

На правах рукописи



СУРГУТСКАЯ НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА, ПОКРЫТЫХ
УГЛЕРОДОМ И ОБЛАДАЮЩИХ ПОДОБНЫМИ ПЕРОКСИДАЗЕ
СВОЙСТВАМИ

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск – 2017

Работа выполнена на кафедре биотехнологии и органической химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель: доктор химических наук,
Трусова Марина Евгеньевна

Официальные оппоненты: Лосев Владимир Николаевич,
доктор химических наук, профессор,
Сибирский федеральный университет,
старший научный сотрудник госбюджетной
темы ГХ-4

Гавриленко Наталья Айратовна,
кандидат химических наук, доцент,
Национальный исследовательский Томский
государственный университет, кафедра
аналитической химии, доцент

Ведущая организация: Московский технологический университет

Защита состоится 13 декабря 2017 г. в 14:30 на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 43а, 2-й корпус ТПУ, Малая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке ФГАОУ ВО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, ул. Белинского, 55 и на сайте <http://portal.tpu.ru/council/911/worklist>.

Автореферат разослан «___» октября 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Д 212.269.04

Т. М. Гиндуллина

Общая характеристика работы

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)¹ 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_а 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 методик 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.

¹ Наночастицы Fe@C получены от д.ф.-м.н., главного научного сотрудника А.Е. Ермакова (Институт физики металлов Уро РАН)

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 впервые 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 мешающего влияния органической 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.

Положения, выносимые на защиту:

1. Кинетика реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в присутствии наночастиц 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

Основное содержание работы

Во **введении** раскрыта актуальность проведенных исследований, определена цель исследований, сформулированы научная новизна и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** приведены аналитические возможности существующих физико-химических методов определения глюкозы в продуктах пищевой промышленности и биообъектах. Приведены основные достижения в области замены природных ферментов на альтернативные наноматериалы, обладающие подобными ферментам свойствами. Особое внимание уделено использованию подобных пероксидазе свойств наноматериалов для разработки спектрофотометрических методик определения глюкозы в реальных объектах.

Во **второй главе** описаны основные реактивы и аппаратура, используемые для проведения экспериментов. Охарактеризованы объекты исследования и описаны методики проведения экспериментов. Объектами исследования выступали наночастицы железа, покрытые углеродной оболочкой Fe@C (Tsurin V. A., 2014), полученные методом газофазного синтеза в смеси аргона и бутана (рисунок 1).

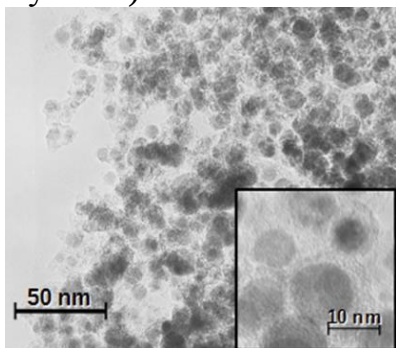


Рисунок 1. Снимок наночастиц Fe@C с просвечивающего электронного микроскопа

Наночастицы имеют сферическую форму и средний размер частиц составляет примерно (5-10 нм). По данным XRD анализа (Galakhov V.R., 2013), Fe@C включают в себя три основных составляющих: α -Fe, Fe₃C, и углерод. Величина намагничиваемости нанокompозита составляет 110 Гс·см³/г (Erokhin A.V., 2014). Объектами исследования на содержание глюкозы являлись соковая продукция и биологические жидкости (сыворотка крови и моча). Основные экспериментальные исследования проводили на двухлучевом спектрофотометре «SPECORD 250 PLUS» (Analytik Jena AG, Германия).

Третья глава посвящена исследованию возможности использования наноматериала в качестве аналога фермента пероксидазы, выбору рабочих параметров проведения процесса окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и расчету кинетических параметров процесса окисления ТМБ с использованием наночастиц Fe@C.

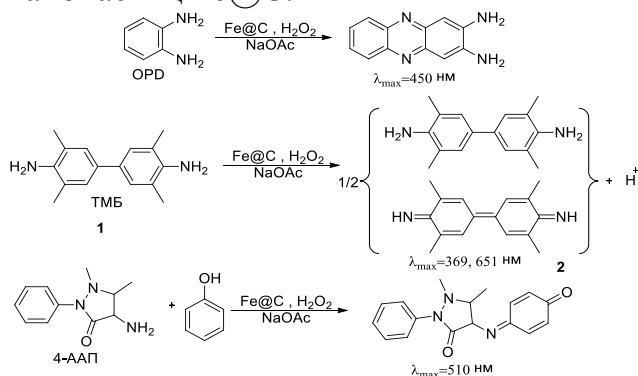


Схема 1. Реакции окисления основных субстратов пероксидазы с использованием наночастиц Fe@C

качественного обнаружения перекиси водорода в растворе. Для реакционных смесей **а**, **б** и **в** рисунка 2, содержащих в качестве субстрата ТМБ (**1**) (схема 1), дополнительно были сняты спектры поглощения в видимой области спектра (рисунок 3), которые подтверждают, что только в присутствии всех трех компонентов в реакционной смеси наблюдается появление характеристических полос поглощения комплекса с переносом заряда (**2**) (схема 1), при длине волны 370 и 652 нм (рисунок 3).

