

ДЕГРАДАЦІЯ, МЕТРОЛОГІЯ І СЕРТИФІКАЦІЯ СЕНСОРІВ

SENSOR'S DEGRADATION, METROLOGY AND CERTIFICATION

УДК 543.9; 577.1; 541.13

МЕТОДИКА ТЕСТУВАННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЇ АМПЕРОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ

В. М. Пешкова, І. С. Кучеренко, О. О. Солдаткін, С. В. Дзядевич

Інститут молекулярної біології та генетики Національної Академії Наук України, лабораторія
біомолекулярної електроніки, вул. Заболотного 150, 03680, Київ, Україна.

E-mail: victoriya.p@gmail.com

МЕТОДИКА ТЕСТУВАННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЇ АМПЕРОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ

В. М. Пешкова, І. С. Кучеренко, О. О. Солдаткін, С. В. Дзядевич

Анотація. В ході роботи запропоновано методику тестування та оптимізації амперометричних перетворювачів, яка повинна суттєво полегшити попередню перевірку перетворювачів при розробці амперометричних біосенсорів та дозволити більш ефективно використовувати їх для створення біосенсорів. Ця методика включає в собі послідовність обов'язкових операцій, що повинен виконувати дослідник при розробці будь-якого безмедіаторного амперометричного ферментного біосенсора, в основі роботи якого лежить реєстрація окислення перекису водню. Ця послідовність включає в себе етапи дослідження основних робочих характеристик, оптимізації цих характеристик з метою подальшого ефективного використання перетворювача в складі біосенсора.

Ключові слова: Амперометричний біосенсор; платиновий перетворювач; мета-фенілендіамін

METHOD OF TESTING AND OPTIMIZATION OF AMPEROMETRIC TRANSDUCERS

V. M. Pyeshkova, I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Abstract. Method of testing and optimization of amperometric transducers were proposed in this work. This method must essentially facilitate preliminary testing of transducers during development of amperometric biosensors and it will allow more effectively use these transducers for creation of biosensors. Proposed method includes the sequence of necessary operations, that researcher has to make during development of each enzyme amperometric biosensors based on registration of peroxide hydrogen oxidation without mediators. The sequence of necessary operations includes study of main working characteristics, optimization of these characteristics with the purpose of following effective usage of transducers as a part of biosensor.

Keywords: Amperometric biosensor, platinum transducers, meta-phenylenediamine

МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЕЙ

В. Н. Пешкова, И. С. Кучеренко, А. А. Солдаткин, С. В. Дзядевич

Аннотация. В работе была представлена методика тестирования и оптимизации амперометрических преобразователей, которая должна существенно облегчить предварительную проверку преобразователей при разработке амперометрических биосенсоров и дать возможность более эффективно использовать их для создания биосенсоров. Эта методика включает в себя последовательность обязательных операций, которые должен осуществлять исследователь при разработке любого безмедиаторного амперометрического ферментного биосенсора, в основе работы которого лежит регистрация окисления пероксидом водорода. Такая последовательность включает в себя этапы исследования основных рабочих характеристик, оптимизации этих характеристик с целью дальнейшего эффективного использования преобразователя в составе биосенсора.

Ключевые слова: Амперометрические биосенсоры, платиновый преобразователь, мета-фенилендиамин

1. ВСТУП

Постійно зростаюча необхідність покращення охорони навколишнього середовища, контролю біотехнологічних процесів, перевірки якості харчових продуктів і питної води, збільшення кількості клінічних тестів у медичній та ветеринарній діагностиці потребує все більш широкого використання в практиці високочутливих, селективних, швидких та економічних методів аналізу. Серед них велику увагу приділяють приладам нового покоління – біосенсорам. Найважливішими з характерних ознак біосенсорів є їхня висока чутливість та селективність, простота у використанні та швидкість аналізу, а також широкий діапазон речовин, що можуть бути детектовані. Це означає можливість, а скоріше, необхідність, їхнього застосування практично в усіх галузях людської діяльності, включаючи медицину, фармацевтичне, харчове, біотехнологічне та хімічне виробництва, сільське господарство, охорону довкілля, тощо [1-4].

Серед існуючих на сьогодні біосенсорів найбільш перспективним вважається клас електрохімічних біосенсорів на основі амперометричного методу вимірювання. На жаль амперометричні біосенсори мають певні недоліки, пов'язані з низькою селективністю самого перетворювача, що дійсно негативно може вплинути на роботу біосенсорів [5].

Тому перед початком розробки біосенсорів дуже важливо провести ретельне тестування та оптимізацію основних робочих характеристик амперометричних перетворювачів для більш ефективного їхнього використання при розробці біосенсорів.

Основною метою даної роботи було розробка методики обов'язкового послідовного тестування та оптимізації амперометричних датчиків на прикладі амперометричних перетворювачів на основі дискових платинових електродів. Запропонована методика включає в себе проведення комплексного дослідження основних характеристик перетворювачів, вибір оптимальних умов для їх функціонування. Також в методиці описано кілька підходів щодо покращення початкових характеристик амперометричних перетворювачів, таких як чутливість до пероксиду водню та селективність відносно інших електроактивних речовин.

