

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Никитина Вита Николаевна

**Электрохимические сенсоры на сахара и гидроксикислоты на
основе поли(аминофенилборных кислот)**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Карякин Аркадий Аркадьевич**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Сергеев Владимир Глебович,**
доктор химических наук, заведующий кафедрой
коллоидной химии, химический факультет, МГУ имени
М.В. Ломоносова, г. Москва

Супрун Елена Владимировна,
доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник, Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Научно-исследовательский
институт биомедицинской химии имени В.Н.
Ореховича" (ИБМХ), г. Москва

Козицина Алиса Николаевна,
кандидат химических наук, доцент,
Химико-технологический институт Уральского
федерального университета имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург

Защита состоится «17» октября 2018 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.02.05 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, ауд. 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, 27 и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/119534909/>

Автореферат разослан «__» сентября 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ананьева И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Сахара и гидроксикислоты играют важнейшую роль в биологических процессах в природе и являются распространенными аналитами в биохимии, клинической диагностике, контроле качества медицинских препаратов, пищевой промышленности. Определение концентрации ключевых метаболитов, лактата и глюкозы, в физиологических жидкостях позволяет судить о наличии патологических состояний и заболеваний, таких как сахарный диабет, гипоксия тканей, дыхательная недостаточность.

Среди экспрессных, надежных, простых в эксплуатации и не требующих трудоемкой пробоподготовки методов лидирующие позиции занимают электрохимические методы. Некоторые моносахариды (глюкоза) и гидроксикислоты (лактат) возможно детектировать амперометрически с помощью биосенсоров на основе соответствующих ферментов-оксидаз. Однако применение ферментов в анализе ограничено в первую очередь по причине низкой стабильности биомолекул.

Биомиметика аффинных реакций включает создание синтетических рецепторов на основе аминокислот, нуклеиновых кислот, функционализированных полимеров или полимеров с молекулярными отпечатками, способных к специфическому распознаванию аналитов за счет определенных функциональных групп. Сенсоры на основе синтетических рецепторов при приемлемой чувствительности обладают преимуществами по сравнению с биосенсорами, а именно: они стабильны на воздухе при комнатной температуре, методы их получения просты и недороги, датчики возможно регенерировать и использовать многократно.

Синтетическими рецепторами для создания сенсоров на полиолы (многоатомные спирты, углеводы) и гидроксикислоты могут служить производные фенилборных кислот, способные обратимо и селективно связываться с 1,2- или 1,3-диольными функциональными группировками с образованием устойчивых циклических боронатных эфиров в водных средах. В качестве чувствительного слоя безреагентных электрохимических сенсоров на глюкозу, фруктозу, лактат возможно использовать проводящие полимеры, имеющие в своей структуре фрагменты фенилборной кислоты (**ФБК**). В таком случае распознавание аналита будет осуществляться борнокислыми функциональными группами, содержащимися в полимере, а проводящие свойства полимера обеспечат преобразование химического сигнала в электрический.

Известные безреагентные электрохимические сенсоры на основе аффинных взаимодействий при регистрации сигнала демонстрируют снижение проводимости чувствительного слоя, что не позволяет различать аналитический сигнал (специфические взаимодействия с аналитом) на фоне неспецифических процессов, которые также всегда приводят к снижению проводимости. В частности, известные

сенсоры на основе ФБК не имеют практической ценности по причине низкой селективности и недостаточной чувствительности метода детектирования.

Таким образом, **целью работы** являлось создание безреагентных электрохимических сенсоров на основе проводящих полимеров, аналогов полианилина, функционализированных борной кислотой, для селективного определения концентрации сахаров и гидроксикислот, в частности, при решении задач неинвазивной клинической диагностики.

Поставленная цель требует решения следующих **задач**:

1) осуществить электрохимическую полимеризацию аминифенилборных кислот для получения электропроводящих полимерных пленок на поверхности электродов;

2) исследовать синтезированные поли(аминофенилборные кислоты) (**поли(АФБК)**) физико-химическими методами;

3) исследовать проводящие свойства полученных полимеров, в частности, при их взаимодействии с сахарами и гидроксикислотами методом спектроскопии электрохимического импеданса (**СЭХИ**);

4) выявить природу аналитического сигнала сенсоров на основе поли(АФБК);

5) синтезировать поли(АФБК) с молекулярными отпечатками для повышения селективности сенсоров на сахара и гидроксикислоты;

6) проанализировать смеси сахаров и гидроксикислот с помощью сенсоров, обладающих различной селективностью;

7) создать ферментативный сенсор на основе поли(АФБК) с молекулярными отпечатками для определения концентрации лактата в поте;

8) провести проверку правильности определения концентрации лактата в поте независимым методом.

Научная новизна. Путем электрополимеризации *мета*-аминофенилборной кислоты (**м-АФБК**) в присутствии фторид-ионов, активирующих электрополимеризацию, синтезирован электропроводящий полимер (**поли(м-АФБК)**). Полученная поли(м-АФБК) сохраняет электроактивность в нейтральных водных растворах.

Методом спектроскопии электрохимического импеданса зарегистрировано обратимое увеличение проводимости поли(м-АФБК) на поверхности электрода в присутствии сахаров и гидроксикислот. Главное достоинство разработанного сенсора состоит в том, что увеличение проводимости чувствительного полимерного слоя в ответ на специфические взаимодействия позволяет отличать их от неспецифических реакций, всегда приводящих к снижению проводимости полимера.

Осуществлен бесфторидный синтез поли(аминофенилборной кислоты) путем электрополимеризации *орто*-изомера аминофенилборной кислоты (*о*-АФБК). В результате электрополимеризации *о*-АФБК получен электропроводящий полимер (**поли(*о*-АФБК)**), наблюдаемые константы связывания которого с сахарами и гидроксикислотами соответствуют наблюдаемым константам связывания для свободной незамещенной фенилборной кислоты, являющейся элементом структуры поли(АФБК). Вид рН-зависимостей констант связывания поли(АФБК) соответствует закономерностям, известным для фенилборных кислот.

Синтезированы электропроводящие полимеры с молекулярными отпечатками гидроксикислот путем электрополимеризации *м*-АФБК в присутствии солей α -гидроксикислот. Образование проводящих полимеров из *мета*-изомера АФБК в результате бесфторидного синтеза подтверждает включение гидроксикислот в полимерную матрицу. Полимеры с молекулярными отпечатками обладают как в 1.5-14 раз более высокими константами связывания с определенными аналитами, так и более низкими константами связывания с другими полиолами по сравнению с полимером без молекулярных отпечатков. Это позволяет достигать желаемой селективности сенсоров. Продемонстрирована возможность раздельного определения сахаров и гидроксикислот в модельных смесях фруктозы и лактата.

Путем синтеза поли(АФБК) с молекулярными отпечатками лактата на планарных трехэлектродных структурах создан неферментативный сенсор для определения концентрации лактата в поте. Правильность определения концентрации лактата для образцов пота подтверждена независимым методом с использованием высокоселективного биосенсора на основе лактатоксидазы.

Практическая и теоретическая значимость. Созданы безреагентные сенсоры на основе аффинных взаимодействий, позволяющие дифференцировать специфические и неспецифические реакции, чем обусловлена их пригодность для практического применения. Проводимость чувствительного полимерного слоя увеличивается в результате взаимодействия с аналитами, в то время как неспецифические реакции приводят к уменьшению проводимости поли(АФБК).

Для каждого из мономеров (*о*- и *м*-АФБК) разработаны условия электрополимеризации, при которых достигаются оптимальные аналитические характеристики сенсоров. Сенсоры на основе полимера, синтезированного из *о*-АФБК, характеризуются коэффициентом чувствительности градуировочной зависимости сопротивления полимера от концентрации глюкозы $2 \pm 1 \text{ M}^{-1}$ (предел обнаружения (ПО) 7.5 мМ, диапазон определяемых концентраций (ДОК) 20–250 мМ); коэффициентом чувствительности определения лактата $8 \pm 1 \text{ M}^{-1}$, (ПО 2.0 мМ, ДОК 14–200 мМ). Сенсоры на основе полимера, синтезированного из *м*-

АФБК, характеризуются коэффициентом чувствительности определения глюкозы $5 \pm 1 \text{ M}^{-1}$ (ПО 2.9 мМ, ДОК 8–130 мМ), коэффициентом чувствительности определения лактата $14 \pm 1 \text{ M}^{-1}$ (ПО 1.1 мМ, ДОК 5–100 мМ). Таким образом, варьируя исходный мономер и условия синтеза можно управлять характеристиками сенсоров. Электроды, модифицированные поли(*m*-АФБК) в присутствии фторид-иона, характеризуются более высокой чувствительностью по сравнению с электродами, модифицированными поли(*o*-АФБК) в результате бесфторидного синтеза.

