

УДК 577.151.4+543.555

РОЗРОБКА ВИСОКОЧУТЛИВОГО ТА СЕЛЕКТИВНОГО АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ПЕРЕТВОРЮВАЧА ДЛЯ СТВОРЕННЯ *IN VIVO* БІОСЕНСОРІВ

О. О. Солдаткін¹, О. М. Щувайло¹, Р. Сеспугліо², О. П. Солдаткін¹

¹Лабораторія біомолекулярної електроніки, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, Київ, 03380, Україна,

²Відділ експериментальної медицини, EA4170, Університет ім. Клода Бернара, вул. Рокфеллера 8. Ліон, 69373, Франція.

E-mail: alex_sold@yahoo.com

РОЗРОБКА ВИСОКОЧУТЛИВОГО ТА СЕЛЕКТИВНОГО АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ПЕРЕТВОРЮВАЧА ДЛЯ СТВОРЕННЯ *IN VIVO* БІОСЕНСОРІВ

О. О. Солдаткін, О. М. Щувайло, Р. Сеспугліо, О. П. Солдаткін

Анотація. Розроблено універсальний амперометричний мікроперетворювач на основі модифікованого вуглецевого волокна для створення мікробіосенсорів на основі оксидоредуктаз (ферментів, які каталізують окислення субстратів з накопиченням перекису водню). З метою збільшення чутливості та селективності мікроелектрода до перекису водню, була проведена металізація його робочої поверхні рутенієм. Як результат, отримано збільшення чутливості електроду до перекису водню на порядки. Потім для подальшого підвищення селективності на рутенізовані мікроелектроди було нанесено різні варіанти полімерних плівок на основі трьох ізомерів діамінобензолу. Найкращі характеристики були виявлені для мікроелектродів модифікованих рутенієм та покритих полімерною мембраною на основі *meta*-діамінобензолу. Саме такі мікроелектроди і були вибрані для подальшої роботи.

Модифікований мікроперетворювач було використано для розробки високо специфічного і чутливого до лактату біосенсора на основі лактат оксидази (як моделі оксидоредуктазного біосенсора). Розроблений лактатний мікробіосенсор було модифіковано додатково напівпроникною мембраною на основі полімерів нафіону та поліуретану, що дозволило розширити лінійний діапазон біосенсорного визначення лактату та змістити його в межі концентрацій лактату, які присутні в мозку щурів.

Ключові слова: амперометричний мікроперетворювач, мікробіосенсор, металізація, діамінобензол, лактат оксидаза, *in vivo* аналіз

DEVELOPMENT OF HIGH- SENSITIVE AND SELECTIVE AMPEROMETRIC TRANSDUCER FOR BIOSENSORS FOR *IN VIVO* ANALYSIS.

О. О. Soldatkin, O. M. Schuvailo, R. Cespuaglio, A. P. Soldatkin

Abstract. Universal amperometric microtransducer based on modified carbon fiber was developed for microbiosensors based on oxidoreductases (enzymes which catalyse substrate oxidation with accumulation of hydrogen peroxide). To improve sensitivity and selectivity of the microelectrode to hydrogen peroxide, its working surface was metallized with ruthenium, which resulted in increase of sensitivity by orders. For further increase of selectivity, various polymeric films on the basis of three diaminobenzene isomers were deposited onto ruthenized electrodes. The best characteristics were

obtained for the microelectrodes modified with ruthenium and covered with polymeric membrane based on *meta*-diaminobenzene; therefore they were selected for further work.

The modified microtransducer was used to elaborate a lactate oxidase based microbiosensor, highly specific and sensitive to lactate, as a model of oxidoreductase biosensor. The developed lactate biosensor was modified with additional semi-permeable membrane on the basis of polymers nafion and polyurethane which allowed to extend linear range of measuring lactate concentrations up to the values typical for rat brain.

Keywords: amperometric microtransducer, microbiosensor, metallization, diaminobenzene, lactate oxidase, *in vivo* analysis

РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО И СЕЛЕКТИВНОГО АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ *IN VIVO* БИОСЕНСОРОВ

А. А. Солдаткин, О. Н. Щувайло, Р. Сеспуглио, А. П. Солдаткин

Аннотация. Разработан универсальный амперометрический микропреобразователь на основе модифицированного углеродного волокна для создания микробиосенсоров на основе оксидоредуктаз (ферментов, которые катализируют окисление субстратов с накоплением перекиси водорода). С целью увеличения чувствительности и селективности микроэлектрода к перекиси водорода, была проведена металлизация его рабочей поверхности рутением. Как результат, получено увеличение чувствительности электрода к перекиси водорода на порядки. Потом для последующего повышения селективности на рутенизированные микроэлектроды были нанесены разные варианты полимерных пленок на основе трех изомеров диаминобензола. Наилучшие характеристики были обнаружены для микроэлектродов модифицированных рутением и покрытых полимерной мембраной на основе *meta*-диаминобензола. Именно такие микроэлектроды и были выбраны для последующей работы.

Модифицированный микропреобразователь был использован для разработки чувствительного к лактату биосенсора на основе лактатоксидазы (как модели оксидоредуктазного биосенсора). Разработанный лактатный микробиосенсор был модифицирован дополнительной полупроницаемой мембраной на основе полимеров нафiona и полиуретана, что позволило расширить линейный диапазон биосенсорного определения лактата и сместить его в диапазон концентраций лактата, которые присутствуют в мозге крыс.

