**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Направление подготовки:** *Химия*

**Образовательная программа:** *Химия*

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

**Бесферментное определение гистамина в слюне на наноструктурированных электродах**

Студент 4 курса

Сухотько Сергей Сергеевич

Уровень/ступень образования

Бакалавриат

Научный руководитель:

Старший преподаватель, к.х.н.,

Наволоцкая Дарья Владимировна

Санкт-Петербург

2018

**СОДЕРЖАНИЕ**

|  |  |
| --- | --- |
| Введение | *3* |
| Обзор литературы | *4* |
| 1. Гистамин как аналит | *4* |
| 2. Слюна как объект анализа | *5* |
| 3. Методы определение гистамина в слюне | *6* |
| 4. Количественное определение гистамина в других объектах | *9* |
| 4.1. Определение гистамина хроматографическими методами | *10* |
| 4.2. Определение гистамина электрохимическими методами | *11* |
| Постановка цели работы | *16* |
| Экспериментальная часть | *17* |
| 1. Реактивы и растворы | *17* |
| 2. Приборы и оборудование для проведения эксперимента | *18* |
| Результаты и их обсуждения | *21* |
| 1. Выбор условий проведения измерений | *21* |
| 2. Изучение электрохимических свойств электродов по отношению к гистамину | *21* |
| 2.1. Медный электрод | *21* |
| 2.2. Медный макроэлектрод, покрытом нафионом | *25* |
| 2.3. Наноструктурированные электроды | *28* |
| Выводы | *33* |
| Благодарности | *34* |
| Список литературы | *35* |

**ВВЕДЕНИЕ**

Определение содержания гистамина в биологических жидкостях играет важную роль в клинической диагностике, поскольку увеличение его концентрации может свидетельствовать либо о предшествующих, либо об уже имеющихся заболеваниях [1]. Более того, гистамин содержится в продуктах питания и при хранении его содержание может увеличиваться, соответственно, уровень содержания гистамина, например, в рыбе или мясе может быть показателем свежести[2].

Слюна как биологическая жидкость в последние годы так же вызывает всё больший интерес в областях биологической и биохимической лабораторной диагностики[3]. Анализ слюны является неинвазивным методом, что приводит практически к полному отсутствию риска заражения и возникновению травм, в отличии, например, от биохимического анализа крови.

С точки зрения высокой чувствительности, селективности, малого времени отклика, миниатюризации, простоты и низкой стоимости конструкции, электрохимические сенсоры на основе наночастиц представляют интерес как перспективные и удобные датчики для количественной оценки гистамина.

Медные и медьсодержащие электроды являются перспективными материалами для создания сенсоров на гистамин, так как ионы меди склонны к комплексообразованию с азотсодержащими органическими соединениями, в том числе и с гистамином. Полученные комплексные соединения могут быть идентифицированы с помощью имеющихся электрохимических методов анализа, что позволит в дальнейшем использовать имеющиеся наноструктурированные сенсоры для определения уровня гистамина в слюне с минимальной пробоподготовкой и высокой чувствительностью.

**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**1. Гистамин как аналит**

Гистамин – биогенный амин, нейромедиатор, принимающий участие в аллергических реакциях, регуляции суточного ритма, тонуса сосудов и активности секреторных клеток слизистой оболочки. В живом организме как правило находится в неактивном (связанном) состоянии в базофилах и тучных клетках. В основном резкие выбросы гистамина в кровеносное русло или локально связаны с протекающими в организме воспалительными процессами или аллергическими реакциями.

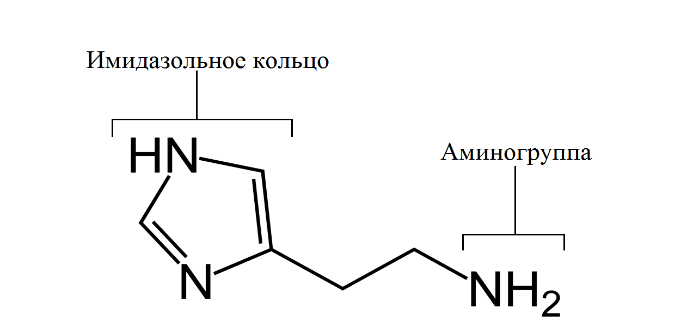


Рисунок 1. Структурная формула гистамина

По физическим свойствам гистамин представляет собой белое кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде и этаноле, но плохо в диэтиловом эфире. Условно молекулу гистамина можно разделить на два структурных фрагмента: имидазольное кольцо и аминогруппу (см. рисунок 1). Значения констант кислотности гистамина принимают следующие значения: рКа1 = 5,87 – по имидазольному кольцу и рКа2 = 9,63 – по аминогруппе. Соответственно, значение изоэлектрической точки гистамина – рН, при котором аминогруппа будет протонирована, а имидазольное кольцо депротонировано, будет иметь значение pI = 7,8.

Наличие нескольких атомов азота в молекуле гистамина позволяет ему образовывать комплексы с катионами металлов в качестве лиганда. Так, например, на сегодняшний день описано большое количество возможных комплексов с гистамином, в таблице 1 приведены константы стабильности для комплексов имидазола с медью.

Таблица 1. Комплексы гистамина с медью в нейтральной среде (KNO3) [4]

|  |  |
| --- | --- |
| Комплексное соединение | Константа стабильности, β |
| [CuH(His)]2+ | 12,88 |
| [CuH(His)2]2+ | 21,83 |

Гистамин наряду с такими биогенными аминами как тирамин, путресцин, кадаверин и спермидин может образовываться путём микробиологического декарбоксилирования аминокислоты гистидина в продуктах питания.

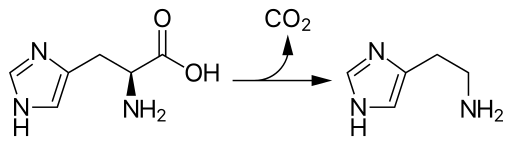


Рисунок 2. Реакция декарбоксилирования гистидина.

Поскольку вышеперечисленные амины в больших дозах токсичны, их содержание в еде необходимо контролировать, что подтверждает большое количество исследований [5]–[9]. Основными продуктами, в которых накапливается гистамин являются в первую очередь рыба (в соответствии с гигиеническими требованиями безопасности РФ в рыбе его содержание не должно превышать 100 мг/кг) [10], сыр, вино, пиво и т.д. Более того, по уровню биогенных аминов можно судить о свежести продуктов питания.

**2. Слюна как объект анализа**

Слюна представляет собой биологическую жидкость, которая выделяется тремя парами крупных слюнных желез (околоушные, подъязычные и подчелюстные) и множеством мелких, расположенных во всей ротовой полости. Состоит на 99,0 – 99,5 % из воды и 0,5 – 1 % сухого остатка, pH слюны близок к нейтральному и находится в пределах от 6,4 до 7,3. Основными составляющими сухого остатка являются соли ионов кальция, фторид-, фосфат- и хлорид-ионов (в сумме примерно 230 – 250 мг/л), белки (2-3 г/л) [3].

