

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201891540 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2019.01.31

(22) Дата подачи заявки  
2015.12.30

(51) Int. Cl. *G01N 27/26* (2006.01)  
*G01N 27/333* (2006.01)  
*G01N 27/49* (2006.01)  
*B82Y 40/00* (2011.01)

(54) НАНОЭЛЕКТРОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ  $Cu(II)$  И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЭЛЕКТРОДА

(86) PCT/RU2015/000958

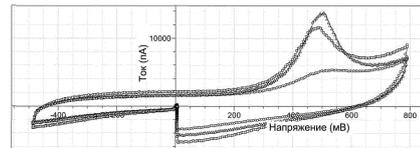
(87) WO 2017/116267 2017.07.06

(71) Заявитель:  
АВТОНОМНАЯ  
НЕКОММЕРЧЕСКАЯ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ  
ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ "СКОЛКОВСКИЙ  
ИНСТИТУТ НАУКИ И  
ТЕХНОЛОГИЙ" (RU)

(72) Изобретатель:  
Ерофеев Александр Сергеевич,  
Горелкин Петр Владимирович,  
Мажуга Александр Георгиевич,  
Усманов Артем Радиевич, Яминский  
Игорь Владимирович (RU), Корчев  
Юрий Евгеньевич (GB)

(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к чувствительному нанoeлектроду многократного применения для селективного определения  $Cu(II)$ . Предложенный нанoeлектрод обеспечивает количественное определение с высоким разрешением немеченных ионов меди внутри или вблизи микрообъектов, таких как живые клетки ткани.



201891540  
A1

201891540  
A1

# **НАНОЭЛЕКТРОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ CU (II) И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЭЛЕКТРОДА**

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

5 Настоящее изобретение в целом относится к устройствам и способам определения ионов металлов. В частности, изобретение относится к нанозлектроду для определения ионов Cu (II), способу его получения и применения для определения ионов меди в образце, а также к системе, содержащей нанозлектрод.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

10

Медь является важным для жизни элементом, однако изменения в ее клеточном гомеостазе могут привести к серьезным нейродегенеративным заболеваниям, включая болезни Менкеса и Вильсона, наследственный амиотрофический боковой склероз, болезнь Альцгеймера и прионные заболевания. Кроме того, высказано предположение о том, что  
15 изменение концентрации меди в клетках также имеет отношение к развитию рака. Поэтому важно разработать устройства и способы для точного контроля концентрации меди в клетках.

Электрохимические способы могут быть более подходящими по сравнению с другими  
20 способами определения ионов меди благодаря повышенной надежности, чувствительности, быстрому отклику и возможности объединения с другими компонентами устройства. В документе US3821100 раскрыт один из первых электрохимических способов определения ионов меди с использованием ионоселективного сенсора для определения меди. В документе CN103941185 раскрыта  
25 система для определения концентрации паров меди на основе сенсора с микрометрической шкалой. В документе CN103940882 раскрыт сенсор для определения следовых количеств ионов меди в образце воды и способ его получения. В документе CN103913502 раскрыт способ быстрого определения меди на основе квадратно-волновой вольтамперометрии и трехэлектродного сенсора. В документе CN102507698 раскрыт новый сенсор для  
30 одновременного определения ионов меди и ионов свинца.

Однако существующие устройства для определения ионов меди имеют макро- или микроразмер и не подходят для локального и внутриклеточного определения. Размеры указанных устройств, как правило, слишком велики для измерения в обычных клетках млекопитающих (5 - 10 мкм), и способы нередко ограничены измерениями в ооцитах и эмбрионах, размер которых по меньшей мере в десять раз больше.

Миниатюризация существующих устройств для определения ионов  $\text{Cu (II)}$  представляет собой сложную техническую задачу. Трудно создать недорогой наноразмерный электрод для определения  $\text{Cu (II)}$ , обладающий высокой чувствительностью к ионам  $\text{Cu (II)}$ , в частности, из-за того, что измерение сигналов низкой интенсивности представляет собой серьезную проблему. Кроме того, поверхность контакта между клеткой и электродом должна быть изолирована от окружающей среды.

Соответственно, существует постоянная потребность в недорогих аналитических инструментах для измерения концентрации ионов меди с наноразмерным разрешением, например, внутри одной клетки. В частности, существует постоянная потребность в обеспечении высокоселективных и высокочувствительных электродов для определения ионов  $\text{Cu (II)}$ , которые имеют наноразмерное пространственное разрешение. Настоящее изобретение решает указанные и другие задачи, как подробнее описано ниже.

20

## КРАТНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Некоторые варианты реализации, раскрытые в данном описании, относятся к наноэлектроду для определения ионов  $\text{Cu (II)}$ , содержащему:

25

нано pipетку, имеющую кончик, имеющий отверстие;  
углеродную пробку, которая занимает по меньшей мере часть внутреннего пространства кончика и имеет первую поверхность, которая обращена к отверстию;  
металлическое покрытие, покрывающее по меньшей мере часть первой поверхности; и

30

по меньшей мере одно хелатирующее ионы  $\text{Cu (II)}$  соединение, связанное с металлическим покрытием.

В некоторых вариантах реализации металл в металлическом покрытии выбран из золота, серебра, платины и их сплавов. В некоторых вариантах реализации хелатирующее ионы Cu (II) соединение содержит в своей структуре тиольную группу. В некоторых вариантах реализации хелатирующее ионы Cu (II) соединение выбирают из природных пептидов; 5 неканонических пептидов; азот-, кислород-, серосодержащих гетероциклических соединений; азот-, кислород-, серосодержащих краун-эфиров. В некоторых вариантах реализации диаметр отверстия составляет от 1 до 1000 нм, от 5 до 100 нм, от 10 до 70 нм или от 20 до 50 нм. В некоторых вариантах реализации наружный диаметр края кончика составляет от 10 до 10000 нм, от 100 до 800 нм или от 200 до 500 нм. В некоторых 10 вариантах реализации по меньшей мере часть первой поверхности является вогнутой и образует полость.

В некоторых вариантах реализации нанoeлектрод дополнительно содержит внутренний электрод, расположенный в контакте со второй поверхностью углеродной пробки, при этом вторая поверхность обращена внутрь нанопипетки.

15

Некоторые варианты реализации, раскрытые в настоящем описании, относятся к способу получения нанoeлектрода для определения ионов Cu (II), включающему стадии:

- (а) обеспечения нанопипетки, имеющей кончик, имеющий отверстие;
- (б) по меньшей мере частичного заполнения внутреннего пространства кончика углеродом для формирования углеродной пробки, первая 20 поверхность которой обращена к отверстию;
- (в) по меньшей мере частичного покрытия первой поверхности металлом с получением металлического покрытия; и
- (г) приведения в контакт металлического покрытия с по меньшей мере 25 одним хелатирующим медь соединением для связывания хелатирующего медь соединения с металлическим покрытием.

