



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 27/00 (2019.05); G01N 27/26 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2017144957, 20.12.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.12.2017

Дата регистрации:
09.09.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.12.2017

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2019 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: 09.09.2019 Бюл. № 25

Адрес для переписки:

620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, УРФУ,
Центр интеллектуальной собственности,
Маркс Т.В.

(72) Автор(ы):

Охохонин Андрей Викторович (RU),
Козицина Алиса Николаевна (RU),
Мальшева Наталья Николаевна (RU),
Русинов Владимир Леонидович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Уральский федеральный
университет имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина" (УрФУ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: H.S.H. Matsumoto et al. Detection of
Skin Cholesterol by a Molecularly Imprinted
Electrode / J. Flow Injection Anal., 2008, vol. 25,
N 1, pages 81-84. Т.Н.Ермолаева и др. Микро-
и наночастицы полимеров с молекулярными
отпечатками - синтез, характеристика и
применение в пьезокварцевых сенсорах /
Сорбционные и хроматографические
процессы, 2015, т. (см. прод.)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области электрохимических методов анализа, в частности к определению содержания свободного холестерина в образце сыворотки или плазмы крови с использованием платинового электрода и растворенного в апротонном растворителе катализатора электрохимического окисления холестерина. Способ определения холестерина в плазме или сыворотке крови включает инкубацию наночастиц, покрытых полимерами с молекулярными отпечатками (ПМО) холестерина, с исследуемой пробой, селективную

сорбцию холестерина на ПМО, десорбцию холестерина из ПМО в органический апротонный растворитель, электрохимическое окисление холестерина с использованием электрокатализатора на поверхности электрода и измерение тока окисления катализатора при наложении на рабочий электрод потенциала в отсутствие и в присутствии холестерина, при этом в качестве электрокатализатора используют хлорид кобальта (II), или хлорид никеля (II), или тиоцианат калия, растворенный в ацетонитриле или диметилформамиде. 4 з.п. ф-лы, 3 пр., 3 ил.

(56) (продолжение):

15, вып. 3, стр. 345-365. Y.Tong et al. Electrochemical cholesterol sensor based on carbon nanotube@molecularly imprinted polymer modified ceramic carbon electrode / Biosens Bioelectron, 2013 Sep 15, 47, pages 553-558.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 27/00 (2019.05); G01N 27/26 (2019.05)(21)(22) Application: **2017144957, 20.12.2017**(24) Effective date for property rights:
20.12.2017Registration date:
09.09.2019

Priority:

(22) Date of filing: **20.12.2017**(43) Application published: **20.06.2019** Bull. № 17(45) Date of publication: **09.09.2019** Bull. № 25

Mail address:

**620002, g. Ekaterinburg, ul. Mira, 19, URFU,
Tsentr intellektualnoj sobstvennosti, Marks T.V.**

(72) Inventor(s):

**Okhokhonin Andrej Viktorovich (RU),
Kozitsina Alisa Nikolaevna (RU),
Malysheva Natalya Nikolaevna (RU),
Rusinov Vladimir Leonidovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Uralskij federalnyj universitet
imeni pervogo Prezidenta Rossii B.N. Eltsina"
(UrFU) (RU)**(54) **METHOD FOR DETERMINING CHOLESTEROL**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method for determining blood plasma or blood serum cholesterol involves incubation of nanoparticles coated with polymers with molecular imprint (PMI) of cholesterol, with analysed sample, selective sorption of cholesterol on PMI, desorption of cholesterol from PMI into an organic aprotic solvent, electrochemical oxidation of cholesterol using an electrocatalyst on the surface of the electrode and measurement of oxidation current of catalyst when applied on working electrode potential in absence and

presence of cholesterol, wherein the electrocatalyst used is cobalt (II) chloride or nickel (II) chloride, or potassium thiocyanate, dissolved in acetonitrile or dimethyl formamide.

EFFECT: invention relates to electrochemical analysis methods, in particular to determination of free cholesterol content in a serum sample or blood plasma using a platinum electrode and a catalyst dissolved in an aprotic solvent electrochemical oxidation of cholesterol.

5 cl, 3 ex, 3 dwg

Изобретение относится к области электрохимических методов анализа, в частности к определению содержания свободного холестерина в образце сыворотки или плазмы крови с использованием платинового электрода и растворенного в апротонном растворителе катализатора электрохимического окисления холестерина. Изобретение
5 может быть использовано в медицине, в частности при диагностике заболеваний сердца, сосудов, почек, печени и обмена веществ.

