3	$(1.03 \pm 0.06) \cdot 10^4$	6.3	$(1.04 \pm 0.06) \cdot 10^4$
$1 \cdot 10^5$	3.6	$(1.00 \pm 0.05) \cdot 10^5$	4.6	$(1.03 \pm 0.05) \cdot 10^5$

Приведенные результаты подтверждают, что аналитический сигнал окислительно-восстановительных превращений НК магнетита, включенных в хитозановое и аминопропилтриэтоксисилановое покрытия, в апротонной среде может служить источником информации о количестве бактерий *E. coli* и *St. aureus* соответственно.

3.3.4. Результаты определения правильности и специфичности разрабатываемых бесферментных электрохимических иммуносенсоров. Анализ реальных объектов

Определение селективности и специфичности, разрабатываемых бесферментных электрохимических иммуносенсоров, осуществляли с использованием ИФА анализа и бактериального посева, применяемых в качестве методов сравнения.

Для определения селективности проводили анализ двух- или трехкомпонентных модельных суспензий бактерий и реальных проб, содержащих помимо *E. coli* и *St. aureus* другие бактерии (таблицы 3.15 и 3.16). Образец, соответствующий каждой концентрации клеток, делили на три равных части, затем каждую из частей анализировали методами ИФА, бактериального посева и разрабатываемым методом. Исследования проводили в трех параллельных сериях опытов.

Таблица 3.15 – Результаты исследования модельных суспензий клеток и реальных проб, содержащих *E. coli* с применением различных методов

($n = 5, P = 0.95, t_{кр}=2.67$)*

Объект	Обнаружено <i>E. coli</i> , КОЕ/см ³			
	Электрохимический иммуносенсор	ИФА	Бактериальный посев	$t_{экср}$
<i>E. coli</i> + <i>M. Flavus</i> (1:1)	$(5.00 \pm 0.10) \cdot 10^5$	$(5.01 \pm 0.10) \cdot 10^5$	$\sim 6 \cdot 10^5$	0.18
<i>E. coli</i> + <i>B. licheniformis</i> (1:1)	$(7.30 \pm 0.04) \cdot 10^3$	$(7.04 \pm 0.05) \cdot 10^3$	$\sim 6 \cdot 10^3$	1.37
<i>E. coli</i> + <i>S. infantis</i> (1:1)	$(9.70 \pm 0.04) \cdot 10^3$	$(1.02 \pm 0.04) \cdot 10^4$	$\sim 1 \cdot 10^4$	1.42
Проба воды из природного водоема	$(1.00 \pm 0.03) \cdot 10^3$	$(1.03 \pm 0.07) \cdot 10^3$	$\sim 1 \cdot 10^3$	1.23
Проба воздуха	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	-

*Проведено в лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск).

Таблица 3.16 – Результаты исследования модельных суспензий, содержащих *S. aureus* с применением различных методов ($n = 5$, $P = 0.95$, $t_{кр}=2.67$)*

Состав смеси	Обнаружено <i>S. aureus</i> , КОЕ/см ³			
	Электрохимический иммуносенсор	ИФА	Бактериальный посев	$t_{эксп}$
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (1:1)	$(1.13 \pm 0.09) \cdot 10^3$	$(1.06 \pm 0.11) \cdot 10^3$	$\sim 1 \cdot 10^3$	1.34
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (1:10)	$(1.12 \pm 0.07) \cdot 10^3$	$(1.09 \pm 0.09) \cdot 10^3$	$\sim 1 \cdot 10^3$	0.73
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (10:1)	$(1.07 \pm 0.04) \cdot 10^4$	$(1.10 \pm 0.05) \cdot 10^4$	$\sim 1 \cdot 10^4$	1.15
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i> (1:1:1)	$(1.04 \pm 0.04) \cdot 10^4$	$(1.05 \pm 0.05) \cdot 10^4$	$\sim 1 \cdot 10^4$	0.28

*Проведено в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск)

По рассчитанным F - и t - критериям можно утверждать, что различие дисперсий метода ИФА и разработанного электрохимического иммуносенсора статистически незначимо (F - критерий), а также обе выборки принадлежат к одной и той же генеральной совокупности и различие средних носит случайный характер (t - критерий).

Приведенные результаты наглядно демонстрируют, что разработанные бесферментные электрохимические иммуносенсоры не уступают по своим характеристикам методу ИФА, однако для реализации процедуры электрохимического иммуноанализа не требуется применение дорогостоящего оборудования, организации специальных помещений, дорогостоящих реагентов, кроме того продолжительность электрохимического метода значительно меньше, чем для ИФА анализа.

Для определения специфичности разрабатываемых иммуносенсоров, ТГЭ с иммобилизованными антителами к бактерии *S. aureus* или *E. coli*, инкубировали в суспензиях, содержащих определяемые бактерии $1 \cdot 10^4$ КОЕ/см³ и бактерии $1 \cdot 10^4$ КОЕ/см³ *S. infantis*. На рисунке 3.24 приведены примеры вольтамперограмм, полученных в результате анализа.

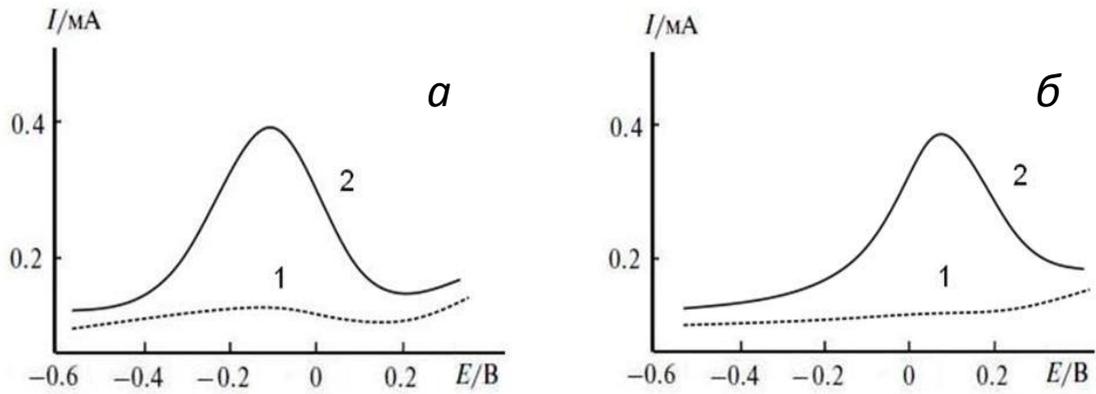


Рисунок 3.24 – Анодные вольтамперограммы, зарегистрированные в суспензиях, содержащих бактерии *E. coli* (2а), *S. aureus* (2б); бактерии *S. infantis* (1); $E_{эл} = -2.50$ В, $\tau_{эл} = 60$ с, $v_{рег-ии} = 0.5$ В/с, фоновый электролит 0.1 М LiClO₄ в ацетонитриле

Как видно из рисунка, в случае инкубации ТПЭ в суспензиях, не содержащих бактериальные клетки *E. coli* или *S. aureus*, электрохимического отклика не наблюдали, поскольку не происходило формирование иммунного комплекса.

На основании полученных данных можно сделать вывод о корректности применения предложенного подхода, основанного на использовании в качестве сигналообразующей метки магнитных НК, покрытых хитозаном и аминопропилтриэтоксисиланом для количественного определения бактерий. Основным преимуществом этого варианта определения перед ранее рассмотренными, является возможность регистрации прямого электрохимического сигнала от НК магнетита, что позволило существенно упростить процедуру иммуноанализа и сократить его продолжительность.

3.4. Бесферментный электрохимический способ определения содержания антигена вируса кори с применением конъюгатов антител – НК магнетита с оксидкремниевым покрытием в качестве метки

Применяя синтезированные НК, функционализированные электроактивным полимерным покрытием, исследовали возможность разработки бесферментного

электрохимического способа иммуноанализа для определения антигенов вирусов на примере антигена вируса кори. В качестве сигналообразующей метки синтезировали конъюгат вторичных антител с НК Fe_3O_4 с оксидкремниевым покрытием [311].

Предложена следующая схема иммуноанализа (рисунок 3.25):

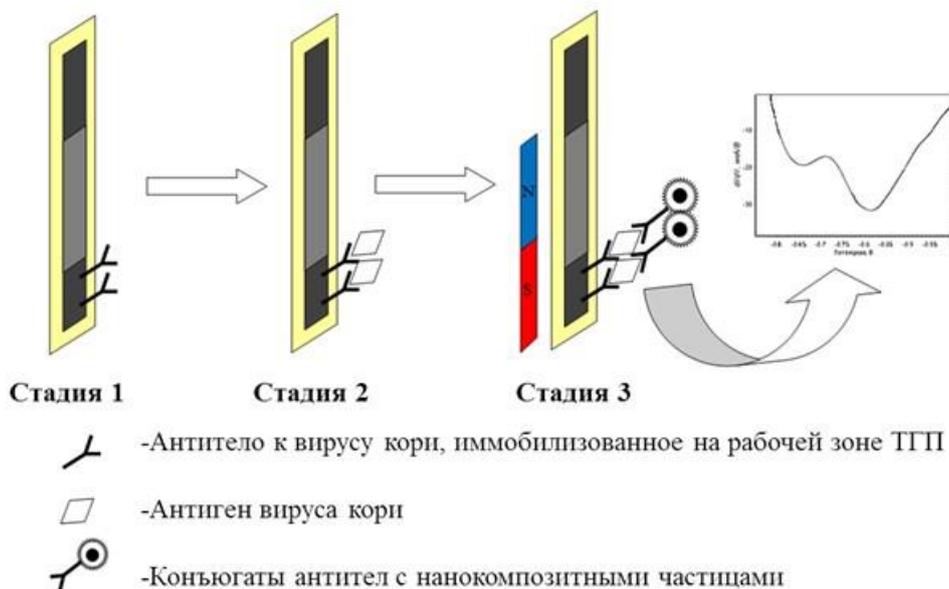


Рисунок 3.25 – Схема проведения бесферментного электрохимического иммуноанализа

Рабочую зону толстопленочной планарной графитоэпоксидной подложки модифицировали с помощью нанесения 10 мкл антител IgG против вируса кори (1 мг/см^3) и высушивали.

Затем в пробирки вносили по 200 мкл суспензии антигена вируса кори (NovO/96) (диапазон концентраций $2,33 \cdot 10^{-1}$, $2,33 \cdot 10^{-2}$, $2,33 \cdot 10^{-3}$, $2,33 \cdot 10^{-4} \text{ мг/см}^3$), помещали в них модифицированные подложки и выдерживали при $(37,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$, 20 мин.

Далее проводили локализацию синтезированных конъюгатов на иммунокомплексе при $(37,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$, 30 мин.

В итоге после образования иммунокомплекса антитела – антиген вируса кори – конъюгат вторичных антител с оксидкремниевыми НК магнетита подвергали кислотной минерализации. Для этого графитоэпоксидную подложку погружали в емкость со смесью кислот, таким образом, чтобы рабочая зона, на которой

сформировался иммунокомплекс, была полностью в растворе, и выдерживали в течение 15 мин. Затем подложку вынимали из емкости, после чего выполняли процедуру минерализации и анализа в соответствии с гл. 3.1.1. Проводили холостой эксперимент, когда подложку инкубировали в суспензии клеток, не содержащей антиген вируса кори. Измеряли ток восстановления ионов Fe^{3+} , методом ИВА с применением ТМГЭ.

Принимая во внимание предлагаемую схему иммуноанализа, можно ожидать, что электрохимический отклик – ток восстановления ионов Fe^{3+} даст информацию о наличии и количестве антигенов вируса кори, локализованных на поверхности подложки.

В случае присутствия искомого инфекционного агента в суспензии происходило образование иммунокомплекса, что сопровождалось наличием на вольтамперограммах тока восстановления железа (рисунок 3.26, а). В случае суспензии, не содержащей антиген вируса кори – холостого опыта, в исследуемом интервале потенциалов тока восстановления железа на кривой не наблюдали (рисунок 3.26, б).

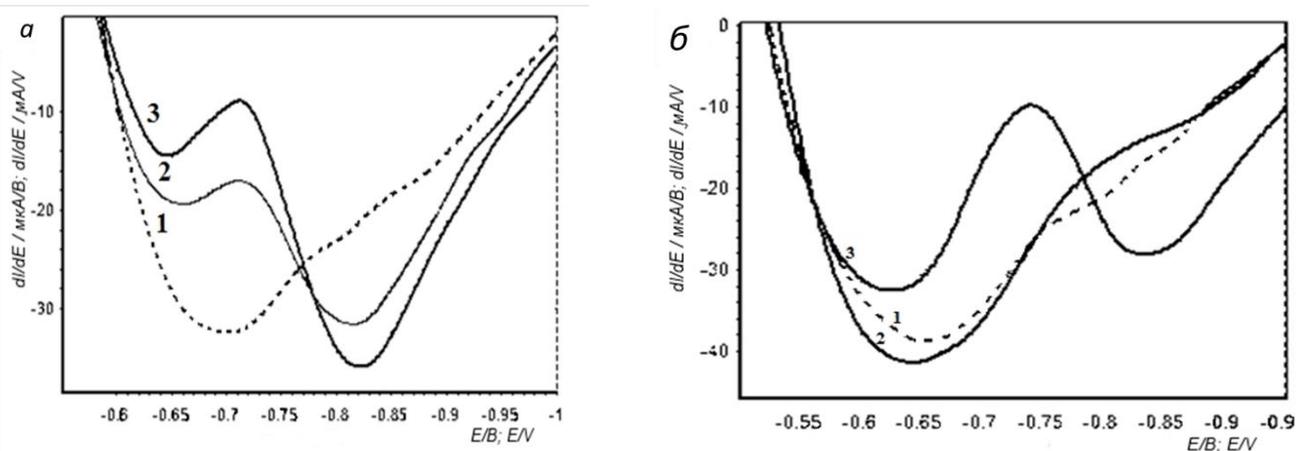


Рисунок 3.26 – Производные вольтамперограмм $\text{Fe}(\text{III})$, полученные в растворах, содержащих (а) и не содержащих антиген вируса кори (б): фоновый электролит – 0.1 М раствор CH_3COONa (рН 7.5), содержащий $5 \cdot 10^{-4}$ М пирокатехола (1); проба (2); проба + добавка ГСО $\text{Fe}(\text{III})$ (3); концентрация антигена $2.33 \cdot 10^{-2}$ мг/см³; $E_{\text{нак}} = 0.1$ В, $\tau_{\text{кон}} = 60$ с, $v_{\text{рег-ии}} = 0.5$ В/с

Осуществляли выбор рабочего времени образования иммунокомплекса антитело – антиген вируса кори и последующей локализации конъюгата вторичных антител с НЧ магнетита. Рабочее время составляет 60 минут, по 30 минут на каждую стадию.

Для определенных рабочих условий была получена линейная зависимость в координатах $dI/dE - \lg C$ в диапазоне $(2.33 \cdot 10^{-4} - 2.33)$ мг/см³ в исходной суспензии dI/dE [мкА/В] = $(2.441 \pm 0.002) \cdot \lg C_{AG} - (11.630 \pm 0.050)$ ($R^2 = 0.990$, $C_{lim} = 1.87 \cdot 10^{-5}$ мг/см³).

Оценку специфичности проводили, инкубируя графитопоксидную подложку с нанесенными антителами к вирусу кори в суспензии содержащей антиген вируса клещевого энцефалита. Затем, проводили процедуру иммуноанализа согласно схеме (рисунок 3.26). В этом случае не наблюдали характерных откликов, поскольку иммунокомплекс на поверхности подложки отсутствовал.

Отсюда следует, что результаты предложенной процедуры бесферментного электрохимического иммуноанализа подтвердили, аналитический сигнал (величина dI/dE), полученный от НЧ Fe₃O₄, локализованных на поверхности подложки, служит источником информации о количестве антигена вируса кори.

В рамках проведенных комплексных исследований представлены теоретическое обоснование применения в качестве сигналообразующих меток неферментативной природы магнитных НЧ и НК и новый общий методологический подход разработки бесферментного электрохимического иммуноанализа для количественного определения бактериальных клеток и антигенов вирусов. Реализованы схемы (рисунки 3.1, 3.25) с целью создания экспрессных, дешевых, простых в употреблении иммуносенсоров для анализа биологических и природных объектов. Применение магнитных наночастиц или нанокомпозитов позволило включить в процедуру иммуноанализа магнитное разделение и концентрирование, что существенно улучшило аналитические характеристики определения инфекционных агентов.

ГЛАВА 4 Варианты бесферментных электрохимических способов и сенсоров на основе катализаторов, содержащих соединения Ni(II), Co(II) органической и неорганической природы, наноксиды никеля(II), наночастицы серебра, золота, наносплавы, наночастицы типа ядро-оболочка для определения мочевины, креатинина, холестерина

В последнее десятилетие тенденцией развития подходов к определению диагностически важных показателей крови является синтез и применение каталитических систем небиологической природы – аналогов ферментов, которые традиционно используются в биохимическом анализе крови. Одним из таких подходов является создание и применение редокс-активных соединений с металлоцентром, в том числе нанокатализаторов, а также полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) или анионнообменных сорбентов, обеспечивающих селективность.

В рамках исследований этой главы осуществляли подход с применением электрокаталитического окисления аналита (схема 4.1).



Схема 4.1 – Механизм электрокаталитического окисления аналита

4.1. Методики эксперимента

4.1.1. Методика количественного определения мочевины, креатинина

1. Проводили предварительную подготовку модифицированного электрода, циклировали многократно в 10 см^3 0.25 М раствора NaOH в диапазоне потенциалов от 0.00 до 0.70 (0.90) В. Скорость сканирования 100 мВ/с . Определяли из зарегистрированных вольтамперограмм потенциал анодного пика катализатора.

2. Затем регистрировали хронопереограммы окисления никеля (II) в фоновом электролите при выбранном предварительно потенциале, а также после введения стандартных добавок - 0.1 см^3 0.1 М раствора мочевины или 0.01 М раствора креатинина или раствора пробы. Фоновый электролит 0.25 М раствор NaOH, продолжительность анализа 90 с , ток измеряли по истечении 70 с .

3. Содержание мочевины или креатинина ($c_{\text{обр}}$, мкМ) определяли по приросту пика анодного тока:

$$C_{\text{обр}} = C_{\text{доб}} \times \left(\frac{\Delta I_{\text{обр}}}{\Delta I_{\text{доб}}} \right) \times \frac{V_{\text{доб}}}{V_{\text{обр}}} \quad (4.1),$$

где $\Delta I_{\text{доб}}$ – ток окисления катализатора, полученный после введения в раствор стандартной добавки мочевины или креатинина;

$\Delta I_{\text{обр}}$ – ток окисления катализатора, полученный в присутствии стандартной добавки мочевины, креатинина или холестерина (образца);

$C_{\text{доб}}$ – концентрация стандартной добавки мочевины, креатинина или холестерина;

$V_{\text{доб}}$ – объем стандартной добавки мочевины или креатинина, вводимый в ячейку;

$V_{\text{обр}}$ – объем второй стандартной добавки (образца), вводимой в ячейку.

4.1.2. Методика количественного определения холестерина с использованием электрода модифицированного наночастицами золота и серебра

1. Проводили предварительную подготовку модифицированного электрода путем многократного циклирования потенциала в диапазоне от -1.00 до

+1.00 В, в 10 см^3 0.25 М раствора NaOH. Скорость сканирования 100 мВ/с. Полное формирование поверхности электрода происходило после 60 циклов.

2. Затем рабочий электрод переносили в эмульсию вода – NaOH – ТГФ – ПАВ. Регистрировали вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от –1.00 до +1.00 В. Определяли из зарегистрированных вольтамперограмм потенциал анодного пика катализатора. Регистрировали вольтамперограммы или хроноамперограммы при потенциале, выбранном на полученной ЦВА до и после введения в раствор стандартной добавки холестерина в ТГФ (100 мкл 5 мМ раствор) или пробы. Содержание холестерина ($C_{обр}$, мкМ) определяли по приросту пика анодного тока согласно уравнению 4.1.

4.1.3. Методика количественного определения холестерина в апротонных средах

1. Готовили растворы катализатора путем последовательного разбавления 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 40 мкМ в органических растворителях (ацетонитрил или ДМФА). Регистрировали вольтамперограммы в 10 см^3 раствора фонового электролита с линейной разверткой потенциала от 0.30 В до 1.70 В отн. Fc/Fc⁺. Скорость сканирования 100 мВ/с. Затем проводили регистрацию вольтамперограмм в 10 см^3 раствора фонового электролита в присутствии катализатора нужной концентрации с линейной разверткой потенциала.

2. Затем вводили в раствор фонового электролита стандартные добавки холестерина или пробы в соответствующем растворителе и регистрировали вольтамперограммы. Содержание холестерина ($C_{обр}$, мкМ) определяли по приросту пика анодного тока согласно уравнению 4.1.

4.2. Бесферментный электрохимический способ количественного определения мочевины и креатинина

4.2.1. Электрокатализаторы НЧ NiO

Регистрировали ЦВА с использованием ТУЭ с нанесенными на рабочую поверхность синтезированными образцами НЧ NiO (по 3 мкл, исходная концентрация 0.5 г/дм³). Наблюдали характерные для системы Ni (II)/Ni (III) пары анодно-катодных пиков после формирования поверхности в соответствии с первым этапом методики (глава 4.1.1). Следует отметить, что для всех ТУЭ, модифицированных НЧ NiO, значения величин пар анодно-катодных пиков практически одинаковые, за исключением ТУЭ, модифицированного НЧ NiO - 2, для которого эта величина составляет около 60 мкА (рисунок 4.1).

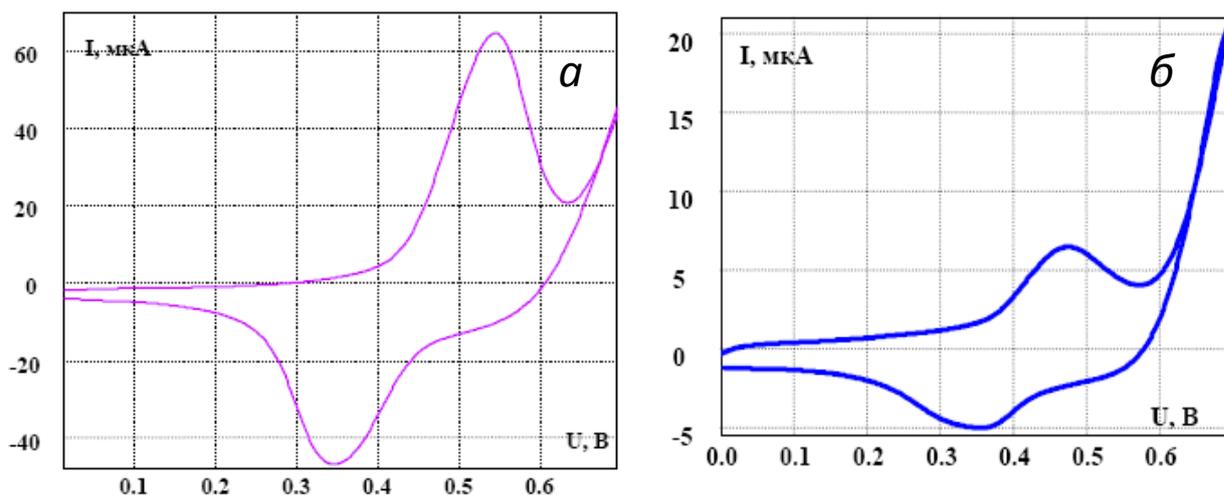


Рисунок 4.1. – ЦВА, зарегистрированные после формирования поверхности ТУЭ, модифицированной наночастицами: NiO - 2 (а) и NiO - 3 (б); фоновый электролит 0.25 М NaOH; исходная концентрация суспензий наночастиц 0.5 г/дм³,

$$v_{\text{рег-ии}} = 0.1 \text{ В/с}$$

Принимая во внимание узкое распределение по размерам НЧ NiO - 2 на рабочей поверхности электрода (преобладающая фракция до 500 нм) по сравнению с остальными синтезированными образцами наночастиц, а, следовательно, и

формирование значительно большего числа каталитических центров, можно ожидать бóльшую величину сигналов НЧ NiO - 2 в отличие от других НЧ.

Таким образом, для дальнейших исследований применяли образец НЧ NiO - 2. Была определена исходная концентрация НЧ в суспензии, при которой наблюдали максимальный электрохимический отклик – 0.5 г/дм³ (рисунок 4.2).

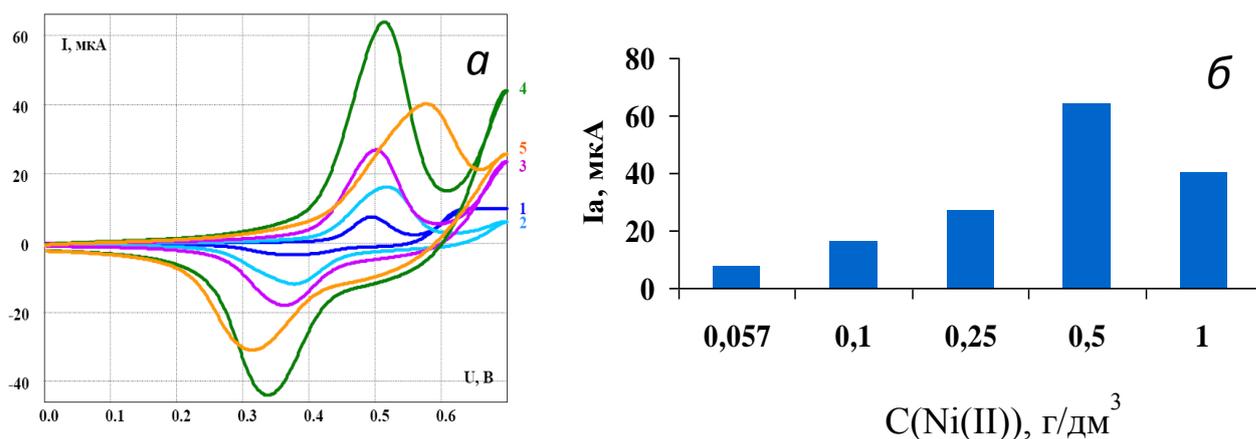


Рисунок 4.2 –ЦВА, зарегистрированные с использованием ТУЭ, модифицированного НЧ NiO - 2 (а): исходная концентрация НЧ в суспензии (в пересчете на содержание Ni (II)): 0.06 г/дм³ (1); 0.10 г/ дм³ (2); 0.25 г/ дм³ (3); 0.50 г/ дм³ (4); 1.00 г/ дм³ (5); фоновый электролит 0.25 М NaOH, $v_{\text{рег-ни}} = 0.1$ В/с.

Зависимость величины анодного сигнала от содержания НЧ NiO - 2 в исходной суспензии (б)

Полученную зависимость анодного сигнала от содержания НЧ в исходной суспензии можно объяснить, рассмотрев физико-химические процессы кристаллизации или осаждения растворенного вещества с образованием твердой фазы на электроде из капли с модификатором, представив ее в виде микрореактора. Принимая во внимание испарение растворителя, приводящее к уменьшению объема, а, следовательно, смещению границы «раствор-воздух-подложка», можно говорить, что межфазные границы играют ключевую роль в образовании твердой фазы на подложке, а скорость процесса высыхания и вязкость жидкости определяют степень регулярности конечной структуры. После высыхания капли на

поверхности рабочей зоны электрода возникают ансамбли наночастиц. При увеличении исходной концентрации НЧ скорость их агломерации также увеличивается, причем этот процесс происходит уже в объеме, до нанесения на электрод. Таким образом, на поверхности ТУЭ распределение НЧ плотное, но неравномерное. Увеличение величины отношения объем - поверхность приводит к существенным фазовым изменениям, в результате чего такой модификатор начинает работать как фаза, т.е. из наносостояния происходит переход в макросостояние. Величина аналитического сигнала такого модификатора существенно ниже, чем для ансамбля наночастиц.

В результате исследований возможности применения НЧ NiO-2 в качестве электрокатализатора были получены линейные зависимости хроноамперометрического сигнала окисления мочевины от ее содержания:

$$I \text{ (мкА)} = 0.011 \cdot C + 0.012 \quad (R^2=0.984) \text{ в случае ТУЭ – NiO (0.10 г/дм}^3\text{);}$$

$$I \text{ (мкА)} = 0.929 \cdot C + 1.472 \quad (R^2= 0.953) \text{ в случае ТУЭ – NiO (0.50 г/дм}^3\text{).}$$

Для других исходных концентраций НЧ оксида никеля(II) в суспензии не было получено линейных зависимостей. Вероятно, число каталитических центров для рассматриваемых концентраций НЧ недостаточно для получения выраженного сигнала в рассматриваемом диапазоне концентраций мочевины.

Однако полученные зависимости не могут быть применены в дальнейших экспериментах по разработке бесферментного электрохимического способа определения мочевины/креатинина, где в качестве электрокатализатора применяли НЧ оксида никеля (II), из-за недостаточной чувствительности по сравнению со стандартно применяемыми методами, а также из-за низких значений коэффициентов корреляции зависимости аналитического сигнала от концентрации мочевины.

В связи с вышеизложенным, в качестве электрокатализаторов для количественного определения мочевины и креатинина применяли синтезированные в ИОС УрО РАН органические комплексы никеля (II), которые

способны дополнительно координировать молекулы мочевины или креатинина вблизи металлоцентра за счет окружения лиганда.

4.2.2. Электрокатализаторы органические соединения Ni (II)

4.2.2.1. Выбор рабочих условий анализа

Проводили выбор толсто пленочного электрода по характеристикам правильности определения, устанавливаемым методом «введено-найдено», по величине и воспроизводимости значений тока при заданном потенциале, зарегистрированных в присутствии мочевины. Равнозначность полученных результатов хроноамперометрического определения мочевины с использованием ТУЭ или ТГЭ, модифицированных комплексами II или III, позволяет применять в дальнейших экспериментах толсто пленочные углеродсодержащие электроды вследствие более простой технологии изготовления.

Кроме того, проводили выбор способа модифицирования рабочей поверхности ТУЭ органическими электрокатализаторами. Применяли две методики:

- внесение в объем электрода. Для этого 20 мкл раствора комплекса Ni(II) в хлороформе ($C(Ni(II)) = 1.67 \text{ г/дм}^3$) вносили в 0.2 г углеродсодержащих чернил «Metech», тщательно перемешивали и сушили при температуре 60 °С один час. Содержание Ni (II) в смеси составляло 10 %, 20 %, 30% или 40 %.

- поверхностное нанесение (модифицирование). Для этого 3 мкл раствора комплекса Ni (II) в ДМФА ($C(Ni(II)) = 5.85 \text{ г/дм}^3$) или в ацетонитриле ($C(Ni(II)) = 2.50 \text{ г/дм}^3$) наносили на рабочую зону толсто пленочный электрода. Сушили при комнатной температуре до полного испарения растворителя.

В случае поверхностного нанесения электрокатализатора на рабочую поверхность электрода наблюдали наилучшую воспроизводимость от электрода к электроду потенциала окисления никеля (II) по сравнению с внесением в объем электрода.

Таблица 4.1 – Электрохимические характеристики 1 мМ мочевины с использованием ТУЭ, модифицированных комплексом II по разным методикам ($n=7$, $P=0.95$)

Содержание Ni(II) в объеме углеродсодержащих чернил, %	$E_n \pm \delta$, В; (S_r , %)	$I_{\text{кат}}/I_{\text{моч}} \pm \delta$, мкА; (S_r , %)
<i>Методика внесения в объем</i>		
10	0.53 ± 0.02 ; (7.5)	0.035 ± 0.013 ; (49)
20	0.480 ± 0.004 ; (1.0)	0.198 ± 0.129 ; (88)
30	0.50 ± 0.02 ; (5.7)	0.245 ± 0.178 ; (43)
40	0.49 ± 0.01 ; (1.2)	0.340 ± 0.106 ; (42)
<i>Методика поверхностного нанесения</i>		
С (Ni(II)) в модифицирующем растворе, г/дм ³ (растворитель)	$E_{\text{изм}} \pm \delta$, В; (S_r , %)	$\Delta I_{\text{кат, моч}} \pm \delta$, мкА; (S_r , %)
5.85 (ДМФА)	0.74 ± 0.06 ; (12)	5.821 ± 0.452 ; (11)
2.50 (CH ₃ CN)	0.56 ± 0.15 ; (23)	0.046 ± 0.026 ; (78)

Правильность выводов подтверждали результатами хроноамперометрического определения мочевины с использованием ТУЭ, модифицированных комплексом II по методике поверхностного модифицирования методом «введено-найденно» (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Результаты хроноамперометрического определения мочевины с использованием ТУЭ, модифицированных комплексом II по методике поверхностного модифицирования. Введено 1 мМ мочевины ($n=7$, $P=0.95$)

С (Ni (II)) в модифицирующем растворе, г/дм ³ (растворитель)	Найдено: $C_{\text{ср}} \pm \delta$, мМ	S_r , %
5.85 (ДМФА)	0.98 ± 0.07	9.5
2.50 (CH ₃ CN)	0.89 ± 0.15	25

В случае плохой растворимости исследуемого комплекса Ni (II) на рабочую поверхность ТУЭ наносили его суспензию.

4.2.2.2. Выбор органического комплекса Ni (II) – эффективного электрокатализатора количественного определения мочевины, креатинина

Выбор катализатора для электрохимического окисления мочевины и креатинина осуществляли на примере мочевины, т.к. мочевина, являясь первичным амином, по сравнению с креатинином легче вступает в реакцию каталитического окисления под действием ионов Ni (II). Определяли электрохимические характеристики для комплексов каждой из четырех групп после нанесения на рабочую поверхность ТУЭ (E_{ox} , I_p , ΔE , $I_{кат}/I_{NiL}$, где $I_{кат}$ — каталитический ток окисления мочевины, регистрируемые в хроноамперометрическом режиме, I_{NiL} — ток окисления комплекса никеля (II)).

