

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и  
медицинской химии Российской академии наук

*На правах рукописи*



Силина Юлия Евгеньевна

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

1.4.2 – Аналитическая химия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора химических наук

Научный консультант: доктор химических наук Золотухина Е.В.

Черноголовка - 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	25
1.1 Органо-неорганические гибриды (ОНГ) и их использование в биоанализе .....	25
1.2 Микроаналитические системы на основе ОНГ пленок: введение в электрохимические биосенсоры .....	28
1.2.1 Методы самосборки ОНГ пленок в биосенсорике .....	32
1.2.2 Механическая и химическая стабильность функциональных ОНГ пленок .....	36
1.2.3 Принципы гальванической иммобилизации ферментов .....	41
1.3 Особенности определения малых биомолекул.....	45
1.3.1 Возможности и ограничения электрохимических биосенсоров на основе ОНГ пленок для определения малых биомолекул .....	48
1.3.2 Матрично-активированная (MALDI-MS) и поверхностно-активированная масс-спектрометрия (SALDI-MS) для обнаружения и определения малых биомолекул .....	50
1.3.2.1 Основные аспекты формирования ионов в методе SALDI-MS .....	57
1.3.2.2 Лазерная десорбция/ионизация с поверхности металлических наночастиц и гибридов на их основе.....	59
1.3.2.3 Механизм лазерной десорбции/ионизации с использованием металлических наночастиц .....	64
1.3.3 Гибридные пленки на основе полупроводников, легированных наночастицами благородных металлов в методе SALDI-MS .....	67
1.4 Гальваническое осаждение наночастиц благородных металлов для создания нанобиосенсоров и мишеней-эмиттеров ионов в масс-спектрометрии .....	69
1.5 Заключение к Главе 1 .....	72
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ОНГ ПЛЕНОК .....	74
2.1 Обоснование целесообразности одностадийного синтеза функциональных ОНГ пленок в биосенсорике .....	74
2.2 Получение ОНГ нанобиосенсоров, их характеристика и принципы работы .....	75
2.2.1 Исследование морфологии, топологии и шероховатости ОНГ пленок .....	81
2.2.2 Исследование химии поверхности ОНГ пленок.....	82
2.2.3 Оценка надежности закрепления неорганического компонента ОНГ пленок методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.....	83
2.2.4 Определение стабильности биоорганического компонента ОНГ пленок .....	85
2.2.5 Контроль активности ферментов до и после иммобилизации в ОНГ пленки.....	87
2.2.6 Моделирование процессов, происходящих в растворах смешанных электролитов .....	89
2.2.7 Характеристика нанобиосенсоров с ОНГ пленками методами циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии .....	91
2.3 Стандартизация нанобиосенсоров с ОНГ пленками методом лазерной десорбции/ионизации .....	93

2.3.1 Принципы биохимического LDI-MS сканирования .....	94
2.3.2 Химическое профилирование органических составляющих ОНГ пленок .....	99
2.4 Формирование гибридных мишеней в методе MALDI/SALDI-MS .....	104
2.4.1 Характеризация мишеней-эмиттеров ионов на основе электроосажденных пленок .....	106
2.4.2 Соосаждение низкомолекулярных органических молекул с наночастицами благородных металлов в отсутствии полимерного и биологического компонентов: формирование гибридных MALDI-мишеней .....	107
2.5 Соосаждение кофакторов из смешанных растворов электролитов: формирование электродов для гетерогенного биокатализа .....	109
2.6 Электрохимическое соосаждение полимер-неорганических гибридов в отсутствии ферментов: формирование функциональных ОНГ пленок на поверхности пьезокварцевых электродов.....	109
2.7 Анализ реальных образцов, содержащих малые биомолекулы.....	111
2.7.1 Анализ дрожжевых экстрактов биосенсорами на основе ОНГ пленок .....	112
2.7.2 Анализ реальных образцов методом SALDI-MS с использованием мишеней на основе гальванических пленок.....	113
2.8 Выводы к Главе 2.....	114
<b>ГЛАВА 3. ОДНОСТАДИЙНЫЙ МЕТОД ФОРМИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ ОНГ: ОТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МНОГОКОМПОНЕНТНОМ РАСТВОРЕ СИНТЕЗА ДО АРХИТЕКТУРЫ ГИБРИДНОЙ ПЛЕНКИ НА ПОВЕРХНОСТИ ЭЛЕКТРОДА .....</b>	<b>115</b>
3.1 Теоретические аспекты организации функционального слоя электрода при одностадийном осаждении ОНГ пленки .....	115
3.1.1 Модельная система на основе Pd <sup>2+</sup> , Нафiona и фермента .....	119
3.2 Исследования смешанных растворов электролитов .....	120
3.3 Моделирование взаимодействий в смешанных растворах электролитов, содержащих биополимерные компоненты.....	122
3.3.1 Взаимодействия в системе GOx-Pd <sup>2+</sup> .....	125
3.3.2 Взаимодействия в системе полимер – базовый электролит, содержащий ионы-прекурсоры благородных металлов.....	128
3.3.3 Взаимодействия в трехкомпонентной системе Нафюн-палладиевый электролит-фермент.....	131
3.3.4 Предполагаемая структура поверхности нанобиосенсора с ОНГ пленкой .....	133
3.4 Стандартизация капсульной структуры ОНГ пленки, содержащей биополимерный компонент.....	138
3.4.1 Методы наноаналитики для стандартизации нанобиосенсоров с ОНГ пленками .....	138
3.4.2 Контроль инкапсуляции ферментов при электрохимическом соосаждении ОНГ пленки.....	145
3.4.2.1 Химическое доказательство присутствия фермента, полимера и воды в гибридной функциональной пленке .....	146

3.4.2.2 Принципы стандартизации ОНГ нанобиосенсоров на основе платформы LDI-MS биосканирования.....	150
3.4.3 Возможна ли капсульная структура построения гибридного ОНГ слоя в условиях изменения числа и природы компонентов в растворе?.....	154
3.5 Механизм закрепления гибридной функциональной пленки Pd-NPs/GOx/Naf на поверхности электрода.....	157
3.6 Аналитические преимущества одностадийного синтеза гибридных функциональных ОНГ пленок .....	161
3.6.1 Воспроизводимость одностадийной методики синтеза ОНГ нанобиосенсоров	161
3.6.2 Механическая стабильность неорганического компонента функциональных ОНГ пленок .....	164
3.7 Выводы к Главе 3.....	166
<b>ГЛАВА 4. КЛЮЧЕВЫЕ ПАРАМЕТРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ОТКЛИК ОНГ НАНОБИОСЕНСОРОВ .....</b>	<b>168</b>
4.1 Параметры, влияющие на электрохимическое поведение систем на основе наночастиц благородных металлов.....	168
4.2 Влияние биоорганического компонента на морфологию и электрохимические характеристики ОНГ нанобиосенсоров.....	171
4.3 Электрохимические принципы оперирования нанобиосенсоров с электроосажденным ферментом .....	174
4.3.1 Анализ катодного отклика электродов с ОНГ пленками и факторов, влияющих на чувствительность электрохимического анализа.....	176
4.3.2 Анализ анодного отклика и факторов, влияющих на чувствительность сигнала при определении пероксида водорода.....	184
4.3.2.1 Разработка поляризационной процедуры определения пероксида водорода в модельных системах.....	185
4.4 Влияние структуры ОНГ слоя на электроаналитические характеристики нанобиосенсоров.....	191
4.4.1 Влияние концентрации фермента на структуру функционального ОНГ слоя и чувствительность определения биомолекул.....	196
4.5 Влияние структуры ОНГ слоя на удержание фермента и электроаналитические характеристики нанобиосенсоров.....	198
4.6 Влияние толщины ОНГ пленки на отклик амперометрических нанобиосенсоров ..	201
4.7 Сравнение электрокаталитической активности к пероксиду водорода сенсоров на основе Pd-NPs и их гибридов с оксидоредуктазами .....	204
4.8 Выводы к Главе 4.....	213
<b>ГЛАВА 5. ПРИМЕНЕНИЕ ПРИНЦИПОВ ОРГАНИЗАЦИИ ОНГ ПЛЕНОК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АДСОРБЦИОННО-ДЕСОРБЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМАХ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ – ОРГАНИЧЕСКАЯ БИОМОЛЕКУЛА МЕТОДОМ SALDI-MS.....</b>	<b>215</b>
5.1 Модельные системы для изучения адсорбционно-десорбционных взаимодействий с поверхности мишеней на основе наночастиц благородных металлов.....	216

5.1.1 Формирование ионов с поверхности электроосажденных пленок наночастиц благородных металлов .....	219
5.1.2 Влияние толщины пленки наночастиц на тип формирующихся ионов и интенсивность сигнала в методе SALDI-MS .....	223
5.1.3 Влияние структурных дефектов электроосажденных пленок на сигнал в методе SALDI-MS .....	228
5.4 Сравнение аналитических характеристик мишеней на основе электроосажденных пленок Pd-NPs и Ag-NPs при определении биомолекул методом SALDI-MS .....	229
5.5 Влияние морфологии и реструктуризации поверхности наночастиц на эффективность ионизации биомолекул в методе SALDI-MS .....	232
5.5.1 Морфология поверхности или присутствие ионов реагентов? .....	235
5.5.2 Перестройка наночастиц при лазерном облучении .....	237
5.5.3 Соотношение энергии лазера и эффективности процесса лазерной десорбции/ионизации биомолекул .....	241
5.5.4 Пути усовершенствования дизайна мишеней-эмиттеров на основе наночастиц благородных металлов для обнаружения и определения малых биомолекул .....	243
5.6 Значение степени десорбции биомолекул и поверхностной кислотности пленок на эффективность сигнала в методе SALDI-MS .....	245
5.6.1 Определяет ли степень абляции биомолекул интенсивность сигнала в методе SALDI-MS? .....	245
5.6.2 Влияние поверхностной химии пленок на тип формирующихся ионов в методе SALDI-MS .....	249
5.6.3 Определение характера взаимодействий биомолекул с поверхностью нанобиосенсоров с помощью SALDI-MS .....	253
5.7 Зависимость между фазовым состоянием биоаналита и эффективностью лазерной десорбцией/ионизацией с поверхности наночастиц благородных металлов .....	255
5.7.1 Влияние пористости и светопоглощения гибридных пленок на эффективность ионизации в методе SALDI-MS .....	256
5.7.1.1 Некоторые особенности ионизации аминокислот с поверхности электроосажденных пленок .....	259
5.7.2 Влияние степени гидрофобности электроосажденных пленок на сигнал в методе SALDI-MS .....	262
5.7.3 Причина усовершенствованных сигналов с поверхности гибридных пленок в методе SALDI-MS .....	264
5.7.4 Влияние стадии адсорбции биомолекул на сигнал в методе SALDI-MS .....	265
5.7.5 Кристаллическое или аморфное состояние биоаналита? .....	269
5.8 Зависимость между эффективностью процессов SALDI-MS с поверхности мишеней на основе наночастиц благородных металлов и их электрокаталитической активностью в сенсорике .....	272
5.9 Выводы к Главе 5 .....	277
<b>ГЛАВА 6. АПРОБАЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОАНАЛИТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ОНГ ПЛЕНОК .....</b>	<b>279</b>

6.1 Гибридные функциональные пленки для модульного биокатализа.....	279
6.1.1 Концепция и принципы работы одноэлектродных нанобиосенсоров в модульном биокатализе .....	281
6.1.2 Влияние состава гибридной пленки и режима поляризации на отклик модульного нанобиосенсора .....	283
6.1.3 Управление модульного амперометрического нанобиосенсора за пределами ферментативного анализа: хемосенсор для определения глутаральдегида.....	285
6.1.4 Процедура регенерации модульного нанобиосенсора с гибридной пленкой ....	286
6.1.5 Алгоритм работы модульных ОНГ нанобиосенсоров .....	288
6.2 Применение ОНГ нанобиосенсоров для анализа сложных образцов .....	291
6.3 Гетерогенный биокатализ: реконструкция свойств биорецептора на электроде за счет реакции с электроосажденным кофактором.....	298
6.3.1 Добавление нековалентно связанного кофактора повышает эффективность биоэлектрокаталитических реакций в растворах .....	299
6.3.2 Механизм формирования адсорбционного ОНГ слоя с кофактором.....	301
6.3.3 Верификация архитектуры гибридных электродов с электроосажденным кофактором.....	304
6.3.4 Особенности электрохимического мониторинга апо-ферментов.....	307
6.5 ОНГ пленки для масс-спектрометрического обнаружения трудно-ионизируемых низкомолекулярных биомолекул .....	310
6.5.1 Обнаружение и определение жирных кислот и триацилглицеридов.....	310
6.5.2 Ионизация жирных кислот с поверхности электроосажденных пленок наночастиц благородных металлов .....	311
6.5.3 Ионизация триацилглицеридов (TAG) и растительных масел с поверхности электроосажденных пленок .....	316
6.5.4 Скрининг образцов молока с помощью мишеней на основе гибридных пленок .....	321
6.6 Мишени-эмиттеры на основе гибридных MALDI/SALDI пленок .....	324
6.6.1 Электроосаждение MALDI матриц в отсутствие полимерного компонента .....	326
6.7 Применение одностадийной методики при формировании ОНГ пленок сорбентов для систем газового анализа.....	330
6.8 Выводы к Главе 6.....	336
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	344
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	347
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	378

## ВВЕДЕНИЕ

*Автор выражает глубокую признательность доктору химических наук Екатерине Викторовне Золотухиной, доктору химических наук Елене Васильевне Бутырской, Dr. Marcus Koch (INM-Leibniz Institute for New Materials, Saarbrücken, Germany/Германия) и к.х.н., доценту Борису Анатольевичу Спиридонову за помощь на разных этапах выполнения работы, ценные советы, идеи и всестороннюю поддержку.*

*„Insight must precede application”, Max Planck*

**Актуальность и степень разработанности темы.** В области молекулярной биологии, фармакологии и биоаналитической химии малые молекулы представляют собой низкомолекулярные ( $\leq 1\text{kDa}$ ) органические соединения, способные регулировать биологические процессы и биохимические реакции. К этой группе аналитов относятся жирные кислоты, триацилглицериды, углеводы, аминокислоты, пептиды, флавоноиды и некоторые фармацевтические препараты. 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).

В этой связи, разработка надежных экспресс-способов определения низкомолекулярных биоаналитов в реальных объектах (биологические жидкости, продукты питания, лекарственные препараты и тд.) является актуальной задачей биоаналитической химии. Однако обнаружение и определение этих соединений в реальных объектах 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 (ОНГ) 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 ОНГ-структур, 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 созданию функциональных пленок, установление закономерностей физико-химических процессов, происходящих в ОНГ пленках при их формировании и дальнейшей эксплуатации, позволит разработать новые тест-системы для 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 масс-спектрометрии) 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 нано-структурированных 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, обуславливающие 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 масс-спектрах трехмерных структур с кластерами воды ( $[3M+3H_2O-H]^-$ ) 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, D-глюкозы, пероксида водорода и глутаральдегида модульного типа; предложен подход к гетерогенной *in-situ* модуляции свойств апо-ферментов на поверхности электродов с иммобилизованными кофакторами; 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 тест-устройств 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 основе наночастиц благородных металлов определяется эффектами их реструктуризации, поверхностной кислотностью/основностью, размерным фактором, теплопроводностью, а также присутствием и доступностью ионов 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 SALDI-сигнала. Снижение температуры плавления наночастиц позволяет снизить энергетические требования к мишеням, что может быть удобным способом при проектировании новых дизайнов эмиттеров ионов с заданной/улучшенной 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 функциональных гибридных пленок на поверхности нанобиосенсоров. 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 т.ч. способ *in situ* модификации структуры апо-ферментов 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 тест-систем 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 органо-неорганических 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 масс-спектрометрического 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 неоднократно 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); XII, XIX Международна наукова конференція молодіх учених і аспірантів, (Україна, 2003, 2004); XLVI, XLVII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Wroclaw, 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 health-resort 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 radiochemistry» (Russia, 2005, 2011); III, IV International conference “Extraction of 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 Bio-sensing Technology, Italy, Riva del Garda (2017); 28<sup>th</sup> 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.

### **Список основных публикаций автора<sup>1</sup> по теме работы**

1. **Silina Y.E.**<sup>\*1</sup>, 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.**<sup>\*</sup> 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>

---

<sup>1</sup> автор, ответственный за переписку и концептуализацию исследований

3. 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. <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., Iatsunskiy 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., Iatsunskiy 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 controlled 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>
- 36. Silina Y.E.\***, Meier F., Nebolsin V.A., Koch M., Volmer D.A. Novel galvanic 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 Cu (II) и Co (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.  
[http://www.kcmf.vsu.ru/resources/t\\_14\\_1\\_2012\\_014.pdf](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.  
[http://www.kcmf.vsu.ru/resources/t\\_13\\_1\\_2011\\_014.pdf](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.  
[http://www.chem.vsu.ru/sorbcr/images/pdf/2011/3/2011\\_03\\_18.pdf](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.  
<https://elar.urfu.ru/handle/10995/42501>.

### **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.



## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

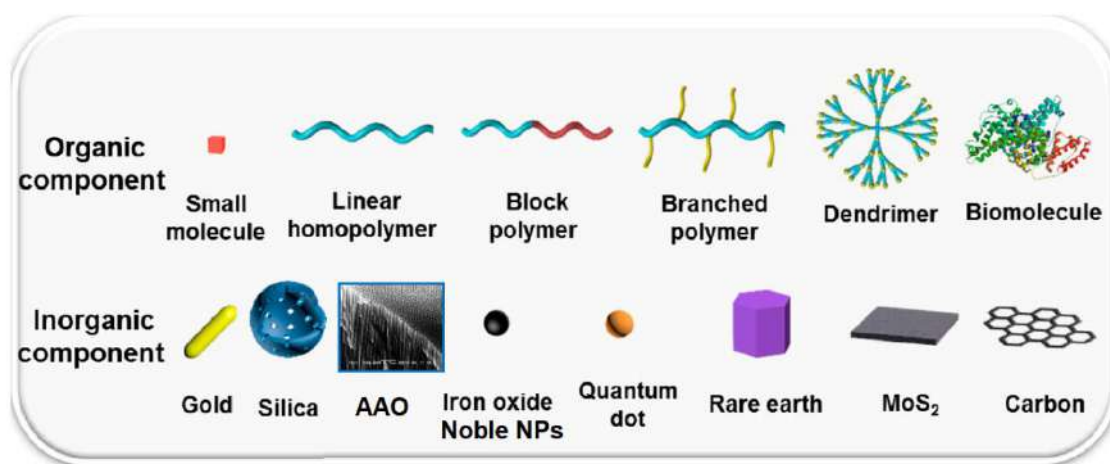
### 1.1 Органо-неорганические гибриды (ОНГ) и их использование в биоанализе

Органическо-неорганические гибриды (ОНГ) – относительно новый класс наноматериалов, нашедший применение в прикладной биомедицине, сенсорики, биоинженерии и биоаналитике.[1][2] Этот уникальный класс наноматериалов сочетает в себе свойства как органических, так и неорганических компонентов. Возможность настройки свойств ОНГ посредством сочетания функциональных компонентов открывает возможности для адаптации химии их поверхности в зависимости от требований инженерной или аналитической задачи.

В общем случае, ОНГ могут быть определены как нанокompозиты с тесно смешанными органическими (биологическими) и неорганическими матрицами.[3] Однако ОНГ наноматериалы представляют собой не просто физические смеси, но, скорее всего, хорошо структурированные самосборки в молекулярном масштабе, имеющие, по меньшей мере, один органический, либо неорганический компонент на наноразмерном уровне ( $\leq 100$  нм). Конечные свойства ОНГ могут быть получены из суммы отдельных компонентов смеси или за счет синергетического эффекта, создаваемого наногибридным интерфейсом.[4]

На архитектуру, конструкцию, стабильность, морфологические и химические свойства ОНГ влияют не только условия их синтеза, например способ получения, рН, температура, время контакта и пр., но также варьирование количества и соотношения органических или неорганических компонентов. В гибридных нанопленках неорганический компонент играет несколько функций: способствует повышению механической и термической стабильности композита, улучшает перенос заряда и RedOx активность системы, а также обеспечивает специфические магнитные, электронные, электрохимические и химические свойства.

Органические компоненты могут вносить вклад в специфические физические или (биологические) химические свойства конечных продуктов (электрические, электрохимические, специфические RedOx, оптические характеристики и пр.). С помощью органического соединения можно улучшать или модифицировать механические свойства поверхностей, контролировать пористость/плотность гибридов, а также варьировать гидрофильный/ гидрофобный баланс поверхности. Примеры некоторых органических и неорганических компонентов, используемых для синтеза ОНГ, обобщены на **Рис. 1.1**.



**Рис. 1.1** – Типичные органические и неорганические компоненты, используемые при синтезе ОНГ наноматериалов.[5] *Примечание:* ААО – анодный оксид алюминия; NPs – наночастицы благородных металлов.

ОНГ структуры можно разделить на два класса: **класс I** – органические и неорганические компоненты соединяются посредством слабых обменных взаимодействий (например, за счет Ван-дер-Ваальсовых, специфических водородных связей) или образования ионных связей. Именно этот класс ОНГ материалов нашел широкое применение при разработке сенсоров и катализаторов.[6,7]

В классе II оба компонента связаны ковалентными или ионо-ковалентными связями. В некоторых случаях гибридные наноматериалы могут иметь оба типа взаимодействий, то есть и слабые Ван-дер-Ваальсовы, и ковалентные взаимодействия одновременно, Рис. 1.2.

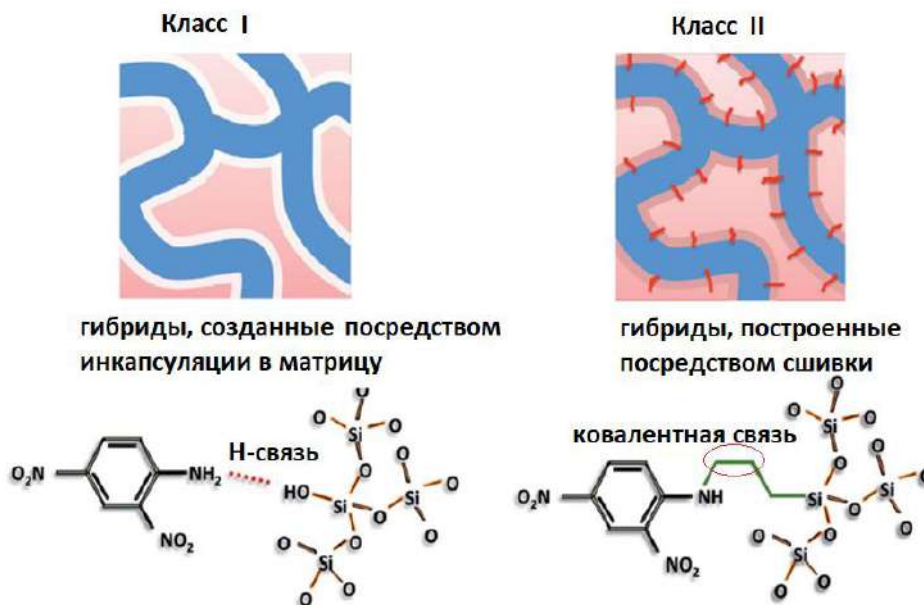


Рис. 1.2 – Классификация ОНГ.[7]

Стратегии синтеза современных ОНГ наноматериалов были систематизированы в нескольких критических обзорах.[7,8] Примеры успешного использования ОНГ на основе существующих методологий охватывают ограниченный круг сенсоров и микроаналитических устройств. Однако в литературе в основном обобщаются методики синтеза ОНГ на основе металлических частиц с прививкой полимеров, содержащих тиольные группы, производные полианилин-2-карбоновой кислоты, хитозана или полиэтиленгликоля.[9-14] Использование таких гибридов было опробовано при разработке микро-измерительных тест-систем в исследовательских лабораториях для целевой доставки лекарственных препаратов при лечении онкологических заболеваний.[9-14]

Другой пример включает синтез белково-неорганических наногрибидов с использованием антител/ферментов/неорганических нанокомпозиов для

формирования микроаналитических устройств иммуно-ферментного типа (ELISA) для детектирования *Escherichia coli*. [10] Предел обнаружения составляет 60 КОЕ L(-1), что намного превосходит коммерческие системы на основе ELISA. Достоинством такого подхода является простой способ приготовления ELISA-assay, отсутствие ковалентной модификации фермента и высокая каталитическая активность. Повышенная ферментативная стабильность такой системы по сравнению со свободной формой фермента была объяснена в терминах уникальной иерархической наноструктуры. [10]

Следует отметить, что ОНГ зачастую аморфны с преобладанием обширных полидисперсных структур в основной матрице/каркасе, что затрудняет изучение их фундаментальных физических и химических свойств. Кроме того, в наногибридах можно выделить широкий диапазон всевозможных архитектур, начиная от сэндвич-подобных структур, ячеистых, решетчатых структурированных узлов до сегментированных пористых материалов, что определенно будет влиять на вариативность аналитических характеристик, получаемых с таких систем.

Одним из самых больших пробелов в области синтеза ОНГ наноструктур является отсутствие общепринятых методик характеристики их состава. Низкая воспроизводимость синтеза ОНГ и отсутствие методик контроля их качества только усугубляет проблему в этой области.

## **1.2 Микроаналитические системы на основе ОНГ пленок: введение в электрохимические биосенсоры**

Прогресс в области нанотехнологий за последние десятилетия привел к широкому внедрению этих материалов во многих областях, включая биотехнологию, аналитическую химию и биосенсорику. Использование наноматериалов в сенсорных системах позволяет снизить пределы обнаружения биоаналитов в реальных образцах, уменьшить матричные эффекты, увеличить диапазон линейности калибровочных зависимостей, а

также значительно повысить сроки эксплуатации микроаналитических устройств на их основе. Практическое внедрение электрохимических нанобиосенсоров первого поколения (Рис. 1.3) позволило значительно продвинуться в области клинической диагностики и скрининге объектов окружающей среды. Эволюция биосенсоров на основе ОНГ наноматериалов хорошо прослеживается в микроаналитических устройствах для определения глюкозы, как наиболее успешного и изученного типа современных биосенсоров.

Классификация электрохимических ферментативных биосенсоров для определения глюкозы от 1-го до 3-го поколения на основе одного из самых распространенных типа ферментов глюкозооксидазы (GOx) в физиологических жидкостях приведена на Рис. 1.3.

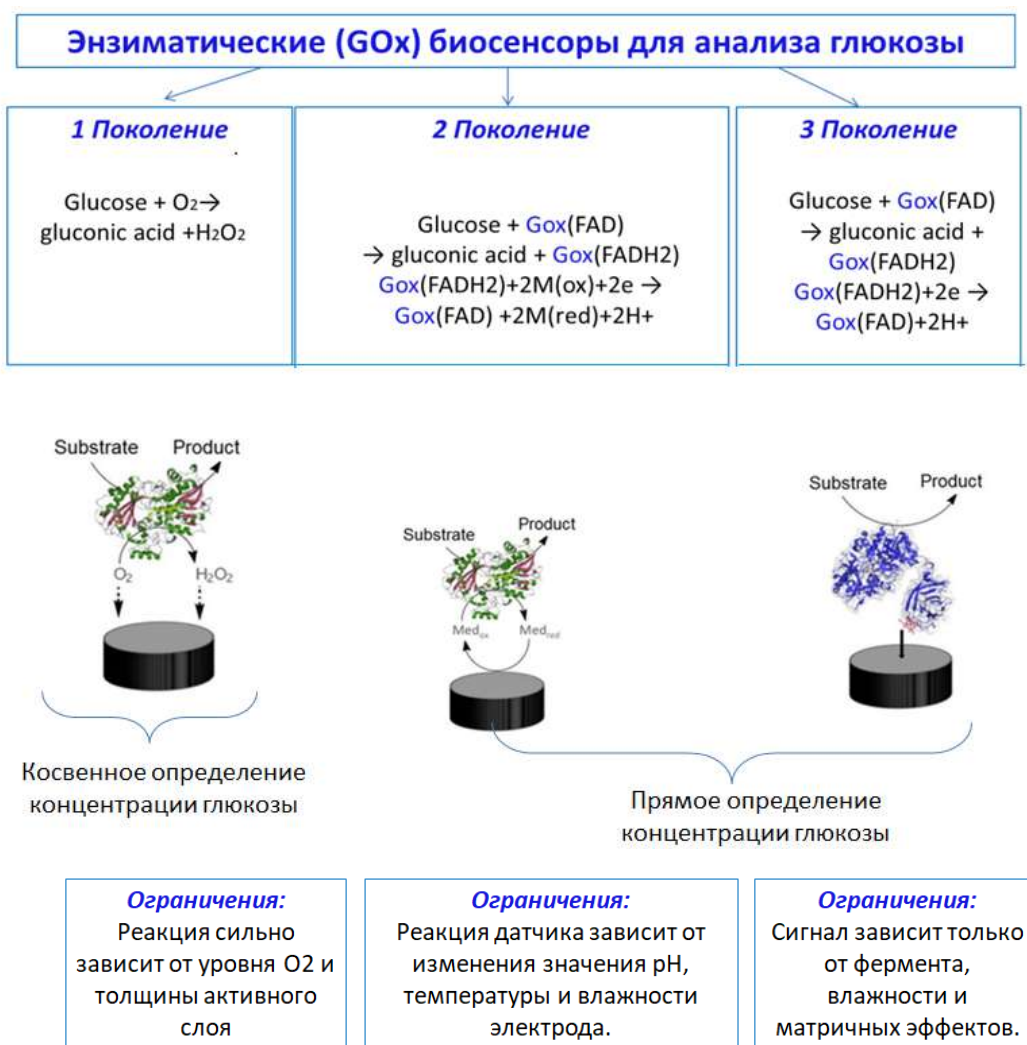


Рис. 1.3 – Классификация ферментативных биосенсоров глюкозы.[11–14]

Ферментативные биосенсоры способны работать в физиологических условиях, обладают превосходной селективностью и надежностью. Однако ферментативные биосенсоры имеют ряд недостатков и ограничений, в том числе: зависимость активности иммобилизованного слоя фермента от температуры, pH, влажности, присутствия токсичных химических веществ ( $H_2O_2$  – продукт ферментативной реакции), условий хранения и режимов эксплуатации.[15]

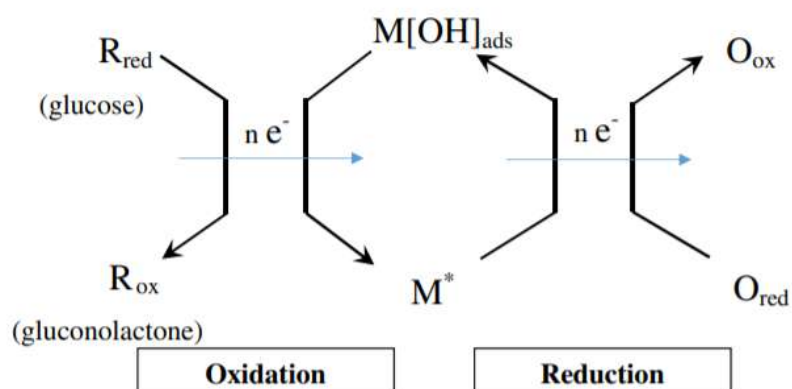
В качестве возможной альтернативы электрохимических биосенсоров было предложено использовать неферментативные микроаналитические устройства на основе наночастиц металлов, их оксидов и всевозможных смесей.[16–20] Неферментное определение глюкозы возможно благодаря редокс-активности самой глюкозы, а также вследствие присутствия наночастиц металлов в дизайне сенсорного слоя и их высокой электрокаталитической способности. Использование неферментных электродов потенциально представляет собой четвертое поколение нанобиосенсоров прямого окисления глюкозы. В качестве преимуществ неферментного типа нанобиосенсоров следует отметить отсутствие зависимости от активности биорецепторов/ ферментов, низкую себестоимость, высокую стабильность базовой линии, быстрое время отклика и низкий предел обнаружения вследствие прямого электрохимического окисления аналита, **Табл. 1.1.**

Как правило, электрокатализ с участием таких сенсоров включает стадию адсорбции аналита на поверхности электрода, и процесс, который предположительно включает *d*-электроны и *d*-орбитали металлической подложки, что позволяет образовывать необходимые связи с адсорбатом.

Для описания процессов катализа неферментных датчиков глюкозы с участием металлов платиновой группы (платины, рутения, иридия, палладия) и золота, была предложена модель формирования слоя водного оксида «Incipient Hydrous Oxide Модель Adatom Mediator (ИНОАМ)», **Рис. 1.4.** [21]

**Табл. 1.1** – Примеры неферментных наносенсоров и их аналитические характеристики на примере определения глюкозы [22–24]

Состав электрода	Чувствительность, $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$	Диапазон линейности, мМ	Предел обнаружения, $\mu\text{M}$	Рабочий потенциал, В
Pt-диск	25.2	-	-	0.35
Нанопористый Pt электрод	1.65	1-10	-	0.40
Pt нанотрубки	0.1	2-14	1.0	0.40
Pt наноцветы	1.87	1-16	48	0.30
Pt наночастицы	0.13	0.2-3.2	5	0.60
Au пористый слой	11.8	2-10	5	0.31
Au-пленка	66.0	0-11	8.7	0.21
Au наночастицы на слое напыленного золота	0.16	0.5-8	0.50	0.25
Au nano/Ti	0.14	1-5	0.02	-0.75
3D Au-film	0.05	1-10	3.2	-0.3
Au/Нафион	$2.34 \cdot 10^{-4}$	5-60	1200	0.5 0.2
NiO-Au/GCE	48	-	1.32	0.60
CuO nanowire	0.49	0.44-2	49	0.10
Cu-CuO/GCE	-	0.1-12	50 $\mu\text{M}$	0.30
NiO/Pt	180	0-3.67	10 $\mu\text{M}$	0.60
Cu/Cu <sub>2</sub> S	361.58	0.002 $\mu\text{M}$ -8.1	0.1 $\mu\text{M}$	-0.10



**Рис. 1.4** – Схематическая иллюстрация модели ИНОАМ, в которой  $\text{M}^*$ - Red металл,  $\text{M[OH]}_{\text{ads}}$  - адсорбированный гидроксильный радикал.[22]

Основное положение теории заключается в том, что «активные» поверхностные атомы металлов подвергаются стадии монослойного

окисления с образованием ад-атомного слоя реакционноспособного водного оксида  $\text{OH}_{\text{ads}}$ , опосредующего окисление и ингибирующего восстановление кинетически медленных электродных реакций.

Однако неферментные микроаналитические устройства часто являются неудовлетворительными с точки зрения селективности определения аналитов в реальных образцах. Для них также характерны высокие матричные интерференции и быстрая потеря активности. Кроме того, малые биоаналиты могут иметь несколько водных изомеров. Например, для глюкозы возможно существование  $\alpha$ -глюкозы,  $\beta$ -глюкозы и  $\gamma$ -глюкозы. В реальных объектах глюкоза взаимопревращается между  $\alpha$  и  $\beta$  формами до тех пор, пока не установится термодинамическое равновесие (в водных средах при pH 6.8 это может занять до 2 часов при температуре  $\sim 24$  °C).

Биоферменты (например, глюкозооксидаза, GOx, или глюкозодегидрогеназа, GDH) являются специфичными для  $\alpha$ -изомера, обеспечивая высокую селективность и чувствительность биохимического анализа. В отсутствие иммобилизованных высокочувствительных ферментов специфичность каталитической реакции на поверхности наночастиц металлов или их оксидов вызывает множество вопросов. Поэтому реальное применение неферментных сенсоров для обнаружения и определения малых молекул, в том числе глюкозы, все еще остается значимой научной проблемой.

### 1.2.1 Методы самосборки ОНГ пленок в биосенсорике

Независимо от способа получения, дизайн современных биосенсоров предполагает использование медиатора (1) для переноса электронов от активного центра фермента к поверхности электрода (или катализатора промежуточного продукта реакции между аналитом и биорецептором), слоя биологического катализатора-фермента (2) и связующего компонента природного (полисахариды) или искусственного (Нафион,



перфторсульфонированные аналоги, поливинилпирролидон) полимера (3).[25][26]

Задача полимерного компонента состоит в создании защитного барьера, предотвращающего мгновенное вымывание водорастворимого фермента при контакте с пробой, и снижение возможных матричных эффектов (обусловлены присутствием в пробе сопутствующих электроактивных веществ). Каждый из упомянутых выше составляющих функционального слоя биосенсора наносится на поверхность электрода индивидуально или в смеси с другими компонентами.

По причине высокой чувствительности ферментов к воздействию температур, токсинам, механическим импульсам и тп. традиционные литографические методы, в том числе методы „soft” литографии [27] при самосборке ОНГ пленок применяются редко.[28]

Вследствие того, что ферменты имеют высокое сродство к биомолекулам, таким как липиды и олигосахариды, их иммобилизация на поверхности твердых носителях часто может быть достигнута за счет методов программированной самосборки.[29] Такие методы позволяют сформировать самоорганизованные пленки и мембраны, в том числе и на нано-уровне. Было показано, что ряд молекулярных сборок, полученных с ферментами, содержащимися в таких пленках и смешанных с другими соединениями (как биологическими, так и синтетическими) позволяет производить капсулы для множества биокаталитических реакций и обеспечивать благоприятную среду (рН, тип буфера) для поддержания активности фермента.[30] Однако вследствие крайне высокой специфичности эта методология не всегда может быть адаптирована к широкому кругу материалов и ферментов на практике.

Как альтернатива методу самосборки был предложен метод послойной физической адсорбции (layer-by-layer, LbL). В этом методе каждый новый слой наносится на подложку после высыхания предыдущего слоя. Материалы, которые могут быть использованы в качестве исходных блоков для

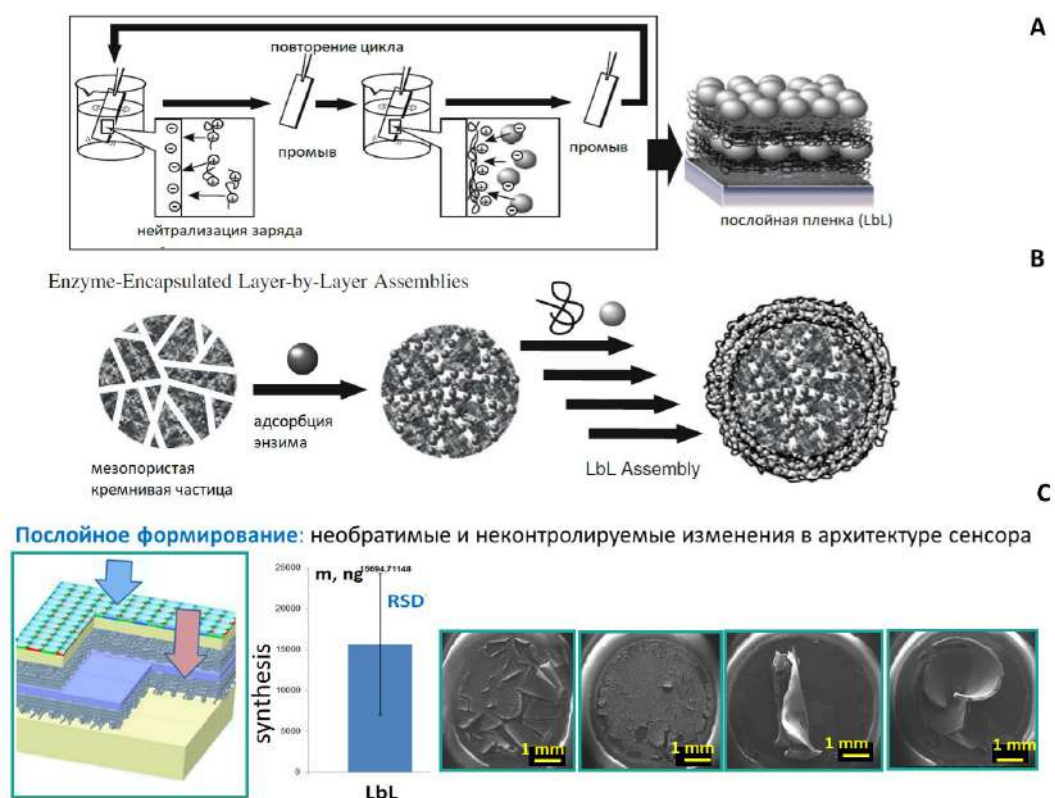
формирования LbL гибридов, охватывают широкий диапазон, включая полиэлектролиты [31], проводящие полимеры [32], белки [33], нуклеиновые кислоты [34], сахараиды [35], вирусы [36], неорганические коллоидные частицы [37], нанотрубки [38], липидные мембраны [39][40] и др. Техника LbL является одной из самых распространенных среди методов получения функциональных пленок нанобиоструктур. Однако эффективность иммобилизации активного компонента (ферменты, сахараиды и пр.) по методу LbL сильно зависит от величины интервала между ферментным слоем и электродом, а также от того насколько микросреда вокруг фермента является благоприятной для сохранения и поддержания его активности после иммобилизации. В этом методе эффективность биохимических реакций после иммобилизации фермента напрямую связана с количеством слоев в пленке. Сложности при диффузии фермента вызывают ухудшение в ферментативной активности в плотно упакованных слоях.

Неплотно собранные LbL конструкции имеют ряд преимуществ в микро-реакторных системах, в том числе и биосенсорах, которые требуют легкой диффузии как субстратов, так и продуктов.[29] Следует отметить, что контроль толщины активных слоев при иммобилизации ферментов этим методом представляет отдельную задачу.

Биосовместимость – одно из наиболее заметных преимуществ процесса послойной сборки. Большинство ферментов, особенно растворимых в воде, имеют заряженные группы, что приводит к их электростатической адсорбции на поверхности подложки/электрода.[41] Механическую надежность таких гибридных LbL систем возможно изменять путем выбора суммарного заряда электролита и поверхности электрода, **Рис. 1.5.**

При ковалентной иммобилизации фермента применяют токсичный глутаровый альдегид (GLU), роль которого состоит в удерживании фермента на твердой поверхности. При этом считается, что важные функциональные группы, обуславливающие каталитическую активность фермента, не

затрагиваются. Тем не менее, использование глутарового альдегида существенно сокращает срок работы ферментов, и уменьшает спектр объектов биологического контроля. Для минимизации токсичного эффекта от использования глутарового альдегида применяют иммобилизацию белковых молекул в пленки природных и синтетических полимеров, что предотвращает денатурацию ферментов. Как пример такого решения, гибридные пленки на основе положительно заряженного слоя хитозана и отрицательно заряженных наночастиц диоксида кремния были попеременно иммобилизованы на графитовом электроде, который затем погружался в раствор миоглобина (Mb) и  $Au^{3+}/HAuCl_4$ . Полученные таким методом наночастицы золота обеспечивали улучшенные электрокаталитические отклики системы.[42,43]



**Рис. 1.5** – Графическая характеристика метода послойной адсорбции: (А) – Сборка LbL пленки на основе электростатического взаимодействия; (В) – «захват» ферментов в мезо-пористую кремнеземную сферу. (С) – недостатки LbL метода, проявляющиеся в низкой воспроизводимости морфологии функциональной пленки и ее сложной архитектуре. Адаптировано с [44].

Инкапсуляция ферментов в микрокапсулы является важной задачей при проектировании нано-реакторов с тюнингowymi аналитическими свойствами. Комбинация иммобилизованных наночастиц металлов и полимерной матрицы, например, Nafion®117, обеспечивает возможность получения гибридных наноструктурированных систем с превосходной стабильностью, воспроизводимостью синтеза и улучшенными аналитическими возможностями при детектировании биоаналитов (предел обнаружения, область линейности, стабильность базовой линии, селективность и тд).[43]

Не так давно был разработан способ иммобилизации ферментов группы оксидаз в пленки нерастворимых полимеров.[59,60] Способ заключается в смешивании фермента с органическим растворителем, с последующим добавлением полимера и нанесением смеси на поверхность электрода. Данный способ позволяет формировать мембраны из истинных растворов полимеров, что ведет к повышению однородности фермент-содержащих пленок. Однако в процессе сушки в пленках образуются многочисленные и неконтролируемые дефекты, что ведет к сильной вариативности аналитических сигналов, получаемых с поверхности биосенсоров на их основе.

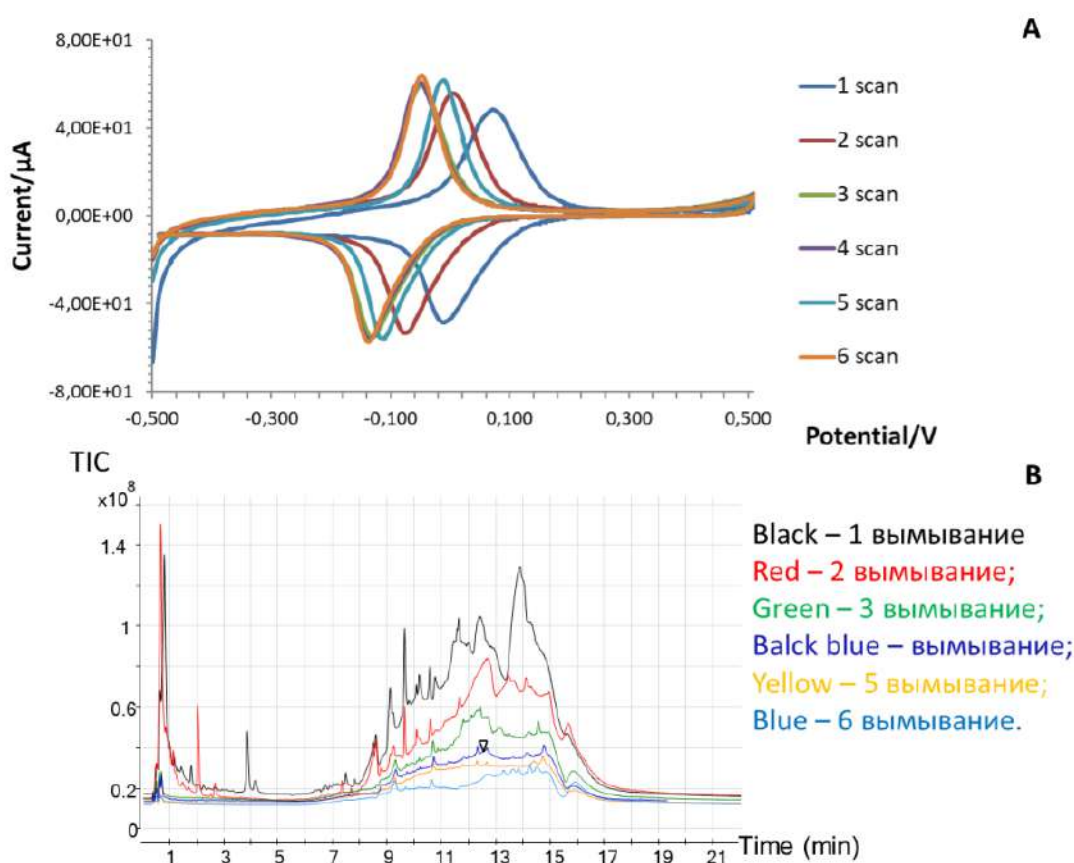
### **1.2.2 Механическая и химическая стабильность функциональных ОНГ пленок**

Наиболее широко используемым на практике подходом нанесения функциональных пленок на электроды является метод капли, и его разновидность – метод послойного капельного нанесения (LbL).[35,47,62] В результате такой сборки биосенсор представляет собой каталитический микро-реактор, в котором последовательно протекают несколько взаимодействий (показано на примере (GOx) и FAD - кофактора):



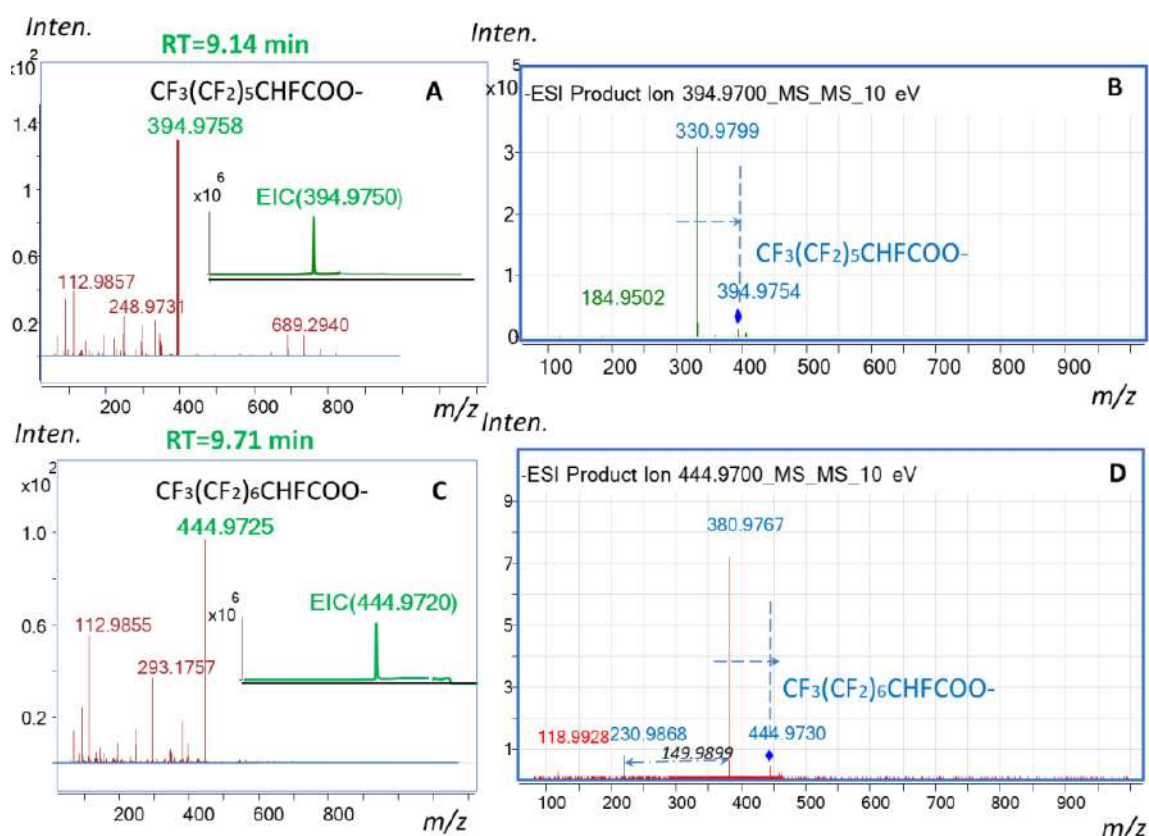


Однако послойное формирование функциональной пленки ограничено электростатическими взаимодействиями. Именно по этой причине такие сэндвич-подобные многослойные пленочные структуры показали неудовлетворительные электрохимические результаты при мониторинге глюкозы в динамическом режиме (Рис. 1.6А). Предположительно наблюдаемый эффект объясняется низкой механической стабильностью активного сенсорного слоя, вызванного вымыванием Нафiona, фермента и медиатора (Рис. 1.6В).



**Рис. 1.6** – (А) Результаты ЦВА (10 мВ/с) в буфере (рН 7), записанные с поверхности LbL биосенсора на основе РВ, GOx и Нафiona. (В) HPLC-ESI-MS хроматограммы капли воды, нанесенной на поверхность LbL биосенсора.[49]

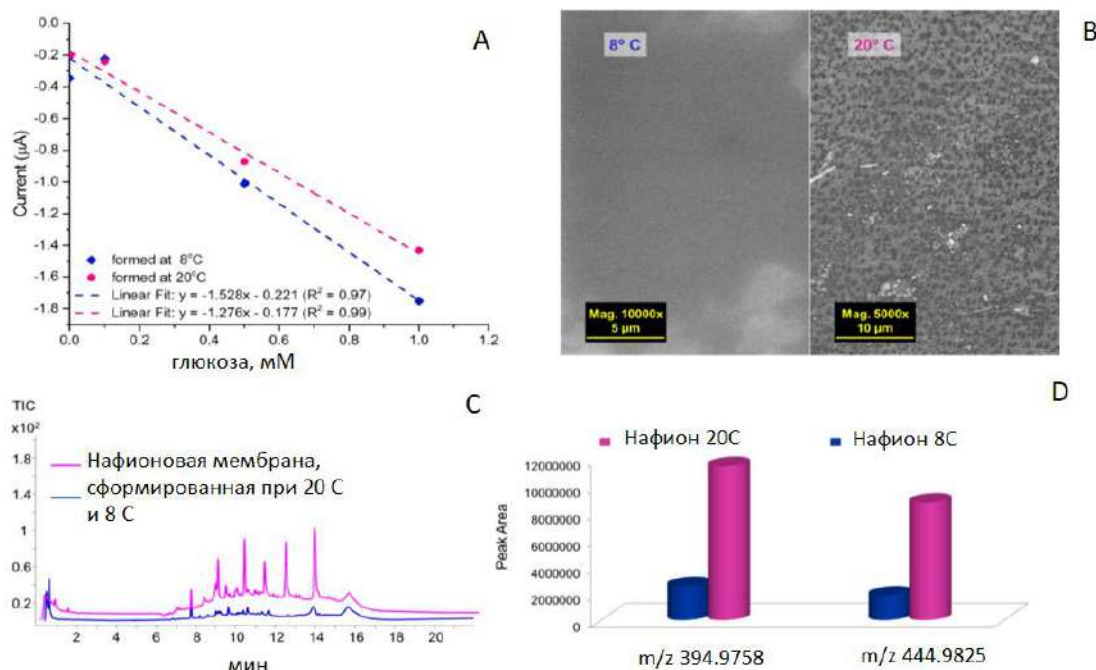
Последующий анализ дистиллированной воды (предварительно нанесенной на поверхность такого биосенсора) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-детекцией в электроспрее, показал значительное присутствие в спектрах Нафионовых фрагментов: фрагменты перфторкарбоновых кислот были идентифицированы как  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5\text{CHFCOO}^-$  при  $m/z$  394.9758 и  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_6\text{CHFCOO}^-$  при  $m/z$  444.972, соответственно, **Рис. 1.7**.



**Рис. 1.7** – EIC-MS-хроматограммы (A,C) и MS-MS спектры (B,D), записанные в негативном режиме ионизации для 30  $\mu\text{L}$  воды, предварительно нанесенной на поверхность биосенсора с LbL архитектурой. CID 10 eV.[49]

Кроме того, отклик LbL микроаналитических систем в значительной степени зависит от их архитектуры, в том числе от количества слоев и толщины ОНГ пленки. Многостадийная процедура синтеза повышает риск неоднородности сформированной гибридной пленки и зависимости ее

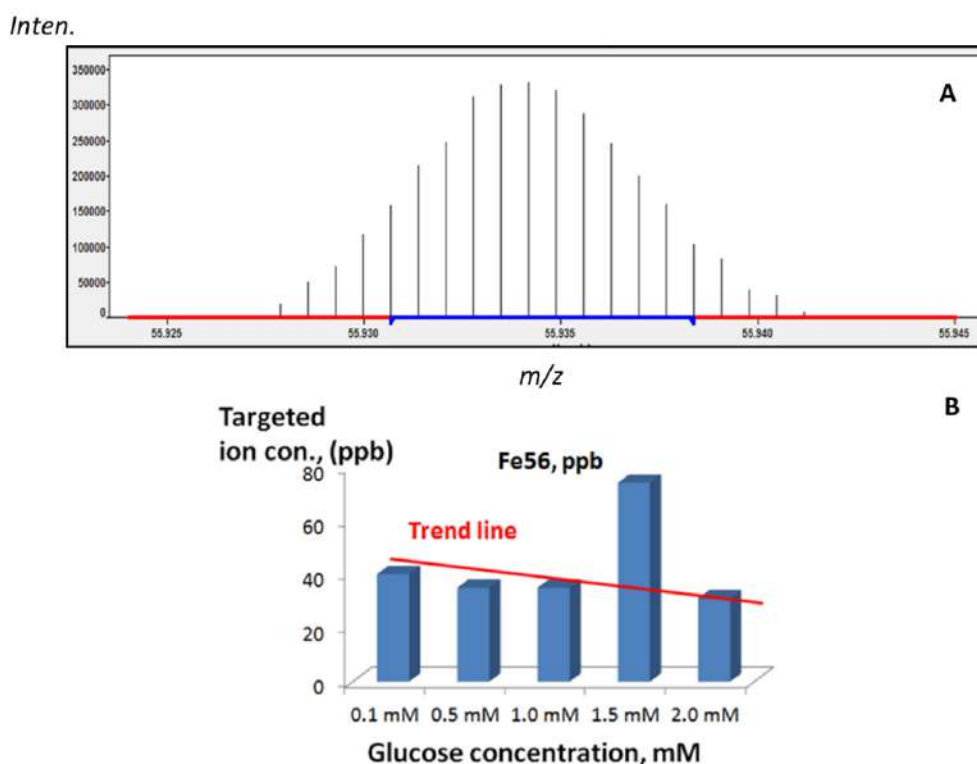
механической и химической стабильности от внешних факторов (температура синтеза или влажность), **Рис. 1.8**.



**Рис. 1.8** – Результаты анализа поверхности LbL биосенсоров. Синий – слой фермент/мембрана образован при 8 °С, розовый при 20 °С. **А** – Калибровочная зависимость биосенсора на основе РВ (1-ый слой, 10 µL), фермента, GOx (2-ой слой, 3 µL), Нафiona (3-й слой, 3 µL) при определении глюкозы. **В** – SEM микрофотографии, полученные с поверхности биосенсоров, приготовленных при разных температурах. **С** – ТИС-хроматограммы, записанные для капли воды, помещенной на поверхность биосенсоров с LbL архитектурой. **Д** – результаты масс-спектров в EIC режиме, показанные в **С** и соответствующие участкам пиков перфторированных фрагментов, зарегистрированных при  $m/z$  394.9758 и  $m/z$  444.9725.[50]

Помимо химической нестабильности органического компонента, механическая стабильность неорганического составляющего также вызывает ряд вопросов. Например, для биосенсора слоистой архитектуры на основе чувствительного к пероксиду водорода Prussian Blue (PB) методом индуктивно-связанной плазменной масс-спектрометрии высокого разрешения (HR-ICP-MS) была выявлена существенная деградация функционального слоя

уже после первых электрохимических экспериментов, **Рис. 1.9**. Стабильность слоя медиатора оценивалась как количество изотопа  $\text{Fe}^{56}$ , мигрировавшего через полимерную (Нафион) защитную мембрану в раствор.



**Рис. 1.9** – HR-ICP-MS масс спектр (А) изотопа  $\text{Fe}^{56}$  и количественная зависимость выщелачивания/вымывания активного компонента РВ ( $\text{Fe}^{56}$ ) из пленки с послойным дизайном (скорость сканирования 10 мВ/с, пробы отобраны после второго скана) (В).

Примечательно, что четкой количественной тенденции вымывания РВ в зависимости от концентрации глюкозы в растворе получено не было. Кроме того, вместо увеличения содержания  $\text{Fe}^{56}$  в капле при увеличении содержания глюкозы в пробе (связано с высоким количеством пероксида, полученного во время окисления больших концентраций аналита) была получена противоположная тенденция. Эти данные указывает на то, что в функциональном слое биосенсора этого дизайна процесс быстро достигает фазы дефицита кислорода, что будет негативно влиять на линейный диапазон калибровочной зависимости при количественном определении биоаналита.



Поэтому стабилизация медиаторного слоя, его замена альтернативными функциональными гибридными материалами, или электрокаталитическими наночастицами поможет обеспечить перенос электронов по механизмам с более предпочтительной кинетикой, а также избежать быстрого истощения кислорода (см. Главу 2).

Подобные проблемы, связанные с вымыванием ферментов, медиаторов или полимерных компонентов, а также недостаточная воспроизводимость синтеза поверхности активного функционального слоя, характерны не только для послойных биосенсоров глюкозы, но наблюдаются и в микроаналитических системах, используемых для контроля других малых биомолекул (лактата, дофамина, холина, серотонина, ацетилхолина, глутамин).[35,47,62]

Таким образом, вместо послойного дизайна возможной альтернативой может стать разработка сенсорных слоев на основе самоорганизующихся гибридных пленок. Для защиты ферментов группы оксидаз могут быть использованы наночастицы благородных металлов, легированные Нафионом или другими полимерами. Такой подход может быть направлен на усовершенствование ферментативного обнаружения малых биоаналитов в реальных образцах, а также на уменьшение выщелачивания/вымывания как самих ферментов, так и полимерных составляющих, играющих роль связующих агентов.

### **1.2.3 Принципы гальванической иммобилизации ферментов**

Методы электроосаждения биорецепторов совместно с полимером на поверхности наночастиц благородных металлов могут рассматриваться как возможная альтернатива существующим методам самосборки. По сравнению с альтернативными системами на основе наноразмерных композитов, наночастицы благородных металлов и их ОНГ проявляют гораздо меньшую

токсичность и большую стабильность в условиях внешней среды. Использование гальванически осажденных наночастиц благородных металлов поможет устранить потребность в дополнительном медиаторном слое, часто необходимом в архитектуре биосенсоров для обеспечения переноса электронов от ферментативного слоя к поверхности электрода. Кроме того, такой подход поможет уменьшить толщину функциональной пленки и скорость генерации аналитического сигнала.[51]

Оксидазы являются достаточно обширной ферментной группой, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции, протекающие с участием кислорода. В реакциях, включающих донорство атома водорода, кислород восстанавливается до воды или перекиси водорода. Помимо того, что гальванические наночастицы благородных металлов могут способствовать устранению образовавшиеся в ходе ферментативной реакции  $H_2O_2$  из системы, и таким образом, сохранять активность ферментов в течение более длительного времени, они также могут вносить вклад в кинетику биохимической реакции и время отклика микроаналитической системы. Однако для проверки выдвинутого тезиса, необходимо гарантировать активность биомолекул после их электрохимической иммобилизации при таком подходе без существенных изменений по сравнению с их активностью в растворах.

Основным требованием при электроосаждении биомакромолекул является выбор базового электролита, концентрации белка и условий электроосаждения. В процессе электроосаждения не должно происходить ни разрушения фермента, ни изменений в его исходной конфигурации/конформации. При выборе условий электроосаждения биомолекулы необходимо учитывать ее заряд в растворе, миграцию в электрическом поле, а также возможные конформационные изменения после осаждения на электроде.[55] Примечательно, что электроосаждать вместе с

наночастицами благородных металлов можно как природные биомакромолекулы (ферменты), так и синтетические полимеры.[56]

В качестве примера можно рассмотреть получение амперометрического сенсора на основе GOx путем пропускания тока через водный раствор фермента и бычьего сывороточного альбумина. Было установлено, что эти электроды являются высокоактивными после нанесения фермента в слое альбумина.[54] Последующая модификация поверхности полипирролом позволила снизить матричные эффекты, в том числе влияние аскорбата и парацетамола на результаты количественного определения глюкозы в реальных образцах.

Также сообщается о простом способе высокоэффективной иммобилизации ферментов путем электроосаждения из водного раствора хитозана, содержащего фермент для амперометрического определения глюкозы. GOx сшивали с хитозаном (CS) с помощью глутаральдегида (GLU, 0.080%) при строгом контроле рН с последующим электроосаждением пленки GOx-GLU-CS. Полученный гибридный ферментный электрод первого поколения характеризовался чувствительностью к глюкозе в  $102 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ . [55] Недостатком способа является его многостадийность и выраженная зависимость эффективности осаждения от параметров окружающей среды (рН, Т, °С, др.).

Осаждение GOx из дистиллированной воды, а также фосфатного буфера при относительно высоком потенциале в 4 В (Ag/AgCl) позволило получить ферментный электрод с 10-кратной амперометрической чувствительностью по сравнению с аналогами.[56] Было показано, что на морфологию пленки и ее гомогенность существенно влияет тип используемого электролита. Так, для фермента, осажденного из водного раствора, толщина пленки была почти в 18 раз выше, чем масса и толщина слоя фермента, осажденного из буфера. Устойчивость к переносу электронов для пленки GOx, осажденной из воды была выше, чем для пленки GOx, осажденной из буфера. В то же время, для

пленки, полученной из буфера, наблюдалась гладкая морфология. На основании полученных данных авторы работы делают вывод, что GOx, осажденный из воды, подвергается как электрофоретической миграции фермента из объема к границе раздела, так и осаждению на границе раздела электродов в результате локального снижения pH. Напротив, осаждение GOx из буфера происходит только из-за изменения pH.[56] К недостатком способа следует отнести необходимость электроосаждения из концентрированных растворов ферментов ( $\geq 15$  мг/мл). Кроме того, для обеспечения требуемой электропроводности раствора ( $\geq 7900$   $\mu\text{См/с}$ ) в исходном растворе фермента присутствуют многочисленные соли, что также может ингибировать фермент в процессе его осаждения. Электроосаждение из водных растворов электролитов не способно обеспечить надежную фиксацию фермента на поверхности электрода, что неизбежно ведет к его интенсивному вымыванию в ходе последующего электрохимического эксперимента.

Заслуживающим внимания также является способ контролируемой иммобилизации GOx при его прямом электроосаждении на платиновом электроде.[57] При этом присутствие неионного детергента Тритона X-100 является существенным для получения многослойного функционального покрытия. Для правильной работы биосенсора с пленками GOx, Тритон X-100 должен присутствовать в концентрации выше его критической концентрации мицелл. В этих условиях возможно формирование однородной пленки фермента в 50 слоев с общей толщиной  $480 \pm 20$  нм. При отсутствии Тритона X-100 образующийся слой фермента не превышает 25 нм. Недостатком способа является загрязнение поверхности сенсора примесью детергента, а также использование высокого потенциала в 1.3 В (по сравнению с электродом AgCl/Ag), что непременно приведет к конформационным изменениям в структуре белка и интенсивному выделению кислорода на поверхности электрода.[57]

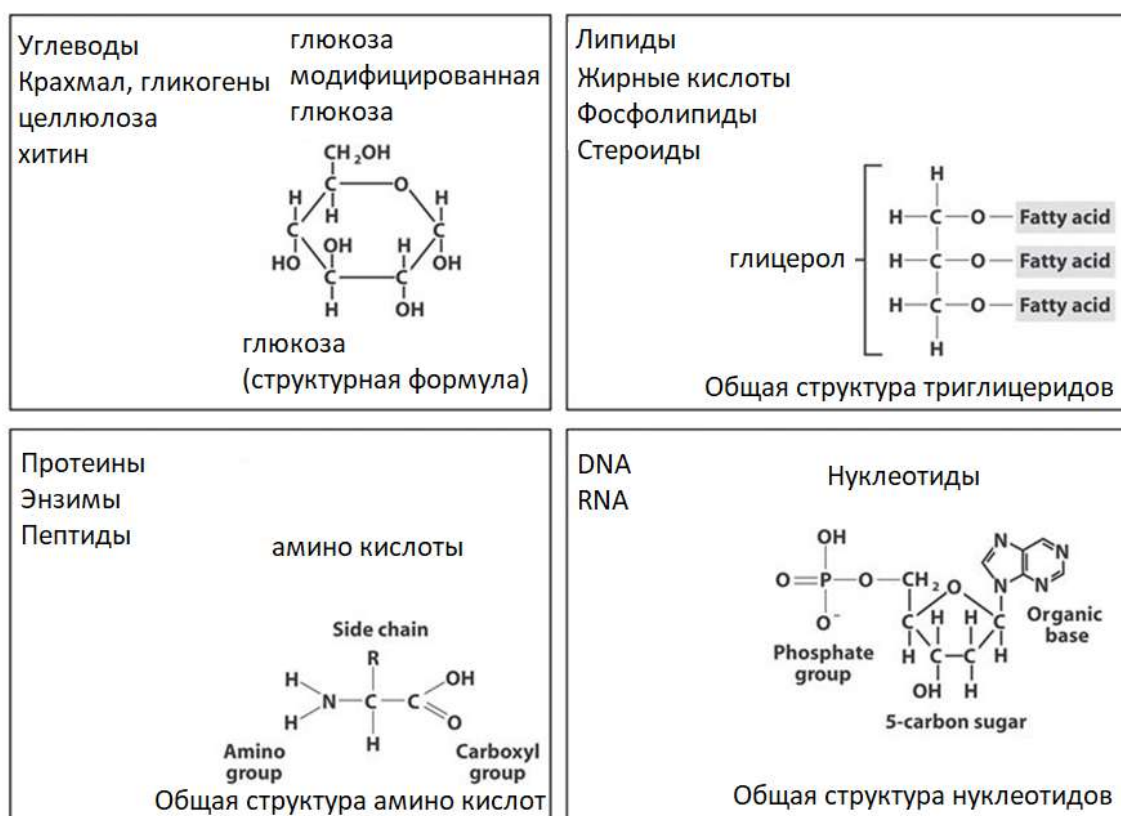
Важным моментом при иммобилизации биомолекул методами электрохимии является формирование благоприятной внутренней среды капсулы-носителя (*enzyme-friendly environment*). Так, активность ферментов после иммобилизации зависит от наличия достаточного количества молекул воды в гибридной капсуле (слое), поддержания оптимальной кислотности среды, присутствия буферов и плотности упаковки биомолекул.[58]

Следует отметить, что формирование биосенсоров на основе электроосажденных биомолекул имеет множество возможных применений для обнаружения малых молекул, метаболитов, белковых антигенов, олигонуклеотидов и тд. Разнообразие материалов электродов, типов ферментов и условий соосаждения создает широкий спектр гибридных функциональных структур для биохимического анализа. Однако закономерности осаждения биомолекул на поверхности электродов из сложных растворов электролитов еще только предстоит изучить. Дальнейшее понимание соотношения параметров электроосаждения позволит выработать общие принципы формирования гибридных функциональных пленок на основе биомолекул и неорганических материалов, определить их химическую и механическую стабильность, а также биосовместимость и аналитическую значимость микроаналитических систем на их основе.

### 1.3 Особенности определения малых биомолекул

В области молекулярной биоаналитической химии малая молекула представляет собой низкомолекулярное (менее 1000 г/моль или 1 килодальтон,  $\leq 1\text{kDa}$ ) органическое соединение, которое способно регулировать биологический процесс/биохимическую реакцию. К этой категории аналитов относятся жирные кислоты, аминокислоты, холестерин, липиды, гликозиды, алкалоиды, углеводы и природные фенолы, **Рис. 1.10.**[59][60,61] Следует отметить, что многие лекарственные препараты – это также по своей природе небольшие по массе молекулы.

Малые биомолекулы могут быть использованы в качестве маркеров для исследования биологических функций, а также для разработки новых терапевтических агентов. Эти молекулы располагаются в свободном состоянии в цитоплазме клетки, благодаря чему могут быстро перемещаться. Достаточно часто малые молекулы выступают как мономеры: мономерами полисахаридов являются моносахариды, мономеры белков – аминокислоты, нуклеиновых кислот – нуклеотиды. Мономерам присуща способность к полимеризации. Сочетание малых молекул происходит путем удаления воды во время реакций конденсации, а распад – в результате химических преобразований в тех продуктах, из которых они синтезировались.



**Рис. 1.10** – Основные классы малых биомолекул.[62]

Малые биомолекулы часто являются веществами-маркерами некоторых заболеваний человека или общего окислительного статуса клеток. Например, по содержанию лактата можно судить об уровне оксигенации тканей.[63] Именно поэтому этот биоаналит имеет первостепенное значение для оценки

физических показателей в спорте, биотехнологии и здравоохранении. Другой пример включает дофамин и серотонин, которые играют заметную роль в центральной нервной системе млекопитающих. Так, недостаток дофамина ведет к развитию депрессий, а его избыток – к шизофрении.[64] Кроме того, способность небольших молекул взаимодействовать с РНК открывает новые возможности для разработки вакцин нового поколения или созданию методик, направленных на терапию заболеваний, которые ранее считались неподдающимися контролю.[65]

Скрининг малых молекул играет передовую роль в новых подходах диагностики и лечения диабета.[66] Например, помимо того, что содержание глюкозы определяет состояние клеточной энергии, современные исследования показывают связь уровня сахара в крови у мышей, вызывающего переключение между критическими клеточными процессами, и отсутствием фермента SIRT6 (регулятор уровня глюкозы). Изучение механизма взаимодействия этого белка с глюкозой может привести к новым подходам при лечении диабета 2 типа.[67] В этой связи, разработка надежных экспресс-способов контроля уровня глюкозы в сложных объектах (кровь, слюна, межклеточная жидкость, ферментативные среды и др.) и других малых молекул, имеет первостепенное значение в биологии, клинической диагностике, биосенсорике, фармакологии и биотехнологии.

Однако обнаружение и определение этих биоаналитов – это совсем нетривиальная аналитическая задача. Зачастую биомолекулы приходится анализировать в реальных объектах, когда объем проб не превышает микро- ( $\mu\text{L}$ /мкл) или нанолитров (нл). В этой связи, метод должен обеспечивать высокую чувствительность при малых объемах пробы и быть толерантным к матричным эффектам.

Важно отметить, что биомолекулы – это хрупкие и низко летучие компоненты (жирные кислоты, углеводы, аминокислоты, пр.), поэтому они не могут быть проанализированы методами газовой хроматографии без

предварительной дериватизации проб, дополнительной пробоподготовки [68,69] и сложного многостадийного определения.[60,61] Биомолекулы очень чувствительны к воздействию высоких температур, поэтому их определение в интактной (неповрежденной) форме является крайне непростой задачей. Качественное и количественное определение этих биоаналитов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии осложняется их высокой гидрофильностью.[70]

Перспективные и высокоинформативные методы электрофореза при определении биоаналитов зарекомендовали себя как экспрессные и эффективные подходы разделения многокомпонентных смесей. Однако эти методы не позволяют проводить количественное определение малых биоаналитов без привлечения дополнительных методик, а также не предоставляют полную структурную информацию.[71,72]

В этой связи, вследствие высокой чувствительности и мягкости условий выполнения анализа, возможности одновременного качественного и количественного определения, а также минимальной пробоподготовки, методы скоростной масс-спектрометрии и биосенсорики играют ведущую роль при обнаружении и определении малых биомолекул.

### **1.3.1 Возможности и ограничения электрохимических биосенсоров на основе ОНГ пленок для определения малых биомолекул**

В течение последнего десятилетия в поисках более информативных способов биотехнологического скрининга и контроля значительные усилия исследователей были сосредоточены на разработке электрохимических биосенсоров.[73] В целом, биосенсоры являются типичным представителем классов ОНГ материалов из-за присутствия в их дизайне как неорганического (электрод на основе металла, оксидов, наночастиц и тд), так и биоорганических компонентов (полимеры, ферменты, аптамеры, антитела,



ДНК/РНК). При этом взаимодействие между биокомпонентом, в том числе между клетками и неорганическим функциональным слоем, является отдельной биоаналитической задачей.[74]

При условии хорошей механической и химической стабильности в водных растворах электрохимические биосенсоры на основе ОНГ пленок могут стать идеальным инструментом для решения целого ряда проблем в биотехнологии и медицине. Амперометрическое обнаружение биоаналитов имеет несколько преимуществ перед альтернативными методиками, в том числе низкий предел обнаружения ( $10^{-9}$ – $10^{-13}$  g) [73], возможность настройки анализа по типу аналита, толерантность к присутствию буферов, небольшой объем пробы, необходимой для определения, экспрессность, а также простота конструкции и низкая себестоимость синтеза функциональной пленки. Кроме того, электрохимические биосенсоры на основе ОНГ пленок позволяют проводить корреляцию между первичными и вторичными экзогенными метаболитами в биопробах, в том числе, и в клеточных культурах, чего нельзя сказать о генетически кодированных биосенсорах.[75][76]

К сегодняшнему дню разработан широкий спектр электрохимических биосенсоров для определения малых биоаналитов, имеющих биологическое, физиологическое и биотехнологическое значение, в том числе глюкозы [77] [78], лактата [79][80] и жирных кислот [81]. Однако эти микроаналитические системы так и не стали стандартным инструментом в биотехнологии. К сожалению, стратегии мониторинга и контроля в биотехнологии по-прежнему включают лишь измерение температуры, pH, количество растворенного кислорода и значение оптической плотности ферментативного раствора.[82][83] Основная причина этого феномена состоит в отсутствии методов стандартизации биосенсоров на основе ОНГ пленок. В тоже время целый спектр биосенсоров с самым различным дизайном и архитектурой используются в исследовательских лабораториях, но лишь единицы

представлены на рынке, лицензированы и одобрены для использования в биотехнологии.[84][85]

Качество ОНГ пленок и биосенсоров на их основе должно определяться по соответствующим протоколам. В настоящее время руководящие принципы стандартизации ОНГ структур находятся на стадии разработки.[86] В этой связи, отсутствуют и общие подходы метрологии и стандартизации биосенсоров на основе таких материалов. Только лишь адресуя вышеупомянутые недостатки в ОНГ пленках, возможен дальнейший прогресс в области создания микроаналитических устройств на их основе.

Другой проблемой биосенсоров является отсутствие баз данных, содержащих постоянно обновляемую экспериментальную информацию об их конструкциях, дизайнах, физических и/или химических свойствах.

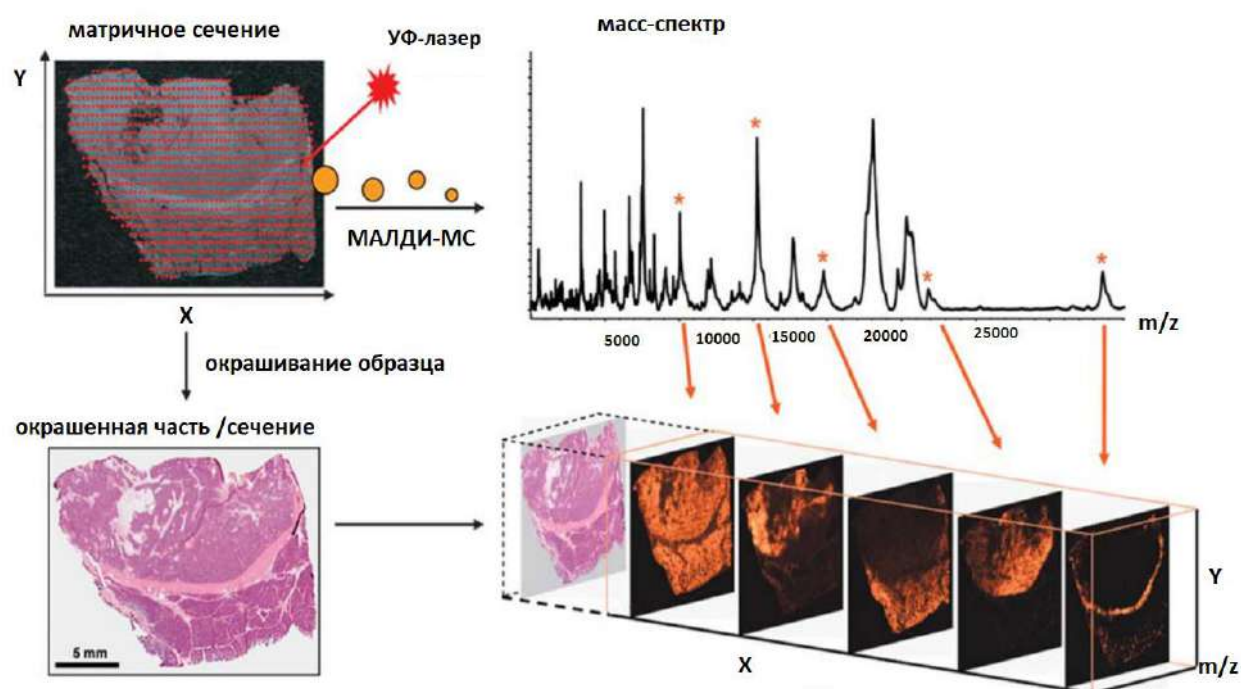
### **1.3.2 Матрично-активированная (MALDI-MS) и поверхностно-активированная масс-спектрометрия (SALDI-MS) для обнаружения и определения малых биомолекул**

Прикладная аналитика зачастую требует быстрого измерения целевых биоаналитов в реальных образцах без предварительной пробоподготовки и многостадийного разделения компонентов смеси. В высокоскоростных масс-спектрометрических подходах используются методы, основанные на прямой ионизации образцов лазерным облучением, в основном посредством лазерной десорбции/ионизации с помощью матрицы (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, MALDI-MS).[87][88] Этим методом часто анализируют синтетические наркотики, лекарственные препараты, эндогенные метаболиты, липиды и паралитические яды. Основные классы целевых соединений охватывают диапазон масс от 200 до 800 Da.

MALDI-MS имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами масс-спектрометрии, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детектором (HPLC-MS). Важно, что MALDI-MS может

достигать высокой пропускной способности выборки. Так, например, применение MALDI на платформе тройного квадрупольного МС для фармакокинетического анализа приводит к 50-кратной увеличенной пропускной способности при измерении проб [89] по сравнению с HPLC-MS, как минимум с сопоставимыми, или даже лучшими аналитическими характеристиками (пределы обнаружения, область линейности, чувствительностью, селективность, отношение сигнал/шум). MALDI-MS не чувствителен к воздействию ионов солей или буферных растворов, как это часто наблюдается при ионизации молекул в электроспрее.[88]

Однако соединения с низкой молекулярной массой, например ниже 600-700 Да трудно определять с помощью этого метода из-за серьезных спектральных помех ( $m/z$ ), связанных с типом используемой органической матрицы.[90] Решение этой проблемы возможно только с привлечением приборов высокого разрешения (ошибка по массе не более 2 ppm) и методов биоинформатики. Помимо указанных проблем, размер кристаллов органической матрицы находится в микронном диапазоне (мкм), что делает *LDI-imaging* (визуализацию распределения компонентов сложной пробы) с использованием классических органических матриц не достаточно точным, **Рис. 1.11.** [91][92] Пространственное разрешение метода не более 30-50 мкм, что соответствует размерам кристаллов матрицы.

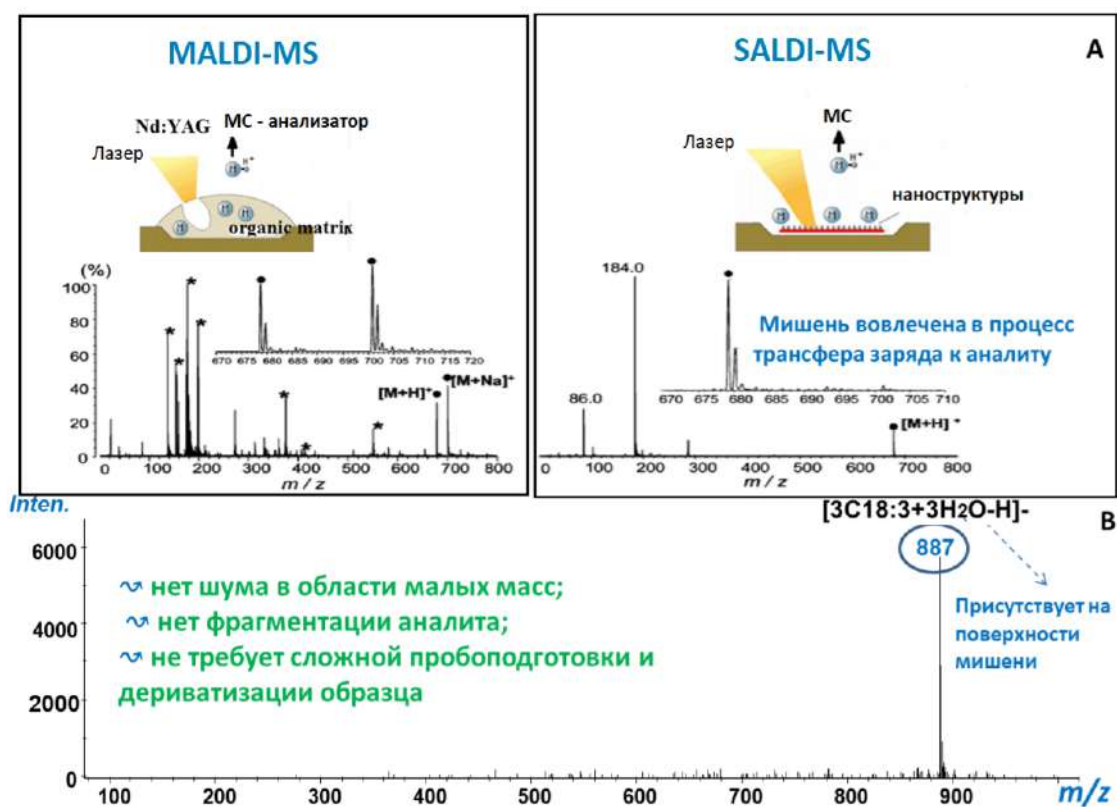


**Рис. 1.11** – Принцип *LDI-imaging* масс-спектрометрии. Секция ткани покрыта матрицей, которая извлекает целевые молекулы из ткани. После этого образец измеряют в растровом режиме масс-спектрометрии, что приводит к формированию пространственно разрешенных масс-спектров.[92] *Примечание:* УФ-лазер воздействует главным образом на кристаллы матрицы. После масс-спектрометрического измерения проводят гистологическое окрашивание образца, что обеспечивает возможность гистологического анализа по масс-спектрам. Обнаруженные сигналы ( $m/z$ ) затем визуализируются как карты интенсивности цвета, классифицируя молекулярные узоры к определённым классам биоаналитов.[92]

В качестве альтернативы методу MALDI-MS был предложен метод поверхностно-активированной лазерной десорбции ионизации масс-спектрометрии (SALDI-MS).[93] Метод позволяет избежать образования микронных кристаллов органической матрицы, что автоматически влечет увеличение разрешения в *LDI-imaging*. Кроме того, отсутствие необходимости использования органической матрицы позволяет получать «чистые» масс-спектры, в которых визуализируются только ионы целевых биоаналитов вместо ионов MALDI-матрицы, **Рис. 1.12**.

Фактически, наночастицы оксидов металлов или наноструктуры на основе кремния практически не ионизируются из-за высоких точек плавления этих материалов по сравнению с органическими матрицами. В результате в низком диапазоне масс визуализируются только ионы, принадлежащие аналитам. Пространственное разрешение (SALDI-визуализация, *LDI-MS imaging*) может достигать до 20-100 нм. Примечательно, что сам наноматериал (мишени-эмиттеры) при этом вовлечен в процесс переноса заряда к аналиту. Другими словами, химия поверхности эмиттера играет важнейшую роль в эффективности процесса десорбции и ионизации аналита.

Общие стадии получения, оценки и дальнейшего применения мишеней в SALDI при скрининге биоаналитов приведены на **Рис. 1.13**.

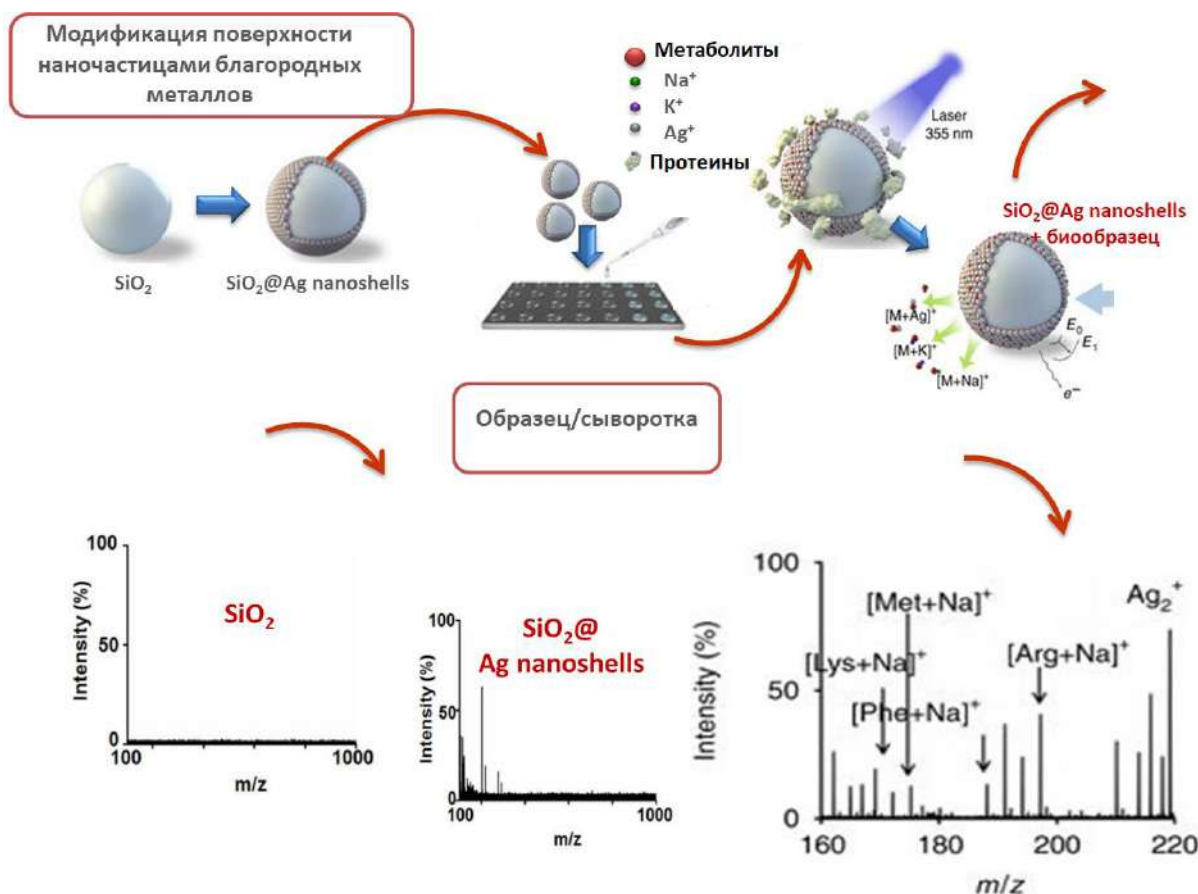


**Рис. 1.12** – Сравнительный анализ (А) и общая схема работы (В) методов MALDI-MS и SALDI-MS. Масс спектр (В) показан на примере определения

линоленовой кислоты в негативном режиме ионизации с поверхности Ag-наночастиц (SALDI-MS, лазер 45%, 355 нм).

Исследования, проведенные в этой области, позволяют заключить, что типы поверхностных структур по-разному влияют на эффективность процесса лазерной десорбции/ионизации для разных классов органических соединений.[100-102] Исследованные поверхности-эмиттеры включают различные пористые, твердые материалы и наноструктурированные покрытия (Табл. 1.2).

Важно отметить, что использование подложек-эмиттеров в методе SALDI-MS должно обеспечить ионизацию целевых аналитов со степенью эффективности, как минимум, сопоставимой с существующими методологиями в MALDI-MS.



**Рис. 1.13** – Схематический процесс использования наночастиц благородных металлов для скрининга биологических проб в SALDI-MS [94].

**Табл. 1.2** – Обзор мишеней/функциональных пленок метода SALDI-MS

Поверхность	Метод подготовки поверхности	Характеристики	Применение	Достоинства	Лит.
<b>Пористые микро- и наноповерхности</b>					
Пористый Si	Электрохимическое травление в растворах HF	$D_{por}= 70-120$ нм, глубина 200 нм, пористость 30-40%	Гексапептид даларгин 0.32 pmol	Подходит для широкого спектра малых молекул	[98]
Пористые оксидные покрытия	a) Электрохимическое травление (Ti - пленки) b) Электрохимическое окисление (алюминиевая фольга)	a) $D_{por}$ TiO <sub>2</sub> =70 нм, длина 250 нм; b) Al нанопористый, $D_{por}=100$ нм	a) малые пептиды, fmol b) ангиотензин	a) Высокая эффективность ионизации, низкий фон b) низкая фрагментация	[99]
Нанопористое Au	Электроосаждение Ag/Au с последующим селективным растворением Ag в HNO <sub>3</sub>	200 нм глубина пористой области	верапамил 100 fmol	Чистые масс-спектры, возможно длительное хранение	[100]
<b>Углерод и производные углерода</b>					
Окисленные углеродные нанотрубки (УНТ)	УНТ окислены в смеси HNO <sub>3</sub> и H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> при 120°C в течение 30 мин	Многостенные окисленные УНТ дают пики в ИК- при 3490 cm <sup>-1</sup> (O-H) и 1600 cm <sup>-1</sup> (C=O)	Аминокислоты, 1-100 нг/мл	Простая подготовка образцов, более однородный и компактный матричный слой	[101]
Коллоидный Графит	Разбавленный раствор коллоидного графита наносили на пластину из нержавеющей стали микропипеткой и сушили на воздухе.	$D_{graphite\ spot} = 3$ мкм	Жирные кислоты, Флавоноиды, fmol	Однородные поверхности позволяют провести количественное определение	[102]
Алмазные нанопровода /Diamond nanowires	Получают кислородной плазмой при 150 mTorr, 300W (40 мин)	$D_{wires} = 10-30$ нм, длина до 660 нм	Верапамил 200 zeptomole	Гидрофильный характер дает минимальное распределение капель	[103]
Углеродные нанопокртия	Плазмохимическое осаждение из паровой фазы	$D_{por} = 100$ нм, Длина до 4 мкм	Малые пептиды, β-циклодекстрин 10 fmol	Высокая активность без потери начальных свойств	[104]
Хлопья графена	Получают из нанопорошка графена, растворенного в этаноле/воде, обрабатывают ультразвуком 5 мин	Толщина 8-10 нм (20-30 монослой) $D_{particle} = 600$ нм	Жирные кислоты, аминокислоты 0.5 mM	Простая подготовка образцов, высокая устойчивость к буферам	[105]
<b>Твердые наноматериалы</b>					
Аморфный Si	Плазменное химическое осаждение из паровой фазы	Тонкие пленки 50-100 нм	Фенилалкиламин 5-150 pg/ml	Может храниться длительное время без потери активности	[106]
Si нановолокна	Decomposition of silane in presence of Au-nanoclusters	$D_{por} = 10-40$ нм, длина 10 μm, пористость 10-50/ μm <sup>2</sup>	ангиотензин - пептиды 500 fmol	Маломощный лазер, чувствительное определение малых полярных молекул	[107]
силиконовые наночастицы	Si-нано-порошки гидроксидированные 10% HNO <sub>3</sub> в течении 30 min	$D_{part.} = 5-50$ нм	Сульфокислоты (50 pmol/μl), Жирные кислоты	Минимальный отбор проб, селективное определение кислот	[108]

			(200 pmol/ $\mu$ l)		
Металл. наночастицы	Au- наночастицы, полученные из AuCl <sub>4</sub> <sup>-</sup>	$D_{part.} = 10-40$ нм	глутатион, ангиотензин 25 fmol	Высокоаффинные ловушки для олигопептидов в смесях	[109]
<b>Наногибридные материалы</b>					
Гибридные металлические наночастицы	Au- наночастицы, выращенные на оксиде графена, приготовленном с помощью полиаллиламингидрохлорида	Толщина 2.17 nm $D_{Au\ part.} = 30$ nm	углеводы, 100 pmol	Высокая устойчивость к солям и буферам, отсутствие значительной фрагментации, простой процесс производства	[110]
Покрытые графеном Co наночастицы	Пиролиз пламенным распылением путем сжигания подходящего металла	CoC-NH <sub>2</sub> , $D = 30$ нм, удельная поверхность, 15 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	бисфенол А 20 ppb	Чистые спектры в диапазоне низких m/z, низкий предел обнаружения	[111]
Электроформованный нанополимер /Electro-spun nano-polymer	Полиакрилонитрил, поливиниловый спирт пиролизованный при 900°C	$D_{pores} = 30-50$ нм	ангиотензин 400 attmol	Чистые спектры в малом диапазоне m/z, хорошая воспроизводимость данных	[112]
Золь-гель-SALDI	Взаимодействие различных количеств дигидроксibenзойной кислоты в исходном зольном растворе	Sol-gels DHB (DHB sol-gel раствор 7,500-10,000 ppm)	Аргинин, брадикинин, инсулин 80 fmol	Чистые масс-спектры, простая методика приготовления	[113]

Большое количество наноматериалов, смесей на их основе и методов их получения сильно затрудняет классификацию на четко определенные категории лазерной десорбции/ионизации. Так, некоторые исследователи считают, что SALDI-MS является нематричным методом, другие относят его к лазерной десорбции/ионизации с использованием неорганической матрицы. Независимо от природы материала, используемого для синтеза мишени-эмиттера и способа ее получения, методы SALDI обычно направлены на достижение следующих целей:

- повышение эффективности процесса лазерной десорбции/ионизации (LDI) по сравнению с неактивированными поверхностями (макро-размерные металлические поверхности, кремний);
- снижение мощности лазерного импульса (кДж), необходимого для десорбции аналита по сравнению с использованием органических матриц;
- мягкой ионизация без разложения и интенсивной фрагментации аналитов;
- уменьшение фоновых шумов;
- снижение или полное отсутствие ионов, связанных с поверхностью в диапазоне низких m/z, которые мешают определению малых молекул.



Основное требование к методу получения мишеней-эмиттеров в методе SALDI – это простота синтеза, надежность и высокая воспроизводимость морфологии и химии поверхности от мишени к мишени, от партии к партии. Поэтому, разработка простых и надежных методов формирования функциональных наноразмерных эмиттеров ионов в методе SALDI является актуальной наноинженерной и наноаналитической задачей.

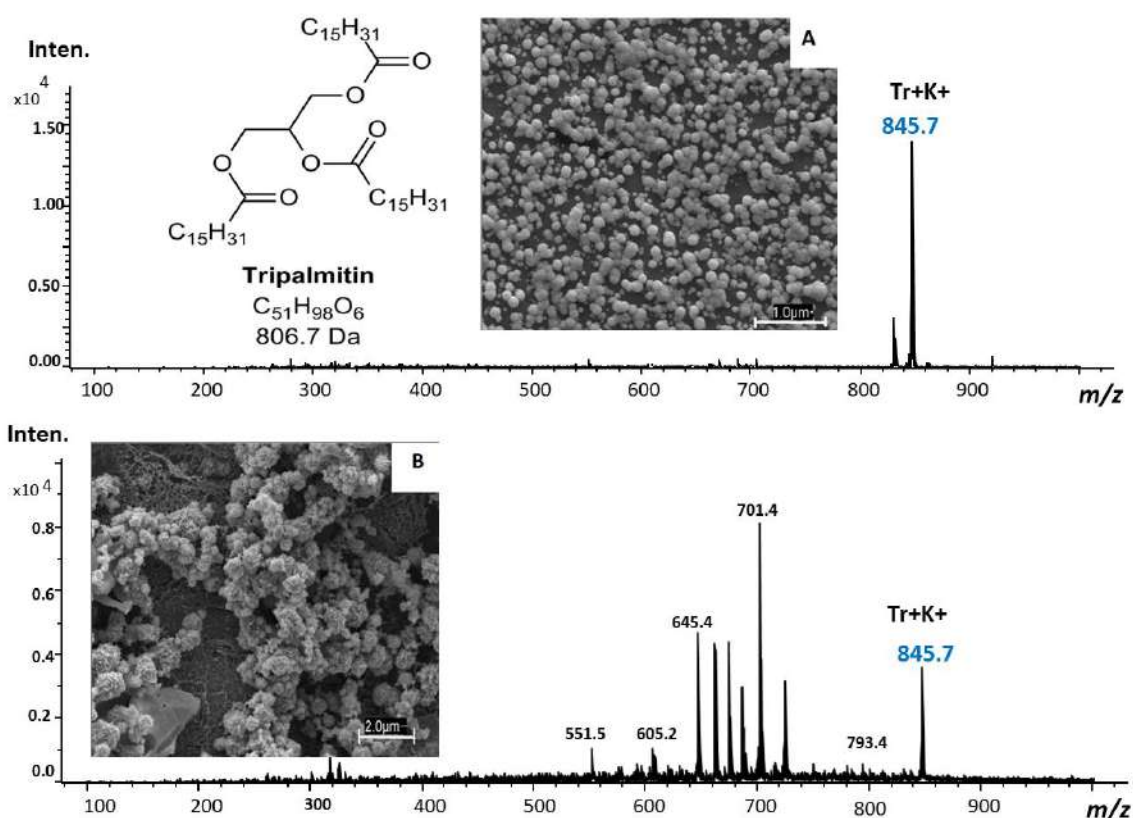
### 1.3.2.1 Основные аспекты формирования ионов в методе SALDI-MS

Вне зависимости от аналитической значимости, основная сложность в методе SALDI-MS состоит в отсутствии единой базы данных по откликам имеющимся мишеням-эмиттерам и классам биоаналитам, отсутствии фундаментального понимания природы формирующегося сигнала, а также параметрах, влияющих на него.

Следует отметить, что принцип выбора мишеней в зависимости от типа и природы аналитов также отсутствуют. Кроме того, методы формирования мишеней в методе SALDI для одних и тех же структур сильно разнятся. Например, наночастицы Ag, Pt или Pd можно получить как химически, так и электрохимически при действии тока или без него – *in situ* reduction (известно в англоязычной литературе как „electroless deposition”).[114–116] При этом очевидно, что морфология и химия поверхности мишеней на основе одного и того же элемента/наночастиц будет значительно отличаться в зависимости от способов получения.[117][118] Так, например мишени на основе наночастиц палладия (Pd-NPs) были получены электролитически при действии внешнего источника тока (**Рис. 1.14А**), а также „*electroless deposition*” в отсутствии тока (**Рис. 1.14В**). При этом полученные масс-спектры для одного и того же аналита существенно отличаются не только уровнем шумов в нижнем диапазоне масс, но и интенсивностью сигнала по целевому аналиту, а также степенью фрагментации.[119]

Для углеродных и углерод-производных материалов было показано, что различные технологии их синтеза создают поверхностные структуры с разной морфологией и свойствами ионизации.[102][120,121]

В некоторых случаях способ синтеза мишени оказывает значительное влияние на эффективность ионизации, а результаты анализа определяются исключительно природой материала подложки. Например, Pt-подложки, полученные простым восстановлением  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  в  $\text{NaBH}_4$  (тонкие порошковые структуры) [122] или гальваническим диспропорционированием одного и того же раствора (самоорганизующиеся цветочно-подобные структуры), показали очень разную морфологию поверхностей. Однако аналитический сигнал для тестируемого соединения, полученный с поверхности таких мишеней, был фактически идентичным.[123]



**Рис. 1.14** – Масс-спектры 30 ppm трипальмитина (Tr): (A) – спектр получен с поверхности гальванических Pd-NPs. (B) – с поверхности Pd-NPs, синтезированных методом химического осаждения.[119] *Примечание:* экспериментальные условия в (A) и (B) были идентичны.

Текущие исследования в области SALDI-MS охватывают три основных направления:

(1) разработка методов синтеза новых мишеней с улучшенными аналитическими характеристиками (меньшие затраты энергии на ионизацию, более высокая чувствительность определения, меньшая фрагментация аналита);

(2) разработка конкретных способов обнаружения и определения целевых биоаналитов, устранение матричных эффектов;

(3) понимание механизмов формирования сигнала в методе, определение ключевых факторов, влияющих на эффективность лазерной ионизации.

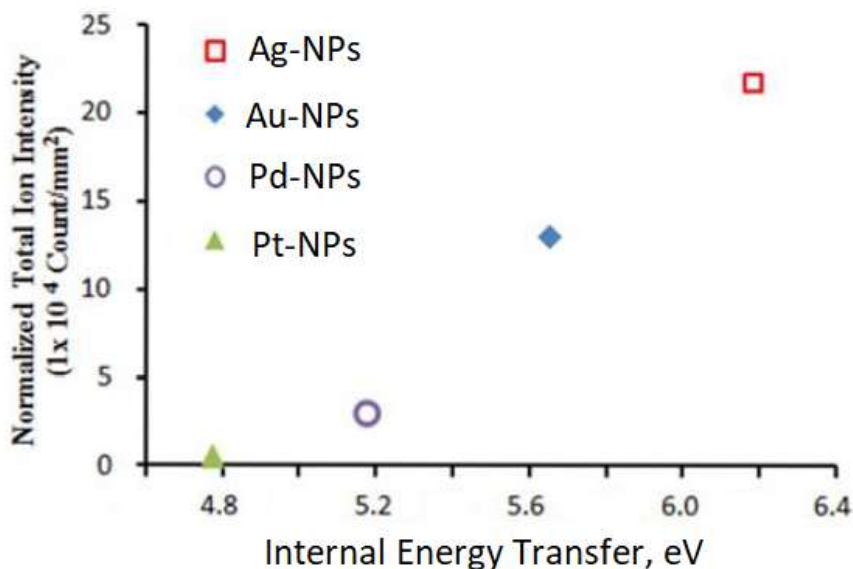
Первые два упомянутых тематических направления сегодня интенсивно развиваются, однако работы, направленные на понимание механизмов образования ионов с тех или иных поверхностей и пленок, практически отсутствуют.[124] Между тем, морфология поверхности, тип, форма, размер, физико-химические свойства мишеней, параметры лазерного излучения и химические свойства биоаналита являются критическими факторами, влияющими на аналитический сигнал метода и эффективность генерации ионов.[128,129] К сожалению, влияние этих факторов на эффективность сигнала в методе SALDI-MS на основе наночастиц благородных металлов и их гибридов до сих пор не обобщалось и не систематизировалось.

### **1.3.2.2 Лазерная десорбция/ионизация с поверхности металлических наночастиц и гибридов на их основе**

Среди широкого разнообразия подложек-эмиттеров особое место уделяется металлическим наночастицам, полупроводникам и их гибридам.[93] Эти эмиттеры ионов нашли такое широкое применение на практике благодаря их способности к мягкой ионизации и низкими пределами обнаружения малых биомолекул. В этой связи, именно для эмиттеров на основе металлических наночастиц и полупроводников на сегодняшний день накоплены некоторые

данные, касающиеся природы формирования сигнала в методе SALDI-MS. Так, например, считается что десорбция аналита с таких поверхностей в основном связана с тепловым процессом (за счет нагрева лазером) и частично с фазовыми переходами.[124] Эффективность десорбции ионов различных наночастиц благородных металлов увеличивается в соответствии с их внутренним переносом энергии (Рис. 1.15).

Термодесорбция может быть ключевым механизмом в процессе десорбции и последующей ионизации ионов. Например, эффективность десорбции бензилпиридиния в значительной степени зависит от природы наночастиц эмиттера. Следовательно, некоторые различия в физико-химических свойствах (теплопроводность, температура нагрева, эффективность фотопоглощения, удельная теплоемкость, плотность) наночастиц благородных металлов могут регулировать и степень передачи внутренней энергии.[127]



**Рис. 1.15** – Нормализованная общая интенсивность ионов бензилпиридиния, десорбированных с поверхности наночастиц различных благородных металлов (Ag-NPs, Au-NPs, Pd-NPs, Pt-NPs) в сравнении с внутренним переносом энергии при лазерном воздействии в 52.8 мДж см<sup>-2</sup>. [127]

С другой стороны, процесс количественной десорбции ионов с поверхности наночастиц металлов и полупроводников не всегда коррелирует с эффективностью ионизации в методе SALDI-MS. Так, например, термическая десорбция с поверхности мишени в ~30% и выше может происходить без ионизации аналита. Однако именно процесс формирования ионов является решающим с точки зрения эффективности биоанализа в методе SALDI-MS.[128]

Другим феноменом является неоднозначное влияние толщины слоя наночастиц благородных металлов на тип формирующегося сигнала. Для самоорганизующихся монослоев наночастиц золота при ионизации глюкозы в масс-спектре наблюдались в основном аддукты типа [Глюкоза+Na]<sup>+</sup>. [129] Изменение толщины слоев влияло исключительно на интенсивность получаемого сигнала.

В противоположность тенденции, обнаруженной при ионизации глюкозы с поверхности наночастиц золота, масс спектр, записанный для глюкозы с серебряных наноструктурированных мишеней вместо ожидаемых натриевых аддуктов содержал кластеры с ионом металла [Глюкоза + Ag]<sup>+</sup>. [122] Более того, с поверхности палладиевых наночастиц тот же биоаналит (глюкоза) визуализировался в масс спектре, записанном в положительном режиме ионизации как калиевый аддукт [Глюкоза+K]<sup>+</sup>. [119] В этой связи, можно заключить, что процесс формирования ионов в методе SALDI-MS является неоднозначным и недостаточно изученным.

Несколько исследований показали, что использование наночастиц благородных металлов позволяет снизить энергию лазера, необходимую на десорбцию и ионизацию малых молекул (300-1500 Da), что в свою очередь ведет к снижению уровней фрагментации аналитов и формированию более чистых масс-спектров. [130] Также стоит отметить взаимосвязь между площадью поверхности мишени и эффективностью ионизации. Обычно

сигнал в SALDI уменьшается с увеличением глубины нанопористых слоев и увеличивается с увеличением площади поверхности.[131]

В целом, среди металлических наночастиц именно наночастицы золота и всевозможные гибриды на их основе наиболее часто применяются в SALDI-MS. Преимуществами использования наночастиц золота являются простота их формирования, химическая стабильность и высокие коэффициенты УФ-поглощения.

Наночастицы на основе золота обычно получают восстановлением  $\text{AuCl}_4$  в цитратных растворах.[100] Полученные таким методом частицы оказались эффективными для определения аминотиолов, низкомолекулярных углеводов [132], стероидов и пептидов.[133] Ag-NPs, и Au-NPs показали схожую эффективность в SALDI-MS при обнаружении эстрогенов, аминотиолов и олефинов.[134]

Существенным недостатком использования наночастиц золота в методе SALDI является образование интерферирующих кластеров золота и необходимость использования стабилизаторов при формировании мишеней эмиттеров. Например, использование цитратного буфера ведет к появлению дополнительных интенсивных цитрат-ионов сигналов в области масс ниже  $m/z$  500. Эти и другие спектральные помехи значительно уменьшают преимущества безматричных подходов в методе SALDI-MS.

Эмиттеры ионов на основе платины более перспективны по сравнению с мишенями на основе золотых наночастиц.[122] Термическая деградация и процесс формирования кластеров в масс-спектрах, наблюдаемый для золотых наночастиц ( $\text{Au}^+$ ,  $[\text{AuF}_2]^+$ ,  $[\text{AuSi}(\text{H}_2\text{O})]^+$ ), в этом случае значительно снижен, поскольку Pt имеет высокую точку плавления (2045 K). В этой связи Pt-частицы проявляют большую устойчивость к облучению лазерными импульсами.[135] Кроме того, наночастицы платины являются черными и способны значительно более эффективно адсорбировать лазерное излучение во всей области УФ спектра.

При определении низкомолекулярных пептидов методом SALDI-MS многообещающие результаты были получены с использованием смесей из нескольких типов наночастиц, **Табл. 1.3**.

Стоит отметить, что лазерная десорбция/ионизация с поверхности металлических наночастиц-эмиттеров имеет ряд преимуществ по сравнению с десорбцией/ионизацией, проводимой с поверхности пористых материалов. Для пористых эмиттеров был доказан «эффект памяти» анализируемых соединений, что делает многократное использование таких мишеней невозможным.[98] Этот эффект минимизирован или полностью исключен при использовании эмиттеров ионов на основе наночастиц.

**Табл. 1.3** – Примеры определения малых биомолекул с использованием металлических наночастиц и наноструктур [100,130,133,136–139]

Нано-частицы $d$ (нм)	Аналиты	Предел обнаружения (fmol)	Наночастицы $d$ (нм)	Аналиты	Предел обнаружения
Cu-наночастицы (100-2000 нм)	грамицидин	1000	Au (10-14 нм)	рибоза глюкоза мальтоза	82 41 151
TiO <sub>2</sub> (4-6 нм)	глутатион ангиотензин	2200 83	Au (14 нм) + производные бензойной кислоты	каптоприл	1000
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (10 – 16 нм)	глутатион ангиотензин	8300 98	Au (12 – 16 нм)	глутатион ангиотензин	140 810
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (300 нм)	ангиотензин инсулин	100 – 1000	Au (14 нм) + цитраты (стабилизатор)	цистеин гомоцистеин	54 34
Pb (1000 нм)	ангиотензин I инсулин	100 – 1000	Ag (3 – 4 нм)	пальмитиновая кислота	50000
Ta-наночастицы (19 – 52 нм)	ангиотензин I инсулин	100 – 1000	Ag (31 – 37 нм)	эстрон эстрадиол эстриол	2230 230 2110
TiN (35 нм)	ангиотензин I инсулин	50	Au-Ag (34 – 44 нм)	неомицин гентамицин	30 15
FePtCu (20 – 100 нм)	ангиотензин I	5	Pt (31 – 43 нм)	глутатион ангиотензин I	23000 43

### **1.3.2.3 Механизм лазерной десорбции/ионизации с использованием металлических наночастиц**

Тип эмиттера в значительной степени определяет профиль ионов в масс-спектрах биоаналитов. Роль эмиттера заключается в стимулировании катионизации биоаналитов, которые обычно трудно ионизировать с использованием традиционных масс-спектрометрических подходов. К таким типам аналитов относят углеводы, жирные кислоты и стероиды.[140] Главное требование при выборе инициаторов-эмиттеров ионов это отсутствие собственной ионизации при контакте с лазером.

Процесс SALDI является результатом взаимодействий импульсного лазерного излучения с поверхностью; то есть производство ионов с поверхности зависит как от длины волны лазерного источника, так и от размеров наноструктурированного материала/пленки. Процессы SALDI-MS для пористых поверхностей (например, пористого кремния, в литературе DIOS) были подробно описаны.[141] Показано, что образование и перенос протонов поверхностными силанольными группами является существенным в процессе ионизации. В общем виде процесс может быть описан следующим образом:

1) Адсорбция нейтральных молекул аналита путем образования водородных связей с поверхностными силанольными группами мишени-инициатора ионов;

2) Электронное возбуждение подложки под действием лазерного импульса генерирует пару свободный электрон/«дырка», что в свою очередь ведет к накоплению положительных зарядов вблизи поверхностного слоя и к увеличению кислотности силанольных групп оксида кремния. В результате происходит облегчение процесса переноса протона к аналиту;

3) Термически активированная диссоциация ионов аналита с поверхности.



Предполагается, что процессы десорбции/ионизации с наноструктурных металлических наночастиц, в основном связаны с физическими свойствами самой подложки-эмиттера, такими как электропроводность, способность поглощать и рассеивать энергию от облучающего лазерного источника.[107][126] Хорошо известно, что переход в размерную область наноструктур и сверх-дисперсных систем сопровождается значительными изменениями в их физико-химических свойствах и кинетики химических процессов, протекающих на таких поверхностях.[142] Когда поверхностные структуры или частицы имеют параметры, аналогичные определенным физическим или химическим параметрам (размер эмбриотической структуры новой фазы, величина длины свободного пробега) они начинают проявлять размер-зависимое поведение.[122] Например, специфические свойства наночастиц объясняются тем, что число атомов на поверхности сопоставимо с общим числом атомов, составляющих частицу. Для сферических частиц диаметром около 1 нм отношение поверхности к внутренним атомам составляет  $\sim 1$ . При увеличении диаметров до десятков нанометров (в некоторых случаях до нескольких мкм) влияние соотношения размеров на свойства вещества мишени все еще остается достаточно сильным, хотя доля поверхностных атомов уменьшается.

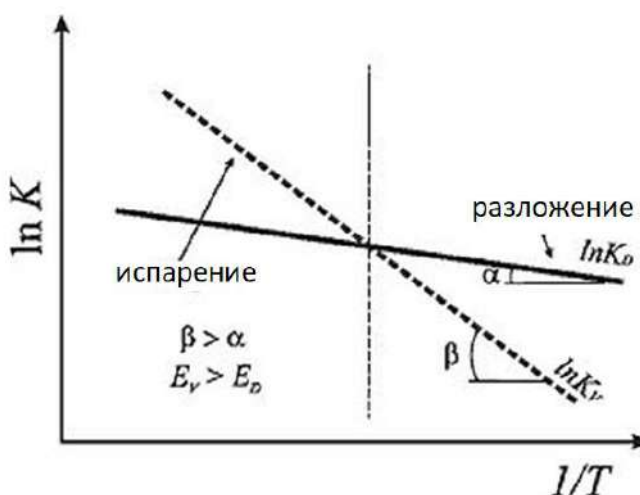
Зависимость теплопроводности материала от размерных факторов была ранее показана Hillenkamp.[131] Тепловая диффузия во время лазерного импульса приводит к однородному нагреву всего объема частиц. Десорбция более плотных слоев требует более высоких затрат энергии лазера, что приводит к сильной тепловой нагрузке на аналит, адсорбированный на поверхности наночастиц. Пиковая температура, достигаемая в конце лазерного импульса, определяется мощностью лазера, поглощающими свойствами наночастиц и аналита, а также диффузией тепла в процессе лазерного импульса. Следует также учитывать, что металлические структуры

способны влиять на константы скорости разложения ( $K_d$ ) и испарения ( $K_v$ ),

**Рис. 1.16.**

Во время испарения энергия активации испарения  $E_v$  выше, чем энергия активации разложения  $E_d$ . В то же время происходит параллельный процесс, показывающий дифференциальную температурную зависимость двух событий. При начале десорбции отрицательный наклон прямой линии испарения,  $\ln K_v$ , больше, чем для линии разложения,  $\ln K_d$ . Таким образом, при низких температурах (правая сторона диаграммы) разложение вещества является доминирующим процессом, но при увеличении температуры скорость испарения определяет весь процесс (левая сторона графика). Быстрое достижение высоких температур может привести к десорбции аналита без его разложения.

Очевидно, что SALDI является не только результатом тепловых взаимодействий. *Vertes* и соавторы описывают взаимодействия импульсного лазерного излучения с поверхностями наноструктур, а также роль источника ионов.[126]



**Рис. 1.16** – Зависимость скоростей испарения и разложения биоаналитов от температуры.[143]

### 1.3.3 Гибридные пленки на основе полупроводников, легированных наночастицами благородных металлов в методе SALDI-MS

Включение наноструктур в дизайн микроаналитических устройств позволяет в целом миниатюризировать их конструкцию независимо от области применения (нанобиосенсоры или масс-спектрометрия на чипе), что приводит к значительному уменьшению потребления реагентов, рабочих растворов и объема проб, требуемых для анализа.

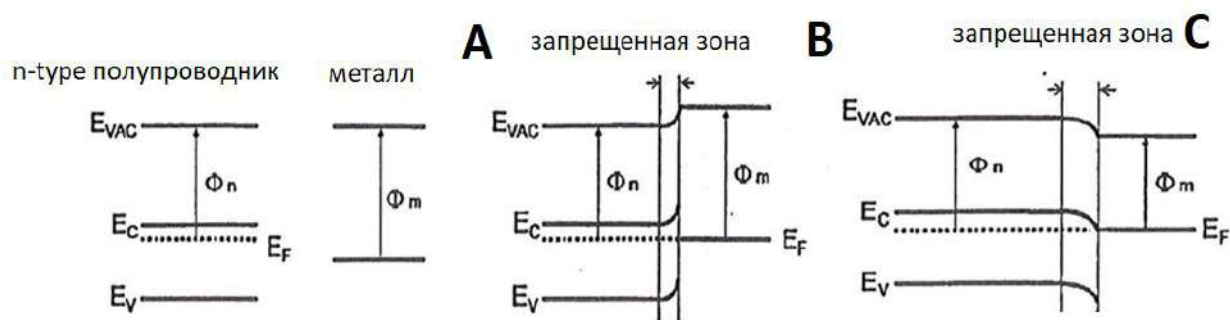
Наноматериалы в целом, и наночастицы благородных металлов в частности, являются перспективными эмиттерами для целой серии новых платформ в биоаналитической химии с быстрым считыванием сигнала (*quick read-out*) и улучшенными возможностями обнаружения аналитов, включая SALDI-MS, immunoassays, Рамановская спектроскопия (SERS), газовые датчики и биосенсоры.[69,144–148] Причина такого феномена заключается в простой функционализации наночастиц благородных металлов, их превосходных каталитических, оптических свойствах, а также биосовместимости. Более того, модификация наночастицами благородных металлов других материалов (например, полупроводников) позволяет создавать гибридные системы с принципиально новыми физическими и аналитическими свойствами.

С физической точки зрения полупроводники в своей структуре имеют запрещенную зону и электроны локализованы внутри полосы проводимости (*n*-типа) или дырок валентной полосы (*p*-типа), что и определяет тип проводимости материала. Наоборот, благородные металлы не имеют запрещенной зоны, что приводит к высокой плотности свободных электронов и, следовательно, к превосходным тепло- и электропроводностям. Тот факт, что благородные металлы и полупроводники изначально отличаются поведением транспорта заряда, плотностью свободных электронов, поглощением света, электрической и тепловой проводимостью, привел к идее объединить их в новый тип гибридных материалов, которые могут обладать

более совершенными свойствами. Комбинация различных электронных структур наночастиц благородных металлов и полупроводников предопределяет синергетическое поведение гибридных материалов на их основе, включая свойства переноса заряда.