Поли(аминофенилборные кислоты) с молекулярными отпечатками различных гидроксикислот (молочной, винной, лимонной) обладают повышенными константами связывания с целевыми молекулами, в то время как константы связывания с другим полиолами понижаются. Так, коэффициент чувствительности сенсоров на лактат на основе поли(АФБК) с молекулярными отпечатками лактата (**поли(АФБК)-Л**) повышен в 9 раз по сравнению с нетемплатированным полимером (без молекулярных отпечатков). Предел обнаружения лактата понижен на порядок, до 0.3 мМ, а диапазон определяемых концентраций смещен в область более низких содержаний. Селективность сенсора на основе поли(АФБК)-Л к лактату относительно глюкозы повышена: коэффициент селективности $k_{\text{глюкоза/лактат}}$ равен 0.026, что на порядок ниже, чем в случае нетемплатированного полимера. Проведено селективное определение концентрации полиолов и гидроксикислот в их смеси с использованием разработанных неферментативных сенсоров с различной селективностью: для модельных смесей лактата и фруктозы степень извлечения не менее 89%.

Создан импедиметрический сенсор для определения концентрации лактата путем синтеза проводящего полимера из *m*-АФБК в присутствии лактат-иона на поверхности планарных графитовых электродных структур. Сенсор на основе поли(АФБК)-Л обладает следующими аналитическими характеристиками: коэффициент чувствительности $23 \pm 3 \text{ M}^{-1}$, ПО 1.5 мМ, ДОК 3–100 мМ. Новый неферментативный сенсор применен для определения концентрации лактата в капле пота, нанесенной на поверхность трехэлектродной структуры. Правильность анализа подтверждена методом сравнения – с помощью высокочувствительного и высокоселективного амперометрического биосенсора на основе фермента лактатоксидазы. Аналитические характеристики сенсора на основе поли(АФБК)-Л остаются неизменными при хранении на воздухе при комнатной температуре в течение 6 месяцев, что недостижимо при использовании биосенсоров. Таким образом, разработанный сенсор может быть предложен для неинвазивной диагностики гипоксии по анализу пота на содержание лактата.

Положения, выносимые на защиту:

1. Электрополимеризация *орто*- и *мета*-аминофенилборных кислот, приводящая к получению проводящих поли(аминофенилборных кислот).
2. Повышение проводимости поли(АФБК) при взаимодействиях с сахарами и гидроксикислотами.
3. Физико-химические закономерности, подтверждающие, что повышение проводимости поли(АФБК) вызвано взаимодействием сахаров или гидроксикислот с борнокислыми группами полимера.
4. Безреагентные импедиметрические сенсоры на сахара и гидроксикислоты, позволяющие по увеличению проводимости дифференцировать специфические взаимодействия от неспецифических реакций (уменьшение проводимости).
5. Повышение селективности сенсоров на основе поли(АФБК) путем синтеза полимеров с молекулярными отпечатками гидроксикислот для отдельного селективного определения сахаров и гидроксикислот в их смеси.
6. Неферментативный высокостабильный сенсор, полученный путем синтеза поли(АФБК) с молекулярными отпечатками лактата, для анализа пота.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на конференциях: Modern Electrochemical methods (Чехия, 2018), Baltic polymer symposium 2017 (Эстония, 2017), International Conference «Biocatalysis-2017: Fundamentals and applications» (Россия, 2017), V Съезд Биохимиков России (Россия, 2016), IX Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА 2016» (Россия, 2016), научная конференция грантодержателей РФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века» (Россия, 2016); 10th International Frumkin Symposium on Electrochemistry (Россия, 2015), International Conference «Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications» (Россия, 2015); International Workshop on Electrochemistry of Electroactive Materials (Германия, 2015); IX Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2014» (Россия, 2014); VI Всероссийская Каргинская конференция "Полимеры-2014" (Россия, 2014).

Публикации. Результаты диссертационной работы опубликованы в 5 статьях в реферируемых научных журналах из списка ВАК РФ и индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и 11 тезисах докладов на всероссийских и международных конференциях.

Личный вклад соискателя. В основу диссертационной работы положены результаты научных исследований, выполненных на химическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова во время обучения в очной аспирантуре на кафедре аналитической химии в период 2013 –

2017 гг. Личный вклад автора состоял в постановке задач исследования, анализе и систематизации литературных данных, подготовке, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертации и представлении работы на научных конференциях.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (155 библиографических ссылок). Работа изложена на 165 страницах машинописного текста и включает 86 рисунков и 30 таблиц.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке РФФИ 16-13-00010 и совместной лаборатории химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и LG Electronics.

Используемые сокращения. *m*-АФБК – *m*-аминофенилборная кислота, *o*-АФБК – *o*-аминофенилборная кислота, поли(АФБК) – поли(аминофенилборные кислоты), поли(*m*-АФБК) – поли(АФБК), полученная из *m*-АФБК; поли(*o*-АФБК)–поли(АФБК), полученная из *o*-АФБК; поли(АФБК)-Т – поли(АФБК), синтезированная в присутствии тартрат-иона; поли(АФБК)-Ц – поли(АФБК), синтезированная в присутствии цитрат-иона; поли(АФБК)-Л – поли(АФБК), синтезированная в присутствии лактат-иона; ЦВА – циклическая вольтамперограмма, ПИ – потенциометрические измерения, СЭХИ – спектроскопия электрохимического импеданса, ПО – предел обнаружения, ДОК – диапазон определяемых концентраций, ФБК – фенилборная кислота, С – концентрация, $K_{\text{набл}}$ – наблюдаемая константа связывания, K_a^B – константа кислотности борной кислоты, $R_{\text{пз}}$ – сопротивление переноса заряда, $C_{\text{дс}}$ – емкость двойного электрического слоя, R_{Ω} – объемное сопротивление фонового раствора, W_0 – диффузионный импеданс при отражающих граничных условиях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во **введении** обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, показаны научная новизна работы и ее практическая значимость.

Обзор литературы (Главы 1-4)

Глава 1 посвящена сенсорным материалам и сенсорам для определения концентрации сахаров и гидроксикислот. Производные фенилборной кислоты являются наиболее перспективными синтетическими рецепторами для разработки ферментативных сенсоров. Рассмотрены физико-химические аспекты взаимодействия ФБК с сахарами и гидроксикислотами (*раздел 1.2*). В *разделе 1.3* представлен обзор оптических и электрохимических сенсоров на основе ФБК и ее производных, рассмотрены принципы их работы. В *разделе 1.4* освещены различные способы иммобилизации ФБК на подложку в сочетании с методами детектирования. **Глава 2** посвящена проводящим полимерам, среди которых особое место отведено полианилину. Рассмотрены особенности структуры, проводящие свойства, способы и механизм синтеза проводящего полианилина. Особое внимание уделено электрохимической полимеризации анилина и аминифенилборной кислоты, исследованиям свойств проводящих полимеров электрохимическими методами. Проанализированы литературные данные об использовании полианилина и поли(АФБК) в качестве чувствительных элементов сенсоров. В **главе 3** описаны преимущества применения в анализе полимеров с молекулярными отпечатками и рассмотрены способы создания молекулярных отпечатков при использовании производных ФБК в качестве чувствительного слоя сенсора. В **главе 4** рассматриваются основы спектроскопии электрохимического импеданса как наиболее чувствительного и малодеструктивного метода исследования свойств проводящих полимеров, а также одного из широко распространенных электрохимических методов регистрации аналитического сигнала сенсоров.

Несмотря на широкое разнообразие методов определения сахаров и гидроксикислот с использованием ФБК, подавляющее большинство из них не обладает должной специфичностью и достаточной селективностью для практических приложений. Сделан вывод, что для создания безреагентного электрохимического сенсора на основе ФБК наиболее обосновано использование функционализированных борной кислотой проводящих полимеров. Для повышения селективности полимерных сенсорных материалов необходимо разработать способ синтеза полимеров с молекулярными отпечатками. Обеспечить селективность и безреагентность сенсора для определения сахаров и гидроксикислот может позволить использование метода спектроскопии электрохимического импеданса.

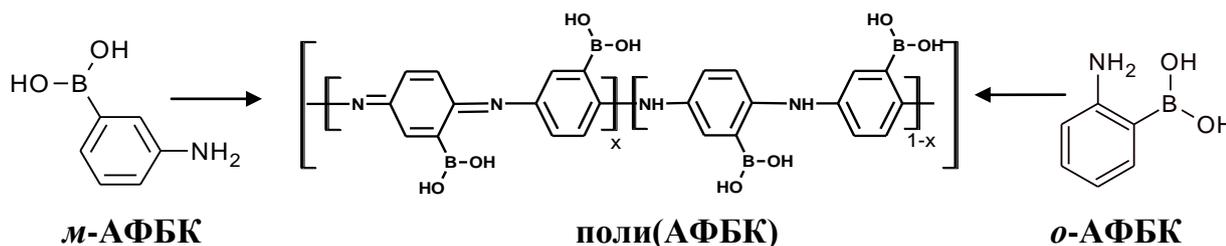
Экспериментальная часть (Глава 5)

В главе 5 приведен перечень использованного в работе оборудования, реактивов, электродов, электрохимических ячеек. Описан электрохимический синтез проводящих полимеров из *o*-АФБК и *m*-АФБК, в том числе полимеров с молекулярными отпечатками. Описаны исследования модифицированных электродов методами спектроскопии электрохимического импеданса и спектроскопии комбинационного рассеяния. Изложена последовательность импедиметрического определения сахаров и гидроксикислот. Приведена процедура отбора пота с активацией потовой железы с помощью электрофореза и определения концентрации лактата в капле пота с помощью планарных печатных электродов, модифицированных поли(АФБК) с молекулярными отпечатками лактата. Изложен процесс изготовления биосенсора на основе лактатоксидазы и его использования в проточно-инжекционном режиме в качестве метода сравнения для анализа пота.

