

# БІОСЕНСОРИ

---

# BIOSENSORS

---

УДК 543.555+577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2020.4.219309>

## РОЗРОБКА ФЕРМЕНТНОГО КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДОФАМІНУ В ВОДНИХ ЗРАЗКАХ

*О. О. Солдаткін<sup>1,2</sup>, Д. В. Сєдюко<sup>1</sup>, Д. Ю. Кучеренко<sup>1</sup>, І. С. Кучеренко<sup>1,2</sup>, С. В. Дзядевич<sup>1,2</sup>,  
О. П. Солдаткін<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,  
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

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

e-mail авторів: alex\_sold@yahoo.com, d.siediuko@gmail.com, didukh.d@gmail.com,  
kucherenko.i.s@gmail.com, dzyad@yahoo.com, a\_soldatkin@yahoo.com

## РОЗРОБКА ФЕРМЕНТНОГО КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДОФАМІНУ В ВОДНИХ ЗРАЗКАХ

*О. О. Солдаткін, Д. В. Сєдюко, Д. Ю. Кучеренко, І. С. Кучеренко, С. В. Дзядевич,  
О. П. Солдаткін*

**Анотація.** В даній роботі розроблено кондуктометричний біосенсор, призначений для визначення концентрацій дофаміну. Для створення біоселективного елементу біосенсора використовували фермент лакказу, що був іммобілізований ковалентною зшивкою глутаровим альдегідом з бичачим сироватковим альбуміном на поверхні кондуктометричного перетворювача. Як перетворювач використовувались дві пари золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладку. В роботі було підібрано оптимальні умови іммобілізації лаккази, досліджено вплив параметрів розчину (іонна сила, рН, буферна ємність) на роботу розробленого біосенсора для визначення дофаміну. Отримані біосенсори демонстрували високу чутливість до дофаміну (мінімальна границя визначення – 5 мкМ). Лінійний діапазон біосенсорного визначення аналіту був до 1 мМ. Встановлено, що розроблений біосенсор характеризується високою відтворюваністю відгуків впродовж декількох годин безперервної роботи (RSD=10%). Перевірено можливість довгострокового зберігання запропонованого біосенсора в різних умовах. Показано, що дофамін-чутливий біосенсор характеризувався гарною селективністю відносно можливих інтерферуючих речовин і в подальшому може бути використаний для визначення концентрації дофаміну в біологічних та фармацевтичних зразках.

**Ключові слова:** кондуктометричний перетворювач, кондуктометрія, біосенсор, іммобілізований фермент, лаккази, дофамін.

## DEVELOPMENT OF ENZYME CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR FOR DOPAMINE DETERMINATION IN AQUEOUS SAMPLES

*O. O. Soldatkin, D. V. Siediuko, D. Yu. Kucherenko, I. S. Kucherenko, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin*

**Abstract.** In this work, a conductometric biosensor was developed to determine dopamine concentrations. To create a bioselective element of the biosensor we used the enzyme laccase, which was immobilized on the surface of the physical transducer by covalent crosslinking of glutaraldehyde with bovine serum albumin. Two pairs of gold interdigitated electrodes deposited on a sital substrate were used as a conductometric transducer. The optimal conditions of laccase immobilization were selected. The influence of solution parameters (ionic strength, pH, buffer capacity) on the work of the developed biosensor for dopamine determination was investigated. The biosensors demonstrated high sensitivity to dopamine (minimum limit of detection - 5  $\mu\text{M}$ ). The linear range of analyte determination was up to 1 mM. It was established that the developed biosensor is characterized by high reproducibility of responses during several hours of continuous operation (RSD = 10%). The proposed biosensor was tested regarding the possibility of its long-term storage under different conditions. It was shown that dopamine-sensitive biosensor was characterized by good selectivity towards probable interferents and can be further used to determine the concentration of dopamine in biological and pharmaceutical samples.

**Keywords:** conductometric transducer, conductometry, biosensor, immobilized enzyme, laccase, dopamine.

## РАЗРАБОТКА ФЕРМЕНТНОГО КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОФАМИНА В ВОДНЫХ ОБРАЗЦАХ

*А. А. Солдаткин, Д. В. Седюко, Д. Ю. Кучеренко, И. С. Кучеренко, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин*

**Аннотация.** В данной работе разработан кондуктометрический биосенсор, предназначенный для определения концентрации дофамина. Для создания биоселективного элемента биосенсора использовали фермент лакказы, который был иммобилизован ковалентной сшивкой глутаровым альдегидом с бычьим сывороточным альбумином на поверхности кондуктометрического преобразователя. В качестве преобразователя использовались две пары золотых электродов, нанесенных на керамическую подложку. В работе были подобраны оптимальные условия иммобилизации лакказы, исследовано влияние параметров раствора (ионная сила, pH, буферная емкость) на работу разработанного биосенсора для определения дофамина. Полученные биосенсоры демонстрировали высокую чувствительность к дофамину (минимальная граница определения - 5 мкМ). Линейный диапазон биосенсорного определения аналита был до 1 мМ. Установлено, что разработанный биосенсор характеризуется высокой воспроизводимостью сигналов в течение нескольких часов непрерывной работы (RSD = 10%). Проверена возможность долгосрочного хранения биосенсора в различных условиях. Показано, что дофамин-чувствительный биосенсор характеризовался хорошей селективностью в отношении возможных интерферирующих веществ и в дальнейшем может быть использован для определения концентрации дофамина в биологических и фармацевтических образцах.

**Ключевые слова:** кондуктометрический преобразователь, кондуктометрия, биосенсор, иммобилизованный фермент, лакказа, дофамин.

## 1. Вступ

Дофамін – біологічно активна хімічна речовина, що виконує ряд життєво важливих функцій у якості гормону та нейромедіатора. Дофамін як нейромедіатор продукується в дофамінергічних нейронах вентральної області середнього мозку, в чорній субстанції. Він є важливою речовиною для нервової системи, тому що відповідає за рух, пам'ять, систему насолоди і заохочення, поведінку та увагу, інгібування синтезу пролактину та ін. Дофамін як гормон синтезується в нирках, де він впливає на ниркову вазодилатацію, діурез та натрійурез.

В залежності від того виступає дофамін гормоном чи нейромедіатором, він виконує різні функції в організмі. Під впливом дофаміну-гормону відбувається підвищення опору периферичних судин і підвищення систолічного артеріального тиску (результат стимуляції альфа-адренорецепторів), збільшується сила серцевих скорочень (результат стимуляції бета-адренорецепторів), збільшується серцевий викид. Частота серцевих скорочень змінюється відносно мало. Потреба міокарда в кисні підвищується, проте в результаті збільшення коронарного кровотоку забезпечується підвищена доставка кисню.

В результаті специфічного зв'язування з дофаміновими рецепторами нирок дофамін зменшує опір ниркових судин, збільшує в них кровотік і ниркову фільтрацію (процес утворення сечі). Також підвищується натрійурез (виведення іонів натрію з сечею), відбувається розширення мезентеріальних судин (судин кишечника). Ця дія на ниркові та мезентеріальні судини є специфічною і характерною лише для дофаміну, таким чином інші катехоламіни (норадреналін, адреналін) не проявляють таку дію. Проте, у великих дозах (при введенні більше 15 мкг/кг в хвилину) дофамін може викликати звуження ниркових судин [1].