Ключевые слова: амперометрический микропреобразователь, микробиосенсор, металлизация, диаминобензол, лактатоксидаза, *in vivo* анализ

Вступ.

На даний момент в світовій біосенсориці розроблено велику кількість амперметричних перетворювачів на основі вуглецевих матеріалів. Серед них виділяються мікроелектроди, що зазвичай містять в собі вуглецеве мікро волокно (діаметром від кількох до десятків мікрон), частина якого (довжиною 100-500 мкм) і слугує робочою поверхнею амперметричного мікроперетворювача. Такі електроди мають ряд переваг, саме вони є основою при створенні микробиосенсоров призначених для *in vivo* застосування, де малі розміри та сумісність з біологічним матеріалом мають вирішальне значення. Однак у випадку використання таких мікроелектродів, як основи при створенні амперметричного

біосенсора, вуглецеве волокно без попередньої підготовки не дає достатньої чутливості. Крім того у таких біосенсорів практично відсутня селективність, пов'язана з селективністю самого перетворювача. Ця проблема виникає за рахунок необхідності використання відносно високого робочого потенціалу, необхідного для визначення перекису водню, що може спричинити електрохімічні впливи інших електроактивних сполук, присутніх в аналізованому середовищі при дослідженнях *in vivo*. Тому, неабиякі зусилля були спрямовані на підвищення чутливості вуглецевих перетворювачів та мінімізацію неспецифічних впливів електроактивних речовин, тобто на модифікацію поверхні електроду та на створення напівпроникного

селективного покриття, що перешкоджає доступу небажаних електрохімічно активних сполук до поверхні перетворювача. Різноманітні полімери з різними дифузними властивостями, комбіновані в багатошарові конструкції, аналізувалися в цьому аспекті. Раніше повідомлялося про ефективні, але не повністю працездатні комплекси таких мембран [1-3]. Загалом було продемонстровано, що вживаючи напівпроникне мембранне покриття, можна запобігти впливу деяких речовин, молекули яких мають електричний заряд, таких як аскорбінова і сечова кислоти. У той же час було показано, що у випадку речовин, що не мають заряду, наприклад таких як ацетамінофен, все ще дуже складно позбавитись їх впливу на роботу амперометричного перетворювача [1].

Для подолання обмежень, зумовлених необхідністю застосування високого робочого потенціалу, були розроблені металізовані вуглецеві електроди [4, 5], а також металізовані електроди модифіковані електрохімічно осадженими полімерними мембранами [6, 7]. В основному такі перетворювачі, що працюють при низьких потенціалах, успішно застосовували при розробці глюкозних [8, 9], лактатних [10, 11] і глутаматних [10, 12] біосенсорів. В цьому сенсі пониження потенціалу, за якого відбувається окислення перекису водню (за рахунок нанесення благородних металів на поверхню вуглецевого електроду), є, напевно, виправданим кроком. Проте треба відзначити, що більша частина вище згаданих конструкцій біосенсорів відноситься до класу макроструктур (розміри робочої зони таких біосенсорів значно перевищують 100 мікрон). У області ж мікробіосенсорів на базі вуглецевого волокна, на сьогодні успішна іммобілізація ферменту в поєднанні з металізацією родієм [9], рутенієм [8], палладієм [13] та іридієм [14] обмежується лише глюкозними біосенсорами.

У наведених вище роботах з металізації мікроелектродів було застосовано метод одночасного електрохімічного осадження ферменту глюкозооксидази (ГОД) та металу з розчину, у якому були одночасно розчинені як фермент, так і сполука металу. Аналіз такого методу спільного нанесення ферменту і благородного металу показує, що він є навряд чи прийнятним для інших ферментів, оскільки останні не є такими дешевими й стабільними, як ГОД. Наступним недоліком є недостатня селективність таких

біосенсорів до деяких електроактивних речовин, які притаманні біологічному середовищу. Цей недолік найбільше проявляє себе у випадку платини, іридію та палладію внаслідок одночасного зменшення напруги окиснення, як для перекису водню, так і для співіснуючих електроактивних молекул (наприклад, аскорбінова і сечова кислоти). Родієві і рутенієві покриття, отримані електрохімічним нанесенням, навпаки, прискорюють окислювально-відновні реакції перекису водню, натомість значно менше — можливих інтерферентів [4, 8, 9]. В той же час привабливість каталітичних властивостей родієвих і рутенієвих шарів послаблюється їхньою низькою стабільністю [4]. Втім, було зазначено, що ці шари набувають значно більшої стабільності внаслідок процесу анодного окислення, ніж катодного відновлення перекису водню [4], крім того рутеній має перевагу завдяки тому, що за низького позитивного потенціалу він є більш каталітично активним відносно електрохімічного окислення перекису водню, ніж родій.

Тому основною метою даної роботи була розробка амперометричних перетворювачів на основі карбонових волокон з використанням металізації (рутенізації) та електрохімічного нанесення додаткових напівпроникних мембран для покращення як чутливості, так і селективності електроду. Проведено комплексне дослідження розробленого перетворювача та апробовано при створенні лактатного мікробіосенсора, як моделі оксидоредуктазного біосенсора для *in vivo* використання.

Матеріали та методи

Матеріали

В роботі використовували лактатоксидазу із *Pedicoccus sp.* (КФ 1.1.3.2), активність 35 од. акт. мг⁻¹ виробництва фірми Sigma–Aldrich Chimie S.a.r.l..