Биохимический анализ слюны является перспективным направлением в медицине. Основное преимущество – неинвазивность методов, то есть отсутствие прямого вмешательства в организм человека с риском заражения и возникновения травм, что происходит, например, при анализе крови. На сегодняшний день лабораторный анализ слюны уже используется для постановки клинического анализа - качественный анализ белков слюны позволяет определять биомаркёры онкологических заболеваний (рак головы, шеи, желудка, молочной железы и т.д.) с использованием метода масс-спектрометрии. Установлено, что при диабете I типа наблюдается уменьшение уровня α-амилазы в слюне. [11]

**3. Методы определение гистамина в слюне**

Контроль содержания гистамина в слюне играет важную роль при диагностике или профилактике различных заболеваний. Как уже было упомянуто выше, одним из основных достоинств анализа слюны – неинвазивность метода, то есть отсутствие прямого вмешательства в организм. Так, например, в работе [1] исследуется зависимость между содержанием гистамина в слюне и предшествующим пародонтозом у здоровых и больных диабетом второго типа людей. В данной работе для определения гистамина в образцах слюны использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофлуориметрическим детектированием. Установлено, что гистамин в слюну высвобождается при воспалительных процессах из тучных клеток и базофильных лейкоцитов. Некоторые исследования показали, что уровень гистамина в слюне повышается при парадонтите или гингивите [1].

Для перевода аналита в аналитическую форму использовалась пробоподготовка, которая включала в себя центрифугирование (3000 об/мин) в течение 30 мин для удаления остатков клеток. На втором этапе чистую надосадочную жидкость смешивали с 0,2 М HClO4 в соотношении 1:1, а затем центрифугировали в течение 10 мин (1500 об/мин). Кислотный экстракт декантировали и хранили при -200 С до анализа. Согласно исследованию, содержание гистамина в слюне составило: у диабетиков 7,5 мкг/мл (0,067 мМ), у контрольной группы 6,2 мкг/мл (0,056 мМ), а у больных пародонтитом 9,7 мкг/мл (0,087 мМ). В соответствии с данной работой в среднем содержание гистамина в слюне находится на уровне 7 \* 10-5 М. Объём пробы составил 2 мл.

Следующее исследование [12] посвящено сорбционно-каталитическому определению гистамина в слюне на наномолярном уровне. В этом исследовании использовалась реакция окисления гидрохинона пероксидом водорода (HQ), катализируемая медью, на бумажных носителях с химически присоединёнными гексаметилендиаминовыми группами (HDMA-filters). Гистамин в свою очередь выступал как деактиватор меди. Для контрастности реакции использовался малононитрил (MN). Эффект гистамина в реакции HQ-Cu(II)-H2O2-MN (1) исследовался как в растворе, так и на медьсодержащих бумажных носителях, основанных на HDMA-filters. Полученные растворы и бумажные носители после окончания реакций были исследованы с помощью спектрофотомерии. Определение гистамина в слюне было исследовано на трёх образцах. Определение производилось двумя способами: по методу калибровочного графика и по методу стандартных добавок. В качестве пробоподготовки производилось разбавление имеющихся образцов в 10 тысяч раз. Согласно данной статье нормальное содержание гистамина в слюне составляет: (1,8 – 3,6) \* 10-9 М. Полученные результаты представлены в таблице 1:

В работе [13] было проведено исследование электрохимического биосенсора для определения биогенных аминов, который основан на модифицированном берлинской лазурью печатном электроде, являющемся чувствительным к перекиси водорода, образование которой обуславливается каталитической реакцией с участием диаминоксидазы. Измерения проводились с помощь хроноамперометрического метода при наложении -0,05 В в течении 30 с. Пробоподготовка: 10 мкл 50% HClO4 были помещены в 1 мл чистой слюны, собранной у здоровых подопытных (подкисление проводилось для предотвращения эндогенных реакций). Перед электрохимическими измерениями 3 мл раствора, содержащего 0,5 М фосфатного буфера и 0,1 M хлорида калия, с рН 7,7 были добавлены в подкисленные образцы. Таким образом, был получен раствор с рН 7,4, который является оптимальным для активности диаминоксидазы. В результате для данного биосенсора, работающего в хроноамперометрическом режиме, были получены предел обнаружения - 1\*10-5 М и рабочий диапазон (2\*10-5 – 3\*10-4 М) определения биогенных аминов (в т.ч. гистамина) в слюне.

В работе [14] определение гистамина в слюне осуществлялось с помощью кинетического метода анализа в комбинации с тонкослойной хроматографией. Для количественного определения использовался метод стандартных добавок. Пробоподготовка слюны: 2 мкл слюны отбиралось утром и разбавлялось в 1000 раз. Для гистамина предел обнаружения составил 2 \* 10-14 М. С помощью данного метода в слюне было обнаружено (1.6 ± 0.6) \* 10–8 M гистамина.

Следующая работа [15] посвящена сравнению нестимулированной, стимулированной и чистой слюны околоушных желёз. Методом определения был ядерно-магнитный резонанс (ЯМР). Пробоподготовка образцов заключалась в центрифугировании (1000 оборотов/мин). Надосадочную жидкость восстанавливали и разделяли на 3 образца. Один анализировали с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим (ЖХ с МС) детектированием с предварительным твердофазным концентрированием, когда как остальные подвергались ультрафильтрации и исследовались методами ЖХ с МС и ЯМР. Полученные результаты для определённого гистамина методом ЯМР были следующими: нестимулированная слюна – 13 мкМ, стимулированная 12 мкМ, околоушная 8,6 мкМ. В среднем 1,1\*10-5 М.

Также рассмотрено сорбционно-каталитическое определение гистамина после планарной хроматографии с использованием поверхностно-активных веществ (ПАВ) [16]. В данной работе исследовался эффект ионного ПАВ на характеристики разделения гистамина и лизина в модельных растворах с помощью тонкослойной хроматографии. В качестве ПАВ использовался н-додецилсульфат натрия, который входил в состав подвижной фазы. В качестве стационарной фазы использовалась импрегнированная бумага. Таким образом, использование н-додецилсульфата увеличивало селективность и в некоторых случаях чувствительность сорбционно-каталитического определения. Комбинация ТСХ с последующим сорбционно-каталитическим определением на носителе позволяло разработать методы определения гистамина в диапазоне концентраций от 1 \* 10-12 до 5 \* 10-11 М. Полученный метод позволяет определять гистамин в слюне. Испытание показало, что его содержание в образце слюны составляет 16,5 ± 0,6 \* 10-8 М.

Краткий обзор имеющихся источников, посвящённых определению гистамина в слюне, представлен в таблице 2.

