

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Шавокшина Вера Александровна**

**Амперометрические (био)сensоры  
на основе наноструктурированной берлинской лазури  
для анализа биологических жидкостей**

Специальность 1.4.2. Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
Д.х.н., проф. Карякин А.А.

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>12</b>
<b>Глава 1. Гексацианоферраты железа и никеля .....</b>	<b>12</b>
1.1. Электрохимические сенсоры для определения концентрации пероксида водорода .....	13
1.2. Подходы для получения наноструктур на поверхности электродов .....	16
<b>Глава 2. Твердоконтактные ионоселективные электроды .....</b>	<b>19</b>
2.1. Устройство твердоконтактных ионоселективных электродов .....	19
2.2. ТК-ИСЭ, функционирующие в режиме ненулевого тока .....	22
2.3. ТК-ИСЭ для определения содержания ионов калия или натрия .....	25
<b>Глава 3. Электрохимические ДНК-сенсоры .....</b>	<b>29</b>
3.1. Методы иммобилизации биомолекул на поверхности электродов .....	29
3.2. Модификация поверхности электродов для иммобилизации ДНК-зондов.....	32
3.3. Способы регистрации гибридизации в электрохимических ДНК-биосенсорах	37
<b>Глава 4. Конденсат выдыхаемого воздуха – неинвазивно собираемая жидкость для оценки пульмонологических осложнений .....</b>	<b>43</b>
4.1. Устройства для сбора конденсата выдыхаемого воздуха .....	43
4.2. Пероксид водорода как маркер окислительного стресса .....	44
<b>Глава 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>48</b>
5.1. Реактивы и растворы .....	48
5.2. Оборудование.....	49
5.3. Методики.....	51
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>61</b>
<b>Глава 6. Твердоконтактные ионоселективные электроды на основе гексацианоферратов железа и никеля .....</b>	<b>61</b>
6.1. Амперометрические отклики твердого контакта в проточно-инжекционной системе .....	61
6.2. Ионоселективные электроды с пластифицированными мембранами в режиме проточно-инжекционной амперометрии .....	65
6.3. Аналитические характеристики ТК-ИСЭ на основе гексацианоферратов железа и никеля.....	68
6.4. Определение содержания калия и натрия в биологических жидкостях (сыворотка крови, пот). .....	76
6.5. ТК-ИСЭ для одновременного определения содержания ионов калия и натрия	78

<b>Глава 7. Электрохимические ДНК/РНК-сенсоры с использованием меток-нанозимов «искусственная пероксидаза» .....</b>	<b>82</b>
7.1. Сенсорные платформы на основе поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофена) .....	82
7.2. Наночастицы на основе берлинской лазури и ПЭДОТ-Н <sub>3</sub> как метки для биосенсоров.....	92
7.3. Детектирование меченых олигонуклеотидов .....	100
7.4. Электрохимический ДНК/РНК-сенсор. Сэндвич-анализ в сыворотке крови ..	109
<b>Глава 8. Сенсоры на основе наноструктурированной БЛ для определения субмикромолярных концентраций Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в конденсате выдыхаемого аэрозоля.....</b>	<b>112</b>
8.1. Получение конденсата выдыхаемого аэрозоля без дополнительного охлаждения .....	112
8.2. Сенсоры на основе нестабилизированной наноструктурированной БЛ в режиме проточно-инжекционной амперометрии .....	113
8.3. Определение концентрации Н <sub>2</sub> O <sub>2</sub> в конденсате выдыхаемого аэрозоля, собранного без дополнительного охлаждения. ....	116
8.4. Окислительный статус конденсата выдыхаемого воздуха .....	119
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>122</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ.....</b>	<b>125</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>126</b>

## СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АФК	– активные формы кислорода
БЛ	– берлинская лазурь
ГЦК	– гепатоцеллюлярная карцинома
ГЦФ	– гексацианоферрат
ДОК	– диапазон определяемых концентраций
дцДНК	– двухцепочечная ДНК
ИСМ	– ионоселективная мембрана
ИСЭ	– ионоселективный электрод
КВА	– конденсат выдыхаемого аэрозоля
КВВ	– конденсат выдыхаемого воздуха
КВВА	– квадратно-волновая вольтамперограмма(ы)
КР	– комбинационное рассеяние
ЛДОК	– линейный диапазон определяемых концентраций
МС	– метиленовый синий
нкРНК	– некодирующая РНК
НЧ	– наночастица(ы)
оцДНК	– одноцепочечная ДНК
ПАВ	– поверхностно-активные вещества
ПВХ	– поливинилхлорид
ПИА	– проточно-инжекционный анализ
ППЭ	– печатный планарный электрод
ППЭ-2РЭ	– печатный планарный электрод с двумя рабочими электродами
ПСС	– полистиролсульфонат
ПЭДОТ	– поли(3,4- этилендиокситиофен)
ПЭДОТ-N <sub>3</sub>	– поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофен)
РЭ	– рабочий электрод
ССМ	– самособирающийся монослой
СУЭ	– стеклоуглеродный электрод
СЭМ	– сканирующая электронная микроскопия
СЭХИ	– спектроскопия электрохимического импеданса
ТК	– твердый контакт
ТК-ИСЭ	– твердоконтактные ионоселективные электроды
ТМБ	– 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

УНТ	– углеродные нанотрубки
ХСЭ	– хлоридсеребряный электрод
ЦВА	– циклическая вольтамперограмма(ы)
ЭДОТ	– 3,4-этилендиокситиофен
ЭДОТ-N <sub>3</sub>	– 3,4-(1-азидометилэтilen)диокситиофен
<i>A</i>	– площадь электрода ( $\text{см}^2$ )
<i>C</i> *	– объемная концентрация (моль· $\text{см}^{-3}$ )
<i>D</i>	– коэффициент диффузии ( $\text{см}^2\cdot\text{с}$ )
$\Delta E_{\text{п}}$	– разность потенциалов между пиками (мВ)
$E^{0'}$	– формальный потенциал окислительно-восстановительной пары (В)
<i>F</i>	– постоянная Фарадея ( $\text{Кл}\cdot\text{моль}^{-1}$ )
<i>I</i> <sub>п</sub>	– фарадеевский ток пика ЦВА (А)
K <sup>+</sup> -ИСЭ	– калий-селективные твердоконтактные электроды
<i>k</i> <sup>0</sup>	– стандартная электрохимическая константа скорости ( $\text{см}\cdot\text{с}^{-1}$ )
<i>k</i> <sub>э</sub>	– электрохимическая константа скорости ( $\text{см}\cdot\text{с}^{-1}$ )
<i>K</i> <sub>д</sub>	– расчетная константа диссоциации комплекса лиганд-рецептор (нМ)
Na <sup>+</sup> -ИСЭ	– натрий-селективные твердоконтактные электроды
<i>R</i>	– универсальная газовая постоянная ( $\text{Дж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$ )
<i>s</i>	– коэффициент чувствительности ( $\text{А}\cdot\text{М}^{-1}\cdot\text{см}^{-2}$ )
S <sub>г</sub>	– относительное стандартное отклонение
<i>S</i> <sub>п,кат</sub>	– площадь катодного пика ЦВА (А·В)
<i>T</i>	– температура (К)
<i>v</i>	– скорость развертки потенциала (В·с <sup>-1</sup> )
V <sub>поток</sub>	– скорость потока раствора-носителя
$\alpha$	– коэффициент переноса
$\Gamma_{\text{макс}}$	– предельная поверхностная концентрация НЧ БЛ (нмоль· $\text{см}^{-2}$ )
$\Gamma_{\text{БЛ}}$	– поверхностная концентрация электроактивной БЛ (нмоль· $\text{см}^{-2}$ )
$\Gamma_{\Sigma}$	– суммарная концентрация адсорбированных наночастиц БЛ, определенная спектрофотометрически (нмоль· $\text{см}^{-2}$ )

## ВВЕДЕНИЕ

### *Актуальность темы*

Развитие персонализированной медицины и потребность в эффективных методах ранней диагностики патологий обеспечивает возрастающий интерес к созданию компактных сенсоров, которые также позволяют проводить измерения непосредственно «у постели больного» (point-of-care testing). Электрохимические сенсоры обладают рядом преимуществ: возможностью миниатюризации и интеграции в портативные устройства, относительно невысокой стоимостью производства и простотой использования. Олигонуклеотиды, детектируемые в сыворотке крови, являются биомаркерами различных заболеваний, включая онкологические. Важной задачей при разработке электрохимических ДНК/РНК-сенсоров является выбор меток для регистрации сигнала, которые должны сочетать в себе стабильность, селективность, низкую стоимость и возможность конъюгации с биомолекулами.

Другое направление развития – разработка неинвазивных методов анализа. Перспективным объектом анализа является конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ), сбор которого не имеет противопоказаний и не доставляет пациенту серьезных неудобств. Однако анализ КВВ сопряжен с рядом трудностей: низкие концентрации основных маркеров, малый объём образца, вариабельность состава в зависимости от устройства сбора КВВ, в том числе за счёт разбавления парами воды при пробоотборе. Важным метаболитом, присутствующим в КВВ, является пероксид водорода – маркер окислительного стресса. Для его определения необходимо разработать высокочувствительные электрохимические сенсоры, способные функционировать в КВВ. Помимо  $H_2O_2$ , представляющими интерес маркерами являются катионы калия и натрия, поскольку изменение содержания катионов в поте может свидетельствовать о нарушении электролитного баланса в организме. Для миниатюризации конструкции ионоселективных сенсоров перспективна разработка твердоконтактных ионоселективных электродов (ТК-ИСЭ), в которых внутренний стандартный раствор заменён на электронно-ионный проводник. Одним из актуальных подходов для повышения чувствительности таких сенсоров является создание ТК-ИСЭ, функционирующих в режиме ненулевого тока.

Ключевой компонент разрабатываемых сенсоров – наноструктуры берлинской лазури (БЛ). БЛ известна как высокоэффективный электрокатализатор восстановления пероксида водорода. Наночастицы БЛ могут использоваться в качестве меток для регистрации гибридизации в ДНК-сенсорах как альтернатива природному ферменту – пероксидазе. Для определения концентрации  $H_2O_2$  в КВВ также предложено использовать сенсоры на основе наноструктурированной БЛ. Однако для многократного использования

сенсора и измерения серии образцов необходима дополнительная стабилизация БЛ, не приводящая к существенной потере чувствительности, одним из наиболее подходящих стабилизаторов БЛ является гексацианоферрат никеля. В то же время, помимо электрокаталитической активности, БЛ обладает электронно-ионной проводимостью, и ионы калия способны интеркалировать в решетку БЛ, что делает БЛ перспективным материалом для создания ТК-ИСЭ на её основе.

Таким образом, разработка усовершенствованных амперометрических сенсоров на основе гексацианоферратов железа и никеля, способных функционировать в биологических жидкостях (сыворотка крови, КВВ, пот) и определять значимые биомаркеры (катионы калия и натрия, нуклеиновые кислоты,  $H_2O_2$ ), согласуется с потребностями современной персонифицированной медицины и задачами аналитической химии.

### ***Цель работы***

Создание амперометрических сенсоров на основе наноразмерных гексацианоферратов железа/никеля для определения биомаркеров (ДНК, РНК,  $H_2O_2$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ) в биологических жидкостях (сыворотка крови, пот, конденсат выдыхаемого аэрозоля).

### ***Задачи***

- Регистрация амперометрических сигналов электродов, модифицированных наноразмерными гексацианоферратами железа или никеля, на неэлектроактивные ионы в проточно-инжекционной системе.
- Создание ТК-ИСЭ на основе гексацианоферратов железа или никеля для определения концентрации ионов калия, натрия в сыворотке крови и поте в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале.
- Создание сенсорной платформы для электрохимических ДНК/РНК-сенсоров на основе проводящего полимера азидометил-замещенного поли(3,4- этилендиокситиофена).
- Исследование влияния условий гибридизации на аналитические характеристики ДНК-сенсоров. Определение немеченых олигонуклеотидов в режиме конкурентного и «сэндвич»-анализа.
- Разработка сенсоров на основе стабилизированной БЛ для определения концентрации пероксида водорода в конденсате выдыхаемого аэрозоля (КВА). Установление различий в уровне пероксида водорода в КВА у разных групп: некурящих и курящих добровольцев, пациентов с постковидным синдромом.

### ***Научная новизна***

1. Твердоконтактные ионоселективные электроды (ТК-ИСЭ) на основе гексацианоферратов железа или никеля, позволяющие проводить определение ионов К или  $Na$  в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале. Сенсоры

применимы для анализа биологических жидкостей (сыворотка крови, пот). Калий-селективные сенсоры на основе наночастиц БЛ достигают рекордно низкого предела обнаружения (1 мкМ), по сравнению с другими ТК-ИСЭ на основе гексацианоферратов переходных металлов. Возможно одновременное определение содержания  $K^+$  и  $Na^+$  с использованием четырехэлектродной сенсорной структуры.

2. Модификация поверхности печатного графитового электрода поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофеном) (ПЭДОТ- $N_3$ ) обеспечивает повышение электрохимической константы скорости ( $k_3$ ) до 2000 раз в присутствии отрицательно заряженного медиатора  $K_3[Fe(CN)_6]$  в диапазоне pH 1.1 – 7.0. Для положительно заряженного медиатора ( $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ )  $k_3$  увеличивается от 2 до 6 раз, по сравнению с немодифицированным электродом.

3. Электрохимические ДНК-сенсоры, в которых впервые использованы композитные наночастицы берлинской лазури (НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ ) в качестве электрокатализитических меток. Показано, что такая функционализация наночастиц БЛ позволяет конъюгировать их с алкин-модифицированными олигонуклеотидами в одну стадию в результате азид-алкиновой клик-реакции, причём после конъюгации композитные наночастицы сохраняют электрокатализитические свойства. Разработанные ДНК/РНК-сенсоры применимы для определения ДНК и РНК, не содержащих меток.

4. Сенсор на основеnanostructuredной БЛ, стабилизированной гексацианоферратом никеля, для определения субмикромолярных концентраций  $H_2O_2$  (предел обнаружения 0.1 мкМ, коэффициент чувствительности  $0.38 \pm 0.05 A \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$ ). Показана применимость сенсора для определения  $H_2O_2$  в конденсате выдыхаемого аэрозоля (КВА), собранного без дополнительного охлаждения. В результате анализа образцов КВА пациентов с постковидным синдромом впервые показано статистически значимое снижение концентрации  $H_2O_2$ , по сравнению с некурящими добровольцами без бронхолегочных нарушений.

### **Практическая значимость**

ТК-ИСЭ на основе гексацианоферратов переходных металлов, функционирующие в режиме проточно-инжекционной амперометрии, обеспечивают экспрессное (до 1 мин) и чувствительное ( $s$  достигает  $75 \pm 10 MA \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$ ) определение содержания ионов калия и натрия. Это позволяет скорректировать недостатки потенциометрических ТК-ИСЭ, связанные с их конструктивной особенностью – отсутствием внутреннего стандартного раствора. Использование наночастиц БЛ в качестве твердого контакта значительно упрощает модификацию поверхности электрода благодаря возможности простой адсорбции из суспензии наночастиц. Реализация одновременного определения

концентрации калия и натрия, а также возможность получения градуировочной зависимости с использованием эквимолярных растворов солей калия и натрия значительно ускоряет анализ серии образцов.

Синтез проводящего полимера ПЭДОТ- $N_3$  для создания сенсорных платформ методом «зелёной» электрохимической полимеризации не требует применения органических растворителей. Использование композитных наночастиц БЛ (НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ ) с пероксидазной активностью в качестве электрокатализических меток позволяет снизить стоимость ДНК-сенсоров, а также делает их менее требовательными к условиям хранения. Практическая значимость подтверждена успешным определением фрагмента РНК HULC (Highly Upregulated in Liver Cancer) – потенциального биомаркера гепатоцеллюлярной карциномы – в клинически значимом диапазоне концентраций. В связи с тем, что гибридизацию с ДНК-зондами, иммобилизованными на сенсорной платформе, возможно проводить в разбавленной сыворотке крови, созданные электрохимические ДНК/РНК-сенсоры открывают перспективы для разработки диагностических тест-систем.

Сенсоры на основе стабилизированной БЛ позволяют определять концентрацию  $H_2O_2$  в КВА, собранном без дополнительного охлаждения. Установлено, что у пациентов с диагностированным постковидным синдромом концентрация  $H_2O_2$  в образцах КВА понижена, а у курящих людей, наоборот, повышена по сравнению с некурящими. Практическая значимость результатов обусловлена отсутствием специфических диагностических тестов для постковидного синдрома. Таким образом, показана потенциальная применимость  $H_2O_2$  как биомаркера для неинвазивной диагностики постковидного синдрома и нарушений, связанных с дисбалансом активных форм кислорода в организме.

### ***Положения, выносимые на защиту***

1. Твердоконтактные ионоселективные электроды на основе гексацианоферрата железа или никеля, функционирующие в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале, позволяют определять содержание ионов калия или натрия, включая их одновременное определение, в поте и сыворотке крови.

2. Сенсорные платформы на основе электрохимически синтезированного поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофена) обеспечивают одностадийную иммобилизацию алкин-модифицированных биомолекул и увеличение электрохимической константы скорости в присутствии диффузионно-подвижных медиаторов ( $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  или  $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$ ).

3. Амперометрические ДНК-сенсоры и ДНК/РНК-сенсоры с электрокатализитическими метками на основе композитных наночастиц берлинской лазури

(НЧ БЛ/ПЭДОТ-N<sub>3</sub>) функционируют в режимах конкурентного (ДНК-сенсоры) и «сэндвич»-анализа (ДНК/РНК-сенсор) в сыворотке крови.

4. Электрохимические сенсоры на основе наноструктурированной берлинской лазури, стабилизированной гексацианоферратом никеля, позволяют выявлять статистически значимые различия в содержании пероксида водорода в конденсате выдыхаемого аэрозоля, собранного без дополнительного охлаждения у пациентов с постковидным синдромом, курящих и некурящих добровольцев.

### ***Степень достоверности***

Достоверность получаемых результатов на каждом этапе обеспечена использованием реактивов достаточной степени чистоты, современного оборудования для электрохимических измерений и альтернативных методов исследования, применением подхода «введено-найдено», статистической обработкой получаемых результатов и погрешностей.

### ***Соответствие паспорту научной специальности***

Диссертационная работа соответствует специальности 1.4.2. Аналитическая химия по направлениям исследований: методы химического анализа; теория и практика пробоотбора и пробоподготовки в аналитической химии; клинический анализ.

### ***Апробация результатов исследования***

Результаты работы были представлены на 11 всероссийских и международных научных конференциях (10 устных докладов и 1 стендовый): XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2019» (Москва, Россия, 2019), 15th International Students Conference «Modern Analytical Chemistry» (Прага, Чехия, 2019), XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2020» (Москва, Россия, 2020), European Biosensor Symposium «EBS 2021 online» (Вильдау, Германия, 2021), XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2021» (Москва, Россия, 2021), 13-я Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения (БИОКАТАЛИЗ-2023)» (Сузdalь, Россия, 2023), 19<sup>th</sup> ISEAC (The Nineteenth International Symposium on Electroanalytical Chemistry) (Чанчунь, Китай, 2023), Всероссийская конференция по электрохимии с международным участием (Москва, Россия, 2023), XI Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2024» (Екатеринбург, Россия, 2024), 20<sup>th</sup> ISEAC (The Twentieth International Symposium on Electroanalytical Chemistry) (Чанчунь, Китай, 2025), 40<sup>th</sup> Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry (Чанчунь, Китай, 2025).

### ***Публикации***

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 1 патент и 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2. Аналитическая химия.

### ***Личный вклад автора***

В основу диссертационной работы легли результаты научных исследований, выполненных под руководством д.х.н., проф. Карякина А.А. на химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова в период с 2019 до 2025 г. Личный вклад автора состоял в постановке задач исследования, анализе и систематизации литературных данных, подготовке, планировании и проведении всех представленных электрохимических экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертации и представлении работы на конференциях. Наночастицы берлинской лазури и композитные НЧ БЛ/ПЭДОТ-Н<sub>3</sub> были синтезированы и охарактеризованы к.х.н., с.н.с. М.А. Комковой и А.А. Зарочинцевым. Изображения СЭМ были получены к.х.н. Леонтьевым А.П., спектроскопии КР – к.х.н., доц. Елисеевым А.А., НПВО-ИК – к.х.н., в.н.с. Броцманом В.А. Конденсоры были напечатаны Дубовым Л.А. и к.х.н., с.н.с. Андреевым Е.А. Измерения методом капиллярного электрофореза выполнены в ГИН РАН н.с. Максимовой Ю.А.

### ***Структура и объём работы***

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и выводов, списка литературы. Материал изложен на 138 страницах (275 тыс. знаков), включает 80 рисунков и 25 таблиц. В списке литературы 206 ссылок.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ 19-13-00131, 24-13-00049.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Глава 1. Гексацианоферраты железа и никеля

Общую формулу гексацианоферратов переходных металлов можно представить как  $A_xM^{(1)}[Fe(CN)_6]_y \cdot n H_2O$ , где A – катионы щелочных металлов, а  $M^{(1)}$  – атом переходного металла в высокоспиновом состоянии, координированный с атомами азота [1,2]. Берлинская лазурь (БЛ), или гексацианоферрат железа, соответственно имеет формулу, где  $M^{(1)}$  – атом Fe. БЛ имеет гранецентрированную кубическую ячейку, в которой атомы Fe(II) связаны с атомами углерода из цианидной группы, а атомы Fe(III) находятся в октаэдрическом окружении атомов азота (рисунок 1).

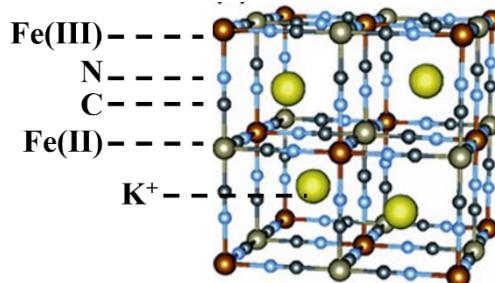


Рисунок 1. Фрагмент кристаллической решетки берлинской лазури [3].

Гексацианоферрат никеля (ГЦФ Ni) имеет аналогичную кубическую структуру, атомы железа и никеля чередуются по углам куба. При этом никель связан только с атомами азота, а железо – с углеродом, по аналогии с БЛ в полостях ГЦФ Ni могут присутствовать ионы щелочных металлов.

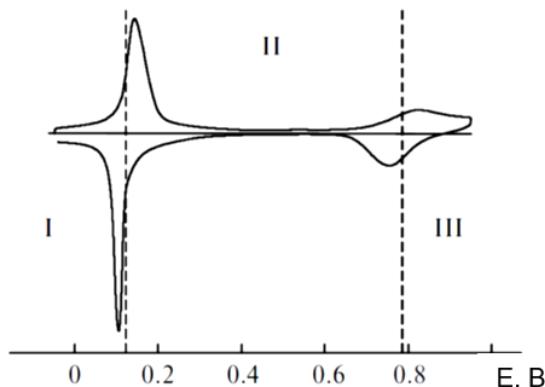
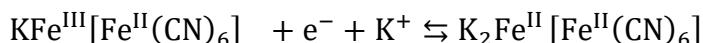
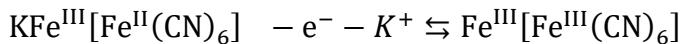


Рисунок 2. ЦВА электрода, модифицированного БЛ. Римскими цифрами обозначены формы существования БЛ: (I) берлинский белый, (II) берлинская лазурь, (III) берлинский зелёный ( $0.1 \text{ M KCl/HCl}$ ,  $40 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ) [4].

На циклической вольтамперограмме (ЦВА) электрода, модифицированного БЛ, можно наблюдать 2 пары пиков (рисунок 2). При потенциале ниже 0.2 В (отн. ХСЭ) БЛ восстанавливается до берлинского белого с включением катионов из раствора [5]:



В области анодных потенциалов БЛ окисляется до формы берлинского зеленого, с деинтеркаляцией катионов:



В решетку БЛ и её аналогов преимущественно интеркалируют ионы аммония и щелочных металлов [6–8]. Кроме того, было отмечено, что для катионов первой группы потенциал интеркаляции в ячейки БЛ и её аналогов возрастает с увеличением радиуса катиона. Сначала это было показано для БЛ [9], а позже подтвердилось для аналогов БЛ на основе Ni, Cu, Cd, Cr [10–15].

### **1.1. Электрохимические сенсоры для определения концентрации пероксида водорода**

Необходимость определения пероксида водорода обусловлена его распространённостью в различных областях. В пищевой промышленности, где  $\text{H}_2\text{O}_2$  используется для стерилизации упаковки молочных продуктов и в качестве антимикробного средства, его содержание регламентируется. Это требование связано с тем, что превышение допустимых концентраций может привести к повреждению клеток организма [16]. Кроме того, дезинфицирующие свойства пероксида делают его эффективным реагентом для очистки вод, включая воду бассейнов. При использовании для этих целей электрохимических проточных реакторов, генерирующих  $\text{H}_2\text{O}_2$ , возникает потребность в интеграции в такую систему сенсора для определения остаточного пероксида в очищенной воде [17]. Определение  $\text{H}_2\text{O}_2$  важно в биосенсорах, поскольку он является продуктом ферментативной реакции с участием оксидаз. Наконец,  $\text{H}_2\text{O}_2$  служит биомаркером для ряда заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, сердечно-сосудистые патологии, окислительный стресс и т.д. [18].

Разработка сенсоров для определения пероксида водорода является важной задачей, затрагивающей область интересов промышленности и клинической диагностики. Среди возможных методов определения электрохимические сенсоры более предпочтительны. Они компактны, просты в изготовлении, легко интегрируются с компьютером для получения и интерпретации данных. Кроме того, такие сенсоры обычно менее чувствительны к мешающим компонентам матрицы образца и их окраске.

БЛ – подходящий трансдьюсер для создания сенсоров для определения пероксида водорода. БЛ в восстановленной форме (берлинский белый) является эффективным (электро)катализатором восстановления пероксида водорода. В нейтральной среде электрохимическая константа скорости восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$  на электроде, модифицированном БЛ, на 3 порядка выше, чем на платиновом электроде [19]. Другим преимуществом БЛ, позволяющим считать её «искусственной пероксидазой», является её

селективность и возможность функционировать в присутствии растворенного кислорода. Токи восстановления пероксида водорода в 400–600 раз превышают токи восстановления кислорода той же концентрации. В то время как на платиновых электродах токи восстановления кислорода, наоборот, в 10 раз могут превышать катодные отклики на пероксид водорода [19]. В связи с этим для снижения кислородного фона определение пероксида водорода на платиновых электродах выполняют при высоком потенциале, что может привести к паразитным сигналам компонентов матрицы образца, которые также могут окисляться в данных условиях. БЛ катализирует восстановление  $H_2O_2$  при низких приложенных потенциалах ( $\sim 0.0$  В отн. ХСЭ), минимизируя мешающее влияние от других компонентов матрицы образца (аскорбиновая кислота, мочевина и т.д.).

В таблице 1 представлены примеры чувствительных электрохимических сенсоров для определения пероксида водорода с акцентом на системы, использующие БЛ в качестве трансдьюсера. Помимо аналитических характеристик сенсоров (коэффициент чувствительности и линейный диапазон определяемых концентраций), в таблице указаны электроды, которые использованы в качестве основы сенсора. Стеклоуглеродные электроды (СУЭ) широко используются в фундаментальных исследованиях, что объясняется их гладкой поверхностью и улучшенной воспроизводимостью результатов. Однако поскольку сенсоры обычно функционируют в трехэлектродном режиме, использование СУЭ в качестве рабочего ограничивает компактность сенсора и электрохимической ячейки. Более того, методики синтеза на поверхности СУЭ не всегда можно адаптировать для печатных планарных электродов. В отличие от СУЭ печатные планарные электроды (ППЭ) характеризуются большей компактностью, пригодны для масштабирования производства, благодаря подходящей подложке обладают гибкостью, что расширяет спектр их практического применения. Кроме того, в таблице 1 приведены условия регистрации сигнала: в режиме проточно-инжекционного анализа (ПИА) или в стационарном режиме в ячейке фиксированного объёма при перемешивании (batch-режим).

Таблица 1. Электрохимические сенсоры для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (1,2-ДАБ – диаминобензол; СУЭ – стеклоуглеродный электрод, ППЭ – печатный планарный электрод, ПИА – проточно-инжекционный анализ; УНТ – углеродные нанотрубки, МОК – металлогорганический каркас, ГСЭ – графитовый стержневой электрод)

<b>Трансдьюсер</b>	<b>Электрод</b>	<b>Способ синтеза трансдьюсера</b>	<b>Режим измерения</b>	$s, \text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$	<b>ЛДОК, М</b>	<b>Ссылка</b>
<b>БЛ</b>	СУЭ	Потенциостатический	ПИА $0.8 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$	0.6	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	[20]
<b>БЛ</b>	СУЭ	Гальваностатический	ПИА $1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$	0.6 0.3	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	[21]
<b>БЛ/поли(1,2-ДАБ)</b>	СУЭ					
<b>НЧ БЛ</b>	ППЭ	Химический	Batch	0.82	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	[22]
<b>Наноструктурированная БЛ</b>	СУЭ	ЦВА	ПИА $0.5 - 1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$	0.2	$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-2}$	[23]
<b>Наноструктурированная БЛ</b>	СУЭ	Темплатный	ПИА $0.7 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$	0.7	$1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-2}$	[24]
<b>Наноструктурированная БЛ</b>	СУЭ	ЦВА (температный)	ПИА $0.7 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$	0.06	$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-2}$	[25]
<b>Наноструктурированная БЛ</b>	Макропористые золотые	ЦВА	Batch	8.8	$5 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	[26]
<b>НЧ Pd</b>	ГСЭ	ЦВА	ПИА $2 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$	0.07	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	[27]
<b>НЧ Au-NH<sub>2</sub>/Cu-МОК</b>	СУЭ	Химический	Batch	1.71	$5 \cdot 10^{-6} - 8.5 \cdot 10^{-4}$	[28]
<b>HoVO<sub>4</sub>/P-CN нанокомпозит</b>	СУЭ	Ультразвуковой	Batch	0.72	$9 \cdot 10^{-9} - 7.7 \cdot 10^{-6}$	[18]
<b>Bi<sub>2</sub>Te<sub>3</sub></b>	СУЭ	Коммерческий	Batch	4.9	$1 \cdot 10^{-7} - 3 \cdot 10^{-5}$	[29]
<b>БЛ/полианилин</b>	ППЭ	Химический	ПИА $0.5 - 1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$	0.74	$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-2}$	[30]
<b>БЛ/ГЦФ Ni</b>	ППЭ	Химический	ПИА $0.8 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$	0.35	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	[31]
<b>НЧ БЛ/ГЦФ Ni</b>	ППЭ	Химический	Batch	0.8	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	[32]
<b>БЛ/УНТ/полипиррол</b>	СУЭ	Химический	Batch	0.345	$4 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	[33]
<b>УНТ/БЛ</b>	УНТ	ЦВА	Batch	31.4	$5 \cdot 10^{-8} - 5 \cdot 10^{-6}$	[34]

## **1.2. Подходы для получения наноструктур на поверхности электродов**

Для создания высокочувствительных сенсоров применяются стратегии синтеза наноструктур на поверхности электрода. За счет улучшения массопереноса и увеличения количества активных центров наноструктуры БЛ обладают большей активностью в реакциях электрокатализа. Из-за низкого произведения растворимости БЛ её синтез преимущественно проводят не из смеси Fe(II) и Fe(III), а из смеси солей железа (III), но с введением в систему восстановителя. Это также позволяет контролировать получение наночастиц, но не подходит для синтеза непосредственно на поверхности электрода. Химический синтез при использовании пероксида водорода в качестве восстановителя позволил синтезировать НЧ БЛ с выдающейся (электро)катализической активностью [22,35]. В результате адсорбции НЧ БЛ на поверхности печатных электродов были созданы электрохимические сенсоры для определения пероксида водорода [22], однако не была показана применимость данных сенсоров для анализа реальных объектов (таблица 1). В [36] предложено использовать последовательное аэрозольное распыление  $K_4[Fe(CN)_6]$  и  $FeCl_3$  на платиновые электроды для получения наноструктур, но метод довольно трудоемкий и длительный: после 4 часов распыления было получено  $0.46 \text{ нмоль} \cdot \text{см}^{-2}$  электроактивной БЛ.

Электрохимически БЛ можно синтезировать гальваностатически [21], при постоянном потенциале [37] и в режиме циклической вольтамперометрии [23]. Гальваностатический синтез обеспечивает снижение фонового тока сенсоров, по сравнению с потенциостатическим [21], но не позволяет получать наноструктурированную БЛ из-за высокой скорости кристаллизации. Тем не менее, в [23] было показано, что при использовании разбавленных растворов прекурсоров возможно в режиме циклической вольтамперометрии остановить осаждение БЛ на ранних стадиях после образования зародышей на поверхности электрода. Поверхность электрода с островками БЛ представляет из себя систему микроэлектродов, поэтому сочетает в себе преимущества микроэлектродов: низкий предел обнаружения, в том числе и за счёт снижения соотношения сигнал/шум, а также устраняет их недостатки – низкие значения токового отклика (таблица 1). Однако данный подход был реализован на СУЭ, а также нет данных о стабильности получаемых покрытий в процессе анализа. Другим подходом для синтеза наноструктур является потенциодинамический синтез в присутствии только феррицианид-ионов, изначальное отсутствие ионов железа в растворе, способствует образованию более однородной пленки [38], но данный подход не является экспрессным.

Альтернативные методы синтеза предполагают использование различных матриц [24,25,38,39]. Например, анодированный оксид алюминия может быть использован для

получения нанотрубок БЛ или её аналогов [39]. В методе Ленгмюра-Блоджетт поверхностно-активное вещество (ПАВ) выступает в качестве матрицы для контроля образования зародышей и ориентации монослоя БЛ на границе между ПАВом и водной фазой [38]. В [24] при использовании комбинации ПАВ в качестве матрицы для получения системы микроэлектродов, было показано, что синтезированная БЛ является поликристаллом с размерами кристаллитов менее 100 нм с толщиной слоя около 60–80 нм. Этот метод, несмотря на трудности с воспроизводимостью синтеза и необходимостью тщательной отмычки компонентов матрицы, негативно влияющих на электроактивность БЛ, позволяет добиться выдающихся пределов обнаружения (1 нМ).

Гидротермальный синтез наноструктур БЛ с добавками, препятствующими агломерации (полимеры вроде полиамилина или полиэтиленгликоля [40], глюкоза [41]), отличается простотой и масштабируемостью, но менее пригоден для модификации электродов. Использование «сшивающих» реагентов для повышения стабильности адсорбированной БЛ может негативно влиять на её электроактивность и соотношение сигнал/шум [40].

В таблице 1 представлены не только сенсоры, использующие БЛ в качестве трансдьюсера. Например, сенсоры на основе наночастиц Pd, несмотря на простоту изготовления и возможность функционирования в режиме проточно-инжекционной амперометрии, демонстрируют недостаточную чувствительность для определения микромолярных концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ЛДОК:  $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$ ) [27]. В то же время сенсоры на основе наночастиц золота, функционирующие при низком потенциале ( $-0.05$  В отн. насыщенного каломельного электрода) и обладающие достаточной селективностью к мешающим компонентам матрицы, характеризуются технологически сложным процессом изготовления.

Высокочувствительные сенсоры, описанные в работах [18,29], демонстрируют низкие пределы обнаружения (вплоть до 9 нМ), однако их производство сопряжено с использованием дорогостоящих компонентов. В [18] сенсор на основе нанокомпозита ванадата гольмия с фосфор-легированным графитоподобным нитридом был применен для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  в молоке и моче. В [29] для повышения соотношения сигнала/шум, благодаря значительному снижению фоновых токов, был использован топологический изолятор ( $\text{Bi}_2\text{Te}_3$ ), который обеспечивает проводимость только на поверхности материала. Однако данные материалы не обеспечивают достаточную селективность определения пероксида водорода в присутствии кислорода, кроме того, влияние других интерферирующих компонентов матрицы на подобные системы изучено не было.

### **Стабилизация БЛ**

При разработке сенсоров для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  в биологических жидкостях существует ряд сложностей. Во-первых, необходимо исключить мешающее влияние супероксидных радикалов и других компонентов матрицы. Во-вторых, необходима достаточная чувствительность, поскольку  $\text{H}_2\text{O}_2$  присутствует в малых количествах. Кроме того, необходимо обеспечить стабильность сенсора, не допуская его деградации при взаимодействии с матрицей образца. В процессе каталитического восстановления пероксида водорода образуются гидроксид-ионы, которые реагируют с  $\text{Fe}^{3+}$  с образованием гидроксида, что приводит к разрушению связей CN-Fe и растворению БЛ [42]. Также затруднено проведение определения сенсорами на основе БЛ без дополнительной стабилизации, если в образце присутствуют комплексообразователи ионов железа (например антикоагулянты – ЭДТА, цитрат натрия).

Полимеры могут быть использованы в качестве стабилизаторов БЛ. Модификацию электродов можно проводить поверх синтезированной БЛ [21], либо путем межфазного химического синтеза, обеспечивающего хорошую адгезию пленки полимера. В отличие от электрополимеризации при таком способе синтеза не надо прикладывать напряжение, поэтому это можно делать не только на поверхности электрода, но и на непроводящих подложках. Дополнительно такая модификация не приводила к снижению коэффициента чувствительности сенсора ( $0.74 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-2}$  [30], таблица 1). В [33] для стабилизации БЛ также применялся полипиррол, но изготовление электродов было длительным (синтез превышал 6 часов), поскольку полимер был использован в качестве восстановителя. Создание нанокомпозитов БЛ с углеродными нанотрубками (УНТ) тоже приводит к повышению чувствительности и стабильности сенсоров [34]. Синтез БЛ на поверхности, модифицированной УНТ, был реализован благодаря наличию ионов железа (III) в УНТ [34]. Несмотря на высокую чувствительность сенсор имеет ограниченный линейный диапазон ( $0.05 - 5 \text{ мкМ}$ ), а также для получения сенсора с таким количеством БЛ ( $0.4 \text{ нмоль}\cdot\text{см}^{-2}$ ) было необходимо провести 500 циклов электрополимеризации, что с учетом скорости развертки и диапазона потенциалов занимает больше 8 часов.

Ранее было показано, что остальные гексацианоферраты переходных металлов не проявляют каталитической активности, а регистрируемая незначительная каталитическая активность вызвана преимущественно образованием БЛ в виде дефектов в процессе синтеза гексацианоферратов [43]. Однако близкая структура ГЦФ Ni делает его подходящим стабилизатором БЛ, поскольку это не приводит к значительному снижению чувствительности сенсора, а синтез не является трудоемким процессом [31,44]. В [31] было показано, что для повышения стабильности сенсора предпочтительно проводить

модификацию поверхности электрода БЛ и ГЦФ Ni не в результате совместного синтеза, а послойного осаждения БЛ и ГЦФ Ni. Для достижения наибольшей стабильности было нанесено последовательно по 5 слоёв БЛ и ГЦФ Ni. При исследовании стабильности в жестких условиях было показано, что более 90 % чувствительности сенсора сохраняется после часа в 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Однако такая модификация довольно длительная, поэтому предпочтительнее проводить синтез ГЦФ Ni в режиме циклической вольтамперометрии.

Таким образом, наиболее простым подходом для полученияnanoструктурированной БЛ на поверхности электрода является потенциодинамический синтез из раствора разбавленных солей [23] или адсорбция наночастиц БЛ на поверхности электрода [22]. В качестве стабилизатора БЛ для проведения анализа в биологических жидкостях предпочтительно использовать полимеры [35] или гексацианоферрат никеля [31,44].

## **Глава 2. Твердоконтактные ионоселективные электроды**

### **2.1.Устройство твердоконтактных ионоселективных электродов**

Контроль уровня основных электролитов в поте и крови важен в современной медицинской диагностике и терапии. Ионы калия и натрия играют фундаментальную роль в поддержании гомеостаза организма, и их точное определение важно для оценки состояния пациента. Концентрация натрия в поте служит индикатором состояния гидратации организма, а повышенные значения коррелируют с развитием обезвоживания и нарушением водно-солевого баланса [45], что особенно важно в спортивной медицине, педиатрии и при работе в трудных условиях. В то же время контроль за содержанием ионов калия в поте или сыворотке крови необходим для диагностики гипо- или гиперкалиемии, которые чреваты осложнениями со стороны сердечно-сосудистой и нервной системы. Помимо биологических жидкостей, контролируется содержание калия в продуктах питания (фруктовые соки, детское питание). Это связано с тем, что несоответствие заявленного и фактического уровня калия представляет угрозу для пациентов, соблюдающих низкокалиевую диету (например, при заболевании почек), также это может являться маркером фальсификации продукции.

Классические потенциометрические ионоселективные электроды (ИСЭ) нашли широкое применение и давно зарекомендовали себя как золотой стандарт в области аналитической химии [46], однако такие ИСЭ с внутренним раствором имеют ряд ограничений [47]. Изменение давления, испарение внутреннего раствора влияет на отклик сенсора. В связи с этим данные приборы проблематично использовать в экспедициях или при глубоководных исследованиях [48].

Из-за большой разницы в активностях ионов во внутреннем растворе ИСЭ и анализируемом может возникать трансмембранный поток ионов из внутреннего раствора,

что затрудняет анализ разбавленных растворов. Для устранения этого эффекта используют стратегии, направленные на снижение активности ионов во внутреннем растворе. Альтернативой является гальваностатическая поляризация, которая подавляет нежелательный ионный транспорт через мембрану [49]. Однако для реализации данных подходов необходимо знать активность определяемого иона в пробе и подбирать соответствующие условия для каждого образца.

В то же время актуальной задачей остается миниатюризация ИСЭ. Для уменьшения размеров сенсора необходимо сократить объём внутреннего раствора, тем не менее такая модификация неизбежно приводит к повышению стоимости всей конструкции сенсора. Современная тенденция миниатюризации и упрощения конструкции приборов привела к развитию твердоконтактных ионоселективных электродов (ТК-ИСЭ), в которых отсутствует внутренний раствор. Вместо раствора между ионоселективной мембраной (ИСМ) и электродом находится электронно-ионный проводник, который и называется твердым контактом. Прототипом современных ТК-ИСЭ является покрытый проволочным электродом, разработанный в 1971 году [50]. Однако его конструкция не позволяла обеспечить стабильные потенциометрические отклики из-за проблемы сопряжения электрода и ионоселективной мембранны, которая является ионным проводником [51]. Затем стало понятно, что для повышения стабильности работы сенсора между ИСМ и электродом должен быть электронно-ионный проводник. Твердый контакт позволяет связывать активность ионов с генерируемым сигналом, при этом поддерживая потенциал на границе электрод|ИСМ. Для обеспечения стабильного потенциометрического отклика, предпочтительно, чтобы материал твердого контакта обладал большой емкостью, а также был гидрофобен. Гидрофобность материала должна препятствовать образованию водного слоя между ИСМ и твердым контактом, который приводит к дрейфу потенциала. Основными материалами для твердого контакта являются проводящие полимеры, углеродные материалы, наноматериалы [52]. Тем не менее проводящие полимеры не являются универсальным материалом для ТК-ИСЭ. Например, полианилин и его производные чувствительны к изменению pH, что вносит вклад в потенциометрический отклик при разработке сенсоров на другие ионы. Таким образом, необходимо правильно подбирать материал твердого контакта в зависимости от задач. ТК-ИСЭ характеризуются не только простотой конструкции и миниатюризации, но и возможностью изготовления с использованием современных технологий трафаретной печати. Это снижает стоимость ТК-ИСЭ, а также позволяет получать гибкие структуры, выбирая соответствующие подложки.

### ***Компоненты ионоселективной мембранны***

Основными компонентами ТК-ИСЭ являются электрод (проводящая подложка) с твердым контактом и пластифицированная ИСМ. Ключевые компоненты ИСМ: ионофор, переносчик, пластификатор, полимерный носитель.

Переносчик необходим для компенсации заряда, образующегося в мемbrane комплекса ионофора с определяемым катионом, повышения ионной проводимости, упрощения ионного обмена между ИСМ и раствором [53]. Для катионселективных мембран в качестве переносчика выбирают липофильную соль с подвижным катионом (обычно щелочной металл) и объемного липофильного аниона (производные тетрафенилбората). В мемbrane переносчик должен присутствовать в диссоциированном состоянии [53]. Присутствие анионов в ИСМ обеспечивает «исключение Доннана» и ограничивает проникновение анионов в мембрану. При выборе переносчика важно, чтобы он был гидрофобным, поскольку именно его утечка из мембраны при хранении приводит к увеличению сопротивления мембраны и ухудшению характеристик сенсора [54].

Полимер в составе мембраны обеспечивает необходимые физико-механические свойства, чаще используют поливинилхлорид (ПВХ). Пластификатор необходим для пластичности мембраны и создания среды для перемещения остальных её компонентов. В зависимости от диэлектрической проницаемости и липофильности пластификатора возможно варьировать свойства ИСМ. ИСМ на основе 2-нитрофенилоксилового эфира (*o*-НФОЭ) обладают более низким сопротивлением, по сравнению с ИСМ на основе диоктилсебационата, кроме того, степень диссоциации электролитов в таких мембранах выше [55]. Снижение чувствительности сенсоров при хранении, в том числе, может быть связано с вымыванием липофильной добавки и пластификатора из ИСМ [56].

Ионофор – главный компонент ИСМ, обеспечивающий селективный транспорт ионов. Обычно ионофор образует комплекс с целевым ионом. При использовании равновесного подхода селективность ИСМ к определяемому иону в присутствии интерферирующего определяется соотношением соответствующих констант образования ион-ионофорного комплекса [57].

### ***Принцип работы ТК-ИСЭ***

В зависимости от типа механизмов формирования сигнала различают окислительно-восстановительные емкостные отклики и механизм перезарядки двойного электрического слоя. В ТК-ИСЭ с окислительно-восстановительным емкостным откликом в качестве твердого контакта обычно используются проводящие полимеры, обладающие электронной и ионной (в результате легирования) проводимостью. На рисунке 3 изображен интерфейс ТК-ИСЭ, селективный к катионам  $M^+$ .

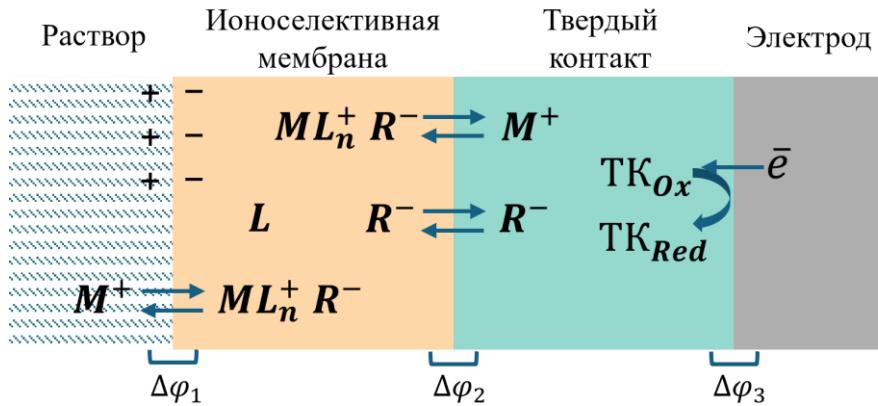
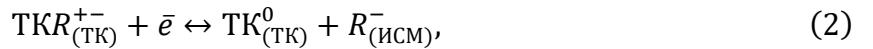
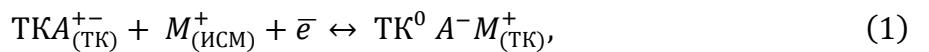


Рисунок 3. Схематическое изображение интерфейса ТК-ИСЭ с мембраной, селективной к катиону M, которая содержит незаряженный ионофор L, липофильный анион R. Твердый контакт демонстрирует окислительно-восстановительный емкостной отклик [47,51].

Подобно окислительно-восстановительным реакциям электрода сравнения, встроенного в ИСЭ с внутренним раствором, происходящие процессы можно описать уравнениями:



Где ТК – материал твердого контакта (например, проводящий полимер); A<sup>-</sup> - анионы, которым легирован твердый контакт; M<sup>+</sup> – определяемые катионы, R<sup>-</sup> – анионы соли-переносчика, входящей в состав ИСМ.

## 2.2. ТК-ИСЭ, функционирующие в режиме ненулевого тока

При переходе к твердоконтактным ИСЭ поддержание стабильного потенциометрического отклика осложняется. Кроме того, потенциометрические сенсоры имеют ограниченную чувствительность ( $2.3 \cdot RT/(nF)$ ), это может вызывать проблемы при определении физиологически значимых колебаний концентрации в биообразцах. Например, содержание калия в сыворотке крови человека находится в диапазоне от 3.5 до 5.5 mM, и такое изменение активности приведет к изменению потенциала на 9.2 мВ ( $20^\circ\text{C}$ ), для ионов натрия (135 – 145 mM) изменения составят около 1.8 мВ [51]. При стандартном коэффициенте чувствительности ИСЭ 58.2 мВ ( $20^\circ\text{C}$ ) изменение потенциала всего на 1 мВ эквивалентно изменению активности одновалентного катиона на 4.1 % [51]. Даже незначительный дрейф базовой линии или шум могут привести к существенной погрешности при анализе биообразцов. В связи с этим активно стали развиваться методы регистрации сигнала в режимах ненулевого тока [57], что позволяет преодолеть эти недостатки, а также повысить чувствительность и точность измерений.

В отличие от вольтамперометрии электроактивных ионов, неэлектроактивные ионы таким способом определяют редко [58]. Основным преимуществом

вольтамперометрических ТК-ИСЭ является то, что их можно использовать для одновременного определения разных катионов [59]. Наноструктурированные поверхности также используются для определения катионов. Например, в [60] показан вольтамперометрический сенсор на основе наноструктурированного оксида марганца для анализа натрия в образцах мочи. Без нанесения ИСМ удалось добиться в 2.5 раза большего отклика на ионы натрия, по сравнению с калием, но из-за широких пиков, увеличивается погрешность измерений.

Недавно новый виток развития получил метод тонкослойной кулонометрии [61,62]. В фиксированном объёме проводится концентрирование катионов в мембране, а в результате регистрации вольтамперограммы происходит высвобождение катионов в раствор. Линейный отклик калий-селективного сенсора наблюдался в диапазоне от 1 до 30 мкМ [62]. Данный подход может быть использован для создания сенсоров, не требующих предварительной калибровки.

Параллельно активно развивается метод «кулонометрии при постоянном потенциале», которая заключает в себе хроноамперометрические измерения с последующим интегрированием тока [63] и соответственно требует предварительной калибровки сенсора. На рисунке 4 представлена схема ТК-ИСЭ, функционирующего в режиме амперометрии при постоянном потенциале.

