

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

Сургутская Наталья Сергеевна

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА, ПОКРЫТЫХ
УГЛЕРОДОМ И ОБЛАДАЮЩИХ ПОДОБНЫМИ ПЕРОКСИДАЗЕ
СВОЙСТВАМИ**

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

Доктор химических наук,
Трусова Марина Евгеньевна

Томск-2017

Условные обозначения и сокращения

Fe@C-наночастицы железа покрытые углеродом

TMB- 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

OPD- орто-фенилендиамин

NHS- N-гидроксисукцинимид

EDC-1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид

MES- 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES) натриевая соль

HRP – пероксидаза хрена

GFP- зеленый флуоресцирующий белок

4-ААП- 4- аминоантипирин

ВЭЖХ - Высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ-МС - газовая хроматография—масс-спектрометрия

ТГ- термогравиметрия

ДСК- дифференциальная сканирующая калориметрия

Оглавление

Введение.....	5
Глава1 Литературный обзор.....	11
1.1. Аналитические возможности физико-химических методов определения глюкозы.....	12
1.2. Наночастицы как альтернатива ферментам.....	19
1.3. Количественное определение ряда органических веществ с использованием подобных пероксидазе свойств наночастиц спектрофотометрическими методами.....	24
Глава 2. Аппаратура, объекты исследования и методики эксперимента....	30
2.1. Основное оборудование и реактивы.....	30
2.2. Объекты исследования.....	32
2.3. Методика проведения кинетических исследований.....	33
2.4. Методика определения глюкозы ферментативным методом с использованием стандартного набора реагентов.....	33
2.5. Общая методика ковалентной функционализации поверхности наночастиц Fe@C.....	34
2.6. Прививка GFP на поверхность Fe@C-COOH.....	35
Глава 3. Исследование подобной пероксидазе активности наночастиц Fe@C.....	36
3.1. Применение наночастиц Fe@C в качестве аналога фермента пероксидазы.....	36
3.2. Определение рабочих параметров реакции окисления 3,3',5,5'- тетраметилбензидина в присутствии наночастиц Fe@C.....	38
3.3. Исследование кинетики реакции окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C и расчет основных кинетических параметров процесса.....	42
3.4 Влияние структуры наночастиц Fe@C на подобную пероксидазе активность.....	46
Глава 4. Выбор рабочих параметров спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C.....	51

4.1. Выбор рабочих значений концентрации и времени взаимодействия глюкозооксидазы с раствором глюкозы.....	54
4.2. Влияние времени взаимодействия наночастиц Fe@C на величину аналитического сигнала окисленного ТМБ.....	56
4.3. Изучение зависимости оптической плотности окисленного ТМБ от концентрации глюкозы в модельных растворах и оценка предела обнаружения глюкозы.....	58
4.4. Оценка мешающего влияния компонентов матрицы на аналитический сигнал окисленного ТМБ при спектрофотометрическом определении глюкозы...	61
Глава 5 Применение спектрофотометрического метода с использованием наночастиц Fe@C для определения глюкозы в биообъектах и пищевых продуктах.....	65
5.1. Методика спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C в соковой продукции.....	65
5.2 Методика спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C в биологических жидкостях.....	68
5.3 Метрологическое обеспечение спектрофотометрических методик определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C.....	71
Глава 6 Процессы поверхностной функционализации наночастиц Fe@C для получения материалов медицинского назначения	74
6.1. Влияние поверхностной функционализации наночастиц Fe@C на подобную пероксидазе активность.....	75
6.2. Наночастицы Fe@C как платформа для прививки биомолекул.....	78
Выводы.....	82
Список литературы.....	84
Приложение А.....	102
Приложение Б.....	103
Приложение В.....	107
Приложение Г.....	110

Введение

Актуальность работы. Глюкоза является основным компонентом практически всех продуктов питания и неотъемлемым источником энергии для всех живых организмов.

Кроме того, глюкоза входит в перечень важных клинико-диагностических показателей для обнаружения проблем в организме человека и постановки диагнозов. Концентрация глюкозы в крови и моче отражает состояние углеводного обмена, который регулируется печенью, гормонами и центральной нервной системой. Снижение данного компонента в крови помогает диагностировать тяжелые заболевания печени, поджелудочной железы и даже воспалительные заболевания головного мозга. В свою очередь повышение концентрации глюкозы в крови и моче способствует выявлению таких заболеваний как сахарный диабет и гликозурия.

Для некоторых видов пищевых продуктов содержание глюкозы регламентировано. Так, например, в техническом регламенте на соковую продукцию из фруктов и овощей ТР ТС 023/2011, утвержденном Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 882 пунктами 20 и 22 статьи 5 содержание сахара (в том числе глюкозы) строго регламентировано, что требует наличия аттестованных методик по его определению согласно требованиям Федерального закона № 184-ФЗ.

Сегодня существует широкий спектр лабораторных методов определения глюкозы как в пищевых, так и в биообъектах. Большинство из них, особенно титрование, являются неселективными по отношению к глюкозе и используются для определения общего количества сахаров в образце. Более современные методы, основанные на использовании методов ВЭЖХ и ГХ-МС, требуют предварительной дериватизации сахаров и подбора рабочих параметров разделения сложной матрицы в зависимости от используемого материала колонки или предварительной экстракции образцов пищевых и биологических продуктов из водной среды в органическую и их сушки.

Несмотря на большое количество публикаций, описывающих определения глюкозы, лишь небольшое количество аттестованных методик по определению в соках и биообъектах являются аттестованными, например, капиллярный электрофорез ФР.1.31.2013.15579, которая является аттестованной методикой для определения фруктозы, глюкозы и сахарозы в напитках, плодоовощной продукции, БАД и мёде.

Спектрофотометрические ферментативные методы определения глюкозы, обладающие исключительной селективностью, экспрессностью и достаточной точностью определения являются хорошей альтернативой для практического использования при анализе продуктов пищевой промышленности. Они нашли свое применение в анализе биообъектов и применяются при контроле соковой и молочной продукции согласно государственным стандартам. При этом использование ферментов ограничено из-за их низкой стабильности и жестких требований к условиям хранения.

В связи с этим создание новых альтернативных каталитических систем для разработки методик определения глюкозы, обладающих повышенной стабильностью и такой же высокой специфичностью как ферментативные методы является актуальной задачей.

В течение последнего десятилетия наблюдается интенсивное развитие тематики, связанной с возможностью замены ферментов на альтернативные наноматериалы, обладающие свойствами подобными природным ферментам. Особое место среди наноматериалов занимают наночастицы на основе графита или покрытые им, которые обладают повышенной стабильностью при хранении на воздухе и в водных средах при комнатной температуре, а также способных проявлять аналогичный ферментам вид активности.

В данной работе рассматривается возможность применения наночастиц железа, покрытых углеродной оболочкой (Fe@C) в качестве аналога фермента пероксидазы, и его применения в качестве одного из компонентов для спектрофотометрического определения глюкозы в различных объектах. Работа выполнялась при поддержке грантов РФФИ 13-03-98009 р_сибирь_a и РФФИ 16-

33-00351 мол_а, проекта в рамках программы повышения конкурентоспособности Томского Политехнического университета ВИУ_ИФВТ_77_2014 и Государственного задания «Наука» № 4.5924.2017.

Цель работы: изучение подобной пероксидазе активности наночастиц железа, покрытых углеродом и разработка методики спектрофотометрического определения глюкозы в пищевых продуктах и биообъектах.

Для достижения указанных целей необходимо решить следующие задачи:

- оценить возможность использования наночастиц железа, покрытых углеродной оболочкой (Fe@C) в качестве аналога фермента пероксидазы в реакциях окисления основных ее субстратов;
- определить рабочие условия реакции окисления субстрата пероксидазы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина с использованием наночастиц Fe@C и рассчитать основные кинетические параметры данного процесса;
- разработать алгоритм методик определения глюкозы спектрофотометрическим методом с использованием наночастиц Fe@C в соковой продукции и биообъектах;
- провести метрологическую аттестацию результатов спектрофотометрической методики определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C .

Научная новизна

1. Впервые показано, что наночастицы железа, покрытые углеродом Fe@C проявляют подобную пероксидазе активность и окисляют основные субстраты пероксидазы в присутствии пероксида водорода.

2. Впервые рассчитаны основные кинетические параметры процесса окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (константы Михаэлиса и максимальные скорости реакции) с использованием наночастиц Fe@C . Показано, что для достижения половины максимальной скорости реакции наночастицы требуют концентрацию вносимой перекиси водорода 114,4 мМ. При этом кинетика

реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина описывается уравнением Михаэлиса-Ментен для ферментативной кинетики.

3. Впервые разработаны условия спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C и показан диапазон определяемых содержаний глюкозы от 2,3 до 37 мкМ.

4. Впервые разработан алгоритм методик спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C в пищевых продуктах и биообъектах.

Практическая значимость

1. Проведена оценка влияния мешающих компонентов матрицы в соках и биологических жидкостях при определении глюкозы с использованием наночастиц Fe@C методом спектрофотометрии.

2. Предложены методики спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C в пищевых продуктах и биообъектах и проведена их метрологическая экспертиза.

3. Методики количественного определения глюкозы в образцах жидких пищевых продуктов и биологических жидкостях нашли практическое применение в лабораториях и центрах ФБУ «Алтайский ЦСМ» (г. Барнаул), ФГБУЗ «Головной центр гигиены и эпидемиологии ФМБА России» (г. Москва) и Ханты-Мансийской государственной медицинской академии (г. Ханты-Мансийск), и имеются акты о внедрении результатов.

Апробация работы

Отдельные части работы докладывались и обсуждались на II Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Высокие технологии в современной науке и технике» (Томск, 2013 г.), II Всероссийского конкурса научных докладов студентов «Функциональные материалы: разработка, исследование, применение» (Томск,

2014 г.), IX Международной конференции студентов и молодых учёных «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2012 г.), XXVII Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (Иркутск, 2013 г.), IV Международной конференции молодых учёных «Органическая химия сегодня» (Санкт-Петербург, 2014 г.) 7th International Conference «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications» (Томск, 2016 г.) X Международной конференции молодых учёных по химии «МЕНДЕЛЕЕВ-2017» (Санкт-Петербург, 2017 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи, материалы 9 докладов, тезисы 9 докладов.

Объем и структура работы. Работа изложена на 114 страницах, содержит 30 рисунков, и 15 таблиц, состоит из 6 глав, выводов, списка литературы из 146 наименований, и 4 приложений.

Автор выражает глубокую признательность профессору Г.Б. Слепченко (ФАХ ИПР Томский Политехнический университет) за помощь и консультации во время подготовки материалов и написания кандидатской диссертации. Автор выражает искреннюю благодарность своим научному руководителю д.х.н., доценту М.Е. Трусковой, и соруководителю к.х.н., доценту П.С. Постникову (Томский Политехнический университет) за помощь и постоянное внимание к работе. Автор выражает искреннюю благодарность д.ф.-м.н., главному научному сотруднику А.Е. Ермакову и к.ф.-м.н., зав. лабораторией М.А. Уймину (Институт физики металлов Уро РАН) за предоставленные наноматериалы Fe@C.

Положения, выносимые на защиту

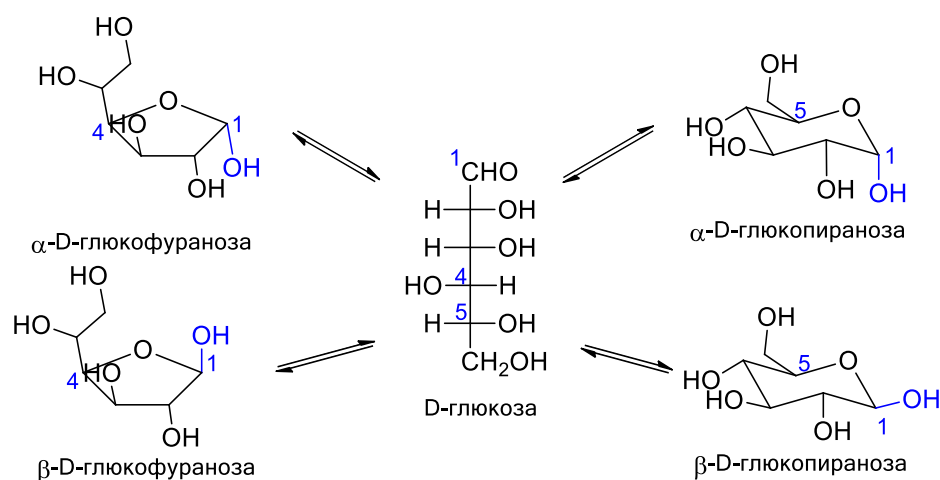
1. Кинетика реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в присутствии Fe@C.
2. Рабочие условия основных этапов спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C.

3. Алгоритм методик количественного химического анализа соковой продукции и биологических жидкостей (сыворотка крови и моча) на содержание глюкозы спектрофотометрическим методом с использованием наночастиц Fe@C.

Глава1 Литературный обзор

Глюкоза (виноградный сахар или декстроза) представляет собой бесцветное кристаллическое вещество без запаха и имеющее сладкий вкус. Декстроза является моносахаридом, относящимся к группе альдокетоз, хорошо растворимым в воде, реактиве Швейцара, концентрированных растворах хлорида цинка и серной кислоте.

В природе глюкоза существует в виде пяти таутомерных форм, представленных на схеме:



Глюкоза является неотъемлемым компонентом всех растений, пищевых продуктов и живых организмов.

Сахара, присутствующие в пищевых продуктах, составляют их основную энергетическую ценность, и их содержание в некоторых продуктах (соковая продукция) регламентировано согласно действующим техническим регламентам (ТР ТС 023/2011).

Поступающие вместе с продуктами углеводы перерабатываются в желудочно-кишечном тракте в глюкозу, которая является незаменимым источником энергии в организме [1]. Прием глюкозы оказывает благоприятное влияние на нервную систему и стимулирует работу головного мозга и кровеносной системы, а также способствует более быстрому восстановлению функций организма после физического истощения и нормализации защитной функции печени [2].

Кроме того, уровень содержания глюкозы в биологических жидкостях имеет важное клинико-диагностическое значение [3-5]. Повышенное содержание глюкозы в крови (сыворотке крови) может сигнализировать о сахарном диабете, панкреатите и ряде других заболеваний. В моче глюкоза исследуется реже, но также способствует постановке диагноза глюкозурия характерного для людей, страдающих диабетом.

В связи с этим оценка содержания сахаров (в том числе и глюкозы) важна для контроля качества продуктов питания и возможности подбора низкоуглеводных диет, а также для предупреждения, оценки и контроля течения заболеваний [6].

Современные методы, позволяющие проводить количественное определение глюкозы в модельных и реальных объектах, охватывают практически весь спектр существующих аналитических приборов и оборудования [7, 8]. Однако не все они могут применяться для анализа реальных объектов в аттестованных медицинских лабораториях и лабораториях пищевой промышленности, в которых рамки исследования основных показателей качества ограничены действующим законодательством.

1.1. Аналитические возможности физико-химических методов определения глюкозы

Самыми ранними методами определения глюкозы являются титриметрические методы, основанные на ее восстановительных свойствах. К ним относятся методы иодометрического, перманганатометрического титрования и феррицианидный метод. Все эти методы основаны на способности глюкозы восстанавливать соли меди или калий железосинеродистый на одной из стадий ее определения. Несмотря на широкую применимость данных методов в современных лабораториях для анализа содержания сахара в кондитерских изделиях [9], молочных продуктах [10] и винах [11], методы обладают низкой специфичностью к глюкозе в присутствии других сахаров. Данные методы

применимы только для определения общего количества редуцирующих сахаров и сахара после инверсии в образцах пищевых продуктов. Метод не применим для количественного определения глюкозы в биологических объектах в связи с завышенными результатами определения более чем на 5% (погрешность примерно равна 25%).

Более современные хроматографические методы анализа, позволяют анализировать смеси сложного состава. К таким методам относится метод ГХ-МС [12]. Этот метод отличается высокой чувствительностью, однако количественное определение глюкозы и других сахаров требует предварительных стадий пробоподготовки [13], связанных с экстракцией исходных образцов биообъектов или пищевых продуктов из водных сред, и их переводом в возгоняемые формы преимущественно за счет образования эфиров. Так, метод ГХ-МС был использован группой ученых под руководством W-N. Paul Lee [14] для обнаружения глюкозы и фруктозы в образцах сыворотки крови. Несмотря на низкий предел обнаружения сахаров (0,3 мкМ) исходные образцы сыворотки крови требовали длительной пробоподготовки, связанной с отделением белковых структур, проведением химической модификации, нескольких стадий сушки и переносом образцов в органический растворитель. Алгоритм этой пробоподготовки представлен на рисунке 1.

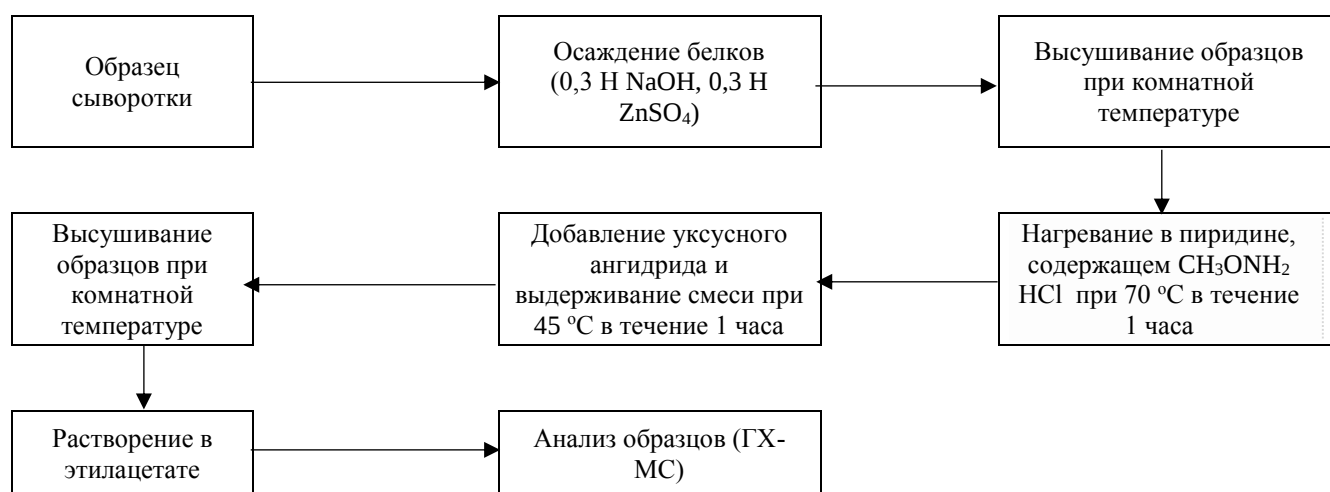


Рисунок 1. Алгоритм процесса проведения пробоподготовки образцов сыворотки крови для количественного определения глюкозы методом ГХ-МС

Более широкое распространение получили методы ВЭЖХ, с применением детекторов УФ, флуоресценции или показателя преломления для количественного определения веществ. Основным преимуществом данного метода является простота пробоподготовки, так как разделение определяемых компонентов происходит в водной среде. Для проведения процессов определения глюкозы метод также требует предварительной ионизации сахаров в растворе путем увеличения pH среды. Недавно опубликованная работа [15] по определению глюкозы, других сахаров и кислот в цитрусовых фруктах методом ВЭЖХ продемонстрировала возможность определения глюкозы в диапазоне 100-5000 мг/л с пределом обнаружения 67 мг/л. Данный метод применим и к определению глюкозы в молочных порошках с верхним пределом обнаружения 29 мкг/мл [16].

Использование амперометрических импульсных детекторов совместно с ВЭЖХ позволило определить глюкозу и другие сахара в орехах [17], апельсиновой биомассе [18], стеблях кукурузы [19] с пределом обнаружения 0,2 мкМ (для глюкозы) [17].

Законодательством Российской Федерации допускается использование метода ВЭЖХ с рефрактометрическим детектором для анализа сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита в соковой продукции [20], имеющего предел обнаружения и 0,3 г/л в области концентраций глюкозы от 1 до 650 г/л.

Несмотря на достаточно хорошие метрологические характеристики этих методик при изменении объекта исследования, имеющего более сложную матрицу, методы требуют повторного подбора условий разделения.

Широкое распространение получили методы капиллярного электрофореза, основанные на разделении смеси на кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Для разделения нейтральных углеводов их предварительно ионизируют в нужном фоновом электролите за счет комплексообразования с борат-ионами или за счет прямой ионизации гидроксильных групп в фоновых растворах с высоким pH. Так, предварительное фотоокисление углеводов в среде основного фонового электролита позволило разделить и количественно определить сахара в диапазоне концентраций от нм до

мкМ при 270 нм [21, 22]. Кроме того, метод капиллярного электрофореза с использованием системы «Капель» (ФР.1.31.2013.15579) является аттестованной методикой для определения фруктозы, глюкозы и сахарозы в напитках, плодоовощной продукции, БАД и меде.

Другие электрохимические методы определения глюкозы в реальных объектах [23] основаны на использовании поверхностно-модифицированных электродов, содержащих специфический фермент – глюкозооксидазу, как представлено на рисунке 2 [24].

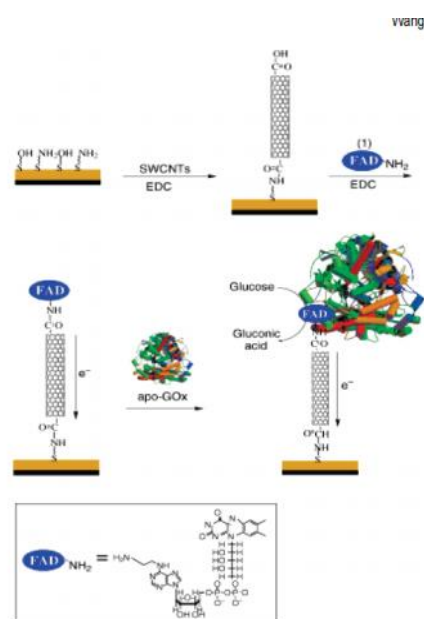
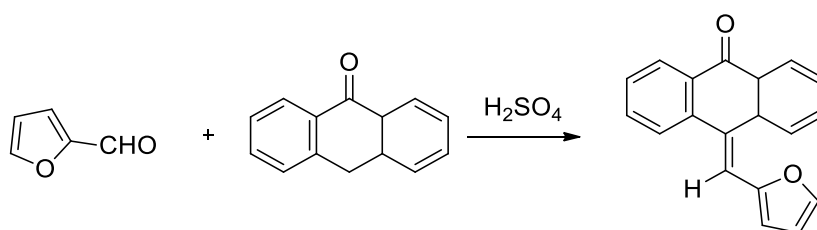


Рисунок 2. Схема проведения процесса поверхностной функционализации поверхности электродов глюкозооксидазой

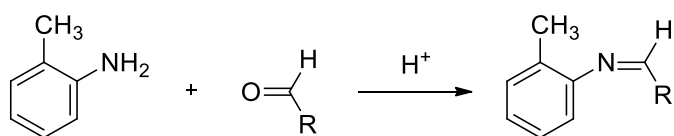
Количественное определение глюкозы в растворе при этом регистрируется по количеству образованной перекиси водорода или по кислороду, израсходованному на окисление глюкозы. В зависимости от типа покрытия и материала электрода существующие электрохимические методы позволяют количественно определять глюкозу в модельных растворах в диапазонах концентраций: 0,12-2,16 мМ [25], 2-22 мМ [26], 0,1-11,5 мМ [27], при этом пределы обнаружения не превышают 0,03 мМ. Разработка данных методов преимущественно ориентирована на определение глюкозы в биообъектах [28] и пока не была применена для анализа пищевых продуктов.

Большую популярность получила группа колориметрических методов определения глюкозы в водных средах [29, 30]. Они условно могут быть разделены на две группы: неферментативные и ферментативные.

Первая группа включает в себя известный антронный метод, заключающийся в переводе глюкозы в оксиметилфурфурол в кислой среде и его дальнейшим взаимодействии с антроном с образованием окрашенного в зеленый или сине-зеленый цвет продукта ($\lambda_{\max}=620-625$ нм), по следующей схеме:



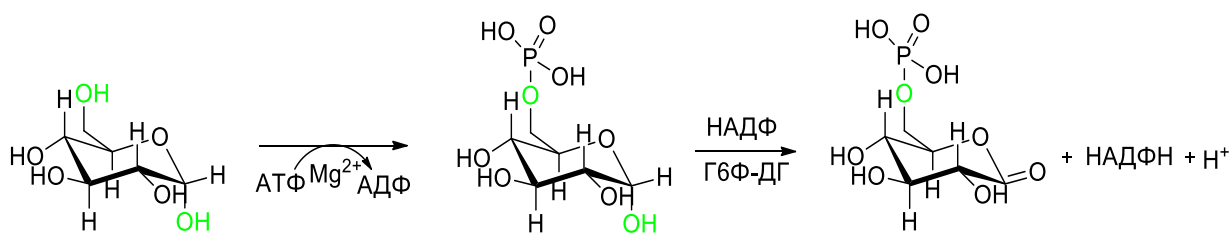
Ортотолуидиновый метод также основан на образовании окрашенного продукта взаимодействия глюкозы с о-толуидином в кислой среде ($\lambda_{\max}=620$ нм) по общей схеме:



Оба метода просты, обладают достаточной точностью определения, но требуют четкого соблюдения температурного режима и чистоты используемых веществ. Кроме того, возможность их применения ограничивается биообъектами, так как другие дисахариды (сахар), которыми богаты пищевые продукты, способны к гидролизу в сильнокислых средах до моносахаридов, легко вступающих в оба типа реакций, что может исказить результаты определения.

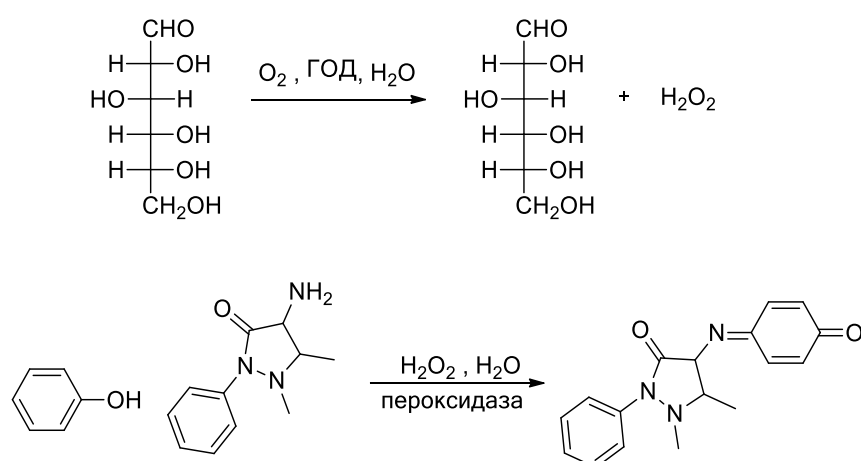
Обширное практическое применение в лабораторной практике получили методы ферментативного определения глюкозы. Они нашли свое применение преимущественно в лабораториях медицинской диагностики и для анализа глюкозы в соковой и молочной продукции. Ферментативные методы определения глюкозы также являются косвенными, и основаны на взаимодействии продуктов реакции с хромогенными субстратами.

В пищевой промышленности большую распространённость получил метод [31], в основе которого лежит использование фермента гексокиназы по реакциям, представленным на схеме:



Определение глюкозы при этом происходит в две основные стадии: на первой стадии происходит фосфорилирование глюкозы в присутствии АТФ и фермента гексокиназы до Гл-6-Ф, которая под действием второго фермента дегидрогеназы (Г6Ф-ДГ) восстанавливает НАДФ до НАДФН. Определение концентрации глюкозы при этом происходит по окрашенному НАДФН.