Таблица 2. Аналитические методы, используемые для количественного определения гистамина в слюне, и их характеристики.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№** | **Метод** | **Содержание, М** | **ПО, М** |
| 1 | ВЭЖХ | ~ 7 \* 10-5 |  |
| 2 | Кинетический | (1,8 – 3,6) \* 10-9 |  |
| 3 | Амперометрия | 2 \* 10-5 – 3 \* 10-4 | 1 \* 10-5 |
| 4 | Кинетический + ТСХ | (1.6 ± 0.6) \* 10–8 | 2 \* 10-14 |
| 5 | ЯМР | 1,1 \* 10-5 |  |
| 6 | ТСХ | (16,5 ± 0,6) \* 10-8 | 1 \* 10-12 |

**4. Количественное определение гистамина в других объектах**

Контроль уровня гистамина и остальных биогенных аминов в продуктах питания играет важную роль, так как в больших дозах они вызывают отравления, симптомы которых выражаются в виде головных болей, тошноты, гипо- и гипертензии и проблем с пищеварительным трактом . Таким образом, содержание биогенных аминов может быть показателем качества продуктов питания, поскольку их появление обычно связывается с несоблюдением санитарных норм во время производства и хранения. Также по количеству содержащихся биогенных аминов и аминокислот можно оценивать географическое происхождение мёда и классифицировать вина по технологии и месту производства, году сбора винограда [17].

В последние годы для анализа биогенных аминов используются в основном хроматографические методы такие как высокоэффективная жидкостная хроматография и капиллярный электрофорез, в меньшей степени используются спектроскопические и электрохимические методы. Так же в число распространённых входят тест-системы.

**4.1. Определение гистамина хроматографическими методами**

В последние годы для анализа биогенных аминов используются в основном хроматографические методы такие как газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография и капиллярный электрофорез, в меньшей степени используются спектроскопические и электрохимические методы. Так же в число распространённых входят тест-системы.

Таблица 3. Жидкостная хроматография в качестве метода определения гистамина.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Детектор** | **Объекты анализа** | **Предел обнаружения, М** | **Диапазон определяемого содержания, М** | **Ссылка** |
| Флюориметрический | Вино | 1,8 \* 10-7 | (0,045 – 5,52) \* 10-5 | [18] |
| Флюоресцентный | Вино | 8 \* 10-7 | (0,045 - 2,7) \* 10-4 | [19] |
| Спектрофотометрический | Моча | 0,23 \* 10-6 | (0,45 – 90) \* 10-6 | [20] |
| Фотометрический с диодной матрицей | Вино, пиво | 3,6 \* 10-7 | (1,5 -60,2) \* 10-5 | [21] |
| Времяпролётный масс-анализатор | Вино | 9 \* 10-7 | (1,8 - 360,4) \* 10-5 | [22] |
| Масс-спектрометрический | Вино | 6,4 \* 10-9 | (2,7 – 135,14) \* 10-7 | [23] |

**4.2. Определение гистамина электрохимическими методами**

Основными преимуществами электрохимических методов являются высокая чувствительность, низкие пределы обнаружения (до 10-9 – 10-10 М) и малое время отклика (до 30 с). Как известно, для проведения анализа данными группами методов требуется электрохимическая ячейка, содержащая как минимум два электрода – рабочий (индикаторный) и референтный, а также анализируемый раствор или расплав. Размер электродов может варьироваться, например, в последние годы широкое применение нашли печатные электроды (от англ. screen-printed), размеры которых не превышают 10 мм x 28 мм x 0.35 мм (схема представлена на рис. ).

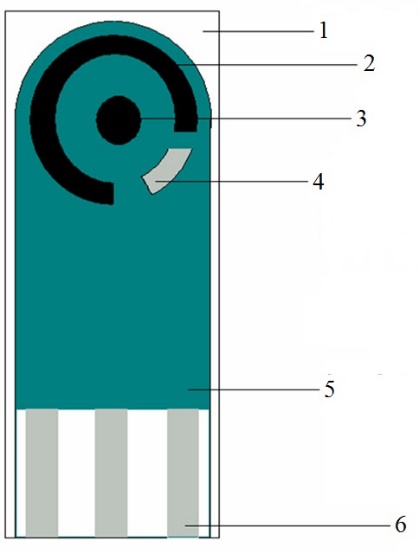


Рисунок 3. Принципиальная схема печатного электрода. 1 - подложка из инертного материала, 2 - вспомогательный электрод, 3 - рабочий электрод, 4 - электрод сравнения, 5 - изолятор, 6 - контакты.

Следующая ступень миниатюризации – это использование ультрамикроэлектродов, относящихся к разряду микроэлектродов – электродов, которые как минимум в одном измерении имеют микрометровые размеры, что позволяет их использовать для анализа ультрамалых проб, исследования процессов в живых организмах и даже в отдельных клетках. Таким образом, одним из перспективных достоинств электрохимических методов является миниатюризация химического анализа, что позволяет использовать минимальный объём пробы и минимизировать расход материалов для уменьшения себестоимости сенсора.

Был произведён анализ широкого списка литературы, посвящённой электрохимическим методам определения гистамина в различных объектах анализа (таблица 4).

Таблица 4. Краткий обзор источников, посвящённых определению гистамина электрохимическими методами. (ПО – предел обнаружения)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Группа методов | Объекты анализа | ПО (самые низкие из найденных) | Источник |
| Хроматографические с электрохимическими вариантами детектирования | Рыба, мясо, алкогольные напитки, фрукты, сыры, мозг и кожа крыс | 12 нг; 0,125\*10-12 М | [24]–[27] |
| Электрофоретические | Мастоциты, алкогольные напитки, дрозофила фруктовая | 4 \* 10-9 М; 50\*10-9 М | [28], [29] |
| Электрохимические биосенсоры | Морепродукты, рыба, мясо, кровь | 9 \* 10-12 М; 6,9 \* 10-8 М | [30]–[33] |
| Электрохимические бесферментные | Рыба, алкогольные напитки, биологические жидкости, клетки мозга, тучные клетки | 3 \* 10-7 М; 3,5 \* 10-7 М | [5], [7], [34] |

Были рассмотрены хроматографические методы с электрохимическими вариантами детектирования. Согласно имеющейся литературе, наименьшее значения пределов обнаружения составили порядки нанограммов, однако для достижения данного значения пробы были подвергнуты рутиной пробоподготовке, в которую входили последующее концентрирование [24], [25], [27] или дериватизация [26], что значительно увеличивало общее время анализа.

**Электрохимические сенсоры**

**Биосенсоры**

К электрохимическим биосенсорам относятся системы, состоящие из двух подсистем, а именно из системы биохимического распознавания (в общем смысле – селективный слой) и преобразователя первичного сигнала (трансдъюсера). Биораспознающим агентом зачастую являются ферменты, антитела или антигены, отдельные клетки, микроорганизмы и срезы тканей, которые иммобилизованы в рабочий электрод, являющийся первичным преобразователем [35]. Таким образом, биосенсоры нашли широкое применение в различных отраслях жизни человека в силу собственной высокой специфичности, экспрессности и лёгкости в эксплуатации. Так, например, в медицине используются глюкометры (фермент глюкозооксидаза) как амперометрические датчики для измерения уровня глюкозы в крови. Краткая характеристика биосенсоров с амперометрическим вариантом детектирования представлена в таблице.

