Министерство образования и науки Российской Федерации
Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина

А. В. Иванова, А. Н. Козицина, Е. Л. Герасимова, С. Ю. Сараева,
Ю. А. Глазырина, А. И. Матерн

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Лабораторный практикум

Рекомендовано методическим советом УрФУ в качестве
учебно-методического пособия для студентов, обучающихся
по программе магистратуры по направлениям подготовки
240100 Химическая технология, 020100 Химия

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2014

УДК 57.088:543.55(076.5)
Э455

Рецензенты:

Кафедра физико-химических технологий защиты биосферы ФГБОУ ВПО «Уральский государственный лесотехнический университет», зав. каф. ФХТЗБ, д.х.н., проф. Первова И.Г.

Ишметова Р.И., к.х.н., с.н.с. лаборатории гетероциклических соединений ИОС УрО РАН, доцент кафедры химии ФГБОУ ВПО «УГГУ»

Научный редактор: Кочеров В.И., к.х.н., доцент, доцент кафедры аналитической химии ХТИ ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»

Учебно-методическое пособие включает пять лабораторных работ по электрохимическим методам исследования биологических объектов (потенциометрия, инверсионная вольтамперометрия, циклическая вольтамперометрия, хроноамперометрия) с кратким изложением основ этих методов.

Предназначено для студентов, обучающихся в магистратуре по направлениям подготовки 020100 – Химия и 240100 – Химическая технология.

Электрохимические методы исследования биологических объектов: лаборатор. Практикум: [учеб.-метод. пособие] / [А. В. Иванова и др.; под общ. ред. С. Ю. Сараевой; науч. ред. В.И. Кочеров]; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014 – 52 с.

ISBN 978-5-7996-1144-6

57.088:543.55(076.5)

©Уральский федеральный университет, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ..……..……4

Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности…….……..…..….5

Лабораторная работа 1. Потенциометрическое определение стехиометрических коэффициентов взаимодействия антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия ……..……..10

Лабораторная работа 2. Определение антиоксидантной активности сыворотки крови …..……..….14

Инверсионная вольтамперометрия в исследовании микроэлементного статуса организма……..16

Лабораторная работа 3. Инверсионно-вольтамперометрическое определение тяжелых металлов в крови……..21

Электрохимические биосенсоры…….……..…….30

Лабораторная работа 4. Инверсионно-вольтамперометрический бесферментный метод определения условно-патогенных микроорганизмов *E.coli* с использованием магнитных наночастиц Fe_3O_4 в биообъектах….……..…….36

Лабораторная работа 5. Амперометрический бесферментный метод определения мочевины в сыворотке крови, диализной жидкости……..…….…….43

Требования техники безопасности…..……...……..…...50

Список рекомендуемой литературы……..51

ПРЕДИСЛОВИЕ

Охрана здоровья человека стала приоритетной задачей для большинства стран. Для ее решения необходимо развивать и совершенствовать методы медицинской диагностики. Следует отметить, что в настоящее время к анализу биологических объектов привлекается большое количество методов исследования: химических, биохимических, физико-химических, физических и т. д. Значительное место занимают электрохимические методы анализа, направления исследований которых в последнее десятилетие сильно ориентировано на анализ фармацевтической продукции и биологических жидкостей (кровь и ее фракции, моча, слюна, лимфа, спино-мозговая жидкость, слезная жидкость, семенная жидкость и т. д.). Электрохимические методы обладают рядом преимуществ, а именно высокой чувствительностью и селективностью определения, экспрессностью анализа, простотой используемого оборудования, возможностью определения как индивидуальных, так и интегральных параметров.

В данном учебно-методическом пособии приведены примеры использования электрохимических методов, а именно потенциометрии, разных вариантов вольтамперометрии и хроноамперометрии, в анализе биологических объектов.

Перед выполнением лабораторных работ магистранту следует прочитать теоретическую часть по теме предстоящей работы и внимательно ознакомиться с методическими указаниями ее выполнения. Пособие предусматривает самостоятельное проведение магистрантом некоторых расчетов, необходимых для приготовления растворов, необходимых, в частности, для приготовления медиаторной системы, синтеза наночастиц и определения тех или иных компонентов в исследуемых образцах.

Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности

Активные формы кислорода (АФК) играют двойственную биологическую роль в организме человека. АФК являются необходимым элементом фагоцитоза, при котором происходит разрушение поврежденных, старых, иммунологически несовместимых или злокачественных клеток и клеток, пораженных вирусами. Кроме того, благодаря высокой химической активности АФК выполняют функцию сигнальных внутриклеточных трансдьюсеров и межклеточных медиаторов. Однако, при воздействии ряда неблагоприятных факторов, наблюдается избыточное образование АФК. Его патологические последствия проявляются при чрезмерном накоплении АФК и продуктов окисления биомолекул – состоянии, называемом окислительным стрессом. Факторы, вызывающие окислительный стресс, различны, но все они приводят к окислительной модификации макромолекул, т. е. повреждению ДНК, белков, липидов и т. д.

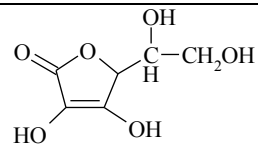
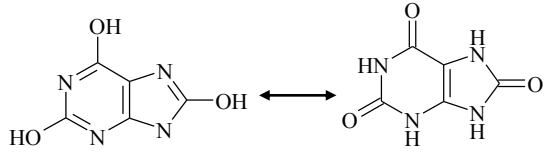
В здоровом организме сохраняется равновесие в системе оксиданты–антиоксиданты. Поддержание окислительно-восстановительных реакций на стационарном уровне обеспечивается действием согласованной антиоксидантной системы.

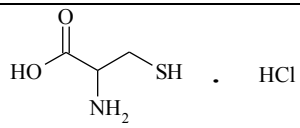
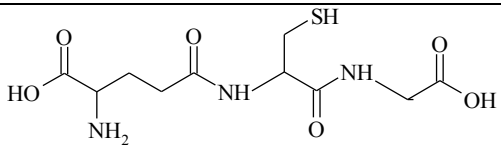
Антиоксиданты – это вещества различной химической природы, способные тормозить или устранять свободно-радикальное окисление органических соединений различными АФК. Важную роль в организме человека играют низкомолекулярные антиоксиданты, которые при взаимодействии с радикалами образуют малоактивные продукты, так называемые «перехватчики свободных радикалов». Среди низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов большое внимание уделяется мочевой кислоте. Также одним из важнейших антиоксидантов биологических сред является аскорбиновая кислота (витамин С).

Она используется организмом для биохимических окислительно-восстановительных процессов. Ее восстановительные свойства могут использоваться не только для ликвидации активных форм кислорода, но и для регенерации других антиоксидантов биологических сред. Кроме того, особо выделяют группу тиольных антиоксидантов, к которым относится глутатион. Глутатион играет одну из ключевых ролей в защите клеток и внутриклеточной среды от поражения активными формами кислорода. Снижение внутриклеточного содержания восстановленного глутатиона существенно снижает устойчивость клеток и организма к лучевому поражению или интоксикации. Роль антиоксидантов выполняют и некоторые аминокислоты, особое внимание уделяется цистеину, который также относится к группе антиоксидантов, содержащих тиоловую группировку. Цистеин входит в состав белков и проявляет достаточно сильные антиоксидантные свойства. Цистеин является предшественником глутатиона. Структурные формулы некоторых важнейших антиоксидантов, описанных выше и входящих в состав биологических объектов, приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Антиоксиданты, входящие в состав биологических объектов.

Антиоксиданты	Структурная формула
Аскорбиновая кислота	
Мочевая кислота	 Енольная форма Кетонная форма

Цистеина гидрохлорид	
Глутатион	

Таким образом, особо важной является информация об антиоксидантной активности (АОА) различных биологических сред при широкой группе патологических состояний организма, таких как сердечно-сосудистые патологии, эндокринные заболевания, заболевания центральной нервной системы, процессы старения организма и многих других. Поэтому одной из важных задач современной медицинской диагностики является создание простых и доступных методов определения интегральной антиоксидантной активности биологических объектов, которые в силу своей простоты и экспрессности могут быть пригодны для масштабных диагностических исследований.

Наиболее доступными и экспрессными методами определения АОА являются электрохимические методы. Кроме преимуществ, связанных с низкой стоимостью аппаратуры и реактивов, они позволяют напрямую оценить электронно-донорно-акцепторные свойства исследуемой системы, т. е. свойства, определяющие антиоксидант/оксидантный баланс организма.

Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности заключается в использовании в качестве источника информации сдвига потенциала платинового электрода в медиаторной системе $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, наблюдающегося при введении образца в раствор. Этот сдвиг является следствием химического взаимодействия антиоксидантов с $K_3[Fe(CN)_6]$, т. е.

изменения соотношения окисленной и восстановленной форм компонентов медиаторной системы в результате реакции:

$$a\cdot\text{Fe(III)} + b\cdot\text{AO} = a\cdot\text{Fe(II)} + b\cdot\text{AO}_{Ox},$$

где АО – антиоксидант,

AO_{Ox} – продукт окисления антиоксиданта;

a, *b* – стехиометрические коэффициенты реакции.

Медиаторная система Fe(III)/Fe(II) является обратимой, поэтому потенциал этой системы подчиняется уравнению Нернста и до введения анализируемого образца может быть выражен уравнением:

$$E = E^0 + b \cdot \lg \frac{a_{\text{Ox}}}{a_{\text{Red}}}, \qquad (1)$$

где *E* – измеряемый потенциал в системе до введения анализируемого образца, В;

E^0 – стандартный окислительно-восстановительный потенциал системы, В;

$b = 2{,}3 \cdot RT/nF$;

R – универсальная газовая постоянная (8,314 Дж/моль·К),

T – температура, К;

n – число электронов, участвующих в реакции;

F – постоянная Фарадея (96485 Кл/моль);

a_{Ox} и a_{Red} – активности окисленной и восстановленной форм медиаторной системы соответственно.

Поскольку ионная сила раствора в течение эксперимента не меняется, то можно в уравнении Нернста активности заменить на концентрации окисленной (C_{Ox}, М) и восстановленной (C_{Red}, М) форм медиаторной системы. Выражение (1) преобразуется в:

$$E = E_0 + b \cdot \lg \frac{C_{\text{Ox}}}{C_{\text{Red}}}, \qquad (2)$$

где E_0 – реальный (формальный) окислительно-восстановительный потенциал системы, В.

После введения в раствор образца, содержащего антиоксиданты, изменяется соотношение окисленной и восстановленной форм, и потенциал медиаторной системы (E_1) можно выразить:

$$E_1 = E_0 + b \cdot \lg \frac{C_{Ox} - X}{C_{Red} + X}, \quad (3)$$

где E_1 – измеряемый потенциал в системе после введения анализируемого образца, В;

X – концентрация антиоксидантов в исследуемом образце, М-экв.