Лактат натрію, бичачий сироватковий альбумін, 50% водний розчин глутарового альдегіду, аскорбінова кислота, водний розчин перекису водню (3 ваг. %), Нафіон — перфторполімерна іон-обмінна смола (5 ваг. %), розчин у суміші аліфатичного спирту і води, орто-, мета-, пара-діамінобензол, гомованілінова, аскорбінова, аспарагінова, сечова кислоти, цистеїн, допамін, глутамін, ацетамінофен та інші речо-

вини використано виробництва Sigma–Aldrich Chemie.

Мікроелектроди на основі вуглецевого волокна

Мікроелектроди (Рис. 1) на основі вуглецевого волокна ($D = 30$ мкм, тип AVCO, Lowell, MA) були виготовлені в нашій лабораторії. Брався скляний капіляр з відтягнутим кінцем, який обрізали таким чином, щоб отримати тупий зріз з внутрішнім діаметром біля 35 мкм, в який вставляли вуглецеве моноволокно діаметром 30 мкм та довжиною 8–10 мм. З'єднання капіляра з вуглецевим волокном запаювали. Після з'єднання вільний кінець вуглецевого волокна обрізався до необхідної довжини за допомогою скальпеля під мікроскопом. Якісний електричний контакт між вуглецевим волокном та срібним провідником забезпечувався через затискний контакт. Потім всередині скляного капіляра срібний провідник припаювався до мідного, яким і під'єднувався до потенціостату PalmSens.

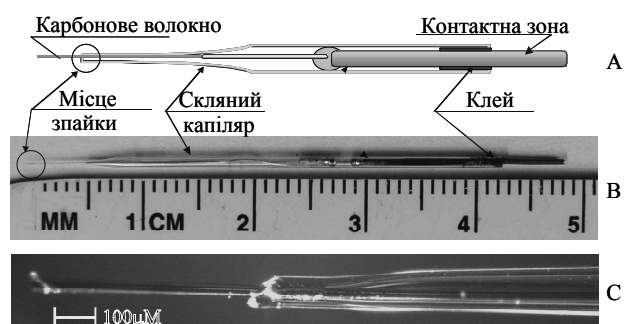


Рис. 1. Конструкція амперометричного мікроелектрода на основі вуглецевого волокна. Схематичний (А) та зовнішній (В,С) вигляд перетворювача.

Методика пошарової модифікації мікроелектродів на основі вуглецевого волокна з метою створення біосенсора.

Електрохімічне нанесення рутенію. Експерименти з електрохімічним нанесенням рутенію виконували в комірці об'ємом 1 мл. Розчин для металізації отримувався додаванням 1,5 ваг. % розчину рутеній (III) нітрозил нітрату до 10 мМ фосфатного буферного розчину (рН 7,4) у об'ємному співвідношенні 1/1. Впродовж цієї процедури рН суміші знижувалось приблизно до значень рН=1–2. Необхідне кінцеве значення рН близько 4,5 забезпечували додаючи необ-

хідну кількість КОН. Електрохімічне нанесення рутенію з розчину виконували за допомогою необхідного постійного потенціалу протягом 30 хвилин. (відносно Ag/AgCl електроду порівняння). Після нанесення модифікований електрод ретельно промивали у 10 мМ фосфатному буфері (рН 7,4).

Електрохімічна полімеризація полі-діамінобензолу. Наступним кроком було нанесення шару полімеру на основі діамінобензолу (ДАБ) з 0,1 М розчину мономеру ДАБ у фосфатному буфері (рН 7,0). Електрохімічне осадження плівки на рутенієвій поверхні здійснювали впродовж 45 хвилин при постійному потенціалі (+0,7 В). Перед використанням розчини ДАБ обезкиснювали шляхом 15-хвилинного продування аргонем. Перед виготовленням біоселективної мембрани модифіковану поверхню ретельно промивали дистильованою водою.

Формування біоселективної мембрани. Біоселективні ферментні мембрани для лактатних мікробіосенсорів виготовляли, застосовуючи суміш ферменту лактатоксидази з бичачим сироватковим альбуміном (БСА), отриману в 0,1 М фосфатному буфері, рН 6,5. Кінцева концентрація ферменту становила 40 мг мл⁻¹, а БСА — 20 мг мл⁻¹. До суміші додавали також гліцерин до кінцевої концентрації 5 ваг. %, щоб стабілізувати фермент впродовж його іммобілізації, запобігти передчасному висиханню і поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача. Розчин глутарового альдегіду (ГА) з кінцевою концентрацією 0,2 ваг. % застосовували для перехресного зв'язування молекул ферменту та молекул БСА. Суміш, що містила фермент, БСА, гліцерин та ГА, наносили на чутливу поверхню перетворювача, після чого витримували впродовж 1 години за кімнатної температури.

Створення додаткової напівпроникної мембрани. Зовнішню напівпроникну мембрану наносили зверху біоселективного шару, використовуючи суміш нафїон-поліуретан у суміші розчинників (етиловий спирт / тетрагідрофуран) з концентрацією кожного полімеру у 1 ваг. %. Мікроелектроди кілька разів поспіль занурювали в розчин полімеру із 1-хвилинним інтервалом між зануреннями. Готові біосенсори з додатковими мембранами на основі нафїон-поліуретану зберігали за кімнатної температури (принаймні 15 хвилин перед застосуванням).

Методика амперометричного вимірювання.