Когда проводят хроноамперометрические измерения при постоянном потенциале и добавляют раствор, содержащий анализируемый ион, изменение активности определяемого иона вызывает изменение потенциалов на границе раздела фаз. Однако поскольку потенциал рабочего электрода поддерживается постоянным, возникает транзиентный ток между ИСЭ и вспомогательным электродом, пока не установится новое равновесие. Транзиентный ток вызывает окисление или восстановление твердого контакта, пока изменение потенциала твердого контакта не скомпенсирует исходный скачок потенциала на границе ИСМ | раствор [64]. В общем случае транзиентный ток зависит от емкости твердого контакта ( $C_{SC}$ ) и сопротивления ИСМ ( $R_{ISM}$ ) [65]:

$$I = I_0 e^{-t/R_{ISM}C_{SC}} \quad (3)$$

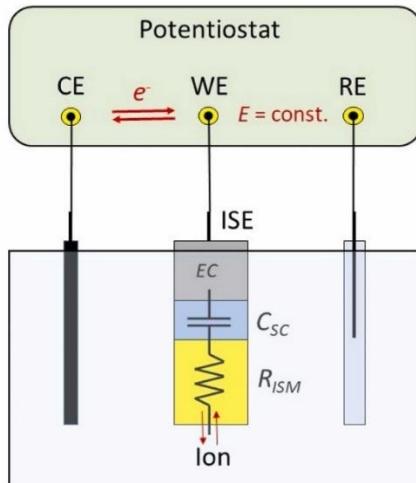


Рисунок 4. Схема функционирования ТК-ИСЭ в режиме «кулонометрии при постоянном потенциале». Потенциал между ТК-ИСЭ (ISE) и электродом сравнения (RE) поддерживается постоянным, возникающий транзиентный ток между ТК-ИСЭ и вспомогательным электродом (СЕ) интегрируется для получения заряда.  $C_{SC}$  – емкость ТК,  $R_{ISM}$  – сопротивление ИСМ [64].

Несмотря на то, что при регистрации хроноамперограммы в стационарном режиме может возникать пик как отклик на добавленный ион, высоту пика нельзя рассматривать в качестве аналитического сигнала из-за его невоспроизводимости, поэтому проводят интегрирование для определения заряда. Такой batch-режим не подходит для последовательного анализа нескольких образцов. Несмотря на это разработанные сенсоры, которые функционируют в режиме «кулонометрии при постоянном потенциале», были успешно использованы для определения калия в сыворотке крови [66–69]. Недостатками данного метода являются длительное время отклика (до 15 минут) из-за необходимости достижения стационарного тока, проблема определения начального времени для последующего интегрирования. Для сокращения времени отклика ТК-ИСЭ было предложено модифицировать ячейку и электрические схемы [65,69]. Например, в [65] Э. Баккер использовал нестандартную электрическую схему с дополнительным конденсатором. Другой вариант – использование ИСЭ, который подключен как электрод сравнения, для предотвращения поляризации и снижения времени отклика [69,70]. В [70] в качестве сигнала рассматривают не суммарный заряд, а значение тока на хроноамперограмме. При этом ток, зарегистрированный на хлоридсеребряном электроде, который выступает в качестве рабочего, линейно зависит от концентрации хлорида калия. Это связано с возможным наложением линейной зависимости потенциала ТК-ИСЭ от логарифма активности и экспоненциальной зависимостью тока ХСЭ от потенциала, но линейный диапазон сенсора очень ограничен (2 – 8 мМ).

Альтернативой стационарным измерениям является проведение измерений в режиме проточно-инжекционной амперометрии. ПИА является широко распространенной техникой, которая была разработана для жидкостной хроматографии [71]. Возможны разные варианты ориентация сопла, из которого выходит поток буфера-носителя, относительно поверхности электрода. В ячейке типа «wall-jet» сопло располагается перпендикулярно поверхности электрода, причем диаметр сопла меньше, чем диаметр рабочего электрода. Ранее было показано, что конфигурация электрода в системе «wall-jet» в проточных системах обеспечивает стабильность и воспроизводимость сигнала [72–74]. Применимость амперометрического детектирования при ПИА неэлектроактивных ионов, основанного на реакциях переноса ионов на границе раздела несмешивающихся жидкостей с ионоселективными мембранами, была показана около 30 лет назад [75,76]. Однако это не привело к широкому распространению таких сенсоров, только недавно было показано, что применение амперометрического детектирования в проточно-инжекционном режиме для ТК-ИСЭ на основе проводящих полимеров демонстрирует значимые преимущества, включая стабильность фонового сигнала, воспроизводимость амперометрического отклика [77–80]. Сравнительно невысокие коэффициенты селективности разработанных сенсоров (таблица 2) связаны с тем, что измерения проводились в буфере-носителе, содержащем избыток мешающих ионов [78]. Выбор подходящего буфера-носителя может устранить эту проблему. Таким образом, амперометрическое определение неэлектроактивных ионов является перспективным направлением, предлагающим возможности для дальнейших исследований и усовершенствований.

### **2.3. ТК-ИСЭ для определения содержания ионов калия или натрия**

Органические полимеры (в частности полипиррол, ПЭДОТ) хорошо зарекомендовали себя в качестве твердых контактов [81,82], но они, как правило, неселективны к неорганическим ионам. Модификация органических полимеров для создания участков для распознавания ионов является трудоемким процессом [83,84]. В связи с этим возникает интерес к неорганическим полимерам, способным к селективной интеркаляции катионов.

Как было показано в главе 1, гексацианоферраты железа способны интеркалировать катионы щелочных металлов, а также обладают электронной и ионной проводимостью, соответственно подходят для использования в качестве твердого контакта в ИСЭ. Действительно, известны примеры создания ИСЭ на основе БЛ и её аналогов. В [85–87] было реализовано вольтамперометрическое определение калия в присутствии натрия и наоборот, за счет различных потенциалов интеркаляции данных катионов удалось выполнить успешное определение ионов даже в отсутствие ИСМ. Однако ЛДОК таких

сенсоров очень ограничен: для  $\text{K}^+$ -ИСЭ предел обнаружения равен 0.6, 9.2, 12 мМ в присутствии 1, 50, 100 мМ  $\text{Na}^+$ ; для  $\text{Na}^+$ -ИСЭ предел обнаружения составляет 0.6, 17 и 21 мМ в присутствии 1, 50 и 100 мМ ионов калия соответственно.

В таблице 2 представлены характеристики (коэффициент чувствительности, логарифм коэффициента селективности, ЛДОК) некоторых разработанных ТК-ИСЭ для определения ионов калия или натрия, более детально рассмотрены сенсоры на основе ГЦФ переходных металлов. Стоит отметить, что существуют работы, где ГЦФ был использован без дополнительного нанесения ионоселективной мембранны, однако достигнутая селективность была недостаточной.

Таблица 2. Твердоконтактные ионоселективные электроды (Пот-я – потенциометрия, КГЭ – композитный электрод с графитом, ХА – хроноамперометрия;  $\lg K$  – логарифм коэффициента селективности, в скобках указан мешающий ион).

ТК	Ион	ИСМ	Элек- трод	Метод	$s, \text{ мВ}$	$-\lg K$	ЛДОК, м
<b>ПЭДОТ</b>	K				7 мА/ $\text{M}/\text{см}^2$	1.7 (Na)	$3.2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
	Na	да	СУЭ	ХА (ПИА)	7.5 мА/ $\text{M}/\text{см}^2$	2 (K)	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
<b>ПЭДОТ</b>	K	да	СУЭ	Пот-я	<b>58.8</b>	<b>3.61</b> (Na)	<b><math>1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-1}</math></b>
<b>ПОТ<sup>1</sup></b>	K	да	СУЭ	Обратная ХА	28 мА/ $\text{M}/\text{см}^2$	3.5 (Na)	$2 \cdot 10^{-3} - 8 \cdot 10^{-3}$
<b>ОУНТ/ ОДА<sup>2</sup></b>	K	да	ППЭ	Пот-я	<b>57.4</b>	5.0 (Na) 2.0 ( $\text{NH}_4$ )	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$
<b>НЧ ZnO</b>	K	да	СУЭ	Пот-я	<b>56.18</b>	4.8 (Na)	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
<b>KNiГЦФ</b>	K				<b>46.8</b>	0.49 (Na)	$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
<b>NaNiГЦФ</b>	Na	нет	СУЭ	Пот-я	<b>57.2</b>	0.4 (K)	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-2}$
<b>БЛ</b>	K				<b>53.9</b>	0.92(Na) 1.09 ( $\text{NH}_4$ )	
<b>KNiГЦФ</b>	Na				<b>56.6</b>	0.24 (Li)	
	K	нет	КГЭ	КВВА	<b>67.0</b>	0.77 (Na) 1.85 ( $\text{NH}_4$ )	
	Na				<b>54.8</b>	0.13 (Li)	
<b>БЛ/УНТ</b>	Na	нет	ППЭ	ХА	14 мА/ $\text{M}/\text{см}^2$	—	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$
<b>БЛ</b>	K	да	КГЭ	Пот-я	<b>57.8</b>	4.0 (Na) 1.9 ( $\text{NH}_4$ )	
<b>KNiГЦФ</b>	K				<b>57.4</b>	4.1 (Na) 1.9 ( $\text{NH}_4$ )	$5 \cdot 10^{-6} - 1$
<b>NaNiГЦФ</b>	Na				<b>56.6</b>	2.7 (K)	
<b>БЛ/ хитозан</b>	Na	да	ППЭ	Пот-я	<b>52.4</b>	4.7 (K)	$1 \cdot 10^{-4} - 1$

<sup>1</sup> Поли(3-октилтиофен-2,5-диил)

<sup>2</sup> однослойные углеродные нанотрубки, функционализированные октадециламиновой группой

В. Нефф разработал первый потенциометрический сенсор на основе электрохимически синтезированной БЛ и эпоксидной смолы, достигнув предела обнаружения  $1 \cdot 10^{-5}$  М и коэффициента чувствительности 54–57 мВ [95].

В [91] показали, что потенциал композитных электродов на основе порошка графита и ГЦФ переходных металлов линейно зависит от логарифма коэффициента активности ионов в растворе. При этом показана собственная селективность ГЦФ к катионам щелочных металлов. Диапазон определяемых концентраций (ДОК) для каждого сенсора по-отдельности не указан, но верхний предел ДОК определялся в основном растворимостью соли, а нижний – проводимостью образца, поскольку сигнал регистрировали в режиме квадратно-волновой вольтамперометрии.

В работе [90] исследовали, как катионы, присутствующие при синтезе ГЦФ Ni, влияют на селективность твердого контакта. Покрытый проволочным электродом, который представляет собой СУЭ с адсорбированной суспензией ГЦФ Ni в силиконовом геле, исследовали в потенциометрическом режиме [90]. Было показано, что сенсоры на основе ГЦФ Ni селективны к ионам щелочных металлов даже в отсутствие ИСМ. Для большинства исследованных ГЦФ Ni селективность уменьшалась в ряду Cs > K > Na > Li. Только для KNiГЦФ (ГЦФ Ni, синтезированный в присутствии ионов калия) зависимость убывала в ряду K > Cs > Na > Li. При этом коэффициент чувствительности к калию практически не зависит от катиона, с которым синтезирован ГЦФ Ni (Li, Na, K или Cs), заметное отклонение наблюдалось только для CsNiГЦФ, у которого коэффициент чувствительности увеличился на 14 %. В то время как при определении других катионов (Li, Na, Cs) наибольшую чувствительность демонстрировали сенсоры на основе гексацианоферратов, синтезированных в присутствии определяемых катионов.

В [13] осуществляли ПИА с амперометрическим детектированием катионов на ГЦФ железа или меди без ИСМ. Селективность достигалась за счёт выбора потенциала регистрации ПИА, поскольку потенциал интеркаляции зависит от гидратированного радиуса катиона и увеличивается с возрастанием радиуса [12]. Сенсор на основе ГЦФ меди был использован для анализа сыворотки крови и образцов мочи. В качестве подвижной фазы использовали растворы 0.01 М LiClO<sub>4</sub> или 0.01 М HNO<sub>3</sub>, однако в этих средах наблюдалась недостаточная стабильность гексацианоферратов, особенно ГЦФ Ni. Экспериментально установлено, что при значении потенциала 0.3 В в результате введения 0.01 М анализируемого раствора отклик был стабилен всего в течение 8–10 инжекций. При потенциале 0.2 В наблюдалось снижение сигнала на 20 % после 8 инжекций.

В [96] исследовали ТК-ИСЭ на основе БЛ с мембраной из ПВХ, однако калий-селективные сенсоры демонстрировали субнернстовский отклик с максимальной

чувствительностью 42 мВ на декаду в диапазоне от  $1 \cdot 10^{-3} - 1$  М, вероятно из-за деградации пленки БЛ. В [97] было отмечено, что БЛ растворяется в мембранообразующей смеси, поэтому использование её в качестве твердого контакта было затруднено. В то же время в [93] показан потенциометрический сенсор на основе БЛ или её аналогов (ГЦФ никеля или меди). Сенсоры на основе БЛ обладали широким ЛДОК ( $5 \cdot 10^{-6} - 1$  М) и высокой селективностью к ионам калия  $\lg K_{\text{пот}(K/Na)} = -4.0$ , что близко к предельно достижимой селективности мембран на основе валиномицина [98]. Однако нет примеров использования данных сенсоров для анализа биологических жидкостей, а также сенсоры трудоемки в приготовлении: перед нанесением ИСМ суспензию БЛ смешивали с графитовым порошком и прессовали в ПВХ-корпусе. Существует пример использования наноматериалов БЛ в качестве твердого контакта в ИСЭ, в [94] разработаны натрий-селективные потенциометрические сенсоры на основе нанокомпозита хитозан/БЛ. Однако предел обнаружения ТК-ИСЭ недостаточен для определения катионного состава разбавленных растворов (ЛДОК равен  $1 \cdot 10^{-4} - 1$  М  $Na^+$ ). Использование наночастиц в качестве твердого контакта упрощает изготовление ТК-ИСЭ, поскольку стадию модификации поверхности электрода суспензией наночастиц легко автоматизировать.

В [88] описаны компактные потенциометрические ТК-ИСЭ, изготовленные на печатных планарных электродах. Эти сенсоры были протестированы для определения калия в слюне и продуктах питания (соки, детское питание). Сенсор обеспечивал экспрессное детектирование со временем отклика, не превышающим 30 с. Однако требуется дальнейшая оптимизация системы для снижения чувствительности к изменению pH. В [92] сенсоры на основе БЛ и УНТ без мембранны использовали для амперометрического определения натрия в почвенных вытяжках, измерения проводили в ячейке фиксированного объёма при перемешивании. Но результаты, полученные на ИСЭ, могут более, чем на 50 % расходиться с данными атомно-абсорбционной спектроскопии, что свидетельствует о недостаточной селективности сенсора.

### Глава 3. Электрохимические ДНК-сенсоры<sup>3</sup>

Электрохимические биосенсоры широко применяются для определения низкомолекулярных веществ, однако с их помощью возможно определять и биомолекулы, в частности ДНК. Для определения ДНК разработаны различные системы тестирования, основанные, например, на поверхностном плазмонном резонансе, флуоресценции, а также другие методы анализа, сочетающие электрофоретическое разделение и радиоизотопное обнаружение [99]. Однако данные методы из-за дорогостоящего и крупногабаритного оборудования мало подходят для разработки систем, выполняющих внелабораторный анализ. В связи с этим возникает интерес к разработке электрохимических ДНК-биосенсоров. Такие устройства обладают высокой чувствительностью, в то же время миниатюрны, надежны, относительно дешевы и просты в использовании [100].

Основу электрохимического ДНК-биосенсора составляют одноцепочечные ДНК-зонды, которые иммобилизованы на поверхности электрода для распознавания комплементарной одноцепочечной ДНК-мишени. Гибридизация этих одноцепочечных ДНК (оцДНК), т. е. формирование двойной спирали, – это основное событие, которое необходимо зарегистрировать при функционировании ДНК-биосенсора.

#### 3.1. Методы иммобилизации биомолекул на поверхности электродов

Важным этапом при создании электрохимических ДНК-сенсоров является иммобилизации оцДНК (ДНК-зондов) на поверхности электрода, которая должна обеспечивать их стабильное закрепление при сохранении доступности для гибридизации с комплементарными ДНК-мишениями. Следовательно, эффективность гибридизации связана в том числе и со свойствами поверхности электрода, что обуславливает необходимость тщательного выбора метода её модификации. Основные подходы иммобилизации включают адсорбционное, аффинное и ковалентное связывание (рисунок 5). Причем эти методы относятся не только к иммобилизации ДНК-зондов, но и других биомолекул, таких как ферменты, антитела и т.д..

---

<sup>3</sup> При подготовке данной главы диссертации были использованы материалы выпускной квалификационной работы автора

Шавокшина В.А. 2021 Электрохимические сенсорные платформы на основе поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофена) для детекции олигонуклеотидов

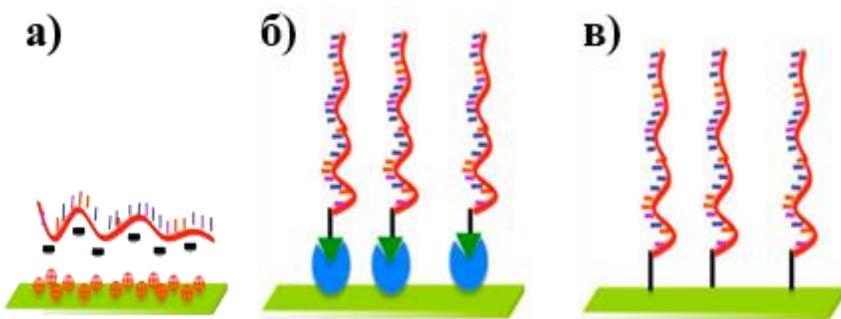


Рисунок 5. Схема основных подходов для иммобилизации ДНК-зондов: в результате адсорбции (а), возникновения аффинных взаимодействий (б), ковалентной иммобилизации (в) [101].

Адсорбция – это простейший способ иммобилизации, не требующий предварительной модификации ДНК-зондов. Отрицательно заряженные олигонуклеотиды удерживаются на электроде за счёт электростатических взаимодействий (рисунок 5а). Несмотря на простоту реализации, метод характеризуется низкой воспроизводимостью и склонностью к десорбции при изменении рН, температуры или ионной силы [100]. Дополнительным ограничением является хаотичная ориентация иммобилизованных биомолекул, снижающая эффективность гибридизации.

Аффинная иммобилизация, например, через систему авидин-биотин выделяется высокой специфичностью (рисунок 5б). Авидин образует тетракоординированные комплексы с биотинилированными ДНК-зондами, обеспечивая надежное связывание. Однако данный метод требует использования дорогостоящих реагентов, отличается длительностью процедуры, и существуют стерические ограничения, связанные с размером авидина [101].

### **Ковалентная иммобилизация**

Ковалентное связывание обеспечивает стабильную и селективную иммобилизацию ДНК-зондов. По сравнению с адсорбцией оно более стабильно и селективно, а по сравнению с аффинными методами требует меньших затрат времени и денег. Важным преимуществом является возможность контролируемой ориентации молекул, повышающей их доступность для гибридизации. Широко распространена хемосорбция функционализированных тиольной группой ДНК-зондов на поверхности золотых электродов. В результате формирования связи, по устойчивости близкой к ковалентной, происходит образование самособирающегося монослоя (ССМ), процедура отличается простотой и воспроизводимостью. В то же время ССМ подвержены фотоокислению, способны функционировать в ограниченном диапазоне потенциалов [-0.6; 0.6] В [102], а присутствие ПАВ приводит к разрушению ССМ [103].

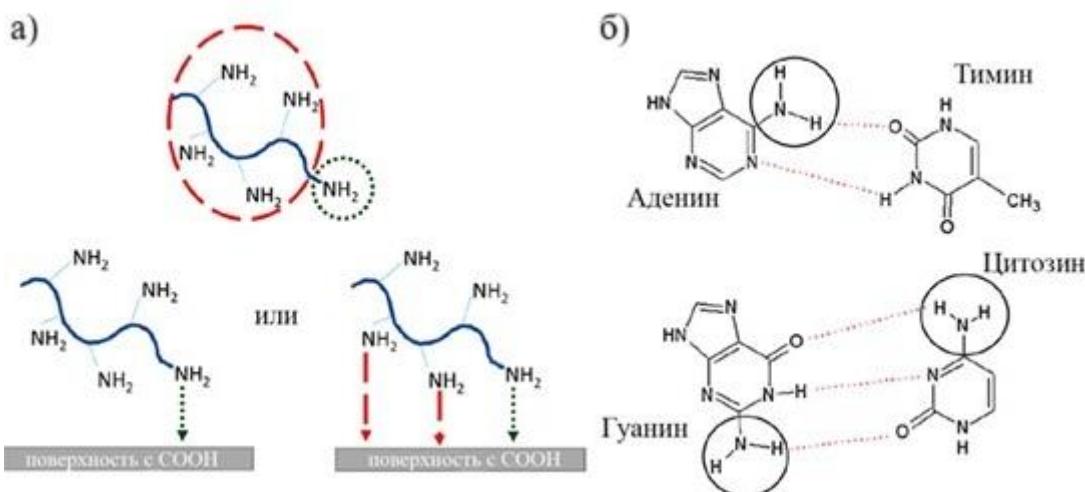


Рисунок 6. а) Альтернативные пути иммобилизации NH<sub>2</sub>-модифицированного оцДНК-зонда на поверхности с карбоксильными функциональными группами: через концевую аминогруппу или аминогруппы азотистых оснований. б) Схема формирования водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями [104].

Альтернативным подходом является ковалентная иммобилизация с образованием амидных связей между аминогруппами биомолекул и поверхностью, функционализированной карбоксильными группами. Несмотря на относительную простоту, данный метод недостаточно специфичен: в реакцию вступают не только концевые аминогруппы, а также аминогруппы основной цепи ДНК, содержащиеся в азотистых основаниях (рисунок 6а). Это приводит к нарушению способности образования водородных связей с комплементарным олигонуклеотидом (рисунок 6б) [104]. Кроме того, гидролиз активаторов, добавляемых в реакционную смесь, может снижать выход реакции и воспроизводимость получаемых сенсоров.

#### *Азид-алкиновое циклоприсоединение (клик-химия)*

Одним из вариантов ковалентной иммобилизации ДНК-зондов и других биомолекул является азид-алкиновое циклоприсоединение [105], которое относится к клик-реакциям. Концепция клик-химии была предложена в 2001 году Б. Шарплесом, такие реакции должны удовлетворять ряду условий: (1) иметь высокий выход; (2) обладать широким спектром применимых реагентов; (3) побочные продукты не должны быть токсичными. Кроме того, при проведении реакции должны быть соблюдены следующие критерии: (1) реакция проходит в условиях, достижимых в любой лаборатории; (2) использованы доступные реагенты и (3) нетоксичные растворители; (4) целевой продукт реакции легко выделить. Термин «клик-химия» используется для описания класса реакций, которые удовлетворяют всем этим требованиям, и включает реакции циклоприсоединения, нуклеофильного замещения, эпоксидирования и т. д. [106]. В 2022 году К. Бертоцци, М. Мельдаль и Б.

Шарплесс стали лауреатами Нобелевской премии по химии «за разработку клик-химии и биоортогональной химии».



Рисунок 7. Схема азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого Cu(I).

1,3-диполярное циклоприсоединение по Хьюсгену азода и алкина с образованием 1,2,3-триазола является самой популярной и используемой реакцией клик-химии (рисунок 7) [106], а также она подходит для иммобилизации ДНК-зондов. Функционализация нуклеиновых кислот азидными или алкиновыми функциональными группами не нарушает их биохимические свойства. Азиды и неактивированные алкины практически не реагируют с биологическими функциональными группами, они реагируют только друг с другом т.е. реакция биоортогональна, образующийся триазольный цикл стабилен и нетоксичен [107], а реакцию можно проводить в том числе и в водной среде. Кроме того, азиды и алкины не вступают в заметные гидрофобные, кислотно-основные взаимодействия, поэтому не оказывают значительного влияния на биомолекулы. В отличие от реакции N-гидроксисукциниimidных эфиров с аминогруппами, клик-реакция не требует строгого контроля pH и может протекать в диапазоне pH от 4 до 11. В [104] было показано, что иммобилизация ДНК-зондов в результате клик-реакции приводит к повышению эффективности гибридизации с комплементарными оцДНК и снижению предела обнаружения в таких сенсорах, по сравнению с иммобилизацией через образование карбодииimidных связей. Таким образом, азид-алкиновое циклоприсоединение является простым и селективным способом ковалентной иммобилизации ДНК-зондов.

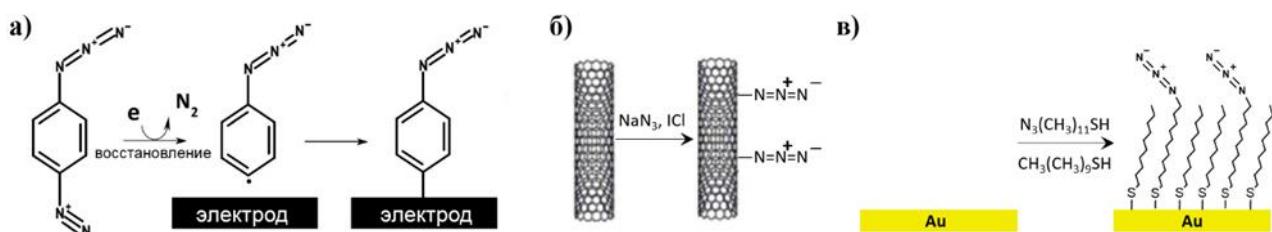
### 3.2. Модификация поверхности электродов для иммобилизации ДНК-зондов

Иммобилизация ДНК-зонда на поверхности электрода обеспечивает необходимую специфичность биосенсора к комплементарному олигонуклеотиду или мишени. Однако неспецифическая адсорбция некомплементарных олигонуклеотидов на поверхности электрода, не занятой ДНК-зондами, снижает селективность, давая ложноположительный сигнал, а также затрудняет доступ мишени к зондам, в результате уменьшается чувствительность и воспроизводимость анализа [108].

Минимизация неспецифической адсорбции и контролируемая ориентация иммобилизованного ДНК-зонда имеют решающее значение для достижения высокой чувствительности и специфичности анализа. В связи с этим модификация поверхности электрода — важный этап при разработке ДНК-биосенсоров. Целесообразно использовать олигонуклеотиды, модифицированные алкиновыми фрагментами, поскольку они не

вступают в реакцию при фосфорамидитном синтезе олигонуклеотидов. В то же время азидные группы, наоборот, реакционноспособны и дают побочные продукты с фосфорогорганическими соединениями по реакции Штаудингера [107]. Таким образом, для иммобилизации ДНК-зондов предпочтительной является модификация электрода азидными функциональными группами.

Одним из наиболее простых существующих подходов является функционализация поверхности углеродных электродов или наноматериалов. В работе [109] описана модификация графитовой поверхности азидными группами посредством реакции с азидом йода ( $\text{IN}_3$ ). Однако данный реагент является слишком взрывоопасным, что ограничивает масштабирование методики. Альтернативный подход предполагает использование более стабильных солей арилдиазония, в частности 4-азидобензолдиазония, для электрохимической модификации стеклоуглеродных электродов в режиме циклической вольтамперометрии (рисунок 8а) [110]. Создание функционализированных наноматериалов, в частности углеродных нанотрубок (рисунок 8б), также обеспечивает иммобилизацию алкин-модифицированных биомолекул. Тем не менее, для дальнейшей разработки биосенсоров такие подходы имеют ограничения, поскольку на немодифицированных углеродных поверхностях выражена неспецифическая адсорбция биомолекул [111].



В [112] была реализована модификация поверхности золотого электрода ССМ на основе азид-замещенного ундекантиола (рисунок 8в). Однако формируемый ССМ не является электроактивным, а длинные алкильные фрагменты могут приводить к замедлению процессов гетерогенного переноса заряда [113]. Кроме того, в данном методе ограничен выбор материалов электродной поверхности и продолжительность процесса формирования монослоя. Указанные недостатки ограничивают разработку и масштабирование производства электрохимических биосенсоров на основе ССМ [114].

Для повышения селективности и чувствительности биосенсоров поверхность электрода можно модифицировать проводящими полимерами, содержащими функциональные группы. С одной стороны, высокая электронная плотность основной цепи проводящего полимера обеспечивает кулоновское отталкивание олигонуклеотидов, препятствуя неспецифической адсорбции [115]. С другой стороны, наличие функциональных групп создает условия для ковалентной иммобилизации ДНК-зондов.

В работе [116] для модификации поверхности электрода проводящим полимером, содержащим азидные группы, выполняли электрополимеризацию азидоанилина (рисунок 9). Однако следует учитывать, что (био)сенсоры преимущественно функционируют в нейтральной среде, где проводимость полианилина значительно снижается. В связи с этим необходима модификация электродной поверхности полимером, который является проводящим в данных условиях.

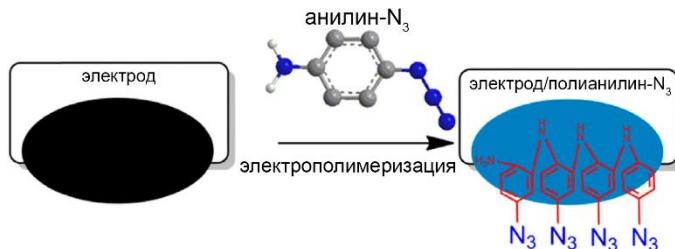


Рисунок 9. Схема модификации стеклоуглеродного электрода полиазидоанилином [116].

Другим полимером, содержащим азидогруппу, является азидометил-замещенный поли(3,4-этилендиокситиофен), который сохраняет проводимость и в нейтральной среде.

#### **Поли(3,4-этилендиокситиофен)**

Поли(3,4-этилендиокситиофен) (ПЭДОТ) – проводящий полимер, сохраняющий проводимость в водных и органических средах. ПЭДОТ устойчив к внешним воздействиям и не обладает цитотоксичностью. Эти преимущества сочетаются с коммерческой доступностью, поэтому ПЭДОТ находит применение при создании солнечных батарей, топливных элементов, суперконденсаторов, а также электрохимических (био)сенсоров [117]. Получать ПЭДОТ можно химически или в результате электрополимеризации.

Электрохимический синтез позволяет контролировать толщину получаемой полимерной пленки, а также отличается воспроизводимостью. Следовательно, для создания электрохимических сенсоров данный способ синтеза предпочтителен.

Электрохимическая полимеризация 3,4-этилендиокситиофена (ЭДОТ) инициируется при достижении потенциала окисления мономера, приводящего к генерации высокореакционных катион-радикалов (рисунок 10). Эти катион-радикалы вступают в реакции с нейтральными мономерами или друг с другом, запуская процесс полимеризации. Стадия димеризации сопровождается элиминацией двух протонов с последующим

окислением образовавшегося димера, что обеспечивает дальнейший рост полимерной цепи [118]. Предполагается, что для замещенных производных ЭДОТ, содержащих азидометильные или хлорметильные функциональные группы, полимеризация должна протекать аналогично.

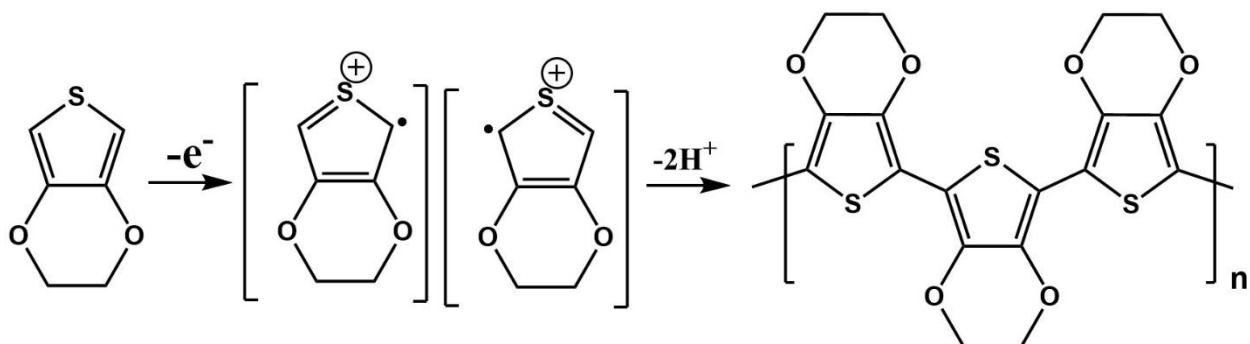


Рисунок 10. Схема полимеризации ЭДОТ [118].

Низкая растворимость ЭДОТ в водной среде ( $2.0 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  при  $25^\circ\text{C}$  [119]) обуславливает необходимость использования органических растворителей (ацетонитрил, пропиленкарбонат, дихлорметан). Однако для (био)сенсорных приложений лучше ограничить проведение полимеризации в таких условиях, поскольку растворитель, включенный в полимерную пленку, может негативно влиять на структуру и активность биомолекул. Для проведения синтеза ПЭДОТ в воде применяют ПАВ (лаурилсульфат натрия, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин) [119], но их присутствие может нарушать электрон-транспортные характеристики сенсорных платформ, а также приводить к неспецифической адсорбции. Возможно получение ПЭДОТ в водной среде и без использования ПАВ [119,120], однако для создания (био)сенсоров такой подход пока не нашёл широкого распространения.

Другим направлением является использование полистиролсульфоната (ПСС) в качестве противоиона для повышения гидрофильности. Однако плёнки ПЭДОТ:ПСС склонны к набуханию, поэтому сенсоры на их основе могут быть недостаточно стабильны [121]. Внедрение ПСС также может привести к снижению электроактивности полимера, а также чувствительности определения отрицательно заряженных анализаторов из-за возникновения электростатического отталкивания. Таким образом, существует проблема получения ПЭДОТ и его производных в водной среде без использования ПАВ и иных компонентов.

Ограничения, связанные с ковалентной иммобилизацией биомолекул на сенсорные платформы на основе ПЭДОТ, стимулировали разработку его функционализированных производных, в частности поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофена) (ПЭДОТ- $N_3$ ). Данные материалы сохраняют высокую электропроводность исходного полимера, одновременно приобретая возможность ковалентного связывания с биомолекулами.

Например, в [122] была продемонстрирована принципиальная возможность создания ДНК-сенсора на основе ПЭДОТ- $\text{N}_3$ , где алкин-модифицированные ДНК-зонды были иммобилизованы посредством азид-алкинового циклоприсоединения (рисунок 11). Однако ПЭДОТ- $\text{N}_3$  был синтезирован в дихлорметане, а определение ДНК проводили в водном растворе. Дополнительным ограничением является регистрируемый аналитический сигнал – уменьшение силы тока не позволяет надежно дифференцировать специфический отклик от фоновых процессов и неспецифической блокировки поверхности.

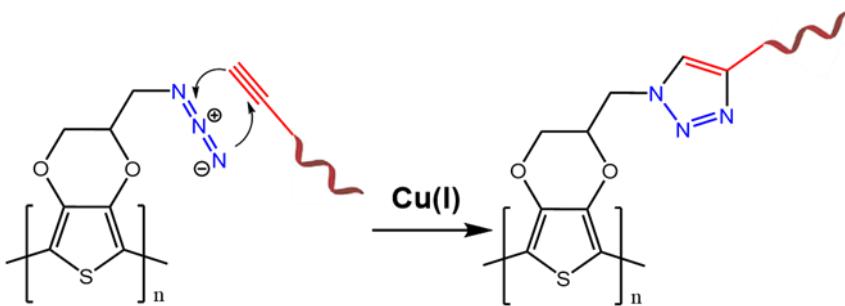


Рисунок 11. Азид-алкиновое циклоприсоединение ПЭДОТ- $\text{N}_3$  и алкинированной ДНК, катализируемое солями Cu(I) [122].

Известные методики синтеза ПЭДОТ- $\text{N}_3$ , включая химический синтез в результате окисления мономера солями Fe(III) в водно-органической среде [123], не описывают получение ПЭДОТ- $\text{N}_3$  в водной среде без использования ПАВ. При этом электрохимические характеристики модифицированного электрода могут оказывать значительное влияние на аналитические характеристики разрабатываемых сенсоров. Однако модификация поверхности электрода проводящими полимерами не всегда приводит к улучшению кинетики процессов гетерогенного переноса заряда. Например, в [124] при разработке ДНК-биосенсора поверхность электрода на основе допированного бором алмаза модифицируют полианилином. В результате сопротивление переноса заряда на модифицированных электродах значительно повышается. Или, например, при осаждении полипиррола на поверхности платинового электрода происходит значительное увеличение разности потенциалов между пиками ( $\Delta E_{\text{п}}$ ), наблюдаемое на циклической вольтамперограмме в присутствии феррицианида калия (pH 7.0). В то время как на немодифицированном электроде наблюдалась симметричная пара пиков окисления и восстановления с  $\Delta E_{\text{п}}$  85 мВ. В [125] после модификации золотого электрода сopolимером полипиррол/полианилин  $\Delta E_{\text{п}}$  возрастает с 80 мВ до 120 мВ.

Таким образом, ПЭДОТ- $\text{N}_3$  является перспективным материалом для создания сенсорных платформ на его основе. Ключевое преимущество – наличие функциональных азидных групп, облегчающих иммобилизацию биомолекул. Следует отметить, что параметры синтеза (растворитель и состав реакционной смеси, материал электрода) влияют

на функциональные свойства получаемых покрытий. При создании ДНК-сенсоров необходимо предварительно оценить электрон-транспортные характеристики системы, а также оценить влияние модификации на чувствительность и селективность разрабатываемых сенсоров.

### 3.3. Способы регистрации гибридизации в электрохимических ДНК-биосенсорах

Одним из главных процессов в работе ДНК-сенсоров является гибридизация комплементарных участков олигонуклеотидов. Среди множества схем функционирования ДНК-сенсоров и различных подходов для подтверждения факта гибридизации рассмотрим три основных: прямое окисление образующейся двухцепочечной ДНК (дДНК), использование диффузационно-подвижных медиаторов или ковалентно иммобилизованных меток.

#### *Регистрация гибридизации без использования меченых ДНК*

Прямое окисление азотистых оснований (преимущественно гуанина) представляет собой простейший метод детектирования, не требующий введения дополнительных меток или медиаторов (рисунок 12а). Однако он не получил широкого распространения из-за необходимости приложения высоких потенциалов, приводящих к увеличению фонового тока и снижению селективности определения. Это делает метод применимым преимущественно для модельных систем, но малопригодным для анализа биообъектов [126].

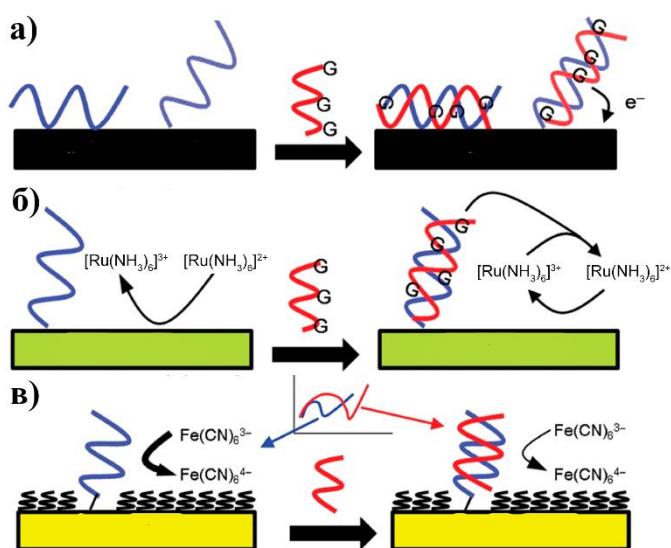


Рисунок 12. Схема функционирования ДНК-сенсоров без использования меток: а) прямое окисление гуаниновых оснований комплементарной оцДНК, б) электрокатализическое окисление гуанина с помощью подвижного медиатора, в) регистрация спектров электрохимического импеданса в присутствии медиатора [115].

В качестве альтернативы возможно введение в систему диффузионно-подвижных медиаторов. Электрохимические реакции с медиаторами должны протекать быстро, обратимо и при низких потенциалах [100]. Например, положительно заряженный медиатор – гексаамминрутения ( $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ ) может взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК в результате электростатического притяжения. После образования дЦДНК плотность отрицательного заряда повышается, что и приводит к повышению тока окисления медиатора [127].

Отрицательно заряженный  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , наоборот, будет отталкиваться от дЦДНК. В таких сенсорах формирование аналитического сигнала может происходить за счёт блокировки поверхности в результате успешной гибридизации. Это приводит к увеличению сопротивления переноса заряда из-за ограничения доступа медиатора к поверхности электрода (рисунок 12в) [128]. Например, в [129] на поверхности СУЭ синтезировали композит БЛ с углеродными многостенными УНТ и полипирролом. Ковалентная иммобилизация микроРНК осуществлялась за счёт амидных связей. Для регистрации сигнала гибридизации регистрировали спектры электрохимического импеданса в присутствии  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , а в качестве аналитического сигнала рассматривали повышение сопротивления. Однако такой сигнал не обладает достаточной специфичностью и может возникать из-за блокировки поверхности непроводящими олигонуклеотидами или неспецифической адсорбции компонентов матрицы.

#### *Регистрация гибридизации с применением меченых ДНК*

Для повышения чувствительности и селективности анализа широко применяются метки, участвующих в генерации электрохимического сигнала, пропорционального концентрации целевой ДНК-мишени.

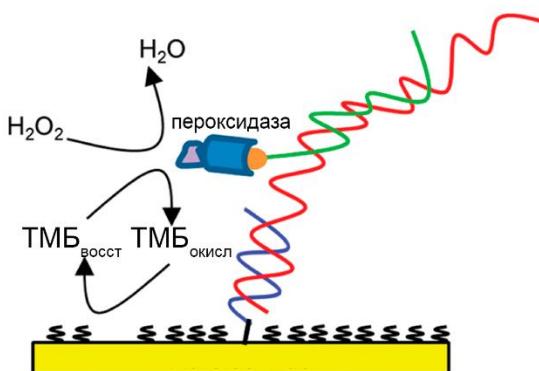


Рисунок 13. Регистрация гибридизации с использованием олигонуклеотидов, меченых ферментом пероксидазой [115].

Электроактивные метки находят применение в сенсорных системах для генерации сигнала. Один из вариантов реализации данного подхода – иммобилизация ДНК-зонда на поверхности электрода, когда к противоположному концу зонда ковалентно пришита

электроактивная метка. В результате гибридизация с комплементарными участками олигонуклеотидов влияет на гибкость зонда и на вероятность (эффективность) переноса электронов между электроактивным центром метки и электродом. Однако чувствительность таких сенсоров ограничена площадью электрода и количеством ДНК-зондов с меткой, которые можно иммобилизовать. Для преодоления этих ограничений можно использовать диффузионно-подвижный медиатор.

Другим вариантом детектирования является процесс, при котором метку содержит ДНК-мишень. Среди различных типов меток особое место занимают ферменты, в частности пероксидаза, которая иммобилизуется на олигонуклеотиде и после гибридизации формирует каталитический отклик при добавлении пероксида водорода в систему. Механизм основан на способности пероксидазы катализировать восстановление  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а для регенерации активного центра фермента используют второй субстрат, такой как 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), в том числе выполняющий функцию медиатора: при его восстановлении на поверхности электрода (рисунок 13) формируется амперометрический отклик [115]. Несмотря на селективность таких меток ферменты обладают рядом ограничений, включая низкую стабильность, повышенную стоимость и строгие требования к условиям хранения. В связи с этим в последнее время активно ведутся разработки биосовместимых меток на основе наноматериалов, основными преимуществами которых являются стабильность и простота функционализации. На рисунке 14 представлены основные стратегии применения наночастиц для формирования сигнала в ДНК-биосенсорах, включая как каталитические, так и некatalитические методы генерации сигнала.

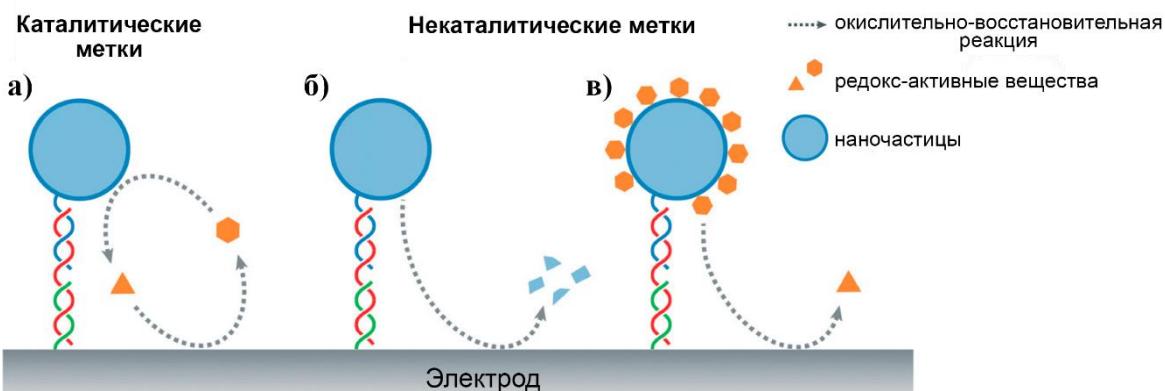


Рисунок 14. Схема использования наночастиц для формирования сигнала в ДНК-биосенсорах. Наночастицы могут действовать как а) нанокатализаторы; б) окислительно-восстановительные метки; в) «переносчики» окислительно-восстановительно активных меток [130].

Металлические наночастицы представляют интерес в качестве редокс-меток (рисунок 14б). Один из подходов предполагает кислотное растворение наночастиц (в

азотной или соляной кислоте), связанных с целевыми оцДНК, с последующим определением катионов металла методом инверсионной вольтамперометрии [130].

Более простым подходом является использование наночастиц в качестве носителей других редокс-активных меток, которые ковалентно связаны с ними (рисунок 14в). Например, в [131] для понижения предела обнаружения в 1000 раз (до 3.8 аМ) использовали наночастицы золота, связанные с металлоорганическими соединениями, но несмотря на выдающиеся характеристики данный метод не получил широкого распространения в практике создания ДНК-биосенсоров [130].

Наибольшее практическое применение в электрохимических ДНК-биосенсорах нашли наночастицы, функционирующие в качестве каталитических меток. Благодаря высокой каталитической активности, имитирующей действие природных ферментов, такие наноматериалы получили название «нанозимы». В то же время нанозимы сохраняют преимущества, присущие наноматериалам: экономическая доступность, стабильность при хранении, простота функционализации [132].

При использовании меток на основе нанозимов чаще всего используют наночастицы, имитирующие пероксидазную активность (катализирующие восстановление  $H_2O_2$ ): наночастицы оксида железа [133], наночастицы переходных [134] и благородных [135] металлов. В основном в таких сенсорах каталитический цикл требует присутствия двух субстратов: пероксида водорода и восстанавливавшего субстрата (ТМБ, пирокатехин и т.д.), который регенерирует нанозим и участвует в формировании амперометрического сигнала, восстанавливаясь на поверхности электрода. Параллельно развивается направление безмедиаторного катализа, основанного на прямом электронном переносе между электродом и наночастицами. В работе [136] представлен ДНК-биосенсор с использованием золотых наночастиц в качестве электрокатализической метки для окисления гидразина. Конъюгация наночастиц с олигонуклеотидами снижает их электрокатализическую активность, что потребовало дополнительного введения боргидрида натрия для восстановления каталитических свойств меток. Тем не менее использование таких реагентов, как  $NaBH_4$  и гидразин существенно ограничивает возможность многократного использования сенсора [126].

Сравнительный анализ разработок в области электрохимических ДНК-сенсоров (таблица 3) демонстрирует большую популярность подходов, использующих меченные ДНК-мишени с применением наночастиц, несмотря на существование альтернативных методов без использования меток.

Таблица 3. Способы регистрации гибридизации в электрохимических ДНК-сенсорах (ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия, ЛВ – линейная вольтамперометрия, ХА – хроноамперометрия).

Метка	Медиатор или субстрат	Определяемый объект	Метод определения	Ссылка
Нет	—	ДНК (Гепатит С)	ДИВ	[122]
Нет	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/-4-}$	ДНК	ЛВ <sup>4</sup>	[137]
Нет	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/-4-}$	микроРНК	СЭХИ	[129]
Нет	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$	ДНК (вирус мозаики цветной капусты)	ДИВ	[138]
<b>Пероксидаза</b>	$\Gamma\text{X}^5 + \text{H}_2\text{O}_2$	ДНК	ХА	[139]
<b>НЧ Au</b>	$\text{NH}_2\text{NH}_2$	ДНК	ЛВ	[136]
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	ТМБ + $\text{H}_2\text{O}_2$	микроРНК	ДИВ	[133]
<b>мНЧ ГЦФ Zr<sup>6</sup></b>	$\text{H}_2\text{O}_2$	ДНК	ДИВ	[134]
<b>НЧ PtPd</b>	ТМБ + $\text{H}_2\text{O}_2$	Муцин-1	ХА	[135]
<b>Пероксидаза+ Pt-Pd кластеры с оксидом графена</b>	$\text{H}_2\text{O}_2$	HULC	ДИВ	[140]

Нанозимы являются перспективной альтернативой меткам на основе природных ферментов благодаря стабильности и низкой стоимости. Однако каталитическая активность нанозимов на основе платины или оксидов железа либо уступает, либо сопоставима с активностью ферментов [35]. Дополнительным ограничением является недостаточная селективность таких наночастиц в реакции восстановления пероксида водорода в присутствии растворенного кислорода, поскольку они проявляют оксидазную активность, участвуя в реакции восстановления  $\text{O}_2$ . Для преодоления данных ограничений перспективным решением является использование меток на основе наночастиц берлинской лазури (НЧ БЛ). Как отмечалось ранее, БЛ обладает пероксидазной активностью и катализирует восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$ , при этом каталитически активной является только форма берлинского белого, в связи с этим электрокатализическое восстановление  $\text{H}_2\text{O}_2$  проводят при низких потенциалах (0.0 В), что минимизирует паразитные сигналы от компонентов матрицы образца.

<sup>5</sup> Гидрохинон

<sup>6</sup> Магнитные наночастицы гексацианоферрата Zr(II)

В работе [35] описаны катализитически синтезированные НЧ БЛ, полученные в результате восстановления пероксидом водорода смеси солей Fe(III). Такие НЧ БЛ обладают высокой каталитической активностью, до 300 раз превосходящей активность природного фермента, пероксидазы из корней хрена. Кроме того, в отличие от нанозимов на основе благородных металлов или оксидов металлов, НЧ БЛ не проявляют оксидазной активности, что обеспечивает высокую селективность восстановления пероксида водорода в присутствии растворенного кислорода. Помимо выраженной каталитической активности, НЧ БЛ также являются эффективными электрокатализаторами восстановления  $H_2O_2$ . Модификация поверхности электрода наночастицами БЛ позволяет достичь коэффициента чувствительности определения  $H_2O_2$ , почти в 1.5 раза превышающего аналогичный показатель для сенсоров на основе плёнок БЛ [22]. Благодаря этим преимуществам катализитически синтезированные НЧ БЛ являются перспективным материалом для создания меток на их основе.