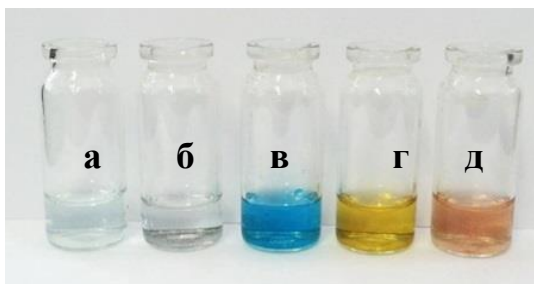


Рисунок 2. Образы реакционных смесей: **а** $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ТМБ}$ **б** $\text{Fe@C} + \text{ТМБ}$ **в** $\text{Fe@C} + \text{ТМБ} + \text{H}_2\text{O}_2$ **г** $\text{Fe@C} + \text{OPD} + \text{H}_2\text{O}_2$ **д** $\text{Fe@C} + 4\text{-ААП} + \text{H}_2\text{O}_2$

Нами показано, что наночастицы Fe@C способны катализировать реакции окисления основных субстратов пероксидазы (схема 1), таких как 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (**1**), о-фенилендиамин (OPD) и 4-аминоантипирин (4-ААП), в присутствии H_2O_2 с образованием окрашенных продуктов реакции (рисунок 1) и могут быть использованы в качестве аналога пероксидазы для

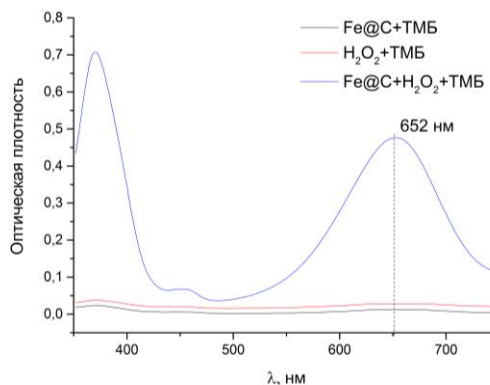


Рисунок 3. Спектры поглощения реакционных смесей, содержащих: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ТМБ}$; $\text{Fe@C} + \text{ТМБ}$; $\text{Fe@C} + \text{ТМБ} + \text{H}_2\text{O}_2$

Для дальнейшего исследования подобной пероксидазе активности наноматериала в качестве субстрата для визуализации нами был выбран ТМБ, как наиболее часто встречающийся в литературе субстрат. Длина волны, при которой проводились все последующие эксперименты, составляла 652 нм (рисунок 3).

Выбор рабочих параметров реакции окисления ТМБ с использованием наночастиц Fe@C был направлен на оценку влияния pH, температуры и

концентрации наночастиц Fe@C на относительную эффективность процесса окисления ТМБ (рисунок 4).

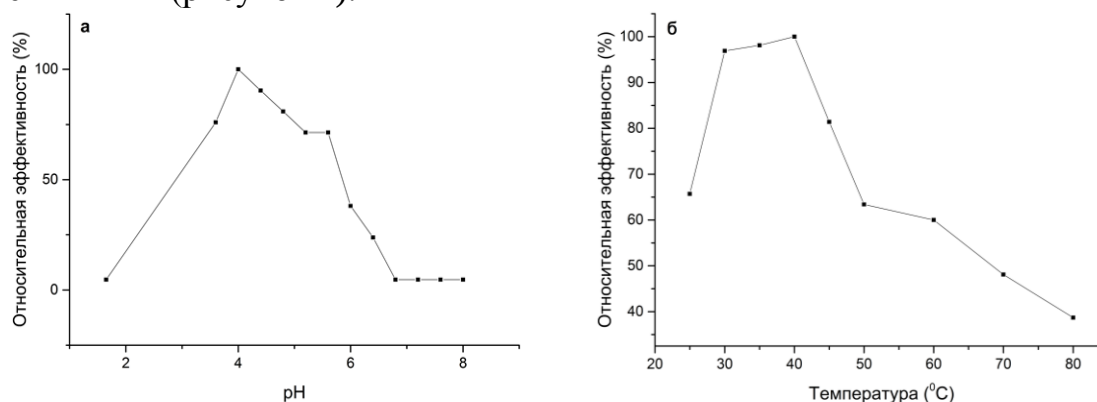


Рисунок 4. Влияние pH (а) и температуры (б) на относительную эффективность окисления ТМБ в присутствии наночастиц Fe@C

Показано, что рабочие значения pH, обеспечивающие максимальную эффективность окисления ТМБ, лежат в пределах $4 \pm 0,5$ (рисунок 4а) 0,1М NaOAc буфера, а рабочие температурные параметры процесса в пределах 30-40 °C (рисунок 4б). Рабочая концентрация наноматериала Fe@C (рисунок 5),

необходимая для достижения максимальной эффективности процесса окисления ТМБ должна быть не менее 16 мкг/мл при соблюдении ранее выбранных рабочих значений pH и температуры.

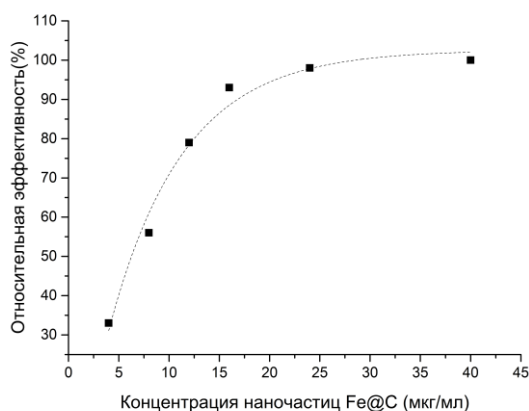


Рисунок 5. Зависимость относительной эффективности окисления ТМБ от концентрации наночастиц Fe@C в растворе

Дополнительно было продемонстрировано, что наночастицы обладают повышенной стабильностью при хранении в средах с различной pH и температурой без потери своей каталитической активности в реакции окисления ТМБ.

Исследование кинетики реакции окисления ТМБ в присутствии 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.

