Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук (ИОНХ РАН)

На правах рукописи

Conf.

Силина Юлия Евгеньевна

МИКРОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ОРГАНО-НЕОРГАНИЧЕСКИХ ГИБРИДНЫХ ПЛЕНОК

1.4.2. Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук

Работа выполнена в лаборатории электродных процессов в жидкостных системах Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук

Научный консультант: Золотухина Екатерина Викторовна

доктор химических наук

Официальные Евтюгин Геннадий Артурович

оппоненты: доктор химических наук

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский)

федеральный университет», Химический факультет им.

А.М. Бутлерова, заведующий кафедрой

Вирюс Эдуард Даниэлевич

доктор химических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», ведущий научный сотрудник

Зуев Борис Константинович

доктор технических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции «Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского»

Российской академии наук, заведующий лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное

учреждение высшего образования «Московский

государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится "10" октября 2023 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 01.4.002.92 ИОНХ РАН по адресу: г. Москва, Ленинский проспект, д. 31.

С диссертацией можно ознакомиться у Ученого секретаря ИОНХ РАН (Ленинский просп., д. 31) и на сайте ИОНХ РАН: http://www.igic.ras.ru/

Автореферат разослан " / июля 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета 01.4.002.92 кандидат технических наук

М.С. Доронина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. В области молекулярной биологии, фармакологии и биоаналитической химии малые молекулы представляют низкомолекулярные (≤1kDa) органические соединения, способные регулировать биологические процессы и биохимические реакции. К этой группе аналитов относятся жирные кислоты, триацилглицериды, углеводы, аминокислоты, флавоноиды некоторые фармацевтические пептиды, И Низкомолекулярные биоаналиты являются маркерами целого спектра заболеваний, а также используются для мониторинга и контроля биотехнологических процессов. Именно поэтому их обнаружение и определение имеет первостепенное значение не только в биотехнологии и фармакологии, но и в спорте (в т.ч. мониторинг запрещенных препаратов), здравоохранении (поиск новых подходов для лечения заболеваний, например, сахарного диабета) и биохимии (изучение механизмов управления окислительными процессами в клетках).

B этой разработка надежных экспресс-способов связи, определения низкомолекулярных биоаналитов в реальных объектах (биологические жидкости, продукты питания, лекарственные препараты и т.д.) является актуальной задачей биоаналитической химии. Однако обнаружение и определение этих соединений совсем нетривиальная задача: биомолекулы термически и химически нестабильны, и часто не могут быть проанализированы в исходной аналитической форме методами газовой или жидкостной хроматографии без предварительной дериватизации и многостадийной пробоподготовки. Химический анализ этой группы аналитов осложняется еще и тем, что объем предоставляемых проб часто находится в области микро- или нанолитров. В этой связи, методики их определения должны обеспечивать высокую чувствительность при малых объемах проб и, по возможности, быть толерантными к матричным эффектам. Этим критериям соответствуют методы скоростной масс-спектрометрии и биосенсорики, основным функциональным элементом которых являются чувствительные органо-неорганические гибридные $(OH\Gamma)$ пленки.

ОНГ пленки представляют собой самоорганизующиеся системы, состоящие из неорганического (металл, полупроводник, диэлектрическая частица) и органического (полимеры, ферменты, кофакторы) компонентов. Независимо от рабочего принципа микроаналитических тест-систем (электрохимические биосенсоры, пьезокварцевые микровесы, мишени-эмиттеры для скоростной масс-спектрометрии), именно функциональные ОНГ пленки, их природа, тип, структура и методика нанесения определяют качество выходного аналитического сигнала, получаемого с поверхности таких устройств.

Современные ОНГ пленки на поверхности микроаналитических устройств формируются, как правило, с помощью технологии послойного капельного

нанесения. В результате многостадийности процесса свойства образующихся пленок сильно зависят от выбранного способа и условий нанесения отдельных компонентов. Например, послойное осаждение медиатора (или электрокатализатора), фермента (биорецептора) и стабилизирующего полимера в случае биосенсоров приводит к образованию довольно плотных пленок (микронной толщины), подвергающихся механическому разрушению при изменении степени набухания, и, как следствие, вымыванию активных компонентов слоя. Такая нестабильность структуры и состава ОНГ пленки ведет к быстрой деградации аналитического сигнала вне зависимости от типа измерительной платформы.

Развиваемый в данной работе контролируемый подход к созданию ОНГструктур, состоящих из наночастиц неорганической фазы, биоорганических молекул, а также функциональных полимеров путем их самоорганизации при одноэтапном электрохимическом осаждении из смешанных растворов, позволяет получать механически и химически стабильные функциональные наноразмерные пленки с высокой воспроизводимостью аналитических свойств, морфологии и состава поверхности. Путем варьирования параметров синтеза (тип фонового электролита, природа и количество биополимерных компонентов в растворе, их концентрация и соотношение, а также время осаждения, плотность тока, рН) возможно направленно получать разные структуры функциональных пленок, то есть «настраивать» дизайн и выходные характеристики микро-измерительных устройств на основе ОНГ пленок под требования конкретной аналитической задачи. Применение такого подхода к пленок, функциональных установление закономерностей химических процессов, происходящих в ОНГ пленках при их формировании и эксплуатации, разработать дальнейшей позволит новые тест-системы мониторинга, контроля и экспресс-определения низкомолекулярных биомолекул, имеющих важное физиологическое и биохимическое значение.

Цель работы состояла в разработке методологии создания и применения в анализе наноструктурированных функциональных органо-неорганических гибридных пленок нанобиосенсоров и тест-систем с настраиваемой структурой и свойствами.

На основании поставленной цели в работе решались следующие задачи:

- 1. Разработать методологию синтеза функциональных ОНГ пленок путем гальваностатического осаждения из смешанных растворов компонентов-прекурсоров.
- 2. Предложить методологические решения для подтверждения состава сформированных наноструктурированных ОНГ пленок микроаналитических систем.
- 3. Установить механизм формирования функциональных ОНГ пленок, получаемых одностадийным методом синтеза из смешанных растворов электролитов.
- 4. Выявить физико-химические критерии, влияющие на свойства получаемых одностадийным способом ОНГ пленок в различных микроаналитических системах

(электрохимические нанобиосенсоры, мишени-эмиттеры ионов в массспектрометрии) и определяющие аналитические возможности методов на их основе.

- 5. Объяснить и описать механизм формирования сигнала в методе SALDI-MS с использованием мишеней на основе электроосажденных пленок.
- 6. Разработать аналитические решения для мониторинга, контроля и определения биомолекул с применением микроаналитических устройств на основе ОНГ пленок, получаемых одностадийным методом синтеза.

Научная новизна результатов

- Разработан новый одностадийный метод электрохимического синтеза наноструктурированных ОНГ пленок из смешанных растворов электролитов, позволяющий в одной процедуре гальваностатической поляризации осадить все компоненты ОНГ в нужную структуру слоя и получать ОНГ пленки с воспроизводимой морфологией и свойствами.
- Разработаны оригинальные методические подходы к оценке стабильности и однородности распределения компонентов в осаждаемом слое («химического профиля») синтезируемых ОНГ пленок, определение состава и структуры которых другими методами невозможны или затруднены.
- Установлено влияние природы используемых при синтезе компонентов, их концентрации, рН раствора синтеза и параметров электрохимической поляризации на морфологию и свойства получаемых функциональных ОНГ пленок. Показано, что предлагаемый одностадийный подход позволяет многократно повысить механическую и химическую стабильность, как биорецептора и полимера, так и неорганического компонента (наночастицы благородных металлов) ОНГ слоя микроаналитических систем.
- На основании установленных закономерностей влияния состава раствора и условий синтеза на морфологию образующихся пленок предложены варианты ОНГ структур капсульная и адсорбционная. На примере системы палладий-глюкозооксидаза-Нафион с привлечением методов квантово-химического моделирования предложен механизм, заключающийся в образовании в растворе синтеза различных по заряду и составу комплексов палладия, осаждаемых последовательно на электроде, приводящий к самосборке капсульной структуры на поверхности электрода.
- Установлены и систематизированы факторы, обусловливающие отклик микроаналитических систем на основе полученных ОНГ пленок с наночастицами благородных металлов (амперометрические нанобиосенсоры, мишени-эмиттеры ионов в методе SALDI-MS); показано, как условия синтеза, химический состав и морфология наноструктурированного ОНГ слоя влияют на тип выходного сигнала. Так, при регистрации аналитического сигнала в капле раствора аналита с поверхности нанобиосенсоров, полученных по одностадийной методике, следует учитывать

влияние растворенного кислорода и оксидов наночастиц благородных металлов. Формирование аналитического сигнала в методе SALDI-MS с поверхности мишеней-эмиттеров на основе наночастиц благородных металлов и ОНГ на их основе невозможно без присутствия ионов реагентов на поверхности, а также эффектов ее реструктуризации в ходе лазерного импульса.

- Систематизированы представления о процессах лазерной десорбции/ионизации биомолекул с поверхности наночастиц благородных металлов и их ОНГ методом SALDI-MS; установлены особенности ионизации целого спектра низкомолекулярных биоаналитов (аминокислот, пептидов, жирных кислот, триацилглицеридов, углеводов, антибиотиков), заключающиеся в формировании воспроизводимых калиевых аддуктов как с молекулярными ионами ($[M+K]^+$), димерами ($[2M+K]^+$), так и с фрагментами аналитов в масс-спектрах в положительном режиме регистрации сигнала. Ионизация жирных кислот с поверхности наночастиц с толщиной пленки более 140-160 нм сопровождается катионизацией с ионом металла, например, $[M+Ag_{107}]^+$ (при ионизации с поверхности серебряных наночастиц), а интенсивность сигнала коррелирует с числом кратных связей в биомолекулах. В негативном режиме регистрации сигнала ионизация жирных кислот сопровождается образованием в массспектрах тримерных структур с кластерами воды ([3М+3H₂O-H]⁻) вследствие соосаждения молекул воды в ходе гальваностатической поляризации.
- Показана применимость различных вариантов разработанных одностадийных ОНГ функциональных пленок в микроаналитических приложениях: разработаны одноканальные амперометрические нанобиосенсоры для анализа L-лактата, Dглюкозы, пероксида водорода и глутаральдегида модульного типа; предложен подход к гетерогенной in-situ модуляции свойств апо-ферментов на поверхности электродов с кофакторами; иммобилизованными показана возможность формирования однородных полимерных сорбентов на поверхности пьезокварцевых микровесов; доказана эффективность работы нанобиосенсоров на основе ОНГ пленок с иммобилизованными оксидазами для циклического электрохимического определения глюкозы, низших спиртов, лактата и пероксида водорода без вымывания водорастворимых ферментов (GOx, AOx, LOx, CAT, HRP).
- Сформулированы и систематизированы требования к оптимальной структуре и составу функциональных ОНГ слоев в зависимости от типа измерительной аналитической платформы.

Теоретическая значимость

В работе определены закономерности формирования наноструктурированных самоорганизующихся ОНГ пленок в зависимости от природы органического (полимер, биорецептор, малые органические молекулы) и неорганического компонента (прекурсоры ионов благородных металлов); разработаны способы

определения их химической и механической стабильности, установлено влияние дизайна и структуры получаемых пленок на их физико-химические и аналитические свойства.

Полученные в работе результаты позволили сформулировать и развить новое направление, заключающееся в научно обоснованном подходе к дизайну тестустройств на основе самоорганизующихся ОНГ пленок путем направленного изменения их структуры и свойств под требования конкретной аналитической задачи и типа измерительной платформы (нанобиосенсоры, мишени-эмиттеры ионов). Предложенный механизм взаимодействия компонентов в растворе смешанного электролита и последовательность соосаждения позволяет объяснить структуру ОНГ слоя на электроде, которая важна при оценке электроаналитических свойств таких пленок в биосенсорах. Оптимальная структура функционального слоя пленки, обеспечивающая высокую механическую и химическую стабильность ОНГ нанобиосенсоров, представляет собой капсульную структуру.

Показано, что эффективность ионизации в методе SALDI-MS с ОНГ пленок на наночастиц благородных металлов определяется эффектами реструктуризации, поверхностной кислотностью/основностью, размерным фактором, термопроводностью, также присутствием доступностью И реагентов/функциональных групп. Интенсивность процессов реорганизации поверхности эмиттеров находится в прямой зависимости от диаметра наночастиц благородных металлов. Увеличение диаметра и увеличение температуры плавления наночастиц (зависит от степени химической чистоты) приводит к снижению SALDIсигнала. Снижение температуры плавления наночастиц позволяет снизить энергетические требования к мишеням, что может быть удобным способом при проектировании новых дизайнов эмиттеров ионов заданной/улучшенной c эффективностью ионизации биоаналитов.

Установлена взаимосвязь между эффективностью процессов лазерной десорбции ионизации в методе SALDI-MS и электрокаталитической активностью электродов на основе ОНГ пленок.

Практическая значимость

Показана применимость разработанного способа синтеза для получения разнообразных по составу функциональных ОНГ пленок, формируемых на электродной подложке из растворов сложного состава, содержащих ферменты (GOx, AOx, LOx, HRP, CAT) или низкомолекулярные органические биомолекулы (кофакторы - FAD, FMN, MALDI матрицы – CHCA), полимеры (Naf, PPy, ALG, Tween-80, PEG-3500, Triton X-100) и ионы-прекурсоры благородных металлов (ионы серебра, палладия).

Разработанные методологические решения анализа структуры наноразмерных ОНГ вносят существенный вклад в область наноаналитики и были успешно апробированы при анализе состава И степени химической однородности гибридных нанобиосенсоров. функциональных пленок на поверхности Предложенные подходы позволят повысить воспроизводимость состава ОНГ пленок при использовании в сенсорике, например, от сенсора к сенсору и от партии к партии.

