

## **ОТЗЫВ**

### **официального оппонента**

на диссертацию Гусельниковой Ольги Андреевны

«Методы и подходы к созданию сенсоров для детектирования биологически активных веществ и экотоксикантов с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

### **Актуальность темы диссертации**

Определение биологически активных веществ и различных экотоксикантов до настоящего времени остается актуальной задачей аналитической химии. Определение данных веществ возможно с использованием современных методов анализа, в том числе, хроматографических или хромато-масс-спектрометрических. Однако, для решения ряда задач перспективно применение различных сенсоров или тест-систем, позволяющих провести не только скрининг проб, но и оценить содержание определяемого компонента. Использование физико-химических методов исследования, таких как ИК- и КР-спектроскопии, осложнено их недостаточной чувствительностью. Выходом из этого положения является использование в аналитической практике поверхностно-усиленного рамановского рассеяния, получившего название гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), проявляющегося у молекул, адсорбированных на поверхности плазмон-активных благородных металлов, преимущественно золота и серебра.

Для создания сенсорных систем, характеризующихся высокой чувствительностью и воспроизводимостью определения с использованием ГКР, необходимо решение задач выбора соответствующей природы и геометрических параметров подложки из благородного металла, разработки способов закрепления на них необходимых функциональных групп селективных к определяемым компонентам. При создании подобных сенсоров важным является достижение максимального сочетания положительных свойств матрицы, модифицирующего агента и способа его закрепления на поверхности носителя.

В этой связи диссертационная работа Гусельниковой О.А., посвященная созданию сенсоров для определения биологически активных веществ и экотоксикатов с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния, *является актуальной.*

### Объем и структура диссертации

Диссертационная работа выполнена в Исследовательской школе химических и биомедицинских технологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет». Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов, списка из 302 использованных литературных источников и приложения, изложена на 256 страницах машинописного текста, содержит 90 рисунков, 28 схем и 20 таблиц.

**Во введении** приведена актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены выносимые на защиту положения.

**В первой главе** (литературный обзор) рассмотрены основные подходы к ковалентной модификации поверхности твердых тел ароматическими солями диазония (АСД) и комплекс современных физико-химических методов исследования привитых слоев. Приведены основные направления по химическому преобразованию закрепленных групп (метод поверхностной сборки) с целью придания им новых аналитических свойств.

Несмотря на небольшой объем (по отношению к объему диссертации), литературный обзор создает благоприятное впечатление четкостью и последовательностью изложения самой необходимой информации. Соискателем проведен анализ известных подходов по модифицированию поверхности наноразмерных материалов органическими функциональными группами, методам их химического преобразования, изучению физико-химических свойств поверхностных слоев и использованию создаваемых материалов в качестве сенсоров для определения различных классов химических соединений.

**Вторая глава** посвящена описанию способов закрепления функциональных групп на поверхности наноразмерных пленок золота, их химического преобразования и методам исследования поверхностных слоев с использованием комплекса физико-химических методов. Приведено обоснование выбора в качестве аналитического метода рамановской спектроскопии в варианте ГКР, а в качестве плазмон-активного субстрата наноразмерных пленок золота, нанесенных на полимерные решетки, сформированные на стеклянной пластинке. Приведено обоснование использования в качестве модифицирующих агентов производных АСД – арендиазоний тозилатов: 4-нитробензолдиазоний тозилат (АДТ-NO<sub>2</sub>), 4-(гептадекафторооктил)бензолдиазоний тозилат (АДТ-C8F17), 4-аминобензолдиазоний тозилат (АДТ-NH<sub>2</sub>), 4-карбоксибензолдиазоний тозилат (АДТ-COOH) и способов их закрепления на поверхности золотых решеток: электрохимического и самопроизвольного (спонтанного). Элементный состав органических слоев на поверхности золотых пленок охарактеризован с

использованием метода рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФС), а толщина пленок и их морфология - с использованием метода атомно-силовой спектроскопии (АСС). Для определения свойств пленок применены методы циклической вольтамперометрии (ЦВА) и поверхностной смачиваемости.

Приведены подходы к приданию поверхностному слою специфических свойств по отношению к определяемому аналиту методом поверхностной сборки органической функциональной группы (ОФГ), в котором в качестве линкера использовались закрепленные на золотой решетке АДТ. Так, модифицирование липофильными солями диазония позволило создать сенсоры для определения липидов и маркеров сердечно-сосудистых заболеваний ( $\beta$ -ситостерола и сквалена).

В дальнейшем автор формулирует задачи и обоснование выбора функциональных групп для определения тяжелых металлов, синтетических азокрасителей, маркеров заболеваний и энантиомеров. В качестве линкера для поверхностной сборки функциональных групп с использованием реакций ацилирования предложены АДТ-NH<sub>2</sub> и АДТ-COОН, предварительно закрепленные на поверхности золотых решеток. В качестве функционально-аналитических групп для определения ионов металлов выбрана диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА), для определения азокрасителей – поли-N-изопропилакриламид (ПНИПАМ), короткоцепочечные олигонуклеотиды - для определения комплиментарности ДНК, энантиомеры винной кислоты – для валидации лекарственных препаратов. Полученные поверхностные органические слои охарактеризованы с использованием методов РФС, АСС, ГКР и определения угла смачивания. Разработаны методики определения целевых аналитов и оценены их метрологические характеристики.