Недостатками используемых в настоящее время методов определения холестерина являются: низкая надежность и стабильность ферментов и их высокая стоимость (ферментативные методы), высокая погрешность в определении цвета окрашенного
10 комплекса (калориметрические методы), высокие требования к квалификации персонала и высокая стоимость соответствующего оборудования (ВЭЖХ и МС).

Известен способ определения холестерина, при котором используют растворенный в диметилформамиде бромид калия, выступающий в качестве электрокатализатора, и платиновый дисковый рабочий электрод. В результате наложения на рабочий электрод
15 потенциала в приэлектродном пространстве протекает электрохимическая реакция окисления бромида калия с образованием химически активного иона Br^+ , который окисляет растворенный холестерин. Концентрацию холестерина определяют, измеряя ток окисления электрокатализатора в отсутствие и в присутствии холестерина в раствор (Wei-Hung Chiang [и др.]. *Amperometric detection of cholesterol using an indirect electrochemical
20 oxidation method // Steroids*. 2011. №14(76). С. 1535-1540).

Недостатком известного способа является неселективность определения холестерина вследствие высокой реакционной способности электрокатализатора, способного окислять не только холестерин, но и другие компоненты сыворотки или плазмы крови.

Известен способ определения холестерина, при котором используют полимеры с
25 молекулярными отпечатками (ПМО) в виде самоорганизующихся монослоев, селективно сорбирующие холестерин, в качестве неподвижной фазы в ВЭЖХ (Matsumoto H.S.H., Ota L, Nagaoka T. *Detection of Skin Cholesterol by a Molecularly Imprinted Electrode // Journal of Flow Injection Analysis*. 2008. №1 (25). С. 81-84).

Недостатками известного способа являются использование дорогого и сложного в
30 эксплуатации оборудования, большое время анализа.

Наиболее близким техническим решением, выбранным в качестве прототипа, служит способ определения холестерина, при котором в качестве чувствительного и селективного элемента используют фермент -оксидазу, селективно катализирующую
35 реакцию окисления холестерина кислородом с образованием пероксида водорода, превращающимся в свою очередь в воду под действием фермента пероксидазы. Концентрацию холестерина определяют, измеряя электрохимический сигнал от пероксидазы после ее реакции с пероксидом водорода в присутствии холестерина (White & Bolbot, 2002, заявка на патент US 2005/0056551, опубл. 17.03.2005). Для определения
40 концентрации холестерина используют зависимость тока окисления пероксидазы от концентрации холестерина в растворе.

Недостатками известного метода являются необходимость использования нестойких, дорогостоящих ферментов, требующих особых условий хранения и необходимость предварительных операций по модификации ферментами рабочего электрода.

Технический результат, достигаемый при реализации изобретения -упрощение метода
45 анализа, повышение его чувствительности, достоверности, универсальности.

Заявляемый способ определения холестерина включает селективное извлечение холестерина из пробы с применением полимеров с молекулярными отпечаткам, электрохимическое окисление холестерина с использованием растворенного в

апротонном растворителе электрокатализатора, измерение тока окисления катализатора при наложении на рабочий электрод потенциала в отсутствие и в присутствии холестерина в растворе.

От прототипа способ отличается тем, что в качестве электрокатализатора используют неорганические соединения, растворенные в апротонных средах (например, ацетонитрил и диметилформамид). При этом в качестве катализатора может быть использован хлорид кобальта (II) или хлорид никеля (II) или тиоцианат калия, а в качестве рабочего электрода - платиновый дисковый электрод или платиновая проволока.

Предпочтительно для селективного выделения холестерина из исследуемой пробы плазмы или сыворотки крови ее инкубируют с магнитными наночастицами или наночастицами оксида кремния, покрытыми полимерами с молекулярными отпечатками (ПМО) холестерина, отделяют эти наночастицы с сорбированным холестерином с помощью магнита или центрифуги, соответственно, и редуцируют в апротонном растворителе, при этом холестерин из ПМО десорбируется в апротонный растворитель.

Концентрация холестерина в исследуемой пробе может быть определена по разнице токов окисления, генерируемых электрокатализатором в отсутствие и в присутствии десорбированного из ПМО холестерина на поверхности рабочего электрода при наложении потенциала.