В некоторых вариантах реализации способ после стадии (б) и до стадии (в) дополнительно включает стадию:

- (д) формирования полости на первой поверхности.
- 30 В некоторых вариантах реализации полость формируют путем электрохимической обработки, в частности, электрохимическим травлением. В некоторых вариантах реализации на первую поверхность наносят металл способом электрохимического

осаждения. В некоторых вариантах реализации металл выбирают из группы, включающей золото, серебро, платину и их сплавы. В некоторых вариантах реализации хелатирующее ионы Cu (II) соединение содержит в своей структуре тиольную группу. В некоторых вариантах реализации хелатирующее ионы Cu (II) соединение выбрано из природных пептидов; неканонических пептидов; азот-, кислород-, серосодержащих гетероциклических соединений; азот-, кислород-, серосодержащих краун-эфиров. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает стадию

(е) установки электрода в контакте со второй поверхностью углеродной пробки, при этом вторая поверхность обращена внутрь нанопипетки.

10

Некоторые варианты реализации, раскрытые в настоящем описании, относятся к системе для определения ионов Cu (II) в образце, при этом система содержит нанoeлектрод, раскрытый в настоящем описании в качестве рабочего электрода. В некоторых вариантах реализации система дополнительно содержит противоэлектрод, электрод сравнения, источник напряжения на указанные рабочий электрод и противоэлектрод и измеритель тока для измерения тока между указанными рабочим электродом и противоэлектродом. В некоторых вариантах реализации противоэлектрод представляет собой электрод из платиновой проволоки, а электрод сравнения представляет собой Ag/AgCl электрод. В некоторых вариантах реализации нанoeлектрод, противоэлектрод, электрод сравнения, источник напряжения и измеритель тока соединены электрически.

20

Некоторые варианты реализации, раскрытые в настоящем описании, относятся к способу определения ионов Cu (II) в образце, включающему стадии:

(а) приведения в контакт образца с набором электродов, содержащим нанoeлектрод, раскрытый в настоящем описании в качестве рабочего электрода;

25

(б) определения отклика рабочего электрода на вольтамперограмме путем изменения потенциала, прикладываемого к нанoeлектроду;

30

(в) измерения высоты пика вольтамперограммы, соответствующей восстановлению ионов Cu (II) до ионов Cu (I) на рабочем электроде для определения концентрации ионов Cu (II).

В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает стадии:

получения калибровочных кривых для высоты пиков вольтамперограммы для известных концентраций ионов Cu (II); и

сравнения измеренной высоты пиков вольтамперограммы образца с калибровочной кривой для определения концентрации ионов Cu (II) в образце.

5 В некоторых вариантах реализации набор электродов дополнительно содержит противэлектрод, электрод сравнения, источник напряжения на указанные рабочий электрод и противэлектрод и измеритель тока для измерения тока между указанными рабочим электродом и противэлектродом. В некоторых вариантах реализации противэлектрод представляет собой электрод из платиновой проволоки, а электрод  
10 сравнения представляет собой Ag/AgCl электрод. В некоторых вариантах реализации вольтамперограмма выбрана из группы, состоящей из циклической вольтамперограммы, квадратно-волновой вольтамперограммы и квадратно-волновой адсорбционной инверсионной вольтамперограммы. В некоторых вариантах реализации при переходе Cu (II) в Cu (I) наблюдаются характеристические пики при потенциалах восстановления в  
15 диапазоне от +200,0 мВ до +700 мВ, в частности, от +400,0 мВ до +600 мВ. В некоторых вариантах реализации прикладываемый потенциал изменяют в диапазоне, который включает потенциал, при котором происходит переход Cu (II) в Cu (I), в частности, в диапазоне от -500 мВ до 800 мВ. В некоторых вариантах реализации изменение потенциала, прикладываемого к нанoelectроду, включает приложение отрицательного  
20 потенциала накопления. В некоторых вариантах реализации потенциал накопления составляет от -500 мВ до +0,0 мВ, в частности, от -500 мВ до -100,0 мВ. В некоторых вариантах реализации отрицательный потенциал накопления прикладывают в течение по меньшей мере 10 мс, по меньшей мере 30 мс или по меньшей мере 50 мс. В некоторых вариантах реализации изменение потенциала, прикладываемого к нанoelectроду,  
25 включает приложение положительного потенциала при скорости сканирования от 8 В/с до  $2 \cdot 10^3$  В/с. В некоторых вариантах реализации чувствительность определения концентрации ионов Cu (II) возрастает со скоростью сканирования и/или значением (более отрицательным) потенциала накопления и/или продолжительностью приложения потенциала накопления.

30

Предложенный нанoelectрод можно применять для локального определения ионов меди в жидкостях, внутри или вблизи микрообъектов различной природы и размеров, например,

клеток, бактериальных клеток, тканей и животных, липосом, микрокапель и так далее. Электрод можно применять для прокариотов и эукариотов. Подходящие микрообъекты являются достаточно мягкими, так что нанокapилляр способен в них проникнуть. Предложенный нанoeлектрод обладает высокой чувствительностью и селективностью к ионам меди.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 представлена вольт-амперная характеристика углеродного нанoeлектрода, полученного путем пиролитического осаждения углерода внутри вытянутой нанопипетки. Характеристику регистрировали в растворе 1 мМ ферроцена в метаноле (FeMeOH).

На Фигуре 2 представлена вольт-амперная характеристика, полученная в процессе травления углеродного нанoeлектрода в растворе 0,1 М NaOH, 10 мМ KCl в течение 40 циклов по 10 секунд каждый для формирования полости на поверхности нанoeлектрода. Кривая для каждого последующего цикла находится выше кривой для предыдущего цикла.

На Фигуре 3 представлена вольт-амперная характеристика углеродного нанoeлектрода после вытравливания полости. Характеристику регистрировали в растворе 1 мМ FeMeOH.

На Фигуре 4 представлена вольт-амперная характеристика, полученная в процессе осаждения золота на углеродном нанoeлектроде в растворе 10 мМ  $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Кривая для каждого последующего цикла находится ниже кривой для предыдущего цикла.

На Фигуре 5 представлена вольт-амперная характеристика нанoeлектрода после осаждения на его поверхности слоя золота. Характеристику регистрировали в растворе 1 мМ FeMeOH.

На Фигуре 6 представлена вольт-амперная характеристика нанoeлектрода после осаждения на его поверхности слоя золота и до осаждения хелатирующего медь соединения. Характеристику регистрировали при различных концентрациях ионов меди в растворе PBS (забуференный фосфатом солевой раствор, pH которого составляет 7,4, полученный из 7,2

мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 150 мМ NaCl). Круги - PBS, квадраты -  $3 \cdot 10^{-7}$  М медь, треугольники -  $10^{-6}$  М медь.

На Фигуре 7 представлена вольт-амперная характеристика варианта предложенного медного нанозэлектрода, полученная при различных концентрациях ионов меди в растворе PBS (забуференный фосфатом солевой раствор, рН которого составляет 7,4, полученный из 7,2 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 150 мМ NaCl). Круги - PBS, квадраты -  $3 \cdot 10^{-7}$  М медь, треугольники -  $10^{-6}$  М медь.