Приобретенные системные знания о механизмах формирования аналитического сигнала и факторах, влияющих на него в электрохимических нанобиосенсорах и масс-спектрометрии на чипе, вносят существенный вклад в развитие теории этих методов.

Установленные в работе закономерности физико-химических процессов, происходящих при самосборке, эксплуатации и формировании сигнала с поверхности тест-систем на основе ОНГ пленок, позволили разработать несколько оригинальных аналитических приложений, в *m.ч.* способ *in situ* модификации структуры апоферментов в капле раствора непосредственно на электродах за счет реакции с иммобилизованным кофактором, *in vitro* способ электрохимического профилирования клеток *Saccharomyces cerevisiae*, способ контролируемого формирования функциональной полимерной пленки на поверхности пьезокварцевых микровесов, а также создать целый спектр индивидуальных SALDI и гибридных MALDI/SALDI мишеней-эмиттеров ионов для скоростной масс-спектрометрии.

В работе решена проблема экспресс-определения целой серии низкомолекулярных физиологически активных веществ, анализ которых классическими методами затруднен: (глюкоза, лактат, жирные кислоты и др).

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой работы явился новый подход к синтезу функциональных ОНГ пленок из растворов прекурсоров компонентов сложного состава методом одностадийного гальваностатического осаждения, совокупность методологических решений анализа состава наноструктурированных ОНГ материалов на основе методов масс-спектрометрии, а также известные теоретические и экспериментальные подходы физической, аналитической и биоаналитической химии.

Для изучения морфологии и физико-химических свойств сформированных тестсистем на основе ОНГ пленок использовали современные методы анализа (РЭМ, ЭДА, ПЭМ, АСМ, спектроскопия в УФ-видимой области, ИК-Фурье, комбинационного рассеяния).

Верификацию механической и химической стабильности ОНГ проводили электрохимическими методами и методами масс-спектрометрии (ИСП-МС, ВЭЖХ со спрей-ионизацией, с лазерной десорбцией-ионизацией) с введением дополнительных оценочных критериев для оценки стабильности и химической однородности гибридных пленок.

Положения, выносимые на защиту:

- 1. Механизм одностадийного синтеза самоорганизующихся органонеорганических функциональных пленок, включающий стадии образования комплексов ионов металлов с биополимерными компонентами в растворе.
- 2. Комплексный методический подход к аттестации состава и структуры ОНГ пленок, содержащих неорганический и биополимерный компоненты.
- 3. Путем изменения числа, природы и соотношения компонентов функционального слоя в смешанном растворе электролита возможно изменять структуру функционального ОНГ слоя с капсульной на адсорбционную; наиболее стабильную работу ОНГ в составе нанобиосенсоров обеспечивает капсульная структура; адсорбционная структура ОНГ слоя обеспечивает оптимальную работу мишеней эмиттеров ионов в скоростной масс-спектрометрии.
- 4. Метод регистрации электро-аналитических сигналов с поверхности разработанных нанобиосенсоров, позволяющий подавить перекрестную чувствительность наночастиц в составе ОНГ пленки к кислороду.
- 5. Механизм формирования аналитического сигнала в методе SALDI-MS с поверхности электроосажденных пленок включает стадии реорганизации их поверхности и высвобождения ионов-реагентов при действии лазера.
- 6. Совокупность способов экспрессного электрохимического и массспектрометрического определения низкомолекулярных биомолекул, имеющих важное физиологическое значение.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается непротиворечивостью полученных результатов известным из научно-технической литературы для аналогичных систем, использованием классических теоретических и экспериментальных подходов к описанию и анализу результатов, достаточным количеством экспериментов с использованием современных методов и методических подходов, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации.

Результаты работы доложены на отечественных и зарубежных конференциях: II-d Volga conference on Analytical chemistry (Russia, 2001); I-st Regional conference "The problems of chemistry and chemical technology" (Russia, 2001); VII International "Forum Chemiczne" (Poland, 2001); I, II International forum "Analytics and analysts" (Russia, 2003, 2008); XIII, XVII Scientific conference of young scientists "The problems of theoretical and practical chemistry" (Russia, 2003, 2007); XIL, XIX Международна наукова конференція молодіх ученіх і аспірантів, (Украіна, 2003, 2004); XLVI, XLVII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Wrocław, Poland, 2003, 2004); V

All-Russian conference "Ecoanalytics" (Russia, 2003); XIX International symposium "Ars Separatoria" (Poland, 2004); VII All-Russian symposium "Test-methods of chemical analysis" (Russia, 2004); II International conference "Environmental protection in healthresort zone" (Україна, 2004); VII conference "Analytics of Siberia and long-distance East" (Russia, 2004); All-Russian conference "Analytics of Russia" (Russia, 2004); II Regional conference "The problems of theoretical and practical analytical chemistry" (Russia, 2004); XLVIII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Poland, 2005); II, III International symposium «Separation and concentration in analytical chemistry and 2005, 2011); III, IV International conference "Extraction of radiochemistry» (Russia, organic compounds" (Russia, 2005, 2010); II International forum "The actual problems of modern chemical science" (Russia, 2006); VI All-Russian conference for analysis of the environment objects «Ecoanalitica-2006» (Russia, 2006); International Congress on Analytical Sciences "ICAS-2006", (Moscow, Russia, 2006); Proc. XXI International Symposium on physico-chemical methods of separation «Ars Separatoria 2006» (Poland, 2006); III All-Russian conference with international participation "Physicochemical basics of polymer chemistry" (Russia, 2006); International Symposium of Olfaction and Electronic Noses "ISOEN 2007" (Russia, 2007); II All-Russian conference on analytical chemistry with international participation (to jubilee academician Y.A. Zolotova) «Analytics of Russia, 2007» (Russia, 2007); Russian Symposium for chemistry and extractions technology (to jubilee academician N.M. Zhavoronkova) (Russia, 2007); International theoretical and practical conference "Fundamental aspects of biology to solve ecological problems", to jubilee academ. K.V. Gorbunova (Russia, 2008); II, III International scientific and technical conference "Modern methods in theoretical and practical electrochemistry" (Russia, 2010, 2011).

Кроме того, материалы работы прошли апробацию в виде приглашенных устных докладов и лекций: VII annual Russian conference for junior scientists/VII Ежегодная Конференция Молодых ученых, (Russia, 2010); XIII International conference "Physicochemical basics of ionic-exchange processes - IONITE -2011", Voronezh, Russia (2011); EMN Meeting on Mesoporous Materials, Czech Republic, Prague (2016); 14-th Euro Fed Lipid Congress, Belgium, Gent, (2016); European Molecular Biology Laboratory, Microfluidic, Heidelberg, Germany (2016); 7-th World Congress on Mass Spectrometry, Italy, Rom (2017); 12-th International Biosensor Conference, (2017); 10-th World Congress of Chemical Engineering, Spain, Barcelona (2017); 4-d Word Congress on Mass Spectrometry, United Kingdom, London (2017); 5-th International Conference on Biosensing Technology, Italy, Riva del Garda (2017); 28th Unniversary World Congress on Biosensors, USA, Miami (2018).

"Nano-heterostructures in the analysis of complex gas and liquid mediums", INM – Leibniz Institute for New Materials, Saarbrucken, Germany (2015). "The key parameters affected LDI-MS and its application in a droplet lab-on-a-chip", Institut für Analytische

Chemie, Universität Leipzig, Leipzig, Germany (2018). "Exploring the potential of electroplated noble metal-semiconductor hybrids within bio- and environmental sensing", Korea Institute of Science and Technology (KIST-Europe), Saarbrucken, Germany (2018). "Removal of heavy and radioactive metals from the aqueous solutions by means of alginate scavengers", IBMT-Fraunhofer Institut für Bomedizinische Technik, St. Ingbert (2018). "Analytics for Analysts: the role of analytical and bioanalytical chemistry in modern biotechnology, biosensing, bio-and environmental screening", Technical University of Denmark (DTU), Lyngby, Denmark (2018). "The big help of the small deposits: from mass spectrometry on a chip to bio- and environmental sensing", University of Graz (Karl-Franzens-Universität Graz), Graz, Austria (2019). "The role of chemical nanoanalytics in microsystems and sensor development", IMM - Fraunhofer-Institut für Mikrotechnik und Mikrosysteme, Maiz, Germany (2019). "Tailored Nanomaterial-based Enzymatic Biosensors for Biotechnology and Life Science", center office of Fraunhofer-gesellschaft, Munich, Germany (2019). Exploring the potential of HR-ICP-MS towards amperometric sensors design optimization and their operating conditions identification, Hochschule Krems, Austria (2019). "The approaches to bridge the instrumental analytics and life cycle analysis", University of Applied Science, Hochschule Kaiserslautern, Germany (2020). "EnCoRe: Novel platform towards encapsulation, storage and controlled release of biomolecules. The application for bioanalytics, biosensor development and biotechnology", Technische Universität Wien (TU Wien), Austria (2021). Design und Entwicklung von biologischen Lab-on-a-Chip Systemen, Technische Universität Wien (TU Wien), Austria (2021). Lehrkonzept im Bereich von Konventionelle analytische Chemie und Schnellanalytik (Fakultät für Chemie, Universität Wien), Austria, (2023).

Основные результаты работы опубликованы в 42 статьях в рецензируемых научных журналах, 38 из которых входят в перечень изданий, утвержденный Ученым советом ИОНХ РАН, защищены 12 патентами РФ, и изложены более чем в 45 тезисах докладов на отечественных и зарубежных конференциях разных уровней.

Личный вклад автора

Все экспериментальные работы, представленные в диссертации, выполнены лично автором или при его непосредственном участии. Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоит в формировании научного направления, постановке задач, разработке подходов к их решению, планированию экспериментов, интерпретации данных и обобщению результатов, подготовке материалов к публикации (от концепта статей до их написания и редактуры).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, шести глав, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 396 страницах текста, содержит 139 рисунков и 35 таблиц, приложение, список цитируемой литературы насчитывает 329 библиографических наименований.

Список сокращений и обозначений

 $t_{3\pi}$ — продолжительность электролиза ${
m Me}^0$ — наночастицы благородных металлов

 I_k — катодный ток $Pd ext{-}NPs$ — наночастицы палладия $Ag ext{-}NPs$ — наночастицы серебра ALG — альгинат $Au ext{-}NPs$ — наночастицы золота PPy — полипиррол AAO — пористый оксид алюминия Naf — $Ha\phi$ ион DIOS — пористый оксид кремния

MALDI-MS – матрично-активированная GOx – глюкозооксидаза

лазерная десорбция/ионизация

СНСА – α-циано-4-гидроксикоричная кислота LOx – лактатоксидаза

SALDI-MS – поверхностно-активированная МАМ – многоступенчатый амперометри-

лазерная десорбция/ионизация ческий режим

FAD – флавинадениндинуклеотид ЦВА – циклическая вольтамперометрия

FMN – флавинмононуклеотид AM – хроноамперометрия

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе проведен обзор научно-технической литературы, в котором рассмотрены современные аналитические тест-системы на основе наноразмерных ОНГ структур для качественного и количественного анализа малых биомолекул. Показано, что большинство гибридных микроаналитических систем (SALDI-MS, MALDI-MS, электрохимические биосенсоры) имеют ряд схожих проблем, связанных низкой воспроизводимостью получаемых результатов, химической неравномерностью И механической нестабильностью формирующейся функциональной пленки, выраженным эффектом «сладких пятен» (MALDI-MS), а также неоднозначностью результатов при работе в многокомпонентных пробах. Такое поведение микроаналитических систем связано с неоптимальными способами формирования функциональных гибридных пленок (послойное нанесение, метод изменяющимися свойствами ИХ непредсказуемо при введении биоорганических компонентов (полимеры, биорецепторы).

Во **второй главе** подробно описаны варианты дизайна ОНГ пленок, предназначенные для электрохимического и масс-спектрометрического определения малых биомолекул. Обоснован предлагаемый в работе подход одностадийного синтеза ОНГ пленок на электродных подложках гальваностатическим двухэлектродным методом из растворов сложного состава, содержащих прекурсоры

компонентов гибридного слоя. Методологические аспекты предлагаемой стратегии схематически представлены на **Рис. 1**.

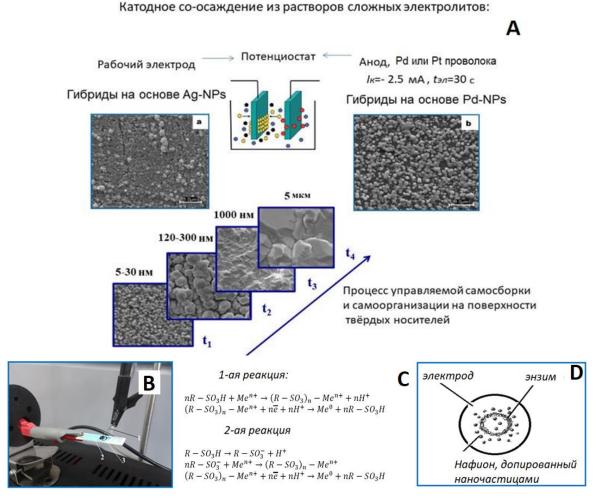


Рис. 1 — (**A**) — Схематическое изображение процесса управляемой самосборки ОНГ пленок (в зависимости от I_k , и $t_{\mathfrak{I}\mathfrak{I}}$ из смешанного раствора прекурсоров ОНГ. (**B**) — Экспериментальная установка одностадийного соосаждения компонентов гибридной пленки из капли раствора, химизм (**C**) и схематическая иллюстрация процессов синтеза (**D**): 1 — противоэлектрод; 2 — трафаретный электрод, SPE; 3 — 10 мкл раствора синтеза. *Примечание*: Me^{n+} — ионы металла; Me^0 — наночастицы металла, R-SO₃ — сульфогруппы полимера (показано для Нафиона как связующего агента). В данном примере состав смешанного электролита в капле Pd-электролит/ GOx/ Naf, 1:1:1 v/v/v. При токе -2.5 мА в течение 30 с формируется ОНГ состава Pd-NPs/GOx/Naf. 1

Меняя ток и время электролиза, концентрацию и состав раствора синтеза, содержащего прекурсоры компонентов формирующегося ОНГ, режим поляризации, можно получать разные по составу и архитектуре слоя ОНГ материалы. В рамках

_

¹После синтеза функционального слоя тестирование электродов проводили в капельном режиме. 150 мкл раствора аналита непосредственно наносилось на трафаретные электроды с последующими испытаниями в АМ, МАМ, ЦВА режимах.