Дофамін є одним з важливих нейромедіаторів для центральної нервової системи (ЦНС) ссавців, він впливає на рецептори D1, D2, D3, D4, D5. Дофамін відповідає за задоволення, мотивацію до дій, а також за цікавість до вивчення нової інформації [2], [3].

Таким чином, завдяки ряду важливих функцій визначення концентрації дофаміну у організмі людини є важливим для біомедичних досліджень. Вміст дофаміну в крові змінюється в залежності від віку здорової людини. Надлишок або дефіцит цієї життєво важливої речовини є причиною ряду захворювань. Тому, відхилення від норми концентрації дофаміну в різних рідинах організму людини, таких як плазма (табл.1) або сеча (табл. 2), може служити прогностичним маркером захворювань.

Таблиця 1

### Норми вмісту дофаміну у плазмі крові в залежності від віку

Вік пацієнта, роки	Концентрація дофаміну, пг/мл
>6	10
>18	20
3-15	60

Таблиця 2

### Норми вмісту дофаміну у сечі в залежності від віку

Вік пацієнта, роки	Концентрація дофаміну, нмоль/24 г
3-8	523-2472
9-12	334-3100
13-17	334-4218
>17	340-3139

Згідно «дофамінової теорії шизофренії» [4, 5] мозок пацієнтів, хворих на шизофренію, виробляє більше дофаміну, що надходить в постсинаптичні нейрони мозку в мезолімбичній системі під час наявності таких ознак як психоз, слухові і зорові галюцинації, нав'язливі думки, проте переважання істинної депресії, екстрапірамідні розлади, каталепсія - характеризується пониженим рівнем дофаміну. Пацієнти, які страждають на хворобу Паркінсона [6] або феохромоцитому [7] та стрес мають знижені показники концентрацій дофаміну. Всі ці хвороби визначаються за вмістом катехоламінів, у тому числі дофаміну, в плазмі крові або через 24-годинне збирання сечі. Таким чином, точне визначення концентрації дофаміну може сприяти своєчасному виявленню патологій на ранніх стадіях.

Кількісне визначення дофаміну є дуже важливим у клінічному аналізі для виявлення нейродегенеративних захворювань. Найбільш розповсюдженим фізико-хімічним методом визначення дофаміну, що використовується у клінічних лабораторіях є високоефективна рідинна хроматографія [8]. Суть методу полягає у розділенні проби (плазми крові) на складові компоненти, яке відбувається у хроматографічній колонці. Крім того, було розроблено інші аналітичні методи визначення дофаміну, наприклад, оптична спектроскопія [9] та мас-спектрометрія [10]. Однак, ці методи є трудомісткими та дорогими, тому вони не набули широкого використання.

Для підвищення рівня дофаміну при хворобі Паркінсона, депресії призначають прийом препаратів, що містять дофамін. Дофамін, як лікарський засіб, випускається під такими торговельними марками - Intropin, Dopastat, Revimine та ін. Ці засоби входять в перелік основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я [11]. Дофамін вводиться методом внутрішньовенної ін'єкції. Крім того, період напіврозпаду дофаміну в плазмі дуже короткий (приблизно одна хвилина у дорослих, дві хвилини у новонароджених дітей і до п'яти хвилин у недоношених новонароджених), тому дофамін зазвичай вводять у вигляді безперервної внутрішньовенної крапельниці, а не одноразової ін'єкції [12]. Тому, окрім виявлення дофаміну у біологічних рідинах, визначення його концентрації також важливо у лікарських формах. На даний час найчастіше для контролю якості лікарських препаратів застосовують різні варіанти хроматографії. Проте ці методи вимагають складної попередньої обробки зразків та дорогого обладнання.

Способом вирішення вище вказаних проблем є використання нових біоаналітичних приладів – біосенсорів. На сьогодні існує ряд лабораторних прототипів біосенсорів для визначення дофаміну. Спільним недоліком таких біосенсорів є доволі складні за будовою електроди та модифіковані біоселективні елементи, що збільшує їх вартість та обмежує можливість масового виробництва.

На сьогодні, для визначення дофаміну було розроблено ряд електрохімічних біосенсорів

на основі різних ферментів та з використанням різних перетворювачів.

Амперометричний метод найчастіше використовується для прямого визначення дофаміну. Він має ряд переваг, таких як невеликий розмір обладнання, легке використання, швидке отримання результатів та висока точність [13]. Проте, амперометричне визначення має ряд обмежень. Наприклад, порівняно великий потенціал для прямого окислення на електроді та утворення фенокси-радикалів. Ці радикали здатні з'єднуватися з утворенням полімерної плівки на електроді, що призводить до зниження швидкості переносу електронів [14].

Іншим недоліком, амперометричних біосенсорів для виявлення дофаміну є співіснування багатьох інтерферуючих сполук у біологічних системах. Аскорбінова та сечова кислоти існують у рідинах організму людини у високій концентрації, і можуть бути легко окислені при потенціалах близьких до потенціалу окислення дофаміну, що призводить до накладання відгуків та неправильного визначення концентрацій дофаміну. Крім того, концентрація дофаміну є надзвичайно низькою (0,01-1 мкМ) у здорових осіб та ще меншою (в наномольному діапазоні) у пацієнтів з хворобою Паркінсона, тоді як концентрація аскорбінової кислоти на 2-3 порядки вище [15]. Тому важливо розробити метод селективного визначення дофаміну з високою чутливістю та низькою межею визначення.

Крім того, більшість розроблених біосенсорів не було протестовано у реальних зразках. Тому є доцільним розробити новий біосенсор який буде перевірено у медичних зразках. За останні роки було зроблено численні спроби створення такого методу. Серед них було запропоновано використання різних електродних матеріалів, в тому числі вуглецевих електродів, легованих бором [16], проведено модифікацію електродів за допомогою самоорганізованих моношарів [17], ковалентну модифікацію [18], використання різних наноматеріалів [19-21] або селективних полімерних плівок [22, 23], що мають позитивний вплив на виявлення дофаміну. Всі ці модифікації безперечно покращують селективність та чутливість біосенсорів на дофамін, але вони є більш складними у роз-

робці та використанні, дорожчими, потребують детального дослідження їх характеристик та потребують більше часу як для розробки, так і для проведення виміру аналізу у зразках.

Тому завдання створення простого, швидко та точного методу для визначення дофаміну остається актуальним. Проаналізувавши недоліки, переваги та особливості електрохімічних біосенсорів ми дійшли висновку, що розробка кондуктометричного біосенсора для визначення дофаміну є актуальною. Такі біосенсори мають важливі переваги: не потребують використання електроду порівняння; працюють при малій амплітуді перемінної напруги, тим самим запобігають фарадеївським процесам на електродах; нечутливі до світла; можуть бути мініатюризовані за допомогою дешевої стандартної технології тонких плівок [24].

Виходячи з вище приведеного, метою роботи була розробка нового кондуктометричного біосенсора на основі лаккази для визначення дофаміну, який був би простішим за будовою та використанням у порівнянні з існуючими біосенсорами, а також дослідження ефективності аналізу зразків фармацевтичного препарату.