Для определения ртути предложена система с функциональными группами меркаптоянтранной кислоты. Поверхностная сборка функциональной группы основана на реакции взаимодействия меркаптоянтранной кислоты с 4-этинильными группами, закрепленными на поверхности золотых решеток при облучении солнечным светом. Для определения фосфорорганических пестицидов параоксона и фенитроциона предложена система сборки металлоорганических каркасов на поверхности золотых решеток, модифицированных АДТ-COОН. Приведены методики определения пестицидов и их метрологические характеристики. Приведены исследования по плазмон-индуцированной реакции восстановления тройных связей 4-этинилфенильных групп, закрепленных на поверхности бинарных золото-платиновых пленок, в зависимости от толщины платинового покрытия и плазмон-индуцированной полимеризации на золотых решетках.

*В третьей главе* (экспериментальная часть) приведены данные об используемых реагентах, оборудовании и методиках проведения экспериментов.

*В приложении 1* приведены исследования противобактериальной активности нанозвездочек золота, модифицированных АДТ.

### **Научная новизна и достоверность полученных результатов**

Предложены способы ковалентного закрепления АДТ на поверхности наноразмерных материалов на основе золота и их вторичной трансформации поверхности плазмон-активных золотых решеток с целью придания им селективных свойств по отношению к определяемому компоненту.

Предложены высокочувствительные и селективные сенсорные системы, основанные на эффекте ГКР, показана возможность определения азокрасителей, ионов металлов, маркеров заболеваний, пестицидов, гликопротеина, комплиментарности олигонуклеотидов и дискреминации хиральных аминов.

Впервые предложены способы определения биологически активных веществ и экотоксикантов методом ГКР с использованием сенсоров на основе модифицированных органическими реагентами золотых решеток, проведена оценка метрологических характеристик методик их определения.

**Достоверность полученных результатов** не вызывает сомнений. Эксперимент выполнен на очень высоком уровне с использованием современных физико-химических методов исследования. Состав закрепленных на поверхности золотых решеток органических соединений подтвержден методами рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния, морфология поверхности исследована методом атомно-силовой спектроскопии. В ряде случаев свойства поверхностных слоев охарактеризованы методом циклической вольтамперометрии и определением угла смачивания. Для оценки правильности разработанных методик использовались стандартные подходы: анализ модельных растворов, сопоставление с данными, полученными независимыми методами. В частности, при хиральном определении 3-(3,4-дигидроксифенил)-L-аланина, полученные результаты сопоставлены с результатами, полученными методом ВЭЖХ с хиральной колонкой.

Объем проведенных исследований соответствует поставленным целям и достаточен для обоснования выносимых на защиту положений. Примененные приборы, реактивы, методы исследования, в целом, адекватны намеченной цели и задачам.

### **Практическая значимость работы**

Предложены высокочувствительные и селективные методики определения ионов металлов, азокрасителей, пестицидов, олигонуклеотидов, маркеров заболеваний с использованием разработанных сенсоров на основе модифицированных золотых решеток методом ГКР.

Разработаны методы экспресс-дискриминации хиральных аминов на поверхности модифицированных золотых решеток, основанные на измерении угла смачивания с использованием мобильного телефона.

### **Обоснованность положений, выносимых на защиту, и выводов по работе**

Положения, выносимые на защиту, не вызывают возражений, имеют научную новизну, теоретически обоснованы и экспериментально доказаны. Выводы по работе соответствуют содержанию диссертации, базируются на большом экспериментальном материале и не противоречат имеющимся литературным данным, на которые в тексте диссертации имеются соответствующие ссылки.

### **Значение результатов диссертации для науки и производства**

Полученные в диссертационной работе Гусельниковой О.А. результаты имеют важное теоретическое и практическое значение для развития научных исследований в области создания и исследования новых сенсорных систем на основе плазмон-активных материалов для определения ряда органических соединений, биологических молекул и ионов металлов. Соискателем предложены подходы к закреплению функциональных групп на поверхности золотых решеток, преобразованию групп методом поверхностной сборки с целью придания им селективных свойств по отношению к определяемому компоненту, систематическому исследованию поверхностных слоев с использованием современных физико-химических методов.

Предложены направления модифицирования поверхности золотых решеток и рекомендации по применению разработанных сенсорных систем для определения широкого перечня органических соединений, биологических молекул и ионов металлов.

Разработанные методические подходы по закреплению функциональных групп и их последующей химической трансформации могут быть успешно использованы для модифицирования поверхности разнообразных твердых тел как на неорганической, так и органической основе. Полученные результаты, несомненно, будут интересны для сотрудников высших учебных заведений и научных организаций, занимающихся разработкой новых типов сорбционных материалов, тест-систем и сенсоров для определения широкого круга органических соединений и различных экотоксикатов.

