

На правах рукописи



ШИНКО ЕВГЕНИЯ ИВАНОВНА

**ПРИМЕНЕНИЕ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ИММУНОСЕНСОРОВ НА
ОСНОВЕ ГИБРИДНЫХ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ**

1.4.2. Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Воронеж – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Липецкий государственный технический университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Ермолаева Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты: **Медянцева Эльвина Павловна**, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», химический институт им. А.М. Бутлерова, кафедра аналитической химии, профессор

Суханов Павел Тихонович, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий», факультет экологии и химической технологии, кафедра физической и аналитической химии, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный университет», г. Краснодар

Защита состоится «05» апреля 2023 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 24.2.288.07 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, г. Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 439.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан «15» февраля 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета 24.2.288.07

кандидат химических наук, доцент



Столповская Надежда Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одним из важнейших направлений современной аналитической химии является создание недорогих и доступных средств экспресс-контроля лекарственных веществ, используемых в ветеринарной практике для борьбы с инфекционными заболеваниями, в качестве стимуляторов роста, а также в пищевой продукции. Наиболее часто в мышечной ткани, молоке и меде обнаруживаются антибиотики (аминогликозиды, тетрациклины, фторхинолоны, полимиксины) и β -агонисты (рактопамин, кленбутерол, сальбутамол), содержание которых в пищевой продукции в РФ строго нормируется.

Для определения лекарственных веществ в настоящее время используют методы высокоэффективной жидкостной или газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором, характеризующиеся низким пределом обнаружения и высокой чувствительностью. Однако такие методы требуют применения дорогостоящего оборудования, сложной пробоподготовки, что повышает стоимость и сложность анализа. Альтернативу таким методам составляют биосенсоры, в частности иммуносенсоры, которые позволяют осуществлять экспрессное и селективное детектирование лекарственных веществ практически без предварительной пробоподготовки.

Пьезоэлектрические гравиметрические иммуносенсоры уже положительно зарекомендовали себя в экологическом мониторинге и пищевом анализе для определения как индивидуальных соединений, так и их суммарного содержания в различных пробах. Для определения лекарственных веществ на максимально допустимом и более низком уровне, регламентированном в РФ, актуальной проблемой остается расширение перечня детектируемых соединений, повышение чувствительности определения и снижение предела обнаружения аналитов. Эта проблема для гравиметрических сенсоров может быть решена за счет увеличения активной поверхности распознающего слоя, в том числе при применении наночастиц металлов, кремневых или углеродных наночастиц. Наиболее перспективными наноматериалами являются углеродные нанотрубки, которые в настоящее время активно используются в электрохимических или оптических биосенсорах нового поколения, благодаря их сверхвысокой удельной поверхности, уникальным структурным, механическим, электронным и оптическим свойствам. Биосенсоры на основе УНТ могут быть функционализированы путем сопряжения нескольких компонентов, тем самым потенциально усиливая процессы распознавания и передачи сигнала, в отличие от моносопряженных биосенсорных систем. В то же время для использования на практике иммуносенсоров на базе УНТ пока не решено множество проблем. Это касается в том числе и пьезоэлектрических иммуносенсоров для определения лекарственных веществ в пищевых продуктах и биологических жидкостях. В частности, до сих пор не до конца решена проблема обеспечения устойчивости и высокой активности распознающего аффинного слоя на основе антител, антигенов или гаптенных, а также выбора условий проведения анализа с применением пьезоэлектрических сенсоров на основе УНТ.

В связи с этим поиск новых подходов к созданию распознающего слоя на базе УНТ для расширения возможностей пьезоэлектрических сенсоров для определения лекарственных веществ в медицинских и пищевых объектах остается актуальной задачей аналитической химии.

Степень разработанности темы исследования. Включение УНТ в биосенсорные устройства позволило разработать чувствительные электрохимические биосенсоры для определения физиологически активных соединений, биомаркеров различных заболеваний, в том числе онкологических. Наиболее развиты амперометрические сенсоры на основе УНТ. Хорошо известно, что обработка кислотами приводит к образованию множества функциональных групп и перераспределению поверхностной энергии УНТ. Это сопровождается возникновением большого количества активных сайтов и повышением каталитической активности биомолекул. Однако до настоящего времени отсутствуют систематические исследования, связанные с особенностями формирования устойчивого распознающего слоя пьезоэлектрического иммуносенсора на основе УНТ.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось определение эффективных условий подготовки углеродных нанотрубок и разработка на их основе пьезоэлектрических иммуносенсоров для высокочувствительного определения лекарственных веществ в пищевой продукции, биологических жидкостях и фармацевтических препаратах.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- оценить влияние ряда окислителей на образование активных функциональных групп на поверхности УНТ для эффективного ковалентного связывания со слоем модификатора и биореагентом;
- выявить закономерности формирования устойчивого распознающего слоя пьезоэлектрического иммуносенсора на основе углеродных нанотрубок после активации карбоксильных групп, аминирования, фторирования, тиолирования, модифицирования тиолированных УНТ наночастицами золота;
- обосновать концентрации иммунореагентов, обеспечивающие максимальный сигнал иммуносенсора при определении аминогликозидных, фторхинолоновых антибиотиков, тетрациклина, полимиксина, колхицина и рактопамина;
- определить условия увеличения чувствительности определения антибиотиков с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора в статическом и проточно-инжекционном режиме, в прямом и конкурентном форматах иммуноанализа;
- апробировать разработанные пьезоэлектрические иммуносенсоры на основе УНТ в анализе модельных смесей лекарственных веществ и реальных объектов – биологических жидкостей, пищевых продуктов животного происхождения и фармацевтических препаратов.

Научная новизна.

Для повышения чувствительности определения лекарственных веществ в жидких средах с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора предложено включать в состав распознающего слоя многостенные углеродные нанотрубки, способствующие существенному увеличению поверхностной концентрации иммунореагентов (антител или антигенов).

Установлено, что активация углеродных нанотрубок посредством карбоксилирования, аминирования, фторирования и тиолирования способствует повышению эффективности связывания конъюгатов антибиотиков или антител с

аффинным слоем на поверхности пьезоэлектрического иммуносенсора и повышению устойчивости распознающего слоя.

Проведённое систематическое исследование условий определения лекарственных веществ (антибиотики – аминогликозиды, тетрациклины, фторхинолоны, полимиксины и рактопамин) с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора на основе функционализированных углеродных нанотрубок в прямом или конкурентном форматах иммуноанализа, в статическом или проточно-инжекционном режиме показывает, что аналитические характеристики сенсора зависят не только от формата или режима анализа, но и от способа активации многостенных углеродных нанотрубок.

Показана возможность применения пьезоэлектрических иммуносенсоров для анализа реальных объектов – биологических жидкостей, пищевых продуктов животного происхождения и фармацевтических препаратов, установлены метрологические характеристики способов определения.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработаны и апробированы новые пьезоэлектрические иммуносенсоры на основе углеродных наноматериалов для высокочувствительного определения аминогликозидных, фторхинолоновых антибиотиков, тетрациклина, полимиксина, колхицина и рактопамина в модельных растворах и реальных объектах, в том числе фармацевтических препаратах, в объектах пищевой промышленности и биологических жидкостях.

Предложены способы получения биорецепторного покрытия иммуносенсора на основе гибридных углеродсодержащих материалов для высокочувствительного и селективного определения лекарственных веществ. Научная новизна способа определения фторхинолонов с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора подтверждена патентом РФ (патент № 2018122565).

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач использованы методы ИК-спектроскопии, атомно-силовой микроскопии и пьезокварцевого микровзвешивания. Аналитический сигнал сенсора регистрировали на измерительной установке CPNA-330 (ЗАО «ЭТНА», Россия) и установке, состоящей из проточной ячейки объемом 15-20 мкл, перистальтического насоса («KNAUER», Германия), цифрового модуля ДиСкоп («Бафика», Россия).