## 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

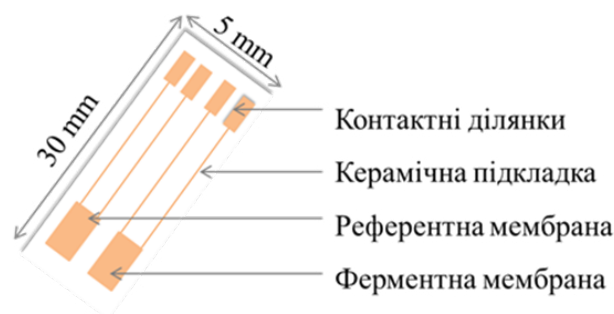
### 2.1. МАТЕРІАЛИ

В роботі використовували такі реактиви: лаккази з *Agaricus bisporus* з активністю 5,6 од.акт./мг фірми, бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), дофамін, гліцерол, глутамат, цистеїн, глюкоза, тирозин, та 25 %-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) фірми «Sigma-Aldrich» (США). Усі інші реактиви, що використовувались у роботі, були вітчизняного і закордонного виробництва та мали кваліфікацію "ос. ч." та "х. ч.". Зразки фармацевтичного препарату були вироблені фармацевтичною фірмою «Дарниця» (м. Київ) з концентрацією 5 мг/мл.

### 2.2. КОНСТРУКЦІЯ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ НА ОСНОВІ ЗОЛОТИХ ГРЕБІНЧАСТИХ ЕЛЕКТРОДІВ

В роботі використовували кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно наших

рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України (м. Київ, Україна). Вони мають розмір 5 мм × 30 мм та складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, нанесених на керамічну підкладку (рис. 1).



**Рис. 1. Схематичне зображення золотого гребінчастого кондуктометричного перетворювача**

Кожна пара гребінчастих електродів містить 20 комплементарних растрових пальців, що мають ширину та зазор між ними 20 мкм із загальною площею чутливої поверхні біля 2 мм<sup>2</sup>. Використання одночасно двох пар електродів обумовлено необхідністю проводити вимірювання у диференційному режимі, коли на одну з пар електродів наносять ферментну мембрану, а на іншу пару – референтну мембрану з БСА. Використання диференційного режиму дозволяє значно покращувати точність біосенсорних вимірювань і зменшувати вплив неінформативних заряджених частинок на відгук біосенсора.

### 2.3. ВИГОТОВЛЕННЯ БІОСЕЛЕКТИВНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Імобілізація ферменту є ключовим кроком у створенні біосенсорів на основі ферментів. В нашій роботі біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом коїмобілізації лаккази із БСА у парах ГА на поверхні кондуктометричного перетворювача (Рис. 2). Для виготовлення робочої мембрани готували розчин: 7,5% лаккази з 2,5 % БСА у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2 з 10% гліцерином. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферменту брали тільки БСА (10 %). Отримані розчини наноси-

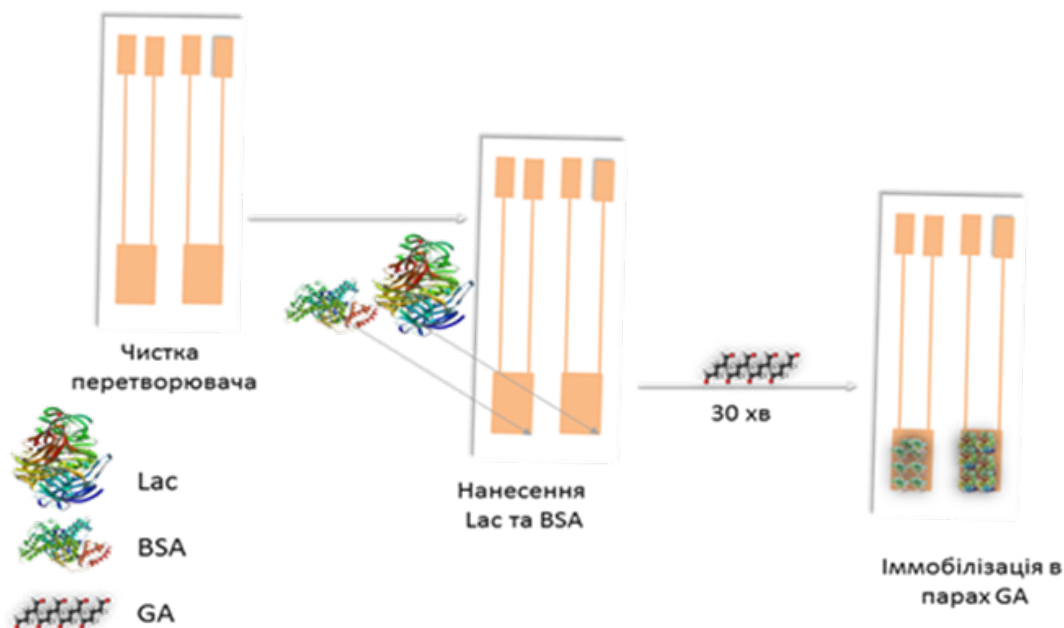


Рис. 2. Схематичне зображення процесу іммобілізації лаккази з БСА в парах ГА

ли на робочі поверхні гребінчастих електродів. Обидві мембрани були з однаковим вмістом білка. ГА утворював ковалентні зв'язки між молекулами ферменту та БСА, а гліцерол виступав допоміжною речовиною, що стабілізує фермент впродовж іммобілізації та запобігає передчасному висиханню краплі і поліпшує адгезію мембрани до поверхні перетворювача. Далі кондуктометричні перетворювачі з нанесеними мембранами поміщали в насичені пари глутарового альдегіду на 15 хв. Потім біосенсори витримували протягом 20 хвилин на повітрі за кімнатної температури. Після іммобілізації, біосенсори відмивали в робочому буферному розчині (10 хв.) від незв'язаних компонентів біоселективних мембран.

#### 2.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА УСТАНОВКА ДЛЯ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ВИМІРЮВАНЬ

В роботі використовувалась стаціонарна кондуктометрична вимірювальна установка, схема якої зображена на рис. 3 [25].

З низькочастотного генератора сигналів ГЗ-118, змінна напруга з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ подавалась на диференційну пару кондуктометричних електродів. Електроди знаходились у комірці з розчином, що досліджувався.

Для підвищення чутливості сенсора, та мінімізації шумів, що виникають за рахунок неспецифічних впливів, застосовувався диференційний режим вимірювання.