## 10 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложенный медный нанозэлектрод содержит нанопипетку с кончиком. Термин «нанопипетка» означает трубку или капилляр с узким кончиком на одном конце. Кончик имеет отверстие с внутренним диаметром в наноразмерном диапазоне, например, от 1 до 1000 нм, от 5 до 100 нм, от 10 до 70 нм или от 20 до 50 нм. Наружный диаметр кончика регулируют таким образом, чтобы он не превышал размер микроскопического объекта и составлял, например, от 10 до 10000 нм, от 100 до 800 нм или от 200 до 500 нм. Внутренний и наружный диаметры кончика зависят от планируемого применения и регулируются известным способом в зависимости от параметров процесса изготовления. Другой конец нанопипетки имеет размер, позволяющий вводить провод внутрь нанозэлектрода. Оборудование и способы изготовления нанопипеток известны, см., например, Actis, P. et al.//Biosensors and Bioelectronics 26, pp. 333 - 337. В некоторых вариантах реализации нанопипетки могут быть изготовлены путем лазерного вытягивания капиллярных трубок.

25 Длина кончика нанопипетки может быть различной в зависимости от применения. Длина в диапазоне от 5 до 100 микрометров (мкм) целесообразна для применения с микрообъектами, такими как клетки млекопитающих. Нанопипетка может быть изготовлена из любого подходящего непроводящего материала, имеющего высокую температуру плавления, например, кварца, стекла, боросиликата.

30

Нанопипетка может иметь два или более параллельных канала. Каналы могут быть расположены радиально или концентрически. Указанные нанопипетки могут быть

изготовлены из многоканальных капиллярных трубок, которые являются коммерчески доступными. Многоканальные нанопипетки позволяют использовать различные хелатирующие медь соединения в разных каналах или комбинировать наноэлектрод для определения меди с другими аналитическими микроустройствами.

5

Нанопипетка имеет углеродную пробку, занимающую по меньшей мере часть внутреннего пространства кончика. Термин «углеродная пробка» в настоящем описании означает кусок углеродсодержащего материала, который полностью заполняет или блокирует внутреннее пространство кончика в поперечном направлении и по меньшей мере частично занимает  
10 внутреннее пространство кончика в продольном направлении (направление, параллельное оси нанопипетки).

Часть поверхности углеродной пробки находится в контакте со стенками нанопипетки. Другая часть поверхности обращена к отверстию. На данную часть поверхности  
15 ссылаются как на «первую поверхность» углеродной пробки. Еще одна часть поверхности обращена внутрь нанопипетки, то есть к более широкой части нанопипетки, противоположной кончику. На данную часть поверхности ссылаются как на «вторую поверхность» углеродной пробки.

20 Способы и устройства для заполнения нанопипетки углеродом известны в данной области техники. Например является способ пиролитического разложения углеводов, описанный в Takahashi Y. et al. *Angewandte Chemie* 50, pp. 9638 – 9642.

В некоторых вариантах реализации внешняя поверхность углеродной пробки является  
25 плоской и находится на одном уровне с краем кончика.

В других вариантах реализации по меньшей мере часть наружной поверхности углеродной пробки является вогнутой, то есть имеет углубление. Указанная конфигурация также упоминается как «нанополость». Нанополость обеспечивает лучшую адгезию слоя металла  
30 к углеродной пробке.

Способы и устройства для создания полостей в углеродных телах известны в данной области техники. Напримером является способ электрохимического травления, описанный в Clausmeyer J. et al.//*Electrochemistry Communications* 40, pp. 28 – 30.

5 По меньшей мере на часть первой поверхности углеродной пробки нанесено металлическое покрытие. Металл способен образовывать связь с хелатирующим медь соединением, в частности, ковалентную связь. Примерами таких металлов являются золото, серебро и платина. Термин «металлическое покрытие» также включает сплавы металлов. Осаждение металла на поверхности углерода может быть выполнено, например,  
10 электрохимическим способом из подходящих солей или кислот. Осаждение металла в полости обеспечивает более сильное связывание хелатирующего медь соединения с наноэлектродом.

Наноэлектрод содержит по меньшей мере одно хелатирующее медь соединение, связанное  
15 с металлическим покрытием. Молекулы хелатирующего медь соединения действуют как специфические коллекторы ионов меди и повышают чувствительность и селективность наноэлектрода к ионам меди.

Хелатирующее медь соединение обратимо и селективно связывает ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , тем самым  
20 увеличивая локальную концентрацию ионов поблизости от наноэлектрода. При приложении положительного потенциала на наноэлектрод ионы  $\text{Cu}^{2+}$  восстанавливаются до ионов  $\text{Cu}^+$  и высвобождаются от наноэлектрода.

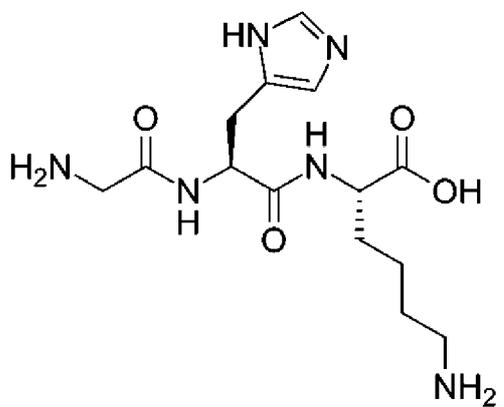
Другой характеристикой подходящего хелатирующего медь соединения является его  
25 способность связываться с металлическим покрытием.

В некоторых вариантах реализации указанная способность обеспечивается присутствием тиольной группы в структуре хелатирующего медь соединения. Тиольная группа способна образовывать прочную ковалентную связь с металлическим покрытием. Связывание  
30 дополнительно усиливается, когда металл покрытия представляет собой золото, поскольку связь сера-золото обладает особенно высокой энергией связи (44 ккал/моль).

В одном из конкретных вариантов реализации структура хелатирующего медь соединения включает пептиды, способные координировать ионы меди. Указанные пептиды могут быть выделены из природных источников или синтезированы химически.

- 5 В конкретном варианте реализации пептиды, способные координировать ионы меди, содержат в своей структуре фрагменты пептида гистидина.

Конкретным примером такого пептида является пептид глицил-L-гистидил-L-лизин (ГНК), структура которого указана ниже



10

Поскольку пептид содержит три аминокислоты, его называют трипептидом. Трипептид ГНК имеет сильное сродство к меди (II) и впервые был выделен из плазмы человека.

15 Синтез пептидов, предназначенных для применения в нанoeлектроде, может быть выполнен классическим способом синтеза пептидов, в частности, путем жидкофазного синтеза или твердофазного синтеза пептидов.

20 В другом варианте реализации пептид, способный координировать ионы меди, модифицируют путем введения линкерного пептида для усиления связывания соединения с поверхностью металлического покрытия.

В конкретном варианте реализации линкерный пептид содержит по меньшей мере одну серосодержащую группу.

Примером линкерного пептида, содержащего серосодержащую группу, является липоевая кислота. Введение липоевой кислоты в пептид, способный координировать ионы меди, обеспечивает сильное связывание с поверхностью металла и при этом не влияет на координационные свойства пептида.

5

Неограничивающий список хелатирующих медь агентов, которые могут быть использованы в нанoeлектроде в соответствии с настоящим изобретением, включают природные пептиды, неканонические пептиды, азот-, кислород-, серосодержащие гетероциклические соединения, азот-, кислород-, серосодержащие краун-эфиры.