Для ковалентной иммобилизации меток на ДНК-мишениях также предпочтительно использовать азид-алкиновое циклоприсоединение, в связи с этим необходима дополнительная функционализация НЧ БЛ. Ранее было показано, что для каталитического синтеза наночастиц БЛ, помимо  $H_2O_2$ , возможно использовать органические мономеры, выступающие в роли восстановителей [30]. Наиболее эффективными среди них являются те, которые в результате окислительной полимеризации образуют проводящие полимеры. Данный подход был адаптирован и для каталитического синтеза композитных НЧ БЛ в присутствии анилина [35] или 3-аминофенилборной кислоты [22]. При добавлении органического мономера к эквимолярной смеси солей Fe(III) происходит окислительная полимеризация, в ходе которой комплекс  $Fe^{III}[Fe^{III}(CN)_6]$  восстанавливается, образуя композитные наночастицы БЛ/проводящий полимер. Такой подход позволяет быстро (время синтеза не превышает 10 минут) получать наночастицы, содержащие функциональные группы, необходимые для последующей ковалентной иммобилизации меток на ДНК-мишениях.

### *Электрохимические ДНК-биосенсоры для определения некодирующей РНК HULC*

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), или рак печени, относится к числу наиболее распространенных онкологических заболеваний, занимая четвертое место в мире среди причин смерти от рака [141]. Отсутствие выраженной симптоматики ГЦК на ранних стадиях, а также низкая эффективность терапевтических и хирургических вмешательств на поздних этапах заболевания определяют актуальность разработки тестов, позволяющих диагностировать ГЦК на ранних стадиях. Длинная некодирующая РНК HULC (Highly

Upregulated in Liver Cancer) активируется при ГЦК, способствует росту опухоли, образованию метастаз и невосприимчивости к терапии [142]. Следовательно, может быть потенциальным биомаркером для диагностики ГЦК [142,143].

Для обнаружения длинных некодирующих РНК (нкРНК) традиционно применяются такие методы, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени, нозерн-блоттинг или коиммунопреципитация [144]. Однако данные подходы имеют ряд ограничений: ДНК-полимеразы, применяемые в ПЦР, могут вносить ошибки в последовательность нуклеотидов в процессе амплификации. Нозерн-блоттинг ограничен в применении из-за использования радиоактивных или дорогостоящих меток. Коиммунопреципитация позволяет обнаруживать только длинные нкРНК, связанные белками, поэтому не может быть использована для определения HULC [144]. Альтернативным направлением для определения длинных нкРНК является разработка электрохимических ДНК-биосенсоров.

В настоящее время известна одна работа, где описан электрохимический биосенсор для определения РНК HULC [140]. В качестве метки был использован фермент пероксидаза, а регистрацию каталитического тока в присутствии пероксида водорода проводили в режиме дифференциально-импульсной вольтамперометрии. Для повышения эффективности катализа и усиления сигнала применяли биметаллические Pt-Pd нанодендритные кластеры, иммобилизованные на оксиде графена. Следует отметить, что ферментные метки характеризуются высокой стоимостью и ограниченной стабильностью, а Pt и Pd не обеспечивают достаточной селективности в реакции каталитического восстановления  $H_2O_2$ .

Проблему селективности и стабильности меток можно решить за счёт использования наночастиц на основе берлинской лазури. Таким образом, разработка электрохимических ДНК-биосенсоров, использующих в качестве меток наночастицы на основе БЛ, является актуальным направлением для диагностики ГЦК.

## **Глава 4. Конденсат выдыхаемого воздуха – неинвазивно собираемая жидкость для оценки пульмонологических осложнений**

### **4.1. Устройства для сбора конденсата выдыхаемого воздуха**

В процессе дыхания человек выдыхает аэрозоль, который содержит капли слюны, а также капли жидкости, выстилающей дыхательные пути. Жидкость, которая получается при конденсации выдыхаемого аэрозоля, является неинвазивно собираемой и может быть маркером ряда заболеваний [145].

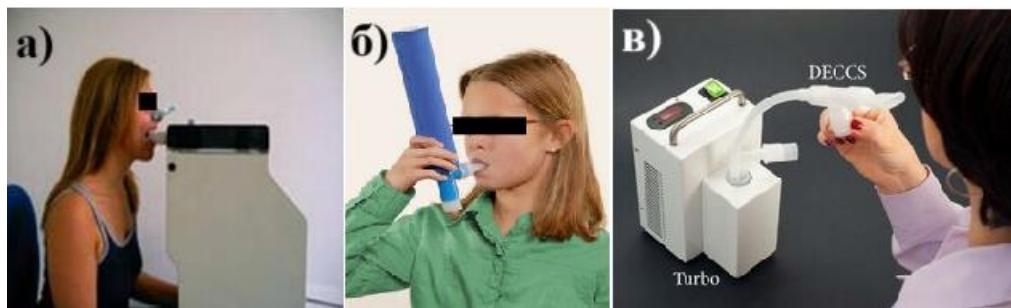


Рисунок 15. Коммерческие устройства для сбора конденсата выдыхаемого воздуха: а) EcoScreen, б) RTube, в) Turbo-Deccs [146].

Для сбора образцов КВВ преимущественно используются системы с дополнительным охлаждением. Наиболее известны коммерчески доступные приборы EcoScreen (Jaeger, Германия), RTube (Respiratory Research Inc., США), Turbo-Deccs (ItalChill, Италия). EcoScreen и Turbo-Deccs – настольные приборы с активным охлаждением за счет встроенных термоэлектрических элементов. Так, Turbo-Deccs позволяет регулировать температуру в процессе сбора КВВ от  $-10^{\circ}\text{C}$  до комнатной температуры с точностью  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  [147]. RTube – более компактный и портативный прибор с пассивным охлаждением, где в полипропиленовую трубку вставлен охлажденный алюминиевый корпус. Алюминиевый корпус предварительно охлаждают до  $-20^{\circ}\text{C}$  в бытовой морозильной камере, а во время сбора образца происходит его постепенный нагрев. В настоящее время разрабатывается коммерческое компактное устройство Inflammacheck (Великобритания) для одновременного определения концентрации пероксида и углекислого газа в КВВ [148]. Для охлаждения используется элемент Пельтье, однако отсутствует информация о методах измерения пероксида водорода и определяемых содержаниях.

#### **4.2. Пероксид водорода как маркер окислительного стресса**

Определение пероксида водорода в биологических образцах играет важную роль в изучении окислительного стресса организма, когда нарушается баланс между производством активных форм кислорода (АФК) и способностью антиоксидантных систем нейтрализовать их воздействие. Пероксид водорода является одной из наиболее стабильных АФК и образуется в ходе нормального клеточного метаболизма. Однако его избыточное накопление может провоцировать радикалы, повреждающее ДНК и белки.

##### ***Определение пероксида водорода в конденсате выдыхаемого воздуха***

Основные подходы определения пероксида водорода в КВВ из-за его малых содержаний – спектрофотометрическое, флуориметрическое или хемилюминесцентное. При этом обычно одним из реагентов является фермент пероксидаза. Однако несмотря на то, что флуориметрическое определение обеспечивает очень высокую чувствительность

определения пероксида в модельных растворах, в КВВ могут присутствовать компоненты, приводящие к тушению люминесценции [149]. Чувствительность спектрофотометрического определения ограничена, и анализ реальных образцов может приводить к ложноположительным откликам [150]. В связи с этим для создания компактных анализаторов предпочтительно использовать электрохимические сенсоры, однако немногих сенсоров были протестированы для определения концентрации  $H_2O_2$  в КВВ.

В [151] представлен электрохимический сенсор на основе нанокомпозита БЛ, включающего ПЭДОТ:ПСС и сшивающие агенты (этиленгликоль с дивинилсульфоном) для повышения механической стабильности полимера. Композит адсорбировали на золотых печатных планарных электродах. Измерения проводили в режиме амперометрии при постоянном потенциале в ячейке фиксированного объема. Для повышения чувствительности сенсора интегрировали амперометрические отклики, полученные в течение 2 минут. Также в [151] было отмечено, что температура элемента Пельтье влияет на концентрацию пероксида водорода в КВВ. При температуре конденсации 20°C средняя концентрация  $H_2O_2$ , полученного из системы, имитирующей легкие (через промывалки с раствором перекиси пропускали воздух), составила 9.8 мкМ. Тогда как для температуры 10°C измеренная концентрация в системе была в районе 6 мкМ. При анализе  $H_2O_2$  в КВВ, собранного при 20 °C обнаружено не более 0.25 мкМ. Однако, по-видимому, образец всё же разбавлялся конденсируемыми парами воды, поскольку за 3 минуты было собрано 150 мкл образца.

В [152] представлен сенсор на основе БЛ для анализа пероксида водорода в режиме реального времени. Модификация бумажных сенсоров берлинской лазурью происходила на стадии печати за счет использования соответствующей углеродной пасты, содержащей БЛ. Измерения проводили при потенциале 0.0 В в режиме амперометрии. Линейность градуировочной зависимости наблюдалась от 5 до 320 мкМ с коэффициентом чувствительности  $19 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ . В работе показана применимость только на модельных растворах пероксида, поскольку пока ДОК сенсора не включает физиологический диапазон концентраций.

В [30] электроды на основе БЛ, стабилизированной проводящим полимером (полианилинов) в результате межфазного химического синтеза, были использованы в проточно-инжекционном режиме для анализа КВВ, собранного на приборе EcoScreen. У здоровых некурящих людей концентрация пероксида в КВВ составила в среднем 1.5 мкМ, несмотря на увеличение средней концентрации  $H_2O_2$  в КВВ курильщиков, статистически значимой разницы между группами не было обнаружено.

Таблица 4. Содержание пероксида водорода в КВВ у некурящих и курящих добровольцев. (ХЛ – хемилюминесценция, СФ – спектрофотометрия, ХА – хроноамперометрия, ЯМР – ядерно-магнитный резонанс)

№	Группа людей	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], мкМ	Пробоотбор	Способ измерения	ссылка
1	Здоровые (20 чел.) Курильщики (20 чел.)	>0.05 0.17	Конденсор с циркулирующей водой	ХЛ	[153]
2	Здоровые Курильщики	0.033±3.9 0.161±11.5	EcoScreen (15 мин)	Ecocheck™	[154]
3	Здоровые (26 чел.) Курильщики (29 чел.)	0.8±0.4 1.7±0.7	EcoScreen (15 мин)	СФ	[155]
4	Курильщики	0.15±0.05	Конденсор с элементом ХА Пельтье	ХА	[151]
5	Курильщики (20 чел.)	2.7±0.8	Криоконденсор (5 мин)	СФ	[156]
6	Здоровые (30 чел.)	0.115±57	RTube (10 мин)	ХЛ	[157]
7	Здоровые	0.21 ± 0.04	RTube (6-7 мин)	ЯМР	[158]

Как видно из таблицы 4 курение влияет на повышение концентрации пероксида водорода в КВВ. Одним из факторов повышения концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> является скопление фагоцитов и лейкоцитов с нарушенным кислородным обменом в нижней области дыхательных путей [159]. В то же время концентрация пероксида водорода в КВВ, полученным с дополнительным охлаждением, как правило не превышает 1 мкМ. В [155,156] зафиксирована концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> выше 1 мкМ, что может быть связано с недостаточной чувствительностью спектрофотометрического определения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в КВВ.

Помимо курения, дисбаланс в организме может наблюдаться у пациентов с постковидным синдромом. Постковидный сидром или «long-COVID» – это состояние пациента, у которого после перенесенного COVID-19 присутствует ряд симптомов и жалоб на состояние, не вызванными другими заболеваниями [160]. Перечень возможных симптомов может достигать 200, однако специфические диагностические тесты отсутствуют. В [160] было показано, что у пациентов с постковидным синдромом наблюдается окислительный стресс, что выражалось в повышении концентрации малонового альдегида в сыворотке крови, который связан с разрушением липидных мембран свободными радикалами. В связи с этим возникает интерес к поиску неинвазивного маркера окислительного стресса для данных пациентов.

\* \* \*

На основании проведенного анализа литературных данных установлено, что берлинская лазурь (БЛ) является подходящим материалом для сенсорных приложений благодаря своим уникальным (электро)катализитическим свойствам. Перспективным направлением является разработка подходов к анализу биомаркеров в конденсате выдыхаемого воздуха. Были определены основные проблемы при анализе КВВ – низкая концентрация некоторых биомаркеров (в частности  $H_2O_2$ ) и зависимость состава образца от используемого конденсора. Для преодоления этих ограничений в работе предлагается использовать конденсор, минимизирующий разбавление пробы, а также разработать чувствительные сенсоры для определения  $H_2O_2$ , которые могут функционировать в КВВ.

Для создания компактных систем мониторинга электролитного баланса перспективно использование твердоконтактных ионоселективных электродов (ТК-ИСЭ). Одним из подходов повышения чувствительности ТК-ИСЭ является переход от потенциометрических измерений к регистрации сигнала в режиме ненулевого тока. Однако существующие сенсоры этого типа характеризуются ограниченным диапазоном определяемых концентраций и продолжительным временем анализа. Ранее было показано, что амперометрическое детектирование в проточно-инжекционном режиме для ТК-ИСЭ на основе проводящих органических полимеров способствует сокращению времени анализа и повышению воспроизводимости сигнала. Однако необходимо решение двух ключевых задач: повышение селективности таких сенсоров и разработка ТК-ИСЭ на печатных планарных структурах для упрощения масштабирования производства. В этой связи гексацианоферраты переходных металлов представляет особый интерес как материал для твердого контакта

Потенциальной платформой для создания биосенсоров является азид-замещенный поли(3,4-этилендиокситиофен), функциональные группы которого открывают широкие возможности для иммобилизации биомолекул методами клик-химии. Однако выявлены основные ограничения существующих электрохимических ДНК-сенсоров: ферментные метки на основе пероксидазы обладают низкой стабильностью, а нанозимы благородных металлов демонстрируют недостаточную селективность. В связи с этим перспективным направлением является исследование наночастиц БЛ в качестве селективных электрокатализитических меток, сочетающих высокую каталитическую активность с устойчивостью к условиям хранения и эксплуатации. Практическая реализация разрабатываемой сенсорной платформы будет продемонстрирована на примере электрохимического ДНК/РНК-биосенсора для определения фрагмента маркера гепатоцеллюлярной карциномы.

## Глава 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 5.1.Реактивы и растворы

В работе использованы: гексагидрат хлорида железа (III) (хч, Реахим), феррицианид калия (хч, Sigma Aldrich), хлорид натрия (хч, Helicon), хлорид калия (хч, Helicon), хлорид аммония (хч, Helicon), дигидрофосфат калия (хч, Helicon), гидрофосфат калия (хч, Helicon), никель (II) хлористый шестиводный (ч, Химмед), хлорид гексаамминрутения (III) (хч, Реахим), ацетат натрия (хч, Реахим), тригидрат цитрата натрия (чда, Реахим), пирокатехин (хч, Химмед), нитрат аммония (хч, Химмед), фторид натрия (хч, Химмед), сульфат натрия (хч, Химмед), раствор Денгарда 50Х (полисахароза 400, 1% поливинилпирролидон, 1% бычий сывороточный альбумин) (осч, ThermoFisher), соляная кислота (конц, Реахим), хлорная кислота (хч, Реахим), лимонная кислота (хч, Химмед), уксусная кислота (хч, Химмед), пероксид водорода (30 %, Sigma Aldrich).

Мономер 3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофен был синтезирован из 3,4-(1-хлорометилэтилен)диокситиофена (Sigma Aldrich) в присутствии  $\text{NaN}_3$  [161] и предоставлен Апаринным И.О.

Для проведения клик-реакции были использованы аскорбиновая кислота (осч, Lumiprobe), трис(3-гидроксипропилтриазолил-метил)амин (ТГПТА, Lumiprobe), пентагидрат сульфата меди (хч, Sigma Aldrich), ацетат триэтиламмония (AppliChem).

Компоненты ионоселективных мембран: высокомолекулярный поливинилхлорид (ПВХ, Fluka), 2-нитрофенилоктиловый эфир (*o*-НФОЭ, Fluka), тетракис(4-хлорфенил)борат калия (KTCIФБ, Merck), тетрафенилборат натрия (NaTФБ, Merck), валиномицин (ионофор калия I, Sigma Aldrich), 4-трет-бутилкаликс[4]арен-тетрауксусной кислоты тетраэтиловый эфир (ионофор натрия X, Sigma Aldrich), а также предварительно перегнанный тетрагидрофуран (Sigma Aldrich).

Для приготовления растворов-носителей для проточно-инжекционного анализа использовали 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Трис-HCl) или бис(2-гидроксиэтил)имино-трис(гидроксиметил)метан (Бис-Трис).

Олигонуклеотиды (в том числе алкин-модифицированные, олигонуклеотиды с флуоресцентной меткой Cy3), очищенные методом ВЭЖХ, были синтезированы Genterra.

Фермент каталазу из печени быка (2000-5000 ОЕ, Sigma Aldrich) применяли без дополнительной очистки.

С целью валидации применимости сенсоров для анализа реальных проб использовали лиофилизированную сыворотку человека (Spintrol “H” Pathological 1002210, Spintrol “H” Normal 1002120, Spinreact).

Фотоотверждаемый полимер для 3D-печати был получен у 3D Vision.

Все эксперименты проводились при комнатной температуре ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), если не указано обратное.

## 5.2.Оборудование

### Электроды

Для электрохимических исследований использовали печатные планарные трехэлектродные сенсоры (рисунок 16а), которые содержат:

- рабочий электрод из углеродной пасты (диаметр – 1.8 мм, ООО Русенс). Для исследования электроактивности медиаторов на поверхности модифицированных ПЭДОТ- $\text{N}_3$  электродов использована углеродная паста ООО НПП Дельта-пасты, в остальных экспериментах использованы электроды с углеродной пастой Gwent;
- вспомогательный электрод из углеродной пасты;
- электрод сравнения из серебряной пасты (0.175 В отн СВЭ  $25^\circ\text{C}$ ); все потенциалы приводятся относительно этого электрода сравнения, если не указано обратное.

Для одновременного определения содержания ионов калия и натрия использованы планарные печатные электроды с двумя независимыми рабочими электродами (ППЭ-2РЭ) (рисунок 16б).

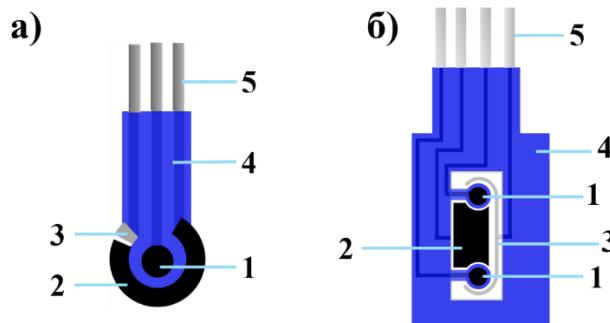


Рисунок 16. Схема печатных планарных структур с одним рабочим электродом (а) и с двумя независимыми рабочими электродами (б). Цифрами обозначены: 1 – рабочий электрод, 2 – вспомогательный электрод, 3 – электрод сравнения, 4 – изолятор, 5 – контакты.

В экспериментах с внешним электродом сравнения использовали хлоридсеребряный электрод  $\text{Ag}|\text{AgCl}|1\text{M KCl}$ . В качестве внешнего вспомогательного электрода был использован стеклоуглеродный стержень.

### Оборудование

Регистрацию циклических вольтамперограмм для расчёта  $k_s$  проводили с использованием модульного потенциостата/гальваностата AUTOLAB PGSTAT 128N с интегратором FI20. Регистрацию хроноамперограмм в проточно-инжекционном режиме для анализа пероксида водорода выполняли на потенциостате/гальваностате  $\mu$ AUTOLAB type III, все остальные электрохимические измерения выполняли с использованием

потенциостата-гальваностата PalmSens4, поддерживающего режим мультиканальных измерений. Для визуализации и обработки результатов использованы программы NOVA, PSTrace и Origin.

Проточно-инжекционная система включала в себя перфузионный шприцевой насос Perfusor Compact S (Braun) и ручной инжектор Rheodyne 7125 (Phenomenex) (рисунок 17). Объём петли для загрузки образца составляет 150 мкл.

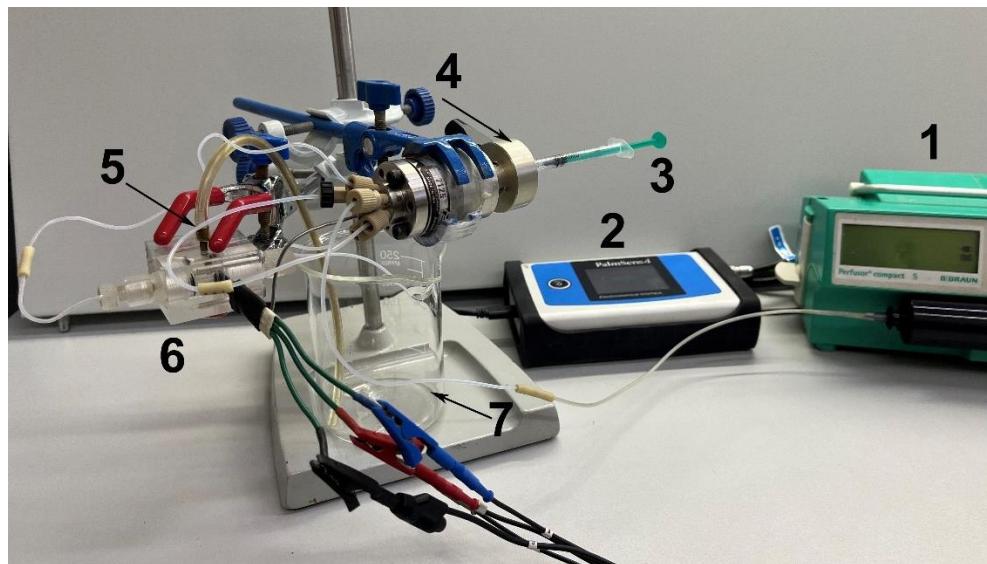


Рисунок 17. Фото проточно-инжекционной системы. 1 – перфузионный насос, 2 – потенциостат, 3 – место ввода пробы, 4 – инжектор, 5 – петля для раствора пробы, 6 – ячейка «wall-jet» с планарным электродом, 7 – слив.

Проточная ячейка типа «wall-jet» с диаметром сопла 0.5 мм изготовлена из оргстекла Plexiglass (ООО Русенс) (рисунок 18).

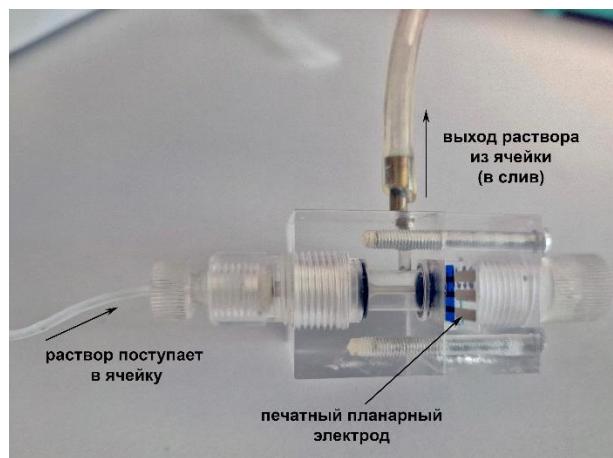


Рисунок 18. Фото «wall-jet» ячейки.

Для регистрации спектров комбинационного рассеяния использован спектрометр Renishaw InVia с зеленым лазером (514 нм, 20 мВт) в диапазоне  $300 - 1700 \text{ см}^{-1}$  или  $100 - 2200 \text{ см}^{-1}$ .

ИК-спектры нарушенного полного внутреннего отражения регистрировали на кристалле Zn-Se в диапазоне  $600 - 2200 \text{ см}^{-1}$  (разрешение  $2 \text{ см}^{-1}$ ) на ИК-Фурье спектрометре Shimadzu IRAffinity-1.

Для получения микрофотографий модифицированных ПЭДОТ- $\text{N}_3$  электродов и функционализированных НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$  использовали электронный микроскоп LeoSUPRA 50 VP (21 кВ, рабочее расстояние 1.2 см, детектор SE2).

Для спектрофотометрических измерений в диапазоне 400-850 нм (шаг 1 нм) был использован спектрофотометр Lambda 950 (Perkin-Elmer, США).

Распределение наночастиц по размерам определяли методом динамического рассеяния света на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания).

Для синтеза НЧ БЛ и приготовления мембранообразующей смеси использовали центрифугу Eppendorf MiniSpin, ультразвуковую ванну ПСБ-Галс. Для нанесения мембранообразующей смеси на электрод использовали магнитную мешалку Экрос ПЭ-6100 (макс. 2000 об/мин). Для проведения хроноамперометрических измерений при перемешивании использовали ячейку фиксированного объёма (300 мкл), выполненную из оргстекла.

Для проведения клик-реакции и экспериментов с меченными олигонуклеотидами были использованы: центробежный вакуумный концентратор CentriVap (Labconco), микрообъемный спектрофотометр УФ-диапазона Nanodrop (ThermoFisher), магнитная мешалка IKA RET basic с электронным контактным термометром IKA ETS-D5 (IKA), люминесцентный спектрометр LS-55 (Perkin Elmer).

3D печать конденсора была выполнена на принтере Anycubic Photon M3 Premium (Китай) из фотоотверждаемого полимера.

### **5.3.Методики**

#### ***Электрохимический синтез ПЭДОТ- $\text{N}_3$***

Электрополимеризацию ЭДОТ- $\text{N}_3$  на поверхности печатных электродов в режиме циклической вольтамперометрии проводили в стеклянной ячейке с тремя разделенными пространствами. Отсек ячейки с рабочим электродом заполняли 10 мМ ЭДОТ- $\text{N}_3$ , растворенным в 0.1 М  $\text{HClO}_4$ . Синтез проводили в диапазоне потенциалов от 0.2 до 1.0 В, со скоростью развертки потенциала  $40 \text{ мВ}\cdot\text{s}^{-1}$  в течение 10 циклов. После синтеза промывали электроды 0.1 М  $\text{HClO}_4$ , затем водой и высушивали на воздухе. Синтез ПЭДОТ или ПЭДОТ-Cl проводили аналогично, используя соответствующие мономеры.

***Исследование электроактивности медиаторов на поверхности модифицированных электродов. Расчёт электрохимической константы скорости.***

Для исследования электроактивности на поверхности печатных планарных электродов регистрировали ЦВА в присутствии 5 мМ  $K_3[Fe(CN)_6]$  или 5 мМ  $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ . Скорость развертки потенциала варьировалась от  $0.01 \text{ В}\cdot\text{с}^{-1}$  до  $1 \text{ В}\cdot\text{с}^{-1}$ . В качестве фоновых электролитов использовали:

- 0.1 М KCl в 0.1 HCl (pH 1.1),
- 0.05 М  $CH_3COONa/C_6H_8O_7$  и 0.1 М KCl (pH 3.0),
- 0.05 М  $Na_3C_6H_5O_7/CH_3COOH$  и 0.1 М KCl (pH 5.0),
- 0.05 М  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  и 0.1 М KCl (pH 7.0).

ЦВА регистрировали до совпадения двух последовательных вольтамперограмм. Для определения  $\Delta E_{\pi}$  и расчёта  $k_s$  использовали средние значения ( $P = 0.95$ ), полученные на трёх разных электродах.

Электрохимические константы рассчитывали с использованием модифицированного метода Николсона и вычисляли безразмерный параметр  $\Psi$ , согласно уравнениям [162,163]:

$$\Psi = \frac{-0.6288 + 0.021 \cdot \Delta E_{\pi}}{1 - 0.017 \cdot \Delta E_{\pi}} \quad \text{при } \Delta E_{\pi} < 220 \text{ мВ} \quad (4)$$

$$\Psi = 2.18 \left( \frac{(1 - \alpha)}{\pi} \right)^{1/2} \exp \left[ \left( -\frac{(1 - \alpha)^2 F}{RT} \right) n \Delta E_{\pi} \right] \quad \text{при } \Delta E_{\pi} \geq 220 \text{ мВ} \quad (5)$$

, где  $\Delta E_{\pi}$  – разность потенциалов между пиками ЦВА.

Затем вычисляли  $k_s$  как тангенс угла наклона, полученный линейной аппроксимацией зависимости  $\Psi$  от параметра, вычисляемого с помощью скорости развертки и постоянных величин в соответствии с уравнением [162,164]:

$$\Psi = k_s \left( \frac{RT D_O^{\alpha-1}}{\pi n F v D_R^\alpha} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

, где  $D_O$  and  $D_R$  – коэффициенты диффузии окисленной и восстановленной формы ( $\text{см}^2\cdot\text{с}^{-1}$ ) приведены в таблице 5 ;  $v$  – скорость развертки потенциала ( $\text{мВ}\cdot\text{с}^{-1}$ ); коэффициент переноса  $\alpha = 0.5$  [163];  $n$  – число электронов, участвующих в реакции;  $R$  – универсальная газовая постоянная ( $\text{Дж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$ );  $T$  – температура (К).

Таблица 5. Значение коэффициентов диффузии для медиаторов (в присутствии 0.1 М KCl) [165,166].

Медиатор	$[Fe(CN)_6]^{3-}$	$[Fe(CN)_6]^{4-}$	$[Ru(NH_3)_6]^{3+}$	$[Ru(NH_3)_6]^{2+}$
$D, \times 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	7.6	6.5	8.4	11.9

### Каталитический синтез НЧ БЛ

НЧ БЛ синтезировали в результате добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 мМ) в эквимолярную смесь (50 мМ) FeCl<sub>3</sub> и K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] в 0.1 М KCl/HCl [167].

Для синтеза функционализированных НЧ БЛ/ПЭДОТ-N<sub>3</sub> в качестве восстановителя использовали ЭДОТ-N<sub>3</sub>, растворенный в этаноле. Итоговую смесь, содержащую 75 мМ FeCl<sub>3</sub> и K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] и 50 мМ ЭДОТ-N<sub>3</sub> подвергали ультразвуковой обработке в течение 30 с, а потом центрифугировали (13000 об/мин) 60 с. Удаляли надосадочный раствор и к осадку приливали водно-спиртовой раствор, полученный смешением равных объемов 0.1 М KCl/HCl и этанола. Данную процедуру повторяли не менее трёх раз. Затем осадок промывали раствором 0.1 М KCl/HCl. Храстили полученные НЧ БЛ/ПЭДОТ-N<sub>3</sub> в растворе 0.1 М KCl/HCl (pH 1.1), перед использованием предварительно подвергали ультразвуковой обработке. Концентрацию НЧ БЛ и НЧ БЛ/ПЭДОТ-N<sub>3</sub> определяли спектрофотометрически (молярный коэффициент экстинкции на элементарную ячейку БЛ равен  $4.85 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  ( $\lambda = 700 \text{ нм}$ )). Для пересчета на концентрацию НЧ БЛ использовали данные распределения наночастиц по размерам, параметр элементарной ячейки БЛ (10.2 Å), а также, что на одну элементарную ячейку приходится по 4 атома Fe(III) и Fe(II).

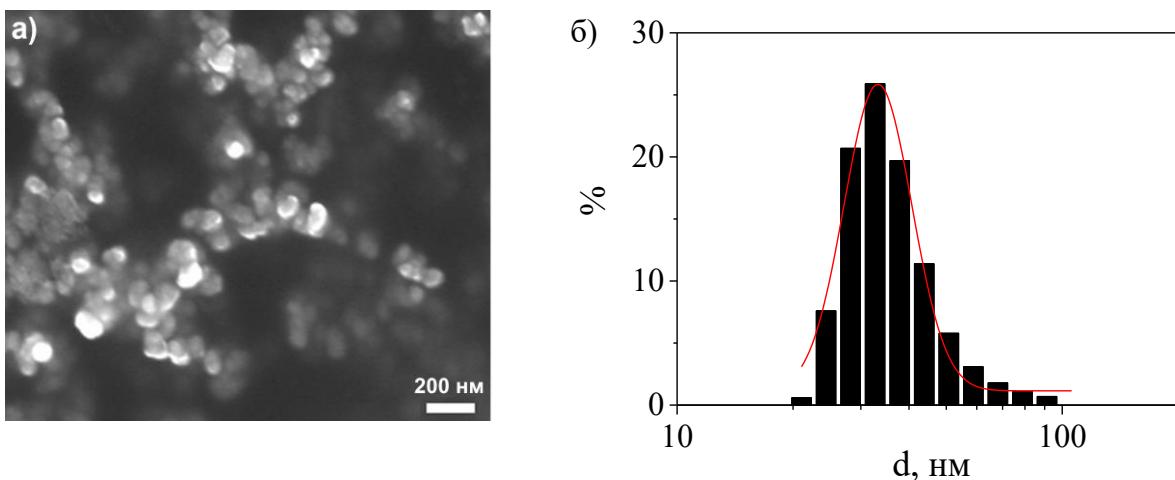


Рисунок 19. а) СЭМ-изображение композитных наночастиц НЧ БЛ/ПЭДОТ-N<sub>3</sub>. б) Распределение композитных наночастиц по размерам НЧ БЛ/ПЭДОТ-N<sub>3</sub> (средний диаметр равен 34.6 нм) (данные динамического рассеяния света).

### Клик-реакция функционализированных НЧ БЛ с олигонуклеотидами

НЧ БЛ переносили в 0.2 М буферный раствор ацетата калия (pH 5.5). В качестве ДНК-мишеней использовали алкин-модифицированные олигонуклеотиды (таблица 6),

которые добавляли к супензии НЧ БЛ. Концентрация олигонуклеотидов варьировалась в диапазоне 1 – 200 мкМ, а НЧ БЛ от 10 до 35 нМ. Затем 10 мМ раствора CuSO<sub>4</sub>/ТГПТА добавляли в микропробирку с НЧ БЛ для получения 0.5 мМ раствора. Раствор дегазировали в результате пропускания аргона над раствором в течение 10 минут. Затем в микропробирку добавляли свежеприготовленный раствор аскорбиновой кислоты, чтобы итоговая концентрация составила 0.5 мМ. Микропробирку так же дегазировали в течение 5 минут, заворачивали в фольгу и оставляли на ночь при комнатной температуре. Затем полученные конъюгаты НЧ БЛ с олигонуклеотидами помещали в центрифугу на 90 с (13000 об/мин), отделяли надосадочный раствор и заменяли его ацетатным буферным раствором (рН 5.5). Данную процедуру повторяли не менее 4 раз.

Таблица 6. ДНК-зонды и ДНК-мишени, использованные для конъюгации.

<b>ДНК-зонды</b>	
<b>1</b>	5'-гексинил-TTTTT TTAAG AATGG AЦАТЦ АТТТТ АТТТЦ АТТТТ ААТТТ АГТТТ ТГТТТ ААТТЦ ТАГТТ ТЦАГТ ТТГА-3'
<b>2</b>	3'-гексинил-TTTTT TTЦТТ АЦЦТГ ТАГТА АААТА
<b>ДНК-мишени</b>	
<b>5N</b>	3'-гексинил-ААТЦТТАЦЦТГТАГТАААА-5'
<b>25N</b>	3'-ААТЦТТАЦЦТГТАГТАААА-гексинил-5'
<b>50N</b>	3'-ТАААГТААААТТАААТЦААААЦААА-гексинил-5'
<b>50N(κ)</b>	3'-гексинил-ТТААГАТЦАААГТЦААААЦТ-5'
<b>70N</b>	3'-ТТААГАТЦАААГТЦААААЦТ-гексинил-5'
<b>5ММ</b>	3'-ТАААГТААААТТЦЦГГААААЦААА-гексинил-5'

#### *Иммобилизация ДНК-зондов на поверхности модифицированных электродов*

Для иммобилизации алкин-модифицированных ДНК-зондов длиной 75 оснований ((зонд **2** в таблице 6: 5'-гексинил-TTTTT TTAAG AATGG AЦАТЦ АТТТТ АТТТЦ АТТТТ ААТТТ АГТТТ ТГТТТ ААТТЦ ТАГТТ ТЦАГТ ТТГА-3') электроды, модифицированные ПЭДОТ-N<sub>3</sub>, помещали в пластиковую пробирку, предварительно изолировав контакты. Пробирку заполняли буферным раствором ацетата триэтиламмония (рН 7.0, 0.1 М), чтобы рабочий электрод был полностью погружен в раствор. Добавляли в пробирку раствор олигонуклеотидов до итоговой концентрации 5 мкМ, а затем добавляли растворы CuSO<sub>4</sub> и ТГПТА, чтобы их итоговая концентрация составила 1 мМ. Пробирки с электродами дегазировали в роторном вакуумном испарителе в течение 10 минут. Затем на вход в прибор подавали аргон для создания инертной атмосферы. В пробирки быстро добавляли свежеприготовленный раствор аскорбиновой кислоты (до 1 мМ), снова дегазировали и продували внутри прибора аргоном в течение 5 минут. После этого пробирки закрывали крышками, оборачивали фольгой и оставляли при комнатной температуре на 24 часа. По истечении заданного времени электроды сполоскивали буферным раствором, после высыхания хранили электроды при -18°C не более 2 месяцев.

Аналогичную процедуру проводили с ДНК-зондом длиной 25 оснований (зонд **2** в таблице 6: 3'-гексинил-ТТТТТ ТТЦТГ АЦЦТГ ТАГТА АААТА) для дальнейшего проведения сэндвич-анализа.

### *Гибридизация комплементарных ДНК-мишеней с ДНК-зондами*

Для проведения гибридизации 15 мкл суспензии, содержащей НЧ БЛ/ПЭДОТ-N<sub>3</sub>/оцДНК (0.001–10 нМ) наносили на поверхность электрода, модифицированного ПЭДОТ-N<sub>3</sub> с иммобилизованными ДНК-зондами. Выдерживали электроды в течение 1 часа, а затем тщательно споласкивали соответствующим раствором для гибридизации. В качестве растворов для суспензии НЧ БЛ/ПЭДОТ-N<sub>3</sub>/оцДНК использовали:

- а) раствор Денгарда (полисахароза 400, 1% поливинилпирролидон, 1% бычий сывороточный альбумин)
- б) 0.75 М NaCl, 75 мМ цитрат натрия (рН 6.0)
- в) 0.01 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 6.0)
- г) 0.1 М KCl, 0.05 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 6.0)

Для исследования селективности сенсоров, после гибридизации погружали электроды в буферный раствор IV на 10 минут, температура растворов составляла 20°C, 40°C, 70°C, 75°C и контролировалась с использованием магнитной мешалки с интегрированным термометром.

### *Флуориметрическое определение олигонуклеотидов*

Рабочий электрод сенсора после иммобилизации ДНК-зондов вырезали и помещали в пластиковую микропробирку (180 мкл), туда же добавляли фосфатный буферный раствор, содержащий комплементарные олигонуклеотиды с флуоресцентным цианиновым красителем (Су3). После проведения гибридизации оценивали изменение интенсивности флуоресценции раствора. Регистрацию спектров проводили при  $\lambda_{возб}=532$  нм в диапазоне 540–650 нм (900 В, ширина щели 5 нм, 600 нм/мин).

Для определения соотношения НЧ БЛ и олигонуклеотидов, суспензию НЧ БЛ/ПЭДОТ-N<sub>3</sub> смешивали с раствором олигонуклеотидов, конъюгированных с Су3. Микропробирку выдерживали при температуре 90°C в течение 15 минут. После этого смесь охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали. Надосадочный раствор отделяли и определяли изменение интенсивности флуоресценции, по сравнению с исходным раствором меченых олигонуклеотидов.

### *Регистрация сигнала электрохимических ДНК-сенсоров*

Для регистрации электрокаталитических откликов проводили измерения в режиме хроноамперометрии в ячейке при постоянном перемешивании. При фиксированном потенциале 0.0 В регистрировали токовый отклик, возникающий в результате добавления

растворов  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.05 – 1.0 мМ) в ячейку. Измерения проводили в фосфатном буферном растворе (0.1 М KCl, 0.05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (рН 6.0)).

Для оценки эффективности прямого электрокатализа в ячейку добавляли пирокатехин (3 мМ), после выхода тока на стационарное значение аналогично инжектировали растворы  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.05 – 1.0 мМ).

### **Электрохимический ДНК/РНК-сенсор, «сэндвич»-анализ**

Для обнаружения целевой РНК, участка длинной некодирующей РНК HULC, применяли «сэндвич»-анализ.

Таблица 7. ДНК-зонд, целевая РНК, меченая оцДНК для «сэндвич»-анализа.

Олигонуклеотиды для сэндвич-анализа		
ДНК-зонд	3'-Алкин- <b>T T T T T T C T T A C T C T G T A G T A A A A T A</b> -5'	
Целевая РНК (2'-OMe-HULC)	5'- <b>A A G A A U G G A C A U C A U U U U A</b> У У Ц А У У У У А У У У Г У У У <b>A A U U C U A G U U U C A G U U U G A</b> -3'	
Меченая ДНК		3'-Алкин- <b>T T A A G A T C A A A G T C A A A A C T</b> -5'

Для этого 15 мкл раствора РНК 2'-О-метил-HULC (63 мер) в сыворотке крови, разбавленной в 10 раз, наносили на электрод с иммобилизованными ДНК-зондами (таблица 7). Через 4 часа электроды тщательно промывали, затем наносили 15 мкл комплементарных олигонуклеотидов (30 нМ), меченых НЧ БЛ, и выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре. Сигнал сенсоров определяли аналогично при потенциале 0.0 В в ячейке при постоянном перемешивании.

### **Электроактивность метод на основе НЧ БЛ на поверхности модифицированных электродов**

Для исследования электроактивности НЧ БЛ на поверхности модифицированных электродов регистрировали квадратно-волновые вольтамперограммы [0.0; 0.3] В с амплитудой 0.05 В, шагом 0.002 В и частотой 1 Гц.

### **Модификация поверхности электрода гексацианоферратами железа и никеля**

Электрохимический синтез БЛ на поверхности печатных электродов проводили в стеклянной ячейке с тремя разделенными пространствами. В качестве фонового электролита использовали 0.1 KCl/0.1 М HCl. В таблице 8 приведены условия синтеза БЛ для сенсоров в диапазоне потенциалов от 0.4 до 0.75 В. После синтеза выдерживали электроды при 100°C в течение 1 часа.

Таблица 8. Условия электрохимического синтеза БЛ в режиме циклической вольтамперометрии.

Модификация электродов БЛ	$C(\text{FeCl}_3)$ , $C(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6])$ , мМ	$v$ , мВ·с <sup>-1</sup>	Число циклов
<b>Наноструктурированная БЛ (сенсоры на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	2	20	1
<b>Твердый контакт для ИСЭ</b>	4	40	4–6

Для модификации поверхности печатного электрода НЧ БЛ 2 мкм суспензии НЧ БЛ (0.01 – 1 мМ) наносили на рабочий электрод и оставляли высушиваться на воздухе. Через 24 часа модифицированные электроды так же выдерживали при 100°C в течение 1 часа.

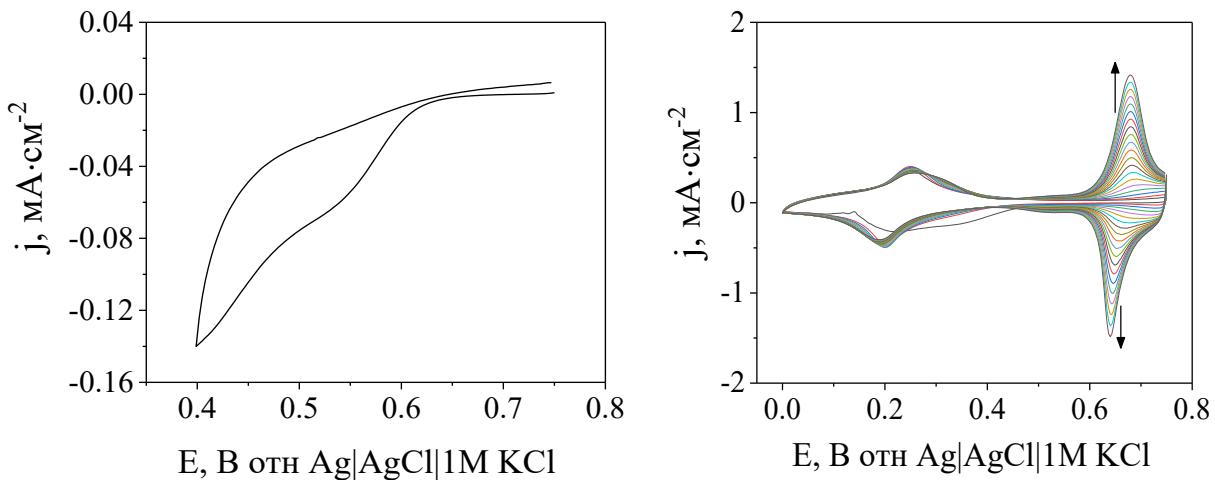


Рисунок 20. а) ЦВА синтеза наноструктурированной БЛ (1 цикл, 2 мМ  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 2 мМ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 М  $\text{KCl}/\text{HCl}$ , 0.02 В·с<sup>-1</sup>); б) ЦВА синтеза гексацианоферрата никеля на поверхности электрода, модифицированного БЛ. (20 циклов; 0.5 мМ  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 1 мМ  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 М  $\text{KCl}/0.1$  М  $\text{HCl}$ , 0.1 В·с<sup>-1</sup>).

Для активации электрохимически синтезированной БЛ адсорбированных НЧ БЛ после отжига регистрировали ЦВА в фоновом электролите в диапазоне потенциалов от –0.05 до 0.3 В (40 мВ·с<sup>-1</sup>). ЦВА регистрировали до совпадения двух последовательно снятых кривых.

Для стабилизации наноструктурированной БЛ на поверхности модифицированных электродов проводили электрохимический синтез ГЦФ Ni. В качестве фонового электролита использовали 0.5 М  $\text{KCl}/0.1$  М  $\text{HCl}$ . Синтез проводили в стеклянной ячейке с разделенными пространствами. Для приготовления ростовой смеси в стакан при постоянном перемешивании добавляли фоновый электролит, 0.01 М  $\text{NiCl}_2$ , а затем аккуратно по каплям добавляли раствор 0.02 М  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , чтобы итоговые концентрации  $\text{NiCl}_2$  и  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  составили 1 мМ и 0.5 мМ соответственно. Важно, чтобы раствор оставался прозрачным. Синтез проводили в режиме циклической вольтамперометрии в

диапазоне потенциалов [0.75; 0.0] В со скоростью развертки потенциала  $0.1 \text{ В}\cdot\text{s}^{-1}$  в течение 18–35 циклов. Аналогично синтезировали ГЦФ Ni на поверхности печатных электродов для создания ТК-ИСЭ.

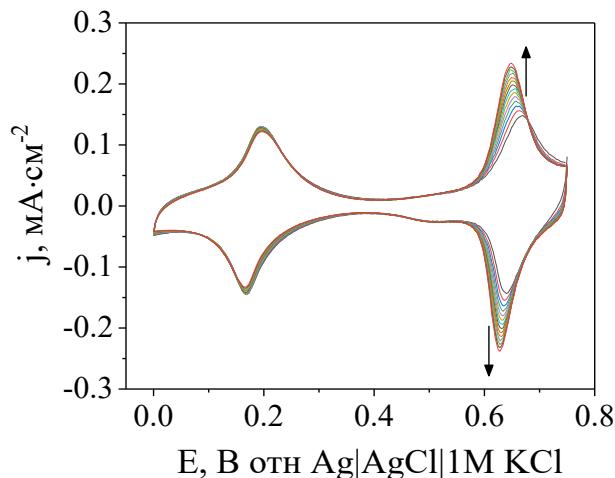


Рисунок 21. ЦВА активации ГЦФ Ni, синтезированного на наноструктурированной БЛ ( $0.1 \text{ M KCl/HCl}$ ;  $40 \text{ мВ}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Г<sub>БЛ</sub>  $0.6 \text{ нмоль}\cdot\text{см}^{-2}$ , Г<sub>ГЦФNi</sub>  $1.1 \text{ нмоль}\cdot\text{см}^{-2}$ .

После синтеза аналогично отжигали модифицированные электроды при  $100^\circ\text{C}$  в течение 1 часа, а для активации регистрировали ЦВА в  $0.1 \text{ M KCl/HCl}$  в диапазоне потенциалов от 0 до  $0.75 \text{ В}$ , до наложения двух последующих ЦВА (рисунок 21).

На основании данных ЦВА рассчитывали количество электроактивной БЛ (на формульную единицу) или ГЦФ Ni (рисунок 22).

$$\Gamma_{\text{БЛ/ГЦФ Ni}} = \frac{S_{\text{п,кат}}}{v \cdot F \cdot A \cdot 4} \quad (7)$$

, где  $S_{\text{п,кат}}$  – площадь катодного пика ЦВА,  $v$  – скорость развертки потенциала,  $A$  – площадь рабочего электрода,  $F$  – постоянная Фарадея.

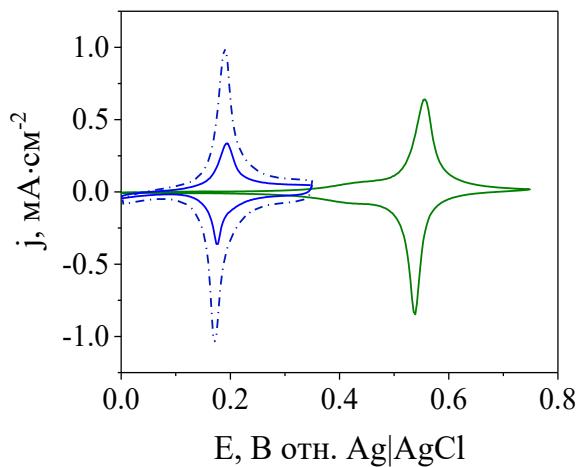


Рисунок 22. Циклические вольтамперограммы модифицированных электродов после активации: НЧ БЛ (—), БЛ (---), ГЦФ Ni (—) ( $0.1 \text{ M KCl/HCl}$ ,  $40 \text{ мВ}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

### ***Создание твердоконтактных ионоселективных электродов***

Для калий-селективных сенсоров мембранообразующая смесь содержала 100 мг компонентов (по массе 32 % ПВХ, 63.5 % *o*-НФОЭ, 0.5 % КТClФБ и 4 % валиномицина), растворенных в 900 мкл свежеперегнанного ТГФ.

Для натрий-селективных сенсоров 100 мг смеси (32.5 % ПВХ, 65 % *o*-НФОЭ, 0.5 % NaTФБ и 2 % ионофора X) растворяли в 900 мкл ТГФ. Затем 3 мкл смеси наносили на электрод, модифицированный НЧ БЛ или ГЦФ Ni, и через 5 секунд раскручивали электрод до 1500 об·мин<sup>-1</sup> в течение 1 минуты. Затем оставляли электрод на воздухе на 48 часов. Перед проведением измерений замачивали электроды, покрытые ионоселективной мембраной, в водном растворе 0.01 KCl или NaCl в течение 3–4 часов.

### ***Ионоселективные электроды в режиме проточно-инжекционной амперометрии***

Для регистрации хроноамперограмм в режиме проточно-инжекционной амперометрии использовали «wall-jet» ячейку. В качестве буфера-носителя использовали 100 mM Бис-Трис (рН 6.0), скорость потока 40 мл·ч<sup>-1</sup>. Градуировочные зависимости регистрировали при –0.05 В (ИСЭ на основе НЧ БЛ или пленок БЛ) или 0.2 В (ИСЭ на основе ГЦФ Ni).

Для амперометрического определения ионов натрия в образцах сыворотки крови образцы последовательно разбавляли буферным раствором Бис-Трис (50 mM pH 6.0) в 2000-4000 раз, для определения ионов калия – в 300-500 раз. Для определения K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup> в образцах пота, предварительно образцы разбавляли буферным раствором в 100-500 раз.