Результаты и их обсуждение

Глава 6. Сенсоры на основе поли(АФБК)

Для электрохимического синтеза проводящих пленок поли(АФБК) в качестве мономеров использовали *орто*- и *мета*-изомеры АФБК (схема 1):



m-АФБК

поли(АФБК)

o-АФБК

Схема 1. Мономеры для электрохимического синтеза поли(АФБК).

На рис.1А представлены циклические вольтамперограммы (ЦВА) электрополимеризации *m*-АФБК в присутствии фторид-ионов на поверхности стеклоуглеродных торцевых электродов. На первом цикле вольтамперограммы наблюдается характерная «нуклеационная петля» и отсутствие катодного пика при обратной развертке потенциала в катодную область, свидетельствующее о необратимом окислении мономера. Минимальный анодный потенциал, позволяющий не допустить переокисления полимера и его деградации, но достаточный для окисления молекулы мономера с образованием катион-радикала составил 0.9 В (отн. Ag/AgCl). О формировании проводящей полимерной структуры на поверхности электрода можно заключить уже в процессе синтеза по увеличению тока окисления мономера в области высоких потенциалов (0.75 В) с каждым последующим циклом (Рис. 1А). Состав ростовой смеси и параметры потенциодинамического осаждения оптимизировали, оценивая электроактивность полученных полимерных пленок путем регистрации ЦВА модифицированных электродов.

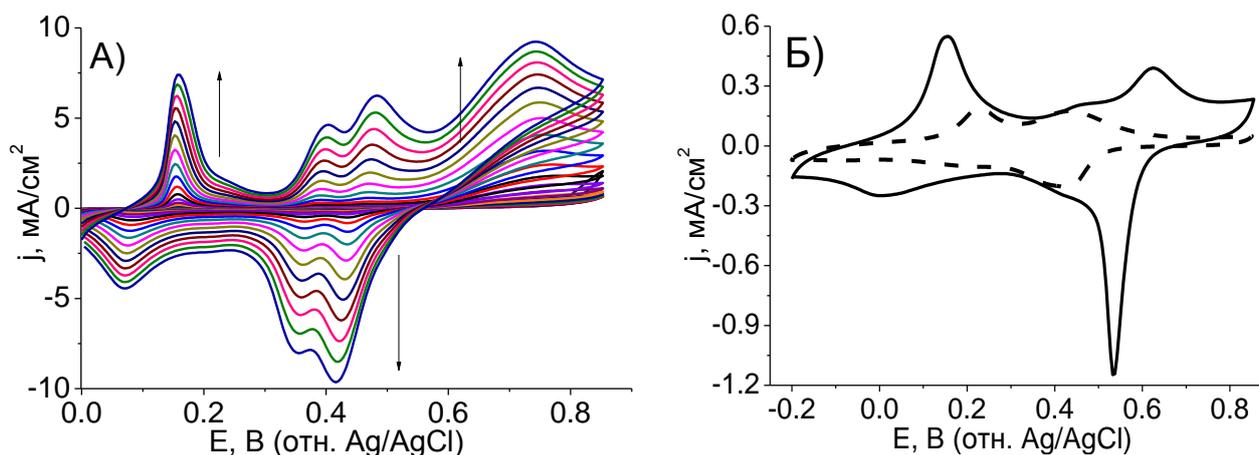


Рис. 1. **А)** ЦВА электрополимеризации *m*-АФБК (0.04M) из раствора содержащего 0.2M NaF, 0.125 M H₂SO₄, 40мВ/с, 25 циклов. **Б)** ЦВА стеклоуглеродных электродов, модифицированных поли(*m*-АФБК), полученной в присутствии (—) и без (---) NaF; 0.1M KCl, 0.1M HCl.

ЦВА электродов, модифицированных поли(*m*-АФБК) в присутствии фторид-ионов, имеют вид, характерный для проводящего незамещенного полианилина, чего не наблюдается при проведении полимеризации *m*-АФБК в отсутствие фторид-ионов (Рис. 1Б). Ценным свойством синтезированного полимера для аналитических задач является сохранение его электроактивности в нейтральных водных растворах, о чем свидетельствуют ЦВА модифицированных поли(*m*-АФБК) электродов в фосфатных буферных растворах в диапазоне рН 5.8 – 7.4. По полученной из данных ЦВА зависимости формального потенциала перехода эмеральдин-пернигранилин ($E^{\sim} \sim 0.6$ В при рН 1.2 на Рис. 1Б) от рН, найдено, что реакция происходит с переносом двух протонов на один электрон. Наклон электродной функции составил 0.14 ± 0.02 В/рН, что соответствует теоретическому значению 0.12 В/рН.

Спектроскопия электрохимического импеданса электродов, модифицированных поли(*m*-АФБК). Проводящие свойства синтезированных в присутствии фторид-иона пленок поли(*m*-АФБК) изучали методом спектроскопии электрохимического импеданса в фосфатных буферных растворах (рН 5.8 – 7.4) в диапазоне частот от 10 кГц до 1 Гц. Постоянный потенциал поляризации электрода устанавливали равным формальному потенциалу перехода эмеральдин/пернигранилин на ЦВА модифицированных электродов в соответствующем рН. Электрохимическую систему (проводящая полимерная пленка на поверхности электрода в фоновом электролите в отсутствие медиатора) моделировали эквивалентной электрической схемой, представленной на вставке на Рис. 2. Элементам электрической схемы соответствуют: R_{Ω} – объемное сопротивление фонового раствора, $R_{пз}$ – сопротивление переноса заряда, $C_{дс}$ – ёмкость двойного электрического слоя, W_0 – диффузионный импеданс при

отражающих граничных условиях. Наблюдается хорошее соответствие экспериментальных данных предложенной модели: теоретическая кривая проходит через экспериментальные точки (Рис. 2), следовательно, выбранная эквивалентная схема пригодна для аппроксимации и позволяет рассчитывать параметры электрохимической системы из данных СЭХИ.

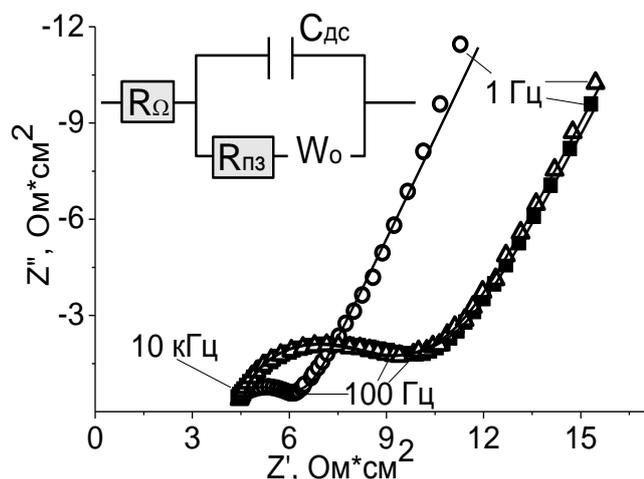


Табл. 1. Сопротивление переноса заряда, рассчитанное по эквивалентной электрической схеме.

Состав раствора	$R_{пз}, \text{ Ом} \cdot \text{ см}^2$
Буферный раствор (до введения аналита)	3.2 ± 0.03
Буферный раствор, содержащий 20 мМ фруктозы	1.17 ± 0.02
Буферный раствор (после вымывания аналита)	3.20 ± 0.06

Рис. 2. Спектры электрохимического импеданса стеклоуглеродных электродов, модифицированных поли(*m*-АФБК) в присутствии фторид-иона, $\Delta E = 5 \text{ мВ}$, $E_{dc} = -50 \text{ мВ}$, 0.05 М фосфатный буферный раствор, $\text{pH } 7.0$, содержащий 0.1 М KCl и: (Δ) – 0 мМ фруктозы (до введения аналита), (\circ) – 20 мМ фруктозы, (\blacksquare) – 0 мМ фруктозы (после замены раствора, содержащего 20 мМ фруктозы, на исходный буферный раствор); (—) – результат аппроксимации. Вставка: эквивалентная электрическая схема.

После введения сахара или гидроксикислоты в электрохимическую ячейку, содержащую фоновый буферный раствор, на спектре импеданса наблюдается уменьшение диаметра высокочастотной полуокружности. Расчет электрохимических параметров при аппроксимации спектров подтверждает, что наблюдаемое изменение высокочастотной области спектра поли(*m*-АФБК) в присутствии сахара соответствует уменьшению сопротивления полимерной пленки (Табл. 1). Погрешность определения значений параметра $R_{пз}$ не превышает 2%. При последующей замене раствора в ячейке на исходный буферный раствор, не содержащий ни сахара, ни гидроксикислоты, спектр импеданса возвращается к первоначальному виду, что говорит об обратимости отклика сенсора на основе поли(*m*-АФБК).

Таким образом, использование проводящего полимера *m*-АФБК в качестве чувствительного слоя сенсора дает возможность дифференцировать специфические взаимодействия полимера с аналитом, в результате которых увеличивается проводимость полимера, и неспецифические процессы, в том числе реакции гидролиза и деградации, всегда приводящие к увеличению сопротивления.