Для анализа биообъектов преимущество отдается глюкозооксидазному методу [30]. Определение происходит через предварительное окисление глюкозы глюкозооксидазой (ГОД) с выделением пероксида водорода, который в присутствии пероксидазы окисляет хромогенный субстрат (4-аминоантипирин в присутствии фенола) с образованием окрашенного продукта реакции как показано на схеме:



Ферментативные методы широко распространены в области клинической диагностики для определения глюкозы в сыворотке крови и моче. Они реже

применяются для анализа пищевых продуктов, но допускаются нормативными документами для анализа глюкозы в соковой продукции [31], а также могут являться одной из ключевых стадий определения фруктозы и сахарозы в жидких пищевых продуктах [31-33]. Эти методы обладают высокой чувствительностью и селективностью, по сравнению с описанными выше методами, реакции протекают в водных буферных растворах и не требуют сложной пробоподготовки образцов. Кроме того, ферментативные методы предполагают небольшой расход реагентов для проведения исследования. При этом существенным недостатком являются высокая стоимость ферментов и жесткие требования к условиям транспортировки и хранения, которые нередко препятствуют их практическому использованию.

В связи с этим в течение последних десяти лет интенсивно развивается направление, связанное с возможностью замены ферментов на альтернативные материалы, которые бы обладали повышенной стабильностью и высокой специфичностью к определяемому веществу. Большое число работ по данной тематике связано с использованием наноматериалов как альтернативных неорганических структур для эффективной замены ферментов в процессах определения различных веществ.

1.2. Наночастицы как альтернатива ферментам

Природные ферменты находят широкое применение в медицине [34], химической и пищевой промышленности [35]. Несмотря на высокую каталитическую эффективность и специфичность природных ферментов они являются дорогостоящими, зависимыми от внешних условий, таких как pH и температура, и обладают низкой стабильностью при хранении, что значительно ограничивает возможности их транспортировки и использования. Сравнительно недавно обнаруженные свойства наноматериалов проявлять подобную ферментам активность открыло перед исследователями возможность их использования в качестве так называемых «искусственных ферментов».

Основными преимуществами «искусственных ферментов» перед природными являются их повышенная стабильность при хранении и возможность многократного использования без снижения каталитической активности [36, 37]. Кроме того, поверхность некоторых из них может быть легко функционализирована [38] для повышения каталитических [39-41] или улучшения физико-химических характеристик [42] (рисунок 3).

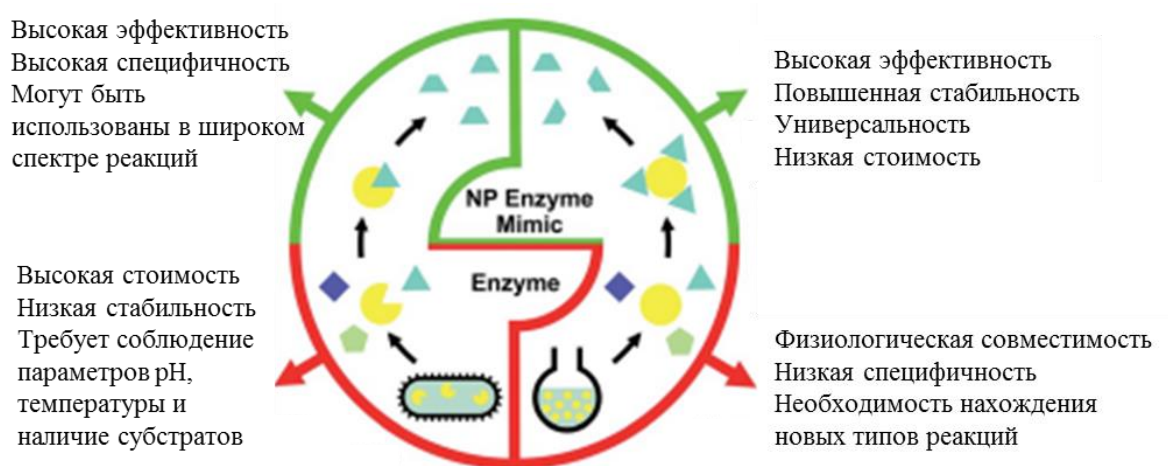


Рисунок 3. Преимущества и недостатки природных ферментов и наноматериалов, обладающих подобными ферментам свойствами [43]

Свойствами подобными ферментам преимущественно обладают наночастицы оксидов металлов, однако также встречаются и наноматериалы на основе ноль-валентных металлов и графита (квантовые точки и фуллерены) [43, 44]. Подобная ферментам активность наноматериалов связана со способностью генерировать активные формы кислорода (ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси как неорганического, так и органического происхождения) или взаимодействовать с ними аналогично природным ферментам.

Известные наноматериалы условно можно разделить на 4 большие группы по типу проявляемой ими ферментативной активности [43]: 1) аналоги каталазы 2) аналоги оксидазы 3) аналоги супероксиддисмутазы (СОД) и 4) аналоги пероксидазы. В таблице 1 представлены основные виды наноматериалов,

обладающих подобными ферментам свойствами, а также возможные области их потенциального применения.

Таблица 1 – Основные представители неорганических наноматериалов, обладающих подобными ферментам свойствами

Вид активности	Наноматериал	Применение	Литература
Подобная каталазе активность	Fe ₃ O ₄ NP, γ -Fe ₃ O ₄ NPs, FePt NPs, Ir NPs, Co ₃ O ₄ NPs, LaNiO ₃ нановолокна, CeO ₂ NPs	Защита клеток от пагубного воздействия H ₂ O ₂ Определение кальция в молоке	[45-52]
Подобная оксидазе активность	CeO ₂ NPs CoFeO ₄ NPs MnO ₂ NPs Mn ₃ O ₄ octahedrons Au NPs Au/Pt NC	SO ₃ ²⁻ - detection Иммуноферментный анализ Сенсор для фенолов и танина Окисление и определение глюкозы	[53-59]
Подобные супероксиддисмутаза свойства	CeO ₂ NPs, Pt NPs	Защита клеток в лучевой терапии, антиоксидантная активность, восстановление активных форм кислорода	[60-63]
Подобные галогенпероксидаза свойства	V ₂ O ₅ нанонити	Препятствие роста микроорганизмов	[64]
Подобные глутатионпероксидаза свойства		Восстановление активных форм кислорода	[65]
Подобные сульфитоксидаза свойства	MoO ₃ NPs	Предотвращение дефицита SuO _x	[66]
Подобные пероксидаза свойства	Fe ₃ O ₄ , Cu, CuInS ₂ Co ₃ O ₄ NPs, CoFe LDHs, CeO ₂ NPs, MnO ₂ NPs, MnSe NPs, V ₂ O ₃ NC, Ir NPs, Au/CuS NC, V ₂ O ₅ нанонити, WC наностержни	Определение H ₂ O ₂ и глюкозы Иммуноферментный анализ Защита клеток от H ₂ O ₂ Удаление загрязняющих веществ в сточных водах Катализ в органических растворителях	[47,48, 55, 67-79]

Следует отметить, что наноматериалы являются более универсальными агентами в отличие от природных ферментов, так как одновременно могут обладать несколькими видами активности в зависимости от условий проведения эксперимента. Например, приведенные в таблице 1 нанонити V₂O₅ [64, 65, 78] сочетают в себе как подобную пероксидазе активность и способны взаимодействовать с пероксидом водорода, так и подобные глутатионпероксидазе

и галогенпероксидазе свойства, связанные со способностью разлагать пероксиды липидов и окислять галогениды в присутствии перекиси водорода. Наночастицы оксида железа [45, 67, 68] способны объединять в себе подобную пероксидазе и каталазе активность и иметь различный механизм разложения пероксида водорода в зависимости от наличия или отсутствия в системе дополнительного донора электронов. В свою очередь наночастицы оксида церия [51-53, 60-62, 74] являются самым универсальным сенсором, способным объединять практически все описанные выше виды ферментативной активности.

Большое число работ по данной тематике посвящено изучению именно подобных пероксидазе свойств наноматериалов ввиду распространенности данного вида активности и возможности его применения для лабораторных исследований, диагностики заболеваний и решению экологических задач (таблица 1) [47, 48, 67-76]. Данный вид активности связан со способностью наночастиц взаимодействовать с пероксидом водорода с образованием реакционноспособных гидроксильных радикалов. При этом кинетика реакций и вид кинетических кривых, полученных с использованием наноматериалов, соответствуют уравнению Михаэлиса-Ментен (рисунок 4) для ферментативной кинетики [80].

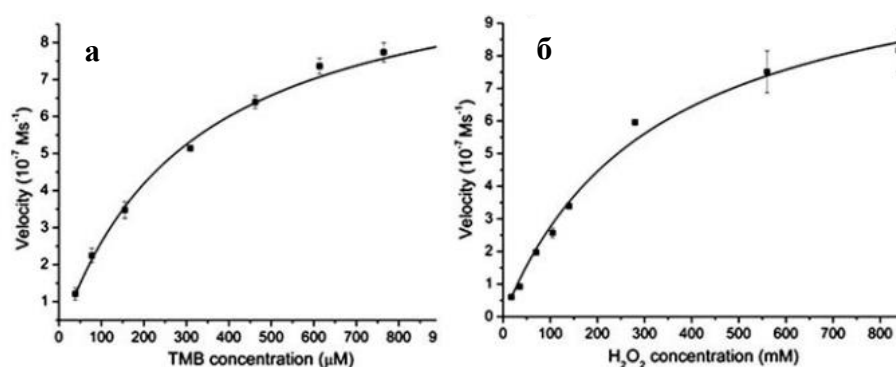


Рисунок 4. Кинетические кривые окисления ТМБ в присутствии наночастиц оксида железа, покрытых берлинской лазурью [80].

Практически значимыми процессами с участием таких наноматериалов являются разложение ряда загрязняющих веществ и возможность проведения

реакций не только в водных средах, но и в среде органических растворителей без потери каталитической активности.

Так, например, наночастицы ванадия не теряют своей пероксидазной активности в реакции окисления 2,2'-азино-бис(3-этилбензолтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS) в спиртовых растворах, а проведение этой реакции в среде ацетонитрила приводит к ее значительному увеличению [78]. Проведение реакций окисления субстратов пероксидазы в среде органических растворителей с использованием наночастиц может изменять и направление протекания этих реакций. Учеными из Наньянского технологического университета было показано, что в присутствии наноматериала WC NR [79] в органических растворителях вместо классического продукта реакции окисления ТМБ в водных средах, окрашенного в синий цвет с максимумом поглощения при длине волны 652 нм, образуется соединение желтого цвета с максимумом в области 450 нм (рисунок 5). Предположительно это связано с формированием устойчивого комплекса переходного металла с активными формами кислорода в апротонных средах, что приводит к дестабилизации комплекса с переносом заряда и образованию дииминового продукта окисления ТМБ.

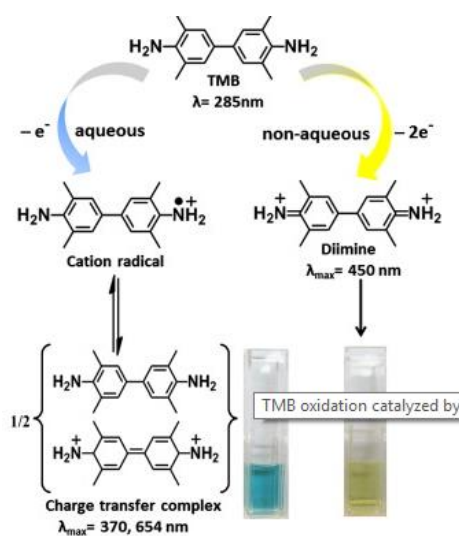
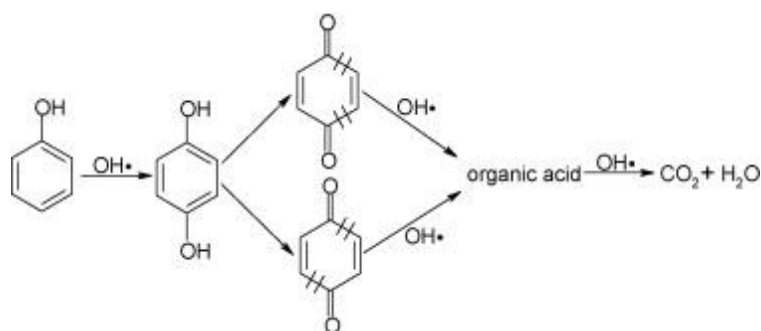


Рисунок 5. Взаимодействие наночастиц WC NR с ТМБ в водной среде и в среде органического растворителя [79]

Механизм деградации некоторых загрязняющих веществ под действием наноматериалов, обладающих подобной пероксидазе активностью, отличается от механизма действия пероксидазы. В классических примерах деградации фенолов в водных средах в результате действия пероксидазы образуются преимущественно продукты полимеризации фенола [81-83]. При использовании наноматериалов продуктами окисления чаще всего выступают 1,4- или 1,2-гидрохины, хиноны и органические кислоты, на основании чего механизм разложения фенолов под действием наночастиц обладающих пероксидазной активностью осуществляется по общей схеме [84]:



Основные представители наноматериалов, обладающие подобной пероксидазе активностью и используемые для каталитического окисления фенолов представлены в таблице 2 [85].

Таблица 2 – Основные представители неорганических наноматериалов обладающих пероксидазной активностью и используемых для каталитического окисления фенолов в водных средах

Наноматериал (г/л)	pH	Соотношение фенол: H ₂ O ₂ (м.д.: mM)	Время	Относительная эффективность разложения	Литература
Au/HAP (0,1)	6.8	100/490	2 ч.	~82 %	[86]
Fe ₃ O ₄ NPs (5)	6-7	94/1200	6 ч.	~100%	[87]
Fe ₃ O ₄ NPs (0,1)	3	282/6	3 ч.	~85 %	[88]
γ-FeOOH наночастицы (0,12)		40/500	1 ч.	~80 %	[89]
Fe ₂ O ₃ NPs (0,015)	2-3	1000/163	0,5 ч.	~100 %	[84]
CuO NPs (0,05)	3-7	250/100	35 мин.	~100 %	[85]

С точки зрения аналитической химии наночастицы, обладающие подобными пероксидазе свойствами, представляют интерес в качестве реагентов для качественного и количественного определения веществ в пищевых и биологических объектах.

1.3. Количественное определение ряда органических веществ с использованием подобных пероксидазе свойств наночастиц спектрофотометрическими методами

Как указывалось ранее, подобная пероксидазе активность является наиболее часто встречающейся активностью у наноматериалов неорганического происхождения. Детектировать ее проще благодаря наличию субстратов пероксидазы (рисунок 6), позволяющих легко визуализировать результат каталитического разложения пероксида водорода.

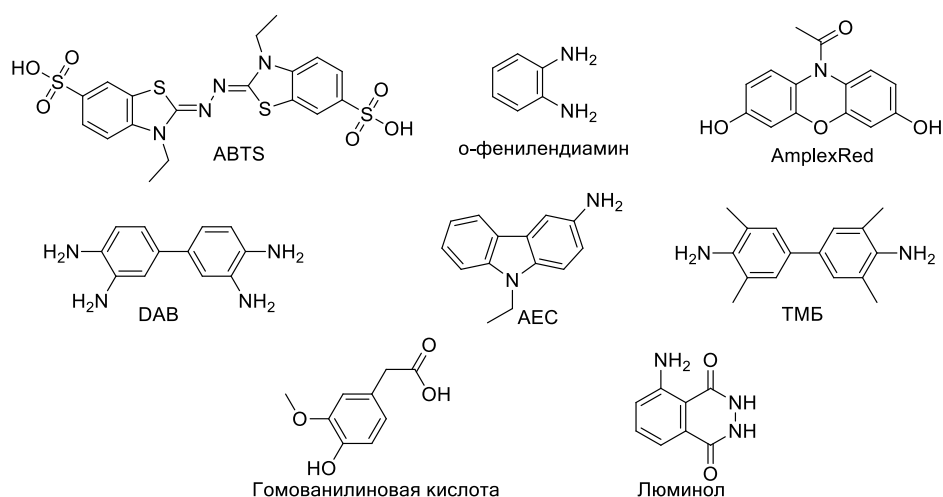


Рисунок 6. Основные субстраты фермента пероксидазы

Наноматериалы, проявляющие подобную пероксидазе активность, самостоятельно могут использоваться только для обнаружения и определения ограниченного класса веществ, таких как перекись водорода и фенолы. Основанные на этом методы позволяют определять остаточные концентрации перекиси, например, в пищевых продуктах, а также могут использоваться для количественного определения фенолов в водных средах.

Так, например, учеными Zhuang J. et al [90] наночастицы оксида железа были использованы для детектирования пероксида водорода в образцах проб дождевой воды. Метод основан на классической реакции взаимодействия активных гидроксильных радикалов с ТМБ и появлением окрашенного комплекса имеющего максимум поглощения при 652 нм и по интенсивности поглощения которого определяется концентрация пероксида в образцах. Метод показал высокую эффективность при определении реальных образцов кислотного дождя с использованием метода «введено-найденно». Градуировочная кривая, полученная с использованием данного метода, имеет линейный участок в области концентраций перекиси водорода 0-70 мкМ и предел обнаружения $1,75 \cdot 10^{-7}$ М. Кроме того, полученный материал не терял своей каталитической активности при повторном использовании в течение трех последовательных циклов.

Примеров использования наноматериалов для определения фенола очень мало, так как преимущественно работы посвящены способам деградации данного вещества. Одна из работ по количественному определению фенолов в водных средах посвящена использованию нанокомпозита RGO/Cu₈S₅/PPy [91]. Авторами работы была использована система, состоящая из 4-ААР, перекиси водорода и наноматериала для колориметрического определения продукта взаимодействия фенола с 4-аминоантипирином (4-ААП) при 500 нм (рисунок 7). Разработанная методика позволяет определять содержание фенола в диапазоне от 0 до 200 мкМ и пределом определения $1,78 \cdot 10^{-6}$ М.

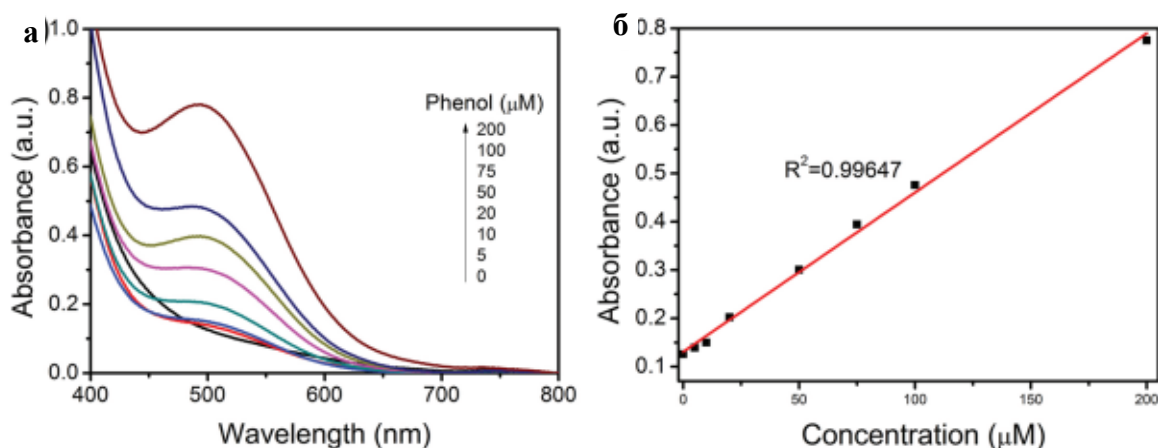


Рисунок 7. Абсорбционные кривые реакционных растворов при 500 нм с содержанием фенола 0-200 мкМ (а) и градуировочная кривая для количественного определения фенола в водных средах (б) [91]

Пероксидазу преимущественно используют в качестве одного из компонентов в комплексном анализе биологических веществ, способных при окислении образовывать пероксид водорода (глюкоза, холестерин), концентрация которого соответствует содержанию исходного вещества и определяется с помощью фермента. Поэтому области применения наноматериалов, обладающих пероксидазными свойствами, также существенно расширяются при использовании их в комплексе с другими реагентами.

С 2008 года опубликовано большое число работ, посвященных количественному определению глюкозы в водных средах и в биологических объектах [92-103].

Научной группой [94] была опубликована одна из первых работ по разработке методики для определения глюкозы в водных растворах с использованием модифицированных наночастиц оксида железа. Для этого растворы глюкозы предварительно обрабатывались глюкозооксидазой, а образующаяся H_2O_2 вступала в реакцию с хромогенным субстратом в присутствии наночастиц Fe_3O_4 . В результате была получена одна из первых калибровочных кривых для определения глюкозы в водных средах.

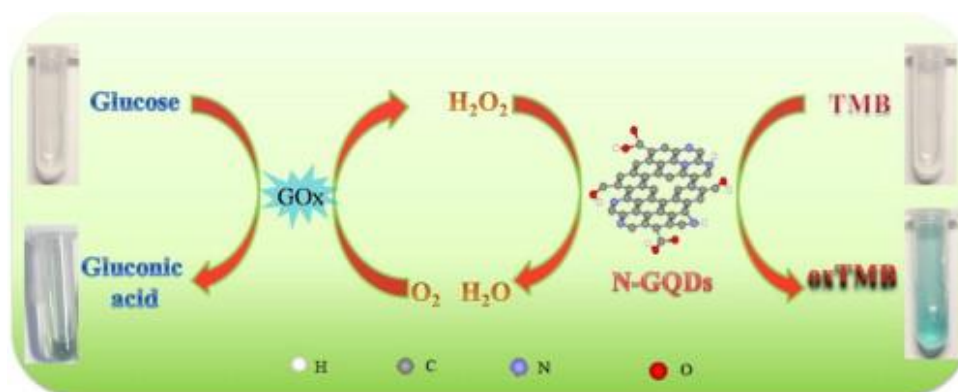


Рисунок 8. Графический вариант детектирования глюкозы в водных растворах с использованием графитовых квантовых точек [95]

Позже, другими научными группами на основе данный подход был реализован для разработки методик по спектрофотометрическому определению глюкозы и холестерина в реальных образцах (рисунок 8) с использованием наноматериалов различной структуры (таблица 3).

Таблица 3. Основные параметры спектрофотометрических методик с использованием наноматериалов для количественного определения глюкозы и холестерина в реальных объектах

Определяемый компонент	Частицы	Объект анализа	Метрологические характеристики (линейный диапазон, предел обнаружения)	Литература
Глюкоза	ZnFe ₂ O ₄	моча	1,25-18,75 мкМ (0,3 мкМ)	[96]
	GO _x -Fe ₃ O ₄		2-200 мкМ (0,74 мкМ)	[97]
	MMS	цельная кровь	15-250 мг/дл	[98]
	PB-Fe ₂ O ₃ NPs		1-80 мкМ (0,16 мкМ)	[99]
	Ch-Ag NPs		5-200 мкМ (0,1 мкМ)	[100]
	CuS NPs		2-1800 мкМ 0,12 мкМ	[101]
	Fe ₃ O ₄ NPs	Буферные растворы	50-1000 мкМ 30 мкМ	[69]
Холестерин	CuO:GNS	Буферные растворы	0,1-0,8 мМ (78 мкМ)	[102]
	ZnO	Молочная продукция	0,5-500 нМ (2 нМ)	[103]
	MMS	Цельная кровь	15-250 мг/дл (-)	[97]

При использовании наночастиц оксидов металлов часто наблюдается постепенное нарушение структуры их поверхности за счет выщелачивания активных ионов металла при хранении в водных (особенно кислых) средах.

Данный недостаток накладывает ограничения на условия хранения суспензий таких наноматериалов [90].

В связи с этим появлялись работы, связанные с модификацией поверхности наноматериалов различными органическими группами и покрытиями, которые способствовали не только повышению стабильности наноматериала, но и зачастую приводили к улучшению подобной пероксидазе активности. Так, органо-неорганические наноматериалы, содержащие на поверхности карбоксильные группы, отличались повышенной стабильностью суспензий и проявляли более высокую подобную пероксидазе активность, чем исходные наночастицы [39, 41, 97, 104].

Последнее время преимущество отдается разработке методик определения глюкозы с использованием карбонизированных наночастиц (фуллерены, квантовые точки на основе графита и наночастицы оксидов, покрытые углеродной оболочкой), которые обладают повышенной стабильностью и являются биоинертными, что делает их безопасными для человеческого организма и экологии.

На сегодняшний день существует только несколько примеров использования таких наноматериалов для количественного определения глюкозы.

Так, группой ученых под руководством Shy C. [104] для количественного определения глюкозы были использованы C_{60} -карбоксифуллерены, обладающие высокой подобной пероксидазе активностью даже после высокотемпературной обработки и длительного хранения в растворах с различным pH. По сравнению с материалами, приведенными в таблице 3, C_{60} -карбоксифуллерены имеют небольшой диапазон определяемых концентраций глюкозы от 1,0-40 мкМ, но один из самых низких пределов обнаружения глюкозы 0,5 мкМ. При этом отклонение результатов определения глюкозы в реальных объектах (сыворотка крови) не превышает 5%, что позволяет достаточно точно определять глюкозу в образцах сыворотки крови. Графеновые квантовые точки [95] имеют более широкий диапазон определения глюкозы 25–375 мкМ и предел определения - 16

мкМ, они также подходят для количественного определения глюкозы в реальных объектах (сыворотке и фруктовых соках).

Другой группой ученых под руководством Н. Тап [105], в качестве аналога пероксидазы был использован гибридный наноматериал – наночастицы оксида железа покрытые углеродом. Было показано, что наночастицы $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ проявляют значительно более высокую каталитическую активность, чем его составляющие по отдельности (магнитное ядро и углеродная оболочка), а его использование при спектрофотометрическом определении глюкозы позволяет определять ее концентрации в интервале от 6 до 100 мкМ.

Все описанные выше методики позволяют определять, как низкие, так и довольно высокие концентрации веществ после сильного разбавления исходной пробы. Вносимое количество наноматериала является незначительным, что подтверждает экономичное расходование данных материалов. Кроме того, методы обладают высокой селективностью при наличии сопутствующих компонентов в пробе [95, 104, 105].

Следует отметить, что наночастицы при их использовании в колориметрических методах уже показали себя как перспективные реагенты, обладающие достаточной специфичностью для анализа глюкозы и холестерина в биологических объектах. При этом нет ни одного примера использования наночастиц для разработки методик количественного определения глюкозы в пищевых продуктах.

Таким образом, разработка универсальных методик детектирования и количественного определения глюкозы как в пищевых продуктах, так и в биообъектах с использованием карбонизированных наноматериалов, является актуальной задачей.

В данной работе рассматривается возможность применения наночастиц железа, покрытых углеродной оболочкой ($\text{Fe}@\text{C}$), в качестве аналога фермента пероксидазы и их применение в качестве одного из компонентов для спектрофотометрического определения глюкозы в различных объектах.

Глава 2 Аппаратура, объекты исследования и методики эксперимента

2.1. Основное оборудование и реактивы

Экспериментальные исследования проводили на двухлучевом спектрофотометре «SPECORD 250 PLUS» (Analytik Jena AG, Германия) в комплекте с персональным компьютером. В работе использовали кварцевые кюветы объемом 750 мкл с объемом анализируемой пробы 600 мкл и длиной оптического пути 10 мм.