этого подхода были получены ОНГ структуры с различными неорганическими, биохимическими и полимерными компонентами (Табл. 1).

Табл. 1 — Состав ОНГ-систем, используемых для установления физико-химических основ одностадийного синтеза из растворов смешанных электролитов

Неорганический	Полимерный компонент	Био - или органический
компонент	/функциональные группы	компонент
Pd-NPs	 Нафион/-SO₃H; -CF₂- 	 Глюкозооксидаза/GOx
Ag-NPs	• Полипиррол/(С ₄ H ₂ NH) _n	 Лактатоксидаза/LOx
Au-NPs	 Альгинат/-ООН, ОН-,-О- 	• Алкогольоксидаза/АОх
• AAO	 Тритон X-100/С₂Н₄О- 	 Пероксидаза/HRP
 монокристал. SiO₂ 	• ПЭГ-5000/ -О-	• Каталаза/САТ
 пористый SiO₂ (DIOS) 	• Tween-80/-COO-, OH-, -O-	• Кофакторы (FAD, FMN)
		 α-циано-4-гидрокси-
		коричная кислота (СНСА)

Для верификации аналитических сигналов, получаемых с поверхности таких ОНГ систем, было разработано несколько инновационных подходов. Так, на основе метода масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) разработан оригинальный способ определения стабильности неорганического компонента в ОНГ структурах (і). На основе ВЭЖХ с масс-спектрометрией в электроспрее предложен способ контроля надежности закрепления полимерного компонента ОНГ (ii). На основе измерительной платформы метода SALDI-MS предложен алгоритм мониторинга и контроля биоорганического компонента в составе ОНГ пленки (ііі), работающий по принципу биохимического сканирования. С использованием кислородного оптического минисенсора разработан способ контроля активности ферментов группы оксидаз после их соосаждения с наночастицами неорганической фазы на поверхность электродов (iv).

Закономерности влияния архитектуры используемых в работе ОНГ слоев на микроаналитических систем на их основе изучались на примере свойства обнаружения низкомолекулярных (≤1000 Da) биомолекул/биоаналитов (**объекты** анализа): D-глюкоза, L-лактат, низшие спирты (C₁-C₄), пероксид водорода, антибиотики (эритромицин, сульфаметазин, резерпин), пептиды (брадикинин, агеотензин), аминокислоты (пролин (Pro), гистидин (His), глутамин (Gln), аргинин (Arg)), жирные кислоты (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3), триацилглицериды (триолеин, трипальмитин). С учетом объема проб (часто не превышает уровня нанолитров), высокой чувствительности этих веществ к температурам и быстрой деградации, их определение в исходной аналитической форме (в m.ч. без биоаналитическими дериватизации) традиционными методами, включая электрофорез, газовую или жидкостную хроматографию, сильно затруднено.

Третья глава посвящена изучению механизма формирования функциональных ОНГ пленок на поверхности электродов из смешанных многокомпонентных растворов при гальваностатической поляризации, а также способам характеристики их структуры и состава.

Структура ОНГ слоя для целей биоаналитики требует учета процессов, протекающих с участием всех составляющих материала. Биокомпонент (фермент класса оксидаз) катализирует окисление биомолекулы с выделением H₂O₂, который в свою очередь способен окисляться или восстанавливаться на наночастицах неорганической фазы при наложении поляризации. При этом протекает ряд редокспревращений (показано на примере глюкозы и GOх в нейтральной среде):

Glucose +
$$GOx/FAD_{(ox)} \rightarrow GOx/FAD_{(red)} + Glucolactane$$
 (1)

$$GOx/FAD_{(red)} + O_2 \rightarrow GOx/FAD_{(ox)} + H_2O_2$$
 (2)

$$H_2O_2 + 2H_2O + 2e^-(Me) \rightarrow 4OH^-$$
 (3)

$$O_2 + 2Me \rightarrow 2Me - 0 \tag{4}$$

Реакции (2), (4) протекают в присутствии растворенного кислорода. Наличие оксидов на поверхности частиц металла (сформированных в ходе синтеза или в ходе реакций (3), (4)) общего состава Me_xO_y может также стимулировать протекание реакций:

$$\frac{nMe}{Me_xO_y} + Glucose \xrightarrow{2xH^+,xe^-} (n+x)Me + \frac{x}{y}H_2O + Glucolactane$$
 (5)

$$nMe/Me_xO_y + 40H^- \rightarrow (n-2)Me/Me_{x-2}O_{y+2} + 2H_2O + 2e^-$$
 (6)

Соответственно, природа и химический состав поверхности частиц металла могут оказать существенное влияние на аналитические свойства формируемых ОНГ пленок. Очевидно, что необходимо контролировать состав и структуру образующихся на поверхности электрода функциональных ОНГ пленок.

В первую очередь были охарактеризованы морфология (**Puc. 2**), топология (AFM), химический состав поверхности (EDX, FT-IR, LDI-MS) и биохимическая активность (кислородный оптический минисенсор, электрохимические исследования) сформированных одностадийным осаждением ОНГ пленок.

Соосаждение всех компонентов пленки подтверждали помощью предложенного в этой работе подхода LDI-MS биохимического сканирования. Наличие в спектре FAD, используемого в качестве кофактора при производстве GOx (Рис. 3А), доказывает успешное соосаждение фермента совместно с кофактором (типы ионов в масс-спектре [M-H+Na]+, [M-H+Na+1]+, [M-H+Na+2]+-, [M-2H+2Na]+ и [М-2H+2Na+1]+). Идентичность формирующихся типов ионов была уставлена путем соосаждения индивидуального кофактора FAD совместно с Нафионом и Pd-NPs, **Рис.** 3В. Другим важным наблюдением этой серии экспериментов и результатом разработанного LDI-MS биохимического алгоритма сканирования является возможность визуализировать молекулы воды (18 *а.е.м.*) непосредственно в структуре гибридного нанослоя (**Рис. 3A**), что стало важным результатом для последующего моделирования процессов формирования функциональной пленки.

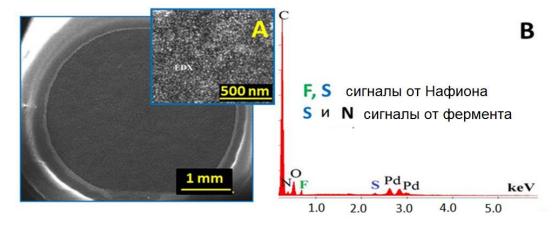


Рис. 2 — Микрофотографии (**A**) и EDX-спектр (**B**) поверхности нанобиосенсора с ОНГ пленкой, полученной соосаждением из трехкомпонентного раствора (Pd-электролит/GOx/Naf, 1:1:1 v/v) при I_k = -2.5 мA, $t_{3\pi}$ = 30 с.

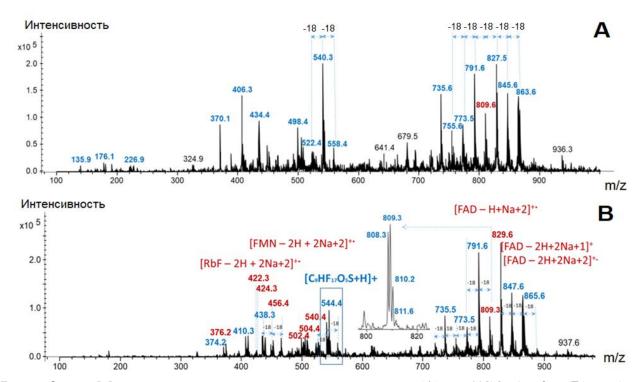


Рис. 3 — Масс-спектры с поверхности пленок (**A**) Pd/GOx/Naf; (**B**) FAD, соосажденного с Нафионом и Pd-NPs. Верификация химии поверхности проводилась с использованием алгоритма LDI-MS биосканирования.

Предложенные в работе количественные критерии LDI-MS биосканирования позволили установить количество соосажденного Нафиона (m/z 544, [C₉HF₁₇O₅S+H]⁺) в ОНГ слое (78%). Эффективность осаждения Нафиона методом послойного

нанесения (LbL) оказалась гораздо ниже (всего 11%), что объясняется различием в растворимости реагентов, их неконтролируемым растеканием по поверхности и деформацией при испарении. Одностадийная стратегия электроосаждения, развитая в данной работе, лишена указанных недостатков.

Для уточнения механизмов формирования функциональных ОНГ пленок при их одностадийном электроосаждении использовали метод квантово-химического моделирования с использованием теории функционала плотности на основе корреляционного функционала Lee-Yang-Parr b3lyp.² Первоначально был проведен детальный анализ молекулярных взаимодействий в многокомпонентном растворе электролита на примере GOx, Нафиона (Naf) и Pd-прекурсора.

Согласно проведенным расчетам, катионы металла в растворе взаимодействуют с остатками аминокислот на поверхности GOx, формируя промежуточный металл-ферментный комплекс $GOx \cdot nPd^{2+}$, который затем и осаждается на рабочем электроде. Наибольшее значение энергии адсорбции Pd^{2+} катионов на поверхности GOx были получены при их взаимодействии с боковыми радикалами основных аминокислот (Arg, 96.8 ккал/моль, Lys, 83.9 ккал/моль) и метионина (Met, 71.6 ккал/моль).

Далее была исследована роль полимерного компонента (на примере Нафиона) в процессе формирования биокластеров в смешанном растворе. Нафион, помимо области валентных колебаний OH^- группы, имеет характерную SO_3^- группу-маркер, что позволило провести необходимые вычисления путем моделирования FT-IR спектров. Ориентируясь на наилучшее соответствие между рассчитанными и экспериментальными спектрами колебаний Pd/GOx/Naf в области $v_{calc}(SO_3^-$ sym) при $1049~cm^{-1}$, составлена оптимизированная модельная структура, в которой сольватная оболочка сульфогруппы состоит из шести молекул воды и одной молекулы аргинина (Arg). На основе квантово-химического моделирования в сочетании с анализом ИКспектров и теории ионного обмена было предположено, что в растворе синтеза имеет место взаимодействие SO_3^- групп Нафиона с Pd^{2+} и GOx, сорбировавшим катионы Pd^{2+} .

Наибольшая энергия адсорбции катионов палладия на GOx имеет место в случае их фиксации на боковом радикале остатков Arg. Результатом взаимодействия данных областей (Pd^{2+} -Arg_{GOx}) с сульфогруппой Нафиона в системе Нафион + Pd-электролит + GOx является образование структуры, представленной на **Puc. 4**.

_

 $^{^2}$ Для расчетов был использован следующий базисный набор: 6-31G(d,p) для O, N, H, C и LANL2DZ ECP с добавочной f-функцией для Pd.

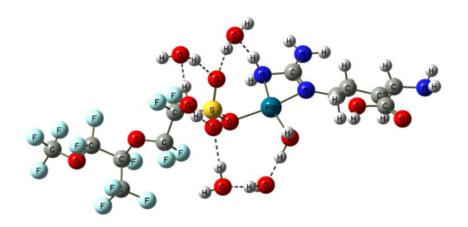


Рис. 4 — Оптимизированная структура фрагмента Нафион/Pd-электролит/GOx в растворе. Сульфогруппу окружают 6 молекул воды и молекула аргинина, боковой радикал которой сорбировал Pd^{2+} . Пунктир - водородные связи, $\varepsilon = 55$.

В растворе исследуемой трехкомпонентной смеси возможно существование непрореагировавшего с Нафионом ферментного комплекса типа $GOx \cdot nPd^{2+}$, величина заряда которого положительна, и свободных ионов палладия, образующих комплексы с низкомолекулярными компонентами электролита. При включении поляризации комплексы палладия восстанавливаются на электроде до металла. Учитывая разную подвижность низкомолекулярных и органических комплексов палладия, можно предположить следующую последовательность формирования слоя: низкомолекулярные положительно заряженные комплексы палладия раньше достигают поверхности электрода за счет большей подвижности по сравнению с полимерными или ферментными комплексами, что приводит к формированию Pd^0 на поверхности электрода. Затем происходит соосаждение палладия и фермента из комплекса $GOx \cdot nPd^{2+}$, поскольку он положительно заряжен и имеет меньшие размеры, чем нейтральный кластер Нафиона, адсорбировавший фермент-палладиевый комплекс. Осаждение Нафиона из комплекса происходит в последнюю очередь вследствие его большего размера и нейтрального заряда. В результате на электроде образуется капсульная структура, с распределением компонентов, показанным схематично на Рис. 5.