- Комплексы никеля (II) – производные фторированных кетонов (группа 1)

Присутствие в комплексах первой группы перфторалкильных заместителей приводит не только к усилению акцепторных свойств карбонильных групп лиганда, а следовательно, и к усилению связи Ni — O=C< (карбонил), но и акцепторных свойств карбонильных групп. В качестве растворителей комплексов Ni (II) применяли ДМФА, ДМСО, ТГФ и ацетонитрил (CH₃CN).

При исследовании электродов, модифицированных комплексом II с содержанием никеля 17.12 г/дм³, наблюдали либо невоспроизводимые ЦВА в случае применения в качестве растворителя ТГФ, либо их отсутствие в случае применения в качестве растворителя ДМФА вследствие образования на рабочей поверхности ТУЭ кристаллов, которые быстро осыпались.

Для комплекса II максимальное содержание никеля, при котором наблюдали пару анодно-катодных пиков, характерных для системы Ni(II)/Ni(III), составляло 8.56 г/дм³ по Ni(II) как в ДМФА, так и в ДМСО. Однако в случае ДМФА наблюдали бóльшую разность потенциалов анодного и катодного пиков (ΔE) по сравнению с ΔE , регистрируемой в случае применения ДМСО, что указывает на осложнение процесса переноса электрона (рисунок 4.3).

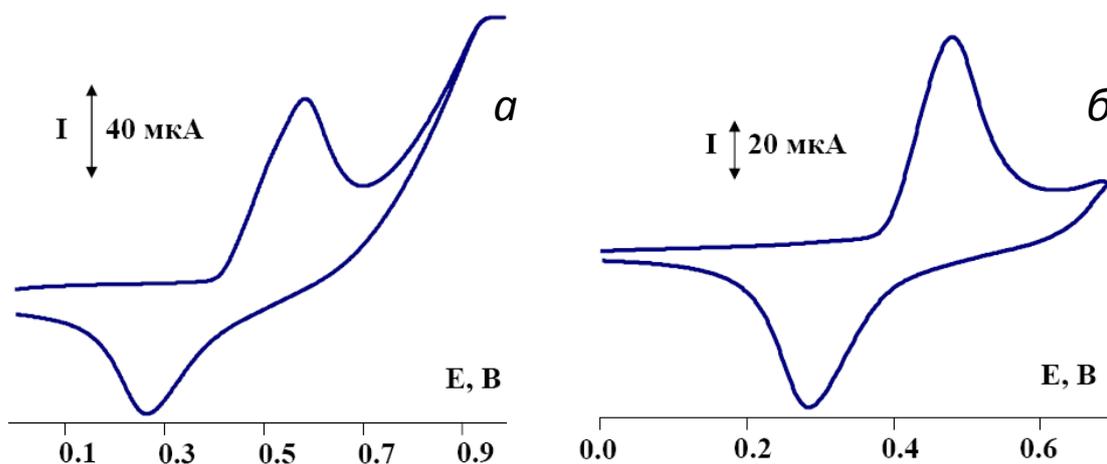


Рисунок 4.3. – ЦВА, зарегистрированные после формирования рабочей поверхности ТУЭ, модифицированных комплексом II: ДМФА (а); ДМСО (б); содержание по Ni(II) 8.56 г/дм³; фоновый электролит 0.25М NaOH, $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$ В/с

В дальнейших экспериментах применяли ТУЭ, модифицированные раствором комплекса II в ДМСО, содержание Ni (II) 8.56 г/дм³.

При исследовании электродов, модифицированных комплексом III с содержанием никеля 14.88 г/дм³, не наблюдали пиков на ЦВА в случае применения в качестве растворителя ДМФА. В случае ДМСО для ТУЭ, модифицированных комплексом III с содержанием никеля 14.88 г/дм³, были зарегистрированы ЦВА с выраженными анодно-катодными сигналами (рисунок 4.4.). Эти электроды применяли в дальнейших исследованиях.

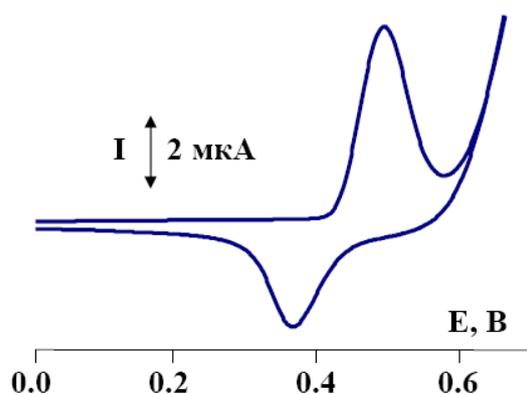


Рисунок 4.4. – ЦВА, зарегистрированные после формирования рабочей поверхности ТУЭ, модифицированных комплексом III; содержание по Ni(II) 14.88 г/дм³; фоновый электролит 0.25 М NaOH, $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$ В/с.

Для ТУЭ, модифицированных растворами комплекса IV в ацетонитриле и ДМСО не наблюдали выраженных анодно-катодных сигналов, соответствующих системе Ni(II)/Ni(III), после регистрации ЦВА. Содержание Ni (II) в модифицирующем растворе составляло 23.48 г/дм³ и 46.95 г/дм³.

Для выбранных модифицированных ТУЭ получены электрохимические и аналитические характеристики (таблицы 4.3, 4.4).

Таблица 4.3 – Электрохимические характеристики 1 мМ мочевины с использованием ТУЭ, модифицированных комплексами II и III ($n = 5, P = 0.95$)

Растворитель	$C_{Ni(II)}$, г/дм ³	$E^*_{\text{кат}} \pm \delta$, мВ; (S_r , %)	$E^{**}_{\text{пизм}} \pm \delta$, мВ; (S_r , %)	$I_{\text{кат}}/I_{\text{моч}} \pm \delta$; (S_r , %)
ТУЭ, модифицированный комплексом II				
ДМСО	8.56	0.51±0.05; (11)	0.55±0.05; (9.4)	1.81±0.18; (11)
ТУЭ, модифицированный комплексом III				
ДМФА	14.88	0.52±0.01; (4.4)	0.56±0.01; (5.9)	1.78±0.21; (13)

* E_{ox} – потенциал окисления катализатора из ЦВА; ** $E_{изм}$ – потенциал, при котором проводился хроноамперометрический анализ в присутствии мочевины.

Таблица 4.4 – Результаты хроноамперометрического определения мочевины с использованием ТУЭ, модифицированных комплексами II и III. Введено 1 мМ мочевины ($n = 5, P = 0.95$)

Растворитель	$C_{Ni(II)}$, г/дм ³	Найдено $C_m \pm \delta$, мМ;	S_r , %	R^2 , %
ТУЭ, модифицированный комплексом II				
ДМСО	8.56	0.97±0.08	9.7	97
ТУЭ, модифицированный комплексом III				
ДМФА	14.88	0.97±0.07	7.9	97

Таким образом, органические комплексы никеля (II) II и III могут быть применены в дальнейших исследованиях в качестве электрокатализаторов при электрохимическом определении мочевины и креатинина.

- Производные 3-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-s-тетразина (группа 2).

Органических комплексы никеля (II), входящие во вторую группу, содержат в структуре лиганда тетразиновый цикл, в 3 и 6 положениях которого располагаются группы, способные к дополнительной координации центральным ионом Ni(II) и карбонильной группой мочевины или креатинина.

Для ТУЭ, модифицированных раствором комплекса V в ДМФА, на ЦВА наблюдали выраженные анодно-катодные сигналы, соответствующие системе Ni(II)/Ni(III). Содержание Ni(II) в модифицирующих растворах составляло 5.85 г/дм³ и 2.93 г/дм³. И, хотя величина токов для ТУЭ, модифицированных комплексом V с содержанием по Ni(II) 5.85 г/дм³, выше, чем при содержании 2.93 г/дм³, в первом случае наблюдали смещение измеряемого потенциала от потенциала обратимого процесса окисления-восстановления, что свидетельствовало об осложнении процесса переноса электрона (рисунок 4.5).

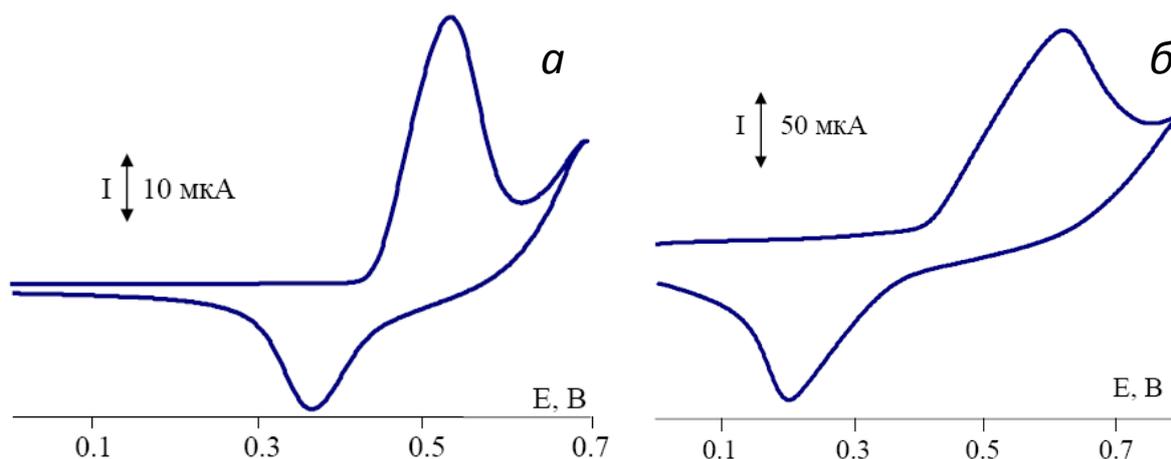


Рисунок 4.5 – ЦВА, зарегистрированные после формирования рабочей поверхности ТУЭ, модифицированных раствором комплекса V в ДМФА. Содержание Ni(II) 2.93 г/дм³ (a); 5.85 г/дм³ (б); фоновый электролит 0.25М NaOH, $v_{\text{рег-ии}} = 0.1 \text{ В/с}$

Органический комплекс VIII практически не растворим в часто используемых органических растворителях. Наилучшая растворимость комплекса VIII наблюдалась при использовании ДМФА, причем максимальное содержание никеля в исходном растворе составило всего 0.21 г/дм³. Для ТУЭ, модифицированных раствором комплекса VIII в ДМФА, не наблюдали выраженных анодно-катодных

сигналов, соответствующих системе Ni(II)/Ni(III). Использование суспензий данного комплекса в ДМФА с большим содержанием Ni (II) не улучшило вольтамперных характеристик, модифицированных ТУЭ.

Вероятно, наличие объемных заместителей может не только препятствовать образованию координационных связей с аминами, но и уменьшать электрохимическую активность самого комплекса.

Для ТУЭ, модифицированных раствором комплекса IX в ДМФА, наблюдали смещение измеряемого потенциала от потенциала обратимого процесса окисления-восстановления на ЦВА, что свидетельствовало об осложнении процесса переноса электрона. Использование ТУЭ с более высоким содержанием Ni(II) на рабочей поверхности не улучшило вольтамперных характеристик.

По-видимому, наличие длинноцепочечных алкильных групп может препятствовать переносу электрона между никелевыми центрами и рабочим электродом. Кроме того, одновременное присутствие в структуре комплекса заместителя, содержащего вторичную амино - группу (производное ундециламина) и ионов никеля (II) может способствовать окислению лиганда в процессе формирования поверхностного слоя и смещению потенциала анодно-катодного пика от обратимого потенциала окисления-восстановления.

При исследовании электродов с нанесенным раствором органического комплекса X в CH₃CN с содержанием Ni (II), равным 15 г/дм³, на ЦВА не наблюдали выраженных пар анодно-катодных пиков.

Таким образом, органический комплекс никеля (II) V применяли в дальнейших исследованиях в качестве электрокатализатора при электрохимическом определении мочевины и креатинина (таблицы 4.5 – 4.6).

Таблица 4.5 – Электрохимические характеристики 1 мМ мочевины с использованием ТУЭ, модифицированных комплексом V ($n = 5, P_T = 0.95$)

Растворитель	$C_{Ni(II)}$, г/дм ³	$E_{п±δ}$, мВ; (S_r , %)	$E_{пизм±δ}$, мВ; (S_r , %)	$I_{кат}/I_{моч±δ}$; (S_r , %)
ДМФА	2.93	$0.53 ± 0.01$ (7.3)	$0.55 ± 0.01$ (8.1)	$3.96 ± 0.48$ (14)

Таблица 4.6 – Результаты хроноамперометрического определения мочевины с использованием ТУЭ, модифицированного комплексом V. Введено 1 мМ мочевины ($n = 5, P = 0.95$)

Растворитель	$C_{Ni(II)}$, г/дм ³	Найдено $C_M ± δ$, мМ;	S_r , %	R^2 , %
ДМФА	2.93	$1.00 ± 0.01$	1.7	100

• Вицинальные диамины (группа 3).

Определяемые карбонилсодержащие амины могут быть координированы как с центральным атомом (Ni(II)), так и с вицинальными атомами азота.

При исследовании электродов с нанесенным суспензией органического комплекса VI в ДМФА с содержаниями Ni(II) равным 1.16 г/дм³, на ЦВА не наблюдали выраженных пар анодно-катодных пиков, вероятно, из-за недостаточного содержания никеля.

Лучшими растворителями для комплекса VII были толуол, ацетон, ДМСО. Содержание Ni(II) в суспензиях указанных растворителей равно 0.48 г/дм³, 0.36 г/дм³ и 1.00 г/дм³ соответственно. Максимальное содержание Ni(II) в растворе ДМФА достигало лишь 0.72 г/дм³.

На ЦВА, зарегистрированных с использованием ТУЭ, модифицированных раствором комплекса VII в ДМФА или суспензией этого комплекса толуоле, наблюдали четко выраженные пары анодно-катодных пиков, однако величины значений токов не позволили в дальнейшем применять эти электроды в электроанализе. Для ТУЭ, модифицированных суспензиями в ацетоне и ДМСО, на ЦВА не наблюдали выраженных анодно-катодных пиков.

Таким образом, ни один представитель группы 3 не применялся в дальнейших исследованиях.

•Производные порфирина (группа 4)

В состав органических комплексов никеля с порфиринами входят алкильные или фенильные, а также сопряженные пиразиновые заместители, в которых атомы азота порфиринового цикла могут участвовать в дополнительном координировании с молекулами аминов. Вследствие плохой растворимости производных порфирина в органических растворителях для нанесения на рабочую поверхность электродов использовали либо суспензии комплексов в подходящем растворителе, либо очень разбавленные растворы.

Для ТУЭ с нанесенной суспензией комплекса XI в ДМФА с содержанием Ni (II) 2.02 г/дм³ на ЦВА наблюдали четко выраженный анодно-катодный сигнал, в отличие от ТУЭ с нанесенной суспензией в ДМФА с содержанием Ni (II) 0.81 г/дм³ (рисунок 4.6).

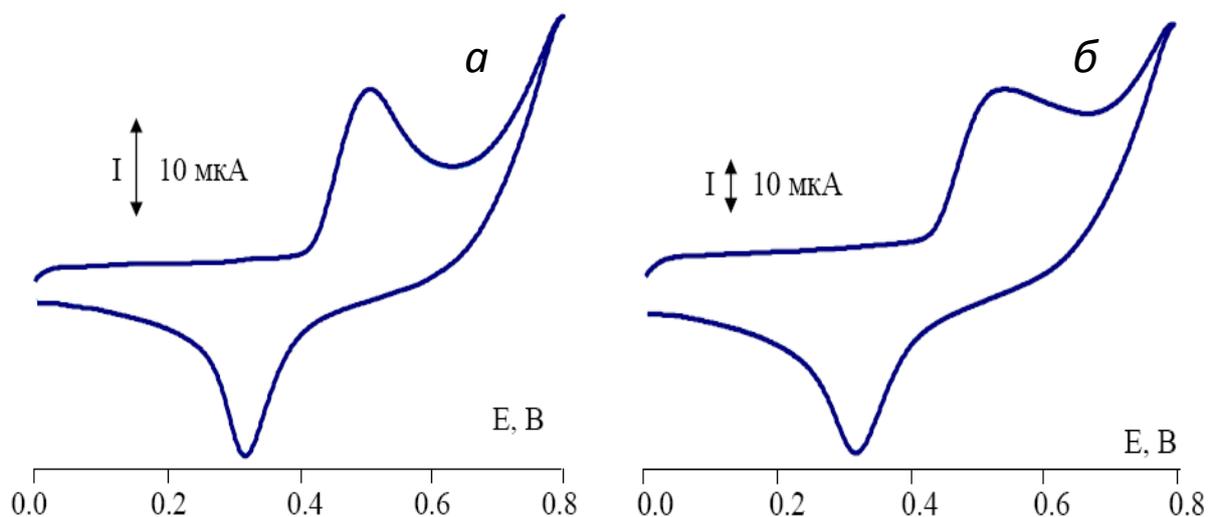


Рисунок 4.6 – ЦВА, зарегистрированные после формирования рабочей поверхности ТУЭ, модифицированных растворами комплекса XI в ДМФА; содержание Ni (II) 2.02 г/дм³ (а); 0.81 г/дм³ (б); фоновый электролит 0.25М NaOH; $v_{рег-инт} = 0.1$ В/с

В случае применения в качестве растворителя ДМСО также наблюдали на ЦВА четко выраженный анодно-катодный сигнал (рисунок 4.7).

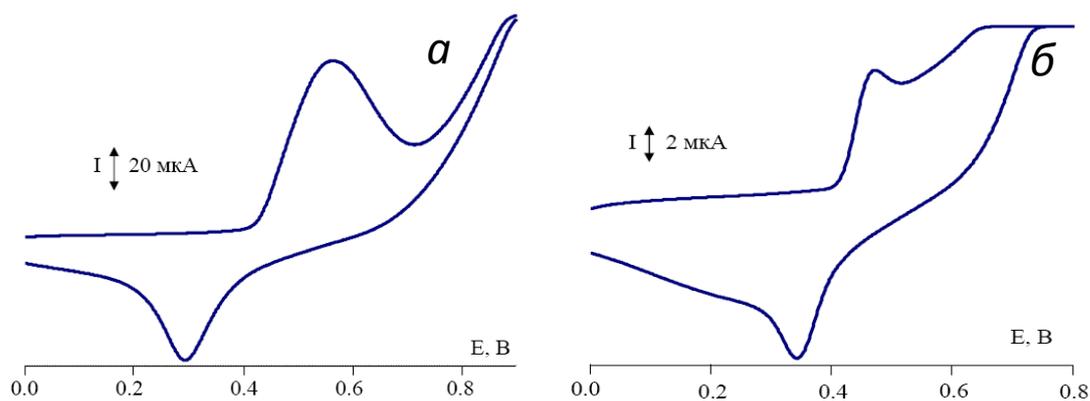


Рисунок 4.7 – ЦВА, зарегистрированные после формирования рабочей поверхности ТУЭ, модифицированных растворами комплекса XI в ДМСО, содержание Ni (II) 1.00 г/дм³ (а); в CH₃CN 1.00 г/дм³ (б); фоновый электролит 0.25M NaOH, $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$ В/с

Однако, ΔE для указанных модифицированных ТУЭ несколько больше, чем при использовании ТУЭ, модифицированных суспензией комплекса XI в ДМФА с содержанием Ni (II) 2.02 г/дм³. В случае ТУЭ с раствором комплекса XI в CH₃CN анодно-катодный сигнал плохо выражен (рисунок 4.7).

Комплекс XII плохо растворим в ДМФА, не растворим в ДМСО. Зарегистрированы ЦВА для ТУЭ, модифицированных суспензиями комплекса XII в ДМФА с содержанием Ni (II) 0.81 г/дм³ и 2.02 г/дм³ (рисунок 4.8).

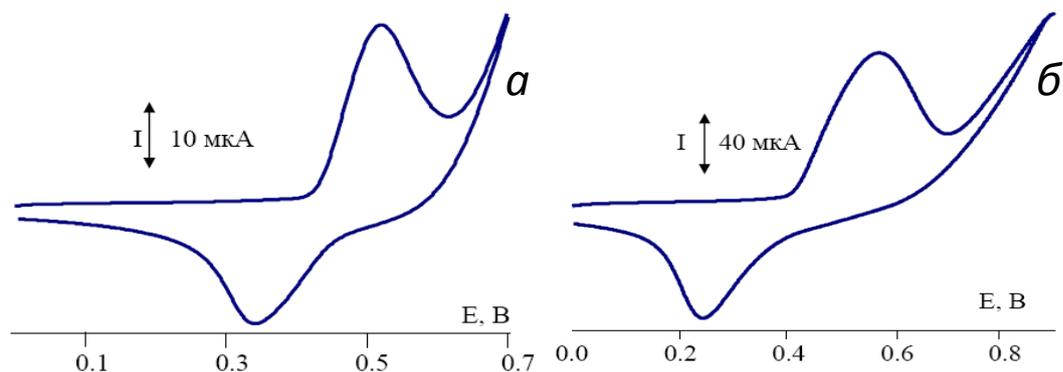


Рисунок 4.8 – ЦВА, зарегистрированные после формирования рабочей поверхности ТУЭ, модифицированных суспензиями комплекса XII в ДМФА. Содержание Ni (II) 0.81 г/дм³ (а); 2.03 г/дм³ (б); фоновый электролит 0.25M NaOH; $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$ В/с

Хотя для электродов с нанесенной на рабочую поверхность суспензией комплекса XII в ДМФА, содержащей $2.03 \text{ г/дм}^3 \text{ Ni (II)}$, и наблюдали на циклической вольтамперограмме значительно бóльшую величину сигнала по сравнению с электродами, модифицированными суспензией с содержанием никеля 0.81 г/дм^3 , во втором случае зарегистрирован уширенный анодный пик, что свидетельствовало о затруднении переноса электрона в исследуемом процессе (рисунок 4.8).

Для ТУЭ, модифицированных суспензией комплекса XIII в ДМСО, зарегистрированы ЦВА с выраженными окислительно–восстановительными сигналами, однако значения величин токов не позволили применять эти электроды в дальнейших исследованиях.

При исследовании электродов с нанесенной суспензией органического комплекса XIV в ДМСО с содержаниями Ni (II) 7.03 г/дм^3 ; 3.52 г/дм^3 ; 1 г/дм^3 , на ЦВА не наблюдали выраженных пар анодно-катодных пиков.

При исследовании электродов с нанесенной суспензией органического комплекса XV в ТГФ с содержаниями Ni (II) 1 г/дм^3 и электродов с нанесенными суспензиями органического комплекса XVI в ТГФ с низким содержанием Ni (II) , равным 1.99 г/дм^3 и 0.20 г/дм^3 соответственно, на ЦВА также не наблюдали выраженных пар анодно-катодных пиков.

Таким образом выбраны представители четвертой группы для дальнейших исследований по количественному определению аминов (таблицы 4.7 – 4.8)

Органический комплекс никеля (II) V, применяли в дальнейших исследованиях в качестве электрокатализатора при электрохимическом определении мочевины и креатинина (таблицы 4.5 – 4.6).

Таблица 4.7 – Электрохимические характеристики 1 мМ мочевины с использованием ТУЭ, модифицированных комплексами XI и XII ($n = 5$; $P = 0.95$)

Растворитель	$C_{Ni(II)}$, г/дм ³	$E_{п±δ}$, мВ; (S_r , %)	$E_{пизм±δ}$, мВ; (S_r , %)	$I_{кат}/I_{моч±δ}$; (S_r , %)
ТУЭ, модифицированный комплексом XI				
ДМФА	2.02	0.63±0.04; (3.7)	0.67±0.04; (3.0)	2.04±0.27; (15)
ТУЭ, модифицированный комплексом XII				
ДМФА	0.81	0.51±0.02; (5.4)	0.54±0.02; (7.3)	3.66±0.36; (18)

Таблица 4.8 – Результаты хроноамперометрического определения мочевины с использованием ТУЭ, модифицированных комплексами XI и XII. Введено 1 мМ мочевины ($n = 5$; $P = 0.95$)

Растворитель	$C_{Ni(II)}$, г/дм ³	Найдено $C_M±δ$, мМ;	S_r , %	R^2 , %
ТУЭ, модифицированный комплексом XI				
ДМФА	2.02	1.03 ± 0.02	9.6	103
ТУЭ, модифицированный комплексом XII				
ДМФА	0.81	0.91 ± 0.08	11	91

В результате исследований в качестве электрокатализаторов для количественного определения мочевины и креатинина выбраны органические комплексы II, III, V, XI и XII.

4.2.2.3 Кинетические параметры электрокаталитических превращений мочевины и креатинина

Были зарегистрированы ЦВА с использованием ТУЭ, модифицированного комплексом III в отсутствие и в присутствии мочевины (рисунок 4.9) или креатинина (рисунок 4.10).

Вольтамперограммы, зарегистрированные в отсутствие и присутствии мочевины/креатинина, соответственно, соответствуют, по-видимому, процессу электроокисления исследуемого субстрата.

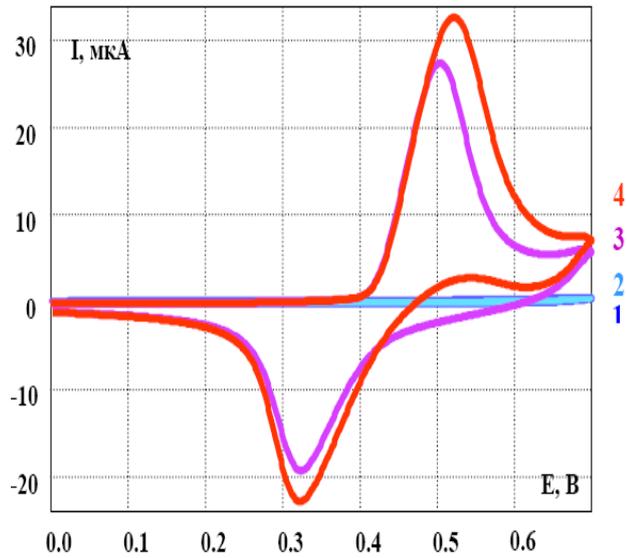


Рисунок 4.9 – ЦВА, зарегистрированные на немодифицированном ТУЭ: в отсутствие мочевины (1), в присутствии 3 мМ мочевины (2); а также на ТУЭ, модифицированном комплексом III: в отсутствие мочевины (3), в присутствии 3 мМ мочевины (4); фоновый электролит 0.25М NaOH, $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$ В/с

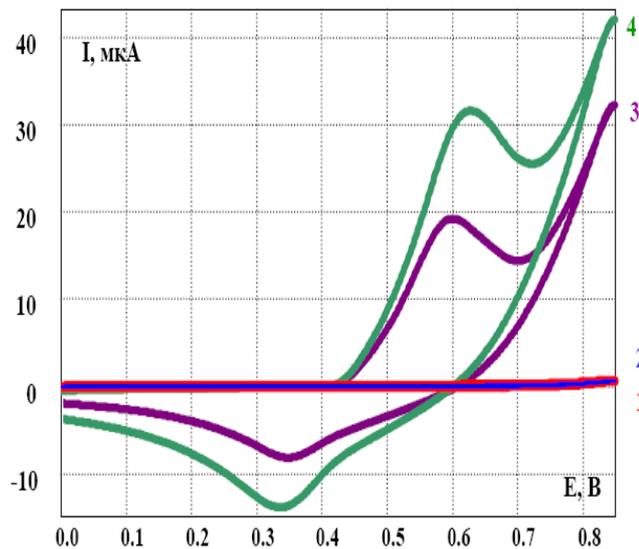
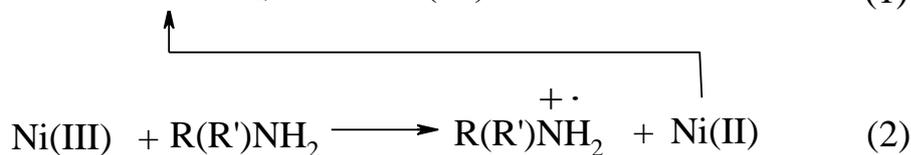


Рисунок 4.10 – ЦВА, зарегистрированные на немодифицированном ТУЭ: в отсутствие креатинина (1), в присутствии 0.02 мМ креатинина (2); а также на ТУЭ, модифицированном комплексом III: в отсутствие креатинина (3), в присутствии 0.02 мМ креатинина (4); фоновый элеткроит 0.25М NaOH, $v_{\text{рег-ии}} = 0.1$ В/с

Схему электрохимического каталитического окисления мочевины/креатинина можно представить, учитывая, что соединения, содержащие аминогруппу, в процессе электрохимического окисления образуют катион-радикалы [355, 356]:



где R(R')NH_2 — мочевина или креатинин, L — органический лиганд.

Полученная линейная зависимость величины тока окисления катализатора (I , мкА) от скорости наложения потенциала (v , мВ/с): $I = 0.4 \cdot v + 0.25$; $R^2 = 0.9997$, указывает на то, что в электрохимическом процессе принимает участие электроактивное вещество, локализованное на поверхности электрода. Вероятно, это процесс обратимого электрохимического окисления Ni(II)L/Ni(III)L .

Линейная зависимость тока окисления мочевины (I , мкА) от обратного квадратного корня времени регистрации аналитического сигнала ($t^{-0.5}$, с $^{-0.5}$) в присутствии 1 мМ мочевины подчиняется уравнению Коттрела ($I = 0.65 \cdot t^{-0.5} + 0.25$; $R^2 = 0.997$), что указывает на лимитирующую стадию в процессе окисления мочевины — диффузию аналита из объема раствора. Также была получена линейная зависимость I от $t^{-0.5}$ процесса исследования электрохимического окисления креатинина.

4.2.2.4 Аналитические характеристики количественного электрохимического определения мочевины и креатинина

Для выбранных в предыдущих исследованиях органических комплексов II, III, V, XI и XII получены аналитические характеристики электрокаталитического определения мочевины и креатинина (таблица 4.9).

Для приведенных комплексов получены линейные зависимости аналитического сигнала от концентрации мочевины в диапазоне концентраций

$1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-2}$ М. Максимально близкие, воспроизводимые значения найденной добавки зарегистрированы для ТУЭ, модифицированных комплексами II, III, V и XI. Для ТУЭ, модифицированного комплексом XII, наблюдали наименьшие по величине аналитические сигналы окисления аналита. В случае определения мочевины c_{lim} , рассчитанный по 3 σ -критерию – $8.7 \cdot 10^{-6}$ М, тогда как для стандартного ферментативного метода с применением колориметрического анализатора BUN/UREA Vitrous System (Johnson & Johnson, Великобритания) составляет $C_{lim} = 2 \cdot 10^{-4}$ М.

Креатинин является вторичным амином, поэтому ожидали, что каталитическая активность комплексов никеля (II) будет меньше по сравнению с мочевиной [356]. Для ТУЭ с нанесенными комплексами XI и XII не были наблюдали выраженных сигналов окисления креатинина.

Для комплексов II, III, V получены линейные зависимости аналитического сигнала от концентрации мочевины в диапазоне концентраций $5 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ М. В случае определения креатинина c_{lim} , рассчитанный по 3 σ -критерию – $2.7 \cdot 10^{-5}$ М, тогда как минимальное содержание креатинина в сыворотке крови взрослого здорового человека составляет $4.4 \cdot 10^{-5}$ М.

Таким образом, полученные аналитические сигналы при гетерогенном электрокаталитическом окислении электронеактивных мочевины или креатинина позволяют применять органические комплексы для количественного определения заявленных аминов.

Таблица 4.9 – Оценка правильности электрокаталитического определения мочевины/креатинина с применением модифицированных ТУЭ ($n = 5, P = 0.95$)

электрод	$C_{\text{аналит}}, \text{ мМ}$		$S_r, \%$	$t_{\text{эксп}}$	Уравнение регрессии, ($I_{\text{cat}}: \mu\text{А}; C: \text{мМ}$)	R^2	Диапазон концентраций, мМ
	Введено	Найдено					
Мочевина							
ТУЭ-II	1	1.11±0.09	9.4	2.73	$I = 5.46 \cdot C + 9.08$	0.995	0.01 ÷ 10.00
ТУЭ-III		1.09±0.09	8.5	2.23	$I = 0.26 \cdot C + 0.55$	0.999	
ТУЭ-V		0.98±0.05	5.5	0.89	$I = 18.71 \cdot C + 20.62$	0.992	
ТУЭ-XI		0.85±0.12	6.7	2.29	$I = 5.73 \cdot C + 9.57$	0.998	
ТУЭ-XII		0.95±0.08	7.0	1.39	$I = 0.04 \cdot C + 0.65$	0.994	
Креатинин							
ТУЭ-II	0.5	0.54±0.09	14	0.99	$I = 1.88 \cdot C + 0.38$	0.997	0.03 ÷ 0.50
					$I = 1.45 \cdot C + 0.79$	0.988	0.03 ÷ 1.00
ТУЭ-III		0.58±0.20	28	0.89	$I = 0.92 \cdot C + 0.12$	0.999	0.05 ÷ 0.55
					$I = 0.72 \cdot C - 0.04$	0.954	0.03 ÷ 1.00
ТУЭ-V	0.46±0.04	7.8	2.24	$I = 2.11 \cdot C + 0.18$	0.997	0.03 ÷ 0.50	

4.2.3. Разработка методики хроноамперометрического селективного определения содержания мочевины в модельном растворе и образцах сыворотки крови

На первом этапе исследований проводили определение мочевины в модельном растворе, в состав которого входило максимальное количество компонентов сыворотки крови (аминокислоты, мочевая и аскорбиновая кислоты), вступающих в реакции окисления, катализируемые соединениями никеля (II), а, следовательно, потенциально мешающих определению мочевины (таблица 4.10) [357].

Таблица 4.10 – Состав модельных растворов, имитирующих сыворотку крови.
Содержание альбумина во всех модельных растворах 45 г/дм³

Компоненты модельного раствора	Мр1 (С, мМ)	Мр2 (С, мМ)
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	6.4	6.4
7. Аскорбиновая кислота	0.057	0.057
8. Мочевая кислота	0.480	0.480
9. Креатинин	1	1
10. Мочевина	0	5

Большинство компонентов, представленных в таблице 4.10, проявляют кислотные свойства, поэтому селективное выделение мочевины из модельных растворов проводили с использованием анионообменной колонки HYPERSEP IСОН (Metrohm, Швейцария), которую перед анализом активировали пропусканием через неё 10 см³ 10 %-го раствора NaOH и 10 см³ деионизированной воды. Затем 0.1 см³ пробы (модельный раствор/сыворотка крови) смешивали с 0.9 см³ 0.9 %-ного раствора NaCl и пропускали через колонку 2 см³ полученного раствора. Количественное определение мочевины в полученном растворе проводили по методике, приведенной в гл. 4.1.1.1 (таблицы 4.11, 4.12). Рабочими электродами служили ТУЭ, модифицированные комплексом III.