Например, контакт между металлом, имеющим рабочую функцию  $\Phi_m$ , и полупроводником  $n$ -типа с рабочей функцией  $\Phi_n$  вызывает перенос заряда между ними, приводящий к образованию потенциального барьера (барьер Шоттки, **Рис. 1.17А,В**) или омического контакта (**Рис. 1.17С**) в зависимости от соотношения  $\Phi_m > \Phi_n$  или  $\Phi_m < \Phi_n$ . При входе в электронный контакт, уровень Ферми выстраивается таким образом, что на полупроводниковой стороне происходит изгиб полосы.[149]

Этот изгиб создает зону истощения, известную как барьер Шоттки (**Рис. 1.17А,В**). Образование такого барьера приводит к протеканию тока только в одном направлении, т.е. от металла к полупроводнику. В случае образования омического контакта (**Рис. 1.17С**) изгиб полосы на полупроводниковой стороне происходит вниз, что приводит к быстрому свободному потоку заряда, как из металла, так и из полупроводника.



**Рис. 1.17** – Энергетическая диаграмма для полупроводников  $n$ -типа (**А**) и металла (**В**), когда металл и полупроводник  $n$ -типа ( $\Phi_m > \Phi_n$ ) находятся в равновесии друг с другом; (**С**) аналогично (**В**), но для ситуации, когда ( $\Phi_m < \Phi_n$ ).[149]

В общем случае скорости переноса зарядов на легированных металлом полупроводниковых поверхностях выше по сравнению с чистыми полупроводниками, что может значительно влиять на электрохимические свойства таких гибридов. Именно этот эффект и обуславливает интерес к гибридным наноматериалам как в сенсорике, так и масс-спектрометрии.[150]

Наконец, гибриды на основе наночастиц благородных металлов и полупроводников имеют 3D-размерность, и как результат, высокую площадь удельной поверхности. Ожидается, что такие гибридные материалы и пленки будут иметь больше каталитически активных центров, чем аналогичные 1D- или 2D-структуры.[151]

#### **1.4 Гальваническое осаждение наночастиц благородных металлов для создания нанобиосенсоров и мишеней-эмиттеров ионов в масс-спектрометрии**

При осаждении наночастиц благородных металлов на полупроводниковые поверхности был успешно реализован целый спектр физико-химических (лазерная абляция, напыление, непрерывный микрофлюидальный синтез, конденсация инертного газа) и биологических методов.[152,153,162,154–161]

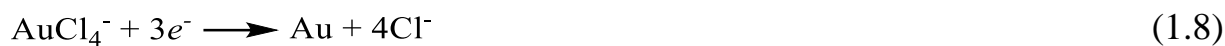
Среди вышеупомянутых способов синтеза гальваническое осаждение наночастиц благородных на поверхность полупроводников имеет ряд преимуществ, в том числе, простота и экономичность. Примечательно, что электроосаждение может выполняться в двух режимах: электрохимическом, и в некотором роде спонтанно, то есть в отсутствии внешнего тока (*способ 1*), а также при приложенном постоянном потенциале (*способ 2*). Первый способ известен в литературе как „*in situ electroless deposition*”/”*galvanic displacement*”.[163] В общем случае, наночастицы Au, Ag, Pd и Pt могут самопроизвольно образовывать металлические структуры на различных полупроводящих подложках, таких как Si, Ge, CdS, PbS, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, оксиды

Cu, Zn и Sn, посредством гальванического диспропорционирования из растворов солей металлов.[164–167] Образование наночастиц металлов происходит в отсутствие внешнего тока из-за переноса заряда, как показано для металл-полупроводниковой системы типа Pt/Ge:



В этом случае окислительно-восстановительная пара  $\text{Pt}^{2+}/\text{Pt}^0$  имеет стандартный электродный потенциал ( $E_0$ ) = 0.758 В, тогда как для пары  $\text{Ge}^0/\text{Ge}^{4+}$  потенциал ( $E_0$ ) составляет -0.124 В. Общий потенциал данной гальванической ячейки находится на уровне 0.882 В. Интересно, что эффективность скоростей осаждения частиц благородного металла пропорционально возрастает при более высоком стандартном электродном потенциале окислительно-восстановительных пар самого металла.[168–170] Аналогичная тенденция наблюдается для металлов, осажденных посредством гальванического смещения на поверхностях кремния: плотность золотых наночастиц (Au-NPs) может достигать значений  $10^{11} \text{ cm}^{-2}$ .[171]

Часто такие реакции протекают в присутствии сильных восстановителей, таких как боргидриды Li, Na, триметиламинобораны, цитраты натрия.[172,173] Однако присутствие восстановителей не является необходимым или обязательным, если реакция гальванического диспропорционирования происходит в присутствии HF. В этом случае предотвращается образование оксидного слоя на поверхности полупроводника, что ведет к реакции диспропорционирования, приводящей к восстановлению ионов благородных металлов до соответствующих наночастиц, как показано ниже для полупроводниковой системы Au/Si:



Скорость осаждения наночастиц благородных металлов можно контролировать с помощью таких параметров как тип полупроводника, состав электролита, концентрация солей, присутствия комплексообразующих и/или внешних восстановителей, иных отдельных химических веществ, рН, температуры, а также времени контакта. Таким образом, поверхностные свойства и функциональность гибридных наноматериалов могут быть адаптированы в соответствии с типом аналитической задачи.

Аналитические микросистемы, полученные таким способом, оказались весьма эффективными при обнаружении и определении соединений малой массы (некоторых метаболитов, лекарственных препаратов), а также продемонстрировали стабильную активность в течение длительного периода времени без снижения в чувствительности.[143,174,175]

Несмотря на вышеуказанные преимущества, методика нанесения гальванического покрытия/пленки реакцией электролитического диспропорционирования (*способ 1*) имеет некоторые ограничения, включая присутствие примесей из-за использования HF или восстановителей, а также слабую связь между слоем наночастиц благородного металла с поверхностью полупроводника. Кроме того, сообщается о значительной абляции при лазерном облучении таких поверхностей в биоаналитическом скрининге с использованием SALDI-MS. Зачастую гальваническое осаждение в отсутствие тока не гарантирует воспроизводимость морфологии поверхности и химии таких гибридов, что приводит к значительному снижению аналитических преимуществ тест-систем на их основе, включая биосенсоры и мишени-эмиттеры для SALDI-MS. Например, самые незначительные изменения в морфологии или поверхностной химии гибридов могут резко повлиять на тип получаемого сигнала ( $H^+$ , кластеры  $Me^{n+}$ , аддукты  $Na^+$  и  $K^+$  и др.), отношение сигнал/шум, а также на пути фрагментации биоаналита.[176–179][119]

Регулируемое гальваническое осаждение наночастиц благородных металлов (*способ 2*) часто конкурирует с методом электрохимического осаждения (*способ 1*). Этот способ требует наличия электролита, держателя образца, потенциостата, электрода сравнения и позволяет получать наночастицы благородных металлов, проявляющих самоорганизующиеся способности и регулируемые свойства (морфологию, размерность, функциональность, степень гидрофобности/гидрофильности) за счет изменения основных электрохимических параметров системы (времени осаждения, силы тока, pH, состава электролита).[180]

Гальванический способ не требует использования стабилизаторов, позволяет получать наночастицы с предсказуемым размером и плотностью распределения, а также является инструментально контролируемым процессом. Гибридные металл-полупроводниковые системы, полученные этим способом, просты в производстве, химически и механически стабильны, их синтез практически не сопровождается образованием отходов. [81,165, 168,170]

## **1.5 Заключение к Главе 1**

Представленный обзор литературы показывает, что современные сенсорные микроаналитические системы на основе наночастиц благородных металлов имеют множество преимуществ с точки зрения обнаружения и количественного определения малых биомолекул. Однако большинство этих систем (SALDI-MS, биосенсоры и др.) имеют ряд схожих проблем, связанных с низкой воспроизводимостью результатов анализа, химической неравномерностью и механической нестабильностью формирующейся функциональной пленки, а также неоднозначностью результатов при работе в многокомпонентных пробах. Такое поведение систем зачастую связано с неоптимальными способами формирования ОНГ пленок и их непредсказуемо



изменяющимися свойствами при введении новых биоорганических компонентов (полимеры, биорецепторы), а также незнанием основных параметров, влияющих на получаемый аналитический сигнал.

Общая идея, лежащая в основе данной работы, заключается в разработке и использовании в биоанализе самоорганизующихся гальванических ОНГ пленок на основе наночастиц благородных металлов с их последующим применением в электрохимических нанобиосенсорах, модульном и гетерогенном биокатализе, экспресс-системах типа MALDI-MS и SALDI-MS. Процесс управляемой самосборки функциональных пленок позволит «настроить» дизайн микроаналитических систем на их основе под требования конкретной аналитической задачи и упростить процедуры тест-анализа физиологически значимых биоаналитов в реальных пробах.

Установление взаимосвязи между природой органических компонентов (полимер, фермент, малые органические молекулы), неорганического составляющего (прекурсоры ионов благородных металлов) и дизайном формирующихся наноструктурированных ОНГ пленок, их физическими, химическими и аналитическими свойствами также является целью данной диссертационной работы.

## **ГЛАВА 2. МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ОНГ ПЛЕНОК**

В этой главе описаны способы синтеза ОНГ пленок для сенсорного и масс-спектрометрического обнаружения и определения низкомолекулярных биоаналитов. Обосновано использование новой одностадийной методики синтеза пленок из растворов электролитов сложного состава, содержащих все компоненты функционального слоя в сравнении с известными методами. Подробно рассмотрены методологические подходы, используемые для установления морфологии, дизайна, состава и характеристики свойств получаемых функциональных пленочных покрытий. Кроме того, разработаны и систематизированы сразу несколько аналитических протоколов, которые могут быть использованы для верификации аналитических сигналов, получаемых с поверхности микроаналитических устройств на основе новых ОНГ пленок при определении низкомолекулярных биоаналитов.

Предложенные аналитические решения позволяют отслеживать и оптимизировать параметры синтеза ОНГ пленок, влияющие на дизайн, архитектуру и выходные сигналы микроаналитических устройств на их основе (биосенсоры, мишени-эмиттеры ионов для масс-спектрометрии, пьезосенсоры).

### **2.1 Обоснование целесообразности одностадийного синтеза функциональных ОНГ пленок в биосенсорике**

Целью данного этапа исследования была разработка альтернативного решения способу послойной сборки (LbL) ферментативных биосенсоров. Новый способ получения ОНГ функциональных пленок позволил бы решить целую серию проблем, связанных с использованием LbL-технологии. Например, одностадийное производство ОНГ пленок путем смешения основных активных реагентов в растворе с последующим образованием промежуточных биокластеров и их электрохимическим нанесением на электрод, значительно упростило бы процесс изготовления биосенсоров.

Кроме того, такой подход позволил бы преодолеть проблемы, связанные с широкой вариабельностью биосенсоров от партии к партии при использовании методологии послойной сборки.

Предполагается, что совместное соосаждение ферментов группы оксидаз и ионогенных или проводящих полимеров из растворов сложных электролитов с электрокаталитическими наночастицами благородных металлов позволит предотвратить утечку биоорганического составляющего. Использование полимерного компонента позволит сформировать мембранно-подобную адсорбционную или капсульную структуру гибрида, что является необходимым условием для устранения анионных помех на отклик биосенсоров при измерениях, проводимых в реальных образцах, а также позволит защитить водорастворимый фермент от интенсивного вымывания. Сформированные функциональные гибридные покрытия не будут иметь сэндвич-подобной структуры. Такой подход позволит разработать новую платформу в сенсорике для производства гибридных наночастиц металлов, допированных полимерами, ферментами или кофакторами для специфического обнаружения малых биоаналитов в биологических, пищевых и экологических образцах.

Ожидается, что каталитические наночастицы благородных металлов, допированные проводящими полимерами, помогут увеличивать скорость переноса заряда внутри Red/Ox центра оксидаз. В свою очередь, это приведет к смещению рабочего потенциала электрода, близкому к таковому у самих ферментов (кофакторов), к улучшению водоудерживающих свойств гибридного полимерного слоя и увеличению скорости диффузии внутри системы.

## **2.2 Получение ОНГ нанобиосенсоров, их характеристика и принципы работы**

Для электрохимического соосаждения ОНГ пленок в работе использовали трафаретные (SPE) электроды DRP-110DGPHOX от фирмы

DropSens (Llanera, Испания). Трехэлектродные микро-датчики были отпечатаны на керамической подложке. Каждый датчик состоял из рабочего электрода, модифицированного слоем оксида графена (GO), вспомогательного углеродного электрода и серебряного электрода сравнения. Диаметр рабочего электрода составлял 0.4 см. Для повышения устойчивости потенциала серебряный электрод сравнения был преобразован в хлоридсеребряный. Эта процедура проводилась путем электрохимической обработки электрода сравнения в 1 М растворе NaCl при потенциале 0.5 В в течение 50 с.

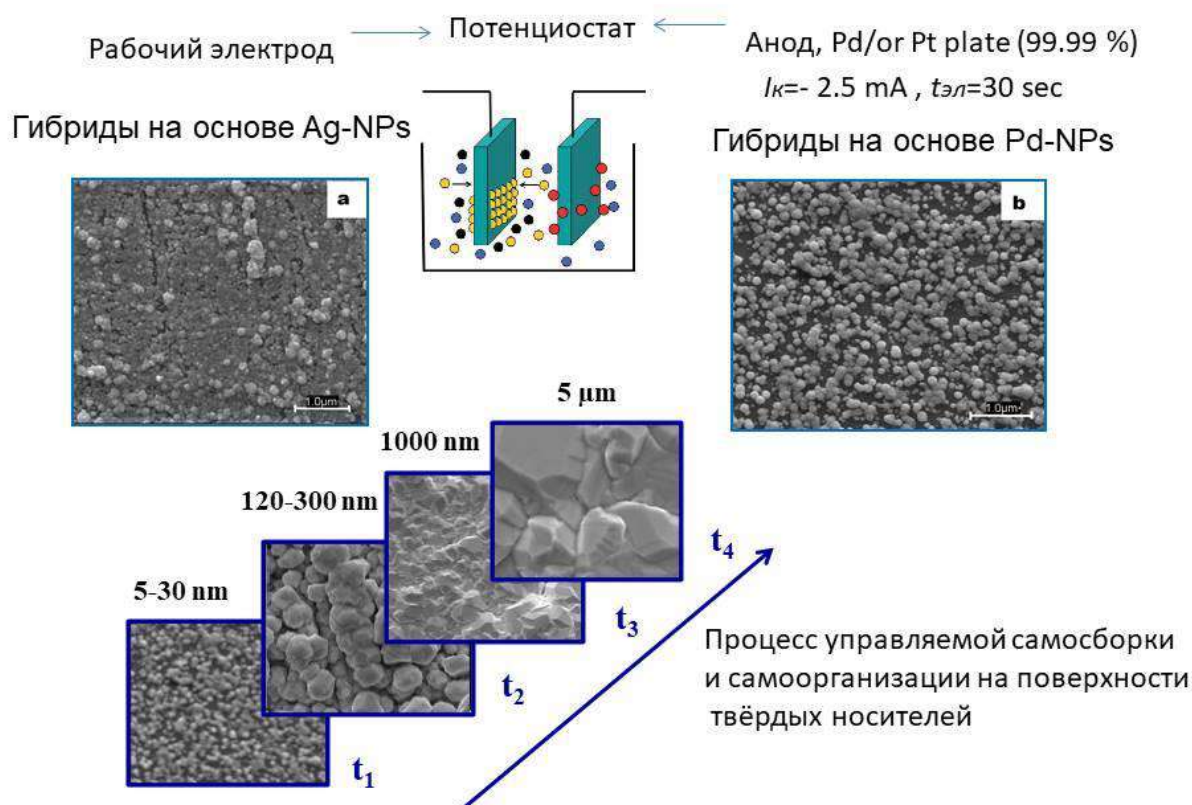
Нанобиосенсоры на основе ОНГ пленок с наночастицами благородных металлов изготавливали путем пипетирования 10 мкл мультикомпонентной смеси, содержащей прекурсоры полимера, фермента и водный раствор базового электролита с ионами благородных металлов.

Водный раствор электролита прекурсоров серебра готовили на основе AgCl, 3 г/л;  $K_4[Fe(CN)_6]$  10 г/л и  $Na_2CO_3$ , 25 г/л. Базовый раствор электролита палладия получали с использованием  $H_2PdCl_4$  3.5 г/л;  $(NH_4)_2HPO_4$  20 г/л;  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , 100 г/л; и  $NH_4Cl$ , 25 г/л с последующей коррекцией pH аммиаком до 9. Стоит отметить, что при этом в растворе палладиевого электролита, вероятно, находится смесь всех форм палладия, включая  $PdCl_4^{2-}$ ,  $Pd(NH_3)_4^{2+}$  и  $Pd^{2+}$ . [183]

В качестве прекурсоров полимеров использовали 2% водно-спиртовой раствор Нафiona, 50 мМ водный раствор пиррола, или 100 мМ раствор альгината высокой степени вязкости (LN/LT 1:1; Alginatec, Riedenheim, Германия) в 0.9 % NaCl. В ходе электрохимического синтеза биоорганонеорганических гибридов при соосаждении ферментов группы оксидаз (GOx – глюкозооксидаза, LOx – лактатоксидаза, AOx – алкогольоксидаза) с полимерами и солями благородных металлов, последовательно меняли концентрацию ферментов в пределах от 1 мг/мл до 18 мг/мл, также варьируя и объемное соотношение компонентов. Кроме того, тестировали возможность соосаждения ферментов с различной степенью активностью из растворов

разной кислотности (Табл. 2.1). Плотность тока меняли от 20  $\mu\text{A}$  до 30 мА, а время электролиза от 5 до 600 секунд (Рис. 2.1).

Катодное со-осаждение из растворов сложных электролитов:



**Рис. 2.1** – Схематическое изображение процесса управляемой самосборки ОНГ пленок (в зависимости от приложенного тока,  $I_k$ , и времени электролиза,  $t_{эл}$ ) из растворов смешанных электролитов.

Варьирование параметров системы (тип электролита, концентрация добавок, ионная сила раствора, рН, плотность тока, время электролиза) было использовано для оценки оптимальных условий синтеза гибридных нанобиосенсоров, в которых наночастицы благородных металлов, допированные полимером, влияют на скорость переноса заряда в пределах Red/Ox центра ферментов группы оксидаз. Возможный механизм осаждения из сложных растворов электролитов представлен на **Рис. 2.2**.

**Табл. 2.1** – Характеристика ферментов, используемых в работе

Фермент	Заявленная производителем активность в растворе	Диапазон pH	Катализируемая реакция на электроде	Ингибиторы
GOx/ Glucose Oxidase, Type VII, <i>Aspergillus niger</i>	от $\geq 10000$ до 250000 UN (10 – 250 KU)	4 – 7	D-glucose + O <sub>2</sub> → D-glucono-1.5-lactone + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ag <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>
LOx/ Lactate Oxidase, <i>Aerococcus Viridans</i>	50 – 100 UN	6.5 – 8	L-Lactate + O <sub>2</sub> → Pyruvate + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
AOx/ Alcohol Oxidase <i>Pichia pastoris</i>	10 – 40 UN	6.5 – 8.3	RCH <sub>2</sub> OH + O <sub>2</sub> → RCHO + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Совместное осаждение ферментов проводилось из «мягких» электролитов (базовые электролиты, содержащие ионы-прекурсоры благородных металлов готовили в фосфатном буфере) для сохранения их активности после иммобилизации.

Изготовленные нанобиосенсоры с ОНГ пленками промывали деионизированной водой, сушили в потоке N<sub>2</sub> и хранили при +4 °С.



**Рис. 2.2** – Экспериментальная установка одностадийного соосаждения гибридной функциональной пленки в капле. А: 1 – электрод/проволока; 2 – трафаретный электрод, SPE; 3 – 10 мкл раствора смешанного электролита и

схематическая иллюстрация процессов синтеза (В, С). *Примечание:*  $Me^{n+}$  – благородные ионы;  $Me^0$  – наночастицы благородных металлов (показано для Нафиона как связующего агента).

Для оценки каталитической способности сформированных в ходе электролиза гибридных наночастиц благородных металлов к разложению пероксида как промежуточному продукту ферментативной реакции, в качестве стандартных систем использовали сенсоры с иммобилизованными пероксидазными и оксидоредуктазными ферментами: Peroxidase (HRP) от horseradish (Type II); каталазу/ $H_2O_2:H_2O_2$  Oxidoreductase (CAT) из бычьей печени. Пероксидаза (HRP) и каталаза (CAT) катализируют следующие реакции:



Для сравнения откликов нанобиосенсоров, полученных по предложенной методике с известными системами, использовали метод послойного LbL синтеза биосенсоров. Процедура синтеза LbL биосенсоров была адаптирована из работ Ricci.[184] Так, 10 мкл свежеприготовленного раствора, содержащего 0.1 М феррицианида калия ( $K_3Fe(CN)_6$ ) в 10 мМ HCl, смешанного с 0.1 М раствором хлорида железа ( $FeCl_3$ ) в 10 мМ HCl (пропорция 1:1 (об./об.)) пипетировали непосредственно на поверхность рабочего электрода, модифицированного оксидом графена (SPE/GO). Для стабилизации образовавшегося медиаторного слоя берлинского синего (PB) сенсоры помещали в печь при 100 °C на 2 часа. Перед иммобилизацией глюкозооксидазы (GOx) для сшивки и правильной ориентации фермента на поверхности, 2.5 мкл свежеприготовленного раствора глутаральдегида (1% об./об. в воде) наносили на поверхность рабочего электрода, предварительно

модифицированного РВ. Каплю глутаральдегида оставляли для высыхания при комнатной температуре на 30 мин. После этого наносили отдельные слои на основе фермента (3 мкл) и полимера (3 мкл). Предварительно 3 мкл GOx, растворенного в фосфатном буфере и бычьим альбумине BSA (5 об.% в воде) помещали на рабочий электрод, модифицированный РВ и глутаровым альдегидом, с последующим нанесением 3 мкл капли прекурсора полимера (Нафиона или альгината, или пиррола) не менее, чем через 20 часов после предыдущего этапа иммобилизации слоя фермента. Полимеризация мембраны проводилась непосредственно на электроде. Такой дизайн соответствовал 4-слойной архитектуре.

Для образования устойчивой полимерной пленки альгината, прекурсор альгината (50 мМ альгинат высокой вязкости готовили в 0.9% NaCl) смешивали в пропорции 1:4 с 20 мМ с PdCl<sub>2</sub> (агент кросс-сопряжения/cross-linker). Сшивку полимера проводили при комнатной температуре до полного высыхания пленки.[185–187] Свободное (незаполимеризовавшиеся) количество реагентов удаляли последующим промыванием электрода с пленкой альгината (ALG) в дистиллированной воде.

Для сравнения аналитических откликов, полученных с 4-слойных биосенсоров, частично модифицировали последний этап формирования слоя фермента. Так, после нанесения глутарового альдегида на электрод, фермент смешивали непосредственно с прекурсорами полимеров (Нафиона, альгината или пиролла) и готовую смесь наносили на электрод в соответствии с ранее оптимизированной процедурой.[49,191] Полученный в таких условиях дизайн биосенсоров соответствовал 3-слойному уровню организации слоя. LbL биосенсоры с разным количеством слоев исследовали методом LDI-MS биосканирования, см. часть 2.3. Полученные масс-спектры сопоставляли со спектрами, снятыми с поверхности нанобиосенсоров, синтезированными по предложенной одностадийной методике.



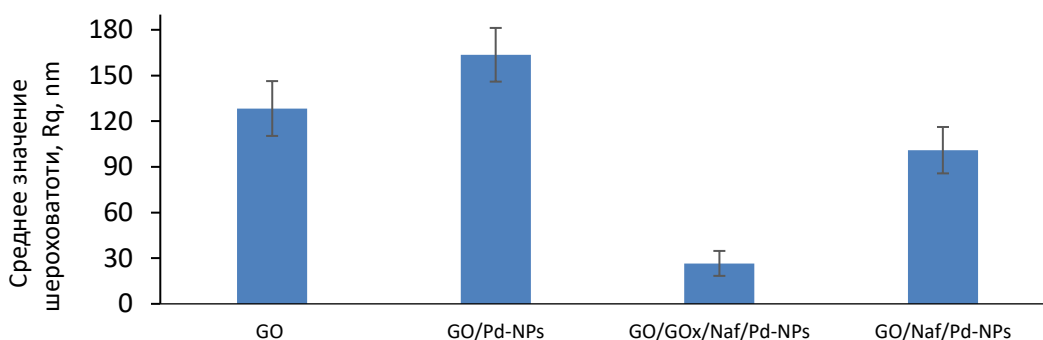
## 2.2.1 Исследование морфологии, топологии и шероховатости ОНГ пленок

Исследование морфологии гибридных пленок проводили на сканирующем электронном микроскопе (SEM) Quanta (Хиллсборо, Орегон, США) 400 FEG, оснащенном системой рентгеновского спектрального анализа EDAX (Махвах, Нью-Джерси, США) Genesis V 6.04 при напряжении 10 кэВ. Размер изображений составлял не менее 1024x884 пикселей.

Для проверки истинности инкапсуляции ферментов в гибридный биоорганический слой во время гальванического соосаждения, был проведен ряд ПЭМ исследований как индивидуальных наночастиц благородных металлов, так и их ОНГ. Для этой цели небольшие части функционального гибридного слоя удаляли путем царапания поверхности нанобиосенсоров наждачной бумагой P180. Затем на поверхность отделенной пленки помещали каплю этанола, после чего полученную суспензию пипетировали на решетку из кремния с регулярными отверстиями (Plano, Wetzlar, тип S147-4). ПЭМ-изображения получали при ускоряющем напряжении 200 кВ с использованием микроскопа JEOL (Akishima, Токио, Япония) JEM 2100 Lab6 (полюсный наконечник HR), оборудованного камерой Gatan (Плезантон, Калифорния, США) Orius SC1000 CCD.

Морфологическую характеристику чистых SPE-трафаретных электродов, модифицированных оксидом графена (SPE/GO), а также ОНГ пленок, нанесенных на SPE/GO проводили методом атомно-силовой микроскопии (AFM) в бесконтактном режиме при комнатной температуре с использованием системы Park NX 10 AFM (Park Systems, Корея). Оценку шероховатости ( $R_q$ ) проводили по сумме различных изображений профиля каждого образца. Оценка среднеквадратичной шероховатости трехмерного изображения выполнялась с использованием программного обеспечения Park XEI (Park Systems, Корея).

Интересно, что переход от SPE/GO электродов к гибриднему GO/Pd-NPs/GOx/Naf слою сопровождался значительным улучшением в однородности поверхности (оценивалась как среднеквадратичная шероховатость,  $R_q$ ), **Рис. 2.3**. Этот эффект также может привести к оптимальному распределению заряда по поверхности нанобиосенсора и, как следствие, к улучшенному аналитическому сигналу, получаемому с таких ОНГ систем.



**Рис. 2.3** – Оценка шероховатости профиля ( $R_q$ ) электродов, модифицированных оксидом графена (GO); пленками на основе Pd-NPs (GO/Pd-NPs); смеси Нафiona, фермента и Pd-NPs (GO/Pd-NPs/Naf), а также GO/Pd-NPs/GOx/Nafion. Параметры осаждения пленок:  $I_k = -2.5$  мА;  $t_{эл.} = 30$  с.

### 2.2.2 Исследование химии поверхности ОНГ пленок

Для контроля химического состава поверхности гибридных пленок после их удаления с поверхности электрода, изучали спектры их пропускания на FT-IR/ИК-Фурье спектрометре IRSpirit (Shimadzu, Tokyo). Для контроля параметров прибора и анализа данных использовалось программное обеспечение Lab Solutions IR (Shimadzu, Tokyo). При осаждении Нафiona проводили скрининг следующих характеристических полос [189]:  $3400\text{ см}^{-1}$ ,  $2900\text{ см}^{-1}$ ,  $1615\text{ см}^{-1}$ ,  $1420\text{ см}^{-1}$ ,  $1060\text{ см}^{-1}$ ,  $900\text{-}980\text{ см}^{-1}$ ; мониторинг инкапсуляции альгината проводили при  $3420\text{ см}^{-1}$ ,  $3200\text{ см}^{-1}$ ,  $1620\text{ см}^{-1}$ ,  $1594\text{ см}^{-1}$  и  $1409\text{ см}^{-1}$ . [190] Верификацию успешного соосаждения ферментов класса

оксидаз проводили по следующим характеристическим полосам: 3293  $\text{cm}^{-1}$ , 2393  $\text{cm}^{-1}$ , 3067  $\text{cm}^{-1}$ , 2931  $\text{cm}^{-1}$ , 2393  $\text{cm}^{-1}$ , 1654  $\text{cm}^{-1}$ , 1522  $\text{cm}^{-1}$ , 1458  $\text{cm}^{-1}$ , 1387  $\text{cm}^{-1}$ , 1300  $\text{cm}^{-1}$ , 1249  $\text{cm}^{-1}$ , 1077  $\text{cm}^{-1}$ , 950  $\text{cm}^{-1}$ , 831  $\text{cm}^{-1}$ . [191]

Помимо анализа соскобов с поверхности нанобиосенсоров, проводился также FT-IR анализ индивидуальных и смешанных растворов электролитов. Такой подход позволит выявить возможные качественные изменения в растворах смешанных электролитов.

Для более детальной верификации химического состава поверхности гибридного слоя, готовые нанобиосенсоры адаптировали на стальной MALDI-мишени. Анализ поверхности электродов с ОНГ пленками проводили на масс-спектрометре Esquire HCT +3D, оснащенный ионной ловушкой (IT) Bruker (Бремен, Германия) и источником формирования ионов (AP)-MALDI MassTech (Бертонсвилль, Мэриленд, США). Для исследований использовали Nd:YAG лазер (355 нм, 200 Гц, 3 нс). Масс-спектры получали в режиме полного сканирования ионов от  $m/z$  100-1000, EIC или SIM mode при следующих параметрах источника: капиллярное напряжение -2.500 В; смещение концевой пластины, -500 В; скиммер, 40.0 В; осушающий газ 6.0 л/мин; температура газа 70 °С. Обычно для измерения ионного тока число лазерных выстрелов усреднялось до 9000.

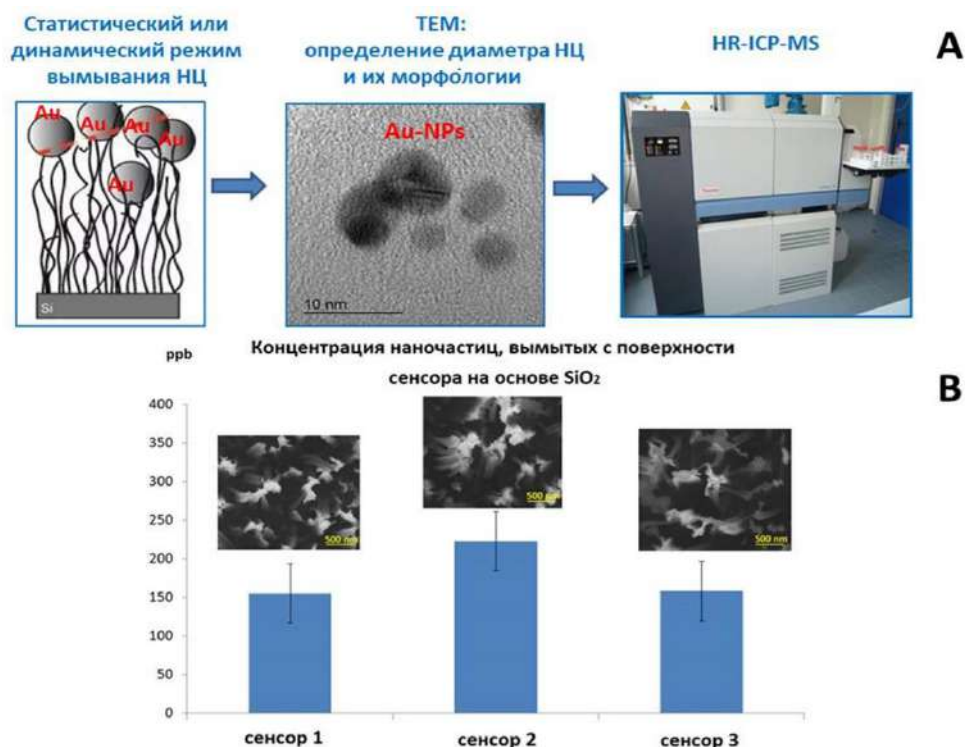
### **2.2.3 Оценка надежности закрепления неорганического компонента ОНГ пленок методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой**

Для проверки надежности закрепления пленок наночастиц благородных металлов на поверхности трафаретных электродов (неорганический компонент), отобранные после электрохимических исследований образцы (капля в объеме 150  $\mu\text{L}$ ) испытуемого раствора подвергали анализу методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, ICP-MS. Образцы отбирали после первого и второго скана в режиме ЦВА при скоростях развертки 10-20 мВ/с.

При низкой механической стабильности неорганического компонента ОНГ пленки в масс-спектрах ожидается появление пиков, соответствующих ионным (Гауссово распределение) или металлическим формам (образуются спайки) наночастиц.[192][193] В этой связи, оптимизировали протокол оценки механической стабильности неорганического компонента гибридных нанопленок, **Рис. 2.4**. Такой способ неразрушающего контроля позволяет оптимизировать условия синтеза ОНГ пленок и изучить влияние различных экспериментальных факторов на стабильность гибридных наноструктур.

Анализ растворов аналитов, отобранных после электрохимических экспериментов, проводили на приборе ELEMENT XR (Thermo Fisher Scientific, Бремен, Германия), оснащенный автосэмплером SC-E2 DX (Elemental Scientific, Омаха, США). Для анализа 100 мкл раствора глюкозы, собранного после контакта с LbL биосенсорами и одностадийными нанобиосенсорами, разбавляли в 100 мл 2% HCl и измеряли общее содержание изотопа Fe<sub>56</sub> (в случае LbL дизайна на основе медиатора PB) и изотопа Pd<sub>105</sub> (в случае одностадийного дизайна ОНГ на основе наночастиц палладия) со следующими параметрами источника: расход охлаждающего газа, 16.00 л/мин; отклонение Фарадея, -218 В; мощность плазмы 1250 Вт; скорость перистальтического насоса 10 об/мин; горелка X-Pos., 2.1 мм; Y-Pos., 0.9 мм; Z-Pos., -4.0 мм. Напряжение детектора было установлено на уровне 1700 В. Прибор настраивали на режимы высокого и среднего разрешения с использованием 1 ppb стандартного раствора полиэлементов (ELEMENT, Thermo Fisher Scientific, Бремен, Германия).[194][195]

Перед проведением анализа все калибровочные растворы и холостые образцы были дополнены 2% HCl. Измерения из одной и той же партии образцов были выполнены, по крайней мере, в трех экземплярах, и окончательные результаты были выражены как средние значения с относительным стандартным отклонением.



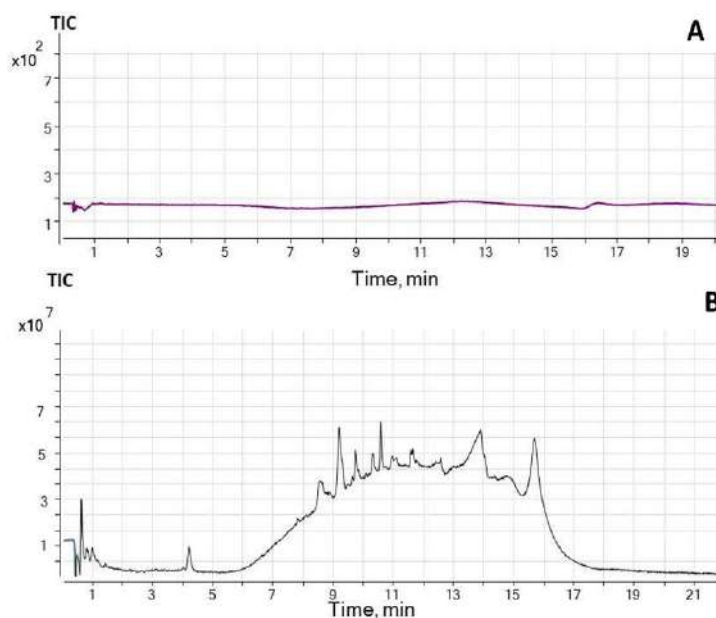
**Рис. 2.4** – Схема контроля механической стабильности неорганического компонента ОНГ пленки (А) и пример валидации сенсоров с Au-NPs (Au<sub>197</sub> как пример) из нескольких партий (В).

#### 2.2.4 Определение стабильности биоорганического компонента ОНГ пленок

Для оценки долговременной стабильности нанобиосенсоров без вымывания ферментов и полимеров (биоорганических компонентов), были проведены следующие масс-спектрометрические исследования (ионизация в электроспрее, ESI-MS): условия хроматографирования – колонка ZORBAX Eclipse Plus C 18 (размер 2.1×50 mm, размер частиц 1.8 μm), температура колонки 30 °C; мобильная фаза (А) – 0.3% муравьиная кислота, мобильная фаза (В) – ацетонитрил; градиент: 90% А – 2 мин, затем увеличено до 10% в 9 мин. Скорость потока – 0.3 мл/мин; объем инжестируемой пробы – 5 мкл. Исследования проводились на квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре Q-TOF LC/MS 6545 (Agilent Technologies, Калифорния, США),

оборудованном источником электро-спрея ESI Jet Stream Technology по ранее оптимизированному протоколу.[49] Сканы регистрировали в режиме отрицательных ионов при  $m/z$  100-3000, капиллярном напряжении 4500 В, напряжение фрагментатора 70 эВ; температура сухого газа 350 °С; расход газа 9 л/мин. Анализ данных проводился с помощью программного продукта MassHunter Software Tool.

В ходе исследований было установлено, что нанобиосенсоры на основе ОНГ пленок, синтезированные согласно предложенной одностадийной методике, характеризуются высокой механической стабильностью биоорганического компонента. Анализ капли дистиллированной воды, помещенной на поверхность таких нанобиосенсоров, не выявил значимого вымывания используемых ферментов (GOx) и полимеров (Нафийон), **Рис. 2.5А.** Однако анализ капли, отобранной с поверхности биосенсора, синтезированного методом LbL с использованием тех же исходных компонентов, выявил интенсивное вымывание биоорганического слоя, **Рис. 2.5В.**

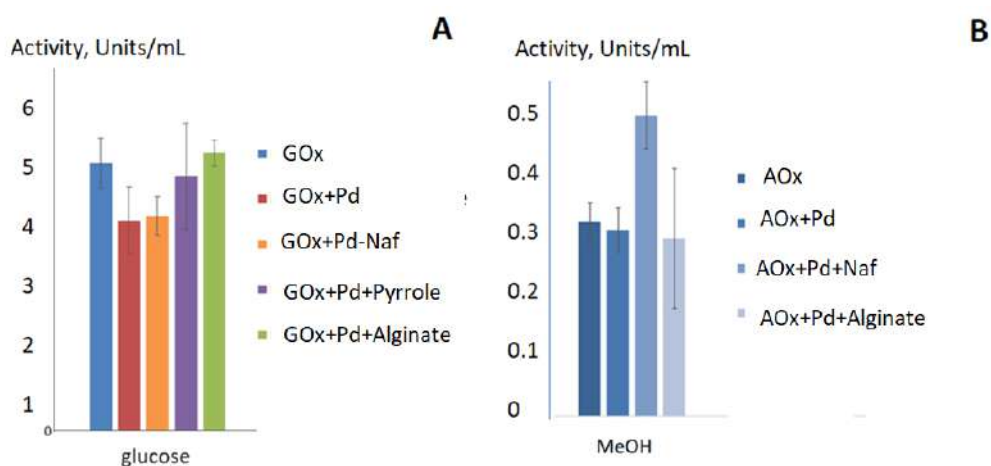


**Рис. 2.5** – Результаты анализа капли воды, помещенной на 30 мин на поверхность нанобиосенсора, синтезированного по новой одностадийной методике (A) и LbL биосенсора (B) на основе пленки Pd-NPs/GOx/Nafion.

## 2.2.5 Контроль активности ферментов до и после иммобилизации в ОНГ пленки

Для проверки активности ферментов группы оксидаз в исходном растворе до и после их электрохимического соосаждения, использовался выдвижной игольчатый оптоволоконный минисенсор кислорода OXR430 (Pyro Science GmbH, Аахен, Германия), подключенный к оптоволоконному измерителю FireStingO2 (Pyro Science GmbH, Аахен, Германия). Анализ данных проводился с помощью программного продукта Pyro Oxygen Logger.

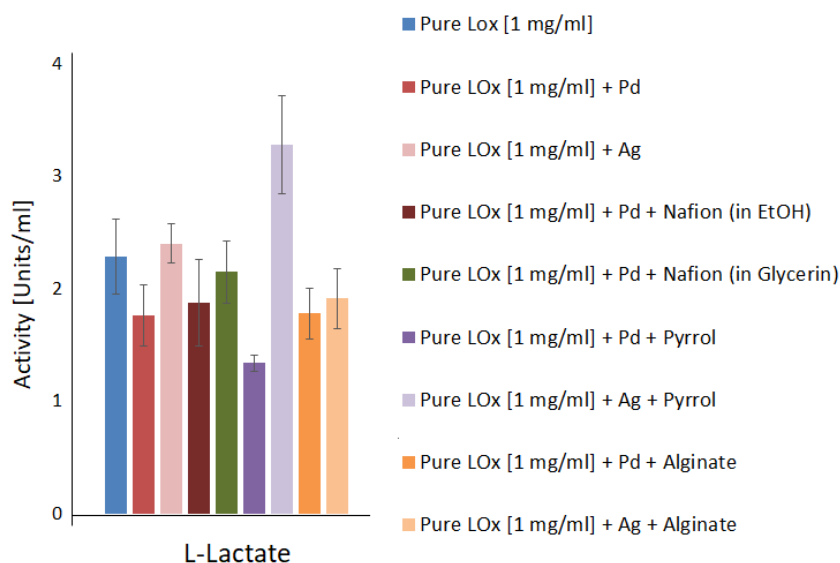
Для исследования влияния добавок неорганических компонентов, синтетических и природных полимеров на активность ферментов, измеряли потребление кислорода ферментов группы оксидаз при добавлении каждого нового компонента. Интересно, что никаких существенных изменений в активности ферментов при этом не наблюдалось, **Рис. 2.7**



**Рис. 2.6** – Отклик оптического кислородного минисенсора, выраженный в виде числа молей растворенного кислорода (мкмоль/л), присутствующего в 1 мг/мл растворе GOx (A) и AOx (B) при добавлении Pd-базового электролита, прекурсоров природных и синтетических полимеров.

Активность исходного раствора фермента (чистый GOx или AOx) и их смесей (pH = 6.98) сравнивали в присутствии 100 мМ растворов глюкозы (A) и 100 мМ растворов метанола (MeOH), приготовленных в фосфатном буфере.

Аналогичные закономерности были получены для мультикомпонентных растворов на основе Ag-базового электролита, **Рис. 2.7**.



**Рис. 2.7** – Отклик оптического кислородного минисенсора (мкмоль/л), измеренный для чистой (pure) лактозы оксидазы (LOx) по реакции с лактатом (100 мМ) и после добавления электролитов, содержащих ионы-прекурсоры Ag, природных и синтетических полимеров.

Другими словами, исследования с использованием кислородного минисенсора не подтвердили возможных конформационных изменений в первозданной/исходной структуре ферментов при их смешении с компонентами электролитов.[79] В некоторых случаях (Alginate при смешении с Pd-электролитом и GOx, Nafion – при смешении с Pd-электролитом и АОx, pyrrole – при смешении с Ag-электролитом и LOx) наблюдалось даже повышение активности фермента по сравнению с его немодифицированной формой, **Рис. 2.6, 2.7**.

Этот факт можно объяснить тем, что соли, содержащиеся в растворе электролита, могут действовать как защитный барьер, предотвращая потенциальный прямой контакт между молекулами фермента и органическими растворителями (раствор Нафiona – водно-спиртовой раствор).[196] Кроме того, в водно-органических белковых растворах ионы



переходных металлов способны образовывать комплексы с молекулами фермента, что также может способствовать сохранению их ферментной активности.[197] Однако для более глубокого понимания процессов, происходящих на атомно-молекулярном уровне в растворах смешанных электролитов, необходимы дальнейшие наноаналитические исследования, а также моделирование процессов, происходящих в таких системах.

Анализ активности ферментов после их иммобилизации на поверхности электродов проводили по ранее оптимизированному протоколу.[50]

### **2.2.6 Моделирование процессов, происходящих в растворах смешанных электролитов**

В двухкомпонентных растворах, содержащих прекурсоры полимера и ионы благородных металлов возможны каскадные электростатические взаимодействия, приводящие к формированию адсорбционного полимер-неорганического слоя на поверхности электродов при наложении поляризации.

Введение третьего биологического компонента (макромолекулы с массой ~40-180 kDa) приведет к формированию супрамолекулярных систем, образованию гибридных биокластеров в растворе смешанного электролита с их последующим соосаждением на поверхности рабочего электрода. При этом формирование простого адсорбционного слоя на поверхности трафаретных электродов на основе гибридов с макромолекулами в дизайне является неоднозначным.

Для изучения механистических аспектов формирования гибридных биокластеров и их закрепления на поверхности трафаретных электродов, проводилась оптимизация сформированных в растворе структур с использованием теории функционала плотности на основе корреляционного функционала Lee-Yang-Parr b3lyp. Учитывая влияние окружающей среды на

результаты моделирования, была использована сольватационная модель поляризуемого континуума (PCM).[198]

Все квантово-химические расчеты были выполнены с использованием программного продукта Gaussian 09.23. Энергия взаимодействия между фрагментами 1 и 2 комплекса 1 + 2 рассчитывалась по следующей формуле:

$$E_{\text{int}} = E_1 + E_2 - E_{12}, \quad (2.3)$$

где  $E_{1,2}$  – энергии изолированных фрагментов 1 и 2,  $E_{12}$  – энергия комплекса, состоящего из фрагментов 1 и 2.

Для проверки взаимодействий, происходящих в растворе электролита (расчеты проводили на примере палладиевого электролита) и смесях GOx с Нафионом, были рассчитаны FT-IR спектры нескольких репрезентативных фрагментов Naf, Pd/Naf и Pd/GOx/Naf с сульфо-группой Нафиона в различных средах. Предпочтительные структуры были выбраны согласно безэталонному структурно-групповому анализу супрамолекулярных систем.[199] Для этого была проанализирована область симметричных валентных колебаний  $\text{SO}_{3\text{sym}}^-$  группы. Эта область не перекрывалась с пиками других полос в спектрах тестируемых растворов.

Влияние фактора разбавления в системе учитывалось изменением диэлектрической проницаемости внешней среды ( $\epsilon$ ).[200] В зависимости от содержания воды, этанола и пропанола в системе использовались следующие значения диэлектрической проницаемости: для водно-спиртового раствора Naf,  $\epsilon = 30$ ; для системы Naf/Pd,  $\epsilon = 33$ ; для системы GOx/Naf/Pd,  $\epsilon = 55$ .

В работе рассчитывались волновые числа  $\nu_{\text{calc}}(\text{SO}_{3\text{sym}}^-)$  всех смоделированных структур. Масштабный коэффициент рассчитывался следующим образом:

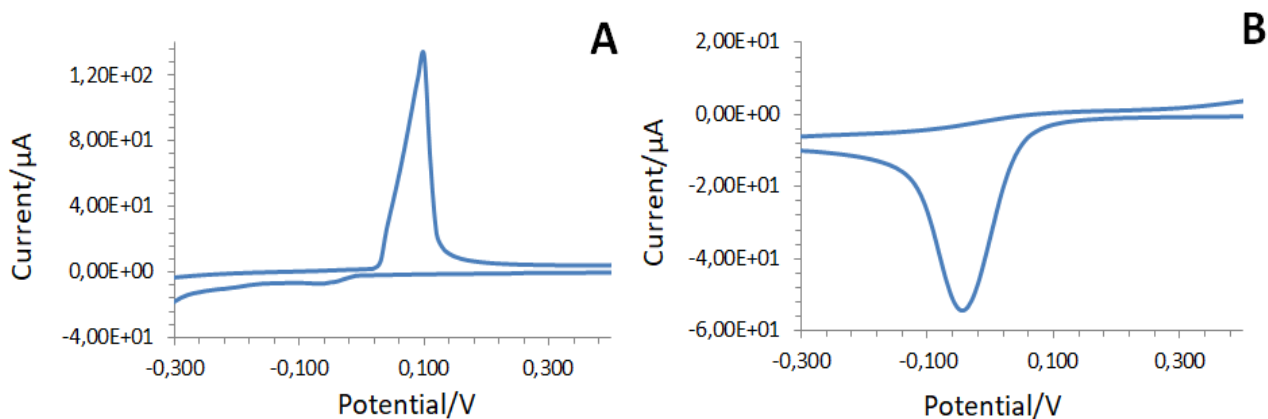
$$\nu_{\text{exp}}(\text{SO}_{3\text{sym}}^-)/\nu_{\text{calc}}(\text{SO}_{3\text{sym}}^-) \quad (2.4)$$

где  $v_{\text{exp}}(\text{SO}_3^-_{\text{sym}})$  – экспериментальное значение  $v(\text{SO}_3^-_{\text{sym}})$  Нафиона в воде ( $1060 \text{ cm}^{-1}$ ),  $v_{\text{calc}}(\text{SO}_3^-_{\text{sym}})$  – расчетное значение  $v(\text{SO}_3^-_{\text{sym}})$  для репрезентативного фрагмента Нафиона, где сульффо-группа гидратирована молекулами воды.

### 2.2.7 Характеристика нанобиосенсоров с ОНГ пленками методами циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии

Для оценки электроактивности нанобиосенсоров с ОНГ пленками, синтезированными по одностадийной и LbL методике, их отклики регистрировали в фосфатном буфере,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а также в растворах исследуемых биоаналитов (D-глюкоза, L-лактат, метанол (MeOH), этанол (EtOH), бутанол (BuOH), кверцетин и пр.) методом циклической вольтамперометрии (ЦВА). Измерения проводили в капельном режиме (объем капли 150 мкм) на биологическом потенциостате PalmSens4 (PalmSens, Нидерланды), изменяя скорость сканирования от 10 до 300 мВ/с.

Как видно из ЦВА-кривых (**Рис. 2.8**), записанных при скорости сканирования 20 мВ/с, наночастицы серебра и палладия в структуре нанобиосенсоров с ОНГ пленками являются электроактивными. Пики, соответствующие электроокислению серебра (**A**) и электровосстановлению кислорода (РВК) на палладии (**B**), визуализируются с хорошей интенсивностью по току.



**Рис. 2.8** – ЦВА-кривые, записанные в фосфатном буфере при pH = 6.98 с поверхности нанобиосенсоров с ОНГ пленками, полученных методом одностадийного электроосаждения: Ag-NPs/GOx/Naf (**A**) и Pd-NPs/AOx/Naf (**B**); скорость развертки 20 мВ/с.

Следует отметить, что положение максимума катодного пика электродов с гибридными пленками сильно зависит от состава исходного смешенного электролита даже при идентичных условиях получения (**Табл. 2.3**). Этот факт, вероятно, скажется на электроаналитических свойствах нанобиосенсоров.

Калибровочные зависимости с поверхности нанобиосенсоров снимали в режиме хроноамперометрии (АМ) с наложением стабильного потенциала, предварительно определенным по методу ЦВА. Все измерения для одного и того же нанобиосенсора проводили, по меньшей мере, трехкратно.

**Табл. 2.3** – Изменение потенциала катодного пика РВК (показано на примере GOx/Naf/Pd-NPs) нанобиосенсоров с ОНГ пленками в зависимости от состава раствора электролита

Качественный состав нанобиосенсора	Потенциал катодного пика РВК на ЦВА, фосфатный буфер, pH = 6.85*, 20 мВ/с	Ток, $\mu\text{A}$ $\pm$ SD
Pd-NPs	-0.01	-42 $\pm$ 2
Pd-NPs + Нафион (соосаждение)	-0.06	-23 $\pm$ 1.5
Pd-NPs + Альгинат (соосаждение)	-0.11	-8 $\pm$ 1
Pd-NPs + Пиррол (соосаждение импульсном режиме поляризации)	-0.20	-18 $\pm$ 3
Pd-NPs + GOx + Нафион (соосаждение)	-0.12	-15 $\pm$ 1
Pd-NPs + AOx + Нафион (соосаждение)	-0.06	-16 $\pm$ 2
Pd-NPs + LOx + Нафион (соосаждение)	-0.18	-32 $\pm$ 4
Pd-NPs + FAD (кофактор) + Нафион	0.00	-6 $\pm$ 0.2

Pd-NPs + NAD (кофактор), (соосаждение)	-0.22	-33±1.5
LbL-дизайн (4-х слойная архитектура с GOx) Первый к электроду слой - Pd-NPs	-0.01	-6.6±1.1

\* - все системы были синтезированы в идентичных условиях при  $I_k = -2.5$  мА и времени электролиза 30 с.

### 2.3 Стандартизация нанобиосенсоров с ОНГ пленками методом лазерной десорбции/ионизации

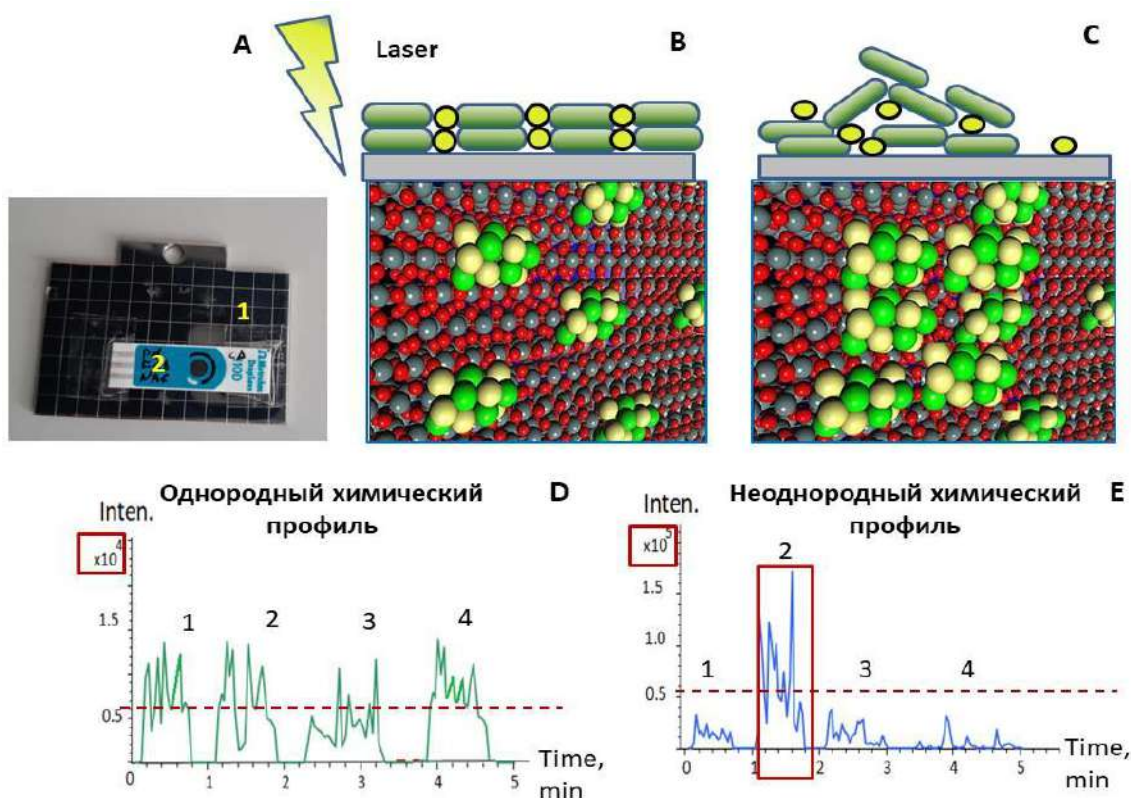
Функциональные свойства ОНГ, которые можно настраивать путем вариации природы компонентов системы и параметров синтеза, сделали этот класс наноматериалов важнейшим элементом в различных областях, в том числе в производстве микро- и наноаналитических устройств. К сожалению, массовое производство таких систем все еще невозможно вследствие низкой механической и химической стабильности функционального слоя и недостаточно высокой воспроизводимости синтеза.[1]

Контроль состава, структуры и свойств гибридных наночастиц сам по себе является специфической аналитической задачей и играет важную роль в производстве гибридных наноматериалов для массового использования и промышленного производства. Однако наноэффекты плохо поддаются контролю, особенно – с точки зрения химии поверхности. Ранее уже были показаны значительные ограничения большинства современных методов анализа для контроля качества и химии поверхности ОНГ наноструктур.[1,201] В тоже время, для проверки синтеза гибридных наноматериалов возможно использовать широкий спектр аналитических методов на основе микроскопии (СЭМ, ПЭМ, АФМ и т.д.) и фотоэлектронной спектроскопии (XPS, UPS, и т.д.). Однако упомянутые методы не позволяют обнаружить минимальные изменения в химии поверхности наногрибидов, что может быть критично при массовом производстве микроаналитических устройств на их основе.

В этой связи, разработка новых инструментальных наноаналитических подходов, которые могли бы позволить получить более глубокое представление о процессе изготовления, качестве и базовых характеристиках гибридных наноматериалов значительно ускорило бы прогресс в области наноаналитики, сенсорики и новом направлении аналитической химии – лаборатории на чипах.

### 2.3.1 Принципы биохимического LDI-MS сканирования

На этом этапе работы метод, ранее известный как лазерная десорбция/ионизация (LDI-MS) [93], был адаптирован и использован в качестве аналитической платформы для химической стандартизации амперометрических биосенсоров с LbL пленками (стандартная методика), а также нанобиосенсоров на основе ОНГ пленок, синтезированных по новой одностадийной методике, **Рис. 2.9А**.



**Рис. 2.9** – (А) Схема адаптации биосенсора с гибридным функциональным слоем на поверхности MALDI-мишени. (В) Схематическое изображение

платформы LDI-MS, применяемой для проверки биосенсоров с однородными (В) и неоднородными (С) химическими профилями. ТС-хроматограммы, полученные от биосенсоров с однородным (D) и неоднородным (E) профилем. Пунктирная линия (D,E) – допустимые значения пороговых значений (определяются в соответствии с требованиями конкретной задачи, а именно: диапазон линейности, предел обнаружения и тд).

Установив специфические пути ионизации электрокатализаторов (наночастицы благородных металлов), полимеров (Нафiona, Тритона, полипиррола) и ферментов (на основе определения кофакторов) с поверхности биосенсоров возможно проводить быстрое химическое профилирование их поверхности, оценку качества функциональных слоев, мониторинг от партии к партии, отслеживать изменчивость отклика в течение дня, недели или месяца.

Общая концепция оценки химической однородности гибридных пленок проиллюстрирована на **Рис. 2.9В**. Хроматограмма, полученная с химически однородного слоя во время лазерного облучения, представляет собой равномерные пики примерно одинаковой интенсивности (**Рис. 2.9D**). Напротив, достаточно разные интенсивности MS-сигналов с эффектом «спаек» (**Рис. 2.9 С,Е**) на хроматограммах соответствуют химически неоднородному профилю. Основополагающий принцип предложенного подхода аналогичен «sweet spot phenomenon»/эффект «сладких пятен», известный в методе MALDI-MS. Этот эффект обусловлен формированием неоднородных кристаллических структур, образующихся после высыхания капли.[202,203] В результате образования макро-кристаллов может быть установлена различная эффективность ионизации аналита с существенно более высоким изменением интенсивности MS-сигнала.

Предложенный подход к стандартизации сенсоров был апробирован при характеристике слоев РВ. Ранее было разработано несколько масс-спектрометрических способов обнаружения РВ в исторических пигментах и

произведениях искусства.[195,196] Однако эти способы зачастую основаны на деструктивной пробоподготовке, например, предварительной обработке слоя РВ растворами NaOH или льняным маслом [195,196], что приводит к обнаружению в масс-спектрах разновидностей ионов, которые скорее связаны с типом используемой матрицы или растворителя, а не с самим аналитом. Поэтому разработка альтернативных масс-спектрометрических способов для обнаружения и определения РВ в его исходной аналитической форме является актуальной аналитической задачей. В этой связи, адаптация мягкого «soft» метода ионизации SALDI-MS для определения РВ (или других медиаторов/электрокатализаторов на основе наночастиц металлов) в неповрежденной аналитической форме может быть значимой альтернативой.

Обычно в методе SALDI-MS, целевой аналит наносится (i) на поверхность функциональной подложки (включая пористый кремний, графит, наночастицы графена, металлические наночастицы) с его последующей лазерной десорбцией (ii), ионизацией (iii) и MS-анализом (iv). В этом случае поверхность подложки служит донором  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  ионов (режим положительной ионизации) или электронов (режим отрицательной ионизации).

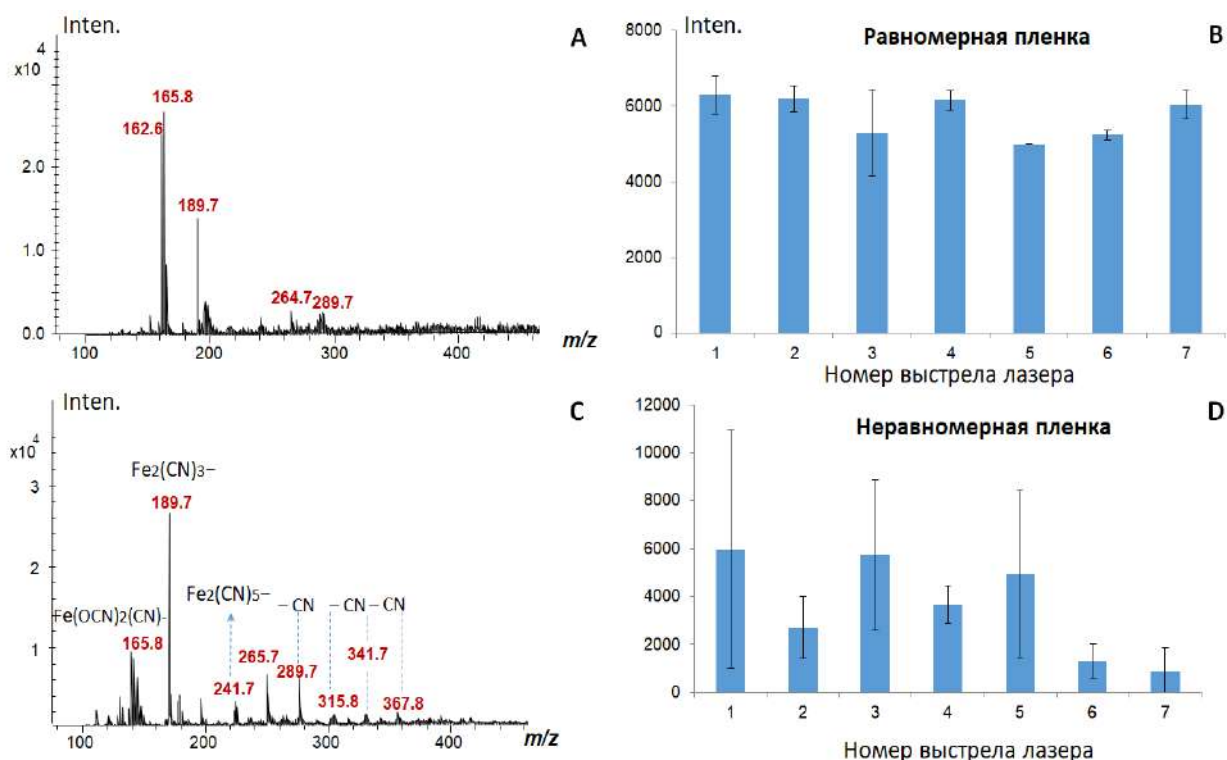
Примечательно, что оксид графена (GO), покрывающий поверхность рабочего электрода, может играть значительную роль при транспорте электронов к функциональному слою (в данном случае РВ).[206] Ранее было показано, что GO может выступать в качестве многообещающего субстрата/мишени-эмиттера в методе SALDI-MS для десорбции/ионизации целого спектра биоаналитов, в том числе жирных кислот, триацилглицеринов, флавоноидов.[207][208][209] В связи с этим, можно предположить, что, как и в случае с биомолекулами, эффективная лазерно-индуцированная десорбция и ионизация слоя медиатора РВ будет происходить и с поверхности GO.

Для достижения поставленной цели важно идентифицировать характерные типы ионов, генерируемые с поверхности GO,



модифицированного конкретным медиатором (в данном случае РВ), а также установить пути их ионизации. Наиболее стабильные сигналы для слоя РВ с поверхности GO были обнаружены при  $m/z$  165.8, 189.7 и 241.7, которые могут быть обусловлены присутствием  $\text{Fe}(\text{OCN})_2(\text{CN})^-$ ,  $\text{Fe}_2(\text{CN})_3^-$  и  $\text{Fe}(\text{CN})_5^-$ , соответственно, **Рис. 2.10**.

На основании выявленного пути ионизации слоя РВ, сформированного на SPE/GO, далее поверхность пленки сканировалась в режиме хроматографирования для проверки химической гомогенности /неоднородности. С этой целью был выявлен наиболее устойчивый пик при  $m/z$  189.7. Значение этой массы извлекали из ТИС-хроматограммы и по ней проводили количественный анализ химической однородности поверхности пленки (**Рис. 2.10**).

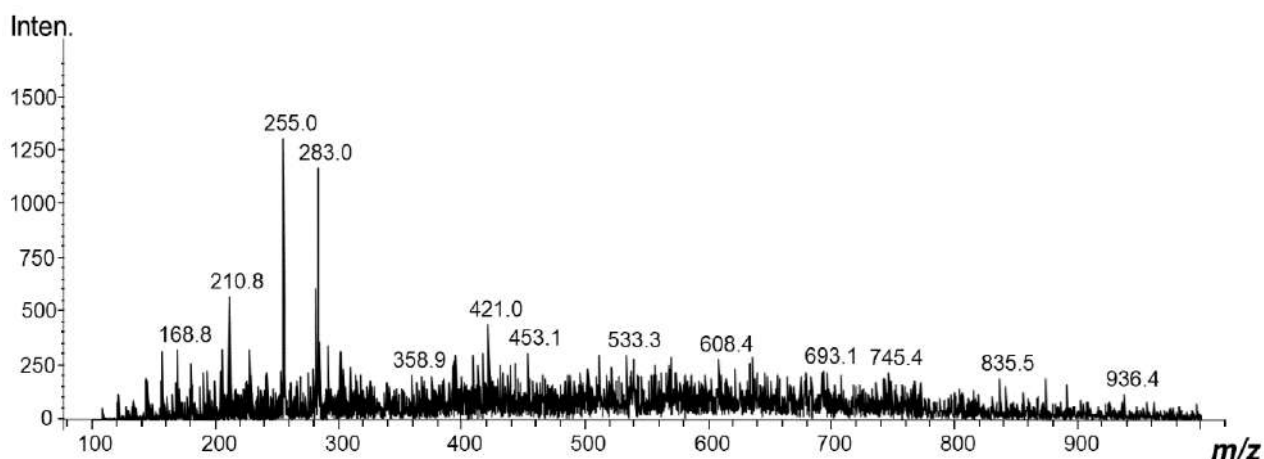


**Рис. 2.10** – LDI-масс-спектры (A,C), полученные в режиме отрицательной ионизации для однородного (A) и неоднородного (C) РВ слоя, нанесенного на

GO. (**B,D**) – зависимость интенсивности извлеченного сигнала ( $m/z$  189.7), полученного с пленки PB/GO от количества лазерных импульсов.<sup>2</sup>

Полученные данные позволяют судить о химической однородности или неоднородности неорганического компонента на основе PB пленки, синтезированной в конкретных условиях (показано для двух пленок, приготовленных в пределах одной партии по идентичным протоколам). В данном примере для двух протестированных сенсоров на основе пленок PB можно заранее ожидать разные аналитические отклики вследствие различной диффузии аналита к активному слою (в случае химически однородной пленки ожидаются более высокие и стабильные сигналы с меньшим уровнем шумов).

Метод LDI-MS, настроенный в режиме химического сканирования поверхности, использовался также для отслеживания изменений в условиях хранения биосенсоров. Было зафиксировано формирование новых ионов в масс-спектре, полученных с поверхности PB-биосенсора после его хранения на воздухе при доступе света в течение 5 дней, что указывает на полную или частичную деградацию чувствительного слоя, **Рис. 2.11**.



<sup>2</sup> *Примечание:* измерения, показанные в (**B,D**) проводились трижды, интенсивность лазера 45%.

**Рис. 2.11** – LDI-MS-спектры, полученные в режиме отрицательной ионизации с поверхности биосенсора с пленкой PB после хранения в режиме доступа света в течение 5 дней, интенсивность лазера 45%.

Таким образом, выявленный путь ионизации медиаторов с поверхности SPE/GO электродов может быть использован для мониторинга изменений в способе приготовления биосенсоров, или условий их хранения. Примечательно, что метод LDI-MS, используемый для скрининга биосенсоров, предлагает несколько преимуществ по сравнению с альтернативными методами масс-спектрометрии, например: (1) возможность анализировать поверхность биосенсора с пленкой в ее первоначальной форме, (2) полученные ионные частицы могут быть относятся исключительно к целевому слою биосенсора вместо используемой мишени (Au-пластина, бумага) или матрицы (льняное масло), (3) по своей природе анализ является неразрушающим и, следовательно, позволяет проводить дальнейшее использование биосенсора.

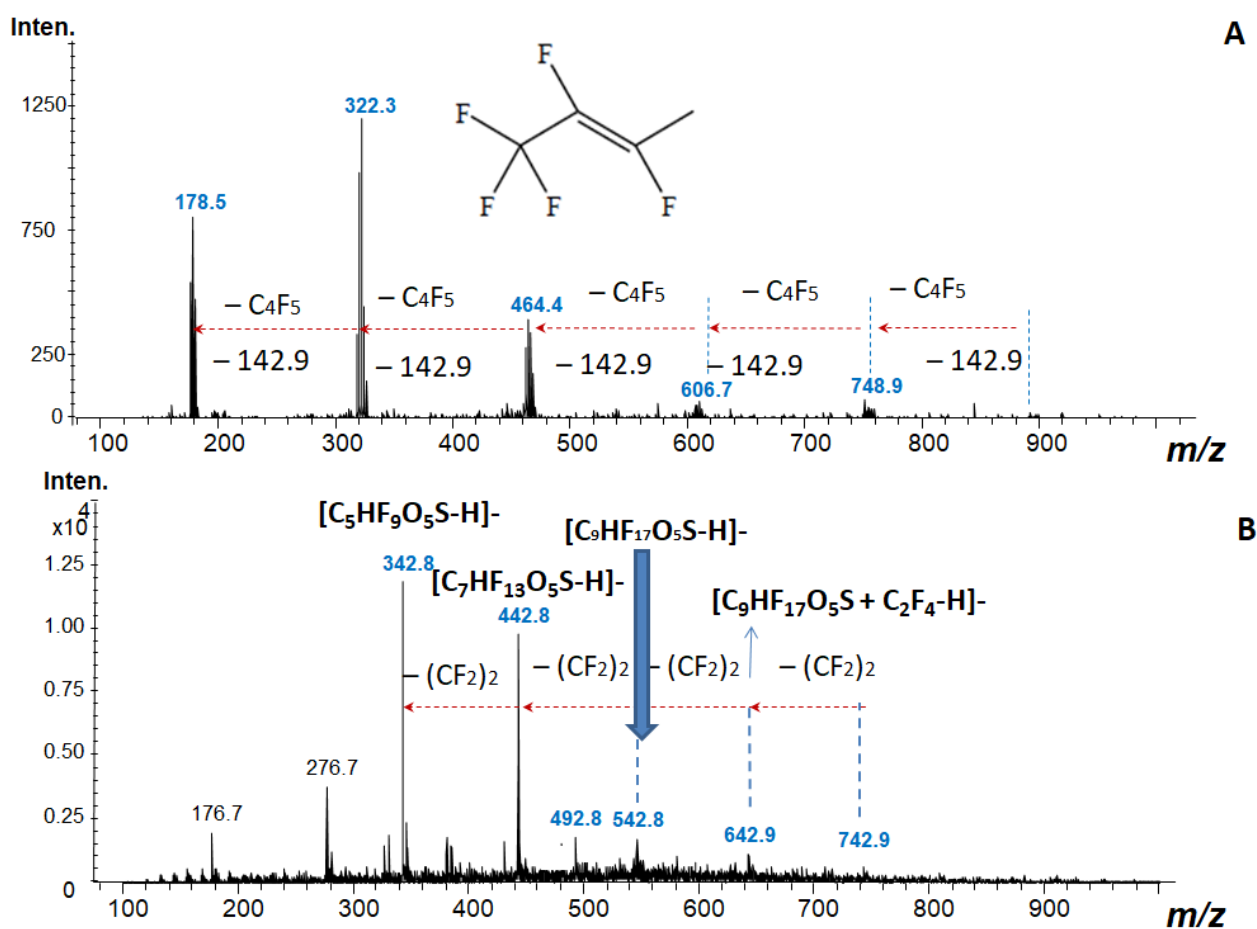
### **2.3.2 Химическое профилирование органических составляющих ОНГ пленок**

Этот же подход на основе платформы LDI-MS использовался при анализе органического составляющего (полимеров, кофакторов, малых MALDI-матриц) поверхности биосенсоров в зависимости от их архитектуры. Например, разные пути ионизации Нафтона были установлены с поверхности биосенсоров, синтезированных методом послойного LbL нанесения и нанобиосенсоров с одностадийным формированием функциональной ОНГ пленки (**Рис. 2.12**).

Для послойно изготовленных LbL биосенсоров в масс-спектрах наблюдалось четкое высвобождение низкомолекулярных воспроизводимых фрагментов  $C_4F_5^-$  (**Рис. 2.12А**). Напротив, в LDI-спектрах, полученных с

поверхности нанобиосенсоров, синтезированных по одностадийной методике, фиксировались повторяющиеся  $CF_2^-$  ионы, **Рис. 2.12В**. Такой результат можно объяснить разной толщиной пленки Нафiona. Качественное различие в спектрах позволяет проводить дифференциацию сенсоров и их стандартизацию по химическому критерию.

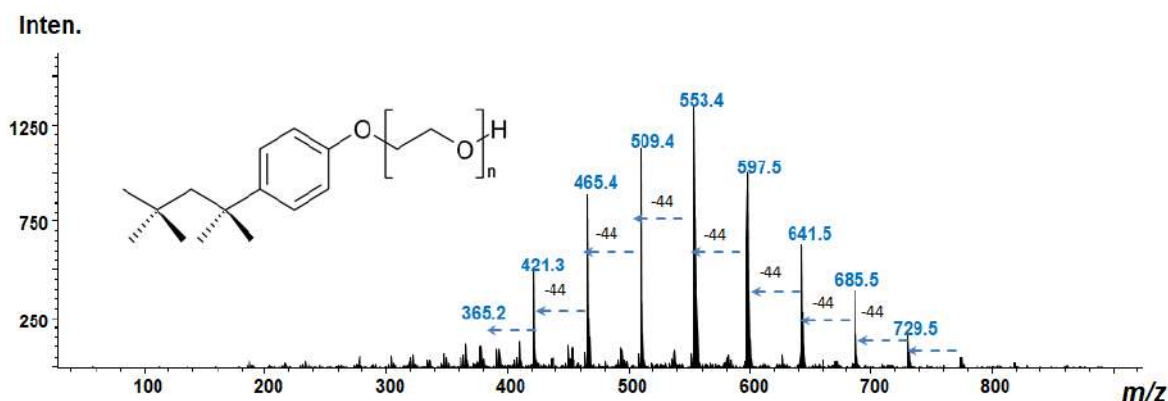
С помощью этого же подхода возможно проведение количественной оценки эффективности соосаждения Нафiona совместно с наночастицами палладия. Для этой цели была приготовлена серия калибровочных растворов Нафiona в диапазоне 200-20000 ppm с последующим соосаждением на поверхность электродов, модифицированных GO. LDI-MS анализ проводился по наиболее стабильному пику, а именно при  $m/z$  542.8. Эффективность соосаждения Нафiona совместно с наночастицами палладия составила ~78%, см. **Приложения, Табл. П2.1**.



**Рис. 2.12** – Масс-спектры, полученные в отрицательном режиме ионизации с поверхности LbL-биосенсоров (**A**) и ОНГ Pd-NPs/GOx/Нафion

нанобиосенсоров (В). Синтез нанобиосенсора был проведен по новой методике из смешанного электролита, содержащего Pd-электролит, 1 мг/мл GOx и 2% водно-спиртового раствора Нафiona (pH 7).

Универсальность предложенного подхода для характеристики органического и полимерного компонентов ОНГ пленок была продемонстрирована при стандартизации нанобиосенсоров, полученных электрохимическим способом на основе различных полимеров. Основная сложность подхода состояла в установлении принципиальных качественных (finger prints/“отпечатки пальцев“) путей ионизации и фрагментации полимеров с поверхности электродов с ОНГ пленками. Так, ионизация Тритона X-100 с поверхности ОНГ на основе пленок Ag-NPs сопровождалась повторяющимися характерными низкомолекулярными фрагментами в масс-спектре ( $-\text{[C}_2\text{H}_4\text{O]}^-$ ), **Рис. 2.13**. Фактически, Тритон X-100 представляет собой смесь этоксилированных октилфенолов. Эти соединения отличаются на 44 атомные единицы массы ( $-\text{[C}_2\text{H}_4\text{O]}^-$ ) в зависимости от их степени этоксилирования.[210]

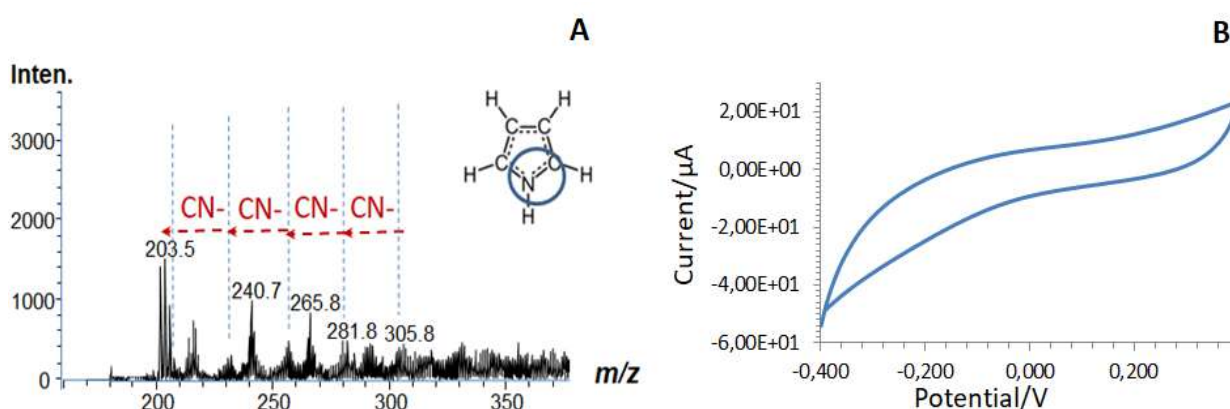


**Рис. 2.13** – Масс-спектр, полученный в положительном режиме ионизации с поверхности пленок Ag-NPs (AgCl, 3 г/л;  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 10 г/л;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 25 г/л), допированных Тритоном X-100 (500 ppm).

Другим примером является специфическая ионизация звеньев полипиррола (PPy) с поверхности Pd-NPs/GOx/PPy нанобиосенсоров,

сопровождающаяся образованием в газовой фазе повторяющимися CN-группировками, что позволяет использовать этот маршрут ионизации как маркер присутствия полипиррола в ОНГ пленке, а также судить об успешности его электрохимического соосаждения, **Рис. 2.14**.

Записанный ЦВА (**Рис. 2.14В**) также подтвердил наличие емкостных токов, соответствующих успешно проведенной процедуре электрохимической полимеризации пиррола.

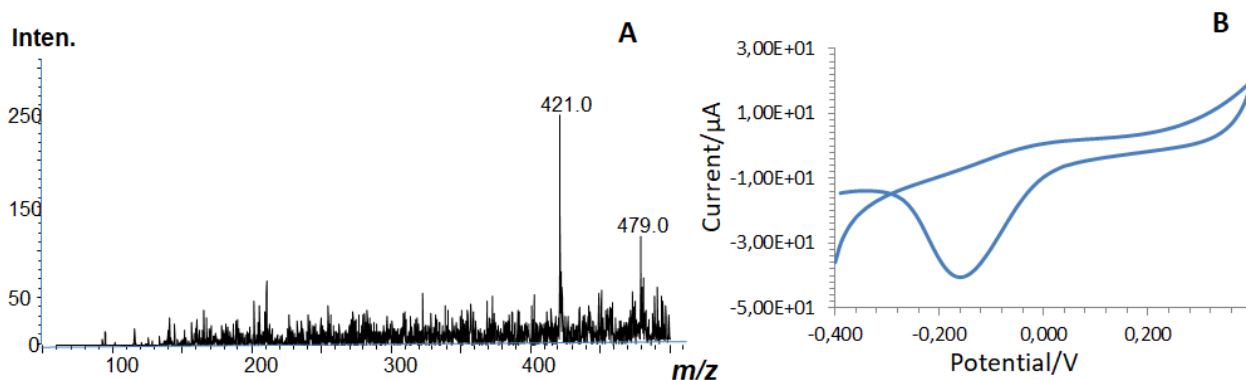


**Рис. 2.14** – Масс-спектр (А), полученный в отрицательном режиме ионизации и ЦВА (В), записанный при 50 мВ/с в фосфатном буфере с поверхности электрода, модифицированного Pd-NPs/PPy. Синтез электрода проводили из раствора смешанного электролита, содержащего Pd-электролит в качестве базового и 50 мМ водного раствора прекурсора пиррола. Режим синтеза – 1 этап осаждение Pd-NPs при -2.5 мА в течение 30 с; 2 – полимеризация пиррола +1.5 мА в течение 30 с, лазер 45% (стадии повторяют 4 раза, финальная поляризация при 0 мА/см<sup>2</sup> в течение 10 с).<sup>3</sup>

LDI-MS биосканирование также позволяет оптимизировать условия синтеза ОНГ пленок. Так, при незначительном изменении методики получения ОНГ на основе пиррола и палладиевого электролита в масс-спектре не было зафиксировано ранее присутствующих характерных ионов (**Рис.**

<sup>3</sup>Примечание: в таком дизайне Pd-NPs закрыты слоем PPy.

**2.15A**), что подтверждает отсутствие полимеризации пиррола в конкретных экспериментальных условиях. Это предположение было проверено методом циклической вольтамперометрии (**Рис. 2.15B**). Кроме пика, соответствующего электровосстановлению кислорода на палладии, не было зафиксировано ни емкостных токов, ни электрохимических волн, соответствующих слою соосажденного PPy.



**Рис. 2.15** – Масс-спектр (**A**), полученный в отрицательном режиме ионизации и ЦВА (**B**), записанный при 50 мВ/с в фосфатном буфере с поверхности Pd-NPs/PPy электродов. Синтез электрода был проведен из электролита, содержащего Pd-электролит и 50 mM водного раствора прекурсора пиррола. Режим синтеза – соосаждение Pd-NPs с GOx и пирролом при -1.5 мА в течение 30 с.<sup>4</sup>

Ожидается, что, используя LDI-MS подход в режиме биохимического сканера, можно проводить контроль соосаждения ферментов при одностадийном электрохимическом формировании нанобиосенсоров. Такой подход в целом поможет расширить понимание о влиянии химии поверхности пленок амперометрических биосенсоров на их сигнал, а также предоставит возможность модернизировать дизайн, точно настроить производительность и процедуру контроля их синтеза.

<sup>4</sup> *Примечание:* в таком дизайне присутствуют только Pd-NPs, полимеризации пиррола в заданном режиме не происходит.

## 2.4 Формирование гибридных мишеней в методе MALDI/SALDI-MS

Электролитическое осаждение наночастиц серебра при формировании мишеней-эмиттеров в методе скоростной масс-спектрометрии проводили из раствора электролита серебрения при плотностях тока,  $I_k$  (-0.09) – (-0.4) А/дм<sup>2</sup> (шаг 0.05) и времени электролиза ( $t_{эл}$ ) от 30 с до 20 мин (анод: серебряная пластина).

Пленки палладия получали из  $H_2PdCl_4$  электролита палладирования с рН 9, а также из раствора кислотного электролита на основе  $PdCl_2$  (3 г) с рН 2 (анод – палладиевая пластина) при токах от -0.09 до -0.8 А/дм<sup>2</sup> и времени электролиза  $t_{эл}$  от 30 с до 20 мин. Толщину ( $h$ ) гальванических пленок рассчитывали по уравнению:

$$h = \frac{m}{\rho \cdot A} \cdot 10^{-3} \quad (2.5)$$

где  $m$  – масса пленки (мг),  $\rho$  плотность металла (г/см<sup>3</sup>; Pd, 11.99; Ag, 10.5),  $A$  – площадь стальной мишени (6.25 см<sup>2</sup>).

Массу пленок на основе наночастиц благородных металлов или их ОНГ контролировали методом пьезокварцевого микровзвешивания (QCM). Для этой цели использовали кварцевые кристаллы (АТ-срез, диаметр 14 мм, площадь поверхности 1.5 см<sup>2</sup>) с базовой частотой 10 МГц.

Для экспериментов 10 мкл раствора электролита, содержащего основной электролит, полимер и целевой фермент (GOx, АОx, LOx), наносили на поверхность с последующим электроосаждением при включении поляризации. Непрореагировавшее количество смешанных электролитов удаляли дистиллированной водой сразу же после синтеза. Частотные сдвиги отражали вес гальванических покрытий с точностью до наногаммов. Массу ОНГ пленок оценивали по уравнению Зауэрбрея.[211] Для работы использовалось программное обеспечение «NanoSens Explorer» и



измерительная система SAGO, предоставленные ООО «Сенсоры и Новые технологии»<sup>5</sup> (СНТ, Воронеж, Россия).

Для оценки эффективности десорбции/ионизации ( $S$ ) с поверхности гальванических пленок использовали коэффициент отклика:

$$S = \frac{I}{c} \quad (2.6)$$

где  $I$  – ионный ток по искомому аналиту,  $C$  – концентрация аналита (нг в капле).

Для сравнения откликов, полученных с мишеней-эмиттеров или нанобиосенсоров на основе пленок наночастиц благородных металлов, проводили напыление этих же металлов на поверхность подложки (стали при подготовке мишени для масс-спектрометрии или ГО электрода производстве нанобиосенсоров). Напыление проводили на приборе Gatan (Плезантон, Калифорния, США), оснащенным монитором Gatan 681-20000. Металлические пленки с толщиной слоя не более 20-100 нм формировали в атмосфере аргона (99.999%).

Для изучения процессов лазерной десорбции/ионизации с поверхности металл-полупроводниковых гибридных пленок, использовали кремниевые пластины (Si(100),  $p$ -тип, удельное сопротивление 0.008-0.012  $\Omega \cdot \text{см}$ ) от фирмы Sumco (Токио, Япония). Поверхность кремния подвергали химическому травлению в растворах плавиковой кислоты в течение 10 мин с последующим погружением пластин на 30 с в растворы, содержащие ионы-прекурсоры благородных металлов. В таких условиях на поверхности кремния происходило формирование наночастиц благородных металлов в отсутствие внешнего источника тока. Этот способ получил название «бестоковый режим»/„*electroless galvanic deposition/displacement*”.[212]

---

<sup>5</sup>Автор лично выражает благодарность профессору Воронежского государственного университета инженерных технологий, заведующей кафедрой физической и аналитической химии, профессору РАН Кучменко Татьяне Анатольевне за предоставление измерительной системы SAGO (QCM) для оценки массы и толщины гибридных пленок, приведенных в работе.

LDI-MS сигналы с поверхности мишеней-эмиттеров с гальваническими пленками сравнивали с откликами, полученными в идентичных экспериментальных условиях для тех же тестовых биоаналитов с поверхности пористого кремния (DIOS, Waters, Эшборн, Германия).

Для синтеза пленок наногридов на основе пористого анодного оксида алюминия ( $p\text{-Al}_2\text{O}_3$  или ААО по тексту), использовали Al-фольгу толщиной 60 мкм (99.98%, VWR, Дармштадт, Германия). Анодирование проводили согласно ранее оптимизированному протоколу.[213]

#### **2.4.1 Характеризация мишеней-эмиттеров ионов на основе электроосажденных пленок**

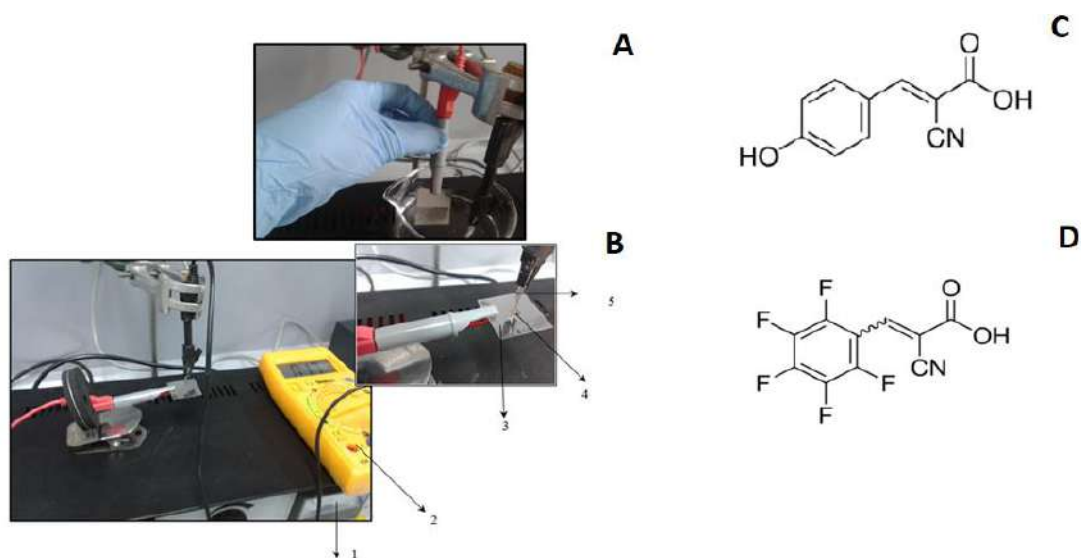
Для измерений дифракции рентгеновских лучей использовали систему X'Pert PRO (MRD) PANalytical (Алмело, Нидерланды). Данные были записаны в условиях скользящего падения ( $\Theta = 0.6^\circ$ , зазор с фиксированной расходимостью  $0.5^\circ$ , щель Соллера  $0.04$  рад, анти-рассеивающие щели  $0.5^\circ$  на падающем луче) под углом  $20^\circ - 130^\circ 2\Theta$  с шагом  $0.02^\circ$  в 15 с. Для анализа результатов использовали программное обеспечение TOPAS V4 (Bruker AXS, Германия).

Оптические характеристики напыленных слоев пленок благородных металлов (Au, Ag, Pd) на стали, пористом кремнии ( $p\text{-SiO}_2$ ) и алюминии ( $p\text{-Al}_2\text{O}_3$ ) были получены с использованием спектрофотометра Cary 5000 UV-Vis NIR (Varian, Дармштадт, Германия). Оптические свойства пленок измеряли в режиме отражения в диапазоне 200 – 800 нм.

Исследование морфологии и топологии поверхности сформированных мишеней-эмиттеров с гальваническими пленками исследовали методами SEM и ТЕМ/ПЭМ, которые применяли для нанобиосенсоров на основе ОНГ пленок (см. выше). Масс-спектрометрические исследования проводили по ранее описанным протоколам (см. части 2.3, 2.4).

## 2.4.2 Соосаждение низкомолекулярных органических молекул с наночастицами благородных металлов в отсутствие полимерного и биологического компонентов: формирование гибридных MALDI-мишеней

Для проверки универсальности разработанной методологии синтеза ОНГ пленок, оценивали возможность соосаждения малых органических молекул из двухкомпонентных растворов электролитов с наночастицами благородных металлов в отсутствие полимерного компонента и макробиомолекул. Для этой цели использовали стандартные MALDI матрицы, а именно  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричную (CHCA) и  $\alpha$ -циано-2,3,4,5,6-пентафтор-коричную (FCCA) кислоты. Соосаждение CHCA и FCCA из растворов кислых электролитов (pH = 4 – 5) осуществляли гальваническим методом (см. **Рис. 2.16**) в соответствии с ранее оптимизированным протоколом.[214] Предполагается, что отсутствие супрамолекулярных структур в растворах синтеза приведет к формированию простого адсорбционного ОНГ слоя на поверхности стальных мишеней при наложении поляризации.

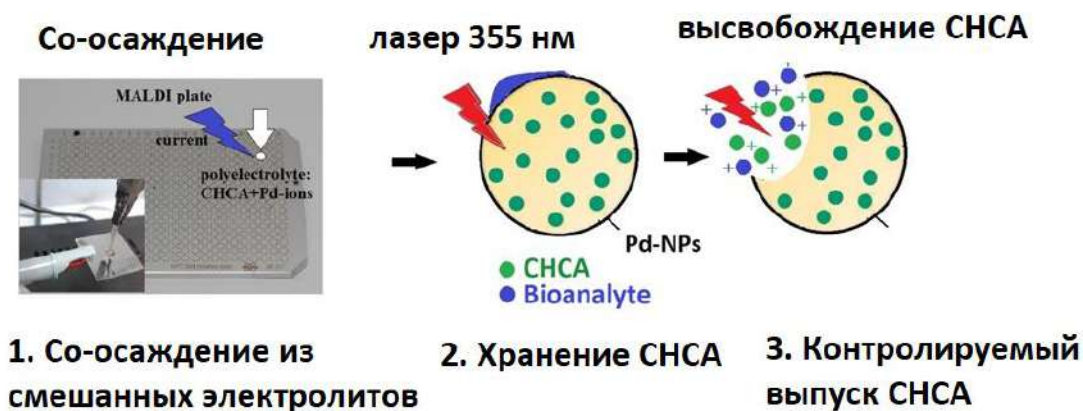


**Рис. 2.16** – Иллюстрация иммобилизации MALDI матриц с наночастицами благородных металлов в классической ячейке (**A**); совместное соосаждение в капле (**B**): 1 – потенциостат; 2 – цифровой мультиметр; 3 – полированная

стальная пластина; 4 – 10 мкл Pd-электролита с добавками MALDI матриц; 5 – Pd-электрод; (C,D) – химическая структура MALDI-матриц: C)  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота (CHCA), 189.17 г/моль; D)  $\alpha$ -циано-2,3,4,5-пентофторкоричная кислота (FCCA), 263.12 г/моль.

В случае эффективной иммобилизации органических матриц путем совместного соосаждения с наночастицами благородных металлов их вымывание при контакте с растворителями будет минимальным, что также существенно облегчит условия хранения гибридных мишеней.

Предполагается, что неконтролируемое вымывание органических матриц с поверхности таких наногбридов не будет происходить до тех пор, пока лазер не взаимодействует с поверхностью. При лазерном импульсе возможно контролируемое высвобождение соосажденных матриц, **Рис. 2.17** (показано на примере CHCA и Pd-NPs). Как только происходит частичная трансформация поверхности гибридной пленки (преимущественно за счет тепловой деформации и реорганизации наночастиц, см. Главу 5), этот процесс влечет за собой высвобождение MALDI матриц на поверхность пленки. В свою очередь, высвободившиеся MALDI молекулы все еще способны взаимодействовать с аналитом (показано синим на схеме, **Рис. 2.17**) согласно классическому механизму транспорта протонов.



**Рис. 2.17** – Схематичное изображение процессов, происходящих при высвобождении MALDI матриц при действии лазера.

## **2.5 Соосаждение кофакторов из смешанных растворов электролитов: формирование электродов для гетерогенного биокатализа**

Синтез наночастиц, легированных кофактором (флавин-адениндинуклеотид, FAD, флавиномононуклеотид, FMN) проводили из электролитов на основе Ag-, Pd- и полимеров (ALG (0.9%), PPy (0.1%), Naf (2.5%)), смешанных в соотношении 1:1:1 об./об. Концентрация исходных кофакторов в сложных растворах электролитов не должна быть ниже 0.4 мМ.

Для приготовления электродов, легированных кофакторами на основе ALG- и Nafion, использовали следующие параметры:  $I_k$ , -2.5 мА и  $t_{el}$  90 с для образования наночастиц, легированных кофактором на основе ALG; плотность тока  $I_k$  -2.5 мА и  $t_{el}$  30 с – для образования наночастиц с кофактором и Нафионом. Для синтеза электродов, легированных кофактором на основе PPy, использовали режим импульсного осаждения: -30 мА/см<sup>2</sup> в течение 10 с (стадия 1), затем 30 мА/см<sup>2</sup> в течение 10 с (стадия 2), 0 мА/см<sup>2</sup> в течение 10 с (стадия 3). В ходе синтеза получали электроды с ОНГ пленкой, состоящей из иммобилизованного в твердой форме кофактора.

Электроаналитические свойства полученных гибридных электродов исследовали в капельном режиме. Рабочий раствор (капля, объемом 150  $\mu$ L), содержал жидкий фермент в апо-форме и соответствующий субстрат.

## **2.6 Электрохимическое соосаждение полимер-неорганических гибридов в отсутствие ферментов: формирование функциональных ОНГ пленок на поверхности пьезокварцевых электродов**

Для исследования возможности формирования функциональных ОНГ пленок по предложенной методике на поверхности пьезорезонаторов, используемых в системах газового анализа типа «E-Nose», в базовые

электролиты на основе палладия и серебра добавляли от 1 до 5% следующих полимеров: Тритон X-100, Tween-80 и полиэтиленгликоль-3500 (PEG-3500). Эти полимеры традиционно используются в качестве сорбционных покрытий электродов пьезорезонаторов в методе пьезокварцевого микровзвешивания.

Электролиз из двухкомпонентных растворов электролитов, содержащих полимер-неорганические компоненты проводили непосредственно на поверхности пьезокварцевых преобразователей в капельном режиме при катодных токах то -1 мА до 10 мА в течение 30-180 с. При отсутствии биокомпонента в смешанном растворе электролита можно предположить формирование адсорбционного ОНГ слоя на поверхности пьезорезонаторов при включении поляризации.

Объекты исследования (ОНГ) и объекты анализа (низкомолекулярные биоаналиты), используемые в данной работе, систематизированы в **Табл. 2.4.** и **Табл. 2.5.**

**Табл. 2.4** – Составляющие ОНГ пленок

Неорганический компонент ОНГ	Полимерный компонент ОНГ / функциональные группы	Био - или органический компонент ОНГ
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pd-NPs</li> <li>● Ag-NPs</li> <li>● Au-NPs</li> <li>● ААО (пористый оксид алюминия)</li> <li>● моно-кристаллический SiO<sub>2</sub></li> <li>● пористый SiO<sub>2</sub> (DIOS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Нафион/-SO<sub>3</sub>H; -CF<sub>2</sub>-</li> <li>● Полипиррол/- (C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>NH)<sub>n</sub></li> <li>● Альгинат/-ООН, ОН-, -О-</li> <li>● Тритон X-100/C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O-</li> <li>● ПЭГ-5000/ -О-</li> <li>● Tween-80/-COO-, ОН-, -О-</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Глюкозооксидаза/GOx</li> <li>● Лактатоксидаза/LOx</li> <li>● Алкогольоксидаза/AOx</li> <li>● Пероксидаза/HRP</li> <li>● Каталаза/CAT</li> <li>● Кофакторы (FAD, FMN)</li> <li>● α-циано-4-гидрокси-коричная кислота (CHCA)</li> </ul>

**Табл. 2.5** – Объекты анализа, используемые в работе

Класс соединений						
Угле- воды	Жир- ные кис- лоты	Триацил- глицериды	Анти- биотики	Пептиды	Амино- кислоты	Низ- шие спирты
Д- Глюкоза	C16:0	Триолеин (ООО)	Эритро- мицин	Брадикинин	Пролин	C <sub>1</sub> -C <sub>4</sub>
Лактоза	C18:0	Трипаль- метин (PPP)	Сульфа- метазин	Ангеотензин I	Гистиин	
Мальто- триоза	C18:1 C18:2 C18:3		Резерпин	Ангеотензин II	Глутамин  Аргигин	

### 2.7 Анализ реальных образцов, содержащих малые биомолекулы

Матричные эффекты очень разнообразны и в значительной степени влияют на получаемый аналитический сигнал с поверхности микроаналитических устройств.[215][216] Поэтому возможные матричные эффекты необходимо отслеживать и минимизировать.

Основные матричные эффекты (*ME*), правильность анализа и эффективность процессов в работе оценивались по алгоритму, предложенному *Matuszewski*: [217]

$$ME = \frac{B}{A} \cdot 100\%, \quad (2.7)$$

где *A* – аналитический сигнал, записанный для целевого аналита в буферном растворе (рН 7), *B* – аналитический сигнал, записанный в клеточной культуральной среде или ином реальном объекте (растительные масла, молочные продукты и др.) после добавки аналита.

### **2.7.1 Анализ дрожжевых экстрактов биосенсорами на основе ОНГ пленок**

Ферментацию дрожжей проводили культивированием классического лабораторного штамма Ву4742 в среде дрожжевого экстракта (YPD). YPD среда содержала 10 г дрожжевого экстракта, 20 г пептона и 20 г глюкозы. Ферментацию проводили в ферментаторе (Merck, Darmon), оборудованным датчиком растворенного кислорода, рН-сенсором и температурным зондом. Все процессы мониторили с помощью контроллера Applikon (Applikon, Delft, The Netherlands). Биосенсорный анализ проводили как для образцов, содержащих живые клетки, так и ферментативной среды после ее контакта с клетками.

Для определения компонентов, присутствующих в реальных образцах и возможно мешающих электрохимическому определению, YPD среду на различных стадиях ферментации отфильтровывали и анализировали с помощью метода газовой хроматографии, совмещенной с масс-детектором (GC-MS). Для этой цели, 2 мкл пробы вводили автоматическим дозатором PAL (CTC Analytics, Цвинген, Швейцария) в систему GC-MS QP5050 (Shimadzu, Киото, Япония). Температуру впрыска в инжектор устанавливали на уровне 200 °С (соотношение разделения/split ratio 1:100). Для разделения компонентов среды использовали колонку ZB-WAX-плюс (Torrance, USA, 30 м×0.25 мм с толщиной пленки 0.25 мкм) со следующим температурным градиентом: 50 °С в течение 1 мин, 200 °С при 20 К/мин и выдерживали при температуре 250 °С в течение 10 мин. Температура инъекции в масс-спектрометр составляла 220 °С. Масс-спектры регистрировали в режиме ТИС в диапазоне  $m/z$  40 – 600.



## 2.7.2 Анализ реальных образцов методом SALDI-MS с использованием мишеней на основе гальванических пленок

Для определения стандартов жирных кислот исходные растворы аналитов с концентрацией 1 мг/мл растворяли в метаноле. Лактозу, мальтотриозу, глюкозу и исследуемые антибиотики готовили в воде, трипальмитин – в хлороформе или метаноле. Исходные растворы ангиотензина, брадикинина и аминокислот с концентрацией 500 нг/мл готовили в дистиллированной воде. Рабочие растворы получали разбавлением исходных растворов до требуемых уровней концентрации и пипетировали непосредственно на мишени в количестве 1 мкл (нг/мкл или нг/пятно) с последующим высыханием капли при комнатной температуре.

Стандартные MALDI эксперименты проводили с использованием капельного способа путем смешивания равных количеств растворов анализируемого вещества с матрицей СНСА (5 мг/мл в 50:50 ацетонитрил/вода (ACN/H<sub>2</sub>O)).

Образцы молока получали из местного супермаркета. Для анализа образцов методом SALDI-MS и MALDI-MS, 1 мкл коммерческого образца разбавляли 1 мл метанолом. В исследовании использовали как обычное молоко, так и обезжиренный аналог после обработки лактазой (безлактозный продукт).

Образцы растительных масел (оливкового, подсолнечного или рапсового разной степени обработки) также приобретали в местных супермаркетах. Пробоподготовка включала растворение 1 мл образцов масел в 1 мл смеси ацетонитрила/тетрагидрофурана (75:25 об./об.) с последующим нанесением 1 мкм смеси на мишени.

Стандартные эксперименты с использованием MALDI (10 мг/мл DHB растворяли в метаноле) для анализа растительных масел проводили методом капли в соответствии с протоколом, ранее оптимизированным *Schiller*. [218]

## 2.8 Выводы к Главе 2

1. Предложена новая методика одностадийного синтеза ОНГ пленок, позволяющая в одной процедуре осадить все компоненты функциональной пленки в нужную структуру слоя.
2. Предложено несколько аналитических протоколов, которые могут быть использованы для верификации аналитических сигналов, получаемых с поверхности микроаналитических тест-систем на основе ОНГ пленок. Разработанные подходы позволяют отслеживать и оптимизировать параметры синтеза ОНГ пленок, влияющие на дизайн, архитектуру и выходные сигналы микроаналитических устройств на их основе (биосенсоры, мишени для масс-спектрометрии, пьезосенсоры). На основе метода индуктивно-связанной плазмы масс-спектрометрии разработан способ стандартизации неорганического компонента ОНГ пленок в соответствии с протоколом неразрушающей подготовки образца.
3. На основе ВЭЖХ предложен способ контроля надежности закрепления полимерного биоорганического компонента ОНГ пленок на подложках.
4. На основе метода LDI-MS предложен оригинальный алгоритм стандартизации биосенсоров, работающий по принципу биохимического сканирования биоорганического компонента, и позволяющий получать подробную информацию о химии поверхности электродов, степени химической однородности поверхности, механизмам адсорбции, десорбции и ионизации биоаналитов с поверхности электродов или мишеней, а также параметрам, ответственным за перенос заряда с мишени-эмиттера или электрода на основе ОНГ с поверхности к биоаналиту.
5. На основе оптического минисенсора предложен способ контроля активности ферментов группы оксидаз после их соосаждения с наночастицами благородных металлов.

### **ГЛАВА 3. ОДНОСТАДИЙНЫЙ МЕТОД ФОРМИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОАКТИВНЫХ ОНГ: ОТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МНОГОКОМПОНЕНТНОМ РАСТВОРЕ СИНТЕЗА ДО АРХИТЕКТУРЫ ГИБРИДНОЙ ПЛЕНКИ НА ПОВЕРХНОСТИ ЭЛЕКТРОДА**

В главе рассматривается механизм формирования тонких гибридных функциональных пленок из многокомпонентного раствора. Было предложено несколько моделей взаимодействий, происходящих в многокомпонентном растворе электролита на примере глюкозооксидазы (GOx), Нафiona (Naf) и Pd-прекурсора. Кроме того, проведен детальный анализ молекулярной структуры гибридного сенсорного слоя, сформированного посредством гальванического нанесения из многокомпонентного раствора электролита на поверхность трафаретных электродов (SPE). Предложена модель закрепления Pd-NPs/GOx/Naf ОНГ пленки на поверхности рабочего электрода (SPE), модифицированного оксидом графена (GO).

#### **3.1 Теоретические аспекты организации функционального слоя электрода при одностадийном осаждении ОНГ пленки**

Достоинством одноэтапного электрохимического синтеза ОНГ пленок на поверхности электродов является уникальная возможность в одной процедуре осадить все компоненты ОНГ в нужную структуру слоя, а также полный инструментальный контроль процесса, т.е. возможность управления синтезом и, как следствие, функциональностью получаемых микроаналитических систем. Помимо этого, получаемые электрохимическим одноэтапным методом соосаждения пленки являются тонкими, хотя возможно формирование и более плотных структур с равномерным распределением компонентов, с хорошими адсорбционными свойствами и низким поверхностным сопротивлением, что в целом способно существенно облегчить перенос электронов. Все это должно выгодно отличать получаемые ОНГ пленки и микроаналитические системы на их основе среди известных аналогов (см. Главу 1).

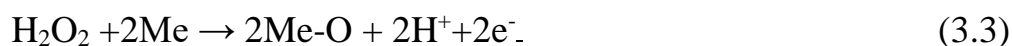
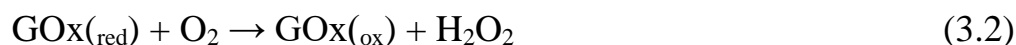
Поскольку полимерные компоненты не вымываются в ходе хранения и эксплуатации ожидается, что такие пленки будут обладать улучшенной химической и механической стабильностью. Последний пункт положительно отразится на воспроизводимости определения целевых аналитов и приведет к уменьшению влияния матричных эффектов, упрощению процедуры синтеза пленок, их хранения и увеличению общих сроков эксплуатации нанобиосенсоров. Кроме того, поскольку скорость вымывания, как ферментов, так и полимерного органического компонента из плотно упакованных тонких пленок с хорошо распределенными в слое компонентами снижается, использование таких ОНГ нанобиосенсоров поможет достичь более выгодных аналитических показателей (чувствительность, специфичность и селективность) при обнаружении и определении малых биомолекул.

Важно отметить, что использование наночастиц благородных металлов наряду с ферментами класса оксидаз призвано облегчить отвод пероксида водорода из ОНГ систем, который формируется в ходе биокаталитической реакции и существенно снижает активность ферментов. Такой подход поможет сохранить активность ферментов в течение более длительного промежутка времени. Кроме того, гибридные наночастицы, содержащие полимерный компонент (Naf, PPy или ALG), могут выступать в качестве защитной капсулы для ферментов, что также сокращает вероятность их преждевременного вымывания и последующей деактивацией функционального ОНГ слоя.

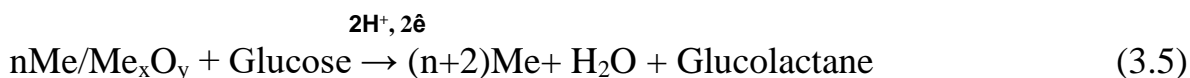
В рассматриваемой гибридной системе одновременно могут протекать два редокс-процесса. С одной стороны, биологический компонент (фермент) катализирует окисление биоаналита с выделением  $H_2O_2$ , который способен окисляться или восстанавливаться на наночастицах неорганической фазы при наложении поляризации. С другой стороны, металлические наночастицы в гибридном слое могут подвергаться окислению (или формировать оксиды в процессе соосаждения из растворов смешанных электролитов), в результате

чего образуется новый оксидный слой наночастиц ( $Me_xO_y$ ) с отдельными каталитическими свойствами. В результате, можно предположить формирование аддитивного, а в некоторых случаях и синергетического эффекта при последующем окислении биоаналитов на поверхности таких гибридных нанобиосенсоров. Общий электрохимический процесс, ожидаемый в таком случае, можно описать в виде следующей схемы (показано для глюкозы и фермента GOx в качестве примера):

*1-ая реакция (катализируется ферментом GOx):*



*2-ая возможная реакция (катализируется наночастицами благородных металлов (Me)/или их оксидами ( $Me_xO_y$ ) в отсутствие фермента по принципу неферментных сенсоров):*



В первом случае GOx в водной среде катализирует окисление глюкозы до глюконолактона (далее происходит гидролиз глюколактона до глюконовой кислоты). Этот процесс сопровождается высвобождением двух электронов, используемых при восстановлении кислорода до перекиси водорода с привлечением нековалентно связанного с ферментом кофактора флавинадениндинуклеотида (FAD), который после окисления глюкозы существует в восстановленной форме  $\text{FADH}_2$ . Следует отметить, что кофактор не добавляли дополнительно к ферменту или раствору электролита.

Нековалентно связанный с ферментом кофактор уже присутствует в промышленном образце GOx.

Помимо разложения пероксида водорода целью использования металлических наночастиц благородных металлов является поддержание оптимальной кинетики ферментной реакции. За счет каскада последовательных взаимодействий наночастиц благородных металлов с кислородом в таких системах можно избежать его быстрого восстановления на электроде. Быстрое истощение кислорода в биохимических системах на основе оксидаз обычно приводит к быстрой потере их каталитической активности.

В предлагаемом дизайне гибридной пленки наночастицы металла являются электрокатализаторами окисления пероксида водорода, формируемого при окислении субстрата ферментом, но при определенных условиях могут служить и токовыми коллекторами, если находятся достаточно близко к редокс-центру фермента, таким образом, обеспечивая прямой электронный перенос с белкового центра на электрод.

Более того, в результате допирования гибридного слоя наночастицами благородных металлов потенциалы, при которых ведется скрининг продукта реакции, оказываются снижены в сравнении с объемными/bulk металлами (наноразмерный эффект). В результате может улучшиться предел их обнаружения и снизиться влияние матричных эффектов: чем выше рабочий потенциал электрода, тем более широкий спектр органических аналитов (глюкоза, лактат, дофамин, холин, серотонин, ацетилхолин, глутамин) может окисляться одновременно с целевым биоаналитом.

Таким образом, формирование ОНГ пленок одноэтапным методом электроосаждения из многокомпонентного раствора синтеза, содержащего все компоненты функциональной пленки, является интересным, новым и удобным способом.

### 3.1.1 Модельная система на основе Pd<sup>2+</sup>, Нафиона и фермента

Многокомпонентный раствор электролита, используемый для электрохимического синтеза ОНГ пленки на поверхности трафаретного электрода, представляет собой смесь водно-спиртового раствора Нафиона (50% пропанол-1 и ~5 % этанол) в Н<sup>+</sup> форме, фермента (GOx) и солей палладия в фосфатном буфере. Несмотря на то, что синтез гибридной пленки проводили из электролита палладирования на основе хлорпалладиевой кислоты, содержащей анионный и весьма стабильный комплекс PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>, положительно заряженные комплексы ионов палладия все же присутствует в этом растворе в виде Pd(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>2+</sup> или Pd<sup>2+</sup>. [183] Вследствие малого объема электролита (10 мкл) PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> будут сосредотачиваться лишь в приповерхностном слое электрода. Предполагается, что концентрация Pd<sup>2+</sup> при этом хоть и мала, однако, не равна нулю, поэтому именно эти ионы будут «работать» в первую очередь после «ухода» из раствора. Равновесие в такой системе будет сдвигаться, и концентрация Pd<sup>2+</sup> будет восстанавливаться, и так до тех пор, пока весь Pd<sup>2+</sup> не израсходуется. УФ-анализ раствора электролита подтвердил наличие ионов Pd<sup>2+</sup> (интенсивный широкий пик в области 200 – 220 нм).

В данном электролите буфер будет «забирать» ионы водорода из Нафиона, вследствие чего Нафион «в ответ» будет забирать Pd<sup>2+</sup> из раствора, что является дополнительной движущей силой процесса ионного обмена. Как только эти катионы свяжутся, их концентрация в растворе восстановится. Таким образом, в процессе формирования гибридных пленок из такого электролита еще в растворе можно ожидать образование промежуточных биокластеров из-за взаимодействия между катионами благородных металлов, находящихся в избытке и молекулами фермента (GOx), а также между Нафионом и ионами металла. Далее именно эти биокластеры могут и будут принимать участие в соосаждении на электродную поверхность при наложении поляризации. Однако детальные аспекты этой

последовательности, а также механизм закрепления комплексов на поверхности рабочего электрода на этом этапе остаются не вполне неясными.

Другим возможным вариантом формирования функциональной пленки из сложного раствора электролита является независимое соосаждение компонентов раствора в ходе поляризации электрода, особенно, если ионы металла входят в состав отрицательно заряженных комплексов и не способны на взаимодействие с полимерной матрицей Нафiona. В любом случае, компоненты раствора синтеза способны оказать сильное влияние на активность фермента, изменяя его конформацию, поэтому вопрос о взаимодействиях в растворах и в формирующихся на поверхности электрода гибридных пленках требует дальнейших исследований.

Для изучения взаимодействий, происходящих в многокомпонентных растворах, была проведена целая серия наноаналитических исследований (*см. разделы ниже*), в т.ч. с использованием оригинальных способов, описанных в Главе 2.

### **3.2 Исследования смешанных растворов электролитов**

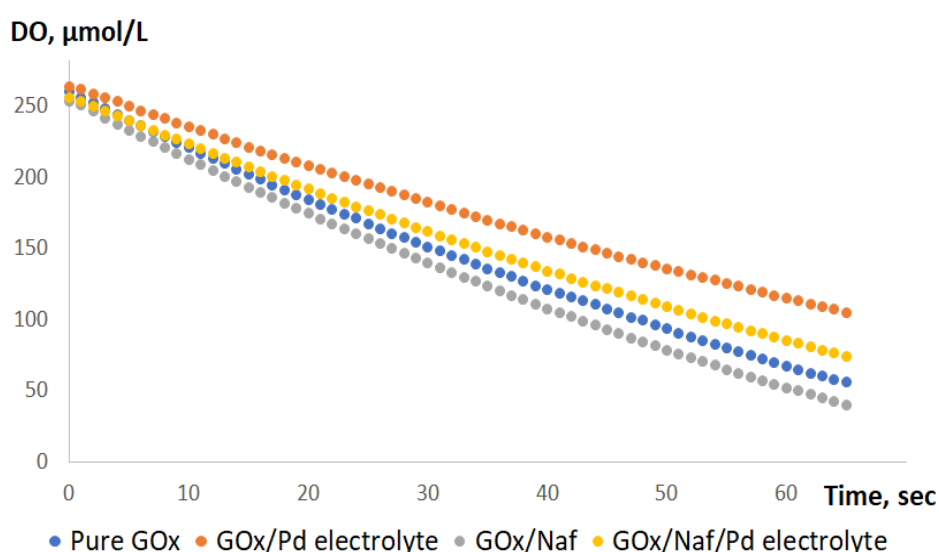
В действительности, в трехкомпонентном растворе синтеза находится целый спектр компонентов: соли буферного раствора (фосфатный буфер необходим для приобретения белком правильной конформации), пропиловый спирт (присутствующий в 5% растворе Нафiona, нейтрализованного до рН 7 0.1 М КОН), этанол (использовали для разбавления исходного раствора Нафiona) и компоненты хлорпалладиевой кислоты (возможно образование аммиачных комплексов палладия, коррекцию рН в базовом палладиевом электролите проводили аммиаком). Соответственно, все эти компоненты или взаимодействия между ними могут негативно повлиять на активность фермента, ГОх.

Для исследования влияния воздействия Pd-электролита и Нафiona на активность ГОх в растворе, активность фермента оценивали до и после



добавления каждого из индивидуальных компонентов смеси с помощью оптического кислородного минисенсора, см. Главу 2.

Как видно из **Рис. 3.1**, по мере окисления глюкозы GOx происходит снижение концентрации кислорода, потребляемого в реакции (3.2). При этом добавки базового палладиевого электролита или прекурсора полимерного компонента несколько снижают активность фермента (убыль кислорода замедляется), но это снижение не столь существенно, как при возможном необратимом изменении конформации белка в растворе.



**Рис. 3.1** – Отклик оптического минисенсора кислорода, выраженный в виде числа молей растворенного кислорода (мкмоль/л), присутствующего в растворах. Активность исходного раствора свободного фермента (чистый GOx) и его различных смесей (pH 6.98) сравнивали в присутствии 100 мМ растворов глюкозы в фосфатном буфере.

Иными словами, исследования с помощью кислородного минисенсора не подтвердили возможных конформационных изменений в первозданной структуре фермента группы оксидаз. Аналогичные закономерности были получены при смешении исследуемых растворов ферментов с прекурсорами альгината (ALG) и пиррола (PPy).

Причина сохранения активности фермента в условиях добавления как полимерных компонентов смеси, так и палладиевого электролита, вероятно, состоит в том, что соли раствора электролита действуют как своеобразный защитный барьер, предотвращая прямой контакт между молекулами фермента и органическими растворителями (например, выделяемыми из раствора Наффона, включая пропанол, Pr или этанол, Et).[219]

В литературе также сообщается о фактах сохранения ферментной активности в водно-органических белковых растворах, содержащих ионы переходных металлов вследствие образования промежуточных биокомплексов.[197] Для более глубокого понимания процессов, происходящих на молекулярном уровне в растворах электролитов, далее проводили теоретическое моделирование процессов.

### **3.3 Моделирование взаимодействий в смешанных растворах электролитов, содержащих биополимерные компоненты**

На следующем этапе было проведено компьютерное моделирование энергии адсорбции  $Pd^{2+}$  на боковых цепях аминокислот и пептидных группах молекул фермента GOx. Для этой цели моделировали FT-IR спектры нескольких индивидуальных и смешанных систем на основе Наффона (Naf), а именно в водно-спиртовых растворах индивидуального Naf, а также Pd/Naf и Pd/GOx/Naf. Примечательно, что содержание воды в мультикомпонентных растворах увеличилось в системах  $Naf \rightarrow Pd/Naf \rightarrow Pd/GOx/Naf$  слева направо. Этот фактор учитывался при изменении диэлектрической проницаемости среды. Пики валентных симметричных колебаний  $SO_3^-$  - аниона, выбранного из экспериментальных FT-IR спектров, суммированы в **Табл. 3.1**.