Таким образом, изменение потенциала служит источником информации об антиоксидантной активности. Концентрацию антиоксидантов (X) или антиоксидантную активность (АОА, М-экв) рассчитывают по формуле:

$$\text{АОА} = \frac{C_{Ox} - \alpha C_{Red}}{1 + \alpha}, \quad (4)$$

где коэффициент α представляет собой:

$$\alpha = C_{Ox} / C_{Red} \cdot 10^{(E_1 - E)nF/2.3RT}. \quad (5)$$

Поскольку в состав молекулы антиоксиданта может входить несколько функциональных групп с антиоксидантными свойствами, под интегральной АОА понимается эффективная эквивалентная концентрация антиоксидантов, вступивших в реакцию с $K_3[Fe(CN)_6]$.

Схема установки для определения антиоксидантной активности приведена на рис. 1.

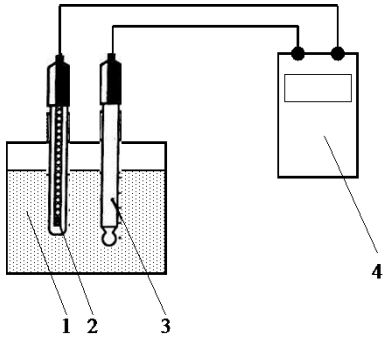


Рис. 1 – Схема потенциометрической установки для определения антиоксидантной активности. 1 – электрохимическая ячейка, содержащая медиаторную систему в фосфатном буферном растворе; 2 – платиновый рабочий электрод; 3 – хлоридсеребрянный электрод сравнения; 4 – pH-метр–иономер в режиме милливольтметра.

Лабораторная работа №1
«Потенциометрическое определение стехиометрических коэффициентов взаимодействия антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия»

Цель работы. Освоение методики потенциометрического определения антиоксидантной активности и расчет стехиометрических коэффициентов взаимодействия водорастворимых антиоксидантов, входящих в состав биологических объектов, с гексацианоферратом (III) калия.

Сущность метода определения

Сущность потенциометрического метода определения антиоксидантной активности и основные формулы приведены в теоретической части (стр. 5–8).

Экспериментально полученные значения стехиометрических коэффициентов коррелируют с количеством гидроксиль-

ных (-OH) и тиоловых (-SH) групп антиоксидантов, что дает информацию об антиоксидантной активности соединения.

Объекты анализа

0,01 М растворы исследуемых антиоксидантов: аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, глутатиона и цистеина. Аликвота вносимой пробы антиоксиданта выбирается таким образом, чтобы концентрация антиоксиданта в электрохимической ячейке составляла 0,0001; 0,0005; 0,0010; 0,0015 и 0,0020 М-экв.

Реактивы

– Калий железосинеродистый ($K_3[Fe(CN_6)]$) по ГОСТ 4206-75, х.ч.;

– Калий железистосинеродистый ($K_4[Fe(CN)_6]$) по ГОСТ 4207-75, ч.д.а.

Медиаторная система состава 0,5 М $K_3[Fe(CN_6)]$ + 0,005 М $K_4[Fe(CN)_6]$ готовится в пробирке вместимостью 5 $см^3$.

– Натрий фосфорнокислый 2-замещенный, 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$) по ГОСТ 4172-76, х.ч.;

– Калий фосфорнокислый 1-замещенный (KH_2PO_4) по ГОСТ 4198-75, ч.д.а.

Фосфатный буферный раствор, pH 7,4: в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ помещают 1,73 г $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ и 0,26 г KH_2PO_4.

– Кислота аскорбиновая 99% (Panreac);

– *L*-глутатион восстановленный 98,0–101,0% (Panreac);

– *L*-цистеин гидрохлорид 99% (Panreac);

– Мочевая кислота 99% (Sigma–Aldrich);

– Вода деионизированная.

Ход анализа

В электрохимическую ячейку помещают фосфатный буферный раствор с pH 7,4. Затем добавляют 0,1 $см^3$ медиаторной системы, содержащей 0,5 М $K_3[Fe(CN_6)]$ и 0,005 М $K_4[Fe(CN)_6]$. Объем буферного раствора рассчитывают таким образом, чтобы

после добавления медиаторной системы и аликвоты исследуемого антиоксиданта суммарный объем электрохимической ячейки составлял 5 см^3. Заполняют таблицу 2.

Таблица 2.

Рабочие условия определения АОА модельных растворов антиоксидантов (С = 0,01 М).

Концентрация антиоксиданта в электрохимической ячейке, М	Суммарный объем электрохимической ячейки, см^3	Аликвота антиоксиданта, см^3	Объем буферного раствора, см^3	Концентрация медиаторной системы в суммарном объеме ячейки, C_{Ox}/C_{Red}, М/М
0,0001	5			$10^{-2}/10^{-4}$
0,0005				
0,0010				
0,0015				
0,0020				

В ячейку помещают рабочий платиновый электрод и хлоридсеребрянный электрод сравнения, подключенные к pH-метру–иономеру, и фиксируют потенциал E в течение 3–5 мин. Эксперимент проводится при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Далее добавляют аликвоту исследуемого раствора антиоксиданта. Фиксируют потенциал E_1 до момента выхода кривой $E = f(t)$ на плато. Измерения для каждого образца проводят 3 раза. Для каждого измерения вычисляют сдвиг потенциала в системе ($\Delta E = E - E_1$) и значение антиоксидантной активности исследуемого объекта в ячейке по формулам (4)–(5) из теоретической части (стр. 8), учитывая разбавление медиаторной системы в ячейке. Результаты вычислений заносят в таблицу 3.

Таблица 3.

Антиоксидантная активность и стехиометрические коэффициенты реакции взаимодействия антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия.

Вещество	Концентрация антиоксиданта, М					$n_{эксп}$ (средн)	$n_{теор}$
	0,0001	0,0005	0,0010	0,0015	0,0020		
	АОА, М-экв						
Мочевая кислота							**2**
Аскорбиновая кислота							**2**
Цистеин							**1**
Глутатион							**1**

Расчет стехиометрических коэффициентов взаимодействия антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия.

Стехиометрические коэффициенты реакции антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия (n) рассчитывают для каждого измерения по уравнению:

$$n = АОА/C, \qquad (6)$$

где АОА – антиоксидантная активность, М-экв, рассчитывается по уравнениям (4)–(5) из теоретической части (стр. 9);

C – исходная концентрация антиоксиданта, М.

Рассчитывают среднеарифметические значения n для каждой концентрации антиоксидантов и в целом для каждого анти-

оксиданта. Полученные результаты ($n_{эксп(средн)}$) заносят также в таблицу 3.

Вывод

Вывод должен содержать краткий обзор проделанной работы, принцип проведения анализа объекта на предмет антиоксидантной активности, а также заключение о степени соответствия полученных данных теоретически ожидаемым.

Лабораторная работа №2
«Определение антиоксидантной активности сыворотки крови»

Цель работы. Освоение методики потенциометрического определения антиоксидантной активности контрольного образца сыворотки крови человека.

Сущность метода определения

Сущность потенциометрического метода определения антиоксидантной активности и основные формулы приведены в теоретической части (стр. 5–8). Полученное в результате анализа значение антиоксидантной активности соответствует интегральному содержанию антиоксидантов в сыворотке крови.

Объект анализа – контрольный образец сыворотки крови человека. *Перед проведением анализа сыворотку хорошо перемешать. Если образец был заморожен, то его (не открывая!) предварительно разморозить при комнатной температуре. Работать с биологическими объектами необходимо в перчатках!*

Реактивы

– Калий железосинеродистый ($K_3[Fe(CN_6)]$) по ГОСТ 4206-75, х.ч.;

– Калий железистосинеродистый ($K_4[Fe(CN)_6]$) по ГОСТ 4207-75, ч.д.а.

Медиаторная система состава 0,012 М $K_3[Fe(CN_6)]$ + 0,0006 М $K_4[Fe(CN)_6]$ готовится в пробирке вместимостью 5 $см^3$.

– Натрий фосфорнокислый 2-замещенный, 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$) по ГОСТ 4172-76, х.ч.;

– Калий фосфорнокислый 1-замещенный (KH_2PO_4) по ГОСТ 4198-75, ч.д.а.

Фосфатный буферный раствор, pH 7,4: в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ помещают 1,73 г $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ и 0,26 г KH_2PO_4.

– Вода деионизированная.

Ход анализа

В электрохимическую ячейку помещают 1,8 $см^3$ фосфатного буферного раствора с pH 7,4; добавляют 0,2 $см^3$ медиаторной системы, содержащей 0,012 М $K_3[Fe(CN_6)]$ и 0,0006 М $K_4[Fe(CN)_6]$. Далее в ячейку помещают рабочий платиновый электрод и хлоридсеребрянный электрод сравнения и фиксируют потенциал E в течение 5–7 минут. Эксперимент проводится при постоянном перемешивании с использованием магнитной мешалки. Затем добавляют аликвоту контрольного образца сыворотки крови 0,4 $см^3$. Фиксируют потенциал E_1 в момент выхода кривой $E = f(t)$ на плато, но не более 25 минут. Измерения проводят 3–5 раз. Для каждого измерения вычисляют сдвиг потенциала в системе ($\Delta E = E - E_1$) и значение антиоксидантной активности исследуемого образца по формулам (4)–(5) из теоретической части (стр. 9), учитывая разбавление медиаторной системы и исследуемого образца в электрохимической ячейке.

Рабочие условия определения антиоксидантной активности сыворотки крови приведены в таблице 4.

Проводят статистическую обработку полученных данных (P = 0,95).

Вывод

Вывод должен содержать краткий обзор о проделанной работе и сущности метода определения интегральной антиоксидантной активности биологических объектов.

Таблица 4.

Рабочие условия определения АОА сыворотки крови

Концентрация медиаторной системы в суммарном объеме ячейки, C_{Ox}/C_{Red}, М/М	Объем буферного раствора с медиаторной системой, $см^3$	Аликвота образца, $см^3$	Разбавление образца
$10^{-3}/5 \cdot 10^{-5}$	**2**	**0,4**	**6**

Инверсионная вольтамперометрия в исследовании микроэлементного статуса организма

Одними из наиболее вредных для биосферы Земли загрязнений, имеющих самые разнообразные вредные последствия для жизнедеятельности живых организмов, являются загрязнения тяжелыми металлами. Наряду с пестицидами, диоксинами, нефтепродуктами, фенолами, фосфатами и нитратами тяжелые металлы ставят под угрозу само существование цивилизации. Увеличивающийся масштаб загрязнений окружающей среды оборачивается ростом генетических мутаций, раковых, сердечно-сосудистых и профессиональных заболеваний, отравлений, дерматозов, снижением иммунитета и связанных с этим болезней. В подавляющем большинстве случаев первоисточником загрязнений является экологически безграмотная деятельность человека. Среди опасных для здоровья веществ тяжелые металлы и их соединения занимают особое место, т. к. являются постоянными спутниками в жизни человека.