По материалам диссертации опубликовано 10 статей в журналах, входящих в базы цитирования Scopus и Web of science. Результаты работы доложены на конференциях различного уровня.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы. Оформление диссертации и автореферата соответствует установленным требованиям; работа логично изложена и аккуратно оформлена.

В работе приведен большой объем экспериментальных, теоретических данных и их обстоятельная интерпретация, однако по материалу диссертации следует сделать некоторые замечания:

1. В тексте диссертации, к сожалению, отсутствует обоснование выбора для нанесения наноразмерного золотого покрытия подложки в виде «решетки» из штрихов на поверхности полимерного материала, нанесенного на стеклянную подложку. Почему выбрана столь сложная топография поверхности и столь сложная методика его получения, и чем предлагаемая подложка лучше ровной поверхности или поверхности «золотых нанозвездочек», на которых был получен «отличный» сигнал ГКР (стр. 77 диссертации)? Почему профиль штриха нанесен лазером под углом  $45^\circ$ ? Необходимо было привести полную характеристику данной «решетки», а именно: профиль штриха, его глубину, количество штрихов на мм. Столь сложное получение подложки может ограничивать широкое применение предлагаемых сенсоров для определения органических соединений и биологических молекул.
2. При определении концентрации ионов металлов автор в качестве аналитического сигнала использует интенсивность КР-полос карбонильных групп, но не использует полосы непосредственно связи металл-кислород или металл-азот, являющихся более доказательными как с точки зрения подтверждения процесса комплексообразования, так и с точки зрения достоверности определения содержания металла. Кроме того, в спектрах ГКР наблюдаются полосы, соответствующие колебаниям связи Me-N, а при определении ртути в спектрах наблюдаются полосы, отвечающие связи ртути с кислородом, но не обнаружены полосы, отвечающие связи Hg-S. Возникает вопрос о механизме взаимодействия ртути с меркаптоантарной кислотой, если в спектрах ГКР наблюдается полоса C-Hg-S. Заявление автора о возможности идентификации металлов на поверхности системы Au-ДТПА излишне оптимистично, поскольку, как следует из рис. 52 (стр. 129 диссертации) при извлечении из раствора, содержащего одновременно  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  полосы в спектрах ГКР не соответствуют полосам при извлечении металлов из индивидуальных растворов, как по положению, так и по интенсивности. При большем количестве металлов картина значительно усложнится.

3. При синтезе и определении аналитов в тексте диссертации приводится строго определенное время. Например, при получении сенсорных систем для определения азокрасителей и комплиментарности ДНК «решетки погружались в раствор на 20 мин», при модифицировании винной кислотой - на 2 ч, при определении ионов металлов на 20 мин. Каким образом установлено, что данное время выдерживания в растворе является оптимальным, и что будет происходить, если время выдерживания в растворе будет больше или меньше приведенного?
4. В диссертации нет детального рассмотрения селективности определения целевых аналитов, так при определении ситостерола и сквалена используются полосы  $C=C$ , однако для данных веществ различие составляет всего  $10\text{ см}^{-1}$ . Кроме того наличие данных полос возможно и для других соединений присутствующих в реальных объектах. При выделении азокрасителей автор использовал систему с ПНИПАМ, однако использованные красители относятся к разным классам, катионным и анионным красителям. Поэтому возникает вопрос не только о возможности разделения красителей различных классов, но внутриклассового разделения красителей.
5. В тексте диссертации присутствует ряд неточностей. В тексте и в подрисуночных подписях, например, к рис. 15 и рис. 21, приведено «УФ-спектры...», хотя на данных рисунках приведены спектры поглощения в диапазоне длин волн 400-1100 нм. При описании метрологических характеристик методик (стр. 112 диссертации) автор не совсем корректно оперирует понятиями предела обнаружения и минимально определяемой концентрации (предел определения), хотя приведены правильные расчеты предела обнаружения и минимально определяемой концентрации. В таблице 5 на стр. 91 диссертации нарушено правило значащих цифр. В названии раздела 2.4.1 написано «...на золотых/палладиевых решетках...», но данный раздел посвящен исследованиям на бинарных золото-платиновых решетках. В тексте диссертации присутствует достаточно большое количество опечаток.

Сделанные замечания не являются принципиальными и не снижают общей положительной оценки диссертации. Поставленная цель достигнута, а задачи исследования – выполнены. В работе представлен большой объем экспериментальных и теоретических данных, грамотная интерпретация которых подтверждает обоснованность выводов и свидетельствует о высоком научном уровне представленной к защите работы.

Диссертационная работа Гусельниковой О.А. представляет завершённую научно-квалификационную работу на актуальную тему, содержащую большой экспериментальный и теоретический материал, проработки научной новизны и практической значимости, в которой, на основании выполненных автором