10

Нанoeлектрод можно использовать в качестве рабочего электрода в системе для определения ионов  $\text{Cu (II)}$  в образце. Система может содержать противоэлектрод, электрод сравнения, источник напряжения на указанные рабочий электрод и противоэлектрод и измеритель тока для измерения тока между указанными рабочим электродом и  
15 противоэлектродом, при этом нанoeлектрод, противоэлектрод, электрод сравнения, источник напряжения и измеритель тока электрически соединены друг с другом. Применение предложенного нанoeлектрода, однако, не ограничено описанной выше конкретной системой. Возможны другие конфигурации электродов и измерительных и управляющих устройств, как хорошо известно специалистам в данной области техники.

20

Для проведения измерений металлическая проволока или другой проводник могут быть подключены ко второй поверхности углеродной пробки нанoeлектрода. Проволока используется для приложения электрического потенциала на нанoeлектрод во время измерения и для электрического подключения нанoeлектрода к другим компонентам  
25 измерительной установки.

Предложенный нанoeлектрод можно применять для локального определения ионов меди в жидкостях, внутри или вблизи микрообъектов различной природы и размеров, например, клеток, бактериальных клеток, тканей и животных, липосом, микрокапель и так далее.  
30 Электрод можно применять для прокариотов и эукариотов. Подходящие микрообъекты являются достаточно мягкими, так что нанокapилляр способен проникнуть в них с целью

определения ионов меди. Предложенный нанoeлектрод обладает высокой чувствительностью и селективностью по отношению к ионам Cu (II).

Навигация нанoeлектрода в микрообъекте или вблизи него может осуществляться механически «вручную» под управлением соответствующих оптических систем. Также можно осуществлять навигацию нанoeлектрода в микрообъекте с помощью автоматизированных инструментов. Например, для определения положения объекта можно использовать сканирующий ион-проводящий микроскоп, а затем можно использовать систему позиционирования для трехмерного позиционирования контролируемой навигации нанoeлектрода в микрообъектах или вблизи них.

Предложенный нанoeлектрод можно использовать в электроаналитическом способе определения ионов Cu (II) в образце, основанном на вольтамперометрическом анализе. Для всех вольтамперометрических способов общим является то, что они включают приложение потенциала (E) на рабочий электрод и контроль результирующего тока (I), протекающего через электрохимическую ячейку. Во многих случаях изменяют прикладываемый потенциал или контролируют ток в течение периода времени (t) как функцию приложенного потенциала (E). Таким образом, все вольтамперометрические способы могут быть описаны как некоторая функция E, I и t. Электрохимическая ячейка, в которой проводится вольтамперометрический анализ, состоит из рабочего (индикаторного) электрода, электрода сравнения и, как правило, противоэлектрода (вспомогательного электрода). Восстановление или окисление вещества на поверхности рабочего электрода при соответствующем потенциале приводит к массовому переносу нового материала на поверхность электрода и генерированию тока (I).

Согласно способу определения ионов Cu (II) в соответствии с настоящим изобретением для выполнения вольтамперометрических измерений используют циклическую вольтамперометрию, при этом потенциал от начального потенциала (E1) до конечного потенциала (E2) изменяется во времени на протяжении полного цикла. Циклическая вольтамперометрия основана на изменении приложенного на рабочий электрод потенциала как в прямом, так и в обратном направлениях (при некоторой частоте сканирования) при осуществлении контроля тока.

Как правило, результирующая вольтамперограмма отображает один или несколько пиков, каждый из которых соответствует конкретному электрохимическому превращению, происходящему на рабочем электроде. В способе в соответствии с настоящим изобретением электрохимическое превращение представляет собой переход  $\text{Cu (II)}$  в  $\text{Cu (I)}$ , для которого характерны пики при восстановительных потенциалах в диапазоне от +200,0 мВ до +700 мВ, в частности, от +400,0 мВ до +600 мВ. Высота пика прямо пропорциональна концентрации электроактивных частиц, ионов  $\text{Cu (II)}$ . Поэтому в результате получения соответствующей калибровочной кривой можно измерить концентрацию  $\text{Cu (II)}$  в образце.

Для электрохимических измерений можно использовать стандартные электронные схемы и устройства, которые включают управляемый усилитель и чувствительный индикатор напряжения и тока. Схемы могут содержать любое чувствительное устройство для определения изменений тока порядка 1 - 10 пикоампер на основе базового тока 10 - 1000 пикоампер. Такие электронные схемы и устройства имеют быстрое время отклика, относительно независимы от температуры или позволяют компенсировать изменения температуры. Устройство имеет вход в цепь, в которую прикладывается известное напряжение. Известны чувствительные схемы определения, в том числе усилители с фиксированным напряжением и трансимпедансные усилители. Выходной ток зависит от изменений входного напряжения, и могут быть определены небольшие изменения тока.

Предложенный способ определения ионов  $\text{Cu (II)}$  включает стадию приведения в контакт образца с набором электродов, содержащим предложенный наноэлектрод в качестве рабочего электрода. Противозлектрод и электрод сравнения могут быть расположены вне образца, однако находятся в электрическом контакте с рабочим электродом, например, через раствор электролита. Затем записывают вольтамперограмму путем изменения потенциала, прикладываемого к наноэлектроду. Измеряют высоту пика, соответствующего переходу  $\text{Cu (II)}$  в  $\text{Cu (I)}$ , и сравнивают с калибровочной кривой для определения концентрации ионов  $\text{Cu (II)}$  в образце.

В некоторых вариантах реализации во время записи вольтамперограммы на рабочий электрод прикладывают возрастающий положительный потенциал. Потенциал изменяют в диапазоне, включающем потенциал, при котором происходит переход Cu (II) в Cu (I).

- 5 В некоторых вариантах реализации положительный потенциал прикладывают при скорости сканирования в диапазоне от 8 В/с до  $2 \cdot 10^3$  В/с. Такое быстрое приложение положительного потенциала обеспечивает одновременное восстановление всех ионов меди, собранных на электроде, и, в результате, сильный ток, который увеличивает чувствительность измерения.

10

При медленном скачке напряжения ток, обусловленный переходом ионов меди, распределяется во времени, что может привести к плохому отклику электрохимического сигнала.

- 15 В некоторых вариантах реализации отрицательный потенциал накопления прикладывают на рабочий электрод до приложения положительного потенциала. Отрицательный потенциал накопления увеличивает сбор ионов меди на электроде посредством миграции, тем самым дополнительно увеличивая их локальную концентрацию. Применение положительного потенциала после применения потенциала накопления обеспечивает еще
- 20 более сильные токи и лучшую чувствительность.

В некоторых вариантах реализации потенциал накопления составляет от -500 мВ до +0,0 мВ, в частности, от -500 мВ до -100,0 мВ.

- 25 В некоторых вариантах реализации отрицательный потенциал накопления прикладывают в течение по меньшей мере 10 мс, по меньшей мере 30 мс или по меньшей мере 50 мс.