Положения, выносимые на защиту:

1. Углеродные нанотрубки, эффективно окисленные и функционализированные в условиях, установленных в результате исследований, образуют существенно более прочные ковалентные связи с подложкой и молекулами иммунореагентов.

2. Существенное увеличение чувствительности определения лекарственных веществ обеспечивается повышением концентрации сайтов распознавания на поверхности распознающего слоя пьезоэлектрического гравиметрического иммуносенсора на основе гибридных углеродсодержащих материалов.

3. Аналитические характеристики (диапазон определяемых концентраций аналитов и предел обнаружения) пьезоэлектрического иммуносенсора для определения лекарственных веществ зависят как от способа функционализации углеродных нанотрубок, так и от режима и формата иммуноанализа. В статическом режиме в прямом формате иммуноанализа

наблюдается расширение линейного диапазона определяемых концентраций лекарственных веществ.

4. Способы определения фторхинолонов, аминогликозидов, полимиксина, тетрациклина, рактопамина и колхицина с помощью пьезоэлектрических иммуносенсоров на основе УНТ, позволяющие осуществлять селективное, экспрессное и высокочувствительное детектирование следовых концентраций лекарственных веществ в пищевых продуктах, биологических жидкостях и фармацевтической продукции с минимальной пробоподготовкой.

Степень достоверности подтверждается использованием современного аналитического оборудования, результатами статистической обработки экспериментальных данных, отсутствием систематической погрешности, а также хорошей воспроизводимостью результатов при анализе реальных объектов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на следующих конференциях: IX международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017); Всероссийских молодежных конференциях «Достижения молодых ученых: химические науки» (Уфа, 2017); Третьем съезде аналитиков России (Москва, 2017); Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2017» (Тула, 2017); XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019); VII Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Органические и гибридные наноматериалы» (Иваново, 2019).

Личный вклад автора заключался в систематизации литературных данных, участии в общей постановке задач исследования, выполнении экспериментальных исследований, обработке и интерпретации полученных результатов, практической апробации разработанных способов анализа.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в журналах, входящих в Перечень ВАК и индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, 7 тезисов докладов, получен 1 патент РФ.

Структура и объём диссертации.

Диссертационная работа изложена на 130 страницах печатного текста, включает 29 рисунков, 24 таблицы. Состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 4 глав результатов и обсуждений, заключения, библиографического списка, включающего 247 ссылки на работы, приложения, в составе которого 4 рисунка.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («У.М.Н.И.К.») (договор №11559ГУ/2017 (код 0033770) от 22.05.2017) и гранта РФФИ и Липецкой области в рамках научного проекта № 20-43-480001.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Раздел состоит из двух глав, в которых систематизированы общие сведения о методах получения и свойствах УНТ, а также литературные данные по использованию углеродных наноматериалов в биосенсорах. Оценены перспективы применения УНТ в сенсорах для детектирования лекарственных препаратов, в том числе в пьезоэлектрических сенсорах. На основании анализа литературных данных были сформулированы цели и задачи работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве определяемых соединений были выбраны следующие фармацевтические препараты (Таблица 1).

Для иммунохимического определения объектов исследования применяли поликлональные антитела к: левофлоксацину - (Ab:Lev), ципрофлоксацину - (Ab:Cip), полимиксиам - (Ab:Poly), колхицину - (Ab:Col), тетрациклину - (Ab:Tetr), гентамицину - (Ab:Gent), стрептомицину - (Ab:Str), канамицину - (Ab:Kana) и моноклональные антитела к рактопамину (Ab:Ract).

Таблица 1 – Объекты исследования

Название	Формула	Название	Формула
Фторхинолоны		β-агонисты	
Левифлоксацин (Lev)		Рактопамин (Ract)	
Ципрофлоксацин (Cip)		Колхициновые алкалоиды	
		Колхицин (Col)	
Аминогликозиды		Тетрациклины	
Гентамицин (Gent)		Тетрациклин (Tetr)	
Стрептомицин (Str)		Полимиксины	
		Полимиксин Е (Poly)	
Канамицин (Kana)			

Для синтеза конъюгатов с аналитами применяли бычий сывороточный альбумин (BSA) («ПанЭко», Россия).

В работе были использованы многостенные углеродные нанотрубки, предоставленные Институтом проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН (Черноголовка) (УНТ-1) и Институтом катализа им. Г.К.

Борескова Сибирского отделения Российской академии наук (ИК СО РАН) (г. Новосибирск) (УНТ М-2L), а также углеродные нанотрубки «Таунит» производства ООО «НаноТехЦентр» (г. Тамбов).

В качестве физического преобразователя сенсора использовали пьезокварцевые резонаторы АТ-среза с собственной частотой колебаний $10 \text{ МГц} \pm 1 \text{ Гц}$ с золотыми электродами (диаметр 4 мм) (ЗАО «ЭТНА», Россия). Аналитический сигнал сенсора регистрировали в статическом режиме на измерительной установке CPNA-330 (ЗАО «ЭТНА», Россия), в проточно-инжекционном режиме на установке, состоящей из: 1 – проточной ячейки объемом 15-20 мкл, 2 –

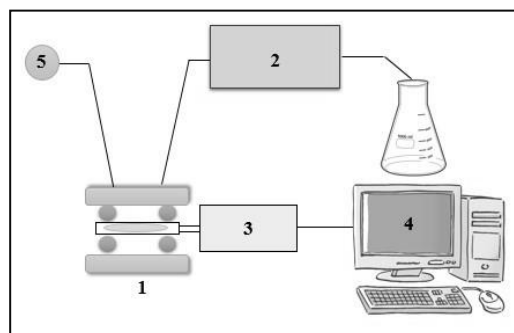


Рисунок 1 – Схема установки для проточно-инжекционного анализа

перистальтического насоса («KNAUER», Германия), 3 – цифрового модуля ДиСкоп («Бафика», Россия), 4 – персонального компьютера и 5 – дозатора (рисунок 1).

Ультразвуковую обработку углеродных наноматериалов осуществляли в ультразвуковой ванне («ПСБ-Галас», Россия). При обработке УНТ для их осаждения, а также отделения надосадочной жидкости при пробоподготовке пищевых продуктов и биологических жидкостей применяли центрифугу («MPW», Польша).

Контроль за процессами дериватизации поверхности углеродных нанотрубок осуществляли методом ИК-спектроскопии (ИК-спектрометр «Shimadzu I Raffinity-1», Япония) и методом пьезокварцевого микровзвешивания.

Оценка профиля поверхности распознающего слоя сенсора осуществлялась с помощью атомного силового микроскопа SOLVER P47-Pro (ЗАО «Нанотехнология-МДТ», Зеленоград, Россия) в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием кантилеверов NSGO 1/20 (Зеленоград, Россия), с резонансной частотой сканирования в диапазоне 120–180 кГц. Поверхность обрабатывали с помощью фильтров программы «NOVA».

Наночастицы золота ($d=4 \text{ нм}$), синтезированные путем восстановления золотохлористоводородной кислоты боргидридом натрия с применением микроволнового нагрева, были иммобилизованы на тиолированные УНТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование условий формирования распознающего слоя пьезоэлектрического иммуносенсора на основе УНТ

Для получения устойчивого и чувствительного распознающего слоя на основе УНТ на поверхности гравиметрического пьезоэлектрического иммуносенсора необходимо обеспечить их ковалентное связывание как со слоем модификатора, сформированным на золотом электроде, так и с биомолекулами. В качестве модификаторов выбраны тиосоединения: 2-меркаптоэтиламин (цистеамин) и 2-амино-3-меркаптопропионовая кислота (цистеин), имеющие высокую адгезию к поверхности золотого электрода и образующие тонкие пленки самоорганизованных монослоев с терминальными аминогруппами.

