

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037290**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.04

(21) Номер заявки
201891540

(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**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/RU2015/000958**

(87) **WO 2017/116267 2017.07.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**АВТОНОМНАЯ
НЕКОММЕРЧЕСКАЯ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "СКОЛКОВСКИЙ
ИНСТИТУТ НАУКИ И
ТЕХНОЛОГИЙ" (RU)**

(56) **US-A1-20110027913
RU-C1-2399040
US-B1-6200444
WO-A1-2012104429
US-A1-20090288962**

(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 нанозлектроду многократного применения для селективного определения Cu (II). Предложенный нанозлектрод обеспечивает количественное определение с высоким разрешением немеченых ионов меди внутри или вблизи микрообъектов, таких как живые клетки ткани.

B1

037290

037290

B1

Область техники

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

Уровень техники

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 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 способами определения ионов меди благодаря повышенной надежности, чувствительности, быстрому отклику и возможности объединения с другими компонентами устройства. В документе US 3821100 раскрыт один из первых электрохимических способов определения ионов меди с использованием ионоселективного сенсора для определения меди. В документе CN 103941185 раскрыта система для определения концентрации паров меди на основе сенсора с микрометрической шкалой. В документе CN 103940882 раскрыт сенсор для определения следовых количеств ионов меди в образце воды и способ его получения. В документе CN 103913502 раскрыт способ быстрого определения меди на основе квадратно-волновой вольтамперометрии и трехэлектродного сенсора. В документе CN 102507698 раскрыт новый сенсор для одновременного определения ионов меди и ионов свинца.

Однако существующие устройства для определения ионов меди имеют макро- или микро-размер 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 Cu (II) представляет собой сложную техническую задачу. Трудно создать недорогой наноразмерный электрод для определения Cu (II), обладающий высокой чувствительностью к ионам 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 Cu (II), которые имеют наноразмерное пространственное разрешение. Настоящее изобретение решает указанные и другие задачи, как подробнее описано ниже.

Краткое описание изобретения

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

- 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;
- по меньшей мере одно хелатирующее ионы 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; 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 вариантах реализации по меньшей мере часть первой поверхности является вогнутой и образует полость.

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

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

- (а) обеспечение нанопипетки, имеющей кончик, имеющей отверстие;
- (б) по меньшей мере частичное заполнение внутреннего пространства кончика углеродом для формирования углеродной пробки, первая поверхность которой обращена к отверстию;
- (в) по меньшей мере частичное покрытие первой поверхности металлом с получением металличе-

ского покрытия;

(г) приведение в контакт металлического покрытия по меньшей мере с 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) формирование полости на первой поверхности.

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

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.

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

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

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

(в) измерение 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:

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

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

В некоторых вариантах реализации набор электродов 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 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 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 нанoeлектроду, включает приложение отрицательного 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 нанoeлектроду, 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.

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. Электрод можно применять для про-

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

На фиг. 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 с каждый для формирования полости на поверхности нанoeлектрода. Кривая для каждого последующего цикла находится выше кривой для предыдущего цикла.

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

На фиг. 4 представлена вольт-амперная характеристика, полученная в процессе осаждения золота на углеродном нанoeлектроде в растворе 10 мМ HAuCl₄·H₂O. Кривая для каждого последующего цикла находится ниже кривой для предыдущего цикла.

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

На фиг. 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 (буференный фосфатом солевой раствор, pH которого составляет 7,4, полученный из 7,2 мМ Na₂HPO₄, 2,8 мМ KH₂PO₄ и 150 мМ NaCl). Круги - PBS, квадраты - 3·10⁻⁷ М медь, треугольники - 10⁻⁶ М медь.

На фиг. 7 представлена вольт-амперная характеристика варианта предложенного медного нанoeлектрода, полученная при различных концентрациях ионов меди в растворе PBS (буференный фосфатом солевой раствор, pH которого составляет 7,4, полученный из 7,2 мМ Na₂HPO₄, 2,8 мМ KH₂PO₄ и 150 мМ NaCl). Круги - PBS, квадраты - 3·10⁻⁷ М медь, треугольники - 10⁻⁶ М медь.