Полученные кинетические кривые начальной скорости реакции окисления ТМБ от концентрации вносимой перекиси водорода и ТМБ (рисунок 6) имели гиперболическую форму и соответствовали модели Михаэлиса-Мэнтен для ферментативной кинетики.

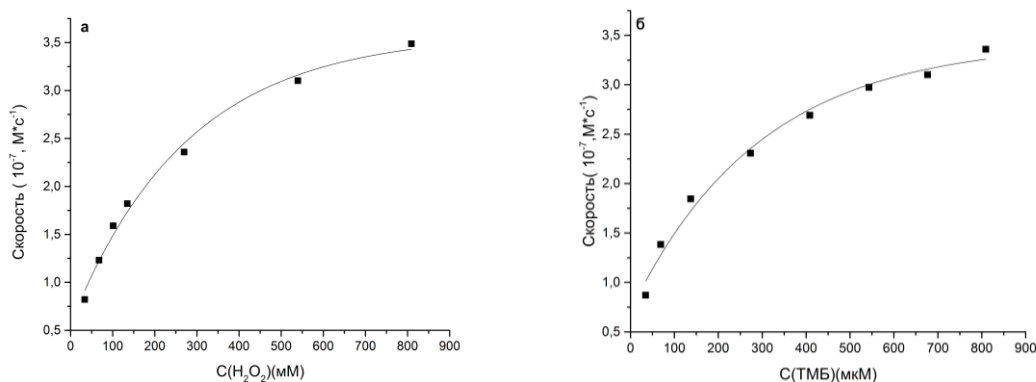


Рисунок 6. Зависимость начальной скорости реакции окисления ТМБ от концентрации субстратов H₂O₂(а) и ТМБ (б)

Расчет основных кинетических параметров процесса проводили путем преобразования кинетических кривых в линейную форму согласно уравнению Лайнуивера – Берка (рисунок 7):

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

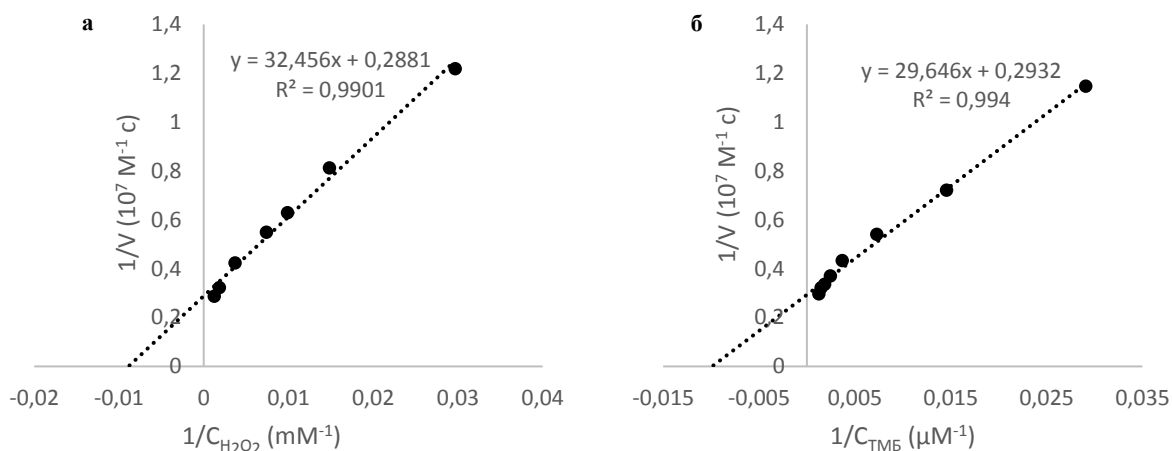


Рисунок 7. Кинетические кривые скорости реакции от концентрации вносимых H₂O₂(а) и ТМБ (б) в двойных обратных координатах

Рассчитанные кинетические параметры процесса окисления ТМБ, сравнивали с уже известными кинетическими параметрами фермента и других наноматериалов (таблица 1).

Таблица 1. 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		Gao L., 2007	Рассчитанные нами	Li R., 2013	Gao L., 2007	An Q., 2013

Как видно из таблицы 1, наночастицы Fe@C обладают большей специфичностью к ТМБ, чем сама пероксидаза. Однако, по отношению к перекиси водорода специфичность значительно ниже и для достижения максимальной скорости реакции требуется большая концентрация вносимой перекиси водорода. Стоит отметить, что несмотря на значительную разницу в кинетических параметрах наночастиц из таблицы 1 все они нашли практическое применение для анализа как H_2O_2 , так и более сложных органических молекул. Промежуточное положение кинетических параметров наночастиц Fe@C делает их перспективными для дальнейшего практического применения.

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.

В связи с тем, что наночастицы Fe@C не содержат на поверхности ионов железа подобно ферменту, а углеродное покрытие состоит из гексагонального графита, также способного катализировать реакции разложения перекиси подобно фуллеренам или графитовым квантовым точкам (Guo Y., 2011; Shi W., 2011), необходимо определить, за счет чего наноккомпозит проявляет ярко выраженную подобную пероксидазе активность.

Для этого нами были выбраны два подхода:

- Исследование зависимости подобной пероксидазе активности наночастиц от величины углеродного слоя на их поверхности. Было показано (рисунок 8), что наблюдается закономерное увеличение скорости окисления ТМБ в ряду $Fe@C_{bigcoat}(20\% C) < Fe@C (3\% C) < Fe@C_{smallcoat} (C < 1\%)$.