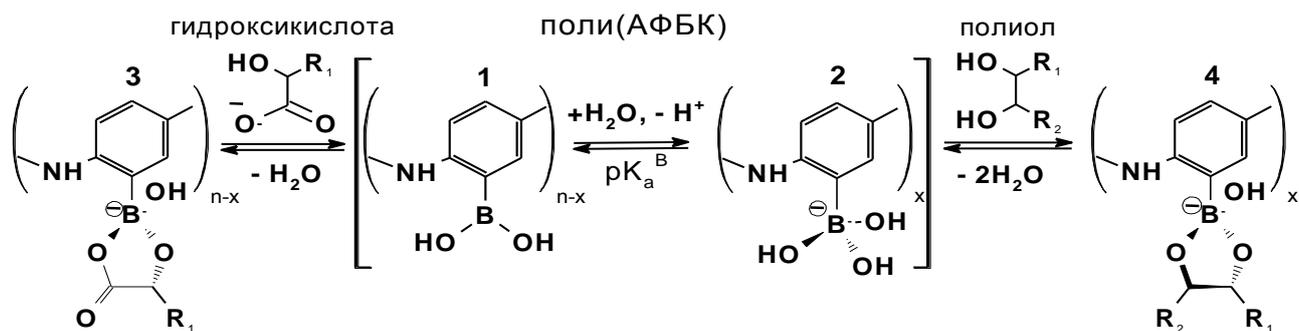


Схема 2. Равновесия в системе поли(АФБК)-полиол и поли(АФБК)-гидроксикислота.

Увеличение проводимости полимерной пленки при взаимодействии с аналитами можно объяснить, рассмотрев равновесия в системе поли(АФБК)-полиол и поли(АФБК)-гидроксикислота в водной среде (схема 2). Синтезированный полимер, аналог полианилина, функционализированный борной кислотой, является самодопированным (электроактивность сохраняется в нейтральных растворах), что обусловлено наличием отрицательно заряженного в нейтральной и щелочной средах заместителя (борной кислоты) в бензольном кольце. Соотношение между звеньями полимера типа **1** и **2** зависит от pH среды и константы кислотности борнокислой группы в поли(АФБК), K_a^B . При взаимодействии поли(АФБК) с гидроксикислотой или полиолом равновесие смещается в сторону образования наиболее устойчивых отрицательно заряженных боронатных эфиров **3** и **4**, соответственно. Таким образом, образование боронатного эфира в присутствии аналитов приводит к увеличению количества отрицательно заряженных заместителей в поли(АФБК). Соответственно, возрастает степень допирования поли(АФБК), что приводит к увеличению проводимости.

Сенсор на основе поли(м-АФБК) и определение наблюдаемых констант связывания поли(м-АФБК) с аналитами. Сопротивление синтезированной поли(м-АФБК) зависит от концентрации сахара или гидроксикислоты. Для аппроксимации концентрационных зависимостей было предложено использовать уравнение (1):

$$\frac{R_{пз}}{R_0} = \frac{1 + \frac{R_\infty}{R_0} \cdot K_{набл} \cdot C}{1 + K_{набл} \cdot C}, \quad (1)$$

где C – концентрация аналита, $R_{пз}$ – сопротивление полимера при определенной концентрации аналита, R_0 – исходное сопротивление полимера в буферном растворе без аналита, R_∞ – сопротивление полимера при бесконечно большой концентрации аналита, $K_{набл}$ – наблюдаемая константа связывания полимера с аналитом. Теоретическая кривая соответствует экспериментальным данным, что подтверждает обоснованность применения уравнения (1) (Рис. 3).

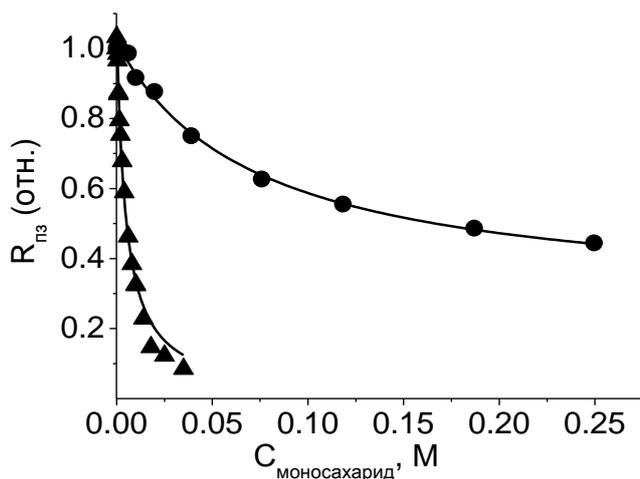


Рис. 3. Зависимости сопротивления поли(м-АФБК) от концентрации: (▲) – фруктозы, (●) – глюкозы, 0.05M фосфатный буферный раствор, pH 7.0, содержащий 0.1M KCl.

Таким образом, были определены $K_{\text{набл}}$ поли(м-АФБК) с глюкозой ($18 \pm 3 \text{ M}^{-1}$), лактатом ($32 \pm 6 \text{ M}^{-1}$), фруктозой ($196 \pm 11 \text{ M}^{-1}$) и тартратом ($770 \pm 30 \text{ M}^{-1}$). Тенденция к увеличению констант связывания в ряду глюкоза < лактат < фруктоза < тартрат аналогична для ФБК, являющейся элементом структуры поли(АФБК).

Была изучена pH зависимость наблюдаемых констант связывания поли(м-АФБК) с фруктозой (Рис. 4А).

Уравнение для описания полученной pH-зависимости в соответствии с равновесиями, представленными на схеме 2, имеет вид (2):

$$K_{\text{набл}} = \frac{K_{\text{тетр}} + K_{\text{триг}} [H^+] / K_a^B}{1 + [H^+] / K_a^B}, \quad (2)$$

где K_a^B – константа кислотности борнокислых групп в полимере, $K_{\text{триг}}$ и $K_{\text{тетр}}$ – константы образования тригональной и тетраэдрической форм боронатного эфира.

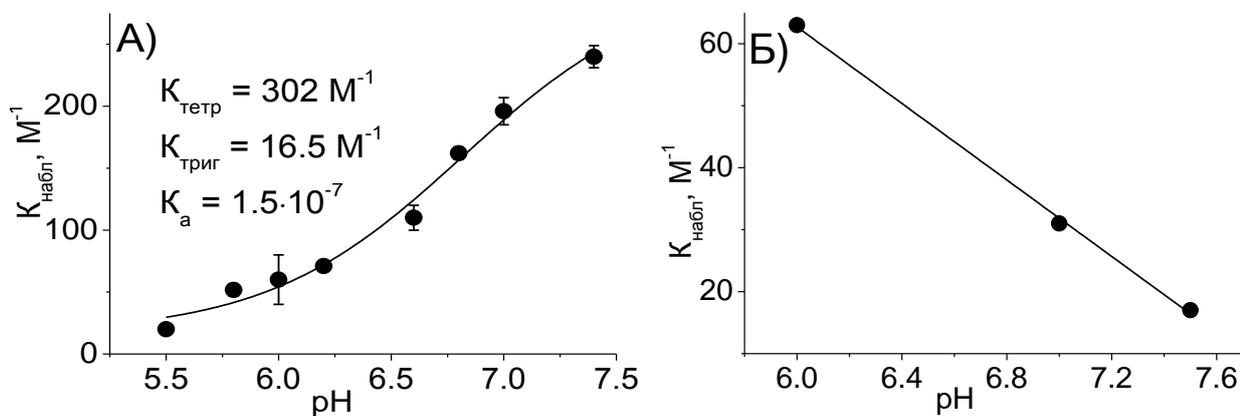


Рис. 4. Зависимость констант связывания от pH поли(м-АФБК) с: А) фруктозой, Б) N-ацетилнейраминовой кислотой в фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1M KCl.

Результат аппроксимации по приведенному уравнению согласуется с экспериментальными данными. Найденное значение pK_a^B поли(м-АФБК) составило 6.8 ± 0.1 , что на две единицы ниже, чем для свободной фенолборной кислоты, предельные значения констант $K_{\text{тетр}} = 302 \text{ M}^{-1}$ и $K_{\text{триг}} = 16.5 \text{ M}^{-1}$. Для гидроксикислот pH-зависимость констант связывания подчиняется противоположной тенденции: наблюдаемые константы связывания в нейтральных средах (от 5.5 до 7.5 единиц pH)

возрастают при снижении рН (Рис. 4Б). Такие рН-профили констант связывания известны для низкомолекулярных фенилборных кислот.

Таким образом, наблюдаемые константы связывания с сахарами и гидроксикислотами, найденные путем анализа концентрационных зависимостей сопротивления поли(*м*-АФБК), подчиняются общим закономерностям, характерным для наблюдаемых констант связывания ФБК.

Потенциометрическое определение фруктозы с использованием электродов, модифицированных поли(*м*-АФБК). Потенциометрический отклик разработанных сенсоров на добавление аналита (фруктозы) исследовали в диапазоне рН 6.2-7.4 в условиях постоянного перемешивания (batch-режим) (Рис. 5А). Для каждого значения рН были получены зависимости скачка потенциала от концентрации аналита (Рис. 5Б), аппроксимацию которых проводили по уравнению, аналогичному уравнению 1, где вместо сопротивления использовали скачок потенциала.