Скорость, при которой прикладывают потенциал накопления, не имеет особого значения. Скорость можно установить на некотором значении и поддерживать в течение

- 30 определенного периода времени.

Чувствительность определения концентрации ионов  $\text{Cu}(\text{II})$  возрастает с увеличением значения скорости сканирования и/или значения (более отрицательного) потенциала накопления и/или продолжительности приложения потенциала накопления.

- 5 В некоторых вариантах реализации потенциал во время записи вольтамперограммы изменяют в диапазоне от -500 мВ до 800 мВ.

#### ПРИМЕР

Несколько нанопипеток получили с использованием лазерного пуллера P-2000 (Sutter  
10 Instrument) из кварцевых капилляров с наружным диаметром 1,2 мм и внутренним диаметром 0,90 мм (Q120-90-7,5, Intracel). Для изготовления использовали следующие параметры: Heat 790, Filament 3, Velocity 45, Delay 130 и Pull 90.

Каждую нанопипетку заполняли газообразным бутаном через трубку Tygon. Кварцевую  
15 трубку, соединенную с аргоновым резервуаром для обеспечения постоянного потока аргона, разрезали, чтобы покрыть кончик нанопипетки. Затем кончик нанопипетки нагревали с помощью бутановой горелки, чтобы вызвать пиролизическое разложение газообразного бутана с образованием в результате углеродной пробки внутри кончика нанопипетки.

20

После осаждения углерода внутреннюю поверхность углеродной пробки приводили в  
контакт с проволокой  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ , формируя таким образом рабочий электрод. Рабочий  
электрод и другой электрод  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ , действующий в качестве вспомогательного  
электрода/электрода сравнения, погружали в 2 мл 1 мМ раствора  $\text{FeMeOH}$  в PBS  
25 (забуференный фосфатом солевой раствор, pH которого составляет 7,4, полученный из 7,2  
мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,8 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 150 мМ  $\text{NaCl}$ ). Оба электрода подключали к усилителю  
Axopatch 700B с цифровым преобразователем DigiData 1322A (Molecular Devices) и ПК с  
программным обеспечением pClamp 10 (Molecular Devices).

30 Потенциал рабочего электрода линейно изменяли циклически. Продолжительность одного  
цикла составляла 10 секунд. На Фигуре 1 представлена полученная вольт-амперная  
характеристика рабочего электрода. Величина плато при положительном потенциале

указывает на установившийся ток, при этом кажущийся радиус углеродной пробки составляет примерно 20 нм (подробности методики расчета см. в Actis P. et al.//*ACS Nano* 8, pp. 875 - 884).

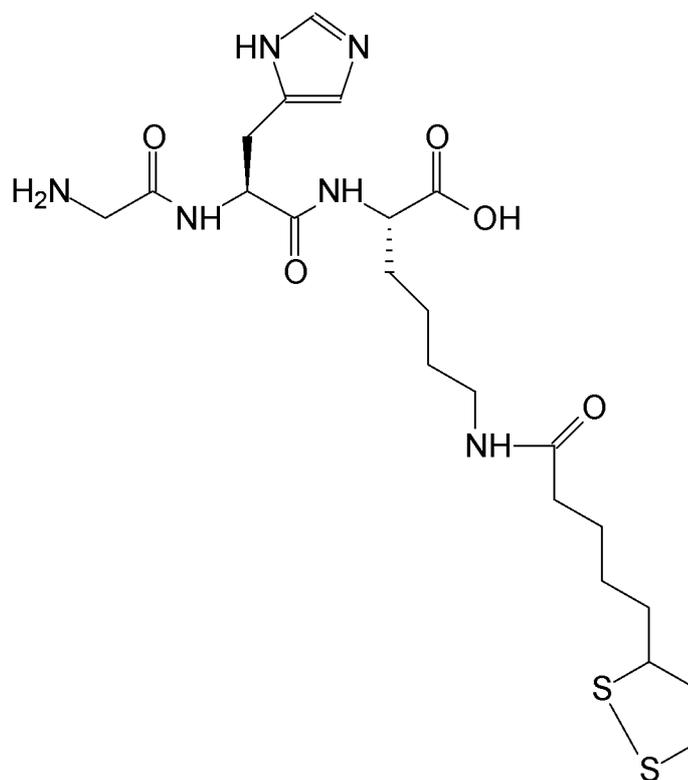
5 После осаждения углерода вытравливали полость в углеродной пробке путем погружения электрода в раствор 0,1 М NaOH, 10 мМ KCl и применения 40 циклов положительного напряжения до 2,1 мВ в течение 10 секунд каждый. На Фигуре 2 представлена вольт-амперная характеристика в процессе травления углеродной пробки. На Фигуре 3 представлена вольт-амперная характеристика нанoeлектрода с полостью. После травления  
10 ток уменьшался в положительной части потенциала и увеличивался в отрицательной части потенциала, свидетельствуя об изменении формы нанoeлектрода с диска на трубку.

На следующей стадии пленку из золота электрохимически осаждали на поверхности углеродного нанoeлектрода путем погружения нанoeлектрода в 10 мМ раствор  $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  и приложения напряжения. На Фигуре 4 представлена вольт-амперная характеристика  
15 процесса осаждения. Первоначальное осаждение золота происходило в полости, на что указывает медленное изменение тока, поскольку область взаимодействия поверхности золота с раствором остается неизменной. Затем началось увеличение лавинного тока, которое свидетельствует о том, что полость полностью заполнена, и золото осаждается вне  
20 полости. На этой стадии электрохимическое осаждение остановили, чтобы предотвратить образование электрода микроразмера.

На Фигуре 5 представлена вольт-амперная характеристика нанoeлектрода после осаждения золота. Как видно, ток при положительных потенциалах значительно увеличился, что  
25 свидетельствует о существенном увеличении размера электрода из-за осаждения твердого золота в протравленной полости. Данный вывод подтверждается также увеличением тока кислорода при отрицательных потенциалах.

На Фигуре 6 представлена вольт-амперная характеристика нанoeлектрода после осаждения  
30 золота, зарегистрированная при различных концентрациях ионов меди в PBS. Режим приложения напряжения был таким же, как на Фигуре 7, как описано ниже.

На следующей стадии хелатирующее медь соединение иммобилизовали на поверхности золота, поместив нанoeлектрод, полученный на предыдущей стадии, в раствор  $10^{-3}$  М пептида глицил-L-гистидил-L-лизин в этаноле на одну ночь. Структурная формула пептида глицил-L-гистидил-L-лизин представлена ниже.



5

На Фигуре 7 представлены вольтамперограммы полученного нанoeлектрода для определения меди, записанные при различных концентрациях ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . Каждый цикл на Фигуре 7, а также на Фигуре 6 состоял из нескольких стадий. На первой стадии медленно уменьшающийся отрицательный потенциал прикладывали к нанoeлектроду до тех пор, пока потенциал не достигал -500 мВ относительно электрода сравнения. На данной стадии хелатирующий агент меди собирал ионы  $\text{Cu}^{2+}$ . На второй стадии потенциал быстро увеличивали до 800 мВ. На второй стадии увеличение потенциала от 0 до 800 мВ, которое произошло за 4 мс (скорость сканирования 200 В/с), привело к восстановлению ионов  $\text{Cu}^{2+}$  до ионов  $\text{Cu}^+$ . Указанный переход соответствует максимуму на вольтамперограммах при примерно 500 мВ. На третьей стадии потенциал быстро уменьшали с 800 мВ до 0. Продолжительность полного цикла составляла 60 мс.