Таблица 5. Электрохимические биосенсоры для определения уровня гистамина (для всех методов электродом сравнения был Ag/AgCl)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Объект анализа** | **Электрохимическая ячейка** | | | **Потенциал детектирования, мВ** | **ПО, М / срок службы, день** | **Источник** |
| **Рабочий электрод (подложка / агент)** | **Вспомогательный электрод** | **Фоновый электролит** |
| Креветка | GCE, CeO2, PANI / DAO | Pt | ФБ, pH 7,4 | -100 | 5 \* 10-5 | [36] |
| Рыба | Графит / АО(87 %), HRP (13 %) | Pt | ФБ | - 50 | 2 \* 10-7  18 | [32] |
| Креветка | SPE / DAO | Pt | ФБ, рН 7,4 | 350 | 7 \* 10-5  30 | [33] |
| Куриное мясо | SPE, MnO2 / AO | Нержавеющая сталь | ФБ, рН 7,5 | 400 | 3 \* 10-6  15 | [37] |
| Рыба | SPE, угольные нанотрубки, ферроцен / DAO, HRP | Угольная паста | ФБ, рН 8,0 | -50 | 2 \* 10-7 | [2] |
| Кровь | Au / MADH | Pt | 0,35 М пиррола, 0,05 М K3[Fe(CN)6] | 750 | 3 \* 10-5 | [38] |

Условные обозначения: HOX (от англ. histamine oxidase) – гистаминоксидаза, GCE (glassy-carbon electrode) – стеклоуглеродный электрод, PANI (polyaniline) – полианилин, DAO (diamine oxidase) – диаминоксидаза, AO (amine oxidase) – аминоксидаза, HRP (horseradish peroxidase) – пероксидаза хрена, MADH (methylamine dehydrogenase) – метиламиндегидрогеназа, SPE (screen-printed electrode) - печатный электрод, ФБ – фосфатный буфер, ПО – предел обнаружения.

Несмотря на высокую чувствительность рассмотренных биосенсоров, одним из главных их недостатков является недолговечность при хранении и эксплуатации, связанная с нестабильностью ферментов. Так же иммобилизация ферментами обычно производится путём сложных и трудоёмких процедур, поэтому данные устройства обладают низкой прецизионность.

**Сенсоры на основе наноструктур**

Стоит учитывать, что химические сенсоры не ограничиваются биохимическими. В последние годы в связи с бурным прорывом в области нанотехнологий возрос и интерес к сенсорам на основе наноструктур, в которых в качестве селективного слоя могут выступать наноструктурированные материалы. Основными причинами использования наноматериалов для создания электродов являются усиление аналитического сигнала за счёт большого соотношения истинной площади поверхности электрода к объёму раствора и способности к электрокатализу. Как правило, увеличение аналитического сигнала ведёт к увеличению чувствительности и уменьшению пределов обнаружения (таблица 6).

Нанокомпозитные материалы могут представлять из себя различные наночастицы, которые могут быть синтезированы широким спектром методов. Одной из перспективных методик создания наноструктурированных поверхностей является метод «Слой за слоем» (от англ. «Layer by layer», далее LBL). Работа [39] посвящена синтезированию металлоксидных графеновых нанокомпозитов. На первом этапе была получена суспензия графена в воде путём электрохимического отслаивания графита в 1 М растворе сульфата аммония. Раствор Cu(NH3)6(CH3COO)2 был приготовлен путём растворения солей Cu(CH3COO)2∙nH2O (C = 0,01 M) и NH4CH3COO (C = 0,1 M) в деионизованной воде, рН раствора был доведён до значения 9,4 с помощью раствора NH4OH. Один цикл синтеза LBL заключался в последовательной обработке инертной подложки раствором Cu(NH3)6(CH3COO)2, дистиллированной водой, графеновой суспензией и ещё раз дистиллированной водой. Количество циклов определяло количество нанослоёв (от 10 до 60).

Таблица 6. Электрохимические сенсоры на основе нанокомпозитных материалов (для всех методов электродом сравнения был Ag/AgCl, а в источниках [1], [39] вспомогательным электродом являлась платина.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Метод** | **Объект анализа** | **Электрохимическая ячейка** |  | **Диапазон потенциалов**  **Потенциал детектирования, мВ** | **Предел обнаружения, М** | **Ссылка** |
| **Рабочий электрод / размер, мкм** | **Фоновый электролит** |
| ИВА | Рыба | Au / 12,5 | pH 2,0 |  | 4\*10-10г/кг | [5] |
| ДИВА | Рыба | GCE / MWCNTs | ФБ, рН 7,0 | 40 – 140 | 1 \* 10-7 | [7] |
| ЦВА | Клетки | Углеволокно / 7 | Трис-буфер, рН 7,4 | -700 – 1100  300 | 1 \* 10-6 | [40] |
| ДИВА | Рыба | GCE / полистирол/ нанокомпозитный оксида графена | рН 5,0 | 0 – 1500 | 3 \* 10-8 | [41] |
| Амп. |  | Графит / наночастицы типа ядро-оболочка состава Cu@Pd |  | 550 | 3 \* 10-9 | [42] |
| Амп. |  | FrGO/GCE |  | 740 | 7 \* 10-9 | [43] |

Условные обозначения: GCE (glassy carbon electrode) – стеклоуглерод, MWCNTs (multi-walled carbon nanotubes) – многостенные углеродные нанотрубки, GONC (polystyrene-graphene oxide nanocomposite) – полистирол-графен оксидный нанокомпозит, FrGO (fluorine doped reduced graphene oxide) – фтор-допированный восстановленный оксид графена, ИВА – инверсионная вольтамперометрия, ДИВА дифференциальная импульсная вольтамперометрия, ЦВА – циклическая вольтамперометрия, Амп. - амперометрия

**ПОСТАНОВКА ЦЕЛИ РАБОТЫ**

Из приведённых в обзоре литературы данных можно предположить, что наноструктурированные электроды на основе оксидов графена и меди (II) обладают высокой чувствительностью по отношению к гистамину за счёт потенциального комплексообразования медь-гистамин. Данные факты показывают перспективность их использования при биохимическом анализе слюны на гистамин.

Таким образом целью работы является изучение возможности амперометрического определения гистамина в слюне на электродах, модифицированных наноструктурами оксид меди – оксид графена.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

Выбрать оптимальные условия электрохимического определения гистамина на примере синтетической слюны

Определить аналитические характеристики разработанных модифицированных электродов на примере определения гистамина в синтетической слюне.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

**1. Реактивы и растворы**

Гидрофсофат калия трёхводный, ч. д. а.

Дигидрофосфат калия, ч. д .а.

Имидазол, х. ч.

Раствор Нафиона в изопропиловом спирте 9%

Изопропиловый спирт, х. ч.

Гистамин

Хлорид натрия, ч. д. а.

Хлорид калия, ч. д. а.

Гидрофосфат натрия, ч. д. а.

Гидрокарбонат натрия, ч. д. а.

Роданид калия, ч. д. а.