Виміри проводились у 10 мМ фосфатному буфері, рН=7,4, з 150 мМ NaCl за температури 36°C у відкритій комірці при інтенсивному перемішуванні. Концентрацію перекису водню та лактату в комірці задавали додаванням до робочого буферу порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів. Дослідження проводилися щонайменше у трьох серіях.

Результати та обговорення

Першим етапом нашої роботи було провести металізацію електродів для досягнення кращої чутливості перетворювача до перекису водню та, навпаки, зменшення чутливості до інтерферуючих речовин. Спочатку були проведені експерименти для визначення оптимальних умов електронанесення каталітичного шару рутенію, для чого було отримано ряд металізованих мікроелектродів за різних потенціалів впродовж процесу електроосадження рутенію (в діапазоні від -0,35 В до -0,65 В). Оцінка активності отриманих електродів до перекису водню концентрацією 1 мМ оцінювалась при їх роботі за постійного потенціалу +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Виявлено сильну залежність густини анодного струму від потенціалу електронанесення рутенію (Рис. 2). Максимум густини анодного струму з відповідною максимальною чутливістю до перекису водню спостерігався для електродів, металізованих при потенціалі -0,5 В, який і був застосований в подальшому для металізації електродів.

На рис. 3 представлено циклічні вольтамперограми для вуглецеволоконних електродів з та без рутенієвого покриття отримані в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

З Рис. 3Б видно, що значний окислювальний струм для перекису водню спостерігається при напрузі, що перевищує +0,27 В. При нижчій напрузі мають місце відновні процеси. Отримана точка переходу процесу відновлення в окиснення (+0,27 В) не узгоджується з раніше опублікованими даними, отриманими для рутенію, нанесеного на скло-вуглецеві електроди (+ 0,37 В) [4] і на вуглецеве волокно (+0,45 В) [8]. Цей зсув точки переходу можна пояснити її залежністю від сполуки у якій знаходиться благородний метал і складу середовища при електронанесенні. Було показано, що неста-

більність відновних властивостей рутенієвого шару, продемонстрована раніше [4], має місце і в нашому випадку, і тому напруга для роботи з металізованим мікроелектродом у +0,4 В була визнана як оптимальна (при цій напрузі фоновий струм ще залишається малим). На відміну від цього, в експериментах з непокритими вуглецево волоконними електродами окислення перекису водню починається при значно вищих напругах (близько +0,8 В), при яких більшість електроактивних речовин, зазвичай присутніх у біологічних рідинах, буде впливати на відгук електроду [15].

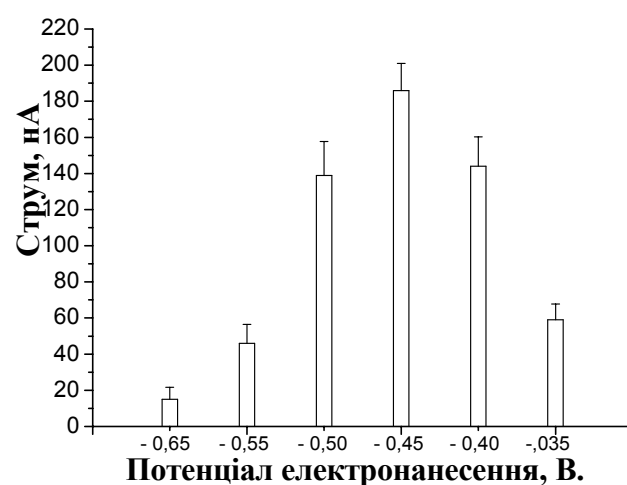


Рис. 2. Залежність чутливості до перекису водню металізованих рутенієм мікроелектродів, отриманих за різних величин потенціалів електронанесення каталітичного шару рутенію (n=3). Умови вимірювання: 1 мМ перекис водню у 10 мМ фосфатному буфері (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

На Рис. 4 представлено результати порівняння калібрувальних кривих визначення перекису водню за допомогою мікроперетворювача до та після його рутенізації. За отриманими даними видно, що величина відгуку, а відповідно і чутливість електроду до перекису водню зростала майже на два порядки після рутенізації (границя визначення перекису водню до та після металізації мікроперетворювача — 3 мкМ та 0,05 мкМ, відповідно).

Однак при вибраній для рутенізованих електродів робочій напрузі +0,4 В може відбуватися також окислення супутніх електроактивних компонентів (наприклад, аскорбінової кислоти), що спотворює результати визначення. Тому наступним етапом дослідження було вивчення селективності розроблених перетворювачів.