Така методика тестування амперометричних датчиків дозволить швидко та якісно проводити оцінку придатності відповідних амперометричних перетворювачів для розробки відповідних ферментних амперометричних біосенсорів та запропонує шляхи вирішення проблем.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Реактиви

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), 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА), водний розчин перекису водню (3 ваг. %), мета-діамінобензол, аскорбінова та сечова кислоти, цистеїн, дофамін, ацетамінофен використано виробництва Sigma–Aldrich Chimie S.a.r.l. (Франція); глюкоза, 98 % етиловий спирт, 50% гліцерин були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти “х.ч.”. В якості робочого буферного розчину використовували 25 мМ калій-фосфатний буферний розчин (KH_2PO_4 -NaOH), рН 7,0, фірми “Merck” (Німеччина) або 25 мМ HEPES($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ -NaOH) буферний розчин, рН 7,0, фірми Sigma–Aldrich Chimie (США).

2.2. Амперометричний перетворювач на основі дискового платинового електроду

Матеріали, що найчастіше використовуються при виготовленні амперометричних перетворювачів, це благородні метали та різні форми вуглецю. Найчастіше, це такі метали, як платина, золото, срібло і високоякісна сталь, оскільки вони мають чудові електричні і механічні властивості.

В нашій роботі ми використовували амперометричні перетворювачі на основі платинового дроту ($D = 0,5$ мм), виготовлені в нашій лабораторії, оскільки платина є одним з найбільш інертних металів, крім того вона нерозчинна в кислотах і лугах, за винятком «царської горілки». Платинові дискові електроди виготовлялись в нашій лабораторії за наступною технологією: шматочок платинового дроту діаметром 0,5 мм і довжиною 3 мм поміщали в звужений з одного боку скляний капіляр, після чого звужений кінець капіляру із платиною у середині герметизувався запаюванням в полум’ї пальника. Електричне з’єднання платини з провідником забезпечувалось низькотемпературним запаюванням за допомогою сплаву Вуда ($t_{\text{пл}} = +80$ °С). Відкритий кінець електроду заповнювався епоксидною смолою, частина провідника знаходилась

в середині капіляру, а частина залишалась ззовні. Перед першим використанням, робоча частина електроду зі впаяною платиною проходила механічну обробку на наждачно-му папері та за допомогою алюмінієвої пасти. При необхідності, робоча поверхня платинового електроду поновлювалася за допомогою полірування. Розміри амперометричних перетворювачів та, особливо, чутливої їх частини підбирались експериментально, намагаючись мініатюризувати їх, але ж враховуючи складність нанесення біологічного матеріалу на мініатюрні перетворювачі.

На рис.1 зображено робочий амперометричний перетворювач на основі платинового дроту діаметром 0,5 мм виготовлений в нашій лабораторії.



Рис. 1. Схематичне зображення структури робочого електроду на основі платинового дроту діаметром 0,5 мм: 1 – скляний корпус електроду; 2 – платиновий дріт; 3 – електричне з’єднання за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда; 4 – внутрішній провідник; 5 – захисний чохол; 6 – епоксидна смола; 7 – контактна площадка

2.3. Методика модифікації амперометричних перетворювачів.

Для досягнення необхідної селективності амперометричних мікроперетворювачів до перекису водню відносно інших електроактивних речовин необхідно було провести модифікацію чутливої поверхні перетворювача. Електрохімічне нанесення шару полімеру на основі полі-фенілендіаміну (ПФД) з розчину мономеру фенілендіаміну з концентрацією 0,1 М проводили у фосфатному буфері (рН 7,0). Перед використанням розчини ПФД обезкиснювали шляхом 15-хвилинного продування аргоном. Електрохімічне осадження плівки на чутливі поверхні платинових електродів здійснювали впродовж 45 хвилин при постійному потенціалі (+0.7 В). Перед подальшим нане-

сенням біоселективної мембрани модифіковану ПФД поверхню перетворювача ретельно промивали дистильованою водою.

2.4. Методика виготовлення біоселективних ферментних мембран

Біоселективні ферментні мембрани для глюкозного біосенсора виготовляли, використовуючи суміш відповідного ферменту з БСА, отриману в 0,1 М фосфатному буфері, рН 6,5. Кінцева концентрація ферменту становила 40 мг/мл, а БСА - 20 мг/мл. До кожної суміші додавали також гліцерин (5 ваг. %), щоб стабілізувати ферменти впродовж їх іммобілізації, запобігти передчасному висиханню і поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача. Розчин глутарового альдегіду (ГА) з кінцевою концентрацією 0,2 ваг. % використовували для перехресного зв'язування молекул ферменту та молекул БСА. Суміш, що містила відповідний фермент, БСА, гліцерин та ГА, наносили на чутливу поверхню перетворювача, після чого витримували впродовж 1 години за кімнатної температури. Перед початком роботи біосенсори відмивали в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів біомембрани.