Обоснование эффективности окислительной системы и условий окисления. Характер и количество активных функциональных групп на поверхности углеродных материалов в существенной степени зависит от природы

применяемого окислителя и условий проведения процесса окисления. Рассмотрено изменение поверхностных характеристик УНТ при обработке различными окислителями: $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$; HNO_3 ; $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HNO}_3$; $\text{KMnO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$; $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{H}_2\text{SO}_4$; $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NH}_4\text{OH}$. Применение метода ИК-спектроскопии и пьезокварцевого микровзвешивания позволило оценить увеличение поверхностной концентрации активных функциональных групп при воздействии окислителей.

Методом ИК-спектроскопии путем сопоставления спектров окисленных УНТ и УНТ до окисления выявлено увеличение количества кислородсодержащих функциональных групп, в частности гидроксильных и карбонильных. В окисленных наноматериалах особое внимание уделялось увеличению пика, отвечающего валентным колебаниям карбонильной группы $>\text{C}=\text{O}$ (1685 см^{-1}). Кроме того, отмечается появление пиков: 964 см^{-1} , свидетельствующего о внеплоскостных деформационных колебаниях $-\text{OH}$ в карбоксильной группе, и 1130 см^{-1} , отвечающего валентным колебаниям $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{O}$ (рисунок 2).

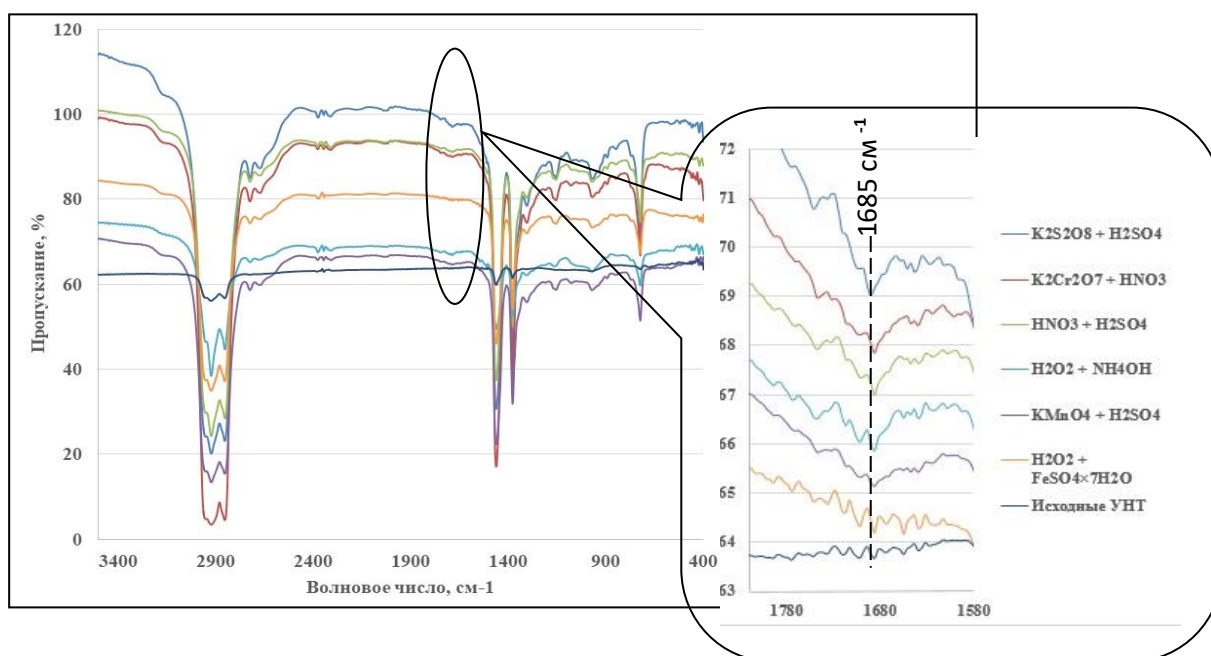


Рисунок 2 – ИК-спектры исходных и окисленных УНТ-1

Полученные данные согласуются с результатами пьезокварцевого микровзвешивания (таблица 2): увеличение массы поверхностного слоя сенсора с закрепленными на его электроде УНТ косвенно свидетельствует о различной поверхностной концентрации активных функциональных групп, образованных после окисления углеродных нанотрубок. Независимо от типа исследуемых углеродных нанотрубок максимальное увеличение поверхностной концентрации кислородсодержащих функциональных групп наблюдалось при применении окислительных систем $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HNO}_3$; $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{H}_2\text{SO}_4$ и $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$. При применении системы $\text{KMnO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$, характеризующейся высоким значением окислительно-восстановительного потенциала, отмечается существенно меньшее увеличение концентрации кислородсодержащих групп, что объясняется тем, что только примерно 10% перманганата калия расходуется на окисление поверхности УНТ, а остальная часть идет на окисление C до CO_2 или разлагается.

Невысокий прирост массы при применении окислительной системы $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NH}_4\text{OH}$ объясняется присутствием в углеродных наноматериалах остатков оксидных катализаторов (частиц переходных металлов), дезактивирующих пероксид водорода за счет его каталитического разложения, поэтому он не участвует в окислении поверхности УНТ. Методом пьезокварцевого микровзвешивания не удалось оценить эффективность окисления в системах 1 и 2 (таблица 2) – при воздействии окислителей происходит слипание УНТ и образование взвеси, а при закреплении их на поверхности сенсора наблюдается срыв частотных колебаний.

Таблица 2 – Оценка эффективности воздействия окислительных систем на УНТ-1, УНТ М-Л2 и УНТ «Таунит»

Окислительная система	E, В	УНТ-1		УНТ М-Л2		«Таунит»	
		Δf , Гц	Δm , нг	Δf , Гц	Δm , нг	Δf , Гц	Δm , нг
1 - HNO_3 , H_2SO_4^*	+0,98	-	-	-	-	-	-
2 - HNO_3	+0,98	-	-	-	-	-	-
3 - $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HNO}_3$	+1,49	6007	7389	5124	6303	1613	1984
4 - $\text{KMnO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$	+1,51	1801	2215	690	849	1168	1437
5 - $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{H}_2\text{SO}_4$	+2,19	6855	8432	6610	8131	1796	2209
6 - $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	+0,84	985	1212	532	654	1175	1445
7 - $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NH}_4\text{OH}$	+0,84	2120	2608	1103	1357	1087	1337
8 - $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4^{**}$	+0,98	4000	4918	2353	2894	1456	1791

* последовательное добавление кислот

** одновременное добавление кислот

Изучено влияние температуры и времени контакта окислителя с поверхностью углеродного материала на значение массы поверхностного слоя, модифицированного окисленными углеродными наноматериалами (таблица 3).

Так, окисление системой $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HNO}_3$ всех исследованных УНТ следует осуществлять при температуре 80 °С в течение 2 ч, в тоже время при применении $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{H}_2\text{SO}_4$ и $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ высокие приращения массы наблюдаются для трубок, окисленных при 70 °С. Однако для обработки УНТ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{H}_2\text{SO}_4$ требуется 4 ч, в то время как при использовании $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ достаточно 2 ч.

Таблица 3 – Влияние условий окисления УНТ на поверхностную концентрацию функциональных групп

Углеродные материалы	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HNO}_3$			$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{H}_2\text{SO}_4$			$\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ (8)		
	T, °С	t, ч	Δm , нг	T, °С	t, ч	Δm , нг	T, °С	t, ч	Δm , нг
УНТ-1	80	2	7650	70	4	8785	70	2	4917
УНТ М-2L			7890			8411			2890
«Таунит»			2511			2902			1787

Активация поверхности УНТ. Карбоксилирование углеродных наноматериалов. Важной стадией для повышения устойчивости распознающего слоя на основе УНТ является функционализация поверхности.