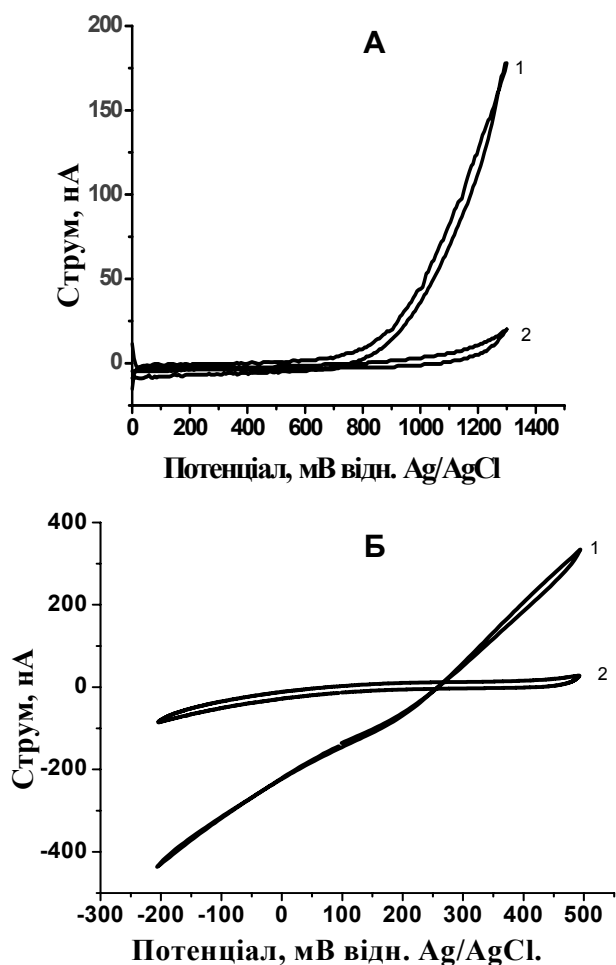


Рис. 3. Циклічні вольтамперограми, отримані для мікроелектродів — з металізацією рутенієм (Б) та без такої (А) у присутності 1 мМ перекису водню (1), та у буфері (2). Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4), розгортка потенціалу зі швидкістю 20 мВ/сек., температура 36°C.

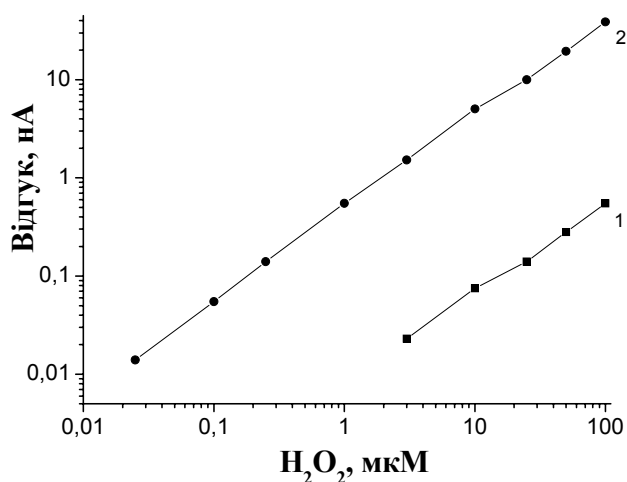


Рис. 4. Калібрувальні криві мікроперетворювача на перекис водню до (1) та після (2) рутенізації поверхні. Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

Для оцінки селективності рутенізованих вуглецево-волоконних електродів, яка є дуже важливою характеристикою особливо для *in vivo* застосування, використовували вісім електроактивних речовин (аскорбінова, сечова, аспарагінова, гомованілінова кислоти, L-цистеїн, ацетамінофен, допамін, глутамін). Для контролю такі самі експерименти виконували з вуглецево-волоконними електродами без покриття. Результати представлено в табл. 1. Як голі, так і рутенізовані електроди не давали відгуків на глутамін та гомованілінову кислоту. Найпомітніший ефект полягав у зменшеній чутливості рутенізованого електроду до аскорбінової кислоти порівняно з неметалізованими електродами (понад 20 разів). Відгуки перетворювачів на інші електроактивні речовини також зменшувались, за виключенням допаміну.

Таблиця 1
Відгуки амперметричних мікроелектродів ($n=3$) до та після рутенізації на внесення в електрохімічну комірку перекису водню та інших електроактивних речовин.

Електроактивні речовини	Відгуки електроду на основі голого карбонового волокна, нА	Відгуки електроду на основі металізованого карбонового волокна, нА
Аскорбінова кислота, 500 мкМ	99,6±2,34	3,1±0,39
Сечова кислота, 100 мкМ	11,73±1,00	0,81±0,40
Аспарагінова кислота, 100 мкМ	0±0,05	0±0,05
Гомованілінова кислота, 100 мкМ	0±0,02	0±0,02
L-цистеїн, 100 мкМ	5±0,50	1,6±0,63
Ацетамінофен, 100 мкМ	7,27±0,89	0,2±0,20
Допамін, 20 мкМ	0,99±0,05	4,81±0,70
Глутамін, 100 мкМ	0±0,02	0±0,02
Перекис водню, 50 мкМ	0,28±0,04	19,48±1,18

Незважаючи на позитивні ефекти, отримані після металізації електродів, слід зазначити, що рутенізовані вуглецево-волоконні мікроелектроди все ж не є достатньо селективними до перекису водню для вимірювань *in vivo*. Тому для поліпшення селективності мікроелектродів було використано додаткові полімерні мембрани, отримані за рахунок електрополімеризації

на поверхні рутенієвого шару. З-поміж широкого класу окси- та аміноароматичних речовин, які здатні до електрополімеризації, в біосенсорах більш часто використовують ізомери діамінобензолу (фенілендіаміну) [1, 2, 7, 16]. Було проведено ряд порівняльних досліджень щодо властивостей полімерних мембран на основі діамінобензолу (ДАБ), отриманих з різних ізомерів (Рис. 5). Результати, описані в літературі, щодо різних мономерів різняться між собою [7, 17-20], що очевидно пов'язане з тим, що на характеристики отримуваних полімерних мембран мають значний вплив, як умови електрохімічного окислення мономерів, так і робоча поверхня електроду на якому утворюється полімерна плівка. Тому в нашій роботі було проведено порівняльне дослідження ізомерів діамінобензолу при утворенні полімерної плівки на поверхні шару рутенію. Орто, мета і пара ДАБ ізомери були електрохімічно окислені на поверхні вказаних електродів з утворенням напівпроникних полімерних мембран. В усіх випадках застосовували однакові умови електроокислення: 0,1 М концентрація мономера в 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,0, і процедура електроокислення при постійній напрузі +0,7 В впродовж 45 хвилин за кімнатної температури.