Для одновременного определения содержания калия и натрия использовали ППЭ-2РЭ. Хроноамперограммы регистрировали в проточной тонкослойной ячейке, потенциалы регистрации хроноамперограмм и скорость потока были аналогичны потенциалам, описанным ранее. В качестве буфера-носителя использовали 50 mM Бис-Трис (рН 6.0).

### ***Ионоселективные электроды в режиме потенциометрии***

Измерения ТК-ИСЭ проводили в режиме потенциометрии при разомкнутой цепи. 200-300 мкл анализируемого раствора наносили на поверхность электрода. Регистрировали изменение потенциала в течение 5-10 минут до установления стационарного значения. Каждый раствор анализировали не менее трёх раз.

### ***Сбор образцов конденсата выдыхаемого аэрозоля***

На работу с пациентами получено заключение локального этического комитета ФГАО ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России №233 от 23 октября 2023 года «Определение содержания перекиси водорода в конденсате выдыхаемого воздуха у пациентов с бронхолегочными проявлениями постковидного синдрома».

Для сбора КВА добровольцы в течение 30 минут дышали в конденсор, в который был вставлен одноразовый мундштук, а на другом конце конденсора была закреплена пластиковая микропробирка объёмом 1.5 мл. Вдох производился носом, а выдох ртом в конденсор. Контролировали, чтобы до сбора КВА после приема пищи прошло не менее 1 часа.

В качестве здоровых добровольцев без бронхологических нарушений были выбраны 15 человек в возрасте от 19 до 65 лет (средний возраст – 32 года). Так же собирали КВА у некурящих пациентов с диагностированным постковидным синдромом (10 человек; 28 – 80 лет, средний возраст – 54 года). В исследовании приняли участие курящие добровольцы (15 человек, 20 – 67 лет, средний возраст – 36 лет), у которых сбор КВА производился не менее, чем через час после курения. Образцы КВА хранили при 4°C не более 5 часов после сбора.

***Проточно-инжекционный анализ пероксида водорода в конденсате выдыхаемого аэрозоля***

$\text{H}_2\text{O}_2$  определяли в режиме проточно-инжекционной амперометрии в ячейке типа «wall-jet». В качестве буфера-носителя использовали фосфатный буферный раствор: 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1 M NaCl (pH 6.0). Хроноамперограммы регистрировали при потенциале –0.05 В и скорости потока  $60 \text{ мл}\cdot\text{ч}^{-1}$ . Образцы КВА перед введением в систему ПИА разбавляли в 2 раза концентрированным буферным раствором (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 M NaCl; pH 6.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Глава 6. Твердоконтактные ионоселективные электроды на основе гексацианоферратов железа и никеля<sup>7</sup>

#### 6.1. Амперометрические отклики твердого контакта в проточно-инжекционной системе

Электроды, модифицированные ГЦФ Ni или НЧ БЛ исследовали в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале. Ранее было показано, что проводящие полимеры (ПЭДОТ, допированный полианилин) способны генерировать амперометрические отклики на неэлектроактивные ионы [78,79], и такой способ регистрации сигнала ТК-ИСЭ имеет ряд преимуществ по сравнению с потенциометрией. В связи с этим важно исследовать способность электродов, модифицированных БЛ или ГЦФ Ni, формировать амперометрические отклики в ответ на введение неэлектроактивных ионов.

Для амперометрического определения ионов в проточно-инжекционном режиме необходимо подобрать раствор-носитель. Поскольку разрабатываемые сенсоры предназначены для анализа биообразцов (сыворотка крови, пот), предпочтительно использовать буферный раствор, чтобы не допустить изменения pH при инжектировании объектов анализа. ТК-ИСЭ способны функционировать в фосфатном буферном растворе (рН 6.0) [78,79]. Однако этот раствор-носитель содержит избыток мешающих ионов (калия или натрия), что снижает селективность сенсоров, а также чувствительность и способность надежно определять низкие концентрации ионов. Кроме того, данный раствор не подходит для одновременного определения содержания ионов калия и натрия. С другой стороны, поскольку измерения проводятся на печатных планарных электродах, функционирующих по трехэлектродной схеме, для стабильной работы такого электрода сравнения необходима концентрация хлорид-ионов в фоновом растворе не ниже 1 mM, чтобы предотвратить поляризацию [168,169]. Заявленным критериям соответствует буферный раствор Бис-Трис, не содержащий мешающих ионов, а также включающий эквимолярную концентрацию хлорид-ионов. Известно, что Бис-Трис обладает хелатирующей способностью, однако это заметно для катионов меди и свинца, слабо проявляется для двухвалентных катионов щелочноземельных металлов (десятичный логарифм константы комплексообразования

<sup>7</sup> При подготовке данной главы диссертации использованы публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении учёных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

V.A. Shavokshina, V.N. Nikitina, A.A. Karyakin, Improved performance of Prussian blue solid contact allowing flow injection amperometric detection of potassium ions in the excess of sodium, Journal of Electroanalytical Chemistry 962 (2024) 118264. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2024.118264>.

V. Shavokshina, A. Okoneshnikov, V. Nikitina, A. Karyakin, Amperometric Signal Generation by Self-Doped Polyanilines for Ion-Selective Electrodes, Journal of Analytical Chemistry 79 (2024) 740–748. <https://doi.org/10.1134/S1061934824700126>.

$\lg K_{CaL}^{Ca} = 2.25$ ), в то время как связывание с ионами калия и натрия пренебрежимо мало ( $\lg K_{NaL}^{Na} = -0.82$ ) [170]. В связи с этим в данной работе в качестве раствора-носителя для ТК-ИСЭ использован буферный раствор Бис-Трис (рН 6.0).

В качестве твердого контакта предложено использовать НЧ БЛ, которые адсорбировали из суспензии для модификации электрода, или ГЦФ Ni, синтезированный электрохимически. При проведении измерений в проточно-инжекционном режиме с одним насосом анализируемый образец вводится в петлю фиксированного объема, а после поворота инжектора с потоком буферного раствора поступает в ячейку, где располагается сенсор. На рисунке 23 представлена хроноамперограмма, зарегистрированная на электроде, модифицированном ГЦФ Ni. В результате введения в систему растворов KCl формируется амперометрический отклик в виде пары разнонаправленных пиков. При инжектировании соли возникает ток, вызывающий восстановление твердого контакта для компенсации изменения потенциала на границе с раствором, вызванного введением ионов в систему. Поскольку измерения проводятся в проточно-инжекционном режиме, образуется также и анодный пик, связанный с обратной перезарядкой твердого контакта в процессе отмыки раствором буфера-носителя.

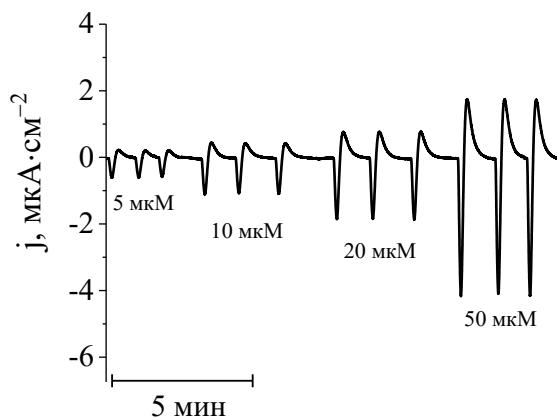


Рисунок 23. Амперометрические отклики сенсора, модифицированного ГЦФ Ni ( $1.1 \text{ нмоль}\cdot\text{см}^{-2}$ ), без ионоселективной мембранны полученные в результате инжектирования растворов KCl (Бис-Трис, рН 6.0).

Аналитически значимым является первый (в данном случае катодный) пик на хроноамперограмме [77,78]. С увеличением концентрации KCl пропорционально возрастает как высота катодного пика, так и его площадь. В данной работе в качестве аналитического сигнала рассматривали высоту пика. Аналогичные по форме сигналы формируются и на электродах, модифицированных НЧ БЛ или электрохимически синтезированной БЛ. На рисунке 24 представлены градуировочные зависимости высоты амперометрических откликов твердых контактов от концентрации KCl. Зависимости имеют гиперболическую форму с начальным линейным участком (рисунок 24б). Коэффициент

чувствительности ( $s$ ) определяли как тангенс угла наклона начального участка,  $s$  модифицированных НЧ БЛ электродов составляет  $40 \pm 8 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , что в два раза выше, чем у сенсоров на основе пленок БЛ с эквивалентным количеством ГБЛ ( $8 \text{ нмоль} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Коэффициент чувствительности сенсоров, модифицированных ГЦФ Ni, почти вдвое выше, чем для сенсоров на основе НЧ БЛ, и составляет  $70 \pm 12 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , что может быть связано с недостаточной стабильностью НЧ БЛ без мембраны в ПИА.

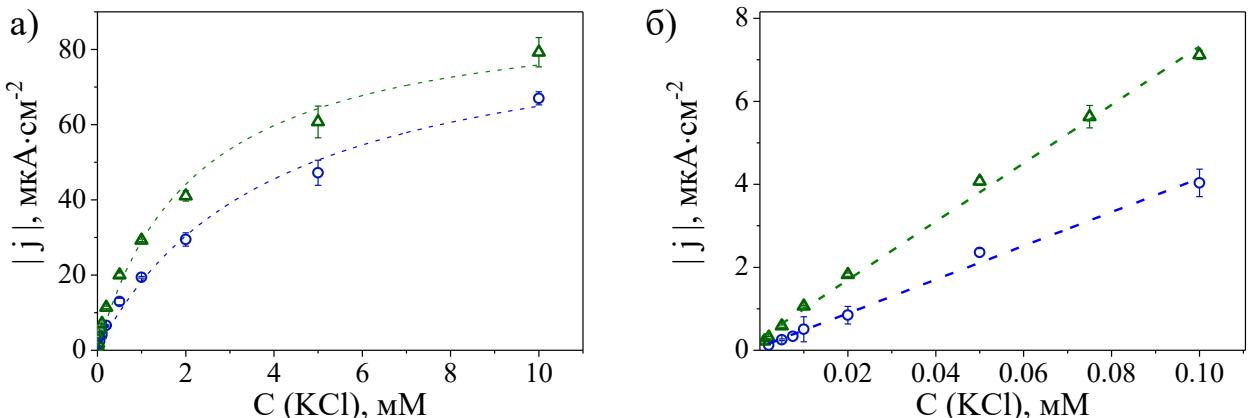


Рисунок 24. а) Градуировочная зависимость электрода, модифицированного НЧ БЛ (○) или ГЦФ Ni (△), без ионоселективной мембранны. б) соответствующий начальный участок. (0.1 М Бис-Трис, pH 6.0).

Высота пика зависит от потенциала регистрации хроноамперограммы (рисунок 25). Для электродов, модифицированных НЧ БЛ, в зависимости от приложенного потенциала максимальная чувствительность наблюдается при потенциале  $-0.05$  В (рисунок 25а). Для электродов, модифицированных ГЦФ Ni, максимум достигается при 0.2 В (рисунок 25б). Гексацианоферраты железа и никеля проявляют окислительно-восстановительную активность, поэтому максимальный отклик находится близко к формальному потенциальному, при котором также достигается и максимальная проводимость. Однако несмотря на то, что формальный потенциал твердых контактов зависит от концентрации катионов калия в растворе, максимум амперометрического отклика не смещается при изменении концентрации KCl.

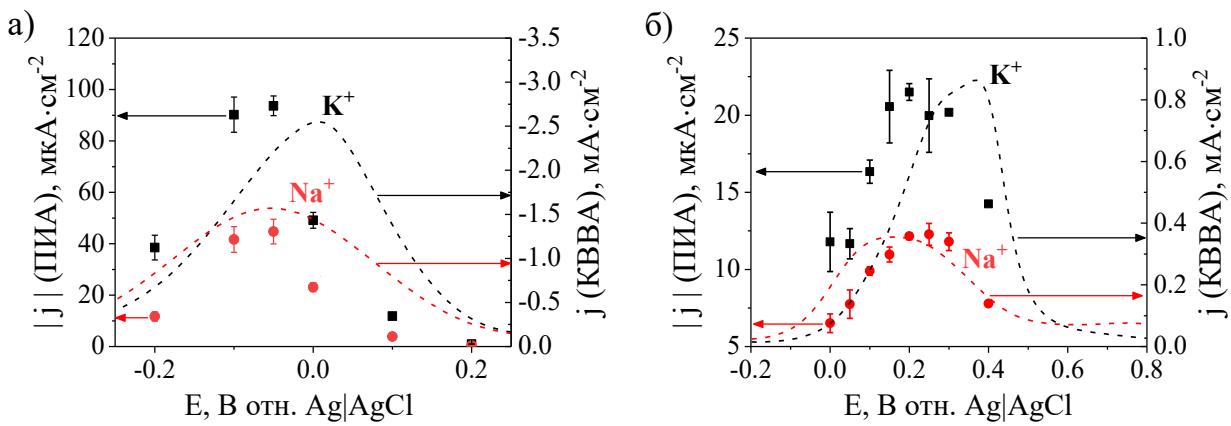


Рисунок 25. Зависимость тока пика от потенциала регистрации хроноамперограммы для сенсора, модифицированного НЧБЛ (а) и ГЦФ Ni (б), и соответствующие квадратноволновые вольтамперограммы (КВВА) в присутствии 10 мМ KCl/NaCl (а), 1 мМ KCl/NaCl (50 мМ Бис-Трис pH 6.0).

Кроме того, ГЦФ железа и никеля обладают селективностью к ионам калия. Амперометрический отклик на раствор KCl в 2–4 раза превышает отклик на эквивалентную концентрацию NaCl, независимо от приложенного потенциала (рисунок 25). Учитывая недостаточную селективность к ионам калия, разработанных ранее ТК-ИСЭ на основе ПЭДОТ ( $\lg K_{K/Na} = -1.7$ ) [78], данное свойство твердого контакта может способствовать повышению селективности калий-селективных электродов. Это особенно актуально для сенсоров, предназначенных для анализа биологических жидкостей, где концентрация ионов натрия может до 40 раз превышать концентрацию ионов калия.

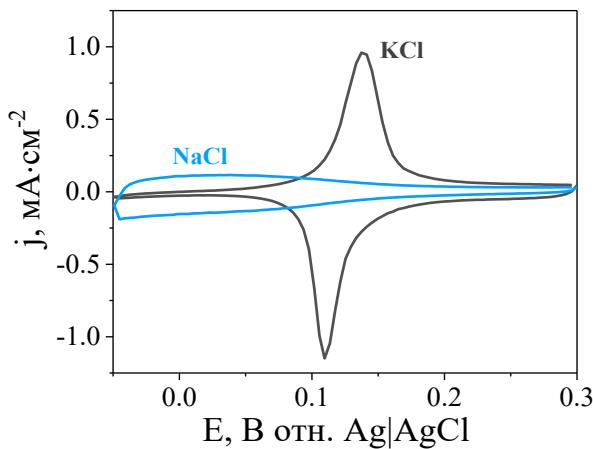


Рисунок 26. ЦВА электрода, модифицированного БЛ, в растворах 0.1 М солей (0.1 М HCl,  $40 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

Для исследования влияния природы катионов на электроактивность гексацианоферратов регистрировали ЦВА в присутствии различных солей. БЛ не проявляет электроактивности в присутствии ионов натрия [4], в отличие от растворов солей калия, что подтверждают данные ЦВА (рисунок 26). Однако в то же время ГЦФ Ni, несмотря на

близкие размеры кристаллической решетки, сохраняет электроактивность в присутствии катионов щелочных металлов и ионов аммония (рисунок 27).

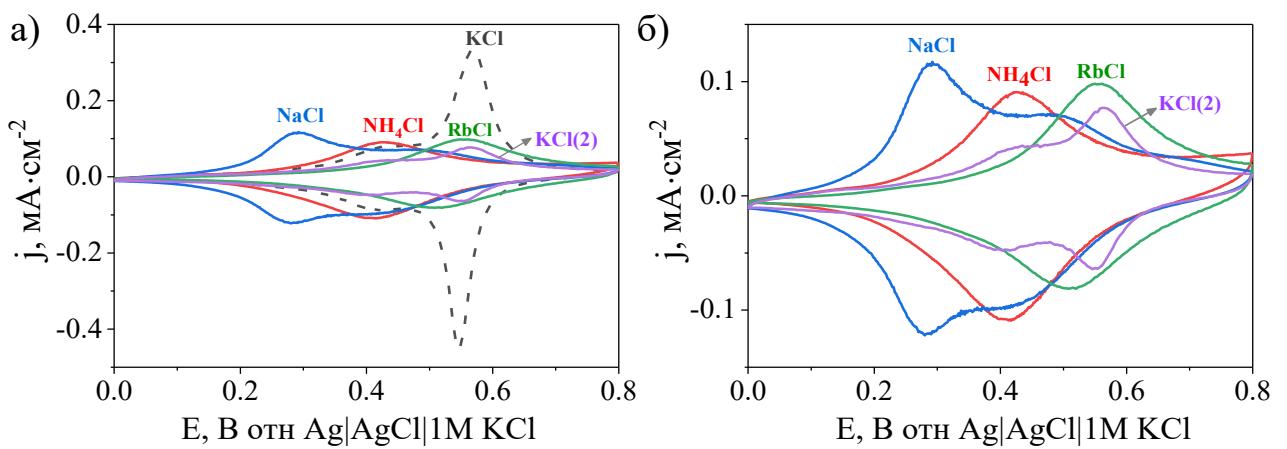


Рисунок 27. ЦВА электрода, модифицированного ГЦФ Ni, в присутствии 0.1 М различной соли; KCl (1) – ЦВА в растворе KCl после синтеза, KCl (2) – ЦВА в растворе KCl после регистрации ЦВА в растворах других солей; б) приближенные ЦВА (0.1 М HCl,  $40 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

На рисунке 27 приведены ЦВА электрода, модифицированного ГЦФ Ni, которые зарегистрированы в растворах разных солей. Потенциал интеркаляции связан со свободной энергией Гиббса гидратации катионов, поскольку с увеличением радиуса щелочных металлов она уменьшается, потенциал интеркаляции возрастает при переходе от натрия к цезию [171].

Увеличенный амперометрический отклик на ионы калия (рисунок 25) связан с его упрощенной интеркаляцией, по сравнению с ионами натрия. При этом ионы аммония, которые по размеру близки к ионам калия, демонстрируют схожее с ним поведение. Так потенциал интеркаляции  $\text{NH}_4^+$  совпадает с потенциалом интеркаляции  $\text{K}^+$  в обедненной калием форме ГЦФ Ni (рисунок 27б). Кроме того, амперометрические отклики на ионы калия и аммония в ПИА равны по величине. Следовательно, размер гидратированных ионов влияет на величину амперометрического сигнала электродов, модифицированных гексацианоферратами железа или никеля, в ПИА.

## 6.2. Ионоселективные электроды с пластифицированными мембранными в режиме проточно-инжекционной амперометрии

Для создания ТК-ИСЭ на электроды, модифицированные гексацианоферратами железа или никеля, наносили мембранообразующую смесь на основе ПВХ и *o*-НФОЭ, а затем раскручивали электрод для равномерного распределения смеси. Такой способ нанесения (spin-coating) позволяет получать более однородные мембранные покрытия, по сравнению с нанесением без раскручивания [62]. Сопротивление ИСМ на основе *o*-НФОЭ ниже, чем у ИСМ на основе диоктилсебациновата, благодаря большей диэлектрической проницаемости и присутствию ионных примесей. Кроме того, добавление липофильной

соли (производных тетрафенилбората) позволяет дополнительно снизить сопротивление мембранны и уменьшает омическое падение напряжения в мембранах, поляризованных в результате протекания тока [55]. Поскольку НЧ БЛ нестабильны при регистрации хроноамперограммы в проточно-инжекционном режиме, покрытие твердого контакта ИСМ должно обеспечить не только необходимую селективность, но и повысить операционную стабильность НЧ БЛ.

Нанесение ИСМ на электроды, не влияет на форму амперометрического сигнала, генерируемого при введении раствора соли в проточно-инжекционную систему, и на хроноамперограмме можно наблюдать пару разнонаправленных пиков (рисунок 28). При попадании в ячейку с сенсором раствора KCl, в результате обменных процессов в ИСМ изменяется потенциал на границе ИСМ | раствор. Однако поскольку измерения проводятся при фиксированном потенциале, происходит частичное восстановление твердого контакта (ГЦФ Ni или НЧ БЛ), в результате на хроноамперограмме это выражается в увеличении катодного тока. Благодаря проточно-инжекционному режиму измерений (буфер-носитель непрерывно протекает через ячейку с сенсором) система возвращается в исходное состояние. При обратной перезарядке твердого контакта на хроноамперограмме наблюдается анодный пик. Из-за того, что сенсор взаимодействует с анализируемым раствором ограниченное время, равновесие в этот момент не достигается.

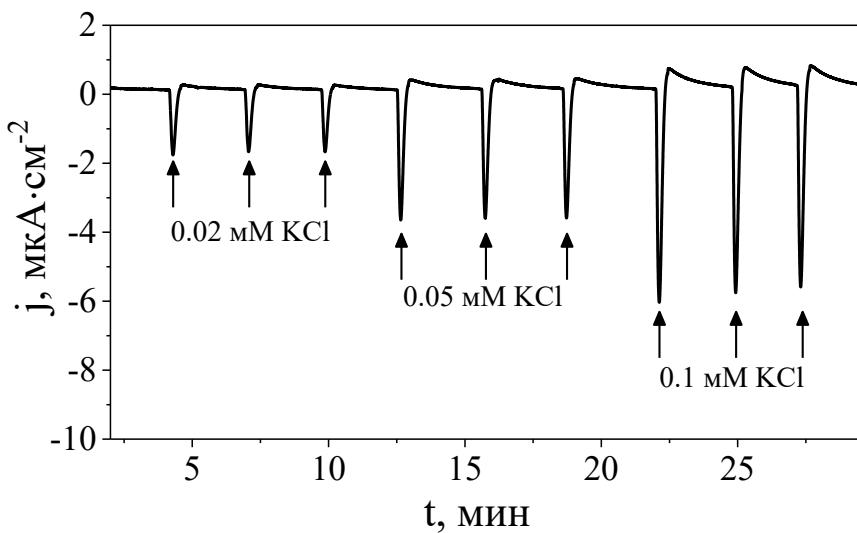


Рисунок 28. Амперометрические отклики K<sup>+</sup>-ИСЭ на основе ГЦФ Ni в результате введения растворов KCl (Бис-Трис, pH 6.0).

Для более детального исследования ТК-ИСЭ в проточно-инжекционном режиме использовали режим постоянного потока (с помощью двух насосов). Для этого через один насос в ячейку подавался поток буфера-носителя, через второй – раствор анализируемой соли, для переключения потоков так же использовали инжектор. Форма и природа амперометрического сигнала (рисунок 29а) в режиме постоянного потока аналогична

транзиентным токам, которые наблюдал Э. Баккер при постоянном потенциале для электрохимически синтезированных пленок БЛ на стеклоуглеродном электроде [97]. Однако эти данные были получены не в проточной системе, а в ячейке фиксированного объёма без принудительной конвекции, что не позволяет получать воспроизводимые токовые отклики. Наблюдаемый в данной работе отклик в ПИА представляет собой наложение симметричных импульсов транзиентного тока, которые соответствуют перезарядке трансдьюсера при изменении направления потока ионов [172]. Преимущество ПИА в том, что определяемый катион принудительно вымывается из ячейки с сенсором, что ускоряет возвращение сенсора в исходное состояние. Это обеспечивает стабильный фоновый сигнал в процессе измерения, а также решает проблему определения начального времени, возникающую при интерпретации результатов хроноамперометрии, полученных в batch-режиме [66].

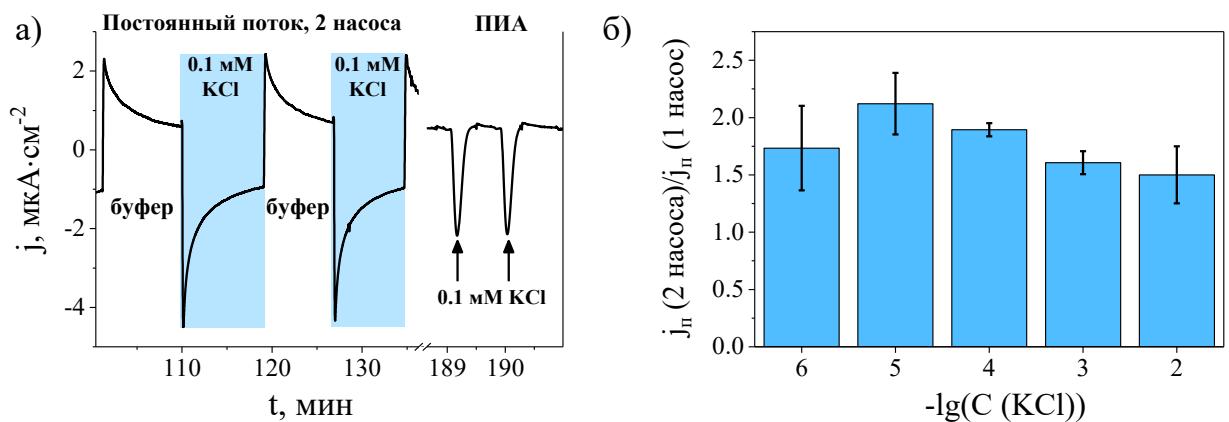


Рисунок 29. а) Амперометрические отклики  $\text{K}^+$ -ИСЭ на основе НЧ БЛ в режиме постоянного потока с двумя насосами; и в проточно-инжекционном режиме с одним насосом ( $E = -0.05$  В, Бис-Трис pH 6.0); б) соответствующее отношение тока катодного пика, регистрируемого в режиме постоянного потока, и в режиме ПИА с одним насосом.

Важным параметром в ПИА является коэффициент дисперсии, который указывает отношение предельного тока к току пика [173]. Поскольку амперометрическим откликом ТК-ИСЭ является не каталитический процесс, а перезарядка полимера, то ближайшим аналогом предельного тока является ток, измеряемый в режиме постоянного потока ( $j_{\text{п}}(2 \text{ насоса})$ ). Для оценки работы сенсора в разных режимах ПИА рассчитывали отношение тока, регистрируемого в режиме постоянного потока с двумя насосами, к току пика, регистрируемому в ПИА с одним насосом (рисунок 29а). В результате соотношение токов практически не зависит от концентрации инжектируемой соли (рисунок 29б), полученное среднее значение  $1.8 \pm 0.3$  является стандартным для систем ПИА [174,175].

Регистрация сигнала в режиме ПИА значительно снижает время анализа. Максимум тока катодного пика достигается за 8–10 с. Для возврата в исходное состояние (к исходному

значению фонового сигнала тока) требуется 20–80 с. По сравнению с другими амперометрическими методами [65,92], высота пика, зарегистрированного в ПИА, хорошо воспроизводится ( $s_r$  не превышает 5 %). Это связано с тем, что ток пика вычисляется от фонового значения тока, которое не смешается в процессе измерений, поскольку после каждой инжекции анализируемого раствора происходит промывка сенсора и ячейки раствором-носителем.

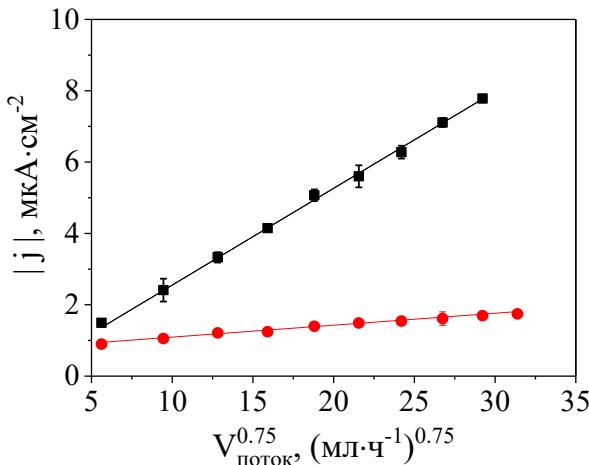


Рисунок 30. Зависимость амперометрического отклика от скорости потока для электрода, модифицированного НЧ БЛ, без ионоселективной мембранны (■) и с калий-селективной мембраной (●) в результате инъектирования 0.1 мМ KCl (0.1 М Бис-Трис, pH 6.0; –0.05 В)

Скорость потока буфера-носителя влияет на чувствительность сенсоров. Амперометрические отклики ИСЭ и электрода, модифицированного НЧ БЛ без ИСМ, возрастают с увеличением скорости потока ( $V_{\text{поток}}$ ) и линейно зависят от  $V_{\text{поток}}^{0.75}$ (рисунок 30). Такой вид зависимости в случае «wall-jet» ячейки подтверждает, что лимитирующим процессом является массоперенос [73]. Тангенс угла наклона для K<sup>+</sup>-ИСЭ составляет  $(30 \pm 2)$  нА·мл<sup>(-17/12)·ч<sup>3/4</sup>; для сенсора без ИСМ тангенс угла наклона увеличивается почти в 10 раз и достигает  $(270 \pm 11)$  нА·мл<sup>(-17/12)·ч<sup>3/4</sup>. Для K<sup>+</sup>-ИСЭ на основе ГЦФ Ni тангенс угла наклона оказывается выше и составляет  $(88 \pm 5)$  нА·мл<sup>(-17/12)·ч<sup>3/4</sup>.</sup></sup></sup>

### 6.3. Аналитические характеристики ТК-ИСЭ на основе гексацианоферратов железа и никеля

Нанесение мембранообразующего коктейля приводит к снижению чувствительности сенсора не более, чем на 30 %, по сравнению с модифицированными электродами без ИСМ. При этом чувствительность ТК-ИСЭ на основе НЧ БЛ или ГЦФ Ni практически не зависит от потенциала регистрации хроноамперограммы (рисунок 31). Это согласуется с данными [96], где для сенсоров на основе БЛ были проведены электрографиметрические исследования, которые показали, что ионы калия проникают в ИСМ, независимо от приложенного потенциала.

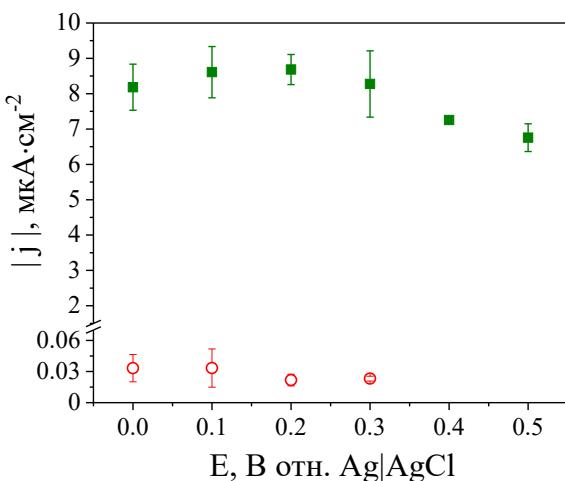


Рисунок 31. Зависимость амперометрического сигнала  $K^+$ -ИСЭ на основе ГЦФ Ni от потенциала регистрации хроноамперограммы в результате инжекции 0.1 мМ KCl (■) или 0.1 мМ NaCl (○).

В данной работе отклики ИСЭ на основе НЧ БЛ регистрировали при – 0.05 В, а на основе ГЦФ Ni – при 0.2 В. Для построения градуировочных зависимостей использовали среднюю высоту катодного пика, средние значения рассчитывали по результатам как минимум трёх инжекций раствора анализируемой соли.

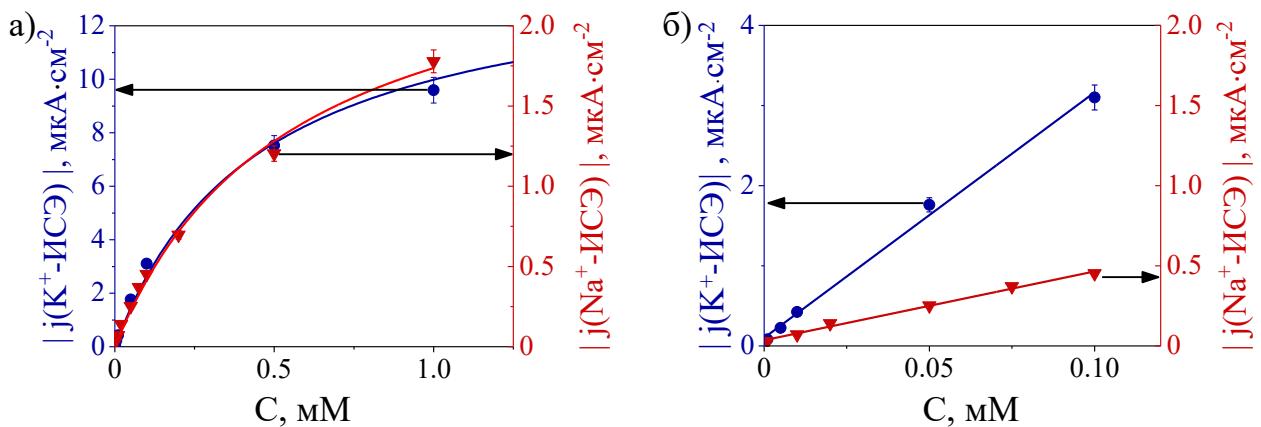


Рисунок 32. а) Градуировочные зависимости калий- (●) и натрий-селективных (▼) сенсоров на основе НЧ БЛ; б) Начальный участок соответствующих градуировочных графиков (0.1 М Бис-Трис, pH 6.0).

Натрий-селективные сенсоры создавали аналогично калий-селективным, заменяя только состав мембранообразующей смеси. На рисунке 32 представлены градуировочные зависимости для  $K^+$ -ИСЭ и  $Na^+$ -ИСЭ на основе НЧ БЛ. Амперометрические отклики ТК-ИСЭ зависят от концентрации определяемых ионов, что позволяет проводить измерения в диапазоне от  $1 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-2}$  М. Градуировочные зависимости ТК-ИСЭ аппроксимировали гиперболической кривой с начальным линейным участком. Коэффициент чувствительности ИСЭ определяли как тангенс угла наклона линейного начального участка градуировочного графика (таблица 9).

Верхний предел линейного диапазона ТК-ИСЭ такой же, как у модифицированных электродов без ИСМ. Однако у ТК-ИСЭ на основе ПЭДОТ:ПСС в режиме ПИА верхняя граница ЛДОК также составляла  $1 \times 10^{-4}$  М для  $\text{K}^+$ -ИСЭ [78]. Следовательно ограничение верхнего диапазона ЛДОК обусловлено преимущественно ИСМ, а не характеристиками материала твердого контакта, поскольку, как было показано ранее, сопротивление ИСМ влияет на величину транзиентного тока (уравнение 3) [65].

Для оценки влияния ИСМ на сопротивление сенсора регистрировали спектры электрохимического импеданса ТК-ИСЭ на основе НЧ БЛ с разным количеством твердого контакта. По данным СЭХИ (рисунок 33а) диаметр полуокружности на спектрах, характеризующий сопротивление переноса заряда ( $R_{\text{пз}}$ ) [176], не зависит от количества адсорбированных НЧ БЛ. Например, при  $\Gamma_{\text{БЛ}}=1.6$  нмоль·см<sup>-2</sup>  $R_{\text{пз}}$  составляет  $45.3 \pm 0.4$  кОм, а при  $\Gamma_{\text{БЛ}}=4.7$  нмоль·см<sup>-2</sup> –  $45.1 \pm 0.3$  кОм. Поскольку  $R_{\text{пз}}$  для таких сенсоров совпадают в пределах погрешности, оно определяется в первую очередь сопротивлением ИСМ. На  $R_{\text{пз}}$  также влияет концентрация KCl в растворе (рисунок 33б).  $R_{\text{пз}}$  в разбавленных растворах из-за возрастающего объёмного сопротивления мембранны соответственно увеличивается [96]. Стоит отметить, что в области ЛДОК сенсора  $R_{\text{пз}}$  практически не изменяется.

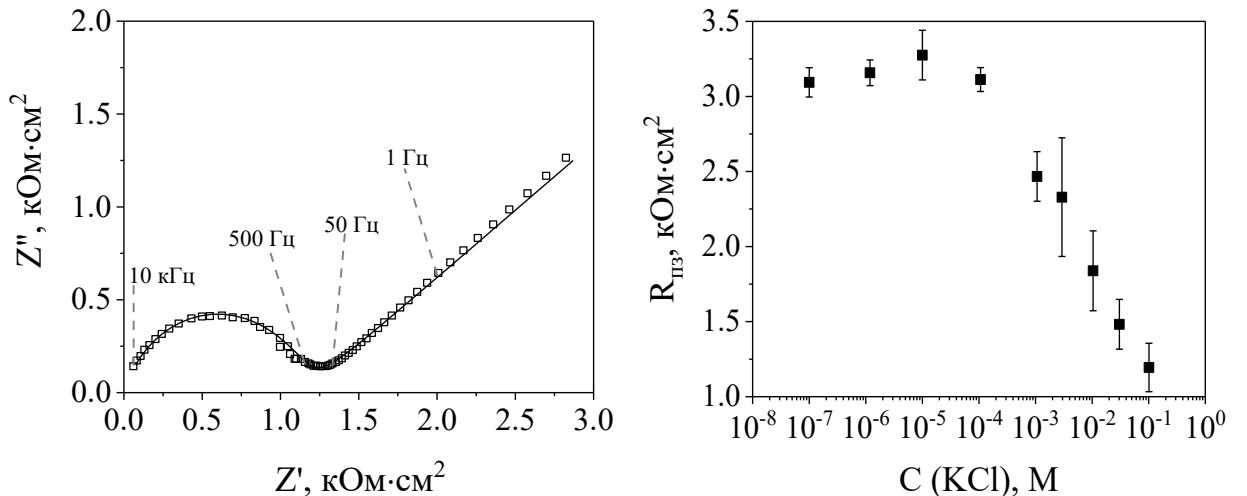


Рисунок 33. а) Спектр электрохимического импеданса  $\text{K}^+$ -ИСЭ на основе НЧ БЛ ( $\Gamma_{\text{БЛ}}=1.6$  нмоль·см<sup>-2</sup>;  $E_{dc}=-0.05$  В, 0.1 М Бис-Трис, 0.1 М KCl) б) зависимость сопротивления переноса заряда ( $R_{\text{пз}}$ )  $\text{K}^+$ -ИСЭ на основе НЧ БЛ от концентрации KCl в растворе.

Для оценки влияния количества твердого контакта на чувствительность сенсоров, на печатные планарные электроды адсорбировали различное количество НЧ БЛ. Количество электроактивной БЛ рассчитывали из данных ЦВА, зарегистрированных до нанесения ИСМ на поверхность модифицированного электрода. На рисунке 34 представлены амперометрические отклики  $\text{K}^+$ -ИСЭ с разным количеством адсорбированных НЧ БЛ.

Величина сигнала возрастает с увеличением  $\Gamma_{БЛ}$ , но выходит на плато при  $1\text{--}2 \text{ нмоль}\cdot\text{см}^{-2}$ , что соответствует полному заполнению поверхности электрода [22]. Для дальнейшей работы и анализа реальных объектов использовали сенсоры с  $\Gamma_{БЛ}$  от 1.5 до  $3 \text{ нмоль}\cdot\text{см}^{-2}$ .

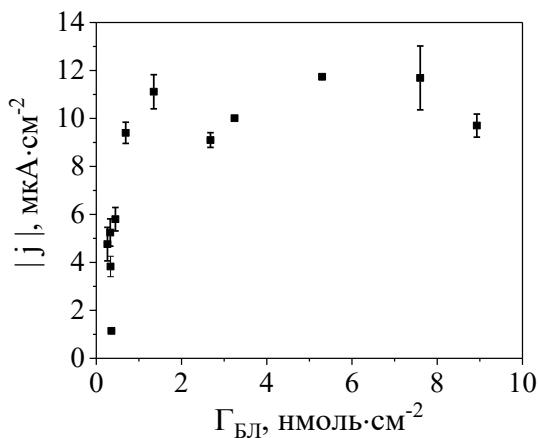


Рисунок 34. Зависимость амперометрического отклика  $K^+$ -ИСЭ на основе НЧ БЛ от поверхностной концентрации электроактивной БЛ ( $\Gamma_{БЛ}$ ) (1 мМ KCl; 0.1 М Бис-Трис, pH 6.0;  $-0.05$  В).

В таблице 9 приведены аналитические характеристики разработанных сенсоров на основе НЧ БЛ и ГЦФ Ni. Предел обнаружения (1 мкМ) сенсоров на основе НЧ БЛ является наименьшим среди известных на сегодняшний день сенсоров на основе берлинской лазури. Такой предел обнаружения близок к теоретически достижимому значению для данной системы, поскольку сравним с фоновой концентрацией ионов калия, обусловленной утечкой ионов из ИСМ.

Несмотря на то, что ГЦФ железа или никеля обладают сродством к ионам калия, при замене ионофора в ИСМ на натрий-селективный, возможно создать и  $Na^+$ -ИСЭ. Как видно из рисунка 32б, у ТК-ИСЭ на основе наночастиц БЛ форма градуировочного графика и ЛДОК аналогичны для  $K^+$ -ИСЭ и  $Na^+$ -ИСЭ. Коэффициент чувствительности  $Na^+$ -ИСЭ несколько ниже, однако это не является ограничением для анализа биологических жидкостей, поскольку концентрация ионов натрия в них выше, чем концентрация ионов калия. Сенсоры на основе ГЦФ Ni исследовали аналогично. Форма градуировочного графика и аналитические характеристики близки к сенсорам на основе НЧ БЛ, однако коэффициент чувствительности сенсоров на основе ГЦФ Ni оказывается выше (таблица 9).

Таблица 9. Аналитические характеристики разработанных амперометрических ТК-ИСЭ с калий- или натрий-селективной мембраной в проточно-инжекционном режиме ( $n=3$ ,  $P=0.95$ ).

Твердый контакт	Определяемый катион	ДОК, М	ЛДОК, М	$s, \text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$
НЧ БЛ	$\text{K}^+$	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$	$46 \pm 12$
НЧ БЛ	$\text{Na}^+$	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$	$4 \pm 1$
ГЦФ Ni	$\text{K}^+$	$2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$	$75 \pm 10$
ГЦФ Ni	$\text{Na}^+$	$5 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-6} - 7.5 \times 10^{-5}$	$25 \pm 8$

Чувствительность  $\text{K}^+$ -ИСЭ в ПИА выше, чем в режиме потенциометрии. При определении 0.1 мМ KCl изменение концентрации на 1 % приведет к изменению сигнала разработанных ТК-ИСЭ на 1–2 нА, что значительно превышает стандартное отклонение фонового сигнала в процессе измерений (0.02–0.08 нА). В то же время для классических потенциометрических сенсоров изменение активности определяемого иона на 1 % соответствует 0.2 мВ и не превышает погрешность измерений.

Для создания сенсоров с воспроизводимыми аналитическими характеристиками необходимо контролировать количество электроактивного твердого контакта на электроде. Этот контроль осуществляется легко: для ГЦФ Ni за счёт контроля токов ЦВА в процессе синтеза, для НЧ БЛ спектрофотометрически необходимо оценить концентрацию наночастиц в суспензии перед адсорбцией. Нанесение ИСМ при раскручивании также повышает воспроизводимость характеристик у ТК-ИСЭ.

### Селективность ТК-ИСЭ

Для исследования влияния аниона инжектируемой соли и оценки селективности ТК-ИСЭ последовательно вводили в систему соли натрия, калия и аммония. На рисунке 35 представлены амперометрические отклики  $\text{K}^+$ -ИСЭ, генерируемые в ПИА в результате инжектирования 1 мМ солей. Амперометрический отклик на соли, содержащие катион натрия, до 100 раз ниже, чем на калиевые соли. Из рисунка 35 видно, что анион определяемой соли не влияет на величину амперометрического сигнала.

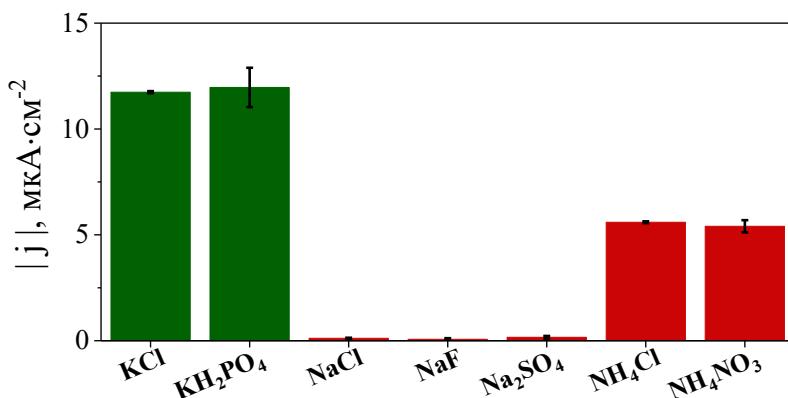


Рисунок 35. Амперометрические отклики  $\text{K}^+$ -ИСЭ на основе НЧ БЛ на 1 мМ растворы различных солей в режиме ПИА (0.1 М Бис-Трис, pH 6.0;  $-0.05$  В).

Также исследовали селективность к ионам аммония, которые присутствуют в поте и КВВ. Они могут оказывать мешающее влияние при определении ионов калия, так как размер иона  $\text{NH}_4^+$  близок по размеру к катиону калия. В таблице 10 приведены коэффициенты селективности ИСЭ, рассчитанные как отношение концентраций целевого и мешающего иона, которые приводят к идентичному амперометрическому сигналу. Полученные коэффициенты селективности приближаются к теоретически достижимым для используемых ионофоров, что открывает перспективы для определения концентрации калия или натрия в биообъектах, таких как сыворотка крови и пот. Кроме того, достигнутая селективность в 2 раза выше, чем у амперометрических ИСЭ на основе ПЭДОТ [78].

Таблица 10. Логарифмы коэффициентов селективности (К) ТК-ИСЭ в режиме проточно-инжекционной амперометрии.

Твердый контакт	Определяемый катион	$-\lg K_{\text{K}/\text{Na}}$	$-\lg K_{\text{Na}/\text{K}}$	$-\lg K_{\text{K}/\text{NH}_4}$	$-\lg K_{\text{Na}/\text{NH}_4}$
НЧ БЛ	$\text{K}^+$	3.2	—	0.8	—
НЧ БЛ	$\text{Na}^+$	—	3.9	—	4.2
ГЦФNi	$\text{K}^+$	3.5	—	0.8	—
ГЦФNi	$\text{Na}^+$	—	3.6	—	4.3

Представленные в таблице 10 коэффициенты селективности получены методом отдельных растворов, поэтому для оценки селективности в присутствии избытка мешающих ионов инжектировали смешанные растворы солей. В таблице 11 показана величина амперометрического отклика  $\text{K}^+$ -ИСЭ на инжекцию раствора KCl, содержащего разное количество ионов натрия или аммония. В результате видно, что эквимолярная концентрация  $\text{NH}_4^+$  или десятикратный избыток  $\text{Na}^+$  не влияет на сигнал ИСЭ.

Таблица 11. Амперометрические сигналы  $\text{K}^+$ -ИСЭ на основе ГЦФ Ni в присутствии 0.1 мМ KCl и разного количества мешающих ионов в анализируемом растворе.

Раствор $j, \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	Концентрация мешающих ионов			
	0.1 мМ KCl	+ 0.1 мМ NaCl	+ 0.5 мМ NaCl	+ 1 мМ NaCl
8.7±0.4	9.0±0.5	8.7±0.2	8.7±0.6	
0.1 мМ KCl	+ 0.1 мМ NH <sub>4</sub> Cl	+ 0.2 мМ NH <sub>4</sub> Cl	+ 1 мМ NH <sub>4</sub> Cl	
8.7±0.4	9.0±0.3	9.8±0.4	13.2±0.8	

Введение биообразцов в проточно-инжекционную систему может привести к изменению концентрации буфера-носителя и соответственно ионной силы, поэтому оценивали её влияние на чувствительность сенсоров. Для этого регистрировали амперометрические сигналы на 0.01 мМ KCl в растворах Бис-Трис (рН 6.0) разной концентрации (50 мМ, 75 мМ, 100 мМ), величина амперометрического отклика показана в таблице 12.

Таблица 12. Величина отклика  $\text{K}^+$ -ИСЭ на основе ГЦФ Ni на 0.01 мМ KCl в буферном растворе Бис-Трис различной концентрации.

[Бис-Трис], мМ	50	75	100
$ j , \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	1.19±0.04	1.23±0.06	1.18±0.06

В результате видно, что концентрация буферного раствора в данном диапазоне концентраций не оказывает влияния на чувствительность сенсоров.

### Стабильность ТК-ИСЭ

Важным параметром сенсоров является их стабильность при хранении. Несмотря на то, что НЧ БЛ имеют тенденцию вымываться с поверхности электрода, нанесение мембранообразующей смеси способствует повышению операционной стабильности ТК-ИСЭ.

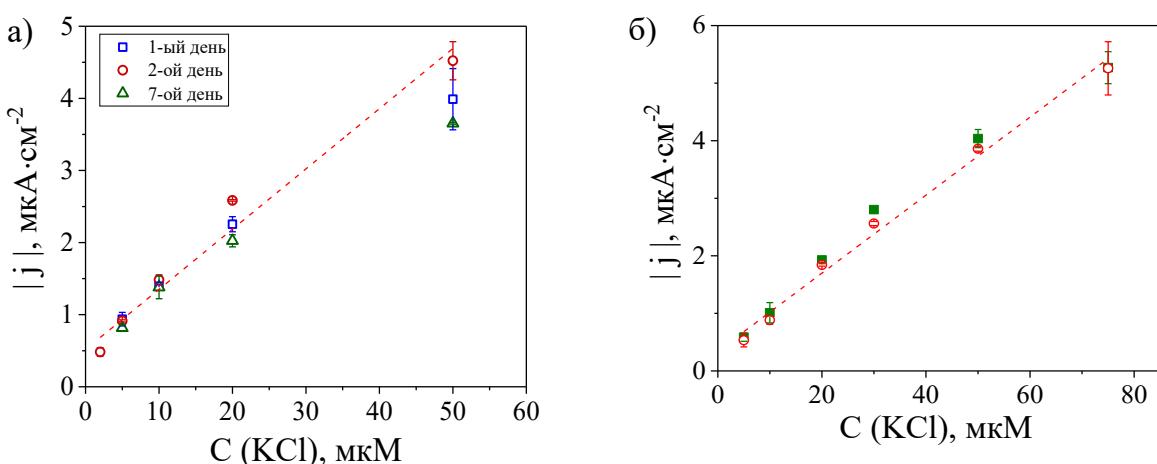


Рисунок 36. а) Изменение градуировочной зависимости для  $\text{K}^+$ -ИСЭ на основе НЧ БЛ при хранении в течение 7 дней. б) Сохранение чувствительности  $\text{K}^+$ -ИСЭ на основе ГЦФ Ni до (■) и после (○) 5 часов измерения серии биообразцов.

В течение 7 дней хранения ТК-ИСЭ на основе НЧ БЛ сохраняется 85 % чувствительности (рисунок 36а), у сенсора на основе ГЦФ Ni – 94 %. Кроме того, в течение 5 часов измерений растворов биообразцов ТК-ИСЭ на основе ГЦФ Ni сохраняют 95 % чувствительности (рисунок 36б).

