

БІОСЕНСОРИ BIOSENSORS

УДК 577.15.08:543.9

ДОСЛІДЖЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК АМПЕРОМЕТРИЧНИХ НІКЕЛЕВИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОТЕНЦІОСТАТУ «PALMSENS» ТА ЙОГО ВІТЧИЗНЯНОГО АНАЛОГУ

І. С. Кучеренко^{1,2}, О. С. Яковлева³, О. О. Солдаткін^{1,2}, В. Г. Мельник⁴,
Л. М. Семеничева⁴, О. П. Солдаткін^{1,2}, С. В. Дзядевич^{1,2}

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150,
03680, м. Київ, Україна, *e-mail*: kucherenko.i.s@gmail.com

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64,
01003, м. Київ, Україна

³ Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Г. Сковороди, 2,
04655, м. Київ, Україна

⁴ Інститут електродинаміки НАН України, просп. Перемоги, 56, 03680, м. Київ, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК АМПЕРОМЕТРИЧНИХ НІКЕЛЕВИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОТЕНЦІОСТАТУ «PALMSENS» ТА ЙОГО ВІТЧИЗНЯНОГО АНАЛОГУ

І. С. Кучеренко, О. С. Яковлева, О. О. Солдаткін, В. Г. Мельник, Л. М. Семеничева,
О. П. Солдаткін, С. В. Дзядевич

Анотація. В роботі було досліджено характеристики нікелевих амперометричних перетворювачів, підключених до експериментального потенціостату українського виробництва та комерційного потенціостату PalmSens (Нідерланди). При цьому досліджували як власні характеристики перетворювачів, так і відмінності при підключенні перетворювачів до різних приладів. Порівняння проводилось у декількох режимах роботи. До потенціостатів підключали амперометричні електроди з нікелю або біосенсиори для визначення глюкози (отримані шляхом іммобілізації глюкозооксидази на поверхню даних електродів) і порівнювали ефективність вимірювання вмісту перекису водню та глюкози обома потенціостатами. Зокрема, порівняно такі параметри датчиків як відгуки сенсорів, шум сигналу, мінімальна межа вимірювання речовин, калібрувальні криві для визначення концентрації перекису водню та глюкози, відтворюваність відгуків при тривалій роботі. Також перевірено селективність сенсорів до перекису водню відносно основних інтерферуючих речовин: аскорбінової кислоти та етилового спирту. Показано, що нікелеві перетворювачі можуть виступати основою для створення хемо- та біосенсорів. Крім цього, продемонстровано, що у більшості випадків запропонований новий потенціостат вітчизняного виробництва не поступається потенціостату PalmSens і може служити його більш дешевим аналогом при розробці біосенсорних тест систем.

Ключові слова: біосенсор, глюкозооксидаза, перекис водню, потенціостат, амперометрія

STUDY OF CHARACTERISTICS OF AMPEROMETRIC NICKEL TRANSDUCERS USING POTENTIOSTAT 'PalmSens' AND IT'S UKRAINIAN ANALOG

I. S. Kucherenko, O. S. Yacovleva, O. O. Soldatkin, V. G. Melnyk, L. M. Semenycheva,
A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Abstract. Characteristics of nickel amperometric transducers connected to experimental Ukrainian potentiostat and to commercial potentiostat PalmSens were studied in this work. During this, intrinsic characteristics of transducers and differences caused by connection to different potentiostats were examined. Comparison was made in several working modes. Amperometric electrodes made from nickel and biosensors for glucose determination (obtained by immobilization of glucose oxidase onto the surface of these electrodes) were connected to the potentiostats and effectiveness of measurement of hydrogen peroxide and glucose contents by both potentiostats was compared. I.e., sensor responses, signal noise, limit of detection of substances, calibration curves for determination of hydrogen peroxide and glucose, reproducibility of responses during continuous operation were compared. Also selectivity of sensors to hydrogen peroxide respectively to main interfering substances (ascorbic acid and ethanol) was checked. It was shown that nickel transducers can be a basis for creation of chemo- and biosensors. Besides, it was demonstrated that for the most parameters new Ukrainian potentiostat is not inferior to the potentiostat PalmSens and Ukrainian potentiostat can serve as a cheaper analog of PalmSens during development of biosensor test systems.

Keywords. biosensor, glucose oxidase, hydrogen peroxide, potentiostat, amperometry

ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ НИКЕЛЕВЫХ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОТЕНЦИОСТАТА «PalmSens» И ЕГО УКРАИНСКОГО АНАЛОГА

И. С. Кучеренко, А. С. Яковлева, А. А. Солдаткин, В. Г. Мельник, Л. Н. Семенычева,
А. П. Солдаткин, С. В. Дзядевич