Анализ нанопорошков проводили методами ИК-спектроскопии на ИК-Фурье спектрометрах Nicolet 5700 и Bruker Tensor 27 в режиме МНПВО в таблетках KBr и без наполнителя на кристалле ZnSe, флуоресцентном микроскопе AxioImager M1, Carl Zeiss. Количество функциональных групп на поверхности наноматериала определяли с использованием элементного анализатора Elementar Vario Macro, синхронного термоанализатора SDT Q600 (TA Instruments). и ТГ/ДТА анализатора NETZSCH STA 409 PC/PG, оборудованного масс-детектором Balzers MID, в атмосфере аргона со скоростью нагрева 10 °С/мин. Количество иммобилизованного белка на поверхности определяли с помощью флуориметрии (Cary Eclipse) и спектрофотометрии (Unico 2800) по ранее построенным градуировочным кривым.

Центрифугирование проводили на центрифугах Eppendorf MiniSpin+ и Sigma 2-16P при 14000 об/мин.

Взвешивание точной навески вещества проводили на лабораторных аналитических весах ViBRA HT с погрешностью взвешивания $\pm 0,0001$ г.

В работе была использована мерная лабораторная стеклянная посуда: колбы наливные вместимостью 5, 10, 50, 100 и 250 мл.

Добавки исследуемых веществ осуществляли при помощи дозатора типа ДПОФц-1-0,5-10 с дискретностью установки доз 0,1 мкл и погрешностью не более 7,0 % отн., дозатора типа ДПОФц-1-20-200 с дискретностью установки доз 1 мкл и погрешностью не более 3%отн. и ДПОФц-1-100-1000 с дискретностью установки доз 5 мкл и погрешностью не более 2,0%отн.. Для каждого раствора

какого-либо вещества использовали отдельную пипетку или сменный наконечник дозатора.

Характеристика используемых веществ

Ацетон и этанол использовали марки «хч» без предварительной очистки. DMSO марки «ч» 95 % «Aldrich», H_2O_2 концентрации от 38 до 30% с аптечного склада (Точная концентрация определялась по известным методикам [106]). Все реагенты используемые в работе были аналитически чистыми веществами производителя «Sigma-Aldrich»: глюкозооксидаза (ГОД, 228000 ед./г), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) чистоты 99%, о-фенилендиамин (OPD) чистоты 99%, глюкоза чистоты 99%, фруктоза чистоты 98%, сахароза чистоты 99,5%, лактоза чистоты 98%, мальтоза чистоты 98%, фенол чистоты $\geq 99\%$, витамины (С чистоты $\geq 99\%$, В1 чистоты $\geq 99\%$, В6 чистоты $\geq 99\%$, В12 чистоты $\geq 98\%$, Д3 чистоты $\geq 98\%$), кислоты (лимонная чистоты $\geq 99\%$, яблочная чистоты $\geq 99\%$, молочная чистоты $\geq 98\%$, мочева чистоты $\geq 98\%$ и янтарная чистоты $\geq 98\%$), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDC) чистота 98%, 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES) натриевая соль чистоты 99%, N-гидроксисукцинимид (NHS) чистоты 98%. pQe30-TagGFP2 вектор был получен от Eurogen. Рекомбинантный белок TagGFP2 экспрессировался в E.coli BL21 (DE3) и очищался на колонке методом аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA-агарозы. Арендиазоний тозилаты были синтезированы непосредственно перед использованием по известной лабораторной методике [107]

Приготовление фоновых и исследуемых растворов

Воду, используемую в работе, очищали дистилляцией с использованием дистиллятора ДЭ-4. Растворы исследуемых веществ готовили либо растворением навесок этих веществ, взвешенных с погрешностью не более 0,0002 г, в подходящем растворителе либо из стандартных растворов этих веществ путем их разбавления. Все используемые растворы готовились непосредственно перед работой.

2.2. Объекты исследования

Объектами исследования выступали наночастицы железа, покрытые углеродной оболочкой Fe@C, полученные методом газофазного синтеза в смеси аргона и бутана (рисунок 9) [108].

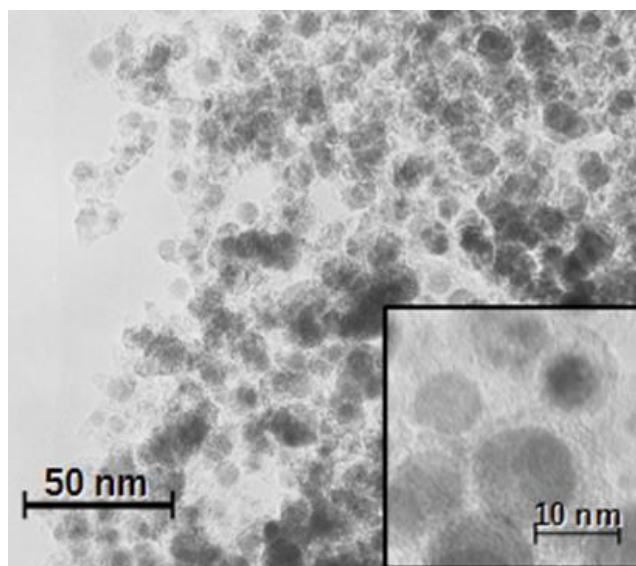


Рисунок 9. Снимок наночастиц Fe@C с просвечивающего электронного микроскопа

Наночастицы имеют сферическую форму и средний размер частиц составляет примерно (5-10 нм). По данным XRD анализа [109], Fe@C включают в себя три основных составляющих: α -Fe, Fe_3C , и углерод. Величина намагничиваемости нанокompозита составляет $110 \text{ Гс} \cdot \text{см}^3/\text{г}$ [110-111].

Объектами исследования на содержание глюкозы являлись соковая продукция и биологические жидкости (сыворотка крови и моча). В работе были использованы соки производителей «Любимый» (гранат, яблоко, груша, клубника) и «Фруто-няня» (банан), приобретенные в ближайшем гипермаркете. Образцы сыворотки получены из «НИИ Кардиологии», образцы мочи получены от добровольцев.

2.3. Методика проведения кинетических исследований

Кинетические исследования основывались на получении и исследовании кривых зависимости изменения оптической плотности от времени каталитической реакции при длине волны 652 нм на спектрофотометре Specord 250 plus в кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Кинетические исследования проводили по методике [80]. Реакции протекали при температуре 40 °С в 550 мкл буферного раствора ацетата натрия (NaOAc, 0,1 М, pH 3,6) с 20 мкл раствора наночастиц Fe@C (0,5 мг/мл).

Исследование каталитической активности наночастиц Fe@C по отношению к пероксиду водорода проводили при постоянном объёме вносимого раствора ТМБ (5 мкл, C= 10 мг/мл), а объем 30 % перекиси водорода изменяли в пределах от 0 до 48 мкл. Исследование активности наночастиц по отношению к ТМБ проводили при постоянном объеме вносимой перекиси водорода 0,192 мкл и различных объемах раствора ТМБ (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 мкл).

2.4. Методика определения глюкозы ферментативным методом с использованием стандартного набора реагентов

Определение глюкозы в образцах биологических и пищевых продуктов проводили с использованием стандартного набора для определения глюкозы компании «Вектор БЭСТ», имеющего линейность определения глюкозы до 28 ммоль/л и коэффициентом вариации -5%.

Стандартный набор содержит:

Реагент 1 (P1) - фосфатный буферный раствор, содержащий глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-аминоантипирин, фенол, стабилизатор, готовый к использованию.

Реагент 2 (P2) – депротеинирующий раствор, готовый к использованию.

Калибратор – калибровочный раствор глюкозы, 10 ммоль/л, готовый к использованию.

Измерение содержания глюкозы в исследуемых образцах проводили согласно прилагаемой инструкции. Для этого 10 мкл исследуемых веществ и 10 мкл калибратора (10мМ) были добавлены к 1 мл раствора стандартных реагентов. Полученные растворы инкубировали в течение 10 мин при 37 °С. Оптическая плотность полученных растворов измеряли при длине волны 510 нм против Реагента 1. Концентрация глюкозы в каждом образце рассчитывали согласно уравнению:

$$C = \frac{E}{E_c} \cdot 10 \quad (1)$$

где, E и E_c – оптическая плотность исследуемого образца и калибратора, 10 – концентрация глюкозы в калибраторе.

Если концентрация глюкозы выходила за пределы линейности методики, исходные образцы разбавляли дистиллированной водой и полученный результат умножали на количество разбавлений.

2.5. Общая методика ковалентной функционализации поверхности наночастиц Fe@C

Наночастицы Fe@C (0,02 г) диспергировали в 5 мл дистиллированной воды с частотой 22,2 кГц в течение нескольких секунд. Растворы соответствующей соли диазония (п-нитро-, п-амино- и п-карбоксибензолдиазоний тозилат) [112] 0,03 г в 6 мл воды был добавлен к суспензии наночастиц. Реакционная смесь выдерживалась до прекращения выделения пузырьков азота. Модифицированные наночастицы (Fe@C) отделяли от реакционной массы магнитом, пятикратно промывали водой, спиртом и ацетоном и сушили под вакуумом в течение 2 часов.

Fe@C-NO₂ ИК-спектр (кристалл ZnSe, отражение) см⁻¹: 881, 1014, 1180, 1346, 1521, 1628, 1701.

Fe@C-NH₂ ИК-спектр (кристалл ZnSe, отражение): 881, 1014, 1180, 1336, 1521, 1625, 3426.

Fe@C-COOH ИК-спектр (кристалл ZnSe, отражение): 883, 1014, 1273, 1393, 1601, 1703, 3444.

2.6. Прививка GFP на поверхность Fe@C-COOH

Наночастицы Fe@C-COOH 50 мг диспергировали в 5 мл 0,1 М раствора EDC, приготовленного в буферном растворе MES (pH 6,0). К суспензии добавляли 5 мл 0,2 М раствора NHS в MES буфере (pH 6,0). Реакционная смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего наночастицы отделяли от раствора магнитом и трехкратно промывали MES буфером.

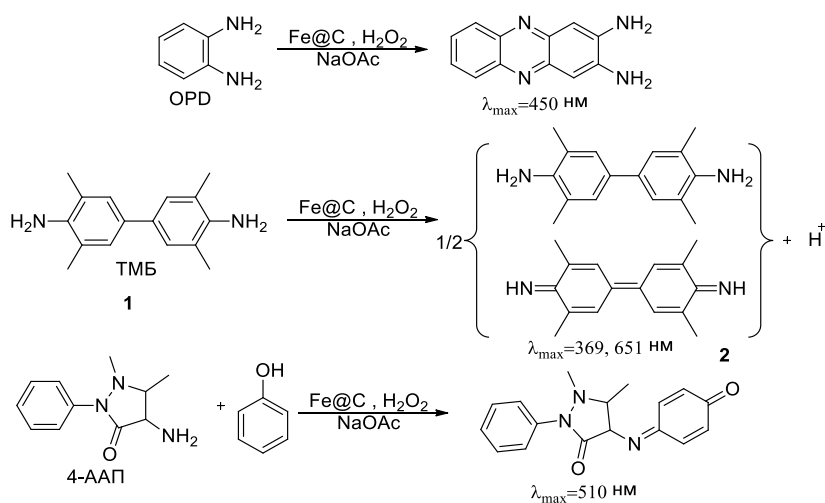
Для иммобилизации белка TagGFP2 100 мкл раствора белка в 0,1 М PBS буфере (0,6 мкг/мл, $2,2 \cdot 10^{-5}$ М) добавляли к 100 мкл суспензии активированных наночастиц Fe@C-COOH MNPs (20 мкг/мл, $2,0 \cdot 10^{-6}$ М). Реакционную смесь выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре. Модифицированные белком наночастицы отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 13400 об/мин. Наночастицы промывали два раза с 0,1М раствором PBS и сушили под вакуумом.

Глава 3. Исследование подобной пероксидазе активности наночастиц Fe@C

Ввиду того, что гибридные наночастицы Fe@C являются новыми материалами, химические свойства которых не были всесторонне изучены, использование их в качестве аналога пероксидазы потребовало проведение дополнительных исследований. В связи с этим требовалось исследовать возможность использования наночастицы Fe@C в качестве аналога фермента пероксидазы, определить рабочие условия процесса окисления субстратов пероксидазы в присутствии наноматериала и определить основные кинетические параметры этого процесса.

3.1. Применение наночастиц Fe@C в качестве аналога фермента пероксидазы

Для исследования возможности использования наночастиц Fe@C в качестве аналога пероксидазы, наночастицы были протестированы в реакциях окисления основных субстратов фермента, таких как 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) (1), о-фенилендиамин (OPD) и 4-аминоантипирин (4-ААП), продукты окисления которых имеют синюю, оранжево-желтую и розовую окраску (рисунок 10) и максимумы поглощения при 369, 651 нм и 450 нм и 510 нм соответственно и представленных на схеме:



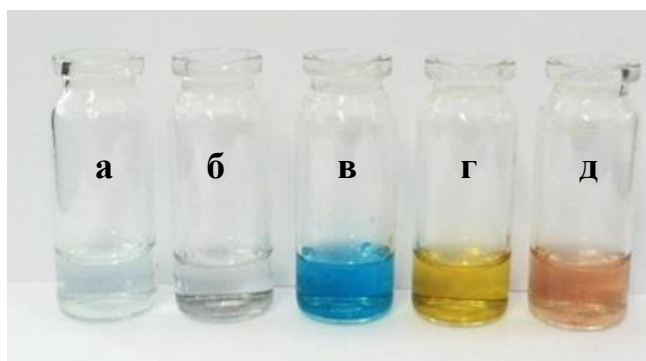


Рисунок 10. Образы реакционных смесей, содержащих: **а** $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ТМБ}$ **б** Fe@C + ТМБ **в** $\text{Fe@C} + \text{ТМБ} + \text{H}_2\text{O}_2$ **г** $\text{Fe@C} + \text{OPD} + \text{H}_2\text{O}_2$ **д** $\text{Fe@C} + 4\text{-ААП} + \text{H}_2\text{O}_2$

Как видно из рисунка 10, только смеси **в**, **г** и **д**, содержащие одновременно и наночастицы и перекись в присутствии хромогенного субстрата, изменяют свою окраску. Для реакционных смесей **а**, **б**, **в** Рисунок 10, содержащих в качестве субстрата ТМБ (1), дополнительно были сняты спектры поглощения в видимой области спектра (рисунок 11), которые подтверждают, что только в присутствии всех трех компонентов в реакционной смеси наблюдается появление характерных полос поглощения комплекса с переносом заряда (2) при 370 и 652 нм.

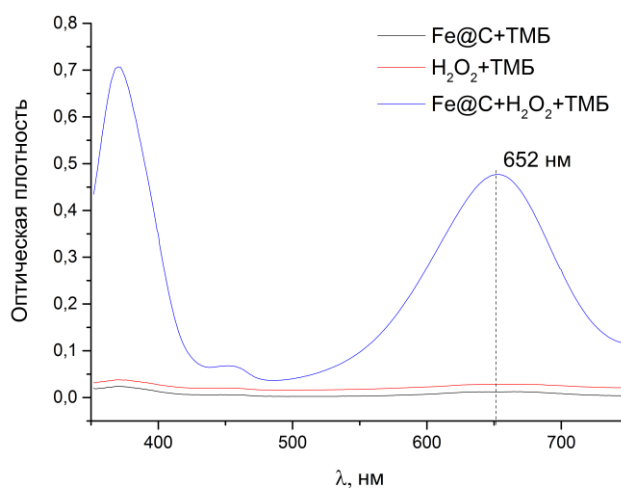


Рисунок 11. Спектры поглощения реакционных смесей, содержащих: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ТМБ}$, $\text{Fe@C} + \text{ТМБ}$, $\text{Fe@C} + \text{ТМБ} + \text{H}_2\text{O}_2$

Данный факт, свидетельствует о том, что наночастицы Fe@C способны генерировать гидроксильные радикалы, а, следовательно, процесс протекает по подобному ферменту механизму. Таким образом, наночастицы Fe@C могут быть использованы в качестве аналога фермента для качественного определения перекиси в растворе.

Для дальнейшего исследования подобной пероксидазе активности наноматериала в качестве субстрата для визуализации нами был выбран ТМБ (1), продукт окисления которого имеет максимумы поглощения при длинах волн 370 и 652 нм, как наиболее часто встречающийся в литературе субстрат [41,68-71,80,94-96], что позволяет проводить сравнительный анализ активности наночастиц с другими наноматериалами. Длина волны, при которой проводились все последующие эксперименты составляла 652 нм (рисунок 11).

3.2. Определение рабочих параметров реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в присутствии наночастиц Fe@C

С целью выбора рабочих параметров реакции окисления ТМБ с использованием наночастиц Fe@C была проведена оценка влияния концентрации наночастиц в растворе, pH и температуры на эффективность протекания этой реакции. Расчет относительной эффективности проводили исходя из полученных значений оптической плотности реакционных растворов при 652 нм.

Исследования по влиянию pH реакционной среды на относительную эффективность окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C проводили при комнатной температуре и концентрации наночастиц Fe@C 0,01 мг/мл. Показатель pH варьировали в пределах от 1 до 8 с использованием 0,1 М буферных растворов лимонной кислоты, бората, NaOAc и PBS. Как видно из рисунка 12а рабочие параметры pH, при которых наблюдается максимальная относительная эффективность окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C, лежат в пределах pH 3,6-4,4 при использовании NaOAc буферного раствора в качестве реакционной среды. Низкая эффективность окисления ТМБ с использованием

наночастиц Fe@C в растворе лимонной кислоты может быть обусловлена антиоксидантными свойствами лимонной кислоты, а ее падение в щелочных средах связано с резким осаждением наноматериала и выпадением в осадок субстрата пероксидазы.

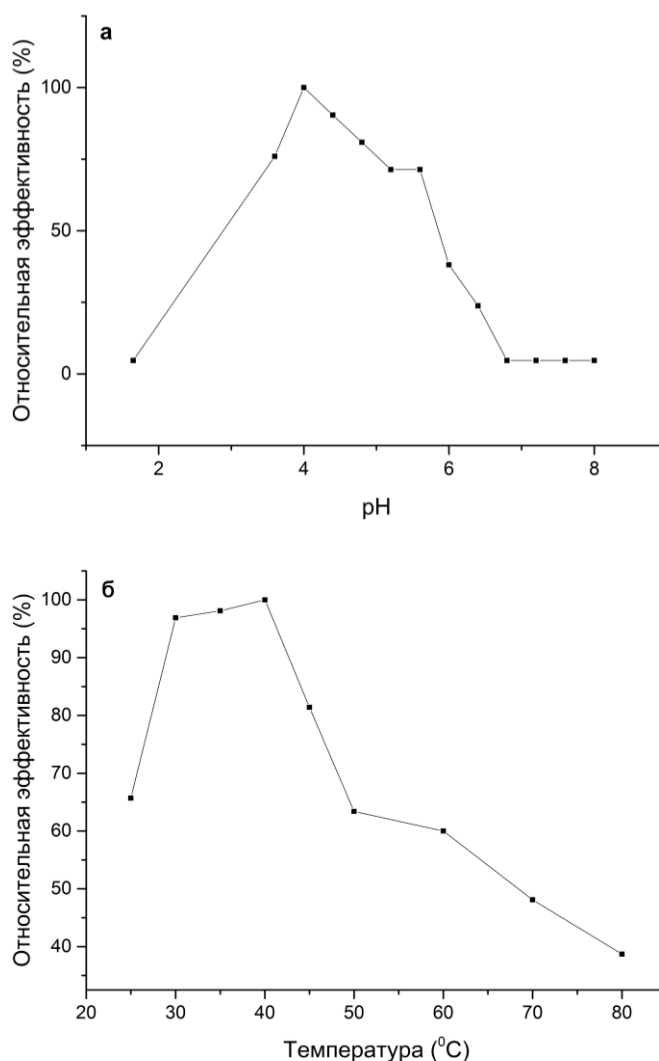


Рисунок 12. Влияние pH (а) и температуры (б) на относительную эффективность окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C

Определение рабочих температурных параметров процесса окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C проводили в буферном растворе NaOAc при выбранных ранее рабочих значениях pH = 3,6-4,4. Растворы предварительно нагревали до необходимой температуры от 25 до 90 °C, добавляли равное количество 30% H₂O₂ (5 мкл) и Fe@C (0,01 мг/мл). Реакционные растворы

выдерживали в течение 15 мин при выбранной температуре и измеряли оптическую плотность растворов при 652 нм. Было показано, что рабочие температурные параметры окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C лежат в пределах 30-40 °C (рисунок 12б). Падение относительной эффективности окисления ТМБ с использованием Fe@C при повышенных температурах (50 °C и выше, рисунок 11б) может быть связано с самопроизвольным разложением H_2O_2 .

Полученные значения рабочих параметров pH и температуры, при которых наблюдается максимальное проявление подобной пероксидазе активности наночастиц Fe@C, совпадают с рабочими параметрами фермента и других наноматериалов, проявляющих подобный вид активности [68, 104, 105, 113].

Как было указано в литературном обзоре, основным преимуществом большинства наноматериалов, особенно углеродной структуры, является их повышенная стабильность [104, 105].

Для доказательства стабильности наночастиц Fe@C образцы наноматериала равной массовой концентрации 10 мг/мл выдерживали в растворах с разной pH и температурой в течение 2 часов. После инкубации образцы наноматериала промывали водой до получения нейтральной pH промывных вод и оценивали влияние условий хранения наноматериала на относительную эффективность окисления ТМБ при проведении реакций при ранее выбранных рабочих параметрах pH и температуры. Полученные данные, представленные на рисунке 13, свидетельствуют о повышенной стабильности наноматериала при различных условиях хранения без потери их каталитической активности.

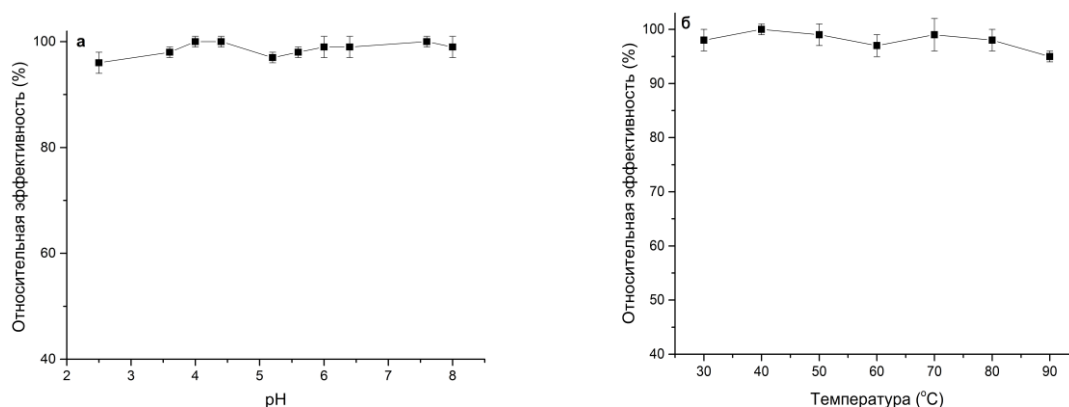


Рисунок 13. Исследование изменения относительной эффективности в реакциях окисления ТМБ в присутствии Fe@C после хранения наноматериала в средах с различной рН (а) и температурой (б)

Следует отметить, что деградация магнитного ядра наночастиц Fe@C происходит только после длительного его кипячения в концентрированных растворах сильных кислот [111]; также частичное высвобождение ионов железа происходит при длительном выдерживании наноматериала в концентрированном растворе перекиси водорода при нагревании.

Исследование влияния концентрации наноматериала на проявляемую ими подобную пероксидазе активность проводили при выбранных рабочих параметрах температуры и рН (рН 3,6, температура 40 °C). Концентрацию наноматериала в растворе варьировали путем добавления разного объема исходной суспензии наночастиц Fe@C с концентрацией 0,5 мг/мл. Измерение оптической плотности анализируемых образцов проводилось после 10 минут от начала реакции при длине волны 652 нм.

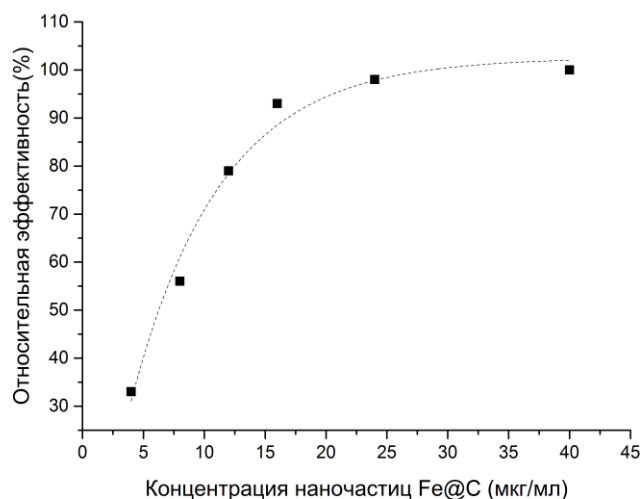


Рисунок 14. Зависимость относительной эффективности окисления ТМБ от концентрации наночастиц Fe@C в растворе

На рисунке 14 наблюдается значительное увеличение относительной эффективности окисления ТМБ при увеличении концентрации наночастиц от 4 до 16 мкг/мл, дальнейшее увеличение концентрации вносимого наноматериала не приводит к повышению эффективности процесса окисления. Таким образом, рабочая концентрация наночастиц Fe@C в реакции окисления ТМБ должна быть не менее 16 мкг/мл.

3.3. Исследование кинетики реакции окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C и расчет основных кинетических параметров процесса

Исследование кинетики реакции окисления ТМБ с использованием наночастиц Fe@C проводили при выбранных ранее рабочих параметрах: pH $4 \pm 0,5$, температура 30-40 °C и объем вносимой суспензии наночастиц Fe@C 20 мкл, 0,5 мг/мл в 550 мкл ацетатного буфера согласно методике 2.1 главы 2 [80]. В результате были получены кинетические кривые зависимости интенсивности поглощения, окисленного ТМБ от времени реакции при разных концентрациях вносимой перекиси водорода и ТМБ. Нами были рассчитаны начальные скорости

реакции окисления ТМБ (рисунок 15) по тангенсу угла наклона кривых и известному коэффициенту экстинкции окисленного ТМБ ($39000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [68]).