### **ТК-ИСЭ в режиме потенциометрии**

Разработанные ТК-ИСЭ также функционируют в режиме потенциометрии. Измерения проводили относительно внутреннего электрода сравнения. Потенциометрический отклик стабилизировался в течение 5–10 минут, что значительно дольше, чем при измерении в режиме проточно-инжекционной амперометрии, где для получения сигнала требуется не более 30–60 секунд. На рисунке 37 представлен пример градуировочной зависимости К<sup>+</sup>-ИСЭ на основе ГЦФ Ni.

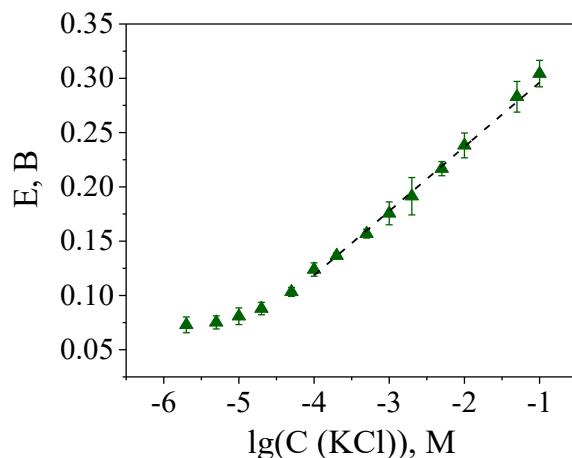


Рисунок 37. Градуировочная зависимость для определения K<sup>+</sup> с помощью K<sup>+</sup>-ИСЭ на основе ГЦФ Ni в потенциометрическом режиме.

В таблице 13 представлены аналитические характеристики разработанных сенсоров. Стоит отметить, что коэффициент чувствительности ТК-ИСЭ близок к теоретическому 59.2 мВ (при 25°C).

Таблица 13. Сравнение аналитических характеристик сенсора в режиме потенциометрии и проточно-инжекционной амперометрии (n=3, P=0.95).

Твердый контакт	Определяемый катион	Потенциометрия		ПИА
		наклон, мВ	C <sub>мин</sub> , М	
НЧ БЛ	K <sup>+</sup>	56±2	2×10 <sup>-5</sup>	1×10 <sup>-6</sup>
НЧ БЛ	Na <sup>+</sup>	33±3	2×10 <sup>-4</sup>	5×10 <sup>-6</sup>
ГЦФ Ni	K <sup>+</sup>	58±1	3×10 <sup>-5</sup>	2×10 <sup>-6</sup>
ГЦФ Ni	Na <sup>+</sup>	57±2	1×10 <sup>-4</sup>	5×10 <sup>-6</sup>

Как видно из таблицы 13 измерение в режиме проточно-инжекционной амперометрии на порядок позволяет понизить предел обнаружения, по сравнению с

потенциометрией. Другим важным преимуществом измерений в режиме ПИА является повышение соотношения сигнал/шум. Для разработанных сенсоров в ПИА соотношение сигнал/шум в 6 раз выше, чем в режиме потенциометрии. Стандартное отклонение фонового сигнала в ПИА составляет 0.02–0.08 нА, против 1–2 мВ в потенциометрии. В то же время в режиме потенциометрии линейный диапазон на градуировочной зависимости сохраняется в области высоких концентраций. Это позволяет проводить анализ объектов с высоким содержанием ионов калия и натрия (сыворотка крови), минимизируя предварительное разбавление пробы.

#### **6.4. Определение содержания калия и натрия в биологических жидкостях (сыворотка крови, пот).**

Разработанные ТК-ИСЭ были использованы для определения содержания калия и натрия в стандартизованной сыворотке крови. Были проанализированы образцы сыворотки с нормальным содержанием всех основных метаболитов, а также с повышенным (патологическим) содержанием. Для проведения измерений в режиме проточно-инжекционной амперометрии необходимо не более 2–5 мкл образца сыворотки крови, а время анализа не превышает 1 минуту. Полученные результаты совпадают с паспортными значениями в пределах погрешности (таблица 14).

Таблица 14. Результаты определения ионов калия и натрия в стандартизованных образцах сыворотки крови в режиме проточно-инжекционной амперометрии ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ).

	<b>Образец сыворотки</b>	<b>Определено (мМ) ТК-ИСЭ на основе:</b>		<b>Паспортные значения, мМ</b>
		<b>НЧ БЛ</b>	<b>ГЦФ Ni</b>	
<i>C(K<sup>+</sup>)</i>	Норма	4.4 ± 0.5	4.5 ± 0.3	4.8 ± 1.0
	Патология	6.6 ± 0.7	6.4 ± 0.5	7.0 ± 1.0
<i>C(Na<sup>+</sup>)</i>	Норма	114 ± 9	113 ± 5	112 ± 12
	Патология	164 ± 10	160 ± 9	142 ± 28

С помощью K<sup>+</sup>-ИСЭ на основе НЧ БЛ был проведен анализ образцов неразбавленной сыворотки крови (рисунок 38) в режиме потенциометрии. Измерения проводились в буферном растворе Бис-Трис, а также в присутствии избытка мешающих ионов (0.1 М NaCl), что не повлияло на коэффициент чувствительности и величину отклика калий-селективного сенсора. Полученные результаты совпали с данными паспорта образца.

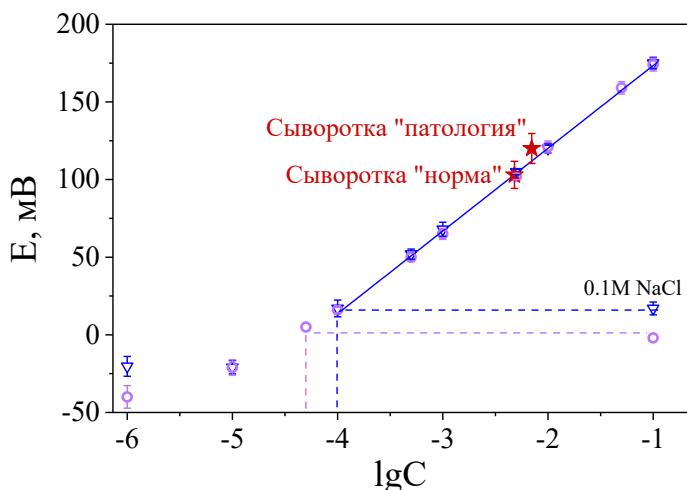


Рисунок 38. Зависимость потенциала  $K^+$ -ИСЭ на основе НЧ БЛ от концентрации  $KCl$  в 0.1 М Бис-Трис (○) или в присутствии 0.1 М  $NaCl$  (▽). Результаты измерений неразбавленных образцов сыворотки крови (★).

Помимо образцов сыворотки крови были проанализированы образцы пота, собранного после электрофоретической активации потовых желез с использованием пилокарпина. Форма амперометрического сигнала, формируемого в результате инжекции разбавленных биообразцов (сыворотки крови, пота) совпадает с откликом на градуировочные растворы  $NaCl$  или  $KCl$ . Правильность получаемых результатов подтверждали методом капиллярного электрофореза.

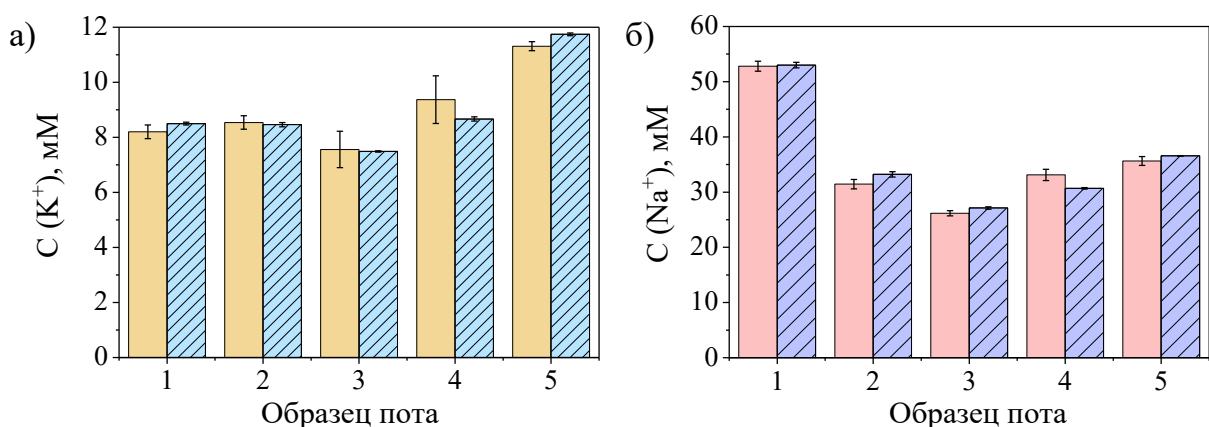


Рисунок 39. Сравнение результатов определения содержания ионов калия или натрия в образцах пота ТК-ИСЭ в режиме проточно-инжекционной амперометрии (закрашенные столбцы) и методом капиллярного электрофореза (заштрихованные столбцы).

На рисунке 39 представлено сравнение результатов определения содержания ионов калия (рисунок 39а) и натрия (рисунок 39б), полученных разработанными ТК-ИСЭ на основе НЧ БЛ или ГЦФ Ni, с результатами измерения методом капиллярного электрофореза. Относительное отклонение результатов, полученных разными методами, не превышает 7 %, а коэффициенты корреляции для  $K^+$ -ИСЭ и  $Na^+$ -ИСЭ равны 0.994 и 0.992 соответственно. Важно отметить, что все измеренные концентрации ионов калия и натрия

находились в пределах физиологической нормы для пота человека. Таким образом, разработанные ТК-ИСЭ применимы для определения содержания калия и натрия в образцах сыворотки крови и пота.

### 6.5.ТК-ИСЭ для одновременного определения содержания ионов калия и натрия

Для создания сенсора, позволяющего одновременно измерять содержание калия и натрия в биообразцах, использовали четырехэлектродные печатные планарные электроды (ППЭ-2РЭ), которые помимо вспомогательного электрода и электрода сравнения содержат два рабочих электрода (рисунок 16). Модификацию рабочих электродов (РЭ) выполняли аналогично печатным структурам с одним РЭ, описанным ранее. Электрохимический синтез ГЦФ Ni одновременно на двух РЭ позволяет получать сенсоры с воспроизводимым количеством твердого контакта на каждом РЭ,  $s_r$  ГЦФ Ni не превышает 5 %.

Измерения проводили в тонкослойной проточной ячейке, где анализируемый раствор после инжекции последовательно омывает сначала первый РЭ, затем попадает на второй. Амперометрические сигналы регистрировали с использованием потенциостата, поддерживающего мультиканальные измерения. Как видно из рисунка 40а, форма пиков для обоих РЭ (серым обозначен первый РЭ, красным – второй) идентична сигналам, полученным в ячейке типа «wall-jet». Высота пика линейно зависит от концентрации хлорида калия в диапазоне от 1 мкМ до 100 мкМ (рисунок 40б). Сенсоры без ионоселективной мембранны демонстрируют высокую чувствительность: для первого РЭ  $s = 181 \pm 2 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , в то время как для второго наблюдается незначительное снижение чувствительности до  $147 \pm 2 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , вероятно обусловленное гидродинамическим профилем потока.

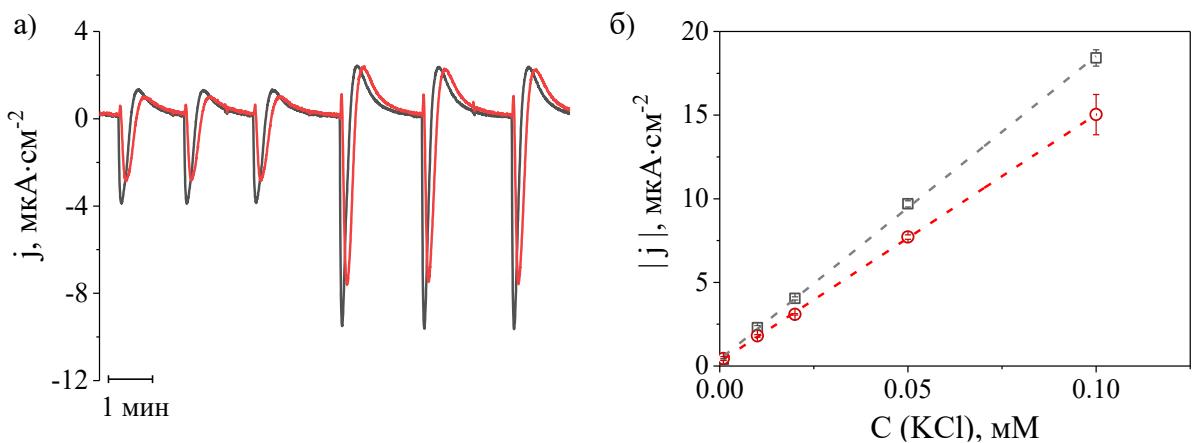


Рисунок 40. а) Примеры амперометрических откликов ППЭ-2РЭ, модифицированных ГЦФ Ni, в тонкослойной проточной ячейке на инжекцию растворов KCl (50 мМ Бис-Трис, pH 6.0) б) соответствующие градуировочные зависимости (■ – рабочий электрод №1, ○ – рабочий электрод №2).

Для оценки влияния потока на сенсоры с ионоселективной мембраной использовали ППЭ-2РЭ, модифицированные ГЦФ Ni, количество ГЦФ Ni на электродах было одинаковым и составляло  $0.6 \text{ нмоль} \cdot \text{см}^{-2}$ . На оба РЭ нанесли калий-селективную мембрану. Как видно из рисунка 41 высота тока пиков второго РЭ отличается не более, чем на 10 % от первого сенсора. Коэффициент чувствительности первого сенсора равен  $50 \pm 4 \text{ мА} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ , второго –  $46 \pm 4 \text{ мА} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ . Следовательно, после нанесения ионоселективной мембраны расположение РЭ не оказывает значительного влияния на аналитические характеристики ТК-ИСЭ.

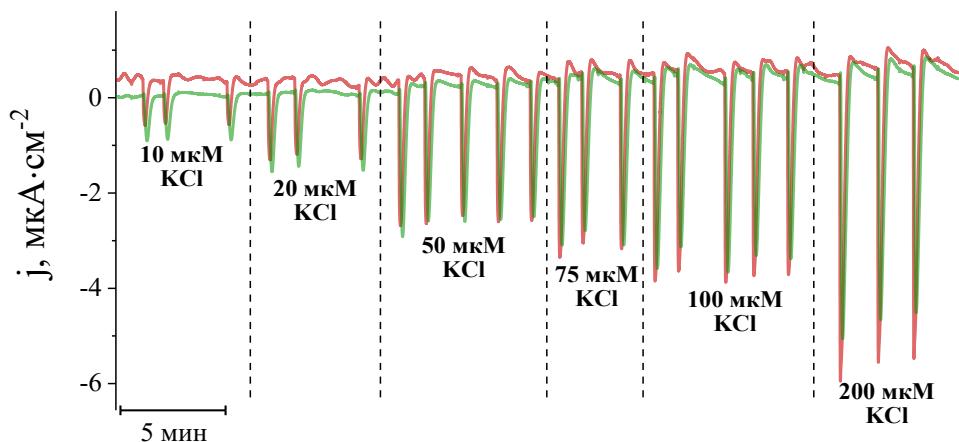


Рисунок 41. Примеры амперометрических откликов ППЭ-2РЭ с двумя калий-селективными сенсорами на основе ГЦФ Ni (50 мМ Бис-Трис, pH 6.0).

Для создания сенсоров, подходящих для одновременного определения калия и натрия, на модифицированные электроды наносили соответствующие мембранообразующие смеси. Как видно из рисунка 42а инъектирование KCl приводит к амперометрическому сигналу только одного из электродов, с калий-селективной мембраной (синяя линия), а инъектирование NaCl – пику только натрий-селективного сенсора (оранжевая линия). При введении эквимолярной смеси KCl и NaCl наблюдаются отклики на обоих электродах ( $\text{K}^+$ -ИСЭ и  $\text{Na}^+$ -ИСЭ), высота пика при введении смеси такая же, как и при раздельном инъектировании солей. В связи с этим, для ускорения калибровки сенсора инъектировали не отдельные соли, а раствор, содержащий эквимолярные концентрации KCl и NaCl. На рисунке 42б представлены такие градуировочные зависимости, а красным отмечены точки, полученные при введении растворов, не содержащих мешающих ионов. Несмотря на то, что чувствительность  $\text{Na}^+$ -ИСЭ ( $20 \pm 3 \text{ мА} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ ) почти в 2 раза ниже, чем у  $\text{K}^+$ -ИСЭ ( $37 \pm 5 \text{ мА} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ ), это не препятствует анализу биологических образцов, где концентрация натрия обычно значительно выше, чем калия.

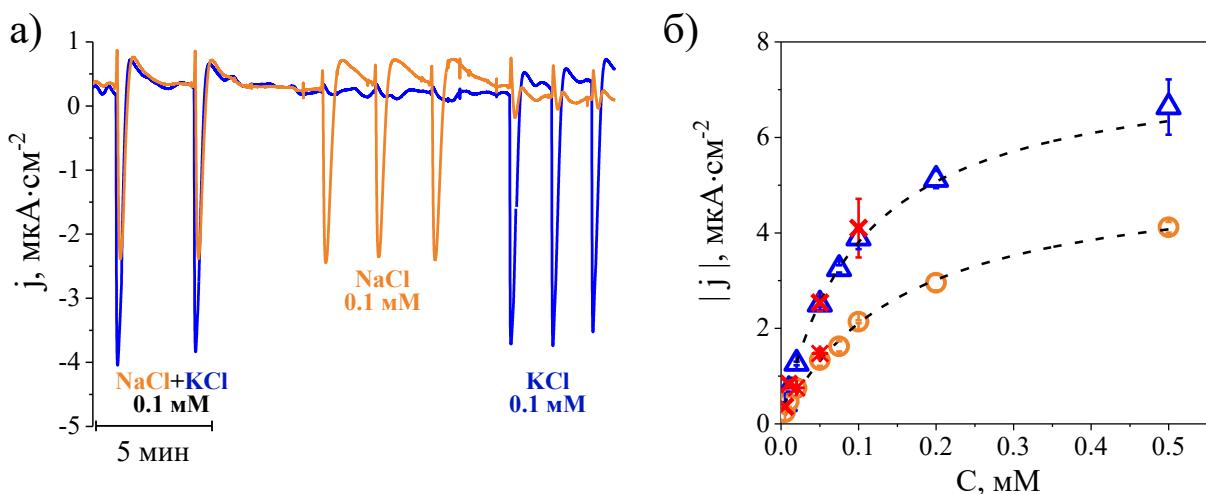


Рисунок 42. а) Примеры амперометрических откликов ППЭ-2РЭ с калий- (синяя кривая) и натрий-селективными (оранжевая кривая) сенсорами на основе ГЦФ Ni (50 мМ Бис-Трис, pH 6.0). б) Соответствующие градуировочные зависимости калий- ( $\Delta$ ) и натрий-селективного ( $\circ$ ) сенсора, полученные в результате инъектирования эквимолярных растворов KCl и NaCl. Красным ( $\times$ ) показаны амперометрические отклики сенсора на инъекцию растворов KCl или NaCl, не содержащих мешающих ионов.

Аналогичные сенсоры были успешно изготовлены на основе НЧ БЛ. Их ключевое преимущество – легкость модификации поверхности за счёт простой адсорбции НЧ БЛ из их суспензии. Чувствительность сенсоров близка к характеристикам ТК-ИСЭ на основе ГЦФ Ni:  $30 \pm 6 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  для  $\text{K}^+$ -ИСЭ и  $28 \pm 4 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  для  $\text{Na}^+$ -ИСЭ.

Таблица 15. Сравнение результатов одновременного измерения содержания калия и натрия в образцах пота ТК-ИСЭ (ППЭ-2РЭ) и методом капиллярного электрофореза.

Образец пота	ТК-ИСЭ		Капиллярный электрофорез	
	C( $\text{K}^+$ ), мМ	C( $\text{Na}^+$ ), мМ	C( $\text{K}^+$ ), мМ	C( $\text{Na}^+$ ), мМ
1	$8.5 \pm 0.1$	$31.4 \pm 0.8$	$8.46 \pm 0.08$	$33.2 \pm 0.5$
2	$7.56 \pm 0.05$	$33.1 \pm 0.7$	$7.49 \pm 0.03$	$30.7 \pm 0.1$
3	$9.3 \pm 0.2$	$35.6 \pm 0.6$	$8.67 \pm 0.08$	$36.57 \pm 0.04$

Электроды на основе ГЦФ Ni использовали для анализа образцов пота. В таблице 15 приведены результаты анализа трёх образцов пота. Для исключения систематической погрешности и проверки правильности измерений использовали метод капиллярного электрофореза. В результате относительное отклонение от результатов капиллярного электрофореза не превышает 8 %, подтверждая применимость разработанных биамперометрических ТК-ИСЭ для мультиэлектролитного анализа биообразцов.

\* \* \*

В результате установлено, что электроды, модифицированные гексацианоферратами железа или никеля, генерируют воспроизводимые амперометрические отклики в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале. Причём высота катодного пика линейно зависит от концентрации определяемых катионов.

Нанесение пластифицированной ионоселективной мембраны позволило создать калий-, а также натрий-селективные ТК-ИСЭ, функционирующие как в режиме проточно-инжекционной амперометрии, так и в режиме классической потенциометрии. Амперометрический режим детектирования обеспечивает более высокую чувствительность твердоконтактных ионоселективных электродов (ТК-ИСЭ) по сравнению с традиционной потенциометрией. Параллельно была решена проблема продолжительного времени анализа, характерная для многих электродов, функционирующих в режиме ненулевого тока. В отличие от существующих амперометрических ТК-ИСЭ на основе проводящих полимеров разработанные ТК-ИСЭ более селективны, что обеспечено комплексным подходом: во-первых, за счёт применения фонового электролита, исключающего присутствие мешающих ионов, а также благодаря использованию материала твердого контакта, обладающего собственной селективностью. Калий-селективные сенсоры способны функционировать в присутствии эквимолярных концентраций ионов аммония и избытка мешающих ионов натрия.

Ионоселективная мембрана не только обеспечивает селективность определения, но способствует повышению стабильности сенсоров: ТК-ИСЭ на основе наночастиц БЛ сохраняют 85 % исходной чувствительности в течение 7 суток, а на основе гексацианоферрата никеля – до 94 %, демонстрируя сохранение 95 % чувствительности при непрерывных 5-часовых измерениях в проточно-инжекционном режиме. Разработанные ТК-ИСЭ применимы для определения концентрации ионов натрия и калия в сложных биологических матрицах – сыворотке и поте. Правильность получаемых результатов подтверждена методом капиллярного электрофореза, что открывает перспективы для разработки портативных систем мониторинга электролитов и носимых устройств.

## Глава 7. Электрохимические ДНК/РНК-сенсоры с использованием меток-нанозимов «искусственная пероксидаза»<sup>8</sup>

### 7.1. Сенсорные платформы на основе поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофена)

#### *Модификация электродов азидометил замещенным ПЭДОТ*

Полимеризация тиофенов, включая их производные, такие как этилендиокситиофен, происходит по радикальному механизму, который инициируется окислением мономера. Радикалы, образующиеся под воздействием электрического поля, взаимодействуют как с другими радикалами, так и с нейтральными мономерами, что приводит к образованию димеров и олигомеров. Эти структуры затем осаждаются в виде высокомолекулярных структур ПЭДОТ- $N_3$  на поверхности электрода. Традиционные методы синтеза производных ПЭДОТ требуют использования органических растворителей, а для полимеризации в водной среде применяются поверхностно-активные вещества. Поскольку большинство (био)сенсоров функционирует в водной среде, предпочтительнее проводить модификацию поверхности в аналогичных условиях, что также является более экологичным и экономически выгодным подходом.

Для создания (био)сенсорных платформ электрополимеризацию ЭДОТ- $N_3$  на поверхности электрода выполняли в водной среде. Электрохимический синтез позволяет контролируемо и воспроизводимо проводить синтез только на ограниченной поверхности рабочего электрода. Полимеризацию ЭДОТ- $N_3$  проводили в режиме циклической вольтамперометрии, а из-за невысокой растворимости ЭДОТ- $N_3$  в водной среде использовали разбавленный раствор мономера (0.01 М). Синтез в водной среде также способствует получению более тонких и однородных пленок, по сравнению с синтезом в органических растворителях [177]. Поскольку при электрополимеризации в водной среде мешающим фактором является взаимодействие между молекулами воды и образующимися катион-радикалами, синтез проводили в присутствии хлорной кислоты. Кислая среда препятствует протеканию побочных процессов, благодаря преимущественному образованию  $H_3O^+$  [178].

---

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении учёных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

<sup>8</sup> V.A. Shavokshina, M.A. Komkova, I.O. Aparin, T.S. Zatsepin, A.A. Karyakin, E.A. Andreev, Improved Electroactivity of Redox Probes onto Electropolymerized Azidomethyl-PEDOT: Enabling Click Chemistry for Advanced (Bio)Sensors, ACS Appl Polym Mater 3 (2021) 1518–1524. <https://doi.org/10.1021/ACSAPM.0C01371>.

M.A. Komkova, V.A. Shavokshina, A.A. Zarochintsev, D.M. Melnik, I.O. Aparin, T.S. Zatsepin, A.A. Karyakin, Catalytically synthesized Prussian Blue nanozymes as labels for electrochemical DNA/RNA sensors, Talanta 257 (2023) 124337. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2023.124337>

А также материалы выпускной квалификационной работы автора: Шавокшина В.А. 2021 Электрохимические сенсорные платформы на основе поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофена) для детекции олигонуклеотидов

В [179,180] автором было показано, что предпочтительнее проводить электрополимеризацию ЭДОТ- $N_3$  в диапазоне потенциалов от -0.2 до 1.0 В. Данный верхний граничный потенциал обеспечивает достаточную скорость генерации катион-радикалов, при этом предотвращается переокисление образующегося полимера. Переокисление, происходящее при более высоких потенциалах, приводит к деградации полимера, а также к ухудшению свойств материала – снижению электропроводности [181]. Нижний граничный потенциал не оказывает значительного влияния на скорость электрополимеризации, но необходим для контроля собственной электроактивности полимера в процессе синтеза. ЦВА, полученные в процессе электрополимеризации ЭДОТ- $N_3$ , в заданном диапазоне потенциалов представлены на рисунке 43. Характерное пересечение кривых (нуклеационная петля), образующееся на начальном этапе электрополимеризации, связано с образованием зародышей и гомогенными реакциями между олигомерами и ЭДОТ- $N_3$  (рисунок 43а) [182]. Об успешном образовании проводящего ПЭДОТ- $N_3$  свидетельствует увеличение токов окисления мономера при верхнем граничном потенциале (1.0 В) с каждым циклом.

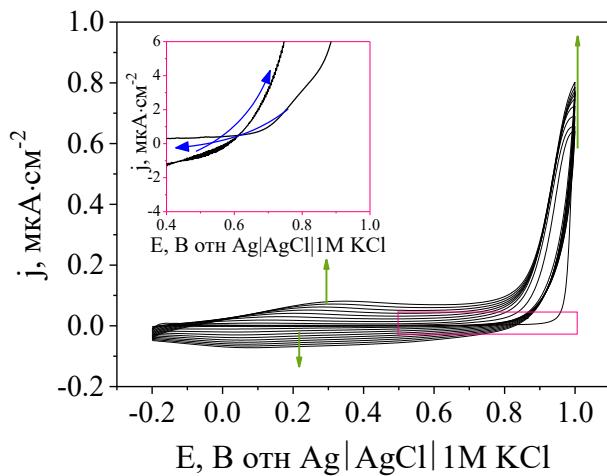


Рисунок 43. Электрохимический синтез ПЭДОТ- $N_3$  (10 мМ ЭДОТ- $N_3$ ; 0.1 М  $HClO_4$ ; 40  $mV \cdot s^{-1}$ ). На вставке показан первый цикл циклической вольтамперограммы (петля нуклеации).

Толщина синтезируемого ПЭДОТ- $N_3$  связана с количеством циклов электрополимеризации. Из рисунка 44в видно, что толщина полимерной плёнки после 10 циклов составляет 130 нм и увеличивается до 300 нм при 30 циклах электрополимеризации (рисунок 44г). Для повышения количества азидных групп, доступных для конъюгации, и однородности поверхности, важно сформировать сплошную плёнку полимера на электроде. Данные сканирующей электронной микроскопии подтверждают, что после 10 циклов электрополимеризации на рабочем электроде образуется сплошная полимерная пленка (рисунок 44б). Кроме того, поскольку после 10 цикла электрополимеризации наблюдается

снижение скорости образования полимера, для создания (био)сенсорных платформ синтез ПЭДОТ- $\text{N}_3$  проводили в течение 10 циклов.

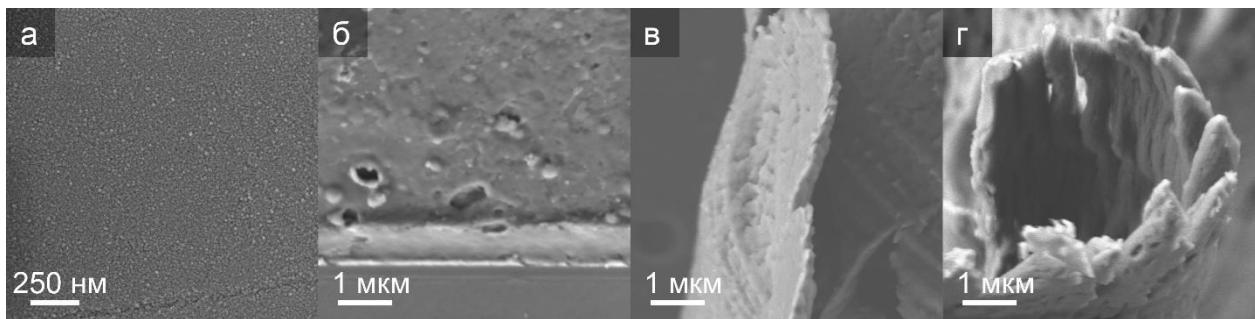


Рисунок 44. Микрофотография немодифицированного электрода (а) и ПЭДОТ- $\text{N}_3$ , синтезированного в результате 10 циклов (б); поперечный срез ПЭДОТ- $\text{N}_3$ , синтезированного после 10 (в) и 30 (г) циклов электрополимеризации.

Для исследования структуры синтезированного материала были зарегистрированы ИК-спектры и спектры комбинационного рассеяния (КР) с поверхности электродов. На спектрах КР (рисунок 45а) наблюдаются полосы, характерные для структуры ПЭДОТ. В области 700 и 740  $\text{cm}^{-1}$  наблюдаются симметричные и асимметричные колебания C-S-C, связанные с тиофеновым фрагментом. Деформационные колебания оксиэтиленового фрагмента проявляются при 990  $\text{cm}^{-1}$ , а валентные колебания связи C-O-C – при 1100  $\text{cm}^{-1}$ . Также наблюдаются C-C колебания между мономерными звенями (1270  $\text{cm}^{-1}$ ), валентные колебания C $_{\beta}$ -C $_{\beta}$  (1370  $\text{cm}^{-1}$ ), а также симметричные C $_{\alpha}$ =C $_{\beta}$  (1440  $\text{cm}^{-1}$ ) и асимметричные C=C (1510  $\text{cm}^{-1}$ ) валентные колебания в ароматической системе тиофена [183]

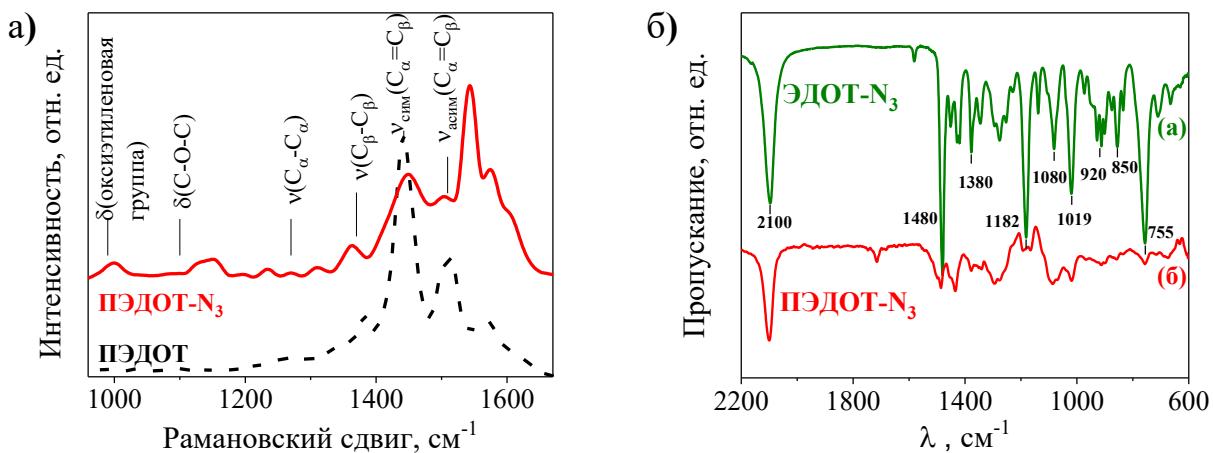


Рисунок 45. а) Спектр комбинационного рассеяния ПЭДОТ- $\text{N}_3$  и ПЭДОТ. б) ИК-спектр мономера ЭДОТ- $\text{N}_3$  и соответствующего полимера ПЭДОТ- $\text{N}_3$ .

На рисунке 45б представлены ИК-спектры мономера ЭДОТ- $\text{N}_3$  и полимера ПЭДОТ- $\text{N}_3$  с поверхности электрода, зарегистрированные в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Основные характеристические полосы: колебания связи C-S (851 и 930  $\text{cm}^{-1}$ ), валентные колебания диоксиэтиленовой группы (1019, 1080 и 1181  $\text{cm}^{-1}$ ), C=C валентные колебания (1380 и 1480  $\text{cm}^{-1}$ ) [184]. У ЭДОТ- $\text{N}_3$  присутствует

заметная полоса при  $755\text{ cm}^{-1}$ , соответствующая плоскостным и внеплоскостным деформационным колебаниям =C-H, для ПЭДОТ-N<sub>3</sub> она уменьшается, что свидетельствует об  $\alpha,\alpha'$ -связывании мономера в процессе полимеризации [185]. Полоса колебаний азидной группы при  $2100\text{ cm}^{-1}$  [186], присутствующая в мономере, сохраняется и у полимера. Следовательно, полученный на электродах полимер действительно является азидометил-замещенным поли(3,4-этилендиокситиофеном).

Таким образом, в результате электрохимического синтеза в водной среде без добавления ПАВ был получен ПЭДОТ-N<sub>3</sub>. Методом НПВО ИК-спектроскопии и КР-спектроскопии подтвердили присутствие в структуре полимера азидных групп, позволяющих провести конъюгацию с ДНК-зондами. Наличие функциональных групп позволяет проводить иммобилизацию не только олигонуклеотидов, но и других биомолекул, посредством биоортогональной азид-алкиновой клик-реакции [106,107].

Можно предположить, что синтезированное полимерное покрытие обеспечит снижение неспецифической адсорбции заряженных биомолекул за счёт двух факторов. Во-первых, формирование ПЭДОТ-N<sub>3</sub> сплошной пленки на поверхности электрода, во-вторых, гидрофобность  $\pi$ -электронной структуры. Благодаря этому модифицированные электроды являются перспективными платформами для электрохимических биосенсоров. Для исследования кинетики переноса заряда на сенсорных платформах использовали разнозаряженные внешнесферные медиаторы – феррицианид калия и хлорид гексаамминрутения.

### **Электроактивность медиаторов на поверхности модифицированных электродов**

При создании ДНК-сенсоров с косвенной регистрацией гибридизации возможно использование диффузионно-подвижных медиаторов. Для характеристики электроактивности медиаторов на поверхности модифицированных электродов регистрировали ЦВА в диапазоне скоростей развертки потенциала от  $0.01\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  до  $1\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  в присутствии медиатора:  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  или  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ .

В присутствии  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  на ЦВА для немодифицированного электрода при рН 7.0 не наблюдается выраженных пиков восстановления или окисления (рисунок 46а). Таким образом, немодифицированные электроды непригодны для разработки (био)сенсоров, функционирующих с  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  в нейтральных рН. На ЦВА сенсорных платформ на основе ПЭДОТ-N<sub>3</sub>, наоборот, можно наблюдать симметричную пару пиков (рисунок 46б). Разность потенциалов между пиками ( $\Delta E_{\text{п}}$ ) составляет  $65 \pm 3\text{ мВ}$  (скорость развертки  $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) и близка к теоретически ожидаемому значению для электрохимически

обратимого процесса (57 мВ при 298 К [187]). Даже при скорости сканирования 1000 мВ·с<sup>-1</sup> на ЦВА сохраняются симметричные пики, а  $\Delta E_{\text{п}}$  не превышает  $102 \pm 7$  мВ.

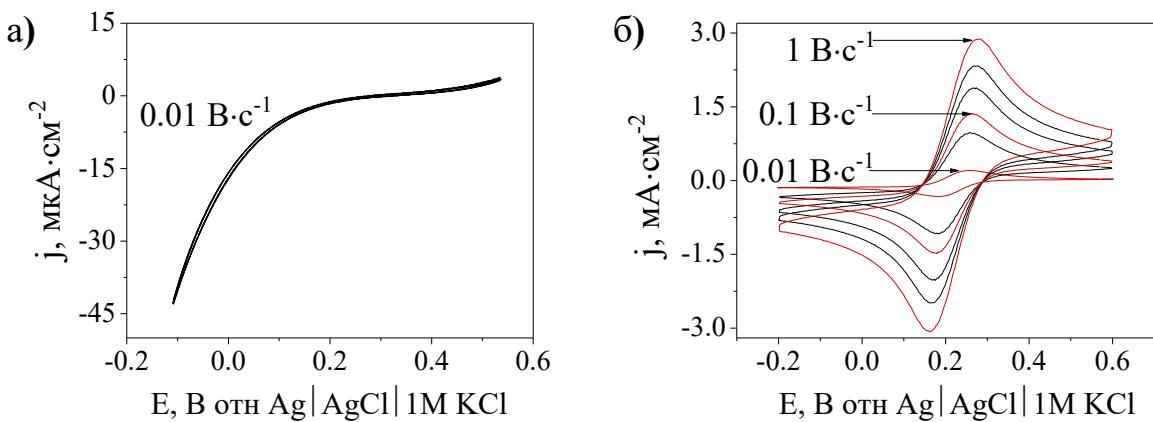


Рисунок 46. ЦВА немодифицированного (а) и модифицированного ПЭДОТ-Н<sub>3</sub> (б) электрода в 5 мМ  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  при увеличении скорости развёртки потенциала (рН 7.0). Рабочий и вспомогательный электрод изготовлен из углеродной пасты ООО НПП Дельта-пасты.

В отличие от  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  на ЦВА  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  на немодифицированном электроде присутствует симметричная пара пиков (рисунок 47). При низких скоростях развёртки ( $10 - 25$  мВ·с<sup>-1</sup>)  $\Delta E_{\text{п}}$  составляет  $74 \pm 4$  мВ, возрастаая до  $134 \pm 10$  мВ при 1000 мВ·с<sup>-1</sup>. В результате модификации поверхности электрода ПЭДОТ-Н<sub>3</sub>  $\Delta E_{\text{п}}$  уменьшается по сравнению с немодифицированным электродом, при 10 мВ·с<sup>-1</sup>  $\Delta E_{\text{п}}$  равна  $68 \pm 3$  мВ и возрастает до  $100 \pm 10$  мВ (1000 мВ·с<sup>-1</sup>). Таким образом, на сенсорных платформах повышается обратимость электрохимического процесса как для отрицательно заряженного медиатора  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , так и для  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ , заряженного положительно.

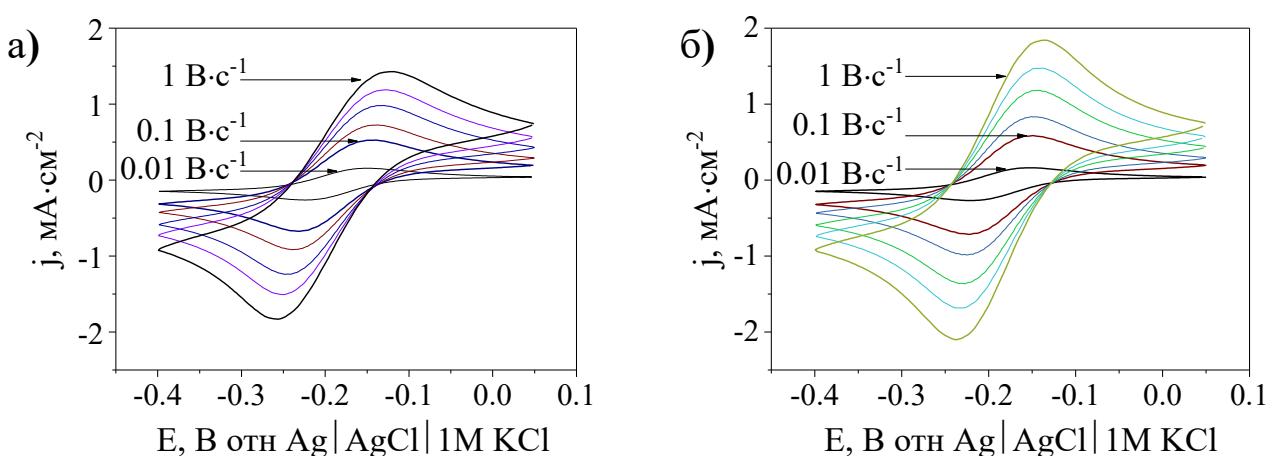


Рисунок 47. ЦВА немодифицированного (а) и модифицированного ПЭДОТ-Н<sub>3</sub> (б) электрода, в 5 мМ  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  при разной скорости развёртки потенциала (рН 7.0). Рабочий и вспомогательный электрод изготовлен из углеродной пасты ООО НПП Дельта-пасты.

С увеличением скорости развертки потенциала возрастают также токи пиков на ЦВА. При этом токи катодного и анодного пиков линейно зависят от квадратного корня скорости развертки потенциала (рисунок 48). Следовательно, процесс является диффузионно-контролируемым, аналогичная зависимость наблюдается и для  $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ .

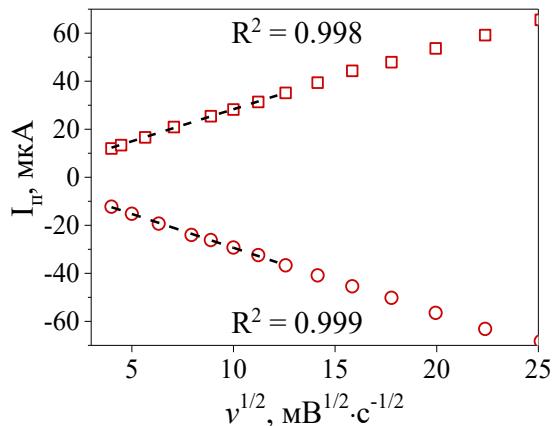


Рисунок 48. Изменение катодного (○) и анодного (□) токов пиков ЦВА в зависимости от скорости развертки потенциала для электрода, модифицированного ПЭДОТ- $N_3$  (5 мМ  $K_3[Fe(CN)_6]$ , pH 7.0).

Эта зависимость подчиняется классическому уравнению Рэндлса-Шевчика:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C^* v^{1/2} \quad (8)$$

где  $n$  – число электронов, участвующих в реакции,  $A$  – площадь электрода ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  – коэффициент диффузии ( $\text{cm}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ ),  $C^*$  - объемная концентрация электроактивного вещества (моль $\cdot$ см $^{-3}$ ),  $v$  – скорость развертки потенциала ( $\text{В} \cdot \text{с}^{-1}$ ).

Данное уравнение может быть использовано для расчёта коэффициента диффузии. Для окисленной формы  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  расчётный коэффициент диффузии, определенный на 8 электродах, модифицированных ПЭДОТ- $N_3$ , составил  $(7.0 \pm 0.6) \times 10^{-6}$  см $^2 \cdot \text{с}^{-1}$ . Данная величина в пределах погрешности совпадает с референсным табличным значением  $D$  ( $7.6 \times 10^{-6}$  см $^2 \cdot \text{с}^{-1}$ ). При линеаризации зависимости тока пика от квадратного корня из скорости развертки, выбирали диапазон низких скоростей сканирования (до 150 мВ $\cdot$ с $^{-1}$ ), где разность потенциалов между пиками на ЦВА сохраняла постоянное значение.

Для численной оценки изменения электроактивности медиаторов на поверхности электродов рассчитывали электрохимическую константу скорости ( $k_3$ ) при разных pH, используя расширенный метод Николсона. После регистрации ЦВА при разных скоростях развертки потенциала в присутствии медиатора находили разность потенциалов между анодным и катодным пиком ( $\Delta E_p$ ). С возрастанием  $v$  увеличивается необратимость электрохимической реакции, что приводит к увеличению  $\Delta E_p$ . Затем для каждой скорости развертки вычисляли безразмерный параметр переноса заряда ( $\Psi$ ), который зависит от  $\Delta E_p$

(уравнения приведены в экспериментальной части). Согласно уравнению (6), вычисляли  $k_3$ , как тангенс угла наклона линейной зависимости  $\Psi$  от скорости развертки (рисунок 49). Такой подход, в отличие от единичных оценок  $\Psi$  при одной скорости развертки, обеспечивает более надежное усреднение  $k_3$  на широком диапазоне скоростей.

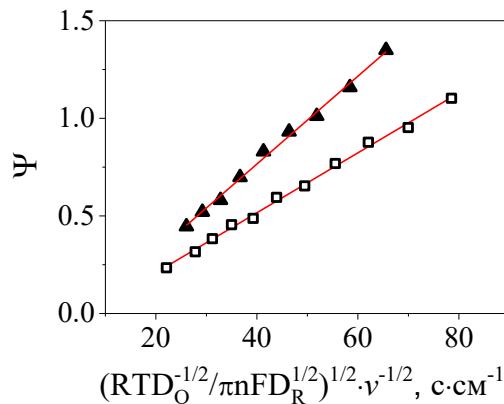


Рисунок 49. Зависимость параметра переноса заряда ( $\Psi$ ) от скорости развертки потенциала для электродов, модифицированных ПЭДОТ- $N_3$ , в присутствии  $K_3[Fe(CN)_6]$  (□) или  $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$  (▲) (рН 7.0). Тангенс угла наклона соответствует электрохимической константе скорости.

В результате исследования зависимости  $k_3$  от рН установлено, что тенденции изменения  $k_3$  различаются для медиаторов разного заряда (рисунок 50). У немодифицированных электродов для отрицательно заряженного  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  величина  $k_3$  снижается с увеличением рН (рисунок 50а), тогда как для положительно заряженного  $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$  отмечается противоположная тенденция (рисунок 50б). Это может объясняться депротонированием функциональных групп (фенольных, карбоксильных) на углеродной поверхности печатного электрода, приводящему к формированию отрицательно заряженной поверхности при повышении рН. Возникающие электростатические эффекты способствуют увеличению  $k_3$  для  $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$  и уменьшению для  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ .

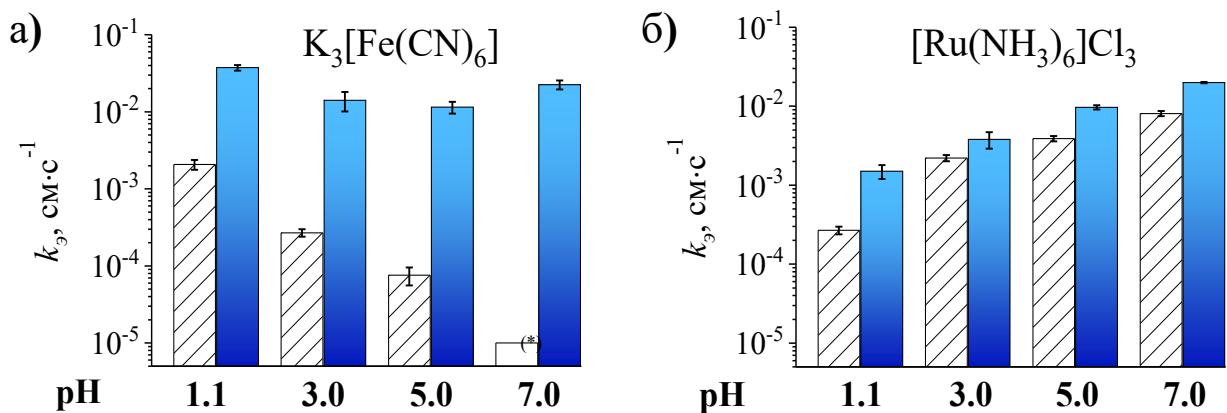


Рисунок 50. Влияние pH на электрохимическую константу скорости для медиаторов а) 5 мМ  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , б) 5 мМ  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  на поверхности немодифицированных электродов (столбцы со штриховкой) и модифицированных ПЭДОТ-Н<sub>3</sub> (закрашенные столбцы); (\*) – теоретическое значение  $k_ө$  для необратимого процесса [165])

Для сенсорных платформ на основе ПЭДОТ-Н<sub>3</sub> константы меньше зависят от pH, что объясняется экранированием полимером поверхностных углеродных групп. Кроме того, во всём рассматриваемом диапазоне pH наблюдается значительное увеличение  $k_ө$ , по сравнению с немодифицированными электродами. Для внешнесферного медиатора  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ , который считается «нечувствительным к поверхности» [188], значение  $k_ө$  возрастает до 5 раз (рисунок 50б). Для  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , который более чувствителен к свойствам поверхности, модификация поверхности ПЭДОТ-Н<sub>3</sub> обеспечивает увеличение  $k_ө$  на 2–3 порядка (рисунок 50а). При pH 5.0  $k_ө$  возрастает более, чем в 100 раз: от  $(8 \pm 2) \times 10^{-5} \text{ см} \cdot \text{s}^{-1}$  до  $(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ см} \cdot \text{s}^{-1}$ . В нейтральной среде расчет  $k_ө$  для немодифицированного электрода невозможен из-за отсутствия на ЦВА выраженных пиков. Если принять, что  $1 \cdot 10^{-5} \text{ см} \cdot \text{s}^{-1}$  – верхний предел константы для необратимой системы [165], то для электрода, модифицированного ПЭДОТ-Н<sub>3</sub>,  $k_ө$  увеличивается более чем на три порядка и составляет  $(2.3 \pm 0.3) \times 10^{-2} \text{ см} \cdot \text{s}^{-1}$ . Результаты, полученные в данной работе для немодифицированного печатного планарного электрода в присутствии  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  согласуются со значением  $k_ө$ , рассчитанной методом Николсона в [163]:  $(2.535 \pm 0.039) \times 10^{-3}$  при pH 3.0.

Таблица 16. Значения электрохимической константы скорости  $k_ө, \times 10^2 \text{ см} \cdot \text{s}^{-1}$  в присутствии 5 мМ  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  на модифицированных электродах.