Аннотация. В работе было исследовано характеристики никелевых амперометрических преобразователей, подключенных к экспериментальному потенциостату украинского производства и коммерческого потенциостата PalmSens (Нидерланды). При этом исследовали как собственные характеристики преобразователей, так и отличия при подключении преобразователей к разным приборам. Сравнение проводилось в разных режимах работы. К потенциостатам подключали амперометрические электроды из никеля или биосенсоры для определения глюкозы (полученные путем иммобилизации глюкозооксидазы на поверхность этих электродов) и сравнивали эффективность измерения содержания перекиси водорода и глюкозы обоими потенциостатами. В частности, сравнивались такие параметры датчиков, как отклики сенсоров, шум сигнала, минимальная граница определения веществ, калибровочные кривые для определения концентрации перекиси водорода и глюкозы, воспроизводимость откликов при продолжительной работе. Также проверено селективность сенсоров к перекиси водорода относительно основных интерферирующих веществ: аскорбиновой кислоты и этилового спирта. Показано, что никелевые преобразователи могут быть основой для создания хемо- и биосенсоров. Кроме этого, продемонстрировано, что в большинстве случаев предложенный новый потенциостат отечественного производства не уступает потенциостату PalmSens и может служить его более дешевым аналогом при разработке биосенсорных тест систем.

Ключевые слова: биосенсор, глюкозооксидаза, перекись водорода, потенциостат, амперометрия

1. ВСТУП

Біосенсорика – новітня галузь аналітичної біотехнології, одним з основних напрямів якої є розробка електрохімічних біосенсорів для виявлення та оцінки концентрації певних речовин [1]. Найважливіші переваги біосенсорів – високі чутливість і селективність, простота використання, швидкість аналізу, широкий діапазон речовин, які можна детектувати [2]. Однак ефективність роботи біосенсора залежить не тільки від характеристик самого біосенсора, а і від вимірювального обладнання, до якого підключено біосенсор.

Характеристики перетворювачів прямо впливають на характеристики біосенсорів, які створюють на їх основі. Так, висока чутливість перетворювача до перекису водню може бути корисною при розробці біосенсорів, в основі яких лежать ферментативні реакції із виділенням даної речовини. З іншого боку, невелика собівартість перетворювача добре позначиться на вартості біосенсора. В даній роботі проведено дослідження планарних амперометричних нікелевих перетворювачів, створених шляхом недорогої технології вакуумного напилення металу на підкладку. Крім простої та дешевої технології виготовлення, їх перевагою було нанесення 4-х робочих електродів, а також допоміжного електроду та електроду порівняння, на один перетворювач.

На сьогодні в Україні існує проблема підбору потенціостату для створення лабораторних прототипів біосенсорів, оскільки зараз можна використовувати потенціостати лише закордонного походження – PalmSens [3], DropSens [4] та інші. Ці потенціостати коштують декілька тисяч доларів, що робить їх досить дорогими для придбання українськими лабораторіями. Крім того, їх складно купувати через бюрократичні процедури, оскільки відділень даних фірм в Україні немає, а замовляти напряму у виробника неможливо. Тому актуальною є розробка українського потенціостату, який би відповідав за характеристиками потенціостатом закордонного походження, але був би набагато вигіднішим в фінансовому плані, і вироблявся би в Україні.

В Інституті електродинаміки НАНУ (Відділ електричних і магнітних вимірювань) було розроблено експериментальний прототип по-

тенціостату та передано в Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ (лабораторія біомолекулярної електроніки) для його тестування.

Метою даної роботи було порівняти характеристики потенціостату українського виробництва із потенціостатом PalmSens (Нідерланди) для того, щоб визначити чи здатен потенціостат українського виробництва замінити PalmSens при розробці біосенсорів. Зокрема, робота була націлена на порівняння аналітичних характеристик сенсорів та біосенсорів при амперометричному визначенні перекису водню та глюкози. Перекис водню було обрано для визначення, оскільки саме ця речовина часто виступає одним з продуктів ферментативних реакцій, які мають місце в ферментних амперометричних біосенсорах, та її окиснення на поверхні електродів продукує сигнал даних біосенсорів [5]. Глюкоза є найпоширенішою органічною речовиною, яку визначають за допомогою біосенсорів, оскільки існує зростаюча потреба у визначенні вмісту глюкози в крові діабетиків та інших хворих; біосенсори для визначення вмісту даної речовини були створені одними з перших, і продовжують розробляються в багатьох лабораторіях світу [6]. На даний момент саме біосенсори для визначення глюкози є найбільш вивченими та розповсюдженими, тому саме їх і було використано для порівняння роботи потенціостатів.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали

В роботі використовували наступні реактиви: глюкозооксидазу (ГОД, ЕС 1.1.3.4) із *Aspergillus niger* з активністю 272 од.акт./мг фірми «Genzyme» (Великобританія); бичачий сироватковий альбумін (БСА), аскорбінову кислоту та водний розчин глутарового альдегіду (ГА) фірми Sigma (Німеччина). Перекис водню, $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ та інші сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“

2.2. Конструкція амперометричних перетворювачів

В більшості випадків в існуючих амперометричних системах використовуються дрові електроди, які конструктивно не зовсім зручні для побудови біосенсорів. Значно перспективнішим є використання планарних тонкоплівкових електродних систем, розміщених на єдиній скляній або керамічній підкладці. Особливо це стосується мультисенсорних систем. Для створення планарного амперометричного мультисенсора була вибрана конструкція (Рис. 1), електрохімічна комірка в якій складається чотирьох робочих електродів, порівняльного та допоміжного електрода.