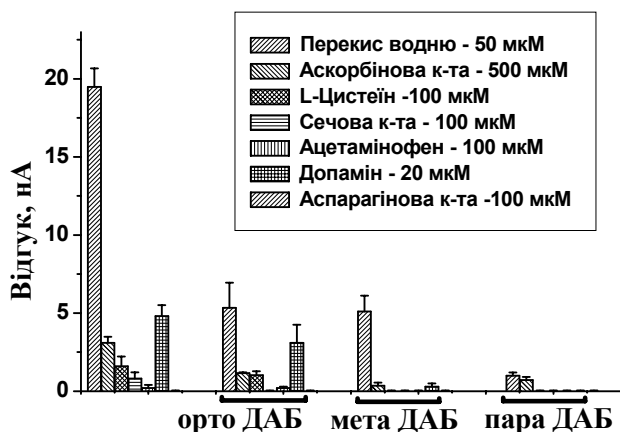


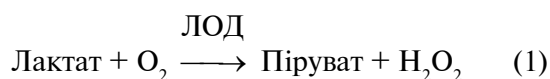
Рис. 5. Порівняння відгуків мікроелектродів (n=4) на основі рутенізованого вуглецевого волокна (без та з покриттям полімерними мембранами на основі різних ізомерів діамінобензолу) до перекису водню та ряду електроактивних речовин. Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння, температура 36°C.

Слід відзначити значні розбіжності у властивостях електродів з покриттям полімерами, отриманими з різних ізомерів ДАБ. Перетво-

рювачі з рутенієвим шаром, покриті *мета*-ДАБ полімером, демонстрували найкращу селективність до перекису водню. Це узгоджується з результатами, опублікованими раніше [6, 7]. Доволі дивними були результати, отримані в наших експериментах з електродами, що мали мембрани, генеровані з *орто*-ДАБ. Така мембрана характеризувалася дуже обмеженою здатністю до виключення перешкод, на відміну від позитивних результатів, продемонстрованих для цього ізомеру в [16, 21]. Мембрани, генеровані з *пара*-ДАБ, є також не ефективними і це, вірогідно, є наслідком дуже обмеженої дифузії перекису водню через мембрану. Отже, в нашому випадку для рутенізованих електродів було обрано *мета*-ДАБ, як найкращий з ізомерів діамінобензолу, використаних для нанесення додаткової напівпроникної мембрани на каталітичний шар рутенію.

Як відомо з літературних джерел, властивості полімерів, електрогенерованих на поверхнях електродів, можуть змінюватись під час зберігання [20]. В нашому випадку перевірялась стабільність електродів, покритих полі-*мета*-ДАБ, шляхом оцінки їх відгуків на перекис водню та аскорбінову кислоту від часу зберігання в робочому буфері за температури 36°C. Як видно з Рис. 6, електроди з електрогенерованим полімером виявляли збільшення відгуку на перекис водню впродовж перших 2-3 годин. Після 3 годин сигнал електродів стабілізувався і залишався стабільним більше 50 годин безперервного знаходження у буферному розчині. Крім того величина відгуку мікроперетворювача на 500 мкМ аскорбінову кислоту залишалась стабільною на рівні похибки вимірювання. Отже, така конструкція перетворювачів може бути успішно використана для безперервних вимірювань впродовж принаймні 50 годин.

Для перевірки ефективності роботи модифікованих мікроелектродів в складі біосенсоров на основі оксидоредуктаз (які каталізують окислення субстратів з накопиченням перекису водню, як одного із продуктів реакції) було розроблено мікробіосенсори на основі лактатоксидази (ЛОД) для визначення лактату. Робота лактатного біосенсора базується на такій ферментативній реакції:



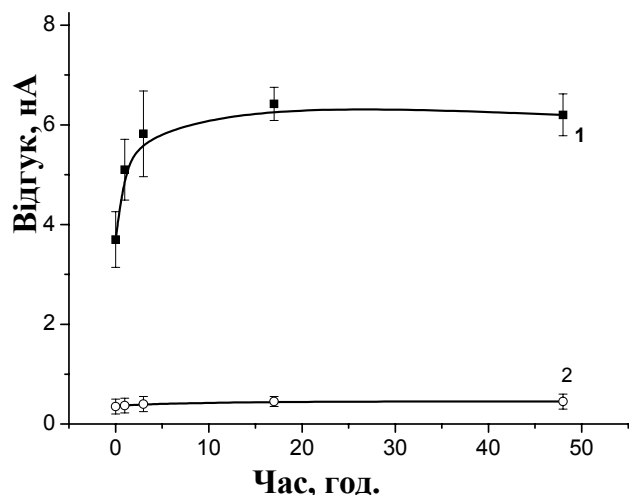


Рис. 6. Операційна стабільність відгуків рутенізованих мікроелектродів ($n=3$) на основі вуглецевого волокна, вкритих полімерною мембраною на основі полі-мета-діамінобензолу на 50 мкМ перекису водню(1) та 500 мкМ аскорбінової кислоти (2). Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

Перетворення вказаного субстрату супроводжується накопиченням електрохімічно активного перекису водню, що дає можливість визначати субстрат за допомогою амперметричних біосенсорів на основі відповідної оксидази.