Модификация электрода	pH			
	1.1	3.0	5.0	7.0
ПЭДОТ	$1.9 \pm 0.4$	$0.9 \pm 0.3$	$1.2 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.3$
ПЭДОТ-Н <sub>3</sub>	$3.7 \pm 0.6$	$1.4 \pm 0.4$	$1.2 \pm 0.2$	$2.3 \pm 0.7$

Для оценки влияния азидометильного фрагмента аналогично регистрировали ЦВА в присутствии  $K_3[Fe(CN)_6]$  для электродов, модифицированных ПЭДОТ, и рассчитывали  $k_s$ . Для электродов, модифицированных незамещенным и азидометил-замещенным ПЭДОТ, можно наблюдать близкие значения  $k_s$ , полученные в присутствии гексацианоферрата калия (таблица 16). Следовательно, повышение электроактивности медиаторов на поверхности модифицированных электродов, в первую очередь связано с экранированием функциональных групп на поверхности электрода.

### **Иммобилизация олигонуклеотидов на сенсорных платформах**

На рисунке 51 представлена схема иммобилизации ДНК-зондов, содержащих алкильный фрагмент, на поверхности электродов, модифицированных ПЭДОТ- $N_3$ . Клик-реакцию проводили в пробирках, куда помещали электроды, модифицированные ПЭДОТ- $N_3$ , алкинированные ДНК-зонды и необходимые реактивы ( $CuSO_4$ , ТГПТА, аскорбиновая кислота). Лиганд ТГПТА образует комплекс с  $Cu(I)$  и необходим для поддержания достаточного количества катализатора. Кроме того, лиганд выполняет защитную функцию для биомолекул, не допуская их окисления, поскольку быстрее вступает в реакцию с радикалами и побочными продуктами реакции [189]. Клик-реакцию проводили в атмосфере аргона, чтобы обеспечить стабильность катализатора.

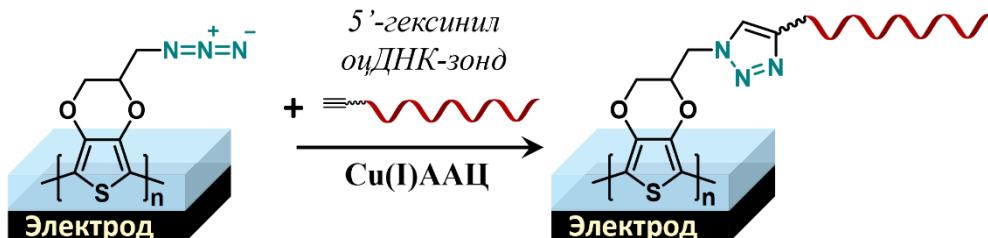


Рисунок 51. Схема иммобилизации ДНК-зондов на сенсорной платформе в результате азид-алкинового циклоприсоединения (ААЦ), катализируемого  $Cu(I)$ .

Одним из косвенных показателей успешной иммобилизации олигонуклеотидов является увеличение разности потенциалов между пиками на ЦВА после клик-реакции. Для сенсоров на основе ПЭДОТ- $N_3$  были зарегистрированы ЦВА в присутствии  $K_3[Fe(CN)_6]$ , в таблице 17 представлена разность потенциалов между пиками, рассчитанная из данных ЦВА. Между собой сравнивали ЦВА для трёх групп электродов, прошедших различные стадии модификации:

- электроды, модифицированные проводящим полимером (ПЭДОТ или ПЭДОТ- $N_3$ );
- модифицированные электроды после клик-реакции с алкин-модифицированными олигонуклеотидами;
- модифицированные электроды, которые прошли все стадии клик-реакции, но при этом олигонуклеотиды не были добавлены в реакционную смесь.

Таблица 17. Разность потенциалов между пиками из ЦВА электродов, модифицированных ПЭДОТ или ПЭДОТ- $N_3$ , прошедшие различные стадии для иммобилизации олигонуклеотидов ( $pH\ 7.0$ ,  $5\ \text{мМ}\ K_3[Fe(CN)_6]$ ,  $40\ \text{мВ}\cdot\text{с}^{-1}$ ).

	$\Delta E_{\text{п}},\ \text{мВ}$	
	ПЭДОТ	ПЭДОТ- $N_3$
<b>Модифицированные электроды без предварительной обработки</b>	$78 \pm 3$	$68 \pm 4$
<b>Модифицированные электроды после клик-реакции с олигонуклеотидами</b>	$85 \pm 15$	$145 \pm 11$
<b>Модифицированные электроды после проведения всех этапов клик-реакции, но без олигонуклеотидов</b>	$75 \pm 11$	$88 \pm 12$

Реагенты и все процедуры при проведении клик-реакции не влияют существенно на  $\Delta E_{\text{п}}$  модифицированных электродов. В то же время для электродов, модифицированных ПЭДОТ- $N_3$ , после клик-реакции с олигонуклеотидами разность потенциалов возросла более, чем в 2 раза и составила  $145 \pm 11\ \text{мВ}$ . Однако для электродов, модифицированных ПЭДОТ, значимого изменения разности потенциалов между пиками в результате модификации не наблюдается. Таким образом, увеличение разности потенциалов между пиками преимущественно связано с ковалентной иммобилизацией олигонуклеотидов, а не с неспецифической адсорбцией.

Несмотря на то, что целью работы является создание электрохимических сенсоров с электрокаталитическими метками, для косвенного контроля успешной иммобилизации ДНК-зондов была выполнена клик-реакция с оцДНК-зондами, содержащими флуоресцентные метки (Су3). После проведения гибридизации оценивали интенсивность флуоресценции раствора, в который был погружен рабочий электрод сенсора в процессе гибридизации. Для оценки влияния неспецифической адсорбции исследовали немодифицированные графитовые электроды (1) и электроды, модифицированные полимерами ПЭДОТ-С1 (2) и ПЭДОТ- $N_3$  (3 и 4 на рисунке 52).



Рисунок 52. Схема модификации электродов олигонуклеотидами, содержащими флуоресцентные метки. 1,2,3 – проверка неспецифической адсорбции, 4 – гибридизация с иммобилизованными ДНК-зондами.

На рисунке 52 представлены схемы модификации электродов, рассматриваемых в данном эксперименте, где 1, 2 и 3 процессы представляют неспецифическую адсорбцию меченых олигонуклеотидов, 4 процесс соответствует специфичной гибридизации с ковалентно-иммобилизованными ДНК-зондами.

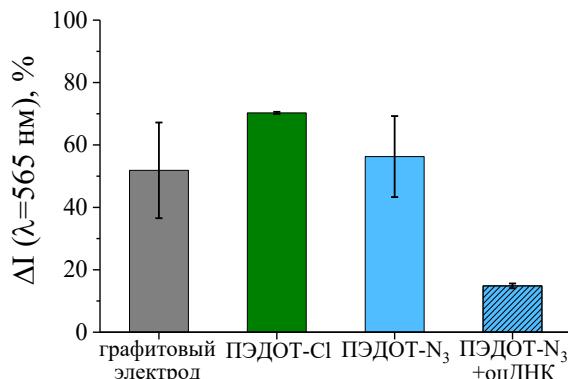


Рисунок 53. Остаточная интенсивность флуоресценции раствора с ДНК-зондами, содержащими флуоресцентные метки, после конъюгации с электродами различной модификации (количество меченых оцДНК в растворе 1.5 нмоль) ( $n = 4$ ,  $P = 0.95$ ).

На рисунке 53 показано, что для электродов, модифицированных ПЭДОТ-Н<sub>3</sub> с иммобилизованными ДНК-зондами, наблюдается наибольшее снижение интенсивности растворов, содержащих комплементарные меченные ДНК. То есть для остальных электродов, которые способны только к неспецифической адсорбции меченых олигонуклеотидов, снижение интенсивности флуоресценции оказалось меньше. Это может свидетельствовать об успешной гибридизации меченых ДНК с иммобилизованными ДНК-зондами.

## 7.2. Наночастицы на основе берлинской лазури и ПЭДОТ-Н<sub>3</sub> как метки для биосенсоров

В медиаторных ДНК-биосенсорах сигналом обычно служит уменьшение токов или повышение сопротивления переноса заряда из-за затруднения доступа медиатора к поверхности электрода. Однако такой сигнал не является селективным и может возникать в результате неспецифических процессов, например адсорбции или дедопирования полимера. С целью повышения селективности и чувствительности для регистрации гибридизации можно использовать метки.

В качестве меток в данной работе предложено использовать наночастицы берлинской лазури (НЧ БЛ). Известно, что каталитически синтезированные НЧ БЛ отличаются высокой каталитической активностью, до 300 раз превосходящей природный фермент пероксидазу из корней хрена, не проявляют оксидазную активность и способны функционировать в физиологических растворах [12]. Благодаря этим особенностям НЧ БЛ

получили название «нанозимы». Кроме того, НЧ БЛ стабильны, просты в получении, не требуют специальных условий хранения и дешевле ферментов.

Для формирования сигнала в ДНК-сенсорах с применением наночастиц в качестве меток возможны различные варианты; поскольку наночастицы могут функционировать как электроактивные маркеры [190], каталитические метки с ферментоподобной активностью (нанозимы) [135], электрокатализитические метки [136]. НЧ БЛ объединяют в себе все эти свойства (рисунок 54). Так, при потенциале меньше 0.15 В, аналогично пленкам БЛ, НЧ БЛ способны восстанавливаться; следовательно, возможна регистрация тока восстановления НЧ БЛ, конъюгированных с олигонуклеотидами, при использовании их в качестве электроактивной метки (рисунок 54а).

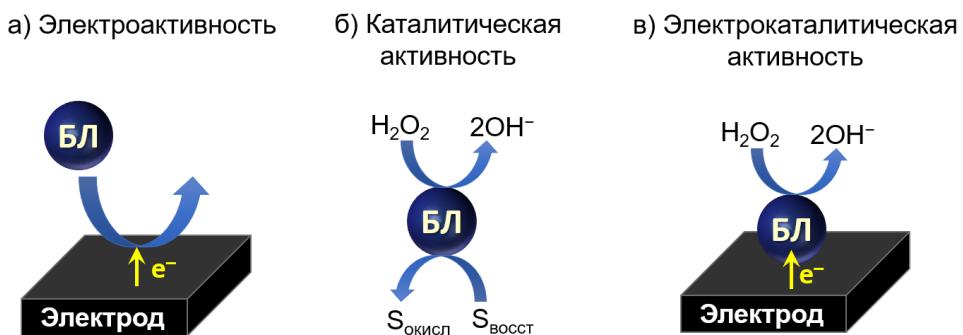


Рисунок 54. Свойства НЧ БЛ, применимые для регистрации сигнала.

Кроме того, НЧ БЛ являются нанозимами, проявляя пероксидазную активность, селективно восстанавливая пероксид водорода [35]. Для реализации данного процесса в ячейку вводят пероксид водорода, а также восстанавливающий субстрат для регенерации НЧ БЛ. Данный подход применим для оптических сенсоров, где в качестве сигнала возможна регистрация изменения окраски восстановленной ( $S_{\text{восст}}$ ) или окисленной формы ( $S_{\text{окисл}}$ ) второго субстрата (рисунок 54б).

Третий возможный режим детектирования основан на электрокатализитических свойствах НЧ БЛ, участвующих в электрокатализитическом восстановлении пероксида водорода. В отличие от каталитического детектирования, здесь нет необходимости в присутствии второго субстрата. Регенерация нанозимов может осуществляться за счёт восстановления на поверхности электрода (рисунок 54в). Для повышения эффективности электрокатализа возможно введение в систему диффузионно-подвижного медиатора с последующей регистрацией катодного тока восстановления медиатора на поверхности электрода.

Для создания ДНК-мишеней, ковалентно связанных с НЧ БЛ, предпочтительна предварительная функционализация наночастиц. Ранее был разработан подход для каталитического синтеза композитных наночастиц в присутствии органического мономера

– замещенного анилина [22]. При его добавлении к эквимолярной смеси солей Fe(III) происходит окислительная полимеризация и образуются композитные наночастицы НЧ БЛ/проводящий полимер. Аналогичный подход был использован для получения композитных наночастиц НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ . При добавлении ЭДОТ- $N_3$  в водно-спиртовую смесь, содержащую  $FeCl_3$  и  $K_3[Fe(CN)_6]$ , происходит каталитический синтез наночастиц и окислительная полимеризация мономера. В результате синтезируются композитные наночастицы НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ , содержащие азидные функциональные группы. По данным СЭМ синтезированные композитные НЧ БЛ имеют сферическую форму и диаметр от 30 до 60 нм (рисунок 19а), в зависимости от концентрации соли в реакционной смеси. В данной работе использовали наночастицы диаметром 35–40 нм (рисунок 19б).

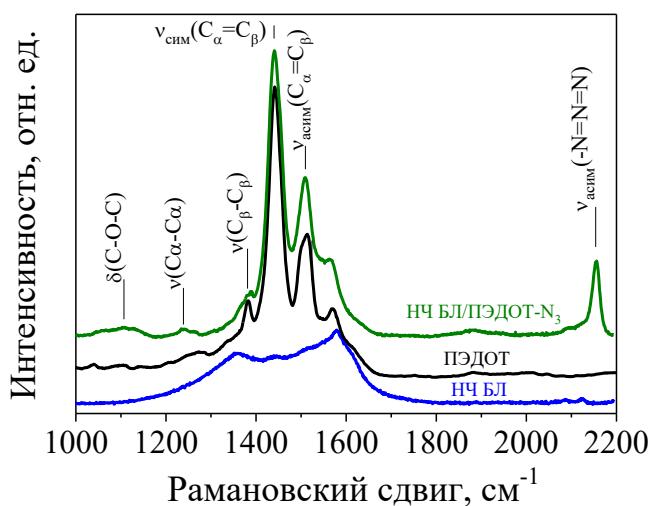


Рисунок 55. Спектр комбинационного рассеяния наночастиц БЛ, ПЭДОТ и композитных наночастиц НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ .

Данные спектроскопии КР (рисунок 55) подтверждают композитную природу синтезированных наночастиц, включая основные полосы ПЭДОТ, а также полосу асимметричных валентных колебаний азидной группы ( $2150 \text{ см}^{-1}$ ).

Для получения меченых ДНК-мишеней искусственно синтезированные олигонуклеотиды, содержащие алкильную функциональную группу, конъюгировали с композитными наночастицами в результате азид-алкинового циклоприсоединения (рисунок 56). Данная клик-реакция селективна и может быть проведена в среде с высоким содержанием солей, необходимых для преодоления кулоновского отталкивания соседних олигонуклеотидов [191]. Клик-реакцию проводили аналогично иммобилизации ДНК-зондов, для этого в реакционную смесь так же добавляли лиганд ТГПТА и аскорбиновую кислоту для восстановления Cu (II).

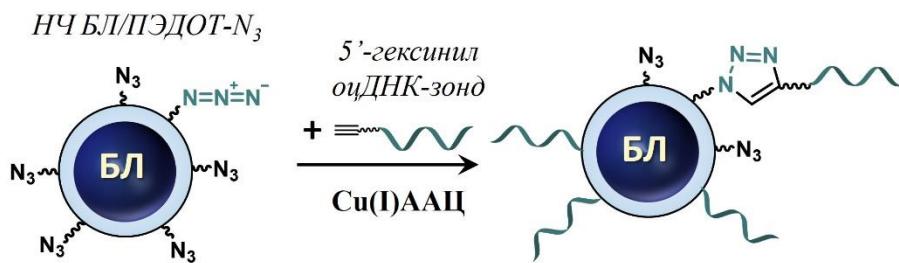


Рисунок 56. Конъюгация композитных наночастиц БЛ (НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ ) с алкин-модифицированными олигонуклеотидами в результате азид-алкинового циклоприсоединения (ААЦ), катализируемого Cu(I).

Для подтверждения конъюгации НЧ БЛ с олигонуклеотидами и оценки её эффективности проводили конъюгацию с олигонуклеотидами, содержащими флуоресцентную метку (Су3). Данные флуоресценции подтверждают, что при увеличении концентрации олигонуклеотидов и НЧ БЛ в реакционной смеси для конъюгации, возрастает соотношение получаемых олигонуклеотидов, связанных с НЧ БЛ. С одной стороны, увеличение количества олигонуклеотидов повышает вероятность гибридизации. Одновременно с этим повышенная плотность олигонуклеотидов на сенсоре может снижать эффективность гибридизации с оцДНК-зондом, а также блокировать поверхность и препятствовать переносу заряда между НЧ БЛ и электродом. В дальнейшем в работе использовались меченные олигонуклеотиды, в которых соотношение олигонуклеотидов к НЧ БЛ составляло ~15–20.

#### *Электроактивность меток на основе наночастиц берлинской лазури*

Формирование композитных структур НЧ БЛ, а также ковалентное связывание с олигонуклеотидами может привести к значительному изменению свойств НЧ БЛ. Для контроля и количественной оценки этих изменений выполнен сравнительный анализ электроактивности на различных стадиях модификации НЧ БЛ. Для этого использовали метод квадратно-волновой вольтамперометрии. Регистрацию квадратно-волновых вольтамперограмм (КВВА) проводили в суспензиях, содержащих различные концентрации НЧ БЛ, НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$  или НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ /оцДНК. КВВА регистрировали как на немодифицированных электродах, так и на сенсорных платформах на основе ПЭДОТ- $N_3$  (рисунок 57).

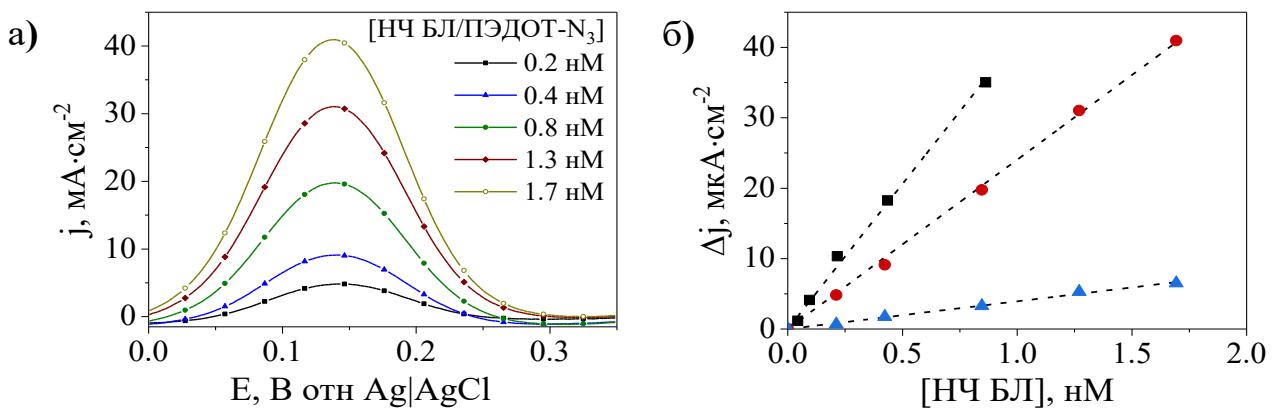


Рисунок 57. Квадратно-волновые вольтамперограммы определения в растворе композитных наночастиц (НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ ) на модифицированных ПЭДОТ- $N_3$  электродах ( $\Delta E_{\text{ампл}} = 0.05$  В,  $\Delta E_{\text{шаг}} = 0.002$  В,  $v = 1$  Гц; pH 7.0). б) Градуировочные зависимости для определения в растворе: НЧ БЛ (■), композитных НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$  (●), НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ /оцДНК (▲).

Как видно из рисунка 57а при потенциале ниже 0.2 В начинается восстановление НЧ БЛ в составе композита. С увеличением концентрации НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$  в растворе возрастает ток пика на КВВА (рисунок 57б). Коэффициенты чувствительности определения наночастиц на разных стадиях модификации представлены в таблице 18.

Таблица 18. Коэффициенты чувствительности ( $A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$ ) определения НЧ БЛ с использованием немодифицированных электродов и сенсорных платформ на основе ПЭДОТ- $N_3$  в режиме квадратно-волной вольтамперометрии.

Определяемый объект	Коэффициент чувствительности ( $s$ ), $A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$	
	Немодифицированный электрод	Электрод, модифицированный ПЭДОТ- $N_3$
НЧ БЛ	$15 \pm 4$	$40 \pm 6$
НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$	$11 \pm 3$	$29 \pm 4$
НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ /оцДНК	$2.0 \pm 0.6$	$5 \pm 1$

Сравнивая полученные  $s$ , можно отметить, что, во-первых, чувствительность определения НЧ БЛ на электродах, модифицированных ПЭДОТ- $N_3$ , возрастает в 2.5 раза, по сравнению с немодифицированными, при этом увеличение чувствительности наблюдается для всех типов наночастиц. Во-вторых, последовательная функционализация наночастиц приводит к снижению коэффициента чувствительности. Такая тенденция может быть связана с экранированием БЛ полимером и олигонуклеотидами. Но в то же время даже после конъюгации с оцДНК сохраняется не менее 20 % исходной электроактивности НЧ БЛ, подтверждая применимость функционализированных НЧ БЛ для сенсорных приложений.

## Электрокаталитическая активность адсорбированных меток на основе наночастиц берлинской лазури

Электрокаталитические метки являются более селективными, чем электроактивные, в связи с этим предпочтительнее использовать НЧ БЛ в качестве электрокаталитических меток; поскольку известно, что немодифицированные НЧ БЛ обладают высокой электрокаталитической активностью, что позволяет использовать их, например, для создания высокоэффективных сенсоров для определения пероксида водорода [22]. В ДНК-сенсорах электрокаталитические метки на основе НЧ БЛ будут располагаться на некотором расстоянии от поверхности электрода. Однако поскольку модификация НЧ БЛ может приводить к снижению электрокаталитической активности, предварительно исследовали электрокаталитическую активность адсорбированных НЧ БЛ. Для исследования электрокаталитической активности композитных НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$  или меченых олигонуклеотидов (НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ /оцДНК) их суспензию адсорбировали на поверхности немодифицированного электрода.

После адсорбции для оценки количества электроактивной БЛ ( $\Gamma_{БЛ}$ ) регистрировали ЦВА модифицированных электродов (рисунок 58). На ЦВА в данном диапазоне потенциалов наблюдается одна пара пиков, при этом даже для НЧ БЛ, конъюгированных с олигонуклеотидами, разность потенциалов между пиками не превышает 35 мВ. С увеличением количества адсорбированных НЧ БЛ площадь ЦВА и токи пиков возрастают.

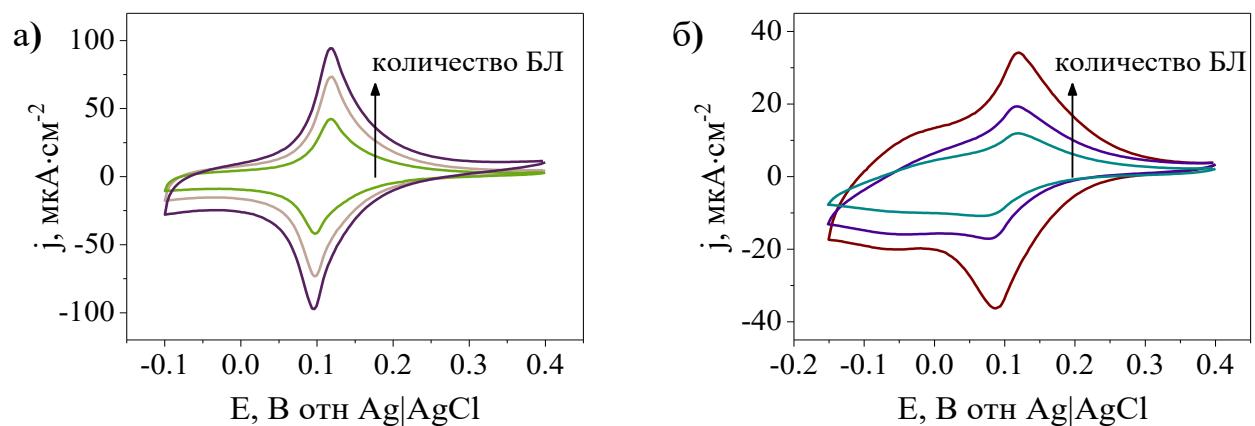


Рисунок 58. ЦВА электродов с разным количеством адсорбированных композитных наночастиц (НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ ) (а) и меченых олигонуклеотидов (НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ /оцДНК) (б) ( $0.1 \text{ M KCl/HCl}$ ,  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Молярную концентрацию БЛ в исходной суспензии определяли спектрофотометрически, что позволило рассчитать суммарную поверхностную концентрацию БЛ на электроде ( $\Gamma_\Sigma$ ). Отношение  $\Gamma_\Sigma$  к  $\Gamma_{БЛ}$  характеризует долю электроактивной БЛ в адсорбированном слое. На рисунке 59 представлена корреляция поверхностной концентрации электроактивных НЧ БЛ и  $\Gamma_\Sigma$  для композитных наночастиц

(рисунок 59а) или меченых олигонуклеотидов (рисунок 59б). Для НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$  тангенс угла наклона равен 0.48 (рисунок 59а), тогда как для НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$ /оцДНК он снижается до 0.02 (рисунок 59б). Линейный характер зависимости свидетельствует о сохранении доли электроактивного материала, независимо от концентрации, что важно для последующей разработки воспроизводимых сенсоров. Не все наночастицы, адсорбированные на электроде, включены в электрокаталитические процессы, поскольку при адсорбции наночастиц на поверхности электрода часть из них может оказаться вдали от поверхности и не участвовать в электрокатализе. Резкое снижение доли электроактивной БЛ в НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$ /оцДНК обусловлено с непроводящей природой биомолекул, препятствующей электронному транспорту.

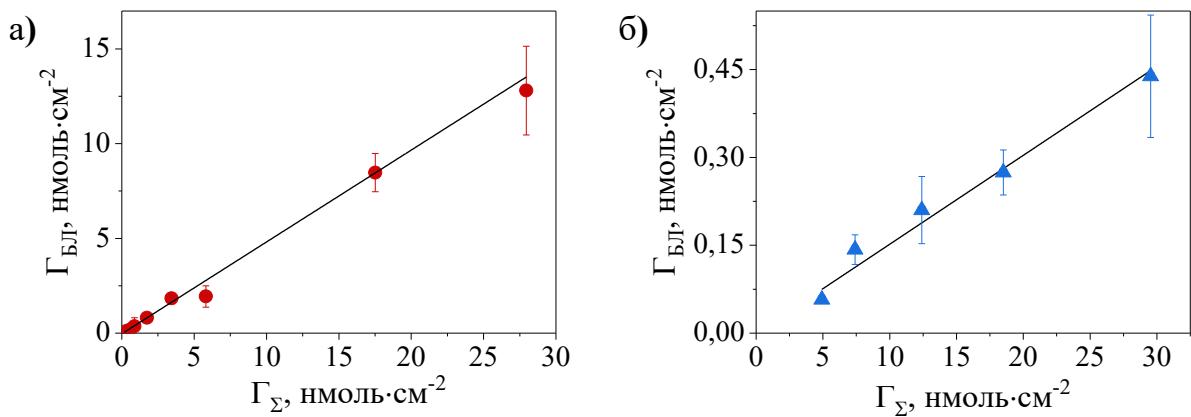


Рисунок 59. Зависимость количества электроактивных НЧ БЛ, определенного методом циклической вольтамперометрии, от общего количества НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$  (а) или НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$ /оцДНК (б), адсорбированных на электроде (определенено спектрофотометрически).

Изменение электрокаталитической активности адсорбированных НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$ /оцДНК исследовали в стационарном режиме при перемешивании. Измерения выполняли при потенциале 0.0 В, при котором БЛ существует в восстановленной форме, которая является электрокатализатором восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В результате добавления в ячейку растворов  $\text{H}_2\text{O}_2$  наблюдается увеличение стационарного катодного тока (рисунок 60а), причём величина амперометрического сигнала линейно зависит от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рисунок 60б).

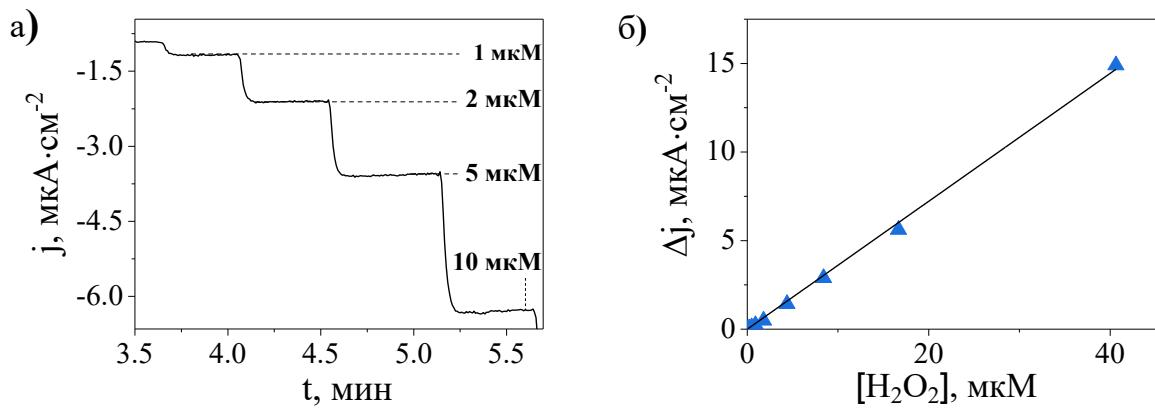


Рисунок 60. Электрокаталитические отклики сенсора с адсорбированными НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$ /оцДНК на добавление  $\text{H}_2\text{O}_2$  в batch-режиме; б) соответствующая градуировочная зависимость определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{pH } 6.0$ ;  $E_{dc} = 0.0$  В).

С увеличением количества электроактивной БЛ на электроде коэффициент чувствительности тоже возрастает, достигая предельного значения (рисунок 61), такая закономерность может быть связана с достижением предельного заполнения поверхности рабочего электрода.

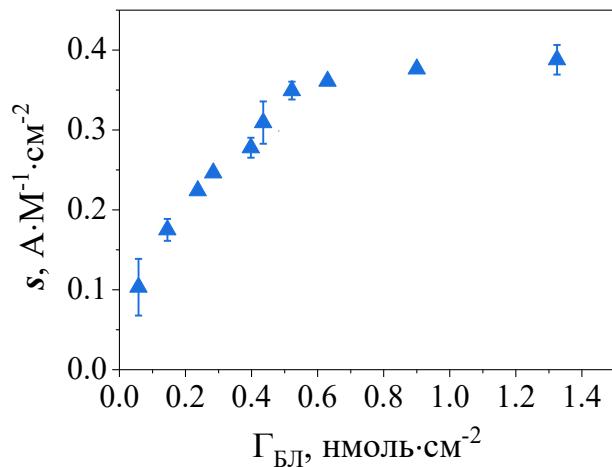


Рисунок 61. Зависимость коэффициента чувствительности определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  от поверхностной концентрации адсорбированных электроактивных НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$ /оцДНК.

Чтобы оценить предельную поверхностную концентрацию НЧ БЛ ( $\Gamma_{\max}$ ), соответствующую заполнению поверхности электрода монослоем НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$ /оцДНК, необходимо учесть размер наночастиц, объемную долю полимера и размер олигонуклеотидов. С учетом того, что НЧ БЛ имеют сферическую форму,  $\Gamma_{\max}$  для НЧ БЛ с диаметром 40 нм составляет  $1.0 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Согласно данным ИСП-АЭС о соотношении железа (содержится только в БЛ) и серы (содержится только в ПЭДОТ- $\text{N}_3$ ) объемная доля полимера у НЧ диаметром 40 нм составляет 16 % [192]. Считая, что последовательность из 25 нуклеотидов имеет длину 8 нм [193],  $\Gamma_{\max}$  для меченых олигонуклеотидов составит  $0.5 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ , что согласуется с экспериментальными данными.

В таблице 19 представлены коэффициенты чувствительности сенсоров с адсорбированными НЧ БЛ после различных модификаций. Сравнивая коэффициенты чувствительности (при  $\Gamma_{БЛ} = 0.5 \text{ нмоль}\cdot\text{см}^{-2}$ ), можно сделать вывод, что после конъюгации композитных НЧ БЛ с оцДНК сохраняется 85 % их электрокатализической активности.

Таблица 19. Коэффициент чувствительности ( $s$ ) сенсоров с адсорбированными НЧ БЛ различной модификации, определенные в реакции электрокатализического восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\Gamma_{БЛ} = 0.5 \text{ нмоль}\cdot\text{см}^{-2}$ ).

Модификатор	НЧ БЛ	НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$	НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$ /оцДНК
$s, \text{A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-2}$	0.5 [22]	$0.45\pm0.03$	$0.38\pm0.03$

Следовательно, в составе конъюгатов наночастицы БЛ обладают высокой электрокатализической активностью и могут быть использованы в качестве электрокатализических меток в ДНК-сенсорах.

### 7.3. Детектирование меченых олигонуклеотидов

Для оценки применимости разработанных сенсорных платформ и электрокатализических меток на основе нанозимов для определения ДНК использовали модельную систему, представленную на рисунке 62. Для этого на электродах, модифицированных ПЭДОТ- $\text{N}_3$ , иммобилизовали ДНК-зонд, полученный в результате обратной транскрипции участка некодирующей РНК HULC (Highly Upregulated in Liver Cancer). Компллементарные участкам ДНК-зонда ДНК-мишени с алкильными фрагментами конъюгирували в результате клик-реакции с НЧ БЛ/ПЭДОТ- $\text{N}_3$ . Длина ДНК-мишени варьировалась от 20 до 25 нуклеотидов (н.о.). В таблице 20 показаны нуклеотидные последовательности ДНК-мишени, а также обозначено расположение меток-нанозимов.

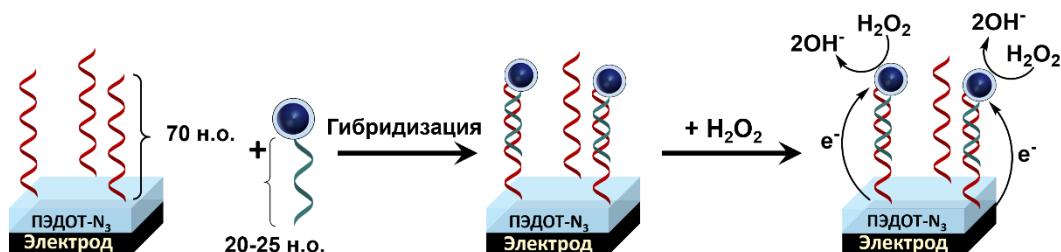


Рисунок 62. Схема работы электрохимического ДНК-сенсора при прямом электрокаталиze.

Предложенная схема регистрации сигнала заключается в гибридизации иммобилизованных ДНК-зондов с меченными ДНК-мишениями с последующей регистрацией электрокатализического тока восстановления, возникающего при добавлении в систему  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

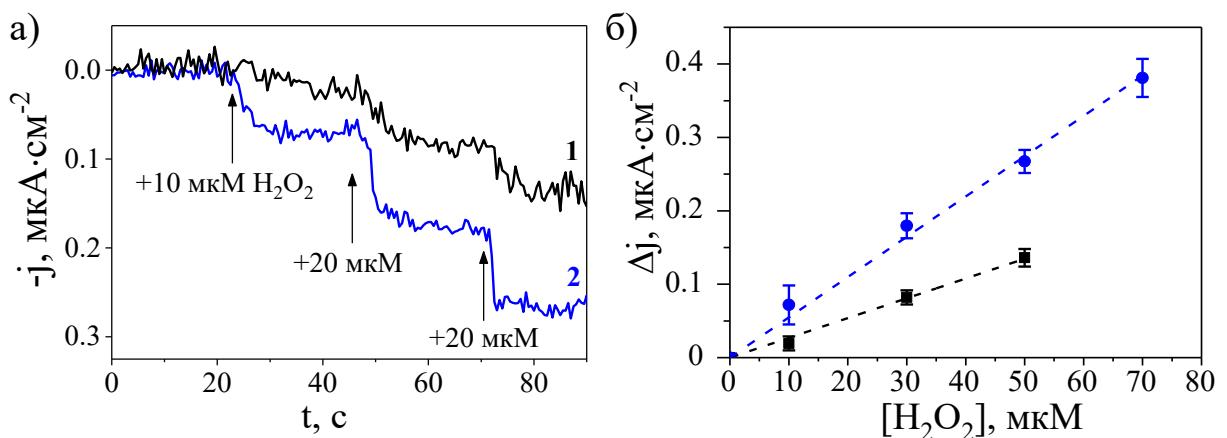


Рисунок 63. а) Пример сигналов ДНК-сенсоров после гибридизации в растворах с концентрацией ДНК-мишеней  $1 \text{ нМ}$  (1) и  $10 \text{ нМ}$  (2) на увеличение концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ . б) Градуировочные зависимости электрокаталитического тока восстановления НЧ БЛ в ДНК-сенсорах от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ячейке.

Регистрацию сигнала в ДНК-сенсорах проводили при  $0.0 \text{ В}$  в ячейке при постоянном перемешивании. В результате добавления в ячейку  $\text{H}_2\text{O}_2$  наблюдается электрокаталитический отклик, генерируемый метками-нанозимами разной концентрации (рисунок 63а). Как было установлено в п. 7.2 одна электрокаталитическая метка конъюгирована с несколькими ДНК-мишениями. Однако несмотря на это, связывание каждой НЧ БЛ эквивалентно одному акту гибридизации, соответственно концентрацию меченых НЧ БЛ в анализируемом растворе можно считать целевой концентрацией ДНК-мишеней.

С целью повышения надежности измерений для каждого ДНК-сенсора определяли коэффициент чувствительности, как тангенс угла наклона (рисунок 63б). Для построения градуировочной зависимости от концентрации ДНК-мишеней рассчитывали среднее значение коэффициента чувствительности не менее трёх ДНК-сенсоров. Коэффициент чувствительности сенсоров в реакции электрокаталитического восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$  возрастает с увеличением концентрации меченых ДНК-мишеней в растворе (рисунок 64б).

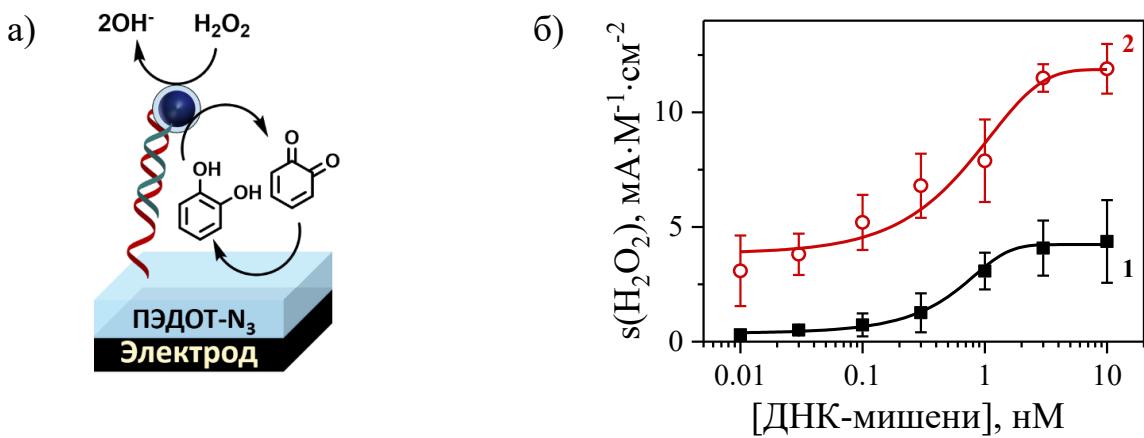


Рисунок 64. а) Схема медиаторного электрокатализа в присутствии пирокатехина; б) Градуировочная зависимость чувствительности ДНК-сенсоров от концентрации ДНК-мишеней при прямом ■ (1) и медиаторном ○ (2) электрокатализе.

Для аппроксимации градуировочной зависимости использовали четырёхпараметрическое уравнение, которое также используется для аппроксимации в иммуноферментном анализе [194,195]:

$$S = S_{\max} + \frac{S_{\min} - S_{\max}}{(1 + (c_{\text{ДНК-мишень}}/K_d)^p)} \quad (9)$$

, где  $S_{\max}$  – коэффициент чувствительности сенсора при бесконечно большой концентрации ДНК-мишеней,  $S_{\min}$  – коэффициент чувствительности сенсора без меченых ДНК-мишеней,  $p$  – коэффициент Хилла,  $c_{\text{ДНК-мишень}}$  – концентрация ДНК-мишеней,  $K_d$  – константа диссоциации комплекса лиганд-рецептор.

S-образная форма градуировочного графика в координатах Бьеरрума указывает на один тип участков связывания. Расчетная константа диссоциации комплекса лиганд-рецептор ( $K_d$ ) составляет  $(0.75 \pm 0.02)$  нМ. Коэффициент  $p$  равен 0.91, следовательно ДНК-зонды на поверхности электрода практически не взаимодействуют друг с другом и связывание с ДНК-мишениями происходит независимо. Для перехода к анализу реальных объектов тестировали разработанные ДНК-сенсоры при проведении гибридизации в разбавленном растворе сыворотки крови человека. Расчетная  $K_d$  при гибридизации в сыворотке крови составляет  $(0.77 \pm 0.04)$  нМ, что совпадает с  $K_d$ , полученной при гибридизации в фосфатном буферном растворе ( $(0.75 \pm 0.02)$  нМ), соответственно ДОК сенсора сохраняется.

Разработанный ДНК-сенсор позволяет электрохимически обнаруживать меченные ДНК-мишени в широком диапазоне концентраций: от 0.03 до 3 нМ. Следовательно ДНК-зонд, иммобилизованный на электроде достаточно гибкий, чтобы обеспечить необходимое расстояние между электрокаталитической меткой и поверхностью электрода.

Такой способ регистрации сигнала более предпочтителен, поскольку при неспецифической адсорбции и блокировке поверхности электрода сигнал, наоборот, будет уменьшаться.

При прямом электрокатализе происходит туннелирование электрона к НЧ БЛ от поверхности электрода, для реализации данного процесса необходимо, чтобы расстояние между ними не превышало 10 Å. Следовательно, не все электрокаталитические метки участвуют в формировании сигнала. Для повышения эффективности электрокатализа возможно регистрировать сигнал в присутствии подвижного медиатора, который окисляется наночастицами БЛ, а затем восстанавливается на поверхности электрода (рисунок 64а). В качестве медиатора использовали пирокатехин, который является подходящим субстратом для каталитической реакции с НЧ БЛ [196]. В присутствии диффузионно-подвижного медиатора в процесс будут вовлечены наночастицы, которые находятся на значительном расстоянии от поверхности электрода, превышающем возможную дистанцию для туннелирования электрона. Для оценки эффективности электрокатализа можно сравнить коэффициенты чувствительности сенсора в присутствии медиатора и без него. Как видно из рисунка 64б, при медиаторном электрокатализе в присутствии пирокатехина ток восстановления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> увеличивает всего в 3–8 раз, что свидетельствует об эффективности прямого электрокатализа. Чтобы убедиться, что незначительное увеличение не связано с недостаточной концентрацией медиатора в растворе, исследовали зависимость токового отклика от концентрации пирокатехина (рисунок 65).

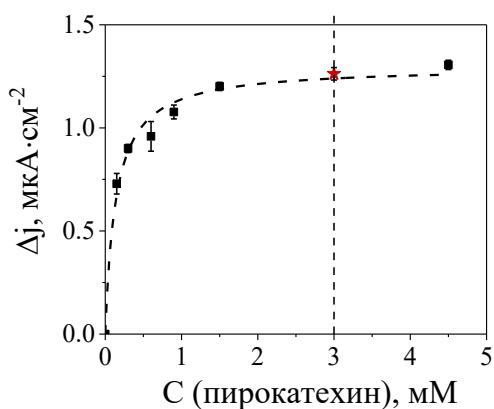


Рисунок 65. Зависимость стационарного тока от концентрации пирокатехина в растворе для ДНК-сенсора с 5 нМ меченых ДНК-мишеней. (0.05 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.0 В).

Так же в режиме хроноамперометрии при постоянном перемешивании регистрировали изменение электрокаталитических токов при фиксированной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и последовательном увеличении концентрации пирокатехина. Полученная зависимость катодного тока от концентрации медиатора представляет кривую с насыщением. При концентрации пирокатехина больше 0.75 мМ ток практически не

изменяется. Следовательно, регистрация откликов ДНК-сенсоров в присутствии диффузионно-подвижного медиатора выполнялась в избытке медиатора. Все последующие измерения на ДНК-сенсорах из-за высокой эффективности прямого электрокатализа проводили без подвижного медиатора в системе.

При выполнении всех экспериментов с ДНК-сенсорами для контроля неспецифической адсорбции олигонуклеотидов, дополнительно все процедуры гибридизации проводили с электродами трёх типов, на которых не было ковалентно иммобилизованных ДНК-зондов (рисунок 66):

- I) немодифицированными электродами;
- II) немодифицированными электродами с адсорбированными ДНК-зондами;
- III) электродами, модифицированными ПЭДОТ- $N_3$ , без ДНК-зондов



Рисунок 66. Электроды, которые были использованы для оценки неспецифических взаимодействий с меченными олигонуклеотидами: I) немодифицированные электроды, II) немодифицированные электроды с адсорбированными ДНК-зондами, III) электроды, модифицированные ПЭДОТ- $N_3$ , без ДНК-зондов.

После гибридизации с 0.1 нМ ДНК-мишеней чувствительность ДНК-сенсоров более чем в 20 раз превысила максимальную чувствительность немодифицированных электродов с адсорбированными ДНК-зондами ( $0.14 \pm 0.02 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) (рисунок 66-II). А также более чем в 50 раз превысила чувствительность электродов, модифицированных ПЭДОТ- $N_3$  без ДНК-зондов ( $0.05 \pm 0.02 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) (рисунок 66-III). Следовательно, модификация поверхности электродов ПЭДОТ- $N_3$  снижает неспецифическую адсорбцию олигонуклеотидов на поверхности электрода, поскольку гидрофобная π-электронная система полимера ПЭДОТ- $N_3$  отталкивает отрицательно заряженные оцДНК.

#### *Зависимость аналитических характеристик ДНК-сенсоров от условий гибридизации*

Для оценки влияния расположения электрокаталитической метки относительно ДНК-зонда и поверхности электрода, были исследованы меченные олигонуклеотиды, комплементарные различным участкам ДНК-зонда (таблица 20). После гибридизации ДНК-мишеней, содержащих 0.1 нМ НЧ БЛ, с ДНК-зондами регистрировали прямой электрокаталитический ток восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Таблица 20. Синтезированные ДНК-зонды и ДНК-мишени. Синий круг изображает относительное положение НЧ БЛ.

Обозначение условного расстояния между меткой и электродом	Последовательность олигонуклеотидов синтезированных оцДНК-зондов и оцДНК-мишеней
5N	5'- Алкин- <b>TTTTTTTTAAGAATGGAATCATTCAATTAAATTAGTTTGTAACTTAGTTCAAGTTTGA</b> -3' 3'-Алкин- <b>AATTCTTAACCTGTAGTAAAA</b> -5' 
25N	5'- Алкин- <b>TTTTTTTTAAGAATGGAATCATTCAATTAAATTAGTTTGTAACTTAGTTCAAGTTTGA</b> -3' 3'- <b>AATTCTTAACCTGTAGTAAAA</b> -5'-Алкин 
50N	5'- Алкин- <b>TTTTTTTTAAGAATGGAATCATTCAATTAAATTAGTTTGTAACTTAGTTCAAGTTTGA</b> -3' 3'- <b>TAAAGTAAATTAATCAAAACAA</b> -5'-Алкин 
50N (конечная)	5'- Алкин- <b>TTTTTTTTAAGAATGGAATCATTCAATTAAATTAGTTTGTAACTTAGTTCAAGTTTGA</b> -3' 3'-Алкин- <b>TTAAGATCAAAGTCAAAAC</b> -5'-Алкин 
70N	5'- Алкин- <b>TTTTTTTTAAGAATGGAATCATTCAATTAAATTAGTTTGTAACTTAGTTCAAGTTTGA</b> -3' 3'- <b>TTAAGATCAAAGTCAAAAC</b> -5'-Алкин 

В таблице 21 представлены коэффициенты чувствительности соответствующих сенсоров. Наибольший коэффициент чувствительности ( $0.41 \pm 0.05 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) был зарегистрирован для сенсоров с ДНК-мишенью (50 N), которая комплементарна центральному участку ДНК-зонда (таблица 20). Предположительно, из-за отсутствия стерических ограничений при такой конфигурации обеспечивается оптимальное расстояние между нанозимами и поверхностью электрода для эффективного переноса заряда. Данную последовательность олигонуклеотидов (50 N) использовали в дальнейших экспериментах.

Таблица 21. Коэффициент чувствительности к  $\text{H}_2\text{O}_2$  в результате электроокаталитического восстановления на электроде, модифицированном ПЭДОТ- $\text{N}_3$  с иммобилизованными олигонуклеотидами, после гибридизации с 0.1 нМ нанозимов, конъюгированных с различными ДНК-мишениями.

ДНК-мишень	5N	25N	50N	50N (конечная)	75N
$s(\text{H}_2\text{O}_2)$ , $\text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	$0.11 \pm 0.05$	$0.19 \pm 0.08$	$0.41 \pm 0.05$	$0.27 \pm 0.09$	$0.22 \pm 0.07$

Состав буферного раствора для гибридизации влияет на её эффективность. В данной работе использованы четыре различных раствора:

- раствор Денгарда (полисахароза 400, 1% поливинилпирролидон, 1% бычий сывороточный альбумин)
- 0.75 M NaCl, 75 mM цитрат натрия (pH 6.0)
- 0.01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 6.0)

г) 0.1 М KCl, 0.05 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 6.0)

Раствор Денгарда содержит компоненты, позволяющие блокировать поверхность электрода для неспецифической адсорбции (бычий сывороточный альбумин), и компоненты, ускоряющие процесс гибридизации. Натрий-цитратный раствор широко используется для гибридизации оцДНК, а также в блоттинге, где в зависимости от материала мембранны обычно варьируют концентрацию буфера для поддержания оптимальной ионной силы. Поскольку НЧ БЛ нестабильны в нейтральных и щелочных растворах из-за взаимодействия Fe<sup>3+</sup> с гидроксид-ионами [19], использовали натрий-цитратный раствор с рН 6.0, который не обладает буферной емкостью. Фосфатный буферный раствор разной концентрации был выбран для оценки влияния ионной силы на характеристики сенсоров. Ионная сила буферного раствора влияет на величину электростатических взаимодействий олигонуклеотидов, а следовательно, и на эффективность гибридизации. При низкой ионной силе, когда электролит не обеспечивает достаточного экранирования заряда между иммобилизованными ДНК-зондами и ДНК-мишениями в растворе, гибридизация может не происходить. Однако высокая ионная сила (~1 М) может приводить к снижению эффективности гибридизации из-за образования ассоциатов ДНК-зондов (стекирование оснований и водородных связей), когда электростатическое отталкивание ослаблено [197].

Таблица 22. Коэффициенты чувствительности ДНК-сенсоров после гибридизации в различных растворах с 5 нМ нанозимов, коньюгируемых с ДНК-мишениями (n=3, P=0.95), время гибридизации – 120 минут.