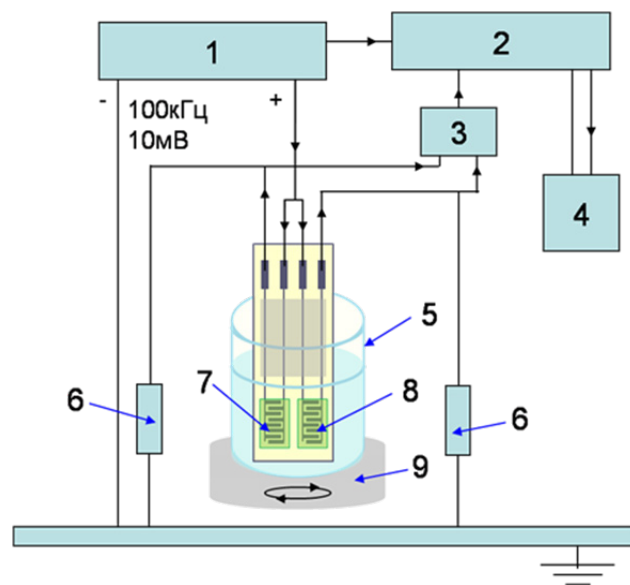


Рис. 3. Блок-схема вимірювальної установки: 1 – генератор сигналів, 2 – нановольтметр, 3 – диференційний підсилювач, 4 – реєструючий пристрій, 5 – робоча комірка з буферним розчином об'ємом 2 мл, 6 – опори навантаження, 7, 8 – електроди з нанесеними на них ферментною та референтною мембранами, 9 – магнітна мішалка

Отриманий на електродах сенсора сигнал, знімався з опорів навантаження  $R_n = 1$  кОм, та надходив через диференційний підсилювач «Unipan-233-6» на селективний нановольтметр «Unipan-233». Після вольтметра цей сигнал подавався на реєструючий пристрій (самописець або персональний комп'ютер).

## 2.5. МЕТОДИКА ВИМІРЮВАННЯ

Виміри проводились у 5мМ фосфатному буфері та універсальному буфері з різним рН за кімнатної температури у відкритій комірці за інтенсивного перемішування. Концентрацію субстратів в комірці задавали додаванням до робочого буферу порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів субстрату. Дослідження проводилися щонайменше у трьох серіях. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливанням температури, рН середовища, електричними наводками, подавлялися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань.

## 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1. ПРИНЦИП РОБОТИ БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДОФАМІНУ

В основі роботи біосенсора для визначення дофаміну лежить ферментативна реакція за участі лаккази. Лакказа – фермент класу оксидаз, широко використовується в якості біологічного елементу розпізнавання в електрохімічних біосенсорах для визначення фенолів та їхніх похідних [26, 27], оскільки він може каталізувати окислення фенольних сполук, що супроводжується відновленням кисню до води. Найбільш суттєвими перевагами лаккази є здатність каталітично переносити електрони без додаткових кофакторів, окислювати феноли в присутності молекулярного кисню.

Таким чином, в біоселективній мембрані біосенсора на основі лаккази, в присутності  $O_2$  дофамін окислюється до дофаміна-о-хінона. Цей процес може бути представлений наступною реакцією:



Біохімічні реакції на поверхні перетворювача за участі ферменту супроводжуються появою в розчині нових іонів, що призводить до зміни електропровідності розчину з аналітом. Відповідно, дану ферментативну реакцію можна детектувати за допомогою кондуктометричного перетворювача.

### 3.2. ВИБІР ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТУ

Імобілізація ферменту є ключовим кроком у створенні біосенсорів на основі ферментів. Відповідно першим етапом створення будь якого біосенсора є оптимізація процесу імобілізації біологічного матеріалу на фізичний перетворювач. В нашій роботі, спочатку було перевірено роботу біосенсорів на основі різних концентрацій лаккази для імобілізації в парах ГА протягом 15 хв. Для підбору оптимальної концентрації лаккази використовували ферментні розчини з масовою часткою лаккази 5%, 7,5%, 10% та 20%. Основні аналітичні характеристики протестованих біосенсорів наведено у табл. 3. Проаналізувавши дані, ми дійшли висновку, що найбільш оптимальною концентрацією є 7,5% лаккази.

Також було порівняно аналітичні характеристики біосенсорів в залежності від тривалості імобілізації ферменту (від 10 до 40 хвилин) при створенні біоселективного елементу біосенсора (Табл. 4).

Таблиця 3

**Вплив концентрації ферменту в розчині для імобілізації на аналітичні характеристики біосенсорів**

Аналітичні показники	Концентрація лаккази в розчині для приготування біосенсорів			
	20 %	10 %	7,5 %	5 %
Мінімальна межа визначення, мкМ	10,6	10,9	5	16,6
Чутливість, мкСм/мМ	19,17	24,59	11,71	10,16
Лінійний діапазон, мМ	0-1	0- 2	0-2	0-2
Шум базової лінії, мкСм	0,075	0,3	0,075	0,075
Дрейф базової лінії, мкСм/хв	0,25	0	0,375	0,15

Таблиця 4

**Залежність параметрів біосенсора від тривалості іммобілізації**

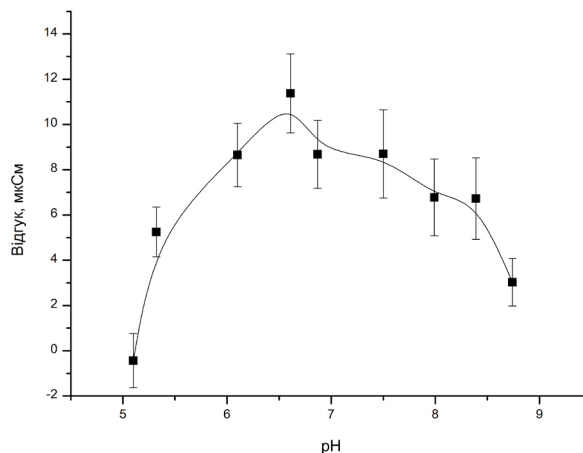
Аналітичні показники	Час іммобілізації в парах ГА				
	10 хв	15 хв	20 хв	30 хв	40 хв
Мінімальна межа визначення, мкМ	15	5	8	6	9,2
Чутливість, мкСм/мМ	11,94	11,71	15,56	22,11	20,11
Лінійний діапазон, мМ	0-2	0-2	0-2	0-1	0-1
Шум базової лінії, мкСм	0,15	0,075	0,15	0,125	0,2
Дрейф базової лінії, мкСм/хв	1,35	0,375	2,1	1,65	1,4

При іммобілізації ферменту протягом 10-15 хв. біосенсори характеризувались високою мінімальною межею визначення дофаміну, крім того, відбувалося поступове зменшення відгуків біосенсора впродовж роботи, обумовлене недостатнім закріпленням ферментів (відкріплення незв'язаних молекул ферментів). При 40 хв. відгуки на дофамін були менші, ніж в решті випадків, ймовірно через зменшення активності лактази в наслідок надмірного зшивання активних центрів. Для подальшої роботи було обрано оптимальний час іммобілізації 30 хв.

**3.3. ВПЛИВ РОБОЧОГО БУФЕРНОГО РОЗЧИНУ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ БІОСЕНСОРА**

Робота кондуктометричного біосенсора базується на зміні провідності зразка. Ця зміна провідності може залежати як від самої ферментативної реакції, так і від характеристик розчину, в якому ця реакція відбувається. Тому передусім було досліджено вплив параметрів буферного розчину (іонна сила, буферна ємність, рН) на величину відгуків нашого біосенсора.

Як відомо, кожен фермент має певний рН оптимум для своєї роботи. Деякі ферменти після їх іммобілізації здатні змінювати свій рН оптимум, зсуваючи його або в лужну, або в кислу зону. Тому, перш за все, було важливо дослідити як впливає зміна рН середовища на відгуки біосенсора (Рис. 4). Всі виміри проводились в спеціальному універсальному багатокомпонентному буфері, що характеризується однаковою буферною ємністю в усьому діапазоні рН.