Подробное описание изобретения

Предложенный медный нанoeлектрод 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 нанoeлектрода. 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.

Длина кончика нанопипетки может быть различной в зависимости от применения. Длина в диапазоне от 5 до 100 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.

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 нанoeлектрод для определения меди с другими аналитическими микроустройствами.

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 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 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.

Способы и устройства для заполнения нанопипетки углеродом известны в данной области техники. Примером является способ пиролизического разложения углеводородов, описанный в Takahashi Y. et al. *Angewandte Chemie* 50, pp. 9638 - 9642.

В некоторых вариантах реализации внешняя поверхность углеродной пробки является 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 к углеродной пробке.

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

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, электрохимическим способом из подходящих солей или кислот. Осаждение металла в полости обеспечивает более сильное связывание хелатирующего медь соединения с нанозлектродом.

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

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

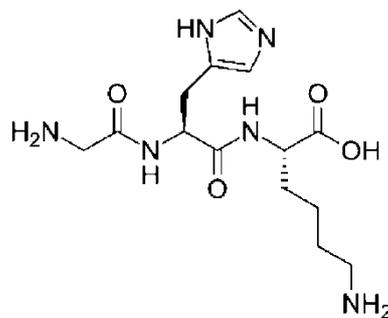
Другой характеристикой подходящего хелатирующего медь соединения является его способность связываться с металлическим покрытием.

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 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.

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 (GHK), структура которого указана ниже



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

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

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.

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

Наноэлектрод можно использовать в качестве рабочего электрода в системе для определения ионов 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 противоэлектродом, при этом наноэлектрод, противоэлектрод, электрод сравнения, источник напряжения и измеритель тока электрически соединены друг с другом. Применение предложенного наноэлектрода, однако, не ограничено описанной выше конкретной системой. Возможны другие конфигурации электродов и измерительных и управляющих устройств, как хорошо известно специалистам в данной области техники.

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

Предложенный наноэлектрод 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 нанокапилляр способен проникнуть в них с целью определения ионов меди. Предложенный наноэлектрод обладает высокой чувствительностью и селективностью по отношению к ионам Cu (II) .

Навигация наноэлектрода в микрообъекте или вблизи него может осуществляться механически "вручную" под управлением соответствующих оптических систем. Также можно осуществлять навигацию наноэлектрода 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 наноэлектрода в микрообъектах или вблизи них.

Предложенный наноэлектрод 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 (E_1) до конечного потенциала (E_2) 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 Cu (II) в 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 Cu (II) . Поэтому в результате получения соответствующей калибровочной кривой можно измерить концентрацию 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 пА на основе базового тока 10-1000 пА. 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 Cu (II) включает стадию приведения в контакт образца с набором электродов, содержащим предложенный наноэлектрод в качестве рабочего электрода. Противоэлектрод 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, соот-

ветствующего переходу Cu (II) в Cu (I), и сравнивают с калибровочной кривой для определения концентрации ионов 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).

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.

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

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 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.

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 определенного периода времени.

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

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 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 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 пиролизное разложение газообразного бутана с образованием в результате углеродной пробки внутри кончика нанопипетки.

После осаждения углерода внутреннюю поверхность углеродной пробки приводили в контакт с проволокой Ag/AgCl, формируя таким образом рабочий электрод. Рабочий электрод и другой электрод Ag/AgCl, действующий в качестве вспомогательного электрода/электрода сравнения, погружали в 2 мл 1 мМ раствора FeMeOH в PBS (забуференный фосфатом солевой раствор, pH которого составляет 7,4, полученный из 7,2 мМ Na_2HPO_4 , 2,8 мМ KH_2PO_4 и 150 мМ NaCl). Оба электрода подключали к усилителю Axopatch 700B с цифровым преобразователем DigiData 1322A (Molecular Devices) и ПК с программным обеспечением pClamp 10 (Molecular Devices).