Таблица 4.11 – Результаты хроноамперометрического определения мочевины в модельных растворах с применением анионообменной колонки (I) и без нее (II) ($n = 5, P = 0.95, t_{кр}=2.78$)

Модельный раствор	Найдено, $C \pm \delta$, мМ ($Sr, \%$)	
	I	II
Мр1	0.92 ± 0.04 (5.2)	30.8
Мр2	5.37 ± 0.45 (9.6)	38.9

Таблица 4.12 – Результаты хроноамперометрического определения мочевины в сыворотке крови, полученные с использованием разработанного и независимого методов ($n = 5$; $P = 0.95$, $F_{кр} = 6.39$, $t_{кр} = 2.78$)

Стандартный уреазный метод (Vitros BUN/UREA Slide, Johnson&Johnson Clinical Diagnostics, Inc.), C1	Разработанный способ, C2	C2/C1, %	$t_{эксп}$	$F_{эксп}$
13.3 ± 0.2	12.4 ± 0.7	93	3.43	0.05
4.8 ± 0.1	5.3 ± 0.6	109	2.28	0.02
2.30 ± 0.04	2.3 ± 0.3	99	0.00	0.01
4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.2	100	0.00	0.16

По рассчитанным F - и t - критериям можно утверждать, что различие дисперсий уреазного метода и разработанного электрохимического способа статистически незначимо (F -критерий), а также выборки принадлежат к одной и той же генеральной совокупности и различие средних носит случайный характер (t -критерий).

4.2.4. Хроноамперометрическое определение содержания креатинина в модельном растворе

Для селективного определения креатинина в модельных растворах использовали синтезированные образцы ПМО креатинина [357].

Сорбционную способность синтезированных ПМО относительно креатинина определяли следующим образом. В стакан емк. 25 см^3 помещали 0.27 г полимера (ПМО – Кр или ПБМО), добавляли 10 см^3 0.10 М раствора креатинина, перемешивали в течение 1 ч и фильтровали. Затем в полученном фильтрате (Ф1) определяли креатинин по методике, приведенной в гл. 4.1.1.1. Затем полимер (ПМО – Кр или ПБМО) промывали 10 см^3 этанола и высушивали при $80 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 45 мин до полного испарения этанола. После этого ПМО помещали в стаканчик емк. 25 см^3 , добавляли 10 см^3 деионизированной воды и интенсивно

перемешивали в течение 1 ч. Фильтровали под вакуумом, полученный фильтрат (Ф2) анализировали на наличие креатинина по методике, приведенной в гл. 4.1.1.1.

Сорбционную способность ПМО-Кр и ПБМО рассчитывали с использованием формул:

$$\alpha = \frac{(C_0 - C_p) \times V}{m} \quad (4.2)$$

$$R = \frac{(C_0 - C_p) \times 100}{C_0} \quad (4.3)$$

$$D = \frac{RV}{(100 - R) \times m} \quad (4.4)$$

где α – сорбция, ммоль/г; R – степень извлечения, %; D – коэффициент распределения, см³/г; C_0 – концентрация креатинина в исходном растворе, М; C_p – равновесная концентрация креатинина в фильтрате (Ф2), полученном после сорбции на ПМО, М; V – объем исходного раствора, см³; m – масса используемого полимера, г.

Рассчитанные для ПМО – Кр и ПБМО по формулам (4.3) и (4.4) степени извлечения (R , %) и коэффициенты распределения (D , см³/г) указывают на значительно более высокую сорбционную способность синтезированного ПМО – Кр по сравнению с ПБМО и косвенно подтверждают наличие в структуре полимера пор, комплементарных креатинину (таблица 4.13).

Таблица 4.13 – Степень извлечения и коэффициенты распределения ПМО – Кр и ПБМО ($C_{кр} = 0.1$ М, $V = 10$ см³, $m = 0.2705$ г, $t = 60$ мин)

Полимер	R , %	D , см ³ /г
ПМО– Кр	69.5	36.3
ПБМО	7.0	0.7

Кроме того, было определено, что в случае ПМО – Кр зависимость сорбции креатинина от концентрации анализита в исследуемом растворе подчиняется уравнению Ленгмюра в отличие от ПБМО (рисунок 4.11).

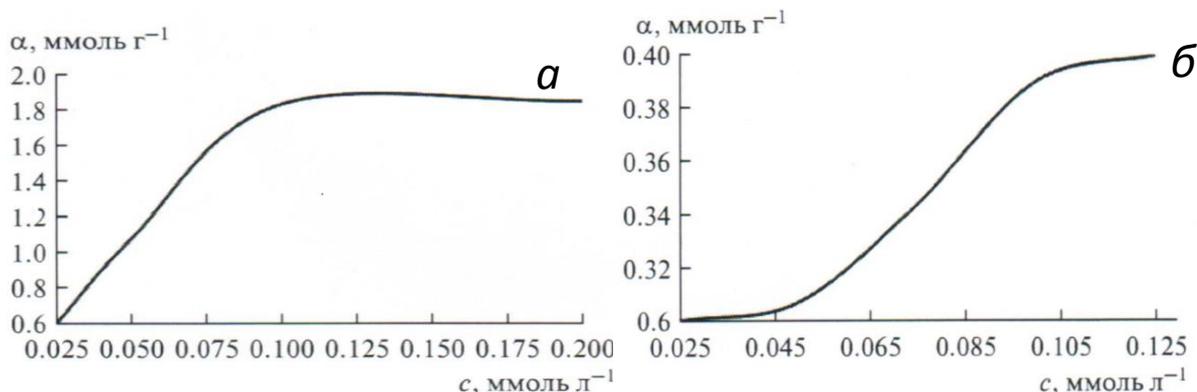


Рисунок 4.11 – Изотермы сорбции креатинина из водных растворов с использованием ПМО – Кр (а) и ПБМО (б)

Рассчитанный с использованием формулы (4.5) импринтинг фактор для ПМО – Кр, составляет 52, что позволяет применять синтезированные ПМО креатинина для эффективного выделения этого анализита из многокомпонентных растворов.

$$IF = \frac{D_{\text{ПМО-Кр}}}{D_{\text{ПБМО}}} \quad (4.5)$$

Результаты хроноамперометрического определения креатинина в фильтрах Ф1 и Ф2 с использованием синтезированных полимеров показали, что ПМО – Кр сорбируют не менее 70 % креатинина. Вероятно, полученное значение связано с расположением функциональных групп внутри пор полимера, что может способствовать неспецифическому взаимодействию с молекулами креатинина (таблица 4.14).

Таблица 4.14 – Результаты хроноамперометрического определения креатинина в фильтратах Ф1 и Ф2 ($n = 5$, $P = 0.95$, введено 0.1 М креатинина)

Исследуемый раствор	ПМО – Кр		ПБМО	
	$(C \pm \delta)$, М (Sr , %)	$t_{\text{эксп}}$	$(C \pm \delta)$, М (Sr , %)	$t_{\text{эксп}}$
Ф1	0.025 ± 0.004 (15)	41.9	0.096 ± 0.012 (14)	0.7
Ф2	0.076 ± 0.012 (15)	5.3	0.009 ± 0.001 (12)	203.5

Результаты хроноамперометрического определения креатинина в модельных растворах с использованием синтезированных полимеров несколько завышены (таблица 4.15). Вероятно, это связано с неспецифической сорбцией мешающих компонентов модельных растворов Мр1 и Мр2.

Таблица 4.15 – Результаты хроноамперометрического определения креатинина после его выделения из модельных растворов с использованием ПМО –Кр ($n = 5$, $P = 0.95$, введено 1 мМ креатинина)

Модельный раствор	Найдено, $C \pm \delta$, мМ (Sr , %)	$t_{\text{эксп}}$
Мр1	1.11 ± 0.08 (6.2)	3.07
Мр2	1.17 ± 0.07 (4.6)	5.43

В таблицах 4.16, 4.17 представлено сравнение характеристик некоторых литературных данных по способам и сенсорам и разработанных для определения мочевины и креатинина.

Представленные результаты исследований демонстрируют возможность применения разработанных бесферментного электрохимического способа количественного определения мочевины и креатинина в клинической лабораторной диагностике.

Таблица 4.16 – Сравнение характеристик некоторых сенсорных систем и разработанного способа для определения мочевины (норма в сыворотке крови человека: 2.5 – 8.3 ммоль/дм³)

Способ/сенсор	Интервал определяемых концентраций, мМ	C_{lim} , мМ	Стабильность (дни)	Ссылки
MWCNT-полимер-Au-уреаза	1.0 – 20.0	0.04	15	[358]
Pt/полипиррол-Ag-уреаза	0.2 – 16.0	0.05	10	[359]
АО «ДИАКОН-ДС» в ЕС CE-partner4U	2.0 – 50.0	1.0	42	[360]
Разработанный способ	0.01 – 10.0	8.7 мкМ	Не ограничено	

Таблица 4.17 – Сравнение характеристик некоторых сенсорных систем и разработанного способа для определения креатинина (норма в сыворотке крови человека: 52 – 120 мкмоль/дм³)

Способ/сенсор	Интервал определяемых концентраций, мкМ	C_{lim} , мкМ	Стабильность (дни)	Ссылки
Толстопленочный углеродный электрод с электроосажденной медью	6.0 – 378	–	–	[361]
Углеродный электрод на основе квантовых точек	0.442 – 8.840	0.229	10	[362]
Стандартный метод с применением набора реагентов и биохимического анализатора "Cobas Fara"	28 – 1368	–	20	[363]
Разработанный способ	50 – 1000	27	Не ограничено	

4.3 Бесферментный электрохимический способ количественного определения холестерина.

4.3.1. Применение в качестве электрокатализаторов окисления холестерина НЧ золота и серебра

На первом этапе исследований для создания растворов, имитирующих сыворотку крови, готовили эмульсии холестерина в воде с использованием ПАВ. Сначала для приготовления эмульсии холестерина в воде необходимо было выбрать в качестве стабилизатора ПАВ, присутствие которого в рабочем растворе не оказывало влияния на ток окисления катализатора при соответствующем потенциале [364– 366].

Применяли ПАВ: Тритон X-100, ЦТАБ и ЛСН. Регистрировали ЦВА с использованием СУЭ, с нанесенными НЧ серебра, в рабочей ячейке 0.25 М раствор NaOH–ТГФ (1:1, по объему), а затем добавляли 1 мМ раствора ПАВ.

На ЦВА, зарегистрированных в отсутствие и в присутствии 1 мМ Тритона X-100 или ЛСН, наблюдали увеличение или уменьшение анодного сигнала. Вероятно, это связано с перекрытием электроактивной поверхности НЧ, в случае ЛСН. В качестве стабильного эмульгатора, отвечающего всем критериям электрокаталитического определения холестерина, был выбран ЦТАБ, который использовали в дальнейших исследованиях. Определение проводили согласно методике гл. 4.1.2.

Для СУЭ, модифицированными и немодифицированными НЧ Ag-Au, зарегистрированы ЦВА (рисунок 4.12).

В случае немодифицированного СУЭ на ЦВА не наблюдали откликов в рабочем диапазоне потенциалов (рисунок 4.12, кривая 1), в отличие от СУЭ, модифицированного НЧ Ag-Au, при использовании которых на ЦВА присутствовали анодные сигналы при 0.38 В, 0.68 В и 0.80 В, а также катодный сигнал при -0.20 В (рисунок 4.12, кривая 2). Внесение в фоновый электролит 1 мМ ЦТАБ (рисунок 4.12, кривая 3) не приводит к заметному изменению формы ЦВА. При внесении в рабочую ячейку 6 мМ холестерина наблюдали увеличение

величины анодного сигнала при потенциале 0.38 В (рисунок 4.12, кривая 4) с одновременным смещением потенциала пика на 0.14 В. Такое поведение в присутствии наночастиц благородных металлов характерно для электрокаталитического процесса окисления аналита [366, 367].

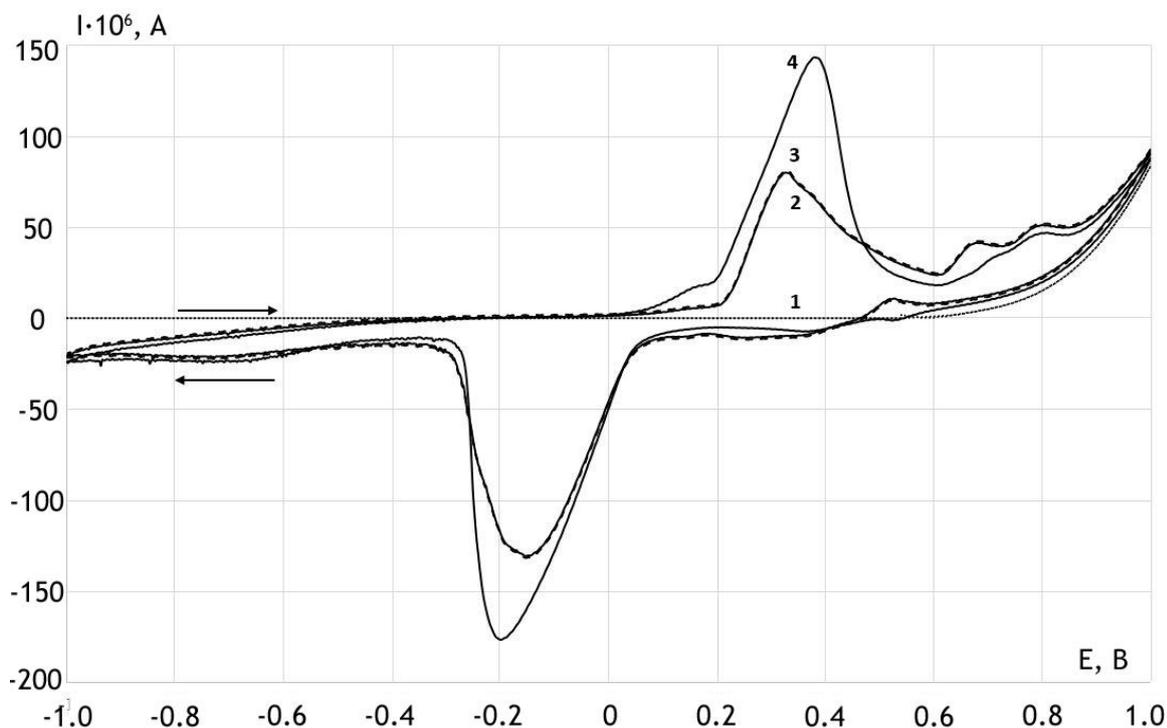


Рисунок 4.12 – ЦВА, зарегистрированные на немодифицированном СУЭ, фоновый элетролит – 10 см³ эмульсии вода: ТГФ (1:1 по объему), содержащей 0.125 М NaOH (1), на электроде, модифицированном НЧ Ag-Au, фон (2), фоновый электролит 1мМ ЦТАБ (3) и фоновый элетролит 1 мМ ЦТАБ и 6 мМ холестерина (4); $v_{рег-ии} = 100$ мВ/с

Для всех синтезированных типов НЧ серебра и золота, используемых в качестве электрокатализаторов, получены зависимости аналитического сигнала от концентрации холестерина в диапазоне концентраций от 1 до 7 мМ (таблица 4.16).

Для НЧ Au, Au-Ag, (Au+Ag) не наблюдали электрокаталитической активности в присутствии холестерина, что, по-видимому, связано с частичным растворением золота при подготовке рабочей поверхности СУЭ.

Таблица 4.16 – Зависимость анодного тока НЧ от концентрации холестерина в рабочем растворе (эмульсии) ($n = 5$, $P = 0.95$)

Тип наночастиц	Состав наночастиц	Уравнение регрессии $I(A) = a \cdot C_{\text{хол}}(M) + b$		R^2	$S_r, \%$
		a	b		
1	НЧ Ag	$4.5 \cdot 10^{-6}$	$5.7 \cdot 10^{-5}$	0.65	-
	НЧ Au	$2.5 \cdot 10^{-6}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$	0.59	-
2	НЧ Ag–Au	$1.4 \cdot 10^{-5}$	$5.8 \cdot 10^{-5}$	0.97	4,5
	НЧ Au–Ag	$8.2 \cdot 10^{-6}$	$9.5 \cdot 10^{-4}$	0.73	-
3	НЧ (Au+Ag)	$1.3 \cdot 10^{-6}$	$7.5 \cdot 10^{-4}$	0.55	-
4	НЧ эAg	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$3.0 \cdot 10^{-4}$	0.95	5,8

Несмотря на ряд преимуществ электрохимического метода синтеза НЧ эAg, а именно: 1) получение НЧ с указанным размером путем контроля осаждения НЧ, изменяя потенциал осаждения, плотность тока, время осаждения и т.д., 2) исключение этапов, характерных для химических методов синтеза – отмывки от непрореагировавших реагентов, центрифугирования, сушки, диспергирования в растворителе и т.д., данный метод обладает существенным недостатком – невозможностью получения композиционных наноматериалов. Для ТУЭ, модифицированных НЧ эAg, синтезированных методом электрохимического осаждения, хотя и были получены линейные зависимости аналитического сигнала от концентрации холестерина в диапазоне концентраций аналита 1- 5 мМ, однако недостаточная чувствительность не позволяет применять их в дальнейших исследованиях.

На основании вольтамперных характеристик можно сказать, что наиболее выраженный сигнал зарегистрирован для СУЭ, модифицированных НЧ типа ядро–оболочка – НЧ Ag–Au. В этом случае возможно проявление синергетического эффекта [366], т.е. имеет место усиление электрокаталитических свойств одного металла другим.

Для СУЭ, модифицированных НЧ Ag–Au, были зарегистрированы хроноамперограммы и получена линейная зависимость тока окисления НЧ от обратного квадратного корня времени регистрации аналитического сигнала для рабочего раствора ($t^{0.5}$, $c^{-0.5}$) в присутствии 5 мМ холестерина (рисунок 4.13), $R^2 = 0.990$. Линейный характер зависимости указывает на лимитирующую стадию в процессе окисления холестерина – диффузию аналита из объема раствора.

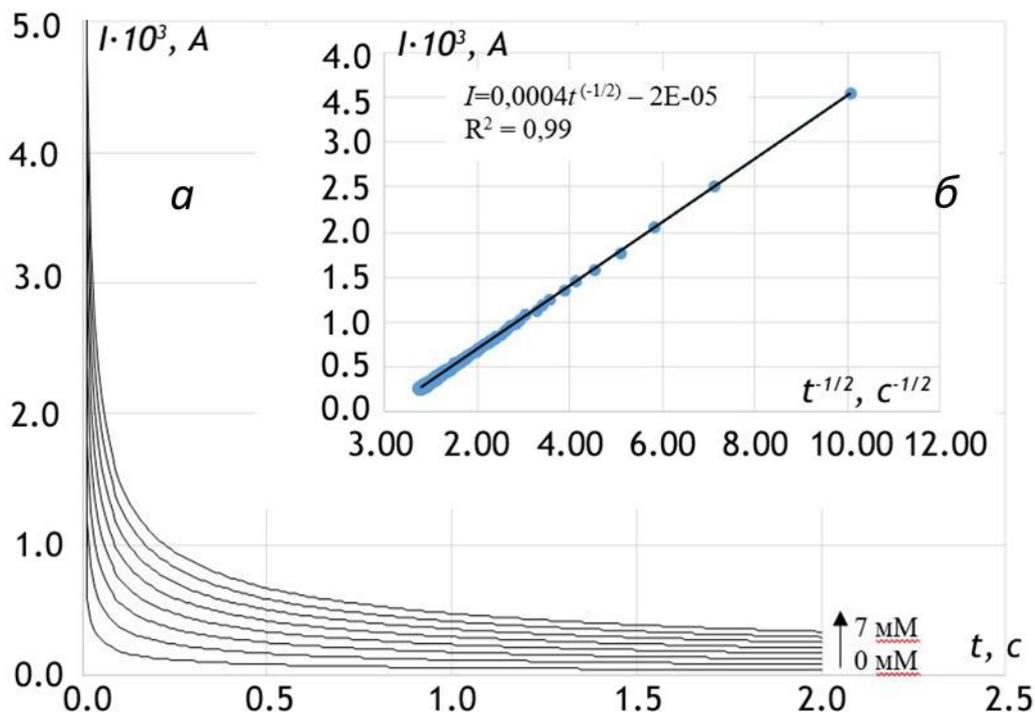


Рисунок 4.13 – Хроноамперограммы, зарегистрированные на СУЭ, модифицированном наночастицами НЧ Ag–Au, в отсутствие и в присутствии 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 мМ холестерина; фоновый элетролит 0.125 М NaOH в смеси ТГФ–вода (1:1, по объему), содержащем 1 мМ ЦТАБ (а). Зависимость тока окисления НЧ от обратного квадратного корня от времени в рабочем растворе, в присутствии 5 мМ холестерина (б)

4.3.2 Применение в качестве электрокатализаторов окисления холестерина хлоридов никеля (II) и кобальта (II), тиоцианата калия в ДМФА

Для ДПЭ в растворе CoCl_2 , или NiCl_2 , или KSCN в ДМФА были зарегистрированы ЦВА в отсутствии и в присутствии или и холестерина (рисунок 4.14).

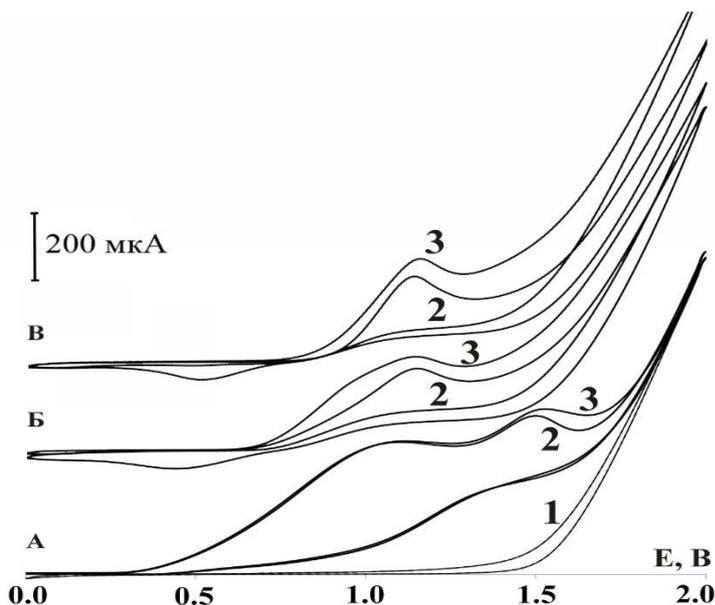


Рисунок 4.14 – ЦВА, зарегистрированные на ДПЭ в присутствии 15 мМ KSCN (а,2); 10 мМ NiCl_2 (б,2); 10 мМ CoCl_2 (в,2) и после добавки 10 мМ холестерина (3); фоновый элетролит 0.1 М LiClO_4 в ДМФА (1);

$$v_{\text{рег-ии}} = 0.1 \text{ В/с}$$

Наблюдали характерные для системы Co(II)/Co(III) ; Ni/Ni(III) пары анодно-катодных пиков после формирования поверхности в соответствии с первым этапом методики (глава 4.1.3). Для ДПЭ в растворе KSCN в ДМФА были зарегистрированы 2 анодных пика при $E_1 = 1.08 \text{ В}$ и $E_2 = 1.52 \text{ В}$, катодные пики на ЦВА отсутствуют, что, вероятно, характеризует необратимый процесс окисления тиоцианата калия на поверхности платинового электрода.

Кроме того, из рисунков видно, что внесение электронеактивного в исследуемой области потенциалов холестерина, приводит к увеличению величины

тока окисления катализатора, что указывает на каталитический процесс электроокисления холестерина.

На следующем этапе исследований проводили расчет характеристик электрохимического процесса окисления холестерина в присутствии катализаторов в ДМФА. Для этого применяли уравнения Рэндлса-Шевчика (4.6) [368] и Гейровского-Ильковича (4.7) [369]:

$$i_{ap} = -0,496\sqrt{\alpha n'} n F A C_{кат} \sqrt{\frac{FvD}{RT}} \quad (4.6)$$

$$E = E_{\frac{1}{2}} - \frac{0.0542}{\alpha n} \lg\left(\frac{i}{i_d - i}\right) \quad (4.7)$$

где i_{ap} – ток пика окисления катализатора, А; A – площадь электрода, см²; $C_{кат}$ – концентрация катализатора в рабочем растворе, М; n' – число электронов, участвующих в элементарном акте; 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 полувольты, В; i – регистрируемый ток, А; i_d – предельный диффузионный ток, А.

Результаты расчетов, приведенных в таблице 4.18, демонстрируют, что в процессе электрокаталитического окисления холестерина в случае хлорида кобальта или хлорида никеля участвует по одному электрону, следовательно, исследуемый процесс можно представить:



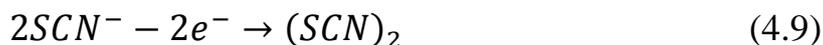
где Me – Co, Ni; L – молекула ДМФА (лиганд), n и m – количество молекул ДМФА в сольватной оболочке вокруг катиона металла.

Таблица 4.18 – Результаты расчета характеристик электрохимического процесса окисления холестерина в присутствии катализаторов 10 мМ NiCl₂, 10 мМ CoCl₂ и 15 мМ KSCN

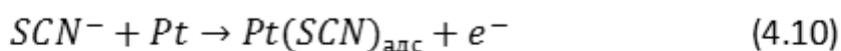
Катализатор		I_{an}/I_{kn}^*	E_{an}^{**}, V	$D, м^2с^{-1}$	n
NiCl ₂		2.60	1.16	$3.87 \cdot 10^{-6}$	1.00
CoCl ₂		2.75	1.12	$2.08 \cdot 10^{-6}$	1.06
KSCN	Волна I	200	1.08	$5.11 \cdot 10^{-9}$	0.98
	Волна II	60	1.52		0.94

I_{an}/I_{kn}^* - отношение токов анодного и катодного сигналов; E_{an}^{**} - потенциал анодного сигнала

В случае применения в качестве электрокатализатора KSCN (схема 4.3), наблюдали два сигнала окисления. Известно [370], что окисление тиоцианат-ионов приводит к образованию тиоцианогена (SCN)₂ по общей схеме:



Принимая во внимание, что тиоцианоген при комнатной температуре является сильным окислителем, а также два анодных одноэлектронных переноса процесса, то электрохимическую реакцию окисления KSCN на поверхности платинового электрода можно представить:



Реакция (4.10) соответствует первому сигналу, реакция (4.11) – второму.

После внесения в рабочую ячейку, содержащую KSCN, холестерина на ЦВА не наблюдали прироста первого анодного сигнала, вследствие того, что продукт реакции (4.10) Pt(SCN)_{адс} не обладает окислительными свойствами. Продукт же второй реакции (4.11) тиоцианоген окисляет холестерин, что подтверждается появлением прироста тока на второй анодной волне. Известно [371, 372], что тиоцианоген взаимодействует с алкенами и циклоалкенами с образованием

преимущественно дизамещенных продуктов. Вероятно, реакцию окисления холестерина с электрогенерированным тиоцианогеном можно представить:

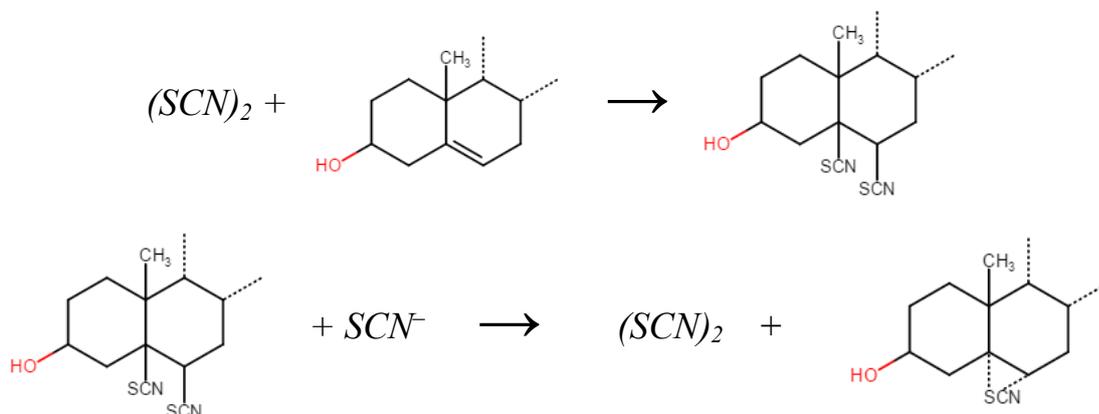
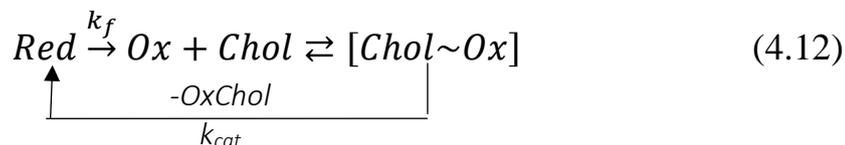


Схема 4.2 – Механизм каталитического окисления холестерина электрогенерированным тиоцианогеном

Предполагая, что механизм окисления холестерина является электрокаталитическим, а скорость электрохимической реакции окисления CoCl_2 , NiCl_2 , KSCN намного выше скорости химической, то можно прийти к выводу о подчинении исследуемых реакций с участием катализаторов неорганической природы ферментативной кинетике:



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.

Применяя уравнения ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментена были рассчитаны константы Михаэлиса K_m для катализатора (таблица 4.19).

Таблица 4.19 – Аналитические характеристики определения холестерина с использованием в качестве электрокатализаторов NiCl₂, CoCl₂ и KSCN в ДМФА

Катализатор	Концентрация, М	C_{lim} , мкМ	Область линейной зависимости $I - C_{хол}$,	Уравнение регрессии, I , мкА; C , мкМ	R^2	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

На рисунке 4.15 представлены зависимости тока окисления катализатора от концентрации холестерина в рабочем растворе, полученные экспериментально хроноамперометрическим методом при потенциале 1.21 В для NiCl₂ и 1.20 В для CoCl₂, а также линейным сканированием потенциала для KSCN, и полученные после расчетов с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен. Рисунок иллюстрирует совпадение расчетных (модельных) зависимостей с экспериментально полученными. Приведенные результаты подтверждают подчинение исследуемых реакций с участием катализаторов неорганической природы ферментативной кинетике.

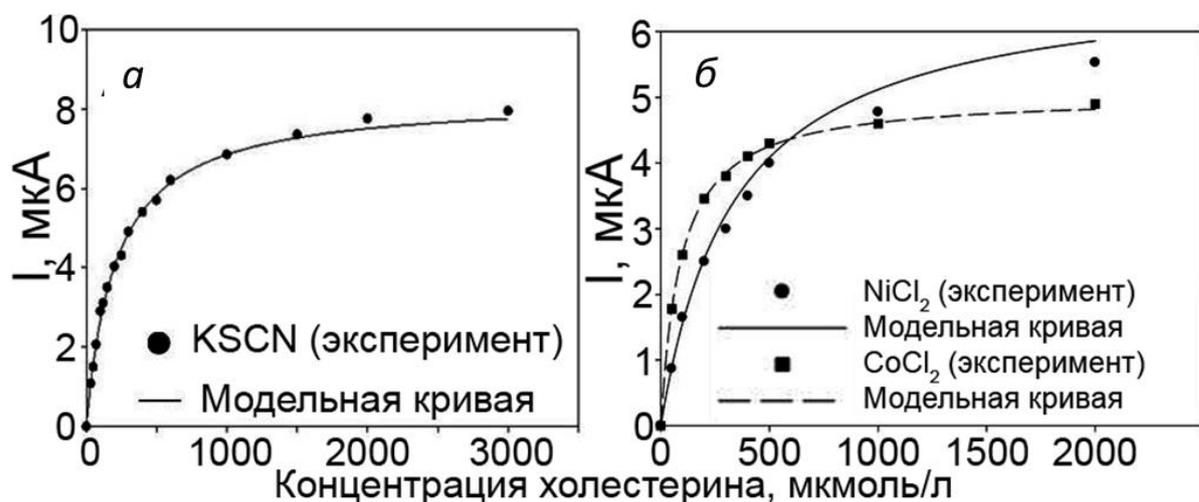


Рисунок 4.15 – Зависимости тока окисления KSCN (концентрация 15 мМ) (а) и NiCl₂ и CoCl₂ (C = 10 мМ) (б) от концентрации холестерина в ДМФА;

$$v_{\text{рег-ни}} = 0.1 \text{ В/с}$$

Лучшие аналитические характеристики электрокаталитического определения холестерина были получены для KSCN (таблица 4.18), однако наибольшее сродство к холестерину, наименьшее значение константы Михаэлиса K_m , зарегистрированы для CoCl₂.

4.3.3 Применение в качестве электрокатализатора окисления холестерина хлорида никеля (II) в ацетонитриле

Исследованы электрокаталитические свойства CoCl₂ по отношению к холестерину в среде ацетонитрила, т.к. последний обладает меньшей токсичностью по сравнению с ДМФА [373].

Для ДПЭ в растворе CoCl₂ в CH₃CN были зарегистрированы ЦВА в отсутствии и в присутствии или и холестерина (рисунок 4.16).