Раствор для гибридизации	Денгарда	0.75 М NaCl, 75 мМ Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	0.01 М KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 М KCl, 0.05 М KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
s(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), mA·M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup>	8.8±1.5	13.5±2.5	84±11	17.6±3.7

При сравнении коэффициентов чувствительности сенсоров, полученных в результате гибридизации в растворах различного состава (таблица 22), видно, что в разбавленном фосфатном растворе чувствительность максимальна. Однако поскольку коэффициент чувствительности электродов типа I, II и III (рисунок 66), которые не содержат ковалентно присоединенных ДНК-зондов, в данных условиях оказались выше, чем для ДНК-сенсоров, это увеличение чувствительности связано с неспецифической адсорбцией меченых нанозимов. Для остальных растворов коэффициент чувствительности, полученный на сенсорных платформах, превышал характеристики на электродах типа I, II, III, где возможна только неспецифическая адсорбция меченых олигонуклеотидов.

Из-за того, что в растворе Денгарда присутствуют компоненты, блокирующие поверхность электрода, после гибридизации в растворе Денгарда у ДНК-сенсоров в 15 раз

снизилось соотношение сигнал/фон. Кроме того, время анализа из-за дрейфа базовой линии и долгого выхода тока на стационарное значение увеличилось и составило не менее 60 минут, в отличие от стандартных 3–5 минут для остальных растворов. После гибридизации в натрий-цитратном растворе и концентрированном фосфатном получены близкие коэффициенты чувствительности и достаточная селективность. Однако поскольку при pH 6.0 натрий-цитратный раствор не обладает достаточной буферной емкостью, для дальнейших экспериментов был использован 50 мМ фосфатный буферный раствор.

Для оценки селективности сенсоров проводили гибридизацию с олигонуклеотидами 5ММ, содержащими 5 нуклеотидных замен (АААЦА-АААЦТ-ЦЦЦГГ-ААААТ-ГАААТ). Расчетные температуры плавления целевого дуплекса и дуплекса, содержащего олигонуклеотидные замены, равны 71.7°C и 68.5°C соответственно. После гибридизации выдерживали модифицированные электроды в горячем буферном растворе при температуре 40, 70 и 75°C. В таблице 23 представлены коэффициенты чувствительности сенсоров после гибридизации с разными ДНК-мишениями и отмычки в буферном растворе при разной температуре.

Можно отметить, что чувствительность сенсора к целевым ДНК-мишениям выше, однако с увеличением температуры наблюдается снижение чувствительности сенсора, а при температуре 75°C уже не наблюдалось электрокатализитических откликов. В связи с этим не рекомендуется выдерживать ДНК-сенсоры, содержащие электрокатализитические метки, в горячих растворах.

Таблица 23. Коэффициенты чувствительности ДНК-сенсоров после гибридизации с целевыми ДНК-мишениями и с ДНК-мишениями, содержащими 5 нуклеотидных замен, в режиме хроноамперометрии ([ДНК-мишеней] = 3.5 нМ) (n=4, P=0.95).

	<b>s, mA·M<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup></b>		
	<b>25°C</b>	<b>40°C</b>	<b>70°C</b>
<b>Целевые ДНК-мишени</b>	4.7±0.6	2.5±0.3	1.2±0.4
<b>ДНК-мишени 5ММ</b>	4.5±0.3	2.0±0.5	0.2±0.2

Дополнительно селективность сенсора исследовали в присутствии метиленового синего (МС), который тоже может выступать в качестве метки, свидетельствующей о протекании гибридизации. Известно, что МС способен к трем видам взаимодействия с ДНК: (1) электростатическое взаимодействие положительно заряженного МС с отрицательно заряженным фосфатом в ДНК; (2) связывание с гуаниновым основанием, (3) интеркаляция МС в дДНК [198]. Поскольку ДНК-зонд содержит незначительное количество гуанина, а преимущественно состоит из аденина и тимина, разрушение дДНК будет приводить к снижению сигнала в присутствии МС. Для этого регистрировали

квадратно-волновые вольтамперограммы, а ток пика окисления МС оценивался как показатель разрушения дуплекса.

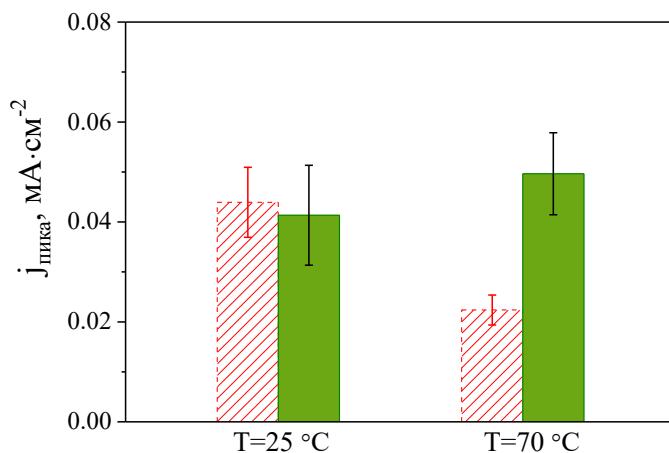


Рисунок 67. Ток пика квадратно-волновых вольтамперограмм, зарегистрированных в 5 мкМ метиленового синего ( $E_{\text{амп}} = 25$  мВ,  $E_{\text{шаг}} = 1$  мВ,  $f = 15$  Гц) после гибридизации с 3 нМ комплементарных оцДНК (закрашенные столбцы) и оцДНК с 5 миссматчами (заштрихованные столбцы) при разной температуре.

После гибридизации при комнатной температуре отклики сенсора с целевыми ДНК-мишениями и ДНК-мишени 5ММ статистически не различаются (рисунок 67). Отклик на олигонуклеотиды, содержащие 5 нуклеотидных замен, после выдерживания в горячем буферном растворе (70°C), снижался в 2.5 раза. В то время как отклик на полностью комплементарные нуклеотиды оставался неизменным.

### Конкурентный анализ

Рассмотренные ранее подходы не позволяют детектировать оцДНК без электрокаталитических меток. Разработанные ДНК-сенсоры могут функционировать в сыворотке крови человека, поэтому следующей задачей для оценки применимости сенсоров к анализу реальных объектов было исследование возможности определения участков ДНК, не содержащих меток. Для этого предложено использовать конкурентный анализ. На рисунке 68 показана схема конкурентного анализа, реализованного в ДНК-сенсорах. Для этого гибридизацию проводили со смесью меченых и немеченых олигонуклеотидов. Зарегистрированные электрокаталитические отклики сравнивали с результатами, полученными в присутствии только меченых олигонуклеотидов.

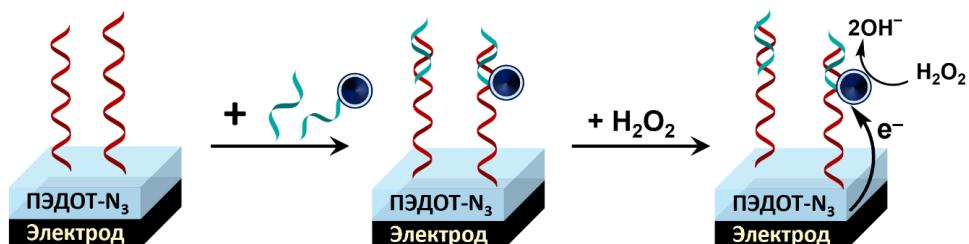


Рисунок 68. Схема конкурентного анализа ДНК-сенсора.

При аппроксимации градиуровочной зависимости, полученной в присутствии немеченых ДНК-мишеней, коэффициент Хилла совпал со значением, определенным для системы с меченными ДНК-мишениями, поскольку условия эксперимента и тип связывания в данном случае не менялись. Присутствие конкурирующих олигонуклеотидов без меток приводит к снижению токового отклика сенсора и соответственно к снижению чувствительности на градиуровочной зависимости (рисунок 69).

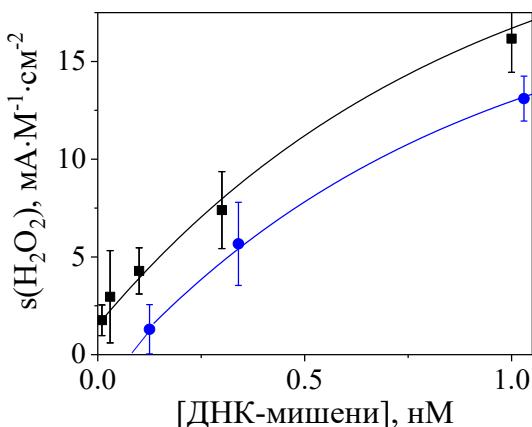


Рисунок 69. Градиуровочные зависимости ДНК-сенсоров с меченными олигонуклеотидами (■) и в присутствии 0.2 нМ олигонуклеотидов без меток (●).

При введении в систему 0.2 нМ ДНК-мишеней без меток по смещению градиуровочной зависимости обнаружено  $0.17 \pm 0.09$  нМ немеченых ДНК, относительное отклонение между введенной и найденной величиной составило 15 %. Следовательно, данные ДНК-сенсоры способны функционировать в режиме конкурентного анализа.

#### 7.4. Электрохимический ДНК/РНК-сенсор. Сэндвич-анализ в сыворотке крови

Другим вариантом использования ДНК-сенсора для анализа реальных объектов – реализация стратегии «сэндвич»-анализа. В этом подходе целевая молекула ДНК или РНК последовательно связывается с двумя зондами: иммобилизованным на поверхности электрода и зондом, содержащим электрокатализическую метку (рисунок 70).

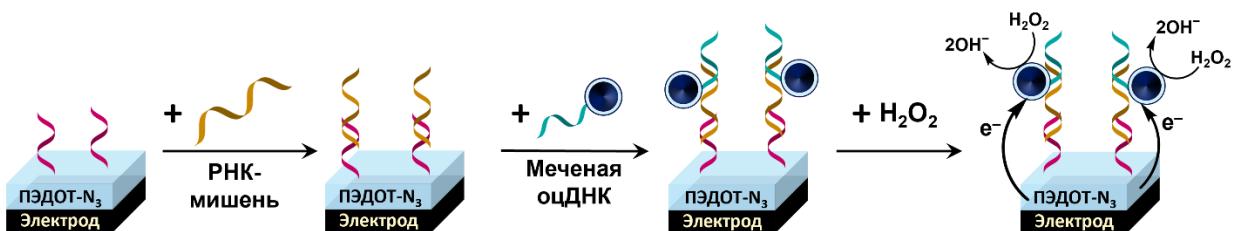


Рисунок 70. Схема «сэндвич»-анализа ДНК/РНК-сенсора.

В качестве целевой молекулы был выбран участок РНК HULC (63 основания), ДНК-зонд был иммобилизован на поверхности электрода, модифицированного ПЭДОТ- $N_3$ . Длина всех олигонуклеотидов была подобрана так, чтобы сохранить расстояние

электрокаталитической метки до электрода, реализованное в ДНК-сенсорах, описанных ранее.

Гибридизацию с РНК-мишениями выполняли в сыворотке крови человека, разбавленной в 10 раз. Присутствие рибонуклеаз в сыворотке крови препятствует продолжительной инкубации РНК, ранее было показано, что короткие линейные участки РНК не рекомендуется держать в сыворотке крови больше 2 часов, в то время как для длинных нкРНК период полураспада составляет более 16 часов [199]. Для сочетания экспрессности анализа и чувствительности сенсора инкубацию с РНК-мишениями выполняли в течение 4 часов. В качестве сигнала сенсора так же рассматривали электрокаталитический ток восстановления НЧ БЛ после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Градуировочная зависимость ДНК/РНК-сенсоров от концентрации РНК-мишеней представлена на рисунке 71. Константа диссоциации, по сравнению с ДНК-сенсорами, возрастает и равна  $28 \pm 2$  нМ. Диапазон определяемых концентраций сенсора составляет от 0.2 до 100 нМ, что включает ожидаемые уровни биомаркера в сыворотке крови человека (1 – 10 нМ [140]).

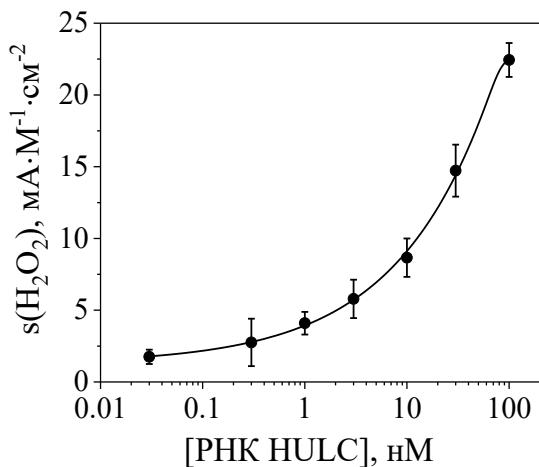


Рисунок 71. Градуировочная зависимость определения целевой РНК (участок РНК HULC) методом «сэндвич»-анализа при проведении гибридизации в сыворотке крови ([ДНК-мишеней] = 30 нМ).

Проверка правильности разработанного ДНК/РНК-сенсора была выполнена способом «введено-найдено». При добавлении 2 нМ участка РНК HULC в сыворотку крови, разбавленную в 10 раз, было обнаружено  $1.8 \pm 0.2$  нМ РНК ( $n = 4$ ). Относительная погрешность определения (расхождение между введенной и найденной концентрациями) не превышает 10%, что соответствует допустимым пределам для данного исследования. Таким образом, разработанный ДНК/РНК-сенсор демонстрирует высокую эффективность определения целевой РНК в сложной биологической матрице.

\* \* \*

Реализация электрохимического синтеза ПЭДОТ- $N_3$  в водной среде без применения поверхностно-активных веществ позволила создать сенсорные платформы для ДНК-сенсоров. Модификация печатных графитовых электродов ПЭДОТ- $N_3$  приводит к повышению электроактивности медиаторов на поверхности электродов: для анионного  $[Fe(CN)_6]^{3-4-}$  электрохимическая константа скорости возрастает на 2 – 3 порядка (до  $(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$ ), по сравнению с немодифицированными электродами, в то время как для катионного  $[Ru(NH_3)]^{3+/2+}$  наблюдается увеличение в 3 – 5 раз.

Композитные наночастицы БЛ являются подходящими электрокатализическими метками для ДНК-сенсоров. Полимер ПЭДОТ- $N_3$  обеспечивает как стабилизацию наночастиц, так и их функционализацию для конъюгации с олигонуклеотидами. После конъюгации композитные наночастицы БЛ сохраняют до 85 % электрокатализической активности в реакции восстановления пероксида водорода. Высокая эффективность прямого электрокатализа НЧ БЛ подтверждена незначительным увеличением (не более, чем в 8 раз) коэффициента чувствительности ДНК-сенсоров в присутствии диффузионно-подвижного медиатора пирокатехина.

Созданные на основе платформы ДНК-сенсоры позволяют определять ДНК-мишени в диапазоне от 0.03 до 3 нМ. Кроме того, ДНК-сенсоры функционируют в режиме конкурентного анализа: при введении в систему 0.2 нМ олигонуклеотидов без меток обнаружено  $0.17 \pm 0.09$  нМ. ДНК/РНК-сенсоры применимы для проведения анализа в сыворотке крови, сохраняя при этом высокий коэффициент чувствительности ( $22.4 \pm 0.8 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). При определении РНК-маркера в режиме «сэндвич»-анализа в сыворотке крови после добавления 2 нМ РНК сигнал ДНК/РНК-сенсора соответствовал 1.8 нМ. Полученные результаты подтверждают, что разработанные электрохимические ДНК/РНК сенсоры являются потенциальной основой для создания диагностических тестов.

## Глава 8. Сенсоры на основе наноструктурированной БЛ для определения субмикромолярных концентраций $\text{H}_2\text{O}_2$ в конденсате выдыхаемого аэрозоля<sup>9</sup>

### 8.1. Получение конденсата выдыхаемого аэрозоля без дополнительного охлаждения

Одним из подходов для концентрирования нелетучих метаболитов в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) является сбор конденсата без дополнительного охлаждения, что позволяет минимизировать разбавление пробы парами воды. В данной работе образцы КВВ, полученные без активного охлаждения, будут обозначены как конденсат выдыхаемого аэрозоля (КВА). Для конденсации паров выдыхаемого аэрозоля использовали разработанный в лаборатории конденсор. Принцип его действия основан на повышении эффективности конденсации за счёт внутренних структур, обеспечивающих формирование турбулентных потоков (рисунок 72а). Из-за турбулентности существенно возрастает частота столкновения частиц и увеличивается размер образующихся капель. Конструкция конденсора также включает элемент для улавливания слюны, предотвращая её попадание в образец. При спокойном дыхании в конденсор в течение 30 минут возможно получить от 70 до 250 мкл образца КВА.

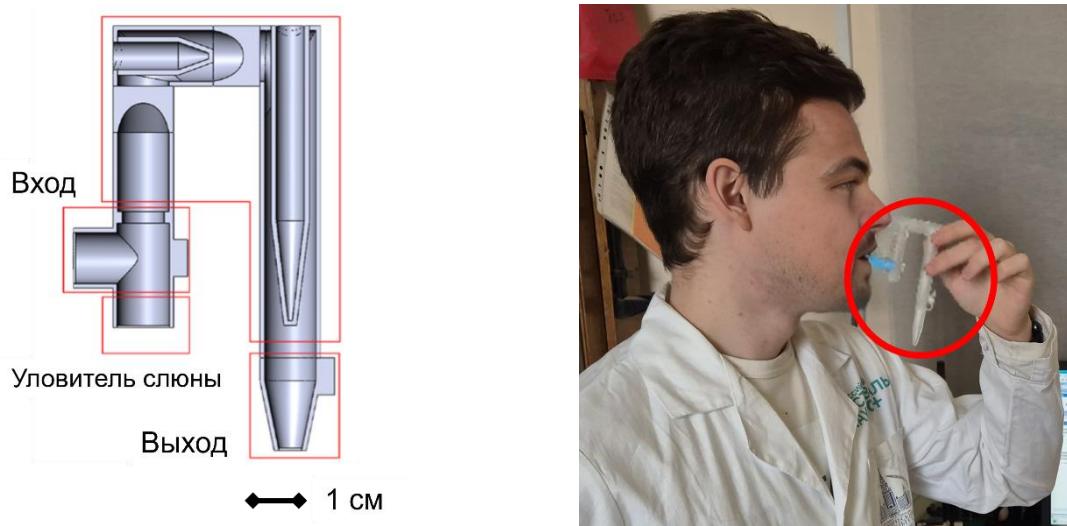


Рисунок 72. а) Схема внутреннего устройства конденсора; б) пример сбора КВА с помощью конденсора без активного охлаждения.

В [200] было показано, что проводимость образцов КВА, собранных данным конденсором, соответствует концентрации ионов, эквивалентной  $3.0 \pm 0.3 \text{ мМ NaCl}$ . В то же время в работах, использующих традиционные методы сбора КВВ с активным

<sup>9</sup> При подготовке данной главы диссертации использована публикация, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении учёных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

E.A. Andreev, V.A. Shavokshina, V.N. Nikitina, D.D. Pozdnyakova, I.A. Baranova, A.G. Chuchalin, A.A. Karyakin, Sensor platform for noninvasive evaluation of pulmonary oxidative status, Talanta 290 (2025) 127792. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.127792>.

охлаждением, сообщается о существенно более низкой ионной силе. В [201] проводимость образцов КВВ, собранных в конденсор, охлаждаемый циркулирующей ледяной водой, была эквивалентна проводимости раствора 0.1 mM NaCl. Таким образом, данный конденсор позволяет собирать на порядок более концентрированные образцы КВА. Другим его преимуществом является компактность (рисунок 72б), невысокая стоимость и простота эксплуатации. Именно эти преимущества делают данный конденсор предпочтительным устройством для получения КВА, чтобы в дальнейшем исследовать содержание пероксида водорода в образцах и оценить его значимость как биомаркера.

## **8.2. Сенсоры на основе нестабилизированной наноструктурированной БЛ в режиме проточно-инжекционной амперометрии**

Как было показано в обзоре литературы (таблица 1) сенсорные платформы на основе БЛ демонстрируют рекордные показатели чувствительности при определении пероксида водорода. Для обеспечения надежного определения субмикромолярных концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$ , необходимо повысить соотношение сигнал/шум, регистрируемое на электродах, модифицированных БЛ. Одним из источников возникновения шума являются процессы зарядки/разрядки двойного электрического слоя. Поскольку БЛ является электроактивной и способна заряжаться при изменении потенциала, одним из подходов для минимизации шумов является оптимизация количества электрокатализического материала, то есть снижение поверхностной концентрации БЛ.

В процессе синтеза БЛ на поверхности электрода образуются зародыши (нуклеационные центры), поэтому использование разбавленных растворов прекурсоров ( $\text{FeCl}_3$  и  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) и малого числа циклов электрополимеризации позволяет синтезировать наноструктурированные покрытия БЛ [23]. В данной работе в результате электрохимического синтеза получены электроды с Гбл 0.1 – 0.5 нмоль· $\text{cm}^{-2}$ . Электроды, модифицированные БЛ, исследовали методом спектроскопии электрохимического импеданса при потенциале, соответствующему потенциалу перехода берлинского белого в берлинскую лазурь (рисунок 73). Спектры аппроксимировали эквивалентной схемой (рисунок 73).

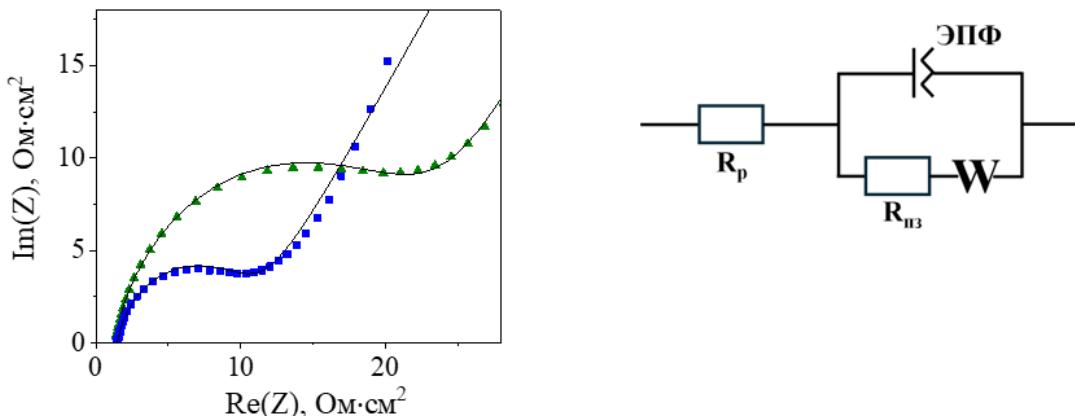


Рисунок 73. Спектры электрохимического импеданса наноструктурированной БЛ (■) и наноструктурированной БЛ, стабилизированной ГЦФ Ni (▲), линией обозначена соответствующая аппроксимация спектров ( $0.1 \text{ M KCl/HCl}$ ;  $E_{dc} = 0.15 \text{ В}$ ). Эквивалентная схема для аппроксимации спектров электрохимического импеданса.  $R_p$  – сопротивление раствора,  $R_{\text{пз}}$  – сопротивление переноса заряда, ЭПФ – элемент постоянной фазы, соответствующий емкости на границе электрод|БЛ,  $W$  – элемент Варбурга для диффузионной части импеданса с отражающими граничными условиями.

В результате аппроксимации полученных спектров значение  $R_{\text{пз}}$  составляет не менее  $7 \Omega \cdot \text{см}^2$ , а показатель степени элемента постоянной фазы (ЭПФ)  $n \geq 0.8$ , что указывает на поведение, близкое к идеальному конденсатору. В [202] было показано, что при значениях  $\Gamma \geq 1.1 \text{ нмоль} \cdot \text{см}^{-2}$  и  $R_{\text{пз}} \sim 1 \Omega \cdot \text{см}^2$  поверхность электрода покрыта сплошной пленкой БЛ. При меньших значениях  $\Gamma$  и большем  $R_{\text{пз}}$  поверхность электрода заполнена частично. Следовательно, в данной работе синтезирована наноструктурированная БЛ.

Сенсоры, модифицированные БЛ, исследовали в проточно-инжекционном режиме при постоянном потенциале  $-0.05 \text{ В}$ . При данном потенциале БЛ находится в форме берлинского белого, которая обладает электрокаталитической активностью в реакции восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Проточно-инжекционный анализ удобен для анализа серии образцов, потому что каждый образец ограниченное время контактирует с сенсором, а потом вымывается из ячейки потоком буферного раствора. В результате инжекции  $\text{H}_2\text{O}_2$  на хроноамперограмме наблюдается катодный пик, свидетельствующий об электрокаталитическом восстановлении  $\text{H}_2\text{O}_2$  на поверхности модифицированного электрода. На рисунке 74а представлены примеры сигналов, наблюдаемых в результате увеличения концентрации инжектируемого  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Таким образом, при определении  $\text{H}_2\text{O}_2$  на уровне  $0.1 \text{ мкМ}$  сигнал превосходит шум в  $5 - 7$  раз ( $s_{\text{фон}} = 7 \text{ нА} \cdot \text{см}^{-2}$ ), что позволяет надежно детектировать субмикромолярные концентрации пероксида, ожидаемые в образцах КВА (предел обнаружения сенсора  $0.06 \text{ мкМ}$ ). На рисунке 74б представлены градуировочные зависимости для сенсоров с разным количеством БЛ. С увеличением

количества БЛ возрастает чувствительность сенсоров, но в то же время возрастает и шум, что осложняет определение субмикромолярных концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

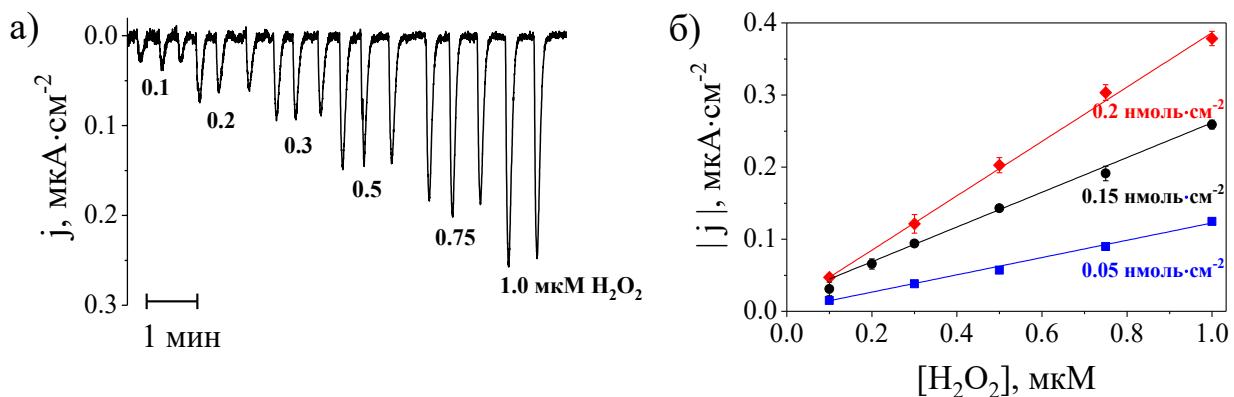


Рисунок 74. а) Катодные отклики сенсора ( $0.15 \text{ нмоль см}^{-2}$  БЛ);  $E = -0.05 \text{ В}$ ,  $50 \text{ мМ}$  фосфатный буфер рН 6.0, содержащий  $0.1 \text{ М}$   $\text{NaCl}$ . б) Градуировочные зависимости определения концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  сенсорами с различным количеством БЛ в проточно-инжекционном режиме: (■) –  $0.05 \text{ нмоль см}^{-2}$ , (●) –  $0.15 \text{ нмоль см}^{-2}$ , (◆) –  $0.2 \text{ нмоль см}^{-2}$ .

Однако в процессе электрокатализитического восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$  генерируются гидроксид-ионы, которые приводят к растворению БЛ [203]. В связи с этим после непродолжительного анализа образца КВА коэффициент чувствительности сенсора снижается почти в 2 раза: с  $0.31 \pm 0.04 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  до  $0.16 \pm 0.03 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Для проведения анализа реальных образцов КВА необходима стабилизация наноструктурированной БЛ без существенного снижения чувствительности. Ранее было показано, что гексацианоферрат никеля (ГЦФ Ni) является наиболее подходящим стабилизатором БЛ, а для большего повышения операционной стабильности сенсора предпочтительнее проводить послойный синтез БЛ и ГЦФ Ni [31,44].

#### **Стабилизация БЛ. Синтез ГЦФ Ni**

Стабилизирующий слой ГЦФ Ni был синтезирован поверх наноструктурированной БЛ. Синтез проводили в режиме циклической вольтамперометрии из метастабильного раствора, содержащего ионы  $\text{Ni}^{2+}$  и  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ . В процессе развертки потенциала  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  восстанавливается и образует с катионами  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{K}^+$  малорастворимый комплекс ( $\text{K}_2\text{Ni}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) на поверхности электрода [204].

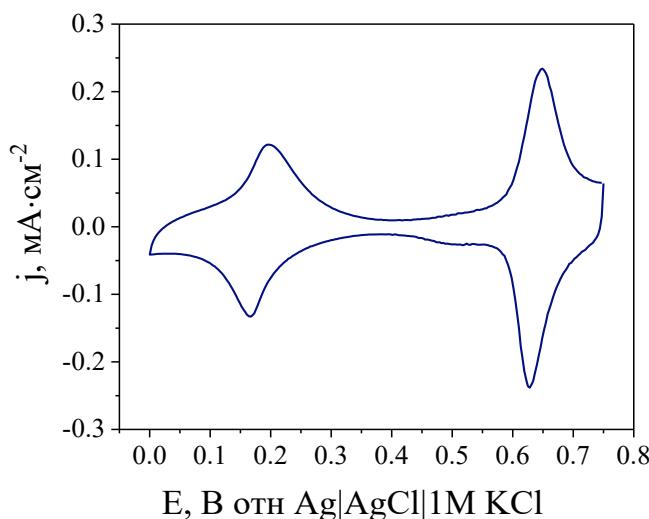


Рисунок 75. ЦВА электрода, модифицированного стабилизированной БЛ (0.1 М KCl/HCl; 40 мВ·с<sup>-1</sup>). Г<sub>БЛ</sub> 0.6 нмоль·см<sup>-2</sup>, Г<sub>ГЦФNi</sub> 1.1 нмоль·см<sup>-2</sup>.

На ЦВА стабилизированной БЛ после синтеза (рисунок 75) можно наблюдать пару пиков, соответствующих переходу берлинская лазурь-берлинский белый ( $E_{1/2} = 0.18$  В), пару пиков  $K_2Ni[Fe^{II}(CN)_6]/KNi[Fe^{III}(CN)_6]$  ( $E_{1/2} = 0.18$  В) и переход в районе 0.5 В, соответствующей менее обогащенной калием форме  $KNi_{1.5}[Fe^{II}(CN)_6]/Ni_{1.5}[Fe^{III}(CN)_6]$  [205]. Данный способ стабилизации БЛ отличается воспроизводимостью получаемых сенсоров. При последовательном синтезе серии из 15 электродов Г<sub>БЛ</sub> составила  $0.51 \pm 0.02$  нмоль·см<sup>-2</sup>, а Г<sub>ГЦФ Ni</sub> =  $0.94 \pm 0.06$  нмоль·см<sup>-2</sup>. Стабилизация наноструктурированной БЛ ГЦФ Ni не приводит к существенному изменению аналитических характеристик сенсоров в реакции электрокаталитического восстановления пероксида водорода:  $s$  достигает  $0.38 \pm 0.05$  А·М<sup>-1</sup>·см<sup>-2</sup>, а предел обнаружения сенсоров равен 0.1 мкМ. Стоит отметить, что ГЦФ Ni не проявляет электрокаталитической активности в реакции восстановления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [43], а выполняет только стабилизирующую функцию. Такие модифицированные электроды являются перспективными сенсорными платформами для создания высокочувствительных сенсоров на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, подходящих для анализа биообразцов.

### **8.3. Определение концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в конденсате выдыхаемого аэрозоля, собранного без дополнительного охлаждения.**

Образцы КВА анализировали в режиме проточно-инжекционной амперометрии. На рисунке 76 представлены примеры сигналов сенсоров на инжекцию образов КВА, разбавленных в 4 раза. Видно, что форма пиков аналогична форме отклика на добавление раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Поскольку БЛ чувствительна к изменению катионного состава (в первую очередь концентрации ионов калия и натрия) раствора-носителя, в качестве буфера для ПИА использовали калий-fosфатный буфер с хлоридом натрия в качестве электролита. Кроме того, при разбавлении образцов КВА использовали в 2 раза более

концентрированный буферный раствор для создания ионной силы, соответствующей раствору-носителю.

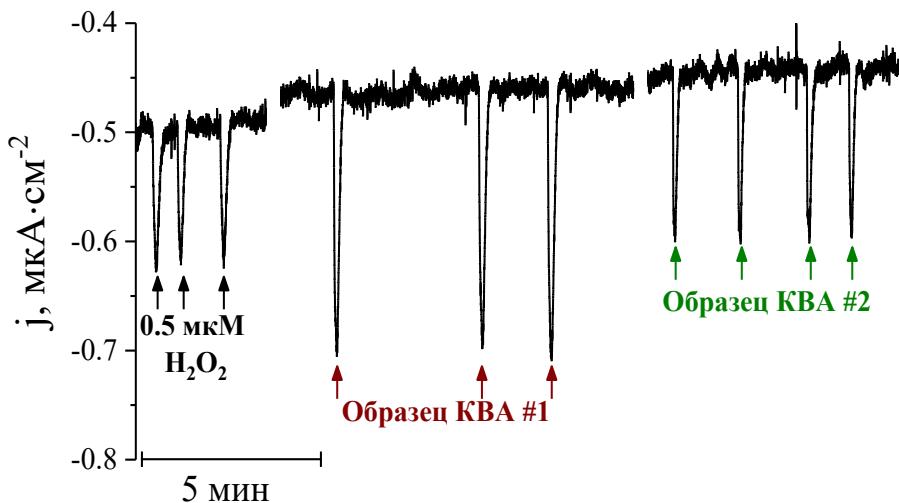


Рисунок 76. Проточно-инжекционный анализ растворов  $\text{H}_2\text{O}_2$  и образцов КВА от курящего (КВА #1) и некурящего (КВА #2) добровольца, разбавленных в 4 раза.

Модификацияnanoструктуройованной БЛ гексацианоферратом никеля значительно повышает стабильность сенсоров. На рисунке 77 представлена градуировочная зависимость сенсора до и после анализа образцов КВА в течение 4 часов в режиме проточно-инжекционной амперометрии. После анализа реальных образцов коэффициент чувствительности и ЛДОК сенсора не изменились, что свидетельствует о стабильности разработанных сенсоров и применимости для анализа пероксида водорода в КВА.

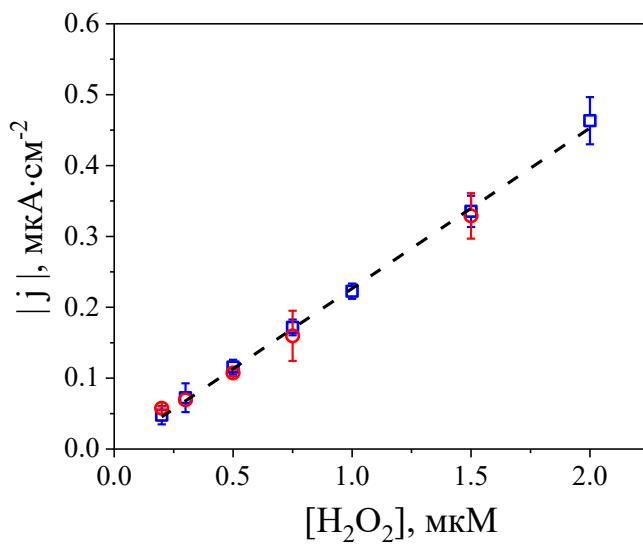


Рисунок 77. Градуировочная зависимость сенсоров на основе nanoструктурированной БЛ, стабилизированной ГЦФ Ni, до (■) и после (○) 4-го часа анализа образцов КВА.

Образцы КВА инкубировали с раствором фермента каталазы, катализирующей диспропорционирование  $\text{H}_2\text{O}_2$ , в результате чего величина амперометрического отклика на

образец снижалась более, чем на 90 % (рисунок 78). Это подтверждает, что регистрируемый отклик на образцы КВА – результат восстановления пероксида водорода.

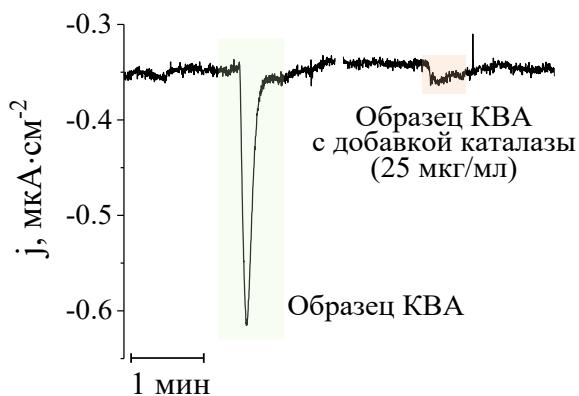


Рисунок 78. Пример снижения сигнала на образец КВА после добавления в него каталазы.

Поскольку при измерении таких низких содержаний пероксида водорода на сигнал сенсора могут оказывать влияние даже растворенные в образце газы, исследовали влияние кислорода на величину отклика сенсора. Для этого через порцию раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  дополнительно пропускали атмосферный воздух, через другую порцию раствора пропускали аргон для дегазации. Как видно из таблицы 24 это не повлияло на величину амперометрического отклика.

Таблица 24. Влияние аэрации и дегазирования раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  на величину сигнала сенсора.

Пропускание через раствор 1 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2$ :			
$ j $ , мкА·см <sup>-2</sup>	-	Воздух	Аргон
	0.22±0.02	0.20±0.01	0.21±0.02

Для оценки стабильности  $\text{H}_2\text{O}_2$  в собранных образцах КВА при хранении, свежесобранный образец КВА помещали в холодильник при температуре +4°C. Каждый час измеряли концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  в образце. В результате показано, что в течение минимум 4 часов концентрация аналита в образце не меняется (таблица 25). Это позволяет транспортировать в присутствии хладагента образцы КВА. Образцы также можно хранить в течение недели, если поддерживать температуру не выше -18°C.

Таблица 25. Динамика изменения концентрации пероксида водорода в КВА (хранение при +4°C).

Время хранения, ч	0	1	2	3	4.5	24
[ $\text{H}_2\text{O}_2$ ], мкМ	1.00±0.01	0.93±0.04	0.98±0.08	0.96±0.09	0.92±0.03	0.18±0.05

Для определения референсного уровня  $\text{H}_2\text{O}_2$  в КВА были проанализированы образцы от группы здоровых некурящих добровольцев. В результате анализа 59 образцов КВА,

установлено, что концентрация пероксида водорода в среднем составляет  $2.7 \pm 0.5$  мкМ, что существенно превышает концентрацию пероксида водорода в КВВ, полученным с активным охлаждением (таблица 4). Следовательно, данный метод сбора КВА обеспечивает более высокую концентрацию не только ионов, но и целевого биомаркера – пероксида водорода.

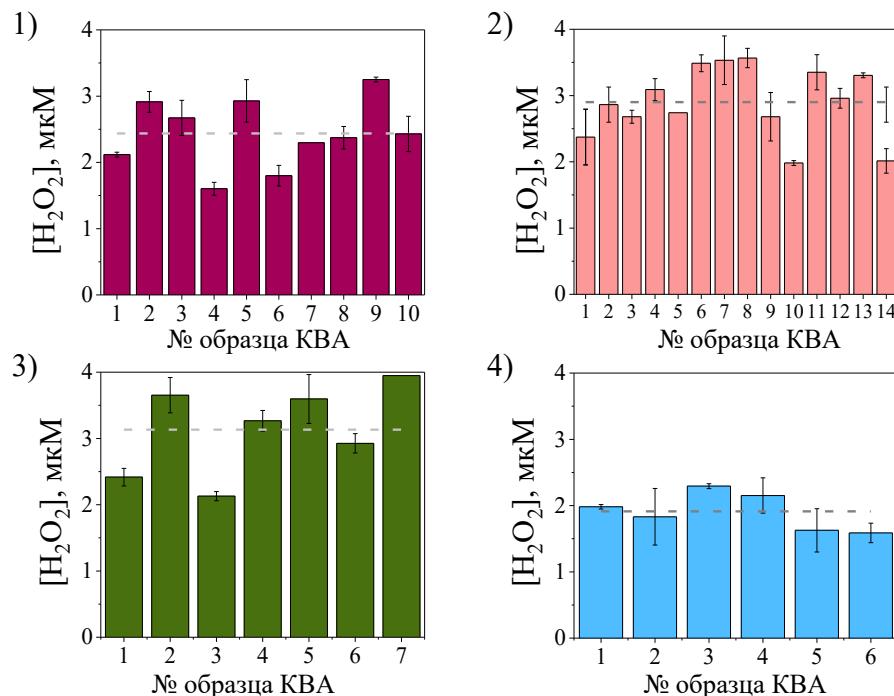


Рисунок 79. Концентрация  $H_2O_2$  в различных образцах конденсата выдыхаемого аэрозоля, собранных у 4 здоровых некурящих добровольцев, собранных в разные дни; пунктирной линией обозначено полученное среднее значение концентрации пероксида для данного человека.

Дополнительно исследовали вариабельность концентрации  $H_2O_2$  в образцах КВА у одного человека, для этого у четырёх добровольцев собирали КВА в разные дни (рисунок 79). Рассчитанные для этих данных относительные стандартные отклонения составляют от 15 до 20 %, что свидетельствует об умеренном изменении концентрации пероксида водорода.

#### 8.4. Окислительный статус конденсата выдыхаемого воздуха

Согласно опубликованным данным концентрация  $H_2O_2$  в КВВ отличается в зависимости от способа сбора образца, метода анализа и степени нарушений в организме. В данной работе помимо некурящих людей образцы КВА собирали у двух групп: некурящие пациенты с диагностированным постковидным синдромом и курящие добровольцы. На рисунке 80 представлено относительное содержание пероксида водорода в образцах КВА этих групп. Среднее значение концентрации пероксида в КВА здоровых некурящих было обозначено за 100 % с доверительным интервалом 20%, что соответствует

диапазону концентраций 2.2–3.2 мкМ (серая область на рисунке 80). У 15 курящих добровольцев было собрано 22 образца КВА, в результате концентрация  $H_2O_2$  в 21 образце выше доверительного интервала для некурящих.

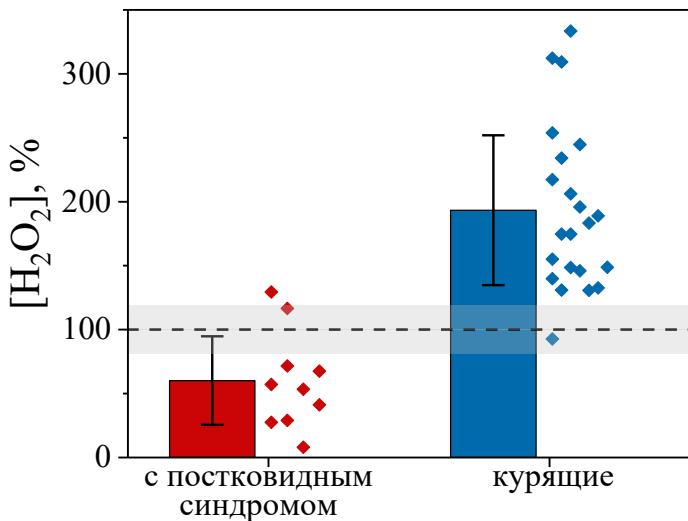


Рисунок 80. Содержание пероксида водорода в КВА, относительно здоровых некурящих ( $100\pm20\%$ , серая область на графике), для разных групп людей. Столбцами обозначено среднее значение.

Другая группа изучаемых добровольцев – пациенты с постковидным синдромом. Все пациенты перенесли COVID-19, после перенесенного заболевания имеют жалобы, и на основании совокупности симптомов у них диагностирован постковидный синдром. Несмотря на то, что функция дыхания у таких пациентов снижена, у всех удалось собрать достаточный объём КВА, необходимый для анализа. В результате концентрация  $H_2O_2$  у пациентов с постковидным синдромом в среднем ниже, чем у здоровых некурящих. Это снижение уровня пероксида водорода может указывать на измененный окислительный статус при постковидном синдроме, потенциально связанный с легочной гипоксемией (снижение насыщения крови кислородом). Также вирус SARS-CoV-2 влияет на работу нейроэндокринной системы [206], что может приводить к дисбалансу гормонов, регулирующих окислительные процессы в организме.

Для оценки статистически значимых различий между тремя группами добровольцев (здоровые некурящие ( $n=15$ ), пациенты с постковидным синдромом ( $n=10$ ), курильщики ( $n=15$ )) использовали однопараметрический дисперсионный анализ. В расчётах учтены только независимые измерения образцов, полученных от разных людей. Предварительно, все результаты были проверены по критерию Шапиро-Уилка на предмет нормальности распределения. Полученные  $p$ -значения составили 0.74; 0.18; 0.24, что при выбранном уровне значимости (0.05) не исключает нормальность распределения каждой из трёх исследуемых выборок. Дисперсии выборок однородны, в связи с этим допустимо

использовать однофакторный дисперсионный анализ. После отклонения гипотезы о равенстве всех средних значений при помощи F-критерия Фишера выполнялось попарное сравнение средних значений для исследуемых выборок с использованием t-критерия. В результате показано, что средние значения трёх выборок статистически различаются.

\* \* \*

Таким образом, разработанные электрохимические сенсоры на основе наноструктурированной БЛ, стабилизированной ГЦФ Ni, обладают достаточной чувствительностью и селективностью для определения пероксида водорода в КВА. Показано, что КВА, собранный без дополнительного охлаждения, является перспективным биообразцом для оценки окислительного статуса. В частности, такой КВА у курящих добровольцев имеет повышенное содержание  $H_2O_2$  и является индикатором окислительного стресса, вызванного табакокурением. Однако наиболее значимым результатом является впервые зафиксированное снижение концентрации  $H_2O_2$  в КВА у пациентов с постковидным синдромом, по сравнению с контрольной группой здоровых некурящих. Следовательно, пероксид водорода в КВА является потенциальным биомаркером для постковидного синдрома. Комбинация метода сбора КВА и высокочувствительных сенсоров открывает новые возможности для неинвазивной диагностики нарушений, связанных с дисбалансом активных форм кислорода в организме.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были созданы амперометрические сенсоры на основе наноразмерных гексацианоферратов железа/никеля для определения биомаркеров в биологических жидкостях. Были разработаны твердоконтактные ионоселективные электроды для определения содержания ионов калия, натрия в поте и сыворотке крови. Электроды, модифицированные наночастицами берлинской лазури или гексацианоферратом никеля, генерируют воспроизводимые отклики в режиме проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале, а высота катодного пика линейно зависит от концентрации инъектируемых катионов.

Разработанные сенсоры компактны и просты в изготовлении. В сравнении с существующими аналогами, функционирующими в режиме ненулевого тока, удалось сократить время анализа, достичь воспроизводимых амперометрических откликов ( $s_r \leq 5\%$ ) и снизить предел обнаружения. Выбор соответствующего раствора-носителя, не содержащего мешающих катионов, позволил достичь селективности сенсоров, близкой к предельно возможной для используемых ионофоров.

Вторым направлением исследования стало создание амперометрических ДНК/РНК-сенсоров, функционирующих в сыворотке крови человека. Была разработана сенсорная платформа на основе проводящего полимера ПЭДОТ- $N_3$ , синтезированного в водной среде без поверхностно-активных веществ. Это позволило достичь высоких значений электрохимической константы скорости в присутствии разнозаряженных медиаторов. Кроме того, наличие функциональных групп на поверхности полимера обеспечивает одностадийную иммобилизацию алкин-модифицированных олигонуклеотидов посредством биоортогональной клик-реакции.

В современных электрохимических ДНК-сенсорах в качестве метки традиционно используют природный фермент пероксидазу, однако природные ферменты имеют ряд ограничений – недостаточная стабильность, высокая стоимость и строгие требования к условиям хранения. Для преодоления этих ограничений в данной работе в качестве электрокаталитических меток предложено использовать нанозимы с пероксидазной активностью – функционализированные композитные наночастицы БЛ. Разработанные сенсоры демонстрируют высокую чувствительность при определении как меченых, так и немеченых олигонуклеотидов в режимах конкурентного и «сэндвич»-анализа.

Несмотря на известную диагностическую ценность конденсата выдыхаемого воздуха его состав существенно варьируется в зависимости от условий отбора проб и конструкции конденсатора. В связи с этим необходимо было определить содержание пероксида водорода – маркера окислительного стресса – в конденсате выдыхаемого

аэрозоля, полученным с использованием нового типа конденсора. Учитывая низкие содержания  $H_2O_2$  в конденсате выдыхаемого аэрозоля и малые объемы образца, были разработаны высокочувствительные сенсоры для определения концентрации  $H_2O_2$  в данной матрице. Электрохимический синтезnanostructuredированной берлинской лазури из разбавленных растворов прекурсоров позволил снизить предел обнаружения сенсоров, в том числе за счет снижения шума. Проблема потери чувствительности сенсоров в процессе анализа конденсата выдыхаемого аэрозоля была решена благодаря стабилизации nanostructuredированной берлинской лазури гексацианоферратом никеля. В результате показано, что концентрация  $H_2O_2$  в конденсате выдыхаемого аэрозоля, собранного без дополнительного охлаждения, у трех групп добровольцев (некурящих, курящих и пациентов с постковидным синдромом) статистически различаются.

По результатам диссертационной работы можно сформулировать следующие **выводы:**

1. Режим проточно-инжекционной амперометрии при постоянном потенциале для твердоконтактных ионоселективных электродов на основе гексацианоферратов железа или никеля позволяет проводить экспрессное (15–60 с), высокочувствительное ( $s$  до  $75 \pm 10 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $C_{\min}$  до 1 мкМ) определение ионов калия или натрия. Сенсоры функционируют в присутствии избытка мешающих ионов ( $K^+$  или  $Na^+$ ), показана возможность использования сенсоров для анализа содержания ионов калия или натрия в сыворотке крови и поте человека (относительное отклонение от результатов капиллярного электрофореза не превышает 8 %). При использовании печатных планарных структур с двумя рабочими электродами возможно одновременное определение содержания ионов калия и натрия в образцах пота.

2. В результате модификации поверхности печатного графитового электрода проводящим полимером поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофеном) (ПЭДОТ- $N_3$ ) улучшаются электрон-транспортные свойства медиаторов на поверхности модифицированных электродов: для  $[Fe(CN)_6]^{3-/-4-}$  электрохимическая константа скорости возрастает до 3 порядков (до  $(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$ ), для  $[Ru(NH_3)]^{3+/2+}$  – до 5 раз (до  $(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$ ). В сочетании с наличием функциональных азидных групп, модифицированные ПЭДОТ- $N_3$  электроды являются подходящей сенсорной платформой для иммобилизации ДНК-зондов.