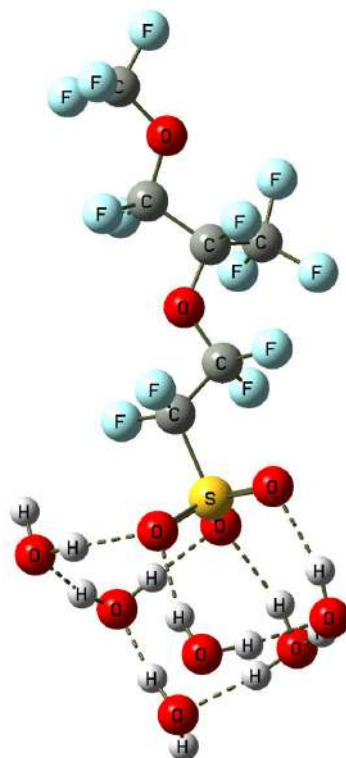
**Табл. 3.1** – Пики симметричного валентного колебания аниона  $SO_3^-$  ( $cm^{-1}$ ) в спектрах водно-спиртового раствора Нафион; смеси Нафион+ Pd электролита; смеси Нафион + Pd-электролита + GOx

Номер характеристического пика	Naf	Naf/Pd	GOx/Naf/Pd
1	1069	1069	1069
2	1055	1052	1049

Сдвиг симметричных растягивающих колебаний группы  $SO_3^-$  Нафиона в FT-IR спектрах растворов  $Naf \rightarrow Pd/Naf \rightarrow Pd/GOx/Naf$  можно рассматривать как доказательство взаимодействий, происходящих между  $Pd^{2+}$ , GOx и Naфion. В частности, пик при  $1060\text{ см}^{-1}$  соответствует симметричной растягивающейся вибрации сульфогруппы в спектре Нафиона при набухании.[220] Характерный пик симметричной растягивающейся вибрации аниона  $SO_3^-$  делится на две полосы: 1)  $1069\text{ см}^{-1}$  и 2)  $1055\text{ см}^{-1}$  (Naf),  $1052$  (Pd/Naf) и  $1049\text{ см}^{-1}$  (Pd/GOx/Naf), **Табл. 3.1**. Максимум первой полосы при переходе  $Naf \rightarrow Naf/Pd \rightarrow GOx/Naf/Pd$  не меняет своего положения. Однако максимум второй полосы смещен на  $5\text{ см}^{-1}$  в растворе Naf, на  $8\text{ см}^{-1}$  в растворе Pd/Naf и на  $11\text{ см}^{-1}$  в растворе Pd/GOx/Naf по сравнению с Naf в воде ( $1060\text{ см}^{-1}$ ).

Ранее подобное поведение описывалось в литературе для спиртовых растворов Нафиона и объяснялось различием в координации сульфогрупп и образованием протонированных молекул метанола.[221] При этом изменения FT-IR спектров Нафиона в значительной степени зависели от концентрации метанола. А именно, полоса при  $1053\text{ см}^{-1}$  смещалась в область больших волновых чисел после увеличения содержания воды в Нафине (переход от чистого метанола к воде). Однако в исследуемом случае разбавление приводило к смещению полосы в область меньших волновых чисел. Это означает, что сдвиг пика от  $1055\text{ см}^{-1}$  до  $1052\text{ см}^{-1}$  и  $1049\text{ см}^{-1}$  происходит из-за взаимодействий между Нафионом и другими компонентами раствора электролита, например с  $Pd^{2+}$  базового электролита палладирования или

функциональными группами ферментов. Репрезентативный фрагмент Нафiona с 6 молекулами воды приведен на **Рис. 3.2**.



**Рис. 3.2** – Оптимизированная структура репрезентативного фрагмента Нафiona с 6 молекулами воды в водной среде (PCM модель).

Для интерпретации наблюдаемых смещений были выполнены квантово-химические расчеты FT-IR спектров Нафiona с различным окружением сульфогруппы на примере пропанола (Pr), воды и одной из аминокислот фермента – аргинина (Arg). Данная область выбрана вследствие того, что она не перекрывается пиками других полос компонентов исследуемой смеси и отражает важное для интерпретации взаимодействие Нафiona с различными компонентами системы.

Далее анализировалось влияние окружения сульфогруппы на положение максимума полосы симметричных валентных колебаний аниона  $SO_3^-$  sym. В ходе расчетов определены структуры, рассчитанные частоты которых

наилучшим образом соответствуют экспериментальным ИК-спектрам, **Табл. 3.2**. Наличие выше приведенных структур в растворе позволяет предположить, что сдвиги частот в экспериментальных спектрах могут быть обусловлены взаимодействиями  $\text{Pd}^{2+}$  с Нафионом (присутствует структура  $\text{R-Naf-Et-(H}_2\text{O)}_5\text{-Pd}^{2+}\text{-H}_2\text{O)}_3$ ) и Нафиона с  $\text{Pd}^{2+}$  и GOx ( $\text{R-Naf-Pd}^{2+}\text{-Arg-(H}_2\text{O)}_6$ ), происходящими в растворе. Детальное объяснение всех расчетных структур, приведенных в **Табл. 3.2**, будет рассмотрено далее.

**Табл. 3.2** – Рассчитанные и экспериментальные максимумы полос  $\text{SO}_3^-$  в спектрах водно-спиртового раствора Нафион; смеси Нафион и Pd электролита; смеси Нафион + Pd электролита + GOx

№	Система	Модель	Расчет, $\text{нм}^{-1}$	Эксперимент, $\text{нм}^{-1}$
1	Нафион в водно-спиртовом растворе	$\text{R-Naf-(H}_2\text{O)}_3\text{-PrH}^+\text{-(Et)}_2^*$	1055	1055
2	Раствор Нафион + Pd электролит	$\text{R-Naf-Et-(H}_2\text{O)}_5\text{-Pd}^{2+}\text{-H}_2\text{O)}_3$	1052	1052
3	Раствор Нафион + Pd электролит + GOx	$\text{R-Naf-Pd}^{2+}\text{-Arg-(H}_2\text{O)}_6$	1049	1049
4	Нафион, набухший в воде	$\text{R-Naf-(H}_2\text{O)}_n, n=6,7$	1060	1060
5	Системы 1-3	$\text{R-Naf-(H}_2\text{O)}_5\text{-PrH}^+\text{-Et}$	1063	1069

\*Naf - боковой фрагмент Нафион с анионом  $\text{SO}_3^-$ , Pr - молекула пропанола-1; Et-этанола, Arg – аргинин.

### 3.3.1 Взаимодействия в системе GOx-Pd<sup>2+</sup>

Ранее адсорбционные свойства катионов палладия и некоторых других катионов благородных металлов были подробно изучены на частицах неорганической фазы [222], однако, подобные взаимодействия на поверхности биокластеров или биомолекул являются не столь общеизвестными.

На следующем этапе были проведены теоретические исследования, подтверждающие адсорбцию  $\text{Pd}^{2+}$  на поверхности GOx. Методами квантовой химии рассчитаны энергии взаимодействия между элементарной структурой

$\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^0$ ,  $\text{Na}^+$  (катионы, присутствующие в буферном растворе) и несколькими аминокислотами в воде и на воздухе. В качестве модельного фрагмента использовали N-метилацетамид (NMA, малая молекула и часто играет роль маркера-метаболита).[223][224] Оценивалась возможность взаимодействия между атомом кислорода группы  $\text{C}=\text{O}$  с NMA,  $\text{Pd}^{2+}$  и  $\text{Pd}^0$ . Поскольку в ходе электрохимического осаждения в результате электролиза на электроде образуются палладиевые наночастицы (Pd-NPs), исследование молекулярных взаимодействий проводилось исключительно для  $\text{Pd}^0$  в качестве сорбата, который является центром образованных Pd-NPs наночастиц.

Для расчетов были выбраны аминокислоты, содержащие атомы азота, кислорода и серы в боковых цепях. Эти атомы имеют пару свободных электронов, которая занимает свободную орбиталь металлических частиц с образованием связи донор-акцептор, что и могло бы быть причиной образования комплекса в растворе по типу катион металла  $\leftrightarrow$  боковая цепь аминокислот. Предполагается, что боковые цепи аминокислот взаимодействуют с  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{Pd}^0$ . Соответствующие энергии взаимодействия суммированы в **Табл. 3.3**.

Из приведенной таблицы видно, что энергии взаимодействия (E) между ионами  $\text{Pd}^{2+}$  и боковыми цепями выбранных аминокислот и NMA в воде значительно выше по сравнению с  $\text{Pd}^0$  и  $\text{Na}^+$ . Наибольшая энергия была получена для основных аминокислот и метионина. Энергия взаимодействия между  $\text{Pd}^{2+}$  и NMA сравнима с энергией взаимодействия аминокислот в растворе.

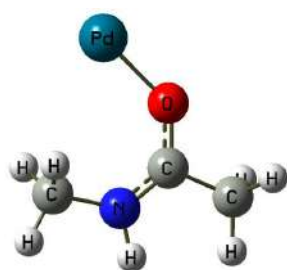
В качестве примера были сконструированы молекулярные структуры комплексов, образованных между  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^0$ , Arg и NMA в воде и воздухе, **Рис. 3.3** (см. также Приложения, **Рис. П.3.1**). Известно, что ионы палладия и натрия находятся в растворе в гидратированном виде. Энергия взаимодействия между  $\text{Na}^+$  и молекулой воды намного выше, чем между  $\text{Na}^+$  и боковыми цепями

аминокислот. Поэтому взаимодействие фермента с катионами натрия, скорее всего, реализуется с участием молекул воды.

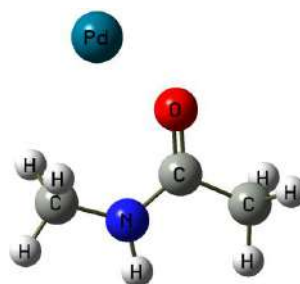
**Табл. 3.3** – Энергии взаимодействия<sup>6</sup> между Pd<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Pd<sup>0</sup> и боковыми радикалами некоторых аминокислот и NMA (ккал/моль) в различных средах

Среда Ион Лиганд	Вода E <sub>Pd<sup>2+</sup></sub> ,	Вода E <sub>Pd<sup>0</sup></sub> ,	Воздух E <sub>Pd<sup>0</sup></sub> ,	Вода E <sub>Na<sup>+</sup></sub>
Arg	96.8	22.0	18.1	9.2
Lys	83.9	20.4	17.8	9.6
His	79.7	19.9	17.1	11.7
Met	71.6	21.0	17.9	2.8
Gln	63.3	11.6	10.4	9.4
Cys	62.8	19.8	16.7	2.0
Ser	53.9	14.9	6.4	7.9
Asn	53.4	6.9	9.7	9.3
Glu	51.8	13.2	11.2	6.7
Asp	50.0	6.9	12.5	6.9
NMA*	64.9	11.7	10.1	10.1

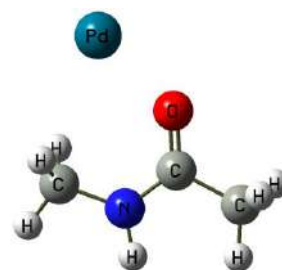
\*NMA – N-метилацетамид



Pd<sup>2+</sup>-NMA в воде,  
 $R_{PdO} = 1.90 \text{ \AA}$   
 $R_{CN} = 1.31 \text{ \AA}$ ,  
 $R_{NH} = 1.01 \text{ \AA}$ ,  
 $R_{CO} = 1.29 \text{ \AA}$



Pd<sup>0</sup>-NMA в воде  
 $R_{PdO} = 2.14 \text{ \AA}$   
 $R_{CN} = 1.34 \text{ \AA}$ ,  
 $R_{NH} = 1.00 \text{ \AA}$ ,  
 $R_{CO} = 1.25 \text{ \AA}$



Pd<sup>0</sup>-NMA в воздухе  
 $R_{PdO} = 2.19 \text{ \AA}$   
 $R_{CN} = 1.35 \text{ \AA}$ ,  
 $R_{NH} = 1.00 \text{ \AA}$ ,  
 $R_{CO} = 1.24 \text{ \AA}$

**Рис. 3.3** – Оптимизированные структуры комплексов Pd<sup>2+</sup>, Pd<sup>0</sup> с NMA в воде и воздухе.

<sup>6</sup>  $E_{B3} = E_1 + E_2 - E_{12}$ , здесь  $E_{B3} > 0$  в случае устойчивого связывания

Далее была исследована возможность присоединения  $\text{Pd}^{2+}$  к ферменту без промежуточных молекул воды. Энергия удаления одной молекулы воды из первой гидратной оболочки гидратированного  $\text{Pd}^{2+}$  составляет 27.2 ккал/моль. Это значение существенно меньше, чем энергия катионов, взаимодействующих с аминокислотами, приведенных в **Табл. 3.3**. Следовательно, замена молекулы воды первой гидратной оболочки  $\text{Pd}^{2+}$  боковой цепью аминокислот является энергетически более благоприятной. Другими словами, в водном растворе  $\text{Pd}^{2+}$  будет адсорбироваться на остатках аминокислот фермента без промежуточных молекул воды.

Важно отметить, что при нейтральном pH GOx имеет отрицательный заряд и не может осаждаться на отрицательно заряженном электроде.[225] Однако в рассматриваемом примере осаждение GOx на рабочем электроде может быть обусловлено образованием положительно заряженного металл-ферментативного комплекса  $\text{GOx} \cdot n\text{Pd}^{2+}$  в растворе с его последующим восстановлением до  $\text{GOx-Pd}^0$  на отрицательно заряженном электроде.

### **3.3.2 Взаимодействия в системе полимер – базовый электролит, содержащий ионы-прекурсоры благородных металлов**

Следует отметить, что во всех анализируемых растворах при добавлении базового электролита, содержащего ионы-прекурсоры металлов, наблюдались значительные изменения в ИК-спектрах в области валентных OH группы 3500 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ , см. **Рис. П.3.2** (показано для альгината, смешанного с палладиевым электролитом). В условиях эксперимента OH группы альгината частично депротонированы (pH ~ 8), поэтому изменения в ИК-спектрах в этой области при взаимодействии с электролитом, содержащим ионы-прекурсоры палладия, подтверждают катионную природу базового электролита палладирования, см. часть 3.1.1.

Для альгината, однако, не было зарегистрировано значительных сдвигов в диапазоне 1620  $\text{cm}^{-1}$  (карбоксильные группы), что исключает участие этих групп при сшивке матрицы альгината. Также для альгината не наблюдалось



различий в пике при  $1150\text{ см}^{-1}$ , который представляет асимметричную С-О-С вибрацию растяжения, и пиках при  $1594\text{ см}^{-1}$  и  $1409\text{ см}^{-1}$  (асимметричные и симметричные вибрации растяжения, соответственно, связи С-О СОО- групп). Эти данные указывает на то, что гликозидные связи между молекулами альгината не изменяются при взаимодействии с данным палладиевым электролитом. Однако отсутствие специфических групп-маркеров в составе альгината по аналогии с Нафионом делает расчет ИК-спектров при его смешении с электролитом палладирования непростой задачей для моделирования.

В сравнении с альгинатом, Нафион помимо области валентных ОН- групп имеет характерную  $\text{SO}_3^-$  группу-маркер, что позволяет провести необходимые вычисления. В область ИК-спектра при  $3500 - 4000\text{ см}^{-1}$  также возможно вносят вклад мономеры и димеры воды (в мембранной сетке полимера), полосы валентных ОН колебаний которых лежат в области  $3550 - 3750\text{ см}^{-1}$ . [226] Поэтому для исключения этого мешающего эффекта наиболее целесообразно проводить расчет молекулярных взаимодействий в системе Нафион-электролит по сульфогруппе.

Наилучшее согласование теории и эксперимента имеет место при нахождении вблизи сульфогруппы шести молекул растворителя ( $3\text{ H}_2\text{O}$  и 3 молекулы спирта, что естественно, поскольку раствор содержит 45% воды и ~50% пропанола и частично диссоциированного противоиона  $\text{H}^+$ , находящегося во второй гидратной оболочке сульфогруппы). Вероятность полной диссоциации протона снижена вследствие того, что диэлектрическая проницаемость водно-спиртового раствора меньше диэлектрической проницаемости воды. Рассчитанная частота  $\nu_{\text{calc}}(\text{SO}_3^-_{\text{sym}}) = 1055\text{ см}^{-1}$  данной структуры совпадает с экспериментальным значением  $1055\text{ см}^{-1}$ , см. **Табл. 3.2**. В данной структуре протон сольватирован молекулой пропанола (протонированный пропанол  $\text{C}_3\text{H}_9\text{O}^+ \equiv \text{PrH}^+$ ) (см. Приложения **Рис. П3.3**). Между атомом кислорода сульфогруппы и протонированным пропанолом находится

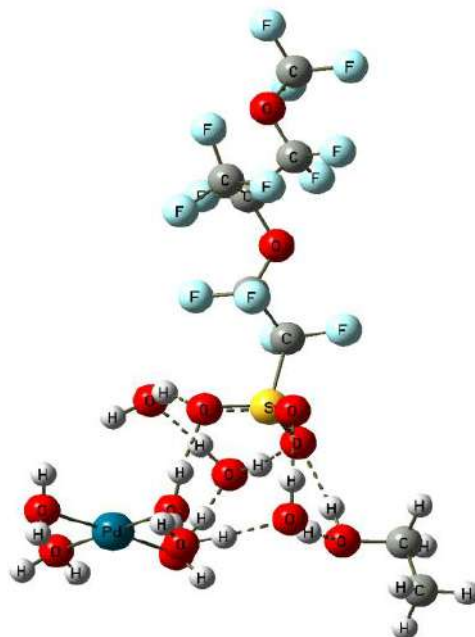
молекула воды. Заметим, что моделирование структуры, в которой протонированный пропанол взаимодействует с  $SO_3^-$  без промежуточных молекул воды приводит к существенному снижению  $\nu(SO_3^-_{sym})$ . При этом влияние катиона  $PrH^+$  на сульфогруппу является достаточно сильным.

Далее было проанализировано взаимодействие в многокомпонентной системе, содержащей водно-спиртовой раствор Нафiona и базовый палладиевый электролит. Буферный раствор связывает протоны сульфополимера и переводит их в раствор. Он стимулирует превращение катионов палладия и натрия из электролита в полимерную матрицу Нафiona. Следует отметить, что катионы  $Na^+$  также присутствуют в многокомпонентном растворе и могут взаимодействовать с сульфогруппой Нафiona.

Для набухшего в воде Нафiona в натриевой форме могут образовываться пары ионов, разделенные растворителем. В этом случае вблизи сульфогруппы присутствуют только молекулы воды, и никакого сдвига, связанного с набухшим в воде Нафионом, не регистрируется. Кроме того, катионы  $Pd^{2+}$  более вероятно присоединены к полимерному каркасу, чем одновалентные катионы. Оптимизированная структура (вычисленное волновое число  $\nu_{calc}(SO_3^-_{sym})$ ), которая наилучшим образом соответствует экспериментальному значению репрезентативного фрагмента Pd-электролита + Нафион в растворе, показана на **Рис. 3.4**.

Далее в гидратной оболочке сульфогруппы учитывалась одна молекула этанола и пять молекул воды. Катион  $Pd^{2+}$  гидратируется четырьмя молекулами воды. Одна из этих молекул воды образует водородную связь с  $SO_3^-$ -анионом. При этом три другие молекулы воды оболочки гидратации  $Pd^{2+}$  удалены от сульфогруппы. Одна молекула воды расположена между катионом  $Pd^{2+}$  и сульфогруппой. В этой структуре вычисленное волновое число  $\nu_{calc}(SO_3^-_{sym}) = 1052 \text{ см}^{-1}$  (*структура 2, Табл. 3.1*) хорошо совпадает с экспериментальным результатом. Уменьшение значения  $\nu(SO_3^-_{sym})$  с  $1055 \text{ см}^{-1}$

<sup>1</sup> (структура 1, Табл. 3.1) до 1052 см<sup>-1</sup> (структура 2) объясняется влиянием Pd<sup>2+</sup>.



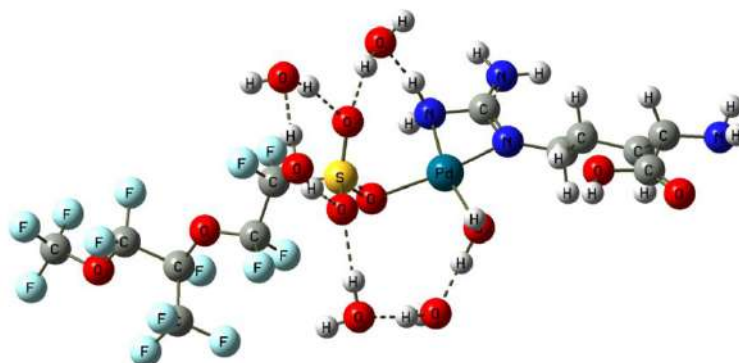
**Рис. 3.4** – Оптимизированная структура репрезентативного фрагмента Pd-электролита + Нафион в растворе. Одна молекула EtOH, восемь молекул воды и катион Pd<sup>2+</sup> расположены вблизи сульфогруппы. Водородные связи показаны пунктирными линиями ( $\epsilon = 33$ ).

### 3.3.3 Взаимодействия в трехкомпонентной системе Нафион-палладиевый электролит-фермент

Далее анализировались взаимодействия между Нафион, GOx и Pd<sup>2+</sup> в смешанном растворе электролита. Методы квантовой химии указывают на возможную адсорбцию катиона на боковых радикалах остатков аминокислот и пептидной группы GOx. Нафион также будет «поглощать» Pd<sup>2+</sup> из внешнего раствора, отдавая протоны, которые будут связываться с буфером. Подтверждением наличия взаимодействий в системе Pd<sup>2+</sup> и GOx с Нафион может быть сдвиг частоты валентных симметричных колебаний SO<sub>3</sub><sup>-</sup> группы Нафиона при анализе ряда ИК спектров: раствор Нафион > раствор Нафион + Pd-электролит > раствор Нафион + Pd-электролит + GOx. Изменение положений максимумов сульфогруппы в спектрах данного ряда может

свидетельствовать о взаимодействии Нафiona с компонентами Pd-электролита и фермента GOx.

Наилучшее соответствие между рассчитанными и наблюдаемыми спектрами колебаний Pd/GOx/Naf было получено в области  $\nu_{\text{calc}}(\text{SO}_3^-_{\text{sym}})$  при  $1049 \text{ см}^{-1}$ . Модель этой структуры представлена на **Рис. 3.5**.



**Рис. 3.5** – Оптимизированная структура репрезентативного фрагмента раствора Нафion + Pd электролит + GOx. Сульфогруппу окружают 6 молекул воды и молекула аргинина, боковой радикал которой сорбировал  $\text{Pd}^{2+}$ . Пунктиром показаны водородные связи.<sup>7</sup>

В оптимизированной модельной структуре гидратационная оболочка сульфогруппы состоит из шести молекул воды и одной молекулы аргинина (с  $\text{Pd}^{2+}$ , адсорбированным на аминокислотных боковых цепях). Отсутствие молекулы спирта внутри расчетной структуры можно объяснить увеличением числа молекул воды при добавлении раствора GOx в *систему 2*, см. **Табл. 3.2**. Хорошее соответствие между расчетными и экспериментальными спектрами было получено для аналогичных структур с лизином ( $1045 \text{ см}^{-1}$ ) и метионином ( $1043 \text{ см}^{-1}$ ).

---

<sup>7</sup> *Примечание:* при оптимизации структура помещалась в среду с  $\epsilon = 55$ .

В случае сульфогруппы Нафиона, расположенной рядом с пептидной группой (в представленном исследовании NMA или NMA + Pd<sup>2+</sup>) модельная структура, гарантирующая совпадение между вычисленными ( $v_{\text{calc}}(\text{SO}_3^-_{\text{sym}})$ ) значениями числа экспериментальных волн для фрагмента Pd/GOx/Naf в растворе получена не была.

Кроме того, важно проанализировать взаимодействия между Нафионом и С-концом аминокислотной последовательности (R – COO<sup>-</sup> из GOx). Поскольку GOx отрицательно заряжен в водном растворе, можно ожидать адсорбции Pd<sup>2+</sup> на карбоксильных группировках (–COO<sup>-</sup>) аминокислот.[227] Однако характерные структуры, включая R – COO<sup>-</sup> – (H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> – Naf – Pd<sup>2+</sup> фрагменты, которые могли обеспечить корреляцию между расчетными и экспериментальными числовыми значениями волн в SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>sym</sub>-области FT-IR спектров получены не были. Отсутствие таких взаимодействий можно объяснить стерическим фактором и значительно меньшим количеством карбоксильных групп, присутствующих в аминокислотах фермента (GOx).

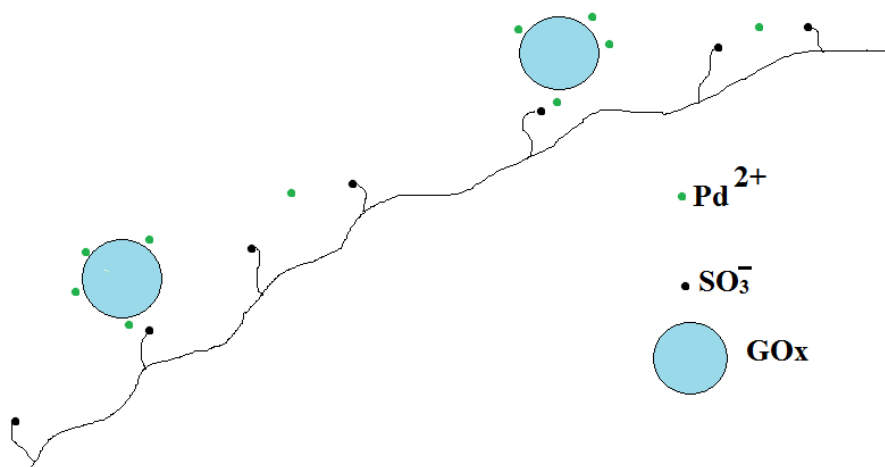
### **3.3.4 Предполагаемая структура поверхности нанобиосенсора с ОНГ пленкой**

В ходе гальваностатической поляризации электрода, находящегося в контакте со смешанным раствором соли хлорпалладиевой кислоты, GOx и Нафионом, происходят одновременно два процесса: выделение водорода и электровосстановление палладия из комплексных ионов, находящихся в приэлектродном слое.

На основе квантово-химического моделирования в сочетании с анализом ИК-спектров и теории ионного обмена, предполагается, что в растворе смешанного электролита, используемого для приготовления одностадийной пленки на поверхности биосенсора, имеет место взаимодействие SO<sub>3</sub><sup>-</sup> групп Нафиона с Pd<sup>2+</sup> и с GOx, сорбирующей катионы Pd<sup>2+</sup>. Таким образом, осаждение GOx на рабочем электроде, являющимся катодом,

свидетельствует об образовании в растворе фермента в виде промежуточного комплекса  $GOx \cdot nPd^{2+}$  с общим положительным зарядом. Только при таком заряде этот ферментный комплекс может соосадиться на катоде. Наибольшая энергия адсорбции катионов палладия на  $GOx$  имеет место в случае их фиксации на боковом радикале остатков аргинина (см. Табл. 3.3). Поэтому наиболее вероятно, что  $Pd^{2+}$  будет сорбироваться именно на данных участках. Результатом взаимодействия данных областей ( $Pd^{2+}-Arg_{GOx}$ ) с сульфогруппой Нафиона в системе Нафион + Pd-электролит +  $GOx$  является образование структур, представленных на Рис. 3.5.

В водно-спиртовом растворе Нафион (система 1, Табл. 3.1) находится в виде совокупности рыхлых кластеров, внутри которых расположены стержнеобразные гидрофобные каркасы, а на периферии – группы  $SO_3^-$ . В растворе смеси Нафион + Pd электролит +  $GOx$  предполагаемая поверхность таких кластеров вследствие адсорбции  $Pd^{2+}$  и  $GOx$  имеет вид, представленный на Рис. 3.6. Аналогичный вид имеет противоположная сторона кластера.

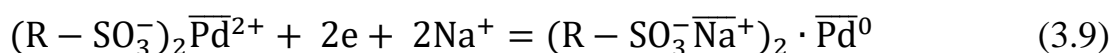
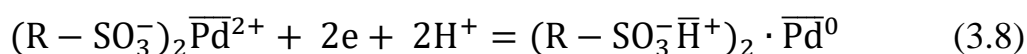


**Рис. 3.6** – Участок предполагаемой поверхности Нафион с катионами  $Pd^{2+}$  и  $GOx \cdot nPd^{2+}$  в растворе Нафион + Pd электролит +  $GOx$ .

Общий заряд комплекса  $GOx \cdot nPd^{2+}$  положителен, но его значение неизвестно, поскольку заряд  $GOx$  отрицателен, а  $n$  - число сорбированных катионов  $Pd^{2+}$  неизвестно. Кластер Нафиона, провзаимодействовавший с  $Pd^{2+}$  и  $GOx \cdot nPd^{2+}$  является электрически нейтральным, аналогично ионообменной

мембране, для которой при ионном обмене имеет место условие электронейтральности.

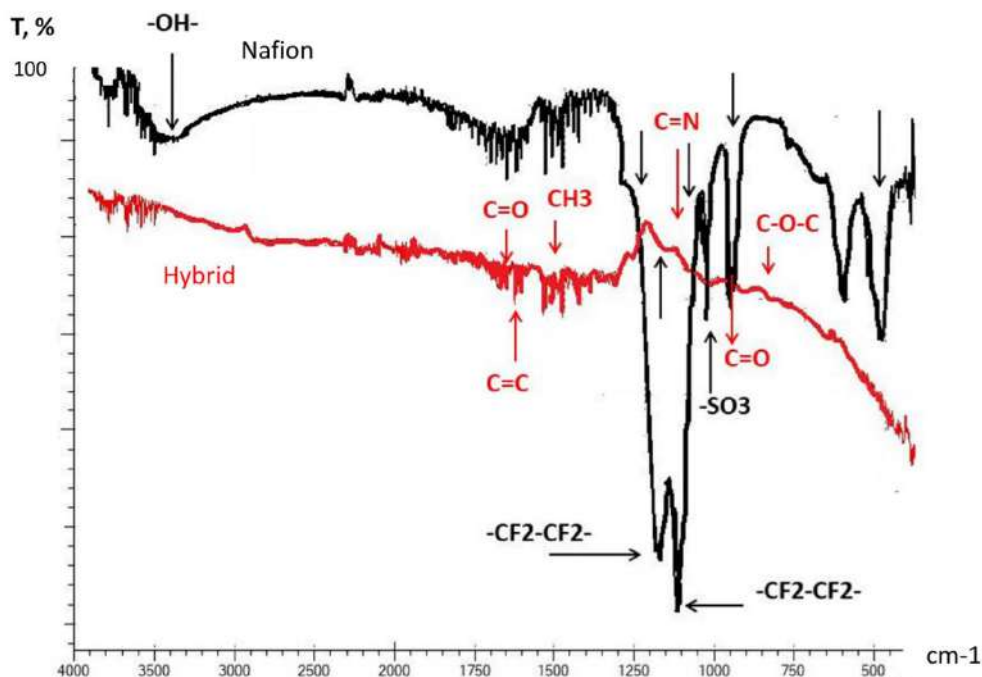
Кроме того, в растворе исследуемой трехкомпонентной смеси возможно существование не взаимодействующего с Нафионом фермента типа  $GOx \cdot nPd^{2+}$ , величина заряда которого положительна. При включении электрического тока катионы палладия восстанавливаются до нейтрального Pd. Восстановление  $Pd^{2+}$  осуществляется в соответствии с уравнениями:



где черта над символом элемента означает его принадлежность фазе Нафион, ее отсутствие – фазе раствора.

Поскольку в растворе имеются катионы водорода и натрия, то Нафион в ходе восстановления  $Pd^{2+}$  будет переходить в водородную и натриевую формы. Данный вывод подтверждается наличием в гибридном покрытии структур типа  $SO_3H$  и  $SO_3Na$ , **Рис. 3.7**.

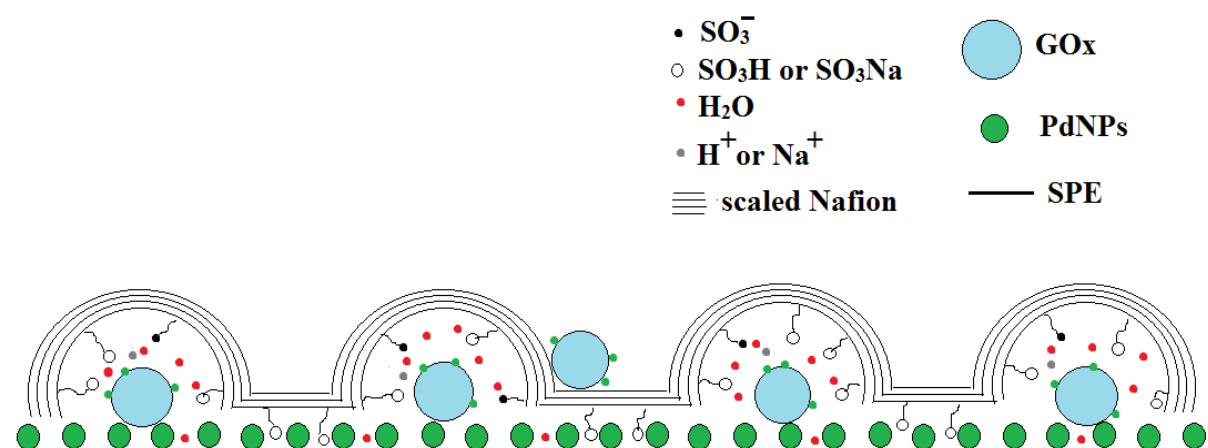
В этой связи, можно предположить следующую последовательность формирования гибридного покрытия. Катионы Pd, не связанные с Нафионом и GOx раньше достигают поверхности электрода, поскольку гидратированный  $Pd^{2+}$  имеет положительный заряд и более мобилен по сравнению с полимером или ферментом, что приводит к началу формирования на поверхности электрода наночастиц  $Pd^0$ . Затем происходит осаждение фермента в форме  $GOx \cdot nPd^{2+}$ , поскольку он положительно заряжен и имеет меньшие размеры, чем нейтральный кластер Нафиона, адсорбированный фермент и палладий. Осаждение Нафиона происходит в последнюю очередь вследствие его большего размера и нейтрального заряда.



**Рис. 3.7** – ИК-спектры, записанные в режиме трансмиссии с поверхности пленки индивидуального Нафiona (*черный спектр*), высушенной на воздухе, и соскоба пленки с поверхности гибридного нанобиосенсора (*красный спектр*).

Важно отметить, что для кластера Нафiona характерно неравномерное распределение электронной плотности. Так, вблизи сульфогруппы имеет место область отрицательного заряда, а над поверхностью сорбированного Нафионом фермента  $GOx \cdot nPd^{2+}$  заряд положителен вследствие наличия катионов палладия. В ходе осаждения кластер Нафiona поворачивается к катоду поверхностью, на которой сорбировано большее количество  $Pd^{2+}$  и  $GOx \cdot nPd^{2+}$ , т.е. стороной с большим количеством фермента. Таким образом, в нижнем слое покрытия преимущественно находятся наночастицы Pd, в следующем слое гибридной пленки – преимущественно фермент в форме  $GOx \cdot nPd^0$  и молекулы воды, и, наконец, в верхнем слое располагается Нафион. Предполагаемая поверхность гибридного покрытия нанобиосенсора представлена на **Рис. 3.8**.





**Рис. 3.8** – Идеализированная структура предполагаемой поверхности нанобиосенсора с ОНГ пленкой. Основное количество фермента сорбируется на Pd-NPs и закрывается Нафионом, что упрочняет его фиксацию на поверхности трафаретного SPE/GO электрода.[228]

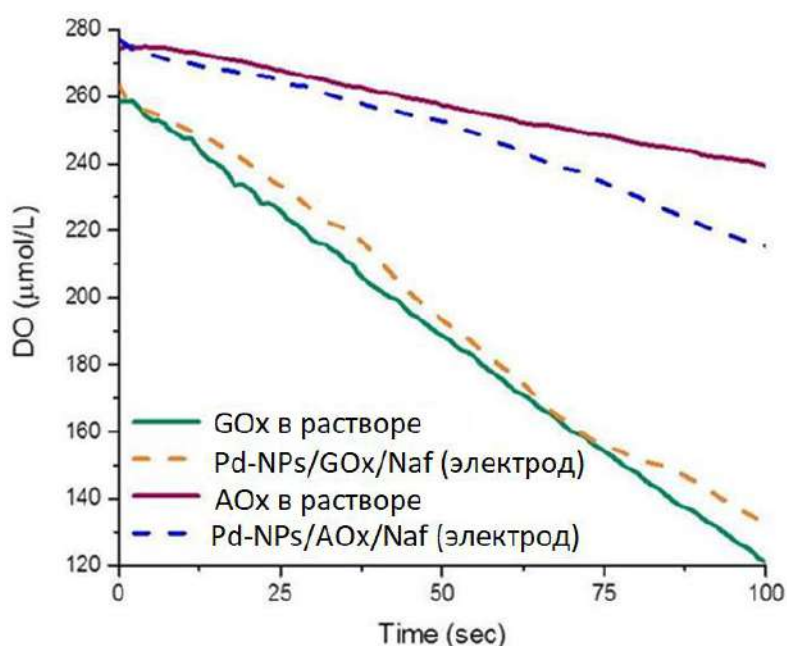
Подводя итог, следует отметить, что палладиевые наночастицы (Pd-NPs) преимущественно расположены в первом слое гибридного покрытия с последующим промежуточным слоем на основе фермента, который сверху «закрывает» Нафионом. При этом Нафионовый слой представлен как полупроницаемая мембрана с порами. В противном случае, диффузия аналита к внутреннему слою, содержащему фермент, будет невозможной.

Финальная структура гибридного Pd-NPs/GOx/Naf слоя, сформированного на электроде, представляет собой металл-полимерный каркас (Pd-NPs внизу и Нафион вверху) с иммобилизованными молекулами GOx в середине этой архитектуры. Иными словами, слой фермента как бы инкапсулирован в металл-полимерный каркас, что, вероятно, и будет обеспечивать его высокую механическую стабильность при последующих экспериментах в водных растворах.

### 3.4 Стандартизация капсульной структуры ОНГ пленки, содержащей биополимерный компонент

#### 3.4.1 Методы наноаналитики для стандартизации нанобиосенсоров с ОНГ пленками

После соосаждения из раствора смешанного электролита, содержащего фермент, прекурсоры полимера и прекурсоры ионов палладия в соотношении 1:1:1 (v/v/v) при pH 7 ферменты сохраняли ~90-100 % активности по сравнению с их активностью в растворах, Рис. 3.9.



**Рис. 3.9** – Отклик оптического кислородного микросенсора (выражается в количестве молей растворенного кислорода, мкмоль/л). Активность (GOx) и (AOx) (пунктирная линия) после совместного соосаждения в течение 30 с с Нафионом и Pd-NPs в сравнении с активностью этих же ферментов в растворе (сплошная линия) в присутствии 100 мМ растворов глюкозы и этанола, соответственно.

Факт сохранения активности ферментов после их соосаждения на электродах при соблюдении оптимального соотношения между активными компонентами раствора синтеза позволяет предположить, что в ходе

электролиза серьезных конформационных изменений с ферментами из группы оксидаз не происходит.

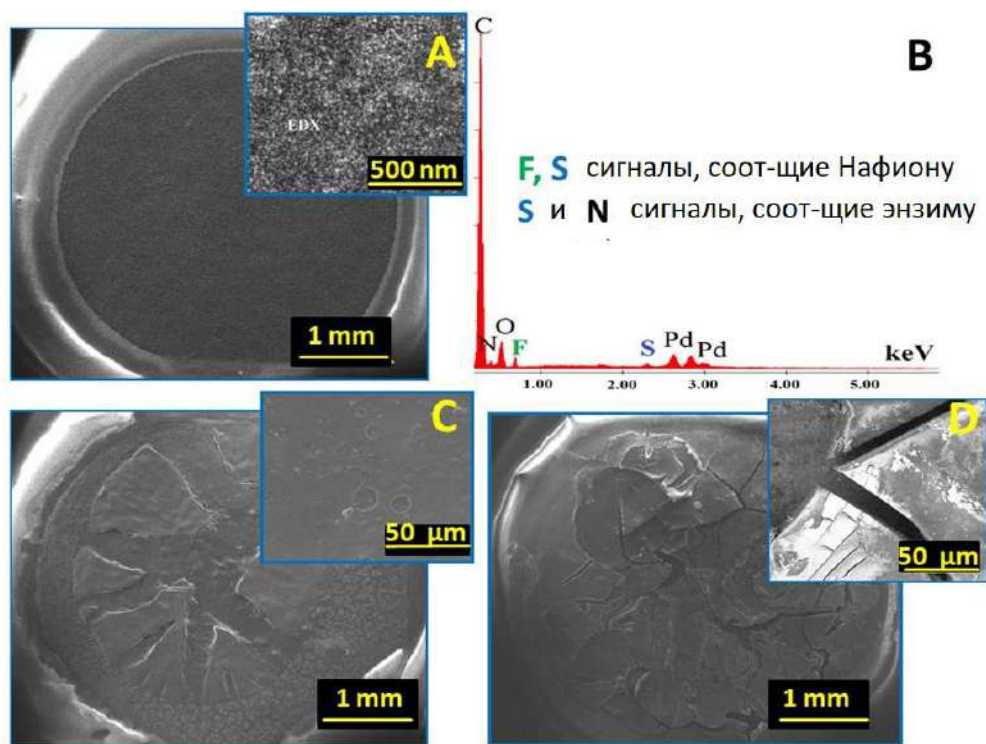
В силу того, что активность ферментов измеряли непосредственно на электроде в присутствии целевого анализата/субстрата можно сделать два важных обобщения:

*~ фермент находится либо в адсорбированном состоянии на поверхности гибридного слоя, что непременно повлекло бы его быстрое и практически мгновенное вымывание (этого не наблюдалось в ходе многостадийных исследований, см. также **Рис. 2.7**);*

*~ фермент инкапсулирован в металл-полимерную капсулу, но анализат/субстрат способен диффундировать через поры в пленке гибридного полимерного компонента вглубь этой капсульной структуры, где и происходит его взаимодействие с ферментом.*

В пользу капсульной структуры говорит тот факт, что после иммобилизации с наночастицами благородных металлов и прекурсорами полимеров ферменты группы оксидаз остаются активными в течение, как минимум 120-150 циклов, что было бы невозможно в случае простой адсорбции ОНГ слоя на поверхности электрода. Иными словами, быстрого вымывания водорастворимых ферментов из металл-полимерной капсулы не происходит.

Примечательно, что морфология поверхности нанобиосенсоров с пленками, сформированными методом одностадийного электрохимического нанесения из растворов смешанных электролитов, представляла собой однородно распределенные по поверхности гибридные наночастицы со средним размером 10 – 15 нм с иммобилизованным биоорганическим слоем (**Рис. 3.10 А,В** – показано для Pd-NPs). Важно отметить, что морфология полученных гибридных наночастиц сохранялась стабильной на протяжении как минимум двух лет: не наблюдалось ни агломерации частиц на поверхности электрода, ни их перегруппировок.



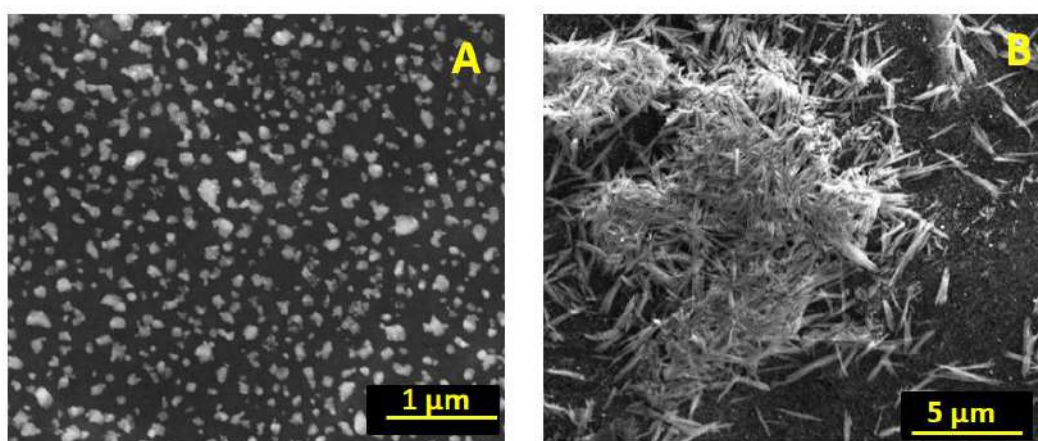
**Рис. 3.10** – (А) Микрофотографии и EDX-спектр (В) поверхности нанобиосенсора, полученного методом соосаждения из трехкомпонентного раствора электролита (Pd-электролит/GOx/Нафийон, 1:1:1 v/v) при катодном токе -2.5 мА в течение 30 с. (С, D) – Микрофотографии поверхности LbL-биосенсоров с GOx и АОx, соответственно.

Элементный EDX анализ выявил присутствие в гибридном слое как полимера (показано для Нафийона, устойчивые F- и S-сигналы), так и иммобилизованного фермента (N- и S-сигналы). Эти данные позволяют сделать промежуточный вывод об успешности проведенной процедуры одностадийной иммобилизации всех реагентов многокомпонентной смеси в процессе осаждения наночастиц на поверхность электрода.

Очевидно, что сформированная однородная поверхность будет иметь ряд преимуществ в сравнении с поверхностью биосенсоров, полученных по LbL-технологии (Рис. 3.10 С, D).[229] Для биосенсоров, синтезированных по многослойной технологии сборки, на поверхности были выявлены многочисленные дефекты и трещины.

Интересно, что морфология поверхности ОНГ пленок, сформированных при инкапсуляции ферментов и полимеров из растворов Ag-электролита, значительно отличалась от морфологии гибридных пленок, полученных из растворов Pd-электролита, **Рис. 3.11**.

Так, гибридные наночастицы объединялись в более крупные агломераты со средним размером 80 – 100 нм. Кроме того, плотность и распределение таких частиц по поверхности рабочего электрода была значительно меньше, чем для аналогов, сформированных из Pd-электролита. Более того, SEM анализ одних и тех же нанобиосенсоров на основе Ag-NPs непосредственно после их производства (**Рис. 3.11А**) и после 4 месяцев хранения (**Рис. 3.11В**), выявил значительные изменения в морфологии таких гибридов вследствие многостадийных процессов перегруппировок.



**Рис. 3.11** – SEM-изображения поверхности гибридного нанобиосенсора с пленкой Ag-NPs/GOx/Naf, полученной электролизом смешанного раствора электролита при -3 mA в течение 60 с. (А) – микрофотография поверхности получена непосредственно после производства ОНГ нанобиосенсора и после его хранения в течение 4 мес (В).

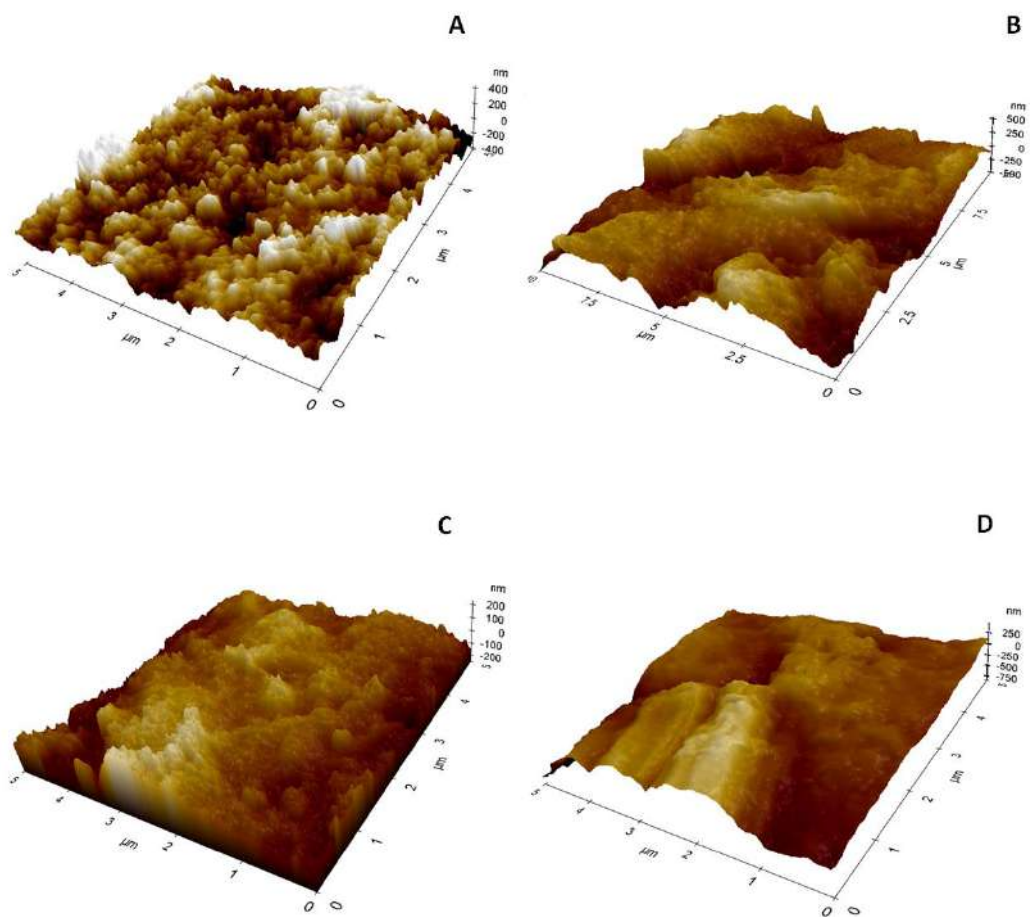
Полученный результат находится в согласии с ранее сообщаемой тенденцией изменения структуры наночастиц серебра (Ag-NPs) с течением времени.[230] В этом случае, для поддержания стабильности системы в

реагентную смесь необходимо вводить дополнительные стабилизаторы Ag-NPs (например, цитраты), что неизбежно повлияет на тип, химическую чистоту и интенсивность получаемого аналитического сигнала с поверхности нанобиосенсоров.

Далее с помощью AFM изучалась топология трафаретных SPE/GO электродов до и после осаждения как индивидуальных Pd-NPs, так и гибридных Pd-NPs/Naf, Pd-NPs/GOx, Pd-NPs/GOx/Naf, **Рис. 3.12**.

Следует отметить, что при переходе от чистого SPE/GO до гибридного GO/Pd-NPs/GOx/Naf слоя наблюдалось значительное улучшение в однородности пленок (оцененное как среднеквадратичная шероховатость,  $R_q$ ), что в свою очередь может привести к улучшенному распределению заряда по поверхности нанобиосенсора. Средняя толщина слоя с гибридными наночастицами Pd-NPs/GOx/Naf, оцененная методом AFM, находилась в диапазоне  $14 \pm 9$  нм. Это значение соответствовало толщине, рассчитанной по закону Фарадея на основе данных, полученных с помощью метода пьезокварцевого микровзвешивания QCM ( $12 \pm 1$  нм), см. **Приложения, Рис. ПЗ.4**.

Интересно, что анализ методами AFM и QCM выявил две области с различной толщиной функционального слоя в конечной структуре гибридной капсулы: *1 уровень* соответствовал Pd-NPs/Naf, *2 уровень* – Pd-NPs/GOx/Naf. Предполагается, что наименьшая толщина слоя соответствует *1 уровню* (Pd-NPs/Naf) с диаметром  $d_1 \sim 9$  нм и вторая часть слоя соответствует *2 уровню* (Pd-NPs/GOx/Naf) с  $d_2 \sim 14$  нм. При этом толщина Pd-NPs, образующихся при гальваническом соосаждении в отсутствие Нафиона и GOx (см. **Рис. ПЗ.4**), составляет  $\sim 24$  нм. Это наблюдение доказывает выдвинутое ранее предположение, что некоторые катионы  $Pd^{2+}$  из раствора смешанного электролита «потребляются» для взаимодействия с Нафионом и GOx (см. **Раздел 3.3**), а также формирование капсульной структуры гибридной пленки, см. **Рис. 3.8**.

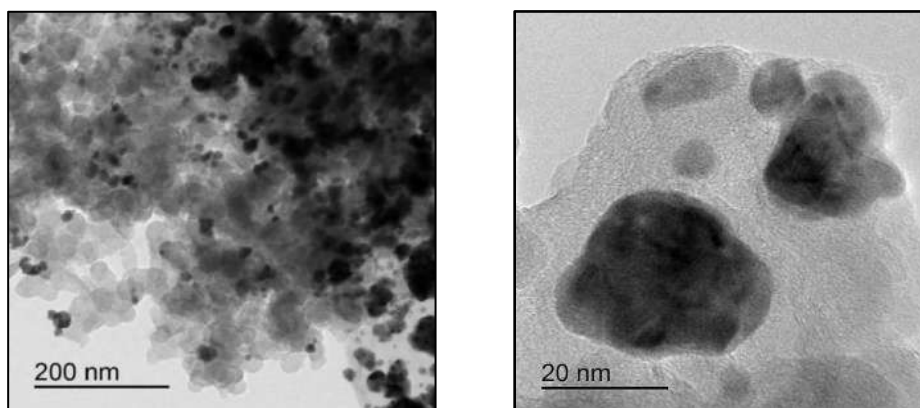


**Рис. 3.12** – AFM-изображения поверхности чистого электрода SPE/GO (A), электрода, модифицированного индивидуальными Pd-NPs, GO/Pd-NPs (B), гибридными GO/Pd-NPs/Naf (C) и GO/Pd-NPs/GOx/Naf (финальная структура функционального слоя) наночастицами, D.

Кроме того, наблюдаемые существенные морфологические различия в системах подразумевают и разные молекулярные взаимодействия, приводящие к образованию гибридных пленок в двух- и трехкомпонентных системах. Иными словами, осаждение Pd-NPs из различных растворов электролитов (на примере чистого Pd-электролита, смеси Pd-электролита с Нафионом и многокомпонентного раствора Pd/GOx/Nafion) на поверхности SPE/GO, скорее всего, происходит по разным механизмам.

Наконец, предложенная выше модель формирования гибридной пленки (см. **Рис. 3.8**) была подтверждена методом просвечивающей микроскопии.

Полученные данные однозначно указывают на капсульный характер сформированной гибридной пленки, **Рис. 3.13**. Так, в центре этой шароподобной структуры находится наночастица (неорганический компонент), окруженная гибридным биоорганическим слоем (биоорганический компонент).



**Рис. 3.13** – ПЭМ-изображения, полученные для соскоба гибридной Pd-NPs/GOx/Naf пленки с поверхности трафаретного SPE/GO электрода.

Так как ПЭМ-исследования были проведены для нанобиосенсоров после их многократного использования для определения глюкозы в буферных растворах, то можно сделать вывод о том, что биоорганический слой не подвержен быстрому вымыванию. Противоположный результат следует ожидать в случае простой физической адсорбции биоорганического компонента на слое наночастиц.

Стоит отметить, что методом ПЭМ было невозможно разделить гибридный слой биоорганического компонента, окружающего Pd-NPs, *т.е.* разделить визуализировать присутствие полимера или фермента. В этой связи, поверхность нанобиосенсоров с функциональными гибридными пленками подвергалась дальнейшему анализу с помощью ранее разработанных протоколов, в том числе с использованием LDI-MS биохимического сканирования (см. Главу 2).



### 3.4.2 Контроль инкапсуляции ферментов при электрохимическом соосаждении ОНГ пленки

На следующем этапе было важно проверить может ли LDI-MS, используемый в качестве «биосканера», поддерживать весь путь контроля состава ОНГ нанобиосенсоров, синтезированных по одностадийной методике, включая скрининг ферментов.

На основании мониторинга характеристических фрагментов Нафтона и фермента/соответствующего кофактора (низкомолекулярный биоаналит) возможно судить об успешности процедуры инкапсуляции/соосаждения обоих компонентов на поверхности трафаретных электродов. Независимо от методики приготовления функциональной пленки (архитектура, послойное нанесение, количество слоев, процедура электролиза и пр.), только присутствие специфического фермента может гарантировать надежный и селективный отклик амперометрического биосенсора (ферментативные биосенсоры).

Синтез нанобиосенсоров по одностадийной методике основан на одновременной инкапсуляции фермента с полимером и Pd-NPs из фосфатного электролита на поверхности электрода. Однако насколько известно, до сих пор не существует биоаналитического метода, который можно было бы использовать для подтверждения совместного осаждения фермента из растворов смешанных электролитов. Так, амперометрические исследования, основанные исключительно на калибровочных зависимостях, не всегда могут рассматриваться как информативный электроаналитический подход, гарантирующий присутствие инкапсулированного фермента в общей архитектуре биосенсора. Полученный амперометрический отклик может быть получен в результате прямого электрохимического окисления аналита из-за присутствия металлических наночастиц (на этом принципе основана работа неферментных биосенсоров, см. Главу 1). Иными словами, в рассматриваемом случае Pd-NPs (без инкапсулированного GOx) могут также способствовать

превращению глюкозы в глюконовую кислоту посредством прямого переноса электронов, приводящего к появлению токовых откликов (АМ-сигнал). Для того, чтобы исключить эти предположения, необходимо гарантировать успешную инкапсуляцию фермента совместно с Pd-NPs и полимером во время одностадийного или мультстадийного электролиза.

В этом отношении «LDI-MS-биосканер» может стать возможным решением для контроля инкапсуляции фермента при совместном соосаждения с наночастицами благородных металлов, а также для изучения и визуализации процессов, происходящих в гибридном слое – «нанокапсуле».

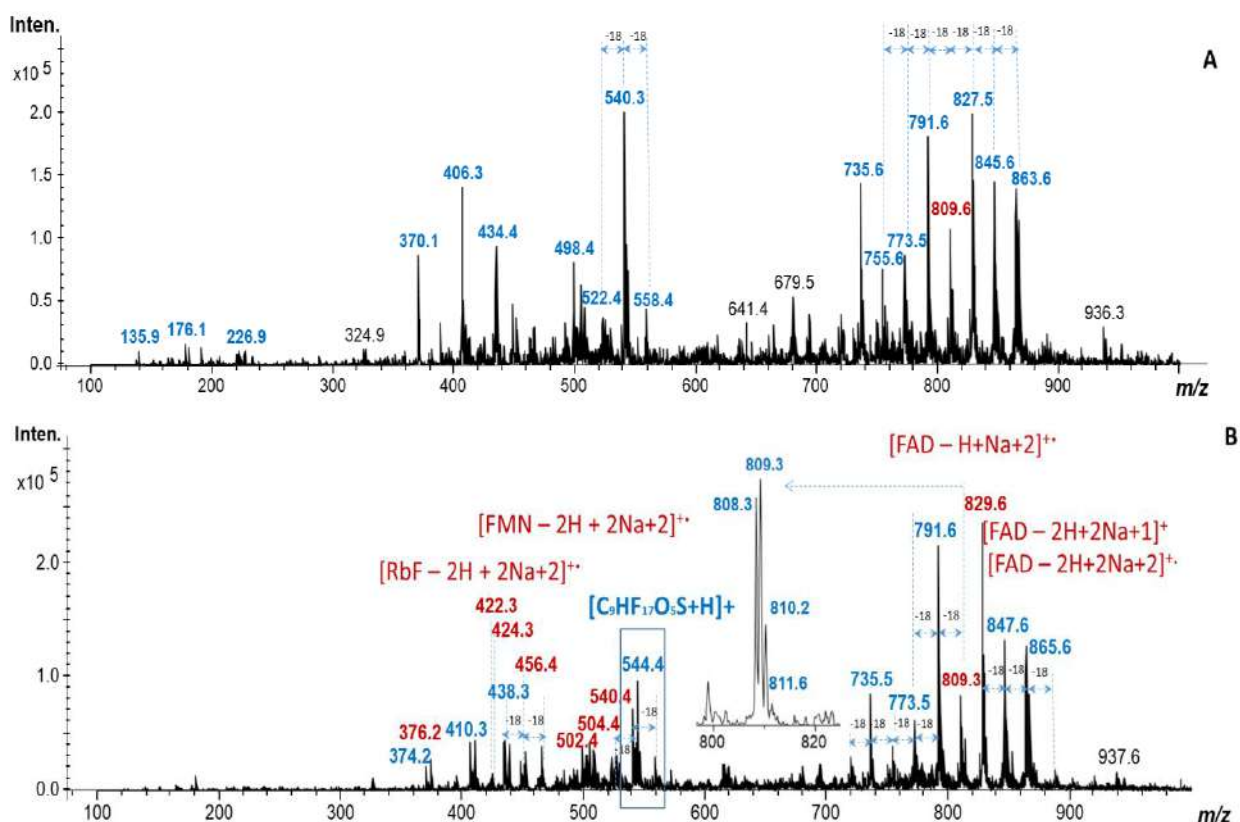
#### **3.4.2.1 Химическое доказательство присутствия фермента, полимера и воды в гибридной функциональной пленке**

Далее изучали масс-спектрометрические отклики, полученные с помощью LDI-MS сканирования с поверхности нанобиосенсоров. Прежде всего, было важно идентифицировать типы основных ионов, которые связаны с инкапсулированным ферментом. Важным результатом, наблюдаемым в этом эксперименте, было наличие в спектре кофактора флавинадениндинуклеотида (FAD), **Рис. 3.14А**. В отличие от целой молекулы фермента (~80 кДа), FAD – это низкомолекулярное органическое соединение, которое легко может быть ионизировано с поверхности оксида графена (GO, поверхность рабочего электрода) по алгоритму SALDI-MS.

Для проверки идентичности формирующихся фрагментов с поверхности нанобиосенсора и их возможной принадлежности к кофактору FAD, далее из растворов смешанных электролитов проводили инкапсуляцию индивидуального кофактора совместно с Нафионом и Pd-NPs.

При ионизации индивидуального FAD с поверхности нанобиосенсора было зарегистрировано его несколько аномальное спектральное поведение. Так, в дополнение к ожидаемым формирующимся ионам  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ , в масс-спектрах были обнаружены необычные типы ионов  $[M-H+Na]^+$ ,  $[M-H+Na+1]^+$ ,  $[M-H+Na+2]^+$ ,  $[M-2H+2Na]^+$  и  $[M-2H+2Na+1]^+$ , **Рис. 3.14В**. Также

наблюдалось образование ионов, соответствующих более низкомолекулярным видам флавинов, включая флавиновый моноклеотид (FMN) и рибофлавин (RbF), а также трансформациям, связанных с переносом четного числа электронов.[231] Можно предположить, что механизм, лежащий в основе этого пути ионизации, аналогичен тому, что происходит в биологических окислительно-восстановительных системах в отличие от классического механизма транспорта протона.

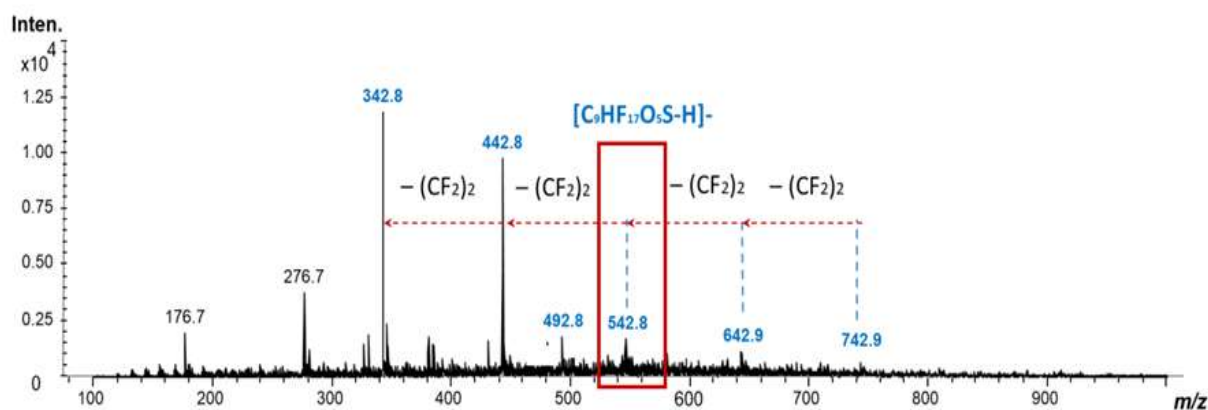


**Рис. 3.14** – Масс-спектры, полученные в положительном режиме ионизации с поверхности (А) ОНГ нанобиосенсора с инкапсулированным GOx; (В) нанобиосенсора с инкапсулированным FAD (250 нг/мкл) в присутствии Нафiona и Pd-NPs.<sup>8</sup>

В масс-спектрах, записанных в отрицательном режиме ионизации с поверхности гибридного нанобиосенсора, полученного при совместном

<sup>8</sup> Все нанобиосенсоры были получены согласно предложенной методике одностадийного синтеза.

соосаждении Нафiona, GOx и Pd-электролита, отчетливо видны повторяющиеся фрагменты  $CF_2^-$ , соответствующие Нафиону, **Рис. 3.15**. Таким образом, с помощью LDI-MS сканирования было возможно визуализировать как полимерный компонент нанобиосенсора, так и сам биорецептор после проведенной процедуры электрохимического соосаждения/инкапсуляции.



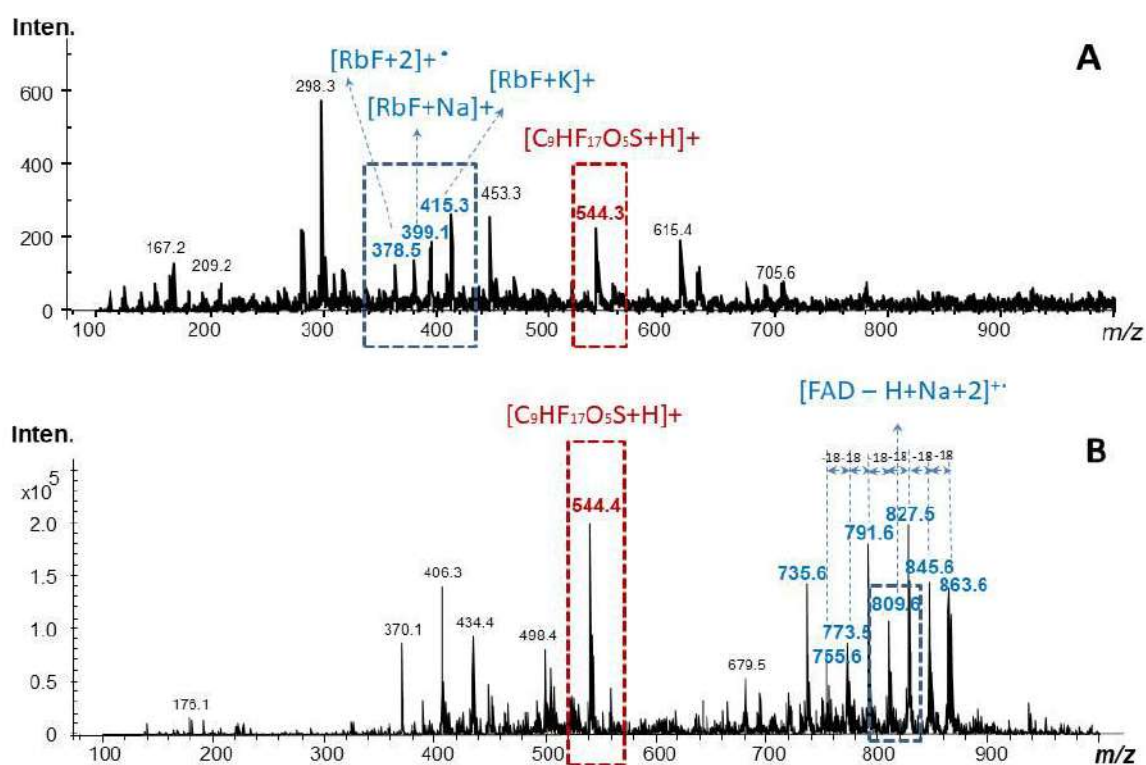
**Рис. 3.15** – Масс-спектр, записанный с поверхности нанобиосенсора с ОНГ пленкой в отрицательном режиме ионизации.

Другим важным наблюдением этой серии экспериментов и результатом разработки биохимического сканирования является возможность визуализировать молекулы воды непосредственно в структуре гибридного нанослоя/ОНГ пленки, **Рис. 3.14А**. В положительном режиме ионизации а масс-спектре, записанном с поверхности ОНГ нанобиосенсора, отчетливо видны кластеры воды (18 аму). Это наблюдение было важным, поскольку количество воды, удерживаемой в структуре фермента, может непосредственно коррелировать с его каталитической активностью.[222,223] Кроме того, наличие воды в гибридном слое определяет стабильность биосенсоров во время их хранения и эксплуатации.

Полученные экспериментальные данные хорошо коррелируют с моделированием процессов формирования биокластеров в растворах смешанных электролитов, включающих присутствие молекул воды в

гибридной пленке (см. **Рис. 3.5** и **Рис. 3.8**).

Аналогичным образом визуализировали инкапсуляцию других ферментов группы оксидаз, включая АОх и LOх. Так, в масс-спектрах, полученных после иммобилизации LOх (**Рис. 3.16А**), фиксировали появление пиков, соответствующих рибофлавины (RbF, является фрагментом мононуклеотида флавина (FMN)):  $[M+H]^+$  при  $m/z$  377.5 и  $[M+2]^+$  при  $m/z$  378.5.[234]



**Рис. 3.16** – LDI-MS спектры, полученные с поверхности нанобиосенсоров с инкапсулированным (А) LOх (в качестве кофактора использует FMN), и (В) АОх (использует аналогичный GOх кофактор, FAD).

Масс-спектральное поведение, подобное ионизации GOх, было обнаружено и при ионизации АОх (использует FAD в качестве кофактора аналогично GOх), **Рис. 3.16В**. Присутствие кластеров воды было обнаружено во всех масс-спектрах, записанных с поверхности нанобиосенсоров с ОНГ

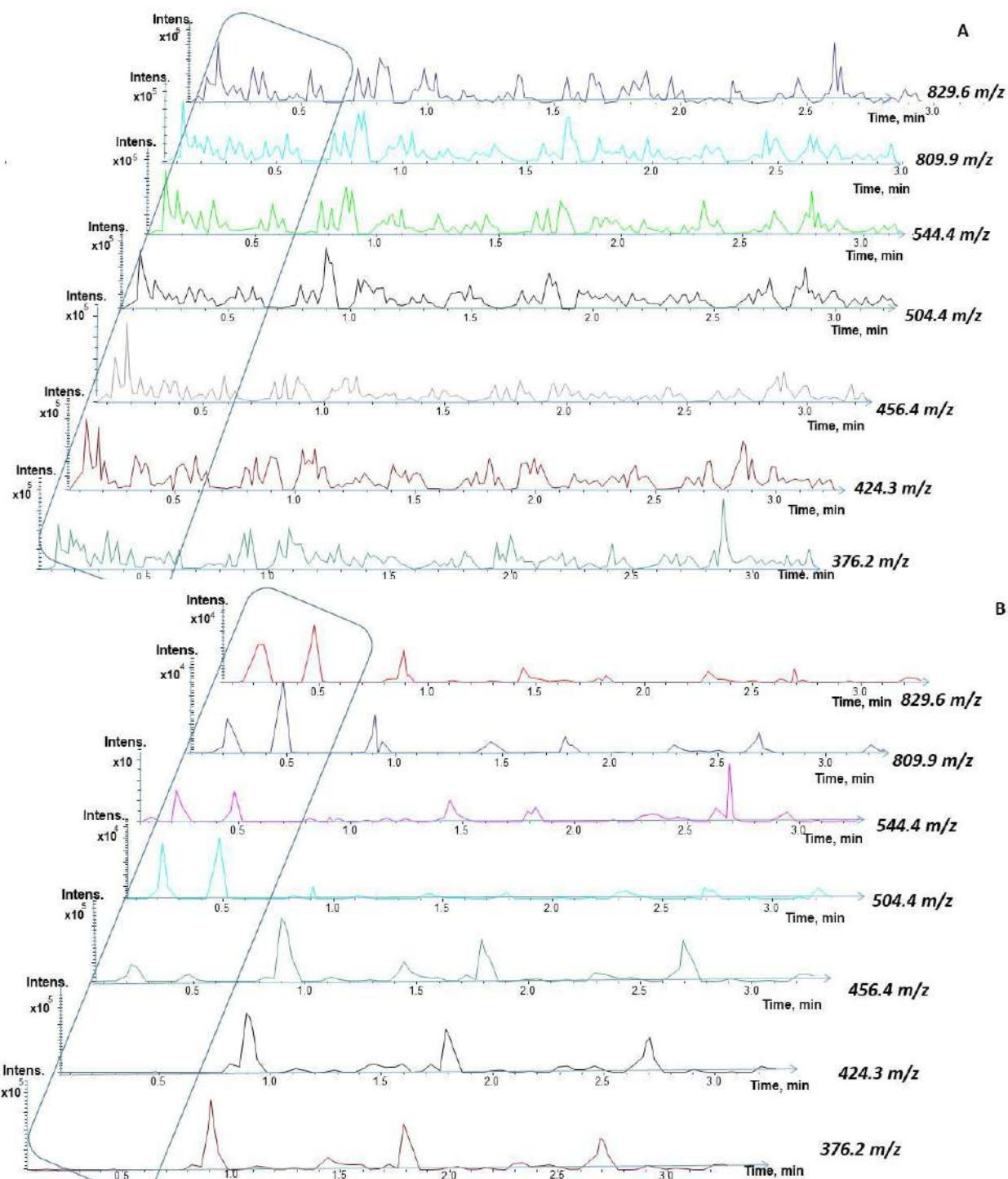
пленками независимо от типа соосаждаемого фермента и природы кофактора.

### **3.4.2.2 Принципы стандартизации ОНГ нанобиосенсоров на основе платформы LDI-MS биосканирования**

В ходе экспериментов было доказано, что обработка поверхности нанобиосенсоров лазером в течение 45 с была достаточной для визуализации разницы между биохимическим профилем нанобиосенсоров, синтезированными по одностадийной методике и их LbL аналогами, см. **Рис. 3.17**. Так, для нанобиосенсора дизайна Pd-NPs/GOx/Naf были записаны непрерывные хроматографические пики в режиме экстракции целевых ионов, EIC, с аналогичным распределением интенсивности сигналов в течение всего сканированного периода по сравнению с нерегулярными зигзагообразными пиками, полученными с поверхности LbL биосенсора. Кроме того, качество аналитической информации, получаемой с поверхности ОНГ нанобиосенсоров, синтезированных по новой одностадийной методике, было намного выше по сравнению с LbL аналогами. Это явление можно объяснить наличием Pd-NPs в архитектуре одностадийных нанобиосенсоров, эффективно поглощающих энергию лазера (см. Главу 5). Таким образом, такие информативные хроматограммы, записанные с поверхности нанобиосенсоров в течение 45 с, могут помочь установить даже незначительное качественное или количественное различие в их конструкции или условиях эксплуатации.

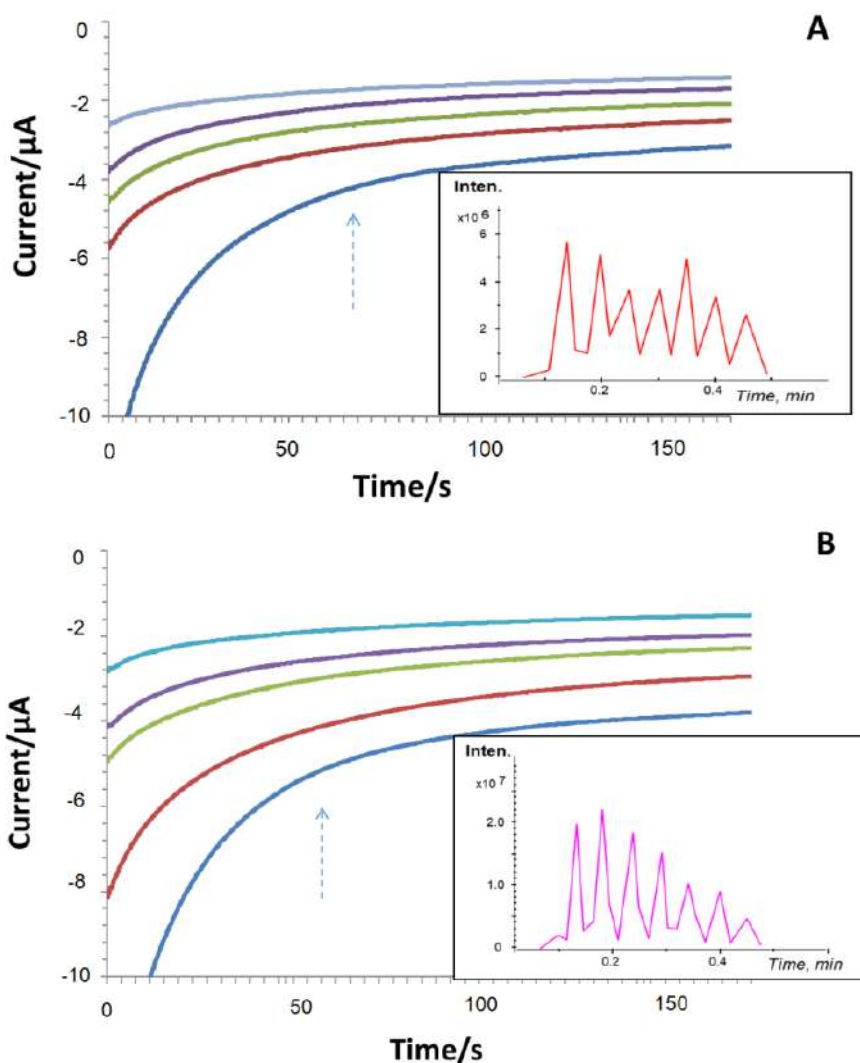
Далее была изучена оценка потенциала платформы LDI-MS биохимического биосканирования при оценке воспроизводимости синтеза ОНГ нанобиосенсоров, синтезируемых в рамках одной партии. Несмотря на очень схожий биохимический профиль, записанный в TIC режиме в течение первых 45 с для двух нанобиосенсоров из одной и той же партии (**Рис. 3.18**), была обнаружена четкая разница в их поведении в EIC режиме, см. **Приложения Рис. П3.5**. Этот результат может быть интерпретирован

небольшим различием в поверхностной химии ОНГ нанобиосенсоров, синтезированных по новой одностадийной методике.



**Рис. 3.17** – LDI-MS EIC хроматограммы поверхности (А) Pd-NPs/GOx/Naf нанобиосенсора, полученного по новой методике и (В) LbL биосенсора на основе PB/GOx/Naf. EIC хроматограммы соответствуют наиболее

репрезентативным ионам GOx/FAD ( $m/z$  376.2; 424.3; 456.4; 504.4; 809.6; 829.6) и Нафиона ( $m/z$  544.4) в **Рис. 3.14**.



**Рис. 3.18** – Хроноамперометрические зависимости, полученные в растворах глюкозы (стрелками показано увеличение концентрации глюкозы от 0 до 40  $\mu\text{M}$  с шагом 10  $\mu\text{M}$ ) с поверхности новых Pd-NPs/GOx/Naf нанобиосенсоров из одной партии (нанобиосенсор 1 – **A** и нанобиосенсор 2 – **B**) при приложенном потенциале -0.08 В. Вставки – LDI-MS профиль, полученный в TIS режиме в течение 45 с, лазер 45%.

Таким образом, сравнение химических профилей ОНГ нанобиосенсоров и формирование базы данных спецификаций делает возможной стандартизацию процесса их изготовления. Общие принципы стандартизации



с использованием подхода LDI-MS сканирования [235] обобщены в **Приложении на Рис. ПЗ.6.**

Помимо контроля биохимического профиля поверхности метод LDI-MS сканирования позволил установить количество соосажденного Нафиона в сравнении со слоистой LbL архитектурой, см. **Табл. 3.4.** Эффективность осаждения Нафиона по методу послойного нанесения оказалась крайне низкой по сравнению с новым одностадийным подходом: 11% против 78%, соответственно. Низкие значения количеств осажденного Нафиона на электрод по методу капли можно объяснить различием в растворимости реагентов, их растеканием по поверхности и испарением. Эти эффекты сведены к минимуму в ходе электролитического формирования пленки.

**Табл. 3.4** – Количественные характеристики соосаждения Нафиона<sup>9</sup>

Синтез	Градуировочная зависимость	R <sup>2</sup>	Количественное значение, найденное по градуировочной зависимости, нг/пятно	Эффективность осаждения, %
Послойное нанесение электрод методом капли, LbL	$y = 2.7681x + 10423$	0.9803	350±17	11.29
Одностадийное формирование из раствора смешанного электролита	$y = 0.052x - 3.3333$	0.9995	676±23	78.07

<sup>9</sup> Данные получены путем экстракции значений из EIC спектров,  $m/z$  544.

### 3.4.3 Возможна ли капсульная структура построения гибридного ОНГ слоя в условиях изменения числа и природы компонентов в растворе?

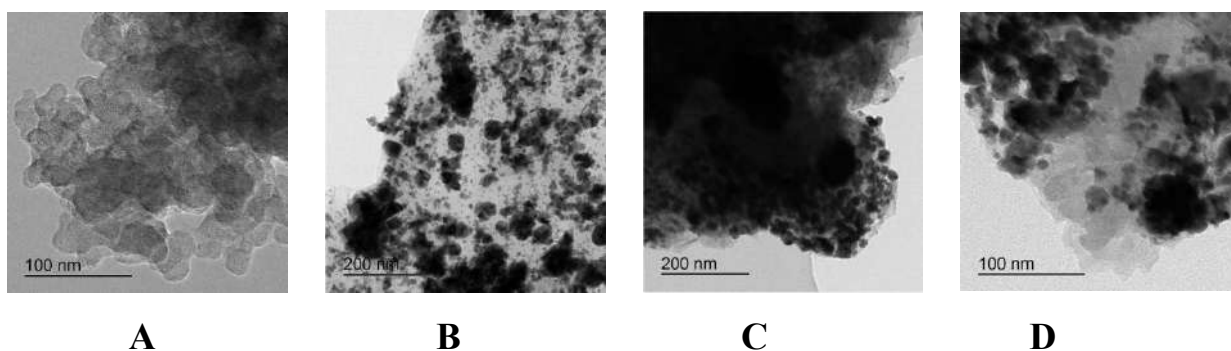
LDI-MS подход биохимического сканирования поверхности биосенсоров оказался эффективным и при мониторинге процедуры инкапсуляции ферментов, проводимой из многокомпонентных растворов электролитов при изменении исходного протокола синтеза, в том числе, режима электролиза, числа и типа активных компонентов в растворе. Было установлено, что при электроосаждении ферментов из 4-компонентных растворов (вводили дополнительный кофактор в электролит, отдельный 4 компонент смеси) не происходило соосаждения ни кофактора, ни фермента (тестировались системы фермент/кофактор Pd/Naf/GDH/NAD<sup>+</sup> и Pd/Naf/ADH/NAD<sup>+</sup>), см. **Приложения Рис. П3.7**. Полученные сенсоры не проявляли ни ферментативной, ни электрохимической активности по отношению к тестируемым биоаналитам (*данные не показаны*). Предполагается, что в таких условиях синтеза вместе с наночастицами благородных металлов происходит соосаждение только полимерного органического компонента. Образование промежуточных биокластеров, по-видимому, тормозится обширными конкурентными процессами, протекающими одновременно в четырехкомпонентном растворе электролита.

Это предположение находится в согласии с результатами, показанными в работе [236]. Так, соосаждение из четырех- компонентного раствора, содержащего фермент алкоголь-дегидрогеназу (ADH), и внешний кофактор NAD<sup>+</sup> сопровождалось лишь незначительным нанесением на электрод слоя палладиевых наночастиц совместно с Нафионом (см. также **Приложения Рис. П.3.7**). В случае реальной инкапсуляции биорецептора из 4-х компонентного раствора электролита (Pd/Naf/ADH/NAD<sup>+</sup>), NAD<sup>+</sup>, кофактор (как малая молекула) должен визуализироваться при  $m/z$  664. Однако фрагменты, соответствующие NAD<sup>+</sup> не были обнаружены в масс-спектрах. Именно из-за отсутствия инкапсулированного фермента при последующем

электрохимическом определении бутанола таким ОНГ нанобиосенсором никакого аналитически значимого сигнала, кроме электрохимического восстановления кислорода в катодной области на наночастицах палладия, допированных Нафионом, авторам работы [236] зарегистрировать не удалось. Уменьшение отрицательных токов в катодной области с увеличением концентрации аналита (бутанола) вне зависимости от типа фермента (использовались как ферменты группы оксидаз, работа которых зависит от кислорода, так и дегидрогеназ, работа которых не зависит от количества кислорода) дополнительно подтверждает этот факт [236], см. также Главу 4.

В противоположность процессу соосаждения из 4-компонентного раствора, соосаждение фермента из двухкомпонентного раствора электролита представляется возможным. Согласно данным ПЭМ при электрохимическом соосаждении фермента также возможно образование капсуло-подобной структуры. Интересно, что в поверхностном слое такой гибридной пленки наночастицы металла не визуализировались (**Рис. 3.19А**, показано на примере Pd-NPs и GOx). В этом случае преимущественно поверхность состояла из органических наноразмерных частиц фермента. Однако практическое использование таких пленок в целях биосенсорики не оправдало себя. Так, вследствие интенсивного вымывания биорецептора (в условиях отсутствия полимерного связующего при формировании капсульной структуры) наблюдается интенсивное падение аналитического сигнала при определении биоаналитов вплоть до исходной базовой линии сенсора уже после первых испытаний. Электроанализ в таких условиях не представляется эффективным.

Удаление фермента из смеси влечет за собой образование ОНГ пленки на основе наночастиц, распределенных в адсорбтиве полимера (**Рис. 3.19В**, показано на примере Pd-NPs и Нафиона). При этом образование шароподобных капсульных наногетероструктур, как было показано в случае соосаждения фермента из двухкомпонентного раствора, не происходит.



**Рис. 3.19** – ПЭМ-изображения, полученные с поверхности нанобиосенсоров, синтезированных из двухкомпонентных растворов, содержащих Pd-NPs и GOx (**A**), Pd-NPs и Нафiona (**B**) и разным типом полимерного связующего: альгинат (**C**) и пиррол (**D**).

Таким образом, успешная реализация капсульной структуры гибридного слоя нанобиосенсора возможна преимущественно из трехкомпонентных растворов смешанных электролитов, содержащих биорецептор совместно с кофактором (*1 компонент*), полимер (*2 компонент*) и базовый электролит (ионы-прекурсоры благородных металлов, *3 компонент*).

При замене типа полимерного связующего капсульная структура гибридной пленки нанобиосенсора была подтверждена также не для всех исследуемых систем, состоящих из трех активных компонентов. Например, из трехкомпонентных растворов электролитов, содержащих палладиевый прекурсор, GOx и альгинат формируются преимущественно нерегулярные гибридные структуры с преобладанием неорганического компонента (**Рис. 3.19C**, показано на примере Pd-NPs, GOx и альгината). Соосаждение из растворов, содержащих пиррол в качестве мономера, ведет к формированию нано-подобных сфер с хаотичным распределением как органического, так и неорганического компонента в матрице (**Рис. 3.19D**, показано на примере Pd-NPs, GOx и пиррола). Причина отсутствия капсульной структуры при формировании гибридных слоев из растворов пиррола и альгината, вероятно, кроется в неоптимальных условиях электрохимического осаждения биополимерного компонента. Очевидно, что этот шаг при использовании

альгината и пиррола следует оптимизировать отдельно. По своим электроаналитическим характеристикам, как будет показано в Главе 4, эти ОНГ также заметно уступают аналогам с более выраженной капсульной и регулярной структурой (например, Pd-NPs/GOx/Naf; Pd-NPs/LOx/Naf; Pd-NPs/AOx/Naf).

ОНГ пленки, построенные согласно адсорбционной структуре самосборки будут иметь преимущества при проектировании других микроаналитических систем, в том числе для разработки мишеней-эмиттеров ионов для масс-спектрометрического анализа или функциональных пленок в методе пьезокварцевого микровзвешивания, см. Главы 5 и 6.

### **3.5 Механизм закрепления гибридной функциональной пленки Pd-NPs/GOx/Naf на поверхности электрода**

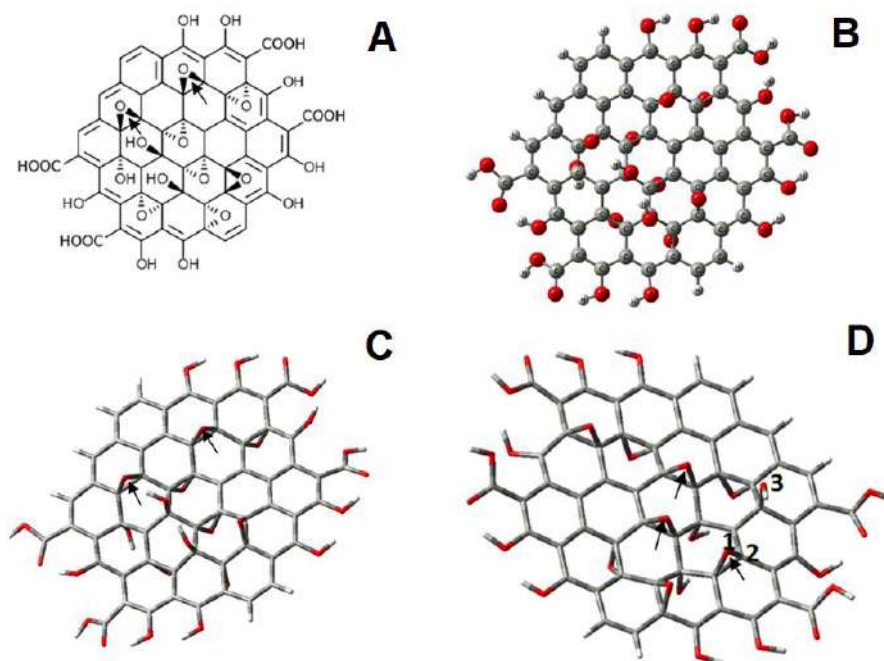
Для надежного закрепления функционального ОНГ слоя (рассмотрено на примере Pd-NPs/GOx/Naf) к поверхности электрода необходима реализация взаимодействия между SPE/GO электродом и Pd-NPs. В конструкции нанобиосенсоров, синтезированных по одностадийной методике (Pd-NPs/GOx/Naf), палладиевые наночастицы играют роль катализатора при разложении продукта ферментативной реакции между оксидазами и аналитом/субстратом. Другими словами, успех проведения биоанализа таким сенсором зависит от надежности закрепления слоя электрокатализатора на поверхности электрода.

Для понимания процесса закрепления Pd-NPs/GOx/Naf пленки на поверхности рабочего электрода и описания взаимодействий, происходящих в системе, был выполнен квантово-химический расчет адсорбции атома Pd<sup>0</sup> на поверхности оксида графена (материал рабочего электрода, SPE/GO).

Оксид графена представляет собой соединение на основе графена с различными кислородсодержащими функциональными группами и/или молекулами, прикрепленными к краям и внутренней части углеродной сетки. Несмотря на многочисленные существующие модели, однозначного описания

химической формулы и структуры оксида графена до сих пор не существует.[206]

Для изучения взаимодействий между Pd-NPs и поверхностью электрода была выбрана модель oxidized circumcoronene molecule (OCM) как простейшей структуры GO, **Рис. 3.20А**. [237] Анализ относительной реактивности различных участков графена был проведен на основе результатов *Yang*. [238] Согласно этому исследованию, скорость окисления графена вблизи окисленного центра более чем в  $10^{20}$  раз выше, чем у оригинального исходного участка графена.



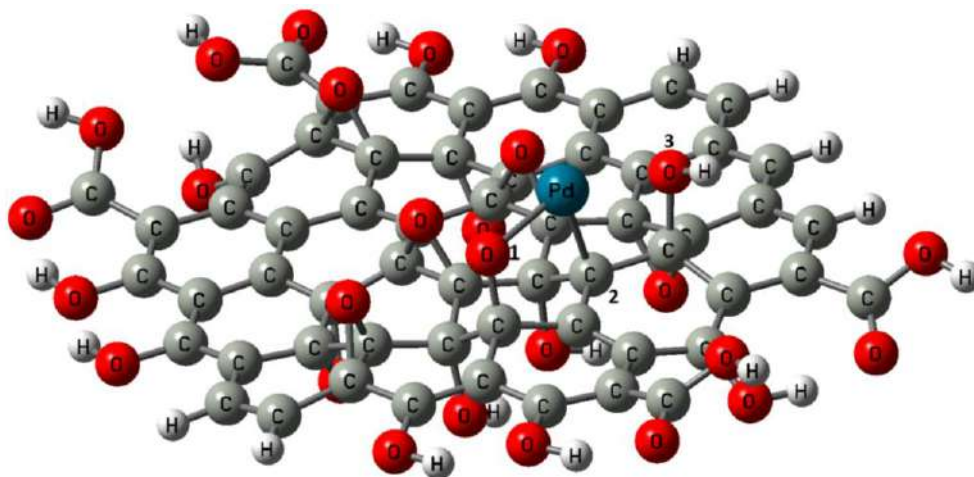
**Рис. 3.20** – Модель оксида графена (oxidized circumcoronene molecule, OCM) **А:** Структура OCM согласно алгоритму последовательного добавления новых кислородсодержащих групп на поверхность графена в зависимости от реакционной способности неокисленных участков. **В, С, D:** Различные представления оптимизированной структуры OCM (b - форма "ball and stick", С - форма "Tube", **D** - обратная сторона моделей А, В и С в форме Tube). (1 - номер атома О эпоксидной группы на поверхности оксида графена, 2 - номер атома С той же эпоксидной группы, 3 - номер атома кислорода гидроксильной группы).

Оптимизация структуры ОСМ позволила получить модель оксида графена, которая представлена на **Рис. 3.20В**. Различные изображения модели GO и ее обратной стороны, построенные с использованием программы GaussView, обобщены на **Рис. 3.20С,Д**. Во время оптимизации было обнаружено небольшое искажение плоскости графена. Структура, показанная на **Рис. 3.20Д**, указывает на более высокую энергию взаимодействия с атомом палладия.

Во время моделирования системы Pd<sup>0</sup>-ОСМ было показано, что нейтральные Pd<sup>0</sup> закреплены на поверхности SPE/GO исключительно в регионах ОСМ, содержащих, по крайней мере, не менее 3-х близко расположенных эпоксидных групп. Если атом Pd<sup>0</sup> расположен вблизи одиночной эпоксидной группы, 2-х эпоксидных групп (показаны стрелками на **Рис. 3.20А,С**) или вблизи гидроксила, то адсорбция Pd<sup>0</sup> на такие области оксида графена энергетически невыгодна.

В стартовой структуре частица Pd<sup>0</sup> располагалась вблизи 3-х эпоксидных групп (показаны стрелками на **Рис. 3.20**). В ходе оптимизации атом Pd сместился к атому кислорода 1, имеющему в структуре без атома металла несколько больший по модулю отрицательный заряд. Эпоксидная группа, включающая атом кислорода 1 разрушилась, атом палладия образовал с данным атомом кислорода ковалентную связь и ближайшим к нему атомом углерода 2 оксида графена. Атом кислорода 1 в оптимизированной структуре (**Рис. 3.21**) ковалентно связан только с одним атомом углерода графеновой сетки и не входит в состав эпоксидной группы. Структура других кислородсодержащих групп модели оксида графена не изменилась вследствие адсорбции атома Pd<sup>0</sup>. Энергия взаимодействия Pd<sup>0</sup> с оксидом графена составляла 17.7 ккал/моль. Успешное осаждение Pd<sup>0</sup> является первым шагом к образованию нанокластеров Pd<sub>n</sub> на поверхности электрода. Наночастицы Pd<sub>n</sub> показали наибольшую энергию адсорбции на оксиде графена из-за множественных взаимодействий между атомами Pd и материалом электрода.

Энергия взаимодействия нанокластеров, Pd<sub>9</sub> с оксидом графена может достигать значений до 1.70 эВ (39.2 ккал/моль).[239] Дальнейшее увеличение размера Pd-NPs увеличит энергию их адсорбции на рабочем электроде из-за увеличения числа атомных взаимодействий (в т.ч. из-за увеличения размерных дефектов).



**Рис. 3.21** – Оптимизированная структура системы Pd<sup>0</sup>-oxidized circumcoronene molecule (Pd<sup>0</sup>-ОСМ).

Поскольку энергия взаимодействия GOx с оксидом графена находится в диапазоне от 9.3 до 116 ккал/моль [240], что существенно меньше энергии взаимодействия между Pd<sup>0</sup> и боковыми радикалами аминокислот и NMA, ожидается, что присоединение GOx к поверхности рабочего электрода будет наиболее устойчивым в местах с осажденными Pd-NPs.

Предложенный механизм, приводящий в действие самосборку гибридный функциональный слой на поверхности трафаретных электродов, позволит синтезировать модульные ферментативные наноаналитические устройства с прогнозируемыми и настраиваемыми свойствами (см. Главу 6, модульный биокатализ).

Примененный на этом этапе исследования подход к оценке молекулярных взаимодействий в растворах смешанных электролитов может служить руководством и своеобразной инструкцией для изучения взаимодействий, происходящих в сложных пленочных ОНГ системах.



## 3.6 Аналитические преимущества одностадийного синтеза гибридных функциональных ОНГ пленок

### 3.6.1 Воспроизводимость одностадийной методики синтеза ОНГ нанобиосенсоров

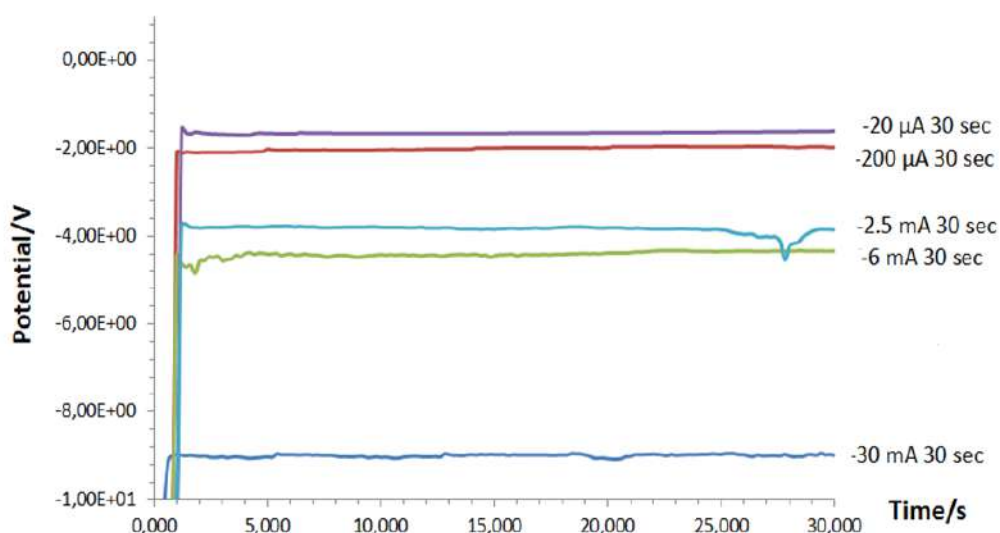
Отклик биосенсора и его аналитическая значимость зависят не только от присутствия фермента, специфичности и чувствительности обнаружения целевого аналита, но также определяется воспроизводимостью процедуры синтеза функциональной пленки. Даже небольшие изменения в архитектуре нанобиосенсоров, например, из-за различий в температуре или влажности во время синтеза, эксплуатации или хранения, могут привести к существенным различиям в их электрохимическом поведении. Поэтому на следующем этапе было важно оценить воспроизводимость процедуры электрохимического синтеза при одностадийном изготовлении нанобиосенсоров из растворов смешанных электролитов.

Для этой цели использовался метод пьезокварцевого микровзвешивания (QCM). Массу получаемых гибридных покрытий рассчитывали по уравнению *Зауэрбрея*. [211] При этом оценивалась воспроизводимость всего гибридного слоя. Для сравнения воспроизводимости синтеза при совместном осаждении с подходом послойного LbL нанесения, известное количество многокомпонентного электролита (1:1:1 v/v/v) помещали на поверхность QCM. Электролиз в обоих случаях проводили при одинаковом токе и времени. Избыток непрореагировавшего материала удаляли промывкой дистиллированной водой и последующей сушкой пленки.

Важно отметить, что для сравнения полученных данных с методом послойного нанесения, полностью реконструировать многоступенчатый синтез процедуры LbL на поверхности QCM не удалось из-за перегрузки микровесов. В этой связи, использовали упрощенный способ получения послойных покрытий, а именно пипетирование смешанного электролита в капле на поверхность QCM, что технически аналогично LbL методу.

Числовые значения, полученные с помощью QCM анализа, подтвердили, что изменения массы ( $\pm SD$ ) в методе капельного нанесения слоистой пленки (имитация подхода LbL) в  $\sim 40$  раз выше по сравнению с гибридами GOx-Nafion-Pd-NPs, полученными путем совместного соосаждения (данные показаны для GOx-модифицированных гибридов). Очевидно, что значения погрешностей ( $\pm SD$ ), найденные для одной капли в методе капельного нанесения, будут значительно выше в случае трех капель (многоступенчатый синтез биосенсоров) из-за увеличения нестабильности системы и сильных колебаний массы в слоистой архитектуре пленке. Иными словами, воспроизводимость синтеза по алгоритму послойного формирования примерно в 120 раз ниже общей воспроизводимости одностадийного синтеза ОНГ пленки.

Более того, согласно предложенной методике формирования активных функциональных ОНГ слоев, синтез нанобиосенсоров из растворов смешанных электролитов является полностью инструментально контролируемым процессом (Рис. 3.22). Этот факт также объясняет полученные выше результаты воспроизводимости синтеза ОНГ пленок.



**Рис. 3.22** – Процесс синтеза ОНГ (показано для гибридов на основе Pd-NPs/Naf в качестве примера) в режиме хронопотенциометрии.

Важно отметить, что процедуру нанесения пленок с нанограммовым пленочным покрытием гораздо проще контролировать, чем процедуру формирования пленок слоистой микро- и макроархитектуры (LbL). Так, средняя масса, полученная для нанобиосенсоров с гибридной пленкой, составляла  $4 \pm 0.2$  мкг против  $23 \pm 9$  мкг, найденной по методу капельного нанесения. При этом масса  $4 \pm 0.2$  мкг относится к чистой массе активного функционального слоя. В отличие от метода гальванического соосаждения, масса  $23 \pm 9$  мкг в методе капельного нанесения представляет общую сумму электролита, пипетированного на поверхность электрода, и содержит не прореагировавший/остаток GOx и свободный Нафион, что может привести к непредсказуемому каскаду электрохимических реакций в присутствии биоаналита.

Преимущества одностадийного синтеза нанобиосенсоров по сравнению с биосенсорами, синтезированными методом послойной сборки, обобщены на Рис. 3.23.

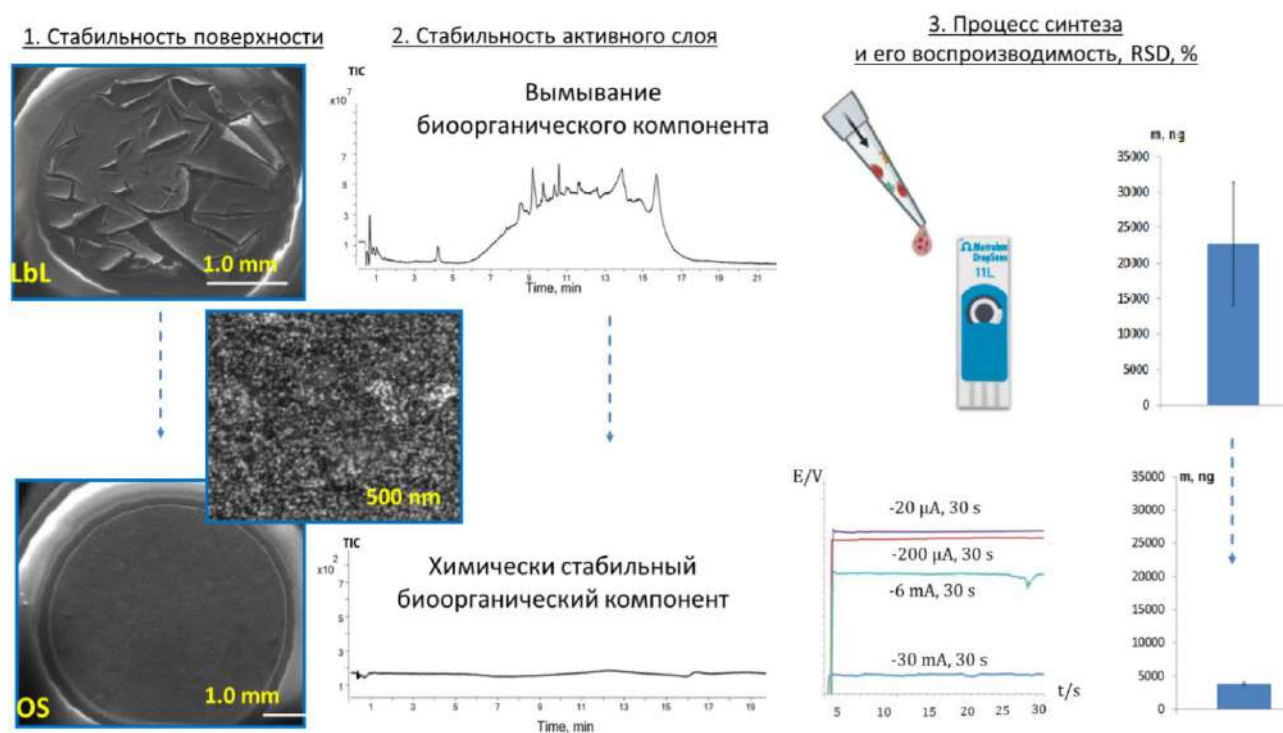


Рис. 3.23 – Сопоставление некоторых характеристик ОНГ-OS и ОНГ-LbL нанобиосенсоров, определяющих их аналитическую значимость.

Очевидно, что улучшенная морфология поверхности ОНГ, полученных по одностадийной методике, обеспечивает высокую химическую и механическую стабильность получаемых функциональных пленок, а инструментально контролируемый способ их производства позволяет повысить воспроизводимость синтеза.

### **3.6.2 Механическая стабильность неорганического компонента функциональных ОНГ пленок**

Воспроизводимость и точность измерений с помощью биосенсоров в значительной степени зависят от общей механической стабильности системы и, что более важно, от стабильности слоя неорганического компонента.

Далее оценивалась механическая стабильность неорганического компонента нанобиосенсоров, полученных с помощью гальванического соосаждения из растворов смешанных электролитов в сравнении с послойным нанесением. Механическую стабильность для обоих типов биосенсоров оценивали после электрохимических испытаний, как в отсутствие, так и в присутствии целевого биоаналита с помощью разработанного в работе способа на основе платформы ICP-MS (см. Главу 2).

Использование традиционных методик по оценке механических характеристик ОНГ пленок с общей толщиной слоя 10-15 нм (например, определение модуля Юнга) не представляется возможным. Задача усложняется еще и тем, что все три компонента ОНГ слоя (полимер, наночастицы благородных металлов, фермент) находятся «в тесном контакте» и отделить неорганический компонент от биополимерной матрицы возможно только при использовании плазмы (биополимерный компонент сгорает в плазме и далее происходит ионизация исключительно неорганического компонента ОНГ слоя – наночастиц благородных металлов). Для сравнения механической стабильности ОНГ нанобиосенсоров на основе Pd-NPs, использовали также LbL биосенсоры на основе медиатора РВ, Табл. 3.5.

**Табл. 3.5** – Содержание Fe<sup>56</sup> и Pd<sup>105</sup> в 100 мМ капле раствора глюкозы после тестирования LbL-биосенсоров и нанобиосенсоров, синтезированных по одностадийной методике

Изотоп/Калибровочная зависимость	Pd <sup>105</sup> (RSD, %)*	Fe <sup>56</sup> (RSD, %)
		Y=36.43·x + 348.01 R <sup>2</sup> =0.9996
Содержание Pd <sup>105</sup> и Fe <sup>56</sup> в растворе глюкозы как результат миграции неорганического компонента, ppb		
Pd-NPs/GOx/Nafion, синтезированный по одностадийной методике	0.263 (1.01)	–
LbL – послойная сборка PB/GOx/Nafion (3-слойный дизайн)	–	280 (2.03)

Механическая стабильность неорганического компонента ОНГ слоя на основе Pd-NPs была на несколько порядков выше, чем механическая стабильность PB. Именно стабильность неорганического компонента, как базового ОНГ слоя будет определять механическую и химическую стабильность всего ОНГ и микроаналитических систем на их основе, см. часть 3.5.

Далее анализировали влияние дизайна неорганического и биополимерного компонента на скорость вымывания электрокатализатора на основе палладия (оценивали по изотопу Pd<sub>105</sub>). Для этого синтезировали сенсоры с пленкой Pd-NPs и последующим нанесением фермента и Нафiona по методу капли (LbL дизайн). Результаты анализа 150 мкл капли аналита, предварительно нанесенного на поверхность сенсора и подвергнутого электрохимическому определению в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) или хроноамперометрии (АМ), систематизированы в **Табл. 3.6**.

Вымывание Pd-NPs после электрохимических испытаний с поверхности нанобиосенсоров, синтезированных по предложенной новой одностадийной методике, было в десять раз меньше по сравнению с LbL аналогами на основе

Pd-NPs (микронные слои биоорганического компонента при вымывании в LbL дизайне «забирают» часть неорганического слоя, Pd-NPs).

**Табл. 3.6** – Общее содержание Pd<sub>105</sub>, обнаруженное методом ICP-MS в растворах аналитов, отобранных с поверхности нанобиосенсоров после электрохимических испытаний<sup>10</sup>

Дизайн биосенсора	Pd <sup>105</sup> , ppt (RSD, %)	Электрохимический метод	Аналит
Метод послойной сборки Pd-NPs/AOx/Naf*	582 (1.12)	ЦВА	Фосфатный буфер
	378 (1.09)	АМ	Этанол
Метод электроосаждения Pd-NPs/AOx/Naf**	37 (2.24)	ЦВА	Фосфатный буфер
	18 (1.49)	АМ	Этанол

Примечания:

\* Pd-NPs были нанесены гальваническим путем на поверхность SPE/GO до иммобилизации фермента (алкоголоксидазы (AOx)) и полимера (Naf)

\*\* Pd-NPs осаждали совместно с ферментом (AOx) и Naf.

### 3.7 Выводы к Главе 3

1. Одностадийное формирование нанобиосенсоров из растворов смешанных электролитов основано на образовании промежуточных металл-ферментных комплексов типа GOx · nPd<sup>2+</sup> и Pd<sup>2+</sup>-полимер в растворах с их последующим соосаждением на электрод. Синтезированные из сложных растворов электролитов ОНГ пленки, полученные одностадийным методом, не имеют послойной сэндвич-подобной архитектуры.

2. 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 пленочных материалов в биосенсорах.

<sup>10</sup>Стабильность определяли по выносу Pd-NPs из ОНГ слоя.

Оптимальная структура функционального слоя пленки, обеспечивающая высокую механическую и химическую стабильность ОНГ нанобиосенсоров, синтезированных по одностадийной методике, представляет собой капсульную структуру.

**3.** Показано, что при идентичных параметрах электроосаждения изменение числа и природы активных компонентов в мультикомпонентном растворе электролита, в том числе природы полимера (альгинат, полипиррол), в значительной степени влияет на структуру формирования ОНГ слоя. Помимо капсульной структуры возможно образование адсорбционного ОНГ слоя. Механическая стабильность неорганического компонента ОНГ определяет механическую и химическую стабильность всего ОНГ слоя и микроаналитических систем на их основе.

**4.** Сформированы общие принципы стандартизации ОНГ нанобиосенсоров с использованием подхода LDI-MS биосканирования. Предложенный подход позволяет полностью избежать использования химических растворителей и удовлетворяет принципам „Green Chemistry“.

## **ГЛАВА 4. КЛЮЧЕВЫЕ ПАРАМЕТРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ОТКЛИК ОНГ НАНОБИОСЕНСОРОВ**

Глава посвящена анализу и систематизации роли биоорганического компонента на электрохимический отклик ОНГ нанобиосенсоров на основе наночастиц благородных металлов, а также выбору, оптимизации и валидации условий электрохимического осаждения ферментов из многокомпонентных растворов синтеза. В этой главе также систематизированы фундаментальные аспекты, влияющие на бионаноинженерию оксидазных нанобиосенсоров окисления пероксида водорода на основе модельной микроаналитической системы. Кроме того, обобщены результаты фундаментального исследования по поиску и валидации оптимальных рабочих параметров амперометрических нанобиосенсоров на основе ОНГ наночастиц палладия, синтезированных по предложенной методологии.

### **4.1 Параметры, влияющие на электрохимическое поведение систем на основе наночастиц благородных металлов**

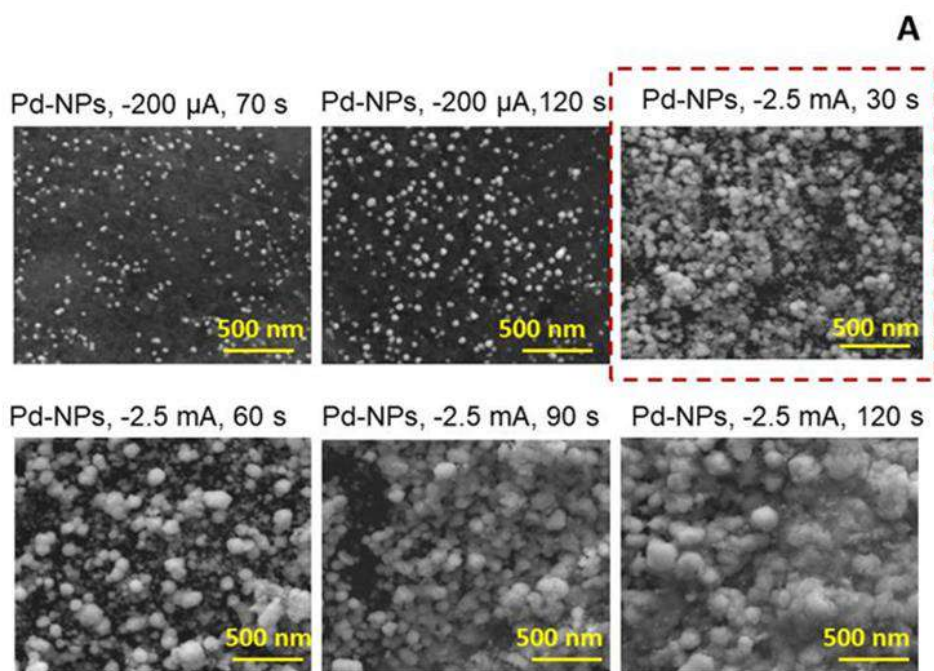
Важно отметить, что даже небольшое различие в структуре ОНГ пленок при их формировании может существенно влиять на каталитическую активность соосажденных ферментов, а также на общий процесс массопереноса биоаналитов на поверхности и в объеме нанобиосенсоров. Другими словами, оптимальное соотношение между полимером, ферментом и наночастицами благородных металлов (рассматривается Pd-NPs в качестве модельной системы) должно быть определено и поддерживаться на стабильном уровне для того, чтобы гарантировать эффективную биоэлектрокаталитическую реакцию. С другой стороны, размер, режим и морфология электроосажденных частиц палладия, определяемые режимом синтеза, могут во многом влиять на аналитические характеристики формируемого ОНГ [241], включая чувствительность и воспроизводимость электрохимического сигнала. В связи с этим, первоначально необходимо

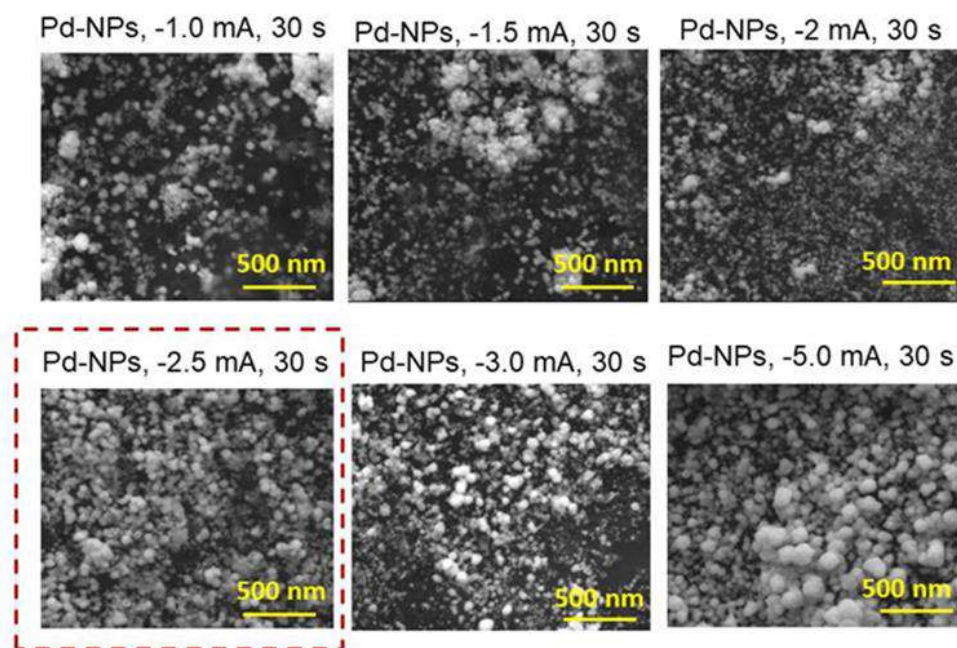


определить влияние условий электроосаждения наночастиц на морфологию формируемого на поверхности электрода слоя и его электрохимические свойства.

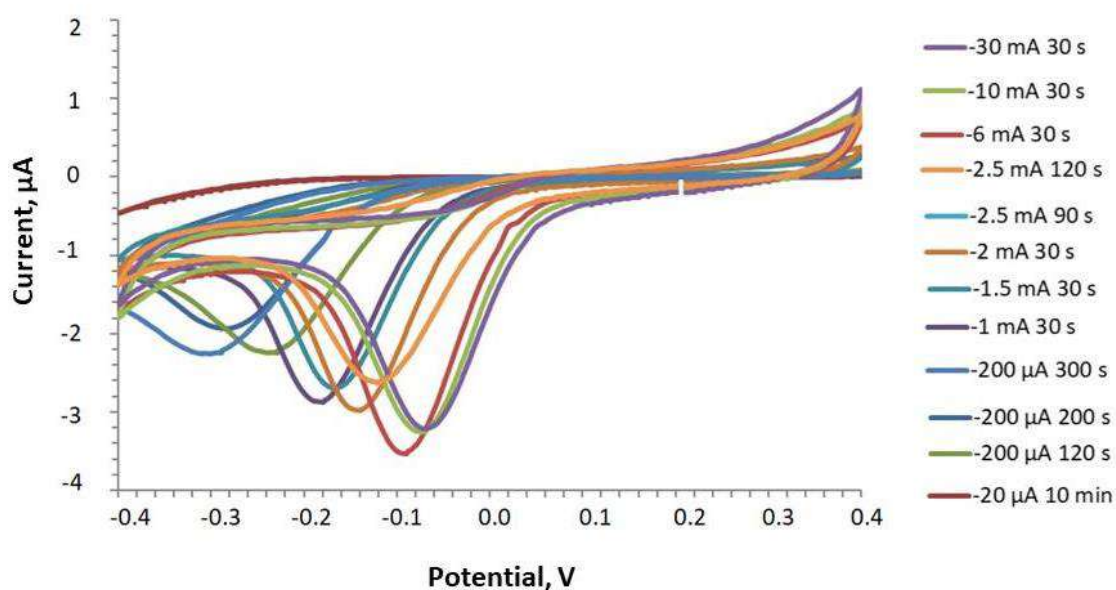
Электроосаждение наночастиц (показано на примере палладия) проводилось в гальваностатическом режиме поляризации, путем варьирования величины тока и времени осаждения. На **Рис. 4.1** приведены микрофотографии наночастиц, полученных на поверхности трафаретного SPE электрода. Увеличение силы тока в процессе осаждения в основном влияет на размер наночастиц (см. **Рис. 4.1А**), а увеличение времени осаждения – на плотность их распределения по поверхности. Укрупнение наночастиц и образование агломератов приводит к уменьшению площади поверхности, а, следовательно, и изменению токовых откликов.