Очень часто многоэлементный анализ используют в медицине при выяснении причин острых и хронических отравлений, а также при лечении профессиональных болезней, связанных с хроническим воздействием тяжелых металлов на организм в ус-

ловиях реального производства и экологических особенностей региона.

Важнейшими «металлическими ядами» являются соединения бария, висмута, кадмия, марганца, меди, ртути, свинца, серебра, таллия, хрома, цинка и соединения некоторых неметаллов (мышьяка, сурьмы), для которых установлены предельно-допустимые содержания (табл. 5). Ряд перечисленных выше химических элементов, соединения которых являются токсичными, в небольших количествах содержатся в тканях организма как нормальная его составная часть. В виду незначительных количеств этих химических элементов, содержащихся в организме, их называют микроэлементами.

Таблица 5

Предельно-допустимые концентрации токсичных микроэлементов в биологических жидкостях человека

Элемент	Кровь (мкг/мл)	Моча (мкг/мл)
Mn	0,06	0,07
Ag	0,1	0,06
As	0,2	0,004
Ba	0,08	0,8
Cd	0,005	0,04
Bi	0,03	0,02
Cr	0,004	0,02
Cu	0,9	0,1
Pb	0,25	0,08
Tl	0,01	0,002
Zn	1,2	0,07

Общепризнанно, что наиболее опасными элементами для человека, да и вообще для теплокровных животных, являются кадмий, ртуть и свинец (Cd, Hg, Pb).

Кадмий вызывает отравление, описанное в Японии как болезнь «итаи-итаи» (ох-ох). Название болезни происходит от боли в спине и ногах, сопровождающей декальцификацию костей, что приводит к их ломкости. Хроническое отравление кадмием разрушает печень и почки, приводя к сильнейшему нарушению их функции. Избыток кадмия нарушает метаболизм металлов, особенно железа и кальция, нарушает действие цинковых и иных металлоферментов, блокирует сульфгидрильные группы ферментов, нарушает синтез ДНК. Кадмий легко замещает металлы в флавопротеиновых комплексах, где главенствующую роль играют железо и молибден, нарушая двухстадийный процесс окисления.

Ртуть токсична в любой своей форме. В природных условиях она довольно быстро превращается в летучее токсическое соединение — хлорид метилртути. В организме его ионы быстро попадают в эритроциты, печень и почки, накапливаются в мозге, вызывая серьезные необратимые кумулятивные нарушения ЦНС. Это приводит, в конце концов, к общему и церебральному параличу, деформации конечностей, особенно пальцев, затрудненному глотанию, конвульсиям и смерти. Ртуть блокирует активность ряда важнейших ферментов, в частности карбоангидразы, карбоксипептидазы, щелочной фосфатазы. Ртуть легко замещает кобальт в корриноидах, что ведет к недостатку в организме витамина B_{12} и нарушению механизма биосинтеза ДНК.

Токсичность **свинца** была известна почти 5 тысяч лет среди греческих и арабских ученых. В современных условиях наибольшим источником загрязнения свинцом среды обитания считаются выхлопы бензиновых двигателей автомашин, поскольку в бензин добавляется тетраэтилсвинец для повышения октанового числа. Свинец препятствует одной из ступеней биосинтеза гема, считается сильнейшим нейротоксином, вызывает повышенную агрессивность. Хроническое отравление свинцом по-

степенно приводит к нарушениям функций почек, нервной системы, анемии. Токсичность свинца увеличивается при недостатке в организме кальция и железа. Свинец блокирует SH-группы белков, образуя комплексы с фосфатными группами рибозы у нуклеотидов, особенно у цитидина, и тем самым быстро разрушает РНК, ингибирует ферменты.

Цинк в виде двухвалентного элемента входит в состав свыше 20 ферментов. Большая часть цинка в теле человека находится в мышцах, а самая высокая концентрация — в простате. В крови он присутствует в эритроцитах как кофактор в карбоангидразе. Избыток цинка может разбалансировать метаболические равновесия других металлов. Разбалансировка отношения цинк/медь является главным причинным фактором в развитии ишемической болезни сердца. Избыток цинка часто наблюдается у больных сахарным диабетом. Недостаток его вызывает целый ряд хронических болезней, например, малокровие, снижение иммунитета, задержку роста и полового созревания, бесплодие, плохую память, депрессию, избыточный вес и др.

Медь является необходимым кофактором для нескольких важнейших ферментов, катализирующих разнообразные окислительно-восстановительные реакции, без которых нормальная жизнедеятельность организма невозможна. Медь входит в состав цитохромоксидазы, тироназы и других белков. Их биологическая роль связана с процессами гидроксилирования, переноса кислорода, электронов и окислительного катализа. В тканях здорового организма концентрация меди в течение всей жизни поддерживается строго постоянной благодаря системе, препятствующей непрерывному накоплению меди в тканях путем ограничения ее абсорбции или стимуляции ее выведения. Около 95% меди в организме присутствует в составе гликопротеина крови церулоплазмина. Известен факт недостатка этого белка в крови при болезни Вильсона–Коновалова – врожденном дефиците ме-

таболизма. При этом в организме из-за нехватки активной Cu-лизилоксидазы нарушается процесс сшивки мономеров эластина и коллагена, что затрудняет синтез соединительной ткани. С другой стороны «освободившиеся» ионы меди, лишившись по сути единственного нормального потребителя, откладываются в специфических тканях (печень, ядра мозга, почки, эндокринные железы, радужная оболочка глаз), где оказывают прямой токсический эффект. Создается парадоксальная ситуация избытка меди в специфических тканях при ее недостатке в нормальной цепи метаболизма.

Токсичность «металлических ядов» объясняется связыванием их с соответствующими функциональными группами белковых и других жизненно важных соединений в организме. В результате нарушаются нормальные функции соответствующих клеток и тканей, и наступает отравление, которое в ряде случаев заканчивается смертью.

Таким образом, исследование баланса микроэлементов в организме на сегодняшний день важно для постановки диагнозов и разработки методов лечения различных заболеваний. Одним из методов определения тяжелых металлов в биологических средах является метод инверсионной вольтамперометрии (ИВ), отличающийся селективностью, универсальностью, простотой как процедуры, так и обработки результатов анализа.

ИВ является разновидностью методов вольтамперометрии, в которых измеряется величина тока в зависимости от меняющегося потенциала. Особенностью ИВ является присутствие стадии предварительного химического, электрохимического или адсорбционного концентрирования определяемого вещества на поверхности или в объеме индикаторного электрода с последующим электропревращением концентрата. Аналитическим сигналом служит ток электропревращения, зафиксированный при регистрации вольтамперограммы. Предварительное концен-

трирование позволяет значительно увеличить аналитический сигнал и повысить чувствительность метода вольтамперометрии. Предел обнаружения методов ИВ достигает до 10^{-10} М.

В ИВ используются индикаторные электроды из твердых инертных материалов – золота, платины, углерода, пиролитического графита. Успешное применение графитовых электродов обусловлено высокой химической и электрохимической стойкостью углеродных материалов, сравнительно высоким перенапряжением на них водорода и кислорода, широкой рабочей областью потенциалов, а также простотой механического обновления поверхности электродов и доступностью материалов. При использовании толстопленочных предварительно модифицированных малым количеством нерастворимого соединения ртути графитсодержащих электродов (ТМГЭ), удается избежать токсического влияния металлической ртути и растворов ее солей.

Лабораторная работа № 3
«Инверсионно-вольтамперометрическое определение тяжелых металлов в крови»

Цель работы: Освоение методики определения массовой концентрации ионов цинка, меди, свинца и кадмия в цельной крови без предварительного химического разложения с применением программно-аппаратного комплекса «ИВА–5».

Сущность метода определения

Для измерения концентрации ионов металлов определяемые элементы концентрируют из раствора на поверхности индикаторного электрода (ТМГЭ) в течение заданного времени при определенном потенциале. При этом определяемые элементы восстанавливаются на поверхности электрода:

$Me^{2+} + 2e + Hg \rightarrow Me^{0}(Hg)_{амальгама}$, где Me – Cu, Pb, Cd или Zn.

После этого при линейно изменяющемся потенциале рабочего электрода регистрируют вольтамперограмму (графическую

зависимость тока I от потенциала E), на которой находят и измеряют скачок анодного тока искомого элемента, являющийся аналитическим сигналом (АС). АС металлов регистрируются при следующих потенциалах: (-1,0)±(0,1) В для цинка, (-0,65)±(0,05) В для кадмия, (-0,45)±(0,05) В для свинца, (-0,30)±(0,05) В для меди. Величина АС элемента прямо пропорциональна концентрации его ионов в растворе и обусловлена процессом его электрохимического окисления:

$$Me^0(Hg)_{амальгама} - 2e \rightarrow Me^{2+} + Hg.$$

Содержание элемента в пробе оценивается способом добавки. Расчет концентрации компонента в пробе (C_x) проводится программой автоматически по выражению, приведенному далее в разделе «Вычисление результатов».

Оборудование

Определение содержания ионов тяжелых металлов в крови выполняется с использованием программного обеспечения «Iva-2003». На рис. 2 представлен программно-аппаратный комплекс «ИВА–5», в состав которого входят вольтамперометрический анализатор, электрохимическая ячейка с тремя электродами и компьютер.

Электрохимическая ячейка представляет собой электролизер (химический стакан) вместимостью 10 $см^3$ с погруженными в него тремя электродами: индикаторным (рабочим) – ТМГЭ; вспомогательным – стержень из стеклоуглерода, электродом сравнения – хлоридсеребряный электрод.

Объект анализа – цельная кровь. *Если образец был заморожен, то его (не открывая!) предварительно разморозить при комнатной температуре. Работать с биологическими объектами необходимо в перчатках!*

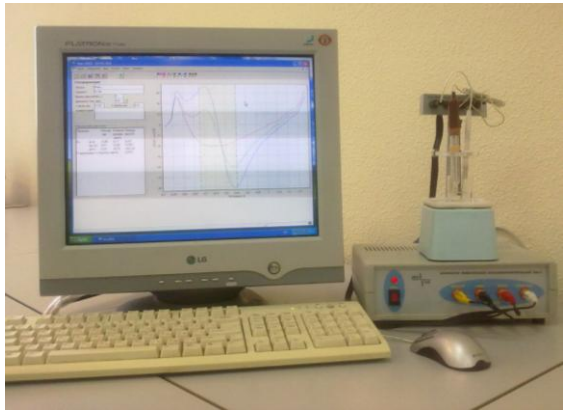


Рис. 2 – Программно-аппаратный комплекс «ИВА-5».