Вода дистиллированная

Вода деионизованная

Аргон

**Приготовление растворов**

Раствор калий-фосфатного буфера с рН 7,8. Навески гидрофосфата калия трёхводного (K2HPO4\*3H2O) массой 51,79460 г и дигидрофосфата калия (KH2PO4) массой 3,13000 г были помещены в мерную колбу ёмкостью 250 мл, затем полученные навески были растворены в деионизованной воде с доведением раствора в колбе до метки.

Раствор имидазола в воде 0,1 М. Навеска 0,32040 г имидазола была помещена в колбу ёмкостью 50 мл, затем в колбу была помещена деионизованная вода до метки.

Растворы имидазола с концентрациями 1 \* 10-2 М, 1 \* 10-3 М, 1 \* 10-4 М, 1 \* 10-5 М, 1 \* 10-6 М и 1 \* 10-7 М были получены путём последовательного разбавления.

Раствор Нафиона в изопропиловом спирте 0,09 %. Имеющийся 9%-й раствор был сначала разбавлен в 10 раз путём отбора 1 мл исходного раствора и добавлением 9 мл изопропила. Полученный 0,9%-й раствор был разбавлен аналогично.

Раствор гистамина в воде с концентрацией 1 \* 10-2 М. Навеска гистамина с массой 0,01112 г была растворена в 10 мл деионизованной воды. Последующие стандартные растворы гистамина с концентрациями от 1 \* 10-3 М до 1 \* 10-7 М были приготовлены путём последовательного разбавления.

Раствор искусственной слюны. Навески хлорида натрия (0,67000 г), хлорида калия (0,12000 г), гидрофосфата натрия (0,02600 г), дигидрофосфата калия (0,02000 г), гидрокарбоната натрия (0,15000 г) и роданида калия (0,03300) были помещены в колбу объёмом 100 мл. Полученная смесь солей была растворена в деионизованной воде, полученный раствор был доведён до метки.

**2. Приборы и оборудование для проведения эксперимента**

**Приборы и параметры измерений**

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Ресурсный Образовательный Центр по направлению химия».

Потенциостат-гальваностат Р-30SM (ООО «Элинс», г. Черноголовка). Прибор позволяет проводить измерения в постояннотоковом режиме. Параметры измерений: скорость развёртки – 50 мВ/с, диапазон тока – 1000 мкА, диапазон потенциалов – 15 В, измерения проводились в режимах циклической вольтамперометрии, число циклов – от 3 до 6, прямой амперометрии с потенциалами детектирования +200 мВ.

Портативный аналитический потенциостат EmStat для электрохимических сенсоров (PalmSens).

Весы аналитические “OHAUS” AR 2140, НПВ 210 г, цена деления 0,00001 г, класс 1 специальный.

**Химическая посуда**

Колбы мерные наливные по ГОСТ 10394-74 вместимостью 10, 25, 50; 100 и 250 мл.

Пипетки, градуированные по ГОСТ 20292-74 вместимостью 1; 5 и 10 мл.

Пипетки переменного объёма (пипет – дозаторы) для дозирования жидкости в пределах 2 – 200 мкл и 100 – 1000 мкл.

**Электроды**

1. В качестве рабочих электродов использовались следующие материалы: медный макроэлектрод, который представлял собой медную проволоку с фиксированной рабочей поверхностью площадью 13,07 мм2, покрытый нафионом медный электрод (13,07 мм2), электроды, модифицированные нанокомпозитом из оксида графена и оксида меди (II) (60 слоёв).

Медный, покрытый плёнкой нафиона, макроэлектрод был получен путём однократного погружения в 0,09 % раствор нафиона в изопропиловом спирте с последующей сушкой на воздухе при комнатной температуре в течение часа.

Наноструктурированные электроды были получены методом LBL на кафедре Химии твёрдого тела СПбГУ. В качестве подложки использовалось золото.

2. Электрод сравнения – хлоридсеребряный (Е = 222 ± 1 мВ, Т = 298 К)

3. Вспомогательный электрод – платина.

**Электрохимическая ячейка**

Конструкция электрохимической ячейки (объём фонового электролита для всех измерений составлял 10 мл), в которой проводились измерения наноструктурированных электродов, представлена на рисунке 4. На рисунке 5 представлена фотография, на которой изображена трёхэлектродная ячейка, используемая в работе.

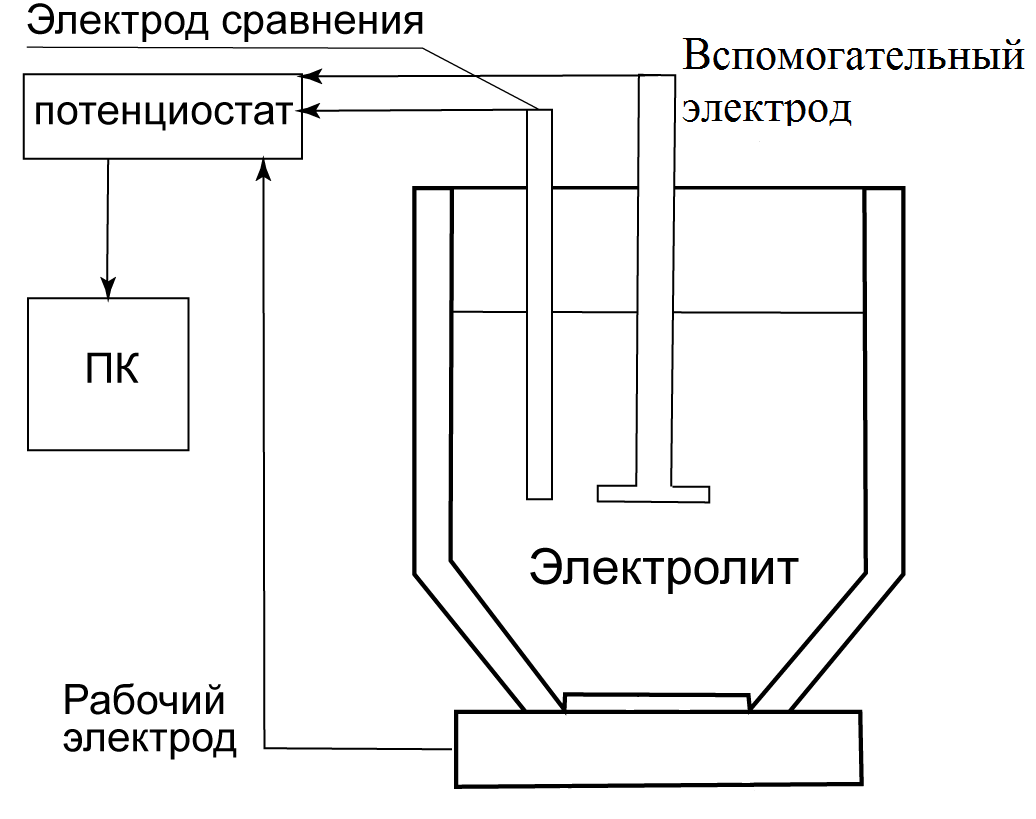


Рисунок 4. Принципиальная схема электрохимической ячейки.