Изменение числа, соотношения и природы активных компонентов в мультикомпонентном растворе синтеза, в том числе, природы полимера, в значительной степени влияет на структуру формирующегося ОНГ слоя. Капсульная структура слоя также возможна при соосаждении GOx с Pd-NPs в отсутствии полимерного компонента (**Puc. 6A**), однако, в этом случае происходит быстрое вымывание водорастворимого фермента, что подтверждает адсорбционный механизм

закрепления его на поверхности наночастиц металла. Соосаждение Pd-NPs совместно с полимерами в отсутствии фермента приводит к формированию адсорбционных структур (**Puc. 6B-D**). Замена природы полимерного составляющего на альгинат или полипиррол в трехкомпонентных растворах, содержащих палладиевый прекурсор и GOx, приводит к формированию нерегулярных гибридных структур с преобладанием неорганического компонента.³

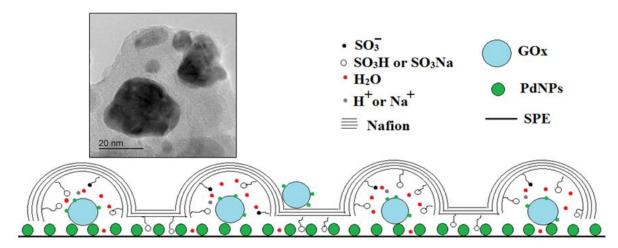


Рис. 5 — Идеализированная структура ОНГ-слоя на поверхности электрода, I_k =-2.5 MA, $t_{3\pi} = 30$ с. Bcmaвка — ПЭМ-изображение соскоба пленки Pd-NPs/GOx/Naf.

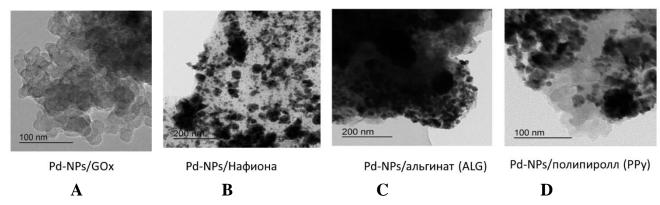


Рис. 6 — ПЭМ-изображения ОНГ структур, полученных одностадийным синтезом в идентичных условиях: I_k =-2.5 MA, t_{3A} = 30 C.

Взаимодействие ОНГ капсульной структуры Pd-NPs/GOx/Naf слоя с поверхностью рабочего электрода SPE (оксид графена) реализуется за счет адсорбционного взаимодействия Pd^0 частиц, **Pиc. 7**. Энергия адсорбции в ~18 ккал/моль обеспечивает закрепление Pd-NPs как структурообразующего элемента всего ОНГ слоя. Т.о., предложенный механизм взаимодействия компонентов в многокомпонентном растворе позволяет объяснить структуру образующегося на

_

 $^{^3}$ Электроаналитические характеристики нанобиосенсоров с разной структурой ОНГ слоя систематизиованы в Главе 4.

электродной подложке ОНГ функционального слоя, которая важна при оценке электроаналитических свойств таких пленок в биосенсорных приложениях.

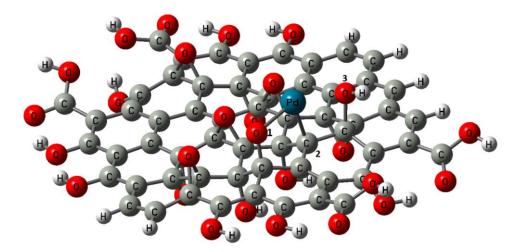


Рис. 7 — Оптимизированная структура системы Pd^0 -оксид графена.

Преимущества ОНГ пленок, полученных одностадийным синтезом (ОНГ-ОS) по сравнению с послойно организованными (ОНГ-LbL) аналогами, обобщены на **Рис. 8**. Улучшенная морфология поверхности ОНГ-ОS обеспечивает высокую химическую и механическую стабильность получаемых функциональных ОНГ-ОS пленок, а инструментально контролируемый способ их синтеза позволяет повысить воспроизводимость состава от партии к партии.

Поскольку воспроизводимость измерений в биосенсорах, модифицированных ОНГ пленками в значительной степени зависят от общей механической и химической стабильности системы, в том числе, слоя неорганического компонента, далее проводили сравнительный анализ стабильности как ОНГ-LbL, так и ОНГ-OS слоев. С помощью оптимизированного в работе ИСП-МС способа контроля неорганического составляющего ОНГ установили, что механическая стабильность ОНГ-OS слоев, оцениваемая по выносу неорганического компонента из материала, была в 30-33 раза выше, чем в структуре ОНГ-LbL аналогичного состава.

В связи с многочисленными преимуществами ОНГ-ОЅ пленок перед классическим способом их получения, можно ожидать и улучшенные аналитические характеристики при обнаружении и определении биомолекул с помощью нанобиосенсоров на их основе. Для проверки этого предположения, однако, необходимо разработать надежный способ регистрации аналитического сигнала с поверхности ОНГ-ОЅ нанобиосенсоров нового типа.

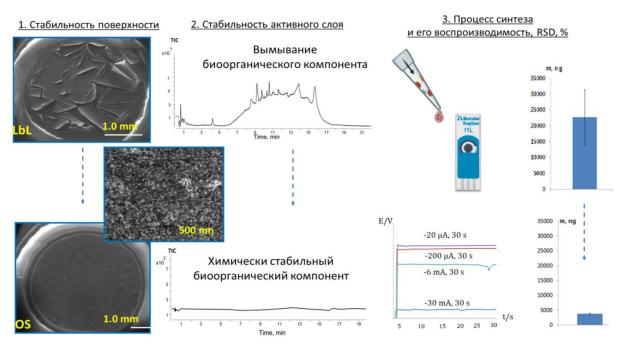


Рис. 8 — Сопоставление некоторых характеристик ОНГ-OS и ОНГ-LbL нанобиосенсоров, определяющих их аналитическую значимость.

Четвертая глава посвящена установлению ключевых параметров синтеза, влияющих на структуру и электрохимический отклик формирующихся ОНГ слоев и определяющих аналитические характеристики ОНГ-OS нанобиосенсоров.

Используемые в практике амперометрических пероксидазных сенсоров режимы поляризации относятся к процессам электровосстановления пероксида водорода на катализаторах разной природы, например, кристаллах берлинской лазури $(БЛ)^4$. Поскольку согласно реакциям (3) и (4) частицы металла в ОНГ реагируют с необходимо кислородом установить закономерности пероксидом И взаимодействия для электрохимических Pd-NPs. БЛ способна селективно реагировать на пероксид водорода, однако, для наночастиц благородных металлов растворенный кислород является мешающим агентом, поскольку область потенциалов электровосстановления H_2O_2 и кислорода (PBK) пересекаются. В то же время, для пероксида водорода, образующегося в ходе ферментативной реакции с оксидазами (см. реакции (2)-(4)), возможно каталитическое разложение на неорганических центрах ОНГ, которое будет протекать с выделением кислорода по брутто-реакции:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Me} 2H_2O + O_2$$
 (7)

Иными словами, анализируя выделение или потребление кислорода в капле раствора на электроде, можно сравнить каталитические свойства неорганических

_

⁴A.A. Karyakin, Electroanalysis, **2001**, 13, 813-819.

компонентов ОНГ пленок. Особенно важно это в области низких концентраций пероксида водорода, когда количество растворенного в пробе кислорода сопоставимо с концентрацией образующегося пероксида.

Сопоставление результатов тестирования оптического минисенсора кислорода и хроноамперометрии (AM) подтверджает нескольких конкурентых реакций, протекающих на поверхности Pd-NPs-модифицированного электрода при его эксплуатации в капле раствора пероксида водорода (**Puc. 9**).

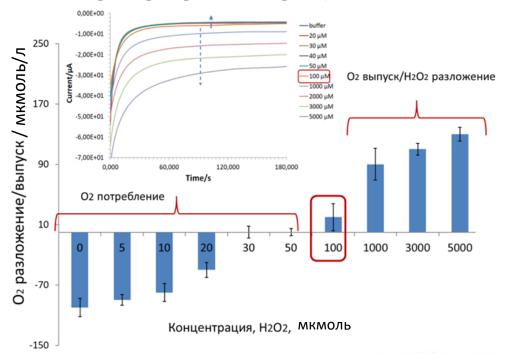


Рис. 9 — Отклик оптического минисенсора кислорода в капле раствора пероксида водорода во время AM измерений (вставка) при потенциале -0.08 В на трафаретном электроде (SPE) с Pd-NPs (I_k =-2.5 MA, t_{3A} = 30 C).

Фактически, чувствительность Pd-NPs к H_2O_2 в катодном режиме поляризации проявляется только при концентрациях пероксида выше 100 мкм. Следовательно, классический режим катодной поляризации не подходит для определения малых концентраций образующегося в ходе биохимических реакций пероксида.

В связи с этим в работе был разработан и стандартизирован способ двухступенчатой катодно-анодной поляризации (МАМ-режим) для детекции пероксида водорода: *первый шаг* – поляризация при потенциале катодного пика для восстановления поверхности палладия, *второй шаг* – поляризация при анодном потенциале, выбранном в диапазоне 0.2...0.4 В для регистрации тока, связанного с окислением пероксида водорода (**Рис. 10**).

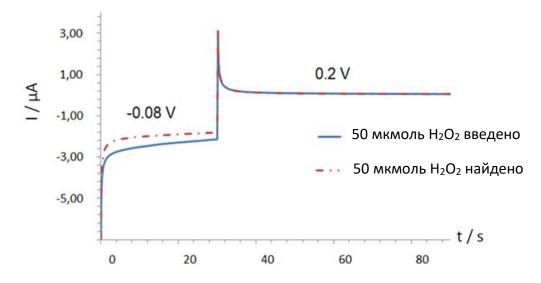


Рис. 10 — Результаты теста на правильность определения H_2O_2 в МАМ-режиме посредством SPE, модифицированного Pd-NPs (I_k =-2.5 мA, t_{3n} = 30 c).

Такой методический подход позволяет уменьшить поляризацию пероксидзависимых систем от $0.7~\rm B$ до $0.2~\rm B$ в сравнении с аналогами, а правильность определения пероксида повысить до 101.3%.

Для проверки селективности и чувствительности определения пероксида водорода в реальных ферментативных средах сенсором на основе Pd-NPs (неферментное определение), проводили электроопределение веществ, которые также могут проявлять электроактивность в заданных экспериментальных условиях (этанол, уксусная кислота, глицерин, глюкоза). Согласно проведенным тестам, сенсор на основе Pd-NPs не обладает чувствительностью ни к одному из протестированных соединений в ферментативных средах (pH 4-7), кроме пероксида водорода, что, вероятно, связано со стадией адсорбции этого аналита. Энергии адсорбции (E_{ads}) пероксида на поверхности Pd/PdO были максимально высокими (E_{ads} (Pd/H₂O₂) = -15.2 ккал/моль; E_{ads} (PdO/H₂O₂) = -17.4 ккал/моль) в сравнении со спиртами, органическими пероксидами и др. соединениями, что также будет влиять на концентрацию H_2O_2 приэлектродном слое.

Разработанный МАМ-режим регистрации электроаналитического сигнала пероксид-зависимых систем позволил подобрать состав и структуру ОНГ-ОЅ пленок нанобиосенсоров для улучшения их аналитических возможностей. С этой целью варьировали условия синтеза ОНГ-ОЅ нанобиосенсоров глюкозы: состав раствора, концентрацию фермента и полимерного связующего, время и ток осаждения. Так, увеличение концентрации фермента GOx от 1 до 9 мг/мл в растворе синтеза сопровождалось практически линейным увеличением чувствительности ОНГ-ОЅ нанобиосенсора к глюкозе. Дальнейшее увеличение концентрации GOx до 12-18 мг/мл приводило к значительной потери чувствительности и образованию адсорбционной структуры ОНГ слоя, способствующей вымыванию фермента.

Варьирование параметров поляризации (время и ток) показало, что не только количество биорецептора, но и диаметр наночастиц (по данным РЭМ) влияют на формирующуюся структуру ОНГ слоя и, как следствие, на аналитические характеристики нанобиосенсора на его основе, **Табл. 2**.

Табл. 2 — Влияние структуры ОНГ-ОЅ пленок на аналитические характеристики нанобиосенсоров (оценивались в капле в присутствии 150 мкл глюкозы)

Дизайн	Область	Чувствитель-	Базовая линия,	Правильность	
	линейности,	ность,	μΑ	опреде	ления
	мМ	μΑ/μмol		Введено,	Найдено,
				мМ	мМ
-2.5 мА, 30 с	0.2-100	115	2.90·10 ⁻¹ ±0.11	1.00	0.92 ± 0.02
5 мг/мл (GOx)					
-5 mA, 30 c	5-50	49	1.20·10 ⁻¹ ±0.12	1.00	0.87 ± 0.01
5 мг/мл (GOx)					
-2.5 мА, 30 с	0.2-100	160	5.50·10 ⁻¹ ±1.27	1.00	0.96 ± 0.03
9 мг/мл (GOx)					
-5 мА, 120 с	Осаждения	Осаждения			
9 мг/мл (GOx)	фермента не	фермента не	$3.05 \cdot 10^0 \pm 0.17$	-	-
·	происходит	происходит			
-2.5 мА, 90 с	1-5	468	$4.83 \cdot 10^{-1} \pm 0.32$	1.00	0.89 ± 0.05
9 мг/мл (GOx)					
-1.0 мА, 30 с	1-10	40	$7.50 \cdot 10^{-1} \pm 0.11$	1.00	0.94 ± 0.04
9 мг/мл (GOx)					

За счет улучшенной стабильности всех компонентов ОНГ слоя диапазон линейности градуировочных зависимостей для OS-ОНГ нанобиосенсоров существенно выше, чем для LbL-ОНГ аналогов, **Puc. 11**.

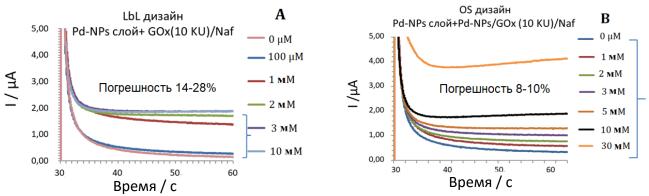


Рис. 11 — Сравнение некоторых аналитических характеристик ОНГ-LbL (**A**) и ОНГ-OS (**B**) нанобиосенсоров при испытаниях в капле растворов глюкозы, рН 6.98.