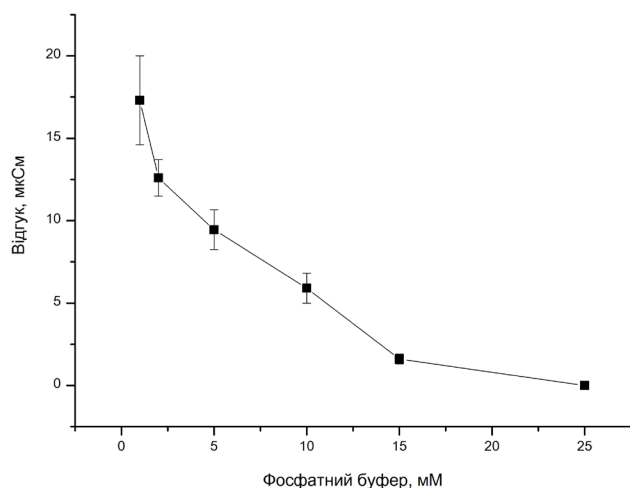
**Рис. 4. Залежність величини відгуків біосенсора від рН робочого буферного розчину. Концентрація дофаміну – 200 мкМ. Вимірювання проводились в 5 мМ універсальному буфері**

Графік залежності величини сигналу на додавання 200 мкМ дофаміну від рН мав дзвоноподібну форму з максимумом при рН 6,5. Тому для наступних експериментів було обрано фосфатний буферний розчин з рН 6,5.

Наступним параметром буферного розчину, що впливає на роботу кондуктометричних біосенсорів є буферна ємність. Тому було перевірено вплив концентрації буферного розчину на величину відгуків біосенсора (Рис. 5). Як видно з рисунку, відгуки біосенсора були найвищі при мінімальній концентрації буферу (1 мМ), і експоненційно зменшувались при підвищенні концентрації буферного розчину. Це є типовою залежністю для кондуктометричних біосенсорів. Нажаль для роботи не можна вибрати 1 мМ буферний розчин (відгуки біосенсора на дофамін найбільші), оскільки його буферна ємність буде недостатньою для підтримки стабільного рН після додавання у ви-



мірювальну комірку реальних зразків з іншим рН. Тому для подальшої роботи було вирішено використовувати 5 мМ фосфатний буфер, що вже характеризується достатньою буферною ємністю.

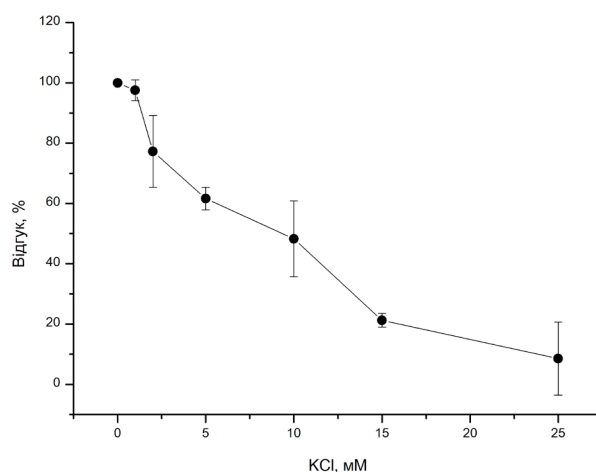


**Рис. 5.** Залежність величини відгуків біосенсора від концентрації робочого буферу. Концентрація дофаміну – 200 мкМ. Вимірювання проводились в фосфатному буфері рН 6,5

Крім буферної ємності розчину, на роботу біосенсора може впливати іонна сила розчину. При збільшенні буферної ємності збільшується також іонна сила розчину та його фонові провідність. Також реальні біологічні зразки, можуть характеризуватися значною іонною силою, і відповідно, впливати на результати аналізу дофаміну.

Ми провели дослідження стабільності відгуків біосенсорів в умовах різної іонної сили розчину. В ході експерименту ми міряли величини сигналу на одну концентрацію субстрату (200 мМ дофаміну) із додаванням до робочого буферного розчину KCl різної концентрації від 1 мМ до 25 мМ (Рис. 6).

Із побудованого на основі одержаних даних графіка видно, що зі збільшенням іонної сили відгук на концентрацію субстрату зменшується за експонентою. Одна з головних причин такої залежності пов'язана зі зростанням фонові провідності розчину. Тому під час проведення вимірювань за допомогою кондуктометричного біосенсора дуже важливим є контроль іонної сили аналізованих зразків.

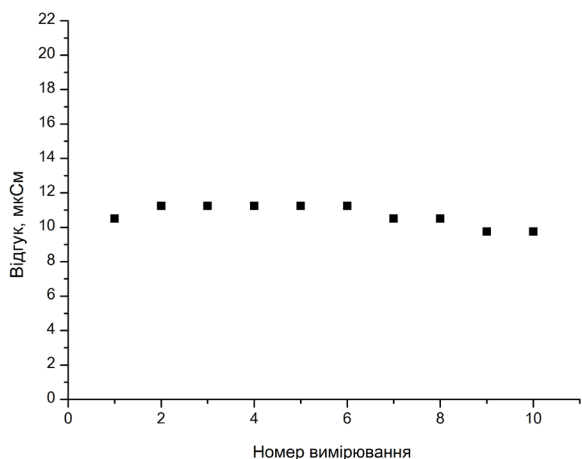


**Рис. 6.** Залежність відгуків біосенсора від концентрації KCl в розчині. Концентрація дофаміну – 200 мкМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері рН 6,5

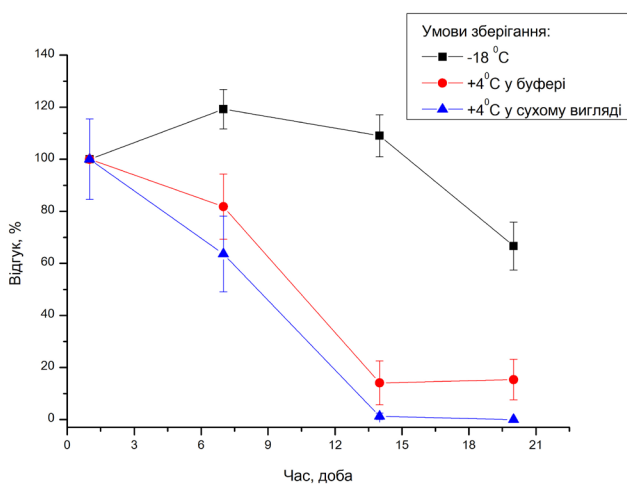
#### 3.4. ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ БІОСЕНСОРА ПІД ЧАС РОБОТИ ТА ЗБЕРІГАННІ

Важливою характеристикою біосенсорів є їх стабільність при безперервній роботі. Тому на наступному етапі роботи було досліджено відтворюваність відгуків біосенсора впродовж декількох годин безперервної роботи. Одне вимірювання дофаміну займало 2-3 хв., проміжок між вимірюваннями складав близько 5 хв.; за цей час біосенсор відмивали від субстрату, кілька разів змінюючи робочий буфер. Результати дослідження відтворюваності сигналів біосенсора при безперервній роботі представлено на рис. 7. Помітного падіння відгуків за 10 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків становило не більше 10%.