Как видно из ЦВА, записанных с поверхности электродов, модифицированных палладиевыми наночастицами (**Рис. 4.2**) в фоновом растворе (калий-фосфатный буфер), потенциал и ток пика восстановления кислорода на палладии существенно меняются для наночастиц, осажденных в разных режимах поляризации.



**B**

**Рис. 4.1** – Микрофотографии, полученные для Pd-NPs, синтезированных при различных временах осаждения (А) и токах (В).



**Рис. 4.2** – ЦВА, записанные при 20 мВ/с в буфере (рН 6.98) с поверхности электродов с пленками Pd-NPs, синтезированных при различных условиях.

Наблюдаемый эффект связан с изменением размером частиц в зависимости от условий синтеза, см. **Рис. 4.1**. Важно, что на палладии в анодной области потенциалов ток изменяется только по величине при

изменении режима осаждения, однако, потенциал начала окисления палладия остается неизменным, **Рис. 4.2** (анодная область).

Анализ полученных электрохимических зависимостей для наночастиц благородных металлов, электроосажденных в разных режимах, позволяет проводить своеобразную стандартизацию электродов в режиме размер наночастиц  $\leftrightarrow$  потенциал катодного пика, что является интересным и новым способом контроля воспроизводимости процесса синтеза ОНГ с точки зрения материаловедения.

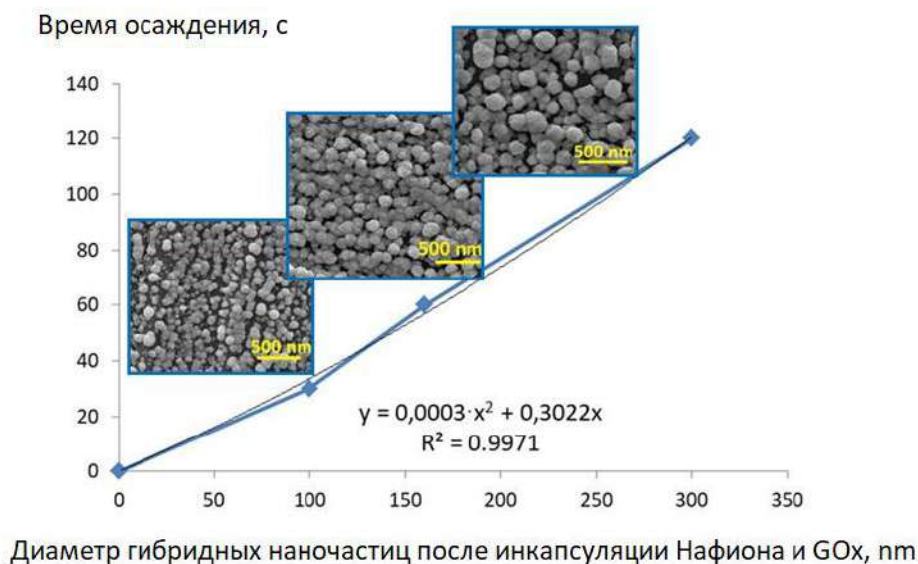
#### **4.2 Влияние биоорганического компонента на морфологию и электрохимические характеристики ОНГ нанобиосенсоров**

Для наночастиц серебра и палладия обнаруживается значительный дрейф потенциала анодного пика окисления (серебро) и катодного пика восстановления кислорода (палладий) при изменении скорости развертки потенциала (**Приложения, Рис. П4.1**). Такое поведение можно в целом объяснить изменением состояния дисперсности металлических частиц в ходе циклирования (окисление-восстановление) за счет рекристаллизационных процессов. Многократное циклирование нанобиосенсоров на основе индивидуальных наночастиц выявило значительное уменьшение токовых откликов характеристических пиков от скана к скану.

Важным вопросом является роль биоорганических компонентов ОНГ пленок на морфологию и электрохимические свойства нанобиосенсоров на основе наночастиц металлов. Поэтому далее исследовали влияние состава электролита и параметров соосаждения неорганического и органических компонентов, включая ток и время осаждения на морфологию и химию поверхности ОНГ.

Методом сканирующей электронной микроскопии было установлено, что изменение любого из вышеупомянутых параметров синтеза приводит к образованию функциональных гибридных наноструктур с различным расстоянием между наночастицами, размером и плотностью распределения по

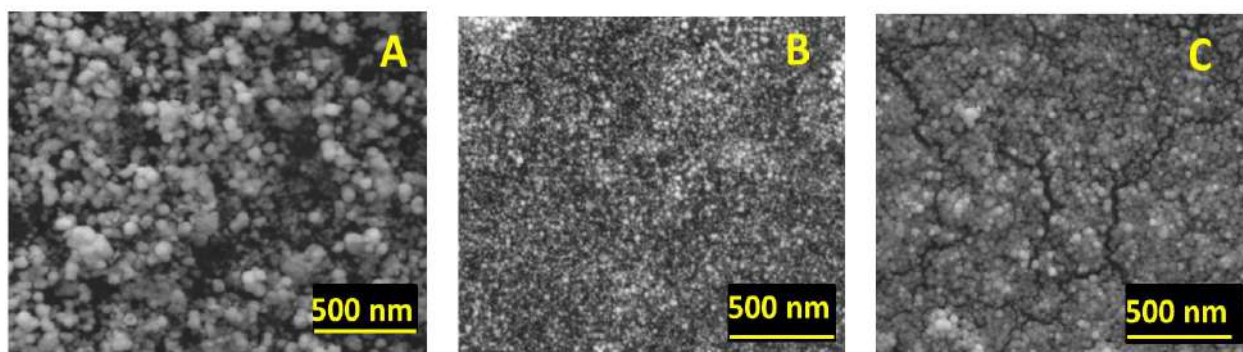
поверхности электродов. Например, увеличение времени осаждения с 30 до 120 с при одинаковом токе сопровождается почти линейным увеличением размера ОНГ структур, высоты их кластеров и уменьшением расстояния между соседними наночастицами, **Рис. 4.3**.



**Рис. 4.3** – Зависимость диаметра гибридных Pd-NPs с соосажденным Нафионом (рН 7, соотношение компонентов в растворе электролита 1:1 об./об.,  $I_k = -40$  мА) от времени осаждения. *Примечание:* в данном случае использовали более высокое значение тока ( $I_k = -40$  мА) для того, чтобы сделать наблюдаемый эффект более выраженным по сравнению с ОНГ пленками, полученными при низких значениях тока.

Электроосаждение из растворов смешанных электролитов, содержащих прекурсор полимера и биоконпоненты, позволяет получать монодисперсные или близкие к таковым гибридные пленки (см. **Рис. 4.4**). При этом для таких систем в отличие от чистых металлических наночастиц, не содержащих органический компонент, значительного дрейфа потенциала пика окисления/восстановления зарегистрировано не было, что позволяет судить о стабилизации наночастиц металла биоорганическим компонентом, см.

**Приложения, Рис. П4.1**, а также об изменении диффузионных процессов в ОНГ системах. На поверхности электродов на основе индивидуальных наночастиц металла диффузия кислорода протекает быстрее. Внедрение полимера в дизайн электрода приводит к замедлению процесса диффузии кислорода. Изменение процессов диффузии кислорода в ОНГ слоях электродов на основе наночастиц благородных металлов непременно скажется и на их выходных электроаналитических характеристиках, см. часть 4.3.1.



**Рис. 4.4** – Изменение морфологии пленок (показано для Pd-NPs) при переходе от чистых наночастиц (А) до ОНГ: Pd-NPs/Naf/AOx (В) и Pd-NPs/ALG/AOx (С). *Примечание:* ОНГ пленки были получены в идентичных условиях синтеза (ток -2.5 мА, время 30 с).

Аналогичные закономерности (при переходе от чистых наночастиц благородных металлов к их биоорганическим гибридам) были получены с помощью предложенного протокола анализа стабильности неорганического компонента на основе индуктивно-связанной масс-спектрометрии (ICP-MS), (см. **Табл. 3.4**, Глава 3). Полученные данные позволяют судить об улучшенной механической и химической стабильности неорганического компонента одностадийных ОНГ пленок. Так механическая стабильность палладия (оценивалась по изотопу палладия  $Pd^{105}$ ) в дизайне предложенных нанобиосенсоров была на несколько порядков выше, чем стабильность медиатора на основе РВ (оценивалась по изотопу  $Fe^{56}$ ), см. **Табл. 3.4**.

Морфологию ОНГ пленок можно регулировать параметрами электрохимического осаждения и путем изменения состава многокомпонентного раствора электролита. В дополнение к настраиваемой морфологии ОНГ, зависящей от условий синтеза, также возможно изменять химию поверхности гибридов, количество соосажденного полимера (см. **Приложения, Табл. 2.1**) или фермента. Этот факт открывает новые возможности в области создания нанобиосенсоров при инкапсулировании различных количеств ферментов в зависимости от ожидаемого диапазона концентраций детектируемых биоаналитов. Например, мониторинг глюкозы в биологических образцах потребует меньших количеств инкапсулированного фермента (уровень ppm) по сравнению с мониторингом уровня глюкозы в аналитически значимом диапазоне в биотехнологических процессах (уровень mM).

На основании полученных данных можно заключить, что при идентичных параметрах синтеза ОНГ пленок (плотность тока, продолжительность электролиза, концентрация ионов-прекурсоров благородных металлов в электролите) введение органического и биорецепторного компонентов способствует уменьшению диаметра наночастиц с 60-80 нм до 10-20 нм, а также электрохимической и механической стабилизации гибридных систем.

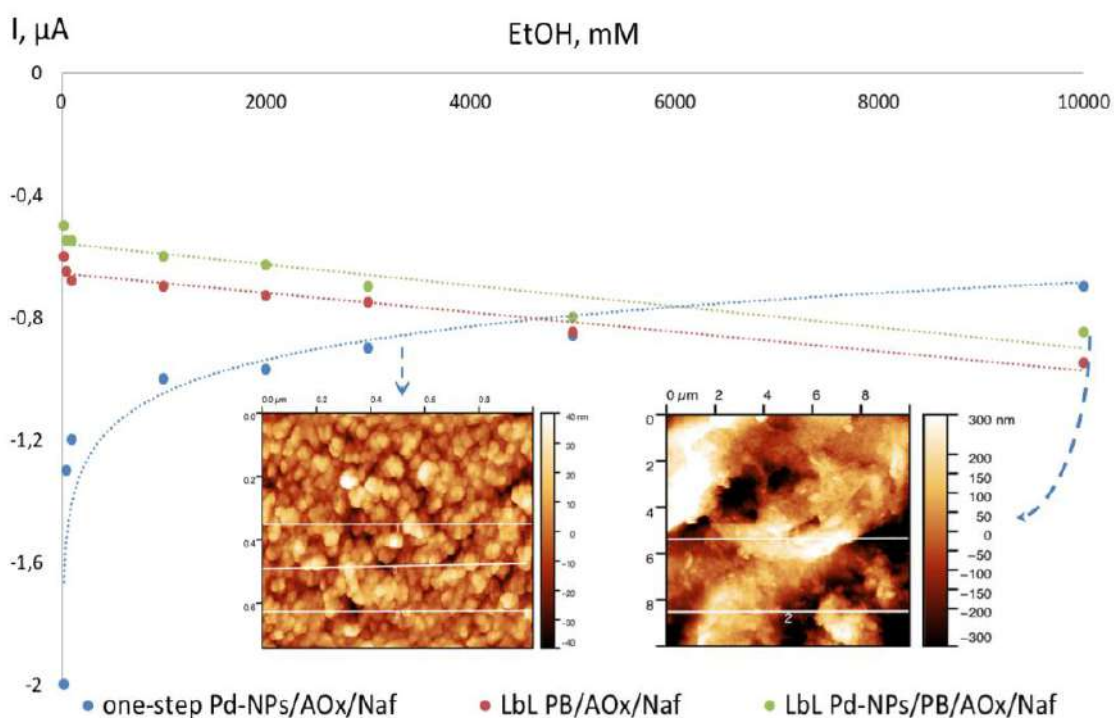
На следующем этапе было важно определить электрохимический режим регистрации аналитического сигнала для надежного обнаружения  $H_2O_2$  (как продукта биохимической реакции между ферментами группы оксидаз и субстратом) на поверхности индивидуальных или гибридных наночастиц благородных металлов.

#### **4.3 Электрохимические принципы оперирования нанобиосенсоров с электроосажденным ферментом**

Используемые в практике амперометрических пероксидазных сенсоров режимы поляризации относятся к процессам электровосстановления

пероксида водорода на катализаторах разной природы, таких как частицы благородных металлов или кристаллы берлинской лазури (РВ). Известно, что РВ способен селективно реагировать на пероксид водорода [242], однако, для благородных металлов избирательность этого взаимодействия остается пока под вопросом. Так растворенный кислород является мешающим агентом, поскольку область потенциалов восстановления  $H_2O_2$  и электровосстановления кислорода пересекаются.

Действительно, при определении одного и того же аналита (показано на примере детекции этанола, рН 7) были получены абсолютно разноплановые калибровочные зависимости на основе нанобиосенсоров с Pd-NPs и инкапсулированной АОх (Pd-NPs/АОх/Naf) и для сенсоров LbL дизайна на основе того же фермента, но с использованием РВ в качестве электрокатализатора (РВ/АОх/Нафион), **Рис. 4.5**.



**Рис. 4.5** – Калибровочные зависимости, полученные для EtOH с поверхности нанобиосенсоров на основе Pd-NPs с электроосажденным АОх и Нафионом в качестве связующего (одностадийный синтез), а также с поверхности LbL биосенсоров на основе РВ, АОх и Нафиона при потенциале -0.04 В.

Однако, при экранировании Pd-NPs слоем берлинской лазури (Pd-NPs/PВ/АОх/Нафион) зависимость, полученная для этого нанобиосенсора, становилась идентичной зависимости, полученной с использованием индивидуального слоя РВ. Другими словами, фермент в ОНГ сенсорах после электроосаждения работает верно, а вот режим регистрации аналитического сигнала с Pd-NPs остается неясным.

Использование катодного пика электровосстановления пероксида водорода для нанобиосенсоров на основе ОНГ с наночастицами металлов может явиться невозможным в системах, содержащих растворенный кислород. Кроме того, такое определение нецелесообразно проводить в потенциодинамических условиях поляризации, поскольку в анодной области потенциалов происходит адсорбция кислорода из капли раствора, вызывая формирование оксидных слоев, электровосстановление которых является мешающим процессом, приводящим к перекрестной чувствительности и неоднозначности калибровки сенсоров по катодному пику.[236] Проведенный эксперимент показывает, что требуется более детальный анализ возможности использования катодной поляризации для детектирования пероксида водорода (как основного электроактивного продукта биохимической реакции) биосенсорами на основе пленок наночастиц благородных металлов.

#### **4.3.1 Анализ катодного отклика электродов с ОНГ пленками и факторов, влияющих на чувствительность электрохимического анализа**

Для электровосстановления пероксида водорода брутто-реакцию в нейтральной среде можно записать в виде:



В то же время, для пероксида водорода, образующегося в ходе ферментативной реакции, возможно чисто химическое каталитическое разложение на неорганических центрах ОНГ и электродной поверхности, которое будет протекать по брутто-реакции с выделением кислорода:





Таким образом, в анализируемом растворе будут присутствовать сразу два аналита для частиц металла в ОНГ (пероксид и кислород) и только один для ОНГ на основе РВ, селективно восстанавливающей пероксид водорода. С другой стороны, образующиеся ОН-радикалы и ионы, являющиеся соответственно интермедиатом и продуктом реакции (4.1) оказывают разрушающее действие на слой РВ, трансформирующегося в оксиды железа (см. также **Рис. 2.10**), которые также могут катализировать разложение пероксида по реакции (4.2).

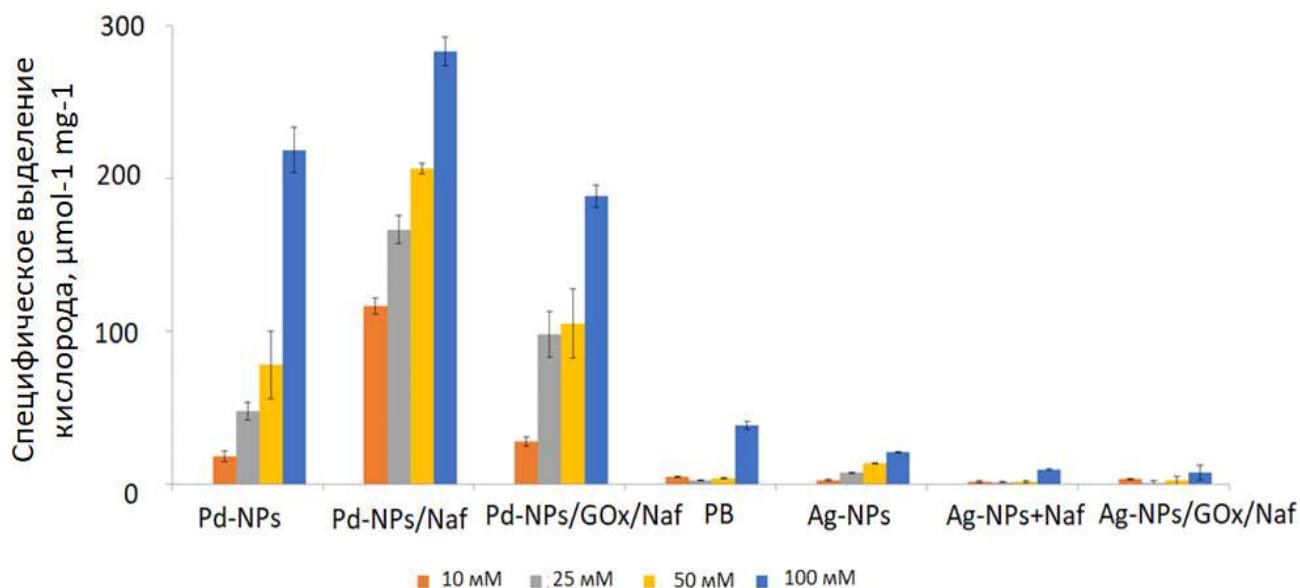
Таким образом, анализируя выделение или потребление кислорода (за счет ферментативной реакции), можно сравнить каталитические свойства неорганических компонентов ОНГ пленок.

Выделение кислорода за счет каталитического разложения пероксида по реакции (4.2) детектировали при помощи специального оптического минисенсора кислорода OXR430 игольчатого типа (Pyro Science GmbH, Германия), см. **Главу 2**. Для сравнения электрокаталитических зависимостей при детектировании пероксида водорода в диапазоне концентраций 10-100 мМ использовали ОНГ системы на основе Pd-, Ag- и РВ.

Как видно из **Рис. 4.6** сенсоры на основе Pd-NPs обладают ожидаемо наиболее высокой каталитической активностью в реакции (4.2). Кроме того, система с палладиевыми наночастицами и Нафионом обнаруживает повышенное выделение кислорода, поскольку среда вблизи наночастиц палладия становится более кислой за счет сульфокислотных групп полимера.

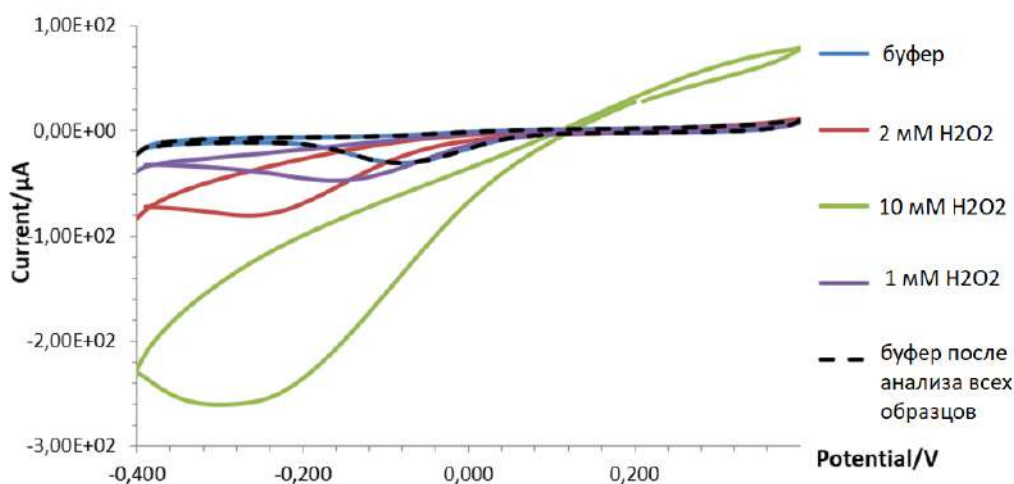
Серебро практически не разлагает пероксид водорода, что хорошо согласуется с данными работы [243]. Наконец, ОНГ на основе РВ, как и ожидалось, практически не проявляют каталитической активности к разложению пероксида с выделением кислорода вплоть до самой высокой концентрации, когда возможно либо превращение РВ в оксиды железа за счет высокой концентрации образующихся ОН-реагентов, либо существенным

становится разложение пероксида оксидом графена (SPE/GO, поверхность рабочего электрода трафаретных сенсоров), располагающегося под активным слоем РВ. [244]



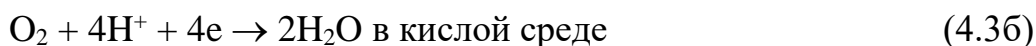
**Рис. 4.6** – Отклики оптического кислородного минисенсора (мкмоль/л на единицу веса функционального слоя, мг) при реакции с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pH 6.89), полученные с поверхности Pd-NPs, РВ, Ag-NPs и их биоорганических гибридов (показаны для GOx и Nafion в качестве примера).

Примечательно, что взаимодействие с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на поверхности Pd-NPs не приводило к каким-либо необратимым изменениям в откликах электрохимического сенсора, что является важным критерием при разработке долгосрочных и надежных нанобиосенсоров. Так, не было обнаружено никаких изменений в электрохимическом поведении Pd-NPs при переходе от низкого уровня концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к высокому и обратно, **Рис. 4.7**.



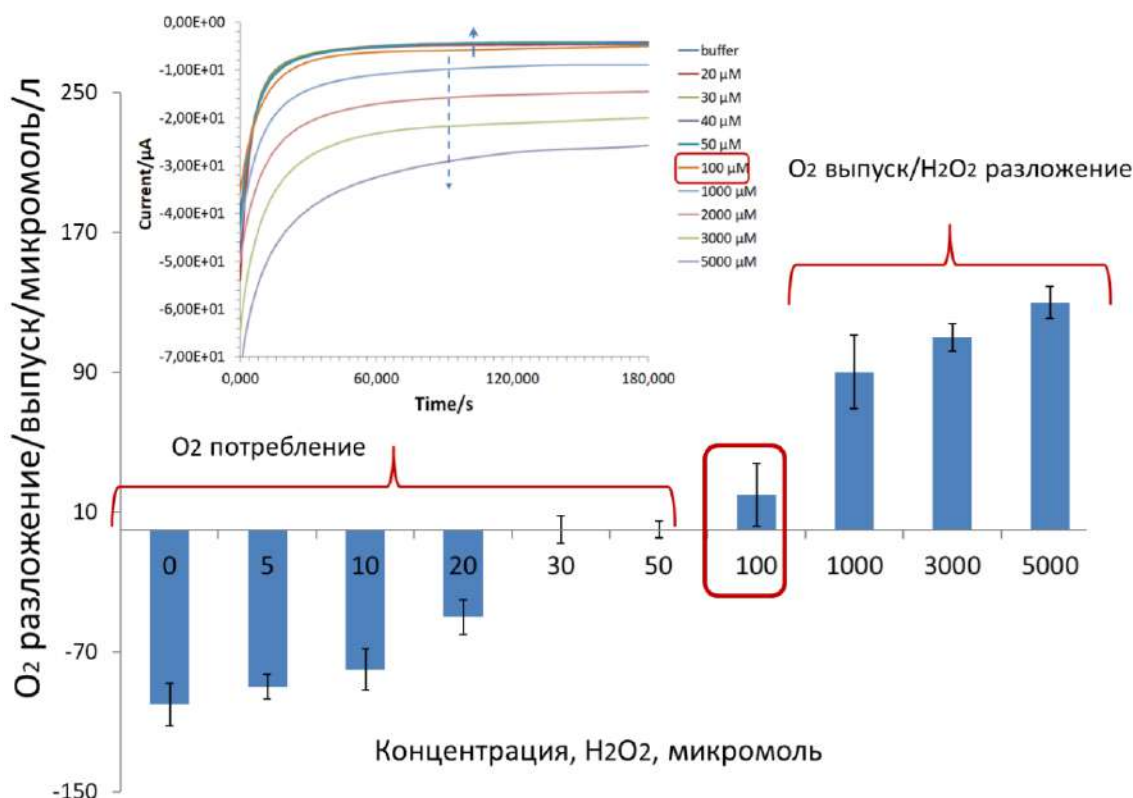
**Рис. 4.7** – ЦВА, записанные с поверхности SPE/GO электрода, модифицированным Pd-NPs (-2.5 мА, 30 с) в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при скорости сканирования 20 мВ/с по сравнению с Ag/AgCl/sat.KCl, pH в капле 7.

Таким образом, при анализе электроактивности ОНГ к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> необходимо одновременно контролировать концентрацию кислорода в пробе, что особенно важно в области низких концентраций пероксида водорода, когда количество растворенного в пробе кислорода сопоставимо с концентрацией пероксида, а следовательно, реакция электровосстановления растворенного кислорода может существенно повлиять на уровень детектируемого амперометрического отклика за счет реакций:



Дальнейшее исследование поведения наночастиц благородных металлов при определении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в микроаналитическом диапазоне концентраций (1 мкМ – 5 мМ) проводили с помощью тандема электрохимических экспериментов и кислородного минисенсора. Электрохимический отклик регистрировался в амперометрическом режиме при постоянном потенциале -0.08 В. Полученные результаты указывают на сильную конкуренцию в диапазоне концентраций пероксида до 1 мкМ между реакцией восстановления кислорода и

восстановлением пероксида водорода на наночастицах Pd (Рис. 4.8).



**Рис. 4.8** – Отклик кислородного минисенсора во время реакции между Pd-NPs и пероксидом водорода (эксперименты проводились при  $20 \pm 2$  °C, сигнал регистрировался при 100 с). *Вставка* – амперометрические отклики, полученные с Pd-NPs при детектировании H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при потенциале -0.08 В.

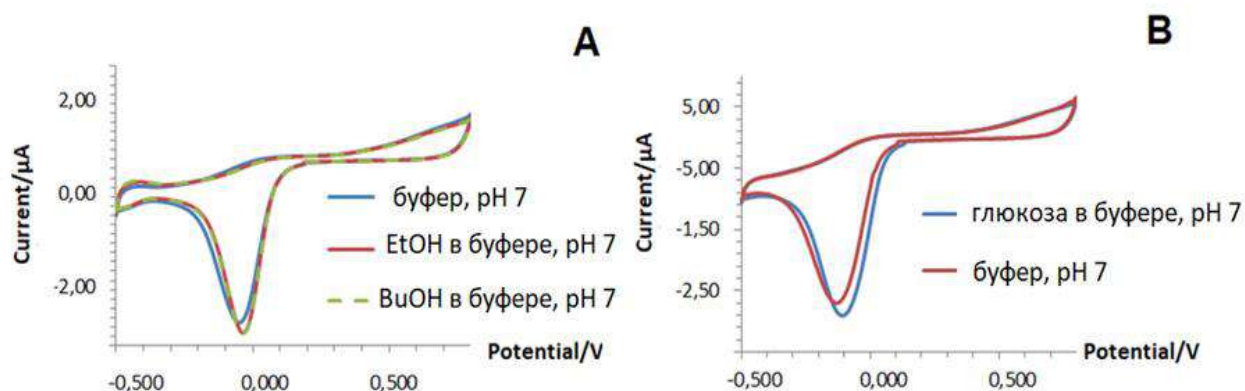
Фактически, чувствительность индивидуальных наночастиц палладия к пероксиду проявляется только при его концентрациях выше 100 мкМ. По результатам работы минисенсора потребление кислорода на Pd-NPs регистрировали в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до уровня 100 мкМ. Выше этой концентрации скорость выделения кислорода из-за каталитического разложения пероксида по реакции (4.2) превышала скорость его восстановления на палладиевых частицах по реакции (4.3), что и приводило к росту концентрации кислорода, детектируемой оптическим минисенсором.

Учитывая, что в гибридном слое нанобиосенсора количество Pd-NPs по

меньшей мере в три раза меньше (1:1:1 *об./об.*, см. Глава 2) по сравнению с системами на основе индивидуальных Pd-NPs и эффективность восстановления  $H_2O_2$  также на несколько порядков ниже, можно ожидать, что мешающее влияние кислорода при регистрации токов по пероксиду в таких системах будет более выражено. Как следствие этого, а также как результат изменения диффузионных процессов в системах, диапазон концентраций, в котором влияние кислорода на результаты при анализе реальных биоаналитов, продуктом реакции которых с оксидазами является пероксид водорода, может быть существенно расширен. Например, при обнаружении спиртов ферментативным биосенсором с пленкой АОх/Nafion/Pd-NPs в работе [236] было показано, что при потенциале -0.08 В вместо увеличения отрицательных токов (см. вставку на **Рис. 4.8**, от 100 мкМ) с увеличением концентрации аналита (вызванное увеличением выделяющегося  $H_2O_2$ ), авторы фиксировали непрерывное уменьшение катодного тока до уровня концентраций бутанола 10-15 мМ. Аналогичные количественные закономерности были получены с поверхности одностадийных ОНГ, модифицированных alcohol dehydrogenase (ADH), работа которых не зависит от количества потребляемого или выделяемого кислорода. Однако и для этого дизайна нанобиосенсора (ADH/Nafion/Pd-NPs/NAD) по-прежнему фиксировалось уменьшение катодных токов [236], что еще раз доказывает доминирование реакций электровосстановления кислорода.

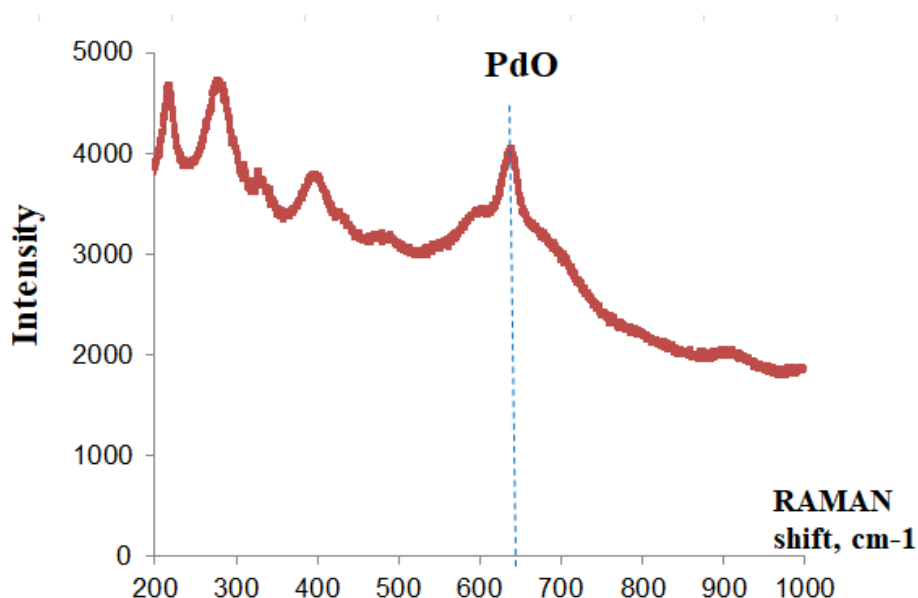
Для дальнейших исследований микроаналитических систем на основе Pd-NPs с соосажденными ферментами были проведены ЦВА исследования в широком диапазоне сканирования потенциалов (от -0.5 В до 0.7 В). Исследования проводили как в буферном растворе, так и в присутствии тестируемых целевых биоаналитов. Действительно, почти никаких изменений в ЦВА кривых для нанобиосенсоров на основе Pd-NPs с инкапсулированными АОх или ГОх, протестированными в фосфатном буфере или в присутствии биоаналитов (глюкозы, низкомолекулярных спиртов, включая этанол (EtOH),

бутанол (BuOH), зарегистрировано не было, **Рис. 4.9.**



**Рис. 4.9** – ЦВА кривые, записанные с поверхности нанобиосенсоров (одностадийный метод синтеза) на основе Pd-NPs с инкапсулированными АОх (А), GOх (В) и Нафионом в фосфатном буфере, EtOH (10 мМ) и BuOH (10 мМ) при скорости сканирования 20 мВ/с и pH 7, Ag/AgCl/sat.KCl.

Катодный пик при потенциалах  $-0.05...+0.1$  В соответствовал восстановлению PdO (присутствие PdO было подтверждено RAMAN исследованием, см. **Рис. 4.10**) и электровосстановлению кислорода. Закономерности, снятые в буферном растворе не менялись при тестировании в растворах аналитов. Катодные и анодные волны при  $-0.45$  В были связаны с реакциями адсорбции/десорбции водорода, протекающими на палладии.[245] Увеличение анодного тока в диапазоне потенциалов  $0.4...0.7$  В соответствовало адсорбции кислорода и образованию оксидов наночастиц палладия,  $Pd_xO_y$ .[246] Другими словами, несмотря на успешную инкапсуляцию/соосаждение ферментов в структуре нанобиосенсоров, обеспечение их работы в катодном диапазоне потенциалов является нетривиальной электроаналитической задачей. Это утверждение особенно справедливо, если концентрация  $H_2O_2$  сравнима с концентрацией растворенного кислорода в капле.



**Рис. 4.10** – КР-спектр, записанный с поверхности нанобиосенсора на основе пленки Pd-NPs, указывающий на присутствие PdO при  $640 \text{ nm}^{-1}$ . *Примечание:* пик при  $640 \text{ nm}^{-1}$  был определен как PdO.[247]

В действительности проблема мешающих основному аналитическому сигналу процессов гораздо глубже и проявляется уже при анализе воспроизводимости фонового сигнала ОНГ. Так, при изучении катодного тока ОНГ нанобиосенсоров на основе АОх в потенциостатическом режиме поляризации  $-0.05 \text{ В}$  в буферном растворе (без аналита), (см. **Приложения, Рис.П 4.2**, показано для одностадийного Pd-NPs с инкапсулированными АОх и Nafion) наблюдается непрерывное уменьшение катодного тока при обновлении капли буферного раствора на поверхности электрода. Такое поведение системы с точки зрения электроаналитики указывает на нестабильность «базовой линии» сенсора за счет постепенного восстановления оксидов палладия и электровосстановления кислорода.

Описанный выше характер электрохимического поведения является иллюстрацией общей проблемы биосенсоров на основе оксидаз: выраженная зависимость от концентрации кислорода [248], которая может быть довольно

неясной в сложных системах, таких как ОНГ нанобиосенсоры на основе пленок наночастиц благородных металлов.

Следует отметить, что положение катодного пика, а также химический состав поверхности наночастиц значительно зависят от температуры и кислотности/основности раствора. Это означает, что условия окружающей среды и хранения будут в значительной степени влиять на характеристики ОНГ нанобиосенсоров. Следовательно, нанобиосенсоры, сконструированные по одностадийной методике с электроосажденными ферментами, не могут надежно работать в катодном диапазоне потенциалов. Поэтому разработка способа регистрации амперометрического сигнала для ОНГ нанобиосенсоров, синтезированных по новой одностадийной методике, является первостепенной задачей с точки зрения их применения (см. следующий раздел).

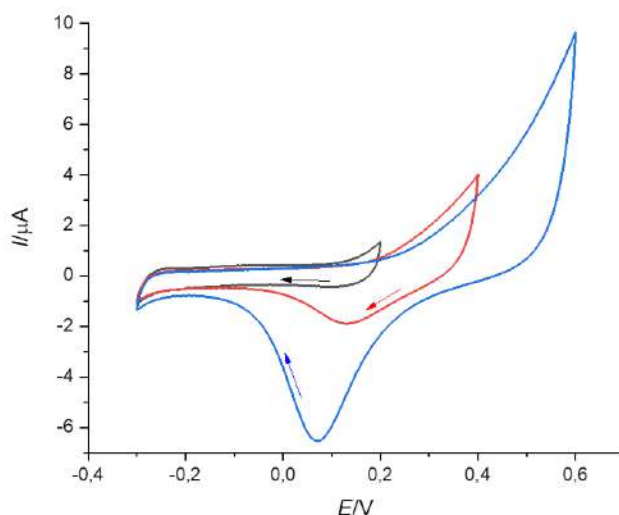
#### **4.3.2 Анализ анодного отклика и факторов, влияющих на чувствительность сигнала при определении пероксида водорода**

Поскольку проведенный анализ катодного сигнала ОНГ нанобиосенсоров показал невозможность использования катодной поляризации для детектирования низких концентраций пероксида водорода, возникает необходимость разработать иной способ для электрохимического детектирования этого аналита на пленках ОНГ, полученных одностадийным методом синтеза. Однако ввиду «сложности» гибридного/сенсорного покрытия с одной стороны, и новизны микроаналитической системы (использовались трафаретные электроды, модифицированные оксидом графена) с другой стороны, разработку принципов работы нанобиосенсоров на основе наночастиц благородных металлов было бы правильнее проводить в модельной системе, используя классические инертные электроды и трехэлектродную электрохимическую ячейку.



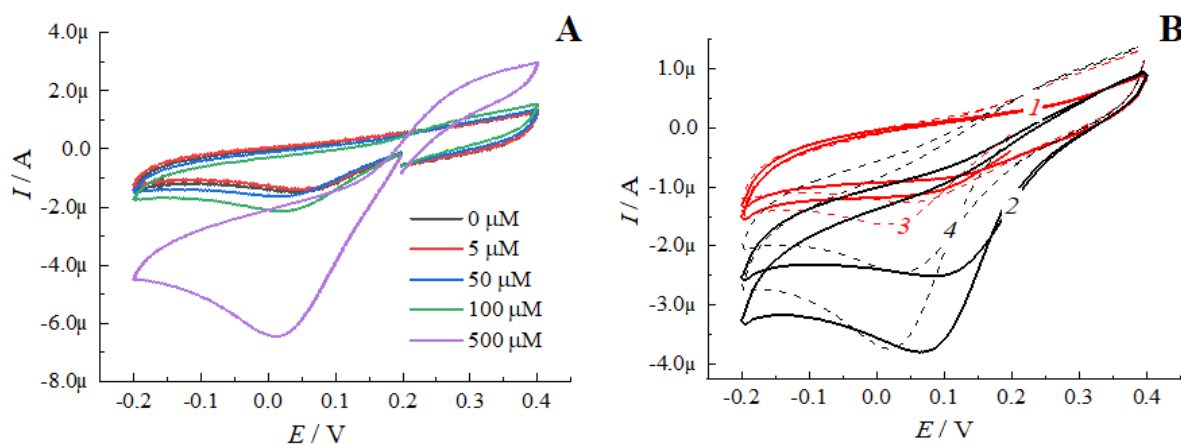
### 4.3.2.1 Разработка поляризационной процедуры определения пероксида водорода в модельных системах

В качестве модельной системы использовали стеклоуглеродный электрод (GCE) в форме диска с электроосажденным на его поверхности палладием. Как было показано в работе [241], оксиды палладия формируются на поверхности частиц при потенциалах положительнее 0.2 В. Из **Рис. 4.11** видно, что помимо пределов поляризации на токовые отклики, соответствующие адсорбции кислорода на палладию и формированию оксидов (в анодной области) и десорбции (электровосстановлению) кислорода в катодной области, существенно влияет наличие растворенного кислорода. Введение в фоновый раствор пероксида водорода приводит к изменению ЦВА: с увеличением концентраций пероксида происходит рост как анодных, так и катодных токовых откликов (**Рис. 4.12А**). Примечательно, что, как и для ОНГ систем на основе SPE/GO (см. **Рис. 4.8**), так и в классической модельной системе в растворах с низкой концентрацией пероксида водорода даже в инертной атмосфере почти не наблюдается чувствительности катодного пикового тока к  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Рис. 4.12А**).



**Рис. 4.11** – ЦВА кривые, записанные в фосфатном буфере с поверхности Pd-NPs на GCE (Ar-атмосфера, в отсутствие  $\text{O}_2$ , черная линия) при скорости сканирования 10 мВ/с, pH 7.5. *Примечание:* Красные и синие линии были

получены в присутствии кислорода. Предел анодного сканирования: 0.2, 0.4 и 0.6 В по сравнению с Ag/AgCl/sat.KCl.



**Рис. 4.12** – ЦВА кривые в фосфатном буфере при скорости сканирования 50 мВ/с, полученные с поверхности GCE, модифицированного Pd-NPs. (А) с различной концентрацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при pH 7.5 в 50 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (В) при различных pH: pH 7.5 (1,2); pH 5.5 (3,4) при (1,3) инертной и (2,4) воздушной атмосферах.

Присутствие молекулярного кислорода в растворе приводит к увеличению катодного тока, а потенциал катодного пика смещается в зависимости от pH (**Рис. 4.12В**). Поскольку концентрация растворенного кислорода сильно зависит от множества факторов, включая температуру, то катодный ток пика в растворах, содержащих растворенный кислород, не может быть использован для обнаружения перекиси водорода нанобиосенсорами на основе наночастиц палладия независимо от типа электрода (трафаретные SPE/GO или GCE-стеклоуглеродные электроды).

Напротив, при потенциале 0.2... 0.4 В наблюдался рост тока анодной ветви в зависимости от концентрации пероксида за счет окислительного разложения пероксида водорода, происходящего на поверхности наночастиц, который можно записать брутто-реакцией:



Согласно данной реакции, разложение пероксида должно облегчать образование оксидов палладия, что приведет к увеличению анодного тока в вышеупомянутом диапазоне потенциалов. Таким образом, представляется возможным количественно определять пероксид водорода в кислородсодержащих водных растворах с помощью Pd-NPs-модифицированных электродов при анодных потенциалах. Однако учитывая, что сформированный оксид палладия может оказывать мешающее влияние, необходимо обновление поверхности частиц палладия путем восстановления оксидов, сформировавшихся во время анодной поляризации.

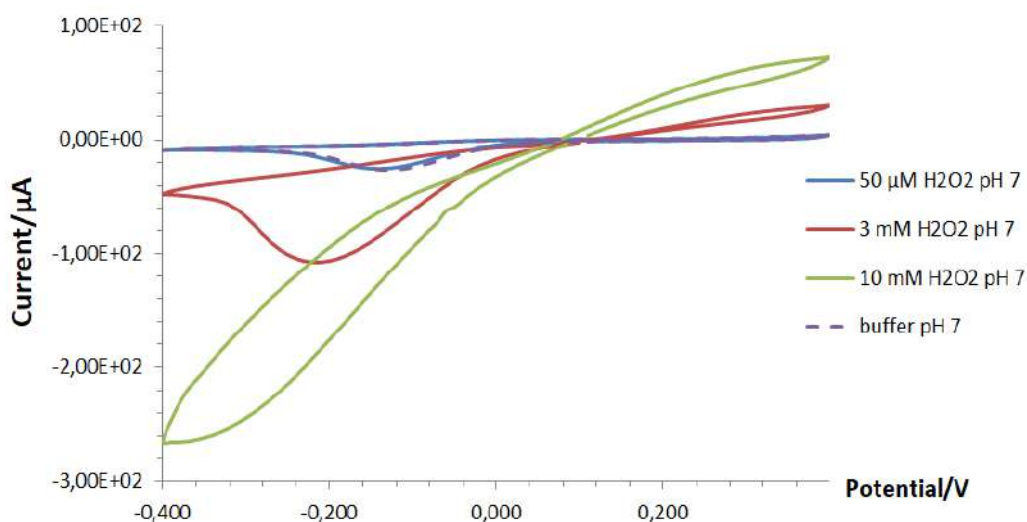
Для этой цели была разработана следующая двухступенчатая процедура поляризации: *первый шаг* – поляризация при потенциале катодного пика для восстановления образующихся Pd-оксидов, *т.е.* для обновления поверхности; *второй шаг* – поляризация при анодном потенциале, выбранном в диапазоне 0.2... 0.4 В для регистрации тока, связанного с окислением пероксида водорода.

Важно отметить, что потенциал и продолжительность первой ступени поляризации существенно зависят от pH, определяемого природой раствора аналита (буферная система или ферментативная среда), присутствия молекулярного кислорода, размера исходных наночастиц в ОНГ и природы органических/биорецепторных соединений в структуре функционального сенсорного слоя. В этом отношении потенциал первой ступени поляризации, выполняемой при потенциале катодного пика, должен быть предварительно оценен в ЦВА-исследованиях для различных экспериментальных условий.

Например, для фосфатного буфера с pH 7.5 и pH 5.5 многоступенчатая амперометрическая процедура на стеклоуглеродном электроде, модифицированном Pd-NPs, проводилась следующим образом: длительность поляризации при потенциале катодного пика 120 с, поляризация при анодном потенциале 0.4 В в течение 30 с. Как видно из **Рис. П4.3** (см. **Приложения**), ток второй ступени поляризации пропорционален концентрации пероксида

водорода в растворе. В то же время, изменение pH и присутствие молекулярного кислорода в растворах с низкой концентрацией  $\text{H}_2\text{O}_2$  не оказывает существенного влияния на реакции, происходящие при потенциалах анодной поляризации.

Далее, разработанный и описанной выше в модельной системе на основе стеклоугрерода ступенчатый режим поляризации, было необходимо реализовать на трафаретных электродах. С этой целью изучали ЦВА на SPE/GO, модифицированных Pd-NPs, и согласно с ними выбирали ступенчатый режим поляризации. Полученные данные представлены на **Рис. 4.13**.



**Рис. 4.13** – ЦВА кривые, записанные в диапазоне от -0.4 В до 0.4 В при 20 мВ/с в фосфатном буфере и растворах  $\text{H}_2\text{O}_2$  с поверхности SPE/GO, модифицированного пленкой Pd-NPs.

Для выбора потенциалов и продолжительности ступеней поляризации на Pd-NPs-модифицированных SPE/GO необходимо вернуться к вопросу о влиянии режимов электроосаждения наночастиц Pd на их электрохимические свойства. Наночастицы, синтезированные при различных параметрах электроосаждения (показано для наночастиц, электроосажденных в течение 30

с и 60 с) тестировали на предмет обнаружения пероксида водорода в многоступенчатом режиме поляризации. Электрокаталитическая способность наночастиц меняется в анодном диапазоне поляризации с изменением размера и плотности их распределения по поверхности электрода, см. **Приложения, Рис. П4.5**. Так, увеличение времени осаждения с 30 с до 60 с сопровождалось увеличением размера частиц с 20 нм до 70-75 нм (см. также **Рис. 4.4**) с последующим снижением чувствительности при определении  $H_2O_2$ .

Далее проводили сопоставление откликов и электроаналитических характеристик электродов, оперированных в разных электрохимических режимах. Результаты определения  $H_2O_2$  приведены в **Табл. 4.1**.

**Табл. 4.1** – Влияние электрохимического режима на аналитические характеристики электродов на основе пленок Pd-NPs (-2,5 мА, время осаждения 30 с) при определении  $H_2O_2$  в капле

Приложенный потенциал, В	Калибровочная зависимость	$R^2$	Чувствительность 0-1000 $\mu\text{M}$ , $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	Область линейности	Предел обнаружения, $\mu\text{M}$	Правильность, % *	RSD**
- 0.08	$Y = -0.0043x - 4.600$	0.943	4.3	100 $\mu\text{M}$ – 100 мМ	250	$30.7 \pm 10.2$	Низкая
- 0.05	$Y = -0.0051x - 4.330$	0.994	5.1	100 $\mu\text{M}$ – 100 мМ	150	$37.7 \pm 3.8$	Низкая
0	$Y = -0.0037x - 2.265$	0.998	3.7	100 $\mu\text{M}$ – 100 мМ	180	$45.2 \pm 5.1$	Низкая
0.02	$Y = -0.0011x - 0.167$	0.999	1.1	100 $\mu\text{M}$ – 100 мМ	180	$48.3 \pm 0.8$	Низкая
0.08	$Y = -0.0007x - 0.041$	0.999	0.7	100 $\mu\text{M}$ – 100 мМ	100	$50.7 \pm 6.4$	Низкая
-0.08 V (шаг 1) 0.2 V (шаг 2)	$Y = 0.0052x + 0.177$	0.998	5.2	5 $\mu\text{M}$ – 100 мМ	7	$101.3 \pm 6.1$	Высокая
-0.08 V (шаг 1) 0.4 V (шаг 2)	$Y = 0.0069x + 0.054$	0.999	6.9	1 $\mu\text{M}$ – 100 мМ	2	$101 \pm 1.0$	Высокая

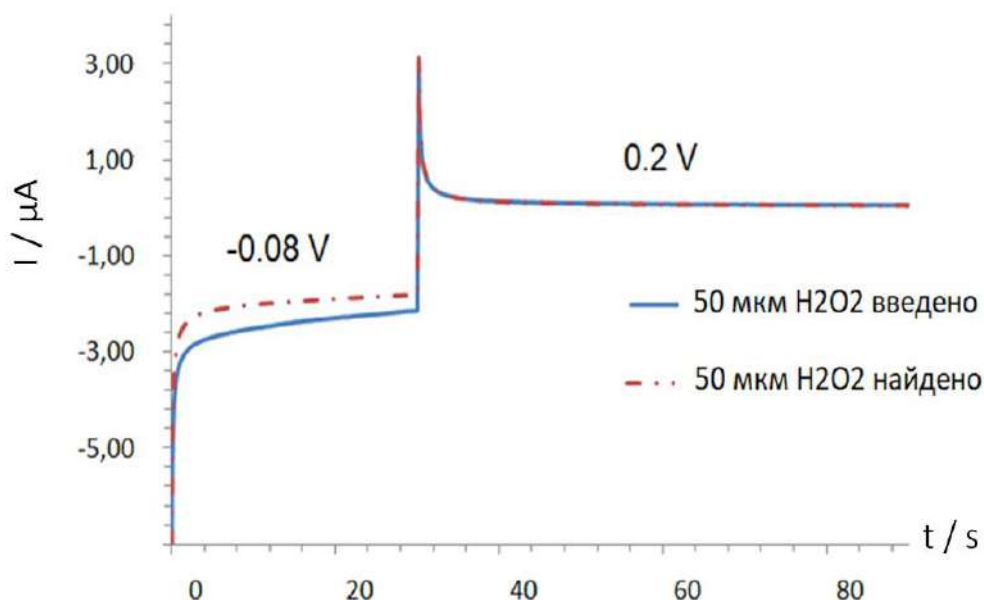
\* оценено в диапазоне ниже 1000  $\mu\text{M}$ .

\*\* воспроизводимость в диапазоне 10-1000  $\mu\text{M}$

Из полученных зависимостей следует, что предлагаемый двух-ступенчатый режим поляризации позволяет повысить чувствительность определения пероксида, расширить линейный диапазон калибровочной зависимости и повысить правильность его определения. В то же время, величина анодного потенциала на второй ступени поляризации может сильно влиять на эти параметры. Поэтому особое внимание при оптимизации способа регистрации сигналов в зависимости от дизайна электродов следует обращать на нахождение величины поляризации электрода.

В частности, несмотря на более высокую чувствительность Pd-NPs (-2.5 мА, 30 с) к обнаружению  $\text{H}_2\text{O}_2$  при 0.4 В против 0.2 В, в дальнейших экспериментах поляризацию следует проводить именно при потенциале 0.2 В. Такой подход позволит минимизировать помехи, возникающие при потенциале 0.4 В от других электроактивных аналитов (ацетофенон, аскорбиновая кислота и т.д.), присутствующих в реальных образцах, а также предотвратить возможную электродеградацию фермента.

Следующим важным вопросом является проверка воспроизводимости сигнала, считываемого в разработанном многоступенчатом амперометрическом режиме (МAM: -0.08 В в течение 30 с, 0.2 В в течение 60 с). Как видно из **Рис. 4.14**, при регистрации сигнала при 0.2 В правильность определения аналита электродом на основе Pd-NPs, работающим в оптимизированном МAM режиме, находится на достаточно высоком уровне (~погрешность не более 2%). Кроме того, для предложенного МAM-режима регистрации аналитического сигнала наблюдалась высокая стабильность базовой линии электрода, а также отсутствие мешающего влияния сопутствующих электроактивных аналитов, см. **Приложения, Рис. П4.6 – 4.8**.



**Рис. 4.14** – Результаты теста на правильность определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  в МАМ-режиме в 150 мкл капле раствора посредством SPE, модифицированного Pd-NPs ( $I_k = -2.5 \text{ mA}$ ,  $t_{эл} = 30 \text{ c}$ ).

Таким образом, благодаря детальному изучению процессов, влияющих на токовый сигнал в полученной электрохимической микроаналитической системе, удалось установить режим поляризации электрода, позволяющий воспроизводимо и точно определять  $\text{H}_2\text{O}_2$  нанобиосенсорами на основе пленок наночастиц благородных металлов.

#### 4.4 Влияние структуры ОНГ слоя на электроаналитические характеристики нанобиосенсоров

Пероксид водорода на поверхности наночастиц благородных металлов в катодной области восстанавливается до воды.[249] При окислении пероксида на наночастицах в анодной области в качестве продукта реакции выделяется кислород, который в свою очередь будет эффективно вовлечен в каскад биокаталитических реакций с использованием оксидаз (например, в реакциях между GOx и глюкозой). Таким образом, за счет постоянного пополнения кислородом, в системе предотвращается его быстрое истощение и дефицит (см. реакции (2.2) и (4.1)), что увеличивает время жизни и эффективность

работы ферментов группы оксидаз, а значит, и эффективность ферментативного определения низкомолекулярных биоаналитов. В этой связи, гибридные нанобиосенсоры с инкапсулированными оксидазами со всех сторон (биохимический + электрохимический аспекты) логичнее оперировать именно в анодной области потенциалов согласно предложенному двухступенчатому МАМ протоколу.

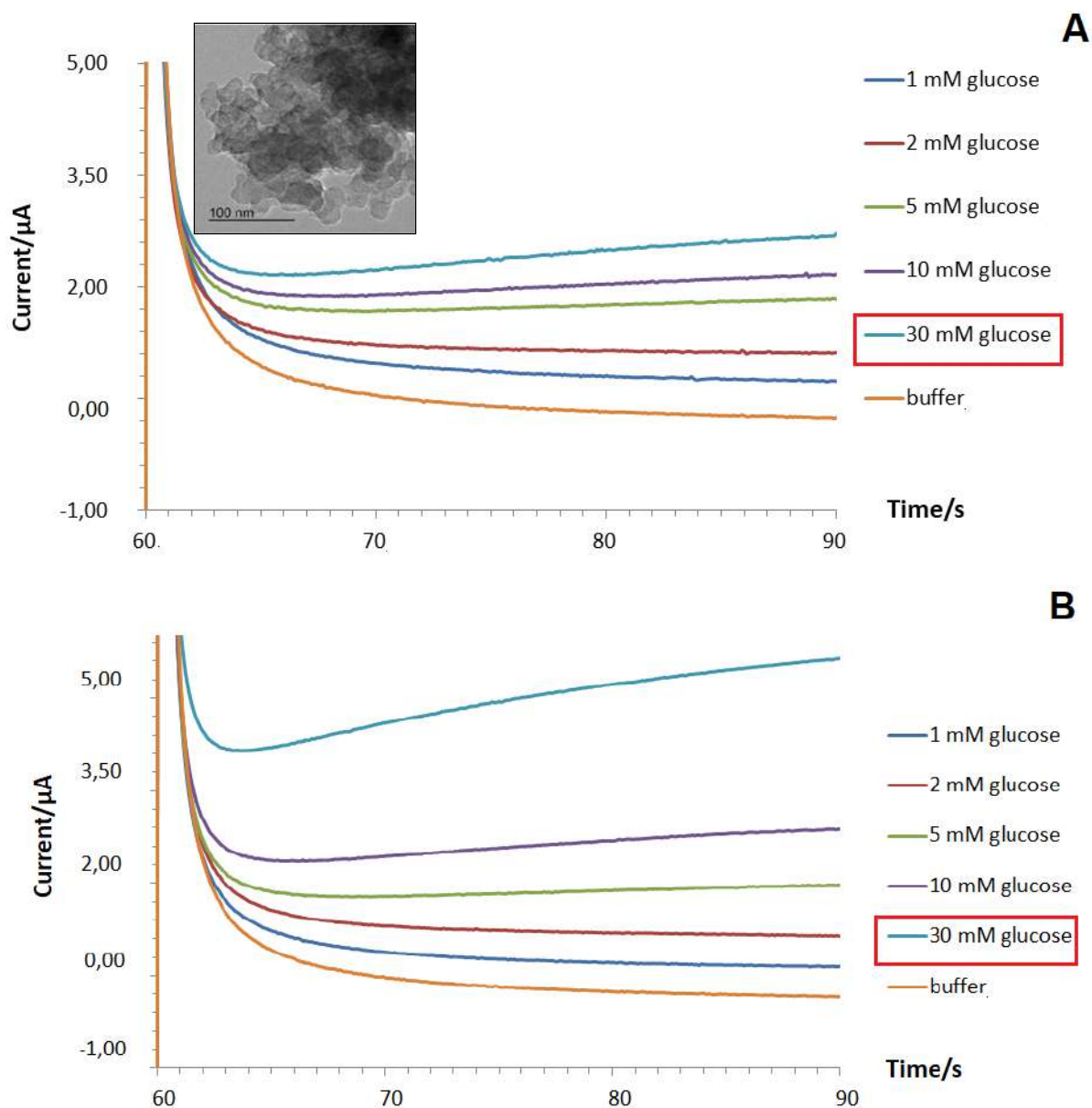
Далее в оптимизированном МАМ режиме проводили определение глюкозы. С помощью разработанных нанобиосенсоров (одностадийный метод) была получена линейная зависимость анодного тока от концентрации глюкозы в аналитически значимом диапазоне от 1 мМ до 10 мМ, **Рис. 4.15А**.

Для расширения области динамического диапазона обнаружения глюкозы нанобиосенсорами на основе Pd-NPs, Нафиона и GOx, была реализована следующая конструкция сенсорной пленки. Сначала на поверхность трафаретного электрода SPE/GO осаждали индивидуальный слой Pd-NPs при -2.5 мА в течение 30 с (*этап 1*). Затем проводили одностадийную инкапсуляцию фермента и Нафиона из раствора смешанного электролита (Pd-NPs/Pd-NPs/Pd/GOx/Naf) (*этап 2*), **Рис. 4.15А**. Такой дизайн позволял получить двухслойную конструкцию функциональной пленки ОНГ нанобиосенсора. Благодаря предварительной модификации поверхности электрода Pd-NPs на *этапе 1* удалось увеличить линейный динамический диапазон нанобиосенсора к глюкозе с 1 – 10 мМ до 1 – 30 мМ, **Рис. 4.15В**.

Вероятно, что первый слой Pd-NPs (*этап 1*) облегчает электрический контакт с Pd-NPs из гибридного сенсорного ОНГ слоя, содержащего фермент (*этап 2*). Предложенный подход к изменению электроаналитических характеристик нанобиосенсоров за счет простой перепроектировки слоя электрокатализатора следует рассматривать как возможную альтернативу сложным, дорогостоящим, трудоемким технологиям с использованием платформы генетически-кодированных ферментов. В этом случае для улучшения откликов систем не нужно оптимизировать ни тип используемых



штаммов микроорганизмов, ни количество иммобилизованного фермента, исследовать влияние рН или стратегии иммобилизации ферментов в сенсорный слой. Область линейности калибровочной зависимости возможно расширить за счет простого увеличения доли неорганического компонента – слоя электрокатализатора.



**Рис. 4.15** – Хроноамперометрические кривые в МАМ режиме с поверхности нанобиосенсоров с ОНГ пленками в присутствии глюкозы: **A** – одностадийный дизайн Pd-NPs/GOx/Naf (вставка – SEM-изображение поверхности электрода); **B** – двухстадийный дизайн Pd-NPs/Pd-NPs/Pd/GOx/Naf.

Сравнение аналитических характеристик гибридной системы при анализе растворов глюкозы с аналогичными на основе оксидаз, показывает, что предлагаемый двухстадийный дизайн и способ регистрации сигнала в МАМ режиме для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  (как продукта ферментативной реакции) позволяют:

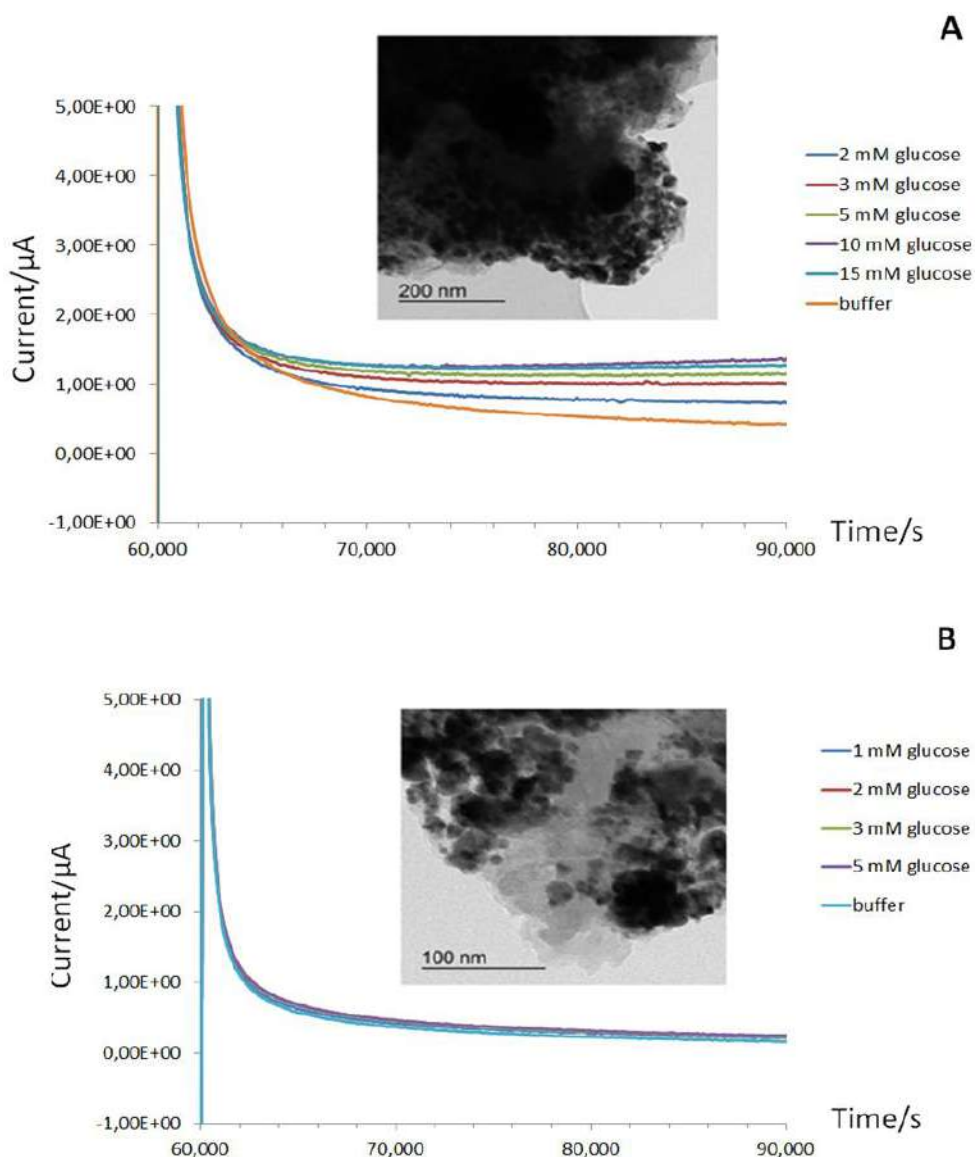
- (1) значительно уменьшить величину потенциала анодной поляризации;
  - (2) исключить влияние мешающего компонента (кислорода) на аналитический отклик системы;
  - (3) увеличить линейный динамический диапазон анализа;
  - (4) существенно повысить правильность и воспроизводимость определения,
- см. **Табл. 4.1.**

Кроме того, полученные закономерности позволяют сделать промежуточный вывод, что при постоянном количестве фермента и полимерного связующего количество и диаметр наночастиц, выполняющих роль электрокатализаторов (неорганический компонент) в дизайне непосредственно влияет на выходные электроаналитические параметры нанобиосенсоров с ОНГ пленками.

Следует отметить, что нанобиосенсоры, полученные одностадийным методом из смешанных растворов электролитов при аналогичных параметрах электролиза (-2.5 мА, 30 с), но содержащие вместо Нафиона прекурсоры альгината и пиррола, показали значительно более низкие электроаналитические характеристики при анализе растворов глюкозы, **Рис. 4.16.**

Область линейности нанобиосенсора на основе альгината, используемого в качестве связующего, не превышала диапазона 1 – 3 мМ, а для нанобиосенсора на основе полипиррола – 1 мМ. Кроме того, чувствительность анализа была крайне низкой. Такое электрохимическое поведение гибридных систем, вероятно, связано с отсутствием капсульной структуры при формировании функционального слоя. Для таких систем происходит

формирование адсорбционного слоя функциональной пленки, что приводит к быстрому вымыванию водорастворимого фермента, **Рис. 3.19C,D**.



**Рис. 4.16** – Хроноамперометрические кривые, записанные в МАМ режиме с поверхности нанобиосенсоров на основе Pd-NPs с инкапсулированным GOx и полимерным связующим в присутствии глюкозы: **A** – с альгинатом; **B** – с пирролом. *Вставки* – SEM-изображения поверхности электродов.

Важно отметить, что не только тип полимерного связующего, архитектура/дизайн и количество электроосажденного палладия может оказывать влияние на электроаналитические свойства нанобиосенсоров

глюкозы на основе ОНГ, но и такие факторы, как концентрация биорецептора в смешанном растворе электролита, и режим соосаждения. Проблемы вымывания/выщелачивания полимеров и ферментов из функциональных слоев достаточны известны и ведут к быстрой деградации сигналов, получаемых с поверхности нанобиосенсоров.[49][229] В связи с этим, далее необходимо определить компромисс между дизайном 3D-структур на основе наночастиц благородных металлов, удерживающих Нафион и ферменты от неконтролируемого вымывания, и, в то же время, обеспечивающих биохимическую активность пленки в присутствии биоаналита.

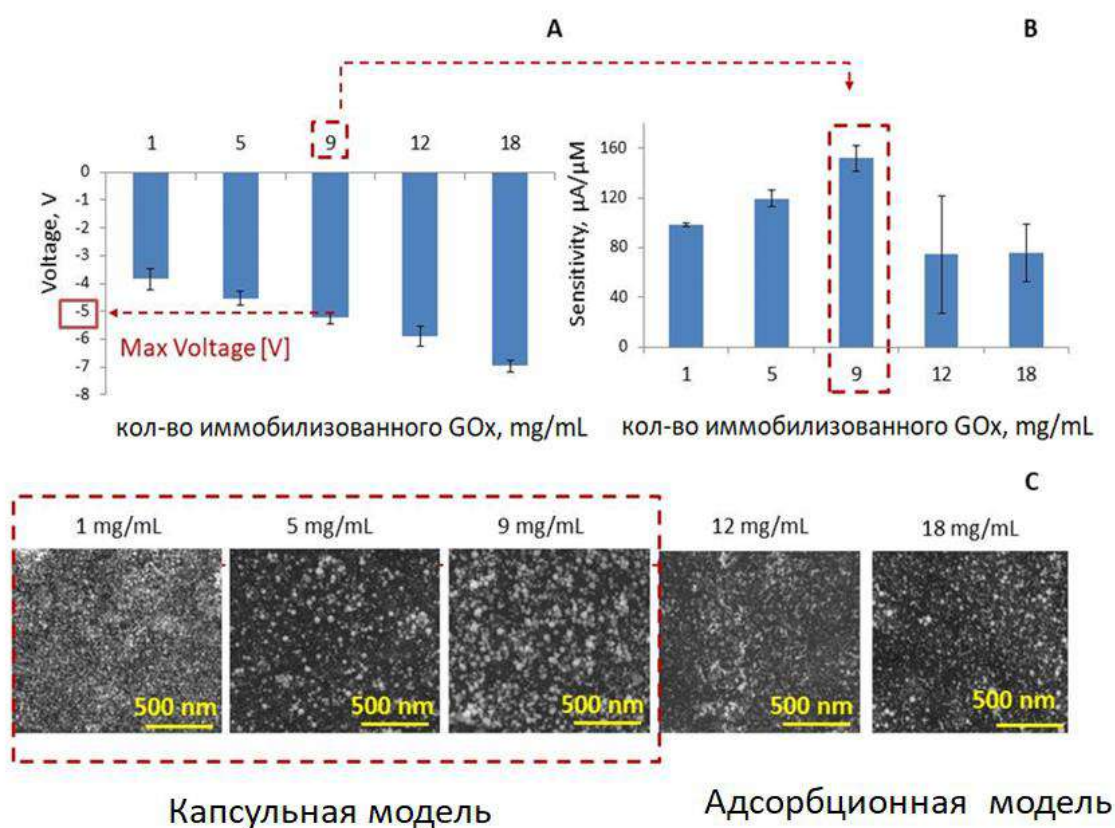
С этой целью далее варьировали количество фермента (GOx в качестве примера), которое возможно иммобилизовать посредством гальванического нанесения на SPE/GO электрод вместе с наночастицами (рассмотрено на примере Pd-NPs) и Нафиона из многокомпонентного раствора электролита.

#### **4.4.1 Влияние концентрации фермента на структуру функционального ОНГ слоя и чувствительность определения биомолекул**

Увеличение концентрации GOx с активностью 10 KU с 1 мг/мл до 9 мг/мл в смешанном растворе синтеза в гальваностатических условиях сопровождалось ростом напряжения в ходе синтеза с одной стороны, а с другой – увеличением чувствительности нанобиосенсоров к глюкозе, **Рис. 4.17А,В**. Дальнейшее увеличение концентрации GOx (10 KU) в растворе до значений 12 мг/мл и 18 мг/мл приводило к значительной потере в чувствительности определения глюкозы.

Наблюдаемое явление угнетения чувствительности сенсора с ростом концентрации GOx в растворе выше 9 мг/мл объясняется слишком высокой концентрацией органического компонента в растворе электролита, приводящей к образованию адсорбционного ОНГ слоя вместо желаемой 3D-капсульной структуры. Эта тенденция была подтверждена методом электронной сканирующей микроскопии, **Рис. 4.17С**. Кроме того, увеличение концентрации GOx в растворе электролита с 1 мг/мл до 18 мг/мл

сопровождалось одновременным увеличением напряжения во время формирования ОНГ слоя с  $-3.8 \pm 0.37$  В до  $-6.9 \pm 0.21$  В (Рис. 4.17А). В целом, если напряжение во время соосаждения фермента достигает уровня  $-5.23 \pm 0.21$  В, то из-за конформационных изменений в структуре фермента можно ожидать значительное ухудшение аналитических характеристик ОНГ нанобиосенсоров. Следовательно, концентрация используемых ферментов при электроосаждении не должна превышать 5-9 мг/мл.



**Рис. 4.17** – Настройка аналитических свойств 3D нанобиосенсоров на основе Pd-NPs посредством изменения количества соосажденного фермента (параметры синтеза: ток  $-2.5$  мА, время электролиза 30 с). **А** – электрохимические отклики, зарегистрированные в режиме хронопотенциометрии во время синтеза нанобиосенсоров из смешанного раствора электролита (одностадийный синтез), **В** – значения чувствительности нанобиосенсоров в присутствии глюкозы. **С** – микрофотографии поверхности нанобиосенсоров.

Интересно также, что увеличение активности фермента с 10 KU до 250 KU при одинаковой концентрации в растворе электролита не сопровождалось линейным увеличением в чувствительности нанобиосенсоров. Более того, нанобиосенсоры, полученные из растворов, содержащих 10 KU или 50 KU GOx, проявляли более высокие аналитические характеристики при определении глюкозы, чем нанобиосенсоры, синтезированные с использованием фермента с активностью 250 KU. Базовые линии нанобиосенсоров на основе менее активных ферментов были значительно стабильнее. Такой результат объясняется высокой степенью очистки ферментов с активностью 250 KU, и, как результат повышенной чувствительностью к воздействию токов, что и приводит к их частичной деградации или конформационным изменениям.

Обобщая вышеизложенные закономерности можно заключить, что изменение концентрации фермента в смешанном растворе электролита также оказывает заметное влияние на модель построения функционального ОНГ слоя нанобиосенсоров. Исходная активность фермента в растворе не влияет на структуру формирующегося сенсорного слоя, однако, позволяет управлять чувствительностью нанобиосенсоров, синтезированных по одностадийной методике.

#### **4.5 Влияние структуры ОНГ слоя на удержание фермента и электроаналитические характеристики нанобиосенсоров**

Для создания оптимальной конструкции гибридных нанобиосенсоров, обеспечивающих длительное удержание на поверхности и хранение ферментов, а также более глубокого понимания диффузионных процессов в гибридной системе, далее было необходимо исследовать нанобиосенсоры с различной архитектурой и найти соотношение между плотностью и размером Pd-NPs (неорганический компонент), и биоорганической оболочкой (фермент-полимер).

С этой целью во время изготовления нанобиосенсоров морфология и

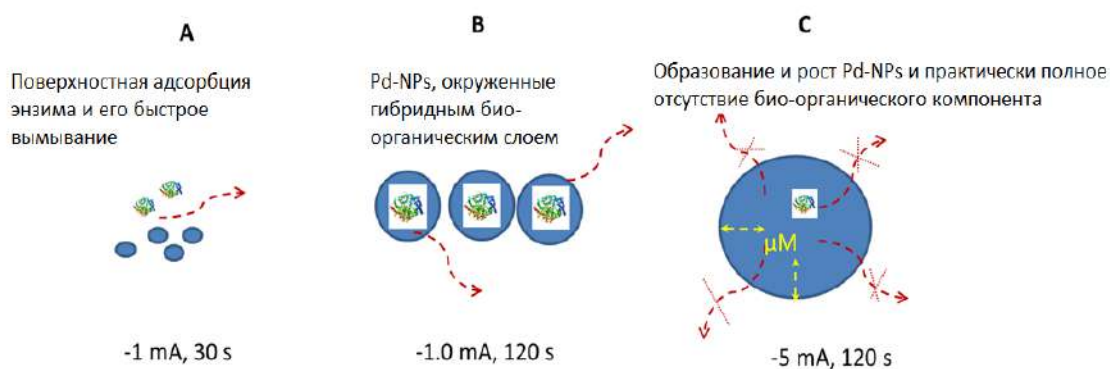
размер гибридных наночастиц тщательно контролировались методами сканирующей и просвечивающей микроскопии с последующей оценкой откликов, генерируемых в присутствии аналита. Важно отметить, что помимо базовой линии, чувствительности (Табл. 4.2) и области линейности, нанобиоинженерный этап синтеза влияет на механическую стабильность сформированного функционального слоя (как неорганического, так и органического составляющего) и правильность определения.

**Табл. 4.2** – Влияние дизайна ОНГ нанобиосенсоров на их аналитические характеристики (оценивались в присутствии глюкозы в капле)

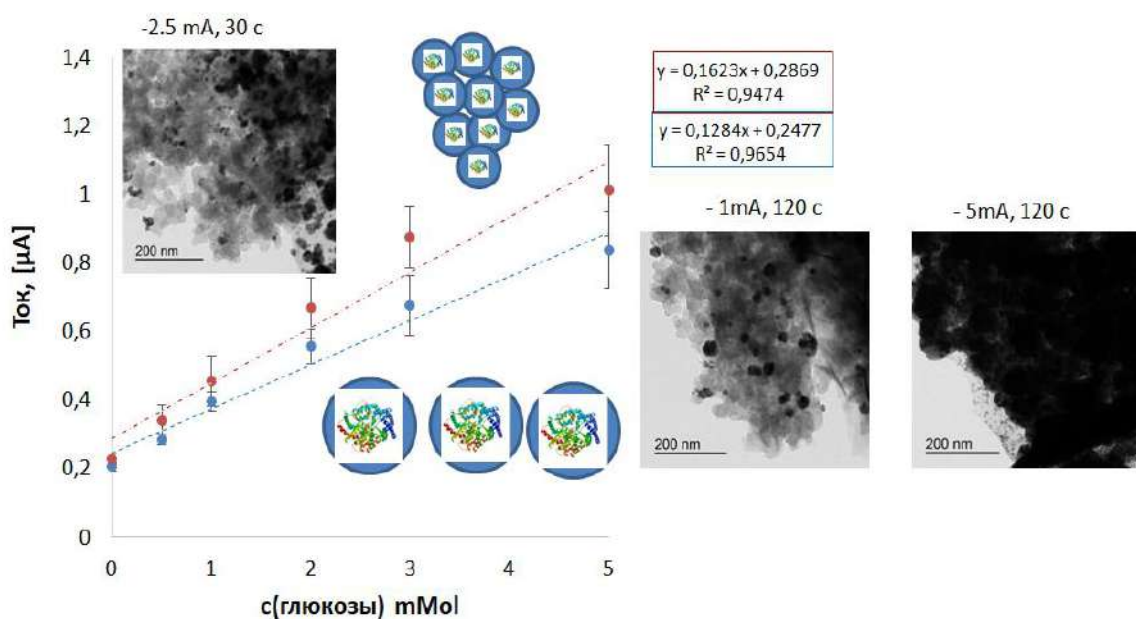
Дизайн	Область линейности, мМ	Чувствительность, $\mu\text{A}/\mu\text{mol}$	Базовая линия, $\mu\text{A}$	Правильность определения, %
-2.5 мА, 30 с 5 мг/мл (GOx)	0.2-100	115	$2.90 \cdot 10^{-1} \pm 0.11$	92
-5 мА, 30 с 5 мг/мл (GOx)	5-50	49	$1.20 \cdot 10^{-1} \pm 0.12$	87
-2.5 мА, 30 с 9 мг/мл (GOx)	0.2-100	160	$5.50 \cdot 10^{-1} \pm 1.27$	96
-5 мА, 120 с 9 мг/мл (GOx)	Инкапсуляции фермента не происходит	Инкапсуляции фермента не происходит	$3.05 \cdot 10 \pm 0.17$	-
-2.5 мА, 90 с 9 мг/мл (GOx)	1-5	468	$4.83 \cdot 10^{-1} \pm 0.32$	89
-1.0 мА, 30 с 9 мг/мл (GOx)	1-10	40	$7.5 \cdot 10^{-1} \pm 0.11$	94

Что касается технических аспектов конструкции нанобиосенсоров, то снижение обоих параметров синтеза (тока и времени осаждения) не сопровождается образованием функциональной пленки с выраженными сенсорными свойствами, что объясняется недостаточным или неполным удерживанием фермента в этих условиях. Уменьшение тока с -2.5 мА до -1 мА и увеличение времени осаждения с 30 с до 120 с при производстве нанобиосенсоров ведет к увеличению размера гибридных Pd-NPs и потери чувствительности при определении глюкозы с  $162 \pm 8 \mu\text{A}/\mu\text{mol}$  (синтез при

-2.5 мА, 30 с) до  $128 \pm 12 \mu\text{А}/\text{мкмоль}$  (-1 мА, 120 с). Одновременное увеличение обоих параметров, тока и времени осаждения (-5 мА, 120 с), сопровождается полной потерей биохимической активности, что объясняется укрупнением неорганического компонента (Pd-NPs) и отсутствием биоорганического составляющего, **Рис. 4.18**. Методом ПЭМ для Pd-NPs, синтезированных при токе -2.5 мА в течение 30 с, было подтверждено образование биоорганической оболочки, **Рис. 4.19**.



**Рис. 4.18** – Схематическое изображение влияния параметров синтеза на структуру ОНГ пленок при электроосаждении из растворов смешанных электролитов.



**Рис. 4.19** – Калибровочные зависимости, полученные с нанобиосенсоров с пленками Pd-NPs/GOx/Naf в присутствии глюкозы: **верхняя линия**: сенсор



синтезируется при -2.5 мА, 30 с; **нижняя линия** – сенсор синтезируется при -1 мА в течение 120 с (GOx, 9 мг/мл). *Примечание:* калибровочная зависимость для нанобиосенсора, синтезированного при -5 мА в течение 120 с, не может быть показана (в этих условиях фермент не удерживается на поверхности). *Вставки* – ПЭМ изображения.

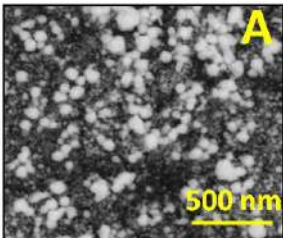
Дальнейшее увеличение тока и времени осаждения приводило к увеличению содержания Pd-NPs и уменьшению органического (содержащего фермент) компонента. В результате было обнаружено отсутствие электрохимической активности таких гибридных нанобиосенсоров. Увеличение тока до -5 мА приводит к образованию адсорбционно-подобного ОНГ слоя, который не удерживается должным образом на поверхности Pd-NPs и быстро элюируется после погружения в водные растворы биоаналитов.

#### **4.6 Влияние толщины ОНГ пленки на отклик амперометрических нанобиосенсоров**

Одной из основных проблем в биоэлектрохимии является правильное соединение ферментов с поверхностью для обеспечения непосредственного контакта Red/Ox центра биорецептора и электрода.[250]

В этой связи было необходимо определить влияние толщины пленки функционального слоя нанобиосенсоров на получаемые электроаналитические отклики. С этой целью на одном и том же электроде последовательно наносили несколько сенсорных слоев, включая чистые Pd-NPs, а также гибридный слой с иммобилизованной лактозооксидазой (Pd/LOx/Naf) и глюкозооксидазой (Pd/GOx/Naf). Как и ожидалось, архитектура и толщина полученного активного слоя оказывала существенное влияние на отклик нанобиосенсоров, **Табл. 4.3.**

**Табл. 4.3** – Влияние толщины активного слоя на отклик ОНГ нанобиосенсоров

Область линейности (LDR)/предел обнаружения (LOD)	Дизайн	
		А: 1-ый слой: Pd-NPs -2.5 мА 30 s 2-ой слой: Pd/LOx/Naf -2.5 мА 30 s 3-слой: Pd/GOx/Naf -2.5 мА 30 s Толщина пленки: 15 – 20±5 нм 
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , LDR, мМ LOD, μМ	0.02 – 100 мМ 7 ± 2 μМ	1 – 100 мМ 180 ± 20 μМ
Глюкоза, LDR, мМ LOD, μМ	0.2 – 50 мМ 100 ± 10 μМ	1 – 15 мМ 500 ± 45 μМ
Лактат LDR, мМ LOD, μМ	0.5 – 2 мМ 250 ± 20 μМ	1.5 – 2 мМ 850 ± 85 μМ

Данные сканирующей микроскопии (см. вставку микрофотографий в **Табл. 4.3**) показали, что толщина функционального слоя составляет всего 15-20 нм, что значительно улучшает коммуникацию между Red/Ox центром биорецептора и поверхностью электрода. Увеличение тока до -5 мА и времени осаждения от 30 с до 120 с приводит к агломерации слоев и образованию более плотной функциональной пленки. Такой дизайн скорее представляет собой послойную архитектуру, состоящую из наночастиц разной формы, диаметра и толщины.

Предположительно из-за увеличения толщины функционального слоя на поверхности электрода область линейности, полученная с этих нанобиосенсоров, не является оптимальной.

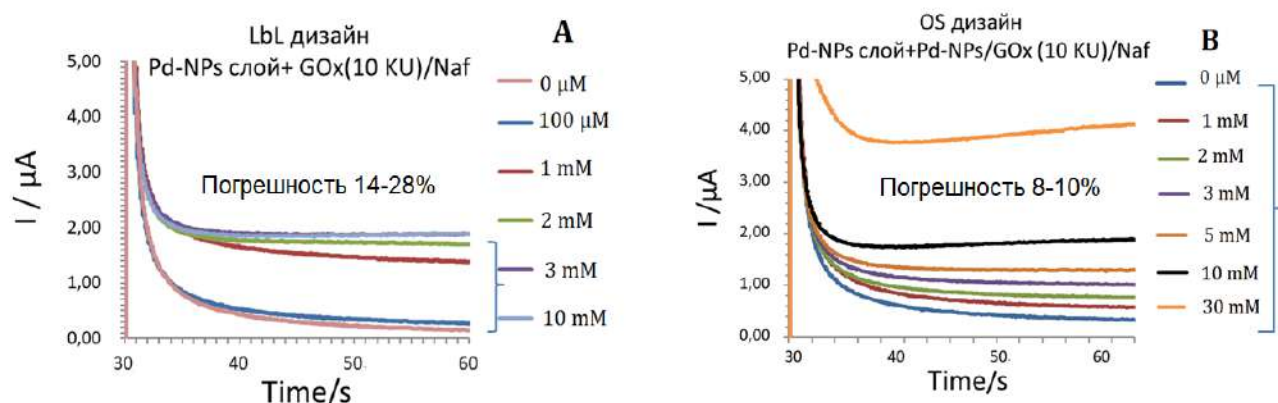
Улучшенные электроаналитические характеристики нанобиосенсоров с архитектурой слоя, полученного при -2.5 мА в течение 30 с, можно объяснить образованием тонкой пленки на поверхности электрода, что облегчает

доставку анализируемого вещества (пероксид водорода), выделяющегося во время ферментативной реакции к каталитическим центрам (Pd-NPs), в том числе за счет сокращения диффузионного пути.

Стоит отметить, что электрохимические свойства наночастиц металлов к пероксиду водорода моделируют поведение ферментов, разлагающих пероксид водорода в живых клетках, в *т.ч.* пероксидаз и каталаз. В связи с этим повышенный интерес вызывает вопрос о сопоставлении свойств ферментативных систем, палладий-содержащих электродов и их гибридов в реакциях с  $H_2O_2$ .

Для сравнения аналитических характеристик LbL и новых (OS) нанобиосенсоров, проводили моделирование послойной структуры электрода. На поверхность электрода наносили Pd-NPs по стандартной процедуре электроосаждения. Затем пипетировали 3 мкл смеси жидкого фермента и Нафиона в соотношении 1:1 и оставляли электрод для высыхания функционального слоя при 4 °C в течение 24 часов. После высыхания слоя проводили электрохимические испытания электрода в растворах глюкозы,

**Рис. 4.20.**



**Рис. 4.20** – Сравнение аналитических характеристик LbL (A) и OS (B) нанобиосенсоров при испытаниях в растворах глюкозы.

Очевидно, что за счет улучшенной стабильности всех компонентов ОНГ слоя диапазон линейности градуировочных зависимостей для OS-ОНГ нанобиосенсоров существенно выше, чем для LbL-ОНГ аналогов.

#### 4.7 Сравнение электрокаталитической активности к пероксиду водорода сенсоров на основе Pd-NPs и их гибридов с оксидоредуктазами

Сенсоры на основе наночастиц благородных металлов, выполняющие роль искусственных каталаз или пероксидаз обычно имеют ряд преимуществ при анализе пероксидов по сравнению со способами его ферментативного определения. Сюда следует отнести длительное хранение без потери в активности (не менее 2 лет) и чувствительности анализа (сенсорные слои на основе ферментов обычно быстро деградируют ~30% в 5-7 дней), а также высокую стабильность базовой линии.

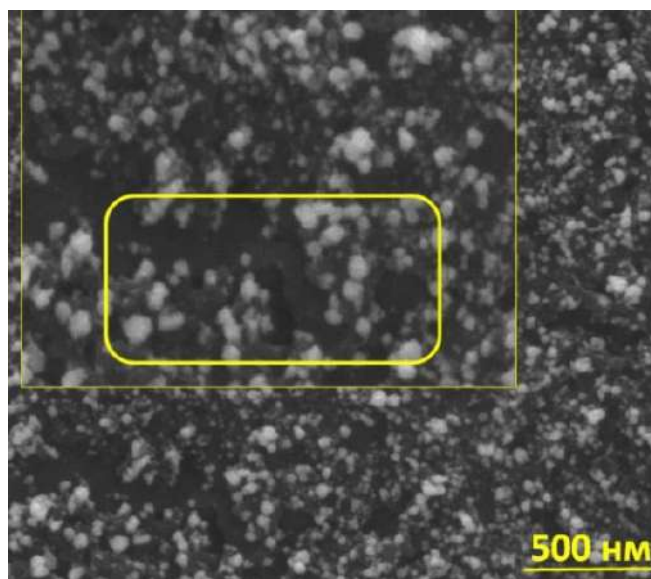
Для сравнения электрохимического поведения и определения чувствительности к пероксиду водорода сенсоров на основе природных ферментов (**I группа**) с сенсорами на основе Pd-NPs (**II группа**), а также гибридных систем типа Pd-NPs+10  $\mu$ L раствора жидкого фермента, сформированных путем иммобилизации капли фермента непосредственно на поверхности Pd-NPs (**III группа**) и ОНГ, полученных одностадийным электролизом смешанных растворов электролитов (**IV группа**), были изготовлены 4 группы биосенсоров. При снятии калибровочных зависимостей с сенсоров **I группы** наночастицы металлов не использовались, и к капле пероксида водорода в буфере (150  $\mu$ L) добавляли 10  $\mu$ L жидкого фермента (1 мг/мл раствора САТ в буфере или 1 мг/мл HRP).

При создании сенсоров **III группы** поверхность трафаретных электродов (SPE/GO) предварительно модифицировали слоем наночастиц, Pd-NPs. При калибровке таких сенсоров к раствору H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> добавляли 10  $\mu$ L фермента (1 мкг/мкл), аналогично подходу, используемому при подготовке сенсоров **I группы**.

Для синтеза сенсоров **IV группы** проводили одностадийное инкапсулирование/соосаждение ферментов из растворов электролитов, полученных при смешении прекурсоров альгината (или Нафiona) с Pd<sup>2+</sup>-содержащим электролитом и ферментом каталазой, САТ (1/1/1 (об./об)). По

аналогичным протоколам проводили иммобилизацию пероксидазы хрена, HRP. Электролиз осуществляли при тех же токах и времени, что и осаждение индивидуальных Pd-NPs.

Данные сканирующей электронной микроскопии показывают, что на поверхности электродов для гибридов **IV группы** происходит формирование двухкомпонентной пленки, **Рис. 4.21**. В образце присутствует как слой биоорганического компонента (фермент-альгинат/фермент-Нафийон – более светлая пленка), так и наночастицы палладия (более мелкие темные частицы). Таким образом, биополимерный слой на поверхности трафаретных электродов удерживается слоем неорганических наночастиц за счет адсорбции, что предотвращает интенсивное вымывание органического составляющего ОНГ пленки при последующих электрохимических экспериментах.



**Рис. 4.21** – Микроизображение, полученное с поверхности ОНГ пленки на основе Pd-NPs с соосажденной пероксидазой (HRP) и альгинатом (ALG), **IV группа**. Желтым цветом выделены области с наиболее выраженным и видимым слоем соосажденного биополимерного компонента.

Следует отметить, что структура слоя, полученная из растворов смешанных электролитов, содержащих прекурсоры альгината (группа

природных полимеров) и пероксидазы/или каталазы, явно отличается от капсульной структуры, представленной и валидированной при иммобилизации фермента GOx и Нафiona (см. Главу 3). Тем не менее, соосаждение биополимерного компонента совместно с наночастицами палладия в текущих условиях эксперимента и формирование тонкой функциональной ОНГ пленки на поверхности трафаретных электродов очевидно.

Далее оценивались электрокаталитические свойства сформированных ОНГ пленок на основе САТ, HRP, полимеров и Pd-NPs. При исследовании электрохимических откликов, полученных при анализе растворов пероксида водорода с поверхности таких сенсоров с использованием разработанного режима регистрации аналитического сигнала (см. Главу 4), было обнаружено несколько иное поведение систем, как в катодной области потенциалов при  $-0.08$  В, так и в анодной при  $0.2$  В по сравнению с сенсорами на основе индивидуальных Pd-NPs или их гибридов с инкапсулированным GOx (см. Приложение, см. Рис. П4.8). Так, сигнал в катодном диапазоне потенциалов при  $-0.08$  В (область поляризации Pd-NPs в двухступенчатом амперометрическом режиме) изменяется линейно с увеличением концентрации  $H_2O_2$  в пределах от 50 до 1000 мкмоль. Предел обнаружения пероксида в этом случае составлял  $7 \pm 2$  мМ. Другими словами одностадийная иммобилизация  $H_2O_2$ -чувствительных ферментов совместно с Pd-NPs и полимерами позволяет успешно подавить конкурентные реакции (электровосстановление кислорода и оксидов палладия), которые обычно протекают на наночастицах в катодной области (см. раздел 4.3).

Кроме того, чувствительность определения пероксида водорода в анодной области сенсорами на основе гибридных пленок Pd-NPs/HRP/Naf или Pd-NPs/HRP/ALG была в 4-5 раз выше, чем сенсорами на основе индивидуальных Pd-NPs, см. Приложение, Рис. П4.9. Этот эффект объясняется процедурой электрохимической регенерации HRP [251,252] за

счет переноса электронов с Pd-NPs, выполняющих роль электроактивного слоя, что приводит к выраженному синергическому эффекту в гибридной системе в области анодных потенциалов. Вероятный механизм можно представить так:



Пероксид водорода формирует комплекс с HRP, который может окислять палладий (донор), вызывая увеличение токовых откликов. Кроме того, в анодной области  $\text{H}_2\text{O}_2$  напрямую окисляется на поверхности Pd-NPs (электрокаталитическое разложение), что подтверждается экспериментом с использованием кислородного сенсора:



Активный кислород, высвобождаемый в реакциях, может адсорбироваться на поверхности Pd-NPs, вызывая образование PdO. Реакции (4.5) – (4.7) рециркулируются на электроде, что приводит к увеличению токовых значений в двухступенчатом амперометрическом МАМ режиме.

Полученные закономерности, с одной стороны, подтверждают факт успешной инкапсуляции природных оксидоредуктаз совместно с ALG/или Нафионом и Pd-NPs в оптимизированных ранее для иммобилизации GOx условиях и сохранение их активности после электроосаждения, а с другой стороны – доказывают правильность предложенного способа регистрации аналитического сигнала при детектировании пероксида водорода нанобиосенсорами на основе Pd-NPs (анодная область).

При замене пероксидазы в составе ОНГ пленок на каталазу (CAT) электрохимическое поведение электрода заметно меняется. Так, независимо от типа полимерного связующего, используемого при синтезе ОНГ, в анодной области потенциалов с увеличением концентрации пероксида водорода для гибридных Pd-NPs/CAT/Naf или Pd-NPs/CAT/ALG нанобиосенсоров не было зафиксировано линейного возрастания токовых откликов. Отсутствие сигнала

на Pd-NPs в области анодных потенциалов 0.2 – 0.4 В объясняется быстрым отводом  $\text{H}_2\text{O}_2$  из системы уже во время катодной поляризации электрода за счет реакции с каталазой (CAT). Другими словами, в системе не остается свободного пероксида для его окисления на поверхности Pd-NPs в анодной области (кинетика параллельных реакций на этом этапе не изучалось).

В то же время, сигнал в катодном диапазоне потенциалов при -0.08 В (область поляризации Pd-NPs при использовании двухступенчатого амперометрического режима) увеличивается линейно с увеличением концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Этот эффект объясняется значительным ростом концентрации кислорода, выделяющегося при разложении пероксида каталазой.

В сравнении с каталазой, разложение пероксида пероксидазой хрена протекает без выделения кислорода (см. **Главу 2**), что и объясняет различия в электрохимическом поведении этих систем с Pd-NPs.

Данные кислородного оптического минисенсора подтверждают это предположение. Так, в условиях отсутствия CAT, при разложении 10 мМ пероксида водорода на Pd-NPs уровень выделения кислорода не превышал отметку в 400 микромоль/л в независимости от дизайна наночастиц (индивидуальные Pd-NPs наночастицы или ОНГ на основе ALG, Naf). Согласно данным кислородного минисенсора, после соосаждения CAT совместно с Pd-NPs и Нафионом уровень выделения кислорода при разложении 10 мМ пероксида водорода в капле достигал значений в 1200-1500 микромоль/л. Этот факт свидетельствует о синергетическом эффекте между Pd-NPs и инкапсулированным/соосажденным ферментом CAT при взаимодействии с пероксидом.

Следует отметить, что нанобиосенсоры с иммобилизованным слоем CAT требуют более высокой катодной поляризации, чем -0.08 В, выбранной для электродов на основе индивидуальных Pd-NPs или их гибридов с GOx. Так, например, оптимальные результаты, в том числе, чувствительность



электроаналитического определения при работе с каталазой были получены в амперометрическом режиме при потенциале  $-0.4$  В, что хорошо согласуется с закономерностями, систематизированными в [253].

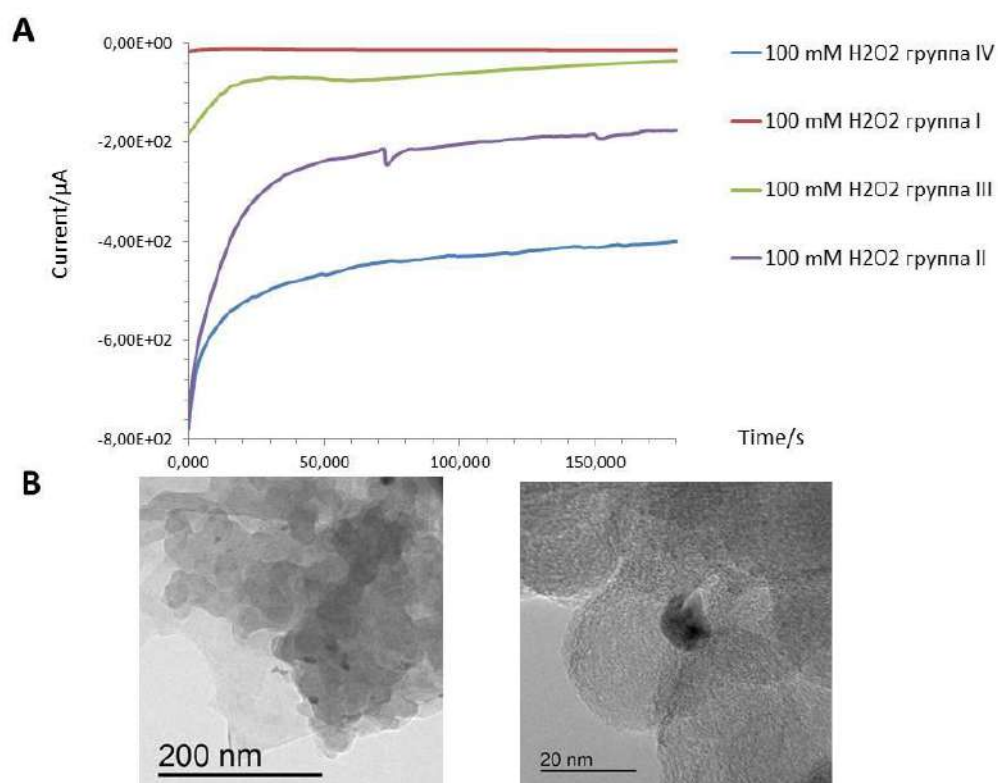
Известно, что природная каталаза имеет очень массивную структуру, с глубоко «спрятанным» внутри и плохо доступным к поверхности электрода кофактором на основе комплексов Fe (III/II).[254] В результате, из-за обедненного переноса электронов в около-электродном пространстве, в большинстве случаев линейные диапазоны обнаружения пероксида водорода биосенсорами на основе чистой каталазы, не превышают уровня  $0.1 - 5.0$  мМ. Интересно, что изменение платформы регистрации сигнала с  $-0.08$  В до  $-0.4$  В позволило не только увеличить чувствительность гибридных нанобиосенсоров (**IV группа**) к пероксиду водорода более, чем в 3-4 раза, но также повысить область линейности калибровочной зависимости с  $12$  мМ (**I группа** сенсоров на основе ферментов, неорганический компонент отсутствует) до  $100$  мМ (**IV группа**, нанобиосенсоры на основе ОНГ пленок и САТ), **Табл. 4.5**, см. также **Рис. 4.22**. Этот эффект объясняется синергическим эффектом реакций с кислородом, протекающих на поверхности палладия.

Таким образом, ведущую роль в типах взаимодействий с пероксидом водорода в гибридных системах играют специфические биорецепторы, и их «внедрение» в дизайн гибридных пленок позволяет управлять «read-out» платформами регистрации аналитических сигналов.

Высокая воспроизводимость электрохимического сигнала при использовании гибридов с каталазой позволяет рекомендовать такие системы для надежного ферментативного определения пероксида водорода в катодной области потенциалов для ряда биоаналитических и технологических процессов, протекающих в избытке кислорода, а также там, где диапазон ожидаемых концентраций целевого аналита не известен, либо находится в широких пределах (уровень мМ), **Рис. 4.23**.

**Табл. 4.5** – Сравнительный анализ аналитических характеристик пероксид-чувствительных нанобиосенсоров<sup>11</sup>

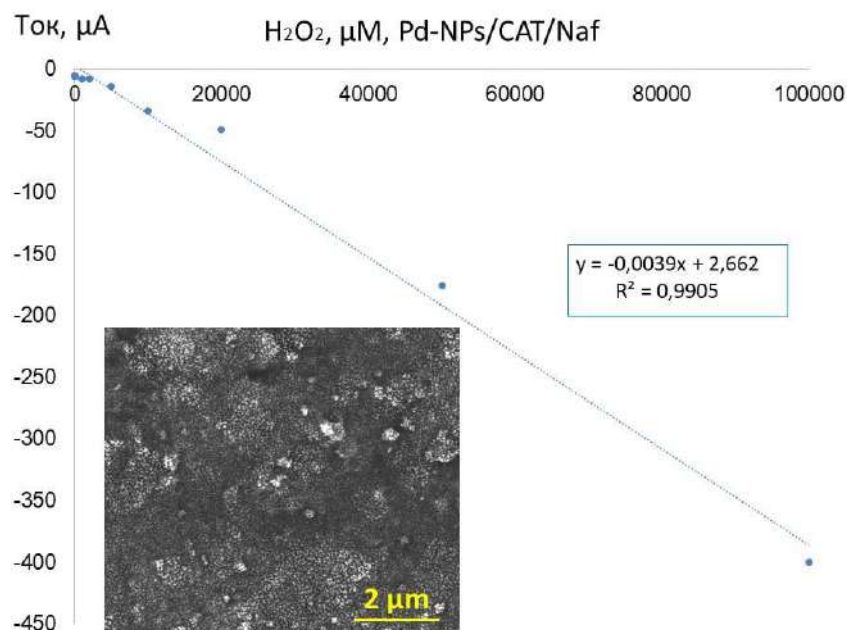
Дизайн сенсора	Чувствительность определения, $\mu\text{A}/\mu\text{mol}$	Предел обнаружения, $\mu\text{M}$	Область линейности, $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\mu\text{M}$ - $\text{mM}$
<b>I группа, CAT</b> (10 $\mu\text{L}$ , 1 мг/мл), метод капли	1.1	$7\pm 2 \mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$ – 12 $\text{mM}$
<b>II группа, Pd-NPs,</b> электроосаждение	2.4	$1000\pm 100 \mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$ – 100 $\text{mM}$
<b>III группа,</b> Pd-NPs (электроосаждение) + 10 $\mu\text{L}$ CAT, 1 мг/мл (метод капли)	0.7	$50\pm 10 \mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$ – 50 $\text{mM}$
<b>IV группа,</b> Pd-NPs/CAT/Naf (соосаждение, 1/1/1)	3.9	$80\pm 15 \mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$ – 20 $\text{mM}$ 1000 $\mu\text{M}$ – 100 $\text{mM}$



**Рис. 4.22** – Амперометрические зависимости, полученные при -0.4 В с поверхности трафаретных электродов с ферментативными наночастицами при анализе 100 мМ пероксида водорода в буфере (А). ПЭМ-изображения

<sup>11</sup> Оценивали при потенциале -0.4 В.

ферментативных наночастиц (группа IV) (В).



**Рис. 4.23** – Микрофотография поверхности и калибровочная зависимость по  $\text{H}_2\text{O}_2$  с нанобиосенсора на основе пленки Pd-NPs/CAT/Naf<sup>12</sup> (IV группа) при потенциале -0.4 В.

Использование нанобиосенсоров на основе Pd-NPs в катодной области с соосажденной каталазой и полимерным связующим становится возможным только благодаря природе самого фермента, работа которого протекает с выделением большого количества кислорода. При этом рост концентрации пероксида водорода сопровождается линейным ростом катодных токов (аддитивный сигнал с кислородом). Иными словами, в этом случае кислород больше не оказывает мешающего конкурентного влияния на сигнал.

В сравнении с нанобиосенсорами на основе Pd-NPs с инкапсулированными оксидазами, работа которых возможна при потреблении кислорода, катодные токи уменьшались с ростом концентрации аналита на фоне электровосстановления кислорода на палладии (аналогичное поведение системы было установлено для «чистых» Pd-NPs в отсутствии ферментов

<sup>12</sup> Одностадийный метод синтеза

группы оксидаз (GOx, AOx, LOx) в дизайне электродов). Именно поэтому надежная работа нанобиосенсоров на основе Pd-NPs и оксидаз в катодной области являлась неоднозначной, см. раздел 4.3. Однако очевидно, что благодаря иным биохимическим реакциям между аналитом и ферментом (в противоположность GOx) и каталитическому действию Pd-NPs возможно оперирование предложенных нанобиосенсоров с соосаженными ферментами группы каталаз в катодной области.

Сравнение электроаналитических зависимостей, полученных с поверхности новых нанобиосенсоров на основе Pd-NPs с инкапсулированными САТ с LbL биосенсорами показало, что LbL структуры нельзя использовать в том же режиме, что и биосенсоры, полученные одностадийным способом. Так, добавление капли растворов ферментов САТ (10  $\mu\text{L}$ , 1 мг/мл) к калибровочным растворам пероксида водорода, пипетированным на поверхность LbL-сенсоров (Pd-NPs – первый слой, 3  $\mu\text{L}$  альгината или Нафиона – второй слой), приводило к немедленному угнетению электрохимических сигналов в анодной области вплоть до нулевой базовой линии. Такое поведение систем свидетельствует о прямой биохимической реакции между жидкой каталазой в капле на поверхности электродов и полном удалении пероксида водорода. Другими словами, вследствие многослойной архитектуры сенсора и прямой биохимической реакцией между  $\text{H}_2\text{O}_2$  и САТ, происходящей в верхнем слое, в системе не остается «свободного» аналита, способного достичь поверхности неорганического электрокатализатора (Pd-NPs) для окисления в анодной области потенциалов.

Можно заключить, что архитектура пленок ОНГ биосенсоров и природа соосаженных ферментов влияет не только на количественные зависимости, получаемые при анализе биоаналитов, но и на платформу/режим регистрации электроаналитического сигнала.

Обобщая полученные экспериментальные данные, можно с уверенностью констатировать положительное влияние Pd-NPs на свойства

совместно соосажденных CAT и HRP в приэлектродном слое, а также на электроаналитические свойства микро-измерительных систем на их основе, см. **Табл. 4.5**. Иными словами ферменты не ингибируются за счет их взаимодействия с палладием и пероксидом, а возвращаются в каталитический цикл.

Таким образом, внедряя наночастицы благородных металлов в дизайн ОНГ биосенсоров на основе каталазы или пероксидазы, возможно контролируемо изменять характеристики ранее известных ферментов, обеспечивая получение качественно и принципиально новых измерительных тест-систем. По сравнению с генетически-кодированными методами (genetic encoded approaches), основанными на разработке новых ферментов, такой биохимический способ является более перспективным как с экономической точки зрения, так с точки зрения трудозатрат, времени и обширности спектра генерируемых систем (с учетом вариантности по типам существующих наночастиц, их форм, размеров и комбинации гибридов).

#### **4.8 Выводы к Главе 4**

- 1.** При идентичных параметрах синтеза (плотность тока, продолжительность электролиза, концентрация ионов-прекурсоров благородных металлов) введение биоорганических (фермент-полимер) компонентов в электролит способствует механической стабилизации гибридных наночастиц и уменьшению их диаметра с 60 – 80 нм до 10 – 20 нм.
- 2.** Путем варьирования концентрации и природы биоорганических компонентов в растворе синтеза и режима их соосаждения можно управлять как структурой функционального ОНГ слоя, так и электроаналитическими характеристиками нанобиосенсоров на их основе.
- 3.** При постоянном количестве фермента и полимерного связующего количество, диаметр и толщина слоя наночастиц, выполняющих роль электрокатализаторов (неорганический компонент) непосредственно

определяет электроаналитические параметры нанобиосенсоров, синтезированных по одностадийной методике. Использование МАР-режима регистрации сигнала с поверхности разработанных нанобиосенсоров с ОНГ пленками позволяет избавиться от перекрестной чувствительности к кислороду.

4. Найдены системы, в которых наночастицы благородных металлов (на примере Pd-NPs) выполняют функции, аналогичные природным ферментам при детектировании пероксида водорода. Систематизированы электроаналитические принципы работы гибридных оксидоредуктазных нанобиосенсоров с соосажденной пероксидазой и каталазой.

5. Оптимальный состав и структура ОНГ слоев для использования в биосенсорике: *неорганический компонент: Pd-NPs; полимерный компонент: Nafion; биоконпонент: ферменты группы оксидаз; концентрация биоконпонента в смешанном электролите:  $\leq 9$  мг/мл; режим соосаждения:  $\leq -3.5$  мА; 30-60 s; структура ОНГ слоя: капсульная; режим считывания сигнала: двухстадийная катодно-анодная поляризация.*

## **ГЛАВА 5. ПРИМЕНЕНИЕ ПРИНЦИПОВ ОРГАНИЗАЦИИ ОНГ ПЛЕНОК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АДсорбЦИОННО-ДЕсорбЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМАХ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ – ОРГАНИЧЕСКАЯ БИОМОЛЕКУЛА МЕТОДОМ SALDI-MS**

Глава посвящена изучению адсорбционно-десорбционных взаимодействий тестовых биоаналитов с поверхностью наночастиц благородных металлов. В данном случае биоаналит, нанесенный 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 биоаналита может привести к угнетению чувствительности амперометрического нанобиосенсора как за счет уменьшения электроактивной поверхности катализатора, так и за счет недоступности биоаналита для биохимического взаимодействия с биорецептором (ферментом). Поэтому установление закономерностей десорбции биоорганического компонента с поверхности электролитических наночастиц важно для прогнозирования аналитических свойств пленочных ОНГ структур, развиваемых в данной работе.

Для изучения указанных явлений подходят методы ионизации с твердых подложек, включая метод SALDI-MS. После ионизации всех компонентов ОНГ пленки в масс-спектрах помимо обнаружения детектируемых аналитов возможно определить характер их адсорбции, *т.е.* типы формирующихся связей между поверхностью мишени/пленки и биоаналитом.

## 5.1 Модельные системы для изучения адсорбционно-десорбционных взаимодействий с поверхности мишеней на основе наночастиц благородных металлов

В связи с совместной кристаллизацией органической матрицы в методе MALDI (CHCA, FCSA) с анализируемым веществом, интерпретация масс-спектров при обнаружении и определении малых молекул с  $M_r \leq 600$  Da без привлечения инструментов высокого разрешения является сложной задачей. Кроме того, выраженный эффект «сладких пятен» приводит к неудовлетворительной воспроизводимости результатов от пятна к пятну, и от мишени к мишени даже при профилировании проб на качественном уровне.[89][255] С точки зрения количественного анализа MALDI редко используется в лабораториях на ежедневной основе как надежный аналитический инструмент без привлечения дополнительных способов пробоподготовки (смешение пробы с наночастицами  $Fe_2O_3$  и тп.) для образования однородных слоев.

Методы SALDI-MS (безматричные методы с использованием неорганического субстрата-эмиттера ионов) могут помочь устранить или минимизировать вышеуказанные недостатки. Активность SALDI мишеней-эммитеров ионов связана с их физическими свойствами, в частности с высокой удельной площадью, хорошей электропроводностью и способностью поглощать/рассеивать энергию от лазерного источника.[126]

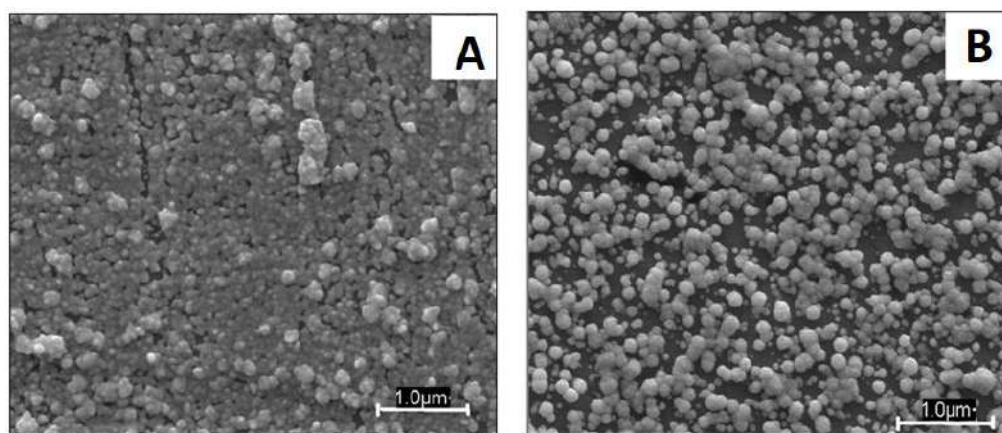
Для изучения адсорбционно-десорбционных взаимодействий, происходящих при ионизации органических биоаналитов с поверхности мишеней на основе наночастиц благородных металлов, использовали несколько модельных электролитических систем: мишени на основе индивидуальных Pd-NPs, Ag-NPs, Au-NPs и их металл-полупроводниковые гибриды на кремнии (пористый p-SiO<sub>2</sub>, гладкий SiO<sub>2</sub>) и анодном/пористом оксиде алюминия (ААО). Ожидалось, что мишени на основе гальванических пленок помогут избежать или минимизировать проявление эффекта «сладких пятен», а также обеспечить одинаковую чувствительность определения



(эффективность ионизации) по всей поверхности подложки (мишени-эмиттера).

Наночастицы серебра, Ag-NPs, были выбраны за их высокую отражательную способность, отличную тепло- и электропроводность, что может играть важную роль при лазерном облучении поверхности.

Наночастицы палладия, Pd-NPs, были выбраны из-за высокой площади поверхности, их каталитической активности, а также способности палладия поглощать водород (1 об. Pd способен поглощать до 900 об. водорода) с образованием  $Pd_xH_y$  (скорость диффузии  $\sim 10^{-7} \text{ см}^2\text{с}^{-1}$ ), [256][257] что может быть критично при транспорте протона от подложки к аналиту в методе лазерной десорбции/ионизации, **Рис. 5.1**. Кроме того, пленки на основе Pd-NPs обеспечивают постоянную электропроводность, что делает распределение тепла на поверхностях во время лазерного облучения однородным и может обеспечить равномерную ионизацию аналита.



**Рис. 5.1** – SEM-изображения поверхности мишеней-эмиттеров, модифицированных Ag-NPs (A) и Pd-NPs (B),  $I_k = -15 \text{ mA}$ ,  $t_{el} = 3 \text{ min}$ .

Выбор наночастиц золота связан с их высокой оптической активностью и эффектом ближнего поля, доказанным Рамановской спектроскопией (и активно используемым в методе SERS), их высокой химической стабильностью и биосовместимостью.[193]

В качестве тестовых аналитов на этом этапе исследования был выбран ряд биологически активных компонентов, которые обычно демонстрируют низкую эффективность лазерной десорбции/ионизации с использованием методов MALDI или DIOS (пористый кремний, Waters), а также высокую степень фрагментации: жирные кислоты, углеводы и антибиотики.

Определение углеводов, липидов или жирных кислот обычно требует вспомогательных реагентов и многостадийной химической дериватизации для получения продуктов, поддающихся ионизации лазером.[258][259] Определение низкомолекулярных антибиотиков методом MALDI-MS часто сопряжено с образованием множества трудно идентифицируемых в масс-спектре фрагментов разной интенсивности. Закономерности, полученные при лазерной десорбции/ионизации этих аналитов с поверхности гальванических наноразмерных пленок будут систематизированы ниже.

Поверхность синтезированных гальванических мишеней представлена наночастицами металлов, **Рис. 5.1**. На поверхности можно четко наблюдать повторяющиеся кластеры из наночастиц диаметром 30-60 нм. Интересно, что структуры пленок геометрически сходны в разных масштабах, а отдельные сегменты структурированы в большие кластеры, что обычно характерно для фрактальных образований.

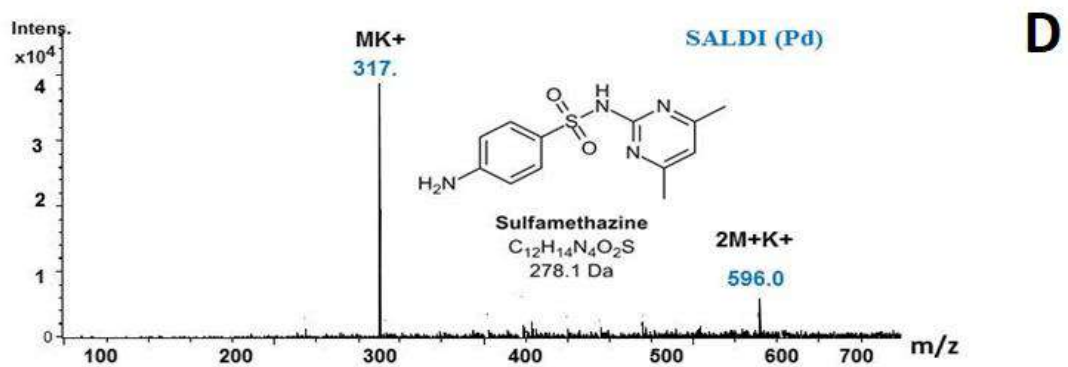
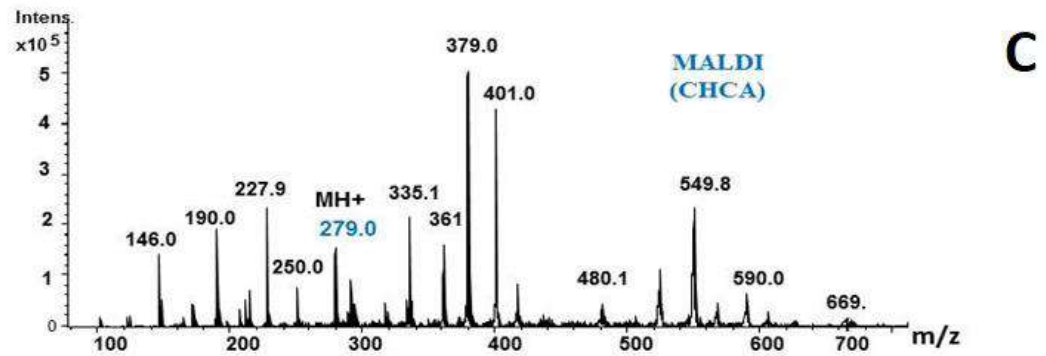
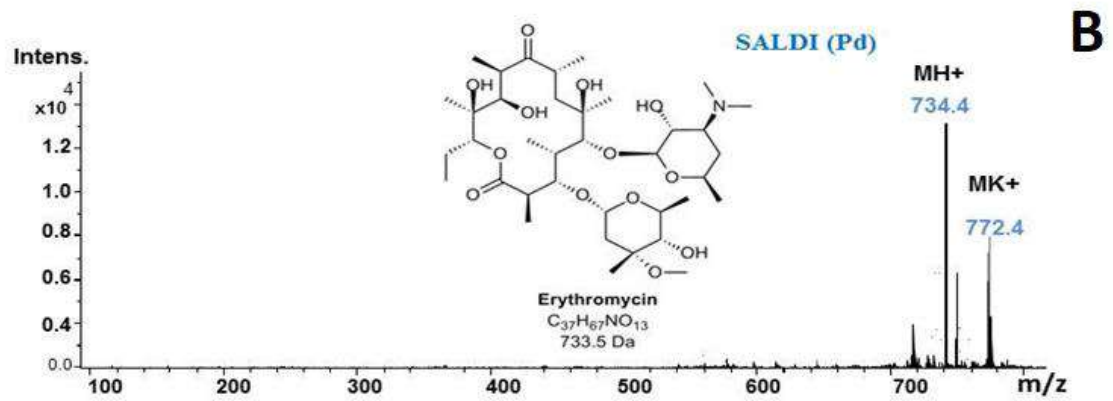
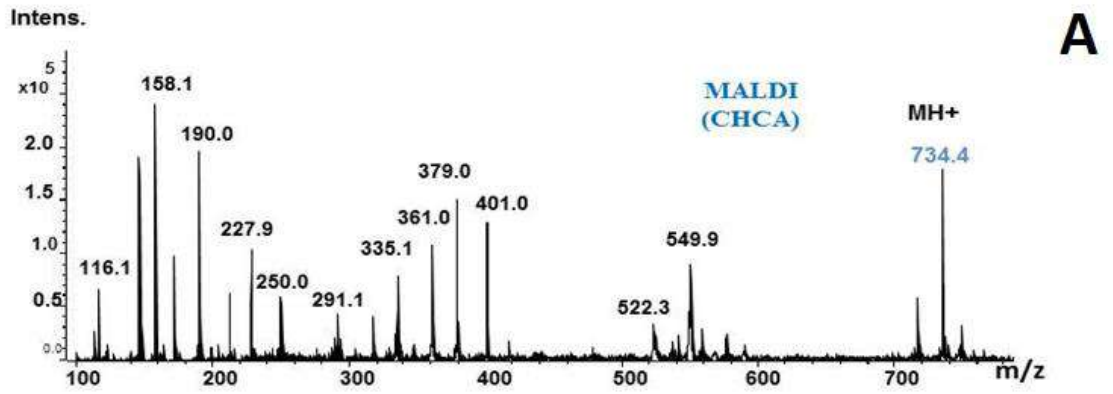
Для подтверждения образования самоорганизующихся пленок, состоящих из наночастиц, с помощью приложения «box-counting» application (Natick, MA, USA) рассчитали коэффициент фрактальной размерности ( $D_f$ ), который является одной из важнейших характеристик самоподобия структур.[260] Приложение преобразует 2D-цветные изображения в двоичные изображения и автоматически вычисляет фрактальные размеры полученных черно-белых изображений, давая информацию о воспроизводимости процесса синтеза.