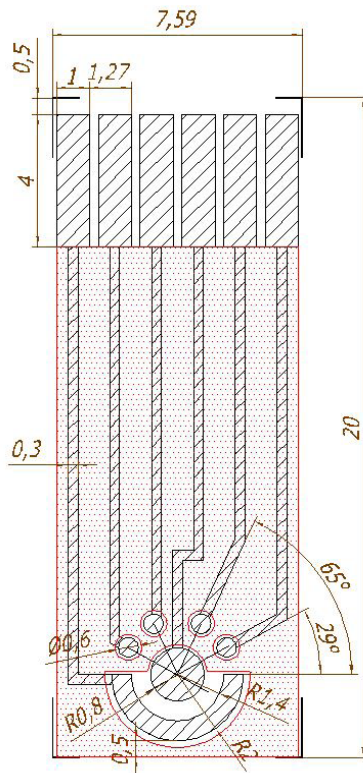


Рис. 1. Схема планарного амперометричного мультисенсора на основі нікелевих електродів.

Металізація пластин електродів проводилась методом магнетронного розпилення на установці вакуумного напилення «Катод-1М». В якості провідної системи використовувались плівки Ti-Ni. Для формування адгезійного підшару Ti використовувалась мішень марки BT1-00. Поверхневий опір плівки підшару

складав 150-200 Ом/см. В якості основного провідного шару використовувались плівки Ni марки НВК, поверхневий опір плівки Ni складав $R_s \leq 0.15$ Ом/см. Струмopовідні шини за виключенням активної області та зони контактів покривались захисним шаром, в якості якого використовувався фоторезист ФП383 з товщиною 1,5-2 мкм, задублений при температурі 150 °C протягом 30 хв. Поверхневий опір струмопровідних шин складав 0,13-0,15 Ом/см, що забезпечує опір доріжки від контактної області до активної зони не більше 30 Ом. В якості підкладки використовувався ситал односторонньої поліровки марки СТ-50-I-0,6 з класом поліровки робочої поверхні – 13-14.

2.3. Методика нанесення додаткової полімерної мембрани на основі фенілендіаміну

Немодифіковані перетворювачі характеризуються досить широким спектром чутливості до різноманітних електроактивних речовин. Для покращення селективності перетворювачів використовують 2 підходи: зменшення робочого потенціалу та нанесення напівпроникних мембран на поверхню перетворювача (дані мембрани пропускають до електроду невеликі сполуки типу перекису водню і не дають дифундувати більшим речовинам). В нашому випадку було використано мембрану, проникну для перекису водню, на основі поліфенілендіаміну (ПФД). Для її нанесення, чистий перетворювач занурювали у 1 мМ розчин м-фенілендіаміну, після чого отримували одну циклічну вольтамперограму (якщо проводити кілька циклів полімеризації, мембрана стає настільки щільною, що значно зменшується чутливість перетворювача до перекису водню). Фенілендіамін був розчинений у 10 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4. Початковий потенціал – 0 В, кінцевий потенціал становив +0,9 В, швидкість зміни потенціалу складала 20 мВ на секунду, крок зміни потенціалу – 5 мВ. Дана методика нанесення ПФД мембрани була адаптована із [7].

2.4. Методика виготовлення біоселективних ферментних мембран

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом ковалентної іммобілізації ферментів і допоміжних речовин на поверхню

амперометричного перетворювача. Вихідний розчин містив 4 % (тут і далі – масова частка) ГОД, 2 % БСА у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 3 % гліцерином. Перед нанесенням на поверхню перетворювачів цей розчин змішували з 2 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів (приблизно 0,1 мкл суміші на кожен електрод) та висушували протягом 30 хв. на повітрі за кімнатної температури. Потім електроди занурювали у робочий буфер на 10 хв. для вимивання незв'язаних компонентів біоселективних елементів та надлишку глутарового альдегіду.

2.5. Експериментальні установки для амперометричних вимірювань

В роботі використовувалась триелектродна схема амперометричного аналізу. Робочі амперометричні електроди, допоміжний електрод та внутрішній електрод порівняння підключались до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди) або потенціостату українського виробництва. До PalmSens підключався 8-ми каналний пристрій (CH-8 multiplexer) того ж виробника, що дозволяв отримувати сигнали одночасно з 8 робочих електродів [3].

Потенціостат українського виробництва був розрахований на роботу з 4-ма робочими електродами і був складовою амперометричного комплексу, схема якого наведена на Рис. 2.