Реактивы

– Стандартные растворы ионов металлов: растворы Zn (II) и Cu (II) с концентрацией 10^{-3} г/дм^3, раствор Pb (II) с концентрацией 10^{-4} г/дм^3, раствор Cd (II) с концентрацией 10^{-5} г/дм^3;

– Кислота соляная по ГОСТ 14261-77, ос.ч. и растворы HCl концентрации 0,1 моль/дм^3 и 6 моль/дм^3;

– Натрий хлористый 99,0–100,5% (Sigma–Aldrich) и раствор NaCl концентрации 1 моль/дм^3;

– Вода деионизированная.

Выполнение анализа

1. Подготовка электрохимической ячейки и электродов к измерениям

Стеклянный стакан (электролизер вместимостью 10 см^3) перед проведением анализа промывают 0,1 М раствором HCl и 3–5 раз деионизированной водой. Электроды (вспомогательный, сравнения и индикаторный) также ополаскивают деионизированной водой.

В электролизер, установленный на магнитной мешалке, помещают 0,4 см^3 6 М раствора HCl, объём раствора доводят до метки 5 см^3 деионизированной водой, опускают электроды и

подключают к соответствующим разъемам коллектора: к разъему «Срав.» – электрод сравнения, к разъему «Всп.» – вспомогательный электрод, к разъему «Раб.Изм.» – рабочий электрод (ТМГЭ). *Внимание: Рабочий электрод подключают к прибору после погружения его в раствор и отключают перед извлечением его из раствора.*

Перед использованием индикаторного электрода ТМГЭ проводят электрохимическое восстановление его модифицирующего слоя, используя специальный алгоритм программного обеспечения. С этой целью в окне программы **«Iva-2003»** в разделе **«Методика»** выбирают строку **«Формирование поверхности электрода»** и далее **«тип V (ТМГЭ)»**.

После процедуры формирования электрод готов к проведению анализа, его можно использовать для анализа **только одной пробы цельной крови** на содержание цинка, меди, свинца и кадмия.

Внимание: Между измерениями ТМГЭ обязательно помещают в деионизированную воду, либо следят за тем, чтобы на поверхности рабочего электрода всегда оставалась полусфера жидкости.

2. Проверка электрохимической ячейки на чистоту

Электролизер и электроды промывают деионизированной водой. В электролизер помещают 0,2 $см^3$ 1 М раствора NaCl и 0,017 $см^3$ 6 М раствора HCl. Объём электролита доводят до метки 5 $см^3$ деионизированной водой и опускают электроды в электролизер.

Запускают программу **«Методика»** – **«Кровь»** – **«Zn»**, по которой концентрирование цинка проводится при потенциале (-1,4) В в течение 30 с при перемешивании, и регистрируют производную фоновую вольтамперограмму цинка.

При наличии на вольтамперограмме АС цинка, превышающего 10 мкА/В, программу останавливают, содержимое элек-

тролизера выливают, электролизер несколько раз ополаскивают деионизированной водой, заполняют ячейку свежим фоновым электролитом и заново регистрируют вольтамперограмму цинка. После проверки ячейки на чистоту по цинку переходят к проверке ячейки на чистоту по меди.

Не меняя раствор, и не вынимая электроды, в электролизер вводят дополнительно 0,4 $см^3$ 6 М раствора HCl. Запускают программу **«Методика»** – **«Кровь»** – **«Cu»**, по которой концентрирование меди проводится при потенциале (-1,0) В в течение 30 с при перемешивании, и регистрируют фоновую вольтамперограмму меди. При наличии на фоновой вольтамперограмме АС меди содержимое электролизера выливают, несколько раз ополаскивают водой. Ячейка и электролит считаются чистыми на содержание меди, если на вольтамперограмме АС этого металла отсутствует. Убедившись в чистоте ячейки по цинку и меди, переходят к анализу крови на содержание этих металлов.

3. Определение цинка (II) в крови

В электролизер вместимостью 5 $см^3$ помещают 0,017 $см^3$ 6 М раствора HCl и 0,2 $см^3$ 1 М раствора NaCl, объём электролита доводят до метки 5 $см^3$ деионизированной водой и опускают электроды в электролизер.

Запускают программу **«Zn»** (без фона), в электролизер при перемешивании раствора (сразу после запуска программы) вводят аликвоту пробы цельной крови 0,01 $см^3$. *При отсутствии на вольтампереграмме четко выраженного АС цинка вводят дополнительно 0,01 $см^3$ пробы.*

Регистрируют три вольтамперограммы цинка в пробе крови. Затем с помощью дозатора вносят добавку стандартного раствора ионов цинка объемом 0,05–0,10 $см^3$ и концентрации 10^{-3} $г/дм^3$. Величина АС должна увеличиться в 1,5–2 раза по сравнению с первоначальной. Регистрируют три вольтамперограммы цинка в

пробе с добавкой в тех же условиях (рис. 3) и производят расчет содержания цинка в крови.

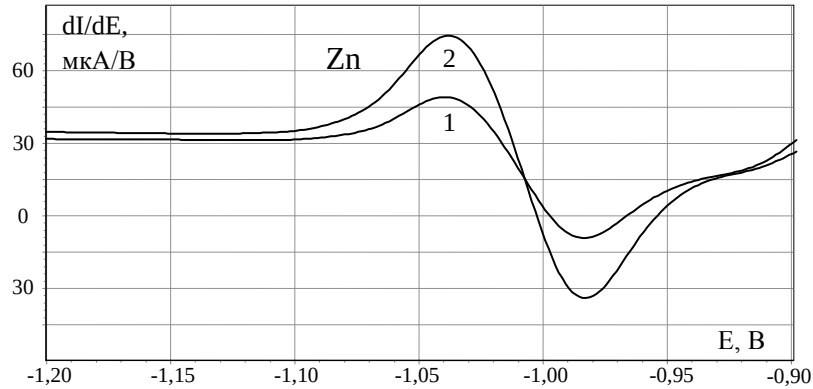


Рис. 3 – Производные вольтамперограммы цинка (II) в цельной крови (1) и в крови с добавкой (2).

Условия определения: фоновый электролит 0,02 М HCl + 0,04 М NaCl, $E_{нак}$ = -1,4 В, $t_{нак}$ = 30 с, $v_{разв}$ = 0,5 В/с.

4. Определение меди (II) в крови

Не меняя раствор, и не вынимая электроды, в электролизер вводят дополнительно 0,4 см^3 6 М раствора HCl. Запускают программу **«Cu»** (без фона) и сразу вводят в электролизер дополнительную аликвоту пробы 0,1 см^3 при обязательном перемешивании раствора.

При отсутствии на вольтамперегамме четко выраженного АС меди вводят дополнительно 0,1 см^3 пробы. Аналогично определению цинка проводят анализ пробы на содержание меди (II) способом добавки. Регистрируют последовательно три вольтамперограммы меди в пробе крови, вносят добавку стандартного раствора ионов меди объемом 0,05–0,10 см^3 и концентрации 10^{-3} г/л. Величина АС должна увеличиться в 1,5–2 раза по сравнению с первоначальной. Регистрируют три вольтамперограммы меди в пробе с добавкой (рис. 4) в тех же условиях и производят расчет содержания меди в крови.

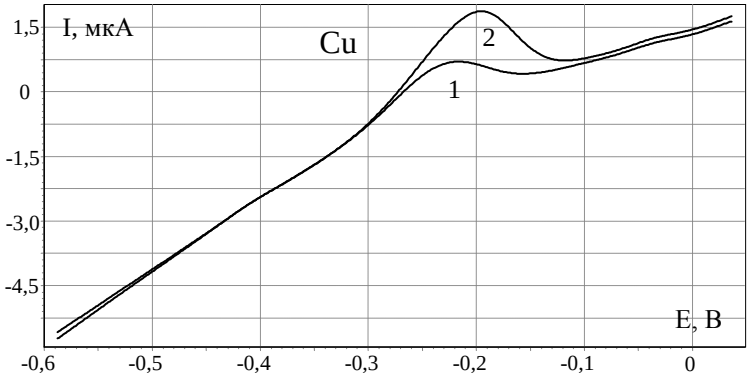


Рис. 4 – Интегральные вольтамперограммы меди (II) в цельной крови (1) и в крови с добавкой (2).

Условия определения: фоновый электролит 0,5 М HCl + 0,04 М NaCl, $E_{нак}$ = -1,0 В, $t_{нак}$ = 30 с, $\nu_{разв}$ = 0,5 В/с.

По окончании анализа крови на содержание цинка (II) и меди (II), раствор из электролизера выливают. Электролизер и электроды 3–5 раз ополаскивают деионизированной водой.

5. Определение свинца (II) и кадмия (II) в крови

В электролизер помещают 0,4 см^3 6 М раствора HCl, объём раствора доводят до метки 5 см^3 деионизированной водой, опускают электроды в электролизер. Запускают программу **«Методика» – «Кровь» – «Pb, Cd»**, по которой концентрирование определяемых элементов проводится при потенциале (-1,2) В в течение 180 с при перемешивании, и регистрируют фоновую вольтамперограмму в интервале потенциалов (-1,0)–(-0,3) В. При наличии на фоновой вольтамперограмме АС свинца и кадмия, превышающих 1,5 и 0,0 мкА/В, соответственно, программу останавливают, содержимое электролизера выливают, электролизер несколько раз ополаскивают деионизированной водой, заполняют свежим фоновым электролитом и заново регистрируют вольтамперограмму фона.

Убедившись в чистоте ячейки по свинцу и кадмию, переходят к анализу крови на содержание этих металлов. Аликвоту пробы цельной крови 0,2 см^3 вводят в электролизер сразу после запуска программы при перемешивании раствора. *При отсутствии на вольтамперограмме четко выраженных АС свинца и кадмия вводят дополнительно 0,2 см^3 пробы (кадмия в пробе может и не быть!).*

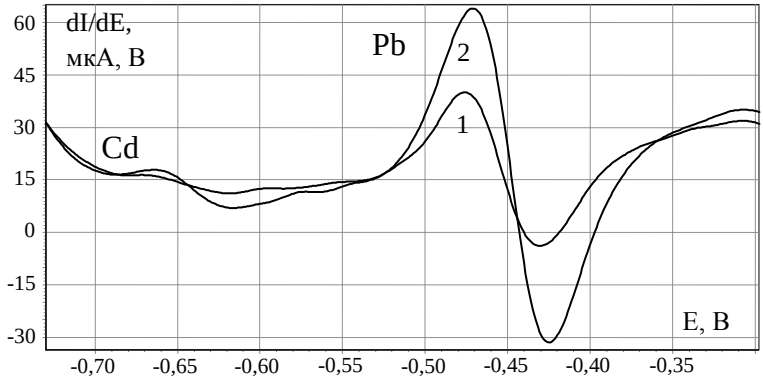


Рис. 5 – Производные вольтамперограммы кадмия (II) и свинца (II) в цельной крови (1) и в крови с добавкой (2). Условия определения: фоновый электролит 0,5 М HCl, $E_{нак}$ = -1,2 В, $t_{нак}$ = 180 с, $\nu_{разв}$ = 0,5 В/с.