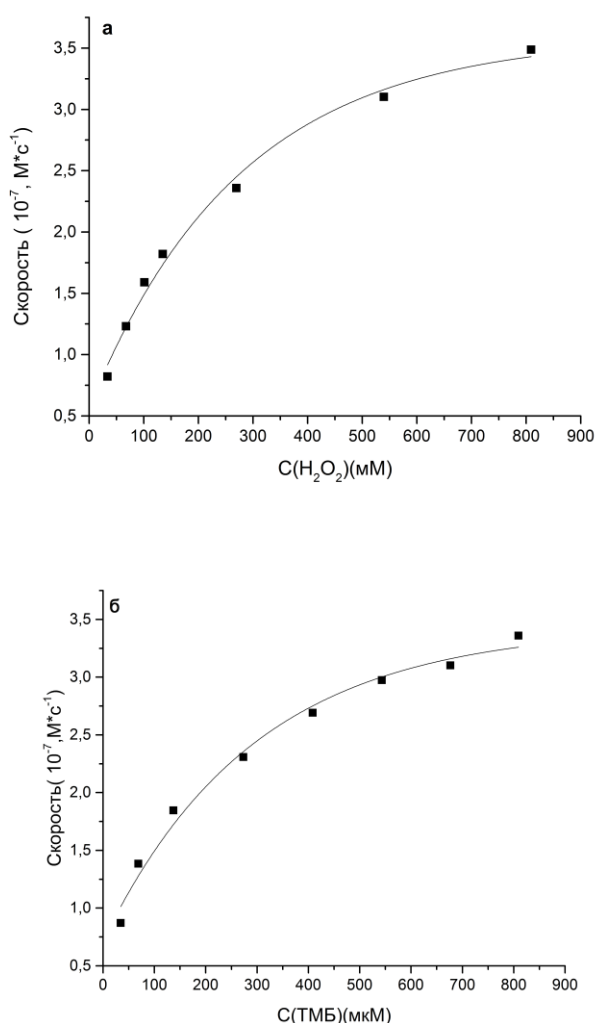


Рисунок 15. Кинетические кривые скорости реакции окисления ТМБ от концентрации вносимой H_2O_2 (а) и ТМБ (б)

Гиперболическая форма полученных кинетических кривых (рисунок 15) соответствует модели Михаэлиса-Мэнтен для ферментативной кинетики. Для расчета основных параметров процесса, таких как константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции, полученные кинетические кривые были преобразованы в линейную форму согласно уравнению Лайнуивера – Берка (рисунок 16):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}, \quad (2)$$

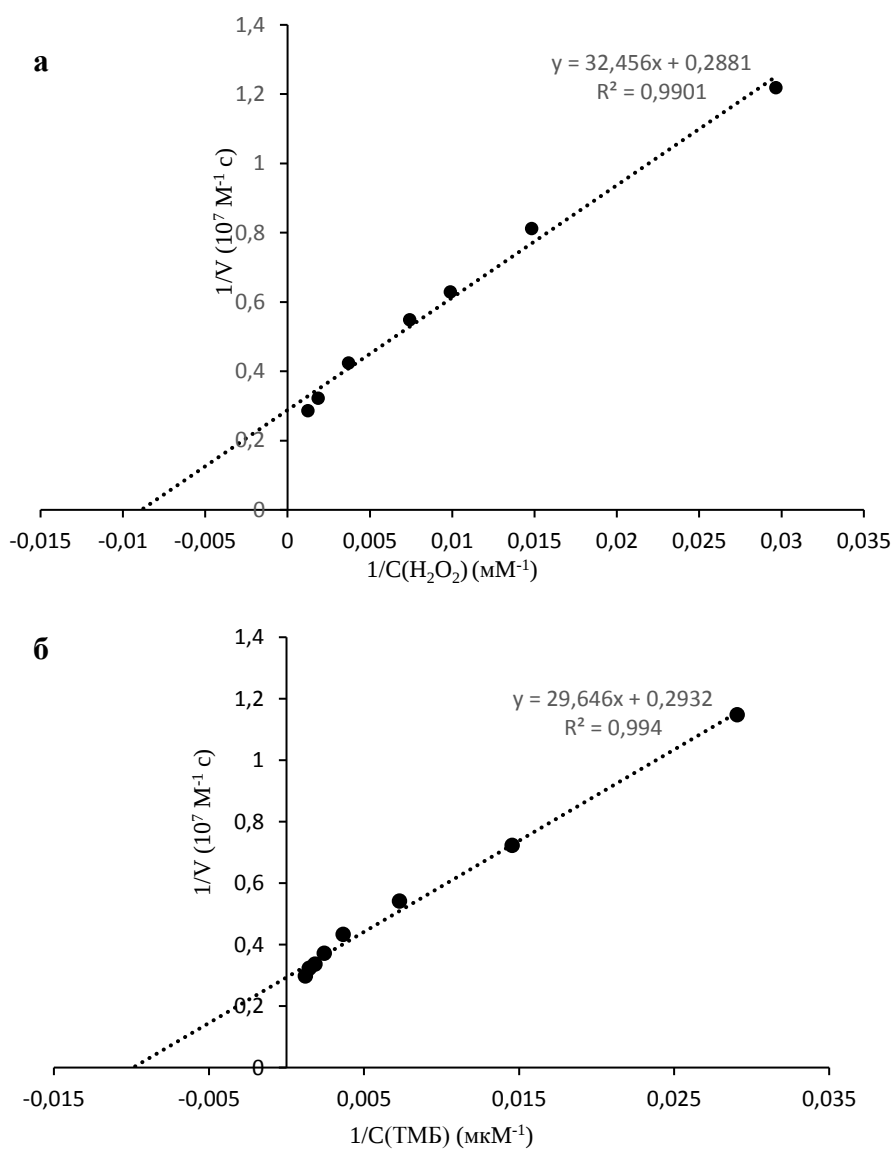


Рисунок 16. Кинетические кривые скорости реакции от концентрации вносимых H_2O_2 (а) и ТМБ (б) в двойных обратных координатах

Рассчитанные кинетические параметры процесса окисления ТМБ, а также известные кинетические параметры для фермента, наночастиц оксида железа и графит содержащий наноматериалов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Сравнение основных кинетических параметров процесса окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C, пероксидазы и других наноматериалов

Субстрат	Кинетический параметр	Fe ₃ O ₄	Fe@C	C[C(COOH) ₂] ₂	HRP	Fe ₃ O ₄ @C
H ₂ O ₂	K _m (мМ)	154,0	114,4	24,58	3,70	0,072
	V _{max} (Мс ⁻¹)	9,8·10 ⁻⁸	35·10 ⁻⁸	0,347·10 ⁻⁸	8,71·10 ⁻⁸	18,0·10 ⁻⁸
ТМБ	K _m (мМ)	0,098	0,088	0,233	0,434	0,380
	V _{max} (Мс ⁻¹)	3,4·10 ⁻⁸	7,5·10 ⁻⁸	0,40·10 ⁻⁸	10·10 ⁻⁸	74,0·10 ⁻⁸
Литература		[68]	Рассчитанные нами	[104]	[68]	[114]

Как видно из таблицы 4, наночастицы Fe@C обладают большей специфичностью к ТМБ чем сама пероксидаза. Однако, по отношению к перекиси водорода специфичность значительно ниже и для достижения половины максимальной скорости реакции требуется большая концентрация вносимой перекиси водорода.

По своим кинетическим параметрам наночастицы Fe@C близки к наночастицам оксида железа и требуют достаточно высокую концентрацию перекиси водорода, чем углеродсодержащие наноматериалы (таблица 4). Эта разница в кинетических параметрах Fe₃O₄@C и наночастиц Fe@C, скорее всего, связана с разницей в структуре углеродной поверхности наноматериалов. Из литературы известно, что сольвотермические методы синтеза наночастиц Met_xO_y@C зачастую приводят к образованию на поверхности карбоксильных групп, что предположительно способствует повышению стабильности суспензий таких наноматериалов и к увеличению их каталитических свойств в реакциях с субстратами пероксидазы [104, 105]. В свою очередь, углеродное покрытие наночастиц Fe@C, формируемое в инертной атмосфере аргона не содержит на своей поверхности COOH-групп [114].

Несмотря на это все представленные в таблице 4 наноматериалы нашли практическое применение для количественного определения пероксида водорода и более сложных органических объектов. Таким образом, наночастицы Fe@C

являются перспективными материалами для дальнейшего применения в анализе реальных объектов.

Одновременно с этим, расчет константы скорости (частоты оборотов) наночастиц Fe@C в классической размерности затруднен, в связи со сложным фазовым составом наноматериала и расчетом его молярной концентрации.

3.4 Влияние структуры наночастиц Fe@C на подобную пероксидазе активность

Структурные особенности наночастиц Fe@C не позволяют дать конкретного объяснения о том, за счет чего наноккомпозит проявляет ярко выраженную подобную пероксидазе активность. Сама пероксидаза способна разлагать пероксид водорода благодаря наличию в активной части фермента иона железа. В свою очередь наночастицы Fe@C не содержат на поверхности ионов железа, ядро полностью покрыто несколькими слоями графита [110-111].

Из известных литературных источников [104, 114] известно, что подобная пероксидазе активность наноматериалов на основе графита (квантовые точки и фуллерены) предположительно обусловлена процессами переноса электрона от углерода на поверхности к пероксиду. Наночастицы Fe@C в своей структуре объединяют два компонента, которые могут обуславливать данный вид активности.

В связи с этим нами были проведены исследования по объяснению подобных пероксидазе свойств наноккомпозита Fe@C. Для этого нами были выбраны два подхода, основанные на оценке роли углеродного слоя наночастиц Fe@C:

- зависимости подобной пероксидазе активности наночастиц Fe@C от величины углеродного слоя на их поверхности;
- исследование пероксидазной активности поверхностного углеродного слоя.

Первый подход основан на измерении оптической плотности растворов ТМБ, содержащих наночастицы Fe@C с различной толщиной углеродного слоя на поверхности при длине волны 652 нм. Для исследований были взяты следующие образцы наноматериалов: Fe@C (стандартный образец, с содержанием углерода примерно 3%), Fe@Csmallcoat (содержание углерода менее 1%) и Fe@Cbigcoat (содержание углерода не менее 20%), полученные на базе Института Физики металлов имени М.Н. Михеева Уральского отделения РАН. Исследования проводили при комнатной температуре в ацетатном буфере с pH 3,6. Массовая концентрация наночастиц во всех случаях была одинаковой и составляла 0,5 мг/мл. Как видно из рисунка 17а раствор, содержащий наночастицы Fe@Csmallcoat с тонким углеродным слоем на поверхности, имеют самое большое значение оптической плотности при добавлении 4 мкл 30% H₂O₂ и обладают самой высокой активностью в данных превращениях. Наночастицы Fe@Cbigcoat и Fe@C в указанных условиях проявляют соизмеримую активность. Увеличение объема вносимой H₂O₂ до 12 мкл (рисунок 17б), приводит к увеличению оптической плотности растворов только стандартных наночастиц Fe@C и не влияет на подобную пероксидазе активность Fe@Cbigcoat.

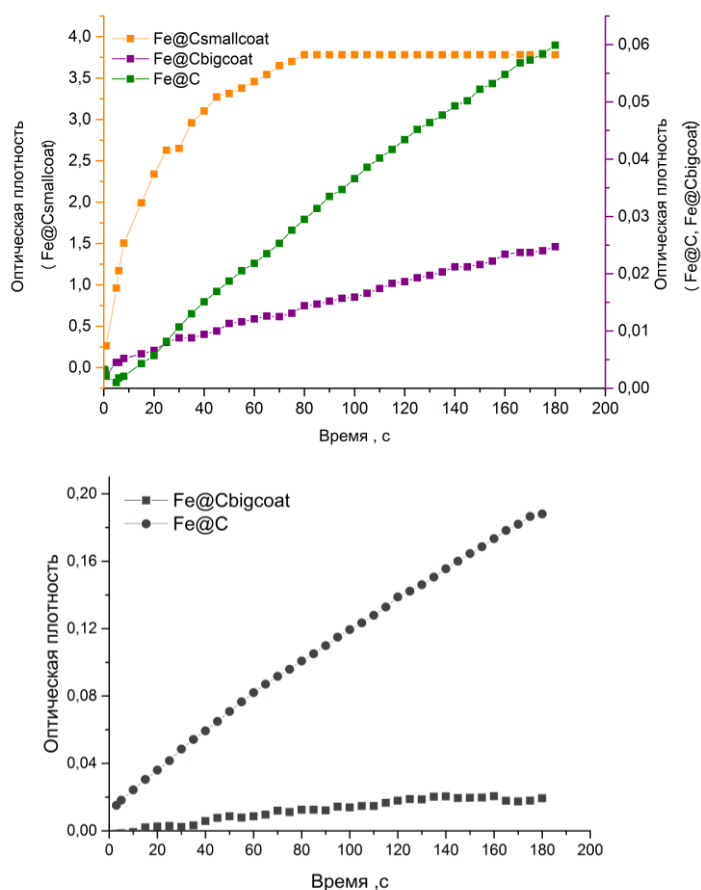


Рисунок 17. Зависимость оптической плотности окисленного ТМБ при 652 нм от времени взаимодействия с наночастицами Fe@C, Fe@Cbigcoat и Fe@Csmallcoat при разных объемах вносимой концентрациях H_2O_2 4мкл (а) и 12 мкл (б)

Таким образом, наблюдается закономерное увеличение подобной пероксидазе активности в ряду Fe@Cbigcoat < Fe@C < Fe@Csmallcoat.

Второй подход заключался в оценке способности углеродного слоя на поверхности наноматериала проявлять подобную пероксидазе активность. Для этого нами была оценена эффективность окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C и наночастиц Ni@C (рисунок 18), полученных аналогичным методом [109]. Необходимость использования наночастиц Ni@C в качестве образца сравнения связана со сложностью извлечения железного ядра из наночастицы. Полное удаление магнитного ядра происходит только после длительного кипячения наночастиц Fe@C в растворах сильных кислот, что может привести к частичному окислению углерода на поверхности с образованием СО-групп и повлиять на результаты экспериментов. При этом содержащийся в

наночастицах Ni@C никель не обладает подобными пероксидазе свойствами в отличие от железного ядра, а углеродные оболочки наночастиц Ni@C и Fe@C имеют одинаковую структуру [109, 110].

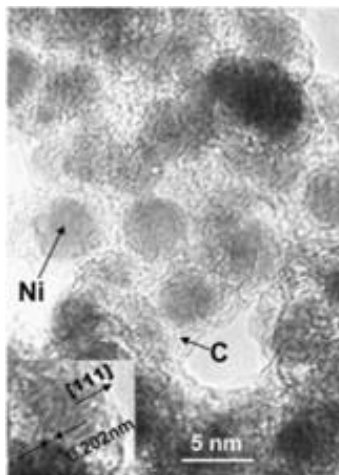


Рисунок 18. Микрофотография наночастиц Ni@C с просвечивающего электронного микроскопа

Исследование подобной пероксидазе активности проводили при равных массовых концентрациях наночастиц Ni@C и Fe@C при комнатной температуре в среде натрий ацетатного буфера. Так, при добавлении 4 мкл 30% H_2O_2 (рисунок 19), растворы, содержащие наночастицы Fe@C или Ni@C, имеют приблизительно равные значения оптической плотности окисленного ТМБ. При дальнейшем увеличением вносимой H_2O_2 рисунок 19 оптическая плотность растворов ТМБ, содержащих наночастицы Ni@C, не изменяется и резко возрастает для наночастиц Fe@C.

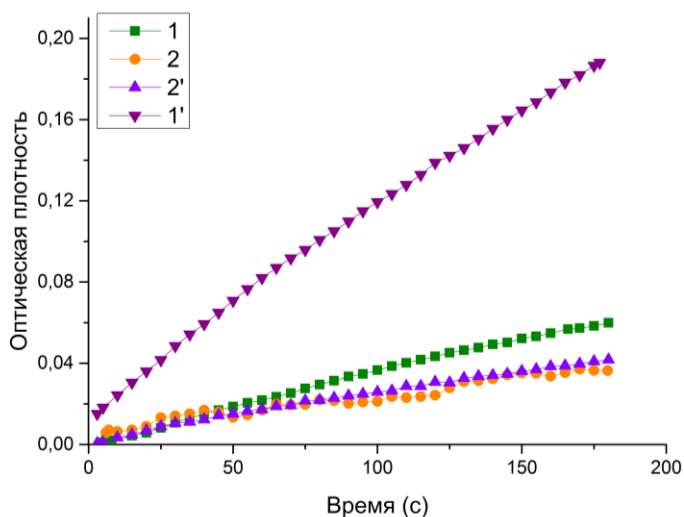


Рисунок 19. Зависимость оптической плотности окисленного ТМБ от времени при взаимодействии раствора с наночастицами Fe@C (1, 1') и Ni@C (2, 2') при разных объемах вносимой H₂O₂ 4мкл (1, 2) и 12 мкл (1', 2')

На основании полученных данных предположено, что подобная пероксидазная активность наночастиц Fe@C, обусловлена наличием в их структуре железного магнитного ядра. При этом углеродное покрытие проявляет пренебрежимо малую эффективность в процессе окисления субстрата пероксидазы и обладает низкими подобными пероксидазным свойствам. С учетом структурных особенностей наночастиц Fe@C и отсутствия прямого доступа перекиси к металлическому ядру можно сделать предположение, что проявляемая наноматериалом активность связана с процессами переноса электронов от магнитного ядра к углеродной поверхности или углеродное покрытие является проницаемым для перекиси в местах его дефектов [109,111].

Таким образом, полученные экспериментальные данные говорят о возможности применения наночастиц в качестве аналога пероксидазы для обнаружения пероксида водорода в водных средах. Кроме того, кинетические исследования подтверждают, что реакция окисления субстратов пероксидазы в присутствии наночастиц Fe@C протекает по механизму фермента и соответствует модели Михаэлиса-Мэнтен для ферментативной кинетики. В связи с этим наночастицы Fe@C являются перспективными материалами для разработки методик количественного определения веществ.

Глава 4. Выбор рабочих параметров спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C

Наиболее важным применением обнаруженной активности наночастиц Fe@C является использование их в качестве одного из компонентов для количественного определения различных объектов. На основе литературных данных наиболее распространенными детектируемыми объектами при участии фермента пероксидазы являются глюкоза и холестерин [69, 96-103]. Учитывая свойства фермента количественное определение данных соединений происходит по перекиси водорода, которая выделяется после их окисления и соответствует содержанию данных веществ в пробах. Поэтому для определения таких объектов необходимо использование дополнительных реагентов – специфических ферментов ГОД или холестериноксидазу (рисунок 20).

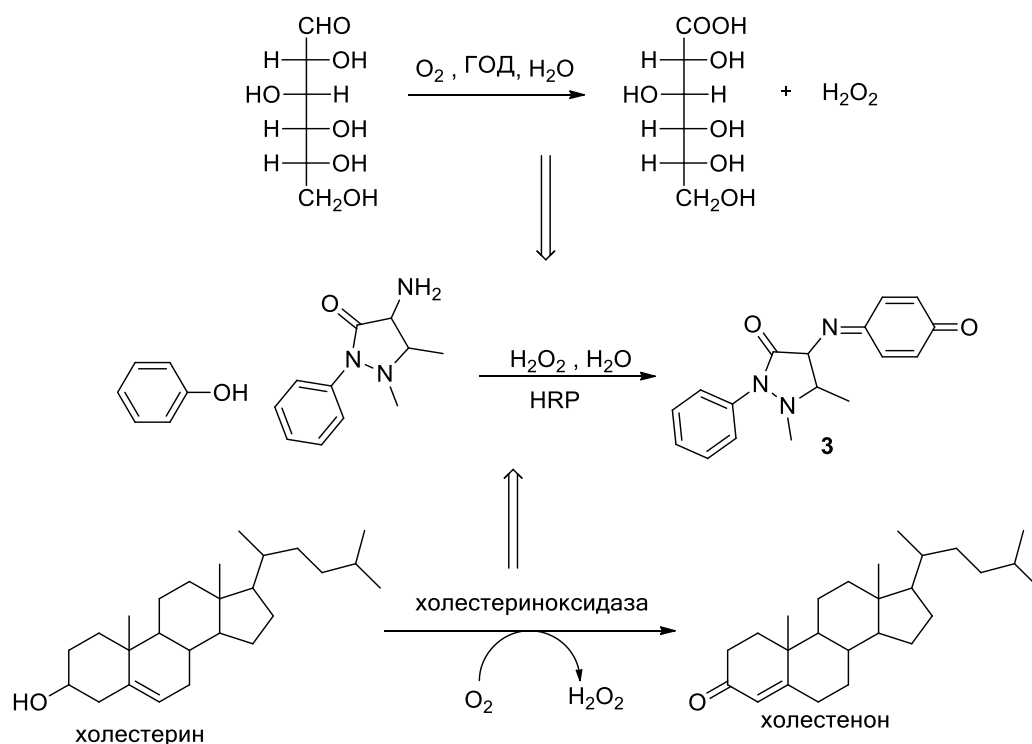


Рисунок 20. Определение холестерина и глюкозы ферментативными методами

Классические методики по определению глюкозы включают в себя использование стандартных наборов, содержащих глюкозооксидазу (ГОД), которая окисляет глюкозу до глюконовой кислоты и перекиси водорода, пероксидазу, которая разлагает выделившийся на первой стадии пероксид до гидроксильных радикалов, и хромогенный субстрат (3), вступающий в реакцию с этими радикалами (рисунок 20). В результате образуется окрашенный продукт, по интенсивности поглощения которого определяется концентрация исходной глюкозы.

Нами была предложена методика, в которой в качестве фермента на второй стадии процесса использовали наночастицы Fe@C (рисунок 21), и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) в качестве хромогенного субстрата. Количественное содержания глюкозы в пробе определяли по интенсивности поглощения окисленного ТМБ при длине волны 652 нм.

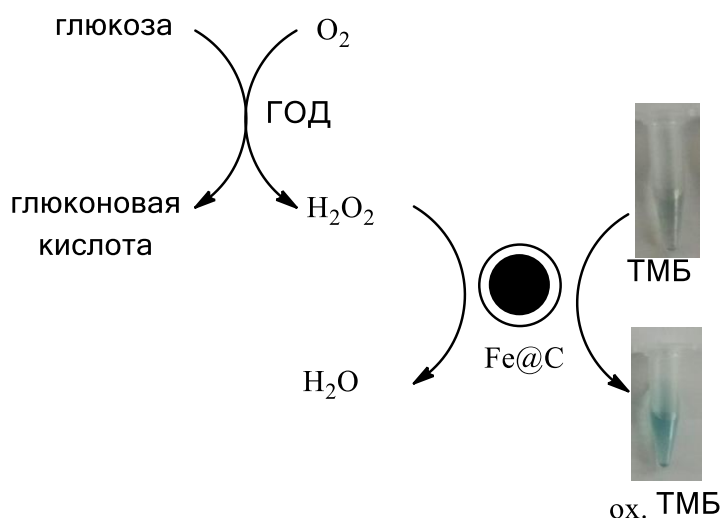


Рисунок 21. Схематичное изображение процесса определения глюкозы в водных средах с использованием наночастиц Fe@C

Несмотря на близкие рабочие параметры фермента и наноматериала Fe@C (30-40 °C и pH 4±0,5; глава 3) и фермента глюкозооксидазы (37 °C и pH 4-7) [104] процесс определения глюкозы в растворах проводили отдельно, в два этапа. На первом этапе проводили взаимодействие между глюкозой и ГОД, а на второй

взаимодействие выделившейся перекиси водорода с наноматериалом и хромогенным субстратом (рисунок 21). Данный подход препятствует возможному взаимному влиянию фермента и гетерогенного катализатора. На основе известных литературных данных [98-101, 104-105], процесс окисления глюкозы ГОД проводится преимущественно в фосфатном буфере, в котором Fe@C проявляют более низкую подобную пероксидазе активность, чем в ацетатном буфере.

На основании этого нами предложен алгоритм проведения процесса спектрофотометрического определения глюкозы, представленный на рисунке 22.

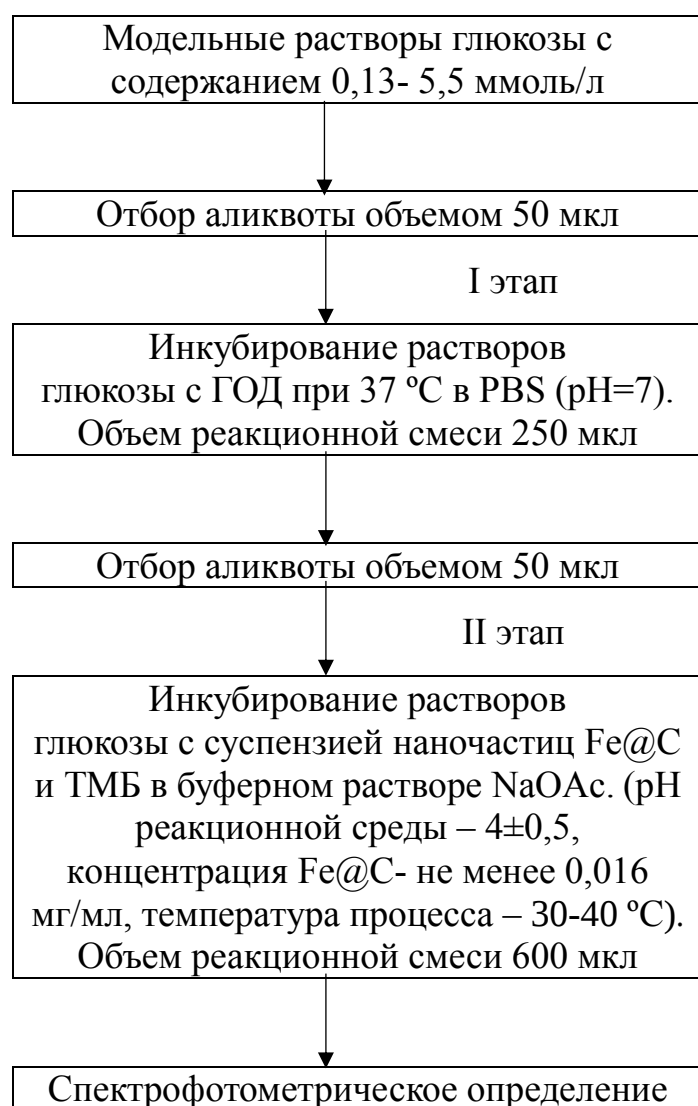


Рисунок 22. Алгоритм проведения спектрофотометрического определения глюкозы в модельных растворах

Рабочие параметры проведения второго этапа определения глюкозы (концентрация наночастиц Fe@C, pH и температура с участием ТМБ в качестве субстрата) были определены в главе 3 и представлены в предложенном алгоритме (рисунок 22). Поэтому для разработки спектрофотометрической методики определения глюкозы являлось необходимым исследовать влияние на оптическую плотность окисленного ТМБ концентрации и времени взаимодействия фермента глюкозооксидазы на первой этапе процесса и времени взаимодействия наночастиц – на втором.

4.1. Выбор рабочих значений концентрации и времени взаимодействия глюкозооксидазы с раствором глюкозы

На основании проведенных кинетических исследований (глава 3) было выявлено, что для достижения максимальной скорости реакции окисления субстрата пероксидазы наноматериалы, в том числе наночастиц Fe@C, требуют более высокую концентрацию H_2O_2 чем пероксидаза. Из литературы также известно, что при использовании других наноматериалов для определения глюкозы концентрация ГОД в системе была выше, чем для классического глюкозооксидазного метода. В связи с этим необходимым являлось подобрать такую концентрацию фермента ГОД на первой стадии процесса, чтобы получить как можно больше количества H_2O_2 в системе.

Для подбора рабочей концентрации глюкозооксидазы нами были проведены модельные эксперименты, в которых концентрация глюкозы была постоянной и составляла 1 ммоль/л, а концентрация ГОД варьировалась в пределах от 0,04 до 4 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. Аликвоту реакционного раствора (50 мкл) добавляли к 520 мкл буферного раствора NaOAc, содержащего 20 мкл суспензии наночастиц Fe@C (0,5 мг/мл) и 10 мкл раствора ТМБ (10 мг/мл). Полученные реакционные смеси выдерживали в течение 40 мин при 40 °С, после чего была измерена их оптическая плотность при 652 нм. Как показано на рисунке 23, оптическая плотность растворов, содержащих от 0,04 до 0,2 мг/мл ГОД, постепенно возрастает. Дальнейшее увеличение концентрации

ГОД в системе практически не влияет на изменение оптической плотности реакционных растворов. Таким образом, рабочая концентрация вносимой ГОД должна быть не менее 0,2 мг/мл.