Важным вопросом является роль природы полимерного компонента ОНГ слоев в предлагаемом одностадийном режиме синтеза в формируемой структуре, поскольку изменение природы полимерного компонента неизбежно вызовет изменение

процессов, происходящих в растворах смешанных электролитов, обсужденных в Главе 3. Действительно, ОНГ пленки, полученные из многокомпонентных растворов, содержащих прекурсоры альгината (ALG) или полипиррола (PPy) в качестве альтернативы Нафиону, при идентичных параметрах электролиза (-2.5 мA, 30 с) не проявили значимых электроаналитических откликов в составе нанобиосенсоров при определении глюкозы. Область линейности градуировочной зависимости нанобиосенсора с Pd-NPs/GOx/ALG не превышала 1-3 мM, а с Pd-NPs/GOx/PPy 1 мМ. Такое поведение ОНГ-ОЅ систем с иными полимерами связано с формированием функционального слоя адсорбционного типа вместо 3D-капсульной структуры, что приводит к быстрому вымыванию водоростворимого фермента, **Puc. 12**.

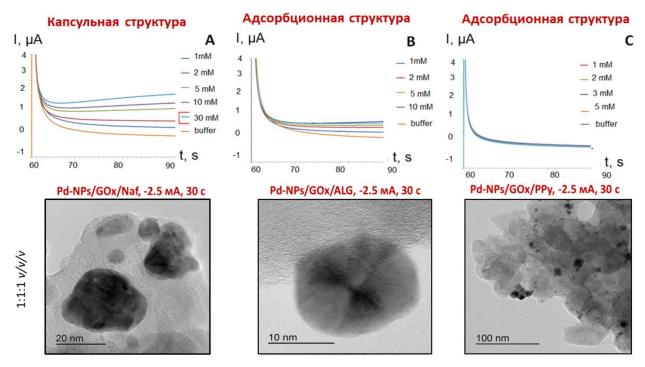


Рис. 12 — Роль структуры ОНГ-OS слоя на электроаналитические характеристики нанобиосенсоров глюкозы.

Дальнейшие исследования показали, что для формирования капсульной структуры GOx с ALG и PPy одноэтапный синтез не подходит, и требуется изменение режима поляризации при формировании ОНГ пленки. Замена Pd-NPs в составе ОНГ-OS на Ag-NPs приводила к значительному дрейфу базовой линии электродов и низкой эффективности соосаждения биополимерного компонента.

Т.о., меняя соотношение и концентрацию активных компонентов в растворе синтеза и режим их осаждения, можно управлять структурой функционального ОНГ слоя и влиять на аналитические характеристики нанобиосенсоров на их основе.

Пятая глава посвящена изучению адсорбционно-десорбционных взаимодействий тестовых аналитов с поверхностью наночастиц благородных металлов. В данном случае биомолекула, нанесенная на слой наночастиц,

осажденных электрохимически на подложку (мишень), является одновременно и модельной системой, отражающей адсорбированный биоорганический слой на поверхности наночастиц в ОНГ-структурах, получаемых из многокомпонентных растворов. Образование прочно связанных с наночастицами металла в ОНГ адсорбционных комплексов биомолекул может привести угнетению чувствительности амперометрического нанобиосенсора как за счет уменьшения электроактивной поверхности катализатора, так и за счет недоступности аналита для биохимического взаимодействия биорецептором. Поэтому закономерностей десорбции биоорганического компонента с поверхности наночастиц важно для прогнозирования электроаналитических свойств микро-измерительных тест-систем на основе ОНГ.

Для изучения описанных явлений подходят методы ионизации с твердых подложек, включая метод SALDI-MS. После ионизации всех компонентов ОНГ в масс-спектрах (**Puc. 4**) помимо обнаружения тестовых аналитов возможно определить характер их адсорбции, т.е. типы формирующихся связей между поверхностью мишени и биомолекулой. Т.о., с помощью метода SALDI-MS, с одной стороны, представляется возможным определение природы адсорбционно-десорбционных взаимодействий между наночастицами металла в ОНГ слое и биоаналитами (i), а с другой — установление параметров, влияющих на сигнал SALDI-MS с использованием эмиттеров на основе наночастиц благородных металлов (ii).

Анализ полученных спектров показал, что при ионизации с поверхности электроосажденных Pd-NPs, Ag-NPs, Au-NPs тестовые аналиты образуют интенсивные аддукты с катионом калия $[M+K]^+$, что исключает формирование ковалентных связей с подложкой при адсорбции. В случае самопротонируемых биоаналитов в масс-спектрах⁵ также визуализируются ионы $[M+H]^+$, **Puc. 13**.

Масс-спектры, полученные с поверхности мишеней на основе Pd-NPs и Ag-NPs, характеризовались высоким качеством и низким уровнем шумов в сравнении со спектрами, записанными при определении аналогичных аналитов стандартным методом MALDI-MS, **Puc. 13, 14**.

Формирование калиевых аддуктов в масс-спектрах после ионизации биоаналитов с поверхности наночастиц благородных металлов, вероятно, можно объяснить присутствием калиевых солей в электролитах серебрения и палладирования (~8 ppm согласно результатам ИСП-ОЭС, **Рис. 14A**, вставка). При

Воспроизводимостью типов формирующихся ионов в спектре.

⁵Качество аналитической информации в масс-спектрометрии на чипе определяется: 1. Чистотой масс-спектра в области масс ≤ 600 Da; 2. Степенью фрагментации биоаналита; 3. Соотношением сигнал-шум (S/N); 4. Энергией лазера, затраченной на ионизацию; 5. Наличием аддуктов в масс-спектрах, димеров, тримеров и кластерных ионов; 6. Интенсивностью основного пика; 7.

этом ионизация этих же биомолекул с помощью MALDI сопровождалась образованием ионов типа $[M+Na]^+$ (**Puc. 14B**), а полученные спектры были загрязнены матричными ионами, что затрудняло их интерпретацию.

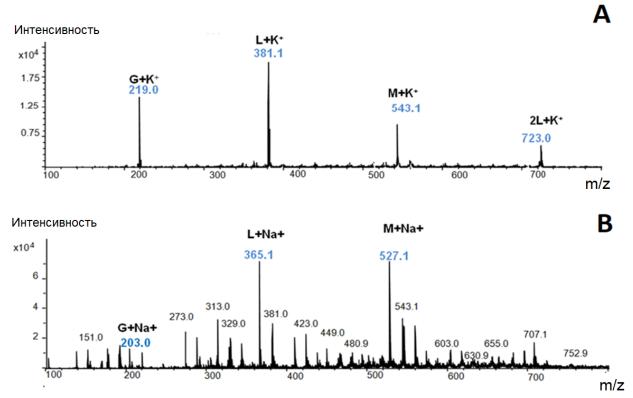


Рис. 13 – (A) SALDI и MALDI (CHCA) (B) масс-спектры 30 нг/мкл смеси глюкозы (G), лактозы (L) и мальтотриозы (M), полученные с поверхности Pd-NPs с толщиной пленки 40 нм.

В плане формирования «чистых» масс-спектров исключение составили мишени на основе Au-NPs, ионизация с поверхности которых сопровождалась сильной абляцией золотых структур (в виду их плохой адгезии к мишени), что приводило к загрязнению капилляра в источнике ионов. Кроме того, ионизация биомолекул протекала с низкой эффективностью и высокой степенью фрагментации. В этой связи мишени на основе Au-NPs были исключены из дальнейших экспериментов.

Мишени на основе пленок Pd-NPs различной толщины показали хорошую воспроизводимость стадии их синтеза (см. параметр D_f в **Табл. 3**). В зависимости от толщины пленки погрешность определения тестируемых углеводов от мишени к мишени варьировалась от 2.5 до 20 %.

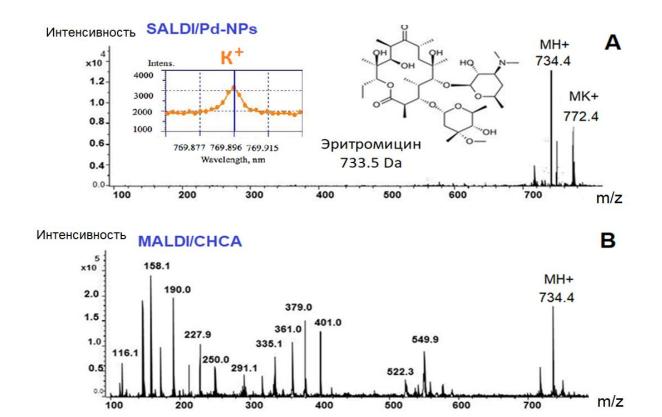


Рис. 14 — SALDI (**A**) и MALDI масс-спектры (**B**) 10 ppm эритромицина на мишени, модифицированной Pd-NPs (I_k =-2.5 MA, $t_{3\pi}=30$ C). Вставка — ИСП-ОЭС спектр электролита палладирования, содержащего катионы K^+ .

Табл. 3 – SALDI-MS воспроизводимость ионных токов тестируемых углеводов с использованием мишеней на основе Pd-NPs

Толщина пленки	$D_{ m f}^{1}$	Глюкоза	Лактоза	α-Мальтотриоза
Pd-NPs (h, нм)		$(I \pm SD) \times 10^{-4}$	$(I \pm SD) \times 10^{-4}$	$(I \pm SD) \times 10^{-4}$
20	1.81 ± 0.18	1.16 ± 0.15	4.83 ± 0.57	1.00 ± 0.20
40	1.83 ± 0.20	0.92 ± 0.14	3.90 ± 0.17	0.78 ± 0.02
60	1.88 ± 0.13	0.70 ± 0.18	2.65 ± 0.13	0.63 ± 0.11

¹Фрактальный размерный фактор (критерий самоподобия структур), используемый в качестве альтернативного критерия демонстрации воспроизводимости синтеза мишени.

Следует отметить, что разновидности K^+ аддуктов наблюдались только для наночастиц с толщиной слоя ≤ 100 нм (**Puc. 15A**), тогда как ионы кластеров Pd и Ag в основном генерировались с поверхности более массивных пленок с толщиной ≥ 120 нм (**Puc. 15B**, показано на примере Ag-NPs и смеси жирных кислот).

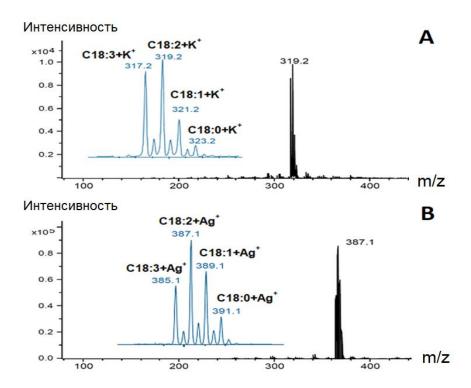


Рис. 15 — SALDI масс-спектры 300 мкг/мкл смеси жирных кислот C18:0 — C18:3 (лазер 40 %), полученные с поверхности электроосажденных Ag-NPs⁶ с толщиной слоя 20-40 нм (**A**) и 140-160 нм (**B**). 7

Интенсивность сигнала в обоих случаях коррелировала с числом кратных связей в липидах. Природа металла, как и в случае нанобиосенсоров, также играла важную роль. Так, несмотря на сходство физико-химических свойств подложек-эмиттеров ионов, включая средние диаметры наночастиц, работу выхода электрона и отражательную способность, мишени на основе Pd-NPs демонстрировали большую эффективность ионизации для всех тестовых аналитов, чем аналоги на основе Ag-NPs. Вероятным объяснением может служить разная электро- и теплопроводность серебра и палладия: для Ag эти характеристики выше, что обеспечивает быстрое распределение тепла после лазерного облучения по всей поверхности мишени с такой пленкой. В случае Pd-NPs из-за меньшей теплопроводности нагрев сосредоточен на меньшей площади. В результате с Pd поверхности становится возможным более эффективная десорбция биоаналита.

Очевидно также, что чувствительность определения разных классов биоаналитов с использованием одной и той же мишени, существенно зависит от природы малых биомолекул, см. **Табл. 4**.

⁶Установление путей ионизации биомолекул и стандартизация выходных аналитических сигналов с поверхности новых мишеней являлось отдельной подзадачей.

⁷Без дериватизации определение C18:0-C18:3 с помощью MALDI-MS невозможно.

Табл. 4 — Чувствительность определения тест-биомолекул, S^8 , (оценивали по ионному току $[M+K]^+$) с поверхности Pd-NPs (-9.4 мA, 30 с), лазер 40%, толщина пленки 40 нм

Группа аналитов	Аналит	pK _a (25 °C)	S	Тип ионов	Факторы, влияющие на LDI сигнал
Жирные	C18:0	10.15	67	K ⁺	Число двойных связей
кислоты	C18:1	9.85	33	аддукты	в молекуле
	C18:2	9.24	93		
	C18:3	8.28	100		
Амино	ARG	12.48	50	K ⁺	Кислотность
кислоты	HIS	1.70	100	аддукты	аминокислот
	CYS	1.96	117		
Антибиотики	Сульфаметазин	7.40	2667	K+, H+	Основные группы и
	Эритромицин	8.88	1333	аддукты	группы, имеющие
	Резерпин	6.60	2400		сродство к катионам
Углеводы	Глюкоза	12.28	400	K ⁺	ОН-группы
	Лактоза	11.94	367	аддукты	обеспечивают
	Мальтотриоза	11.98	667		адсорбцию аналита за
					счет Н-связей
Пептиды	Ангиотензин I	-	96	K ⁺ and	Число -ОН и СООН
	Ангиотензин II		73	H^+	групп, протонное
	Брадикинин		88	аддукты	сродство [М+Н]+

Наибольшую чувствительность мишени на основе пленки Pd-NPs проявили к сульфаметазину, содержащему в составе сульфо- и азиновые- группы. Интересно, что SPE, модифицированные Pd-NPs, также проявили высокую электрохимическую чувствительность при определении азинов и гидразинов. Иными словами, основываясь на результатах предварительного скрининга методом SALDI-MS, возможно априори подобрать класс или группу аналитов, к которым электрод с аналогичными наночастицами может проявлять электрохимическую чувствительность.