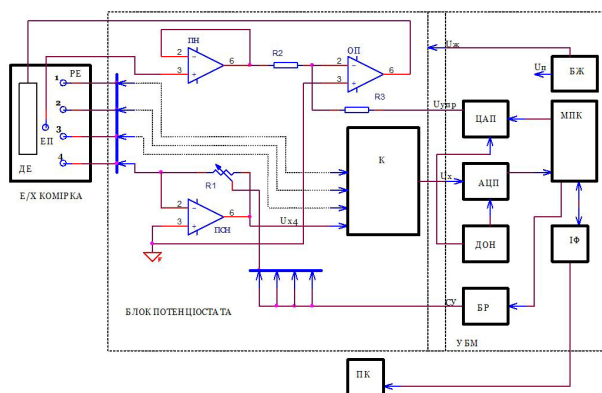


Рис. 2. Структурна схема апаратури амперометричного комплексу.

До його складу входять: електрохімічна вимірювальна комірка (Е/Х комірка) з чотир-

ма робочими електродами (РЕ), допоміжним електродом (ДЕ) та електродом порівняння (ЕП), електронний вимірювальний блок (ВБ) і персональний комп'ютер (ПК). ВБ складається з уніфікованого базового модуля (УБМ) та адаптера сенсорів - блока потенціостата. За допомогою останнього підтримуються необхідні потенціали електродів комірки, а також знімається і перетворюється її вихідний струмовий сигнал. Електроживлення вимірювальної системи здійснюється блоком живлення (БЖ) від акумулятора або через мережевий адаптер від мережі змінного струму.

Базовий модуль виконує основні функції, властиві широкому класу вимірювальної апаратури: формує напругу живлення електронних вузлів усього вимірювального блока, вимірює і перетворює в цифрову форму вхідні інформативні сигнали (U_x), виробляє аналогові ($U_{уп}$) і логічні сигнали керування (СУ) вимірювальними перетворювачами. У цьому випадку таким вимірювальним перетворювачем, що формує сигнал U_x , є потенціостат П.

До складу УБМ входить мікропроцесорний контролер (МПК) із відповідним програмним забезпеченням нижнього рівня, що забезпечує виконання вимірювальних операцій, необхідну обробку сигналів та обмін даними із персональним комп'ютером (ПК) через інтерфейс (ІФ). Для сполучення вимірювального перетворювача (потенціостата) із МПК УБМ містить аналого-цифровий перетворювач (АЦП) та цифро-аналоговий перетворювач (ЦАП) з джерелом опорної напруги (ДОН) і блок регістрів (БР) для формування логічних сигналів СУ.

Основним елементом потенціостату є операційний підсилювач (ОП), у колі зворотного зв'язку якого включена вимірювальна комірка. За допомогою ЕП комірки визначається електричний потенціал в досліджуваному розчині поблизу РЕ. Для коректності цього визначення необхідно, щоб в колі ЕП струм був практично відсутнім. З цією метою в схему потенціостату введений повторювач напруги із вхідними струмами, меншими 1 рА. Вихідний струм потенціостату I_x протікає в колі РЕ і при цьому потенціал РЕ повинен бути близьким до 0. Для зняття цього струму з дотриманням зазначеного режиму застосовується перетворю-

вач струм - напруга (ПСН) на основі прецизійного операційного підсилювача з великим коефіцієнтом підсилення. Такий перетворювач підключено до кожного з робочих електродів. У колі зворотного зв'язку ПСН включений регульований резистор R1, що визначає його коефіцієнт перетворення і, отже, діапазон вимірюваних струмів. За допомогою комутатора К (перемикача каналів) до виходу потенціостату підключається вихід одного з ПСН. Для перемикання діапазонів вимірювання використовуються сигнали СУ. Величина вихідного сигналу U_x визначається співвідношенням:

$$U_x = I_x \cdot R1$$

де: I_x – струм між ДЕ і РЕ.

Значення U_x перетворюється в цифровий код за допомогою АЦП і передається МПК у персональний комп'ютер комплексу для подальшої обробки і реєстрації. Величина струму I_x у комірці з електродом порівняння повністю визначається електрохімічними процесами на РЕ, які, у свою чергу, залежать від потенціалу розчину (потенціал ДЕ відносно потенціалу РЕ). Точність завдання цих потенціалів залежить від напруг зсуву операційних підсилювачів потенціостата, що також необхідно враховувати при виборі елементної бази і при розробці детальних принципових схем цього пристрою. Потенціал ЕП у даній схемі жорстко пов'язаний з керуючою напругою $U_{уп}$ (вони рівні, якщо R2 = R3). Величина $U_{уп}$ формується цифро-аналоговим перетворювачем блоку УБМ. Керування значенням $U_{уп}$ здійснюється за допомогою ПК програмою верхнього рівня через МПК блоку УБМ. Більшу інформацію щодо структури та функціонування амперометричного комплексу можна знайти в роботі [8].

2.6. Методика проведення вимірювань

Виміри проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 2,5 мл при постійному перемішуванні та при постійному потенціалі +0,8 В (прикладеному до робочих електродів) відносно внутрішнього електрода порівняння. Робочим буфером виступав 5 мМ фосфатний буфер з рН 6,5.