Ковалентное связывание УНТ с аминокруппами антител или конъюгатов (рисунок 3) возможно и без активации карбоксильных групп, но при этом не удастся сформировать устойчивый распознающий слой, который не разрушается при проведении неоднократных измерений в жидких средах или при регенерации, поэтому для повышения эффективности связывания углеродных наноматериалов с биомолекулами требуется их активация. На поверхности модификатора электрода, в качестве которого был использован цистеин, закрепляли УНТ, а затем проводили активацию карбоксильных групп раствором N-этил-N'-(3-диметил-аминопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDAC) в воде или диметилформамиде (DMF) в присутствии или отсутствии N-гидроксисукцинимиды (NHS) (таблица 4). Максимальная устойчивость слоя наблюдается при активации наноструктур раствором EDAC+NHS в DMF. Применение для активации растворов EDAC в воде или DMF приводит к образованию нестабильного производного ацилмочевины, что снижает образование возможных активных «сайтов» связывания на поверхности наноматериалов. Присутствие NHS в активационной смеси преобразует нестабильное производное ацилмочевины в более стабильный активный эфир, что обеспечивает образование устойчивой амидной связи между функциональными группами наноструктур и аминокруппой антител.

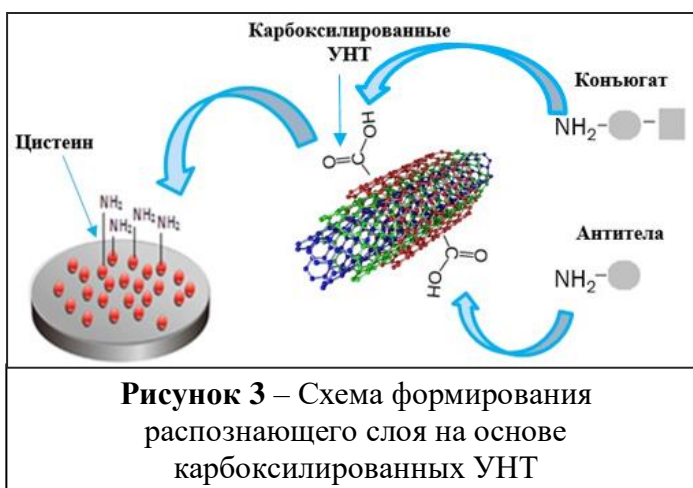


Рисунок 3 – Схема формирования распознающего слоя на основе карбоксилированных УНТ

Таблица 4 – Оценка влияния активационной смеси на устойчивость распознающего слоя; *N* – число циклов измерений

Углеродные материалы	Состав активационной смеси	N
УНТ-1	EDAC (водный раствор)	25
	EDAC+DMF	25
	EDAC+NHS+DMF	30
	Без активации	18
УНТ M-2L	EDAC (водный раствор)	32
	EDAC+DMF	30
	EDAC+NHS+DMF	34
	Без активации	18
«Таунит»	EDAC (водный раствор)	24
	EDAC+DMF	23
	EDAC+NHS+DMF	28
	Без активации	16

Выдерживание активирующего раствора на поверхности УНТ в течение 90 мин обеспечивает сохранение постоянного аналитического сигнала сенсора в течение 28 – 34 циклов измерений (N).

Аминирование УНТ. Образование прочных ковалентных связей с подложкой и молекулами иммунореагентов возможно после аминирования кислородсодержащих функциональных групп.

Аминирование УНТ осуществлялось двумя способами – в парах аммиака и в растворе гидроксида аммония. Контроль за ходом протекания процесса осуществляли методом ИК-спектроскопии (рисунок 4).

Сопоставление ИК-спектров показало, что при применении раствора гидроксида аммония процесс протекает более активно, о чем свидетельствует большая интенсивность линий поглощения в области $\sim 3500\text{ см}^{-1}$, обусловленная валентными колебаниями NH-связи, а также в областях 1650-1580 и 900-650 см^{-1} , связанными с плоскими и неплоскими деформационными колебаниями -NH, соответственно.

Иммобилизацию аминированных углеродных нанотроек на цистеиновую подложку осуществляли с применением кросс-реагента – глутарового альдегида (ГА). Ковалентное связывание антибиотик-белкового конъюгата или антител с аминированными углеродными нанотрубками может происходить как непосредственно за счет связывания с карбоксильными группами белковых молекул, так и

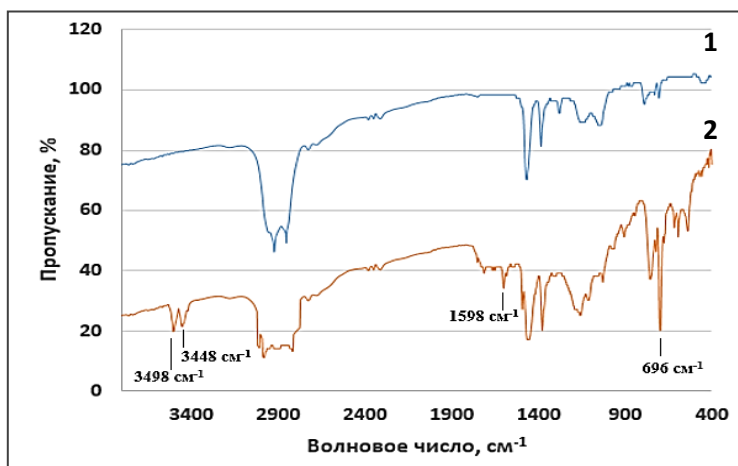


Рисунок 4 – ИК спектры аминированных УНТ: 1 – аминирование раствором гидроксида аммония, 2 – в парах аммиака