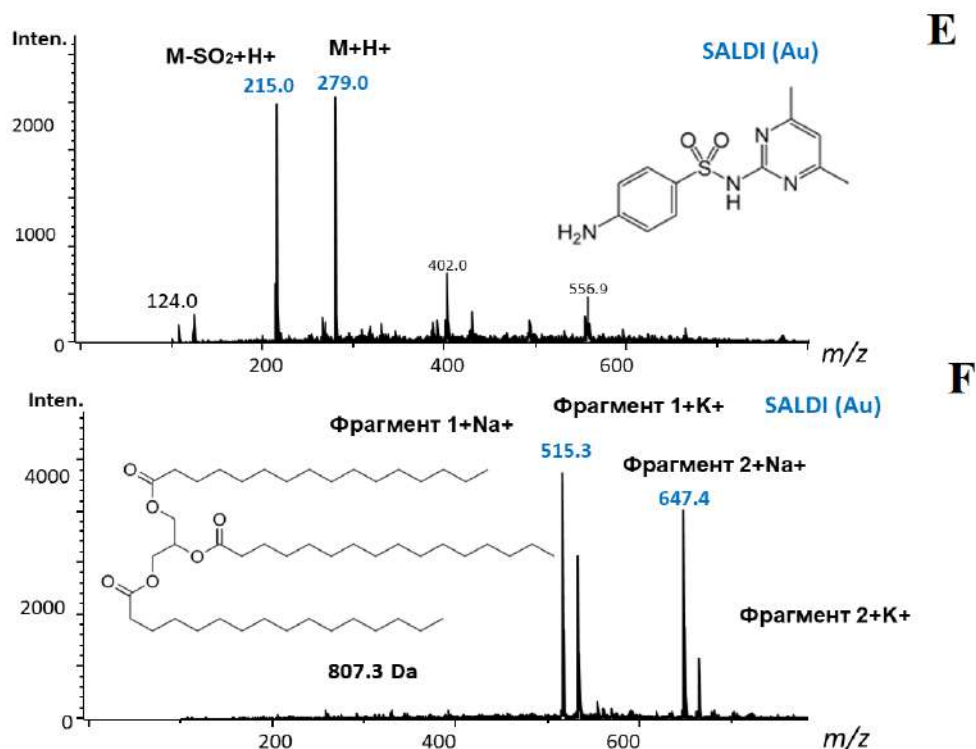
Для пленок на основе Pd-NPs (в качестве примера) параметр  $D_f$  составил  $1.87 \pm 0.13$ , для Ag-NPs  $1.71 \pm 0.29$ . Оба значения  $D_f$ , близкие к числовому

значению 2, указывает на самоорганизующуюся природу сформированных наночастиц.[260]

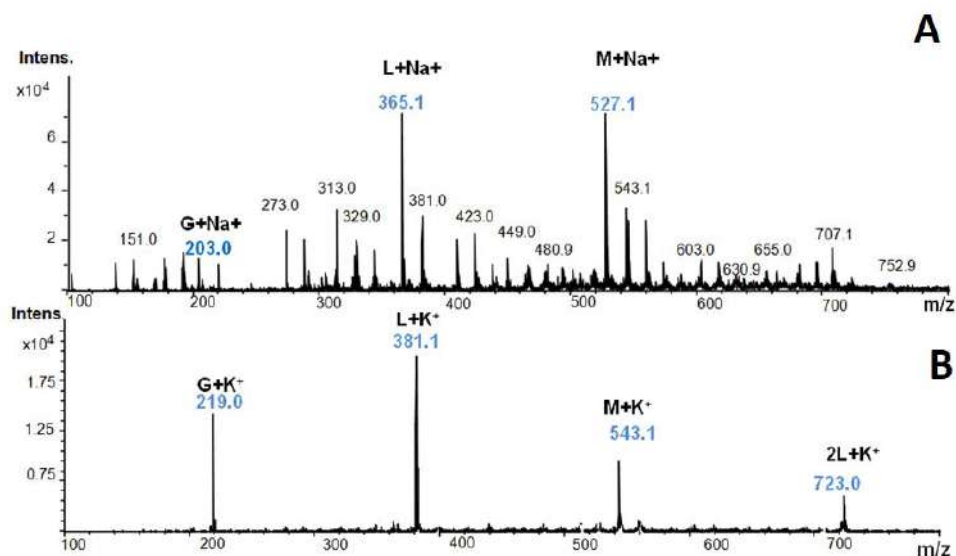
### **5.1.1 Формирование ионов с поверхности электроосажденных пленок наночастиц благородных металлов**

Предположение о том, что образование  $Pd_xH_y$  может способствовать эффективному транспорту протона от поверхности мишени к аналиту (см. выше) не было подтверждено на практике. Ионизация тестовых биоаналитов (антибиотики, углеводы и тд.) с поверхности мишеней, модифицированных Pd-NPs и Ag-NPs, сопровождалась образованием интенсивных аддуктов с катионами калия  $[M+K]^+$ , **Рис. 5.2, Рис. 5.3.**[119] Ионизация с поверхности Au-NPs протекала с образованием ионов разного типа ( $[M+K]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+H]^+$ ), однако, интенсивность полученных сигналов по молекулярному иону была низкой, а степень фрагментации высокой, **Рис. 5.2Е,Ф.** Кроме того, ионизация с поверхности мишеней, модифицированных Au-NPs, сопровождалась сильной абляцией золотых структур (в виду их плохой адгезии к стали), что приводило к загрязнению капилляра в источнике ионов. В этой связи мишени на основе Au-NPs были исключены из дальнейших экспериментов.





**Рис. 5.2** – MALDI (A,C) и SALDI (B,D) масс-спектры 10 ppm эритромицина (A,B) и 10 ppm сульфаметазина (C,D,E) с поверхности Pd-NPs (D) и Au-NPs (E), 30 ppm трипальметина с Au-NPs (F), см. в сравнении со спектром, приведенным на Рис. 6.18A для Pd-NPs и 30 ppm трипальметина, лазер 40%.



**Рис. 5.3** – (A) MALDI (CHCA) и (B) SALDI масс-спектры смеси глюкозы (G), лактозы (L)<sup>13</sup> и α-мальтотриозы (M), полученные с поверхности Pd-NPs с

<sup>13</sup> Примечание: [2L+K]<sup>+</sup> соответствует димеру лактозы.

толщиной пленки 40 нм (концентрация каждого аналита в трехкомпонентной смеси 30 ppm, лазер 40 %).

При этом ионизация этих же тест-аналитов с помощью MALDI матриц сопровождалась образованием ионов типа  $[M+H]^+$  или  $[M+Na]^+$ . Предположительно, причину различия в типах формирующихся ионов методом MALDI и SALDI следует искать в природе используемого для приготовления наночастиц электролита. Небольшая примесь солей калия в растворах электролитов могла бы объяснить соосаждение калия вместе с наночастицами палладия и серебра во время электролиза.

Это предположение было подтверждено последующим ICP-OES экспериментом: согласно полученным данным (показано на примере электролита палладирования), электролит содержал более 8 ppm  $K^+$ , см. Приложения, **Рис. П5.1**.

Важно отметить, что ионизация всех тестовых аналитов с поверхности электролитических мишеней не сопровождалась образованием в масс-спектрах инородных ионов, не соответствующих искомому аналиту. Все полученные SALDI масс-спектры с поверхности мишеней на основе Pd-NPs Ag-NPs были высокого качества в сравнении с MALDI (CHCA) спектрами, значительно загрязненными матричными ионами, см. **Рис. 5.2А,С** и **Рис. 5.3А**.

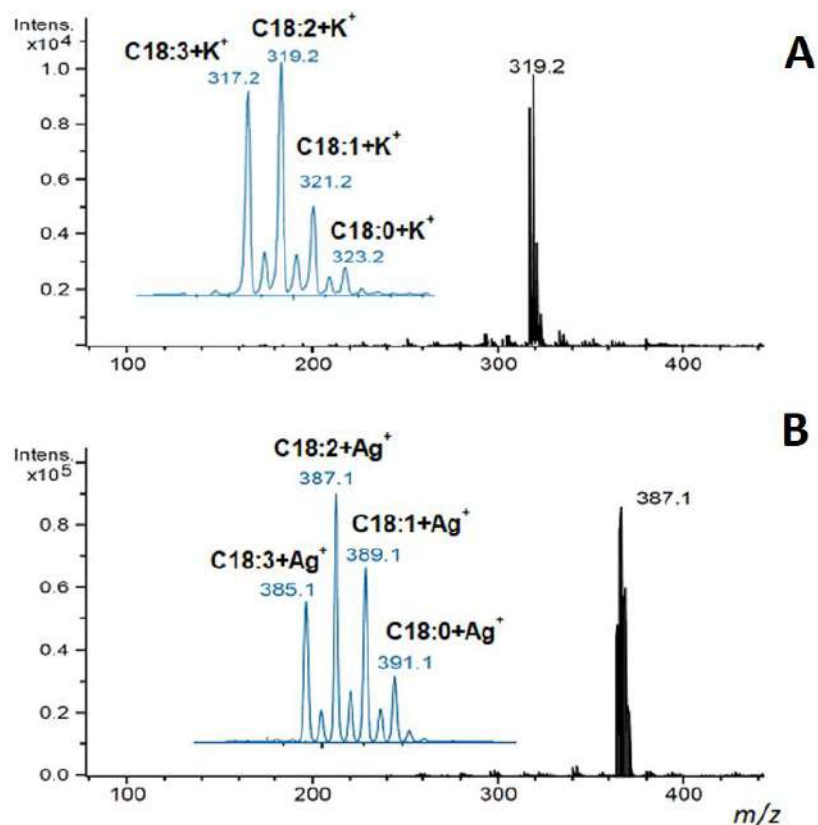
Интересно, что механизм лазерной десорбции/ионизации с поверхностей электролитических SALDI мишеней-эмиттеров и тип генерируемых ионов зависели от химической структуры биоаналитов и их концентрации. Так, например, за счет эффекта самопротонирования молекулы антибиотиков с высоким содержанием протонов (эритромицин, сульфаметазин) в области концентраций  $>50$  ppm образовывали ионы типа  $[M+H]^+$ . Снижение концентрации ниже 50 ppm приводило к формированию масс-спектров с единственным пиком типа  $[M+K]^+$  без фоновых шумов и интенсивной фрагментации аналитов (**Рис. 5.2**).

Важно подчеркнуть, что ионизация с поверхности электролитических наночастиц благородных металлов не приводила к значительной фрагментации тестируемых соединений, обычно наблюдаемой в MALDI при энергиях лазера ~40-55%. Этот эффект можно объяснить быстрым и локальным нагреванием Pd-NPs и Ag-NPs, что и обеспечивает десорбцию аналитов без термического разложения.

*Эффективность ионизации в методе SALDI оценивается не только по интенсивности токовых откликов, но и по степеням фрагментации биоаналитов, фоновым шумам в низком диапазоне масс и требуемой энергии лазера, необходимой для обеспечения лазерной десорбции/ионизации биоаналита.*

### **5.1.2 Влияние толщины пленки наночастиц на тип формирующихся ионов и интенсивность сигнала в методе SALDI-MS**

Интересно, что разновидности  $K^+$  аддуктов наблюдались только для тонких пленок наночастиц с толщиной слоя ( $h$ )  $\leq 100$  нм (**Рис. 5.4А**), тогда как ионы кластеров Pd и Ag в основном генерировались с поверхности более плотных пленок,  $h \geq 120$  нм; **Рис. 5.4В** (показано на примере Ag-NPs). Вероятно, что причиной такого изменения в механизме ионизации является размерный фактор и разное количество дефектов внутри плотных слоев наноструктур по сравнению с более тонкими. Плотные пленки могут иметь значительно более рыхлую структуру слоев, что может объяснить вынос частиц при ионизации с их поверхности лазерным пучком.



**Рис. 5.4** – SALDI масс-спектры смеси жирных кислот C18:0 – C18:3 (300  $\mu\text{g/mL}$  концентрация каждой в смеси, лазер 40 %), записанные с поверхности Ag-NPs с толщиной слоя  $h = 20 \text{ nm}$  (A) и  $h = 140 \text{ nm}$  (B).<sup>14</sup>

Для жирных кислот интенсивность SALDI-сигнала коррелировала с числом кратных связей (Рис. 5.4): менее интенсивные сигналы были получены для насыщенных жирных кислот. Особенно ярко этот эффект проявлялся для серебряных наночастиц с толщиной слоя более 100 нм; тем не менее, тонкие пленки также сохраняли приемлемую интенсивность сигнала  $[\text{M}+\text{K}]^+$ . Для пленок Ag-NPs наблюдаемый эффект можно объяснить высоким сродством моновалентного катиона к двойной связи.  $\text{Ag}^+$  легко принимает  $\pi$ -электроны на свободные  $s$ -орбитали и занимаемые  $d$ -орбитали перекрываются с  $\pi$ -орбиталями.[261]

<sup>14</sup> Толщину слоя наночастиц рассчитывали по уравнению (2.5), см. Главу 2.



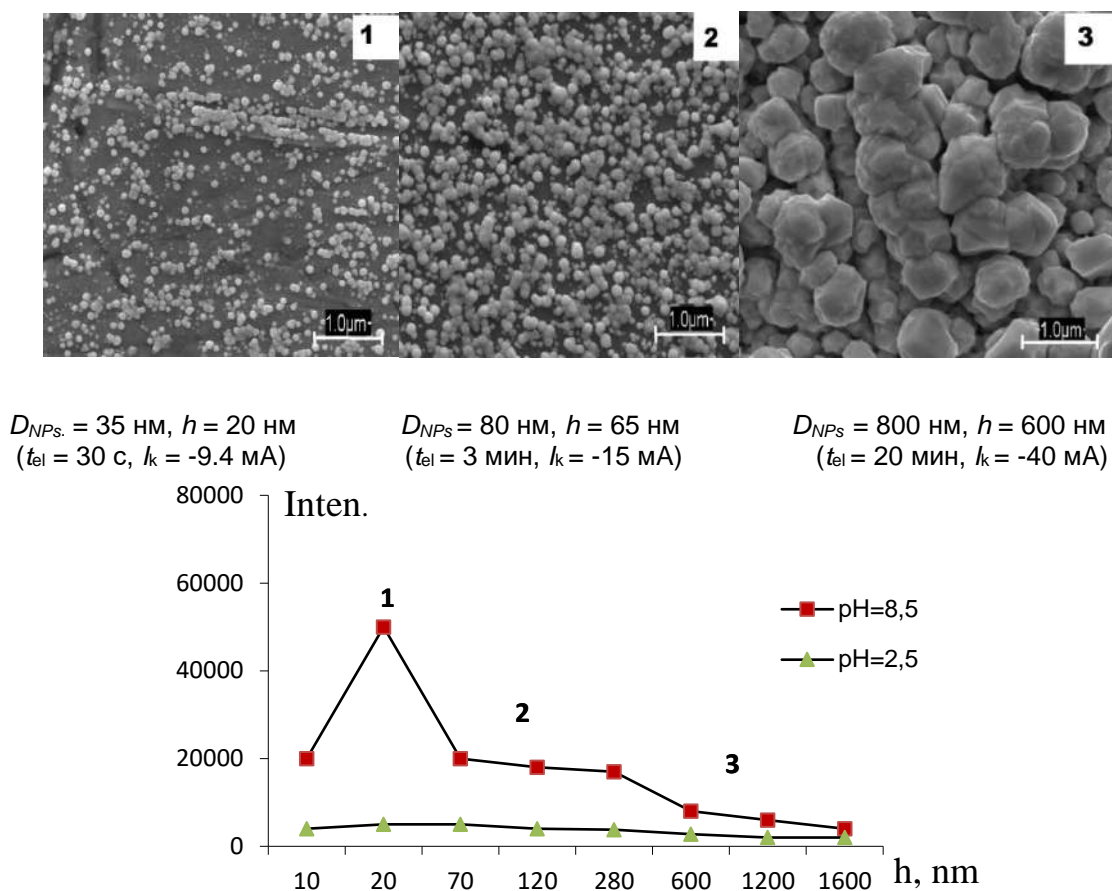
Следует отметить, что на формирование сигналов  $[M+Ag]^+$  также влияло характерное соотношение изотопов серебра  $^{107}Ag$  и  $^{109}Ag$  (51.84% против 48.16%), приводящее к появлению двух сигналов сходной интенсивности в масс-спектре, а именно  $[M+^{107}Ag]^+$  и  $[M+^{109}Ag]^+$ . Поэтому для количественного анализа, несмотря на то, что интенсивность аналитического сигнала, наблюдаемого для  $[M+Ag]^+$  аддуктов на порядок выше, чем для ионов типа  $[M+K]^+$ , на практике выгодно использовать моноизотопные типы ионов или ионы, соотношение изотопов которых сильно отличается. Соотношение изотопов калия составляет  $^{39}K$  (95.25)/ $^{41}K$  (6.73) против  $^{107}Ag$  (51.8)/ $^{109}Ag$  (48.16). В этой связи, для дальнейших экспериментов все тестовые аналиты при ионизации с пленок Pd-NPs или Ag-NPs определяли по формирующимся ионам типа  $[M+K]^+$ .

Для достижения максимальной эффективности ионизации тестируемых биоаналитов далее определяли оптимальную толщину гальванических Pd-NPs и Ag-NPs пленок. В этих экспериментах кислотность раствора электролита, продолжительность и ток электролиза при синтезе слоя неорганических частиц систематически варьировались.

В ходе экспериментов установили, что наночастицы, полученные из растворов электролитов с pH 8.5, обеспечивают получение более высоких токовых откликов по всем тестируемым соединениям. Низкие значения pH электролитов приводят к снижению адгезии пленок к стальной мишени, вероятно, из-за мешающего воздействия процесса выделения водорода, более интенсивно протекающего в кислых средах. При этом происходит наводораживание пленок палладия, что в итоге является причиной сильной лазерной абляции поверхности даже после однократного облучения.

Время и ток электролиза в значительной степени влияли на морфологию поверхности (диаметр наночастиц) и определяли интенсивность LDI-MS сигнала. Ток варьировали в пределах от -9.4 до -80 мА, а продолжительность электролиза от 30 с до 20 мин. Оптимальные значения сигнала и S/N были

получены для времени электролиза от 30 с до 3 мин, и при токе -9.4 мА. Пленки, полученные в этих условиях, имели толщину от 20 до 60 нм (**Рис. 5.5**).



**Рис. 5.5** – Изменение морфологии электролитических Pd-NPs (изображение *вверху*) в различных условиях синтеза; зависимость сигнала  $[M+K]^+$  лактозы (10 ppm) от толщины пленки Pd-NPs, диаметра частиц и pH (изображение *снизу*).

При времени электролиза  $>3$  мин получали подложки со значительно сниженной эффективностью лазерной десорбцией/ионизацией. Как правило, более продолжительное время электролиза и высокие токи увеличивают толщину пленок, а также диаметр частиц. При этом структуры начинают агломерироваться до тех пор, пока не образуют крупные глобулы. Более крупные структуры теряют свои уникальные свойства при ионизации биоаналитов по сравнению с аналогами на основе наноразмерных частиц (см.

также раздел, посвященный эффектам реорганизации поверхности/спекания наночастиц при действии лазера, часть 5.3.2).

Гальванические структуры, полученные с использованием оптимизированных условий, показали хорошую воспроизводимость синтеза: точность в рамках «мишень-мишень» варьировалась от 2.5 до 20 % RSD для трех тестируемых углеводов и трех различных пленок, **Табл. 5.1**. Чтобы продемонстрировать оценку повторяемости процедуры синтеза, таблица также включает значения  $D_f$  для тех же мишеней-эмиттеров.

**Табл. 5.1** – SALDI-MS воспроизводимость ионных токов тестируемых углеводов с использованием тонких пленок Pd-NPs ( $n = 3$ ; концентрация аналитов 30 нг/пятно; лазер 40%, =12.000 лазерных выстрелов/пятно)

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

<sup>1</sup>Фрактальный размерный фактор, используемый в качестве альтернативного средства демонстрации воспроизводимости синтеза мишени.

Обобщая результаты можно сказать, что влияние толщины пленки неорганического компонента на аналитические отклики с поверхности мишеней в методе SALDI-MS было аналогично закономерностям, полученным с поверхности одностадийных ОНГ нанобиосенсоров, см. Главу 4. В обоих случаях увеличение толщины неорганического компонента с 20-40 нм до 120-140 нм оказывает существенное влияние как на качественные зависимости (полное изменение в путях ионизации аналитов), так и на количественные отклики, получаемые с этих микроаналитических систем (пределы обнаружения биоаналитов, область линейности калибровочных зависимостей, т.д.).

*С точки зрения улучшенных аналитических параметров определения биоаналитов для всех изученных микроаналитических систем предпочтительным является использование мишеней на основе тонких пленок наночастиц с толщиной слоя 20-60 нм.*

Полученные результаты согласуются с теоретическим объяснением LDI-активности металлических наночастиц.[131] Наночастицы металлов способны влиять на константы скорости разложения ( $K_d$ ) и испарения ( $K_v$ ), см. **Рис. 1.16**. Диффузия тепла во время лазерного импульса приводит к однородному нагреву общего объема частиц, который является однородным и эффективным для более мелких частиц. Десорбция из плотных слоев требует более высокого лазерного излучения, что может привести к сильному термическому воздействию на адсорбированные молекулы аналита на поверхности и их разложению (в масс-спектрах наблюдается сильная фрагментация). Пиковые температуры, достигаемые в конце лазерного импульса, определяются типом и энергией лазера, поглощающими свойствами частиц и диффузией тепла в течение длительности лазерного импульса.[131] Известно [43], что по мере увеличения толщины металлических пленок температурный переход априори предполагает резкое повышение температуры на поверхности под действием лазерного излучения, что также согласуется с полученными результатами, **Рис. 5.5** и **Табл. 5.1**.

### **5.1.3 Влияние структурных дефектов электроосажденных пленок на сигнал в методе SALDI-MS**

Для детального изучения морфологии поверхности сформированных структур и их влияния на SALDI-MS активность, сравнили аналитические характеристики тонких пленок Pd и Ag с толщиной слоя 20 – 40 нм с пленками, полученными прямым напылением на стальные мишени. Напыление пленок серебра и палладия проводили в камере Гатан (Pleasanton, CA, USA, Модель

681), оснащенной монитором Гатана 681-20000 для определения толщины пленки.

SEM-изображения (**Приложения, Рис. П5.2А**), полученные с поверхности напыленных пленок, свидетельствовали о формировании однородного покрытия палладия (рассмотрено в качестве примера) без видимых частиц или иных дефектов по сравнению с гальваническими пленками, состоящими из Pd-NPs (**Рис. 5.1-5.4**). Никаких примесных элементов на поверхности таких мишеней методом EDX/X-ray обнаружено не было, см. **Приложения, Рис. П5.2В**.

Важно, что с поверхности мишеней с напыленными пленками LDI-сигналов для тестируемых биоаналитов не наблюдалось ни при каких условиях.

*Очевидно, что SALDI активность электролитических Pd-NPs и Ag-NPs структур тесно связана с размерным фактором и изменением их физических свойств (электропроводность, способность поглощать и рассеивать энергию от лазерного источника света).*

#### **5.4 Сравнение аналитических характеристик мишеней на основе электроосажденных пленок Pd-NPs и Ag-NPs при определении биомолекул методом SALDI-MS**

Эксперименты показали, что мишени на основе палладиевых наночастиц демонстрируют несколько лучшие аналитические свойства, чем аналоги на основе Ag-NPs, **Табл. 5.2**. Сначала физико-химические свойства двух подложек-эмиттеров ионов кажутся сходными, включая средние диаметры наночастиц, фрактальные размерные факторы  $D_f$ , рабочую функцию электрона и отражательную способность. Однако различие в эффективности ионизации с поверхности обеих пленок для исследуемых тестовых соединений было значительным (эффективность ионизации,  $(S)^1 \times 10^3$ , см. **Табл. 5.2**).

**Табл. 5.2** – Сравнение ионизации тест-соединений с поверхности пленок Ag-NPs и Pd-NPs ( $h = 20$  нм, время электролиза 30 с, ток -9.4 мА)

Пленка	Эффективность ионизации <sup>15</sup> , (S) <sup>1</sup> × 10 <sup>3</sup>				$D_f$	$D_{part}$ (nm)	$W^3$ (eV)	$E^0$ (V)	$T_{melt}$ (°C)	$R_{355}^4$ (nm)	$\kappa^5$ (Cm/m)	$\lambda^6$ (W/m·K)
	Tr	S	L	C18:3								
Pd-NPs	1.5	1.7	1.6	0.40	1.87±0.12	35±10	4.99	+0.99	1554.4	690	0.9×10 <sup>7</sup>	71.8
Ag-NPs	1.1	0.2	0.1	0.13	1.71±0.29	40±10	4.30	+0.79	960.8	920	6.3×10 <sup>7</sup>	429

<sup>1</sup>S рассчитывали в соответствии с уравнением (2.6); концентрация аналитов: 30 нг/пятно для трипальметина (Tr), сульфаметазина (S), лактозы (L) и 80 нг/пятно (C18: 3). <sup>2</sup>Средний размер наночастиц. <sup>3</sup>Работа выхода электрона. <sup>4</sup>Отражательная способность при 355 нм. <sup>5</sup>Электрическая проводимость при 25 °C. <sup>6</sup> Теплопроводность.

Причина такого расхождения, вероятно, связана с разными электро- и теплопроводностями серебра и палладия: для серебра эти значения значительно выше, что и обеспечивает более быстрое распределение тепла после лазерного облучения поверхности. Однако в случае Pd-NPs нагрев будет сосредоточен на меньшей площади из-за более низкой теплопроводности, потенциально обеспечивая более эффективное испарение/термодесорбцию тестового аналита в газовую фазу.[262] Кроме того, электроны палладия удовлетворяют теории *Bloch*, позволяя *s-s* переходы внутри металла по сравнению с моновалентными металлами.[263] Это дает Pd идеальное тепловое сопротивление и приводит к гомогенному нагреву поверхности во время лазерного облучения. Теплота испарения для Pd составляет 362 кДж·моль<sup>-1</sup> по сравнению с 250 кДж·моль<sup>-1</sup> для серебра, что на практике обеспечивает пониженные эффекты абляции пленок. Некоторые качественные и количественные зависимости при обнаружении и определении исследуемых тест-соединений мишенями-эмиттерами на основе пленок Pd-NPs суммированы в **Табл. 5.3-5.4**.

<sup>15</sup> Рассчитывалась по формуле (2.6)

**Табл. 5.3** – Чувствительность ( $S$ , оценивали по ионному току  $[M+K]^+$ ) с поверхности пленки Pd-NPs (-9.4 мА, 30 с), лазер 40%

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

**Табл. 5.4** – Результаты количественного определения тест-соединений с поверхности пленок Pd-NPs ( $h = 20$  нм; лазер 40%, данные получены по извлеченным ионным следам (EIS) из спектров полного сканирования (TIC))

Аналит	Область линейности, ppm	LOD <sup>1</sup> (ppm)	$S/N = f(c)^2$	
			$y = ax + b$	$R^2$
Лактоза	10-250	0.5	$y = 0.734x + 2.8598$	0.9944
Глюкоза	10-500	7	$y = 0.859x - 2.0680$	0.9911
Жирная кислота, C18:3	80-1000	80	$y = 0.379x - 7.8936$	0.9978
Эритромицин	10-150	0.5	$y = 1.633x + 8.3833$	0.9801
Сульфаметазин	10-150	0.5	$y = 0.637x + 5.4259$	0.9856

<sup>1</sup>предел обнаружения (при  $S/N = 3$ );

<sup>2</sup>калибровочные зависимости.

Наибольшую чувствительность мишени на основе пленок Pd-NPs проявляли к антибиотику сульфаметазину, содержащему в составе сульфо- и азиновые- группы. Интересно, что графаретные электроды с Pd-NPs, синтезированными из этого раствора электролита, также проявили высокую электрохимическую чувствительность при определении незначительных концентраций азинов и гидразинов.<sup>16</sup> В этой связи можно предположить, что чувствительность SALDI-MS мишеней к тому или иному классу соединений может быть связана с электрокаталитической чувствительностью биосенсоров на основе наночастиц благородных металлов (см. часть 5.5).

Калибровочные зависимости с областью линейности до ~200 нг/пятно были получены для большинства тест-соединений: наименьшие пределы обнаружения были установлены для антибиотиков. Стоит отметить, что полученные числовые закономерности в **Табл. 5.4** хорошо согласовывались с другими исследованиями. Например, *Niziol* с соавторами получил аналогичные значения чувствительности обнаружения ряда низкомолекулярных соединений (включая углеводы и аминокислоты) с использованием ОНГ пленок на основе наночастиц серебра.[264]

### **5.5 Влияние морфологии и реструктуризации поверхности наночастиц на эффективность ионизации биомолекул в методе SALDI-MS**

Далее систематически изучалось влияние морфологии Pd-наноструктур, присутствия ионов реагентов/поверхностной химии и влияния реструктуризации поверхности мишени-эмиттера на эффективность аналитического сигнала в методе SALDI-MS.

---

<sup>16</sup> *Y.E. Silina*, C. Fink-Straube, M. Koch, E.V. Zolotukhina, A rapid *in vitro* electrochemical screening of extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* by palladium nanoparticles-modified electrodes, *Bioelectrochemistry*, **2023**, 149, 108283.

E.V. Zolotukhina, A. Katsen-Globa, M. Koch, C. Fink-Straube, T. Sukmann, M.G. Levchenko, *Y.E. Silina*, The development of alginate-based amperometric nanoreactors for biochemical profiling of living yeast cells, *Bioelectrochemistry*, **2022**, 145, 108082.

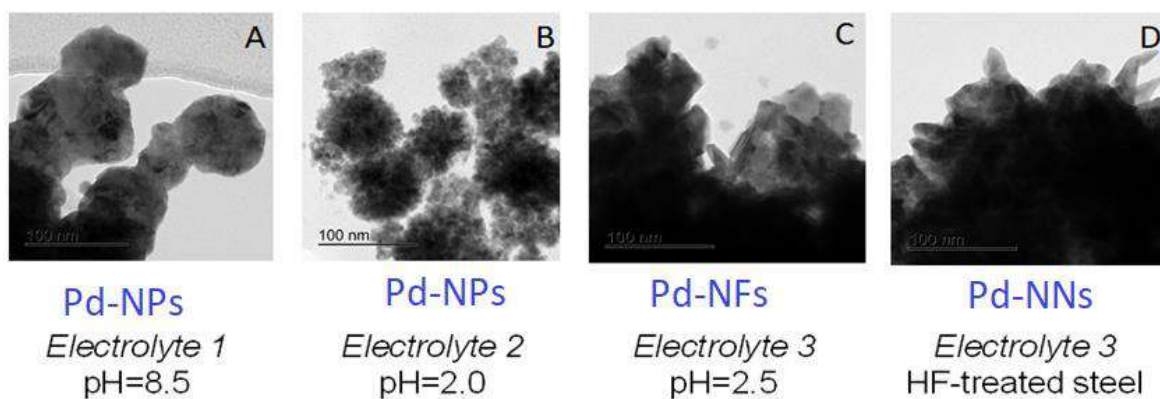


В зависимости от условий синтеза и типа электролита, исследуемые поверхности на основе палладия представляли собой однородно напыленные пленки, наночастицы (Pd-NPs), наноцветки (Pd-NFs) и наноиглы (Pd-NNs). Доминирующая роль морфологии поверхности в процессе лазерной абляции, ранее установленная для эмиттеров на основе кремния, для подложек на основе пленок наночастиц благородных металлов до сих пор не исследовалась. Морфологию наноструктур палладиевых пленок направленно меняли путем изменения pH раствора, типа реагентов и их количества:  $\text{H}_2\text{PdCl}_4$ , 3.5 г/л;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 20 г/л;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 100 г/л;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 25 г/л, pH = 8.5 (*Электролит 1*). *Электролит 2* был идентичен *Электролиту 1*, за исключением pH = 2.0. *Электролит 3* – 1 %  $\text{PdCl}_2$  в 0.2 М HCl, pH = 2.5.

Для оценки влияния процедуры обработки подложки на морфологию и химию поверхности наноструктур, стальную подложку предварительно обрабатывали раствором HF. Морфология мишеней-эмиттеров, синтезированных из *Электролитов 1-3*, используя идентичные условия синтеза ( $I_k = -9.4$  мА, 30 с), систематизирована на **Рис. 5.6**.

Средний диаметр Pd-NPs, полученных из *Электролита 1*, составлял 60-65 нм (**Рис. 5.6А**); в то время как *Электролит 2* давал распределение частиц в диапазоне 20-30 нм, **Рис. 5.6В**. Эмиттеры с пленками, полученными из чистого раствора  $\text{PdCl}_2$  (*Электролит 3*, pH = 2.5) в условиях стационарного тока ( $I_k = -9.4$  мА, 30 с), характеризовались двухслойной структурой (**Рис. 5.6С**): первый поверхностный слой представлял собой Pd-NPs (20 нм), второй слой состоял из Pd наноцветков (Pd-NFs) диаметром 130 нм.

Предварительная обработка стали HF в течение 1 мин перед осаждением палладиевых структур (30 с, *Электролит 3*) оказала заметное влияние на конечный результат [179]: была получена совершенно иная поверхность, представленная наноиглами палладия (Pd-NNs, **Рис. 5.6D**).



**Рис. 5.6** – ПЭМ-изображения наноструктур палладия.

В SALDI-MS экспериментах с участием эмиттеров на основе пленок Pd-NPs, синтезированных из растворов *Электролита 1*, были получены интенсивные сигналы для тест-соединений с низким уровнем шума в масс-спектрах. В тоже время, пленки, синтезированные с использованием *Электролита 2 и 3*, показали низкую адгезию на стали и высокие уровни шума в диапазоне низких масс,  $m/z$ , по сравнению с *Электролитом 1*. Все тестируемые аналиты, ионизированные с поверхности пленок, синтезированных из *Электролита 1*, обнаруживались в масс-спектрах как аддукты калия  $[M+K]^+$ .

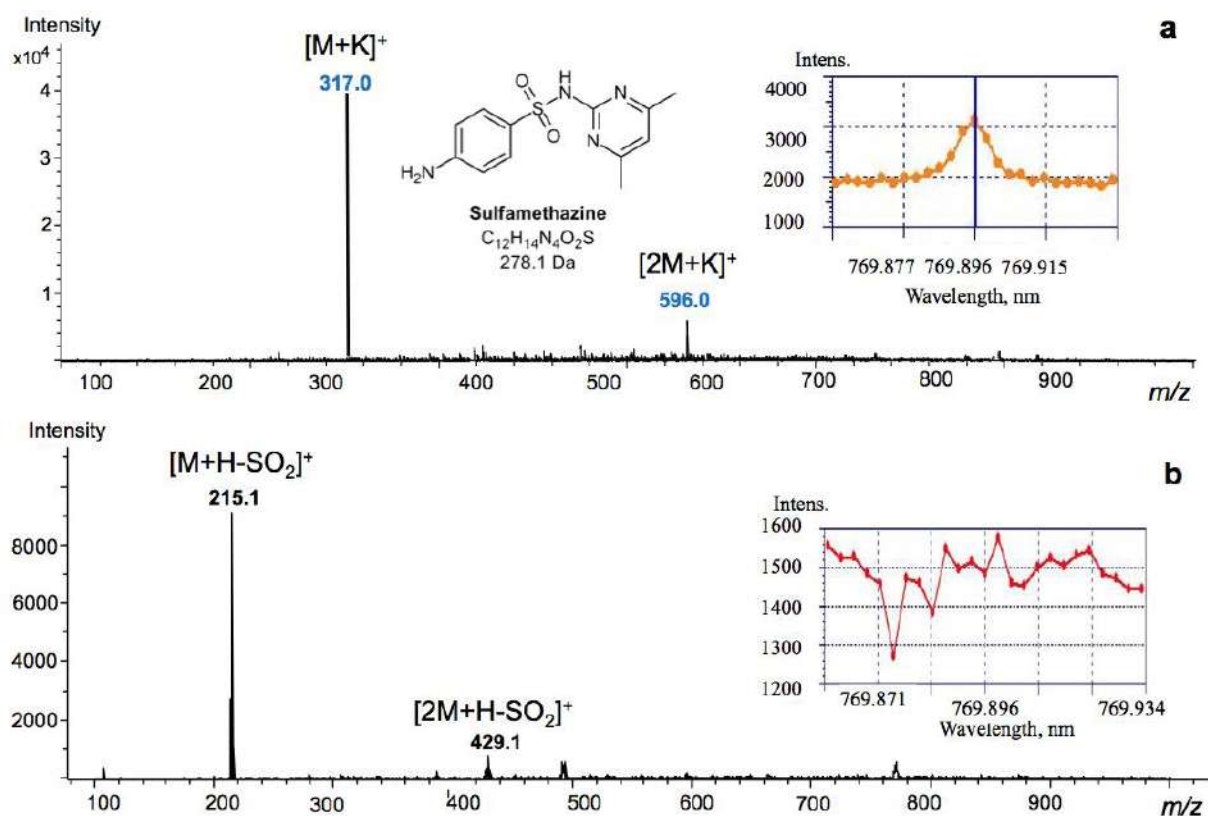
Чтобы получить дополнительное представление о функции эмиттеров на основе пленок Pd-NPs, синтезированных из фосфатных *Электролитов 1 и 2*, на поверхность напыленного палладия, Pd-NFs и Pd-NNs распыляли слой KCl с толщиной 5 нм. При этом полученные численные значения токовых откликов по типу ионов  $[M+K]^+$  были значительно меньше по сравнению с токами, полученными с поверхности необработанных гальванических пленок Pd-NPs. Эти наблюдения ясно демонстрируют важную роль включения ионов  $K^+$  при совместном соосаждении Pd на подложку во время электролиза, тогда как напыленные слои калия не содержат доступных ионов  $K^+$ . Иными словами, напыленные пленки «проигрывают» наноструктурированным с точки зрения эффективности формирования сигнала в методе SALDI-MS. Увеличение

концентрации ионов калия во время электролиза путем добавления дополнительного количества ионов калия к раствору электролита (50 ppm, а не 10 ppm, как было найдено экспериментально для *Электролита 1*) не влияло на увеличение выхода ионов по току/на интенсивность LDI-сигнала.

Присутствие ионов реагентов и морфология пленок неорганического компонента одинаково важны при формировании сигнала в методе. Морфология пленок неорганического компонента определяется природой растворов электролита, величиной катодного тока, pH и предварительной стадией обработки поверхности мишени. В свою очередь, морфология наноструктур определяет доступность ионов реагентов при лазерном облучении (см. ниже).

### **5.5.1 Морфология поверхности или присутствие ионов реагентов?**

Полученные ПЭМ-данные (**Рис. 5.6**) хорошо коррелировали с измеренными значениями отражения светового потока: наноструктуры Pd с большим количеством дефектов показали более высокое поглощение (см. **Приложения, Рис. П5.3**). Отражательные способности мишеней-эмиттеров ионов снижались в следующем порядке: Pd-NNs > Pd-NFs > Pd-NPs > напыленный Pd. Поэтому, основываясь только на морфологии поверхности и оптических свойствах поверхностей, можно ожидать, что LDI-отклик будет самым высоким для мишеней на основе пленок Pd-NNs и Pd-NFs. Однако эти мишени показали далеко не лучшие ионизационные свойства в сравнении с мишенями на основе пленок Pd-NPs, **Рис. 5.7**. С поверхности мишени на основе пленок Pd-NFs были записаны лишь фрагменты сульфаметазина достаточно низкой интенсивности. Молекулярный ион в масс-спектре зафиксировать не удалось.



**Рис. 5.7** – Масс-спектры сульфаметазина (10 нг/пятно) с поверхности пленок (а) Pd-NPs (вставка показывает ICP-OES спектр *Electrolyte 1*, pH 8.5, содержание  $K^+$  в *Electrolyte 1*  $8.28 \pm 0.764$  ppm); (б) Pd-NFs (вставка показывает ICP-OES спектр *Electrolyte 3*, pH 2.5).

ICP-OES анализ выявил содержание ионов калия только в *Electrolyte 1*, который использовался для синтеза пленок Pd-NPs, что и объясняет образование интенсивных калиевых аддуктов тестовых аналитов в масс-спектрах. В свою очередь, отсутствие активных ионов ( $K^+$ ) на поверхности мишени на основе пленок Pd-NFs (синтез из *Electrolyte 3*) объясняет низкую LDI-MS-эффективность этой мишени несмотря на ее хорошие оптические свойства.

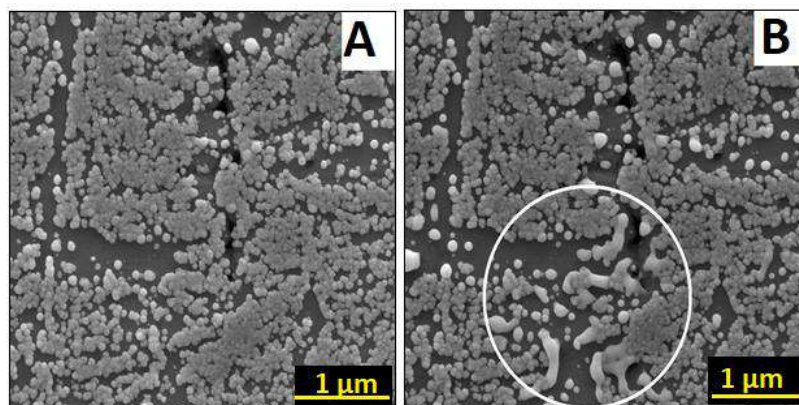
*Иными словами, оптические свойства мишени/пленки и ее морфология в отсутствии свободных ионов реагентов на поверхности не является приоритетными критериями, определяющими эффективность сигнала в методе SALDI-MS.*

Однако если ионы, которые могут способствовать катионизации аналита, присутствуют в объеме мишени, а не на поверхности, то, скорее всего, это также негативно отразится на общей эффективности процесса. Важным шагом является «выпуск» ионов реагентов на поверхность из объема материала/пленки, что обеспечивается при контакте с лазером (см. следующий раздел).

### 5.5.2 Перестройка наночастиц при лазерном облучении

Типичные пороговые значения абляции для металлов находятся на уровне 1-10 Дж/см<sup>2</sup> по сравнению с 0.1-1 Дж/см<sup>2</sup>, установленном для органических материалов [265], что объясняет отсутствие лазерной абляции неорганических подложек-эмиттеров по сравнению с органическими MALDI матрицами. Однако металлические структуры проявляют эффекты плавления/спекания, приводящие к значительным изменениям морфологии поверхности материала, и как следствие, к их иным аналитическим свойствам.

Роль тепловых процессов при облучении лазером изучаемых модельных поверхностей на основе пленок наночастиц благородных металлов хорошо прослеживается: SEM-изображения демонстрируют эффекты частичного плавления и агломерации наночастиц металлов даже после первичного лазерного облучения, **Рис. 5.8**.



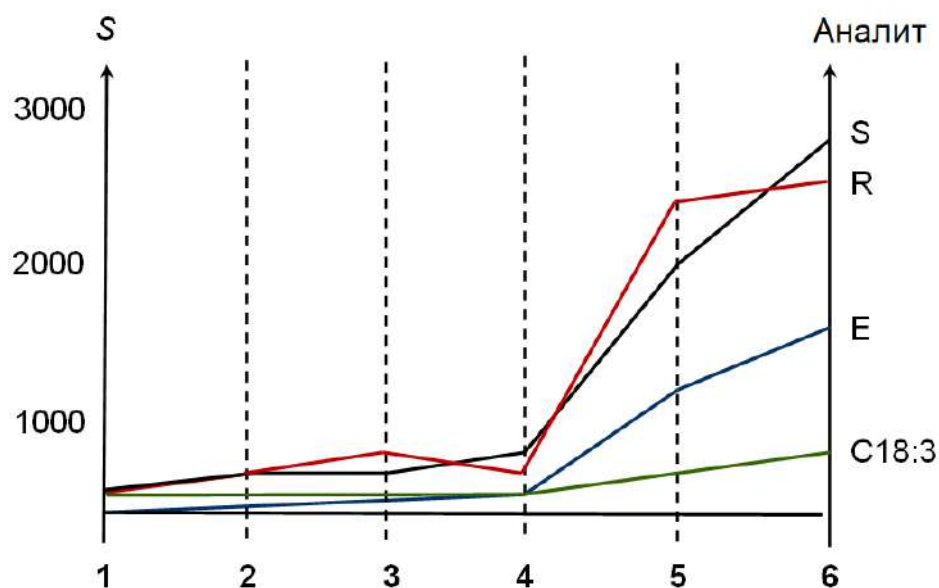
**Рис. 5.8** – SEM-изображения гальванической пленки Pd-NPs ( $h = 65 \pm 5$  нм) до (A) и после (B) обработки лазером, 12000 лазерных импульсов/пятно.

Морфологические изменения поверхности пленки не сразу отражаются на воспроизводимости измерений после повторного использования мишеней для ионизации аналита, и поэтому многократное использование таких поверхностей представляется вполне возможным.

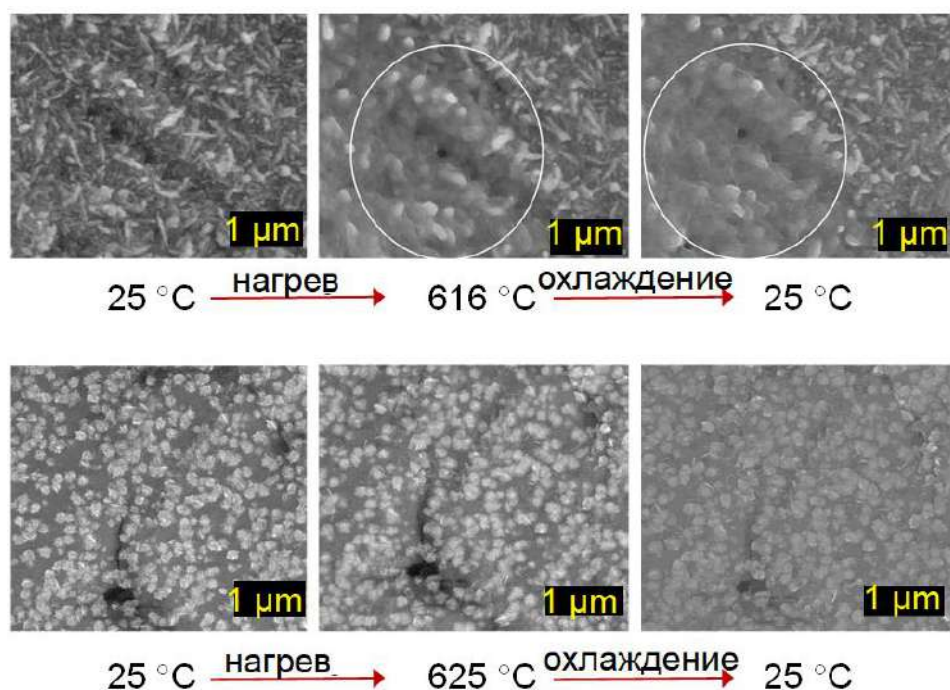
Температура плавления наночастиц сильно зависит от их размера и геометрических параметров.[266] Эти различия могут варьировать от нескольких единиц до нескольких сотен кельвинов. Было показано, что наиболее устойчивые в термическом отношении формы имеют форму цилиндра и додекаэдра.[267] Кроме того, температуры плавления наноструктур резко снижаются при диаметрах  $<30$  нм.[268] Существенно, что во время электролиза, полученные Pd структуры вероятно загрязнены  $Pd_xO_y$ ,  $Pd(OH)_2$  и  $Pd_xH_y$ , что может изменить температуры их плавления и значительно затруднить теоретическое описание процесса. Поэтому использовали более практичный метод для измерения точек плавления синтезированных пленок, а именно, симулировали процесс «таяния»/спекания Pd-наноструктур непосредственно в E-SEM камере.

Эксперимент нагрева проводили на FEI Quanta 400 E-SEM FEG с использованием газообразного гелия (чистота 99.9%) при давлении в камере 400 Па. После 5-кратной продувки камеры между 800 и 1500 Па SEM-изображения регистрировали при ускоряющем напряжении 30 кэВ с высокотемпературным G-SED детектором. Температуру образца повышали ступенчато, начиная с комнатной температуры (298 К) до тех пор, пока не наблюдалось изменение морфологии наноструктур («таяние»).

Результаты эксперимента показали, что Pd-наноструктуры диаметром от 30 до 180 нм начинают спекаться при одинаковых температурах, даже несмотря на то, что они демонстрировали очень разные значения LDI-эффективности, **Рис. 5.9.** Pd-NPs (30 – 60 нм), Pd-NFs (130 – 150 нм) и Pd-NNs (180 – 200 нм) плавилась примерно при 890 – 898 К, тогда как металлический Pd плавится при 1827 К, **Рис. 5.10.**



**Рис. 5.9** – Зависимость отклика ( $S$ , ионный ток/нг аналита) от морфологии Pd-наноструктур: (1) напыленная Pd-пленка + 5 нм слой  $K^+$ ; (2) Pd-NN + 5 нм  $K^+$ ; (3) Pd-NF из *Электролита 3* после  $K^+$  напыления; (4) Pd-NPs + Pd-NFs +  $K^+$ ; (5) Pd-NPs из *Электролита 2*; (6) Pd-NPs из *Электролита 1*.  $S$  – сульфаметазин, R – резерпин, E – эритромицин, C18:3 – линоленовая кислота.



**Рис. 5.10** – SEM-изображения Pd-NNs (*сверху*) и Pd-NFs (*снизу*) в процессе теплового эксперимента *in situ* (E-SEM).

Полученные экспериментальные данные согласуются с результатами, представленными ранее для углеродных эмиттеров-ионов и кремниевых подложек, синтезированных методом травления. При использовании УФ-лазера с длиной волны 337 нм температурные интервалы спекания поверхности находились в диапазоне 800-1000 К.[269] Пиковые температуры частиц углерода, полученные в конце импульса лазера были измерены с использованием ИК-лазера и находились в диапазоне ~ 1000 К.

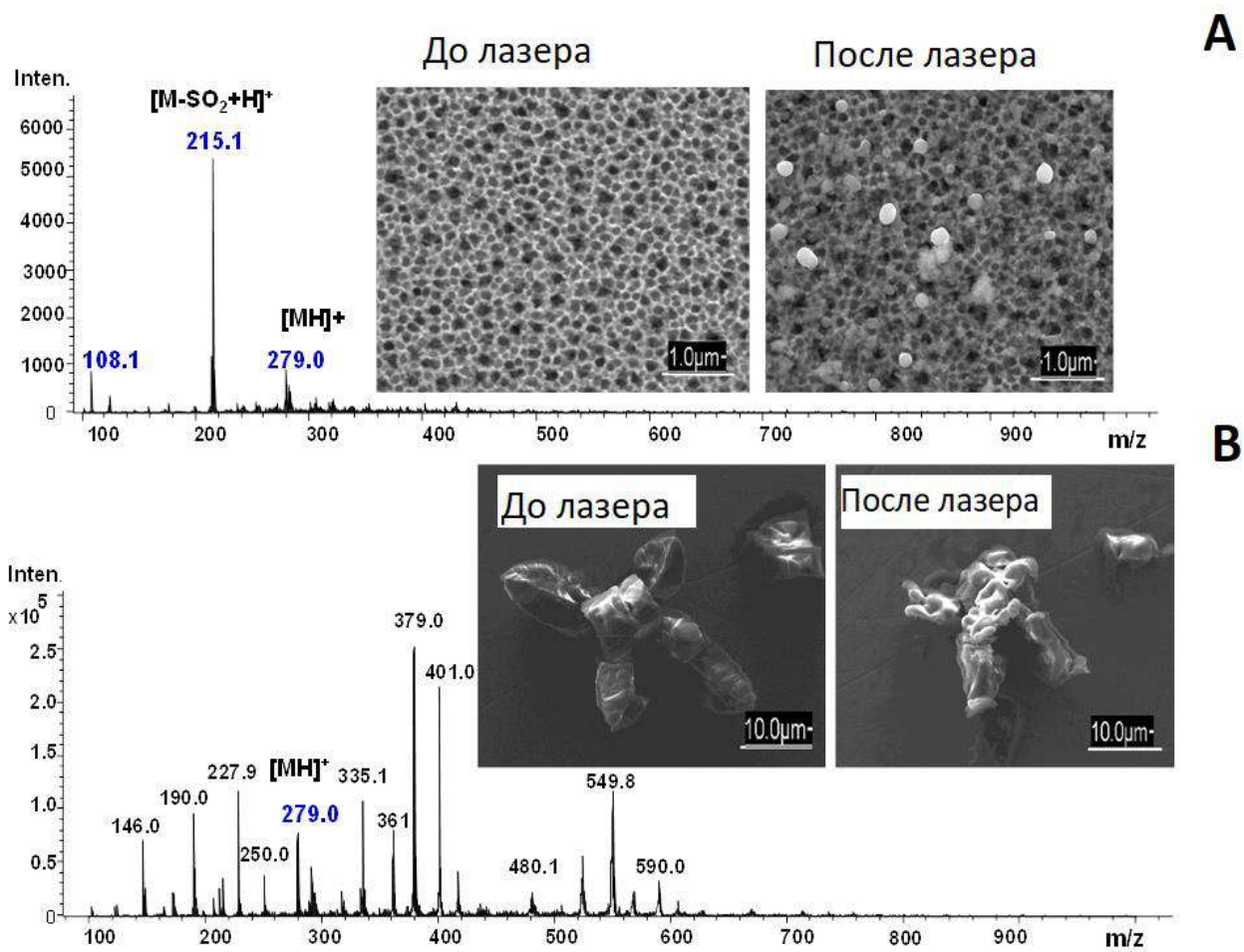
При увеличении диаметра Pd наноструктур от 130 до 400-800 нм (путем варьирования времени электролиза и плотности тока) точка плавления этих структур также увеличилась от 898 К до 1007 К, что приводило к получению подложек более стойких к лазерному облучению (на поверхности не наблюдалось реорганизации). Подложки-эмиттеры с высокой точкой плавления демонстрировали полную потерю LDI-эффективности.

*Сделанные наблюдения позволили предположить, что получаемый SALDI-отклик в значительной степени связан с эффектами реструктуризации поверхности пленок. Эти эффекты проявляются независимо от природы пленок и длины волны лазера (355 нм – эксперименты, представленные в работе, 337 нм – данные из литературы).*

*В общем виде – отсутствие эффектов реорганизации наноструктур влечет за собой потерю способности мишени-эмиттера поставлять ионы-реагенты для последующей катионизации аналита при лазерном облучении поверхности.*

Эта гипотеза находит экспериментальное подтверждение в методах MALDI-MS и DIOS-MS (ионизация с поверхности пористого кремния). В обоих случаях наблюдалось существенное изменение поверхности-эмиттера ионов до и после лазерного воздействия, **Рис. 5.11.**

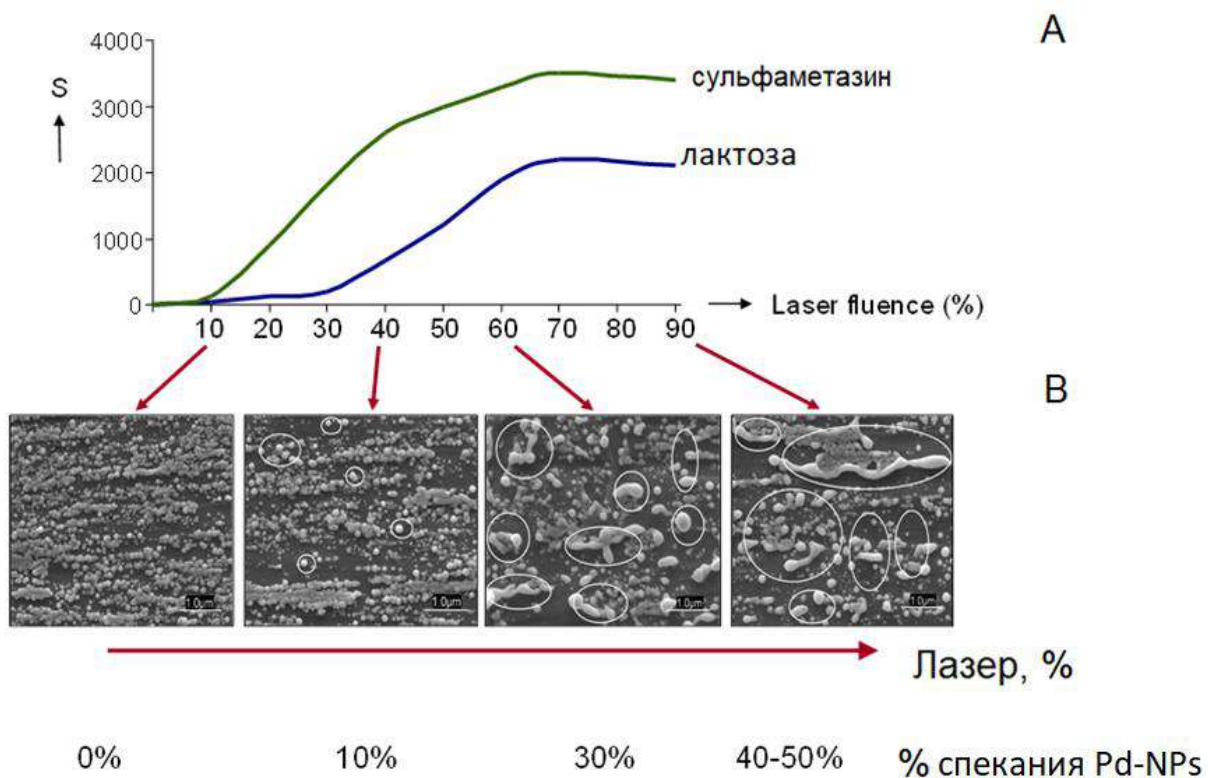




**Рис. 5.11** – DIOS (A) и MALDI (B) масс-спектры сульфаметазина. Вставки – SEM-изображения мишеней-эмиттеров, демонстрирующие морфологические изменения после лазерного облучения поверхности. Лазер 45%.

### 5.5.3 Соотношение энергии лазера и эффективности процесса лазерной десорбции/ионизации биомолекул

Как показано в предыдущем разделе, перестройка Pd-NPs является одним из ключевых факторов активности мишеней-эмиттеров ионов в методе SALDI-MS. Далее была установлена прямая корреляция между затраченной энергией лазера и аналитическим сигналом, получаемым с поверхности пленок на основе наночастиц благородных металлов, см. **Рис. 5.12**.



**Рис. 5.12** – Зависимость отклика ( $S$ ) тестируемых аналитов с поверхности Pd-NPs от энергии лазера (A), и связанных с ней изменений морфологии поверхности мишени-эмиттера ионов (B).

Доминирующим при воздействии лазера с энергией ниже порогового значения ( $< 20\%$ ) является процесс термической десорбции с поверхности пленки. Однако этой энергии не достаточно для эффективной ионизации аналита; средние плотности энергии лазерного излучения ( $\sim 20\text{-}40\%$ ) приводят к одновременному возникновению процессов термической десорбции и фазового перехода за счет частичного преобразования поверхности эмиттеров; в этой области происходит заметное увеличение LDI-сигнала, см. **Рис. 5.12**. Воздействие лазера на пороге температуры плавления или выше этого значения приводит к изменению морфологии структур.

*Именно эта область является наиболее полезной для аналитических целей в методе SALDI-MS с поверхности гальванических пленок на основе наночастиц благородных металлов; частичная реорганизация поверхности вызывает высвобождение ионов реагентов, соосажденных в процессе электролиза, которые и способствуют катионизации аналита.*

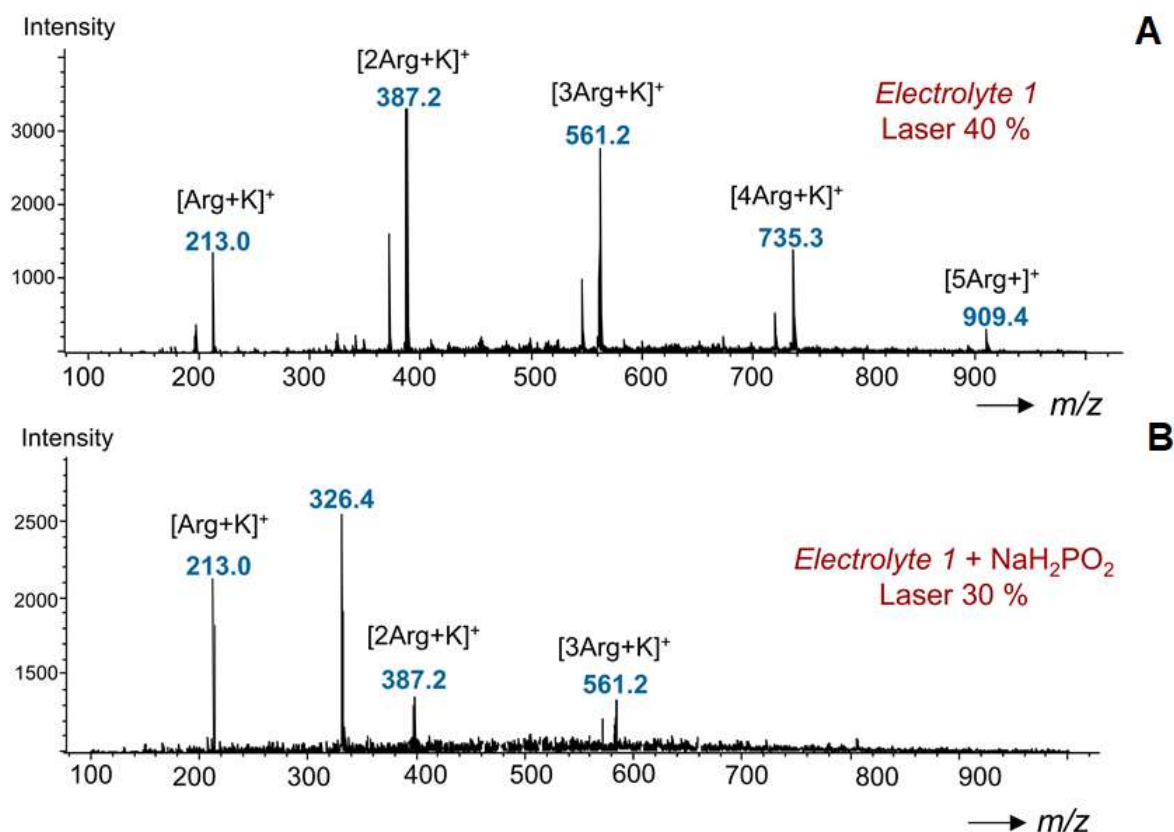
При уровнях лазерного воздействия, превышающих допустимое пороговое значение (>60%), происходит значительная агломерация наночастиц и эффективность десорбции/ионизации аналитов снижается.

#### **5.5.4 Пути усовершенствования дизайна мишеней-эмиттеров на основе наночастиц благородных металлов для обнаружения и определения малых биомолекул**

Зависимость эффективности LDI-сигнала от степени плавления поверхности использовалась для дальнейшего улучшения аналитических характеристик пленок Pd-NPs при определении биоаналитов. Точку плавления Pd-NPs диаметром 60 – 80 нм целенаправленно снижали путем добавления восстановителя (0.2 М гипофосфита натрия) в раствор *Электролита 1*. При этом во время синтеза содержание фосфора в пленках Pd увеличивалось. Одновременно ионизация целевых аналитов с поверхности модифицированных мишеней на основе таких пленок Pd-NPs происходила при более низкой энергии лазера (**Рис. 5.13**, показано на примере ионизации аргинина). Для ионизации аргинина с такой мишени требовалось лишь 30% вместо 40% энергии лазера, необходимой для ионизации того же количества аналита с мишени на основе оригинальных Pd-NPs.

Добавление восстановителя во время синтеза пленок также подавляет образование кластерных поли-ионов типа  $[nM(\text{аргинин})+K]^+$ . Важно иметь в виду, что энергия лазера в 30% была недостаточной для LDI исследуемых аналитов на исходных Pd-NPs из-за отсутствия выраженных эффектов плавления. После добавления  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  во время электролиза образовавшаяся поверхность способна подвергаться преобразованию даже в условиях

воздействия 30% энергии лазера (Приложения, Рис. П5.4); при лазере >40% изменения морфологии, наблюдаемые для этих мишеней, уже напоминали изменения, наблюдаемые при >90% энергии лазерного излучения на исходных Pd-NPs.



**Рис. 5.13** – Масс-спектры аргинина (30 нг/пятно), полученные с поверхности исходных Pd-NPs (температура плавления 890 К) (А) и с поверхности Pd-NPs с пониженной точкой плавления после добавления восстановителя в электролит (В).

Таким образом, можно заключить, что LDI поведение мишеней на основе пленок наночастиц во многом сходно с закономерностями, наблюдаемыми при ионизации с углеродных или кремниевых подложек (прослеживается зависимость порогового значения лазера на эффективность процесса десорбции/ионизации). Пороговое значение лазерной энергии соответствует фазовым переходам при процессах плавления. Хотя эта перестройка непосредственно приводит к повышенной десорбции/ионизации с

поверхности наноструктур C и Si, эффективный LDI-отклик с поверхности нанопленок на основе Pd-NPs зависит от двух сопутствующих факторов:

1. плавления/спекания наноструктур;
2. присутствия ионов реагентов (например,  $K^+$ ), высвобождаемых при лазерном облучении.

*Подложки-эмиттеры с идеальными морфологическими и светопоглощающими свойствами (напыленные пленки) не будут эффективно десорбировать и ионизировать анализируемые вещества, если реагентные ионы не высвобождаются во время лазерного импульса.*

## **5.6 Значение степени десорбции биомолекул и поверхностной кислотности пленок на эффективность сигнала в методе SALDI-MS**

Далее изучалось влияние степени абляции биоаналита и кислотности поверхности мишени-эмиттера ионов на эффективность генерации ионов в методе SALDI-MS. Степень удаления абляцированного аналита с поверхности мишеней на основе пленок Pd-NPs исследовали с помощью электронно-дисперсной рентгеновской (EDX/X-ray) спектроскопии. Полученные результаты сравнивали с данными десорбции/ионизации тест-аналитов на пористом кремнии (DIOS), гладком необработанном кремнии, а также мишеней с использованием традиционных MALDI матриц (CHCA).

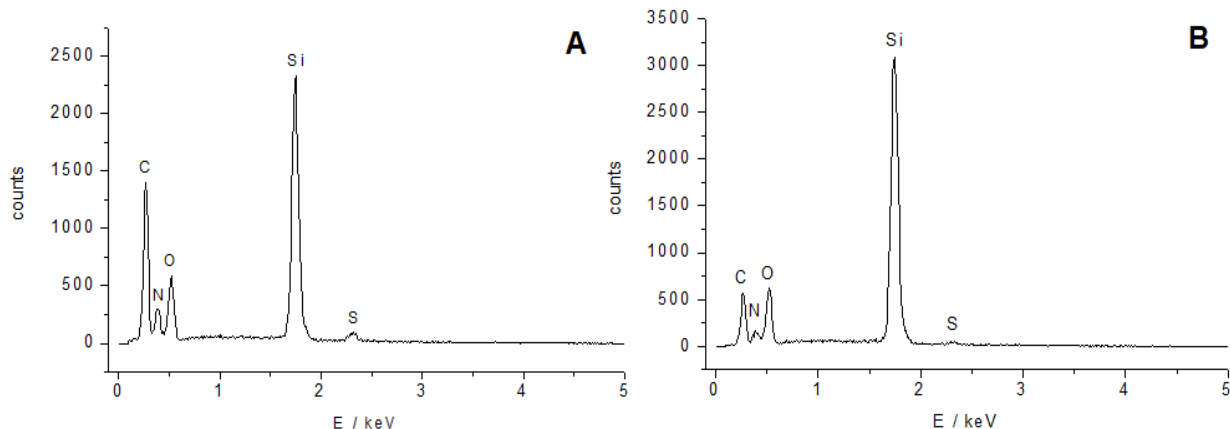
Чтобы обеспечить достаточный сигнал для анализируемых веществ во время рентгеновского анализа, выбирали наиболее плотную часть высушенного анализируемого вещества для количественного EDX определения; высушенные пятна исследовали до и после обработки поверхности лазером.

### **5.6.1 Определяет ли степень абляции биомолекул интенсивность сигнала в методе SALDI-MS?**

В качестве тестируемого соединения в этих экспериментах использовали сульфаметазин из-за его способности к прямой лазерной десорбции/ионизации

даже с гладких стальных поверхностей, что позволяет провести корреляцию процесса лазерной абляции с процессом ионизации.

В качестве элементов-маркеров для сульфаметазина ( $C_{12}H_{14}O_2S$ ) и количественного определения значений абляции возможно использовать азот и серу. Оба элемента не имеют пересечений с матричными элементами соединений MALDI или SALDI в EDX спектрах (**Рис. 5.14**). Однако коррекция базовой линии спектров EDX для серы оказалась более надежной по сравнению с азотом, поскольку сигнал по азоту располагался рядом с пиками углерода и кислорода в спектрах EDX для сульфаметазина. В этой связи, количественное определение десорбированного органического анализита с поверхности эмиттеров проводили по спектральной линии серы. Кроме того, сера обычно не обнаруживается в фоновых спектрах, как кислород, углерод или азот и получаемые сигналы можно с достоверностью идентифицировать с присутствием или отсутствием анализируемого компонента (сульфаметазина).



**Рис. 5.14** – EDX/X-ray спектры сульфаметазина (250 нг/пятно), полученные с поверхности DIOS до (**A**) и после (**B**) лазерного облучения (импульс 3 нс; лазер 40 %, 200 Гц).

Несмотря на разный характер морфологических изменений после лазерного облучения в MALDI и SALDI (см. **Приложения, Рис. П5.5**), EDX-анализ показал очень близкие количественные зависимости при десорбции

выбранного тест-аналита в газовую фазу с поверхности исследуемых мишеней (см. значения абляции в **Табл. 5.5**).

**Табл. 5.5** – Резюме физико-химических характеристик мишеней-эмиттеров ионов относительного количества десорбированного анализита и LDI-сигнала

Мишень	Кол-во анализита, (at.%)		Абляция (%) <sup>1</sup>	Размер пятна (mm)	$S$ (ng <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$k$ (W/mK) <sup>3</sup>	$A_{355}$ (%) <sup>4</sup>	$T_m$ (°C) <sup>3</sup>	Мишень/ (поверхностные группы) <sup>5</sup>
	До лазера	После лазера							
MALDI (CHCA)	3.3±0.1	2.1±0.4	38	2	2400	0.1	72	250	-/+ (H <sup>+</sup> /R-O <sup>-</sup> )
DIOS (пористый кремний)	2.2±0.1	0.9±0.3	59	5	1600	2.0	43	755	+/+ (R-O <sup>-</sup> )
Mono SiO <sub>2</sub> (гладкий)	3.7±0.3	2.1±0.3	43	3	240	156	48	1414	+/+ (R-O <sup>-</sup> )
Pd-NPs (60 nm)	4.5±0.0	3.1±0.8	31	1.5	1500	1.5	78	620-650	+/+ (PdO, H <sup>+</sup> /R-O <sup>-</sup> )
Полированная сталь	4.3±0.1	3.2±0.1	25	2	140	41.1	64	1540	-/+ (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )

<sup>1</sup> относительное количество десорбированного анализита (сульфаметазина), рассчитанное как разность между количеством сульфаметазина до и после лазерного облучения для одного и того же пятна образца.

<sup>2</sup> аналитический отклик (эффективность ионизации подложки, ионный ток/количество образца). <sup>3</sup> теплопроводность ( $k$ ) и точки ( $T_m$ ) плавления относятся к наноструктурам (не к сыпучим материалам) <sup>4</sup> абсорбция при 355 nm (отражательная способность в %).

<sup>5</sup> активные поверхностные группы (ответственные за формирование сигнала в методах MALDI/SALDI-MS) и их вероятные пути диссоциации.

В текущих условиях эксперимента 62±2% анализита все еще оставалось после лазерного воздействия на мишени с органической MALDI матрицей. Количество недесорбированного в газовую фазу анализита с поверхности пленки Pd-NPs составило 69±5%. Подложка-эмиттер на основе пористого кремния (DIOS) демонстрировала более эффективную лазерную абляцию (степень десорбции): так только 41±2% анализируемого вещества оставалось на поверхности после лазерного облучения.

Важно отметить, что DIOS-эмиттеры не обеспечивали высоких значений ионизации тест-аналита по сравнению с MALDI матрицами или мишенями на основе пленок Pd-NPs. Такой результат позволяет предположить, что значения лазерной десорбции/абляции аналита не коррелируют линейно с выходом по ионизации. Этот результат был довольно неожиданным, поскольку, чем больше вещества десорбировалось с поверхности и перешло в газовую фазу, тем выше вероятность его ионизации.

Для проверки этого предположения определяли значения абляции/десорбции с поверхности полированных кремниевых Si-пластин (непористый кремний). Эти мишени-эмиттеры показали высокие значения абляции анализируемого вещества после лазерного импульса (> 40% десорбция), в то время как эффективность ионизации с таких мишеней по сравнению с DIOS, Pd-NPs и MALDI была крайне низкой, см. **Табл. 5.5**. Этот эффект, вероятно, связан с высокой теплопроводностью Si-пластин (240 Вт/м·К) по сравнению с пористыми подложками DIOS (2.0 Вт/м·К), что приводит к эффективному локальному нагреву [270] и, как следствие, более высоким значениям десорбции.

В то же время, отсутствие активированных силанольных групп на его поверхности не обеспечивает эффективную ионизацию аналита.[271] Значение десорбции с поверхности полированной стальной мишени было на 25% ниже и десорбция тестового аналита с такой поверхности не сопровождалась образованием каких-либо аналитически значимых сигналов в масс-спектре. Другими словами, эффективной ионизации не происходило, **Табл. 5.5**.

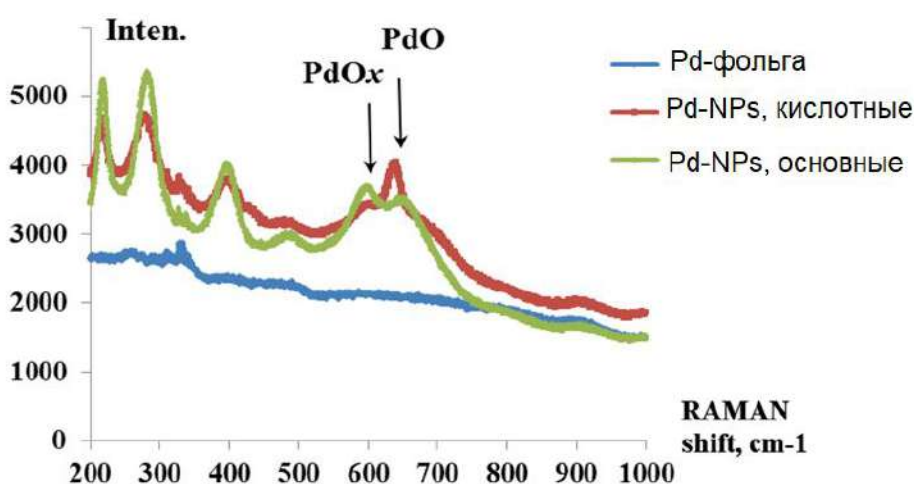
*В целом, степень абляции/десорбции аналита с поверхности мишеней-эмиттеров не коррелирует с выходом по ионизации. То есть, эффективная десорбция аналита в газовую фазу не является гарантом его успешной ионизации.*



## 5.6.2 Влияние поверхностной химии пленок на тип формирующихся ионов в методе SALDI-MS

Далее исследовали влияние химии поверхности эмиттеров ионов на эффективность лазерной десорбции/ионизации в методе SALDI-MS. Даже незначительное изменение химии поверхности пленки может вызывать серьезные изменения в типах формирующихся ионов для тест-аналитов, а также в путях их фрагментации (см. далее по тексту).

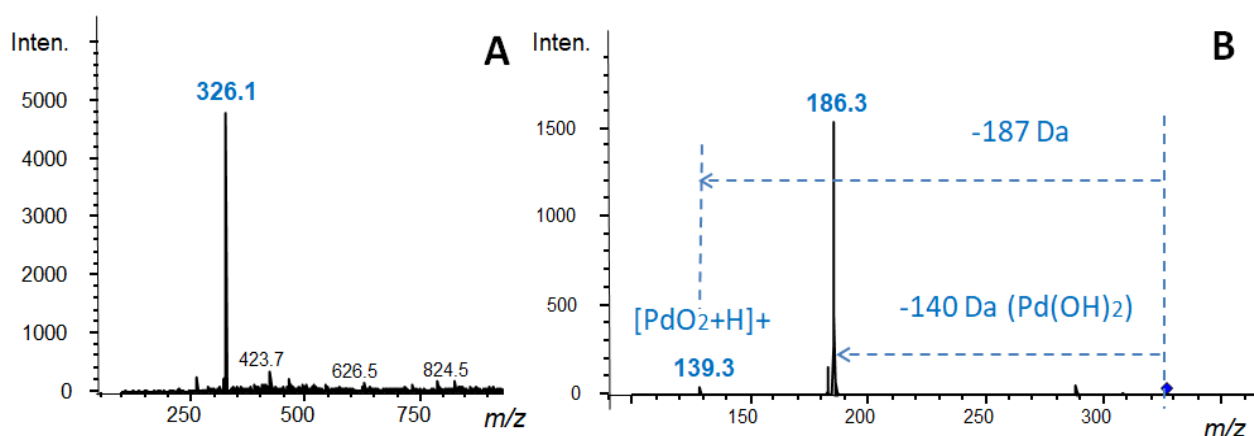
Анализ мишеней на основе пленок Pd-NPs, синтезированных из кислых и основных электролитов методом Рамановской спектроскопией, показал существенные различия в химии их поверхности (**Рис. 5.15**). Так, никаких функциональных групп не было зарегистрировано на поверхности палладиевой фольги, нанесенной на стальную подложку методом напыления в вакууме (толщина пленки 40 нм). Однако для пленок на основе Pd-NPs независимо от типа электролита, из которого их производили, был зафиксирован основной сигнал при  $630\text{--}640\text{ см}^{-1}$ , соответствующий связи Pd-O. В дополнение к этому пику в спектре пленок основных Pd-NPs отчетливо фиксируется пик при  $600\text{ см}^{-1}$ , соответствующий трансформации PdO в нестехиометрические оксиды PdO<sub>x</sub>. [247]



**Рис. 5.15** – Спектры комбинационного рассеивания Pd-фольги и гальванических пленок Pd-NPs, полученных из электролитов различной

кислотности. Пики при  $640 \text{ nm}^{-1}$  и  $600 \text{ nm}^{-1}$  указывают на присутствие PdO и PdO<sub>x</sub> (лазер Nd:YAG, 532 нм).

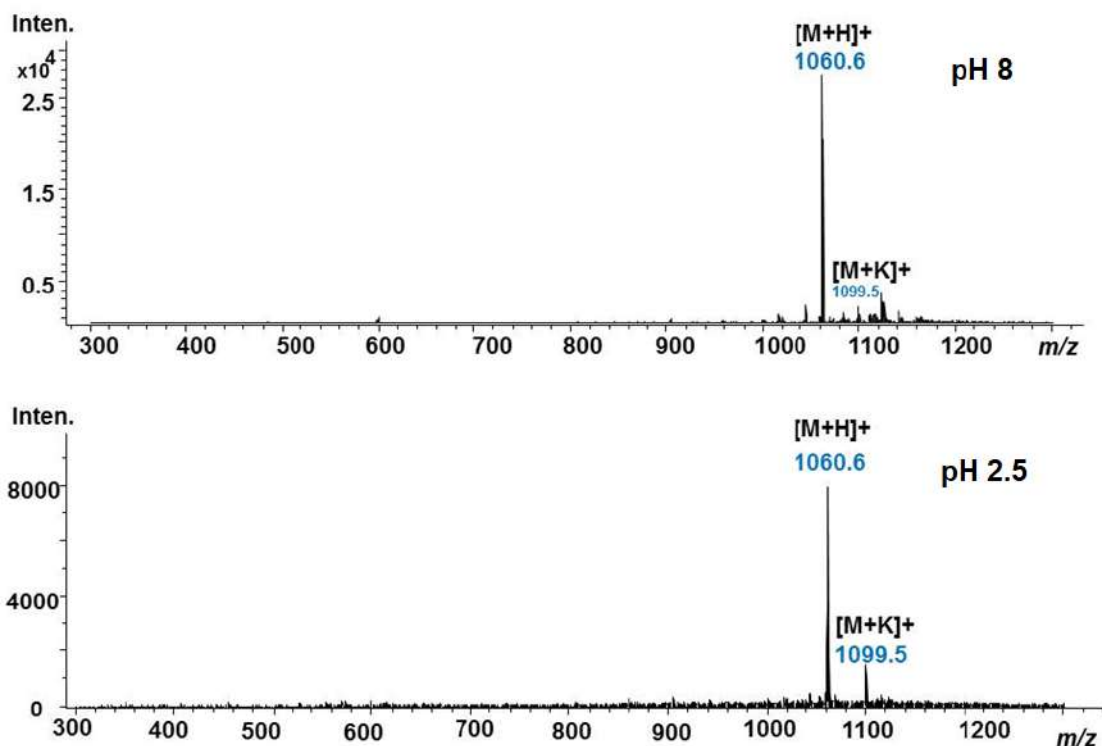
Данные, полученные методом Рамановской спектроскопии, хорошо согласуются с результатами масс-спектрометрического анализа мишеней (без использования аналитов). Так, в положительном режиме ионизации с поверхности основных пленок Pd-NPs (полученных из электролита с pH 9), фиксируется образование Pd<sub>x</sub>(OH)<sub>y</sub> и Pd<sub>x</sub>O<sub>y</sub>, **Рис. 5.16**.



**Рис. 5.16** – LDI-MS спектры (**A** – полный спектр, **B** – MS/MS спектр пика при  $m/z$  326), записанные непосредственно с поверхности Pd-NPs (основной электролит) в положительном режиме ионизации, лазер 40%.

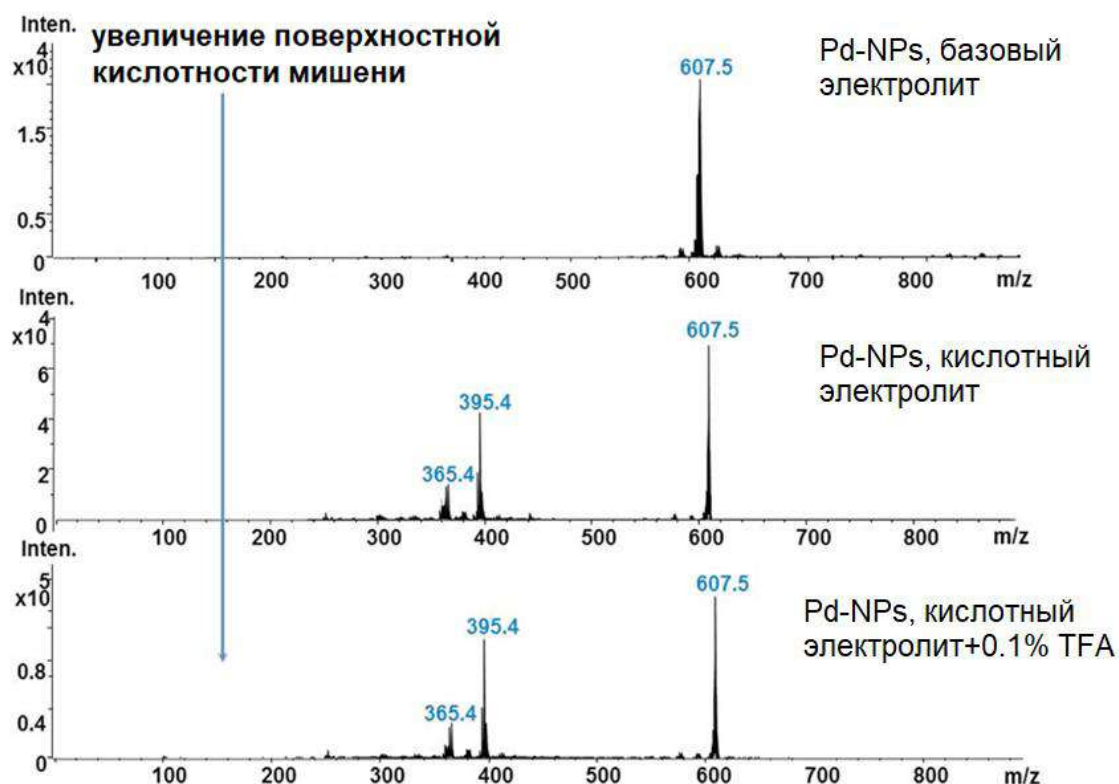
Ионизация пептида брадикинина с поверхности пленок Pd-NPs, синтезированных из кислых растворов электролитов, была менее эффективна, чем ионизация того же аналита с Pd-NPs, полученных из основных растворов при прочих идентичных условиях эксперимента, **Рис. 5.17**.

Кроме того, изменение химического состава поверхности подложки-эмиттера также способно изменять характер диссоциации образующихся ионов, **Рис. 5.18** (показано на примере резерпина). Резерпин – широко изученный антибиотик и пути его диссоциации и ионизации известны.[272]



**Рис. 5.17** – SALDI масс-спектры 30 нг/пятно пептида брадикинина, полученные с поверхности пленок Pd-NPs, имеющих различную кислотность/основность поверхности (интенсивность лазера, 40%).

В масс-спектрах в положительном режиме ионизации с поверхности Pd-NPs, полученных из основного электролита, фиксировался пик при  $m/z$  607, что соответствует потери 2Да от иона-предшественника резерпина  $[M+H]^+$  вследствие окисления. Интенсивность пика 3,4-дегидрорезерпина ( $m/z$  607) увеличивалась с увеличением поверхностной кислотности мишени-эмиттера при идентичных условиях эксперимента: два дополнительных фрагмента при  $m/z$  365 и  $m/z$  395 наблюдались в масс-спектрах при ионизации с поверхностей с более высокой кислотностью. Наибольшая степень фрагментации резерпина была зафиксирована с поверхности пленок Pd-NPs, приготовленных из кислотного электролита с последующим добавлением 1 мкл 0.1% раствора TFA (трифторуксусная кислота,  $pK_a = 0.23$ ), **Рис. 5.18**, нижний спектр.



**Рис. 5.18** – SALDI масс-спектры 30 ppm резерпина, записанные в положительном режиме ионизации с мишеней на основе пленок Pd-NPs с различной поверхностной кислотностью.

Следует отметить, что интенсивная фрагментация биоаналита в ходе ионизации (*on target in situ* fragmentation) [128] сильно затрудняет процесс интерпретации масс-спектров (дополнительное количество и интенсивность фрагментов усложняют поиск молекулярного иона). Анализ масс-спектров по формирующимся в ходе ионизации фрагментам редко позволяет получить полную структурную информацию об искомом анализе.[273] В этой связи, ионизация антибиотиков с идентичной резерпину природой (pKa) и структурой с поверхности мишеней-эмиттеров, имеющих в своем составе обширные кислотные центры, является нежелательной.

Подводя промежуточный итог, следует отметить, что путем настройки pH электролита возможно проводить синтез мишеней-эмиттеров с контролируемой химией поверхности, а также «настраивать» ее под конкретные аналитические задачи. Более того, контролируя химию

поверхности мишеней, возможно контролировать пути ионизации и фрагментации исследуемых аналитов в методе SALDI. Так, химия поверхности подложки-эмиттера и доступность функциональных групп при контакте с аналитом в ходе лазерного импульса играет ключевую роль в процессах десорбции и ионизации в методе SALDI-MS с поверхности гальванических пленок, представленных наночастицами благородных металлов.

Эти данные и промежуточные выводы хорошо согласуются с экспериментальными результатами, полученными с поверхности Pd-NPs-модифицированных амперометрических биосенсоров при определении малых биоаналитов. Именно сформированные в ходе электроосаждения оксиды палладия (химия поверхности) препятствовали надежной регистрации аналитического сигнала электровосстановления пероксида водорода в катодной области (см. Главу 4).

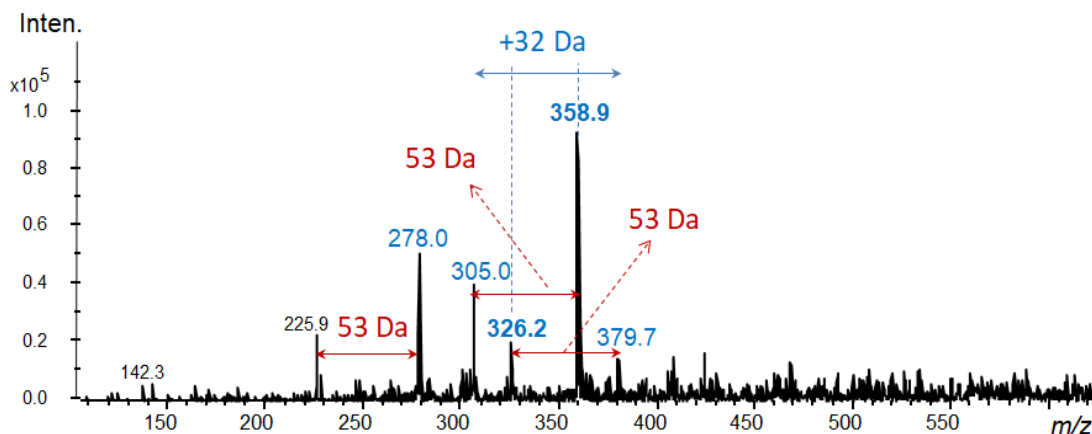
*Другими словами, независимо от базового принципа работы микроаналитических устройств на основе пленок наночастиц благородных металлов (биосенсоры или SALDI-MS-мишени) химия их поверхности является одним из важнейших факторов, влияющим на аналитические характеристики и надежность этих измерительных систем.*

### **5.6.3 Определение характера взаимодействий биомолекул с поверхностью нанобиосенсоров с помощью SALDI-MS**

С помощью методологии SALDI-MS и с учетом изучения фундаментальных параметров, влияющих на генерируемый сигнал с поверхности мишеней на основе наночастиц благородных металлов, возможно более детально определить механизмы взаимодействий биоаналитов с функциональными пленками. Так, суммируя полученные данные по закономерностям ионизации углеводов, антибиотиков и пептидов с поверхности тонких электролитических пленок, можно с уверенностью исключить формирование ковалентных связей или каких-либо специфических

взаимодействий с биоаналитами в системах на их основе: большинство изученных малых молекул формирует в масс-спектрах аддукты с калием, источником которого являются соли, используемые при приготовлении электролита (см. Табл. 5.4 с Приложения, Рис. П5.1).

В случае протекания каких-либо окислительных процессов между аналитом и поверхностью мишени также возможна визуализация этих явлений в масс-спектрах. Так при нанесении раствора пероксида водорода на поверхность SPE/GO электрода, модифицированного Pd-NPs, в масс-спектрах четко идентифицируются продукты окисления поверхности пленки, включая смещение по массе +32 Da ( $+O_2$ ) (Рис. 5.19), а также повторяющиеся структуры типа  $Pd^{2+}/2$  (см. в сравнении с Рис. 5.16). Эти результаты находятся в полном согласии с закономерностями электроокисления пероксида водорода на SPE электроде, модифицированном Pd-NPs (см. Главу 4).



**Рис. 5.19** – LDI-MS спектр, записанный для 1 мМ  $H_2O_2$  в положительном режиме ионизации с поверхности SPE/GO электрода, модифицированного пленкой Pd-NPs, лазер 45%.

Иными словами, метод SALDI-MS позволяет:

~ получить подробную аналитическую информацию о химии поверхности электродов в биосенсорике или мишеней в масс-спектрометрии;

~ оценить степень химической однородности поверхности электродов или мишеней (см. Главу 2, часть 2.3.1);

~ получить представления о механизмах адсорбции, десорбции и ионизации биоаналита с поверхности электродов или мишеней;

~ изучить параметры, ответственные за перенос заряда с мишени-эмиттера или электрода на основе ОНГ пленок с поверхности к биоаналиту.

Следующим важным фактором, влияющим на сигнал в методе SALDI-MS как самостоятельного биоаналитического инструмента, так и метода скрининга поверхности электродов в биосенсорике, является определение фазового состояния биоаналитов при адсорбции на наноструктурированных электролитических пленках.

### **5.7 Зависимость между фазовым состоянием биоаналита и эффективностью лазерной десорбцией/ионизацией с поверхности наночастиц благородных металлов**

Далее исследовалась эффективность процесса лазерной десорбции/ионизации тест-аналитов (на примере антибиотиков, аминокислот и пептидов) с поверхности гладкого кремния (*n*-Si), пористого кремния (DIOS), пористого оксида алюминия (AAO), алюминиевых нанопроволок/Al-wires и Al-фольги. Дополнительная модификация пористых полупроводниковых пленок наночастицами палладия в бесточковом режиме в течение 30 с (electroless deposition, см. Главу 1) позволила расширить перечень тестируемых мишеней-эмиттеров ионов до гибридных металл-полупроводниковых подложек: DIOS+Pd-NPs и AAO+Pd-NPs.

Такой подход позволит значительно изменить электрохимические свойства как самих наночастиц, так и полупроводников, а понимание процессов, происходящих в гибридных системах, позволит правильно настроить их работу для последующего использования в масс-спектрометрии и биосенсорике.[150]

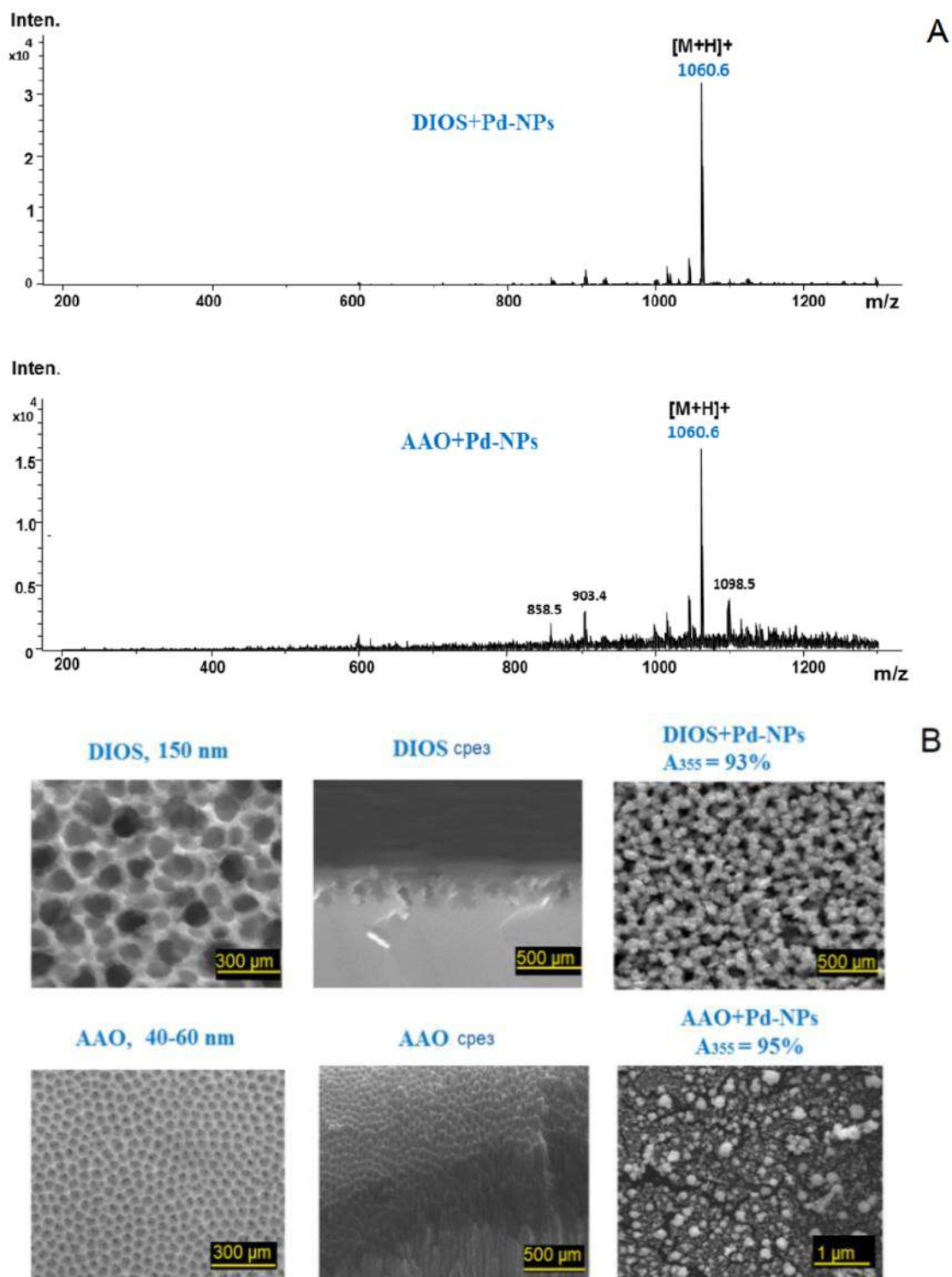
### 5.7.1 Влияние пористости и светопоглощения гибридных пленок на эффективность ионизации в методе SALDI-MS

Изначально исследовали влияние пористости мишени и светопоглощения (%) при длине волны 355 нм ( $A_{355}$ ), что соответствует типу используемого в экспериментах лазера. Важно отметить, что увеличенная площадь поверхности и глубина пор тестируемых мишеней не влияют на эффективность LDI-сигнала. Фактически, никаких сигналов типа  $[M+H]^+$  по степени интенсивности, уровням фрагментации и S/N отношения, сопоставимых с MALDI-MS не было получено для тестируемых аналитов с поверхности Al-фольги ( $A_{355} = 55\%$ ), Al-нанопроводов/wires ( $A_{355} = 90\%$ ), ААО ( $A_{355} = 75\%$ ), DIOS ( $A_{355} = 43\%$ ) или n-Si ( $A_{355} = 48\%$ ). Ранее свойства ААО и ОНГ на его основе были исследованы в нескольких микроаналитических систем.[195,274–276]

В предыдущих разделах была подробно исследована роль термических эффектов нагрева в процессе лазерной десорбции/ионизации. В ходе данного этапа работы было установлено, что с поверхности Al-нанопроводов/wires, гибридных пленок DIOS+Pd-NPs и ААО+Pd-NPs отражалось только 5-10% энергии, а поглощалось в виде тепла >90%. Несмотря на превосходное светопоглощение при 355 нм (длина волны UV-лазера, используемого в работе) Al-нанопроводов, а также наличие эффектов спекания Al-наноструктур после воздействия лазера с этой поверхности не было получено никаких значимых LDI-сигналов независимо от класса и концентрации тест-аналита.

Между тем, гибридные металл-полупроводниковые мишени, полученные электрохимической иммобилизацией Pd-NPs на пористых носителях (DIOS и ААО), показали формирование протонированных типов ионов для тестируемых аналитов с хорошей интенсивностью сигнала и соотношением S/N, **Рис. 5.20** (масс-спектры показаны для брадикинина).





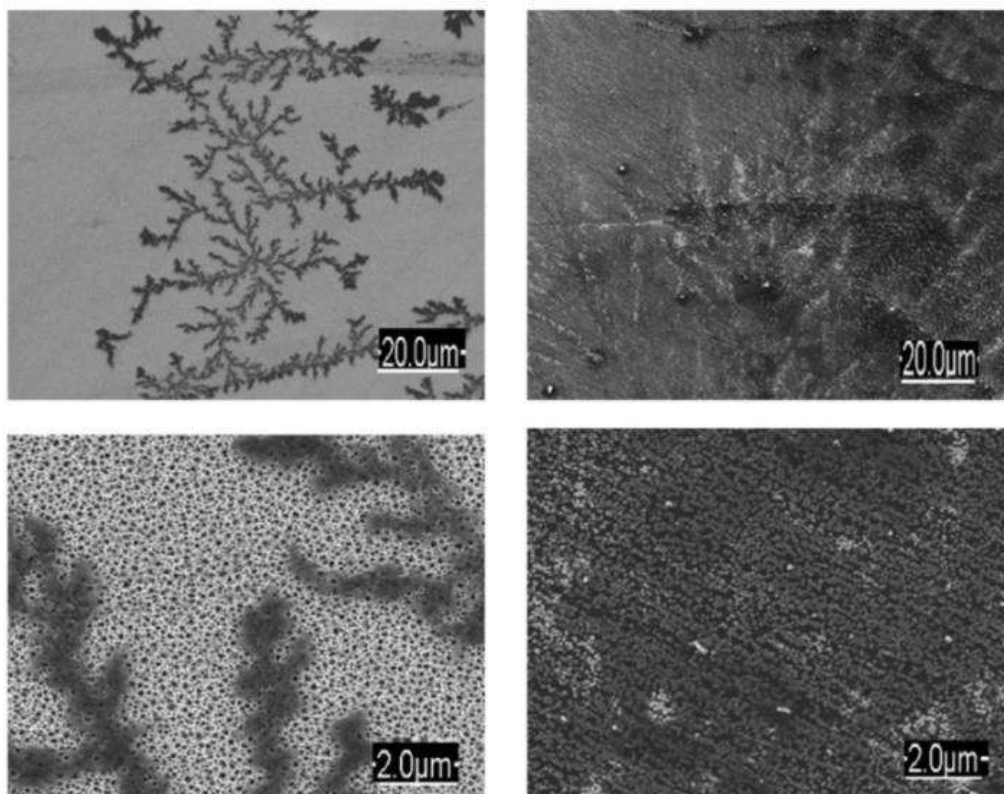
**Рис. 5.20** – (A) Масс-спектры 30 мкг/мкл брадикинина, полученные с поверхности пористых мишеней, модифицированных пленками Pd-NPs (лазер 40%) и (B) SEM-изображения мишеней.

Таким образом, несмотря на меньший диаметр пор и глубину каналов по сравнению с DIOS+Pd-NPs (несколько мкм), гибридная мишень на основе

AAO+Pd-NPs (300 нм поры) не показала улучшенных аналитических характеристик/*LDI-эффективность*.

*Таким образом, ни светопоглощающие свойства, ни пористость поверхности мишени (как индивидуальные параметры) не определяют ее эффективность в методе SALDI-MS.*

Согласно проведенным SEM-исследованиям, капля аминокислоты после пипетирования на поверхность гибридных мишеней на пористой основе, состоящей из полупроводников и Pd-NPs, покрывала более широкую область пространства по сравнению с индивидуальными пористыми поверхностями (**Рис. 5.21**, на примере 30 ppm глутамина, Gln).



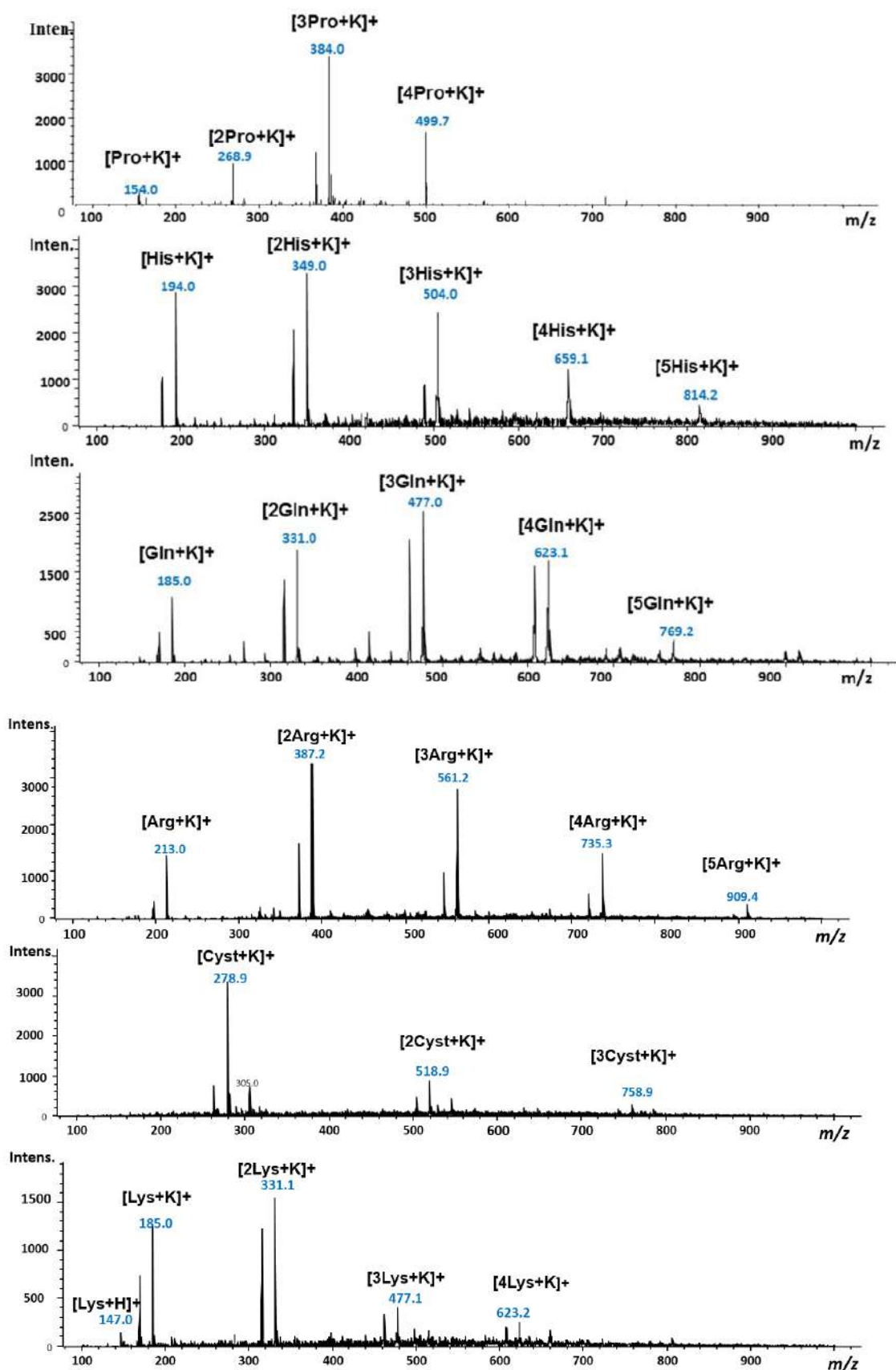
**Рис. 5.21** – SEM изображения 30 ppm Gln, помещенного/пипетированного на чистые/немодифицированные DIOS (*слева*) и гибридные DIOS+Pd-NPs (*справа*) мишени-эмиттеры ионов. *Примечание:* Gln, нанесенный на DIOS+Pd-NPs покрывает гораздо более широкую область (темная область).

Исходя из проведенных экспериментов, можно заключить, что *пористость, шероховатость и светопоглощение подложек напрямую не определяют LDI-эффективность, однако, вероятнее всего, влияют на степень гидрофобности поверхности и способ распределения аналита на ней.*

### **5.7.1.1 Некоторые особенности ионизации аминокислот с поверхности электроосажденных пленок**

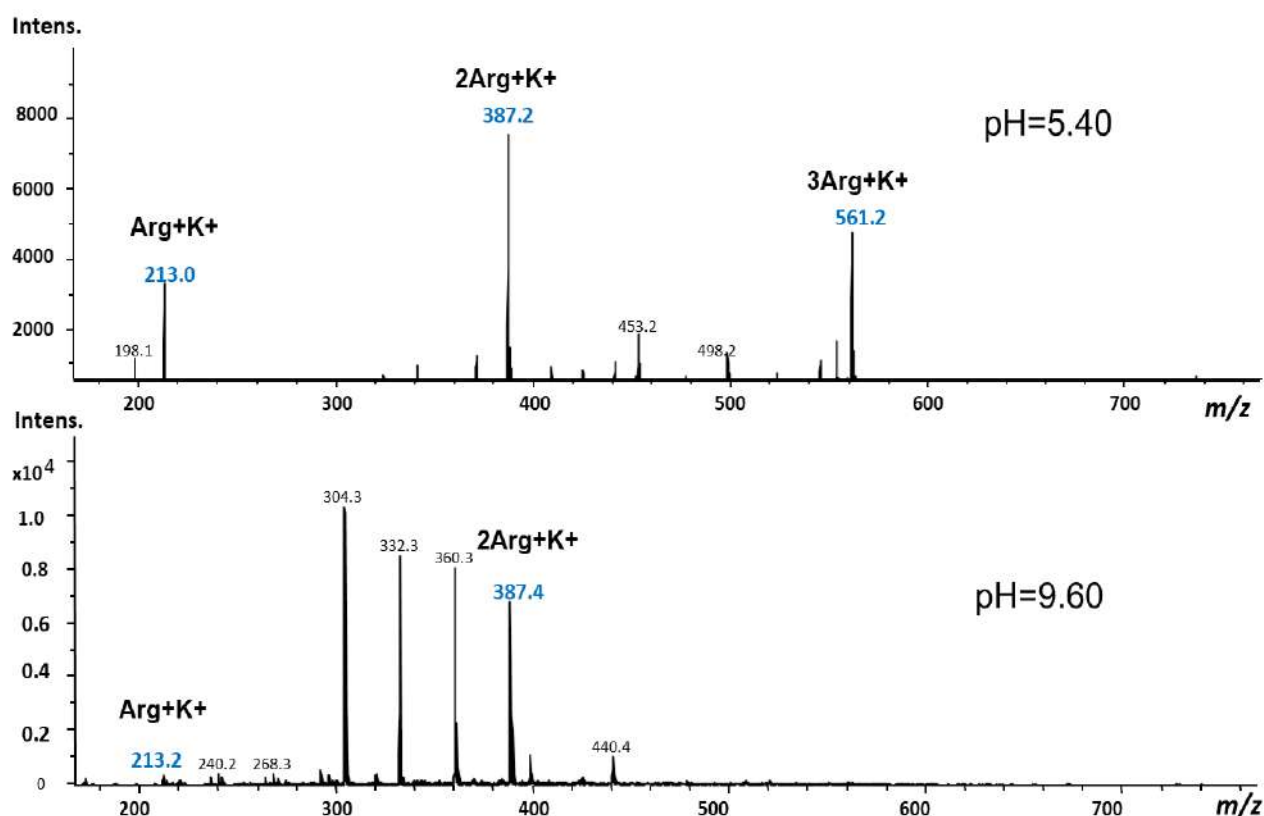
Независимо от типа подложки мишени (сталь, оксид графена, пористый кремний, анодный оксид алюминия) при последующем электроосаждении наночастиц палладия и пипетировании растворов аминокислот, ионизация всех тестируемых соединений этой группы сопровождалась образованием обширных поли-ионов типа  $[nM_{(\text{аминокислота})} + K]^+$ , **Рис. 5.22** (показано для DIOS+Pd-NPs). Можно предположить, что димеризация аминокислот обусловлена их биполярными свойствами и происходит не в растворе, а в газовой фазе непосредственно после трансформации поверхности мишени при действии лазера и высвобождении ионов-реагентов ( $K^+$ ). С увеличением концентрации аминокислот этот эффект становится более выраженным.

Стоит отметить, что кроме поли-ионов типа  $[nM_{(\text{аминокислота})} + K]^+$  при ионизации аминокислот в масс-спектрах также визуализировались поли-ионы типа  $[nM_{(\text{аминокислота})} + Na]^+$ , однако, значительно меньшей интенсивности. Na – это элемент, присутствующий на всех стеклянных капиллярах и узлах масс-спектрометра, поэтому появление в масс-спектрах также и аддуктов с натрием при ионизации биполярных аминокислот вполне объяснимо. Формирование поли-ионных продуктов в масс-спектрах аминокислот, вероятно, связано со свойствами аминокислот и их способностью к комплексообразованию, конденсации, образованию множественных водородных связей и тд.



**Рис. 5.22** – Масс-спектры, записанные при ионизации 30 мкг/мкл аминокислот и с поверхности мишени на основе DIOS+Pd-NPs пленки, рН 6.98, лазер 40 %.

Изменение pH растворов аминокислот в сторону слабо кислотного или слабо основного не приводило к изменению типов формирующихся ионов в масс-спектрах, **Рис. 5.23**. По-прежнему основными сигналами были поли-ионы типа  $[nM_{(\text{аминокислота})}+K]^+$ , однако, пипетирование более кислых или более основных растворов аминокислот, приводило к подавлению ионов основных растворов аминокислот, приводило к подавлению ионов  $[nM_{(\text{аминокислота})}+Na]^+$  и увеличению интенсивности сигналов  $[nM_{(\text{аминокислота})}+K]^+$ . Появление дополнительных ионов в нижнем диапазоне масс при ионизации аргинина (основной аминокислоты, pKa 12.48, находящейся в протонированной форме при pH < 10) с поверхности мишени на основе Pd-NPs (pH 9.60) связано с изменением химии самой мишени и возможной деградацией поверхности. В этой связи проводить дальнейшее увеличение основности растворов нецелесообразно. Отдельно стоит отметить, что при оценке чувствительности мишеней на основе электроосажденных наночастиц к аминокислотам, расчет стоит проводить по моно пику  $[M+K]^+$ , см. **Табл. 5.3**.



**Рис. 5.23** – Масс-спектры, полученные при ионизации 15 мкг/мкл аргинина с поверхности Pd-NPs при кислых и основных pH, лазер 40 %.

### 5.7.2 Влияние степени гидрофобности электроосажденных пленок на сигнал в методе SALDI-MS

На следующем этапе было исследовано влияние смачиваемости поверхности исследуемых мишеней-эмиттеров на интенсивность формирующегося сигнала. К сожалению, четкой зависимости между контактными углами смачивания мишеней и генерируемым LDI-сигналом провести не удалось (Табл. 5.6). Измерение контактного угла проводили с использованием гониометра Dataphysics OCA35 (Filderstadt, Германия). Каждую мишень с левым и правым контактными углами анализировали не менее трех раз, и результаты выражали как средние значения  $\pm$ SD.

**Табл. 5.6** – Зависимость LDI-сигналов с поверхности тестируемых мишеней-эмиттеров от контактного угла смачивания

Мишень	Al- фольга	AAO	AAO+ Pd-NPs	Al-wires	<i>n</i> -Si	DIOS	DIOS+ Pd-NPs
Угол смачивания, град. (RSD, %)	49.4 (3.1)	85.0 (4.2)	150.4 (2.5)	150.0 (1.5)	72.3 (13.4)	122.5 (5.4)	71.9 (5.7)
<b>S</b> (нГ <sup>-1</sup> )*	35	270	1330	30	100	200	5000

\*Примечание: эффективность ионизации подложки (ионный ток/количество образца); оценивали для 30 ppm сульфаметазина, детектируемого по фрагменту при *m/z* 215 (соответствуют экструзии SO<sub>2</sub> продукта).

С одной стороны, увеличение пористости мишеней (Приложения, Рис. П5.6) при одновременном увеличении угла смачивания по сравнению с гладкими приводило к улучшенным значениям ионизации (Табл. 5.6, см. данные, полученные для AAO и DIOS). В то же время практически никакого сигнала не было получено с поверхности супергидрофобной Al-нанопроводов/Al-wires мишени, несмотря на превосходные свойства

смачивания и схожий с ААО поверхностный химический состав (контролировали методом EDX).

Иммобилизация Pd-NPs на поверхности полупроводников позволила изменить углы контакта DIOS и ААО: для DIOS+Pd-NPs угол контакта 72 град. против 150 град., найденный для модифицированного ААО+Pd-NPs. Изменение смачивающих свойств мишеней после осаждения Pd-NPs можно объяснить морфологическими изменениями подложек.[277]

Для субстрата ААО была создана супергидрофобная листообразная поверхность лотоса с агрегатами Pd-NPs, расположенными сверху. В случае же DIOS структура пор была более грубой и из-за последующего осаждения Pd-NPs (**Приложения, Рис. П5.6**) привела к уменьшению контактного угла.[278] Несмотря на относительно низкий контактный угол, гибридная мишень DIOS+Pd-NPs показала наиболее интенсивный LDI-сигнал (см. **Табл. 5.6**, LDI-отклик показан для сульфаметазина) по сравнению с ААО+Pd-NPs. Однако больший угол смачивания должен приводить к увеличению концентрации анализируемого вещества на единице площади. Кроме того, практически идентичные углы смачивания<sup>17</sup>, найденные для n-Si и DIOS+Pd-NPs мишеней, не коррелируют с их разной LDI-эффективностью (**Табл. 5.6**).

*На основании полученных данных можно заключить, что помимо угла смачивания подложки, по-видимому, дополнительные факторы являются доминирующими при формировании сигнала в методе SALDI с поверхности металл-полупроводниковых эмиттеров и эмиттеров на основе пленок наночастиц благородных металлов. Таким фактором, скорее всего, является адсорбция/распределение аналита на поверхности мишеней.*

---

<sup>17</sup> Следует отметить, что контактный угол мишеней определяют в капли аналита, однако, их LDI-MS эффективность анализируют после высыхания капли и воздействия лазера.

### 5.7.3 Причина усовершенствованных сигналов с поверхности гибридных пленок в методе SALDI-MS

Согласно ранее опубликованным исследованиям, гибридные комплексы на основе металл-полупроводниковых пленок могут демонстрировать повышенную LDI-эффективность за счет плазмонного эффекта, эффекта ближнего поля, поглощения фотонов и высокой сорбционной емкости.[279] Механизм для пористого кремния, модифицированного в бестоковом режиме 3D-Pt наноструктурами, был предложен *Kawassaki*. [280] Было выдвинуто предположение, что кислотность групп Si-OH пористого кремния увеличивается из-за электроноакцепторной природы Pt, приводящей к удалению протонов из Si-OH.[123] В этой связи можно предположить, что улучшенный LDI-сигнал, полученный с поверхности AAO+Pd-NPs и DIOS+Pd-NPs нельзя объяснить только с точки зрения изменения/повышения поверхностной кислотности мишеней. В экспериментах, несмотря на присутствие гидроксильных групп на поверхности AAO [281], фактически наблюдалось различное распределение видов ионов для сульфаметазина, ионизированного с DIOS+Pd-NPs и AAO+Pd-NPs (см. **Приложения, Рис. П5.6**).

Последующий ICP-MS анализ дистиллированной воды после контакта с металл-полупроводниковыми мишенями-эмиттерами показал значительную миграцию Pd-NPs с поверхности AAO+Pd-NPs по сравнению с DIOS+Pd-NPs (приблизительно 40 ppb было обнаружено для AAO+Pd-NPs и 2 ppb для DIOS+Pd-NPs, **Табл. 5.7**).

Увеличение количества Pd, мигрирующего с поверхности AAO, скорее всего, вызвано слабой связью между полупроводниковым слоем (AAO) и наночастицами металла (Pd-NPs). Вероятно, что иная природа процессов фиксации металлических Pd-NPs к полупроводниковому слою AAO в сравнении с процессами, происходящими в системе DIOS ↔ металлические Pd-NPs объясняет совершенно иной механизм лазерной десорбции/ионизации



аналита с такой поверхности. В этой связи можно предположить, что способ кристаллизации и распределения ананта на поверхности металл-полупроводниковых мишенях может непосредственно влиять на LDI-отклик.