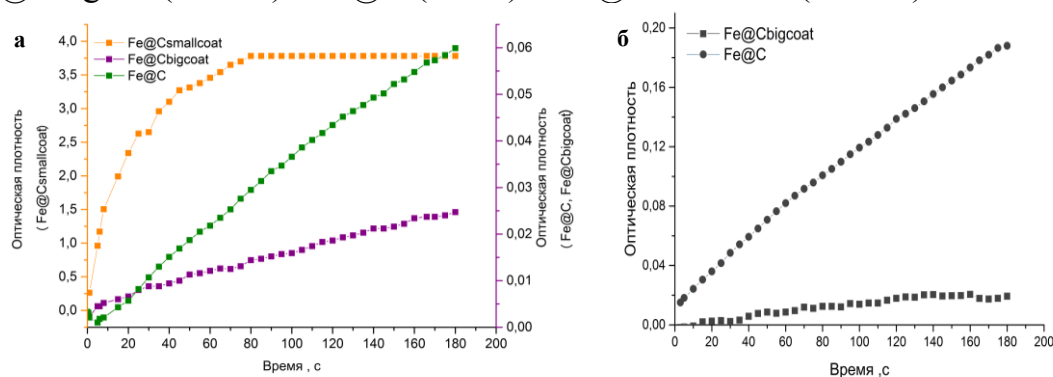


Рисунок 8. Зависимость оптической плотности окисленного ТМБ при 652 нм от времени взаимодействия с наночастицами Fe@C, Fe@Cbigcoat и Fe@Csmallcoat при разных объемах вносимой концентрациях H_2O_2 4мкл (а) и 12 мкл (б)

- Исследование подобной пероксидазе активности поверхностного углеродного слоя. Для оценки подобной пероксидазе активности углеродного слоя нами были выбраны наночастицы Ni@C (рисунок 9а), полученные тем же методом и имеющие аналогичную структуру углеродной поверхности, но ядро которых не обладает подобной пероксидазе активностью. Было показано, что в отличие от наночастиц Fe@C каталитическая активность наночастиц Ni@C в реакции

окисления ТМБ окисления остается постоянной и не зависит от количества вносимой H_2O_2 (рисунок 9б).

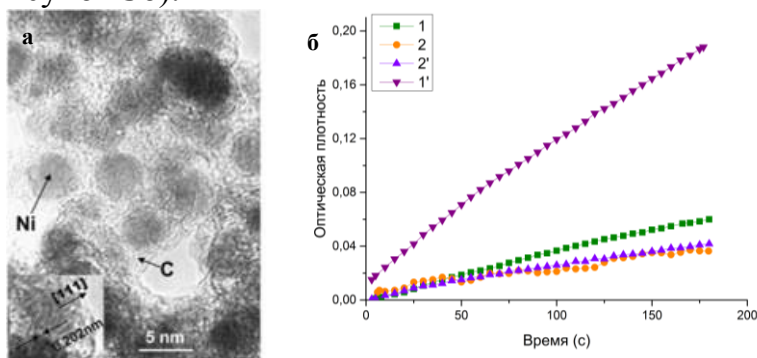


Рисунок 9. Зависимость оптической плотности окисленного ТМБ от времени при взаимодействии раствора с наночастицами Fe@C (1, 1') и Ni@C (2, 2') при разных объемах вносимой H_2O_2 4мкл (1, 2) и 12 мкл (1', 2')

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 пероксидазе свойствами. 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.

Четвертая глава посвящена разработке алгоритма методики

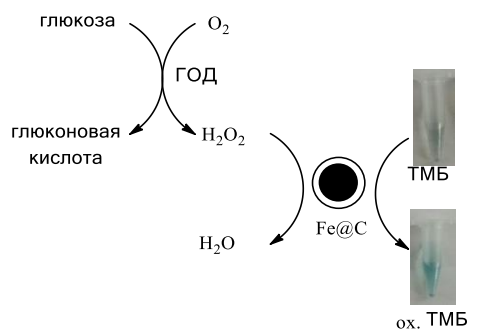
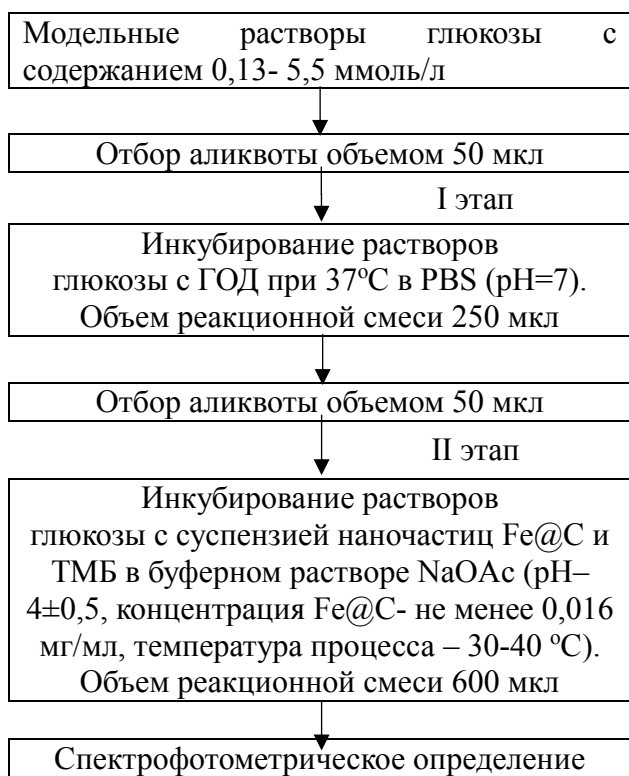


Схема 2. спектрофотометрического определения содержания глюкозы с использованием наночастиц Fe@C

разработки алгоритма методики спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C, выбору недостающих рабочих параметров для ее реализации, а также построению градуировочной зависимости оптической плотности окисленного ТМБ от концентрации глюкозы и оценке влияния компонентов органической матрицы на аналитический сигнал.