3. Композитные наночастицы берлинской лазури (НЧ БЛ/ПЭДОТ- $N_3$ ), сохраняющие 85 % электрокаталитической активности после конъюгации с олигонуклеотидами, использованы как эффективные электрокаталитические метки в ДНК-сенсорах. ДНК-сенсоры позволяют определять меченные ДНК-мишени в диапазоне

0.03 – 3 нМ. ДНК-сенсоры функционируют в режиме конкурентного анализа: при введении в систему 0.2 нМ олигонуклеотидов без меток обнаружено  $0.17 \pm 0.09$  нМ. ДНК/РНК-сенсоры с электрокаталитическими метками на основе наночастиц БЛ способны функционировать в сыворотке крови. Показана возможность определения участка РНК HULC, которая является участком маркера гепатоцеллюлярной карциномы, в диапазоне 0.2 – 100 нМ, что включает клинически значимую концентрацию РНК. При определении 2 нМ РНК в сыворотке крови способом «введенено-найдено» рассчитанная концентрация не более чем на 10 % отклоняется от истинного значения.

4. Стабилизированные гексацианоферратом никеля сенсоры на основе наноструктурированной БЛ применимы для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  в конденсате выдыхаемого аэрозоля ( $C_{\min} 0.1 \text{ мкM}$ ,  $s = 0.38 \pm 0.05 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). 100 % чувствительности сенсора сохраняется в течение 4 часов измерений образцов конденсата выдыхаемого аэрозоля, собранного без дополнительного охлаждения. Обнаружено значимое изменение концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в конденсате выдыхаемого аэрозоля, по сравнению с некурящими добровольцами без бронхолегочных нарушений: у пациентов с постковидным синдромом наблюдается снижение на 39 %, у курящих добровольцев – повышение на 95 %.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает благодарность д.х.н., проф. Карякину Аркадию Аркадьевичу за руководство диссертационной работой, к.х.н. Андрееву Егору Андреевичу, к.х.н. Никитиной Вите Николаевне, к.х.н. Комковой Марии Андреевне за неоценимую помощь, советы и возможность перенять знания и опыт. Автор благодарен к.х.н. Вохмяниной Дарье Владимировне и д.б.н. Супрун Елене Владимировне за ценные замечания и комментарии, а также остальным сотрудникам нашей лаборатории и всем, кто участвовал в настоящем исследовании и содействовал его выполнению.

Автор выражает благодарность к.х.н. Елисееву Андрею Анатольевичу за проведение КР-спектроскопических исследований, к.х.н. Броцману Виктору Андреевичу за проведение ИК-спектроскопических исследований, к.х.н. Леонтьеву Алексею Павловичу за данные СЭМ;

к.х.н. Максимовой Юлии Александровне за проведение измерений методом капиллярного электрофореза и обработку полученных результатов;

д.м.н., проф. Чучалину Александру Григорьевичу, д.м.н., проф. Барановой Ирине Александровне, к.м.н. Поздняковой Дарье Дмитриевне за помощь в организации исследования;

к.х.н. Зацепину Тимофею Сергеевичу и Мельнику Денису Михайловичу за синтез и предоставление необходимых олигонуклеотидов и реагентов;

Автор искренне благодарен семье, Ане и Полине за поддержку и помощь.

Автор выражает благодарность Российскому научному фонду за финансовую поддержку выполненных исследований в рамках грантов 19-13-00131, 24-13-00049.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Paoletta A., Faure C., Timoshevskii V., Marras S., Bertoni G., Guerfi A., Vijh A., Armand M. and Zaghib K.* A review on hexacyanoferrate-based materials for energy storage and smart windows: challenges and perspectives // *J. Mater. Chem. A Mater.* 2017. V. 5. P. 18919–18932.
2. *Boström H.L.B., Kholina Y. and Simonov A.* Stimuli-responsive Prussian blue analogues // *J. Mater. Chem. C Mater.* 2025. V. 13. P. 15290–15302.
3. *Piernas Muñoz M.J. and Castillo Martínez E.* Prussian Blue Based Batteries. Cham: Springer International Publishing, 2018. 108 p.
4. *Karyakin A.A.* Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications // *Electroanalysis.* 2001. V. 13. P. 813–819.
5. *Kong B., Selomulya C., Zheng G. and Zhao D.* New faces of porous Prussian blue: interfacial assembly of integrated hetero-structures for sensing applications // *Chem. Soc. Rev.* 2015. V. 44. P. 7997-8018.
6. *Ito D., Jang S.-H., Ando H., Momma T. and Tateyama Y.* Dissimilar Diffusion Mechanisms of Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> Ions in Anhydrous Fe-Based Prussian Blue Cathode // *J. Am. Chem. Soc.* 2025. V. 147. P. 25441–25453.
7. *Xu C., Yang Z., Zhang X., Xia M., Yan H., Li J., Yu H., Zhang L. and Shu J.* Prussian Blue Analogues in Aqueous Batteries and Desalination Batteries // *Nanomicro Lett.* 2021. V. 13. P. 166.
8. *Kraft A.* Some considerations on the structure, composition, and properties of Prussian blue: a contribution to the current discussion // *Ionics (Kiel).* 2021. V. 27. P. 2289–2305.
9. *Lundgren C.A. and Murray R.W.* Observations on the composition of Prussian blue films and their electrochemistry // *Inorg. Chem.* 1988. V. 27. P. 933–939.
10. *Scholz F. and Dostal A.* The Formal Potentials of Solid Metal Hexacyanometalates // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996. V. 34. P. 2685–2687.
11. *Thomsen K.N. and Baldwin R.P.* Amperometric detection of nonelectroactive cations in flow systems at a cupric hexacyanoferrate electrode // *Anal. Chem.* 1989. V. 61. P. 2594–2598.
12. *Sinha S., Humphrey B.D. and Bocarsly A.B.* Reaction of nickel electrode surfaces with anionic metal-cyanide complexes: formation of precipitated surfaces // *Inorg. Chem.* 1984. V. 23. P. 203–212.
13. *Thomsen K.N. and Baldwin R.P.* Evaluation of electrodes coated with metal hexacyanoferrate as amperometric sensors for nonelectroactive cations in flow systems // *Electroanalysis.* 1990. V. 2. P. 263–271.
14. *Phadke S., Mysyk R. and Anouti M.* Effect of cation (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>) in aqueous electrolyte on the electrochemical redox of Prussian blue analogue (PBA) cathodes // *J. Energy Chem.* 2020. V. 40. P. 31–38.
15. *Gao Z.* Electrochemical behavior of chromium(III)-hexacyanoferrate film modified electrodes: Voltammetric and electrochemical impedance studies // *J. Electroanal. Chem.* 1994. V. 370. P. 95–102.
16. *Xing L., Zhang W., Fu L., Lorenzo J.M. and Hao Y.* Fabrication and application of electrochemical sensor for analyzing hydrogen peroxide in food system and biological samples // *Food Chem.* 2022. V. 385. P. 132555.
17. *Santos A.M., Souto R.S., Barros W.R.P. and Lanza M.R.V.* Integrated system for in situ generation and online monitoring of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Coupling an electrochemical flow reactor to a flow injection analysis system // *Process Saf. Environ. Prot.* 2025. V. 198. P. 107149.

18. *Kokulnathan T., Wang T.-J., Ahmed F., Alshahrani T. and Arshi N.* Synergism of Holmium Orthovanadate/Phosphorus-Doped Carbon Nitride Nanocomposite: Nonenzymatic Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide // *Inorg. Chem.* 2024. V. 63. P. 3019–3027.
19. *Karyakin A.A.* Review Article Advances of Prussian blue and its analogues in (bio)sensors // *Curr. Opin. Electrochem.* 2017. V. 5. P. 92–98.
20. *Karyakin A.A. and Karyakina E.E.* Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors // *Sens. Actuators B Chem.* 1999. V. 57. P. 268–273.
21. *Lukachova L.V., Kotel'nikova E.A., D'Ottavi D., Shkerin E.A., Karyakina E.E., Moscone D., Palleschi G., Curulli A. and Karyakin A.A.* Nonconducting polymers on Prussian Blue modified electrodes: improvement of selectivity and stability of the advanced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transducer // *IEEE Sens. J.* 2003. V. 3. P. 326–332.
22. *Komkova M.A., Zarochintsev A.A., Karyakina E.E. and Karyakin A.A.* Electrochemical and sensing properties of Prussian Blue based nanozymes "artificial peroxidase" // *J. Electroanal. Chem.* 2020. V. 872. P. 114048.
23. *Puganova E.A. and Karyakin A.A.* New materials based on nanostructured Prussian blue for development of hydrogen peroxide sensors // *Sens. Actuators B Chem.* 2005. V. 109. P. 167–170.
24. *Karyakin A.A., Puganova E.A., Bolshakov I.A. and Karyakina E.E.* Electrochemical Sensor with Record Performance Characteristics // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 7678–7680.
25. *Karyakin A.A., Puganova E.A., Budashov I.A., Kurochkin I.N., Karyakina E.E., Levchenko V.A., Matveyenko V.N. and Varfolomeyev S.D.* Prussian Blue Based Nanoelectrode Arrays for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detection // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 474–478.
26. *Mokrushina A.V., Heim M., Karyakina E.E., Kuhn A. and Karyakin A.A.* Enhanced hydrogen peroxide sensing based on Prussian Blue modified macroporous microelectrodes // *Electrochem. Commun.* 2013. V. 29. P. 78–80.
27. *Karakaya S. and Dilgin Y.* Sensitive Flow-Injection Electrochemical Determination of Hydrogen Peroxide at a Palladium Nanoparticle-Modified Pencil Graphite Electrode // *Anal. Lett.* 2019. V. 52. P. 998–1017.
28. *Dang W., Sun Y., Jiao H., Xu L. and Lin M.* AuNPs-NH<sub>2</sub>/Cu-MOF modified glassy carbon electrode as enzyme-free electrochemical sensor detecting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // *J. Electroanal. Chem.* 2020. V. 856. P. 113592.
29. *Zhao F., Zhou S. and Zhang Y.* Ultrasensitive Detection of Hydrogen Peroxide Using Bi<sub>2</sub>Te<sub>3</sub> Electrochemical Sensors // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2021. V. 13. P. 4761–4767.
30. *Borisova A.V., Karyakina E.E., Cosnier S. and Karyakin A.A.* Current-Free Deposition of Prussian Blue with Organic Polymers: Towards Improved Stability and Mass Production of the Advanced Hydrogen Peroxide Transducer // *Electroanalysis.* 2009. V. 21. P. 409–414.
31. *Sitnikova N.A., Borisova A.V., Komkova M.A. and Karyakin A.A.* Superstable Advanced Hydrogen Peroxide Transducer Based on Transition Metal Hexacyanoferrates // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 2359–2363.
32. *Karpova E.V., Shcherbacheva E.V., Komkova M.A., Eliseev A.A. and Karyakin A.A.* Core-Shell Nanozymes "Artificial Peroxidase": Stability with Superior Catalytic Properties // *J. Phys. Chem. Lett.* 2021. V. 12. P. 5547–5551.

33. *Jin E., Bian X., Lu X. and Wang C.* Fabrication of multiwalled carbon nanotubes/polypyrrole/Prussian blue ternary composite nanofibers and their application for enzymeless hydrogen peroxide detection // *J. Mater. Sci.* 2012. V. 47. P. 4326–4331.
34. *Husmann S., Nossol E. and Zarbin A.J.G.* Carbon nanotube/Prussian blue paste electrodes: Characterization and study of key parameters for application as sensors for determination of low concentration of hydrogen peroxide // *Sens. Actuators B Chem.* 2014. V. 192. P. 782–790.
35. *Komkova M.A., Karyakina E.E. and Karyakin A.A.* Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. V. 140. P. 11302–11307.
36. *Chu Z., Zhang Y., Dong X., Jin W., Xu N. and Tieke B.* Template-free growth of regular nano-structured Prussian blue on a platinum surface and its application in biosensors with high sensitivity // *J. Mater. Chem.* 2010. V. 20. P. 7815.
37. *Karyakin A., Karyakina E. and Gorton L.* On the mechanism of  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction at Prussian Blue modified electrodes // *Electrochim. Commun.* 1999. V. 1. P. 78–82.
38. *Zhang D., Wang K., Sun D., Xia X. and Chen H.* Potentiodynamic deposition of Prussian blue from a solution containing single component of ferricyanide and its mechanism investigation // *J. Solid State Electrochem.* 2003. V. 7. P. 561–566.
39. *Sabzi R.E., Kant K. and Losic D.* Electrochemical synthesis of nickel hexacyanoferrate nanoarrays with dots, rods and nanotubes morphology using a porous alumina template // *Electrochim. Acta.* 2010. V. 55. P. 1829–1835.
40. *Chu Z., Liu Y. and Jin W.* Recent progress in Prussian blue films: Methods used to control regular nanostructures for electrochemical biosensing applications // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 96. P. 17–25.
41. *Zheng X.-J., Kuang Q., Xu T., Jiang Z.-Y., Zhang S.-H., Xie Z.-X., Huang R.-B. and Zheng L.-S.* Growth of Prussian Blue Microcubes under a Hydrothermal Condition: Possible Nonclassical Crystallization by a Mesoscale Self-Assembly // *J. Phys. Chem. C.* 2007. V. 111. P. 4499–4502.
42. *Lee P.K. and Woi P.M.* Current Innovations of Metal Hexacyanoferrates-Based Nanocomposites toward Electrochemical Sensing: Materials Selection and Synthesis Methods // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2020. V. 50. P. 393–404.
43. *Sitnikova N.A., Komkova M.A., Khomyakova I.V., Karyakina E.E. and Karyakin A.A.* Transition metal hexacyanoferrates in electrocatalysis of  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction: An exclusive property of prussian blue // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 4131–4134.
44. *Karpova E.V., Karyakina E.E. and Karyakin A.A.* Iron–nickel hexacyanoferrate bilayer as an advanced electrocatalyst for  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 103328–103331.
45. *Hauke A., Oertel S., Knoke L., Fein V., Maier C., Brinkmann F. and Jank M.P.M.* Screen-Printed Sensor for Low-Cost Chloride Analysis in Sweat for Rapid Diagnosis and Monitoring of Cystic Fibrosis // *Biosensors.* 2020. V. 10. P. 123.
46. *Dimeski G., Badrick T. and John A.S.* Ion Selective Electrodes (ISEs) and interferences—A review // *Clin. Chim. Acta.* 2010. V. 411. P. 309–317.
47. *Gao L., Tian Y., Gao W. and Xu G.* Recent Developments and Challenges in Solid-Contact Ion-Selective Electrodes // *Sensors.* 2024. V. 24. P. 4289.
48. *Weber A.W., O’Neil G.D. and Kounaves S.P.* Solid Contact Ion-Selective Electrodes for in Situ Measurements at High Pressure // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 4803–4807.

49. *Peshkova M.A., Sokalski T., Mikhelson K.N. and Lewenstam A.* Obtaining Nernstian Response of a Ca<sup>2+</sup>-Selective Electrode in a Broad Concentration Range by Tuned Galvanostatic Polarization // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 9181–9187.
50. *Cattrall R.W. and Freiser H.* Coated wire ion-selective electrodes // *Anal. Chem.* 1971. V. 43. P. 1905–1906.
51. *Shao Y., Ying Y. and Ping J.* Recent advances in solid-contact ion-selective electrodes: functional materials, transduction mechanisms, and development trends // *Chem. Soc. Rev.* 2020. V. 49. P. 4405-4465.
52. *Lyu Y., Gan S., Bao Y., Zhong L., Xu J., Wang W., Liu Z., Ma Y., Yang G. and Niu L.* Solid-Contact Ion-Selective Electrodes: Response Mechanisms, Transducer Materials and Wearable Sensors // *Membranes*. 2020. V. 10. P. 128.
53. *Stelmach E., Wagner B., Maksymiuk K. and Michalska A.* Finding a perfect match of ion-exchanger and plasticizer for ion-selective sensors // *Talanta*. 2024. V. 269. P. 125408.
54. *Keresten V., Lazarev F. and Mikhelson K.* Transfer of Sodium Ion across Interface between Na<sup>+</sup>-Selective Electrode Membrane and Aqueous Electrolyte Solution: Can We Use Nernst Equation If Current Flows through Electrode? // *Membranes*. 2024. V. 14. P. 74.
55. *Zook J.M., Langmaier J. and Lindner E.* Current-polarized ion-selective membranes: The influence of plasticizer and lipophilic background electrolyte on concentration profiles, resistance, and voltage transients // *Sens. Actuators B Chem.* 2009. V. 136. P. 410-418.
56. *Paczosa-Bator B., Piech R. and Cabaj L.* The influence of an intermediate layer on the composition stability of a polymeric ion-selective membrane // *Electrochim. Acta*. 2012. V. 85. P. 104-109.
57. *Bondar A.V., Keresten V.M. and Mikhelson K.N.* Ionophore-Based Ion-Selective Electrodes in Non-Zero Current Modes: Mechanistic Studies and the Possibilities of the Analytical Application // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. P. 145-154.
58. *Zhang J., Harris A.R., Cattrall R.W. and Bond A.M.* Voltammetric Ion-Selective Electrodes for the Selective Determination of Cations and Anions // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 1624-1633.
59. *Cuartero M., Crespo G.A. and Bakker E.* Ionophore-Based Voltammetric Ion Activity Sensing with Thin Layer Membranes // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 1654-1660.
60. *Machini W.B.S., Martin C.S., Martinez M.T., Teixeira S.R., Gomes H.M. and Teixeira M.F.S.* Development of an electrochemical sensor based on nanostructured hausmannite-type manganese oxide for detection of sodium ions // *Sens. Actuators B Chem.* 2013. V. 181. P. 674-680.
61. *Liu Y., Crespo G.A. and Cuartero M.* Approaching to Calibration-Free Ion Detection Based on Thin Layer Coulometry with Ultrathin Ion-Selective Membranes // *ACS Measurement Science Au.* 2025. V. 5. P. 63-69.
62. *Liu Y., Crespo G.A. and Cuartero M.* Voltammetric Ion-Selective Electrodes in Thin-Layer Samples: Absolute Detection of Ions Using Ultrathin Membranes // *Anal. Chem.* 2024. V. 96. P. 1147-1155.
63. *Hupa E., Vanamo U. and Bobacka J.* Novel Ion-to-Electron Transduction Principle for Solid-Contact ISEs // *Electroanalysis*. 2015. V. 27. P. 591-594.
64. *Bobacka J.* Perspective on the coulometric transduction principle for ion-selective electrodes // *Sens. Actuators B Chem.* 2024. V. 410. P. 135674.

65. Kraikaew P., Jeanneret S., Soda Y., Cherubini T. and Bakker E. Ultrasensitive Seawater pH Measurement by Capacitive Readout of Potentiometric Sensors // ACS Sens. 2020. V. 5. P. 650-654.
66. Kondratyeva Y.O., Tolstopjatova E.G., Kirsanov D.O. and Mikhelson K.N. Chronoamperometric and coulometric analysis with ionophore-based ion-selective electrodes: A modified theory and the potassium ion assay in serum samples // Sens. Actuators B Chem. 2020. V. 310. P. 127894.
67. Han T., Mattinen U. and Bobacka J. Improving the Sensitivity of Solid-Contact Ion-Selective Electrodes by Using Coulometric Signal Transduction // ACS Sens. 2019. V. 4. P. 900-906.
68. Han T., Song T., Bao Y., Sun Z., Ma Y., He Y., Gan S., Jiang D., Han D., Bobacka J. and Niu L. Amperometric response of solid-contact ion-selective electrodes utilizing a two-compartment cell and a redox couple in solution // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2022. V. 922. P. 116683.
69. Han T., Song T., Bao Y., Wang W., He Y., Liu Z., Gan S., Han D., Bobacka J. and Niu L. Fast and sensitive coulometric signal transduction for ion-selective electrodes by utilizing a two-compartment cell // Talanta. 2023. V. 262. P. 124623.
70. Kalisz J., Węgrzyn K., Michalska A. and Maksymiuk K. Resolution increase of ion-selective electrodes response by using a reversed amperometric setup // Electrochim. Acta. 2022. V. 427. P. 140886.
71. Kissinger P.T. Amperometric and coulometric detectors for high-performance liquid chromatography // Anal. Chem. 1977. V. 49. P. 447A-456A.
72. Stojanovic R.S., Bond A.M. and Butler E.C.V. A comparative study of the cylindrical wire, thin-layer, and wall-jet detector cells for the determination of inorganic arsenic by ion exclusion chromatography with constant and pulsed amperometric detection // Electroanalysis. 1992. V. 4. P. 453-461.
73. Yamada J. and Matsuda H. Limiting diffusion currents in hydrodynamic voltammetry // J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 1973. V. 44. P. 189-198.
74. Hanekamp H.B. and de Jong H.G. Theoretical comparison of the performance of electrochemical flow-through detectors // Anal. Chim. Acta. 1982. V. 135. P. 351-354.
75. Lee H.J. and Girault H.H. Amperometric Ion Detector for Ion Chromatography // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 4280-4285.
76. Horvath V., Horvai G. and Pungor E. Amperometric measurements with ion-selective electrode membranes in a flow system // Microchimica Acta. 1990. V. 100. P. 217-224.
77. Zavolskova M.D., Nikitina V.N., Maksimova E.D., Karyakina E.E. and Karyakin A.A. Constant Potential Amperometric Flow-Injection Analysis of Ions and Neutral Molecules Transduced by Electroactive (Conductive) Polymers // Anal. Chem. 2019. V. 91. P. 7495-7499.
78. Nikitina V.N., Maksimova E.D., Zavolskova M.D. and Karyakin A.A. Flow injection amperometry as an alternative to potentiometry for solid contact ion-selective membrane-based electrodes // Electrochim. Acta. 2021. V. 377. P. 138074.
79. Shavokshina V., Okoneshnikov A., Nikitina V. and Karyakin A. Amperometric Signal Generation by Self-Doped Polyanilines for Ion-Selective Electrodes // Journal of Analytical Chemistry. 2024. V. 79. P. 740-748.

80. *Shavokshina V.A., Nikitina V.N. and Karyakin A.A.* Improved performance of Prussian blue solid contact allowing flow injection amperometric detection of potassium ions in the excess of sodium // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2024. V. 962. 118264
81. *van de Velde L., d'Angremont E. and Olthuis W.* Solid contact potassium selective electrodes for biomedical applications – a review // Talanta. 2016. V. 160. P. 56-65.
82. *Hu J., Stein A. and Bühlmann P.* Rational design of all-solid-state ion-selective electrodes and reference electrodes // TrAC Trends Anal. Chem. 2016. V. 76. P. 102-114.
83. *Bobacka J., Ivaska A. and Lewenstam A.* Potentiometric Ion Sensors // Chem. Rev. 2008. V. 108. P. 329-351.
84. *Migdalski J., Blaž T. and Lewenstam A.* Conducting polymers - mechanisms of cationic sensitivity and the methods of inducing thereof // Electrochim. Acta. 2014. V. 133. P. 316-324.
85. *Ang J.Q., Nguyen B.T.T., Huang Y. and Toh C.-S.* Ion-selective detection of non-intercalating Na<sup>+</sup> using competitive inhibition of K<sup>+</sup> intercalation in Prussian blue nanotubes sensor // Electrochim. Acta. 2010. V. 55. P. 7903-7908.
86. *Ang J.Q., Nguyen B.T.T. and Toh C.S.* A dual K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> selective Prussian blue nanotubes sensor // Sens. Actuators B Chem. 2011. V. 157. P. 417-423.
87. *Ang J.Q. and Li S.F.Y.* Novel sensor for simultaneous determination of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> using Prussian blue pencil graphite electrode // Sens. Actuators B Chem. 2012. V. 173. P. 914-918.
88. *Rius-Ruiz F.X., Crespo G.A., Bejarano-Nosas D., Blondeau P., Riu J. and Rius F.X.* Potentiometric Strip Cell Based on Carbon Nanotubes as Transducer Layer: Toward Low-Cost Decentralized Measurements // Anal. Chem. 2011. V. 83. P. 8810-8815.
89. *Pietrzak K., Krstulović N., Blažeka D., Car J., Malinowski S. and Wardak C.* Metal oxide nanoparticles as solid contact in ion-selective electrodes sensitive to potassium ions // Talanta. 2022. V. 243. P. 123335.
90. *Giorgetti M., Scavetta E., Berrettoni M. and Tonelli D.* Nickel hexacyanoferrate membrane as a coated wire cation-selective electrode // Analyst. 2001. V. 126. P. 2168-2171.
91. *Düssel H., Dostal A. and Scholz F.* Hexacyanoferrate-based composite ion-sensitive electrodes for voltammetry // Fresenius J. Anal. Chem. 1996. V. 355. P. 21-28.
92. *González-Navá V.J., Solís-Valdés S., Manríquez J., Sepúlveda-Guzmán S., Stortini A.M. and Bustos E.* Detection of sodium ion in aqueous soil extract using Prussian blue modified screen-printed electrodes // Electrochim. Acta. 2025. V. 513. P. 145564.
93. *Klink S., Ishige Y. and Schuhmann W.* Prussian Blue Analogues: A Versatile Framework for Solid-Contact Ion-Selective Electrodes with Tunable Potentials // ChemElectroChem. 2017. V. 4. P. 490-494.
94. *Ghosh T., Chung H.-J. and Rieger J.* All-Solid-State Sodium-Selective Electrode with a Solid Contact of Chitosan/Prussian Blue Nanocomposite // Sensors. 2017. V. 17. P. 2536.
95. *Krishnan V., Xidis A.L. and Neff V.D.* Prussian blue solid-state films and membranes as potassium ion-selective electrodes // Anal. Chim. Acta. 1990. V. 239. P. 7-12.
96. *Gabrielli C., Hémery P., Liatsi P., Masure M. and Perrot H.* An Electrogravimetric Study of an All-Solid-State Potassium Selective Electrode with Prussian Blue as the Electroactive Solid Internal Contact // J. Electrochem. Soc. 2005. V. 152. P. H219.
97. *Jarolímová Z., Han T., Mattinen U., Bobacka J. and Bakker E.* Capacitive Model for Coulometric Readout of Ion-Selective Electrodes // Anal. Chem. 2018. V. 90. P. 8700-8707.
98. *Mikhelson K.N.* Ion-Selective Electrodes. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. V. 81. 162 p.

99. *Kokkinos C.* Electrochemical DNA Biosensors Based on Labeling with Nanoparticles // *Nanomaterials*. 2019. V. 9. P. 1361.
100. *Rashid J.I.A. and Yusof N.A.* The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review // *Sens. Biosensing Res.* 2017. V. 16. P. 19-31.
101. *Nimse S., Song K., Sonawane M., Sayyed D. and Kim T.* Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications // *Sensors*. 2014. V. 14. P. 22208-22229.
102. *Ferapontova E.E.* DNA Electrochemistry and Electrochemical Sensors for Nucleic Acids // *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2018. V. 11. P. 197-218.
103. *Drozd M., Pietrzak M.D. and Malinowska E.* SPRi-Based Biosensing Platforms for Detection of Specific DNA Sequences Using Thiolate and Dithiocarbamate Assemblies // *Front. Chem.* 2018. V. 6. P. 173.
104. *McKenna M., Soberon F., Ricco A.J., Daniels S. and Kelleher S.M.* Click chemistry as an immobilization method to improve oligonucleotide hybridization efficiency for nucleic acid assays // *Sens. Actuators B Chem.* 2016. V. 236. P. 286-293.
105. *Gierlich J., Burley G.A., Gramlich P.M.E., Hammond D.M. and Carell T.* Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA // *Org. Lett.* 2006. V. 8. P. 3639-3642.
106. *Sapsford K.E., Algar W.R., Berti L., Gemmill K.B., Casey B.J., Oh E., Stewart M.H. and Medintz I.L.* Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. P. 1904-2074.
107. *El-Sagheer A.H. and Brown T.* Click chemistry with DNA // *Chem. Soc. Rev.* 2010. V. 39. P. 1388-1405.
108. *Mahbubur Rahman M., Li X.B., Lopa N.S., Ahn S.J. and Lee J.J.* Electrochemical DNA hybridization sensors based on conducting polymers // *Sensors*. 2015. V. 15. P. 3801-3829.
109. *Devadoss A. and Chidsey C.E.D.* Azide-modified graphitic surfaces for covalent attachment of alkyne-terminated molecules by "click" chemistry // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 5370-5371.
110. *Yáñez-Sedeño P., González-Cortés A., Campuzano S. and Pingarrón J.M.* Copper(I)-Catalyzed Click Chemistry as a Tool for the Functionalization of Nanomaterials and the Preparation of Electrochemical (Bio)Sensors // *Sensors*. 2019. V. 19. P. 2379.
111. *Hanssen B.L., Siraj S. and Wong D.K.Y.* Recent strategies to minimise fouling in electrochemical detection systems // *Rev. Anal. Chem.* 2016. V. 35. P. 1-28.
112. *Collman J.P., Devaraj N.K. and Chidsey C.E.D.* "Clicking" Functionality onto Electrode Surfaces // *Langmuir*. 2004. V. 20. P. 1051-1053.
113. *Berchmans S., Nirmal R.G., Prabaharan G., Mishra A.K. and Yegnaraman V.* Solution phase electron transfer versus bridge mediated electron transfer across carboxylic acid terminated thiols // *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2006. V. 10. P. 439-446.
114. *Travas-Sejdic J., Peng H., Yu H.H. and Luo S.C.* DNA detection using functionalized conducting polymers // *Methods in Molecular Biology*. 2011. V. 751. P. 437-452.
115. *Paleček E. and Bartošík M.* Electrochemistry of nucleic acids // *Chem. Rev.* 2012. V. 112. P. 3427-3481.
116. *Ipek Y., Dinçer H. and Koca A.* Electrode modification based on "click electrochemistry" between terminal-alkynyl substituted cobalt phthalocyanine and 4-azidoaniline // *Sens. Actuators B Chem.* 2014. V. 193. P. 830-837.

117. *Lakard B.* Electrochemical Biosensors Based on Conducting Polymers: A Review // Applied Sciences. 2020. V. 10. P. 6614.
118. *Малев В., Кондратьев В., Тимонов А.* Синтез электроактивных полимеров Полимер-модифицированные электроды. Санкт-Петербург: Нестор-История, 2012. С. 18-43.
119. *Nasybulin E., Wei S., Kymmissis I. and Levon K.* Effect of solubilizing agent on properties of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) electrodeposited from aqueous solution // Electrochim. Acta. 2012. V. 78. P. 638-643.
120. *Bobacka J.* Potential Stability of All-Solid-State Ion-Selective Electrodes Using Conducting Polymers as Ion-to-Electron Transducers // Anal. Chem. 1999. V. 71. P. 4932-4937.
121. *Wen Y. and Xu J.* Scientific Importance of Water-Processable PEDOT-PSS and Preparation, Challenge and New Application in Sensors of Its Film Electrode: A Review // J. Polym. Sci. A Polym. Chem. 2017. V. 55. P. 1121-1150.
122. *Galán T., Prieto-Simón B., Alvira M., Eritja R., Götz G., Bäuerle P. and Samitier J.* Label-free electrochemical DNA sensor using "click"-functionalized PEDOT electrodes // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 74. P. 751-756.
123. *Daugaard A.E., Hvilsted S., Hansen T.S. and Larsen N.B.* Conductive Polymer Functionalization by Click Chemistry // Macromolecules. 2008. V. 41. P. 4321-4327.
124. *Gu H., Su X.D. and Loh K.P.* Electrochemical Impedance Sensing of DNA Hybridization on Conducting Polymer Film-Modified Diamond // J. Phys. Chem. B. 2005. V. 109. P. 13611-13618.
125. *Radhakrishnan S., Sumathi C., Dharuman V. and Wilson J.* Polypyrrole nanotubes-polyaniline composite for DNA detection using methylene blue as intercalator // Analytical Methods. 2013. V. 5. P. 1010-1015.
126. *Rasheed P.A. and Sandhyarani N.* Electrochemical DNA sensors based on the use of gold nanoparticles: a review on recent developments // Microchimica Acta. 2017. V. 184. P. 981-1000.
127. *Guo Y., Su S., Wei X., Zhong Y., Su Y., Huang Q., Fan C. and He Y.* A silicon-based electrochemical sensor for highly sensitive, specific, label-free and real-time DNA detection // Nanotechnology. 2013. V. 24. P. 444012.
128. *Patolsky F., Katz E. and Willner I.* Amplified DNA Detection by Electrogenerated Biochemiluminescence and by the Catalyzed Precipitation of an Insoluble Product on Electrodes in the Presence of the Doxorubicin Intercalator // Angewandte Chemie International Edition. 2002. V. 41. P. 3398-3402.
129. *Yang L., Wang J., Lü H. and Hui N.* Electrochemical sensor based on Prussian blue/multi-walled carbon nanotubes functionalized polypyrrole nanowire arrays for hydrogen peroxide and microRNA detection.
130. *Bezinge L., Suea-Ngam A., Demello A.J. and Shih C.J.* Nanomaterials for molecular signal amplification in electrochemical nucleic acid biosensing: Recent advances and future prospects for point-of-care diagnostics // Mol. Syst. Des. Eng. 2020. V. 5. P. 49-66.
131. *Kaur B., Malecka K., Cristaldi D.A., Chay C.S., Mames I., Radecka H., Radecki J. and Stulz E.* Approaching single DNA molecule detection with an ultrasensitive electrochemical genosensor based on gold nanoparticles and cobalt-porphyrin DNA conjugates // Chemical Communications. 2018. V. 54. P. 11108-11111.
132. *Yu R., Wang R., Wang Z., Zhu Q. and Dai Z.* Applications of DNA-nanozyme-based sensors // Analyst. 2021. V. 146. P. 1127-1141.

133. *Tian L., Qi J., Oderinde O., Yao C., Song W. and Wang Y.* Planar intercalated copper (II) complex molecule as small molecule enzyme mimic combined with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanozyme for bienzyme synergistic catalysis applied to the microRNA biosensor // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 110. P. 110-117.
134. *Zhang G.Y., Deng S.Y., Cai W.R., Cosnier S., Zhang X.J. and Shan D.* Magnetic Zirconium Hexacyanoferrate(II) Nanoparticle as Tracing Tag for Electrochemical DNA Assay // Anal. Chem. 2015. V. 87. P. 9093-9100.
135. *Zhao R.N., Feng Z., Zhao Y.N., Jia L.P., Ma R.N., Zhang W., Shang L., Xue Q.W. and Wang H.S.* A sensitive electrochemical aptasensor for Mucin 1 detection based on catalytic hairpin assembly coupled with PtPdNPs peroxidase-like activity // Talanta. 2019. V. 200. P. 503-510.
136. *Liu J., Tian M. and Liang Z.* DNA analysis based on the electrocatalytic amplification of gold nanoparticles // Electrochim. Acta. 2013. V. 113. P. 186-193.
137. *Wu N.Y., Gao W., He X., Chang Z. and Xu M.T.* Direct electrochemical sensor for label-free DNA detection based on zero current potentiometry // Biosens. Bioelectron. 2013. V. 39. P. 210-214.
138. *Du M., Yang T., Li X. and Jiao K.* Fabrication of DNA/graphene/polyaniline nanocomplex for label-free voltammetric detection of DNA hybridization // Talanta. 2012. V. 88. P. 439-444.
139. *Spain E., Kojima R., Kaner R.B., Wallace G.G., O'Grady J., Lacey K., Barry T., Keyes T.E. and Forster R.J.* High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalised polyaniline nanofibres // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. P. 2613-2618.
140. *Liu F., Xiang G., Jiang D., Zhang L., Chen X., Liu L., Luo F., Li Y., Liu C. and Pu X.* Ultrasensitive strategy based on PtPd nanodendrite/nano-flower-like@GO signal amplification for the detection of long non-coding RNA // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 74. P. 214-221.
141. *Kim E. and Viatour P.* Hepatocellular carcinoma: old friends and new tricks // Exp. Mol. Med. 2020. V. 52. P. 1898-1907.
142. *Lapitan L.D.S., Pietrzak M., Krawczyk M. and Malinowska E.* Serum biomarkers and ultrasensitive biosensors for diagnosis of early-stage hepatocellular carcinoma // Sens. Actuators B Chem. 2023. V. 393. P. 134209.
143. *Xie H., Ma H. and Zhou D.* Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma // Biomed Res. Int. 2013. V. 2013.
144. *Li J.J., Shang L., Jia L.P., Ma R.N., Zhang W., Jia W.L., Wang H.S. and Xu K.H.* An ultrasensitive electrochemiluminescence sensor for the detection of HULC based on Au@Ag/GQDs as a signal indicator // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2018. V. 824. P. 114-120.
145. *Stolarek R., Bialasiewicz P., Krol M. and Nowak D.* Breath analysis of hydrogen peroxide as a diagnostic tool // Clinica Chimica Acta. 2010. V. 411. P. 1849-1861.
146. *Konstantinidi E.M., Lappas A.S., Tzortzi A.S. and Behrakis P.K.* Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects // The Scientific World Journal. 2015. V. 2015.
147. *Dosedělová V., Foret F., Doubková M., Brat K. and Kubáň P.* A novel temperature-controlled open source microcontroller based sampler for collection of exhaled breath condensate in point-of-care diagnostics // Talanta. 2022. V. 237. P. 122984.
148. *Neville D.M., Fogg C., Brown T.P., Jones T.L., Lanning E., Bassett P. and Chauhan A.J.* Using the Inflammacheck Device to Measure the Level of Exhaled Breath Condensate Hydrogen Peroxide in Patients With Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (The

- EXHALE Pilot Study): Protocol for a Cross-Sectional Feasibility Study // JMIR Res. Protoc. 2018. V. 7. P. e25.
149. Dennis J.O., Rabih A.A.S., Md Khir M.H., Abdullah M.A. and Ahmed M.G.A. Review on Exhaled Hydrogen Peroxide as a Potential Biomarker for Diagnosis of Inflammatory Lung Disease // Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering. 2015. V. 22. P. 77-87.
  150. Bruhn A., Liberona L., Lisboa C. and Borzone G. Limitations of the Technique to Determine Hydrogen Peroxide Levels in Exhaled Breath Condensate From Patients With Adult Respiratory Distress Syndrome // Archivos de Bronconeumología (English Edition). 2005. V. 41. P. 542-546.
  151. Chen Y.-C. and O'Hare D. Exhaled breath condensate based breath analyser – a disposable hydrogen peroxide sensor and smart analyser // Analyst. 2020. V. 145. P. 3549-3556.
  152. Maier D., Laubender E., Basavanna A., Schumann S., Güder F., Urban G.A. and Dincer C. Toward Continuous Monitoring of Breath Biochemistry: A Paper-Based Wearable Sensor for Real-Time Hydrogen Peroxide Measurement in Simulated Breath // ACS Sens. 2019. V. 4. P. 2945-2951.
  153. Zappacosta B., Persichilli S., Mormile F., Minucci A., Russo A., Giardina B. and De Sole P. A fast chemiluminescent method for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurement in exhaled breath condensate // Clinica Chimica Acta. 2001. V. 310. P. 187-191.
  154. Gerritsen W.B., Zanen P., Bauwens A.A., van den Bosch J.M. and Haas F.J. Validation of a new method to measure hydrogen peroxide in exhaled breath condensate // Respir. Med. 2005. V. 99. P. 1132-1137.
  155. Inonu H., Doruk S., Sahin S., Erkorkmaz U., Celik D., Celikel S. and Seyfikli Z. Oxidative Stress Levels in Exhaled Breath Condensate Associated With COPD and Smoking // Respir. Care. 2012. V. 57. P. 413-419.
  156. Ferreira I.M., Hazari M.S., Gutierrez C., Zamel N. and Chapman K.R. Exhaled Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. V. 164. P. 1012-1015.
  157. Quimbar M.E., Davis S.Q., Al-Farra S.T., Hayes A., Jovic V., Masuda M. and Lippert A.R. Chemiluminescent Measurement of Hydrogen Peroxide in the Exhaled Breath Condensate of Healthy and Asthmatic Adults // Anal. Chem. 2020. V. 92. P. 14594-14600.
  158. Kakeshpour T., Metaferia B., Zare R.N. and Bax A. Quantitative detection of hydrogen peroxide in rain, air, exhaled breath, and biological fluids by NMR spectroscopy // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2022. V. 119. e2121542119
  159. Nowak D., Antczak A., Krol M., Pietras T., Shariati B., Bialasiewicz P., Jeczkowski K. and Kula P. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers // European Respiratory Journal. 1996. V. 9. P. 652-657.
  160. Stufano A., Isgrò C., Palese L.L., Caretta P., De Maria L., Lovreglio P. and Sardanelli A.M. Oxidative Damage and Post-COVID Syndrome: A Cross-Sectional Study in a Cohort of Italian Workers // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 7445.
  161. Godeau G., N'Na J., Boutet K., Darmanin T. and Guittard F. Postfunctionalization of Azido or Alkyne Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Surfaces: Superhydrophobic and Parahydrophobic Surfaces // Macromol. Chem. Phys. 2016. V. 217. P. 554-561.
  162. Lavagnini I., Antiochia R. and Magno F. An Extended Method for the Practical Evaluation of the Standard Rate Constant from Cyclic Voltammetric Data // Electroanalysis. 2004. V. 16. P. 505-506.

163. *Trachioti M.G., Lazanas A.Ch. and Prodromidis M.I.* Shedding light on the calculation of electrode electroactive area and heterogeneous electron transfer rate constants at graphite screen-printed electrodes // *Microchimica Acta*. 2023. V. 190. P. 251.
164. *Agarwal R.* The Nicholson Method of Determination of the Standard Rate Constant of a Quasireversible Redox Couple Employing Cyclic Voltammetry: Everything One Needs to Know! // *ACS Electrochemistry*. 2025. V. 1. P. 1885-1894.
165. *Bard A.J. and Faulkner L.R.* *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd Edition. New York: Wiley, 2001. 850 p.
166. *Wang Y., Limon-Petersen J.G., Compton R.G.* Measurement of the diffusion coefficients of  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  and  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$  in aqueous solution using microelectrode double potential step chronoamperometry // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2011. V. 652. P. 13-17.
167. *Komkova M.A., Karyakina E.E. and Karyakin A.A.* Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. V. 140. P. 11302-11307.
168. *Komkova M.A., Karyakina E.E. and Karyakin A.A.* Noiseless Performance of Prussian Blue Based (Bio)sensors through Power Generation // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 6290-6294.
169. *Keresten V., Solovyeva E. and Mikhelson K.* The Origin of the Non-Constancy of the Bulk Resistance of Ion-Selective Electrode Membranes within the Nernstian Response Range // *Membranes (Basel)*. 2021. V. 11. P. 344.
170. *Sigel H., Scheller K.H. and Prijs B.* Metal ion/buffer interactions. Stability of alkali and alkaline earth ion complexes with triethanolamine (tea), 2-amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (tris)and 2-[bis(2-hydroxyethyl)-amino] 2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Bistris) in aqueous and mixed solvents // *Inorganica Chim. Acta*. 1982. V. 66. P. 147-155.
171. *Lee H.-W., Pasta M., Wang R.Y., Ruffo R. and Cui Y.* Effect of the alkali insertion ion on the electrochemical properties of nickel hexacyanoferrate electrodes // *Faraday Discuss.* 2014. V. 176. P. 69-81.
172. *Vanamo U., Hupa E., Yrjänä V. and Bobacka J.* New Signal Readout Principle for Solid-Contact Ion-Selective Electrodes // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 4369-4374.
173. *Ruzicka J. and Hansen H.* *Flow Injection Analysis*. New York: John Wiley & Sons, 1988. 528 p.
174. *McKelvie I.D.* Principles of flow injection analysis // *Compr. Anal. Chem.* 2008. V. 54. P. 81-109.
175. *Ruzicka J.* Flow-injection methods: a new tool for instrumental analysis // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A*. 1982. V. 305. P. 645-656.
176. *Han T., Chen S., Song T., Han D. and Niu L.* Single-Frequency Effective Capacitance  $C_{\text{ec}}$  and Membrane Resistance  $Z$  Readout for Solid-Contact Ion-Selective Electrodes // *ACS Measurement Science Au.* 2025. V. 5. P. 216-225.
177. *Fenoy G.E., Hasler R., Quartinello F., Marmisollé W.A., Lorenz C., Azzaroni O., Bäuerle P. and Knoll W.* "Clickable" Organic Electrochemical Transistors // *JACS Au.* 2022. V. 2. P. 2778-2790.
178. *Zhang S., Hou J., Zhang R., Xu J., Nie G. and Pu S.* Electrochemical polymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene in aqueous solution containing N-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside // *Eur. Polym. J.* 2006. V. 42. P. 149-160.
179. *Shavokshina V.A., Komkova M.A., Aparin I.O., Zatsepin T.S., Karyakin A.A. and Andreev E.A.* Improved Electroactivity of Redox Probes onto Electropolymerized Azidomethyl-PEDOT:

Enabling Click Chemistry for Advanced (Bio)Sensors // ACS Appl. Polym. Mater. 2021. V. 3. P. 1518-1524.

180. Шавокшина В.А. Электрохимические сенсорные платформы на основе поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофена) для детекции олигонуклеотидов. ВКР, 2021. 65 с.
181. Láng G.G., Ujvári M., Vesztergom S., Kondratiev V., Gubicza J. and Szekeres K.J. The Electrochemical Degradation of Poly(3,4-ethylenedioxothiophene) Films Electrodeposited from Aqueous Solutions // Zeitschrift für Physikalische Chemie. 2016. V. 230. P. 1281-1302.
182. Tamburri E., Orlanducci S., Toschi F., Terranova M.L. and Passeri D. Growth mechanisms, morphology, and electroactivity of PEDOT layers produced by electrochemical routes in aqueous medium // Synth. Met. 2009. V. 159. P. 406-414.
183. Garreau S., Louarn G., Buisson J.P., Froyer G. and Lefrant S. In situ spectroelectrochemical Raman studies of poly(3,4-ethylenedioxothiophene) (PEDT) // Macromolecules. 1999. V. 32. P. 6807-6812.
184. Kvarnström C., Neugebauer H., Blomquist S., Ahonen H.J., Kankare J. and Ivaska A. In situ spectroelectrochemical characterization of poly(3,4-ethylenedioxothiophene) // Electrochim. Acta. 1999. V. 44. P. 2739-2750.
185. Hagiwara T., Yamaura M., Sato K., Hirasaka M. and Iwata K. Synthesis and properties of poly(3,4-dimethoxythiophene) // Synth. Met. 1989. V. 32. P. 367-379.
186. Bu H.B., Götz G., Reinold E., Vogt A., Schmid S., Blanco R., Segura J.L. and Bäuerle P. "Click"-functionalization of conducting poly(3,4-ethylenedioxothiophene) (PEDOT) // Chemical Communications. 2008. P. 1320-1322.
187. Compton R.G. and Banks C.E. Understanding voltammetry. World Scientific Publishing Company, 2007. 371 p.
188. McCreery R.L. Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry // Chem. Rev. 2008. V. 108. P. 2646-2687.
189. Presolski S.I., Hong V.P. and Finn M.G. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation // Curr. Protoc. Chem. Biol. 2011. V. 3. P. 153-162.
190. Wen S.H., Wang Y., Yuan Y.H., Liang R.P. and Qiu J.D. Electrochemical sensor for arsenite detection using graphene oxide assisted generation of prussian blue nanoparticles as enhanced signal label // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1002. P. 82-89.
191. Cutler J.I., Zheng D., Xu X., Giljohann D.A. and Mirkin C.A. Polyvalent oligonucleotide iron oxide nanoparticle "click" conjugates // Nano Lett. 2010. V. 10. P. 1477-1480.
192. Komkova M.A., Shavokshina V.A., Zarochintsev A.A., Melnik D.M., Aparin I.O., Zatsepин T.S. and Karyakin A.A. Catalytically synthesized Prussian Blue nanozymes as labels for electrochemical DNA/RNA sensors // Talanta. 2023. V. 257. P. 124337.
193. Jing T.W., Jeffrey A.M., DeRose J.A., Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S., Harrington R.E., Appella E., Larsen J., Vaught A., Rekesh D., Lu F.X. and Lindsay S.M. Structure of hydrated oligonucleotides studied by in situ scanning tunneling microscopy // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993. V. 90. P. 8934-8938.
194. Findlay J.W.A. and Dillard R.F. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays // AAPS J. 2007. V. 9. P. E260-E267.
195. Kutluk H., Bruch R., Urban G.A. and Dincer C. Impact of assay format on miRNA sensing: Electrochemical microfluidic biosensor for miRNA-197 detection // Biosens. Bioelectron. 2020. V. 148. P. 111824.

196. *Komkova M.A., Ibragimova O.A., Karyakina E.E. and Karyakin A.A.* Catalytic Pathway of Nanozyme "artificial Peroxidase" with 100-Fold Greater Bimolecular Rate Constants Compared to Those of the Enzyme // *J. Phys. Chem. Lett.* 2021. V. 12. P. 171-176.
197. *Gong P. and Levicky R.* DNA surface hybridization regimes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. P. 5301-5306.
198. *Hassan R.A., Heng L.Y. and Tan L.L.* Novel DNA Biosensor for Direct Determination of Carrageenan // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 6379.
199. *Wang C. and Liu H.* Factors influencing degradation kinetics of mRNAs and half-lives of microRNAs, circRNAs, lncRNAs in blood in vitro using quantitative PCR // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. P. 7259.
200. *Andreev E.A., Shavokshina V.A., Nikitina V.N., Pozdnyakova D.D., Baranova I.A., Chuchalin A.G. and Karyakin A.A.* Sensor platform for noninvasive evaluation of pulmonary oxidative status // *Talanta.* 2025. V. 290. P. 127792.
201. *Effros R.M., Biller J., Foss B., Hoagland K., Dunning M.B., Castillo D., Bosbous M., Sun F. and Shaker R.* A Simple Method for Estimating Respiratory Solute Dilution in Exhaled Breath Condensates // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003. V. 168. P. 1500-1505.
202. *Komkova M.A., Karpova E.V., Sukhorukov G.A., Sadovnikov A.A. and Karyakin A.A.* Estimation of continuity of electroactive inorganic films based on apparent anti-Ohmic trend in their charge transfer resistance // *Electrochim. Acta.* 2016. V. 219. P. 588-591.
203. *Noël J., Médard J., Combellas C. and Kanoufi F.* Prussian Blue Degradation during Hydrogen Peroxide Reduction: A Scanning Electrochemical Microscopy Study on the Role of the Hydroxide Ion and Hydroxyl Radical // *ChemElectroChem.* 2016. V. 3. P. 1178-1184.
204. *Erinmwiningbovo C., Koster D., Brogioli D. and La Mantia F.* Dynamic Impedance Spectroscopy of Nickel Hexacyanoferrate Thin Films // *ChemElectroChem.* 2019. V. 6. P. 5387-5395.
205. *Hao X., Yan T., Wang Z., Liu S., Liang Z., Shen Y. and Pritzker M.* Unipolar pulse electrodeposition of nickel hexacyanoferrate thin films with controllable structure on platinum substrates // *Thin Solid Films.* 2012. V. 520. P. 2438-2448.
206. *Sasikumar S. and Unniappan S.* SARS-CoV-2 Infection and the Neuroendocrine System // *Neuroendocrinology.* 2024. P. 1158-1175.