Концентрації субстратів в робочій комірці задавали додаванням аліквот концентрованих розчинів субстратів (перекис водню – 50 мМ, глюкоза – 100 мМ). Усі дослідження проводились у 3-5 повторностях.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення перекису водню амперометричними перетворювачами із використанням двох потенціостатів

Чутливість амперометричних перетворювачів до перекису водню є дуже важливим параметром при створенні та роботі біосенсорів, що базуються на вимірюванні концентрації перекису водню як продукту ферментативної реакції. Висока чутливість перетворювача стосовно перекису водню приведе до високої чутливості біосенсора, на основі даного перетворювача, до досліджуваної речовини. Тому першим етапом роботи було порівняння чутливості амперометричних перетворювачів до перекису водню із використанням двох потенціостатів (PalmSens, Нідерланди та вітчизняного виробництва). Було проведено порівняння відгуків перетворювачів, під'єднаних до обох потенціостатів, в режимі амперометричних вимірювань, та отримано циклічні вольтамперограми (ЦВА) за відсутності та за наявності перекису водню в вимірювальній комірці.

3.1.1. Циклічні вольтамперограми

Метод циклічної вольтамперометрії дозволяє аналізувати чутливість перетворювачів до певних субстратів при різному потенціалі. Тому, аналізуючи ЦВА, можна визначити оптимальний робочий потенціал для амперометричних вимірювань.

При проведенні експерименту, спочатку отримували 1-2 ЦВА у чистому робочому буфері, після чого до вимірювальної комірки додавали перекис водню (0,5 мМ) і отримували ще 3-4 вольтамперограми. Умови отримання ЦВА були однаковими для обох потенціостатів. Типові ЦВА обох потенціостатів до та після додавання перекису водню зображені на Рис. 3.

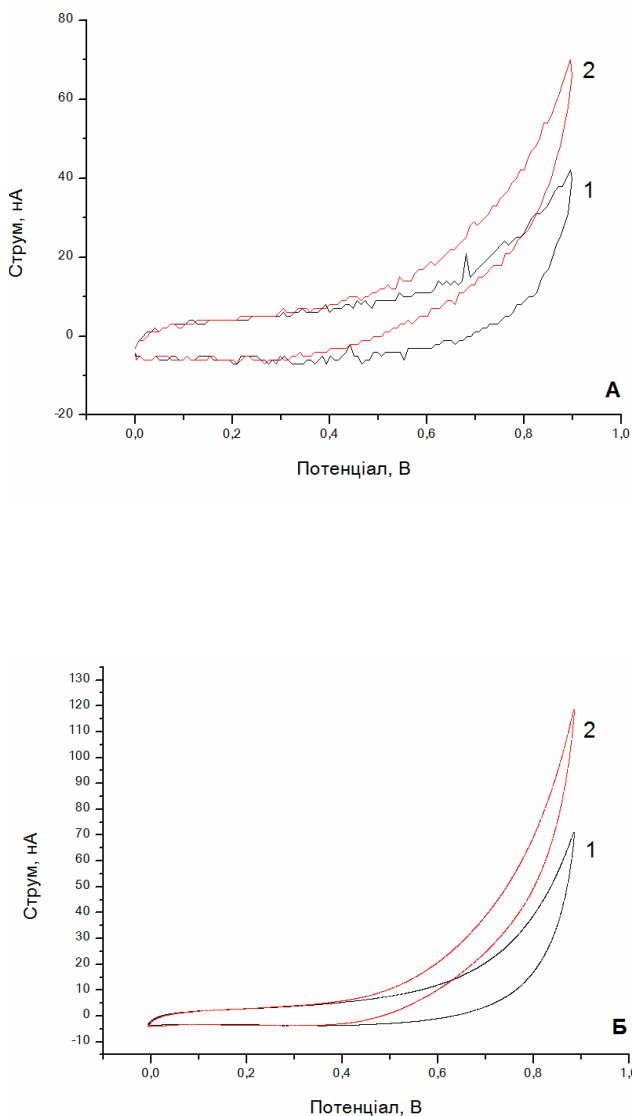


Рис. 3. Циклічні вольтамперограми, отримані до (1) та після (2) додавання до комірки 0,5 мМ перекису водню із використанням потенціостату українського виробництва (А) та PalmSens (Б). Початковий потенціал становив 0 В, кінцевий – 0,9 В відносно внутрішнього електроду порівняння. Шаг зміни потенціалу – 0,008 В, швидкість зміни потенціалу – 0,02 В/с. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5.

Як видно з Рис. 3, потенціостат PalmSens демонструє менший рівень шуму, більш плавну вольтамперограму і має більшу чутливість до перекису водню, у порівнянні з потенціостатом українського виробництва. В обох випадках, суттєве збільшення сигналу при до-

даванні перекису водню спостерігається при потенціалі від +0.6 В. Відповідно, незважаючи на меншу чутливість, вітчизняним потенціостатом можна правильно визначати оптимальний робочий потенціал для амперометричних вимірювань.