Для классических ферментативных методов определения глюкозы пероксидаза используется в комплексе с глюкозооксидазой (ГОД), которая окисляет глюкозу до глюконовой кислоты и пероксида водорода, вступающей во взаимодействие с ферментом и образующей окрашенный комплекс с субстратом пероксидазы.

Нами была предложена методика, в которой вместо фермента пероксидазы на второй стадии процесса использовали наночастицы Fe@C и ТМБ в качестве хромогенного субстрата, по схеме 2.



Несмотря на близкие рабочие параметры фермента глюкозооксидазы и наноматериала Fe@C, процесс определения глюкозы в растворах проводили отдельно в два этапа, чтобы избежать взаимного влияния фермента и гетерогенного катализатора согласно алгоритму, приведенному на рисунке 10.

Рисунок 10. Алгоритм методики спектрофотометрического определения глюкозы в модельных растворах

Для проведения методики согласно данному алгоритму (рисунок 10) требовалось дополнительно исследовать влияние концентрации и времени взаимодействия фермента глюкозооксидазы на первом этапе процесса и времени взаимодействия наночастиц на втором этапе на оптическую плотность.

Подбор рабочих параметров первого этапа проводили на модельных растворах глюкозы с концентрацией 1 ммоль/л и при фиксированном времени взаимодействия наночастиц с реакционным раствором (40 минут).

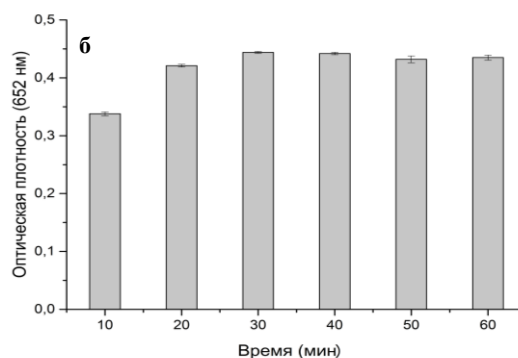
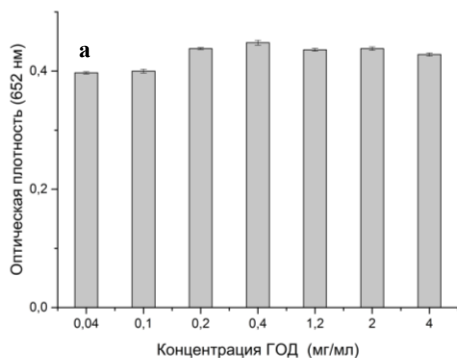


Рисунок 11. Зависимость оптической плотности реакционных растворов от концентрации ГОД (а) и времени взаимодействия фермента с раствором глюкозы (б)

Для оценки влияния концентрации ГОД, концентрация фермента варьировалась в пределах от 0,04 до 4 мг/мл, а время реакции ГОД с раствором глюкозы было фиксированным и составляло 30 минут. Как показано на рисунке 11а, рабочая концентрация вносимой ГОД должна быть не менее 0,2 мг/мл.

Выбор рабочего времени взаимодействия растворов глюкозы с ферментом проводили при выбранном ранее рабочем значении концентрации ГОД (0,2 мг/мл) в фосфатном буферном растворе. Время взаимодействия раствора глюкозы с ферментом варьировалось от 10 до 60 мин. Как показано на рисунке 11б, время взаимодействия глюкозы с ферментом должно быть не менее 20 мин, т.к. дальнейшее увеличение времени реакции не приводит к увеличению аналитического сигнала.

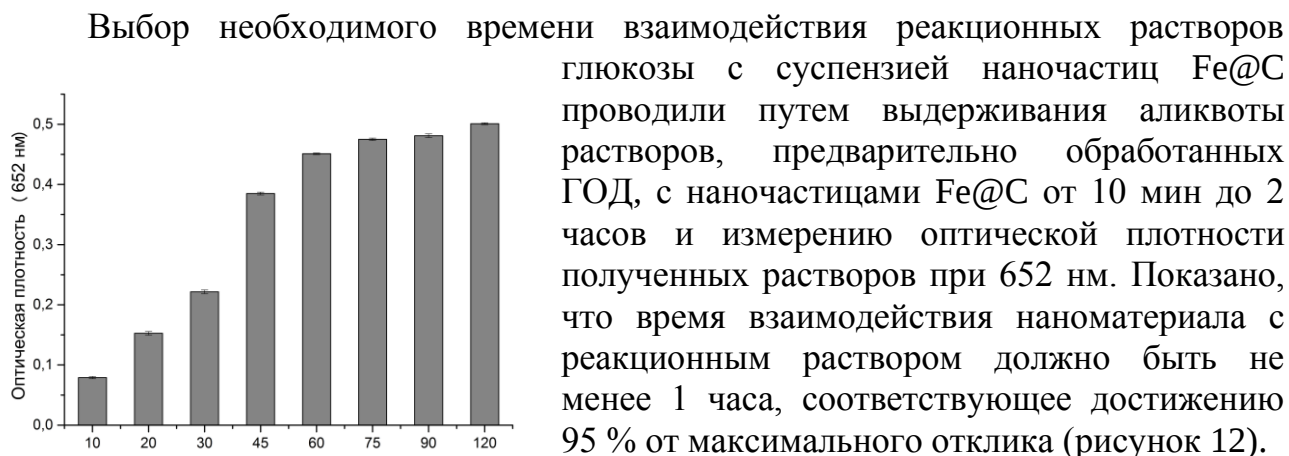


Рисунок 12. Зависимость оптической плотности реакционных растворов от времени взаимодействия наночастиц Fe@C с раствором

глюкозы с суспензией наночастиц Fe@C проводили путем выдерживания аликвоты растворов, предварительно обработанных ГОД, с наночастицами Fe@C от 10 мин до 2 часов и измерению оптической плотности полученных растворов при 652 нм. Показано, что время взаимодействия наноматериала с реакционным раствором должно быть не менее 1 часа, соответствующее достижению 95 % от максимального отклика (рисунок 12).