2.5. Експериментальна установка для амперометричних вимірювань

В роботі використовується триелектродна схема амперометричного аналізу. Розроблені робочі амперометричні перетворювачі разом з допоміжним платиновим електродом (із значно більшою площею платинової поверхні порівняно з робочим електродом) та Ag/AgCl електродом порівняння підключаються до потенціостату PalmSens (Нідерланди).

Кожен з перелічених вище електродів виконує свою функцію при амперометричному аналізі. Коли до робочого електроду прикладається позитивний потенціал, всі молекули, що окислюються на поверхні електроду, віддають свої електрони електроду, тобто відбувається перехід електронів із розчину до електроду. За відсутності другого електроду через стехіометричний розбаланс генерувалася б велика різниця потенціалів. Тому функція допоміжного електроду полягає в замиканні ланцюга, щоб електрони через зовнішній ланцюг під дією

прикладеної напруги поверталися назад до розчину. Очевидно, що це спричиняє процес відновлення на допоміжному електроді, еквівалентний за величиною процесу окислення на робочому електроді. Цей потік електронів і формує струм амперометричного датчика. Третій електрод системи – це електрод порівняння, який повинен мати в своєму складі відому хімічну сполуку, що включає обидві форми редокс-пари. Звичайно це Hg/HgCl₂ (насичений каломельний електрод) чи Ag/AgCl (хлор-срібний електрод). Завдяки тому, що прикладений потенціал є фіксованим, електрод порівняння має стабільну точку, відносно якої може вимірювати робочий електрод. Тобто прикладений потенціал контролюється між робочим електродом і електродом порівняння, в той час як струм вимірюється між робочим і допоміжним електродами [1].

Амперометричні перетворювачі під'єднувалися до потенціостату. Відстань між допоміжним платиновим електродом, електродом порівняння та робочим амперометричним перетворювачем, в процесі вимірювання, була однаковою і складала приблизно 5 мм. Усі представлені в роботі результати вимірювань проводили у відкритій вимірювальній комірці при постійному перемішуванні та при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Схема експериментальної установки приведена на рис. 2.

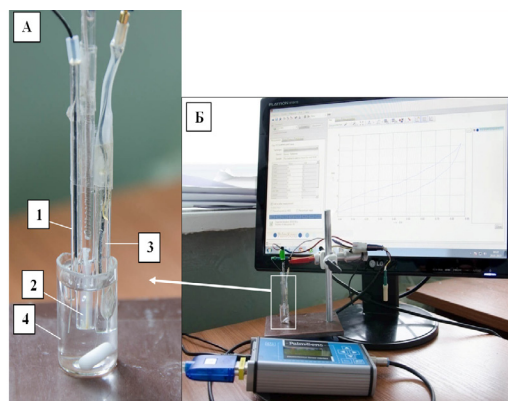


Рис. 2. Зовнішній вигляд триелектродного амперометричного перетворювача, зануреного у вимірювальну комірку з розчином (А): 1 – допоміжний електрод, 2 – хлор-срібний електрод порівняння, 3 – робочий електрод, 4 – комірка з робочим буферним розчином, об'ємом 2 мл на магнітній мішалці. Зовнішній вигляд портативної амперометричної установки PalsSens, що підключена до персонального комп'ютера та амперометричного перетворювача (Б)

2.6. Методика вимірювання

Вимірювання проводились у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0 у вольтамперометричному режимі та при постійному потенціалі + 0,5 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння у відкритій комірці при інтенсивному перемішуванні. Концентрацію субстратів у вимірювальній комірці задавали внесенням до робочого буферу порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів субстратів. Усі дослідження проводилися щонайменше у трьох серіях.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження вольтамперометричних характеристик електродів

Тестування амперометричних перетворювачів, які будуть використані для конструювання біосенсорів, є важливою стадією, що передує розробці будь-якого біосенсору. Перший етап запропонованої нами методики тестування амперометричних перетворювачів полягає у перевірці чутливості до перексиду водню методом циклічної вольтамперометрії. Вивчення циклічних вольтамперограм, отриманих на амперометричних перетворювачах, дозволяє аналізувати їх чутливість до певних субстратів при різному потенціалі. Крім того, застосовуючи метод циклічної вольтамперометрії, можна обирати оптимальний потенціал для подальшої роботи в амперометричному режимі.

Для амперометричних платинових дискових електродів було отримано дві вольтамперограми (діапазон потенціалу від 0 до +850 мВ, швидкість розгортання потенціалу 50 мВ/с).

На рисунку 3 зображено приклад типових вольтамперограм, за допомогою яких аналізують чутливість амперометричних перетворювачів щодо перекису водню. Першу циклічну вольтамперограму було отримано на платиновому електроді у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0 без субстрату (рис. 3, крива 1). Другу – в тих самих умовах, але при наявності 100 мкМ перексиду водню у вимірювальній комірці (рис. 3, крива 2). Як видно з рисунку,

при додаванні у робочу комірку джерела електронів (перексиду водню) спостерігається поява окиснювального струму та підвищення сигналу датчика.