Проводят определение свинца (II) и кадмия (II) в пробе способом добавки (рис. 5) аналогично определению цинка и меди. Объемы стандартных добавок ионов свинца и кадмия – по 0,05 см^3, концентрации – 10^{-4} и 10^{-5} г/дм^3 соответственно.

<u>Внимание:</u> Перед утилизацией электродов ТМГЭ после анализа их следует выдержать в растворе пробы при потенциале +0,4 В не менее 3 минут.

Вычисление результатов

При работе на анализаторе «ИВА–5» процедуры обработки вольтамперограмм и вычисления результатов анализа преду-

смотрены программным обеспечением и проводятся автоматически. Результаты анализа пробы (содержание элементов в мкг/дм^3) выдаются на мониторе ПК в виде протокола. Концентрация компонентов вычисляется по формуле:

$$C_{пр} = \frac{I_1 \times C_{доб} \times V_{доб}}{(I_2 - I_1) \times V_{пр}}, \qquad (7)$$

где $C_{пр}$ – содержание определяемого элемента в анализируемой пробе, мкг/дм^3;

I_1 – среднее значение величины АС элемента для пробы;

I_2 – среднее значение величины АС элемента для пробы с добавленным стандартным раствором определяемого элемента;

$C_{доб}$ – концентрация стандартного раствора определяемого элемента, из которого делают добавку, мкг/дм^3;

$V_{доб}$ – объем стандартного раствора определяемого элемента, добавленный в электролизер, см^3;

$V_{пр}$ – аликвота пробы, помещенная в электролизер, см^3.

Проводят статистическую обработку полученных данных (P = 0,95) и результаты в виде $C_{ср} \pm \Delta$ заносят в табл. 5.

Таблица 5.

Результаты анализа цельной крови

№ п/п	Определяемый металл	Найдено в пробе крови $C_{ср} \pm \Delta$, мкг/л
1	Zn	
2	Cu	
3	Pb	
4	Cd	

Вывод. Вывод должен содержать краткий обзор проделанной работы, ход ее выполнения и анализ полученных результатов.

Электрохимические биосенсоры

Вопросы чувствительного и селективного определения широкого круга биологически активных соединений относятся к актуальным проблемам современной аналитической химии. В полной мере это относится к задачам, связанным с охраной здоровья населения и ранней диагностикой заболеваний человека средствами аналитической химии. Своевременная диагностика заболевания позволит, как можно раньше, принять необходимые терапевтические действия для более быстрого выздоровления. Достижения в области биохимии и энзимологии дали начало развитию нового направления аналитической химии – методов анализа (в том числе и электрохимических), основанных на использовании различных биохимических сенсоров (биосенсоров).

Под термином «биосенсор» понимают устройство, в котором чувствительный слой, содержащий биологический материал (ферменты, бактерии, антитела, рецепторы, ДНК и др.), непосредственно реагирующий на присутствие определяемого компонента, генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента. Конструктивно биосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей, или трансдьюсеров, – биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом. Биохимический преобразователь выполняет функцию биологического элемента распознавания, преобразуя определяемый компонент, а точнее, информацию о химических связях, в физическое или химическое свойство или сигнал, а физический преобразователь это свойство фиксирует с помощью специальной аппаратуры. Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, не прибегая ни к каким дополнительным операциям, связанным с использова-

нием других реагентов, концентрированием и т. д. Общая схема функционирования биосенсора представлена на рис. 6.

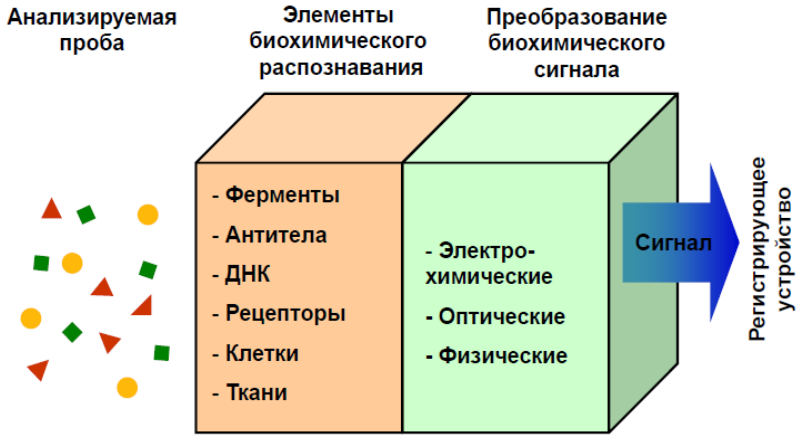


Рис. 6 – Общая схема биосенсора

Существуют разные подходы к классификации биосенсоров: по природе биохимического компонента, по типу преобразователя сигнала, по способу регистрации сигнала, по конструкции биосенсора, по аналитической задаче и области применения биосенсора. Наиболее важные классификации приведены на рис. 7. Чаще всего биосенсоры называют в соответствии с природой биохимического компонента, а наибольшее распространение в настоящее время получили электрохимические биосенсоры.

Ферментные сенсоры – одни из самых распространенных биосенсоров. Они включают чистые препараты фермента или биологические препараты (гомогенаты тканей или микробных культур), проявляющие биологическую активность. В соответствии с назначением ферментные сенсоры подразделяют на субстратные и ингибиторные.

Рис. 7 – Классификация биосенсоров.

Субстратные биосенсоры предназначены для определения специфических субстратов ферментативных реакций. Взаимодействие субстратов с ферментом обычно сопровождается образованием пероксида водорода, иногда других видов продуктов ферментативных реакций.

$$\text{Определяемое вещество} + O_2 \xrightarrow{\text{фермент}} \text{продукт} + H_2O_2$$

$$\text{Определяемое вещество} + NAD^+ \xrightarrow{\text{фермент}} \text{продукт} + NADH + H^+$$

где NAD^+ и NADH – окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотида – производного витамина B_3, важного кофермента, акцептора водорода.

Самым «старым» является биосенсор на основе фермента глюкозоксидазы для определения глюкозы в крови. Впервые для детектирования кислорода при помощи указанного биосенсора был использован электрод Кларка. Принципиально схема рабо-

ты биосенсора для определения глюкозы описывается следующим уравнением:

$$\text{Глюкоза} + O_2 \xrightarrow{\text{глюкозоксидаза}} \text{глюконовая кислота} + H_2O_2$$

Уменьшение содержания кислорода, связанное с его восстановлением по уравнению:

$$O_2 + 2\,H_2O + 4e \xrightarrow{-0{,}6\text{В (Ag/AgCl)}} 4\,OH^-,$$

может быть зафиксировано при помощи электрода Кларка.

Действие ингибиторных ферментных биосенсоров основано на эффекте ингибирования фермента определяемым веществом.

Сенсоры на основе микроорганизмов – биосенсоры, биорецепторами которых являются живые ткани, бактерии, микроорганизмы. Безусловно, преимуществом этого типа биосенсоров является экономичность и устойчивость по сравнению с ферментами, дорогими и быстро теряющими свою активность. Для биосенсоров данного типа характерно то, что биоматериал «создает» естественные условия для ферментов, способствующие стабилизации их активности, что очень важно для биосенсора, так как выделенные ферменты в таких же условиях разрушаются. Однако существенными недостатками такого вида сенсоров является низкая селективность, поскольку клетки живых организмов содержат самые разные ферменты, и достаточно большое время отклика.

Сенсоры на основе надмолекулярных структур клетки – сенсоры, в составе которых применяют внутриклеточные структуры, имеющие сложное строение. Это могут быть липидные мембраны со встроенными рецепторами, органеллы клеток (митохондрии, хлоропласты), полиферментные комплексы и т. д.

Пока такие биосенсоры не нашли широкого применения, поскольку их биологические компоненты, извлеченные из привычного окружения, недостаточно устойчивы для того, чтобы сохранять операционные параметры сенсоров в течение дли-

тельного срока. Их используют для изучения биохимических процессов, например, для подтверждения механизма токсического действия загрязнителей или для выявления пути передачи нервного импульса или иного биохимического сигнала от рецептора. К числу таких биосенсоров относят, например, сенсоры для оценки фитотоксичности, включающие компоненты фотосинтезирующего аппарата клеток растений.

В основе функционирования **иммуносенсоров** лежит принцип специфического взаимодействия между антигеном (клетки микроорганизмов, вирусы, белки и полисахариды) и соответствующим ему антителом (особые белки, образующиеся в организме человека или животного под действием антигена). Иммуносенсоры используют для определения компонентов иммунохимического взаимодействия – антител или антигенов. Независимо от метода детектирования иммуноанализ можно разделить на прямой и непрямой. В первом случае источником информации служит результат непосредственного взаимодействия антигена с антителом. Во втором – взаимодействие антигена с антителом определяют с использованием меченых компонентов – «метки». В качестве «метки» могут быть применены ферменты, флуоресцентные, люминесцентные соединения, ионы, наночастицы металлов и другие соединения.

ДНК-сенсоры включают в качестве биохимического компонента нуклеиновые кислоты (ДНК). Чаще всего это не природные компоненты, выделенные из живого организма, а их фрагменты, называемые также ДНК-зондами или ДНК-праймерами. Их подбирают таким образом, чтобы они отражали специфичность строения ДНК в целом, т. е. детектирование молекул ДНК основано на взаимодействии между комплементарными цепями. Природа этого взаимодействия – водородные связи между парами нуклеотидов.

В ДНК-сенсорах рецепторный слой состоит из иммобилизованных одноцепочечных ДНК, которые улавливают из раствора комплементарные цепи. ДНК-зонды синтезируют в процедурах ДНК-амплификации на основе ПЦР. Их могут дополнительно модифицировать, чтобы повысить устойчивость или облегчить включение в состав биосенсора. Также в составе ДНК-сенсоров используют синтетические олигонуклеотидные последовательности, не имеющие природного аналога, а подобранные в соответствии со способностью взаимодействовать с определенными биомолекулами. Такие нуклеиновые рецепторы получили название аптамеры. ДНК-сенсоры на основе аптамеров называют аптасенсорами.