Типова залежність відгуку лактатного мікробіосенсора від концентрації субстрату у відкритій комірці з перемішуванням представлена на Рис. 7. Очевидно, що у випадку лактатного мікробіосенсора таке швидке насичення відгуку від концентрації лактату (Рис. 7, крива 1) спричинене обмеженою кількістю кисню у ферментній мембрані, що діє як ко-субстрат реакції.

З метою розширення лінійного діапазону роботи біосенсора, додаткову зовнішню мембрану на основі суміші нафіону та поліуретану наносили зверху ферментних біоселективних мембран. Така додаткова мембрана суттєво змінювала динамічний діапазон мікробіосенсорів через обмежену дифузію лактату до ферментної мембрани (Рис. 7, крива 2). При цьому, дифузія молекул кисню (значно менших за розміром) практично не змінювалась. Властивості зовнішньої додаткової мембрани отримували, оптимізуючи процедуру покриття (3-х кратне занурення лактатного біосенсора в суміш на-

фіону та поліуретану розширює динамічний діапазон мікробіосенсора до 1,75 мМ (коефіцієнт лінійності $R=0,9984$). Наведені аналітичні параметри розробленого мікробіосенсора були прийнятні для *in vivo* аналізів у тканині мозку щурів з нормальними концентраціями лактату [22].

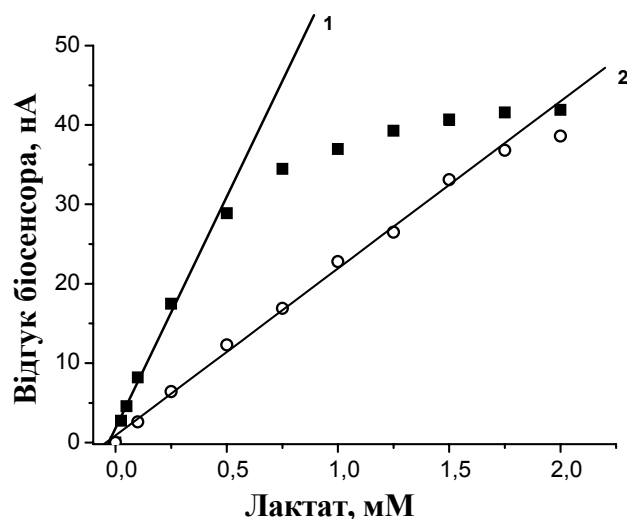


Рис. 7. Калібрувальні криві для мікробіосенсорів, чутливих до лактату, до (1) та після нанесення зовнішньої полімерної мембрани (1/1 нафіон/поліуретан). Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

Останнім етапом роботи було порівняння та аналіз поетапного впливу усіх модифікацій амперметричних мікроелектродів на їх чутливість до перекису водню і селективність відносно можливих інтерферентів. Для дослідження цих характеристик ми перевіряли чутливість перетворювачів до 50 мкМ H_2O_2 та 500 мкМ аскорбінової кислоти (модель інтерферента) до та після кожної модифікації електродів (Таблиця 2).

За отриманими даними було перераховано приблизну похибку, яку може вносити лише аскорбінова кислота при використанні розроблених мікробіосенсорів для аналізів *in vivo*. Як можна побачити з результатів представлених в Таблиці 2, використання запропонованої нами схеми модифікації мікроелектродів на основі вуглецевого волокна, можна зменшити вплив інтерферуючих речовин до кількох тисяч разів, відносно відгуку на перекис водню.

Таблиця 2
Вплив різних варіантів модифікації мікроелектродів на їх чутливість та селективність*.

Модифікація мікроелектродів на основі карбонового волокна	Відгук на 50 мкМ H ₂ O ₂ , нА	Відгук на 500 мкМ аскорбінову кислоту, нА	Похибка, яку може вносити аскорбінова кислота при експериментах <i>in vivo</i> , %
Без модифікації	0,28±0,04	96,60±2,34	34500
Рутенізація	19,48±1,18	3,10±0,39	15,91
Рутенізація + <i>мета</i> -ДАБ	5,10±1,02	0,35±0,25	6,86
Рутенізація + <i>мета</i> -ДАБ + ЛОД	4,24±1,1	0,17±0,15	4,01
Рутенізація + <i>мета</i> -ДАБ + ЛОД + нафіон з поліуретаном	3,95±1,05	0,15±0,15	3,79

* Кожна серія складалась з 4 електродів.

Висновок

В роботі приведені результати експериментів по модифікації мікроелектродів з метою досягнення їх більшої чутливості та селективності. Виявилось, що використовуючи вуглецево-волоконні мікроелектроди з покриттям шаром рутенію і напівпроникною полімерною плівкою полі-*мета*-діамінобензолу, можна отримати високо чутливі амперметричні мікроперетворювачі з вираженою селективністю до перекису водню. Такий сенсор перекису водню може бути використаний для оцінки концентрацій H₂O₂ в водних розчинах, що само по собі є важливим. Крім того, такий мікроперетворювач, покритий ферментним біоселективним шаром на основі лактатоксидази, давав можливість виготовлення мікробіосенсорів, високо специфічних і чутливих до лактату. Використання ж в свою чергу додаткової мембрани на основі нафіону та поліуретану, дозволило розширити лінійний діапазон біосенсорного визначення лактату та змістити його в межі концентрацій лактату, які присутні в мозку щурів. Заміна ж лактат оксидази в біоселективній мембрані на іншу оксидоредуктазу дасть можливість отримати біосенсор, селективний до іншої речовини (глюкоза, глютамінова кислота, холін та ін.).