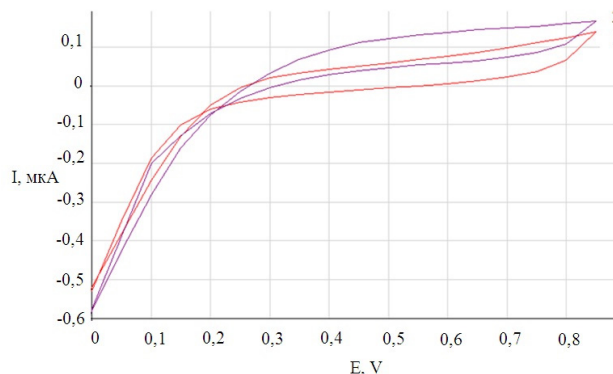


Рис. 3. Циклічні вольтамперограми, отримані на перетворювачах у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0 (1) та при наявності 100 мкМ перексиду водню у вимірювальній комірці (2)

Використовуючи метод циклічних вольтамперограм, описаний вище, було отримано залежність чутливості амперометричного платинового дискового електрода від величини прикладеного потенціалу. На рис. 4 представлено результати проведеного дослідження, а саме залежність величини відгуків амперометричного перетворювача на додавання у вимірювальну комірку 100 мкМ перексиду водню від прикладеного до нього потенціалу (0,3-0,85 В).

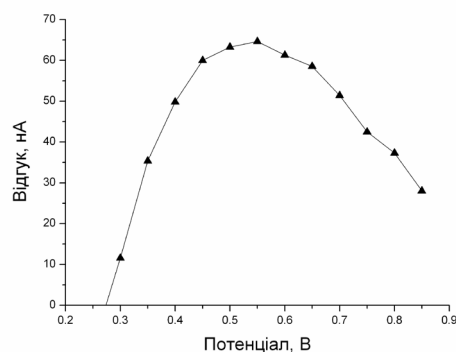


Рис. 4. Залежність величини відгуків аперометричного перетворювача на додавання у вимірювальну комірку 100 мкМ перексиду водню від прикладеного потенціалу (0,3-0,85В) відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Вимірювання проводили у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0

Аналізуючи отриману залежність, було з'ясовано, що найбільша чутливість до пероксиду водню у амперометричних датчиків, що досліджувалися, спостерігається при робочому потенціалі від 0,5 до 0,6 В.

3.2. Дослідження відтворюваності сигналу амперометричних перетворювачів на пероксид водню

Наступна стадія тестування амперометричних перетворювачів на основі дискового платиногового електроду полягає у дослідженні відтворюваності сигналу, яке проводили наступним чином: протягом декількох годин з інтервалом в 20 хвилин отримували відгуки амперометричних перетворювачів на одну і ту ж концентрацію пероксиду водню (8 мкМ), при цьому перетворювач весь час між вимірюваннями залишався у буферному розчині з постійним перемішуванням (рис. 5). Відтворюваність сигналів перевірялась на трьох амперометричних перетворювачах. Стандартне відхилення відгуків всіх перетворювачів була в межах $\pm 5\%$, що є допустимим показником, тому проведення подальших процедур по вдосконаленню відтворюваності перетворювачів даного типу не є необхідним.

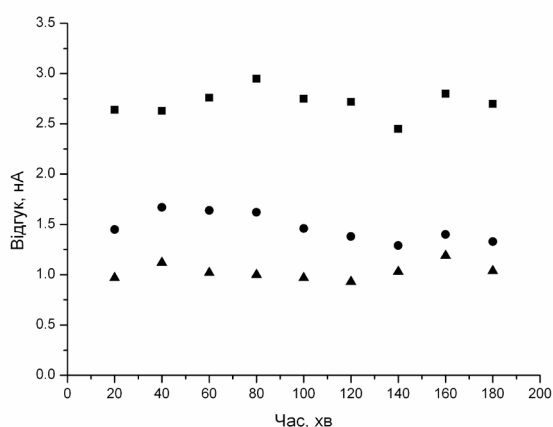


Рис. 5. Відтворюваність сигналів трьох платинових перетворювачів на внесення у вимірювальну комірку 8 мкМ пероксиду водню. Вимірювання проводилися в 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0 при накладанні потенціалу 0,5 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрація пероксиду водню - 8мкМ

3.3. Дослідження селективності амперометричних перетворювачів

Суттєвою проблемою, яка часто постає при проведенні аналізів зразків за допомогою біосенсорів, є недостатня селективність, а саме залежність роботи амперометричних перетворювачів від інтерферуючих сполук, що можуть бути присутні у біологічних рідинах – спиртів, фенольних речовин, аскорбінової кислоти тощо. При цьому поява неспецифічного сигналу може бути обумовлена як неселективним відгуком біомембрани, так і реакцією на інтерферуючі речовини самого перетворювача. Очевидно, що селективність амперометричних перетворювачів, які застосовуються при розробці біосенсорів, повинна бути всебічно досліджена та за необхідності оптимізована. Тому наступним стадією запропонованої методики тестування амперометричних перетворювачів є дослідження чутливості біосенсорів на інші електроактивні речовини, що можуть бути присутні у зразках.