Потенциал рабочего электрода линейно изменяли циклически. Продолжительность одного цикла составляла 10 с. На фиг. 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).

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 с каждый. На фиг. 2 представлена вольт-амперная характеристика в процессе травления углеродной пробки. На фиг. 3 представлена вольт-амперная характеристика наноэлектрода с полостью. После травления ток уменьшался в положительной части потенциала и увеличивался в отрицательной части потенциала, свидетельствуя об изменении формы наноэлектрода с диска на трубку.

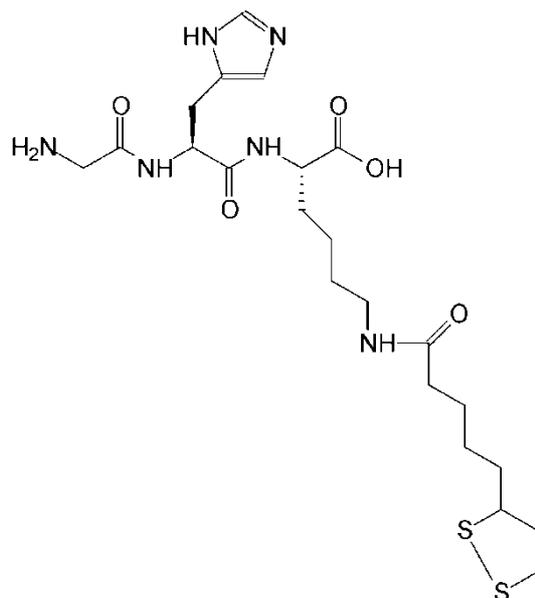
На следующей стадии пленку из золота электрохимически осаждали на поверхности углеродного наноэлектрода путем погружения наноэлектрода в 10 мМ раствор $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и приложения напряжения. На фиг. 4 представлена вольт-амперная характеристика процесса осаждения. Первоначальное 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

полости. На этой стадии электрохимическое осаждение остановили, чтобы предотвратить образование электрода микроразмера.

На фиг. 5 представлена вольт-амперная характеристика нанoeлектрода после осаждения золота. Как видно, ток при положительных потенциалах значительно увеличился, что 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 фиг. 6 представлена вольт-амперная характеристика нанoeлектрода после осаждения золота, зарегистрированная при различных концентрациях ионов меди в PBS. Режим приложения напряжения был таким же, как на фиг. 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.



На фиг. 7 представлены вольтамперограммы полученного нанoeлектрода для определения меди, записанные при различных концентрациях ионов Cu^{2+} . Каждый цикл на фиг. 7, а также на фиг. 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 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 Cu^{2+} до ионов 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 фиг. 7 с фиг. 6 (нанoeлектрод без хелатирующего агента меди) показывает, что нанесение хелатирующего медь соединения на поверхность металла значительно повышает чувствительность нанoeлектрода по отношению к ионам Cu^{2+} при низких концентрациях.

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

Полученный нанoeлектрод для определения меди использовали для измерения концентрации ионов меди внутри клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека). Для позиционирования нанoeлектрода 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 ± 2 мкМ. После инкубации клеток биядерными комплексами Cu 9 мкМ концентрация внутри клеток увеличилась до 220 ± 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, обращенную к отверстию, и вторую поверхность, обращенную внутрь нанопипетки;

металлическое покрытие, покрывающее по меньшей мере часть первой поверхности; 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. Нанoeлектрод по меньшей мере по одному из пп.1-7, дополнительно содержащий внутренний электрод, находящийся в контакте со второй поверхностью углеродной пробки.