3.1.2. Відгуки перетворювачів та калібрувальні криві для визначення перекису водню

Калібрувальні криві амперометричних перетворювачів для визначення перекису водню необхідні для оцінки чутливості перетворювачів до різних концентрацій перекису водню. Експеримент проводили в режимі амперометричних вимірювань у 5 мМ фосфатному буфері, при потенціалі 0,8 В відносно внутрішнього електроду порівняння шляхом додавання до робочої вимірювальної комірки 0,2 мМ H_2O_2 кожні 30 секунд при потенціалі 0,8 В відносно внутрішнього електроду порівняння. Отримані калібрувальні криві наведені на Рис. 4. З рисунка видно, що відгуки сенсорів були прямо пропорційні концентрації перекису водню на всьому діапазоні концентрацій, причому чутливість PalmSens була дещо більшою; середня чутливість сенсорів складала 100 нА/мМ. Чутливості потенціостату українського виробництва було цілком достатньо для достовірного визначення концентрації перекису водню. З іншого боку, калібрувальна крива, отримана за із використанням PalmSens, мала невелике відхилення від лінійності, в той час як потенціостат українського виробництва показав пряму залежність струму від концентрації перекису водню.

Важливою характеристикою сенсорів є відтворюваність відгуків при додаванні однакових концентрацій досліджуваної речовини (це показує, як змінюється чутливість сенсора під час тривалої роботи). Цей параметр може залежати як від характеристик сенсора, так і від характеристик потенціостату. Тому наступним етапом роботи було дослідження відтворюваності відгуків на перекис водню із використанням двох потенціостатів. Для цього, впродовж декількох годин безперервної роботи отримували відгуки на одну і ту саму концентрацію перекису водню (0,5 мМ). Час одного відгуку складав близько 40 секунд. Тривалість між

відгуками складала приблизно 3 хв., протягом цього часу перетворювач і робочу комірку відмивали від перекису водню шляхом триразової заміни робочого буферу. Відтворюваність відгуків на перекис водню була майже однаковою для обох потенціостатів (відносно стандартне відхилення відгуків становило 8% для українського потенціостату та 7% для PalmSens). В обох випадках спостерігалось збільшення відгуків сенсорів впродовж вимірювань на 15-20%, що, ймовірно, пов'язано із використанням внутрішнього електроду порівняння, який приводив до дрейфу прикладеного потенціалу; потенціостат українського виробництва продемонстрував дещо менший дрейф сигналу протягом експерименту порівняно із закордонним аналогом. Першопричина дрейфу скоріше за все лежить в умовах вимірювань, аніж в потенціостатах.

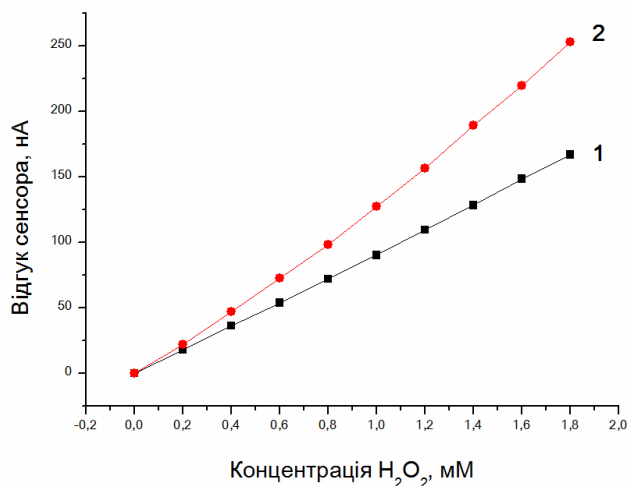


Рис. 4. Калібрувальні криві сенсорів для визначення перекису водню, отримані із використанням потенціостату українського виробництва (1) та PalmSens (2). Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері рН 6,5 за потенціалу 0,8 В відносно внутрішнього електрода порівняння.

Протягом місяця використання чутливість перетворювачів до перекису водню практично не змінювалась, що обумовлено стійкістю нікелю до хімічних модифікацій. Втім, через 1,5-2 місяця роботи відбувалось відшарування нікелю з поверхні перетворювачів, що практично унеможливило подальшу роботу з

ними. Причиною відшарування нікелю ймовірно було прикладання потенціалу до електродів. Тому слід завчасно замінювати нікелеві перетворювачі на нові, що не становить проблеми через низьку собівартість даних перетворювачів.

3.1.3. Методика покращення селективності перетворювача

Як відомо, електроактивні сполуки, що присутні в розчині, можуть значно впливати на роботу амперметричних сенсорів. Тому на наступному етапі роботи було порівняно чутливість перетворювачів на основі нікелевих електродів до аскорбінової кислоти та етилового спирту, що є поширеними інтерферуючими речовинами. Етиловий спирт практично не впливав на нікелеві перетворювачі даного типу, а аскорбінова кислота впливала суттєво. Після цього, було перевірено можливість покращення селективності перетворювачів шляхом нанесення мембрани (плівки) з ПФД з використанням обох потенціостатів. Отримана мембрана повинна утворювати пори, розмір яких є достатнім для проходження перекису водню до поверхні електрода, але не є достатнім для проходження більших за розміром речовин. Методика формування ПФД мембрани описана в пункті 2.3. Відповідно, необхідно було порівняти, за використання якого з потенціостатів при нанесенні додаткова мембрана вийде більш функціональною.