3.3.1. Перевірка чутливості амперометричних перетворювачів до аскорбінової кислоти

Як відомо, найбільш проблематичним інтерферентом є аскорбінова кислота, яка може бути присутня в багатьох біологічних зразках. Поява неспецифічного сигналу біосенсора на аскорбінову кислоту і подібні інтерферуючі компоненти обумовлена їх електрохімічним окисненням на електроді. Результати перевірки чутливості перетворювачів до аскорбінової кислоти приведені на рисунку 6. Отримані вольтамперограми на амперометричних перетворювачах змінювались в залежності від внесення у вимірювальну комірку різних концентрацій аскорбінової кислоти (0, 1, 2, 5, 10 та 20 мМ).

Використовуючи результати описані вище, отримані методом циклічної вольтамперограми, було побудовано залежність чутливості амперометричного перетворювача на основі платиногового дискового електроду щодо 10 мМ аскорбінової кислоти від величини прикладеного робочого потенціалу (рис. 7).

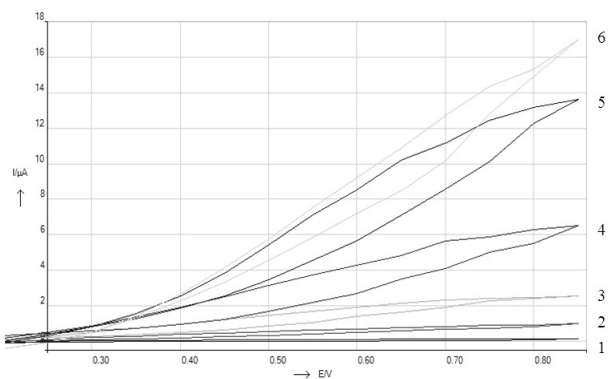


Рис. 6. Циклічні вольтамперограми отримані на амперометричному платиновому перетворювачі у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0 (1) та при додаванні 1 мМ (2), 2 мМ (3), 5 мМ (4), 10 мМ (5) та 20 мМ (6) аскорбінової кислоти

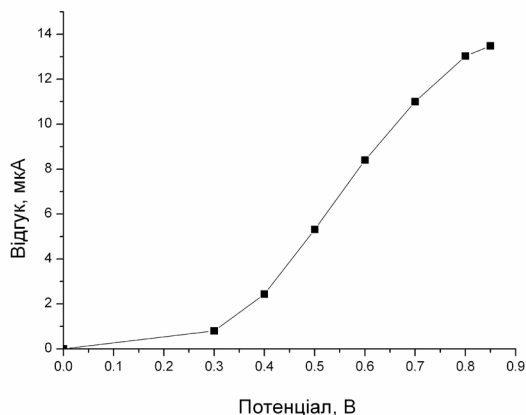


Рис. 7. Залежність величини відгуків амперометричного перетворювача на додавання у вимірювальну комірку 10 мМ аскорбінової кислоти від прикладеного потенціалу (0-0,85В) відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Вимірювання проводили у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0

На відміну від пероксиду водню, відгуки на аскорбінову кислоту при збільшенні потенціалу зростають практично лінійно. Оскільки при меншому потенціалі відгуки даних електродів на аскорбінову кислоту значно менші, то для роботи з реальними зразками, в яких може бути присутні електроактивні речовини такі, як аскорбінова кислота, бажано при даних умовах обирати більш низький потенціал.

3.3.2. Перевірка чутливості платинових електродів щодо етилового спирту

Крім аскорбінової кислоти, ще одним поширеним інтерферентом, що часто вносить похибку в результати аналізу, отримані амперометричним біосенсором є етиловий спирт.

По аналогії з дослідженням, проведеним з аскорбіновою кислотою, було виконано роботу по перевірці чутливості амперометричного перетворювача до етилового спирту (рис. 8).

Використовуючи результати, отримані методом циклічної вольтамперограми, було побудовано залежність чутливості амперометричного перетворювача на основі платинового дискового електрода щодо 800 мМ етилового спирту від величини прикладеного робочого потенціалу 0,1-0,85В (рис. 9).