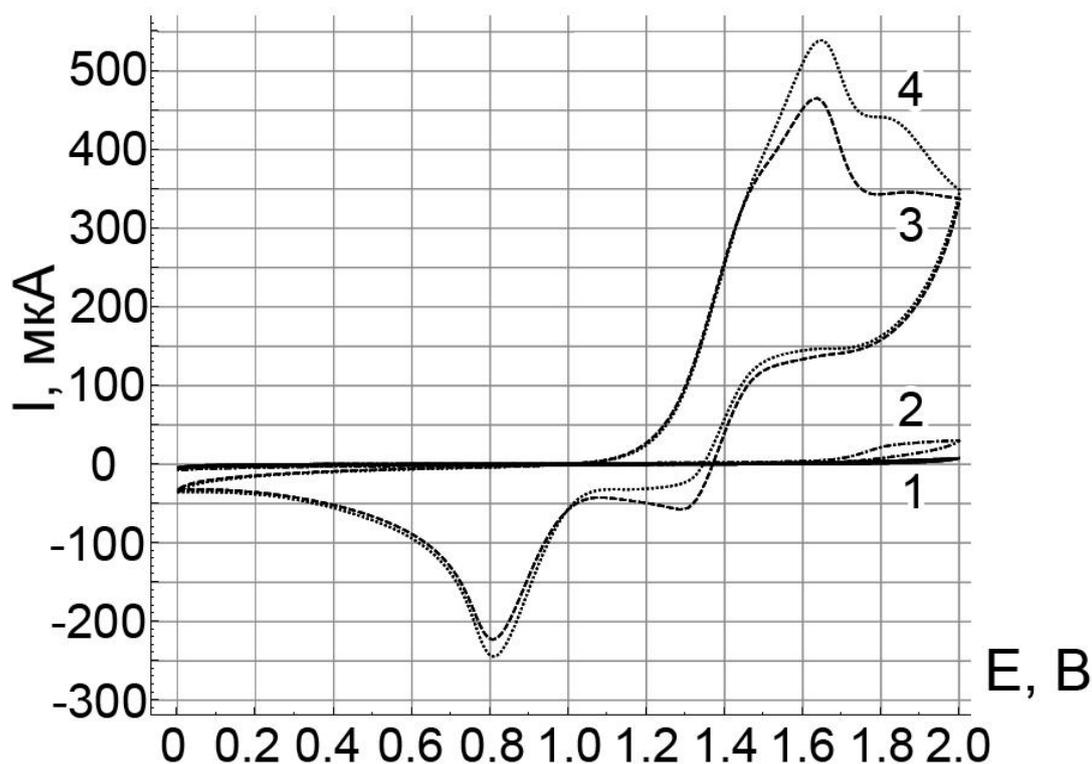


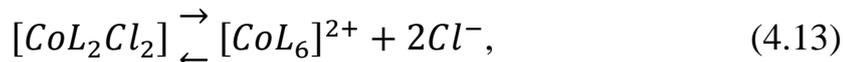
Рисунок 4.16 – ЦВА, зарегистрированные на ПДЭ; фоновый электролит 0.1 М LiClO_4 в ацетонитриле (1), фон + 0.5 мМ холестерина (2), фон + 25 мМ CoCl_2 (3) и фон + 25 мМ CoCl_2 + 0.2 мМ холестерина (4); $v_{\text{рег-ии}} = 0.1 \text{ В/с}$

На ЦВА 2 (в отсутствие хлорида кобальта в рабочей ячейке) наблюдали слабовыраженный сигнал окисления, характерный для холестерина. На ЦВА 3 в присутствии CoCl_2 , наблюдали пару анодных и катодных сигналов при потенциалах 1.35 В и 0.50 В соответственно, относящихся, очевидно, к паре Co(II)/Co(III) . Слабовыраженные сигналы окисления при 1.47 В и восстановления при 1.00 В пики, вероятно, так же характерны для пары Co(II)/Co(III) . Вероятно, их присутствие обусловлено реакцией комплексообразования между катионом кобальта, хлорид-ионами и молекулами ацетонитрила [374].

Кроме того, из рисунков видно, что внесение неэлектроактивного в исследуемой области потенциалов холестерина, приводит к увеличению величины тока окисления катализатора, что указывает на каталитический процесс электроокисления холестерина.

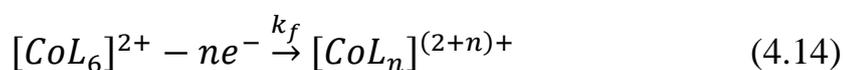
4.3.3.1 Электропревращения CoCl_2 в ацетонитриле

Известно [374], что CoCl_2 в ацетонитриле присутствует в двух формах: $[\text{CoCl}_2\text{L}_2]$ и $[\text{CoL}_6]^{2+}$, находящимися в равновесии (4.13), причем электроактивным является преимущественно комплекс $[\text{CoL}_6]^{2+}$.



где L – лиганд CH_3CN .

На поверхности индикаторного электрода протекает электрохимическая реакция (4.14) (рисунок 4.16, ЦВА 3).



где L_n – сольватная оболочка вокруг катионов кобальта, состоящая из n молекул ацетонитрила, k_f – константа скорости прямой электрохимической реакции.

Получена линейная зависимость $i_d^{-1} vs. \omega^{-\frac{1}{2}}$ (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, что определяет первый порядок реакции (4.14). В этом случае концентрации CH_3CN и хлорид-ионов остаются постоянны в процессе электрохимической реакции, т.е. на поверхности ДПЭ равновесие (4.13) смещается в сторону продуктов реакции, вследствие уменьшения концентрации комплекса $[\text{CoL}_6]^{2+}$.

Применяя уравнения Левича (4.15) и Коттрела (4.16) с использованием ВДПЭ с вращением и без вращения [375] рассчитывали количества электронов n , участвующих в электрохимической реакции, и коэффициент диффузии D электроактивного комплекса кобальта (II):

$$i_d = 0.62nFC^*D^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2} \quad (15)$$

$$i = nFC^*D^{1/2}\pi^{-1/2}t^{-1/2} \quad (16)$$

где i_d – плотность предельного диффузионного тока, А/см²; ν – кинематическая вязкость жидкости, для ацетонитрила 0.004536 см²/с; ω – скорость вращения ВДЭ, рад/с; F – постоянная Фарадея, 96485.3 Кл·моль⁻¹; c^* – концентрация CoCl₂ в объеме раствора, моль·л⁻¹; t – время, с; π – число пи, 3.14.

Получены линейные зависимости тока окисления CoCl₂ от квадратного корня скорости вращения ВДЭ (рисунок 4.17, а) и тока окисления CoCl₂ от обратного квадратного корня времени с использованием стационарного ДПЭ (рисунок 4.17, б).

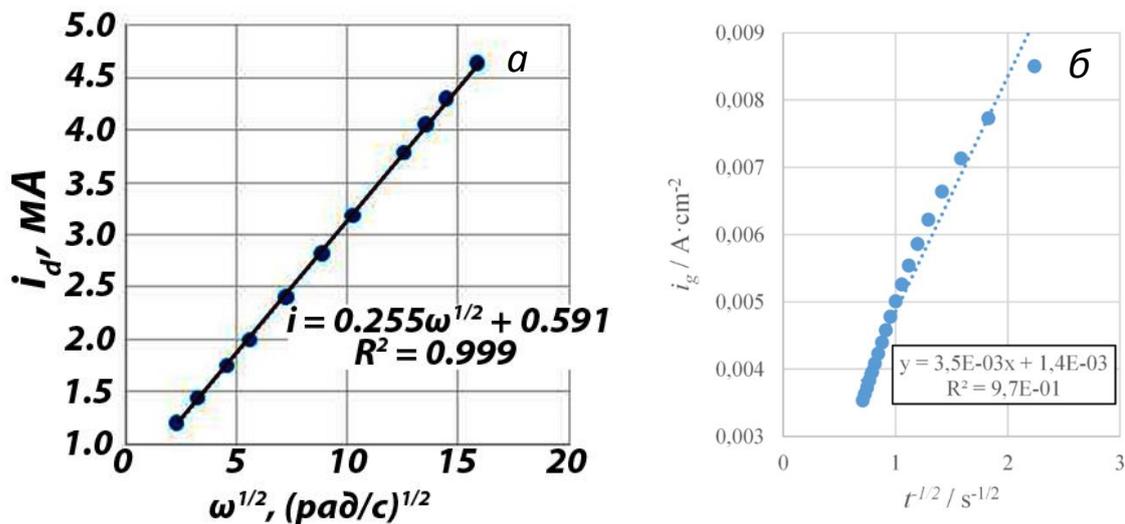


Рисунок 4.17 – Зависимость тока окисления от $\omega^{(1/2)}$, полученная из ВА с линейной разверткой потенциала на платиновом ВДЭ в растворе CoCl₂ в 0.1 М LiClO₄ ацетонитриле в диапазоне от -0.30 до 1.70 В ($\nu_{\text{рег-ии}} = 50$ мВ/с) (а); зависимость тока окисления от $t^{-1/2}$, полученная из хроноамперограмм при $E = 1.37$ В, $\tau = 60$ с (б)

После решения уравнений были рассчитаны параметры: $D = 6.88 \cdot 10^{-5}$ см²/с и $n = 0.96$. Таким образом, электроокисление CoCl₂ в CH₃CN протекает с участием одного электрона:



4.3.3.2 Кинетические характеристики электрокаталитического окисления холестерина

Электроокисление молекулы холестерина может протекать в положении 1 (гидроксогруппа), положении 2 (двойная связь), положении 3 (аллильное) и положении 4 (третичный атом углерода) (схема 4.2) [376].

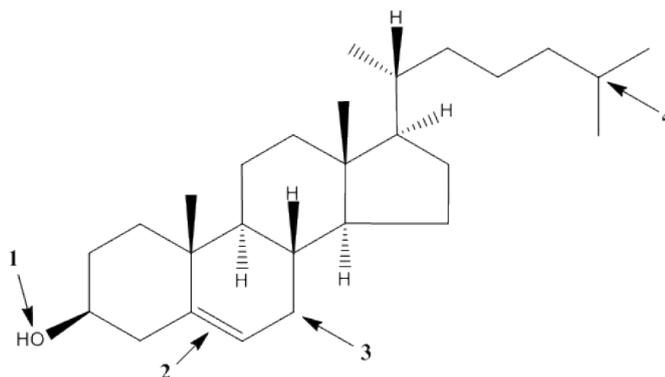


Схема 4.3 – Структурная формула холестерина

Процесс окисления по третичному атому углерода в исследуемых параметрах эксперимента не возможен, т.к. для этого необходимы более жесткие условия [376]. Изучали электрохимические превращения холестерин хлороформиата, молекула которого отличается от молекулы холестерина, наличием неокисляемой $-O-COCl$ группы, защищающей гидроксогруппу. На вольтамперограммах увеличение анодного сигнала в присутствии холестерин хлороформиата в рабочей ячейке в присутствии катализатора соизмерим с увеличением сигнала окисления $CoCl_2$, зарегистрированным в присутствии такого же количества холестерина. Вероятно, реакция электрокаталитического окисления холестерина идет преимущественно в положениях 2 и/или 3, что позволяет применить разрабатываемый способ для определения не только свободного холестерина, но и его эфиров.

В результате приведенных исследований предлагается следующая схема электроокисления холестерина с участием $CoCl_2$ в качестве катализатора в ацетонитриле на ПДЭ (рисунок 4.18):



Рисунок 4.18 – Схема электроокисления холестерина в присутствии катализатора – CoCl_2 в ацетонитриле на поверхности ПДЭ, где Chol – холестерин; $\text{Co}^{3+} \cdots \text{Chol}$ – аддукт, образующийся в процессе электрокаталитической реакции между катионом металла и молекулой холестерина; OxChol – окисленный холестерин (возможно, хлорпроизводные холестерина), образующийся в результате реакции

Предполагая, что механизм окисления холестерина является электрокаталитическим, а скорость электрохимической реакции окисления CoCl_2 , намного выше скорости химической, то можно прийти к выводу о зависимости исследуемых реакций с участием катализаторов неорганической природы ферментативной кинетике:

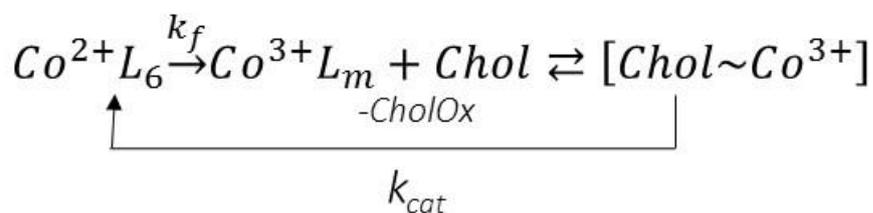
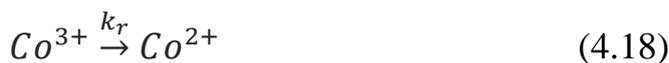


Схема 4.4 – Электрокаталитическое окисление солей кобальта

В условиях постоянства концентрации субстрата реакцию восстановления Co^{3+} за счет окисления холестерина можно представить, как квазимономолекулярную:



Была рассчитана константа скорости превращения Co^{3+} в Co^{2+} - k_r с использованием метода вращающегося диска [377]. Применяли уравнение:

$$\frac{i_k}{i_g} = Bk_r^{\frac{1}{2}}C_{хол}^{\frac{1}{2}}\omega^{-\frac{1}{2}} \quad (4.19)$$

где $B = 1.61D^{-\frac{1}{6}}\nu^{\frac{1}{6}}$, i_k – каталитический ток, который наблюдали в результате каталитической реакции (с), т.е. прирост анодного тока Co^{2+} в присутствии холестерина в рабочей ячейке по сравнению с предельным током i_g , регистрируемым без холестерина в тех же условиях.

Из зависимости отношения каталитического тока к предельному току от обратного квадратного корня скорости вращения дискового электрода рассчитывали $Bk_r^{\frac{1}{2}}C_{хол}^{\frac{1}{2}}$, которая линейно зависит от $C_{хол}^{\frac{1}{2}}$ в диапазоне концентраций холестерина 0.1; 0.2; 0.5 и 1.0 мМ (рисунок 4.19, а). Затем рассчитывали каталитическую эффективность, которая составила $k_r = 2.25 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹с⁻¹ (рисунок 4.19, б).

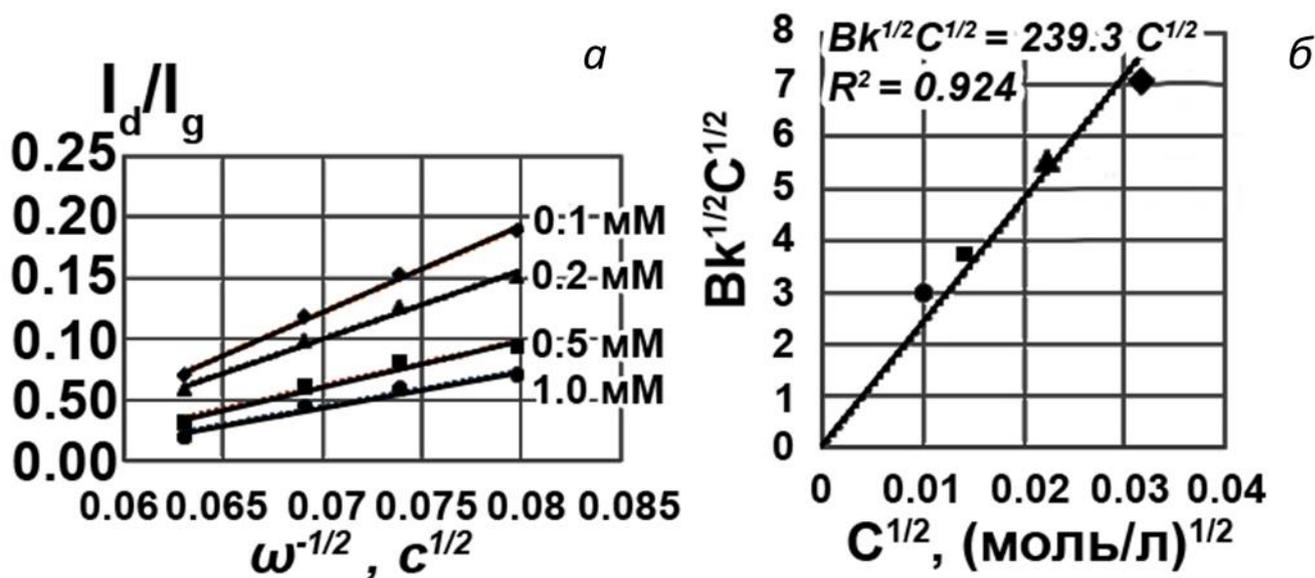


Рисунок 4.19 – Зависимость $\frac{i_d}{i_g}$ от $\omega^{-\frac{1}{2}}$ (а); зависимость $B \cdot k_r^{\frac{1}{2}} \cdot C_{хол}^{\frac{1}{2}}$ от $C_{хол}^{\frac{1}{2}}$ (б).

Диапазон концентраций холестерина 0.1, 0.2, 0.5 и 1.0 мМ.

Предполагая, что поведение CoCl_2 и субстрата – холестерина подчиняется кинетике ферментативных реакций, рассчитывали константу Михаэлиса K_m с использованием уравнения Михаэлиса-Ментена:

$$-\frac{dC_{\text{хол}}}{dt} = \frac{kC_{\text{cat}}C_{\text{хол}}}{K_m + C_{\text{хол}}} \quad (4.20)$$

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

На рисунке 4.20 представлены экспериментальная зависимость тока окисления катализатора CoCl_2 от концентрации холестерина в рабочей ячейке для концентраций холестерина от 0 до 2000 мкМ и расчетная, после подстановки полученных данных в уравнение Михаэлиса-Ментена. Линейный участок 0-200 мкМ, который применяли в дальнейших исследованиях.

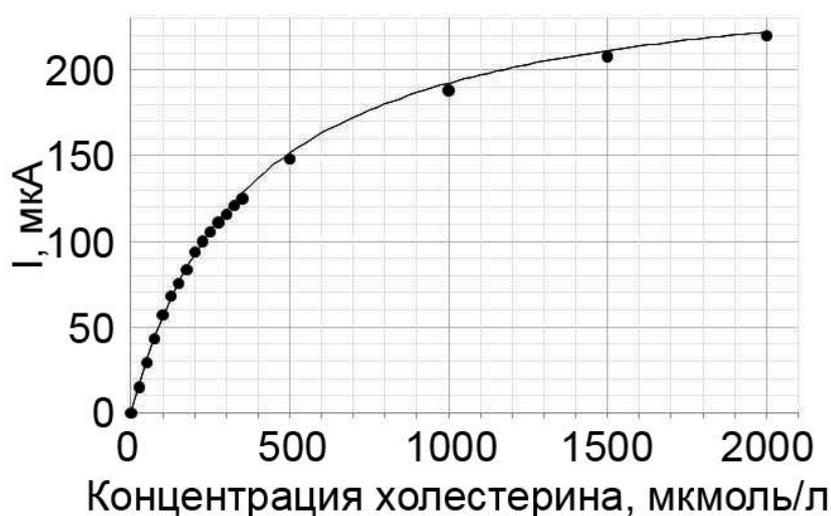


Рисунок 4.20 – Экспериментальная зависимость тока окисления холестерина от его концентрации (точки) и расчетная кривая (сплошная линия)

В представленном уравнении вместо скорости ферментативной реакции подставлено значение предельного тока окисления хлорида кобальта (II):

$$i = \frac{nFkC_{cat}C_{хол}}{K_m + C_{хол}} = \frac{i_{max}C_{хол}}{K_m + C_{хол}} \quad (4.21)$$

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

Для определения параметра K_m , уравнение (4.21) может быть переписано в уравнение Лайнуивера-Бурка [378]:

$$I^{-1} = I_{max}^{-1} + K_m I_{max}^{-1} C_{хол}^{-1} \quad (4.22)$$

На основании линейной зависимости i^{-1} от $c_{хол}^{-1}$ $i^{-1} = 1.567 \cdot c_{хол}^{-1} + 0.003$ (рисунок 4.21) были рассчитаны значения $K_m = 370$ мкМ и $I_{max} = 3.12 \cdot 10^{-4}$ А.

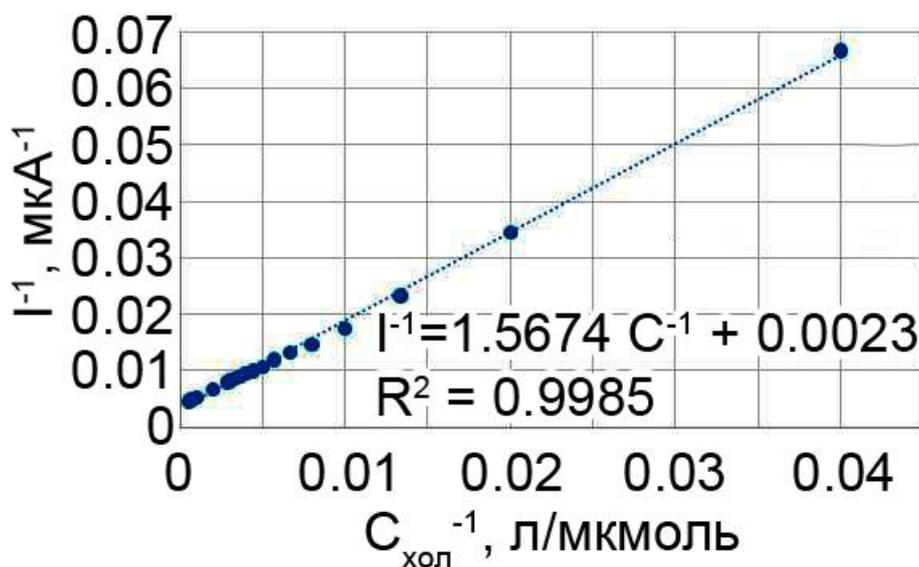


Рисунок 4.21 – График зависимости I^{-1} (мкА⁻¹) - $c_{хол}^{-1}$ (мкМ)

На основании полученных результатов, можно говорить, что в ацетонитриле поведение хлорида кобальта (II) (катализатор) и холестерина (субстрат) подчиняется ферментативной кинетике Михаэлиса-Ментена.

Сравнивая значения k_{cat} и K_m , полученные в результате проведенных исследований для $CoCl_2$, и известные из литературы для фермента

холестеролоксидазы [379, 380], можно сделать вывод о сопоставимой эффективности приведенных катализаторов (таблица 4.20).

Таблица 4.20 – Значения констант Михаэлиса и каталитической константы для CoCl_2 и холестериноксидазы в фосфатном буфере

	$K_m, \text{мМ}$	$k_{cat}, \text{с}^{-1}$
Холестериноксидаза [380] из <i>Brevibacterium sterolicum</i>	0.04–1.6	26–106
Холестериноксидаза [380] из <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	0.4–2.2	2–271
CoCl_2	0.370	0.94

4.3.3.3 Аналитические характеристики определения холестерина с использованием хлорида кобальта (II) в ацетонитриле

Определяли рабочую концентрацию CoCl_2 для определения холестерина. Были получены линейные зависимости аналитического сигнала от концентрации холестерина в присутствии различных концентраций хлорида кобальта (II) в диапазоне концентраций холестерина от 0 до 200 мкМ (таблица 4.21).

При применении CoCl_2 в диапазоне концентраций 5 мМ – 20 мМ наблюдали или низкую чувствительность, или нелинейность зависимости аналитического сигнала от концентрации холестерина. Это может быть связано с недостатком катализатора в приэлектродном слое.

В случае концентраций 30 мМ и 40 мМ CoCl_2 наблюдали низкую чувствительность. По-видимому, это связано со стерическими затруднениями.

Лучшие аналитические характеристики при определении холестерина были получены в случае применения 25 мМ хлорида кобальта (II). В дальнейших исследованиях применяли выбранную концентрацию электрокатализатора.

Таблица 4.21 –Градуировочные зависимости для различных концентраций Co^{2+} в присутствии холестерина. Диапазон концентраций холестерина 0 – 200 мкМ

$C(\text{CoCl}_2)$, мМ	Уравнение регрессии лин. участка $I=a \times c+b$, (I , мкА; $C_{\text{хол}}$, мкМ)	R^2
5	$I = (-0.04 \pm 0.01) \cdot C + (13.1 \pm 0.4)$	0.991
10	$I = (0.28 \pm 0.06) \cdot C + (1.9 \pm 0.5)$	0.922
15	$I = (0.07 \pm 0.04) \cdot C - (2.0 \pm 0.9)$	0.719
20	$I = (0.75 \pm 0.30) \cdot C + (69.3 \pm 3.0)$	0.690
25	$I = (0.40 \pm 0.04) \cdot C + (19.8 \pm 4.0)$	0.971
30	$I = (0.29 \pm 0.03) \cdot C + (27.9 \pm 4.1)$	0.947
40	$I = (0.17 \pm 0.10) \cdot C + (108.9 \pm 8.5)$	0.788

На втором этапе проводили выбор рабочей скорости развертки потенциала в диапазоне скоростей от 25–300 мВ/с. Максимальный аналитический сигнал и диапазон линейности наблюдали при скорости сканирования 100 мВ/с.

Получены аналитические характеристики определения холестерина с использованием выбранных условий (таблица 4.22). C_{lim} , рассчитанный по 3σ -критерию составляет 2 мкМ.

Таблица 4.22 – Аналитические характеристики электрокаталитического определения холестерина ($n = 6$, $P = 0.95$, $t_{\text{кр}} = 2.78$)

Введено, мкМ	Найдено, $C \pm \Delta C$, мкМ	S_r , %	$t_{\text{эксп}}$	C_{lim} , мкМ
50.0	48 ± 2	5.8	2.49	2
100.0	100 ± 6	4.5	0.00	
150.0	155 ± 7	6.0	1.51	

Таким образом, в результате проведенных исследований в качестве электрокатализатора для электрохимического определения холестерина был выбран хлорида кобальта (II) в ацетонитриле.

4.3.4 Хроноамперометрическое определение содержания холестерина в модельном растворе и образцах сыворотки крови

Для установления сорбционной способности ПМО - ОКНЧ и ПМО - МНЧ в пробирке Эппендорфа смешивали 10 мкг НЧ и 1 см³ 3 мМ раствора холестерина (c_0) в ацетонитриле, диспергировали с использованием УЗ. Затем полученную суспензию выдерживали в течение 1 ч, отделяли НЧ: 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 методике в выбранных условиях анализа. Концентрация оставшегося в супернатанте холестерина – $C_{ост}$.

Наночастицы с сорбированным холестерином высушивали в течение 45 минут при температуре 80 °С, редиспергировали в 1 см³ ацетонитрила также с использованием ультразвуковой обработки в течение 3 мин., выдерживали в течение 1 ч и сепарировали. Супернатант анализировали на содержание холестерина. Рассчитанная концентрация десорбированного из частиц ПМО в супернатант холестерина – $C_{дес}$. Рассчитанные сорбционные характеристики приведены в таблице 4.23.

Таблица 4.23 – Сорбционные характеристики НЧ ПМО

НЧ ПМО	$C_{ост}$, мМ	$C_{дес}$, мкМ	α , 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

Таким образом, лучшие сорбционные характеристики получены для НЧ ПМО – МНЧ - Д. Применение этих частиц позволяет ввести в процедуру магнитную сепарацию, что значительно облегчает процесс анализа.

4.3.4.1 Методика и устройство для электрохимического селективного анализа содержания холестерина в модельном растворе

Количественное определение холестерина проводили в модельном растворе, (таблица 4.24).

Таблица 4.24 – Состав модельных растворов, имитирующих сыворотку крови. Содержание альбумина во всех модельных растворах 45 г/дм³

№	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	1.000	1.000
10	Мочевина	5.000	5.000
11	Холестерин	5.000	7.000

На рисунке 4.22 представлена схема устройства для количественного определения содержания холестерина.

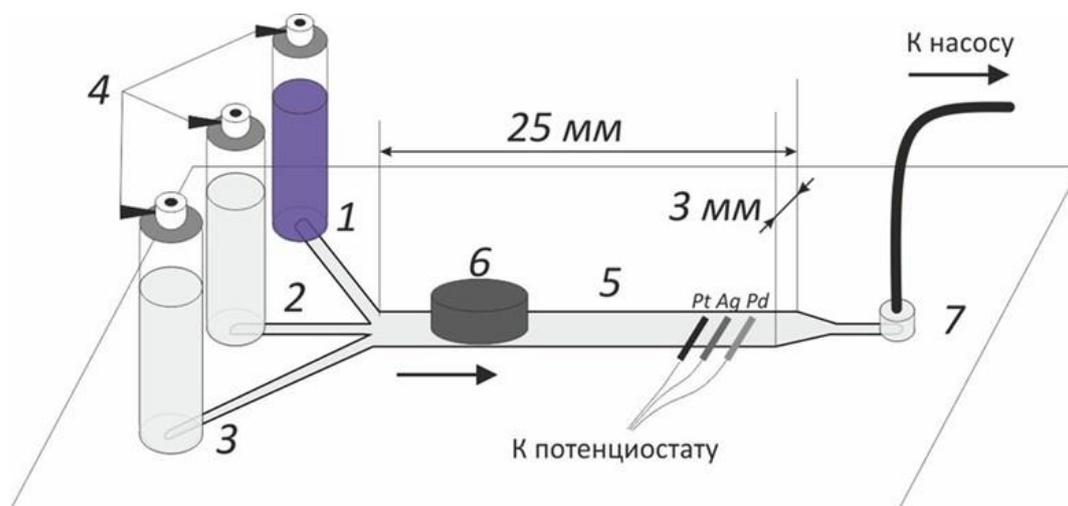


Рисунок 4.22 – Схема устройства для электрохимического селективного анализа содержания холестерина, где 1-3 – входные отверстия; 4- клапаны; 5 – проточная зона; 6 – магнит; 7 – выходное отверстие

У входного отверстия 1 – емкость, содержащая раствор CoCl_2 (25 мМ) и LiClO_4 (0.1 М) в ацетонитриле. У входного отверстия 2 – емкость, содержащая суспензию 10 мг магнитных НЧ с ПМО холестерина в стандартном растворе холестерина в ацетонитриле ($C_{ст} = 3$ мМ). У входного отверстия 3 – емкость, содержащая исследуемый раствор с неизвестным количеством холестерина в ацетонитриле, в котором диспергированы 10 мг ПМО – МНЧ - Д

При открытии клапана с помощью насоса реакционная смесь из емкости поступает в проточную зону. Поочередное открытие и закрытие клапанов позволяет пропускать через проточную зону необходимый раствор. К проточной зоне подведены: платиновая проволока (рабочий электрод), серебряная проволока (электрод сравнения), палладиевая проволока (вспомогательный электрод). Выходное отверстие 7 соединено с емкостью для слива с помощью шланга. Насос обеспечивает движение жидкости через проточную зону со скоростью $5 \cdot 10^{-6}$ дм³/с.

Процесс анализа включал в себя следующие стадии.

1. Раствор CoCl_2 (25 мМ) и LiClO_4 (0.1 М) в ацетонитриле из емкости через отверстие 1 поступал в проточную зону, в которой происходила подготовка рабочего электрода путем многократного циклирования потенциала. В конце

процедуры регистрировали вольтамперограмма с линейной разверткой потенциала в диапазоне от 0.00 до 1.70 В отн. серебряной проволоки. Регистрировали анодный сигнал катализатора.

2. Суспензия 10 мг магнитных НЧ с ПМО холестерина в стандартном растворе холестерина в ацетонитриле из емкости через отверстие 2 поступал в проточную зону, посредством магнитного поля магнитные частицы с сорбированным на них холестерином «оседали» в проточной зоне.

3. Благодаря медленному движению раствора из емкости около отверстия 1 через «осевшие» магнитные частицы, при этом сорбированный холестерин десорбируется в ацетонитрил. Каждые 30 с регистрировали линейную развертку потенциала. Регистрировали максимальное значение величины тока.

4. Магнит удаляли, раствор из емкости около отверстия 1 прокачивали для вымывания частиц из нее в емкость для слива. Эти частицы могут быть вновь извлечены с помощью магнита для многократного использования.

5. Для суспензии НЧ с неизвестным содержанием холестерина проводили процедуру по п.п. 2–4. Регистрировали значение величины тока.

6. Проводили расчет согласно формуле 4.1.

7. Установка готова для следующего анализа.

Результаты электрохимического определения холестерина в образце приведены в таблице 4.25.

Таблица 4.25 – Результаты электрохимического определения холестерина, в модельных растворах с применением ПМО и устройства ($n = 5$, $P = 0.95$)

Исследуемый раствор	Найдено: $C \pm \delta$, мМ (S_r , %)
Раствор холестерина в ацетонитриле $C = 2$ мМ	2.20 ± 0.28 (16)
Мр1	5.41 ± 0.35 (18)
Мр2	7.37 ± 0.29 (18)

Несмотря на присутствие неспецифической сорбции компонентов модельных растворов на поверхности частиц ПМО, представленные результаты исследований демонстрируют возможность применения разработанных бесферментного электрохимического способа количественного определения холестерина в клинической лабораторной диагностике.

Разработанное устройство может служить прототипом для простой в употреблении, портативной, дешевой автоматической установки для экспресс-анализа холестерина.

В таблице 4.26 представлено сравнение характеристик некоторых литературных данных по способам и сенсорам и разработанных для определения холестерина.

Таблица 4.26 – Сравнение характеристик некоторых сенсорных систем и разработанного способа для определения холестерина (норма в сыворотке крови человека: 4.2 – 7.7 ммоль/дм³)

Способ/сенсор	Интервал определяемых концентраций, мкМ	C _{lim} , мкМ	Стабильность (дни)	Ссылки
Pt электрод/углеродные нанотрубки/холинэстераза	5 – 300	4.8	7	[381]
Au НЧ/ Pt электрод/холинэстераза	35.3– 500	10.5	60	[382]
Стандартный лабораторный ферментативный колориметрический метод "CHOD-PAF"	до 20.7 мМ	518	42	[383]
Разработанный способ	20 –200	3,0	Не ограничено	

В результате проведенных исследований представлено теоретическое и экспериментальное обоснование бесферментного определения конкретных

соединений диагностического значения (холестерин, мочеви́на, креатинин) с применением в качестве электрокатализаторов наночастиц Ni (II), органических и неорганических соединений Ni (II), Co (II), а также ионообменного концентрирования и синтезированных молекулярных отпечатков на поверхности наночастиц оксида кремния и магнетита.