Калібрувальні криві для визначення перекису водню та аскорбінової кислоти до та після нанесення плівки наведені на Рис. 5. Без плівки, перетворювачі демонстрували дуже високу чутливість до аскорбінової кислоти (близько 3600 нА/мМ із використанням обох потенціостатів). Після нанесення плівки, чутливість знизилась до 20 – 40 нА/мМ (тобто в 90 разів). Чутливість перетворювачів до перекису водню після нанесення мембрани знизилась в два рази (від в середньому від 800 нА/мМ до 400 нА/мМ). Це свідчить про те, що на поверхні електродів сформувався щільний шар ПФД. Змінюючи умови нанесення ПФД, можливо досягти більш високої чутливості перетворювачів нанесеною плівкою до перекису водню, однак це виходило за межі даного до-

слідження. Використання для нанесення ПФД різних потенціостатів практично не впливало на отриманий результат.

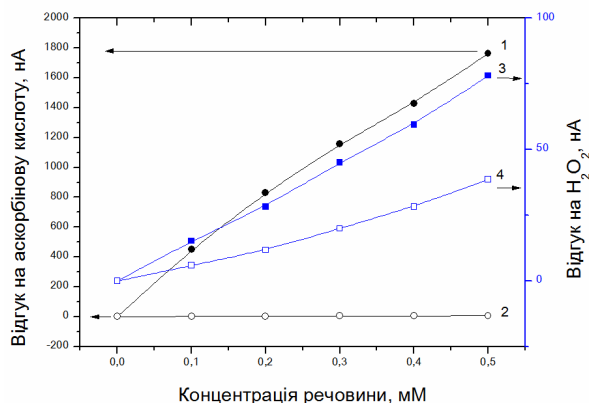


Рис. 5. Калібрувальні криві сенсорів для визначення аскорбінової кислоти (1, 2) та перекису водню (3, 4), отримані із використанням потенціостату українського виробництва до (1, 3) та після (2, 4) нанесення ПФД мембрани. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері рН 6,5 за потенціалу 0,8 В відносно внутрішнього електрода порівняння.

3.2. Розробка біосенсорів на основі ГОД для визначенні глюкози

Наступним етапом роботи була перевірка можливості створення біосенсорів для визначення глюкози шляхом іммобілізації ГОД на робочі електроди перетворювачів (див. п. 2.4). Дані біосенсори були підключені до двох потенціостатів з метою порівняння аналітичних характеристик біосенсорів, а саме калібрувальних кривих для визначення глюкози та відтворюваності відгуків на глюкозу.

Калібрувальні криві біосенсорів для визначення глюкози, отримані з використанням одного перетворювача, підключеного по черзі до обох потенціостатів, наведені на Рис. 6. Лінійний діапазон вимірювання глюкози складав 0,1-2 мМ для потенціостату українського виробництва та 0,05-2 мМ для PalmSens. Форма калібрувальних кривих була однаковою, що свідчило про відносну незалежність робочих характеристик біосенсора від підключеного потенціостату. Втім, через меншу чутливість і більший шум базової лінії у випадку українського потенціостату, при підключенні

до нього біосенсорів останні демонстрували більшу межу вимірювання глюкози (100 мкМ) у порівнянні з підключенням до PalmSens.

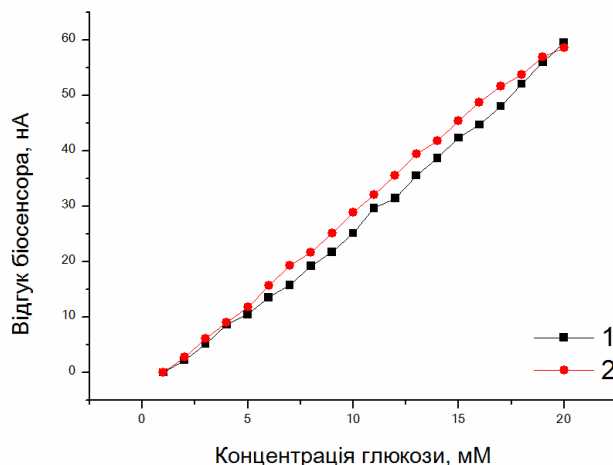


Рис. 6. Типові калібрувальні криві біосенсора для визначення глюкози, отримані із використанням потенціостату українського виробництва (1) та PalmSens (2). Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері рН 6,5 за потенціалу 0,8 В відносно внутрішнього електрода порівняння.