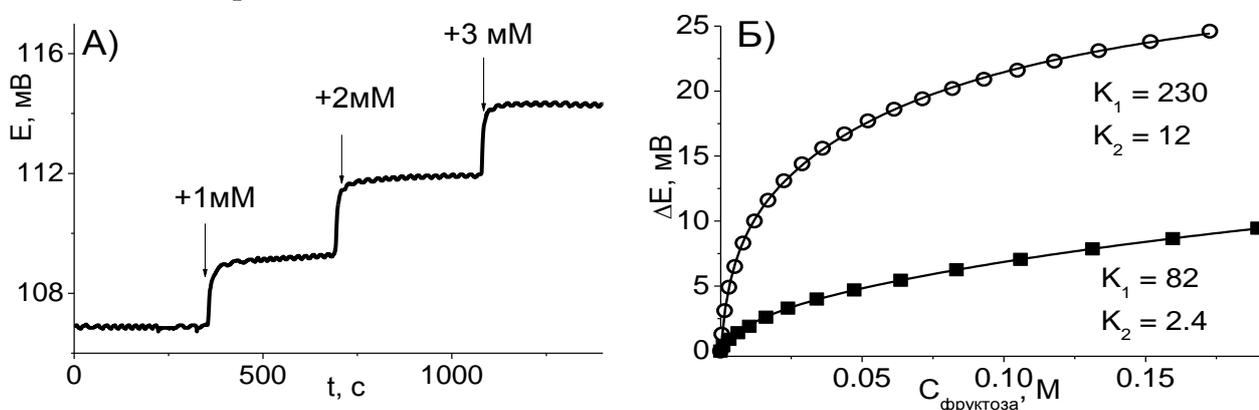


Рис. 5. А) Кривая потенциометрического отклика электрода, модифицированного поли(*м*-АФБК), на добавление фруктозы, фосфатный буферный раствор, содержащий 0.1 М КСl, рН 6.8. Б) Градуировочные зависимости электродов, модифицированных поли(*м*-АФБК), в фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М КСl, (○) – рН 7.4, (■) – рН 6.2, (—) – результат аппроксимации.

Наблюдаемые константы связывания поли(*м*-АФБК), найденные из данных СЭХИ и потенциометрических измерений (ПИ), совпадают в пределах ошибки эксперимента (Табл. 2). Однако константы связывания синтезированной поли(*м*-АФБК) по своему абсолютному значению не совпадают с литературными данными для ФБК. Повышение константы связывания полученного полимера *м*-АФБК по сравнению с низкомолекулярными аналогами может быть обусловлено присутствием фторид-иона в смеси для полимеризации *м*-АФБК. Для проверки этой гипотезы необходимо осуществить бесфторидный синтез поли(АФБК).

Бесфторидный синтез целесообразен также с практической точки зрения. Так, ситалловые подложки, широко используемые для изготовления электродных структур, неустойчивы к воздействию фтороводородной кислоты, присутствующей в растворе при модификации электродов поли(*м*-АФБК).

Табл. 2. Константы связывания поли(*м*-АФБК) с фруктозой в фосфатных буферных растворах ($n=3-5$, $p=0.95$).

pH	$K(CЭХИ), M^{-1}$	$K_1(ПРЦ), M^{-1}$
7.4	240 ± 9	230 ± 19
7.0	196 ± 11	188 ± 20
6.8	162 ± 5	140 ± 18
6.6	110 ± 10	103 ± 12
6.2	71 ± 4	82 ± 11

Борноокислая группа проявляет свойства слабого акцептора электронов, и, будучи в *мета*-положении в *м*-АФБК, препятствует электрофильному замещению в *пара*-положение к амино-группе. Фторид-ион переводит $-B(OH)_2$ группу в электроно-донорную $-BF_3^-$, тем самым активируя рост проводящего полимера (схема 3):

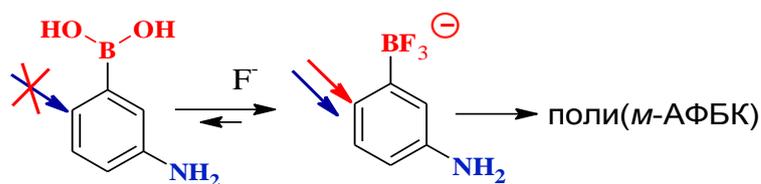


Схема 3. Направление электрофильной атаки в *м*-АФБК.

В то же время борноокислая группа в *орто*-положении к аминогруппе не препятствует характерному для незамещенного анилина механизму полимеризации. В связи с этим, осуществить бесфторидный синтез проводящей поли(АФБК) представляется возможным из другого коммерчески доступного изомера: *орто*-АФБК, о полимеризации которого не было известно ранее.

Глава 7. Бесфторидный синтез поли(АФБК)

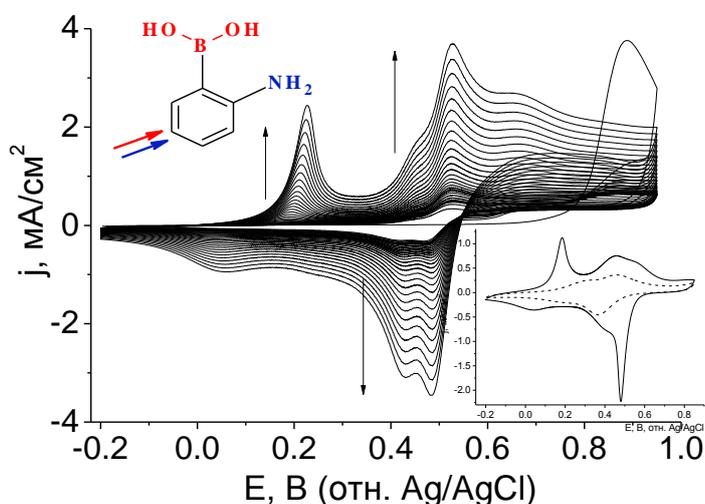


Рис. 6. ЦВА электрополимеризации *о*-АФБК на стеклоглеродном электроде в $0.7M H_2SO_4$ в отсутствие F^- , скорость развертки $40mV \cdot s^{-1}$. Вставка: ЦВА в $0.1M HCl$, $0.1M KCl$ электродов, модифицированных поли(*о*-АФБК) в: (—) отсутствие F^- , (---) присутствии F^- ; скорость развертки $40mV/s$.

На ЦВА бесфторидной электрополимеризации *о*-АФБК наблюдается рост электроактивности в области окисления мономера с каждым последующим циклом (Рис. 6), что говорит об образовании проводящего полимера. На ЦВА электродов модифицированных в отсутствие фторид-ионов в кислой среде наблюдаются области электроактивности, характерные для проводящего полианилина (Рис. 6, вставка). Структура полученной поли(*о*-АФБК) подобна проводящему полианилину, что

также подтверждается данными спектроскопии комбинационного рассеяния.

Показано, что проводимость поли(*о*-АФБК), полученной путем бесфторидного синтеза, возрастает при взаимодействии с сахарами и гидроксикислотами аналогично

поли(*m*-АФБК), синтезированной в присутствии фторид-ионов. Однако синтезированные из разных мономеров поли(АФБК) обладают разной аффинностью к сахарам и гидроксикислотам. Наблюдаемые константы связывания сахаров и гидроксикислот с поли(*o*-АФБК) находятся в соответствии с константами связывания с фенилборной кислотой, являющейся структурным фрагментом поли(АФБК), в то время как константы связывания для поли(*m*-АФБК) в 2-5 раз выше (Табл. 3).

Табл. 3. Наблюдаемые константы связывания $K_{набл}$, M^{-1} , фенилборной кислоты и поли(АФБК) с глюкозой, фруктозой и лактатом ($n = 3-5$, $p = 0.95$).

	D-Глюкоза (рН 7.0)	L-Лактат (рН 6.0)	D-Фруктоза (рН 7.0)
Фенилборная кислота	2	18.5	92
Поли(<i>o</i> -АФБК) (бесфторидный синтез)	2.6±1.6	21±3	98±10
Поли(<i>m</i> -АФБК) (синтез со фторидом)	18±3	32±6	196±11

Были изучены рН зависимости наблюдаемых констант связывания поли(*o*-АФБК) с фруктозой и лактатом (Рис. 7). Константы связывания с лактатом уменьшаются при увеличении рН, в то время как для фруктозы наблюдается обратная тенденция. Такой вид рН-зависимости наблюдаемых констант связывания с сахарами и гидроксикислотами характерен для фенилборных кислот.

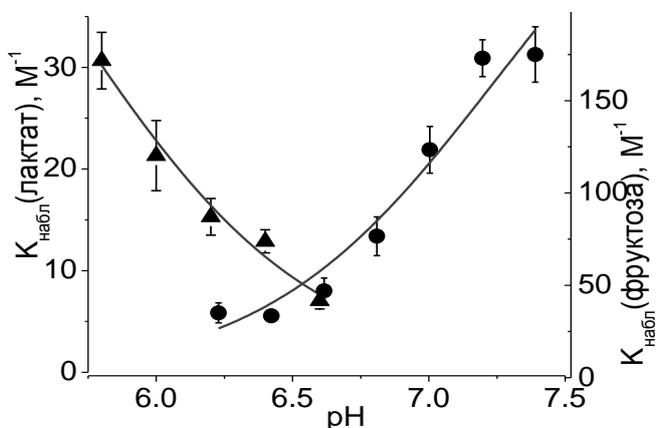


Рис. 7. Зависимость наблюдаемой константы связывания поли(*o*-АФБК) с фруктозой (●) и лактатом (▲) от рН.