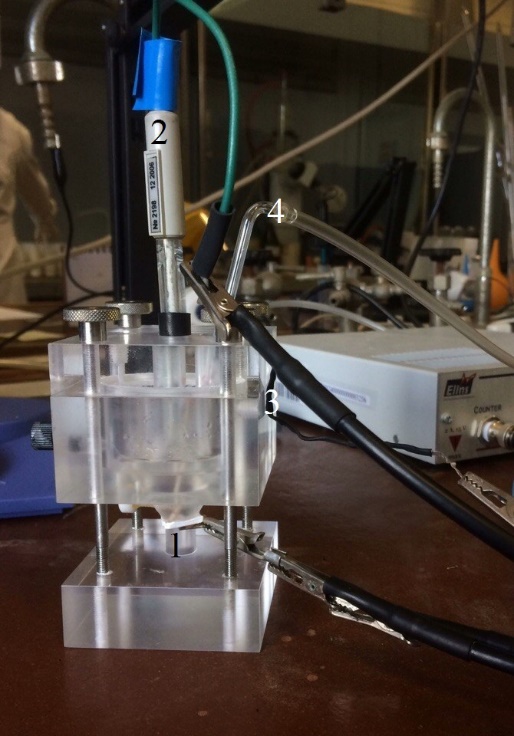


Рисунок 5. Вид трёхэлектродной ячейки. 1 – место крепления рабочего электрода, 2 – электрод сравнения, 3 – вспомогательный электрод, 4 – продувка аргоном

**Обработка экспериментальных данных**

Математическая обработка экспериментальных данных осуществлялась при помощи программы «OriginPro 8».

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ**

**1. Выбор условий проведения измерений.**

Как следует из литературного обзора, гистамин образует прочные комплексные соединения с ионами меди (I) и меди (II). Однако, ионы меди могут образовывать прочные комплексные соединения и с амино- и тиольными группами аминокислот и белков, содержащихся в слюне. Аминогруппы характеризуются рК ≥ 9,0, а тиольные рК ≤ 5,0. Поэтому, для достижения селективности и получения аналитической информации, в качестве аналитической была выбрана электрохимическая реакция ионизации Cu (0) до Cu (I) с последующим образованием комплекса Cu (I) с гистамином.

Для моделирования эксперимента в качестве аналита на первом этапе работы был выбран имидазол, который является частью структуры гистамина, а в качестве рабочего электрода медный макроэлектрод, что позволит в дальнейшем судить о правильности выбора условий определения гистамина в искусственной слюне.

Работа с имидазолом предполагает образование комплексов меди с гистамином по имидазольной группе, что позволит избежать влияния других аминосодержащих соединений. Выбор рН 7,8 совпадает со значением изоэлектрической точки гистамина, так как именно такая структура предполагает образование комплексов меди с гистамином через имидазольное кольцо.

**2. Изучение электрохимических свойств электродов по отношению к гистамину.**

*2.1. Медный электрод*

На первом этапе работы необходимо было изучить аналитические характеристики медного электрода по отношению к имидазолу.

Для исследования электрохимических взаимодействий медного электрода и имидазола были выбраны методы циклической вольтамперометрии и прямой амперометрии.



Рисунок 6. Циклические вольтамперограммы растворов имидазола на медном макроэлектроде при pH 7,8

Были получены ЦВА для фона, в качестве которого был выбран калий-фосфатный буферный раствор со значением рН 7,8, а также для серии растворов имидазола, которые были получены путём добавок 0,1 М раствора имидазола. Соответственно, были получены ЦВА для концентраций имидазола от 1 \* 10-3 М до 1,1 \* 10-2 М. На полученных ЦВА видно увеличение значения предельного тока при потенциалах выше 200 мВ. Предположительно в этой области происходит перезарядка и образование комплексов меди (I) с имидазолом.

На основе полученных ЦВА была получена зависимость предельного тока относительно фона от концентрации имидазола при 200 мВ.

**

Рисунок 7. Зависимость относительного предельного анодного тока от концентрации имидазола при 200 мВ.

Таким образом, было решено провести амперометрические измерения при наложении потенциала в 200 мВ, поскольку метод прямой амперометрии является более точным, чем метод циклической вольтамперометрии.



Рисунок 8. Амперометрические измерения на медном макроэлектроде при рН 7,8 с добавками имидазола (обозначены стрелками) при 200 мВ.



Рисунок 9. Зависимость относительной плотности тока от концентрации имидазола при рН 7,8.

Поскольку величина силы тока является менее универсальной, было предложено перейти к плотности тока:

*,* где j – плотность тока (А\*м-2), i – сила тока, S – рабочая площадь электрода

На полученной выше зависимости плотности тока от концентрации имидазола наблюдается линейная зависимость в диапазоне концентраций от 1 \* 10-4 М до 1 \* 10-2 М.

По полученным данным можно сделать вывод, что медь действительно является перспективным материалом для создания сенсоров, чувствительных к соединениям, содержащим в своём составе имидазольное кольцо.

*2.2. Медный макроэлектрод, покрытом нафионом.*

Нафион нашёл широкое применение в электрохимических методах анализа в качестве селективной мембраны, которая пропускает низкомолекулярную фракцию, а высокомолекулярную задерживает. Исходя из данных, имеющихся в обзоре литературы, известно, что в слюне содержатся белки и другие азотсодержащие высокомолекулярные соединения. Соответственно, предполагается использовать покрытый нафионом медный электрод, в котором нафион будет задерживать высокомолекулярную фракцию слюны.

Таким образом, было решено покрыть нафионом медный макроэлектрод и оценить его влияние на величину аналитического сигнала. Для этого аналогично п. 2.1 – 2.2 были проведены вольтамперометрические и амперометрические измерения при тех же значениях потенциала.



Рисунок 10. Циклические вольтамперограммы растворов имидазола на медном макроэлектроде, покрытом нафионом при pH 7,8.



Рисунок 11. Зависимость относительного предельного тока от концентрации имидазола при 200 мВ.

На полученных циклических вольтамперограммах видно, что присутствие нафиона не влияет на химические процессы, происходящие на поверхности электрода, что подтверждается отсутствием изменения формы кривых.

Аналогично п. 2.2. были проведены амперометрические измерения.



Рисунок 12. Амперометрические измерения на медном макроэлектроде при рН 7,8 с добавками имидазола (обозначены стрелками).

С помощью полученных данных была получена зависимость плотности тока от концентрации имидазола.



Рисунок 13. Зависимость относительной плотности тока от концентрации имидазола при рН 7,8

Для оценки влияния нафиона на зависимости плотностей токов от концентраций для медного и медного, покрытого нафионом, электродов были помещены на один график.



Рисунок 14. Зависимости плотностей тока от концентрации имидазола на медном и покрытом нафионом медном электродах.

На представленных на рисунке 14 зависимостях видно, что присутствие нафиона уменьшает чувствительность электрода.

*2.3. Наноструктурированные электроды*

2.3.1. Оценка влияния подложки

Поскольку в работе предполагается использовать наноструктурированные электроды, которые представляют собой подложку из золота, покрытую наночастицами оксида графена и оксида меди (II), то для оценки влияния золота были проведены вольтамперометрические измерения на чистом золоте.