Також було досліджено стабільність біосенсора при довгостроковому зберіганні (Рис. 8). Процедура експерименту була наступною: виготовляли низку біосенсорів, отримували декілька відгуків на дофамін, після чого біосенсори зберігались в різних умовах. Весь експеримент тривав три тижні. Через кожні сім днів зберігання, отримували декілька відгуків кожного біосенсора на ту ж саму концентрацію дофаміну. Було перевірено 3 варіанти зберігання біосенсорів: в сухому стані за температури +4 °С; в сухому стані за температури -18 °С та у робочому буферному розчині за температури +4 °С. Зберігання в сухому стані при



**Рис. 7. Відтворюваність відгуків біосенсора на дофамін впродовж кількох годин роботи. Концентрація дофаміну – 200 мкМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері рН 6,5**



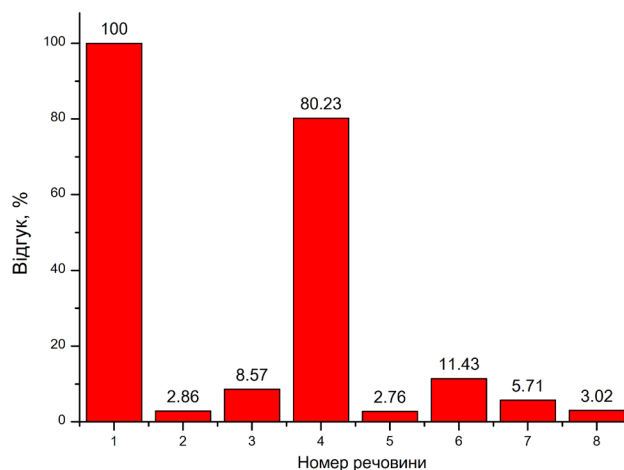
**Рис. 8. Стабільність біосенсорів при довгостроковому зберіганні. Усі відгуки після зберігання було нормалізовано відносно величини відгуків відповідних біосенсорів відразу після їх приготування (прийнято за 100%). Концентрація дофаміну – 200 мкМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері рН 6,5**

+4 °С виявилось найгіршим – після зберігання протягом першого тижня відгуки біосенсорів зменшилися у два рази. Після зберігання у буферному розчині при +4 °С 7 днів, відгуки біосенсорів зменшилися на 15-20%. Найкращим було зберігання біосенсорів в морозильній ка-

мері: відгуки зменшилися на 25-30% лише на 21 день зберігання.

### 3.5. АНАЛІЗ СЕЛЕКТИВНОСТІ БІОСЕНСОРА

Однією із основних проблем відомих амперометричних біосенсорів для визначення дофаміну є погана селективність відносно інтерферентів (особливо електроактивних речовин типу аскорбінової та сечової кислот). Використання кондуктометричного методу аналізу, теоретично мало значно покращити селективність біосенсора. Але для практичного використання розробленого кондуктометричного біосенсора для визначення дофаміну у реальних зразках потрібно було довести, що селективність його роботи достатня. Для цього, проведено ряд дослідів із дослідження впливу інтерферуєючих речовин на роботу розробленого біосенсора. В експериментальну комірку вносили розчин з 5 мМ інтерферуєючої речовини (глутамат, цистеїн, тирозин, глюкоза, сечова кислота, аскорбінова кислота, цистеїн). Відгук біосенсора розраховано у відсотках (Рис. 9).



**Рис. 9. Селективність дофамін-чутливого кондуктометричного біосенсора відносно дофаміну (1), глутамату (2), цистеїну (3), аскорбінової кислоти (4), сечової кислоти (5), тирозину (6), глюкози (7) та аргініну (8). Концентрація усіх аналітів – 5мМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері рН 6,5**

Результати експерименту свідчать про те, що розроблений кондуктометричний біосенсор проявляє достатню селективність до дофаміну відносно ряду можливих інтерферентів, окрім аскорбінової кислоти (АК). Це пояснюється чутливістю лактази разом із дофаміном і до аскорбінової кислоти [28]. Відомо навіть про розробку біосенсора на основі лактази, чутливого до АК [29]. Відповідно запропонований біосенсор можна використовувати для аналізу фармацевтичних зразків, в яких немає АК. При застосуванні біосенсора для аналізу біологічних рідин, вирішити проблему чутливості біосенсора до АК, можливо застосуванням додаткового біосенсора на основі аскорбатоксидази, чутливого лише до АК.

### 3.6. ДОСЛІДЖЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК РОЗРОБЛЕНОГО КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА

Останнім етапом розробки та оптимізації роботи біосенсора на основі лаккази для визначення концентрації дофаміну необхідно було визначити аналітичні характеристики біосенсора.

Мінімальну межу біосенсорного визначення дофаміну виміряли як концентрацію дофаміну, що дає відгук в три рази більший за величину шуму базової лінії. Таким чином межа вимірювання дофаміну дорівнювала 5 мкМ. Цей параметр несуттєво змінювався в залежності від конкретного біосенсора та трошки зростав в процесі використання біосенсора. Для визначення лінійного діапазону роботи біосенсора будувалась калібрувальна крива (Рис. 10). Лінійний діапазон роботи біосенсора був до 1000 мкМ. Лінійна ділянка даної калібрувальної кривої описується рівнянням  $G=0,03 \cdot C+0,16$ , де  $G$  – зміна провідності (мкСм),  $C$  – концентрація дофаміну (мкМ). Чутливість біосенсора до дофаміну була 29 мкСм/мМ.

Отримані аналітичні характеристики свідчать про перспективність подальшого застосування розробленого біосенсора для кількісного аналізу дофаміну в реальних зразках.

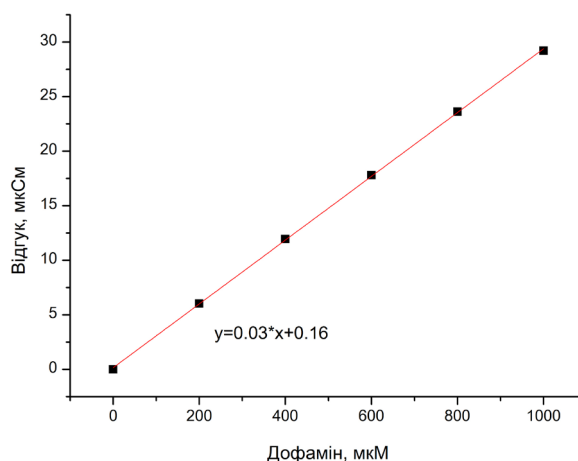


Рис. 10. Лінійна ділянка калібрувальної кривої біосенсора для визначення дофаміну. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері рН 6,5

### 4. ВИСНОВКИ

Розроблено кондуктометричний біосенсор на основі лаккази для кількісного визначення дофаміну в водних зразках. Проведено оптимізацію умов іммобілізації ферменту на поверхню кондуктометричного перетворювача: концентрація лаккази – 7.5%; тривалість іммобілізації – 30 хв. Визначено вплив основних параметрів робочого буферного розчину (іонна сила, буферна ємність, рН) на величину відгуків біосенсора на дофамін. Оптимальними робочим буферним розчином для функціонування запропонованого дофамін-чутливого біосенсора був 5 мМ фосфатний буфер, рН 6.5.