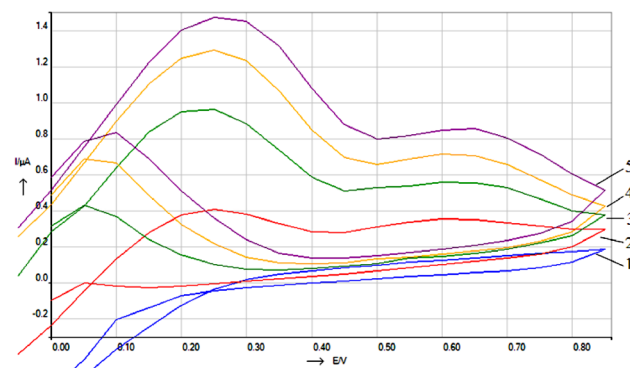


Рис. 8. Циклічні вольтамперограми, отримані на амперометричному платиновому перетворювачі у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0 (1) та при додаванні 400 мМ (2), 800 мМ (3), 1200 мМ (4) та 1600 мМ (5) етилового спирту

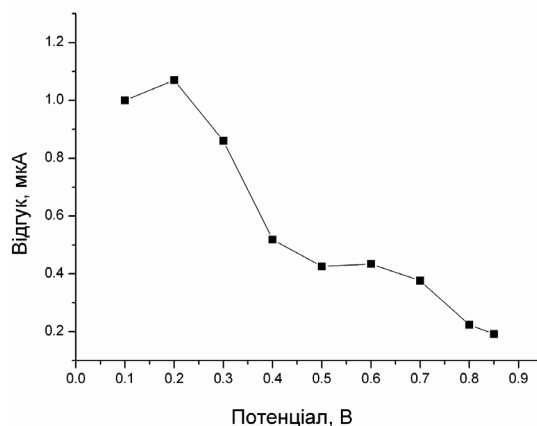


Рис. 9. Відгуки на додавання 800 мМ етилового спирту, отримані на платиновому перетворювачі у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0 при накладанні потенціалу від 0,1-0,85В

Згідно отриманих результатів відгук платинових перетворювачів на етиловий спирт є невисокими і майже не змінюється при зміні потенціалу від 0,4 до 0,7В, а, отже, це, в свою чергу, дозволяє використовувати дані перетворювачі для аналізу зразків, в яких може бути присутній етиловий спирт.

3.3.3. Порівняння чутливості амперометричних перетворювачів до перекису водню, аскорбінової кислоти та етилового спирту

Для більш детальної оцінки селективності амперометричних перетворювачів щодо перексиду водню відносно найбільш поширених інтерферуючих речовин (аскорбінова кислота та етиловий спирт) було побудовано калібрувальні графіки чутливості перетворювача на ці речовини (рис. 10). Результати порівняльного аналізу було отримано при робочому потенціалі 0,5 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Потенціал було вибрано в попередніх експериментах враховуючи чутливість перетворювача до перексиду водню.

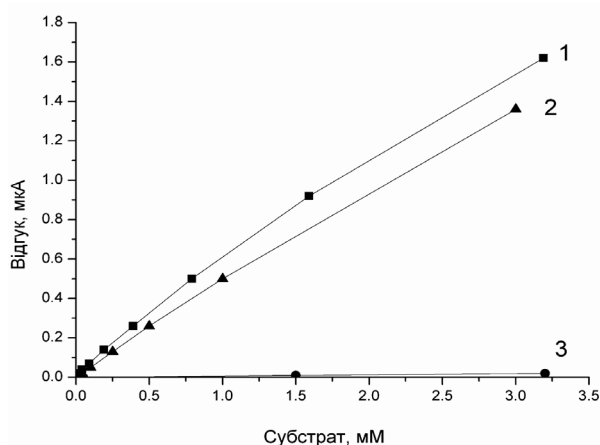


Рис. 10. Залежність величини відгуку платинових електродів від концентрації перексиду водню (1), аскорбінової кислоти (2) та етилового спирту (3) в електрохімічній комірці. Вимірювання проводили у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0 при потенціалі 0,5В

Згідно рисунку 10 видно, що при потенціалі 0,5 В відгуки на аскорбінову кислоту були достатньо високі порівняно із відгуками на перексид водню. Відповідно селективності перетворювача буде недостатньо для роботи

із зразками, в яких аскорбінова кислота буде присутня в значній мірі. В свою чергу, відгуків перетворювачів на внесення етилового спирту майже не спостерігалось, що дає можливість використовувати ці датчики для аналізу зразків, що містять етиловий спирт.

Щоб подолати суттєвий вплив аскорбінової кислоти на відгуки перетворювачів застосовують різні підходи по додатковій модифікації поверхні перетворювачів. Ці підходи дозволяють проводити селективний аналіз в присутності інтерферентів у значних концентраціях навіть при роботі на більш високих потенціалах.

3.4. Покращення селективності амперометричного перетворювача.

В попередньому підрозділі було продемонстровано, що використаний в роботі амперометричний перетворювач є недостатньо селективний для подальшої розробки на його основі ферментного біосенсора. Тому наступною стадією запропонованої методики тестування амперометричних перетворювачів є покращення їх селективності за рахунок нанесення додаткових мембран. Щоб покращити селективність перетворювачів та запобігти окисленню інтерферуючих речовин на поверхні електрода використовують різноманітні додаткові полімерні мембрани, що обмежують дифузію інтерферуючих речовин до поверхні перетворювача, при цьому пропускають до електрода цільову речовину (в нашому випадку – перексид водню) [6-8].