Рисунок 8. Циклические вольтамперограммы для растворов имидазола в диапазоне концентраций от 1 10-4 М до 1 10-2 М на золотом электроде при РН 7,8.

На полученных ЦВА видно, что сила тока при потенциалах более 200 мВ при увеличении концентрации имидазола не изменяется. Общее отклонение от фона объясняется собственной электрохимической активностью имидазола.

2.3.2. Наноструктурированные оксидом графена и оксидом меди (II) электроды.

Были проведены вольтамперометрические измерения для растворов гистамина на наноструктурированном золотом электроде при рН 7,8.



Рисунок. 10. Циклические вольтамперограммы для растворов гистамина в диапазоне концентраций. от 1 10-9 М до 1 10-4 М на наноcтруктурированном электроде при рН 7,8.

На полученных ЦВА заметно уменьшение предельного значения тока в области потенциалов от - 200 мВ, однако происходит изменение соотношения высот пиков на анодной ветви. Уменьшается пик ионизации меди и появляется второй пик (связанный с образованием комплекса с медь. (I) через имидазольную группу гистамина), высота которого относительно базовой линии растёт.

Таким образом, было решено перейти к испытанию наноструктурированного сенсора в искусственной слюне.



Рисунок. 11 Циклические вольтамперограммы для растворов гистамина в диапазоне концентраций от 1 \* 10-10 до 1 \* 10-6 М в искусственной слюне.

На полученных ЦВА на анодной ветке видно, что наноструктурированный электрод в искусственной слюне проявляет похожие свойства, что и при рН 7,8. Заметно уменьшение пика растворения меди и увеличение высоты второго пика, который отвечает, как было сказано ранее, за образование комплексов меди с имидазольным кольцом гистамина.

Исходя из полученных вольтамперограмм, было решено провести амперометрические измерения при наложении потенциала – 200 мВ.



Рисунок 15. Амперометрические измерения в искусственной слюне с добавками гистамина с использованием наноструктурированного электрода при 200 мВ.

По полученной амперограмме была построена зависимость изменения силы тока от концентрации гистамина.



Рисунок 16. Зависимость изменения силы тока от концентрации гистамина в искусственной слюне.

Таким образом, на полученном градуировочном графике (рисунок 16) видно, что линейный диапазон находится в пределах от 2 \* 10-7 М до 2 \* 10-5 М. С помощью математической обработки были определены значения чувствительности и предела обнаружения, которые составили 8,5 мА\*л\*моль-1 и 3,2 \* 10-8 М, соответственно, где чувствительность представляет собой тангенс угла наклона прямой, а значение предела обнаружения было определено по следующей формуле:

, где Смин – минимальная концентрация в линейном диапазоне, σ – значение шума.

**ВЫВОДЫ**

1. Предложен рабочий электрод, модифицированный наночастицами оксида графена и оксида меди (II), для бесферментного амперометрического определения гистамина.

2. Были определены основные аналитические характеристики предложенного электрода на примере количественного определения гистамина в искусственной слюне: предел обнаружения – 3,2 \* 10-8 М, линейный диапазон определяемых концентраций – 2 \* 10-7 М – 2 \* 10-5 М, чувствительность – 8,5 мА\*л\*моль-1.

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Выражаю благодарность:

- Ресурсному центру Научного парка СПбГУ «Ресурсный Образовательный Центр по направлению химия» за предоставленные материалы и оборудование

- Научному руководителю, кандидату химических наук, Дарье Владимировне Наволоцкой за помощь в подготовке выпускной квалификационной работы

- Руководителю научной лаборатории электрохимических методов анализа и мембранного разделения СПбГУ, профессору, доктору химических наук Сергею Сергеевичу Ермакову за помощь в подготовке выпускной квалификационной работы

- Лаборатории под руководством профессора Валерия Павловича Толстого (кафедра химии твердого тела) за предоставленные электроды.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

[1] M. Venza, M. Visalli, M. Cucinotta, D. Cicciù, P. Passi, and D. Teti, “Salivary Histamine Level as a Predictor of Periodontal Disease in Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Subjects,” *J. Periodontol.*, vol. 77, no. 9, pp. 1564–1571, 2006.

[2] S. Pérez, J. Bartrolí, and E. Fàbregas, “Amperometric biosensor for the determination of histamine in fish samples,” *Food Chem.*, vol. 141, no. 4, pp. 4066–4072, 2013.

[3] У. Образования, Г. Государственный, М. Университет, and А. Н. Коваль, *Биохимия ротовой жидкости*. 2011.

[4] S. Sjöberg, “Critical evaluation of stability constants of metal-imidazole and metal-histamine systems (Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 69, no. 7, pp. 1549–1570, 1997.

[5] B. Akbari-Adergani, H. Hosseini, M. Shekarchi, and M. Pirali-Hamedani, “A competitive histamine evaluation of canned tuna fish samples by electrochemical and immunochemical methods for post market surveillance,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 15, no. 6, pp. 1336–1344, 2012.

[6] A. Veseli *et al.*, “Electrochemical determination of histamine in fish sauce using heterogeneous carbon electrodes modified with rhenium(IV) oxide,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 228, pp. 774–781, 2016.

[7] A. Geto, M. Tessema, and S. Admassie, “Determination of histamine in fish muscle at multi-walled carbon nanotubes coated conducting polymer modified glassy carbon electrode,” *Synth. Met.*, vol. 191, pp. 135–140, 2014.

[8] B. Akbari-adergani, P. Norouzi, M. R. Ganjali, and R. Dinarvand, “Ultrasensitive flow-injection electrochemical method for determination of histamine in tuna fish samples,” *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 4, pp. 1116–1122, 2010.

[9] U. T. Yilmaz and D. Inan, “Quantification of histamine in various fish samples using square wave stripping voltammetric method,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 10, pp. 6671–6678, 2015.

[10] “\* Собрание законодательства Российской Федерации , 2000, № 31, ст . 3295,” vol. 3, pp. 1–269, 2006.

[11] П. Слюны and И. Е. Г. О. Диагностические, “Протеом слюны и его диагностические возможности,” pp. 54–58, 2015.

[12] Y. Y. Petrova, “A sorption-catalytic procedure for determining histamine,” *J. Anal. Chem.*, vol. 65, no. 5, pp. 538–547, 2010.

[13] S. Piermarini, G. Volpe, R. Federico, D. Moscone, and G. Palleschi, “Detection of biogenic amines in human saliva using a screen-printed biosensor,” *Anal. Lett.*, vol. 43, no. 7, pp. 1310–1316, 2010.

[14] E. Y. Byrina, O. Y. Vetrova, O. S. Dolgushina, and Y. Y. Petrova, “Determination of bioactive compounds by catalytic method coupled with planar chromatography,” *J. Anal. Chem.*, vol. 68, no. 8, pp. 706–715, 2013.