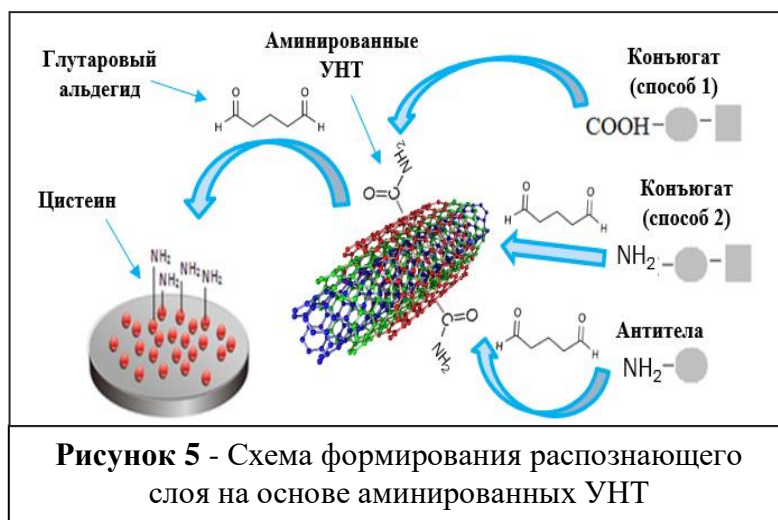


Рисунок 5 - Схема формирования распознающего слоя на основе аминированных УНТ

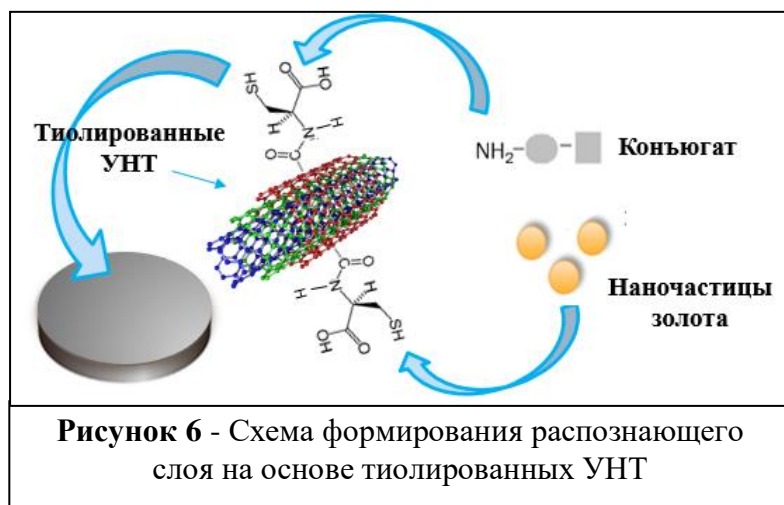
через молекулу глутарового альдегида (рисунок 5). Значение сигнала сенсора (Δf) с распознающим слоем, полученным с применением ГА, превышает аналогичную величину сенсора со слоем сформированном способом 1 (таблица 5), что объясняется не только большей поверхностной концентрацией конъюгата, но и его доступностью, связанной с появлением линкерного мостика на основе ГА.

Таблица 5 – Влияние способа иммобилизации белкового конъюгата при определении ципрофлоксацина (0,2 мкг/мл) на аналитический сигнал сенсора

Способ иммобилизации антибиотик-белкового конъюгата	Δf , Гц	Δm , нг
Способ 1. Без ГА	161	198,0
Способ 2. Через ГА	207	254,6

Тиолирование УНТ. При применении для тиолирования УНТ цистеина можно исключить стадию модифицирования поверхности электрода сенсора. Установлено, что цистеин прочно связывается с карбоксильными группами УНТ при нагревании до 90 °С и обработке ультразвуком в течение 2,5 ч.

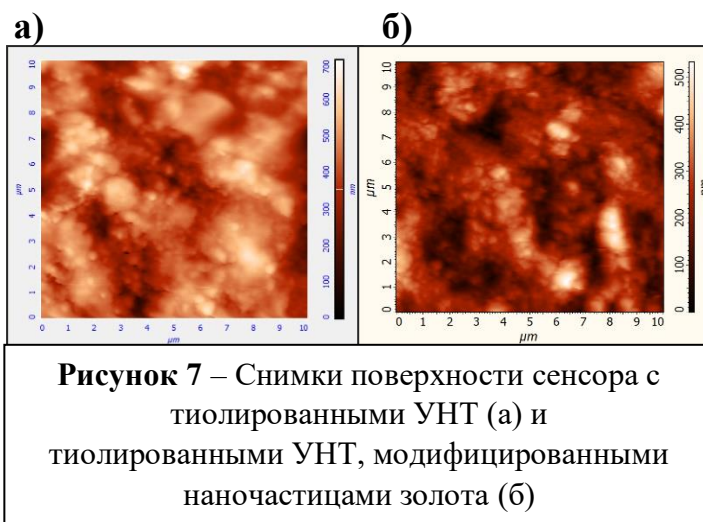
Коллоидный раствор предварительно высушенных и диспергированных в диметилформамиде тиолированных УНТ наносили на поверхность золотого электрода сенсора, затем дозировали раствор конъюгата и выдерживали в течение 24 ч. За это время происходило образование прочных ковалентных связей между аминокетонами белкового конъюгата и карбоксильными группами УНТ (рисунок 6).



Для повышения площади активной поверхности распознающего слоя предложено дополнительно осуществлять его модификацию наночастицами золота (рисунок 6), что способствует не только увеличению концентрации иммобилизованных антигенов или антител, но и повышению стерической доступности биомолекул для связывания в гетерогенный иммунокомплекс –

это косвенно подтверждается данными атомно-силовой микроскопии (рисунок 7). При сопоставлении снимков и значений шероховатости слоев на основе тиолированных УНТ ($R_a = 60$ нм) и тиолированных УНТ, декорированных наночастицами золота ($R_a = 76$ нм), установлено, что более высокое значение шероховатости слоя с наночастицами золота связано с появлением на поверхности УНТ равномерно расположенных выпуклых структур (рисунок 7б), изменяющих рельеф поверхности и обеспечивающих иммобилизацию большего количества биомолекул.

Фторирование УНТ «Таунит». Взаимодействие атомов фтора с УНТ происходит за счет ковалентного присоединения фтора к графеновым слоям углеродного каркаса без его разрушения. Обработку углеродного материала проводили парами водного раствора HF (40%) при температуре 115 °С в интервале от 30 до 60 мин, основываясь на методике, приведенной в работе *.



* Nebogatikova N.A. Functionalization of graphene and few-layer graphene films in an hydrofluoric acid aqueous solution / N.A. Nebogatikova, I.V. Antonova, V.Y. Prinz, V. A. Volodin, D. A. Zatsepin, E. Z. Kurmaev, I. S. Zhidkov, S. O. Cholakh // Nanotechnol Russia. – 2014. – No. 9. – P. 51–59.

Сопоставление характеристик сенсоров на основе УНТ, активированных различными способами, при конкурентном определении ципрофлоксацина (0,2 мкг/мл) показало большую устойчивость в жидких средах карбоксилированных и фторированных УНТ (таблица 6). Стабильность распознающего слоя (N) на основе аминированных и тиолированных УНТ существенно ниже.

Таблица 6 – Влияние способа активации поверхности УНТ на аналитический сигнал пьезоэлектрического сенсора

Способ модифицирования	Δf , Гц	N	Способ модифицирования	Δf , Гц	N
Карбоксилирование	625	35	Тиолирование	52	17
Аминирование (способ 1)	133	15	Тиолирование с наночастицами золота	107	15
Аминирование (способ 2)	207	20	Фторирование	74	32

При применении карбоксилированных и аминированных УНТ наблюдаются довольно высокие значения аналитического сигнала, свидетельствующие о высокой концентрации на поверхности доступных активных функциональных групп, в более значительной степени это проявляется для карбоксилированных УНТ.

Отмечено увеличение Δf при использовании тиолированных УНТ с наночастицами золота, однако устойчивость распознающего слоя в этом случае вдвое ниже, чем при применении карбоксилированных или фторированных углеродных нанотрубок.

Влияние концентрации дисперсии УНТ на количество поверхностных сайтов связывания.

Изменяя концентрацию дисперсии УНТ, можно управлять концентрацией поверхностных сайтов связывания и массой распознающего слоя, что чрезвычайно важно при подготовке гравиметрического сенсора к работе. На цистеиновую подложку наносили 2 мкл дисперсии УНТ с различной концентрацией и измеряли Δf сенсора при определении 0,2 мкг/мл ципрофлоксацина (таблица 7).

Таблица 7 – Влияние концентрации дисперсии УНТ на характеристики пьезоэлектрического сенсора

Вид углеродных материалов	C, мг/л	Δf , Гц	N	R _a , нм
УНТ-1	100	1732	21	-
	144	4000	27	134,1
	200	3997	20	-
«Таунит»	100	1326	9	-
	144	1456	30	87,8
	200	1489	25	-

Установлено, что концентрация углеродных наноматериалов, (144 мг/л), обеспечивающая формирование наиболее устойчивого слоя, одинакова для УНТ «Таунит» и УНТ-1. Использование дисперсий с меньшей концентрацией УНТ

снижает устойчивость распознающего слоя, а с большей – приводит к перегрузке распознающего слоя и срыву колебаний сенсора. Экспериментальным путем было установлено, что для образования устойчивого слоя необходимо выдерживать УНТ на подложке в течение 24 ч.