ДНК-сенсоры используют для установления последовательности нуклеотидов целевой молекулы ДНК, комплементарной зонду, для выявления белков и низкомолекулярных соединений, специфически взаимодействующих с определенными участками ДНК. К ним относятся регуляторные белки, маркеры онкологических заболеваний, соединения, повреждающие ДНК, многие лекарственные препараты противоракового действия.

Биосенсоры с использованием наноматериалов

Переход к наноразмерному состоянию органических и неорганических материалов является важнейшей чертой современного этапа развития науки и техники. Такие свойства наноструктурированных материалов, как хорошая электропроводность, высокая удельная поверхность и, как следствие, высокая адсорбционная способность делают их весьма перспективными компонентами сенсоров: трансдьюсеров и сигналообразующих меток. Создание слоя наноматериала на поверхности трансдьюсера открывает широкие возможности иммобилизации на этой поверхности различных соединений, в том числе биологических. В связи с этим наблюдается повышенный интерес к разработке био-

сенсоров с привлечением наноматериалов (наночастицы металлов, их оксидов, углеродные нанотрубки).

В данном методическом пособии представлены бесферментные методы анализа биообъектов. Это связано с тем, что в современных методах анализа исключение ферментов, как дорогих и быстро теряющих свою активность реагентов, а также сопутствующих им субстратов является весьма привлекательным. Простота электрохимического определения обеспечит экономический эффект и требуемые пределы обнаружения методов.

В лабораторных работах представлены:

– бесферментный инверсионно-вольтамперометрический метод иммуноанализа на содержание *E.coli* с использованием магнитных наночастиц Fe_3O_4 в качестве сигналообразующей «метки»;

– бесферментный метод для амперометрического определения мочевины с использованием в качестве чувствительного элемента наночастиц Ag или макроциклического комплекса никеля (II).

Лабораторная работа № 4
«Инверсионно-вольтамперометрический бесферментный метод определения условно-патогенных микроорганизмов E.coli с использованием магнитных наночастиц Fe_3O_4 в биообъектах»

Цель работы. Освоение методики электрохимического иммуноанализа с использованием магнитных наночастиц Fe_3O_4 в качестве сигналообразующей «метки».

Сущность метода определения

В методе определения патогенных микроорганизмов в качестве детектируемой электрохимической метки используются магнитные наночастицы Fe_3O_4. Общий принцип иммуноанализа заключается в образовании иммунокомплекса между бактерией,

меченной наночастицами, и антителами, иммобилизованными на углеродной подложке. Аналитическим сигналом метода служит количество ионов Fe (III), полученных после кислотного разложения меченого магнетитом иммунокомплекса антитело–бактерия, и определяемых методом инверсионной вольтамперометрии. Поскольку концентрация бактерий *E.coli* в интервале 10^2–10^8 КОЕ/см^3 линейно связана с концентрацией ионов Fe (III), для получения результатов используют способ градуировочного графика.

Реактивы

– Микроорганизм бактерии *E.coli* 10^8 КОЕ/см^3;

– Кроличьи поликлональные антитела к *E. coli* (1 г/дм^3);

– Железо хлористое ($FeCl_2$) >99% (Sigma–Aldrich);

– Железо хлорное ($FeCl_3$) >97% (Sigma–Aldrich);

– Аммиак водный 25% раствор по ГОСТ 24147-80, ос.ч.;

– Кислота азотная по ГОСТ 11125-84, ос.ч. плотностью 1,40 г/см^3;

– Кислота соляная по ГОСТ 14261-77, ос.ч. плотностью 1,19 г/см^3 и растворы HCl концентрации 0,1 моль/дм^3 и 0,5 моль/дм^3;

– Кислота серная по ГОСТ 14262-78, ос.ч. плотностью 1,83 г/см^3;

– Пероксид водорода 30% по ГОСТ 10929-76, х.ч.;

– Натрий уксуснокислый 3-водный ($CH_3COONa{\cdot}3H_2O$) по ТУ 6-09-1567-78, ос.ч. и раствор ацетата натрия концентрации 1 моль/дм^3;

– Пирокатехол по ТУ 6-09-4025-83, ч. и его раствор концентрации 0,05 моль/дм^3;

– Государственный стандартный образец (ГСО) состава водных растворов ионов Fe (III) с аттестованным значением концентрации 1 г/дм^3 и раствор Fe (III) концентрации 10^{-3} г/дм^3;

– Натрия гидроксид по ГОСТ 4328-77, х.ч. и раствор NaOH концентрации 0,1 моль/дм^3;

– Натрия хлорид 99,0–100,5% (Sigma–Aldrich) и 0,9%-ый раствор NaCl.

Объекты анализа – вытяжки из испражнений или продуктов питания, содержащие микроорганизм бактерии *E.coli*. *Работать с биологическими объектами необходимо в перчатках!*

Синтез наночастиц

Наночастицы Fe_3O_4 получают путем добавления по каплям 4–5 $см^3$ 25%-го водного раствора NH_3 к 50 $см^3$ раствора, содержащего ионы железа Fe (II) и Fe (III), при температуре 25^0C и постоянном интенсивном перемешивании с помощью мешалки IKA Eurostar digital 2482000. Расчет навесок солей железа проводят в соответствии с уравнением:

$$8\ NH_4OH + 2\ FeCl_3 + FeCl_2 \rightarrow Fe_3O_4 + 8\ NH_4Cl + 4\ H_2O$$

при условии получения 50 $см^3$ суспензии Fe_3O_4 с концентрацией 1 $г/дм^3$.

Полученный продукт (наночастицы Fe_3O_4) осаждают с помощью магнита, на который устанавливается стакан с суспензией, надосадочную жидкость сливают, осадок промывают деионизированной водой несколько раз, пока pH не достигнет 7,0–7,5. Добавляют деионизированную воду до отметки 50 $см^3$ и полученную наносуспензию подвергают УЗ обработке в течение 30 с (мощность 100 Вт) на ультразвуковом гомогенизаторе Ultrasonic processor 500W (Sigma–Aldrich).

С целью получения 20 $см^3$ суспензии наночастиц Fe_3O_4 концентрации 0,125 $г/дм^3$ отбирают необходимую аликвоту синтезированной суспензии с исходной концентрацией 1 $г/дм^3$ и разбавляют деионизированной водой.

Ход анализа

1. Приготовление растворов для построения градуировочного графика

Растворы микроорганизма бактерии *E.coli* для построения градуировочной зависимости (объемом 1,0 $см^3$) готовят после-

довательным разбавлением в 10, 100, 1000, 10000 и 100000 раз основного раствора с содержанием бактерии *E.coli* 10^8 КОЕ/см^3. Разбавление проводят 0,9%-ым раствором хлорида натрия в пробирках вместимостью 1,5 см^3. Таким образом, получают серию из пяти растворов с содержанием *E.coli* 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 и 10^7 КОЕ/см^3.

2. Получение коньюгата наночастиц Fe_3O_4 с микроорганизмом и иммунокомплекса антитело-микроорганизм, меченный наночастицами Fe_3O_4.

На поверхность семи углеродных подложек, зачищенных керамическим скребком, наносят по 0,01 см^3 раствора кроличьих поликлональных антител к *E.coli* и сушат в течение 10 мин при температуре (37,0±0,1)^{o}C в инкубаторе GFL type 1010.

Водную суспензию наночастиц Fe_3O_4 концентрации 0,125 г/дм^3 подвергают УЗ обработке в течение 10 с (мощность 100 Вт) и по 0,25 см^3 добавляют к растворам (объемы по 0,5 см^3), содержащим микроорганизм *E.coli* (пять растворов для построения градуировочного графика и исследуемый образец), и к 0,9%-му раствору NaCl без микроорганизма (холостой опыт). Инкубируют при температуре (37,0±0,1)^{o}C в течение 30 мин для получения коньюгата наночастиц Fe_3O_4 с микроорганизмом *E.coli*.

Затем свободные наночастицы магнетита отделяют с помощью магнитного штатива «MagneSphere®», Promega, США. Все растворы переносят в чистые пробирки вместимостью 1,5 см^3, в которые помещают подложки с иммобилизированными антителами. Инкубируют при температуре (37,0±0,1)^{o}C в течение 30 мин для образования иммунокомплексов. В холостом опыте подложка инкубируется в растворе, не содержащем бактерии *E.coli*.

3. Кислотное разложение иммунокомплекса антитело-микроорганизм, меченный наночастицами Fe_3O_4

Кислотное разложение иммунокомплекса проводят для каждой подложки по одному алгоритму. Подложку с иммунокомплексом опускают на 15 мин в стеклянный стаканчик, в который предварительно добавлены 5 $см^3$ воды и по 0,3 $см^3$ концентрированных серной и азотной кислот, таким образом, чтобы зона, на которой сформировался иммунокомплекс, была полностью покрыта раствором. Затем подложку вынимают из стаканчика и выполняют процедуру кислотного разложения оставшегося раствора. Для этого раствор выпаривают на плитке до объема примерно 1 $см^3$. Охлаждают, добавляют деионизированной воды до общего объема примерно 5 $см^3$, нагревают на плитке до появления белых паров и выпаривают еще 8–10 мин до влажных солей. Процедуру повторяют. Охлаждают, добавляют 3–5 $см^3$ деионизированной воды и 0,3 $см^3$ 30%-го раствора пероксида водорода. Выпаривают до влажных солей. Охлаждают, добавляют 3–5 $см^3$ воды и снова выпаривают до влажных солей. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ с использованием деионизированной воды. pH раствора доводят 0,1 М раствором NaOH до 7,1–7,3, контроль ведут с помощью pH-метра.

В результате кислотного разложения получаются растворы с разным содержанием ионов Fe (III), по которому можно судить о наличии и количестве микроорганизмов, образовавших иммунокомплексы антитело-микроорганизм, меченные наночастицами Fe_3O_4, на поверхности углеродной подложки.

4. Подготовка ячейки и электродов

Электрохимическое определение Fe (III) выполняется с использованием программного обеспечения «Iva-2003» программно-аппаратного комплекса «ИВА-5» (ООО НПВП «ИВА», Екатеринбург). Используется электрохимическая ячейка, представляющая собой электролизер (химический стакан) вместимостью 25 $см^3$ с погруженными в него тремя электродами: индикатор-

ным (рабочим) – ТМГЭ; вспомогательным – стержень из стеклоуглерода, электродом сравнения – хлорсеребряный электрод.

Электролизер перед проведением анализа промывают 0,1 М раствором HCl и 3–5 раз деионизированной водой. Электроды также ополаскивают деионизированной водой.

Подготовка индикаторного электрода к измерениям, связанная с электрохимическим восстановлением его модифицирующего слоя, проводится согласно схеме, описанной в лабораторной работе №3 (стр. 23). После процедуры формирования рабочей поверхности электрод ТМГЭ готов к проведению анализа.