[15] J. Figueira, S. Gouveia-Figueira, C. Öhman, P. Lif Holgerson, M. L. Nording, and A. Öhman, “Metabolite quantification by NMR and LC-MS/MS reveals differences between unstimulated, stimulated, and pure parotid saliva,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 140, pp. 295–300, 2017.

[16] E. Y. Byrina, Y. V. Gimranova, E. V. Sevast’yanova, and Y. Y. Petrova, “Sorption-catalytic determination of histamine and lysine after planar chromatography using surfactants,” *J. Anal. Chem.*, vol. 69, no. 11, pp. 1102–1111, 2014.

[17] V. Pereira, M. Pontes, J. S. Câmara, and J. C. Marques, “Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldeyde derivatization procedure,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1189, no. 1–2, pp. 435–443, 2008.

[18] C. Proestos, P. Loukatos, and M. Komaitis, “Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection,” *Food Chem.*, vol. 106, no. 3, pp. 1218–1224, 2008.

[19] K. Henríquez-Aedo, M. Vega, S. Prieto-Rodríguez, and M. Aranda, “Evaluation of biogenic amines content in chilean reserve varietal wines,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 8, pp. 2742–2750, 2012.

[20] O. Comas-Basté, M. L. Latorre-Moratalla, R. Bernacchia, M. T. Veciana-Nogués, and M. C. Vidal-Carou, “New approach for the diagnosis of histamine intolerance based on the determination of histamine and methylhistamine in urine,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 145, pp. 379–385, 2017.

[21] F. Chem, “Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines , Amino Acids , and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples,” pp. 608–613, 2007.

[22] S. Jia, Y. P. Kang, J. H. Park, J. Lee, and S. W. Kwon, “Determination of biogenic amines in Bokbunja (Rubus coreanus Miq.) wines using a novel ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry,” *Food Chem.*, vol. 132, no. 3, pp. 1185–1190, 2012.

[23] S. Millán, M. C. Sampedro, N. Unceta, M. A. Goicolea, and R. J. Barrio, “Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 584, no. 1, pp. 145–152, 2007.

[24] G. Favaro, P. Pastore, G. Saccani, and S. Cavalli, “Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode,” *Food Chem.*, vol. 105, no. 4, pp. 1652–1658, 2007.

[25] V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, and J. M. Pingarrón, “Pulsed amperometric detection of histamine at glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles,” *Electroanalysis*, vol. 17, no. 4, pp. 289–297, 2005.

[26] M. Maldonado and K. Maeyama, “Simultaneous electrochemical measurement method of histamine and N τ-methylhistamine by high-performance liquid chromatography- amperometry with o-phthalaldehyde-sodium sulfite derivatization,” *Anal. Biochem.*, vol. 432, no. 1, pp. 1–7, 2013.

[27] R. Draisci, S. Cavalli, L. Lucentini, and A. Stacchini, “Ion Exchange separation and pulsed amperometric detection for determination of biogenic amines in fish productsa),” *Chromatographia*, vol. 35, no. 9–12#2963, pp. 584–590, 1993.

[28] W. JIN, D. YU, Q. DONG, and X. YE, “Quantitation of caffeine by capillary zone electrophoresis with end-column amperometric detection at a carbon microdisk array electrode.,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 38, no. 1, pp. 11–5, 2000.

[29] Q. Wang, F. Ding, N. Zhu, H. Li, P. He, and Y. Fang, “Determination of hydroxyl radical by capillary zone electrophoresis with amperometric detection,” *J Chromatogr A*, vol. 1016, no. 1, pp. 123–128, 2003.

[30] W. Henao-Escobar, L. Del Torno-De Román, O. Domínguez-Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, and M. J. Arcos-Martínez, “Dual enzymatic biosensor for simultaneous amperometric determination of histamine and putrescine,” *Food Chem.*, vol. 190, pp. 818–823, 2016.

[31] S. Leonardo and M. Campàs, “Electrochemical enzyme sensor arrays for the detection of the biogenic amines histamine, putrescine and cadaverine using magnetic beads as immobilisation supports,” *Microchim. Acta*, vol. 183, no. 6, pp. 1881–1890, 2016.

[32] M. Niculescu, C. Nistor, I. Frébott, P. Peč, B. Mattiasson, and E. Csöregi, “Redox hydrogel-based amperometric bienzyme electrodes for fish freshness monitoring,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 7, pp. 1591–1597, 2000.

[33] C. M. Keow, F. Abu Bakar, A. B. Salleh, L. Y. Heng, R. Wagiran, and L. S. Bean, “An amperometric biosensor for the rapid assessment of histamine level in tiger prawn (Penaeus monodon) spoilage,” *Food Chem.*, vol. 105, no. 4, pp. 1636–1641, 2007.

[34] J. Wang *et al.*, “Hydrogen evolution assisted deposition of a three-dimensional porous nickel film for the electrocatalytic oxidation of histamine,” *Microchim. Acta*, pp. 1–8, 2017.

[35] Г. В. Преснова, М. Ю. Рубцова, and А. М. Егоров, “Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена,” pp. 60–65.

[36] M. B. Gumpu, N. Nesakumar, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, and J. B. B. Rayappan, “Development of electrochemical biosensor with ceria-PANI core-shell nano-interface for the detection of histamine,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 199, pp. 330–338, 2014.

[37] D. Telsnig, K. Kalcher, A. Leitner, and A. Ortner, “Design of an Amperometric Biosensor for the Determination of Biogenic Amines Using Screen Printed Carbon Working Electrodes,” *Electroanalysis*, vol. 25, no. 1, pp. 47–50, 2013.

[38] K. Zeng, H. Tachikawa, Z. Zhu, and V. L. Davidson, “Amperometric detection of histamine with a methylamine dehydrogenase polypyrrole-based sensor,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 10, pp. 2211–2215, 2000.

[39] I. Kodintsev, K. Reshanova, and V. Tolstoy, “Layer-by-layer synthesis of metal oxide (or hydroxide)-graphene nanocomposites. the synthesis of CuO nanorods-graphene nanocomposite,” *AIP Conf. Proc.*, vol. 1748, 2016.

[40] S. Samaranayake, A. Abdalla, R. Robke, K. M. Wood, A. Zeqja, and P. Hashemi, “In vivo histamine voltammetry in the mouse premammillary nucleus,” *Analyst*, vol. 140, no. 11, pp. 3759–3765, 2015.

[41] L. Saghatforoush, M. Hasanzadeh, and N. Shadjou, “Polystyrene–graphene oxide modified glassy carbon electrode as a new class of polymeric nanosensors for electrochemical determination of histamine,” *Chinese Chem. Lett.*, vol. 25, no. 4, pp. 655–658, 2014.

[42] R. K. R. Gajjala and S. K. Palathedath, “Cu@Pd core-shell nanostructures for highly sensitive and selective amperometric analysis of histamine,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 102, no. September 2017, pp. 242–246, 2018.

[43] F. Shahzad, S. A. Zaidi, and C. M. Koo, “Synthesis of Multifunctional Electrically Tunable Fluorine-Doped Reduced Graphene Oxide at Low Temperatures,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 28, pp. 24179–24189, 2017.