Сравнение Фигуры 7 с Фигурой 6 (нанозлектрод без хелатирующего агента меди) показывает, что нанесение хелатирующего медь соединения на поверхность металла значительно повышает чувствительность нанозлектрода по отношению к ионам  $\text{Cu}^{2+}$  при низких концентрациях.

- 5 Кроме того, на Фигуре 7 показано, что ток, связанный с восстановлением ионов меди, может быть точно измерен в присутствии других ионов в растворе, что демонстрирует селективность нанозлектрода в отношении меди.

Полученный нанозлектрод для определения меди использовали для измерения  
10 концентрации ионов меди внутри клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека). Для позиционирования нанозлектрода использовали микроманипулятор. Концентрация ионов меди была определена до и после воздействия на клетки биядерных комплексов Cu, описанных в *J. Med. Chem.* 57, pp. 6252 - 6258. Начальная концентрация ионов меди внутри клеток составляла  $6 \pm 2$  мкМ. После инкубации клеток биядерными  
15 комплексами Cu 9 мкМ концентрация внутри клеток увеличилась до  $220 \pm 30$  мкМ.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нанoeлектрод для определения ионов Cu (II), содержащий:  
нанопипетку, имеющую кончик, имеющий отверстие;  
углеродную пробку, которая занимает по меньшей мере часть внутреннего пространства кончика и имеет первую поверхность, которая обращена к отверстию;  
металлическое покрытие, покрывающее по меньшей мере часть первой поверхности;  
и  
по меньшей мере одно хелатирующее ионы Cu (II) соединение, связанное с металлическим покрытием.
2. Нанoeлектрод по п. 1, отличающийся тем, что металл выбран из золота, серебра, платины и их сплавов.
3. Нанoeлектрод по любому из пп. 1 - 2, отличающийся тем, что хелатирующее ионы Cu (II) соединение имеет в своей структуре тиольную группу.
4. Нанoeлектрод по любому из пп. 1 - 3, отличающийся тем, что хелатирующее ионы Cu (II) соединение выбрано из природных пептидов; неканонических пептидов; азот-, кислород-, серосодержащих гетероциклических соединений; азот-, кислород-, серосодержащих краун-эфиров.
5. Нанoeлектрод по любому из пп. 1 - 4, отличающийся тем, что диаметр отверстия составляет от 1 до 1000 нм, от 5 до 100 нм, от 10 до 70 нм или от 20 до 50 нм.
6. Нанoeлектрод по любому из пп. 1 - 5, отличающийся тем, что наружный диаметр кончика составляет от 10 до 10000 нм, от 100 до 800 нм или от 200 до 500 нм.
7. Нанoeлектрод по любому из пп. 1 - 6, отличающийся тем, что по меньшей мере часть первой поверхности является вогнутой и образует полость.

8. Наноэлектрод по меньшей мере по одному из пп. 1 - 7, дополнительно содержащий внутренний электрод, находящийся в контакте со второй поверхностью углеродной пробки, при этом вторая поверхность обращена внутрь нанопипетки.

9. Способ получения наноэлектрода для определения ионов  $\text{Cu (II)}$ , включающий стадии:

- (а) обеспечения нанопипетки, имеющей кончик, имеющий отверстие;
- (б) по меньшей мере частичного заполнения внутреннего пространства кончика углеродом для формирования углеродной пробки, первая поверхность которой обращена к отверстию;
- (в) по меньшей мере частичного покрытия первой поверхности металлом с получением металлического покрытия; и
- (г) приведения в контакт металлического покрытия с по меньшей мере одним хелатирующим медь соединением для связывания хелатирующего медь соединения с металлическим покрытием.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что способ после стадии (б) и до стадии (в) дополнительно включает стадию:

- (д) формирования полости на первой поверхности.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что полость создают путем электрохимической обработки, в частности, электрохимическим травлением.

12. Способ по любому из пп. 9 - 11, отличающийся тем, что первую поверхность покрывают металлом путем электрохимического осаждения.

13. Способ по любому из пп. 9 - 12, отличающийся тем, что металл выбран из золота, серебра, платины и их сплавов.

14. Способ по любому из пп. 9 - 13, отличающийся тем, что хелатирующее ионы  $\text{Cu (II)}$  соединение содержит в своей структуре тиольную группу.

15. Способ по любому из пп. 9 - 14, отличающийся тем, что хелатирующее ионы  $\text{Cu}$  (II) соединение выбрано из природных пептидов; неканонических пептидов; азот-, кислород-, серосодержащих гетероциклических соединений; азот-, кислород-, серосодержащих краун-эфиров.

16. Способ по любому из пп. 9 - 15, дополнительно включающий стадию

(е) установки электрода в контакте со второй поверхностью углеродной пробки, при этом вторая поверхность обращена внутрь нанопипетки.

17. Система для определения ионов  $\text{Cu}$  (II) в образце, содержащая наноэлектрод по любому из пп. 1 - 8 в качестве рабочего электрода.

18. Система по п. 17, дополнительно содержащая противоэлектрод, электрод сравнения, источник напряжения на указанные рабочий электрод и противоэлектрод и измеритель тока для измерения тока между указанными рабочим электродом и противоэлектродом.

19. Система по п. 18, в которой противоэлектрод представляет собой электрод из платиновой проволоки, а электрод сравнения представляет собой  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  электрод.

20. Система по любому из пп. 18 - 19, в которой наноэлектрод, противоэлектрод, электрод сравнения, источник напряжения и измеритель тока соединены электрически.

21. Способ определения ионов  $\text{Cu}$  (II) в образце, включающий стадии:

(а) приведения в контакт образца с набором электродов, содержащим наноэлектрод по любому из пп. 1 - 8 в качестве рабочего электрода;

(б) определения отклика рабочего электрода на вольтамперограмме путем изменения потенциала, прикладываемого к наноэлектроду; и

(в) измерения высоты пика вольтамперограммы, соответствующего восстановлению ионов  $\text{Cu}$  (II) до ионов  $\text{Cu}$  (I) на рабочем электроде для определения концентрации ионов  $\text{Cu}$  (II).

22. Способ по п. 21, дополнительно включающий стадии:  
составления калибровочных кривых для высоты пиков вольтамперограммы для известных концентраций ионов  $\text{Cu (II)}$ ; и  
сравнения измеренной высоты пиков вольтамперограммы образца с калибровочной кривой для определения концентрации ионов  $\text{Cu (II)}$  в образце.

23. Способ по любому из пп. 21 - 22, отличающийся тем, что указанный набор электродов дополнительно содержит противэлектрод, электрод сравнения, источник напряжения на указанные рабочий электрод и противэлектрод и измеритель тока для измерения тока между указанными рабочим электродом и противэлектродом.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что противэлектрод представляет собой электрод из платиновой проволоки, а электрод сравнения представляет собой  $\text{Ag/AgCl}$  электрод.