Також було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів на глюкозу впродовж декількох годин безперервної роботи з використанням обох потенціостатів. Процедура експерименту була така сама як і при дослідженні відтворюваності відгуків голого амперометричного перетворювача на перекис водню, тільки в якості субстрату використовували глюкозу. Помітного падіння відгуків за 15 вимірювань не відбувалось, що свідчить про гарну іммобілізацію ГОД в складі біоселективного елементу. Відтворюваність відгуків була різною для різних потенціостатів: відносно середньоквадратичне відхилення відгуків на глюкозу становило 4,4 % у випадку PalmSens і 7,9 % у випадку українського потенціостату.

3.3. Порівняння отриманих результатів

За результатами усіх експериментів було складено порівняльну таблицю, в яку увійшли аналітичні характеристики сенсорів та біосенсорів при вимірюванні концентрацій перекису водню та глюкози із використанням обох потенціостатів (Табл. 1). Як видно з таблиці, в більшості випадків характеристики

обох потенціостатів відрізнялися незначно. В цілому, потенціостат українського виробництва поступався PalmSens за деякими параметрами, але характеристик обох потенціостатів було достатньо для роботи з біосенсорами. Загалом, потенціостат українського виробництва може використовуватись для створення амперометричних сенсорів та біосенсорів як більш дешевий аналог закордонних потенціостатів. Характеристики нікелевих амперометричних перетворювачів теж були цілком прийнятні для створення на їх основі біосенсорів.

Таблиця 1

Порівняння характеристик амперометричних сенсорів та біосенсорів, отриманих на потенціостаті українського виробництва та PalmSens.

Параметри порівняння роботи сенсорів та біосенсорів	PalmSens	Потенціостат українського виробництва
Величина відгуку на 0,5 мМ H_2O_2 , нА	121,4	101,4
Шум базової лінії чистого сенсора, нА	0,5	1,3
Межа визначення H_2O_2 , мкМ	6,2	19,2
Час відгуку на H_2O_2 , хв.	< 1 хв	< 1 хв
Похибка вимірювання H_2O_2 , %	8	6,8
Кількість одночасно вимірюваних каналів	1 (з мультиплексором - 8)	4
Величина відгуку на 0,5 мМ глюкози, нА	11,5	13,1
Шум базової лінії біосенсора, нА	0,4	1,1
Межа визначення глюкози, мкМ	52	126
Час відгуку на глюкозу, хв.	< 1 хв	< 1 хв
Похибка вимірювання глюкози, %	4,4	7,9
Орієнтовна ціна потенціостату, грн.	40000 грн	2000 грн

4. ВИСНОВКИ

В роботі було проведено дослідження характеристик нікелевих перетворювачів при вимірюванні перекису водню та глюкози із використанням двох потенціостатів. Аналітичні характеристики визначення цих речовин обома потенціостатами в більшості випадків були майже однаковими. Потенціостат українського виробництва поступався потенціостату PalmSens лише за деякими параметрами: шум сигналу, межа визначення речовин, похибка вимірювання глюкози. В цілому, в роботі було продемонстровано, що потенціостат українського виробництва є більш дешевою альтернативою потенціостату PalmSens для використання його у біосенсоріці. Характеристики вітчизняної розробки цілком достатньо для виконання більшості задач по розробці біосенсорів. Властивості нікелевих амперометричних перетворювачів теж були цілком прийнятні для створення на їх основі біосенсорів.

Автори вдячні за фінансову підтримку НДР проектів «Розробка біосенсорних тест системи та підходи до покращення їхніх аналітичних характеристик» та «Розробка електрохімічних і фотохімічних біосенсорів з використанням мембран на основі хлоропластів і ферментів» від Державного агентства з питань науки, інновації та інформатизації України та фінансову підтримку від НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kimmel D.W., LeBlanc G., Meshievitz M.E., Cliffel D.E., Electrochemical sensors and biosensors // Analytical Chemistry.- 2012.- V. 84.- P. 685–707.
2. Dzyadevych S.V., Soldatkin O. P. Naukovi ta tehnologichni zasady stvorennya miniat'urnih electrohimichnih biosensoriv. Naukova dumka, K. 2006. 256 s. (2006).
3. Official web-site of manufacturer of

- PalmSens: <http://www.palmsens.com/en/instruments/palmsens/>
4. Official web-site of manufacturer of DropSens: http://www.dropsens.com/en/potentiostats_pag.html
5. S.B. Hall, E.A. Khudaisha, A.L. Hart. Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part 1. An adsorption-controlled mechanism // *Electrochim. Acta.*, 43, pp. 579-588 (1998).
6. A. Harper, M.R. Anderson. Electrochemical glucose sensors developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction // *Sensors*, 10, pp. 8248-8274 (2010).
7. S.J. Killoran, R.D. O'Neill. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt-Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications // *Electrochim. Acta*, 53, pp. 7303-7312 (2008).
8. A.D. Vasylenko, L.V. Shkotova, V.G. Melnyk, L.M. Semenycheva, S.V. Dzyadevych. Mnogokanal'nyj izmeritelnyj kompleks dlya electrohimicheskikh issledovaniy // *Sensor electronics and microsystem technologies*, 1, pp. 64-75 (2009).

Стаття надійшла до редакції 10.12.2013 р.