Найденные константы связывания поли(*o*-АФБК) с сахарами и гидроксикислотами, а также рН-профили этих констант полностью совпадают с данными для фенилборной кислоты. Таким образом, изменение проводимости поли(АФБК) есть результат специфического взаимодействия остатков борной кислоты в полимере с аналитами.

В Табл. 4 представлены аналитические характеристики сенсоров на основе поли(аминофенилборных кислот), полученных в результате электрополимеризации *o*-АФБК в отсутствие фторид-ионов или *m*-АФБК в присутствии фторид-ионов. Коэффициент чувствительности сенсоров на основе проводящих поли(АФБК) рассчитывали по формуле (3):

$$s = K_{набл} \cdot (R_{пз}^0 - R_{пз}^\infty) / R_{пз}^0, \quad (3)$$

Важной характеристикой модифицированных электродов является время отклика, которое соответствует времени регистрации спектра импеданса в указанном диапазоне частот, и составляет 1.5-2 мин.

Табл. 4. Аналитические характеристики сенсоров ($n = 3 - 5$, $p = 0.95$).

Мономер Аналит	Коэффициент чувствительности, mM^{-1}		Диапазон определяемых содержаний, mM		Предел обнаружения, mM	
	<i>o</i> -АФБК	<i>m</i> -АФБК	<i>o</i> -АФБК	<i>m</i> -АФБК	<i>o</i> -АФБК	<i>m</i> -АФБК
D-Глюкоза	2 ± 1	5 ± 1	20–250	8–130	7.5	2.9
L-Лактат	8 ± 1	14 ± 1	14–200	5–100	2.0	1.1
D-Фруктоза	29 ± 3	73 ± 2	9–150	3–90	1.5	0.1

Повышение чувствительности сенсоров на основе поли(*m*-АФБК), полученной в присутствии фторид-ионов, по сравнению с поли(*o*-АФБК), полученной путем бесфторидного синтеза, для всех исследуемых аналитов (глюкоза, фруктоза, лактат, манноза, тартрат) предположительно обусловлено тем, что фторид-ион во время синтеза придает борнокислой группе АФБК тетраэдрическую конфигурацию (за счет образования BF_3^-), наиболее выгодную для последующего взаимодействия с аналитами, так как преобладающими продуктами реакции являются тетраэдрические формы боронатного эфира **3** и **4** (см. схему 2).

Глава 8. Сенсоры на основе поли(АФБК) с молекулярными отпечатками гидроксикислот

Для повышения селективности и чувствительности сенсоров на основе поли(АФБК) была проведена бесфторидная полимеризация *m*-АФБК, что стало возможным при замене фторида, необходимого для синтеза проводящего полимера *m*-АФБК, на гидроксикислоты. Однозарядные анионы гидроксикислот: лактат, тартрат, цитрат способны подобно фториду ковалентно связываться с АФБК при рН 2-4 с образованием тетраэдрического отрицательно заряженного боронатного эфира (структура **3** на схеме 2).

Проводящий полианилин можно получить только в кислой среде при $\text{pH} < 4$. В этих условиях константы связывания фенилборной кислоты с гидроксикислотами максимальны, поэтому в качестве молекул-темплатов для синтеза поли(АФБК) с молекулярными отпечатками использовали гидроксикислоты, а не моносахариды. Этим обусловлены безуспешные попытки синтеза поли(АФБК) с молекулярными отпечатками моносахаридов, предпринятые ранее другими научными группами. На ЦВА электрополимеризации *m*-АФБК в присутствии тартрата наблюдается рост тока

в анодной области с увеличением числа циклов (Рис. 8). Формирование проводящего полимера в результате электрополимеризации *m*-АФБК в отсутствие фторида, свидетельствует о том, что гидроксикислоты включаются в структуру полимера в процессе синтеза.

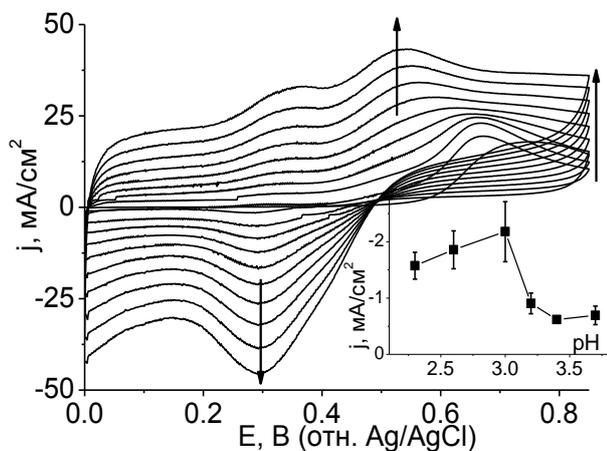


Рис. 8. ЦВА электрополимеризации *m*-АФБК (0.1М) в присутствии 0.2М тартрата натрия в 0.1М H₂SO₄, 10 циклов, скорость развертки 40мВ·с⁻¹. Вставка: рН-зависимость плотности тока катодного пика на ЦВА модифицированных электродов, 0.1М KCl, 0.1М HCl.

куполообразных рН-профилях скорости роста полимера на поверхности стеклоуглеродных торцевых электродов находится вблизи первой рКа гидроксикислот (вставка на Рис. 8).

Проводимость поли(АФБК) с молекулярными отпечатками, полученных в оптимальных условиях, возрастает при взаимодействии с аналитами, что на спектре импеданса отражается уменьшением диаметра высокочастотной полуокружности, аналогично представленному на Рис. 2. Из концентрационных зависимостей сопротивления (аналогичных Рис. 3) определены наблюдаемые константы связывания поли(АФБК) с молекулярными отпечатками с сахарами и гидроксикислотами.

Табл. 5. Наблюдаемые константы связывания поли(АФБК) с молекулярными отпечатками гидроксикислот с глюкозой, фруктозой и лактатом, М⁻¹, (n = 3 – 5, p = 0.95).

Аналит \ Полимер	Поли(<i>o</i> -АФБК)	Поли(<i>m</i> -АФБК) с молекулярными отпечатками			
		Фторид	Тартрат	Лактат	Цитрат
Д-глюкоза, рН 7.0	2.6±1.6	18±3	35±3	32±4	25±4
Д-фруктоза, рН 7.0	98±10	196±11	420±50	410±40	188±15
Л-лактат, рН 6.0	21±3	32±6	14±3	150±20	48±3

Были разработаны условия бесфторидного синтеза проводящих поли(АФБК) с молекулярными отпечатками лактата (поли(АФБК)-Л), тартрата (поли(АФБК)-Т) и цитрата (поли(АФБК)-Ц).

Оптимальное значение рН ростового раствора для синтеза проводящей поли(АФБК) с молекулярными отпечатками гидроксикислот соответствует максимальной скорости роста проводящего полимера, которую оценивали по высоте острого катодного пика на ЦВА модифицированных электродов. Максимум на

Поскольку получить поли(АФБК) в отсутствие молекул, способных связываться с борнокислыми группами при рН синтеза, возможно только при полимеризации *o*-АФБК, то полимером без молекулярных отпечатков следует считать только полимер, который был получен путем бесфторидной полимеризации *o*-АФБК. Эффект молекулярного отпечатка оценивали, сравнивая наблюдаемые константы связывания синтезированных поли(АФБК) с ключевыми аналитами (Табл. 5). Поли(АФБК) с молекулярными отпечатками обладают повышенными константами связывания с глюкозой в 10-14 раз, с фруктозой в 2-4 раза по сравнению с полимером без отпечатков, полученным из *o*-АФБК в отсутствие солей гидроксикислот или фторида натрия. Для полимеров, синтезированных в присутствии фторида и цитрата, наблюдается сравнимое увеличение констант связывания как с гидроксикислотами, так и с моносахаридами. Соответственно, сенсоры на их основе обладают схожими аналитическими характеристиками.

Использование тартрат-иона в качестве темплата приводит к увеличению константы связывания поли(АФБК) с моносахаридами и практически не оказывает влияния на константу связывания с лактатом. Сенсоры на основе поли(АФБК)-Т обладает повышенным в 8 раз по сравнению с полимером без молекулярных отпечатков коэффициентом чувствительности определения глюкозы, при этом ПО снижается в 4 раза, до 1.8 мМ, коэффициент селективности $k_{\text{лактат/глюкоза}} = \frac{S_{\text{глюкоза}}}{S_{\text{лактат}}} = 0.56$, в то время как для других поли(АФБК) $k_{\text{лактат/глюкоза}} > 1$.