При лазерном облучении термическому воздействию подвергается не только биомолекула, но и подложка (эмиттер). Отсутствие лазерной абляции неорганических мишеней эмиттеров по сравнению с MALDI матрицами объясняется разными пороговыми значениями абляции для металлов (1-10 Дж/см²) по сравнению с органическими материалами (0.1-1 Дж/см²). Однако металлические структуры проявляют эффекты плавления/спекания, приводящие к заметным изменениям морфологии поверхности и иным аналитическим свойствам, **Рис. 16**.

 $^{^8}S = I/C$, где I – ионный ток по искомому аналиту, C – концентрация аналита в капле.

⁹E. Carpene, D. Höche, P. Schaaf, Schaaf (Ed.), Springer Berlin Heidelberg, Heidelberg, **2010**, 21–47.

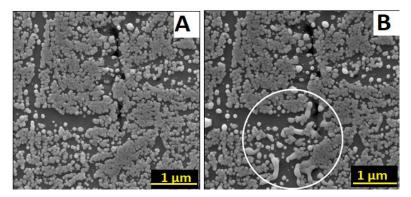


Рис. 16 — РЭМ-изображения поверхности мишени на основе Pd-NPs до (**A**) и после (**B**) обработки лазером. 10

Следовательно, LDI-отклик, получаемый с поверхности мишеней на основе пленок наночастиц благородных металлов, в значительной степени связан с эффектами реструктуризации поверхности.

Поскольку химическое строение биомолекул сказывается на эффективности ионизации, то и химический состав поверхности пленок, используемых в качестве мишеней-эмиттеров, играет важную роль. Даже незначительное изменение состава поверхности пленок может вызывать серьезные изменения в типах формирующихся ионов тестовых биоаналитов, а также в путях их ионизации и фрагментации, **Рис. 17**.

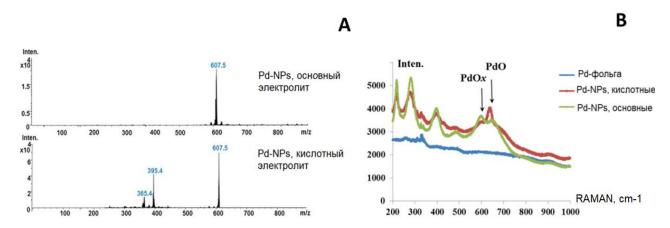


Рис. 17 — SALDI масс-спектры (**A**) 30 ppm резерпина, полученные с поверхности пленок Pd-NPs, приготовленных из электролитов с различной кислотностью и KP спектры (**B**), записанные с Pd-фольги и электроосажденных Pd-NPs с разным pH. Пики при 640 hm^{-1} и 600 hm^{-1} указывают на присутствие PdO и PdO_x.

¹⁰лазер 40 %, 3 ns, 200 Гц.

Проведенные исследования позволяют заключить, что адсорбционные свойства электроосажденных наночастиц, как в составе мишеней эмиттеров ионов, так и в составе ОНГ слоев, при взаимодействии с биоаналитами будут определяться не только физико-химическими свойствам биомолекул, но и химическим составом поверхности. Применительно к электрохимическим нанобиосенсорам на основе ОНГ пленок это означает, что чем более эффективно протекает процесс лазерной десорбции/ионизации биомолекул с поверхности (исключая случаи образования координационных связей между поверхностью мишени и аналитом), т.е. чем менее прочное адсорбционное взаимодействие, тем легче должно протекать электроокисление этого аналита в биосенсорах. Подтверждающие данные в работе были получены в системах Pd-NPs и Pd-NPs/ALG при обнаружении кверцетина.

Шестая глава посвящена апробации предлагаемого в работе одноэтапного синтеза функциональных ОНГ пленок в различных микроаналитических приложениях (i), а также разработке способов определения низкомолекулярных биомолекул, имеющих важное физиологическое значение с помощью микроаналитических тест-систем с ОS-ОНГ пленками (ii).

На основе установленных закономерностях формирования ОНГ пленок капсульной структуры разработаны активные слои одноканальных нанобиосенсоров модульного типа. Идея данного подхода состоит в иммобилизации нескольких функциональных покрытий из растворов, содержащих GOx, LOx, Нафион и палладиевый электролит на трафаретном электроде, т.е. в создании мультиферментного ОНГ слоя. В результате на одном электроде формируется несколько функциональных центров: (1) Pd-NPs/Haфион/GOx, (2) Pd-NPs/Haфион/LOx (Puc. 18A).

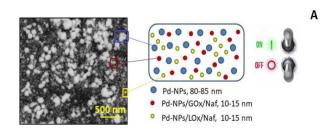
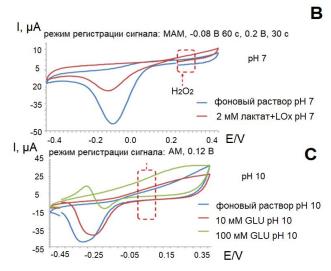


Рис. 18 — РЭМ-изображение и схема одноканального нанобиосенсора (A). Примечание: опция «ON/OFF» иллюстрирует возможность переключения между Pd-NPs, Pd-NPs/GOx/Naf или Pd-NPs/LOx/Naf в зависимости от режима работы. (B,C) — режимы считывания сигналов.



За счет такой организации сенсорного слоя, а также путем оптимизации режима электрохимического считывания сигналов и варьирования рН раствора удалось обеспечить надежное переключение между режимами детекции L-лактата, D-глюкозы, перекиси водорода и глутаральдегида (GLU), **Puc. 18B,C**.

Данные воспроизводимости базовой линии модульного нанобиосенсора с ОНГ пленкой от партии к партии приведены в **Табл. 5**, а выборочные аналитические характеристики при определении тест-аналитов – в **Табл. 6**.

Табл. 5 – Воспроизводимость базовой линии модульного нанобиосенсора в буфере

(рН 7) от партии к партии

Номер партии	омер партии Базовая линия, µА		RSD, %
01	$2.23 \cdot 10^{-1}$		
02	2.10·10 ⁻¹	2.12 ± 0.10	4.78
03	2.03 · 10 - 1		

Табл. 6 — Выборочные аналитические характеристики, полученные с помощью разработанного ОНГ-нанобиосенсора при определении тестируемых аналитов

Аналит	Режим анализа	pН	R ²	Линейный динамический диапазон
D-Глюкоза	MAM	7.02	0.987	200 мкМ – 50 мМ
L-Лактат	MAM	7.04	0.977	500 мкМ – 2 мМ
H_2O_2	MAM	7.00	0.998	20 мкМ — 100 мМ
Глутаральдегид	AM	10.01	0.971	1 мМ – 100 мМ

Работа нанобиосенсора была протестирована при определении глюкозы в ферментативной среде, используемой для культивирования дрожжей, **Рис. 19**. Несмотря на присутствие иных электроактивных компонентов (**Рис. 19A**), правильность определения глюкозы в ферментативной среде до контакта с клетками была зафиксирована на уровне ~94% (**Рис. 19B**). После непосредственного посева клеток было зарегистрировано резкое снижение концентрации глюкозы в ферментативной среде до 40 мМ (1 час контакта) и 0 мМ (24 часа), соответственно.

Полученные закономерности определения глюкозы хорошо коррелировали с ростом концентрации продукта микробной активности — этанолом. Проведенный тест на специфичность не выявил никаких значительных помех со стороны D-фруктозы при анализе D-глюкозы с помощью ОНГ-OS нанобиосенсора (**Puc. 19**).

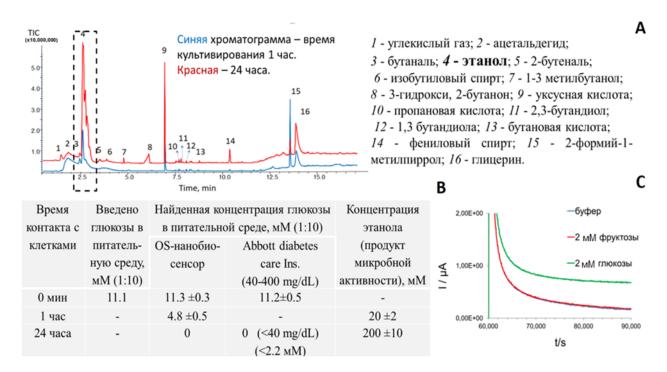


Рис. 19 — Совокупность аналитических параметров при определении глюкозы в ферментативной YPD среде с помощью ОНГ-OS нанобиосенсора (активность GOx 50 KU, концентрация GOx в смешанном электролите 3 мг/мл, I_k =-2.5 мA, $t_{3\pi}$ = 30 c).

На основании установленных закономерностей адсорбции электрохимически активных биомолекул на поверхности электродов с электроосажденными функциональными пленками, разработан способ экспрессного профилирования клеток *Saccharomyces cerevisiae* в ферментативных средах, **Рис. 20**, имеющий ряд преимуществ по сравнению с аналогами, **Табл. 7**.

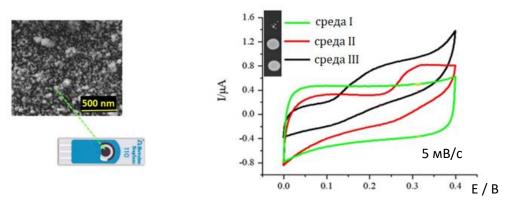
Еще одним приложением разработанного одностадийного подхода явилось моделирование скрининга микробных ферментов путем амперометрического мониторинга апо-ферментов на электродах с ОНГ-ОЅ пленкой. Способ заключался в превращении ферментов из апо-формы в холо-форму непосредственно на электроде. В отсутствии кофактора (FAD) апо-GOх может связывать субстрат (глюкозу), однако, не способен его окислять.

1. Среды роста клеток

2. Образование вторичных метаболитов в среде



3. Электрохимическое профилировование вторичных метаболитов



Puc. 20 — Общий принцип электрохимического профилирования клеток Saccharomyces cerevisiae.

Табл. 7 — Сравнение некоторых параметров скрининга внеклеточных матриц дрожжевых клеток с применением различных платформ

Параметр	Газовая хроматография с масс-детектором	ОНГ электроды, предложенные в работе	Генетически кодированные биосенсоры ro-GFP2
Требует	инвазивный	неинвазивный	неинвазивный
разрушения			
образца или нет			
Продолжитель-	от 20 до 60 мин	3 мин	8 дней
ность анализа			
Тип матрицы	Влияет на результат дериватизации	Не требует пробоподготовки	Измерения только в буфере
Анализ при			
физиологических	нет	да	нет
условиях			
Сложность	Требует	Простой анализ	Требует
анализа	дорогостоящего		значительных
	оборудования		генетических
			манипуляций
Степень	Непортативный	in vitro, in vivo	Непортативный
портативности		портативные режимы	

Реализация идеи проводилась путем иммобилизации кофактора FAD на поверхности SPE электрода вместе с Pd-NPs и альгинатом по разработанной одностадийной методологии. Замена фермента (Mr >80-120 kDa) в смешанном растворе синтеза на низкомолекулярный биокомпонент (<1000 Da) при идентичных режимах электролиза (I_k =-2.5 MA) приводила к формированию адсорбционного PdO-NPs/Pd-NPs/ALG/FAD слоя. Вследствие расположения FAD в верней части функционального слоя, становится возможной прямая биохимическая реакция между апо-GOх и иммобилизованным FAD (**Puc. 21**).

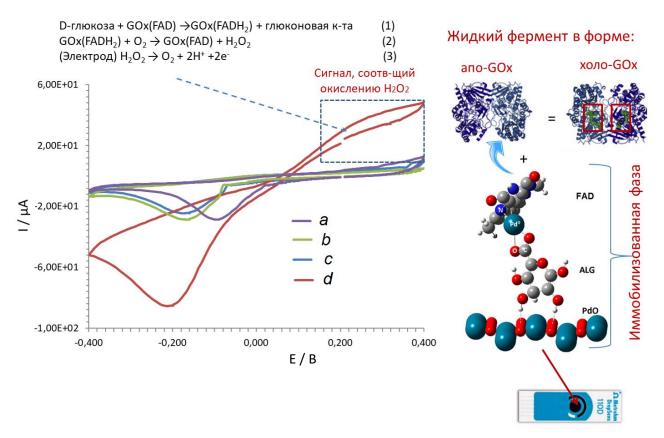


Рис. 21 — Схема скрининга апо-ферментов микроаналитической системой на основе PdO/Pd-NPs/ALG/FAD пленки: ЦВА кривые PdO/Pd-NPs/ALG/FAD электрода в растворах фосфатного буфера, pH 7.02 (a) в присутствии 10 мМ раствора глюкозы (b), 0.75 мг/мл апо-GOx (c) и 0.75 мг/мл апо-GOx + 10 мМ глюкозы (d).

Установленные закономерности ионизации жирных кислот (C18:1-C18:3) и триацилглицеридов с поверхности электроосажденных пленок Pd-NPs, сопровождающиеся образованием в масс-спектрах аддуктов типа [M+K]⁺ (см. **Рис.** 22), позволили разработать экспресс-способ определения жирных кислот в образцах растительных масел, **Табл. 8**.