Исследование условий определения лекарственных веществ с помощью пьезоэлектрического сенсора на основе УНТ

Изучены условия определения антибиотиков (левофлоксацина, цiproфлоксацина, полимиксина, тетрациклина, стрептомицина, канамицина и гентамицина), колхицина и рактопамина в конкурентном и прямом форматах анализа, статическом и проточно-инжекционном режиме. Определение рабочей концентрации поликлональных антител осуществляли по графикам зависимости аналитического сигнала сенсора от концентрации иммунореагента в конкурентном (рисунок 8а) и прямом (рисунок 8б) форматах анализа.

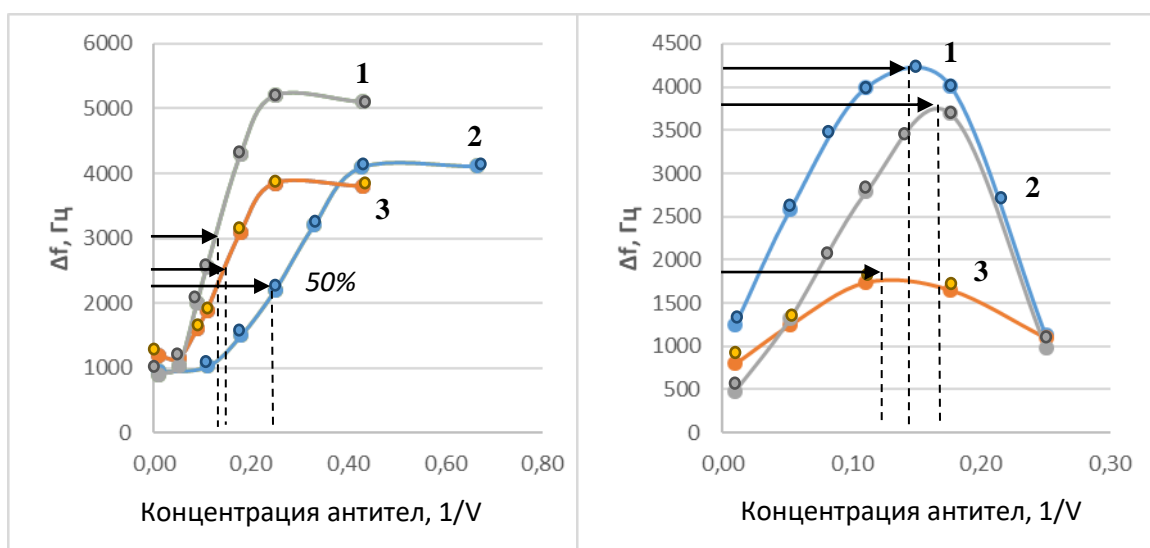


Рисунок 8 – Определение рабочей концентрации антител в: а) конкурентном (1-гентамицин, 2-канамицин, 3-стрептомицин) и б) прямом (1-колхицин, 2-рактопамин, 3-полимиксин) форматах иммуноанализа

При формировании распознающего слоя на поверхность электрода резонатора наносили каплю 1 мМ раствор цистеина и выдерживали при комнатной температуре в течение 90 мин. Затем дозировали 2 мкл активированных УНТ в ДМФ и выдерживали в течение 24 ч при 4°C, после чего проводили иммобилизацию антибиотик-белковых конъюгатов (конкурентный формат анализа) или антител к исследуемым веществам (прямой формат анализа).

Для подготовки пробы при проведении анализа в конкурентном формате к 40 мкл анализируемого раствора, содержащего определяемый аналит, добавляли 10 мкл раствора поликлональных антител с концентрацией, отвечающей 50 %-ому связыванию. Выдерживали в течение 2-3 мин до завершения взаимодействия молекул аналита с антителами.

При проведении анализа в статическом режиме на распознающий слой сенсора наносили 5 мкл подготовленной анализируемой пробы и выдерживали 20 мин до завершения реакции взаимодействия не связавшихся антител с белковым конъюгатом, иммобилизованным на поверхности электрода сенсора. Затем

промывали поверхность сенсора от не связавшихся реагентов фосфатным буферным раствором (рН=7,2) и высушивали до постоянной массы.

В случае проточно-инжекционного определения аналита над поверхностью иммуносенсора с иммобилизованным конъюгатом антибиотика пропускали фосфатный буферный раствор (рН=7,2) до установления постоянного значения Δf . После чего в поток раствора-носителя вводили 200 мкл подготовленной пробы и измеряли аналитический сигнал сенсора. Регенерацию биослоя осуществляли, пропуская над поверхностью сенсора регенерирующий раствор KCNS (200 мкл, 0,003 М).

Исследовано влияния скорости потока раствора носителя в ПИА (в интервале от 1 до 120 мкл/мин) на величину Δf . Так, определение фторхинолонов рекомендовано проводить при пропускании пробы над поверхностью сенсора со скоростью 50 мкл/мин, что сопровождается максимальным значением Δf .

Сопоставление результатов определения фторхинолонов с применением распознающего слоя сенсора на основе карбоксилированных УНТ-1 в прямом и конкурентном форматах, проточно-инжекционном и статическом режимах анализа (таблица 8) показало, что проведении измерений в статическом режиме в прямом формате иммуноанализа возможно в более широком диапазоне определяемых содержаний. Однако продолжительность определения в проточно-инжекционном режиме не превышает 15 мин, в то время как для проведения анализа в статическом режиме необходимо около 30 мин.

Таблица 8 – Результаты определения фторхинолонов в конкурентном формате иммуноанализа в статическом и проточно-инжекционном режимах (P=0,95; n=3)

Анализируемое вещество	Диапазон определяемых содержаний, нг/мл	Анализируемое вещество	Диапазон определяемых содержаний, нг/мл
Статический режим		Проточно-инжекционный режим	
<i>Конкурентный формат иммуноанализа</i>			
Lev	10-350	Lev	30-450
Cip	10-370	Cip	40-490
<i>Прямой формат иммуноанализа</i>			
Lev	30-650	-	
Cip	25-670		

Метрологические характеристики способов определения антибиотиков с применением пьезоэлектрического сенсора зависят не только от условий и формата проведения иммуноанализа, но и от способа функционализации УНТ, используемых при формировании распознающего слоя (таблица 9). Применение активированных УНТ позволяет осуществлять определение антибиотиков различных групп с высокой чувствительностью. При определении аминогликозидов наблюдается увеличение коэффициента чувствительности градуировочной функции при переходе от подложек на основе тиолированных УНТ к карбоксилированным и аминированным. Минимальный предел обнаружения канамицина достигается при применении пьезоэлектрических сенсоров на основе тиолированных УНТ, декорированных наночастицами золота.

Таблица 9 – Метрологические характеристики определения антибиотиков (P=0,95; n=3)

Аналит	Способ активации УНТ-1	C _{min} , мкг/мл	Диапазон определяемых содержаний, мкг/мл	Уравнение градуировочной функции	R ²
Конкурентный формат иммуноанализа					
Gent	Карбоксилированные УНТ-1	0,28	0,6-1,0	y = -302x+442	0,98
	Аминированные УНТ-1	0,23	0,3-0,8	y = -910x+963	0,99
Str	Карбоксилированные УНТ-1	0,19	0,3-1,1	y = -500x + 644	0,98
	Аминированные УНТ-1	0,17	0,2-0,7	y = -847x + 751	0,94
Poly	Карбоксилированные УНТ-1	0,06	0,09-0,4	y = -82x+53	0,94
Col	Карбоксилированные УНТ-1	6*	8-390*	y = -89x+42*	0,98
Kana	Тиолированные УНТ-1	2*	5-60*	y = -16x+1560*	0,95
	Тиолированные УНТ-1 с наночастицами золота	0,2*	1-75*	y = -17x+2097*	0,97
Прямой формат иммуноанализа					
Ract	Карбоксилированные УНТ-1	0,04*	0,1-22*	y = 4,9x+52*	0,99
Col	Карбоксилированные УНТ-1	8*	10-465*	y = 44x+4,4*	0,99
Poly	Карбоксилированные УНТ-1	0,07	0,09-0,6	y = 45x + 14	0,98

* нг/мл

Оценку селективности определения лекарственных веществ с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора осуществляли по коэффициентам перекрестного реагирования (CR, %):

$$CR, \% = 100 \times \frac{C_{\text{стр.ан.}}}{C_{\text{опр. соед.}}}$$

где C_{опр.соед.}, C_{стр.ан.} – концентрация определяемого и перекрестно реагирующего вещества (рисунок 9).