Таким образом, рабочие параметры проведения первой стадии методики: концентрация ГОД – не менее 0,2 мг/м; pH реакционной среды – 7; время обработки – не менее 30 минут; температура процесса – 37 °С. Рабочие параметры определения глюкозы второй стадии методики: концентрация наночастиц Fe@C – не менее 0,016 мг/мл; время обработки – не менее 1 часа; температура процесса – 30-40 °С; pH реакционной среды – $4 \pm 0,5$.

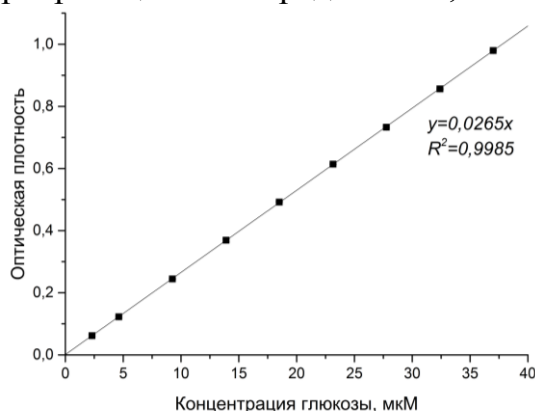


Рисунок 13. Градуировочная зависимость оптической плотности окисленного ТМБ от концентрации глюкозы в растворе

При выбранных ранее рабочих параметрах процесса определения глюкозы нами был построен график зависимости оптической плотности окисленного ТМБ от концентрации глюкозы в растворе (рисунок 13). Полученный график показывает, что рабочий диапазон концентраций глюкозы лежит в пределах 2,3-37 мкМ. Полученное уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации глюкозы имеет вид: $A_{652 \text{ нм}} = 0,0265x$ с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9985$. Предел обнаружения глюкозы составил 0,21 мкмоль/л, рассчитанный по правилу 3σ .

Проведена оценка мешающего влияния компонентов матрицы (сахара, органические кислоты, витамины и белки) на аналитический сигнал окисленного ТМБ при спектрофотометрическом определении глюкозы (таблица 2).

Таблица 2. 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

Все измерения проводились параллельно в одинаковых условиях, согласно разработанному алгоритму (рисунок 9). Исходная концентрация глюкозы для приготовления всех исходных растворов была одинакова и составляла 1,35 мМ. С учетом разбавления и согласно градуировочному графику ожидаемая величина оптической плотности растворов должна лежать в области 0,265 и соответствовать концентрации глюкозы 9,25 мкмоль/л (таблица 2).

Как видно из данных, приведенных в Таблице 2, спектрофотометрическая методика определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C обладает высокой специфичностью в присутствии других сахаров, органических кислот, витаминов и белков (погрешность определения не превышает 5%) и методика может быть использована для анализа реальных объектов.

Пятая глава посвящена разработке методик спектрофотометрического определения глюкозы в соковой продукции и биообъектах, проверке правильности

полученных результатов и определению основных метрологических показателей разработанных методик.

На основе проведенных исследований и согласно разработанному алгоритму (рисунок 9) 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. Пробы сока требовали незначительной пробоподготовки, заключающейся в предварительном центрифугировании проб при 10000 оборотах в течение 5 мин и ее разбавлением в 100 раз. Полученные из градуировочного графика значения концентраций глюкозы в разбавленном образце умножали на общее количество разбавлений (6000 раз) с получением конечного результата (таблица 3).

Таблица 3. Экспериментальные данные по определению глюкозы в соковой продукции

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

Таблица 4. Проверка правильности методики методом «введено-найденно»

Образец	Содержание глюкозы, ммоль/л (n=3)		
	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

Оценку правильности определения глюкозы в соковой продукции по разработанной методике с использованием наночастиц Fe@C подтверждали методом «введено-найденно». Для исследования был выбран образец грушевого сока «Любимый» с наименьшим содержанием глюкозы.

Как видно из данных таблицы 4, количество добавки стандартного раствора глюкозы в образец сока определяется достаточно точно.

Экспериментальные данные по определению глюкозы сравнивали с данными, полученными с использованием набора стандартных реагентов производства «Вектор БЭСТ» (глюкозооксидазная методика) (таблица 5). Рассчитанные значения критериев Фишера и Стьюдента не превышают критические, методики обладают одинаковой воспроизводимостью результатов, и разработанная методика не содержит систематической ошибки.

Таблица 5. Сравнение результатов определения глюкозы в соковой продукции с использованием наночастиц Fe@C и независимым методом

Образец сока	Содержание глюкозы, ммоль/л		Расчетные значения критериев		Табличные значения критериев (P=0.95)	
	Разработанный метод (n=5)	Глюкозооксидазный метод (n=3)	ξ , F-тест	ξ_1 , t-критерий	F-тест	t-критерий
Банан	118,2±6,0	119,3±4,8	10,3	2,0	19,25	2,45
Яблоко	129,3±7,1	128,3±5,9	11,4	1,0		
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		
Груша	101,0±3,4	99,5±4,1	4,0	2,4	6,94	

Разработанный алгоритм был использован для спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C в готовых образцах сыворотки крови, полученных из НИИ «Кардиологии», и образцов мочи, полученных от добровольцев, страдающих сахарным диабетом.