Внимание: Между измерениями ТМГЭ обязательно помещают в деионизированную воду, либо следят за тем, чтобы на поверхности рабочего электрода всегда оставалась полусфера жидкости.

5. Электрохимическое определение Fe (III)

Определение железа проводят во всех растворах, полученных после кислотного разложения иммунокомплексов: 5 растворов для построения градуировочного графика (10^3–10^7 КОЕ/см^3 *E.coli*), раствор для холостого опыта и раствор исследуемого образца.

Электролизер и электроды промывают 3–5 раз деионизированной водой. В электролизер вместимостью 25 см^3 помещают 1,0 см^3 1 М раствора ацетата натрия и 0,1 см^3 0,05 М раствора пирокатехола. Объём электролита доводят до метки 10 см^3 деионизированной водой и опускают электроды в электролизер.

Запускают программу **«Методика»** – **«Воды»** – **«Fe»** (с фоном), по которой накопление поверхностно активного комплекса железа (III) с пирокатехолом проводится при потенциале +0,1 В в течение 60 с при перемешивании, и регистрируют фоновую вольтамперограмму железа.

При наличии на дифференциальной вольтамперограмме АС Fe (III) содержимое электролизера выливают, электролизер и электроды несколько раз ополаскивают деионизированной во-

дой, заполняют свежим фоновым электролитом и регистрируют три фоновые вольтамперограммы.

Далее в электролизер вводят 0,1 $см^3$ пробы и регистрируют вольтамперную кривую. При отсутствии на вольтамперограмме четко выраженного АС Fe (III) аликвоту пробы увеличивают (максимальный объем аликвоты пробы 1,0 $см^3$). Регистрируют три вольтамперограммы железа в пробе в интервале потенциалов от (-0,50) до (-1,20) В.

Затем с помощью дозатора вносят добавку стандартного раствора ионов Fe (III) концентрации 10^{-3} $г/дм^3$ в таком количестве, чтобы величина АС увеличилась в 1,5–2 раза по сравнению с первоначальной (объем добавки 0,01–0,1 $см^3$ в зависимости от АС в пробе). Регистрируют три вольтамперограммы и АС Fe (III) в пробе с добавкой в тех же условиях (рис. 8).

Внимание: Перед утилизацией электродов ТМГЭ после анализа их следует выдержать в растворе пробы при потенциале +0,4 В не менее 3 минут.

По окончании анализа раствор из электролизера выливают. Электролизер и электроды 3–5 раз ополаскивают деионизированной водой.

Расчет содержания патогенных микроорганизмов

При работе на анализаторе «ИВА–5» процедуры обработки вольтамперограмм и вычисления результатов анализа предусмотрены программным обеспечением и проводятся автоматически по формуле (7), приведенной в лабораторной работе №3 (стр. 30). Результаты анализа всех растворов на содержание Fe (III) ($мкг/дм^3$) выдаются на мониторе ПК в виде протокола.

По результатам определения Fe (III) в растворах с концентрацией *E.coli* в интервале 10^3–10^7 $КОЕ/см^3$ строят градуировочную зависимость содержания *E.coli* от концентрации Fe (III). По градуировочному графику определяют содержание патогенного микроорганизма *E.coli* в исследуемом образце.

Проводят статистическую обработку полученных данных (P = 0,95).

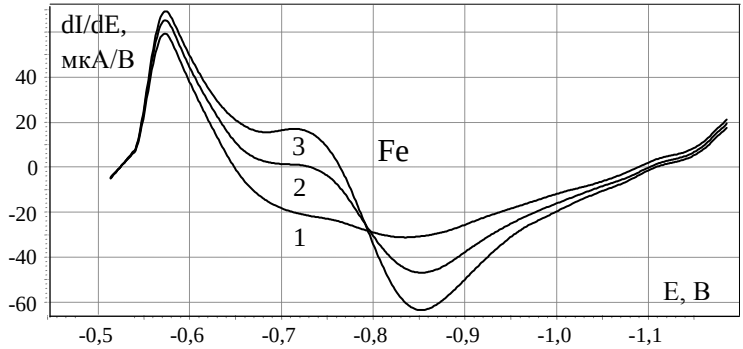


Рис. 8 – Вольтамперограммы восстановления комплекса железа с пирокатехолом, зарегистрированные с использованием ТМГЭ: 1 – фон, 2 – фон + проба, 3 – фон + проба + стандартная добавка Fe (III). Фоновый электролит: 0,1 М CH_3COONa + 0,05 М пирокатехол. $v_{разв}$ = 0,5 В/с.

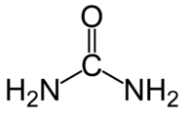
Вывод

Вывод должен содержать краткий обзор проделанной работы, ход выполнения анализа и результаты определения *E. coli* в образце.

Лабораторная работа №5
«Амперометрический бесферментный метод определения мочевины в сыворотке крови, диализной жидкости»

Цель работы: Освоение методики электрохимического определения мочевины в сыворотке крови, диализной жидкости.

Сущность метода определения



Мочевина – диамид угольной кислоты, является конечным продуктом метаболизма

белка у млекопитающих. Анализ на мочевину входит в биохимический анализ крови. Нормы для детей: 1,8–6,4 ммоль/дм^3; для взрослых: 2,5–6,4 ммоль/дм^3.

Определение мочевины проводится **хроноамперометрическим методом**, основанным на изучении зависимости от времени величины тока, протекающего через ячейку при определенном значении электродного потенциала. Аналитическим сигналом является величина тока, линейно зависящая от концентрации мочевины в интервале концентраций 10^{-2}–10^{-5} М. В качестве катализаторов электрохимического окисления мочевины используются наночастицы Ag или комплекс никеля (II) с органическим лигандом. Селективность определения обеспечивается пропусканием исследуемого раствора через анионообменную колонку, задерживающую мешающие определению мочевины компоненты сыворотки крови или диализной жидкости. Расчетным методом содержания мочевины является способ добавки.

Работа выполняется с использованием программно-аппаратного комплекса «ИВА–5» (ООО НПВП «ИВА», Екатеринбург) в комплекте с электрохимической ячейкой (электролизер вместимостью 25 см^3) и тремя электродами: индикаторным толстопленочным углеродсодержащим электродом (ТУЭ), хлоридсеребряным электродом сравнения и стеклоуглеродным стержнем в качестве вспомогательного электрода. Используется программное обеспечение **«Iva the best»**.

Реактивы

– Серебро азотнокислое 99,9% (Alfa Aesar) и раствор $AgNO_3$ концентрации 0,01 моль/дм^3;

– Натрий лимоннокислый 3-замещенный, 5,5-водный по ГОСТ 31227-2004, пищевой и раствор цитрата натрия ($Na_3C_6H_5O_7$) концентрации 0,05 моль/дм^3;

– Натрия тетрагидридоборат 96% (Panreac) и раствор $NaBH_4$ концентрации 0,1 моль/дм^3;

– Раствор 1,1,1,7,7,7–гексафторгептан–2,4,6–трикетонат диникеля (II) тетрагидрат в ДМСО концентрации 0,072 моль/дм^3;

– Натрий хлористый 99,0–100,5% (Sigma–Aldrich) и 0,9%-ый раствор NaCl;

– Натрия гидроксид по ГОСТ 4328-77, х.ч., растворы NaOH концентрации 10% и 0,25 моль/дм^3;

– Мочевина >98% (Fluka) и раствор мочевины концентрации 0,1 моль/дм^3.

Объект анализа – сыворотка крови человека, диализная жидкость. *Перед проведением анализа образцы хорошо перемешать. Если образец был заморожен, то его (не открывая!) предварительно разморозить при комнатной температуре. Работать с биологическими объектами необходимо в перчатках!*

Синтез наночастиц Ag

Наночастицы Ag получают путем добавления к 20 см^3 деионизированной воды 0,5 см^3 0,01 М раствора $AgNO_3$ и 0,1 см^3 0,05 М раствора цитрата натрия. Далее при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки добавляют 0,6 см^3 0,1 М раствора $NaBH_4$, который готовят непосредственно перед синтезом. Полученный золь желтого цвета перемешивают 15 мин, переливают в пробирку вместимостью 50 см^3 и используют для модифицирования электродов без дополнительных операций в течение суток.

По истечении суток суспензию наночастиц Ag перед модифицированием электродов обязательно подвергают УЗ обработке в течение 30 с (мощность 100 Вт) на ультразвуковом гомогенизаторе Ultrasonic processor 500W (Sigma–Aldrich).

Подготовка индикаторного электрода

Индикаторный электрод ТУЭ модифицируют методом капельного нанесения на рабочую поверхность 0,005 см^3 синтезированного золя серебра или раствора 1,1,1,7,7,7–

гексафторгептан–2,4,6–трикетонат диникеля (II) тетрагидрата в ДМСО концентрации 0,072 моль/дм^3 (с содержанием Ni (II) 8,56 г/дм^3). Затем электрод сушат при комнатной температуре до полного испарения растворителя. Таким образом получают бесферментный амперометрический сенсор на мочевину.

Подготовка пробы

Для селективного выделения и концентрирования мочевины из сыворотки крови или диализной жидкости используют анионообменную колонку «Hypersep IC-OH» (Metrohm, Швейцария). Предварительно проводят регенерацию анионообменной колонки последовательным пропусканием через неё 10 см^3 10%-го раствора NaOH и 10 см^3 деионизированной воды. Затем 0,1 см^3 исследуемой жидкости, разбавленной 0,9 см^3 0,9%-го раствора NaCl, пропускают через анионообменную колонку. Далее проводят хроноамперометрическое определение мочевины в фильтрате.

Ход анализа

Анализ включает две стадии: 1 стадия – формирование поверхности модифицированного электрода многократным циклированием в определенном интервале потенциалов; 2 стадия – хроноамперометрическое определение содержания мочевины при потенциале, выбранном по циклической вольтамперограмме в зависимости от используемого модификатора.

Электрохимическую ячейку (химический стакан вместимостью 25 см^3) несколько раз ополаскивают деионизированной водой, заполняют 0,25 М раствором NaOH до отметки 10 см^3 и устанавливают на магнитной мешалке. Электроды опускают в раствор и подключают к соответствующим разъемам коллектора: к разъему «Срав.» – электрод сравнения, к разъему «Всп.» – вспомогательный электрод, к разъему «Раб.Изм.» – индикаторный электрод.

Для формирования рабочей поверхности модифицированного электрода его многократно циклируют в интервале потенциалов от 0,0 до 0,7 В в случае модифицирования электрода комплексом никеля (II) с органическим лигандом (рис. 9) или от (-1,0) до 1,0 В, если модификатор – наночастицы Ag (рис. 10).