Указанный технический эффект достигается тем, что в качестве электрокатализатора используют растворенные в апротонном растворителе неорганические соединения, способные катализировать реакцию окисления холестерина, при этом концентрация холестерина определяется путем измерения тока окисления электрокатализатора в присутствии холестерина. В качестве селективного элемента используют магнитные наночастицы или наночастицы оксида кремния, покрытые ПМО холестерина, способные избирательно сорбировать молекулы холестерина и десорбировать их в апротонный растворитель, а

Указанные отличительные признаки существенны. Достоверность, точность и универсальность определения достигается за счет использования электрокатализатора, позволяющего окислять неэлектроактивный холестерин. Использование магнитных наночастиц или наночастиц оксида кремния, покрытых полимером с молекулярными отпечатками, обеспечивает за счет наноразмеров частиц и высокой специфичности высокую селективность анализа. При этом обеспечивается полное отделение магнитных наночастиц или наночастиц оксида кремния, покрытых полимером с молекулярными отпечатками, от пробы сыворотки или плазмы крови за счет воздействия магнитного поля или центробежной силы, что исключает влияние других компонентов крови на точность и достоверность результатов анализа.

Сущность изобретения поясняется фигурами.

На фигуре 1 изображены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на платиновом дисковом электроде в растворе хлорида кобальта (II) и перхлората лития в ацетонитриле, где: 1 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная на фоне; 2 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная на пробе в отсутствие хлорида кобальта (II) в растворе; 3 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная на пробе в присутствии хлорида кобальта в растворе; 4 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная после введения добавки.

На фигуре 2 изображены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на платиновой проволоке (рабочий электрод) в растворе хлорида никеля (II) и перхлората лития в диметилформамиде, где: 1 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная на фоне; 2 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная

на пробе; 3 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная после введения добавки.

На фигуре 3 изображены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные на платиновом дисковом электроде в растворе тиоцианата калия и перхлората лития в диметилформамиде, где: 1 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная на фоне; 2 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная на пробе; 3 - циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная после введения добавки.

Заявляемый способ иллюстрируется следующими примерами. Пример 1.

Анализируемую пробу сыворотки крови инкубируют в течение 20 минут с магнитными наночастицами, покрытыми полимером с молекулярными отпечатками холестерина. После инкубации наночастицы с сорбированным на них холестерином отделяют с использованием внешнего магнитного поля и диспергируют с применением ультразвукового облучения в растворе хлорида кобальта (II) в ацетонитриле. В полученный раствор помещают платиновый дисковый электрод, электрод сравнения и вспомогательный электрод и накладывают на рабочий электрод потенциал, при котором происходит электрохимическое окисление хлорида кобальта (II). В качестве сигнала, характеризующего содержание холестерина в анализируемой пробе, используют прирост тока окисления хлорида кобальта (II) в присутствии холестерина относительно тока окисления хлорида кобальта (II) в отсутствие холестерина (фиг.1). В пробе обнаружено 6.1 мМ холестерина.

Пример 2.

Анализируемую пробу плазмы крови инкубируют в течение 20 минут с наночастицами оксида кремния, покрытыми полимером с молекулярными отпечатками холестерина. После инкубации наночастицы с сорбированным на них холестерином отделяют с использованием центрифуги и диспергируют с применением ультразвукового облучения в растворе хлорида никеля (II) в диметилформамиде. В полученный раствор помещают платиновую проволоку (рабочий электрод), электрод сравнения и вспомогательный электрод и накладывают на рабочий электрод потенциал, при котором происходит электрохимическое окисление хлорида никеля (II). В качестве сигнала, характеризующего содержание холестерина в анализируемой пробе, используют прирост тока окисления хлорида никеля (II) в присутствии холестерина относительно тока окисления хлорида никеля (II) в отсутствие холестерина (фиг. 2). В пробе обнаружено 5.2 мМ холестерина.

Пример 3.