Також в роботі перевірена селективність біосенсора на основі лаккази відносно можливих інтерферуючих речовин (глутамату, цистеїну, аскорбінової кислоти, сечової кислоти, тирозину, глюкози та аргініну). Нажаль, біосенсор виявився чутливим до аскорбінової кислоти, що пояснюється чутливістю лаккази разом із дофаміном і до аскорбінової кислоти. Величини відгуків на інші речовини не перевищували 12%, що підтверджує специфічність розробленого біосенсора. Показано, що біосенсор характеризується високою відтворюваністю відгуків протягом одного робочого дня безперервної роботи. В сухому стані за температури -18 °С біосенсор залишався найбільш стабільним у порівнянні з іншими умовами зберігання.

Досліджено основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора: чутливість, лінійний діапазон, шум, дрейф, мінімальна межа визначення, тощо. Показано, що біосенсор має високу чутливість до дофаміну: мінімальна межа визначення – 5 мкМ. Лінійний діапазон визначення знаходився в межах від 5 мкМ до 1 мМ.

Пропонований біосенсор можна використовувати для визначення концентрації дофаміну в водних зразках, зокрема при контролі процесу виробництва ліків та контролі якості фармацевтичними препаратів, що містять дофамін, або в парі з біосенсором чутливим до аскорбінової кислоти для контролю дофаміну в сироватці крові.

## 5. ПОДЯКА

Робота була проведена завдяки фінансовій підтримці від Національного фонду досліджень України в рамках конкурсу проєктів із виконання наукових досліджень і розробок «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» (проєкт 2020.02/0097, договір № 03/02.2020) та НАН України в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України ««Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій».

## Список використаної літератури

[1]. R.C. Harris and M.-Z. Zhang, “Dopamine, the Kidney, and Hypertension,” *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 14, no. 2, pp. 138–143, Apr. 2012.

[2]. E.S. Bromberg-Martin, M. Matsumoto, and O. Hikosaka, “Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting,” *Neuron*, vol. 68, no. 5, pp. 815–834, Dec. 2010.

[3]. M. Matsumoto and O. Hikosaka, “Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals,” *Nature*, vol. 459, no. 7248, pp. 837–841, Jun. 2009.

[4]. “Antipsychotic drugs, neurotransmitters, and schizophrenia,” *Am. J. Psychiatry*, vol. 135, no. 2, pp. 165–173, Feb. 1978.

[5]. A. Carlsson, “Does dopamine play a role in schizophrenia?,” *Psychol. Med.*, vol. 7, no. 4, pp. 583–97, Nov. 1977.

[6]. D. Hinzen, O. Hornykiewicz, W. Kobinger, L. Pichler, C. Piffl, and G. Schingnitz, “The dopamine autoreceptor agonist B-HT 920 stimulates denervated postsynaptic brain dopamine receptors in rodent and primate models of Parkinson’s disease: a novel approach to treatment,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 131, no. 1, pp. 75–86, Nov. 1986.

[7]. O. Kuchel, N. T. Buu, P. Hamet, W. Nowaczynski, and J. Genest, “Free and conjugated dopamine in pheochromocytoma, primary aldosteronism and essential hypertension,” *Hypertension*, vol. 1, no. 3, pp. 267–273, 1979.

[8]. L. Zhang and W. K. Zhao, “[Solvent extraction and high performance liquid chromatography with electrochemical detection for determination of plasma catecholamines],” *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, vol. 10, no. 6, pp. 572–5, Nov. 1989.

[9]. M. Zhu, X. Huang, J. Li, and H. Shen, “Peroxidase-based spectrophotometric methods for the determination of ascorbic acid, norepinephrine, epinephrine, dopamine and levodopa,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 357, no. 3, pp. 261–267, Dec. 1997.

[10]. H. R. Kim, T.-H. Kim, S.-H. Hong, and H.-G. Kim, “Direct detection of tetrahydrobiopterin (BH4) and dopamine in rat brain using liquid chromatography coupled electrospray tandem mass spectrometry,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 419, no. 4, pp. 632–7, Mar. 2012.

[11]. WHO, “WHO Model List of Essential Medicines,” *Essent. Med. Heal. Prod.*, no. August, pp. 1–39, 2017.

[12]. V. Bhatt-Mehta and M. C. Nahata, “Dopamine and Dobutamine in Pediatric Therapy,” *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.*, vol. 9, no. 5, pp. 303–314, Sep. 1989.

[13]. K. Jackowska and P. Krysinski, “New trends in the electrochemical sensing of dopamine,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 11, pp. 3753–3771, Apr. 2013.

[14]. S. Sánchez-Cortés, O. Francioso, J., García-Ramos, C. Ciavatta, and C. Gessa, “Catechol polymerization in the presence of silver surface,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 176, no. 2–3, pp. 177–184, Jan. 2001.

- [15]. S. Hou, M. L. Kasner, S. Su, K. Patel, and R. Cuellari, "Highly Sensitive and Selective Dopamine Biosensor Fabricated with Silanized Graphene," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 35, pp. 14915–14921, Sep. 2010.
- [16]. P. R. Roy, T. Okajima, and T. Ohsaka, "Simultaneous electroanalysis of dopamine and ascorbic acid using poly (N,N-dimethylaniline)-modified electrodes," *Bioelectrochemistry*, vol. 59, no. 1–2, pp. 11–19, Apr. 2003.
- [17]. C. R. Raj, T. Okajima, and T. Ohsaka, "Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 543, no. 2, pp. 127–133, Feb. 2003.
- [18]. G. Erdoğan and M. M. Mutlu, "Selective Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid at Poly (m-Aminobenzene Sulfonic Acid)," *Am. J. Anal. Chem.*, vol. 02, no. 05, pp. 582–588, 2011.
- [19]. A. Liu, M. D. Wei, I. Honma, and H. Zhou, "Biosensing Properties of Titanate Nanotube Films: Selective Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbate and Uric Acid," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 16, no. 3, pp. 371–376, Feb. 2006.
- [20]. V. K. Sharma and L. Trnkova, "Copper Nanoparticle Modified Pencil Graphite Electrode for Electroanalysis of Adenine," *Electroanalysis*, vol. 28, no. 11, pp. 2834–2840, Nov. 2016.
- [21]. W. Yan, X. Feng, X. Chen, X. Li, and J.-J. Zhu, "A selective dopamine biosensor based on AgCl@polyaniline core-shell nanocomposites" *Bioelectrochemistry*, vol. 72, no. 1, pp. 21–7, Feb. 2008.
- [22]. A. Balamurugan and S.-M. Chen, "Poly(3,4-ethylenedioxythiophene-co-(5-amino-2-naphthalenesulfonic acid)) (PEDOT-PANS) film modified glassy carbon electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid" *Anal. Chim. Acta*, vol. 596, no. 1, pp. 92–8, Jul. 2007.
- [23]. S. S. Kumar, J. Mathiyarasu, K. L. N. Phani, and V. Yegnaraman, "Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid on poly (3,4-ethylenedioxythiophene) modified glassy carbon electrode" *J. Solid State Electrochem.*, vol. 10, no. 11, pp. 905–913, Nov. 2006.
- [24]. Z. Muhammad-Tahir and E. C. Alcocilja, "A conductometric biosensor for biosecurity," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 18, no. 5–6, pp. 813–819, May 2003.
- [25]. Soldatkin OO, Peshkova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV. Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor. *Mater Sci Eng C*. 2008;28(5–6):959–64.
- [26]. D. Li *et al.*, "NiCu Alloy Nanoparticle-Loaded Carbon Nanofibers for Phenolic Biosensor Applications," *Sensors*, vol. 15, no. 11, pp. 29419–29433, Nov. 2015.
- [27]. Y. Liu, X. Qu, H. Guo, H. Chen, B. Liu, and S. Dong, "Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 12, pp. 2195–2201, Jun. 2006.
- [28]. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. V. Properties of laccase I after further purification Molitoris, H.P.; Esser, K.; *Arch. Mikrobiol.* (1970) 72, 267-296
- [29]. Ascorbic acid biosensor based on laccase immobilized on an electrode modified with a self-assembled monolayer and coated with functionalized quantum dots Zhan Wang & Qiao Xu & Jian-Hao Wang & Qin Yang & Jiu-Hong Yu & Yuan-Di Zhao, *Microchim Acta* (2009) 165:387–392.