Наибольший эффект включения молекулярного отпечатка наблюдается для поли(АФБК)-Л в случае определения лактата. Константа связывания поли(АФБК)-Л с лактатом повышена в 7 раз по сравнению с поли(*o*-АФБК) без отпечатков. Чувствительность сенсоров на основе поли(АФБК)-Л для определения лактата значительно улучшена по сравнению с полимером без молекулярных отпечатков: коэффициент чувствительности повышен в 9 раз, ПО понижен на порядок с 2 до 0.3 мМ, ДОК смещается в область более низких содержаний: от 10^{-2} до 10^{-3} М. (Табл. 6). Чувствительность определения лактата с помощью электродов, модифицированных поли(АФБК)-Л, превышает не только чувствительность определения лактата с использованием поли(*o*-АФБК), но и других поли(АФБК) с молекулярными отпечатками. Несмотря на то, что чувствительность сенсоров на основе поли(АФБК)-Л при определении глюкозы также увеличивается, селективность полимера к лактату относительно глюкозы повышается. По сравнению с другими поли(АФБК) селективными к лактату коэффициент селективности $k_{\text{глюкоза/лактат}}$ для поли(АФБК)-Л улучшен на порядок и составляет 0.026 при рН 6.0.

Табл. 6. Аналитические характеристики электродов, модифицированных поли(АФБК), для определения лактата, ($n = 3 - 5$, $p = 0.95$).

Аналит \ Полимер	Поли(<i>o</i> -АФБК)	Поли(<i>m</i> -АФБК) с молекулярными отпечатками			
		Фторид	Цитрат	Тартрат	Лактат
Коэффициент чувствительности, M^{-1}	8±1	14±1	26±3	9±1	70±3
Предел обнаружения, мМ	2.0	1.1	0.6	2.0	0.3
Диапазон определяемых концентраций, мМ	14–200	5–100	1.5–70	3–90	1–35

Таким образом, поли(АФБК) с молекулярными отпечатками обладают как в 1.5-14 раз повышенными константами связывания с определенными аналитами, так и пониженными константами связывания с прочими полиолами, что позволяет достигать желаемой селективности сенсоров на основе поли(АФБК).

Глава 9. Применение сенсоров на основе поли(АФБК) для решения аналитических задач

Применение сенсоров с различной чувствительностью для анализа смеси сахаридов и гидроксикислот. Различия в чувствительности и селективности синтезированных поли(АФБК) позволяют осуществить селективное определение сахаров и гидроксикислот в смеси, что было продемонстрировано на примере смесей лактат-фруктоза. С помощью двух сенсоров с наиболее различающейся селективностью: на основе поли(АФБК) с отпечатками лактата и поли(АФБК) с отпечатками фторида (коэффициенты селективности к фруктозе относительно лактата $k_{\text{лактат/фруктоза}}$ равны 0.77 и 0.42 соответственно) были проанализированы модельные смеси лактата и фруктозы в соотношениях 1:1 и 3: 2 (Табл. 7).

Табл. 7. Анализ модельной смеси фруктозы и лактата с помощью двух сенсоров на основе поли(АФБК) с молекулярными отпечатками.

Введено, мМ		Найдено, мМ		Степень извлечения, %	
Фруктоза	Лактат	Фруктоза	Лактат	Фруктоза	Лактат
1.5	1.5	1.6±0.4	1.7±0.4	96.6	88.8
4.0	4.0	3.9±0.9	3.8±0.9	97.1	95.6
1.0	1.5	1.1±0.2	1.6±0.4	93.5	92.8

Полученные значения относительного падения сопротивления представляли в виде суммы относительных падений сопротивлений для каждого компонента смеси. Для каждого датчика уравнение, связывающее измеренное относительное

сопротивление полимера в анализируемой смеси ($R_{\Sigma_{отн}}$) с концентрациями фруктозы $C_{фру}$ и лактата $C_{лак}$ имеет вид (3):

$$1 + R_{\Sigma_{отн}} = \frac{R_{отн}^0 + R_{отн}^{\infty} \cdot K_{набл} \cdot C_{фру}}{1 + K_{набл} \cdot C_{фру}} + \frac{R_{отн}'^0 + R_{отн}'^{\infty} \cdot K'_{набл} \cdot C_{лак}}{1 + K'_{набл} \cdot C_{лак}} \quad (3)$$

Величины относительных сопротивлений при нулевой ($R_{отн}^0$ и $R_{отн}'^0$) и бесконечно большой концентрациях компонентов ($R_{отн}^{\infty}$ и $R_{отн}'^{\infty}$), а также наблюдаемые константы связывания полимера с фруктозой и лактатом $K_{набл}$ и $K'_{набл}$ были определены из соответствующих градуировочных зависимостей сенсоров при рН 6.0.

Таким образом, путем синтеза поли(АФБК) с молекулярными отпечатками гидроксикислот становится возможным изменять сродство полимера к анализам и достигать желаемой чувствительности и селективности сенсора в зависимости от поставленной задачи. Возможность управлять аналитическими характеристиками сенсоров на основе поли(АФБК), варьируя молекулы-темплаты при электрополимеризации, открывает перспективы для проведения селективного определения сахаров и гидроксикислот с помощью неферментативных сенсоров.

Неферментативные сенсоры на основе поли(АФБК) с молекулярными отпечатками лактата для определения концентрации лактата в образцах пота.

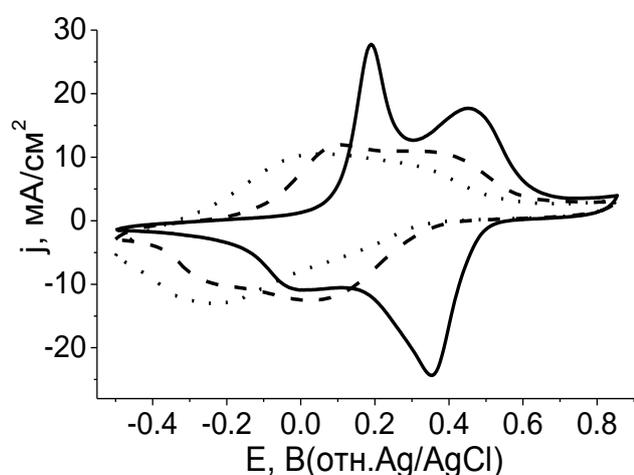


Рис. 9. ЦВА планарных графитовых электродов, модифицированных поли(АФБК-Л), в: (—) рН 1.2 (0.1 М НСl), (---) рН 3.5 (0.05 М фталата), (· · ·) рН 6.0 (0.05 М фосфата), содержащих 0.1М КСl, 40 мВ/с.

Известно, что увеличение содержания лактата в поте коррелирует с его увеличением в крови. Следовательно, определение концентрации лактата в поте позволяет отслеживать состояние гипоксии (кислородное голодание органов и тканей). Потовая железа способна концентрировать лактат, поэтому его концентрация в поте на порядок выше, чем в крови. Применение неферментативных сенсоров для анализа пота становится возможным благодаря тому, что кроме лактата среди содержащихся в поте веществ только глюкоза и фторид способны связываться

с поли(АФБК). Однако они не оказывают мешающего влияния, так как их концентрации на 2-3 порядка ниже концентрации лактата.

Для создания сенсора для определения лактата в капле пота синтез поли(АФБК)-Л был осуществлен на поверхности планарных печатных графитовых электродов.

Синтезированный в оптимизированных условиях полимер обладает электроактивностью в широком диапазоне рН. ЦВА имеет вид, характерный для проводящего полианилина (0).

Наблюдаемая константа связывания поли(АФБК)-Л, синтезированной на поверхности планарного электрода с лактатом равна $40 \pm 5 \text{ M}^{-1}$. Импедиметрический сенсор на основе поли(АФБК)-Л для определения лактата обладает следующими аналитическими характеристиками: коэффициент чувствительности $23 \pm 3 \text{ M}^{-1}$, ПО 1.5 мМ, ДОК 3-100 мМ, что соответствует диапазону содержаний лактата в поте. Воспроизводимость градуировочного графика характеризуется относительным стандартным отклонением не более 5%, следовательно, нет необходимости в проведении градуировки разработанных сенсоров непосредственно перед измерением. Коэффициент чувствительности сенсора остается неизменным при хранении сенсора на воздухе при комнатной температуре в течение 6 месяцев.

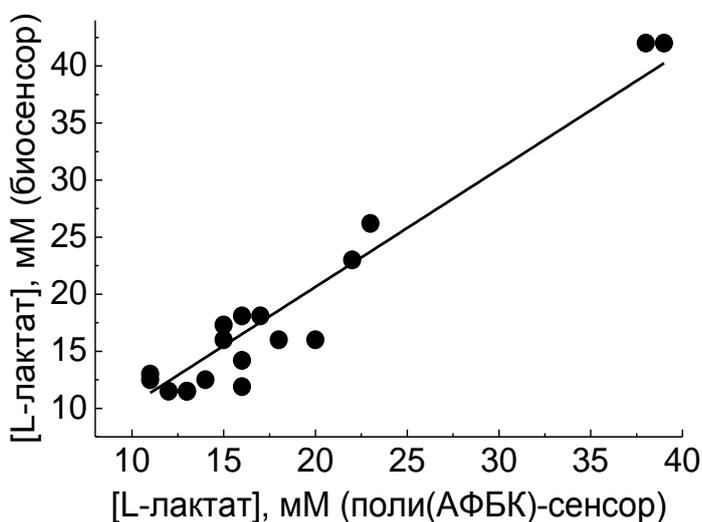


Рис. 10. Корреляция концентраций лактата в поте, измеренных с помощью сенсора на основе поли(АФБК) и биосенсора.

С помощью разработанного неферментативного сенсора были проанализированы 17 образцов пота от 7 добровольцев. Непосредственно перед измерением образец пота разбавляли в два раза фосфатным буферным раствором, рН 6.0. Анализ проводили методом спектроскопии импеданса в капле объемом 150 мкл, нанесенной на трехэлектродную структуру с модифицированным поли(АФБК)-Л рабочим электродом.