**Табл. 5.7** – Общее содержание Pd<sup>18</sup> в дистиллированной воде после погружения<sup>19</sup> полупроводниковых мишеней-эмиттеров ионов, модифицированных Pd-NPs [282]

Калибр. формула <sup>20</sup>	Pd <sub>104</sub>	Pd <sub>105</sub>	Pd <sub>106</sub>	Pd <sub>108</sub>
	$Y=9.64 \cdot X - 501.31$ $R^2=0.9995$	$Y=19.56 \cdot X - 1022.6$ $R^2=0.9997$	$Y=23.83 \cdot X - 1298.9$ $R^2=0.9998$	$Y=23.48 \cdot X - 1485.17$ $R^2=0.9996$
Содержание свободного Pd (ppb), обнаруженного в воде в результате миграции ионов с поверхности металл-полупроводниковых мишеней				
DIOS+ Pd-NPs	1.89 (8.5%)*	1.92 (12.3%)	2.15 (1.4%)	1.77 (0.6%)
ААО+ Pd-NPs	32.15 (4.0%)	40.91 (10.0%)	55.98 (15.9%)	34.72 (3.25%)

#### 5.7.4 Влияние стадии адсорбции биомолекул на сигнал в методе SALDI-MS

Для проверки предположения о влиянии типа мишени-эмиттера ионов на кристаллизационные свойства анализируемого вещества, в следующем наборе экспериментов исследовали адсорбцию сульфаметазина (тест-аналита) на поверхности мишеней с помощью Рамановской спектроскопии.

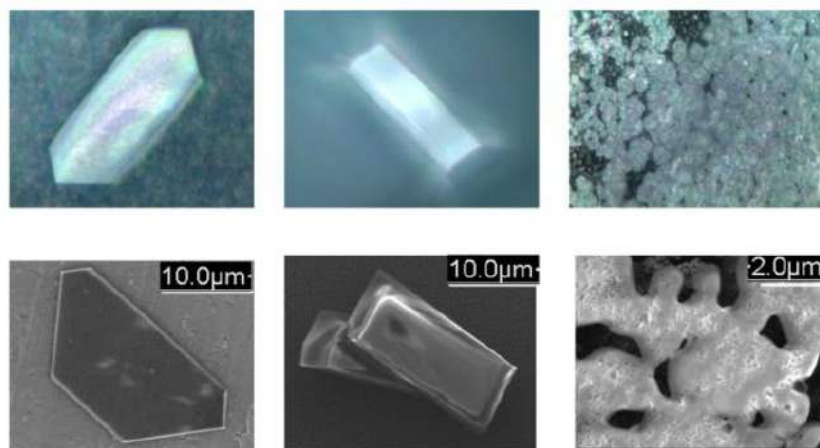
Сульфаметазин относится к сульфонамидным антибиотикам, которые различают по количеству метильных групп в пиримидиновом кольце: 2, 1 и 0 соответственно. Полиморфизм сульфаметазина хорошо известен.[283][284] Тот же эффект полиморфизма, который постулируется в литературе для сульфаметазина, наблюдался в экспериментах с гибридными мишенями с помощью SEM и Рамановской спектроскопии: одна кристаллическая форма

<sup>18</sup> По значениям выноса палладия с поверхности полупроводников можно судить о механической стабильности гибридной пленки.

<sup>19</sup> Время погружения 60 мин.

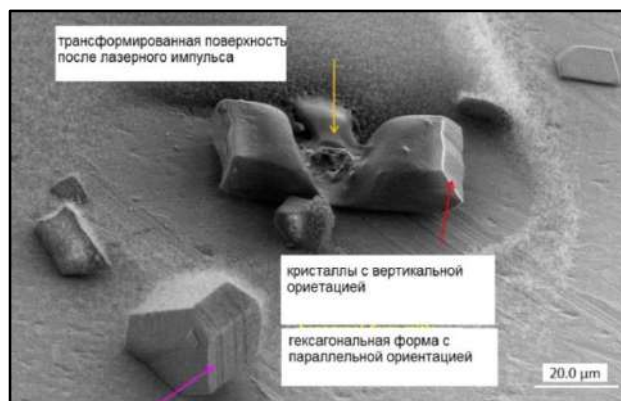
<sup>20</sup> Анализ проводили методом ICP-MS.

аналита является прямоугольной, а другая – гексагональной (**Рис. 5.24**). Кроме видимых двух кристаллических форм на мишенях фиксировали также форму аморфного сульфаметазина после сушки 1 мкл раствора при комнатной температуре.



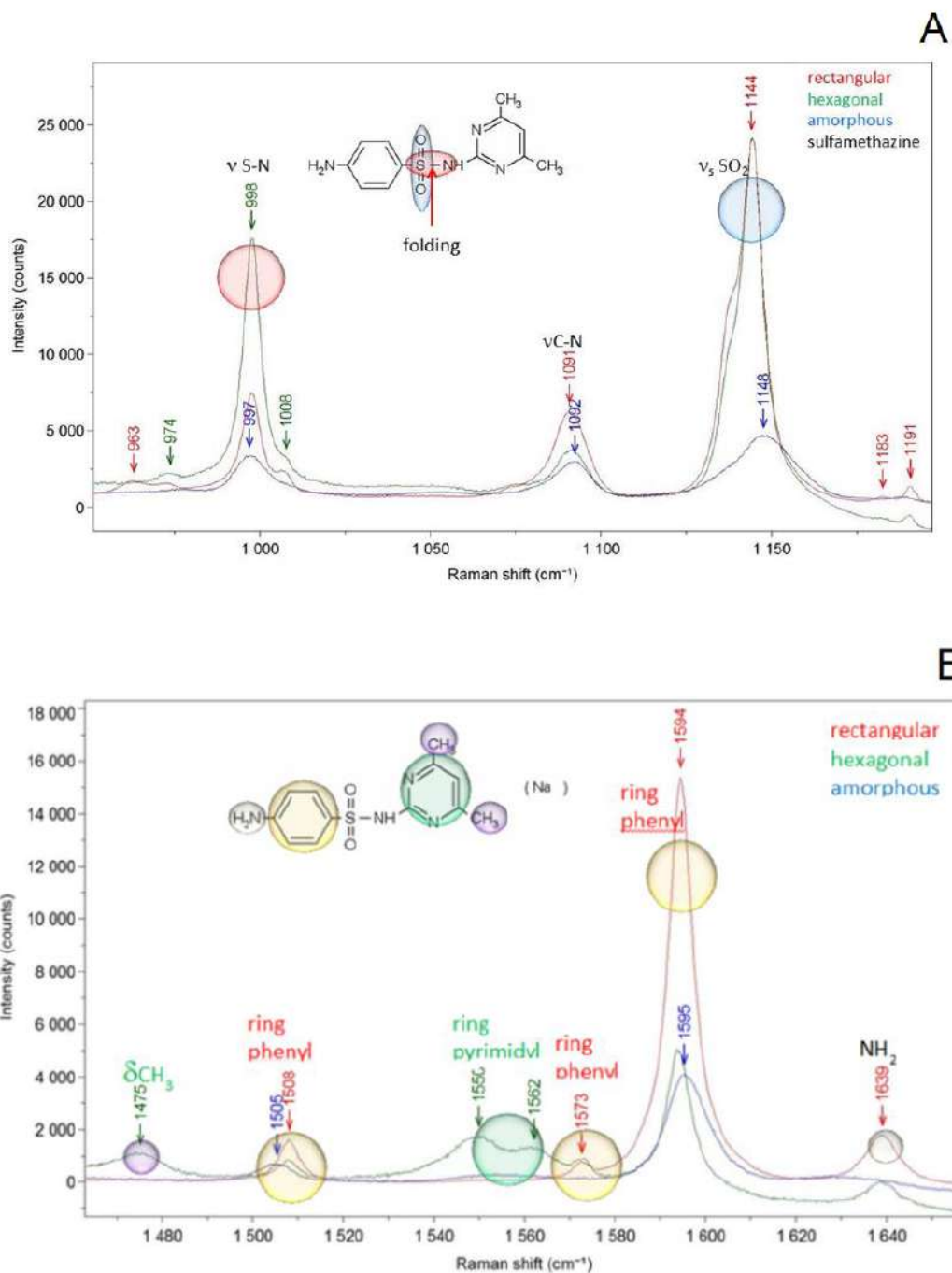
**Рис. 5.24** – Фазовые формы сульфаметазина согласно данным Рамановской (вверху) и сканирующей спектроскопии (внизу). *Примечание:* Аморфный слой сульфаметазина покрывал гораздо большую область мишени.[282]

Данные SEM, полученные для кристаллического сульфаметазина, подтверждают результаты Рамановской спектроскопии (**Рис. 5.24**). Так, хорошо видны прямоугольная и гексагональная формы слоистых структурированных кристаллов сульфаметазина с параллельной и вертикальной ориентацией. После лазерного облучения в ходе экспериментов прямоугольный кристалл подвергается трансформации/расплавлению подобно тому, как это явление наблюдали в ходе лазерной десорбции/ионизации аналита, **Рис. 5.25**.



**Рис. 5.25** – SEM-изображение кристаллов сульфаметазина на поверхности стальной мишени после ее облучения лазером (He-Ne laser, 633 нм, Melles Griot, USA).

Снятые КР-спектры подтвердили микроскопические RAMAN и SEM данные: зафиксированы вибрации с низкой интенсивностью и широкими пиками в области  $1148\text{ см}^{-1}$  вместо  $1144\text{ см}^{-1}$  для  $\text{SO}_2$  группы, что типично для аморфных соединений (**Рис. 5.26**).



**Рис. 5.26** – Рамановские спектры прямоугольных (rectangular) и гексагональных (hexagonal) кристаллов сульфаметазина и слоя аморфного сульфаметазина, полученные с поверхности мишени DIOS+Pd-NPs. Лазер He-Ne, 633 нм laser (Melles Griot, IDEX Optics and Photonics, USA). [282]

Что касается стабильности полиморфного сульфаметазина, то известно, что при повышении температуры гексагональный кристалл может быть

преобразован в прямоугольную форму (~160 °C), а затем в аморфное состояние (~250 °C).[283] Эти изменения являются необратимыми и эндотермическими. Исходя из того, что в условиях эксперимента Pd-NPs начинают спекаться при ~860 К (~587 °C), можно с уверенностью сказать, что в системе мишень-аналит достигнуты пороговые значения температуры для перехода сульфаметазина в аморфное состояние уже в первый момент перед началом ионизации.

Обычно аморфное состояние является более «активным» по сравнению с кристаллическим [285][286], и затраты энергии на его ионизацию значительно меньше. Поэтому если сульфаметазин уже находится на поверхности в виде аморфного состояния перед воздействием лазера, то для его эффективной ионизации может потребоваться меньше энергии.

Логично также предположить, что свойства кристаллизации анализируемого вещества могут быть функцией субстрата-мишени, на которое оно наносится. Именно поэтому наблюдаемый полиморфизм сульфаметазина после сушки его водного раствора при комнатной температуре на поверхности тестируемых мишенях может существенно влиять на эффективность его ионизации.

*В этом отношении аморфная форма анализа может быть ионизирована с меньшими затратами энергии лазера, чем кристаллическая форма. Кроме того, кристаллы обычно имеют 3D-формат, и рост кристаллов в Z-направлении приводит к уменьшению площади поверхности, покрытой анализом, что в конечном итоге приводит к отсутствию интенсивного LDI-сигнала при лазерной десорбции.*

### **5.7.5 Кристаллическое или аморфное состояние биоаналита?**

Как показано в предыдущем разделе, перед лазерным облучением слой аморфного анализа был обнаружен исключительно на металл-полупроводниковых мишенях. В следующем наборе экспериментов слой

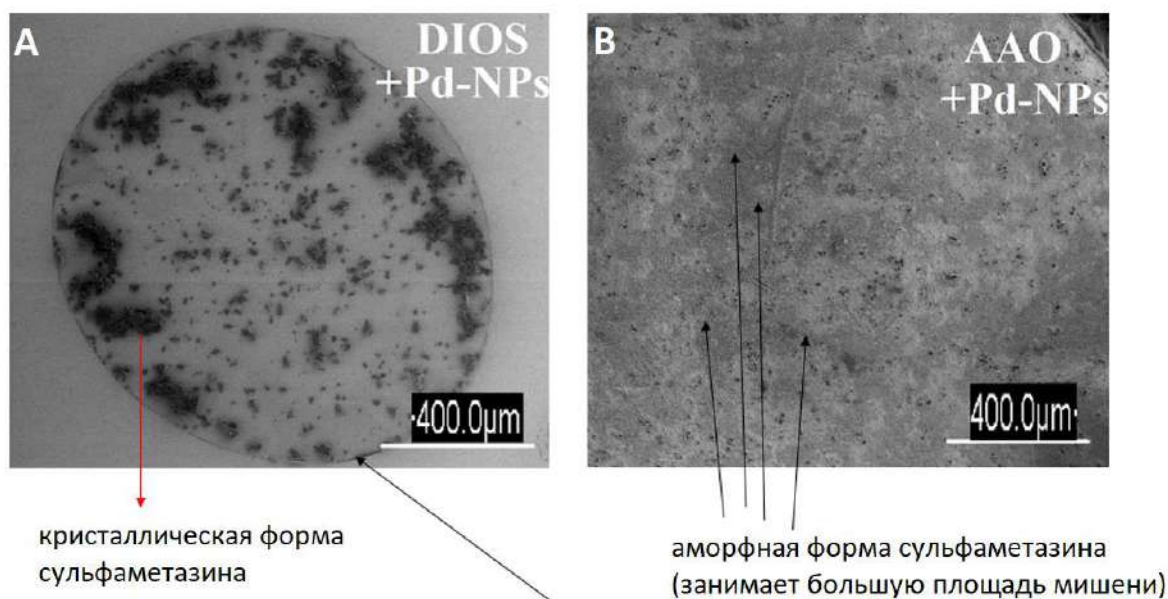
аморфного анализируемого вещества, сформированный после сушки водного раствора при комнатной температуре на металл-полупроводниковых мишенях, трансформировали в кристаллическую форму путем смешивания анализируемого вещества с 30 ppm KCl. Переход аналита из аморфного состояния в кристаллическое сопровождался значительным снижением LDI-сигнала (**Приложения, Рис. П5.7**, показано для 30 мкг/мкл сульфаметазина + 30 мкг/мкл KCl), что подтверждает ранее выдвинутое предположение о влиянии фазового состояния аналита на сигнал в методе SALDI.

Следует отметить, что в основном кристаллы сульфаметазина были обнаружены на Al-wires. Именно с поверхности этой мишени не было получено практически никакого LDI-сигнала независимо от природы тестового аналита несмотря на хорошие смачивающие и светопоглощающие свойства этой поверхности. Иными словами, *адсорбция/кристаллизация аналита на поверхности мишени играет значительную роль в образовании ионов в методе SALDI-MS.*

Сделанные выводы хорошо согласуются с результатами экспериментов (**Приложения, Рис. П5.6**). Основной LDI-сигнал, полученный с поверхности мишеней без участия Pd-NPs, соответствовал фрагменту сульфаметазина при  $m/z$  215, поскольку такая ориентация кристаллов облегчает удаление  $SO_2$  группы. *Чем больше кристаллы, образующиеся на твердой поверхности, тем меньше аналита доступно на облучаемой лазером области, что приводит к потере или существенному уменьшению LDI-сигнала.*

В отличие от DIOS+Pd-NPs мишеней, использование которых при пипетировании сульфаметазина, приводит к образованию кристаллов биоаналита на поверхности, использование мишеней на основе ААО+Pd-NPs способствует образованию аморфных форм данного аналита (см. **Рис. 5.27**). Наблюдаемый LDI-сигнал от этой мишени-эмиттера был интенсивным, потому что каждый лазерный импульс затрагивал достаточное количество образца (см. **Приложения Рис. П5.5**). Слой аморфного сульфаметазина

покрывает большую площадь мишени, что увеличивает вероятность попадания лазера в слой анализта с его последующей десорбцией и ионизацией.



**Рис. 5.27** – SEM-изображения поверхности металл-полупроводниковых мишеней на основе DIOS+Pd-NPs (A) и AAO+Pd-NPs (B) при адсорбции 2000 мкг/мкл сульфаметазина.

*Результаты этого исследования дают последовательное доказательство о ведущей роли стадии адсорбции анализта на поверхности мишеней при образовании ионов в методе SALDI-MS. Образование аморфного слоя анализта на гибридных металл-полупроводниковых мишенях облегчает формирование сигнала в методе. В свою очередь кристаллизационные свойства анализируемого вещества, по-видимому, являются функцией поверхности мишени-эмиттера.*

Более глобальный промежуточный вывод этой части исследования состоит в том, что процесс лазерной десорбции/ионизации более эффективно протекает с поверхности мишеней эмиттеров ионов сложного состава, чем с поверхностей на основе пленок индивидуальных наночастиц.

Применительно к электрохимическим нанобиосенсорам на основе ОНГ это означает, что чем более интенсивно и эффективно протекает процесс ионизации биоаналита с такой поверхности (исключая случаи образования координационных связей между поверхностью мишени и аналитом, см. определение жирных кислот на плотных пленках серебра и палладия, часть 5.1.1 и Рис. 5.4), тем легче возможно его электроокисление в биосенсорике.

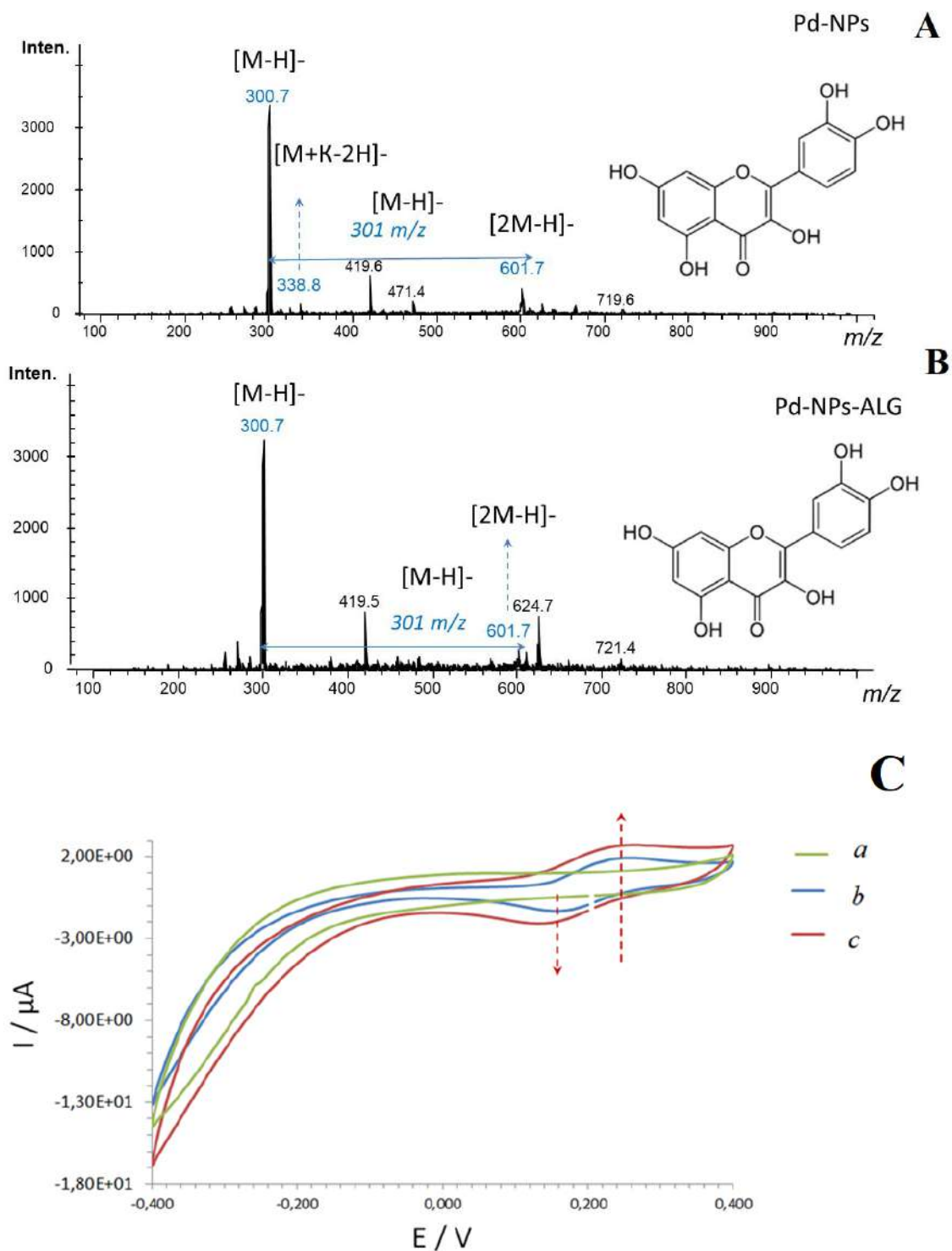
### **5.8 Зависимость между эффективностью процессов SALDI-MS с поверхности мишеней на основе наночастиц благородных металлов и их электрокаталитической активностью в сенсорике**

Сочетая полученные знания по механизмам лазерной десорбции/ионизации с поверхности индивидуальных электроосажденных наночастиц с закономерностями, полученными при электроокислении биоаналитов на электродах, модифицированных такими материалами, удалось установить взаимосвязь между этими процессами.

*Можно обобщить, что, чем выше эффективность процесса лазерной десорбции/ионизации с поверхности электроосажденных мишеней к определенному классу тест-аналитов, тем выше может быть электрокаталитическая активность таких материалов к этому классу соединений.*

Так, например, ионизация флавоноида кверцетина с поверхности электродов, модифицированных как индивидуальными Pd-NPs, так и ОНГ на их основе (Pd-NPs-ALG) протекала достаточно успешно в обоих случаях с формированием классических типов ионов  $[M-H]^-$ ,  $[M+K-2H]^-$  и  $[2M-H]^-$ , см. Рис. 5.28 А,В. Параллельно с этим, данные, полученные в режиме ЦВА с поверхности электродов на основе этих же пленок, также свидетельствуют об их высокой электрокаталитической активности к кверцетину, Рис. 5.28С.



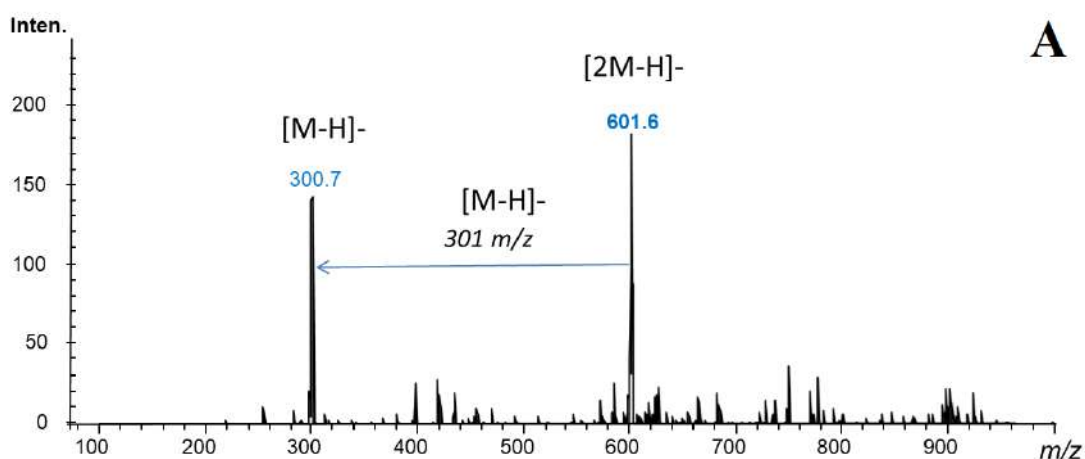


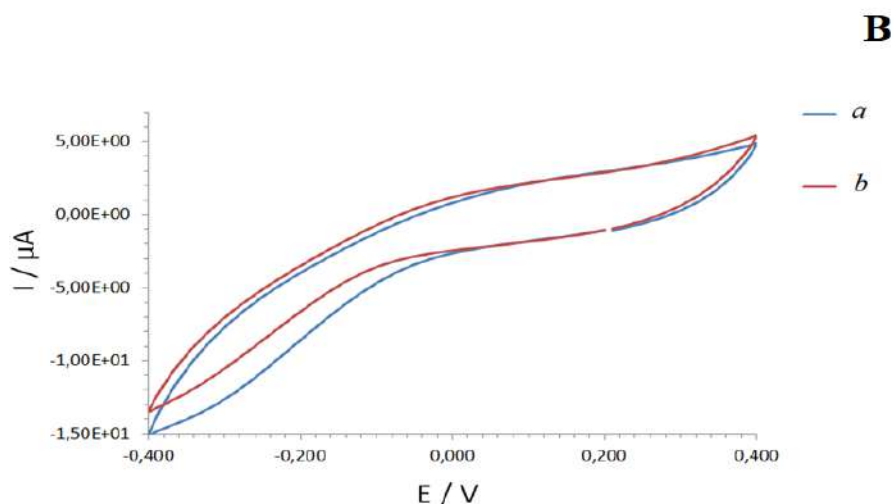
**Рис. 5.28** – **A,B** – LDI-MS спектры, записанные в отрицательном режиме ионизации для 200 нг/мл кверцетина с поверхности трафаретного электрода, модифицированного Pd-NPs (**A**) и Pd-NPs-ALG (**B**). **C** – ЦВА кривые, записанные при pH 4 и скорости сканирования 20 мВ/с в капле клеточной питательной НС среде (смесь аминокислот и глюкозы), нанесенной на

электрод, модифицированный Pd-NPs (a), 2 mM кверцетина в питательной НС среде, нанесенной на электрод, модифицированный Pd-NPs (b) и 2 mM кверцетина, нанесенной на электрод, модифицированный Pd-NPs/ALG (c).

Примечательно, что токи, полученные с электрода, модифицированного ОНГ пленкой Pd-NPs/ALG были выше, чем токи, полученные с поверхности электрода на основе индивидуальных Pd-NPs. Этот эффект, вероятно, связан с минимизацией взаимодействий между аналитом и поверхностью ОНГ пленки (в масс-спектре для Pd-NPs/ALG более не фиксируется образование ионов  $[M+K-2H]^-$ ), что, в конечном счете, и приводит к более эффективному электроокислению тестовой биомолекулы. Более того на ЦВА фиксируется изменение максимальных потенциалов для Pd-NPs/ALG в сравнении с Pd-NPs в сторону более низких значений.

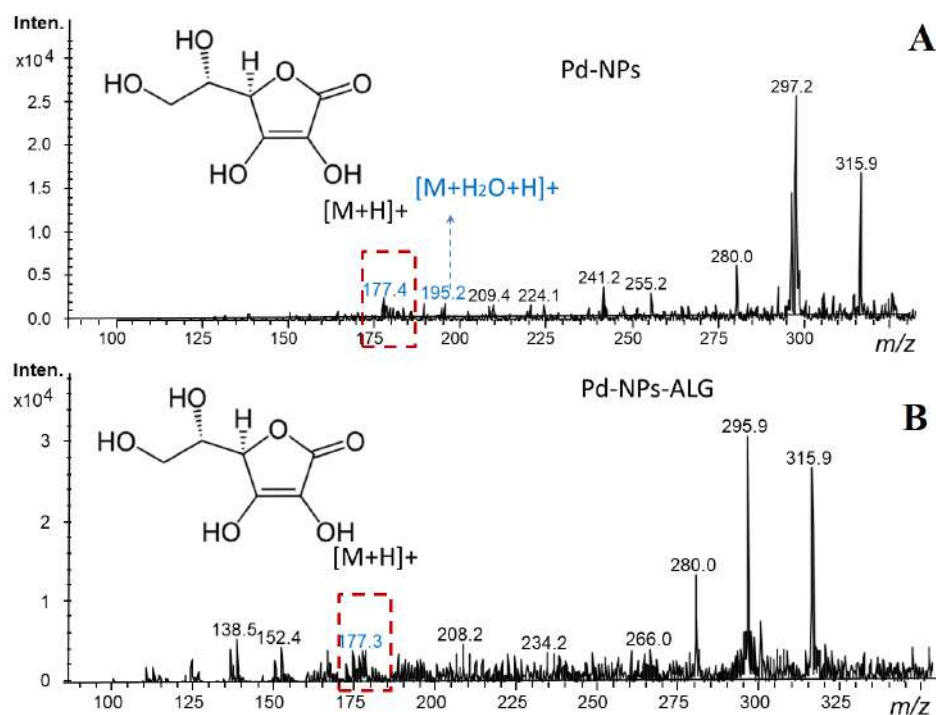
Однако с поверхности коммерческих трафаретных электродов, покрытых пленками палладиевых чернил, практически никакого значимого сигнала, отличного от области шумов, получено не было, **Рис. 5.29А**. Интересен еще и тот факт, что электроокисление кверцетина на поверхности такого электрода не происходило: роста ни анодных, ни катодных токов при добавлении кверцетина в концентрации 2 mM – 10 mM отмечено не было.

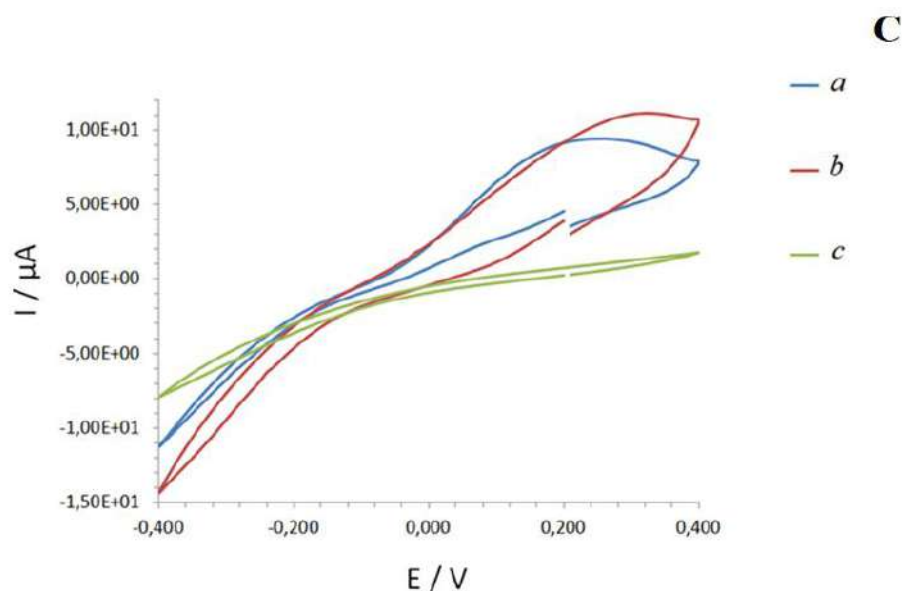




**Рис. 5.29** – А – LDI-MS спектр, записанный в отрицательном режиме ионизации для 200 нг/мл кверцетина с поверхности трафаретного SPE электрода, модифицированного палладиевыми чернилами. В – ЦВА кривые, записанные при pH 4 и скорости сканирования 20 мВ/с в капле клеточной питательной среде НС (а) и 2 мМ кверцетина в питательной среде НС (b).

Полученные выше закономерности были подтверждены и при обнаружении аскорбиновой кислоты (АК) с поверхности мишеней на основе индивидуальных наночастиц, а также их ОНГ, **Рис. 5.30**.



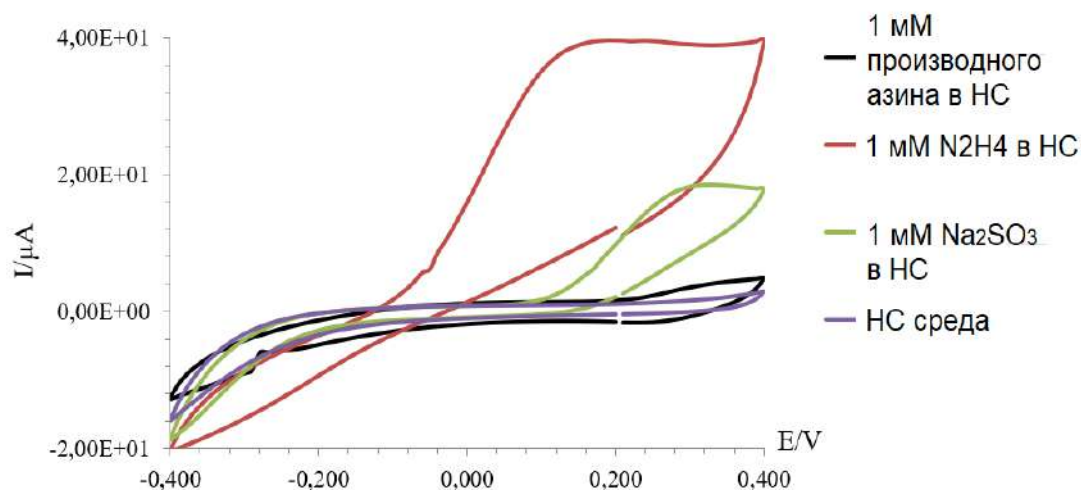


**Рис. 5.30** – **А,В** – LDI-MS спектры, полученные для 10 нг/мл АА с поверхности SPE электрода, модифицированного пленками Pd-NPs (**А**) и Pd-NPs-ALG (**В**). **С** – ЦВА кривые при pH 5 и скорости сканирования 20 мВ/с в капле с 1 мМ раствором АА, записанные с поверхности SPE, модифицированных пленками Pd-NPs (*a*), Pd-NPs-ALG (*b*) и палладиевыми чернилами (*c*).

С поверхности Pd-NPs/ALG гибрида наибольшая эффективность процесса лазерной десорбции/ионизация аскорбиновой кислоты дублировалась с более высокими токовыми откликами ее электроокисления по сравнению с зависимостями, полученными для индивидуальных Pd-NPs, **Рис. 5.30А,В**. Ионизации АА с поверхности электрода, модифицированного коммерческими палладиевыми чернилами, отмечено не было (**Рис. 5.30С**).

Интересно, что трафаретные электроды, модифицированные пленками Pd-NPs, также проявили высокую электрохимическую чувствительность при окислении азинов, гидразинов и сульфо-содержащих компонентов, **Рис. 5.31**. Предварительно чувствительность электроосажденных Pd-NPs пленок к азинам и сульфо-содержащим компонентам была доказана методом SALDI-MS, см. **Табл. 5.4**.

Основываясь на результатах предварительного скрининга методом SALDI-MS, возможно априори подобрать класс или группу аналитов, к которым электрод с аналогичной пленкой наночастиц может проявлять электрохимическую чувствительность.



**Рис. 5.31** – ЦВА, записанные при 20 мВ/с в капле ферментативной среды (HC среда) и 1 мМ растворов гидразина, сульфита натрия и соли диаммония 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) с поверхности электрода, покрытого пленкой Pd-NPs.

## 5.9 Выводы к Главе 5

1. Определены ключевые параметры, ответственные за перенос заряда с поверхности мишеней на основе пленок наночастиц благородных металлов к биоаналитам. Большинство тестируемых аналитов при адсорбции не образуют специфических связей с поверхностью электроосажденных пленок ( $K^+$ ,  $H^+$  аддукты в масс-спектрах). Приобретенные знания важны не только с точки зрения теории метода SALDI-MS, но и для понимания природы закрепления биоаналита на поверхности амперометрических нанобиосенсоров, построения теоретических моделей и анализа доли процессов электрокатализа и адсорбции на аналитический сигнал.

2. Кристаллизационные свойства аналита зависят от природы функциональной пленки мишени и ее физико-химических свойств, включая пористость, степень гидрофобности, диаметр и форму наноструктур. Формирование и адсорбция аморфного слоя биоаналита на поверхности пленок является предпочтительным с точки зрения эффективности формирования сигнала в методе SALDI-MS.

3. Присутствие ионов реагентов на поверхности пленок и эффекты их реорганизации одинаково важны при формировании сигнала в методе SALDI-MS. Морфология наночастиц (НЧ), зависящая от природы электролита, pH, величины катодного тока и продолжительности электролиза, определяет доступность ионов реагентов при лазерном облучении.

4. Интенсивность процессов реорганизации поверхности пленок находится в прямой зависимости от диаметра НЧ благородных металлов. Увеличение диаметра и увеличение температуры плавления НЧ (зависит от степени химической чистоты) приводит к потере интенсивности SALDI-сигнала. Снижение температуры плавления НЧ позволяет снизить энергетические требования к мишеням, что может быть удобным способом при проектировании новых дизайнов эмиттеров ионов с заданной/улучшенной эффективностью ионизации биоаналитов.

5. Оптимальные мишени-эмиттеры ионов: *неорганический компонент*: Pd-NPs и металл-полупроводниковые комплексы на их основе; *тип электролита*: pH 6 – 8; *структура ОНГ слоя*: адсорбционная; *биокомпонент*: низкомолекулярные биоаналиты – пептиды, жиры, аминокислоты, углеводы, антибиотики; *кристаллизационная фаза аналита на поверхности*: аморфная форма; *тип адсорбционных взаимодействий с аналитом*: электростатический; *режим считывания сигнала*:  $[M+H]^+$ ,  $[M+K]^+$ ; *детектируемые концентрации биоаналитов*: от 5-3000 мг/мл.

## **ГЛАВА 6. АПРОБАЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОАНАЛИТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ОНГ ПЛЕНОК**

Глава посвящена апробации предлагаемой в работе одноэтапной методике синтеза наноразмерных ОНГ функциональных пленок в различных микроаналитических приложениях. Здесь приводятся конкретные способы электрохимического определения малых биомолекул в капле (амперометрические нанобиосенсоры), предложены подходы к использованию новых ОНГ нанобиосенсоров в модульном и гетерогенном биокатализе, а также экспрессного масс-спектрометрического определения низкомолекулярных биоаналитов (SALDI-MS чипы, гибридные MALDI-MS/SALDI эмиттеры). Помимо новых микроаналитических приложений, предложены способы определения низкомолекулярных биомолекул, имеющих важное физиологическое значение с помощью тест-устройств на основе новых ОНГ пленок.

### **6.1 Гибридные функциональные пленки для модульного биокатализа**

Каскадный нанобиокатализ, основанный на использовании более двух последовательных биореакций в одном и том же нанореакторе/электроре, является перспективной биотехнологической, и в тоже время, сложной инженерной задачей.[287] В отличие от многоступенчатых аналогов, каскадный биокатализ позволяет избежать выделения промежуточных продуктов, способствует снижению накопления токсичных реагентов и затрат на изготовление и эксплуатацию нанореакторов. Для этой цели используют принципы модульных нанобиокатализаторов.[288] Модульность может быть достигнута специфической конструкцией (дизайном) нанореакторов.

Что касается разработки нанобиосенсоров, то модульный подход может быть реализован только при условии, если иммобилизация фермента происходит воспроизводимым и полностью инструментально контролируемым способом.

Сегодня в литературе можно найти множество протоколов по производству нанобиосенсоров на основе оксидаз, состоящих из шести, семи, или более вспомогательных компонентов. Фактически, это делает производство биоаналитических устройств сложным, в высшей степени невозпроизводимым, очень трудоемким и довольно дорогим процессом. Большинство из представленных дизайнов и протоколов, вероятно, никогда не будут реализованы на практике и коммерциализированы.

В тоже время не было предпринято никаких попыток сконструировать нанобиосенсоры на основе оксидаз с индивидуальными сегментарными блоками для обнаружения нескольких аналитов с помощью единичного электрода (моносенсорные системы). Очевидно, что такой подход потребует существенных фундаментальных знаний в области нано-инженерии для изготовления функциональных пленок нанобиореакторов с прогнозируемыми свойствами. Вместо этого было предложено несколько дорогостоящих массивов интегрированных нанобиосенсоров различной архитектуры, стратегией синтеза, сложным интерфейсом и режимами считывания аналитических сигналов (при полном отсутствии стадии их стандартизации).[14][289]

В большинстве случаев изготовление нанобиосенсоров основано на послойном LbL методе. Для этого метода характерны низкая воспроизводимость синтеза функциональной пленки и использование токсичных сшивающих агентов (например, глутаральдегида), приводящих к примесям и неоднородностям в активном биорецепторном слое. Как результат, LbL нанобиосенсоры содержат многочисленные непрореагировавшие компоненты в сенсорном слое, что может привести к каскаду непредсказуемых биохимических реакций.

Поэтому использование таких нанобиосенсоров для модульного нанобиокатализа является нетривиальной инженерной и биоаналитической задачей. Более того, в настоящее время отсутствуют подходы к надежному и



воспроизводимому синтезу, простому электрохимическому и биоэлектронному интерфейсу в производстве многофункциональных нанобиосенсоров. Одной из наиболее часто используемых стратегий в производстве многоступенчатых нанореакторов является одновременная ковалентная иммобилизация нескольких ферментов из многокомпонентной ферментативной «коктейльной смеси».[288] Однако этот подход демонстрирует сильное конкурентное поведение ферментов за активные центры сшивающих агентов во время иммобилизации. Как следствие этого наблюдается низкая ферментативная активность пленки по сравнению с нанобиосенсорами, разработанными с использованием индивидуальных ферментов.[290]

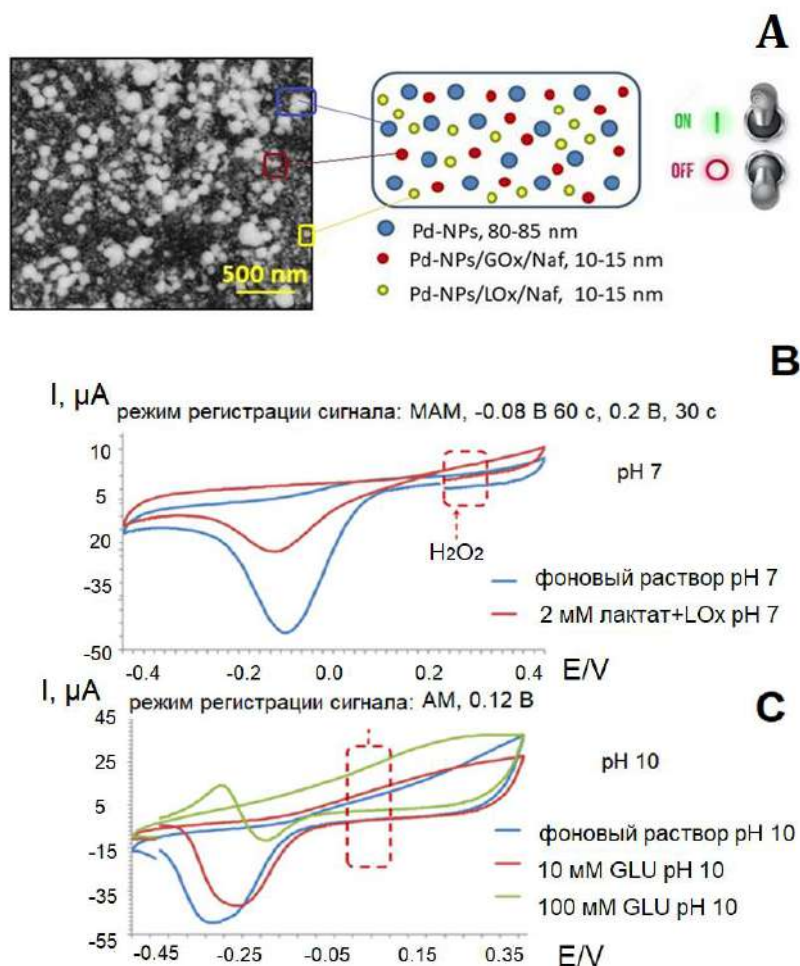
Для решения вышеупомянутых проблем и производства нанобиосенсоров с гибкой и управляемой архитектурой пленок в данной работе была предложена методика одностадийного формирования функционального гибридного слоя (см. Главы 2,3). Следующим шагом в разработке нанобиосенсоров с электроосажденными пленками с настраиваемыми свойствами могло бы стать конструирование модульных одноэлектродных наноаналитических устройств для мультиплексного анализа. Ожидается, что такой подход может составить конкуренцию микроаналитическим системам типа «E-Tongue», которые имеют ряд ограничений при количественном анализе сложных смесей.

### **6.1.1 Концепция и принципы работы одноэлектродных нанобиосенсоров в модульном биокатализе**

Мультиферментная иммобилизация на трафаретном электроде достигалась посредством нанесения нескольких функциональных покрытий из растворов, содержащих GOx, LOx, Nafion (связывающий агент/защитный слой) и палладиевый электролит. Этот подход позволяет формировать несколько уровней функциональных наночастиц на одном и том же электроде: наночастицы палладия, допированные Нафионом и GOx (Pd-

NPs/Нафион/GOx) (1), распределенные между Pd-NPs/Нафион/LOx (2). Такой дизайн обеспечивает формирование архитектуры сенсора шахматного порядка за счет соосажденного слоя (2) между промежутками слоя (1).

Исследование геометрии и размера гибридных наночастиц (см. Главу 4), определение влияния параметров синтеза на сенсорные свойства и оптимизация способа регистрации аналитических сигналов, делают возможным конструирование одноэлектродного нанобиосенсора с переключаемыми модулями для мультиплексного обнаружения сразу нескольких аналитов: L-лактата, D-глюкозы, перекиси водорода и глутаральдегида, **Рис. 6.1**.



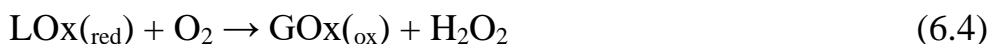
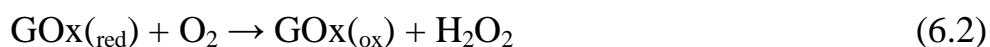
**Рис. 6.1** – SEM-изображение и схема гибридного одноэлектродного нанобиосенсора (А). *Примечание:* опция «ON/OFF» иллюстрирует возможность управляемого переключения между функциональными чистыми (Pd-NPs) и гибридными наночастицами (Pd-NPs/GOx/Naf или Pd-

NPs/LOx/Naf) в зависимости от режима их работы (**В,С**) – режимы считывания аналитических сигналов. GLU – глутаровой альдегид.

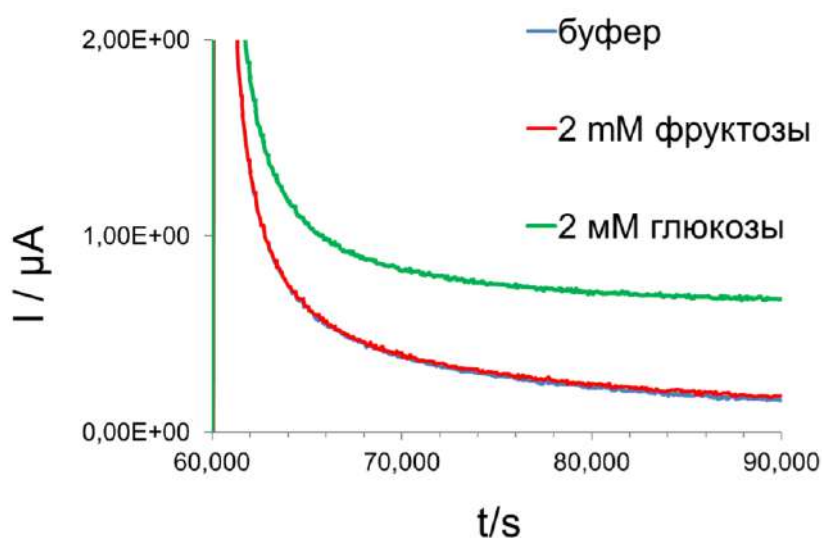
Для обеспечения прогнозируемой реакции нанобиосенсора одним из наиболее важных шагов при формировании гибридного электрода является определение параметров сегментных блоков (**Рис. 6.1А**). Так, в зависимости от морфологии, размера, распределения и химического состава поверхности функциональных наночастиц можно «настроить» требуемую биохимическую реакцию. При этом, необходимо оптимизировать режим электрохимического считывания сигналов, обеспечивая возможность отдельного обнаружения аналитов. Электрохимические параметры регистрации сигнала позволят обеспечить надежное переключение между аналитами (L-лактат, D-глюкоза, перекись водорода и глутаральдегид) по типу иммобилизованного фермента (GOx или LOx), pH, режиму поляризации и этапам регенерации сенсора, **Рис. 6.1В,С**.

### **6.1.2 Влияние состава гибридной пленки и режима поляризации на отклик модульного нанобиосенсора**

Селективное обнаружение D-глюкозы и L-лактата реализуется с использованием соответствующих ферментов-оксидаз (GOx/LOx). Продуктом этих реакций является пероксид водорода, который может быть успешно определен на Pd-NPs (см. уравнения реакций ниже), например, с помощью предложенной двухступенчатой процедуры: *первая стадия* - поляризация при потенциале катодного пика для уменьшения доли оксидов и предотвращения электровосстановления кислорода, *вторая стадия* - поляризация при анодном потенциале в диапазоне 0.2-0.4 В для регистрации тока, связанного с разложением пероксида водорода (см. также Главу 4).



Проведенный тест на специфичность не выявил никаких значительных помех со стороны D-фруктозы при определении D-глюкозы с помощью Pd-NPs/GOx/Naf нанобиосенсора, синтезированного на основе предложенного одностадийного подхода, **Рис. 6.2**. Мешающего влияния со стороны лактата при определении глюкозы также зафиксировано не было. Таким образом, настроить работу одноэлектродного модульного нанобиосенсора для раздельного определения лактата и глюкозы оказалось вполне возможным.



**Рис. 6.2** – Результаты теста на специфичность, выполненного с D-глюкозой и D-фруктозой на Pd-NPs/GOx/Naf нанобиосенсоре при pH 7 в МАМ режиме.

Конструкция такого модульного нанобиосенсора имеет ряд преимуществ по сравнению с LbL аналогами. Во-первых, отсутствие излишнего количества активных и непрореагировавших компонентов позволяет обеспечить воспроизводимость каскадных биохимических реакций. Во-вторых, в LbL дизайне необходимо использование глутаральдегида (GLU) в композиции (сшивающий агент), что часто приводит к значительному снижению активности фермента. Эксперимент, проведенный с помощью кислородного минисенсора, выявил почти 2.5-кратное снижение активности фермента в присутствии GLU, см. **Приложения Рис. П.6.1**. Этот негативный эффект

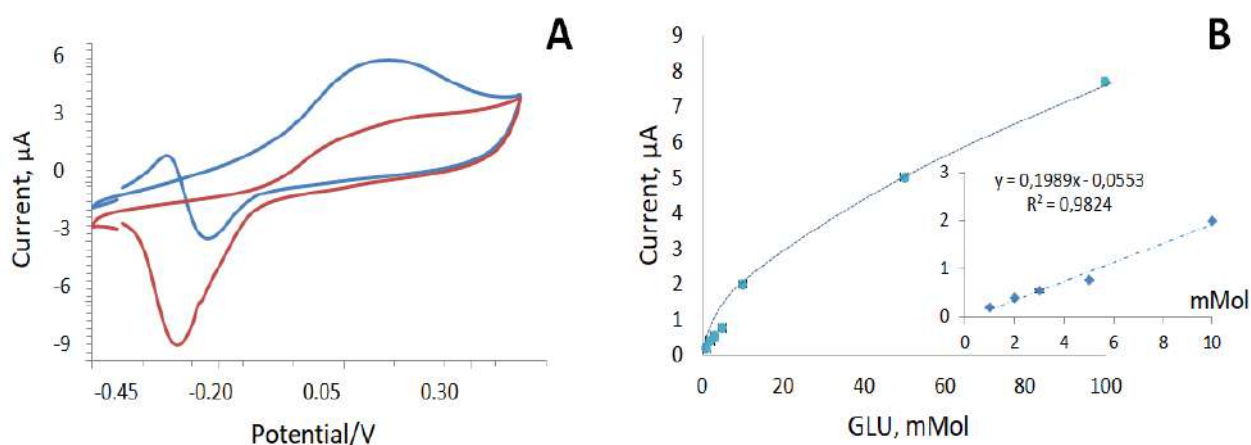
полностью отсутствует в нанобиосенсорах, синтезированных по новой одностадийной методике.

Стандартизация базовой линии сенсора в конкретных электрохимических условиях позволит измерять пероксид водорода при рН 7 не только как продукта активности оксидаз (диапазон низких концентраций), но и как самостоятельного компонент/аналита при более высоких уровнях концентрации (см. часть 6.1.5).

### 6.1.3 Управление модульного амперометрического нанобиосенсора за пределами ферментативного анализа: хемосенсор для определения глутаральдегида

Отсутствие глутаральдегида в дизайне нанобиосенсоров делает возможным его определение как аналита тем же сенсором на основе гибридных Pd-NPs. Эта задача может быть реализована путем изменения рН раствора в капле и подбором электрохимического режима считывания сигнала.

С этой целью после дезактивации ферментов (сенсор нагревали до 65 °С в течение 1 ч) однокорпусный/одноэлектродный нанобиосенсор тестировали в режиме ЦВА с GLU (Рис. 6.3А).



**Рис. 6.3** – Данные ЦВА при 20 мВ/с, записанные с поверхности модульного нанобиосенсора с ОНГ пленками (А): красный – в фосфатном буфере, рН 10; синий – 100 мМ GLU раствор, рН 10. Калибровочная зависимость для GLU

при pH 10 и потенциале 0.12 В в АМ режиме (В).

Значительное увеличение тока при обнаружении GLU было зафиксировано при потенциале 0.12 В и pH 10. Калибровочная зависимость, полученная при потенциале 0.12 В в режиме АМ, показала широкий динамический диапазон, а именно LDR = 1-100 мМ с коэффициентом регрессии  $R^2 = 0.971$  (Рис. 6.3В), предел обнаружения (сигнал-шум соотношение, S/N = 3)  $200 \pm 10$  мкМ.

Стоит отметить, что после тестирования модульного одноэлектродного нанобиосенсора в режиме амперометрии с GLU при pH 10 оказалось возможно использовать этот же сенсор еще раз, в том числе для обнаружения  $H_2O_2$  при pH 7. Окисление GLU при pH 10 не приводило к каким-либо необратимым изменениям в структуре и сенсорных свойствах ОНГ пленки на основе Pd-NPs. Другими словами, необратимых изменений в структуре сенсорного электроактивного слоя не происходит, что делает изготовление таких электродов привлекательным для модульного циклического биокатализа.

#### **6.1.4 Процедура регенерации модульного нанобиосенсора с гибридной пленкой**

Регенерация поверхности имеет решающее значение для циклического непрерывного использования или интеграции сенсора в микрофлюидные устройства. Использование МАМ режима при детектировании пероксида водорода помогло сохранить базовую линию нанобиосенсора после непрерывного использования на уровне 95-99 % по сравнению с сигналом, полученным с этой же тест-системы после производства.

Однако после использования нанобиосенсора для определения 100 мМ GLU при pH 10 было обнаружено, что базовая линия соответствует лишь ~79.4% сигнала при pH 7 по сравнению с сигналом, записанным с сенсора сразу после его производства. Этот результат объясняется образованием значительного количества поверхностных оксидов палладия при окислении

GLU в щелочных средах.

Для глубокой очистки поверхности модульного нанобиосенсора на основе Pd-NPs был разработан протокол регенерации с целью полного восстановления исходной базовой линии: поляризация в капле буферного раствора при -0.2 В в течение 180 сек с последующим переключением на уровень 0.2 В в течение 30 с. Уже после такой однократной процедуры регенерации восстановление исходных токовых откликов было зарегистрировано на уровне ~98% (см. Табл. 6.1).

**Табл. 6.1** – Изменение базовой линии модульного нанобиосенсора после определения 100 мМ глутаральдегида (GLU) при pH 10

Номер измерения*	I (μA) при 0.2 V
01	1.46·00 <sup>-1</sup>
02	1.32·00 <sup>-1</sup>
03	1.27·00 <sup>-1</sup>
04	1.27·00 <sup>-1</sup>
05	1.15·00 <sup>-1</sup>
06	1.09·00 <sup>-1</sup>
07	1.13·00 <sup>-1</sup>
08	1.10·00 <sup>-1</sup>
09	1.04·00 <sup>-1</sup>
10	1.16·00 <sup>-1</sup>
Процедура глубокой очистки поверхности сенсора/регенерации при -0.2 В в течение 180 с	
11	1.40·00 <sup>-1</sup>
12	1.43·00 <sup>-1</sup>

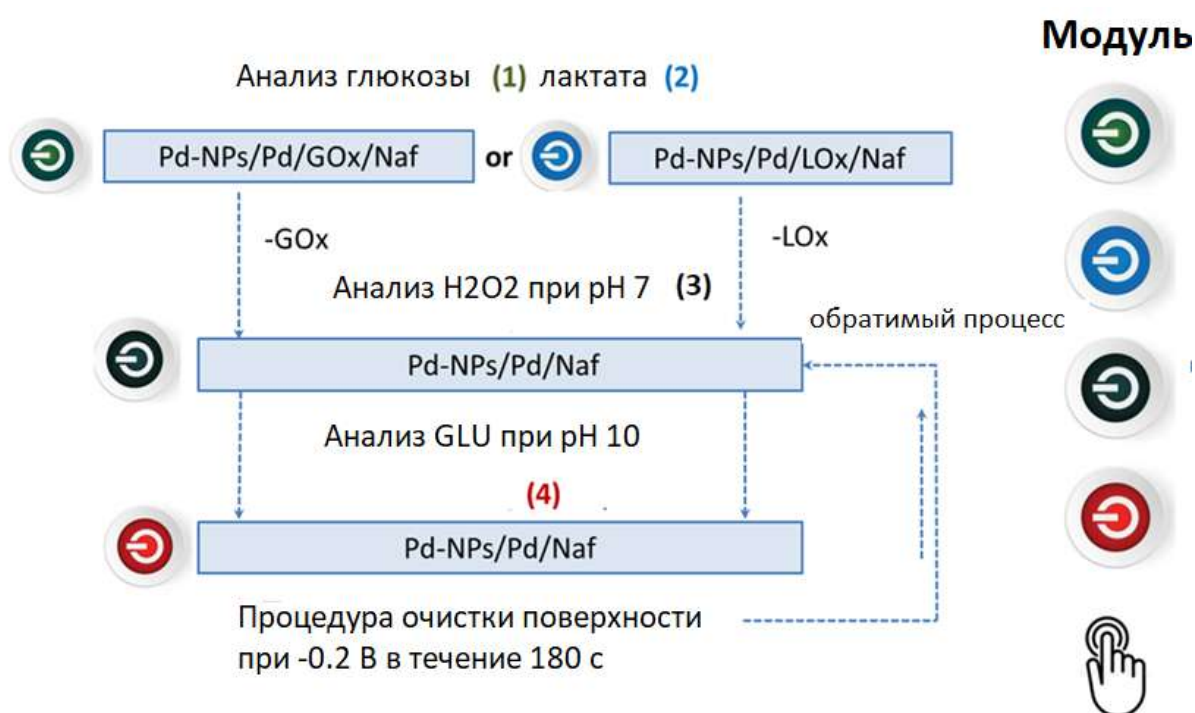
\* - испытания проводили с новой каплей буферного раствора

Последующий циклический эксперимент, проведенный путем переключения между режимами детектирования GLU (режим АМ, pH 10) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (МММ, pH 7) в течение 10 циклов, не выявил значимых различий в

откликах. Таким образом, предложенная процедура регенерации делает возможным многократное обнаружение  $H_2O_2$  при pH 7 одним и тем же электродом даже после его использования для определения GLU в щелочной среде при pH 10.

### 6.1.5 Алгоритм работы модульных ОНГ нанобиосенсоров

Специфичность и чувствительность модульного нанобиосенсора основана на переключении между отдельными модулями при детектировании целевого аналита без существенных помех со стороны других функциональных слоев.[291] В данном случае специфическое обнаружение биоаналита «запускается» иммобилизованным типом оксидаз, работающих в разных режимах регистрации сигнала при pH 7, **Рис. 6.4.**



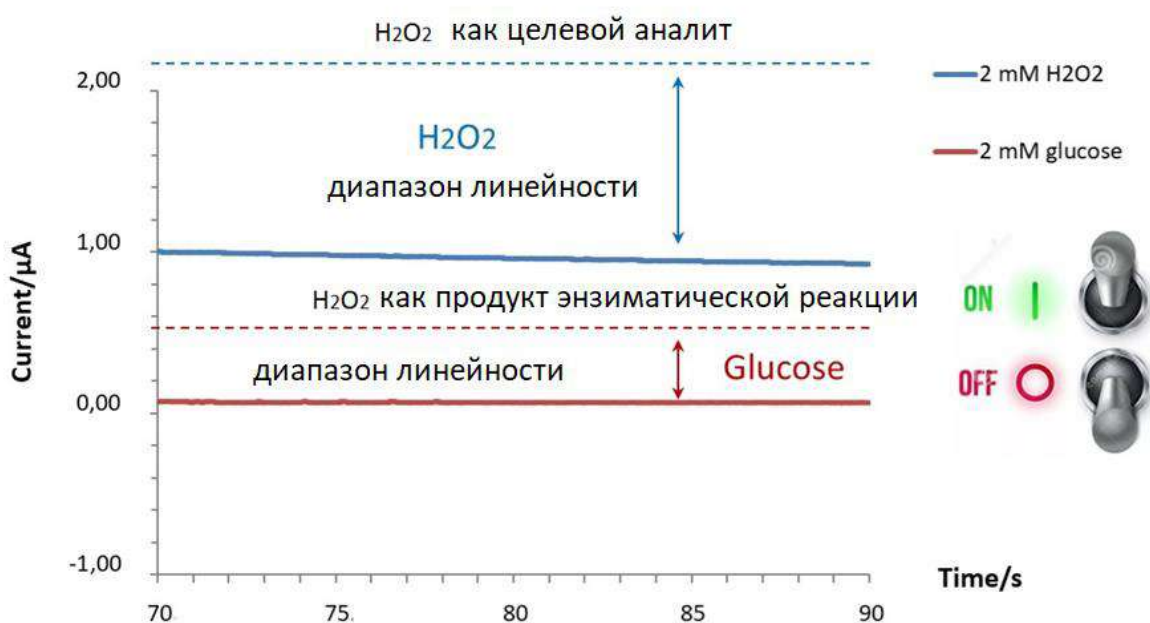
**Рис. 6.4** – Алгоритм использования ОНГ нанобиосенсоров на основе Pd-NPs в модульном биокатализе.[292]

После деактивации ферментов (при использовании растворов с агрессивным pH или хранения при высоких температурах, более 65 °C, стимулирующих процесс старения ферментов), возможно дальнейшее



определение пероксида водорода и глутаральдегида в широком диапазоне концентраций с помощью того же электрода с той же гибридной ОНГ пленкой.

Важно отметить, что для градуации сигнала между окислением  $H_2O_2$  как целевого аналита или в качестве продукта ферментативной активности (при анализе лактата или глюкозы) следует учитывать базовую линию, калибровочные зависимости и область линейности, полученные при определении индивидуальных растворов  $H_2O_2$ , глюкозы и лактата на одном и том же сенсоре, **Рис. 6.5**.



**Рис. 6.5** – Кривые МВАМ (поляризация при -0.08 В, считывание сигнала при 0.2 В), записанные с одного и того же сенсора при одинаковой концентрации целевого аналита. *Примечание:* электрохимическое считывание для оксидазо-содержащих нанобиосенсоров (определение глюкозы и лактата) является таким же, как используется при определении индивидуального  $H_2O_2$  (в качестве целевого аналита), но происходит на различных уровнях по току (в этом дизайне область линейности для глюкозы составляет 200 мкМ-50 мМ; область линейности по пероксиду водорода 20 мкМ-100 мМ). Такой подход позволяет проводить раздельное последовательное детектирование аналитов одним сенсором (глюкозы, за которой следует  $H_2O_2$ ) в соответствии с алгоритмом, представленном на **Рис. 6.4**. Опция «ON/OFF» (ВКЛ./ВЫКЛ.) указывает на переключение между режимами электрохимического обнаружения, базовыми линиями и областями линейности.

Таким образом, обнаружение  $\text{H}_2\text{O}_2$  в качестве самостоятельного аналита или продукта ферментативной реакции оксидаз одним и тем же сенсором и при идентичном режиме регистрации сигнала происходит на различных токовых уровнях. Это происходит потому, что количество чистого 2 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  раствора (показано в качестве примера), помещенного на поверхность сенсора, всегда превышает количество  $\text{H}_2\text{O}_2$ , выделяющееся во время специфической ферментативной реакции между иммобилизованным GOx и 2 мМ глюкозы. Однако для гарантии воспроизводимости такого определения, воспроизводимость синтеза модульного одноэлектродного нанобиосенсора с ОНГ пленкой и его калибровка из аналогичной партии должна быть на достаточно высоком уровне.

Важно отметить, что предложенные нанобиосенсоры, полученные по одностадийной методике, соответствуют этому требованию, см. **Табл. 6.2**. Калибровка одноэлектродных гибридных нанобиосенсоров, производимых по предложенному протоколу (см. **Глава 3,4**), должна выполняться при различных рН и электрохимических режимах: для обнаружения  $\text{H}_2\text{O}_2$ , D-глюкозы и L-лактата (селективность в отношении специфического биоаналитического обнаружения достигается типом иммобилизованной оксидазы: LOx, GOx и тд.) – при рН 7 в многоступенчатом потенциостатическом режим, поляризация при -0.08 В, 60 с следующая за регистрацией сигнала при 0.2 В в течение 30 с; в амперометрическом режиме при 0.12 В и рН 10 при определении глутаральдегида (GLU). Некоторые аналитические характеристики модульного нанобиосенсора приведены в **Табл. 6.3**.

**Табл. 6.2** – Воспроизводимость базовой линии одноэлектродных модульных нанобиосенсоров при рН 7 от партии к партии

Номер партии	Базовая линия, $\mu\text{A}$	$\pm\text{SD}$	RSD, %
Партия 1	2.23·00-1	2.12 $\pm$ 0.10	4.78
Партия 2	2.10·00-1		
Партия 3	2.03·00-1		

**Табл. 6.3** – Выборочные аналитические характеристики, полученные с помощью разработанного нанобиосенсора при определении тест-аналитов

Аналит	Режим анализа	рН	R <sup>2</sup>	Линейный динамический диапазон
Глюкоза	МAM	7	0,987	200 мкМ – 50 мМ
Лактат	МAM	7	0,977	500 мкМ – 2 мМ
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	МAM	7	0,998	20 мкМ – 100 мМ
Глутаральдегид	AM	10	0,971	1 мМ-100 мМ

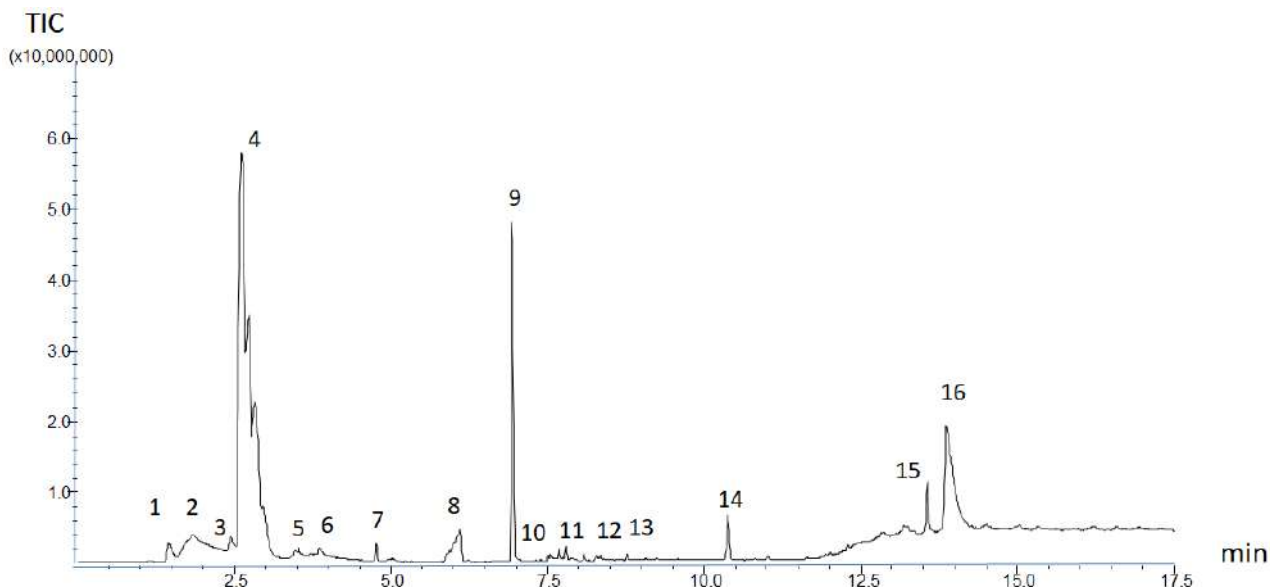
Следующим шагом в этом исследовании будет разработка специфических протоколов для изучения и проверки модульной гибридной системы при одновременном присутствии всех целевых аналитов в смеси, оценка матричных эффектов и разработка руководящих принципов для их устранения или минимизации.

## 6.2 Применение ОНГ нанобиосенсоров для анализа сложных образцов

Для оценки аналитических характеристик гибридных нанобиосенсоров при работе в многокомпонентных системах, на следующем этапе проводили их тестирование в клеточной культуральной среде YPD (10 г/л дрожжевой экстракт, 2% пептона, 20 г/л глюкозы).

Согласно результатам газовой хроматографии в тестируемых образцах присутствует заметное количество таких продуктов, как этанол, глицерин, уксусная кислота, альдегиды и карбоновые кислоты. Все эти вещества образуются в ферментативной среде как результат микробной активности

дрожжей, Рис. 6.6.



**Рис. 6.6** – GC-MS-хроматограмма, полученная на колонке ZB-WAX<sup>+</sup> для экстракта YPD среды после контакта с дрожжевыми клетками BY4742:

1 - углекислый газ; 2 - ацетальдегид; 3 - бутаналь; 4 - этанол; 5 - 2-бутеналь; 6 - изобутиловый спирт; 7 - 1-3 метилбутанол; 8 - 3-гидрокси, 2-бутанон; 9 - уксусная кислота; 10 - пропановая кислота; 11 - 2,3-бутандиол; 12 - 1,3 бутандиол; 13 - бутановая кислота; 14 - фениловый спирт; 15 - 2-формий-1-метилпиррол; 16 - глицерин. *Примечание:* этанол, бутеналь, его производные, уксусная кислота и глицерин являются типичными побочными продуктами дрожжевой ферментации глюкозы вследствие клеточного метаболизма (глюкоза не визуализируется в хроматограмме без дополнительной пробоподготовки, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не визуализируется в хроматограмме на данной колонке, требуется специализированная колонка для определения молекул с массой ниже 40 Да).

Некоторые из перечисленных выше классов соединений при определенных электрохимических условиях могут быть электроактивными на поверхности наночастиц благородных металлов, что может влиять на отклик нанобиосенсора.[84]

Важно отметить, что селективность определения пероксида водорода с помощью Pd-NPs или нанобиосенсоров глюкозы (Pd-NPs/Pd/GOx/Naf) в

значительной степени зависит от способа регистрации сигнала, приложенного потенциала, pH, селективности и специфичности используемого в дизайне сенсора/пленки фермента и присутствия сопутствующих аналитов.

В этой связи, для определения влияния матричных эффектов на результаты электрохимического обнаружения пероксида водорода и глюкозы проводился анализ как образцов, содержащих питательную среду с клетками, так и анализ культуральной среды до и после контакта с клетками. Также проводили анализ ферментативных культуральных сред посредством добавления известного количества  $H_2O_2$  и глюкозы (метод введено-найдено).

При калибровке сенсоров рабочие растворы готовили в соответствующей культуральной среде/матрице YPD при pH 4. Вследствие изменения pH катодный пик нанобиосенсора на основе Pd-NPs смещался до потенциала -0.4 В. В этой связи, режим регистрации аналитического сигнала модифицировали: поляризация при -0.4 В в течение 60 с и последующей регистрацией сигнала при 0.35 В. При этих условиях чувствительность нанобиосенсора на основе Pd-NPs к пероксиду водорода как продукту ферментативной реакции в матрице YPD снижалась в  $3.5 \pm 0.9$  раза по сравнению с буферными растворами.

Матричные эффекты, рассчитанные по протоколу *Matuszewski* [217], были зафиксированы на уровне 26-45%, что однозначно иллюстрирует существенное подавляющее влияние среды/матрицы на результаты определения. В этой связи, для снижения влияния матричных эффектов проводили разбавление проб культуральной среды до уровня 1:10.

Результаты калибровки нанобиосенсора при анализе  $H_2O_2$  (как продукта микробной активности), а также данные анализа реальных образцов с различной оптической плотностью приведены в **Табл. 6.4**. Важно отметить, что в YPD среде отчетливо прослеживается зависимость амперометрического сигнала от оптической плотности образца, т.е. от количества клеток, а значит, и от количества производимого в качестве перекисных метаболитов.

**Табл. 6.4** – Аналитические отклики, записанные с поверхности нанобиосенсора при 0.35 В (режим МАМ) при его испытаниях в культуральной клеточной среде после контакта с клетками

Образец	I, $\mu\text{A}$	Оптическая плотность образца с клетками в среде, D*	I, $\mu\text{A}$
YPD среда (0 мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2$ )	$3.94 \cdot 10^{-1}$	D = 0.3	$4.01 \cdot 10^{-1}$
100 мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2$ +YPD	$6.70 \cdot 10^{-1}$	D = 5.9	$5.70 \cdot 10^{-1}$
1000 мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2$ +YPD	$9.44 \cdot 10^{-1}$	D = 6.3	$6.6 \cdot 10^{-1}$
3000 мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2$ +YPD	$1.42 \cdot 10^0$	D = 7.5	$8.99 \cdot 10^{-1}$

\*D = 1 – соответствует  $1.5 \cdot 10^7$  клеток/mL. Все образцы приготовлены методом разбавления клеток одной фазы роста (III – стационарная фаза).

С другой стороны, с увеличением оптической плотности и времени культивирования количество глюкозы в питательной среде, измеренное Pd-NPs/GOx/Naf модульным нанобиосенсором, снижалось с 170 мМ (до контакта с клетками) до уровня 40 мМ (1 час контакт) и 0 мМ после 24 часов.

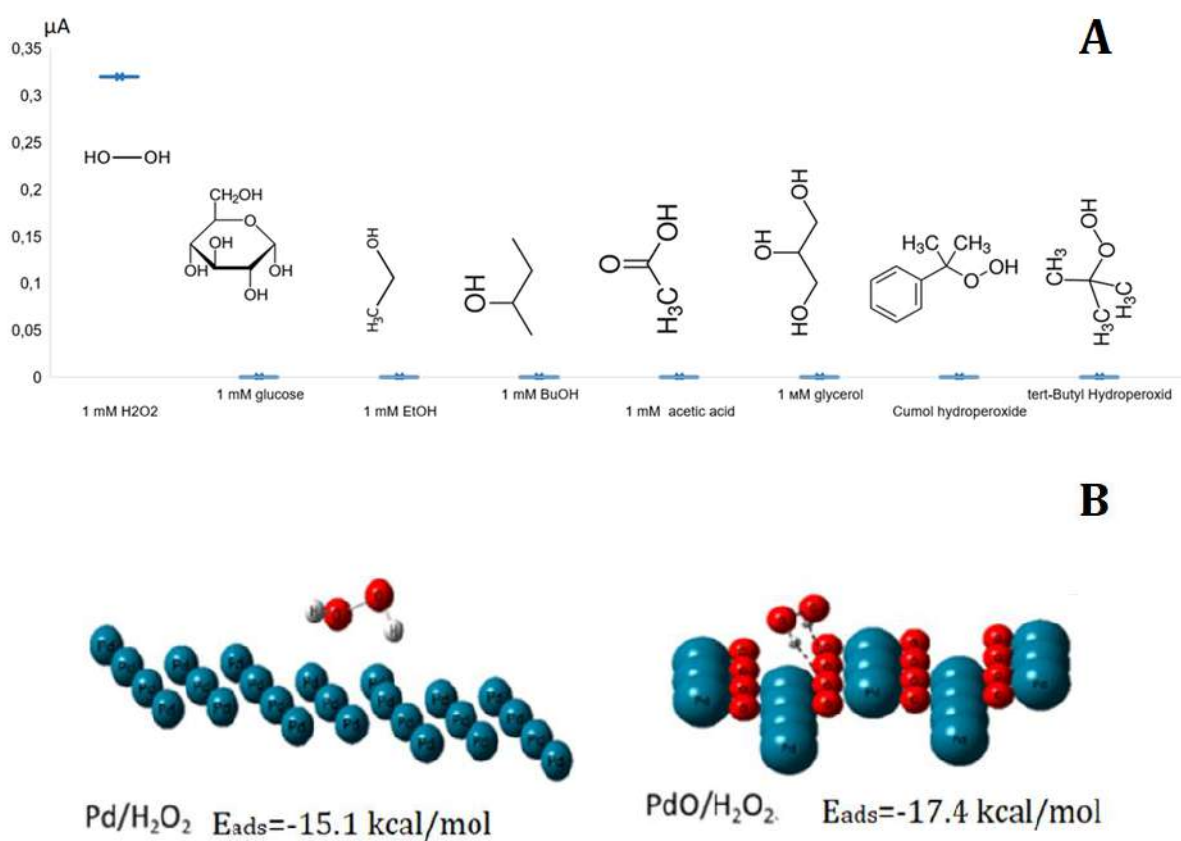
Этот результат находится в согласии с данными газовой хроматографии образцов (**Рис. 6.6**): так уже через 1 час после начала культивации клеток фиксируется значительное количество этанола в пробе (~20-40 мМ до 200 мМ после 24 часов культивации), который является прямым продуктом микробной активности дрожжей.

Матричные эффекты, определенные при разбавлении проб 1:10 были следующими: 94-101% в области калибровки по глюкозе 1 – 40 мМ и 98% (незначительное подавление сигнала) по перексиду водорода в диапазоне от 100 мкмоль до 1 мМ.

При этом также следует отметить, что метод газовой хроматографии при культивации дрожжей оказался неинформативным в отношении обнаружения и определения малых биомолекул, в том числе перекисных соединений и

глюкозы, см. **Рис. 6.6** (эти анализы без дополнительной пробоподготовки и дериватизации невозможно визуализировать в хроматограмме).

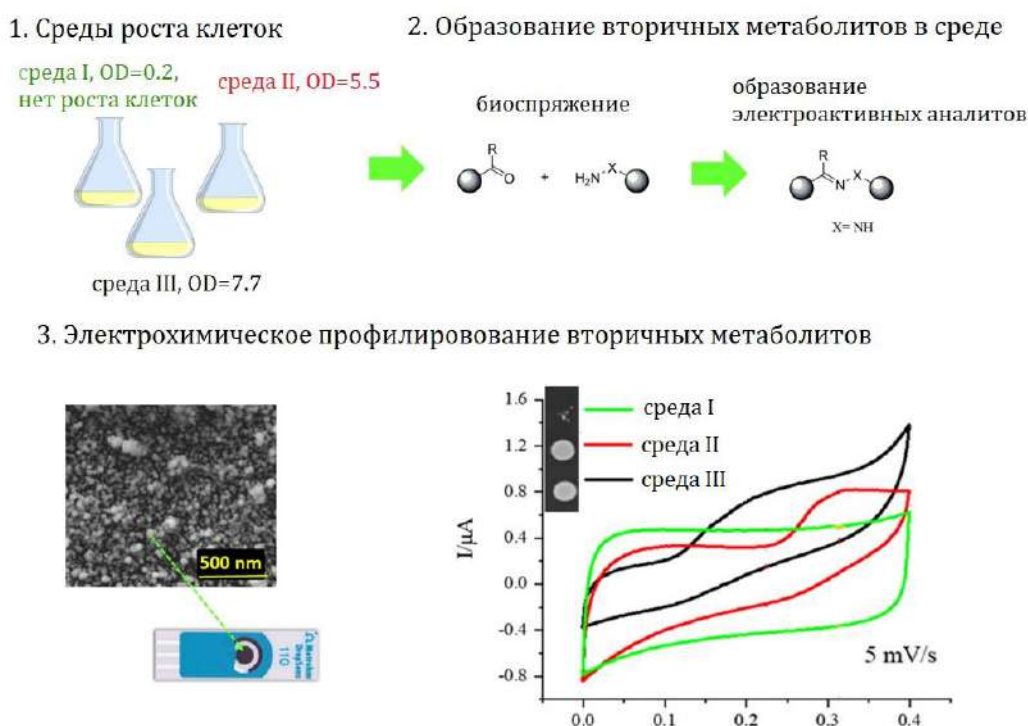
Для проверки селективности и чувствительности определения пероксида водорода в реальных ферментативных средах (YPD среда) сенсором на основе Pd-NPs (неферментное определение), проводили обнаружение веществ, которые также могут проявлять электроактивность в заданных экспериментальных условиях (этанол, бутанол, уксусная кислота, глицерин, глюкоза и тд). Согласно проведенным тестам, сенсор на основе Pd-NPs не обладает чувствительностью ни к одному из протестированных соединений, кроме пероксида водорода, **Рис. 6.7А**.



**Рис. 6.7** – (А) – Результаты амперометрического определения некоторых биоаналитов в культуральной YPD среде сенсором на основе пленки Pd-NPs. Считывание сигналов проводилось в МАМ режиме при 0.35 В. Концентрация тестируемых аналитов 1 мМ. (В) – Репрезентативные взаимодействия в системах Pd/PdO ↔ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Пунктир – водородные связи.

Высокая избирательность сенсора на основе Pd-NPs к пероксиду водорода, вероятно, связана со стадией адсорбции этого аналита. Энергии адсорбции ( $E_{ads}$ ) пероксида на поверхности Pd/PdO были максимально высокими в сравнении со спиртами и органическими пероксидами (Рис. 6.7В), что также будет влиять на концентрацию  $H_2O_2$  в капле в приэлектродном слое.

На основании установленных закономерностей адсорбции электрохимически активных биоаналитов на поверхности электродов с электроосажденными функциональными пленками, в том числе на основе Pd-NPs, разработан способ экспрессного электрохимического профилирования клеток *Saccharomyces cerevisiae* в ферментативных средах, Рис. 6.8.



**Рис. 6.8** – Последовательность шагов и общий принцип электрохимического профилирования клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Электрохимический скрининг дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) *in vitro* режиме в зависимости от их оптической плотности, времени культивирования и типа используемой среды роста проводили в течение 3 мин на поверхности



электрода, модифицированного пленкой Pd-NPs в режиме циклической вольтамперометрии при низких скоростях сканирования 5-20 мВ/с.

Способ основывался на электроокислении вторичных метаболитов, образующихся во внеклеточной среде в результате микробной активности дрожжевых клеток.<sup>21</sup> Природа электрохимически активных биоаналитов, формирующихся во внеклеточной матрице дрожжевых клеток в зависимости от типа питательной среды и плотности клеток, была изучена и подтверждена с помощью метода газовой хроматографии, совмещенной с масс-детектором. Предложенный электрохимический способ имеет ряд преимуществ по сравнению с аналогами, Табл. 6.5.

**Табл. 6.5** – Сравнение параметров скрининга внеклеточных матриц *S. Cerevisiae* разными аналитическими платформами

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

<sup>21</sup>Y.E. Silina\*, C. Fink-Straube, M. Koch, E.V. Zolotukhina, A rapid *in vitro* electrochemical screening of extracellular matrix of *Saccharomyces cerevisiae* by palladium nanoparticles-modified electrodes, *Bioelectrochemistry*, 2023, 149, 108283.

### 6.3 Гетерогенный биокатализ: реконструкция свойств биорецептора на электроде за счет реакции с электроосажденным кофактором

При микробном выделении полученные экзогенные ферменты часто теряют свою биохимическую активность вследствие многостадийной диссоциации кофакторов и гидролиза. Кроме того, экзогенная экспрессия белка часто происходит без выделения кофактора (фермент в апо-форме). Однако для биоэлектрохимических приложений или скрининга микроорганизмов, производящих нужный фермент в требуемом количестве, присутствие кофакторов необходимо для успешного Red/Ox превращения субстратов в продукты.

Следует отметить, что ферменты имеют очень массивную архитектуру с глубоко «спрятанным» внутри этой структуры активным Red/Ox центром, что затрудняет коммуникацию с электродом и вызывает многочисленные ограничения процессов массопереноса как субстратов, так и продуктов реакции.[293][250][294] Ранее было показано, что основные электрохимические сигналы на электродах с участием ферментов, обусловлены нековалентно связанными с белком кофакторами, а скорее их свободными RedOx-активными формами.[295,296]

Предполагается, что *in situ* модуляция/изменение свойств микробных ферментов/белков путем взаимодействий с иммобилизованными на электродах кофакторами может быть новой стратегией улучшения скоростей ферментативных кофактор-зависимых реакций. Другими словами, весь экспрессированный микробный фермент в апо-форме может стать активным непосредственно на электроде.

Реализация этого способа возможна путем иммобилизации кофакторов на электродах в их биохимически активных формах (без трансформации и демеризации) [297]. Проведение электролиза из смешанных растворов электролитов, содержащих кофакторы и природные полимеры (например, альгинат, ALG) при невысоких токах, может способствовать сохранению

биохимически активных форм кофакторов. В дальнейшем контролируемое высвобождение иммобилизованного кофактора в капле раствора, содержащего фермент в апо-форме, может способствовать реконструкции структуры белка в его активную холо-форму.

### 6.3.1 Добавление нековалентно связанного кофактора повышает эффективность биоэлектродокаталитических реакций в растворах

Для доказательства предложенной выше концепции необходимо проверить, как влияет дополнительное количество кофактора на активность фермента в растворе. Только после этого шага можно переходить к изучению гетерогенных процессов биокатализа на электродах.

Для этой цели было проведено несколько модельных экспериментов с использованием кислородного минисенсора. Полученные данные (Рис. 6.9, показано для электролита, содержащего FAD, система на основе GOx) и FMN (система на основе LOx)) показывают, что добавление нековалентно связанного кофактора в электролит повышает эффективность биоэлектродокаталитических трансформаций независимо от состава электролита. Аналогичные зависимости были получены для биорецепторов и «добавочных» кофакторов на основе Ag-электролита.

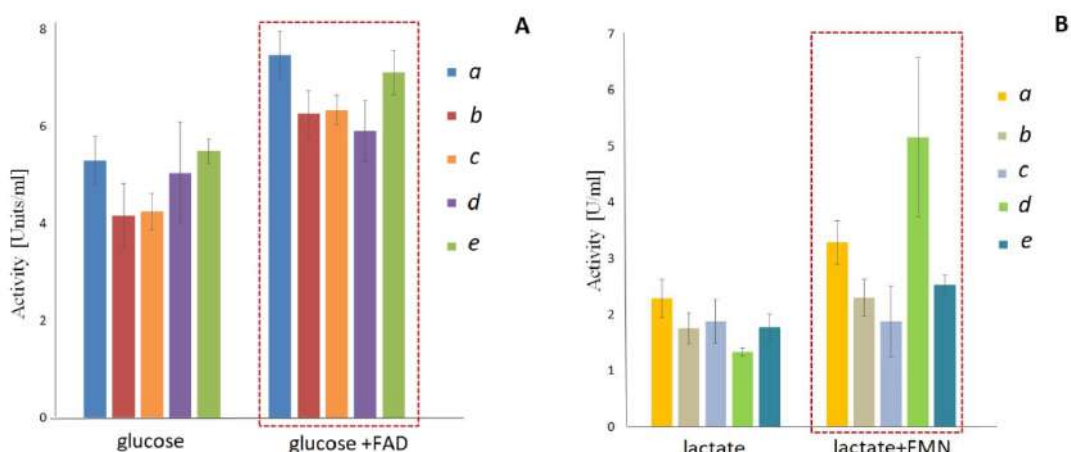
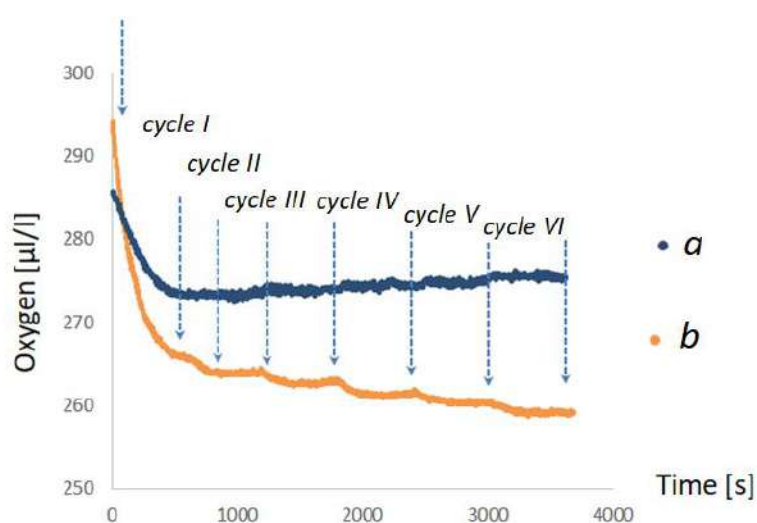


Рис. 6.9 – «Настройка» активности фермента в растворе по составу смешанного электролита. Результаты оптического кислородного минисенсора ( $\mu\text{mol/L}$ ) исследования для 1 мг/мл GOx (a) и GOx с добавками,

дополнительное количество FAD (A): (b) – GOx +Pd-электролит, (c) – GOx +Nafion, (d) –GOx+Pyrrrole и (e) – GOx +ALG (показанный в присутствии 100-миллиметровой D-глюкозы). (B) – LOx (a), а также LOx, LOx с добавкой FMN, (b) – LOx + Pd-электролит, (c) – LOx +Nafion, (d) – LOx+пиррол и (e) – LOx+альгинат (в присутствии 100 мМ L-лактата).

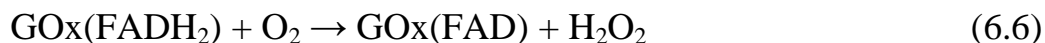
Проведенный последующий циклический эксперимент в растворах с добавками кофакторов показал возможность непрерывных каскадных реакций, происходящих в таких растворах даже после достижения термодинамического равновесия, **Рис. 6.10**.



**Рис. 6.10** – Циклическая диаграмма зависимости потребления кислорода для эксперимента между GOx (0.05 мг/мл) с дополнительным количеством (0,05 мг/мл) FAD и 10 мМ глюкозы (a). Потребление кислорода показано для смеси GOx + FAD, добавляемой в начале реакции (b), по сравнению с коммерческим GOx (без дополнительного добавления FAD) в присутствии 10 мМ глюкозы и фосфатного буфера (a).

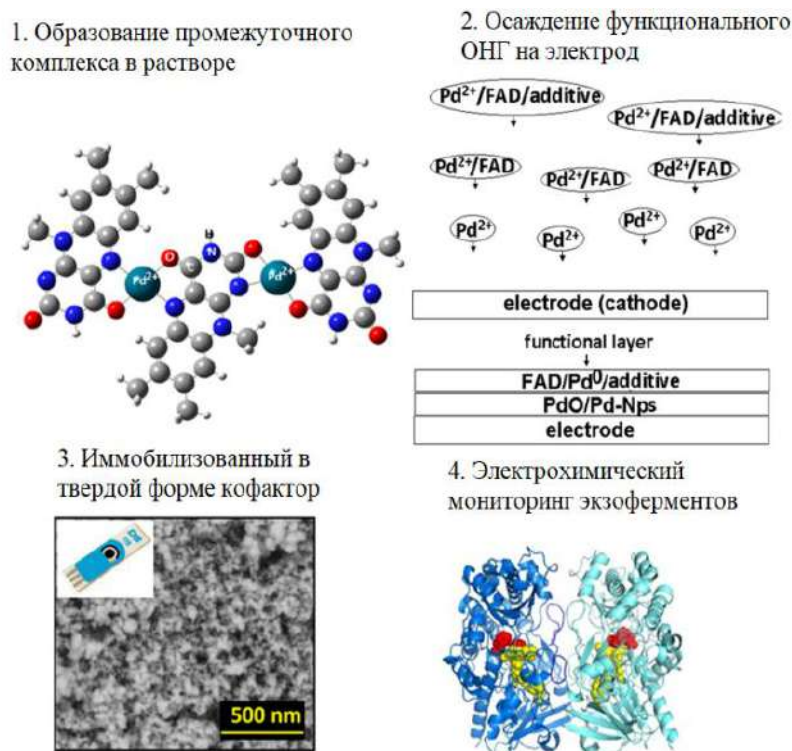
Положительный эффект, наблюдаемый в таких системах, объясняется образованием множественных водородных связей между добавленным кофактором и ферментом, что позволяет реализовать несколько рабочих циклов в соответствии с последовательностями (6.5) – (6.6). Это означает, что

в случае успешной иммобилизации FAD с наночастицами благородных металлов на электроде с последующим высвобождением кофактора также можно ожидать биохимические превращения субстрата в продукт в течение нескольких циклов.



### 6.3.2 Механизм формирования адсорбционного ОНГ слоя с кофактором

Предложенная концепция гетерогенного биоэлектрокатализа может быть достигнута посредством электрохимической иммобилизации кофактора (низкомолекулярная органическая молекула) из смешанных растворов электролитов, **Рис. 6.11** (показано на примере кофактора FAD, необходимого для обеспечения работы GOx (т.е. Lumiflavin как стабильный и репрезентативный фрагмент FAD), Pd-электролит и добавки полимеров (альгинат, ALG, пиррол).



**Рис. 6.11** – Схема *in situ* модуляции активности ферментов на поверхности электрода. (1) – структура комплекса 2Pd<sup>2+</sup>/3LF в растворе; (2) – схема

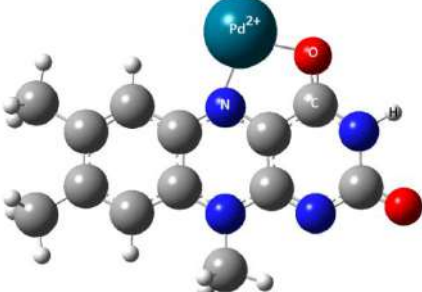
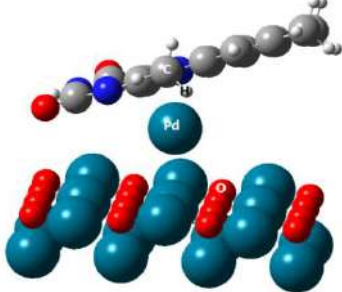
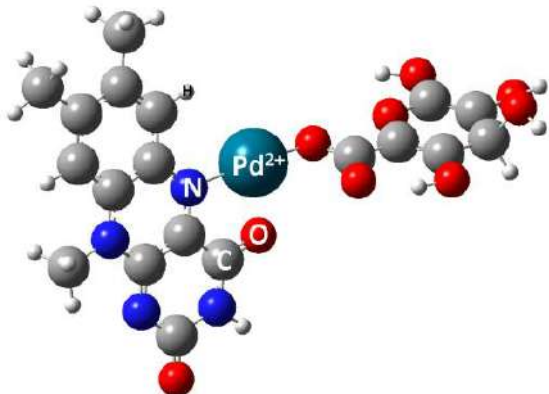
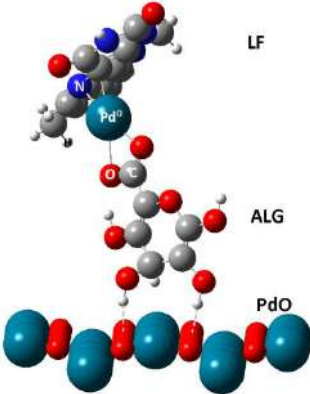
осаждения функционального слоя на электрод: частицы/кластеры с одинаковым зарядом и меньшей массой быстрее движутся к поверхности электрода при приложенной поляризации. (3) – SEM-изображение поверхности гибридного функционального слоя (PdO/Pd-NPs-FAD-альгинат); (4) – после того, как электрод с иммобилизованным кофактором в твердой форме готов, далее возможен электрохимический скрининг микробных экзоферментов.

Для проверки механизма, ведущего к самосборке ОНГ слой на основе кофакторов и полимеров непосредственно на поверхности электродов, были проведены квантово-химические исследования по алгоритму, приведенному в Главе 3. Оптимизированные структуры комплексов между люмифлавином (LF), катионами Pd<sup>2+</sup> и полимерным агентом (альгинат, ALG) суммированы в **Табл. 6.6**.

В наиболее энергетически выгодной структуре LF с катионом металла Pd<sup>2+</sup> расположен близко к атомам -O и -N и удален от -NCH<sub>3</sub> группы, **Табл. 6.4, структура А**. Из-за значительной энергии взаимодействия между Pd<sup>2+</sup> и LF образование цепи молекул FAD, связанных друг с другом катионами палладия, является наиболее вероятным процессом. Добавление структуры 2Pd<sup>2+</sup>/3LF (**Рис. 6.11, 1**) к Pd<sup>2+</sup>/LF приводит к появлению комплекса 3Pd<sup>2+</sup>/4LF и тд.

В ходе компьютерного моделирования было обнаружено, что фиксация LF на пленке PdO посредством водородной связи или ориентация LF колец параллельно плоскости PdO является энергетически невыгодной ( $E_{\text{int}} > 0$ ). Напротив, осаждение *структуры А* на слой PdO, осуществляемое при переходе Pd<sup>2+</sup> → Pd<sup>0</sup> (восстановление катионов на катоде), является энергетически благоприятным процессом (-13.2 ккал/моль), **Табл. 6.6, структура В**.

**Табл. 6.6** – Оптимизированные структуры [298] и энергии взаимодействия образующихся комплексов в растворах и после их иммобилизации на электроде/PdO: углерод – серый, водород – белый, кислород – красный, азот – синий, Pd – бирюзовый

Комплекс в растворе	Структура на электроде
 <p style="text-align: center;"><b>А</b></p> <p style="text-align: center;">Система люмифлавин-Pd<sup>2+</sup> E<sub>вз</sub> = - 74.8 ккал/моль<sup>22</sup></p>	 <p style="text-align: center;"><b>В</b></p> <p style="text-align: center;">Система люмифлавин-Pd<sup>0</sup>/PdO, E<sub>вз</sub> = - 13.2 ккал/моль</p>
 <p style="text-align: center;"><b>С</b></p> <p style="text-align: center;">Система люмифлавин-Pd<sup>2+</sup>/ALG E<sub>вз</sub> = - 44.3 ккал/моль</p>	 <p style="text-align: center;"><b>Д</b></p> <p style="text-align: center;">Система люмифлавин-Pd<sup>0</sup>/ALG/PdO, E<sub>вз</sub> PdO/ALG = - 35.2 ккал/моль</p>

\*пунктирные линии – водородные связи

Кроме этой модели катион палладия может также образовывать комплекс с анионом LF и ALG (Табл. 6.6, структура С). Альгинат в растворах с pH 5-9 ведет себя как полианион, и его карбоксильные группы полностью диссоциированы. В растворе этот полианион сшивается катионами

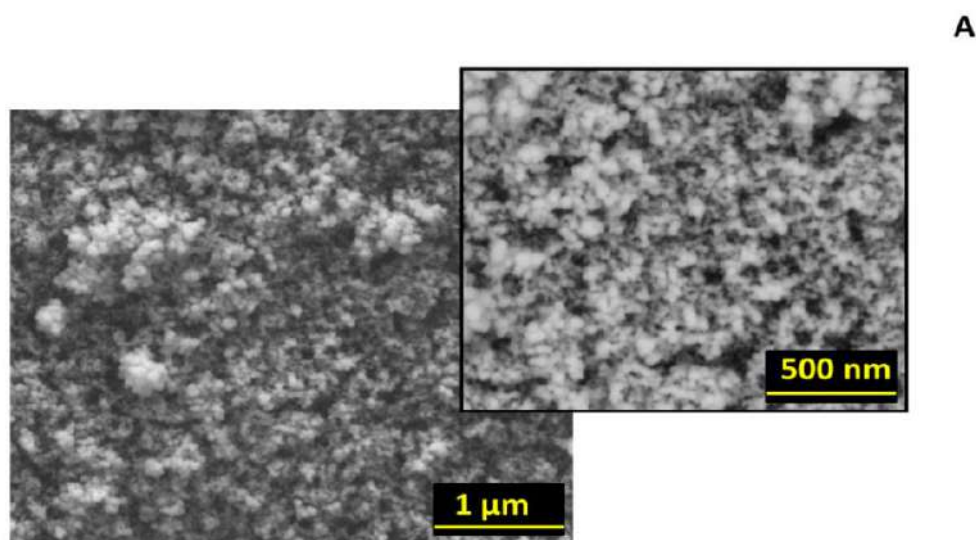
<sup>22</sup> E<sub>вз</sub> = E<sub>12</sub> - (E<sub>1</sub> + E<sub>2</sub>), E<sub>вз</sub> < 0 в случае устойчивого связывания.

палладия.[299] Во время электролиза первый слой (слой 1) функциональной пленки представлен смесью Pd<sup>0</sup> и PdO с последующим присоединением ALG (слой 2) и LF-Pd<sup>0</sup> (слой 3), **Табл. 6.6, структура D**.

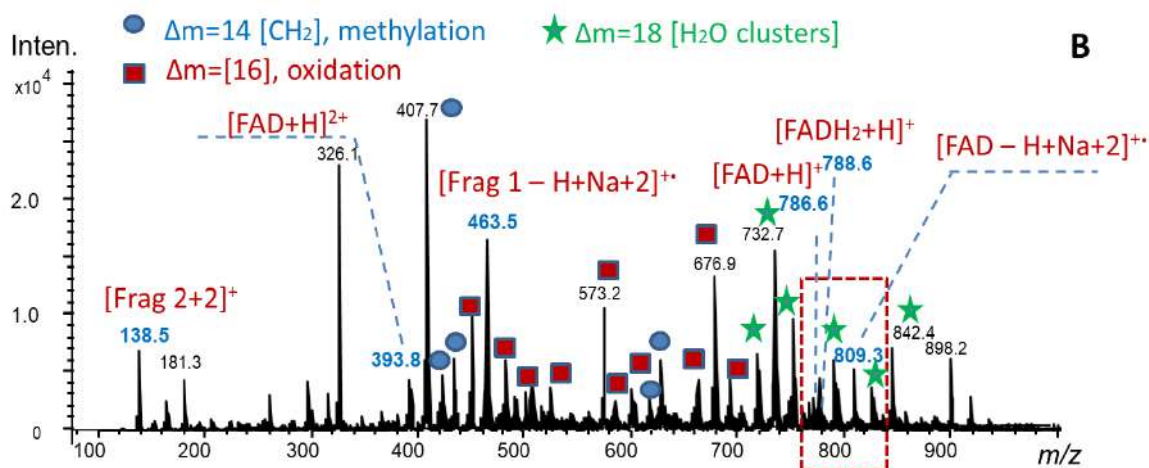
Другими словами, два параллельных процесса, а именно формирование *структуры В* и *Д* лежат в основе закрепления/адсорбции FAD к поверхности трафаретного электрода. Примечательно, что в обоих случаях не происходит образования новых связей в структуре кофактора, что важно с точки зрения сохранения его Red/Ox активности.

### **6.3.3 Верификация архитектуры гибридных электродов с электроосажденным кофактором**

Наночастицы палладия, допированные FAD, осаждали при -2.5 мА в течение 60 с из раствора смешанного электролита, содержащего ALG. В этих условиях происходило образование однородного ОНГ адсорбционного слоя функциональной пленки (**Рис. 6.12А**). Химический состав поверхности гибридной пленки после синтеза контролировали по предложенной методике LDI-MS биосканирования, **Рис. 6.12В**.





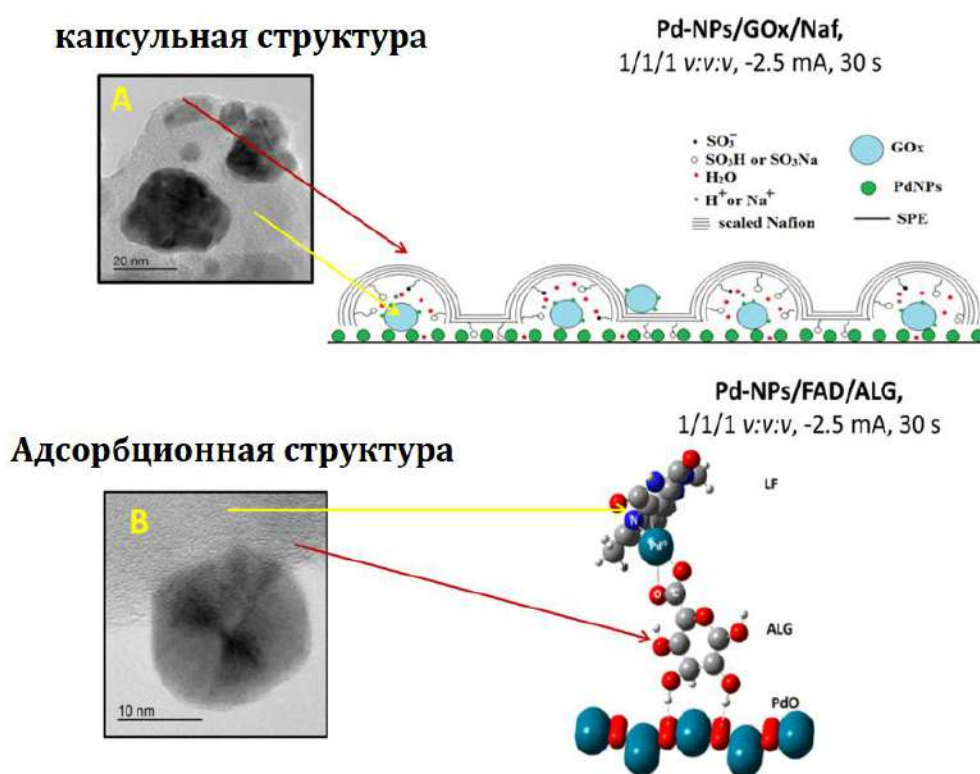


**Рис. 6.12** – SEM-изображение (А) и LDI-MS спектр (В) поверхности электрода, модифицированного ОНГ слоем на основе PdO/Pd-NPs/ALG/FAD. Frag. 1 и Frag. 2 - фрагменты, соответствующие FAD при  $m/z$  439 и 136.

Ионизация FAD в дополнение к ожидаемым  $[M+H]^+$  ионам при  $m/z$  786 и  $[M+H]^{2+}$  и  $m/z$  393.8 сопровождалась образованием аномальных спектральных подвидов: например,  $[M-H+Na+2]^+$ , обнаруженных в спектре при  $m/z$  809. Аналогичная тенденция во время ионизации FAD наблюдалась ранее в методе MALDI-MS.[231] Механизм ионизации FAD с поверхности гибридного электрода может быть аналогичен тому, что происходит в биологических RedOx системах.[231] Присутствие в масс-спектрах повторяющихся единиц  $\Delta 14$ ,  $\Delta 16$  и  $\Delta 18$  скорее связано с ионизацией ALG. Иными словами биохимический анализ поверхности подтвердил успешное соосаждение как полимерного связующего ALG, так и кофактора – FAD, **Рис. 6.12В**.

Не менее важный момент – это то, что в сформированных на электродах *структурах В и D* (Табл. 6.6) слой кофактора располагается сверху функциональной пленки, что и будет обеспечивать его прямой контакт с ферментом. В таких структурах реализуется адсорбционная модель активного слоя, в противоположность капсульным (см. Главу 3), формирующихся в присутствии двух высокомолекулярных компонентов в смешанном растворе электролита (полимер + фермент).

Иными словами, изменяя количество высокомолекулярных биоорганических компонентов (или молекулярную массу/заряд) в смешанном растворе электролита (ферменты ~40-80 kDa против кофакторы ~600-800 Da), возможно также изменять структуру функциональных пленок, синтезированных по новой одностадийной методике, **Рис. 6.13**. В данной структуре кофактор «не закрыт» слоем полимерного компонента в сравнении с капсульной моделью. Этот факт делает возможным прямое взаимодействие на электроде между электроосажденным FAD и апо-ферментом в жидкой форме.



**Рис. 6.13** – Смоделированные репрезентативные структуры функциональных слоев электроосажденных Pd-NPs/GOx/Naf- (**А**) и Pd-NPs/FAD/ALG-модифицированных (**В**) электродов. *Примечание:* природа используемого полимерного агента, заряд и молекулярная масса биокон компонента (~ 80 кДа для ферментов против 785 Да для FAD (LF - является стабильным фрагментом FAD) влияет на архитектуру функциональных слоев. *Жёлтые стрелки* - расположение биокон компонента в гибридном функциональном слое, *красные стрелки* - расположение полимерного компонента.

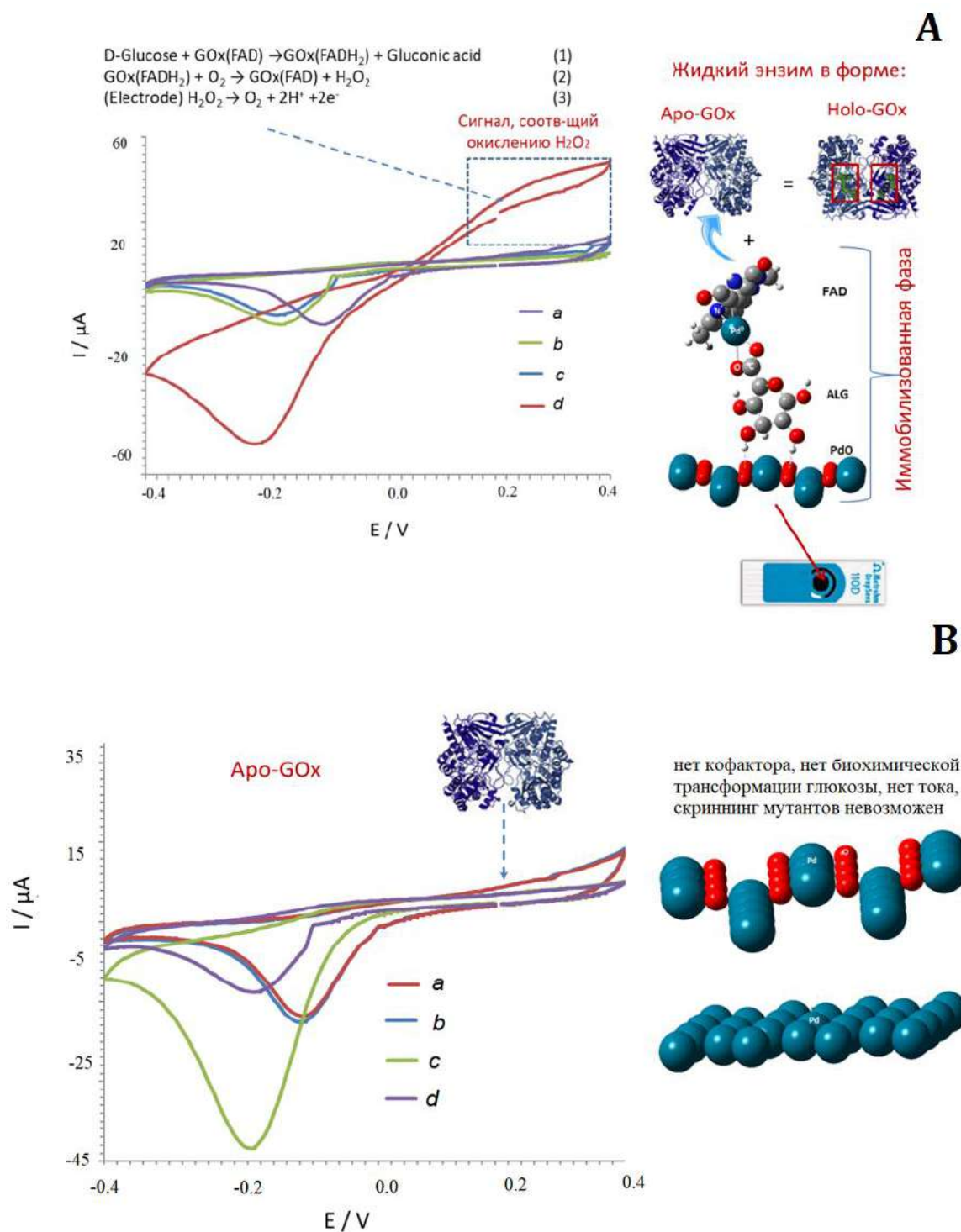
### 6.3.4 Особенности электрохимического мониторинга апо-ферментов

Для моделирования процессов превращения фермента из апо-формы в холо-форму непосредственно на электроде (моделирование скрининга микробных ферментов), FAD кофактор удаляли из коммерческого фермента GOx путем кислотного гидролиза с последующим центрифугированием белка при 13 000 об/мин в течение 15 минут. Затем полученный белок в апо-форме растворяли в фосфатном буфере. Следует отметить, что в отсутствие кофактора (FAD) апо-GOx все еще может связывать субстрат (глюкозу), однако, не способен его окислять.

Далее проводили гетерогенный биокатализ между апо-ферментом в капле и субстратом-глюкозой на поверхности электрода с иммобилизованным кофактором (Pd-NPs/FAD/ALG). Для сравнения зависимостей были также протестированы электроды, модифицированные индивидуальными Pd-NPs.

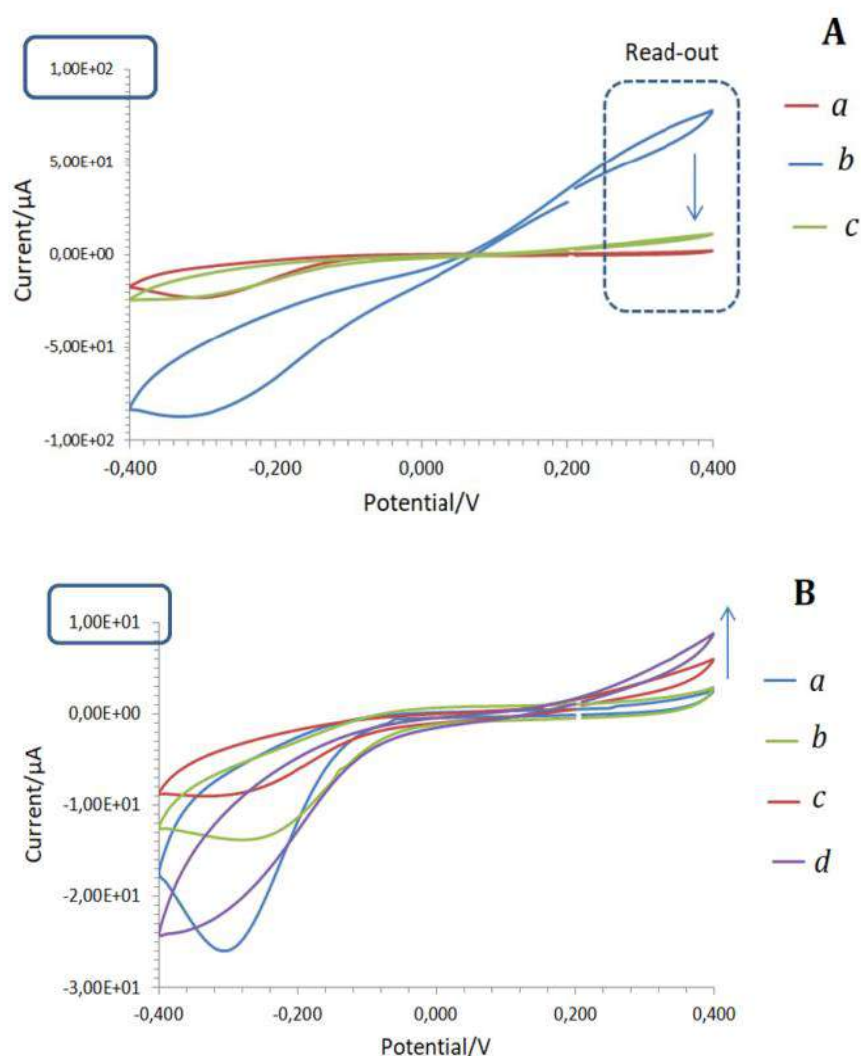
Сравнивая электрохимические зависимости на **Рис. 6.14**, становится очевидным аналитическое преимущество гибридной PdO-NPs/Pd-NPs/ALG/FAD микроаналитической тест-системы по сравнению с электродом на основе PdO/Pd-NPs. Продукт биохимических взаимодействий ( $H_2O_2$ ) согласно последовательностям (1) – (3) возможно надежно детектировать в анодной области, проводя скрининг штаммов микроорганизмов, производящих оптимальное количество целевого фермента в апо-форме. Этот эксперимент также доказал возможность преобразовать апо-GOx в холо-GOx непосредственно на электроде.

Суммируя полученные данные, можно констатировать успешную реализацию стратегии гетерогенного биокатализа на поверхности ОНГ электродов с иммобилизованными кофакторами. Иммобилизованные кофакторы, действительно, сохраняют свою биологическую активность и могут быть далее использованы для восстановления структуры/активности апо-фермента.



**Рис. 6.14** – (А) – ЦВА кривые, полученные с поверхности PdO/Pd-NPs/ALG/FAD электрода при 20 мВ/с в присутствии: *a* – фосфатного буфера; *b* – 10 мМ раствора глюкозы в буфере; *c* – 0.75 мг/мл апо-GOx в буфере; *d* – 0.75 мг/мл апо-GOx + 10 мМ глюкозы. (В) – ЦВА кривые, полученные с поверхности PdO/Pd-NPs электрода при 20 мВ/с в присутствии: *a* – фосфатного буфера; *b* – 10 мМ раствора глюкозы в буфере; *c* – 0.75 мг/мл апо-GOx в буфере; *d* – 0.75 мг/мл апо-GOx + 10 мМ глюкозы.

Образование адсорбционно-подобных структур кофактора в верхней части гибридного слоя, не защищенного полимерным компонентом от вымывания, подтверждается электрохимическими исследованиями. Результаты, приведенные на **Рис. 6.15А**, однозначно подтверждают эту гипотезу: наблюдалось постепенное снижение тока, возможно вызванное элюированием FAD после длительного использования (~300-400 циклов) Pd-NPs/FAD/ALG-модифицированного электрода в водных растворах фермента.



**Рис. 6.15** – (А) ЦВА-кривые, полученные в присутствии 50 мМ субстрата (глюкоза) и 1 мг/мл апо-GOx при 20 мВ/с из свежеприготовленных (b) и используемых (~300-400 циклов) (c) Pd-NPs/FAD/ALG-модифицированных электродов. (a) – базовая линия интенсивно используемого Pd-NPs/FAD/ALG-модифицированного электрода, записанная в присутствии 50 мМ глюкозы и в

отсутствие апо-GOx. (В) ЦВА-кривые, записанные с поверхности интенсивно используемого Pd-NPs/FAD/ALG-модифицированного электрода: (a) - в капле 50 мМ глюкозы (базовая линия), (b) - в капле 50 мМ глюкозы + 1 мг/мл апо-GOx (10 KUnits), (c) 50 мМ глюкозы + 1 мг/мл апо-GOx (50 KUnits), (d) - 50 мМ глюкозы + 1 мг/мл апо-GOx (250 KUnits)

Однако даже после интенсивного использования Pd-NPs/FAD/ALG-модифицированных электродов дальнейшее профилирование апо-ферментов в зависимости от их активности (KUnits) все еще возможно, см. **Рис. 6.15В**. Кинетические аспекты взаимодействий в системах жидкий фермент ↔ иммобилизованный кофактор ↔ жидкий субстрат, субстрат ↔ иммобилизованный кофактор, фермент ↔ субстрат должны быть подробно изучены на следующих этапах.