Созданный на основе искусственных аналогов ферментов новый класс недорогих, надежных, экспрессных и простых в использовании сенсорных систем для определения широкого круга жизненно важных показателей будет являться альтернативой устаревающим лабораторным ферментативным методам. И, в конечном счете, будет использован для быстрого скрининга широкого спектра аналитов при низкой стоимости.

ГЛАВА 5. Вольтамперометрические методы в анализе токсичности наноматериалов

Растущее использование наноматериалов требует тщательной оценки их токсичности, биологических взаимодействий, возможных последствий для живых организмов. Многообразие наноматериалов, разобщенность проводимых исследований токсического воздействия на живой организм, привели к противоречивым оценкам их безопасности. К сожалению, до конца не изучены механизмы индуцирования наночастицами деструктивных эффектов в клетках и организме в целом.

В данной главе предложено развитие методов электроанализа и демонстрации их применения к исследованию накопления наночастиц в клетках, взаимосвязи этого параметра с жизнеспособностью клеток, изменением цитокинного статуса клеток [384, 385].

5.1 Электронно-микроскопический анализ взаимодействия НЧ Ag, Au или Fe₃O₄ с клеточной культурой WI-38

Для всех типов НЧ в первые сутки в контрольных образцах клеток сохранялись ультраструктуры и обнаруживали ядра различных размеров и форм, видны клеточные и ядерные мембраны и гомогенный хроматин. На пятые сутки в клетках этих же контрольных образцах фиксировали небольшие деструктивные изменения.

На рисунке 5.1 представлены микрофотографии клеток линии WI-38 после их инкубации с НЧ серебра в течение 24 ч и 120 ч. После инкубации клеточной культуры WI-38 с суспензией НЧ Ag (10 и 25 мкг/см³) в течение 24 часов наблюдали неравномерное поглощение наночастиц. На микрофотографиях видны клетки, клеточные органеллы и темные области (оптически более плотные) НЧ (выделены стрелками). После первых суток инкубации практически все поглощенные НЧ локализуются в объеме клеток или их органеллах. На мембранах наночастицы не обнаруживаются. С увеличением концентрации НЧ в исходных суспензиях количество поглощаемых клетками наночастиц увеличивается. После

120 часов на микрофотографиях фиксируется полная деструкция клеточной мембраны и угнетение клеточной линии.

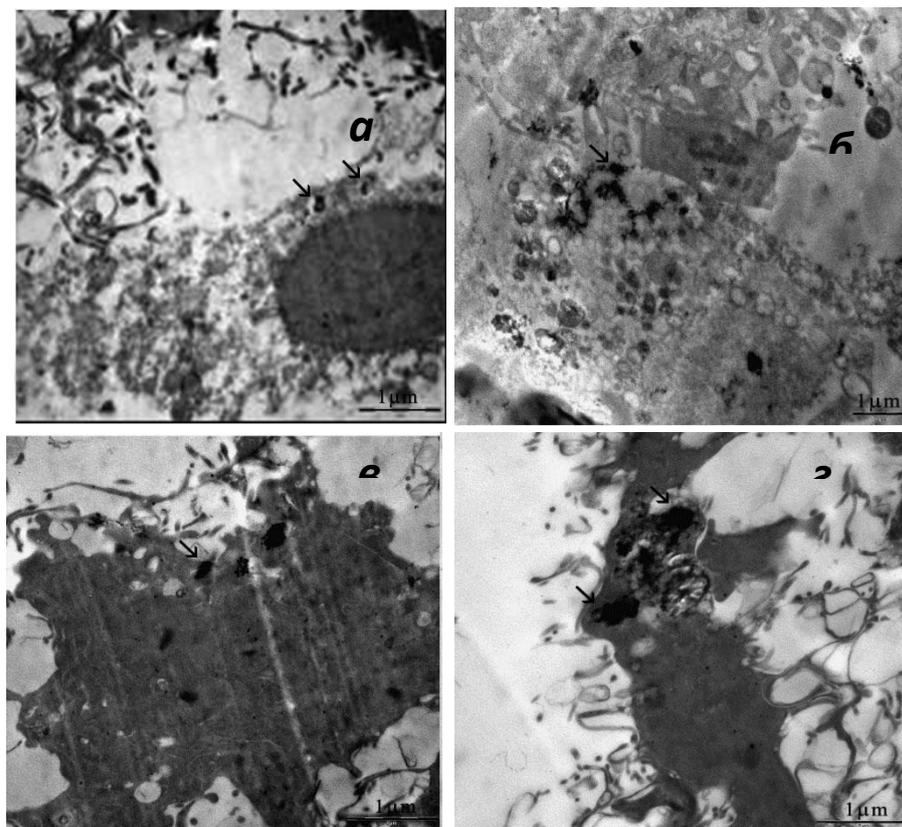


Рисунок 5.1 – Микрофотографии клеточной культуры WI-38 после 24 ч инкубации с НЧ Ag 10 мг/см³ (а) and 25 мг/см³ (б); после 120 ч инкубации с НЧ Ag 10 мг/см³ (в) и 25 мг/см³ (г)

На рисунке 5.2 представлены микрофотографии клеток линии WI-38 после их инкубации с НЧ Au в течение 24 ч и 120 ч. После инкубации клеточной культуры WI-38 с суспензией НЧ Au (10 мкг/см³) в течение 24 часов на микрофотографиях видны клетки, клеточные органеллы и более темные области (оптически более плотные) поглощенных скоплений наночастиц внутри клетки и внеклеточном пространстве. При внесении НЧ Au в концентрации 25 мкг/см³ в культуру клеток в первые сутки НЧ располагались вне клеток и внутри клеточных органелл, хотя уже наблюдали деструкция клеток. С увеличением концентрации НЧ Au в исходных суспензиях количество поглощаемых клетками наночастиц увеличивалось. После инкубации в течение 120 часов наблюдали полная деструкция клеточной мембраны и угнетение клеточной линии.

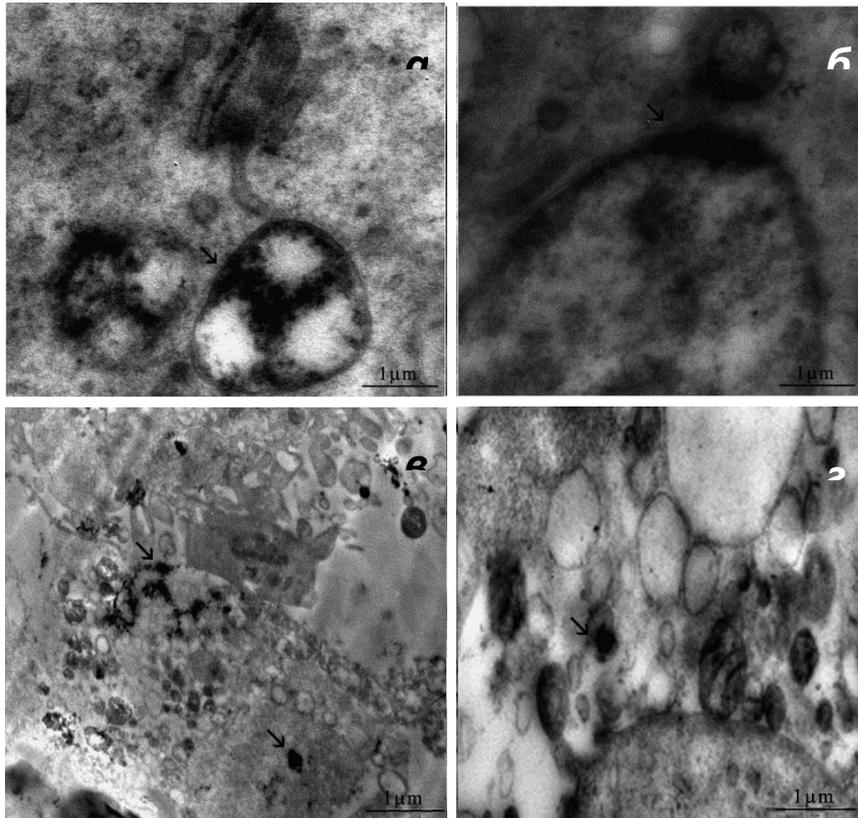


Рисунок 5.2 – Микрофотографии клеточной культуры WI-38 после 24 ч инкубации с НЧ Au 10 мг/см^3 (а) and 25 мг/см^3 (б); после 120 ч инкубации с НЧ Au 10 мг/см^3 (в) и 25 мг/см^3 (г)

На рисунке 5.3 представлены микрофотографии клеток WI-38 с НЧ Fe_3O_4 после 24 и 72 ч инкубации. На микрофотографии видны клетки, клеточные органеллы и более темные области (оптически более плотные) НЧ. С увеличением времени инкубации клеток с НЧ количество поглощаемых клетками наночастиц увеличивалось. Введенные НЧ локализовались в объеме клеток или их органеллах. Однако в отличие от НЧ серебра и золота, НЧ магнетита не оказывали интенсивного деструктивного воздействия.

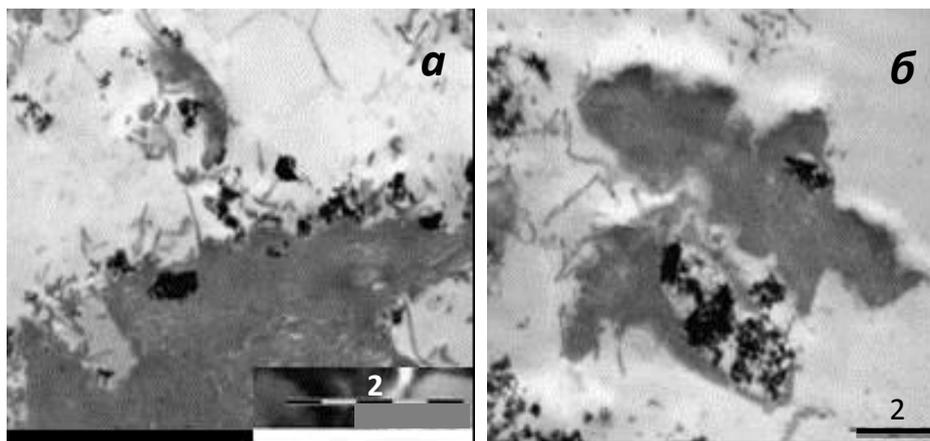


Рисунок 5.3 – Микрофотографии клеточной культуры WI-38 после 24 ч инкубации с 1000 мкг/см^3 НЧ Fe_3O_4 (а) and после 72 ч инкубации (б)

5.2 Кинетика поглощения наночастиц клетками

5.2.1 Методики количественного определения содержания НЧ Ag, Au.

Для определения серебра (I) методом анодной инверсионной вольтамперометрии в качестве фонового раствора использовали $0.05 \text{ M NH}_4\text{OH} + 0.05 \text{ M NH}_4\text{NO}_3$. Предварительное концентрирование серебра(I) на поверхности СУ проводили при потенциале -0.60 В . ВА регистрировали в интервале $-0.50 - 0.50 \text{ В}$. Регенерацию электрода проводили при потенциале 0.50 В в течение 10 сек . В указанных условиях линейная зависимость АС от концентрации ионов серебра (I) сохраняется в диапазоне $2 - 25 \text{ мкг/дм}^3$ и $25 - 250 \text{ мкг/дм}^3$ при времени накопления 120 сек и 10 сек соответственно (таблица 5.1).

Золото (III) определяли на фоне $1 \text{ M KBr} + 0.03 \text{ M HBr}$ методом анодной дифференциально-импульсной инверсионной вольтамперометрии [386]. Вольтамперограммы регистрировали в интервале $-0.20 - 0.68 \text{ В}$. Регенерацию рабочего электрода проводили при потенциале 0.68 В в течение 10 сек . Начальный потенциал анодной развертки составлял -0.20 В для минимизирования дополнительного осаждения золота во время регистрации вольтамперограммы в катодной области потенциалов. Дополнительное осаждение способствует повышению пика анодного тока, но приводит к ухудшению воспроизводимости.

С использованием импрегнированного графита в качестве рабочего электрода не удалось зарегистрировать воспроизводимый АС золота в описанных в работе условиях. Хорошо выраженный АС был получен при использовании ТУЭ. Однако и в этом случае при потенциале предварительного концентрирования -0.50 В, рекомендуемом в работе, не удалось получить линейной зависимости величины пиков тока от концентрации золота (III).

Зафиксированная в этих условиях зависимость величины пиков тока от концентрации золота (III) прямопропорциональна в диапазоне концентраций Au (III) $10 - 100$ мкг/ дм³ и $5 - 100$ мкг/ дм³ при потенциалах накопления -0.70 В и -0.90 В соответственно и времени накопления 120 сек. В дальнейшей работе использовали потенциал накопления -0.90 В, поскольку в этом случае удается снизить минимальную определяемую концентрацию ионов золота (III) в два раза (таблица 5.1).

Аналитические характеристики определения серебра и золота представлены в таблице 5.1. Как видно из таблицы, предложенный метод может быть применен для определения следовых количеств рассмотренных металлов в биологических образцах. Относительное стандартное отклонение, полученные для серии из 9 повторяющихся измерений сигналов не превышает 4 %. Правильность определения близка к 100 % с хорошей воспроизводимостью ($S_r = 6.2\%$ при 5 мкг/ дм³ Ag и 3.5 % при 10 мкг/ дм³ Au).

Таблица 5.1 – Аналитические характеристики определения ионов металлов методами квадратно-волновой анодной инверсионной вольтамперометрии со стеклоуглеродным электродом (для серебра(I)) и дифференциально-импульсной инверсионной вольтамперометрии с толстопленочным углеродсодержащим электродом (для золота(III))

	Уравнение регрессии ($n = 24$)	R^2	X_d (мкг/дм ³)	S_r , % ($n = 9$)	Правильность ($n = 5, P = 0.95$)
Ag	$y = (0.501 \pm 0.002) \cdot X$ - (0.036 ± 0.023)	0.9996	0.4	3.6 при 10 мкг/дм ³	104 % для 5 мкг/дм ³ (5.2 ± 0.4) % $S_r = 6.2$
Au	$y = (0.009 \pm 0.0001) \cdot X$ - (0.007 ± 0.003)	0.9990	2.6	3.4 при 20 мкг/дм ³	97 % для 10 мкг/дм ³ (9.7 ± 0.3) % $S_r = 3.5$

5.2.2 Поглощение НЧ Au и Ag клеточными культурами

Содержание ионов металлов в клеточных культурах тем больше, чем выше концентрация исходной суспензии наночастиц (таблица 5.2).

После 120 часов инкубации наблюдали уменьшение содержания серебра в клетках, что указывает на выведение ионов металлов в межклеточное пространство. Для ионов золота наблюдали напротив накопление при контакте с суспензией, содержащей 25 мкг/см³ металла в исходной суспензии.

При инкубации клеток культуры с суспензией НЧ Au и Ag в одинаковой концентрации количество поглощенных наночастиц различно. Клетки WI-38 поглощали в большей степени наночастицы золота, чем серебра.

Таблица 5.2 – Содержание ионов Ag (I) и Au (III) в минерализате клеток WI 38 после инкубации с НЧ Au и Ag ($n = 5, P = 0.95$)

Наночастицы	Концентрация наночастиц в суспензии, мкг/см ³	Содержание ионов металлов в клетках после инкубации, мкг/см ³	
		Время инкубации, час.	
		24	120
Ag	10	7.70	7.40
	25	33.50	5.45
Au	10	39.00	20.0
	25	76.93	170.67

Содержание ионов железа определяли и использованием методики, приведенной в главе 3.1.1 или фотометрическим методом (таблица 5.3). Пробоподготовку в случае применения оптического метода осуществляли аналогично электрохимическому. Далее проводили реакцию трехвалентной формы Fe³⁺ в кислой среде с роданид-ионами с образованием комплексного соединения красного цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации железа в интервале 0.05 – 4.0 мг/см³. Максимум светопоглощения продукта реакции, соответственно, находится при $\lambda = 500$ нм.

Таблица 5.3 – Результаты определения содержания железа в минерализате клеток WI 38 с НЧ Fe₃O₄ ($n = 5, P = 0.95$)

Наночастицы	Концентрация наночастиц в суспензии, мкг/см ³	Количество наночастиц, поглощенное клетками, мкг/г. Время инкубации, час.	
		24	120
Fe ₃ O ₄	1000	1700.00	3834.00

5.3 Оценка жизнеспособности и цитокинового статуса клеточной культуры WI - 38 в условиях воздействия НЧ Ag, Au или Fe₃O₄

В процессе инкубации жизнеспособность контрольных образцов исследуемых клеточных линий менялась до 76 %.

При воздействии НЧ Ag, доля погибших клеток при использовании обеих концентраций практически совпадает, но в два раза превышает значение для контрольной линии, в которую наночастицы не вводили (таблица 5.4). Инкубация с НЧ Au в их максимальной концентрации вызывает трехкратное увеличение доли мертвых клеток WI-38 относительно контрольной линии клеточной культуры (таблица 5.4). При взаимодействии клеток с НЧ Ag в концентрациях 10 мкг/ см³ и 25 мкг/ см³ доля живых клеток составила 67 % и 63 % соответственно.

Таблица 5.4 – Результаты оценки жизнеспособности клеток WI-38 в условиях воздействия НЧ Ag, Au в течение 120 часов

Наночастицы	Концентрация наночастиц в суспензии, мкг/см ³	Общее количество клеток	Доля погибших клеток, %
Ag	Контрольный образец	17	19
	10	10	33
	25	11	37
Au	Контрольный образец	21	24
	10	11	38
	25	11	67

В случае же применения НЧ магнетита увеличение доли погибших клеток в суспензии клеток с НЧ по сравнению с контрольным образцом незначительно (таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Результаты оценки жизнеспособности клеток WI-38 в условиях воздействия НЧ Fe₃O₄ в течение 72 часов

Образец	Общее количество клеток	Доля погибших клеток, %	Доля живых клеток, %
Без наночастиц (контроль)	33	12	88
1000 мкг/см ³ Fe ₃ O ₄ в питательной среде клеток	20	13	87

Известно [387], что возникновение воспалительных процессов (в нашем случае токсического влияния) приводит к увеличению концентрации цитокинов, либо к их сильному угнетению. На рисунке 5.4 показано влияние химической природы наночастиц и их содержания на концентрацию интерликина (цитокина) ИЛ-6 в клетках WI-38. Наблюдали существенное изменение концентрации цитокинов в случае НЧ золота, тем большее, чем выше концентрация наночастиц в суспензии, вводимой в клеточную культуру. В случае воздействия НЧ серебра наблюдали угнетение цитокина, что говорит о более высокой цитотоксичности этих НЧ.

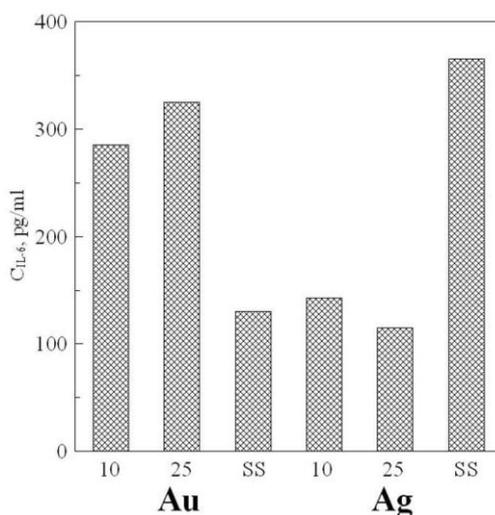


Рисунок 5.4 – Зависимость концентраций интерликина ИЛ-6 клеточной линии WI-38 после введения суспензии наночастиц золота и серебра 10 и 25 мкг/г (в пересчете на Au и Ag соответственно). SS – контрольный образец без наночастиц. Время инкубации 120 час

В случае применения НЧ магнетита наблюдали несущественное изменение концентрации цитокинов в суспензии клеток по сравнению с контрольным образцом.

5.4 Оценка пульмонотоксичности и резорбтивной токсичности частиц магнетита (Fe_3O_4) нано- и микрометрового диапазонов

Предыдущие исследования показали низкую токсичность НЧ магнетита по сравнению с НЧ благородных металлов, несмотря на достаточно большое поглощение этого материала клетками. Представлялось интересным сравнить воздействие частиц Fe_3O_4 нанометрового и микрометрового размера на живой организм [388]. Была проведена сравнительная оценка токсичности частиц магнетита нанометрового (10 нм и 50 нм) и микрометрового (1 мкм) диапазонов по результатам сдвигов клеточного состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа через 24 часа после интратрахеального введения указанных частиц, а также по ряду показателей состояния организма после повторных внутрибрюшинных инъекций тех же материалов.

Все сравниваемые частицы вводились аутбредным лабораторным крысам-самкам:

– однократно интратрахеально в дозе 2 мг в 1 см³ стерильной деионизированной воды, поскольку было найдено, что в суспензии на физиологическом растворе агломерация происходит слишком быстро;

– или по 3 раза в неделю в течение 5 недель внутрибрюшинно в дозе 500 мг/кг в 4 см³ стерильной деионизированной воды.

Животные контрольных групп получали соответствующим путём такой же воды без частиц.

Надфоновое (сверх контрольного уровня) содержание железа через 24 часа после введения магнетита было в случае 10-нанометровых частиц вдвое ниже, чем в случае 50-нанометровых и 1-микрометровых (при отсутствии различия между двумя последними) (таблица 5.6).

Таблица 5.6 – Содержание железа в лёгочной ткани крыс через 24 часа после интратрахеального введения 2 мг магнетита с разным размером частиц, или дистиллированной воды ($X \pm s.e.$)

Группы крыс, которым были введены суспензии частиц диаметром:			
10 нм	50 нм	1 мкм	Контроль (вода)
Содержание железа (мг/кг сырой ткани)			
$200 \pm 9^*$	$257 \pm 8^{*+}$	$258 \pm 15^{*+}$	$141 \pm 5^+$
Разность между группой, получившей магнетит, и контрольной			
59 ± 10	$116 \pm 9^+$	$117 \pm 16^+$	–

Значком * обозначены величины, статистически значимо отличающиеся от контрольного показателя; значком + – то же от показателя группы крыс, получивших 10-нанометровые частицы ($P < 0.01$ по t -критерию, учитывающему стандартную ошибку сложных средних, при котором данные по каждой крысе рассматриваются как выборка, состоящая из 5 определений).

Показано, что при равных массовых дозах НЧ обладают значительно более выраженной биологической агрессивностью, чем частицы микрометрового диапазона, но вызывают более активную и эффективную защитную реакцию альвеолярного фагоцитоза.

В пределах нанометрового диапазона зависимость между диаметром и токсичностью частиц неоднозначна, что может быть связано с различиями токсикокинетики, которую контролируют как физиологические механизмы, так и прямая пенетрация наночастиц через биологические барьеры и, наконец, неодинаковая растворимость.

Таблица 5.7 – Основные цитологические характеристики БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии магнетита (2 мг/см³) в различных фракциях ($\bar{x} \pm S_x$)

Диаметр частиц	Число клеток, млн.			НЛ/АМ
	Общее	Альвеолярные макрофаги (АМ)	Нейтрофильные лейкоциты (НЛ)	
–	2.86±0.48	2.30±0.40	0.33±0.06	0.16±0.03
10 нм	20.07±3.86*□	2.83±0.63	16.32±3.06*□	6.39±0.66*□
50 нм	31.86±6.52*□	5.74±1.25*□•	25.40±5.54*□	5.05±0.69*□
1 мкм	4.22±0.63•	1.67±0.33•	2.15±0.37*•	1.61±0.37*•

Значками помечены: «*» – статистически значимое различие с контрольной группой; «•» – то же с группой «10 нм»; «□» – то же с группой «1 мкм» ($P < 0,05$); по *t*-критерию Стьюдента).

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствует в пользу существующих представлений о существенно более высокой токсичности в нано-состоянии даже тех веществ, которые при действии частиц микрометрового диапазона являются относительно биологически инертными. Поскольку металл в микросостоянии и тот же металл или его соединение в виде нанообъектов ведут себя по-разному, следует ожидать, что суммарное содержание металлов не позволяет оценить реальные биохимические функции и токсичность. Хотя и определение содержания наночастиц в клеточном материале, например, с применением электрохимических методов, может служить вспомогательным методом оценки негативного действия наночастиц, однако проводить исследования, направленные только на количественный анализ НЧ в живых объектах, является недостаточным. Необходимо исследовать форму нахождения, стабилизацию, перенос через клеточные мембраны НЧ и морфологию НЧ, НЧ-клетка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования в области электрохимического анализа и сенсоров/иммуносенсоров для определения соединений диагностического значения позволили развить новые подходы в указанном направлении, связанные с двумя его аспектами:

1) бесферментные электрохимические способы генерации высокочувствительного отклика сенсоров не связанные с необходимостью включения ферментов;

2) новые методологические подходы к оценке применения наноразмерных материалов в сенсорных устройствах с точки зрения их потенциальной токсичности.

Развитие указанных направлений связано с проведением широкого круга исследований, среди которых следует выделить следующие наиболее важные компоненты:

– создание новых нанокомпозитных материалов на основе наночастиц Fe_3O_4 и полимерных матриц (полипиррол, поливинилбензилхлорид, модифицированный хинолином, оксид кремния, модифицированный ферроценом, хитозан и продукт поликонденсации 3-аминопропилтриэтоксисилана), индивидуальных и смешанных наночастиц серебра (золота - серебра) и оксида никеля. Материалы различались по среднему размеру частиц, их морфология, состав и природа поверхностных групп были охарактеризованы комплексом современных физико-химических методов (просвечивающая электронная микроскопия, электронная дифракционная спектроскопия, динамическое рассеяние света, УФ – и ИК – спектроскопия). Установлены магнитная восприимчивость, агрегативная и седиментационная устойчивость суспензий наночастиц, необходимые для их применения в анализе;

– установление основных закономерностей протекания электрохимических превращений НЧ и НК на основе Fe_3O_4 в водной и апротонной средах, предложены вероятные схемы исследуемых процессов;

– определение закономерностей, связывающих концентрацию наночастиц и аналитический сигнал железа, серебра, никеля и на этой основе – оценка перспектив применения новых наноматериалов как сигналообразующих меток и электрокатализаторов в составе электрохимических сенсоров;

– оценка кинетики взаимодействия синтезированных и охарактеризованных наночастиц на основе Fe_3O_4 с грамположительными и грамотрицательными клетками и выявление закономерностей, определяющих характер таких взаимодействий в зависимости от природы клеточных культур и наноматериалов;

– разработка новых высокочувствительных гибридных вариантов электрохимического иммуноанализа и иммуносенсоров для количественного определения бактерий и бактериальных антигенов с использованием охарактеризованных наноматериалов как непрямых и прямых сигналообразующих меток. Обоснование алгоритмов проведения анализа модельных клеточных культур и реальных образцов с пределами обнаружения на уровне 10 КОЕ/см^3 ;

– электрохимический способ бесферментного электрохимического иммуноанализа антигена с использованием конъюгатов антител с нанокompозитными частицами на основе магнетита (предел обнаружения $1.87 \cdot 10^{-5} \text{ мг/см}^3$);

– разработка высокочувствительных методов определения мочевины, креатинина и холестерина по току окисления оксида никеля, холестерина по электрокаталитическому отклику наночастиц серебра, золота, оксидов и комплексов. В случае холестерина эффективность электрокатализа по результатам кинетических исследований в органических растворителях не уступала по эффективности ферменту холестеролоксидазе;

– реализация преимуществ новых полимерных материалов с молекулярными отпечатками, в том числе, на платформе наночастиц кремния, магнетита и ионообменных колонок в бесферментном электрохимическом определении ряда важных биохимических показателей (содержание мочевины, креатинина и холестерина), достижение высокой селективности анализа в сыворотке крови и

имитантах сыворотки крови достигается иммобилизацией. Достигнутые пределы обнаружения ($8.7 \cdot 10^{-6}$ М для мочевины, $2.7 \cdot 10^{-5}$ М для креатинина и $3.0 \cdot 10^{-6}$ М для холестерина) не уступают лучшим образцам ферментных биосенсоров;

– выявление выраженной биологической агрессивности наночастиц по сравнению с материалами микрометрового размера и установление снижения токсичности при переходе от традиционных наночастиц благородных металлов к наночастицам на основе предложенных гибридных материалов на платформе магнетита.

Совокупность полученных в работе результатов позволяет говорить о формировании нового научного направления, имеющего важное значение для создания средств электрохимической диагностики по жизненно важным показателям, а именно, использовании гибридных наноматериалов на платформе оксидов ряда металлов как универсальном приеме генерации сигнала и повышения его чувствительности за счет оптимизации условий электрокатализа, использования поверхностной модификации и реализации иных электрохимических свойств указанных материалов. Как показали примеры соответствующих способов электрохимического анализа и иммуноанализа, реализация преимуществ, заложенных в таких гибридных наноструктурах, позволяет решать широкий круг востребованных аналитических задач: выявлять возбудителей инфекционных заболеваний в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и биологических жидкостях пациентов; устанавливать присутствие соответствующих антител; контролировать важные биохимические показатели, такие как содержание мочевины, креатинина, холестерина и др. Полная реализация найденных технологических и методологических решений позволит создать аналитические устройства, выгодно отличающиеся от существующих аналогов по своим операционным и аналитическим характеристикам.

Перспективы дальнейшей разработки в указанном научном направлении связаны с расширением перечня определяемых клинических показателей и реализации предложенных методических решений в создании

высококочувствительных измерительных устройств, ориентированных на использование вне медицинских учреждений, непосредственно больными в рамках государственной стратегии развития персонифицированной медицины. Разработанные устройства и их близкие аналоги с теми же наноматериалами могут быть успешно использованы в эколого-аналитическом мониторинге, производственном контроле сырья и полуфабрикатов, качества лекарств и пищевой продукции. Самостоятельное значение имеют подходы к экспресс-оценке биологической агрессивности (токсичности) наноматериалов, позволяющие ускорить процесс их безопасного внедрения в различные сферы деятельности, включая медицину и экологию.

Автор выражает искреннюю благодарность: директору ИОС УрО РАН, заведующему лабораторией гетероциклических соединений, заведующему кафедрой органической и биомолекулярной химии ХТИ УрФУ, академику Чарушину В.Н.; научному руководителю ИОС УрО РАН, профессору кафедры органической и биомолекулярной химии ХТИ УрФУ, академику Чупахину О.Н.; директору ХТИ УрФУ, чл.-кор. РАН Русинову В.Л.; в.н.с. ИОС УрО РАН, к.х.н. Русинову Г.Л.; доценту кафедры органической и биомолекулярной химии Утеповой И.А.; коллективу медицинского диагностического центра г. Екатеринбурга и лично директору д.м.н. Бейкину Я.Б; зам. директора ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», профессору, д.б.н. Агафонову А.П.; профессору, д.т.н., зав. лаб. ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Сафатову А.П.; доценту кафедры энзимологии МГУ Рубцовой М.Ю.; коллективу отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРП Роспотребнадзора и лично руководителю, профессору, д.м.н. Кацнельсону Б.А. за содействие в организации и проведении представленных исследований.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ВА – вольтамперометрия

ЦВА – циклическая вольтамперометрия

ИВА – инверсионная вольтамперометрия

ДИВА – дифференциально-импульсная вольтамперометрия

ГКР – метод гигантского комбинационного рассеяния света

QCM – метод кварцевых микровесов

МЕМС – микроэлектромеханические системы

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

ИФА – иммуноферментный анализ

НЧ – наночастица

НК – нанокompозитная частица

ГКР – спектроскопии комбинационного рассеяния

ПЦР – метод полимеразной цепной реакции

ТГЭ – толсто пленочный графитсодержащий электрод

ТПЭ – толсто пленочный платиновый электрод

ТУЭ – толсто пленочный углеродсодержащий электрод

ТМГЭ – толсто пленочный графитсодержащий электрод, модифицированный каломелью (Hg_2Cl_2)

СУЭ – стеклоуглеродный электрод

E – потенциал

$E_{\text{эл}}$ – потенциал электролиза

$E_{\text{ох}}$ – потенциал анодного пика

$E_{\text{опр}}$ – потенциал окисления определяемого соединения

$\tau_{\text{конц}}$ – время концентрирования

$\tau_{\text{эл}}$ – время электролиза

C – концентрация

I – ток

Q – количество электричества

$v_{\text{рег-ии}}$ – скорость сканирования потенциала

R^2 – коэффициент корреляции

S_r – относительное среднеквадратичное отклонение

НК Fe_3O_4 – X – нанокompозитные частицы магнетита с хитозановым покрытием

НК Fe_3O_4 – АПЭС – нанокompозитные частицы магнетита с 3-аминопропилтриэтоксисилановым покрытием

НК Fe_3O_4 – ПП – наночастицы магнетита, модифицированные полипирролом

НК Fe_3O_4 – ПVBXX – нанокompозитные частицы магнетита с поливинилбензилхлоридным покрытием, модифицированным гетероциклическими соединениями

НК Fe_3O_4 – ФЦSiO₂ – нанокompозитные частицы магнетита с оксидкремниевым покрытием, модифицированным ферроценом

E. coli – бактерии *Escherichia coli* ATCC 25992

St. aureus – бактерии *Staphylococcus aureus* B-1266

S. typhi. – бактерии *Salmonella typhimurium* SL 7207

Ab – антитела

Ag – антиген

Ig – иммуноглобулины

ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия

РЭМ (СЭМ) — растровая (сканирующая) электронная микроскопия

Mr – модельный раствор

ЛСН – лаурилсульфат натрия

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

эAgНЧ – электроосажденные наночастицы серебра

ПМО – полимеры с молекулярными отпечатками

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – N,N-диметилформаид

ДМЭ — 1,2-диметоксиэтан

ТГФ — тетрагидрофуран

CH₃CN – ацетонитрил

ПМО – синтезированные образцы ПМО креатинина

ПБМО – синтезированные образцы ПМО без креатинина

ПАВ — поверхностно-активное вещество

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

ЭГДМА – этиленгликольдиметакрилат

ДВБ – дивинилбензол

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

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

АИБН - азоизобутиронитрил

ТРИМ – триметилпропантриметакрилат

ТФЭ – твердофазная экстракция

ТХАК – тетрахлораурат калия

ТЭОС – тетраэтоксисилан

ЦН – цитрат натрия

ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид

ЭГДМА – этиленгликольдиметакрилат

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тёрнер, Э. Биосенсоры: основы и приложения [Текст] / Э. Тёрнер, И. Карубе, Дж. Уилсон — М.: Мир. — 1992. — 614 с.
2. Tian, K. A review of recent advances in nonenzymatic glucose sensors [Текст] / K. Tian, M. Prestgard, A. Tiwar // *Materials Science and Engineering*. — 2014. — V. 41. — P. 100–118.
3. Higson, S. Biosensors for medical applications [Текст] / S. Higson // Woodhead Publishing Limited. — 2012. — 337 p.
4. Ahmed, M. Electrochemical biosensors for medical and food applications [Текст] / M. U. Ahmed, M. M. Hossain and E. Tamiya // *Electroanalysis*/ — 2008. — V. 20. — P. 616 – 626.
5. Wang, J. Analytical electrochemistry [Текст] / J. Wang – Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. — 2006. — 272 p.
6. Thevenot, D. R. Physical Chemistry and Analytical Chemistry Divisions of IUPAZC [Текст] / D. R. Thevenot, R. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson // *Pure Applied Chemistry*. — 1999. — V. 71. — P. 2333 – 2348.
7. Clark, L. C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery [Текст] / L. C. Clark, L. Champ // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 1962. — V. 102. — P 29 – 45.
8. Karunakaran, Ch. Biosensors and Bioelectronics [Текст] / Ch. Karunakaran, R. Rajkumar, K. Bhargava // USA: Elsevier. — 2015. — 344 pp.
9. Rocchitta, G. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids (Review) [Текст] / G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri, G. Latte, G. Madeddu, G. Galleri, S. Nuvoli, P. Bagella, M. I. Demartis, V. Fiore, R. Manetti and P. A. Serra // *Sensors*. — 2016. — V. 16. — P. 21.
10. Niu, Y. Antibody oriented immobilization on gold using the reaction between carbon disulfide and amine groups and its application in immunosensing [Текст]

/ Y. Niu, A. I. Matos, L. M. Abrantes, A. S. Viana, G. Jin // *Langmuir*. – 2012. – V. 28. – P. 17718.