Найденные концентрации лактата в поте лежат в рабочем диапазоне сенсора от 10 до 40 мМ. Правильность определения концентрации лактата для образцов пота была подтверждена методом сравнения с использованием высокоселективного амперометрического биосенсора на основе фермента лактатоксидазы (Рис. 10). Коэффициент корреляции составил 0.97.

Таким образом, на основе поли(АФБК) с молекулярными отпечатками лактата был разработан неферментативный сенсор для анализа пота на содержание лактата. Сенсор может быть предложен для применения в клинической практике для неинвазивной диагностики гипоксии.

ВЫВОДЫ

1. Осуществлен электрохимический синтез проводящих полимеров как путем электрополимеризации *орто*-аминофенилборной кислоты без фторид-ионов, так и электрополимеризацией *мета*-аминофенилборной кислоты в присутствии фторид-ионов. В ответ на взаимодействия полученных поли(аминофенилборных кислот) с сахарами или гидроксикислотами происходит повышение проводимости синтезированного полимера. Это позволяет различить специфические взаимодействия на фоне неспецифических реакций, всегда приводящих к уменьшению проводимости.

2. Наблюдаемые константы связывания электрополимеризованной *орто*-аминофенилборной кислоты с глюкозой ($2.6 \pm 1.6 M^{-1}$), лактатом ($21 \pm 3 M^{-1}$), фруктозой ($98 \pm 10 M^{-1}$), тартратом ($210 \pm 20 M^{-1}$) соответствуют наблюдаемым константам связывания, известным для фенилборной кислоты, являющейся структурным элементом синтезированного полимера. Кроме того, зависимости наблюдаемых констант связывания синтезированной поли(*о*-аминофенилборной кислоты) от pH аналогичны pH-профилям, характерным для констант фенилборной кислоты. Данное соответствие подтверждает, что увеличение проводимости полимера является следствием специфических взаимодействий борнокислых групп в его структуре с сахарами и гидроксикислотами.

3. Сенсоры на основе поли(*о*-АФБК) имеют следующие аналитические характеристики: пределы обнаружения глюкозы 7.5 мМ, лактата 2.0 мМ, диапазоны определяемых концентраций 20–250 мМ глюкозы и 14–200 мМ лактата. Сенсоры на основе поли(*м*-АФБК) характеризуются пределами обнаружения: 2.9 мМ глюкозы и 1.1 мМ лактата, диапазонами определяемых концентраций 8–130 мМ глюкозы и 5–100 мМ лактата.

4. Для повышения селективности сенсоров синтезированы поли(аминофенилборные кислоты) с молекулярными отпечатками солей α -гидроксикислот (лактат, тартрат, цитрат). Об успешном включении кислот в структуру поли(аминофенилборной кислоты) можно судить по формированию проводящего полимера в результате бесфторидной электрополимеризации *мета*-аминофенилборной кислоты. Полимеры с молекулярными отпечатками обладают как в 1.5-14 раз повышенными константами связывания с определенными аналитами, так и пониженными константами связывания с прочими полиолами, что позволяет достигать желаемой селективности. Проведено отдельное определение сахаров и гидроксикислот на примере анализа модельных смесей фруктозы и лактата.

5. Путем электрополимеризации *мета*-аминофенилборной кислоты с молекулярными отпечатками лактата на планарной трехэлектродной структуре создан ферментативный сенсор для контроля содержания лактата в поте. Лактатный

сенсор имеет следующие аналитические характеристики: коэффициент чувствительности $23 \pm 3 \text{ M}^{-1}$, предел обнаружения 1.5 мМ, диапазон определяемых концентраций 3-100 мМ, соответствующий диапазону содержания лактата в поте. Чувствительность сенсора остается неизменной при хранении на воздухе при комнатной температуре в течение 6 месяцев, что недостижимо для биосенсоров. Правильность определения концентрации лактата с использованием созданного неферментативного сенсора в образцах пота подтверждена независимым высокоселективным методом.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых журналах из перечня ВАК

Минобрнауки РФ и индексируемых в базах Web of Science и/или Scopus:

1. E. A. Andreyev, M. A. Komkova, V. N. Nikitina, N. V. Zaryanov, O. G. Voronin, E. E. Karyakina, A. K. Yatsimirsky, A. A. Karyakin. Reagentless polyol detection by conductivity increase in course of self-doping of boronate-substituted polyaniline // Analytical Chemistry. — 2014. — V. 86, № 23. — P. 11690–11695 (IF 6.0);
2. V. N. Nikitina, I. R. Kochetkov, E. E. Karyakina, A. K. Yatsimirsky, A. A. Karyakin. Tuning electropolymerization of boronate-substituted anilines: Fluoride-free synthesis of the advanced affinity transducer // Electrochemistry Communications. — 2015. — V. 51. — P. 121–124 (IF 4.7);
3. В. Н. Никитина, Н. В. Зарянов, Е. Е. Карякина, А. А. Карякин. Электрополимеризация 2-аминофенилборной кислоты и применение полученного полимера для определения сахаров и оксикислот // Электрохимия. — 2017. — V. 53, № 3. — P. 352–358 (ИФ 1.0);
4. V. N. Nikitina, N. V. Zaryanov, I. R. Kochetkov, E. E. Karyakina, A. K. Yatsimirsky, A. A. Karyakin. Molecular imprinting of boronate functionalized polyaniline for enzyme-free selective detection of saccharides and hydroxy acids // Sensors and Actuators, B: Chemical. — 2017. — V. 246. — P. 428–433 (IF 5.7);
5. N. V. Zaryanov, V. N. Nikitina, E. V. Karpova, E. E. Karyakina, A. A. Karyakin. Nonenzymatic sensor for lactate detection in human sweat // Analytical Chemistry. — 2017. — V. 89. — P. 11198–1120 (IF 6.0).

Иные публикации

Тезисы докладов конференций:

1. Никитина В.Н., Воронин О.Г., Карякин А.А. Электрохимическая полимеризация о-аминофенилбороновой кислоты и свойства полученных полимеров при комплексообразовании с сахарами // VI Всероссийская Каргинская конференция "Полимеры-2014". Москва, Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 2014;
2. Никитина В.Н., Комкова М.А., Андреев Е.А., Воронин О.Г., Карякин А.А. Синтетические рецепторы на основе проводящих полимеров для определения компонентов

клеточных стенок микроорганизмов // IX Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2014». Светлогорск, Россия, 2014;

3. Nikitina V.N., Kochetkov I.R., Karyakina E.E., Yatsimirsky A.K., Karyakin A.A. Fluoride-free synthesis of conducting boronate-substituted polyaniline for sensing applications // International Workshop on Electrochemistry of Electroactive Materials (WEEM-2015). Bad Herrenalb, Germany, 2015;

4. Nikitina V.N., Zaryanov N.V., Kochetkov I.R., Yatsimirsky A.K., Karyakin A.A. Molecularly imprinted poly(anilineboronic acids) for reagentless polyol detection // 10th International Frumkin Symposium on Electrochemistry. Moscow, A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Russia, 2015;

5. Nikitina V.N., Zaryanov N.V., Kochetkov I.R., Karyakin A.A. Electrochemical synthesis of conducting polyanilineboronic acids for sensing applications // International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", Московская область, Истра, Россия, 2015;

6. Никитина В.Н., Зарянов Н.В., Карякин А.А. Синтетические рецепторы на основе поли(анилинборных кислот) с молекулярными отпечатками // IX Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой "ЭМА 2016", Екатеринбург - Ленева, Россия, 2016;

7. Никитина В.Н., Зарянов Н.В., Карякин А.А. Высокоселективные синтетические рецепторы на основе поли(анилинборных кислот) для детекции сахаров и оксикислот // V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Сочи, Россия, 2016;

8. Никитина В.Н., Зарянов Н.В., Андреев Е.А., Комкова М.А., Карякина Е.Е., Карякин А.А. Новые сенсорные материалы с повышенной селективностью на основе боронат-замещенного полианилина // Научная конференция грантодержателей РФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века», ИОХ, Россия, 2016;

9. Nikitina V. N., Zaryanov N.V., Karyakin A.A. Hydroxy acids imprinted poly(anilineboronic acid) for selectivity improvement of the advanced affinity sensor // International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and applications", Московская область, Истра, Россия, 2017;

10. Nikitina V. N., Zaryanov N.V., Karyakin A.A. Boronate functionalized polyaniline as advanced sensor material for affinity interactions // Baltic polymer symposium 2017, Tallinn, Эстония, 2017;

11. Nikitina V. N., Maksimova E.D., Zavolskova M. D., Karyakin A.A. Versatile electrochemical sensors based on conducting boronate-functionalized polyaniline // Modern Electrochemical Methods XXXVIII, Jetřichovice, Чехия, 2018.

Патенты

Андреев Е.А., Комкова М. А., Никитина В. Н., Зарянов Н. В., Карякина Е. Е., Карякин А. А. Патент РФ № 2639494 от 21.12.2017 года. Патентообладатель: МГУ имени М.В.Ломоносова, опубликовано в официальном бюллетене ФИПС «Изобретения. Полезные модели» № 36 от 21.12.2017.