Пробы сыворотки крови или мочи (объемом до 2,0 мл) требовали незначительной пробоподготовки, заключающейся в предварительном центрифугировании проб при 4000 оборотах в течение 5 мин и разбавлением в 5 раз (сыворотка крови) и в 20 раз (моча) дистиллированной водой. Дальнейшее определение проводили согласно разработанному ранее алгоритму. Полученные из градуировочного графика значения концентрации глюкозы умножали на общее количество разбавлений с получением конечного результата (таблица 6).

Таблица 6. 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

Таблица 7. Проверка правильности методики методом «введено-найдено»

Образец	Содержание глюкозы, ммоль/л (n=3)		
	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

Оценку правильности определения глюкозы в образцах сыворотки (образец № 2) и мочи (образец № 1) по разработанной методике с использованием наночастиц Fe@C также подтверждали методом «введено-найдено» и с использованием набора стандартных реагентов производства «Вектор БЭСТ».

Как видно из данных таблицы 7, количественное определение добавки стандартного раствора глюкозы в образец сыворотки крови и мочи определяется достаточно точно.

Таблица 8. Сравнение результатов определения глюкозы в биологических жидкостях с использованием наночастиц Fe@C и независимым методом

№ образца	Содержание глюкозы, ммоль/л		ξ_1 , t-критерий
	Разработанный метод (n=5)	глюкозооксидазный метод (n=3)	
Сыворотка крови			
1	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	25,0±1,8	24,9±0,9	1,6
2	36,5±2,4	36,8±1,8	2,4

При сравнении полученных экспериментальных результатов с результатами определения глюкозы глюкозооксидазным методом (таблица 8), расчётные значения критерия Стьюдента также не превышают критическое значения t-критерия $t(P=0.95, f=6)=2,45$ и разработанная методика не содержит систематической

ошибки.

Таким образом, разработанные методики подходят для определения содержания глюкозы в соковой продукции и биологических жидкостях.

Метрологическая экспертиза полученных результатов спектрофотометрической методики определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C проводилась в аккредитованной метрологической службе Федерального государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Главный центр гигиены и эпидемиологии» (г. Москва) (таблица 9).

Таблица 9. Диапазоны измерений, относительные значения показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и точности при $P=0,95$ методики спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C для соковой продукции и биологических жидкостей

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

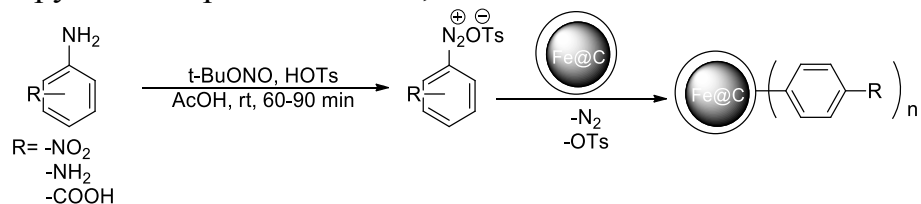
¹⁾ Соответствует относительному значению расширенной неопределенности с коэффициентом охвата $k=2$

Сравнение с нормативными документами по определению глюкозы в соковой продукции (спектрофотометрическая методика (ГОСТ Р 51240-98 действующий) и ВЭЖХ методика (ГОСТ Р 53766-2009 действующий)) показало, что разработанная методика спектрофотометрического определения глюкозы с использованием наночастиц Fe@C не уступает существующим по показателю повторяемости, диапазонам определяемых концентраций, себестоимостью

анализов и имеет преимущество, связанное с уменьшением количества используемых для анализа реактивов.

В шестой главе продемонстрирована возможность управления свойствами наночастиц путем их поверхностной функционализации органическими группами, а также возможности их дальнейшего использования в качестве материалов медицинского назначения.

Для оценки влияния поверхностной функционализации наночастиц Fe@C на проявляемую ими подобную пероксидазе активность поверхность наночастиц Fe@C была ковалентно функционализирована тремя видами покрытий с использованием арендиазоний тозилатов, имеющих amino-, нитро- и карбоксильную группы в пара-положении, по схеме:



Все наноматериалы в равных массовых концентрациях были протестированы в реакции окисления ТМБ. Как видно из рисунка 14, использование наночастиц Fe@C-COOH в качестве катализатора приводит к резкому росту оптической плотности реакционных растворов по сравнению с растворами, содержащими наночастицы Fe@C, Fe@C-NO₂ и Fe@C-NH₂, в тех же условиях и за то же время.

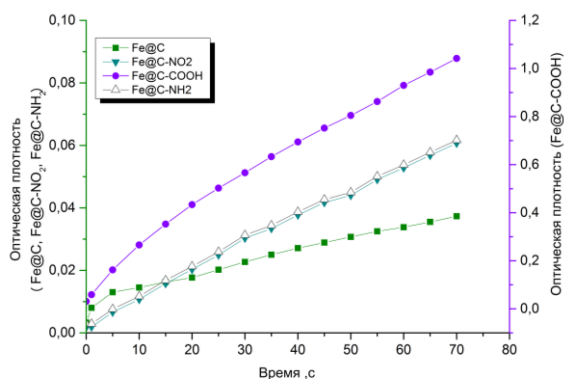


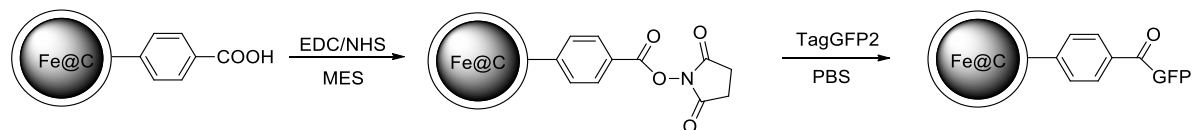
Рисунок 14. Зависимости оптической плотности реакционных растворов от времени в присутствии наночастиц Fe@C, Fe@C-NO₂, Fe@C-NH₂ и Fe@C-COOH

Таким образом, наноматериал, имеющий на поверхности карбоксильные группы, проявляет более высокую подобную пероксидазе активность, чем исходный наноматериал. Данные частицы будут требовать меньшее количество вносимой перекиси водорода для достижения максимальной скорости окисления субстрата пероксидазы. Поэтому наночастицы Fe@C-COOH являются перспективными материалами для спектрофотометрического определения глюкозы, так как будут способствовать сокращению времени определения глюкозы и уменьшению количества вносимого катализатора на втором этапе процесса.