9. Способ получения нанoeлектрода для определения ионов Cu (II) по пп.1-8, включающий стадии:

(а) обеспечение нанопипетки, имеющей кончик, имеющий отверстие;

(б) по меньшей мере частичное заполнение внутреннего пространства кончика углеродом для формирования углеродной пробки, которая имеет первую поверхность, обращенную к отверстию, и вторую поверхность, обращенную внутрь нанопипетки;

(в) по меньшей мере частичное покрытие первой поверхности металлом с получением металлического покрытия;

(г) приведение в контакт металлического покрытия по меньшей мере с одним хелатирующим медь соединением для связывания хелатирующего ионы Cu (II) соединения с металлическим покрытием.

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

(д) формирование 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 Cu (II) соединение содержит в своей структуре тиольную группу.

15. Способ по любому из пп.9-14, отличающийся тем, что хелатирующее ионы 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) установка электрода в контакте со второй поверхностью углеродной пробки.

17. Система для определения ионов Cu (II) в образце, содержащая нанoeлектрод по любому из пп.1-8 в качестве рабочего электрода.

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

19. Система по п.18, в которой противoeлектрод представляет собой электрод из платиновой проволоки, а электрод сравнения представляет собой Ag/AgCl электрод.

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

21. Способ определения ионов Cu (II) в образце, включающий стадии:

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

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

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

22. Способ по п.21, дополнительно включающий стадию:

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

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

23. Способ по любому из пп.21-22, отличающийся тем, что указанный набор электродов 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.

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что противоэлектрод представляет собой электрод из платиновой проволоки, а электрод сравнения представляет собой 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 Cu (II) в 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 Cu (II) в Cu (I), в частности, в диапазоне от - 500 мВ до 800 мВ.

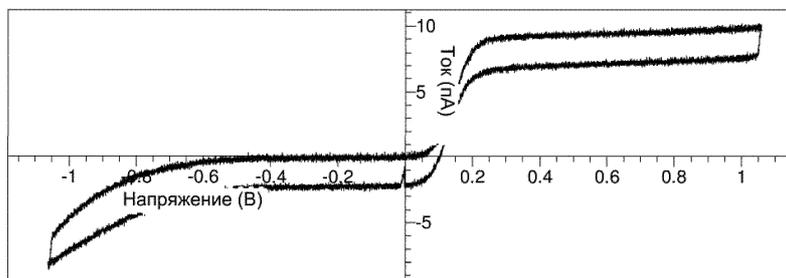
28. Способ по любому из пп.21-27, отличающийся тем, что изменение потенциала, приложенного к углеродной пробке нанoeлектрода, включает приложение отрицательного потенциала накопления.

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

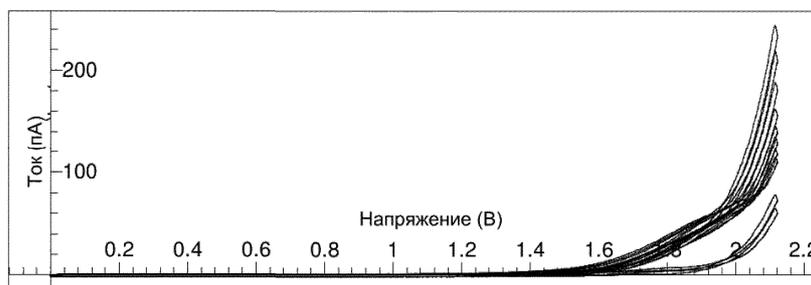
30. Способ по любому из пп.28-29, отличающийся тем, что отрицательный потенциал накопления прикладывают в течение периода времени по меньшей мере 10 мс, по меньшей мере 30 мс или по меньшей мере 50 мс.

31. Способ по любому из пп.21-27, 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.