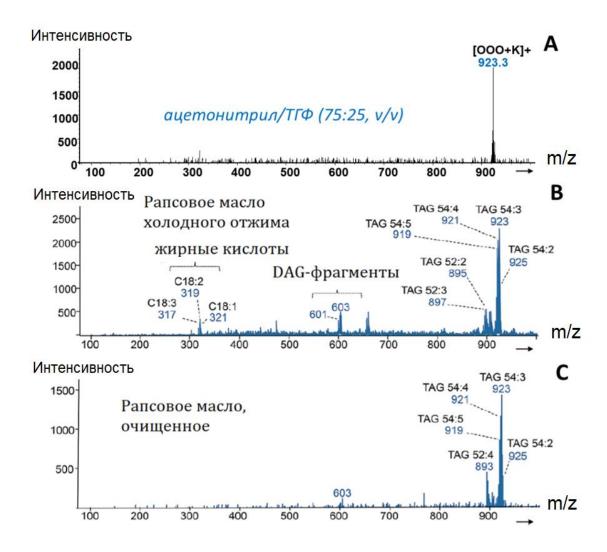


Рис. 22 — Результаты обнаружения триацилглицеридов и жирных кислот мишенью на основе пленки Pd-NPs: \mathbf{A} — масс-спектр 30 нг/мкл аналитического стандарта триолеина, \mathbf{B} — масс-спектр, полученный для 1 мкл рапсового масла холодного отжима, \mathbf{C} — для 1 мкл очищенного рапсового масла. *Примечание*: TAG — триацилглицериды.

Отдельно стоит отметить отсутствие шумов в нижнем диапазоне масс при ионизации триацилглицеридов с поверхности разработанных мишеней и отсутствие интенсивной фрагментации биомолекул, что является существенным преимуществом при оценке аналитической значимости тест-способа.

Кроме того, использование мишеней эмиттеров на основе новых пленок позволяет избежать стадию дериватизации гидрофобных образцов, обычно необходимой при обнаружении и определении стандартным методом MALDI.

Табл. 8 — Определение жирных кислот в очищенном рапсовом масле с помощью мишени на основе пленки Pd-NPs

Добав	Положительный режим ионизации			Предел	RSD,	Валидация методики	
-ка	$[M+K]^{+}$	y = ax + b	\mathbb{R}^2	обнару-	%	Введено,	Найдено,
	m/z			жения		%	<mark>%</mark>
				(добавка			
				FFA), %			
C18:1	321.0	y=2083.5x-64.5	0.997	0.2-4	6	2.0	1.79 ± 0.03
C18:2	319.0	$y=4452.5 \cdot x - 95.2$	0.998	0.2-4	12	2.0	1.86±0.05
C18:3	317.0	y=1651.5x+89.5	0.992	0.2-4	14	2.0	1.98 ± 0.08

Установленные факторы, влияющие на сигнал в методе SALDI-MS с поверхности пленок нового типа, позволили предложить дизайн мишени эмиттера, обеспечивающий экспресс-анализ молочных продуктов без проведения сложной пробоподготовки образца, **Рис. 23**.

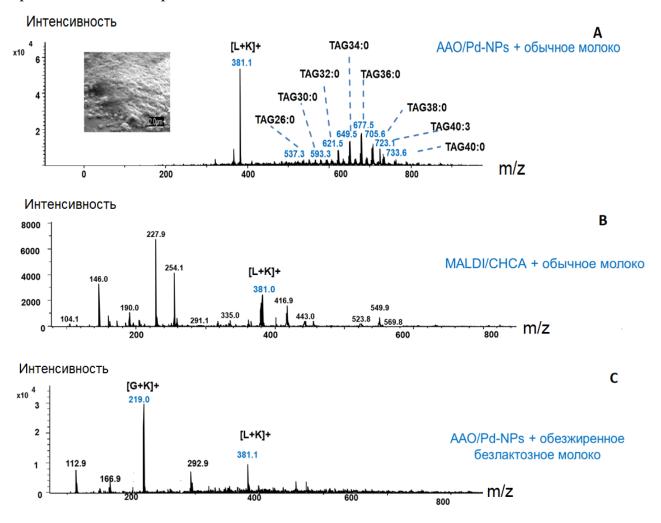


Рис. 23 — Масс-спектры, полученные для молока жирностью 3.5% (**A,B**) и обезжиренного безлактозного молока (**C**) с поверхности мишени на основе гибридной пленки AAO-Pd-NPs (**A,C**) и MALDI (**B**) — стандартный метод, лазер 45%. *Примечание:* L — лактоза, G — глюкоза.

Для обычного молока с поверхности пленки AAO+Pd-NPs помимо интенсивного пика при m/z 381, соответствующего аддукту калия и лактозы ([L+K]⁺) без каких-либо интерференционных ионов в диапазоне низких масс были обнаружены характерные отпечатки молочных липидов, **Puc. 23A**. В тоже время скрининг этого же образца стандартным методом MALDI-MS не позволил провести визуализацию молочных липидов, **Puc. 23B**. При анализе безлактозного молока (ультра-пастеризованный продукт) в масс-спектре появлялся новый пик при m/z 219.0, который соответствовал m/z 219.0 [G+K]⁺, **Puc. 23C**, а интенсивность пика при m/z 381 = [L+K]⁺ была меньше в 6 раз. Производители молока добавляют в безлактозное молоко фермент лактазу, который расщепляет лактозу до глюкозы.

Простота и экспрессность (5 мин) разработанного способа делает его надежным инструментом для анализа эффективности и полноты проведения технологического процесса, а также для обнаружения фактов фальсификации молочных продуктов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты позволили сформулировать и развить новое направление, заключающееся в научно обоснованном подходе к дизайну микро-измерительных тест-систем на основе самоорганизующихся ОНГ пленок путем направленного изменения их структуры и свойств под требования конкретной аналитической задачи.

Предложенные в работе методические подходы к аттестации структуры, состава, механической и химической стабильности образующихся функциональных ОНГ пленок, аналитические приложения нанобиосенсоров и тест-систем на их основе, а также способы электрохимического и масс-спектрометрического определения целой серии низкомолекулярных биомолекул без длительной процедуры пробоподготовки, могут быть полезны в сфере биотехнологии, биохимии, биоаналитической и электроаналитической химии, в чем и видится дальнейшее развитие предлагаемого направления.

выводы:

1. Разработана методология одностадийного синтеза функциональных ОНГ пленок для их использования в различных микроаналитических тест-системах (электрохимические нанобиосенсоры, мишени эмиттеры ионов для скоростной масс-спектрометрии, пьезокварцевые микровесы). Особенностью методологии является то, что смешанный раствор электролита содержит все прекурсоры компонентов функционального слоя, соосаждаемые на электроде в зависимости от взаимодействий в растворе синтеза, концентрации компонентов и режима поляризации. Эти параметры определяют структуру (капсульная, адсорбционная), стабильность и

аналитические свойства получаемых ОНГ пленок и микроаналитических тестсистемах на их основе. Совместное соосаждение ферментов группы оксидаз и сульфо-полимеров из растворов смешанных электролитов с электрокаталитическими наночастицами металлов позволяет предотвратить утечку биоорганического компонента при работе в водных средах за счет формирования капсульной структуры ОНГ слоя.

- 2. Предложены подходы к аттестации структуры получаемых ОНГ пленок. На основе метода масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой разработан подход для контроля неорганического компонента ОНГ слоя. Подход выполнен в соответствии с протоколом неразрушающей подготовки образца рассматриваться как надежный способ оптимизации дизайна неорганического составляющего. На основе ВЭЖХ предложен способ контроля полимерного органического компонента ОНГ (биосенсоры, мишени для масс-спектрометрии, пьезосенсоры). На основе метода LDI-MS предложена стратегия стандартизации биосенсоров, основанная на принципах биохимического сканирования биоорганического компонента, и позволяющая получить подробную информацию о химии поверхности функциональных пленок; степени химической однородности их поверхности; механизму адсорбции, десорбции и ионизации биоаналита с поверхности электродов или мишеней. Установлены и полностью расшифрованы пути ионизации неорганических компонентов, полимеров и кофакторов с поверхности функциональных ОНГ пленок, что позволяет значительно упросить контроль их качества.
- 3. С привлечением метода квантово-химического моделирования установлен формирования функционального слоя на электродах. Согласно механизм предложенной капсульной модели одностадийное формирование ОНГ пленок основано на образовании промежуточных металл-ферментных и металл-полимерных комплексов типа $GOx \cdot nPd^{2+}$ и Pd^{2+} полимер в растворах с их последующим соосаждением на электроды при включении поляризации. Исключение ферментов (~40-180 кДа) из раствора смешанного электролита, а также варьирование природы полимерного составляющего (Нафион, ALG, PPy, Ag-NPs/Tween-80, Ag-NPs/PEG-3500, Ag-NPs/Тритон X-100, Pd-NPs-PEG-3500) приводит к изменению структуры ОНГ слоя с капсульной на адсорбционную, и, как следствие – к иным свойствам микроаналитических систем на их основе.
- **4.** Установлено влияние поверхностных оксидов и адсорбированного кислорода на отклик пероксид-зависимых нанобиосенсоров, полученных одностадийным синтезом на их чувствительность и селективность определения. При постоянном количестве биорецептора и полимерного связующего количество, размер наночастиц и толщина их слоя непосредственно определяют электроаналитические параметры

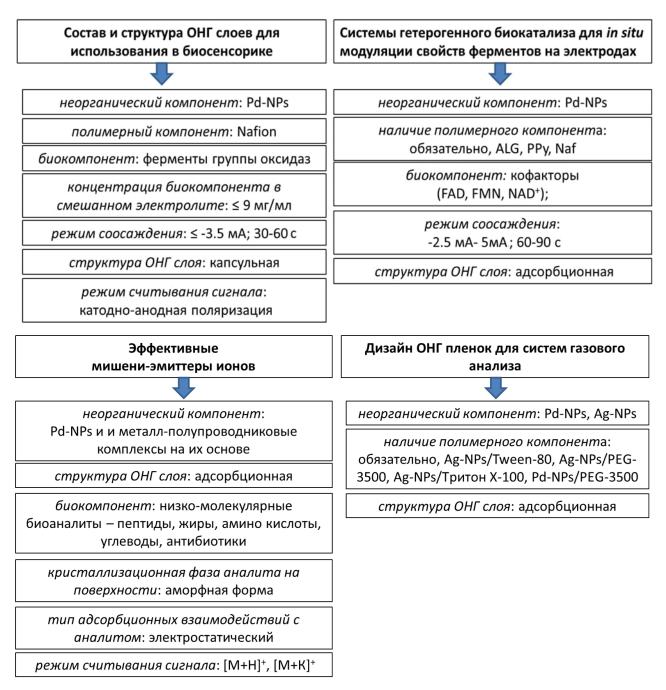
ОНГ-ОЅ нанобиосенсоров. Использование МАМ-режима регистрации сигнала позволяет избавиться от перекрестной чувствительности ОНГ-ОЅ нанобиосенсоров к кислороду, уменьшить поляризацию пероксид-зависимых электродов от 0.7 В до 0.2 В в сравнении с аналогами. Полученные знания о сформированных типах ОНГ-ОЅ сенсорных слоев, их физико-химических свойствах и параметрах, влияющих на электроаналитический отклик электродов на их основе, позволили разработать серию нанобиосенсоров глюкозы с высокой стабильностью базовой линии, динамическим диапазоном до 30 мМ и правильностью определения 90-103%.

5. Получены представления о механизме формирования аналитического сигнала методе лазерной десорбции/ионизации с поверхности электрохимически осажденных наночастиц (НЧ) благородных металлов: присутствие ионов реагентов и эффекты реорганизации неорганического компонента одинаково важны при формировании сигнала в методе SALDI с поверхности НЧ благородных металлов. Морфология НЧ (зависит от природы электролита, рН, величины катодного тока и продолжительностью электролиза) определяет доступность ионов реагентов при облучении. Интенсивность процессов реорганизации лазерном поверхности эмиттеров находится в прямой зависимости от размера НЧ. Увеличение диаметра и увеличение температуры плавления НЧ (зависит от степени химической чистоты) влечет потерю SALDI-сигнала. Снижение температуры плавления НЧ позволяет снизить энергетические требований к мишеням, что является удобным способом при проектировании новых дизайнов эмиттеров ионов с заданной/улучшенной эффективностью ионизации биоаналитов. Химия поверхности НЧ определяет тип формирующихся ионов ($[M+H]^+$, $[M+K]^+$, $[M+H_2O-H]^-$ и др.) в масс-спектре и степень фрагментации биоаналитов.

6. На основании сформированных методологических подходов к управляемому синтезу ОНГ структур предложен и оптимизирован целый ряд тест-систем на их основе: одноканальные амперометрические биосенсоры модульного типа, электроды для *in situ* модуляции свойств экзогенных ферментов в апо-форме; гибридные MALDI-MS эмиттеры ионов с менее выраженным эффектом «сладких пятен», простые SALDI-MS мишени эмиттеры и функциональные ОНГ пленки пьезокварцевых микровесов. Некоторые требования к структурам в зависимости от типа измерительных платформ тест-систем приведены в виде блок-схемы ниже.

применимость найденных закономерностей и Доказана подходов обнаружении И определении целого ряда физиологически значимых Разработанные нанобиосенсоры низкомолекулярных биомолекул. позволили проводить профилирование S. Cerevisiae в зависимости от оптической плотности клеток, времени культивирования и типа питательной среды, экспресс-опредление глюкозы в ферментативных растворах дрожжей в динамическом диапазоне от $200~\mu M$ до 30~mM и правильности $101.3\pm1.5\%$.