Стаття надійшла до редакції 16.10.2020 р.

UDC 543.555+577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2020.4.219309>

## DEVELOPMENT OF ENZYME CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR FOR DOPAMINE DETERMINATION IN AQUEOUS SAMPLES

*O. O. Soldatkin<sup>1,2</sup>, D. V. Siediuko<sup>1</sup>, D. Yu. Kucherenko<sup>1,2</sup>, I. S. Kucherenko<sup>1,2</sup>, S. V. Dzyadevych<sup>1,2</sup>, A. P. Soldatkin<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine,  
150 Zabolotnogo str., 03680, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Taras Shevchenko Kyiv National University,  
64 Volodymyrska str., 01601, Kyiv, Ukraine

### Summary

Dopamine is a biologically active chemical that performs a number of vital functions as a hormone and neurotransmitter. Dopamine as a neurotransmitter is an important substance for the nervous system, as it is responsible for movement, memory, pleasure and reward system, behavior and attention, inhibition of prolactin synthesis, etc. Dopamine as a hormone affects renal vasodilation, diuresis and natriuresis.

Therefore, the determination of dopamine concentration in the human body is important for biomedical research. The content of dopamine in the blood varies depending on the age of a healthy person and can serve as a prognostic marker of many diseases.

**The aim** of this work was to develop a new enzyme conductometric biosensor for the determination of dopamine in aqueous samples and to study the biosensor's analytical characteristics.

**Methods:** The conductometric method of analysis with differential measurement mode was used in the work. Two pairs of gold interdigitated electrodes deposited on a sital substrate were used as a conductometric transducer. To create a bioselective element of the biosensor we used the enzyme laccase, which was immobilized on the surface of the physical transducer by covalent crosslinking of glutaraldehyde with bovine serum albumin.

**Results:** The optimal conditions of laccase immobilization were selected. The influence of solution parameters (ionic strength, pH, buffer capacity) on the work of the developed biosensor for dopamine determination was investigated. The biosensors demonstrated high sensitivity to dopamine (minimum limit of detection - 5  $\mu\text{M}$ ). The linear range of analyte determination was up to 1 mM. It was established that the developed biosensor is characterized by high reproducibility of responses during several hours of continuous operation (RSD = 10%). The proposed biosensor was tested regarding the possibility of its long-term storage under different conditions. The selectivity of dopamine-sensitive biosensor towards probable interferents was studied.

**Conclusion.** A conductometric biosensor was developed for the determination of dopamine concentration. The biosensor was shown to be highly sensitive to dopamine: the minimum limit of detection is 5  $\mu\text{M}$ . The linear range of determination was 5  $\mu\text{M}$  - 1 mM. The developed conductometric biosensor was proven to be suitable for measuring dopamine concentration in biological and pharmaceutical samples.

**Keywords:** conductometric transducer, conductometry, biosensor, immobilized enzyme, laccase, dopamine.

УДК 543.555+577.15

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2020.4.219309>

## РОЗРОБКА ФЕРМЕНТНОГО КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДОФАМІНУ В ВОДНИХ ЗРАЗКАХ

*О. О. Солдаткін<sup>1,2</sup>, Д. В. Седюко<sup>1</sup>, Д. Ю. Кучеренко<sup>1</sup>, І. С. Кучеренко<sup>1,2</sup>, С. В. Дзядевич<sup>1,2</sup>,  
О. П. Солдаткін<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,  
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

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

### Реферат

Дофамін - біологічно активна хімічна речовина, що виконує ряд життєво важливих функцій у якості гормону та нейромедіатора. Дофамін як нейромедіатор є важливою речовиною для нервової системи, тому що відповідає за рух, пам'ять, систему насолоди і заохочення, поведінку та увагу, інгібування синтезу пролактину та ін. Дофамін як гормон впливає на ниркову вазодилатацію, діурез та натрійурез.

Таким чином, завдяки ряду важливих функцій дофаміну, визначення його концентрації у організмі людини є важливим для біомедичних досліджень. Вміст дофаміну в крові змінюється в залежності від віку здорової людини і може служити прогностичним маркером багатьох захворювань.

**Мета** даної роботи полягала в розробці нового ферментного кондуктометричного біосенсора для визначення дофаміну в водних зразках та дослідження його аналітичних характеристик.

**Методи дослідження:** В роботі застосовували кондуктометричний метод аналізу з диференційним режимом вимірювання. Як кондуктометричний перетворювач використовувались дві пари золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладку. Для створення біоселективного елемента біосенсора використовували фермент лакказу, який був іммобілізований ковалентною зшивкою глутаровим альдегідом з бичачим сироватковим альбуміном на поверхні фізичного перетворювача.

**Результати дослідження:** В роботі було підібрано оптимальні умови іммобілізації лаккази. Досліджено вплив параметрів розчину (іонна сила, рН, буферна ємність) на роботу розробленого біосенсора для визначення дофаміну. Отримані біосенсори демонстрували високу чутливість до дофаміну (мінімальна границя визначення – 5 мкМ). Лінійний діапазон біосенсорного визначення аналіту був до 1 мМ. Встановлено, що розроблений біосенсор характеризується високою відтворюваністю відгуків впродовж декількох годин безперервної роботи (RSD=10%). Перевірено можливість довгострокового зберігання запропонованого біосенсора в різних умовах. Вивчено якою селективністю характеризувався дофамін-чутливий біосенсор відносно можливих інтерферентів.

**Висновки:** Розроблено кондуктометричний біосенсор, що призначений для визначення концентрацій дофаміну. Показано, що біосенсор має високу чутливість до дофаміну: мінімальна межа визначення – 5 мкМ. Лінійний діапазон визначення знаходився в межах від 5 мкМ до 1 мМ. Доведено, що розроблений кондуктометричний може бути використаний для визначення концентрації дофаміну в біологічних та фармацевтичних зразках.

**Ключові слова:** кондуктометричний перетворювач, кондуктометрія, біосенсор, іммобілізований фермент, лаккази, дофамін.