Значения CR,% для структурных аналогов определяемых соединений не превышают 2-12%, что свидетельствует о возможности высокоспецифичного определения антибиотиков в жидких средах в присутствии соединений родственного строения.

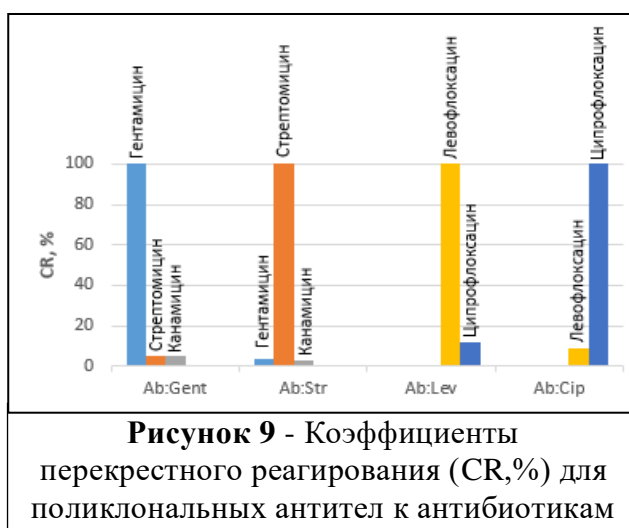


Рисунок 9 - Коэффициенты перекрестного реагирования (CR,%) для поликлональных антител к антибиотикам

Применение пьезоэлектрических сенсоров для определения лекарственных веществ в реальных объектах

Разработаны способы определения фторхинолонов и аминогликозидов с помощью пьезоэлектрических сенсоров на основе карбоксилированных УНТ-1 в молоке и мёде, рактопамина в говядине, а также полимиксина и колхицина в биологических жидкостях – слюне и плазме крови (Таблица 10).

Таблица 10 - Определение лекарственных веществ с помощью пьезоэлектрических иммуносенсоров в продуктах питания и биологических жидкостях
($P=0,95$, $n=5$, $t_{\text{табл}}=2,78$)

Объект исследования	Анализируемое вещество	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	S_r	$t_{\text{эксп}}$
<i>Конкурентный формат анализа</i>					
Молоко	Lev	50	49 ± 5	0,08	0,56
		100	101 ± 8	0,06	0,35
		200	201 ± 8	0,03	0,35
Мёд	Kana	20	19 ± 2	0,08	1,39
		50	51 ± 3	0,05	0,93
		70	73 ± 5	0,06	1,67
Плазма крови	Col	100	99 ± 4	0,03	0,70
		200	199 ± 17	0,07	0,16
		300	297 ± 8	0,02	1,04
Слюна	Col	100	99 ± 5	0,04	0,56
		200	205 ± 8	0,03	1,74
		300	299 ± 7	0,02	0,40
<i>Прямой формат иммуноанализа</i>					
Молоко	Cip	50	49 ± 6	0,10	0,46
		100	98 ± 6	0,05	0,93
		300	297 ± 15	0,04	0,56
Говядина	Ract	0,20	$0,19 \pm 0,02$	0,08	1,39
		5,0	$4,8 \pm 0,3$	0,05	1,85
		20	21 ± 2	0,08	1,39
Плазма крови	Col	100	101 ± 5	0,04	0,56
		300	295 ± 7	0,02	1,99
		400	401 ± 30	0,06	0,09
Слюна	Poly	100	101 ± 4	0,03	0,70
		200	199 ± 15	0,06	0,19
		500	499 ± 37	0,06	0,08

Правильность определения аналитов подтверждали методом «введено-найденно» с применением теста Стьюдента. Разработанные способы позволяют определять антибиотики в продуктах питания на МДУ и ниже (молоко: 100 нг/мл для фторхинолонов, 150 нг/мл для канамицина).

Как в конкурентном, так и в прямом форматах иммуноанализа значения относительного стандартного отклонения s_r свидетельствуют о высокой воспроизводимости результатов измерений (s_r не превышает 0,1).

Разработанные иммуносенсоры на основе карбоксилированных УНТ-1 апробированы при анализе лекарственных форм (Таблица 11). Проведенные

исследования показали, что установленные концентрации антибиотиков соответствуют заявленным характеристикам фирм-производителей.

Таблица 11 – Определение лекарственных веществ с помощью пьезоэлектрических иммуносенсоров в фармацевтических препаратах (P=0,95, n=5, $t_{\text{табл}}=2,78$)

Препарат	Определяемое соединение	Заявлено производителем, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	s_r	$t_{\text{эксп}}$
Левифлоксацин АО «ВЕРТЕКС»	Левифлоксацин	250	249±22	0,07	0,13
Ципрофлоксацин, ООО «ОЗОН»	Ципрофлоксацин	500	504±38	0,06	0,29

Применение теста Стьюдента показало отсутствие систематической погрешности и подтвердило правильность определения антибиотиков с применением разработанных пьезоэлектрических иммуносенсоров ($t_{\text{табл}}= 2,78 > t_{\text{эксп}}$).

Все разработанные способы определения лекарственных препаратов с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора, модифицированного углеродными наноматериалами, характеризуются высокой чувствительностью, селективностью и могут быть рекомендованы для определения антибиотиков в пищевых продуктах, биологических жидкостях и фармацевтических препаратах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Обоснована перспективность применения многостенных углеродных нанотрубок при формировании распознающего слоя массчувствительного пьезоэлектрического иммуносенсора, способствующих существенному увеличению поверхностной концентрации распознающих компонентов – антител или антигенов. Методами ИК-спектроскопии и пьезокварцевого микровзвешивания установлено влияние способа окисления, температуры и продолжительности обработки наноматериалов окислителем на концентрацию кислородосодержащих функциональных групп, обеспечивающих образование прочных ковалентных связей УНТ со слоем модификатора электрода сенсора и иммунореагентом, и позволяющих существенно увеличить поверхностную концентрацию "сайтов связывания". Наибольшую эффективность показали окислительные системы: $K_2Cr_2O_7 + HNO_3$ (80°C, 2 ч), $K_2S_2O_8 + H_2SO_4$ (70°C, 4 ч) и $HNO_3 + H_2SO_4$ (70°C, 2 ч).

2. Показано, что с помощью функционализации поверхности УНТ (карбоксилирование, аминирование, тиолирование, фторирование) возможно образование более устойчивого распознающего слоя сенсора. Методом ИК-спектроскопии установлено образование устойчивых связей между поверхностными карбоксильными и аминогруппами углеродных материалов с амино- или карбоксильными группами иммунореагентов, а также с аминогруппами модификатора поверхности сенсора (цистеина) непосредственно или через глутаровый альдегид. Показано, что при тиолировании поверхности УНТ цистеином возможно исключить стадию предварительной модификации поверхности золотого электрода. Отмечено, что включение золотых наночастиц ($d=4$ нм), иммобилизованных на тиолированных углеродных материалах, способствует увеличению активной поверхности распознающего слоя сенсора и

снижению предела обнаружения. Продемонстрировано, что максимальную устойчивость при работе в жидких средах проявляет распознающий слой, сформированный на основе карбоксилированных и фторированных УНТ (35 и 32 циклов измерений в жидких средах).