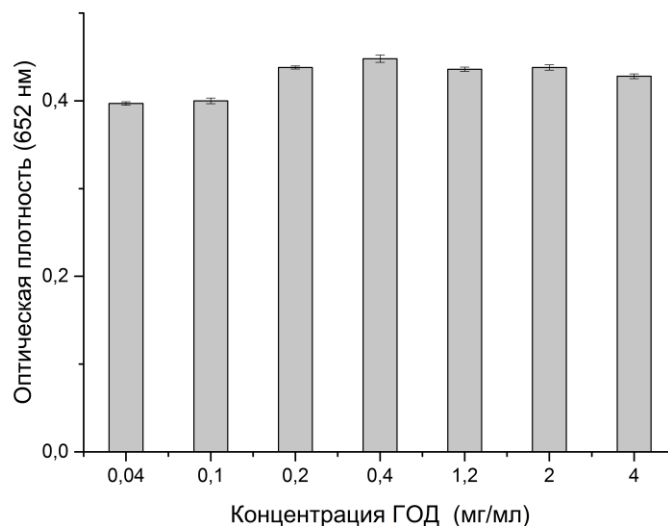


Рисунок 23. Зависимость оптической плотности реакционных растворов от концентрации ГОД

Исследование влияния времени взаимодействия растворов глюкозы с ферментом также проводили при концентрации исходного раствора глюкозы 1 ммоль/л при выбранном ранее рабочем значении концентрации ГОД (0,2 мг/мл) в фосфатном буферном растворе. Растворы инкубировали при 37 °С от 10 минут до 1 часа. Аликвоту реакционного раствора (50 мкл) добавляли к 520 мкл буферного раствора NaOAc, содержащего 20 мкл суспензии наночастиц Fe@C (0,5 мг/мл) и 10 мкл раствора ТМБ (10 мг/мл). Полученные реакционные смеси выдерживали в течение 40 мин при 40 °С, после чего была измерена их оптическая плотность растворов при 652 нм.

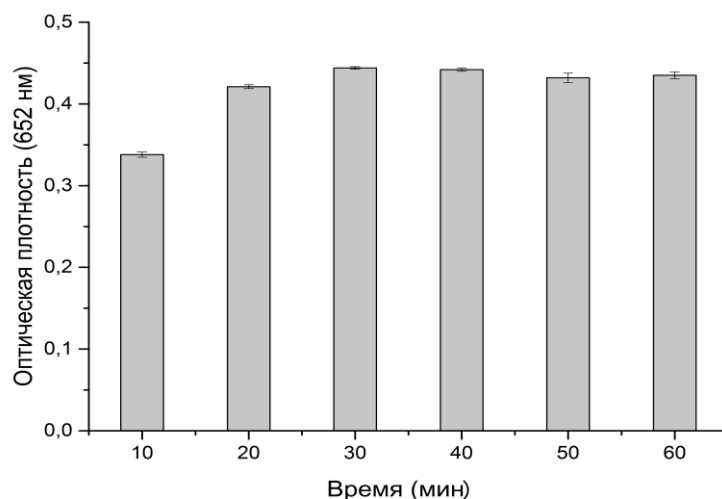


Рисунок 24. Зависимость оптической плотности реакционных растворов от времени взаимодействия ГОД с раствором глюкозы

На рисунке 24 показано, что время взаимодействия глюкозы с ферментом должно быть не менее 20 мин, т.к. дальнейшее увеличение времени реакции не приводит к увеличению аналитического сигнала окисленного ТМБ.

4.2. Влияние времени взаимодействия наночастиц Fe@C на величину аналитического сигнала окисленного ТМБ

Определение необходимого времени взаимодействия наноматериала для эффективного определения глюкозы проводили согласно выбранным ранее рабочим параметрам (главы 2 и 3), и согласно разработанному алгоритму (рисунок 22).

Растворы с содержанием глюкозы 1 ммоль/л, инкубировали в фосфатном буферном растворе с концентрацией ГОД 0,2 мг/мл в течение 30 мин при 37 °С. Далее 50 мкл пробы реакционных растворов переносили в буферный раствор 0,1 М ацетата натрия, содержащего 20 мкл наночастиц Fe@C (0,5 мг/мл) и 10 мкл раствора ТМБ и инкубировали от 10 минут до 2 часов при температуре 40 °С., после чего была измерена оптическая плотность реакционных растворов при 652 нм.

Результаты, представленные на рисунке 25 показывают, что время взаимодействия наночастиц Fe@C с реакционным раствором должно быть не менее 1 часа, соответствующее достижению 95 % от максимального значения аналитического сигнала окисленного ТМБ.

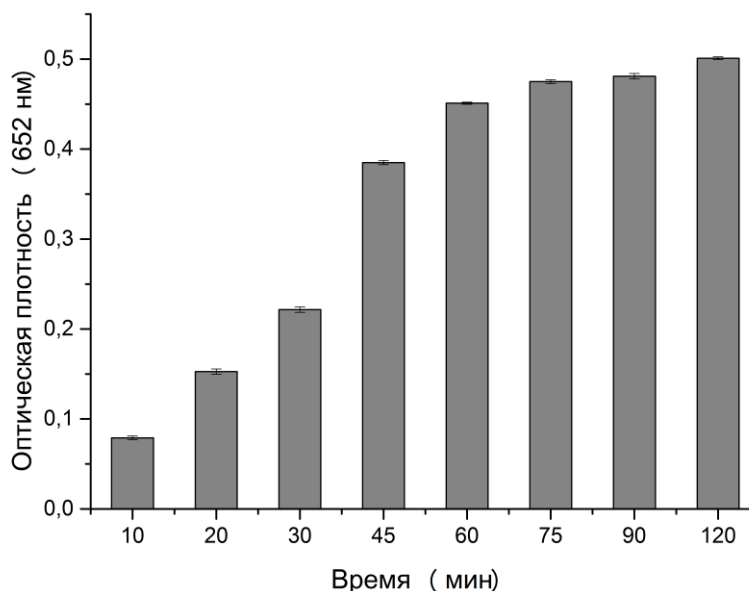


Рисунок 25. Зависимость оптической плотности реакционных растворов от времени взаимодействия наночастиц Fe@C с раствором

Таким образом, рабочие параметры проведения первой стадии методики (общий объем реакционной смеси 250 мкл) определения глюкозы следующие:

- концентрация глюкозооксидазы – не менее 0,2 мг/мл;
- рН реакционной среды- 7;
- время обработки – не менее 30 минут;
- температура процесса – 37 °С.

Для второй стадии рабочие параметры определения глюкозы (общий объем реакционной смеси 600 мкл) лежат в следующих пределах:

- концентрация наночастиц Fe@C – не менее 0,016 мг/мл;
- время обработки – не менее 1 часа;
- температура процесса – 30-40 °С;
- рН реакционной среды – $4 \pm 0,5$.

4.3. Изучение зависимости оптической плотности окисленного ТМБ от концентрации глюкозы в модельных растворах и оценка предела обнаружения глюкозы

Основываясь на выбранных ранее рабочих параметрах процесса спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C и согласно предложенному алгоритму (рисунок 22) нами построен график зависимости оптической плотности от концентрации глюкозы в растворе (рисунок 26). Для построения градуировочной зависимости приготовление модельных растворов глюкозы проводили путем разбавления стандартного раствора глюкозы концентрацией 10 ммоль/л. Полученный график имеет линейную зависимость в области концентраций глюкозы 2,3-37 мкМ (рисунок 26) Полученное уравнение зависимости аналитического сигнала окисленного ТМБ от концентрации глюкозы в растворе имеет вид: $A_{652\text{ nm}} = 0,0265x$ с коэффициентом корреляции $R = 0,998$. Предел обнаружения глюкозы составил 0,21 мкмоль/л, рассчитанный по закону 3σ [115].

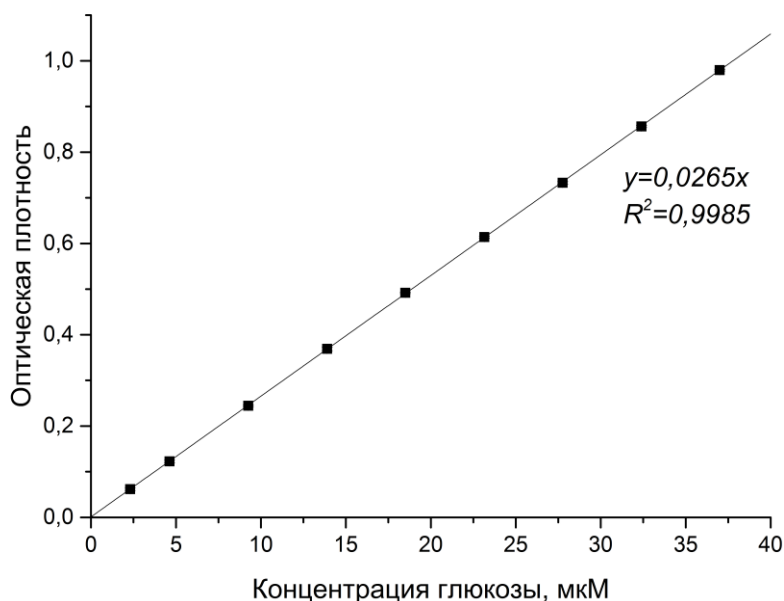


Рисунок 26. Градуировочная зависимость оптической плотности окисленного ТМБ от концентрации глюкозы в растворе

Подтверждение адекватности модели проводили по критерию Фишера. В таблице 5 приведены основные данные для расчета. Среднее значение оптической плотности ($\bar{y}_i$) рассчитано на основании трех параллельных измерений, а $\check{y}_i$, согласно уравнению калибровочного графика.

Таблица 5 – Экспериментальные и расчетные данные для оценки адекватности предложенной модели

№	x_i	y_{1u}	y_{2u}	y_{3u}	$\bar{y}_i$	$s_i^2 \cdot 10^6$	$\check{y}_i$	$(\bar{y}_i - \check{y}_i)^2$
1	2,31	0,0634	0,0632	0,0596	0,0621	4,6	0,0612	$7,2 \cdot 10^{-7}$
2	4,62	0,1241	0,1196	0,1253	0,1230	9,0	0,1224	$3,2 \cdot 10^{-7}$
3	9,25	0,2444	0,2417	0,2465	0,2442	5,8	0,2451	$8,5 \cdot 10^{-7}$
4	13,9	0,3692	0,3678	0,3656	0,3675	3,3	0,3684	$6,6 \cdot 10^{-7}$
5	18,5	0,4942	0,4924	0,4903	0,4923	3,8	0,4903	$4,2 \cdot 10^{-6}$
6	23,15	0,6136	0,6173	0,614	0,6150	4,1	0,6135	$2,2 \cdot 10^{-6}$
7	27,76	0,7324	0,7311	0,7353	0,7329	4,6	0,7356	$7,3 \cdot 10^{-6}$
8	32,4	0,8544	0,8597	0,8556	0,8566	7,7	0,8586	$4,1 \cdot 10^{-6}$
9	37	0,9823	0,979	0,9773	0,9795	6,5	0,9805	$9,3 \cdot 10^{-7}$
Σ						49,4		$2,1 \cdot 10^{-5}$

На основании приведенных данных был проведен расчёт дисперсии воспроизводимости и дисперсии адекватности по формулам:

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\sum_{u=1}^9 \sum_{i=1}^3 (y_{iu} - \bar{y}_i)^2}{9(3-1)} = \frac{\sum_{u=1}^6 s_i^2}{9} = 2,75 \cdot 10^{-6} \quad (3)$$

$$S_{\text{ад}}^2 = \frac{\sum_{u=1}^9 n_i (\bar{y}_i - \check{y}_i)^2}{f} = 8,02 \cdot 10^{-6} \quad (4)$$

Далее находили табличное значение критерия Фишера для уровня значимости 0,05 $F(0.05, 8, 18) = 3,20$. Расчётное значение F-критерия (2,92) ниже табличного, следовательно, полученная модель описывает процесс адекватно.

Таким образом, наночастицы Fe@C обеспечивают линейность методики в области концентраций глюкозы 2,3 до 37,00 мкмоль/л при проведении методики по предложенному алгоритму (рисунок 22).

Нами проведён сравнительный анализ градуировочных зависимостей спектрофотометрических методик определения глюкозы с использованием других наноматериалов. Для этого нами были проанализированы линейные диапазоны и пределы определения разработанной нами методики и уже существующих

спектрофотометрических методик определения глюкозы с использованием других наноматериалов (таблица 6). Выбор наноматериалов для сравнения был основан на следующих параметрах:

1. структурные особенности наноматериалов (включены наноматериалы на основе железа или графита);
2. использование ТМБ в качестве субстрата для визуализации;
3. подобный алгоритм проведения определения.

Таблица 6 – Метрологические характеристики спектрофотометрических методик определения глюкозы с использованием наноматериалов

№	Наноматериал	Линейный диапазон (мкМ)	Предел обнаружения(мкМ)	Литература
1	Fe@C	2,3-37	0,21	Разработанная нами
2	Fe ₃ O ₄ -porphyrin compositions	5-25	2,21	[116]
3	Bare Fe ₃ O ₄	50-1000	30	[69]
4	Fe ₃ O ₄ @C	6-100	2	[114]
5	Fe ₃ O ₄ MNPs	30–1000	3	[117]
6	γ -Fe ₂ O ₃ nanoparticles	1–80	0,21	[118]
7	Carbon nitride dots	1–5	0,5	[119]
8	Co _x Fe _{3-x} O ₄ nanocubes	8–90	2,47	[120]
9	C[C(COOH) ₂] ₂	1-40	0,5	[104]
10	ZnFe ₂ O ₄	1,25–18,75	0,3	[96]

Как видно из представленных данных (таблица 6), спектрофотометрическая методика определения глюкозы с участием наночастиц Fe@C имеет небольшой диапазон определяемых концентраций глюкозы по сравнению с наноматериалами 3-6 и 8; он сопоставим с 9 и шире, чем для наноматериалов 2 и 10. В большинстве случаев нижняя граница диапазона для наночастиц Fe@C находится в области более низких концентраций глюкозы, чем для большинства наноматериалов. Также следует отметить наличие систематической ошибки в методиках,

разработанных с использованием других наноматериалов (4,10), так как их уравнения градуировочных кривых содержат свободный член.

Особым преимуществом спектрофотометрической методики с использованием наночастиц Fe@C является низкий предел детектирования (0,21 мкМ), сопоставимый только с наночастицами γ -Fe₂O₃ (6).

В целом разработанный диапазон не уступает линейным диапазонам других наноматериалов, а предел определения позволяет использовать данную методику для определения глюкозы в биообъектах.

4.4. Оценка мешающего влияния компонентов матрицы на аналитический сигнал окисленного ТМБ при спектрофотометрическом определении глюкозы

Оценку специфичности методики спектрофотометрического определения глюкозы проводили на основании имеющихся литературных данных [121-125] о составе некоторых пищевых продуктов и биообъектов, к которым условно может быть применена разрабатываемая методика. Как было показано в главе 1 основными продуктами пищевой промышленности в которых законодательством допускается применение спектрофотометрического определения глюкозы и сахара является соковая продукция [31]. При анализе биологических жидкостей (сыворотка крови и моча) спектрофотометрические методы являются основными.

Ввиду отсутствия доступа к производственным регламентам и техническим условиям для оценки среднего соотношения этих компонентов были проанализированы литературные данные [126-129] о составе некоторых видов соковой продукции и биообъектов (приложение 1).

Согласно данным, приведенным в приложении 1, в зависимости от вида сока и производителя соотношение органических кислот (сахаров, витаминов) и глюкозы меняется, поэтому для исследования специфичности спектрофотометрической методики определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C были взяты концентрации, соответствующие их среднему

соотношению. Так, для исследования влияния кислот было взято соотношение 1:5, а для сахаров 1:1. Содержание витаминов в продуктах питания по отношению к глюкозе крайне мало, поэтому для удобства проведения экспериментов их соотношение было увеличено до 1:50.

В связи с тем, что разрабатываемая спектрофотометрическая методика определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C имеет достаточно низкий предел обнаружения глюкозы (0,21 мкМ), и является перспективной для анализа биообъектов, было исследовано влияние белков на аналитический сигнал окисленного ТМБ. В качестве источника белка нами был взят яичный белок; массовое соотношение всех белков к глюкозе составляло 1:1 и 1:2.

Все измерения проводились параллельно в одинаковых условиях. Исходная концентрация глюкозы для приготовления всех исходных растворов была одинакова и составляла 1,35 мМ. Предварительно раствор глюкозы (25 мкл) смешивали с 25 мкл раствора сопутствующего вещества либо дистиллированной воды. Дальнейшее определение проводили согласно разработанному ранее алгоритму и рабочим параметрам процесса (пункт 4.1.2.). С учетом разбавления ожидаемая величина оптической плотности растворов должна лежать в области 0,2648 и соответствовать концентрации глюкозы 9,25 мкмоль/л (согласно данным градуировочной зависимости, представленной в пункте 4.2).

Полученные экспериментальные данные, полученные на основании трех параллельных экспериментов, представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Оценка влияния компонентов матрицы на величину оптической плотности окисленного ТМБ в модельных растворах глюкозы

Сопутствующее вещество	Соотношение сопутствующий компонент: глюкоза (мМ:мМ)	Оптическая плотность реакционных растворов при 652 нм	
		До введения	После введения
Сахара			
Сахароза	1:1	0,268 ±0,013	0,272±0,011
Фруктоза			0,282±0,014
Мальтоза			0,261±0,012
Лактоза			0,268±0,012
Органические кислоты			
Лимонная кислота	1:10	0,268 ±0,013	0,259±0,015
Яблочная кислота			0,266±0,011
Молочная кислота			0,285±0,015
Мочевая кислота			0,264±0,014
Янтарная кислота			0,265±0,012
Витамины			
Витамин С	1:50	0,268 ±0,013	0,26±0,01
Витамин В1			0,269±0,011
Витамин В6			0,269±0,013
Витамин В12			0,268±0,012
Витамин Д3			0,262±0,013
Белки ¹⁾			
Яичный белок	1:1	0,268 ±0,013	0,261±0,012
	1:2		0,275±0,016

¹⁾ указаны массовые соотношения сопутствующий компонент: глюкоза

¹⁾ указаны массовые соотношения сопутствующий компонент: глюкоза

Как видно из данных, приведенных в таблице 7, значения оптической плотности проб, содержащих в качестве добавок сахараиды, кислоты и витамины отличаются незначительно от исходной пробы, содержащей только глюкозу, и погрешность не превышает 5%.

Дополнительно было оценено влияние сахаров на аналитический сигнал в отсутствие глюкозы в растворе. Как показано на рисунке 27 пробы, не содержащие глюкозу, имеют малое значение аналитического сигнала при 652 нм, близкое к значению холостой пробы и не превышают 5% от аналитического сигнала пробы глюкозы.

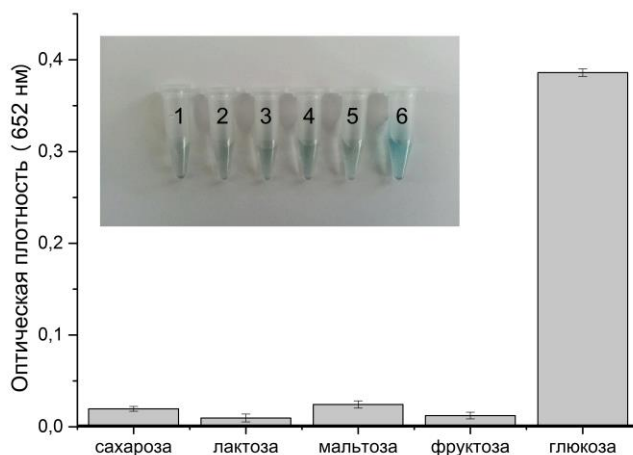


Рисунок 27. Зависимость оптической плотности растворов окисленного ТМБ от содержания сахаридов и глюкозы 1 – холостая проба, 2 – сахароза, 3 – лактоза, 4 – мальтоза, 5 – фруктоза, 6 – глюкоза

Таким образом, проведённые эксперименты подтверждают высокую специфичность спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C по разработанному алгоритму в присутствии других сахаров, кислот, витаминов и белков. Высокая селективность методики преимущественно обусловлена применением глюкозооксидазы на первой стадии процесса определения глюкозы, который окисляет только этот субстрат с образованием перекиси водорода.

Высокая специфичность разрабатываемой методики позволяет использовать полученную градуировочную зависимость для спектрофотометрического определения глюкозы в реальных объектах при проведении методики согласно разработанному алгоритму (рисунок 22).

Глава 5 Применение спектрофотометрического метода с использованием наночастиц Fe@C для определения глюкозы в биообъектах и пищевых продуктах

5.1. Методика спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C в соковой продукции

На основе проведенных исследований и согласно разработанному алгоритму (рисунок 22) нами была разработана методика определения глюкозы в соковой продукции. Набор статистических данных получен на соках производителей «Любимый» (гранат, яблоко, груша, клубника) и «Фруто-няня» (банан).

Объем анализируемой пробы сока рассчитывали исходя из содержания общего числа углеводов в исследуемом объекте так, чтобы концентрация глюкозы попадала в пределы линейности градуировочного графика.

Образцы сока требовали незначительной пробоподготовки для удаления нерастворимых примесей.

Объем пробы сока (объемом до 2,0 мл) предварительно центрифугировали при 10000 оборотах в течение 5 мин. Надосадочную жидкость объемом 100 мкл переносили в мерную колбу на 10 см³, прибавляли 5 см³ дистиллированной воды, встряхивали и доводили объем до метки дистиллированной водой. Из полученного раствора отбирали 50 мкл, переносили в эппендорф, прибавляли 50 мкл раствора ГОД (1 мг/мл) и 150 мкл PBS буфера (10 mM, pH 7,0). Полученные растворы инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Из реакционного раствора отбирали аликвоту 50 мкл и помещали в эппендорф, добавляли 10 мкл раствора ТМБ (10 мг/мл в ДМСО), 20 мкл раствора наночастиц Fe@C (0,5 мг/мл) и 520 мкл 0,1 M NaOAc буфера. Смесь инкубировали при 45 °C в течение 1 часа. Затем измеряли интенсивность поглощения растворов при длине волны 652 нм. Полученные значения концентрации глюкозы при 652 нм умножали на общее количество разбавлений (6000 раз) с получением конечного результата. В случае,

если полученные значения концентрации превышали предел линейности методики надосадочные растворы дополнительно разбавляли в 2 раза.

Полученные экспериментальные данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Экспериментальные данные по определению глюкозы в соковой продукции

Образец сока	Содержание глюкозы (n=5)	
	В разбавленном образце, мкМ (разбавление 6000 раз)	В исходной пробе, мМ
Банан	19,66±1,0	118,2±6,0
Яблоко	21,54±1,1	129,3±7,1
Груша	16,82±0,8	101,0±4,7
Клубника	33,2±1,3	199,3±7,8
Гранат	34,1±1,4	204,7±8,4

Оценку правильности определения глюкозы в соковой продукции по разработанной методике с использованием наночастиц Fe@C подтверждали методом «введено-найдено» и с использованием независимого метода.

Использование метода «введено-найдено» предполагает добавку раствора исследуемого вещества с известной концентрацией и дальнейшим сравнением полученных значений до и после введения добавки. Из-за высокого содержания глюкозы в соковой продукции введение добавки проводилось к неразбавленному соку и варьировалась в пределах от 30 до 120 мМ. Для исследования был выбран образец сока с наименьшим содержанием глюкозы производителя «Любимый» со вкусом груши (таблица 9).

Таблица 9 – Проверка правильности методики методом «введено-найдено»

Образец	Содержание глюкозы, ммоль/л		
	В пробе	Введено	Найдено
Грушевый сок	101,0±4,7	30	127,3±5,6
		60	156,4±6,9
		90	186,9±7,2
		120	216,8±8,7

Как видно из данных таблицы 9, количественное определение добавки стандартного раствора глюкозы в образец сока определяется достаточно точно, а отклонение экспериментальных значений на основании трех параллельных экспериментов не превышает 5% от истинного значения добавки.

В качестве независимого метода была использована глюкозооксидазная методика спектрофотометрического определения глюкозы с использованием набора стандартных реагентов производства «Вектор БЭСТ». Результаты спектрофотометрического определения глюкозы в соках с использованием наночастиц Fe@C и глюкозооксидажным методом представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Сравнение результатов определения глюкозы в соковой продукции с использованием наночастиц Fe@C и независимым методом

Образец сока	Содержание глюкозы, ммоль/л		ξ , F-тест	ξ_1 , t-критерий
	Разработанный метод (n=5)	Глюкооксидазный метод (n=3)		
Банан	118,2±6,0	119,3±4,8	10,3	2,0
Яблоко	129,3±7,1	128,3±5,9	11,4	1,0
Груша	101,0±3,4	99,5±4,1	4,0	2,4
Клубника	199,3±8,1	199,6±8,7	1,6	2,0
Гранат	204,7±8,7	203,5±9,8	3,01	2,1

При использовании наночастиц Fe@C конечный результат содержания глюкозы в образце определялся на основании 5 параллельных экспериментов; для стандартного набора измерения проводили 3 раза. Оценка воспроизводимости результатов измерений двумя методами нами был использован метод Фишера, рассчитанные значения ξ приведены в таблице 10) Так как величина расчётного значения критерия оказалась ниже табличных значений $F(0.95,4,2) = 19,25$ или $F(0.95,2,4) = 6,94$ (в случае грушевого сока), можно сделать вывод об одинаковой воспроизводимости данных при использовании этих двух методов определения. Расчётные значения ξ_1 также не превышают критическое значения критерия Стьюдента $t(P=0.95, f=6) = 2,45$, что свидетельствует об отсутствии

систематической ошибки при проведении спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C.

5.2. Методика спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C в биологических жидкостях

В связи с тем, что цельная кровь является многокомпонентной системой, в которой возможно влияние форменных элементов на стабильность суспензии наночастиц Fe@C при проведении экспериментов, определение проводили в сыворотке крови. Готовые образцы сыворотки крови для анализа были получены из НИИ «Кардиологии», образцы мочи – от добровольцев, страдающих сахарным диабетом.

Пробы сыворотки крови или мочи (объемом до 2,0 мл) предварительно центрифугировали при 4000 оборотах в течение 5 мин. Для образцов сыворотки крови надосадочную жидкость объемом 1 см³ переносили в мерную колбу на 5 см³, прибавляли 2 см³ дистиллированной воды, встряхивали и доводили объем до метки дистиллированной водой. Для образцов мочи надосадочную жидкость объемом 0,5 см³ переносили в мерную колбу на 10 см³, добавляли 2 см³ дистиллированной воды, встряхивали и доводили объем до метки дистиллированной водой. Из полученных водных растворов сыворотки и мочи отбирали 50 мкл, переносили в эппендорф, прибавляли 50 мкл раствора ГОД (1 мг/мл) и 150 мкл PBS буфера (10 mM, pH 7,0). Полученные растворы инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Из реакционного раствора отбирали аликвоту 50 мкл и помещали в эппендорф, добавляли 10 мкл раствора ТМБ (10 мг/мл в ДМСО), 20 мкл раствора наночастиц Fe@C (0,5 мг/мл) и 520 мкл 0,1 M NaOAc буфера. Смесь инкубировали при 45 °C в течение 1 часа. Затем измеряли интенсивность поглощения растворов при длине волны 652 нм. Полученные значения концентрации глюкозы при 652 нм умножали на общее количество разбавлений (для сыворотки – 300 раз, для мочи – 1200) с получением конечного результата. В случае, если полученные значения концентрации превышали предел

линейности методики надосадочные растворы дополнительно разбавляли в 2 раза дистиллированной водой. Молярную концентрацию глюкозы в разбавленном образце определяли методом градуировочного графика (рисунок 25).

Полученные экспериментальные данные представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Экспериментальные данные по определению глюкозы в сыворотке крови и моче

Образец биологической жидкости	Разбавление	Содержание глюкозы (n=5)	
		В разбавленном образце, мкМ	В исходной пробе, мМ
Сыворотка крови			
1	600	23,5±1,7	14,1±1,0
2	300	13,6±0,9	4,1±0,3
3		15,7±1,2	4,7±0,4
4		29,3±1,8	8,8±0,5
5	600	23,4±1,3	14,0±0,8
Моча больных сахарным диабетом			
1	1200	20,9±1,5	25,0±1,8
2		30,4±2,0	36,5±2,4

Оценку правильности определения глюкозы в образцах биологических жидкостей по разработанной методике с использованием наночастиц Fe@C также подтверждали методом «введено-найдено» и с использованием набора стандартных реагентов производства «Вектор БЭСТ».