Нами также продемонстрировано, что наночастицы Fe@C-COOH могут быть использованы для прививки зеленого флуоресцирующего белка (GFP), который является перспективным контрастным агентом для мечения клеток и

медицинской диагностики (Hoffman R., 2015) и позволит придать наночастицам флуоресцирующие свойства, которыми они не обладают в исходном состоянии.

Прививка белка на поверхность осуществлялась за счет последовательных стадий карбодиимидной активации карбоксильных групп на поверхности 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 исследовали методом ИК-спектроскопии (рисунок 15), которая доказала успешную прививку TagGFP2 на поверхность наноматериала (появление полосы поглощения в области $900\text{--}1100\text{ см}^{-1}$, характерной для большинства белковых структур). По данным термогравиметрического анализа наночастиц Fe@C-COOH и нанокомпозита Fe@C-TagGFP2 количество белка на поверхности наночастиц - $0,2\text{ нмоль/мг}$.

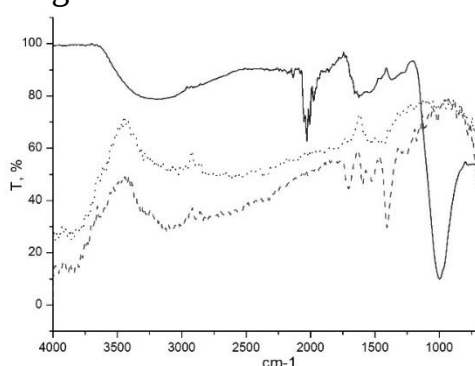


Рисунок 15. ИК-спектры наночастиц Fe@C-MNPs (точечная линия), Fe@C-COOH (штриховая линия) и нанокомпозита, содержащего GFP на поверхности Fe@C-TagGFP2 (сплошная линия).

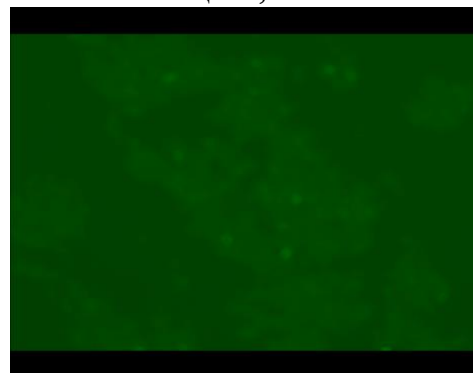


Рисунок 16. Снимок нанокомпозита Fe@C-TagGFP2 с флуоресцирующего микроскопа

Фотографии Fe@C-TagGFP2 полученные на флуоресцирующем микроскопе (рисунок 16) подтверждают, что композит проявляет флуоресцирующие свойства, однако имеют нерегулярное покрытие поверхности белком, что связано со стерическими трудностями прививки молекулы белка к активированным центрам.

Таким образом, нами 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.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах:

1. **Surgutskaya, N. S.** Iron-core/carbon-shell nanoparticles with intrinsic peroxidase activity: new platform for mimetic glucose detection / N. S. Surgutskaya, M. E. Trusova, G. B. Slepchenko, A. S. Minin, A. G. Pershina, M. A. Uimin, A. E. Yermakov and P. S. Postnikov // *Analytical Methods*. – 2017 – Vol. 9. – p. 2433-2439.

2. **Сургутская, Н. С.** Пероксидазная активность наноразмерных частиц Fe@C в реакции окисления о-фенилендиамина / Н. С. Сургутская, П. С. Постников и А. И. Галанов // *Фундаментальные исследования*. – 2013 – №. 11-9. – С. 1846-1849.

3. **Surgutskaya, N. S.** The Fe-core/carbon-Shell Ultrafine Nanopowders as Platform for Biomolecules Grafting / N. S. Surgutskaya, P. S. Postnikov, A. G. Pershina, A. I. Galanov, M. E. Trusova and A. E. Sazonov // *Advanced Materials Research*. – 2014 – Vol. 1040. – p. 194-198.

4. **Surgutskaya, N. S.** Spectrophotometric determination of glucose with Fe@C nanoparticles as peroxidase mimetic // *Материалы докладов X Международной конференции молодых учёных по химии «МЕНДЕЛЕЕВ -2017»*. – г. Санкт-Петербург. – 2017. – С.454.

5. **Surgutskaya, N. S.** Intrinsic peroxidase-like activity of Fe-core/carbon shell nanoparticles: kinetic study and application for determination of glucose // *Book of Abstracts of 7th International Conference International Conference «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications»*. – г. Томск. – 2016. – С. 48.

6. **Сургутская, Н. С.** Исследование процессов разложения перекисей на наночастицах железа, покрытых углеродом / Н. С. Сургутская, П. С. Постников и А. И. Галанов // *Материалы докладов XXVIII Международной научно-технической конференции «РЕАКТИВ-2013»*. – г. Иркутск. – 2013. – С. 59.

7. **Сургутская, Н. С.** Неожиданная пероксидазная активность наночастиц металлов, покрытых углеродом // *Материалы докладов II Всероссийская научно-техническая конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Высокие технологии в современной науке и технике»*. – г. Томск. – 2013. – С. 132.

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. Трусовой, 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.