25. Способ по любому из пп. 21 - 24, отличающийся тем, что указанная вольтамперограмма выбрана из группы, состоящей из циклической вольтамперограммы, квадратно-волновой вольтамперограммы и квадратно-волновой адсорбционной инверсионной вольтамперограммы.

26. Способ по любому из пп. 21 - 25, отличающийся тем, что при переходе  $\text{Cu (II)}$  в  $\text{Cu (I)}$  наблюдаются характеристические пики при потенциалах восстановления в диапазоне от +200,0 мВ до +700 мВ, в частности, от +400,0 мВ до +600 мВ.

27. Способ по любому из пп. 21 - 26, отличающийся тем, что прикладываемый потенциал изменяют в диапазоне, включающем потенциал, при котором происходит переход  $\text{Cu (II)}$  в  $\text{Cu (I)}$ , в частности, в диапазоне от - 500 мВ до 800 мВ.

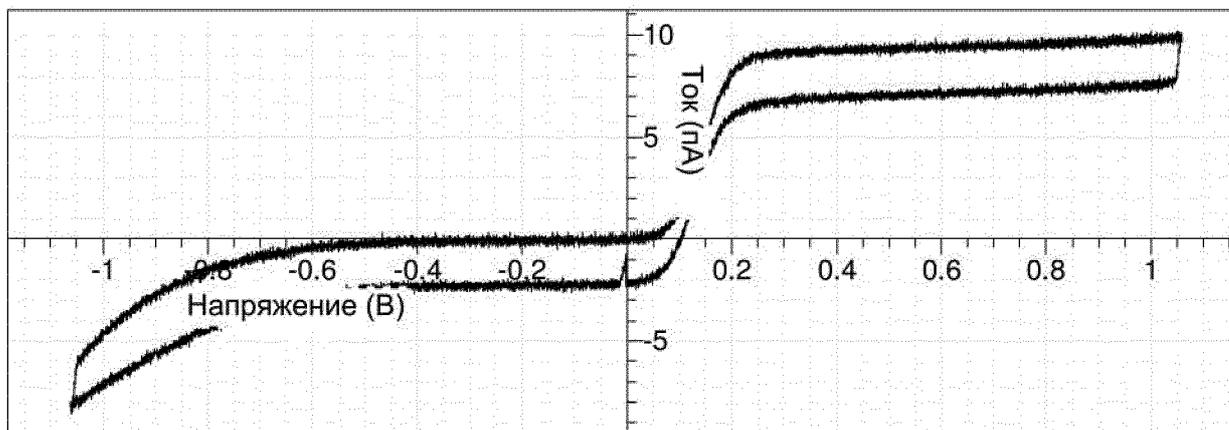
28. Способ по любому из пп. 21 - 27, отличающийся тем, что изменение потенциала, приложенного к углеродной пробке нанoeлектрода, включает приложение отрицательного потенциала накопления.

29. Способ по любому из пп. 21 - 28, отличающийся тем, что потенциал накопления составляет от -500 мВ до +0,0 мВ, в частности, от -500 мВ до -100,0 мВ.

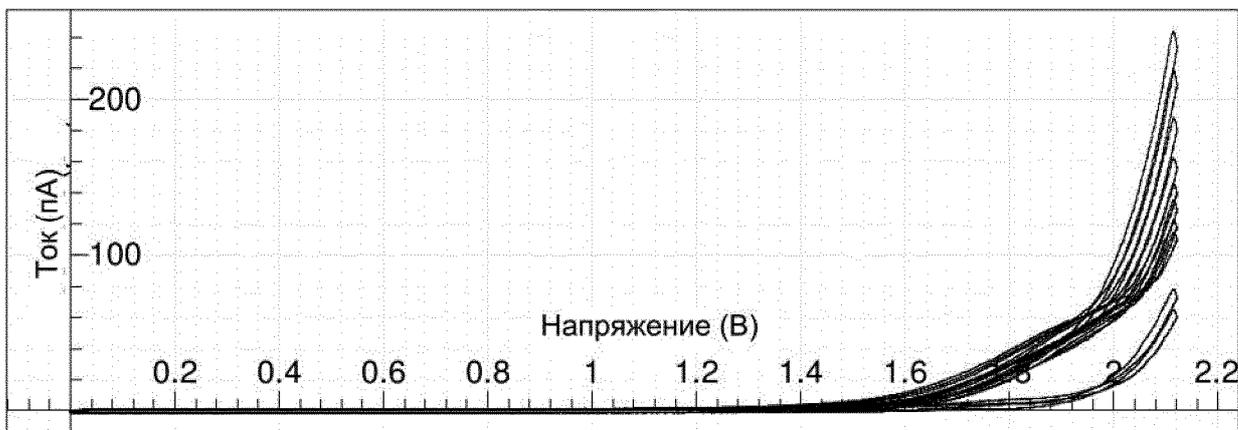
30. Способ по любому из пп. 21 - 29, отличающийся тем, что отрицательный потенциал накопления прикладывают в течение периода времени по меньшей мере 10 мс, по меньшей мере 30 мс или по меньшей мере 50 мс.

31. Способ по любому из пп. 21 - 30, отличающийся тем, что изменение потенциала, приложенного к нанoeлектроду, включает приложение положительного потенциала при скорости сканирования в диапазоне от 8 В/с до  $2 \cdot 10^3$  В/с.

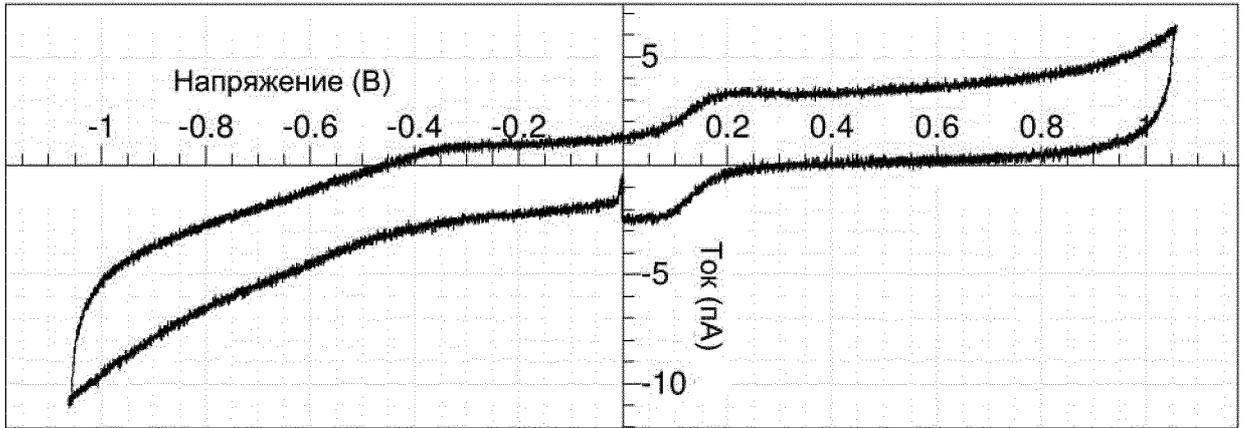
32. Способ по любому из пп. 21 - 31, отличающийся тем, что чувствительность определения концентрации ионов  $\text{Cu (II)}$  возрастает со скоростью сканирования и/или значением (более отрицательным) потенциала накопления и/или длительностью приложения потенциала накопления.