11. Trilling, A.K. Antibody orientation on biosensor surfaces: A minireview [Текст] / A.K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuilhof // *The Analyst*. – 2013. – V. 138. – P.1619.

12. Trilling, A.K. Orientation of llama antibodies strongly increases sensitivity of biosensors [Текст] / A.K. Trilling, T. Hesselink, A. van Houwelingen, J.H.G. Cordewener, M.A. Jongsma, S. Schoffelen, J. Beekwilder // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. –V. 60. – 130.

13. Evtugyn, G. Biosensors: Essentials [Текст] / G. Evtugyn // Springer. – 2013. – 283 pp.

14. Scheller, F. W. Future of Biosensors: A Personal View. A review [Текст] / F. W. Scheller, A. Yarman, T. Bachmann, T. Hirsch, S. Kubick, R. Renneberg, S. Schumacher, U. Wollenberger, C. Teller and F. F. Bier // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – 2014. – V. 1140. – P.1 – 28.

15. Li, S. Molecularly Imprinted Catalysts: Principles, Syntheses, and Applications [Текст] / S. Li, Sh. Cao, S.A. Piletsky, A.P.F. Turner // Elsevier Inc, 2015. – P. 273.

16. Брайнина, Х.З. Наноматериалы: риски и использование *in vivo* и *in vitro* в диагностике [Текст] / Х.З. Брайнина, А.Н. Козицина, Ю.А. Глазырина, Л.В. Устинов // *Химический анализ в медицинской диагностике*. – Под ред. Г.К. Будникова. – М.: Наука. – 2010. – Т. 11. – С. 164– 178.

17. Leca–Bouvier, B. Enzyme for biosensing application. Recognition receptors in biosensors [Текст] / B. Leca–Bouvier, L. Blum; in M. Zourob edition // New York: Springer. – 2010. – P. 177–220.

18. Neujahr, H. Biosensor for environmental control [Текст] / H. Neujahr // *Biotechnology and Genetic Engineering Review*. – 1984. – V.1. – P. 167.

19. Synowiecki, J. Production and selected applications of immobilized enzymes [Текст] / Synowiecki J., Wesołowska S. // *Biotechnologia*. – 2007. – V. 77. – P. 7.
20. Moreira, F. Novel sensory surface for creatine kinase electrochemical detection [Текст] / Moreira F., Dutra R., Noronha J., Sales G. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – V. 56. – P. 217.
21. Neujahr, H. iosensor for environmental control [Текст] / Neujahr H. // *Biotechnology and Genetic Engineering*. – 1984. – V. 1. – P. 167.
22. Straroub, N. Liquid photopolymerizable compositions as immobilized matrix of biosensors [Текст] / N. Straroub, A. Rebview // *Bioelectrochemistry*. – 2007. – V. 71. – I. 1. – P. 29.
23. Psoma, S. Low fluorescence enzyme matrices based on microfabricated SU–8 films for phenol micro–biosensor application [Текст] / S. Psoma, P. Wal, N. Rooij // *Procedia Engineering*. – 2011. – V. 25. – P. 1369.
24. Putzbach, W. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial–based electrochemical biosensor. A review [Текст] / W. Putzbach, N. Ronkainen // *Sensors*. – 2013. – V. 13. – P 4811.
25. Ying, W. Immobilization of laccase by Cu^{2+} chelate affinity interaction on surface–modified magnetic silica particles and its use for removal of 2,4 dichlorophenol [Текст] / W. Ying, Ch. Xiaochung, H. Forong, W. Ran // *Environmental Science Pollutant Resources*. – 2013. – V. 20. – P. 622.
26. Monosik, R. Biosensors– classification, characterization and new trends [Текст] / R. Monosik, M. Stredansky, E. Sturdik // *Acta Chemica Slovaca*. – 2012. – V. 1. – P. 109.
27. Spahn, C. Enzyme immoblization in biotechnology [Текст] / C. Spahn, S. Minter // *Recent Patents on Engineering*. – 2008. – V. 2. – P. 195.
28. Vutti, S. Click Chemistry Mediated Functionalization of Vertical Nanowires for Biological Applications [Текст] / S. Vutti, S. Schoffelen, J. Bolinsson, N. Buch–

Mnson, N. Bovet, J. Nygrd, K. L. Martinez, and M. Meldal // *European Chemical Journal*. – 2016. – V. 22. – P. 496 – 500.

29. Dawan, S. Label-free capacitive immunosensors for ultra-trace detection based on the increase of immobilized antibodies on silver nanoparticles [Текст] / S. Dawan, P. Kanatharana, B. Wongkittisuksa, W. Limbut, A. Numnuam, Ch. Limsakul, P. Thavarungkul // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – V. 699. – P. 232 – 241.

30. Zeng, X. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications [Текст] / X. Zeng, C. Andrade, M. Oliveira, X. Sun // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2012. – V. 402. – № 10. – P. 3161–3176.

31. Емельянов, В.И. Эффект гигантского комбинационного рассеяния света молекулами, адсорбированными на поверхности металла [Текст] / В.И. Емельянов, Н.И. Коротеев // *Успехи Физических Наук*. – 1981. – № 135. – С. 345.

32. Набиев, И.Р. Гигантское комбинационное рассеяние и его применение к изучению биологических молекул [Текст] / И.Р. Набиев, Р.Г. Ефремов, Г.Д. Чуманов // *Успехи Физических Наук*. – 1988. – № 154. – С. 459.

33. Liu, G. Peptide-nanoparticle hybrid SERS probes for optical detection of protease activity [Текст] / G. Liu, T. Rosa-Bauza, Y. Salisbury, M. Cleo, P. Luke // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2007. – V. 7. – P. 2323–2330.

34. Marx, K. M. Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface [Текст] / K.M. Marx // *Biomacromolecules*. – 2003. – V. 4. – P.1099–1120.

35. Cooper, M.A. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions [Текст] / M.A. Cooper, V.T. Singleton // *Journal of Molecular Recognition*. – 2007. – V.20. – P.154–184.

36. Fritz, J. Cantilever biosensors. Review [Текст] / Fritz, J. // *Analyst*. – 2008. – V.133. – P. 855–863.

37. Pedersen, H.C. Cantilever biosensor reader using a common-path, holographic optical interferometer [Текст] / H.C. Pedersen, M.L. Jakobsen, S.G. Hanson, C. Dam-Hansen, T. Olesen, P. Hansen // *Applied Physics Letters*. – 2010. – V.97. – P. 221110.
38. Lavrik, N.V. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors [Текст] / N.V. Lavrik, M.J. Sepaniak, P.G. Datskos // *Review of Scientific Instruments*. – 2004. – V. 75. – P. 2229–2253.
39. Wang, J. Analytical electrochemistry [Текст] / J. Wang // Wiley-VCH. – 2006. – 345 pp.
40. Warsinke, A. Electrochemical immunoassays [Текст] / A. Warsinke, A. Benkert, F.W. Scheller // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2000. – V. 366. – P. 622–634.
41. Rocha-Santos, T. A. P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles [Текст] / T. A. P. Rocha-Santos // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 62. – P. 28–36.
42. Gründler, P. Chemical sensors. An introduction for scientists and engineers [Текст] / P. Gründler – Berlin: Springer. – 2007. – 408 pp.
43. Wang, J.-Qi. pH-Based potentiometrical flow injection biosensor for urea [Текст] / J.-Qi Wang, J.-Ch. Chou, T.-P. Sun, Sh.-K. Hsiung, G.-B. Hsiung. // *Sensors and Actuators. B*. – 2003. – V. 91. – P. 5–10.
44. Şehitoğullari, A. Preparation of a potentiometric immobilized urease electrode and urea determination in serum [Текст] / A. Şehitoğullari, A.H. Uslan // *Talanta*. – 2002. – V. 57. – P. 1039–1044.
45. Галюс, З. Теоретические основы электрохимического анализа, пер. с польск. [Текст] / З. Галюс – М., 1974. – 553 стр.
46. Orazem, M.E. Electrochemical impedance spectroscopy [Текст] / M.E. Orazem, B. Tribollett – New York: Wiley. – 2008. – 432 pp.

47. Ionescu, R.E. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine [Текст] / R.E. Ionescu, C. Gondran, L. Bouffier, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, S. Cosnier // *Electrochimica Acta*. – 2010. – V. 55. – P. 6228–6232.
48. Vig, A. Impedimetric aflatoxin M1 immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition [Текст] / A. Vig, A. Radoi, X. Muñoz-Berbel, G. Gyemant, J-L. Marty // *Sensors and Actuators B*. – 2009. – V. 138. – P. 214–220.
49. Porfireva, A.V. Impedimetric aptasensors based on carbon nanotubes—poly(methylene blue) composite [Текст] / A.V. Porfireva, G.A. Evtugyn, A.N. Ivanov, T. Hianik // *Electroanalysis*. – 2010. – V. 22. – P. 2187–2195.
50. Rocchitta, G. Development and characterization of an implantable biosensor for telemetric monitoring of ethanol in the brain of freely moving rats [Текст] / G. Rocchitta, O. Secchi, M.D. Alvau, R. Migheli, G. Calia, G. Bazzu, D. Farina, M.S. Desole // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 84. – P. 7072–7079.
51. Prodromidis, M.I. Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis [Текст] / M.I. Prodromidis, M.I. Karayannis // *Electroanalysis*. – 2002. – V. 14. – P. 241–261.
52. Dzyadevych, S.V. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future [Текст] / S.V. Dzyadevych, V.N. Arkhypova, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezi-Renault // *IRBM*. – 2008. – V. 29. – P. 171–180.
53. Lee, C.A. Preparation of multiwalled carbon nanotube–chitosan–alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol [Текст] / C.A. Lee, Y.C. Tsai // *Sensors and Actuators B Chemistry*. – 2009. – V. 138. – P. 518–523.
54. Chaubey, A. Mediated biosensors [Текст] / A. Chaubey, B.D. Malhotra // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2002. – V. 17. – P. 441–456.
55. Wang, J. Electrochemical glucose biosensors [Текст] / J. Wang // *Chemical Reviews*. – 2008. – V. 108. – P. 814–825.

56. Arduini, F. Biosensors based on cholinesterase 2214 inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review) [Текст] / F. Arduini, A. Amine, D. Moscone, G. Palleschi // *Microchim Acta*. – 2010. – V. 170. – P. 193–214.
57. Medyantseva, É.P. Estimation of several antidepressants using an amperometric biosensor based on immobilized monoamino oxidase [Текст] / É.P. Medyantseva, R.M. Varlamova, D.A. Gimaletdinova, A.N. Fattakhova, G.K. Budnikov // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2007. – V. 41. – P.341–344.
58. Campanella, L. Organophosphorus and carbamate pesticide analysis using an inhibition tyrosinase organic phase enzyme sensor; comparison by butyrylcholinesterase + choline oxidase OPEE and application to natural waters [Текст] / L. Campanella, D. Lelo, E. Martini, M. Tomassetti // *Analytica Chimica Acta*. – 2007. – V. 587. – P. 22–32.
59. Будников, Г.К. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине [Текст] / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин, В.Н. Майстренко // Издательство: Бинوم. Лаборатория знаний. – 2014. Серия: Методы в химии. – 116 стр.
60. Rodríguez–Delgado, M. M. Laccase–based biosensors for detection of phenolic compounds [Текст] / M.M. Rodríguez–Delgado, G.S. Alemán–Nava, J.M. Rodríguez–Delgado, G. Dieck–Assad, S.O. Martínez–Chapa, D. Barceló, R. Parra // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2015. – V. 74. – P. 21–45.
61. Lawal, A. T. Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors [Текст] / A. T. Lawal // *Materials Research Bulletin*. – 2016. – V. 73. – P. 308–350.
62. Turan, J. An effective surface design based on a conjugated polymer and silver nanowires for the detection of paraoxon in tap water and milk [Текст] / J. Turan, M. Kesik, S. Soylemeza, S. Goker, S. Coskun, H. E. Unalan, L. Toppare // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2016. – V. 228. – P. 278–286.

63. Cao, Y. Magnetic AuNP@Fe₃O₄ nanoparticles as reusable carriers for reversible enzyme immobilization [Текст] / Y. Cao, L. Wen, F. Svec, T. Tan, Y. Lv // Chemical Engineering Journal. – 2016. – V. 286. – P. 272–281.
64. Wieckowska, A. Ultrasmall Au nanoparticles coated with hexanethiol and anthraquinone/hexanethiol for enzyme-catalyzed oxygen reduction [Текст] / A. Wieckowska, M. Dzwonek // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2016. – V. 224. – P. 514–520.
65. H. Bia. Interference-blind microfluidic sensor for ascorbic acid determination by UV/vis spectroscopy [Текст] / H. Bia, A. C Fernandes, S. Cardoso, P. Freitas // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2016. – V. 224. – P. 668–675.
66. Fang, Y. Detection of methyl salicylate using bi-enzyme electrochemical sensor consisting salicylate hydroxylase and tyrosinase [Текст] / Y. Fang, H. Bullock, S. A. Lee, N. Sekar, M. A. Eiteman, W. B. Whitman, R. P. Ramasamy // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – V. 85. – P. 603–610.
67. Zhou, J. Disposable poly (o-aminophenol)-carbon nanotubes modified screen print electrode-based enzyme sensor for electrochemical detection of marine toxin okadaic acid [Текст] / J. Zhou, X. Qiu, K. Su, G. Xu, P. Wang // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2016. – V. 235. – P. 170–178.
68. Wang, J. An enzyme-metal-insulator-silicon structured sensor using surface photovoltage technology for potentiometric glucose detection [Текст] / J. Wang, H. Zhao, L. Du, H. Cai, P. Wang // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2013. – V. 187. – P. 147–152.
69. Lin, Y.H. Integrating solid-state sensor and microfluidic devices for glucose, urea and creatinine detection based on enzyme-carrying alginate microbeads [Текст] / Y.H. Lin, S.H. Wang, M.H. Wu, T.M. Pan, C.S. Lai, J.D. Luo, C.C. Chiou // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – V. 43. – P. 328–335.
70. Bäcker, M. Chip-based amperometric enzyme sensor system for monitoring of bioprocesses by flow-injection analysis [Текст] / M. Bäcker,

D. Rakowski, A. Poghossian, M. Biselli, P. Wagner, M.J. Schöning // *Journal of Biotechnology*. – 2013. – V. 163. – I. 4. – P. 371–376.

71. Lei, Y. Microbial biosensors [Текст] / Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani // *Analytica Chimica Acta*. – 2006. – V. 568. – P. 200–210.

72. Ron, E.Z. Biosensing environmental pollution [Текст] / E.Z. Ron // *Current opinion in Biotechnology*. – 2007. – V. 8. – P.252–256.

73. Ding, L. Trends in Cell-Based Electrochemical Biosensors [Текст] / L. Ding, D. Du, X. Zhang and H. Ju // *Current Medicinal Chemistry*. – 2008. – V.15. – P. 3160–3170.

74. de Carvalho, C.C.R. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes [Текст] / C.C.R. de Carvalho // *Advances in Biotechnology*. – 2011. – V. 29. – P. 75–83.

75. Wang, P. Cell-based biosensors and its application in biomedicine [Текст] / P. Wang, G.X. Xu, L.F. Qin, Y. Xu, Y. Li, R. Li // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2005. – V. 108. – P. 576–584.

76. Lei, Y. Microbial biosensors [Текст] / Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani // *Analytica Chimica Acta* – 2006. – V. 568. – P. 200–210.

77. Ding, L. Trends in Cell-Based Electrochemical Biosensors [Текст] / L. Ding, D. Du, X. Zhang, and H. Ju // *Current Medicinal Chemistry*. – 2008. – V. 15. – P. 3160–3170.

78. May, K.M.L. Development of a whole-cell-based biosensor for detecting histamine as a model toxin [Текст] / K.M.L. May, Y. Wang, L.G. Bachas, K.W.Anderson // *Analytical Chemistry*. – 2004. – V. 76. – P. 4156–61.

79. Popovtzer, R. Novel integrated electrochemical nanobiochip for toxicity detection in water [Текст] / R. Popovtzer, T. Neufeld; D. Biran, E.Z. Ron, J. Rishpon, Y. Shacham-Diamand // *Nano Letters*. – 2005. – V. 5. – P. 1023–1027.

80. Yue, H. Label-free electrochemiluminescent biosensor for rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* using phage as highly specific recognition

agent [Текст] / H. Yue, Y. He, E. Fan, L. Wang, S. Lu, Z. Fu // *Biosensors and Bioelectronics* 2017. – V. 94. – P. 429–432.

81. Jiang, Y. Polyglutamine toxicity in yeast uncovers phenotypic variations between different fluorescent protein fusions [Текст] / Y. Jiang, S.E. DiGregorio, M.L. Duennwald1, and P. Lajoie // *Traffic*. – 2017. – V. 18. – P. 58–70.

82. Liu, Q. Cell-based biosensors and their application in biomedicine. Review [Текст] / Liu Q., Wu C., Cai H., Hu N., Zhou J., Wang P // *Chemical Reviews*. – 2014. – V. 114. – P. 6423–6461.

83. Qureshi, A. Whole-cell based label-free capacitive biosensor for rapid nanosize-dependent toxicity detection [Текст] / A. Qureshi, A. Pandey, R. S.Chouhan, Y. Gurbuz, J. H.Niazi // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V.67. – P. 100–106.

84. Tiwari, A. Gong Electrochemical detection of a breast cancer susceptible gene using cDNA immobilized chitosan-co-polyaniline electrode [Текст] / A. Tiwari // *Talanta*. – 2009. – V.77. – P. 1217–1222.

85. Qureshi, A. DNA structure, reactivity, and 2372 recognition [Текст] / A. Qureshi, A. Pandey, R.S. Chouhan, Y. Gurbuz, J.H. Niazi // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – V. 67. – P. 100–106.

86. Labuda, J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report) [Текст] / J. Labuda, A.M.O. Brett, G. Evtugyn, M. Fojta, M. Mascini, M. Ozsoz // *Pure Applied Chemistry*. – 2010. – V. 82. – P. 1161–1187.

87. Song, S. Aptamer-based biosensors [Текст] / S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2008. – V. 27. – P. 108–117.

88. Freeman, R. Sensing and Biosensing with Semiconductor Quantum Dots [Текст] / R. Freeman, J. Girsh, B. Willner, and I. Willner// *Journal of Instrumental Chemistry*. – 2012. – V. 52. – P. 1125–1136.

89. Golub, E. Electrochemical, photoelectrochemical, and surface plasmon resonance detection of cocaine using supramolecular aptamer complexes and metallic or

semiconductor nanoparticles [Текст] / E. Golub, G. Pelossof, R. Freeman, H. Zhang, I. Willner // *Analytical Chemistry*. – 2009. – V. 81. – P. 9291–9298.

90. Freeman, R. Biosensing and probing of intracellular metabolic pathways by NADH-sensitive quantum dots [Текст] / R. Freeman, R. Gill, I. Shweky, M. Kotler, U. Banin, I. Willner // *Angewandte Chemie – International Edition*. – 2009. – V. 48. – P. 309–313.

91. Somers, R. C. CdSe nanocrystal based chem-/bio- sensors [Текст] / R.C. Somers, M. G. Bawendi, D. G. Nocera // *Chemical Society Review*. – 2007. – V. 36. – P. 579–591.

92. Kim, J.H. Adaptation of inorganic quantum dots for stable molecular beacons [Текст] / J.H. Kim, D. Morikis, M. Ozkan // *Sensors and Actuators, B*. – 2004. – V. 102. – P. 315–319.

93. Kim, J. H. Multicolour hybrid nanoprobe of molecular beacon conjugated quantum dots: FRET and gel electrophoresis assisted target DNA detection [Текст] / J.H. Kim, S. Chaudhary, M. Ozkan // *Nanotechnology 2007*. – V. 18. – P. 195105 – 195112.

94. Sharon, E. CdSe/ZnS quantum dots–G–quadruplex/hemin hybrids as optical DNA sensors and aptasensors [Текст] / E. Sharon, R. Freeman, I. Willner // *Analytical Chemistry*. – 2010. – V. 82. – P. 7073–7077.

95. Freeman, R. Amplified multiplexed analysis of DNA by the exonuclease iii-catalyzed regeneration of the target dna in the presence of functionalized semiconductor quantum dots [Текст] / R. Freeman, X. Liu, I. Willner // *Nano Letters*. – 2011. – V. 11. – P. 4456– 4461.

96. Li, L. Simultaneous fluoroimmunoassay of two tumor markers based on CdTe quantum dots and gold nanocluster coated–silica nanospheres as labels [Текст] / L. Li, D. Feng, J. Zhao, Z. Guoa and Y. Zhang // *Royal Society of Chemistry Advertisements*. – 2015. – V. 5. – P. 105992–105998.

97. Liu, Y. A label-free photoelectrochemical aptasensor based on nitrogen-doped graphene quantum dots for chloramphenicol determination [Текст] / Y. Liu, K.

Yan, O.K. Okoth, J. Zhang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V. 74. – P. 1016–1021.

98. Stiles, P.L. Surface-enhanced Raman spectroscopy [Текст] / P.L. Stiles, J.A. Dieringer, N.C. Shah and R.P. Van Duyne // *Annual Reviews of Analytical Chemistry*. – 2008. – V. 1. – P. 601–626.

99. Shanmukh, S. Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate [Текст] // S. Shanmukh, J. Driskell, Y. Zhao, R. Dluhy and R.A. Tripp // *Nano Letters*. – 2006. – V. 6. – P. 2630–2636.

100. Shafer-Peltier, K.E. Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering [Текст] / K.E. Shafer-Peltier, C.L. Haynes, M.R. Glucksberg and R.P. Van Duyne // *Journal of American Chemical Society*. – 2003. – V. 125. – P. 588–593.

101. ДЫКМАН, Л.А. ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ – СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, БИОМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ [Текст] / Л.А. ДЫКМАН. – Москва: Наука, 2008. – 318 с.

102. Larginho, M. Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics – From genomics to proteomics [Текст] / M. Larginho, P.V. Baptista // *Journal of Proteomics*. – 2012. – V. 10. – P. 2811–2823.

103. Welch, C.M. The detection of nitrate using in-situ copper nanoparticle deposition at a boron doped diamond electrode [Текст] / C.M. Welch, M.E. Hyde, C.E. Banks, R.G. Compton // *Analytical Sciences*. – 2005. – V. 21. – P. 1421–1430.

104. Welch, C.M. Electroanalysis of Trace Manganese via Cathodic Stripping Voltammetry: Exploration of Edge Plane Pyrolytic Graphite Electrodes for Environmental Analysis [Текст] / C.M. Welch, C.E. Banks, Š.Komorsky-Lovrić and R.G. Compton // *Croat Chemical Acta*. – 2006. – V. 79. – P. 27.

105. Brainina, Kh.Z. The effect of the system polydispersity on voltammograms of nanoparticles electrooxidation [Текст] / Kh.Z. Brainina, L.G. Galperin, E.V. Vikulova, A.L. Galperin // *Journal of Solid State Electrochemistry*. – 2013. – V. 17. – I. 1. – P. 43–53.

106. 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 // Trends in Analytical Chemistry. – 2011. – V. 42. – P. 216–227.
107. 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.
108. 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. – I. 10. – P. 2197–2206.
109. Doria, G. Gold–silver–alloy nanoprobess for one–pot multiplex DNA detection [Текст] / G. Doria, M. Larginho, J.T. Dias, E. Pereira, R. Franco and P.V. Baptista // Nanotechnology. – 2010. – V. 21. – P. 255.
110. Doria, G. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications [Текст] / G. Doria, J. Conde, B. Veigas, L. Giestas, C. Almeida, M. Assunção, J. Rosa // Sensors. – 2015. – V.12. – I. 2. – P. 1657 – 1687.
111. Fredj, Z. Neutravidin biosensor for direct capture of dual–functional biotin–molecular beacon–AuNP probe for sensitive voltammetric detection of microRNA [Текст] / Z. Fredj, S. Azzouzi, A. Turner, B. Ali, W.C. Mak // Sensors and actuators B Chemical. – 2017. – V. 248. – P. 77 – 84.
112. Hui, N. Gold nanoparticles and polyethylene glycols functionalized conducting polyaniline nanowires for ultrasensitive and low fouling immunosensing of alpha–fetoprotein [Текст] // N. Hui, X. Sun, Z. Song, S. Niu, X. Luo // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – V. 86. – P. 143–149.
113. Aoa, H. A fluorometric biosensor based on functional Au/Ag nanoclusters for real–time monitoring of tyrosinase activity [Текст] / H. Aoa, Zh. Qiana, Y. Zhua, M. Zhaoa, C. Tanga, Y. Huanga, H. Fenga, A. Wang // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – V. 86. – P. 542–547.

114. Wang, L. Bioconjugated silica nanoparticles: development and applications [Текст] / L. Wang, W. Zhao, W. Tan // *Nano Research*. 2008. – V. 1. – P. 99 – 115.
115. Wang, L. Watching silica nanoparticles glow in the biological world [Текст] / L. Wang, K. M. Wang, S. Santra, X. J. Zhao, L. R. Hilliard, J. E. Smith, J. R. Wu, W. H. Tan // *Analytical chemistry*. – 2006. – V. 78. – P. 646 – 654.
116. Shrivastava, S. Next-generation polymer nanocomposite-based electrochemical sensors and biosensors: A review [Текст] / S. Shrivastava, N. Jadon, R. Jain // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 82. – P. 55 – 67.
117. Devi, R. Construction and application of an amperometric xanthine biosensor based on zinc oxide nanoparticles–polypyrrole composite film [Текст] / R. Devi, M. Thakur, C.S. Pundir // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – V. 26. – P. 3420 – 3426.
118. Liu, X. Electrochemical detection of avian influenza virus H5N1 gene sequence using a DNA aptamer immobilized onto a hybrid nanomaterial–modified electrode [Текст] / X. Liu, Z. Cheng, H. Fan, S. Ai, R. Han // *Electrochimica Acta*. – 2011. – V. 56. – P. 6266 – 6270.
119. Tallury, P. Silica-based multimodal/multifunctional nanoparticles for bioimaging and biosensing applications [Текст] / P. Tallury, K. Payton, S. Santra // *Nanomedicine*. – 2008. – V. 3. – P. 579 – 592.
120. Sounderya, N. Use of core/shell structured nanoparticles for biomedical applications [Текст] / N. Sounderya, Y. Zhang // *Recent pathology and biomedical engineering*. – 2008. – V. 1. – P. 34 – 42.
121. Tallury, P. Nanobioimaging and sensing of infectious diseases [Текст] / P. Tallury, A. Malhotra, L. M Byrne, S. Santra // *Advanced drug delivery reviews*. – 2010. – V. 62. – P. 424–437.
122. Radecka, H. Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Self-Assembled Monolayers: Application of Nanoparticles for Analytical Signals Amplification [Текст] / H. Radecka, J. Radecki, I. Grabowska, K. Kurzątkowska //

Functional nanoparticles for bioanalysis nanomedicine, and bioelectronic devices. – New York: ACS Symposium Series, 2012. – P. 293 – 312.

123. Long, N.V. Synthesis and characterization of Pt–Pd alloy and core–shell bimetallic nanoparticles for direct methanol fuel cells (DMFCs): Enhanced electrocatalytic properties of well–shaped core–shell morphologies and nanostructures [Текст] / N.V. Long, T.D. Hien, T. Asaka, M. Ohtaki, M. Nogami // Journal of alloys and compounds. – 2011. – V. 509. – P. 7702 – 7715.

124. Wang, G. Synthesis, characterization and microwave absorption properties of Fe₃O₄/Co core/shell–type nanoparticles [Текст] / G. Wang, Y. Chang, L. Wang, C. Liu // Advanced powder technology. – 2012. – V. 23. – P. 861– 870.

125. Chen, Y. Enhanced stability and bioconjugation of photo–cross–linked polystyrene–shell, Au–core nanoparticles [Текст] / Y. Chen, J. Cho, A. Young, T.A. Taton // Langmuir. – 2007. – V. 23. – P. 7491 – 7497.

126. Zhiguo, G. An ultrasensitive electrochemical biosensor for glucose using CdTe–CdS core–shell quantum dot as ultrafast electron transfer relay between graphene–gold nanocomposite and gold nanoparticle [Текст] / G. Zhiguo, Y. Shuping, L. Zaijun, S. Xiulan, W. Guangli, F. Yinjun, L. Junkang // Electrochimica acta. – 2011. – V. 56. – P. 9162 – 9169.

127. Lee, C.S. A novel fluorescent nanoparticle composed of fluorene copolymer core and silica shell with enhanced photostability [Текст] / C.S. Lee, H.H. Chang, J. Jung, N.A. Lee, N.W. Song, B.H. Chung // Colloids and surfaces B: Biointerfaces. – 2012. – V. 91. – P.219 – 230.

128. Chatterjee, K. Core/shell nanoparticles in biomedical applications [Текст] / K. Chatterjee, S. Sarkar, K. J. Rao, S. Paria // Advances in colloid and interface science. – 2014. – V. 209. – P. 8 – 39.

129. Козицина, А.Н. Бесферментный электрохимический метод определения *E.coli* с использованием нанокompозитов Fe₃O₄ с оболочкой SiO₂, модифицированной ферроценом [Текст] / А.Н. Козицина, Н.Н. Малышева, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина, О.Н. Чупахин // Журнал

аналитической химии. – 2015. – Т. 70. – № 5. – С. 2327 – 2336. (англ. перевод Kozitsina, A.N. An enzyme-free electrochemical method for the determination of *E. coli* using Fe₃O₄ nanocomposites with a SiO₂ shell modified by ferrocene [Текст] / A.N. Kozitsina, N.N. Malysheva, I.A. Utepova, Y.A. Glazyrina, A.I. Matern, K.Z. Brainina, O.N. Chupakhin // Journal of Analytical Chemistry. – 2015. – V. 70. – I. 5. – P. 540 – 545).

130. Козицина, А. Н. Синтез и исследование электрохимических превращений магнитных нанокompозитов на основе Fe₃O₄ [Текст] / А.Н. Козицина, Н.Н. Малышева, Е.В. Вербицкий, И.А. Утепова, Ю.А. Глазырина, Т.С. Митрофанова, Г.Л. Русинов, А.И. Матерн, О.Н. Чупахин, Х.З. Брайнина // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2013. – № 11. – С. 2327–2336. (англ. перевод Kozitsina, A. N. Synthesis and research of electrochemical behavior of magnetic nanocomposites based on Fe₃O₄ [Текст] / A.N. Kozitsina, N.N. Malysheva, E.V. Verbitsky, I.A. Utepova, Yu.A. Glazyrina, T.S. Mitrofanova, G.L. Rusinov, A.I. Matern, O.N. Chupakhin, Kh.Z. Brainina // Russian Chemical Bulletin. – 2013. – V. 62. – I. 11. – P. 2327 – 2336).

131. Jenjob, S. Facile synthesis of silver immobilized-poly(methyl methacrylate)/polyethyleneimine core-shell particle composites [Текст] / S. Jenjob, T. Tharawut, P. Sunintaboon // Materials science and engineering C. – 2012. – V. 32. – P. 2068.

132. Mahdavian, A. R. Nanocomposite particles with core-shell morphology. An investigation into the affecting parameters on preparation of Fe₃O₄-poly (butyl acrylate-styrene) particles via miniemulsion polymerization [Текст] / A. R. Mahdavian, Y. Sehri, H. S. Mobarakeh // European polymer journal. – 2008. – V. 44. – P. 2482.

133. Huang, Z. Morphology control and texture of Fe₃O₄ nanoparticle-coated polystyrene microspheres by ethylene glycol in forced hydrolysis reaction [Текст] / Z. Huang, F. Tang, L. Zhang // Thin solid films. – 2005. – V. 471. – P. 105.

134. Scott, R. W. J. Synthesis, characterization, and applications of dendrimer-encapsulated nanoparticles [Текст] / R.W. J. Scott, O.M. Wilson, R.M. Crooks // Journal of physical chemistry B. – 2005. – V. 109. – P.692.