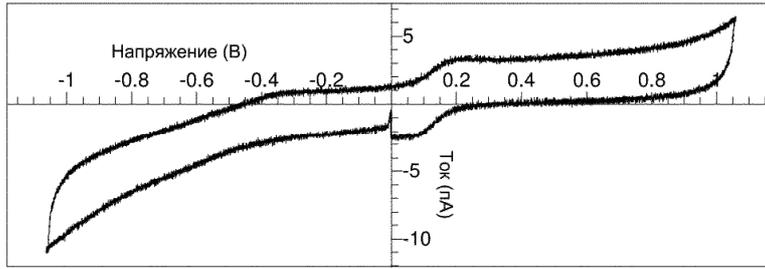
32. Способ по любому из пп.21-31, отличающийся тем, что чувствительность определения концентрации ионов Cu (II) возрастает со скоростью сканирования, и/или значением (более отрицательным) потенциала накопления, и/или длительностью приложения потенциала накопления.



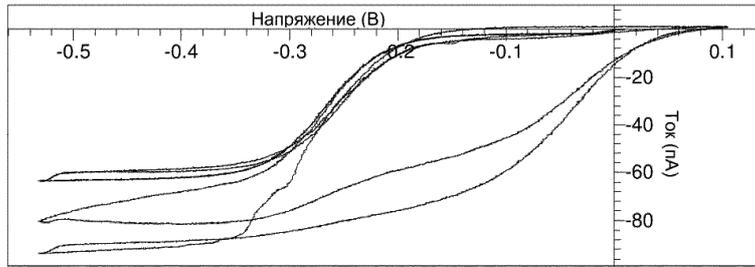
Фиг. 1



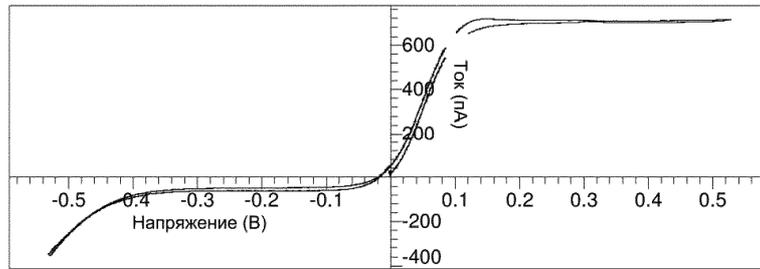
Фиг. 2



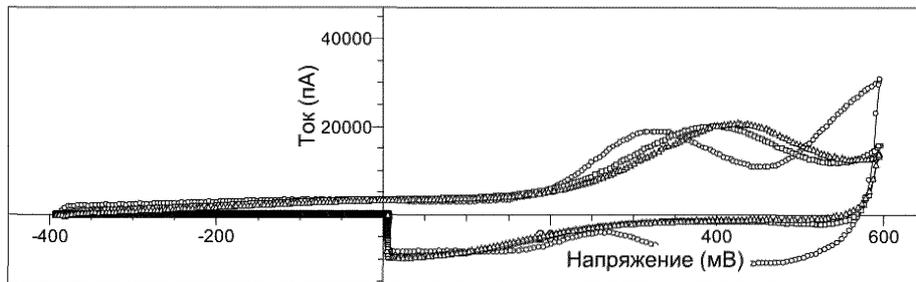
Фиг. 3



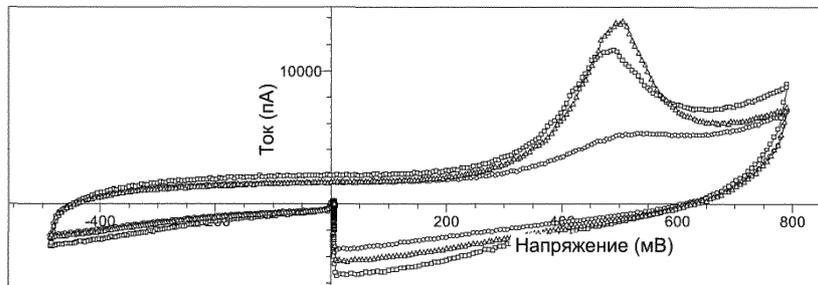
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7