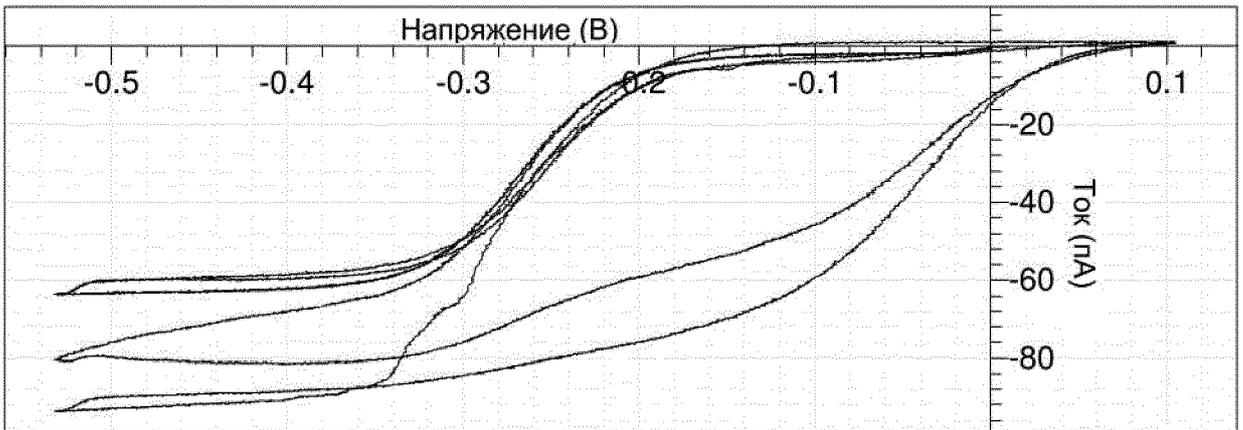
Фигура 1



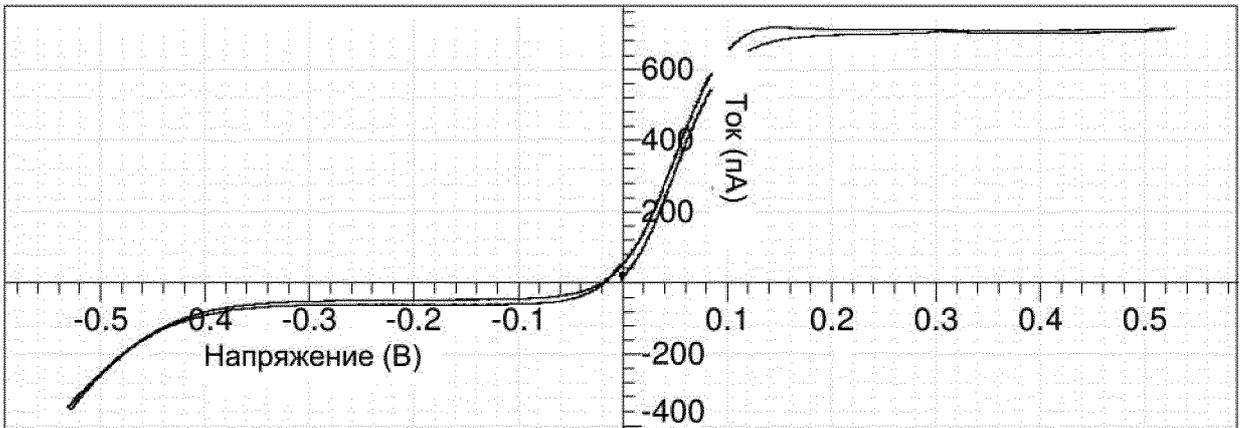
Фигура 2



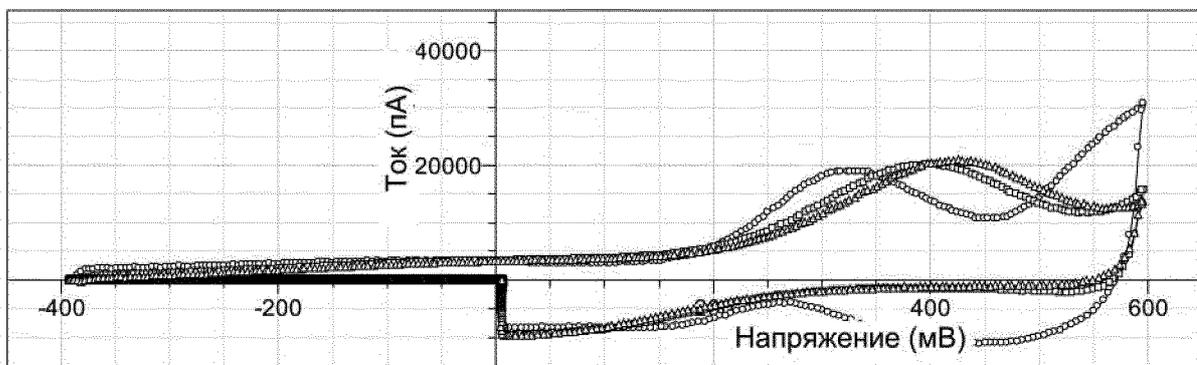
Фигура 3



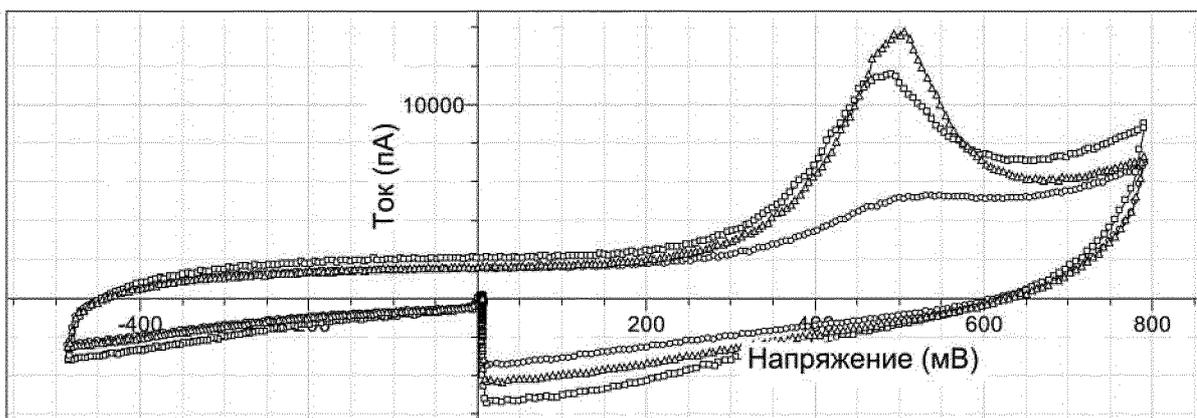
Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7