135. Chen, Y. Synthesis of glyconanospheres containing lumi-nescent CdSe-ZnS quantum dots [Текст] / Y. Chen, T. Ji, Z. Rosenzweig // Nano letters. – 2003. – V. 3. – P. 581 – 584.
136. Landfester, K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles [Текст] / K. Landfester // Angewandte chemie international edition. – 2009. – V. 48. – P. 4488 – 4507.
137. Antonietti, M. Polyreactions in miniemulsions [Текст] / M. Antonietti, K. Landfester // Progress in polymer science. – 2002. – V. 27. – P. 689–757.
138. Behrend, O. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound [Текст] / O. Behrend, K. Ax, H. Schubert // Ultrasonic sonochemistry. – 2000. – V. 7. – P. 77 – 85.
139. Al-Ghamdi, G.H. Encapsulation of titanium dioxide in styrene/n-butyl acrylate copolymer by miniemulsion polymerization [Текст] / G. H. Al-Ghamdi, E. D. Sudol, V. L. Dimonie, M. S. El-Aasser // Journal of applied polymer science. – 2006. – V. 101. – P. 3479 – 3486.
140. Esteves, A. C. C. Polymer encapsulation of CdE (E = S, Se) quantum dot ensembles via in-situ radical poly-merization in miniemulsion [Текст] / A. C. C. Esteves, A. Barros-Timmons, T. Monteiro, T. Trindade // Journal of nanoscience and nanotechnology. – 2005. – V. 5. – P. 766 – 771.
141. Medeiros, S. F. Thermally-sensitive and magnetic poly(N-vinylcaprolactam)-based nanogels by inverse miniemulsion polymerization [Текст] / S. F. Medeiros, A. M. Santos, H. Fessi, A. Elaissari // Journal of colloid science biotechnology. – 2012. – V. 1. – P. 99 – 112.
142. Ladj, R. Polymer encapsulation of inorganic nanoparticles for biomedical applications [Текст] / R. Ladj, A. Bitar, M. M. Eissa, H. Fessi, Y. Mugnier, R. Le Dantec, A. Elaissari // International journal of pharmaceutics. – 2013. – V. 458. – P. 230 – 241.
143. Помогайло, А. Д. Наночастицы металлов в полимерах [Текст] / А.Д. Помогайло, А.С. Розенберг, И.Е. Уфлянд. – М: «Химия», 2000. – 672 с.

144. Бакеева, И. В. Современные нанокompозитные материалы — оргоно–неоргоанические гибридные гели. Учебное пособие. [Текст] / И.В. Бакеева, И.В. Морозова. – М: Издательско–полиграфический центр (ИПЦ МИТХТ), 2006. –40 с.
145. Лисичкин, Г. В. Химия привитых поверхностных соединений [Текст] / Г. В. Лисичкин. – М.: Физматлит, 2003. – 592 с.
146. Motherwell, W. Recent Progress in the Design and Synthesis of Artificial Enzymes [Текст] / W. Motherwell, M. Bingham, Y. Six // Tetrahedron. – 2001. – V. 57. – I. 22. – P. 4663 – 4686.
147. Raynal, M. Supramolecular Catalysis. Part 2: Artificial Enzyme Mimics [Текст] / M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal–Ferran, P.W. van Leeuwen // Chemical Society Review. – 2014. – V. 43. – I. 5. – P. 1734 – 1787.
148. Resmini, M. Molecularly Imprinted Polymers as Biomimetic Catalysts [Текст] / M. Resmini // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2012. – V. 402. – I. 10. – P. 3021 – 3026.
149. Simmons, T.R. Mimicking hydrogenase: From biomimetics to artificial enzymes [Текст] / T.R. Simmons, G. Beggren, M. Bacchi, M. Fontecave, V. Artero // Coordination Chemistry Reviews. – 2014. – P. 1 – 24.
150. Holm, R.H. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology [Текст] / R.H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon // Chemical Review. – 1996. – V. 96. – I. 7. – P. 2239 – 2314.
151. Berggren, G. Biomimetic assembly and activation of [FeFe]–hydrogenases [Текст] / G. Berggren, A. Adamska, C. Lambertz, T. R. Simmons, J. Esselborn, M. Atta, S. Gambarelli, J.–M. Mouesca, E. Reijerse, W. Lubitz, T. Happe, V. Artero and M. Fontecave // Nature. – 2013. – V. 499. – P.66.
152. 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.

153. 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.
154. Szekely, G. *Molecularly Imprinted Catalysts* / G. Szekely, Ch. Didaskalou // Chapter 7 *Biomimics of Metalloenzymes via Imprinting*. – 2016. – P. 121 – 158.
155. 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.
156. 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.
157. Pauling, L. *A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies* [Текст] / L. Pauling // *Journal of American Chemical Society*. – 1940. – V. 62. – P. 2643 – 2657.
158. Li, S. *Molecularly imprinted sensors overview and applications* [Текст] / S. Li, – Amsterdam/Boston: Elsevier, 2012. – P. 370.
159. 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.
160. 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.
161. 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.

162. 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.

163. 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.

164. 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.

165. 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.

166. 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.

167. Shoji, R. Atrazine sensor based on a nano chemical receptor modified electrode [Текст] / R. Shoji, T. Takeuchi, I. Kubo // *Analytical Chemistry*. – 2003. – V. 75. – I. 18. – P. 4882 – 4886.

168. Flores, A. Imprinted polymers prepared by aqueous suspension polymerization [Текст] / A. Flores, D. Cunliffe, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2000. – V. 77. – P. 1841 – 1850.

169. 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.

170. 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.

171. 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.

172. 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.

173. 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.

174. Darwish, M.S. Magnetite core–shell nano–composites with chlorine functionality: preparation by miniemulsion polymerization and characterization [Текст] / M.S. Darwish, S. Machunsky, U. Peuker, U. Kunz, T. Turek // *Journal of Polymer Research*. – 2010. – V. 18. – № 1. – P. 79 – 88.

175. 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.

176. 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.

177. 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.

178. 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.

179. 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.

180. 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.

181. Bélanger, D. Electrografting: a powerful method for surface modification [Текст] / D. Bélanger, J. Pinson // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – V. 40. – № 7. – P. 3995 – 4048.

182. 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.

183. Meekel, A.A.P. Regioselectivity and Enantioselectivity in an Antibody Catalyzed Hetero Diels-Alder Reaction [Текст] / A.A.P. Meekel, M. Resmini, U.K. Pandit // *Bioorganic Medical Chemistry*. – 1996. – V.4. – I. 7. – P. 1051 – 1057.

184. Zhang, H. Molecularly Imprinted Nanoreactors for Regioselective Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction [Текст] / H. Zhang, T. Piacham, M. Drew, M. Patek, K. Mosbach, L. Ye // *Journal of American Chemical Society*. – 2006. – V. 128. – I. 13. – P. 4178 – 4179.

185. Nikitina, V.N. Molecular imprinting of boronate functionalized polyaniline for enzyme-free selective detection of saccharides and hydroxy acids [Текст] / Nikitina

V.N., Zaryanov N.V., Kochetkov I.R., Karyakina E.E., Yatsimirsky, A.K., Karyakin A.A. // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. – 2017. – V. 246. – P. 428 – 433.

186. Zhao, H. Highlights of Biocatalysis and Biomimetic Catalysis [Текст] / H. Zhao // *ACS Catalysis*. – 2011. – V. 1. – I. 9. – P. 1119 – 1120.

187. Marchetti, L. Biomimetic Catalysis [Текст] / L. Marchetti, M. Levine // *ACS Catalysis*. – 2011. – V. 1. – I. 9. – P. 1090 – 1118.

188. Alizadeh, T. A New Molecularly Imprinted Polymer (MIP)–based Electrochemical Sensor for Monitoring 2, 4, 6–Trinitrotoluene (TNT) in Natural Waters and Soil Samples [Текст] / T. Alizadeh, M. Zare, M.R. Ganjali, P. Norouzi, B. Tavana // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – V. 25. – I. 5. – P. 1166 – 1172.

189. Pietrzyk, A. Selective Histamine Piezoelectric Chemosensor Using a Recognition Film of the Molecularly Imprinted Polymer of Bis (bithiophene) Derivatives [Текст] / A. Pietrzyk, S. Suriyanarayanan, W. Kutner, R. Chitta, F. D'Souza // *Analytical Chemistry*. – 2009. – V. 81. – I. 7. – P. 2633 – 2643.

190. Li, J. Fabrication of an Oxytetracycline Molecular–Imprinted Sensor Based on the Competition Reaction via a GOD–Enzymatic Amplifier [Текст] / J. Li, F. Jiang, Y. Li, Z. Chen // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – V. 26. – I. 5. – P. 2097 – 2101.

191. Ермолаева, Т.Н. Микро– и наночастицы полимеров с молекулярными отпечатками – синтез, характеристика и применение в пьезокварцевых сенсорах, Сорбционные и хроматографические процессы [Текст] / Т.Н. Ермолаева, В.Н. Чернышова, О.И. Бессонов. – 2015. – Т. 15. – Вып. 3. – С.345 – 365.

192. Moreira, F.T. Man–tailored Biomimetic Sensor of Molecularly Imprinted Materials for the Potentiometric Measurement of Oxytetracycline [Текст] / F.T. Moreira, A.H. Kamel, J.R. Guerreiro, M.G.F. Sales // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – V. 26. – I. 2. – P. 566 – 574.

193. Queirós, R.B. Label–free Detection of Microcystin–LR in Waters Using Real–Time Potentiometric Biosensors Based on Single–Walled Carbon Nanotubes Imprinted Polymers [Текст] / R.B. Queirós, J.P. Noronha, P.V.S. Marques, M.G.F. Sales, // *Procedia Engineering*. – 2012. – V. 47. – P. 758 – 761.

194. Shen, X. Molecularly imprinted electrochemical sensor for advanced diagnosis of alpha-fetoprotein [Текст] / X. Shen, Y. Ma, Q. Zeng, J. Tao, J. Huang, L. Wang // *Analytical Methods*. – 2016. – V. 8. – P. 7361 – 7368.

195. Sergeyeva, T. Catalytic molecularly imprinted polymer membranes: development of the biomimetic sensor for phenols detection [Текст] / T. Sergeyeva, O. Slinchenko, L. Gorbach, V. Matyushov, O. Brovko, S. Piletsky, L. Sergeeva, G. Elska // *Analytica Chimica Acta*. – 2010. – V. 659. – P. 274 – 279.

196. Mirmohseni, A. Application of Molecularly Imprinted Polymer for Determination of Glucose by Quartz Crystal Nanobalance Technique [Текст] / A. Mirmohseni, R. Pourata, M. Shojaei // *IEEE Sensors Journal*. – 2014. – V. 14. – P. 2807 – 2812.

197. Alexander, S. Modified graphene based molecular imprinted polymer for electrochemical non-enzymatic cholesterol biosensor [Текст] / S. Alexander, P. Baraneedharan, S. Balasubrahmanyam, S. Ramaprabhu // *European Polymer Journal*. – 2017. – V. 86. – P. 106 – 116.

198. Wu, B. A molecularly imprinted electrochemical enzymeless sensor based on functionalized gold nanoparticle decorated carbon nanotubes for methyl-parathion detection [Текст] / B. Wu, L. Hou, M. Du, T. Zhang, Z. Wang, Z. Xue, X. Lu // *RSC Advertisements*. – 2014. – 4. – 53701 – 53710.

199. Rayanasukha, Y. Non-enzymatic urea sensor using molecularly imprinted polymers surface modified based-on ion-sensitive field effect transistor (ISFET) [Текст] / Y. Rayanasukha, S. Pratontep, S. Porntheeraphat, W. Bunjongpru, J. Nukeaw // *Surface and Coatings Technology*. – 2016. – V. 306. – Part A. – P. 147 – 150.

200. Zayats, M. Imprinting of specific molecular recognition sites in inorganic and organic thin layer membranes associated with ion-sensitive field-effect transistors [Текст] / M. Zayats, M. Lahav, A.B. Kharitonov, I. Willner // *Tetrahedron*. – 2002. – V. 58. – P. 815 – 824.

201. Kou, L.–J. Potentiometric sensor for determination of neutral bisphenol A using a molecularly imprinted polymer as a receptor [Текст] / L.–J. Kou, R.–N. Liang, X.–W. Wang, Y. Chen, W. Qin // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – V. 405. – P. 4931 – 4936.
202. Moreira, F.T.C. Myoglobin–biomimetic electroactive materials made by surface molecular imprinting on silica beads and their use as ionophores in polymeric membranes for potentiometric transduction [Текст] / F.T.C. Moreira, R.A.F. Dutra, J.P.C. Noronha, M.G.F. Sales // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – 26. – 4760 – 4766.
203. Rajkumar, R. Analysis of recognition of fructose by imprinted polymers [Текст] / R. Rajkumar, A. Warsinke, H. Möhwald, F.W. Scheller, M. Katterle // *Talanta*. – 2008. – V. 76. – P. 1119 – 1123.
204. Yalow, R.S. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods [Текст] / R.S. Yalow, S.A. Berson // *Nature*. – 1959. – V. 184. – P. 1648 – 1649.
205. Suri, C.R. Immunoanalytical techniques for analyzing pesticides in the environment [Текст] / C.R. Suri, R. Boro, Y. Nangia // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2009. – V. 28. – I. 1. – 29 – 39.
206. Seidel, M. Automated analytical microarrays: a critical review [Текст] / M. Seidel, R. Niessner // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2008. – V. 391. – P. 1521 – 1544.
207. Harris, L.J., Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody [Текст] / L.J. Harris, S.B. Larson, K.W. Hasel, A. Pherson // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – I. 7. – P. 1581 – 1597.
208. Harlow, E. *Antibodies Lab Manual (P): A Laboratory Manual* [Текст]. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1998. – 456 pp.
209. Mattes, M.J. Binding parameters of antibodies – a reappraisal [Текст] / M.J. Mattes // *Tumor Target*. – 1999. – V. 4. – P. 63–69.
210. Proll, G. *Handbook of Spectroscopy: Second, Enlarged Edition*. Chapter 36 [Текст] / G. Proll, M. Ehni // *Immunoassays*. – 2002. – P. 1313 – 1334.

211. Rubenstein, K. E. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique [Текст] / Rubenstein K.E., Schneider R.S., Ullman E.F. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1972. – V. 47. – P. 846 – 851.
212. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа [Текст] / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высшая школа, 1991. – С. 3 – 4.
213. Zhang, B. Nanogold–penetrated poly(amidoamine) dendrimer for enzyme–free electrochemical immunoassay of cardiac biomarker using cathodic stripping voltammetric method [Текст] / B. Zhang, Y. Zhang, W. Liang, B. Cui, J. Li, X. Yu, L. Huang // *Analytica Chimica Acta*. – 2016. – V. 904. – P. 51 – 57.
214. Barroso, J. Photoelectrochemical detection of enzymatically generated CdS nanoparticles: Application to development of immunoassay [Текст] / J. Barroso, L. Saa, R. Grinyte, V. Pavlov // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 77. – P. 323 – 329.
215. Wu, X. Rapid and quantitative detection of 4(5)–methylimidazole in caramel colours: a novel fluorescent–based immunochromatographic assay [Текст] / X. Wu, M. Huang, S. Yu, F. Kong // *Food Chemistry*. – 2016. – V. 190. P. 843 – 847.
216. Sanghavi, B. J. Aptamer–functionalized nanoparticles for surface immobilization–free electrochemical detection of cortisol in a microfluidic device [Текст] / B. J. Sanghavi, J. A. Moore, J. L. Chávez, J. A. Hagen, N. Kelley–Loughnane, C.–F. Chou, N. S. Swami // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 78. – P. 244 – 252.
217. Beloglazova, N. V. Design of a sensitive fluorescent polarization immunoassay for rapid screening of milk for cephalixin [Текст] / N. V. Beloglazova, S. A. Eremin // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2015. – V. 407. – I. 28. – P. 8525 – 8532.
218. Yalow, R.S., Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods [Текст] / R.S. Yalow, S.A. Berson // *Nature*. – 1959. – V. 184. – P. 1648 – 1649.

219. Engvall, E. Enzyme-linked immunosorbent assay, quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes [Текст] / E. Engvall, K. Jonsson, P. Perlmann // *Biochemical and Biophysical Acta.* – 1971. – V. 251. – P. 427 – 434.
220. Azemun, P. Rapid detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae* Antimicrobial Agents [Текст] / P. Azemun, T. Stull, M. Roberts, A.L. Smith // *Chemother.* – 1981. – V. 20. – P. 168 – 170.
221. Huo, X. Strategic Applications of Nanomaterials as Sensing Platforms and Signal Amplification Markers at Electrochemical Immunosensors. Review [Текст] / X. Huo, X. Liu, J. Liu, P. Sukumaran, S. Alwarappan, D.K.Y. Wong // *Electroanalysis.* – 2016. – V. 28. – P. 1 – 21.
222. Subash, C.B. Current aspects in immunosensors. Review [Текст] / C.B. Subash, T.-H. Tanga, M. Citartana, Y. Chen, T. Lakshmipriya // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2014. – V. 57. – P. 292 – 302.
223. Karunakaran, Ch. Chapter 4 Immunosensors Biosensors and Bioelectronics [Текст] / Ch. Karunakaran, M. Pandiaraj, P. Santharaman. – New York: Elsevier Inc. – 124 pp.
224. Kaspar Binz, H. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains [Текст] / H. Kaspar Binz, P. Amstutz, A. Plückthun // *Natural Biotechnology.* – 2005. – V. 23. – I. 10. – P. 1257 – 1268.
225. Renberg, B. Affibody molecules in protein capture microarrays: evaluation of multidomain ligands and different detection formats [Текст] / B. Renberg, J. Nordin, A. Merca, M. Uhlén, J. Feldwisch // *Journal of Proteome Resources.* – 2007. – V. 6. – P. 171 – 179.
226. Miao, Z. Protein scaffold-based molecular probes for cancer molecular imaging [Текст] / Z. Miao, J. Levi, Z. Cheng // *Amino Acids.* – 2010. – V. 1. – P. 9.
227. Binz, H.K. Engineered proteins as specific binding reagents [Текст] / H.K. Binz // *Current Opinion in Biotechnology.* – 2005. – V. 16. – P. 459 – 469.

228. Dillon, P.P. Immunoassay for the determination of morphine–3–glucuronide using a surface plasmon resonance–based biosensor [Текст] / P.P. Dillon, S.J. Daly, B.M. Manning, R. O’Kennedy // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2003. – V. 18. – P. 217 – 227.
229. Tsai, C.W. Strategy of Fc–recognizable peptide ligand design for oriented immobilization of antibody [Текст] / C.W. Tsai, S.L. Jheng, W.Y. Chen, R.C. Ruaan // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86. – I. 6. – P. 2931 – 2938.
230. Tang, J. Amplified impedimetric immunosensor based on instant catalyst for sensitive determination of ochratoxin A [Текст] / J. Tang, Y. Huang, C. Zhang, H. Liu, D. Tang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 86. – P. 386 – 392.
231. Liu, Y. Single Chain Fragment Variable Recombinant Antibody Functionalized Gold Nanoparticles for a Highly Sensitive Colorimetric Immunoassay [Текст] / Y. Liu, Y. Liu, R. L. Raymond, X. Zenga // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2009. – V. 24. – I. 9. – P. 2853 – 2857.
232. Hou, L. Graphene oxidelabeled sandwich–type impedimetric immunoassay with sensitive enhancement based on enzymatic 4–chloro–1–naphthol oxidation [Текст] / L. Hou, Y. Cui, M. Xu, Z. Gao, J. Huang, D. Tang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – V. 47. – P. 149 – 156.
233. Bahadır, E.B. A review on impedimetric biosensors [Текст] / E.B. Bahadır, M.K. Sezgintürk // *Nanomedicine and Biotechnology*. – 2014. – V. 2. – P. 1 – 15.
234. Akter, R. Femtomolar Detection of Cardiac Troponin I Using a Novel Label–free and Reagent–free Dendrimer Enhanced Impedimetric Immunosensor [Текст] / R. Akter, B. Jeong, Y.–M. Lee, J.–S. Choi, M.A. Rahman // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2017. – V. 91. – P. 637 – 643.
235. Orazem, M.E. Electrochemical impedance spectroscopy [Текст] / M.E. Orazem, B. Tribollett – Wiley: New York, 2008. – p.320.
236. Malvano, F. Impedimetric label–free immunosensor on disposable modified screen–printed electrodes for ochratoxin A [Текст] / F. Malvano, D. Albanese, A. Crescitelli, R. Pilloton, E. Esposito // *Biosensors*. – 2016. – 6. – 3. – P. 11 – 17.

237. Shen, M.Y. Silicon nanowire field-effect-transistor based biosensors: From sensitive to ultra-sensitive [Текст] / M.Y. Shen, B.R. Li, Y.K. Li // Biosensors and Bioelectronics. – 2014. – V. 60. – P. 101 – 111.

238. Lin, S.P. A reversible surface functionalized nanowire transistor to study protein-protein interactions [Текст] / S.P. Lin, C.Y. Pan, K.C. Tseng, M.C. Lin, C.D. Chen, C.C. Tsai, Y.T. Chen // Nano Today. – 2009. – V. 4. – I. 3. – P. 235 – 243.

239. Okamoto, S. Immunosensors based on graphene field-effect transistors fabricated using antigen-binding fragment [Текст] / S. Okamoto, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, K. Matsumoto // Japanese Journal of Applied Physics. – 2012. – V. 51. – I. 6.

240. Presnova, G. Biosensor based on a silicon nanowire field-effect transistor functionalized by gold nanoparticles for the highly sensitive determination of prostate specific antigen [Текст] / G. Presnova, D. Presnov, V. Krupenin, V. Grigorenko, A. Trifonov, I. Andreeva, M. Rubtsova // Biosensors and Bioelectronics. – 2017. – V. 88. – P. 283 – 289.

241. Su, W. Microfluidic platform towards point-of-care diagnostics in infectious diseases [Текст] / W. Su, X. Gao, L. Jiang, J. Qin // Journal of Chromatography A. – 2015. – V. 1377. – P. 13 – 26.

242. Eletxigerra, U. Disposable microfluidic immuno-biochip for rapid electrochemical detection of tumor necrosis factor alpha biomarker [Текст] / U. Eletxigerra, J. Martinez-Perdiguero, S. Merino // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2015. – V. 221. – P. 1406–1411.

243. Kallempudi, S.S. A new microfluidics system with a hand-operated, on-chip actuator for immunosensor applications [Текст] / S.S. Kallempudi, Z. Altintas, J.H. Niazi, Y. Gurbuz // Sensors and Actuators, B: Chemical. – 2012. – V. 163. – I. 1. – P. 194–201.

244. Tang, M. A review of biomedical centrifugal microfluidic platforms [Текст] / M. Tang, G. Wang, S.K. Kong, H.P. Ho // Micromachines. – 2016. – V. 7. – P. 2.

245. Kong, L.X. Lab-on-a-CD: A Fully Integrated Molecular Diagnostic System [Текст] / L.X. Kong, A. Perebikovskiy, J. Moebius, L. Kulinsky, M. Madou // Journal of Laboratory Automation. – 2015. – V. 11. – P. 56–61.

246. Gilmore, J. Challenges in the Use of Compact Disc–Based Centrifugal Microfluidics for Healthcare Diagnostics at the Extreme Point of Care [Текст] / J. Gilmore, M. Islam, R. Martinez–duarte // *Micromachines*. – 2016. – V. 7. – I. 4. – P. 52.
247. Tighe, P. J. ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls [Текст] / P. J. Tighe, R. R. Ryder, I. Todd, L. C. Fairclough // *PROTEOMICS – Clinical Applications*. – 2015. – V. 9. – Issue 3–4. – P. 406 – 422.
248. Yang, J. Development of blocking ELISA for detection of antibodies against H9N2 avian influenza viruses [Текст] / J. Yang, X. Dai, H. Chen, Q. Teng, X. Li, G. Rong, L. Yan, Q. Liu, Z. Li // *Journal of Virological Methods*. – 2016. – V. 229. – P. 40 – 47.
249. Tran, H.V. An electrochemical ELISA–like immunosensor for miRNAs detection based on screen–printed gold electrodes modified with reduced graphene oxide and carbon nanotubes [Текст] / H.V. Tran, B. Piro, S. Reisberg, N. Huy, L. D. Nguyen, T. Duc, H.T. Pham // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – V. 62. – I. 15. – P. 25 – 30.
250. Wu, H. Development of a label–free immunosensor system for detecting plasma cortisol levels in fish [Текст] / H. Wu, H. Ohnuki, K. Hibi, H. Ren, H. Endo // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 42. – P. 19 – 27.
251. Bahadira, E.B. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics [Текст] / E.B. Bahadira, M.K. Sezginür // *Talanta*. – 2015. – V. 132. – P. 162 – 174.
252. Ricci, F. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors [Текст] / F. Ricci, G. Adornetto, G. Palleschi // *Electrochimica Acta*. – 2012. – V. 84. – P. 74 – 83.
253. Ma, C. MultisHRP–DNA–coated CMWNTs as signal labels for an ultrasensitive hepatitis C virus core antigen electrochemical immunosensor / C. Ma, M. Liang, L. Wang, H. Xiang, Y. Jiang, Y. Li, G. Xie // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – V. 47. – P. 467 – 474.

254. Kokkinos, Ch. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies [Текст] / Ch. Kokkinos, A. Economou, M.I. Prodromidis // Trends in Analytical Chemistry. – 2015. – V. 5. – P. 1 – 18.
255. Rusling, J.F. Nanomaterials–based electrochemical immunosensors for proteins [Текст] / J.F. Rusling // Chemical Record. – 2012. – V. 12. – P. 164–176.
256. Wan, Y. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics [Текст] / Y. Wan, Y. Su, X. Zhu, G. Liu, C. Fan // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – V. 47. – P. 1 – 11.
257. Chikkaveeraiah, V. Electrochemical immunosensors for detection of cancer protein biomarkers [Текст] / V. Chikkaveeraiah, A.A. Bhirde, N.Y. Morgan, H.S. Eden, X. Chen // ACS Nano. – 2012. – V. 6. – P. 6546 – 6561.
258. Yang, H. Enzyme–based ultrasensitive electrochemical biosensors [Текст] / H. Yang // Current Opinion in Chemical Biology. – 2012. – V. 16. – P. 422 – 428.
259. Moschou, D. Amperometric IFN immunosensors with commercially fabricated PCB sensing electrodes [Текст] / D. Moschou, L. Greathead, P. Pantelidis, P. Kelleher, H. Morgan, T. Prodromakis // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – V. 86. – P. 805 – 810.
260. Ahn, J. Human alpha–fetal protein immunoassay using fluorescence suppression with fluorescent–bead/antibody conjugate and enzymatic reaction [Текст] / J. Ahn, Y.–B. Shin, J. Lee, M.–G .Kim // Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – V. 71. – P. 115 – 120
261. dos Santos Pires, A. C. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria [Текст] / A. C. dos Santos Pires, N. Ferreira Soares, L. H. M. da Silva, M. da Silva, M. Vieira De Almeida // Sensors and Actuators B. – 2011. – V.153. – P 17 – 23
262. Bixner, O. Controlled magnetosomes: Embedding of magnetic nanoparticles into membranes of monodisperse lipid vesicles [Текст] / O. Bixner, E. Reimhult // Journal of Colloid and Interface Science. – 2016. – V. 466. – P. 62 – 71

263. Reimhult, E. Nanoparticle–triggered release from lipid membrane vesicles [Текст] / E. Reimhult // *New Biotechnology*. – 2016. – V. 32. – I. 6. – P. 665 – 672
264. Leem, H. An Efficient Liposome–Based Immunochromatographic Strip Assay for the Sensitive Detection of *Salmonella Typhimurium* in Pure Culture [Текст] / H. Leem, S. Shukla, X. Song, S. Heu, M. Kim // *Journal of Food Safety*. – 2014. – V. 34. – I. 3. – P. 239 – 248
265. Hasanzadeh, M. Dendrimer–encapsulated and cored metal nanoparticles for electrochemical nanobiosensing [Текст] / M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. Eskandani, J. Soleymani, F. Jafari, M. de la Guardia // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 53. – P. 137 – 149
266. Mark, S.S. Dendrimer–functionalized self–assembled monolayers as a surface plasmon resonance sensor surface [Текст] / S.S. Mark, N. Sandhyarani, C. Zhu, C. Campagnolo, C.A. Batt // *Langmuir*. – 2004. – V. 20. – Issue 16. – P. 6808 – 6817
267. Zhu, H. Multiwalled carbon nanotubes incorporated with dendrimer encapsulated with Pt nanoparticles: An attractive material for sensitive biosensors [Текст] / H. Zhu, Y. Zhu, X. Yang, C. Li // *Chemistry Letters*. – 2006. – V. 35. – I. 3. – P. 326 – 327.
268. Ezzati, J. Nanomaterial–based electrochemical immunosensors as advanced diagnostic tools [Текст] / J. Ezzati N. Dolatabadi, M. de la Guardia // *Analytical Methods*. – 2014. – V. 6. – I. 12. – P. 3891 – 3900.
269. Lim, S.A. A highly sensitive gold nanoparticle bioprobe based electrochemical immunosensor using screen printed graphene biochip [Текст] / S.A. Lim, H. Yoshikawa, E. Tamiya, H.M. Yasin, M.U. Ahmed // *RSC Advertisement*. – 2014. – V. 4. – P. 58460 – 58466.
270. Xu, Q. Disposable electrochemical immunosensor by using carbon sphere/gold nanoparticle composites as labels for signal amplification [Текст] / Q. Xu, F. Yan, J. Lei, C. Leng, H. Ju // *Chemical European Journal*. – 2012. – 18. – 4994 – 4998.
271. Lin, D. Triple signal amplification of graphene film, polybead carried gold nanoparticles as tracing tag and silver deposition for ultrasensitive electrochemical

immunosensing [Текст] / D. Lin, J. Wu, M. Wang, F. Yan, H. Ju // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 54. – P. 3662 – 3668.

272. Qian, J. Simultaneous detection of dual proteins using quantum dots coated silica nanoparticles as labels [Текст] / J. Qian, H. Dai, X. Pan, S. Liu // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – V. 28. – P. 314 – 319.

273. Rosenthal, S.J. Biocompatible quantum dots for biological applications [Текст] / S.J. Rosenthal, J.C. Chang, O. Kovtun, J.R. McBride, I.D. Tomlinson // *Chemistry and Biology*. – 2011. – V. 18. – P. 10 – 24.

274. Algar, W.R. Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. Review. [Текст] / W.R. Algar, A.J. Tavares, U.J. Krull // *Analytica Chimica Acta*. – 2010. – V. 673. – P. 1 – 25.

275. Esteve–Turrillas, F.A. Nanomaterial-based electrochemical immunosensors as advanced diagnostic tools. Review [Текст] / F.A. Esteve–Turrillas, A. Abad–Fuentes // *The Royal Society of Chemistry*. – 2014. – V. 1. – P. 1 – 10.

276. Yan, P. Ultrasensitive detection of clenbuterol by quantum dots based electrochemiluminescent immunosensor using gold nanoparticles as substrate and electron transport accelerator [Текст] / P. Yan, Q. Tang, A. Deng, J. Li // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – V. 191. – P. 508 – 515.

277. Sharma, A. Relative efficiency of zinc sulfide (ZnS) quantum dots (QDs) based electrochemical and fluorescence immunoassay for the detection of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) [Текст] / A. Sharma, V. K. Rao, D. V. Kamboj, R. Gaur, S. Upadhyay, M. Shaik // *Biotechnology Reports*. – 2015. – V. 6. – P. 129 – 136.

278. Martín–Yerga, D. Electrochemical immunosensor for anti–tissue transglutaminase antibodies based on the in situ detection of quantum dots [Текст] / D. Martín–Yerga, M.B. Gonzalez–Garcia, A. Costa–Garcia // *Talanta*. – 2014. – V. 130. – P. 598 – 602.

279. Liu, G. Nanoparticle–based electrochemical immunosensor for the detection of phosphorylated acetylcholinesterase: an exposure biomarker of organophosphate

pesticides and nerve agents [Текст] / G. Liu, J. Wang, R. Barry, C. Petersen, C. Timchalk, P.L. Gassman // *Chemical European Journal*. – 2008. – V. 14. – P. 9951 – 9959.

280. Li, Y.L. Surface–biofunctionalized multicore/shell CdTe@SiO₂ composite particles for immunofluorescence assay [Текст] / Y.L. Li, X. Duan, L.H. Jing, C.H. Yang, R.R. Qiao, M.Y. Gao // *Biomaterials*. – 2011. – V. 32. – P 1923.

281. Kazemi, S.H. Porous graphene oxide nanostructure as an excellent scaffold for label–free electrochemical biosensor: Detection of cardiac troponin I [Текст] / S.H. Kazemi, E. Ghodsi, S. Abdollahi, S.Nadri // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – V. 69. – P. 447 – 452.

282. Santharaman, P. Label–free electrochemical immunosensor for the rapid and sensitive detection of the oxidative stress marker superoxide dismutase 1 at the point–of–care [Текст] / P. Santharaman, M. Das, S.K. Singh, N.K. Sethy, K. Bhargava, J.C. Claussen, C. Karunakaran // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. – 2016. – V. 236. – P. 546 – 553.

283. Zhang, H. A novel electrochemical immunosensor based on nonenzymatic Ag@Au–Fe₃O₄ nanoelectrocatalyst for protein biomarker detection [Текст] / H. Zhang, L. Ma, P. Li, J. Zheng // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 85. – P. 343 – 350.

284. Majer–Baranyi, K. Optical waveguide lightmode spectroscopy technique–based immunosensor development for aflatoxin B1 determination in spice paprika samples [Текст] / K. Majer–Baranyi, Z. Zalán, M. Mörtl, J. Juracsek, I. Szendro, A. Székács, N. Adányi // *Food Chemistry*. – 2016. – V. 211. – P. 972 – 977.

285. Zhang, Y. Label–free electrochemical immunosensor based on enhanced signal amplification between Au@Pd and CoFe₂O₄/graphene nanohybrid [Текст] / Y. Zhang, J. Li, Z. Wang, H. Ma, D. Wu, Q. Cheng, Q. Wei // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – P. 23391.