Анализируемую пробу сыворотки крови инкубируют в течение 20 минут с магнитными наночастицами, покрытыми полимером с молекулярными отпечатками холестерина. После инкубации наночастицы с сорбированным на них холестерином отделяют с использованием внешнего магнитного поля и диспергируют с применением ультразвукового облучения в растворе тиоцианата калия в диметилформамиде. В полученный раствор помещают платиновый дисковый электрод, электрод сравнения и вспомогательный электрод и накладывают на рабочий электрод потенциал, при котором происходит электрохимическое окисление хлорида тиоцианата калия. В качестве сигнала, характеризующего содержание холестерина в анализируемой пробе, используют прирост тока окисления тиоцианата калия (по второй ступени) в присутствии холестерина относительно тока окисления тиоцианата калия (по второй ступени) в отсутствие холестерина (фиг. 3). В пробе обнаружено 4.5 мМ холестерина.

Из полученных данных видно, что при использовании предложенного способа определения свободного холестерина существенно упрощается процедура анализа, а также повышается его чувствительность, достоверность и универсальность.

Преимущество заявляемого способа перед известными состоит в том, что использование неорганических электрокатализаторов и полимеров с молекулярными отпечатками позволяет значительно упростить и улучшить правильность определения аналита.

5

(57) Формула изобретения

1. Способ определения холестерина в плазме или сыворотке крови, включающий инкубацию наночастиц, покрытых полимерами с молекулярными отпечатками (ПМО) холестерина, с исследуемой пробой, селективную сорбцию холестерина на ПМО, десорбцию холестерина из ПМО в органический апротонный растворитель, электрохимическое окисление холестерина с использованием электрокатализатора на поверхности электрода и измерение тока окисления катализатора при наложении на рабочий электрод потенциала в отсутствие и в присутствии холестерина, отличающийся тем, что в качестве электрокатализатора используют хлорид кобальта (II), или хлорид никеля (II), или тиоцианат калия, растворенный в ацетонитриле или диметилформамиде.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для селективного выделения холестерина из исследуемой пробы ее инкубируют с магнитными наночастицами, покрытыми ПМО холестерина, отделяют эти наночастицы с сорбированным холестерином с помощью магнита и редуцируют в апротонном растворителе, при этом холестерин из ПМО десорбируется в апротонный растворитель.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для селективного выделения холестерина из исследуемой пробы плазмы или сыворотки крови ее инкубируют с наночастицами оксида кремния, покрытыми ПМО холестерина, отделяют эти наночастицы с сорбированным холестерином с помощью центрифуги и редуцируют в апротонном растворителе, при этом холестерин из ПМО десорбируется в апротонный растворитель.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве исследуемой пробы используют сыворотку или плазму крови.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве рабочего электрода используют платиновый дисковый электрод или платиновую проволоку.