Для покращення селективності даних перетворювачів застосовували поліфенілендіамінову (ПФД) мембрану, що була нанесена на поверхню платинового дискового робочого електрода за допомогою електрополімеризації. Переваги застосування поліфенілендіамінових мембран описані в попередніх статтях [9, 10]. Ця мембрана утворює пори, розмір яких є достатнім для проходження перексиду водню до поверхні електрода, та є недостатнім для проходження більших за розміром речовин. Для формування ПФД мембрани амперометричний перетворювач занурювали у 5 мМ розчин м-фенілендіаміну, після чого отримували 4-5 циклічних вольтамперограм (рис. 11).

Як видно з рисунку, четверта та п'ята вольтамперограми майже не відрізнялися одна від одної, що свідчило про закінчення формування шару ПФД на поверхні робочого електроду.

Для дослідження впливу полімерної мембрани на відгуки датчиків було протестовано чутливість перетворювачів до перексиду водню та інтерферентів до та після модифікації поліфенілендіаміном. Отримані результати представлено в таблиці 1. В якості інтерферентів використовували аскорбінову кислоту, етиловий спирт та ще ряд речовин, що часто вносять похибку в роботу амперометричних біосенсорів такі, як дофамін, цистеїн, сечова кислота та парацетамол (N-ацетил-п-амінофенол).

До нанесення ПФД мембрани перетворювач достатньо сильно реагував на інтерференти. Відповідно могли виникнути проблеми при використанні біосенсора на основі даного перетворювача при аналізі біологічних рідин. Втім, після нанесення ПФД мембрани відгуки перетворювачів на інтерференти зникли зовсім або зменшились до незначних розмірів, при цьому чутливість перетворювачів до перекису водню впала лише на 20% (табл.1).

поліфенілендіаміном робочі електроди нанесли біомембрану на основі глюкозооксидази. Даний фермент було обрано у якості моделі, оскільки глюкозооксидаза (ГОД) високо специфічна, стабільна та найбільш вивчена при використанні у біосенсоріці. На запропонованому біосенсорі на основі ГОД було отримано вольтамперограми просто в робочому буферному розчині та при додаванні у вимірювальну комірку 0,5мМ глюкози (Рис. 12). Ці вольтамперограми було порівняно з вольтамперограмою, отриманою на тому ж самому амперометричному перетворювачі без ферментної мембрани. Як видно з рисунку 12 вольтамперограми, отримані на амперометричному перетворювачі з нанесенням ферментної мембрани та без неї практично не відрізнялись, що свідчить про те, що біоселективна мембрана не впливає на роботу перетворювача в буферному розчині. При додаванні глюкози у вимірювальну комірку вольтамперограма змінюється суттєво (рис. 12, крива 3), що свідчить про роботу фермента, а відповідно і про те, що опротестовані в нашій роботі амперометричні перетворювачі з успіхом можуть бути використані при розробці біосенсорів.

Таблиця 1.

Перевірка селективності амперометричних перетворювачів до та після нанесення ПФД мембрани.

<i>Сполука</i>	<i>Відгук без ПФД мембрани</i>	<i>Відгук з ПФД мембраною</i>
Перекис водню, 50 мкМ	34,7 ± 2,6	27,6 ± 0,8
Аскорбінова кислота, 500 мкМ	33,2 ± 1,7	0,9 ± 0,5
Етиловий спирт, 1мМ	0,02 ± 0,02	0
Сечова кислота, 100 мкМ	10,6 ± 1,8	0
Парацетамол, 100 мкМ	7,3 ± 1,2	0
Цистеїн, 100 мкМ	2,8 ± 0,4	0,02 ± 0,02
Дофамін, 20 мкМ	14,8 ± 1,3	1,2 ± 0,3

3.5. *Перевірка роботи амперометричного біосенсора на основі перетворювачів, що тестувались.*

Наприкінці проходження повного тестування амперометричних перетворювачів за пропонованою методикою, необхідно було провести перевірку даних перетворювачів під час роботи в складі біосенсорів. Для цього під час приготування біосенсорів на модифіковані

4. ВИСНОВКИ

В даній роботі запропоновано універсальну методику тестування амперометричних перетворювачів, яку слід проводити перед розробкою будь-якого безмедіаторного ферментного біосенсора, в основі роботи якого лежить окислення перекису водню. В ході тестування датчиків було досліджено основні аналітичні характеристики робочих електродів на основі платинового дроту методом циклічної воль-