3. Разработаны сенсоры для определения антибиотиков в статическом и проточно-инжекционном режимах, прямом и конкурентном формах иммуноанализа. Установлено, что наблюдается расширение линейного диапазона определяемых концентраций лекарственных веществ (30-650 и 25-670 нг/мл для Lev и Cip, 10-465 нг/мл и 0,09-0,6 мкг/мл для Col и Poly, соответственно) в статическом режиме в прямом формате иммуноанализа. Использование распознающего слоя на основе карбоксилированных УНТ позволяет проводить анализ в широком диапазоне определяемых содержаний, в то же время при применении распознающих слоев на основе аминированных, тиолированных и фторированных углеродных материалов наблюдается определение более низких концентраций. Показано, что с разработанные способы позволяют определять гентамицин, канамицин, стрептомицин, левофлоксацин, ципрофлоксацин, полимиксин и тетрациклин на МДУ и ниже, а рактопамин – с пределом обнаружения 0,04 нг/мл и диапазоном определяемых содержаний: 0,1-22 нг/мл.

4. Продемонстрирована возможность применения пьезоэлектрических иммуносенсоров на основе углеродных материалов для высокочувствительного и селективного определения аминогликозидных (гентамицин, канамицин, стрептомицин), фторхинолоновых (левофлоксацин, ципрофлоксацин) антибиотиков, полимиксина, тетрациклина, колхицина и рактопамина в пищевых продуктах, биологических жидкостях и фармацевтических препаратах. Разработанные методики характеризуются правильностью и высокой воспроизводимостью, поэтому могут быть использованы для систематического контроля за содержанием антибиотиков в биологических жидкостях, пищевых продуктах и фармацевтических препаратах.

Перспективы дальнейшей разработки темы связаны с комплексным изучением синтеза и включения в распознающий слой пьезоэлектрического иммуносенсора магнитных углеродных наноматериалов для сокращения времени подготовки сенсора к анализу и продления срока его службы.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:
Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и
индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus**

1. Фарафонова О.В. Поверхностные ансамбли на основе углеродных нанотрубок в пьезоэлектрическом иммуносенсоре для высокочувствительного определения рактопамина / О.В. Фарафонова, **Е.И. Шукшина (Шинко)**, С.С. Гражулене, Т.Н. Ермолаева // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2017. - Т.17. - №4. – С. 548-556. doi: 10.17308/sorpchrom.2017.17/412

2. **Шукшина (Шинко) Е.И.** Аффинные взаимодействия на поверхности пьезоэлектрического сенсора, модифицированного углеродными нанотрубками, при определении фторхинолонов / Е.И. Шукшина (Шинко), О.В. Фарафонова, И.А. Шанин, С.С. Гражулене, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолаева // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2018. - Т.18. - №3. – С. 394-403. doi: 10.17308/sorpchrom.2018.18/544

3. **Шинко Е.И.** Активация углеродных нанотрубок для повышения эффективности аффинного взаимодействия на поверхности пьезоэлектрического сенсора при определении антибиотиков / Е.И. Шинко, О.В. Фарафонова, К.В. Шестопапов, Т.Н. Ермолаева // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2019. - Т.19. - №3. – С. 334-343. doi: 10.17308/sorpchrom.2019.19/750

4. **Шинко Е.И.** Применение углеродных нанотрубок для повышения чувствительности определения антибиотиков с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора / Е.И. Шинко, О.В. Фарафонова, Т.Н. Ермолаева // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2021. – Т.87. - №12. – С. 11-16. doi: 10.26896/1028-6861-2021-87-12-12-17

5. **Shinko E.I.** Determination of the fluoroquinolones levofloxacin and ciprofloxacin by a piezoelectric immunosensor modified with multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) / E.I. Shinko, O.V. Farafonova, I. A. Shanin, S. A. Eremin, T. N. Ermolaeva // Analytical Letters. – 2022. – Vol.55. – No.7. – P.1164-1177. doi: 10.1080/00032719.2021.1991364

Тезисы докладов:

6. Фарафонова О.В. Применение многостенных углеродных нанотрубок для увеличения чувствительности определения фармацевтических препаратов с помощью пьезоэлектрических иммуносенсоров / О.В. Фарафонова, **Е.И. Шукшина (Шинко)**, Т.Н. Ермолаева // Тезисы докладов IX международного конгресса: БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ. – 2017. – Москва. – С.348-349.

7. **Шукшина (Шинко) Е.И.** Высокочувствительный пьезоэлектрический сенсоров для определения полимиксина / Е.И. Шукшина (Шинко), Е.С. Тогузова, О.В. Фарафонова, Т.Н. Ермолаева // Тезисы докладов III Всероссийской молодежной конференции: Достижения молодых ученых: химические науки. – 2017. – Уфа. – С. 372-373.

8. **Шукшина (Шинко) Е.И.** Определение полимиксина и колхицина с помощью пьезоэлектрических иммуносенсоров на основе многостенных углеродных нанотрубок / Е.И. Шукшина (Шинко), О.В. Фарафонова, Т.Н. Ермолаева // Третий съезд аналитиков России: сборник тезисов докладов. - 2017. - Москва. – С. 228.

9. Фарафонова О.В. Пьезоэлектрические иммуносенсоры для высокочувствительного и селективного определения фторхинолонов в пищевой продукции и биологических жидкостях / О.В. Фарафонова, **Е.И. Шукшина (Шинко)**, Т.Н. Ермолаева // Третий съезд аналитиков России: сборник тезисов докладов. - 2017. - Москва. – С. 183.

10. **Шукшина (Шинко) Е.И.** Изучение условий высокочувствительного определения колхицина с помощью пьезоэлектрического иммуносенсора / Е.И. Шукшина (Шинко), О.В. Фарафонова, Т.Н. Ермолаева // Тезисы докладов Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2017». – 2017. –Тула. – С. 33-35.

11. Фарафонова О.В. Аффинный пьезоэлектрический сенсор для определения фторхинолонов / О.В. Фарафонова, **Е.И. Шинко**, Т.Н. Ермолаева // XXI Тезисы докладов Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. –Т.4. – 2019. – Санкт-Петербург. – С. 322.

12. Фарафонова О.В. Применение гибридных композитов на основе углеродных наноматериалов в пьезоэлектрических иммуносенсорах / О.В. Фарафонова, М.Ю. Ларина, **Е.И. Шинко**, Т.Н. Ермолаева // Тезисы докладов VII Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Органические и гибридные наноматериалы». – 2019. – Иваново. – С. 179-183.

Патенты РФ:

13. Пат. 2706362 Российская Федерация. Композиция покрытия пьезоэлектрического сенсора для определения фторхинолонов в жидких средах [Текст] / **Шукшина (Шинко) Е.И.**, Фарафонова О.В., Ермолаева Т.Н.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «ЛГТУ» – № 2018122565; заявл. 19.06.2018; опубл. 18.11.2019.

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за консультации и содействие в выполнении работы научному руководителю д.х.н. проф. Татьяне Николаевне Ермолаевой и к.х.н. Фарафоновой Ольге Вячеславовне; за предоставленные реагенты д.х.н., проф. Ерёмину С.А., Шанину И.А. (МГУ им. М.В. Ломоносова), д.х.н., проф. Гражугене С.С. (Институт проблем технологии микроэлектроники и особочистых материалов РАН, Черноголовка), д.х.н., проф. Коваленко Г.А. (Институт катализа СО РАН, Новосибирск); за помощь при проведении экспериментальных исследований Поповой М.В., Лариной М.Ю., Стебенева Т.Б., Труновой Т.А.