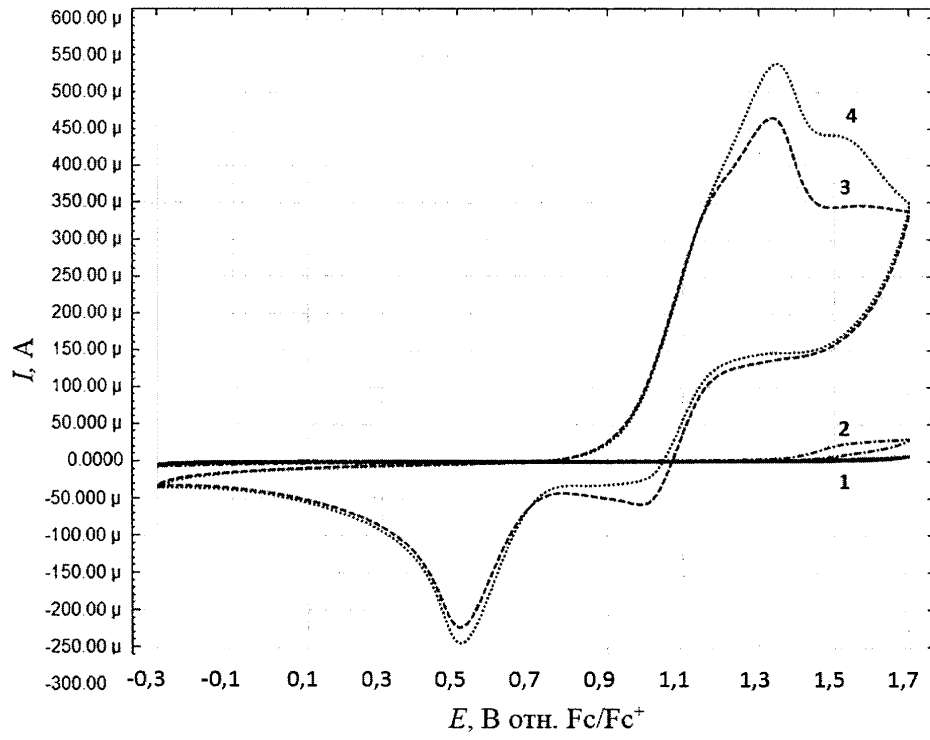
30

35

40

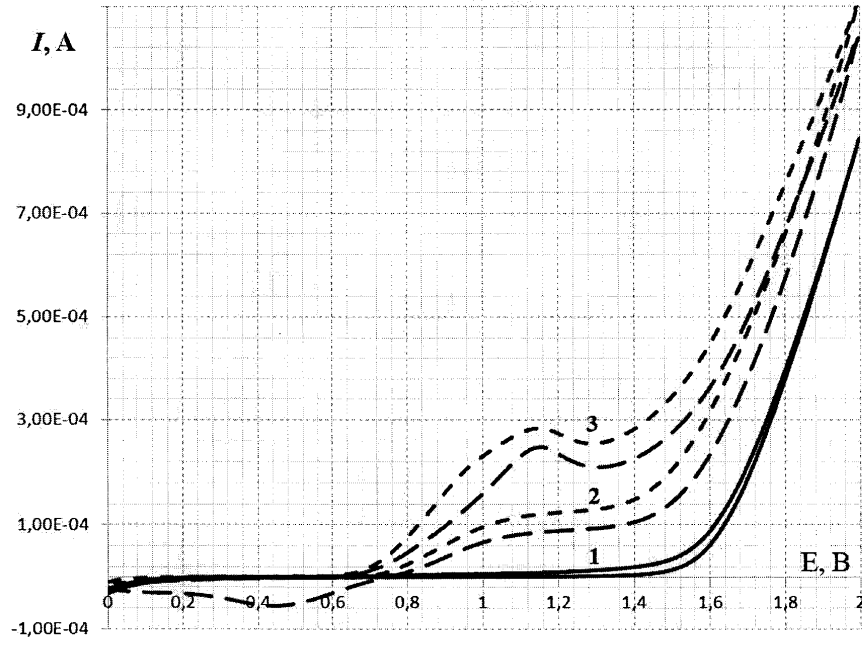
45

1

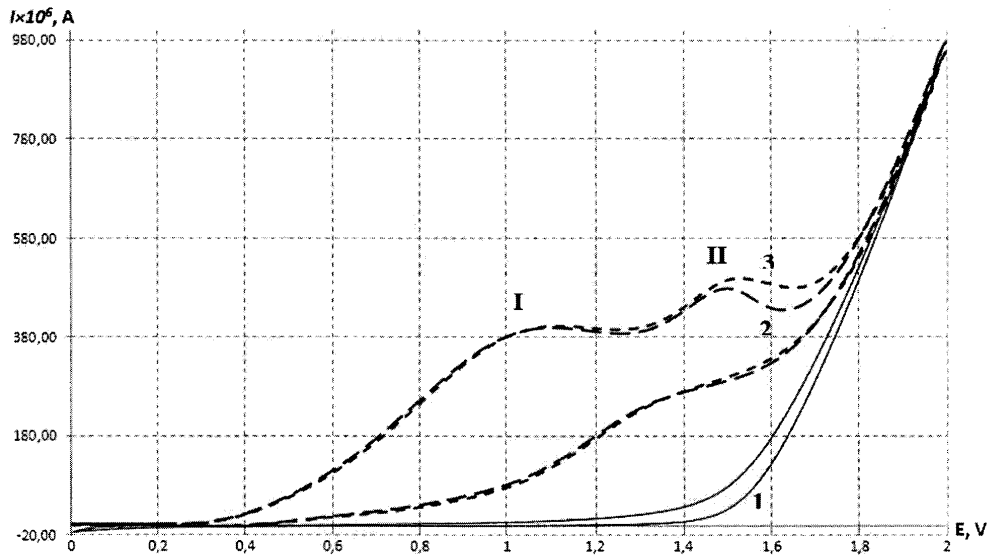


Фиг. 1

2



Фиг. 2



Фиг. 3