Добавку стандартного раствора глюкозы также проводили к неразбавленным образцам сыворотки крови и мочи. С учетом всех разбавлений согласно пункту 2.4. главы 2 величина добавки варьировалась в пределах от 1,5 до 18 мМ. Для исследования нами были выбраны образцы с наименьшим содержанием глюкозы (сыворотка крови – образец № 2, моча – образец № 1).

Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 12. Доверительный интервал рассчитан на основании 3 параллельных экспериментов.

Таблица 12 – Проверка правильности методики методом «введено-найдено»

Образец	Содержание глюкозы, ммоль/л		
	В пробе	Введено	Найдено
Сыворотка крови			
2	4,1±0,3	1,5	5,5±0,4
		3	6,9±0,5
		4,5	8,7±0,6
		6	9,9±0,6
Моча			
1	25,0±1,8	6	30,5±1,8
		12	36,3±2,2

Как видно из данных таблицы, количественное определение добавки стандартного раствора глюкозы в образец сока определяется достаточно точно, а отклонение экспериментальных значений на основании трех параллельных экспериментов не превышает 5% от истинного значения.

Результаты спектрофотометрического определения глюкозы в биологических жидкостях с использованием наночастиц Fe@C и глюкозооксидазного метода представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Сравнение результатов определения глюкозы в биологических жидкостях с использованием наночастиц Fe@C и независимым методом

№ образца	Пол пациента	Результаты, полученные с использованием наночастиц (мМ) (n=5)	Результаты глюкозооксидазного метода(мМ) (n=3)	ξ ₁ , t-критерий
Сыворотка крови				
1	мужской	14,1±1,0	14,3±0,5	2,4
2		4,1±0,3	3,9±0,3	2,3
3		4,7±0,4	4,9±0,3	1,3
4		8,8±0,5	8,6±0,4	2,2
5		14,0±0,8	14,2±0,6	2,3
Моча				
1	мужской	25,0±1,8	24,9±0,9	1,6
2	женский	36,5±2,4	36,8±1,8	2,4

В случае использования наноматериала конечный результат содержания глюкозы в образце определялся на основании 5 параллельных экспериментов, для стандартного набора измерения проводили 3 раза. Расчётные значения критерия Стьюдента также не превышают критическое значения t -критерия $t(P=0,95, f=6)=2,44$, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки при проведении спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C.

Таким образом, экспериментальные данные по содержанию глюкозы в пищевых продуктах и биообъектах, полученные с использованием Fe@C согласуются с результатами независимого метода определения глюкозы и разработанная методика подходит для определения содержания глюкозы в соковой продукции и биологических жидкостях.

5.3. Метрологическое обеспечение спектрофотометрических методик определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C

Метрологическая экспертиза полученных результатов спектрофотометрической методики определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C проводилась в аккредитованной метрологической службе Федерального государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Головной центр гигиены и эпидемиологии» (г. Москва).

Анализ проб и обработку полученных результатов проводился согласно документа на методику КХА. При этом придерживались общих требований для аттестации методик:

- для каждой серии анализируемых проб были получены по два параллельных результата анализа;
- параллельные пробы анализировались практически одновременно в одинаковых условиях в строгом соответствии с методикой КХА;

- в целях «расшатывания» эксперимента для оценки случайной погрешности, связанной с использованием различных средств измерений (мерной посуды, приборов) эксперимент рандомизирован;

- по результатам анализов параллельных проб проводилась оценка показателя повторяемости (сходимости) результатов анализа;

- по результатам анализов проб, выполненных в разных условиях (допускаемых методикой), проводилась оценка характеристики случайной погрешности, то есть показателя воспроизводимости;

- значение характеристики общей погрешности результатов анализа установлено расчетным путем по значениям характеристик случайной и систематической погрешностей;

Алгоритм расчета всех показателей представлен в приложении Б. Результаты спектрофотометрического определения глюкозы в соках и биологических жидкостях представлены в приложении В. Относительные значения показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и точности представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Диапазоны измерений, относительные значения показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и точности при $P=0,95$ методики спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C в соковой продукции и биологических жидкостях

Диапазоны измерений глюкозы ммоль/л	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), σ_R , %	Показатель точности (границы относительной погрешности при вероятности $P=0,95$), $\pm\delta$, ¹⁾ %
Соковая продукция			
От 0,1 до 50 включ.	5	10	20
От 50 до 250 включ.	4	8	16
Биологические жидкости			
От 0,1 до 50 включ.	8	12	24
¹⁾ Соответствует относительному значению расширенной неопределенности с коэффициентом охвата $k=2$			

Нами было проведено сравнение нормативных документов по определению глюкозы в соковой продукции (таблица 15)

Таблица 15 – Сравнение спектрофотометрической методики определения глюкозы с использованием Fe@C с нормативными методами

Показатель	Методики определения глюкозы		
	Спектрофотометрическая ферментативная методика (ГОСТ Р 51240-98 действующий)	Спектрофотометрическая с использованием Fe@C	ВЭЖХ (ГОСТ Р 53766-2009 действующий)
Себестоимость одного анализа (руб)	150	120	230
Количество используемых реактивов	6	5	6
Диапазон определяемых концентраций (ммоль/л)	- (не указан)	0,1-250 (соковая продукция) 0,1-50 (биологические жидкости)	6-3000 (соковая продукция) 1-28 (биологические жидкости)
Показатель повторяемости (%)	5 (для соковой продукции не указан)	5	6
Стабильность используемых реактивов	Не стабильны	Используемый наноматериал отличается повышенной стабильностью при хранении	стабильны

Как видно из данных таблицы 15, разработанная методика имеет ряд преимуществ, связанных с уменьшением стоимости анализа, количества используемых реагентов, позволяет работать в области более низких концентраций глюкозы и немного уменьшить показатель повторяемости.

Глава 6. Процессы поверхностной функционализации наночастиц Fe@C для получения материалов медицинского назначения

Из литературных источников известно, что процессы поверхностной функционализации наноматериалов зачастую способны приводить к улучшению их физико-химических характеристик [130-133] и получению новых материалов, что может существенно расширить возможности их потенциального применения в различных отраслях науки, техники и медицины [134-135].

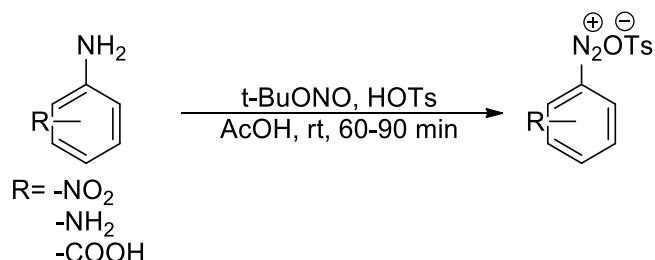
В основном, процессы функционализации поверхности направлены на повышение стабильности суспензий наночастиц в водных и органических средах, что может существенно повысить их каталитические свойства за счет увеличения доступности поверхностных активных центров или дополнительной ориентации реагирующих молекул, или для прививки белковых структур или лекарственных препаратов для медицинской диагностики или целенаправленной доставки лекарственных средств [136-137].

Нами были проведены исследования по возможному влиянию поверхностной модификации наночастиц на проявляемую ими пероксидазную активность, а также проведены попытки иммобилизации биомолекул на поверхность наноматериала Fe@C для получения новых медицинских сенсоров на его основе.

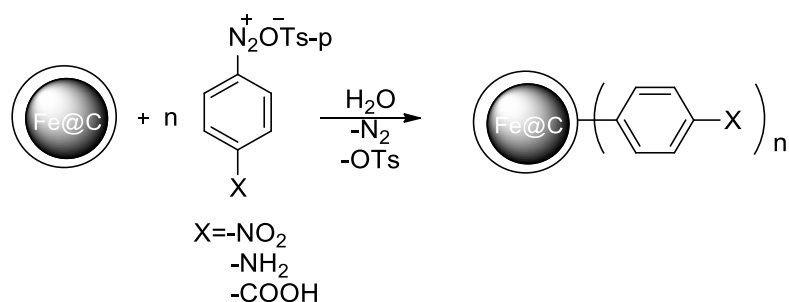
6.1. Влияние поверхностной функционализации наночастиц Fe@C на подобную пероксидазе активность

При сравнении кинетических параметров наночастиц Fe@C с другими известными наноматериалами (глава 3) было предположено, что наличие на поверхности наночастиц, полученных сольвотермальными методами, карбоксильных групп, скорее всего, способствует улучшению кинетических параметров наноматериала.

Для исследования влияния функционализации поверхности наночастиц Fe@C на проявляемую ими подобную пероксидазе активность поверхность наноматериала была ковалентно функционализирована тремя видами покрытий. В качестве агентов для функционализации нами были использованы арендиазоний тозилаты [107], имеющие amino-, nitro- и карбоксильную группы в пара-положении:



Функционализация поверхности наночастиц проводилась путем предварительного диспергирования и выдерживания наноматериала в водном растворе соответствующей соли диазония по известной методике [112] согласно схеме:



Успешную функционализацию поверхности наночастиц подтверждали методом ИК-спектроскопии. Ковалентную связь между поверхностью наноматериала и расчет количества функциональных групп (0,12 ммоль/г), привитых на поверхность, проводили с использованием метода ТГ-ДСК.

Функционализированные наноматериалы, содержащие нитро- (Fe@C-NO_2) amino- (Fe@C-NH_2) и карбоксильную (Fe@C-COOH) группы в равных массовых концентрациях были протестированы в реакции окисления ТМБ в присутствии пероксида водорода. В результате были получены кинетические кривые зависимости изменения оптической плотности от времени протекания реакции при добавлении наноматериалов (рисунок 28).

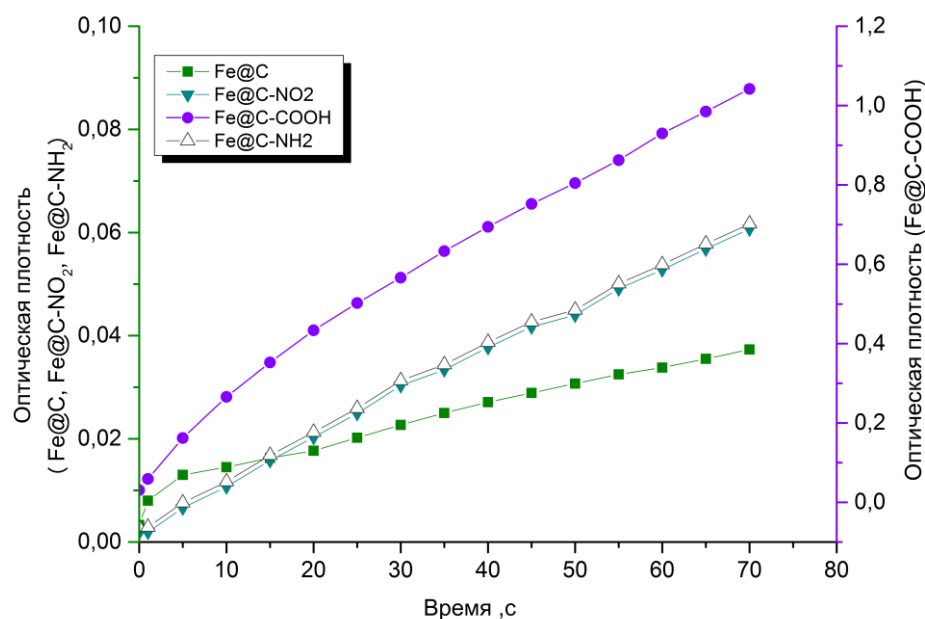


Рисунок 28. Зависимость оптической плотности реакционных растворов от времени в присутствии наночастиц Fe@C , Fe@C-NO_2 , Fe@C-NH_2 и Fe@C-COOH

Как видно из рисунка 28, оптическая плотность растворов, содержащих наночастицы Fe@C, Fe@C-NO₂ и Fe@C-NH₂, изменяется незначительно в течение 70 секунд от начала реакции. Наклон кинетических кривых также остается практически одинаков, что свидетельствует о приблизительно равных скоростях протекания реакции. Наличие же на поверхности карбоксильных групп приводит к резкому увеличению оптической плотности в тех же условиях за то же время.

Таким образом наноматериалы, имеющие на поверхности карбоксильные группы проявляют более высокую подобную пероксидазе активность, чем немодифицированные наноматериалы и как следствие будут требовать меньшее количество вносимой перекиси водорода для достижения максимальной активности. Кроме того, использование Fe@C-COOH для спектрофотометрического определения глюкозы по предложенному ранее алгоритму скорее всего будет способствовать повышению экспрессности метода или уменьшению вносимого катализатора на втором этапе процесса. В связи с этим данные материалы также являются перспективными для дальнейшего исследования.

6.2. Наночастицы Fe@C как платформа для прививки биомолекул

Сегодня, уникальные свойства наноматериалов позволяют использовать их в различных областях науки и техники [138-139]. Медицина является одним из наиболее перспективных направлений применения наночастиц [140]. Наночастицы на основе железа, обладающие ярко выраженными магнитными свойствами, получили широкое распространение как перспективные материалы для создания более простых диагностических и терапевтических систем. Они являются перспективными материалами для магнитно-резонансной томографии (МРТ) [141], носителями для направленной доставки лекарств [142] и белковых молекул [143].

Особое место в этом направлении занимают металлические наночастицы, покрытые углеродом. Прежде всего, это связано с их безопасностью для человеческого организма [144]. Металлическое ядро защищено от воздействия окружающей среды, и наночастицы не теряют магнитных свойств при их использовании. Кроме того, углеродная оболочка не только биоинертна, но может быть субстратом для ковалентной функционализации с использованием ароматических солей диазония [38, 145].

В связи с этим нами были проведены исследования по возможной модификации поверхности наночастиц Fe@C биомолекулами, которые бы способствовали приданию наночастицам новых свойств и возможности их применения для медицинской диагностики.

В качестве биомолекулы для функционализации поверхности нами был выбран зеленый флуоресцирующий белок, который является перспективным контрастным агентом для мечения клеток и медицинской диагностики [146]. Кроме того, функционализация позволит придать наночастицам флуоресцирующие свойства, которыми он не обладает в исходном состоянии.

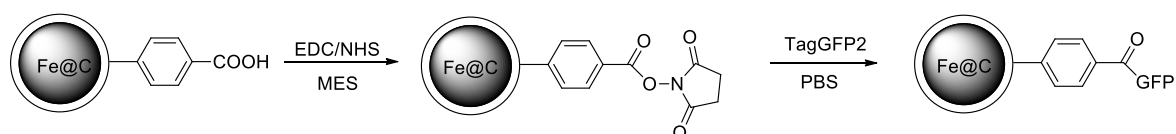
Ввиду того, что в структуре белка присутствуют только амидные связи, не вступающие в реакцию диазотирования, для ковалентной прививки GFP на

поверхность наноматериала требовалась предварительная функционализация поверхности активными группами для его связывания.

Наиболее часто встречающиеся конъюгаты получают путем связывания белка с производными карбоновых кислот после карбодиимидной активации карбоксильных групп.

В связи с этим поверхность наночастиц Fe@C MNPs предварительно была функционализирована карбоксильными группами с использованием *p*-карбоксибензолдиазоний тозилата в качестве модификатора (раздел 6.1.) [112]. Успешная прививка также доказывалась методами ИК спектроскопии, которая показала наличие COOH-групп на поверхности в области 1500-1700 см⁻¹ (рисунок 28). Количество карбоксильных групп на поверхности было рассчитано согласно данным ТГ-ДСК и элементного анализа и составляло 0,1 ммоль/г.

Прививка белка на поверхность осуществлялась за счет последовательных стадий карбодиимидной активации карбоксильных групп путем выдерживания наночастиц в буферном растворе MES (pH 6,0), содержащем EDC и NHS и дальнейшей прививкой белка к активированной поверхности в среде PBS буферного раствора по схеме:



Полученные наноматериалы также исследовали методом ИК-спектроскопии (рисунок 29) для доказательства успешной прививки TagGFP2 на поверхность, которая показала наличие полосы поглощения в области 900-1100 см⁻¹, характерной для большинства белковых структур. Сравнение данных термогравиметрического анализа для наночастиц Fe@C-COOH и нанокомпозита Fe@C-TagGFP2 также позволило рассчитать примерное количество белка на поверхности (0,2 нмоль/мг).

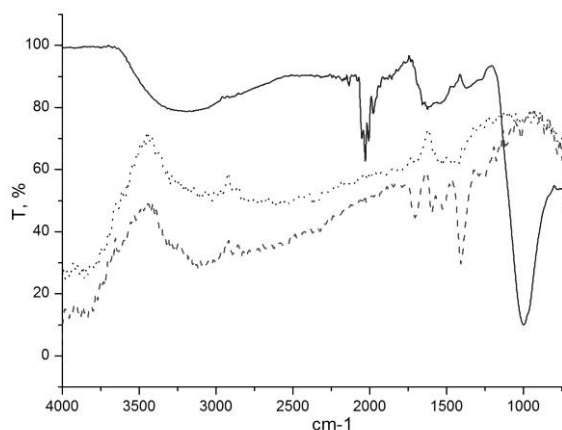


Рисунок 29. ИК-спектры наночастиц Fe@C MNPs (точечная линия), Fe@C-COOH (штриховая линия) и нанокompозита, содержащего GFP на поверхности Fe@C-TagGFP2 (сплошная линия).

Полученный нанокompозит Fe@C-TagGFP2 был исследован на флуоресцирующем микроскопе (рисунок 30) для выявления возможного проявления им флуоресцирующих свойств.

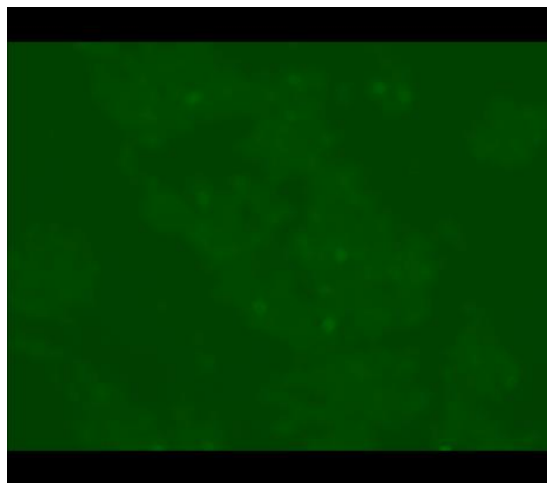


Рисунок 30. Снимок нанокompозита Fe@C-TagGFP2 с флуоресцирующего микроскопа

Из представленного снимка (рисунок 29) видно, что полученный нанокомпозит проявляет флуоресцирующие свойства. При этом не все наночастицы из пробы проявляют данные свойства, что свидетельствует о нерегулярности покрытия поверхности белком. Нерегулярность покрытия поверхности может быть связано со стерическими трудностями прививки большой молекулы белка к активным центрам поверхности, а также перекрыванию других активных центров уже привитым белком.

Таким образом, нами была показана возможность использования наночастиц Fe@C для иммобилизации биомолекул посредством поверхностной функционализации для получения нового класса наноматериалов медицинского назначения

Выводы

1. Впервые показано, что наночастицы железа, покрытые углеродной оболочкой проявляют подобные пероксидазе свойства и способны окислять основные субстраты пероксидазы в присутствии H_2O_2 .

2. Подобраны рабочие параметры реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина с использованием наночастиц Fe@C (концентрация наночастиц Fe@C – не менее 0,016 мг/мл, температура процесса – 30-40 °С, pH реакционной среды – $4 \pm 0,5$) и изучены кинетические закономерности данного процесса. Показано, что реакция окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в присутствии наночастиц Fe@C протекает по механизму фермента и кинетика реакции описывается уравнением Михаэлиса-Ментен.

3. Предложен алгоритм методики спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C и выбраны рабочие условия основных ее этапов на модельных средах:

- первая стадия: концентрация глюкозооксидазы – не менее 0,2 мг/мл, pH реакционной среды – 7, время обработки – не менее 30 минут, температура процесса – 37 °С.

- вторая стадия: концентрация наночастиц Fe@C – не менее 0,016 мг/мл, время обработки – не менее 1 часа, температура процесса – 30-40 °С, pH реакционной среды – $4 \pm 0,5$.

4. Установлены границы линейного диапазона спектрофотометрического определения глюкозы (2,3–37,0 мкМ) с использованием наночастиц Fe@C и проведена оценка ее предела обнаружения (0,21 мкМ).

5. Показано, что основные компоненты пищевых продуктов и биообъектов (сахара, витамины, органические кислоты и белки) не оказывают значимого влияния (погрешность не более 5%) на аналитический сигнал окисленного 3,3',5,5'-тетраметилбензидина.

6. Впервые разработаны методики спектрофотометрического определения глюкозы в соковой продукции и биообъектах с использованием наночастиц Fe@C и определены их основные метрологические характеристики.

7. Проведена оценка влияния процессов поверхностной функционализации наночастиц Fe@C на эффективность окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Показано, что наличие на поверхности наноматериала карбоксильных групп приводит к резкому увеличению подобной пероксидазе активности наноматериала.

Список литературы

1. Giugliano, D. Glucose metabolism and hyperglycemia / D. Giugliano, A. Ceriello and K. Esposito // *Am J Clin Nutr.* – 2008. – Vol. 87. – № 1. – P. 217–222.
2. Mergenthaler, P. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function / P. Mergenthaler, U. Lindauer, G. A. Dienel, and A. Meisel // *Trends Neurosci.* – 2013. – Vol. 36. – № 10. – P. 587–597
3. Freckmann, G. Continuous Glucose Profiles in Healthy Subjects under Everyday Life Conditions and after Different Meals / G. Freckmann, S. Hagenlocher, A. Baumstark, N. Jendrike, R. C. Gillen, K. Rössner, and C. Haug // *J Diabetes Sci Technol.* – 2007. – Vol. 1. – № 5. – P. 695–703.
4. Ehehalt, F. Blood Glucose Homeostasis in the Course of Partial Pancreatectomy – Evidence for Surgically Reversible Diabetes Induced by Cholestasis / F. Ehehalt, D. Sturm, M. Rösler, M. Distler, J. Weitz, S. Kersting, B. Ludwig, U. Schwanebeck, H.-D. Saeger, M. Solimena, R. Grützmann // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10. – № 8. – DOI:10.1371/journal.pone.0134140.
5. Crane, P. K. Glucose Levels and Risk of Dementia / P. K. Crane, R. Walker, R. A. Hubbard, G. Li, D.M. Nathan, H. Zheng, S. Haneuse, S. Craft, T. J. Montine, S.E. Kahn, W. McCormick, S.M. McCurry, J.D. Bowen, and E.B. Larson // *N Engl J Med.* – 2013. – Vol. 369. – P. 540-548.
6. Imamura, F. Effects of Saturated Fat, Polyunsaturated Fat, Monounsaturated Fat, and Carbohydrate on Glucose-Insulin Homeostasis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Feeding Trials / F. Imamura, R. Micha, J. H. Y. Wu, M. C. de Oliveira Otto, F. O. Otite, A. I. Abioye, and D. Mozaffarian // *PLoS Med.* – 2016. – Vol. 13. – № 7. – DOI: 10.1371/journal.pmed.1002087.
7. Galant, A.L. Glucose: Detection and analysis / A.L. Galant, R.C. Kaufman, and J.D. Wilson // *Food Chemistry.* – 2015. – Vol. 188. – P. 149–160.

8. Wang, H.-C. Recent developments in blood glucose sensors / H.-C. Wang and A.-R. Lee // *Journal of Food and Drug Analysis*. – 2015. – Vol. 23(2). – P. 191–200.
9. ГОСТ 5903-89 Изделия кондитерские. Методы определения сахара. – М. : Стандартинформ, 2012. – 26 с.
10. ГОСТ 8764-73 Консервы молочные и молокосодержащие. Методы контроля. – М.: Стандартинформ, 2010. – 4 с.
11. ГОСТ 13192-73 Вина, виноматериалы и коньяки. Методы определения сахаров. – М.: Стандартинформ, 2011. – 14 с.
12. Milkovska-Stamenova, S. GC-MS Method for the Quantitation of Carbohydrate Intermediates in Glycation Systems / S. Milkovska-Stamenova, R. Schmidt, A. Frolov and C. Birkemeyer // *J. Agric. Food Chem.* – 2015. – Vol. 63 (25). – P. 5911–5919.
13. Ruiz-Matute, A.I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses / A.I. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M.L. Sanz, and I. Martínez-Castro // *Journal of Chromatography B*. – 2011. – Vol. 879 (17–18). – P. 1226–1240.
14. Wahjudi, P. N. Measurement of Glucose and Fructose in Clinical Samples Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry / P. N. Wahjudi, M. E. Patterson, S. Lim, J. K. Yee, C. S. Mao, and W-N. P. Lee // *Clin Biochem.* – 2010. – Vol. 43(1-2). – P. 198–207.
15. Carballo, S. Optimisation of analytical methods for the characterisation of oranges, clementines and citrus hybrids cultivated in Spain on the basis of their composition in ascorbic acid, citric acid and major sugars / S. Carballo, F. A. Zingarello, S. E. Maestre, J. L. Todolí and M. S. Prats // *International Journal of Food Science & Technology*. – 2014. – Vol. 49. – P. 146–152.
16. Ma, J. The analysis of carbohydrates in milk powder by a new “heart-cutting” two dimensional liquid chromatography method / J. Ma, X. Hou, B. Zhang, Y. Wang, and L. He // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2014. – Vol. 94. – P. 24–31.

17. Gangola, M. P. A reliable and rapid method for soluble sugars and RFO analysis in chickpea using HPAEC-PAD and its comparison with HPLC–RI / M. P. Gangola, S. Jaiswal, Y. P. Khedikar, and R.N. Chibbar // Food Chemistry. – 2014. – Vol. 154. – P. 127–133.
18. Widmer, W. Analysis of biomass sugars and galacturonic acid by gradient anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection without post-column addition / W. Widmer // Biotechnology Letters. – 2011. – Vol. 33. – P. 365–368.
19. Wang, X. Simultaneous separation and quantitative determination of monosaccharides, uronic acids, and aldonic acids by high performance anion-exchange chromatography couples with pulsed amperometric detection in corn stover prehydrolysates /X. Wang, Y. Xu, L. Fan, Q. Yong, S. Yu // BioResources. – 2012. – Vol. 7. – P. 4614–4625.
20. ГОСТ 31669-2012 Продукция соковая. Определение сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита методом высокоэффективной жидкостной хроматографии– М.: Стандартинформ, 2013. – 11 с.
21. Oliver, J. D. Simple and robust determination of monosaccharides in plant fibers in complex mixtures by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography / J. D. Oliver, M. Gaborieau, E.F. Hilder, and P. Castignolles // Journal of Chromatography A. – 2013. – Vol. 1291. – P. 179–186.
22. Sarazin, C. Application of a new capillary electrophoretic method for the determination of carbohydrates in forensic, pharmaceutical, and beverage samples / C. Sarazin, N. Delaunay, C. Costanza, V. Eudes, and P. Gareil // Talanta. – 2012. – Vol. 99. – P. 202–206.
23. Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors / J. Wang //Chem. Rev. – 2008. – Vol. 108. – P. 814–825.
24. Patolsky, F. Long-Range Electrical Contacting of Redox Enzymes by SWCNT Connectors / F. Patolsky, Y. Weizmann, and I. Willner // Angew. Chem., Int. Ed. – 2004. – Vol. 43(16). – P. 2113-2117.