На основе новых мишеней эмиттеров ионов предложены способы определения антибиотиков, углеводов, пептидов, аминокислот, жирных кислот и триацилглицеридов с пределами обнаружения от 10 до 200 ppm и динамическим линейным диапазоном до 3000 ppm.



Автор выражает глубокую признательность д.х.н. Екатерине Викторовне Золотухиной, а также д.х.н., профессору Елене Васильевне Бутырской за помощь на разных этапах выполнения работы, ценные советы и всестороннюю поддержку.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

- **1.** *Silina Y.E.**11, Fink-Straube C., Koch M., Zolotukhina E.V. A rapid *in vitro* electrochemical screening of extracellular matrix of Saccharomyces cerevisiae by palladium nanoparticles-modified electrodes // *Bioelectrochemistry*. **2023**. V. 149. P. 108283. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108283
- **2.** Koch M., Katsen-Globa A., Zolotukhina E.V., *Silina Y.E.** Testing of yeast cells damage using hydrogen peroxide spiking and Pd-NPs-based electrodes and impact of oxidoreductase presence on electrochemical read-out // *Biochemical Engineering Journal*. **2023**. V. 195. P. 108908. https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108908
- **3.** Zolotukhina E.V., Butyrskaya E.V., Koch M., Herbeck-Engel P., Levchenko M.G., *Silina Y.E.** First principles of hydrazine electrooxidation at oxides-free and oxides-based palladium electrodes in complex media // *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**. V. 25. P. 9881 9893. https://doi.org/10.1039/D3CP00829K
- **4.** Zolotukhina E.V., Katsen-Globa A., Koch M., Fink-Straube C., Sukmann T., Levchenko M.G., *Silina Y.E.** The development of alginate-based amperometric nanoreactors for biochemical profiling of living yeast cells // *Bioelectrochemistry*. **2022**. V. 145. P. 108082. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108082
- **5.** Apushkinskaya N., Zolotukhina E.V., Butyrskaya E.V., *Silina Y.E.* In situ* modulation of enzyme activity via heterogeneous catalysis utilizing solid electroplated cofactors // *Computational and Structural Biotechnology Journal.* **2022**. V. 20. P. 3824 3832. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.07.012
- **6.** Koch M., Apushkinskaya N., Zolotukhina E.V., *Silina* Y.E.* Towards hybrid One-pot/One-electrode Pd-NPs-based Nanoreactors for Modular Biocatalysis // *Biochemical Engineering Journal.* **2021**. V. 175. P. 108132. https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108132
- **7.** Butyrskaya E.V., Korkmaz N., Zolotukhina E.V., Krasiukova V., *Silina Y.E.** Mechanistic aspects of functional layer formation in hybrid one-step designed GOx/Nafion/Pd-NPs nanobiosensors // *Analyst.* **2021**. V. 146. P. 2172 2185. https://doi.org/10.1039/D0AN02429E
- **8.** *Silina Y.E.**, Apushkinskaya N., Talagaeva N.V., Levchenko M.G., Zolotukhina E.V. Electrochemical operational principles and analytical performance of Pd-based amperometric nanobiosensors // *Analyst.* **2021**. V. 146. P. 4873 4882. https://doi.org/10.1039/D1AN00882J
- **9.** *Silina Y.E.**, Morgan B. LDI-MS Scanner: Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry-based biosensor standardization // *Talanta*. **2021**. V. 223. P. 121688. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121688
- **10.** Katsen-Globa A., Schulz A., Pütz N., Koch M., Kohl Y., Schneider-Ickert A.W., Velten T., *Silina Y.E.** Toward Alginate-Based Membrane Technology for High Performance Recovery of Heavy Metals in Cells // *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**. V. 4. P. 2558 2569. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01559
- 11. Korkmaz N., Hwang C., Kessler K.K., *Silina Y.E.*, Müller L., Park J. A novel copper (II) binding peptide for a colorimetric biosensor system design // *Talanta*. 2021. V. 232. P. 122439.

¹¹ Концептуализация идеи, автор, ответственный за переписку

https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122439

- **12.** Semenova D., Gernaey K.V., Morgan B., *Silina Y.E.** Towards one-step design of tailored enzymatic nanobiosensors // *Analyst*. **2020**. V. 145. P. 1014 1024. https://doi.org/10.1039/C9AN01745C
- **13.** Nebol'sin V.A., Galstyan V., *Silina Y.E.* Graphene Oxide and its Chemical Nature: Multi-Stage Interactions between the Oxygen and Graphene, *Surfaces and Interfaces* // **2020**. V. 21. P. 100763. https://doi.org/10.1016/j.surfin.2020.100763
- **14.** Pontius K., Semenova D., *Silina Y.E.*, Gernaey K.V., Junicke H. Automated electrochemical glucose biosensor platform as an efficient tool towards on-line fermentation monitoring: novel application approaches and insights // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **2020**. V. 21. P. 436. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00436
- **15.** *Silina Y.E.**, Gernaey K.V., Semenova D., Iatsunskyi I. Application of Organic-Inorganic Hybrids in Chemical Analysis, Bio-and Environmental Monitoring // *Appl. Sci.* **2020**. V. 10. P. 1458. https://doi.org/10.3390/app10041458
- **16.** Semenova D., *Silina Y.E.** The Role of Nanoanalytics in the Development of Organic-Inorganic Nanohybrids Seeing Nanomaterials as They Are // *Nanomaterials*. **2019**. V. 9 (№ 12). P. 1673. https://doi.org/10.3390/nano9121673
- **17.** *Silina Y.E.**, Semenova D., Spiridonov B.A. One-step encapsulation, storage and controlled release of small molecular weight organic compounds via electroplated nanoparticles // *Analyst*. **2019**. V. 144. P. 5677 5681.

https://doi.org/10.1039/C9AN01246J

- **18.** *Silina Y.E.**, Koch M., Herbeck-Engel P., Iatsunskyi I. Exploring the Potential of High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry towards non-Destructive Control and Validation of Electroless Gold Nanoparticles onto Silicon Nanowires Hybrids // *Anal. Methods.* **2019**. V. 11. P. 3987 3995. https://doi.org/10.1039/C9AY01182J
- **19.** Semenova D., *Silina Y.E.*, Koch M., Micheli L., Zubov A., Gernaey K.V. Sensors for biosensors: a novel tandem monitoring in a droplet towards efficient screening of robust design and optimal operating conditions // *Analyst.* **2019**. V. 144. P. 2511 2522. https://doi.org/10.1039/C8AN02261E
- **20.** Semenova D., Gernaey K., *Silina Y.E.** Exploring the potential of electroless and electroplated noble metal-semiconductor hybrids within bio-and environmental sensing // *Analyst*. **2018**. V. 143. P. 5646 5669. https://doi.org/10.1039/C8AN01632A
- **21.** Semenova D., *Silina Y.E.** Exploring the Potential of Electroplated Chips towards Biomedical Sensing and Diagnostics // *Proceedings MDPI*. **2018**. V. 2, P. 817. https://doi.org/10.3390/proceedings2130817
- **22.** Semenova D., Zubov A., *Silina Y.E.*, Micheli L., Koch M., Fernandes A.C., Gernaey K.V. Mechanistic modeling of cyclic voltammetry: a helpful tool for understanding biosensor principles and supporting design optimization // *Sens. Actuators B Chem.* **2018**. V. 259. P. 945 955. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.088
- **23.** *Silina Y.E.**, Koch M., Herbeck-Engel P., Fink-Straube C. Multi-dimensional hydroxyapatite microspheres as a filling material of minicolumns for effective removal at trace level of noble and non-noble metals from aqueous solutions // *J. Environ. Chem. Eng.*, **2018**. V. 6.

- P. 1886 1897. https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.044
- **24.** *Silina Y.E* *, Tillotson J.R., Manz A. Storage and *c*ontrolled release of fragrances maintaining a constant ratio of volatile compounds // *Anal. Methods.* **2017**. V. 9. P. 6073 6082. https://doi.org/10.1039/C7AY01799E
- **25.** *Silina Y.E.**, Herbeck-Engel P., Koch M. A study of enhanced ion formation from metal-semiconductor complexes in atmospheric pressure laser desorption/ionization mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* **2017.** V. 52. P. 43 53. https://doi.org/10.1002/jms.3898
- **26.** *Silina Y.E.**, Jung J., Kraegeloh A., Koch M., Fink-Straube C. Interactions between DPPC as a component of lung surfactant and amorphous silica nanoparticles investigated by HILIC-ESI-MS // J. Chromatogr. B. **2016**. V. 1030. P. 222 229. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.014
- **27.** *Silina Y.E.**, Fink-Straube C., Peuschel H., Hanselmann R.G., Volmer D.A. *p*-Coumaric acid, a novel and effective biomarker for quantifying hypoxic stress by HILIC-ESI-MS // *J. Chromatogr. B.* **2016**. V. 1020. P. 6 13. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.005
- **28.** Peuschel H., Ruckelshausen T., Kiefer S., *Silina Y.E.*, Kraegeloh A. Penetration of CdSe/ZnS quantum dots into differentiated *vs* undifferentiated Caco-2 cells // *J. Nanobiotech.* **2016**. V. 17. P. 70. https://doi.org/10.1186/s12951-016-0222-9
- **29.** *Silina Y.E.**, Kuchmenko T.A., Koch M. Nanoporous anodic aluminum oxide films for UV/Vis detection of noble and non-noble metals // *Anal. Method.* **2016**. V. 8. P. 45 51. https://doi.org/10.1039/C5AY02498F
- **30.** Wu W., Guijt R.M., *Silina Y.E.*, Koch M., Manz A. Plant leaves as templates for soft lithography // *RSC Advances.* **2016**. V. 6. P. 22469 22475. https://doi.org/10.1039/C5RA25890A
- **31.** *Silina Y.E.**, Koch M., Volmer D.A., Influence of surface melting effects and availability of reagent ions on LDI-MS efficiency after UV-laser irradiation of Pd nanostructures // *J. Mass Spectrom.* **2015**. V. 50. P. 578 585. https://doi.org/10.1002/jms.3564
- **32.** *Silina Y.E.**, Kuchmenko T.A., Volmer D.A. Sorption of hydrophilic dyes on anodic aluminum oxide films and application to pH sensing // *Analyst.* **2015**. V. 140. P. 771 778. https://doi.org/10.1039/C4AN00806E
- **33.** *Silina Y.E.**, Fink-Straube C., Hayen H., Volmer D.A., Analysis of fatty acids and triacylglycerides by Pd nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Methods.* **2015**. V. 7. P. 3701 3707. https://doi.org/10.1039/C5AY00705D
- **34.** *Silina Y.E.**, Koch M., Volmer D.A. Impact of analyte ablation rate and surface acidity of Pd nanoparticles on laser desorption/ionization efficiency // *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**. V. 387. P. 24 30. https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.06.009
- **35.** *Silina Y.E* *, Koch M., D.A. Volmer. The role of physical and chemical properties of Pd nanostructured materials immobilized on inorganic carriers on ion formation in atmospheric pressure laser desorption/ionization mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.*, **2014**. V. 49. P. 468 480. https://doi.org/10.1002/jms.3362
- Silina Y.E.*, Meier F., Nebolsin V.A., Koch M.,. Volmer D.A. Novel galvanic **36.** nanostructures of Ag and Pd for efficient laser desorption/ionization of low molecular weight compounds // **J**. Am. Soc. Mass Spectrom. **2014**. V. 25. P. 841 850. https://doi.org/10.1007/s13361-014-0853-8
- 37. Silina Y.E.*, Volmer D.A., Nanostructured solid substrates for efficient laser

- desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) of low molecular weight compounds, *Analyst.* **2013**. V. 138. P. 7053 7065. https://doi.org/10.1039/C3AN01120H
- **38.** *Силина Ю.Е.**, Спиридонов Б.А., Битюцких М.Ю. Сорбционное извлечение Сu (II) и Со (II) модифицированным композитом на основе нанопористого оксида алюминия // *Вестник ВГУИТ.* **2013**. №3. С. 138 142. DOI:10.20914/2310-1202-2013-3-138-142
- **39.** *Силина Ю.Е.**, Кучменко Т.А., Коренман Я.И. Парофазная модификация пьезокварцевых микровесов // *Конденсированные среды и межфазные границы.* **2012**. Т. 14. № 1. С. 90 95. УДК: 543.27-8, ID: 17711941, http://www.kcmf.vsu.ru/resources/t 14 1 2012 014.pdf
- **40.** *Силина Ю.Е.**, Спиридонов Б.А., Кучменко Т.А., Умарханов Р.У. // Исследование морфологии поверхности ультрадисперсных электролитических пленок серебра и палладия и возможности их применения для модификации пьезорезонаторов. *Конденсированные среды и межфазные границы*. **2011**. Т. 13. № 1. С. 89 95. <u>УДК: 544.023.2</u>, <u>ID: 16441630</u>, http://www.kcmf.vsu.ru/resources/t_13_1_2011_014.pdf
- **41.** *Силина Ю.Е.**, Спиридонов Б.А., Горшунова В.П., Кучменко Т.А., Умарханов Р.У. Сорбция паров аммиака тонкими пленками специфических реагентов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. **2011**. Т. 11. №.3. С. 422 431. <u>УДК: 544.723.23</u>, ID: 16463307, http://www.chem.vsu.ru/sorbcr/images/pdf/2011/3/2011_03_18.pdf
- **42.** *Силина Ю.Е.**, Спиридонов Б.А., Горшунова В.П., Кучменко Т.А. Определение общей кислотности газовой фазы тест-полосками на основе нанопористого оксида алюминия // *Аналитика и контроль.* **2011**. Т. 15. № 3. С. 324 331. <u>УДК 543.27-8, https://elar.urfu.ru/handle/10995/42501.</u>