Література

- Zhang Y., Hu Y., Wilson G. S., Moatti-Sirat D., Poitout V., Reach G., Elimination of the acetaminophen interference in an implantable glucose sensor // *Analytical Chemistry*. — 1994. — Vol.66, №7. — P.1183-1188.
- Moussy F., Harrison D. J., O'Brien D. W., Rajotte R. V., Performance of subcutaneously implanted needle-type glucose sensors employing a novel trilayer coating // *Analytical Chemistry*. — 1993. — Vol.65, №15. — P.2072-2077.
- Pan S., Arnold M. A., Selectivity enhancement for glutamate with a Nafion/glutamate oxidase biosensor // *Talanta*. — 1996. — Vol.43, №7. — P.1157-1162.
- O'Connell P. J., O'Sullivan C. K., Guilbault G. G., Electrochemical metallisation of carbon electrodes // *Analytica Chimica Acta*. — 1998. — Vol.373. — P.261-270.
- Gorton L., A carbon electrode sputtered with palladium and gold for the amperometric detection of hydrogen peroxide // *Analytica Chimica Acta*. — 1985. — Vol.178, №2. — P.247-253.
- Daly D. J., O'Sullivan C. K., Guilbault G. G., The use of polymers coupled with metallised electrodes to allow H₂O₂ detection in the presence of electrochemical interferences // *Talanta*. — 1999. — Vol.49, №3. — P.667-678.
- Yang Q., Atanasov P., Wilkins E., Development of needle-type glucose sensor with high selectivity // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 1998. — Vol.46, №3. — P.249-256.
- Sakslund H., Wang J., Lu F., Hammerich, O., Development and evaluation of glucose microsensors based on electrochemical codeposition of ruthenium and glucose oxidase onto carbon fiber microelectrodes // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. — 1995. — Vol.397, №1-2. — P.149-155.
- Wang J., Angnes L., Miniaturized glucose sensors based on electrochemical codeposition of rhodium and glucose oxidase onto carbon-fiber electrodes // *Analytical Chemistry*. — 1992. — Vol.64, №4. — P.456-459.
- White S. F., Turner A. P. F., Bilitewski U., Schmid R. D., Bradley J., Lactate, glutamate and glutamine biosensors based on rhodinized carbon electrodes // *Analytica Chimica Acta*. — 1994. — Vol.295, №3. — P.243-251.
- Wang J., Chen Q., Enzyme Microelectrode Array Strips for Glucose and Lactate // *Analytical Chemistry*. — 1994. — Vol.66, №7. — P.1007-1011.
- O'Neill R. D., Chang S. — C., Lowry J. P., McNeil C. J., Comparisons of platinum, gold, palladium and glassy carbon as electrode materials in the

- design of biosensors for glutamate // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2004. — Vol.19, №11. — P.1521-1528.
13. Sakslund H., Wang J., Hammerich O., Analysis of the factors determining the sensitivity of a miniaturized glucose biosensor made by codeposition of palladium and glucose oxidase onto an 8 μm carbon fiber // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. — 1996. — Vol.402, №1-2. — P.149-160.
 14. Wang J., Rivas G., Chicharro M., Glucose microsensor based on electrochemical deposition of iridium and glucose oxidase onto carbon fiber electrodes // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. — 1997. — Vol.439, №1. — P.55-62.
 15. Шувайло О. Н., Данилейко Л. В., Архипова В. Н., Дзядевич С. В., Ельская А. В., Сеспуглио Р., Солдаткин А. П., Разработка микробиосенсоров на основе углеродных волокон для определения глюкозы, ацетилхолина и холина in-vivo // *Биополимеры и клетка*. — 2002. — Т. 18, №6. — С. 489-495.
 16. Kelly S. C., O'Connell P. J., O'Sullivan C. K., Guilbault G. G., Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of L-lysine in food // *Analytica Chimica Acta*. — 2000. — Vol.412, №1-2. — P.111-119.
 17. Curulli A., Kelly S., O'Sullivan C., Guilbault G. G., Paleschi G., A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film // *Biosensors and Bioelectronics*. — 1998. — Vol.13, №12. — P.1245-1250.
 18. Craig J. D., O'Neill R. D., Comparison of simple aromatic amines for electrosynthesis of permselective polymers in biosensor fabrication // *Analyst*. — 2003. — Vol.128, №7. — P.905-911.
 19. Geise R. J., Adams J. M., Barone N. J., Yacynych A. M., Electropolymerized films to prevent interferences and electrode fouling in biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. — 1991. — Vol.6, №2. — P.151-160.
 20. Murphy L. J., Reduction of Interference Response at a Hydrogen Peroxide Detecting Electrode Using Electropolymerized Films of Substituted Naphthalenes // *Analytical Chemistry*. — 1998. — Vol.70, №14. — P.2928-2935.
 21. Craig J. D., O'Neill R. D., Electrosynthesis and permselective characterisation of phenol-based polymers for biosensor applications // *Analytica Chimica Acta*. — 2003. — Vol.495, №1-2. — P.33-43.
 22. Shram N. F., Netchiporouk L. I., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Bonnet C., Cespuoglio R., In Vivo Voltammetric Detection of Rat Brain Lactate with Carbon Fiber Microelectrodes Coated with Lactate Oxidase // *Analytical Chemistry*. — 1998. — Vol.70, №13. — P.2618-2622.