25. Unnikrishnan, B. A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene–glucose oxidase biocomposite / B. Unnikrishnan, S. Palanisamy, and S.-M. Chen // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – Vol. 39. – P. 70–75.
26. Liu, S. Self-assembled graphene platelet–glucose oxidase nanostructures for glucose biosensing / S. Liu, J. Tian, L. Wang, Y. Luo, W. Lu, and X. Sun, // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – Vol. 26. – P. 4491–4496.
27. Bharath, G. Enzymatic electrochemical glucose biosensors by mesoporous 1D hydroxyapatite-on-2D reduced graphene oxide / G. Bharath, R. Madhu, S.-M. Chen, V. Veeramani, A. Balamurugan, D. Mangalaraj, C. Viswanathana, and N. Ponpandian // *J. Mater. Chem. B.* – 2015. – Vol. 3. – P. 1360–1370.
28. Heller, A. Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management / A. Heller and B. Feldman // *Chem. Rev.* – 2008. – Vol. 108 (7). – P. 2482–2505.
29. Buzanovskii, V. A. Methods for the determination of glucose in blood. Part 1 / V. A. Buzanovskii // *Review Journal of Chemistry.* – 2015. – Vol. 5 (1). – P. 30–81.
30. Buzanovskii, V. A. Methods for the determination of glucose in blood. Part 2 / V. A. Buzanovskii // *Review Journal of Chemistry.* – 2015. – Vol. 5 (2). – P. 143–191.
31. ГОСТ Р 51240-98 Соки фруктовые и овощные. Метод определения D-глюкозы и D-фруктозы. – М.: Госстандарт России, 2002. – 8 с.
32. ГОСТ Р 51938-2002 Соки фруктовые и овощные. Метод определения сахарозы. – М.: Стандартинформ, 2008. – 11 с.
33. ГОСТ Р 51258-99 Молоко и молочные продукты. Метод определения сахарозы и глюкозы. – М.: Стандартинформ, 2009. – 7 с.
34. Vellard, M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals / M. Vellard // *Current Opinion in Biotechnology.* – 2003. – Vol. 14(4). – P. 444–450.
35. Gurung, N. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond / N. Gurung, S. Ray, S. Bose, and V. Rai // *Biomed Res Int.* – 2013. – DOI: 10.1155/2013/329121.

36. Panchal, U. Catalytic activity of recyclable resorcinarene-protected antibacterial Pd nanoparticles in C-C coupling reactions / U. Panchal, K. Modi, M. Panchal, V. Mehta, and V.K. Jain // *Chinese Journal of Catalysis*. – 2016. – Vol. 37(2). – P. 250–257.
37. Beletskaya, I. Recyclable Nanostructured Catalytic Systems in Modern Environmentally Friendly Organic Synthesis / I. Beletskaya and V. Tyurin // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15. – P. 4792-4814.
38. Grass, R. N. Covalently Functionalized Cobalt Nanoparticles as a Platform for Magnetic Separations in Organic Synthesis / R. N. Grass, E. K. Athanassiou and W. J. Stark // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – Vol. 46. – P. 4909 –4912.
39. Wang, S. Comparison of the peroxidase-like activity of unmodified, amino-modified, and citrate-capped gold nanoparticles / S. Wang, W. Chen, A.-L. Liu, L. Hong, H.-H. Deng and X.-H. Lin // *ChemPhysChem*. – 2012. – Vol. 13. – P. 1199-1204.
40. Jiang, H. Peroxidase-like activity of chitosan stabilized silver nanoparticles for visual and colorimetric detection of glucose / H. Jiang, Z. Chen, H. Cao and Y. Huang // *Analyst*. – 2012. – Vol. 13. – P. 5560-5564.
41. Zhu, H. Peroxidase-like activity of aminopropyltriethoxysilane-modified iron oxide magnetic nanoparticles and its application to clenbuterol detection / H. Zhu, Y. Hu, G. Jiang and G. Shen // *Eur Food Res Technol*. – 2011. – Vol. 233. – P. 881-887.
42. Fan, Y. The effective peroxidase-like activity of chitosan-functionalized CoFe_2O_4 nanoparticles for chemiluminescence sensing of hydrogen peroxide and glucose / Y. Fan and Y. Huang // *Analyst*. – 2012. – Vol. 17. – P. 1225-1231.
43. Ragg, R. Solids Go Bio: Inorganic Nanoparticles as Enzyme Mimics / R. Ragg, M. N. Tahir, and W. Tremel // *Eur. J. Inorg. Chem.* – 2016. - Vol.2016 (13-14) 1906–1915
44. He, W. Enzyme-Like Activity of Nanomaterials / W. He, W. Wamer, Q. Xia, J. Yin and P. P. Fu // *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. – 2014. – Vol. 32. – P. 186–211.

45. Chen, Z. Dual Enzyme-like Activities of Iron Oxide Nanoparticles and Their Implication for Diminishing Cytotoxicity / Z. Chen, J.-J. Yin, Y.-T. Zhou, Y. Zhang, L. Song, M. Song, S. Hu and N. Gu // *ACS Nano*. – 2012. – Vol. 6 (5). – P. 4001–4012.
46. Fan, J. Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritin–platinum nanoparticles / J. Fan, J.-J. Yin, B. Ning, X. Wu, Y. Hu, M. Ferrari, G.J. Anderson, J. Wei, Y. Zhao and G. Nie // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32(6). – P. 1611–1618.
47. Su, H. Dual-Enzyme Characteristics of Polyvinylpyrrolidone-Capped Iridium Nanoparticles and Their Cellular Protective Effect against H₂O₂-Induced Oxidative Damage / H. Su, D.-D. Liu, M. Zhao, W.-L. Hu, S.-S. Xue, Q. Cao, X.-Y. Le, L.-N. Ji, and Z.-W. Mao // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2015. – Vol. 7(15). – P. 8233–8242.
48. Mu, J. Intrinsic peroxidase-like activity and catalase-like activity of Co₃O₄ nanoparticles / J. Mu, Y. Wang, M. Zhao and L. Zhang // *Chem. Commun.* – 2012. – Vol. 48. – P. 2540–2542.
49. Mu, J. Catalase Mimic Property of Co₃O₄ Nanomaterials with Different Morphology and Its Application as a Calcium Sensor / J. Mu, L. Zhang, M. Zhao and Y. Wang // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2014. – Vol. 6(10). – P. 7090–7098.
50. Wang, B. A novel route to prepare LaNiO₃ perovskite-type oxide nanofibers by electrospinning for glucose and hydrogen peroxide sensing/ B. Wang, S. Gu, Y. Ding, Y. Chu, Z. Zhang, X. Ba, Q. Zhang and X. Li // *Analyst*. – 2013. – Vol. 138(1). – P. 362–367.
51. Pirmohamed, T. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity / T. Pirmohamed, J. M. Dowding, S. Singh, B. Wasserman, E. Heckert, A.S. Karakoti, J.E.S. King, S. Seal and W.T. Self // *Chem. Commun.* – 2010. – Vol. 46. – P. 2736–2738.
52. Celardo, I. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles / I. Celardo, J.Z. Pedersen, E. Traversa and L. Ghibelli // *Nanoscale*. – 2011. – Vol. 3. – P. 1411–1420.

53. Asati, A. Oxidase-Like Activity of Polymer-Coated Cerium Oxide Nanoparticles / A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, S. Nath and J.M. Perez // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2009. – Vol. 48(13). – P. 2308–2312.
54. Zhang, X. CoFe₂O₄ Nanoparticles as Oxidase Mimic-Mediated Chemiluminescence of Aqueous Luminol for Sulfite in White Wines / X. Zhang, S. He, Z. Chen, and Y. Huang // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. – Vol. 61 (4). – P. 840–847.
55. Liu, X. BSA-templated MnO₂ nanoparticles as both peroxidase and oxidase mimics / X. Liu, Q. Wang, H. Zhao, L. Zhang, Y. Sub and Y. Lv // *Analyst.* – 2012. – Vol. 137. – P. 4552-4558.
56. Zhang, X. Evaluation of the antioxidant activity of phenols and tannic acid determination with Mn₃O₄ nano-octahedrons as an oxidase mimic / X. Zhang and Y. Huang // *Anal. Methods.* – 2015. – Vol. 7. – P. 8640-8646.
57. Luo, W. Self-catalyzed, self-limiting growth of glucose oxidase-mimicking gold nanoparticles / W. Luo, C. Zhu, S. Su, D. Li, Y. He, Q. Huang and C. Fan // *ACS Nano.* – 2010. – Vol. 4(12). – P. 7451-7458.
58. He, W. Au@Pt nanostructures as oxidase and peroxidase mimetics for use in immunoassays / W. He, Y. Liu, J. Yuan, J.-J. Yin, X. Wu, X. Hu, K. Zhang, J. Liu, C. Chen, Y. Ji and Y. Guo // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32(4). – P. 1139–1147.
59. Lee, J.-W. Intrinsic polyphenol oxidase-like activity of gold@platinum nanoparticles / J.-W. Lee, S. Yoon, Y.M. Lo, H. Wu, S.-Y. Lee and B. Moon // *RSC Adv.* – 2015. – Vol. 5. – P. 63757–63764. |
60. Kim, C.K. Ceria Nanoparticles that can Protect against Ischemic Stroke / C. K. Kim, T. Kim, I.-Y. Choi, M. Soh, D. Kim, Y.-J. Kim, H. Jang, H.-S. Yang, J.-Y. Kim, H.-K. Park, S.P. Park, S. Park, T. Yu, B.-W. Yoon, S.-H. Lee and T. Hyeon // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2012. – Vol. 51(44). – P. 11039–11043.
61. Korsvik, C. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles / C. Korsvik, S. Patil, S. Seal and W. T. Self // *Chem. Commun.* – 2007. – Vol. 10. – P. 1056-1058.

62. Hirst, S. M. Anti-inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles / S. M. Hirst, A. S. Karakoti, R. D. Tyler, N. Sriranganathan, S. Seal, C. M. Reilly // *Small*. – 2009. – Vol. 5(24). – P. 2848–2856.
63. Zheng, W. Screening reactive oxygen species scavenging properties of platinum nanoparticles on a microfluidic chip / W. Zheng, B. Jiang B., Y. Hao, Y. Zhao, W. Zhang and X. Jiang // *Biofabrication*. – 2014. – Vol. 6(4). - DOI: 10.1088/1758-5082/6/4/045004.
64. Natalio, F. Vanadium pentoxide nanoparticles mimic vanadium haloperoxidases and thwart biofilm formation / F. Natalio, R. André, A.F. Hartog, B. Stoll, K.P. Jochum, R. Wever and W. Tremel // *Nature Nanotechnology*. – 2012. – Vol. 7. – P. 530–535.
65. Vernekar, A. A. An antioxidant nanozyme that uncovers the cytoprotective potential of vanadia nanowires / A. A. Vernekar, D. Sinha, S. Srivastava, P.U. Paramasivam, P. D'Silva and G. Mugesesh // *Nature Communications*. – 2014. – Vol. 5. - DOI:10.1038/ncomms6301.
66. Ragg, R. Molybdenum Trioxide Nanoparticles with Intrinsic Sulfite Oxidase Activity / R. Ragg, F. Natalio, M.N. Tahir, H. Janssen, A. Kashyap, D. Strand, S. Strand and W. Tremel // *ACS Nano*. – 2014. – Vol. 8 (5). – P. 5182–5189.
67. Fan, K. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues / K. Fan, C. Cao, Y. Pan, D. Lu, D. Yang, J. Feng, L. Song, M. Liang and X. Yan // *Nature Nanotechnology*. – 2012. – Vol. 7. – P. 459–464.
68. Gao, L. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles / L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett and X. Yan // *Nature Nanotechnology*. -2007. – Vol. 2. – P. 577 – 583.
69. Wei, H. Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles as Peroxidase Mimetics and Their Applications in H₂O₂ and Glucose Detection / H. Wei and E. Wang // *Anal. Chem.* – 2008. – Vol. 80 (6). – P. 2250–2254.
70. Shi, Y. Fe₃O₄ peroxidase mimetics as a general strategy for the fluorescent detection of H₂O₂-involved systems / Y. Shi, P. Su, Y. Wang and Y. Yang // *Talanta*. – 2014. – Vol. 130. – P. 259–264.

71. Hua, L. Copper nanoclusters as peroxidase mimetics and their applications to H_2O_2 and glucose detection / L. Hua, Y. Yuana, L. Zhanga, J. Zhaoa, S. Majeeda and G. Xua // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 762. – P. 83–86.
72. Liu, H. A sensitive hydrogen peroxide biosensor using ultra-small CuInS_2 nanocrystals as peroxidase mimics / H. Liu, C. Gu, W. Xiong and M. Zhang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2015. – Vol. 209. – P. 670–676.
73. Zhang, Y. Novel application of CoFe layered double hydroxide nanoplates for colorimetric detection of H_2O_2 and glucose / Y. Zhang, J. Tian, S. Liu, L. Wang, X. Qin, W. Lu, G. Chang, Y. Luo, A.M. Asiri, A.O. Al-Youbi and X. Sun // *Analyst*. – 2012. – Vol. 137. – P. 1325–1328.
74. Jiao, X. Well-redispersed ceria nanoparticles: Promising peroxidase mimetics for H_2O_2 and glucose detection / X. Jiao, H. Song, H. Zhao, W. Bai, L. Zhang and Y. Lv // *Anal. Methods*. – 2012. – Vol. 4. – P. 3261–3267.
75. Qiao, F. Peroxidase-like activity of manganese selenide nanoparticles and its analytical application for visual detection of hydrogen peroxide and glucose / F. Qiao, L. Chen, X. Li, L. Li and S. Ai // *Sensors and Actuators B*. – 2014. – Vol. 193. – P. 255–262.
76. Han, L. A V_2O_3 -ordered mesoporous carbon composite with novel peroxidase-like activity towards the glucose colorimetric assay / L. Han, L. Zeng, M. Wei, C.M. Li and A. Liu // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7. – P. 11678–11685.
77. Q. Cai, S. Lu, F. Liao, Y. Li, S. Ma and M. Shao Catalytic degradation of dye molecules and in situ SERS monitoring by peroxidase-like Au/CuS composite // *Nanoscale*, 2014,6, 8117–8123
78. André, R. V_2O_5 Nanowires with an Intrinsic Peroxidase-Like Activity / R. André, F. Natálio, M. Humanes, J. Leppin, K. Heinze, R. Wever, H.-C. Schröder, W.E.G. Müller and W. Tremel // *Adv. Funct. Mater.* – 2011. – Vol. 21(3). – P. 501–509.
79. Li, N. Novel tungsten carbide nanorods: An intrinsic peroxidase mimetic with high activity and stability in aqueous and organic solvents / N. Li, Y. Yan, B.-Y.

Xia, J.-Y. Wang and X. Wang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – Vol. 54. – P. 521-527.

80. Zhang, X.-Q. Prussian blue modified iron oxide magnetic nanoparticles and their high peroxidase-like activity / X.-Q. Zhang, S.-W. Gong, Y. Zhang, T. Yang, C.-Y. Wang and N. Gu // *J. Mater. Chem.* – 2010. – Vol. 20. – P. 5110–5116.

81. Pradeep, N. V. Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review / N. V. Pradeep, S. Anupam, K. Navya, H. N. Shalini, M. Idris and U. S. Hampannavar // *Applied Water Science*. – 2015. – Vol. 5(2). – P. 105–112.

82. Kolhe, P. M. Degradation of Phenol Containing Wastewater by Advance Catalysis System – A Review / P. M. Kolhe, S. T. Ingle and N. D. Wagh // *Annual Research & Review in Biology*. – 2015. – Vol. 8(3). – P. 1-15.

83. Pradeep, N. V. Polymerization of Phenol using Free and Immobilized Horseradish Peroxidase / N. V. Pradeep, Anupama and U. S. Hampannavar // *Journal of Environment and Earth Science*. – 2012. – Vol. 2. – № 1. – P. 31-36.

84. Zelmanov, G. Iron(3) oxide-based nanoparticles as catalysts in advanced organic aqueous oxidation / G. Zelmanov and R. Semiat // *Water Res.* – 2008. – Vol. 42(1–2). – P. 492–498.

85. Feng, Y.-B. High-efficiency catalytic degradation of phenol based on the peroxidase-like activity of cupric oxide nanoparticles / Y.-B. Feng, L. Hong, A.-L. Liu, W.-D. Chen, G.-W. Li, W. Chen and X.-H. Xia // *Int. J. Environ. Sci. Technol.* – 2015. – Vol. 12. – P. 653–660.

86. Han, Y. F. Removing organic compounds from aqueous medium via wet peroxidation by gold catalysts / Y. F. Han, N. Phonthammachai, K. Ramesh, Z. Zhong and T. White // *Environ Sci Technol.* – 2008. – Vol. 42(3). – P. 908–912.

87. Zhang, S. X. Superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as catalysts for the catalytic oxidation of phenolic and aniline compounds / S. X. Zhang, X. L. Zhao, H. Y. Niu, Y. L. Shi, Y. Q. Cai and G. B. Jiang // *J Hazard Mater.* – 2009. – Vol. 167(1–3). – P. 560–566.

88. Zhang, J. B. Decomposing phenol by the hidden talent of ferromagnetic nanoparticles / J. B. Zhang, J. Zhuang, L. Z. Gao, Y. Zhang, N. Gu, J. Feng, D. L. Yang, J. D. Zhu and X. Y. Yan // *Chemosphere*. – 2008. – Vol. 73(9). – P. 1524–1528.
89. Peng, C. Graphene-templated formation of two-dimensional lepidocrocite nanostructures for high-efficiency catalytic degradation of phenols / C. Peng, B. W. Jiang, Q. Liu, Z. Guo, Z. J. Xu, Q. Huang, H. J. Xu, R. Z. Tai and C. H. Fan // *Energy Environ Sci*. – 2011. – Vol. 4(6). – P. 2035–2040.
90. Zhuang, J. A novel application of iron oxide nanoparticles for detection of hydrogen peroxide in acid rain / J. Zhuang, J. Zhang, L. Gao, Y. Zhang, N. Gu, J. Feng, D. Yang and X. Yan // *Materials Letters*. – 2008. – Vol. 62. – P. 3972–3974.
91. Jiang, Y. Synthesis of RGO/Cu₈S₅/PPy Composite Nanosheets with Enhanced Peroxidase-Like Activity for Sensitive Colorimetric Detection of H₂O₂ and Phenol / Y. Jiang, Y. Gu, G. Nie, M. Chi, Z. Yang, C. Wang, Y. Wei and X. Lu // *Part. Part. Syst. Charact.* – 2017. – Vol. 34(3). – DOI: 10.1002/ppsc.201600233.
92. Cash, K.J. Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes / K. J. Cash and H. A. Clark // *Trends Mol Med*. – 2010. – Vol. 16(12). – P. 584–593.
93. Makaram, P. Trends in Nanomaterial-Based Non-Invasive Diabetes Sensing Technologies / P. Makaram, D. Owens and J. Aceros // *Diagnostics*. – 2014. – Vol. 4. – P. 27-46.
94. Yua, F. The artificial peroxidase activity of magnetic iron oxide nanoparticles and its application to glucose detection / F. Yua, Y. Huang, A. J. Cole and V. C. Yang // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – P. 4716–4722.
95. Lin, L. Intrinsic peroxidase-like catalytic activity of nitrogen-doped graphene quantum dots and their application in the colorimetric detection of H₂O₂ and glucose / L. Lin, X. Song, Y. Chen, M. Rong, T. Zhao, Y. Wang, Y. Jiang and X. Chen // *Analytica Chimica Acta*. – 2015. – Vol. 869. – P. 89–95.
96. Su, L. Colorimetric Detection of Urine Glucose Based ZnFe₂O₄ Magnetic Nanoparticles / L. Su, J. Feng, X. Zhou, C. Ren, H. Li and X. Chen // *Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 84. – P. 5753–5758.

97. Dong, Y. Graphene oxide-Fe₃O₄ magnetic nanocomposites with peroxidase-like activity for colorimetric detection of glucose / Y. Dong, H. Zhang, Z. U. Rahman, L. Su, X. Chen, J. Hu and X. Chen // *Nanoscale*. – 2012. – Vol. 4. – P. 3969–3976.
98. Kim, M. I. Colorimetric Quantification of Glucose and Cholesterol in Human Blood Using a Nanocomposite Entrapping Magnetic Nanoparticles and Oxidases / M. I. Kim, D. Cho, and H. G. Park // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2015. – Vol. 15. - № 10. – P. 7955-7961.
99. Dutta, A. K. New peroxidase-substrate 3,5-di-tert-butylcatechol for colorimetric determination of blood glucose in presence of Prussian Blue-modified iron oxide nanoparticles / A.K. Dutta, S.K. Maji, P. Biswas and B. Adhikary // *Sensors and Actuators B*. – 2013. – Vol. 177. – P. 676–683.
100. Jiang, H. Peroxidase-like activity of chitosan stabilized silver nanoparticles for visual and colorimetric detection of glucose / H. Jiang, Z. Chen, H. Cao and Y. Huang // *Analyst*. – 2012. – Vol. 13. – P. 5560-5564.
101. Dutta, A. K. CuS nanoparticles as a mimic peroxidase for colorimetric estimation of human blood glucose level / A.K. Dutta, S. Das, S. Samanta, P. K. Samanta, B. Adhikary and P. Biswas. // *Talanta*. – 2013. – Vol. 107. – P. 361–367.
102. Sharma, V. Cytocompatible peroxidase mimic CuO:graphene nanosphere composite as colorimetric dual sensor for hydrogen peroxide and cholesterol with its logic gate implementation / V. Sharma and S.M. Mobin // *Sensors and Actuators B*. – 2017. – Vol. 240. – P. 338–348.
103. Havata, A. Colorimetric cholesterol sensor based on peroxidase like activity of zinc oxide nanoparticles incorporated carbon nanotubes / A. Hayata, W. Haiderb, Y. Razab and J. L. Martyc // *Talanta*. – 2015. – Vol. 143. – P. 157–161.
104. Li, R. A novel glucose colorimetric sensor based on intrinsic peroxidase-like activity of C₆₀-carboxyfullerenes / R. Li, M. Zhen, M. Guan, D. Chen, G. Zhang, J. Ge, P. Gong, C. Wang and C. Shu // *Biosens Bioelectron.* – 2013. – Vol. 47. – P. 502-507.

105. Li, Q. Carbon coated magnetite nanoparticles with improved water-dispersion and peroxidase-like activity for colorimetric sensing of glucose / Q. Li, G. Tang, X. Xiong, Y. Cao, L. Chen, F. Xu and H. Tan // *Sensors and Actuators B.* – 2015. – Vol. 215. – P. 86–92.

106. ГОСТ 177-88 Водорода перекись. Технические условия. – М.: Стандартиформ, 2006. – 9с.

107. Filimonov, V. D. Unusually Stable, Versatile, and Pure Arenediazonium Tosylates: Their Preparation, Structures, and Synthetic Applicability / V. D. Filimonov, M. Trusova, P. Postnikov, E. A. Krasnokutskaya, Y. M. Lee, H. Y. Hwang, H. Kim and K.-W. Chi // *Org. Lett.* – 2008. – Vol.1 10. – P. 3961-3964.

108. Tsurin, V. A. Synthesis, structure, and magnetic properties of iron and nickel nanoparticles encapsulated into carbon / V. A. Tsurin, A. Ye. Yermakov, M. A. Uimin, A. A. Mysik, N. N. Shchegoleva, V. S. Gaviko and V. V. Maikov // *Physics of Solid State.* – 2014. – Vol. 56 (2). P. 287-300.

109. Galakhov, V. R. Electronic structure and resonant X-ray emission spectra of carbon shells of iron nanoparticles / V. R. Galakhov, S. N. Shamin, E. M. Mironova, M. A. Uimin, A. Ye. Yermakov and D. W. Boukhvalov // *JETP Letters.* – 2013. – Vol. 96 (11). – P. 710-713.

110. Galakhov, V. R. Characterization of Carbon-Encapsulated Nickel and Iron Nanoparticles by Means of X-ray Absorption and Photoelectron Spectroscopy / V. R. Galakhov, A. S. Shkvarin, A. S. Semenova, M. A. Uimin, A. A. Mysik, N. N. Shchegoleva, A. Ye. Yermakov, and E. Z. Kurmaev // *J. Phys. Chem. C.* – 2010. – Vol. 114 (51). – P. 22413-22416.

111. Erokhin, A. V. Phenylacetylene hydrogenation on Fe@C and Ni@C core-shell nanoparticles: About intrinsic activity of graphene-like carbon layer in H₂ activation / A. V. Erokhin, E. S. Lokteva, A. Ye. Yermakov, D. W. Boukhvalov, K. I. Maslakov, E. V. Golubina and M. A. Uimin // *Carbon.* – 2014. – Vol. 74. – P. 291-301.

112. Postnikov, P. S. Aryldiazonium tosylates as new and effective agents for covalent functionalization of carbon coating of metal nanoparticles by aromatic groups /

P. S. Postnikov, M. E. Trusova, T. A. Fedushchak, M. A. Uimin, A. E. Ermakov and V. D. Filimonov // *Nanotechnologies in Russia*. – 2010. – Vol. 5 (7-8). – P. 15-16.

113. Chen, W. Peroxidase-Like Activity of Cupric Oxide Nanoparticle / W. Chen, J. Chen, A.-L. Liu, L.-M. Wang, G.-W. Li and X.-H. Lin // *ChemCatChem*. – 2011. – Vol. 3. – P. 1151 – 1154.

114. An, Q. Peroxidase-Like Activity of Fe_3O_4 @Carbon Nanoparticles Enhances Ascorbic Acid-Induced Oxidative Stress and Selective Damage to PC-3 Prostate Cancer Cells / Q. An., C. Sun, D. Li, K. Xu, J. Guo, and C. Wang // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2013. – Vol. 5. – P. 13248–13257.

115. Shrivastava, A. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods / A. Shrivastava and V. B. Gupta // *Chronicles of Young Scientists*. – 2011. – Vol. 2(1). – P. 21-25.

116. Liu, Q. Glucose-sensitive colorimetric sensor based on peroxidase mimics activity of porphyrin- Fe_3O_4 nanocomposites / Q. Liu, H. Li, Q. Zhao, R. Zhu, Y. Yang, Q. Jia, B. Bian and L. Zhuo // *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. – 2014. – Vol. 41 – P. 142–151.

117. Kim, M. I. Fabrication of nanoporous nanocomposites entrapping Fe_3O_4 magnetic nanoparticles and oxidases for colorimetric biosensing / M. I. Kim, J. Shim, T. Li, J. Lee and H.G. Park // *Chemistry-A European Journal*. – 2011. – Vol. 17. – P. 10700–10707.

118. Mitra, K. Colorimetric estimation of human glucose level using gamma- Fe_2O_3 nanoparticles: An easily recoverable effective mimic peroxidase / K. Mitra, A. B. Ghosh, A. Sarkar, N. Saha, and A. K. Dutta // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – Vol. 451. – P. 30–35.

119. Liu, S. (2012). A general strategy for the production of photoluminescent carbon nitride dots from organic amines and their application as novel peroxidase-like catalysts for colorimetric detection of H_2O_2 and glucose / S. Liu, J. Q. Tian, L. Wang, Y. L. Luo, and X. P. Sun // *RSC Advances*. – 2012. – Vol. 2. – P. 411–413.

120. Yang, W. S. $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ hierarchical nanocubes as peroxidase mimetics and their applications in H_2O_2 and glucose detection / W. S. Yang, J. H. Hao, Z. Zhang, B.