## **6.5 ОНГ пленки для масс-спектрометрического обнаружения трудно-ионизируемых низкомолекулярных биомолекул**

### **6.5.1 Обнаружение и определение жирных кислот и триацилглицеридов**

Растительные масла представляют собой сложные смеси триацилглицеридов (TAG), моно - и диацилглицеридов, свободных жирных кислот (FFA), восковых эфиров, алканов, стеролов, токоферолов и других соединений.[258] Определение TAG и FFA необходимо для контроля качества и подтверждения подлинности растительных масел. В основном для этой цели используют спектроскопию комбинационного рассеивания (RAMAN), жидкостную и газовую хроматографию, а также масс-спектрометрию с ионизацией в электроспрее (ESI), химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) или ионизацию с помощью MALDI-MS. Во всех случаях требуется интенсивная пробоподготовка образцов.[300][301]

При анализе таких образцов методом MALDI-MS в масс-спектрах помимо пиков аналита присутствуют и пики органических матриц (особенно для  $m/z < 500$ ), выражены эффекты «сладких пятен», что в результате

приводит к плохой воспроизводимости данных, в том числе, и из-за отсутствия однородности кристаллов матрица/образец.[302]

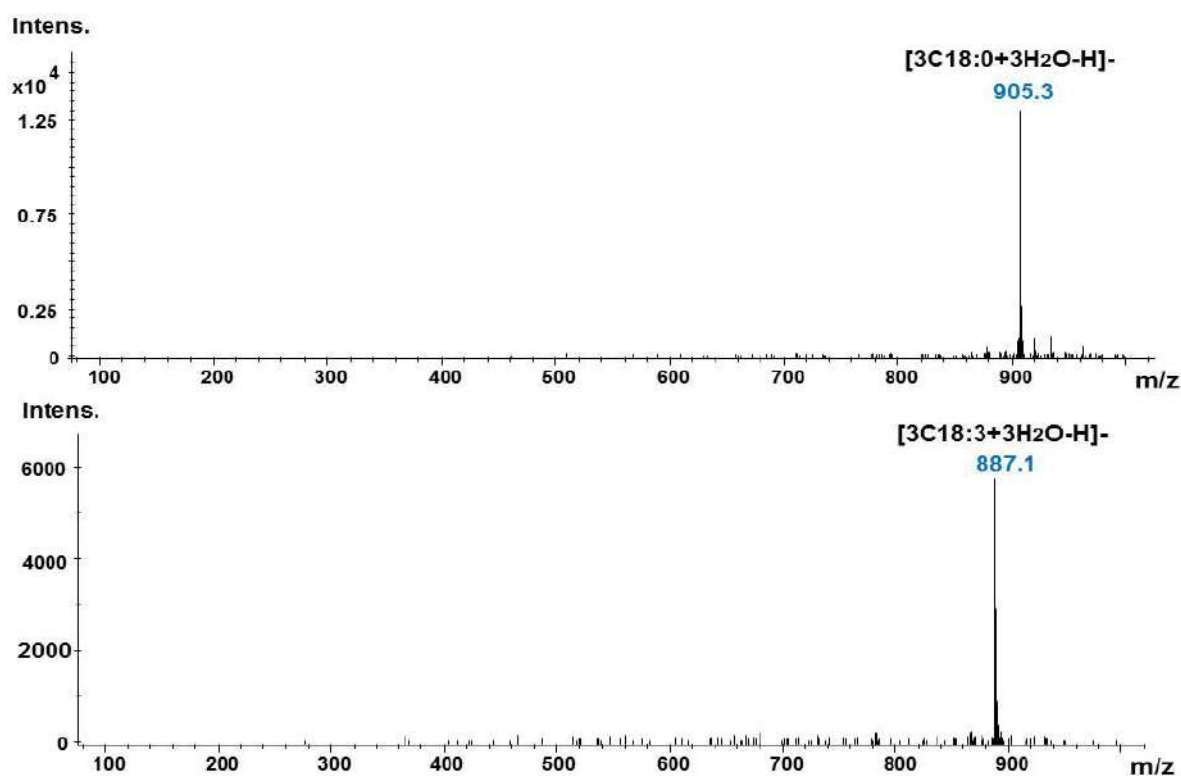
Эти проблемы могут быть сведены к минимуму при использовании «безматричного» SALDI-MS метода. В SALDI-MS молекулы аналита десорбируются лазером с поверхности наноразмерных неорганических материалов. При этом сама подложка-эмиттер участвует в переносе ионов к аналиту и поддерживает его десорбцию/ионизацию, образуя заряженные ионы. Метод SALDI-MS толерантен к присутствию солей и буферных растворов, что делает обнаружение интактных (не подвергнутых обработки) образцов вполне реалистичным. Метод SALDI-MS может быть использован для определения анализируемых веществ, которые обычно плохо ионизируются с помощью MALDI-MS.

В Главе 5 были обобщены основные физико-химические параметры, влияющие на образование ионов в методе SALDI-MS с поверхности наночастиц благородных металлов и их гибридов с полупроводниками. В этой главе показано применение этих же пленочных материалов для определения жирных кислот и триацилглицеридов (TAGs) в коммерческих образцах растительных масел.

### **6.5.2 Ионизация жирных кислот с поверхности электроосажденных пленок наночастиц благородных металлов**

Ионизацию жирных кислот изучали с поверхности электроосажденных Pd-NPs и Ag-NPs диаметром 60 – 80 нм с толщиной слоя 10-20 нм, нанесенных на стальную подложку. Ранее (см. Главу 5) было показано, что такие мишени позволяют обнаруживать широкий спектр низкомолекулярных соединений в виде аддуктов типа  $[M+K]^+$ . В положительном режиме ионизации жирные кислоты не стали исключением. При ионизации в отрицательном режиме ионизации ожидалось, что жирные кислоты будут ионизироваться аналогично механизму, ранее установленному при их ионизации в электроспрее или APCI-MS.[303] Однако в отрицательном масс-спектре было выявлено образование

необычных тримерных агломератов жирных кислот типа  $[3M+3H_2O-H]^-$ , **Рис. 6.16.**

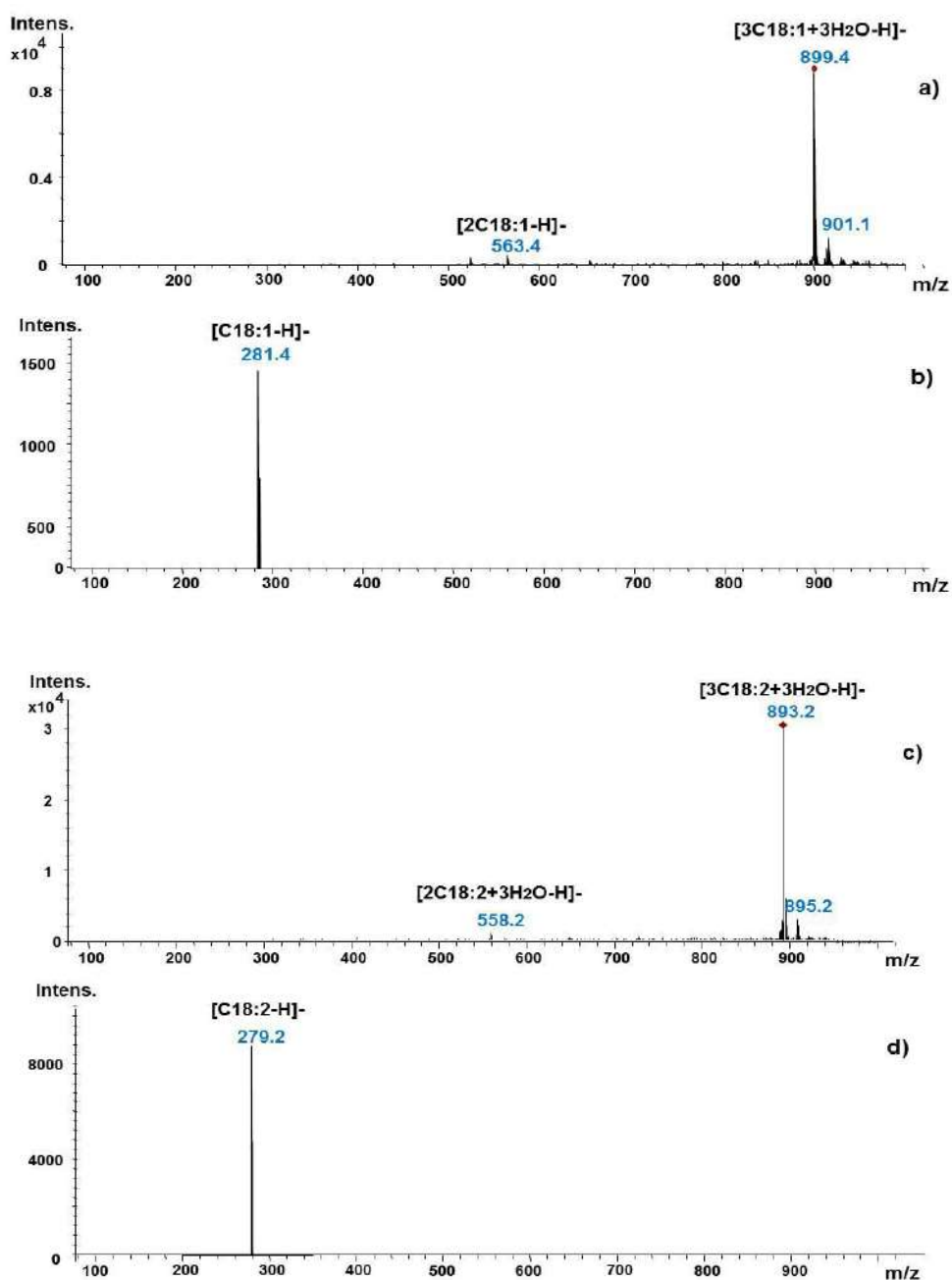


**Рис. 6.16** – LDI масс-спектры C18:0 (верх) и C18:3 (низ) в режиме отрицательной генерации ионов, полученные с поверхности Pd-NPs. Лазер 45%, концентрация аналита на уровне 200 ppm.

В гораздо меньшей степени (<5%) наблюдалось формирование  $[3M-2H+K]^+$  катионизированных тримеров. Интересно, что депротонированных ионов типа  $[M-H]^-$  в масс-спектрах обнаружено не было. Этот результат отличался от закономерностей ионизации жирных кислот в отрицательных режимах с поверхности пористого кремния.[304] *Budimir* с соавторами сообщали о депротонированных молекулах в качестве основных видов формирующихся ионов.[305] Катионизированные мультимеры типа  $[2(M-H)+Na]^+$  и  $[3M-2H+K]^+$  присутствовали только в следовых количествах. MS/MS анализ необычных формирующихся при ионизации структур типа  $[3M+3H_2O-H]^-$  в данной работе подтвердил наличие свободных жирных кислот (**Рис. 6.17**)



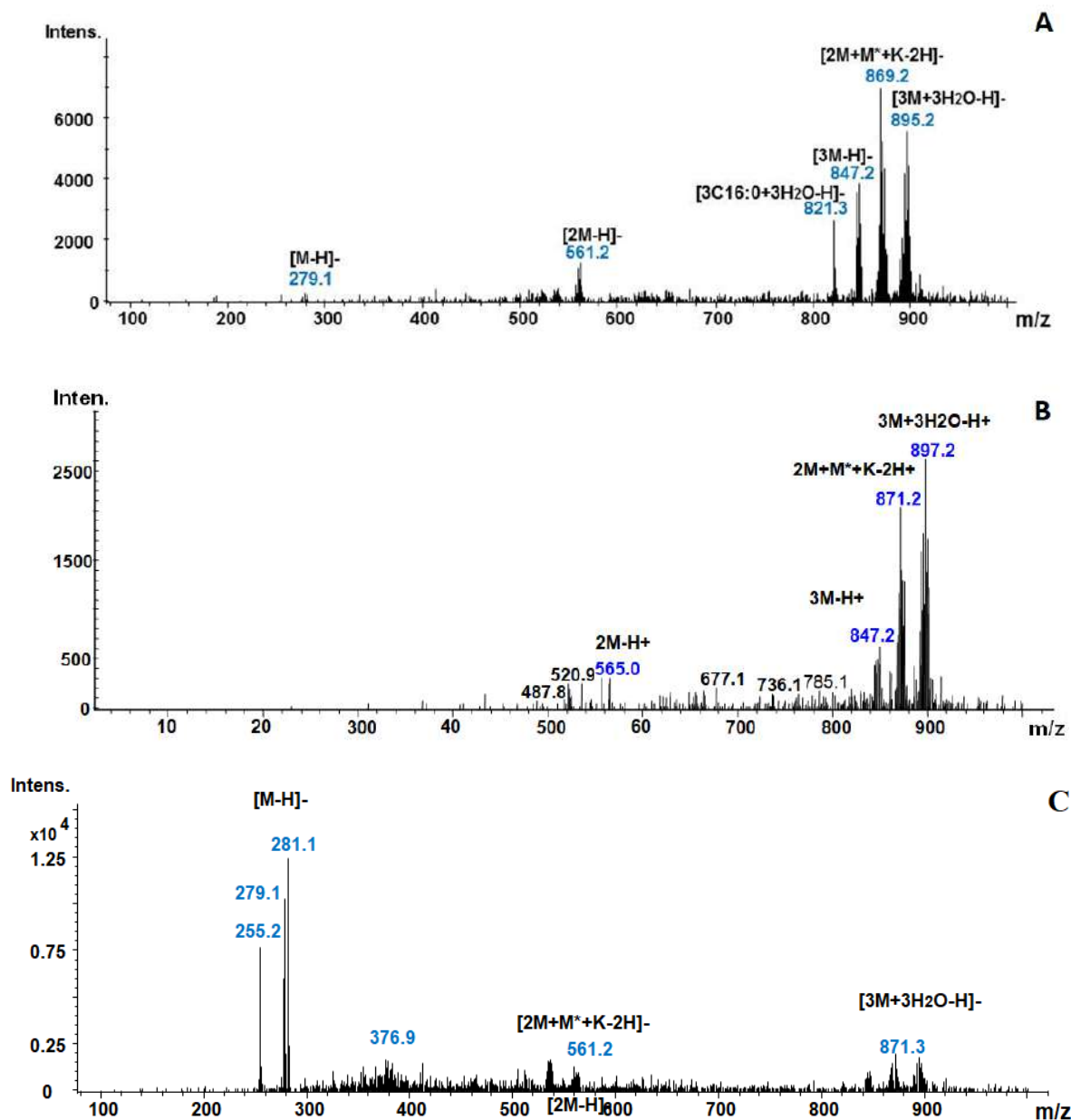
даже при очень низких энергиях активации, указывая на слабые ионные взаимодействия в агрегатах тримеров.



**Рис. 6.17** – Масс-спектры, полученные в отрицательном режиме ионизации с поверхности пленок Pd-NPs при анализе олеиновой кислоты и линолевой кислот: (А) полный скан, (В) CID пика  $m/z$  899; (С) полный скан линолевой кислоты MS, (D) CID  $m/z$  893. (CID = 1 эВ, лазер 45 %, концентрация аналитов, 200 ppm).

*Budimir* в своих экспериментах также описывали формирование гетеро-

димеров и гетеротримеров для смесей жирных кислот аналогично гетеротримерам, обнаруженным в масс-спектрах при ионизации с поверхности наночастиц благородных металлов, **Рис. 6.18А**.



**Рис. 6.18** – LDI масс-спектры смеси жирных кислот (C16:0, C18:0-C18:3), полученные в отрицательном режиме ионизации с поверхности оригинальных Pd-NPs (**А**), Ag-NPs (**В**) и модифицированных Pd-NPs, нагретых до 400 °С.

Важно отметить, что  $[3M+3H_2O-H]^-$  ионы образовывались независимо от природы использованных растворителей ( $CHCl_3$ , н-гексан, тетрагидрофуран или метанол), в которых растворяли образцы жирных кислот. Это наблюдение

предполагает непосредственное участие материала эмиттера ионов в процессе лазерной десорбции/ионизации и то, что гидратация анализируемого вещества происходит на поверхности пленки.[178]

Аналогичные закономерности ионизации были получены и с мишеней, модифицированных пленками Ag-NPs (Рис. 6.18В). Однако сигналы, записанные с поверхности Pd-NPs при ионизации жирных кислот, были более интенсивны и имели меньший химический фон, чем с поверхности мишеней на основе пленок Ag-NPs. Этот эффект, вероятно, связан с более низкой теплопроводностью Pd-NPs и меньшей фрагментацией аналитов при интенсивном локальном нагреве в местах воздействия лазера. Аналитически значимые закономерности, полученные с поверхности мишеней на основе оригинальных пленок Pd-NPs в обоих режимах ионизации, приведены в Табл. 6.7.

**Табл. 6.7** – Аналитические зависимости, полученные при определении жирных кислот (5 – 10000 нг/мкл) с поверхности мишеней на основе пленок Pd-NPs<sup>23</sup>

Ана-лит	Положительный режим ионизации			Отрицательный режим ионизации		
	$[M+K]^+$ $m/z$	$y = ax + b$	$R^2$	$[3M+3H_2O-H]^-$ $m/z$	$y = ax + b$	$R^2$
C16:0	295	$y=337x-5234$	0.996	821	$y=32.2x+3956$	0.924
C18:0	323	$y=852x+242123$	0.988	905	$y=613.8x+11128$	0.896
C18:1	321	$y=889x+57482$	0.942	899	$y=1554.9x+81590$	0.960
C18:2	319	$y=1402x+47094$	0.983	893	$y=538.5x+34615$	0.942
C18:3	317	$y=1055x+31104$	0.987	887	$y=164.8x+19780$	0.930

<sup>23</sup> Лазер 45%, ионные токи экстрагировали из ПС-хроматограмм.

Можно предположить, что наличие кластеров воды в масс-спектрах объясняется присутствием адсорбированной воды в слое электролитических наночастиц благородных металлов. Молекулы воды соосаждаются на поверхности Pd-NPs во время синтеза.[178]

Это предположение было подтверждено последующим экспериментом путем нагревания мишени на основе Pd-NPs до 400 °С в течение 3 часов. В результате происходило удаление молекул воды, физически адсорбированных в процессе электролиза на поверхности мишени. Анализ полученных масс-спектров для жирных кислот, ионизированных с такой модифицированной поверхности, выявил формирование иных типов ионов, см. **Рис. 6.18С** в сравнении с **Рис. 6.18А**. Интенсивность сигналов, связанных с образованием кластеров воды в области  $m/z$  800, снизилась на несколько порядков. В то же самое время в масс-спектрах визуализировались пики типа  $[M-H]^-$ . Проведенный эксперимент снова доказывает влияние химии поверхности эмиттера на тип формирующихся ионов в методе SALDI-MS, см. часть 5.4.3.

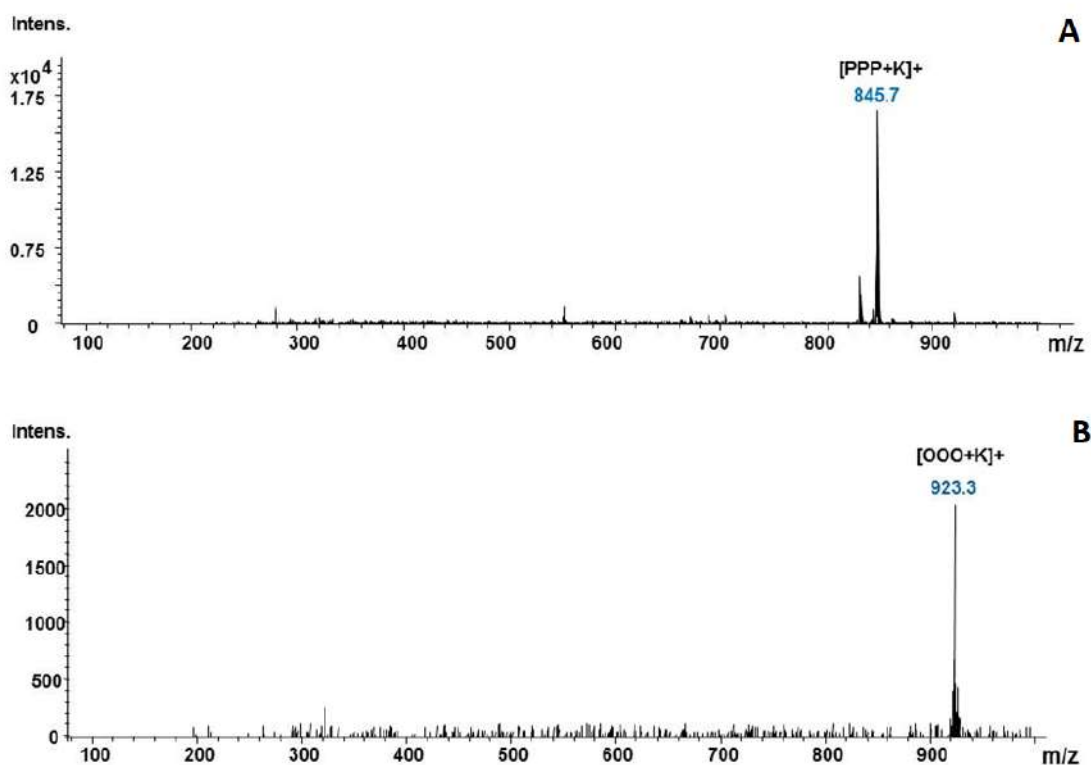
### **6.5.3 Ионизация триацилглицеридов (TAG) и растительных масел с поверхности электроосажденных пленок**

Далее исследовались пути ионизации TAGs (на примере трипальмитина, PPP, и триолеина, OOO) с поверхности наночастиц благородных металлов. В положительном режиме оба аналита визуализировались в виде  $[M+K]^+$  с минимальными фоновыми сигналами в диапазоне низких  $m/z$ , **Рис. 6.19**. При этом с помощью MALDI-MS не удалось получить в масс-спектре для PPP и OOO значимых и стабильных аналитических сигналов.

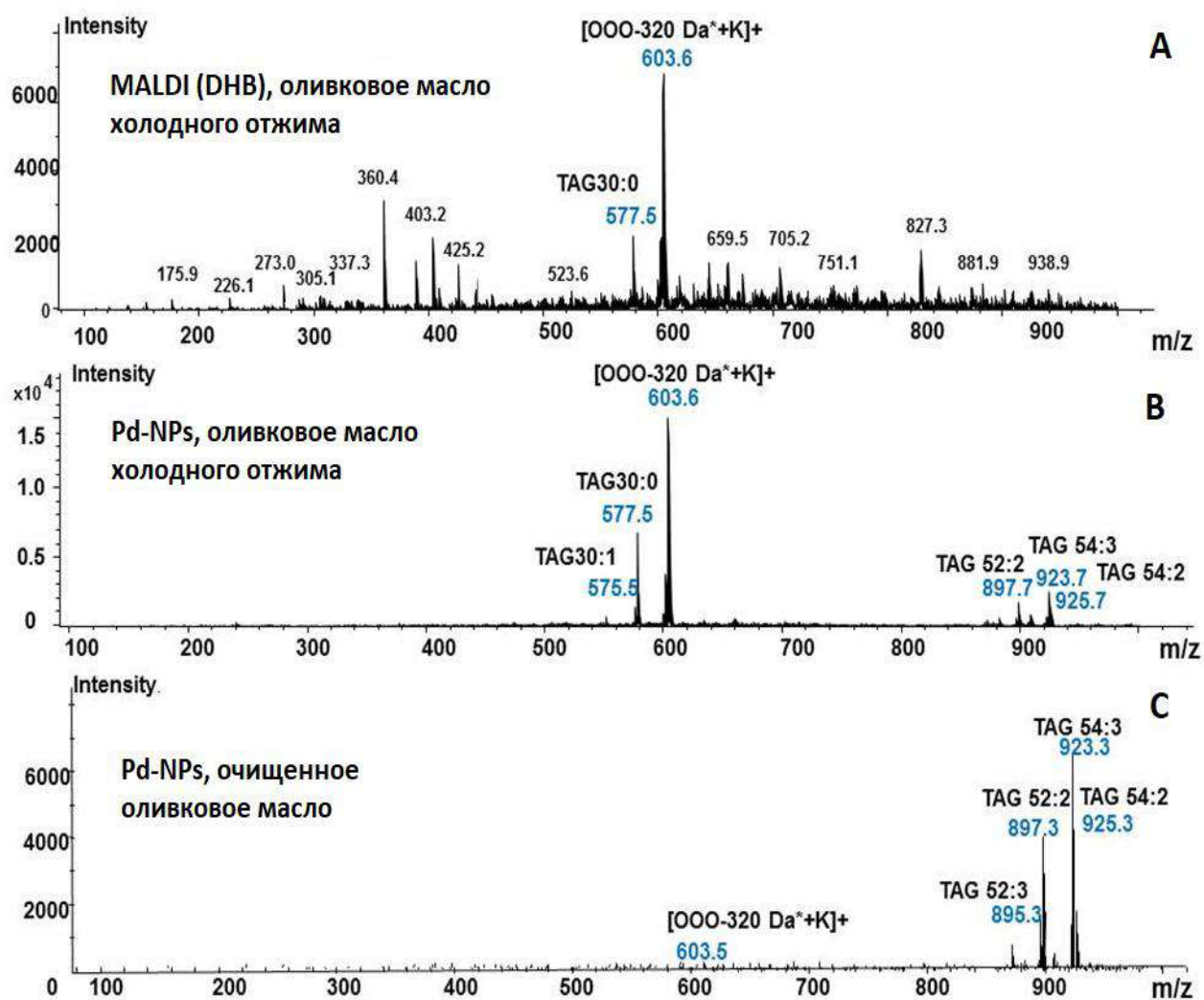
На следующем этапе тестировали масс-спектрометрическое поведение мишени на основе пленок Pd-NPs по отношению к более сложным анализам, содержащим смеси TAGs – растительным маслам. Исследовались следующие виды масел: оливковые масла, холодная экстракция (образец **I**) и оливковое масло для жарки (**II**); рапсовое масло, холодная экстракция (**III**) и очищенное масло (**IV**); подсолнечное масло, холодной экстракции (**V**), а также очищенное

(VI). Для всех образцов масел в масс-спектрах фиксировались ионы типа  $[M+K]^+$ .

Триацилглицериды и диацилглицериды (DAG) фиксировали в диапазоне от 30:1 (DAG, содержащий пальмитиновую и линолевую кислоты) до 54:2 (TAG, содержащий стеариновую и олеиновую кислоту, **Рис. 6.20**). Характеристические ионы тестируемых масел были представлены главным образом TAG 30:0, 30:1, продуктами деградации при  $m/z$  601 и 603, триолеином (ООО,  $m/z$  923) и OLL ( $m/z$  919, О-олеиновая кислота, L-линолевая кислота). Сигналы при  $m/z$  601 и 603 наблюдались только для образцов холодного отжима (группы **I, III, V**) и, вероятно, были вызваны термическим разложением (воздействие лазера).[306][307] Эти типы ионов либо совсем не наблюдали в масс-спектрах очищенных масел, либо интенсивность этих сигналов была минимальной, **Рис. 6.20**.



**Рис. 6.19** – Масс-спектры, полученные с поверхности Pd-NPs для стандартов TAGs в режиме положительной ионизации: (A) трипальмитин (PPP, 30 ppm); (B) триолеин (ООО, 10 мкл/мл); лазер 45%.



**Рис. 6.20** – LDI-MS мониторинг коммерческих растительных масел в положительном режиме ионизации: (A) MALDI (DHB матрица); (B, C) с поверхности пленок Pd-NPs.

При анализе рапсового масла в масс-спектре было обнаружено значительное количество TAG 54:3 ( $m/z$  923.3), 54:4 ( $m/z$  921.3), 54:5 ( $m/z$  919.3) (Табл. 6.8), в то время как для подсолнечного масла визуализировались TAG 54:5, 54:6, 54:4, 54:2. Поскольку на данном этапе исследования выборка образцов была небольшой, систематическое сравнение и интерпретация распределений TAGs здесь не предпринимались. Вариации TAGs, а также одновременные измерения других компонентов масла (например, фитостеролов), могут позволить использовать описанный способ SALDI для обнаружения фальсификаций образцов масел в будущем.

**Табл. 6.8** – Основные типы TAGs, обнаруженные в исследованных образцах масел в сравнении с литературными данными<sup>1</sup>

Образец масла	SALDI-сигнал/положительный режим ионизации			
	<i>m/z</i>	Типы TAG	Соотношение, %	Типовые значения, сообщаемые в литературе <sup>3</sup> , %
(I) Оливковое масло Холодная экстракция	575.5	TAG 30:1	9	-
	577.5	TAG 30:0	36	25
	601.6	LL <sup>2</sup>	11	15
	603.6	LO	54	46
	897.7		45	53
	923.7	TAG 52:2	100	73
	925.7	TAG 54:3 TAG 54:2	63	19
(II) Оливковое масло для жарки	899.3	TAG 52:1	25	
	897.3	TAG 52:2	58	
	895.3	TAG 52:3	20	
	919.3	TAG 54:4	27	
	923.3	TAG 54:3	100	
	925.3	TAG 54:2	62	
(III) Рапсовое масло Холодная экстракция	603.6	OO	22	
	893.3		18	
	895.3	TAG 52:4	23	
	897.3	TAG 52:3	24	
	919.3	TAG 52:2	82	
	921.3	TAG 54:5	90	
	923.3	TAG 54:4	100	
	925.3	TAG 54:3 TAG 54:2	36	
(IV) Рапсовое масло, очищенное	893.3	TAG 52:4	32	
	895.3	TAG 52:3	24	
	919.3	TAG 54:5	59	
	921.3	TAG 54:4	79	
	923.3	TAG 54:3	100	
	925.3	TAG 54:2	46	
(V) Подсолнечное масло, Холодная экстракция	601.3	LO	9	56
	603.3	OO	7	36
	895.3		32	18
	897.3	TAG 52:3	33	11
	917.3	TAG 52:2	82	38
	919.3	TAG 54:6	100	52
	921.7	TAG 54:5	72	47
	925.3	TAG 54:4 TAG 54:2	42	9

(VI)	893.7	TAG 52:4	34	
Подсолнечное	895.7	TAG 52:3	27	
масло,	917.7	TAG 54:6	96	
очищенное	919.7	TAG 54:5	100	
	921.7	TAG 54:4	59	
	923.7	TAG 54:3	28	

Примечания:

<sup>1</sup> TAGs обнаруженные методом MALDI.

<sup>2</sup> diacylglycerides (DAG): *L*-Linoleic, *O*-Oleic acid.

<sup>3</sup> сообщались в [306,307] как Na<sup>+</sup> аддукты против обнаруженных с помощью Pd-NPs K<sup>+</sup>- аддуктов.

Кроме того, жирные кислоты C18:0-C18:3 были обнаружены в оливковом масле холодного отжима (I), рапсовом (III) и подсолнечном (V). В очищенных маслах свободных жирных кислот (FFA) обнаружено не было, поскольку жирные кислоты присутствуют в детектируемых количествах только в необработанных образцах. Именно поэтому пробы очищенных масел использовали для демонстрации возможностей количественного определения методом LDI-MS с помощью мишеней-эмиттеров на основе пленок наночастиц благородных металлов.

С этой целью к образцам рафинированного рапсового масла добавляли известное количество жирных кислот в диапазоне от 0.5 до 2%, Табл. 6.9. Полученные зависимости могут быть использованы для количественного определения FFA в образцах масел с точностью ~15%.

**Табл. 6.9** – Данные количественного определения жирных кислот с помощью мишени на основе пленки Pd-NPs (n = 3)

Добавка	Положительный режим ионизации			Предел обнаружения (добавка FFA), %	RSD, %	Валидация*	
	[M+K] <sup>+</sup> m/z	y = ax + b	R <sup>2</sup>			Введено, %	Найдено*, %
C18:1	321.0	y=2083.5·x – 64.5	0.997	0.2-4	6	2.0	1.79±0.03
C18:2	319.0	y=4452.5·x – 95.2	0.998	0.2-4	12	2.0	1.86±0.05
C18:3	317.0	y=1651.5·x + 89.5	0.992	0.2-4	14	2.0	1.98±0.08

\*Примечание: показано только для 2% кислот, добавленных в рапсовое масло.

Таким образом, предложен быстрый подход профилирования образцов



масел с помощью мишеней на основе пленок Pd-NPs. Помимо прочего, способ позволяет получить масс-спектры без каких-либо интерференционных ионов в диапазоне низких  $m/z$ . Ионизация в положительном режиме приводит к формированию простых катионизированных видов типа  $[M+K]^+$  для всех исследованных соединений, тогда как анионообразование с поверхности синтезируемых пленок протекает по более сложному механизму. В частности, тримерные кластерные анионы были зафиксированы исключительно в масс-спектрах свободных жирных кислот. Необычное кластерообразование было связано с физически-адсорбированными молекулами воды, которые «внедряются» в структуру пленок гальванических наночастиц во время их синтеза.

Подытоживая все выше сказанное, следует отметить, что после минимальной пробоподготовки образцов (разбавление), используя метод SALDI-MS на основе гальванических пленок успешно был проведен как скрининг широкого спектра растительных масел по TAGs составу, так и количественное определение жирных кислот.

#### **6.5.4 Скрининг образцов молока с помощью мишеней на основе гибридных пленок**

Молоко и пищевые продукты на его основе являются важными питательными компонентами, поэтому обнаружение минимальных чужеродных примесей необходимо для их быстрого скрининга. Производители и покупатели молочных продуктов получают преимущества в случае разработки быстрого, простого и надежного способа скрининга и профилирования стандартов молока.[308]

В следующем наборе экспериментов молоко из местного супермаркета было протестировано на гибридных металл-полупроводниковых мишенях-эмиттерах. Вследствие гидрофильности этих образцов (в противоположность анализу растительных масел) было решено формировать наночастицы благородных металлов на пленках пористого алюминия (ААО). В этом случае

происходило частичное растекание капли по поверхности гибридной пленки и образец полностью покрывал мишень, что обеспечивало формирование его аморфного слоя.

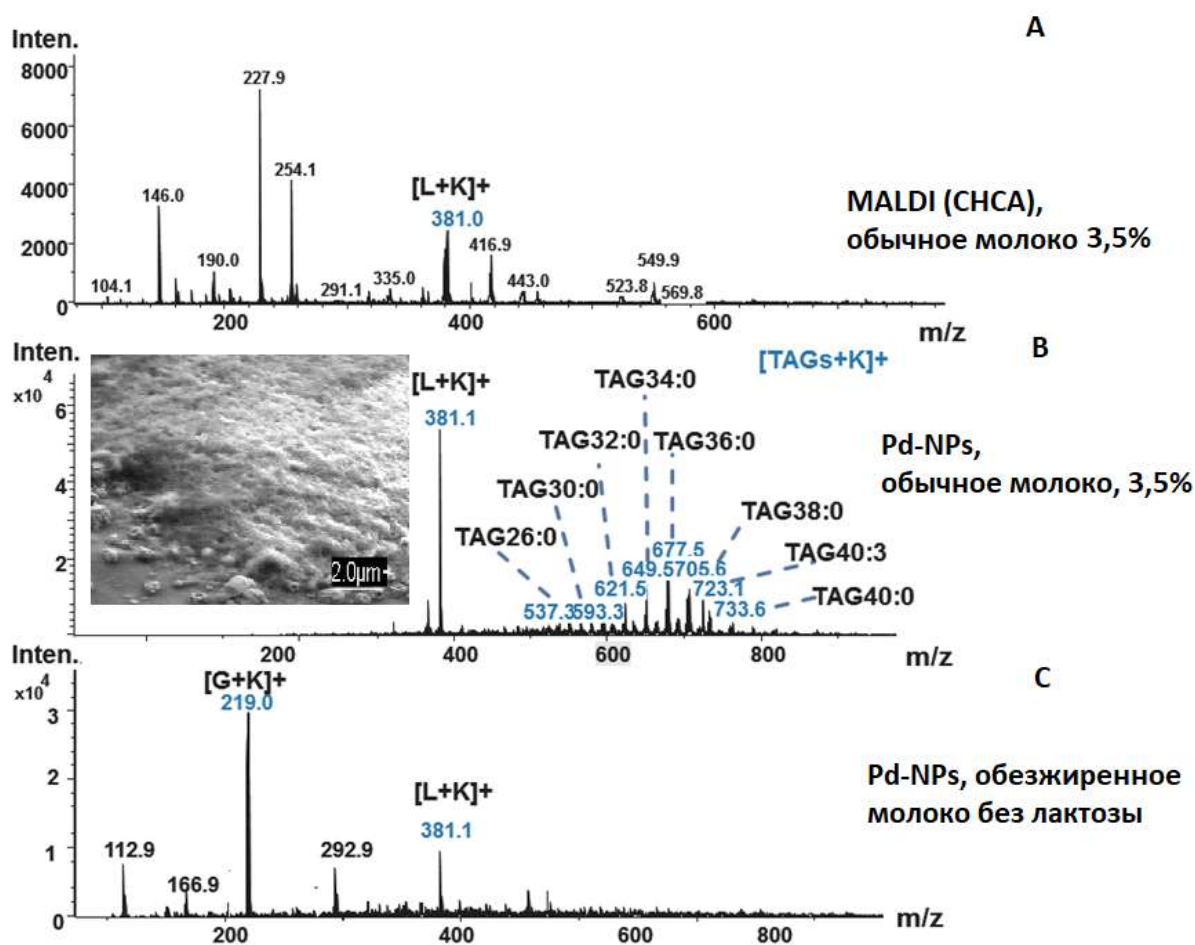
Гибридная мишень на основе пленки ААО+Pd-NPs показала лучшие сигналы по сравнению с аналогичными мишенями на основе DIOS+Pd-NPs. Для обычного молока, с поверхности гибридной ААО+Pd-NPs пленки в режиме положительной ионизации, помимо наиболее интенсивного пика при  $m/z$  381, соответствующего аддукту калия и лактозы ( $[L+K]^+$ ) без каких-либо интерференционных ионов в диапазоне низких масс, были обнаружены характерные «отпечатки» молочных липидов, **Рис. 6.21**.

«Отпечатки пальцев» липидов молока в обычном образце были представлены в основном аддуктами калия триацилглицеридов (TAG) в диапазоне от TAG 26:0 до TAG 40:0. «Вклад» TAGs типа ( $[TAG +K]^+$ ), найденных для обычного молока был в согласии с их типичным уровнем распределения.[308][309]

Следует отметить, что «отпечатки пальцев» молочных жиров были обнаружены только на металл-полупроводниковых мишенях, **Рис. 6.21В**. Методом MALDI-MS (CHCA матрица) в положительном режиме ионизации для обычного молока в масс-спектрах был зафиксирован лишь лактозный калиевый аддукт при  $m/z$  381 =  $[L+K]^+$ . Аналогичные данные были получены с мишеней, покрытых индивидуальными пленками Pd-NPs, см. **Приложение Рис. П6**. Практически никакой реакции на тестируемый продукт не было получено с поверхности эмиттеров на основе индивидуальных DIOS или ААО пленок.

При обнаружении молочных липидов LDI-сигнал с высокой интенсивностью был получен с поверхности гибридных мишеней на основе пленок ААО+Pd-NPs, что может быть объяснено с точки зрения улучшенного распределения образца по поверхности. Так, например, образец молока, помещенный на поверхность мишени с пленкой ААО+Pd-NPs, занимал

площадь диаметром всего 2 мм. Сигналы же с поверхности DIOS+Pd-NPs были менее выраженными: для молока, разбавленного в метаноле и нанесенного на гибридную DIOS+Pd-NPs мишень, наблюдалось распространение аморфного слоя с диаметром капли после растекания более 10 мм, что приводило к меньшей концентрации аналита на облучаемой лазером области. Влияние концентрации аналита приводит к различной интенсивности десорбции и ионизации во время лазерного облучения.



**Рис. 6.21** – Масс-спектры, полученные в положительном режиме ионизации для обычного молока жирностью 3.5% (А,В) и обезжиренного молока без лактозы (С). *Примечание:* TAG – триацилглицериды, L – лактозы, G – глюкоза.

Далее мишень на основе ААО+Pd-NPs применили для скрининга

безлактозного обезжиренного образца. Такой продукт производители обычно предлагают для людей с симптомами непереносимости лактозы (дефицита фермента лактазы в организме).

При анализе безлактозного продукта в масс-спектре появлялся новый пик при  $m/z$  219.0, который соответствовал калиевому аддукту глюкозы ( $m/z$  219.0 = [G+K]<sup>+</sup>), **Рис. 6.21С**. В то же самое время по сравнению с образцом обычного молока никаких ионов, относящихся к молочным липидам, в масс-спектре не наблюдалось, а интенсивность пика при  $m/z$  381 = [L+K]<sup>+</sup> была меньше в 6 раз.

Полученные результаты были в согласии с коммерческой стратегией: чтобы избежать негативных симптомов со стороны пищеварительной системы у людей с непереносимостью лактозы, производители молока добавляют в безлактозное молоко фермент лактазу, что также делает молочный вкус слаще (фермент лактаза расщепляет лактозу до глюкозы). Кроме того, для снижения активности фермента лактазы и увеличения сроков хранения продукта, производители ультра-пастеризуют молоко, что приводит к уменьшению содержанию молочных жиров, см. **Рис. 6.21С**.

Таким образом, без проведения сложной предварительной обработки образца подход, основанный на использовании гибридной мишени с пленкой ААО + Pd-NPs, позволил провести скрининг образцов молока в течение 5 мин. Простота способа делает его привлекательным аналитическим инструментом для определения эффективности и полноты проведения технологического процесса, а также для обнаружения фактов фальсификации молочных продуктов.

## **6.6 Мишени-эмиттеры на основе гибридных MALDI/SALDI пленок**

Простая функционализация и настройка поверхностной химии наночастиц привели к разработке целой серии новых сенсорных платформ на их основе.[310][94] Примечательно, что наночастицы благородных металлов уже были предложены в качестве своеобразных гибридных капсул для

хранения, контролируемого высвобождения и определения малых биомолекул.[311] Для контроля эффективности инкапсуляции малых биоаналитов вместе с наночастицами применяют метод MALDI-MS.[312]

MALDI-MS обладает превосходной чувствительностью и скоростью анализа не только для ионных соединений, таких как белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, но также и для неионных соединений, в *т.ч.* липиды. Поскольку метод позволяет обнаруживать биоаналиты в широком диапазоне масс, он широко используется в различных областях химии, биологии и фармацевтике. Однако применение MALDI для определения малых молекул (< 700 Да) все еще остается большой проблемой из-за интерференции со стороны используемых матриц в области низких масс и присутствия эффекта «сладких пятен»/«sweet spot phenomenon».[313]

В основе эффекта «сладких пятен» лежит образование неоднородных и различных полиморфных кристаллических структур, формирующихся в процессе нанесения аналита совместно с матрицей методом капли. В результате наблюдается различная эффективность ионизации аналита с сильной вариацией интенсивности MS-сигнала от пятна к пятну.[314][203] Именно поэтому в последние годы при определении малых биомолекул все больше внимания уделяется безматричным методам анализа, примером которых является SALDI-MS. Тем не менее, применение наноматериалов в качестве матрицы для лазерной десорбции/ионизации является неким видом искусства, в том числе из-за множества факторов, влияющих на процессы лазерной десорбции/ ионизации с поверхности наноструктур.[315] Кроме того, SALDI-MS не может конкурировать с технологией MALDI из-за сложного синтеза наноструктур, где даже незначительные изменения в морфологии или химии поверхности пленки могут резко повлиять на поведение системы и, таким образом, на общий MS-отклик. Кроме того, MS-спектры, полученные с поверхности наноструктур, в основном представлены аддуктами натрия или калия по сравнению с простыми протонированными

видами, генерируемыми в MALDI-MS.[316] В этой связи, можно предположить, что сочетание эффективности ионизации матриц MALDI с прогрессом в нанотехнологии и наноматериалах, связанным с достижением высокого отношения поверхности к объему и воспроизводимой морфологии, поможет преодолеть феномен «сладких пятен», который обычно наблюдается в методе MALDI-MS как результат образования макро-кристаллов. Такой комбинированный подход позволит соосаждать малые органические соединения при электролизе вместе с наночастицами благородных металлов.

Соосаждение MALDI матриц или других низкомолекулярных соединений, которые способны образовывать промежуточные комплексы в растворах смешанных электролитов с катионами благородных металлов, ведет к образованию гомогенного адсорбционного слоя на поверхности подложки. Последующая обработка такой гибридной поверхности лазером приведет к высвобождению MALDI матриц и переносу протона.

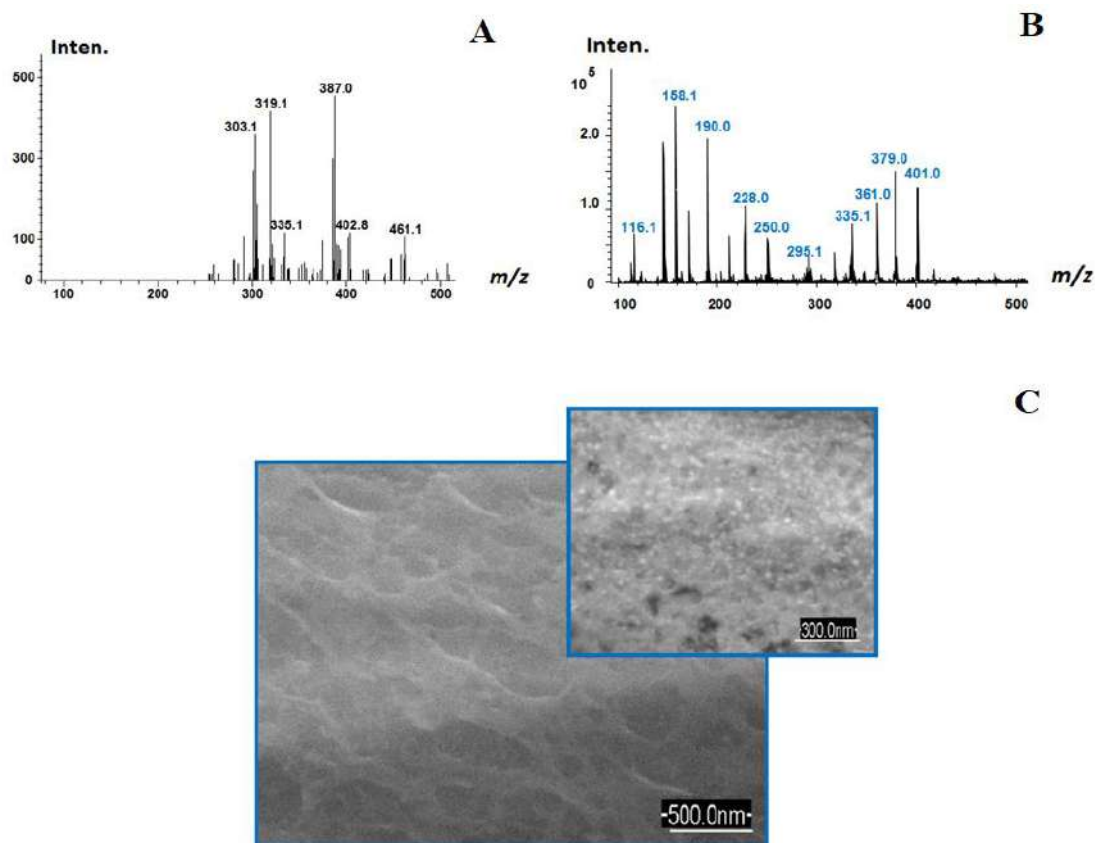
### **6.6.1 Электроосаждение MALDI матриц в отсутствие полимерного компонента**

Для тестирования предложенного способа, использовали несколько MALDI матриц, а именно СНСА и FCCA. Соосаждение СНСА и FCCA осуществляли методом гальванического нанесения (см. Главу 2). Примечательно, что соосаждение проходило в отсутствие биополимерного компонента и формирование в растворах синтеза биокластерных структур по алгоритму, приведенному в Главе 3, не происходило.

Перед соосаждением была оптимизирована концентрация MALDI матриц в растворе электролитов. Экспериментально установлено, что концентрация MALDI-матриц в электролите, которая требуется для проведения эффективного соосаждения в капле, не должна быть менее 1000-2000 ppm.

В следующем наборе опытов были оптимизированы параметры гальванического нанесения (ток ( $I_k$ ), время осаждения ( $t_{э.л}$ ) и pH электролита).

Интересно, что сосаждения MALDI матриц (производные коричных кислот, малые органические молекулы) не происходило при высоких значениях тока и нейтральных рН, см. **Рис. 6.22А**.



**Рис. 6.22** – Масс-спектры, полученные с поверхности гибридных пленок (показано на примере *CHSA*), синтезированных при одинаковом времени осаждения 30 с, но разных плотностях токах: **А)** -100 мА; **В)** -10 мА. SEM-изображение (**С**) поверхности гибридной Pd-NPs/*CHSA* пленки.

Осаждение MALDI матриц (*CHSA* в качестве примера) с Pd<sup>2+</sup> наблюдали при токах ниже -10-15 мА, **Рис. 6.22В**. Важно отметить, что в этом случае происходило формирование адсорбционного слоя ОНГ пленки на поверхности мишени (**Рис. 6.22С**) в противоположность капсульной модели функционального слоя, сформированного из растворов синтеза, содержащих биополимерный компонент, см. Главу 3.

Триггером, обеспечивающим контролируемый «выпуск» сосажденных

матриц (CHCA), должен явиться лазерный импульс по аналогии с идеологией, оптимизированной ранее для термо-зависимых процессов.[317]

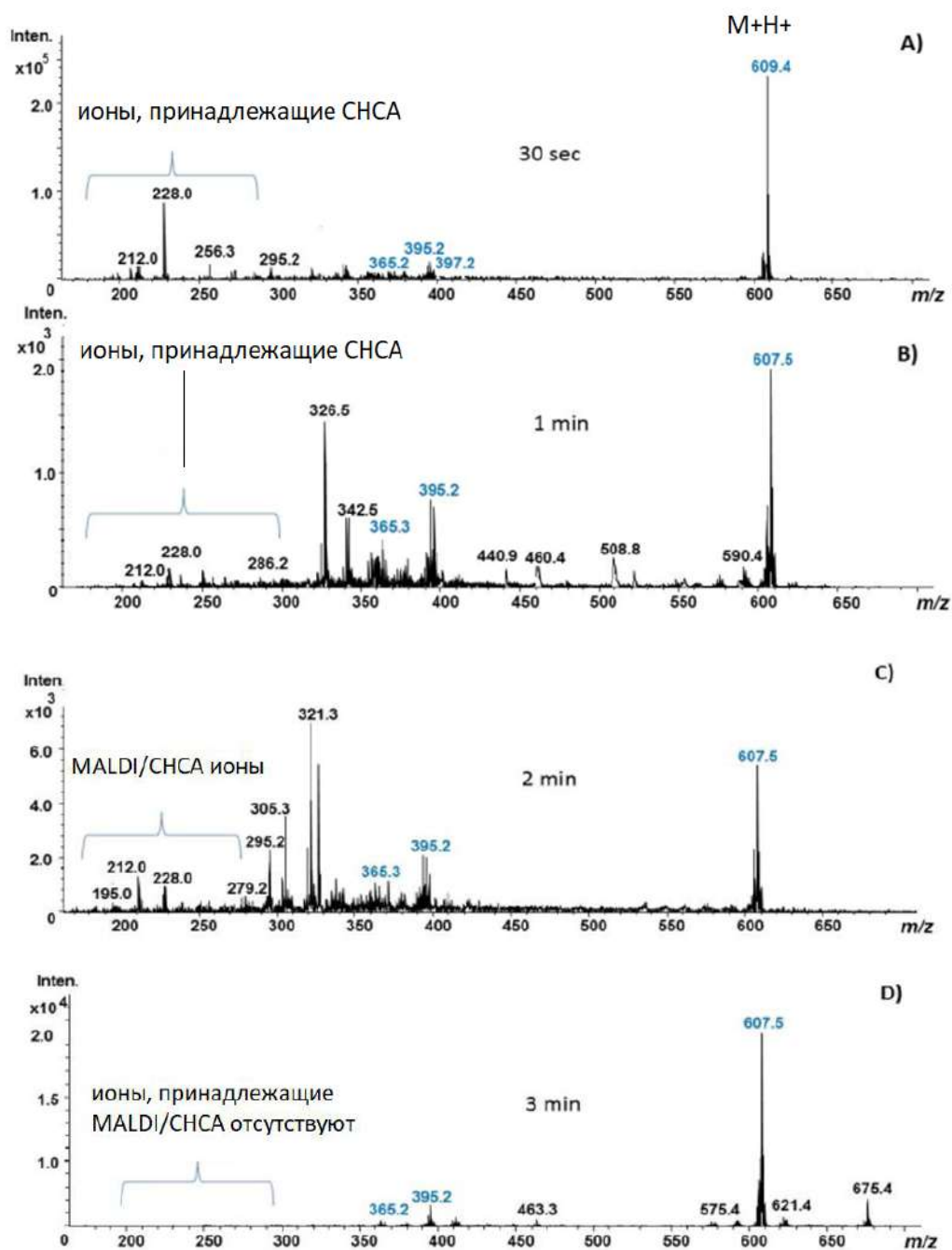
На следующей стадии испытывалась эффективность ионизации полученных гибридов с соосажденной органической матрицей для обнаружения малых биомолекул. Для этой цели 1 мкл небольшого лекарственного препарата резерпина ( $m/z$  608) помещали на поверхность гибридной мишени. Несмотря на простоту процедуры соосаждения, масс-спектры, полученные для резерпина с поверхности такой гибридной мишени, были достаточно высокого качества.

Как только лазерный луч попадает на гибридные мишени-эмиттеры, полученные при продолжительности электролиза 30 с и 2 мин, ионы, типичные для CHCA при  $m/z$  211.0 и 228.0 и соответствующие  $[\text{CHCA}+\text{Na}]^+$  и  $[\text{CHCA}+\text{K}]^+$  аддукты были зарегистрированы в масс-спектрах (Рис. 6.23, А-С). Кроме того, с поверхности этих мишеней при определении резерпина в режиме положительной ионизации были получены типовые пики, соответствующие его протонированной форме при  $m/z$  609.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Увеличение времени осаждения с 1 до 2 мин сопровождалось сдвигом основного пика с  $m/z$  609.4 до  $m/z$  607.4 и потерей 2 Да от иона-предшественника  $[\text{M}+\text{H}]^+$  из-за окисления резерпина [21]. Дальнейшее увеличение времени осаждения до 3 мин приводило к исчезновению сигналов, связанных с MALDI (Рис. 6.23D).

В этом случае пик резерпина регистрировали при  $m/z$  607.4 со значительно меньшей интенсивностью ( $10^4$ ) по сравнению с образцами, где было выражено присутствие ионов MALDI. Этот факт объясняется с точки зрения формирования «чистого» слоя Pd-NPs, который, возможно, маскирует предварительно сформированный тонкий слой гибридных Pd-NPs/CHCA.

Эта серия экспериментов подтвердила, что дизайн гибридных MALDI/SALDI мишеней определяет их аналитические свойства.





**Рис. 6.23** – Масс-спектр 30 нг/мкл резерпина, записанный с поверхности гибридной MALDI/SALDI мишени с сосажденной матрицей CHCA. *Примечание:* параметры электролиза: (A)  $I_k = -10$  мА,  $t_{эл} = 30$  с; (B)  $I_k = -10$  мА,  $t_{эл} = 1$  мин; (C)  $I_k = -10$  мА,  $t_{эл} = 2$  мин; (D)  $I_k = -10$  мА,  $t_{эл} = 3$  мин.

Следует подчеркнуть, что предложенная методология позволяет осуществлять одностадийное сосаждение, хранение и контролируемое высвобождение низкомолекулярных органических соединений, что

потенциально полезно для разработки количественных подходов в методе MALDI.

Преимущества представленного способа формирования MALDI/SALDI мишеней-эмиттеров можно суммировать следующим образом: простой, быстрый и недорогой способ синтеза гибридных мишеней-эмиттеров (1); полностью автоматически контролируемый процесс (2); отсутствие стабилизаторов (3); адаптированная и воспроизводимая морфология поверхности (4); химическая стабильность в процессе хранения сформованных ОНГ (5); формирование однородного ОНГ гибридного слоя наночастиц (6); со-осаждение MALDI совместно с наночастицами благородных металлов с последующим MS-анализом целевых биоаналитов обеспечивает формирование  $M+H^+$  типов ионов в масс-спектрах (7); высокая воспроизводимость синтеза от партии к партии (8); многообразие использования гибридных мишеней-эмиттеров открывает возможности для экспресс-биоанализа (9); универсальность той же стратегии при соосаждении широкого спектра матриц MALDI (10); за счет уменьшения эффектов «сладких пятен» предлагаемая стратегия соосаждения поможет улучшить количественные аспекты MALDI-MS в будущем (11).

### **6.7 Применение одностадийной методики при формировании ОНГ пленок сорбентов для систем газового анализа**

Одной из приоритетных задач микроаналитических систем газового анализа типа «E-Nose» является формирование массива сенсоров под требования аналитической задачи. При этом особое внимание уделяется сенсорным покрытиям поверхности трансдюсеров и стадии формирования функциональных пленок. При нанесении полимерных пленок на поверхность масс-метрических пьезокварцевых преобразователей в основном используют метод капли. Однако этот метод нанесения пленок не является оптимальным. Так, например, сообщалось о многочисленных трещинах и дефектах в полимерных пленках и неравномерной поверхности после их нанесения, что

неизбежно влечет за собой высокие погрешности при анализе равновесных газовых фаз проб.[318][319][320][321] Метод парофазной модификации в парах полимерных сорбентов также не позволил полностью решить эту проблему.[322]

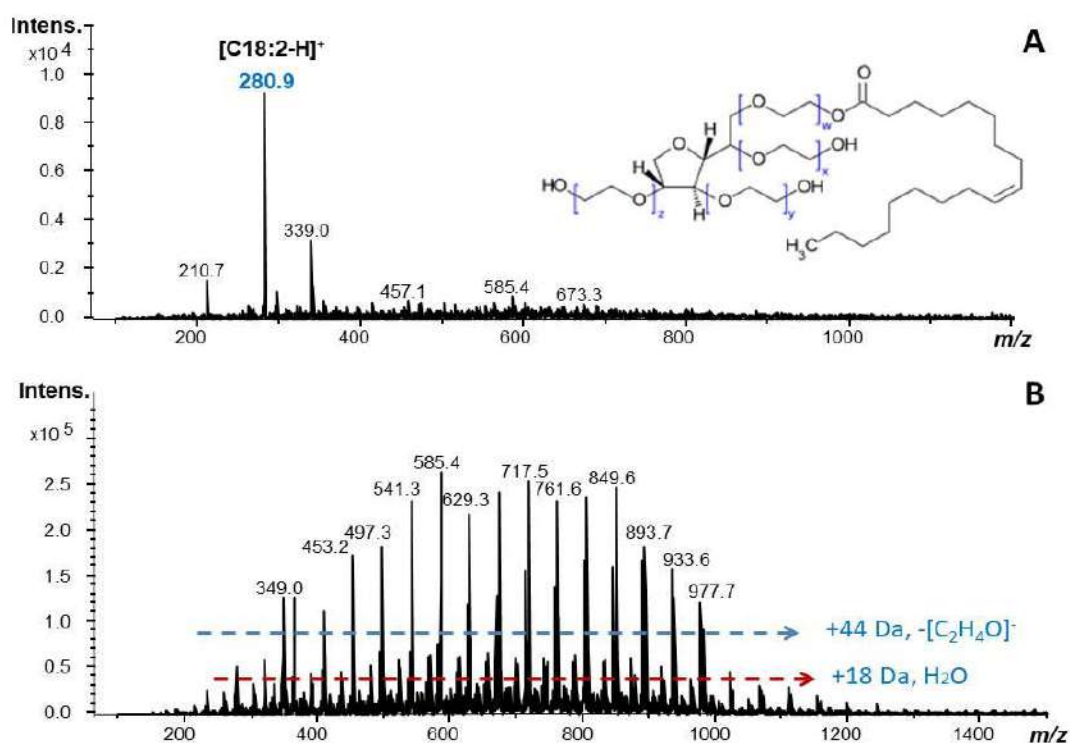
Ранее было предложено использовать индивидуальные пленки на основе наночастиц палладия и серебра в качестве носителей-трафаретов неподвижной фазы (сорбента) при формировании функциональных пленок в методе пьезокварцевого микровзвешивания.[323] Этот способ хорошо зарекомендовал себя при формировании стабильных подложек-трафаретов для их последующего заполнения полимером, что существенно увеличивает воспроизводимость нанесения чувствительной полимерной пленки (сорбента) и снижает вероятность ее произвольного растекания. Однако этот способ все-таки не позволил полностью решить известную проблему метода, связанную с неоднородностью формирования чувствительных слоев полимерных сорбентов на поверхности пьезокварцевых электродов.

В этой связи метод одностадийного формирования ОНГ пленок из смешанных растворов электролитов (см. **Главы 2,3**) адаптировали для нанесения полимерных сорбентов на поверхность пьезокварцевых преобразователей. При исследовании возможности нанесения сорбентов по предложенной одностадийной методике в качестве тестируемых соединений использовали следующие хроматографические фазы: Тритон X-100, Tween-80 и полиэтиленгликоль-3500 (PEG-3500). Все эти полимеры традиционно применяются в качестве сенсорных покрытий электродов пьезорезонаторов.

Tween 80 (polysorbate) в качестве гидрофильных групп содержит полиоксиэтиленовые группы. На основе закономерностей, показанных для ОНГ методом LDI-MS сканирования в Главе 2 (**Рис. 2.15** для Тритона X-100, который также содержит полиоксиэтиленовые группы), можно предположить, что при правильном выборе условий электроосаждения из смешанных растворов электролитов в масс-спектре будут визуализироваться фрагменты

полиоксиэтиленовых групп. Этот факт можно использовать как доказательство успешного нанесения полимерной нанопленки на поверхность пьезокварцевого электрода.

Теоретическое предположение было подтверждено на практике после соосаждения 2.5% раствора Tween-80 совместно с Ag-NPs (Рис. 6.23). При использовании менее концентрированных растворов сорбентов формирование функциональной пленки по предложенной методике не наблюдалось.

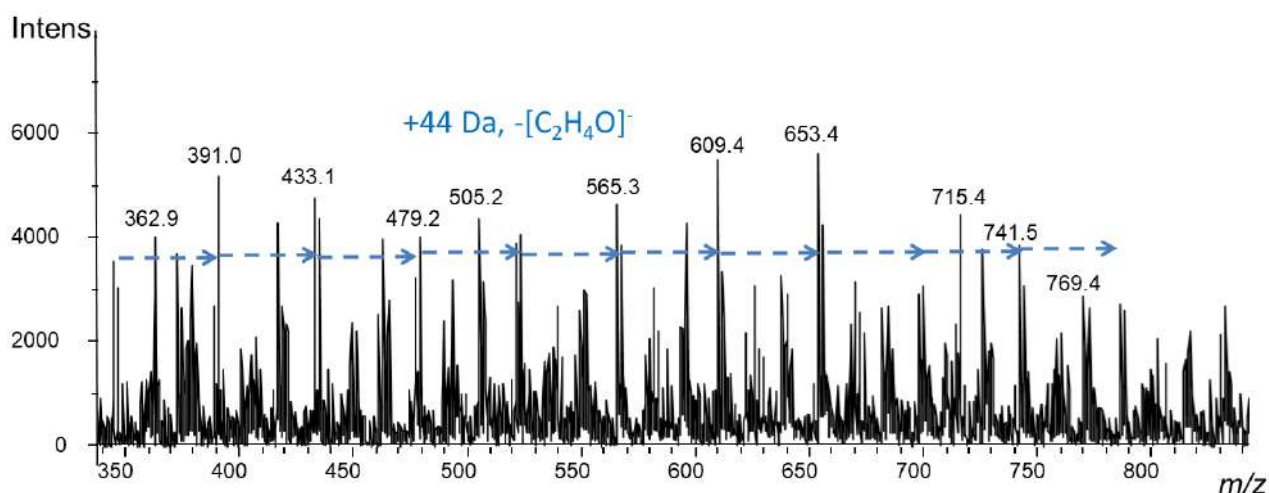


**Рис. 6.24** – Масс-спектры, записанные в отрицательном (А) и положительном (В) режиме ионизации с поверхности пьезосенсоров с пленками на основе Ag-NPs+Tween 80 (электроосаждение из 2.5 % раствора). Режим электролиза:  $I_k = -2.5$  мА,  $t_{el} = 60$  с.

В отрицательном режиме ионизации основным типом ионов в масс-спектре были остатки жирных кислот типа C18:2 и C18:0, что также сообщается при ионизации в электроспрее раствора-стандарта Tween-80.[324] Кроме того, в масс-спектрах визуализируются четкие кластеры воды,

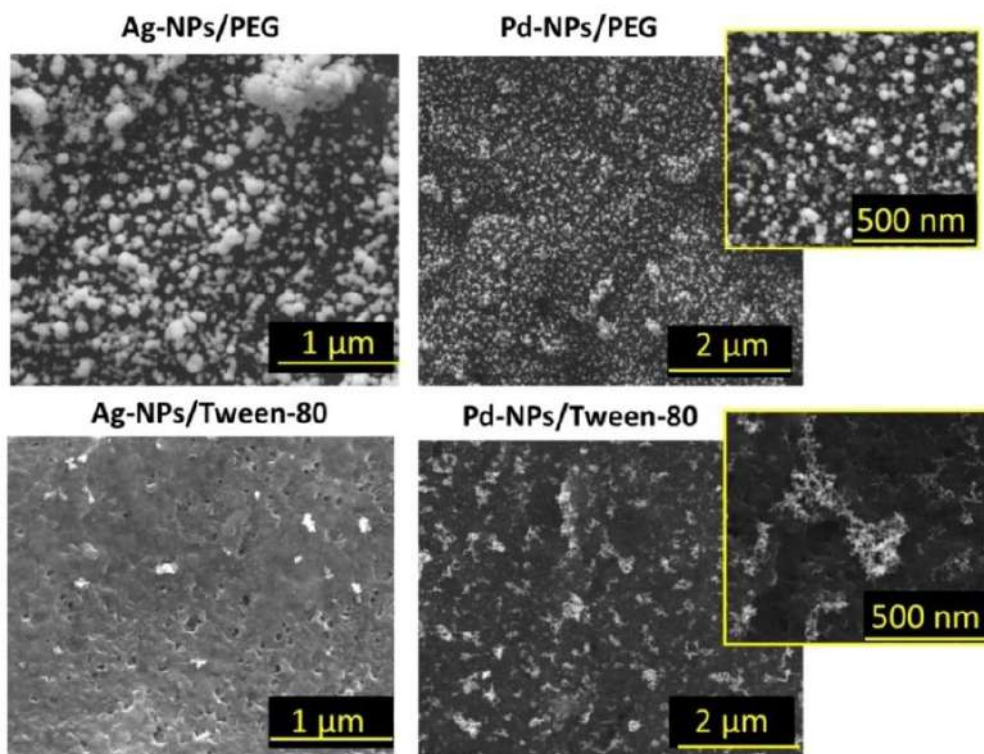
вероятно, из-за легкой потери воды в источнике ионизации из протонированных молекул и специфических фрагментов сложных эфиров жирных кислот.[324] Аналогичные закономерности были получены и для 2.5% раствора Tween-80, соосажденным совместно с Pd-NPs (см. **Приложения, Рис. П6.10**).

По предложенной методике также удалось обеспечить соосаждение PEG-3500. В масс-спектрах, снятых с поверхности пьезокварцевых преобразователей, модифицированных пленками ОНГ на основе PEG-3500-Ag-NPs, идентифицировались все характерные для этого полимера типы ионов, см. **Рис. 6.25**.[325]



**Рис. 6.25** – Масс-спектры, записанные в положительном режиме ионизации с поверхности пьезосенсоров с пленками Ag-NPs+PEG-3500, полученными электроосаждением из 2.5 % раствора PEG-3500,  $I_k = -2.5$  мА,  $t_{el} = 60$  с.

По данным сканирующей микроскопии выявлено образование «двойного» ОНГ слоя (**Рис. 6.26**) на поверхности пьезорезонаторов, один из которых, более светлый соответствуют полимерному компоненту, а второй – наночастицам, предотвращающим интенсивное вымывание и деградацию полимерной пленки при последующем тестировании сенсора в парах аналитов.

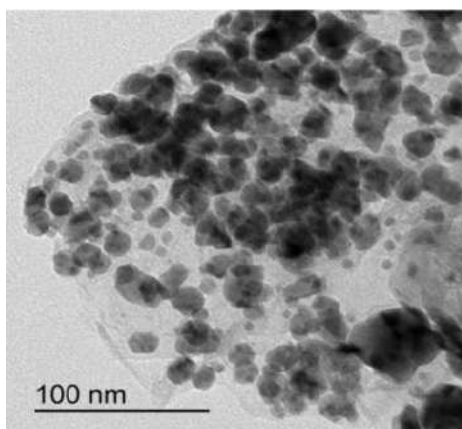


**Рис. 6.26** – SEM микрофотографии, полученные с поверхности пьезосенсоров на основе одностадийных полимер-неорганических гибридных пленок. *Примечание:* в двухкомпонентном смешанном растворе электролита формируются кластеры типа прекурсор полимера-Pd<sup>2+</sup> и прекурсор полимера-Ag<sup>+</sup> с их последующим осаждением на электрод.

На основании данных ПЭМ можно с уверенностью судить о формировании функциональной пленки адсорбционного типа при электроосаждении из смешанных растворов электролитов, содержащих полимер и прекурсоры ионы благородных металлов, **Рис. 6.27**.

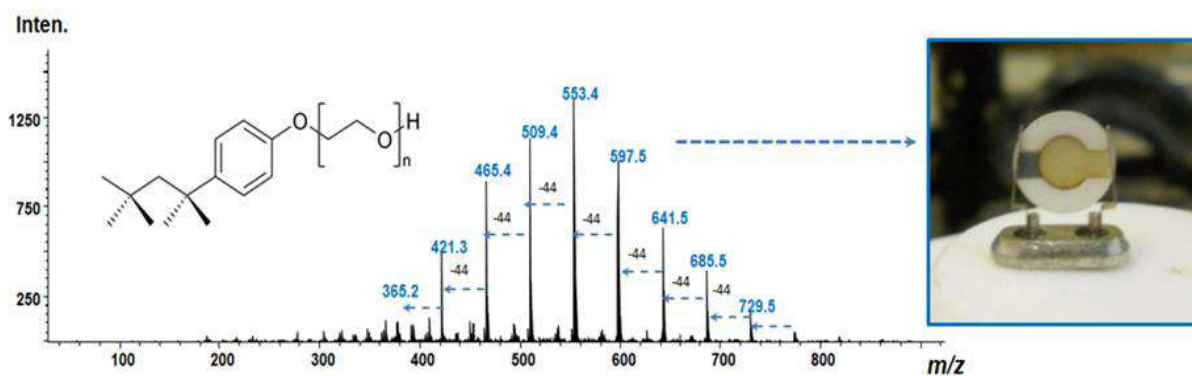
Сформированные гибридные пленки характеризуются гомогенностью ОНГ профиля, и этот факт определенно положительно скажется на воспроизводимости результатов газового анализа. Увеличивая концентрацию полимерного компонента в растворе электролита при аналогичных режимах поляризации возможно формирование пленок разной толщины и массы. Этот

факт позволяет выполнять программированную настройку систем газового микроанализа под требования аналитической задачи.



**Рис. 6.27** – ПЭМ микрофотография, полученная с поверхности пьезорезонатора с пленкой Ag-NPs+PEG-3500.

Таким образом, путем внедрения предложенной методологии одностадийного формирования ОНГ возможно в значительной степени решить вопрос с неоднородным образованием функциональных пленок сорбентов на поверхности пьезокварцевых резонаторов, **Рис. 6.28**.



**Рис. 6.28** – Масс-спектр, полученный с поверхности пьезокварца, модифицированного ОНГ (Ag-NPs + Triton X-100). *Примечание:* методологическая часть (не вошедшая в эту работу), включая разработку новых типов функциональных пленок и трафаретов на основе наночастиц благородных металлов, а также инновационные подходы к нанесению сорбентов на электроды пьезорезонаторов, и способы определения

легколетучих соединений в газовых смесях с помощью пьезосенсоров, разработаны при непосредственном участии автора этой работы.

## 6.8 Выводы к Главе 6

1. Предложен подход к конструкции одноэлектродных амперометрических нанобиосенсоров для модульного биокатализа. В качестве примера разработан модульный нанобиосенсор для мультиплексного детектирования L-лактата, D-глюкозы, пероксида водорода и глутаральдегида.

2. В сложных ферментативных средах чувствительность и специфичность анализа биоаналитов достигаются за счет использования ферментов. Электрокаталитическая избирательность неферментных наночастиц благородных металлов к определенным классам биомолекул в присутствии мешающих электроактивных компонентов связана с энергиями адсорбции ( $E_{ads}$ ) аналитов. Варьируя pH раствора и изменяя аналитическую форму аналита на электроде, а также химический состав поверхности электроосажденных наночастиц, возможно направленно изменять  $E_{ads}$ , а, значит, управлять чувствительностью электроанализа.

3. Предложенная одностадийная методика синтеза функциональных ОНГ пленок из растворов смешанных электролитов была апробирована при синтезе электродов с иммобилизованными кофакторами. Соосаждение кофакторов в биохимически активных формах позволило реконструировать структуру апо-ферментов в холо-форму непосредственно на электроде.

4. На основе разработанных нанобиосенсоров с ОНГ пленками предложен способ экспресс-определения (90 с) глюкозы в ферментативных средах при культивации дрожжей *S. Cerevisiae*. Определение возможно в широком динамическом диапазоне от 200  $\mu$ M до 30 mM, правильность определения  $101.3 \pm 1.5\%$ . Способ характеризуется высокой воспроизводимостью токовых откликов и базовой линии нанобиосенсоров



вследствие отсутствия вымывания фермента. Предложен способ экспрессного (3 мин) электрохимического профилирования клеток *S. Cerevisiae* в зависимости от их оптической плотности, времени культивирования и типа среды роста.

**5.** Апробирован подход к формированию функциональных пленок ОНГ в методе пьезокварцевого микровзвешивания: *неорганический компонент*: Pd-NPs, Ag-NPs; *наличие полимерного компонента*: обязательно, Ag-NPs/Tween-80, Ag-NPs/PEG-3500, Ag-NPs/Тритон X-100, Pd-NPs-PEG-3500); *структура ОНГ слоя*: адсорбционная.

**6.** Полученные знания о физико-химических процессах, протекающих при лазерной десорбции/ионизации низкомолекулярных биоаналитов с поверхности электроосажденных пленок наночастиц благородных металлов, позволили разработать сразу несколько способов экспресс-определения жирных кислот, триацилглицеридов, скрининга растительных масел и молока при минимальной пробоподготовке. Разработаны стратегии одностадийного соосаждения, хранения и контролируемого высвобождения низкомолекулярных соединений в отсутствие биополимерного компонента. Концепция продемонстрирована на примере соосаждения MALDI-MS матриц. Предложенный подход рассматривается как простой способ получения гибридных мишеней для метода MALDI-MS с менее выраженным эффектом «сладких пятен».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложена новая методология синтеза наноразмерных ОНГ, которая позволяет в одной процедуре соосадить все компоненты в нужную структуру слоя. Определена последовательность биорецепторов и полимеров, которые возможно инкапсулировать без потери в активности в ходе гальванического соосаждения вместе с наночастицами благородных металлов из растворов электролитов сложного состава. Синтезированные по разработанной методологии функциональные гибридные пленки не имеют послойной сэндвич-подобной структуры, что позволяет конструировать их дизайн по оптимизированным последовательностям и заданным свойствам. Такой подход может явиться основой для разработки единой платформы производства микроаналитических устройств на основе наночастиц благородных металлов, допированных полимерами, кофакторами и биорецепторами, используемых при обнаружении биомолекул в биологических, пищевых и экологических образцах.

Для характеристики компонентов ОНГ пленок (неорганического, полимерного, биорецепторного или малых органических молекул), а также контроля качества наноразмерных структур в работе предложена целая серия наноаналитических способов на основе инструментальных платформ методов неорганической (ICP-MS), органической (HPLC-ESI-MS/MS, LDI-MS) масс-спектрометрии, оптимизированы рабочие алгоритмы, введены оценочные критерии. Например, предложенный способ LDI-MS биосканирования поверхности ОНГ, позволяет проводить неразрушающий контроль химической чистоты наноструктурированной поверхности на предмет присутствия примесей в функциональном биоорганическом слое; сравнивать химическую однородность поверхности от партии к партии, и от сенсора к сенсору; оценивать химический состав отдельных ОНГ слоев нанобиосенсоров, идентифицировать соосаждение биорецептора или полимера. Установлены и полностью расшифрованы пути ионизации

неорганических компонентов (электрокатализаторов) полимеров и биорецепторов с поверхности ОНГ, используемых в дизайнах микроаналитических устройств, что позволяет значительно упростить процедуры контроля их качества при промышленном производстве.

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 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 [326-329], 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 тест-систем на их основе.

Совместное соосаждение ферментов группы оксидаз и сульфополимеров 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 и может рассматриваться как надежный способ оптимизации дизайна неорганического составляющего. На основе ВЭЖХ предложен способ контроля надежности закрепления полимерного органического компонента ОНГ на подложках (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 упростить контроль их качества.

3. С привлечением метода квантово-химического моделирования установлен механизм формирования функционального слоя на электродах. Согласно 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 (Нафюн, 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-OS нанобиосенсоров. Использование МАМ-режима регистрации сигнала позволяет избавиться от перекрестной чувствительности ОНГ-OS 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-OS 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%.

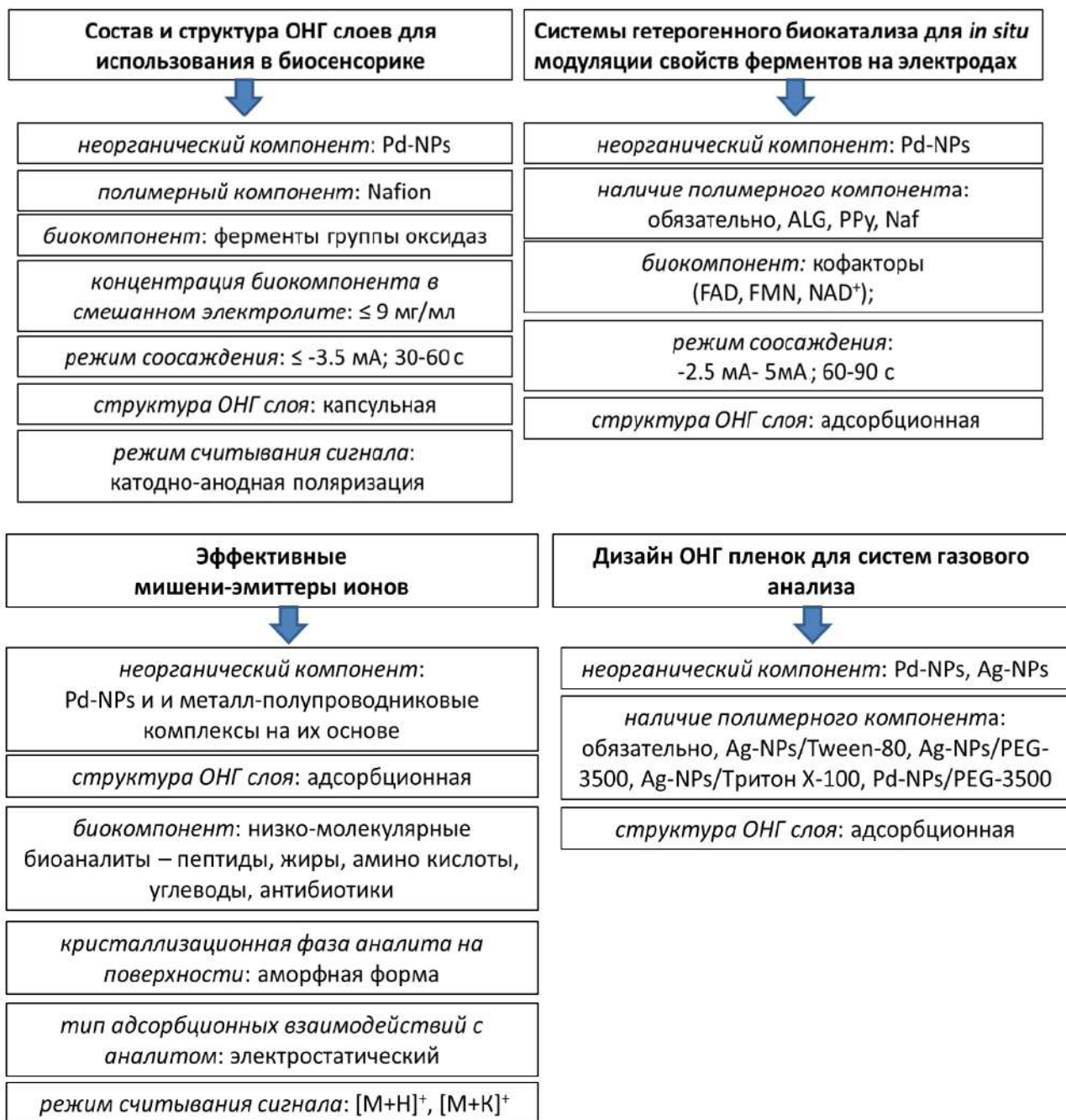
**5.** Получены представления о механизме формирования аналитического сигнала в методе лазерной десорбции/ионизации с поверхности электрохимически осажденных наночастиц (НЧ) благородных металлов: присутствие ионов реагентов и эффекты реорганизации неорганического компонента одинаково важны при формировании 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 лазерном

облучении. Интенсивность процессов реорганизации 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 требования 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.

Доказана применимость найденных закономерностей и разработанных подходов при обнаружении и определении целого ряда физиологически значимых низкомолекулярных биомолекул. Разработанные нанобиосенсоры позволили проводить профилирование *S. Cerevisiae* в зависимости от оптической плотности клеток, времени культивирования и типа питательной среды, экспресс-определение глюкозы в ферментативных растворах дрожжей в динамическом диапазоне от 200  $\mu$ M до 30 mM и правильности  $101.3 \pm 1.5\%$ .

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.



## СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ОНГ – органо-неорганические гибриды

ELISA – микроаналитические устройства иммуноферментного анализа

GOx – глюкозооксидаза

LOx – лактатоксидаза

AOx – алкогольоксидаза

LbL – способ послойной сборки

Nafion<sup>®</sup>117 или / Naf – Нафион

Pd-NPs – наночастицы палладия

Pd-NFs – наночастицы палладия

Pd-NNs – наночастицы палладия

Au-NPs – наночастицы золота

Ag-NPs – наночастицы серебра

FAD – флавинадениндинуклеотид

FMN – флаavin мононуклеотид

RbF – рибофлавин

NAD – никотинамидадениндинуклеотид

HPLC-ESI-MS – метод жидкостной хроматографии совмещенной с масс спектрометрическим детектором, ионизация в электроспрее

HR-ICP-MS – масс спектрометрия высокого разрешения с индуктивно-связанной плазмой

ICP-OES (ИСП-МС) – индуктивно-связанная плазма совмещенная с оптическим эмиссионным детектором

MALDI-MS – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

SALDI-MS – поверхностно-активированная лазерная десорбция/ионизация

SPE – трафаретные электроды

GO – оксида графена

$I_k$  – плотность катодного тока



$t_{эл}$  – продолжительность электролиза  
Me<sup>0</sup> – наночастицы благородных металлов  
HRP – пероксидаза хрена  
CAT – каталаза  
TEM – просвечивающая электронная микроскопия  
TEM – сканирующая электронная микроскопия  
AFM – атомно-силовая микроскопия  
FT-IR – ИК-Фурье спектроскопия  
ALG – альгинат  
PPy – полипиррол  
PCM – сольватационная модель поляризуемого континуума  
ЦВА – циклическая вольтамперометрия  
АМ – хроноамперометрия  
PB – Prussian Blue  
GO – оксид графена  
QCM – метод пьезокварцевого микровзвешивания  
DIOS – лазерная десорбция ионизация с поверхности пористого кремния  
(коммерческий образец)  
p-SiO<sub>2</sub> – пластины пористого кремния  
AAO/p-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – пористый оксид алюминия  
CHCA – α-циано-4-гидроксикоричная кислота  
FCCA – α-циано-2,3,4,5,6-пентафтор-коричная кислота  
DNB – 2,5-дихлорбензойная кислота  
YPD – дрожжевой экстракт пептона  
Arg – аргинин  
NMA – N-метилацетамид  
Pr – пропанол  
Et – этанол  
R<sub>q</sub> – среднеквадратичная шероховатость

OCM – модель oxidized circumcoronene molecule  
GCE – стеклоуглеродный электрод  
MAM – многоступенчатый амперометрический режим  
LDR – область линейности  
LOD – предел обнаружения  
 $D_f$  – фрактальная размерность  
RSD – среднеквадратичное отклонение  
 $S$  – эффективность ионизации  
 $S/N$  – соотношение сигнал/шум  
Al-wires – алюминиевые нанопровода  
*n*-Si – непористый кремний  
Pro – пролин  
His – гистидин  
Gln – глутамин  
E-Tongue – микроаналитические системы типа «электронный язык»  
E-Nose – микроаналитические системы типа «электронный нос»  
GLU – глутаральдегид  
GC-MS – газовая хроматография, совмещенная с масс-детектором  
TAG – триацилглицериды  
DAG – диацилглицериды  
FFA – свободные жирные кислоты  
CID – изолированный пик иона  
OOO – триолеин  
АК – аскорбиновая кислота

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Semenova D., Silina Y.E. The role of nanoanalytics in the development of organic-inorganic nanohybrids-seeing nanomaterials as they are // *Nanomaterials*. V. 9. 2019. P. 1673. <https://doi.org/10.3390/nano9121673>.
- [2] Taylor-Pashow K.M.L., Della Rocca J., Huxford R.C., Lin W. Hybrid nanomaterials for biomedical applications // *Chemical Communications*. 2010. P. 5832-5849 <https://doi.org/10.1039/c002073g>.
- [3] Sanchez C., Rozes L., Ribot F., Laberty-Robert C., Grosso D., Sassoie C., Boissiere C., Nicole L. “Chimie douce”: A land of opportunities for the designed construction of functional inorganic and hybrid organic-inorganic nanomaterials // *Comptes Rendus Chimie*. 2010. P. 3-39. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2009.06.001>.
- [4] Carraro M., Gross S., Hybrid materials based on the embedding of organically modified transition metal oxoclusters or polyoxometalates into polymers for functional applications: A review // *Materials*. 2014. V. 4. P. 3956–3989. <https://doi.org/10.3390/ma7053956>.
- [5] Zhao N., Yan L., Zhao X., Chen X., Li A., Zheng D., Zhou X., Dai X., Xu F.-J. Versatile Types of Organic/Inorganic Nanohybrids: From Strategic Design to Biomedical Applications // *Chemical Reviews*. 2019. V. 119. P.1666–1762. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00401>.
- [6] Nicole L., Rozes L., Sanchez C., Integrative Approaches to Hybrid Multifunctional Materials: From Multidisciplinary Research to Applied Technologies // *Advanced Materials*. 2010. V. 22. P. 3208–3214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201000231>.
- [7] Faustini M., Nicole L., Ruiz-Hitzky E., Sanchez C. History of Organic–Inorganic Hybrid Materials: Prehistory, Art, Science, and Advanced Applications // *Advanced Functional Materials*. 2018. V. 28. P. 1704158. [doi.org/10.1002/adfm.201704158](https://doi.org/10.1002/adfm.201704158).
- [8] Ozin G.A., Panoscopic materials: synthesis over ‘all’ length scales // *Chemical Communications*. 2000. P. 419–432. <https://doi.org/10.1039/A905090F>.
- [9] Wang Y., Black K.C.L., Luehmann H., Li W., Zhang Y., Cai X., Wan D., Liu S.Y., Li M., Kim P., Li Z.Y., Wang L.V., Liu Y., Xia Y. Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment // *ACS Nano*. 2013. P. 2068–2077. <https://doi.org/10.1021/nn304332s>.
- [10] Wei T., Du D., Zhu M.J., Lin Y., Dai Z., An Improved Ultrasensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Hydrangea-Like Antibody-Enzyme-Inorganic Three-in-One Nanocomposites // *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2016. V. 8. P. 6329–6335. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b11834>.

- [11] Liu Y., Yu D., Zeng C., Miao Z., Dai L. Biocompatible graphene oxide-based glucose biosensors // *Langmuir*. 2010. V. 29. P. 6158–6160. <https://doi.org/10.1021/la100886x>.
- [12] Wei A., Sun X.W., Wang J.X., Lei Y., Cai X.P., Li C.M., Dong Z.L., Huang W. Enzymatic glucose biosensor based on ZnO nanorod array grown by hydrothermal decomposition // *Applied Physics Letters*. 2006. V. 89. P. 123902. <https://doi.org/10.1063/1.2356307>.
- [13] Wang J. Glucose biosensors: 40 Years of advances and challenges // *Electroanalysis*. 2001. V.13. P. 983-988. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200108\)13:12<983::aid-elan983>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::aid-elan983>3.0.co;2-%23).
- [14] Moser I., Jobst G., Urban G.A. Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine // *Biosensors and Bioelectronics*. 2002. V. 17. P. 297-302. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00298-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00298-6).
- [15] Nery E.W., Kundys M., Jeleń P.S., Jönsson-Niedziółka M. Electrochemical glucose sensing: Is there still room for improvement? // *Analytical Chemistry*. 2016. V. 88. P. 11271–11282. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03151>.
- [16] Toghiani K.E., Compton R.G. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: A perspective and an evaluation // *International Journal of Electrochemical Science*. 2010. V. 5. P. 1246–1301.
- [17] Dhara K., Mahapatra D.R. Electrochemical nonenzymatic sensing of glucose using advanced nanomaterials // *Microchimica Acta*. 2018. V. 185, № 49. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2609-1>.
- [18] Mohapatra J., Ananthoju B., Nair V., Mitra A., Bahadur D., Medhekar N.V., Aslam M. Enzymatic and non-enzymatic electrochemical glucose sensor based on carbon nanoions // *Applied Surface Science*. 2018. V. 442. P. 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.02.124>.
- [19] Holzinger M., Goff A. Le, Cosnier S. Nanomaterials for biosensing applications: A review // *Frontiers in Chemistry*. 2014. V. 2. P. 1–10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00063>.
- [20] Rakhi R.B., Nayuk P., Xia C., Alshareef H.N. Novel amperometric glucose biosensor based on MXene nanocomposite // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. P. 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep36422>.
- [21] Olejnik A., Karczewski J., Dolega A., Siuzdak K., Grochowska K. Insightful analysis of phenomena arising at the metal.polymer interphase of au-ti based non-enzymatic glucose sensitive electrodes covered by nafion // *Coatings*. 2020. V. 10. P. 1–17. <https://doi.org/10.3390/coatings10090810>.
- [22] Tian K., Prestgard M., Tiwari A. A review of recent advances in nonenzymatic glucose sensors // *Materials Science and Engineering C*. 2014. V. 41. P. 100–118. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.013>.

- [23] Wang G., He X., Wang L., Gu A., Huang Y., Fang B., Geng B., Zhang X. Non-enzymatic electrochemical sensing of glucose // *Microchimica Acta*. 2013. V. 180. P. 161–186. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0923-1>.
- [24] Sridara T., Upan J., Saianand G., Tuantranont A., Karuwan C., Jakmunee J. Non-enzymatic amperometric glucose sensor based on carbon nanodots and copper oxide nanocomposites electrode // *Sensors (Switzerland)*. 2020. V. 20. P. 808. <https://doi.org/10.3390/s20030808>.
- [25] Прибиль М.М., Высокоэффективные лактатные биосенсоры на основе инженерии иммобилизованной лактатоксидазы, дисс. на соискание уч. степени канд. хим. наук, Российская государственная библиотека (РГБ), Москва. 2015. 30 с. <http://www.chem.msu.ru/rus/theses/2015/2015-05-14-pribil/abstract.pdf>
- [26] Vaddiraju S.S., Singh H., Burgess D.J., Jain F.C., Papadimitrakopoulos F. Enhanced glucose sensor linearity using poly(vinyl alcohol) hydrogels // *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2009. V. 3. P. 863–874. <https://doi.org/10.1177/193229680900300434>.
- [27] 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>.
- [28] Wu W.Y., Zhong X., Wang W., Miao Q., Zhu J.J. Flexible PDMS-based three-electrode sensor // *Electrochemistry Communications*. 2010. V. 12. P. 1600–1604. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.09.005>.
- [29] Ariga K., Ji Q., Hill J.P. Enzyme-Encapsulated layer-by-layer assemblies: Current status and challenges toward ultimate nanodevices // *Advances in Polymer Science*. 2010. V. 229. P. 2191. [doi.org/10.1007/12-2009-42](https://doi.org/10.1007/12-2009-42).
- [30] Caseli L. Enzymes immobilized in langmuir-blodgett films: Why determining the surface properties in langmuir monolayer is important? // *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*. 2018. V. 90. P. 631–644. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170453>.
- [31] Yoo D., Shiratori S.S., Rubner M.F. Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes // *Macromolecules*. 1998. V. 31. P. 4309–4318. <https://doi.org/10.1021/ma9800360>.
- [32] Cheng J.H., Fou A.F., Rubner M.F. Molecular self-assembly of conducting polymers // *Thin Solid Films*. 1994. V. 244. P. 985–989. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(94\)90616-5](https://doi.org/10.1016/0040-6090(94)90616-5).
- [33] Ariga K., Ji Q., Hill J.P. Enzyme-Encapsulated layer-by-layer assemblies: Current status and challenges toward ultimate nanodevices // *Advances in Polymer Science*. 2010. V. 229. P. 51–87. <https://doi.org/10.1007/12-2009-42>.
- [34] Ai H., Jones S.A., Lvov Y.M. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles // *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2003. V. 39. P. 23. <https://doi.org/10.1385/CBB:39:1:23>.

- [35] Fukui Y., Fujimoto K. The Preparation of Sugar Polymer-Coated Nanocapsules by the Layer-by-Layer Deposition on the Liposome // *Langmuir*. 2009. V. 25. P. 10020–10025. <https://doi.org/10.1021/la9008834>.
- [36] Lvov Y., Haas H., Decher G., Moehwald H., Mikhailov A., Mtchedlishvily B., Morgunova E., Vainshtein B. Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus // *Langmuir*. 1994. V. 10. P. 4232–4236. <https://doi.org/10.1021/la00023a052>.
- [37] Lvov Y., Ariga K., Onda M., Ichinose I., Kunitake T. Alternate Assembly of Ordered Multilayers of SiO<sub>2</sub> and Other Nanoparticles and Polyions // *Langmuir*. 1997. V. 13. P. 6195–6203. <https://doi.org/10.1021/la970517x>.
- [38] Liu Z., Ma R., Osada M., Iyi N., Ebina Y., Takada K., Sasaki T. Synthesis, Anion Exchange, and Delamination of Co–Al Layered Double Hydroxide: Assembly of the Exfoliated Nanosheet/Polyanion Composite Films and Magneto-Optical Studies // *Journal of the American Chemical Society*. 2006. V. 39. P. 1284872–4880. <https://doi.org/10.1021/ja0584471>.
- [39] Volodkin D., Klitzing R., Moehwald H. Polyelectrolyte multilayers: Towards single cell studies // *Polymers*. 2014. V. 6. P. 1502–1527. <https://doi.org/10.3390/polym6051502>.
- [40] Yashchenok A.M., Gorin D.A., Pankin K.E., Lomova M.V., Shtykov S.N., Klimov B.N., Kurochkina G.I., Grachev M.K. Transfer ratio of Langmuir-Blodgett films as an indicator of the single-crystal silicon surface modified by polyionic layers // *Semiconductors*. 2007. V. 41. P. 684–688. <https://doi.org/10.1134/S1063782607060139>.
- [41] Lvov Y., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption // *Journal of the American Chemical Society*. 1995. V. 117. P. 6117–6123. <https://doi.org/10.1021/ja00127a026>.
- [42] Zhu M., Zhu Y., Zhang L., Shi J. Preparation of chitosan/mesoporous silica nanoparticle composite hydrogels for sustained co-delivery of biomacromolecules and small chemical drugs // *Science and Technology of Advanced Materials*. 2013. V. 14. P. 45005. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/14/4/045005>.
- [43] Liu Y., Geng T., Gao J. Layer-by-layer immobilization of horseradish peroxidase on a gold electrode modified with colloidal gold nanoparticles // *Microchimica Acta*. 2008. V. 39. P. 161241–248. <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0779-y>.
- [44] Wang Y., Caruso F. Enzyme encapsulation in nanoporous silica spheres // *Chemical Communications*. 2004. P. 1528–1529. <https://doi.org/10.1039/B403871A>.
- [45] Karyakin A.A., Karyakina E.E., Gorton L., Bobrova O.A., Lukachova L.V., Gladilin A.K., Levashov A.V. Improvement of Electrochemical Biosensors Using Enzyme Immobilization from Water–Organic Mixtures with a High Content of Organic Solvent // *Analytical Chemistry*. 1996. V. 68. P. 4335–4341. <https://doi.org/10.1021/ac960397i>.
- [46] Karyakin A.A., Kotel'nikova E.A., Lukachova L.V., Karyakina E.E., Wang J. Optimal Environment for Glucose Oxidase in Perfluorosulfonated Ionomer Membranes:

- Improvement of First-Generation Biosensors // *Analytical Chemistry*. 2002. V. 74. P. 1597–1603. <https://doi.org/10.1021/ac0155409>.
- [47] Umar A., Ahmad R., Al-Hajry A., Kim S.H., Abaker M.E., Hahn Y.-B. Spruce branched  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanostructures as potential scaffolds for a highly sensitive and selective glucose biosensor // *New Journal of Chemistry*. 2014. V. 38. P. 5873–5879. <https://doi.org/10.1039/C4NJ01148A>.
- [48] Gao W., Emaminejad S., Nyein H.Y.Y., Challa S., Chen K., Peck A., Fahad H.M., Ota H., Shiraki H., Kiriya D., Lien D.H., Brooks G.A., Davis R.W., Javey A. Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis // *Nature*. 2016. V. 529. P. 509–514. <https://doi.org/10.1038/nature16521>.
- [49] 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 // *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2018. V. 259. P. 945-955. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.088>.
- [50] 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. 2511-252. <https://doi.org/10.1039/c8an02261e>.
- [51] Ghica M.E., Brett C.M.A., Development of a carbon film electrode ferrocene-mediated glucose biosensor // *Analytical Letters*. 2005. V. 38. P. 907–920. <https://doi.org/10.1081/AL-200054036>.
- [52] Ammam M. Electrochemical and electrophoretic deposition of enzymes: principles, differences and application in miniaturized biosensor and biofuel cell electrodes // *Biosensors & Bioelectronics*. 2014. V. 58. P. 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.030>.
- [53] Stine K.J. Biosensor applications of electrodeposited nanostructures // *Applied Sciences (Switzerland)*. 2019. V. 9. P. 797. <https://doi.org/10.3390/app9040797>.
- [54] Strike D.J., Rooij N.F., Koudelka-Hep M., Electrodeposition of glucose oxidase for the fabrication of miniature sensors // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1993. V. 13. P. 61–64. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0925-4005\(93\)85323-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0925-4005(93)85323-3).
- [55] Tan Y., Deng W., Chen C., Xie Q., Lei L., Li Y., Fang Z., Ma M., Chen J., Yao S. Immobilization of enzymes at high load/activity by aqueous electrodeposition of enzyme-tethered chitosan for highly sensitive amperometric biosensing // *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. V. 25. P. 2644–2650. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.040>.
- [56] Ammam M., Fransær J. A study on electrodeposition of glucose oxidase from low conductivity solutions // *Electrochimica Acta*. 2010. V. 55. P. 9125–9131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.08.050>.

- [57] Matsumoto N., Chen X., Wilson G.S. Fundamental studies of glucose oxidase deposition on a Pt electrode // *Analytical Chemistry*. 2002. V. 74. P. 362–367. <https://doi.org/10.1021/ac015536x>.
- [58] Stein E.W., Volodkin D.V., McShane M.J., Sukhorukov G.B. Real-time assessment of spatial and temporal coupled catalysis within polyelectrolyte microcapsules containing coimmobilized glucose oxidase and peroxidase // *Biomacromolecules*. 2006. V. 7. P. 710–719. <https://doi.org/10.1021/bm050304j>.
- [59] Govardhanagiri S., Bethi S., Nagaraju G.P. Chapter 8 - Small Molecules and Pancreatic Cancer Trials and Troubles, in: G.P.B.T.-B.T. to P.C.U. to C. Nagaraju (Ed.), *Cancer Sensitizing Agents for Chemotherapy* // Academic Press. 2019. p. 117–131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817661-0.00008-1>.
- [60] Silina Y.E., Welck 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 // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2016. V. 1029–1030. P. 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.014>.
- [61] Silina Y.E., Fink-Straube C., Hanselmann R.G., Peuschel H., Volmer D.A., P-Coumaric acid a novel and effective biomarker for quantifying hypoxic stress by HILIC-ESI-MS // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2016. V. 1020. P. 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.005>.
- [62] Labuda J., Bowater R.P., Fojta M., Gauglitz G., Glatz Z., Hapala I., Havliš J. Kilar, et al. "Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018)" *Pure and Applied Chemistry*. 2018. V. 90. № 7. pp. 1121–1198. <https://doi.org/10.1515/pac-2016-1120>
- [63] Uehara T., Sumiyoshi T., Itoh H., Kurata K. Lactate production and neurotransmitters; evidence from microdialysis studies // *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 2008. V. 90. P. 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.04.001>.
- [64] Post M.R., Sulzer D. The chemical tools for imaging dopamine release // *Cell Chem. Biol.* 2021. V. 17. № (6). P. 748–764. [10.1016/j.chembiol.2021.04.005](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.04.005)
- [65] Haniff H.S., Knerr L., Liu X., Crynen G., Boström J., Abegg D., Adibekian A., Lekah E., Wang K.W., Cameron M.D., Yildirim I., Lemurell M., Disney M.D. Design of a small molecule that stimulates vascular endothelial growth factor A enabled by screening RNA fold-small molecule interactions // *Nature Chemistry*. 2020. V.12. P. 952–961. <https://doi.org/10.1038/s41557-020-0514-4>.
- [66] Asalla S., Girada S.B., Kuna R.S., Chowdhury D., Kandagatla B., Oruganti S., Bhadra U., Bhadra M.P., Kalivendi S.V., Rao S.P., Row A., Ibrahim A., Ghosh P.P., Mitra P. Restoring Mitochondrial Function: A Small Molecule-mediated Approach to Enhance Glucose Stimulated Insulin Secretion in Cholesterol Accumulated Pancreatic beta cells // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. P. 27513. <https://doi.org/10.1038/srep27513>.



- [67] Raj S., Dsouza L.A., Singh S.P., Kanwal A. Sirt6 Deacetylase: A Potential Key Regulator in the Prevention of Obesity, Diabetes and Neurodegenerative Disease // *Frontiers in Pharmacology*. 2020. V. 11. P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.598326>.
- [68] Marcos J., Pozo O.J. Derivatization of steroids in biological samples for GC-MS and LC-MS analyses // *Bioanalysis*. 2015. V. 7. P. 2515–2536. <https://doi.org/10.4155/bio.15.176>.
- [69] Deng W., Goldys E.M. Chemical sensing with nanoparticles as optical reporters: from noble metal nanoparticles to quantum dots and upconverting nanoparticles // *The Analyst*. 2014. V. 139. P. 5321–5334. <https://doi.org/10.1039/C4AN01272K>.
- [70] Hua J., Huang K.L. A reversed phase hplc method for the analysis of nucleotides to determine 5'-PDE enzyme activity // *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. 2010. V. 24. P. 167–174. <https://doi.org/10.4314/bcse.v24i2.54719>.
- [71] Heegaard N.H., Kennedy R.T. Identification, quantitation, and characterization of biomolecules by capillary electrophoretic analysis of binding interactions // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. P. 3122–3133. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991001\)20:15/16<3122::AID-ELPS3122>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991001)20:15/16<3122::AID-ELPS3122>3.0.CO;2-M).
- [72] Gao Z., Zhong W. Recent (2018–2020) development in capillary electrophoresis // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021. V. 414. P. 115–130. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03290-y>.
- [73] Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures // *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2008. V. 8. P. 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>.
- [74] Peuschel H., Ruckelshausen T., Kiefer S., Silina Y.E., Kraegeloh A. Penetration of CdSe/ZnS quantum dots into differentiated vs undifferentiated Caco-2 cells // *Journal of Nanobiotechnology*. 2016. V. 14. P. 70. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0222-9>.
- [75] Liu Y., Liu Y., Wang M. Design, Optimization and Application of Small Molecule Biosensor in Metabolic Engineering // *Frontiers in Microbiology*. 2017. V. 8. P. 2012. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02012>.
- [76] Lyublinskaya O., Antunes F. Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor HyPer // *Redox Biology*. 2019. V. 24. P. 101200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101200>.
- [77] Thapa M., Sung R., Heo Y.S. A Dual Electrode Biosensor for Glucose and Lactate Measurement in Normal and Prolonged Obese Mice Using Single Drop of Whole Blood // *Biosensors*. 2021. V. 11. № 12, P. 507. <https://doi.org/10.3390/bios11120507>
- [78] Jayakumar K., Bennett R., Leech D. Electrochemical glucose biosensor based on an osmium redox polymer and glucose oxidase grafted to carbon nanotubes: A design-of-experiments optimisation of current density and stability // *Electrochimica Acta*. 2021. V. 371. P.137845. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.137845>.

- [79] Rathee K., Dhull V., Dhull R., Singh S. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review // *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016. V. 5. P. 35–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.010>.
- [80] Goers L., Ainsworth C., Goey C.H., Kontoravdi C., Freemont P.S., Polizzi K.M. Whole-cell *Escherichia coli* lactate biosensor for monitoring mammalian cell cultures during biopharmaceutical production // *Biotechnology and Bioengineering*. 2017. V. 114. P. 1290–1300. <https://doi.org/10.1002/bit.26254>.
- [81] Röhlen D.L., Pilas J., Dahmen M., Keusgen M., Selmer T., Schöning M.J. Toward a hybrid biosensor system for analysis of organic and volatile fatty acids in fermentation processes // *Frontiers in Chemistry*. 2018. V. 6. P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00284>.
- [82] P. Noll, M. Henkel. History and Evolution of Modeling in Biotechnology: Modeling & Simulation, Application and Hardware Performance // *Comput Struct Biotechnol J*. 2020. V. 18. P. 3309–3323. doi: 10.1016/j.csbj.2020.10.018
- [83] Baeza J.A., Larroche C., Sanromán M.Á., Du G., Principles of Bioprocess Control // Elsevier, 2017. pp. 527–561. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00018-5>.
- [84] Pontius K., Semenova D., Silina Y.E., Gernaey K.V., Junicke H. Automated Electrochemical Glucose Biosensor Platform as an Efficient Tool Toward On-Line Fermentation Monitoring: Novel Application Approaches and Insights // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. V. 8. P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00436>.
- [85] Siontorou C.G., Batzias F.A. Innovation in biotechnology: moving from academic research to product development—the case of biosensors // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010. V. 30. P. 79–98. <https://doi.org/10.3109/07388550903427298>.
- [86] Silina Y.E., Gernaey K.V., Semenova D., Iatsunskyi I. Application of organic-inorganic hybrids in chemical analysis, bio- and environmental monitoring // *Applied Sciences (Switzerland)*. 2020. V. 10. P. 1458. <https://doi.org/10.3390/app10041458>.
- [87] Чамян К.Р., Парамонов С.А., Ревельский И.А., Буряк А.К. Анализ пентоксифиллина методом масс - спектрометрии с матрично - активированной лазерной десорбцией / ионизацией // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2011. V. 11. P. 641–648.
- [88] Писарев И., Новиков О.О., Фадеева Д.А. [и др.] Масс-спектрометрия: история и перспективы использования // *Молодой ученый*. 2012. № 10 (45). С. 99-104. <https://moluch.ru/archive/45/5495/>
- [89] Volmer D.A., Sleno L., Bateman K., Sturino C., Oballa R., Mauriala T., Corr J. Comparison of MALDI to ESI on a Triple Quadrupole Platform for Pharmacokinetic Analyses // *Analytical Chemistry*. 2007. V. 79. P. 9000–9006. <https://doi.org/10.1021/ac7016234>.

- [90] Sleno L., Volmer D.A. Toxin Screening in Phytoplankton: Detection and Quantitation Using MALDI Triple Quadrupole Mass Spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2005. V. 77. P. 1509–1517. <https://doi.org/10.1021/ac0486600>.
- [91] Gemperline E., Chen B., Li L., Challenges and recent advances in mass spectrometric imaging of neurotransmitters // *Bioanalysis*. 2014. V. 6. P. 525–540. <https://doi.org/10.4155/bio.13.341>.
- [92] Aichler M., Walch A. MALDI Imaging mass spectrometry: Current frontiers and perspectives in pathology research and practice // *Laboratory Investigation*. 2015. V. 95. P. 422–431. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.156>.
- [93] 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>.
- [94] Huang L., Wan J., Wei X., Liu Y., Huang J., Sun X., Zhang R., Gurav D.D., Vedarethinam V., Li Y., Chen R., Qian K. Plasmonic silver nanoshells for drug and metabolite detection // *Nature Communications*. 2017. V. 8. P. 220. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00220-4>.
- [95] Law K.P., Larkin J.R. Recent advances in SALDI-MS techniques and their chemical and bioanalytical applications // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. V. 399. P. 2597–2622. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4063-3>.
- [96] Li Y., Luo P., Cao X., Liu H., Wang J., Wang J., Zhan L., Nie Z. Enhancing surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry performance by integrating plasmonic hot-electron transfer effect through surface modification // *Chemical Communications*. 2019. V. 55. P. 5769–5772. <https://doi.org/10.1039/C9CC02541C>.
- [97] Song K., Cheng Q., Desorption and ionization mechanisms and signal enhancement in surface assisted laser desorption ionization mass spectrometry (SALDI-MS) // *Applied Spectroscopy Reviews*. 2020. V. 55. P. 220–242. <https://doi.org/10.1080/05704928.2019.1570519>.
- [98] Thomas J.J., Shen Z., Crowell J.E., Finn M.G., Siuzdak G. Desorption/ionization on silicon (DIOS): A diverse mass spectrometry platform for protein characterization // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001. V. 98. P. 4932–4937. <https://doi.org/10.1073/pnas.081069298>.
- [99] Nayak R., Knapp D.R. Effects of Thin-Film Structural Parameters on Laser Desorption/Ionization from Porous Alumina // *Analytical Chemistry*. 2007. V. 79. P. 4950–4956. <https://doi.org/10.1021/ac062289u>.
- [100] Pilolli R., Palmisano F., Cioffi N. Gold nanomaterials as a new tool for bioanalytical applications of laser desorption ionization mass spectrometry // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. V. 402. P. 601–623. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5120-2>.

- [101] Rainer M., Qureshi M.N., Bonn G.K. Matrix-free and material-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry for the analysis of low molecular weight compounds // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. V. 400.P. 2281–2288. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4138-1>.
- [102] Zhang H., Cha S., Yeung E.S. Colloidal Graphite-Assisted Laser Desorption/Ionization MS and MS<sub>n</sub> of Small Molecules. 2. Direct Profiling and MS Imaging of Small Metabolites from Fruits // *Analytical Chemistry*. 2007. V. 79. P. 6575–6584. <https://doi.org/10.1021/ac0706170>.
- [103] Coffinier Y., Szunerits S., Drobecq H., Melnyk O., Boukherroub R. Diamond nanowires for highly sensitive matrix-free mass spectrometry analysis of small molecules // *Nanoscale*. 2012. V. 4. P. 231–238. <https://doi.org/10.1039/C1NR11274K>.
- [104] Xu S., Li Y., Zou H., Qiu J., Guo Z., Guo B. Carbon Nanotubes as Assisted Matrix for Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2003. V. 75. P. 6191–6195. <https://doi.org/10.1021/ac0345695>.
- [105] Rodríguez C.E., Palacios J., Fajardo I., Urdiales J.L., Guével X. Le, Lozano J., Sánchez-Jiménez F. Conventional Matrices Loaded onto a Graphene Layer Enhances MALDI-TOF/TOF Signal: Its Application to Improve Detection of Phosphorylated Peptides // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2016. V. 27. P. 366–369. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1299-3>.
- [106] Cuiffi J.D., Hayes D.J., Fonash S.J., Brown K.N., Jones A.D. Desorption-ionization mass spectrometry using deposited nanostructured silicon films // *Analytical Chemistry*. 2001. V. 73. P. 1292–1295. <https://doi.org/10.1021/ac001081k>.
- [107] Go E.P., Apon J.V., Luo G., Saghatelian A., Daniels R.H., Sahi V., Dubrow R., Cravatt B.F., Vertes A., Siuzdak G. Desorption/ionization on silicon nanowires // *Analytical Chemistry*. 2005. V. 77. P. 1641–1646. <https://doi.org/10.1021/ac048460o>.
- [108] Wen X., Dagan S., Wysocki V.H. Small-Molecule Analysis with Silicon-Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2007. V. 79. P. 434–444. <https://doi.org/10.1021/ac061154l>.
- [109] Chen Y., Luo G., Diao J., Chornoguz O., Reeves M., Vertes A. Laser desorption/ionization from nanostructured surfaces: Nanowires, nanoparticle films and silicon microcolumn arrays // *Journal of Physics: Conference Series*. 2007. V. 59. P. 548–554. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/59/1/117>.
- [110] Kim Y.-K., Min D.-H. Durable Large-Area Thin Films of Graphene/Carbon Nanotube Double Layers as a Transparent Electrode // *Langmuir*. 2009. V. 25. P. 11302–11306. <https://doi.org/10.1021/la9029744>.
- [111] Kawasaki H., Nakai K., Arakawa R., Athanassiou E.K., Grass R.N., Stark W.J. Functionalized Graphene-Coated Cobalt Nanoparticles for Highly Efficient Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Analysis // *Analytical Chemistry*. 2012. V. 84. P. 9268–9275. <https://doi.org/10.1021/ac302004g>.

- [112] Lu T., Olesik S.V. Electrospun Nanofibers as Substrates for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization and Matrix-Enhanced Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2013. V. 85. P. 4384–4391. <https://doi.org/10.1021/ac303292e>.
- [113] Lin Y.-S., Chen Y.-C. Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry on Sol–Gel-Derived 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Film // *Analytical Chemistry*. 2002. V. 74. P. 5793–5798. <https://doi.org/10.1021/ac020418a>.
- [114] Sagandykova G., Piszczek P., Radtke A., Mametov R., Pryshchepa O., Gabryś D., Kolankowski M., Pomastowski P. Silver Nanostructured Substrates in LDI-MS of Low Molecular Weight Compounds // *Materials*. 2022, V. 15, P. 4660. <https://doi.org/10.3390/ma15134660>
- [115] Nizioł J., Rode W., Laskowska B., Ruman T. Novel monoisotopic  $^{109}\text{Ag}$ NPET for laser desorption/ionization mass spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2013. V. 85. P. 1926–1931. <https://doi.org/10.1021/ac303770y>.
- [116] Sherrod S.D., Diaz A.J., Russell W.K., Cremer P.S., Russell D.H. Silver nanoparticles as selective ionization probes for analysis of olefins by mass spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2008. V. 80. P. 6796–6799. <https://doi.org/10.1021/ac800904g>.
- [117] Semenova D., Gernaey K.V., 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>.
- [118] Semenova D., Silina Y.E. Exploring the Potential of Electroplated Chips towards Biomedical Sensing and Diagnostics // *Proceedings*. 2018. V. 2 (13) P. 817. <https://doi.org/10.3390/proceedings2130817>.
- [119] Silina Y.E., Meier F., Nebolsin V.A., Koch M., Volmer D.A. Novel galvanic nanostructures of Ag and Pd for efficient laser desorption/ionization of low molecular weight compounds // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2014. V. 25. P. 841–851. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0853-8>.
- [120] Ren S.F., Zhang L., Cheng Z.H., Guo Y.L. Immobilized carbon nanotubes as matrix for MALDI-TOF-MS analysis: Applications to neutral small carbohydrates // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2005. V. 16. P. 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.11.017>.
- [121] Tang H.W., Ng K.M., Lu W., Che C.M. Ion desorption efficiency and internal energy transfer in carbon-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Desorption mechanism(s) and the design of SALDI substrates // *Analytical Chemistry*. 2009. V. 81. P. 4720. <https://doi.org/10.1021/ac8026367>.
- [122] Kawasaki H., Yonezawa T., Watanabe T., Arakawa R. Platinum Nanoflowers for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2007. V. 111. P. 16278–16283. <https://doi.org/10.1021/jp075159d>.

- [123] Kawasaki H., Yao T., Suganuma T., Okumura K., Iwaki Y., Yonezawa T., Kikuchi T., Arakawa R. Platinum Nanoflowers on Scratched Silicon by Galvanic Displacement for an Effective SALDI Substrate // *Chemistry – A European Journal*. 2010. V. 16. P. 10832–10843. <https://doi.org/10.1002/chem.201001038>.
- [124] Picca R.A., Calvano C.D., Cioffi N., Palmisano F. Mechanisms of nanophase-induced desorption in LDI-MS. A short review // *Nanomaterials*. 2017. V. 7. P. 75. <https://doi.org/10.3390/nano7040075>.
- [125] Kawasaki H., Ozawa T., Hisatomi H., Arakawa R. Platinum vapor deposition surface-assisted laser desorption/ionization for imaging mass spectrometry of small molecules // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2012. V. 26. P. 1849–1858. <https://doi.org/10.1002/rcm.6301>.
- [126] Stolee J.A., Walker B.N., Zorba V., Russo R.E., Vertes A. Laser–nanostructure interactions for ion production // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012. V. 14. P. 8453–8471. <https://doi.org/10.1039/C2CP00038E>.
- [127] Ng K.-M., Chau S.-L., Tang H.-W., Wei X.-G., Lau K.-C., Ye F., Ng A.M.-C. Ion-Desorption Efficiency and Internal-Energy Transfer in Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization: More Implication(s) for the Thermal-Driven and Phase-Transition-Driven Desorption Process // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2015. V. 119. P. 23708–23720. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b05957>.
- [128] Silina Y.E., Koch M., Volmer D.A. Impact of analyte ablation and surface acidity of Pd nanoparticles on efficiency of surface-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry // *International Journal of Mass Spectrometry*. 2015. V. 387. P. 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.06.009>.
- [129] Liu Y.C., Chang Y.H., Lin Y.H., Liou C.C., Kuo T.R. High-performance sample substrate of gold nanoparticle multilayers for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Nanomaterials*. 2019. V. 9. P. 1078. <https://doi.org/10.3390/nano9081078>.
- [130] Daniel M.-C., Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology // *Chemical Reviews*. 2004. V. 104. P. 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>.
- [131] Schürenberg M., Dreisewerd K., Hillenkamp F. Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Peptides and Proteins with Particle Suspension Matrixes // *Analytical Chemistry*. 1999. V. 71. P. 221–229. <https://doi.org/10.1021/ac980634c>.
- [132] Wu H.P., Yu C.J., Lin C.Y., Lin Y.H., Tseng W.L. Gold Nanoparticles as Assisted Matrices for the Detection of Biomolecules in a High-Salt Solution through Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2009. V. 20. P. 875–882. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.01.002>.

- [133] Duan J., Linman M.J., Chen C.Y., Cheng Q.J. CHCA-Modified Au Nanoparticles for Laser Desorption Ionization Mass Spectrometric Analysis of Peptides // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2009. V. 20. P. 1530–1539. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.04.009>.
- [134] Chiu T.-C., Chang L.-C., Chiang C.-K., Chang H.-T. Determining estrogens using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with silver nanoparticles as the matrix // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2008. V. 19. P. 1343–1346. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.06.006>.
- [135] Lee H., Habas S.E., Kwestin S., Butcher D., Somorjai G.A., Yang P. Morphological control of catalytically active platinum nanocrystals // *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 2006. V. 45. P. 7824–7828. <https://doi.org/10.1002/anie.200603068>.
- [136] Larginho M., Capelo J.L., Baptista P.V. Nanoparticles for Mass Spectrometry Applications BT - *Handbook of Nanoparticles*, in: M. Aliofkhaezai (Ed.) // Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 1371–1396. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-15338-4\\_32](https://doi.org/10.1007/978-3-319-15338-4_32).
- [137] Nayak R., Knapp D.R. Matrix-Free LDI Mass Spectrometry Platform Using Patterned Nanostructured Gold Thin Film // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 18. P. 7772–7778, <https://doi.org/10.1021/ac1017277>.
- [138] Kim S.W., Kwon S., Kim Y.K. Graphene oxide derivatives and their nanohybrid structures for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of small molecules // *Nanomaterials*. 2021. V. 11. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/nano11020288>.
- [139] Hayasaka T., Goto-Inoue N., Zaima N., Shrivastava K., Kashiwagi Y., Yamamoto M., Nakamoto M., Setou M. Imaging mass spectrometry with silver nanoparticles reveals the distribution of fatty acids in mouse retinal sections // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2010. V. 21. P. 1446–1454. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2010.04.005>.
- [140] Chambers M.C., Maclean B., Burke R., Amodei D., Ruderman D.L., Neumann S., Gatto L., Fischer B., Pratt B., Egertson J., Hoff K., Kessner D., Tasman N., Shulman N., Frewen B., Baker T.A., Brusniak M.-Y., Paulse C., Creasy D. et. al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics // *Nature Biotechnology*. 2012. V. 30. P. 918–920. <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>.
- [141] Vertes A. Soft Laser Desorption Ionization - Maldi, Dros and Nanostructures BT - *Laser Ablation and its Applications*, in: C. Phipps (Ed.) // Springer US, Boston, MA. 2007. pp. 505–528. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30453-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30453-3_20).
- [142] Arnold N., Schrems G., Bäuerle D. Ablative thresholds in laser cleaning of substrates from particulates // *Applied Physics A*. 2004. V. 79. P. 729–734. <https://doi.org/10.1007/s00339-004-2644-8>.