Для этого в окне **«Iva the best»** запускают программу **«urea-CV»**, по которой циклирование проводится (дважды по 63 цикла) до тех пор, пока регистрируемые циклические вольтамперограммы не станут воспроизводимыми.

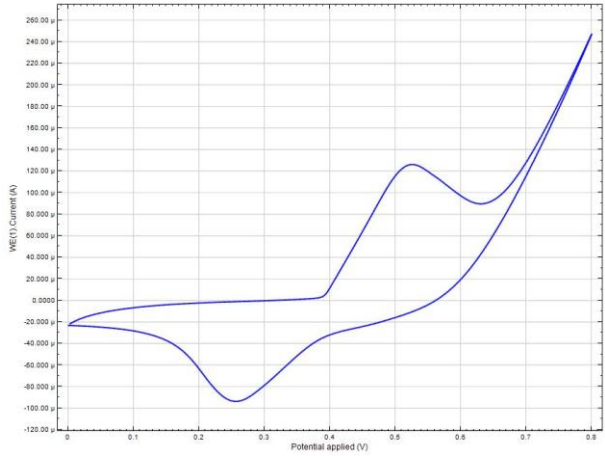


Рис. 9 – Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные при формировании рабочей поверхности ТУЭ, модифицированного комплексом никеля (II) с органическим лигандом. Фоновый электролит 0,25 М NaOH, $v_{разв}$ = 0,1 В/с.

По циклическим вольтамперограммам выбирают потенциал для хроноамперометрических исследований окисления мочевины. Потенциал должен находиться немного положительнее потенциала анодного пика катализатора (на его «склоне»). Для ТУЭ, модифицированного комплексом Ni (II) – в интервале

0,50–0,55 В (рис. 9), для ТУЭ, модифицированного наночастицами Ag – в интервале 0,30–0,40 В (рис. 10).

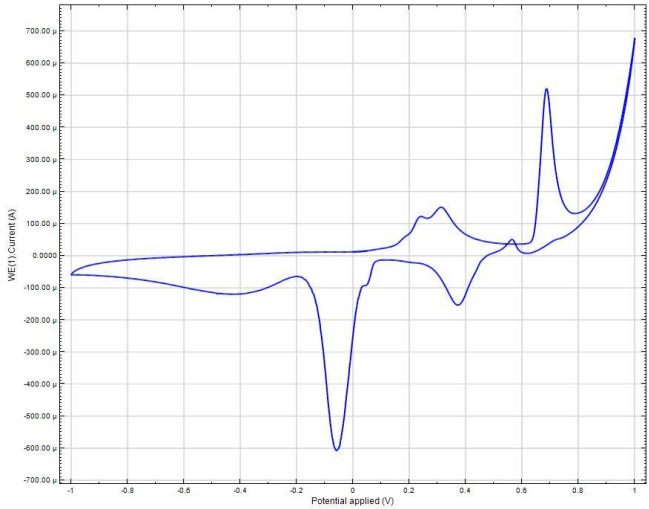


Рис. 10 – Циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная при формировании рабочей поверхности ТУЭ, модифицированного наночастицами Ag (100-й цикл). Фоновый электролит 0,25 М NaOH, $\nu_{разв}$ = 0,1 В/с.

Не меняя электролита в электрохимической ячейке, переходят к хроноамперометрическому анализу пробы способом добавки. Для этого в окне **«Iva the best»** запускают программу **«urea-CA»**, в которой задают выбранный потенциал и время проведения анализа (90 с).

Регистрируют хроноамперограмму фонового раствора. Затем в ячейку вводят 0,1 см^3 фильтрата, полученного после пропускания исследуемой пробы через анионообменную колонку, и регистрируют хроноамперограмму пробы. Далее в ячейку вводят 0,1 см^3 стандартной добавки 0,1 М раствора мочевины и регистрируют хроноамперограмму пробы с добавкой (рис. 11).

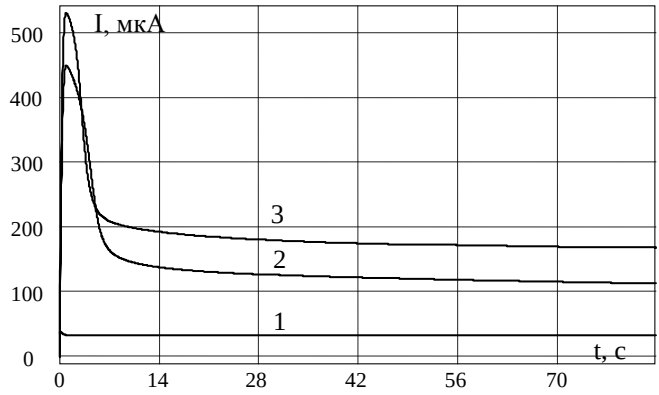


Рис. 11 – Хроноамперограммы окисления мочевины, зарегистрированные с использованием ТУЭ/$Ag_{нано}$ на фоне 0,25 М NaOH (1), на фоне + 0,1 $см^3$ фильтрата (2) и на фоне + 0,1 $см^3$ фильтрата + 0,1 $см^3$ 0,1 М раствора мочевины (3).

После регистрации кривых в одном окне и их сохранения можно проводить обработку полученных результатов. Ток в мкА для фона, фона с фильтратом и фона с фильтратом и стандартной добавкой мочевины измеряют по истечении 70 с самостоятельно по хроноамперограммам.

Расчет содержания мочевины

Вычисления концентрации мочевины проводят по формуле:

$$C_{обр} = C_{доб} \times \left(\frac{\Delta I_{обр}}{\Delta I_{доб}} \right) \times \frac{V_{доб}}{V_{обр}}, \quad (8)$$

где $\Delta I_{доб}$ – ток окисления никеля (II), полученный после введения в раствор стандартной добавки мочевины ($\Delta I_{доб} = I_{доб} - I_{обр}$), мкА;

$\Delta I_{обр}$ – ток окисления никеля (II), полученный в присутствии исследуемого образца ($\Delta I_{обр} = I_{обр} - I_{фон}$), мкА;

$C_{доб}$ – концентрация стандартного раствора мочевины, моль/дм^3;

$V_{доб}$ – объем стандартной добавки мочевины, см^3;

$V_{обр}$ – объем исследуемого образца, введенного в ячейку, см^3.

Проводят статистическую обработку полученных данных (P = 0,95).

Вывод

Вывод должен содержать краткий обзор проделанной работы, ход выполнения анализа и результаты определения мочевины в образце.

ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

При выполнении анализов необходимо соблюдать требования техники безопасности согласно следующим ГОСТам:

- при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76;
- электробезопасность при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-79;
- организация обучения работающих по технике безопасности труда по ГОСТ 12.0.004-90;
- помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

Список рекомендуемой литературы

1. Brainina Kh. Z., Ivanova A. V., Sharafutdinova E. N., Lozovskaya E. L., Shkarina E. I. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation // Talanta. – 2007. – V. 71, № 1. – P. 13–18.

2. Brainina Kh. Z., Alyoshina L. V., Gerasimova E. L., Kazakov Ya. E., Ivanova A. V., Beykin Ya. B., Belyaeva S. V., Usatova T. I., Khodos M. Ya. New Electrochemical Method of Determining Blood and Blood Fractions Antioxidant Activity // Electroanalysis. – 2009. – V. 21. – № 3–5. – P. 618–624.

3. Брайнина Х. З., Герасимова Е. Л., Казаков Я. Е., Ходос М. Я. Окислительный стресс: природа, вклад в патогенез, защита и диагностика // Химический анализ в медицинской диагностике. – Под ред. Г. К. Будникова. – М.: Наука. – 2010. – Т. 11. – С. 132–163.

4. Герасимова Е. Л., Иванова А. В., Брайнина Х. З. Потенциометрия в исследовании АОА биологических объектов. 2013, LAP LAMBERT Academic Publishing. ISBN 978-3-659-35355-0, 145 стр.

5. Н. Ф. Захарчук, С. Ю. Сараева, Л. И. Колядина, О. И. Судаева, Х. З. Брайнина. Прямое определение кадмия, свинца и меди в цельной крови методом инверсионной вольтамперометрии с использованием модифицированных толстопленочных графитовых электродов // Ж-л «Химия в интересах устойчивого развития». – 2003. – № 11. – С. 725–737.

6. Н. Ф. Захарчук, О. И. Судаева, С. Ю. Сараева, Л. И. Колядина, Х. З. Брайнина. Определение цинка в цельной крови и ее фракциях методом инверсионной вольтамперометрии с исполь-

зованием модифицированных толстопленочных углеродсодержащих электродов // Ж-л «Химия в интересах устойчивого развития». –2004. – № 12. – С. 689–701.

7. Козицина А. Н., Брайнина Х. З., Бейкин Я. Б. Электрохимический иммуносенсор, на основе белка А, меченого коллоидным золотом // Сенсор. – 2002. – № 4. – С. 22–26.

8. Глазырина Ю. А., Козицина А. Н., Брайнина Х. З. Электрохимическое определение Salmonella с использованием нано Fe_3O_4. 2012, LAP LAMBERT Academic Publishing. ISBN 978-3-8465-0356-0, 130 стр.

9. А. Н. Козицина, Ж. В. Шалыгина, С. С. Деденева, Г. Л. Русинов, С. Г. Толщина, Е. В. Вербицкий, Х. З. Брайнина. Каталитические системы на основе органических комплексов никеля (II) в хроноамперометрическом определении мочевины и креатинина. Известия академии наук. Серия химическая. – 2009. – № 6, – С. 1091–1097.

10. Х. З. Брайнина, А. Н. Козицина, Ю. А. Глазырина, Л. В. Устинов. Наноматериалы: риски и использование in vivo и in vitro в диагностике // Химический анализ в медицинской диагностике. – Под ред. Г. К. Будникова. – М.: Наука. – 2010. – Т. 11. – С. 164–178.

11. Х. З. Брайнина, А. Н. Козицина. Химические и биохимические сенсоры: от биосенсоров к биочипам и мультисигнальным системам // Химические сенсоры. – Под ред. Ю. Г. Власова. – М.: Наука. – 2011. – Т. 14. – С. 314–344.

Учебное издание

Иванова Алла Владимировна
Козицина Алиса Николаевна
Герасимова Елена Леонидовна
Сараева Светлана Юрьевна
Глазырина Юлия Александровна
Матерн Анатолий Иванович

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Лабораторный практикум

План выпуска 2014 г. Подписано в печать 08.04.2014
Формат 60×84 1/16 Бумага офсетная Гарнитура Times
Уч.-изд.л. 2,5 Усл.печ.л. 3,0 Тираж 50 экз. Заказ № 594

Издательство Уральского университета
620000, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4