P. Lu, B. L. Zhang and J. L. Tang // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4. – P. 35500–35504.

121. Walker, R. W. Laboratory Determined Sugar Content and Composition of Commercial Infant Formulas, Baby Foods and Common Grocery Items Targeted to Children / R. W. Walker and M. I. Goran, // Nutrients. – 2015. – Vol. 7(7). – P. 5850–5867.

122. Andrés, V. Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages / V. Andrés, M. D. Tenorio and M. J. Villanueva // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 173. – P. 1100–1106.

123. Hasnaoui, N. Organic Acids, Sugars, and Anthocyanins Contents in Juices of Tunisian Pomegranate Fruits / N. Hasnaoui , R. Jbir , M. Mars , M. Trifi , A. Kamal-Eldin , P. Melgarejo and F. Hernandez // International Journal of Food Properties. – 2011. – Vol. 14(4). – P. 741-757.

124. Vasconcellos, J. Comparison of Total Antioxidant Potential, and Total Phenolic, Nitrate, Sugar, and Organic Acid Contents in Beetroot Juice, Chips, Powder, and Cooked Beetroot / J. Vasconcellos, C. Conte-Junior , D. Silva , A. P. Pierucci, V. Paschoalin and T. S. Alvares // Food Sci. Biotechnol. – 2016. – Vol. 25(1). – P. 79-84.

125. Kim, Y.-M. Organic acid and sugar contents in different domestic fruit juices / Y.-M. Kim, S.-J. Hwang, M. Seo, S.-R. Jin, K.-T. Lee // Korean Journal of Agricultural Science. – 2016. – Vol. 43. – P. 705-714.

126. Carballo, S. Optimisation of analytical methods for the characterisation of oranges, clementines and citrus hybrids cultivated in Spain on the basis of their composition in ascorbic acid, citric acid and major sugars / Carballo, F. A. Zingarello, S. E. Maestre, J. L. Todolí and M. S. Prats // International Journal of Food Science and Technology. – 2014. – Vol. 49 (1). – P. 146–152.

127. Ehling, S. Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by Liquid ChromatographyMass Spectrometry: An Enhanced Tool for Authenticity Testing / S. Ehling and S. Cole // J. Agric. Food Chem. – 2011. – Vol. 59 (6). – P. 2229–2234.

128. Khosravi, F. Determination of Organic Acids in Fruit juices by UPLC / F. Khosravi, N. Rastakhiz , B. Iranmanesh and S. S. S. J. Olia // *International Journal of Life Sciences*. – 2015. – Vol. 9(5). – P. 41 – 44.
129. Chinnici, F. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography / F. Chinnici, U. Spinabelli, C. Riponi and A. Amati // *Journal of Food Composition and Analysis*. -2005. – Vol. 18. – P. 121–130.
130. Ji, P. Influence of Surface Modification of Zinc Oxide Nanoparticles on Thermal Behavior and Hydrophilic Property of PET–PEG Composites / P. Ji, C. Wang, Z. Jiang and H. Wang // *Polymer Composites*. – 2016. – Vol. 37(6). – P. 1830-1838.
131. Zhou, Z. Influence of surface chemical properties on the toxicity of engineered zinc oxide nanoparticles to embryonic zebrafish / Z. Zhou, J. Son, B. Harper, Z. Zhou and S. Harper // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1568–1579.
132. Dobosz, B. The influence of surface modification, coating agents and pH value of aqueous solutions on physical properties of magnetite nanoparticles investigated by ESR method / B. Dobosz, R. Krzyminiewski, J. Kurczewska and G. Schroeder // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2017. – Vol. 429. – P. 203–210.
133. Zhang, X. Effects of surface modification on the properties of magnetic nanoparticles/PLA composite drug carriers and in vitro controlled release study / X. Zhang, L. Xue, J. Wang, Q. Liu, J. Liu, Z. Gao and W. Yang // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2013. – Vol. 431. – P. 80–86.
134. Ali, A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles / A. Ali, H. Zafar, M. Zia, I. Haq, A. Rehman Phull, J. S. Ali and A. Hussain // *Nanotechnol Sci Appl*. – 2016. – Vol. 9. – P. 49–67.
135. Zhen, Z. RGD-Modified Apoferritin Nanoparticles for Efficient Drug Delivery to Tumors/ Z. Zhen, W. Tang, H. Chen, X Lin, T. Todd, G. Wang, T. Cowger, X. Chen and J. Xie // *ACS Nano*. – 2013. – Vol. 7 (6). – P. 4830–4837.

136. Khdair, A. Modified-chitosan nanoparticles: Novel drug delivery systems improve oral bioavailability of doxorubicin / A. Khdair, I. Hamad, H. Alkhathi, Y. Bustanji, M. Mohammad, R. Tayem and K. Aiedeh // *Eur J Pharm Sci.* – 2016. – Vol.93. – P. 38-44.
137. Bose, R. JC Lipid-based surface engineering of PLGA nanoparticles for drug and gene delivery applications / R. JC Bose, S.-H. Lee and H. Park // *Biomaterials Research.* – 2016. – Vol. 20. – P. 1-9 DOI: 10.1186/s40824-016-0081-3.
138. Chen, A. Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical application / A. Chen and S. Chatterjee // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – Vol. 42. – P. 5425-5438.
139. Zang, Q. Nanomaterials for energy conversion and storage / Q. Zhang, E. Uchaker, S. L. Candelaria and G. Cao // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – Vol. 42. – P. 3127-3171.
140. Solanki, A. Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging / A. Solanki, J.D. Kim, K.-B. Lee // *Nanomedicine.* – 2008. – Vol. 3. – P. 567-578.
141. Davis, M. E. Nanoparticles therapeutics: an emerging treatment modality for cancer/ M.E. Davis, Z. Chen, D.M. Shin // *Nat. Rev.* – 2008. – Vol. 7. – P. 771-782.
142. Pridgen, E. M. Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy / E. .M. Pridgen, R. Langer and O. C. Farokhzad // *Nanomedicine.* – 2007. – Vol. 2. – P. 669-680.
143. Goddard, J. M. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds / J. M. Goddard and J. H. Hotchkiss // *Prog. Polym. Sci.* – 2007. – Vol. 32. – P. 698-725.
144. Herrmann, I. K. In vivo risk evaluation of carbon-coated iron carbide nanoparticles based on short- and long-term exposure scenarios. / I. K. Herrmann, B. Beck-Schimmer, C. M. Schumacher, S. Gschwind, A. Kaech, U. Ziegler, P. A. Clavien, D. Günther, W.J. Stark, R. Graf and A. A. Schlegel // *Nanomedicine (Lond).* – 2016. – Vol. 11(7). – P. 783-796.

145. Grass, R. N. Covalently functionalized cobalt nanoparticles as a platform for magnetic separation in organic synthesis / R. N. Grass, E.K. Athanassiou and W.J. Stark // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – Vol. 46. – P. 4909-4912.

146. Hoffman, R. M Application of GFP imaging in cancer / R. M Hoffman // *Laboratory Investigation.* – 2015. – Vol. 95. – P. 432–452.

Приложение А

Таблица 1 – Содержание органических кислот, сахаров и витаминов в пищевых продуктах и биообъектах

Наименование образца	Основные компоненты													
	Органические кислоты ммоль/л						Сахара ммоль/л			Витамины 10 ⁻³ ммоль/л				
	Мочевая	Молочная	Лимонная	Янтарная	Фумаровая	Яблочная	Сахароза	Глюкоза	Фруктоза	В1	В6	В12	С	Д3
Пищевые продукты														
Яблочный сок	-	6,7-13,3	5,7-25,7	1,6-7,1	(7,8-10,3)*10 ⁻³	2,9-41,8	20,5-116,8	133-250	244-344				22,7-51,1	
Грушевый сок	-	-	7,5-10,3	2,5-27,1	(7,8-10,3)*10 ⁻³	3,7-8,9	123-158	177-211	161-333					
Авокадо										0,003	0,002	-	0,056	<0,001
Мультифруктовый										0,009		-	0,470	-
Биообъекты														
Сыворотка крови	0,15-0,45						-	3,6-5,5	-	-				
Моча	1,2-3,0							До 2,8						

Приложение Б

Алгоритм проведения расчётов по оценке точности (правильности и прецизионности) спектрофотометрической методики определения глюкозы

1. Оценка показателей прецизионности (повторяемости и воспроизводимости)

1.1. Находится среднее арифметическое x_{ml} и выборочная дисперсия S_{ml}^2 результатов единичного анализа содержания компонента в m -ом образце, полученных в условиях повторяемости (параллельных определений) по формулам:

$$x_{ml} = \frac{\sum_{i=1}^N x_{mli}}{N}, \quad (1)$$

$$S_{ml}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{mli} - x_{ml})^2}{N-1}, \quad (2)$$

$$m=1, \dots, M, l=1 \dots L$$

1.2. На основе полученных значений выборочных дисперсий проверяли гипотезу о равенстве генеральных дисперсий, используя критерий Кохрена, рассчитанного по формуле

$$G_{m(max)} = \frac{(S_{ml}^2)_{max}}{\sum_{l=1}^L S_{ml}^2}, \quad (3)$$

сравнивали его с табличным значением этого критерия для числа степеней свободы $v=N-1$, соответствующего максимальной дисперсии, и $f=L$, соответствующего числу суммируемых дисперсий, и принятой доверительной вероятности $P=0,95$

1.3. По результатам проверки была принята гипотеза об однородности дисперсий S_{ml}^2 . Средние квадратические отклонения, характеризующие повторяемости, рассчитывают по формуле:

$$\sigma_{rm} \approx S_{rm} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L S_{ml}^2}{L}}, \quad (4)$$

1.4. Проверку средних значений, полученных в условиях повторяемости (или в условиях внутрилабораторной прецизионности), X_{ml} на наличие выбросов проводили по критерию Граббса.

а) Для результатов измерений каждого ОО $\{X_{ml}, l=1, \dots, L\}$ находили максимальное $X_{m,max}$ и минимальное $X_{m,min}$ значения.

Рассчитывали X_m - общее среднее значение результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости (или в условиях внутрилабораторной прецизионности) и их средние квадратические отклонения S_m по формулам:

$$X_m = \frac{\sum_{l=1}^L X_{ml}}{L} \quad (5)$$

$$S_m = \frac{\sum_{l=1}^L (X_{ml} - X_m)^2}{L-1} \quad (6)$$

б) Рассчитывали статистики Граббса по формулам:

$$GR_{m,max} = \frac{X_{m,max} - X_m}{S_m}, \quad (7)$$

$$GR_{m,min} = \frac{X_m - X_{m,min}}{S_m}. \quad (8)$$

Сравнивали их с критическим значением для числа степеней свободы $f=L$, соответствующего числу лабораторий (или серии результатов измерений), и принятой доверительной вероятности $P=0,95$

1.5. Средние значения прошли проверку на наличие выбросов по критерию Граббса (дисперсии являются однородными по критерию Граббса). Выборочное среднее квадратическое отклонение результатов измерений m -го ОО, полученных в условиях воспроизводимости (или внутрилабораторной прецизионности) - $S_{R,m}$ рассчитывали по формуле:

$$\sigma_{Rm} \approx S_{R,m} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L'} (X_{ml} - X'_m)^2}{L'-1} + \left(\frac{1}{n} - \frac{1}{N}\right) * S_{rm}^2}, \quad (9)$$

$$m=1, \dots, M,$$

где X'_m - среднее арифметическое результатов измерений;

L' - число результатов измерений.

2. Оценка показателя правильности

2.1. Рассчитывали значения следующих величин:

- среднее значение результатов анализа пробы с фиксированной (начальной) навеской пробы

$$\bar{X} = \frac{\sum_{l=1}^L X_l}{L}, \quad (10)$$

- среднее значение результатов анализа пробы с измененной навеской

$$\bar{X}' = \frac{\sum_{l=1}^L \bar{X}'_l}{L}, \quad (11)$$

- СКО, характеризующее случайный разброс результатов анализа пробы с начальной навеской пробы

$$S_1 = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X_l - \bar{X})^2}{L-1}}, \quad (12)$$

- СКО, характеризующее случайный разброс результатов анализа пробы с измененной навеской

$$S_2 = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X'_l - \bar{X}')^2}{L-1}}, \quad (13)$$

- оценку математического ожидания систематической погрешности методики измерений

$$\Theta = \bar{X} - \bar{X}', \quad (14)$$

- рассчитанное значение t -критерия

$$t = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L}}} \quad (15)$$

2.2. Расчетное значение t сравнивают с при числе степеней свободы $f=L-1$ и доверительной вероятности $P=0,95$

2.3. По результатам проверки было установлено, что систематическая погрешность незначима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю ($\Theta=0$).

2.4. Показатель правильности методики анализа (верхнюю и нижнюю границы, в которых неисключенная систематическая погрешность методики анализа находится с принятой вероятностью $P=0,95$) рассчитывают по формуле:

$$\Delta_c = 1,96 \sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L}} = 1,96 \sigma_c \quad (16)$$

3 Оценка показателя точности методики измерений

Показатель точности методики измерений (границы, в которых погрешность результатов измерений находится с доверительной вероятностью $P=0,95$) рассчитывают по формуле:

$$\delta = 1,96 \sqrt{\sigma_R^2 + \sigma_c^2}, \quad (17)$$

$$\sigma_c^2 = \sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L}} \quad (18)$$

Приложение В

1. Расчет показателей повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности спектрофотометрической методики определения глюкозы в биологических жидкостях (25 мМ)

Таблица 1 – Экспериментальные данные, необходимые для оценивания показателей прецизионности (повторяемости, промежуточной прецизионности и воспроизводимости)

Серия 1 $\eta=2$						Серия 2 $\eta=2$					
Лаборатория	Результаты анализа пробы		Хср	Спробы	SR ² проб	Лаборатория	Рез-ты анализа проб с изм-й навес.		Х'ср	S'пробы	SR' ² проб
	X1	X2					X'1	X'2			
1	23,0	21,0	22,0	1,4	2,0	1	25,5	23,6	24,5	1,3	1,8
2	25,9	24,9	25,4	0,71	0,5	2	21,0	23,0	22,0	1,4	2,0
3	28,8	29,5	29,2	0,49	0,25	3	28,7	25,0	26,8	2,616	6,8
4	20,1	24,0	22,1	2,7	7,4	4	24,9	21,0	22,9	2,757	7,6
5	28,6	21,3	24,9	5,2	26,6	5	23,4	23,9	23,6	0,353	0,12
6	22,4	20,4	21,4	1,4	2,0	6	26,4	23,0	24,7	2,404	5,8
7	20,3	21,6	20,9	0,9	0,85	7	25,0	23,0	24,0	1,414	2,0
8	24,1	23,1	23,6	0,7	0,5	8	29,7	28,0	28,9	1,202	1,4
9	22,8	23,4	23,1	0,4	0,18	9	26,0	25,0	25,5	0,707	0,5
10	25,5	23,5	24,5	1,4	2,0	10	26,0	27,0	26,5	0,707	0,5
11	23,7	26,5	25,1	1,9	3,9	11	30,0	31,0	30,5	0,707	0,5
12	29,0	24,6	26,8	3,1	9,7	12	24,7	21,0	22,8	2,616	6,8
13	22,2	21,3	21,8	0,64	0,4	13	25,9	21,2	23,5	3,323	11,0
14	29,7	28,0	28,8	1,2	1,4	14	26,0	27,0	26,5	0,707	0,5
15	29,9	28,5	29,2	0,99	0,98	15	21,0	23,0	22,0	1,414	2,0

Расчет метрологических параметров произведён согласно алгоритму, описанному в приложении Б, обобщенные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты расчета основных метрологических показателей

Серия 1		Серия 2		Рассчитанные и табличные показатели
X ₁ =24,6		X' ₂ =25,0		Θ= 0,41 <i>Θ-значение смещения</i>
S ₁ = 2,9		S ₂ = 2,5		L=15; η=N-1=1
S ₁ ² = 8,1		S ₂ ² = 6,1		f=14; p=0,95
Sr= 2,0	S _R = 2,9	Sr= 1,8	S _R = 2,5	t _{расч} = 0,42; t _{табл} =2,15 (t _T >t _p)
Sr(%)= 8,1	S _R (%)= 11,6	Sr(%)= 7,3	S _R (%)= 9,9	
G _{расч.} = 0,45		G _{расч} = 0,22		G _{табл} =0,47
GR _{max} =1,6		GR _{max} =2,2		GR _{табл} =2,5
GR _{min} =1,3		GR _{min} =1,2		
Δc= 1,9; Δc%= 7,8; δ= 5,9; δ%= 24,0				

2. Расчет показателей повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности спектрофотометрической методики определения глюкозы в соковой продукции (150 мМ)

Таблица 3 – Экспериментальные данные, необходимые для оценивания показателей прецизионности (повторяемости, промежуточной прецизионности и воспроизводимости)

Серия 1 $\eta=2$						Серия 2 $\eta=2$					
Лаборатория	Результаты анализа пробы		$X_{\text{ср}}$	$S_{\text{пробы}}$	$SR^2_{\text{пробы}}$	Лаборатория	Рез-ты анализа проб с изм-й навес.		$X'_{\text{ср}}$	$S'_{\text{пробы}}$	$SR'^2_{\text{пробы}}$
	X_1	X_2					X'_1	X'_2			
1	140	135	137,5	3,5	12,5	1	153	152	152,5	0,70	0,50
2	150	139	144,5	7,8	60,5	2	132	149	140,5	12,0	144,5
3	156	149	152,5	4,9	24,5	3	130	146	138,0	11,3	128,0
4	140	134	137,0	4,2	18,0	4	128	134	131,0	4,2	18,0
5	129	136	132,5	4,9	24,5	5	144	134	139,0	7,07	50,0
6	152	145	148,5	4,9	24,5	6	149	131	140,0	12,7	162,0
7	155	147	151,0	5,7	32,0	7	142	150	146,0	5,7	32,0
8	150	156	153,0	4,2	18,0	8	135	130	132,5	3,5	12,5
9	137	145	141,0	5,6	32,0	9	130	127	128,5	2,1	4,5
10	134	147	140,5	9,2	84,5	10	130	137	133,5	4,9	24,5
11	138	139	138,5	0,71	0,5	11	152	158	155,0	4,2	18,0
12	150	150	150,0	0	0,0	12	150	146	148,0	2,8	8,0
13	115	116	115,5	0,71	0,5	13	133	146	139,5	9,2	84,5
14	145	142	143,5	2,1	4,5	14	159	166	162,5	4,9	24,5
15	122	121	121,5	0,71	0,5	15	125	121	123,0	2,8	8,0

Расчет метрологических параметров произведён согласно алгоритму, описанному в приложении Б, обобщенные данные приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты расчета основных метрологических показателей

Серия 1		Серия 2		Рассчитанные и табличные показатели
X ₁ =140		X' ₂ =141		Θ= 0,166 <i>Θ-значение смещения</i>
S ₁ = 11		S ₂ = 11		L=15; η=N-1=1
S ₁ ² = 119		S ₂ ² = 113		f=14; p=0,95
Sr= 4,7	S _R = 11	Sr= 6,9	S _R = 10,6	t _{расч} = 0,04; t _{табл} =2,15 (t _T >t _p)
Sr(%)= 3,4	S _R (%)= 7,8	Sr(%)= 4,9	S _R (%)= 7,6	
G _{расч.} = 0,25		G _{расч} = 0,22		G _{табл} =0,47
GR _{min} =2,3		GR _{min} =1,7		GR _{табл} =2,5
GR _{max} = 1,1		GR _{max} =2,1		
Δc= 7,7; Δc%= 16,2; δ= 22,7; δ%= 5,5				

3. Расчет показателей повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности спектрофотометрической методики определения глюкозы в соковой продукции (50 мМ)

Таблица 5 – Экспериментальные данные, необходимые для оценивания показателей прецизионности (повторяемости, промежуточной прецизионности и воспроизводимости)

Серия 1 $\eta=2$						Серия 2 $\eta=2$					
Лаборатория	Результаты анализа пробы		$X_{\text{ср}}$	$S_{\text{пробы}}$	$SR^2_{\text{пробы}}$	Лаборатория	Рез-ты анализа проб с изм-й навес.		$X'_{\text{ср}}$	$S'_{\text{пробы}}$	$SR'^2_{\text{пробы}}$
	X_1	X_2					X'_1	X'_2			
1	47,7	50	48,9	1,6	2,7	1	59	50	54,5	6,4	40,5
2	49	52	50,5	2,1	4,5	2	51	50	50,5	0,71	0,5
3	47	49	48,0	1,4	2,0	3	43	45	44,0	1,4	2,0
4	57	60	58,5	2,1	4,5	4	60	56	58,0	2,8	8,0
5	59	60	59,5	0,7	0,5	5	49	50	49,5	0,71	0,5
6	58	61	59,5	2,1	4,5	6	63	59	61,0	2,8	8,0
7	59	61	60,0	1,4	2,0	7	61	61	61,0	0	0,0
8	49	48	48,5	0,71	0,5	8	54	58	56,0	2,8	8,0
9	55	62	58,5	4,9	24,5	9	54	51	52,5	2,1	4,5
10	53	50	51,5	2,1	4,5	10	54	55	54,5	0,71	0,5
11	57	51	54,00	4,2	18,0	11	53	47	50,00	4,242	18,00
12	52	57	54,50	3,5	12,5	12	50	48	49,00	1,414	2,00
13	44	46	45,00	1,4	2,0	13	49	49	49,00	0	0,00
14	51	58	54,50	4,9	24,5	14	48	45	46,50	2,121	4,50
15	58	55	56,50	2,1	4,5	15	59	58	58,50	0,707	0,50

Расчет метрологических параметров произведён согласно алгоритму, описанному в приложении Б, обобщенные данные приведены в таблице 6.

Таблица 6. Результаты расчета основных метрологических показателей

Серия 1		Серия 2		Рассчитанные и табличные показатели
X ₁ = 53,9		X' ₂ = 53,0		Θ= 0,89 <i>Θ-значение смещения</i>
S ₁ = 4,9		S ₂ = 5,2		L=15; η=N-1=1
S ₁ ² = 23,9		S ₂ ² = 27,1		f=14; p=0,95
S _r = 2,7	S _R = 4,9	S _r = 2,5	S _R = 5,2	t _{расч} = 0,48; t _{табл} =2,15 (tr>tp)
S _r (%)= 5,1	S _R (%)= 9,1	S _r (%)= 4,8	S _R (%)= 9,8	
G _{расч.} = 0,22		G _{расч} = 0,42		G _{табл} =0,47
GR _{min} = 1,8		GR _{min} = 1,7		GR _{табл} =2,5
GR _{max} =1,3		GR _{max} = 1,5		
Δc= 3,6; δ= 10,3				
Δc%= 6,7; δ%= 19,0				

Приложение Г

Акты о внедрении

ФМБА РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения
ГОЛОВНОЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ
(ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель главного врача по
лабораторному делу, руководитель ИЛЦ



К.Б. Колбутова

2017 г.

АКТ

о внедрении результатов кандидатской диссертационной работы Сургутской Натальи Сергеевны

Настоящий акт подтверждает, что результаты диссертационной работы «Спектрофотометрическое определение количественного содержания глюкозы с использованием наночастиц Fe@C» в части методики измерения массовой концентрации глюкозы в соковой продукции и биологических жидкостях внедрены и могут быть использованы в работе Испытательного лабораторного центра ФГБУЗ «Головной центр гигиены и эпидемиологии ФМБА России», для проведения исследований биологически-активных добавок, продуктов детского питания и специализированных продуктов питания для спортсменов с необходимой точностью.

Представленная методика удовлетворяет требованиям нормативных документов, регламентирующих нормы безопасности и содержания активных веществ, а также полностью удовлетворяет требованиям законодательства об обеспечении единства измерений.

Начальник отдела метрологического
контроля и стандартизации

Е.С. Моисеева

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по НИР

Ханты-Мансийской

государственной Медицинской

академии, д.м.н., проф. Петровский Ф.И.

«18» мая 2017 г.

АКТ

О внедрении методики спектрофотометрического количественного анализа глюкозы в биологических жидкостях (моче и сыворотке крови) с использованием наночастиц Fe@C

Настоящий акт подтверждает, что разработанная с авторским участием Сургутской Н.С. в Национальном исследовательском Томском политехническом университете методика спектрофотометрического определения количественного содержания глюкозы в биологических жидкостях с использованием наночастиц Fe@C внедрена и используется в проблемной научно-исследовательской лаборатории Ханты-Мансийской государственной медицинской академии, г. Ханты-Мансийск. В результате проведенных испытаний данной методики установлено, что:

1. Диапазон определяемых концентраций соответствует реальному содержанию глюкозы в биологических жидкостях
2. Погрешность методики не превышает 8 %
3. Подготовка проб к анализу не требует больших затрат
4. Процесс измерения сигнала не вызывает затруднений

Ответственный за внедрение: главный научный сотрудник ПНИЛ д.т.н., доцент Нехорошева А.В.

Дата 18.05.2017

 «УТВЕРЖДАЮ»
И.о. директора ФБУ «Алтайский ЦСМ»
Романов Е.В.
«15» мая 2017 г.

АКТ

О внедрении методики спектрофотометрического количественного анализа глюкозы в соковой продукции с использованием наночастиц Fe@C

Настоящий акт подтверждает, что разработанная с авторским участием Сургутской Н.С. в Национальном исследовательском Томском политехническом университете методика спектрофотометрического определения количественного содержания глюкозы в соковой продукции с использованием наночастиц Fe@C внедрена и используется в испытательном центре ФБУ «Алтайский ЦСМ», г. Барнаул

Данный акт подтверждает, что методика полностью удовлетворяет требованиям аналитического контроля, отличается простотой пробоподготовки и выполнения измерений и хорошей воспроизводимостью результатов.

Начальник испытательного центра  Стукалов Д.С.

Дата 15.05.17г

Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения
ГОЛОВНОЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ
 (ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России)
 (аттестат аккредитации № RA.RU.311955 от 02.12.2016 г.)

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач

С.А. Богдан

20 17 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ № 41

по результатам метрологической экспертизы методики количественного химического анализа, регламентированной в проекте МУК «Методика измерений массовой концентрации глюкозы в соковой продукции и биологических жидкостях спектрофотометрическим методом с использованием наночастиц Fe@C», разработанной ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский политехнический университет на кафедре биотехнологии и органической химии, (разработчик – Сургутская Н.С.)

Методика предназначена для применения в сферах распространения государственного метрологического контроля и надзора.

Выводы о соответствии МКХА требованиям ГОСТ Р 8.563-2009 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений»:

а) Наименования измеряемых величин и обозначения их соответствуют требованиям ГОСТ 8.417-2002 «Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин»,

б) Выбор средств измерений удовлетворяет условиям измерительной задачи и может быть признан рациональным.

Типы выбранных средств измерений, в том числе стандартных образцов, утверждены Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии.

в) Диапазон измерений соответствует утвержденным диапазонам в приказе Министерства природных ресурсов и экологии Российской Федерации № 425 от 07.12.2012 г.

г) Характеристики погрешности (показатели точности) измерений соответствуют требованиям Министерства сельского хозяйства Российской Федерации N 167 от 23 мая 2014 г., а также требованиям технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011.

д) Процедуры контроля точности измерений предусмотрены; нормативы контроля увязаны с характеристиками погрешности измерений.

е) Требования, правила и операции за исключением указанных в замечаниях № 1-2 изложены с достаточной полнотой для получения результатов измерений, погрешность которых не превышает установленных границ

ж) Метрологические термины соответствуют ГОСТ Р 1.12-2004 «Государственная система стандартизации Российской Федерации. Стандартизация и смежные виды деятельности. Термины и определения»

Рекомендовано: аттестованную методику в установленном порядке внести в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений.

Эксперт:

Начальник отдела метрологического контроля
и стандартизации



Е.С. Моисеева