- [143] 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>.
- [144] Doria G., Conde J., Veigas B., Giestas L., Almeida C., Assunção M., Rosa J., Baptista P.V. Noble metal nanoparticles for biosensing applications // *Sensors*. 2012. V. 12. P. 1657–1687. <https://doi.org/10.3390/s120201657>.
- [145] Zhai D., Liu B., Shi Y., Pan L., Wang Y., Li W., Zhang R., Yu G. Highly sensitive glucose sensor based on pt nanoparticle/polyaniline hydrogel heterostructures // *ACS Nano*. 2013. V. 7. P. 3540–3546. <https://doi.org/10.1021/nn400482d>.
- [146] Lee K.S., El-Sayed M.A. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: Sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition // *Journal of Physical Chemistry B*. 2006. V. 110. P. 19220–19225. <https://doi.org/10.1021/jp062536y>.
- [147] Won Y.H., Stanciu L.A. Cu<sub>2</sub>O and Au/Cu<sub>2</sub>O particles: Surface properties and applications in glucose sensing // *Sensors (Switzerland)*. 2012. V. 12. P. 13019–13033. <https://doi.org/10.3390/s121013019>.
- [148] Ma J., Lee S.M.Y., Yi C., Li C.W. Controllable synthesis of functional nanoparticles by microfluidic platforms for biomedical applications-a review // *Lab on a Chip*. 2017. V. 17. P. 209–226. <https://doi.org/10.1039/C6LC01049K>.
- [149] Lahiri A., Kobayashi S.-I. Electroless deposition of gold on silicon and its potential applications: review // *Surface Engineering*. 2016. V. 32. P. 321–337. <https://doi.org/10.1179/1743294415Y.0000000060>.
- [150] Semenova D., Gernaey K.V., Silina Y.E. Exploring the potential of electroless and electroplated noble metal-semiconductor hybrids within bio- and environmental sensing // *Analyst*. V. 143. P. 2018. 5646–5669. <https://doi.org/10.1039/c8an01632a>.
- [151] Zhao J., Sun M., Liu Z., Quan B., Gu C., Li J. Three Dimensional Hybrids of Vertical Graphene-nanosheet Sandwiched by Ag-nanoparticles for Enhanced Surface Selectively Catalytic Reactions // *Scientific Reports*. 2015. V. 5. P. 16019. <https://doi.org/10.1038/srep16019>.
- [152] Morley K.S., Marr P.C., Webb P.B., Berry A.R., Allison F.J., Moldovan G., Brown P.D., Howdle S.M. Clean preparation of nanoparticulate metals in porous supports: a supercritical route Electronic supplementary information (ESI) available: synthesis of precursor complexes; preparation of aerogels // *Journal of Materials Chemistry*. 2002. V. 12. P. 1898–1905. <https://doi.org/10.1039/b111111f>.
- [153] Tian N., Zhou Z.-Y., Sun S.-G., Cui L., Ren B., Tian Z.-Q. Electrochemical preparation of platinum nanothorn assemblies with high surface enhanced Raman scattering activity // *Chemical Communications*. 2006. V. 4090. P. 4090-4092. <https://doi.org/10.1039/b609164d>.



- [154] Camden J.P., Dieringer J., Zhao J., Duyn R.P., Duyn R.P.V. Controlled plasmonic nanostructures for surface-enhanced spectroscopy and sensing // *Accounts of Chemical Research*. 2008. V. 41. P. 1653–1661. <https://doi.org/10.1021/ar800041s>.
- [155] Robinson R.D., Sadtler B., Demchenko D.O., Erdonmez C.K., Wang L., Alivisatos P. Spontaneous superlattice formation in nanorods through partial cation exchange // *Science*. 2007. V. 317. P. 355–358.
- [156] Dloczik L., Könenkamp R. Nanostructure transfer in semiconductors by ion exchange // *Nano Letters*. 2003. V. 3. P. 651–653. <https://doi.org/10.1021/nl0340879>.
- [157] Frattini A., Pellegrini N., Nicastro D., Sanctis O. Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes // *Materials Chemistry and Physics*. 2005. V. 94. P. 148–152. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.04.023>.
- [158] Evanoff D.D., Chumanov G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays // *ChemPhysChem*. 2005. V. 6. P. 1221–1231. <https://doi.org/10.1002/cphc.200500113>.
- [159] Sudeep P.K., Kamat P.V. Photosensitized growth of silver nanoparticles under visible light irradiation: A mechanistic investigation // *Chemistry of Materials*. 2005. V. 17. P. 5404–5410. <https://doi.org/10.1021/cm0512777>.
- [160] Kabashin A.V., Meunier M. Synthesis of colloidal nanoparticles during femtosecond laser ablation of gold in water // *Journal of Applied Physics*. 2003. V. 94. P. 7941–7943. <https://doi.org/10.1063/1.1626793>.
- [161] Bai H.-J., Yang B.-S., Chai C.-J., Yang G.-E., Jia W.-L., Yi Z.-B. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rhodobacter Sphaeroides* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011. V. 27. P. 2723–2728. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0747-x>.
- [162] Uson L., Sebastian V., Arruebo M., Santamaria J. Continuous microfluidic synthesis and functionalization of gold nanorods // *Chemical Engineering Journal*. 2016. V. 285. P. 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.103>.
- [163] Brenner A., Riddell G.E. Nickel plating on steel by chemical reduction // *Journal of Research of the National Bureau of Standards*. 1946. V. 37. P. 31. <https://doi.org/10.6028/jres.037.019>.
- [164] Mokari T., Rothenberg E., Popov I., Costi R., Banin U. Selective growth of metal tips onto semiconductor quantum rods and tetrapods // *Science*. 2004. V. 304. P. 1787–1790.
- [165] Yang J., Elim H.I., Zhang Q.B., Lee J.Y., Ji W. Rational synthesis, self-assembly, and optical properties of PbS-Au heterogeneous nanostructures via preferential deposition // *Journal of the American Chemical Society*. 2006. V. 28. P. 11921–11926. <https://doi.org/10.1021/ja062494r>.

- [166] Thimsen E., Formal F. Le, Grätzel M., Warren S.C. Influence of plasmonic Au nanoparticles on the photoactivity of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes for water splitting // *Nano Letters*. 2011. V. 11. P. 35–43. <https://doi.org/10.1021/nl1022354>.
- [167] Primo A., Corma A., García H. Titania supported gold nanoparticles as photocatalyst // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011. V. 13. P. 886–910. <https://doi.org/10.1039/c0cp00917b>.
- [168] Yutaka O., Tetsuya O. Electroless deposition processes: fundamentals and applications // *Advances in Electrochemical Science and Engineering*. 1994. P. 57–116.
- [169] Okinaka Y., Hoshino M. Some recent topics in gold plating for electronics applications // *Gold Bulletin*. 1998. V. 31. P. 3–13. <https://doi.org/10.1007/BF03215469>.
- [170] Porter L.A., Choi H.C., Schmeltzer J.M., Ribbe A.E., Elliott L.C.C., Buriak J.M. Electroless nanoparticle film deposition compatible with photolithography, microcontact printing, and dip-pen nanolithography patterning technologies // *Nano Letters*. 2002. V. 2. P. 1369–1372. <https://doi.org/10.1021/nl025790k>.
- [171] Yae S., Nasu N., Matsumoto K., Hagihara T., Fukumuro N., Matsuda H. Nucleation behavior in electroless displacement deposition of metals on silicon from hydrofluoric acid solutions // *Electrochimica Acta*. 2007. V. 53. P. 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.04.058>.
- [172] Duffy P., Reynolds L.A., Sanders S.E., Metz K.M., Colavita P.E. Natural reducing agents for electroless nanoparticle deposition: Mild synthesis of metal/carbon nanostructured microspheres // *Materials Chemistry and Physics*. 2013. V. 140. P. 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2013.03.047>.
- [173] Ellsworth A.A., Walker A.V. Role of the reducing agent in the electroless deposition of copper on functionalized SAMs // *Langmuir*. 2017. V. 33. P. 8663–8670. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00103>.
- [174] Wei J., Buriak J.M., Siuzdak G. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon // *Nature*. 1999. V. 399. P. 243–246. <https://doi.org/10.1038/20400>.
- [175] Cha S., Yeung E.S. Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and MSn of small molecules. Imaging of cerebroside directly from rat brain tissue // *Analytical Chemistry*. 2007. V. 79. P. 2373–2385. <https://doi.org/10.1021/ac062251h>.
- [176] Silina Y.E., Meier F., Nebolsin V.A., Koch M., Volmer D.A. Novel galvanic nanostructures of Ag and Pd for efficient laser desorption/ionization of low molecular weight compounds *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2014. V. 25. P. 841–851. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0853-8>.
- [177] Silina Y.E., Koch M., Volmer D.A. Impact of analyte ablation and surface acidity of Pd nanoparticles on efficiency of surface-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry // *International Journal of Mass Spectrometry*. 2015. V. 387. P. 3701–3707. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.06.009>.

- [178] 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>.
- [179] 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 // *Journal of Mass Spectrometry*. 2015. V. 50. P. 578–585. <https://doi.org/10.1002/jms.3564>.
- [180] Bosch-Navarro C., Rourke J.P., Wilson N.R. Controlled electrochemical and electroless deposition of noble metal nanoparticles on graphene // *RSC Advances*. 2016. V. 6. P. 73790–73796. <https://doi.org/10.1039/C6RA14836K>.
- [181] Silina Y.E., Koch M., Volmer D.A. 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 // *Journal of Mass Spectrometry*. 2014. 49. P. 468–480. <https://doi.org/10.1002/jms.3362>.
- [182] 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 // *Journal of Mass Spectrometry*. 2017. V. 52. P. 43–53. <https://doi.org/10.1002/jms.3898>.
- [183] Tarasov A.L., Kirichenko O.A., Tolkachev N.N., Mishin I.V., Kalenchuk A.N., Bogdan V.I., Kustov L.M. The influence of the dispersion of metals on the activity of Pt/C and Pd/C catalysts in the dehydrogenation of perhydroterphenyl // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 84. 2010. P. 1122–1126. <https://doi.org/10.1134/S0036024410070071>.
- [184] Ricci F., Amine A., Palleschi G., Moscone D. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability // *Biosensors and Bioelectronics*. 2002. V. 18. P. 165–174. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00169-0).
- [185] Gepp M.M., Fischer B., Schulz A., Dobringer J., Gentile L., Vásquez J.A., Neubauer J.C., Zimmermann H. Bioactive surfaces from seaweed-derived alginates for the cultivation of human stem cells // *Journal of Applied Phycology*. 2017. V. 29. P. 2451–2461. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1130-6>.
- [186] Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Zimmermann H., Petrenko A.Y. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: Adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014. V. 25. P. 857–871. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5108-x>.

- [187] Schulz A., Katsen-Globa A., Huber E.J., Mueller S.C., Kreiner A., Pütz N., Gepp M.M., Fischer B., Stracke F., Briesen H., Neubauer J.C., Zimmermann H. Poly(amidoamine)-alginate hydrogels: directing the behavior of mesenchymal stem cells with charged hydrogel surfaces // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2018. V. 29. P. 105. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6113-x>.
- [188] Yashina E.I., Borisova A.V., Karyakina E.E., Shchegolikhina O.I., Vagin M.Y., Sakharov D.A., Tonevitsky A.G., Karyakin A.A. Sol-gel immobilization of lactate oxidase from organic solvent: toward the advanced lactate biosensor // *Analytical Chemistry*. 2010. V. 82. P. 1601–1604. <https://doi.org/10.1021/ac9027615>.
- [189] Sigwadi R., Dhlamini M.S., Mokrani T., N̄emavhola F., Nonjola P.F., Msomi P.F. The proton conductivity and mechanical properties of Nafion®/ ZrP nanocomposite membrane, *Heliyon*. 5 2019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02240>.
- [190] 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 Applied Bio Materials*. 2021. V. 4. P. 2558–2569. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01559>.
- [191] Uc-Cayetano E.G., Ordóñez L.C., Cauich-Rodríguez J.V., Avilés F. Enhancement of electrochemical glucose sensing by using multiwall carbon nanotubes decorated with iron oxide nanoparticles // *International Journal of Electrochemical Science*. 2016. V. 11. P. 6356–6369. <https://doi.org/10.20964/2016.07.85>.
- [192] Lee W.W., Chan W.T. Calibration of single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS) // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2015. V. 30. P. 1245–1254. <https://doi.org/10.1039/C4JA00408F>.
- [193] Silina Y.E., Koch M., Herbeck-Engel P., Iatsunskiy 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 // *Analytical Methods*. 2019. V. 11. P. 3987–3995. <https://doi.org/10.1039/c9ay01182j>.
- [194] 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. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122439>.
- [195] Silina Y.E., Kychmenko T.A., Koch M. Nanoporous anodic aluminum oxide films for UV/vis detection of noble and non-noble metals // *Analytical Methods*. 2016. V.8 P. 45-51. <https://doi.org/10.1039/c5ay02498f>.
- [196] Altreuter D.H., Dordick J.S., Clark D.S. Nonaqueous Biocatalytic Synthesis of New Cytotoxic Doxorubicin Derivatives: Exploiting Unexpected Differences in the Regioselectivity of Salt-Activated and Solubilized Subtilisin // *Journal of the American Chemical Society*. 2002. V. 124 P. 1871–1876. <https://doi.org/10.1021/ja015977y>.

- [197] Nguyen A.I., Spencer R.K., Anderson C.L., Zuckermann R.N. A bio-inspired approach to ligand design: folding single-chain peptoids to chelate a multimetallic cluster // *Chemical Science*. 2018. V. 9. P. 8806–8813. <https://doi.org/10.1039/C8SC04240C>.
- [198] Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models // *Chemical Reviews*. 2005. V. 105. P. 2999–3094. <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
- [199] Butyrskaya E.V., Nechaeva L.S., Shaposhnik V.A., Selemenev V.F. Standardless structural-group analysis of supramolecular systems // *Journal of Analytical Chemistry*. 2009. V. 64. P. 1000–1006. <https://doi.org/10.1134/S1061934809100049>.
- [200] Pérez E.G., González-Salgado D., Lomba E. Molecular dynamics simulations of aqueous solutions of short chain alcohols. Excess properties and the temperature of maximum density // *Fluid Phase Equilibria*. 2021. V. 528. P. 112840. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fluid.2020.112840>.
- [201] Lespes G. Nanoanalytics: analytical methods for characterization of nano- and micro-objects // *Environmental Science and Pollution Research*. 2019. V. 26. P. 5235–5237. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04235-w>.
- [202] Chang W.C., Huang L.C.L., Wang Y.S., Peng W.P., Chang H.C., Hsu N.Y., Bin W.Y., Chen C.H. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited // *Analytica Chimica Acta*. 2007. V. 582. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.08.062>.
- [203] Nishikaze T., Okumura H., Jinmei H., Amano J. Correlation between Sweet Spots of Glycopeptides and Polymorphism of the Matrix Crystal in MALDI Samples // *Mass Spectrometry*. 2012. V. 1. P. A0006. <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.a0006>.
- [204] Pauk V., Havlíček V., Papoušková B., Sulovský P., Lemr K. Simultaneous identification of historical pigments Prussian blue and indigo in paintings by electrospray mass spectrometry // *Journal of Mass Spectrometry*. 2013. V. 48. P. 927–930. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.3228>.
- [205] Kuckova S., Hynek R., Němec I., Kodiček M., Jehlička J. Critical comparison of spectrometric analyses of non-mineral blue dyes and pigments used in artworks // *Surface and Interface Analysis*. 2012. V. 44. P. 963–967. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/sia.4828>.
- [206] 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>.
- [207] Liu Y., Liu J., Deng C., Zhang X. Graphene and graphene oxide: Two ideal choices for the enrichment and ionization of long-chain fatty acids free from matrix-assisted laser desorption/ionization matrix interference // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011. V. 25. P. 3223–3234. <https://doi.org/10.1002/rcm.5218>.

- [208] Liang K., Gao H., Gu Y., Yang S., Zhang J., Li J., Wang Y., Wang Y., Li Y. Graphene oxide aggregate-assisted LDI-MS for the direct analysis of triacylglycerol in complex biological samples // *Analytica Chimica Acta*. 2018. V. 95. P. 376-391. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.049>.
- [209] Liu C.W., Chien M.W., Su C.Y., Chen H.Y., Li L.J., Lai C.C. Analysis of flavonoids by graphene-based surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Analyst*. 2012. V. 137. P. 5809-5816. <https://doi.org/10.1039/c2an36155h>.
- [210] Farsang E., Gaál V., Horváth O., Bárdos E., Horváth K. Analysis of non-ionic surfactant Triton X-100 using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 1223. <https://doi.org/10.3390/molecules24071223>.
- [211] Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung // *Zeitschrift Für Physik*. 1959. V. 155. P. 206–222. <https://doi.org/10.1007/BF01337937>.
- [212] Fukami K. Porous Silicon and Electrochemical Deposition BT - Handbook of Porous Silicon, in: L. Canham (Ed.) // Springer International Publishing, Cham. 2017. pp. 1–10. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-04508-5\\_65-2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-04508-5_65-2).
- [213] Горшунова В.П., Спиридонов Б.А., Федянин В.И. Сорбция аммиака пористым оксидом алюминия, модифицированным наночастицами некоторых переходных металлов // Вестник воронежского государственного технического университета. 2009. Т. 5. С. 99–101, <https://www.elibrary.ru/item.asp?edn=lathuh>
- [214] Silina Y.E., Semenova D., Spiridonov B.A. One-step encapsulation, storage and controlled release of low molecular weight organic compounds via electroplated nanoparticles // *The Analyst*. 2019. V. 144. P. 5677-5681. <https://doi.org/10.1039/c9an01246j>.
- [215] Gaudin V., Hédou C., Soumet C., Verdon E. Development and optimisation of an amperometric immunosensor for the detection of banned antibiotic residues in honey // *Proceedings*. 2020. V. 60(1). № 48. P. 7019. <https://doi.org/10.3390/iecb2020-07019>.
- [216] Perry W.J., Patterson N.H., Prentice B.M., Neumann E.K., Caprioli R.M., Spraggins J.M. Uncovering matrix effects on lipid analyses in MALDI imaging mass spectrometry experiments // *Journal of Mass Spectrometry*. 2020. V. 55. P. 55:e44914491. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.4491>.
- [217] Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS // *Analytical Chemistry*. 2003. V. 75. № 13. P. 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>.
- [218] Schiller J., Süß R., Petkovi M., Arnold K. Triacylglycerol analysis of vegetable oils by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass

- spectrometry and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy // *Journal of Food Lipids*. 2002. V. 9. P. 185–200. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2002.tb00218.x>.
- [219] Khmelnitsky Y.L., Welch S.H., Dordick J.S., Clark D.S. Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents // *Journal of the American Chemical Society*. 1994. V. 116. № 6. P. 2647–2648 <https://doi.org/10.1021/ja00085a066>.
- [220] Ostrowska, Narebska A. Infrared study of hydration and association of functional groups in a perfluorinated J.Nafion membrane, Part 1 // *Colloid & Polymer Science*. 1983. V. 261. P. 93–98. <https://doi.org/10.1007/BF01410686>.
- [221] Tsai C.E., Hwang B.J. Intermolecular interactions between methanol/water molecules and nafion<sup>TM</sup> membrane: An infrared spectroscopy study // *Fuel Cells*. 2007. V. 7. P. 408–416. <https://doi.org/10.1002/fuce.200700002>.
- [222] 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 // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2018. V. 6. P. 1886–1897. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.044>.
- [223] Mennucci B., Martínez J.M. How to model solvation of peptides? Insights from a quantum-mechanical and molecular dynamics study of N-methylacetamide. 1. Geometries, infrared, and ultraviolet spectra in water // *Journal of Physical Chemistry B*. 2005. V. 109. № 19, P. 9818–9829. <https://doi.org/10.1021/jp050034z>.
- [224] Keller D.E., Visser T., Soulimani F., Koningsberger D.C., Weckhuysen B.M. Hydration effects on the molecular structure of silica-supported vanadium oxide catalysts: A combined IR, Raman, UV-vis and EXAFS study // *Vibrational Spectroscopy*. 2007. V. 43. P. 140–151. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.07.005>.
- [225] Hosseinkhani S., Ranjbar B., Naderi-Manesh H., Nemat-Gorgani M. Chemical modification of glucose oxidase: Possible formation of molten globule-like intermediate structure // *FEBS Letters*. 2004. V. 561. P. 213–216. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00134-6).
- [226] Voo W.P., Lee B.B., Idris A., Islam A., Tey B.T., Chan E.S. Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile // *RSC Advances*. 2015. V. 5. P. 36687–36695. <https://doi.org/10.1039/c5ra03862f>.
- [227] Ammam M., Fransaer J. AC-electrophoretic deposition of glucose oxidase // *Biosensors and Bioelectronics*. 2009. V. 25. P. 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.06.036>.
- [228] 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 // *The Analyst*. 2021. V. 146. P. 2172–2185. <https://doi.org/10.1039/d0an02429e>.

- [229] Semenova D., Gernaey K.V., Morgan B., Silina Y.E. Towards one-step design of tailored enzymatic nanobiosensors // *Analyst*. 2019. V. 145. P. 1014-1024. <https://doi.org/10.1039/c9an01745c>.
- [230] Jiang B., Li M., Bai F., Yu H., Mwenya T., Li Y., Song D. Morphology-controlled synthesis of silver nanoparticles on the silicon substrate by a facile silver mirror reaction // *AIP Advances*. 2013. V. 3. P. 032119. <https://doi.org/10.1063/1.4794956>.
- [231] Eppler R.K., Komor R. S., Huynh J., Douglas S., Water C. Dynamics and salt-activation of enzymes in organic media: Mechanistic implications revealed by NMR spectroscopy // *PNAS*. 2006. V. 103 (15). P. 5706-5710. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601113103>
- [232] Zaks A., Klibanov A.M. The effect of water on enzyme action in organic media // *The Journal of Biological Chemistry*. 1988. V. 15, № 263. P. 8017-8021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3131337/>
- [233] Klibanov A. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? // *Trends in Biotechnology*. 1997. V. 15. P. 97-101. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01013-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01013-5).
- [234] Itoh Y., Ohashi Y., Shibue T., Hayashi A., Maki S., Hirano T., Niwa H. Reduction in Desorption Mass Spectrometry: Multiple Protonation on Flavins without Charge Increment // *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*. 2002. V. 50. P. 52–57. <https://doi.org/10.5702/massspec.50.52>.
- [235] 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>.
- [236] Semenova D., Pinto T., Koch M., Gernaey K.V., Junicke H. Electrochemical tuning of alcohol oxidase and dehydrogenase catalysis via biosensing towards butanol-1 detection in fermentation media // *Biosensors and Bioelectronics*. 2020. V. 170. P. 112702. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112702>.
- [237] Lerf A., He H., Forster M., Klinowski J. Structure of graphite oxide revisited // *Journal of Physical Chemistry B*. 1998. V. 102, № 23. P. 4477–4482. <https://doi.org/10.1021/jp9731821>.
- [238] Yang J., Shi G., Tu Y., Fang H. High correlation between oxidation loci on graphene oxide // *Angewandte Chemie - International Edition*. 2014. V. 53. P. 10190-10194. <https://doi.org/10.1002/anie.201404144>.
- [239] Santra S., Hota P.K., Bhattacharyya R., Bera P., Ghosh P., Mandal S.K. Palladium nanoparticles on graphite oxide: A recyclable catalyst for the synthesis of biaryl cores // *ACS Catalysis*. 2013. V. 3. № 12. P. 2776–2789. <https://doi.org/10.1021/cs400468h>.
- [240] Sumaryada T., Gunawan M.S., Perdana S., Arjo S., Maddu A. A molecular interaction analysis reveals the possible roles of graphene oxide in a glucose biosensor // *Biosensors*. 2019. V. 9(1). P. 18. <https://doi.org/10.3390/bios9010018>.



- [241] Gor'kov K.V., Talagaeva N.V., Kleinikova S.A., Dremova N.N., Vorotyntsev M.A., Zolotukhina E.V. Palladium-polypyrrole composites as prospective catalysts for formaldehyde electrooxidation in alkaline solutions // *Electrochimica Acta*. 2020. V. 345. P. 136164. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136164>.
- [242] Karyakin A.A. Prussian blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications // *Electroanalysis*. 2001. V. 13. P. 813-819. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200106\)13:10<813::AID-ELAN813>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200106)13:10<813::AID-ELAN813>3.0.CO;2-Z).
- [243] Neumann C.C.M., Laborda E., Tschulik K., Ward K.R., Compton R.G. Performance of silver nanoparticles in the catalysis of the oxygen reduction reaction in neutral media: Efficiency limitation due to hydrogen peroxide escape // *Nano Research*. 2013. V. 6. P. 511–524. <https://doi.org/10.1007/s12274-013-0328-4>.
- [244] Martin-Martinez M., Álvarez-Torrellas S., García J., Silva A.M.T., Faria J.L., Gomes H.T. Exploring the activity of chemical-activated carbons synthesized from peach stones as metal-free catalysts for wet peroxide oxidation // *Catalysis Today*. 2018. V. 313. P. 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.01.003>.
- [245] Rahul R., Singh R.K., Bera B., Devivaraprasad R., Neergat M. The role of surface oxygenated-species and adsorbed hydrogen in the oxygen reduction reaction (ORR) mechanism and product selectivity on Pd-based catalysts in acid media // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2015. V. 17. P. 15146–15155. <https://doi.org/10.1039/C5CP00692A>.
- [246] Kleinikova S.A., V Gor'kov K., Gerasimova E.V., Dremova N.N., Zolotukhina E.V. Selective electrooxidation of acetaldehyde in aqueous ethanol alkaline solutions on silver-containing electrodes // *Electrochimica Acta*. 2021. V. 377. P. 138076. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138076>.
- [247] Baylet A., Marécot P., Duprez D., Castellazzi P., Groppi G., Forzatti P. In situ Raman and in situ XRD analysis of PdO reduction and Pd<sup>0</sup> oxidation supported on  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst under different atmospheres // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011. V. 13. P. 4607–4613. <https://doi.org/10.1039/C0CP01331E>.
- [248] Silina Y.E., Apushkinskaya N., Talagaeva N.V., Levchenko M.G., Zolotukhina E.V. Electrochemical operational principles and analytical performance of Pd-based amperometric // *The Analyst*. 2021. V. 146. P. 4873-4882. <https://doi.org/10.1039/d1an00882j>.
- [249] Ding M., He Q., Wang G., Cheng H.C., Huang Y., Duan X. An on-chip electrical transport spectroscopy approach for in situ monitoring electrochemical interfaces // *Nature Communications*. 2015. V. 6. P. 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms8867>.
- [250] Mano N. Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications // *Bioelectrochemistry*. 2019. V. 128. P. 218-240. [10.1016/j.bioelechem.2019.04.015](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.015)
- [251] Hoang V.C., Shafaat A., Jankovskaja S., Gomes V.G., Ruzgas T. Franz cells for facile biosensor evaluation: A case of HRP/SWCNT-based hydrogen peroxide detection

- via amperometric and wireless modes // *Biosensors and Bioelectronics*. 2021. V. 191. P. 113420. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113420>.
- [252] Xu J.Z., Zhu J.J., Wu Q., Hu Z., Chen H.Y. An amperometric biosensor based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene blue on a carbon nanotubes modified electrode // *Electroanalysis*. 2003. V. 15. P. 219–224. <https://doi.org/10.1002/elan.200390027>.
- [253] Kafi A. Direct Electrochemistry of Catalase Immobilized at Polymerized-SnO<sub>2</sub> Multiporous Modified Electrode for an Amperometric H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Biosensor // *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. 2018. V. 3. P. 3488-3493. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2018.03.000942>.
- [254] Prakash P.A., Yogeswaran U., Chen S.M. A review on direct electrochemistry of catalase for electrochemical sensors // *Sensors*. 2009. V. 9. P. 1821–1844. <https://doi.org/10.3390/s90301821>.
- [255] Sleno L., Volmer D.A. Some fundamental and technical aspects of the quantitative analysis of pharmaceutical drugs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005. V. 19. P. 1928–1936. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rcm.2006>.
- [256] Patton J.F., Lavrik N.V., Joy D.C., Hunter S.R., Datskos P.G., Smith D.B., Sepaniak M.J. Characterization of hydrogen responsive nanoporous palladium films synthesized via a spontaneous galvanic displacement reaction // *Nanotechnology*. 2012. V. 23. P. 465403. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/46/465403>.
- [257] Johansson M., Skúlason E., Nielsen G., Murphy S., Nielsen R.M., Chorkendorff I. Hydrogen adsorption on palladium and palladium hydride at 1bar // *Surface Science*. 2010. V. 604. P. 718–729. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.susc.2010.01.023>.
- [258] Fuchs B., Süß R., Schiller J. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research // *Progress in Lipid Research*. 2010. V. 49. P. 450–475. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.07.001>.
- [259] Harvey D.J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates // *Mass Spectrometry Reviews*. 1999. V. 18: P. 349–450. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(1999\)18:6,349](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1999)18:6<349::AID-MASB349>3.0.CO;2-1).
- [260] Kirkby M.J. *The fractal geometry of nature*. Benoit B. Mandelbrot. W. H. Freeman and co., San Francisco. 1982. p. 460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/esp.3290080415>.
- [261] Sherrod S.D., Diaz A.J., Russell W.K., Cremer P.S., Russell D.H. Silver Nanoparticles as Selective Ionization Probes for Analysis of Olefins by Mass Spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2008. V. 80. P. 6796–6799. <https://doi.org/10.1021/ac800904g>.
- [262] Cahill D.G., Goodson K., Majumdar A. Thermometry and Thermal Transport in Micro/Nanoscale Solid-State Devices and Structures // *Journal of Heat Transfer*. 2001. V. 124. P. 223–241. <https://doi.org/10.1115/1.1454111>.

- [263] Kemp W.K.G., Klemens P.G., Sreedhar A.K., White G.K. The thermal and electrical conductivity of palladium at low temperatures // *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*. 1955. V. 46. P. 811–814. <https://doi.org/10.1080/14786440708520611>.
- [264] Nizioł J., Rode W., Laskowska B., Ruman T. Novel monoisotopic  $^{109}\text{Ag}$ NPET for laser desorption/ionization mass spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2013. V. 85. P. 1926–1931. <https://doi.org/10.1021/ac303770y>.
- [265] Carpane E., Höche D., Schaaf P. Fundamentals of Laser-Material Interactions BT - Laser Processing of Materials: Fundamentals, Applications and Developments, in: P. Schaaf (Ed.) // Springer Berlin Heidelberg. Berlin. Heidelberg. 2010. p. 21–47. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13281-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13281-0_3).
- [266] Zhang X., Li W., Kou H., Shao J., Deng Y., Zhang X., Ma J., Li Y., Zhang X. Temperature and size dependent surface energy of metallic nano-materials // *Journal of Applied Physics*. 2019. V. 125. P. 185105. <https://doi.org/10.1063/1.5090301>.
- [267] Qi W.H., Wang M.P. Size and shape dependent melting temperature of metallic nanoparticles // *Materials Chemistry and Physics*. 2004. V. 88. P. 280–284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2004.04.026>.
- [268] Guisbiers G., Abudukelimu G., Hourlier D. Size-dependent catalytic and melting properties of platinum-palladium nanoparticles // *Nanoscale Research Letters*. 2011. V. 6. P. 396. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-396>.
- [269] Alimpiev S., Nikiforov S., Karavanskii V., Minton T., Sunner J. On the mechanism of laser-induced desorption–ionization of organic compounds from etched silicon and carbon surfaces // *The Journal of Chemical Physics*. 2001. V. 115. P. 1891–1901. <https://doi.org/10.1063/1.1381531>.
- [270] Kumar R., Kumar M. Effect of size on cohesive energy, melting temperature and Debye temperature of nanomaterials // *Indian Journal of Pure and Applied Physics*. 2012. V. 50. P. 329–334.
- [271] Schürenberg M., Dreisewerd K., Kamanabrou S., Hillenkamp F. Influence of the sample temperature on the desorption of matrix molecules and ions in matrix-assisted laser desorption ionization // *Int. J. Mass Spectrom.* 1998. V. 172. P. 89–94. [doi10.1016/S0168-1176\(97\)00253-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1176(97)00253-X)
- [272] Collings B.A. Fragmentation of Ions in a Low Pressure Linear Ion Trap // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2007. V. 18. P. 1459–1466. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.05.002>.
- [273] Steckel A., Schlosser G. An organic chemist’s guide to electrospray mass spectrometric structure elucidation // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules24030611>.

- [274] Силина Ю.Е., Спиридонов Б.А., Битюцких М.Ю. Сорбционное извлечение Cu (II) и Co (II) модифицированным композитом на основе нанопористого оксида алюминия // Вестник ВГУИТ. 2013. №3. С. 138 – 142.
- [275] Силина Ю.Е., Спиридонов Б.А., Горшунова В.П., Кучменко Т.А. Определение общей кислотности газовой фазы тест-полосками на основе нанопористого оксида // Аналитика и контроль. 2011. С. 324–331.
- [276] Silina Y.E., Kuchmenko T.A., Volmer D.A. Sorption of hydrophilic dyes on anodic aluminium oxide films and application to pH sensing // Analyst. 2015. V. 140. P. 771-778. <https://doi.org/10.1039/c4an00806e>.
- [277] Tam J., Palumbo G., Erb U., Recent Advances in Superhydrophobic Electrodeposits // Materials (Basel, Switzerland). 2016. V. 9. P. 151. <https://doi.org/10.3390/ma9030151>.
- [278] Erb R.A. Wettability of Metals under Continuous Condensing Conditions // The Journal of Physical Chemistry. 1965. V. 69. C. 1306–1309. <https://doi.org/10.1021/j100888a035>.
- [279] Stolee J.A., Vertes A. Polarization dependent fragmentation of ions produced by laser desorption from nanopost arrays // Physical Chemistry Chemical Physics. 2011. V. 13. P. 9140–9146. <https://doi.org/10.1039/c0cp02709j>.
- [280] Arakawa R., Kawasaki H. Functionalized nanoparticles and nanostructured surfaces for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry. 2010. V. 26. P. 1229–1240. <https://doi.org/10.2116/analsci.26.1229>.
- [281] Kumeria T., Santos A., Losic D. Nanoporous anodic alumina platforms: Engineered surface chemistry and structure for optical sensing applications // Sensors (Switzerland). 2014. V. 14. P. 11878–11918. <https://doi.org/10.3390/s140711878>.
- [282] 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 // Journal of Mass Spectrometry. 2017. V. 52. P. 43-53. <https://doi.org/10.1002/jms.3898>.
- [283] Antonio M., Raffaghelli M., Maggio R.M. Tackling quantitative polymorphic analysis through fixed-dose combination tablets production. Pyrazinamide polymorphic assessment // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2021. V. 194. P. 113786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113786>.
- [284] Cao X., Sun C., Thamann T.J. A Study of Sulfamerazine Single Crystals Using Atomic Force Microscopy, Transmission Light Microscopy, and Raman Spectroscopy // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005. V. 94. P. 1881–1892. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.20402>.
- [285] Trasi N.S., Byrn S.R. Mechanically induced amorphization of drugs: A study of the thermal behavior of cryomilled compounds // AAPS PharmSciTech. 2012. V. 13. P. 772–784. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9801-8>.

- [286] Chatteraj S., Bhugra C., Telang C., Zhong L., Wang Z., Sun C.C. Origin of Two Modes of Non-isothermal Crystallization of Glasses Produced by Milling // *Pharmaceutical Research*. 2012. V. 29. P. 1020–1032. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0644-x>.
- [287] Wang B., Barahona M., Buck M. A modular cell-based biosensor using engineered genetic logic circuits to detect and integrate multiple environmental signals // *Biosensors & Bioelectronics*. 2013. V. 40. P. 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.011>.
- [288] Giannakopoulou A., Patila M., Spyrou K., Chalmpes N., Zarafeta D., Skretas G., Gournis D., Stamatis H. Development of a four-enzyme magnetic nanobiocatalyst for multi-step cascade reactions // *Catalysts*. 2019. V. 9. P. 995. <https://doi.org/10.3390/catal9120995>.
- [289] Hassler B., Worden R.M., Mason A., Kim P., Kohli N., Zeikus J.G., Laivenieks M., Ofoli R. Biomimetic interfaces for a multifunctional biosensor array microsystem // *Proceedings of IEEE Sensors*. 2004. V. 2. P. 991–994. <https://doi.org/10.1109/icsens.2004.1426339>.
- [290] Wheeldon I., Minter S.D., Banta S., Barton S.C., Atanassov P., Sigman M. Substrate channelling as an approach to cascade reactions // *Nature Chemistry*. 2016. V. 8. P. 299–309. <https://doi.org/10.1038/nchem.2459>.
- [291] Quijano-Rubio A., Yeh H.-W., Park J., Lee H., Langan R.A., Boyken S.E., Lajoie M.J., Cao L, Chow C.M., Miranda M.C., Wi J., Hong H.J., Stewart L., Oh B.-H., Baker D. De novo design of modular and tunable protein biosensors // *Nature*. 2021. V. 591. P. 482–487. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03258-z>.
- [292] 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>.
- [293] Milton R.D., Minter S.D., Direct enzymatic bioelectrocatalysis: Differentiating between myth and reality // *Journal of the Royal Society Interface*. 2017. V. 14. P. 20170253. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0253>.
- [294] Arsalan A., Younus H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. V. 118. P. 1833–1847. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.030>.
- [295] Suzuki N., Lee J., Loew N., Takahashi-Inose Y., Okuda-Shimazaki J., Kojima K., Mori K., Tsugawa W., Sode K. Engineered glucose oxidase capable of quasi-direct electron transfer after a quick-and-easy modification with a mediator // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21. P. 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms21031137>.
- [296] Bartlett P.N., Al-Lolage F.A. There is no evidence to support literature claims of direct electron transfer (DET) for native glucose oxidase (GOx) at carbon nanotubes or

- graphene // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2018. V. 819. P. 26–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.06.021>.
- [297] Menegatti T., Žnidaršič-Plazl P. Hydrogel-Based Enzyme and Cofactor Co-Immobilization for Efficient Continuous Transamination in a Microbioreactor // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021. V. 9. P. 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.752064>.
- [298] 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>.
- [299] Matyash M., Despang F., Ikonomidou C., Gelinsky M. Swelling and Mechanical Properties of Alginate Hydrogels with Respect to Promotion of Neural Growth // *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2013. V. 20. P. 401–411. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0252>.
- [300] Zabarás D., Gordon M.H. Detection of pressed hazelnut oil in virgin olive oil by analysis of polar components: improvement and validation of the method // *Food Chemistry*. 2004. V. 84. P. 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.029>.
- [301] Woodbury S.E., Evershed R.P., Rossell J.B. Delta 13C analyses of vegetable oil fatty acid components, determined by gas chromatography--combustion--isotope ratio mass spectrometry, after saponification or regiospecific hydrolysis // *Journal of Chromatography. A*. 1998. V. 805. P. 249–257. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(97\)01304-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)01304-6).
- [302] van Kampen J.J.A., Burgers P.C., de Groot R., Gruters R.A., Luiders T.M., Biomedical application of MALDI mass spectrometry for small-molecule analysis // *Mass Spectrom. Rev.* 2011. V. 30. P. 101-120. <https://doi.org/10.1002/mas.20268>
- [303] Byrdwell W.C., Neff W.E. Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2002. V. 16. P. 300–319. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rcm.581>.
- [304] Budimir N., Blais J.-C., Fournier F., Tabet J.-C. The use of desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry for the detection of negative ions for fatty acids // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006. V. 20. P. 680–684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rcm.2363>.
- [305] Budimir N., Blais J.-C., Fournier F., Tabet J.-C. Desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry (DIOS) of model cationized fatty acids // *Journal of Mass Spectrometry*. 2007. V. 42. P. 42–48. <https://doi.org/10.1002/jms.1131>.
- [306] Calvano C.D., Palmisano F., Zambonin C.G. Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of triacylglycerols in oils // *Rapid Communications in Mass*

- Spectrometry. 2005. V.19. P. 1315–1320.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rcm.1933>.
- [307] Calvano C.D., Aresta A., Palmisano F., Zambonin C.G. A laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry investigation into triacylglycerols oxidation during thermal stressing of edible oils // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007. V. 389. P. 2075–2084. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1347-3>.
- [308] Johnson P., Philo M., Watson A., Mills E.N.C. Rapid Fingerprinting of Milk Thermal Processing History by Intact Protein Mass Spectrometry with Nondenaturing Chromatography // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. V. 59. P. 12420–12427. <https://doi.org/10.1021/jf203151e>.
- [309] Etxebarria J., Calvo J., Reichardt N.-C. Nanostructured weathering steel for matrix-free laser desorption ionisation mass spectrometry and imaging of metabolites, drugs and complex glycans // *Analyst*. 2014. V. 139. P. 2873–2883. <https://doi.org/10.1039/C4AN00216D>.
- [310] Mosier-Boss P.A. Review of SERS Substrates for Chemical Sensing // *Nanomaterials*. 2017. V. 7. P. 142. <https://doi.org/10.3390/nano7060142>.
- [311] Masoud H., Alexeev A. Controlled Release of Nanoparticles and Macromolecules from Responsive Microgel Capsules // *ACS Nano*. 2012. V. 6. P. 212–219. <https://doi.org/10.1021/nn2043143>.
- [312] Kreye F., Hamm G., Karrouf Y., Legouffe R., Bonnel D., Siepmann F., Siepmann J. MALDI-TOF MS imaging of controlled release implants // *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. 2012. V. 161. P. 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.017>.
- [313] Calvano C.D., Monopoli A., Cataldi T.R.I., Palmisano F. MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story? // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018. V. 410. P. 4015–4038. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1014-x>.
- [314] Chang W.C., Huang L.C.L., Wang Y.S., Peng W.P., Chang H.C., Hsu N.Y., Yang W.B., Chen C.H. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited // *Analytica Chimica Acta*. 2007. V. 582. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.08.062>.
- [315] Picca R.A., Calvano C.D., Cioffi N., Palmisano F. Mechanisms of Nanophase-Induced Desorption in LDI-MS. A Short Review // *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 2017. V. 7. P. 75. <https://doi.org/10.3390/nano7040075>.
- [316] Greving M.P., Patti G.J., Siuzdak G. Nanostructure-initiator mass spectrometry metabolite analysis and imaging // *Analytical Chemistry*. 2011. V. 83. P. 2–7. <https://doi.org/10.1021/ac101565f>.
- [317] Silina Y.E., Tillotson J.R., Manz A. Storage and controlled release of fragrances maintaining a constant ratio of volatile compounds // *Analytical Methods*. 2017. V. 9. P. 6073–6082. <https://doi.org/10.1039/c7ay01799e>.

- [318] Kuchmenko T., Shuba A., Umarhanov R., Lvova L. The new approach to a pattern recognition of volatile compounds: The inflammation markers in nasal mucus swabs from calves using the gas sensor array // *Chemosensors*. 2021. V. 9. P. 116. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9060116>.
- [319] Pérez R.L., Ayala C.E., Park J.Y., Choi J.W., Warner I.M. Coating-based quartz crystal microbalance detection methods of environmentally relevant volatile organic compounds // *Chemosensors*. 2021. V. 9. P. 153. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9070153>.
- [320] Воде В.В. Выбор массива пьезосенсоров для детектирования летучих органических веществ в воде // *Вестник Московского Университета. Химия*. 2016. Т. 57. С. 53–61.
- [321] Silina Y.E., Spiridonov B.A., Gorshunova V.P., Kuchmenko T.A., Umarhanov R.U. Сорбция паров аммиака тонкими пленками специфических реагентов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2011. Т.11. №. 3. С. 422 – 431.
- [322] 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.
- [323] 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.
- [324] Hvattum E., Yip W.L., Grace D., Dyrstad K. Characterization of polysorbate 80 with liquid chromatography mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy: Specific determination of oxidation products of thermally oxidized polysorbate 80 // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012. V. 62. P. 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.009>.
- [325] Barman B.N., Champion D.H., Sjoberg S.L. Identification and quantification of polyethylene glycol types in polyethylene glycol methyl ether and polyethylene glycol vinyl ether // *Journal of Chromatography A*. 2009. V. 1216. P. 6816–6823. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.024>.
- [326] 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>.
- [327] Silina Y.E., 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>.



[328] Zolotukhina E.V., Butyrskaya E.V., Koch M., Herbeck-Engel P., Levchenko M.G., Y.E. Silina. 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.

[329] Koch M., Katsen-Globa A., Zolotukhina E.V., Silina. 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.

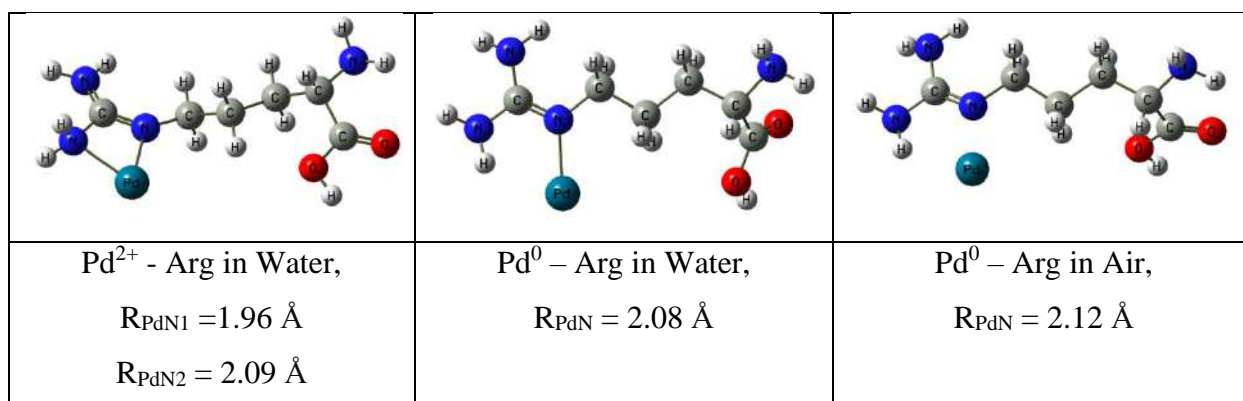
## ПРИЛОЖЕНИЕ

**Табл. П2.1** – LDI-MS результаты ( $n = 10$ ) по соосаждению Нафиона совместно с наночастицами палладия (лазер 45%). Данные получены путем извлечения пика Нафиона из спектров полного сканирования

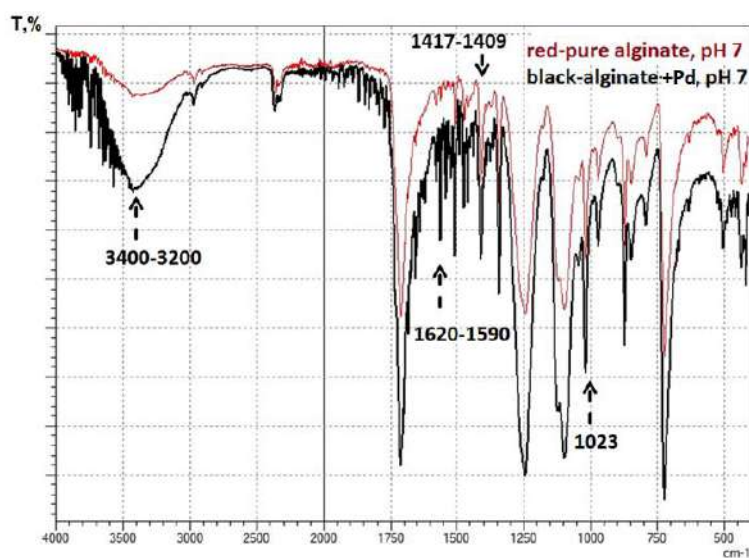
Метод	Градуировочная зависимость	$R^2$	DR*, нг/пятно	E**, %
Одностадийное формирование пленки	$y = 0.052x - 3.3333$	0.9995	$676 \pm 23$	78.07

\*DR – значения осаждения, найденные на основе калибровочной зависимости;

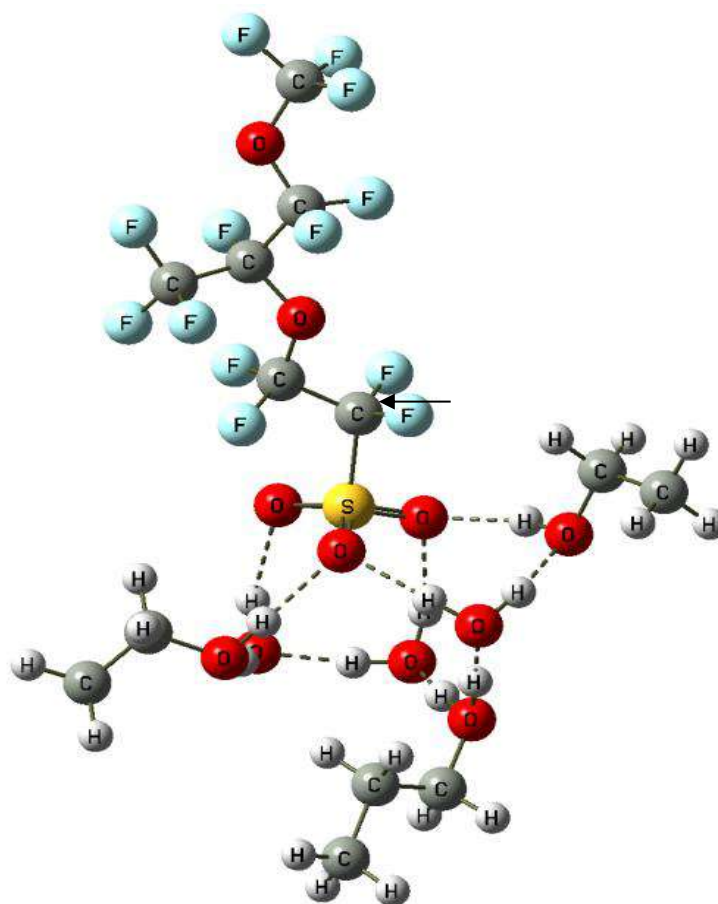
\*\*E – эффективность соосаждения.



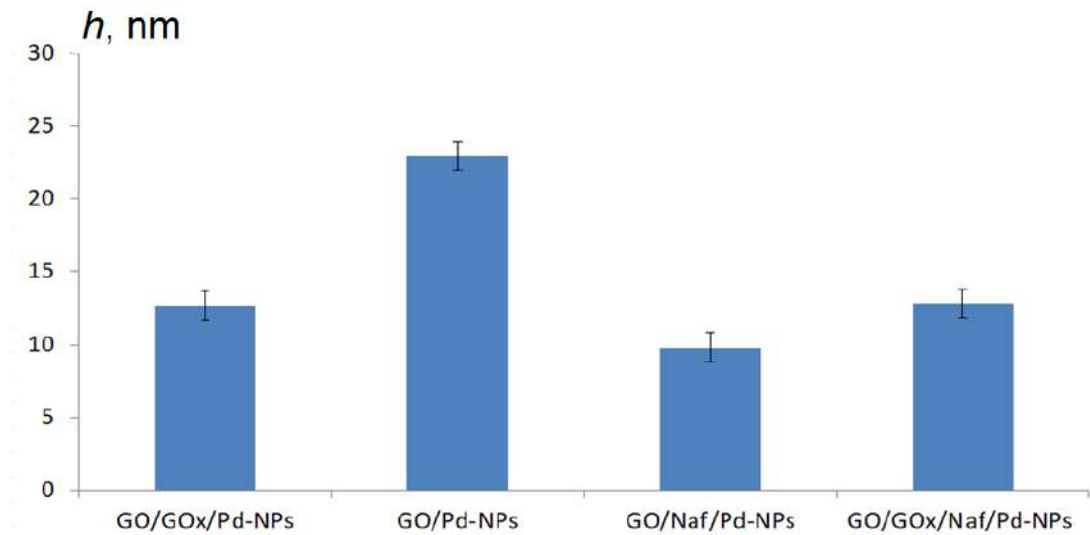
**Рис. П3.1** – Оптимизированные структуры  $Pd^{2+}$  и  $Pd^0$  комплексов с Arg в воде и на воздухе.



**Рис. П3.2** – ИК-спектры, записанные для индивидуального альгинатного мономера и после его смешения с палладиевым электролитом.

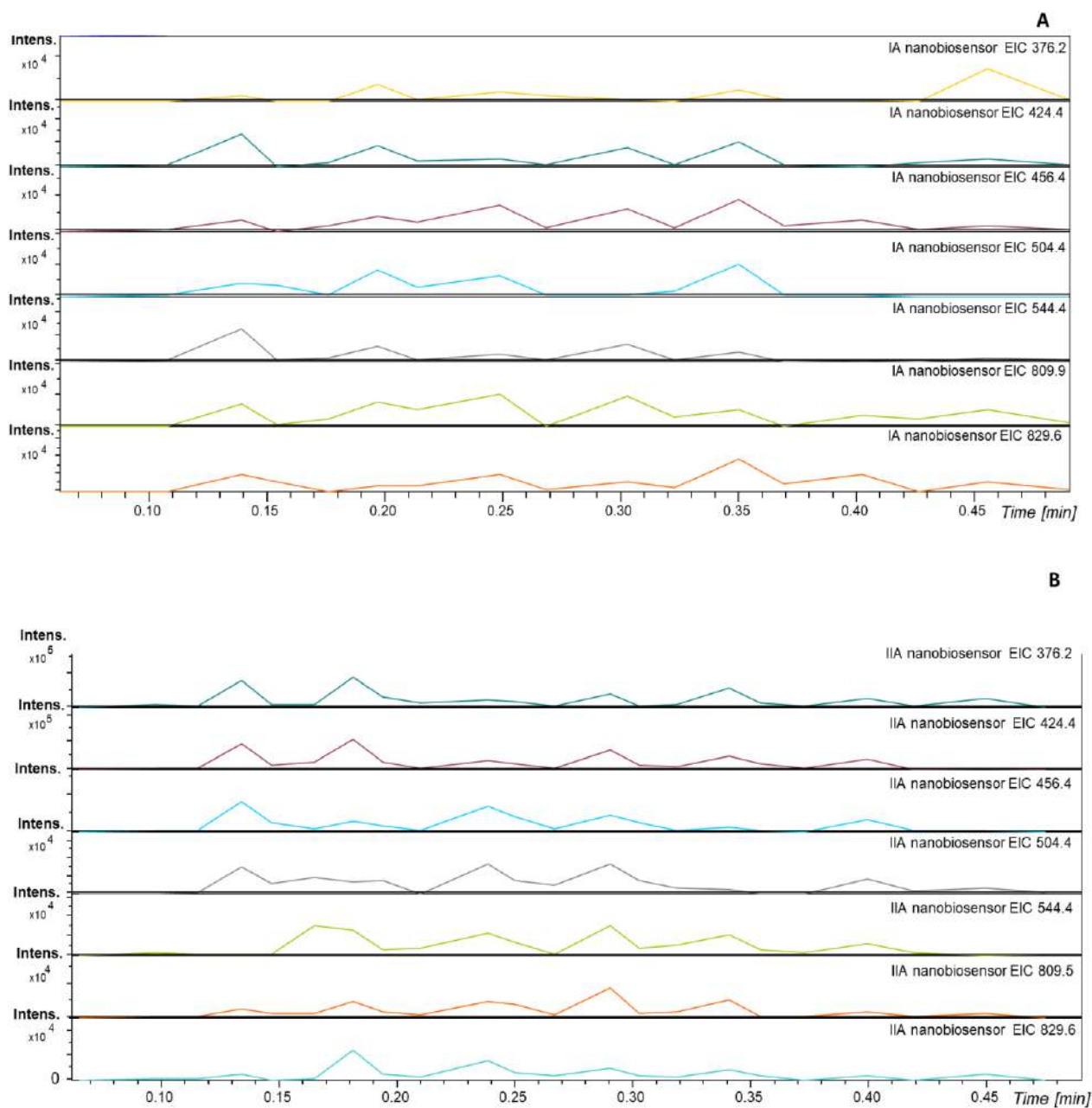


**Рис. ПЗ.3** – Оптимизированная структура фрагмента Нафион с сульфогруппой, окруженной 6 молекулами растворителя (3  $H_2O$ , 2  $Pr$ , 1 -  $PrH^+$ , показан стрелкой). Две молекулы пропанола находятся в первой гидратной оболочке сульфогруппы,  $PrH^+$  – во второй. *Примечание:* пунктир - водородные связи. При оптимизации структура помещалась в среду с  $\epsilon = 30$ .

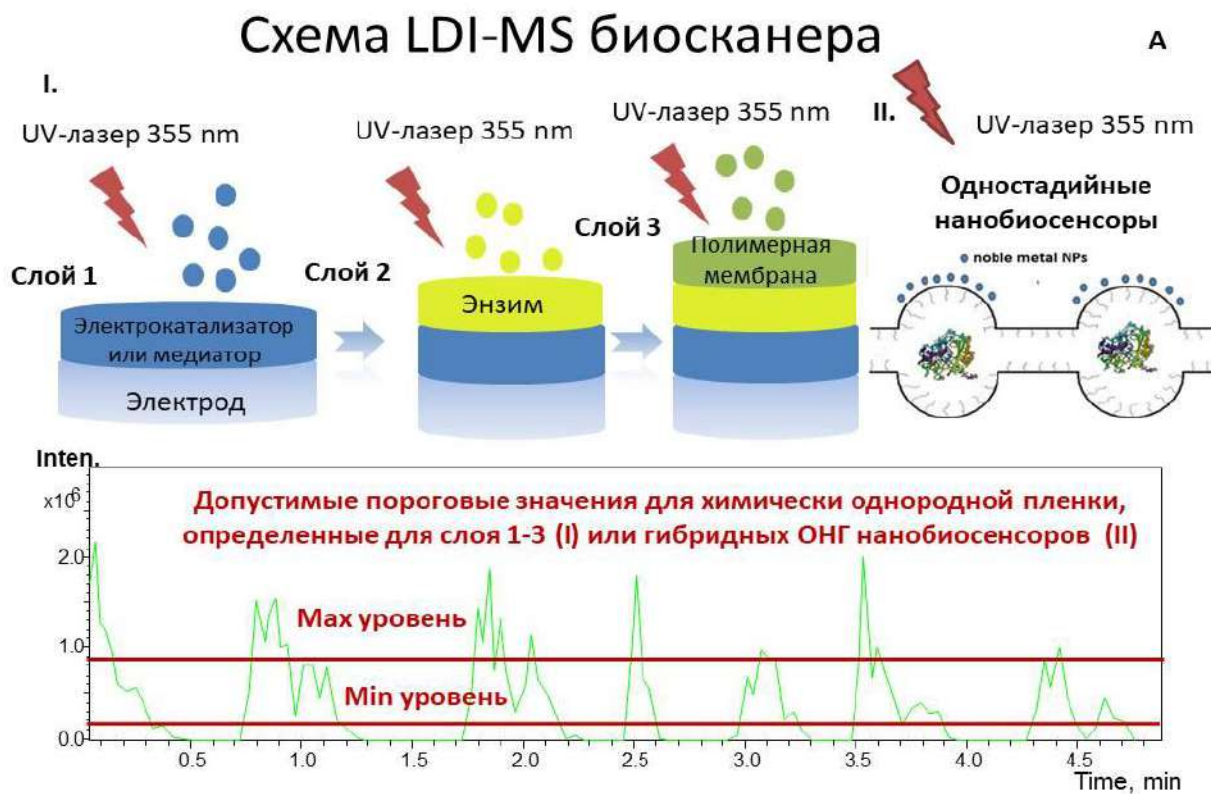


**Рис. ПЗ.4** – Зависимость толщины ( $h$ , нм) гибридного слоя от типа пленки.

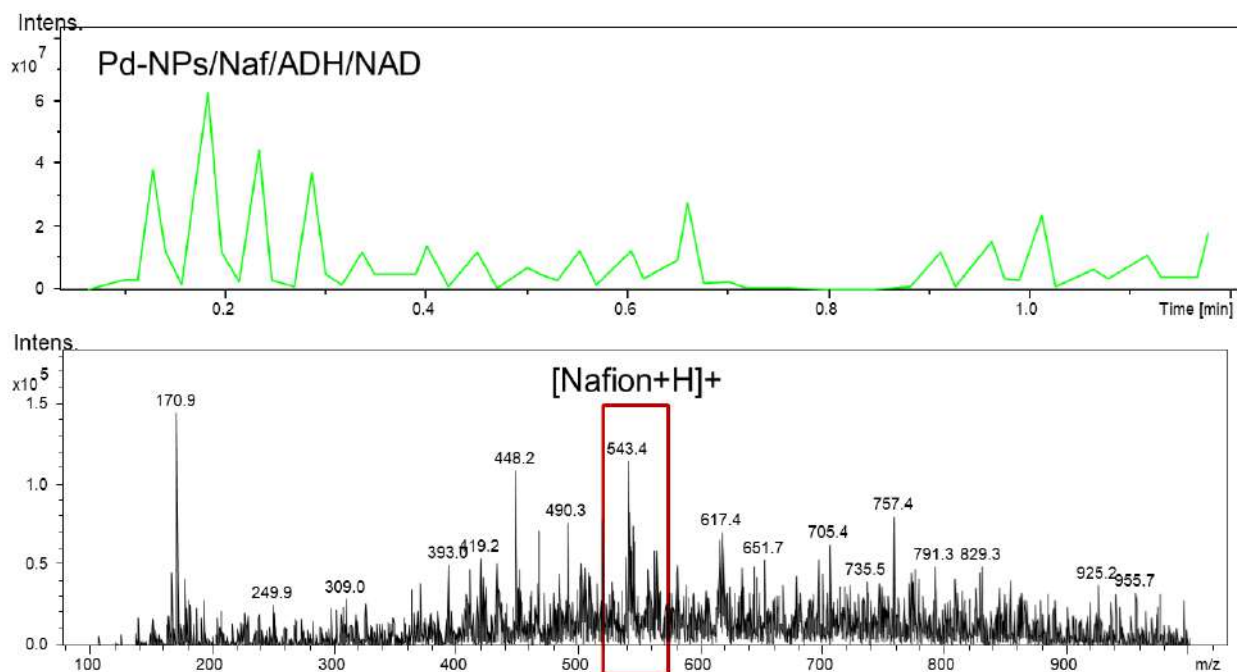
*Примечание:* толщина ( $h$ , нм) рассчитывалась по закону Фарадея. Массы гибридных пленок (нг) оценивали с помощью QCM.



**Рис. ПЗ.5** – EIC-MS хроматограммы, полученные в положительном режиме ионизации с поверхности двух идентичных нанобиосенсоров из одной партии: нанобиосенсор 1 (**A**) нанобиосенсор 2 (**B**). Лазер в течение 45 с, 45%.

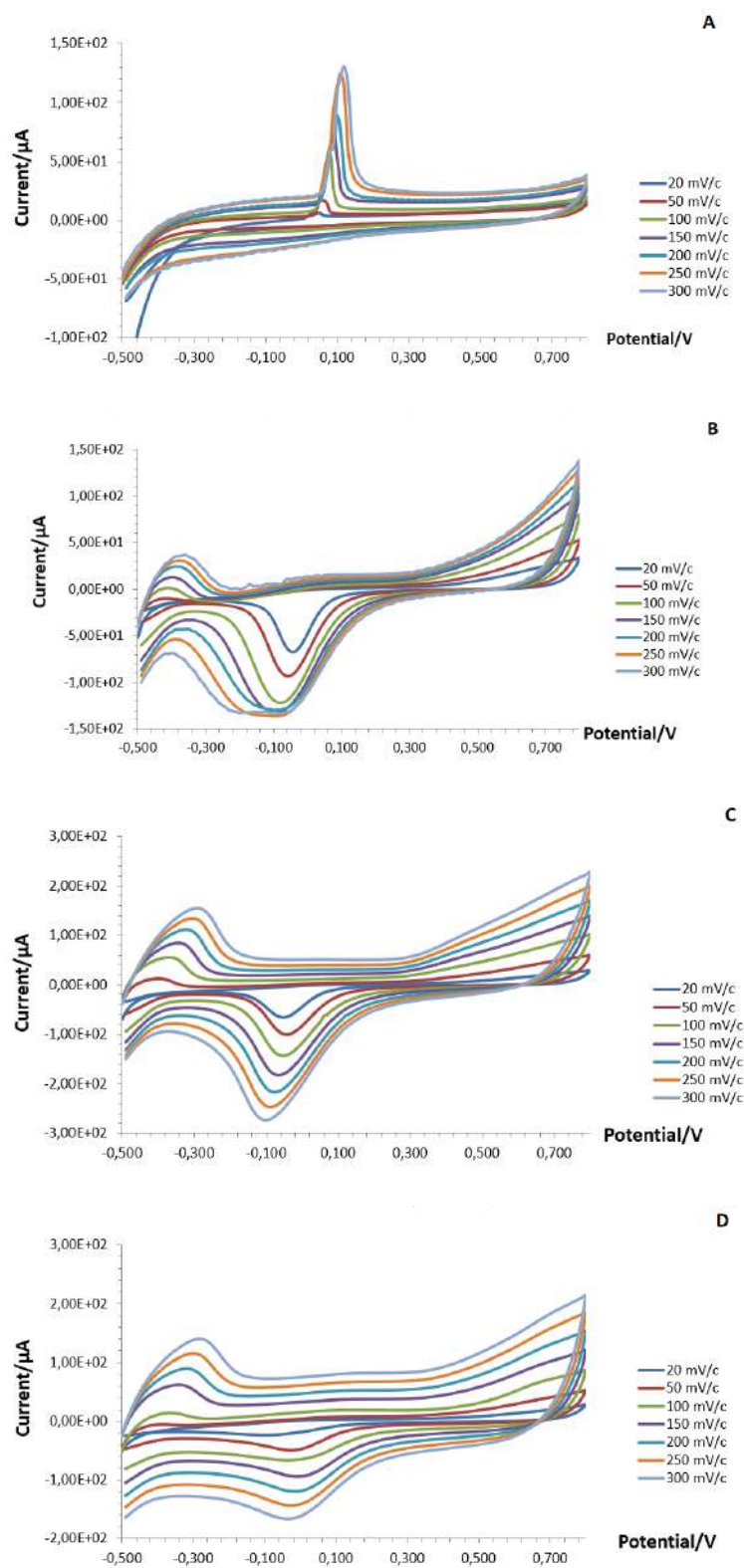


**Рис. ПЗ.6** – Алгоритм работы LDI-MS биохимического сканера (A) и общего процесса стандартизации ОНГ нанобиосенсоров (B).



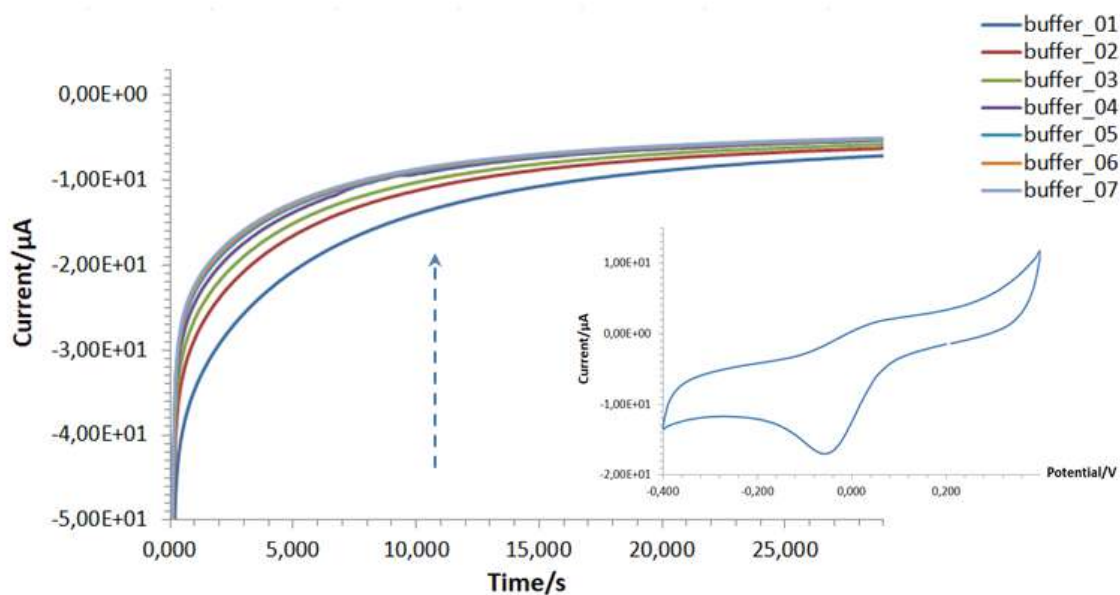
**Рис. П3.7** – ТИС-хроматограмма и масс-спектр, записанный в положительном режиме ионизации с поверхности нанобиосенсора, синтезированного из 4-х компонентного раствора электролита.

*Примечание:* отсутствие характеристического пика при  $m/z$  662.4 доказывает отсутствие соосаждения  $\text{NAD}^+$  из 4-х компонентного раствора.

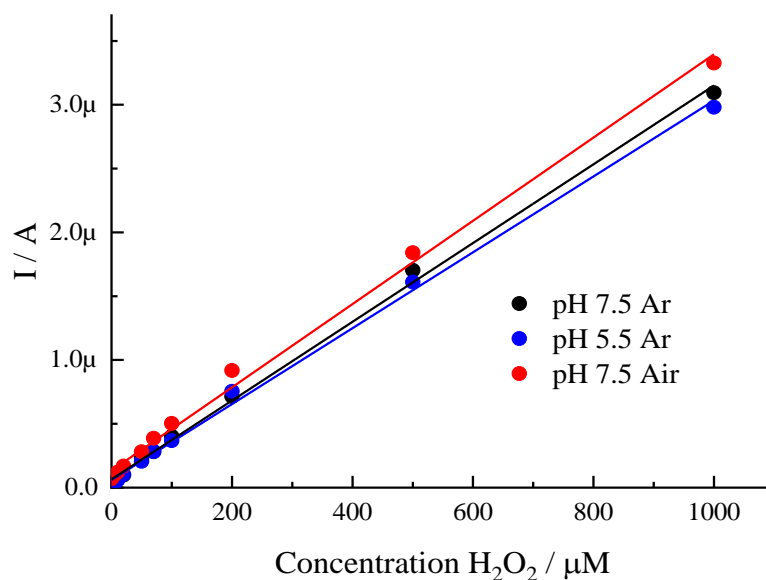


**Рис. П4.1** – ЦВА кривые, записанные в буфере при pH 7 при разных скоростях сканирования для наночастиц серебра (A), палладия (B), наночастиц палладия допированных Нафионом (C) и биоорганическим компонентом, Pd-NPs/Naf/AOx (D). Все ОНГ пленки были получены в идентичных условиях синтеза (ток -2.5 мА, время 30 с).

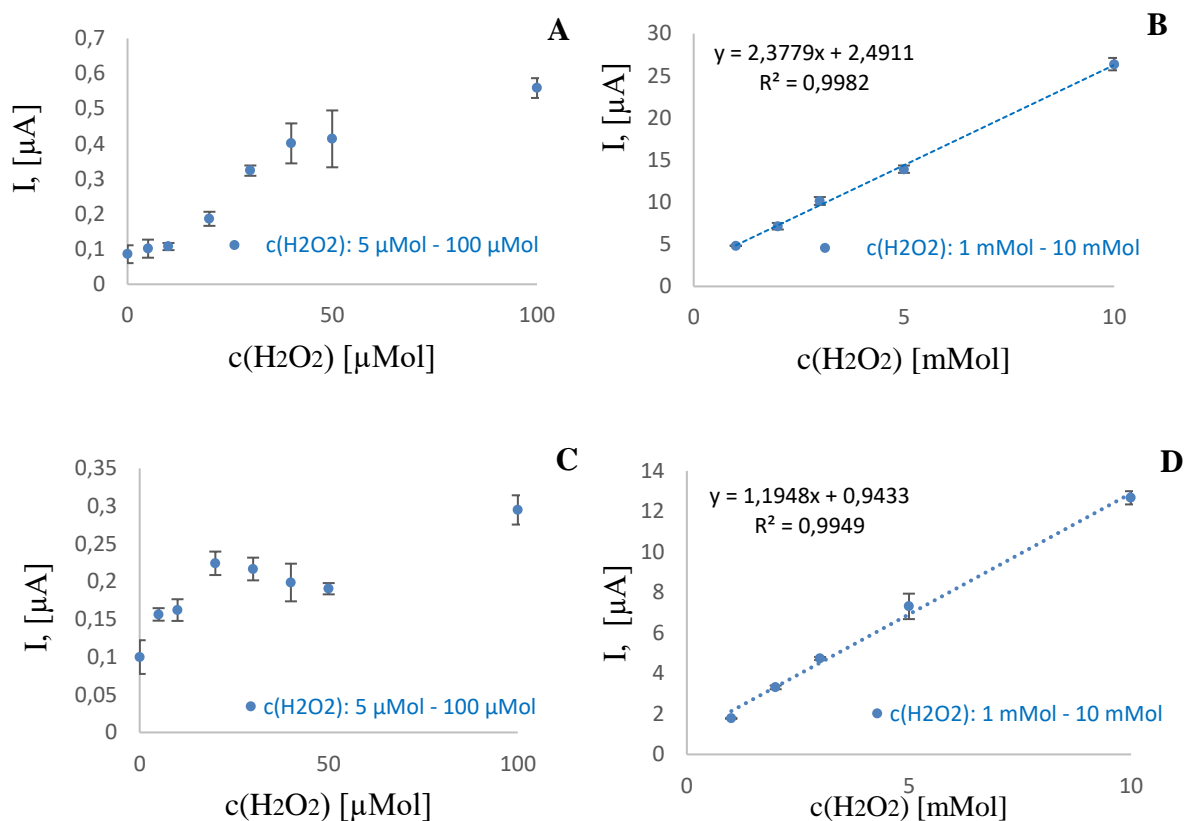




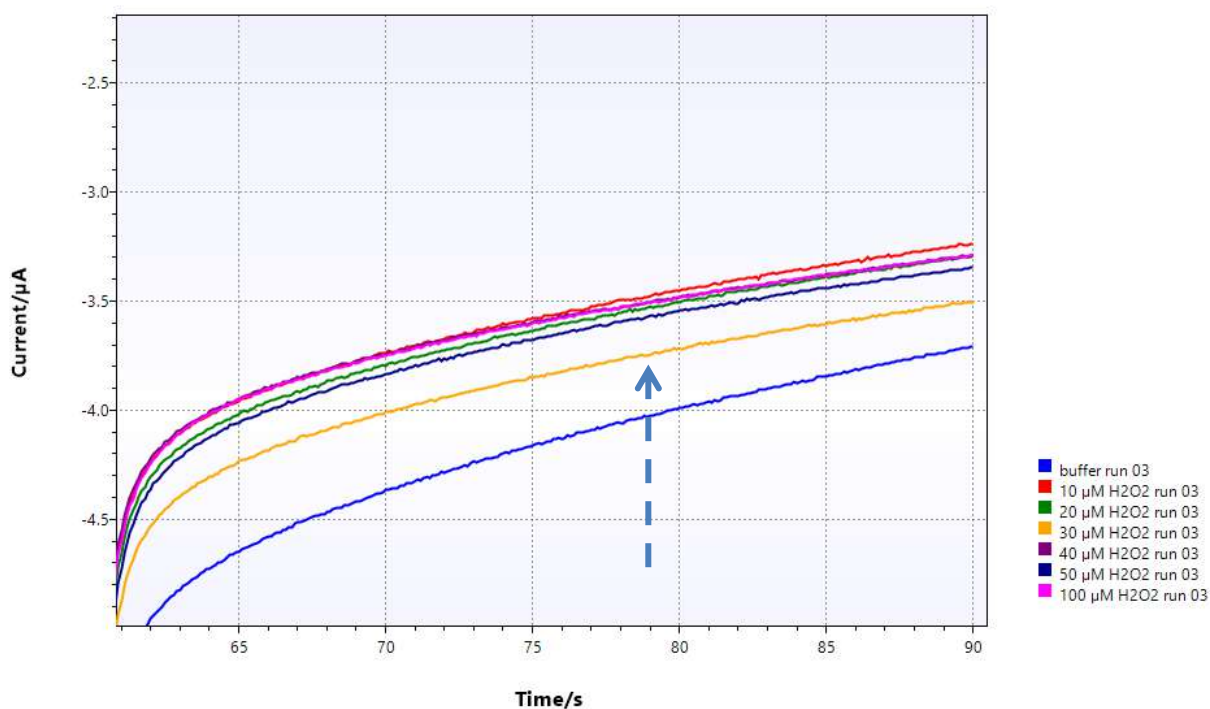
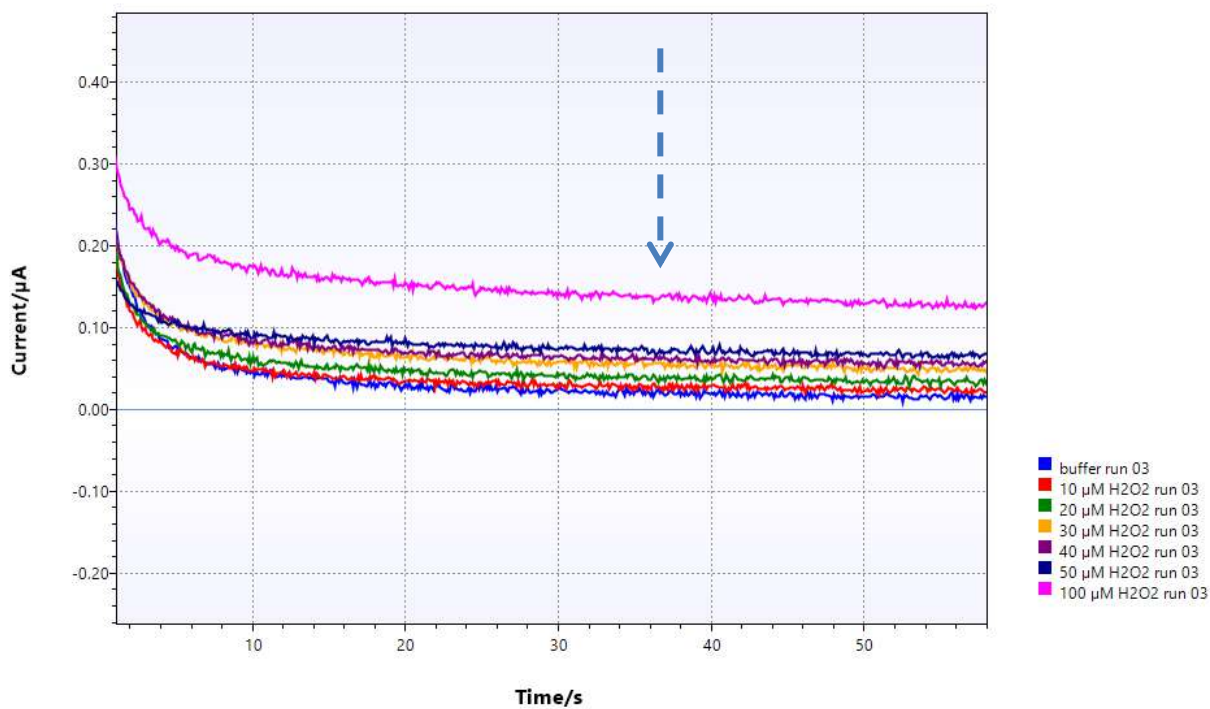
**Рис. П4.2** – Хроноамперометрические кривые, записанные с новой каплей фосфатного буфера с поверхности нанобиосенсора с пленкой АОх/Nafion/Pd-NPs. *Примечание:* регистрация сигнала в АМ режиме проводилась при -0.05 В.



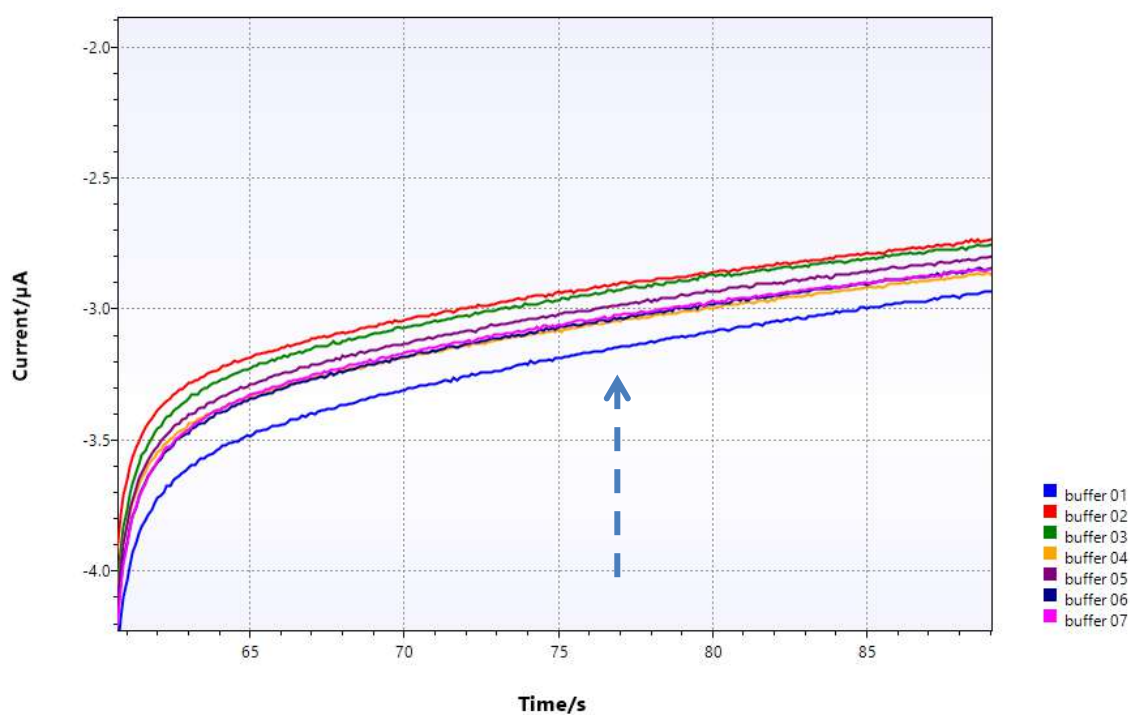
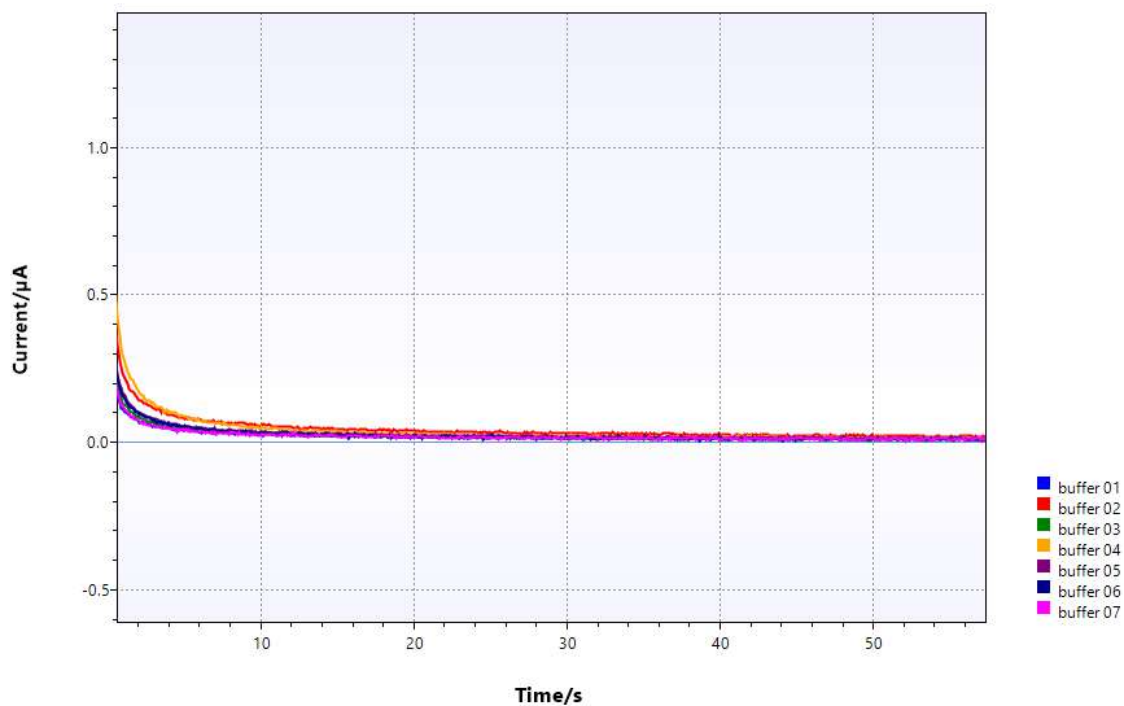
**Рис. П4.3** – Зависимости анодного тока от концентрации пероксида водорода при различных рН на стеклоуглеродном электроде, модифицированном Pd-NPs. *Примечание:* регистрация сигнала проводилась при потенциале 0.4 В.



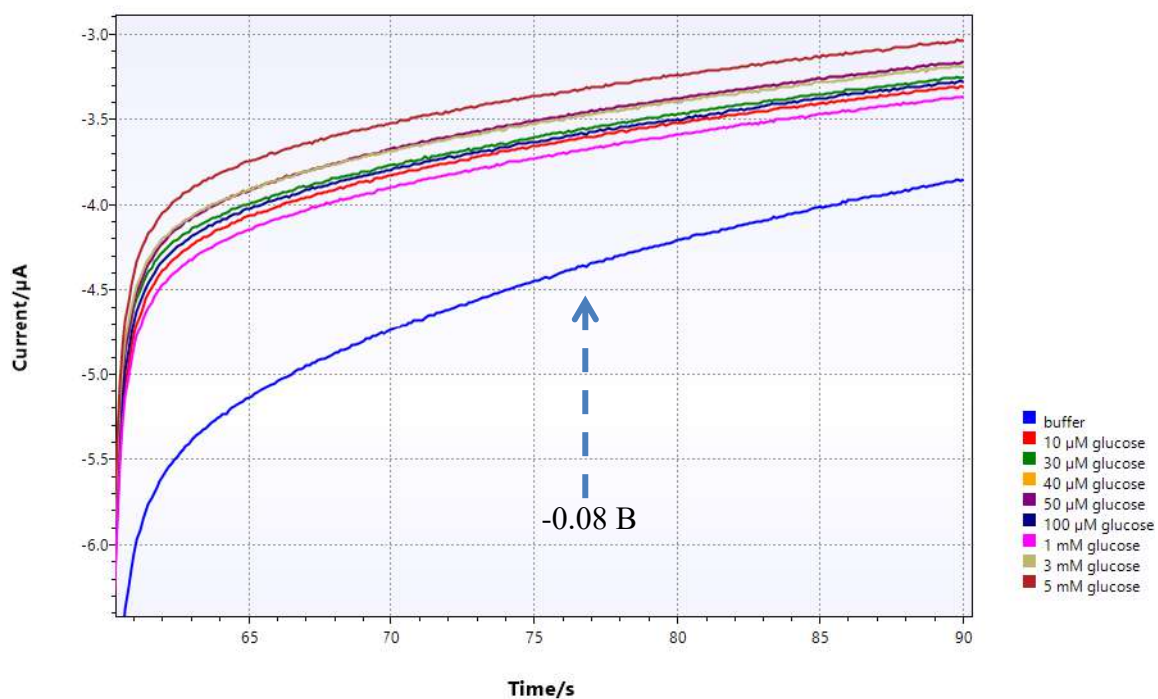
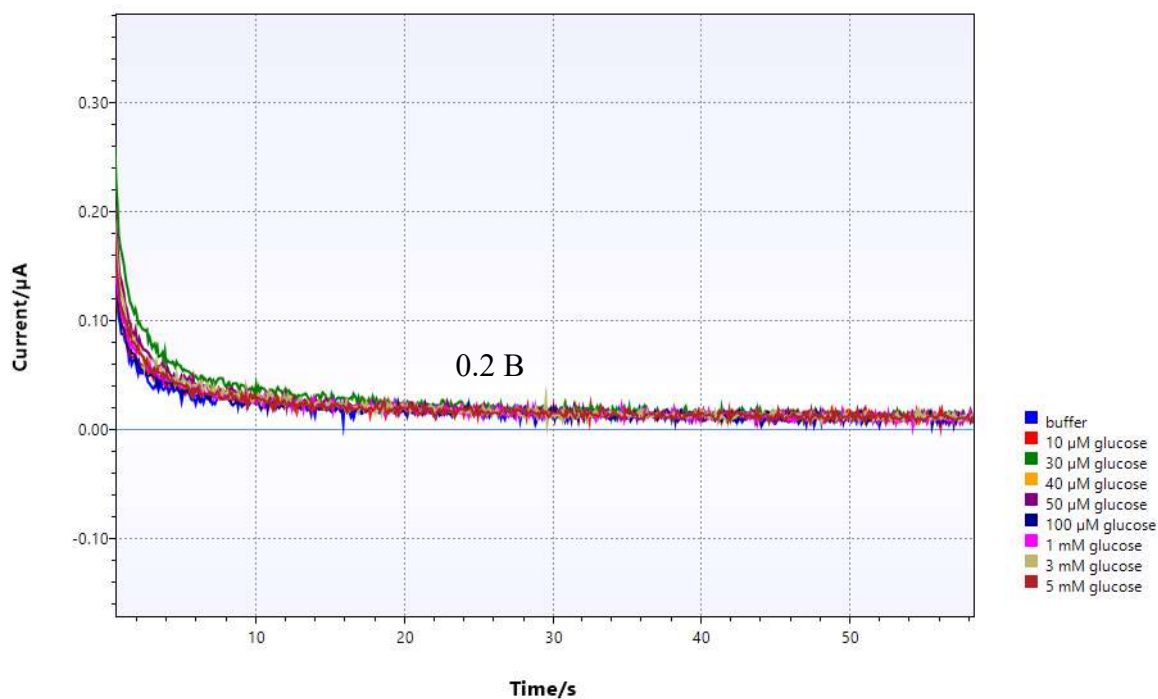
**Рис. П4.4** – Калибровочные зависимости, полученные с поверхности электрода, модифицированного Pd-NPs при определении  $\text{H}_2\text{O}_2$  в аналитически значимом диапазоне концентраций. Pd-NPs синтезировали в течение 30 с (**A,B**); 60 с (**C,D**), регистрацию сигнала проводили в многоступенчатом режиме (МAM): -0.08 В поляризационного напряжения в течение 30 с (*этап 1*), затем 0.2 В в течение 60 с (*этап 2*). Все эксперименты проводили при pH 6.98,  $n = 3$ . *Примечание:* В области низких концентраций пероксида водорода (от 0 до 100 микромоль) наблюдается нелинейная зависимость сигнала (**A,C**). Увеличение времени электролиза с 30 с до 60 с приводит к увеличению диаметра наночастиц с 20 нм до 70-75 нм и, как результат, к снижению чувствительности определения пероксида водорода во всем диапазоне концентраций (**C,D**).



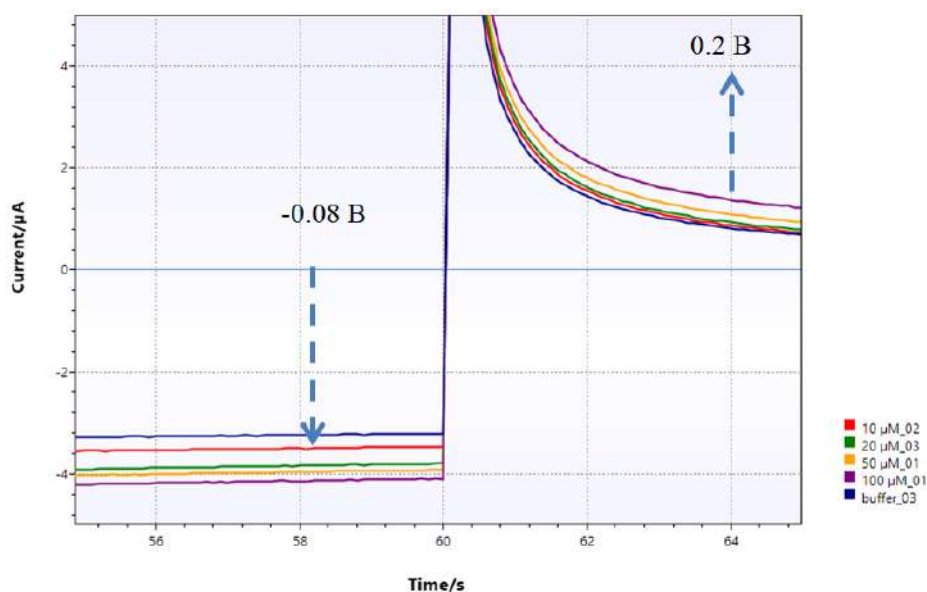
**Рис. П4.5** – Аналитические характеристики SPE/GO электродов, модифицированных Pd-NPs при окислении пероксида водорода в многоступенчатом амперометрическом режиме, (верх) – при потенциале 0.2 В, (низ) – при потенциале 0.08 В.



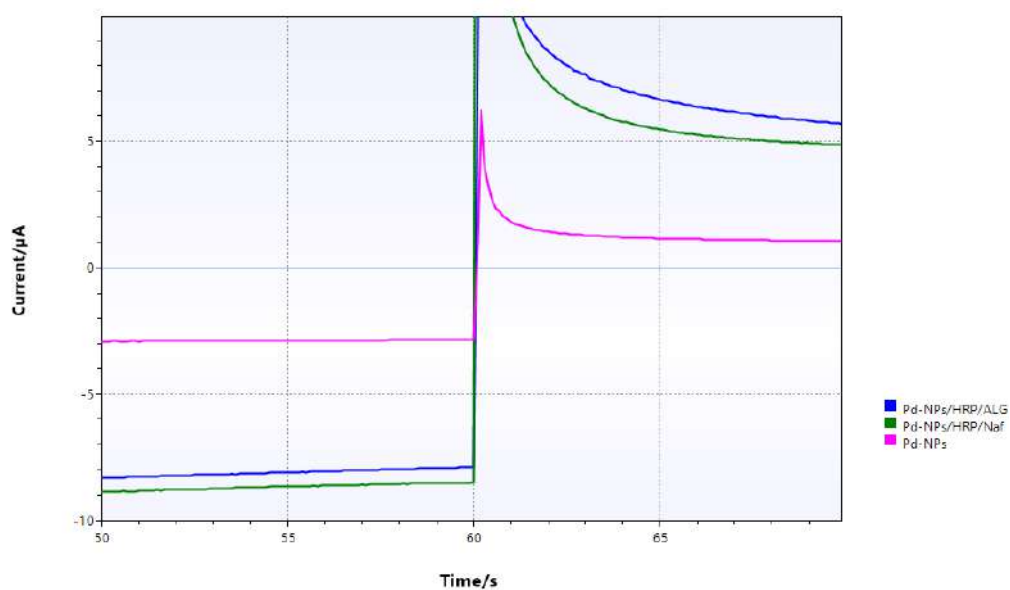
**Рис. П4.6** – Валидация базовых линий SPE/GO электродов, модифицированных Pd-NPs: отклики, полученные в фосфатном буфере в многоступенчатом амперометрическом режиме (МАМ) при потенциале 0.2 В (вверх) и -0.08 В (низ).



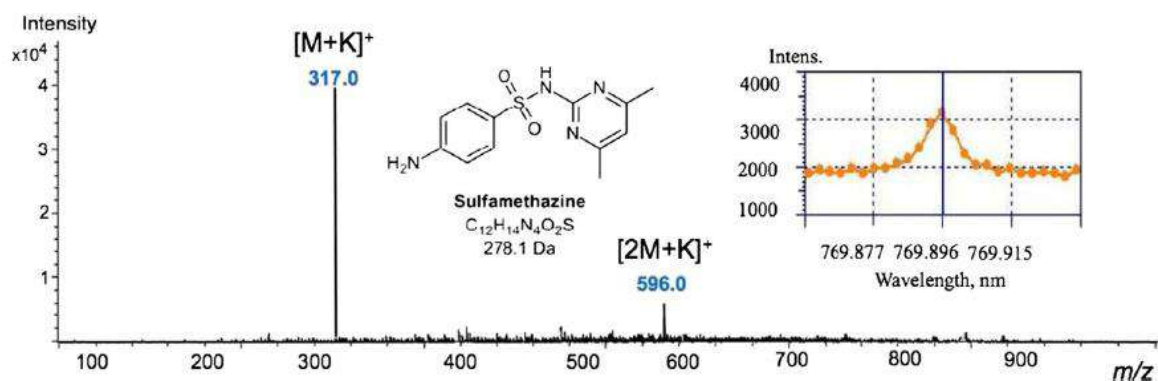
**Рис. П4.7** – Оценка мешающего воздействия глюкозы на регистрацию аналитического сигнала в МАМ режиме с поверхности SPE/GO, модифицированного Pd-NPs: (верх) – при потенциале 0.2 В, (низ) – при потенциале 0.08 В.



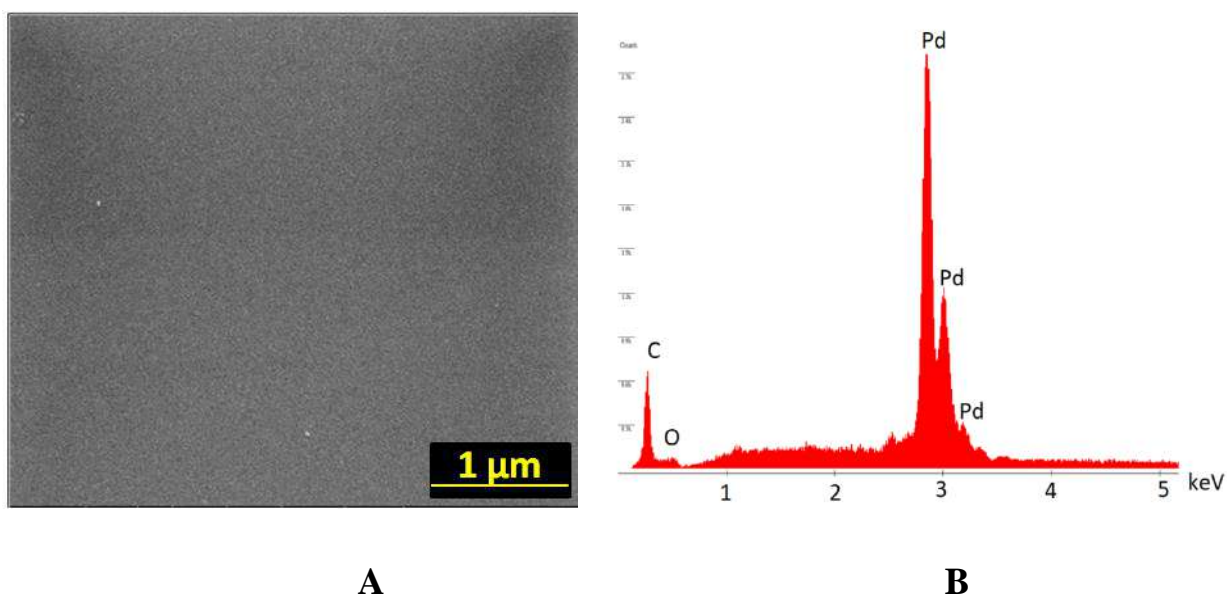
**Рис. П4.8** – Отклики ОНГ нанобиосенсора с инкапсулированной 1 мг/мл HRP, Pd-NPs и альгинатом, полученные в многоступенчатом амперометрическом режиме (МAM) при реакции с  $H_2O_2$ .



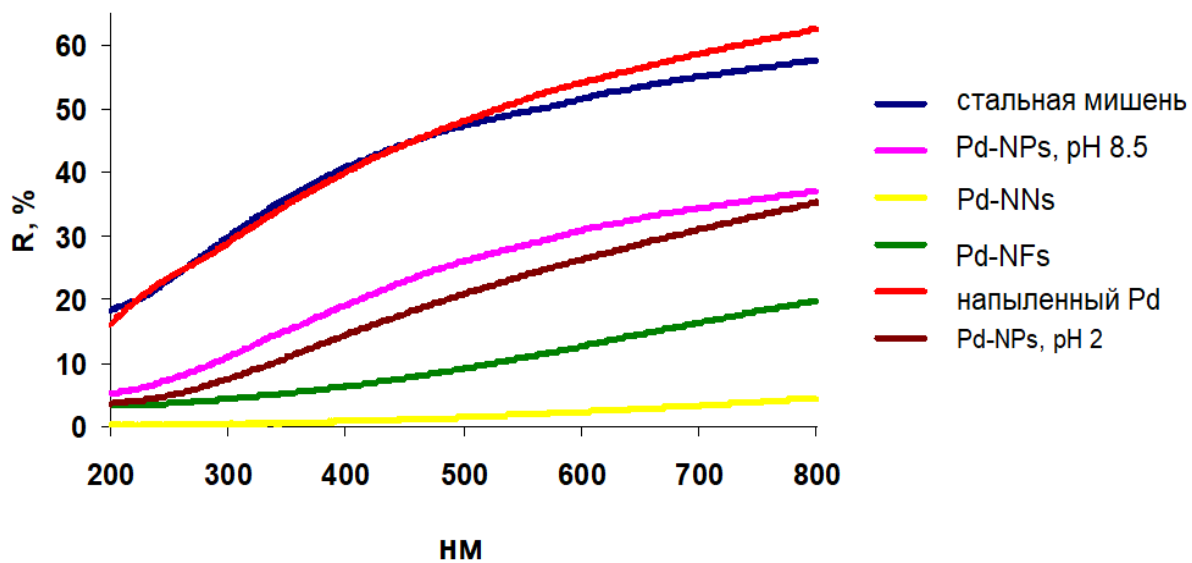
**Рис. П4.9** – Отклики ОНГ нанобиосенсоров на основе пленок Pd-NPs с инкапсулированным HRP/альгинатом (ALG) и HRP/Нафионом (Naf), полученные в многоступенчатом амперометрическом режиме (МAM) при реакции с 1 мМ  $H_2O_2$ , pH 7.02.



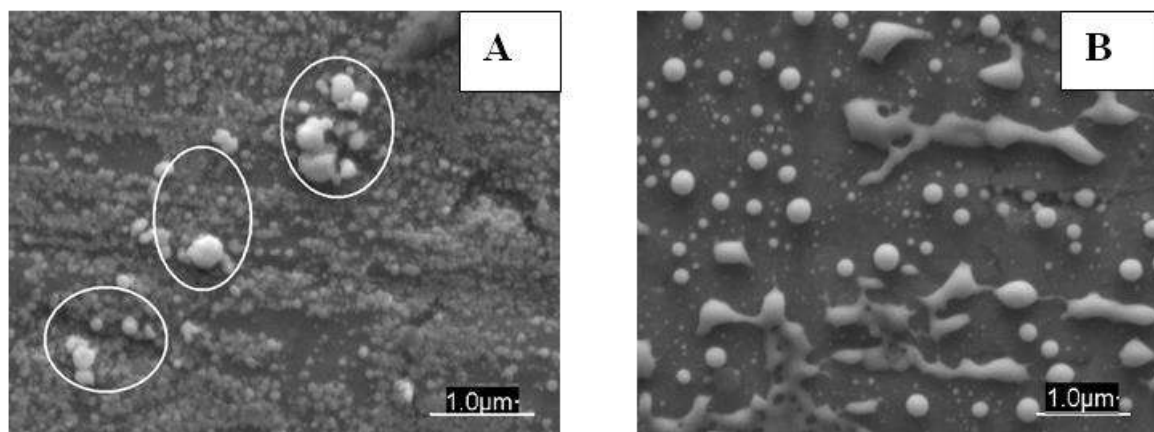
**Рис. П5.1** – SALDI-MS спектр 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  сульфаметазина, полученный с поверхности пленки Pd-NPs. Вставка – ИСП-ОЭС спектр; концентрация  $K^+$  составила  $8.28 \pm 0.764$  ppm.



**Рис. П5.2** – SEM изображение (A) и EDX/X-ray спектр (B), полученные после напыления палладия на сталь с толщиной Pd-пленки 40 нм.

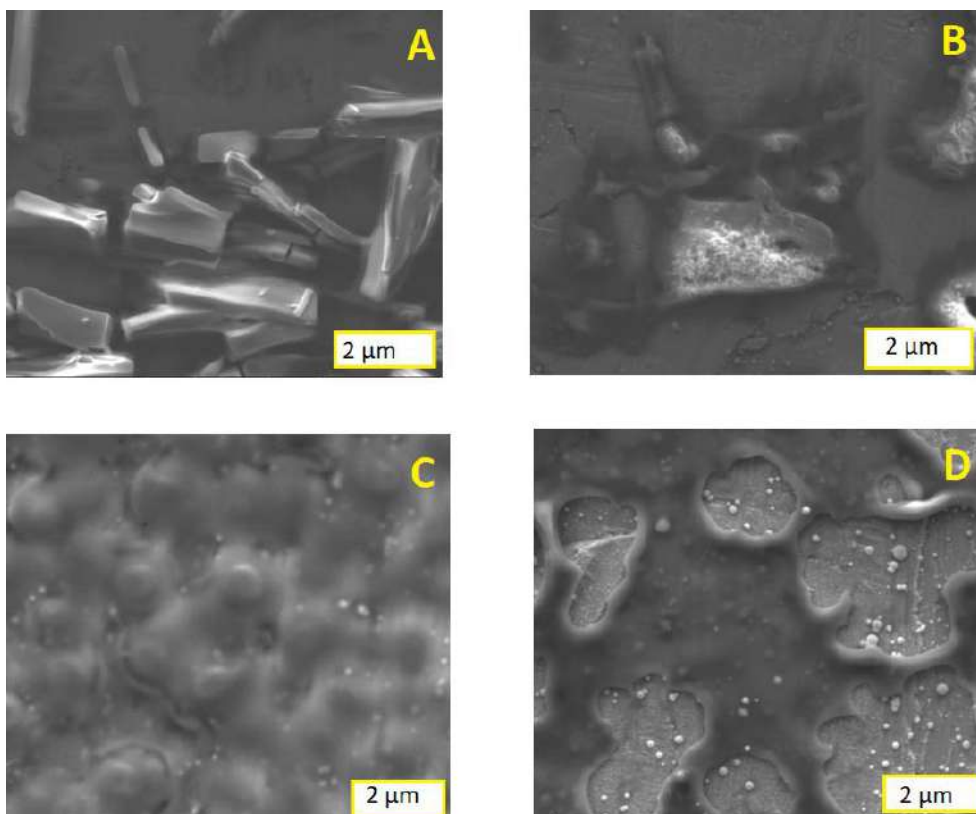


**Рис. П5.3** – Значения отражательной способности наноструктур палладия (наночастицы, Pd-NPs, наноиголы, Pd-NNs, наноцветы, Pd-NFs).

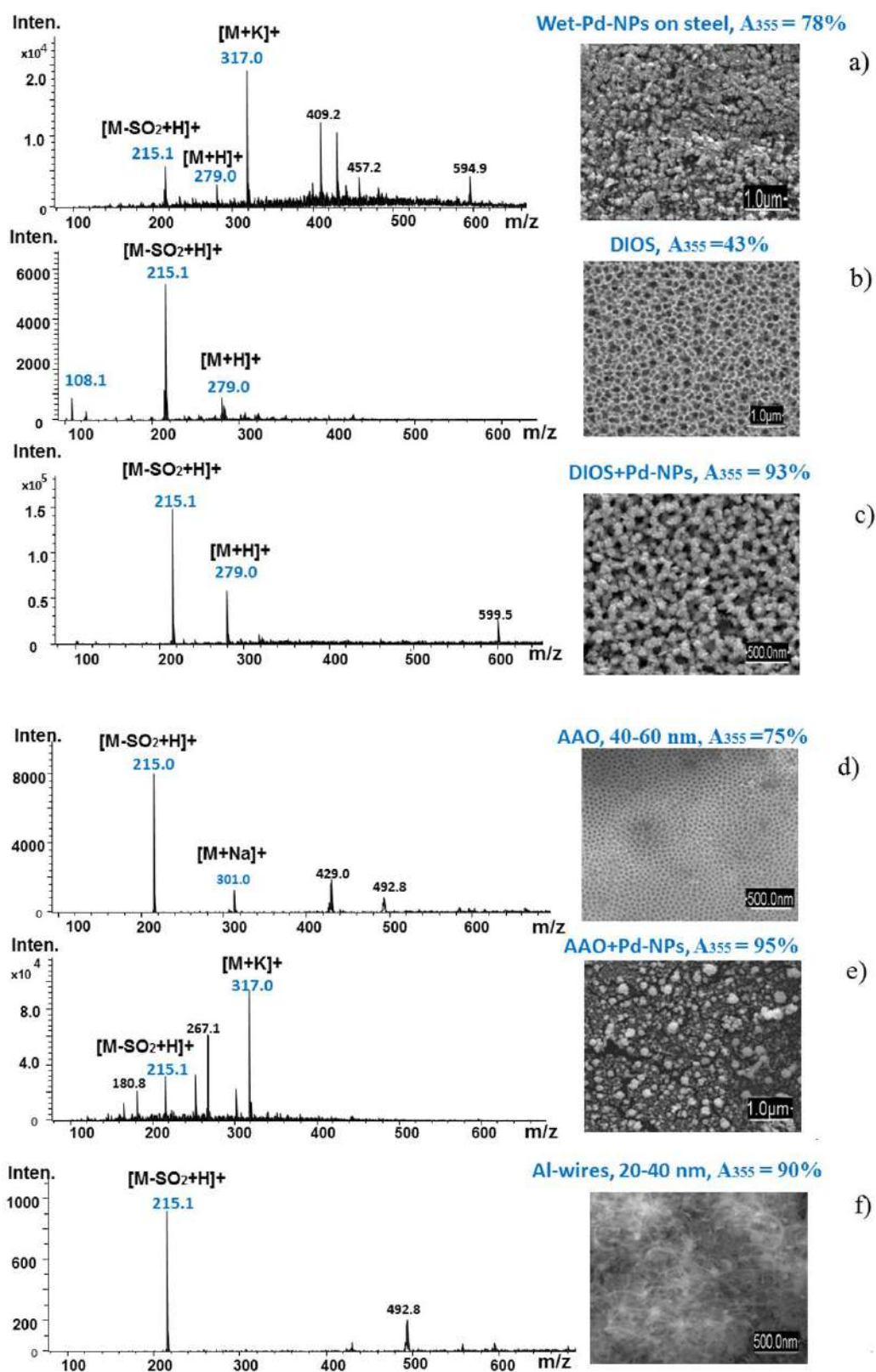


**Рис. П5.4** – SEM-изображения Pd-NPs (+NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>) после лазерного облучения: лазер (A) 30%; (B) 40%.

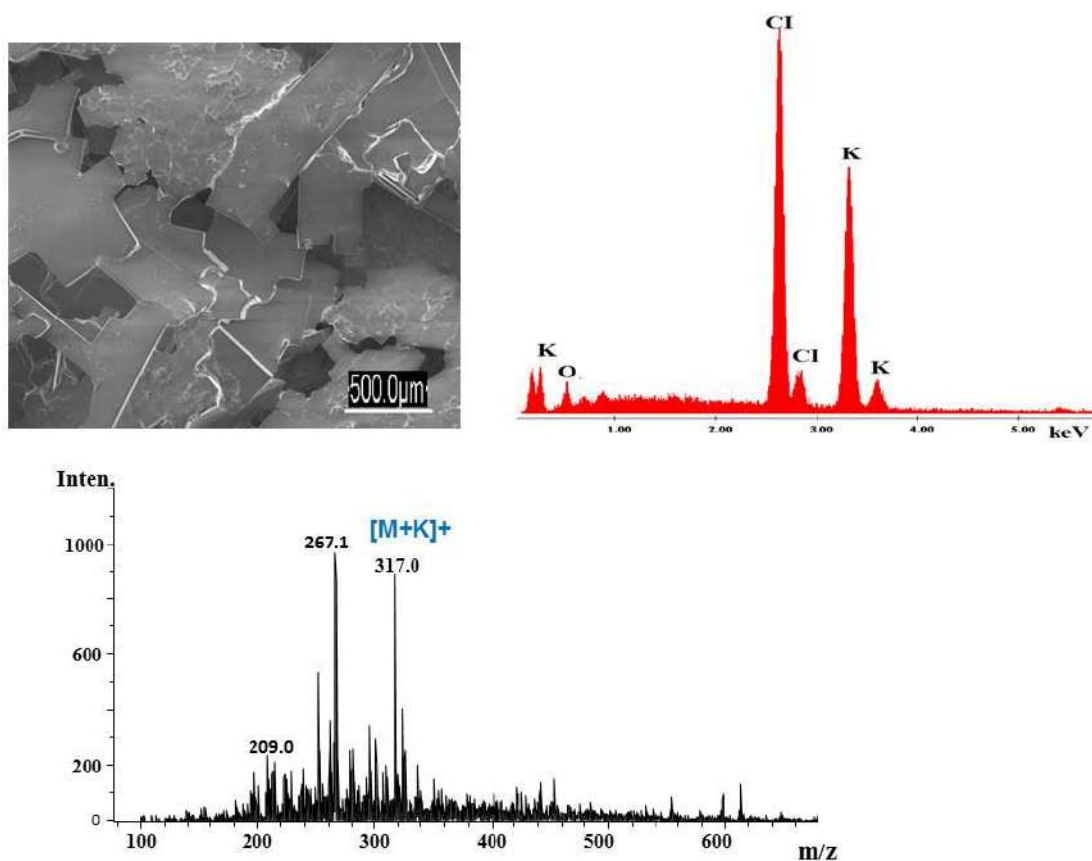




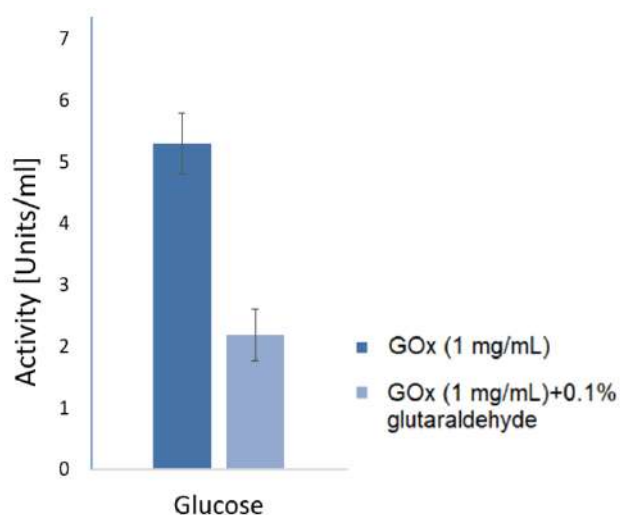
**Рис. П5.5** – SEM изображения кристаллов сульфаметазина (250 нг/пятно) с поверхности стальной мишени (+MALDI/CHCA) до (А) и после (В) лазерной обработки; сульфаметазин (250 нг/пятно) с поверхности. Лазер 40%.



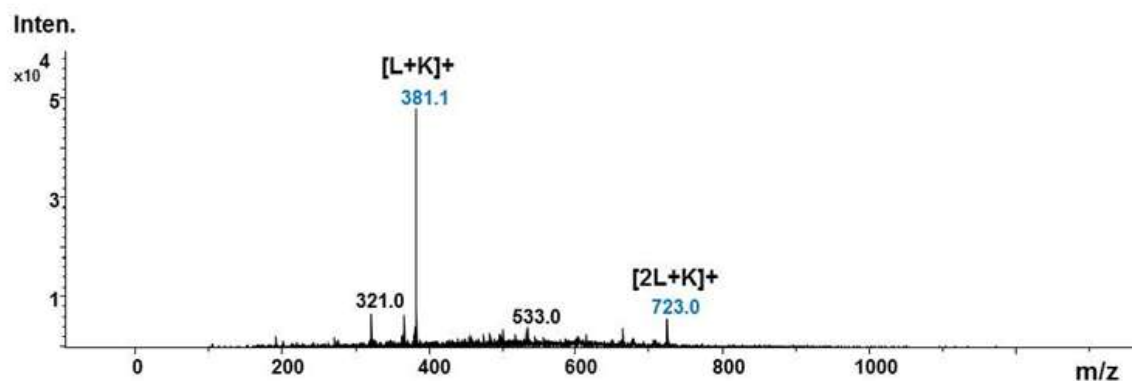
**Рис. П5.6** – Масс-спектры 30 ppm сульфаметазина, полученные с поверхности (a) Pd-NPs, (b) DIOS, (c) гибридных пленок DIOS+Pd-NPs, (d) AAO, (e) AAO+Pd-NPs, (f) Al-нанопроводов/wires; лазер 40%. *Примечание:* пик при  $m/z$  215 соответствует  $SO_2$ .



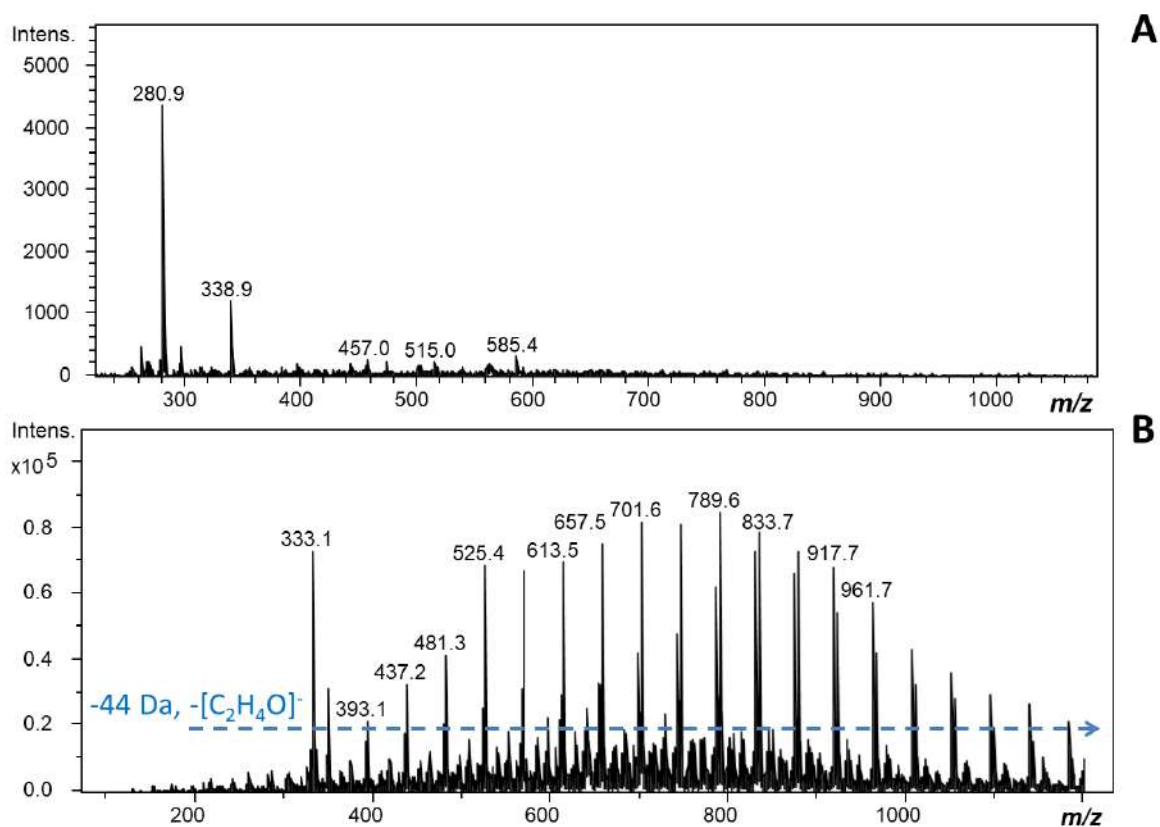
**Рис. П5.7** – SEM/EDX изображения (сверху) и LDI масс-спектр (снизу) 30 ppm сульфаметазина, смешанного с 30 ppm KCl и загруженного на гибридную мишень с пленкой DIOS+Pd-NPs.



**Рис. П6.1** – Активность глюкозооксидазы (10 KUnits, 1 мг/мл), измеренная кислородным минисенсором при  $20 \pm 2$  °C в 100 мМ раствора глюкозы до и после добавления 0.1% глутаральдегида.



**Рис. П6.2** – LDI масс-спектр обычного молока 3.5%, записанный в режиме положительной ионизации с поверхности индивидуальных Pd-NPs, лазер 40%.



**Рис. П6.3** – Масс-спектры, записанные в отрицательном (А) и положительном (В) режимах ионизации с поверхности пьезосенсоров с пленкой Pd-NPs+Tween 80, полученной электроосаждением (ток -2.5 мА, продолжительность электролиза 30 с).