286. Mazloun–Ardakani, M. Label–free electrochemical immunosensor for detection of tumor necrosis factor based on fullerene–functionalized carbon nanotubes/ionic liquid [Текст] / M. Mazloun–Ardakani, L. Hosseinzadeh, A. Khoshroo // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2015. – V. 757. – P. 58 – 64.

287. Ma, H. A label-free electrochemiluminescence immunosensor based on EuPO₄ nanowire for the ultrasensitive detection of Prostate specific antigen [Текст] / H. Ma, J. Zhou, Y. Li, T. Han, Y. Zhang, L. Hu, Q. Wei // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 80. – P. 352 – 358.

288. Brainina, Kh.Z. Hybrid electrochemical magnetic assay for *Salmonella Typhimurium* detection [Текст] / Kh.Z. Brainina, A.N. Kozitsina, Y.A. Glazyrina // *IEEE Sensors journal*. – 2010. – V 10. – №11. – P. 1699 –1704.

289. Zhu, Q. Amperometric immunosensor for simultaneous detection of three analytes in one interface using dual functionalized graphene sheets integrated with redox probe sastracer matrixes [Текст] / Q. Zhu, Y. Chai, R. Yuan, Y. Zhuo, J. Han, Y. Li, N. Liao // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – V. 43. – P. 440 – 445.

290. Leng, C. Gold nanoparticle as an electrochemical label for inherently cross talk-free multiplexed immunoassay on a disposable chip [Текст] / C. Leng, G. Lai, F. Yan, H. Ju // *Analytica Chimica Acta*. – 2010. – V. 666. – P. 97 – 101.

291. Fu, Y. Novel polymeric bionanocomposites with catalytic Pt nanoparticles label immobilized for high performance amperometric immunoassay [Текст] / Y. Fu, P. Li, T. Wang, L. Bu, Q. Xie, X. Xu, L. Lei, C. Zou, J. Chen, S. Yao // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – V. 25. – P. 1699 – 1670.

292. Gan, N. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for HIV p24 based on Fe₃O₄@SiO₂ nanomagnetic probes and nanogold colloid-labeled enzyme-antibody copolymer as signal tag [Текст] / N. Gan, X. Du, Y. Cao, F. Hu, T. Li, Q. Jiang // *Materials*. – 2013. – V. 6. – P. 1255 – 1269.

293. Zhu, Q. A novel amperometric immunosensor constructed with gold-platinum nanoparticles and horseradish peroxidase nanoparticles as well as nickel hexacyanoferrates nanoparticles [Текст] / Q. Zhu, R. Yuan, Y. Chai, J. Han, Y. Li, N. Liao // *Analyst*. – 2013. – V. 138. – P. 620 – 626.

294. Li, Y. Electrodeposition of gold-platinum alloy nanoparticles on carbon nanotubes as electrochemical sensing interface for sensitive detection of tumor marker

[Текст] / Y. Li, R. Yuan, Y. Chai, Z. Song // *Electrochimica Acta*. – 2011. – V. 56. – P. 6715 – 6721

295. Wu, Y. A novel reagentless amperometric immunosensor based on gold nanoparticles/TMB/Nafion-modified electrode [Текст] / Y. Wu, J. Zheng, Li, Y. Zhao, Y. Zhang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2009. – V. 24. – P. 1389 – 1393.

296. Zhang, Y. A novel immunosensor based on an alternate strategy of electrodeposition and self-assembly [Текст] / Y. Zhang, H. Chen, X. Gao, Z. Chen, X. Lin // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2012. – V. 35. – P. 277 – 283.

297. Shi, W. A novel label-free amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen based on redox membrane [Текст] / W. Shi, Z. Ma // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – V. 26. – P. 3068 – 3071.

298. Hayat, A. Development of a novel label-free amperometric immunosensor for the detection of okadaic acid [Текст] / A. Hayat, L. Barthelmebs, A. Sassolas, J.-L. Marty // *Analytica Chimica Acta*. – 2012. – V. 724. – P. 92 – 97.

299. Linting, Z. An immunosensor for ultrasensitive detection of aflatoxin B1 with an enhanced electrochemical performance based on graphene/conducting polymer/gold nanoparticles/the ionic liquid composite film on modified gold electrode with electrodeposition [Текст] / Z. Linting, L. Ruiyi, L. Zaijun, X. Qianfang, F. Yinjun, L. Junkang // *Sensors and Actuators B*. – 2012. – V. 174. – P. 359 – 365.

300. Li, J. Electrochemical immunosensor based on graphene-polyaniline composites and carboxylated graphene oxide for estradiol detection [Текст] / J. Li, S. Liu, J. Yu, W. Lian, M. Cui, W. Xu, J. Huang // *Sensors and Actuators B*. – 2013. – V. 188. – P. 99 – 105.

301. He, S. One-step synthesis of potassium ferricyanide-doped polyaniline nanoparticles for label-free immunosensor [Текст] / S. He, Q. Wang, Y. Yu, Q. Shi, L. Zhang, Z. Chen // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V. 68. – P. 462 – 467.

302. Grieshaber, D. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures [Текст] / D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös // *Sensors*. – 2008. – V. 8. – P. 1400 – 1458.

303. Hasanzadeh, M. Iron and iron–oxide magnetic nanoparticles as signal–amplification elements in electrochemical biosensing [Текст] / M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia // Trends in Analytical Chemistry. – 2015. – V. 72. – P. 1 – 9.
304. Ding, H.L. Recent research progress on magnetic nanocomposites with silica shell structures: preparation and nanotheranostic applications [Текст] / H.L. Ding, Y.X. Zhang, G.H. Li // Nanotechnology. – 2014. – V. 8. – I. 2. – P. 117 – 128.
305. Felton, C. Magnetic nanoparticles as contrast agents in biomedical imaging: recent advances in iron– and manganese–based magnetic nanoparticles [Текст] / C. Felton, A. Karmakar, Y. Gartia, P. Ramidi, A.S. Biris, A. Ghosh // Drug Metabolites Review. – 2014. – V. 46. –I. 2. – P. 142 – 154.
306. Key, J. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine [Текст] / J. Key, J.F. Leary // International Journal of Nanomedicine. – 2014. – V. 9. – P. 711 – 726.
307. Hsing, I.M. Micro– and nano– magnetic particles for applications in biosensing [Текст] / I.M. Hsing, Y. Xu, W. Zhao // Electroanalysis. – 2007. – V. 19. – P. 755 – 768.
308. Emami, M. An electrochemical immunosensor for detection of a breast cancer biomarker based on antiHER2–iron oxide nanoparticle bioconjugates [Текст] / M. Emami, M. Shamsipur, R. Saber, R. Irajirad // Analyst. – 2014. – V. 139. – I. 11. – P. 2858 – 2866.
309. Freitas, M. Iron oxide/gold core/shell nanomagnetic probes and CdS biolabels for amplified electrochemical immunosensing of *Salmonella typhimurium* [Текст] / M. Freitas, S. Viswanathan, H.P. Nouws, M.B. Oliveira, C. Delerue–Matos // Biosensors and Bioelectronics. – 2014. – V. 51. – P. 195 – 200.
310. Kozitsina, A. A New Enzyme – Free Electrochemical Immunoassay for Escherichia coli Detection using Magnetic Nanoparticles [Текст] / A. Kozitsina, T. Svalova, N. Malysheva, Y. Glazyrina, A. Matern // Analytical Letters. – 2016. – V. 49. – I. 2. – P. 245 – 257.

311. Малышева, Н.Н. Бесферментный электрохимический метод определения антигена вируса кори с использованием синтезированных конъюгатов IgG – (Fe₃O₄– SiO₂) в качестве сигналообразующей метки [Текст] / Н.Н. Малышева, Ю.А. Глазырина, В.О. Ждановских, Т.С. Свалова, А.И. Матерн, А.Н. Козицина // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2014. – № 7. – С. 1633 – 1638.

312. Ahmad, T. Magnetic and electrochemical properties of nickel oxide nanoparticles obtained by the reverse–micellar route [Текст] / T. Ahmad, K.V. Ramanujachary, S.E. Lofland, A.K. Ganguli // Solid State Science. – 2006. – V. 8. – P. 425–430.

313. Wu, Zh. Cerium oxide nanoparticles coated by surfactant sodium bis(2–ethylhexyl) sulposuccinate (AOT): local atomic structures and X–ray absorption spectroscopic studies [Текст] / Zh. Wu, R.E. Benfield, L. Guo, H. Li, Q. Yang, D. Grandjean, Q. Li, H. Zhu // Journal of Physics: Condensated Matters. – 2001. – V. 13. – P. 5269–5283.

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

315. Kelly, K.L. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape and dielectric environment [Текст] / K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz // J.Phys. Chem. B. – 2003. – V. 107. – I. 3. – P. 668 – 677.

316. Haiss, W. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra [Текст] / W. Haiss, N.T. K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig // Anal. Chem. – 2007. – V. 79. – P. 4215 – 4221.

317. 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. – 2017. – P. 656 – 664.

318. Okhokhonin, A.V. Enzymeless determination of cholesterol using gold and silver nanoparticles as electrocatalysts [Текст] / A.V. Okhokhonin, S.Y. Saraeva, A.I.

Matern, A.N. Kozitsina // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2017. – V. 72. – I. 4. – P. 354–361.

319. Song, L. A novel biosensor based on Au@Ag core–shell nanoparticles for SERS detection of arsenic (III) [Текст] / L. Song, K. Mao, X. Zhou, J. Hu // *Talanta*. – 2016. – V. 146. – P 285 – 290.

320. Ko, F.-H. Au–Ag core–shell nanoparticles with controllable shell thicknesses for the detection of adenosine by surface enhanced Raman scattering [Текст] / F.-H. Ko, M.R. Tai, Fu.K. Liu, Y.Ch. Chang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2015. – V. 211. – P. 283 – 289.

321. Magnetofluids and their manufacture / S.E. Khalafalla, G.W. Reimers // U.S. Patent 3,764,540, 1973.

322. Production of magnetic fluids by peptization techniques / S.E. Khalafalla, G.W.Reimers // U.S. Patent 3,843,540, 1974.

323. Nab, T.K. Some magnetic properties of magnetite (Fe_3O_4) microcrystals [Текст] / T.K. Nab, R.A. Fox, J.F. Boyle // *Journal of Applied Physics*. – 1968. – V. 39. – I. 12. – P. 5703–5711.

324. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acid media [Текст] / R. Massart // *IEEE Trans Magn MAG*. – 1981. – V. 17. – I. 2. – P. 1247–1248.

325. Сумм, Б.Д. Объекты и методы коллоидной химии в нанохимии [Текст] / Б.Д. Сумм, Н.И. Иванова // *Успехи химии*. – 2000. – Т. 69. – № 11. – С. 995–1007.

326. Зимон, А.Д. Особенности коллоидно–химических свойств наночастиц [Текст] / А.Д. Зимон, А.В. Вегера, А.Н. Павлов // *Труды XII Междунар. научной конф.* – М.: МГУТУ, 2006. – Т. 3. – С. 132 – 136.

327. Зимон, А.Д. Коллоидная химия [Текст]. – М.: Агар, 2003. – 320 с.

328. Feng, Y. Preparation of Fe_3O_4 /polystyrene composite particles from monolayer oleic acid modified Fe_3O_4 nanoparticles via miniemulsion polymerization [Текст] / Y. Feng, J. Li, J. Zhang, F. Liu, W. Yang // *Journal Nanoparticle Research*. – 2009. – V. 11. – P. 289 - 296.

329. Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К. Определение строения органических соединений. М.: Мир. – 2006. – 439 с.
330. Vishnuvardhan, T. K. Synthesis, characterization and a.c. conductivity of polypyrrole/ Y_2O_3 composites [Текст] / K. Vishnuvardhan, V.R. Kulkarni, C. Basavaraja, S.C. Raghavendra // *Bulletin Material Science*. – 2006. – V. 29. – P.77 – 83.
331. 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.
332. Sammakia, T. Highly diastereoselective ortho lithiations of chiral oxazoline substituted ferrocenes [Текст] / T. Sammakia, H. A. Latham, D. R. Schaad // *Journal of organic chemistry*. – 1995. – Vol. 60. – P.10.
333. Delacote, C. Voltammetric response of ferrocene–grafted mesoporous silica [Текст] / C. Delacote, J.–P. Bouillon, A. Walcarius // *Electrochimica acta*. – 2006. – V. 51. – P. 6373–638.
334. Ma, F. K. Preparation and hydrolytic erosion of differently structured PLGA nanoparticles with chitosan modification [Текст] / F. K. Ma, J. Li, M. Kong, Y. Liu, Y. An, X. G. Chen // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – V. 54. – P. 174–179.
335. Kozitsina, A. Determination of *Staphylococcus aureus* B-1266 by an Enzyme-Free Electrochemical Immunosensor Incorporating Magnetite Nanoparticles [Текст] / A. Kozitsina, T. Svalova, N. Malysheva, Y. Glazyrina, A. Matern, V. Rusinov // *Analytical Letters*. – 2017. – V. 50. – Is. 6. – P. 924 – 935.
336. Vasconcelos, I. Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices [Текст] / I. Vasconcelos, C. Fernandes // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2017. – V. 89. – P. 41 – 52.
337. Kozitsina, A.N. Determination of urea and creatinine by chronoamperometry [Текст] / A.N. Kozitsina, S.S. Dedeneva, Zh.V. Shalygina, A.V. Okhokhonin, D.L. Chizhov, A.I. Matern, Kh.Z. Brainina // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 69. – I. 8. – P. 758 – 762.

338. Lei, Z. A facile two-step modifying process for preparation of poly(SStNa)-grafted $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ particles [Текст] / Z. Lei; Y. Li; X. Wei // Journal of solid state chemistry. – 2008. – V. 181. – P. 480 – 486.
339. Liu, Z.-M. Core-shell magnetic nanoparticles applied for immobilization of antibody on carbon past electrode and amperometric immunosensing [Текст] / Z.-M. Liu, H.-F. Yang, Y.-F. Liu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu // Sensors and actuators B: Chemical. – 2006. – V. 113. – P. 956.
340. Под ред. Э.Г. Улумбекова. Большой энциклопедический словарь медицинских терминов. Изд-во «ГЕОТАР – Медиа». – 2012. – 2263 с.
341. Теория и практика иммуноферментного анализа [Текст] / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилов – М.: Высшая школа. – 1991. – 288 с.
342. Brainina, K.Z. Screen-printed enzyme-free electrochemical sensors for clinical and food analysis (Review) [Текст] / K.Z. Brainina, A.N. Kositzina, A.V. Ivanova // Comprehensive Analytical Chemistry ch. coll: Electrochemical sensor analysis. – 2007. – V. 49. – P. 643 – 666.
343. Madigan, M. T. Brock Biology of Microorganisms [Текст] / M. T. Madigan // Lippincott Williams & Wilkins. – 2004. – 352 P.
344. Шейнкман, А.К. N-ацильные соли пиридиния и его бензоаналогов [Текст] / А.К. Шейнкман, С.И. Суминова, А.Н. Кост // Успехи химии. – 1973. – Т.42. – С.1415–1450.
345. Kumar, A. M. Electrochemical and in vitro bioactivity of polypyrrole/ceramic nanocomposite coatings on 316L SS bio-implants [Текст] / A. M. Kumar, S. Nagarajan, S. Ramakrishna, P. Sudhagar, Y. S. Kang, H. Kim, Z. M. Gasem, N. Rajendran // Materials science and engineering: C. – 2014. – V. 43. – P. 76–85.
346. Ramanavicius, A. Electrochemical formation of polypyrrole-based layer for immunosensor design [Текст] / A. Ramanavicius, Y. Oztekin, A. Ramanaviciene // Sensors and actuators B: Chemical. – 2014. – V. 197. – P. 237–243.

347. Захаров, М.С. Хронопотенциометрия (Методы аналитической химии) [Текст] / М.С. Захаров, В.И. Баканов, В.В. Пнев – М: Химия, 1978. –200 с.
348. Jego–Evanno, P. Electrooxidation of substituted ferrocenes: indirect oxidation of the side chain [Текст] / P. Jego–Evanno, J.P. Hurvois., C. Moinet // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2001. –V. 507. – I. 1–2. – P. 270 – 274.
349. Razal, J. M. Wet–spun biodegradable fibres on conducting platforms: novel architectures for muscle regeneration [Текст] / J. M. Razal, M. Kita, A. F. Quigley, E. Kennedy, S. E. Moulton, R. M. I. Kapsa, G. M. Clark, G. G. Wallace // Advanced functional materials. – 2009. – V. 19. – P. 3381 – 3388.
350. ГОСТ 31862–2012. Межгосударственный стандарт. Вода питьевая. Отбор проб. – Введ. 2014–01–01. –М.: Стандартиформ, 2013. – 12 с.
351. Kozitsina, A.N. Study of electrochemical behavior of the Fe₃O₄ nanoparticles in aprotic media [Текст] / A.N. Kozitsina, T.S. Svalova, Yu.A. Glazyrina, A.V. Ivanova, A.I. Matern // Russian Chemical Bulletin. – 2016. – V. 65. – I. 3. – P. 697 – 703.
352. Брайнина, Х.З. Инверсионная вольтамперометрия твёрдых фаз [Текст] / Х. З. Брайнина // М. : Химия, 1972. – 192 с.
353. Карапетьянц, М. Х. Общая и неорганическая химия [Текст] /М. Х. Карапетьянц, С. И. Дракин // М. : Химия, 2000. – 386 с
354. Casellato, U. Effect of Li ions on reduction of Fe oxides in aqueous alkaline medium [Текст] / U. Casellato, N. Comisso, G. Mengoli // Electrochimica Acta. – 2006. – V. 51. – P. 5669–5681.
355. Осетрова Н.В. Анодное окисление мочевины в нейтральных растворах [Текст] / Н.В.Осетрова, А.М. Скундин // Электрохимия. – 1994. – Т. 30. – № 10. – С. 1257–1259.
356. Kozitsina, A.N. Catalytic systems based on the organic nickel(ii) complexes in chronoamperometric determination of urea and creatinine [Текст] / A.N. Kozitsina, Zh.V. Shalygina, S.S. Dedeneva, G.L. Rusinov, S.G. Tolshchina, E.V. Verbitskiy, Kh.Z. Brainina // Russian Chemical Bulletin. – 2009. – V. 58. – I. 6. – P. 1119–1125.

357. Kozitsina, A.N. Determination of urea and creatinine by chronoamperometry [Текст] / A.N. Kozitsina, S.S. Dedeneva, Zh.V. Shalygina, A.V. Okhokhonin, D.L. Chizhov, A.I. Matern, Kh.Z. Brainina // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 69. – I. 8. – P. 758–1762.

358. Dervisevic, M. Design of amperometric urea biosensor based on self-assembled monolayer of cystamine/PAMAM-grafted MWCNT/Urease [Текст] / M. Dervisevic, E. Dervisevic, M. Şenel // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – V. 254. – P. 93–101.

359. Pandey, A.K. Synthesis and characterization of dendritic polypyrrole silver nanocomposite and its application as a new urea biosensor [Текст] / P.C. Pandey, N.R. Agrawal, I. Das // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2018. – V. 135. – I. 3. – P. 45–705.

360. Долгов, В. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей [Текст] / В. Долгов, В.Морозова, Р. Марцишевская и др. – М.: Лабинформ, Центр. – 1995. – 214 с.

361. Raveendran, J. Fabrication of a disposable non-enzymatic electrochemical creatinine sensor [Текст] / J. Raveendran, P.E. Resmi, T. Ramachandran, B.G. Nair, T.G. Satheesh // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. – 2017. – V. 243. – P. 589 – 595.

362. Hooshmand, S. Microfabricated disposable nanosensor based on CdSe quantum dot/ionic liquid-mediated hollow fiber-pencil graphite electrode for simultaneous electrochemical quantification of uric acid and creatinine in human samples [Текст] / S. Hooshmand, Z. Es'haghi // *Analytica Chimica Acta*. – 2017. – V. 972. – P. 28 – 37.

363. McPherson, R.A. Henry's clinical diagnosis and management [Текст] / R.A. McPherson, M.R. Pincus – Elsevier Inc. – 2011. – 1515 p.

364. Okhokhonin, A.V. Enzymeless determination of cholesterol using gold and silver nanoparticles as electrocatalysts [Текст] / A.V. Okhokhonin, S.Y. Saraeva, A.I. Matern, A.N. Kozitsina // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2017. – V. 72. – I. 4. – P. 354 – 361.

365. Liebermann, C. Ueber das Oxychinoterpen [Текст] / C. Liebermann // Deutsche Chemische Gesellschaft. – 1885. – V. 18. – P. 1803–1809.
366. 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.
367. Baghayeri, M. Investigation about electrocatalytic oxidation of glucose on loaded Ag nanoparticles on functionalized carbon nanotubes [Текст] / M. Baghayeri, A. Amiri, A. Motamedifar. – 2016. – V. 22. – P. 1709–1717.
368. Scholz, F. Electroanalytical methods: guide to experiments and applications [Текст] / F. Scholz, A.M. Bond. – Berlin, New York: Springer, 2002. – P. 331.
369. Дамаскин, Б.Б. Электрохимия [Текст] / Б.Б. Дамаскин, О.А. Петрий, Г. Цирлина. – Москва: Химия, КолосС, 2006. – 672 с.
370. 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.
371. 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.
372. Levy, A. One-pot anodic thiocyanation and isothiocyanation of alkenes [Текст] / A. Levy, J.Y. Becker // Electrochimica Acta. – 2015. – V. 178. – P. 294 – 302.
373. 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.
374. 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.

375. Bard, A.J. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. [Текст] / A.J. Bard, L.R. Faulkner. – New York: Wiley, 2001. – P. 833.
376. Morzycki, J.W. *Electrochemical oxidation of cholesterol* [Текст] / J.W. Morzycki, A. Sobkowiak // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2015. – V. 11. – P. 392 – 402.
377. Галюс, З. *Теоретические основы электрохимического анализа* [Текст] / З. Галюс. – М.: Издательство "Мир", 1974. – 552 с.
378. 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.
379. 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.
380. Sampson, N.S. *Assessment of the role of an 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.
381. Tsai, Y.-C. *Amperometric cholesterol biosensors based on carbon nanotube–chitosan–platinum–cholesterol oxidase nanobiocomposite* [Текст] / Y.-C. Tsai, S.-Y. Chen, C.-A. Lee // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2008. – V. 135. – P. 96 – 101.
382. Martín, M. *Cholesterol biosensing with a polydopamine-modified nanostructured platinum electrode prepared by oblique angle physical vacuum deposition* [Текст] / M.Martín, P. Salazar, R. Álvarez, A. Palmero, C. López-Santos, J. González-Mora, // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. – V. 240. – P. 37–45.
383. Liquick Cor-CHOL *Диагностический набор для определения концентрации полного холестерина* // Брошюра. 2012. 2 с.
384. Kozitsina, A. *Electroanalysis in the Evaluation of Nanoparticle Toxicity* [Текст] // A. Kozitsina, E. Pomorceva, Y. Suntsova, J. Beykin, Y. Lagereva, L. Tulakina, A. Matern and Kh. / *Brainina Anal. Bioanal. Electrochem*. – 2013. - V. 5. – P. 647 – 664.

385. Сунцова Ю.А. Электрохимический метод определения концентрации наночастиц серебра и золота в живых клетках [Текст] // Сунцова Ю.А., Поморцева Е.Л., Малахова Н.А., Матерн А.И., Козицина А.Н. / Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2012. – Т.154. – кн. 3.– С.105 – 115.

386. Zakharchuk, N.F. The Determination of gold trace by stripping voltammetry employing graphite electrodes [Текст] // N.F. Zakharchuk, G.S. Bikhmatova, I.G. Yudelevich / Zavod. Lab. – 1971. – P. 531 – 533.

387. Семенова, И.В. Профиль цитокинов у мышей на фоне усиления или угнетения гуморального ответа к эритроцитам барана, индуцированного иммуномодулятором бактериального происхождения–анатоксином стафилококковым очищенным [Текст] // И.В. Семенова, Н.К. Ахматова, Е.А. Курбатова / Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 4. – С.69 – 72.

388. Кацнельсон, Б.А. Экспериментальные данные к оценке пульмонотоксичности и резорбтивной токсичности частиц магнетита (Fe_3O_4) нано- и микрометрового диапазонов [Текст] // Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, С.В.Кузьмин, Т.Д. Дегтярёва, М.П. Сутункова, М.Я. Ходос, А.Н. Козицина / Токсикологический вестник. – 2010. – № 2. – P. 17 - 24.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Акт испытаний электрохимического способа иммуноанализа

УТВЕРЖДАЮ
 Генеральный директор ФГУН ГНЦ ВБ
 «Вектор» Роспотребнадзора,
 д.м.н., профессор
 _____ И.Г. Дроздов
 18 августа 2008 г.

АКТ

испытаний электрохимического способа иммуноанализа для определения патогенных микроорганизмов

В период с 10 августа по 16 августа 2008 г. в лаборатории фило- и аренавирусных инфекций Федерального государственного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) проведены сравнительные испытания электрохимического способа определения патогенных микроорганизмов, детекции микроорганизма методом ПЦР и методом посева на твердые питательные среды. Испытания проведены с использованием модели, имитирующей испражнения животных, инфицированных микроорганизмом *Salmonella thyphmurium* штамм SL 7207. Вариант электрохимического способа определения патогенных микроорганизмов разработан сотрудниками Научно-инновационного центра Уральского государственного экономического университета (НИЦ СТ УрГЭУ) и Общества с ограниченной ответственностью Научно-производственное и внедренческое предприятие «ИВА» (ООО НПВП «ИВА»).

Краткая характеристика электрохимического способа определения патогенных микроорганизмов.

Электрохимический способ иммуноанализа заключается в получении конъюгатов микроорганизмов с магнетиком в анализируемой среде с последующим концентрированием конъюгатов и дальнейшего определения концентрации и наличия микроорганизмов с помощью диагностирующей метки. В качестве магнетика и одновременно диагностической метки используются наночастицы Fe_3O_4 . Перед концентрированием меченных конъюгатов из анализируемой среды выводят не связавшиеся с микроорганизмами наночастицы. Концентрирование меченого конъюгата осуществляют путем формирования на твердом, химически инертном носителе иммунокомплекса: меченный магнитной меткой микроорганизм – антитело, с последующим изъятием иммунокомплекса из среды на носителе. Определение наличия и концентрации микроорганизмов осуществляют по величине сигнала, генерируемого ионами металла после принудительного химического растворения иммунокомплексов.

Испытания проводились в лабораторных условиях по следующей схеме: 10 проб (испражнения животных инфицированных *Salmonella thyphmurium* штамм SL 7207) суспензировали в 3 мл фосфатного буферного раствора и делили на 3 равные части, в каждой из которых определяли концентрацию микроорганизма одним из 3-х методов: бактериальный посев, метод ПЦР, электрохимический метод.

В результате проведенных испытаний установлено:

- 1) совпадение результатов исследований наличия в пробах сальмонеллы тремя методами в 90 % измерений, что статистически соответствует полному совпадению;
- 2) отклонение результатов, полученных электрохимическим способом иммуноанализа, от результатов, полученных методами ПЦР и посева на твердые питательные среды не превышает 6,67%;
- 3) электрохимический способ иммуноанализа позволяет определять содержание микроорганизмов в диапазоне концентраций $10^2 - 10^7$ КОЕ/мл;
- 4) время, затраченное на получение результата, составляет 2 ч для электрохимического метода, 4 ч - для метода ПЦР, и 5 сут - для определения концентрации микроорганизма методом бактериального посева.

Заключение.

Электрохимический способ иммуноанализа отличается:

- 1) хорошим совпадением полученных результатов с общепризнанными методами диагностирования патогенных микроорганизмов (методом бактериального посева и методом ПЦР);
- 2) экспрессностью (время анализа пробы составляет 2 часа);
- 3) имеет преимущество перед методом ПЦР в экономической составляющей (меньшая стоимость оборудования и расходных материалов);
- 4) более высокой чувствительностью по сравнению с методом бактериального посева;
- 5) электрохимический способ иммуноанализа может использоваться для экспресс-диагностики патогенных микроорганизмов.

Электрохимический способ определения микроорганизма после адаптации для других видов бактерий и проведения расширенных испытаний на этих видах бактерий может быть рекомендован для использования в лечебно-профилактических учреждениях для выявления микроорганизмов в клинических образцах и образцах внешней среды.

Председатель комиссии, зав. лабораторией
фило- и аренавирусных инфекций, к.б.н.
(ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

 А.П. Агафонов

Члены комиссии:

1. м.н.с.. лаборатории фило- и аренавирусных
инфекций (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

 О.К. Демина

2. м.н.с.. лаборатории фило- и аренавирусных
инфекций (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

 А.Н. Шиков

3. аспирант Глазырина Ю.А. (УрГЭУ)

 Ю.А. Глазырина



ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Акт испытаний электрохимического иммуносенсора

УТВЕРЖДАЮ:

И.А. генерального директора
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»



В. Н. Михеев
" января 2016 г.

АКТ

испытаний электрохимического иммуносенсора с прямой детекцией аналитического сигнала на основе наночастиц магнетита

В период с 21 июля по 21 августа 2014 года и с 25 января по 29 января 2016 года в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» были проведены сравнительные испытания аналитических возможностей электрохимического иммуносенсора с прямой детекцией аналитического сигнала на основе наночастиц магнетита, разработанного коллективом кафедры аналитической химии химико-технологического института Уральского Федерального Университета (авторы: А.Н. Козицина, Т.С. Свалова, А.И. Матерн). В качестве референсных методов использовали метод иммуноферментного анализа (ИФА) и метод бактериального посева с подсчетом колоний.

Принцип работы электрохимического иммуносенсора

Электрохимический иммуносенсор позволяет регистрировать прямой электрохимический отклик от наночастиц магнетита, включенных в иммунокомплекс «меченая наночастицами бактерия – антитело» на поверхности планарного платинового электрода. Иммунокомплекс на поверхности электрода образуется в результате проведения ряда последовательных стадий: инкубирование бактерий с избытком наночастиц Fe_3O_4 , магнитное отделение несвязавшихся наночастиц, проведение иммунореакции между антителами против целевой бактерии (предварительно иммобилизованными на рабочую область электрода) и мечеными бактериями из анализируемой среды.

В качестве целевой бактерии были использованы *Escherichia coli* (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* (B-1266). Испытания проводили с использованием модельных моно- и бикомпонентных суспензий бактерий, а также проб воды и воздуха, отобранных из природных источников. Каждую исследуемую пробу делили на 3 равные части и параллельно проводили независимый анализ тремя методами: с использованием разработанного электрохимического иммуносенсора, методом бактериального посева с подсчетом колоний и методом ИФА.

В результате проведенных испытаний установлено:

1. Различия результатов определения содержания в пробах бактерий *Escherichia coli* (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* (B-1266) находятся в пределах статистически допустимых значений (совпадение более 90%).

2. Разработанный электрохимический иммуносенсор с прямой детекцией аналитического сигнала позволяет определять бактерии *Escherichia coli* (АТСС 25922) в диапазоне $10-10^5$ КОЕ/мл (СКО не более 10%) и бактерии *Staphylococcus aureus* (В-1266) в диапазоне $10-10^4$ КОЕ/мл (СКО не более 8 %).
3. Предел обнаружения разработанного электрохимического иммуносенсора с прямой детекцией аналитического сигнала составляет 9,3 КОЕ/мл в случае обнаружения бактерий *Escherichia coli* и 8,7 КОЕ/мл в случае обнаружения в пробе бактерий *Staphylococcus aureus* (В-1266).

Заключение

Электрохимический иммуносенсор с прямой детекцией аналитического сигнала на основе наночастиц магнетита имеет следующие характеристики:

1. Экспрессность: время анализа не превышает 1 часа (инструментальный ИФА – 2-3 часа, метод бактериального посева 2-3 суток).
2. Низкая стоимость анализа (в 2-3 раза ниже по сравнению с ИФА и бактериальным посевом).
3. Высокая чувствительность (на уровне ИФА и в 100 раз выше чувствительности метода бактериального посева).
4. Высокая воспроизводимость и точность определения (величина СКО не превышает 10 %; совпадение при проведении сравнительных испытаний более 90 %).

Таким образом, разработанный электрохимический иммуносенсор с прямой детекцией аналитического сигнала на основе наночастиц магнетита может быть рекомендован к использованию в качестве устройства для экспресс-диагностики бактерий *Escherichia coli* (АТСС 25922) и *Staphylococcus aureus* (В-1266) в лабораториях лечебно-профилактических учреждений и аналитических лабораториях по контролю качества объектов окружающей среды.

Зав. отделом биофизики и экологических исследований
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», д.т.н.

 Сафатов А.С.

Зав. лабораторией микробиологии окружающей среды
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», к.б.н.

 Андреева И.С.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3 Акт использования результатов исследовательской деятельности

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

д.м.н. _____ В.Б.Гурвич



АКТ

об использовании результатов исследовательской работы
Козициной Алисы Николаевны

Комиссия в составе:

- Кацнельсон Борис Александрович – руководитель отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, проф., д.м.н., Заслуженный деятель науки РФ, председатель комиссии;
- Широкова Ольга Валентиновна – ученый секретарь ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, к.м.н., член комиссии;
- Привалова Лариса Ивановна – зав. лабораторией научных основ биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, проф., д.м.н., член комиссии

настоящим актом подтверждает, что следующие результаты научно-исследовательской работы Козициной А.Н.

- 1) технологии получения nano- и микрочастиц магнетита (Fe_3O_4) требуемых размеров;
- 2) технологии подготовки стабильных суспензий, содержащих nano- и микрочастицы магнетита, для проведения токсикологических экспериментов;
- 3) методики определения содержания nano- и микрочастиц Fe_3O_4 в биологических объектах, -

использованы Отделом токсикологии и биологической профилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора при выполнении Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008 – 2010 годы» для разработки критериев оценки риска для здоровья, связанного с nano-магнетитовой экспозицией, и предложений по установлению норматива допустимого содержания наночастиц nanoмагнетита в воздухе рабочей зоны

Председатель комиссии

 _____ Б.А. Кацнельсон

Член комиссии

 _____ О.В. Широкова

Член комиссии

 _____ Л.И. Привалова