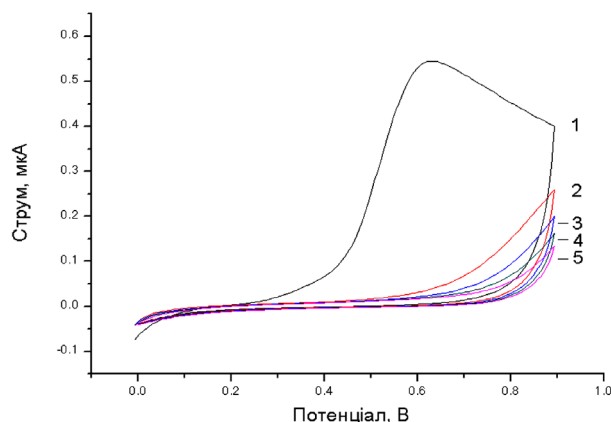


Рис. 11. Циклічні вольтамперограми, отримані при формування шару полі-м-фенілендіаміну на поверхні платинових дискових електродів. Фенілендіамін (5 мМ) був розчинений у 10 мМ калій-фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Початковий потенціал – 0 В, кінцевий потенціал 0,9 В

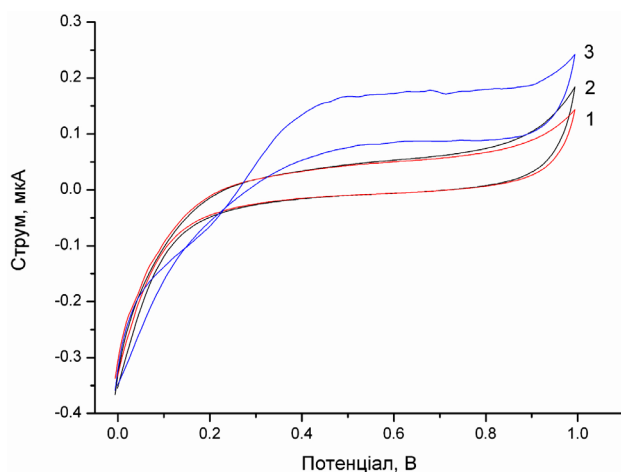


Рис. 12. Циклічні вольтамперограми, отримані на амперометричному перетворювачі без ферментної мембрани (1), після нанесення ферментної мембрани на основі глюкозооксидази (2) та при додаванні 0,5 мМ глюкози у вимірювальну комірку (3). Вимірювання проводили у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0

тамперометрії та амперометричних вимірювань. Було перевірено платинові електроди на чутливість до перекису водню, етанолу та аскорбінової кислоти. Вибрано оптимальний потенціал роботи даних перетворювачів. Було досліджено відтворюваність сигналу амперометричного перетворювача та його селективність. В якості прикладу оптимізації селективності перетворювачів на поверхню робочого електрода була нанесена поліфенілендіаміно-

ва мембрана, що в свою чергу значно знизило та навіть нівелювало чутливість амперометричного перетворювача до інтерферуючих речовин. В результаті тестування було показано, що амперометричні платинові перетворювачі по своїм характеристикам підходять для подальшого використання для розробки ферментних біосенсорів.

Запропонована методика допоможе зберегти час дослідників, суттєво полегшить та систематизує процедуру попередньої перевірки амперометричних перетворювачів при розробці ферментних безмедіаторних біосенсорів.

Робота виконана завдяки фінансовій підтримці програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

Список використаної літератури

- [1]. *S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin. Solid-State Electrochemical Enzyme Biosensors // Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences, pp.221 (2008)*
- [2]. *Hall E. Biosensors // Cambridge: Open University Press, pp. 351 (1991)*
- [3]. *A. Turner, B. Malhotra. Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensors //Amsterdam: Jai Press, Vol.5, pp. 196 (2003)*
- [4]. *B. R. Eggins. Chemical Sensors and Biosensors // Wiley, pp. 300 (2002)*
- [5]. *O. O. Soldatkin. Optimization of simultaneous work of three microbiosensors for multyanalysis of glucose, lactate and glutamate // SEMST, 9 (3), pp. 53-61 (2012)*
- [6]. *J. P. Lowry, M. Miele, R. D. O'Neill, M. G. Boutelle, M. Fillenz. An amperometric glucose-oxidase/poly(o-phenylenediamine) biosensor for monitoring brain extracellular glucose: in vivo characterisation in the striatum of freely-moving rats // Journal of Neuroscience Methods, 79 (1), pp. 65-74 (1998)*
- [7]. *J. P. Lowry, M. Miele, R. D. O'Neill. Partial characterization in vitro of glucose oxidase-modified poly(phenylenediamine)-coated electrodes for neurochemical analysis in vivo // Electroanalysis, 6 (5-6), pp. 369-379 (1994)*
- [8]. *B. M. Dixon, J. P. Lowry, R. D. O'Neill. Characterization in vitro and in vivo of the oxygen dependence of an enzyme/polymer biosensor for monitoring brain glucose // J. Neurosci Methods,*

119(2), pp. 135-142 (2002)

[9]. *O. M. Schuvailo, O. O. Soldatkin, A. Lefebvre, R. Cespuglio, A. P. Soldatkin*. Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate // *Analytica Chimica Acta*, 573 (1), pp. 110-116 (2006)

[10]. *O. O. Soldatkin, O. M. Schuvailo, R. Cespuglio, A. P. Soldatkin*. Development of high-sensitive and selective amperometric transducers for biosensors for in vivo analysis // *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 7(2), pp. 51-60 (2010)